






学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・ 	第328号	氏名	野田 加奈子
審査委員会委員	主査氏名		
	副査氏名	明田 淳一	
	副査氏名	三宅 香敏	

論文題目： Effect of low-intensity focused ultrasound on the middle ear in a mouse model of acute otitis media (マウス急性中耳炎モデルにおける低密度焦点式超音波照射の効果)
 掲載誌： Ultrasound in Med. & Biol. 2013;39:413-423

論文要旨： 中耳炎の起炎菌の急激な薬剤耐性化により難治性中耳炎が増加傾向である。低密度焦点式超音波照射により中耳粘膜局所の薬剤濃度を上昇させ、中耳炎の治療に使用できる可能性を検証する目的で、マウスの健常耳を用いて正常組織障害を起こさない超音波照射量を検討し、またマウス急性中耳炎モデルを用い種々の超音波照射条件における病理像と血液像を検討した。

5-6週のBALB/cマウスの右耳に鼓膜切開を行い経鼓膜的に中耳腔から外耳道に生理食塩水を注入して、外耳道から4つの異なる強度で超音波照射 (0.1、0.5、1.0、1.5W/cm²) を行った。1MHz、duty cycle 20%、照射時間30秒は固定した。左耳はコントロールとして鼓膜切開のみ施行した。照射から24時間後に屠殺、断頭、固定、脱灰、染色 (H&E、fibrinogen免疫染色) し、顕微鏡下に評価した。インフルエンザ菌 (*Nontypable Haemophilus influenzae*) を経中耳骨胞的に10⁴CFU注入してマウス急性中耳炎モデルを作成し、第1、3、5、7、10病日に鼓膜切開し、中耳貯留液を採取して、炎症細胞数、生菌数、炎症性サイトカイン濃度 (IL-1β、TNF-α) を測定した。急性中耳炎モデルにAmpicillin (50、10、2mg/kg)、もしくはリン酸緩衝液 (PBS) を第3、4、5病日に連日腹腔内投与した4群を作成した。同様の薬剤腹腔内投与の条件下で、第3病日に外耳道を生理食塩水で満たし外耳道側から中耳腔に超音波を照射した4群を作成した。第8病日に鼓膜所見を評価し、中耳貯留液を採取して、炎症細胞数、生菌数、炎症性サイトカイン濃度 (IL-1β、TNF-α) を測定し比較検討した。




マウス健常耳への超音波照射では、1.5W/cm²では中耳粘膜が肥厚し、炎症細胞の著明な浸潤およびfibrinogenの著明な血管外漏出が見られたため、中耳への至適照射量を1.0W/cm²、1MHz、duty cycle 20%、照射時間30秒と決定した。マウス急性中耳炎モデルは第10病日まで中耳貯留液の炎症細胞数、生菌数、炎症性サイトカイン濃度 (IL-1β、TNF-α) に変化なく、自然治癒しないことが確認された。本モデルに対してAmpicillin 2、10mg/kg投与群において、超音波照射群が薬剤単独群に比べ中耳貯留液中の生菌数、炎症細胞数、IL-1β、TNF-α濃度が有意に低下していた。鼓膜所見でも、超音波照射群で抗菌剤単独群と比べ中耳炎の重症度が低い傾向が見られた。

本研究により、低密度焦点式超音波照射が中耳粘膜の血管透過性や組織透過性に影響をおよぼし、抗菌剤の中耳局所への取り込みを促進させて中耳の炎症が軽症化されることが示唆された。低密度焦点式超音波照射のヒト難治性中耳炎への臨床応用の基本となる研究であり、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。

最終試験

の結果の要旨

学力の確認

審査区分 課・論	第328号	氏名	野田加奈子
審査委員会委員	主査氏名	森 宣	
	副査氏名	門田淳一	
	副査氏名	三宅秀敏	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 実験に利用したマウスは、実験1、実験2でそれぞれ何匹か？ 2. Day3にLIFUとampicillin投与を実施しているが、どちらを先行したのか、時間間隔は？ 3. NTHi注入実験で、すべてのマウスはpurulent MEE(level 3)とあるが、level 2の間違いではないのか？ 4. LIFU後少なくとも5日間vessel wall disruptionが続くとあるが、5日間vessel wallがdisruptionしたままで5日目でもfibrinogenが新たに漏出しているといっているのか？ 5. 実験2のデザインでLIFUは一回のみ薬剤投与は3日連続投与しているが、vessel wall disruptionが一過性で短時間であるならば複数回LIFUを行なうほうが効果が大きいのではないのか？ 6. LIFUによる細胞膜の透過性亢進はどういう細胞で惹起されやすいのか。炎症局所では好中球等の炎症細胞もその標的になり得るのではないのか。 7. Amoxicillinの使用濃度は、ヒトでの使用濃度と同等と考えていいか。 8. 何故、腹腔内投与にしたのか。血清中濃度を人と同様にするには静脈内投与がいいのではないのか。 9. LIFUが抗菌薬の抗菌活性を亢進させる機序は何か。細菌が死滅しないまでも菌体に変化が生じ、低濃度の抗菌薬でも有効性がみられたという可能性はないか。 10. この研究ではLIFUを抗菌薬のdeliveryとして活用したとしているが、中耳粘膜での抗菌薬の濃度に関しては測定していないので、実際に局所に抗菌薬が集積しているかどうかわからないのではないのか。 11. BLNARなどの耐性菌を使用して実験を行った方がよかったのではないのか。 12. 超音波照射が抗菌剤の中耳局所への取り込みを促進させたと解釈しているが、超音波の細菌への直接作用(ultrasonic deactivation)も十分考えられる。それへのbacterial resistanceは菌のthick,soft capsuleの存在によると言われるが、インフルエンザ菌はcapsuleを有するのか。 13. 超音波造影剤で生じるmicro-bubblesは細胞へのcavitationとstreamingを惹起すると言われているが、本研究では超音波造影剤の使用は考えなかったのか。 14. 同じマウス実験で、tumor targeting therapyに理想的な条件は、0.75W/cm²で2分間照射との報告がある。抗菌作用をめざした本研究とは目的が違うが、30秒照射に固定した理由は何か？ 15. 正常組織の障害をきたさない超音波照射条件を抽出するのが重要であるが、中耳の組織像にて検討されているが、内耳への影響は検討しているのか。中耳、内耳の温度測定はしていないのか？ <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 野田加奈子

論 文 題 目

Effect of low-intensity focused ultrasound on the middle ear in a mouse model of acute otitis media

(マウス急性中耳炎モデルにおける低密度焦点式超音波照射の効果)

要 旨

【目的】以前から超音波照射で薬物の取り込みを促進または制御できることが報告されており、超音波による Drug Delivery System(DDS)の Controlled Drug Release への応用が試みられている。正確な取り込み促進の機序はまだ解明されていないが、超音波を身体の一部に集束させ、限局された部位で薬剤を化学励起させる targeting も考案されており、血栓溶解促進作用、経皮吸収促進作用、遺伝子治療など臨床応用の報告も見られる。近年、中耳炎の起炎菌であるインフルエンザ菌や肺炎球菌の急激な薬剤耐性化に伴い治療に難渋する事がある。超音波を利用した中耳粘膜への DDS の検討がなされれば、低侵襲に中耳粘膜局所の薬剤濃度を上昇させられる可能性があり、難治性中耳炎のひとつの選択肢となる。しかしながら、これまでに中耳、内耳に安全に照射できる超音波照射量や、照射後の中耳、内耳の組織学的検討はなされていない。本研究では、まずマウスの健常耳を用いて超音波照射の中耳に及ぼす影響の判定を行った。組織障害を起こさない超音波照射量を検討し、次にマウス急性中耳炎モデルを用いて治療への超音波の応用の可能性について検討を行った。

【方法】超音波照射の中耳に及ぼす影響の評価として、5-6週のBALB/cマウスの右耳に鼓膜切開を行い経鼓膜的に中耳腔から外耳道に生理食塩水を注入して、外耳道から出力を変えて4つの強度で超音波照射(0.1、0.5、1.0、1.5W/cm²)を行った。1MHz、duty cycle 20%、照射時間30秒は固定した。左耳はコントロールとして鼓膜切開のみ施行した。照射から24時間後に屠殺、断頭、固定、脱灰、染色(H&E、fibrinogen免疫染色)、顕微鏡下に評価した。次に、マウス急性中耳炎モデルを作成した。インフルエンザ菌(Nontypable Haemophilus influenzae)を経中耳骨胞的に10⁴CFU注入後、第1、3、5、7、10病日に鼓膜切開し、中耳貯留液を採取して、炎症細胞数、生菌数、炎症性サイトカイン濃度(IL-1 β 、TNF- α)を測定した。このマウス急性中耳炎モデルを用いて、Ampicillin(50、10、2mg/kg)、もしくはリン酸緩衝液(PBS)を第3、4、5病日に連日腹腔内投与した4群を作成した。同様の薬剤腹腔内投与の条件下で、第3病日に外耳道を生理食塩水で満たし外耳道側から中耳腔に超音波を照射した4群を作成した。第8病日に鼓膜所見を評価し、中耳貯留液を採取して、炎症細胞数、生菌数、炎症性サイトカイン濃度(IL-1 β 、TNF- α)を測定し、比較検討した。

【結果】マウス健常耳への超音波照射では、0.1、0.5W/cm²は中耳粘膜に変化なく、炎症細胞の浸潤やfibrinogenの血管外漏出はほぼ見られなかった。1.0W/cm²は中耳粘膜が軽度肥厚し、軽度の炎症細胞の浸潤やfibrinogenの血管外漏出が見られた。1.5W/cm²は中耳粘膜が肥厚し、炎症細胞の著明な浸潤およびfibrinogenの著明な血管外漏出が見られた。以上から中耳への至適照射量を1.0W/cm²、1MHz、duty cycle20%、照射時間30秒とした。今回作成したマウス急性中耳炎モデルは第10病日まで中耳貯留液の炎症細胞数、生菌数、炎症性サイトカイン濃度(IL-1 β 、TNF- α)に変化なく、自然治癒しないことが確認された。本モデルに対して薬剤(Ampicillin、PBS)を腹腔内投与し超音波照射を加えた4群と、薬剤単独の4群の比較検討では、Ampicillin 2、10mg/kgにおいて超音波照射群で薬剤単独群に比べ中耳貯留液中の生菌数、炎症細胞数、IL-1 β 、TNF- α 濃度が有意に低下していた。鼓膜所見でも、超音波照射群で抗菌剤単独群と比べ中耳炎の重症度が低い傾向が見られた。

【考察・結語】本研究により、超音波照射が中耳粘膜の血管透過性や組織透過性に影響をおよぼすこと、マウス急性中耳炎モデルを用いた検討では超音波照射が抗菌剤の中耳局所への取り込みを促進させて、中耳の炎症が軽症化されることが示唆された。今後ヒトの難治性中耳炎への臨床応用が期待されるかもしれない。