

急性高度難聴患者に対する生体吸収性徐放ゲルを用いた IGF1 の内耳投与による感音難聴治療のランダム化対照試験プロトコル概要

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」(UMIN-CTR00000936) の純音聴力検査結果に関する後ろ向き研究を行い、聴力改善の詳細な過程を解析した。純音聴力検査における閾値を周波数別 (250、500、1000、2000、4000 Hz) およびその平均値の投与 1、2、4、12、24 週間目における経時的変化を調べた。個々の症例における平均聴力の登録時と 24 週目の聴力変化を図 2 に示す。両群の間には、統計学的な有意差が認められた。詳細に観察すると著明な改善が認められた症例 1 例と高度難聴から中等度難聴に改善したグループ、中等度から軽度難聴に改善したグループに分かれることが示されている。難聴の程度が軽い症例では、改善の幅が小さい傾向があった。

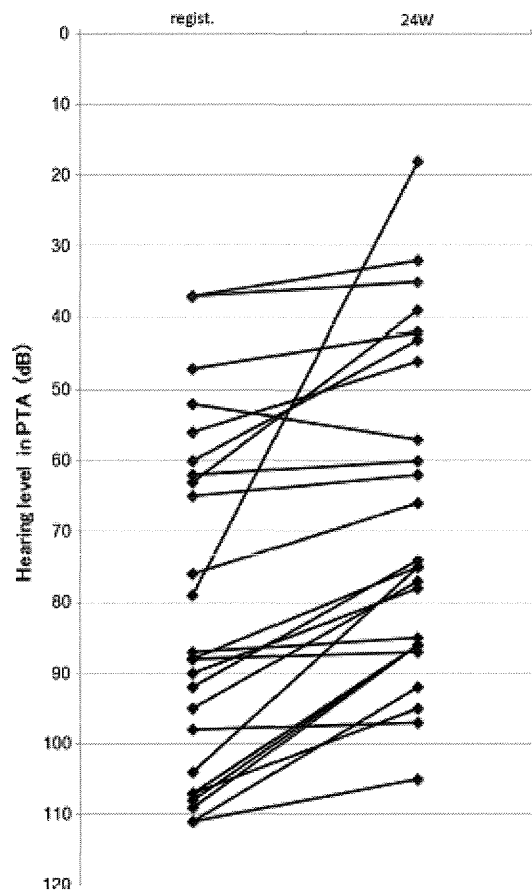


図 2：登録前、投与 24 週目の純音聴力検査聴力レベルの個々の症例における変化

各タイムポイントにおける聴力レベルの変化を調べると、結果、投与 4 週目まではほぼ直線的に聴力が改善し、以後プラトーに達することが分かった (図 3)。ただし、投与 12、24 週目に聴力改善が向上する症例も認められた。

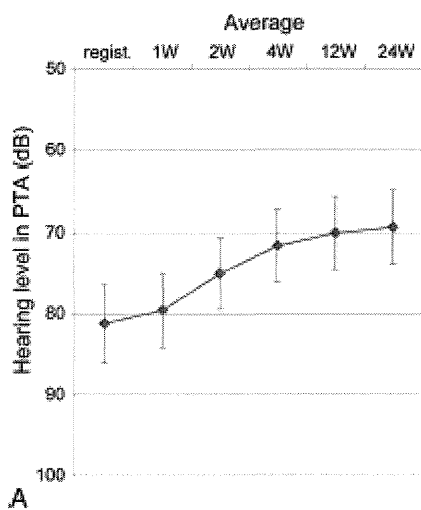


図 3 : 純音聴力平均レベルの経時的な変化

周波数別の解析では、低音域では回復がやや早く、高音域では回復が遅い傾向が認められた。代表例として、0.5, 4kHz を示す。

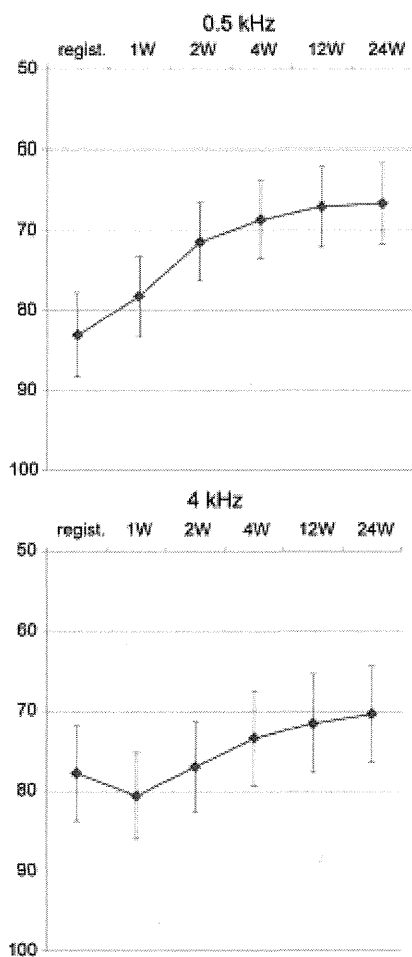


図 4 : 0.5, 4kHz における経時的純音聴力検

## 査閾値の変化

次に、どのタイミングで平均聴力において 10, 20 dB の改善が認められたのかをまとめた。

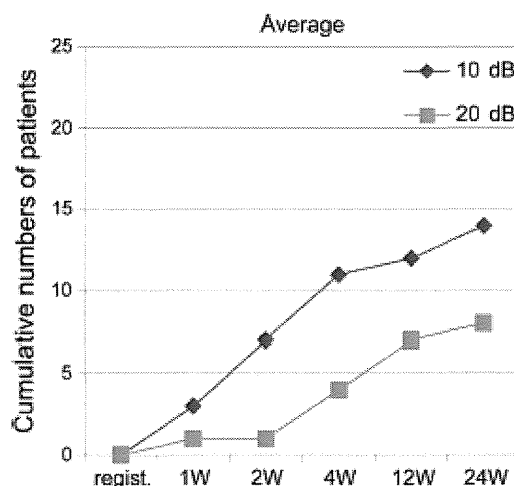


図 5 : 平均聴力において 10, 20 dB の改善が認められた累積症例数

この結果からも、一定の聴力改善が認められるのに、およそ 4 週を要し、20 dB 以上の改善には、さらに時間を要していることが分かる。

次に、IGF1 の内耳に対する作用メカニズムに関する基礎的研究の結果を述べる。

### 1. 蝸牛感覚上皮に対する IGF1 の効果

蝸牛感覚上皮、特に有毛細胞に対する効果を検証するために、器官培養系の実験系を確立した。生後 3 日目のマウス蝸牛感覚上皮を無菌的に摘出し、器官培養を行った。有毛細胞の細胞死を誘導することが知られているアミノ配糖体であるネオマイシンを添加することにより有毛細胞喪失が安定的、かつ濃度依存性に惹起されることを確認した。次に、IGF1 添加による有毛細胞保護効果を調べた

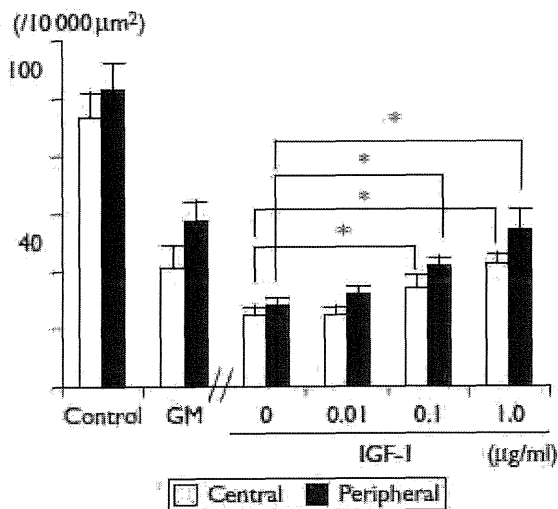
ところ、容量依存性に高い保護効果が認められることが判明した。IGF1 が有毛細胞の細胞死を抑制するタイミングを調べるために、経時的にネオマイシンによる有毛細胞減少を解析し、投与 6 時間後に解析するのが、IGF1 の効果発現機序を解析する目的に妥当であることが判明した。

この条件を用いて、IGF1 受容体活性化により誘導されるとされている細胞内情報伝達系である Akt および Erk の発現の変化を定量的 PCR 法を用いて検討した。結果、IGF1 投与により、双方の情報伝達系が活性化されていることが示唆された。この結果は、リン酸化した Akt および Erk の免疫組織学的な発現パターンとも一致しており、両方の系が活性化されていると考えられた。次に、実際にどちらの細胞内情報伝達系が有毛細胞保護に中心的な役割を果たしているのか調べる目的に、これらの細胞内情報伝達系の阻害薬を用いた実験をおこなったところ、双方の阻害薬で IGF1 による保護効果がキャンセルされることが分かり、双方の系が関与していることが示唆された。さらに、この実験系を用い、これらの情報伝達系の下流にある遺伝子を網羅的に解析し、有意の変化を示す遺伝子が 7 つ確認され、定量的 PCR 法での解析にて、これらの内 2 つの遺伝子で有意の変化が確認できた。検討した。結果、IGF1 投与により、双方の情報伝達系が活性化されていることが示唆された。

## 2. 前庭感覚上皮に対する IGF1 の効果

これまでの研究で、IGF1 が蝸牛に対して保護効果を持つことが、*ex vivo*, *in vivo* の実験で確認されており、さらに、臨床試験でも急性高度難聴に対する有効性を示唆する所見が得られている。一方で、前庭系に対する効果は、これまで解析されていなかった。今後のめまい疾患などへの IGF1 治療の適応拡大を視野に入れ、前庭感覚上皮に対する IGF1 の効果を器官培養系を用いて調べた。

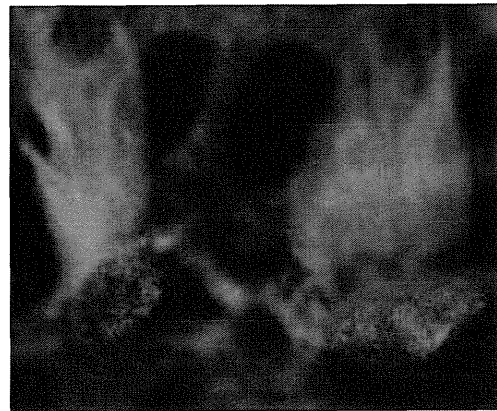
蝸牛感覚上皮と同様に生後 3 日目のマウス卵形囊から感覚上皮を摘出し、器官培養を行った。前庭感覚上皮に対しては、同じアミノ配糖体でもゲンタマイシンが高い毒性を示すことが知られているので、ゲンタマイシンを用い、有毛細胞傷害を惹起することとした。第一にゲンタマイシンによる有毛細胞喪失が容量依存性に誘導されることを確認し、約 50% の有毛細胞喪失が誘導される条件を用いることとした。また、前庭感覚上皮では、striola 周辺とその外側では、アミノ配糖体に対する感受性が異なることが知られているので、striola 周辺とより末梢部分とに分けて解析を行った。結果、前庭感覚上皮でも容量依存性に IGF1 による有毛細胞保護効果が、striola 周辺および末梢部分ともに認められた。



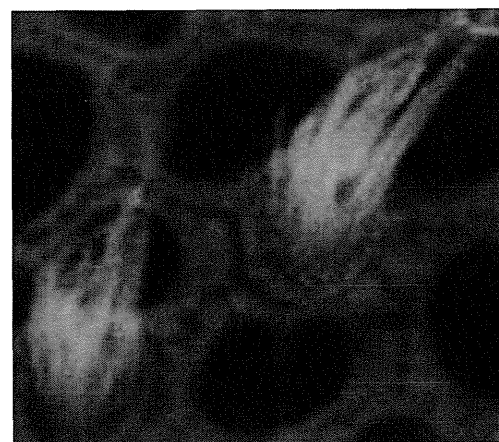
縦軸は有毛細胞数を示す。IGF1 添加により容量依存性に有毛細胞数が増加している

過去の報告で、前庭感覚上皮の支持細胞に対して、IGF1 が細胞増殖を誘導する効果があることが報告されており、また、細胞増殖を伴わない傷害された有毛細胞の自己修復による再生が誘導されることが報告されている。したがって、有毛細胞数の増加に支持細胞増殖に伴う有毛細胞再生が関与している可能性が想起されたが、ゲンタマイシンで傷害した時点での有毛細胞数からの増加は認められず、今回の観察では主として保護効果が中心的役割を果たしたことが示唆された。

次に、IGF1 により保護された有毛細胞が機能的なさいぼうかどうかを検証する目的で、感覚毛に関する詳細な形態学的な解析と FM1-43 を用いた MET チャンネルの評価を行った。保護された有毛細胞は、正常有毛細胞と同様に Espin, TRIOBP を発現しており、啓太学的には機能的と考えられる感覚毛を有することが分かった。



IGF1 により保護された有毛細胞の根の部分に TRIOBP の発現を認める



IGF1 により保護された有毛細胞の先端部に espin の発現が認められる

FM1-43 による解析でも、保護された有毛細胞に正常有毛細胞と同様の取り込みが認められ、MET チャンネルも保護されており、IGF1 により保護された有毛細胞は有毛細胞としての機能を保持していることが示唆された。

以上の所見は、IGF1 が蝸牛のみならず、末梢前庭障害に対しても治療的な効果を持つことを示唆するものといえる。

### 3. 内有毛細胞とラセン神経節細胞シナプス

## 結合に対する効果

臨床的な IGF1 による感音難聴治療効果に関する解析結果から、IGF1 による聴力改善には時間を要し、有毛細胞の細胞死の保護効果だけでは説明できない部分がある。このゆっくりとした聴力回復のメカニズムとして、内有毛細胞とラセン神経節細胞間の神経連絡特にシナプスの再生が関与しているのではないかと推察した。そこで、ラセン神経節を含むマウス蝸牛のスライスカルチャーモデルを作製し、IGF1 の内有毛細胞-ラセン神経節細胞間のシナプス再生についての解析を行った。

興奮性アミノ酸を培養液中に投与することにより、内有毛細胞とラセン神経節細胞を温存し、ラセン神経節細胞と内有毛細胞間の神経線維を選択的に傷害することができた。また、シナプスの高度な傷害が誘導されていることを免疫染色により確認した。一旦、傷害を作製した後に、IGF1 を投与し、内有毛細胞に接する神経線維の数、シナプスのマーカー発現を調べた。結果、IGF1 は濃度依存性にこれらの再生を誘導することが明らかになった。また、この効果は、IGF1 細胞内情報伝達系の阻害薬の投与により、有意に減弱することが明らかとなった。これらの結果は、IGF1 がラセン神経節細胞に作用し、内有毛細胞との間のシナプス結合の再生を誘導する効果を持つことを示すものといえる。

## 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、蝸牛における遠心性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。近年、神経障害にこれら EP1-4 の4つの受容体が関与することが明らかにされつつある。EP1-4 の神経障害における重要性を示す知見が数多く報告されているが、一方で、EP1-4 の作用は複雑な一面も有する。例えば、血流障害は中枢神経系傷害の主たる病態の

ひとつでもあり、蝸牛障害においても血流障害の関与を示唆する報告がいくつかなされているが、EP2, 4 が血管を拡張する作用を持つのみ対して、EP1, 3は血管収縮作用を持つ。したがって、EP1-4 のどの受容体が分布するのか、発現量のバランスの違いにより、血流が低下するのか、増加するのかが決まる。神経細胞に対する直接的な効果についても、一般的には、EP2, 4は神経保護に働き、EP1, 3は神経毒性を介在するとされている。さらに、問題となるのは、病態に応じて、神経保護的あるいは神経傷害的に働くかが変化する場合もある。急性障害では、EP2は神経細胞に保護的に働くが、慢性的な炎症モデルでは傷害作用を持つ。このメカニズムとして、神経細胞では細胞生存促進方向の細胞内情報伝達系を活性するのに対して、EP2はグリア細胞などで活性酸素などを発生させる方向に働く。EP2とEP4は、ともに細胞内のcAMP濃度を上昇させ、血流制御を含めて、よく似た働きを示すことが多いが、EP4は慢性炎症においても神経保護的に働くことが報告されている。以上の中枢神経系でのEP1-4の作用を蝸牛障害に当てはめて考えると、急性障害では、EP2, 4が保護的作用を持つことが期待され、特に、亜急性期を含めた病態を考慮すると、EP4作動薬が蝸牛保護についても最も有効であることが推察される。

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。

EP4の蝸牛における役割、特に、EP4作動薬の治療薬としての能力、薬理的な作用機序を明確にするために、EP4ノックアウトマウスの使用を考慮し、マウスでの実験系でのEP4の蝸牛における役割の解析を行った。第一に、EP4作動薬の音響外傷に対する保護効果を調べた。恒常的な聴覚障害を惹起するレベルの音響外傷を用い、音響外傷前にEP4作動薬あるいは、コントロールとして溶媒のみを正円窓窩に投与し、聴性脳幹反応を用いて、聴力を評価した。コントロールでは、音響外傷後、聴力の回復が全く認められなかったのに対して、EP4作動薬を投与したマウスでは、有意の聴力改善が認められた。組織学的には、蝸牛外有毛細胞の生存促進効果が認められた。これらの知見は、過去のモルモットを用いた実験結果に合致するものであり、EP4作動薬が音響外傷に対する保護効果を持つことが、マウスにおいても確認された。

次に、EP4阻害薬を用いることにより、音響外傷による蝸牛障害が増強されるか否かを検証した。この実験では、音響外傷による聴力障害の増強を評価することが必要となるので、一時的に聴力障害が惹起されるが、経時的に聴力が回復するレベルの音響外傷を用いた。溶媒を投与したコントロールでは、



一時的に聴覚閾値上昇が認められるものの、経時的に有意の聴力改善が認められることが、聴性脳幹反応の記録により確認された。一方、EP4 阻害薬を投与したマウスでは、経時的な聴力の回復が観察されず、恒常的な聴覚閾値上昇が残存した。組織学的にも、残存している蝸牛外有毛細胞数が、EP4 阻害薬を投与したマウスでは有意に少なく、EP4 の作用がブロックされることにより、音響外傷による蝸牛障害が増強されることが示された。この所見は、音響外傷からの聴力回復過程に EP4 が関与することを示唆するものである。EP4 阻害薬局所投与の解析結果から、EP4 が音響外傷からの聴力回復過程に関与することが示唆された。したがって、EP4 ノックアウトマウスは、音響外傷に対して脆弱であることが予想された。

EP4 ノックアウトマウスを用いた解析では、音響外傷などの障害を与えていない状態では、正常動物と比較して、著明な聴覚機能の低下は認められなかったが、聴性脳幹反応および誘発耳音響放射で軽度ではあるが、有意の聴覚低下が認められた。音響外傷を与えた動物での解析では、EP4 ノックアウトマウスでは、正常動物では恒久的な聴力障害が残らないレベルの音響曝露でも外有毛細胞喪失が惹起され、有意に大きな聴力低下が示された。以上の結果から、EP4 は蝸牛の聴覚機能維持に係わっており、EP4 作動薬は感音難聴治療薬としての臨床応用が期待できることが分かった。

臨床的には、プロスタグランジン E1 製剤が、急性高度難聴治療に汎用されている。しかしながら、その有効性を示す報告は乏しい。主として、蝸牛血流改善を期待して、投与されているが、基礎的にも明確な証拠はない。プロスタグランジン E1 は、プロスタグランジン E2 と同様に、EP1-4 の受容体に作用して、薬理的な効果を発揮するが、プロスタグランジン E1 は、プロスタグランジン E2 に比べると、EP1 受容体に対する親和性が低く、EP2, 3, 4 への親和性が高い。したがって、主に EP2-4 に対する効果が中心と考えられる。EP2, 4 が細胞内 cAMP を増加させるのに対して、EP3 は cAMP を減少させる方向に働く。すなわち、EP3 は、EP2, 4 に拮抗的に働く。つまり、これら 3 つの受容体が同時に刺激された場合、EP2, 4 による気血管拡張や神経保護効果は、EP3 により打ち消されている可能性があり、効果が減弱することにもつながる。したがって、プロスタグランジン E1 製剤よりも、特異的に EP4 を作動させる方が、難聴治療においても有効である可能性がある。そこで、モルモット音響外傷モデルを用いて、プロスタグランジン E1 製剤および EP4 作動薬を正円窓窩に投与した場合の音響外傷に対する保護効果を比較した。音響外傷後の聴力評価を聴性脳幹反応にて行ったところ、プロスタグランジン E1 製剤投与動物に比較して、有意に良好な聴力回復が EP4 作動薬投与動物で観察された。さらに、残存外有毛細胞数にも有意の差が認め

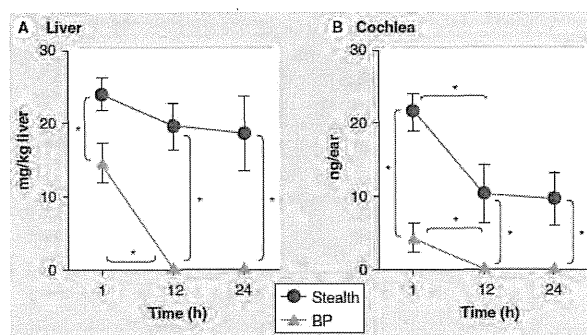
られた。この結果は、内耳局所投与を用いる場合、プロスタグランジン E1 製剤よりも EP4 作動薬の方が、良好な聴力回復が期待できることを示唆するものと言うことができる。

#### 4) ステルス型ナノパーティクルを用いたステロイド内耳徐放に関する研究

ステルス型ナノパーティクル化により全身投与された薬物の蝸牛での動態を検討するために、ローダミン含有ステルス型ナノパーティクルを作製し、フリーのローダミン投与との比較検討を組織学的に行った。フリーのローダミンを投与した場合には、投与 15 分、2 時間、24 時間後、いずれのタイミングにもローダミン蛍光は、蝸牛組織内に認められなかった。一方、ローダミン含有ステルス型ナノパーティクルを投与した蝸牛では、すべてのタイミングで、ローダミン蛍光が蝸牛内に認められた。ローダミン蛍光は、主に血管条の血管に相当する部位に認められた。

次に、フリーのベタメサゾンおよびベタメサゾン含有ステルス型ナノパーティクルを投与した後の、蝸牛および肝臓でのベタメサゾン量を測定した。肝臓では、フリーのベタメサゾン投与 1 時間後には、高い濃度のベタメサゾンが検出されたが、投与 12 時間後には、ほぼ消失していた。ベタメサゾン含有ステルス型ナノパーティクルを投与した場合は、投与後 1-24 時間にわたり、高濃度のベタメサゾンが検出された。つまり、ステルス

ナノパーティクル化により、肝臓など網内系での捕捉が抑制され、長期間の徐放が可能となったことが示された。蝸牛では、フリーのベタメサゾン投与した場合、投与 1 時間後でも、ごく低濃度のベタメサゾンしか検出できず、投与 12 時間以降は、ほとんど検出されなかった。一方、ベタメサゾン含有ステルス型ナノパーティクルを投与した場合、すべてのタイミングで高濃度のベタメサゾンが検出され、投与 24 時間後でも、フリーのベタメサゾン投与 1 時間後よりも高濃度のベタメサゾンが検出された。

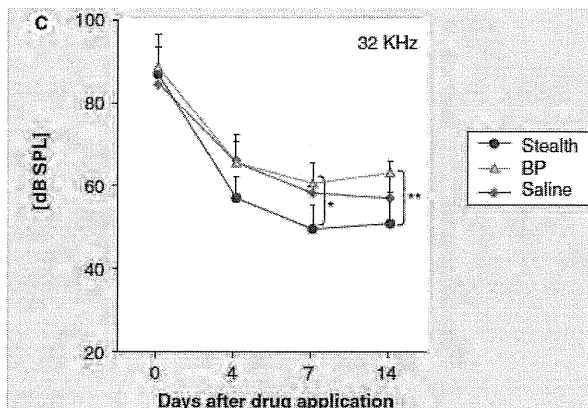


A: 肝臓でのベタメサゾン濃度の経時的変化、  
B: 蝸牛でのベタメサゾン濃度の経時的変化。  
丸は、ベタメサゾン含有ステルス型ナノパーティクルを投与した場合、三角はフリーのベタメサゾン投与した場合

以上の結果から、2つのことが明らかとなった。ひとつは、通常のステロイド静脈内投与を行った場合、蝸牛に到達するステロイドは、きわめた限られた時間、限られた容量しか到達しないという事実である。臨床的に高濃度のステロイド点滴が経験的に用いられているのも、このあたりに原因があったのか

もしれない。しかしながら、高濃度ステロイド投与は、副作用発現のリスクを高めることから、問題点も多い。ふたつめは、ステルスナノパーティクル化により蝸牛に長期間高濃度のステロイドを到達させることができるということである。トータルで投与されるステロイドの容量は、少なくとも済むことから、副作用軽減につながる可能性がある。

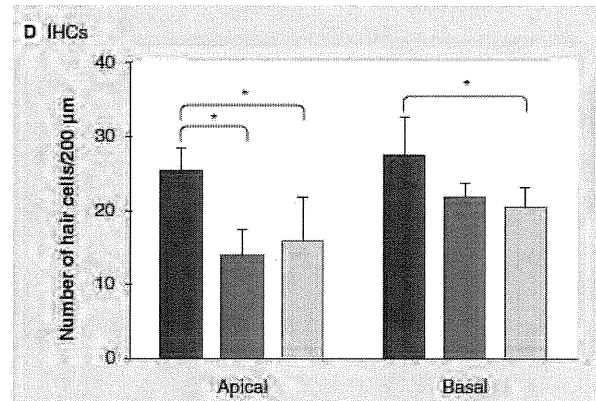
次に、音響外傷に対する治療効果の比較を行った。マウスに音響外傷を与えた後に、フリーのベタメサゾンあるいは、同じ容量のベタメサゾンを含むベタメサゾン含有ステルス型ナノパーティクルを投与し、経時的な聴力変化を聴性脳幹反応にて調べた。また、コントロールとして、生食を投与したマウスを用いた。結果、調べたすべての周波数で、ベタメサゾン含有ステルス型ナノパーティクルを投与した場合に有意に良好な聴力改善が認められた。フリーのベタメサゾン投与した場合、コントロールと同程度の聴力回復しか認められなかった。



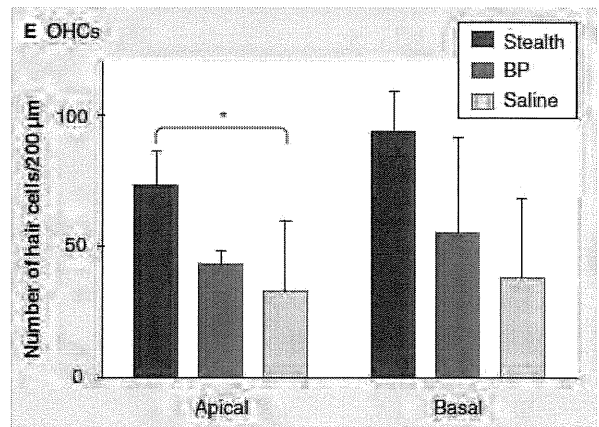
音響曝露後の経時的聴性脳幹反応閾値の変化。Stealth: ベタメサゾン含有ステルス型ナノパーティクル、BP: フリーのベタメサゾン

ン、Saline: 生食。

組織学的にも、ベタメサゾン含有ステルス型ナノパーティクルを投与した場合に最も多くの内、外有毛細胞の残存が認められた。



蝸牛頂回転、基底回転での内毛細胞数



蝸牛頂回転、基底回転での外毛細胞数。

Stealth: ベタメサゾン含有ステルス型ナノパーティクル、BP: フリーのベタメサゾン、Saline: 生食。

これらの結果から、ステロイドをステルスナノパーティクル化することにより、より長時間、高濃度のステロイドを蝸牛に到達させることができ、治療効果を高めることができることが期待できることが明らかとなった。

## 5) $\gamma$ 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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、 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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、 $\gamma$ 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、 $\gamma$ セ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。

ポンプ挿入後、人工外リンパを投与した動物をコントロールとした。聴性脳幹反応による聴力改善の評価では、コントロール群では全く聴力改善が認められなかったのに対して、 $\gamma$ セクレターゼ阻害薬投与群では、有意の聴力改善が8, 10 kHzの2周波数で観察された。組織学的には、内有毛細胞、外有毛細胞、外有毛細胞のさらに外側に存在する異所性有毛細胞の3つに分けて、定量的に評価を行った。残存内有毛細胞数は、両群ともに良好に保たれており、差を認めなかった。外有毛細胞数に関しては、コントロール群で著明な減少を認め、 $\gamma$ セクレターゼ阻害薬投与群では良好に保たれていた。全体の外有毛細胞数では、有意の差を認めなかったが、最外側(第3列)の外有毛細胞数に関しては、有意差を認めた。異所性有毛細胞については、 $\gamma$ セクレターゼ阻害薬投与群では、ひとつの蝸牛あたり平均2つの異所性有毛細胞が認められたが、コントロール群では全く認められなかった。異所性有毛細胞数に関しては、両群間に統計学的有意差を認めた。

以上の所見から、 $\gamma$ セクレターゼ阻害薬の

内耳局所投与は、音響外傷後の蝸牛において、外有毛細胞の保護あるいは再生を促し、聴力改善に寄与することが示唆された。

#### D. 考察

本研究課題は、3つの種類の研究課題からなる。中心となる研究は、臨床研究である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 IGF1 内耳投与による感音難聴治療の検討である。本研究は、過去に研究代表者らが、平成 18-20 年度 厚生労働省科学研究費補助金 感覚器障害研究事業 感音難聴に対する内耳薬物投与システム臨床応用に関する研究で開発したゼラチンハイドロゲルを用いた内耳薬物投与システムの臨床応用研究であり、本研究課題の根幹となる研究である。本年度には、本治療法の適応拡大を視野に入れた基礎的研究開発も同時に施行した。第 2 は、基礎的研究成果を臨床試験に橋渡しするトランスレーショナル研究である 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研究である。本研究のシーズとなる PLGA パーティクルを用いた内耳への薬物徐放に関する基礎的研究開発は、昨年度までの研究に完了しており、臨床試験実施を行うための前臨床試験を進捗させることが目的となる。第 3 の研究は、今後のトランスレーショナル研究のシーズとなる、臨床応用が期待される基礎的研究で

あり、プロスタグランジン E 受容体特異的作動薬、ステルス型ナノパーティクルを用いたステロイド内耳徐放、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が相当する。これら 3 つの研究分野に分類して、考察する。

#### 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

平成 22 年度には、前年度に臨床試験登録を完了した第 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」(UMIN-CTRR00000936) の統計学的解析を行った。この臨床試験では、ゼラチンハイドロゲルによる IGF1 内耳投与の安全性の検証と少数例での有効性に関する解析が目的となる。安全性の検証という観点では、すべての症例に有害事象が認められたが、一時的なめまい、炎症のみであり、すべて観察期間中に消失していることから、一定の安全性が認められたといえる。また、本治療では、鼓膜切開という外科的処置を要するが、観察期間中にすべての症例で鼓膜切開部位は閉鎖しており、問題は生じなかった。本研究は、ヒストリカルコントロールを用いた単群試験であることから、有効性については、言及できる範囲が限定されるが、過去のステロイド全身投与無効例に対する高気圧酸素療法の有効割合 33% に対して、試験治療終了 12 週目で 48% と上回り、統計学的な有意差は認めなかったものの、高気圧酸素に対して同等もしくはより優れた治療効果が期待できることが示唆された。試験治療 24 週目では、

56%の有効割合が認められ、統計学的にも有意差が認められた。したがって、少数例による検討ではあるが、一定の有効性は期待できる治療法であることが示唆されたといえる。これら、安全性、有効性に関する結果は、本治療法が、有効性の検証を目的とした第Ⅱ相臨床試験を行うのに妥当な治療法であることを示すものといえる。有効性検証のための第Ⅱ相臨床試験のデザインに寄与する結果としては、試験治療開始が発症 26 日以上経過した症例では、聴力改善が認められなかったということあげることができる。先行する動物実験の結果からも、早期治療開始が聴力改善の重要な因子となることが示唆されていたが、その結果を裏付けるものといえる。

有効性の検証を目的とした第Ⅱ相臨床試験としては、有効性検証において十分な妥当性を持たせるために、ランダム化対照試験とすることとした。学術的な観点からは、全く同様の手術手技を用いるプラセボ投与が望ましいと考えられたが、急性高度難聴の疾患予後の特徴を考慮し、倫理的な面からプラセボは用いず、実薬対照とすることとした。通常、実薬対照を用いる場合、標準的治療を対照治療とすることが望ましいが、現在、ステロイド全身投与以外に標準的な治療として認識されている治療法はないことから、ステロイド全身投与無効例の救済療法として最も広く用いられているステロイド鼓室内投与を対照治療とすることとした。分担研究者である弘前大学・欠畑らのグループは、本邦で最も早くからステロイド鼓室内投与治療を急性高度難聴に対して用いており、臨床経験も豊富なことから、弘前大学での経験を参考として、試験デザインを行った。弘前大学での後ろ向き研究での解析結果では、ステロ

イド全身投与無効例に対する有効割合は、50%であることから、先行するゼラチンハイドロゲルによる IGF1 内耳投与の有効割合とほぼ同等であり、また、局所投与治療という点で同等の手術侵襲となる点も考慮して、対照治療として妥当であると結論づけた。ただし、投与手技が明らかに異なることから、ブラインド化は不可能であることから、オープン試験とした。

適格基準および除外基準については、先行する臨床試験の基準から3点の変更を加えた。第一は、適格基準における発症からの日数である。先行する臨床試験での結果に基づき、治療効果が期待できる発症後 25 日以内とした。第2に、前治療であるステロイド全身投与の治療効果判定に関する条件である。先行する臨床試験では、厚労省判定基準の不変に限定していたが、実際には回復に相当する 10 dB 以上の聴力改善でも 20 dB 以下の改善では、自覚的には不変と変わりなく、臨床試験登録を希望する症例が多くあった。この点を考慮し、今回のランダム化対照試験では、不変もしくは回復とした。第3の点は、除外基準から前治療における併用療法に関する事項を省いたことである。これらの改訂により、臨床的な効果が期待でき、しかも、実際の臨床の状況に即したデザインの臨床試験とすることができた。したがって、本臨床試験の結果は、広く現実の臨床の場にフィードバックできる成果が得られることが期待できると考えられる。

目標症例数の設定については、上述した適格基準における発症日数の制限の変更を考慮した先行する臨床試験での期待できる有効割合は、63%となる。この結果から、試験治療の有効割合を 60-65%と想定した。対照

治療となるステロイド鼓室内投与については、いくつかの臨床論文の報告がなされているが、デザインされた前向き臨床試験は、少なく、2006年以降に対象症例数が10例以上のステロイド全身投与無効例に対するステロイド鼓室内投与の治療成績という条件で、文献を集め、解析した。をまとめると有効割合は約20-70%とばらつきが大きく、治療方法、効果判定方法も一定しないため、これらの文献での総症例数と有効と判定された症例数から有効割合を算出し、有効割合は、41%であった。以上から、ステロイド鼓室内投与の有効割合を40%と設定し、目標症例数を算出し、各群60例、合計120例とした。急性高度難聴に対する臨床試験の規模としては、大きなものであり、ランダム化対照試験の数がきわめて少ないことを考慮すると、本試験の臨床的意義は大きいと考えられる。また、試験治療、対照治療ともに、実際の臨床に即した無理のない治療スケジュールとなっており、実際の臨床へのフィードバックが可能な研究成果が得られることが期待できる。

本試験のもう一つの特徴は、多施設共同試験として行う点にある。すでに、京都大学では、倫理委員会の承認を得ており、財政面での体制を確立し、平成23年4月から登録開始した。しかし、他施設での承認、臨床試験開始に時間を要し、平成24年2月時点では、47例の登録にとどまった。このため、繰越申請を行い、平成24年10月に登録完了、12月に解析完了を目標とした。結果、平成25年1月時点で109例の登録完了を行うことができた。1年間で62例の登録は、ほぼ順調な経過

といえる。参加9施設中6施設では、予定通りに完了することができたが、3施設での進捗が遅れたため、予定通りに登録完了することができなかった。これらの進捗に遅れがあった施設でも、平成24年9月以降に順調に登録が進行しており、月間6-9症例の登録が行えており、本年度中には登録が完了できる見込みである。

これまでの109例の登録症例における試験治療および対照治療の経過において、重篤な有害事象の報告はなく、安全性の面では順調に臨床試験を施行することができた。京都大学で施行した前向き臨床試験での経験を今回の臨床試験プロトコルに十分反映することができたため、多施設でも大きな問題なく臨床試験が施行できているものと推察される。また、IGF1局所投与に関する手術手技や手順、ゼラチンハイドロゲルの取り扱いについても、登録開始前に行った会議などでの周知徹底により、京都大学以外の8施設でも問題なく、試験治療を行うことができた。今回の臨床試験に参加する施設は、それぞれ中耳手術の経験が豊富な施設であり、この点も円滑な試験治療進行に寄与していると考えられるが、多施設において複数の医師が問題なく投与を行えたことから、今後の展開を考えた場合、一定レベルの中耳手術解剖に関する知識があり、手術用顕微鏡、内視鏡を有する施設であれば、広く行い得る治療法であると考えられる。

一方、症例登録に関しては、各施設の診療

圏における患者数の差違、関連病院などからの紹介体制、地域の耳鼻咽喉科医における臨床試験の認知の差が登録進捗に大きく影響したと考えられる。特に、関連病院、地域の耳鼻咽喉科医の協力体制の構築が重要であると感じられた。また、多くの症例においてインターネットが臨床試験の存在を知るきっかけであったことから、地域におけるインターネットを介した情報収集の浸透度の違いも関係していると考えられた。直接、京都大学への問い合わせを行ってくる症例は圧倒的に首都圏に多く、京都大学以外では首都圏に近い施設での症例登録が順調であったことから、単純な人口の違いだけではなく、インターネット環境の違いが症例登録進捗に関連したのではないかと考えられた。

ステロイド全身投与無効例に対する IGF1 局所投与の聴力改善効果を調べる前向き臨床試験 (Nakagawa et al., 2010) の純音聴力検査所見の経時的変化を後ろ向き解析にすることにより、IGF1 の治療効果のメカニズムに関していくつかの興味深い知見が得られた。第一に、聴力改善は投与 4 週目までにゆっくりと出現することが分かった。この臨床試験では、発症から平均して 3 週目に登録、試験治療が行われていることから、発症 7 週目という時期に聴力改善が認められていることを意味する。ヒトを含めた霊長類での有毛細胞障害過程、特に細胞死に至る時間経過は不明であり、齧歯類との違いは分からない。齧歯類では、音響外傷や耳毒性薬物投与から

2 週で障害レベルは固定し、4 週目には不可逆的な組織学的な変性が生じている。この時間経過を当てはめれば、IGF1 はなんらかの再生的な治療効果を持つのではないかと推察することができる。ヒトとマウスなど齧歯類では、障害過程に要する時間経過が異なることも十分に考えられる。ヒト内耳を用いた実験は不可能であるが、ヒト iPS 細胞由来の内耳有毛細胞を用いた解析を行うことは可能であり、今後ヒト iPS 細胞由来有毛細胞とマウス iPS 細胞由来有毛細胞の比較検討を行うことにより、内耳障害過程のヒトとマウスの違いに関する知見が得られることが望まれる。

突発性難聴におけるヒト内耳における有毛細胞障害過程がマウスなどに比較してゆっくりと進行するものとすれば、IGF1 による有毛細胞保護が中心的なメカニズムと考えられる。また、再生プロセスが関与するとすれば、内有毛細胞とラセン神経節細胞の間のシナプス結合の再生、感覚上皮以外の蝸牛コンパートメントの機能再生が関与している可能性が考えられる。

臨床研究を進捗させると同時に、本治療法の科学的根拠をより強固なものにするための基礎的研究と適応拡大のための基礎的研究を並行して行った。過去の *in vivo* での動物実験で、ゼラチンハイドロゲルによる IGF1 の経正円窓膜投与が、音響外傷、内耳虚血による難聴に治療的効果を持つこと、有毛細胞が保護されることが明らかにされているが、IGF1 が有毛細胞に対してどのような機序で



保護効果を発現するのかわかりませんでした。そこで、本研究では、IGF1に関連する細胞内情報伝達系を調べるために、器官培養系による評価系を確立した。結果として、細胞生存および増殖を促進する細胞内情報伝達系であるAktおよびErkが活性化されていることが判明した。さらに、これらの細胞内情報伝達系阻害薬によりIGF1の効果がキャンセルされることを確認した。IGF1は、内耳の発生に関与していることが知られており、詳細なメカニズムも明らかにされつつある。さらに、ES細胞やiPS細胞から内耳への分化誘導を行う際にも、IGF1が用いられており、前庭感覚上皮では支持細胞の増殖を促進することも知られており、有毛細胞再生への応用も期待できる薬物といえる。IGF1単独での有毛細胞再生誘導は困難と考えるが、後述するγセクレターゼ阻害薬によるノッチ情報伝達系制御との併用などにより、哺乳類蝸牛における有毛細胞再生に応用できる可能性がある。今後、有毛細胞再生への応用といった観点からも、IGF1局所投与の応用研究を進めていきたい。

適応拡大のための基礎的研究として、前庭有毛細胞に対するIGF1の効果についての研究を行った。本研究でも、スクリーニング的な見地から、器官培養を用いた実験を行った。結果、前庭有毛細胞に対しても高い保護効果をIGF1が有することが示された。急性高度難聴では、高頻度で前庭障害によりめまいを合併するが、前庭障害の軽減にもIGF1が有効である可能性が示唆されたといえる。また、メニエル病や前庭神経炎など末梢前庭障害によるめまい疾患にも、IGF1局所投与が応用できる可能性が呈示されたといえる。前庭感覚上皮は、蝸牛感覚上皮に比較して、有毛細胞

再生が誘導しやすいことが知られている。実際、いくつかの実験系では、有毛細胞再生が示されている。前庭感覚上皮についても、今後、有毛細胞再生の観点から、さらに研究開発を進捗させたいと考える。

さらに、内有毛細胞とラセン神経節細胞間のシナプス結合再生誘導効果が示された。この結果は、IGF1による聴力改善が長い時間経過で起こることの説明になりうるものであり、IGF1による聴力改善に再生医学的な側面があることを示唆する点で興味深い。また、この結果は、IGF1がラセン神経節細胞に対して強い効果を持つことを示すものであり、ラセン神経節の状態が臨床的な有効性に関与する人工内耳医療においても、IGF1局所投与が応用できることを示唆するものといえる。

## 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

耳鳴りは、急性高度難聴など急性に発症する感音難聴にも合併するが、老人性難聴を中心とした慢性に進行する感音難聴の多くにも合併するが、有効性が確立された治療法は乏しく、臨床の現場で対応に最も苦慮する症候のひとつである。このような背景から、耳鳴り治療法開発に対する社会的ニーズはきわめて高いのが現状である。しかしながら、感音難聴治療と比較して、耳鳴り治療に対する研究開発は、世界的に見ても進捗は乏しいのが現状である。その理由として、耳鳴り自体の発生機序が明らかにされていないという大きな問題があるが、耳鳴りを評価する実験系が確立されていないことも大きな要因といえる。これまでの臨床での経験および過去の臨床研究から、耳鳴りに対する有効性が確認されている薬物は、きわめて少ない。こ

の中で、多くの医師が実際に有効性を経験したことがある薬物が、局所麻酔薬であるリドカインである。リドカインの静脈内投与は、一時的であるが、明確に耳鳴り抑制に有効である症例が少なからず存在する。しかしながら、その作用機序は全く不明である。リドカインの静脈内投与で得られるリドカインの血液濃度は、心臓のプルキンエ細胞においてナトリウムチャンネルをブロックする濃度より、かなり低く、内耳および中枢でナトリウムチャンネルがブロックされている可能性はきわめて低い。過去には、リドカインの内耳局所投与での耳鳴り抑制の報告もなされている。しかしながら、高濃度のリドカイン投与は、激しいめまいを誘導するため、広く臨床で用いられるには至っていない。また、静脈内投与、局所投与ともに、耳鳴りが抑制されている時間は短く、これも広く用いられない要因のひとつとなっている。このような背景から、われわれはリドカインを内耳に徐放することにより、比較的長期間耳鳴りを抑制することが可能ではないかと考え、内耳へのリドカイン徐放という研究テーマに取り組むこととした。

これまでに、リドカイン含有 PLGA マイクロパーティクルを作製し、*in vitro* での徐放特性解析を行い、モルモットを用いた *in vivo* 実験により、リドカイン含有 PLGA マイクロパーティクルの正円窓膜上投与により、蝸牛外リンパへのリドカイン徐放が可能であること、聴覚系には一時的な抑制効果を示すこと、眼振など平衡障害を示唆する所見が認められないこと、中耳炎や内耳傷害など有害事象を示唆する所見が認められないことを確認した。未公表であるが、ラットにおいても同様の所見が認められることを確認してい

る。これらの所見は、リドカイン含有 PLGA マイクロパーティクル局所投与の安全性、徐放システムとしての有効性を示すが、耳鳴り抑制効果については不明であり、臨床試験を行うためには、この点が解決すべき課題といえる。理想的には、耳鳴り行動動物モデルを用い、行動学的に耳鳴り抑制を示すことが望まれるが、行動モデル作製のためのシステムには、多大な投資が必要となる。また、行動モデル作製のための動物トレーニングには数ヶ月を要する。したがって、行動学的な効果検証の前段階として、有効性が期待できることを確認し、投与量や投与時期など詳細な条件を至適化することが必要となる。同時に、リドカインの蝸牛での作用機序を解明することも重要な課題であり、ある程度メカニズムを明確にすることにより、耳鳴り抑制のための条件も絞り込みやすくなる。このような観点から、リドカインの蝸牛における神経伝達物質に対する効果に着目した実験を行うこととした。蝸牛内有毛細胞の自発放電の増加、あるいは制御機能の障害が、末梢内耳に起因する耳鳴りの原因と考えられていることから、内有毛細胞の遠心系神経終末とその神経伝達物質とされる GABA に注目した。

まず、これまでにドイツ・チュービンゲン大学で開発されている耳鳴り行動モデルラットと同じ音響曝露条件、同じストレイン、週齢を用い、同モデルの蝸牛における GABA<sub>A</sub> 受容体の発現変化を評価したところ、正常のラットでは発現が認められる内ラセン束での発現が消失していることが判明した。組織学的には、内有毛細胞は残存しており、音響外傷にともない脳幹から内有毛細胞への遠心性入力に変化が生じていることが示唆された。音響外傷後にリドカイン含有 PLGA マ

マイクロパーティクルを局所投与することにより、同部での GABA<sub>A</sub> 受容体の発現が保持されたことから、リドカインの内毛細胞神経終末への何らかの効果が、内ラセン束での GABA<sub>A</sub> 受容体維持に関与したことが推察される。一般に、強大音響曝露後には、内毛細胞から過量の興奮性アミノ酸放出が起こり、求心性神経終末の変性が誘導されることが知られている。最近では、ラセン神経節細胞の傷害が惹起される場合があることも明らかにされている。リドカインは、興奮性アミノ酸である NMDA 受容体に対する効果を有することが報告されており、音響外傷に伴う興奮性アミノ酸毒性に伴う遠心性神経終末の二次的変性を修飾している可能性が想起される。内毛細胞神経終末に対するリドカインの効果については、形態学的、電気生理学的にさらに踏み込んだ研究が必要と考えられる。一方で、今回の結果は、リドカインの内耳徐放により、聴覚中枢神経系に何らかの影響を与えたと理解することができる。したがって、脳機能検査を用いて、リドカイン含有 PLGA マイクロパーティクル局所投与による聴覚中枢の変化を解析することが可能かもしれない。薬物の全身投与では、中枢神経系の広い範囲に影響が及び、聴覚系に特異的な変化を抽出することが困難となるが、内耳局所への徐放であれば、他の中枢神経系への影響は限られており、聴覚中枢系への影響を調べる目的に合致した実験システムとなる可能性が想起された。平成 21 年度の行った脳磁図を用いた方法を含め、functional MRI などを用いた脳機能画像検査を用いることにより、動物およびヒトでのリドカイン含有 PLGA マイクロパーティクル局所投与による聴覚中枢の変化を解析することにより、迅速

かつ低侵襲に耳鳴り抑制効果メカニズムの解析が行えると同時に、臨床応用に向けた研究開発を進捗させることができる。

### 3) 新規治療法のシーズ開発研究

平成 22 年度には、3 つの将来の臨床応用を見据えた基礎的な開発研究を行った。臨床試験には、多大な労力と資金が必要となる。これらの研究が臨床研究へと進むためには、科学的なインパクトだけでなく、臨床的な重要性、そして医療経済的に見た魅力も必要な要素となる。シーズ開発研究と位置づけられる 3 つの研究では、すでに臨床で広く使われているが、効果に疑問があるプロスタグランディン製剤を進化させた新規薬物であるプロスタグランディン E 受容体特異的作動薬 (EP4 作動薬)、最も広く臨床で使用されているステロイドの効果を高めるためにドラッグデリバリーシステムによる修飾を加えた薬物 (ステルス型ナノパーティクル封入ベタメサゾン)、これまで不可能であった内耳有毛細胞再生を可能とする化合物 ( $\gamma$ セクレターゼ阻害薬) を用いた。前 2 者は、適応となる病態、安全性が明確となれば、臨床応用は直ちに可能と考えられる薬物であり、EP4 作動薬については、他分野で臨床試験がすでに実施されている。医療経済的な面、すなわち、将来的に商品化が見込めれば、臨床試験のステージに早期に進むことが期待できる。 $\gamma$ セクレターゼ阻害薬については、臨床試験へのハードルは高いが、有毛細胞再生というこれまでに全くない作用機序をもつことから、効果の安定性、適応が明確になれば、臨床応用への道筋はつくことが期待できる。

EP4 作動薬に関する研究では、音響外傷による難聴に対する治療的效果、すでに臨床で

使われているプロスタグランディン E1 製剤に対する優位性が示されており、将来的には保険適応を目指した臨床試験が可能なステージに到達しているといえる。科学的な見地からも、聴覚機能における EP4 の役割も明確にされつつあり、今後、臨床試験に向けた前臨床試験を行える段階にあるといえる。次年度には、トランスレーショナル研究として継続、発展することが期待できる。現在の所、適切な正円窓窩への局所投与が可能であれば、有効性が期待できるといえるが、薬物徐放システムを応用することにより、さらに効果が高まるのか、安全性の面でのメリットはどうかを含めた検討が必要と考える。

ステルス型ナノパーティクル封入ベタメサゾン研究については、本薬物の急性高度難聴治療薬としての有用性を示す結果が得られたが、通常のスステロイド全身投与における内耳における薬物動態を示したという点でも、基礎的、臨床的見地から、重要な知見が得られたといえる。今回の結果は、急性高度難聴に対するステロイド全身投与の位置づけ、適応について、一石を投じるものといえる。急性高度難聴治療については、米国でステロイド内服とステロイド鼓室内投与の有効性を比較する臨床試験が行われており、第一選択治療として、全身投与なのか局所投与なのか、といった問題が、今後一層論じられることになる予想される。局所投与は、全身的な副作用を回避できるという点、内耳に高濃度の薬物を移行させることができるという点で有利であるが、鼓室、特に正円窓窩の解剖学的な個体差の問題や投与手技の問題がある。全身投与では、個人差の問題は小さくなるが、副作用のリスクは大きな問題といえる。ステルス型ナノパーティクル封入ベ

タメサゾンについては、他疾患での有効性などが示され、ステロイドの徐放製剤としての価値が認識されれば、臨床の場に供されることが想定される。この段階で、今回の実験結果を踏まえ、新しいステロイド全身投与治療として、システムティックに臨床試験を行っていきたいと考えている。

$\gamma$ セクレターゼ阻害薬内耳徐放による内耳有毛細胞再生については、現在のところ、基礎的研究開発の段階にあるが、機能的回復の可能性も呈示され、今後の発展が期待できる状況になりつつある。有毛細胞新生の効率をさらに高めると同時に有毛細胞新生が実際に誘導されていることを確実に示すことが、次の課題となる。このためには、さらに実験系をリファインすると同時に、 $\gamma$ セクレターゼ阻害薬投与前に、傷害された蝸牛感覚上皮でのノッチ情報伝達系の一時的な活性化を有効に誘導することが必要となるかもしれない。ノッチ情報伝達系の一時的な活性化については、一旦実験系を器官培養系に戻しての解析が、研究進捗に有効なストラテジーと考えられる。また、臨床応用を考慮した場合、埋め込み型ポンプではなく、侵襲が低いドラッグデリバリーシステムの応用を考えなければならない。今後の見通しとしては、有毛細胞新生の効率化、投与薬物の決定、投与薬物に応じたドラッグデリバリーシステムの応用、そして、ドラッグデリバリーシステムを用いた  $\gamma$ セクレターゼ阻害薬内耳の有効性、安全性の検証という段階が必要となると考えられる。また、therapeutic time window に関する研究も不可欠であり、難聴発症後、どのタイミングまで有効性が期待できるのかを解析することも重要な課題になると考えられる。