

200912035A

厚生労働科学研究費補助金  
医療機器開発推進研究事業

ナノテクノロジーを用いたDDSによる耳鳴の克服

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 坂本達則  
(京都大学大学院医学研究科)

平成22年(2010年)3月

厚生労働科学研究費補助金  
医療機器開発推進研究事業

ナノテクノロジーを用いたDDSによる耳鳴の克服

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 坂本達則  
(京都大学大学院医学研究科)

平成22年(2010年)3月

を受け入れられず、効果の乏しい薬剤を漫然と服用し、外来で医師に長時間の説明を求め、あるいはドクターショッピングという形でいくつもの病院を渡り歩く。このような状況が社会的にも医療経済的にも望ましいとはとうてい言えるものではない。では耳鳴に対して有効な薬剤はないのであろうか。局所麻酔薬リドカインは、静注で耳鳴軽減効果があることは二重盲検でも確認されているが、リドカインは代謝が速く、耳鳴に対する効果はほんの数時間しか持続しないうえ、不整脈やアレルギー反応、中枢抑制によるけいれんを起こす確率が比較的高い薬剤でもある。リドカインの局所投与として経鼓膜的に鼓室内投与することでも耳鳴軽減効果が得られることが経験的に知られているが、数時間持続する激しいめまいを伴い、嚥下とともに薬液は鼓室から排出されることなどからこれも治療効果が持続しない。すなわち、リドカインによる耳鳴治療は、その効果が持続しないことと副作用を考慮すると一般的な治療としては受け入れがたい。我々はこれに対する解決方法として、内耳ドラッグデリバリーシステム（DDS）を用いることができると考えた。具体的には、リドカイン徐放製剤を蝸牛の正円窓膜上に極細径内視鏡を用いて正確に留置することで、濃度と持続時間を制御して、リドカインを蝸牛に選択的に投与することで、副作用を最小限に抑え、満足な効果持続時間を得ることが出来るという方法である。このドラッグデリバリーシステムは、将来的には他

の内耳疾患に対しても広く用いることのできる基盤的な技術である。

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

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

## B. 研究方法

### 1. リドカイン含有PLGAマイクロパーティクル

これまでに、リドカイン徐放PLGAマイクロパーティクル、ナノパーティクルを作成

し、in vitroで徐放すること、in vivoではモルモットの正円窓膜上に留置して蝸牛にリドカインを運搬できること、目立った有害事象が生じないことを示した。これに引き続いての研究を行った。

耳鳴の抑制にリドカインが有効であることは臨床的・経験的には知られているが、その作用機序や作用部位は常に議論の対象となっていた。すなわち、リドカインは中枢に作用しているのか、あるいは末梢（蝸牛）で作用しているのか、さらにはその両方であるか、どちらでもないのかが明らかになっていない。この解明が困難な原因の一つは、耳鳴の抑制効果を可視化する方法がないことである。同じ事が本研究で用いるリドカイン含有パーティクルの作用を検証するときにもあてはまる。ヒトにおいて耳鳴検査と総称される一連の検査があるが、これらは、本質的には、自覚的に感じている耳鳴と外部から与えた参照音との類似性を主体的に評価して申告しているに過ぎない。そして、耳鳴を対象とする動物実験は、本質的に困難である。

現状としてはこのように耳鳴研究は困難な状況にあるが、我々は本研究を通じて下記のような方法での解決を目指した。

### 1.1. リドカインの効果を検出するための分子生物学的手法の確立

耳鳴の存在によって蝸牛で、あるいは中枢で発現する分子の量や性質が変動するのを検出することができれば、有力な方法となる。脳由来神経栄養因子（BDNF）や神経の可塑性と関連のある細胞骨格分子（Arg3.1/Arc）の中枢での発現量がある条件下では耳鳴に

よって変動するという報告もある（Tan 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) vol. 145 (2) pp. 715-26）。われわれはこれと同様に、リドカイン投与系で変動する耳鳴関連分子の検索を試みた。正常げっ歯類、音響外傷によって耳鳴を引き起こした動物、これに加えてリドカインを局所投与した動物を作成し、有毛細胞、ラセン神経節細胞、蝸牛神経核、下丘のそれぞれで様々な分子のin situ ハイブリダイゼーション、および免疫染色を行い、発現量の変化が見られないかを検討した。

### 1.2. リドカインの効果を検出するための生理学的検査

リドカインの投与によって聴力が変化する場合があることが報告されているが、これが検出できればリドカインが何らかの作用を蝸牛においてもたらしたことを支持するデータとなる。正円窓膜上に2%リドカイン含浸スポンゼル、人工外リンパ液含浸スポンゼル、リドカイン含有PLGAマイクロパーティクルを置いた動物を作成し、聴性脳幹反応（Auditory Brainstem Responses、以下ABR）の閾値および聴性複合活動電位（Compound action potential、以下CAP）の測定を行った。ABRは薬剤投与前、直後、3、7日後に測定した。CAPは投与前、投与後30分、1時間、3時間で測定した。

### 1.3. 動物行動モデルを用いた耳鳴の検出とリドカイン含有PLGAマイクロパーティクルの有用性の評価

分子生物学的手法は有力な方法であるが、耳鳴という自覚症状の本質的な評価になっているかという問題がある。動物実験でこれを解決する手法は、条件付けによる行動モデルを用いた評価になる。

Rüttigerらはラットを用いた耳鳴り行動モデルを報告している。(Rüttiger et al. A behavioral paradigm to judge acute sodium salicylate-induced sound experience in rats: a new approach for an animal model on tinnitus. *Hear Res* (2003) vol. 180 (1-2) pp. 39-50) チェンバーの一方に狭いステージ、反対側に報償として砂糖水が出る供給装置を設け、その間の床には通電できるようにした。無音状態では砂糖水の供給はなく、床は通電されている。天井のスピーカーから音を鳴らしている間は床の通電がなく、砂糖水が供給される。このような条件で訓練をしたラットにサリチル酸で耳鳴を誘発して、床の通電なし、無音状態でチェンバーに入れると、あたかも音があるときのような行動を取ると報告している。我々は彼らとの共同研究で、音響暴露（10KHz、トーンバースト、120dB、2時間）によって耳鳴を誘発したラットの作成を試みた。

ほかにも、ラットの強大音に対する反射的運動が前刺激で抑制されることを利用した耳鳴の検出法（GPIAS）も報告されており（Yang et al. Salicylate induced tinnitus:

behavioral measures and neural activity in auditory cortex of awake rats. *Hear Res* (2007) vol. 226 (1-2) pp. 244-53)、これの応用も準備している。

### 1.4. ヒト頭部標本を用いた検討

極細径内視鏡を用いて、経鼓膜的にパーティクルを正円窓膜上に留置するという手技について、臨床試験の前に実践的訓練を行った。

### 1.5. 臨床試験計画

京都大学大学院医学研究科・医学部及び附属病院 医の倫理委員会に提出する第1・2相臨床試験プロトコルを作成している。

現時点での対象患者は、罹病期間3～12ヶ月の慢性耳鳴患者で、軽度～中等度の難聴を伴うもので、プロトコル治療としてリドカイン含有PLGAマイクロパーティクルの単回投与を行う。鼓膜切開を置いて、細径中耳内視鏡で正円窓膜を確認の上、ゼラチンスポンジと混合したリドカイン徐放マイクロパーティクルを留置する。一次エンドポイントは自覚的な耳鳴の改善の有無。副次エンドポイントとして耳鳴スコア（THI）の改善、耳鳴改善の持続時間、めまい等の有害事象の出現である。

## 2. ベタメサゾン含有ステルス型ナノパーティクル

ポリエチレングリコール（PEG）のコーティングを持ったナノパーティクル（ステルス型ナノパーティクル、慈恵医科大学DDS研究所檜垣恵先生提供）による治療の可能性を検討した。

本年度は、データを整理し、論文投稿を行った。

### 3. 倫理面への配慮

動物実験に関しては、本学の動物実験に関する倫理委員会の承認のもとに、動物愛護に十分配慮した上で行う。臨床試験については、本学の医の倫理委員会の承認のもとに施行する。人権擁護上の配慮を十分に行い、対象者に対する不利益、危険性の排除に対する十分な配慮をはかり、研究計画に対する、説明と理解（インフォームドコンセント）を得られた上で研究を実施する。

## C. 研究結果

### 1. リドカイン含有PLGAマイクロパーティクル

#### 1.1. リドカインの効果を検出するための分子生物学的手法の確立

音響外傷の有無、リドカイン局所投与の有無で、免疫染色を用いて各種の分子を半定量的に、あるいはin situ hybridization法を用いてmRNAの存在を、蝸牛、ラセン神経節、脳幹の蝸牛神経核、聴皮質のそれぞれのレベルで検討を行った。これまで知られているArg3.1/Arcの発現量の変化は検出されなかったが、GABA関連の分子については発現量の変動が見られた。

#### 1.2. リドカインの効果を検出するための生理学的検査

ラットの正円窓膜上に薬剤を投与した後のABR閾値について、有意な変動を検出されなかった。

CAPの振幅は、2%リドカイン投与後1時間まで減少し、その後3時間までに回復した。

人工内リンパおよびリドカイン含有PLGAマイクロパーティクル投与群では有意な変動を認めなかった。

#### 1.3. 動物行動モデルを用いた耳鳴の検出とリドカイン含有PLGAマイクロパーティクルの有用性の評価

ラットを音響暴露（10KHz、トーンバースト、120dB、2時間）、あるいはサリチル酸の腹腔内投与後、上記チェンバーにラットを置いたところ、外部からの音刺激なしに水飲み行動の回数が有意に増加した。

#### 1.4. ヒト頭部標本を用いた検討

臨床試験担当となる可能性のある分担研究者が側頭骨標本を用いた実践的トレーニングを行った。

#### 1.5. 臨床試験計画

上述のような計画で臨床試験を検討しているが、対照群としてリドカインを含まない担体のみPLGAマイクロパーティクルの留置を行うことが倫理的に認められるかどうか、またこれらのパーティクルでGMP基準を満たすものが入手できるかどうかなどの問題について議論を行っている。

### 2. ベタメサゾン含有ステルス型ナノパーティクル

データの詳細は昨年度の通りで、論文投稿を行った。

査読者より指摘されたとおり、ベタメサゾンが蝸牛内、特に有毛細胞で働いたことを検証するために、グルココルチコイド受容体の発現についての検討を加えた。

## D. 考察

### 1. リドカイン含有PLGAマイクロパー ティクル

リドカイン含有PLGAマイクロパーティクルの臨床効果を予想するための動物実験として、耳鳴りを検出するための分子生物学的手法の確立を目指した。ラットに音響暴露を与えて内耳障害を加え、耳鳴りを引き起こしたと考えられる状態にしたときに、一部の分子の発現が変動した。このことは、これまでほとんど不可能と考えられていた耳鳴りという自覚症状を分子の発現量で読み取ることが出来るという可能性を示しているばかりでなく、耳鳴りという現象の背景にある分子生物学的気候の解明にもつながる可能性がある。

生理学的検査ではABR閾値の変動は見られず、これまでに本研究で示したモルモットでの挙動（7日目で聴力が一時的に変動すること）とは異なる結果になった。腫の違いによる物なのか、実験手法の問題なのかを検討する余地がある。CAPでは2%リドカイン投与群で振幅の低下が見られ、リドカインが蝸牛に作用を及ぼす、すなわちリドカインは局所投与でも耳鳴りに作用する可能性があることを支持する。リドカイン含有PLGAマイクロパーティクルではCAP振幅に変動は見られなかったため、少なくとも内耳に聴力変動をもたらす濃度のリドカイン濃度には到達していないということになるが、耳鳴りの抑制効果についてはこの段階で否定する物ではないと考えている。

動物行動モデルについては、行動モデルが再現できていることが確認された。今後、リ

ドカインおよびリドカイン含有PLGAマイクロパーティクルを用いて行動実験を行って行きたいと考えている。

ヒト側頭骨標本を用いた検討では、複数の術者が全例同じ方法で正円窓膜上に薬剤を留置することが出来た。また、正円窓膜上に明らかな偽膜が存在する症例は見あたらなかった。

臨床試験については、これらの問題を解決しつつ、近い将来倫理委員会の承認を得たい。

### 2. ステルス・ナノ・ステロイド

ステルス・ナノ・ステロイドはステロイド単独よりも音響外傷後の治療効果が高いことが分かった。ただ、このステルスパーティクルは反復投与によってステルス効果が減少することが報告されたが（Ishihara et al. Accelerated Blood Clearance Phenomenon Upon Repeated Injection of PEG-modified PLA-nanoparticles. Pharm Res (2009)）、その解決については目処が立っているとのことなので（Personal communication）、将来は臨床試験を行って治療へと結びつけることが出来ると考えている。

古典的なナノパーティクルでは蝸牛への分布はほとんど見られず、そのままでは内耳疾患の治療に応用することは困難と考えられたが、今回用いたステルス型ナノパーティクルは蝸牛の血管条では分布が見られた。このパーティクルの分布が問題となっている血液・内耳関門を通過しているかという点については評価が難しい。なぜなら、今回分布が見られた部分は血管条で、血管壁のどの層に

パーティクルが分布したかまでは評価できていないからである。しかし、今回のようなステロイド徐放を目的とする場合、仮にパーティクルが血液・内耳関門を超えていなくても、徐放したステロイドが内耳局所で長時間高濃度に保たれるなら目的は達成されていると考える。実際、ステルス・ナノ・ステロイド投与後の蝸牛内ベタメサゾン濃度を測定して、高い濃度が保たれていることを確認している。

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

## E. 結論

リドカイン徐放パーティクルについて、有害事象評価を含めた前臨床試験を行った。動物を用いた有効性評価は現在進行中で、ヒトにおける安全性・有効性を確認するための臨床試験プロトコルを作成中である。

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

## F. 健康危険情報

現時点で、健康危険情報とすべきものは得られていない。

## G. 研究発表

### 1. 著書

1) 中川隆之、伊藤壽一, 2. 第2章 生体シグナル因子の利用 1.細胞増殖因子 10)内耳 遺伝子医学MOOK13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., 150-155, メディカルドゥ, 大阪, 2009.5.

## 2. 論文発表

- 1) Shojaku H, Watanabe Y, Yagi T, Takahashi M, Takeda T, Ikezono T, Ito J, Kubo T, Suzuki M, Takumida M, Takeda N, Furuya N, Yamashita H; Peripheral Vestibular Disorder Research Committee of Japan., Changes in the characteristics of definite Meniere's disease over time in Japan: a long-term survey by the Peripheral Vestibular Disorder Research Committee of Japan, formerly the Meniere's Disease Research Committee of Japan., *Acta Otolaryngol.* 2009 Feb;129(2):155-60.
- 2) 伊藤壽一., 耳鼻咽喉科手術トレーニング. , 耳鼻臨床.102(1):1-3,2009.01
- 3) 中川隆之., 内耳有毛細胞の再生による難聴治療, *Aging & Health* 51:38-41,2009.
- 4) Usui K, Ikeda A, Nagamine T, Matsubayashi J, Matsumoto R, Hiraumi H, Kawamata J, Matsushashi M, Takahashi R, Fukuyama H., Abnormal auditory cortex with giant N100m signal in patients with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy., *Clin Neurophysiol.* 2009 Nov;120(11):1923-6. Epub 2009 Sep 29.
- 5) Hiraumi H, Nakagawa T, Ito J., Efficiency of a transtympanic approach to the round window membrane using a microendoscope. , *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2009 Mar;266(3):367-71. Epub 2008 Jul 19.
- 6) 松村保広, 加藤哲郎, 濱口哲弥, 南野哲男, 坂本達則, 臨床家たちが語るDDSの臨床応用, *Drug Delivery Syst.* 24(1):9-24, 2009.01
- 7) 坂本達則., DDSの現状 内耳DDS, *血管医.*10(3): 279-287,2009.08
- 8) Horie RT, Sakamoto T, Nakagawa T, Tabata Y, Okamura N, Tomiyama N, Tachibana M, Ito J, Sustained delivery of lidocaine into the cochlea using poly lactic/glycolic acid microparticles. *Laryngoscope*,120,377-83,2010



9) Ogita H, Nakagawa T, Sakamoto T, Inaoka T, Ito J, Transplantation of bone marrow-derived neurospheres into guinea pig cochlea. Laryngoscope,120,576-81,2010

### 3. 学会発表

- 1) Ito J., Keynote Lecture : Research Forum: Stem cells and Genetic therapy for Hair Cell related Hearing Loss. , 3rd International Congress on Rhinology,Otology & Skull Base Surgery - Current Concepts. Athens,Greece. May 7-10,2009.
- 2) Ito J., Round Table Discussion : Meniere's disease - Inner ear pressure regulation out of control., 80th Annual Meeting of the German Society of Oto-Rhino-Laryngology,Head and Neck Surgery. Rostock,Germany. May 20-24,2009.
- 3) Ito J., Symposia : Translational science - Regeneration of Cochlear. 'Cell Therapy for Inner Ear Diseases.', 27th Politzer Society Meeting. London,UK. Sep 3-5,2009.
- 4) Ito J., Symposia : Innovations in Pharamcology and the Inner Ear. 'Local Drug Delivery Therapy for Inner Ear Diseases.', 27th Politzer Society Meeting. London,UK. Sep 3-5,2009.
- 5) Ito J., Corporate Symposia : Operative Cases Using Advanced High Resolution Radiographic Image by Cone-beam CT., AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO. San Diego,CA,USA. Sep 26-29,2009.
- 6) Ito J., Instruction Courses : Regeneration Therapy for the Inner Ear Diseases. , AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO. San Diego,CA,USA. Sep 26-29,2009.
- 7) Ito J., Development Of A Novel Therapeutic Method For Sensorineural Hearing Loss By A Newly-Invented Artificial Sensory Organ., 7th Asia Pacific Symposium on Cochlear Implants and Related Siences (APSCI2009). Singapore. Dec 1-4 2009.
- 8) Ito J., New drug delivery systems for inner ear diseases., The 10th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems. Maui,Hawaii,USA. Dec 16-20 2009.

- 9) 伊藤壽一., きこえのしくみと再生医療を応用した難聴の治療., 日本女医会京都支部の集い. 平成21年3月1日. 京都.
- 10) 伊藤壽一., 聞こえの仕組みと治療でよくなる難聴., 耳の日記念公開講演会. 平成21年3月1日. 京都.
- 11) 伊藤壽一., 感音難聴に対する再生医療の応用., 第68回奈良県耳鼻咽喉科研修会. 平成21年3月7日. 橿原.
- 12) 伊藤壽一., 人工内耳について., 人工内耳相談会講演. 平成21年3月22日. 京都.
- 13) 伊藤壽一., 再生医療を利用した難聴の治療 (特別講演) ., 日本耳鼻咽喉科学会静岡県地方部会. 平成21年4月12日. 静岡.
- 14) 伊藤壽一., 耳鼻咽喉科研修制度と教育システム, 倉敷耳鼻咽喉科・頭頸部外科研究会特別講演. 平成21年6月26日. 倉敷.
- 15) 伊藤壽一., 再生医療を応用した難聴の治療., 第30回耳疾患懇話会特別講演会. 平成21年8月22日. 大阪.
- 16) 伊藤壽一., 再生医学を応用した難聴の克服., 第63回国立病院総合医学会イブニングレクチャー講演. 平成21年10月23日. 仙台.
- 17) 伊藤壽一., Office-based 3D-CTのcadaver dissection courseでの有用性., 第11回耳鼻咽喉科手術支援システム・ナビ研究会シンポジウム. 平成21年11月14日. 金沢.
- 18) 伊藤壽一., 再生医学を応用した難聴の治療., 第43回御茶ノ水耳鼻咽喉科・頭頸部科治療研究会. 平成21年11月19日. 東京.
- 19) 伊藤壽一., 再生医学の難聴治療への応用., 再生医療の全体像を見わたせるわかりやすい解説講座～事業化に失敗しないために～<臨床応用>. 平成21年11月30日. 京都.
- 20) 伊藤壽一., 新しい人工聴覚器の開発., 第4回ウェルネス研究科. 平成21年12月15日. 京都.
- 21) Nakagawa T, Kikkawa YS, Horie RT, Ito J., Hydrogen rescues auditory hair cells from reactive oxygen species., The 32nd ARO MidWinter Meeting. Baltimore,MD,USA. Feb 14-19,2009.
- 22) Nakagawa T, Horie RT, Sakamoto T, Tabata Y, Okamura N, Tomiyama N, Ito J., Relief from peripheral tinnitus: sustained delivery of lidocaine

- into the cochlea using PLGA microparticles. , 3rd Tinnitus Research Initiative Meeting 2009 (TRI). Stresa,Italy. Jun 24-26,2009.
- 23)Nakagawa T., Endoscopic management of skull base chordoma., The 3rd Asia Pacific Rhinology Innovative Leaders (APRIL) Forum on Advanced FESS and Endoscopic Skull Base Surgery. Hong Kong. Aug 7,2009.
- 24)Nakagawa T, Sakamoto T, Kikkawa YS, Hiraumi H, Yamamoto N, Tabata Y, Inui KI, Ito J., Clinical trial for local IGF-1 treatment for acute sensorineural hearing loss., 46th Inner Ear Biology Workshop. Utrecht,Netherlands. Sep 12-15,2009.
- 25)Nakagawa T, Sakamoto T, Kikkawa YS, Hiraumi H, Yamamoto N, Onodera R, Tabata Y, Fukushima M, Inui K, Ito J., Local IGF-1 treatment for acute sensorineural hearing loss., AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO. San Diego,CA,USA. Sep 26-29,2009.
- 26)Nakagawa T, Use of cone beam CT images in cadaver dissection for ESS., AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO. San Diego,CA,USA. Sep 26-29,2009.
- 27)中川隆之, 嘉田真平, 扇田秀章, 坂本達則, 稲岡孝敏, 伊藤壽一, 骨髄由来間葉系細胞移植による内耳再生, 第8回日本再生医療学会. 平成21年3月5~6日. 東京.
- 28)中川隆之, 平海晴一, 坂本達則, 吉川弥生, 山本典生, 伊藤壽一, 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難聴治療, 第110回日本耳鼻咽喉科学会. 平成21年5月14~16日. 東京.
- 29)中川隆之, 生体吸収性材料を用いた新しい感音難聴治療開発, 第8回次世代医療システム産業化フォーラム. 平成21年11月27日. 京都.
- 30)中川隆之, 突発性難聴に対する最新の治療法(特別講演), 第150回日耳鼻青森県地方部会. 平成21年12月13日. 青森.
- 31)Hiraumi H, Kanemaru S, Miura M, Yamamoto N, Sakamoto T, Ito J., Histopathology of the soft tissues preserved in the cholesteatoma surgery., The 6th Extraordinary International Symposium on Recent Advances in Otitis Media. Seoul,Korea. May 6-10,2009.
- 32)Hiraumi H, Yamamoto N, Sakamoto T, Ito J., Revision in Cochlear Implant Surgery., 27th Politzer Society Meeting. London,UK. Sep 3-5,2009.
- 33)Hiraumi H, Yamamoto N, Sakamoto T, Ito J., Cochlear implantation in deaf children with additional disabilities., 7th Asia Pacific Symposium on Cochlear Implants and Related Sciences (APSCI 2009). Singapore. Dec 1-4,2009.
- 34)平海晴一, 金丸眞一, 山本典生, 坂本達則, 伊藤壽一., 蜂巢発育不良耳での経迷路法による聴神経腫瘍摘出., 第110回日本耳鼻咽喉科学会. 平成21年5月14~16日. 東京.
- 35)平海晴一, 三浦 誠, 金丸眞一, 山本典生, 坂本達則, 伊藤壽一., 経乳突手術時に大錐体神経を明瞭に確認できた1例., 第71回耳鼻咽喉科臨床学会. 平成21年7月2~3日. 旭川.
- 36)平海晴一, 山本典生, 坂本達則, 伊藤壽一., 人工内耳埋め込み術後耳に対する再手術症例の検討., 第19回日本耳科学会. 平成21年10月8~10日. 東京.
- 37)平海晴一., 重複障害のある難聴児への聴覚言語獲得支援. 人工内耳の問題点と対応., 第54回日本音言語医学会. 平成21年10月15~16日. 福島.
- 38)Sakamoto T, Horie R, Nakagawa T, Tabata Y, Ito J, Treatment of Tinnitus by Lidocaine Using Inner Ear Drug Delivery, The 32nd ARO MidWinter Meeting. Baltimore,MD,USA. Feb 14-19,2009.
- 39)Sakamoto T, Horie R, Nakagawa T, Higaki M, Ishihara M, Ito J, Treatment of Noise Induced Hearing Loss by Stealth-type Nanoparticles Encapsulating Betamethasone Phosphate, 3rd Tinnitus Research Initiative Meeting 2009 (TRI). Stresa,Italy. Jun 24-26,2009.
- 40)Sakamoto T, Adachi T, Narazaki M, Matsuda T, Nakagawa T, Ito J, Diagnostic Magnetic Resonance Images without Gadolinium for Inner Ear Diseases, 46th Inner Ear Biology Workshop. Utrecht,Netherlands. Sep 12-15,2009.

- 41) Sakamoto T, Anatomy of Inner Ear for MR Images, Examples of 7T MRI of mice, 46th Inner Ear Biology Workshop. Utrecht, Netherlands. Sep 12-15, 2009.
- 42) Sakamoto T, Horie R, Treatment of Tinnitus Using Lidocaine DDS, Tübingen Hearing Research Center, HNO-Universitätsklinik. Tübingen, Germany. Nov 18, 2009.
- 43) 坂本達則, ナノテクノロジーを用いたDDSによる耳鳴の克服, ナノメディシン研究成果発表会. 平成21年2月25日. 東京.
- 44) 坂本達則, 中川隆之, 伊藤壽一, 3D-CTを活用した内視鏡下鼻内手術解剖実習, 第110回日本耳鼻咽喉科学会. 平成21年5月14～16日. 東京.
- 45) 坂本達則, 堀江理恵, 中川隆之, 伊藤壽一, ステルス型ナノパーティクル化による音響外傷に対するステロイド治療効果の増強, 第110回日本耳鼻咽喉科学会. 平成21年5月14～16日. 東京.
- 46) 坂本達則, 耳科領域でのDDSの臨床応用, 第25回日本DDS (Drug Delivery System) 学会. 平成21年7月3～4日. 東京.
- 47) Sakamoto T, Nakagawa T, Kikkawa YS, Hiraumi H, Yamamoto N, Tabata Y, Inui K, Ito J. Clinical Trial for Local IGF-1 Treatment for Acute Sensorineural Hearing Loss. . Anaheim, CA, USA. 2010.2.6-2010.2.10

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得 (予定を含む)

検討中

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
中川隆之、伊藤壽一	2. 第2章 生体シグナル因子の活用 1.細胞増殖因子 10)内耳	田畑泰彦	遺伝子医学MOOK13号 臨床再生誘導治療2009	メディカルドゥ	大阪	2009	150-155

## 雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shojaku H, Watanabe Y, Yagi T, Takahashi M, Takeda T, Ikezono T, Ito J, Kubo T, Suzuki M, Takumida M, Takeda N, Furuya N, Yamashita H; Peripheral Vestibular Disorder Research Committee of Japan.	Changes in the characteristics of definite Meniere's disease over time in Japan: a long-term survey by the Peripheral Vestibular Disorder Research Committee of Japan, formerly the Meniere's Disease Research Committee of Japan.	Acta Otolaryngol	129(2)	155-60	2009
伊藤壽一.	耳鼻咽喉科手術トレーニング.	耳鼻臨床	102(1)	1-3	2009
中川隆之.	内耳有毛細胞の再生による難聴治療	Aging & Health	51	38-41	2009
Usui K, Ikeda A, Nagamine T, Matsubayashi J, Matsumoto R, Hiraumi H, Kawamata J, Matsuhashi M, Takahashi R, Fukuyama H.	Abnormal auditory cortex with giant N100m signal in patients with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy.	Clin Neurophysiol.	120 (11)	1923-6	2009
Hiraumi H, Nakagawa T, Ito J.	Efficiency of a transtympanic approach to the round window membrane using a microendoscope.	Eur Arch Otorhinolaryngol	266(3)	367-71	2009
松村保広, 加藤哲郎, 濱口哲弥, 南野哲男, 坂本達則	臨床家たちが語るDDSの臨床応用	Drug Delivery Syst	24(1)	9-24	2009

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
坂本達則.	DDSの現状 内耳DDS	血管医	10(3)	279-287	2009
Horie RT, Sakamoto T, Nakagawa T, Tabata Y, Okamura N, Tomiyama N, Tachibana M, Ito J	Sustained delivery of lidocaine into the cochlea using poly lactic/ glycolic acid microparticles	Laryngoscope	120	377-83	2010
Ogita H, Nakagawa T, Sakamoto T, Inaoka T, Ito J	Transplantation of bone marrow- derived neurospheres into guinea pig cochlea	Laryngoscope	120	576-81	2010

### III. 研究成果の刊行物 別刷



## 1. 細胞増殖因子

### 14) 内耳

中川隆之・伊藤壽一

内耳の発達や機能維持に、神経栄養因子や細胞増殖因子は重要な役割を果たしている。また、障害された内耳の治療にも有効であることが基礎的に示されており、臨床応用が期待されている。しかし、臨床応用に際しては、内耳にこれらの因子を適切に送達する方法を開発する必要があった。われわれは、ゼラチンハイドロゲルによる薬物徐放を内耳への神経栄養因子や細胞増殖因子の徐放に応用し、基礎的にその有効性を確認し、インスリン様細胞増殖因子1の内耳徐放による急性高度難聴治療の臨床試験を行っている。

#### はじめに

感音難聴は、最も頻度の高い身体障害の1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%には何らかの感音難聴が存在するとされている。しかしながら、いったん喪失した聴力を元に戻す方法は現在のところ存在しない。感音難聴の多くは内耳にある蝸牛の障害が原因であり、特に音刺激を受容する有毛細胞<sup>1)</sup>と有毛細胞が受容した音刺激を脳に伝えるラセン神経節<sup>2)</sup>細胞の障害が主因と考えられている(図①)。現在、高度難聴者に対しては人工内耳<sup>3)</sup>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。人工内耳では、音響刺激を電気刺激に変換し、蝸牛内に挿入された電極が直接蝸牛の神経細胞を刺激することにより聴覚を獲得する。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事実は、逆に聴覚障害が生活の質に与える影響の大

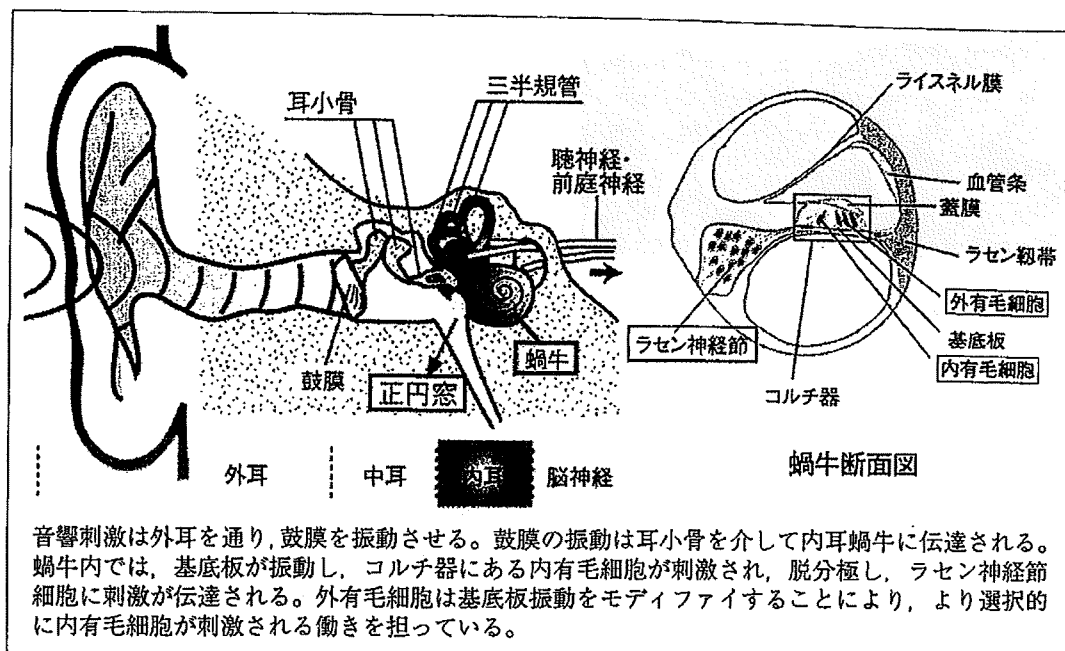
さを物語っている。このような背景から、聴覚再生を目的とした基礎的研究が活発に行われており、一般市民の新規治療法開発に対する期待も高い。

一方、近年の聴覚保護・再生を目的とした基礎的研究により、いくつかの新しい治療法の可能性が呈示されている。薬物治療に関する研究においても、いくつかの治療効果期待できる薬物が動物実験レベルで明らかにされており、神経栄養因子や細胞増殖因子もこれらに含まれる。多くの動物実験では、埋め込み型ポンプやウイルスベクターを用いた遺伝子導入が内耳への神経栄養因子や細胞増殖因子投与方法として用いられている<sup>4)</sup>。つまり、十分な効果を発揮するためには、一定期間以上の期間、内耳に神経栄養因子や細胞増殖因子が徐放されることが不可欠であるといえる。したがって、神経栄養因子や細胞増殖因子を用いた感音難聴治療を実現するためには、臨床応用が可能な安全かつ簡便な方法で、神経栄養因子や細胞増殖因子を内耳に一定期間徐放できるシス

#### key words

感音難聴, 脳由来神経栄養因子, インスリン様細胞増殖因子1, ゼラチンハイドロゲル, 薬物徐放, 局所投与, 有毛細胞, 蝸牛, 突発性難聴

図1 中耳, 内耳解剖



テムが必要となる。われわれは臨床応用への観点から、バイオマテリアルを用いた神経栄養因子や細胞増殖因子の内耳への徐放を考え、研究開発を行ってきた。この方法では、神経栄養因子や細胞増殖因子を含浸させたバイオマテリアルを中耳に留置するという簡単で安全な方法で薬物投与ができる。現在この方法を用いて、一部の研究成果は臨床応用に至っている。本稿では、バイオマテリアルとして生体吸収性ゼラチンハイドロゲルを用い、内耳に神経栄養因子や細胞増殖因子を投与する新しい感音難聴治療について紹介する。

## I. 内耳と神経栄養因子, 細胞増殖因子

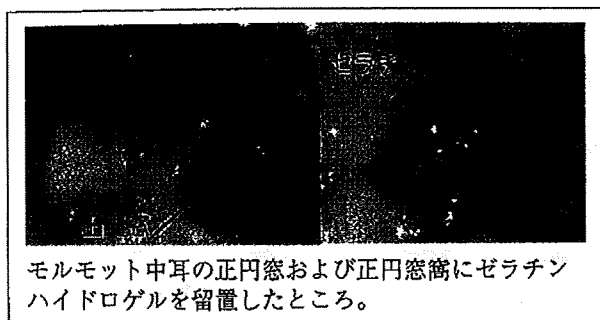
神経栄養因子や細胞増殖因子は、他の臓器と同様に内耳の発生段階において重要な役割を果たしていることが数多くのノックアウトマウスを用いた研究から明らかにされている。さらに、成熟後においても神経栄養因子や細胞増殖因子が内耳の細胞の生存維持や機能に不可欠であることが知られている。例えば、有毛細胞が受容した音響刺激を中枢に伝える役割を担っているラセン神経節細胞は、脳由来神経栄養因子 (BDNF) や Neurotrophin3 が欠如すると細胞死に陥る<sup>3)</sup>。BDNF や Neurotrophin3 は有毛細胞が産生し、パ

ラクラインによりラセン神経節細胞の生存が維持されている。さらに、障害を受けた内耳に神経栄養因子や細胞増殖因子を体外から投与することにより、有毛細胞やラセン神経節細胞を細胞死から回避させることができることが報告されている<sup>1)2)4)</sup>。このような背景から、神経栄養因子や細胞増殖因子は感音難聴を含めた内耳障害の治療薬として期待されている。

## II. ゼラチンハイドロゲルを用いた内耳薬物投与

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おり、広義での再生医療の臨床応用の鍵を握る技術といえる。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、内耳への薬物徐放という問題は解決できるのではないかと考え、神経栄養因子や細胞増殖因子の徐放に適したゼラチンハイドロゲルを用いた研究を展開した。田畑らは、化学的架橋によりゼラチンを重合させたポリマーを作製し、静電結合により薬物をゼラチンポリマーに結合させ、ゼラチンポリマーの生体内での分解により薬物を徐放するシステムを開発し、種々の神経

図② ゼラチンハイドロゲルの正円窓留置



栄養因子や細胞増殖因子の徐放が可能であることを示している<sup>9)</sup>。静電結合の強さやゼラチンポリマーの重合の強さによって徐放のスピードは調整可能とされている。

われわれは、まず 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<sup>9)</sup>、最近では聴覚刺激の中枢への伝達調整にも関与していることが示されている<sup>9)</sup>。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、ラセン神経節細胞に対する細胞死からの保護効果が示されていた<sup>12)</sup>。したがって、BDNF によるラセン神経節細胞保護実験は、ゼラチンハイドロゲルの神経栄養因子や細胞増殖因子を内耳徐放する方法としての有効性を検証するよいモデルと考えられた。まず、BDNF を含浸させたハイドロゲルを中耳正円窓<sup>13)</sup>膜上に留置し(図②)、蝸牛外リンパ中の BDNF 濃度を経時的に ELISA 法にて計測したところ、1 週間以上の徐放効果が期待できることがわかった<sup>7)</sup>。次に、耳毒性薬物全身投与により蝸牛有毛細胞を喪失させ、二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、ハイドロゲルによる BDNF 局所投与による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。ゼラチンハイドロゲルによる BDNF 投与により、組織学的に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<sup>7)</sup>。ゼラチンハイドロゲルを用いた場合の組織学的・電気生理学的な保護効果は、埋め込み型ポンプを用いた場合<sup>7)</sup>と同等であり、ゼラ

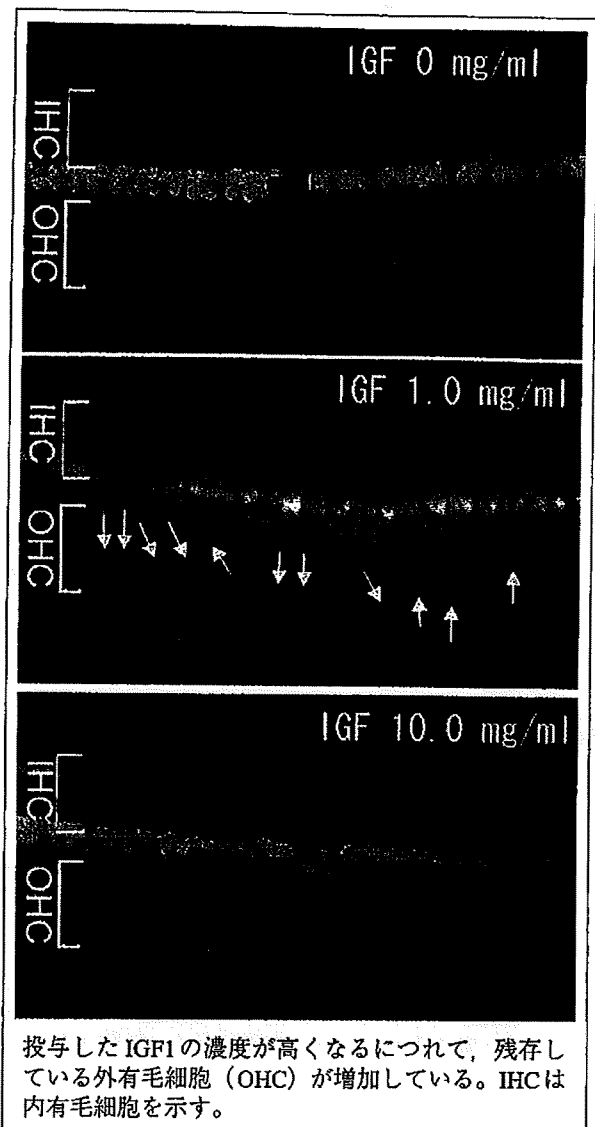
チンハイドロゲルを用いることにより埋め込み型ポンプと同等の薬物投与効果が得られることが示唆された。つまり、ゼラチンハイドロゲルは内耳への神経栄養因子や細胞増殖因子の投与に有用な方法であることが示されたといえる。

### 1. ゼラチンハイドロゲルを用いた IGF1 投与による内耳保護

臨床応用への次のステップとして、すでに臨床での使用が認可されている薬物である細胞増殖因子を用いた実験を行った。いくつかの細胞増殖因子が臨床に供されているが、インスリン様細胞増殖因子 1 (IGF1) を選択した。IGF1 を選択した理由は、第一に日本および米国ですでに市販されている薬物であったこと、第二に内耳の発生に関与し、内耳保護効果を示唆する基礎的な研究結果<sup>14)</sup>があったという 2 点である。また、臨床的にも重篤な有害事象が報告されておらず、安全性が高いことも理由に含まれる。しかしながら、BDNF と比較して、IGF1 の内耳保護効果は十分に検討されているとはいえなかったため、まず効果が期待しやすい条件、すなわち障害を与える前に薬物投与を行う条件での実験を行った。BDNF 実験と同様の方法、すなわち、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し、その後、強大音響曝露を行った。音響外傷による感音難聴は、主として有毛細胞の障害・消失によって引き起こされるが、ラセン神経節細胞や血管条など他の蝸牛組織も障害される、いわば蝸牛の総合的な障害モデルととらえることができ、急性の感音難聴に対する治療効果を調べるモデルとして妥当と考えた。結果、ゼラチンハイドロゲルによる IGF1 投与により、恒久的な聴覚閾値上昇をほぼ完全に抑制することができ、組織学的な有毛細胞の保護も確認された<sup>10)</sup>。つまり、IGF1 は有毛細胞保護効果を有し、ゼラチンハイドロゲルによる IGF1 局所投与は音響外傷による急性高度難聴に対して有効である可能性が示された。

次の段階として、治療的效果を調べるために、薬物投与を障害後、すなわち難聴発症後に投与する実験を行った。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

図③ IGF1による蝸牛感覚上皮保護効果



血障害モデル<sup>13)</sup>での有効性も検討した。内耳虚血は、突発性難聴<sup>14)</sup>の病態の1つと考えられている。音響外傷後にIGF1を投与した場合、音響曝露前投与に比べると効果は劣るものの、有意の聴覚閾値上昇抑制が確認され、有毛細胞の保護効果も確認された（図③）<sup>15)</sup>。内耳虚血モデルでも聴覚閾値の上昇が抑制され、組織学的にも蝸牛有毛細胞生存促進効果が確認された<sup>16)</sup>。したがって、音響外傷および内耳虚血という異なった病態による急性感音難聴に対して、ゼラチンハイドロゲルによるIGF1投与が治療的效果を有すると考えられた。さらに、中耳炎などの有害事象も認められず、安

全性が高い治療法であることも示唆された<sup>17)</sup>。これらの結果に基づき、ゼラチンハイドロゲルを用いたIGF1内耳投与による急性高度難聴治療の臨床試験の準備に着手した。

## 2. ゼラチンハイドロゲルによるIGF1内耳投与臨床応用

上記の研究成果をふまえ、ゼラチンハイドロゲルを用いたIGF1内耳投与による急性高度難聴治療について、安全性と少数例での治療効果を調べる第I～II相臨床試験のデザインを京都大学医学部附属病院探索医療センターの協力のもとに行った。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。確実なエビデンスはないが、ステロイドの全身投与は急性高度難聴に対する一般的な治療法として世界で広く認知されている。今回の臨床試験では、倫理的な配慮から、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。ただし、治療の有効性という面から考えると、発症後聴力低下が固定した症例では効果が期待しにくいことから、発症後30日未満という条件を設けた。症例数はヒストリカルコントロールとし、過去に京都大学耳鼻咽喉科頭頸部外科で突発性難聴ステロイド無効例に施行した高気圧酸素療法の有効性の後ろ向き研究の結果に基づいて行い、目標登録症例数を25例とした。エンドポイントは、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とした。2007年12月より登録を開始、順調に症例登録は進んでおり、いくつかの症例で有効性が確認されている。

## おわりに

これまでに神経栄養因子や細胞増殖因子が内耳障害に有効であることは、多くの基礎的研究成果から明らかであった。しかしながら、有効性を発揮するためには、一定の期間標的となる細胞が神経栄養因子や細胞増殖因子に曝露されている必要がある、いかにして内耳に神経栄養因子や細胞増