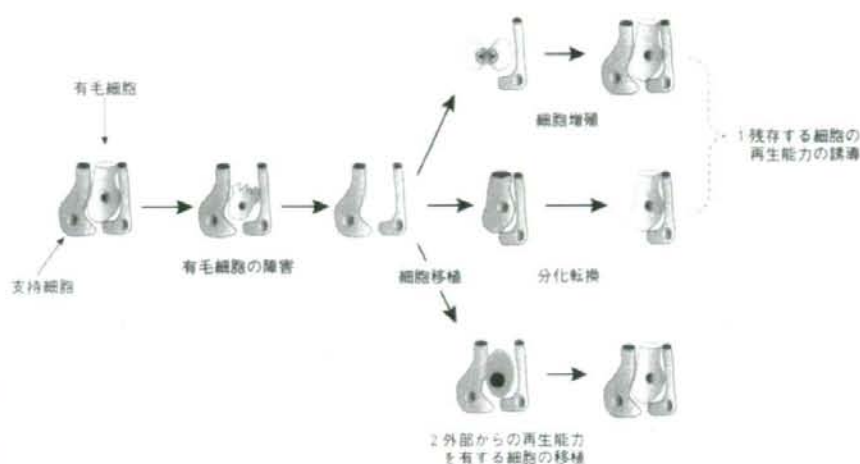


●概念図● 内耳再生へのストラテジー



感覚上皮における有毛細胞再生へのストラテジーを示す。内在する再生能力を誘導する方法として、①残存する支持細胞の増殖を誘導し、増殖した支持細胞を有毛細胞に分化させる。あるいは残存する支持細胞を直接有毛細胞へ分化転換する方法が挙げられる。有毛細胞の再生には、②外部から再生能力を有する細胞を内耳に移植する方法（細胞移植）も考えられる。

は遺伝子異常が関与していることが明らかにされつつある。難聴家系調査やゲノムプロジェクト、突然変異マウスなどの研究により、多くの難聴にかかわる遺伝子がこれまでに判明している。代表的なものを表に示す。また、インターネット上に難聴遺伝子データベースが公開されており、新しいデータが逐次報告されている (<http://webhost.ua.ac.be/hhh/>)。これらには転写因子や分子モーター、ギャップジャンクションタンパク質、イオンチャネルタンパク質、細胞外マトリクス分子など多種の遺伝子が含まれており、このような多数の難聴遺伝子の存在は、それだけ内耳の発生、機能が複雑に制御されていることを示している。こうした原因遺伝子を同定し、そのタンパク質の機能を解析することは、該当する遺伝性難聴の治療法の開発や遺伝子スクリーニングなど臨床面においても重要であるが、内耳発生、特に聴覚に関連する細胞の発生、分化機構を解明する点でも重要な意味をもつ。

近年の内耳発生に関する研究成果のなかで、ノッチ情報伝達系に関する知見は、内耳有毛細胞再生へ新しい手がかりを提供した画期的なものといえる¹⁾。内耳感覚上皮の発達過程において、1列の内毛細胞、3列の外毛細胞、分化した支持細胞など、蝸牛の複雑な細胞構成の構築にはノッチ情報伝達系による側方抑制が機能していることが、ノッチ情報伝達系のリガンドや関連する転写因子のノックアウトマウスの解析により示されている。ノッチ受容体は隣接細胞が発現するリガンドが結合するとセクレターゼ活性により細胞膜内領域で切断され、その細胞内領域が核内に移行し、核内のtransactivatorであるRBP-Jと結合し、標的遺伝子の転写を開始する。Cre-loxPシステムを利用したRBP-J遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスの系では、外毛細胞の外側、つまり通常は支持細胞の存在する領域に、有毛細胞が認められ²⁾、ノッチ情報伝達系が遮断されることにより、支

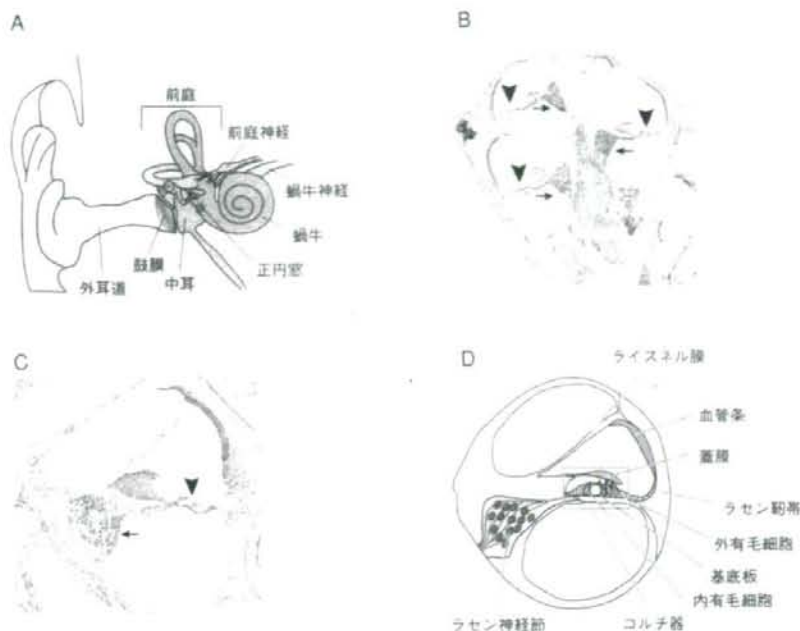


図 内耳、蝸牛の解剖

A) 音波は外耳道を通り、鼓膜を振動させ、中耳に存在する耳小骨を振動させる。耳小骨の振動は内耳にある蝸牛に伝達される。
 B) C) マウス蝸牛断面図。蝸牛軸にそってラセン神経節（矢印）が存在する。矢頭は感覚上皮（コルチ器）の位置を示す。
 D) 蝸牛断面模式図

持細胞が有毛細胞に分化することが示されている。

内耳発生段階における細胞周期制御機構に関連する一連の報告も、内耳再生に多くの示唆を与えるものといえる。発達段階のマウス内耳感覚上皮予定領域では、胎生期13日前後で細胞増殖が停止し、急速に有毛細胞、支持細胞の分化が誘導される。つまり、この時期の前後で発現変化の認められる細胞増殖に関連する因子が細胞増殖の停止に関連することが推察される。サイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質の一つである $p27^{kip1}$ がこの時期の感覚上皮予定領域の細胞増殖が停止に重要な役割を果たしていることが明らかにされ、 $p27^{kip1}$ をノックアウトしたマウスでは過剰に有毛細胞が出現し、生後も細胞増殖が認められることが示された¹⁾。内耳感覚上皮の細胞増殖制御については、RBP、E2F系などいくつかの因子が関与している

ことが示されているが、 $p27^{kip1}$ は支持細胞に比較的特異的に発現することから、支持細胞の増殖誘導について鍵を握る因子と考えられている。

内耳再生への試み①： 内在する細胞による再生

鳥類では、哺乳類と異なり、内耳有毛細胞が再生することが知られているが、そのメカニズムとして1) 支持細胞の増殖、分化による再生と2) 残存する支持細胞が有毛細胞に分化転換する、2つの経路があることが知られている²⁾。哺乳類でも、標的となる分子を操作することにより、同様のストラテジーで再生を誘導できる可能性がある。

前述したノッチ情報伝達系の転写因子を過剰発現することにより、生後の成熟した哺乳類蝸牛感覚上皮で

表 難聴遺伝子

分子名	ヒト遺伝子名	遺伝性難聴の種類	変異マウス	タンパク質の機能
Pou4f3 (Brn3c)	POU4F3	DFNA15		転写因子
Pax3	PAX3	Waardenburg症候群 type I, III	Spotch	転写因子
Myosin VIIa	MYO VIIa	Usher症候群1B DFNB2 DFNA11	Shaker-1	分子モーター
Myosin XV	MYO XV	DFNB3	Shaker-2	分子モーター
Connexin26	GJB2 (CX26)	DFNA3		ギャップジャンクションタンパク質
Claudin14	CLDN14 (Claudin14)	DNFB29		タイトジャンクションタンパク質
KCNQ4 (potassium channel)	KCNQ4	DFNA2		チャネルタンパク質
Cadherin23	CDH23	Usher症候群1D	Waltzer	細胞膜接着因子
Protocadherin15	PCDH15	Usher症候群1F	Ames waltzer	細胞膜接着因子
Usherin	Usherin	Usher症候群2A		細胞膜接着因子
Alpha-tectorin		DFNA8 DFNA12 DFNB21		蓋膜構成タンパク質
Collagen	COL4A5	Alport症候群		細胞外マトリクス分子

代表的な難聴遺伝子と遺伝性難聴の種類、変異マウス、遺伝子がコードするタンパク質の機能を示す

も支持細胞から有毛細胞への分化転換誘導が可能であることが示された。ミシガン大学のRaphaelのグループは、成体モルモットの蝸牛感覚上皮にノッチ情報伝達系の転写因子である *Atoh1* をアデノウイルスを用いて過剰発現させることにより、支持細胞から有毛細胞への分化転換が起こりうることを示し³⁾、アミノ配糖体で聾としたモルモットでも同様の操作により、残存する支持細胞から有毛細胞への分化転換誘導が可能であることを示した⁴⁾。一方、山本ら⁵⁾は、ノッチ情報伝達系の遮断により、内耳感覚上皮での *Atoh1* 発現が亢進し、支持細胞から有毛細胞への分化転換が起こりうることを器官培養系の実験で示した。そこでわれわれは、Raphaelらのグループが用いたモルモット障害モデルを使用し、薬物の内耳局所投与によるノッチ情報伝達系阻害による支持細胞から有毛細胞への分化転換について調べた。ノッチ情報伝達系阻害薬としては、山本らが培養系で有効性を確認したγセクレターゼ阻害剤であるMDL28170を用いた。結果、支持細胞から有毛細胞への分化転換を示唆する所見が認められた⁷⁾。障害後に認められた新生有毛細胞の数は、ウ

イルスペクターによる *Atoh1* 過剰発現に比較すると少なく、また新生有毛細胞が認められる部位も限定されていた。しかしながら、アデノウイルスベクターによる内耳への遺伝子導入という手法に比べ、内耳への薬物局所投与という方法は、臨床応用に近い手法といえ、ノッチ情報伝達系の操作による内耳有毛細胞再生を臨床応用するという観点からは、大きな前進といえる。近年、特定のタンパク質の機能制御を行う小分子化合物を用いた研究 (chemical genetics) が注目を集めており、今後、遺伝子操作で得られた研究成果を「内耳への薬物投与」に置き換えることにより、臨床応用への可能性を高める工夫が積極的になされるであろう。

鳥類での内耳有毛細胞再生のメカニズムを哺乳類に適用するという観点から、哺乳類での支持細胞の増殖誘導も重要な研究アプローチといえる。支持細胞の増殖停止機構として、細胞周期を抑制するサイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質である p27^{Kip1} の役割が最も注目されている。生後の蝸牛感覚上皮においても支持細胞の p27^{Kip1} の発現を抑制することができれば、支

持細胞が再び分裂、増殖する可能性がある。p27^{Kip1}の発現制御メカニズムとしては、p27^{Kip1}遺伝子からの転写、翻訳レベルとp27^{Kip1}タンパク質の細胞内での分解レベルの2つがある。後者のメカニズムにかかわるのが、Fボックスタンパク質の1つであるskp2である。skp2はp27^{Kip1}のエピキチン化に関与し、skp2などの働きでエピキチンを付加されたp27^{Kip1}はプロテアソームにて分解される。

発達段階に応じてマウス内耳感覚上皮でのskp2の発現変化を組織学的に解析することで、内耳感覚上皮で細胞増殖が活発な時期には、skp2によりp27^{Kip1}の発現が抑制されており、内耳感覚上皮で有毛細胞、支持細胞への分化運命が決定されるタイミングにおいては、p27^{Kip1}の発現は支持細胞のみに限定され、有毛細胞では消失することが明らかになった。この有毛細胞でのp27の発現の消失にskp2は関与せず⁸⁾、遺伝子からの転写レベルよりも上流でp27^{Kip1}の発現が制御されている。したがって、成熟した内耳感覚上皮支持細胞でのp27発現抑制には、skp2過剰発現によるタンパク質分解の促進もしくはRNA干渉による翻訳の抑制が有効な手段と推察される。養田らは、ウイルスベクターを用いたskp2の内耳感覚上皮での過剰発現が細胞増殖を誘導すると報告している⁹⁾。しかし、細胞周期にリエントリーすることは、細胞死の誘導につながる可能性もあり¹⁰⁾、今後の検討が注目される。

内耳再生への試み②：細胞移植

哺乳類内耳の再生能力が限られているのならば、再生能力のある細胞を内耳に送り込んでやればよいのではないか、という発想で内耳への細胞移植実験は開始された。最初の内耳への細胞移植実験は、内耳と同じ外胚葉系の幹細胞である神経幹細胞を用いたものである。有毛細胞障害を惹起した内耳に神経幹細胞を移植すると、内耳組織内に移植細胞の侵入を示唆する所見が認められた。また、ごく限られてはいるが、前庭感覚上皮内に侵入した移植細胞の一部が内耳有毛細胞のマーカーであるミオシン7aを発現している所見が認められた¹¹⁾。この結果は、神経幹細胞は障害を受けた内耳感覚上皮には侵入できるということを示しており、有毛細胞に分化する可能性があることを示すものとして内外の注目を集めた。内耳組織由来の細胞や胚

性幹細胞由来の細胞移植でも、感覚上皮内に移植細胞が侵入し、有毛細胞様の細胞に分化することが報告されているが、機能再生に関する報告はなされていない。いかに、有毛細胞や支持細胞といった感覚上皮特有の細胞に効率よく分化する細胞を開発するか、また、移植した細胞をいかにして感覚上皮内へと誘導するかが、解決すべき問題点として残されている。

細胞移植による内耳再生研究では、ラセン神経節細胞が主な研究対象とされている。現在、高度難聴に対する唯一の治療法は人工内耳であるが、人工内耳を埋め込んでもラセン神経節細胞に障害がある場合、良好な聞き取りは得られない。細胞移植によって、ラセン神経節細胞が再生すれば、人工内耳での聞き取りも向上すると期待される。このような臨床的背景に加え、神経細胞は種々の細胞から比較的分化誘導しやすいことにより、細胞移植によるラセン神経節細胞再生に関する研究が活発に行われている。種々の細胞が移植細胞のソースとして用いられているが、最も神経細胞の再生能力が高い細胞が胚性幹細胞(ES細胞)といえる。ES細胞では、高率に神経細胞へと分化誘導する方法が確立されており、*in vitro*、*in vivo*での移植実験がいくつか行われている。最も注目すべき点としては、*in vivo*の移植実験で機能回復を示唆する所見が認められているという点である。

神経細胞へ分化誘導したマウスES細胞を、ラセン神経節変性をあらかじめ誘導したモルモットに移植し、4週間後に、電気刺激聴性脳幹反応にて機能評価したところ、コントロールとしたシャムオベ(偽手術)群よりも有意に機能が回復していることが認められた¹²⁾。組織学的にも、移植細胞由来神経細胞の蝸牛軸での局在が確認されている。今後、移植細胞由来神経細胞が直接的に機能回復に寄与しているのか、栄養因子の供給などの間接的な効果なのかを検討する必要がある。

臨床応用への展望

第一に内耳に内在する細胞を活性化し、内耳の再生を誘導し、内耳性難聴の治療に応用する試みについては、内耳再生を妨げている因子を抑制し、再生を誘導する方法が最も臨床に近い方法といえる。しかしながら、この方法による機能回復に関する知見は、報告されておらず、今後の課題といえる。

Local Drug Delivery to Inner Ear for Treatment of Hearing Loss

Takayuki Nakagawa* and Juichi Ito

Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan

Abstract: Sensorineural hearing loss (SNHL) is one of the most common disabilities in our society. Experimentally, many candidates for use as therapeutic molecules have been discovered. However, a considerable obstacle to clinical application is the lack of an effective method for drug delivery to the cochlea. In order to overcome this obstacle, there needs to be development of a local cochlear drug delivery system. Advances in pharmacological technology have provided various drug delivery systems that use biomaterials, and which can be utilized for local drug delivery to the cochlea. Indeed, recent studies have demonstrated the potential of synthetic and natural biomaterials for local drug delivery to the cochlea, indicating that the clinical application of such local drug delivery systems could be used in the near future for therapeutic treatments. Recent progress in cell therapy research also offers a novel drug delivery method for the cochlea. In addition, transplantation of stem cells into the cochlea has been demonstrated to provide protective effects for the auditory function. Transplantation of genetically engineered cells has also resulted in the sustained delivery of aimed therapeutic molecules within the inner ear. Although problems involving clinical application still need to be resolved, these drug delivery systems for the inner ear may hold the future therapeutic options for treatment of SNHL.

Key Words: Drug delivery system, cochlea, biodegradable polymer, cell transplantation, gene therapy.

THERAPEUTIC TARGETS FOR TREATMENT OF HEARING LOSS

Sensorineural hearing loss (SNHL) is one of the most prevalent disabilities in our society. Sound stimuli are received by auditory hair cells (HCs) in the bony, snail-shaped cochlea, followed by transduction of the sound stimuli by the HCs to neural signals. Spiral ganglion neurons (SGNs), which are auditory primary neurons, are located in the central bony axis of the cochlea and responsible for transmitting auditory signals to the central auditory system. Excessive noise, ototoxic drugs, genetic disorders and aging all contribute to the causes of SNHL. Severe to profound SNHL affects 1 in 1000 newborns, and another 1 in 2000 children before they reach adulthood. About 60% of individuals older than 70 years will manifest SNHL. Previous studies on human temporal bones have demonstrated that the loss of HCs and/or SGNs is a major cause of SNHL [1]. Protecting HCs and SGNs from irreversible degeneration is therefore a primary objective due to the limited regeneration capacity of these cells. Acute SNHL sometimes responds to drug treatment; however, there are no therapeutic options for chronic SNHL except for hearing aids and cochlear implants, which are small devices that are surgically implanted into the cochlea in order to stimulate SGNs. However, the success of cochlear implants depends on the remaining SGNs and with their loss, this severely compromises the efficacy of this technique. HCs and SGNs are therefore the major targets for the treatment of SNHL.

WHY IS LOCAL DRUG DELIVERY REQUIRED FOR THE INNER EAR?

Based on the backgrounds described above, studies are being conducted with the hopes of providing an alternative

means of biological therapy. Thus far, research has identified a number of candidates for use as therapeutic molecules. Experimentally, protective effects of neurotrophins have been demonstrated [2,3], and inhibitors of apoptosis and glutamate antagonists have also been shown to have the ability to promote HC survival [4-6]. Recently, it has been found that local application of genes by virus vectors induces HC regeneration in the mammalian auditory epithelium [7,8], and additionally, by silencing the mutant gene *via* RNA interference, can restore hearing loss in the genetic mouse model [9]. These therapeutic strategies are attractive and promising for the restoration of SNHL. However, clinical application is still quite limited. The problem of how to deliver such therapeutic molecules to the inner ear has been a considerable obstacle in the development of treatments for SNHL. One of the reasons for the difficulty of drug delivery involves the limited blood flow to the cochlea [10]. In addition, the blood-inner ear barrier, which inhibits the transport of drugs from serum to the inner ear, represents a fundamental obstacle to the use of systemic applications [11]. The inner ear tissues are isolated from the surrounding organs by a bony construction, which allows for the topical introduction of drugs or genes. Based on these considerations, local application has generally been the preferred method for drug administration to the inner ear. The sustained delivery of therapeutic molecules is also critical for the efficient treatment of the cochlea, as bioactive molecules usually require a period of minutes or hours over which they produce their pharmacological actions. Consequently, a number of researchers are currently working to solve these problems and develop methods for the local direct application of these molecules into the cochlea [12].

STRATEGIES FOR LOCAL DRUG DELIVERY

The cochlea is connected to the tympanic cavity by the round window membrane (RWM). When substances are applied intratympanically, the assumption is that they will enter the scala tympani through the RWM and then be dis-

*Address correspondence to this author at the Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kawaharacho 54, Shogoin, Sakyo-ku, 606-8507 Kyoto, Japan; Tel: +81-75-751-3346; Fax: +81-75-751-7225; E-mail: tnakagawa@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp

tributed throughout the cochlear fluids. The idea of using a topical application of medicine to the inner ear is not new, as local anesthetics and aminoglycosides were applied decades ago, with the compounds passing through the tympanic membrane into the tympanic cavity during the treatment of the inner ear disorders [13,14]. Intratympanic injections have been used for local application of aminoglycosides or steroids during therapy for Ménière's disease and sudden hearing loss. There are a number of clinical reports showing the efficacy of intratympanic injections of these drugs [see review in reference 12]. However, it is very difficult to predict the amounts of drugs that will actually reach the cochlear fluid space. Some reports have indicated that this method can lead to varying results during therapeutic treatment of Ménière's disease [15-17]. While intratympanic injection is a simple and easy method to perform, unfortunately, a controlled and sustained release of drugs cannot be achieved using this method. The pharmacokinetics of drug entry into cochlear fluids is crucial to determine the efficacy of the method for drug delivery into cochlear fluids [12]. Salt and Plontke have indicated importance of sustained delivery of drugs on the RWM by means of perilymph sampling from various regions of the cochlea [18] and computer simulation [19].

Implantable mini-pumps have also frequently been used for local drug delivery to the cochlea in animal experiments [20]. Several clinical reports have described the efficacy of local glucocorticoid application when using a semi-implantable mini-pump [21,22]. However, the use of an implantable mini-pump has not been widely adopted, given the need for surgical procedures similar to tympanoplasty that must be done in order to place the mini-pump. The use of a local viral gene transfer as a sustained treatment of the inner ear can provide sufficient protection from noise, drug toxicity and re-perfusion injury [23-28]. Today, adenoviral vectors or adeno-associated viral vectors are the most widely used for cochlear gene transfer, because of the high efficiency for the transfection, the availability of high titers, and the ease of production. However, their use can potentially initiate an immune response that results in the destruction of the recipient's cochlear cells.

The use of biomaterials for local drug delivery has recently gained attention as an alternative to the implantable mini-pumps or gene transfer using virus vectors. In general, biodegradable polymers containing therapeutic molecules are placed on the RWM, with the therapeutic molecules released into the cochlear fluids from the polymers in a controlled manner *via* the RWM [12,28].

DRUG DELIVERY *VIA* BIOMATERIALS

In the past decade, pharmaceutical technologists have paid increasing attention to controlled or sustained release technology using biomaterials for the delivery of drugs in order to avoid side effects and achieve sufficient drug levels in tissues. In an effort to develop a controlled-release system, a variety of methods using synthetic and natural materials have been undertaken. Recent publications have reported the use of a controlled-release system for local drug delivery to the inner ear. Two synthetic materials, siloxane-based polymers [29] and poly(lactide/glycolic acid) (PLGA) polymers

[30], and several natural materials, which include hyaluronic acid [31] and gelatin [32-34], have been used for this purpose.

Siloxane-based polymers have been used for years in medical applications that involve contact with the human body. In the clinic, silicone-transdermal patches have been widely used. In this system, drug release is controlled by its diffusion through the silicone network [35]. The actual release rate is determined by the composition of the polymer. This system is particularly suitable for application of lipophilic and low-molecular weight molecules. Arnold *et al.* [29] have utilized this system for local application of beclomethasone into the cochlear fluids. When using this system, the silicone microimplant remains on the RWM, although it does not induce functional and histological damage in the cochlea. Therefore, repeated treatments require that there is extirpation of the material used during the procedure.

Encapsulating bioactive molecules in PLGA or polylactic acid (PLA) particles has been also used as a method of controlled-release application. Water-insoluble, low-molecular weight agents have been encapsulated in PLGA or PLA microparticles and nanoparticles [36,37]. PLGA and PLA are familiar substances to surgeons, as they are the materials that make up absorbable sutures. Tamura *et al.* [30] examined the potential of PLGA nanoparticles for drug delivery to the cochlea using guinea pigs. To evaluate the use of PLGA nanoparticles (140 to 180 nm in diameter) in the cochlea, rhodamine, which is a red fluorescent dye, was encapsulated and then following local application onto the RWM, its overall distribution was evaluated. PLGA nanoparticles containing rhodamine were observed in the cochlea, indicating that PLGA nanoparticles can penetrate through the RWM. Rhodamine is released from PLGA nanoparticles after penetration of the particles through the RWM. Compared to a silicone microimplant, PLGA nanoparticles have the advantage of being able to be repeatedly applied, as the PLGA is dissolved by hydrolysis. However, there is a limitation with regard to the variation of the drugs that can be applied, since the process of encapsulation in the PLGA particles requires that compounds must be dissolved in acetone. Therefore, this method is not suitable for the delivery of proteins or peptides.

GELATIN HYDROGEL

Gelatin is a commonly used natural polymer that is derived from collagen. In the clinic, gelatin polymers have been widely used as hemostats. Recently, gelatin-based controlled-release systems have been developed [38]. During the fabrication process, the isoelectric point of gelatin can be modified to yield either a negatively charged acidic gelatin or a positively charged basic gelatin. This allows for electrostatic interactions to take place between charged therapeutic molecules and gelatin of the opposite charge, leading to the formation of polyion complexes. The significance of such a system is that it provides the ability for application of water-soluble, comparatively high-molecular weight proteins and peptides. Additionally, this method is also capable of being used for the delivery of plasmid DNA [39]. In this system, therapeutic molecules are released by enzymatic degradation of gelatin polymers, for which the rates can be determined based on the crosslinking density of the gelatin polymers.

The potential use of the gelatin hydrogel system was initially investigated for cochlear delivery of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [32]. BDNF plays a crucial role in the development of the inner ears [38] and in the maintenance of the auditory function [41]. In addition, previous studies have demonstrated the effects of local BDNF application when using an osmotic mini pump [3] or adenovirus [26]. We measured BDNF concentrations in the cochlear fluid after placing a gelatin hydrogel that contained this agent onto the RWM [32]. The results revealed a sustained delivery of BDNF into the cochlear fluid *via* the hydrogel over a seven-day period. The functional and histological protection of the SGNs by BDNF that was applied through the gelatin hydrogel was then examined using a guinea pig model of SGN degeneration. The measurement of electrically evoked auditory-brainstem responses, which reflect SGN function, demonstrated that BDNF delivered *via* gelatin hydrogels was able to significantly reduce the threshold elevation [32]. Histological analysis demonstrated an increased survival of SGNs due to BDNF application through gelatin hydrogels. These findings indicate that gelatin hydrogel can be utilized for drug delivery to the cochlea.

Subsequently, we examined the efficacy of cochlear delivery of insulin-like growth factor-1 (IGF1) for the protection of auditory HCs against acoustic trauma [33]. IGF1 is a mitogenic peptide that plays essential roles in the regulation of growth and development in the inner ear [42]. In addition, previous studies on the inner ear have suggested the possibility of inner ear protection by IGF1 [43,44]. Moreover, recombinant human IGF-1 (rhIGF1) has already been approved for clinical use. Therefore, we selected rhIGF1 as a suitable trophic factor for local cochlear application using a gelatin hydrogel. Local rhIGF1 application through the gelatin hydrogel prior to noise exposure has been shown to efficiently protect the hearing from noise trauma. Additionally, histological analysis also revealed that local rhIGF-1 treatment ameliorated the loss of HCs [33].

Our ultimate goal is the clinical use of a local rhIGF1 application using gelatin hydrogel as a therapeutic option for the treatment of SNHL. Therefore, we examined whether post-traumatic application of rhIGF1 to the cochlea *via* gelatin hydrogels could attenuate noise-induced hearing loss. The results demonstrated that functional and histological efficacy of local rhIGF1 treatment on the attenuation of noise-induced hearing loss occurred in a dose-dependent manner [34]. We also measured IGF1 concentrations in the cochlear fluid, cerebrospinal fluid (CSF) and serum after placing a gelatin hydrogel containing rhIGF1 onto the RWM of guinea pigs. The results demonstrated that there was sustained delivery of rhIGF1 into the cochlear fluid, in addition to no alterations of the IGF1 levels in CSF and serum [34]. There were also no adverse effects due to local rhIGF1 treatment found in any of the experimental animals. These findings document both the effectiveness and the safety of local rhIGF1 treatment using gelatin hydrogels for noise-induced hearing loss.

CELL TRANSPLANTATION

Chronic SNHL is usually incurable because of the loss of HCs and SGNs, and which at the present time is irreversible.

Therefore, an alternative means of biological therapy, including cell therapy is required. Indeed, recent studies have indicated that cell therapy could be utilized to regenerate HCs [45] and SGNs [46]. In contrast, cell transplantation is an alternative that can be used as a method for drug delivery where the transplanted cells for this purpose have the ability to survive and generate therapeutic agents. Several stem cells have been reported to have the ability to secrete trophic factors [47-49]. Cell transplantation has been used as a means of delivering peptides or proteins into the central nervous system, demonstrating its viable use as a delivery vehicle for therapeutic molecules [50,51].

Iguchi *et al.* have reported on the ability of neural stem cell-derived cells being used for the production of BDNF and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) after engraftment into the cochlea [47]. In addition, transplantation of neural stem cells into the cochlea has the potential of being able to attenuate HC damages due to transient ischemia of the cochlea [48]. Bone marrow derived cells also have the potential for secreting trophic factors. Implantation of bone marrow stromal cells has been reported to contribute to functional recovery of the brain [52] and spinal cord [53] by means of producing trophic factors. Furthermore, previous studies have revealed the potential of bone marrow derived cells surviving in the cochlea [54,55]. Yoshida *et al.* have demonstrated a significant increase in the protein level of GDNF in cochlear specimens and the prevention of HC death due to transient cochlear ischemia by engraftment of hematopoietic stem cells [49]. These findings indicate that cell transplantation into the cochlea may be a novel strategy for treatment of SNHL by providing a means for local application of trophic factors within the cochlea.

Transplantation of cells that have been genetically manipulated *ex vivo* has been used as a means of delivering peptides or proteins into the central nervous system [56-58]. In comparison with the stem cell transplantation that has been described above, this strategy has an advantage in that aimed gene-encoded products are applicable. In addition, use of non-viral vectors for *ex vivo* gene transfer potentially could resolve the problem of viral vector toxicity in cochlear gene therapy. Therefore, we conducted an examination of the efficacy of cell-gene delivery in the application of therapeutic molecules into the cochlea [59]. NIH3T3 cells were chosen as a delivery vehicle for the gene. NIH3T3 cells are a well-established fibroblast cell line, thus, it is easy to optimize conditions for gene transfer and to select gene-expressing cells for use *in vitro*. In addition, such fibroblasts are available from various human sources, which may be advantageous for extending future clinical investigations. NIH3T3 cells were transfected with the BDNF gene using lipofection, with the cells expressing the BDNF gene being selected for use. We examined the potential for transplanting transfected NIH3T3 cells into the inner ear of the mouse. Immunohistochemistry and Western blotting demonstrated the survival of the grafted cells within the cochlea, and a BDNF-specific enzyme-linked immunosorbent assay revealed a significant increase in BDNF production in the inner ear following cell transplantations [59]. These findings indicate that cell-gene delivery with non-viral vectors may be applicable for the local, sustained delivery of therapeutic

molecules into the cochlea. Cell-gene delivery of therapeutic molecules into the inner ear is suitable for protection of inner ear cells against gradually progressive degeneration. Presbycusis, which is an age-related hearing loss, may also need to be included as one of the targets for cell-gene therapy. BDNF application *via* cell-gene delivery could be an effective strategy for survival promotion of SGNs in cases involving cochlear implants, which require the opening of the cochlea for the purpose of inserting an electrode.

CONCLUSIONS

The lack of effective methods for drug delivery to the cochlea has been a considerable obstacle with regard to developing novel therapeutic strategies for SNHL. However, recent findings in studies examining drug delivery systems using biomaterials and cell therapy demonstrate the efficacy of these strategies for cochlear drug delivery, which in the future may contribute to the establishment of novel therapeutic strategies for SNHL.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a Grant-in-Aid for Regenerative Medicine Realization, a Grant-in-Aid for Scientific Research and a Grant from the 21st Century COE program from the Ministry of Education, Science, Sports, Culture and Technology of Japan, and by a Grant-in-Aid for Researches on Sensory and Communicative Disorders from the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare.

REFERENCES

[1] Schuknecht HF. Pathology of the ear. Cambridge, MA: Harvard University press; 1974.

[2] Miller JM, Chi DH, O'Keefe LJ, Kruszka P, Raphael Y, Altschuler RA. Neurotrophins can enhance spiral ganglion cell survival after inner hair cell loss. *Int J Dev Neurosci* 1997; 15: 631-43.

[3] Shinohara T, Bredberg G, Ulfendahl M, et al. Neurotrophic factor intervention restores auditory function in deafened animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 1657-60.

[4] Nakagawa T, Kim TS, Murai N, et al. A novel technique for inducing local inner ear damage. *Hear Res* 2003; 176: 122-7.

[5] Cunningham LL, Cheng AG, Rubel EW. Caspase activation in hair cells of the mouse utricle exposed to neomycin. *J Neurosci* 2002; 22: 8532-40.

[6] Duan ML, Ulfendahl M, Laurell G, et al. Protection and treatment of sensorineural hearing disorders caused by exogenous factors: experimental findings and potential clinical application. *Hear Res* 2002; 169: 169-78.

[7] Kawamoto K, Ishimoto S, Minoda R, Brough DE, Raphael Y. Math1 gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs *in vivo*. *J Neurosci* 2003; 23: 4395-400.

[8] Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, et al. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by *Atoh1* gene therapy in deaf mammals. *Nat Med* 2005; 11: 271-6.

[9] Maeda Y, Fukushima K, Nishizaki K, Smith RJ. *In vitro* and *in vivo* suppression of GJB2 expression by RNA interference. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1641-1650.

[10] Angelborg C, Hillerdal M, Hultcrantz E, Larsen HC. The microsphere method for studies of inner ear blood flow. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1998; 50: 355-62.

[11] Juhn SK, Rybak LP. Labyrinthine barriers and cochlear homeostasis. *Acta Otolaryngol* 1981; 91: 529-534.

[12] Salt AN, Plontke S. Local inner-ear drug delivery and pharmacokinetics. *Drug Discov Today* 2005; 10: 1299-1306.

[13] Erser MS. Transytympanic injection of anesthetics for the treatment of Meniere's Syndrome. *Arch Otorhinolaryngol* 1951; 43-52.

[14] Schuknecht HF. Ablation therapy for the relief of Meniere's disease. *Laryngoscope* 1956; 66: 859-70.

[15] Lange G, Maurer J, Mann W. Long-term results after interval therapy with intratympanic gentamicin for Meniere's disease. *Laryngoscope* 2004; 114: 102-5.

[16] Thomsen J, Charabi S, Tos M. Preliminary results of a new delivery system for gentamicin to the inner ear in patients with Meniere's disease. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000; 257: 362-5.

[17] Schoendorf J, Neugebauer P, Michel O. Continuous intratympanic infusion of gentamicin *via* a microcatheter in Meniere's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 124: 203-207.

[18] Salt AN, Hale SA, Plontke SK. Perilymph sampling from the cochlear apex: a reliable method to obtain higher purity perilymph samples from scala tympani. *J Neurosci Methods* 2006; 153: 121-9.

[19] Plontke SK, Salt AN. Simulation of application strategies for local drug delivery to the inner ear. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2006; 68: 386-92.

[20] Takemura K, Komeda M, Yagi M, et al. Direct inner ear infusion of dexamethasone attenuates noise-induced trauma in guinea pig. *Hear Res* 2004; 196: 58-68.

[21] Lefebvre PP, Staecker H. Steroid perfusion of the inner ear for sudden sensorineural hearing loss after failure of conventional therapy: a pilot study. *Acta Otolaryngol* 2002; 122: 698-702.

[22] Plontke S, Lowenheim H, Preyer S, et al. Outcomes research analysis of continuous intratympanic glucocorticoid delivery in patients with acute severe to profound hearing loss: basis for planning randomized controlled trials. *Acta Otolaryngol* 2005; 125: 830-39.

[23] Yagi M, Magal E, Sheng Z, Ang KA, Raphael Y. Hair cell protection from aminoglycoside ototoxicity by adenovirus-mediated overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 813-23.

[24] Staecker H, Li D, O'Malley Jr BW, Van De Water TR. Gene expression in the mammalian cochlea: a study of multiple vector systems. *Acta Otolaryngol* 2001; 121: 157-63.

[25] Luebke AE, Foster PK, Muller CD, Peel AL. Cochlear function and transgene expression in the guinea pig cochlea, using adenovirus- and adeno-associated virus-directed gene transfer. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 773-81.

[26] Nakaizumi T, Kawamoto K, Minoda R, Raphael Y. Adenovirus-mediated expression of brain-derived neurotrophic factor protects SGNs from ototoxic damage. *Audiol Neurootol* 2004; 9: 135-143.

[27] Hakuba N, Watabe K, Hyodo J, et al. Adenovirus-mediated overexpression of a gene prevents hearing loss and progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils. *Gene Ther* 2003; 10: 426-33.

[28] Nakagawa T, Ito J. Drug delivery systems for the treatment of sensorineural hearing loss. *Acta Otolaryngol* 2007; Suppl 557: 30-5.

[29] Arnold W, Senn P, Hennig M, et al. Novel slow- and fast-type drug release round-window microimplants for local drug application to the cochlea: An experimental study in guinea pigs. *Audiol Neurootol* 2005; 10: 53-63.

[30] Tamura T, Kita T, Nakagawa T, et al. Drug delivery to the cochlea using PLGA nanoparticles. *Laryngoscope* 2005; 115: 2000-5.

[31] Wang J, Ruel J, Ladrech S, et al. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase-mediated mitochondrial cell death pathway restores auditory function in sound-exposed animals. *Mol Pharmacol* 2007; 71: 654-66.

[32] Endo T, Nakagawa T, Kita T, et al. A novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel. *Laryngoscope* 2005; 115: 2000-5.

[33] Iwai K, Nakagawa T, Endo T, et al. Cochlear protection by local IGF-1 application using biodegradable hydrogel. *Laryngoscope* 2006; 116: 526-33.

[34] Lee KY, Nakagawa T, Okano T, et al. Novel therapy for hearing loss: Delivery of insulin-like growth factor-1 to the cochlea using gelatin hydrogel. *Otol Neurotol* 2007; 28: 976-81.

[35] Colas A. Silicones in pharmaceutical applications. DowCorning Healthcare Industries. <http://www.dowcorning.com/content/publishedlit/51-993a-01.pdf>

[36] Okada H, Yamamoto M, Heya Y, et al. Drug delivery using biodegradable microspheres. *J Control Release* 1994; 28: 121-9.

[37] Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Kunou N, Kawashima Y. Preparation of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *J Control Release* 1993; 25: 89-98.

- [38] Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos AG. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *J Control Release* 2005; 109: 256-74.
- [39] Kushibiki T, Matsumoto K, Nakamura T, Tabata Y. Suppression of tumor metastasis by NK4 plasmid DNA released from cationized gelatin. *Gene Ther* 2004; 11: 1205-14.
- [40] Fritsch B, Tessarollo L, Coppola E, Reichardt LF. Neurotrophins in the ear: their roles in sensory neuron survival and fiber guidance. *Prog Brain Res* 2004; 146: 265-78.
- [41] Tan J, Ruttiger L, Panford-Walsh R, et al. Tinnitus behavior and hearing function correlate with the reciprocal expression patterns of BDNF and Arg3.1/arc in auditory neurons following acoustic trauma. *Neuroscience* 2007; 145: 715-26.
- [42] Varela-Nieto I, Morales-Garcia JA, Vigil P, et al. Trophic effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the inner ear. *Hear Res* 2004; 196: 19-25.
- [43] Staecker H, Van De Water TR. Factors controlling hair-cell regeneration/repair in the inner ear. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8: 480-7.
- [44] Malgrange B, Rigo JM, Coucke P, et al. Identification of factors that maintain mammalian outer hair cells in adult organ of Corti explants. *Hear Res* 2002; 170: 48-58.
- [45] Tateya I, Nakagawa T, Iguchi F, et al. Fate of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice. *Neuroreport* 2003; 14: 1677-81.
- [46] Okano T, Nakagawa T, Endo T, et al. Engraftment of embryonic stem cell-derived neurons into the cochlear modiolus. *Neuroreport* 2005; 16: 1919-22.
- [47] Iguchi F, Nakagawa T, Tateya I, et al. Trophic support of mouse inner ear by neural stem cell transplantation. *Neuroreport* 2003; 14: 77-80.
- [48] Hakuba N, Hata R, Morizane I, et al. Neural stem cells suppress the hearing threshold shift caused by cochlear ischemia. *Neuroreport* 2005; 16: 545-9.
- [49] Yoshida T, Hakuba N, Morizane I, et al. Hematopoietic stem cells prevent hair cell death after transient cochlear ischemia through paracrine effects. *Neuroscience* 2007; 145: 923-30.
- [50] Shingo T, Date I, Yoshida H, Ohmoto T. Neuroprotective and restorative effects of intrastriatal grafting of encapsulated GDNF-producing cells in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 2002; 69: 946-54.
- [51] Ostenfeld T, Tai YT, Martin P, Deglon N, Aebischer P, Svendsen CN. Neurospheres modified to produce glial cell line-derived neurotrophic factor increase the survival of transplanted dopamine neurons. *J Neurosci Res* 2002; 69: 955-965.
- [52] Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol* 2002; 1: 92-100.
- [53] Ohta M, Suzuki Y, Noda T, et al. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp Neurol* 2004; 187: 266-78.
- [54] Naito Y, Nakamura T, Nakagawa T, et al. Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlea of chinchillas. *Neuroreport* 2004; 15: 1-4.
- [55] Sharif S, Nakagawa T, Ohno T, et al. The potential use of bone marrow stromal cells for cochlear cell therapy. *Neuroreport* 2007; 18: 351-354.
- [56] Cejas PJ, Martinez M, Karmally S, et al. Lumbar transplant of neurons genetically modified to secrete brain-derived neurotrophic factor attenuates allodynia and hyperalgesia after sciatic nerve constriction. *Pain* 2000; 86: 195-210.
- [57] Cao L, Liu L, Chen ZY, et al. Olfactory ensheathing cells genetically modified to secrete GDNF to promote spinal cord repair. *Brain* 2004; 127: 535-49.
- [58] Girard C, Bemelmans AP, Dufour N, et al. Grafts of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3-transduced primate Schwann cells lead to functional recovery of the demyelinated mouse spinal cord. *J Neurosci* 2005; 25: 7924-33.
- [59] 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* 2006; 14: 866-71.

Insulin-like growth factor I treatment via hydrogels rescues cochlear hair cells from ischemic injury

Takashi Fujiwara^a, Naohito Hato^a, Takayuki Nakagawa^b, Yasuhiko Tabata^c, Tadashi Yoshida^a, Hayato Komobuchi^a, Shoichiro Takeda^a, Jun Hyodo^a, Nobuhiro Hakuba^a and Kiyofumi Gyo^a

^aDepartment of Otolaryngology, Ehime University Graduate School of Medicine, Shitsukawa, Ehime, ^bDepartment of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine and ^cDepartment of Biomaterials, Field of Tissue Engineering, Institute for Frontier Medical Science, Kyoto University, Kyoto, Japan

Correspondence to Dr Naohito Hato, MD, PhD, Ehime University Graduate School of Medicine, Shitsukawa, Ehime, Japan
Tel: +81 89960 5366; fax: +81 89960 5368; e-mail: nhato@m.ehime-u.ac.jp

Received 18 July 2008; accepted 22 July 2008

DOI: 10.1097/WNR.0b013e328311ca4b

This study was designed to investigate the protective effects of recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF1), applied locally via a hydrogel, against ischemic damage of the cochlea in gerbils. A hydrogel was immersed in rhIGF1 or saline and was applied on the round window membrane 30 min after the ischemia. Local rhIGF1 treatment significantly reduced the elevation of auditory brain responses thresholds at a frequency of 8 kHz

on days 1, 4, and 7 after ischemia. A histological analysis revealed increased survival of inner hair cells in the animals treated with rhIGF1 via the hydrogel 7 days after ischemia. These findings showed that local rhIGF1 application using a hydrogel has the potential to protect the cochlea from ischemic injury. *NeuroReport* 19:1585–1588 © 2008 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Keywords: cochlear, drug delivery, gerbil, growth factor, hair cell, ischemia, protection

Introduction

Sensorineural hearing loss (SNHL) is one of the most common disabilities in Japan, but therapeutic options for SNHL are currently limited. Studies are being conducted to provide alternative means of biological therapy for the inner ear, and several agents have been shown to exert therapeutic activity against SNHL. The delivery of therapeutic molecules to the inner ear is, however, currently a significant obstacle to their clinical application. Systemically applied drugs have great difficulty reaching inner ear cells because of the blood-labyrinth barrier [1], which acts as an obstacle to the transfer of drugs from the serum to cochlear cells, and the limited blood flow to the cochlea [2]. Therefore, the development of a local drug delivery system for the cochlea is crucial for the clinical application of therapeutic agents. On the basis of this need, drug delivery systems using biodegradable materials such as gelatin hydrogels have been investigated for use in treatment of the inner ear. Recent studies have demonstrated the efficacy of gelatin hydrogels for this purpose [3–5]. After gelatin hydrogels containing therapeutic molecules are placed on the round window membrane (RWM), the therapeutic molecules are released from the gelatin polymers and move through the RWM into the perilymph of the cochlea.

Recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF1), which is a mitogenic peptide with essential roles in the regulation of growth and development of the inner ear [6], has been approved for clinical use. Earlier studies have demonstrated that local rhIGF1 treatment via gelatin

hydrogels is effective for attenuating noise-induced hearing loss [4,5]; however, its potential for SNHL has not been examined owing to the additional pathogenesis of SNHL. Cochlear ischemia and reperfusion injury has been considered one cause of acute profound SNHL. We thus established a gerbil model for cochlear ischemia and reperfusion that represents hearing loss similar to sudden deafness in humans [7,8]. Sudden deafness can be defined as greater than 30 dB of hearing loss over at least three contiguous audiometric frequencies occurring within 3 days or less. Though several treatment methods can be used to treat sudden deafness, either in combination or alone, there is no universally accepted treatment for sudden deafness.

In this study, we examined the efficacy of local rhIGF1 treatment via gelatin hydrogels in protection against cochlear damage because of ischemia and reperfusion, to investigate the potential clinical use of this treatment for sudden deafness. We applied gelatin hydrogels containing rhIGF1 to the RWM of gerbils after the onset of SNHL produced by cochlear ischemia and evaluated auditory function by measurements of auditory brain stem responses (ABRs) and cochlear histology.

Materials and methods

Animals

Adult male Mongolian gerbils weighing 60–80 g ($n=12$) were used in this study. The study was conducted in accordance with the Guidelines for Animal Experimentation

of Ehime University School of Medicine, Japan. All experimental procedures were performed in accordance with the US National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animals.

Biodegradable gelatin hydrogels

A biodegradable hydrogel has been developed for sustained delivery of peptides, including growth and trophic factors [9]. In this approach, a positively charged protein is electrostatically complexed with negatively charged polymer chains, which form components of the biodegradable hydrogel. Biodegradation of the polymer chains leads to the release of the peptide. Biodegradable hydrogels are generated by glutaraldehyde cross-linking of gelatin, and the rates of degradation are determined by the concentration of glutaraldehyde. We extracted the residual glutaraldehyde in 48.5 mg of the gelatin hydrogel measured by the gas chromatography/mass spectrography method. The residual glutaraldehyde ratio was 0.14 ppm. An earlier analysis of in-vitro IGF1 release from hydrogels demonstrated that a hydrogel made with 10 mmol/l glutaraldehyde allows optimal IGF1 delivery *in vitro* [10] and enables the sustained delivery of rhIGF1 to cochlear fluids after placement on the RWM *in vivo* [5]. We therefore used this type of hydrogel in this study.

Transient cochlear ischemia and drug application

Baseline ABR thresholds were measured within 7 days before the induction of cochlear ischemia. Cochlear ischemia in gerbils was induced by temporarily occluding the bilateral vertebral arteries in the neck as described previously [7,8]. In brief, under general anesthesia with 1% halothane, the bilateral vertebral arteries were exposed just before their entry into the transverse foramen of the cervical vertebra. A 4-0 silk suture was loosely looped around each vertebral artery, and ischemia was induced by pulling the ligatures with 5 g weights. After 15 min of ischemia, the sutures were removed to allow recirculation, which was confirmed by observation under an operating microscope.

At 30 min after recirculation began, the otic bulla was opened to expose the RWM. A sheet of dried hydrogel was cut to a size of 1.5–2 mm³ under a microscope. A piece of the hydrogel was immersed in rhIGF1 (400 µg dissolved in 40 µl physiological saline; Astellas, Tokyo, Japan) for 30 min and then applied onto the left RWM of each animal in the IGF group ($n=6$). In the control group, the hydrogel pieces were immersed in physiological saline ($n=6$).

Functional analysis

Auditory function was assessed by ABR recordings. Measurements of ABR thresholds for an 8-kHz tone burst (rise/fall time, 0.5 ms; duration, 10 ms) were performed before and at 1, 4, and 7 days after the ischemic insult. The ABRs were recorded using a signal processor (NEC Synax 1200, NEC Medical Systems, Tokyo, Japan). To record bioelectrical potentials, subdermal stainless steel needle electrodes were inserted at the vertex (ground), ventrolateral to the measured ear (active), and contralateral to the measured ear (reference). Cochlear sensory epithelia corresponding to the region of the 8 kHz tone were found to be the most vulnerable to the ischemic injury used in this study [11]. Responses to 300 consecutive stimuli were averaged,

and the ABR threshold was determined by measuring the responses in 5-dB steps.

Histological analysis

On day 7 after ischemic injury, the animals were deeply anesthetized with halothane, and the cochleae were harvested. Immediately after removing the otic bulla, the cochlea was perfused intracardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4 and post-fixed for 2 h with the same fixative at 4°C. After rinsing with phosphate-buffered saline at pH 7.4, sensory epithelia were dissected from the temporal bones and subjected to histological analysis in whole mounts. The specimens were stained with rhodamine-phalloidin (1:250, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) and Hoechst 33342 (20 µg/ml; Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, California, USA). The specimens were then mounted in carbonate-buffered glycerol and viewed under an Olympus BX60 microscope (Olympus Bx60, Olympus America, Lake Success, New York, USA). The numbers of intact and missing hair cells were counted in the basal turn of each cochlea, and the ratio of missing hair cells was calculated for the inner hair cells (IHCs) and outer hair cells, as described previously [8,11].

Statistical analysis

An overall effect of rhIGF1 application on ABR threshold shifts was examined using two-way factorial analysis of variance. For significant interactions, multiple comparisons with Fisher's protected least-significant difference were used for pairwise comparisons. The differences in the ratios of missing IHCs and outer hair cells between the IGF-treated and control groups were examined using an unpaired *t*-test. A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant. Values are expressed as means ± standard deviation.

Results

Functional analysis

In the control animals, which had received gelatin hydrogels immersed in saline, the ABR threshold was elevated to 47.5 ± 6.9 dB on day 1 and gradually decreased to 35.0 ± 7.1 dB on day 7. The degree of the ABR threshold shifts observed in the control group was almost identical to that in earlier studies using temporal occlusion of bilateral vertebral arteries [11,12]. Although elevated ABR thresholds were also found in the IGF group, local rhIGF1 treatment significantly reduced the ABR threshold shifts compared with the control values (Fig. 1). The ABR threshold elevation in the IGF group was significantly lower than that in the control group at each time point. Attenuation of the ABR threshold elevation was especially marked on day 1.

Histological analysis

The loss of hair cells (HCs) was observed in cochlear specimens from the control group (Fig. 2a and b). Degenerative changes that were apparent in the IHC region of control specimens were identical to previous observations [8,11,12]. In contrast to the control specimens, the rhIGF1-treated specimens exhibited limited loss of IHCs (Fig. 2c and d). Quantitative analysis revealed that local rhIGF1 treatment significantly suppressed ischemia-induced IHC loss (Fig. 2e). The number of missing IHCs in the rhIGF1-treated

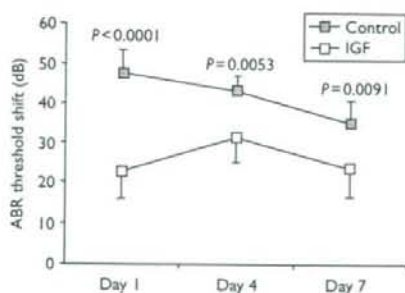


Fig. 1 Changes in the auditory brainstem response (ABR) threshold after transient cochlear ischemia. The ABR was measured in response to an 8000-Hz tone burst. The ABR threshold before ischemia was defined as 0 dB. The average increases in the ABR threshold on days 1, 4, and 7 were significantly less in the insulin-like growth factor (IGF) group than in the control group. All values are means \pm SD. ($n=6$ for each group).

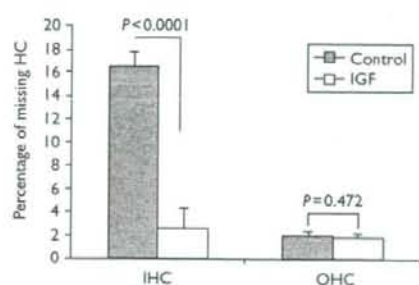


Fig. 3 The rates of inner hair cell (IHC) and outer hair cell (OHC) loss 7 days after transient cochlear ischemia. The rate of IHC loss in the insulin-like growth factor (IGF)-treated group was significantly less than that in the control group. No statistical difference in the rate of OHC loss between the two groups was present. All values are means \pm SD. ($n=6$ for each group).

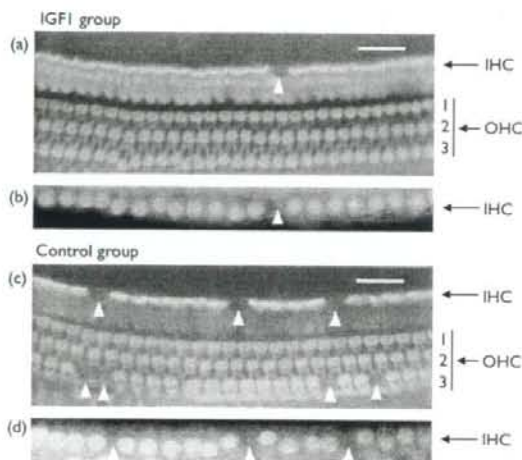


Fig. 2 The surface structure of the organ of Corti 7 days after cochlear ischemia. Representative fluorescence images of the organ of Corti stained with rhodamine-phalloidin (a and c) or Hoechst 33342 (b and d). The organ of Corti samples were obtained from the otic bullae of the (insulin-like growth factor) IGF group (a and b) and control group (c and d). Three rows of outer hair cells (OHCs) and a single row of inner hair cells (IHCs) are present. Fluorescence microscopy revealed fewer IHC deficits in the IGF group compared with the control group. Scale bar = 20 μ m.

specimens was only 15.8% of that in the control specimens (Fig. 3). In contrast, no significant difference in the percentage of missing OHCs was found between the two experimental groups.

Discussion

These findings showed that the posttraumatic application of rhIGF1 into the cochlea via gelatin hydrogels significantly attenuates hearing impairment and IHC damage attributable to cochlear ischemia, supporting the therapeutic potential of local rhIGF1 treatment for acute SNHL because of cochlear ischemia. Earlier studies on acoustic trauma models have demonstrated the efficacy of local rhIGF1

treatment for acute SNHL resulting from acoustic injury [4,5]. This type of the gelatin hydrogel has been used in a clinical trial for angiogenesis in patients with critical limb ischemia [13], and the safety of the gelatin hydrogel for topical application into the middle ear has been demonstrated in the guinea pig experiments [5]. On the basis of existing evidence, local rhIGF1 treatment should be considered for the treatment of sudden deafness.

In the gerbil model for cochlear ischemia and reperfusion, cochlear damage is divided into two phases, acute and chronic. In the acute phase, afferent dendrites attached to IHCs typically swell [8,14]. Degeneration in the cochlear lateral wall is also found in the acute phase [15]. These histological changes are usually reversible and are thought to cause temporal threshold shifts of the ABRs in this model. IHC loss is characteristic of the chronic phase of ischemia-induced cochlear degeneration and results in permanent threshold shifts of the ABRs [8,14]. These findings showed that local rhIGF1 treatment significantly attenuates both temporal and permanent threshold shifts of the ABRs. In addition, local rhIGF1 treatment has the capacity to protect IHCs against cochlear ischemia. Local rhIGF1 treatment is therefore effective for the attenuation of chronic and irreversible degeneration of cochlear sensory epithelia.

Interestingly, these findings showed a notable reduction of the ABR threshold elevation on day 1 in rhIGF1-treated animals during the acute phase of cochlear damage. This observation is quite different from the effects of local rhIGF1 treatment on acoustic trauma models [4,5], in which no significant effects were identified in the acute phase of cochlear damage. This difference might have been caused by differences in the mechanisms for acute cochlear dysfunction between ischemic and acoustic injury. The effects of local rhIGF1 treatment on the cochlear lateral wall or afferent dendrites in the ischemia model might have contributed to the different effects in the acute phase. Further investigations are required to elucidate the precise mechanisms for the effects of rhIGF1 on acute damage after cochlear ischemia.

Conclusion

These findings showed the efficacy of local rhIGF1 application using a biodegradable hydrogel for protecting the

cochlea from ischemic injury. Our goal is the clinical use of local rhIGF1 treatment via a gelatin hydrogel as a therapeutic option for sudden deafness. At present, rhIGF1 has been approved for clinical use. These findings may help in advance the clinical application of local rhIGF1 treatment using gelatin hydrogels for the treatment of sudden deafness.

References

1. Juhn SK, Hunter BA, Odland RM. Blood-labyrinth barrier and fluid dynamics of the inner ear. *Int Tinnitus J* 2001; 7:72-83.
2. Angelborg C, Hillerdal M, Hultcrantz E, Larsen HC. The microsphere method for studies of inner ear blood flow. *J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1998; 90:355-362.
3. Endo T, Nakagawa T, Kita T, Iguchi F, Kim TS, Tamura T, et al. A novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel. *Laryngoscope* 2005; 115:2016-2020.
4. Iwai K, Nakagawa T, Endo T, Matsuoka Y, Kita T, Kim TS, et al. Cochlear protection by local IGF-1 application using biodegradable hydrogel. *Laryngoscope* 2006; 116:529-533.
5. Lee KY, Nakagawa T, Okano T, Hori R, Ono K, Tabata Y, et al. Novel therapy for hearing loss: delivery of insulin-like growth factor-1 to the cochlea using gelatin hydrogel. *Otol Neurotol* 2007; 28:976-981.
6. Varela-Nieto I, Morales-García JA, Vigil P, Diaz-Casares A, Gorospe I, Sánchez-Galiano S, et al. Trophic effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the inner ear. *Hear Res* 2004; 196:19-25.
7. Hakuba N, Gyo K, Yanagihara N, Mitani A, Kataoka K. Efflux of glutamate into the perilymph of the cochlea following transient ischemia in the gerbil. *Neurosci Lett* 1997; 230:69-71.
8. Koga K, Hakuba N, Watanabe F, Shudou M, Nakagawa T, Gyo K. Transient cochlear ischemia causes delayed cell death in the organ of Corti: an experimental study in gerbils. *J Comp Neurol* 2003; 456:105-111.
9. Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos AG. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *J Control Release* 2005; 109:256-274.
10. Holland TA, Tabata Y, Mikos AG. Dual growth factor delivery from degradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds for cartilage engineering. *J Control Release* 2005; 101:111-125.
11. Hakuba N, Watabe K, Hyodo J, Ohashi T, Eto Y, Taniguchi M, et al. Adenovirus-mediated overexpression of a gene prevents hearing loss and progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils. *Gene Ther* 2003; 10:426-433.
12. Yoshida T, Hakuba N, Morizane I, Fujita K, Cao F, Zhu P, et al. Hematopoietic stem cells prevent hair cell death after transient cochlear ischemia through paracrine effects. *Neuroscience* 2007; 145:923-930.
13. Marui A, Tabata Y, Kojima S, Yamamoto M, Tambara K, Nishina T, et al. A novel approach to therapeutic angiogenesis for patients with critical limb ischemia by sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogel: an initial report of the phase I-IIa study. *Circ J* 2007; 71:1181-1186.
14. Hakuba N, Koga K, Shudou M, Watanabe F, Mitani A, Gyo K. Hearing loss and glutamate efflux in the perilymph following transient hindbrain ischemia in gerbils. *J Comp Neurol* 2000; 418:217-226.
15. Morizane I, Hakuba N, Shimizu Y, Shinomori Y, Fujita K, Yoshida T, et al. Transient cochlear ischemia and its effects on the stria vascularis. *Neuroreport* 2005; 16:799-802.



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

日耳鼻 111: 655-663, 2008

「第109回日本耳鼻咽喉科学会総会シンポジウム」
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

感音難聴は、最も頻度の高い身体障害であり、新しい治療法開発に対する難聴者の期待は高い。この20年間に人工内耳など電子器機デバイス領域では新しい治療法の開発があるが、薬物療法を中心とした生物学的な治療法開発は基礎的研究にとどまっている。感音難聴治療開発に関連する研究成果にも目覚ましいものがあるが、臨床応用にはいくつかの解決すべき問題が残されている。そのひとつに、いかにして内耳に薬物を到達させるかという問題がある。簡便かつ安全に、内耳に持続的に薬物を供給することができれば、いくつかの内耳基礎研究成果は臨床応用されることが期待できる。われわれは、この問題に対する解決策として、生体吸収性素材を用いた内耳薬物投与システムを開発した。治療薬を徐放する生体吸収性素材を中耳正円窓に留置し、内耳に薬物を徐放しようとするものである。親水性の高分子（タンパクやペプチド）に適した薬物徐放の材料としてゼラチンポリマー、疎水性、低分子の薬物（ステロイドやリドカイン）を徐放する材料としてポリグリコール乳酸に着目し、内耳への薬物徐放に関する有効性を調べるために、いくつかの動物実験を行った。結果、ゼラチンポリマーは神経栄養因子や細胞増殖因子を内耳に徐放することができ、治療の効果を発揮することが示された。ポリグリコール乳酸を用いる方法では、耳鳴り抑制を目的としたリドカインの蝸牛内への徐放に成功した。ゼラチンポリマーを用いた内耳へのインスリン様細胞成長因子1投与は、京都大学大学院医学研究科の医の倫理委員会の承認を経て、ステロイド無効急性高度難聴例に対する第I-II相臨床試験を行っている。今後、臨床試験をさらに進めると同時に、内耳再生を標的とした治療薬の内耳局所投与に関連する基礎的研究開発を進めていき、新たな感音難聴治療法を日常臨床に1日も早く提供したい。

キーワード：感音難聴，正円窓，ゼラチン，薬物徐放，臨床試験

Keywords: Sensorineural hearing loss, Round window, Gelatin, sustained release, Clinical trial

はじめに

感音難聴は、最も頻度の高い身体障害のひとつである。身体障害者レベルの高度難聴者は約36万人あり、65歳以上の高齢者の60%にはなんらかの感音難聴が存在するとされている。しかしながら、一旦喪失した聴力を元に戻す方法はない。聴力の再生は、高度難聴者においては音のない世界から音のある世界の獲得を意味し、中等度難聴者にとっても社会生活を送る上で大きな福音となることは論を待たない。現在、高度難聴者に対しては、

人工内耳が広く用いられるようになり、対費用効果の高い治療法として評価されている。人工内耳で得られる聴覚は、自然な聴覚とはかなり異なるものであるが、その有益性が高く評価されているということは、聴覚障害が生活の質に与える影響がいかに大きいものかを意味している。現状では、一旦固定した聴覚障害に対する治療としては、補聴器や人工内耳などの電子器機に頼らざるをえない。急性高度難聴を含めても感音難聴に対する有効な治療法が乏しいこと、この事実に対する患者の失望、

新規治療法開発に対する期待感は、耳鼻咽喉科医が日常の外来で強く感じていることではないかと思われる。このような背景から、内耳再生など聴覚再生を目的とした研究が活発に行われており、一般市民の期待も高い。

ひとくちで聴覚障害の新しい治療といっても、感音難聴の原因は多様であり、症例ごとに病態も異なる。感音難聴の治療法開発への戦略を考えるにあたり、感音難聴の進行度に応じた治療法開発を想定することは、現実的の対策を考えるにあたり有効な手段ではないかと考える。障害の原因や部位（例えば、有毛細胞障害なのか、血管条障害なのか）など病態に応じた治療を開発することが理想的であるが、臨床の現場では病態が特定できる感音難聴はむしろまれである。しかし、時間的、聴力喪失レベルに応じた進行度であれば、多くの耳鼻咽喉科医がイメージしやすいのではないだろうか。このような感音難聴進行度に対応して、最も妥当ではないかと考えられる治療戦略を想定してみた（図1）。感音難聴のごく初期には、予防的な治療法が現実的な手段と考えられる。

これには、生活指導など幅広い対応が包括され、老年性難聴や騒音性難聴が対象疾患として想定される。予防という見地から、細胞移植や遺伝子治療より、薬物内服など非侵襲的なアプローチが望ましい。最近では、ダイエットやサプリメント摂取の有効性を示唆するような報告も散見される¹⁰⁾。次の段階は、明らかな感音難聴が発症した比較的早い段階、例えば突発性難聴、遅発性内リンパ水腫、ウイルス性難聴が想定される。自覚症状が出現して間もない老年性難聴も含めることができるかもしれない。この段階の第一選択は、やはり薬物治療になるのではないだろうか。全身投与で有効性が期待できれば理想的だが、ごく限られた選択肢しかないのが現状であることは先述した。聴力障害が固定した段階に対しては、聴力喪失の程度、聴力型に応じ、補聴器、人工中耳、人工内耳、脳幹インプラントなどが選択される。これら電子器機の進歩にも目覚ましいものがあり、また装着性やデザインなどにも大きな改善が進みつつある。しかし、補聴器や人工内耳を装着している患者が聴力回復の可能性を求めて、外来を受診することはめずらしくなく、治療法の有無について相談された経験がある耳鼻咽喉科医も少なくないのではないと思う。すなわち、進捗は著しいともいえるが、必ずしも患者は満足していないのが現状ではないだろうか。これらの電子器機の有効性が期待できない場合、あるいは、これらの電子器機に替わる手段として、細胞移植や遺伝子導入による内耳再生が期待されている¹¹⁾。

この総説では、感音難聴に対する薬物治療、すなわち、感音難聴発症直後、あるいは急性期といえる段階に



図1 感音難聴治療のストラテジー

対する薬物治療の開発について、特に、内耳への薬物局所投与についての最近の基礎的研究の進捗状況と臨床応用の取り組みについて紹介する。まず、内耳薬物投与システム開発に関する基礎的研究について述べ、臨床試験に進むためのステップ、そして臨床試験の進捗状況について紹介する。最後に、今後の展望について述べたい。

内耳薬物投与システムに求められる条件

われわれは、臨床応用を念頭において内耳薬物投与システム開発に着手した。内耳薬物投与システムは、局所投与により効率よく内耳に薬物を到達させようとするものであるが、薬物の局所投与という方法は、決して新しいものではなく、30年以上前から鼓室投与として用いられている方法である。しかしながら、局所投与の有効性について、これまでに詳細な臨床的な検討は行われておらず、最近米国でステロイドの鼓室内注入の大規模な臨床試験が展開されていることが、本年の Mid Winter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology (ARO) で報告されていた¹²⁾。鼓室内投与は簡単な方法であり、手技自体の安全性は高い。しかし、内耳への薬物動態を考えた場合、ばらつきが大きく、1回投与では内耳に薬物が認められる時間はごく限られており、内耳保護効果を期待することはできず、なんらかの持続投与を行うための工夫が必要となる¹³⁾。われわれが研究を開始した当初、いくつかのデバイスが内耳への持続的な薬物投与を目的として、臨床に供されていた。ひとつは、Silverstein の MicroWick というシステムである¹⁴⁾。この方法はきわめて単純なもので、鼓膜切開、チューブ留置を行い、このチューブに細い綿棒のようなものを通し、正円窓窩に留置するというものである。薬物は通常の点耳という形で投与される。シンプルなシステムであることから、現在でも用いられているが、薬物の徐放という機能は全くなく、正円窓への投与の確実性にも疑問が残る。他には、埋め込み型浸透圧ポンプが臨床に供されていた。鼓室形成術の要領で外耳道

ゼラチンハイドロゲル VS PLGAパーティクル

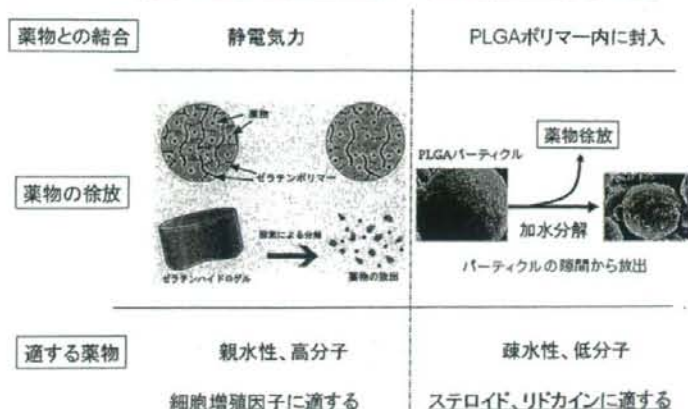


図2 バイオマテリアルを用いた薬物徐放

皮膚を挙上し、ポンプ先端部を正円窓窩に留置し、チューブは外耳道皮下を通し、体外にリザーバーを置くというものである。実際、ステロイド局所投与に用いられ、有効性を示唆する報告がなされているが¹⁰⁾、広く普及するには至らず、販売は停止している。投与できる薬物はリザーバーに一定期間入れておいても活性を失わないものではなくてはならないし、鼓室形成術に準ずる外科的侵襲を要する上に、治療終了後にデバイスを取り除く必要がある。このシステムは、外科的侵襲が問題であったが、薬物の徐放という点では優れたシステムであったといえる。

以上から、われわれは、開発すべき内耳薬物投与システムに求められる条件として、1) 簡便かつ安全性の高い方法であること、ただし、2) 耳鼻咽喉科医としての特色を活かせる、3) 薬物が効果を発揮する期間、適切な量の薬物を内耳に徐放することができる、を想定し、研究開発に臨むこととした。

バイオマテリアルを用いた薬物徐放

ドラッグデリバリーは、再生医学や組織工学の分野で注目されている研究テーマであり、世界で活発な研究が行われている。ドラッグデリバリー開発の中心的な研究テーマがバイオマテリアルを用いた薬物徐放である。われわれは、ドラッグデリバリー分野の研究成果を内耳に応用することにより、薬物徐放という問題は解決できるのではないかと考えた。バイオマテリアルによる薬物徐放について、簡単に説明を加えると、最も広く知られている方法としてシリコンからの薬物徐放がある¹¹⁾。気管支喘息治療目的の気管支拡張薬の徐放製剤として広く用

いられているし、禁煙補助目的のニコチン徐放パッチや癌性疼痛治療のためのフェンタニル徐放パッチもこの方法を用いた経皮的な薬物徐放システムである。感音難聴治療研究でも、内耳への薬物徐放にシリコンを用いた研究が報告されているが¹²⁾、薬物徐放後もシリコンは中耳に残存するという問題がある。複数回投与が必要な場合には必ず取り出さなければならない。また、シリコンで徐放できる薬物は、種類が限定されている。従って、内耳へバイオマテリアルを用いた薬物徐放の応用を考える場合、生体内で分解されるバイオマテリアルを使用することが望ましい。また、多くの薬物の内耳への徐放を行い、治療効果を検証するためには、できるだけ多くの製剤に用いることが可能な薬物徐放システムを開発する必要がある。

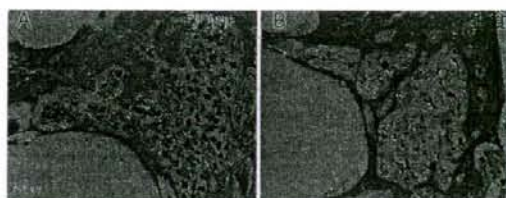
生体分解性のバイオマテリアルとして、薬物徐放に用いられている材料として、ポリ乳酸やポリグリコール乳酸などの合成材料とゼラチンやヒアルロン酸などの天然材料がある。ポリ乳酸やポリグリコール乳酸は、吸収糸の材料としてすでに広く臨床で用いられている。ゼラチンやヒアルロン酸も種々の用途で医療材料として用いられており、生体への安全性が確認されている材料といえる。これらの材料には、それぞれに適した薬物があり、それぞれの特徴を生かした内耳薬物投与を考える必要がある(図2)。ポリ乳酸やポリグリコール乳酸を用いる場合、アセトンなどにポリ乳酸やポリグリコール乳酸と薬物を溶解、混合し、マイクロあるいはナノパーティクルを精製する¹³⁾。これらのパーティクルが分解される過程で薬物が徐放される。従って、脂溶性で低分子、安定性の高い薬物がこの方法に適する。一方、ゼラチンを用

いる場合、あらかじめ陽性もしくは陰性に荷電させたゼラチンポリマーを作製し、薬物と静電的に結合させ、ゼラチンポリマーの加水分解に伴い薬物が徐放される¹²⁾。従って、ゼラチンポリマーには、水溶性で高分子な薬物が適している。われわれは、タンパクやペプチド製剤の徐放にゼラチンポリマーを用い、疎水性、低分子化合物の徐放にポリグリコール乳酸を用いることで、内耳障害治療を標的とした薬物の多くをカバーできる内耳薬物投与システムが開発できると考え、この2つのマテリアルを用いた内耳薬物投与システムを開発することとした。

ゼラチンハイドロゲルを用いた内耳薬物投与

ゼラチンハイドロゲルは、ゼラチンを化学的に重合させたゼラチンポリマーから構成されている。薬物徐放に用いるゼラチンポリマーは、静電的結合により薬物と結合するが、現在陰性あるいは陽性荷電する薬物に対するゼラチンハイドロゲルが1種類ずつ臨床応用可能な段階にある。実際には、種々の等電点のゼラチンを用いることにより、静電結合の特性はある程度変化させることが可能となる。ゼラチンは体内ではコラゲナーゼなどの酵素により加水分解され、薬物が徐放される仕組みとなっている¹³⁾。ゼラチンポリマーの加水分解の速度は、ゼラチンを化学重合させる程度をコントロールすることにより変化させることができるので、薬物を徐放する時間もある程度の範囲で制御可能となる。

われわれは、まず脳由来神経栄養因子 (BDNF) を投与薬物として選択し、蝸牛のラセン神経節細胞に対する保護効果を検討することとした。BDNFは、ラセン神経節細胞の発生、生存に深く関与していることが知られており、最近では聴覚刺激の中樞への伝達調整にも関与していることが示されている¹⁴⁾。さらに、埋め込み型ポンプや遺伝子導入を用いた実験などで、すでにラセン神経節細胞に対する保護効果が示されていた¹⁰⁾¹⁵⁾。従って、ゼラチンハイドロゲルの内耳への薬物投与に対する有効性を調べる実験モデルとして最も適切ではないかと考えた。過去の報告に準じて、耳毒性薬物全身投与により蝸牛有毛細胞を喪失させ、2次的なラセン神経節細胞変性が誘導されるモデルを用いた。第一に蝸牛外リンパへのBDNF徐放について調べたところ、1週間以上の徐放が可能であることが判明した¹⁶⁾。次に、ラセン神経節細胞の組織学的、機能的な保護効果について調べたところ、ゼラチンハイドロゲルによるBDNF投与により、ラセン神経節細胞の減少が抑制され、機能が保持されることが電気刺激聴性脳幹反応にて示された (図3)¹⁶⁾。つまり、ゼラチンハイドロゲルは、内耳への神経栄養因



C 電気刺激聴性脳幹反応閾値変化

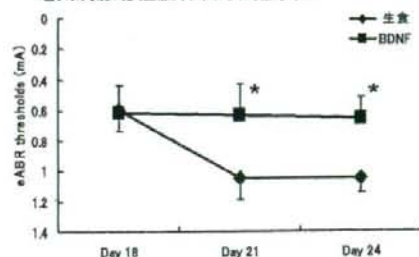


図3 ゼラチンハイドロゲルを用いたBDNF投与によるラセン神経節細胞保護効果
BDNFを局所投与された蝸牛では、ラセン神経節細胞が多く認められるが (A)、コントロールした生食投与を受けた蝸牛では、ラセン神経節細胞がほとんど消失している (B)。電気刺激聴性脳幹反応の閾値もBDNF投与を受けた蝸牛では低下が認められないが、生食投与を受けた蝸牛では経時的に低下している (C)。

子や細胞成長因子の投与に応用できることが示されたわけである。

次に用いた薬物は、インスリン様細胞成長因子1 (IGF1) という細胞成長因子である。IGF1を選択した理由は、1) 日本および米国で既に市販されている薬物であったこと、2) 内耳の発生や保護効果を示唆する基礎的な研究結果があったということが挙げられ、臨床応用に最も近い細胞成長因子と考えられたからである。IGF1の内耳に対する保護効果は十分に調べられていないとはいえなかったため、まず効果が期待しやすい条件、すなわち音響外傷前に薬物投与を行った。すると、IGF1を含浸させたゼラチンハイドロゲルを正円窓膜上に留置することにより、音響外傷から蝸牛有毛細胞を組織学的に保護することができ、恒久的な聴覚閾値上昇をほぼ完全に防御することができた¹⁷⁾。この結果を受け、臨床試験を実施するための非臨床試験としての実験を行った。治療の効果を調べるために、薬物投与は難聴発症後とし、急性高度難聴を対象とした臨床試験を想定し、音響外傷モデルに加え、内耳虚血モデルでの有効性も同時に検討した。なお、虚血モデル解析は愛媛大学耳鼻咽

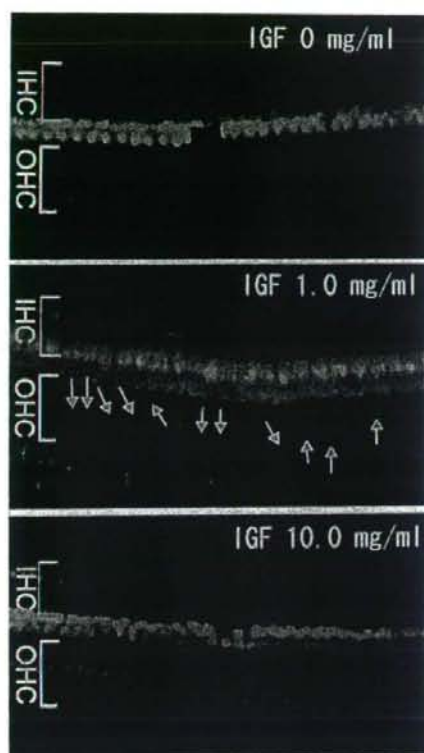


図4 ゼラチンハイドロゲルを用いた IGF1 投与による蝸牛有毛細胞保護効果
音響外傷後、IGF1 を含まない生食を投与された蝸牛では、ほとんどの外有毛細胞 (OHC) が消失しているが、IGF1 投与量が増加するに従い、残存している外有毛細胞数が増えている。内有毛細胞 (IHC) には大きな変化は認められない。(文献18)より改変)

喉科羽藤直人先生が中心となって行った。結果、音響外傷、内耳虚血の両モデルともに感音難聴を有意に抑制することができ、組織学的にも蝸牛有毛細胞生存促進効果が確認された(図4)^{10,11)}。さらに、中耳炎などの有害事象が起こらないことも確認された。

ゼラチンハイドロゲル・IGF1 治療の臨床応用

IGF1 は既に販売されている薬物であり、ゼラチンハイドロゲルも血管再生などの臨床試験ですでに院内製剤として使用されていたこと¹⁰⁾。さらに薬物投与方法が外用に相当することから、臨床応用への問題点は少ないと思われたが、プロトコル作成開始から倫理委員会承認までおよそ1年を要した。臨床試験実施までには解決すべき問題として、いくつかの課題があった。ひとつは、ヒ

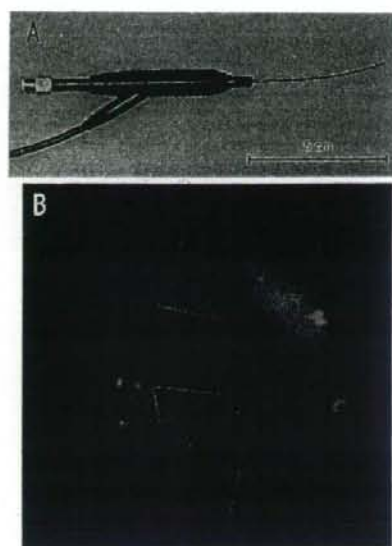


図5 超細径内視鏡 (A) と経鼓膜的に超細径内視鏡により観察した正円窓 (B)。矢頭は正円窓膜を示す。(文献21)から改変)

トでの投与手技の確立である。薬物側の安全性が高いことから、投与手技が有害事象の要因となる可能性が高い因子と考え、安全性に留意した方法の開発を意図した。また、正円窓窩に正確にゼラチンハイドロゲルを留置することが、治療法の有効性に重要な因子となることから、確実しかも低侵襲かつ簡単な方法が必要となる。ヒト側頭骨標本(耳介、外耳道つき)を用いて、手術用顕微鏡、超細径内視鏡を用いて、外来で施行可能な方法を検討した。われわれが用いた超細径内視鏡は外径が1mm以下であり、2mmの鼓膜切開をおけば鼓室内のかなりの範囲が観察できる。鼓膜後下象限に2mm程度の切開をおき、超細径内視鏡を挿入すると、確実に正円窓窩を確認することができ(図5)、手術用顕微鏡(外来処置用顕微鏡)下での操作を併用することにより、安全にしかも容易に正円窓窩にハイドロゲルが留置できることが分かった¹⁰⁾。

われわれにとって最大の課題は、臨床試験のデザインであった。科学的(臨床統計学的に正しい)かつ倫理的に考慮されたデザインが必要となる。しかし、いくら理想的なデザインであっても、症例のリクルートが行えないデザインでは臨床試験として成立しない。厳密なデザインでありながら、倫理的配慮に富み、なおかつ必要な症例数を集めることができる臨床試験ということになる。難しい課題である。また、当然のことながら基礎的な研究結果に立脚し、効果が期待できる症例を対象とし

適応基準

登録時に下記の規準を全て満たす患者を対象とする。

1)	純音聴力検査および耳鼻咽喉科的診察にて突発性難聴診断基準の突発性難聴確実例または疑い例と診断されている	はい
2)	誘発耳音響放射検査にて蝸牛有毛細胞障害が示されている	はい
3)	ステロイド治療の開始日から1週間以上後の有効性判定において、不変と判定されている	はい
4)	急性高度難聴の発症後30日未満である	はい
5)	同意取得時において、年齢が20歳以上である	はい
6)	耳鼻咽喉科外来に通院可能な全身状態である	はい

除外基準

登録時に下記の除外規準に1つでも当てはまる患者は対象としない。

1)	活動性の慢性中耳炎、急性中耳炎、滲出性中耳炎および炎症所見が存在するあるいは耳管機能障害が存在する	いいえ
2)	既にステロイド以外の感音難聴の治療として、バトロキシソンの全身投与、プロスタグランジンE1およびβ製剤の全身投与、高気圧酸素療法を実施している	いいえ
3)	現在治療が必要な悪性新生物を有する	いいえ
4)	悪性腫瘍の治療後5年以上経過しているが治療もしくは寛解状態が保たれていない	いいえ
5)	重篤な肝障害を有する (AST>100, ALT>100)	いいえ
6)	コントロール不良の糖尿病を有する (HbA1cが10を超えるもの)	いいえ
7)	下身体機能不全、副腎機能不全の治療中である	いいえ
8)	生命予後が不良の合併症を有する	いいえ
9)	妊婦、授乳婦および妊娠の可能性(意思)のある女性である	いいえ
10)	重度の薬剤アレルギーの既往を有する	いいえ
11)	過去1年以内にアルコールもしくは薬物依存の既往がある	いいえ

図6 第I-II相臨床試験「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」適応基準と除外基準

なければならない。通常の薬物の臨床試験では、第一段階として安全性のみを検討する第I相という臨床試験が健常者を対象として行われるが、今回は鼓膜切開を要することなどから、安全性と少数例での治療効果を調べる第I-II相臨床試験としてのデザインを行った。対象は、突発性難聴を含める急性高度難聴とし、厚生省班研究の突発性難聴診断基準での確実例および疑い例とした。本研究課題で行った動物実験でも音響外傷および内耳虚血を行ってから早いタイミングで治療の処置を行っているが、他の同様の実験でも薬物投与を早期に開始することが良好な治療効果に結びつくことが示唆されている。つまり、突発性難聴発症から早期に治療を開始した方が有効率は高まることが期待される。しかし、確実なエビデンスはないがステロイドの全身投与が一般的な治療法として、世界で広く用いられている。すなわち、ある程度の有効性が期待できると推察される既存の治療法が存在するともいえる。いいかえると、すべての突発性難聴症例で効果がある程度分かっている治療法を受ける機会を奪うことはできないということになる。このような背景から、今回の臨床試験では、ステロイド全身投与が無効であった急性高度難聴症例を対象とし、ただし、発症後30日未満という条件を設けた。有効性を考えると2週間以内が妥当だと感じられたが、症例のリクルートを考

え、30日未満とした。次の問題は、症例数の設定である。症例数を設定するためには、統計学的な仮説が必要となる。つまり、ハイドロゲルによるIGF1局所投与をステロイド無効の急性高度難聴例に行った場合、何%で有効となるかが予想されるかを事前に設定しなければならない。そこで、これまでに京都大学でステロイド無効例に行われてきた治療法である高気圧酸素療法の臨床統計を行った。2000年から2006年に高気圧酸素療法を行ったステロイド無効突発性難聴症例は199例あり、この内63例に回復以上の治療効果を認めた。従って、回復以上は約33%となる。ハイドロゲルによるIGF1局所投与の回復以上の期待値を63%として、 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。症例登録の適応基準と除外基準を図6に示す²⁴⁾。エンドポイント(この試験から何がわかるか)は、1)ゼラチンハイドロゲルによるIGF1局所投与がステロイド無効急性高度難聴例(発症後30日未満)に対してどの程度の有効性が期待できるのか、2)有害事象はどの程度発生するのかを明らかにすることになる。2008年7月現在、12例の登録が終了している。京都大学医学部附属病院には、探索医療センターという基礎から臨床への橋渡し研究を行う機関があり、われわれ

の臨床試験も同センターの検証部の協力のもとにデザインを行い、実際の臨床試験における登録や経過観察では臨床部のサポートを受けて行っている。詳細な結果は公開できないが、やはり治療を行うまでの期間が長いと有効性は乏しい印象を受けている。現在のところ、問題となる有害事象は発生していない。

ポリグリコール乳酸を用いた内耳薬物投与

ゼラチンハイドロゲルは静電気力により薬物と結合することから、親水性でサイズの大きな分子に適する。疎水性、低分子な薬物については、ゼラチンハイドロゲルは十分な結合力を発揮できないため、薬物は短時間で放出されてしまい、徐放はできない。例えば、ゼラチンハイドロゲルと同じゼラチンポリマーであるゼルフォームなどを用いた場合も同様の理由で徐放はできない。われわれは、疎水性あるいは低分子化合物を徐放する手段として、ポリグリコール乳酸を用いたパーティクル形成を用いている。簡単にいうと薬物を封じ込んだ小さなパーティクルを作り、ポリグリコール乳酸が加水分解されるに伴い形成されるパーティクルのクラック（ひび）から薬物が放出される仕組みである。この手法は、全身投与する製剤としても用いることができる点がゼラチンハイドロゲルを用いた徐放と大きく異なる。現在、われわれはいくつかの薬物の徐放についてポリグリコール乳酸を用いた方法を用いて検討しているが、ここでは耳鳴り抑制を目的としたリドカインの徐放について紹介する。

リドカインは最も広く用いられている局所麻酔薬であるが、不整脈治療として全身投与でも用いられている。リドカインの点滴静注が耳鳴り抑制に有効なことは広く知られており、最も効果的な薬物のひとつである。また、鼓室内投与での有効性を示す報告も散見される²⁰。リドカイン全身投与は常に嚴重な副作用の監視の必要があり、局所投与ではめまいなどの前庭症状が問題となる。リドカインによる耳鳴り治療については、検討すべき課題が多く残されているが、作用時間が短いことも大きな問題の一つである。適切な濃度のリドカインを長期的に蝸牛に供給することができれば、耳鳴りの長期的な抑制、緩和が可能となる可能性がある。そこで、われわれはリドカイン含有ポリグリコール乳酸マイクロパーティクルを作製し、その徐放特性を生体内外で調べた。ポリグリコール乳酸では、ナノスケールのパーティクルを作ることも可能であり、ナノパーティクルは正円窓膜を通過し、蝸牛内での徐放が可能であることを既に報告しているが²⁰、長期的な徐放を目的とした今回の検討では、直径100 μm と5 μm の大小2つのサイズのマイクロパーティクルを作製し、リン酸緩衝液中での徐放動態を

調べた。5 μm のパーティクルでは、最初の5日間で約50%のリドカインが放出され、残りが2週間かけて徐放されることが分かった。100 μm のパーティクルでは、最初の1日で約60%のリドカインが放出され、残りは4週間かけて徐放されることが示された。最初にある程度の量のリドカインが放出され、長期に濃度が維持される徐放動態が望ましいと考え、100 μm のパーティクルを使用して、生体内での徐放解析を行った。結果、2週間蝸牛外リンパ中にリドカインを検出することが可能であり、かなり長期の徐放が可能であることが分かった²⁰。リドカイン含有パーティクル局所投与による中耳、内耳の明らかな傷害は認められていない。以上の結果から、ポリグリコール乳酸は内耳へのリドカイン徐放に有効なバイオマテリアルであることが示唆された。

今後の展望

現在行っているゼラチンハイドロゲルを用いたIGF1局所投与による急性高度感音難聴治療の臨床試験を完了し、次のステップ、多施設での有効性の解析に進めることが第一の目標となる。ゼラチンハイドロゲルは、多くの細胞成長因子や神経栄養因子の徐放に用いることができるので、今後臨床での使用が可能である、あるいは近い将来に可能となる製剤の感音難聴治療への可能性を多角的に検討していきたい。ポリグリコール乳酸による薬物徐放では、まずリドカイン徐放による耳鳴り抑制に関する臨床試験開始が目標となる。現在、ステロイドの徐放についても検討しており、臨床応用を考慮した基礎的研究を展開中である。今回紹介させて頂いた内耳薬物投与システムを内耳再生医療に応用することも重要なミッションと考えている。われわれは、ノッチ情報伝達系阻害薬が内耳有毛細胞再生に応用できる可能性を示唆する所見を得ている²⁰。このような薬物の内耳への徐放や内耳細胞移植治療の支持療法としての内耳薬物投与が内耳再生に関連する研究課題となる。

耳鼻咽喉科臨床医として内耳基礎研究を行っている。特に留学を経験されている先生方は感じられるようだが、欧米の内耳研究者との間に時間的、予算的ハンデイを感じることもある。そして、「日本で臨床しながら、研究してもだめだ」という声をしばしば耳にする。しかし、今回紹介させて頂いた一連のトランスレーショナル（橋渡し）研究は、基礎的研究ができる臨床医が最も有利な分野ではないだろうか。基礎的研究から得られた着想を実際に自分の手で臨床まで持っていき、逆に臨床の現場で感じるジレンマを解消するためのプロジェクトを立ち上げることもできる。一方、多くの他分野の研究者の協力がなければ、内耳薬物投与システムの開発研究、