

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 21 年度総括・分担研究報告書

平成 22 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 21 年度総括・分担研究報告書

平成 22 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. 人工蝸牛管開発—数値解析—・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 12
和田 仁
2. 圧電素子による内耳の機能評価法の確立と
人工内耳電極手術手技の開発・・・・・・・・・・・・・・・・ 14
熊川孝三

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・ 16

IV. 研究成果の刊行物・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 18

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、幹細胞医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。

分担研究者

中川 隆之

(京都大学大学院医学研究科)

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

(京都大学再生医科学研究所)

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)

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。主任研究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かの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。

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

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。

平成 21 年度は、これまでに作製した人工感覚上皮のプロトタイプおよびモルモット蝸牛埋め込み用にデザインした 2 種類のデバイスを用い、以下の検討を行った。

すでに振動特性や起電力が明らかなプロトタイプデバイスに体外で音響刺激を与え、出力をリニアに増幅し、モルモット蝸牛基底部分で蝸牛軸を刺激し、音響刺激に対応した聴性脳幹反応が得られるかを調べた。また、外耳道、鼓膜を経由した音響刺激がデバイスの圧電素子膜を適切に振動させることができるかをレーザードップラー法にて解析した。モルモットの蝸牛基底部分を開窓し、デバイスを鼓室階内、基底板上に留置し、圧電素子膜上にガラスビーズを留置した。外耳道から音響刺激を与え、圧電素子膜上のガラスビーズの動きをレーザードップラーにてとらえ、圧電素子膜の振動を計測した。

2) 蝸牛基底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。また、対象となる感音難聴症例では、有毛細胞障害が想定されるが、有毛細胞喪失が蝸牛基底板振動にどのような影響を与えるかも、人工感覚上皮による聴覚機能再生に重要な因子となる。

モルモット蝸牛基底部のコルチ器構成細胞 4) 自己由来細胞移植によるラセン神経節の物性値に基づき、2次元の有限要素モデル細胞再生

を作製し、コルチ器モデルに Newmark- β

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。外有毛細胞の喪失レベルを変化させ、障害レベルに応じた蝸牛基底板振動特性の変化を解析した。

3) 表面加工による人工感覚上皮固定法開発

本課題は、蝸牛基底板振動をいかにして至適に人工感覚上皮に伝えるかを調べるため行ってきた。これまでの数値モデル解析から、圧電素子の蝸牛基底板への接着は、本来の基底板振動を著しく抑制することが示唆されたことから、平成21年度には、デバイスのフレームのみを固定し、圧電素子膜は直接的に蝸牛基底板に接しておらず、圧電素子膜と蝸牛基底板の間に外リンパが存在する状態での圧電素子膜の振動を調べた。

シリコンフレームで囲まれた圧電素子膜(厚さ4 μ m)をモルモット蝸牛基底板の鼓室階側に設置し、蝸牛内に人工外リンパ液を満たした状態とし、外耳道から音響刺激を与えた際の圧電素子膜の振動の周波数特性を調べ、蝸牛基底板が本来有する周波数特性がどのように変化するかを調べた。

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、神経分化誘導を行い、品質評価のために免疫染色による細胞の評価を行った。また、それぞれの細胞ソースから分化誘導したスフェアの移植実験を行い、組織学的解析およびラセン神経節機能解析として電気刺激聴性脳幹反応計測を行った。

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

本年度は、ヒト側頭骨を用い、蝸牛内にデバイスを挿入し、外耳道からの音響刺激に対する反応を計測するモデル作製を行った。

ヒト側頭骨左右各2耳を用い、コンピームCT撮影を行い、手術アプローチ、デバイス挿入位置をあらかじめ想定した。CT情報に基づき、超細径内視鏡を用い、蝸牛基底回転に到達する手技の有効性を検討した。

(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行い、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を体外に設置し、電極をモルモット蝸牛内に挿入する実験では、116 dB SPL 相当の刺激で聴性脳幹反応が得られ、圧電素子の起電力を増加させることにより聴覚が再生することが示唆された。得られた聴性脳幹反応の潜時は、矩形の電子刺激を与えた場合に得られる電気刺激聴性脳幹反応と一致した。モルモット蝸牛基底回転のサイズに合わせてデザインされた小型デバイスの埋め込み実験では、外耳道からの音圧 110 dB SPL の音響刺激に対し、最大振幅 100nm の圧電素子膜振動が計測された。圧電素子膜が上記の振動を示したのに対して、圧電素子膜を固定するフレーム部位は全く振動を示さなかったことから、音響刺激が圧電素子膜を有効に振動させたことが確認された。また、今回得られた圧電素子膜の振動振幅は、圧電素子からの起電に十分な振幅であった。

2) 蝸牛基底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

蝸牛中心側から外有毛細胞を1列ずつ喪失させたゲインを測定したところ、外有毛細胞のいずれか1列が喪失するのみで、20 dB 程度喪失することが分かった。すなわち、蝸牛外有毛細胞が持つ振幅増幅能のほとんどが1列の外有毛細胞喪失で失わ

れることが分かった。したがって、人工感覚上皮適用患者（従来の人工内耳適用者、90 dB HL 以上）においてはあまり詳細なフィッティングを考える必要はなく、蝸牛のどの位置においても、正常時における内毛細胞から聴神経への出力に相当する刺激を人工感覚上皮から出力すれば良いと考えられる。

3) 表面加工による人工感覚上皮固定法開発

圧電素子膜が蝸牛基底板に接触しない状況で、音響刺激による振動刺激が圧電素子膜に伝導されるかを、モルモット蝸牛を用いて調べた。圧電素子膜を囲むシリコンフレームは蝸牛基底板の骨部に設置し、圧電素子膜と蝸牛基底板の可動部分は外リンパを介して接する状態とした。外耳道からの音圧 110 dB SPL の音響刺激を、周波数を変えて与えたところ、本来 20 kHz で最大振幅が得られると想定される部位で、8 kHz にて最大の振幅が得られた。すなわち、圧電素子膜の振動特性は、*in vitro* での至適周波数条件よりも低い周波数で最大の振幅が得られることが分かった。

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。一方、モルモット脂肪組織由来間葉系細胞は、脂肪、軟骨、骨への分化誘導が確認され、従来報告されているラットおよびヒト脂肪組織由来間葉系細胞と同様の多分化能を有することが示された。さらに、neurosphere forming culture でスフェア形成は認められたが、nestin, NeuroD の発現は乏しく、神経前駆細胞とは断定できないものであった。骨髄、脂肪組織由来細胞のモルモット蝸牛への移植実験を行ったところ、骨髄由来では安定して移植細胞由来神経細胞が移植部位で認められたのに対して、脂肪組織由来では移植細胞由来神経細胞は認められなかった。

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骨髄由来細胞の移植実験を前年度から引き続き行い、サンプル数を増やし、電気刺激聴性脳幹反応閾値に関する統計学的解析を行った。結果、有意の電気刺激聴性脳幹反応閾値回復は認められなかった。

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

ヒト側頭骨解析から、あらかじめ3D-CTを撮影することにより、乳突腔での開窓部位は容易に同定でき、ピンホールで顔面神経管まで到達可能であった。いわゆる後鼓室開放に際しては、頻回の内視鏡観察が必要であったが、蝸牛基底回転に到達することができ、蝸牛基底回転の開窓も容易

に行うことができた。したがって、側頭骨の基本構造を維持したまま蝸牛基底回転にアプローチすることが可能であることが分かった。さらに、超細経内視鏡を用いることにより、蝸牛基底回転内の観察も行うことが可能であり、人工感覚上皮の留置に超細経内視鏡を用いることは、有用であると考えられた。

D. 考察

これまでに開発した圧電素子膜を用いた人工感覚上皮を用いて、実際に生体モルモットで聴性脳幹反応を誘導することができた。この結果は、人工感覚上皮が単に理論上のものではなく、新しい聴覚デバイスとして応用可能なものであることを示す画期的なものであるといえる。ただし、聴性脳幹反応誘導には、強大音響といえるレベルの音刺激が必要であり、実用化を考えた場合、圧電素子膜の高出力化、付加的な埋め込み式増幅装置の開発が必要になると推測された。あるいは、ラセン神経節をより効率的に刺激できる電極が開発できれば、圧電素子膜のスペック向上の範囲は限定されたものでも可能かもしれない。

本年度の研究では、モルモット埋め込み型デバイスを開発し、実際に生体モルモット蝸牛に挿入し、圧電素子膜の音響刺激による振動を測定することができた。懸案事項であった圧電素子膜の基板への接着については、接着しなくても蝸牛基板に隣接させるだけで、十分に振動が伝導されることが分かった。この結果は、蝸牛への侵襲の増加を招くであろう基板への手

術操作を加える必要がないことを意味し、実用化に向けて、重要な所見といえる。

蝸牛基底板振動の数値解析モデルの解析結果は、事前の予想と異なり、軽度の外有毛細胞障害でも、蝸牛基底板振動増幅機構が大きく障害されることを示すものであった。したがって、難聴者への装用を想定した人工感覚上皮においては、外有毛細胞の増幅能力は考慮せずに、正常時における内毛細胞から聴神経への出力に相当する刺激を人工感覚上皮から出力することが目標となることが明らかにされた。この結果は、今後実用化に向けた圧電素子膜のスペック向上のポイントが出力向上にあることを改めて浮き彫りにしたものといえる。

以上の結果から、圧電素子膜の出力を補助する機構を加える、あるいは、圧電素子膜自体の出力向上と効率的な電気刺激のラセン神経節への伝導がクリアすべき課題であることが判明した。

一方、自己由来細胞を用いたラセン神経節細胞再生については、同じ間葉系細胞であっても、脂肪組織由来と骨髄由来で神経細胞への分化誘導効率が異なることが示唆された。今回の結果からは、骨髄由来細胞がよりラセン神経節細胞再生に適した自己由来細胞であることが示唆された。骨髄由来間葉系細胞については、すでに骨再生について臨床応用が京都大学で行われており、現時点では臨床応用へのハードルが最も低い細胞といえる。しかしながら、機能的な改善をえることはできなかった。過去の研究で、ES細胞由来細胞で機能的回復を示唆する所見が認められているもの

と比較すると、蝸牛内に生存している移植細胞由来神経細胞数が少ないことが、ひとつの原因ではないかと考えられた。

臨床応用を想定したヒト側頭骨を用いた手術手技開発からは、低侵襲な方法で蝸牛基底回転にデバイスを留置することが可能であることが分かった。

E. 結論

これまで2年間の研究開発により作製した圧電素子デバイスを用いて、聴性脳幹反応を記録することができた。また、経外耳道的な音響刺激により圧電素子膜の振動が誘導できることが分かった。一方、自己由来細胞由来の神経前駆細胞移植によるラセン神経節細胞再生誘導実験では、組織学的にはラセン神経節細胞様の細胞を再生することはできたが、機能回復を誘導することは出来なかった。今後、iPS細胞を含めたより高機能な自己由来細胞の使用を含めた、さらなる研究開発が必要と考えられた。

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無い。

G. 研究発表

1. 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, pp326-335 ヘルスケアと

- バイオ医療のための先端デバイス機器 シーエムシー出版 東京 2009.
- 2.和田 仁. Biomechanics at Micro- and Nanoscale Levels 公開シンポジウム「マイクロ・ナノバイオメカニクスの開拓」講演収録集. 丸善, 2009.
 - 3.Murakoshi M, Wada H. Atomic force microscopy in studies of the cochlea. B. Sokolowski (Ed.), Molecular Protocols in Auditory Research: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology 493, Humana Press, 401-413, 2009
 - 4.Wada H. Murakoshi M, Iida K, Kumano S. Topological characterization by atomic force microscopy of prestin in the plasma membrane of prestin-transfected Chinese hamster ovary cells using quantum dots. N.P. Cooper, D. Kemp (Eds.), Concepts and Challenges in The Biophysics of Hearing, World Scientific Publishing, 391-392, 2009.
 - 5.Kumano S, Iida K, Murakoshi M, Wada H. Increase in the activity by mutations of the motor protein prestin. N.P. Cooper, D. Kemp (Eds.), Concepts and Challenges in The Biophysics of Hearing, World Scientific Publishing, 405-406, 2009
 - 6.Iida K, Murakoshi M, Kumano S, Wada H. Assessment of the activity of purified prestin and the effect of salicylate on prestin-chloride binding studied by isothermal titration calorimetry. N.P. Cooper, D. Kemp (Eds.), Concepts and Challenges in The Biophysics of Hearing, World Scientific Publishing, 403-405, 2009.
 - 7.Wada H, Murakoshi M, Iida K, Kumano S, Ishihara K. Inner ear biomechanics. T. Yamaguchi (Ed.), Nano-biomedical engineering 2009, World Scientific Publishing, 29-40, 2009.
- ## 2. 論文発表
- 1.Shintaku H, Nakagawa T, Kitagawa D, Tanujaya H, Kawano S, Ito J. Development of piezoelectric acoustic sensor with frequency selectivity for artificial cochlea. Sensors Actuators: A. Physical 158:183-192, 2010.
 - 2.Ogita H, Nakagawa T, Sakamoto T, Inaoka T, Ito J. Transplantation of bonemarrow-derived neurospheres into guinea pig cochlea. Laryngoscope 120: 576-581, 2010.
 - 3.Shintaku H, Tateno T, Tsuchioka N, Tanujaya H, Nakagawa T, Ito J, Kawano S. Culturing neurons on MEMS fabricated P(VDF-TrFE) films for implantable artificial cochlea. Journal of Biomechanical Science and Engineering 5: 229-235, 2010.
 - 4.熊川孝三: 内耳奇形の聴覚検査所見. JOHNS 25:49-54, 2009.
 - 5.Murakoshi M, Iida K, Kumano S, Wada H. Immune atomic force microscopy of prestin-transfected CHO cells using quantum dots. Pflugers Archiv 457:885-898, 2009.
 - 6.Kumano S, Tan X, He DZZ, Iida K, Murakoshi M, Wada H. Mutation-induced reinforcement of prestin-expressing cells. Biochem Biophys Res Commun 389:569-574, 2009.

3. 学会発表

1. Ito J. Instruction Courses : Regeneration Therapy for the Inner Ear Diseases. AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO. San Diego, CA, USA. Sep 6-29,2009.
2. Ito J. Development Of A Novel Therapeutic Method For Sensorineural Hearing Loss By A Newly-Invented Artificial Sensory Organ. 7th Asia Pacific Symposium on Cochlear Implants and Related Siences (APSCI2009). Singapore. Dec 1-4 2009.
3. 伊藤壽一:新しい人工聴覚器の開発. 第4回ウェルネス研究会. 平成21年12月15日. 京都.
4. 伊藤壽一、稲岡孝俊、中川隆之、坂本達則、平海晴一、内藤 泰、熊川孝三、和田 仁:人工感上皮(人工蝸牛)の開発—HIBIKI プロジェクト. 第110回日本耳鼻咽喉科学会 2009年5月14日~16日 東京
5. 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.
6. Hiraumi H, Yamamoto N, Sakamoto T, Ito J. Revision in Cochlear Implant Surgery. 27th Politzer Society Meeting. London,UK. Sep 3-5,2009.
7. 平海晴一, 山本典生, 坂本達則, 伊藤壽一:人工内耳埋め込み術後耳に対する再手術症例の検討 第19回日本耳科学会. 平成21年10月8~10日. 東京.
8. 扇田秀章, 中川隆之, 坂本達則, 稲岡孝敏, 伊藤壽一:骨髄間質細胞を用いたラセン神経節再生 第110回日本耳鼻咽喉科学会. 平成21年5月14~16日. 東京.
9. 扇田秀章, 中川隆之, 坂本達則, 稲岡孝敏, 伊藤壽一:骨髄間質細胞由来神経前駆細胞によるラセン神経節再生 第19回日本耳科学会. 平成21年10月8~10日. 東京.
10. 濱口清海, 嘉田真平, 中川隆之, 伊藤壽一:骨髄由来間葉系細胞移植による感音難聴治療 第110回日本耳鼻咽喉科学会. 平成21年5月14~16日. 東京.
11. 吉田充裕, 中川隆之, 北尻真一郎, 稲岡孝敏, 喜多知子, 伊藤壽一:脂肪組織由来間葉系細胞による内耳再生・保護 第19回日本耳科学会. 平成21年10月8~10日. 東京.
12. Takatoshi Inaoka, Takayuki Nakagawa, Hirofumi Shintaku, Satoyuki Kawano, Shinpei Sato, Hitoshi Wada, Shinji Hamanishi, Yasuhiko Tabata, Kozo Kumakawa, Yasushi Naito, Juichi Ito. A New Concept for Hair Cell Regeneration: Implantation of An Artificial Sensory Epithelium. 33rd Association for Reserch in Otolaryngology Midwinter Meeting 2,6-10, 2010, Anaheim USA
13. Takeda H, Kumakawa K, Tanaka Y, Ashino S, Koyama Y Pre-operative Electrophysiological evaluation in young cochlear implant candidates with cochlear nerve lesions. 12th Symposium on Cochlear Implants in Children 2009.6.17-20 Seattle, USA

14. 熊川孝三、真岩智道、鈴木久美子、藤野睦子、武田英彦、阿部聡子、熊川孝三、中富浩文、内藤 泰、関要次郎、小松崎篤: 当院における聴性脳幹インプラント装用者の術後成績について 第 110 回日本耳鼻咽喉科学会 2009 年 5 月 14 日～16 日 東京
15. 熊川孝三、加藤 央、河村さやか、武田英彦、射場 恵、熊谷文愛、太田昌孝、舘野 誠: 高音急墜型フィルタを介した日本語と英語文の聴取成績の比較—ハイブリッド型人工内耳の適応基準を考える— 第 54 回聴覚医学会 2009 年 10 月 22～23 日 東京
16. 熊谷文愛、射場 恵、河村さやか、加藤 央、武田英彦、熊川孝三: 聴性脳幹インプラント装用者の長期経過。第 54 回聴覚医学会 2009 年 10 月 22～23 日 東京
17. 射場 恵、熊谷文愛、武田英彦、熊川孝三: 埋め込み型骨導補聴器 (BAHA) と従来型補聴器との装用効果を比較しえた 1 例。第 54 回聴覚医学会 2009 年 10 月 22～23 日 東京
18. 岩崎 聡、喜多村 健、福田 諭、小林俊光、熊川孝三、宇佐美 真一、土井勝美、西崎和則、暁 清文、東野哲也: 本邦における埋め込み型骨導補聴器 (Bone-Anchored Hearing Aid:BAHA) 治験—補聴器との比較について— 第 54 回聴覚医学会 2009 年 10 月 22～23 日 東京
19. 工 穰、宇佐美 真一、岩崎 聡、喜多村 健、福田 諭、小林俊光、熊川孝三、土井勝美、西崎和則、暁 清文、東野哲也: 本邦における埋め込み型骨導補聴器 (Bone-Anchored Hearing Aid: BAHA) 治験—片側聾への評価について— 第 54 回聴覚医学会 2009 年 10 月 22～23 日 東京
20. Kozo kumakawa: ① Surgery and Speech performance of auditory brainstem implant. ②Linguistic issues in candidacy criteria of hybrid cochlear implant Forum on current otology and auditory implant at Gaungzhou (広州) 2009 年 9 月 21 日 中国 広州
21. 熊川孝三: 次世代人工内耳と日本語音声 第 54 回日本音声言語医学会セミナー 2009 年 10 月 15 日 福島
22. 熊川孝三: 人工内耳の進歩と聴性脳幹インプラントの現状 第 34 回日本耳鼻咽喉科医会臨床家フォーラム 2009 2009 年 9 月 5 日 横浜
23. 熊川孝三: 補聴器に関する最近の研究—高音漸傾型難聴の補聴
24. 平成 21 年度日耳鼻長野県地方部会 信州大学医学部付属病院 大会議室 2009 年 12 月 20 日 松本市
25. Kumano S, He DZZ, Tan X, Iida K, Ishihara K, Tsumoto K, Ikeda K, Kumagai I, Kobayashi T, Wada H. Significant increase of active prestin molecules by single amino acid replacement. The 10th International Symposium on Future Medical Engineering Based on Bio-nanotechnology, Christchurch, New Zealand, April 16, 2009.
26. Wada H, Murakoshi M, Iida K, Kumano S: 哺乳類の聴覚システムの分子レベルでの理解. The 11th International

- Symposium on Future Medical Engineering Based on Bio-nanotechnology, Tokyo, Japan, July 25, 2009.
27. Kumano S, He DZZ, Tan X, Tsumoto K, Ikeda K, Kumagai I, Kobayashi T, Wada H. Remarkable enhancement of the activity of prestin by point mutation. Third Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics, Engelberg, Switzerland, September 2, 2009.
28. Suzuki S, Andoh M, Wada H. Significant decline in cochlear amplification caused by the functional loss of one of the three rows of outer hair cells. Third Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics, Engelberg, Switzerland, September 2, 2009.
29. 和田 仁, 宇佐美真一, 池田勝久, 小林俊光: 遺伝性難聴に関わる変異 Pendrin のサリチル酸及びその誘導体によるリフォールディング. 第19回日本耳科学会総会・学術講演会, 東京, 2009年10月9日.
30. 村越道生, 浜名 洋, 熊野 峻, 和田 仁: 原子間力顕微鏡と Qdot を用いた内耳モータータンパク質プレスチンの可視化. 第43回日本生体医工学会 東北支部大会, 福島, 2009年11月21日.
31. Murakoshi M, Hamana H, Kumano S, Wada H. Atomic force microscopic imaging of the inner ear motor protein prestin using quantum dots. Watching Biomolecules in Action Symposium & 2nd Kanazawa Bio-AFM Workshop, Osaka, Japan, December 14, 2009.
32. Seshimo N, Hamanishi S, Mazlan R, Kei J, Wada H. Analysis of the vibration characteristics of neonatal middle ears using a sweep frequency impedance meter. The 3rd East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, Singapore, Singapore, December 21, 2009.
33. Suzuki S, Wada H. Three rows of outer hair cells required for efficient cochlear amplification. The 3rd East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, Singapore, Singapore, December 21, 2009.
34. 熊野 峻, 飯田浩司, 村越道生, 和田 仁: 人工脂質二重膜に再構成したタンパク質モータープレスチンの原子間力顕微鏡を用いた構造解析. 第22回バイオエンジニアリング講演会, 岡山, 2010年1月9日.
35. 瀬下直矢, 濱西伸治, 村越道生, Rafidah Mazlan, Joseph Kei, 和田 仁.: Sweep Frequency Impedance Meter を用いた新生児と成人の中耳動特性の比較解析. 第22回バイオエンジニアリング講演会, 岡山, 2010年1月9日.
36. 鈴木 翔, 村越道生, 和田 仁: 蝸牛増幅機構における3列の外有毛細胞の重要性. 第22回バイオエンジニアリング講演会, 岡山, 2010年1月9日.
37. Murakoshi M, Hamana H, Kumano S, Wada H. Immune atomic force microscopy of the inner ear motor prestin using Qdots. SMART-Tohoku GCOE joint Workshop

on Micro & Nano Bioengineering: MIT,
NUS, NTU and Tohoku, Singapore,
Singapore, January 12, 2010.

38. Kumano S, Murakoshi M, Hamana H,
Wada H. High resolution imaging by
atomic force microscopy of prestin
purified and reconstituted into an artificial
lipid bilayer. The 33rd ARO MidWinter
Meeting, Anaheim, CA, USA, February 8,
2010.

39. 川瀬智裕, 熊野 峻, 村越道生, 浜名

洋, 和田 仁: プレスチン膜貫通構造の
単分子力顕微鏡法による解析. 日本機
械学会東北支部 第 45 期総会・講演会,
仙台, 2010 年 3 月 27 日.

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

人工蝸牛管開発—数値解析—

研究分担者 和田 仁 東北大学大学院工学研究科

A. 研究の背景と目的

本研究事業では、ナノテクノロジー、再生医学を融合した人工内耳・人工蝸牛を開発することを目的とする。開発にあたっては基板、およびコルチ器(図1)の振動特性を理解する必要がある。しかし、実験動物を用いて基板、およびコルチ器の振動を直接計測することは蝸牛の脆弱性と振動の微小さゆえ困難である。これに対して、モデルを用いた数値解析は、生理学的条件の影響を受けず、これらの挙動を定量的に明らかにできるため有用であると考えられる。

平成21年度分担研究では、開発する人工感覚上皮の適用患者(従来の人工内耳適用者、90 dB HL以上)における内耳音増幅機構を細胞レベルで解析し、人工感覚上皮が担うべき増幅機能の仕様検討を行った。

B. 研究方法

B.1. コルチ器のモデルの構築

図1に本研究で用いたモデルを示す。本モデルは昨年度までの研究で構築されたモデルに修正を加えたものである。3列からなる外有毛細胞(outer hair cell: OHC; OHC-1, OHC-2 および OHC-3)の伸縮能は、聴毛の変位 x とOHCから生じる力 F_{OHC} の関係として図2のように定義される。OHCから生じる力の最大値 F_{max} は、OHCによるゲインが過去の実験結果に沿うように150 nNと見積もった。本研究では、20 dB SPLの音刺激を耳に入力した際に相当する圧力を基底膜下部(図1)に与え、1列ずつOHCの伸縮能を損なわせた各状態において、図1に示す点の変位を計算した。

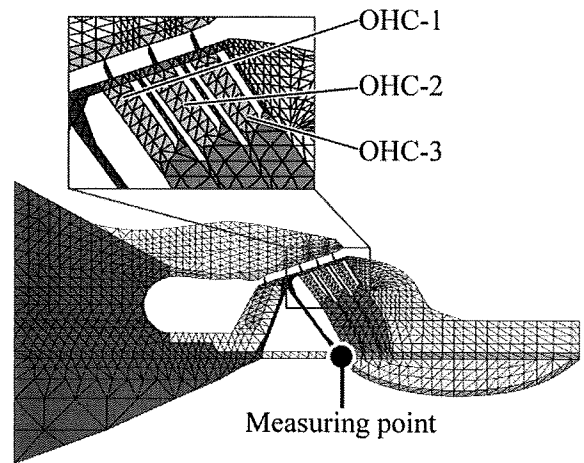


図1. コルチ器有限要素モデル。接点数、要素数はそれぞれ1,310, 2,251である。スケールバーは50 μm 。

B.2. コルチ器の振動の解析

コルチ器モデルにNewmark- β 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。音刺激に起因する駆動力は前庭階、および鼓室階のリンパ液モデルに正弦波状の圧力変動を加えることにより与えた。コルチ器モデルとリンパ液モデル間の境界において、それぞれのモデルより得られた圧力や速度を受け渡すことにより、リンパ液がコルチ器の振動に及ぼす影響を考慮した。

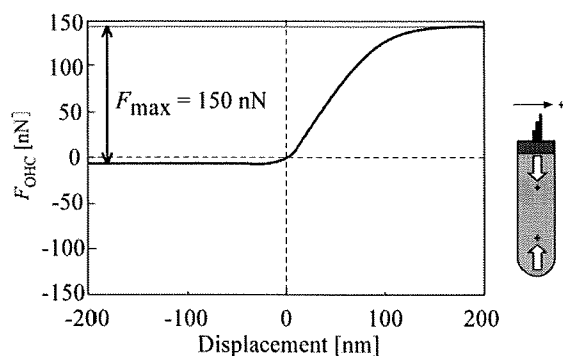


図 2. 聴毛の変位と OHC が発生する力の関係。聴毛が正の方向に屈曲すると、OHC は細胞が縮む方向に力を発生する。

C. 研究結果

図 3 に解析結果を示す。蝸牛中心側から蝸牛外側に向かって順に OHC の伸縮能を損なわせていくと、OHC-1 が伸縮能を失った際に正常時 28.0 dB であったゲインは 10.1 dB まで低下した (図 3(a))。続いて OHC-2, OHC-3 の伸縮能を失わせると、ゲインは、それぞれ 2.9 dB, 0 dB まで低下した。同様に、まず OHC-2 の伸縮能を損なわせた場合、ゲインは 7.6 dB まで低下した (図 3(b))。続いて OHC-3, OHC-1 の伸縮能を失わせると、ゲインはそれぞれ、0.2 dB, 0 dB まで低下した。さらに同様に、まず OHC-3 の伸縮能を損なわせた場合、ゲインは 4.7 dB まで低下した (図 3(c))。続いて OHC-2, OHC-1 の伸縮能を失わせると、ゲインはそれぞれ、0.2 dB, 0 dB まで低下した。これらの結果は、一列の OHC がその伸縮能を失うだけで、内耳の増幅機能が機能の大半が失われることを示している。

D. 考察

このような急激なゲインの低下の原因として次のようなメカニズムが考えられる。まず、3 列分あった伸縮能から 1 列分の伸縮能がなくなる

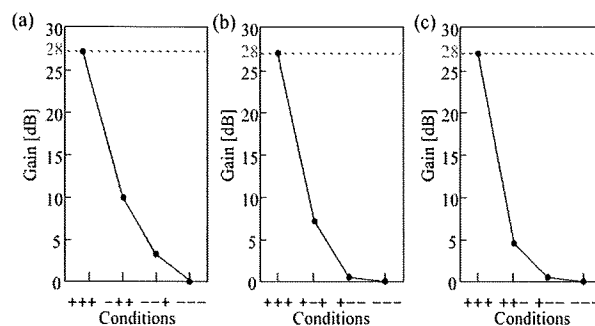


図 3. 基板変位の増幅度変化。+および-はそれぞれ伸縮能の有、無を示している。例えば、“+++”は OHC-1 から OHC-3 まで全てが伸縮能を有していることを示しており、“-++”は OHC-1 のみ伸縮能が無い状態を示している。

ことで、増幅に寄与していた OHC の力の総量が減少する。増幅に寄与する力が減少するためにコルチ器の振動振幅は小さくなり、その結果 OHC の聴毛の変位も小さくなる。OHC の伸縮能は聴毛の変位に伴って生じるため (図 2)、聴毛の変位の低下によって個々の OHC から発生する力も低下する。こうして、OHC の力はコルチ器の振動が定常状態になるまで低下し続ける。OHC-1 の伸縮能損失の場合、定常状態において、OHC-2 および OHC-3 から生じる力は正常時の 10.8% まで低下していた。このような流れから、図 3 に示すような急激なゲインの低下が生じたものと考えられる。

E. 結論

コルチ器の振動振幅は、OHC のいずれか 1 列が伸縮能を失うだけで 20 dB 程度減少する。すなわち蝸牛増幅機能の大半が失われる。したがって、人工感覚上皮適用患者 (従来の人工内耳適用者、90 dB HL 以上) においてはあまり詳細なフィッティングを考える必要はなく、蝸牛のどの位置においても、正常時における内毛細胞から聴神経への出力に相当する刺激を人工感覚上皮から出力すれば良いと考えられる。

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

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

圧電素子による内耳の機能評価法の確立と人工内耳電極手術手技の開発

研究分担者 熊川孝三 虎の門病院耳鼻咽喉科・聴覚センター 教授

研究要旨

圧電素子を入力として用い、頭蓋骨面から内耳の振動を励起することが出来るか否かを検討した。この圧電素子端子は、従来の電磁型端子に比べて、信号に対する追従性ではむしろ良く、さらに **1kHz** 以下では記録上不都合なアーチファクトの起電力が、電気的な刺激の場合よりも約 **30dB~40dB** 少ないという利点が認められた。さらに実際の **ABR**、**ASSR** 検査における反応確認できた。この圧電素子端子は **ASSR** のみならず、**ABR** などを始めとして、他覚的な聴覚検査で応用可能であり、小児の伝音難聴と感音難聴の鑑別診断を他覚的に可能にし、人工内耳の適応決定を小児でも可能にすることができた。

また、圧電素子振動によっても基底板を振動させうることが判明した。このことは、人工蝸牛による内耳の励起が可能であることを推測させた。

A. 目的

圧電素子を入力として用い、頭蓋骨面から内耳の振動を励起することが出来るか否かを検討した。

良く、さらに 1kHz 以下ではアーチファクトの起電力が約 **30dB~40dB** 少なかった。さらに実際の検査における有効性もアーチファクトの減少も確認できた。

B. 方法

磁力を使わない圧電素子による骨導端子 iX-80B を開発した（図1）。

前額面での骨導聴力検査と圧電素子を用いた ASSR 骨導検査とを同時に行いえた7例の解析結果、両者間に良い相関性が認められたことから、この圧電素子端子 iX-80B とそれを用いた骨導 ASSR 検査の有用性が結論付けられた。

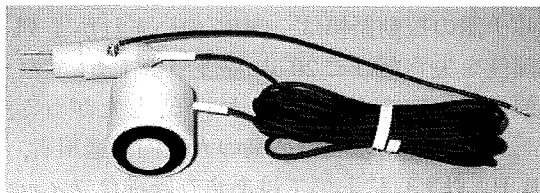


図1 圧電形骨導レシーバ iX-80B の外観図

これを実際の難聴症例7例に対して、適用した。方法は前額面での骨導聴力検査と圧電素子を用いた ASSR 骨導検査とを同時に行った。

C. 結果

圧電素子端子 iX-80B は、従来の電磁型端子に比べて、信号に対する追従性ではむしろ

D. 考察と結論

圧電素子端子 iX-80B は ASSR のみならず、ABR などを始めとして、他の骨導利用の聴覚検査でも応用可能であり、乳幼児期に伝音難聴と感音難聴の鑑別診断を他覚的に可能にしたという点で、その有用性はきわめて高いと考える。

また、圧電素子振動によっても内耳基底板を振動させうることが判明した。このことは、人工蝸牛による内耳の励起が可能であることを強く推測させた。

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 著書

熊川孝三:内耳手術—人工内耳によるコミュニケーション:1)成人の人工内耳の適応と術前準備 高齢者難聴のケア 財団法人長寿科学振興財団発行 pp81-87, 2009.

2. 原著論文

1)熊川孝三:内耳奇形の聴覚検査所見.
JOHNS 25:49-54, 2009.

2)熊川孝三, 武田英彦, 射場恵, 熊谷文愛:
聴性脳幹インプラントに必要な聴覚検査
JOHNS 24:807-812, 2008.

3)熊川孝三:乳幼児の人工内耳の適応と手術.
JOHNS 24:1428-1434, 2008.

3. 学会報告

1) Takeda H, Kumakawa K, Tanaka Y, Ashino S, Koyama Y. Pre-operative Electrophysiological evaluation in young cochlear implant candidates with cochlear nerve lesions.

12th Symposium on Cochlear Implants in Children 2009.6.17-20 Seattle, USA

2) Takatoshi Inaoka, Takayuki Nakagawa, Hirofumi Shintaku, Satoyuki Kawano, Shinpei Sato, Hitoshi Wada, Shinji Hamanishi, Yasuhiko Tabata, Kozo Kumakawa, Yasushi Naito, Juichi Ito.

A New Concept for Hair Cell Regeneration: Implantation of An Artificial Sensory Epithelium 33rd Association for Reserch in Otolaryngology Midwinter Meeting 2,6-10, 2009 Anaheim USA

3) 熊川孝三, 真岩智道, 鈴木久美子, 藤野睦子, 武田英彦, 阿部聡子, 熊川孝三, 中富浩文, 内藤 泰, 関要次郎, 小松崎篤:当院における聴性脳幹インプラント装用者の術後成績について.第 110 回日本耳鼻咽喉科学会 2009年5月14日~16日 東京

4) 伊藤壽一, 稲岡孝敏, 中川隆之, 坂本達則, 平海晴一, 内藤 泰, 熊川孝三, 和田 仁:人工感上皮(人工蝸牛)の開発—HIBIKIプロジェクト.第 110 回日本耳鼻咽喉科学会 2009年5月14日~16日 東京

5) 熊川孝三, 加藤 央, 河村さやか, 武田英彦, 射場 恵, 熊谷文愛, 太田昌孝, 館野誠:高音急墜型フィルタを介した日本語と英語文の聴取成績の比較—ハイブリッド型人工内耳の適応基準を考える— 第54回聴覚医学会 2009年10月22~23日 東京

6) 熊谷文愛, 射場恵, 河村さやか, 加藤 央, 武田英彦, 熊川孝三:聴性脳幹インプラント装用者の長期経過.第54回聴覚医学会 2009年10月22~23日 東京

7) 射場 恵, 熊谷文愛, 武田英彦, 熊川孝三:埋め込み型骨導補聴器(BAHA)と従来型補聴器との装用効果を比較しえた1例.第54回聴覚医学会 2009年10月22~23日 東京

8) 岩崎 聡, 喜多村 健, 福田 諭, 小林俊光, 熊川孝三, 宇佐美 真一, 土井勝美, 西崎和則, 暁 清文, 東野哲也. 本邦における埋め込み型骨導補聴器(Bone-Anchored Hearing Aid:BAHA) 治験—補聴器との比較について—第 54 回聴覚医学会 2009年10月22~23日 東京

9) 工 穰, 宇佐美 真一, 岩崎 聡, 喜多村 健, 福田 諭, 小林俊光, 熊川孝三, 土井勝美, 西崎和則, 暁 清文, 東野哲也 本邦における埋め込み型骨導補聴器(Bone-Anchored Hearing Aid:BAHA) 治験—片側聾への評価について— 第54回聴覚医学会 2009年10月22~23日 東京

4. 講演・シンポジウム・パネル

1) Kozo kumakawa:① Surgery and Speech performance of auditory brainstem implant. ②Linguistic issues in candidacy criteria of hybrid cochlear implant Forum on current otology and auditory implant at Gaungzhou (広州) 2009年9月21日 中国 広州

2) 熊川孝三:次世代人工内耳と日本語音声 第54回日本音言語医学会セミナー 2009年10月15日 福島

3) 熊川孝三:人工内耳の進歩と聴性脳幹インプラントの現状 第34回日本耳鼻咽喉科医会臨床家フォーラム2009 2009年9月5日 横浜

4) 熊川孝三:補聴器に関する最近の研究—高音漸傾型難聴の補聴.平成 21 年度日耳鼻長野県地方部会信州大学医学部付属病院 大会議室 2009年12月20日 松本市

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	頁	出版社名	出版地	出版年
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	ヘルスケアとバイオ 医療のための先端 デバイス機器	326 -335	CMC 出版	東京	2009
和田 仁	Biomechanics at Micro- and Nanoscale Levels	公開シンポジウム 「マイクロ・ナノバイ オメカニクスの開拓」 講演収録集		丸善	東京	2009
Murakoshi M, Wada H.	Atomic force microscopy in studies of the cochlea.	Molecular Protocols in Auditory Research: Methods and Protocols	401 -413	Humana Press	Totowa	2009
Wada H. Murakoshi M, Iida K, Kumano S.	Topological characterization by atomic force microscopy of prestin in the plasma membrane of prestin-transfected Chinese hamster ovary cells using quantum dots.	Concepts and Challenges in The Biophysics of Hearing	391 -392	World Scientific Publishing	Hackensack	2009
Kumano S, Iida K, Murakoshi M, Wada H.	Increase in the activity by mutations of the motor protein prestin.	Concepts and Challenges in The Biophysics of Hearing	405 -406	World Scientific Publishing	Hackensack,	2009
Iida K, Murakoshi M, Kumano S, Wada H.	Assessment of the activity of purified prestin and the effect of salicylate on prestin-chloride binding studied by isothermal titration calorimetry.	Concepts and Challenges in The Biophysics of Hearing	403 -405	World Scientific Publishing	Hackensack,	2009
Wada H, Murakoshi M, Iida K, Kumano S, Ishihara K.	Inner ear biomechanics.	Nano-biomedical engineering 2009	29-40	World Scientific Publishing	Hackensack,	2009
熊川 孝三	内耳手術—人工内 耳によるコミュニ ケーション: 1) 成 人の人工内耳の適 応と術前準備	高齢者難聴のケア	81-87	財団法人長寿 科学振興財団		2009

論文

著者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	頁	出版年
Shintaku H, Nakagawa T, Kitagawa D, TANUJAYA H, Kawano S, Ito J	Development of Piezoelectric Acoustic sensor with frequency selectivity for artificial cochlea.	Sensors and Actuators A: Physical	158	183 -192	2010
Ogita H, Nakagawa T, Sakamoto T, Inaoka T, Ito J.	Transplantation of bone marrow-derived neurospheres into guinea pig cochlea.	Laryngoscope	120	576 -581	2010
Shintaku H, Tateno T, Tsuchioka N, TANUJAYA H, Nakagawa T, Ito J, Kawano S	Culture Neuron on MEMS Fabricated P(VDF-TrFE) Films for Implantable Artificial Cochlea.	J Biomechanical Sciences & Engineering	5(3)	229 -235	2010
熊川 孝三	内耳奇形の聴覚検査所見	JOHNS	25	49 -54	2009
Murakoshi M, Iida K, Kumano S, Wada H.	Immune atomic force microscopy of prestin-transfected CHO cells using quantum dots.	Pflugers Archiv	457	885 -898	2009
Kumano S, Tan X, He DZZ, Iida K, Murakoshi M, Wada H.	Mutation-induced reinforcement of prestin-expressing cells.	Biochem Biophys Res Commun	389	569 -574	2009