

厚生労働科学研究費補助金

(感覚器障害研究事業 H18-感覚-一般-007)

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 19 年度総括・分担研究報告書

平成 20 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

- 突発性難聴に対する 3D-MRA を用いた画像診断に関する研究 12
暁 清文、羽藤直人

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 16

IV. 研究成果の刊行物 18

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。

平成 18 年度には、ヒト側頭骨標本を用いた研究により、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インスリン様細胞成長因子 1 (IGF1) の生体吸収性ゲルによる内耳投与の有効性を明らかとした。平成 19 年度には、急性高度難聴の病態解明に関する研究を行った。また、京都大学医学部附属病院におけるステロイド無効急性高度難聴症例に対する有効性の臨床統計、解析を行い、この結果をコントロールとした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を作成し、倫理委員会の承認を受け、臨床試験を開始した。また、本治療法の適応拡大に関する基礎的研究を行った。

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)
熊川孝三
(虎の門病院)
福嶋雅典
(京都大学医学部附属病院)

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

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

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

前年度の研究を進め、臨床での経鼓膜的生体吸収性ゲル正円窓窩留置を安全、確実にを行うための検討として、3D-CT を用いた正円窓窩位置の把握に関する研究を行い、あらかじめ正円窓窩の位置がどの程度予測できるか、また、理想的な観察確度、鼓膜切開部位を左右4耳を用いて検討した。また、ヒト側頭骨標本(8耳)での超細経内視鏡での正円窓膜視認性に関して、経乳突洞顕微鏡下観察、経外耳道顕微鏡観察の比較検討を行った。正円窓膜が見えるか否か、見えた場合全体の何%が見えるのかを計測した。内視鏡、顕微鏡共に、経鼓膜的観察では、後下象限に2×1mmの鼓膜切開をおくこととした。

2) 急性高度難聴における2次治療としての高気圧酸素療法の有効性に関する後ろ向き研究

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プロトコル作成、特に統計学的解析の根拠となる症例数設定を目的として、京都大学医学部附属病院にて治療を行ったステロイド無効であった急性高度難聴例における高気圧酸素療法の有効性に関する臨床的研究を行った。2000年10月から2006年9月の期間に京都大学医学部附属病院にて2次治療として高気圧酸素療法を行った278例を対象とした。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に基づき、症例の重症度分類、聴力回復に関する有効性の解析を行った。

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プロトコル作成

京都大学医学部附属病院探索医療センターの協力の元に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プロトコル作成を行った。2) 急性高度難聴における2次治療としての高気圧酸素療法の有効性に関する後ろ向き研究の結果に基づき、1984年厚生省研究班報告による突発性難聴・聴力回復の判定基準における回復以上を有効とし、 α エラー=0.05(片側)、 β エラー=0.1とすると、二項分布に基づく必要適格例数の計算を行った。さらに、上記の結果に基づいて、主要エンドポイントを純音聴力検査による平均聴覚閾値の症例登録前から手術後12週目までの変化(回復以上または不変)とし、副次エンドポイントを登録前から手術後24週目までの有害事象の発現割合、純音聴力検査による平均聴覚閾値の症例登録前から手術後12週目、24週目までの変化(著効回復以上または回復以下、治癒または著効回復以下)としたプロトコルおよび関連資料の作成を行った。

4) 突発性難聴に対する3D-MRAを用いた画像診断に関する研究

突発性難聴における内耳虚血の臨床的な関与を調べるために、3.0T MRIを用いて内耳の栄養血管である前下小脳動脈(AICA)なら

びに迷路動脈の描出を試みるとともに、AICAのMRA像と内耳病変との関係を検討した。健康ボランティア12例、愛媛大学耳鼻咽喉科を受診した新鮮突発性難聴症例24例を対象とし、AICAの異常発生率について比較検討を行った。

5) 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第I-II相臨床試験

1973年厚生省特定疾患突発性難聴研究班の診断基準で突発性難聴あるいは疑い例と診断された症例を急性高度難聴とし、これらの症例の中でステロイド全身投与を受けたが、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にて不変と判定された成人例を臨床試験の対象と設定した。なお、投与されたステロイドの種類、量および難聴の重症度、聴力型には、特に制限を設けなかった。ただし、重篤な合併症がある、あるいは、治療中、治療後悪性腫瘍5年以内の症例などは、除外した。インフォームドコンセントの獲得後、症例を登録した。症例の登録にあたっては、担当医に加え、京都大学医学部附属病院探索医療センター臨床部が臨床試験についての説明を行った。症例の登録は京都大学医学部附属病院探索医療センター検証部が行い、登録後にプロトコル治療を4日以内に行うこととした。薬物の投与は、京都大学医学部附属病院デイサージェリーセンターにて、局所麻酔下に行った。鼓膜後下象限に鼓膜切開刃にて2mmの切開を加え、内視鏡ガイド下、正円窓窩にIGF-1含有ゼラチンハイドロゲル(メカセルミンとして300 μ g含有)を中耳手術用の器機を用いて留置した。この後、4日間のみ入院治療とし、以後、投与1, 2, 4, 12, 24週間後に外来にて諸検査

を施行した。

6) 生体吸収性徐放ゲルによる薬物内耳局所投与の適応拡大に対する基礎的研究

生体吸収性徐放ゲルにより投与する薬物種類の拡大および異なる内耳障害の病態に対する適応拡大に関する基礎的研究を行った。投与薬物に関しては、肝細胞増殖因子(HGF)に関する検討をin vitro、in vivoで施行した。In vitroでは、生後3日齢マウスから採取した蝸牛感覚上皮の器官培養を用い、アミノ配糖体であるネオマイシンによる有毛細胞死に対するHGFの防止効果を解析した。ネオマイシンの容量依存的有毛細胞障害効果を検証し、HGFの添加による有毛細胞保護効果を24時間培養で評価した。In vivo実験では、モルモットを実験動物とし、音響外傷に対する生体吸収性徐放ゲルによるHGF投与による感音難聴防止効果を検証した。音響外傷直前に正円窓窩にHGF含有生体吸収性徐放ゲルを留置し、経時的に聴性脳幹反応を計測した。

異なる病態に対する効果については、2つの病態を想定した研究を行った。ひとつは、ラット聴神経の物理的圧迫モデルであり、生体吸収性徐放ゲルによるIGF1内耳局所投与の感音難聴防止効果を検討した。本モデルは、聴神経腫瘍手術などの内耳道手術における残存聴力の温存を想定したモデルとして使用した。IGF1を浸透させた生体吸収性徐放ゲルをラット正円窓窩に留置し、その後頭蓋窩アプローチにて内耳道を明視下におき、マイクロマニピュレーターを用い、聴神経に物理的圧迫損傷を加え、聴覚性脳幹反応消失後の圧迫時間を一定にし、障害の定量化を企図した。経時的に聴性脳幹反応にて聴力評価を行った。もうひとつの病態として、内耳障害

後の有毛細胞再生を目的とし、内耳への薬物投与による有毛細胞再生に関する研究を行った。ノッチ情報伝達阻害薬であるγセクレターゼ阻害薬を投与薬物とし、正常あるいは薬物全身投与により聾としたモルモットへの内耳局所投与を行った。アミノ配糖体であるカナマイシンおよび利尿薬であるエタクリン酸全身投与により聾としたモルモットを使用した。聾モデルでは、耳毒性薬物全身投与2日後にγセクレターゼ阻害薬の内耳局所投与を開始した。組織学的にノッチリガンドおよびレセプターの発現変化および有毛細胞新生についての解析を行った。

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。臨床研究については、京都大学大学院医学研究科・医学部 医の倫理委員会および愛媛大学医学部倫理委員会の承認のもとに研究を行った。また、臨床疫学的研究は、文部科学省、厚生労働省が定める疫学研究に関する倫理指針に準じて行った。

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

3D-CT を外耳道から鼓膜を見た状態に再構築し、経外耳動的な正円窓窩観察に適した観察確度および鼓膜切開部位を左右4耳を使用して検討した(図1)。結果、外耳道をやや前方から見上げる確度に設定することですべての標本において、経鼓膜的に正円窓窩が視認できることが分かった。本研究では内視鏡下に生体吸収性徐放ゲルを留置する方法

を用いているが、本治療法を広く内外で行うことを想定すると耳鼻科外来に設置されている顕微鏡下での観察が理想的であるが、今回の結果は鼓膜切開を広くとれば、十分に外来、顕微鏡下でも生体吸収性徐放ゲルの投与が可能であることを示唆するものといえる。

内視鏡および顕微鏡での実際の正円窓視認性の比較を行った結果では、経乳突洞顕微鏡下観察ではすべての症例で正円窓窩が観察可能であり、正円窓膜全体を観察することが可能であった。ただし、今回使用した標本では、正円窓窩に偽膜が存在するものはなかった。一方、経外耳道顕微鏡観察では、8耳中2耳でしか正円窓膜を観察することができなかった。これに対して、内視鏡を用いた場合は、すべての標本で正円窓膜の観察が可能であった。したがって、侵襲を考慮して、鼓膜切開を小さくとどめた場合、超細経内視鏡を使用する利点が大きいことが分かった。しかし、経乳突洞に比較すると、正円窓膜の50%しか観察することができず、観察範囲に限界があることが分かった。この点は、今後、超細経内視鏡の曲がりなどの形状を経外耳道観察に至適に改善することにより、解決可能と考えられた。

2) 急性高度難聴における2次治療としての高気圧酸素療法の有効性に関する後ろ向き研究

2000年10月から2006年9月の期間に京都大学医学部附属病院にて2次治療として高気圧酸素療法を行った278例のうち、ステロイド全身投与が不変であり、データ解析に必要な情報が揃っている199例について解析を行った。高気圧酸素治療開始前の重症度は、1998年厚生省特定疾患突発性難聴研究班報告による重症度分類のグレード1:46例、グ

レード 2:53 例、グレード 3:53 例、グレード 4:47 例であった。1984 年厚生省研究班報告による突発性難聴・聴力回復の判定基準による効果判定では、治癒 4 例、著明回復 15 例、回復 47 例、不変 133 例であり、回復以上を有効とした場合の有効率は、33%であった。また、著明回復以上は 9.5%にとどまった。

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プロトコル作成

前年度の基礎的研究結果からは、急性高度難聴発症後早期の生体吸収性徐放ゲルによる IGF1 投与が望ましいことが示唆されたが、倫理的配慮から、対象を一般的な治療法であるステロイド全身投与無効例に限定した。治療効果の判定は、ステロイド投与開始 7-10 日で判定することとした。ステロイド治療の詳細については、過去の報告で明らかな容量依存性やステロイドの種類の違いによる効果の差異は確認されていないこと、また表記の次項について限定を加えると他の医療施設からの紹介症例を登録できない、プロトコルをステロイド投与開始からにする必要となることから、ステロイド治療内容については、特に制限を設けず、1984 年厚生省研究班報告による突発性難聴・聴力回復の判定基準による効果判定にて不変であったことを選択基準とした。登録可能な年齢については、過去の疫学的研究から突発性難聴の発症年齢の中心が中年以降であること、臨床試験であることを考慮し、20 歳以上の成人例のみを対象とすることとした。発症からの時間経過については、本臨床試験が第 I - II 相試験であることから、安全性のみではなく、有効性の検証が重要となることを考え、発症後 30 日未満とした。

急性高度難聴における 2 次治療としての高気圧酸素療法の有効性に関する後ろ向き研究により、ステロイド無効急性高度難聴例に対する高気圧酸素療法の 1984 年厚生省研究班報告による突発性難聴・聴力回復の判定基準の回復以上を有効とした場合、33%の有効率が得られることが判明した。この結果に基づき、本試験では回復以上を有効とし、閾値有効割合を 33%、期待有効割合を 63%、 α エラー 0.05 (片側)、 β エラー 0.1 とすると、二項分布に基づく必要適格例数は 22 例となるため、約 10%の不適格例を見込んで目標登録症例数を 25 例とした。

有効性エンドポイントとして、純音聴力検査による平均聴覚閾値の回復以上の割合とその 95%信頼区間を推定し、過去のステロイド無効例に対して施行した高気圧酸素治療との比較検討を「疫学研究に関する倫理指針」に準じて行う。2000 年 10 月から 2006 年 9 月の間に京都大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科にて治療を行った急性高度難聴ステロイド全身投与無効例に対する 2 次治療としての高気圧酸素療法の成績を対照とする。以上の集団から、年齢、発症から治療までの期間、性別をマッチさせた症例を対照として用い、統計学的解析を行うこととした。また、安全性エンドポイントとして、試験期間中に発生した有害事象について、種別別に頻度と発生割合を算出することとした。

4) 突発性難聴に対する 3D-MRA を用いた画像診断に関する研究

健常者での 3D-MRI では内耳の形状を描出することは可能であったが、内耳動脈の描出には至らなかった。3D-MRA では椎骨・脳底動脈から前下小脳動脈までは十分に描出可能であることが判明した。3D-MRA による AICA

異常像は、片側 AICA の描出不可、狭窄像、対側に比して明らかに細い血管像に分類された。これらの異常像は健常群では 3 例 (12.5%) 3 耳、突発性難聴群では 19 例 (79.2%) 23 耳にみられた。突発性難聴群において、健側の異常像は 7 例 (29.2%) であったが、患側は 16 例 (66.7%) と有意に多く ($p < 0.01$)、突発性難聴と AICA 異常像との関連が示唆された。

5) 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第 I-II 相臨床試験

プロトコルの京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会に提出し、承認をうけ、UMIN Clinical Trial Registry に登録した。その後、京都大学医学部附属病院薬剤部にて院内製剤として生体吸収性徐放ゲルの作製を行った。作製したサンプルの安全性試験を日本食品センターおよび三井化学分析センターにて行い、残留エチレンオキサイド、グルタルアルデヒド濃度が基準値以下であることを確認し、エンドトキシン検出閾値以下、無菌であることを確認した。これらの結果確認後、症例登録を平成 19 年 12 月 19 日から開始し、平成 20 年 3 月末日時点で 6 例が登録され、プロトコル治療施行中である。現在のところ、有害事象の発生は認めていない。

6) 生体吸収性徐放ゲルによる薬物内耳局所投与の適応拡大に対する基礎的研究

HGF による蝸牛感覚上皮保護効果に関する *in vitro* 実験では、ネオマイシンにより誘導される容量依存性の有毛細胞障害が HGF 添加により有意に抑制されることが分かった。また、HGF の至適濃度が判明した。この結果を

もとに、*in vivo* での音響外傷実験を行った。音響外傷前に HGF を生体吸収性徐放ゲルを用いて投与することにより、一部の周波数領域において有意の聴力保護効果が認められた。これらの結果は、HGF の生体吸収性徐放ゲルによる内耳投与が IGF1 同様に感音難聴に対する治療効果を有することを示唆するものといえる。しかし、*in vivo* 実験での保護効果は、IGF1 に比較すると限られており、今後 IGF1 との併用効果について検討する予定である。

内耳道手術モデルである聴神経の機械的圧迫モデルでは、第一に本モデルにおける蝸牛の組織学的変化および機能変化を詳細に検討した。結果、聴神経の圧迫損傷によりラセン神経節細胞は高度の変性に陥るが、蝸牛感覚上皮は温存されていることが分かった。聴性脳幹反応、耳音響放射による解析も組織学的な変化を裏付けるものであった。通常、有毛細胞が存在していると有毛細胞からの神経栄養因子供給によりラセン神経節細胞の生存維持が行われているが、聴神経の圧迫による変性では、有毛細胞から供給される神経栄養因子では不十分であることが分かった。生体吸収性徐放ゲルを用いて、蝸牛に IGF1 などの神経保護因子を加えることによりラセン神経節細胞の生存が促進できるかが注目される。IGF1 あるいは生食を含む生体吸収性徐放ゲルを投与した実験では、各群 2 匹について、現在聴力像の変化を評価中である。

γ セクレターゼ阻害薬の内耳局所投与による有毛細胞新生については、コントロールである無処置モルモットでは、異所性有毛細胞の出現を認めなかった。薬物により聾としたモルモットでは、障害後早期の段階では、蝸牛感覚上皮の一部でノッチリガンドおよ

びレセプターの発現亢進が認められた。しかし、この発現亢進はごく一時的なものであった。ノッチリガンドおよびレセプターの発現亢進が認められているタイミングでγセクレターゼ阻害薬を内耳局所投与するとごく限られてはいるが、蝸牛内有毛細胞のさらに内側に新生有毛細胞の出現が認められた。しかしながら、機能的な回復は認められなかった。

D. 考察

ヒト側頭骨を用いた解析から、経外耳道的な正円窓へのアプローチ方法の限界が明らかとなった。臨床応用を考慮すれば、低侵襲という観点からは、経外耳道アプローチで正円窓窩に生体吸収性徐放ゲルを留置することが望ましい。したがって、現時点で最も低侵襲かつ確実に正円窓窩にアプローチする方法として、経外耳道内視鏡アプローチが望ましいと結論づけられた。実際の臨床試験を行った経験から、最も確実かつ安全な方法との印象を受けている。しかし、本研究で用いている方法を広く多施設で展開するためには、経外耳道顕微鏡下アプローチの開発も必要となることが考えられる。今後の本治療法の普及を考えると、今後さらに経外耳道顕微鏡下アプローチの可能性についての検討は必要と考えられた。鼓膜切開の工夫で解決可能な問題と考えられる。

2次治療としての高気圧酸素療法の臨床的解析により、今回行う臨床試験のヒストリカルコントロールが確立された。今回の解析結果は、過去の報告にほぼ合致するものであった。今後の臨床試験における疫学データとして重要なものと考えられる。また、この解析からえられた高気圧酸素治療の有効率は、臨床試験における症例数設定の根拠となるも

のであり、この結果をもとにプロトコルを作成することができた。プロトコルに関しては、急性高度難聴という早期治療が必要な不可逆な疾患ということを考慮し、治療群からなる単群試験とした。したがって、高気圧酸素に関するヒストリカルコントロールは、不可欠なデータといえる。

前年度の基礎的研究で内耳虚血モデルを急性高度難聴モデル動物として使用し、生体吸収性徐放ゲルによる IGF1 投与の治療的効果を明らかとしたが、今年度は内耳虚血の急性高度難聴の病態としての重要性を明確にする目的で、臨床的研究を行った。3D-MRA による検討では AICA の異常所見が多くの症例で認められた。MRA は血管内血液の移動による信号の違いを画像化したものであり、血流が極端に遅い血管では描出不良となる。このため実際には血流が保たれていても、MRA 画像上は血液移動の信号が見られず、血管はあたかも閉塞しているように描出される。すなわち MRA の血管閉塞像は必ずしも実際の血管閉塞を意味しない。しかし、MRA で認められた血管異常像は少なくとも血流低下や乱流の存在を示すものであり、今回の AICA の検討でも間接的に内耳虚血病変との関連が示唆された。今後、MRI や MRA の技術がさらに進歩し、短時間で高解像度の血管像が得られるようになれば、内耳領域の詳細な血流動態の評価も可能となり、突発性難聴と虚血の関係もより明確になると推測された。

本年度には、第 I - II 相臨床試験を京都大学医学部附属病院で開始することができた。臨床試験のアナウンスについては、ホームページを使ったインターネットが有効であった。また、新聞などマスコミにも本臨床試験は広く報道されたが（読売新聞、産経新聞、京都新聞）、インターネットポータルサイト

であるヤフーのトピックスに掲載された効果は非常に大きく、症例のリクルートは順調に進んでいる。また、本臨床試験は京都大学医学部附属病院探索医療センターという専門機関をセンターとして症例登録を行う仕組みになっており、厳密かつインフォームドコンセントが尊重された症例登録が行われている。このような形態で行われる臨床試験は、感覚器障害領域では例がなく、今後のトランスレーショナル研究の発展を考えた場合にも、重要な意義をもつと考えられる。また、世界で初めての細胞成長因子による内耳治療という側面もあることから、内外の注目は高い。このような観点から、UMIN を利用して、臨床試験の国際登録を行った。次年度には、本試験で用いた治療法の安全性と少数例での有効性が明らかになる。この結果に基づき、規模を拡大した第Ⅱ相臨床試験もしくは医師主導型臨床試験への発展を計画している。なお、愛媛大学でもすでに倫理委員会の承認を受けているので、安全性が確認できた時点で、愛媛大学での臨床試験を開始する予定である。

生体吸収性徐放ゲルを用いた感音難聴治療の適応拡大に関する基礎的研究では、現在臨床応用が開始されようとしている HGF の応用に関する基礎的研究を行った。結果、HGF が感音難聴治療に応用可能であることが示唆された。過去に HGF は神経保護作用をもつことが示唆されていることおよび遺伝子導入による HGF 投与が内耳保護作用を有することが示されていることから、今回の結果は妥当なものといえる。HGF は IGF1 とは異なった分子経路で効果を発現していることが予想されるので、次年度には、両細胞増殖因子の相加的な治療効果の有無について解析する計画である。聴神経圧迫損傷モデルは、ユニ

ークなラセン神経節障害の病態が明らかとなった。通常、有毛細胞が存在している場合、有毛細胞からの栄養因子供給でラセン神経節細胞の生存維持は保たれている。しかし、本モデルにおいては有毛細胞が残存しているにもかかわらず、ラセン神経節が高度変性に陥る。このような病態に類似するモデルとしては、ウアバイン局所投与によるラセン神経節障害モデルやクエン酸回路の阻害薬である 3-NP 局所投与モデルにおけるラセン神経節変性が想起される。したがって、このような有毛細胞存在下でのラセン神経節障害においては、ラセン神経節細胞のエネルギー代謝障害が重要な役割を果たすと推察される。現在、生体吸収性徐放ゲルを用いた IGF1 投与の効果について検討中であるが、今後ラセン神経節細胞のエネルギー代謝の観点から考えた投与薬物の選択も考慮すべきであろう。

現在施行している臨床試験は蝸牛有毛細胞の細胞死からのレスキューという観点から行われているものであるが、将来的には有毛細胞再生へと発展させることが期待される。蝸牛有毛細胞再生への戦略は、RNA 干渉を含めた遺伝子導入、細胞移植などがあるが、今回は内耳薬物投与の観点から、薬物による発現タンパクの制御による有毛細胞再生について検討した。すでに、器官培養系の実験では、支持細胞から有毛細胞への分化転換が可能であることが示されており、今回の実験では *in vivo* での有効性を示すことが主眼となった。*In vitro* 同様に異所性の有毛細胞を誘導できたことから、内耳薬物投与による有毛細胞再生の可能性を示すことが呈示できた。しかし、誘導された新生有毛細胞の数はきわめて限られていることから、今後薬物投与に関する条件の至適化、あるいは

は投与する薬物の追加を考えなければならぬ。一方、今回の実験で使用したγセクレターゼ阻害薬は神経疾患治療を含め多くの領域で臨床応用が試みられている薬物であり、近い将来の臨床応用が期待できる薬物といえる。

E. 結論

本年度の研究成果により、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・インスリン様細胞成長因子1内耳投与による感音難聴治療の検討・第I-II相臨床試験を開始することができた。また、臨床的、基礎的研究成果により、内耳薬物投与による感音難聴治療の普及および将来的な適応拡大のマイルストーンに到達することができた。

F. 健康危険情報

特記すべき健康危険情報は無い。

G. 研究発表

著書

1. 内耳再生のストラテジー 中川隆之 メディカルバイオ オーム社 東京 2007
2. 虚血性内耳病変の発生機序と臨床 晁清文 第108日本耳鼻咽喉科学会宿題報告モノグラフ 2007.

論文

1. Nakagawa T, Ito J. Local drug delivery to inner ear for treatment of hearing loss. *Current Drug Therapy* in-press
2. 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.

3. 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.
4. 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.
5. 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.

学会発表

1. 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.
2. Nakagawa T, Okano T, Lee KY, Ito J. Local delivery of IGF1 by gelatin hydrogels for hearing loss. 2007 American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Annual Meeting, Washington DC, USA, Sep. 16-19, 2007.
3. Ryusuke Hori, Takayuki Nakagawa, Tatsunori Sakamoto, Takayuki Okano, Yayoi S Kikkawa, Kazuya Ono, Yoshiko Matsunaga, Yuichiro Matsushita, Tsutomu Shiroya, Juichi Ito. Effects of prostaglandin E receptor agonists on the inner ear. The 31th MidWinter

- Meeting of Association for Research in Otolaryngology. Arizona, Phoenix, USA, February 16-21, 2007.
4. 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. Phoenix, Arizona, USA, Feb. 16-21, 2008.
 5. 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. Phoenix, Arizona, USA, Feb. 16-21, 2008.
 6. Gyo K: optical hypothermia for idiopathic sudden sensorineural hearing loss. The 9th 2007 Japan-Taiwan Conference in Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery. 平成 19 年 11 月 9 日～10 日、仙台
 7. Gyo K, Yoshida T, Fujita K, Takeda S, Hyodo J: Ischemic hearing loss and its underlying mechanisms. 26th Politzer Society Meeting. 平成 19 年 10 月 13 日～16 日 Cleveland, Ohio, USA.
 8. Takeda S, Yoshida T, Hakuba N, Hyodo J, Fujita K, Hata R, Gyo K: Ischemic tolerance in the cochlea. 26th Politzer Society. 平成 19 年 10 月 13～16 日. Cleveland, Ohio, USA.
 9. 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.
 10. 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 回日本耳科学会学術講演会. 平成 19 年 10 月 18-20 日、福岡.
 11. 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 回耳科学会. 平成 19 年 10 月 18 日、福岡.
 12. 堀 龍介、中川隆之、坂本辰則、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. 平成 19 年 10 月 18～20 日、福岡.
 13. 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. 平成 19 年 10 月 18～21 日、福岡.
 14. 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 日、東京.
 15. 兵頭 純、本吉和美、古田口裕、竹田将一郎、羽藤直人、暁 清文. : 突発性難聴における MRA による AICA 描出に関する検討. 急性高度難聴に関する調査研究 平成 19 年度第 2 回研究報告会. 平成 20 年 2 月 9 日、東京.

16. 兵頭 純, 暁 清文. : めまいを伴う突発性難聴のMRAによる前下小脳動脈の形態評価. 第66回日本めまい平衡医学会総会. 平成19年11月14~16日 大阪.
17. 兵頭 純, 前谷俊樹, 暁 清文, 白馬伸洋 : 突発性難聴に対するエダラボンの治療効果の検討. 第52回日本聴覚医学会総会. 平成19年10月4~5日, 名古屋.
18. 竹田将一郎, 吉田 正, 藤田健介, 兵頭 純, 羽藤直人, 暁 清文: 一過性虚血後の内耳に対する低体温の影響についての検討. 第52回日本聴覚医学会総会. 平成19年10月4~5日, 名古屋.
19. 羽藤直人, 兵頭 純, 暁 清文, 篠森裕介, 白馬伸洋 : 突発性難聴に対する内耳低温療法. 第69回耳鼻咽喉科臨床学術講演会. 平成19年7月6~7日, 東京.
20. 羽藤直人, 菰渕勇人, 暁 清文 : 再生促進を目的とした顔面神経減荷手術ー生体吸収性ゼラチンハイドロゲルを用いたb-FGFの徐放投与ー. 第17回日本耳科学術講演会. 平成19年10月18~20日, 福岡.

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

突発性難聴に対する 3D-MRA を用いた画像診断に関する研究

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

突発性難聴における虚血の関与を検討する目的で、3.0T MRI を用いて内耳の栄養血管である前下小脳動脈 (AICA) ならびに迷路動脈の描出を試みるとともに、AICA の MRA 像と内耳病変との関係を検討した。その結果、3D-MRI では内耳の形状描出は可能だが、迷路動脈は描出されなかった。一方、3D-MRA では椎骨・脳底動脈から AICA までは十分に描出可能であり、一部の症例では AICA からの迷路動脈分枝部も同定できた。突発性難聴 24 例 48 耳における AICA の 3D-MRA 像を検討したところ、23 耳 (47.9%) で異常所見がみられた。その内訳は、片側 AICA の描出不可 : 9 例、狭窄 : 11 例、血管径の著明な左右差 : 3 例であった。異常所見を示した耳数は、健側が 7 例 (29.2%)、患側が 16 例 (66.7%) であった。AICA の走行・分岐には正常者でもかなりの個人差があるため結論を得るにはさらに多数例での検討が必要であるが、突発性難聴のなかに AICA 血流動態に異常を示す例の多いことが示唆された。

A. 研究目的

近年、MRI を用いた画像診断技術の進歩により、これまで原因不明とされてきた突発性難聴の中に内耳出血や迷路炎などの疾患が含まれていることが分かってきた。両者は画像的に鑑別可能であり、内耳出血は T1 強調 MRI にて高信号、Gd 造影 T1 強調 MRI で造影効果がないのに対し、迷路炎は Gd-T1 強調 MRI で造影効果があり、T2 強調 MRI で低信号を示す。一方、MR angiography (MRA) は脳血管などの循環障害 (虚血) 診断に汎用されており、椎骨動脈の形態異常や血流動態と突発性難聴との関連を示唆する報告も散見される。現在の MRI の技術レベルでは、前下小脳動脈 (anterior inferior cerebellar artery : AICA) 梗塞が支配領域の脳幹梗塞像として診断可能な程度であり、また MRA でも脳底動脈や AICA の描出はできるが、迷路動脈 (内耳

動脈) やさらに末梢血管の病変までは明確に描出できない。

内耳道内における迷路動脈の走行や分岐にはかなりの個人差があるものの、AICA から分岐するものが過半数を占める。AICA の血流動態変化は迷路動脈やその末梢血管の血流に影響を与えることから、本研究では MRI を用いて内耳やその栄養血管の描出を試みるとともに、AICA 血流動態と内耳病変との関係について検討を行った。

B. 対象と研究方法

1. 3.0T MRI を用いた内耳および内耳栄養血管撮影の試み

(対象) 健常ボランティア 12 名 (男性 8 例、女性 4 例、年齢 22~33 歳、平均 30.6 歳) を検討対象とした。

(方法) MRI 検査は共同研究施設である貞本

病院にて行った。MRI 画像は、GE Healthcare 社 Signa EXCITE (3.0T) を用いて撮影した。撮影モードは TOF-SPGR 法とし、スライス厚 1.0mm の thin slice、オーバーラップ 2.0mm の条件で axial 画像の取り込みを行った。MRI 画像の 3D-MRI への処理には GE 横河メディカル社の画像処理ソフト Voxeltool 3.0, 64u を用いた。

2. 3D-MRA による AICA の検討

(対象) 上記の健常ボランティア 12 例 24 耳と 2005 年 10 月から 2006 年 12 月までの期間に同病院耳鼻咽喉科を受診し、初診時の問診および聴力検査で突発性難聴と診断された 24 例 48 耳 (男性 11 例、女性 13 例、年齢 17 ~ 73 歳、平均 53.0 歳) を検討対象とした。

(方法) 上記 3.0T-MRI を用いて撮影した画像データから処理ソフトで 3D-MRA 像を作成し、得られた AICA の形状を健側と患側で比較した。

C. 研究結果

1. 3.0T MRI を用いた内耳および内耳栄養血管撮影の試み (結果) 3D-MRI では内耳の形状を描出することは可能であったが、内耳動脈の描出には至らなかった (図 1)。3D-MRA では椎骨・脳底動脈から前下小脳動脈までは十分に描出可能であった (図 2)。

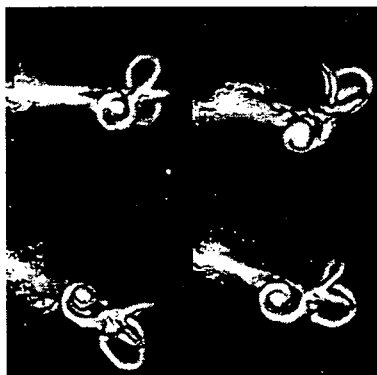


図 1

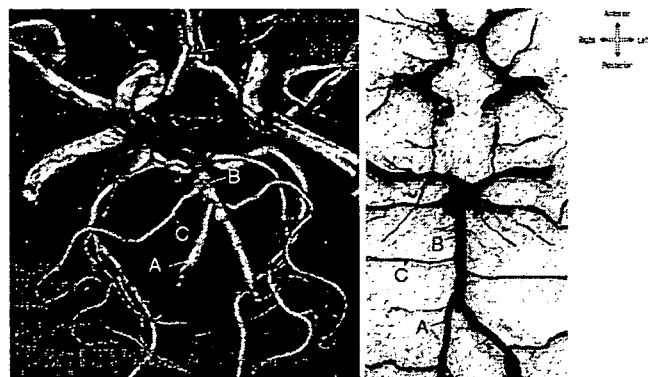


図 2

2. 3D-MRA による AICA の検討

(結果) 3D-MRA による AICA 異常像は、片側 AICA の描出不可 (図 3-A)、狭窄像 (図 3-B)、対側に比して明らかに細い血管像 (図 3-C) に分類された。これらの異常像は健常群では 3 例 (12.5%) 3 耳、突発性難聴群では 19 例 (79.2%) 23 耳にみられた。突発性難聴群において、健側の異常像は 7 例 (29.2%) であったが、患側は 16 例 (66.7%) と有意に多く ($p < 0.01$)、突発性難聴と AICA 異常像との関連が示唆された (表 1)。

なお、一部の症例で前下小脳動脈から内耳動脈 (迷路動脈) が分枝する部位が同定できたが、詳細な分析は不可能であった (図 4)。

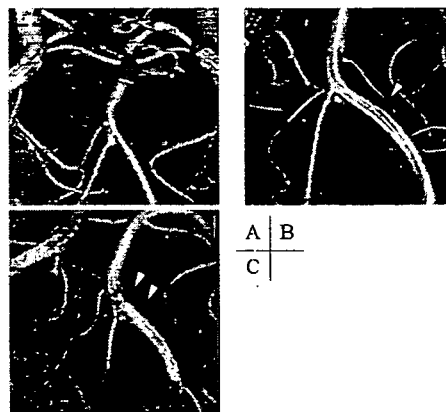


図 3

突発性難聴例 (24例)

| | | | | | | (耳数) | |
|-------|-------|-------|-------|--------|------|-------|-------|
| 同定不可 | | 狭窄 | | 著明な左右差 | | 計 | |
| 患側 | 健側 | 患側 | 健側 | 患側 | 健側 | 患側 | 健側 |
| 5 | 4 | 8 | 3 | 3 | 0 | 16 | 7 |
| (21%) | (17%) | (33%) | (13%) | (13%) | (0%) | (67%) | (29%) |

コントロール (12例)

| | | | | | | (耳数) | |
|-------|------|------|------|--------|------|-------|------|
| 同定不可 | | 狭窄 | | 著明な左右差 | | 計 | |
| 患側 | 健側 | 患側 | 健側 | 患側 | 健側 | 患側 | 健側 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| (13%) | (0%) | (0%) | (0%) | (0%) | (0%) | (13%) | (0%) |

表 1



図 4

D. 考察

近年の MRI の普及に伴い、突発性難聴の病態も徐々に解明されつつある。中島ら⁴⁾は、問診にて突発性難聴を疑った症例に MRI を撮影したところ、10.7%に難聴の原因と考えられる異常が認められたと報告している。突発性難聴では内リンパ嚢が MRI で造影される割合が健側に比して高く、3D-FLAIR (fluid attenuated inversion recovery) 画像で患側内耳に高信号が認められることも少なくない。このような所見は血液迷路関門の破綻やウイルス感染、内リンパ血管系の鬱血など

何らかの病変の存在を意味するが、これらがどのように病態と関連しているかなどは分かっていない。今回の 3.0T MRI を用いた突発性難聴の検討ではこのような異常所見を示す例はなかった。

一方、3D-MRA による検討では AICA の異常所見が多くの症例で認められた。MRA は血管内血液の移動による信号の違いを画像化したものであり、血流が極端に遅い血管では描出不良となる。このため実際には血流が保たれていても、MRA 画像上は血液移動の信号が見られず、血管はあたかも閉塞しているように描出される。すなわち MRA の血管閉塞像は必ずしも実際の血管閉塞を意味しない。しかし、MRA で認められた血管異常像は少なくとも血流低下や乱流の存在を示すものであり、今回の AICA の検討でも間接的に内耳虚血病変との関連が示唆された。

血管病変の診断には MRI の 2 次元画像より血管自体を連続的に描出する 3 次元画像の方が優れている。しかし現在の MRI は、通常の血管造影法と比較しても空間分解能が低く、迷路動脈のような細い血管を鮮明に描出することは困難であり、病変診断が可能なレベルの 3 次元画像を得ることはできなかった。今後、MRI や MRA の技術がさらに進歩し、短時間で高解像度の血管像が得られるようになれば、内耳領域の詳細な血流動態の評価も可能となり、突発性難聴と虚血の関係もより明確になると推測される。

F. 研究発表

論文

1. Terashita T, Saito S, Miyawaki K, Hyodo M, Kobayashi N, Shimokawa T, Saito K, Matsuda S, Gyo K. Localization of

prosaposin in rat cochlea. Neuroscience Research. 57:372-378, 2007

学会発表

1. Gyo K. Topical hypothermia for idiopathic sudden sensorineural hearing loss. The 9th 2007 Japan-Taiwan Conference in Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery. 平成 19 年 11 月 9~10 日、仙台
2. Gyo K, Yoshida T, Fujita K, Takeda S, Hyodo J. Ischemic hearing loss and its underlying mechanisms. 26th Politzer Society Meeting. 平成 19 年 10 月 13~16 日、アメリカ
3. 兵頭 純、本吉和美、古田口裕、竹田将一郎、羽藤直人、暁 清文. 突発性難聴における MRA による AICA 描出に関する検討. 急性高度難聴に関する調査研究 平成 19 年度第 2 回研究報告会. 平成 20 年 2 月 9 日、東京
4. 兵頭 純, 暁 清文. めまいを伴う突発性難聴の MRA による前下小脳動脈の形態評価. 第 66 回日本めまい平衡医学会総会. 平成 19 年 11 月 14~16 日、大阪.
5. 兵頭 純、前谷俊樹、暁 清文、白馬伸洋. 突発性難聴に対するエダラボンの治療効果の検討. 第 52 回日本聴覚医学会総会. 平成 19 年 10 月 4~5 日、名古屋.
6. 竹田将一郎, 吉田 正, 藤田健介, 兵頭純, 羽藤直人, 暁 清文: 一過性虚血後の内耳に対する低体温の影響についての検討. 第 52 回日本聴覚医学会総会. 平成 19 年 10 月 4~5 日、名古屋.
7. Takeda S, Yoshida T, Hakuba N, Hyodo J, Fujita K, Hata R, Gyo K: Ischemic

tolerance in the cochlea. 26th Politzer Society. 平成 19 年 10 月 13~16 日、Cleveland, Ohio, USA.

8. 羽藤直人, 兵頭 純, 暁 清文, 篠森裕介, 白馬伸洋. 突発性難聴に対する内耳低温療法. 第 69 回耳鼻咽喉科臨床学術講演会. 平成 19 年 7 月 6~7 日、東京
9. 羽藤直人, 菰刈勇人, 暁 清文. 再生促進を目的とした顔面神経減荷手術 - 生体吸収性ゼラチンハイドロゲルを用いた b-FGF の徐放投与 -. 第 17 回日本耳科学術講演会. 平成 19 年 10 月 18~20 日、福岡

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・編集者など | 頁 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 |
|------|---------------------|---------------------------------|-------|------|-----|------|
| 中川隆之 | 内耳再生のストラ テジー | メディカルバイオ | 56-61 | オーム社 | 東京 | 2007 |
| 暁 清文 | 虚血性内耳病変の 発生機序と臨床 | 第108 日本耳鼻咽喉 科学会宿題報告モ ノグラフ | 1-135 | 愛媛大学 | 愛媛 | 2007 |

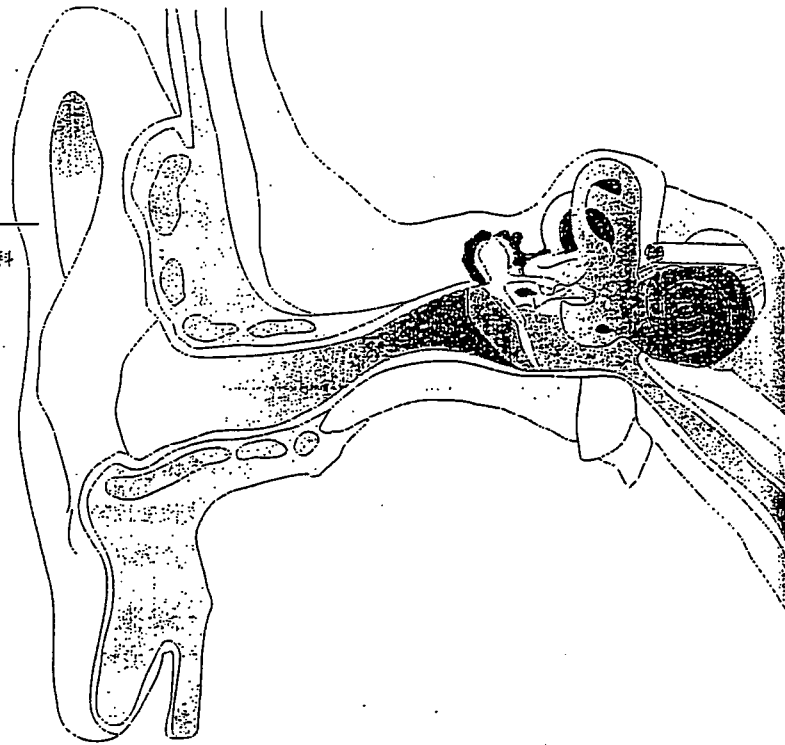
論文

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表雑誌名 | 巻号・頁 | 出版年 |
|---|---|------------------------|--------------|------|
| 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 |
| 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 |
| 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、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 |
| Terashita T, Saito S, Miyawaki K, Hyodo M, Kobayashi N, Shimokawa T, Saito K, Matsuda S, Gyo K. | Localization of prosaposin in rat cochlea. | Neuroscience Research. | 57:372-378 | 2007 |

内耳再生の ストラテジー

● 中川隆之 京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

内耳は、聴覚と平衡感を司る感覚器であり、側頭骨内に存在する骨で囲まれた器官である。哺乳類の場合、内耳の感覚細胞である有毛細胞や1次ニューロンであるラセン神経節細胞は、再生能力に乏しい。このため一度これらの細胞が障害を受けると感音障害が残る。発生学や分子生物学的な知見を利用して、これらの細胞を再生させようという試みが進められている。



内耳の解剖とその生理機能

内耳は、その複雑な形態から解剖学用語で「迷路」とよばれる。骨で囲まれた空間を骨迷路、その内部にある膜で囲まれた空間を膜迷路という。膜迷路は、リンパ液で満たされており、膜様の構造物で内リンパ腔と外リンパ腔に隔られている。

聴覚を司る蝸牛と平衡感を担当する前庭は、それぞれ特徴的な構造をもった感覚上皮を有し、それらには特有の感覚細胞である有毛細胞

が存在する。有毛細胞は、音響刺激などの機械的刺激を神経刺激に変換し、おのおのの1次神経節細胞に刺激を伝達する。このシグナルは第8脳神経を介して脳幹に伝えられる。脳幹で2次ニューロンに刺激が伝えられ、中枢に伝達され

図1

内耳障害のメカニズム
図は蝸牛の断面。内耳障害には主に①～③の原因が考えられる。

