

200828007A

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 20 年度総括・分担研究報告書

平成 21 年 3 月

研究代表者 中川 隆之

(京都大学医学部附属病院)

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 20 年度総括・分担研究報告書

平成 21 年 3 月

研究代表者 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

- 急性高度難聴に対する低体温保護効果の研究 14
 暁 清文、羽藤直人
従来 of 初期治療法による急性高度難聴の治療成績の検討 18
 熊川孝三

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 20

IV. 研究成果の刊行物 23

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

研究代表者 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、動物実験およびヒト側頭骨標本を用いた研究により、非臨床試験を完了した。平成 19 年度には、臨床試験デザインに必要な急性高度難聴に関する臨床統計を行い、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、急性高度難聴の病態解明に関連する臨床的研究および本治療法の適応拡大に関する基礎的研究を行った。平成 20 年度には、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 相臨床試験を実施し、17 症例の登録を行い、円滑に臨床試験を施行した。急性高度難聴治療開発に関する基礎的研究として、低体温保護効果の検討、肝細胞増殖因子およびプロスタグランジン E 特異的受容体作動薬局所投与による治療効果の検討、リドカイン徐放による耳鳴り抑制効果の検討を施行した。

研究分担者

伊藤 壽一
(京都大学大学院医学研究科)
坂本 達則
平海 晴一
山本 典生
(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)

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第一の目的とし、急性高度難聴およびその随伴症状である耳鳴りに対する新しい治療法の開発を行った。

B. 研究方法

1) 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 2 mm 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。聴力改善を厚生省特定疾患突発性難聴研究班が策定の突発性難聴・聴力回復の判定基準にて投与 12 週後に判定した。また、有害事象の発生率について検討した。

2) 従来の初期治療法による急性高度難聴の治療成績の検討

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の有効性を検討するためには、安全性、小症例での有効性の検証を目的とする第 I - II 相臨床試験に立脚した第 II 相臨床試験を行う必要がある。本研究では、虎の門病院耳鼻咽喉科に入院し、安静・点滴などの初期治療を施行した重症例 29 例の治療効果を解析することにより、第 II 相臨床試験の対象となる患者数を調べた。

3) 急性高度難聴に対する低体温保護効果の研究

スナネズミを用いた内耳虚血モデルを用い、虚血-常温群、虚血-低体温群、コントロール-低体温群の 3 群を作製し、聴性脳幹反応による聴力測定および蝸牛感覚上皮の組織学的解析を行った。虚血-低体温群は、虚血負荷から低体温状態までの時間、低体温

維持時間により4群に分けて検討した。

4) 急性高度難聴に対する肝細胞増殖因子の 治療効果に関する実験的研究

前年度の *in vitro* でのアミノ配糖体に対する防御効果および *in vivo* での音響外傷前投与による保護効果実験に引き続き、治療の効果の検討を目的として、音響外傷後に肝細胞増殖因子 (HGF) を生体吸収性ハイドロゲルにて内耳局所投与し、聴性脳幹反応にて聴力測定を経時的に行い、投与3週間後に蝸牛感覚上皮の組織学的解析を行った。実験動物としてモルモットを用い、4kHz, 120dB SPL octave band noise を4時間曝露し、1時間後に 20 μ g の HGF を含有するハイドロゲルを正円窓膜状に留置した。

5) 急性高度難聴に対するプロスタグラン ディンE受容体4作動薬投与の治療効果に 関する実験的研究

プロスタグランディンE1製剤は、本邦で広く急性高度難聴治療に用いられているが、その有効性に関する報告は一定せず、統計学的に有効性を証明した報告はない。プロスタグランディンE受容体は、EP1~EP4のサブタイプが同定されており、各々作用が異なり、EP2, 4とEP3の作用は拮抗することが知られている。したがって、それぞれのレセプター特異的作動薬を用いることにより、プロスタグランディンE1製剤で認められる治療効果を高めることができる可能性がある。各受容体作動薬の中で、神経細胞の保護効果が報告されているEP4作動薬に着目し、その内耳局所投与による急性高度難聴治療効果に対する基礎的研究を行った。モルモットを用いて、音響外傷 (4kHz, 120dB SPL octave band noise 4時間) に対する保護効果を調べ、マウ

スを用いて、蝸牛におけるEP4発現について解析した。

6) ポリグリコール乳酸を用いたリドカイン 徐放による耳鳴り抑制に関する実験的研究

感音難聴の多くには耳鳴りを伴うが、耳鳴りという症候に対する有効な治療法はなく、日常の耳鼻咽喉科臨床での大きな問題の一つとなっている。古くから、局所麻酔薬であるリドカインの全身投与および局所投与により耳鳴りが抑制されることが知られていたが、全身投与では不整脈、局所投与ではめまいという副作用が問題とされていた。最大の問題点は、耳鳴り抑制効果の持続時間がきわめて短いことであった。これらの問題を解決する方法として、リドカインの内耳への徐放を考え、リドカインを2週間以上徐放する能力のあるポリグリコール乳酸にリドカインを封入したマイクロパーティクルを作製し、中耳正円窓膜上に投与した場合の徐放プロファイルおよび有害事象についての研究を行った。実験動物としてモルモットを用いた。

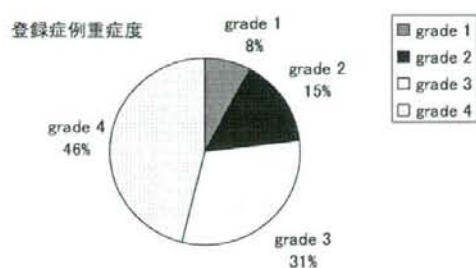
動物実験は、京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設および愛媛大学医学部の定める倫理規定に準じて行い、京都大学大学院医学研究科および愛媛大学医学部の動物実験委員会の承認を得て行ったものである。臨床研究については、京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会および愛媛大学医学部倫理委員会の承認のもとに研究を行った。また、臨床疫学的研究は、文部科学省、厚生労働省が定める疫学研究に関する倫理指針に準じて行った。

C. 研究結果

1) 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

これまでに 17 例の登録が完了し、13 例で投与 12 週後の聴力評価が完了した。男性 7 例、女性 6 例で、平均年齢は 49±12 歳であった。IGF1 投与を行った時期は、23±4 日と遅いタイミングであり、登録時の平均聴力は 80.3±25.4dB と高度障害例が中心であった。厚生省班研究の重症度分類では図 1 に示すごとく grade 3 以上の症例が 77%をしめた。

図 1 : 登録症例の重症度



IGF1 投与 12 週後の効果判定では不変 9 例、回復 4 例であり、有効度は 44%であった。有害事象としては、めまい、中耳炎、鼓膜穿孔について評価した。めまいは、76%の症例で認められたが、いずれも軽微なもので、すべての症例で投与 7 日以内に消失した。急性中耳炎は 2 例で認められたが、いずれも感冒の合併によるもので、抗生物質の投与により、治癒した。鼓膜穿孔の残存は認められず、全症例 4 週間以内に閉鎖した。

2) 従来の初期治療法による急性高度難聴の治療成績の検討

ステロイド投与 1 ヶ月目での初期治療の成績は厚生省班研究基準で検討した結果、

治癒	10 例	(34.5%)
著明回復例	8 例	(27.6%)

回復例	3 例	(10.3%)
不変	8 例	(27.6%)

であった。

3) 急性高度難聴に対する低体温保護効果の研究

虚血-常温群では虚血後 1 日目に約 30dB の ABR 閾値の上昇がみられ、その後徐々に回復したが 7 日目にも約 23dB の閾値上昇が残った。虚血-低体温群では閾値上昇は 1、4、7 日目いずれにおいても虚血-常温群より軽減されていた。7 日目の閾値上昇は約 11dB であり、虚血-常温群との間には有意な差が認められた ($p<0.05$)。虚血-低体温群 (15 分間虚血の 60 分後から 360 分間) では閾値上昇は 1、4、7 日目いずれにおいても虚血-低体温群 (15 分間虚血の 60 分後から 180 分間) よりさらに軽減されていた。7 日目の閾値上昇は虚血-常温群のそれとの間には有意な差が認められた ($p<0.01$)。虚血-低体温群 (虚血の 180 分後から 180 分間) では 7 日目の閾値上昇は約 16dB であったが、他の虚血-低体温群との間に有意な差は認められなかった。虚血-低体温群 (虚血の 180 分後から 180 分間) では閾値上昇は 1、4 日目ではむしろ虚血-常温群より増大している傾向にあり、7 日目の閾値上昇も約 21dB と虚血-低体温群 (15 分間虚血の 60 分後から 360 分間) のそれとの間に有意な差が認められた ($p<0.05$)。

基底回転内有毛細胞の脱落細胞割合 (7 日目は、虚血-常温群で約 16%、虚血-低体温群 (15 分間虚血の 60 分後から 360 分間) で約 5.1%、虚血-低体温群 (15 分間虚血の 60 分後から 180 分間) で約 7%、虚血-低体温群 (虚血の 180 分後から 180 分間) で約 10.1%、虚血-低体温群 (虚血の 180 分後か

ら 180 分間) で約 13.4% であった。虚血-常温群と虚血-低体温群 (15 分間虚血の 60 分後から 360 分間)、虚血-常温群と虚血-低体温群 (15 分間虚血の 60 分後から 180 分間) の間には統計学的な有意差が認められた ($p < 0.01$)。

4) 急性高度難聴に対する肝細胞増殖因子の治療効果に関する実験的研究

HGF 投与を受けた動物では、16 kHz、投与 21 日後において、有意に聴性脳幹反応閾値上昇が抑制されることが示された (図 2)。

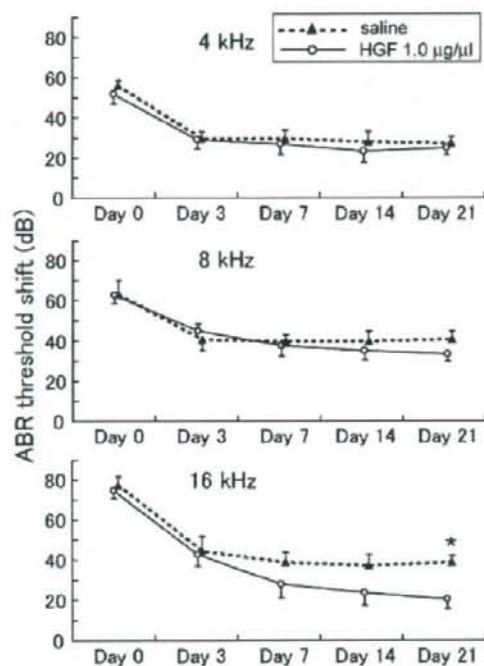


図 2 : 音響曝露後の聴性脳幹反応 (ABR) 閾値上昇の変化。

また、組織学的にも蝸牛の頂部から 60~80% の部位で外有毛細胞が有意に多く残存していることが示された (図 3)。

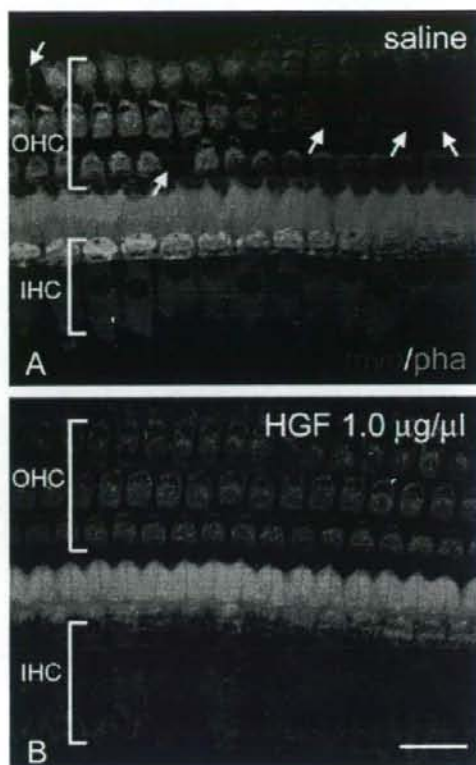


図 3 : 蝸牛基底回転部の組織像。HGF 投与を受けた蝸牛では外有毛細胞 (OHC) の喪失を認めないが、生食投与を受けたコントロールでは外有毛細胞の脱落が散見される (矢印)。

以上の結果から、音響外傷後に投与しても、HGF 内耳局所投与により蝸牛が保護され、聴覚改善が促進されることが明らかとなった。

5) 急性高度難聴に対するプロスタグランジン E 受容体 4 作動薬投与の治療効果に関する実験的研究

マウス蝸牛における EP4 発現について、RT-PCR および免疫染色での評価を行った。結果、RT-PCR にてマウス蝸牛における mRNA レベルでの EP4 発現が示され (図 4)、免疫染色でも蝸牛感覚上皮、ラセン神経節、ラセン靭帯、血管条での発現が認められた (図 5)。

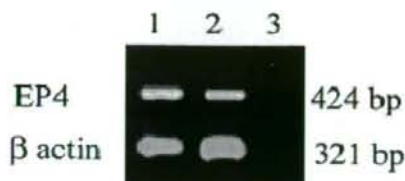


図4：列1はコントロールとした肺、列2は蝸牛、列3はネガティブコントロール



図5：マウス蝸牛におけるEP4免疫染色所見

モルモット音響外傷モデルでは、音響曝露前あるいは直後にEP4作動薬を局所投与した。音響曝露前投与では、4, 8, 16 kHz すべての周波数で有意に聴性脳幹反応閾値上昇が抑制されることが示された(図6 A-C)。一方、音響曝露後の投与では、16 kHz のみで有意の閾値上昇抑制が認められた(図6 D-F)。

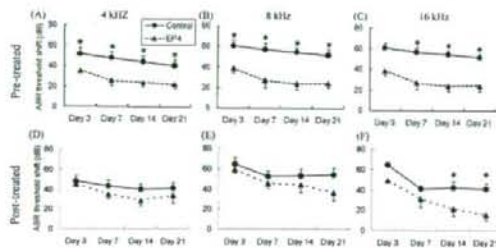


図6：音響曝露後の聴性脳幹反応閾値上昇の経時的変化

また、組織学的には、音響曝露前に投与を行った場合、残存外有毛細胞数に有意の差が認められたが、音響曝露後に投与を行った場合

には有意差は認められなかった。以上の結果より、蝸牛にはEP4が存在し、選択的にEP4を作動させることにより、従来のプロスタグランジンE製剤よりも、より効果的な治療が行える可能性が示唆された。

6) ポリグリコール乳酸を用いたリドカイン徐放による耳鳴り抑制に関する実験的研究

まず、リドカインを含有する2種類のポリグリコール乳酸マイクロパーティクルを作製した。外径5 μm の小さいサイズのパーティクルと外径100 μm の大きなサイズのパーティクルを作製した。第一にそれぞれの徐放特性を調べる目的で、in vitroでの徐放profileを調べた。結果、100 μm のパーティクルの方が長い期間安定して、リドカインを徐放することが示された(図7)。

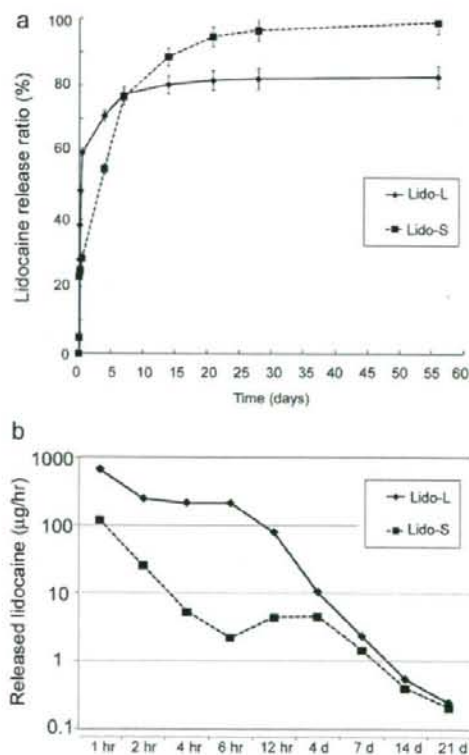


図7：リドカイン含有パーティクルのサイズ

による徐放特性の違い、Lido-L は、外径 100 μm の大きなサイズのパーティクルを示し、Lido-S 外径 5 μm の小さいサイズのパーティクルを示す。

次に、径 100 μm の大きなサイズのパーティクルをモルモット正円窓膜上に留置し、蝸牛外リンパへの *in vivo* での徐放を評価した。結果、投与 14 日後でも外リンパ中のリドカインは計測可能なレベルにあり、投与 1, 3 日目には、高濃度のリドカインが確認された (図 8)。

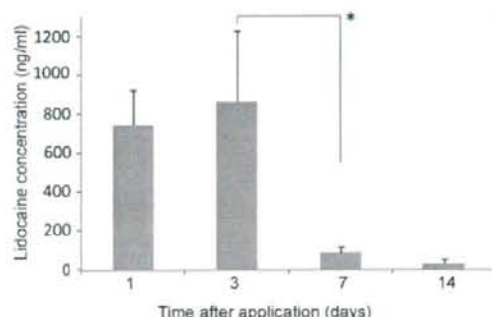


図 8 : リドカイン含有パーティクル正円窓膜上留置後の蝸牛外リンパ中のリドカイン濃度の経時的変化

有害事象については、眼振の発生およびその持続時間と中耳粘膜における炎症所見について評価した。2 あるいは 4% リドカイン液を局所投与した後には、強い眼振が観察されたが、リドカイン含有パーティクル投与後には眼振は全く観察されなかった。また、リドカイン含有パーティクル投与 7 日後の中耳粘膜における炎症細胞の浸潤をコントロールとしたシャムオペ動物と比較したが、有意の差は認められなかった。したがって、リドカイン含有パーティクル投与により、めまいや中耳炎が惹起される可能性はきわめて低い

と考えられた。

D. 考察

本研究課題の最終年度である平成 20 年度には、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 相臨床試験を施行した。本年度中に目標症例 25 例の登録を完了することを目的としたが、平成 20 年 3 月時点で 17 例の登録にとどまっている。これまでの登録、試験を施行した症例では、問題となる有害事象は認めておらず、第 I - II 相臨床試験の目的である安全性の評価という点では、良好な結果が得られているといえる。めまいが 76% と多くの症例で認められたが、すべて 7 日以内に消失しており、激しいめまい症状を訴える症例はなく、むしろ確実に薬物が内耳に移行した証明と理解された。薬物投与に際して、鼓膜切開を行うが、すべての症例で鼓膜は問題なく閉鎖しており、投与方法についても安全性が高いといえる。有効性については、44% の症例で、回復が認められた。ステロイド無効例で、IGF1 投与開始のタイミングが発症後 21 日であることを考慮すれば、高い有効性と考えられる。本試験での症例数は、ステロイド無効例に対する高気圧酸素療法の有効度 30% に対して、60% の有効度を期待し、有意の差を得るために必要な症例数を算出したものである。これまでの結果から推察すると、本試験では高気圧酸素療法に対して、有意に高い有効性を示すことは難しいと予想される。今後予定登録症例がすべて解析可能となった時点で、高気圧酸素療法のサンプルから、年齢、性別、治療開始前重症度、治療開始時期をマッチさせた症例を選び、統計学的解析を行う予定である。すべての症例の登録が完了していないの

で推論にとどまるが、今回の第Ⅰ-Ⅱ相臨床試験で示された安全性、有効性から、第Ⅱ相臨床試験にて詳細な有効性の検討を行う意義は高いと考えられる。一方で、われわれの予想よりも症例登録の速度が遅かった要因として、登録前治療に対する除外基準が厳しかったことなどが考えられる。第Ⅱ相臨床試験デザインに際しては、症例リクルートについても十分に考慮したい。

臨床試験を適切に完了するためには、症例リクルートについての調査も重要な項目といえる。第Ⅱ相臨床試験では、第Ⅰ-Ⅱ相臨床試験よりも必要な症例数が多くなることから、多施設での試験を行う必要がある。したがって、共同研究を行う機関で、どの程度の症例数を見込めるのかについて知る必要がある。このような観点から、虎の門病院での突発性難聴症例で入院治療を要した症例数および初期治療として行ったステロイド全身投与の効果を調べ、予想される登録対象となる症例数の予測を行った。結果、2年間で29症例が突発性難聴で入院治療をうけ、11例が回復あるいは不変にとどまることが分かった。第Ⅰ-Ⅱ相臨床試験での症例登録状況を見ると、17例の登録中2例のみが、初期のステロイド全身投与を行った症例であった。虎の門病院での不変症例は8例であり、年間4例と考えられる。これは、京都大学での年間不変症例数と変わらないことから、同じ条件で臨床試験を行った場合、京都大学と同等の症例数が見込めると推察される。

現在治療法のきわめて限られている急性高度難聴に対する新規治療法開発を目指して、低体温療法、HGF および EP4 作動薬の局所投与に関する基礎的研究開発を行った。低体温療法の臨床応用を考えた場合、全身を低体温にするのはリスクが高いと考えられる

ことから、側頭骨の温度を下げる局所的な治療法が想定される。低体温療法は、内耳虚血後、1時間経過した段階でも高い有効性を示した。また、HGF および EP4 作動薬でも音響曝露後の投与でも有効性を示唆する所見がえられた。したがって、これらの治療法も急性高度難聴に対しての有効性が期待でき、今後の臨床応用が期待できる。

耳鳴りは、明らかな体外音源がない状態で感じる音覚と定義され、人口の約15%が経験を有し、感音難聴を伴わない場合もある。しかし、多くの感音難聴症例の随伴症状として、高頻度に認められる。現在、耳鳴りに有効な治療法はなく、今回耳鳴り軽減のための治療法として、リドカイン内耳徐放に関する研究開発を行った。リドカインは疎水性の薬物であることから、ゼラチンハイドロゲルではなく、ポリグリコール乳酸による徐放システムを用いた。ポリグリコール乳酸によるリドカイン徐放の特性を調べるために、大きさの異なるパーティクルを用意し、その徐放動態を調べ、外径100 μm のパーティクルが望ましい徐放動態を示すことが分かった。外径100 μm のパーティクルは、7日間で含有するリドカインの約80%を徐放し、残り20%が、以後50日以上かかって、ゆっくりと徐放されるプロファイルを示した。このパーティクルを用いて、*in vivo*での徐放動態および有害事象についての検討を行ったところ、投与3日目まで高い蝸牛外リンパ中の濃度が確認され、以後濃度は明らかに低下するものの14日目まで測定可能なレベルを維持した。この結果は、ほぼ *in vitro*での解析結果に準ずるものであり、蝸牛内に送達されたリドカインが比較的早い速度で外リンパ外に運び出されていることを示唆する。この結果は、これまで通常の塩酸リドカイン溶液を鼓室内

投与した場合に耳鳴り抑制効果が数時間以内に消失してしまう結果を支持するものであり、臨床的な耳鳴り抑制効果を考えた場合のリドカイン徐放の重要性を示唆するものといえる。また、著明な有害事象を示唆する所見が認められなかったことから、安全性も高いことが期待できる。これらの結果をもとに、第Ⅰ-Ⅱ相臨床試験のプロトコル作成を行う予定である。

E. 結論

内耳への薬物徐放を可能とする内耳薬物投与システムを応用した感音難聴治療法開発として、過去2年間の非臨床試験およびプロトコル作成に基づいた第Ⅰ-Ⅱ相臨床試験を行い、17例の症例が登録され、現在のところ問題となる有害事象は発生していない。有効性を認める症例も散見されるが、最終的な結論は25例の登録、評価終了を待たなければならない。また、次の段階となる第Ⅱ相臨床試験に向けた準備となる臨床研究を施行し、臨床試験デザインに有用な所見をえることができた。一方、内耳薬物投与システムによる感音難聴および耳鳴り治療のシーズ開発と位置づけられる基礎的研究開発として、HGF, EP4 作動薬、リドカインの内耳局所投与に関する研究および内耳低体温療法の動物実験を試行した。HGF, EP4 作動薬については、音響外傷に対する治療効果を示唆する所見が得られ、内耳低体温については内耳虚血に対する治療効果を示す所見が得られた。リドカイン徐放に関しては、蝸牛内に比較的長期にリドカインを供給する方法が確立できた。これらの基礎的研究成果は、それぞれ臨床応用への可能性があり、今後さらに解析を進め、適応となる内耳障害の病態、病期を検討して

いきたい。

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. 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 ドゥ 大阪 2009

論文

1. 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.
2. Kikkawa YS, Nakagawa T, Horie RT, Ito J. Hydrogen protects auditory hair cells from free radicals. Neuroreport in-print.
3. 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. [Epub ahead of print]
4. Kada S, Nakagawa T, Ito J. A mouse model for degeneration of the spiral ligament.

J Assoc Res Otolaryngol 2009 Feb 11.
[Epub ahead of print]

5. Hiraumi H, Nakagawa T, Ito J.
Efficiency of a transtympanic approach
to the round window membrane using a
microendoscope. Eur Arch
Otorhinolaryngol. 266:367-71, 2009.
6. Fujiwara T, Hato N, Nakagawa T, Tabata
Y, Yoshida T, Komobuchi H, Takeda S,
Hyodo J, Hakuba N, Gyo K. IGF1 treatment
via hydrogels rescues cochlear hair
cells from ischemic injury.
Neuroreport 19:1585-1588, 2008.
7. Nakagawa T, Ito J. Local drug delivery
to inner ear for treatment of hearing
loss. Current Drug Therapy 3: 143-147,
2008.
8. Okano T, Nakagawa T, Kita T, Kada S,
Yoshimoto M, Nakahata T, Ito J. Bone
marrow-derived cells expressing Ibal
are constitutively present as resident
tissue macrophages in the mouse cochlea.
J Neurosci Res 86: 1758-1767, 2008.
9. 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.
10. Hato N, Sawai N, Teraoka T, Wakisaka H,
Takahashi H, Hinohira Y, Gyo K.
Valacyclovir for the treatment of
Bell's palsy. Expert Opin.
Pharmacother 9:14:2531-2536, 2008.
11. Hato N, Murakami S, Gyo K. Steroid and
antiviral treatment for Bell's palsy.
Lancet 371:1818-1820, 2008.
12. Takeda S, Hakuba N, Yoshida T, Fujita
K, Hato N, Hata R, Hyodo J, Gyo K.
Postischemic mild hypothermia

alleviates hearing loss because of
transient ischemia. Neuroreport
19:13:1325-1328, 2008.

学会発表

1. 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
2. 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
3. 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
4. Horie R, Sakamoto T, Nakagawa T,
Tabata Y, Ito J. Controlled release of
lidocaine into the cochlea via
biodegradable materials. XXV Barany
Society Meeting, Kyoto, Japan, Mar.
31-Apr 4, 2008
5. 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
6. 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
7. 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 32nd Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology. Baltimore, Maryland, USA, Feb. 14-19, 2009
 8. 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
 9. 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
 10. 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
 11. 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
 12. 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
 13. 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
 14. Tatsunori SAKAMOTO, Koji NISHIMURA, Takatoshi INAOKA, Takayuki NAKAGAWA, Juichi ITO. Inner Ear Regeneration by Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells. 45th Inner Ear Biology Workshop. Ferrara, Italy. 2008.9.21-2008.9.24
 15. Nakagawa T, Ono K, Kojima K, Matsumoto M, Kawauchi T, Ito J. RNA interference of p27^{kip1} induces proliferation of post-mitotic supporting cells in mouse auditory epithelia. Cell replacement in the inner ear. Bethesda, MD, USA, June 13-15, 2008
 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. 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
 18. Hyodo J, Motoyoshi K, Furutagucgi Y, Hato N, Gyo K. Evaluation of the anterior inferior cerebellar artery configuration by MRA for idiopathic sudden hearing loss with vertigo. XXV Bárány Society Meeting. 2008年3月31日~4月3日 京都
 19. Gyo K. Occlusion of the ear canal and its effects on hearing tests. The 12th JAPAN-KOREA Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. 2008年4月3日~5日 奈良
 20. Fujita K, Hakuba N, Hyodo J, Gyo K. Ginsenoside Rb1 protects against inner ear damage after transient ischemia. The 12th JAPAN-KOREA Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. 2008年4月3日~5日、奈良
 21. 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
 22. 中川隆之：薬物の経正円窓投与 内耳疾患の治療をめざして-基礎研究の最前線 第109回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 大阪 2008年5月16日~17日、大阪
 23. 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総会・学術講演会、平成20年5月15日~17日、大阪
 24. 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学術総会、平成20年5月15日~17日、大阪
 25. 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総会・学術講演会 平成20年5月15日~17日、大阪
 26. 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総会・学術講演会、平成20年6月27~28日、長崎
 27. 中川隆之、小野和也、小島 憲、松本昌宏、伊藤壽一：P27RNA 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
 28. 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. 平成20年10月16日~18日、神戸.
 29. 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
30. 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総会、平成 20 年 10 月 16 日～18 日、神戸
31. 濱口清海、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 20 年 10 月 16 日～18 日、神戸
32. 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 回日本耳科学会総会・学術講演会 平成 20 年 10 月 16 日～18 日、神戸
33. 嘉田真平、中川隆之、濱口清海、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
34. 羽藤直人：b-FGF の徐放投与による再生促進を目的とした顔面神経減荷手術 第 7 回日本再生医療学会総会 平成 20 年 3 月 13 日～14 日、名古屋
35. 前谷俊樹、兵頭 純、暁 清文：内耳障害に対するフリーラジカルスカベンジャーの効果 第 109 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 平成 20 年 5 月 15 日～17 日 大阪
36. 菰刈勇人、羽藤直人、高橋宏尚、脇坂浩之、寺岡正人、澤井尚樹、暁 清文：顔面神経麻痺モデルを用いた bFGF 徐放による神経再生促進効果 第 109 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 平成 20 年 5 月 15 日～17 日 大阪
37. 羽藤直人、菰刈勇人、澤井尚樹、寺岡正人、暁 清文：b-FGF の徐放投与による再生促進を目的とした顔面神経減荷手術 第 70 回耳鼻咽喉科臨床学会学術講演会 平成 20 年 6 月 27 日～28 日 長崎
38. 高木大樹、羽藤直人、兵頭 純、暁 清文：内耳低温療法を用いた突発性難聴の治療検討 第 53 回日本聴覚医学会総会・学術講演会 平成 20 年 10 月 2 日～3 日 東京
39. 竹田将一郎、白馬伸洋、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保護効果：第 18 回日本耳科学会総会学術講演会 平成 20 年 10 月 16 日～18 日 神戸
40. 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. 平成 21 年 3 月 5 日～6 日
- 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

急性高度難聴に対する低体温保護効果の研究

研究分担者 暁 清文、羽藤直人 愛媛大学医学部附属病院

研究要旨

一過性内耳虚血モデルを用いて、虚血後に低体温（32℃）を施行したときの虚血性内耳障害に対する影響を、常温（37℃）の場合と比較し、生理学的、組織学的に検討した。低体温を施行した群では常温のままの群に比べ、内毛細胞の脱落と ABR 閾値上昇が軽減された。しかしながら、虚血 6 時間後に低体温を施行した場合には、内毛細胞の脱落と ABR 閾値上昇は軽減されなかった。以上の結果から、虚血後の低体温は虚血性内耳障害に対して一定時間内に開始すれば保護効果を有することが示された。

この結果は薬剤や細胞を内耳へ侵襲的に投与する場合、低体温環境下で行うことが内耳保護に有用であり、より効果的な投与方法となり得ることを示唆するものである。

A. 研究目的

脳領域において、虚血性脳神経細胞障害に対し虚血後に脳温度を低下させることでその障害が抑制されるとの報告がある。低体温処置は内耳障害時の代謝に対して多面的に作用することが予想され、内耳薬物投与時や手術時の補助療法としての可能性も秘めており、その効果の詳細を検討することが内耳領域においても求められている。2001 年に愛媛大学の渡辺は、本研究で用いたものと同じスナネズミの両側椎骨動脈の血流遮断による一過性内耳虚血モデルを用い、虚血前から低体温を施すことで虚血性内耳障害を防御できることが報告されている。しかしながら、虚血性内耳障害の治療法として低体温を用いる場合には、虚血負荷後に低体温を施行した時の影響を検討することが不可欠である。そこで我々は一過性虚血後の低体温が虚血

性内耳障害に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、一過性内耳虚血後に低体温を施行したときの ABR 閾値測定と内毛細胞の脱落割合の算出を行い、常温群と比較検討した。

B. 研究方法

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. 低体温

実験動物には 12~16 週齢のスナネズミを

用いた。Sham op. - 低体温群として 4 耳、虚血-常温群として 16 耳、虚血-低体温群 (1-6) として 6 耳、虚血-低体温群 (1-3) として 16 耳、虚血-低体温群 (3-3) として 8 耳、虚血-低体温群 (6-3) として 8 耳の計 58 耳について検討した。ハロセン吸入麻酔下に仰臥位にて頸部正中切開を施行し両側の椎骨動脈を露出した。Sham op. 群ではそのまま閉創、虚血群では 15 分間血流を遮断・再開通することにより一過性虚血を負荷した。虚血-低体温群 (1-6) では 15 分間虚血の 60 分後から 360 分間、虚血-低体温群 (1-3) では 180 分間、直腸温を 32°C に維持した。虚血-低体温群 (3-3) では虚血の 180 分後から 180 分間、直腸温を 32°C に維持した。虚血-低体温群 (6-3) では虚血の 360 分後から 180 分間、直腸温を 32°C に維持した。

3. 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、聴力閾値の経時的変化について各群間の差を評価した。

4. 組織学的検討

7 日目の ABR 測定後に深麻酔下に 4% パラホルムアルデヒドにて経心灌流固定し骨髄を摘出した。実体顕微鏡下に基底回転のコルチ器を採取した。その後、核と聴毛の両方を観察するために PBS で 250 倍に希釈したロダミン・ファロイジン (0.25% Triton-X-100、1% ウシ血清アルブミン) を用い室温で 30 分間染色し、PBS 洗浄後に 20 μ g/ml のヘキスト 33342 で 60 分間染色した。グリセロールで封入後、蛍光顕微鏡下 (聴毛はグリーンフィルター: BP546, FT580, LP590、核は UV フィルター: BP365, FT395, LP397) に観察し、内有毛

細胞の脱落細胞割合を算出した。

C. 研究結果

1) 各群における ABR 閾値の経時的変化

虚血-常温群では虚血後 1 日目に約 30dB の ABR 閾値の上昇がみられ、その後徐々に回復したが 7 日目にも約 23dB の閾値上昇が残った。虚血-低体温群 (1-3) では閾値上昇は 1、4、7 日目いずれにおいても虚血-常温群より軽減されていた。7 日目の閾値上昇は約 11dB であり、虚血-常温群との間には有意な差が認められた ($p < 0.05$)。虚血-低体温群 (1-6) では閾値上昇は 1、4、7 日目いずれにおいても虚血-低体温群 (1-3) よりさらに軽減されていた。7 日目の閾値上昇は虚血-常温群のそれとの間には有意な差が認められた ($p < 0.01$)。虚血-低体温群 (3-3) では 7 日目の閾値上昇は約 16dB であったが、他の虚血-低体温群との間に有意な差は認められなかった。虚血-低体温群 (6-3) では閾値上昇は 1、4 日目ではむしろ虚血-常温群より増大している傾向にあり、7 日目の閾値上昇も約 21dB と虚血-低体温群 (1-6) のそれとの間に有意な差が認められた ($p < 0.05$)。

2) 基底回転内有毛細胞の脱落細胞割合

基底回転内有毛細胞の脱落細胞割合 (7 日目) は、虚血-常温群で約 16%、虚血-低体温群 (1-6) で約 5.1%、虚血-低体温群 (1-3) で約 7%、虚血-低体温群 (3-3) で約 10.1%、虚血-低体温群 (6-3) で約 13.4% であった。虚血-常温群と虚血-低体温群 (1-6)、虚血-常温群と虚血-低体温群 (1-3) の間には統計学的な有意差が認められた ($p < 0.01$)。

D. 考察

低体温は脳の分野では複数の細胞障害機序に対する細胞保護効果が認められ、近年では臨床での報告も散見される。耳科領域でも、一過性内耳虚血に対して虚血中から低体温を用いると ABR 聴力閾値の上昇や蝸牛基底回転内有毛細胞の脱落はほぼ完全に防ぐことができることが明らかになっている。しかし、虚血後に低体温を用いる本実験では、ABR 聴力閾値の上昇や蝸牛基底回転内有毛細胞の脱落は有意に軽減されるものの完全に防御するには至らなかった。以前にわれわれは、一過性内耳虚血が負荷されると虚血後速やかに蝸牛内グルタミン酸濃度の上昇がみられ、虚血後 30 分以内にその濃度がピークに達し、さらに虚血中の低体温では蝸牛におけるグルタミン酸濃度上昇が見られないことを報告した。今回の実験ではいずれの低体温群も虚血負荷 60 分以降より開始する低体温であり、超急性期に生じるグルタミン酸毒性が抑制されなかったことが虚血中からの低体温と虚血後の低体温との間に生じた差の一因であると考えられた。今回の実験で、不完全とはいえ ABR 聴力閾値の上昇や蝸牛基底回転内有毛細胞の脱落は有意に軽減されたことより、低体温はグルタミン酸などの超急性期の障害のみではなく、その後の障害機序に対しても多面的に細胞保護効果を有することが示唆された。また、6 時間後から低体温を施行した虚血-低体温群 (6-3) では聴力や内耳の保護効果が認められなかったことより、種差は予想されるものの低体温を臨床で用いる場合には時間的なりミットを考慮する必要があることが明らかになった。

E. 結論

一過性内耳虚血障害に対して虚血後の低

体温は保護効果を示した。虚血性内耳障害に対して低体温は虚血障害後の一定時間 (スナネズミでは約 6 時間) 内では有効な治療法となりうる可能性が示唆された。

F. 研究発表

論文

1. Hato N, Sawai N, Teraoka M, Wakisaka H, Takahashi H, Hinohira Y, Gyo K. Valacyclovir for the treatment of Bell's palsy. *Expert Opin. Pharmacother* 9:14;2531-2536, 2008.
2. Hato N, Murakami S, Gyo K. Steroid and antiviral treatment for Bell's palsy. *Lancet* 371:1818-1820, 2008.
3. Takeda S, Hakuba N, Yoshida T, Fujita K, Hato N, Hata R, Hyodo J, Gyo K. Postischemic mild hypothermia alleviates hearing loss because of transient ischemia. *Neuroreport* 19:13;1325-1328, 2008.
4. Fujiwara T, Hato N, Nakagawa T, Tabata Y, Yoshida T, Komobuchi H, Takeda S, Hyodo J, Hakuba N, Gyo K. Insulin-like growth factor 1 treatment via hydrogels rescues cochlear hair cells from ischemic injury. *Neuroreport* 19:16;1585-1588, 2008.
5. 竹田将一郎, 吉田 正, 藤田健介, 兵頭純, 羽藤直人, 暁 清文, 白馬伸洋: 一過性虚血後の内耳に対する低体温の保護効果 頭頸部自律神経 22:40-42, 2008.
6. 清水義貴, 兵頭 純, 白馬伸洋, 暁 清文: 蝸牛障害とグルタミン酸トランスポーター - *Clinical Neuroscience* 26:1134-1135, 2008.

学会発表

1. Hyodo J, Motoyoshi K, Furutagucji Y, Hato N,

- Gyo K. Evaluation of the anterior inferior cerebellar artery configuration by MRA for idiopathic sudden hearing loss with vertigo. XXV Bárány Society Meeting. 2008年3月31日～4月3日 京都
2. Gyo K. Occlusion of the ear canal and its effects on hearing tests. The 12th JAPAN-KOREA Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. 2008年4月3日～5日 奈良
3. Fujita K, Hakuba N, Hyodo J, Gyo K. Ginsenoside Rb1 protects against inner ear damage after transient ischemia. The 12th JAPAN-KOREA Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. 2008年4月3日～5日 奈良
4. 羽藤直人: b-FGF の徐放投与による再生促進を目的とした顔面神経減荷手術 第7回日本再生医療学会総会. 平成20年3月13日～14日 名古屋
5. 前谷俊樹, 兵頭 純, 暁 清文: 内耳障害に対するフリーラジカルスカベンジャーの効果 第109回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 平成20年5月15日～17日 大阪
6. 菰刈勇人, 羽藤直人, 高橋宏尚, 脇坂浩之, 寺岡正人, 澤井尚樹, 暁 清文: 顔面神経麻痺モデルを用いた bFGF 徐放による神経再生促進効果 第109回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 平成20年5月15日～17日 大阪
7. 羽藤直人, 菰刈勇人, 澤井尚樹, 寺岡正人, 暁 清文: b-FGF の徐放投与による再生促進を目的とした顔面神経減荷手術 第70回耳鼻咽喉科臨床学会学術講演会. 平成20年6月27日～28日 長崎
8. 高木大樹, 羽藤直人, 兵頭 純, 暁 清文: 内耳低温療法を用いた突発性難聴の治療検討 第53回日本聴覚医学会総会・学術講演会 平成20年10月2日～3日 東京
9. 竹田将一郎, 白馬伸洋, 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保護効果: 第18回日本耳科学会総会学術講演会 平成20年10月16日～18日 神戸
- 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