

本実験は、新生有毛細胞同定のために、かなり強い内耳障害を惹起した状態を使用したが、もう少し軽い障害であれば、機能回復に寄与する効果が期待できるかもしれない。

### 6. ステップ3：人工感覚上皮インプラント

空気の粗密波である音響刺激は、蝸牛感覚上皮の有毛細胞で物理的な振動刺激から神経信号に変換される。従って、有毛細胞が喪失した状態では、聴覚は得られない。さらに、再生有毛細胞のソースとなり得る支持細胞も喪失した状態では、先述したような再生のストラテジーは使えない。しかし、有毛細胞に代わって、音響による振動刺激を電気刺激に変換することが可能なシートをインプラントすれば、有毛細胞を再生した場合と同等の効果が得られる可能性がある。われわれは、このような機能を有する圧電素子膜からなるデバイスを作製し、人工感覚上皮と名付けた。

ハンガリーのフォン・ベケシーは、特定の周波数が蝸牛内の特定の部位の基底板を選択的に大きく振動させることを発見し、ノーベル賞を受賞した(18)。低い音では、蝸牛頂部で、高い音では蝸牛基底部で最大の基底板振幅が誘導される。周波数に伴い、基底板が最大振幅する位置が移動することから、Traveling wave theory と命名されている。従って、蝸牛内の特定の部位に人工感覚上皮をインプラントすれば、その領域が担当する周波数の音響刺激により振動、発電し、当該部位のラセン神経節を刺激し、聴覚が得られる。すなわち、蝸牛構造の持つ周波数弁別能力を利用して、周波数弁別は行おうというものである。圧電素子とは、物理的な歪みにより起電する材料であり、われわれの日常生活でも広く用いられている。圧電素子は、電気信号から物理的な運動への変換にも用いられ、電気刺激に対応して、微細な動きを制御することに用いられている。

モルモット蝸牛基底回転の計測を行い、基底板直下の鼓室階に人工感覚上皮をインプラントすることを想定し、設計を行った。圧電素子膜として、厚さ3 $\mu$ mのpoly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene) (P(VDF-TrFE)) からなる薄膜を用いた。体外での計測実験を行ったところ、1~40 kHzの音響刺激に反応して、100~6000 $\mu$ Vの出力が得られた(19)。実際に、モ

ルモット蝸牛にインプラントし、外耳道から与えた音響刺激により圧電素子膜が振動するかどうかを検証したところ、蝸牛基底板と同様の周波数特性を示す振動が確認できた(19)。次に、摘出したモルモット側頭骨を用いて、蝸牛基底回転にインプラントしたデバイスが音響刺激に反応して、起電することを確認した(19)。以上の結果から、われわれが開発した人工感覚上皮は出力こそ本来の蝸牛感覚上皮には及ばないものの、実現可能なコンセプトであることが実証された。現在、起電力を増大したデバイスを作製して、実験中である。

### 7. まとめ

聴覚障害の病期、進行に応じた内耳再生医療開発の現況について紹介した。急性期、すなわちステップ1においては、IGF1などの新規薬物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。IGF1内耳局所投与については、今後、分子生物学的なレベルでの作用機序を明らかにすることも必要となる。亜急性期ともいえるステップ2で紹介したノッチ情報伝達系制御に関しては、今後in vivoでの聴力回復の実現、臨床的に使用可能な化合物の検索が求められる。再生のソースが蝸牛内に残されていない最終段階であるステップ3として、既存の人工内耳とは全くコンセプトが異なり、工学的な蝸牛感覚上皮再生とも表現できる人工感覚上皮開発について紹介した。今後、工学系、産業界との連携を深め、早期に臨床応用への道筋を明確にしたい。

### 文 献

- 1) Slepecky NB. The Cochlea. Springer-Verlag; 1996. p. 44-129.
- 2) Murillo-Cuesta S, et al. Front Mol Neurosci. 2011;4:11.
- 3) Okano T, et al. J Neurosci. 2011;31:18104-18118.
- 4) Iwai K, et al. Laryngoscope. 2006;116:526-533.
- 5) 中川隆之. 日耳鼻. 2008;111:655-663.
- 6) Nakagawa T, et al. Current Drug Therapy. 2008;3:143-147.
- 7) Endo T, et al. Laryngoscope. 2005;115:2016-2020.
- 8) Lee KY, et al. Otol Neurotol. 2007;28:976-981.
- 9) Fujiwara T, et al. Neuroreport. 2008;19:1585-1588.
- 10) Nakagawa T, et al. BMC Med. 2010;8:76.
- 11) Nakagawa T, et al. Otol Neurotol. 2012;33:941-946.
- 12) Lanford PJ, et al. Nat Genet. 1999;21:289-292.
- 13) Izumikawa M, et al. Nat Med. 2005;11:271-276.
- 14) Takebayashi S, et al. Dev Biol. 2007;307:165-178.
- 15) Yamamoto N, et al. J Mol Med (Berl). 2006;84:37-45.
- 16) Hori R, et al. Neuroreport. 2007;18:1911-1914.
- 17) Batts SA, et al. Hear Res. 2009;249:15-22.
- 18) von Békésy G. Nature. 1970;225:1207-1209.
- 19) Inaoka T, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:18390-18395.

## 内耳再生医療開発の現況と課題

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)

Pros and cons of studies for inner ear regeneration

Takayuki Nakagawa

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

### 内耳再生医療の必要性

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。感音難聴治療を考えるにあたって最も重要な点は、一旦障害が固定した感音難聴は回復しないという点にある。この主な原因は、聴覚感覚器である内耳・蝸牛に再生能力がないことにあるとされている。したがって、再生能力に乏しい内耳蝸牛に、いかにして再生を誘導するか、不可逆的な変性に陥る前に保護するかについて、これまで多くの研究が行われてきた。しかしながら、感音難聴は、単一の病態ではなく、また、ひとつの疾患、例えば、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。本稿では、感音難聴の病期を考慮し、再生医学的な観点から、どのような治療アプローチが想定されるのか、また、どのような研究が行われているのかを紹介したい。

### 音響刺激の受容機構と治療の標的

感音難聴治療開発について述べる前に、聴覚機構について簡潔に説明し、蝸牛のどこが治療の対象となるのかについて明確にしたい。詳細については、成書を参照されたい<sup>1,2)</sup>。音響は、空気の疎密波といわれる。空気の振動と表現した方がイメージしやすいかもしれない。空気の振動は、外耳道を通り、鼓膜を振動させる。ここで、空気から膜の振動に置き換わる。鼓膜の振動は、耳小骨という中耳にある小さな3つの骨を振動させる。膜の振動は固体の振動に変わる。耳小骨は、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ているので、固体の振動が液体を伝わる振動へと変化する。この振動が、基底板と呼ばれる構造物を振動させる。この基底板の上に、聴覚感覚上皮が存在し、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有毛細胞である。基底板の振動により、感覚上皮にある有毛細胞の聴毛が変位し、有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。

有毛細胞は、蝸牛の軸側に1列に配列する内有毛細胞とその外側に3列に配列する外有毛細胞に分類され(図1)、それぞれ聴覚受容に関する役割は異なる。ラセン神経節への情報伝達を主に担うのが、内有毛細胞であり、外有毛細胞は、主として周波数弁別を高める役割を果たすと理解されている。ラセン神経節細胞は、蝸牛の軸に相当する部分に存在し、有毛細胞とシナプスを形成し、中枢側では、脳幹の蝸牛神経核に連絡している(図2)。有毛細胞が脱分極するためには、カリウムイオンの流入が必要であり、有

毛細胞が局在するコンパートメントである中央階は、高カリウム濃度に維持されている。他の2つのコンパートメントは低カリウムであり、この濃度勾配が、有毛細胞脱分極に必要となる。中央階の高カリウム濃度維持の中心的な役割を担っているのが、蝸牛側壁に存在する血管条とラセン靭帯である。したがって、有毛細胞、ラセン神経節細胞、そして、血管条やラセン靭帯を構成する細胞の障害が、感音難聴の原因であり、これらの細胞や組織が治療の標的となる。

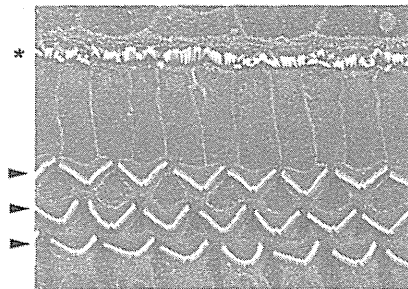


図1：マウス蝸牛感覚上皮表面走査電顕所見  
1列の内有毛細胞(\*)と3列の外有毛細胞(矢頭)が観察される。

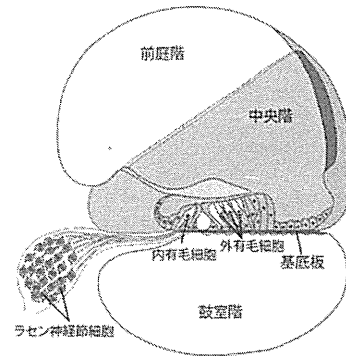


図2：蝸牛断面図模式図(論文4から改変)

### 内耳障害治療開発のストラテジー

内耳障害治療を考える場合、先述したように蝸牛の障害程度やその病期に応じた治療戦略を考えるべきである(図3)。蝸牛感覚上皮を例にとって考えると、有毛細胞に傷害が引き起こされているが、細胞死に陥っていない段階では、傷害有毛細胞の自己修復誘導あるいは細胞死の防止が標的となる。すでに有毛細胞が細胞死に陥っている場合、残存している支持細胞の状態が問題となる。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再生への戦略となる。残存支持細胞数が不十分、あるいは、分化転換不可能な状態の場合、残存支持細胞の増殖誘導する方法<sup>3)</sup>、あるいは、脱分化、再プログラミング(reprogramming)により、内耳前駆細胞の状態まで戻し、内耳発生過程を繰り返すような再生誘導が想定される。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するという戦略が考えられる。一方で、近年のテクノロジー面での進歩を応用し、人工的に感覚上皮機能を有する薄膜を作製しようとする、いわば、biological regeneration に対しての technological regeneration ともいえる手段も考慮に値する<sup>4)</sup>。これらの各戦略は、有毛細胞をラセン神経節細胞や他の内耳機能に不可欠な細胞に置き換えることができる。例えば、ラセン神経節細胞については、脳幹インプラントが technological regeneration に相当し、すでに臨床で使用されている。本稿では、自己修復あるいは細胞死防御、分化転換誘導、細胞移植に関する研究について紹介する。

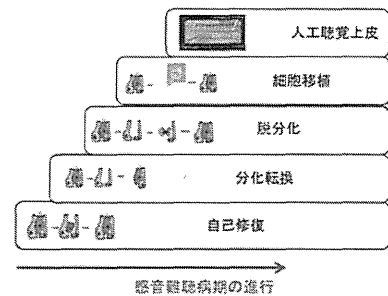


図3：内耳障害治療開発のストラテジー

### 自己修復、細胞死防御

この戦略が、内耳障害治療法として、最も研究が進んでいる分野といえる。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<sup>5)</sup>。われわれは、これらの薬物の中で、インスリン様細胞増殖因子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いたが<sup>6)</sup>、最近まで注目される薬物ではなかった。われわれは、数ある神経栄養因子や細胞増殖因子の中で、臨床で用いることができる数少ない薬物のひとつであることに着目し、臨床への展開が容易な薬物との観点から、IGF1

の感音難聴治療薬としての研究を行った。

急性高度難聴を対象疾患と想定し、まず音響外傷に対する内耳保護効果を調べた。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<sup>7)</sup>。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<sup>8)</sup>。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<sup>9)</sup>。当時、浸透圧ポンプを用いる方法が主流であったが、われわれは、この点でも臨床応用を考慮し、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。われわれは、生体内で分化されるゼラチンハイドロゲルの特性に以前から着目しており、すでに脳由来神経栄養因子の内耳徐放が可能であることを見いだしていた<sup>9)</sup>。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することができることが分かった (図 4)。次の段階として、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を用いて行った<sup>10)</sup>。結果、音響曝露前投与には劣るものの、有意な聴覚保護効果が認められ、IGF1 容量依存性も認められた。同時に、ゼラチンハイドロゲルを用いた IGF1 局所投与による有害事象に関する検討も行ったが、明らかな内耳および中耳の障害は認められなかった。さらに、内耳虚血モデルでの難聴発症後投与でも有効性が示された<sup>11)</sup>。これらの結果を元に、急性高度難聴に対するゼラチンハイドロゲルを用いた IGF1 局所投与の有効性と安全性を検証する臨床試験をデザインした<sup>12)</sup>。対象は、ステロイド全身投与が無効と判定された突発性難聴症例とし、ヒストリカルコントロールとして、京大病院で行った同様の症例に対する高気圧酸素療法の聴力改善の割合を用いた。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。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<sup>13)</sup>。以上の結果に基づき、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る。

#### 分化転換誘導

感音難聴で障害が固定した慢性期の治療は、最も重要かつ困難な課題といえる。急性期に比較的近い亜急性期と慢性期の間には、どのような違いがあるのか、詳細は不明であるが、考えられる差違として、感覚上皮で考えれば、有毛細胞が喪失した後の組織反応の違い、残存している細胞の状態の違いが想起される。有毛細胞喪失から比較的近い時間帯であれば、組織の修復あるいは再生に向けた何らかの機転が不十分ながらも働いている可能性がある。このような亜急性期に相当する状態の治療法として、われわれは、残存している支持細胞から有毛細胞への分化転換の可能性についての研究を行っている。支持細胞とは、感覚上皮において、有毛細胞の間に存在する細胞で、発生学的には同じ前駆細胞から形成されることが知られている。音響外傷などで有毛細胞喪失に至ってから、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る<sup>14,15)</sup>。ノッチ情報伝達系は、発生段階の内耳において、有毛細

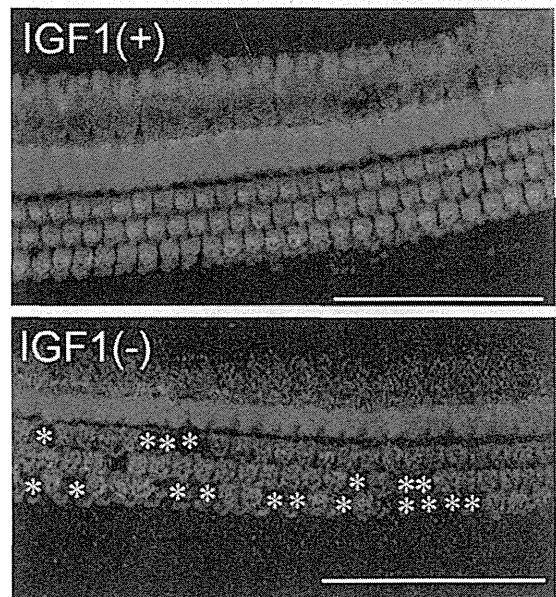


図 4 : IGF1 による蝸牛有毛細胞保護

IGF1 投与された蝸牛ではほぼ正常に有毛細胞が保たれているが、非投与のコントロールでは、外有毛細胞喪失が散見される (\*)。(論文7から改変)

胞と支持細胞の分化に関する運命決定機構を担っている<sup>16)</sup>。発生段階においては、ノッチ情報伝達系が活性化されると、前駆細胞は支持細胞へと分化する。したがって、ノッチ情報伝達系を阻害すると、前駆細胞は有毛細胞に分化する。実際、胎生期および新生マウス蝸牛感覚上皮で、ノッチ情報伝達系を薬物で阻害すると、有毛細胞数が増加することが知られている<sup>17,18)</sup>。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言うことは、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<sup>14)</sup>。

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である $\gamma$ セクレターゼ阻害薬の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(図5)。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。新生有毛細胞数が少なく、また、機能回復が認められなかった要因としては、与えた内耳傷害が高度であったため、残存する支持細胞が十分存在しなかった、あるいは、残存する支持細胞も高度に障害されていたことが考えられる。そこで、現在選択的に有毛細胞喪失を誘導するレベルの音響曝露を行い、その後ノッチ情報伝達系阻害薬投与を行い、機能回復が誘導できないかを調べている。

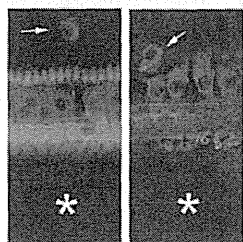


図5：薬物によるノッチ情報伝達系阻害により出現した新生有毛細胞

矢印は、内毛細胞のさらに内側に出現した新生有毛細胞を示し、\*は、元来外有毛細胞が存在していた部位を示す。赤は myosin VIIa 免疫染色、緑は phalloidin による f-actin 染色を示す。(論文 14から改変)

### 細胞移植

感音難聴で障害が完全に固定した慢性期の治療は、さらに困難な課題といえる。臨床的には、補聴器を用いて、残っている聴覚機能を補う戦略がとられている。有毛細胞喪失による高度感音難聴の場合、直接ラセン神経節細胞を電気刺激する人工内耳がその手段となる。生物学的に再生を促す戦略としては、外部から再生能力を有する細胞を移植する手段が研究されている<sup>19)</sup>。移植細胞のソースとしては、万能性を持つ胚性幹細胞や自己由来の万能細胞といえる iPS 細胞、体性幹細胞として骨髄由来間葉系細胞、神経幹細胞などが用いられている。これらの細胞から有毛細胞への分化誘導が可能であることが示されており<sup>20-22)</sup>、有毛細胞再生の戦略として期待されるが、最大の問題点は、移植細胞をいかにして感覚上皮内に送り込むことができるか、にある。われわれの過去の研究でも、感覚上皮内に移植細胞が送達されたのは、蝸牛感覚上皮傷害を惹起してすぐのタイミングに細胞移植を行った場合であり<sup>21)</sup>、これでは慢性期感音難聴の治療手段とはならない。そこで、外科的手段で目的とする部位に移植細胞を送達できるラセン神経節細胞をターゲットとした細胞移植研究を行った。ラセン神経節細胞の喪失は、人工内耳の有効性を左右する重要な問題であると同時に感音難聴の原因のひとつともいえ、臨床的見地からも意義のある研究と考えられた。

ラセン神経節細胞再生を目指した細胞移植研究として、これまでに神経幹細胞、骨髄由来間葉系細胞、胚性幹細胞、iPS 細胞を移植細胞ソースとして用いた研究を行った<sup>23-30)</sup>。本稿では、最も良好な結果を示した胚性幹細胞に関する研究<sup>25-27)</sup>と臨床応用が期待される iPS 細胞を用いた研究<sup>28,30)</sup>について述べる。あらかじめ胚性幹細胞および iPS 細胞に神経分化誘導を行った細胞を移植細胞として用い、in vitro、in vivo の実験を行った。蝸牛感覚上皮と胚性幹細胞由来神経前駆細胞を共培養すると、胚性幹細胞由来神経前駆細胞から神経突起が有毛細胞に向かって伸長され、有毛細胞の底部でシナプス様の結合を形成することが観察された(図6)<sup>25,27)</sup>。幹細胞由来の神経突起と接する部分で、内毛細胞は RIBEYE/CtBP2 を発現し、神経突起では、シナプス形成と関連する synaptophysin, synapsin1 の発現が認められた<sup>27)</sup>。

さらに、シナプス形成を確認するために、電子顕微鏡での観察を行ったところ、幹細胞由来の神経突起と内有毛細胞が接する部分で、電子密度の高いシナプス様構造が確認された(図6)<sup>27)</sup>。以上から、未熟ではあるが、胚性幹細胞由来神経細胞が、有毛細胞とシナプス形成する能力があることが示唆された。iPS細胞でも同様の検討を行ったところ、光顕レベルでは、同様の所見が確認されており<sup>28)</sup>、iPS細胞も胚性幹細胞と同等の能力を有することが推察された。

胚性幹細胞由来神経前駆細胞をラセン神経節細胞喪失させたモルモット蝸牛に移植する実験を施行した<sup>26)</sup>。細胞移植は、元来ラセン神経節が存在する蝸牛軸に細胞を注入する方法を用いた。移植された胚性幹細胞由来神経前駆細胞は、神経細胞に分化し、末梢、中枢両側に神経突起を伸長している像が確認された。さらに、電気刺激聴性脳幹反応を用いた機能評価にて、細胞移植を受けた動物では、コントロールよりも良好な閾値を示し、機能回復にも貢献していることが示唆された。iPS細胞由来神経前駆細胞を用いた解析では、まず、良好な移植細胞の生着率が期待できる新生マウスへの移植実験を行った。移植されたiPS細胞由来神経前駆細胞は、神経細胞に分化し、一部VGLUT1の発現を示し、グルタミン酸作動性神経に分化したことが示唆された<sup>28)</sup>。iPS細胞では、腫瘍形成が問題とされるため、移植後の蝸牛内での腫瘍形成のリスクについての検討を行った<sup>30)</sup>。コントロールとして、胚性幹細胞を用い、胎生マウス皮膚線維芽細胞、成獣マウス尾部皮膚線維芽細胞と由来細胞が異なり、さらにiPS細胞作製のための初期化因子遺伝子導入方法についても、レトロウイルスあるいはプラスミドによる導入と作製方法も異なる3種類のiPS細胞を用いた。これら幹細胞は、すべて同じ方法で神経分化誘導を行った。マウス蝸牛への移植後の生着効率、神経分化細胞数、増殖期細胞数ともに、移植細胞間で差を認めなかったが、成獣マウス尾部皮膚線維芽細胞からレトロウイルスを用いて誘導されたiPS細胞を移植した蝸牛においてのみ奇形種の形成が認められた。移植前の細胞の性質について、比較したところ、すべての細胞種で、Oct3/4を発現する未分化細胞が認められたが、細胞間で有意の差は認められなかった。他の組織への移植実験でも、成獣マウス尾部皮膚線維芽細胞からレトロウイルスを用いて誘導されたiPS細胞では腫瘍形成が起こりやすいことが報告されており、iPS細胞の作製方法よりも由来となる細胞種を選択が移植後の腫瘍形成において重要な因子であることが示されている<sup>31)</sup>。現在、ヒトiPS細胞を用い、神経分化誘導の方法を改訂し、移植前の段階では、ほとんど未分化細胞を認めないことを確認している。現在、ラセン神経節細胞障害モルモットを用い、機能回復に対する効果を評価中である。

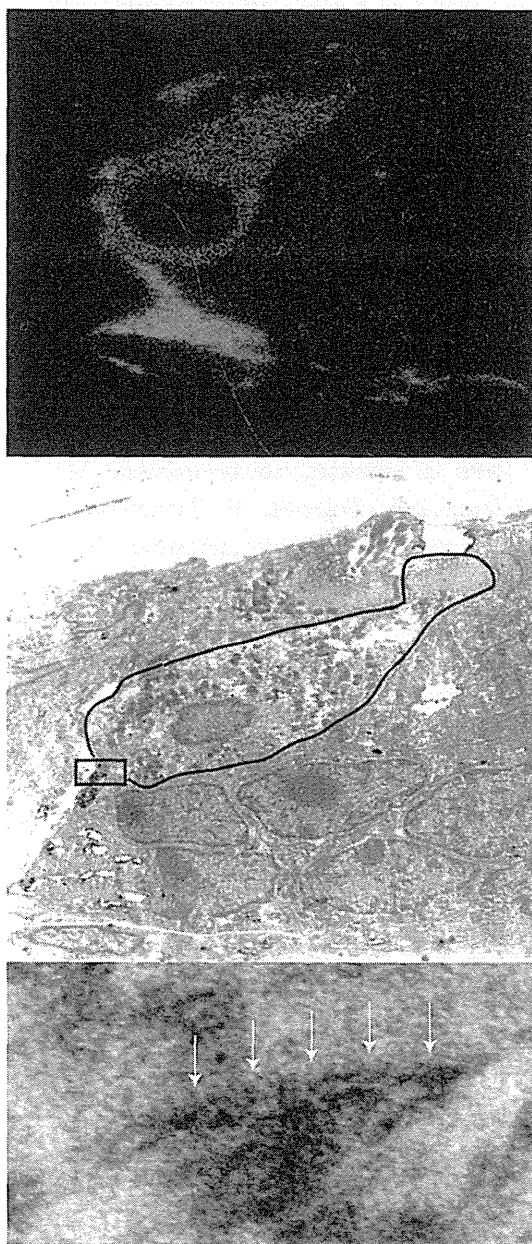


図6：胚性幹細胞由来神経と内有毛細胞間のシナプス結合

上段：胚性幹細胞由来神経から伸長した神経突起(緑)が内有毛細胞(赤)に接している。中段：電顕低倍像、GFPに対する免疫染色をDAB発色で行った後に包埋、薄切。内有毛細胞を実線で示した。四角部分がシナプス結合部。下段：中段四角部分の拡大図。電子密度の高いシナプス構造(矢印)が認められる。(論文27から改変)

## 総括

聴覚障害の病期、進行に応じた内耳再生医療開発の現況について紹介した。急性期においては、IGF1などの新規薬物の難聴治療への可能性が呈示され、一部臨床試験へと進んでいる。今後、分子生物学的なレベルでの作用機序解析を進める必要があるが、同時に臨床試験で得られる結果を掘り下げることが望まれる。亜急性期の治療に関しては、第1に *in vivo* での聴力回復の実現、臨床的に使用可能な化合物の探索が次の段階に求められる。慢性期の治療として、幹細胞医学の進歩を応用することが期待され、10年が経過した。内外で、科学的に興味ある知見は得られているが、未だ明確な臨床への道筋は示されているとは言い難く、他領域との協力を含め、早期に臨床応用への道筋を明確にしたい。

## 参 考 文 献

- 1) Dallos P (1996) in *The Cochlea*, eds Dallos P, Popper AN, Fay RR (Springer-Verlag, New York), pp 1-43.
- 2) Slepecky NB (1996) in *The Cochlea*, eds Dallos P, Popper AN, Fay RR (Springer-Verlag, New York), pp 44-129.
- 3) Ono K, Nakagawa T, Kojima K, et al. Silencing p27 reverses post-mitotic state of supporting cells in neonatal mouse cochleae. *Mol Cell Neurosci* 42: 391-398, 2009.
- 4) Inaoka T, Shintaku H, Nakagawa T, et al. Piezoelectric materials mimic the function of the cochlear sensory epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(45):18390-5, 2011.
- 5) Nakagawa T, Ito J. Local drug delivery to inner ear for treatment of hearing loss. *Current Drug Therapy* 3: 143-147, 2008.
- 6) Murillo-Cuesta S, Rodriguez-de la Rosa L, Cediell R, et al. The role of insulin-like growth factor-I in the physiopathology of hearing. *Front Mol Neurosci* 4:11, 2011.
- 7) Iwai K, Nakagawa T, Endo T, et al. Cochlear protection by local IGF-1 application using biodegradable hydrogel. *Laryngoscope* 116: 526-33, 2006.
- 8) 中川隆之 内耳疾患の治療をめざして 基礎研究の最前線 薬物の経正円窓投与 日耳鼻 111: 655-663, 2008
- 9) Endo T, Nakagawa T, Kita T, et al. A novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel. *Laryngoscope* 115: 2016-20, 2005.
- 10) Lee KY, Nakagawa T, Okano T, et al. Novel therapy for hearing loss: Delivery of insulin-like growth factor-1 to the cochlea using gelatin hydrogel. *Otol Neurotol* 28: 976-81, 2007.
- 11) Fujiwara T, Hato N, Nakagawa T, et al. IGF1 treatment via hydrogels rescues cochlear hair cells from ischemic injury. *Neuroreport* 19: 1585-8, 2008.
- 12) Nakagawa T, Sakamoto T, Hiraumi H, et al. Topical insulin-like growth factor-1 treatment using gelatin hydrogels for glucocorticoid-resistant sudden sensorineural hearing loss: a prospective clinical trial. *BMC Med* 8:76, 2010.
- 13) Nakagawa T, Ogino-Nishimura E, Hiraumi H, et al. Audiometric outcomes of topical IGF1 treatment for sudden deafness refractory to systemic steroids. *Otol Neurotol* 33: 941-6, 2012.
- 14) Hori R, Nakagawa T, Sakamoto T, et al. Pharmacological inhibition of Notch signaling in the mature guinea pig cochlea. *Neuroreport* 18:1911-1914, 2007.
- 15) Batts SA, Shoemaker CR, Raphael Y. Notch signaling and Hes labeling in the normal and drug-damaged organ of Corti. *Hear Res.* 249(1-2):15-22, 2009.
- 16) Lanford PJ, Lan Y, Jiang R, et al. Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nat Genet.* Mar 21(3):289-92, 1999
- 17) Takebayashi S, Yamamoto N, Yabe D, et al. Multiple roles of Notch signaling in cochlear development. *Dev Biol.* 307(1):165-78, 2007.

- 18) Yamamoto N, Tanigaki K, Tsuji M, et al. Inhibition of Notch/RBP-J signaling induces hair cell formation in neonate mouse cochleas. *J Mol Med (Berl)*. 84(1):37-45, 2006.
- 19) Nakagawa T, Ito J. Cell therapy for inner ear diseases. *Curr Pharm Des* 11: 1203-1207, 2005.
- 20) Oshima K, Shin K, Diensthuber M, et al. Mechanosensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell*, 141, 704-716, 2007.
- 21) 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.
- 22) Jeon SJ, Oshima K, Heller S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are progenitors in vitro for inner ear hair cells. *Mol Cell Neurosci*, 34, 59-68, 2007.
- 23) Tamura T, Nakagawa T, Iguchi F, et al. Transplantation of neural stem cells into the modiolus of mouse cochleae injured by cisplatin. *Acta Otolaryngol Suppl*. 551:65-68, 2004.
- 24) Naito Y, Nakamura T, Nakagawa T, et al. Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlea of chinchillas. *Neuroreport* 15: 1-4, 2004.
- 25) Matsumoto M, Nakagawa T, Higashi T, et al. Innervation of stem cell-derived neurons into auditory epithelia of mice. *Neuroreport* 16: 787-790, 2005.
- 26) Okano T, Nakagawa T, Endo T, et al. Engraftment of embryonic stem cell-derived neurons into the cochlear modiolus. *Neuroreport* 16: 1919-1922, 2005.
- 27) Matsumoto M, Nakagawa T, Kojima K, et al. Potential of embryonic stem cell-derived neurons for synapse formation with auditory hair cells. *J Neurosci Res* 86:3075-3085, 2008.
- 28) Nishimura K, Nakagawa T, Ono K, et al. Transplantation of mouse induced pluripotent stem cells into the cochlea. *Neuroreport* 20:1250-1254, 2009.
- 29) Ogita H, Nakagawa T, Sakamoto T, et al. Transplantation of bone marrow-derived neurospheres into guinea pig cochlea. *Laryngoscope* 120: 576-581, 2010.
- 30) Nishimura K, Nakagawa T, et al. Fates of murine pluripotent stem cell-derived neural progenitors following transplantation into mouse cochleae. *Cell Transplant* 21:763-771, 2012.
- 31) Miura, K.; Okada, Y.; Aoi, T.; et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat. Biotechnol.* 27:743-745, 2009.



### 急性感音難聴における新規治療の可能性

## ナノ DDS

中川 隆之\*

Takayuki NAKAGAWA

● Key Words ● 急性感音難聴, ドラッグ・デリバリー・システム, ナノテクノロジー, 内耳●

### I. “ナノ” とは？

ナノとは、国際単位系に用いられる用語で、基礎となる単位の $10^{-9}$ 倍であることを意味する、といわれても、小さいということ以外は、ピンと来ないと思われる。長さの単位メートルで具体的に説明すると、1メートルが概ねヒトの身長サイズを示すとすると、髪の毛がミリ( $10^{-3}$ )メートルの単位となる。次がマイクロ( $10^{-6}$ )メートルで、組織学でよく出てくる単位で、細胞やミトコンドリアの大きさの単位である。ナノ( $10^{-9}$ )メートルは、細胞を構成しているタンパクや遺伝子のサイズになる。

ウイルスの大きさもナノメートル単位である。つまり、ナノパーティクルとは、ナノメートルサイズの粒子ということを表し、細胞よりもはるかに小さいサイズの粒子を使った薬物送達システムの内耳への応用が本稿の要旨となる。ちなみに、ナノテクノロジーとは、ナノメートルサイズでの加工技術であり、それにより製作される機械はナノマシンと呼ばれる。ちなみに、ナノの次に小さい $10^{-12}$ 単位は、ピコである。ナノパーティクルは、われわれの生活のさまざまな分野ですでに活用されている。例えば、トイレの脱臭触媒に金属系のナノパーティクルが用いられている。

### II. “DDS” とは？

ドラッグ・デリバリー・システムの略であることは、ご存じであろう。直訳的に説明を加えれば、より良い効果を獲得するために薬物を送達するシ

ステムとなる。もう少し具体的に表現すると、薬物をマテリアルで修飾することによって薬物の作用を高める工夫、方法となる。では、どのようにして、薬物の効果を高めるのかというと、

- 1) 薬物の徐放
- 2) 薬物の体内半減期の延長
- 3) 薬物の透過, 吸収の促進
- 4) 薬物を目的細胞のみに取り込ませる (ターゲティング)

などを目的として、薬物のマテリアルによる修飾がなされる。

ナノ DDS は、ナノスケールの粒子の中に薬物を封入する DDS 技術であり、上記の 1) ~4) のすべての目的に用いることができる。外殻のマテリアルの生体内での溶け方により、徐放がコントロールできる。パーティクルの表面加工により、肝臓など細網系への取り込みを逃れることができる。表面に特殊な修飾を行うことによって、標的細胞にのみ親和性を持たせるといった加工がなされている。

ナノスケールであることの最大の特徴は、全身投与に使えるという点と細胞内にパーティクルとして取り込まれるという 2 点に集約される。細胞内に粒子として到達することが可能であることから、遺伝子導入にも応用できる。また、サイズを調節することにより、正常の毛細血管からは漏れないが、癌組織の毛細血管は透過するように調節可能であり、癌細胞への受動的ターゲティングがなされている<sup>1)</sup>。この技術は、enhanced permeation and retention (EPR) 効果としてよく知られており<sup>2)</sup>、すでに臨床で用いられている抗癌剤 (ドキシル<sup>®</sup>) に使われている。粒子の材料となる

\* 京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科  
(〒 606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町 54)

マテリアルは数多くあり、さまざまな用途がある。興味のある方は、成書をご参照いただきたい<sup>3)</sup>。

### III. 感音難聴治療における DDS の重要性

感音難聴の薬物治療における主な標的は、蝸牛である。蝸牛に存在する有毛細胞、ラセン神経節細胞、血管条やラセン靭帯の細胞が標的細胞となる。蝸牛は、血流量が少なく、血液内耳関門があるために、全身投与された薬物は、蝸牛内の細胞に到達しにくい<sup>4)</sup>。十分な効果を発揮させるためには、大量・長期投与が必要となり、副作用のリスクは高くなる。全身投与では、なんらかの DDS 技術を使わなければ、蝸牛への適切な薬物移行は実現できない。

蝸牛への薬物投与方法としては、経正円窓膜投与を中心とした局所投与がある。正円窓膜を通過する薬物であれば、全身的な副作用のリスクを大きく軽減しつつ、多くの薬物が蝸牛内に移行することが期待できる。しかし、鼓室内に投与された薬物は直ちに耳管から排泄されてしまうし、単純な鼓室内注入では、ごく限られた時間、蝸牛の基底部に薬物が到達するのみであり、局所投与においても DDS の応用が必要となる<sup>4)</sup>。

DDS の内耳への応用としては、2つの流れがある。ひとつは、既存の臨床で使用可能である薬物を DDS を用いることによって、内耳治療に使えるようにしようとする工夫である。われわれが行っているインスリン様細胞増殖因子 1 (IGF1) をゼラチンハイドロゲルという DDS を用いて内耳治療に応用する研究<sup>5)</sup>が、これに該当する。この方法は、局所投与への応用であり、動物実験<sup>6)</sup>から開始し、現在は第 II 相臨床試験を行っている段階にある。もうひとつは、これまで感音難聴治療に使われてきた薬物を DDS 技術の応用により効果を高める研究である。局所投与、全身投与、両方で研究が行われているが、最も広く行われている研究は、ステロイド局所投与における DDS 応用である<sup>7)</sup>。

### IV. 内耳領域におけるナノ DDS の応用

内耳におけるナノ DDS 研究は、薬物送達と遺

伝子導入という 2つの方向で研究が行われている。われわれも早くからナノパーティクルの応用に着目しており、シンプルなポリ乳酸およびポリグリコールを材料とするナノパーティクルの内耳 DDS への応用に関する研究を行った<sup>8)</sup>。

前述したようにナノパーティクルは、全身投与にも用いることができるので、第一に全身投与した場合の蛍光色素を含有するナノパーティクルの蝸牛での分布を肝臓や腎臓と比較した。蝸牛の血管系にナノパーティクルの局在を認めたが、有意なものではなかった<sup>8)</sup>。実際、ステロイドを含有するナノパーティクルを用いて、音響外傷に対する効果を調べたが、通常ステロイドよりも優れた効果は認められなかった。

シンプルなポリ乳酸およびポリグリコールを材料とするナノパーティクルが有効でなかった原因として、多くのナノパーティクルが全身投与後、肝臓などの細網系でとらえられてしまい徐放効果が得られにくいことがわかった。そこで、ナノパーティクルの表面をポリエチレングリコールで修飾し、肝臓などの細網系でとらえられない工夫を行った<sup>9)</sup>。すると、通常ステロイドを投与した場合と比較して、有意に多い量のステロイドが長期にわたって蝸牛に到達することが明らかとなった<sup>9)</sup>。さらに、音響外傷に対する効果を調べたところ、通常ステロイドよりも有意に良好な聴覚改善効果が認められることがわかった<sup>9)</sup>。したがって、ステロイドの全身投与において、ナノ DDS は、急性感音難聴に対する治療効果を高める可能性があることが示唆されたといえる。

シンプルなポリ乳酸およびポリグリコールを材料とするナノパーティクルは、全身投与では有効な DDS ではないことは前述したが、局所投与では有効性が期待できることが示されている<sup>8)</sup>。正円窓膜上に留置されたナノパーティクルは、蝸牛内に移行し、鼓室階に分布することがわかった。すなわち、ナノパーティクルは正円窓膜を通過することが示されたこととなる。この結果は、他施設での実験でも同様の結果が示されており<sup>10)</sup>、蝸牛内に薬物を運ぶキャリアーとしてナノパーティクルを用いることができることがわかった。この点は、マイクロパーティクルと大きく異なる点で

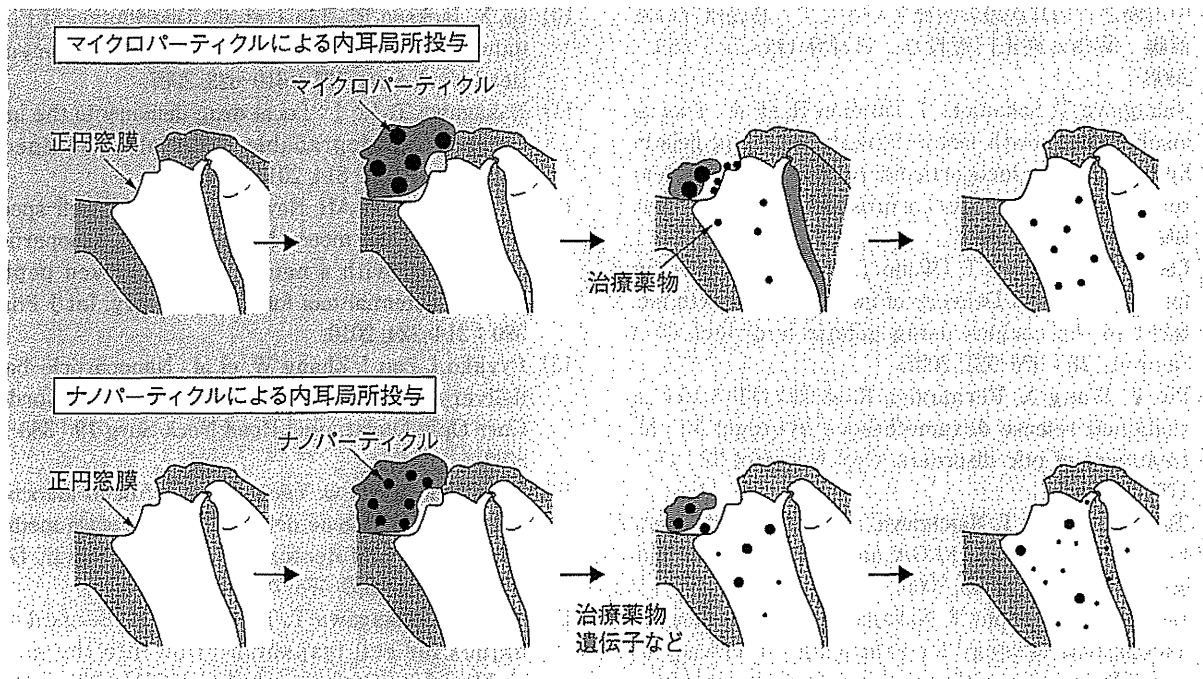


図 1 マイクロパーティクルとナノパーティクルの内耳薬物局所投与における違い (文献 11 から改変)

あり、マイクロパーティクルを正円窓膜上に置いた場合、蝸牛の外でパーティクルが分解されて、薬物が正円窓膜を通ることになるが、ナノパーティクルはパーティクルの状態ですべて正円窓膜を通過し、蝸牛の中で薬物が放出されることになる (図 1)<sup>11)</sup>。

最近の報告では、ナノパーティクル表面を修飾することにより、投与したナノパーティクルがラセン神経節細胞内に取り込まれることが示されている<sup>12)</sup>。経正円窓膜投与では、外リンパ領域には、ある程度安定してナノパーティクルを送達することが可能となりつつあるが、中央階への送達は困難とされている<sup>13)</sup>。しかしながら、蝸牛内リンパ電位を測定する技術があれば、齧歯類の小さな蝸牛であっても聴力を損なうことなく、ウイルスベクターを中央階に送達することが可能であることが示されている<sup>14)</sup>。

過去にわれわれは、細胞移植を同様の方法で行った場合、聴力低下が起こることを報告しているが<sup>15)</sup>、この違いは、投与する物質の大きさの違いと解釈できる。すなわち、マイクロスケールの細胞を中央階に投与すると機能障害は逃れられないが、ナノスケールのウイルスであれば、機能障

害は回避できるといえる。これは、将来の内耳再生医療を見据えた場合のナノパーティクルの大きなアドバンテージといえるかもしれない。

現在、さまざまな材料を使ったナノパーティクルの内耳への応用が研究されている<sup>11)</sup>。どのような材料を使うかは、ナノパーティクル表面の修飾と合わせて、どのような薬物あるいは遺伝子をどの細胞に送り込むのかによって変わる。急性感音難聴を含めた内耳障害治療に対する内耳再生を含めた新規治療法を臨床へとトランスレーションする段階で、ナノ DDS は重要な役割を担うことが予想される。

#### 文 献

- 1) Unezaki S, Maruyama K, Ishida O, et al : Enhanced tumor targeting of doxorubicin by ganglioside GM1-bearing long-circulating liposomes. *J Drug Target* 1 (4) : 287-292, 1993.
- 2) Matsumura Y, Maeda H : A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy ; mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 46 (12 Pt 1) : 6387-6392, 1986.
- 3) 田畑泰彦 (編) : 絵で見てわかるナノ DDS, 遺伝子医学 MOOK 別冊, メディカルドゥ, 大阪, 2007.

- 4) 中川隆之：内耳疾患の治療をめざして 基礎研究の最前線 薬物の経正円窓投与, 日耳鼻 111 : 655-663, 2008.
- 5) Nakagawa T, Sakamoto T, Hiraumi H, et al : Topical insulin-like growth factor-1 treatment using gelatin hydrogels for glucocorticoid-resistant sudden sensorineural hearing loss ; a prospective clinical trial. BMC Med 8 : 76, 2010.
- 6) Lee KY, Nakagawa T, Okano T, et al : Novel therapy for hearing loss ; Delivery of insulin-like growth factor-1 to the cochlea using gelatin hydrogel. Otol Neurotol 28 : 976-981, 2007.
- 7) Piu F, Wang X, Fernandez R, et al : OTO-104 ; a sustained-release dexamethasone hydrogel for the treatment of otic disorders. Otol Neurotol 32 : 171-179, 2011.
- 8) Tamura T, Kita T, Nakagawa T, et al : Drug delivery to the cochlea using PLGA nanoparticles. Laryngoscope 115 : 2000-2005, 2005.
- 9) Horie RT, Sakamoto T, Nakagawa T, et al : Stealth-nanoparticle strategy for enhancing the efficacy of steroids in mice with noise-induced hearing loss. Nanomedicine (London) 5 : 1331-1340, 2010.
- 10) Ge X, Jackson RL, Liu J, et al : Distribution of PLGA nanoparticles in chinchilla cochleae. Otolaryngol Head Neck Surg 137 : 619-623, 2007.
- 11) Nakagawa T, Ito J : Local drug delivery to the inner ear using biodegradable materials. Therapeutic Delivery 2 : 807-814, 2011.
- 12) Roy S, Johnston AH, Newman TA, et al : Cell-specific targeting in the mouse inner ear using nanoparticles conjugated with a neurotrophin-derived peptide ligand ; potential tool for drug delivery. Int J Pharm 390 : 214-224, 2010.
- 13) Pyykko I, Zou J, Zhang W, et al : Nanoparticle-based delivery for the treatment of inner ear disorders. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 19 : 388-396, 2011.
- 14) Kilpatrick LA, Li Q, Yang J, et al : Adeno-associated virus-mediated gene delivery into the scala media of the normal and deafened adult mouse ear. Gene Ther 18 (6) : 569-578, 2011.
- 15) Iguchi F, Nakagawa T, Tateya I, et al : Surgical techniques for cell transplantation into the mouse cochlea. Acta Otolaryngol (Suppl 551) : 43-47, 2004.

\* \* \*

## A minimally invasive approach for cochlear implantation using a microendoscope

Harukazu Hiraumi · Norio Yamamoto ·  
Tatsunori Sakamoto · Juichi Ito

Received: 25 May 2011 / Accepted: 15 March 2012 / Published online: 30 March 2012  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** Given the growing need for minimally invasive approaches to cochlear implantation surgery, we chose to examine the safety of a microendoscopic procedure for cochlear implantation. We performed cochlear implantation surgery on four human temporal bones using a microendoscope and evaluated the safety of the procedure. With a microendoscope, the facial recess was opened and electrodes were inserted into the cochlea. The size of the mastoidectomy ranged from  $5 \times 4$  to  $7 \times 7$  mm. For three of the temporal bones, the surgery was conducted without any damage to the surrounding structures. The chorda tympanica nerve was inadvertently sacrificed in one temporal bone, in which we skipped the identification of the incus. The microendoscope allowed cochlear implantation surgery to be performed with a mastoidectomy of minimal size.

**Keywords** Cochlear implant · Minimally invasive surgery · Microendoscope

### Introduction

Cochlear implantation is now a widely accepted treatment for profound sensorineural hearing loss. Conventional cochlear implantation surgery is conducted with the facial

recess approach, which involves the need for a wide mastoidectomy. The mastoid cell system regulates middle ear pressure [1]. Because the high area-to-volume ratio of the mastoid cell system is important for gas exchange through the mucosa [2], a wide mastoidectomy may lead to negative middle ear pressure and ear drum retraction. In cochlear implantation patients, this can result in unfavorable conditions, including cholesteatoma formation, middle ear infection, and electrode protrusion. Although some doctors are developing minimally invasive strategies for cochlear implantation surgery utilizing image guidance systems to avoid the need for a wide mastoidectomy [3, 4], these procedures are not yet commonly used. One reason for this is that surgeons are not able to see the surgical field directly. Recently, the use of microendoscopy has been reported to provide direct surgical views and requires only a small ostium [5, 6]. However, the potential use of the microendoscope in cochlear implantation surgery has not been evaluated. In this study, we examined the effectiveness and safety of microendoscopy for minimally invasive cochlear implantation surgery using human temporal bones.

### Materials and methods

Four human temporal bones with no middle or inner ear diseases were obtained from four individuals (aged from 68 to 76 years at the time of death; all four were male). A commercially available microendoscope designed for the nasolacrimal duct (0.9 mm in outer diameter, 50 mm in length, with the tip bent at an angle of approximately  $15^\circ$ ; FiberTech, Tokyo, Japan) was prepared (Fig. 1).

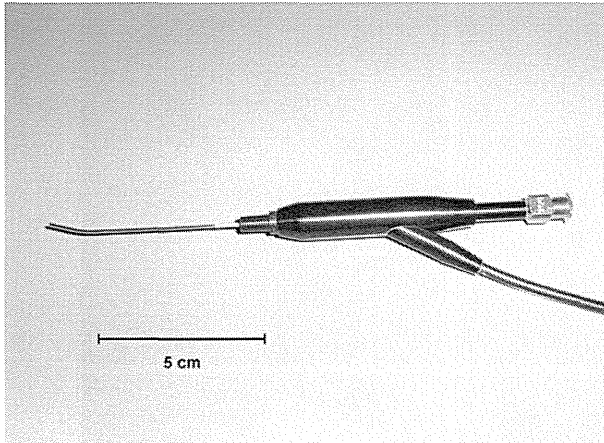
The following six steps were used to perform the cochlear implantation: (1) pre-operative planning was based on a

---

This study was presented at the Sixth International Symposium on Meniere Disease and Inner Ear Disorders, November 14–17, 2010, Kyoto, Japan.

---

H. Hiraumi (✉) · N. Yamamoto · T. Sakamoto · J. Ito  
Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery,  
Graduate School of Medicine, Kyoto University,  
Kawaharacho 54, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan  
e-mail: hhiraumi@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp



**Fig. 1** A microendoscope for the nasolacrimal duct (FiberTech, Tokyo, Japan). The outer diameter is 0.9 mm, and the length is 50 mm. The tip is bent approximately 15°. The view angle is 70°

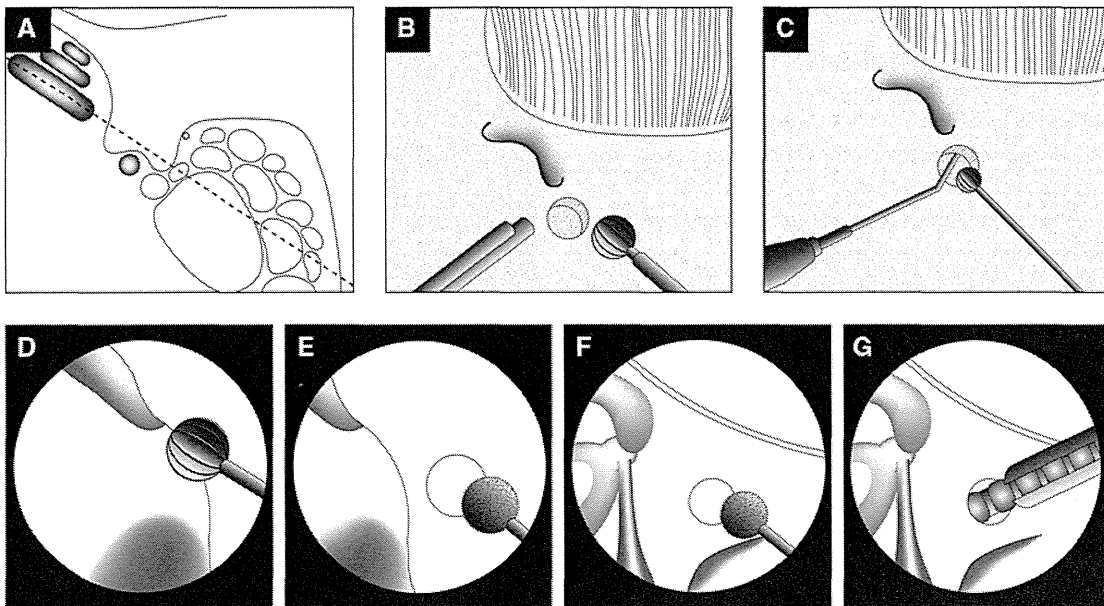
cone-beam computed tomography (CT) scan (Accuitomo, Morita, Japan). A straight line from the cortical bone to the basal turn of the cochlea was drawn on the CT scan (Fig. 2a). A three-dimensional reconstruction of the temporal bone was created, and the approaching line was projected to the cortical bone to determine where to begin drilling. (2) A small mastoidectomy hole (with a diameter of 4 mm) was made from the cortical bone to the antrum using a conventional drilling system (Fig. 2b). The following procedures were performed using a microendoscope, which was introduced through the

hole (Fig. 2c). (3) The attic is opened and the short process of the incus is identified (in this study, the incus was detected in bones 2–4) (Fig. 2d). (4) The facial recess is opened (Fig. 2e); (5) the round window niche is detected through the facial recess, and cochleostomy is performed just ventral to the round window niche (Fig. 2f). (6) Lastly, the electrode (HiRes90K 1j electrode, AB, USA) is inserted into the cochlea using an inserter (Fig. 2g). Steps 3–6 were performed using a microendoscope and a microdrill (Skeeter Otologic Drill System, Medtronic, USA). The size of the mastoidectomy was enlarged as necessary during steps 3–6. All surgical procedures were performed by one author (H.H.).

After the surgery, a CT scan was obtained, and the closest distance from the drilled path to the facial nerve and to the chorda tympani was calculated. The electrode was then removed, and the size of the mastoidectomy was measured along the surface of the temporal bone. Subsequently, the bones were drilled to check for damage to the surrounding structures. After the total mastoidectomy, the size of the posterior tympanotomy was measured using an image processing program (ImageJ: National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

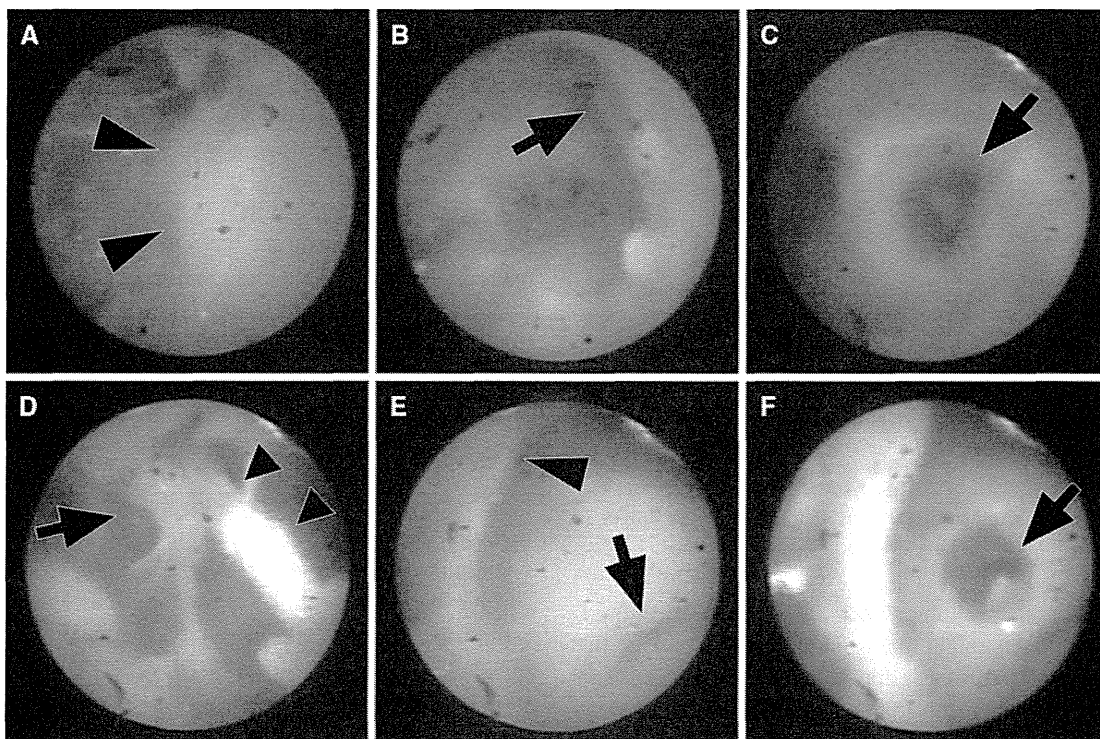
## Results

In all specimens, the prominence of the lateral semicircular canal was easily identified. In bones 2–4, the short process



**Fig. 2** Illustrations of the surgical procedure. A straight line from the cortical bone to the basal turn of the cochlea via the antrum and the facial recess was drawn on the CT scan to determine where to start drilling (a). A small mastoidectomy was made using a conventional drilling system (b). The microendoscope and microdrill were

introduced into the antrum (c). The attic was opened, and the short process of the incus was identified (d). The facial recess was opened (e). The microendoscope and microdrill were inserted through the facial recess, and a cochleostomy was performed (f). The electrode was inserted into the cochlea using an inserter (g)



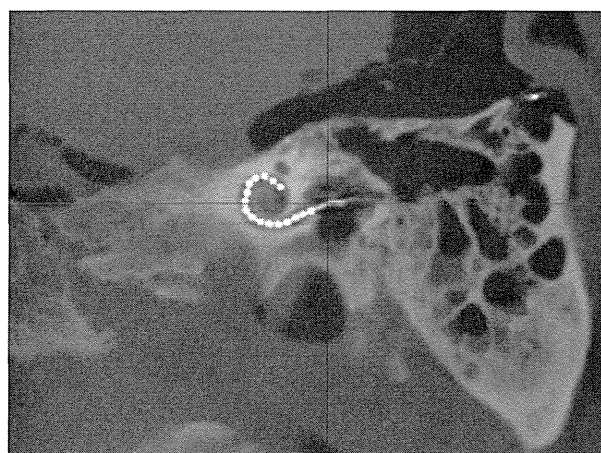
**Fig. 3** Surgical views from the microendoscopic cochlear implantation surgery performed on bone 4. **a** The prominence of the lateral semicircular canal (*arrowhead*) and **b** the short process of the incus (*arrow*) were observed. **c** The facial recess was opened (*arrow*). **d** The

incudo-stapedial joint (*arrow*), and the chorda tympani (*arrowhead*) are visible. **e** The round window niche (*arrow*) was detected (*arrowhead*: the incudo-stapedial joint). **f** The cochlea was opened (*arrow*)

of the incus was detected after a transmastoid atticotomy, and a posterior tympanotomy was performed safely. In bone 1, we did not undertake the process of identifying the incus. In this bone, the fallopian canal was opened, which was noted immediately, and severe damage to the facial nerve was avoided. However, the chorda tympani was inadvertently sacrificed. In bones 2–4, we opened the attic and detected the short process of the incus. In these bones, the fallopian canal and the chorda tympani were preserved. After opening the facial recess, the round window niche was easily detected, and a cochleostomy was performed. The intra-operative findings for bone 4 are shown in Fig. 3. In all bones, the electrodes were fully inserted into the cochlea (Fig. 4). The size of the required mastoidectomy, the size of the posterior tympanotomy, as well as the shortest distances to the facial nerve and the chorda tympani are summarized in Table 1. The surgical time required was about 90 min.

**Discussion**

In this study, we demonstrate that cochlear implantation using a microendoscope is possible and requires only a



**Fig. 4** The CT image taken after the electrode was fully inserted into the cochlea of bone 4

small mastoidectomy. The view provided by the microendoscope was sufficient to identify important landmarks while performing cochlear implantation. The handpiece of the microendoscope is quite small, and the tip is bent by 15°, which minimizes the interaction between the microendoscope and other surgical instruments. These

**Table 1** The size of the required mastoidectomy and posterior tympanotomy, and the shortest distances to the facial nerve and the chorda tympani

		Size of the mastoidectomy (mm)	Size of the posterior tympanotomy (mm)	Distance to the facial nerve (mm)	Distance to the chorda tympani (mm)
1	Lt	7 × 7	2.4 × 3.7	0.0	0.0
2	Rt	7 × 5	2.1 × 2.5	0.4	0.3
3	Lt	8 × 4	2.1 × 2.9	0.4	0.5
4	Rt	5 × 4	2.1 × 2.1	0.8	0.7

characteristics of the microendoscope allow minimally invasive cochlear implantation surgery to be performed under direct visualization.

Cochlear implantation surgery with minimal bone drilling has been explored for years. Kiratzidis et al. [7] reported the usefulness of the trans-canal wall approach. With this approach, the authors created a tunnel through the cortical bone to the facial recess using a specially developed perforator. However, this technique is performed without direct visualization. Recently, some authors have applied image guidance systems to minimally invasive cochlear implantation surgery. Majdani et al. [4] succeeded in performing a cochleostomy in human cadavers through a narrow single-channel mastoidotomy with a navigation system. Labadie et al. [8] applied stereotactic techniques to cochlear implantation surgery and showed that this method precisely identified the line from the cortical bone to the cochlea through the facial recess. While these image guidance systems “visualize” the surgical path, they do not guarantee the accuracy required for ear surgery [9, 10]. In contrast, microendoscope-based cochlear implantation surgery provides a direct surgical view. We were able to detect surgical landmarks directly and complete the surgery using the same processes as those used in the conventional facial recess approach.

However, to apply this surgery to actual patients, there are some problems that need to be addressed. For one, the resolution of the microendoscope is not as high as that of the microscope. Furthermore, the view obtained with the microendoscope is two dimensional, and it is distorted at the marginal area. Another problem is the surgical time. In this study, the surgical time was considerably longer than the time required for conventional surgery, which resulted from the low power of the microdrill and fogging of the microendoscope lens. These two points are problematic, especially in children. In small children, the area between the facial nerve and chorda tympani is small, and highly accurate procedures are needed. In addition, a surgical procedure with a short duration and minimal bleeding is required. Other potential limitations include a poorly pneumatized mastoid. In such patients, large amounts of bone must be removed, which results in a protracted surgical time. It is likely that the development of new devices specialized for microendoscopic cochlear implantation will resolve these problems. Another option to overcome these

problems is the combination of microendoscopy and use of an image guidance system. The image guidance systems provide information about temporal bone anatomy during the surgery, which enhances the accuracy of microendoscopic cochlear implantation. This also enables us to use a powerful conventional drilling system during the early stages of the operation. The effectiveness of the combination of these two technologies should be explored.

## Conclusion

This study demonstrates that the use of a microendoscope allows cochlear implantation surgery to be performed with a minimally sized mastoidectomy. The view provided by the microendoscope is sufficient to detect important landmarks, which allows for the safe execution of the facial recess approach. Microendoscopy may be applied to minimally invasive cochlear implantation in combination with other currently available technologies.

**Acknowledgments** This study was supported by a Grant-in-Aid for Young Scientists (B) (No. 21791612) and by a grant from the Japanese Foundation for Research and Promotion of Endoscopy.

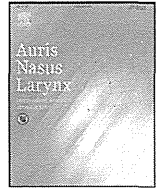
**Conflict of interest** None.

## References

1. Takahashi H, Sugimaru T, Honjo I et al (1994) Assessment of the gas exchange function of the middle ear using nitrous oxide. A preliminary study. *Acta Otolaryngol* 114:643–646
2. Magnuson B (2003) Functions of the mastoid cell system: auto-regulation of temperature and gas pressure. *J Laryngol Otol* 117:99–103
3. Labadie RF, Balachandran R, Mitchell JE et al (2010) Clinical validation study of percutaneous cochlear access using patient-customized microstereotactic frames. *Otol Neurotol* 31:94–99
4. Majdani O, Bartling SH, Leinung M et al (2008) A true minimally invasive approach for cochlear implantation: high accuracy in cranial base navigation through flat-panel-based volume computed tomography. *Otol Neurotol* 29:120–123
5. Hiraumi H, Nakagawa T, Ito J (2009) Efficiency of a transtympanic approach to the round window membrane using a microendoscope. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 266:367–371
6. Plontke SK, Plinkert PK, Plinkert B, Koitschev A, Zenner HP, Lowenheim H (2002) Transtympanic endoscopy for drug delivery to the inner ear using a new microendoscope. *Adv Otorhinolaryngol* 59:149–155



7. Kiratzidis T, Arnold W, Iliades T (2002) Veria operation updated. I. The trans-canal wall cochlear implantation. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 64:406–412
8. Labadie RF, Noble JH, Dawant BM, Balachandran R, Majdani O, Fitzpatrick JM (2008) Clinical validation of percutaneous cochlear implant surgery: initial report. *Laryngoscope* 118:1031–1039
9. Grauvogel TD, Soteriou E, Metzger MC, Berlis A, Maier W (2010) Influence of different registration modalities on navigation accuracy in ear, nose, and throat surgery depending on the surgical field. *Laryngoscope* 120:881–888
10. Grayeli AB, Esquia-Medina G, Nguyen Y et al (2009) Use of anatomic or invasive markers in association with skin surface registration in image-guided surgery of the temporal bone. *Acta Otolaryngol* 129:405–410



## The effect of pre-operative developmental delays on the speech perception of children with cochlear implants

Harukazu Hiraumi\*, Norio Yamamoto, Tatsunori Sakamoto, Shinobu Yamaguchi, Juichi Ito

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Kyoto University, Graduate School of Medicine, 54, Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 February 2011

Accepted 8 May 2012

Available online 20 June 2012

#### Keywords:

Cochlear implant  
Developmental delay  
Speech perception

### ABSTRACT

**Objective:** The objective of this study was to evaluate the relationship between developmental delays and speech perception in pre-lingually deafened cochlear implant recipients.

**Methods:** This study was a retrospective review of patient charts conducted at a tertiary referral center. Thirty-five pre-lingually deafened children underwent multichannel cochlear implantation and habilitation at the Kyoto University Hospital Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. A pre-operative cognitive-adaptive developmental quotient was evaluated using the Kyoto scale of psychological development. Post-operative speech performance was evaluated with speech perception tests two years after cochlear implantation. We computed partial correlation coefficients (controlled for age at the time of implantation and the average pre-operative aided hearing level) between the cognitive-adaptive developmental quotient and speech performance.

**Results:** A developmental delay in the cognitive-adaptive area was weakly correlated with speech perception (partial correlation coefficients for consonant-vowel syllables and phrases were 0.38 and 0.36, respectively).

**Conclusion:** A pre-operative developmental delay was only weakly associated with poor post-operative speech perception in pre-lingually deafened cochlear implant recipients.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The criteria for cochlear implantation in pre-lingually deafened children have recently been expanded, and many children with additional disabilities have undergone this procedure [1]. Although many of these children show progress after surgery [2], the benefit they receive from cochlear implantation ranges widely. For example, progress after cochlear implantation has been shown to be low in children diagnosed with pervasive developmental disorder [2,3]. Congenitally deaf-blind children also show limited development in auditory perception [2]. A developmental delay is found in approximately 30% of children who undergo cochlear implantation [4,5]. Previous studies have reported that deaf children with developmental delays, particularly delays in cognitive functioning, show poor development of speech perception skills after implantation [5–7]. However, many reports have reached this conclusion by comparing the speech outcomes of children with developmental delays to children with normal development, and little information has been presented the relationship between the extent of a pre-operative cognitive delay and outcomes [4]. Because speech perception is variable in

children with cochlear implantation [6], it is not sufficient to compare speech outcomes between delayed and non-delayed children. Instead, it is necessary to examine the relationship between development and speech outcomes in each child. To determine this relationship, we created a scatter plot of developmental quotients in cognitive-adaptive areas and post-operative speech perception scores and calculated the correlation coefficients between these factors in pre-lingually deafened children receiving cochlear implantation.

### 2. Materials and methods

Between January 1996 and December 2008, 42 pre-lingually deafened children (whose age at device implantation was younger than 60 months) underwent cochlear implantation surgery and speech habilitation therapy at the Kyoto University Hospital Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. We excluded four children with an obstructed cochlea, one child with a narrow internal auditory canal and one child who spoke a foreign language. Another child failed to take both the consonant-vowel syllables and phrase perception tests for non-medical reasons and was also excluded from the analysis. In total, 35 children were included in the analysis. All children were implanted with Nucleus multichannel devices (Cochlear Ltd., Australia). The children received the most current devices and coding strategies available

\* Corresponding author. Tel.: +81 75 751 3346; fax: +81 75 751 7225.  
E-mail address: [hhiraumi@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp](mailto:hhiraumi@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp) (H. Hiraumi).

**Table 1**  
Subject characteristics.

Characteristics	
Male/female	21/14
Mean (range) age at cochlear implantation (in months)	37 (18–58)
Mean (range) average aided hearing threshold (dBHL)	75.0 (55.0–110.0)
Etiology of deafness	
Congenital	
Unknown	27
Inner ear malformation	5
Acquired	
Bacterial meningitis	1
Viral infection	2
Device	
CI22M	6
CI24M	18
CI24R	11
Coding strategy	
ACE	27
SPEAK	8

Male/female ratio, etiology of deafness, implant device, and coding strategy are reported as the number of children included in these groups.

in Japan at the time of the surgery. Six children were implanted with CI22M, 18 children were implanted with CI24M, and 11 children were implanted with CI24R. The coding strategies used at the post-operative evaluation were SPEAK, for 8 children, and ACE, for 27 children. In all cases, all of the active electrodes were successfully inserted into the cochlea. The patients' information is shown in Table 1.

The developmental quotients were evaluated according to the Kyoto scale of psychological development, which is one of the most widely used developmental tests in Japan. In the version administered in this study, the valid age range was from 3 months to 14 years. The Kyoto scale of psychological development is highly correlated with the Stanford–Binet intelligence scale and is reported to be useful in assessing the development of small children with various disabilities [8]. We routinely administer this test to children who undergo cochlear implantation surgery. This test is an individualized, face-to-face test that assesses a child's development in the following three areas: postural–motor (fine and gross motor functions), cognitive–adaptive (non-verbal reasoning or visuospatial perceptions assessed using materials) and language–social (interpersonal relationships, socializations and verbal abilities). Typically, it takes approximately 30 min to complete the tests. A score from each of the three areas is converted to a developmental age. The developmental age for each area is divided by the child's chronological age and multiplied by 100 to yield a developmental quotient. Of the developmental quotients for the three areas, the developmental quotient for the cognitive–adaptive area (DQCA) was used in the current study. The standard deviation of the developmental quotients in the Kyoto scale of psychological development is 10. Therefore, children with a DQCA score below 80 were considered delayed, and children with a DQCA score above 80 were considered non-delayed.

Speech perception tests were conducted 2 years after implantation. Consonant–vowel (CV) syllables and short sentences were used in the tests. In the CV syllable perception test, thirteen CV syllables, composed of thirteen Japanese consonants and the vowel /a/, were presented twice (a total of 26 CV syllables). In the phrase perception test, 40 phrases were arranged to form 10 short sentences. The CV syllable perception test was a closed set, and the phrase perception test was an open set. These parts of speech were spoken by a male professional announcer and digitized at a sampling rate of 44,100 Hz. Speech was presented through speakers at 70 dB SPL (using a PowerMac PM-7300/166 computer, Apple, USA) in a random order, and the percentage of correct

answers was recorded. Some children were not able to complete the speech perception test because of poor understanding or poor expressive abilities. For these patients, the percentage of correct answers was set to a chance level (in the CV syllable perception test) or to zero (in the phrase perception test). Five children did not take the phrase perception test for non-medical reasons. These children were excluded from the phrase perception test analysis.

The association between the pre-operative DQCA and speech perception scores was analyzed in two ways. First, the speech perception scores of delayed and non-delayed children were compared using *t*-tests. Second, a correlation analysis was conducted between the pre-operative DQCA and speech perception scores. We calculated the Pearson's correlation coefficient and the partial correlation coefficient. The Pearson's correlation analysis represents an estimated linear regression line. The partial correlation analysis is a multivariate analysis that clarifies a relationship between two factors, taking into account the influence of other factors. In the current study, a partial correlation coefficient was calculated, controlling for age at the time of implantation and the average pre-operative aided hearing level. All statistical analyses were performed using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 11.0 (SPSS Inc., Illinois, USA).

### 3. Results

The DQCA scores ranged from 45 to 118, with a mean value of 87. Eleven children (31%) were considered developmentally delayed, and 24 children (69%) fell into the normal development range. The age at time of implantation and the pre-operative aided hearing level were not significantly different between the delayed and the non-delayed groups ( $p = 0.11$  and  $p = 0.93$ , respectively; *t*-test). The cause of deafness, the implant device, and the coding strategy did not differ between the two groups ( $p = 0.56$ ,  $p = 0.56$ , and  $p = 0.67$ , respectively; chi-square test). The speech perception scores of the delayed and non-delayed groups are presented in Table 2. The CV syllable and phrase perception scores in the non-delayed group were significantly higher than those in the delayed group ( $p < 0.05$  for the CV syllable test and  $p < 0.05$  for the phrase perception test; *t*-test).

Scatter plots of the DQCA and speech perception scores are shown in Figs. 1 and 2. The relationship between the DQCA scores and the speech perception scores was moderate (correlation coefficient = 0.48,  $p < 0.01$  for the CV syllable perception test; correlation coefficient = 0.49,  $p < 0.01$  for the phrase perception test; Pearson's correlation coefficient). After removing the effect of age at the time of implantation and the average pre-operative aided hearing level, we found that the relationship between the DQCA scores and the speech perception scores was weak (partial correlation coefficient = 0.38,  $p < 0.05$ , one-tailed, for the CV syllable perception test; partial correlation coefficient = 0.36,  $p < 0.05$ , one-tailed, for the phrase perception test).

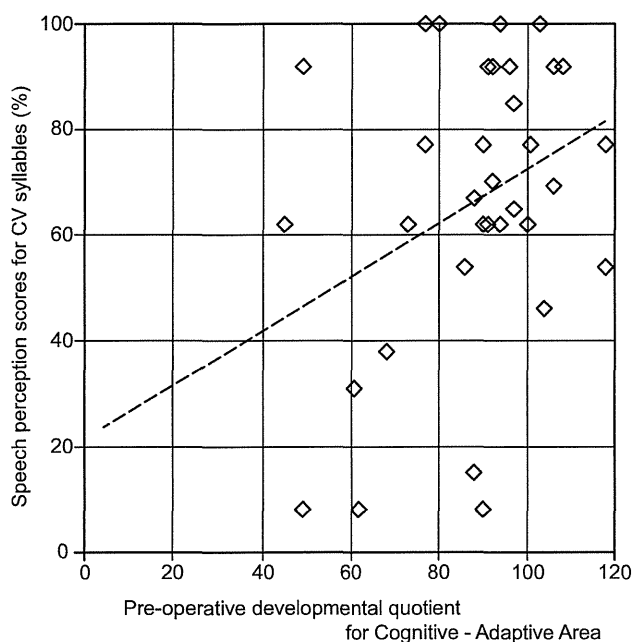
**Table 2**  
Speech perception scores of delayed and non-delayed children.

	Mean	SEM	Significance
CV syllable perception score			
Delayed group	44%	11%	0.02*
Non-delayed group	70%	5%	
Phrase perception score			
Delayed group	52%	14%	0.03*
Non-delayed group	84%	7%	

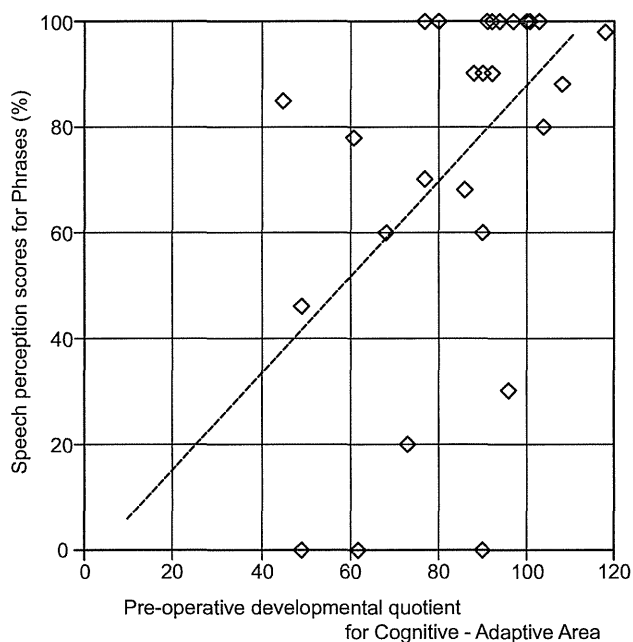
Mean speech perception scores of delayed and non-delayed children are reported as percentages. The delayed group scored significantly lower than the non-delayed group in CV syllable and phrase perception tests (*t*-test).

SEM: standard errors of the means.

\*  $p < 0.05$ .



**Fig. 1.** Scatter plot relating pre-operative DQCA scores to post-operative CV syllable perception scores. The dotted line indicates the estimated linear regression. Children with higher pre-operative DQCA scores had better post-operative CV syllable perception scores (Pearson's correlation coefficient = 0.48,  $p < 0.01$ ; partial correlation coefficient = 0.38,  $p < 0.05$ ). However, the outcomes varied between children with similar pre-operative developmental quotients.



**Fig. 2.** Scatter plot relating pre-operative DQCA scores to post-operative phrase perception scores. The dotted line indicates the estimated linear regression. Many children with a normal DQCA score (above 80) scored above 80% on the post-operative phrase perception test, although the relationship between pre-operative DQCA and post-operative phrase perception scores was not strong (Pearson's correlation coefficient = 0.49,  $p < 0.01$ ; partial correlation coefficient = 0.36,  $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

In this study, 31% of implanted children were considered developmentally delayed. The incidence of developmental delays in children who have undergone cochlear implantation was previously reported to be 23–34% [4–7], and our results fell within this range. Children with a developmental delay are reported to show poor speech outcomes. Pyman et al. compared the speech perception of children with a developmental delay to that of children with normal development and found that children with developmental delays tended to progress more slowly than other children [7]. In a study by Holt and Kirk, children with a developmental delay also showed slower progress in sentence recognition tests [6]. In that study, the authors stressed that the intersubject variability was quite large. In the present study, children with a developmental delay in the cognitive–adaptive area showed significantly poorer speech perception than children without a developmental delay, and the intersubject variability was large, particularly in children with developmental delays.

This large intersubject variability was also observed in the correlation analysis. The correlation between the pre-operative DQCA and the post-operative speech perception scores was weak after removing the effect of other factors. This finding indicates that individual variability is large in children with similar developmental statuses. This result seems reasonable because the outcome of the cochlear implantation can be influenced by several factors, including the habilitation program, technological improvements, and family characteristics. Edwards et al. reported a high coefficient of determination between a developmental delay in cognitive areas and speech perception outcomes [4], which differs from the findings in the present study and a previous study [6]. This difference in findings may be explained by the characteristics of the children included in the studies. In our study, 11 of 35 children were developmentally delayed, and many were only mildly delayed. In the Edwards et al. study, 11 of 32

children were delayed, and 3 children were significantly delayed. This specific patient population may have led to the high coefficient of determination. In the study by Edwards et al., children with a mild delay made appreciable progress [4], and this result is consistent with the present study.

In the present study, a developmental delay showed a weak but significant correlation with speech perception scores. Holt and Kirk suggested that a low speech perception score in delayed children does not necessarily indicate poor listening ability; poor knowledge of grammar or a limited vocabulary may also lead to low speech perception scores [6]. In the present study, we used CV syllables and phrases to evaluate speech perception. Although the two tests require different degrees of linguistic ability, the correlation coefficients were similar. This finding suggests that the low speech recognition scores in delayed children are a result of poor listening ability. However, this result does not indicate that these children are not good candidates for cochlear implantation. Some children with developmental delays had speech perception scores that were comparable to children without developmental delays. Children with poor results may be delayed only at the stage in which they were classified at the time of examination. It is possible that these children will catch up to non-delayed children after several years.

This study showed that a pre-operative developmental delay negatively affected post-operative speech perception, but the impact was not large. Children with a similar pre-operative development status showed variable outcomes. Thus, it does not seem possible to define a developmental quotient cutoff level for the indication of cochlear implantation.

#### 5. Conclusions

Pre-operative developmental delays were only weakly associated with poor post-operative speech perception two years after cochlear implantation. Outcomes varied between children with