

厚生労働科学研究費補助金
医療機器開発推進研究事業

ナノテクノロジーを用いたDDSによる耳鳴の克服

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 坂本達則
(京都大学大学院医学研究科)

平成21年(2009年)3月

厚生労働科学研究費補助金
医療機器開発推進研究事業

ナノテクノロジーを用いたDDSによる耳鳴の克服

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 坂本達則
(京都大学大学院医学研究科)

平成21年(2009年)3月

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
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	18
III. 研究成果の刊行物 別刷	21

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

研究者代表 坂本達則（京都大学大学院医学研究科）

研究要旨

耳鳴は多数の患者が存在し、耐え難い苦痛を伴う症状であるにもかかわらず、これまで確立した治療はなかった。局所麻酔薬リドカインの静注は耳鳴抑制効果はあるが持続せず、鼓室内注入では耳鳴抑制効果があるが激しいめまいを伴うので、治療として受け入れがたかった。我々は、リドカイン徐放製剤を作成し、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するというドラッグデリバリーシステムによってこれらの問題を解決して、耳鳴治療に応用する。また、耳鳴の原因となる難聴の治療として全身投与で用いられるステロイドについて、内耳での利用率改善を目的としてステルス・ナノ・ステロイドの使用を試みたところ良好な結果が得られた。

分担研究者

伊藤 壽一	京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授
田畑 泰彦	京都大学再生医科学研究所 生体組織工学研究部門 教授
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 講師
平海 晴一	京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教

本研究の目的は、内耳ドラッグデリバリーシステム(DDS)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

A. 研究目的

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という形でいくつもの病院を渡り歩く。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、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、リドカイン徐放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、濃度と持続時間を制御して、リドカインを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では、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。

本研究によって、期待される成果としては、これまで、耳鳴に対する積極的な治療は存在しなかったため、多数の国民にとって生活の質の低下の原因となっており、また治療方法を求めて医療機関を渡り歩く、いわゆる「ドクターショッピング」のきっかけにもなってきた。このために患者ばかりでなく医療者側の疲弊の大きな原因の一つでもあった。本研究で開発するリドカイン徐放製剤は、このような耳鳴に対して、安全性が高く、簡便で、確実性も高い新規治療を提供するものであり、国民の生活の質の向上、意味のない治療を反復させないことによる医療費の削減、医師・看護師の労働力などを含めた医療リソースの適正使用の効果が見込まれる。また、ナノテクノロジーやドラッグデリバリーといった技術を持つ企業の医療分野への進出を促進するという経済効果ももたらす。

B. 研究方法

すでに昨年度、リドカイン徐放PLGAマイクロパーティクル、ナノパーティクルを作成し、*in vitro*で徐放すること、*in vivo*ではモルモットの正円窓膜上に留置して蝸牛にリドカ

インを運搬できることを示した。これに引き続いての研究を行う。マイクロパーティクルの作成については、oil-in-water法で行い、表のようなパラメータで作成した。モルモットは体重250~300gのメスの動物を使用した。

本年度は、これに平行してステロイド徐放パーティクルによる難聴治療についても検討した。

1. 徐放製剤の改善

徐放製剤の操作性を改善するため、コンポジット化の工夫を行った。動物（モルモット）およびヒト側頭骨での実際の操作において、粉末パーティクル、りん酸バッファーに浮遊させたもの、ゼラチンスポンジ、ゼラチンハイドロゲルとの混合物などを作成して、投与の操作性について検討した。

また、極細径内視鏡のサイドチャンネルを通じて注入可能な製剤を試みるため、2%キシロカインゼリー®（アストラゼネカ、カルボキシメチルセルロースNaを添加物として含有）とその希釈物について、実際に極細径内視鏡を通しての注入を試みた。2倍、4倍、8倍希釈の2%キシロカインゼリーを用いて、サイドチャンネルのアダプター部分にシュアプラグ延長チューブ®（テルモ、内径2.1mm、長さ20cm、用量0.7ml）を接続し、5ml、1mlの注射器で注入した。

2. パーティクル留置による有害事象評価

作成した数種類のパーティクルのうち、もっともリドカインを多く徐放する直径100 μ mのパーティクルを用いて有害事象評価を行った。

2.1. 聴力変化

全身麻酔下にモルモットの左の正円窓窩に直径100 μ mのリドカイン徐放PLGAパーティクルまたはリドカインを含まないPLGAパーティクル2.5mgを留置し、1, 7, 14日後の聴性脳幹反応（ABR）閾値（V波の出現とする最小音圧）の変動について評価した。

2.2. めまい

めまいの評価は、眼振の発現で行った。また、深麻酔では眼振が出にくいいため、ガス麻酔（セボフルレン®）で留置手術を行った。モルモットにセボフルレンを吸入させ、麻酔が得られた後、モルモットの正円窓窩に直径100 μ mのパーティクル2.5mgを留置。5分程度で覚醒するので、その後暗所にて赤外線カメラを用いて眼振の出現、方向、持続時間についての検討を行った。（n=16）

これに先立って、数種類のリドカイン水溶液を用いてゼラチンスポンジに含浸させ、モルモットの正円窓窩に置くことで暗所にて眼振が発現することを確認した。また、同様にリドカイン液含浸ゼラチンスポンジを留置して15分後に蝸牛を摘出し、蝸牛頂回転から外リンパ液を採取して液体クロマトグラフィーにてリドカイン濃度を推定した。

2.3. 局所炎症

全身麻酔下にモルモットの正円窓窩に直径100 μ mのリドカイン徐放PLGAパーティクル2.5mgを留置、または対照群として手術操作のみで留置を行わなかった動物を、7日後に屠殺、蝸牛を取りだし、4% PFAで室温で3時間固定後、3 μ mの厚さの蝸牛軸と平行な面で切ったパラフィン切片を作成した。蝸

牛中央を通る5切片を選び、組織学的評価を行った。ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、パーティクルを留置した正円窓膜から1 mm以内の中耳粘膜に存在する炎症細胞数を計数した。

3. 耳鳴モデル動物での治療効果

げっ歯類を用いて、音響暴露、またはサリチル酸投与によって耳鳴を誘発することが出来る。また、耳鳴の検出は、脳幹レベルである分子の発現量の変化が見られること、動物の条件付けモデルを用いた実験系がある。現在、Knipper教授（ドイツ、Tubingen）において、これらの耳鳴実験系が使用可能であるため、我々の作成したリドカイン徐放パーティクルをこれらの動物に留置して耳鳴抑制効果を検証している。

4. ヒト側頭骨標本における検討/ヒトにおける投与モデル

ヒト側頭骨標本を用いて、細径中耳内視鏡を用いて経鼓膜的に正円窓窩とその中の正円窓膜を確認し、ここにPLGAパーティクルを留置した。コンポジット型のパーティクルを想定し、パーティクルのみ、りん酸バッファーに浮遊させたパーティクル、ゼラチンスポンジ、ゼラチンハイドロゲルなどを用いて留置を行って操作性を検証した。

5. 臨床試験

京都大学医学部附属病院探索医療センターの支援のもと、同病院倫理委員会に提出する第1・2相臨床試験プロトコルを作成している。

現時点では、感音難聴を伴い、3ヶ月以上持続している片側性慢性耳鳴症例を対象と

し、プロトコル治療としては鼓膜切開を置いて細径中耳内視鏡で正円窓膜を確認してゼラチンスポンジと混合したリドカイン徐放マイクロパーティクルを留置する。単回投与を行い、一次エンドポイントは自覚的な耳鳴の改善の有無とその持続時間、二次エンドポイントは耳鳴スコア（THI）の改善、めまい等の有害事象の出現とする予定である。

6. ステロイド徐放パーティクルによる難聴治療

ステロイドは急性感音難聴の急性期に標準的に用いられている治療薬である。通常、全身投与で用いられるが、内耳の血流がきわめて限られていること（ヒトの場合、心拍出量の1/1000000）、血液-内耳関門の存在などのため、全身投与薬剤の内耳での利用率は非常に低いと考えられ、そのため、ステロイドを大量に使用することになり、ステロイドの副作用に拍車をかけることに繋がっていると考えられる。我々は以前、通常のPLGANANOパーティクルを内耳治療に用いることが出来るかを評価するため、蛍光色素入りのげっ歯類で蛍光色素入りナノパーティクルを静注して、蝸牛への集積を観察したところ、ほとんど見られず、大部分が肝臓や脾臓に捕捉された。これに対して、今回、ポリエチレングリコール（PEG）のコーティングを持ったナノパーティクル（ステルス型ナノパーティクル、慈恵医科大学DDS研究所檜垣恵先生提供）による治療の可能性を検討した。

6.1. ステルス型ナノパーティクルの蝸牛への分布

音響外傷（8KHzバンドノイズ、120dB 2時間）を与えたマウス（4-6週令、オス）に尾静脈からローダミンB封入ステルスナノパーティクルを静注し、経時的に組織採取を行った。組織は固定後切片化して蛍光顕微鏡で観察した。

6.2. ステロイド封入ステルス型ナノパーティクル（ステルス・ナノ・ステロイド）投与後の蝸牛内ステロイド濃度

音響外傷後のマウスにベタメサゾン封入ステルス型ナノパーティクルを尾静脈から静注し、1時間後、12時間後に蝸牛を採取、ホモジナイズして組織内のベタメサゾン濃度を時間分解蛍光イムノアッセイ法（Time-resolved fluoroimmunoassay）にて測定した。

6.3. ステルス・ナノ・ステロイドによる音響外傷後の聴力改善

音響外傷後のマウスにステルス・ナノ・ステロイドを静注し、聴力の改善をABR閾値の改善で評価した。対照群として、生食静注群、等価量のベタメサゾン投与群を用いた（各群、n=4）

6.4. ステルス・ナノ・ステロイドによる音響外傷後の有毛細胞保護効果

音響外傷後のマウスにステルス・ナノ・ステロイドを静注し、蝸牛コルチ器を採取し、残存有毛細胞数を評価した。

7. 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う。臨床試験については、本学の医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。

C. 研究結果

1. 徐放製剤の改善

リドカイン徐放マイクロパーティクルを様々な物性のものと組み合わせて、操作性を検討したところ、粉末のパーティクルそのままでもモルモット、ヒトで正円窓窩に留置することは可能であった。モルモットは2.5mgのパーティクルを留置した（n>20）が、留置できない例はなかったが、容易に正円窓窩から脱落した。ヒトについては下記に別に述べる。りん酸バッファーに浮遊させたものは留置までに沈殿して有効に操作できなかった。ゼラチンスポンジ、ゼラチンハイドロゲルとの混合については、操作性に大きな差はなく、どちらも2.5mgのパーティクルを留置するのに問題はなかった。

細径中耳内視鏡のサイドチャンネルから粘性物質の注入では、生食では注入に全く問題はなかったが、2~8倍希釈の2%キシロカインゼリーでは、徒手的に注入するのは困難であった。

2. パーティクル留置による有害事象評価

2.1. 聴力変化

リドカイン徐放パーティクル留置群では、リドカインを含まないパーティクル留置群に比べて術後7日目のABR閾値が一時的に有意

に上昇していた。他の1日目、14日目には有意な差は見られなかった。(図1)

2.2. めまい

パーティクル留置術後、覚醒した時点から2時間後まで眼振の出現はなく、術後1、3、7日の時点でも眼振の出現はなかった。

リドカイン含浸ゼラチンスポンジを正円窓膜に留置した場合、全例に覚醒直後には術側に向かう水平成分を含む眼振が見られた。低濃度リドカイン留置群では約12分で眼振は停止したが、高濃度留置群ではその後反対側に向かう水平成分を含む眼振に変化し、2時間経過後もまだ持続していた。(表1)

リドカイン含浸ゼラチンスポンジ留置15分後の蝸牛外リンパでのリドカイン濃度測定では、1%リドカイン留置後では 1.1×10^4 ng/ml、2%リドカイン留置後では 1.7×10^4 ng/mlのリドカインが検出された。

2.3. 局所炎症

リドカイン徐放パーティクル留置後の局所炎症所見では、内耳(蝸牛内)には炎症所見を思わせる変化は見られなかった。パーティクル留置部位である中耳の正円窓膜周辺については、軽度の粘膜浮腫が見られ、1例のみ軽度の炎症細胞浸潤が見られた。リンパ球、好中球、形質細胞数について、第三者が計数したが、パーティクル留置群と手術のみ施行群で有意な差は見られなかった。(図2)

3. 耳鳴モデル動物での治療効果

現在進行中である。

4. ヒト側頭骨標本における検討/ヒトにおける投与モデル

ヒト側頭骨標本を用いて、細径中耳内視鏡で経鼓膜的に正円窓窩を確認することは全例問題なく可能であった(8耳)。正円窓窩には正円窓膜の表面に偽膜が存在する場合があることが報告されているが、今回検討した標本には見られなかった。

PLGAパーティクルの留置では、粉末のパーティクルのままでも留置できたが、安定性が悪い印象であった。りん酸バッファーに浮遊させた場合、留置前に沈殿するため留置できなかった。ゼラチンスポンジまたはゼラチンハイドロゲルとの混合については、どちらも操作性に大差なく、問題なく正円窓膜上に留置できた。このとき留置したパーティクル量はそれぞれ10 mgであるが、どの例でも問題なく留置できた。

5. 臨床試験

現在、プロトコル作成中である。

6. ステロイド徐放パーティクルによる難聴治療

6.1. ステルス型ナノパーティクルの蝸牛への分布

ローダミンBを封入した古典的なナノパーティクルでは蝸牛にほとんど集積がないのに対し、ローダミンB封入ステルスナノパーティクル静注では、15分後から24時間後まで蝸牛(特に血管条)に蛍光が検出された。

(図3)

6.2. ステロイド封入ステルス型ナノ パーティクル（ステルス・ナ ノ・ステロイド）投与後の蝸牛 内ステロイド濃度

ベタメサゾン静注群では蝸牛でほとんどステロイドが検出されないのに対して、ステルス・ナノ・ステロイド静注では、1時間後でも12時間後でも蝸牛でステロイドが検出された。肝臓でも濃度測定を行ったところ、肝臓ではベタメサゾンは濃度が低下し、分布は遷延した。（図4）

6.3. ステルス・ナノ・ステロイドに よる音響外傷後の聴力改善

ステルス・ナノ・ステロイド投与群では、ステロイド投与群、生食投与群と比較して、有意に良好な聴力改善が見られた。（図5）

6.4. ステルス・ナノ・ステロイドに よる音響外傷後の有毛細胞保護 効果

ステルス・ナノ・ステロイド投与群では、ステロイド投与群、生食投与群と比較して、有意に有毛細胞が多く残存しており、有毛細胞保護効果が強いと考えられた。（図6，7）

D. 考察

1. 徐放製剤の改善

いくつかの形状の徐放製剤について、その操作性を評価したが、その中ではゼラチンスポンジあるいはゼラチンハイドロゲルとの組み合わせが最も理にかなっていると考えた。昨年の実験ですでにリドカインはゼラチンハイドロゲルと結合しないことをしめしており、ゼラチンハイドロゲルを用いることによ

る徐放性能の変化はないと考える。また、昨年のin vivo徐放実験でもゼラチンハイドロゲルと混合したリドカイン徐放マイクロパーティクルを用いて検証しているが、今後もこの系を中心に実験に用いて行く。

臨床に用いる場合でもゼラチンスポンジはすでに手術材料や止血材料として広く用いられており、またゼラチンハイドロゲルも様々な形で用いられているため、問題はない。ただ、より簡便な正円窓膜上への投与を考えると、細径中耳内視鏡のサイドチャンネルから注入することが出来て、正円窓膜上でゲル化するような製剤であればより望ましいと考える。

2. パーティクル留置による有害事象評価

聴力については、7日後で一時的に低下している。手術操作などに問題があったり、リドカイン徐放パーティクルが急性障害を起こすようなのであれば、術後7日目のみの聴力低下では潜時が長すぎて矛盾する。また、リドカイン自体は代謝の早い薬剤で、パーティクルに内包されていなければ急速に分解されるものである点も矛盾する。この術後7日目のみの聴力低下については再検討を要すると考えている。今回のデータからは聴力への重篤な急性期障害はないということは示されている。

めまいについては、末梢性めまいの指標となる眼振を暗所・赤外線カメラにて評価したが、リドカイン徐放パーティクルの留置では眼振を検出することはなかった。

別に行ったリドカイン液含浸ゼラチンスポンジ正円窓膜上留置による含浸の評価では、

最初に術側向きの眼振が見られ、その後反対側向きの眼振に変化している。初期の眼振は低濃度のリドカインでも検出されており、蝸牛への何らかの物理的刺激や浸透圧の影響などを考える方が妥当である。その後の反対向きの眼振は、低濃度のリドカインでは出現せず、高濃度で出現していることも考えると、リドカインの薬理作用で惹起された可能性が高い。このときのリドカイン濃度を測定しているので、いかなる薬理作用によるものかは今後検討したい。

3. 耳鳴モデル動物での治療効果

耳鳴の動物実験は、耳鳴が自覚症状であるという根本的な問題から容易ではない。Knipper教授の脳幹におけるある分子の発現変化は耳鳴の急速な治療効果については評価が難しいが、客観的にわかりやすい形で評価することの出来るという点からは治療効果のある薬剤をスクリーニングするという目的にはかなっている。行動モデルでは、検査音（模擬的な耳鳴音）と共に足底の電流刺激が停止してえさにたどり着けるという条件付けを行うもので、多数の動物で実験を行うことは出来ないので、スクリーニングで効果が見られたものについて行動モデル実験を行うという段階を踏んでいる。

4. ヒト側頭骨標本における検討/ヒトにおける投与モデル

ヒト側頭骨標本を用いて、細径内視鏡による正円窓窩へのアプローチを行ったが、耳科手術の経験者であれば容易な手技で、ゼラチンスポンジと混合した 10 mg のパーティクルを留置するという目的は問題なく達成でき

ると考える。また、先に我々の研究室で別に行っている臨床試験（「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」）では、同じ細径内視鏡を用いて、ゼラチンハイドロゲルによる徐放製剤を正円窓膜上に留置しているが、手術手技で問題になった症例は現在までにない。これらを踏まえて、第1・2相臨床試験では、細径内視鏡を用いてゼラチンスポンジとの混合物留置をプロトコル治療として採用する。

5. 臨床試験

耳鳴モデル動物における治療効果が実証されていないが、耳鳴の抑制を動物実験で確実に示すことは根源的に無理のあることであるため、リドカイン徐放パーティクルの効果についてはヒトへの投与でしか最終的には評価できないと考え、臨床試験を行うこととした。安全性という点では、今回使用するものに含まれる材料と有害事象評価の範囲で問題ないと考えている。すなわち、PLGAは外科用吸収性縫合糸の材料としてすでに広く用いられているものであり、ゼラチンスポンジも止血材料や外科手術材料として用いられている。また、今回パーティクルを留置する中耳は、鼓膜切開を伴う部位ではあるが、咽頭と連続する体外の空間であり、投与経路としては粘膜への塗布と変わらない。

臨床試験を行うにあたっての問題点の一つは対照群の設定である。小さいとはいえ、鼓膜切開という侵襲を伴うプロトコルであるため、空のパーティクルを用いるというコント

ロールを置くことは倫理的に難しい。ヒストリカルコントロールを用いるなど、今後プロトコル策定の経過で検討が必要である。

6. ステロイド徐放パーティクルによる難聴治療

古典的なナノパーティクルでは蝸牛への分布はほとんど見られず、そのままでは内耳疾患の治療に応用することは困難と考えられたが、今回用いたステルス型ナノパーティクルは蝸牛の血管条では分布が見られた。このパーティクルの分布が問題となっている血液・内耳関門を通過しているかという点については評価が難しい。なぜなら、今回分布が見られた部分は血管条で、血管壁のどの層にパーティクルが分布したかまでは評価できていないからである。しかし、今回のようなステロイド徐放を目的とする場合、仮にパーティクルが血液・内耳関門を超えていなくても、徐放したステロイドが内耳局所で長時間高濃度に保たれるなら目的は達成されていると考える。実際、ステルス・ナノ・ステロイド投与後の蝸牛内ベタメサゾン濃度を測定して、高い濃度が保たれていることを確認している。

治療効果については、ステロイド単独投与や生食投与よりも難聴治療効果が高く、組織学的には有毛細胞保護効果が強いと言うことはこれを裏付けている。

E. 結論

リドカイン徐放パーティクルについて、有害事象評価を含めた前臨床試験を行った。動物を用いた有効性評価は現在進行中で、ヒト

における安全性・有効性を確認するための臨床試験プロトコルを作成中である。

ステロイド徐放パーティクルは、同等量のステロイド投与や生食投与群に比べて、音響外傷後の聴力を有意に改善した。

F. 健康危険情報

現時点で、健康危険情報とすべきものは得られていない。

G. 研究発表

1. 著書

- 1) 中川隆之、伊藤壽一. 第2章 生体シグナル因子の利用 1. 細胞増殖因子 MOOK 13号 臨床再生誘導治療2009 患者までとどいている再生誘導治療 田畑泰彦編 メディカル ドウ 大阪 2009
- 2) 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、774-779頁、羊土社、東京、2008

2. 論文発表

- 1) Inaoka T, Nakagawa T, Kikkawa YS, Tabata Y, Ono K, Yoshida M, Tsubouchi H, Ido A, Ito J., Local application of hepatocyte growth factor using gelatin hydrogels attenuates noise-induced hearing loss in guinea pigs., *Acta Otolaryngol.* 2009 Feb 13:1-5.
- 2) Ogita H, Nakagawa T, Lee KY, Inaoka T, Okano T, Kikkawa YS, Sakamoto T, Ito J., Surgical invasiveness of cell transplantation into the guinea pig cochlear modiolus., *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2009;71(1):32-9.
- 3) Hiraumi H, Nakagawa T, Ito J., Efficiency of a transtympanic approach to the round window membrane using a microendoscope., *Eur Arch*

- Otorhinolaryngol. 2009 Mar;266(3):367-71. Epub 2008 Jul 19.
- 4) Matsumoto M, Nakagawa T, Kojima K, Sakamoto T, Fujiyama F, Ito J. Potential of embryonic stem cell-derived neurons for synapse formation with auditory hair cells. *J Neurosci Res.* 2008 Nov 1;86(14):3075-85.
 - 5) Hori R, Nakagawa T, Sugimoto Y, Sakamoto T, Yamamoto N, Hamaguchi K, Ito J. Prostaglandin E receptor subtype EP4 agonist protects auditory hair cells against noise-induced trauma. *Neuroscience* in-print.
 - 6) Kada S, Nakagawa T, Ito J. A mouse model for degeneration of the spiral ligament. *J Assoc Res Otolaryngol* 2009 Feb 11.
 - 7) Nakagawa T, Ito J. Local drug delivery to inner ear for treatment of hearing loss. *Current Drug Therapy* 3: 143-147, 2008.
 - 8) 中川隆之 内耳疾患の治療をめざして—基礎研究の最前線—薬物の経正円窓投与—日耳鼻 111:655-663, 2008.
- ### 3. 学会発表
- 1) Hamaguchi K, Nakagawa T, Hori R, Yamamoto N, Sakamoto T, Ito J. Prostaglandin E receptor agonists stimulate production of vascular endothelial growth factor in the mouse cochlea. The 32nd Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology. Baltimore, Maryland, USA, Feb. 14-19, 2009
 - 2) Horie R, Nakagawa T, Sakamoto T, Tabata Y, Ito J. Attenuation of tinnitus; Novel strategy using inner ear drug delivery system. 第18回耳科学会、平成19年10月16日-18日、神戸
 - 3) Horie R, Sakamoto T, Nakagawa T, Ito J. Efficacy of Stealth Nano-Particles Encapsulating Betamethasone for Attenuation of Noise Induced Hearing Loss in Mice. The 32st Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology. Baltimore, Maryland, USA, Feb. 14-19, 2009
 - 4) Horie R, Sakamoto T, Nakagawa T, Tabata Y, Ito J. Attenuation of tinnitus: A Novel strategy using inner ear drug delivery system. The 45th Inner Ear Biology. Ferrara, Italy, Sep. 21-24, 2008
 - 5) Horie R, Sakamoto T, Nakagawa T, Tabata Y, Ito J. Controlled release of lidocaine into the cochlea via biodegradable materials. XXIII Barany Society Meeting, Kyoto, Japan, Mar. 31-Apr 4, 2008
 - 6) Kada S, Nakagawa T, Ito J. Animal Model for Regeneration of Cochlear Lateral Wall. The 25th Barany society meeting Kyoto, Japan, Mar. 31-Apr. 3, 2008
 - 7) Kada S, Nakagawa T, Ito J. Functional Regeneration of the Spiral Ligament by Cell Transplantation in Mice. The 32nd Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology. Baltimore, Maryland, USA, Feb. 14-19, 2009
 - 8) Nakagawa T. Future stem cell therapy for sensorineural hearing loss. The 1st International Conference on Hearing: Stem Cells Therapeutic Perspectives. Rome, Italy, May 10, 2008
 - 9) Nakagawa T. Inner Ear Drug Delivery System: From the Bench to the Clinic. Pharmacophysiological approach. The 25th Barany Society Meeting. Kyoto, Japan, April 2., 2008
 - 10) Nakagawa T, Hiraumi H, Sakamoto T, Kikkawa Y, Lee KY, Okano T, Hori R, Ono K, Tabata Y, Hato N, Gyo K, Ito J. Novel therapy for hearing loss: Delivery of insulin-like growth factor-1 to the cochlea by gelatin hydrogels. The 12th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. Nara, Japan, April 3-5, 2008
 - 11) Nakagawa T, Kada S, Ito J. The potential of cell therapy for hearing loss caused by degeneration of the spiral ligament. The 45th Workshop on Inner Ear Biology. Ferrara, Italy, September 21-24, 2008
 - 12) Nakagawa T, Kikkawa YS, Horie RT, Ito J. Hydrogen rescues auditory hair cells from reactive oxygen species. The 32nd Midwinter Meeting of

- Association for Research in Otolaryngology. Baltimore, MA, USA, Feb. 15, 2009
- 13) Nakagawa T, Ono K, Kojima K, Matsumoto M, Kawauchi T, Ito J. RNA interference of p27kip1 induces proliferation of post-mitotic supporting cells in mouse auditory epithelia. Cell replacement in the inner ear. Bethesda, MD, USA, June 13-15, 2008
- 14) Ogita H, Nakagawa T, Inaoka T, Sakamoto T, Ito J. Transplantation of Bone-Marrow Stromal Cell-Derived Neural Progenitors for Regeneration of The Spiral Ganglion Neurons. The 45th Inner Ear Biology Workshop, Ferrara, Italia, Sep. 21-24, 2008
- 15) Sakamoto T, Horie R, Nakagawa T, Tabata Y, Ito J. Treatment of Tinnitus by Lidocaine Using Inner Ear Drug Delivery. ARO 2009 MidWinter Meeting, Baltimore, 2009.2.14-2009.2.19
- 16) Sakamoto T, Nakagawa T, Horie R, Ito J, Tabata Y, Ishiara T, Higaki M. Inner Ear Therapies Against Hearing Impairment and Tinnitus Using Inner Ear Drug Delivery Systems. the Conference on Cell Replacement in the Inner Ear. Bethesda, MD /USA, 2008.6.12-2008.6.15
- 17) Sakamoto T, Nishimura K, Inaoka T, Nakagawa T, Ito J. Inner Ear Regeneration by Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells. 45th Inner Ear Biology Workshop (IEB2008), Ferrara, Italy, 2008.9.21-2008.9.24
- 18) Sekiya T, Matsumoto M, Kojima K, Ono K, Kikkawa YS, Nakagawa T, Viberg A, Canlon B, Ito J. Quantitative Evaluation of the Cochlea and Cochlear Nucleus after Auditory Nerve Compression. The 32nd MidWinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology. Baltimore, Maryland, USA, February 14-19, 2009
- 19) Yamamoto N, Ito J, Kelley MW. Nonmuscle Myosin II Regulates Cochlear Elongation through Regulation of Cell Size and Convergent Extension. 45th Inner Ear Biology Workshop, Ferrara, Italy, September 21st-24th, 2008
- 20) 嘉田真平、中川隆之、瀨川清海、伊藤壽一 The Recovery of Endocochlear Potentials by the Transplantation of Bone Marrow Stromal Cells in Mice. 第18回日本耳科学会 (English Session)、平成20年10月16日-18日、神戸
- 21) 吉川弥生、中川隆之、伊藤壽一 活性酸素理論に基づく内耳性難聴の病態モデル作成 第109回日本耳鼻咽喉科学会 平成20年5月17日-19日 大阪
- 22) 吉川弥生、中川隆之、伊藤壽一 蝸牛感覚上皮における水素ガスの活性酸素除去効果 第18回日本耳科学会 平成20年10月16日-18日 神戸
- 23) 坂本達則、堀江理恵、中川隆之、伊藤壽一. キシロカインによる内耳麻酔の評価. 第67回めまい平衡医学会. 秋田, 2008.10.29-2008.10.31
- 24) 坂本達則、堀江理恵、中川隆之、伊藤壽一. ステルス・ナノ・ステロイドによる音響外傷治療. 第18回日本耳科学会. 神戸, 2008.10.16-2008.10.18
- 25) 坂本達則. ナノテクノロジーを用いたDDSによる耳鳴の克服. ナノメディシン研究成果発表会. 東京. 2008.2.27
- 26) 坂本達則. ナノテクノロジーを用いたDDSによる耳鳴の克服. ナノメディシン研究成果発表会. 東京. 2009.2.25
- 27) 扇田秀章、中川隆之、稲岡孝敏、坂本達則、伊藤壽一 Regeneration of spiral ganglion neurons through transplantation of bone marrow stromal cells. 第18回日本耳科学会学術、平成20年10月16日-18日、神戸
- 28) 扇田秀章、中川隆之、坂本達則、稲岡孝敏、小島憲、伊藤壽一 骨髄間質細胞を用いたラセン神経節再生について 第109回日本耳鼻咽喉科学会、平成20年5月15日-17日、大阪
- 29) 中川隆之 薬物の経正門窓投与 内耳疾患の治療をめざしてー基礎研究の最前線 第109回日本耳鼻咽喉科学会 大阪 2008年5月16日
- 30) 中川隆之、小野和也、小島 憲、松本昌宏、伊藤壽一 p27 RNA干渉によるマウス蝸牛感覚上皮支持細胞の細胞分裂誘導 第18回日本耳科学会、平成20年10月16日-18日、神戸

- 31) 浜口清海、堀龍介、中川隆之、山本典生、伊藤壽一
PGE 受容体作動薬内耳局所投与による内耳保護効果
とその機序の検討 第18回日本耳科学会、平成2
0年10月16日-18日、神戸
- 32) 平海晴一、三浦誠、金丸眞一、坂本達則、伊藤壽一
既往疾患の突発難聴に対する影響 第70回耳鼻咽喉
科臨床学会、平成20年6月27-28日、長崎市
- 33) 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7回日本再生医療
学会、平成19年3月13日-14日、名古屋
- 34) 堀江理恵、坂本達則、中川隆之、岡村昇、田畑泰
彦、伊藤壽一。耳鳴治療薬の開発と内耳ドラッグデ
リバリーシステム(DDS)を用いた新戦略。第8回再生
医療学会。東京。2009.3.5-2009.3.6

- 35) 堀龍介 中川隆之 坂本達則 伊藤壽一 PGE受容
体作動薬内耳局所投与による内耳保護効果 第109
回日本耳鼻咽喉科学会 平成20年5月15日-17日、
大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（予定を含む）

検討中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

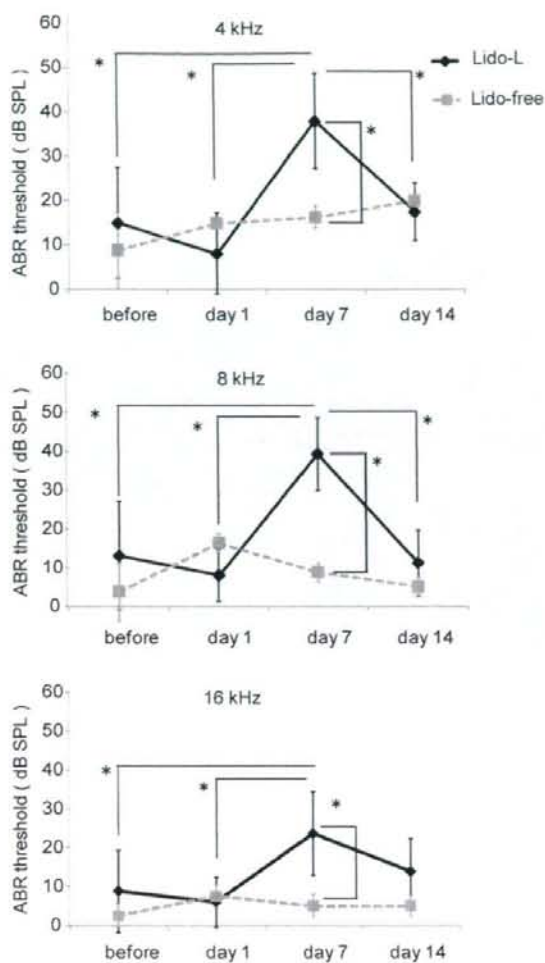


図1 リドカイン徐放パーティクル留置後のABR閾値変化

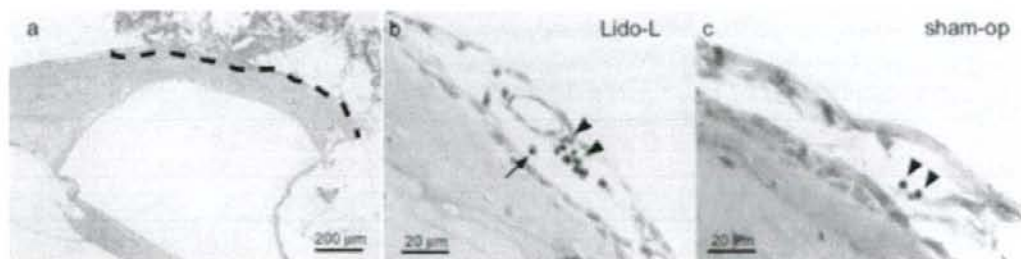


図2 リドカイン徐放パーティクル留置後の中耳粘膜の炎症

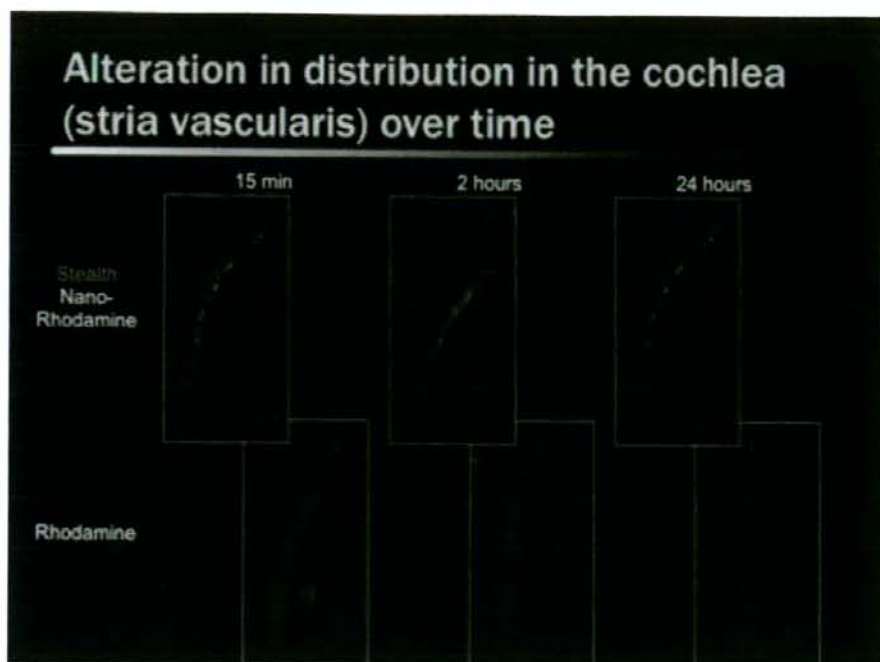


図3 ステルス型ナノパーティクルの蝸牛への分布
 ローダミン単独投与では蝸牛血管条にローダミンが検出されないが、ステルス・ナノ・ローダミン投与では蝸牛血管条に24時間後でも集積が見られる。

Betamethasone concentrations in tissues

- Stealth Nano-Steroid provided...
 - delayed uptake in the liver
 - higher concentration and prolonged delivery in the cochlea

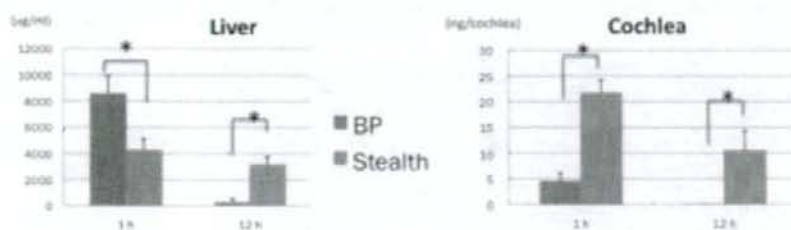


図4 ステルス・ナノ・ステロイド投与後の組織内ステロイド濃度

Better Hearing Recovery by Stealth Nano-steroid

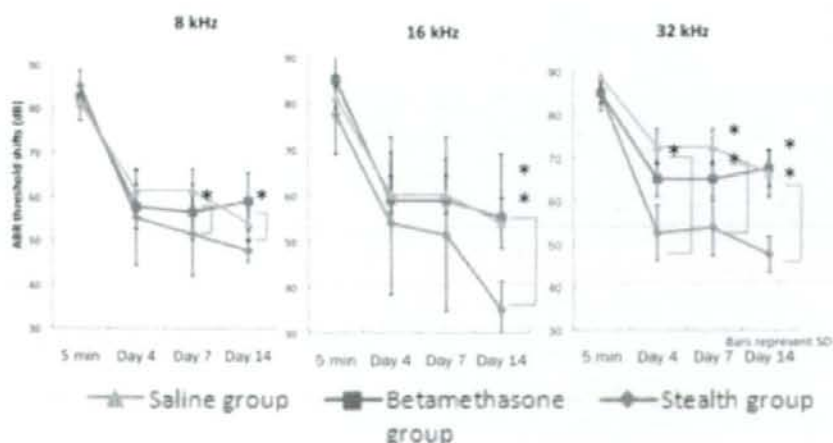


図5 ステルス・ナノ・ステロイド投与による音響外傷後の聴力改善

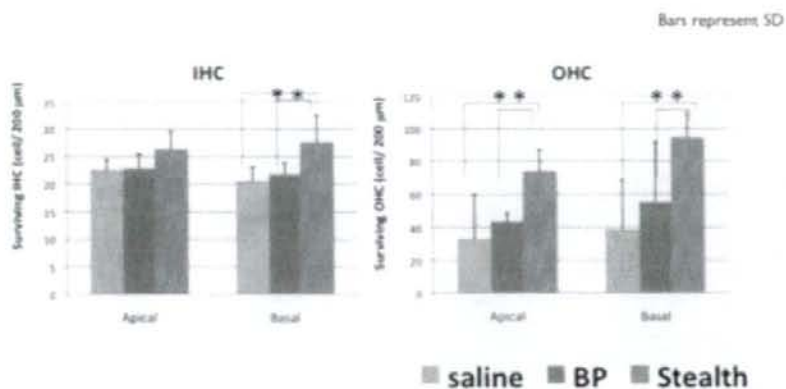
Preservation of hair cells

Cochlear basal turn after phalloidin staining



図6 ステルス・ナノ・ステロイド投与による音響外傷後の有毛細胞保護効果

Numbers of surviving hair cells



- Stealth Nano-Steroid showed significantly better survival

図7 ステルス・ナノ・ステロイド投与による音響外傷後の有毛細胞保護効果