

薬物動態と分布

内耳PK研究

- 投与経路：局所（外耳道、経鼓膜、胞内、蝸牛内、正円窓小窩）および全身（PO、IP、IV、SC、IM）
- 単回、点滴または反復投与後の動態
- 検体採取：内耳液、内耳軟部組織（血管条、コルチ器、らせん靱帯）、鼓室胞、髄液（CSF）、種々の脳構造物、血管および血漿

生物分析*

- 予備LC-MS/MS解析（小分子）
- ELISAアッセイ、市販または特注
- 内耳リンパ液と鼓室胞組織の処理における専門知識

* Cilcare の提携先が実施

その他の治療指標のPK研究

- 投与経路：PO、IP、IV、SC、IM、くも膜下腔、大槽内、ICV、関節内
- 単回（注射または点滴）または反復投与後の動態
- 検体採取：
 - 液体：血漿、血清、CSF
 - 臓器：
 - 肝、腎、脾臓、性腺、心臓、肺、眼球硝子体液
 - 脳：全脳、海馬、線条体、下丘、視床下部、蝸牛核、脳幹、前頭皮質、下垂体、その他の構造物
 - 脊髄
 - 骨（大腿骨）
 - 膝

ベクターと遺伝子治療生体内分布

- 組織プロセッシング：採取、固定、包埋および薄切
- H&E、免疫組織化学、免疫蛍光
- 顕微鏡検査
- qPCR：様々な組織・臓器における治療遺伝子の存在の定量化

バイオマーカー解析

- 血漿ベース**：肝・腎毒性を関連酵素、炎症徴候（血算およびCRP）、代謝指標（血糖値、糖化ヘモグロビン）などを評価することにより判断する。
- トランスクリプトミクス**：液体または組織内のトランスクリプトーム発現（RNAシーケンシング）または特定の遺伝子発現（q-RT PCRによる mRNA）を分析する。
- プロテオミクス**：ELISAまたはマルチプレックス方式を用いて液体または組織内のタンパク質発現を評価（例：炎症の場合）する。

IN VIVO 研究

PK および有効性研究

耐性および安全性研究（非GLP耳毒性を含む）

聴覚表現型解析研究

GLP耳毒性研究・GLP毒性およびトキシコキネティクス

動物モデル

騒音性難聴およびシナプス変性症

- 騒音性**恒久的**難聴（PTS）
- 騒音性**一過性**難聴（TTS）および**シナプス変性症**
- ラット、マウス、モルモットモデル
- 保護**および**再生**プロトコール
- 機能的**読み出し：ABR、DPOAE、Wave I 解析
- 組織病理学**：サイトコクレオグラム（有毛細胞計数）、リボンシナプス計数、SGNおよび線維計数
- RNAおよびタンパク質配列

シスプラチンおよび抗生物質誘発性耳毒性

- シスプラチン、抗生物質（ゲンタマイシン等）による耳毒性障害
- ラット、モルモット、マウスの急性および慢性モデル
- シスプラチンモデルに対して利用できる陽性対照
- 読み出し：ABR、DPOAE
- 組織学：サイトコクレオグラム
- 血液採取：化合物相互作用

ウアベイン誘発性聴神経障害

- モルモットおよびスナネズミモデル
- 主要評価項目：Wave I 解析およびSGN計数
- 追加読み出し：ABR、DPOAE

サリチル酸誘発性耳鳴

- 急性ラットモデル
- 主要評価項目：GPIAS
- 追加読み出し：聴覚過敏症、電気生理学
- 画像：MEMRI
- 生化学的バイオマーカー

糖尿病および難聴

- dB/dBマウスモデル
- 機能的読み出し：ABR、DPOAE、Wave I 解析
- 生化学的バイオマーカー：血糖、HbA1c、尿素、糖化アルブミン等

齧歯類および大型種

多様な齧歯類および大型種、妊娠中の雌および遺伝子導入マウスを含む

- 小型種：
 - マウス
 - ラット
 - モルモット
 - チンチラ
 - スナネズミ
- 大型種：
 - ミニブタ
 - ヒツジ

屋外に移動し次の動物の聴力評価を行うケイパビリティ：

- イヌ
- ネコ
- 非ヒト霊長類（NHP）

耳毒性または耳保護用スクリーニング/投与量選択

耳細胞株に対する *In vitro* アッセイ*

- HEI-OC1耳細胞株の使用
- 主要読み出し：
 - 生存率
 - 細胞毒性
 - ROS産生
 - アポトーシス 対 壊死
 - カスパーゼ3/7活性化
 - カスパーゼ8活性化
 - 細胞内Ca⁺⁺増加
 - ミトコンドリア機能
 - 形態変化
 - サイトカイン産生
 - トランスクリプトミクス解析

蝸牛外植片に対する *Ex vivo* アッセイ

- **耳毒性**モデル：シスプラチン、ゲンタマイシン等による障害
- **興奮毒性**モデル：NMDA/カイニン酸による障害
- **組織学**：有毛細胞、支持細胞、聴神経線維、不動毛、リボンシナプス、らせん神経節細胞の染色（ミオシン7a、SOX2、ファロイジン、チューブリン、CtBP2、GluR2、ホーマー、NF）
- **読み出し**：有毛細胞計数、有毛細胞構成スコアリング、シナプス前および後マーカー計数、神経フィラメント計数

ゼブラフィッシュにおける *In vivo* アッセイ*

- **耳毒性**モデル：シスプラチン、ゲンタマイシン等による障害
- **組織**：DASPEIによる感丘の染色
- **読み出し**：感丘定量化、IC50

* Cilcare の提携先が実施

外科

内耳外科

人工内耳移植

主要読み出し：

- 移植物の全般的蝸牛機能への影響、および移植物のない関連手術に対する影響を評価するための**ABR**測定
- 電極アレイが適切に機能していることを評価するための**インピーダンス**測定
- Auto-NRT*閾値を用いる人工内耳**プログラミング**
- **組織学**：サイトコクレオグラム、トリクローム染色による線維組織の分布

*神経反応テレメトリー

脳電極移植

- 急性および慢性措置のための移植

その他の手術

- 鼓室形成術
- 中耳腔換気用チューブ挿入
- 鼓膜切開術

配送ケイパビリティ

局所的に耳内へ

- **外耳道投与**
- **中耳投与**
 - 経鼓膜
 - 胞内
 - 鼓膜切開（耳管）
 - 正円窓小窩
- **蝸牛内投与**
 - **後三半規管（PSCC）注射**
 - 管開窓による正円窓膜注射（PSCC vent）
 - 蝸牛開口術

その他の経路

- **全身性**：PO、IM、SC、IP および IV（ボーラスまたは点滴）
- **その他**：鼻腔内、局所でCSF内（大槽内、ICV、くも膜下腔）、関節内

製剤

耳配送用製剤*

- 溶解度評価
- 安定性評価
- 製剤化された薬剤の特性評価（溶液ベースの製剤と懸濁液ベースの製剤の両方）
- 徐放性特性の最適化（熱可逆性、粘膜付着性等）
- 法規制遵守

* Cilcare の提携先が実施

- 薬物およびその担体の耳毒性評価

様式

小分子および大分子、ペプチド、抗体およびその他の生物製剤

遺伝子および細胞療法

- 細胞培養
- ベクタートランスダクションおよび遺伝子療法有効性評価のための蝸牛外植片
- *In vivo* 細胞生着と生体内分布研究
- 顕微鏡手術および特殊化投与および投薬経路
- *In vivo* 薬理学モデル
- 非GLPおよびGLP薬理学/毒物学/耳毒性研究
- 機能的聴覚評価（ABR、DPOAE、Wave I解析）
- 組織病理学（サイトコクレオグラム、リボンシナプスおよびSGN計数）
- 方法開発、検証、および試料分析

人工内耳、植え込み型装置、薬剤溶出性電極

電気生理学および電気音響

ABR（聴性脳幹反応）

- 聴覚機能の *In vivo* 非侵襲的および翻訳的測定
- 周波数： 2 kHz ～ 45 kHz
- 強度： 90 dB ～ 0 dB

Wave I～V解析（振幅と潜時）

蝸牛シナプス機能の *In vivo* 非侵襲的および翻訳的測定（記録の *in vivo* ）フェース後に実行可能）

DPOAE（歪成分耳音響放射）およびIODP（入出力歪成分）

- 聴覚機能の *In vivo* 非侵襲的測定
- 周波数： 1 kHz ～ 32 kHz
- 強度： 20 dB ～ 70 dB

CAP（複合活動電位）/CAEP/EEG

- 電極移植手術での皮質聴覚反応の端子測定または反復測定

単細胞性電気生理学

- 聴覚皮質における自発電位と誘発電位の測定
- 端子測定

行動試験

耳鳴検出

- GPIAS（音響性驚愕反応のギャップ・プレパルス抑制）
- PPI（プレパルス抑制）

聴覚過敏検出

耳の評価

耳鏡検査法

- スコアリング・グリッド（鼓膜の外観と完全性）+写真
- ビデオ内視鏡検査、双眼拡大鏡、デジタル顕微鏡

ティンパノメトリー

- 鼓膜と耳小骨鎖の動きと機能を示すティンパノグラム（チンチラで実施）

肉眼的中耳評価

- スコアリング・グリッドおよび写真
- 次の構造の視覚化：
 - 鼓膜
 - 蝸牛
 - 耳小骨
 - 中耳腔
- 薬剤の観察

病理学/組織病理学

耳の組織学

組織病理学

- パラフィン・スライド作製（肉眼的切出し、処理、包埋、薄切、染色）
- 外耳、中耳、内耳の評価
- 病理医の解釈とスコアリング

内耳の平面標本

- 免疫化学および免疫蛍光法
- サイトコクレオグラム（有毛細胞計数）
- 蝸牛構造の染色（支持細胞、線維）
- 特異的マーカー：リボンシナプス、シナプス前-およびシナプス後マーカー
- 蛍光モニタリング（遺伝子ベクタートランスダクション効率、蛍光生成物）

内耳の横断面標本

- パラフィン・スライド標本
- 免疫化学および免疫蛍光法
- 全蝸牛構造染色（有毛細胞、支持細胞、線維、SGN）
- 染色法：H&E（線維およびSGN計数）
- 蛍光モニタリング（遺伝子ベクタートランスダクション効率、蛍光生成物）

その他の器官の組織学

- 肝、腎、脾臓、性腺、心臓、肺、眼球硝子体液、脳、脊髄、骨（大腿骨）、膝

組織病理学

- 免疫化学および免疫蛍光法
- 染色法：H&E、クレシル・バイオレット、サフラニンOファスト・グリーン
- 炎症と軟骨変性のスコアリング

顕微鏡検査と画像

- 走査電子顕微鏡（SEM）：形態的分析
- 光学顕微鏡法
 - 線維およびSGN計数
 - 中耳と蝸牛の組織病理学
- 共焦点蛍光顕微鏡法
 - サイトコクレオグラム
 - リボンシナプス
- 透過電子顕微鏡（TEM）：細胞形態と構造の観察

分子生物学と生化学

次の手法によるバイオマーカー解析：

生化学

- シンプレックス（ELISA）およびマルチプレックス免疫アッセイ
- 定量ウェスタンブロット
- タンパク質配列、LC-MS/MS

分子生物学

- 定量RT-qPCR
- 遺伝子発現解析、RNAseq