

厚生労働科学研究費補助金

(医療機器開発推進研究事業 H19-ナノ-若手-002)

ナノテクノロジーを用いたDDSによる耳鳴の克服

平成19年度総括研究報告書

平成20年3月

主任研究者 坂本達則

(京都大学医学部附属病院)

目 次

I. 総括研究報告書

- ナノテクノロジーを用いたDDSによる耳鳴の克服……………1
坂本 達則

II. 研究成果の刊行に関する一覧表……………15

III. 研究成果の刊行物・別刷……………18

ナノテクノロジーを用いたDDSによる耳鳴の克服

主任研究者 坂本達則 (京都大学医学部附属病院)

研究要旨

耳鳴を煩う患者は多数存在し、耐え難い苦痛を伴う症状であるにもかかわらず、これまで現実的な治療は存在しなかった。局所麻酔薬リドカインは耳鳴抑制効果があることは知られているが、静注では耳鳴抑制効果はあっても数時間であるのに対し、不整脈やけいれん、ショックなど重大な副作用のことを考慮する必要がある。局所治療である鼓室内注入でも耳鳴抑制効果があるが激しいめまいを伴う。これらを考えると、耳鳴治療としては受け入れがたかった。我々は、リドカインを局所で徐放させることでこの問題の大部分を解決できると考え、内耳ドラッグデリバリーを用いた治療システムを計画した。徐放製剤であるリドカイン含有パーティクルを作製し、極細径内視鏡を用いた安全・簡便・低侵襲な手技を用いて正円窓膜上に留置、低濃度で蝸牛のみに局所投与することで、副作用を回避しながら耳鳴治療効果を得る。そのためのin vitroデータ、動物実験、前臨床試験を行い、本研究期間内に臨床試験を行う。

分担研究者

伊藤壽一(京都大学大学院医学研究科)

田畑泰彦(京都大学再生医学研究所)

三浦 誠(京都大学大学院医学研究科)

中川隆之(京都大学医学部附属病院)

平海晴一(京都大学医学部附属病院)

鳴に対する新たな治療方法を提供することである。

我が国の人口の15%が何らかの形で耳鳴を経験しており、そのうち20%が耳鳴によって耐え難い苦痛を感じている。しかし、この非常に苦痛の大きな症状に対して、現在までに確立した治療方法はおろか、その発生機序すら明らかにされていない。耳鳴を主訴に病院を受診した患者は、治療できないという現実を受け入れられず、効果の乏しい薬剤を漫然と服用し、外来で医師に長時間の説明を求め、あるいはドクターショッピング

A. 研究目的

本研究の目的は、ナノテクノロジーを活用したDDSシステムを用いることによって、これまで現実的な治療方法の存在しなかった耳

という形でいくつもの病院を渡り歩く。これは決してまれな光景ではなく、耳鼻咽喉科医なら日常的に経験している。このような状況が社会的にも医療経済的にも望ましいとはとうてい言えるものではない。では耳鳴に対して有効な薬剤はないのであろうか。局所麻酔薬リドカインは、静注で耳鳴軽減効果があることは二重盲検でも確認されているが、リドカインは代謝が速く、耳鳴に対する効果はほんの数時間しか持続しないうえ、不整脈やアレルギー反応、中枢抑制によるけいれんを起こす確率が比較的高い薬剤でもある。リドカインの局所投与として、経鼓膜的に鼓室内投与することでも耳鳴軽減効果が得られることが経験的に知られているが、同時に、数時間持続する激しいめまいを伴い、嚥下とともに薬液は鼓室から排出されることなどからこれも治療効果が持続しない。すなわち、リドカインによる耳鳴治療は、その効果が持続しないことと副作用を考慮すると、一般的な治療としては受け入れがたい。我々はこれに対する解決方法として、内耳ドラッグデリバリーシステム(DDS)を用いることができると考えた。具体的には、リドカインを徐放することが出来る製剤を蝸牛の正円窓膜上に極細径内視鏡を用いて正確に留置することで、リドカインの濃度と持続時間を制御しながら蝸牛に選択的に投与することで、副作用を最小限に抑え、満足な効果持続時間を得ることが出来るという方法である。この蝸牛へのドラッグデリバリーシステムは、将来的には他の内耳疾患に対しても広く用いることのできる基盤的な技術である。

耳鳴研究という観点からは、リドカインの薬理作用はよく知られており、蝸牛へのリドカインの局所投与で治療効果が得られるということから、蝸牛における耳鳴発生機序さらにはその認知の機序の研究も推進することになると期待される。

B. 研究方法

蝸牛への薬物投与については、全身投与を行った場合、蝸牛への血流は非常に少なく、さらに血液蝸牛関門が存在するため、蝸牛への薬物到達はきわめて限られている。蝸牛への直接投与を行う場合、蝸牛は蝸牛骨包と呼ばれる非常に緻密な骨に囲まれており、直接穿刺することは容易ではなく、仮に直接穿刺すると聴力の低下が避けられない。しかし、鼓室に面した蝸牛表面には正円窓と呼ばれる小孔があり、正円窓膜のみで閉鎖されているため、鼓室に投与した薬剤はここから蝸牛内に拡散すると考えられている。リドカインを鼓室内投与した場合も、リドカインは正円窓膜を経由して内耳に到達するが、高濃度で蝸牛内に投与した場合、内耳麻酔によって激しいめまいが起こると考えられている。

そこで、我々は低濃度で持続時間の長いリドカイン徐放製剤を正円窓膜上に留置することで耳鳴治療を行える可能性があると考えた。

本研究の方法としては、まずリドカイン徐放製剤を作製する必要がある。様々な条件の製剤を作製し、in vitro で薬剤が徐放することを確認する。引き続き、これを動物の正円

窓膜上に留置して、リドカインが蝸牛内に徐放されることを実証する。

耳鳴は疾患ではなく症状であるため、動物実験は容易ではないが、いくつかの耳鳴モデル動物が知られているので、これらの正円窓窩にリドカイン徐放製剤を留置して、耳鳴抑制効果を確認する。

人での投与については、安全性が高く、侵襲の少ない方法を選択する必要がある。ここでは、鼓膜切開から極細径内視鏡を用いて正円窓を確認し、製剤を留置するという方法を考えた。これが可能であることを実証するため、ヒト側頭骨標本を用いて手術方法を検討する。

本研究期間内に臨床試験を開始する。

1)リドカイン検出系の確立

作製した徐放製剤が確実にリドカインを徐放すること、あるいは蝸牛内へリドカインを投与できることを証明するにあたって、少量のサンプルからリドカインを検出することの出来る方法を確立しておく必要がある。ここでは紫外線吸光度測定と高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による方法を用いた。

(1) 紫外線吸光度測定によるリドカイン濃度測定

リドカインは、脂肪性芳香族であるベンゼン環と水溶性アミンがアミド結合した構造を取っており、ベンゼン環のような強い共役結合をもつ構造は紫外吸収スペクトルを持つことが予想される。この点に注目して、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で様々な濃度のリドカインに対して、実際に紫外線吸光度を測定した。

(2) HPLC によるリドカイン濃度測定

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は微量の検体から物質を検出する方法として標準的に用いられている。ここでは、蝸牛から採取した最大 10 μ l のタンパクや塩を含む液体からリドカインを検出する必要がある。まずコントロール実験として、モルモットの蝸牛内に直接リドカインを注入した上で蝸牛内の液体を採取し、逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)によって濃度の測定が出来ることを確認した。

2)DDS 製剤の作製・最適化

(1) ゼラチンハイドロゲル

等電点の異なる 2 種類のゼラチンハイドロゲル(酸性、塩基性)について、水溶性リドカイン(塩酸リドカイン)を 30 分以上接触させることで吸着させた。あるいは、吸着後に凍結乾燥して結合を強めた。

放出試験として、37°Cまたは 50°Cの生体条件に近い溶媒中でリドカインを溶出させた。溶媒を経時的にサンプリングして、その紫外線吸光度からリドカイン溶出量を算出した。

(2) PLGA パーティクル

PLGA パーティクルは液中乾燥法にて作製した。簡単に述べると、ジクロロエタンに PLGA を溶解し、on ice でリドカインと混合してボルテックスをかけることでエマルジョンとする。これに 1%ポリビニルアルコール(PVA)を加えて、低速で攪拌中の 1%PVA 中に滴下する。室温蒸散の後洗浄、凍結乾燥を行った。PVA の重合度・ケン化度、ジクロロメタン・ポリマー、リドカインの量、エマルジョンの安定化などのパラメータを変化させ

ることでパーティクルの大きさを調整した。パーティクルの大きさは、マイクロパーティクルについては走査型電子顕微鏡で、ナノパーティクルについてはダイナミック光散乱光度計(DLS)で計測した。

作製したパーティクルの放出試験は、ゼラチンハイドロゲルと同様に行った。

3) DDS 製剤による蝸牛への薬物投与

作製した DDS 製剤を用いて動物の蝸牛にリドカインを投与することが出来ることを証明する必要がある。ここでは、直径の大きい(100 μm) PLGA マイクロパーティクルを酸性ゼラチンハイドロゲルとともにモルモットの正円窓窩に留置し、1、3、7、14 日後に蝸牛から外リンパを採取し、RP-HPLC でリドカイン濃度を測定した。

4) ヒトにおける正円窓膜へのアクセス

ヒトにおける DDS 製剤の投与方法として、鼓膜麻酔をして鼓膜切開を置き、ここから極細径内視鏡を用いて正円窓窩を視認し、ここ

に DDS 製剤を留置するという方法を想定している。これは最終的には開業医が外来で施行できる方法として考えているが、これが実行可能であることを検証する必要がある。ここでは、まず、ヒト側頭骨標本を用いて実際に鼓膜切開を置いて極細径内視鏡を用いて正円窓窩を確認できるかどうかを検討した。

5) 倫理面への配慮

動物実験に関しては、本学の動物実験に関する倫理委員会の承認のもとに、動物愛護に十分配慮した上で行った。

臨床試験については、本学の倫理委員会の承認のもとに施行する。人権擁護上の配慮を十分に行い、対象者に対する不利益、危険性の排除に対する十分な配慮をはかり、研究計画に対する、説明と理解(インフォームドコンセント)を得られた上で研究を実施する。

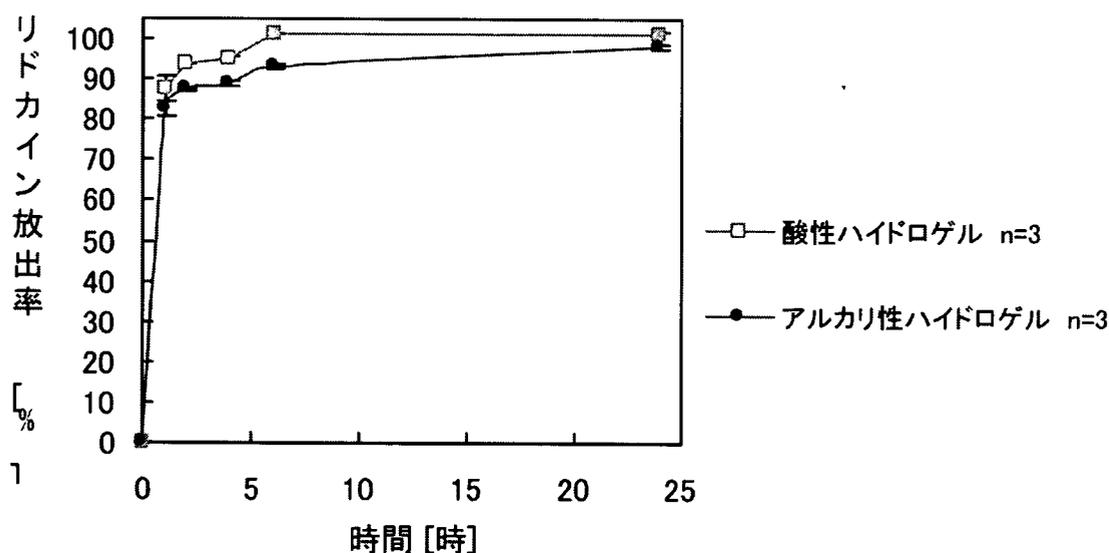


図1 リドカイン含有ハイドロゲルのリドカイン放出率

	PVA	ポリマー (PLGA-7020)	ジクロロメタン	リドカイン	エマルジョン 安定化	平均直径
マイクロ 大	UP-180	2 g	5.5 ml	2 g		100 μ m
マイクロ 小	UMR-10H	500 mg	5 ml	500 mg	超音波処理	5 μ m
ナノ	UMR-10H	50 mg	2 ml	50 mg	ホモジナイズ 超音波処理	40 nm

表1 パーティクル作成条件

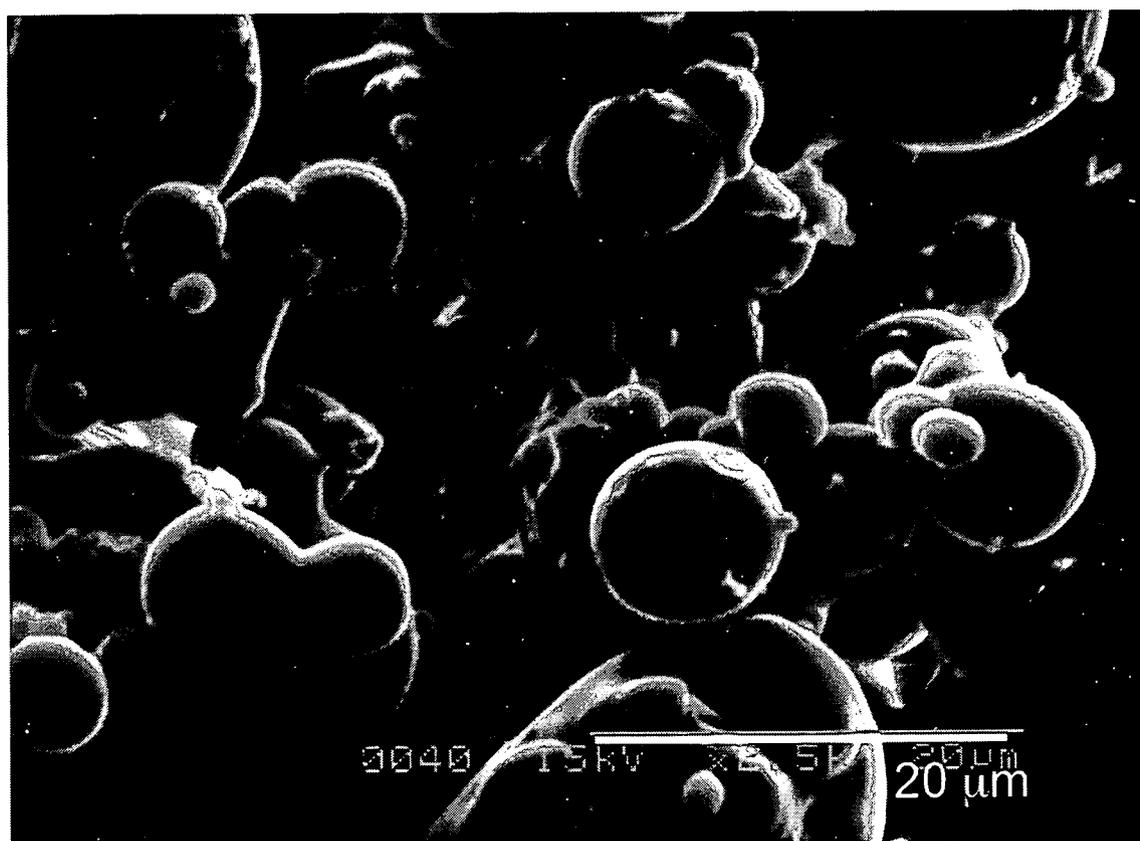


図2 リドカイン含有マイクロパーティクル(直径 100 μ m 中心)

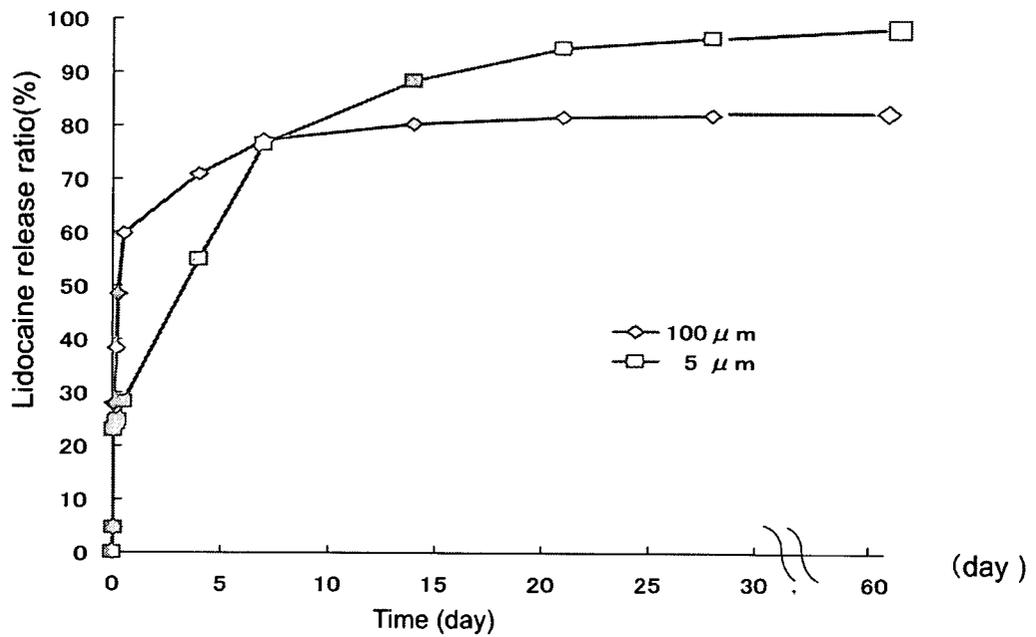


図3 PLGA マイクロパーティクル(直径 100 μm)のリドカイン放出曲線(放出率)

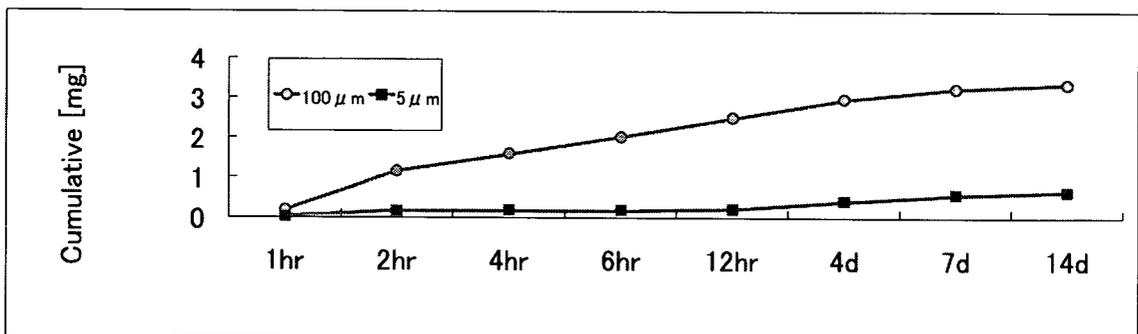


図4 PLGA マイクロパーティクル(直径 100 μm)のリドカイン放出曲線(累積放出量)

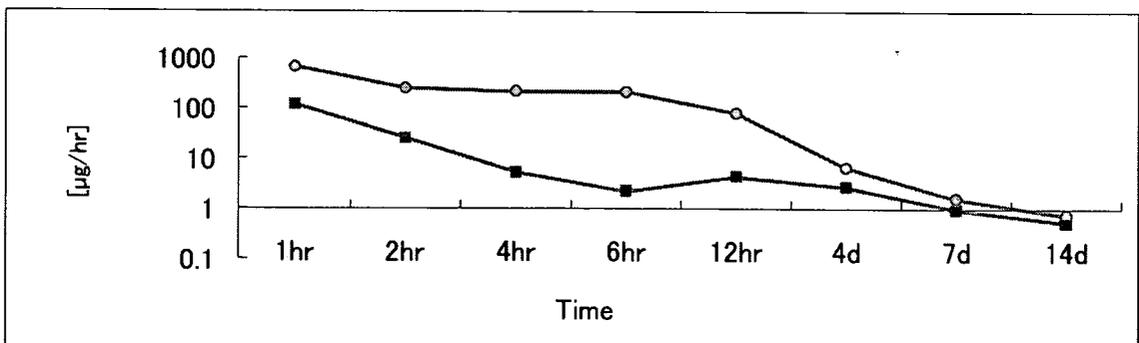


図5 PLGA マイクロパーティクル(直径 100 μm)のリドカイン放出曲線(1時間あたり)

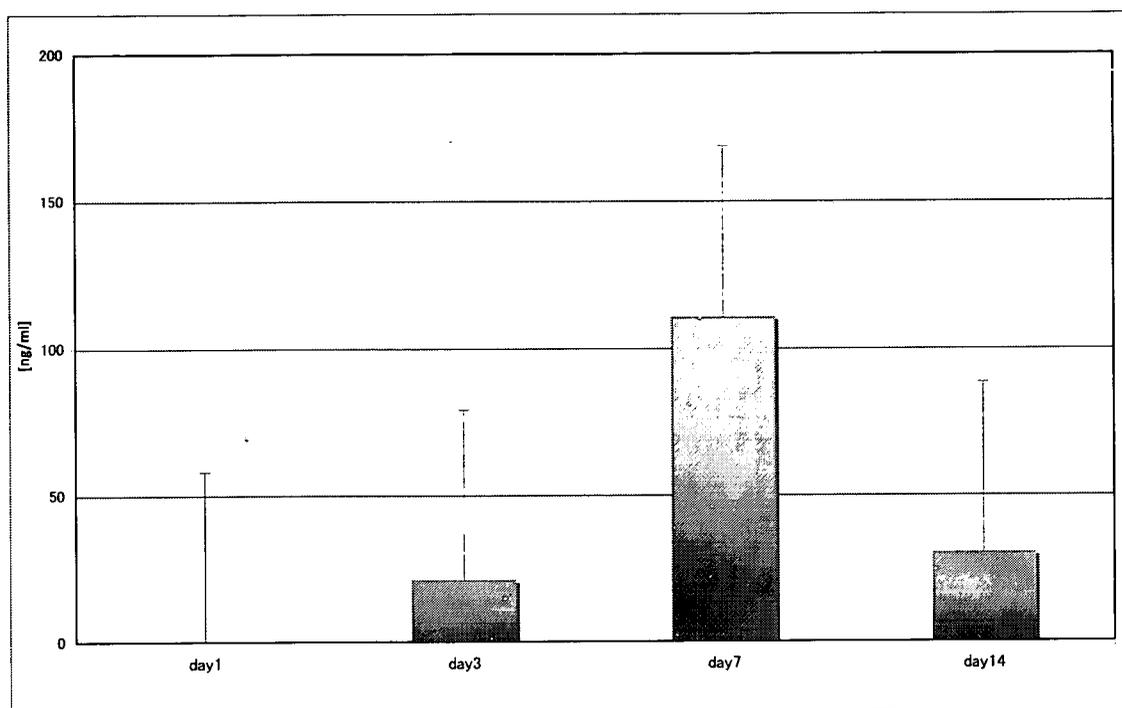


図6 PLGA マイクロパーティクル留置後の蝸牛内リドカイン濃度

C. 研究結果

リドカイン徐放製剤の基剤としてゼラチンハイドロゲルを用いると、リドカインはゲルと結合せず、徐放製剤として用いることが出来ないことを確認した。ポリ乳酸／グリコール酸ポリマー (PLGA) によるパーティクルを作製した場合、リドカインが内包され、2 週間以上徐放させることが出来ることが分かった。サイズは直径 40nm から 100 μ m の範囲で変化させることが出来、直径に応じてリドカイン放出速度と時間が変化することも明らかになった。これらから、PLGA パーティクルはリドカインの徐放に用いるのに適していると考えられた。PLGA パーティクルは粉状であり、実際の手術手技には最適とは言えないが、ゼラチンハイドロゲルはリドカインを吸着しないので、

これと組み合わせてハイブリッド化することで対応できると考えられた。

蝸牛への徐放の実証として、リドカイン含有 PLGA パーティクル(直径 100 μ m)をモルモットの蝸牛正円窓膜上に留置し、一定時間の後に蝸牛内の液体(外リンパ)を採取してリドカイン濃度を測定したところ、3 日目からリドカインが検出され、7 日目には最高濃度に到達し、14 日目でも検出可能であった。これにより、PLGA パーティクルを用いて、リドカインが2 週間にわたって徐放できるということが示された。

ヒトにおける手術手技の検討として、側頭骨標本を用いて、鼓膜切開を置き、極細径内視鏡を用いて正円窓窩が確認でき、操作できることを確認した。

1)リドカイン検出系の確立

(1) 紫外線吸光度測定によるリドカイン濃度測定

PBS 中にリドカインを溶解し、吸光度測定を行った。 $\lambda=263\text{nm}$ において、 $2.5\ \mu\text{g/ml}$ ($10.7\ \mu\text{M}$) から $350\ \mu\text{g/ml}$ (1.5mM) の範囲で検量線を引くことが出来た。

(2) HPLC によるリドカイン濃度測定

モルモットの蝸牛にリドカインを注入し、そこから採取した外リンパについて、RP-HPLC で濃度測定したところ、 $10\ \text{ng/ml}$ ($42.8\ \text{pM}$) 以上で測定できることが確認できた。

2)DDS 製剤の作製・最適化

(1) ゼラチンハイドロゲル

リドカインを含有させた2種類のゼラチンハイドロゲル(酸性、塩基性)について、 37°C および 50°C で溶媒中へのリドカイン溶出量を経時的に測定したところ、数時間以内にほとんど全量が溶出した(図 1)。また、凍結乾燥させたリドカイン含有ハイドロゲルも 37°C の溶媒中に数時間以内に全量が溶出した。以上から、リドカインはハイドロゲルに結合せず、リドカインの徐放効果はないことが分かった。

(2) PLGA パーティクル

液中乾燥法を用いて、表1のようなパラメータを用いてパーティクルの作製を行ったところ、直径 $100\ \mu\text{m}$ から $40\ \text{nm}$ のリドカイン含有 PLGA パーティクルを作製することが出来た。(図 2)

マイクロパーティクルについて、放出試験

を行ったところ、直径 $5\ \mu\text{m}$ 、直径 $100\ \mu\text{m}$ とも 7 日間以上にわたって徐放効果が得られた。(図3, 4, 5)

ナノパーティクルについては、今後検討する。

3)DDS 製剤による蝸牛への薬物投与

リドカイン含有 PLGA マイクロパーティクル(直径 $100\ \mu\text{m}$)を酸性ゼラチンハイドロゲルとともにモルモットの正円窓窩に留置し、1、3、7、14 日後に蝸牛外リンパ中のリドカイン濃度を HPLC で測定したところ、リドカインは 3 日目から検出され、7 日目には高値になり、14 日目でも検出可能であった。(図 6)

4)ヒトにおける正円窓膜へのアクセス

ヒト側頭骨標本(2 標本)について、鼓膜切開して極細径内視鏡で正円窓窩・正円窓膜を確認したところ、実際に視認できた。しかしここから正円窓窩を操作するための鉗子等を挿入することは容易ではないと考えられた。

D. 考察

1)リドカイン検出系

サンプルが十分な量があるときの簡便な検出法としての紫外線吸光度測定による濃度測定、微量検出のための HPLC とも検出系として使用できることが確認された。

2)DDS 製剤の作製・最適化

PLGA マイクロパーティクルについて、リドカイン徐放製剤として使用でき、パーティクルサイズに応じてリドカイン徐放速度(濃度

に寄与)と徐放時間を制御できることも確認できた。

ナノパーティクルは最近になって条件設定が完了して作製できることが分かったところなので、今後徐放性について検討する。マイクロパーティクルは正円窓膜を透過せず、膜上で放出されたリドカインが膜を透過して蝸牛内で拡散するが、ナノパーティクルではパーティクル自体が正円窓膜を超えて蝸牛内に侵入して蝸牛内で徐放することから、より精度の高いターゲティング効果が期待される。

ハイドロゲルは、リドカインと結合せず、リドカイン徐放製剤として用いることが出来なかったことが明らかになった。しかし、上記で作製できた PLGA パーティクルは粉末状の製剤であり、少量を正円窓窩に正確に留置するための形態としては最適とは言えない。ハイドロゲルと組み合わせてハイブリッド DDS 製剤とすることで、PLGA パーティクルとしての徐放性を保ったまま、操作性を改善することができると考えられる。実際、下記のモルモット蝸牛の正円窓窩に PLGA マイクロパーティクルを留置するにあたって、ハイドロゲルを操作性の改善のために用いて、良好な結果であった。

3) DDS 製剤による蝸牛への薬物投与

PLGA マイクロパーティクルを正円窓膜上に置いて放出されたリドカインが、正円窓膜を超えて蝸牛内に到達することが確認された。正円窓膜上に置いた徐放製剤から蝸牛

内に薬物投与できることが実証されたことになり、この方法を用いることの妥当性を支持するものと考えられる。ただし、今回到達した蝸牛内濃度が、目的とする濃度、すなわち耳鳴を抑制し、内耳麻酔によるめまいを起こさないという濃度として適切かどうかは判明していない。この点は、耳鳴モデル動物を用いた耳鳴抑制効果の検討と、動物実験によるめまい・眼振の出現濃度の検討を行って設定濃度の参考とするが、本当の意味での容量設定試験はヒトにおける臨床試験においてのみ評価可能である。今後、早期にこれを開始できるようにしたい。

4) ヒトにおける正円窓膜へのアクセス

極細径内視鏡を用いての正円窓窩の確認は容易であった。しかし、同時に鉗子などを挿入して内視鏡下で正円窓窩の操作を行うことは容易ではなかった。将来的にはこの DDS を用いた治療法が一般の開業医でも外来で施行できるほど簡単な手技のものとして完成させるためには、この点については改善の必要がある。

E. 結論

リドカイン徐放製剤を作製し、これを用いて蝸牛への徐放が可能であることが示された。今後、徐放性剤の最適化と臨床試験への準備を進めて行く。

F. 健康危険情報

現時点では、ヒトにおける健康危険に関す

る情報は得られていない。

G. 研究発表

1. 著書

1. 中川隆之、伊藤壽一. 第4章 治療を目的とした細胞治療 3) 胚性幹細胞 聴神経, 田畑泰彦編 遺伝子医学 MOOK 別冊 進み続ける細胞移植治療の実際 メディカル ドゥ, 大阪, 2008, in-press
2. 坂本達則. 内耳障害に対する細胞移植治療, 山中伸弥, 中内啓光編 再生医療へ進む最先端の幹細胞研究 羊土社, 東京, 2008, p.774-779

2. 論文発表

1. 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, 6(1), 27-31, 2007.
2. 伊藤壽一、中川隆之、山本典生. 内耳障害への再生医学的アプローチ. 最新医学, 62, 130-169, 2007.
3. 中川隆之. 内耳再生のストラテジー. メディカルバイオ, 4(5), 56-61, 2007.
4. 中川隆之、吉川弥生、伊藤壽一. 内耳性難聴:新しい治療法開発への展望. 実験医学, 25, 3052-3057, 2007.
5. 中川隆之. DDSを用いた内耳疾患の治療. 炎症と免疫, 15(2), 60-65, 2007.
6. Nakagawa T*, Ito J. Local drug delivery to inner ear for treatment of hearing loss. Current Drug Therapy, in-press.
7. Lee KY, Nakagawa T*, Okano T, Hori R, Ono K, Tabata Y, Lee SH, Ito J. Novel therapy for hearing loss: Delivery of insulin-like growth factor-1 to the cochlea using gelatin hydrogel. Otol Neurotol, 28, 976-981, 2007.
8. Ohno T, Hirano S, Kanemaru S, Yamashita M, Umeda H, Suehiro A, Tamura Y, Nakamura T, Ito J, Tabata Y. Drug delivery system of hepatocyte growth factor for the treatment of vocal fold scarring in a canine model. Ann Otol Rhinol Laryngol, 116(10), 762-9, 2007.
9. Nakagawa T*, Ito J. Drug delivery systems for the treatment of sensorineural hearing loss. Acta Otolaryngol Suppl, 557, 30-35, 2007.
10. Hori R, Nakagawa T*, Sakamoto T, Matsuoka Y, Takebayashi S, Ito J. Pharmacological inhibition of Notch signaling in the mature guinea pig cochlea. Neuroreport, 18, 1911-1914, 2007.
11. Matsumoto M, Nakagawa T*, Kojima K, Sakamoto T, Ito J. Potential of embryonic stem cell-derived neurons for synapse formation with auditory hair cells. J Neurosci Res, in-press.
12. Okano T, Nakagawa T*, Kita T, Kada S, Yoshimoto M, Nakahata T, Ito J. Bone

- marrow-derived cells expressing Iba1 are constitutively present as resident tissue macrophages in the mouse cochlea. *J Neurosci Res*, in-press.
13. Sharif S, Nakagawa T*, Ohno T, Matsumoto M, Kita T, Riazuddin S, Ito J. The potential use of bone marrow stromal cells for cochlear cell therapy. *Neuroreport*, 18, 351-354, 2007.
 14. Higashi T, Nakagawa T*, Kita T, Kim TS, Sakamoto T, Ito J. Effects of bone-morphogenetic protein 4 on differentiation of embryonic stem cells into myosin VIIa-positive cells. *Acta Otolaryngol Suppl*, 557, 36-40, 2007.
 15. Sakamoto T, Ito J, Ladher RK. Hair cell differentiation becomes tissue specific by E9.5 in mouse inner ear. *Neuroreport*, 18(9), 841-4, 2007.
2. 学会発表
 1. 堀江理恵、中川隆之、坂本達則、吉川弥生、小野和也、田畑泰彦、伊藤壽一. 難治性耳鳴治療における内耳リドカイン徐放に関する研究. 第10回日本組織工学会, 平成19年11月8~9日, 東京
 2. 堀江理恵、中川隆之、坂本達則、田畑泰彦、岡村昇、伊藤壽一. 生体吸収材料を用いたリドカイン徐放に関する研究. 第8回日本再生医療学会, 2008年3月13~14日, 名古屋
 3. Hiraumi H, Takayuki N, Ito J, The efficiency and limitation of transtympanic microendoscope in the approach to the round window membrane. The 2nd Scientific Meeting of the Tinnitus Research Initiative, July 17-21, 2007, Monaco
 4. Nakagawa T, Okano T, Lee KY, Ito J, Local delivery of IGF1 by gelatin hydrogels for hearing loss. The 2007 AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO, September 16-19, 2007, Washington D.C. USA
 5. Hiraumi H, Takayuki N, Ito J, The efficiency of transtympanic microendoscope in the approach to the round window membrane. The 2007 AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO, September 16-19, 2007, Washington D.C. USA
 6. Rie Horie, Tatsunori Sakamoto, Takayuki Nakagawa, Yayoi S Kikkawa, Kazuya Ono, Yasuhiko Tabata, Juichi Ito, Sustained release of lidocaine into the cochlea via biodegradable materials. The 31st Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology, Feb. 16-21, 2008
 7. Inaoka T, Kikkawa YS, Nakagawa T, Tabata Y, Tsubouchi H, Ido A, Hori R,

- Ono K, Ito J, The Potential of Hepatocyte Growth Factor (HGF) for Protection of Cochlear Hair Cells. The 31st Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology, Feb. 16-21, 2008
8. 平海晴一、中川隆之、伊藤壽一、内耳ドラッグデリバリーシステムにおける細経内視鏡の有用性. 第 108 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 平成 19 年 5 月 17~19 日, 金沢
9. 稲岡孝敏、中川隆之、伊藤壽一. ハイドロゲルを用いた rhIGF-1 局所投与の音響外傷に対する有効性の検討. 第 17 回日本耳科学会総会・学術講演会, 平成 19 年 10 月 18~20 日, 福岡
10. 堀江理恵、中川隆之、坂本達則、吉川弥生、小野和也、田畑泰彦、伊藤 壽一. 生体吸収材料を用いた内耳リドカイン徐放に関する研究.in vitro. 第 17 回日本耳科学会総会・学術講演会, 平成 19 年 10 月 18~20 日, 福岡
11. Sakamoto T, Nakagawa T, Hori R, Matsuoka Y, Takebayashi S, Ito J, Pharmacological inhibition of Notch signaling in damaged cochleae of guinea pigs. Age Related Hearing Impairment, International Congress 2007, 2007.5.23-5.25, Antwerp, Belgium
12. Nakagawa T, Okano T, Ito J, Characterization and Mobilization of Cochlear Microglia/macrophages. The 2007 AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO, September 16-19, 2007, Washington D.C. USA
13. 堀 龍介、中川隆之、坂本達則、伊藤 壽一. EP2・EP4 作動薬内耳局所投与による HGF・VEGF への影響. 第 17 回日本耳科学会総会・学術講演会, 平成 19 年 10 月 18~20 日, 福岡
14. Okano T, Nakagawa T, Ito J. Characterization of cochlear microglia/macrophages. The 2007 AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO, September 16-19, 2007, Washington D.C. USA
15. Nakagawa T, Kada S, Ogita H, Inaoka T, Lee KY, Hiraumi H, Sakamoto T, Ono K, Matsumoto M, Hori R, Horie R, Kikkawa Y, Fujimoto Y, Ito J, Cell Therapy For Functional Regeneration of Spiral Ganglion Neurons. The 31st Midwinter Meeting of Association for Res
16. 小野和也、小島 憲、中川隆之、松本昌宏、伊藤壽一. 哺乳類蝸牛支持細胞における p27kip1RNA 干渉. 第 17 回日本耳科学会総会・学術講演会, 平成 19 年 10 月 18~20 日, 福岡
17. 扇田秀章、中川隆之、伊藤壽一. 微細ガラス管を用いた蝸牛軸への細胞移植について. 第 108 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 平成 19 年 5 月 17~19 日, 金沢

18. 岡野高之、中川隆之、伊藤壽一. 成体マウス前庭における骨髄由来細胞の免疫組織学的解析. 第 108 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 平成 19 年 5 月 17~19 日, 金沢
19. 岡野高之、中川隆之、喜多知子、伊藤壽一. マウス前庭における骨髄由来細胞の検討. 第 17 回 日本耳科学会総会・学術講演会, 平成 19 年 10 月 18~20 日, 福岡
20. 扇田秀章、中川隆之、岡野高之、伊藤壽一. マウス ES 細胞由来神経細胞移植によるモルモットラセン神経節の機能再生. 第 17 回 日本耳科学会総会・学術講演会, 平成 19 年 10 月 18~20 日, 福岡
21. 堀 龍介、中川隆之、坂本達則、竹林慎治、小島 憲、山本典生、岡野高之、松本昌宏、嘉田真平、伊藤壽一, ノッチ情報伝達系阻害剤の内耳投与による有毛細胞再生. 第 108 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 平成 19 年 5 月 17~19 日, 金沢
22. 嘉田真平、中川隆之、藤本康子、松本昌宏、堀 龍介、扇田秀章、伊藤壽一. カニクイザル高度難聴モデルにおけるES細胞由来神経細胞移植による電気刺激聴性脳幹反応閾値の変化. 第 17 回 日本耳科学会総会・学術講演会, 平成 19 年 10 月 18~20 日, 福岡
23. Nakagawa T. Future stem cell therapy for age-related hearing impairment. Age Related Hearing Impairment, International Congress 2007, 2007.5.23-5.25, Antwerp, Belgium
24. 平海晴一、森田武志、内藤 泰、伊藤壽一. 振幅変調によるマスキング解除の加齢変化 脳磁場計測による測定. 第 52 回日本聴覚医学会総会・学術講演会, 平成 19 年 10 月 4~5 日, 名古屋
25. Ono K, Kojima K, Nakagawa T, Matsumoto M, Ito J. RNA interference for p27kip1 induce supporting cell proliferation in organotypic cultures of postnatal mammalian cochlea. Neuro2007, Sep. 10-12, Yokohama, Kanagawa, Japan
26. Ono K, Kojima K, Nakagawa T, Matsumoto M, Kawauchi T, Ito J. RNA interference for p27 induces cell cycle reentry of postmitotic cochlear supporting cells. The 31st Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology, Feb. 16-21, 2008, Phoenix,
27. 坂本達則, ラージ・ラダ, 伊藤壽一. 耳胞のパターニングに対する後脳の役割. 第 108 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 平成 19 年 5 月 17~19 日, 金沢
28. 坂本達則, 中川隆之, 伊藤壽一. 耳胞のパターニングに対する後脳の役割. 第 17 回 日本耳科学会総会・学術講演会, 平成 19 年 10 月 18~20 日, 福岡
29. Tatsunori Sakamoto, Juichi Ito, Raj

- Ladher, Hair cell differentiation becomes tissue specific by E9.5 in mouse inner ear. 44th Inner Ear Biology Workshop, 2007.9.17-19, London, U. K.
30. 三浦 誠、坂本達則、平海晴一、金丸眞一、伊藤壽一. 突発性難聴に対する高気圧酸素療法—特に 2 次治療例に対する効果—. 第 108 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 平成 19 年 5 月 17～19 日, 金沢
31. 平海晴一. 耳科手術困難例 私ならこうする. 第 69 回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会, 平成 19 年 7 月 6～7 日, 東京
32. 三浦 誠、坂本達則、平海晴一、金丸眞一、伊藤壽一, 小児人工内耳手術とその問題点. 第 69 回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会, 平成 19 年 7 月 6-7 日, 東京
33. 三浦 誠、坂本達則、平海晴一、金丸眞一、伊藤壽一. 突発性難聴に対する高気圧酸素療法の効果—1 次、2 次治療例の比較検討. 第 52 回日本聴覚医学会総会・学術講演会, 平成 19 年 10 月 4～5 日, 名古屋
34. 三浦 誠、坂本達則、平海晴一、金丸眞一、伊藤壽一. 小児内耳奇形例の人工内耳手術. 第 17 回 日本耳科学会総会・学術講演会, 平成 19 年 10 月 18～20 日, 福岡
35. 平海晴一、中川隆之、金丸眞一、伊藤壽一. 蝸牛下法と経蝶形洞法を併用した錐体尖コレステリン肉芽腫. 第 17 回 日本耳科学会総会・学術講演会, 平成 19 年 10 月 18～20 日, 福岡
36. 三浦 誠、船曳和雄、扇田秀章、伊藤壽一. 聴神経腫瘍に対する温度眼振検査再検討. 第 66 回日本めまい平衡医学会, 平成 19 年 11 月 14～16 日, 大阪
37. 平海晴一、金丸眞一、三浦 誠、伊藤壽一, 経迷路聴神経腫瘍手術におけるナビゲーション. 第 9 回耳鼻咽喉科ナビゲーション研究会, 37948, 山口市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
1 件予定あり。
2. 実用新案登録
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・編集者等	頁	出版社名	出版地	出版年
坂本達則	内耳障害に対する 細胞移植治療	再生医療へ進む最先 端の幹細胞研究. 山中 伸弥, 中内啓光編	774 -779	羊土社	東京	2008

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
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	6(1), 27-31, 2007
伊藤壽一、中川隆之、 山本典生.	内耳障害への再生医学的アプ ローチ	最新医学	62, 130-169, 2007
中川隆之	内耳再生のストラテジー	メディカルバイオ	4(5), 56-61, 2007
中川隆之、吉川弥生、 伊藤壽一	内耳性難聴:新しい治療法開発 への展望.	実験医学	25, 3052-3057, 2007
中川隆之	DDSを用いた内耳疾患の治療.	炎症と免疫,	15(2),60-65, 2007.
Lee KY, Nakagawa T, Okano T, Hori R, Ono K, Tabata Y, Lee SH, Ito J.	Novel therapy for hearing loss: Delivery of insulin-like growth factor-1 to the cochlea using gelatin hydrogel.	Otol Neurotol,	28, 976-981, 2007
Ohno T, Hirano S, Kanemaru S, Yamashita M, Umeda H, Suehiro A, Tamura Y, Nakamura T, Ito J, Tabata Y.	Drug delivery system of hepatocyte growth factor for the treatment of vocal fold scarring in a canine model.	Ann Otol Rhinol Laryngol,	116(10),762-9, 2007
Nakagawa T*, Ito J.	Drug delivery systems for the treatment of sensorineural hearing loss.	Acta Otolaryngól Suppl,	557, 30-35, 2007
Hori R, Nakagawa T, Sakamoto T, Matsuoka Y, Takebayashi S, Ito J.	Pharmacological inhibition of Notch signaling in the mature guinea pig cochlea.	Neuroreport,	18, 1911-1914, 2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	出版年・巻号・頁
Sharif S, Nakagawa T, Ohno T, Matsumoto M, Kita T, Riazuddin S, Ito J.	The potential use of bone marrow stromal cells for cochlear cell therapy.	Neuroreport,	18, 351-354, 2007
Higashi T, Nakagawa T*, Kita T, Kim TS, Sakamoto T, Ito J.	Effects of bone-morphogenetic protein 4 on differentiation of embryonic stem cells into myosin VIIa-positive cells.	Acta Otolaryngol Suppl,	557, 36-40, 2007
Sakamoto T, Ito J, Ladher RK.	Hair cell differentiation becomes tissue specific by E9.5 in mouse inner ear.	Neuroreport,	18(9), 841-4, 2007

8. 内耳障害に対する細胞移植治療

坂本達則

聴覚と平衡機能を司る内耳は、哺乳類ではきわめて限られた再生能力しかもたず、これが内耳障害の回復が困難である原因と考えられていたが、これを克服するために、次々に明らかになってきた内耳発生に関する情報を用いたさまざまなアプローチが試みられている。幹細胞から有毛細胞を誘導することは原理的には可能であることが示されたが、有毛細胞に対する移植治療を行うには移植細胞にも移植方法にも今後の改良が待たれる。ラセン神経節細胞の幹細胞治療については、幹細胞由来神経細胞の移植によって聴覚機能が改善することがわかり、臨床応用が期待される。

はじめに

聴覚と平衡機能を司る内耳は、感覚受容器として働く有毛細胞^{*1}を中心に機能している。聴覚では20 Hz～20 kHz、平衡覚では数 Hzの振動をその頂側にみられる不動毛で受容した有毛細胞は、ラセン神経や前庭神経を介して中枢に刺激を伝達する(図1)。内耳障害は、加齢・強大声への曝露(音響障害)・薬物(アミノグリコシド系抗生剤、抗腫瘍薬、一部の利尿薬など)・遺伝子異常などさまざまな原因で生じるが、組織学的には主として有毛細胞や神経細胞などの障害であることが知られている。有毛細胞は、いったん傷害されるとほとんど再生することがなく、それが内耳障害の回復が非常に困難である原因と考えられていた。しかし、鳥類において、内耳障害後の有毛細胞が再生

することが明らかになり^{1) 2)}、さらに、有毛細胞が再生した後にトリが新たに鳴き声を覚える³⁾ことから、組織学的に再生するだけでなく、聴覚としても機能回復することも明らかになり、哺乳類においても内耳障害に対する再生治療の可能性が模索されるようになった。これまで、細胞移植や遺伝子導入、薬物導入など、さまざまな方法が試みられてきたが、本稿では背景として内耳の発生と内耳幹細胞について述べた後、有毛細胞とラセン神経節細胞^{*2}の細胞移植治療の現状について取り上げる。

1 内耳発生と内耳幹細胞

1) 内耳発生

内耳は、初期体節期(マウスで発生8日頃)に後脳の外側の皮膚外胚葉に形成される耳プラコードを起源

[キーワード]

内耳障害, 有毛細胞, 支持細胞, ラセン神経節細胞, 内耳発生, 内耳幹細胞, 細胞移植

※1 有毛細胞

内耳の蝸牛および前庭の感覚上皮に存在する感覚受容細胞。頂側に存在する聴毛が振動に応じて変位することにより、脱分極し、神経伝達物質を放出する。

Cell transplantation therapy for inner ear damage

Tatsunori Sakamoto : Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine (京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科)