

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659752

研究課題名(和文)内耳薬物動態に関する新しい解析法の確立

研究課題名(英文)New analysis of inner ear pharmacology

研究代表者

小川 郁(Ogawa, Kaoru)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：00169179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：1) IVISシステムを用いたリアルイメージング法を用いた。GFAP発現細胞にルシフェラーゼが発現するマウス(GFAP-lucマウス)左鼓膜にヒアルロン酸とルシフェリンを投与した。ヒアルロン酸の粘性によらず、内耳の薬物動態にはばらつきが見られた。一つには、粘性が高まることで投与しにくくなる可能性が考えられた。つまり投与に関するテクニカルな問題が背景にある。

2) モルモットの音響外傷後、デキサメサゾンとヒアルロン酸の混合した薬を顕微鏡下で鼓膜に投与した。治療前後で聴性脳幹反応(ABR)を両耳測定したが治療効果を認めなかった。以上からヒアルロン酸による徐放効果治療効果は認められないことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Methods 1) Luciferin delivered into the inner ears of GFAP-Luc transgenic mice reacted with luciferase in GFAP-expressing cells in the cochlear spiral ganglion, resulting in photon bioluminescence. Both luciferin and hyaluronic acid (HA) were injected through the left side of ear. We changed the concentration and viscosity of HA. Signals were obtained in the left side of ear in GFAP-luc mice through the IVIS system. 2) Strong intensity noise exposed into male Guinea pigs for two hours. Combination of dexamethasone and HA was administrated into the ear. Results 1) Signal does not depend on the viscosity of hyaluronic acid of inner ear. One reason is that high viscosity of HA can not go through the round window membrane. We considered that the technical problem was involved. 2) The question is "Is the combination of steroid and HA successful or not?" ABR was tested before and after treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳 薬物動態

1. 研究開始当初の背景

内耳障害に対して内耳へのステロイド投与が局所・全身投与で行われている。

解剖学的に内耳は鼓膜を隔ててすぐの部位に存在する。また、リンパ液に満たされており、薬物が拡散することから、臨床的にも内耳は薬物投与のターゲットになりうる。

局所投与は重要であり、薬物動態の解析は難聴に対する治療法を開発する上できわめて重要である。ところが、内耳は非常に小さく IVIS システムを用いたリアルタイムイメージング法を用いた。

Glial fibrillary acidic protein (GFAP: グリア細胞線維性酸性タンパク質発現細胞にルシフェラーゼが発現するマウス (GFAP luc マウス) を用いた。このマウスは GFAP 発現細胞である内耳らせん神経節にルシフェリンが到達するとルシフェラーゼと酵素反応を呈し、発光するというシステムである。したがってリアルタイムに内耳薬物動態を観察することが可能となる。われわれは、この方法を用いて全身投与と内耳局所投与についてそれぞれ検討し、局所投与が早く内耳に到達するものの、非常にばらつきが多いこと、正円窓膜上に偽膜があると薬物が到達しにくくなることを報告している (Kanzaki et al, PLoS one, 2012)。

反復して内耳に投与することは臨床的に困難であるため、1 回投与で内耳にとどまる薬剤、すなわち徐放剤のようなものが求められている。過去の報告では、ヒアルロン酸を用いて内耳への徐放効果があることが報告されている (Otol neurotol)。ヒアルロン酸は生体親和性も高く、実際の人工内耳埋込術でも電極を挿入しやすくするための潤滑油として用いられており、安全性は高く臨床応用しやすい薬剤である。しかしながらヒアルロン酸に関する詳細な薬物動態はわかっていない。

また、ヒアルロン酸の粘性の差異によって内耳の薬物動態に差があるかどうか、治療効果についても検討されていないため、ヒアルロン酸を用いた徐放効果について下記のように検討した。

2. 研究の目的

下記の3点を目的に行った。

1) 鼓室内投与(局所投与)において、ヒアルロン酸の粘性によって徐放効果が高まるかどうか？

2) 全身投与において、ヒアルロン酸併用による内耳薬物動態の差異を確認する。

3) ステロイドとヒアルロン酸の合剤で急性音響外傷の治療が行えるかどうか？

3. 研究の方法

本研究は以下に示す GFAP-Luc トランスジェニックマウスと IVIS

リアルタイムイメージングの併用によってシステムが開発されている。

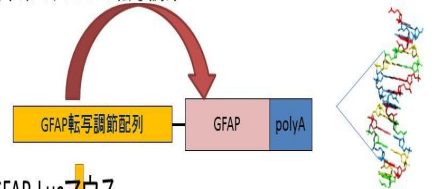
GFAP-Luc トランスジェニックマウスについて(図1: GFAP Luc マウスにおける発光システム)を用いて、ルシフェリンの鼓室内投与を行い、リアルタイムで内耳薬物動態を観察する。

なお GFAP は内耳においては蝸牛神経節内のグリア細胞で中心に強く発現する遺伝子である。すなわち、グリア細胞にルシフェリンが到達し酵素反応を発生したかどうかをリアルタイムに観察できるシステムである。

図1 GFAP Luc マウスにおける発光システム

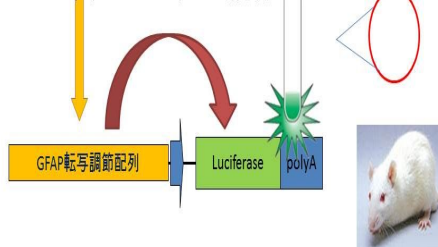
GFAP-Luc トランスジェニックマウス

(本来の)GFAPの転写調節



GFAP-Lucマウス

GFAPのかわりにルシフェラーゼを発現



ルシフェラーゼは、器質であるルシフェリンを分解する際に化学発光を誘導する酵素である。

ルシフェリンの投与を行い、ルシフェリンが内耳グリア細胞に到達するとルシフェラーゼと酵素反応し発光する。この発光が個体の骨・皮膚を透過する。

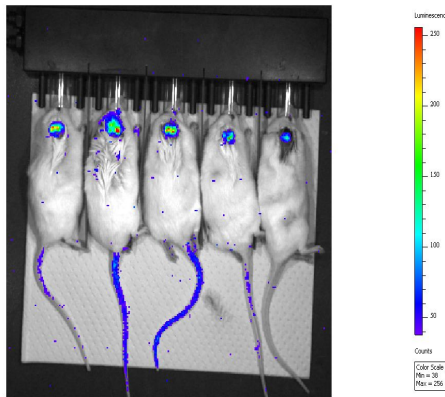
その発光を超高感度発光・蛍光 *in vivo* イメージングシステム IVIS® Imaging System で解析できるようになった。

すなわち、同一個体において、リアルタイムに生体のまま動物のある臓器に対して経皮的に(すなわち)低侵襲に薬物移行を観察することが可能である。このトランスジェニックマウスを用いて、われわれはルシフェリン

の全身投与あるいは鼓室内投与を行い、リアルタイムで薬物動態を観察する。

図2はシグナルを得た1例を示す。

図2 発光シグナルの1例



投与された耳にシグナル発光があることを示す。

上記システムを用いて下記3つの実験課題を行った。

1) 顕微鏡下に上記マウス(GFAP luc マウス)の左鼓膜にヒアルロン酸とルシフェリンを投与した。ヒアルロン酸の粘性を変えて内耳の薬物動態を調べた。

下記の3種類のルシフェリン溶液で比較した。90HA, 290HAとはそれぞれ分子量90,290のヒアルロン酸、分子量が290のヒアルロン酸を示す。

15.15 mg/mL ルシフェリン/生理食塩水
15.15 mg/mL ルシフェリン/90HA
15.15 mg/mL ルシフェリン/290HA
である。

2) 290HAのヒアルロン酸を併用したルシフェリンを皮下注射にて全身投与した場合に薬物動態の差異をみるか？

生食群 ルシフェリン/生理食塩水
290HA群 ルシフェリン/290HA
Wild type (野生型)
の3群で比較する。

3) 白色モルモット(オス)に音響118dB 2時間かけて曝露させた。音響外傷後に難聴になっていることを確認後、デキサメサゾンとヒアルロン酸の混合液を顕微鏡下で左耳鼓膜に投与した。

4. 研究成果

1) ヒアルロン酸の粘性の差によって徐放効果に差を認めるのかどうか？
ヒアルロン酸の粘性によらず、内耳の薬物動

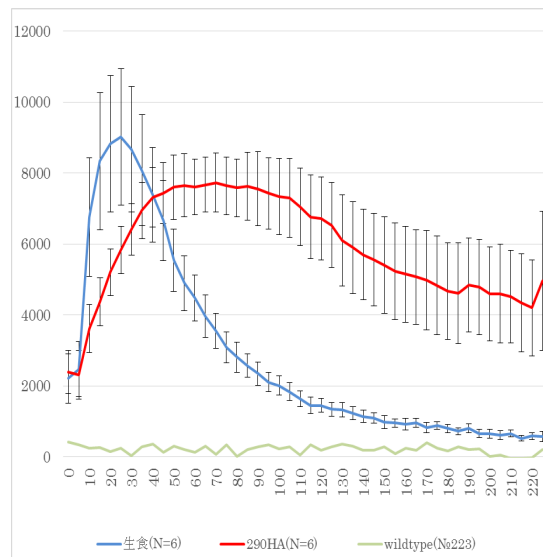
態にはばらつきが見られた。一つには、粘性が高まることで投与しにくくなる可能性が考えられた。つまり投与に関するテクニカルな問題が背景にある。

2) ヒアルロン酸の全身投与により、下图3のような徐放効果を認めた。photon-countにおいて210分まで経過を追ってもヒアルロン酸併用群は併用なしと比較して10倍以上のシグナルを得た。

また、ピークについてもヒアルロン酸なしでは20分経過のところであったが、ヒアルロン酸併用では80分を示した。立ち上がりが遅いものの徐放効果は高いことがわかった。すなわち、ヒアルロン酸併用群では半減期、血中濃度-時間曲線下面積、area under the blood concentration-time curve (AUC)に有意差を認めた。

ただし内耳薬液濃度のピークに差はなかった。

図3 全身投与における内耳薬物動態の比較



3) ステロイドとヒアルロン酸の合剤で音響外傷の治療が行えるかどうか？

治療前後で聴性脳幹反応(ABR)を両耳測定したが治療効果を認めなかった。以上からヒアルロン酸による徐放効果治療効果は認められないことがわかった。

国内外の位置づけと今後の展望

ヒアルロン酸による徐放効果が局所投与では期待されるほどではなかった。これはステロイドとヒアルロン酸を併用してステロイドを徐放しても期待通りの効果はなかったことから示される。この点では、ネガティブデータであるが、臨床的には貴重なデータであると考えられる。

ただし、全身投与では予想通り、徐放効果を認めた。これは投与方法による技術的な問題に

関連しているのかもしれない。すなわち、マウスやモルモットなどの小動物の鼓室(中耳)は小さいため、投与がしにくい点があり、その点がばらつきが出たと考えられる。

本研究から導かれる結論と限界として

1) 小分子ルシフェリンの分布を見ているに過ぎない

2) 光子カウントでルシフェリンの内耳での分布量を見ていることについては、luciferase-assay の原理からして信頼できる

3) すなわち、この系で内耳局所の薬物動態をモニタリングすることが可能である(ここまでは前論文の繰り返し)

4) 今回、投与経路、投与方法での差異をきっちりと見ることができている

5) 静脈注射は腹腔内投与よりさらに半減期が短いので、上記メッセージは下記に読みかえられる

「全身投与では、静注よりもヒアルロン酸を担体として皮下注をするほうが、内耳に長く薬剤が移行しつづける」

今後に向けた展望として、ルシフェリンでなくてステロイドなど実際の薬剤のモニタリングに応用したい、と考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. 神崎 晶:(総説)耳の病気に対する耳寄りな治療法を紹介! 感音難聴に対する薬物・遺伝子の内耳局所投与の実現のために. 日本薬理学会誌 141(4):188-90. 2013 査読なし

〔学会発表〕(計 2 件)

シンポジウム

Kanzaki S, (Panel session-8. Neural & Neuroepithelial generation (Intracochlear drug delivery systems Moderator: Thomas van de Water) ' Drug and Gene Delivery into Inner Ear for Neural and Neuroepithelial cells.' (Antalya, Turkey, Nov.14.2013.)

発表

Kanzaki S, Fujioka M, Yasuda A, Shibata S, Nakamura M, Okano HJ, Okano H, Ogawa K, Novel in vivo imaging analysis of an inner ear (spiral ganglion) drug delivery system in mice. 1st Global Otology Research Forum (G L O R F), Antalya, Turkey, Nov.13.2013.(1st GLORF Award 受賞)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

小川 郁(OGAWA, KAORU)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 00169179

(2)研究分担者

神崎 晶(KANZAKI, SHO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 50286556

藤岡 正人(FUJIOKA, MASATO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号: 70398626