

氏 名 (本籍) ひぐち ひとみ
樋口 仁美 (佐賀県)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

報 告 番 号 乙第 1528 号

学位授与の日付 平成 26 年 9 月 30 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当 (論文博士)

学 位 論 文 題 目

Ototoxicity of Gentian Violet on the Guinea Pig Cochlea
(モルモット内耳に対するゲンチアナバイオレットの内耳毒性)

論文審査委員 (主 査)	福岡大学	教授	中川尚志
(副 査)	福岡大学	教授	井上 亨
	福岡大学	教授	井上隆司
	福岡大学	教授	坂田俊文

【はじめに】

gentian violet (以下 GV と略) は細菌や真菌に対する抗菌作用を有していることが 60 年以上前から経験的に知られていた。その臨床的な有効性のために慢性外耳道炎の治療に世界中で用いられている。しかし、中耳腔にはいった GV が内耳毒性を有するかどうか明らかでない。われわれは、モルモットを用い、聴神経の複合活動電位 (CAP) の測定と側頭骨の病理組織学的変化を評価し、GV の内耳毒性について検討した。また、臨床材料より採取した耳漏より検出された細菌を用い、GV の殺菌効果を調べた。

【対象と方法】

実験動物：プライエル反射陽性のハートレー系白色モルモットを使用した。動物の取り扱いと実験プロトコールは福岡大学倫理委員会で承認をえた。ペントバルビタールを腹腔内投与し、術野は 0.5%リドカインで局麻した。耳後部切開で中耳骨包を露出し、直径約 2mm の小孔を作製し、正円窓膜を顕微鏡下に観察した。

音響負荷システム：4kHz と 8kHz の非同期性トーンバースト音とクリック音を用い、1 秒間に 20 回の頻度で音刺激を行った。規準音圧を $20 \mu\text{Pa}$ として、初期音圧を 80dB SPL から 10dB ずつ減少させながら、反応閾値を測定した。Telephonics 社製 TDH-39 をスピーカーとして使用し、音源を耳介より 10cm 離して、設置した。自由音場における音圧を Brüel & Kjær 社の 2 分の 1 インチ径のマイクロフォンを用いて測定、実耳音圧を調整した。

測定システムと CAP の測定法：ボール電極を正円窓膜にマイクロマニピュレーターでおき、不関電極は頸筋に留置した。CAP は 200 回加算の上、測定した。

薬剤投与：CAP 測定をまず行い、中耳腔を約 0.2ml の GV で満たした。

データ解析：N1 と P1 応答の振幅差が $10 \mu\text{V}$ のときを反応閾値とした。音圧閾値の変化は dB を単位とし、薬剤投与前後で測定し、この差を閾値の変化とみなした。変化が有意であることは Student' s paired t test で判定した。

細菌学的検査：GVの静菌作用は福岡大学病院耳鼻科外来で耳漏より採取したメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）、緑膿菌、モラキセラカタラーリス、インフルエンザ桿菌を用いてディスク法を用いて評価した。細菌を 10^6 colony forming unit (CFU)/mlに希釈し、寒天培地で24時間培養した。 $50\mu\text{l}$ および $75\mu\text{l}$ のGVを8mm径のそれぞれの培養皿に滴下、24時間後に形成された発育阻止防止円の直径を測定した。

【結果】

CAPの変化：0.5%GV投与後30分では閾値変化はなかった。60分で8kHz、4kHz トーンバースト音に対する閾値が上昇し、24時間ではすべて反応が完全に消失した。0.13%GV投与では1時間後に8kHz トーンバースト音で閾値上昇し、3時間で8kHzと4kHz両方のトーンバースト音刺激に対して、反応閾値が上昇し、24時間でも回復がみられなかった。GVは時間依存性にCAP閾値を上昇させた。正円窓膜に5分間のみ0.13%GVを投与し、生食で十分に洗浄しても、時間依存性のCAP閾値の上昇が観察された。

細菌検査：GVを $50\mu\text{l}$ と $75\mu\text{l}$ 投与したところ、静菌作用に体積依存性がみられた。それに加え、GVを0.06%から0.13%に希釈して投与しても、緑膿菌を除き、すべての細菌に静菌作用がみられた。

病理組織：生食による対照実験では24時間、4週間後とも前庭階でわずかな量のタンパク質の沈殿を認めるのみであった。GVを30分投与した動物の病理組織ではコルチ器や蓋膜、前庭階、らせん神経節細胞には問題はなかった。炎症細胞が血管条近傍の中央階にみられ、ライスネル膜に隣接した前庭階にタンパクの沈殿物を認めた。GV投与後24時間の病理結果は、すべての蝸牛回転で内リンパ水腫が生じており、中耳腔に骨新生がみられた。血管条で空胞化変性や浮腫、有毛細胞の消失が観察された。肉芽形成と骨新生は蝸牛階で著明であった。らせん神経節細胞に病理学的変化は認めなかった。

【考察】

GV は耳漏の治療のために有効であるが、今回の実験結果から考えると、中耳腔もしくは鼓膜穿孔を伴った外耳道へ GV を使用することは推奨されない。正円窓に GV を 5 分間滴下し、生理食塩水でよく洗浄したにも関わらず、CAP の閾値上昇は進行した。このことは GV が正円窓膜を速やかに透過し、内耳腔にはいることを示唆している。GV は内耳毒性があり使用の際には外耳道に限られなければならない。

審査結果の要旨

本論文は難治性慢性外耳道炎に有効で、世界中で使用されているゲンチアン・バイオレット（ピオクタニン®、以下 GV）の薬剤のもつ抗菌作用と内耳への影響を検討した。GV は 19 世紀後半に合成され、MRSA 感染や真菌など通常の抗菌剤が無効な微生物に殺菌作用を有する。局所刺激作用が少なく、血清成分が存在する場合でもほとんど影響を受けず、作用時間が長い。日常臨床で耳の感染症に汎用されているが、耳で使用する薬剤として副作用に関する大切な知識である内耳毒性についての検討は少ない。有効性の検証として、抗菌作用をディスク法で評価した。内耳への影響はモルモット蝸牛で聴神経の複合活動電位（CAP）を電気生理の手法を用い測定し、GV による CAP の変化を調べた。また同時に側頭骨を摘出し、病理組織学的評価を行うことにより組織学的変化を観察した。

外来で中耳炎患者に耳漏より細菌を採取した。0.5%より 0.06%まで 4 種類の濃度の GV の緑膿菌、MRSA、肺炎球菌、モラキセラ・カタラリス、インフルエンザ桿菌に対する殺菌作用を調べた。すべての濃度で緑膿菌を除き、効果が認められた。CAP は対照実験として生理食塩水を投与したが、有意な閾値上昇はみられなかった。0.5%GV 投与にて 30 分で変化なかったが、1 時間後に 4kHz と 8kHz に対する反応閾値が上昇し、24 時間では反応がみられなかった。0.13%GV では 1 時間で 8kHz、3 時間で 4kHz、8kHz、click 音に対して反応閾値が上昇、6 時間と 12 時間はほぼ同程度の閾値上昇であった。この変化は非可逆性であった。残存している GV が閾値上昇を招いているのではないかと考え、0.13%GV 投与後、生理食塩水でよく洗浄したが、洗浄をしない場合と同様の結果であった。GV の CAP の影響は非可逆性で、時間依存性および濃度依存性がみられた。0.5%GV 投与 30 分では炎症細胞が中央階に、前庭階にタンパク質の沈殿をみとめたが、各組織は正常な外観であった。0.5%GV 投与 24 時間では蝸牛全回転にタンパク質が沈殿し、有毛細胞が膨化していた。血管条、ラセン神経節は変化なかった。0.5%GV 投与 6 週間では蝸牛回転全てに内リンパ水腫が生じ、中耳腔に骨新生がみられた。血管条には空胞化変性、有毛細胞の消失を認めた。ラセン神経節のみ変化がみられなかった、

GV もブロー液など他の内耳毒性をもつ薬剤と同様に高周波数より障害されているので、ブロー液が正円窓より透過して、障害が生じていると推測される。実験動物と比べると、正円窓の形状や周囲の状態よりヒトの方が内耳毒性を受けにくいと言われている。しかし、いったん生じた内耳障害を回復させる方法がない上、障害の原因を特定することは困難である。GV の強力な非可逆性の内耳毒性を考慮すると、日常診療においては中耳腔内での GV の

使用は避け、外耳道に限局した使用方法を推奨したい。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確さ、表現の明確さ、審査委員との質疑応答は以下の通りである。

1. 斬新さ

GV が内耳毒性を有することをその特性を含めて、生理学的、病理学的手法の二面より明らかに示した。実際の中耳炎より採取した細菌に対する GV の抗菌作用を示した。有効性と副作用を同時に検証、証明した斬新な研究である。

2. 重要性

近年、耐性菌の出現のため、難治性の外中耳炎が増加している。GV の抗菌力と内耳毒性を詳細に示した。その科学的根拠に基づき、実際の臨床医がどのように使用すればよいか、方法を示唆した。このことは日常臨床において重要性をもつ。

3. 実験方法の正確性

本研究は生理学的および病理学的、細菌学的手法を用いた基礎実験である。申請者はモルモットに痛みを与えないように、適切に扱っている。生理実験では対照実験にて実験系に問題がないことを示したうえで、GV による内耳への効果を複合活動電位を測定し、検討している。また断頭するときには十分に麻酔を行い、実験動物に苦痛を与えていない。細菌学的検討では日常診療で一般的に行われているディスク法を用いた。ディスク法は確立した手法であり、忠実にその方法に従って行っているため、正確性は担保されている。

4. 表現の明瞭性

生理学的、病理学的実験および細菌学的検討の経過を明確に示した。明確に示された解析結果に基づいて、明日の臨床に活かすことができる結論を導き出しだしている。

5. 主な質疑応答

Q1 : 0.5%GV 投与で病理学的評価を 30 分と 24 時間で行っている。間隔があいているのはなぜか？

A1 : 途中の時間帯での実験も行った。その中から明確に器質的变化が生じていることが比較できるように 30 分、24 時間、6 週間の 3 点を選んだ。

- Q2 : 0.13%と 0.5%の違いは濃度依存性をみているのではなく、時間依存的に内耳に GV がはいつて時間の差をみているだけではないか？
- A2 : 確かに否定できない点である。しかし、0.13%GV の実験で GV を 0.5%と同様に CAP 測定の際にのみ洗浄した方法と 5 分後に十分に洗浄した二種類の方法をとっている。洗浄の有無にかかわらず、CAP には同じ程度の障害が生じているので、GV の内耳への移行は時間依存性というよりも濃度依存性であると考えている。
- Q3 : モルモットはヒトよりも聞いている周波数が高い。今回の実験も高い周波数を用いたら、より詳細な結果が得られたのではないか？
- A3 : ご指摘のことは承知しているが、今回、測定機器はヒトに対して使用されるものを用いた。
- Q4 : 今回の測定方法よりも ABR の方が非侵襲的だと思うが、実験をあえて、CAP 測定とした理由は？
- A4 : CAP は蝸牛神経の近くで測定するので、信号が大きく、変化がとらえやすい。ABR は CAP に比較して、artifact がはいるため、CAP を用いた。
- Q5 : 蝸牛の細胞外誘導電位を測定するときに CAP とともに有毛細胞由来の receptor potential が測定できるといわれているが、今回はどうであったか？
- A5 : 今回の方法では receptor potential は測定できない。蝸牛内の内リンパ電位を測定する方法の場合に複合活動電位としての AP と receptor potential 由来と考えられている SP (summing potential) が測定できることが報告されている。
- Q6 : CAP 測定において、N 波と P 波を測定しているが、reference electrode の位置によって、その極性が変化するのではないか？
- A6 : 理論的にはその通りであるが、通常はこの電極位置で測定するために N 波が P 波に先行する。
- Q7 : この結果は生理実験が急性毒性を病理学的手法が慢性毒性を示しており、同じ毒性といっても性格が異なるものが混在しているのではないか？
- A7 : 測定している時期に差があり、ご指摘の通りである。
- Q8 : 実際の臨床では内耳障害がよくおきているのか？
- A8 : GV は臨床でよく使われている。基礎的手法で臨床を念頭におき、薄くしたらよいと結論しているものはある。しかし、実際の臨床において薬剤性障害は証明が難しく、臨床報告は渉猟しえる範囲でみあたらなかった。
- Q9 : 内耳毒性は抗がん剤にもあるが、これらの薬剤でも GV のように肉芽形成などをおこす

のか？

A9：現在までの他の報告から考察する限り、GV 独自の作用である。

Q10：希釈して使用すると安全性と細菌毒性が変化するのか？

A10：日常臨床においてよく用いられている濃度は 1% である。1% では皮膚潰瘍形成などの副作用がおきる。このため、当院では 0.5% を用いている。今回の実験でのその視点からの検討を行っていない

Q11：内リンパ水腫の原因は？

A11：血管条に対する影響が強いのではないかと考えている。

以上のように、申請者は適切な回答を行った。相反する事項である有効性と内耳毒性とを基礎的手法で検証、証明した斬新な研究であると総括された。その後、主査および副査による協議により、本論文は学位を授与するに値する研究と評価された。