

## 学位論文審査結果の要旨

氏名	小川 日出夫
審査委員	主査 萬家 俊博 副査 久門 良明 副査 加藤 英政 副査 青戸 守 副査 鈴木 純

論文名 内耳虚血・再灌流障害に対する水素含有生理食塩水の保護効果

### 審査結果の要旨

[はじめに] 突発性難聴は原因不明の急性感音難聴であるが、内耳循環障害説が最も有力視されている。著者らはスナネズミを用いた一過性内耳虚血の動物モデルを作製し、蝸牛の虚血・再灌流障害の機序を解明してきた。このモデルにおいて、一過性内耳虚血により急性感音難聴は、より高い周波数で誘発されること、内有毛細胞が外有毛細胞に比べ有意に障害されること、その障害は虚血後から7日目まで徐々に進行していくことなどの障害機序を明らかにしてきた。

一方、2007年に水素分子(H<sub>2</sub>)が毒性の高い活性酸素種/ラジカルを選択的に還元する抗酸化物質として、酸化ストレスから細胞を保護し、脳の虚血・再灌流障害を抑制することが報告された。この報告によると水素分子はin vitroにおいてスーパーオキシド、過酸化水素、一酸化窒素等の活性の低い安定な活性酸素種/ラジカルとは反応せず、最も細胞障害性の高いヒドロキシラジカル(・OH)等の活性酸素種/ラジカルを還元することにより、酸化ストレスから細胞を防御することが報告されている。耳科領域では内耳虚血、薬剤性難聴、音響外傷などにおいて活性酸素種/ラジカルの関与が知られている。近年、動物実験モデルにおいて、水素ガス吸入により有毛細胞の障害を抑制し、騒音性難聴が予防されること、水素水の飲用により騒音暴露による難聴を抑制することなどが報告されている。本研究では一過性内耳虚血モデルを用い、水素含有生理食

塩水の静脈内投与による内耳保護効果を検討した。

[対象および方法] スナネズミの一過性内耳虚血モデルを用い、1) 非虚血 - 生理食塩水投与群、2) 非虚血 - 水素含有生理食塩水投与群、3) 虚血 - 生理食塩水投与群、4) 虚血 - 水素含有生理食塩水投与群の4群（各群 n = 6）に分けて行った。虚血群には15分間の内耳虚血を行い、再灌流10分後に大腿静脈から水素含有生理食塩水または生理食塩水を5ml/kg投与した。水素含有生理食塩水は、MiZ株式会社より提供された製剤を使用した。この点滴バッグ中は1.3~1.5 ppm (mg/l) の高濃度の水素分子を無菌的に含有している。内耳虚血・再灌流障害抑制効果の生理学的検討として、聴性脳幹反応 (ABR) により聴力閾値を測定した。周波数は、聴覚障害を受けやすい高音域に相当する8kHz、16kHz、32kHzで聴力閾値測定を行った。ABRはday0、1、4、7に評価した。内耳虚血・再灌流障害抑制効果の組織学的検討では、実験7日後のABR閾値測定後に蝸牛骨包を摘出。surface preparation法にてコルチ器を採取し、Rhodamine-Phalloidin、Hoechst33342にて二重染色を行い、有毛細胞の脱落割合を検討した。

[結果] 1) ABR 閾値変化

虚血 - 生理食塩水投与群において ABR 閾値は、より高い周波数 (8kHz :  $24.2 \pm 3.8$  dB、16kHz :  $25.0 \pm 4.7$  dB、32kHz :  $29.2 \pm 3.0$  dB) で、1日目に最も上昇した。その後、閾値上昇は徐々に軽減したが、7日間持続した。虚血 - 水素含有生理食塩水投与群では、1日目の ABR 閾値上昇は3つの周波数 (8kHz :  $11.7 \pm 2.6$  dB、16kHz :  $13.3 \pm 3.1$  dB、32kHz :  $15.0 \pm 2.7$  dB) で有意に抑制された。

2) 組織学的所見と内有毛細胞の脱落割合

虚血 - 生理食塩水投与群において、内有毛細胞の散発的な脱落がみられたが、水素含有生理食塩水投与群では、その脱落は抑制された。細胞の脱落は外有毛細胞より内有毛細胞で顕著であった。内有毛細胞の脱落割合は、虚血 - 生理食塩水投与群  $14.1 \pm 1.8\%$ 、虚血 - 水素含有生理食塩水投与群  $7.5 \pm 2.1\%$  であり、内有毛細胞の脱落が有意に抑制された。

[結論] 内耳の虚血・再灌流後に、水素含有生理食塩水を静脈内投与することにより、虚血・再灌流障害に起因する聴力障害および有毛細胞の損傷が有意に抑制された。本研究により、水素分子が突発性難聴の新しい有効な治療の一つとなり得ることが示された。

#### 【審査結果】

本研究に関する公開審査会は、平成30年1月26日に開催された。申請者から研究内容が英語で口頭発表された後に、審査委員から本研究に関する以下の質問がなされた。1) このモデルで前庭障害は起きるのか、2) 内有毛細胞がより障害された理由、3) 水素分子の投与方法の詳細、4) 水素の保護作用のメカニズム、5) 発生したラジカルに対して十分量の水素分子が内耳に届いているのかどうか、6) このモデルが実際の突発難聴の臨床像と合致しているのか、7) もう少し長時間の虚血負荷でも保護効果は期待できるのか、8) 臨床応用への可能性、などの多方面からの試問が行われた。これらに対し、申請者は質問の意図を十分に理解した上で、詳細かつ明解に答えた。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。