

厚生労働科学研究費補助金

(感覚器障害研究事業 H18-感覚器-一般-008)

感音難聴に対する内耳薬物投与システム臨床応用に
関する研究

平成 18 年度総括・分担研究報告書

平成 19 年 3 月

主任研究者 中川隆之

(京都大学医学部附属病院)

目 次

I. 総括研究報告

- 感音難聴に対する内耳薬物投与システム臨床応用に関する研究・・・・・・・・・・ 1
中川隆之

II. 分担研究報告

- 一過性内耳虚血モデルを用いた生体吸収性徐放ゲルによる・・・・・・・・・・ 8
IGF1 内耳局所投与研究
暁 清文、羽藤直人

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 12

IV. 研究成果の刊行物・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 14

感音難聴に対する内耳薬物投与システム臨床応用に関する研究

主任研究者 中川隆之 京都大学医学部附属病院

研究要旨

本研究は、われわれが開発した生体吸収性徐放ゲルを用いた内耳薬物投与システムを感音難聴治療に臨床応用することを目的とした研究開発を行うものである。感音難聴症例に対する臨床研究を開始するために必要な基礎的研究を行い、本治療法の臨床的な有効性を検証することが目的となる。

研究初年度である平成 18 年度には、インスリン様細胞成長因子 1 (IGF1) を投与薬物とし、急性高度難聴を対象疾患と想定した研究開発を行った。ヒト側頭骨標本を用いた研究により、具体的に臨床の場で IGF1 を浸透させた生体吸収性ゲルを経鼓膜的に正円窓に投与する方法を超細径内視鏡を用いて開発した。また、動物実験で、音響外傷あるいは内耳虚血により発症させた感音難聴に対する IGF1 の生体吸収性ゲルによる内耳投与による治療効果を調べ、その有効性を明らかにすると同時に、副作用の発生についても検証し、安全性を明確とした。これらの知見をもとに、急性高度難聴症例に対する生体吸収性ゲルを用いたリコンビナント・ヒト・IGF1 内耳投与による感音難聴治療の検討・第 I - II 相臨床試験のプロトコルおよび試験概要書を作成し、京都大学医学部附属病院及び愛媛大学医学部附属病院の倫理委員会に臨床試験の申請を行った。

分担研究者

伊藤 壽一
(京都大学大学院医学研究科)
平海 晴一
(京都大学医学部附属病院)
羽藤 直人
暁 清文
(愛媛大学医学部耳鼻咽喉科)
田畑 泰彦
(京都大学再生医学研究所)

性高度難聴も人口 10 万人あたり約 30 人発症しており、感音難聴に対する新しい治療法の開発の必要性は高い。以上のような背景から、多くの基礎的研究が行われており、多くの有効性が期待できる薬物が明らかにされている。しかし、実際に臨床応用に至った基礎的研究成果は、ほとんどない。その理由として、基礎的研究成果を臨床に橋渡しする探索医療的研究が進んでいない点が指摘される。われわれは、この点に着目し、基礎的研究成果を臨床に橋渡しする手段として、生体吸収性徐放ゲルを用いた内耳薬物投与システムを開発した。近年、多くの施設から細胞成長因

A. 研究目的

身体障害者に認定される高度感音難聴者は約 36 万人におよび、65 歳以上人口の 60% は感音難聴を有するとされている。また、急

子や神経栄養因子などのポリペプチドの高い内耳保護効果が報告されている。本研究では、これらの成長因子の中ですでに治療薬物として入手可能なインスリン様細胞成長因子1 (IGF1) を用い、IGF1 を生体吸収性徐放ゲルにより内耳局所投与する方法を感音難聴治療に応用し、臨床的有効性を検討することを目的としている。

B. 研究方法

1) ヒト側頭骨を用いた生体吸収性徐放ゲル投与方法開発

ヒト中耳および内耳の構造と齧歯類の中耳、内耳構造は、著しく異なる。したがって、生体吸収性ゲルによる内耳薬物投与を臨床応用するためには、ヒトの側頭骨解剖に即した投与方法の開発が必要となる。以上の背景から、ヒト側頭骨標本 10 個を用いて、超細径内視鏡を用い、経鼓膜的にゲルを正円窓窩に留置する方法を検討した。鼓膜切開の位置、サイズ、留置可能なゲルの体積を検討した。

2) 生体吸収性徐放ゲルによる IGF1 内耳局所投与の有効性、安全性の検証

われわれは、すでに過去の研究成果から、生体吸収性ゲルを用いた IGF1 の内耳投与により、音響外傷による感音難聴を予防できることを明らかとした。しかし、治療的効果を得るためには、感音難聴発症後に投与した場合の有効性を明確にする必要がある。そこで、モルモット音響外傷モデルおよびスナネズミ内耳虚血モデルを用いて、それぞれ障害を加えた後に薬物投与を行い、その有効性を検討した。また、同時に治療効果の濃度依存性についても調べた。さらに、生体吸収性ゲルを中耳正円窓窩に留置した場合に、中耳における炎症反応の有無についても検討した。

3) 生体吸収性徐放ゲルによる IGF1 内耳局所投与による急性高度難聴治療臨床試験

1973 年の厚生省特定疾患突発性難聴研究班の報告書で定められた突発性難聴診断基準、1984 年同研究班報告による突発性難聴・聴力回復の判定基準、1998 年同研究班報告による重症度分類を参考資料とし、内外の急性高度難聴の臨床試験に関する文献を解析し、生体吸収性徐放ゲルによる IGF1 内耳局所投与による感音難聴治療の対象疾患、その診断基準、病期分類、重症度分類、適格基準、治療プロトコル、観察期間、データモニタリング方法、統計学的解析方法など第 I—II 相臨床試験に必要な事項を京都大学医学部附属病院探索医療検証部と協力、作成し、臨床試験に必要な準備を行った。

動物実験は、京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設および愛媛大学医学部の定める倫理規定に準じて行い、京都大学大学院医学研究科および愛媛大学医学部の動物実験委員会の承認を得て行ったものである。

C. 研究結果

1) ヒト側頭骨を用いた生体吸収性徐放ゲル投与方法開発

生体吸収性徐放ゲルのヒト正円窓窩への留置については、超細径内視鏡を用いることにより、経鼓膜的に十分可能であることが判明した。10 個の側頭骨の解析から、外耳道から見た正円窓窩の位置やその構造には個体差があることが示されたが、いずれの個体でも内視鏡下にゲルを正円窓窩に留置することが可能であった。また、内視鏡およびゲル留置に必要なデバイスの挿入に必要な鼓膜切開は、後下象限に 2mm おけば、十分であることが分かった。また、正円窓窩の体積は平均約 0.05 mL であった。半数の症例で、正円

窓膜上に線維組織の存在を認めたが、ゲルの性状から線維組織が存在しても、その間隙から正円窓膜に接触させることが可能であることが分かった。ゲルを中耳腔、正円窓窩に送達する方法として、内視鏡のサイドチャンネルから注入する方法とピックにて留置する方法を検討したが、ゲルの性状および正円窓膜への接触を確実に行うとの観点から、ピックでの留置が望ましいと考えられた。

2) 生体吸収性徐放ゲルによる IGF1 内耳局所投与の有効性、安全性の検証

モルモット音響外傷モデルで実験では、音響暴露 5 時間後に IGF1 を含浸させたゲルを正円窓膜上に留置した。含浸させた IGF1 は、0.1, 1.0 mg/mL の 2 つの濃度を用いた。生食を含浸させたゲルを留置した耳をコントロールとした。聴性脳幹反応を用いた聴力評価では、高濃度の IGF1 を投与した群で有意の差をもって、コントロールに比した改善効果が認められた。蝸牛有毛細胞に関する組織学的な解析でも、高濃度群において有意に残存している外有毛細胞が多いことが分かった。以上の結果から、音響外傷による急性高度難聴発症後、早期に IGF1 を生体吸収性ゲルを用いて局所投与することにより感音難聴治療効果が得られることが示された。また、投与する IGF1 の濃度としては、薬剤添付文書にて指定されている濃度である 1.0 mg/mL が適切であると考えられた。さらに、本濃度の IGF1 を含浸させたゲルを正円窓膜上に留置した場合の蝸牛外リンパ液への徐放効果を調べた。投与 3 日目に最大の濃度が得られ、投与 7 日後には投与前レベルに低下していることが分かった。一方、脳脊髄液、血清における IGF1 濃度も並行して調べたが、投与に伴う変化は認められなかった。

椎骨動脈血流の遮断を用いるスナネズミ内耳虚血モデルでは、15 分間の虚血負荷を与え、虚血終了 15 分後に薬物局所投与を行った。生食含浸ゲル留置をコントロール耳に行った。結果、IGF1 投与耳では、有意に聴覚閾値の上昇が抑制されることが分かった。また、組織学的にも蝸牛有毛細胞の喪失が有意に抑制されることが明らかとなった。以上の結果から、生体吸収性徐放ゲルによる IGF1 内耳局所投与は、内耳虚血による急性高度難聴にも有効であることが示された。

安全性に関しては、各実験グループにて全身的副作用を示唆する所見を認めず、また、死亡に至る動物も認められなかった。局所所見としては、IGF1 あるいは生食を含浸させた生体吸収性ゲルを留置したすべての中耳腔で明らかな炎症所見を認めなかった。

3) 生体吸収性徐放ゲルによる IGF1 内耳局所投与による急性高度難聴治療臨床試験

対象疾患については、進行性難聴の予防や人工内耳手術時の蝸牛組織保護なども候補と考えられたが、疾患としての病態は不明であるが、診断基準、重症度判定、治療効果判定が明確に規定されており、過去にいくつかの臨床的研究が本邦でも行われている疾患である突発性難聴および疑い例を対象疾患とした。検査データの取得方法を工夫すれば、海外の急性高度難聴治療に関する臨床試験との比較も可能であり、有効性の検討が行いやすいと考えられた。治療プロトコルとしては、単独治療、ステロイドとの併用などが考えられた。効果検証の観点からは、新鮮例に対する単独治療が望ましいと考えられたが、感音難聴は一旦進行すると固定してしまうことが多いなど疾患予後を考慮し、最も一般的な治療法であるステロイドの全身投与を

行い、治療効果がない、もしくは不十分と判定された症例を対象とすることとした。また、突発性難聴では、発症から 10 日間を経過すると予後が悪く、治療効果が乏しくなる傾向にあることが知られている。しかしながら、本試験で使用する治療法については、発症後どの程度の期間まで有効であるかは不明であり、今後の臨床試験あるいは医師主導型治療の拡大を考慮すると、要検討項目であると考え、発症から 60 日未満を対象とすることにした。治療効果判定は、従来の突発性難聴・聴力回復の判定基準（1984 年厚生省班研究）に基づいて行い、治療開始 3 ヶ月後の聴力にて効果判定を行う。有害事象の有無の判定についても、十分に検討するために観察期間を 6 ヶ月とし、中耳炎および鼓膜穿孔を可能性の高い合併症と想定した観察、解析を行うこととした。これらの内容に準じた臨床試験計画書および試験薬概要書を京都大学医学部附属病院探索医療検証部の指導のもとに作成し、京都大学医学部附属病院および愛媛大学医学部附属病院それぞれの倫理委員会に申請し、愛媛大学ではすでに認可されている。

D. 考察

ヒトにおける正円窓窩への薬物投与については、超細経内視鏡を使用することにより、安全、確実に行いうることが分かった。これまでの顕微鏡による観察に比べ、画質は劣るが、十分に明確視野を得ることが可能であり、鼓膜切開の範囲も最小にとどめることができ、侵襲面で優れた投与方法であると考えられた。また、正円窓窩への種々の薬物投与にも応用可能である。さらに、応用開発を進めることにより、蝸牛内操作への発展性もあると考えられた。

動物実験にて、急性高度難聴発症後の生体吸収性ゲルによる IGF1 内耳投与の効果に関する検討を行ったが、音響外傷および内耳虚血という異なる障害機序による感音難聴に対して治療効果を示したことから、臨床的にも比較的早期に投与することができれば、高い治療効果が得られることが期待できると推察される。音響外傷モデルでは、投与する IGF1 濃度についても検討したが、添付文書指定濃度では、有意の効果が得られたが、その 10% の濃度では、十分な治療効果が得られなかった。したがって、ある程度高濃度の IGF1 が局在することが効果発現に必要であると考えられた。また、薬物を投与した中耳局所および全身的な副作用を示唆する所見は認められなかったことから、安全性の高い治療法ということができる。

臨床試験への準備としては、上記の非臨床試験の施行に加え、過去の内外の感音難聴治療に関する文献を詳細に検討し、特に厚生省および厚生労働省の突発性難聴研究班研究の成果を参考にして、いわゆる EBM の視点からも十分な評価が行える臨床試験計画書を作成することができた。

E. 結論

生体吸収性ゲルを用いた IGF1 内耳投与による急性高度難聴治療臨床試験を施行するために必要な基礎的研究開発事項として、ヒト側頭骨を用いた生体吸収性ゲル投与方法開発、動物実験モデルを用いた有効性、安全性の検証を行うと同時に、過去の感音難聴治療に関する臨床試験に関連する文献、資料を検討し、急性高度難聴症例に対する生体吸収性徐放ゲルを用いたリコンビナント・ヒト・IGF1 内耳投与による感音難聴治療の検討（第 I - II 相臨床試験）の準備を行い、京都大学

医学部附属病院および愛媛大学医学部附属病院倫理委員会に申請し、愛媛大学ではすでに認可を受けた。

F. 健康危険情報

特記すべき健康危険情報はない。

G. 研究発表

著書

1. 中川隆之, 伊藤壽一: 1 2. BDNF 2) 内耳細胞増殖因子と再生医療 松本邦夫, 田畑泰彦編 pp346-350 メジカルレビュー社. 大阪. 2006.

論文

1. 中川隆之: DDS を用いた内耳疾患の治療. 炎症と免疫 15: 60-65, 2007.
2. Fujita K, Hakuba N, Hata R, Morizane I, Yoshida T, Shudou M, Sakanaka M, Gyo K. Ginsenoside Rb1 protects against damage to the spiral ganglion cells after cochlear ischemia. *Neurosci Lett* 5 : 2007. (Epub ahead of print)
3. Yoshida T, Hakuba N, Morizane I, Fujita K, Cao F, Zhu P, Uchida N, Kameda K, Sakanaka M, Gyo K, Hata R. Hematopoietic stem cells prevent hair cell death after transient cochlear ischemia through paracrine effects. *Neuroscience* (in-print)
4. 坂本達則, 中川隆之, 伊藤壽一: DDS を用いた感覚器領域における再生医療. 再生医療 16: 27-31, 2007.
5. Nakagawa T, Ito J. Drug delivery systems for the treatment of sensorineural hearing loss. *Acta Otolaryngol Suppl.* 557: 30-35, 2007.

6. 田畑泰彦: Tissue Engineering の最前線- 生体組織の再生誘導治療を実現する医工学技術. *医学のあゆみ* 217: 463-467, 2006.

7. Suzuki T, Nomoto Y, Nakagawa T, Kuwahata N, Ogawa H, Suzuki Y, Ito J, Omori K. Age-dependent degeneration of the stria vascularis in human cochleae. *Laryngoscope* 116: 1846-1850, 2006.

8. Okano T, Nakagawa T, Kita T, Endo T, Ito J. Cell-gene delivery of brain-derived neurotrophic factor to the mouse inner ear. *Mol Ther* 14: 866-871, 2006.

9. Hato N, Kohno H, Okada M, Hakuba N, Gyo K, Iwakura T, Tateno M. A new tool for testing ossicular mobility during middle ear surgery: preliminary report of four cases. *Otol Neurotol* 27: 592-595, 2006.

10. Iwai K, Nakagawa T, Endo T, Matsuoka Y, Kita T, Kim TS, Tabata Y, Ito J. Cochlear protection by local IGF-1 application using biodegradable hydrogel. *Laryngoscope* 116: 526-533, 2006.

学会発表

1. Nakagawa T, Endo T, Tamura T, Iwai K, Okano T, Kita T, Higaki M, Tabata Y, Ito J. Drug delivery to the inner ear: nanoparticle, hydrogel and ex vivo gene transfer. The 11th Korea-Japan Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. Busan, Korea, April 6-8, 2006.
2. 中川隆之, 遠藤剛, 田村哲也, 岩井浩治, 金 泰秀, 伊藤壽一: 生体吸収性徐放製

- 剤による内耳ドラッグデリバリー. 第107回日本耳鼻咽喉科学会. 平成18年5月11~13日. 東京.
3. 嘉田真平, 中川隆之, 岡野高之, 松本昌宏, 大野 恒久, 伊藤壽一: マウスラセン靭帯障害モデルの検討. 第107回日本耳鼻咽喉科学会. 平成18年5月11~13日. 東京.
 4. 盛實 勲, 白馬伸洋, 兵頭 純, 篠森裕介, 藤田健介, 吉田 正, 羽藤直人, 暁清文: 一過性内耳虚血が血管条に及ぼす影響. 第107回日本耳鼻咽喉科学会. 平成18年5月11~13日. 東京.
 5. 菰渕勇人, 羽藤直人, 寺岡正人, 脇坂浩之, 高橋宏尚, 暁清文: Drug delivery system を用いた bFGF の顔面神経再生促進効果 (第2報). 第29回日本顔面神経研究会. 平成18年6月1~2日. 新潟.
 6. 伊藤壽一: 内耳再生. 第48回日本老年医学会シンポジウム. Aging Science Forum 高齢医学における未来医療. 平成18年6月7日. 石川.
 7. 藤田健介, 白馬伸洋, 兵頭 純, 吉田正, 暁清文: 一過性内耳虚血によるラセン神経節細胞障害に対する Ginsenoside Rb1 の効果. 第24回頭頸部自律神経研究会. 平成18年8月26日. 大阪.
 8. Ito J, Nakagawa T, Endo T. A novel method for treatment of inner ear using new drug delivery system. Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum 2006. Moscow, Russia. Aug 27-30, 2006.
 9. 中川隆之, 田畑泰彦, 遠藤剛, 岩井浩治, 喜多知子, 金 泰秀, 伊藤壽一: ゼラチンハイドロゲルを用いた感音難聴治療. 第9回日本組織工学会. 平成18年9月7~8日. 京都.
 10. 寺岡正人, 羽藤直人, 菰渕勇人, 暁清文, 田畑泰彦: DDS を用いた bFGF の顔面神経再生促進効果. 第9回日本組織工学会. 平成18年9月7~8日. 京都.
 11. Kada S, Nakagawa T, Ito J. A mouse model for selective degeneration of the spiral ligament due to local application of 3-nitropropionic acid. The 43rd Inner Ear Biology Workshop. Montpellier, France. Sep. 17-20, 2006.
 12. 嘉田真平, 中川隆之, 伊藤壽一: 3-nitropropionic acid (3-NP) によるマウス内耳障害. 第16回日本耳科学会. 平成18年10月19~21日. 青森.
 13. 中川隆之, 松本昌宏, 小島 憲, 岡野高之, 伊藤壽一: 遺伝子導入を目的とした前庭感覚上皮器官培養システム開発の試み. 第65回日本めまい平衡医学会. 平成18年11月15~17日. 東京.
 14. 藤原崇志, 吉田 正, 兵頭 純, 羽藤直人, 暁清文: 一過性内耳虚血障害に対するゼラチンハイドロゲルを用いた IGF-1 の保護効果. 第49回日本耳鼻咽喉科学会愛媛県地方部会学術講演会. 平成18年12月17日. 松山.
 15. Nakagawa T, Lee KY, Okano T, Matsumoto M, Hiraumi H, Ono K, Tabata Y, Ito J. Therapeutic effects of IGF-1-hydrogel therapy on noise-induced hearing loss in guinea pigs. The 30th Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology. Denver, Colorado, USA, Feb. 10-15, 2007.

G. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得

なし

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし

一過性内耳虚血モデルを用いた生体吸収性徐放ゲルによる IGF1 内耳局所投与研究

分担研究者 暁 清文、羽藤直人 愛媛大学医学部附属病院

研究要旨

基礎的研究としては、生体吸収性徐放ゲルを用いた内耳へのインスリン様細胞成長因子 1 (IGF1) の徐放投与効果を一過性内耳虚血モデルを用いて検討した。結果、内耳虚血負荷 30 分後に薬剤を投与しても感音難聴の程度を軽減する効果を認めた。薬剤投与による副作用は認めなかった。

臨床的研究はまだ施行していないが、急性高度難聴症例に対する生体吸収性ゲルを用いたりコンビナント・ヒト・IGF1 内耳投与による感音難聴治療の検討・第 I - II 相臨床試験のプロトコルおよび試験概要書を作成し、愛媛大学医学部附属病院の倫理委員会に臨床試験の申請を行い、承認を得た。

A. 研究目的

突発性難聴に代表される急性高度感音難聴は、罹患率が高いが治癒率が低く、問題の多い疾患である。感音難聴の治療に関しては、多くの基礎的研究が行われており、有効性が期待できる薬物が明らかにされてきている。しかし、実際に臨床応用に至った基礎的研究成果は、ほとんどない。その理由として、基礎的研究成果を臨床に橋渡しする探索医療的研究が進んでいない点が指摘される。われわれは、この点に着目し、基礎的研究成果を臨床に橋渡しする手段として、生体吸収性徐放ゲルを用いた内耳薬物投与システムを開発した。近年、多くの施設から細胞成長因子や神経栄養因子などのポリペプチドの高い内耳保護効果が報告されている。本研究では、これらの成長因子の中ですでに治療薬物として入手可能なインスリン様細胞成長因子 1 (IGF1) を用い、IGF1 を生体吸収性徐放ゲルにより内耳局所投与する方法を感音難聴

治療に応用し、臨床的有効性を検討することを目的としている。

B. 研究方法

1) 一過性内耳虚血モデルを用いた生体吸収性徐放ゲルによる IGF1 内耳局所投与研究

1. 虚血モデル作製

実験動物には生後 12-24 週、体重 60-80g の雄のスナネズミ 8 匹を用いた (IGF1 投与群：4 匹、コントロール群：4 匹)。全身麻酔下に動物を固定し、仰臥位にて両側の椎骨動脈を剥離し、4-0 絹糸を動脈に掛け 15 分間内耳の血流遮断を行った。虚血負荷後に絹糸を外し、顕微鏡下に両側の椎骨動脈の血流再開を確認した。

2. IGF1

IGF1 は遺伝子組み換えにより作成された recombinant human IGF1 (アステラス製薬、ソマゾン注射用) を使用した。IGF1 10mg を生食 1 ml に溶解し、生体吸収性ゼラチンハイ

ドロゲル 1 mg に溶解した IGF1 を $10 \mu\text{l}$ 添加し、24 時間留置した。

3. 生体吸収性徐放ゲル

生体吸収性徐放ゲルは、ゼラチン水溶液にグルタルアルデヒドを加え化学架橋し、凍結乾燥し作成した。このハイドロゲルは、1 週間以上で徐放することが確認されている。

4. IGF1 添加生体吸収性徐放ゲルの投与方法

内耳虚血を負荷した 30 分後、ハロセン吸入麻酔下に耳朧を開放し、ハイドロゲル 1mg を正円窓に留置した。IGF1 を含有したハイドロゲルを投与した群を IGF1 投与群とし、蒸留水を含有したハイドロゲルを投与した群をコントロール群とした。

5. ABR 測定

刺激音は 8kHz のトーンバーストを用いて加算回数は 300 回とした。ABR 測定は虚血前、虚血 1 日後、4 日後、7 日後に行い、IGF1 投与群およびコントロール群の 2 群間で域値変化を比較検討した。

6. 組織学的検討

虚血 7 日後に断頭し、速やかに蝸牛骨朧を摘出した。前庭窓、蝸牛窓を開放し、蝸牛頂回転に設けた小孔より 4% パラホルムアルデヒドにて局所灌流固定を行った。さらに同液にて 2 時間浸漬固定後、surface preparation にて基底回転のコルチ器を採取し、rhodamine-phalloidin 染色と行い内有毛細胞の脱落細胞数の割合 (%) を測定した。

2) 生体吸収性徐放ゲルによる IGF1 内耳局所投与による急性高度難聴治療臨床試験

1973 年の厚生省特定疾患突発性難聴研究班の報告書で定められた突発性難聴診断基準、1984 年同研究班報告による突発性難聴・聴力回復の判定基準、1998 年同研究班報告による重症度分類を参考資料とし、内外の急性

高度難聴の臨床試験に関する文献を解析し、生体吸収性徐放ゲルによる IGF1 内耳局所投与による感音難聴治療の対象疾患、その診断基準、病期分類、重症度分類、適格基準、治療プロトコル、観察期間、データモニタリング方法、統計学的解析方法など第 I - II 相臨床試験のプロトコルおよび試験概要書作成し、臨床試験に必要な準備を行った。

動物実験は、愛媛大学医学部の定める倫理規定に準じて行い、愛媛大学医学部の動物実験委員会の承認を得て行ったものである。

C. 研究結果

1) 一過性内耳虚血モデルを用いた生体吸収性徐放ゲルによる IGF1 内耳局所投与研究

椎骨動脈血流の遮断を用いるスナネズミ内耳虚血モデルでは、ABR 域値が、IGF1 投与群で 1 日目 $26.3 \pm 6.3\text{dB}$ 、4 日目 $31.3 \pm 2.5\text{dB}$ 、7 日目 $23.8 \pm 2.5\text{dB}$ の結果であった。一方、コントロール群でも 1 日目 $47.5 \pm 6.5\text{dB}$ 、4 日目 $46.3 \pm 2.5\text{dB}$ 、7 日目 $38.8 \pm 2.5\text{dB}$ といずれも上昇したものの、1 日目、4 日目、7 日目すべてにおいて、IGF1 投与群は閾値上昇を抑制した。結果、IGF1 投与耳では、有意に聴覚閾値の上昇が抑制されることが分かった。また、組織学的にも内有毛細胞の脱落割合において、IGF1 投与群が $2.23 \pm 1.71\%$ 、コントロール群が $15.63 \pm 1.78\%$ で、IGF1 投与群で内有毛細胞の脱落が有意に抑制されていた。蝸牛有毛細胞の喪失が有意に抑制されることが明らかとなった。以上の結果から、生体吸収性徐放ゲルによる IGF1 内耳局所投与は、内耳虚血による急性高度難聴にも有効であることが示された。

なお、安全性に関しては、全身的副作用を示唆する所見を認めず、また、死亡に至る動物も認められなかった。局所所見としては、

IGF1 あるいは生食を含浸させた生体吸収性ゲルを留置したすべての中耳腔で明らかな炎症所見を認めなかった。

2) 生体吸収性徐放ゲルによる IGF1 内耳局所投与による急性高度難聴治療臨床試験

対象疾患については、過去にいくつかの臨床的研究が本邦でも行われている突発性難聴および疑い例を対象疾患とした。検査データの取得方法を工夫すれば、海外の急性高度難聴治療に関する臨床試験との比較も可能であり、有効性の検討が行いやすいと考えられた。治療プロトコルとしては、単独治療、ステロイドとの併用などが考えられた。効果検証の観点からは、新鮮例に対する単独治療が望ましいと考えられたが、感音難聴は一旦進行すると固定してしまうことが多いなど疾患予後を考慮し、最も一般的な治療法であるステロイドの全身投与を行い、治療効果がない、もしくは不十分と判定された症例を対象とすることとした。また、突発性難聴では、発症から 10 日間を経過すると予後が悪く、治療効果が乏しくなる傾向にあることが知られている。しかしながら、本試験で使用する治療法については、発症後どの程度の期間まで有効であるかは不明であり、今後の臨床試験あるいは医師主導型治験の拡大を考慮すると、要検討項目であると考え、発症から 60 未満を対象とすることにした。治療効果判定は、従来の突発性難聴・聴力回復の判定基準（1984 年厚生省班研究）に基づいて行い、治療開始 3 ヶ月後の聴力にて効果判定を行う。有害事象の有無の判定についても、十分に検討するために観察期間を 6 ヶ月とし、中耳炎および鼓膜穿孔を可能性の高い合併症と想定した観察、解析を行うこととした。これらの内容に準じた臨床試験計画書および試験

薬概要書を作成し、愛媛大学医学部附属病院の倫理委員会に申請し、認可された。

D. 考察

スナネズミを用いた動物実験にて、急性高度難聴発症後の生体吸収性ゲルによる IGF1 内耳投与の効果に関する検討を行ったが、内耳虚血による感音難聴に対して明らかな治療効果を示した。栄養因子の一つである IGF1 は、ソマトメジン C と呼ばれる 70 個のアミノ酸からなる単鎖ポリペプチドで、インスリンと配列が高度に類似した細胞増殖因子である。IGF1 は主に肝臓で Growth hormone による刺激の結果分泌され、人体の殆どの細胞、特に筋肉、骨、肝臓、腎臓、神経、皮膚及び肺の細胞に影響を及ぼす。有糸分裂を誘導する蛋白で、内耳を含め人体のほとんどの組織の成長・発達において重要な役割を担うことが分かっており、内耳保護効果を有することも既に報告されている。

内耳における虚血性障害に対する IGF1 の防御効果の作用機序については完全には解明されていないが、IGF1 は phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K) /Akt 経路を介して proapoptosis 因子の Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim) を抑制することで、apoptosis を抑制することが分かっている。虚血性内耳障害による有毛細胞の脱落は apoptotic death であり、この抑制が内耳保護に有用であったと考えられる。また、Glucose transporters (GLUTs) は細胞膜にグルコース輸送蛋白を発現させ、グルコースの細胞への取り込みを促進する。脳領域において高血糖が虚血による神経障害を悪化させること、脳虚血障害によって GLUTs、特に GLUT-3 の発現が変動することから、GLUTs が重要な役割を果たすと考えられ

ている。IGF1はGLUTsの発現に作用することから、GLUTsを介した機序も内耳保護に有効であった可能性がある。

E. 結論

生体吸収性ハイドロゲルを用いたIGF1の局所投与は内有毛細胞の脱落及びABR閾値上昇を抑制しており、虚血性内耳障害に対する治療法として有用と思われる。虚血性内耳障害は急性感音難聴の重要な発症機序であり、今後の臨床試験の結果次第では、簡便で副作用も少ないと推測される本治療法は、今後の感音難聴の主役となりうると考える。

F. 研究発表

論文

1. Hato N, Kohno H, Okada M, Hakuba N, Gyo K, Iwakura T, Tateno M. A new tool for testing ossicular mobility during middle ear surgery: preliminary report of four cases. *Otol Neurotol* 27:592-595, 2006.
2. Fujita K, Hakuba N, Hata R, Morizane I, Yoshida T, Shudou M, Sakanaka M, Gyo K. Ginsenoside Rb1 protects against damage to the spiral ganglion cells after cochlear ischemia. *Neurosci Lett* 5 : 2007. (Epub ahead of print)
3. Yoshida T, Hakuba N, Morizane I, Fujita K, Cao F, Zhu P, Uchida N, Kameda K, Sakanaka M, Gyo K, Hata R. Hematopoietic stem cells prevent hair cell death after transient cochlear ischemia through paracrine effects. *Neuroscience* (in-print)

学会発表

1. 盛實 勲, 白馬伸洋, 兵頭 純, 篠森裕介, 藤田健介, 吉田 正, 羽藤直人, 暁清文:一過性内耳虚血が血管条に及ぼす影響. 第107回日本耳鼻咽喉科学会. 平成18年5月11~13日. 東京.
2. 菰渕勇人, 羽藤直人, 寺岡正人, 脇坂浩之, 高橋宏尚, 暁清文:Drug delivery systemを用いたbFGFの顔面神経再生促進効果(第2報). 第29回日本顔面神経研究会. 平成18年6月1~2日. 新潟.
3. 藤田健介, 白馬伸洋, 兵頭 純, 吉田正, 暁清文:一過性内耳虚血によるラセン神経節細胞障害に対するGinsenoside Rb1の効果. 第24回頭頸部自律神経研究会. 平成18年8月26日. 大阪.
4. 寺岡正人, 羽藤直人, 菰渕勇人, 暁清文, 田畑泰彦:DDSを用いたbFGFの顔面神経再生促進効果. 第9回日本組織工学会. 平成18年9月7~8日. 京都.
5. 藤原崇志, 吉田 正, 兵頭 純, 羽藤直人, 暁清文:一過性内耳虚血障害に対するゼラチンハイドロゲルを用いたIGF-1の保護効果. 第49回日本耳鼻咽喉科学会愛媛県地方部会学術講演会. 平成18年12月17日. 松山.

G. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得
なし
- 2) 実用新案登録
なし
- 3) その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

著書

著者氏名	タイトル名	書籍名・編者名など	頁	出版社名	出版地	出版年
中川隆之, 伊藤 藤壽一	1 2. BDNF 2) 内耳	細胞増殖因子と再生医療 松本邦夫, 田畑泰彦編	pp346-350	メジカル レビュー 社	大阪	2006

論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	出版年・巻号・頁
中川隆之	DDS を用いた内耳疾患の治療.	炎症と免疫	15; 60-65, 2007.
Fujita K, Hakuba N, Hata R, Morizane I, Yoshida T, Shudou M, Sakanaka M, Gyo K.	Ginsenoside Rb1 protects against damage to the spiral ganglion cells after cochlear ischemia.	Neurosci Lett	5 : 2007. (Epub ahead of print)
Yoshida T, Hakuba N, Morizane I, Fujita K, Cao F, Zhu P, Uchida N, Kameda K, Sakanaka M, Gyo K, Hata R.	Hematopoietic stem cells prevent hair cell death after transient cochlear ischemia through paracrine effects.	Neuroreport	(in-print)
坂本達則, 中川隆之, 伊藤壽一	DDS を用いた感覚器領域における再生医療.	再生医療	16: 27-31, 2007.
Nakagawa T, Ito J.	Drug delivery systems for the treatment of sensorineural hearing loss.	Acta Otolaryngol Suppl.	557; 30-35, 2007.
田畑泰彦	Tissue Engineering の最前線-生体組織の再生誘導治療を実現する医工学技術.	医学のあゆみ	217; 463-467, 2006.
Suzuki T, Nomoto Y, Nakagawa T, Kuwahata N, Ogawa H, Suzuki Y, Ito J, Omori K.	Age-dependent degeneration of the stria vascularis in human cochleae.	Laryngoscope	116: 1846-1850, 2006.
Okano T, Nakagawa T, Kita T, Endo T, Ito J.	Cell-gene delivery of brain-derived neurotrophic factor to the mouse inner ear.	Mol Ther	14: 866-871, 2006.
Hato N, Kohno H, Okada M, Hakuba N, Gyo K, Iwakura T, Tateno M.	A new tool for testing ossicular mobility during middle ear surgery: preliminary report of four cases.	Otol Neurotol	27:592-595, 2006.
Iwai K, Nakagawa T, Endo T, Matsuoka Y, Kita T, Kim TS, Tabata Y, Ito J.	Cochlear protection by local IGF-1 application using biodegradable hydrogel.	Laryngoscope	116: 526-533, 2006.

12. BDNF

内 耳

中川隆之 NAKAGAWA Takayuki

京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

伊藤壽一 ITO Juichi

京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

1 背景（疾患など）

感音難聴は65歳以上人口の約6割に認められ、75歳以上人口の実に1/4が日常生活に支障をきたすレベルの難聴を有することが知られている。さらに、先天的難聴は1,000人に1人に認められる最も頻度の高い先天的機能障害である。また、厚生労働省で班研究の対象である突発性難聴やメニエール病といった難治疾患も、人口10万人あたり約30人の発症が認められている。これらの難治疾患を含め、感音難聴症例では、ほとんどが音刺激を受容する蝸牛の障害によるものである。現在、有効性が認められている治療法として、ステロイドの全身投与が存在するが、急性期のみが対象となり、有効性も必ずしも満足できるものではない。さらに、ステロイド投与が無効であった場合の二次的な治療法として、高気圧酸素療法などが施行されているが、有効性はきわめて限られているのが現状である。これらの背景から、耳鼻咽喉科領域において、感音難聴治療法の開発は急務とされている。

蝸牛は、渦巻き状の形態をした管腔構造をしており、この管は鼓室階、中央階、前庭階と呼ばれる液体で満たされた3つの空間に分離されている（図1）。音刺激を受容し、神経信号に変換する有毛細胞は、中央階に存在する。有毛細胞が受容した刺激を中枢に伝えるラセン神経節は、渦巻きの軸の部分に存在し、有毛細胞とシナプス結合をもつ。蝸牛では、中央階と呼ばれる空間に満たされている液体（内リンパ液）のみが高カリウムであり、他の空間とのカリウム濃度勾配が内リンパ電位を生成する。内リンパ電位は、有毛細胞の脱分極に不可欠であり、内リンパ電位の形成に不可欠な組織が、蝸牛の側壁に存在する血管条とラセン靱帯である。

これまでの研究成果から、感音難聴の病態には、いくつかの病態が存在することがわかって

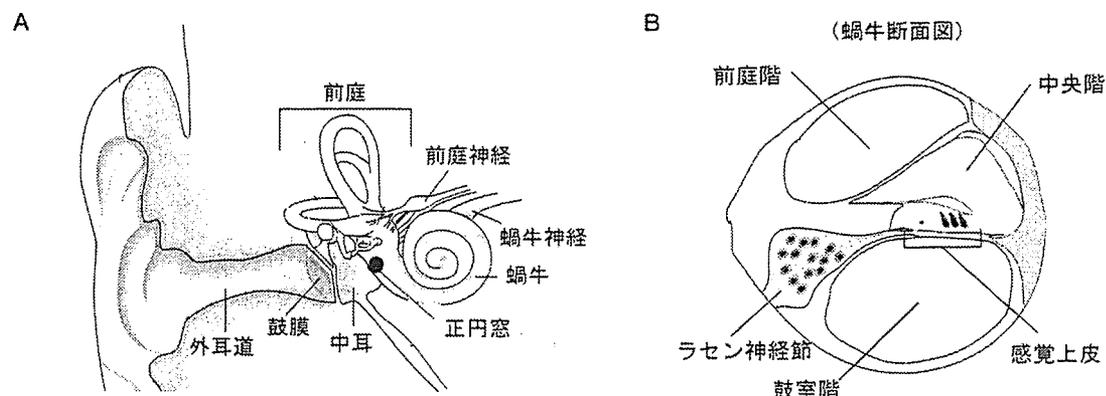


図1 内耳の局在と蝸牛断面図

A：内耳（蝸牛、前庭）は、中耳のさらに深部の骨に存在する。正円窓で膜を介して、中耳と内耳は交通する。

B：蝸牛断面図；蝸牛は前庭階、中央階、鼓室階の3つに分かれる。ラセン神経節は軸に相当する部分に存在する。

いる。有毛細胞障害型、ラセン神経節障害型、血管条およびラセン靭帯障害型と、これらが混在するタイプが存在する。それぞれに特徴的な聴力障害のパターンを示すことが明らかにされており、臨床的にある程度障害部位を推測することが可能である。近年、これらの蝸牛の重要な細胞、組織の再生の可能性が呈示されているが、機能回復を伴う再生医療の臨床応用にはいまだ時間を要するのが現状である。したがって、臨床への応用の観点からは、蝸牛の細胞を不可逆的な変化、すなわち細胞死から保護する方法を開発することが急務といえる。これまでに、本稿で取り上げる脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor：BDNF）などの神経栄養因子、活性酸素除去剤などの有効性が基礎的に明らかにされている^{1) 2)}。これらの薬物は、全身投与により蝸牛で効果を発揮することは困難であり、内耳への局所投与にて、その有効性が認められている。したがって、臨床で使用できる安全かつ確実に内耳に薬物を投与する方法が確立されれば、新しい感音難聴治療が臨床に供される可能性がある。

我々は、このような背景から、京都大学再生医科学研究所・生体組織工学研究部門（生体材料学分野：主任教授 田畑泰彦）が薬物徐放システムとして開発したブタ・コラーゲン由来ゼラチンハイドロゲル（以下ハイドロゲル）³⁾に着目し、本システムを内耳薬物投与システムとして応用するための基礎研究を行った。治療目的の標的は、蝸牛の一次神経節細胞であるラセン神経節細胞の保護とした。その根拠として、ラセン神経節細胞は有毛細胞に比較して、変性や喪失に至る過程が緩やかであるため、実際に保護する機会が臨床的にも想定できること、ラセン神経節細胞が人工内耳の有効性に不可欠なことがあげられる。ここで、人工内耳について、簡単に説明する。人工内耳は、現在、高度感音難聴に対する唯一の治療法であり、音響を電気刺激に変換し、直接ラセン神経節細胞を刺激することにより、聴覚を得る方法である。すなわち、ラセン神経節細胞がある程度残存していなければ、人工内耳を埋め込んでも聴覚を獲得することはできない。投与薬物としてはBDNFを選択した。この背景としては、すでにBDNFのラセン神経節細胞保護作用が知られていること^{1) 2)}、BDNFが他分野での臨床治験に用いられていることがあげられる。

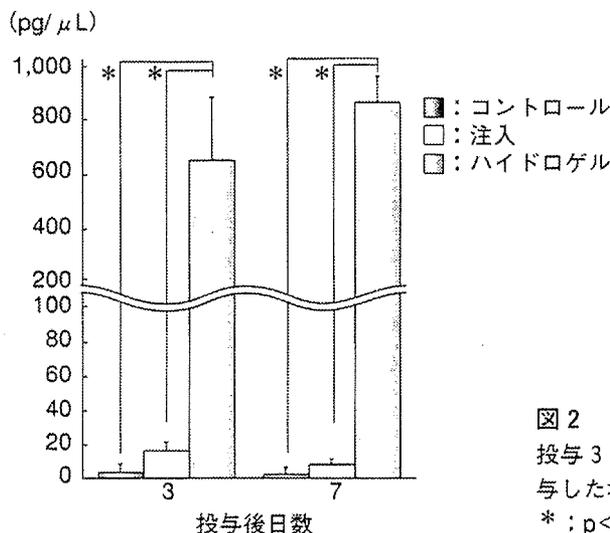


図2 蝸牛外リンパ液中BDNF濃度

投与3日後、7日後ともに、ハイドロゲルを用いてBDNFを投与した場合に有意に高いBDNF濃度が認められた。

* : $p < 0.01$

(文献4より引用)

II 研究の結果

まず、ハイドロゲルにより、蝸牛内にBDNFを適切に投与することができるのかを確認した。BDNFを浸透させたハイドロゲルをモルモット中耳の正円窓膜上に留置し、蝸牛外リンパ液中のBDNF濃度を経時的にELISA法を用いて計測した。正円窓は、蝸牛の中耳への2つの開窓部の一つであり、この部分だけが骨で覆われておらず、3層構造をなす膜となっている。内耳への薬物投与経路として、最も広く用いられている方法が正円窓膜上への薬物投与である。臨床的に、正円窓にアプローチすることは、さほど困難ではなく、少々工夫すれば、経鼓膜的にハイドロゲルを注入することも可能である。投与3、7日後に蝸牛外リンパ液を採取した。対照として、無処置蝸牛から採取したサンプル、同様量のBDNFを正円窓から注入した後に採取したサンプルを使用した。結果、ハイドロゲルを用いた群では、直接注入した場合に比して、3日後で約40倍、7日後では約100倍の濃度のBDNFが外リンパ液中に認められた⁴⁾ (図2)。すなわち、ハイドロゲルは、経正円窓膜的にBDNFを蝸牛内に持続的に投与することができるシステムであることが確認された。この結果は、ハイドロゲルによるBDNFの蝸牛内投与の有効性を示すだけでなく、他の栄養因子や細胞増殖因子などのペプチドを蝸牛内に投与するシステムとして応用可能であることを示唆するものといえる。

次に、ハイドロゲルを用いて投与したBDNFが実際にその生物学的な効果を発起するのかを、ラセン神経節障害動物モデルを用いて検証した。ラセン神経節細胞の障害は、種々の要因で惹起することができるが、実験的には、薬物による直接的な障害モデルと有毛細胞喪失に伴う二次的障害モデルがよく用いられている。本実験では、比較的臨床に即していることから、モルモットの二次的障害モデルを使用した。耳毒性薬物であるカナマイシンとエタクリン酸を全身投与し、投与7～14日後に聴力の評価を行い、聾となっている動物のみを使用し、ラセン神経節細胞の変性が出現しはじめる耳毒性処置18日後からBDNFの局所投与を行い、生食を投与したコントロー

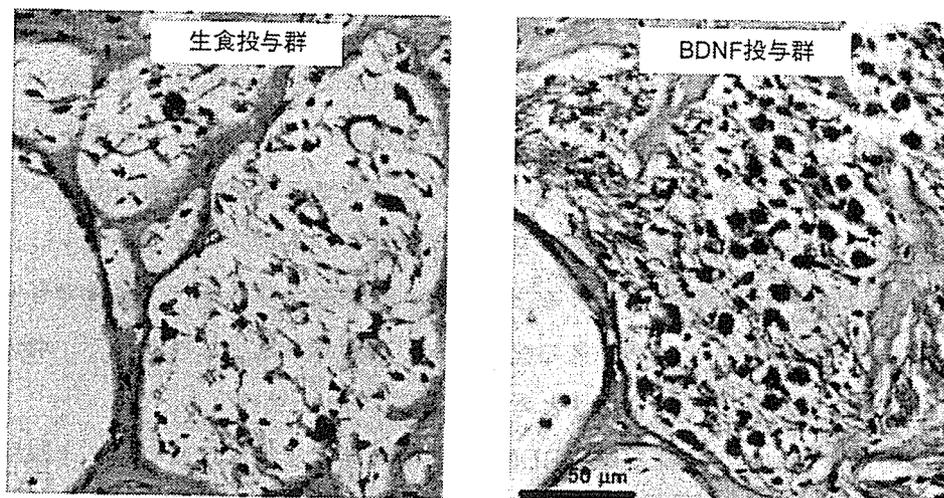


図3 ラセン神経節組織図 (HE染色)

生食を投与したコントロールでは、著明なラセン神経節細胞の変性を認めるが、BDNFをハイドロゲルにて投与するとラセン神経節細胞が温存されている。

ルと機能および組織を比較した。ラセン神経節の機能評価には、電気刺激聴性脳幹反応を用いた。この方法は、人工内耳と同様に直接蝸牛を電気刺激し、脳幹の反応を脳波で測定する方法であり、人工内耳の有効性を反映する方法である。結果、ハイドロゲルによるBDNF投与により、電気刺激聴性脳幹反応の閾値上昇は有意に抑制されることが明らかとなった⁴⁾。また、ラセン神経節細胞密度を解析したところ、BDNF投与した蝸牛では、有意に高い細胞密度が認められた (図3)。すなわち、ハイドロゲルによって蝸牛内に投与されたBDNFは、電気生理学的、組織学的にラセン神経節細胞を保護する生物学的活性を維持していたこととなる。

III 治療の意義や利点・課題・展望

有毛細胞喪失により聾となった症例では、ラセン神経節細胞の生存促進は人工内耳による聴覚獲得という観点から、非常に重要な意義をもつ。近年、BDNFは単に神経細胞などの保護だけでなく、神経伝達にも重要な役割を果たしていることが示唆されている。したがって、BDNFは、人工内耳の有効性を維持するのみではなく、さらに良好な反応をもたらす可能性があるといえる。老人性難聴は、今後の高齢化社会を考慮した場合、重要な社会的問題の一つとなることが予想される。ヒト側頭骨病理の解析から、ラセン神経節細胞の喪失が老人性難聴の病因の一つであることが示唆されている⁵⁾。また、老化モデル動物の解析でも、加齢による聴覚障害とラセン神経節細胞の減少の関係が指摘されている。したがって、老人性難聴の進行防止においても、BDNFによるラセン神経節細胞保護が有効である可能性がある。今後、老人性難聴モデル動物での有効性の検証が待たれる。

本治療法の最大の利点は、低侵襲性と安全性の高さである。現在までに臨床的に使用されて

きた方法は、二つに大別できる。一つは、埋め込み型ポンプを用いる方法で、投与量の調節性に優れるが、通常の中耳手術に近い手術侵襲を要してデバイスを埋め込む必要があり、広く普及するに至らず、現在、臨床的に使用できるポンプは存在しない。いくつかのモデルの有効性が検討されている段階である。反復経鼓膜注入はシンプルな方法であるが、薬物の内耳への到達性が安定しないことに加えて、頻回の投与を要するという問題点がある。ハイドロゲルによる投与では、1回の注入で約2週間の徐放が期待できることから、継続的な投与を行う場合でも少ない投与回数で対応できる。当然ながら、デバイスの埋め込みは不要である。したがって、現在、臨床供給可能な方法の中では最も優れた投与方法と考えられる。

今後の展望であるが、ヒト臨床試験にBDNFが使用可能となれば、直ちにヒト臨床試験を行うことができる。また、近年、BDNFのさまざまな生物学的な効果が明らかにされつつあり、ラセン神経節細胞以外の蝸牛の組織に対する保護効果についても基礎的に追加研究する必要がある。これらの中には内耳障害治療に応用可能なものも多々あり、さらなる研究展開が期待できる。

●文 献

- 1) Shinohara T, Bredberg G, Ulfendahl M, et al : Neurotrophic factor intervention restores auditory function in deafened animals. Proc Natl Acad Sci USA 99 : 1657-1660, 2002
- 2) Nakaizumi T, Kawamoto K, Minoda R, et al : Adenovirus-mediated expression of brain-derived neurotrophic factor protects spiral ganglion neurons from ototoxic damage. Audiol Neurootol 9 : 135-143, 2004
- 3) Tabata Y, Miyao M, Ozeki M, et al : Controlled release of vascular endothelial growth factor by use of collagen hydrogels. J Biomater Sci Polym Ed 11 : 915-930, 2000
- 4) Endo T, Nakagawa T, Kita T, et al : A novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel. Laryngoscope (in print)
- 5) Schuknecht HF : Pathology of the ear. Cambridge, MA, Harvard university press. 1974

●参考：海外の研究施設

- ・蝸牛におけるBDNFの役割. ドイツ・チュービンゲン大学 聴覚研究所
- ・内耳遺伝子および薬物導入による蝸牛保護. 米国ミシガン大学 クレスギ聴覚研究所