

200900017A

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

内耳薬物投与システムを応用した感音難聴、
耳鳴り治療技術の臨床応用に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 中川 隆之

平成22(2010)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

内耳薬物投与システムを応用した感音難聴、
耳鳴り治療技術の臨床応用に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 中川 隆之

平成 22 (2010) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

内耳薬物投与システムを応用した感音難聴、耳鳴り治療技術の 臨床応用	1
中川 隆之	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	12
------------------------------	----

III. 研究成果の刊行物	14
-------------------------	----

内耳薬物投与システムを応用した感音難聴、耳鳴り治療技術の臨床応用

研究代表者 中川隆之 京都大学大学院医学研究科

研究要旨

本研究の目的は、生体吸収性材料を用いた内耳薬物投与システムを用いた感音難聴治療法の臨床応用を行い、感音難聴の治療・重症化防止に貢献することにある。ステロイド全身投与で十分な効果が得られない急性高度難聴症例を対象とし、ゼラチンハイドロゲルによるインスリン様細胞成長因子1（IGF1）内耳投与の安全性、有効性を調べる第Ⅰ－Ⅱ相臨床試験の統計学的解析を行い、第Ⅱ相臨床試験の準備を行った。ポリグリコール乳酸パーティクルによるリドカイン内耳投与による耳鳴抑制効果について蝸牛での効果検証に関する動物実験を行い、脳磁図応用について臨床研究を行った。また、プロスタグランジンE受容体特異的作動薬内耳局所投与の音響外傷に対する治療効果について調べた。ゼラチンハイドロゲルを用いたIGF1内耳投与第Ⅰ－Ⅱ相臨床試験では、投与12週後で48%、投与24週後で56%の症例で聴力回復が認められ、問題となる有害事象は認められなかった。第Ⅱ相臨床試験の準備として、ゼラチンハイドロゲル供給体制の確立を行い、臨床的検討からデキサメサゾン鼓室内投与を対照群とすることが妥当と考えられた。また、リドカイン内耳徐放効果として蝸牛遠心性神経系の修飾効果が主な作用機序であることが示唆され、健常成人を用いた脳磁図による耳鳴評価法の基礎データを集積した。さらに、プロスタグランジンE受容体特異的作動薬内耳局所投与により、音響外傷防御効果、血管内皮増殖因子のパラクライン効果の関与が示された。また、既存薬であるプロスタグランジンE1よりも優れた効果を示すことが分かった。

分担研究者

伊藤 壽一
(京都大学大学院医学研究科)
坂本 達則
平海 晴一
山本 典生
吉川 弥生
手良向 聡
(京都大学医学部附属病院)
田畑 泰彦
(京都大学再生医科学研究所)
暁 清文
(愛媛大学医学部)

熊川 孝三
(虎の門病院)
内藤 泰
(神戸市立医療センター中央市民病院)
宇佐美 真一
(信州大学医学部)
欠畑 誠治
(弘前大学医学部)
村上 信五
(名古屋市立大学大学院医学研究科)
小宗 静男
(九州大学大学院医学研究科)
田淵 経司
(筑波大学人間総合科学研究科)

A. 研究目的

本研究の目的は、研究代表者らが独自に開発した生体吸収性材料を用いた内耳薬物投与システム (Endo 2005; Iwai 2006; Lee 2007) を用いた感音難聴治療研究をさらに推進させ、高度医療、先進医療として臨床に供し、感音難聴の治療・重症化防止による感音難聴者の社会参加を促進することにある。感音難聴は最も頻度の高い身体障害であり、人口の約 20% が感音難聴に伴う症候である耳鳴りに悩まされている。したがって、感音難聴および耳鳴り治療の新規開発に対する社会的要求度は高い。本研究では、現在施行中である急性高度難聴に対するゼラチンハイドロゲルを用いたインスリン様細胞成長因子 1 の内耳投与の臨床試験を進捗させると同時に、内耳薬物投与システムを応用した感音難聴、耳鳴りに対する新規治療法の開発を行う。

B. 研究方法

1) ゼラチンハイドロゲルによるインスリン様細胞成長因子 1 (IGF1) 内耳投与による急性高度難聴治療

京都大学医学部附属病院にて施行中の第 I - II 相臨床試験 (UMIN-CTR: R000001118) を継続して行い、全症例で 24 週の観察期間終了後、登録データの適格性を京都大学附属病院探索医療センター検証部にて行う。適格性解析終了後に統計学的解析を行う。この結果に基づき、京都大学を中心とし、弘前大学、筑波大学、虎の門病院、信州大学、名古屋市立大学、神戸市立医療センター中央市民病院、愛媛大学、九州大学を参加施設とする多施設共同研究とした第 II 相臨床試験の準備を行

う。第一に、第 I - II 相臨床試験での安全性評価に立脚し、ゼラチンハイドロゲル製剤の配布、管理についての薬事法に関する解釈を明確にし、有効性検証を主な目的とした後期相臨床試験のデザインを行う。ステロイド全身投与で十分な効果が得られない急性高度難聴症例を対象とし、ランダム化を基本骨格とし、対照治療、プロトコルデザイン、統計学的解析方法を検討する。

2) ポリグリコール乳酸 (PLGA) パーティクルによるリドカイン内耳投与による耳鳴り治療

リドカイン含有 PLGA マイクロパーティクルによる内耳性耳鳴り治療臨床試験の準備として、リドカイン含有 PLGA マイクロパーティクルの内耳徐放有効性の検証、有害事象に関する動物実験を行うと同時に、リドカインの蝸牛での効果発現機序に関する研究を神経伝達物質に着目して行う。臨床試験に際する他覚的検査方法開発を目的として、脳磁図の新たな解析方法であるスペクトルアナリシス/空間フィルター法の有効性を検討する臨床的研究を行う。本年度は、スペクトルアナリシス/空間フィルター法の聴覚系研究への至適化を図り、健常成人での聴性誘発磁場解析を行う。

3) プロスタグランジン E 受容体特異的作動薬の内耳局所投与による急性高度難聴治療研究

プロスタグランジン E 製剤は、しばしば急性高度難聴治療に用いられるが、プロスタグランジン E に対しては、4 つの受容体が同定されている。研究代表者らは、動物実験

で受容体特異的作動薬の局所投与により、より高い内耳障害治療効果が得られる示唆する所見をえている。本研究では、急性高度難聴に対する有効性を動物実験で検証し、安全性に関する非臨床試験を行う。また、プロスタグランジンE受容体特異的作動薬の蝸牛保護効果のメカニズムに関する分子生物学的解析を行う。

4) γ セクレターゼ阻害薬内耳徐放による内耳有毛細胞再生誘導研究

これまでの基礎的研究成果から、 γ セクレターゼ阻害薬投与により内耳有毛細胞再生が誘導可能なことが示されている。 γ セクレターゼ阻害薬の効果発現のためには、持続投与が不可欠であり、*in vivo*での有効性検証のために機能的解析が可能なモデル確立を目指す。音響外傷モルモットを用いた機能回復モデル確立に関連する研究開発を行うと同時に、より γ セクレターゼ阻害薬投与による内耳有毛細胞再生効果を高めるための基礎的研究開発を内耳器官培養、胎生期マウスを用いて行う。

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

C. 研究結果

1) ゼラチンハイドロゲルによる IGF1 内耳投与による急性高度難聴治療

急性高度難聴に対する IGF1 を浸漬したゼラチンハイドロゲルを中耳正円窓窩に留置する治療法の安全性、少数例での有効性検証を目的とした第 I - II 相臨床試験を施行した。7 日以上ステロイド全身投与を受けたが厚生労働省判定基準で不変であった 25 症例がプロトコル治療を受け、24 週の経過観察が可能であった。内訳は男性 12 例、女性 13 例であり、平均年齢は 49 (23-72) 歳であった。プロトコル治療は、急性高度難聴発症後平均 23 (15-32) 日後行われた。治療前の 5 周波数の平均聴力は、81.2dB (95% confidence interval, 71.2-91.1) であった。

平均聴覚閾値の症例登録前から投与後 12 あるいは 24 週目までの変化が、回復以上であった割合とその 95% 信頼区間を示す。投与 12 週間後の厚労省基準で回復以上の有効割合は、48% (95% confidence interval, 28-69%) であり、著明回復 1 例、回復 11 例であった。平均聴力レベルは、70.0 dB (95% confidence interval, 60.7-79.3) であった。投与 24 週間後の有効割合 56% (95% confidence interval, 35-76%)、著明回復 1 例、回復 13 例であった。平均聴力レベルは、69.3 dB (95% confidence interval, 59.8-78.7) であった。本研究では、京都大学耳鼻咽喉科頭頸部外科における高気圧酸素療法ステロイド全身投与無効急性高度難聴症例に対する有効割合 (33%) をコントロールとした。12 週における P 値は、二項分布に基づく検定の結果 0.0086 であり、ゼラチ

ンハイドロゲルによる IGF1 内耳投与の有効割合は 33%以上であるという仮説は棄却された。一方、24 週においては、P 値は 0.0015 となり、統計学的に有意にゼラチンハイドロゲルによる IGF1 内耳投与は、高気圧酸素療法よりも優れた治療効果をステロイド全身投与無効急性高度難聴症例に対して有すると考えられた。

症例登録前、投与後 12 週目または投与後 24 週目の平均聴覚閾値の平均の推移の解析では、登録前との t 検定による比較で、0.5 kHz で 12、24 週ともに有意の改善が認められた (P = 0.03, 12, 24 週共)。

安全性の評価に関しては、試験薬を投与された 25 例すべてが 24 週の観察を行われており、すべてが安全解析対象となった。安全解析対象 25 例のうち全員になんらかの有害事象が認められた(88件)。そのうち 21 例(84%)に因果関係が否定できない有害事象が認められた。いずれの事象も、重症度は軽度もしくは中等度であった。重篤な有害事象として鼻茸が 1 例認められたが、試験薬との因果関係はなかった。その他に重篤な有害事象はなかった。めまい、浮動感は、12 例(48%)の症例に認められたが、平均 6.2 日で消失した。中耳炎は、7 例(28%)で認められ、平均 9.4 日で治癒した。鼓膜穿孔の残存は認められなかった。

以上の結果に立脚し、ゼラチンハイドロゲルによる IGF1 内耳投与の急性高度難聴の有効性を検証することを目的とした第 II 相臨床試験の準備を開始した。試験治療、ゼラチンハイドロゲルによる IGF1 内耳投与の対照治療として、最近内外でコンセンサスが得られつつあるステロイド鼓室内投与を用い、ラ

ンダム化は行うが、盲見化は手術治療である点を考慮し、行わないことを基本とした。第一に京都大学附属病院の院内製剤であるゼラチンハイドロゲルの他施設への配布が薬事法違反にあたらないかを第 I - II 相臨床試験の結果をもとに、厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課に臨床研究を目的とする未承認医薬品・医療機器の提供に係る特別個別相談を行い、薬事法に抵触しないことを確認した。平成 22 年 1 月 9 日に第 II 相臨床試験参加施設の耳鼻咽喉科、薬剤部担当者、京都大学のゼラチンハイドロゲル提供者である京都大学附属病院薬剤部を交えた start-up ミーティングを行い、ゼラチンハイドロゲルの配布、管理方法についての説明、取り決めを行った。平成 22 年 2 月 18 日、3 月 24 日に京都大学附属病院探索医療センターと耳鼻咽喉科頭頸部外科の間でプロトコルに関する委員会を開催し、参加施設耳鼻咽喉科間では、web 上で、プロトコルデザイン、薬物投与方法に関する討論を行った。結果、登録対象症例は、急性高度難聴症例でステロイドの全身投与を受け、厚労省判定基準で不変もしくは初回検査時 Grade 3 以上で回復にとどまった症例とした。症例登録、割付は、web 上で行い、ランダム化することとした。対照治療は、デキサメサゾン鼓室内投与連続 4 日間とすることとした。治療効果判定は、投与 8 週間後とし、12 週間の観察期間とすることとした。

2) PLGA パーティクルによるリドカイン内耳投与による耳鳴り治療

リドカインを含有する PLGA マイクロパーティクルを作製し、リドカイン徐放効果および

有害事象に関する解析を行った。モルモット正円窓窩にリドカインを含有する PLGA マイクロパーティクルを留置し、投与後 1-14 日後の蝸牛外リンパ中のリドカイン濃度を測定したところ、リドカイン濃度は投与 3 日後にピークを迎え、投与後 14 日まで検出可能なレベルにあった。一方、聴性脳幹反応による聴力変化では、投与 7 日後にのみ一過性の閾値上昇が認められた。前庭機能への影響については、赤外線 CCD カメラによる眼振の評価により行ったが、リドカインを含有する PLGA マイクロパーティクル局所投与によっては、眼振は引き起こされなかった。また、体平衡の異常を示唆する所見も認められなかった。さらに、投与後 7 日目の中耳および内耳組織所見から、シャムオペを行った組織と比較して、有意のこれらの組織に炎症細胞の浸潤が認められないことを確認した。以上の所見から、中耳正円窓窩へのリドカイン含有 PLGA マイクロパーティクルの投与は安全な方法であり、蝸牛内にリドカインを徐放できることが明らかとなった。

リドカイン含有 PLGA マイクロパーティクルの局所投与後 7 日目に一過性の聴性脳幹反応閾値上昇を認めたことは、有害事象ととらえることもできるが、むしろリドカイン内耳投与が聴覚系に作用することを示す所見ともいえる。そこで、リドカイン内耳投与が蝸牛の神経伝達物質分布に与える影響を、ラットを用いて調べた。ラットでは音響外傷後に耳鳴りが生じることを行動学的に示すモデルが確立されているので、本モデルを使用して、組織学的な解析を行った。音響外傷後のラット蝸牛では、遠心性神経終末における GABA 受容体の発現が低下していることが判

明した。一方、リドカイン含有マイクロパーティクルを投与した蝸牛では、GABA 受容体の発現が保たれており、リドカイン内耳局所投与は、蝸牛における遠心系神経伝達を修飾することにより、耳鳴りに対する効果を発揮する可能性が示唆された。

リドカイン含有 PLGA マイクロパーティクルの局所投与による耳鳴り治療の臨床試験を行うに辺り、これまでの他施設での報告と同様に自覚症状の改善および Tinnitus Handicap Inventory スコア変化を用いることを想定しているが、他覚的な検査方法は詳細な効果判定や作用機序解明に重要な役割を果たすことが想定される。そこで、脳磁図を用いて、耳鳴りを他覚的に評価することが出来ないかを調べることにした。本年度は、空間的、時間的情報解析能力に優れるスペクトルイメージングの計測、解析系システムの構築を行い、健常成人での計測解析を行った。

3) プロスタグランジン E 受容体特異的作動薬の内耳局所投与による急性高度難聴治療研究

プロスタグランジン E 受容体には、EP1-4 の 4 つの受容体があることが知られているが、第一にマウス蝸牛におけるこれら 4 つの受容体の発現を免疫組織化学および RT-PCR にて解析した。RT-PCR では、4 種類すべての受容体の発現が確認され、免疫組織学的解析では、蝸牛感覚上皮、ラセン神経節、血管条、ラセン靭帯にすべて発現が認められた。モルモットを用いた EP4 特異的作動薬の内耳局所投与実験では、音響外傷前投与では、聴性脳幹反応閾値上昇を計測したすべての周波数で抑制することができ、音響外傷後の

投与では、16 kHz で有意の閾値上昇が認められた。さらに、音響外傷前投与では、音響外傷による蝸牛外有毛細胞の喪失を有意に抑制することが分かった。これらの所見は、EP4 特異的作動薬が高い内耳有毛細胞保護効果を有することを示唆するものといえる。

次に、EP4 特異的作動薬の有毛細胞保護効果のメカニズムを調べるために、マウス内耳局所等予後の血管上皮増殖因子のタンパクレベルおよび mRNA レベルでの発現の変化を ELISA および定量的 RT-PCR にて調べた。結果、血管上皮増殖因子は、タンパクレベルおよび mRNA レベル共に、EP4 特異的作動薬局所投与後に増加していることが判明した。この血管上皮増殖因子増加が蝸牛内のどの細胞で行われているのかを調べるために、経時的な血管上皮増殖因子発現の変化を免疫組織化学にて調べたところ、ラセン神経節細胞で血管上皮増殖因子発現が著明に増加していることが分かった。これらの結果は、EP4 特異的作動薬局所投与に反応して、ラセン神経節細胞で血管上皮増殖因子産生が増加していることを示唆するものといえる。さらに、血管上皮増殖因子が蝸牛内のどの細胞に効果を発現するのかを調べるために、血管上皮増殖因子受容体の蝸牛での発現を免疫組織化学にて調べたところ、蝸牛有毛細胞、支持細胞、ラセン神経節細胞、ラセン靭帯線維細胞および血管条辺縁細胞で発現が認められた。したがって、EP4 特異的作動薬は主としてラセン神経節細胞に作用して、血管上皮増殖因子の産生を促し、有毛細胞を中心とした蝸牛の聴覚機能に関連する細胞を障害から保護していることが推察された。また、EP2 作動薬についても同様の結果が得られてい

る。

4) γ セクレターゼ阻害薬内耳徐放による内耳有毛細胞再生誘導研究

ノッチ情報伝達系の阻害薬として働く γ セクレターゼ阻害薬を用いて、内耳有毛細胞を再生させる研究を2つの方向から行った。ひとつは、これまでの *in vitro*、*in vivo* の所見の再現性を検証すると同時に聴覚機能回復の実現を目指して、音響外傷モルモット蝸牛に埋め込み型ポンプを用いて γ セクレターゼ阻害薬を投与する実験である。過去のわれわれの実験では、新生した有毛細胞を同定しやすくするために、有毛細胞が広範に傷害されるモデルを用いたが、機能的な回復の可能性を調べるために、蝸牛の特定部位のみで有毛細胞が喪失するモデルでの実験を企図した。本年度には、特定周波数の純音曝露で特定領域の有毛細胞が消失するモデルの確立、埋め込み型ポンプ手術の安定化を行った。結果、モルモットに 6 kHz, 120 dB SPL, 30 分の純音曝露により、蝸牛中回転領域での選択的有毛細胞喪失を誘導することに成功した。また、ポンプ埋め込み手技に関しては、ミシガン大学 Miller 教授にご教示頂き、安定した手技を確立した。

また、これまでの研究結果から、 γ セクレターゼ阻害薬の効果だけでは、多くの有毛細胞新生が期待できないことが分かっていたので、より高効率の有毛細胞新生を目指した追加処置の探索に関する研究を行った。ひとつは、Espin 遺伝子導入と γ セクレターゼ阻害薬投与を合わせる試みであり、前庭感覚上皮の器官培養系を用いて、効果解析を行ったところ、 γ セクレターゼ阻害薬投与に Espin

遺伝子導入を追加することにより、感覚毛様の構造を持つ有毛細胞マーカータンパク陽性細胞数が増加することが分かった。また、発生期蝸牛の分子生物学的解析から、ノッチ情報伝達系に関連する遺伝子を抑制すると、有毛細胞や支持細胞のオリジンとなる細胞が減少することが分かり、 γ シクレターゼ阻害薬投与に先立ち、一旦ノッチ情報伝達系を活性化することが必要であることが示唆された。

D. 考察

ゼラチンハイドロゲルによる IGF1 内耳投与による急性高度難聴治療に関する研究では、第 I - II 相臨床試験の統計学的解析から、投与後 12 週目では有意差は認められなかったが、48%と良好な有効割合がえられ、24 週後では、統計学的に有意に高い有効割合がえられた。本試験での登録症例がすべて発症 2 週間後にプロトコル治療を行っており、平均 23 日であることを考慮すると、自然軽快症例は、ほぼ除去できていると考えられることから、ゼラチンハイドロゲルによる IGF1 内耳投与が急性高度難聴に対して一定の治療効果を持つと考えることができる。安全性の評価では、めまいを中心とした有害事象が観察されたが、すべて想定される範囲内のものであり、総合的にみて、安全性は高いといえることができる。したがって、本治療法は、規模を拡大した第 II 相臨床試験で治療効果を検証するに値する治療法と結論づけることができる。この結果は、世界で初めて、細胞増殖因子製剤を内耳に投与する治療法の安全性を示し、有効性を示唆したという意味で画

期的なものといえる。また、これらの結果に立脚し、適切な第 II 相臨床試験のセットアップを行うことができた。

PLGA パーティクルによるリドカイン内耳投与による耳鳴り治療に関する研究では、リドカイン含有 PLGA パーティクルの局所投与が内耳へのリドカイン徐放方法として有効なものであることが証明され、最も危惧された平衡障害が認められなかったという点の意義は大きい。過去の臨床的研究では、リドカイン局所投与では、比較的良好な耳鳴り抑制効果が認められるものの、激しいめまいが臨床上問題であった。リドカイン含有 PLGA パーティクルを用いることにより、この問題が解決できる可能性が高い。これまでにリドカインが実際に耳鳴り抑制効果を示すことは、臨床的に経験されたいものであるが、作用機序は証明されていない。リドカイン含有 PLGA パーティクル局所投与は、蝸牛に起因する耳鳴りに抑制効果を示すことを期待するものであるが、リドカインの蝸牛での作用機序は、ほとんど明らかにされていない。この点で、今回 preliminary であるが、蝸牛遠心神経系に作用する可能性が呈示されたことは科学的にも有意義なものであり、今後の行動モデルと合わせた有効性に関する解析が期待される。また、臨床的に耳鳴りの他覚的検査法の欠如が新しい薬物治療開発の問題点であり、実際の治療を困難なものとしていた要因のひとつといえる。したがって、耳鳴りの他覚的検査法の開発は、耳鳴り治療法の開発に不可欠なものであり、今年度は脳磁図を用いた新しい解析法のセットアップにとどまっているが、今後の臨床的研究が期待される。

プロスタグランジンE 1 製剤は、広く急性高度難聴治療に用いられているが、臨床的な有用性は議論の分かれるところであった。しかしながら、一方で、有効性を示す症例が存在することも、症例研究レベルでは報告されており、有効性が認められる症例が存在することも事実であった。この点に着目し、プロスタグランジンE 受容体特異的作動薬を用いることにより、より効果的な治療法が開発できるのではないかと考えた。プロスタグランジンE 受容体には、EP1-4 の4種類あることが知られているが、EP2 と 4 が、細胞内 cAMP を上昇させるのに対して、EP3 は細胞内 cAMP を減少させることから、これらの受容体は拮抗する作用を有することが推察されている。このような背景から、われわれは、まず EP4 作動薬に注目し、研究開発を行った。結果、予想通り EP4 作動薬は、高い蝸牛有毛細胞保護効果を示し、その効果は、血管上皮増殖因子のパラクライン効果であることが示唆された。今後、臨床応用を目指し、既存のプロスタグランジンE 1 製剤との効果の比較、いくつか種類がある EP4 作動薬と EP2 作動薬の比較を行うと同時に、EP4 および 2 遺伝子改変動物の解析を行い、聴覚系におけるプロスタグランジンE の役割を明らかとしたい。

γ セクレターゼ阻害薬内耳徐放による内耳有毛細胞再生誘導研究は、前3者の研究と異なり、すでに有毛細胞が喪失した状態からの再生を目指す研究である。 γ セクレターゼ阻害薬は、ノッチ情報伝達系において、NICD の細胞膜からの切り離しを阻害し、結果としてノッチ情報伝達系を阻害する。このため、有毛細胞喪失後の再生誘導といっても、障害

後早期のノッチ情報伝達系が活性化された状態の感覚上皮でしか効果が期待できないものであった。また、有毛細胞再生効率も高いとは言い難いものであった。したがって、ノッチ情報伝達系以外の因子を制御することを加える、あるいは、人為的にノッチ情報伝達系の活性化を制御することは重要な意義を持つと考えられる。

E. 結論

ゼラチンハイドロゲルによる IGF1 内耳投与による急性高度難聴治療に関する第 I - II 相臨床試験の統計学的解析を完了し、その有効性、安全性を明らかとし、この結果に立脚した第 II 相臨床試験の準備を行うことができた。蝸牛に起因する耳鳴り抑制への効果が期待できるリドカイン含有 PLGA パーティクルを開発し、作用機序解明、新規検査方法開発に関する基礎的、臨床的研究を施行した。感音難聴治療に対する新規薬物開発として、プロスタグランジンE 受容体特異的作動薬の有効性を示す所見がえられ、その作用機序に関する研究を行った。 γ セクレターゼ阻害薬内耳徐放による内耳有毛細胞再生誘導研究では、より有効性を高めるための研究を行った。各研究課題は、順調に進捗しており、今後の展開が期待できるものといえる。

F. 健康危険情報

特記すべき健康危険情報はない。

G. 研究発表

著書

1. 中川隆之. 10. 蝸牛への薬物直接投与法 pp353-356 よくわかる聴覚障害 難聴と耳鳴のすべて. 小川 郁編 永井書店 東京 2010.
2. Nakagawa T. Inner ear drug delivery. pp233-243 Current Opinion on Sensorineural Hearing Loss. Koonja Publishing, Seoul, Korea, 2010.
3. 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 10) 内耳. pp150-155 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. メディカル ドゥ 大阪 2009

論文

1. Hori R, Nakagawa T, Yamamoto N, Hamaguchi K, Ito J. Role of prostaglandin e receptor subtypes EP2 and EP4 in autocrine and paracrine functions of vascular endothelial growth factor in the inner ear. BMC Neurosci 11:35, 2010.
2. Horie RT, Sakamoto T, Nakagawa T, Tabata Y, Okamura N, Tomiyama N, Tachibana M, Ito J. Sustained delivery of lidocaine into the cochlea using PLGA microparticles. Laryngoscope 120: 377-383, 2010.
3. Ono K, Nakagawa T, Kojima K, Matsumoto M, Kawauchi T, Hoshino M, Ito J. Silencing p27 reverses post-mitotic state of supporting cells in neonatal

mouse cochleae. Mol Cell Neurosci 42: 391-398, 2009.

4. Kikkawa YS, Nakagawa T, Tsubouchi H, Ido A, Inaoka T, Ono K, Ito J. Hepatocyte growth factor protects auditory hair cells from aminoglycosides. Laryngoscope 119:2027-2031, 2009.
5. 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 160: 813-819, 2009.
6. Kikkawa YS, Nakagawa T, Horie RT, Ito J. Hydrogen protects auditory hair cells from free radicals. Neuroreport 20: 689-694, 2009.
7. Hiraumi H, Nakagawa T, Ito J. Efficiency of a transtympanic approach to the round window membrane using a microendoscope. Eur Arch Otorhinolaryngol. 266: 367-371, 2009.
8. 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 129: 453-457, 2009.

学会発表

1. Ito J. Translational science - Regeneration of Cochlear. 'Cell

- Therapy for Inner Ear Diseases.' 27th Politzer Society Meeting. London, UK. Sep 3-5, 2009.
2. 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.
 3. 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.
 4. 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.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 田浦晶子, 中川隆之, 金丸眞一, 山本典生, 坂本達則, 伊藤壽一. γ セクレターゼ阻害剤および Espin 遺伝子による前庭有毛細胞の感覚毛再生. 第 110 回日本耳鼻咽喉科学会. 平成 21 年 5 月 14~16 日. 東京.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.

14. Yamamoto N, Chang W, Ito J, Kelley MW.
Notch Signaling Specifies Prosensory
Regions in the Inner Ear. 46th Inner
Ear Biology Workshop.
Utrecht, Netherlands. Sep 12-15, 2009.
15. Hori R, Nakagawa T, Yamamoto N,
Hamaguchi K, Ito J. The role of
prostaglandin E receptor subtype EP2
and EP4 in the cochleae. 46th Inner Ear
Biology Workshop.
Utrecht, Netherlands. Sep 12-15, 2009.
16. 堀 龍介, 瀧口清海, 中川隆之, 山本
典生, 伊藤壽一. PGE 受容体作動薬の内
耳中 VEGF への影響. 第 110 回日本耳鼻
咽喉科学会. 平成 21 年 5 月 14~16 日.
東京.
17. 堀 龍介, 中川隆之, 山本典生, 瀧口
清海, 伊藤壽一. プロスタグランディ
ン E1 の治療効果のメカニズムの検討.
第 19 回日本耳科学会. 平成 21 年 10 月 8
~10 日. 東京.
18. 稲岡孝敏, 吉川弥生, 中川隆之, 伊藤
壽一. 肝細胞成長因子 (HGF) による内
耳保護効果. 第 110 回日本耳鼻咽喉科学
会. 平成 21 年 5 月 14~16 日. 東京.

H. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得
なし
- 2) 実用新案登録
なし
- 3) その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

著書

著者氏名	タイトル名	書籍名・編者名など	頁	出版社名	出版地	出版年
中川隆之	10. 蝸牛への薬物直接投与法	よくわかる聴覚障害 難聴と耳鳴のすべて	353-356	永井書店	東京	2010
Nakagawa T	Inner ear drug delivery.	Current Opinion on Sensorineural Hearing Loss.	233-243	Koonja Publishing	Seoul	2010
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	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

論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	出版年・巻号・頁
Hori R, Nakagawa T, Yamamoto N, Hamaguchi K, Ito J.	Role of prostaglandin e receptor subtypes EP2 and EP4 in autocrine and paracrine functions of vascular endothelial growth factor in the inner ear.	BMC Neurosci	2010. 11. 35.
Horie RT, Sakamoto T, Nakagawa T, Tabata Y, Okamura N, Tomiyama N, Tachibana M, Ito J.	Sustained delivery of lidocaine into the cochlea using PLGA microparticles.	Laryngoscope	2010. 120. pp377-383.
Ono K, Nakagawa T, Kojima K, Matsumoto M, Kawauchi T, Hoshino M, Ito J.	Silencing p27 reverses post-mitotic state of supporting cells in neonatal mouse cochleae.	Mol Cell Neurosci	2009. 42. pp391-398.
Kikkawa YS, Nakagawa T, Tsubouchi H, Ido A, Inaoka T, Ono K, Ito J.	Hepatocyte growth factor protects auditory hair cells from aminoglycosides.	Laryngoscope	2009. 119. pp2027-2031.
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. 160. pp813-819.
Kikkawa YS, Nakagawa T, Horie RT, Ito J.	Hydrogen protects auditory hair cells from free radicals.	Neuroreport	2009. 20. pp689-694.
Hiraumi H, Nakagawa T, Ito J.	Efficiency of a transtympanic approach to the round window membrane using a microendoscope.	Eur Arch Otorhinolaryngol	2009. 266. pp367-371.
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. 129 pp453-457

10. 蝸牛への薬物直接投与方法

なぜ、薬物を蝸牛に直接(局所)投与するのか？

感音難聴および耳鳴の薬物治療における問題点として、治療のターゲットとなる部位に適切に薬物を送達させることがある。感音難聴および耳鳴ともに、内耳性、中枢性に分類することができるが、ここでは内耳(蝸牛)を標的とする治療について取りあげることとする。全身投与された薬物が蝸牛に到達するには、血流を介して、蝸牛に薬物がまず到達しなければならない。次に、血液-内耳関門を通過して、薬物が蝸牛内に入る必要がある。この2つのステップそれぞれに問題点がある。まず、蝸牛の血流量は極めて少なく、蝸牛まで到達する薬物の総量が少ない。さらに、血液-内耳関門を通過できない薬物も多く存在する。これらの問題解決には、薬物の加工による蝸牛へのターゲティングなどの方法が想定されるが、いまだ有効な方法の報告はない。一方、蝸牛に直接的に薬物を投与することができれば、これらの問題は容易に解決できる。しかも、高濃度の薬物が供給でき、全身的な副作用も回避できる可能性が高い。したがって、全身投与と比較して、投与できる薬物の選択肢も広がる。感音難聴や耳鳴治療開発を目的とした基礎的研究(動物実験)が、数多く行われているが、これらの実験でも薬物の蝸牛への直接的投与が広く用いられている。実際に有効性が示唆されている研究の多くは、薬物の直接投与を用いているものが多い。このような背景から、新規治療法開発という面でも、臨床的な蝸牛への薬物直接投与方法の開発は重要な課題といえる。

蝸牛への薬物直接投与とは？

蝸牛は骨に囲まれており、中耳(鼓室)とは正円窓が唯一膜様構造物で接している(図1)。一般に、鼓室内に投与された薬物は、正円窓膜を通過して、蝸牛内に到達する。蝸牛への薬物直接投与は、古くから実践されている方法であり、特別新しいものではなく、薬物の鼓室内投与は70年以上前から用いられている。古典的な鼓室内投与では、鼓室内を完全に薬液で満たし、一部が正円窓膜に接し、蝸牛内に移行することを期待した方法である。鼓室は耳管を介して咽頭腔と交通していることから、鼓室内に投与された薬物の多くは耳管を経て、咽頭に排出されてしまう。したがって、正円窓膜を通過して蝸牛内到達する薬物はごく一部であり、また薬物が蝸牛内に存在する時間はごく限られたものとなる。蝸牛への薬物局所投与を蝸牛内に実際に到達する薬物の量や薬物が存在する時間を予測できるものに発展させなければ、臨床的に安定した効果は期待できないし、治療方法の有効性を正しく検証すること

もできない。したがって、少なくとも、薬物がある程度安定して正円窓膜に接していることが必要となる。もちろん、薬物が正円窓膜を通過できることも必要条件である。動物実験レベルでは、蝸牛骨壁に小さな穴をあけ、そこから蝸牛内に直接薬物を注入する方法や正円窓膜から注入する方法も用いられているが、蝸牛への侵襲を考慮すると、このような方法が臨床応用されるのは極めて限定された場合と考えられる。

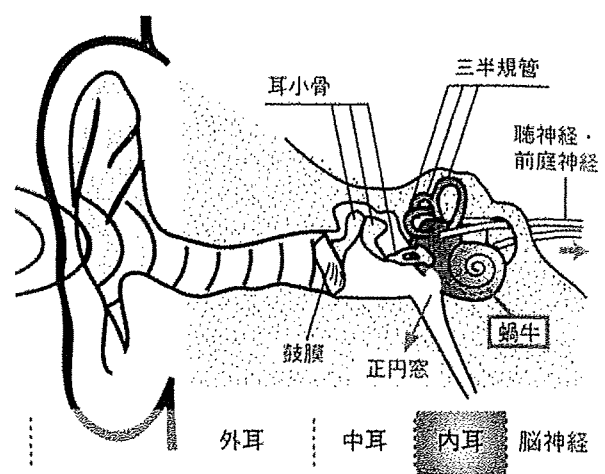


図 1 ● 中耳(鼓室)、内耳の解剖

薬物を局所投与するだけでいいのか？

投与した薬物が短時間で有効性を発揮する場合は、きちんと正円窓に投与されていれば、効果が期待できる。しかし、多くの薬物は一定の時間、一定の濃度が蝸牛内で維持されることが必要となる。このためには、薬物を繰り返し投与するか、薬物を徐放する方法を応用しなければならない。反復投与と持続的な投与では、蝸牛内での薬物動態が異なる。反復投与では、一定の濃度とはならず、投与後薬物濃度が有効濃度を下回る前に次の投与を行い、有効濃度を維持する必要がある。また、蝸牛の基底部と頂部では薬物濃度が異なる可能性も生じる。薬物徐放が可能なシステムを用いた持続投与では、薬物の蝸牛内濃度を一定レベルに長期的に維持することが可能であり、蝸牛全体に薬物を送達することができる。したがって、安定した有効性を期待するためには、なんらかの薬物徐放システムを用いる必要がある。

どのような薬物徐放システムが応用されているのか？

1つは、動物実験でも汎用されている浸透圧ポンプを用いる方法である。動物実験では蝸牛内に直接ポンプチューブ先端が挿入されることが多いが、臨床的にはポンプチューブ先端部が正円窓に留置される。ポンプから一定流量で薬物が正円窓膜上に薬物が投与される。これまでに、ステロイドをこの方法を用いて、蝸牛に直接投与する臨床研究が行われている。この方法は、安定した薬物徐放という点で優れるが、ポンプ内での薬物の安定性とポンプ留置のための手術侵襲が問題となる。もう1つの方法として、薬物徐放に関する組織工学分野の進歩を応用し、生体吸収性のバイオマテリアルを用い、正円窓膜上で薬物を徐放する方法がある。生体吸収性のバイオマテリアルとして、臨床医にとって馴染みが深いものとして、手術時に用いる吸収糸を挙げることができる。われわれは、生体吸収性材料を用いた薬物徐放技術を蝸牛への薬物直接投与に応用する研究を行っている。この方法では、薬物を含有す

る生体吸収性材料を正円窓膜状に留置することにより、生体吸収性材料から徐放された薬物が蝸牛内に移行し、一定期間薬物が蝸牛内に投与され効果を発揮する。手技的には、鼓膜切開と内視鏡での鼓室内観察が必要となる。

生体吸収性材料を用いた内耳への薬物徐放

既に臨床応用されている生体吸収性材料は数多くあり、また、その技術開発も日進月歩の感があり、今後さまざまな疾患、投与薬物に応じた方法、材料が選択可能となると思われる。しかし、基本的には、徐放したい薬物との組み合わせにより、生体吸収性徐放材料を選択する必要がある。現在、われわれは細胞増殖因子などのタンパクやペプチドを徐放する際には、ゼラチンポリマーからなるゼラチンハイドロゲルを用い、分子量が小さな脂溶性の薬物(例えばステロイドやリドカインなどがこれに相当する)には、ポリグリコール乳酸やポリ乳酸を用いている。それぞれの薬物との結合方法、徐放のメカニズムを図2に示す。ゼラチンハイドロゲルでは、ゼラチンポリマーが酵素分解されるに従い、薬物が徐放され、ポリグリコール乳酸やポリ乳酸では、これらのポリマーが加水分解されることにより生じるクラック(ひび割れ)から薬物が徐放される。双方とも、まず *in vitro* (試験管内)での徐放動態を調べ、臨床的に望ましい徐放が可能なる材料を選択する。例えば、ポリグリコール乳酸やポリ乳酸では、

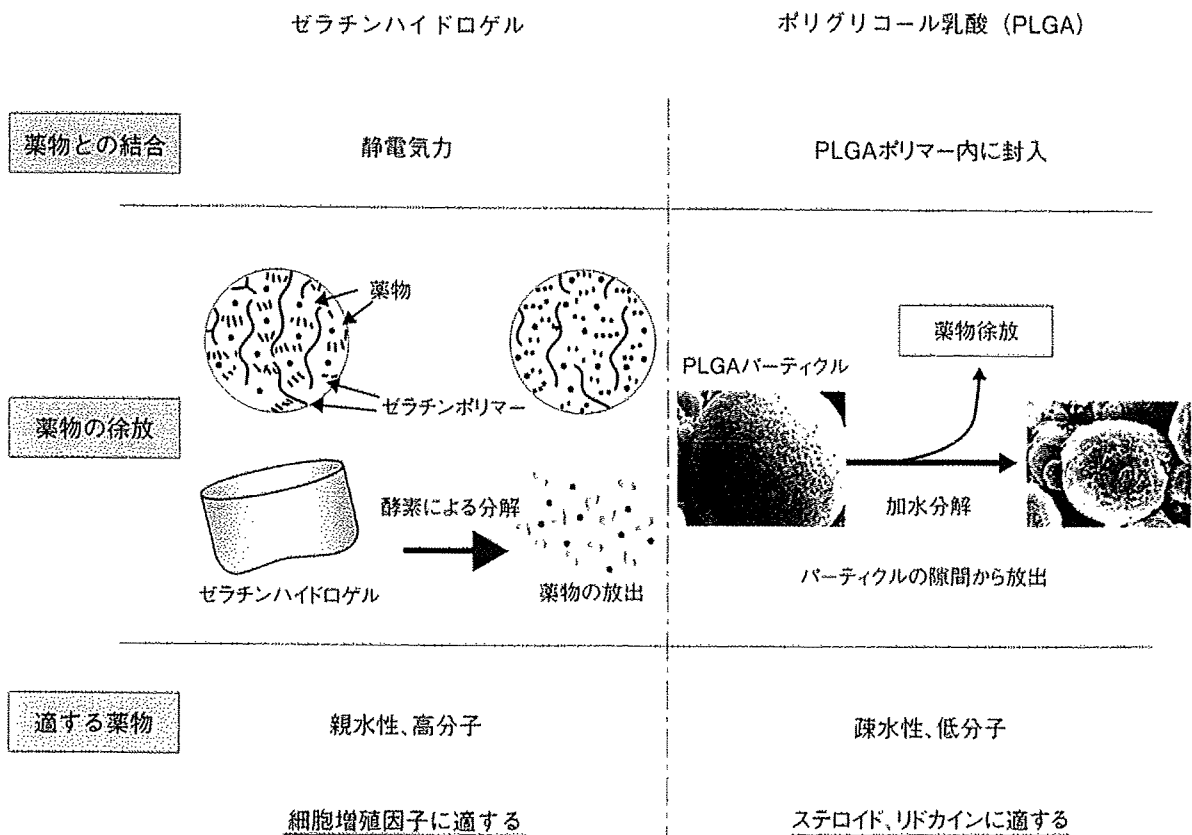


図2 ● 生体吸収性材料による薬物徐放

ポリマーのサイズによって徐放動態が変化し、ゼラチンポリマーでは使用するゼラチンの等電点(酸性か塩基性か)やポリマー重合の程度によって、徐放動態が変化する。次に、動物実験で蝸牛内への徐放動態を検証し、薬物の治療的効果を調べる。有効性が認められれば、安全性試験や毒性試験を行い、臨床応用へと進むことができる。もちろん、徐放に用いる生体吸収性材料の原料や製造工程に対しても、一定の条件が求められる。

ゼラチンハイドロゲルによるインスリン様細胞増殖因子1蝸牛投与による急性高度難聴治療

ゼラチンハイドロゲルを用いた薬物の蝸牛直接投与の臨床応用について紹介する。われわれは、既に臨床での使用が可能であり、しかも蝸牛障害治療に応用可能な細胞増殖因子としてインスリン様細胞増殖因子1(IGF1)に着目した。IGF1は、一般的な薬品として販売されており、成長障害や特殊な耐糖能異常の治療薬として用いられている。また、いくつかの基礎的研究から、IGF1が蝸牛障害治療に有効であることが示唆されていた。これらの知見に立脚して、基礎的研究開発を行い^{1)~4)}、臨床試験プロトコルデザイン、倫理委員会の承認を経て、臨床試験を現在施行中である。基礎的研究開発の詳細については、文献を参照して頂きたい。本稿では、臨床試験デザインと進捗状況について紹介する。突発性難聴を中心とした急性高度難聴を対象疾患とした安全性と少数例での治療効果を調べる第I~II相臨床試験をデザインした。本治療では、局所麻酔下に鼓膜切開を行い、内視鏡下にIGF1を含有するゼラチンハイドロゲルを正円窓に留置する。このため、鼓膜切開という手術侵襲が生じる。また、エビデンスには乏しいものの、ステロイド全身投与という一般的治療法が存在する。このような背景を考慮し、倫理的な配慮を行い、ステロイド全身投与が無効であった発症後30日未満の急性高度難聴症例を対象とした。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が目的となる。平成21年4月1日現在、20例が登録され、いくつかの症例で聴力回復が認められている。また、明らかな有害事象は認められていない。今後、目標症例数である25例でのプロトコル治療が終了した時点で、改めて有効性、安全性に対して公表する予定である。

(中川隆之)

文献

- 1) Iwai K, Nakagawa T, Endo T, et al : Cochlear protection by local IGF-1 application using biodegradable hydrogel. *Laryngoscope* 116 : 526-533, 2006.
- 2) Lee KY, Nakagawa T, Okano T, et al : Novel therapy for hearing loss : Delivery of insulin-like growth factor-1 to the cochlea using gelatin hydrogel. *Otol Neurotol* 28 : 976-981, 2007.
- 3) Fujiwara T, Hato N, Nakagawa T, et al : IGF1 treatment via hydrogels rescues cochlear hair cells from ischemic injury. *Neuroreport* 19 : 1585-1588, 2008.
- 4) Hiraumi H, Nakagawa T, Ito J : Efficiency of a transtympanic approach to the round window membrane using a microendoscope. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 266 : 367-371, 2009.