

## 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 年度総合研究報告書

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 年度総合研究報告書

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. 総合研究報告

- 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

- 表面加工による人工感覚上皮固定法開発・・・・・・・・・・・・・・・・ 19  
田畑 泰彦

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・ 22

## IV. 研究成果の刊行物・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 26

## 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

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。

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) 技術を応用した人工感覚上皮のプロトタイプを作製し、その特性評価を行った。圧電材料である PolyVinylidene DiFluoride (PVDF) に超微小電極を多数形成し、台形状の溝を有する基板に固定して試作デバイスを構築し、周波数弁別特性および振動-電圧変換特性について系統的に計測した。また、試作デバイスの数値設計を行うために、流体-構造連成解析を可能とする数値スキームを Helmholtz 方程式に基づいて開発した。

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底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。

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、モルモット蝸牛頂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。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解析した。

平成 20 年度には、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。

平成 21 年度には、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

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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  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。

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  $\mu\text{m}$ ）をモルモット蝸牛基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。

#### 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、移植細胞開発を行った。同時に、マウス胚性幹細胞（ES細胞）由来神経細胞を移植細胞とし、より低侵襲な細胞移植技術開発および細胞移植の有効性の評価系確立に関する実験を行った。

平成19年度には、モルモット大腿骨から採取した骨髄液から、間葉系細胞を分離培養し、神経分化誘導実験を行い、移植実験に必要な細胞数を確保するために至適培養法の検索を行った。また、モルモットの種々の部位から脂肪組織から間葉系細胞を分離培養し、分化誘導実験を行った。

平成20年度には、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。

平成21年度には、ラセン神経節変性モデルを用いた機能回復に関する解析を行った。

#### 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。

平成19年度には、ヒト側頭骨標本を用い、蝸牛開窓部位と蝸牛基板の視認性に関する検討を行った。さらに、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、圧電素子を蝸牛外に装着した場合の基板振動の惹起について調べる目的で、骨導聴力検査における端子を圧電素子とした場合の刺激伝導の有効性、周波数特性について解析した。

平成20年度には、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底  
板鼓室階側の組織学的解析を行った。

平成 21 年度には、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  
ビーム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

平成 19 年度には、MEMS 技術を応用した人  
工感覚上皮のプロトタイプを作製した。電極  
数は数千レベルまで増加可能であるが、解析  
目的に既存の人工内耳電極と同等の 2 4 電  
極のプロトタイプとした。基板に相当する部  
分は、実際の蝸牛基板と同様に頂回転部で  
幅が広く、基底部で狭い仕様とした。音響暴  
露により得られる周波数特性と出力を計測  
した結果、7 - 12 kHz での周波数特性が確  
認され、2  $\mu$  V 前後の出力が各電極から計測  
できた。

平成 20 年度には、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  
できることが分かった。

平成 21 年度には、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

平成 19 年度には、コルチ器振動の数値解析モデルについては、実際のモルモット蝸牛頂回転部で計測されたコルチ器振動特性を再現する数値解析モデルであることが確認された。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について、PVDF 膜の厚みを 9-80  $\mu\text{m}$  に変化させてシミュレーション解析を行った。PVDF 膜の接着により、コルチ器振動は著明に減少することが分かった。最も薄い PVDF 膜のシミュレーションでも  $10^6$  分の 1 程度に感度が低下することが明らかとなった。しかし、本解析モデルは頂回転でのシミュレーションモデルであるので、基底回転では感度の減衰程度は、 $10^3$  分の 1 程度になると予想され、人工感覚上皮での電気出力特性の工夫により補正可能な範囲と考えられた。

平成 20 年度には、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性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。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。

平成 21 年度には、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、正常時における内有毛細胞

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た。

### 3) 表面加工による人工感覚上皮固定法開発

平成 19 年度に用いた方法では、1×2cm の金属薄膜表面に 25 $\mu$ g のコラーゲンが結合していることが放射線量測定から明らかとなった。このコラーゲン量は、金属薄膜上で一般的な細胞培養が可能なレベルであり、細胞および生体に対する一定の親和性が獲得できたと考えられる。

平成 20 年度の解析からは、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  $^{125}\text{I}$  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、アルカンチオールの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。

平成 21 年度には、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

平成 19 年度の解析から、モルモット骨髄由来間葉系細胞培養実験では、細胞内ノッチリガンド遺伝子導入後に段階的に神経栄養因子存在下で培養する方法で神経前駆細胞が得られることが判明した。また、遺伝子操作を行わない一般的な神経誘導方法でも、形態学的に完全に神経に分化した細胞を得ることができたが、誘導の効率は必ずしも高くなく、移植細胞供給の方法としては若干の問題があると考えられた。モルモット脂肪組織由来間葉系細胞培養実験では、脂肪組織採取部位により多分化能を持つ細胞の比率が大きく、鼠径部から得られる脂肪組織が理想的であることが判明した。

ES 細胞由来神経細胞を用いた移植手技のさらなる低侵襲化を目的とした実験では、細胞移植にプレーを用いて作製したガラスマイクロピペットを用いて、ローゼンタール

管に直接的に細胞を注入する方法について組織学的に評価した。結果、これまで用いていた 31 ゲージ針を用いる方法と同様に蝸牛軸内に細胞を導入することが分かった。さらに、この方法の手術侵襲を調べるために、細胞の代わりに生理食塩水を注入し、電気刺激聴性脳幹反応にて機能評価を行ったところ、明らかな閾値低下およびラセン神経節細胞減少は誘導されないことが判明した。

平成 20 年度には、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。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。

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。

平成 21 年度には、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

平成 19 年度のヒト側頭骨を用いた蝸牛基底板の視認性に関する検討では、蝸牛の基底板を顕微鏡下に見るためには、これまでのソフトサージェリーのように正円窓膜から入れるのではなく、フックポジションを過ぎた基底回転上に開窓することが最適であることが分かった。その部位は解剖学的には、正円窓膜の高さで、キヌタ・アブミ関節から 2 mm 下方に相当する部位であることが明らかとなった。また、人工内耳手術に際しての観察では、蝸牛基底回転にスキータードリルを用いて開窓することにより、蝸牛基底板を明視下におけることが確認された。また、圧電素子を用いた骨導刺激では、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 少ないという利点認められた。したがって、さらに実際の ABR、ASSR 検査における反応確認できた。したがって、圧電素子振動によっても基底板を振動させうる事が判明した。

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なった。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なった。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。

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。

平成 21 年度のヒト側頭骨解析から、あら

はじめ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

本研究では、蝸牛基底板に振動刺激として伝えられる音刺激を有毛細胞の代わりに圧電素子膜で電気信号に変換することにより、聴覚を再獲得する既存の人工内耳とは全く異なる聴覚デバイスを開発することを第一の目的とした。われわれは、この圧電素子膜を人工感覚上皮と名付け、生物学的な有毛細胞再生に変わるテクノロジーの進歩を応用した新しい有毛細胞再生研究と位置づけた。人工感覚上皮開発には、マイクロおよびナノスケールの技術を駆使しなければならないが、このような開発過程で多くの新規技術が開発されることが期待でき、人工感覚上皮の開発だけでなく、新しい人工内耳電極の開発や新電極の蝸牛内固定方法、新しいデバイスを蝸牛に挿入する手術手技もデバイス開発に伴い進捗されることが期待された。本研究では、再生医学融合との観点から、自己細胞由来の細胞移植によるラセン神経節再生研

究を行った。ラセン神経節は、既存の人工内耳だけではなく、本研究で開発する人工感覚上皮においても聴覚獲得に不可欠の細胞といえる。したがって、蝸牛にラセン神経節が存在することが聴覚再生の必要条件となる。また、単にラセン神経節細胞を再生するだけではなく、残存しているラセン神経節細胞と人工感覚上皮デバイスの間を効率よくつなぐ役割を果たす神経細胞を蝸牛内に誘導することにも応用できることから、細胞治療を含めた遺伝子治療などの生物学的な治療技術開発も、人工感覚上皮による聴力獲得に貢献する可能性がある。また、圧電素子膜は、蝸牛基底板振動をとらえ、歪むことにより電力を発生する。したがって、詳細な蝸牛基底板解析と圧電素子膜が蝸牛基底板に装着された状態をシミュレートし、圧電素子膜に求められる物理的なスペックを明らかにすることも重要な意義を持つ。このような幅広い観点から、人工感覚上皮開発を行い、実用可能な人工感覚上皮を開発するだけでなく、蝸牛メカニクス解析や既存の人工内耳治療の進歩につながる知見をえることが、本研究課題の目的といえることができる。

本研究課題の中心となる課題は、音響刺激を電気信号に変換する、すなわち、蝸牛有毛細胞、特に内有毛細胞が生体で担っている機能を再現する圧電素子デバイスの開発にある。われわれは、まず体外での機能評価を想定したプロトタイプデバイスを作製した。このデバイスは、既存の人工内耳電極と同じ24電極を有し、圧電素子膜の幅を変えることにより周波数特性を持たせることに留意した。圧電素子として、PolyVinylidene DiFluoride (PVDF) を用いた。作製したデバ

イスは空気中で7 - 12 kHzの周波数特性をもち、各電極から2  $\mu$  V前後の出力が記録された。多くの感音難聴が高音障害が中心であること、人工感覚上皮をまず挿入する部位が基底回転と想定されていることを考えると、周波数特性は悪くないが、出力不足が懸念された。しかし、蝸牛内は液体で満たされているため、空気中とは振動特性が変わる。このため、われわれは、シリコン液層中での振動特性を解析した。結果、やや周波数特性は低音に向かい、ほぼヒトの会話音域を反映するものとなった。

小型デバイスを開発し、動物蝸牛内に挿入、固定し、その特性を評価することが、究極的な目標であるが、生体蝸牛基板振動解析は、技術的に難しく、多くの時間を要することから、コンピューターシミュレーションで解析できる数値モデルを構築し、デバイスに求められる条件を絞り込んで、デバイスを開発することが必要となる。そこで、われわれは、実際のモルモット蝸牛頂回転部および基底回転部で計測されたコルチ器振動特性を再現する数値解析モデルを構築し、完全に圧電素子膜が基板の鼓室階側に接着された状態を想定して、デバイス挿入後の基板振動を解析した。この解析結果から、本来蝸牛が有する振動特性を損なわず、しかも適切に圧電素子膜が歪むためには、厚さ650 nmの圧電素子膜を用いる必要があることが示唆された。しかしながら、外有毛細胞が障害されている感音難聴モデルを数値解析したところ、たとえ一つの外有毛細胞が喪失しているだけでも、基板振幅増幅機構は、ほとんど損なわれていることが分かった。したがって、数値モデル解析からえられた結論は、デバイ

ス接着による蝸牛基板振動への影響を考慮するよりも、音響刺激によりえられる圧電素子の歪みが生み出す電力が内有毛細胞と等価か否かにあるということであった。

この結果から、比較的製作が容易な厚さ4  $\mu$ mの圧電素子膜を持つデバイスと厚さ650 nmの圧電素子膜デバイスの作製を試みた。双方のデバイスともにモルモット蝸牛基底回転への埋め込みに適したデザインとした。4  $\mu$ mの圧電素子膜デバイスでは、有効と考えられる起電力がえられたが、650 nmの圧電素子膜デバイスでは、圧電素子膜の脆弱性の関係から十分な出力をえることができなかった。そこで、4  $\mu$ mの圧電素子膜デバイスを用いて、モルモット蝸牛への埋め込み実験を行うこととした。

上記の実験と並行して、デバイスをモルモットおよびヒト蝸牛基底回転に埋め込むための手術手技および圧電素子膜の修飾についての研究を行った。手術手技に関しては、モルモット、ヒトともに実用的な手術方法が開発できた。圧電素子膜の修飾については、当初蝸牛基板鼓室階への接着を想定し、蝸牛基板鼓室階の組織学的解析、デバイス表面も加工技術開発を組織工学的見地から行った。結果、接着の対象となるのは、細胞膜であり、組織工学的手法でタンパクへの接着性を高める方法を開発することができた。

4  $\mu$ mの圧電素子膜デバイスのモルモット蝸牛への埋め込み実験では、まず基板に接着させず、近接させ、デバイスと基板の間が外リンパで満たされている状態で、外耳道に与えられた音響刺激が圧電素子デバイスの歪みを誘導できるかを調べた。結果、接着させなくても、音響刺激で電力を発揮するの

に十分な圧電素子の歪みが誘導できることが分かった。この結果に基づき、前項に記載した圧電素子膜の表面コーティング技術開発は、一旦中断した。

次に、音響刺激に対応して圧電素子からえられる電力が聴性脳幹反応を誘導できるか否かを完全に聾としたモルモットを用いて解析した。結果、小型アンプによる起電力の増幅は必要であったが、聴性脳幹反応を記録することができた。これら一連の結果は、われわれが想起した圧電素子デバイスは、音響刺激を電気刺激に変換し、聴覚再生する潜在能力をもつものであることが明らかとなった。今後、デバイス起電力の増強、あるいは、デバイス出力を適切に増幅できる埋め込み型アンプを開発することにより、実用的なデバイスに発展させることが期待できることが分かった。

自己由来細胞を用いたラセン神経節再生に関する研究では、2つの自己由来細胞を用いたが、同じ間葉系細胞でも神経細胞への分化誘導に関しては、誘導効率に差があることが判明した。脂肪組織由来間葉系細胞は、材料となる組織の採取が容易であり、臨床応用が行いやすく、有力な細胞ソースと考えられたが、神経細胞への分化誘導は困難であった。一方、骨髄由来間葉系細胞は、神経方向への分化誘導が容易であり、神経細胞再生に関しては、有力なツールとなりうることが確認できた。モルモットへの移植実験では、蝸牛内に移植細胞由来神経細胞を誘導することができたが、機能的再生は認められなかった。したがって、ラセン神経節の機能的再生実現のためには、移植後神経細胞として生着する細胞数の増加、あるいは、移植細胞由来神経

細胞からの神経突起伸長誘導などの付加的な処置が必要ではないかと考えられた。また、自己由来細胞として、iPS細胞の使用も視野に入れるべきではないかと考えられた。しかし、本研究の成果は、自己由来細胞由来神経細胞を蝸牛内に誘導する事には、成功しており、今後、圧電素子膜デバイスからラセン神経節への至適刺激誘導方法として、細胞移植が応用できるのではないかとということが示唆されたということができる。

## 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として、新規完全埋め込み型聴覚デバイスの開発を行った。圧電素子膜にて、聴覚再生が可能であることを示唆する所見がえられた。また、蝸牛基板振動の数値モデル解析方法を開発し、外有毛細胞喪失の蝸牛基板振動に与える影響を明らかにすることができた。また、自己由来細胞を用いたラセン神経節再生に骨髄由来間葉系細胞を用いることができる可能性が提示された。臨床応用を考慮したヒト側頭骨を用いた解析では、実用的な手術手技を開発することができた。これらの研究成果は、圧電素子膜を用いた新規聴覚デバイス開発のみならず、新しい治療法、また、その評価方法など聴覚医学に貢献する新規知見をもたらすものであり、有意義なものと結論づけることができる。

## 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

### 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 bone marrow-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.
  7. 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.
  8. Nakagawa T, Ito J. Local drug delivery to inner ear for treatment of hearing loss. *Current Drug Therapy* 3: 143-147, 2008.
2. 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 26-29,2009.
  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、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
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) 治療—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) 治療—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. 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
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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リング. 第 19 回日本耳科学会総会・学術講演会, 東京, 2009 年 10 月 9 日.
29. 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ティンの可視化. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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ティ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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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
39. 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
40. 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
41. 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
42. 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)
43. 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
44. 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
45. 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).