

厚生労働科学研究費補助金

(感覚器障害研究事業 H19-感覚-一般-003)

ナノテクノロジー、再生医学を融合した人工内耳・  
人工蝸牛の開発に関する研究

平成 20 年度総括・分担研究報告書

平成 21 年 3 月

研究代表者 伊藤 壽一

(京都大学大学院医学研究科)

厚生労働科学研究費補助金

(感覚器障害研究事業 H19-感覚-一般-003)

ナノテクノロジー、再生医学を融合した人工内耳・  
人工蝸牛の開発に関する研究

平成 20 年度総括・分担研究報告書

平成 21 年 3 月

研究代表者 伊藤 壽一

(京都大学大学院医学研究科)

## 目 次

### I. 総括研究報告

- ナノテクノロジー、再生医学を融合した人工内耳・人工蝸牛の開発・・・・・・・・ 1  
伊藤 壽一

### II. 分担研究報告書

1. 人工感覚上皮開発に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 12  
川野聡恭  
2. 人工蝸牛管開発—数値解析—・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 24  
和田 仁  
3. 表面加工による人工感覚上皮固定法開発・・・・・・・・・・・・・・・・ 28  
田畑泰彦

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・ 31

### IV. 研究成果の刊行物・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33

## ナノテクノロジー、再生医学を融合した人工内耳・人工蝸牛の開発

研究代表者 伊藤 壽一 京都大学大学院医学研究科

### 研究要旨

本研究事業は、ナノテクノロジー、蝸牛バイオメカニクス、内耳生物学および再生医学、組織工学、耳科学の各分野の知見を統合し、医工連携による「内耳再生」を目指すものである。全く新しい発想に基づく聴覚デバイス開発を世界に先駆けて開発し、内耳再生医学と融合させることによる新規感音難聴治療法を開発する。蝸牛バイオメカニクス理論に立脚した圧電素子を応用した完全埋め込み型聴覚デバイスを開発し、同時に蝸牛内の至適部位に固定し、適切にラセン神経節を刺激するための技術を再生医学、組織工学を応用して開発する。さらに、臨床的見地からデバイスに求められる条件を検討し、開発に反映させると共に手術手技開発を行う。また、幹細胞工学を応用した内耳再生医療と融合させることにより、高度障害例にも対応できる医療技術に発展させる。

### 研究分担者

中川 隆之

平海 晴一

坂本 達則

(京都大学医学部附属病院)

川野 聡恭

(大阪大学大学院基礎工学研究科)

田畑 泰彦

(京都大学再生医学研究所)

和田 仁

(東北大学大学院工学研究科)

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)

られる最も頻度の高い先天的機能障害である。したがって、感音難聴治療は、社会的な課題であり、超高齢化社会を迎える本邦においては切実な問題である。人工内耳は、臨床応用されて、20年以上が経過し、最も成功した埋め込み型医療機器のひとつといえる。しかし、現在の人工内耳により得られる聴覚は満足のいくものではないのも事実であり、このような背景から種々の内耳再生医療開発の試みが広くなされている。研究代表者のこれまでの内耳再生に関する研究開発の結果、感覚細胞が神経信号に変換した音刺激を中枢に伝える機能を担うラセン神経節細胞が再生可能であることが明らかになった。一方で、感覚細胞である有毛細胞についても実験レベルでは再生可能であることが分かりつつあるが、臨床応用への道程は険しいことも一方で判明しつつある。

再生医学の応用によりラセン神経節細胞の再生が可能になったことは、人工内耳医療を考える場合にも重要な意義をもつ。人工内耳は、体外器機が音響刺激を電気刺激に変換し、蝸牛内に挿入された電極が直接ラセン神経節細胞を刺激するこ

### A. 研究目的

感音難聴は65歳以上人口の約6割に認められ、75歳以上人口の実に4分の1が日常生活に支障をきたすレベルの難聴を有することが知られている。さらに、先天的難聴は1000人に1人に認め

とにより、聴覚刺激が中枢に伝えられる。ラセン神経節細胞の再生が可能となれば、これまで人工内耳の効果がえられなかった症例においても人工内耳の有効性が享受できるようになる。

一方、現在の人工内耳の問題点として、使用されている電極が少ないこと、体外器機を要すること、適応となる難聴レベルが限定されていることがあげられる。より自然な聴覚の獲得のためには、聴覚中枢の可塑性の制御だけではなく、末梢蝸牛でえられる情報をより自然に近い形で増加させることも重要な意義をもつ。また、体外器機を必要とせず、充電も不要なデバイスを開発することができれば、既存の人工内耳装用例とは全く異なるより自然なライフスタイルを提供することができる。

本研究課題は、これまでの内耳再生研究の成果を生かし、既存の人工内耳が有する問題を解決するために、工学分野の最新のテクノロジーを応用した医工連携による「内耳再生」を目指すものである。

## B. 研究方法

### 1) 圧電素子を応用した人工感覚上皮開発

本研究課題では、超低侵襲手術に対応したマイクロ人工内耳電極および有毛細胞の機能を含めた蝸牛感覚上皮機能を有する人工感覚上皮を開発する。人工感覚上皮は、振動刺激を電気刺激に変換する圧電素子と電気刺激をラセン神経節細胞に伝達する刺激電極から構成される。マイクロ人工内耳電極は、人工感覚上皮の刺激電極部分を使用することで容易

に開発できることから、第一に人工感覚上皮開発を行うこととした。平成 19 年度には、Microelectromechanical systems (MEMS) 技術を応用し、24 電極からなるプロトタイプを作製し、空気中での振動特性、出力特性を計測した。

平成 20 年度は、作製した人工感覚上皮のプロトタイプの液体中での動作特性評価を行った。また、ラセン神経節細胞を刺激するために起電力向上のためにいくつかの工夫を行い、求められる条件を解析した。人工感覚上皮接着による蝸牛基板振動への影響を最小限にとどめるために、デバイスの厚さを薄くし、その動作特性、起電力に関する解析を行った。(詳細は、分担研究者 川野聡恭の報告書を参照)

### 2) 蝸牛基板振動の数値解析モデル構築と人工感覚上皮接着の与える影響の解析

開発した人工感覚上皮の有効性検証は、モルモット蝸牛で行う計画であるので、動物実験を行う前にコンピューター解析を行い、素材条件の至適化を図る必要がある。そこで、モルモット蝸牛をモデルとして、コンピューターによる数値解析のベースとなるコルチ器振動の数値解析モデル開発を行った。平成 19 年度には、蝸牛頂部回転モデル開発を行ったが、モルモット実験で解析予定である基底部のモデル構築を行った。

モルモット蝸牛基底部のコルチ器構成細胞の物性値に基づき、2 次元の有限要素モデルを作製し、コルチ器モデルに Newmark- $\beta$  法、リンパ液モデルに Marker-and-Cell (MAC) 法を用いてモデルの振動挙動の解析を行った。さらに、外有毛細胞が正常に存在する状態お

よび内耳障害により外有毛細胞が喪失した状態のモデル構築を行った。また、人工感覚上皮の素材である PVDF をコルチ器基板直下に接着した場合の振動特性の変化を人工感覚上皮の厚さを変化させて解析し、基板振動を適切に人工感覚上皮に伝達するために求められる人工感覚上皮の厚さの条件を調べた。

(詳細は、分担研究者 和田 仁の報告書を参照)

### 3) 表面加工による人工感覚上皮固定法開発

人工感覚上皮を基板あるいは蝸牛軸に適切に接着固定するためには、疎水性の PVDF ポリマーの表面を加工することにより親水性を高め、生体適合性が高く、蝸牛組織に接着する能力を有する物質でコーティングする必要がある。白金電極を装着した人工感覚上皮表面を想定した素材を作製し、コラーゲンコーティングの有効性について評価した。人工感覚上皮としての圧電素子として、厚さ  $40\mu\text{m}$  の PVDF 膜を用いた。この膜の片面にスパッタリング法により白金薄膜 (数 nm 厚) を形成させた。この白金薄膜へのコラーゲンの化学結合を行った。化学反応の進行とコラーゲン固定化量の測定は以下のように行った。水に対する接触角の測定を行い、99.5% エタノールのみ浸した PVDF 膜の接触角と比較して膜表面の親水性の変化を検討した。接触角はコラーゲン固定化あるいは固定化していない PVDF 膜表面に水滴を滴下して 15 秒後、30 秒後、60 秒後の表面に対する水の接触角を測定した。PVDF 膜表面に固定化されたコラーゲンは放射ラベルされたコラーゲンをを用いて定量した。すなわち、 $^{125}\text{I}$  でラベルされたコラーゲンを  $0.5\mu\text{g/ml}$  の濃度で、同様の化学反応操

作を行った。その後、サンプルの放射活性をガンマカウンターで測定した。

(詳細は、分担研究者 田畑泰彦の報告書を参照)

### 4) 自己由来細胞移植によるラセン神経節細胞再生

人工感覚上皮およびマイクロ人工内耳電極の実効性を検証実験では、モルモット蝸牛を使用する予定であることから、移植動物をモルモットと設定し、モルモット骨髄由来間葉系細胞および脂肪組織由来間葉系細胞の分離、培養、分化誘導実験を行い、*in vitro* の実験系にて移植細胞としての品質評価のためのシステムを構築した。また、それぞれの細胞ソースから分化誘導した神経前駆細胞の移植実験を行い、組織学的解析を行った。

### 5) マイクロ人工内耳電極および人工感覚上皮挿入固定手術手技開発

本研究課題では、早期臨床応用を目指すと同時に開発したデバイスが実際に臨床で用いることができることを示すことにより、産業界からの研究への参画を誘導することを企図している。これらの目的から、想定されるマイクロ電極および人工感覚上皮の挿入固定に関する手術手技開発に関連する臨床研究を行った。実際の人工内耳手術に際し、蝸牛開窓部位とコルチ器基板の視認性の関係、蝸牛鼓室階内部での手術操作を検討した。また、開発した人工感覚上皮のモルモット蝸牛への埋め込み実験を行うために、正常モルモットを用い、手術アプローチ方法、挿入デバイスに求められる条件を調べた。さらに、プロト

タイプモルモット蝸牛基底回転に挿入、固定し、組織学的解析を行った。また、人工感覚上皮との接着面となる蝸牛基板鼓室階側の組織学的解析を行った。

#### (倫理面の配慮)

動物実験に関しては、京都大学動物実験に関する指針に従い、京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設運営委員会の承認のもと、同施設にて実験を行った。動物愛護上の配慮も十分にいき、実験を施行した。

### C. 研究結果

#### 1) 圧電素子を応用した人工感覚上皮開発

プロトタイプデバイスの液体中における動作特性を計測し、1 kHz~4 kHzの範囲で周波数弁別を有することを示した。すなわち、プロトタイプデバイスは会話で重要な周波数帯において機能することが明らかとなった。基底膜振動を流体-構造の連成振動として解析し、高い精度で特性を予測できることを示した。この結果から本解析手法は蝸牛内へ留置後のデバイス特性を設計する方法としても有効であるといえる。また、昨年の和田グループの解析結果を反映させ、膜厚 650 nm のデバイスを作製し、その特性を解析した。結果、デバイスの薄膜化により出力電圧を増大させることができることが分かり、本デバイスは原理的にプロトタイプデバイスの約 60 倍の電圧を出力し、神経細胞の刺激には十分な電力を得ることができると分かった。

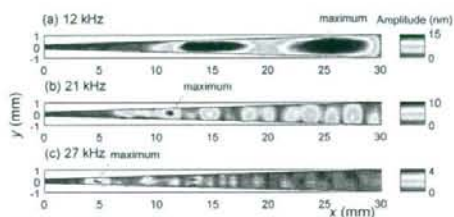


図 1 : 膜厚 650 nm のデバイスの振動特性

(詳細は、分担研究者 川野聡恭の報告書を参照)

#### 2) 蝸牛基板振動の数値解析モデル構築と人工感覚上皮接着の与える影響の解析

蝸牛基底部での基板の振動特性解析を行ったところ、外有毛細胞存在状態では、外有毛細胞喪失状態に比べて特徴周波数が上昇し、特徴周波数における振動速度は増加した。解析結果は特徴周波数の上昇、および振動速度の増加という点で計測結果と同様の傾向を示した。基部では、多くの実験で今回と同様に増幅、および特徴周波数の上昇が報告されている。基部コルチ器は頂部コルチ器に比べて剛性が大きく揺れにくいいため、増幅により感度を上げる必要があるものと考えられた。頂部コルチ器モデルの基板中央部における変位の周波数特性を図 7 に示す。図中の黒線は基板下にポリマーを留置しない場合の解析結果を示す。赤線、青線、橙線、緑線はポリマーの厚さがそれぞれ 0.65  $\mu\text{m}$ , 9.0  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$  の場合の解析結果を示す。ポリマーの厚さが 0.65  $\mu\text{m}$  のとき、ポリマーを留置しない場合と比較して変位は 1/100 程度に低下した。

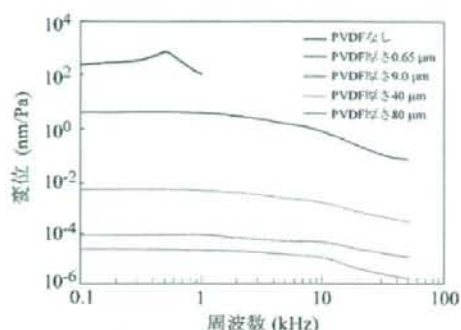


図2：頂部コルチ器モデルの基板中央部における変位の周波数特性。黒線は基板下にポリマーを留置しない場合の解析結果を示す。赤線、青線、橙線、緑線はポリマーの厚さがそれぞれ 0.65  $\mu\text{m}$ 、9.0  $\mu\text{m}$ 、40  $\mu\text{m}$ 、80  $\mu\text{m}$  の場合の解析結果を示す。

基部コルチ器モデルの基板中央部における変位の周波数特性を図8に示す。図中の黒線は基板下にポリマーを留置しない場合の解析結果を示し、赤線、青線は基板下に留置したポリマーの厚さがそれぞれ 0.65  $\mu\text{m}$ 、9.0  $\mu\text{m}$  の場合の解析結果を示す。ポリマーの厚さが 0.65  $\mu\text{m}$  のとき、ポリマーを留置しない場合と比較して変位は 1/10 程度に低下した。また、このときの基板の振動パターンはポリマーを留置しない場合のそれと同様であり、基板の中央部でたわみが生じた。これに対して、ポリマーの厚さが 9.0  $\mu\text{m}$  のとき、変位は 1/100 程度に低下し、たわみはほとんど生じなかった。これらの結果から、PVDFを人工感覚上皮として用いる場合、基板の変位の低下を極力抑え、また基板の正常な振動パターンを維持するために、PVDFの厚さを 0.65  $\mu\text{m}$  程度として蝸牛基部に留置することが望ましいと考えられた。

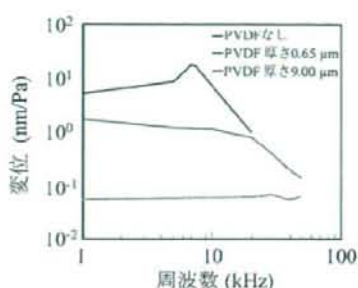


図3：基部コルチ器モデルの基板中央部における変位の周波数特性。黒線は基板下にポリマーを留置しない場合の解析結果を示し、赤線、青線はポリマーの厚さがそれぞれ 0.65  $\mu\text{m}$ 、9.0  $\mu\text{m}$  の場合の解析結果を示す。  
(詳細は、分担研究者 和田 仁の報告書を参照)

### 3) 表面加工による人工感覚上皮固定法開発

接触角測定：15秒後、30秒後、60秒後の接触角は、アルカンチオール反応群で 62.6、61.6、60.6度、エタノール群で 65.1、64.4、62.9度であり、two-way ANOVAによる統計解析で群間に有意差( $p = 0.004$ )を認めた。金表面にアルカンチオールを同様の方法で反応させた場合の接触角は15度前後となった。白金表面にアルカンチオールを反応させた場合の接触角変化は金表面に比べて小さくなったが、未反応群との間には有意差を認めた。これらの結果から、アルカンチオールが表面に結合され、PVDF膜表面にカルボキシル基が導入されたことがわかった。

コラーゲン定量：第3反応後に 125Iラベルされたコラーゲンの溶液の放射線量を基準に算出した、コラーゲン結合量は 15.69  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。一方、金表面の場合の結合量は 12.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、十分な量のコラーゲンが結



合していると考えられた。以上の結果から、期待通り、アルカンチオール自己組織化法を用いることで、PVDF膜表面の白金薄膜へのコラーゲンの化学固定化を達成することが可能であることがわかった。

(詳細は、分担研究者 田畑泰彦の報告書を参照)

#### 4) 自己由来細胞移植によるラセン神経節細胞再生

モルモット骨髄由来間葉系細胞培養実験では、遺伝子操作を行わない neurosphere forming culture で安定的に神経前駆細胞を得る実験系が確立された。得られた神経前駆細胞は、nestin, NeuroD 陽性であり、培養条件下で細胞増殖因子を省き、retinoic acid を添加することにより、ほとんどが神経細胞に分化する性質を有することが判明した。

#### BMSC-derived neural progenitors

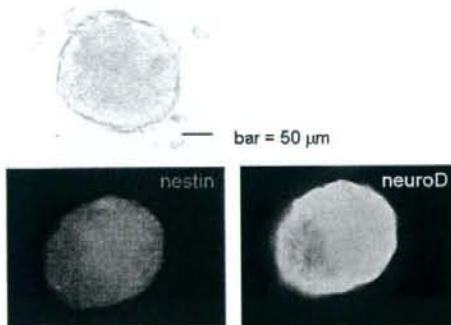


図4：モルモット骨髄由来間葉系細胞から作製した neurosphere

神経前駆細胞段階で、正常モルモット蝸牛軸への移植実験を行ったところ、蝸牛軸およびラセン神経節内に移植細胞の局在が確認され、ほぼすべての細胞が神経に分化している

ことが確認された。

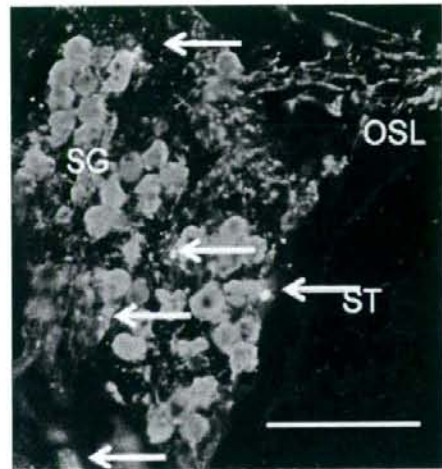


図5：モルモット骨髄間葉系細胞由来神経細胞のラセン神経節での生着。矢印は移植細胞を示す。

次に、ウアバイン局所投与によりラセン神経節細胞傷害を惹起したモルモット蝸牛軸への移植実験を行った。正常モルモットと同様に蝸牛軸およびラセン神経節での移植細胞の局在が認められたが、電気刺激聴性脳幹反応による評価では有意の機能回復を認めることは出来なかった。

モルモット脂肪組織由来間葉系細胞培養実験では、安定的に脂肪組織由来間葉系細胞を得る方法を確立することができた。得られた細胞は、脂肪、軟骨、骨への分化能力を持ち、neurosphere を形成する能力があることが確認された。モルモット蝸牛への移植実験では、移植後鼓室階および蝸牛軸に移植細胞の局在が認められ、蝸牛における神経系細胞再生に用いることが出来ることが分かった。

## 5) マイクロ人工内耳電極および人工感覚上皮挿入固定手術手技開発

平成 20 年度も引き続き耳科手術により、側頭骨、蝸牛への手術アプローチの検討を行った。施行した手術は、鼓室形成術 152 件、人工内耳埋め込み術 30 件であった。人工内耳手術の内訳は成人 11 件、小児 19 件で、特に低年齢の乳幼児手術を多数行った。人工内耳手術では蝸牛基底回転の開窓について、いくつかの手技の有用性を検討した。一般的な乳突削開、後鼓室開放に加えて、正円窓窩の骨底削除による正円窓の明視化、蝸牛基底回転のやや大きな開窓により蝸牛基底板の観察が安定して可能であることが分かった。

モルモット蝸牛基底部への人工感覚上皮デバイス挿入方法開発および挿入するデバイスに求められるサイズや剛性に関する検討を行った。手術アプローチとしては、耳介後部からのアプローチと顎下部からのアプローチの 2 つの方法を比較検討した。前者のアプローチは、蝸牛正円窓を明視下におくことができ、これまでの細胞移植や電気刺激聴性脳幹反応計測に用いてきた方法である。この方法では、視野は良好であり、手術操作も用意であるが、側頭骨ブラから蝸牛までの距離が遠く、用手的にデバイスを留置するにはやや困難が伴うことが分かった。顎下部からのアプローチでは、側頭骨に到達するまでに、耳後部からのアプローチに比して多くの操作を要し、術野が狭いが、側頭骨ブラから蝸牛までの距離が近く、デバイス留置にはこちらのアプローチが適切であることが判明した。蝸牛の開窓部位は蝸牛基底回転、鼓室階とし、挿入予定部位のデバイス接着部位の形状を計測

し、挿入デバイスデザインを行った。PVDF 圧電素材からラセン神経節刺激用に出す電極の位置、形状については現在評価中である。

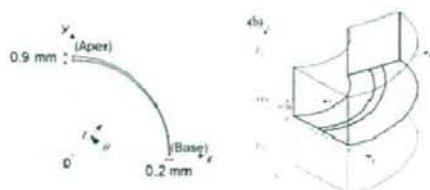


図 6 : モルモット蝸牛基底回転挿入用デバイスのデザイン

モルモット蝸牛基底板の鼓室階側の組織学的な解析から、デバイスの接着面は間葉系の細胞であることが明らかになった。モルモット基底板を組織化学的に解析したところ、鼓室階側はほぼ完全に vimentin 陽性の間葉系細胞で被覆されていることが分かった。デバイス表面を親水化し、コラーゲンコートする技術を開発したが、in vitro での検討から間葉系細胞はコラーゲンコーティング上で接着培養可能なことから、良好な接着条件が期待できることが分かった。

## D. 考察

平成 19 年度の研究成果から、圧電素子を用いた薄膜電極により、ある程度の周波数特性を持たせた電極を作製することが可能であることが判明した。また、この薄膜電極は無電源で電圧を発生することが可能であり、完全埋め込み型の人工感覚上皮として応用可能な技術であることを示すことができた。しかし、一方で、起電圧の増加、実際のヒト蝸牛に近い周波数特性の獲得が問題点となることが、数値解析によるシミュレーションから明らか

となった。具体的には、より薄く、かつ、起電力が大きい圧電素子を開発し、ヒト蝸牛基底回転での周波数特性を持たせることがデバイス開発における課題であった。

デバイスの挿入部位をモルモット蝸牛基底回転と決め、まずモルモット蝸牛基底回転での数値解析モデルを構築した。蝸牛頂部と基底部では、感覚上皮の振動特性は大きく異なることが分かり、平成19年度に行った頂部における数値解析によるシミュレーションは、基底部のモデルを用いて、改めて解析する必要があると考えられた。蝸牛基底部の数値解析から、デバイスの膜厚が $9\mu\text{m}$ では、薄膜デバイスのたわみは形成されず、薄膜デバイスからの起電は得られないことが推察された。一方、膜厚を $0.65\mu\text{m}$ とすることにより、薄膜デバイスでのたわみが生じることが分かり、この厚さでデバイスを作製すれば、ラセン神経節細胞刺激のための起電力が生成されると推察された。

平成19年度には、薄膜デバイスの振動特性解析、起電力測定を空気中で行い、良好な結果が得られたが、デバイスを挿入する蝸牛内は液体で満たされた空間である。したがって、液相での振動特性を行う必要があった。結果、ヒトの会話音域での動作特性が確認された。次に、最大の課題であった膜厚を小さくし、ナノスケールとする問題に取り組んだ。結果、MEMSプロセスを全工程で行うことにより、幅 $0.2\sim 2\text{mm}$ 、厚さ $650\text{nm}$ のデバイスを作製することに成功した。このデバイスは $12\sim 27\text{kHz}$ の周波数弁別特性を持ち、 $90\text{dB SPL}$ の入力で $12\text{mV}$ の出力があることが分かった。これらの特性は、蝸牛内でのラセン神経節刺激が十分可能なレベルにあり、また、先述した

数値解析の条件を満たすものといえる。モルモット蝸牛での挿入実験結果から算出された形状のデバイスを作製し、今後の *in vivo* での解析が期待できる状況となった。

本年度の研究で、デバイスの接着を良好なものにするために、デバイス表面を親水化し、コラーゲンコーティングする技術を開発した。また、モルモット蝸牛基底板の鼓室階面、すなわち、デバイスとの接着面が間葉系細胞であることから、ある程度の接着性が期待できることが分かった。今後、*in vivo* での接着状態を解析し、デバイスの形状改良などで、どれだけ安定した接着が実現できるかが鍵となると考えられた。

自己由来細胞の移植によるラセン神経節細胞再生に関しては、実用化に向けて、有望な結果が得られたといえる。骨髄および脂肪組織由来細胞から、遺伝子導入を用いずに安定して *neurosphere* を得ることが可能となり、モルモット蝸牛に移植した *neurosphere* が生着し、神経細胞へと分化していることが確認できた。われわれの過去の胚性幹細胞由来神経細胞を用いた実験では、機能的な再生が電気刺激聴性脳幹反応で示されているが、今のところ、骨髄および脂肪組織由来細胞を用いた移植実験では、機能再生を証明する所見は得られていない。今後の方向性としては、よりラセン神経節細胞に近い性質を有する細胞に移植後に誘導する方法を検討する予定である。高度に分化した細胞の移植を試みたが、移植用に細胞を採取する段階および移植手術を行う段階で多くの細胞が細胞死に陥ることから、移植細胞の生着という面では、*neurosphere* 段階の細胞の移植が望ましいといえる。遺伝子操作を用いた報告ではあるが、

移植後に一定時間のみノッチ情報伝達系の転写因子を発現させることにより、よりラセン神経節細胞に近い性質を持つ細胞に分化誘導している報告もあることから、移植後に薬物投与などにより、望ましい方向への分化誘導を促す工夫が必要かもしれない。また、移植細胞の生着をさらに高める目的からも、移植後の蝸牛に神経栄養因子などを持続的に投与することも試す必要がある。われわれは、蝸牛への薬物徐放システムとして、ゼラチンハイドロゲルを用いた神経栄養因子の蝸牛内への徐放に成功しているので、この方法を細胞移植の高率化に応用したいと考える。

ヒト蝸牛への圧電素子デバイスの挿入手術手技に関しては、人工内耳手術手技を応用することにより、明視下での操作が可能であることが確かめられた。モルモット蝸牛と比較して、ヒト蝸牛では挿入するスペースが広いことから、デバイスの留置に関しては問題が少ないと推察できるが、より低侵襲に行う必要があり、手術侵襲、特に残存聴力への影響については、さらなる検討が必要であると考えられた。

## E. 結論

ナノテクノロジー、蝸牛バイオメカニクス、内耳生物学および再生医学、組織工学、耳科学の各分野の知見を統合する医工連携による新しい難聴治療法開発の第2段階として、完全埋め込み型聴覚デバイスである人工感覚上皮のプロトタイプを作製し、数値解析モデルから有効性が期待できるデバイスに発展させることができた。また、蝸牛基板接着に関しても、組織学的解析および組織工学的解析

から、良好な接着が期待できる方法を開発することができた。さらに、開発した圧電素子デバイスをモルモットおよびヒト蝸牛に挿入するための手術手技を開発し、*in vivo* 埋め込み実験の基盤を形成することができた。自己由来細胞によるラセン神経節再生に関しては、骨髄および脂肪組織由来間葉系細胞をソースとして、*neurosphere* を安定的に供給する技術開発を行い、移植実験にて蝸牛組織内での神経組織再生に成功した。

今後の課題として、第一に圧電素子デバイスの *in vivo* での有効性検証があげられる。特に、圧電素子デバイスで得られた電力をいかにして、ラセン神経節細胞に電流として伝達するか、という点が問題点となることが予想される。この問題の解決方法として、デバイスの電極部分の加工、デバイス挿入部位、電極位置などの工夫を検討する予定である。自己由来細胞によるラセン神経節細胞再生については、よりラセン神経節細胞に近い性質の細胞再生、中枢との神経接合形成が課題といえる。また、残存しているラセン神経節細胞から神経突起をデバイス側に伸長させる技術開発も検討課題と考える。

## F. 健康危険情報

本研究に関連して得られた健康危険情報はない。

## G. 研究発表

### 著書

1. 新宅博文, 中川隆之, 川野聡恭, 田畑泰

彦, 和田 仁, 伊藤壽一: MEMS 技術による人工内耳の開発, バイオ健康&医療デバイス (仮), シーエムシー出版. (予定)

#### 論文発表

1. Hiraumi H, Nakagawa T, Ito J. Efficiency of a transtympanic approach to the round window membrane using a microendoscope. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 266:367-71, 2009.
2. Ogita H, Nakagawa T, Lee KY, Inaoka T, Okano T, Kikkawa YS, Sakamoto T, Ito J. Surgical invasiveness of cell transplantation into the guinea pig cochlear modiolus. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 71:32-39, 2009.
3. Matsumoto M, Nakagawa T, Kojima K, Sakamoto T, Ito J. Potential of embryonic stem cell-derived neurons for synapse formation with auditory hair cells. *J Neurosci Res* 86:3075-3085, 2008.
4. Nakagawa T, Ito J. Local drug delivery to inner ear for treatment of hearing loss. *Current Drug Therapy* 3: 143-147, 2008.

#### 学会発表

1. 北川 大, 新宅博文, 川野聡恭: 人工内耳基底膜の振動と周波数弁別特性, 日本機械学会 2008 年度年次大会講演論文集 (8), pp.103-104, 横浜, 2008 年 8 月.
2. 中本洋平, 新宅博文, 川野聡恭: 圧電式人工基底膜の振動解析, 日本機械学会 2008

年度年次大会, 日本機械学会 2008 年度年次大会講演論文集 (8), pp.101-102, 横浜, 2008 年 8 月.

3. 北川 大, 新宅博文, 川野聡恭, 人工内耳基底膜の振動特性における周囲流体の影響, 第 21 回バイオエンジニアリング講演会 講演論文集 No.08-53, pp.487-488, 札幌, 2009 年 1 月.
4. 神戸俊也, 新宅博文, 川野聡恭, 薄膜技術を用いた MEMS 人工内耳の開発, 日本機械学会 関西学生会学生員卒業研究発表講演会 (予定)
5. Nakagawa T, Kada S, Ito J. The potential of cell therapy for hearing loss caused by degeneration of the spiral ligament. *The 45th Workshop on Inner Ear Biology, Ferrara, Italy, September 21-24, 2008*
6. Nakagawa T. Future stem cell therapy for sensorineural hearing loss. *The 1st International Conference on Hearing: Stem Cells Therapeutic Perspectives, Rome, Italy, May 10, 2008*
7. Hirofumi Shintaku, Harto Tanujaya, Yohei Nakamoto, Takayuki Nakagawa, Satoyuki Kawano, and Juichi Ito, "Fluid Dynamical Analysis on Basic Characteristics of MEMS Fabricated Artificial Cochlea," *Proceedings of The Seventh JSME-KSME Thermal and Fluids Engineering Conference, Sapporo, Japan, October (2008), p.155 (CDROM).*
8. Hirofumi Shintaku, Harto Tanujaya, Takayuki Nakagawa, Juichi Ito, and Satoyuki Kawano, *Acoustical Frequency*

Selectivity of Piezoelectric Artificial Cochlea, Proceedings of the 25th Sensor Symposium on Sensors, Micromachines, and Applied Systems, Okinawa, Japan, October (2008), pp.847-848.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

（分担）研究報告書

人工感覚上皮開発に関する研究

研究分担者 川野聡恭 大阪大学大学院 基礎工学研究科 教授

研究要旨：本研究では、Stand alone 型人工内耳の創製を目指して、人工基板の開発研究を行った。本年度は、プロトタイプデバイスの振動特性を詳細に計測することで周波数弁別のメカニズムを明らかにした。さらに、その特性を理論的に予測することを目的として、人工基板の振動を周囲流体との流体-構造連成振動として定式化した。周波数弁別に関する実験結果と理論解析結果は良く一致し、理論予測の有効性を示すと共に、周囲流体が人工基板の振動に及ぼす影響について詳細に議論した。さらに、蝸牛内部への埋め込みを視野に入れ、超薄膜技術を用いた MEMS 人工内耳の開発も行った。そして、その振動特性を実測し、プロトタイプデバイス同様周波数弁別を実現できることを示した。

難聴は聴覚の機能障害であり、伝音性難聴と感音性難聴に大別できる。伝音性難聴は主として中耳における伝音機構の障害であるのに対して、感音性難聴は内耳の(主に有毛細胞やラセン神経節)機能低下・障害により引き起こされる。特に、感音性難聴は65歳以上人口の約5割に見られる不可逆的な疾患であり、超高齢化社会を迎える我国において切実な社会的問題であると言える。さらに、先天性難聴は1000人に1人程度に認められる最も頻度の高い先天性機能障害の一つであり、そのほとんどは感音性難聴である。先天性難聴は、小児の感性、言語および知識獲得等に強い影響を及ぼし、生活の質(QOL:Quality of Life)を低下させる。以上より、安全性および効果の高い治療法の開発は喫緊の課題であると言える。

人工内耳は、感音性難聴治療に利用される人工臓器である。臨床応用されて、すでに20年以上が経過しており、最も成功した埋め込み型医療機器の一つと言える。現在の人工内耳のシステムは体外装置および体内装置から構成される。体外装置は、電源、マイク、ス

ピーチプロセッサ、送信機等から成り、音を刺激用電気信号に変換した上で体内装置へ送信する。スピーチプロセッサの音声処理方式は、音声信号のフーリエ変換を基本としており、周波数に応じて刺激電極を選定し、帯域のエネルギー量によって刺激量を決定する。体内装置は、蝸牛管に埋め込まれた刺激用電極を介し、受信した電気信号をラセン神経節に与える。これらの処理は、正常な内耳が行っているものとほぼ同一であるが、次の点異なる。まず、現行の人工内耳は電極数の制限から、音波を最大で24の周波数帯域に分割するが、正常な内耳では、さらに詳細な周波数弁別を行っている。また、刺激用電極の蝸牛管全体への装着が困難であり、刺激可能な領域が中・高周波数受容帯に限られる。これらの差異が原因となり、現在の人工内耳は“自然な聞こえ”を実現できていない。また、現在のシステムでは体外装置が必要不可欠であり、それによる日常生活における制限やQOLの低下も解決すべき課題の一つである。そこで本研究では、MEMS(Microelectromechanical systems)技術を用いて、体外装置と電源を持た

ない Stand alone 型人工内耳の創製を目指している。そして、超微細加工技術による電極数の増加、新たな周波数解析法による“自然な聞こえ”の実現を目標としている。

開発中の人工内耳では、音波により振動する人工基板（圧電材料でできた振動板）が主要な部品である。人工基板は、圧電効果により振動を電気信号に変換し、その信号で神経細胞を刺激する。このシステムは、蝸牛の基板および有毛細胞の働きを人工的に再現したものである。これを、内耳の蝸牛管内部に設置すれば、従来の人工内耳と異なるシステムで感音性難聴を治療できる。本システムの優位性は、外部電源を必要としない完全埋め込み型の人工内耳を実現できること、正常な内耳の状態に近い周波数弁別の実現等が考えられる。以下に、本事業で考案した新しい人工内耳の構造と動作原理、周波数特性の理論予測技術、プロトタイプデバイスの動作特性、薄膜技術を応用した改良型人工内耳について報告する。

#### 構造と動作原理

動作原理を検証するために試作したプロトタイプデバイスの詳細構造を Fig. 1 に示す。デバイスは、圧電性（応力に対応して誘電分極を生ずる現象）を示す有機物質 PVDF(polyvinylidene difluoride)の薄板を台形状の溝を有する基板に固定したものである。ここでは、溝部の振動する領域を人工基板と呼ぶ。溝の長さは 30 mm であり、溝の幅は 2 mm~4 mm まで線形的に変化する。また、人工基板の板厚は 40  $\mu$ m であり、表面に厚さ 100 nm 程度の上部電極を有する。上部電極は 24 個あり、中心間が 1 mm の間隔で溝の長手

方向に直線的に並んでいる。また、裏面には共通のグランド電極がある。便宜上、ここでは x 座標の小さい側から、上部電極を Ch1~Ch24 と番号付けする。人工基板は音波等の外力を印加すると振動し、変形に応じた電位差を圧電効果により上部電極およびグランド電極間で発生する。この台形状は、生体の蝸牛における基板形状を模倣しており、基板が有する周波数弁別能を人工的に再現するものである。すなわち、膜の有する局所的な固有振動数が位置に応じて変化し、印加された音波の周波数に応じて異なる位置が共振する。人工基板の振動様式は、音波の周波数と溝形状で決まる境界条件に依存するが、溝の長さが幅に対して十分に長い場合、幅方向の境界条件が支配的である。すなわち、幅の狭い領域は比較的周波数の高い音波に共振するのに対して、幅の広い領域は比較的周波数の低い音波に共振することになる。また、振動板表面の各上部電極から得られる電気的出力は、電極の位置に応じた周波数特性を示す。すなわち、電気信号は局所的なみずみに比例し、共振する条件では出力が増加する。また、PVDF の配向を幅方向にすることで電気的な出力は、幅方向のみずみに強く依存する。これにより、周波数弁別能を高めることが可能である。



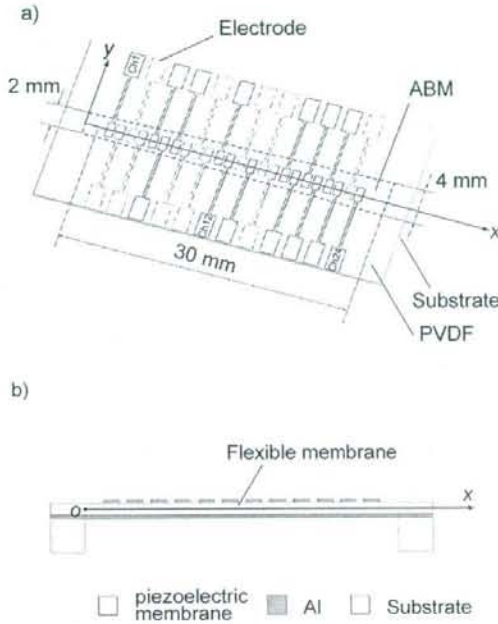


Fig. 1 Schematic of developed artificial cochlea;  
a) 3-D view and b) cross sectional view

### 周波数特性の理論予測技術

人工基底板の周波数特性について理論的に予測するため、ここでは薄肉平板の振動として人工基底板の振動をモデル化した。人工基底板を蝸牛内部に設置した条件では、その振動は周囲流体より強く影響を受ける。そこで、人工基底板の振動を流体と構造の連成振動として捉え、薄肉平板の振動方程式と流体の連続の式を連立して解析を行った。具体的には、まず、フーリエ変換により連続の式の一般解を導出した。そして、そのフーリエ係数を人工基底板上の運動学的条件を満たすよう決定することで、上記二つの基礎式を連立した。

平面応力および微小振幅を仮定すると、薄肉平板の振動を表す基礎方程式は

$$\rho h \frac{\partial^2 w}{\partial t^2} + D \left( \frac{\partial^2 w}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 w}{\partial x^2 \partial y^2} + \frac{\partial^2 w}{\partial y^2} \right) = -P_1 + P_2 \quad (1)$$

と記述できる。ここで、 $D$ 、 $h$ 、 $P_1$ 、 $w$  および  $\rho$  は、それぞれ曲げ剛性、板の厚さ、圧力、板の変位および板の密度である。 $P_1$  の添え字 1 および 2 は、それぞれ膜の上側および下側の流体を表す。ここでは人工基底板は等方性材料と仮定した。曲げ剛性  $D$  は弾性定数  $E$  と

$$D = Eh^3 / [12(1 - \nu^2)] \quad (2)$$

という関係である。ここで、 $\nu$  は Poisson 比であり、膜の材料で決定される。本実験で使用した PVDF は、 $E$  および  $\nu$  が、それぞれ 4.0 GPa および 0.3 である。

流体を非圧縮および非粘性と仮定する。支配方程式は以下の連続の式および Bernoulli の式で表される。

$$\frac{\partial^2 \phi_1}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \phi_1}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \phi_1}{\partial z^2} = 0 \quad (3)$$

$$\rho_1 \frac{\partial \phi_1}{\partial t} = -P_1 \quad (4)$$

ここで、 $\phi$  および  $\rho_1$  は、それぞれ速度ポテンシャルおよび周囲流体の密度を表す。幅  $L_1$  および深さ  $2L_2$  の矩形断面を有する蝸牛管中央に人工基底板を設置したと仮定すれば、境界条件は以下の式で表される。

$$\partial \phi_1 / \partial y = 0 \text{ at } y = \pm L_1 / 2 \quad (5)$$

$$\partial \phi_1 / \partial z = 0 \text{ at } z = \pm L_2 \quad (6)$$

$$\partial \phi_1 / \partial z = \partial w / \partial t \text{ at } z = 0 \quad (7)$$

上記の式(5)および式(6)は、蝸牛管壁面で法線方向の流速が 0 である条件を表す。式(7)は、

人工基板の速度とその表面の流体の速度が一致する条件、すなわち、運動学的条件を表す。

人工基板は台形状であり、固有振動数および波数が空間的に分布する。一波長あたりの板幅  $b(x)$  の変化が十分に緩やかである場合、波数の空間的な変化も緩やかであり、局所的には波動を平面波とみなすことができる。すなわち、 $db(x)/dx \rightarrow 0$  および  $dk(x)/dx \rightarrow 0$  とみなす。このことを利用して、

WKB(Wentzel-Kramers-Brillouin)法により固有振動数の分布を計算した。すなわち、板の変位  $w$  は

$$w(x, y, t) = W(x)\eta(x, y)e^{i(\omega t - kx)} \quad (8)$$

で記述できると仮定する。ここで、 $k(x)$ 、 $W(x)$  および  $\eta(x, y)$  は、それぞれ波数、抱絡線および幅方向の変位関数を表す。ここでは、実験において、幅方向の振動として一次モードが支配的であることから、 $\eta(\xi, \psi)$  として長さ  $b(x)$  の梁の一次モードの解析解

$$\eta(x, y) = c_0 \cos\left(\frac{\beta}{b(x)}y\right) + c_1 \cosh\left(\frac{\beta}{b(x)}y\right) \quad (9)$$

を用いた。ここで、 $c_0$ 、 $c_1$  および  $\beta$  は定数であり、それぞれ 0.8827、0.1173 および 4.730 である。これらの定数は  $\eta(\xi, \psi)$  が境界  $y = \pm b(x)/2$  において、固定端条件を満たすように決定した。さらに、 $W(x)$  の  $x$  方向変化は緩やかであり、

$$dW(x)/dx \ll \partial\eta(x, y)/\partial y \quad (10)$$

と仮定する。一方、速度ポテンシャルについても、WKB法を利用すると、蝸牛管壁面の境

界条件を満たす解は、

$$\phi_i = \sum_{j=0}^{\infty} A_j \cosh \zeta_j (L_i + z) \cos\left(\frac{j\pi}{L_i}y\right) e^{-i\omega t} e^{i\omega z} \quad (11)$$

と記述できる。ここで  $A_j$  と  $\zeta_j$  は、それぞれ  $j$  次のフーリエ係数および  $\zeta_j = (\omega^2/L_i^2) + k^2$  である。次に、 $z=0$  における運動学的条件より、

$$i\omega W(x)\eta(x, y) = -\sum_{j=0}^{\infty} A_j \zeta_j \sinh \zeta_j L_i \cos\left(\frac{j\pi}{L_i}y\right) \quad (12)$$

が得られる。余弦関数の直交関係を利用すると、

$$A_j = \frac{i\omega W \int_{-b/2}^{b/2} \eta \cos\left(\frac{j\pi}{L_i}y\right) dy}{\zeta_j \sinh \zeta_j L_i \int_{-b/2}^{b/2} \cos^2\left(\frac{j\pi}{L_i}y\right) dy} \quad (13)$$

が得られる。さらに、式(4)、式(11)および式(13)より人工基板の振動に寄与する圧力を算出し、式(6)と共に、式(1)に代入すると、次の eikonal 式

$$f = D[k(x)^2 \int_{-b/2}^{b/2} \eta^2(x, y) dy - k(x)^2 \int_{-b/2}^{b/2} \frac{\partial \eta^2(x, y)}{\partial y^2} \eta(x, y) dy + (\beta/b(x)) \int_{-b/2}^{b/2} \eta^2(x, y) dy] - \omega^2 [\rho \int_{-b/2}^{b/2} \eta^2(x, y) dy + 2\rho \sum_{j=0}^{\infty} \frac{[\int_{-b/2}^{b/2} \eta(x, y) \cos(j\pi y/L_i) dy]^2}{\zeta_j \tanh(\zeta_j L_i) \int_{-b/2}^{b/2} \cos^2(j\pi y/L_i) dy}] = 0 \quad (14)$$

が得られる。ここで得られた eikonal 式は、角振動数  $\omega$  に対する波数  $k(\xi)$  の分布を与える。角振動数  $\omega$  を固定した場合、式(14)の未知数は  $k(x)$  のみである。つまり、式(14)を  $k(x)$  について解けばよい。しかし、周囲流体の効果を表

す項は、異なるモードの解を重ね合わせる必要があるため、解析的に解を得ることができない。そこで、ここではNewton法により、式(14)を満たす $k(x)$ を得た。ただし、収束条件は $10^{-6}$ とし、 $j=0\sim 30$ の次数のみを考慮した。なお予備計算により、上記次数が収束条件に対して十分な精度を確保できることを確認している。一方、抱絡線 $W(x)$ は、平均変分原理から、eikonal式と次の関係

$$W(x) = \frac{c}{(\partial f / \partial k)^{1/2}}, \quad (15)$$

が得られる。ここで、 $c$ は定数である。以上より、eikonal式を満たす波数分布 $k(x)$ を算出し、式(15)より抱絡線が得られる。共振位置では抱絡線 $W(x)$ の大きさが増加することから、角振動数を変化させながら $W(x)$ を調べることで局所的な共振周波数と位置の関係が得られる。本解析に用いた数値を表1にまとめた。

Table 1: Parameters for prediction of vibration characteristics of diaphragm

Parameter	Value
Young modulus of PVDF, $E$ (Pa)	$4 \times 10^9$
Poisson ratio of PVDF, $\nu$	0.3
Density of PVDF, $\rho_p$ ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )	1780
Density of silicone oil, $\rho_s$ ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )	873
Density of air, $\rho_a$ ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )	1.2
Length of diaphragm, $l$ (m)	0.03
Width of diaphragm, $b(x)$ (m)	$b(x) = 0.002 + 0.002x/l$
Width of fluid channel, $L_1$ (m)	0.017
Depth of fluid channel, $L_2$ (m)	0.004

周囲流体が空気である条件で算出した $k(x)$ をFig. 2に示す。周波数に応じて、 $k(x)$ は異なる分布を示す。 $x$ 座標と $k(x)$ の関係は、異なる周波数の結果間で定性的に一致しており、 $x$ 座標の小さな領域で $k(x)$ は比較的小さく、ある座標を境に急激に増加する。 $k(x)$ のオーダーから、波長が $\text{mm}$ のオーダーである。次に、 $W(x)$ の分布をFig. 4に示す。 $W(x)$ は周波数に依存し異

なる位置で最大値を示す。最大値を示す位置は共振により振幅が増幅することを示唆している。また、共振位置よりも右側の振幅は、左側のそれよりも相対的に大きくなる。

一方、液体中の条件で算出した $k(x)$ の分布をFig. 5に示す。空気中の結果と比較すると、その変化は緩やかであることが分かる。また、共振が得られる周波数が大幅に低下する。次に、Fig. 5に $W(x)$ の解析結果を示す。 $k(x)$ と同様に空気中よりもその変化が緩やかであることが分かる。以上をまとめると、液体の存在により、共振周波数が減少す

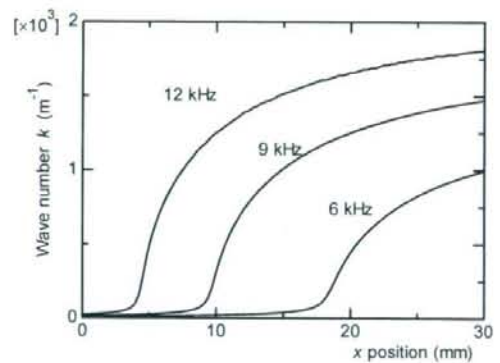


Fig. 2 Distribution of wave number  $k(x)$  at 6 kHz, 9 kHz, and 12 kHz in air

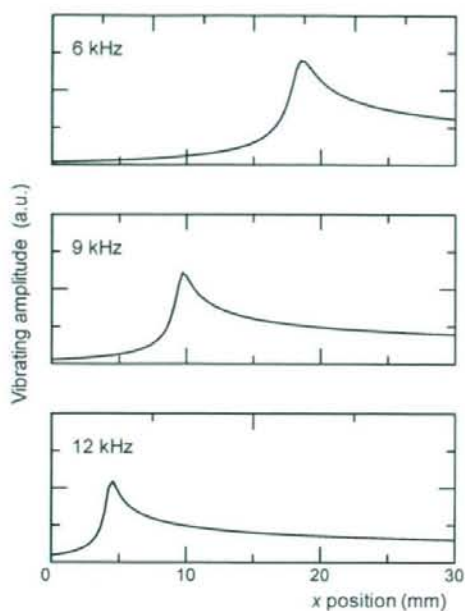


Fig. 3 Envelope function  $W(x)$  in air

ることが分かった。また、波数や共振位置付近の振幅変化も緩やかになることが分かった。式(14)の最終項に着目すると、周囲流体が振動の実効的質量増加に寄与していることが分かる。このことより、周囲流体の存在により共振周波数が減少したと考えられる。共振周波数と  $x$  座標の関係を空気中と液体中条件で比較すると、Fig. 6 のようになり、それぞれ 3.5 ~ 15.5 kHz および 1.0 ~ 6.5 kHz の共振周波数を示すことが分かった。

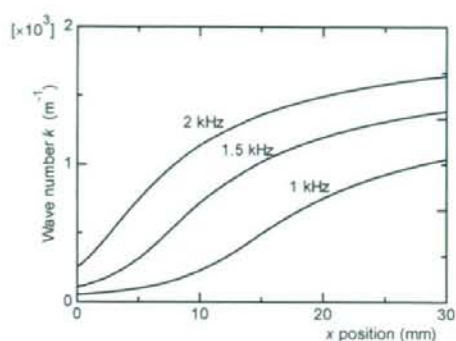


Fig. 4 Distribution of wave number  $k(x)$  at 1 kHz, 1.5 kHz, and 2 kHz in liquid

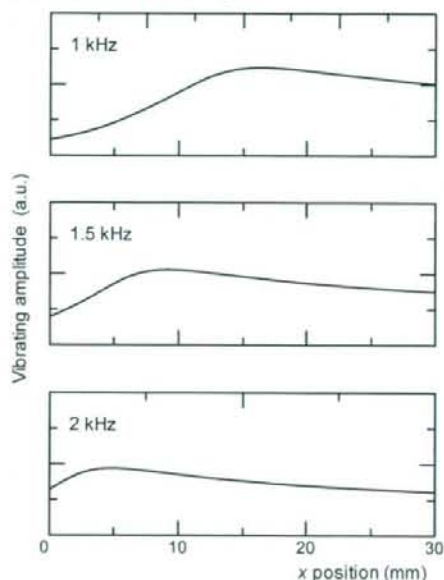


Fig. 5 Envelope function  $W(x)$  in liquid

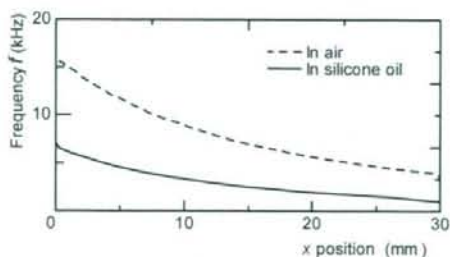


Fig. 6 Predicted relationship between resonance frequency  $f$  and  $x$  position