

2009/2005B

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19-21年度 総合研究報告書

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19-21年度 総合研究報告書

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

目 次

I. 総合研究報告書 ナノテクノロジーを用いたDDSによる耳鳴の克服	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	31
III. 研究成果の刊行物 別刷	36

I. 総合研究報告書

ナノテクノロジーを用いたDDSによる耳鳴の克服

研究代表者 坂本達則（京都大学大学院医学研究科）

研究要旨

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

分担研究者

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

本研究の目的は、内耳ドラッグデリバリーシステム(DDS)を用いることによって、これまで現実的な治療方法の存在しなかった耳鳴に対する新たな治療方法を提供することである。

我が国の人口の15%が何らかの形で耳鳴を経験しており、そのうち20%が耳鳴によって耐え難い苦痛を感じている。しかし、この非常に苦痛の大きな症状に対して、現在までに確立した治療方法はおろか、その発生機序すら明らかにされていない。耳鳴を主訴に病院を受診した患者は、治療できないという現実

A. 研究目的

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

の内耳疾患に対しても広く用いることのできる基盤的な技術である。

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

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

B. 研究方法

1. リドカイン含有PLGAマイクロパーティクルによる耳鳴治療

<H19> 蝸牛への薬物投与については、全身投与を行った場合、蝸牛への血流は非常に

少なく、さらに血液蝸牛関門が存在するため、蝸牛への薬物到達はきわめて限られている。蝸牛への直接投与を行う場合、蝸牛は蝸牛骨包と呼ばれる非常に緻密な骨に囲まれており、直接穿刺することは容易ではなく、仮に直接穿刺すると聴力の低下が避けられない。しかし、鼓室に面した蝸牛表面には正円窓と呼ばれる小孔があり、正円窓膜のみで閉鎖されているため、鼓室に投与した薬剤はここから蝸牛内に拡散すると考えられている。リドカインを鼓室内投与した場合も、リドカインは正円窓膜を経由して内耳に到達するが、高濃度で蝸牛内に投与した場合、内耳麻酔によって激しいめまいが起こると考えられている。

そこで、我々は低濃度で持続時間の長いリドカイン徐放製剤を正円窓膜上に留置することで耳鳴治療を行える可能性があると考えた。

徐放製剤の作成については、様々な条件の製剤を作製して評価したが、その中からリドカイン含有PLGAマイクロパーティクルを以降の実験を用いることとした。このパーティクルは、*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確認した。

耳鳴の抑制におけるリドカイン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。これらに対し、動物実験として分子生物学的手法、および生理学的手法によるリドカインの作用の読み出しを試みた。また、条件付けモデルによる行動実験も用い始めている。

しかし、耳鳴は疾患ではなく症状であるため、最終的にはヒトにおける臨床試験を行う以外に効果を証明する方法はない。ヒトでの投与については、安全性が高く、侵襲の少ない方法を選択する必要がある。ここでは、鼓膜切開から極細径内視鏡を用いて正円窓を確認し、製剤を留置するという方法を考え、ヒト側頭骨標本を用いて手術方法を検討した。また、臨床試験については実施に向けて具体的な議論を行っている。

1.1. <H19> リドカイン検出系の確立

作製した徐放製剤が確実にリドカインを徐放すること、あるいは蝸牛内へリドカインを投与できることを証明するにあたって、少量のサンプルからリドカインを検出することの出来る方法を確立しておく必要がある。ここ

では紫外線吸光度測定と高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による方法を用いた。

(1) 紫外線吸光度測定によるリドカイン濃度測定

リドカインは、脂肪性芳香族であるベンゼン環と水溶性アミンがアミド結合した構造を取っており、ベンゼン環のような強い共役結合をもつ構造は紫外吸収スペクトルを持つことが予想される。この点に注目して、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中で様々な濃度のリドカインに対して、実際に紫外線吸光度を測定した。

(2) HPLCによるリドカイン濃度測定

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は微量の検体から物質を検出する方法として標準的に用いられている。ここでは、蝸牛から採取した最大 10 μ l のタンパクや塩を含む液体からリドカインを検出する必要がある。まずコントロール実験として、モルモットの蝸牛内に直接リドカインを注入した上で蝸牛内の液体を採取し、逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）によって濃度の測定が出来ることを確認した。

1.2. <H19> DDS製剤の作製・最適化

(1) ゼラチンハイドロゲル

等電点の異なる2種類のゼラチンハイドロゲル（酸性、塩基性）について、水溶性リドカイン（塩酸リドカイン）を30分以上接触させることで吸着させた。あるいは、吸着後に凍結乾燥して結合を強めた。

放出試験として、37℃または50℃の生体条件に近い溶媒中でリドカインを溶出させた。溶媒を経時的にサンプリングして、その

紫外線吸光度からリドカイン溶出量を算出した。

(2) PLGAパーティクル

PLGAパーティクルは液中乾燥法にて作製した。簡単に述べると、ジクロロエタンにPLGAを溶解し、on iceでリドカインと混合してボルテックスをかけることでエマルジョンとする。これに1%ポリビニルアルコール（PVA）を加えて、低速で攪拌中の1%PVA中に滴下する。室温蒸散の後洗浄、凍結乾燥を行った。PVAの重合度・ケン化度、ジクロロメタン・ポリマー、リドカインの量、エマルジョンの安定化などのパラメータを変化させることでパーティクルの大きさを調整した。パーティクルの大きさは、マイクロパーティクルについては走査型電子顕微鏡で、ナノパーティクルについてはダイナミック光散乱光度計（DLS）で計測した。

作製したパーティクルの放出試験は、ゼラチンハイドロゲルと同様に行った。

1.3. <H20>徐放製剤の改善

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

また、極細径内視鏡のサイドチャンネルを通じて注入可能な製剤を試みるため、2%キシロカインゼリー®（アストラゼネカ、カルボキシメチルセルロースNaを添加物として含有）とその希釈物について、実際に極細径内

視鏡を通しての注入を試みた。2倍、4倍、8倍希釈の2%キシロカインゼリーを用いて、サイドチャンネルのアダプター部分にシュアブラグ延長チューブ®（テルモ、内径2.1mm、長さ20cm、用量0.7ml）を接続し、5ml、1mlの注射器で注入した。

1.4. <H19> DDS製剤による蝸牛への薬物投与

作製したDDS製剤を用いて動物の蝸牛にリドカインを投与することが出来ることを証明する必要がある。ここでは、直径の大きい（100 μm ）PLGAマイクロパーティクルを酸性ゼラチン水ゲルとともにモルモットの正円窓窩に留置し、1、3、7、14日後に蝸牛から外リンパを採取し、RP-HPLCでリドカイン濃度を測定した。

1.5. <H20>パーティクル留置による有害事象評価

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

聴力変化

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

めまい

めまいの評価は、眼振の発現で行った。また、深麻酔では眼振が出にくいため、ガス麻酔（セボフルレン®）で留置手術を行った。モルモットにセボフルレンを吸入させ、麻酔

が得られた後、モルモットの正円窓窩に直径100 μm のパーティクル 2.5 mg を留置。5分程度で覚醒するので、その後暗所にて赤外線カメラを用いて眼振の出現、方向、持続時間についての検討を行った。（n=16）

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

局所炎症

全身麻酔下にモルモットの正円窓窩に直径100 μm のリドカイン徐放PLGAパーティクル 2.5 mg を留置、または対照群として手術操作のみで留置を行わなかった動物を、7日後に屠殺、蝸牛を取りだし、4% PFAで室温で3時間固定後、3 μm の厚さの蝸牛軸と平行な面で切ったパラフィン切片を作成した。蝸牛中央を通る5切片を選び、組織学的評価を行った。ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、パーティクルを留置した正円窓膜から1 mm 以内の中耳粘膜に存在する炎症細胞数を計数した。

1.6. <H21>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。

1.7. <H21>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。

1.8. <H21>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、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。

1.9. <H19-22> ヒト側頭骨標本における検討/ヒトにおける投与モデル

ヒトにおけるDDS製剤の投与方法として、鼓膜麻酔をして鼓膜切開を置き、ここから極細径内視鏡を用いて正円窓窩を視認し、ここにDDS製剤を留置するという方法を想定している。これは最終的には開業医が外来で施行できる方法として考えているが、これが実行可能であることを検証する必要がある。ここでは、ヒト側頭骨標本を用いて実際に鼓膜切開を置いて極細径内視鏡を用いて正円窓窩を確認できるかどうかを検討した。また、実際にPLGAパーティクルを留置した。コンポジット型のパーティクルを想定し、パーティクルのみ、りん酸バッファーに浮遊させたパーティクル、ゼラチンスポンジ、ゼラチンハイドロゲルなどを用いて留置を行って操作性を検証した。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も行った。

1.10. 臨床試験

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検討した。

1.11.<H21>臨床試験計画

2. ベタメサゾン含有ステルス型ナノパーティクルによる難聴治療

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

2.1. <H20>ステルス型ナノパーティクルの蝸牛への分布

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

2.2. <H2O>ステルス・ナノ・ステロイド) 投与後の蝸牛内ステロイド濃度

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

2.3. <H2O>ステルス・ナノ・ステロイドによる音響外傷後の聴力改善

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

2.4. <H2O>ステルス・ナノ・ステロイドによる音響外傷後の有毛細胞保護効果

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

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による耳鳴治療

1.1. <H19>リドカイン検出系の確立

(1) 紫外線吸光度測定によるリドカイン濃度測定

PBS中にリドカインを溶解し、吸光度測定を行った。λ=263nmにおいて、2.5 μg/ml (10.7μM) から 350 μg/ml (1.5mM) の範囲で検量線を引くことが出来た。

(2) HPLCによるリドカイン濃度測定

モルモットの蝸牛にリドカインを注入し、そこから採取した外リンパについて、RP-HPLCで濃度測定したところ、10 ng/ml (42.8 pM)以上で測定できることが確認できた。

1.2. <H19>DDS製剤の作製・最適化

(1) ゼラチンハイドロゲル

リドカインを含有させた2種類のゼラチンハイドロゲル (酸性、塩基性) について、37℃および50℃で溶媒中へのリドカイン溶出量を経時的に測定したところ、数時間以内にほとんど全量が溶出した (図1)。また、凍結乾燥させたリドカイン含有ハイドロゲルも37℃の溶媒中に数時間以内に全量が溶出した。以上から、リドカインはハイドロゲルに結合せず、リドカインの徐放効果はないことが分かった。

(2) PLGAパーティクル

液中乾燥法を用いて、表1のようなパラメータを用いてパーティクルの作製を行ったところ、直径100 μm から 40 nm のリドカ

イン含有PLGAパーティクルを作製することが出来た。(図2)

マイクロパーティクルについて、放出試験を行ったところ、直径5 µm、直径100 µmとも7日間以上にわたって徐放効果が得られた。(図3, 4, 5)

1.3. <H20> 徐放製剤の改善

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

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

1.4. <H19>DDS製剤による蝸牛への薬物投与

リドカイン含有PLGAマイクロパーティクル(直径100 µm)を酸性ゼラチンハイドロゲルとともにモルモットの正円窓窩に留置し、1、3、7、14日後に蝸牛外リンパ中のリドカイン濃度をHPLCで測定したところ、

リドカインは3日目から検出され、7日目には高値になり、14日目でも検出可能であった。(図6)

1.5. <H20> パーティクル留置による有害事象評価

聴力変化

リドカイン徐放パーティクル留置群では、リドカインを含まないパーティクル留置群に比べて術後7日目のABR閾値が一時的に有意に上昇していた。他の1日目、14日目には有意な差は見られなかった。(図7)

めまい

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

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

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

局所炎症

リドカイン徐放パーティクル留置後の局所炎症所見では、内耳(蝸牛内)には炎症所見を思わせる変化は見られなかった。パーティクル留置部位である中耳の正円窓膜周辺については、軽度の粘膜浮腫が見られ、1例のみ

軽度の炎症細胞浸潤が見られた。リンパ球、好中球、形質細胞数について、第三者が計数したが、パーティクル留置群と手術のみ施行群で有意な差は見られなかった。(図8)

1.6. <H21>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。

1.7. <H21>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。

1.8. <H21>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。

1.9. <H19-21> ヒト側頭骨標本における検討/ヒトにおける投与モデル

ヒト側頭骨標本を用いて、細径中耳内視鏡で経鼓膜的に正円窓窩を確認することは全例問題なく可能であった。正円窓窩には正円窓膜の表面に偽膜が存在する可能性があることが報告されているが、今回検討した標本には見られなかった。しかしここから正円窓窩を操作するための鉗子等を挿入することは容易ではないと考えられた。

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

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。

1.10.<H21>臨床試験計画

現時点でのプロトコルとして、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。

対照群としてリドカインを含まない担体のみの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による難聴治療

2.1. <H20> ステルス型ナノパーティクルの蝸牛への分布

ローダミンBを封入した古典的なナノパーティクルでは蝸牛にほとんど集積がないのに対し、ローダミンB封入ステルスナノパーティクル静注では、15分後から24時間後まで蝸牛（特に血管条）に蛍光が検出された。（図9）

2.2. <H20> ステロイド封入ステルス型ナノパーティクル（ステルス・ナノ・ステロイド）投与後の蝸牛内ステロイド濃度

ベタメサゾン静注群では蝸牛でほとんどステロイドが検出されないのに対して、ステルス・ナノ・ステロイド静注では、1時間後でも12時間後でも蝸牛でステロイドが検出された。肝臓でも濃度測定を行ったところ、肝臓ではベタメサゾンは濃度が低下し、分布は遷延した。（図10）

2.3. <H20> ステルス・ナノ・ステロイドによる音響外傷後の聴力改善

ステルス・ナノ・ステロイド投与群では、ステロイド投与群、生食投与群と比較して、有意に良好な聴力改善が見られた。（図11）

2.4. <H20> ステルス・ナノ・ステロイドによる音響外傷後の有毛細胞保護効果

ステルス・ナノ・ステロイド投与群では、ステロイド投与群、生食投与群と比較して、有意に有毛細胞が多く残存しており、有毛細胞保護効果が強いと考えられた。（図12、13）

D. 考察

1. リドカイン含有PLGAマイクロパーティクル

1.1. <H19> リドカイン検出系

サンプルが十分な量があるときの簡便な検出法としての紫外線吸光度測定による濃度測定、微量検出のためのHPLCとも検出系として使用できることが確認された。

1.2. <H19> DDS製剤の作製・最適化

PLGAマイクロパーティクルについて、リドカイン徐放製剤として使用でき、パーティクルサイズに応じてリドカイン徐放速度（濃度に寄与）と徐放時間を制御できることも確認できた。

ナノパーティクルは最近になって条件設定が完了して作製できることが分かったところなので、今後徐放性について検討する。マイクロパーティクルは正円窓膜を透過せず、膜

上で放出されたリドカインが膜を透過して蝸牛内で拡散するが、ナノパーティクルではパーティクル自体が正円窓膜を超えて蝸牛内に侵入して蝸牛内で徐放することから、より精度の高いターゲティング効果が期待される。

ハイドロゲルは、リドカインと結合せず、リドカイン徐放製剤として用いることが出来ないことが明らかになった。しかし、上記で作製できたPLGAパーティクルは粉末状の製剤であり、少量を正円窓窩に正確に留置するための形態としては最適とは言えない。ハイドロゲルと組み合わせてハイブリッドDDS製剤とすることで、PLGAパーティクルとしての徐放性を保ったまま、操作性を改善することができると考えられる。実際、下記のモルモット蝸牛の正円窓窩にPLGAマイクロパーティクルを留置するにあたって、ハイドロゲルを操作性の改善のために用いて、良好な結果であった。

1.3. <H20> 徐放製剤の改善

いくつかの形状の徐放製剤について、その操作性を評価したが、その中ではゼラチンスポンジあるいはゼラチンハイドロゲルとの組み合わせが最も理にかなっていると考えた。昨年の実験ですでにリドカインはゼラチンハイドロゲルと結合しないことをしめしており、ゼラチンハイドロゲルを用いることによる徐放性能の変化はないと考える。また、昨年のin vivo徐放実験でもゼラチンハイドロゲルと混合したリドカイン徐放マイクロパーティクルを用いて検証しているが、今後もこの系を中心に実験に用いて行く。

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

1.4. <H19> DDS製剤による蝸牛への薬物投与

PLGAマイクロパーティクルを正円窓膜上に置いて放出されたリドカインが、正円窓膜を超えて蝸牛内に到達することが確認された。正円窓膜上に置いた徐放製剤から蝸牛内に薬物投与できることが実証されたことになり、この方法を用いることの妥当性を支持するものと考えられる。ただし、今回到達した蝸牛内濃度が、目的とする濃度、すなわち耳鳴を抑制し、内耳麻酔によるめまいを起こさないという濃度として適切かどうかは判明していない。この点は、耳鳴モデル動物を用いた耳鳴抑制効果の検討と、動物実験によるめまい・眼振の出現濃度の検討を行って設定濃度の参考とするが、本当の意味での容量設定試験はヒトにおける臨床試験においてのみ評価可能である。今後、早期にこれを開始できるようにしたい。

1.5. <H20> パーティクル留置による有害事象評価

聴力については、7日後で一時的に低下している。手術操作などに問題があったり、リドカイン徐放パーティクルが急性障害を起こ

すようなものであれば、術後7日目のみの聴力低下では潜時が長すぎて矛盾する。また、リドカイン自体は代謝の早い薬剤で、パーティクルに内包されていなければ急速に分解されるものである点も矛盾する。この術後7日目のみの聴力低下については再検討を要すると考えている。今回のデータからは聴力への重篤な急性期障害はないということは示されている。

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

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

1.6. <H21>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

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。

1.7. <H21>リドカインの効果を検出するための生理学的検査

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ので、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。

1.8. <H21>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。

耳鳴の動物実験は、耳鳴が自覚症状であるという根本的な問題から容易ではない。Knipper教授の脳幹におけるある分子の発現変化は耳鳴の急速な治療効果については評価

が難しいが、客観的にわかりやすい形で評価することの出来るという点からは治療効果のある薬剤をスクリーニングするという目的にはかなっている。行動モデルでは、検査音（模擬的な耳鳴音）と共に足底の電流刺激が停止してえさにたどり着けるという条件付けを行うもので、多数の動物で実験を行うことは出来ないで、スクリーニングで効果が見られたものについて行動モデル実験を行うという段階を踏んでいる。

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。

1.9. <H2O> ヒト側頭骨標本における検討/ヒトにおける投与モデル

ヒト側頭骨標本を用いて、細径内視鏡による正円窓窩へのアプローチを行ったが、耳科手術の経験者であれば容易な手技で、ゼラチンスポンジと混合した 10 mg のパーティクルを留置するという目的は問題なく達成できると考える。また、先に我々の研究室で別に行っている臨床試験（「急性高度難聴症例に対する生体吸収性徐放ゲルを用いたリコンビナント・ヒト・インスリン様細胞成長因子1内耳投与による感音難聴治療の検討」）では、同じ細径内視鏡を用いて、ゼラチンハイドロゲルによる徐放製剤を正円窓膜上に留置しているが、手術手技で問題になった症例は現在までにない。これらを踏まえて、第1・2相臨床試験では、細径内視鏡を用いてゼラ

チンスポンジとの混合物留置をプロトコル治療として採用する。

1.10. 臨床試験

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

臨床試験を行うにあたっての問題点の一つは対照群の設定である。小さいとはいえ、鼓膜切開という侵襲を伴うプロトコルであるため、空のパーティクルを用いるというコントロールを置くことは倫理的に難しい。ヒストリカルコントロールを用いるなど、今後プロトコル策定の経過で検討が必要である。

2. ベタメサゾン含有ステルス型ナノパーティクルによる難聴治療

古典的なナノパーティクルでは蝸牛への分布はほとんど見られず、そのままでは内耳疾患の治療に応用することは困難と考えられたが、今回用いたステルス型ナノパーティクルは蝸牛の血管条では分布が見られた。この

パーティクルの分布が問題となっている血液・内耳関門を通過しているかという点については評価が難しい。なぜなら、今回分布が見られた部分は血管条で、血管壁のどの層にパーティクルが分布したかまでは評価できていないからである。しかし、今回のようなステロイド徐放を目的とする場合、仮にパーティクルが血液・内耳関門を超えていなくても、徐放したステロイドが内耳局所で長時間高濃度に保たれるなら目的は達成されていると考える。実際、ステルス・ナノ・ステロイド投与後の蝸牛内ベタメサゾン濃度を測定して、高い濃度が保たれていることを確認している。

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。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。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。

E. 結論

リドカイン含有PLGAマイクロ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。

ベタメサゾン含有ステルス型ナノパーティクルは、同等量のステロイド投与や生食投与群に比べて、音響外傷後の聴力を有意に改善した。

F. 健康危険情報

現時点で、健康危険情報とすべきものは得られていない。

G. 研究発表

1. 著書

- 1) 中川隆之、伊藤壽一. 第4章 治療を目的とした細胞治療 3) 胚性幹細胞 聴神経, 田畑泰彦編 遺伝子医学MOOK別冊 進み続ける細胞移植治療の実際 メディカルドゥ, 大阪, 2008
- 2) 中川隆之、伊藤壽一. 第2章 生体シグナル因子の利用 1. 細胞増殖因子 MOOK 13号 臨床再生誘導治療 2009 患者までとどいている再生誘導治療 田畑泰彦編 メディカルドゥ 大阪 2009
- 3) 坂本達則 内耳障害に対する細胞移植治療 再生医療へ進む最先端の幹細胞研究、山中伸弥, 中内啓光、774-779頁、羊土社、東京、2008

2. 論文発表

- 1) 坂本達則、中川隆之、伊藤壽一. DDSを用いた感覚器領域における再生医療. 再生医療, 6(1), 27-31, 2007.
- 2) 伊藤壽一、中川隆之、山本典生. 内耳障害への再生医学的アプローチ. 最新医学, 62, 130-169, 2007.
- 3) 川隆之. 内耳再生のストラテジー. メディカルバイオ, 4(5), 56-61, 2007.
- 4) 中川隆之、吉川弥生、伊藤壽一. 内耳性難聴：新しい治療法開発への展望. 実験医学, 25, 3052-3057, 2007.

- 5) 中川隆之. DDSを用いた内耳疾患の治療. 炎症と免疫, 15(2), 60-65, 2007.
- 6) Nakagawa T*, Ito J. Local drug delivery to inner ear for treatment of hearing loss. *Current Drug Therapy*, in-press.
- 7) Lee KY, Nakagawa T*, Okano T, Hori R, Ono K, Tabata Y, Lee SH, Ito J. Novel therapy for hearing loss: Delivery of insulin-like growth factor-1 to the cochlea using gelatin hydrogel. *Otol Neurotol*, 28, 976-981, 2007.
- 8) Ohno T, Hirano S, Kanemaru S, Yamashita M, Umeda H, Suehiro A, Tamura Y, Nakamura T, Ito J, Tabata Y. Drug delivery system of hepatocyte growth factor for the treatment of vocal fold scarring in a canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 116(10), 762-9, 2007.
- 9) Nakagawa T*, Ito J. Drug delivery systems for the treatment of sensorineural hearing loss. *Acta Otolaryngol Suppl*, 557, 30-35, 2007.
- 10) Hori R, Nakagawa T*, Sakamoto T, Matsuoka Y, Takebayashi S, Ito J. Pharmacological inhibition of Notch signaling in the mature guinea pig cochlea. *Neuroreport*, 18, 1911-1914, 2007.
- 11) Matsumoto M, Nakagawa T*, Kojima K, Sakamoto T, Ito J. Potential of embryonic stem cell-derived neurons for synapse formation with auditory hair cells. *J Neurosci Res*, in-press.
- 12) Okano T, Nakagawa T*, Kita T, Kada S, Yoshimoto M, Nakahata T, Ito J. **Bone marrow-derived cells expressing Iba1 are constitutively present as resident tissue macrophages in the mouse cochlea.** *J Neurosci Res*, in-press.
- 13) Sharif S, Nakagawa T*, Ohno T, Matsumoto M, Kita T, Riazuddin S, Ito J. The potential use of bone marrow stromal cells for cochlear cell therapy. *Neuroreport*, 18, 351-354, 2007.
- 14) Higashi T, Nakagawa T*, Kita T, Kim TS, Sakamoto T, Ito J. Effects of bone-morphogenetic protein 4 on differentiation of embryonic stem cells into myosin VIIa-positive cells. *Acta Otolaryngol Suppl*, 557, 36-40, 2007.
- 15) Sakamoto T, Ito J, Ladher RK. Hair cell differentiation becomes tissue specific by E9.5 in mouse inner ear. *Neuroreport*, 18(9), 841-4, 2007.
- 16) Inaoka T, Nakagawa T, Kikkawa YS, Tabata Y, Ono K, Yoshida M, Tsubouchi H, Ido A, Ito J., Local application of hepatocyte growth factor using gelatin hydrogels attenuates noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Acta Otolaryngol*. 2009 Feb 13:1-5.
- 17) Ogita H, Nakagawa T, Lee KY, Inaoka T, Okano T, Kikkawa YS, Sakamoto T, Ito J., Surgical invasiveness of cell transplantation into the guinea pig cochlear modiolus. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2009;71(1):32-9.
- 18) 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.
- 19) Matsumoto M, Nakagawa T, Kojima K, Sakamoto T, Fujiyama F, Ito J., Potential of embryonic stem cell-derived neurons for synapse formation with auditory hair cells. *J Neurosci Res*. 2008 Nov 1;86(14):3075-85.
- 20) Hori R, Nakagawa T, Sugimoto Y, Sakamoto T, Yamamoto N, Hamaguchi K, Ito J., Prostaglandin E receptor subtype EP4 agonist protects auditory hair cells against noise-induced trauma. *Neuroscience*. 2009 Jun 2;160(4):813-9.
- 21) Kada S, Nakagawa T, Ito J. A mouse model for degeneration of the spiral ligament. *J Assoc Res Otolaryngol* 2009 Feb 11.
- 22) Nakagawa T, Ito J. Local drug delivery to inner ear for treatment of hearing loss. *Current Drug Therapy* 3: 143-147, 2008.
- 23) 中川隆之 内耳疾患の治療をめざして—基礎研究の最前線 薬物の経正円窓投与 日耳鼻

- 111:655-663, 2008.
- 24)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.
- 25)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
- 26)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.
- 27)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.* 2009 Nov;120(11):1923-6. Epub 2009 Sep 29.
- 28)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
- 29)坂本達則., DDSの現状 内耳DDS, *血管医.*10(3): 279-287,2009.08
- 30)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
- 31)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) 堀江理恵、中川隆之、坂本達則、吉川 弥生、小野和也、田畑泰彦、伊藤壽一. 難治性耳鳴治療における内耳リドカイン徐放に関する研究. 第10回日本組織工学会, 平成19年11月8~9日, 東京
- 2) 堀江理恵、中川隆之、坂本達則、田畑 泰彦、岡村昇、伊藤壽一. 生体吸収材料を用いたリドカイン徐放に関する研究. 第8回日本再生医療学会, 2008年3月13~14日, 名古屋
- 3) Hiraumi H, Takayuki N, Ito J, The efficiency and limitation of transtympanic microendoscope in the approach to the round window membrane. The 2nd Scientific Meeting of the Tinnitus Research Initiative, July 17-21, 2007, Monaco
- 4) Nakagawa T, Okano T, Lee KY, Ito J, Local delivery of IGF1 by gelatin hydrogels for hearing loss. The 2007 AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO, September 16-19, 2007, Washington D.C. USA
- 5) Hiraumi H, Takayuki N, Ito J, The efficiency of transtympanic microendoscope in the approach to the round window membrane. The 2007 AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO, September 16-19, 2007, Washington D.C. USA
- 6) Rie Horie, Tatsunori Sakamoto, Takayuki Nakagawa, Yayoi S Kikkawa, Kazuya Ono, Yasuhiko Tabata, Juichi Ito, Sustained release of lidocaine into the cochlea via biodegradable materials. The 31st Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology, Feb. 16-21, 2008
- 7) Inaoka T, Kikkawa YS, Nakagawa T, Tabata Y, Tsubouchi H, Ido A, Horie R, Ono K, Ito J, The Potential of Hepatocyte Growth Factor (HGF) for Protection of Cochlear Hair Cells. The 31st Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology, Feb. 16-21, 2008
- 8) 平海晴一、中川隆之、伊藤壽一. 内耳ドラッグデリバリーシステムにおける細経内視鏡の有用性. 第108回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 平成19年5月17~19日, 金沢
- 9) 稲岡孝敏、中川隆之、伊藤壽一. ハイドロゲルを用いたrhIGF-1局所投与の音響外傷に対する有効性の検討. 第17回 日本耳科学会総会・学術講演会, 平成19年10月18~20日, 福岡