

率(10~30 GPa程度)を考慮して決定した。人工感覚上皮のヤング率は5 MPaとした。

5.3 解析結果及び考察

基板振幅比の周波数変化を Fig. 8 に示す。全体として、入力周波数が低くなるほど基板振幅の減少量が大きくなる傾向がみられた。また、蝸牛窓膜の剛性が高まるにつれ、膜を完全に固定した状態の傾向に近づいていくことがわかる。蝸牛窓が完全に固定された場合、最大の振幅低下量は500 Hzにおいて40 dBとなり、基板振動が最も抑制されることがわかった。以上より、人工感覚上皮挿入時には、蝸牛窓膜の可動性を確保することが重要であることが推察された。

6. まとめ

本報告では、人工感覚上皮の鼓室階への挿入が基板振動に与える影響を検証するため、有限要素法により人工感覚上皮挿入を想定した内耳モデルを構築し、解析を行った。解析結果により、以下のような知見が得られた。

- (1) 鼓室階中における挿入位置の違いによって基板の振幅値には顕著な差はみられないものの、特徴周波数位置の変化には差が生じる。
- (2) 人工感覚上皮の剛性は低い方が、基板の振動に与える影響が小さい。
- (3) 人工感覚上皮挿入時には、蝸牛窓膜の可動性を確保することが重要である。

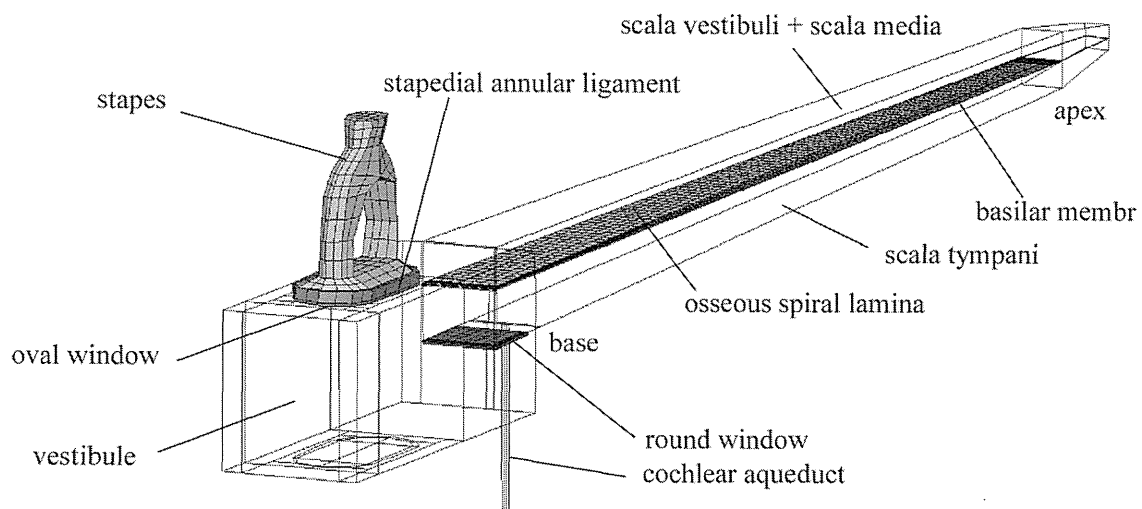


Fig. 1 蝸牛の有限要素モデル

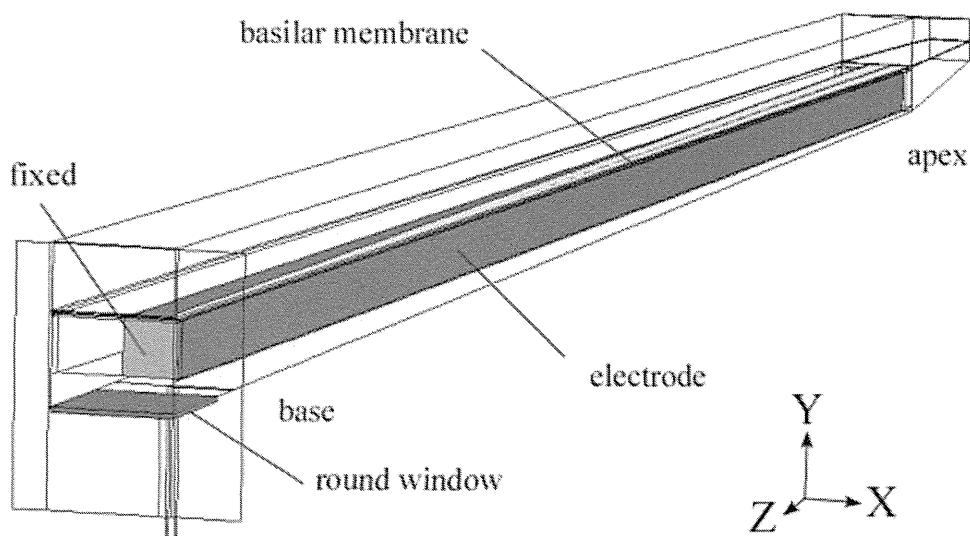


Fig. 2 鼓室階に挿入した人工感覚上皮モデル

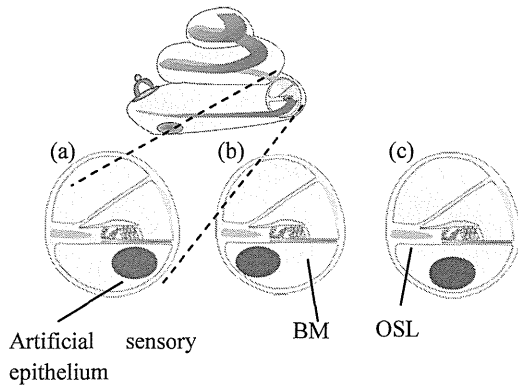


Fig. 3 人工感覚上皮挿入位置
 (a) 基底板直下；(b) 骨ラセン板直下；(c) 鼓室階下方

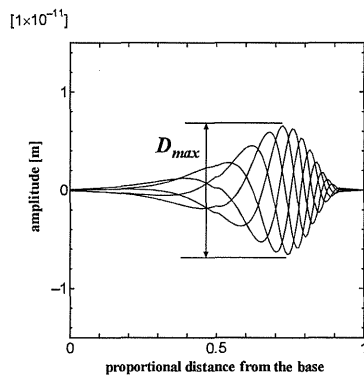


Fig. 4 基底板振動の時間変化

各線は時間ステップごとの基底板の変位を示す。基底板上には進行波が発生していることがわかる。

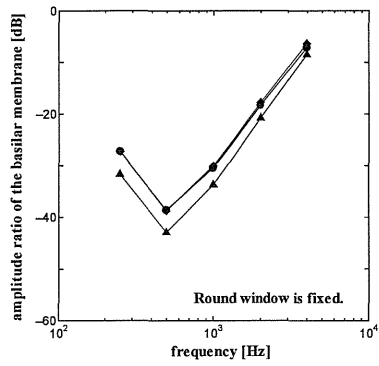


Fig. 5 正常時に対する人工感覚上皮挿入時の基底板最大振幅比変化

▲, 基底板直下 ; ◆, 骨ラセン板下 ; ●, 鼓室階下部

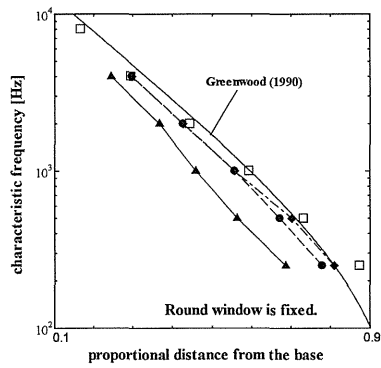


Fig. 6 基底板特徴周波数分布の変化

▲, 基底板直下 ; ◆, 骨ラセン板下 ; ●, 鼓室階下部 ; □, 正常蝸牛 ; 実線は Greenwood による計測結果

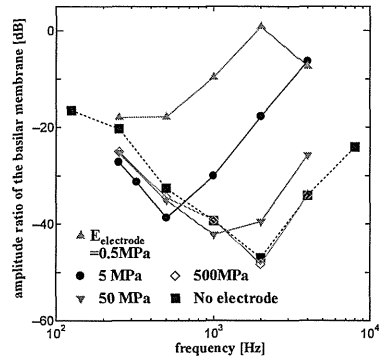


Fig. 7 人工感覚上皮の剛性を変化させた場合の基板最大振幅比変化

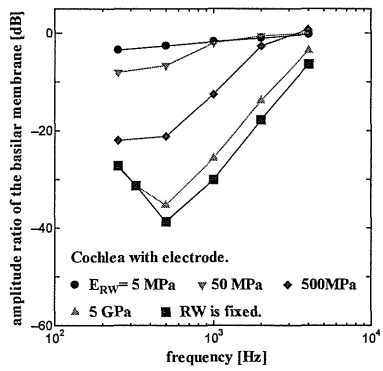


Fig. 8 蝸牛窓膜の剛性を変化させた場合の基板最大振幅比変化

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（感覚器障害分野））
分担研究報告書

MEMS/NEMS 技術を用いた人工感覚上皮の開発に関する研究
－ 有限要素法による振動梁の周波数応答解析 －

研究分担者 川野 聡恭 大阪大学基礎工学研究科

研究要旨：本分担研究では、内有毛細胞および基底膜の機能を代替する人工感覚上皮を開発し、新奇な埋め込み型聴覚システムを創製することが目的である。昨年度は、これまでに開発した人工感覚上皮（BAM）の周波数弁別能の広帯域化を目指し、膜厚の異なる微小振動梁を大量かつ精度良く製造する微細加工プロセス技術を開発した。その結果、膜厚変化の効果により、試作した微小振動梁アレイの周波数帯域が従来のBAMよりも約11.4倍に増大していることを明らかにした。ここでは、新型のLadder-like BAMの設計指針を得るために、レーザによる振動計測実験と流体一構造連成振動の数値解析を行い、理論並びに実験の両面から、振動梁アレイの共振特性を詳細に吟味した。

A. 研究目的

厚み変化を有する振動梁アレイ⁽¹⁾の振動特性を議論する際に、振動梁の共振周波数の理論値の算出には梁の曲げ振動理論を用いてきた。その結果、実験値と理論値の間には、図1に示すように差異が生じており、その原因を、製造過程で生じる残留応力の影響や材料の架橋密度の変化による機械的特性の変化と考えた。つまり、これまでは、製作したデバイスの特性に着目して理論値と実験値の差異について議論してきた。

しかし、理論値を算出する際には、梁の曲げ振動を仮定している。そのため、実際の形状において、梁が長くかつ幅に対して厚みが小さいものにおいては板のような振動挙動を示す可能性があることや、幅に対して厚みが大きい構造を有しているものにおいては、曲げ振動をしていない可能性も考えられる。そこで、各梁の周波数応答解析を、ANSYSを用いて有限要素解析により実施した。

B. 研究手法

本報告書で取り扱うLadder-like BAM（機械構造的には厚みの異なる振動梁アレイ）

の性状および各振動梁への付与番号は昨年度報告書と同一であるからここでは省略する。

解析を行う上で、各梁における要素数がおおよそ 2000 個から 3000 個になるようにメッシュを設定した。また、解析する周波数の間隔は 100 Hz とし、外力には、実験条件と同等とするために、正弦波状の 80 dB SPL (=0.2 Pa) の圧力を付加した。11.7 kHz における応答の様子を図 2 に示す。ここで、梁の変位の様子は、変化を観察しやすくするために実際の縮尺の 2000 倍で表す。

各梁において取得した共振周波数を図 1 に示す。曲げ振動の理論値と比較すると、No. 23 から No. 64 までは概ね一致している。しかし、No. 1 から No. 22 においては、曲げ理論における結果と有限要素法による結果の間に差が生じている。これは、曲げ理論においては、長さに対して厚みが小さく、梁のせん断変形を無視するというベルヌーイ・オイラーの仮定に基づいているが、長さに対して厚みが大きくなるとせん断変形が無視できなくなりチモシェンコ梁となることが原因である。一般的に、チモシェンコ梁はオイラー梁よりも共振周波数は低下することが知られている⁽²⁾。したがって、本解析により得られた結果から No. 1 から No. 22 においてはチモシェンコ梁、No. 23 から No. 64 においてはオイラー梁であることがわかる。

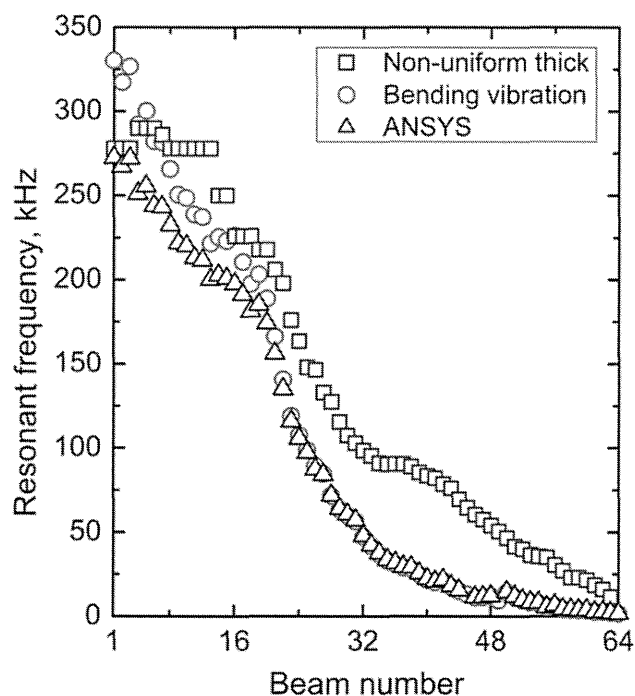


Fig.1 Comparison of theoretical values from bending theory with results from finite element method

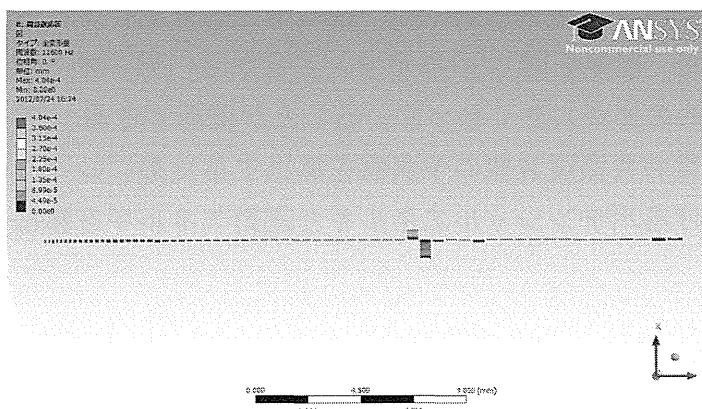
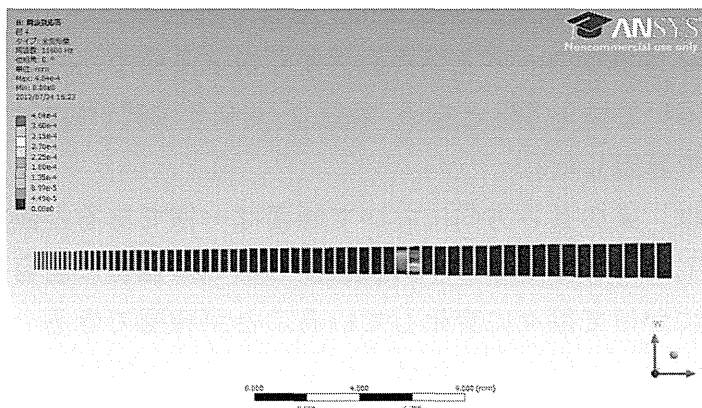
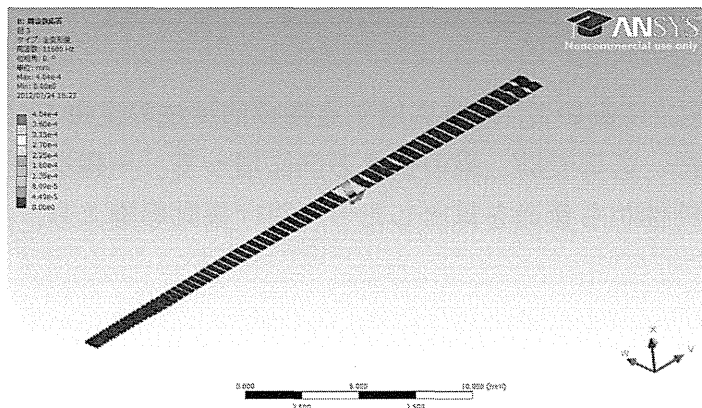


Fig.2 Frequency response of ladder-like BAM at 11.7 kHz from

(a) over view (b) top view and (c) side view

C. 機械的特性の評価

これまでの研究⁽¹⁾において、厚みに対する機械的特性の変化を、微小カンチレバーを用いて評価した。ここでは、梁の長さ方向に沿って、一様な矩形断面をもつ梁として、その振動特性から音速を算出した⁽³⁾。曲げ振動理論より、共振周波数の理論値は

$$f_r = \frac{\alpha^2 h}{4\sqrt{3}\pi L^2} \sqrt{\frac{E}{\rho}} \quad (1)$$

で示される。ここで、 E 、 h 、 L および ρ は、それぞれ梁のヤング率、厚み、長さおよび密度である。 α は振動モードと境界条件から決まる値であり、一次モード振動のカンチレバーにおいては1.875となる。音速 $(E/\rho)0.5$ は式(1)に計測した共振周波数を代入することで算出した。

以上においては、梁の長さ方向において断面は一様であると仮定して議論した。しかし、図3(a)に示すカンチレバーの側面からのSEM画像に着目すると、厚みが自由端から固定端にかけて徐々に変化していることが確認できる。つまり、長さ方向において断面が変化している。これは、カンチレバーを製作する際のグレイスケールマスクの透過率が変化していることに起因している。したがって、機械的特性を評価する際には、変断面のカンチレバーとして扱わなければならない。そこで、長さ方向の厚み分布を得るために、図3(b)に示す自由端側で測定した厚みと透過率の関係を用いた。この結果を指数近似し、透過率を代入することにより長さ方向の厚み分布を算出した。結果を図3(c)に示す。ここから、梁が厚くなるにつれて、自由端と固定端の厚みの比が大きくなっていることが確認できる。

次に、変断面梁の共振周波数の予測値を算出するためにレイリー法を用いた。梁の曲げ振動におけるポテンシャルエネルギーと運動エネルギーを算出し、レイリー法に基づき、

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{\frac{1}{2} \int_0^L EI(x) \left(\frac{\partial^2 y}{\partial x^2} \right)^2 dx}{\frac{1}{2} \int_0^L \rho A(x) y^2 dx}} \quad (2)$$

より，共振周波数を算出した．ここで， $A(x)$ および $I(x)$ は位置 x の関数である断面積および断面二次モーメントである．また，厚み変化 $h(x)$ は，図 3(c) の結果を $h(x) = C_7 + D_7 x$ の形で線型近似した．下付き文字 i は梁番号を示す．さらに，近似ひずみ曲線は

$$y = y_0 \left(1 - \frac{x}{L} \right)^2 \quad 0 \leq x \leq L \quad (3)$$

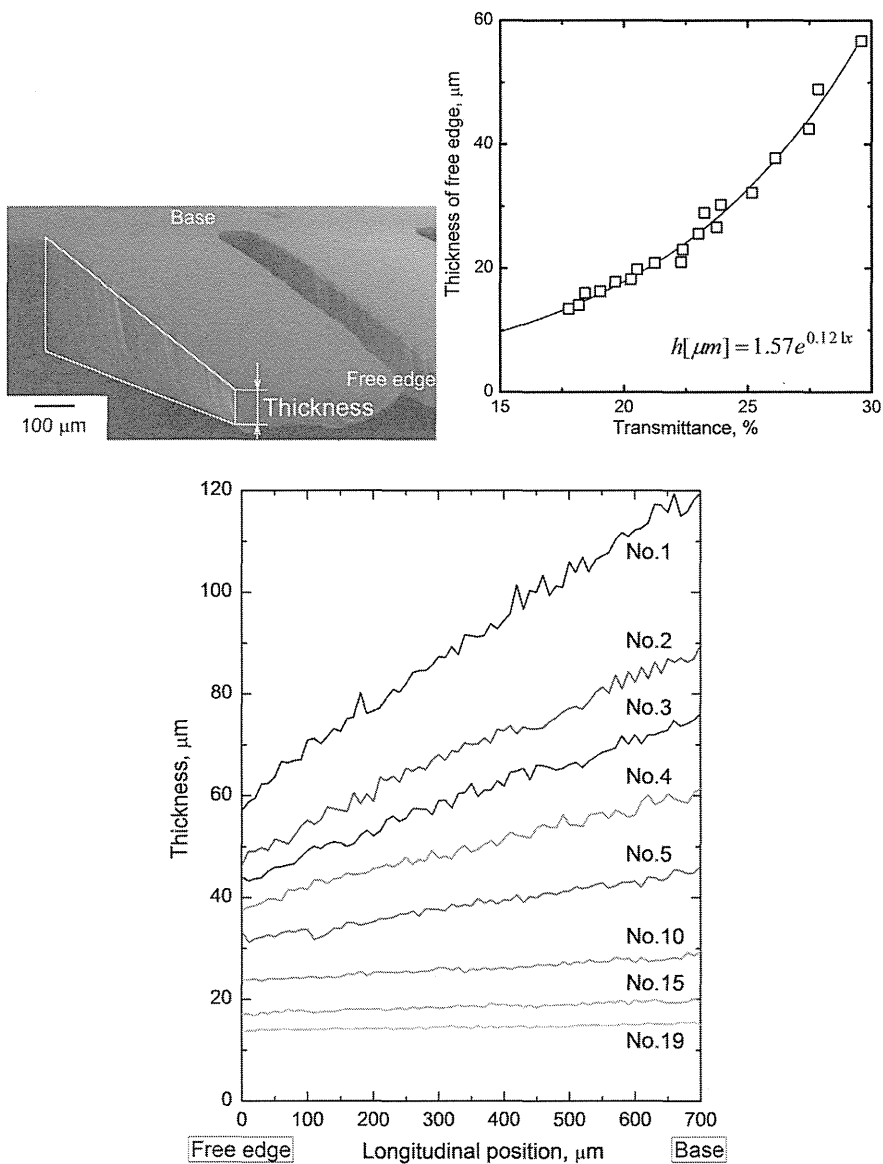


Fig. 3 (a) SEM image from side view, (b) relationship between transmittance and thickness at the free edge and (c) thickness variation along the beam length とした. ここで, y_0 は自由端の最大振幅である. 以上より, 変断面を考慮したカンチレバーの共振周波数は,

$$f_i = \frac{1}{2\pi L} \sqrt{\frac{E}{\rho} \cdot \frac{5\{C_i^3 + C_i^2(C_i + D_i L) + C_i(C_i + D_i L)^2 + D_i^3\}}{2(6C_i + D_i L)}} \quad (4)$$

により, 算出することができる. 図4において, 式(4)により求めた予測値を○で示す. ここでは, 一様断面の曲げ振動理論により求めた理論値よりも断面変形を考慮した予測値のほうが, 実験値に対し, 良い予測値を与えることが確認できる.

ここで, 以上で用いたレイリー法の妥当性を示すために, ANSYS を用いて FEM 解析により, 変断面梁のモード解析を実施した. 図4からわかるように, レイリー法で求めた値と FEM 解析により求めた値は概ね一致している. ここで, 一様断面における理論値と FEM 解析による結果は一致している. このことから, レイリー法で求めた値と理論値の間に顕著な差は生じておらず, レイリー法による近似解は妥当であるといえる.

式(4)より, 計測した共振周波数を代入することで音速を算出することができる. 図5に音速と厚みの関係を示す. 図5より, 一様断面のカンチレバーとして評価した音速は, 厚みが約 30 mm までは増加し, その後, ある値に収束する傾向がある. しかし, SU-8 の密度を 1153 kg/m^3 で一定とし, ヤング率を 2.5 GPa ⁽⁴⁾, 4.0 GPa ⁽⁵⁾ および 5.4 GPa ⁽⁶⁾ として算出した音速の文献値とは約 2 倍の差が生じている. 一方で, 変断面のカンチレバーの音速は, ヤング率が 4.0 GPa および 5.4 GPa における文献値に近い値をとる. しかし, 厚みに対する音速の変化の幅は, 一様断面とした時よりも小さくなっている. 以上より, 梁の振動特性を評価する際には, 梁の形状が重要な因子の 1

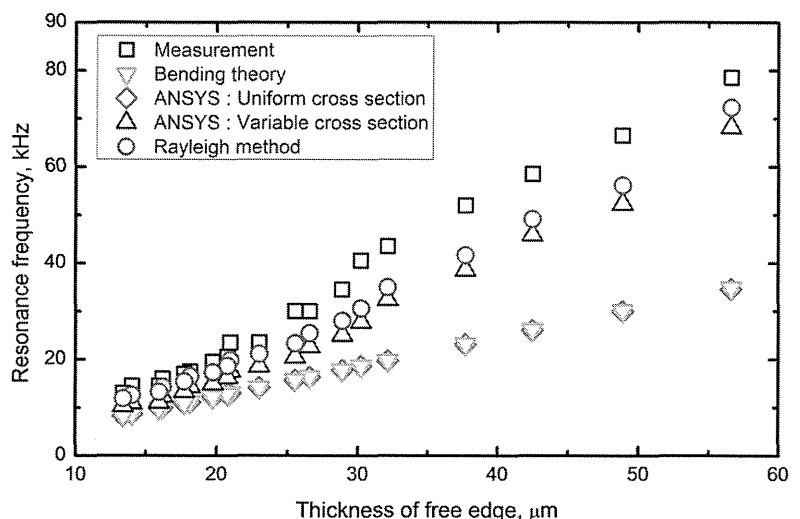


Fig. 4 Resonance frequency of beams with uniform cross section and variable cross section

つであるといえる。

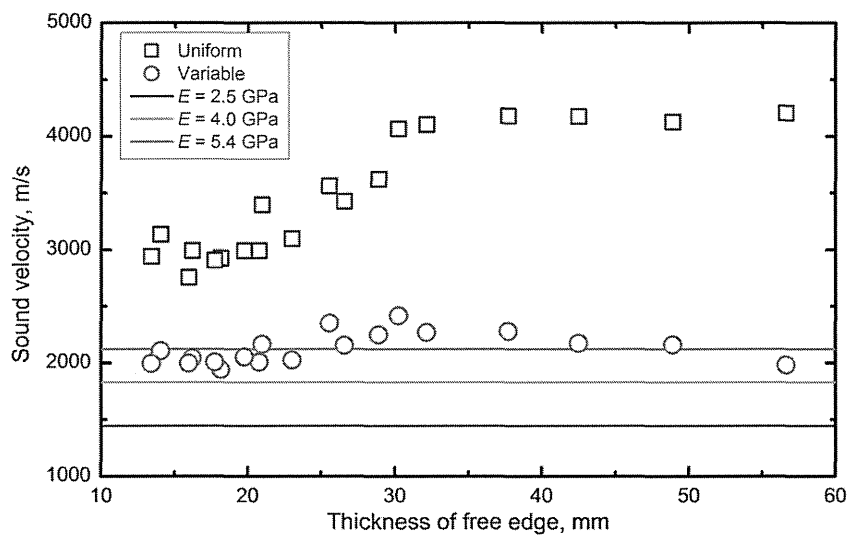


Fig.5 Sound velocity in beams with uniform cross section and variable cross section

研究成果の刊行に関する一覧表

論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	出版年・巻号・頁
中川隆之	超微細加工技術を用いた埋め込み型聴覚デバイス開発：人工感覚上皮開発	Otol Jpn	2012・22・923-926
中川隆之	内耳再生へのストラテジー 内耳障害の病態に応じた治療法の開発戦略	日薬理誌	2013・141・184-187
中川隆之	内耳再生医療開発の現況と課題	PCEM (Tohoku Univ. Med. School)	2011-2012・31・7-13
中川隆之	急性感音難聴における新規治療の可能性 ナノ DDS	JOHNS	2012・28・799-802
Hiraumi H, Yamamoto N, Sakamoto T, Ito J.	A minimally invasive approach for cochlear implantation using a microendoscope	Eur Arch Otorhinolaryngol	2013・Feb;270(2)・477-481
Hiraumi H, Yamamoto N, Sakamoto T, Yamaguchi S, Ito J.	The effect of pre-operative developmental delays on the speech perception of children with cochlear implants.	Auris Nasus Larynx	2013・Feb;40(1)・32-35
森 尚彫, 伊藤 壽一, 平海 晴一, 山口 忍, 柴田 尚美, 山本 典生, 坂本 達則, 岩井 詔子, 小島 憲, 松本 昌宏, 扇田 秀章.	成人人工内耳長期装用例における装用閾値と後迷路機能.	Audiology Japan.	2012・55(3)・190-197
小池卓二, 坂下 輔, 埴慎太郎, 熊川孝三	有限要素法による蝸牛基底板振動シミュレーション：人工内耳電極挿入時の基底板振動挙動変化	耳鼻臨床	2012・補132・24-31

超微細加工技術を用いた埋め込み型聴覚デバイス開発： 人工感覚上皮開発

中川 隆之

京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科

Artificial cochlear epithelium: Development of totally implantable hearing device using micro electro mechanical system

Takayuki Nakagawa

Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University

Hair cell loss is one of main causes for sensorineural hearing loss. The lack of the capacity for hair cell regeneration makes difficult to restore hearing in mammals. As an alternative of biological regeneration of hair cells, we have developed an artificial cochlear epithelium, which is capable to generate electricity in response to sound stimuli after implantation into a cochlea. The mechanical tonotopy for sound frequency remaining within the cochlea is utilized for discrimination of sound frequency. A piezoelectric membrane in an artificial cochlear epithelium converts sound vibration to electric signals. In vitro setting, an artificial cochlear epithelium generated electricity in response to sound application. After implantation into a guinea pig cochlea, sound stimuli were transmitted through the external auditory canal to a piezoelectric membrane in a cochlea. The application of sound to the stapes induced electrical output from the implanted artificial cochlear epithelium. These findings indicate the potential of an artificial cochlear epithelium as a novel hearing device.

Key words : piezoelectric material, traveling wave, basilar membrane, sensorineural hearing loss, hair cell, cochlea

和文キーワード : 圧電素子, 進行波, 基底板, 感音難聴, 有毛細胞, 蝸牛

論文要旨

蝸牛有毛細胞の障害は、感音難聴の主因であり、有毛細胞再生が可能となれば、感音難聴に根本的治療の道筋が拓かれる。しかし、哺乳類における蝸牛有毛細胞再生による聴覚再生は、現時点では困難である。そこで、生物学的な再生へのストラテジーにこだわらず、超微細加工技術など工学的な技術の進歩を応用して、有毛細胞再生にテクノロジー側からのアプローチを試みた。蝸牛には、完全に有毛細胞が失われた状態でも、受動的周波数弁別能力が残っていることに着目し、この受動的周波数弁別能を利用し、振動刺激を電気刺激に変換することができる圧電素子膜を蝸牛の基底板近傍に留置することによる聴覚再生の可能性を検討した。音響による振動刺激

を電気刺激に変換する圧電素子膜を開発し、人工聴覚上皮と命名した。本稿では、人工聴覚上皮の開発コンセプト、開発プロセス、今後の課題について解説する。

哺乳類蝸牛有毛細胞再生

感音難聴の主因の一つは、蝸牛有毛細胞障害である。ヒトを含む哺乳類で一旦失われた聴覚が回復しない要因として、蝸牛有毛細胞を再生する能力がないことがあげられる。感音難聴の根本的治療法開発を目指して、哺乳類蝸牛有毛細胞再生に関する研究が、この20年間、活発に行われてきた。有毛細胞再生研究の発端は、1980年代の鳥類における有毛細胞再生とそれに伴う聴覚再生にある^{1),2)}。その後、遺伝子導入、幹細胞医学の応用な

ど多岐にわたる生物学的なアプローチで、哺乳類蝸牛有毛細胞再生研究が展開されてきた。Athol1 遺伝子導入による蝸牛有毛細胞再生と聴力回復³⁾、多能性幹細胞から有毛細胞分化誘導⁴⁾、細胞移植による有毛細胞再生⁵⁾ など、将来の有毛細胞再生による感音難聴治療を期待させる研究成果が得られてきた。しかし、哺乳類蝸牛では、有毛細胞の感覚毛の方向が異なるだけでも、聴力はきわめて悪く⁶⁾、理想的な場所に正しい方向の感覚毛を有する有毛細胞再生が、良好な聴力に要求される。生物学的なアプローチによる内耳再生研究をさらに発展させることに加え、近年進捗著しいナノテクノロジーなどの超微細加工技術に目を向け、生物学的アプローチに工学的なアプローチを組み合わせた、いわば、学際的な観点で、有毛細胞を含めた感覚上皮再生を試みた。

von Békésyの進行波説

人工内耳は、最も対費用効果の高い医療と評価され、高度難聴に対する一般的な治療法として定着し、その有用性は広く認められている。人工内耳では、蝸牛内に電極を挿入し、直接ラセン神経節を電気刺激することにより、聴覚を獲得する。すなわち、有毛細胞が高度に障害された蝸牛に残されたラセン神経節を活用して聴力を獲得するシステムといえる。しかしながら、有毛細胞喪失後の蝸牛には、von Békésyが50年前に発見した進行波説に示されている機械的な周波数弁別能も残されている⁷⁾。つまり、人工内耳は、蝸牛に残されている機能をフルに活用しているとはいえない。蝸牛の機械的な周波数弁別能を再現する工学的な蝸牛モデルに関する研究がなされているが、これらの研究では、あくまでセンサーとしての可能性を探究するものであり、新しい聴覚器機という観点は盛り込まれていない^{8),9)}。われわれは、蝸牛に残された機械的な周波数弁別能力を活用し、何らかの周波数弁別能を高める工夫を行えば、少なくとも人工内耳におけるサウンドプロセッサの機能を代替できるのでないかと考えた。

圧電素子の応用

蝸牛内有毛細胞は、音響刺激による基底板の振動を電気刺激に変換する役割を担っている。この機能を担うマテリアルとして、圧電素子に着目した。圧電素子は、物理的な歪みにより起電するマテリアルであり、われわれの生活の様々な場面に使われている。例えば、インクジェットプリンターや自動車の燃料噴射装置に用いられている。蝸牛内に伝わる音響刺激で歪むことができる剛性

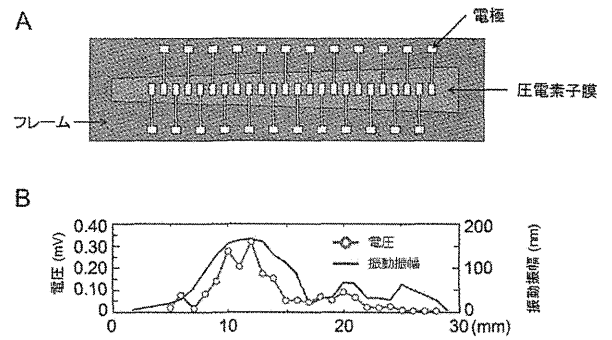


図1 プロトタイプデバイス概略図 (A) と音響刺激に対する反応例 (B)

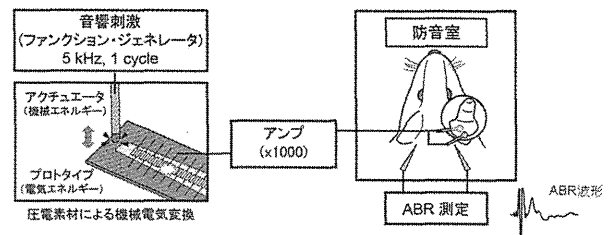


図2 プロトタイプデバイスを用いた聴性脳幹反応誘導実験概略図

の低い、すなわち、薄い圧電素子膜を作製することができれば、蝸牛内に埋め込むことにより、基底板と内有毛細胞の機能を担える可能性がある。また、蝸牛基底板と同様に圧電素子膜の幅を変化させることにより、圧電素子膜自体にも周波数特性を持たせることができ、周波数特性を高めることができるのではないかと推察した。

プロトタイプデバイス

圧電素子膜が音響刺激で起電することができるのかを調べるために、生体蝸牛サイズより大きい、複数の電極が配置されたプロトタイプデバイスを作製し (図1 A)、体外計測実験を行った¹⁰⁾。圧電素子膜は、台形型とし、厚さ40 μm とした。体外でヒト可聴音域の音響曝露を行い、圧電素子膜の振動と起電力を記録したところ、最大振動振幅が得られる場所は、音響の周波数により変化し、最大振幅が得られる部位の電極から最大の電気出力が得られることが分かった (図1 B)¹⁰⁾。次に、薬物により有毛細胞をほぼ完全に喪失させ、聾としたモルモットを用い、体外に設置したプロトタイプから電極のみを蝸牛内に挿入し、音響刺激で聴性脳幹反応が得られるかどうかを検証した (図2)。結果、正常な聴性脳幹反応が得られることが判明した¹¹⁾。ただし、出力は不十分であったため、増幅器を使用した。すなわち、プロトタイプデ

バイスは、人工内耳と同等の働きをすることが示された
 ということができる。

埋め込み型デバイス

プロトタイプデバイスの解析結果に基づき、モルモット
 蝸牛基底回転に埋め込み可能なサイズのデバイスを作
 製した¹¹⁾。プロトタイプからおおよそ1/30のダウン
 サイジングであり、圧電素子膜の厚さは、3 μmまで薄
 膜化することができた。プロトタイプと同様に、まず、
 体外での音響刺激に対する反応を調べた。結果、1-
 40kHzの周波数に反応し、プロトタイプの20倍の出力
 をえることができた¹¹⁾。出力が向上した理由として、圧
 電素子膜の膜厚が1/10以下になることにより、剛性
 が低下し、音響刺激による歪みが大きくなったことが考
 えられる。

次の段階として、デバイスを蝸牛内に埋め込んだ場合
 に、音響刺激が適切に圧電素子膜に伝わるかどうかを検
 証した(図3)。外耳道から音響刺激を与えた際の生体
 モルモット蝸牛基底回転の基板振動をレーザードッ
 プラー法で計測した後にデバイスを留置し、圧電素子膜の
 振動を測定した。圧電素子膜の振幅は、基板振動より
 も小さいものの、圧電素子膜からの起電を誘導するの
 に十分な振幅が得られた¹¹⁾。さらに、基板と同じ周波数
 特性を示すことが明らかとなった。したがって、外耳道
 からの音響刺激は、基板と同様に圧電素子膜に適切に
 伝達されることが分かった¹¹⁾。この実験では、正常モ
 ルモットを用いたので、基板振動には外有毛細胞による
 能動的な振幅も加わっていると考えられる。この点を考
 慮すれば、蝸牛内に埋め込んだ圧電素子膜への音響刺激
 の伝達は良好といえる。

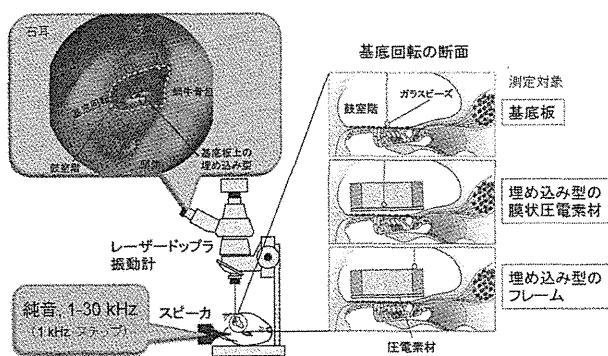


図3 蝸牛埋め込み後の圧電素子膜への音響刺激伝達解析
 実験概略図

蝸牛基底回転鼓室階にデバイスを留置し、外耳道から音響刺激
 を加え、生体基板、膜状圧電素材、フレームの振動をレーザー
 ドップラー振動計で測定した。

次に、蝸牛内のデバイスが音響刺激により起電するか
 どうかを確かめた¹¹⁾。この実験では、圧電素子膜からの
 電気出力を至適条件で計測するために、摘出したモルモ
 ット側頭骨を用いた(図4)。音響刺激は、直接アブミ
 骨から与えた。音響刺激に反応して、圧電素子膜からの
 出力が記録され、音響刺激の停止に伴い、徐々に出力が
 低下することが分かった¹¹⁾。この反応は、生物学的な反
 応の特徴を示しており、圧電素子膜が音響刺激に反応し
 て、電氣的出力が発生していることを示唆する。ただし、
 圧電素子膜から得られる出力は、体外で計測した場合と
 比較すると小さいものであり、さらに音響刺激伝達の条
 件を至適化すれば、さらに出力は向上するものと期待で
 ける。しかしながら、蝸牛鼓室階からラセン神経節を刺
 激することを考えれば、デバイス自体の出力増加、電極
 の工夫などによるラセン神経節刺激条件の至適化などが
 求められる。

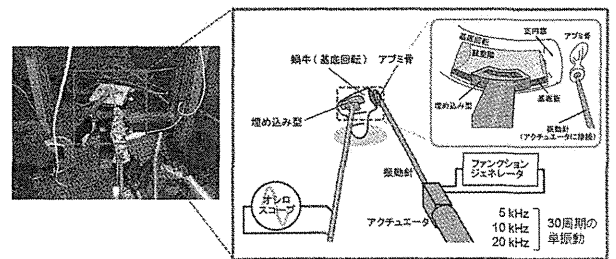


図4 蝸牛埋め込み後の圧電素子膜からの電氣的出力計測
 実験概略図

モルモット側頭骨をステージに固定し、デバイスを蝸牛基底回
 転鼓室階に留置し、音響刺激をアブミ骨から与え、デバイスから
 の出力を計測。

まとめ

高度難聴に陥った蝸牛にも残存している機械的な周波
 数弁別能を利用し、音響刺激に反応して起電することが
 できる人工聴覚上皮を作製した。人工聴覚上皮は、超微
 細加工技術を用いることにより、モルモット蝸牛基底回
 転に埋め込むことが可能なサイズまで小さくすることが
 可能であり、蝸牛埋め込み後に音響刺激により振動し、
 起電することが示された。これらの結果は、圧電素子膜
 を用いた完全埋込み型聴覚デバイスの実現性を示唆し
 ている。今後、出力増大、電気刺激のラセン神経節への
 伝達の至適化を行うことにより、より実現性を高めるこ
 とが求められる。現在、ヒト側頭骨を用いた外挿性に関
 する研究を行っている。また、生物学的な方法として、
 例えば、遺伝子導入により、ラセン神経節から鼓室階内
 へ神経突起を誘導する技術¹²⁾を付加することにより、

より実現性を高めることも視野に入れていきたい。早期の臨床応用を考慮すれば、既存の人工内耳電極や小型増幅器を活用することにより、センサーとして蝸牛を用いた新しい人工内耳システムを開発する方向性も考えられる。今後、テクノロジー、バイオロジーの両面から、さらに研究を進め、新しい聴覚再生への道を切り拓いていきたい。

謝 辞

本研究は、大阪大学大学院基礎工学研究科・川野聡恭教授、東北大学大学院工学研究科・和田仁教授のグループとの共同研究であり、デバイス作製は川野教授のグループが中心となっており、数理的シミュレーションを和田教授のグループが行い、和田教授の指導の下、振動計測実験を京都大学のグループで行った。蝸牛への埋め込み方法については、虎の門病院・熊川孝三先生、神戸市立中央医療センター・内藤泰先生にご助言をいただいた。最後に、デバイス作製の中心的役割を果たした大阪大学大学院基礎工学研究科・新宅博文先生、埋め込み実験の中心的役割を果たした京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科・稲岡孝敏先生、多くのご助言をいただいた伊藤壽一教授をはじめ京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科内耳研究グループのメンバーに深謝したい。

付 記

本研究は、厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）「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」（平成19-21年度）および厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（感覚器障害分野））「MEMS/NEMS人工聴覚器による感音難聴治療法開発」（平成22-23年度）により施行した。

参考文献

- 1) Ryals BM, Rubel EW : Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult Coturnix quail. *Science* 240 : 1774-1776, 1988.
- 2) Corwin JT, Cotanche DA : Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science* 240 : 1772-1774, 1988.
- 3) Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, et al. : Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat Med* 11 : 271-276, 2005.
- 4) Oshima K, Shin K, Diensthuber M, et al. : Mechanosensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell* 141 : 704-716, 2010.
- 5) Tateya I, Nakagawa T, Iguchi F, et al. : Fate of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice. *Neuroreport* 14 : 1677-1681, 2003.
- 6) Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, et al. : Identification of Vangl2 and Scrib1 as planar polarity genes in mammals. *Nature* 423 : 173-177, 2003.
- 7) von Békésy G : Travelling waves as frequency analysers in the cochlea. *Nature* 225 : 1207-1209, 1970.
- 8) White RD, Grosh K : Microengineered hydromechanical cochlear model. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 1296-1301, 2005.
- 9) Wittbrodt MJ, Steele CR, Puria S : Developing a physical model of the human cochlea using microfabrication methods. *Audiol Neurotol* 11 : 104-112, 2006.
- 10) Shintaku H, Nakagawa T, Kitagawa D, et al. : Development of piezoelectric acoustic sensor with frequency selectivity for artificial cochlea. *Sens Actuators A* 158 : 183-192, 2010.
- 11) Inaoka T, Shintaku H, Nakagawa T, et al. : Piezoelectric materials mimic the function of the cochlear sensory epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 : 18390-18395, 2011.
- 12) Shibata SB, Cortez SR, Beyer LA, et al. : Transgenic BDNF induces nerve fiber regrowth into the auditory epithelium in deaf cochleae. *Exp Neurol* 223 : 464-472, 2010.

論文受付 24年1月12日
論文受理 24年1月12日

別刷請求先：〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54
京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科
中川 隆之

内耳再生へのストラテジー

内耳障害の病態に応じた治療法の開発戦略

中川 隆之

要約：感音難聴に代表される内耳障害は、主な身体障害のひとつであるが、多くは不可逆性であり、根本的治療法の開発が強く望まれている。本稿では、内耳蝸牛の感覚上皮に焦点を当て、障害進行段階に応じた治療法開発の取り組みについて紹介する。音響刺激を神経信号に変換する役割を担う蝸牛感覚上皮の有毛細胞が障害されているが、未だ細胞死に至っていない段階では、インスリン様成長因子1などの薬物局所投与の難聴治療への可能性が呈示され、臨床試験も行われている。有毛細胞が喪失しているが、感覚上皮を構成するもうひとつの細胞である支持細胞が温存されている段階では、ノッチ情報伝達系制御による支持細胞から有毛細胞への分化転換による有毛細胞再生による聴覚再生が研究されている。さらに、障害が進行し、再生のソースが蝸牛内に残されていない段階では、工学的な蝸牛感覚上皮再生ともいえる人工感覚上皮開発が行われている。今後の研究発展により、革新的難聴治療が臨床的に実現することが望まれる。

1. 緒言

感音難聴は、頻度の高い身体障害のひとつであり、65歳以上の高齢者の半数以上に聴覚障害は認められ、先天性難聴は1000人に1人の割合で認められる。また、感音難聴は、急激に発症するタイプと徐々に進行するタイプに分けることができ、前者の代表が突発性難聴であり、後者の代表が加齢性難聴といえる。発症による分類だけでなく、発症から早期の段階、すなわち、急性期といえる段階と完全に障害が固定した慢性期、この間に相当する亜急性期と病期を分類することができる。哺乳類では、聴覚感覚器である内耳・蝸牛の再生能力がきわめて乏しいことから、臨床的には、

不可逆的な変化が生じる前に、蝸牛の細胞を細胞死から保護することに主眼がおかれている。蝸牛には、聴覚に不可欠な多くの細胞が存在するが、音響刺激を神経信号に変換する役割を果たしている有毛細胞が、治療の主な標的とされてきた。これまでの研究の中心的課題は、哺乳類蝸牛にて、いかにして有毛細胞再生を誘導するか、あるいは、有毛細胞が不可逆的な変性に陥る前に保護するかについて、という点におかれてきた。一方で、感音難聴は単一の病態ではなく、また、ひとつの疾患、たとえば、突発性難聴においても発症から間もない急性期と難聴が固定した後の慢性期では、治療戦略は当然変わってくるべきである。本稿では、蝸牛有毛細胞を中心として、障害の進行段階に応じた治療方法の開発の現況について総論的に述べる。

2. 内耳・蝸牛の基本構造

空気の振動である音響は、外耳道を通り、鼓膜を振動させる。鼓膜の振動は、耳小骨という中耳にある小さな3つの骨を振動させ、この振動を蝸牛へと伝達する。蝸牛の中は液体で満たされおり、この液体中を音響による振動が伝播される。蝸牛は3層からなるらせん構造をとるが、3層の中央にある中央階と呼ばれる部分に感覚上皮が存在する。感覚上皮は、基底板上に位置し、哺乳類では1列の内有毛細胞と3列の外有毛細胞が配列している(図1)。蝸牛内に伝わった振動は、基板を振動させる。この基板の上に、感覚上皮が存在し、感覚上皮が振動刺激を神経信号に変換する役割を担う。この主役を担うのが内毛細胞である。感覚上皮にある内毛細胞の聴毛が変位し、内毛細胞の脱分極が誘導され、有毛細胞から神経伝達物質が、聴覚の一次ニューロンであるラセン神経節細胞とのシ

キーワード：感音難聴、内耳再生、インスリン様成長因子1、ノッチ情報伝達系、圧電素子膜
 京都大学大学院 医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 (〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54)
 E-mail: tnakaky@gmail.com 原稿受領日：2013年1月4日、依頼原稿
 Title: Strategies for development of therapeutics for inner ear disorders according to the stage of degeneration
 Author: Takayuki Nakagawa

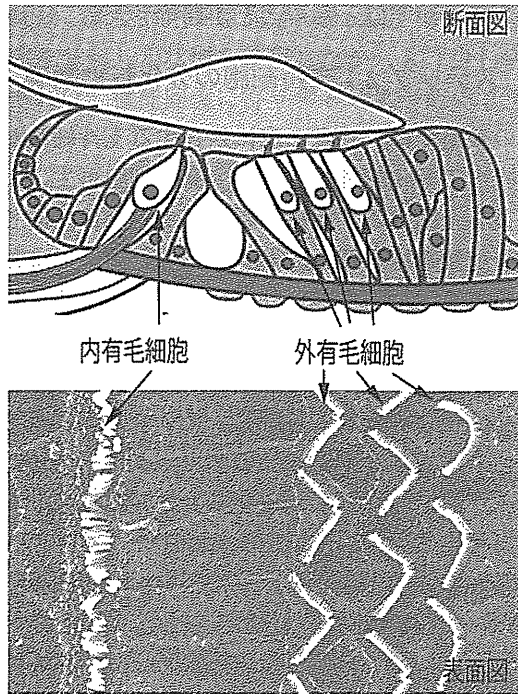


図1 蝸牛感覚上皮断面模式図および表面走査電顕像

ナプス結合に放出される。これにより、ラセン神経節細胞での脱分極が誘導され、聴覚中枢へ聴覚情報が伝達される。外有毛細胞は、振動刺激に反応して、細胞体を伸縮させる自動能を持ち、周波数選択性の向上に寄与するとされている。これら有毛細胞の間には、支持細胞と呼ばれる細胞が存在し、構造的に感覚上皮を支えるだけではなく、神経伝達物質の代謝やイオン輸送など重要な役割を担っている。より詳細は、成書をご参照いただきたい(1)。

3. 内耳障害段階に対応した治療戦略

有毛細胞障害が生じているが、未だ細胞死に陥っていない段階では、障害有毛細胞の自己修復誘導あるいは細胞死の防止が有効な戦略となる(図2)。しかしながら、有毛細胞がすでに不可逆的な変性に陥っている、あるいは、喪失した後では、残存している支持細胞が有毛細胞再生のソースとなる。残存支持細胞が良好な状態で保たれている場合、残存支持細胞から有毛細胞への分化転換誘導がひとつの戦略となる(図2)。感覚上皮の障害が進行し、残存支持細胞数が十分に存在しない場合、残存支持細胞の脱分化あるいは初期化(reprogramming)を誘導し、支持細胞を内耳前駆細胞の状態まで戻し、内耳発生過程を繰り返すという戦略が想定される(図2)。さらに変性が進行し、有毛細胞再生のソースとなる細胞が蝸牛内に存在しない場合、外部から再生能力を持つ細胞を移植し、感覚上皮を再生する、あるいは、感覚上皮機能を有するマイクロデバイスを蝸牛内にインプラントするという戦略が想定される(図2)。現在臨床では、第一のステップとして、ステロイドの全身投与が広く行われているが、有効性を示すエビデンスはない。この段階以降では、残存聴力レベルに応じて、補聴器あるいは人工内耳が選択される。

4. ステップ1：自己修復，細胞死からの回避

各種神経栄養因子、細胞増殖因子、抗酸化剤など様々な薬物の有毛細胞やラセン神経節細胞の細胞死防御、自己修復に関する有効性が動物実験レベルで数多く報告されている。われわれは、これらの薬物の中で、

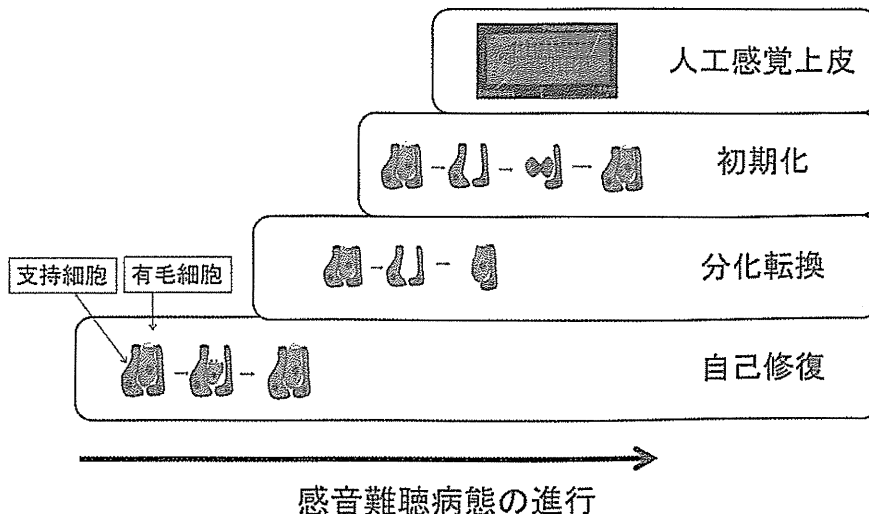


図2 感音難聴治療法の開発戦略

インスリン様成長因子 1 (IGF1) に着目した。IGF1 は、内耳の発生や発達に関連することが報告されており (2, 3)、臨床的に直ちに使用可能な薬物であるという利点があった。臨床医としての立場から、後者の利点に着目し、基礎的研究を開始した。ラット音響外傷モデルを作製し、音響曝露前に IGF1 を内耳に局所投与した (4)。内耳局所投与については、蝸牛が中耳と唯一膜で接する部分である正円窓膜からの投与を用いた。正円窓膜を介する内耳への薬物投与は、広く内耳への薬物投与経路として用いられている (5)。IGF1 などの細胞増殖因子は、効果発現までに時間を要するため、なんらかの徐放手段を考慮すべき必要があった。また、内耳への薬物局所投与では、薬物の徐放システムを用いないと、ごく限られた部位にしか薬物が到達しないことも知られていた (6)。われわれは、臨床応用を考慮し、投与に際する侵襲が低く、徐放効果が期待できるゼラチンハイドロゲルを用いることとした。まず、内耳局所投与でラセン神経節保護効果を有することが広く知られている脳由来神経栄養因子を用い、ラセン神経節保護効果がゼラチンハイドロゲルによる局所投与で再現できるかを検証し、埋め込み型浸透圧ポンプを用いた場合と同等の効果が発揮されることを確認した (7)。IGF1 内耳徐放にもこのゼラチンハイドロゲルを用いた。結果、ゼラチンハイドロゲルを用いた IGF1 の内耳徐放により、音響外傷による蝸牛有毛細胞喪失を抑制できることが分かった (4)。音響外傷後に IGF1 を投与し、容量依存性を検証する実験をモルモットにて行い、有意な聴覚保護効果が認められ、容量依存性が認められることを確認した (8)。さらに、内耳虚血モデルでの難聴発症後投与でも有効性を確認し (9)、安全性に関する検証を行い、臨床試験プロトコルをデザインした。

臨床試験では、ステロイド全身投与が無効な突発性難聴例を対象とし、高気圧酸素療法をヒストリカルコントロールとして用いた (10)。鼓膜切開を行い、IGF1 を浸漬させたゼラチンハイドロゲルを中耳腔の正円窓膜近傍に留置した。結果、投与 24 週後において、ヒストリカルコントロールを有意に上回る聴力改善割合が認められ、重篤な有害事象は認められなかった (10)。また、ゼラチンハイドロゲルを用いた IGF1 局所投与後の純音聴力回復は、統計学的に有意なものであった (11)。現在、デキサメタゾン鼓室内投与をコントロールとしたステロイド全身投与無効突発性難聴症例を対象としたランダム化対照試験を多施設試験として施行中であり、近く登録完了の見込みである。この結果解析により、IGF1 内耳局所投与の突発性難聴難治例に

対する効果が明確となることが期待される。

5. ステップ 2：支持細胞の分化転換誘導

この戦略では、感覚上皮に残存する支持細胞から有毛細胞への分化転換を誘導し、有毛細胞再生による聴力回復を企図する。支持細胞と有毛細胞は、同じ起源となる前駆細胞を持ち、ノッチ情報伝達系により前駆細胞から有毛細胞あるいは支持細胞への分化運命が決定される (12)。ノッチ情報伝達系が活性化、あるいは抑制により、誘導される転写因子が変化し、結果として、活性化されると支持細胞、抑制されると有毛細胞に分化する。ミシガン大学のグループは、ノッチ情報伝達系が活性化されなかった場合に有毛細胞となる細胞に出現する転写因子である *Atho1* をウイルスベクターを用いて強制発現させ、支持細胞から有毛細胞への分化転換誘導に成功した (13)。従って、障害された蝸牛感覚上皮にノッチ情報伝達阻害薬を投与することにより、同様に支持細胞から有毛細胞への分化転換が誘導できる可能性が想起される。ノッチ情報伝達阻害薬が有効となるためには、ノッチ情報伝達系が活性化されている状態であることが条件となる。ノッチ情報伝達系が活性化された状態にある発生段階の蝸牛にノッチ情報伝達阻害薬を投与すると正常よりも多くの有毛細胞が出現し (14)、本来支持細胞となるべき細胞が有毛細胞へと分化していることが分かる。出生間もない段階でも、同様の現象が観察されることが報告されている (15)。成熟した蝸牛では、ノッチ情報伝達系の活性化は観察されないが、障害後数日から 2 週間の間には、感覚上皮の支持細胞でノッチ情報伝達系の活性化が認められている (16, 17)。有毛細胞喪失につながる傷害を受けた感覚上皮で、一時的にノッチ情報伝達系の活性化が認められるということは、一時的に前駆細胞的な性格を支持細胞が持つと解釈することができる。そこで、われわれは、有毛細胞喪失後の蝸牛にノッチ情報伝達系を阻害する薬物を投与することにより、支持細胞から有毛細胞への分化転換が誘導できないかを調べた。

アミノ配糖体と利尿薬を全身投与することにより、成獣モルモットに有毛細胞喪失を惹起し、ノッチ情報伝達系阻害薬局所投与を施行した。アミノ配糖体と利尿薬の量は、ほぼ完全に外有毛細胞が喪失する量とし、新生有毛細胞が同定しやすいように工夫した。結果、外有毛細胞領域に新生有毛細胞は認められなかったが、内毛細胞のさらに内側の本来支持細胞が存在する部位に有毛細胞が認められた (14)。しかしながら、新生有毛細胞の数は少なく、機能改善は認められなかった。