

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, 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, Hulcrantz 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] Ersner MS. Transstympanic 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 Neurootol* 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.

Received: August 21, 2007

Revised: January 02, 2008

Accepted: January 11, 2008



日耳鼻 111: 655-663, 2008

中川 隆之

「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

京都大学大学院医学研究科  
耳鼻咽喉科頭頸部外科

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、治療的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、老人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<sup>12)</sup>。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人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<sup>34)</sup>。

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

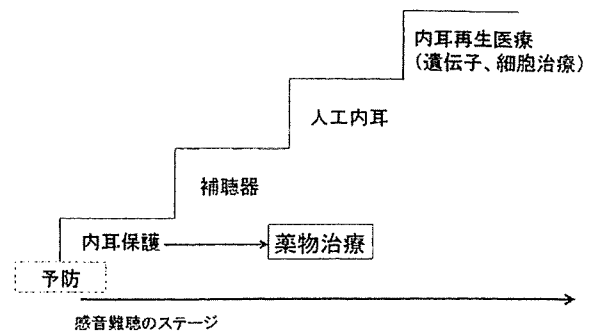


図1 感音難聴治療のストラテジー

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、今年の Mid Winter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology (ARO) で報告されていた<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>。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<sup>7)</sup>。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

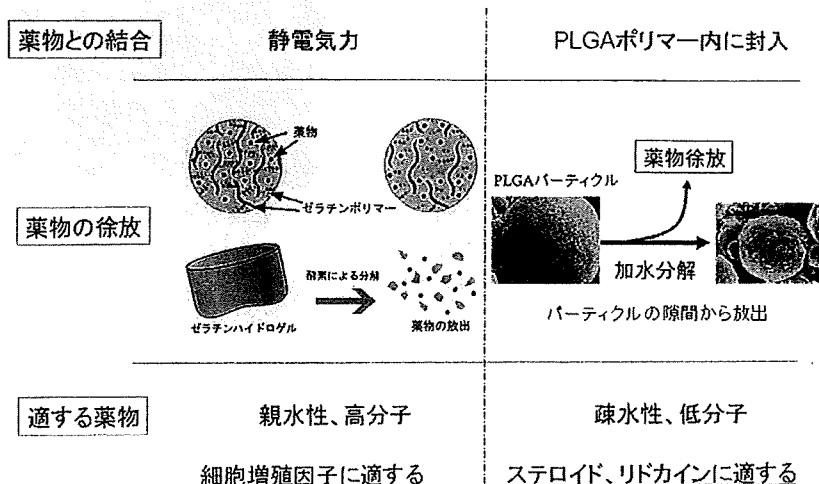


図2 バイオマテリアルを用いた薬物徐放

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<sup>9)</sup>、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が活かせる、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<sup>9)</sup>。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<sup>10)</sup>、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。

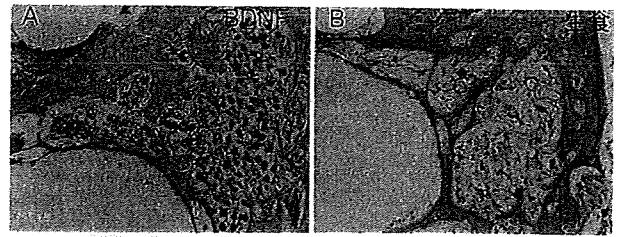
生体分解性のバイオマテリアルとして、薬物徐放に用いられている材料として、ポリ乳酸やポリグリコール乳酸などの合成材料とゼラチンやヒアルロン酸などの天然材料がある。ポリ乳酸やポリグリコール乳酸は、吸収糸の材料としてすでに広く臨床で用いられている。ゼラチンやヒアルロン酸も種々の用途で医療材料として用いられており、生体への安全性が確認されている材料といえる。これらの材料には、それぞれに適した薬物があり、それぞれの特徴を生かした内耳薬物投与を考える必要がある(図2)。ポリ乳酸やポリグリコール乳酸を用いる場合、アセトンなどにポリ乳酸やポリグリコール乳酸と薬物を溶解、混合し、マイクロあるいはナノパーティクルを精製する<sup>11)</sup>。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<sup>12)</sup>。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<sup>12)</sup>。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>13)</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、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<sup>14)15)</sup>。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<sup>16)</sup>。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)<sup>16)</sup>。つまり、ゼラチンハイドロゲルは、内耳への神経栄養



C 電気刺激聴性脳幹反応閾値変化

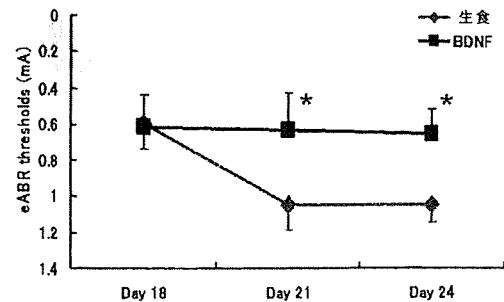


図3 ゼラチンハイドロゲルを用いたBDNF投与によるラセン神経節細胞保護効果

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は調べられて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<sup>17)</sup>。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

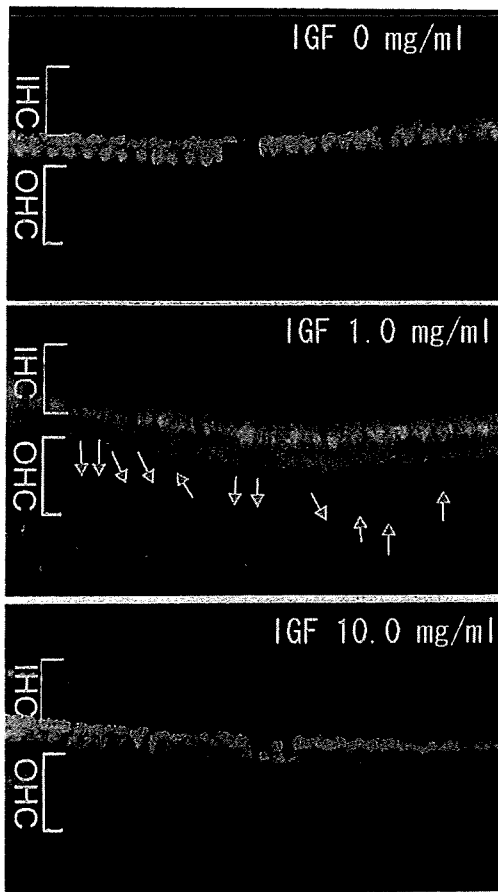


図4 ゼラチンハイドロゲルを用いたIGF1投与による蝸牛有毛細胞保護効果  
音響外傷後、IGF1を含まない生食を投与された蝸牛では、ほとんどの外有毛細胞(OHC)が消失しているが、IGF1投与量が増加するに従い、残存している外有毛細胞数が増えている。内毛細胞(IHC)には大きな変化は認められない。(文献18)より改変)

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)<sup>18)19)</sup>。さらに、中耳炎などの有害事象が起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<sup>20)</sup>、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

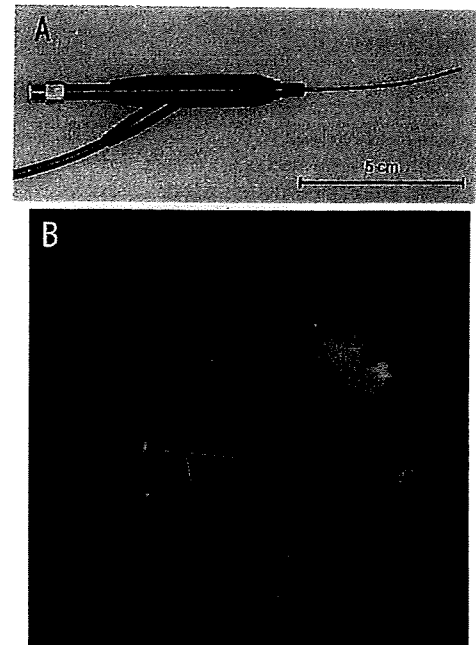


図5 超細径内視鏡(A)と経鼓膜的に超細径内視鏡により観察した正円窓(B)。矢頭は正円窓膜を示す。(文献21)から改変)

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、确实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<sup>21)</sup>。

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、パロキシブンの全身投与、プロスタグランジンE1およびI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癒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)	下垂体機能不全、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的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%で有効となること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、 $\alpha$ エラー0.05(片側)、 $\beta$ 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<sup>29)</sup>。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<sup>23)</sup>。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<sup>24)</sup>、長期的な徐放を目的とした今回の検討では、直径100 $\mu\text{m}$ と5 $\mu\text{m}$ 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 $\mu\text{m}$ 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 $\mu\text{m}$ 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 $\mu\text{m}$ 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<sup>25)</sup>。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<sup>26)</sup>。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、

そして臨床応用を行うことはできなかったことも事実である。ゼラチンハイドロゲル、ポリグリコール乳酸マイクロパーティクル作製では、京都大学再生医学研究所の田畑泰彦教授のグループにお世話になり、東京慈恵会医大 DDS 研究所の故・水島 裕教授、檜垣 恵教授には、ナノパーティクルに関連する研究でご協力頂いた。リドカイン濃度測定では武庫川女子大学薬学部岡村 昇教授のお世話になった。臨床試験は、京都大学医学部附属病院薬剤部および探索医療センターの協力のもとに現在施行中である。関係各位にこの場をお借りして深謝いたします。

### 参考文献

- 1) Someya S, Yamasoba T, Weindruch R, Prolla TA, Tanokura M : Caloric restriction suppresses apoptotic cell death in the mammalian cochlea and leads to prevention of presbycusis. *Neurobiol Aging* 2007 ; 28 : 1613-1622.
- 2) Hirose Y, Sugahara K, Mikuriya T, Hashimoto M, Shimogori H, et al : Effect of water-soluble coenzyme Q 10 on noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 2008 ; 1 : 1-6.
- 3) Okano T, Nakagawa T, Endo T, Kim TS, Kita T, et al : Engraftment of embryonic stem cell-derived neurons into the cochlear modiolus. *Neuroreport* 2005 ; 16 : 1919-1922.
- 4) Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, Abrashkin KA, Swiderski DL, et al : Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat Med* 2005 ; 11 : 271-276.
- 5) Raunch SD : Clinical trial and outcome research. Abstracts of the 31st annual mid winter research meeting of the association for research in Otolaryngology 2008 ; 31 : 1-2.
- 6) Plontke SK, Salt AN : Simulation of application strategies for local drug delivery to the inner ear. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2006 ; 68 : 386-392.
- 7) Silverstein H : Use of a new device, the MicroWick, to deliver medication to the inner ear. *Ear Nose Throat J* 1999 ; 78 : 595-598.
- 8) Plontke S, Lowenheim H, Preyer S, Leins P, Dietz K, 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 : 830-839.
- 9) Colas A : Silicones in pharmaceutical applications. Dow-Corning Healthcare Industries. <http://www.dowcorning.com/content/publishedlit/51-993a-01.pdf>.
- 10) Arnold W, Senn P, Hennig M, Michaelis C, Deingruber K, 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 Neurotol* 2005 ; 10 : 53-63.
- 11) Ishihara T, Izumo N, Higaki M, Shimada E, Hagi T, et al : Role of zinc in formulation of PLGA/PLA nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate and its release profile. *J Control Release* 2005 ; 105 : 68-76.
- 12) 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.
- 13) Ruttiger L, Panford-Walsh R, Schimmang T, Tan J, Zimmermann U, et al : BDNF mRNA expression and protein localization are changed in age-related hearing loss. *Neurobiol Aging* 2007 ; 28 : 586-601.
- 14) Shinohara T, Bredberg G, Ulfendahl M, Pyykkö I, Olivius NP, et al : Neurotrophic factor intervention restores auditory function in deafened animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 ; 99 : 1657-1660.
- 15) Nakaizumi T, Kawamoto K, Minoda R, Raphael Y : Adenovirus-Mediated Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor Protects SGNs from Ototoxic Damage. *Audiol Neurotol* 2004 ; 9 : 135-143.
- 16) Endo T, Nakagawa T, Kita T, Iguchi F, Kim TS, et al : A novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel. *Laryngoscope* 2005 ; 115 : 2016-2020.
- 17) Iwai K, Nakagawa T, Endo T, Matsuoka Y, Kita T, et al : Cochlear protection by local IGF-1 application using biodegradable hydrogel. *Laryngoscope* 2006 ; 116 : 526-533.
- 18) Lee KY, Nakagawa T, Okano T, Hori R, Ono K, 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.
- 19) Fujiwara T, Hato N, Nakagawa T, Tabata Y, Yoshida T, et al : IGF1 treatment via hydrogels rescues cochlear hair cells from ischemic injury. *Neuroreport* (in-print).
- 20) Marui A, Tabata Y, Kojima S, Yamamoto M, Tambara K, 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.
- 21) Hiraumi H, Nakagawa T, Ito J : Efficiency of a transtympanic approach to the round window membrane using a

- microendoscope. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (in-print).
- 22) <http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~ent/ClinicalTrial/GelforMedipro.html>.
- 23) Sakata H, Kojima Y, Koyama S, Furuya N, Sakata E: Treatment of cochlear tinnitus with intratympanic infusion of 4% lidocaine into the tympanic cavity. *Int Tinnitus J* 2001; 7: 46-50.
- 24) Tamura T, Kita T, Nakagawa T, Endo T, Kim TS, et al: Drug delivery to the cochlea using PLGA nanoparticles. *Laryngoscope* 2005; 115: 2000-2005.
- 25) Horie R, Nakagawa T, Sakamoto T, Kikkawa SY, Ono K, et al: Sustained release of lidocaine into the cochlea via biodegradable materials. Abstracts of the 31st annual mid winter research meeting of the association for research in Otolaryngology 2008; 31: 26.
- 26) Horie R, Nakagawa T, Sakamoto T, Matsuoka Y, Takebayashi S, et al: Pharmacological inhibition of Notch signaling in the mature guinea pig cochlea. *Neuroreport* 2007; 18: 1911-1914.

---

連絡先 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54

京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科頭頸部外科

中川隆之

---

論 説

---

## 耳鼻咽喉科手術トレーニング

伊藤 壽一

### Surgical Training in Otorhinolaryngology

Juichi Ito

(Kyoto University)

It is very difficult to master surgical skills in Otorhinolaryngology because of the anatomical complexity of the field. There are several ways to gain surgical skills before being involved in surgery on humans, especially for young surgeons.

This paper introduces the concept of surgical dissection in the field of nasal surgery using a human cadaver and points out certain problems with using human cadavers. Future surgical training systems such as computer-simulated surgical training system are also described.

**Key words :** surgical training, nasal surgery, cadaver, computer-simulated surgical training system

#### はじめに

外科手術手技の習得には分野を問わず困難と時間を伴うものである。耳鼻咽喉科の分野でも事情は同じで、手技によって異なるが数年から10年程かけて一つの手技を習得することになる。このことは以前に本誌にて「耳科トレーニング」について述べた<sup>1)</sup>。耳科手術は耳鼻咽喉科・頭頸部外科学領域の手術の中で習得に非常に時間がかかり、また困難なものである。従来、耳科手術の習得には熟練した術者の助手を務めたり手術ビデオを見たりして徐々にその技術を向上させるという方法が取られてきた。耳科手術など、顕微鏡を使用する手術と他の手術との決定的な違いは、手術は術者一人に委ねられるということであり、モニターを使っても上級者が同じ術野で直接指導するのが困難な点にある。顕微鏡下での手術と同様、内視鏡下の手術も手術が術者一人に委ねられるという点では同様に指導・習熟に困難をきたす。耳鼻咽喉科領域では主に鼻副鼻腔手術に対し内視鏡を用いる。内視鏡下鼻副鼻腔手術 (Endoscopic Sinus Surgery; 以下 ESS

と略す) は耳科手術に比べ比較的経験の浅い医師が手術を始めることが多いが、また手術に伴う事故の多いことも事実である。これはトレーニングもそこそこに実際の手術を行ってしまうことが多かったことにもよると思われる。内視鏡下の手術でも何らかの手術トレーニングを行ってから実際の手術を始めることが必須であるが、顕微鏡下の耳科手術同様これまでこのようなトレーニングを行っている施設はわが国では非常に限られた施設のみであった。本稿では京都大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学のヒト cadaver を用いた ESS 手術実習プログラムを紹介するとともに、耳科手術トレーニングもあわせ、これからの耳鼻咽喉科手術トレーニングシステムのありかたについて言及したい。

#### 鼻・副鼻腔手術実習マニュアル

鼻・副鼻腔手術実習を行うためには側頭骨手術実習<sup>2)</sup>の場合と同様、優れた実習マニュアルが不可欠である。欧米では各施設で優れた鼻・副鼻腔手術マニュアルを作

表1 鼻・副鼻腔手術講習会マニュアル

1) 準備
実習室の機器の点検
手術器具の点検
Cadaverの状態の確認
2) CT読影と基本構造の観察
3DCTでの読影
1. 鼻前頭洞管と Agger Nasi Cell 鉤状突起の位置関係
2. 中鼻甲介水平部, 上鼻甲介の同定
3. 前篩骨動脈, 後篩骨動脈の位置関係
4. 視神経管, 翼口蓋管の位置
5. 基本構造の確認
①下鼻甲介
②鉤状突起 (天蓋, 眼窩内側壁の付着部, 上顎自然口の探索)
③中鼻甲介 (篩骨洞ブラ)
④上鼻甲介
⑤蝶形骨洞自然口
3) 鼻中隔矯正術
4) 前部篩骨洞開放
5) 後部篩骨洞, 蝶形骨洞開放
6) 後鼻神経切断術
7) 下垂体, 頸動脈
8) 斜台部
9) 前頭洞の解放, Modified Lothrop
10) Medial Maxillectomy
11) 前頭蓋底開放

成しそれによって実習を行っている。実習書は図を多用し、よく工夫されているが、側頭骨実習マニュアルに比べその数はそれ程多くはない。頭蓋内部の記載がやや不十分なものと必ずしも実際の手術を想定していないものなども多い。われわれは独自の鼻・副鼻腔手術実習マニュアルを作成しそれに沿って実習を行っている<sup>3)</sup>。表1にわれわれの作成した実習書を紹介する。

#### 鼻・副鼻腔手術実習の問題点

鼻副鼻腔手術実習の必要性はいうまでもないが、実習室の整備には当然費用がかかる。われわれは側頭骨実習の際と同様の実習室を使用しているが、使用する内視鏡機器を整備するには側頭骨実習に比べさらに費用を要する。また、機器の多様化のため実習室のみで収容できる人数に限りがある。

しかし、もっとも大きな問題点はヒト cadaver の入手の問題である。ヒト側頭骨 (cadaver) に比べ鼻・副鼻腔手術実習で使用する cadaver は whole head cadaver であ

り、またその使用目的のため、一般の学生実習で用いられるようなホルマリン固定ではなく、凍結のものを用いることが多い。このため cadaver の入手だけでなく保存にもかなりの設備とスペースが必要となる。Cadaver の入手に関しては限られた数であれば各大学の解剖学教室、病理学教室の協力のもとに、ホルマリン固定の cadaver を使用する方法があり、実際このような方法で実習を行う場合もある。しかし、それでは実際必要とする数に対して大きく不足する。京都大学では海外から輸入したヒト whole head cadaver を使用する場合が多いが、かなり費用がかかる (1 個の whole head cadaver で 1000 ドル位必要な場合もある)。さらに輸入元の米国でも多くの施設でヒト cadaver を使用するため、絶対数が不足する傾向にある。

一方、このような実習に対する倫理的、法的問題は解決されていない。学生の解剖学実習で使用する屍体は以前は身元不明者、また有志からの献体であったが、いずれにせよ学生実習のためのものであり、法的に定められた実習室で行うことが義務付けられている。屍体その一部であれ、解剖学実習室以外で、手術実習のため行うことに対する法的正当性は認められていないのが現状である。またわれわれの行っているような輸入 cadaver を使用することに対しては、その是非についての規定もあいまいな状態である。

耳鼻咽喉科以外の外科系領域でも手術トレーニングの必要性が論議されている。脳神経外科領域では耳鼻咽喉科の側頭骨実習と同様に cadaver を使用した実習を行っている施設もある。また一般外科でも昨今の医療事故の問題からも cadaver を使用しての実習の必要性が論議されている。いずれの分野においても cadaver を使用する限り、耳鼻咽喉科領域での実習と同様の問題、とくに cadaver の入手問題と法的問題は解決されていない。最近では外科系全体がまとまってこれらの問題につき討議し、解決への道を模索しようとする動きがある。いずれにせよこのような手術手技トレーニングが必須であることは議論の余地がないので法的整備も早急にする必要がある。

#### 今後の方向性

側頭骨実習の際にも述べたが、現在行われているような cadaver を用いての実習は、費用の問題、cadaver 入手が困難な点、倫理的な問題もあろうが、手術のスキルアッ

プ、医療事故などを避けるためにも必須であり、少数の施設だけでなくできるだけ多くの施設で行うべきであろうと思われる。

一方 cadaver を使用せずに手術手技トレーニングを行う機器なども開発されている。側頭骨実習の場合は3次元 CT を元にして、合成樹脂などで実際の側頭骨と解剖学的にもまた骨削開用ドリルでの削開感触もかなり類似したものが作成でき、それによって実習を行うことが可能となっている。本トレーニング素材は非常に有用であるが、血管、神経などの軟部組織を構築できないという欠点も有する。また最近では手術術野をコンピューターで再現し、バーチャル手術トレーニングを行うソフト、機器も開発されている。このようなソフトを使用すると解剖学的知識の習得には有用であるが、この機器の欠点は、実際の骨削開、軟部組織の操作などの感触を得るこ

とができない。近い将来にはこのような機器を利用した手術トレーニングが cadaver を使用したトレーニングに代わっていくものと思われるが、現時点ではまだ cadaver を使用したものには遠く及ばない。

前回も述べたが、手術トレーニングに対する学会認定も必要となってくると思われる。

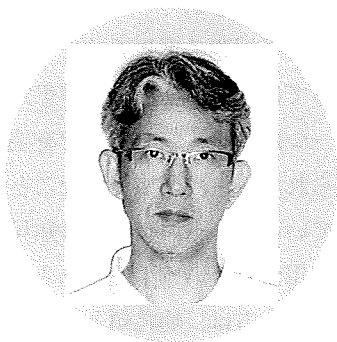
#### 参考文献

- 1) 伊藤壽一：側頭骨を用いた耳科手術トレーニングシステム。耳鼻臨床 99:1~6, 2006.
- 2) 高木 明, 辻 純：側頭骨臨床解剖実習。
- 3) 中川隆之：鼻・副鼻腔手術講習会マニュアル。

---

別刷請求先：伊藤壽一  
〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54  
京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

# 内耳有毛細胞の再生による難聴治療



中川隆之

(なかがわ たかゆき)

京都大学大学院医学研究科  
耳鼻咽喉科頭頸部外科講師

●略歴：1965年生まれ、89年：大阪市立大学医学部卒業、95年：淀川キリスト教病院耳鼻咽喉科医長代行、98年：同医長、2001年：京都大学医学部附属病院助教、08年より現職。2008年（平成20年）度若手研究者表彰事業長寿科学振興財団奨励賞受賞

●専門分野：耳鼻咽喉科学、医学博士

## 研究にあたってのエピソード

複雑な構造と脆弱性を併せ持つ内耳に対するポンプ埋め込みなど手術手技の開発には、多大な時間と労力を要した。研究開発に関係した学生、大学院生、スタッフにこの場を借りて、深謝したい。

## 内耳有毛細胞と感音難聴

音は空気の疎密波、簡単にいうと空気の振動ということができる。この空気の振動は、外耳道を通して、鼓膜を振動させる。鼓膜の振動は、耳小骨という小さな3つの骨を介して、内耳に伝えられる(図1)。

空気の振動を内耳に伝えるまでに障害があり、聞こえが悪くなることを伝音難聴という。伝音難聴を起こす代表的な疾患として中耳炎がある。中耳炎が慢性化して鼓膜に大きな穴ができると、うまく空気の振動を耳小骨に伝えることができなくなる。したがって、鼓膜などの空気の振動を伝えるしくみを治すことで、このタイプの難聴は治療することができる。

一方、内耳に音刺激が伝わっているにもかかわらず、内耳で音を感じることがうまくできない状態を感音難聴という。内耳に大きな障害がなく、内耳から脳に音の信号を伝えることがうまくできない場合も感音難聴に含まれる。感音難聴の多くは、内耳に原因がある。内耳に存在し、音刺激を神経刺激に変

換する細胞が内耳有毛細胞といわれる細胞であり、内耳有毛細胞の障害が多くの感音難聴を引き起こしている。したがって、内耳有毛細胞は感音難聴治療開発の重要なターゲットといえることができる。

内耳有毛細胞の障害は、さまざまな要因で引き起こされる。内耳有毛細胞は音刺激を感じ取る細胞であるが、この音刺激が強すぎる場合、内耳有毛細胞が破壊されてしまう。強大音響曝露がこの状態である。ある程度以上の大きな音を日常的に聞いていても、同様に内耳有毛細胞は傷害される。ある種の抗生物質や抗がん剤も内耳有毛細胞の障害を引き起こすことがよく知られて

いる。結核の治療薬であるストレプトマイシンに代表されるアミノ配糖体と呼ばれる抗生物質が、内耳有毛細胞を細胞死においやることは広く知られている。また、最も広く用いられている抗がん剤の一つである白金製剤も内耳有毛細胞障害を起こすことが知られている。

臨床の現場で最も高頻度に遭遇する内耳有毛細胞障害の原因は老化である。加齢とともに内耳有毛細胞の数が減少し、老人性難聴の原因の一つとなっている。遺伝子異常も内耳有毛細胞障害と関係している。内耳有毛細胞の障害に関わる遺伝子も数多く報告されている。これらの多くは、先天性難聴に関与している。

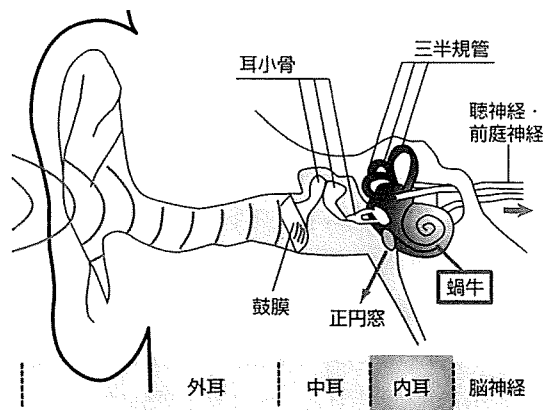


図1. 音刺激の伝達機構



## 感音難聴治療の現況

感音難聴は、急激に起こる急性タイプと緩徐に進行する慢性タイプに分けることができる。急性タイプの代表例が突発性難聴である。突発性難聴は、原因不明に急激に片側の聞こえが悪くなる疾患であるが、ステロイド治療が一般に用いられている。3分の1の患者さんでは、聴力が回復するが、3分の1の患者さんでは完全に回復するには至らない。さらに、残りの3分の1の患者さんではまったく回復が認められない。また、老人性難聴に代表されるじわじわと悪くなるタイプの感音難聴では、まったく有効な治療法がなく、損なわれた聴力を補聴器で補う以外に道は残されていない。

ここまで述べた感音難聴は、すべていったん聞こえを獲得した後に起こる感音難聴であるが、先天障害においても感音難聴は最も頻度が高いものの一つである。生まれながらに聞こえが悪い先天性難聴は、出生1000人に1人の割合で認められる。難聴の程度に応じて、補聴器、あるいは、内耳に電極を埋め込む人工内耳が聴力獲得への道となる。

このように、感音難聴の根本的治療はきわめて限られているのが現状であり、新しい治療法の開発が切望されている。上述した感音難聴のすべてが、内耳有毛細胞の障害のみに起因するものではないが、内耳有毛細胞障害が関与している病態は少なくない。したがって、内耳有毛細胞の障害を克服することができれば、新しい治療法開発の道が拓ける。内耳有毛細胞障害の克服には、内耳有毛細胞が死に至る前に細胞死を防御する方法と、いったん喪失してしまった内耳有毛細胞を再生させる方法が考えられる。内耳有毛細胞は、

哺乳類ではいったん失われると再生しないとされている。したがって、細胞死の防御方法を開発する方が現実的な戦略といえる。

われわれは、内耳有毛細胞の死を防御する方法として、内耳に持続的、かつ、直接的に薬物を投与する方法を開発した。この方法を用いて、インスリン様細胞増殖因子1を内耳に投与する治療法は、厚生労働省感覚器障害事業としての基礎的研究開発を経て、臨床試験を行う段階にある。しかし、細胞死の防御では、治療が有効と想定される期間は、細胞が死んでしまうまでの発症後限られた時間となる。つまり、すでに症状が固定した感音難聴や慢性に進行した感音難聴に対する有効性を期待することはできない。一方、内耳有毛細胞再生はきわめて困難な課題であるが、実現することができれば、聴力を失った多くの患者を救うことができる可能性がある。このような観点から、困難な課題ではあるが、内耳有毛細胞再生をわれわれが取り組むべき重要な研究課題の一つと位置づけている。

## 内耳有毛細胞再生への戦略

いったん失われた内耳有毛細胞は、われわれ人類を含めた哺乳類では通常再生しない。これまでの研究成果から、哺乳類で再生能力が乏しい原因として、再生を抑制する因子が働いている、あるいは、再生する能力がある細胞が乏しいということがわかってきた。われわれは、2つのアプローチ、すなわち、再生を抑制している因子を解除する方法と再生能力がある細胞を内耳に移植する方法で研究開発を行っている。内耳への細胞移植治療については、ES細胞やiPS細胞を含め、種々の幹細胞を用いた難聴治療の可能性について研究

展開し、一部霊長類での実験にも着手している。本稿では、もう一つの戦略、再生を抑制するメカニズムを操作して、内耳有毛細胞を再生する試みについて紹介したい。内耳に残っている細胞を使って、なんとか有毛細胞再生ができないかを研究するアプローチと言い換えることもできる。

内耳有毛細胞の再生戦略を考えるにあたっては、2つの方向性が想定できる。一つは、哺乳類の内耳で有毛細胞が作られる発生段階にどんなことが起こっているのかを調べ、その知見を再生に応用するという手段である。もう一つの考え方は、哺乳類と異なり、内耳有毛細胞の再生能力がある鳥類や両生類では、どのようなメカニズムで再生が誘導されているのか、哺乳類との違いは何かを調べて、再生に応用しようとする考え方である。

内耳感覚上皮は、感覚細胞である有毛細胞と支持細胞からなる。支持細胞は、通常、有毛細胞の周囲に存在し、構造的に有毛細胞を支えているだけではなく、聴覚に不可欠な重要な役割も数多く果たしている。哺乳類内耳の発生に関する研究から、有毛細胞と支持細胞は同じ起源(元になる細胞)から生まれていることが明らかにされている。言い換えれば、少し前の段階に遡れば、支持細胞と有毛細胞は同じ種類の細胞であったということである。そこから、なんらかの因子が作用して、有毛細胞になる細胞と支持細胞になる細胞へと分別作業が行われているわけである。すべてのメカニズムが明らかにされているわけではないが、近年の分子生物学的な研究手法の発展から、多くの重要な知見が得られている。後述するノッチ情報伝達系に関する知見もこのような発生に関する研究に端を発している。一方、鳥類では、いったん有毛細胞

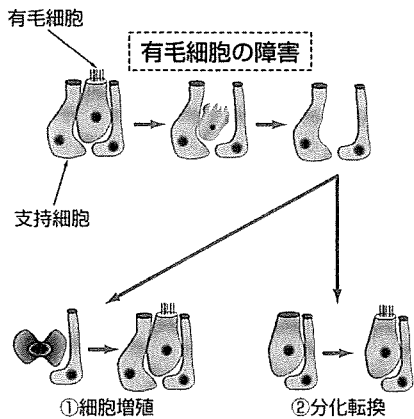


図2. 有毛細胞再生のメカニズム

を喪失しても、有毛細胞が再生できる。鳥類では2つの方法で支持細胞から有毛細胞が再生される(図2)。一つは、有毛細胞喪失後、周囲の支持細胞が分裂、増殖し、新しい有毛細胞に分化するというメカニズムである。この方法は、支持細胞の数を減らすことなく、有毛細胞を再生できるので理想的であるが、支持細胞の増殖、増殖した細胞の有毛細胞への分化という2つのステップが必要となる。もう一つの再生機構は、支持細胞が直接的に有毛細胞に変身(分化転換)するというメカニズムである。この方法では、有毛細胞再生のために支持細胞がひとつ減ることになるが、支持細胞の有毛細胞への分化転換という一つのステップで有毛細胞が再生できる。

### 支持細胞から有毛細胞への分化転換

もともと同じ起源となる細胞から支持細胞と有毛細胞はどのように作り分けられているのだろうか。将来的に支持細胞と有毛細胞になる部分は、発生の比較的早い段階で決定されて、内耳全体の中でも早く細胞増殖が停止する。ほぼ同時に、有毛細胞と支持細胞に明確に区別され、細胞の分化が開始される。音を感じ取る蝸牛の感覚上皮では、

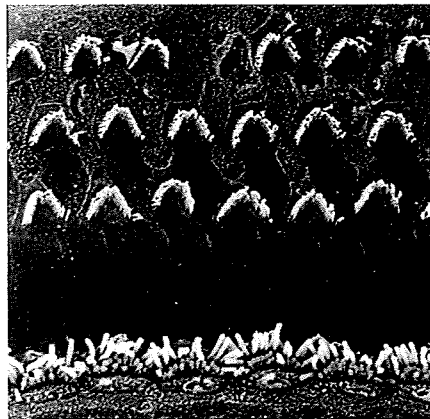


図3. 哺乳動物蝸牛における有毛細胞の配列

有毛細胞と支持細胞が整然とした配列で交互に並んでいる(図3)。この整然とした配列と隣り合う細胞を有毛細胞と支持細胞に分けていく機構として、ノッチ情報伝達系というメカニズムが働いていることが明らかにされている。

ノッチ情報伝達系は、身体が形作られる過程や幹細胞の維持機構など、生体で数多くの重要な働きをしている。有毛細胞と支持細胞の作り分けについても、ノッチ情報伝達系が働いている。有毛細胞になる運命が決まった細胞は、自らの周囲の細胞が有毛細胞にならないように指令を出す。この指令を受けた細胞では、ノッチ情報伝達系が活性化されて、有毛細胞にならずに支持細胞になるようスイッチがオンになり、支持細胞となる。このように、有毛細胞の隣には、支持細胞が存在する仕組みが存在する。支持細胞となるスイッチがオンとなると細胞内で作られる物質として、Hesファミリーというタンパクが存在する。

Hesファミリータンパクは、有毛細胞に分化するために必要なAtoh 1というタンパク質の発現を抑制する働きがあり、支持細胞が有毛細胞になるのを防止している。Hesファミリータンパクの一部を欠損させると、本来、支持細胞があるべき場所にも有毛細胞が出

現する。また、ウイルスベクターを使った遺伝子導入により、強制的にAtoh 1を支持細胞で発現させると、支持細胞が有毛細胞に分化転換することが示されている。すなわち、有毛細胞がなくなってしまうと、支持細胞が残存している状況であれば、残存している支持細胞にAtoh 1を発現させることによって、有毛細胞を再生することができる可能性があるといえる。

### 薬物治療による内耳有毛細胞再生のコンセプト

実際の難聴治療を考えると、人間の内耳にウイルスを入れるには、いろいろと解決すべき問題がある。ウイルスを用いなくて、内耳に遺伝子を入れる試みがなされているが、残念ながら、内耳の細胞にはなかなか遺伝子が入りにくいのが現状である。また、人間の内耳に障害を起こさないようなウイルスを使うことを考えた研究開発も行われている。いずれにせよ、実際の治療法として開発するためには、解決すべき問題が数多く残されている。

われわれは、遺伝子導入を行わずに、薬物で支持細胞でのHesファミリーを抑制して、HesファミリーによるAtoh 1発現抑制を解除すれば、支持細胞内でのAtoh 1発現を誘導できるのではないかと考えた。薬物で、Hesファミリーを抑制できれば、支持細胞でのAtoh 1を促し、有毛細胞への分化転換が誘導できる可能性がある。Hesファミリーの発現をコントロールしているノッチ情報伝達系では、隣の細胞からノッチ関連するシグナルが細胞膜を介して伝えられると、細胞膜の内側にあるNICD (Notch intracellular domain) という物質が細胞膜から切り離され、細胞の核に移行し、Hesファミリーなどが作られる。この細胞膜の内側にあるNICD

の切り離しに、 $\gamma$ セクレターゼという酵素が必要なが知られている。

われわれは、 $\gamma$ セクレターゼの働きを止めてしまう $\gamma$ セクレターゼ阻害薬を使って、支持細胞でのノッチ情報伝達系を阻害することにより、Hesファミリーを抑制し、相対的にAtoh 1の発現を増加させることができれば、支持細胞から有毛細胞への分化転換が誘導できる可能性があると考えた。この方法が実際の内耳で可能かどうかを調べるために、蝸牛感覚上皮の培養系での実験を行った。蝸牛感覚上皮を取り出し、培養系に移し、 $\gamma$ セクレターゼ阻害薬を投与し、支持細胞から有毛細胞への分化転換が誘導されるのかを調べた。結果、 $\gamma$ セクレターゼ阻害薬投与により、支持細胞から有毛細胞への分化転換が誘導できること、発生段階の内耳と生後の内耳では有効な薬物が異なることがわかった。この知見に基づき、生後の内耳に有効なタイプの $\gamma$ セクレターゼ阻害薬を用い、実際にモルモット内耳に $\gamma$ セクレターゼ阻害薬を投与する実験を行った。

### $\gamma$ セクレターゼ阻害薬の内耳投与による内耳有毛細胞再生

$\gamma$ セクレターゼ阻害薬は、比較的短期に体内で活性を失うことが知られているので、十分に効果が発揮されるためには持続的に内耳に投与することが必要となる。確実に持続的投与を行うとの観点から、埋め込み型ポンプを薬物投与方法として用い、モルモット内耳への $\gamma$ セクレターゼ阻害薬投与を行った。培養系の実験では、胎生期および新生マウス蝸牛を用いたが、本研究では成獣モルモットを用いることにより、臨床応用への外挿性を評価することとした。

第一に、とくに傷害を与えていないモルモットを用いて、 $\gamma$ セクレターゼ阻害薬内耳局所投与の効果を評価した。しかし、成熟した蝸牛感覚上皮では、支持細胞から有毛細胞への分化転換は観察されなかった。正常モルモットにおけるノッチ情報伝達系関係分子の発現を調べたところ、蝸牛感覚上皮ではほとんど活性が認められないことがわかった。つまり、完成された蝸牛感覚上皮ではノッチ情報伝達系が活性化されていないため、ノッチ情報伝達系を阻害しても何の効果も認められないというわけである。

次に、広範な有毛細胞脱落を惹起したモルモット感覚上皮を調べると、正常蝸牛では認められなかったノッチ情報伝達系の活性化が残存支持細胞で認められた。この結果は、他施設での解析結果とも合致するものであり、有毛細胞脱落を伴う内耳障害後、蝸牛感覚上皮で一時的にノッチ情報伝達系が活性化されているといえる。 $\gamma$ セクレターゼ阻害薬は、ノッチ情報伝達系が活性化されている状態で、初めて効果が発現されると考え、ノッチ情報伝達系が最も活性化されている傷害4日後のモルモット蝸牛に2週間 $\gamma$ セクレターゼ阻害薬を投与した。すると、一部本来支持細胞が存在する部位に有毛細胞様の細胞を認められた。したがって、成熟した蝸牛組織であっても、傷害後の適切な時期に $\gamma$ セクレターゼ阻害薬を投与することにより、有毛細胞再生が誘導できる可能性が示されたこととなる。残念ながら、今回の検討では、新生有毛細胞の数が少ないことから、新生された有毛細胞の機能的な側面の評価を十分に行うことはできなかった。

今回の実験では、新生有毛細胞をいかにして、残存している有毛細胞と区別するのかという問題があった。傷害

された有毛細胞と新生された未熟な有毛細胞は、形態学的には判別できない。そこで、今回はかなり強い有毛細胞喪失が引き起こされる障害モデルを用い、新生された有毛細胞が識別しやすくなる工夫を行った。このため、蝸牛感覚上皮全体の傷害もかなり強いものとなり、機能的な再生はかなり困難な状況であった。

### 今後の展開

今回の検討から、 $\gamma$ セクレターゼ阻害薬の内耳局所投与は、有毛細胞再生に有効な手段となる可能性が呈示されたが、聴覚機能の回復には至っていない。今後、聴覚機能再生の観点からの、研究が望まれる。具体的には、傷害の程度がもう少し軽度でなかつ傷害される蝸牛感覚上皮の部位が限定されたモデルを使って、有毛細胞再生効率および聴覚機能再生について調べている。さらに、次のステップの課題ともいえるが、 $\gamma$ セクレターゼ阻害薬の投与方法として、埋め込み型ポンプではなく、バイオマテリアルを用いたドラッグデリバリーシステムによる内耳への持続的な投与方法開発が望まれる。臨床応用を考えた場合、埋め込み型ポンプでは、かなりの手術侵襲が加わるが、バイオマテリアルを用いたドラッグデリバリーシステムであれば、鼓膜切開と同等の手術侵襲を伴うのみである。現在、 $\gamma$ セクレターゼ阻害薬を徐放できるドラッグデリバリーシステムを開発し、培養系実験でその有効性を検証している。

感音難聴に対する治療法がきわめて限られている現状を打破すべく、先駆的な治療法開発に取り組むと同時に、耳鼻咽喉科臨床医としての立場から、速やかな臨床応用に関連する研究開発を並行して行っていきたいと考えている。

# 座談会

## 臨床家たちが語る DDSの臨床応用

*Clinician's round-table talk  
on the application of DDS*

1. 自己紹介
2. それぞれの専門分野を  
選んだ動機
3. 各領域における問題点と DDS
4. 将来展望
5. おわりに

*Yasuhiro Matsumura*

*Tetsuro Kato*

*Tetsuya Hamaguchi*

*Tetsuo Minamino*

*Tatsunori Sakamoto*

司会者

国立がんセンター東病院臨床開発センターがん治療開発部 松村保広

発言者

秋田県総合保健センター、秋田大学名誉教授

加藤哲郎

国立がんセンター中央病院消化器内科

濱口哲弥

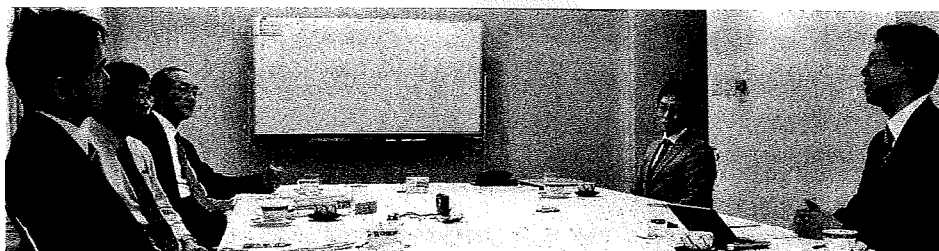
大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学

南野哲男

京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科

坂本達則

(発言順)



この座談会は2008年11月6日(木)、品川プリンスホテルにて収録いたしました。