

**Fig. 2.** Dimensions of the cochlear and stapes model.  $S_V$ ,  $S_T$ , and  $S_{AC}$  are a cross-section area of the SV, the ST, and the cochlear aqueduct (unit is  $\text{mm}^2$ ). Stapedial annular ligament binds the edge of the stapes footplate to the rim of the OW. The OW membrane covers the inner surfaces of the stapes footplate and the stapedial annular ligament. The stapedial annular ligament and the OW membrane were fixed at the rim of the OW. The arrows show the area where the pressure was applied.

end of the cochlear aqueduct (at the lower end of the aqueduct in Fig. 1) was set to be “outlet”, and the pressure fluctuation of the lymphatic fluid at the face of the outlet was fixed at zero. That is, the lymphatic fluid was assumed to be able to flow without restraint at the outlet.

To investigate the effects of a fistula on the vibration of the BM, a small outlet was opened on the bony wall of the cochlea as shown in Fig. 3. Although the size of a real fistula is usually not measured during surgery, it is estimated to be small (Ikezono et al., 2010). In this study, micro-sized outlets were made. The shapes of the outlets

were assumed to be rectangle, and the areas and aspect ratios of each outlet are shown in Table 3.

For each frequency, a single sinusoidal tone of pressure amplitude of 0.2 Pa was applied to the surface of the stapes head (Fig. 2), and the induced vibration of the lymphatic fluid and structures

**Table 1**  
Dimensions of the cochlear model.

<b>Cochlea</b>	
Length <sup>a</sup>	28.6 mm
<b>Basilar membrane<sup>d</sup></b>	
Length	26.1 mm
Width	
Base	100 $\mu\text{m}$
Apex	500 $\mu\text{m}$
Thickness	
Base	30 $\mu\text{m}$
Apex	10 $\mu\text{m}$
<b>Cochlear fluid (volume)<sup>b</sup></b>	
Total fluid space	118.2 $\text{mm}^3$
Cochlear space	48.8 $\text{mm}^3$
Vestibular space	69.4 $\text{mm}^3$
<b>Round window membrane<sup>c</sup></b>	
Area	2.21 $\text{mm}^2$
Thickness	60 $\mu\text{m}$
<b>Oval window membrane</b>	
Area <sup>e</sup>	4.22 $\text{mm}^2$
Thickness	60 $\mu\text{m}$

<sup>a</sup> Ulehlova et al. (1987).

<sup>b</sup> Igarashi et al. (1986).

<sup>c</sup> Becvarovski (2004).

<sup>d</sup> Wever (1949).

<sup>e</sup> Koike et al. (2002).

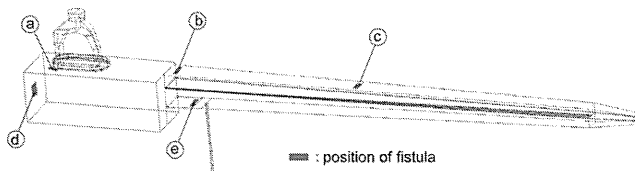
**Table 2**  
Mechanical properties used in the model.

<b>Cochlear fluid</b>	
Density <sup>a</sup>	$1.034 \times 10^3$ [ $\text{kg}/\text{m}^3$ ]
Viscosity	$2.8 \times 10^{-3}$ [ $\text{N s}/\text{m}^2$ ]
<b>Basilar membrane<sup>a</sup></b>	
Young's modulus	$6.33 \times 10^6$ [Pa]
Poisson's ratio	0.49
Density	$1.2 \times 10^3$ [ $\text{kg}/\text{m}^3$ ]
<b>Round window membrane</b>	
Young's modulus	$3.34 \times 10^7$ [Pa]
Poisson's ratio	0.49
Density	$1.2 \times 10^3$ [ $\text{kg}/\text{m}^3$ ]
<b>Oval window membrane</b>	
Young's modulus	$3.34 \times 10^6$ [Pa]
Poisson's ratio	0.49
Density	$1.2 \times 10^3$ [ $\text{kg}/\text{m}^3$ ]
<b>Osseous spiral lamina<sup>c</sup></b>	
Young's modulus	$2.0 \times 10^{11}$ [Pa]
Poisson's ratio	0.3
Density	$1.2 \times 10^3$ [ $\text{kg}/\text{m}^3$ ]
<b>Stapes<sup>b</sup></b>	
Young's modulus	$1.2 \times 10^{10}$ [Pa]
Poisson's ratio	0.3
Density	$2.75 \times 10^3$ [ $\text{kg}/\text{m}^3$ ]
<b>Stapedial annular ligament<sup>b</sup></b>	
Young's modulus	$4.9 \times 10^5$ [Pa]
Poisson's ratio	0.3
Density	$2.5 \times 10^3$ [ $\text{kg}/\text{m}^3$ ]
<b>Rayleigh damping parameters</b>	
$\alpha$	10020 [1/s]
$\beta$	$6.43 \times 10^{-7}$ [s]

<sup>a</sup> Andoh and Wada (2004).

<sup>b</sup> Koike et al. (2002).

<sup>c</sup> Lim et al. (2005).



**Fig. 3.** Position of the fistula on the bony wall of the cochlea. The fistula was opened adjacent to the OW (a), at the basal part of the SV (b), center part of the SV (c), vestibule (d), and adjacent to the RW (e). The fistulas are not drawn to scale.

were calculated. Because the effective area ratio of the stapes head to the TM in this model and the low-frequency lever ratio for the ossicles are  $7.8 \times 10^{-3}$  and 1.3, respectively, the middle ear pressure gain is 44 dB. Therefore, the 0.2 Pa at the stapes head is equivalent to 36 dB at the TM at low frequencies.

### 2.3. Formulation

All calculations in this study were done using CFD-ACE+ software (ESI CFD Inc.). CFD-ACE+ is a Computational Fluid Dynamics and Multiphysics software. It enables coupled simulations of fluid, thermal, chemical, biological, electrical and mechanical phenomena. In this study, the fluid–structure interaction was considered. Macroscopic fluid response is assumed to be incompressible, and thus an incompressible Navier–Stokes equation is used to analyze the dynamic behavior of the lymphatic fluid. The incompressible Navier–Stokes equation is as follows:

$$\frac{\partial \mathbf{v}_f}{\partial t} + (\mathbf{v}_f \cdot \nabla) \mathbf{v}_f + \frac{1}{\rho} \nabla p - \nu \Delta \mathbf{v}_f = 0, \quad (1)$$

where  $\mathbf{v}_f$  is the fluid velocity vector,  $\rho$  is the fluid density,  $p$  is the fluid pressure caused by the motion of the structure,  $\nu$  is the kinematic viscosity of the fluid,  $t$  is the time, and the gradient operator  $\nabla$  and the Laplacian operator  $\Delta$  are defined in the following form

$$\nabla = \left( \frac{\partial}{\partial x}, \frac{\partial}{\partial y}, \frac{\partial}{\partial z} \right), \Delta = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}. \quad (2)$$

In the structure model, the equation of the motion is represented by the following matrix differential equation:

$$[M] \frac{\partial^2 \mathbf{u}_s}{\partial t^2} + [C] \frac{\partial \mathbf{u}_s}{\partial t} + [K] \mathbf{u}_s = \mathbf{f}, \quad (3)$$

where  $[M]$ ,  $[C]$ , and  $[K]$  are the mass, damping, and stiffness matrices, respectively,  $\mathbf{u}_s$  is the structural displacement vector,  $\mathbf{f}$  is the force vector, and  $t$  is the time. The damping matrix  $[C]$  is derived from the linear combination of mass and stiffness matrices, i.e.,

$$[C] = \alpha[M] + \beta[K], \quad (4)$$

where  $\alpha$  and  $\beta$  are Rayleigh damping parameters. The values of the vectors at each time step were obtained using the Newmark- $\beta$  algorithm.

This analysis used the two-way coupling option. A converged steady-state flow field was obtained, and then the pressure loading

from that flow field was applied to the Stress Module to calculate the resulting stresses. Next, the geometry deformations from the structural analysis were fed back to the Flow Modules. The Navier–Stokes Eq. (1) contains a nonlinear term, and the nonlinear fluid motion is coupled back into the right hand side of the kinematic Eq. (3) for the structure model. Consequently, the BM also shows nonlinear motion. However, in a preliminary investigation, the nonlinear component of the BM vibration was too small, and the amplitude of the BM vibration linearly increased by increasing the applied pressure to the stapes head in the pressure range from 0.2 Pa (36 dB at the TM) to 20 Pa (76 dB). The nonlinearity originated in the response of the lymphatic fluid is therefore negligible in this study.

The OW membrane, the RW membrane, and the BM were meshed by Solid Shell Elements. Other parts were meshed by Standard Elements (eight-noded hexahedral elements). The BM was divided equally into 99 elements longitudinally and four elements transversally. The total numbers of the nodes and elements were 41,912 and 28,393, respectively.

## 3. Results

### 3.1. Traveling wave and tonotopic map

Fig. 4 shows the time course of the vibration of the BM at 0.5 and 5 kHz obtained using the FE model. A traversing wave was generated on the BM by vibrating the stapes head, and the position where the traveling wave reached its maximum amplitude was changed according to the stimulus frequency. Greenwood reported the relationship between the frequency of the sound applied to the cochlea and the position where the vibration of the BM shows the maximum amplitude based on measurement results; in other words, the distribution of the characteristic frequency (CF) of the BM (Greenwood, 1990). The dashed line in Fig. 5 shows this relationship. The vertical axis shows the frequency of the sound applied to the cochlea, and the horizontal axis shows the normalized position of the BM from base to apex. The dots in Fig. 5 show the numerically obtained results. Although points of the numerical results lie consistently above the dashed line (about 0.6 oct), the CF distribution obtained from the model is reasonable.

Fig. 6 shows the ratio of the amplitude of the BM to the amplitude of the stapes footplate at the position where the CF of the BM is 2.0 kHz. The numerically obtained results shown by the dots have a similar tendency to the measurement result (Stenfelt et al., 2003) shown by the dashed line although the measurement result has some peaks and notches.

### 3.2. Effect of the fistula on the vibration of the basilar membrane

Fig. 7 shows the time course of the vibration of the BM at 1.0 kHz. The shape of the traveling wave envelope showed no remarkable change when the fistula existed adjacent to the OW (a in Fig. 3), at the basal end of the cochlea (b), and at the vestibule (d). However, the maximum amplitudes of the BM in these cases were smaller than that in the intact cochlea (f) by 11.4 dB, 8 dB and 5.5 dB, respectively. By contrast, when the fistula existed at the center part of the scala vestibuli (c) (12.8 mm from the basal end, CF is 2 kHz), both the shape and amplitude of the traveling wave changed. The envelope of the traveling wave has a notch at the position where a fistula exists, and the maximum amplitude was reduced by 8.4 dB. Fig. 8 shows the time course of the vibration of the BM for stimulus frequencies of 0.5, 1.0 and 2.0 kHz when a fistula exists at the center part of the scala vestibuli. The notch at the position where the fistula exists was remarkable when the input frequency was lower than the CF at the position where the fistula existed. The notch became unclear with increasing input

**Table 3**  
Area of the fistula.

Position	Area (mm <sup>2</sup> )	Aspect ratio
a	0.117	1.50
b	0.075	1.19
c	0.062	1.12
d	0.082	1.32
e	0.764	2.82

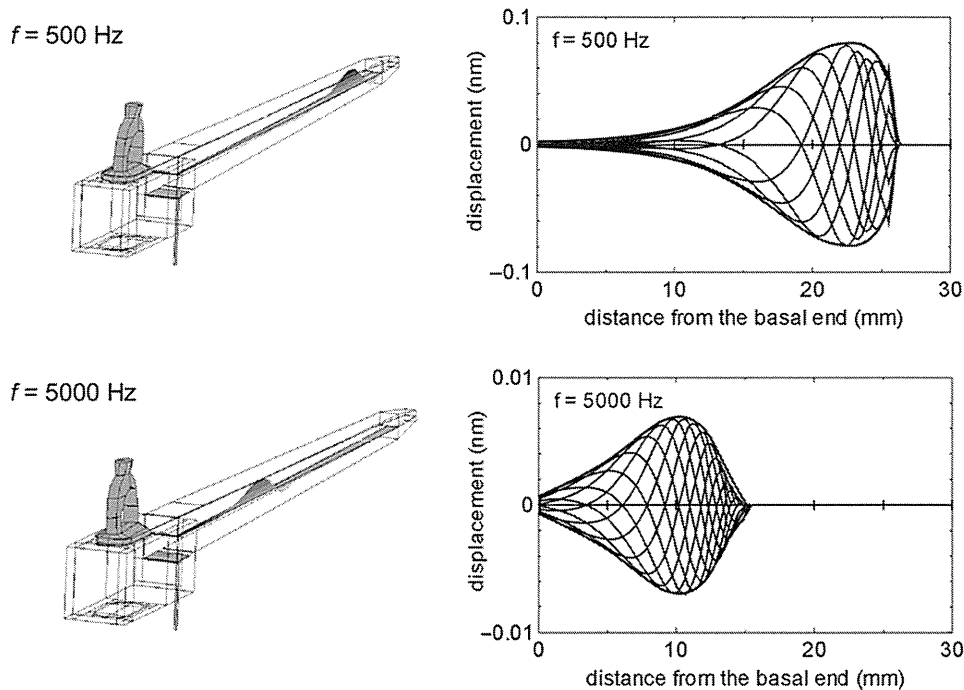


Fig. 4. Time course of BM vibrations in normal cochlea. A small shift (10% of the maximum amplitude) is generated at the basal end ( $x=0$ ) when  $f=5.0$  kHz.

frequency, and disappeared when the input frequency came close to or exceeded the CF at the position where the fistula existed.

Fig. 9 shows the time course of the vibration mode of the BM and the pressure difference between the scala vestibuli and scala tympani at the surfaces of the BM. In the intact cochlea, the pressure difference was relatively large at the basal part of the cochlea and decreased gradually from base to apex. By contrast, in the case of the cochlea with a fistula at the center part of the scala vestibuli, the pressure difference rapidly decreased to the part where the fistula existed.

The ratio of the maximum amplitude of the BM with a fistula to that in the intact cochlea is shown in Fig. 10. When the fistula was opened at the vestibule (a, d) or at the scala vestibuli (b, c), the maximum amplitude of the BM was smaller than that in the intact cochlea, and the BM amplitude decreased with decreasing frequency. By contrast, when the fistula existed at the vicinity of the RW (e), the shape of the traveling wave envelope and the maximum amplitude were scarcely changed. Regarding the place of maximum BM amplitude, no significant change was observed between before

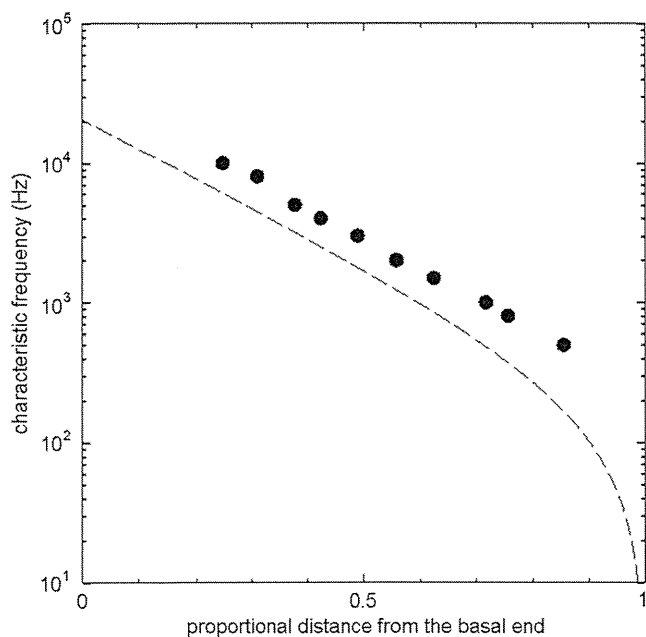


Fig. 5. Distribution of the characteristic frequency of the BM. The dashed line shows the measurement results by Greenwood (1990), and dots show the numerical results.

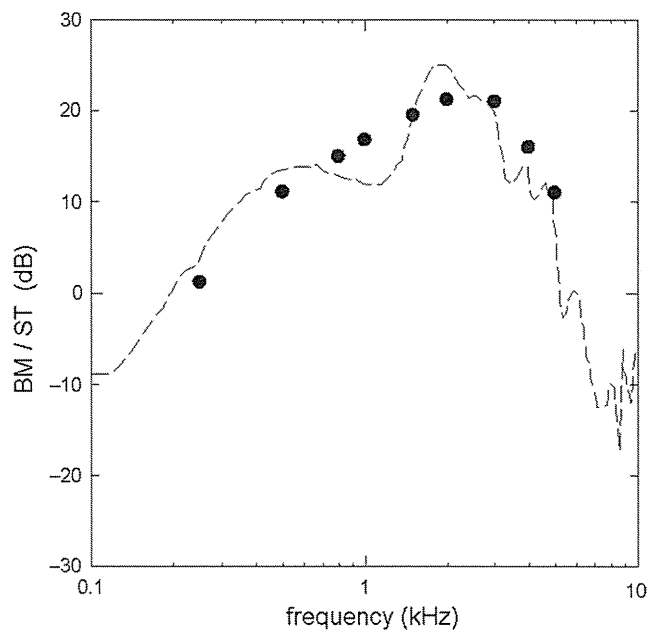
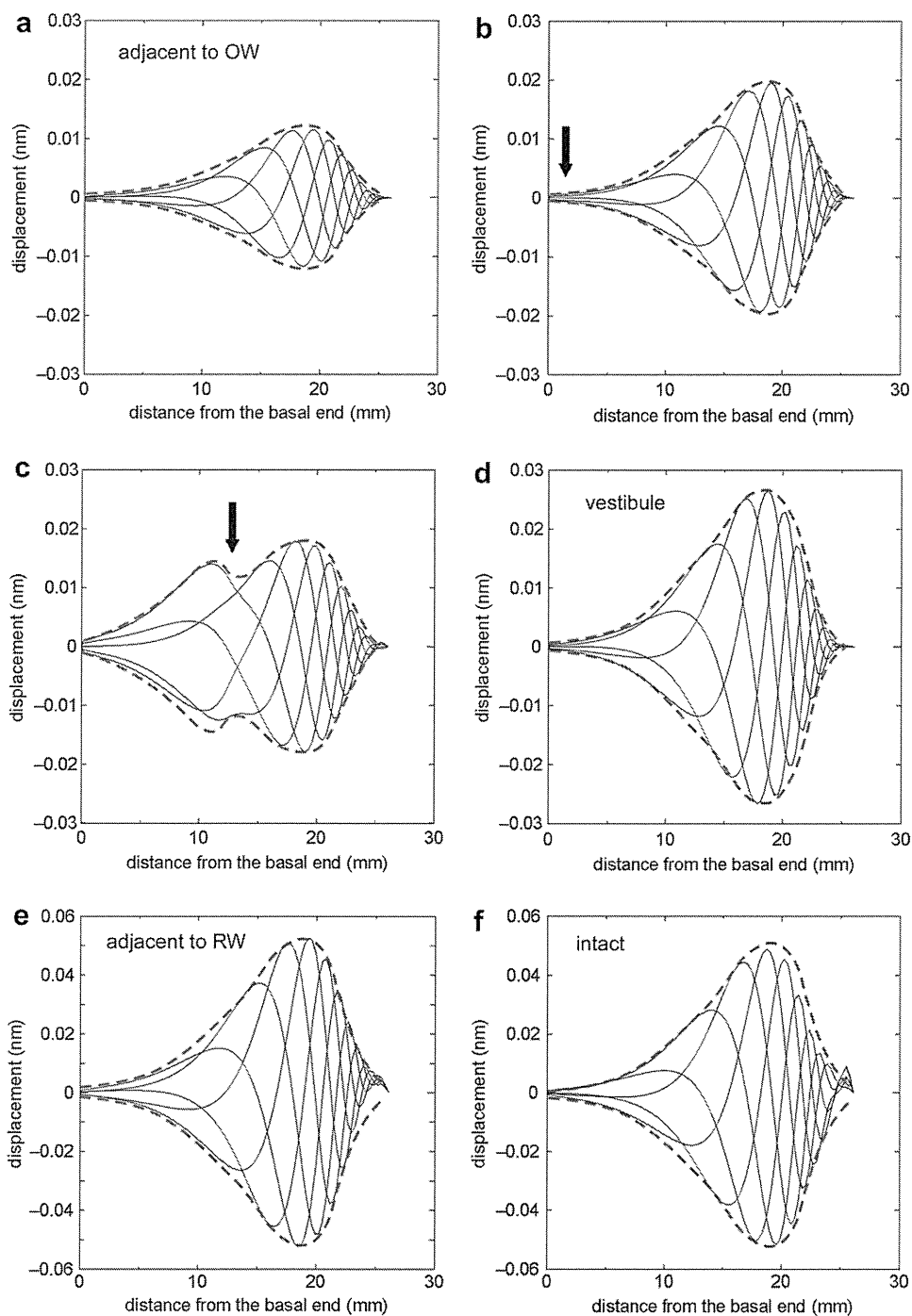


Fig. 6. BM velocity relative to stapes footplate velocity. The dashed line shows the measurement results by Stenfelt et al. (2003), and the dots show the numerical results.



**Fig. 7.** Time course of BM vibrations when a fistula exists. Applied frequency is 1.0 kHz. (a) the fistula exists adjacent to the OW, (b) at the basal part of the SV, (c) center part of the SV, (d) vestibule and (e) adjacent to the RW. (f) Intact cochlea. Phase interval is  $2\pi/5$ . Arrows show the position of the fistula.

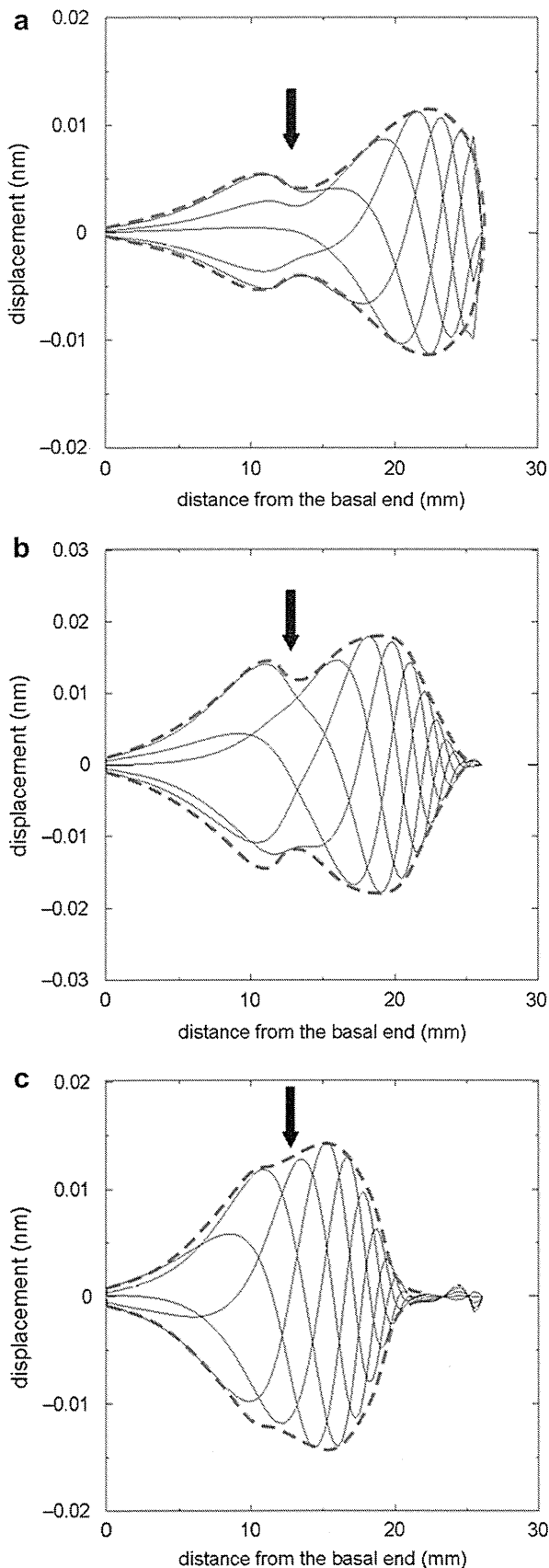
and after opening the fistula at the frequencies at which the results were obtained.

#### 4. Discussion

##### 4.1. Relevance of the model

When a fluid pressure fluctuation is induced by vibration of the stapes, two types of pressure waves occur in the cochlea (Lighthill, 1981). One is a fast wave which is a compressional wave caused by

the stapes vibration. It is uniformly distributed over the cross-section of each scala, and propagates at the velocity of sound. The magnitude difference of the fast wave between the SV and the ST is possibly caused by the stiffness and damping of the BM. The other is a slow wave which results from a fluid flow according to the interaction between the BM and the lymphatic fluid, and the slow wave follows a traveling wave on the BM. The slow wave exists in the vicinity of the BM and has equal magnitude with opposite phases at either side of the BM. The fast wave travels at 1400 m/s, and the speed of energy flow of the slow wave falls from around



100 m/s at the base to zero at the position of resonance (Lighthill, 1981). The wavelengths of the fast wave and the slow wave are estimated to be 280 mm and 20–0 mm for a stimulation of 5 kHz, respectively. The wavelengths of the fast wave are much longer than the length of the cochlea model (36.7 mm); therefore, the assumption of the incompressible fluid is acceptable. In contrast, the wavelength of the slow wave can be shorter than the size of the liquid elements (0.26 mm) near the position of resonance. Therefore, the slow wave at the neighborhood of the portion of resonance may not be accurately estimated. However, the wavelength of the slow wave is approximately 3 mm at the apical side of the position of the resonance, and the amplitude of the slow wave becomes smaller toward the apical part as shown in Fig. 9 ( $f=1.0$  kHz). This wavelength is relatively longer than the size of the liquid elements, and the contribution of the pressure of the slow wave at the apical side away from the resonance position is negligible. The same can be said for other frequencies. Therefore, the contribution of the locally generated slow wave near the BM at the resonance position is believed to be reasonably considered in this model.

The CF distribution is determined by the distribution of the thickness and mechanical properties of the BM. However, determining the proper values in the human cochlea is difficult at present. Therefore, we assumed simple shape and mechanical properties, and checked the validity of the model as a whole by comparing the numerically obtained CF distribution with that obtained by Greenwood (Fig. 5). Our results were plotted consistently above Greenwood's map. Greenwood's map is for active conditions whereas our model is passive. This may be one reason for the model CF values lying consistently above Greenwood's CF map. However, the CF distribution is susceptible to the effect of the stiffness of the BM. When Young's modulus of the BM was reduced to 40% of the value presented in Table 2, the numerical results were in good agreement with the Greenwood's map. In addition, as described in the Geometry section, the spiral shape of the cochlea also affects the CF distribution. The spiral shape contributes to shifting the CF of a certain position of the BM to low frequency. Therefore, Young's value of the BM in Table 2 was used for the straight model. Although there is still room for improvement, the model herein presented is believed to have reasonable validity and to be able to simulate the dynamic behavior of the cochlea at medium to high SPLs.

#### 4.2. Shape of the envelope of the traveling wave

The mechanism of hearing loss directly caused by existence of PLF has not been clarified so far. Hence, the potential causes of hearing loss associated with PLF such as double-membrane break theory (Simmons, 1979), floating labyrinth (Nomura and Hara, 1986; Nomura et al., 1992), perilymphatic hemorrhage (Merchant et al., 2005), pneumolabyrinth (Nishioka and Yanagihara, 1986; Foster and Luebke, 2002), and a bony third window (Merchant and Rosowski, 2008) have been postulated. However, the effects of mixing of the endolymph and perilymph were not examined here because Reissner's membrane has been neglected and the lymph in the cochlea is assumed to be homogeneous in the current cochlear model presented in this study. These effects should be included in the future. However, at this stage, the effects of the existence of PLF by itself on the vibration of the BM were examined here from the view of dynamics.

**Fig. 8.** Time course of BM vibrations when a fistula exists at the center part of the SV. (a) 0.5 kHz, (b) 1.0 kHz, (c) 2.0 kHz. Phase interval is  $2\pi/5$ . Arrows show the position of the fistula. The small displacement of the BM found at the apical region is the transient response generated shortly after applying the sinusoidal vibration to the stapes. This small displacement disappeared within a few cycles.

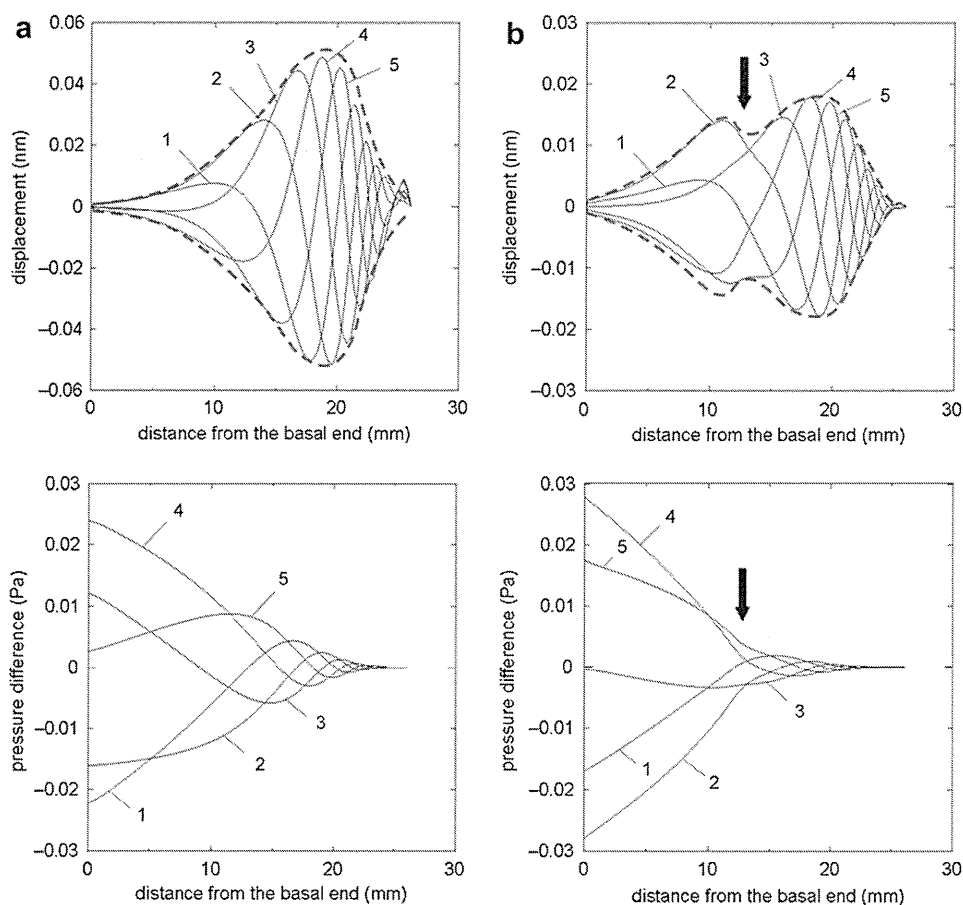


Fig. 9. Time course of BM vibrations and pressure difference between SV and ST. Frequency is 1.0 kHz. Phase interval is  $2\pi/5$ . The numbers present the time course. (a) Intact cochlea. (b) Cochlea with a fistula at the center part of the scala vestibuli. Arrow shows the position of the fistula.

The effects of the fistula on the vibration of the BM were different according to the position of the fistula and to the applied frequency as shown in Figs. 7–9. As shown in Fig. 9, when a fistula exists at the center part of the scala vestibuli and the applied frequency is lower than the CF of the part where the fistula exists, the amplitude of the BM decreases at the part where the fistula existed, resulting in two peaks in the BM amplitude response (wave envelope). The BM is excited by the pressure difference between the scala vestibuli and scala tympani. When a fistula exists on the wall of the scala vestibuli, the pressure of the scala vestibuli falls down in the area from the part of the fistula to apex, and the exciting force acting on the BM is also consequentially reduced. The amplitude at that area is therefore reduced. However, the original peak of the BM still exists in that area. These are reasons why the BM has two peaks and a notch when a fistula exists on the wall of the scala vestibuli and frequencies lower than the CF are applied to the cochlea. This result suggests that the BM in the real cochlea possibly has two peaks in its motion according to the position of a fistula, and the change in the shape of the traveling wave envelope may affect speech recognition.

#### 4.3. Vibration amplitude of the basilar membrane

The maximum amplitude of the BM was reduced at low frequencies below 2 kHz when a fistula existed at the vestibule or at the scala vestibuli (Fig. 10). The vibration of the BM became small especially at low frequencies when the fistula existed at the

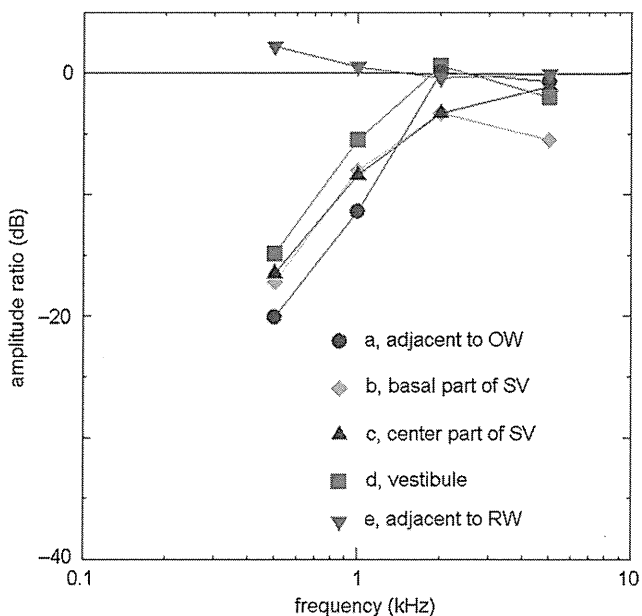


Fig. 10. Ratio of the maximum amplitude of the BM in the cochlea with a fistula to that in the intact cochlea.

vestibule or at the scala vestibuli. This result is consistent with clinical data of patients suffering from PLF (Goto et al., 2001). At low frequencies, the pressure generated in the cochlea with a fistula becomes lower than the pressure in the intact cochlea because the lymphatic fluid easily flows in and out through the fistula. By contrast, at high frequencies, the movement of the lymphatic fluid depends on the inertia of the lymphatic fluid itself rather than on the boundary condition surrounding the lymphatic fluid. This is a reason why the changes in the vibration of the BM at high frequencies are smaller than those at low frequencies.

Meanwhile, when a fistula existed adjacent to the RW, the maximum amplitude was not changed significantly even though the size of the fistula adjacent to the RW is larger than that of the fistula at other places (Table 3). Foster and Luebke (2002) reported that the RW fistula itself does not cause hearing loss, and air bubbles entered into the cochlea from the fistula. Our findings are in agreement with this result. The RW membrane is far more mobile than the bony wall of the cochlea, and the lymphatic fluid at the vicinity of the RW can naturally flow easily. In other words, the RW can be regarded as a large fistula. This is the reason why a fistula near the RW does not affect the vibration of the BM. On the other hand, Kelly and Khanna (1984) reported that opening the round window caused histological damage in the apical region of the BM presumably due to a large momentary pressure differential created across the organ of Corti. This damage was similar to that induced by low-frequency sound and may cause the loss of sensitivity of the BM (Leonard and Khanna, 1984). In our present analysis, the damages of the organ of Corti and the BM have not been considered, and hearing loss was estimated based on only the attenuation of the BM vibration. To clarify the actual mechanism of hearing loss caused by a perilymphatic fistula, the effects of the histological damages should most likely be considered in the future.

## 5. Conclusions

In this study, a three-dimensional finite-element model of the human cochlea was created. Passive dynamic behavior of the BM, which is closely related to auditory activity at moderate to high SPLs, and the cochlear fluid caused by the vibration of the stapes footplate were analyzed. When a fistula exists at the vestibule or at the scala vestibuli, the maximum amplitude of the BM becomes smaller than that in the intact cochlea. The losses in the amplitude increased with decreasing frequency. In particular, when the fistula exists at the basal part of the scala vestibuli, the effect extends to high frequencies. By contrast, when a fistula exists at the vicinity of the RW, the vibration of the BM scarcely changes. This model assists in elucidating mechanisms of hearing loss due to a PLF, and is useful in the establishment of new treatments for the PLF.

## Acknowledgments

This work was supported by a Grants-in-Aid for Scientific Research (C) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science & Technology in Japan. We thank the section editor Anthony Gummer and the anonymous reviewers for their constructive and helpful comments and suggestions.

## References

Andoh, M., Wada, H., 2004. Prediction of the characteristics of two types of pressure waves in the cochlea: theoretical considerations. *J. Acoust. Soc. Am.* 116, 417–425.  
 Andoh, M., Nakajima, C., Wada, H., 2005. Phase of neural excitation relative to basilar membrane motion in the organ of Corti: theoretical considerations. *J. Acoust. Soc. Am.* 118, 1554–1565.  
 Becvarovski, Z., 2004. Absorption of intratympanic topical antibiotics. *Ear Nose Throat J.* 83 (9 Suppl. 4), 18–19.

Böhnke, F., Arnold, W., 1999. 3D-finite element model of the human cochlea including fluid-structure couplings. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 61, 305–310.  
 Cabezudo, L.M., 1978. The ultrastructure of the basilar membrane in the cat. *Acta Oto-Laryngol.* 86, 160–175.  
 Dreiling, F.J., Henson, M.M., Henson Jr., O.W., 2002. The presence and arrangement of type II collagen in the basilar membrane. *Hear. Res.* 166, 166–180.  
 Foster, P.K., Luebke, A.E., 2002. A model for perilymphatic fistula induced hearing loss in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 167, 175–179.  
 Fleischer, M., Schmidt, R., Gummer, A.W., 2010. Compliance profiles derived from a three-dimensional finite-element model of the basilar membrane. *J. Acoust. Soc. Am.* 127 (5), 2973–2991.  
 Goto, F., Ogawa, K., Kunihiro, T., Kurashima, K., Kobayashi, H., Kanzaki, J., 2001. Perilymph fistula – 45 case analysis. *Auris Nasus Larynx* 28 (1), 29–33.  
 Greenwood, D.D., 1990. A cochlear frequency-position function for several species—29 years later. *J. Acoust. Soc. Am.* 87, 2592–2605.  
 Igarashi, M., Ohashi, K., Ishii, M., 1986. Morphometric comparison of Endolymphatic and perilymphatic spaces in human temporal bones. *Acta Otolaryngol.* 101, 161–164.  
 Ikezono, T., Shindo, S., Sekiguchi, S., Morizane, T., Pawankar, R., Watanabe, A., Miura, M., Yagi, T., 2010. The performance of cochlin-tomoprotein detection test in the diagnosis of perilymphatic fistula. *Audiol Neurotol.* 15, 168–174.  
 Iurato, S., 1962. Functional implications of the nature and submicroscopic structure of the tectorial and basilar membranes. *J. Acoust. Soc. Am.* 34, 1386–1395.  
 Kelly, J.P., Khanna, S.M., 1984. Distribution of cochlear damage caused by the removal of the round window membrane. *Hear. Res.* 16 (2), 109–126.  
 Koike, T., Wada, H., Kobayashi, T., 2002. Modelling of the human middle ear using the finite-element method. *J. Acoust. Soc. Am.* 111, 1306–1317.  
 Leonard, D.G.B., Khanna, S.M., 1984. Histological evaluation of damage in cat cochlea used for measurement of basilar mechanics. *J. Acoust. Soc. Am.* 75, 515–527.  
 Lighthill, J., 1981. Energy flow in the cochlea. *J. Fluid Mech.* 106, 149–213.  
 Lim, K.M., Steele, C.R., 2002. A three-dimensional active cochlea model analyzed by the WKB-numeric method. *Hear. Res.* 170, 190–205.  
 Lim, Y.S., Park, Se-Ik, Kim, Y.H., Oh, S.H., Kim, S.J., 2005. Three-dimensional analysis of electrode behavior in a human cochlear model. *Mech. Eng. Phys.* 27, 695–703.  
 Manoussaki, D., Chadwick, R.S., 2000. Effects of geometry on fluid loading in a coiled cochlea. *SIAM J. Appl. Math.* 61, 369–386.  
 Meaud, J., Grosh, K., 2010. The effect of tectorial membrane and basilar membrane longitudinal coupling in cochlear mechanics. *J. Acoust. Soc. Am.* 127 (3), 1411–1421.  
 Merchant, S.N., Rosowski, J.J., 2008. Conductive hearing loss caused by third-window lesions of the inner ear. *Otol. Neurotol.* 29, 282–289.  
 Merchant, S.N., Raviz, M.E., Rosowski, J.J., 1996. Acoustic input impedance of the stapes and cochlea in human temporal bones. *Hear. Res.* 97, 30–45.  
 Merchant, S.N., Adams, J.C., Nadol Jr., J.B., 2005. Pathology and pathophysiology of idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Otol. Neurotol.* 26, 151–160.  
 Nishioka, I., Yanagihara, N., 1986. Role of air bubbles in the perilymph as a cause of sudden deafness. *Am. J. Otol.* 7 (6), 430–438.  
 Nomura, Y., Hara, M., 1986. Experimental perilymphatic fistula. *Am J Otolaryngol.* 7 (4), 267–275.  
 Nomura, Y., Okuno, T., Hara, M., Young, Y.H., 1992. Floating labyrinth. Pathophysiology and treatment of perilymph fistula. *Acta Otolaryngol.* 112, 186–191.  
 Parthasarathi, A.A., Grosh, K., Nuttall, A.L., 2000. Three-dimensional numerical modeling for global cochlear dynamics. *J. Acoust. Soc. Am.* 107 (1), 474–485.  
 Ramamoorthy, S., Deo, N.V., Grosh, K., 2007. A mechano-electro-acoustical model for the cochlea: response to acoustic stimuli. *J. Acoust. Soc. Am.* 121 (5), 2758–2773.  
 Ren, T., 2002. Longitudinal pattern of basilar membrane vibration in the sensitive cochlea. *PNAS* 99 (26), 17101–17106.  
 Schweitzer, L., Lutz, C., Hobbs, M., Weaver, S., 1996. Anatomical correlates of the passive properties underlying the developmental shift in the frequency map of the mammalian cochlea. *Hear. Res.* 97, 84–94.  
 Simmons, F.B., 1979. The double-membrane break syndrome in sudden hearing loss. *Laryngoscope* 89, 59–66.  
 Skrodzka, E.B., 2005. Mechanical passive and active models of the human basilar membrane. *Appl. Acoust.* 66, 1321–1338.  
 Steele, C.R., Taber, L.A., 1979. Comparison of WKB and finite difference calculations for a two-dimensional cochlear model. *J. Acoust. Soc. Am.* 65, 1001–1006.  
 Stenfelt, S., Puria, S., Hato, N., Goode, R.L., 2003. Basilar membrane and osseous spiral lamina motion in human cadavers with air and bone conduction stimuli. *Hear. Res.* 181, 131–143.  
 Ulehlova, L., Voldrich, L., Janisch, R., 1987. Correlative study of sensory cell density and cochlear length in humans. *Hear. Res.* 28, 149–151.  
 Weisskopf, A., Murphy, J.T., Merzenich, M.M., 1978. Genesis of the round window rupture syndrome: some experimental observations. *Laryngoscope* 88, 389–397.  
 Wever, E.G., 1949. *Theory of Hearing*. John Wiley and Sons, Inc., New York.  
 Yoon, Y.J., Puria, S., Steele, C.R., 2007. Intracochlear pressure and derived quantities from a three-dimensional model. *J. Acoust. Soc. Am.* 122 (2), 952–966.

## Web reference

CFD-ACE+, CFD and Multiphysics Solver, ESI CFD Inc., <http://esi-cfd.com/>

## 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<sup>1),2)</sup>。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。Atoh1遺伝子導入による蝸牛有毛細胞再生と聴力回復<sup>3)</sup>、多能性幹細胞から有毛細胞分化誘導<sup>4)</sup>、細胞移植による有毛細胞再生<sup>5)</sup>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<sup>6)</sup>、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、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<sup>7)</sup>。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<sup>8),9)</sup>。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

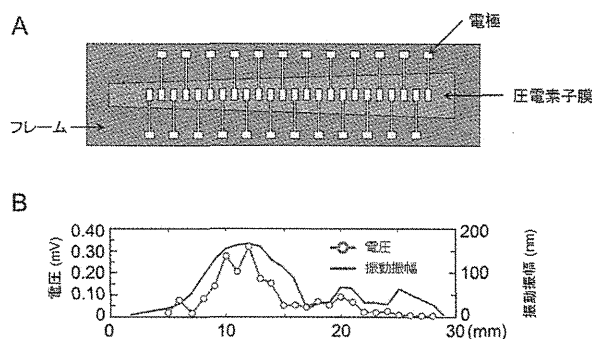


図1 プロトタイプデバイス概略図 (A) と音響刺激に対する反応例 (B)

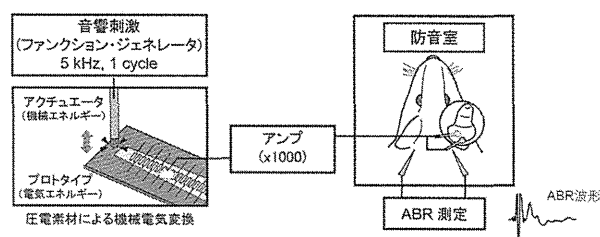


図2 プロトタイプデバイスを用いた聴性脳幹反応誘導実験概略図

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<sup>10)</sup>。圧電素子膜は、台形型とし、厚さ40  $\mu\text{m}$ 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)<sup>10)</sup>。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<sup>11)</sup>。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

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<sup>11)</sup>。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<sup>11)</sup>。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<sup>11)</sup>。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<sup>11)</sup>。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。

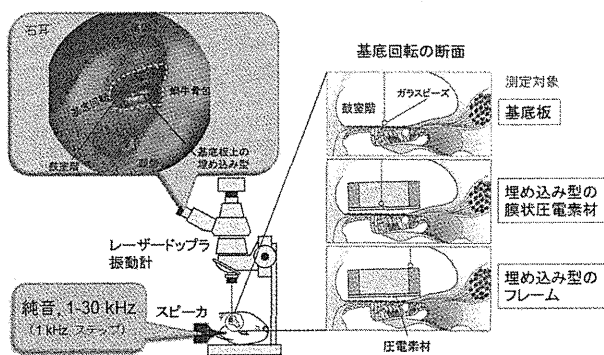


図3 蝸牛埋め込み後の圧電素子膜への音響刺激伝達解析  
 実験概略図

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<sup>11)</sup>。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<sup>11)</sup>。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、電気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。

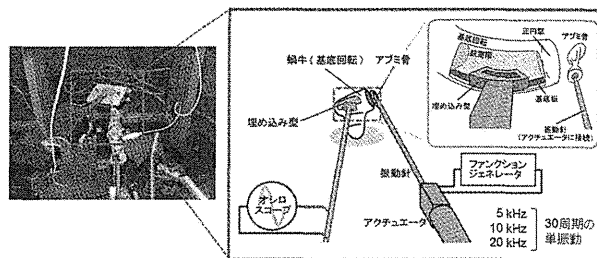


図4 蝸牛埋め込み後の圧電素子膜からの電気的出力計測  
 実験概略図

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  
 を用いた完全埋め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<sup>12)</sup>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、数値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 Scrb1 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、基底板を振動させる。この基底板の上に、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

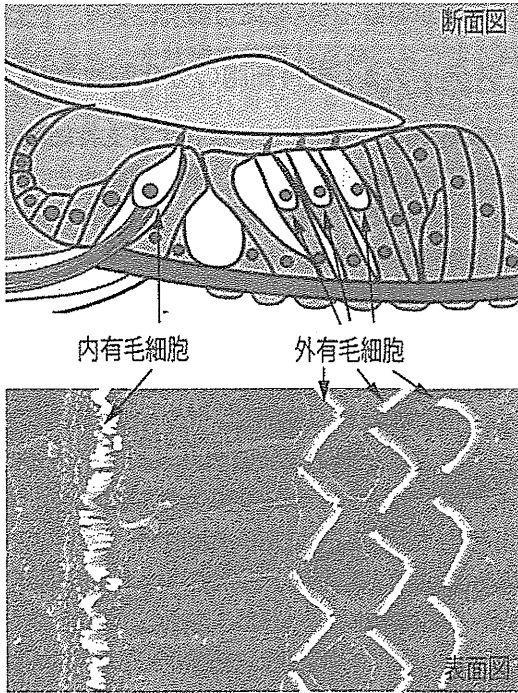


図1 蝸牛感覚上皮断面模式図および表面走査電顕像

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衛、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、

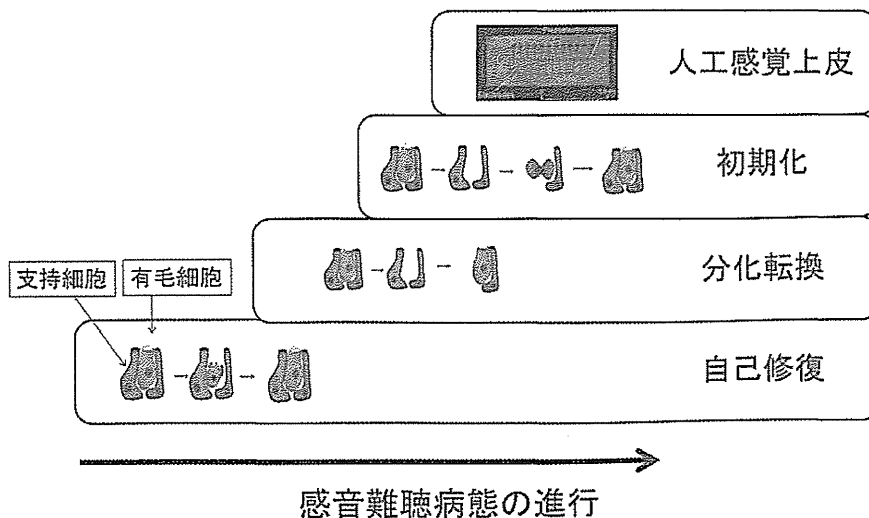


図2 感音難聴治療法の開発戦略

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週間において、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Athol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、内有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。

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。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板振幅が誘導される。周波数に伴い、基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列に配列する内毛細胞とその外側に3列に配列する外毛細胞に分類され(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、内毛細胞であり、外毛細胞は、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靱帯である。したがって、有毛細胞、ラセン神経節細胞、そして、血管条やラセン靱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。

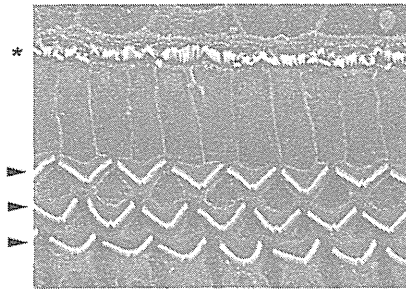


図1：マウス蝸牛感覚上皮表面走査電顕所見  
1列の内有毛細胞(\*)と3列の外有毛細胞(矢頭)が観察される。

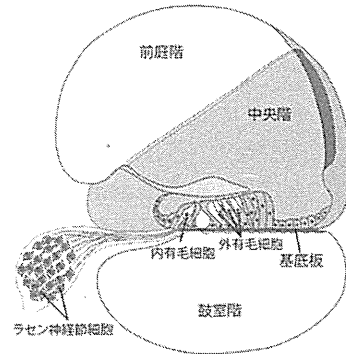


図2：蝸牛断面図模式図(論文4から改変)

#### 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。

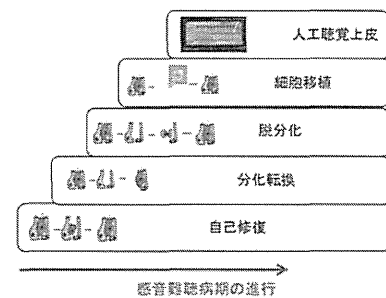


図3：内耳障害治療開発のストラテジー

#### 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>5)</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、有毛細胞

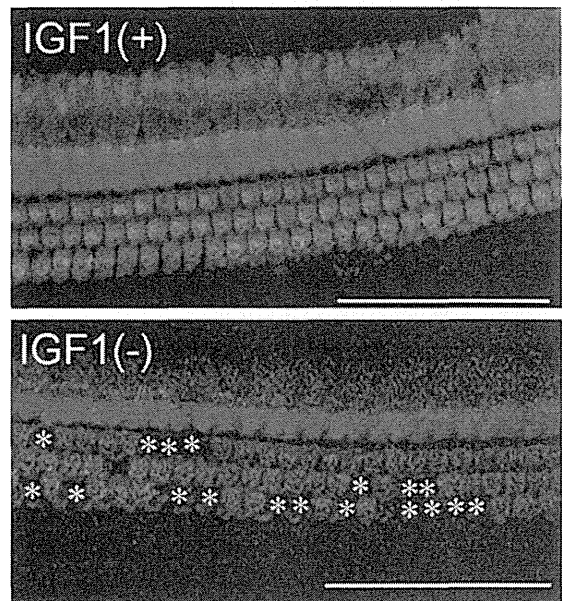


図 4 : IGF1 による蝸牛有毛細胞保護

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、その後に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。

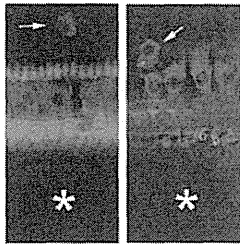


図5：薬物によるノッチ情報伝達系阻害により出現した新生有毛細胞

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りえない。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>29)</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>30)</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。

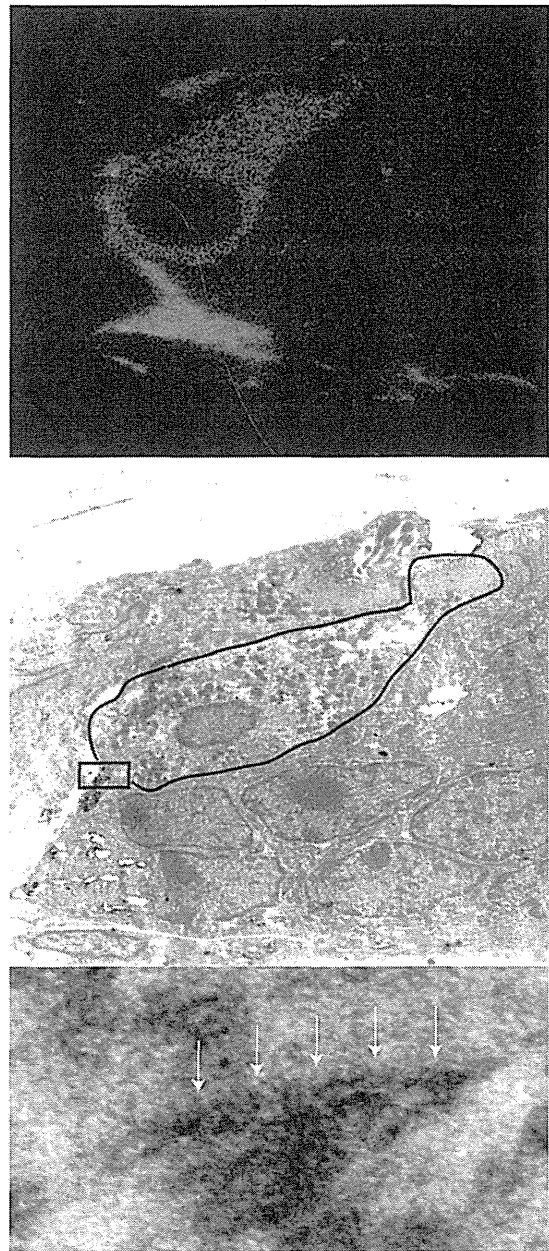


図6：胚性幹細胞由来神経と内有毛細胞間のシナプス結合

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)