平成２５年度厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究推進事業
（感覚器障害分野）

報　告　書

厚生労働省

実施機関：日本障害者リハビリテーション協会

目　　次

＊日本人研究者派遣事業

「ハイブリッド型人工内耳の聴取能への影響･依存聴力への影響についての検討」

樫尾 明憲（東京大学耳鼻咽喉科）・・・・・・・・・・・・・・・・5

＊若手研究者育成活用事業

「クロトリマゾール徐放デバイスの網膜保護効果に関する研究」

Zhaleh KASHKOULI NEZHAD（東北大学大学院医学系研究科・細胞治療分野）

・・・・・・・・・・・・・・・14

日本人研究者派遣事業

ハイブリッド型人工内耳の聴取能への影響･依存聴力への影響についての検討

樫尾 明憲
東京大学耳鼻咽喉科

平成 25 年 6 月 4 日より 26 年 3 月 17 日（18 日帰国）まで、アメリカ合衆国アイオワ州 University of Iowa 耳鼻咽喉科に滞在した。滞在期間中、下記の点を重点的に視察・研修・研究を行った。

1．耳鼻咽喉科教授 Bruce Gantz 氏の指導の下、人工内耳外来・手術の見学
2．人工内耳チーム責任者 Camille Dunn 氏の指導の下、アイオワ大学耳鼻咽喉科における人工内耳症例の検討
3．Research Audiologist Paul Abbas, Carolyn Brown 氏の指導のものと Evoked Compound Action Potential(ECAP)を用いた人工内耳患者における電極における聴神経刺激パターンの検討

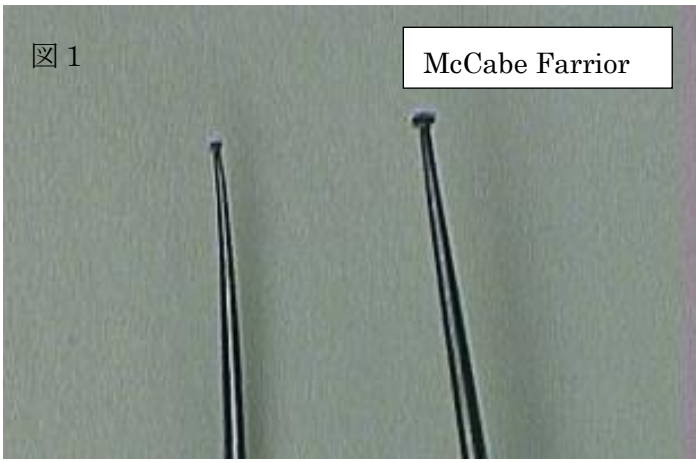
1．人工内耳外来・手術見学

Dr.Gantz 氏の外来は毎週火曜日午前および水曜日に開かれ、その中で人工内耳患者を含めた様々な症例について学んだ。人工内耳患者において特筆するべき点は、聴力レベルだけを比較すると、本邦における適応基準と比べるとその適応範囲が広いことが印象的であった。これについては項目 2 で詳細な検討を行ったのでそちらで述べる。ハイブリッド型人工内耳症例も多数見学することができた。ハイブリッド型人工内耳患者に対するケアとして、術後のステロイド投与以外に初回音入れ（人工内耳電極使用開始）前後にステロイドの投与をおっこなっていた。ハイブリッド型人工内耳における聴力低下は手術介入時に加えて電極刺激で起こることが分かってきており、それに対する対応である。さらに、人工内耳のマッピング（電流量調整）においても一定レベルを越さないように留意していた。ハイブリッド型人工内耳における聴力閾値上昇率（聴力悪化の確率）は Hibrid L 電極（当施設ではコクレア社を使用）において 34%、Hibrid S においては 18%との結果であった。基本的に 6 か月を越すと聴力閾値上昇のリスクはほとんどなくなるとのことであった。Hibrid L 電極は聴力閾値上昇率が 34%と比較的高い結果ではあるが、低音部の聴力が 80dB 未満に温存できていれば補聴することで、その聴力レベルと関係なく Hibrid 効果を同等に享受することができるとの結果も得られており、Hibrid 電極において聴力温存率のみに焦点を当てるべきではないことが示唆された。患者に対するインタビューでも術後聴力閾値上昇の認められた患者であっても人工内耳効果を実感して満足しているケースがほとんどであった。一方、Hibrid S 電極は比較的高い聴力温存率が得られており、術後 Hibrid の効果が非常によく実感できている患者が多かった。一方で、電極数が 6～10 であり患者の中には電極の不具合などで用いることができる電極が減少し、思うように人工内耳の効果が得られない場合もあった。加えて HibridS の場合は、聴力が温存できなかった場合はその成績は不良であり、注意が必要である。

Iowa 大学では積極的に一側聾に対する人工内耳を推し進めていた。一側聾に対する人工内耳の成績は、基本的に失聴期間が短いにもかかわらず、患者によってかなりばらつきがあるのが特徴であった。12 か月フォロー時の聴取能は単語（CNC）テストにおいて 70%-10%であり、1/3 が 10%台であった。ただしこの結果は、人工内耳の効果がないと評価するべきではなく、人工内耳聴取には人工内耳を用いた訓練が重要であるという結論を導き出すべきである。成績の悪いものの多くは、人工内耳術後も健聴耳があるため人工内耳を積極的に用いていないという患者であった。一方で方向感の改善は多くの患者で結果が出ており、実際術後患者にインタビューすると聴取能がそれほど良い患者でなくとも人工内耳の効果を実感・満足している者がほとんどであり、一側聾という障害に対する対策がいかに重要であるかを実感できた。

Gantz 氏の手術は木曜日、金曜日に行われており、10 か月間に人工内耳手術（Hybrid 型を含めて）約 50 症例の見学が可能であった。挿入経路については通常電極、Hybrid L 電極については主に蝸牛窓膜経路を用いていた。手術操作時、McCabe Farrior や 0.2mm Fisch Foot Plate hook（右図）を効果的に用いており、本邦でも導入すべきと考えられた。また、蝸牛窓膜経路を計画しても、蝸牛窓膜の角度によっては、Cochleostomy を用いる必要があり、必ずしもすべての症例で蝸牛窓膜経路を用いることが出来とは限らない。Hybrid S 電極については Cochleostomy を行い人工内耳の挿入を行った。Gantz 氏のご厚意により、Temporal Bone Lab において側頭骨標本を用いた手術訓練も行った。手術手技においては前述機材などをそろえたうえで、本邦においてもほぼ同等の手技が実践可能であると考えられた。

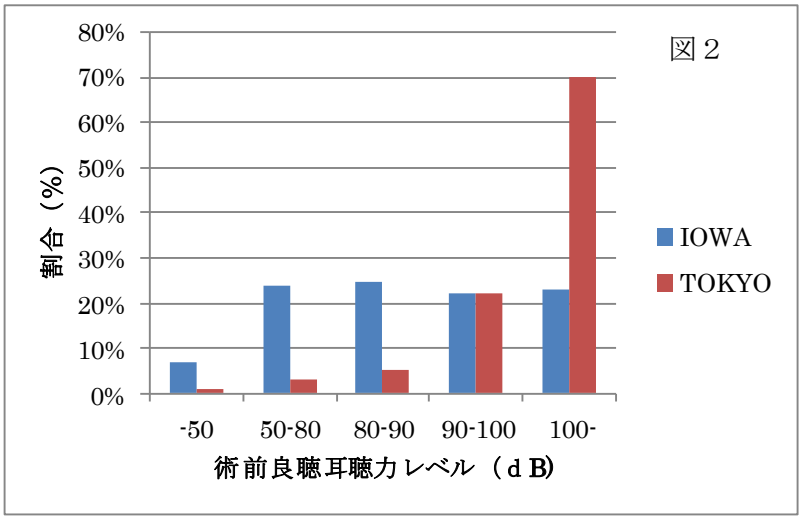
図 1



2．人工内耳手術患者の検討

Gantz 氏の外来見学の中、本邦における人工内耳患者と IOWA 大学における人工内耳患者の聴力レベルに大きな開きがあると感じたため、Camille Dunn 氏の指導の下で IOWA 大学における過去5年間の人工内耳手術患者について術前聴力レベル、

図 2



術前・術後聴取能についての検討を行った。今回は Hybrid 型人工内耳患者を除外し、通常型電極の適応となったもののみを対象（244 例）とした。術前聴力レベルを検討した。術前良聴耳標準純音聴力検査平均値（PTA）の分布割合は図 2 のごとく（青）であり、80dB 未満の聴力レベルの患者が約半数であることがわかった。東大病院（赤）における人工内耳手術施行患者の聴力レベルと比較すると、大きく異なることがわかる。日本の身障者等級に当てはめると IOWA における人工内耳患者の約半数が、日本における聴力障害者 4 級～6 級に認定されるに過ぎない聴力レベルであることは大きな驚きであった。

そこで、聴力レベルが 90dB 未満の患者（本邦で言う聴覚障害 4 級～6 級レベルもしくはそれよりも聴力レベルがよい患者）98 症例に的を絞り、術前の補聴下聴取能（文章課題）について検討した。　結果は、3 図のごとくであり、多くは 50%以下となっており、補聴器のみでは日常生活に 障害をきたしていることが示唆された。術前術後の結果を比較すると図 4 のごとくであった。約 8 割の患者で 人工内耳による聴取能を認めた。ちなみに人工内耳効果が思わしくなかったケース（術後聴取能 50%未満症例や術前術後の聴取能に変化のない　ケース）は、ほとんどが先天聾・長期失聴患者・一側聾などの説明できる 病因あるケースであった。これらの 結果は、少なくとも英語という言語環境においては日本で言う身障者 4 級～6 級対象の者であっても人工内耳の利益を享受できる患者が多数存在するということを示している。人工内耳から得られる言語的情報が 90dB 未満の聴力閾値における補聴効果を上回るということであり、当然言語的な差異の考慮も必要では

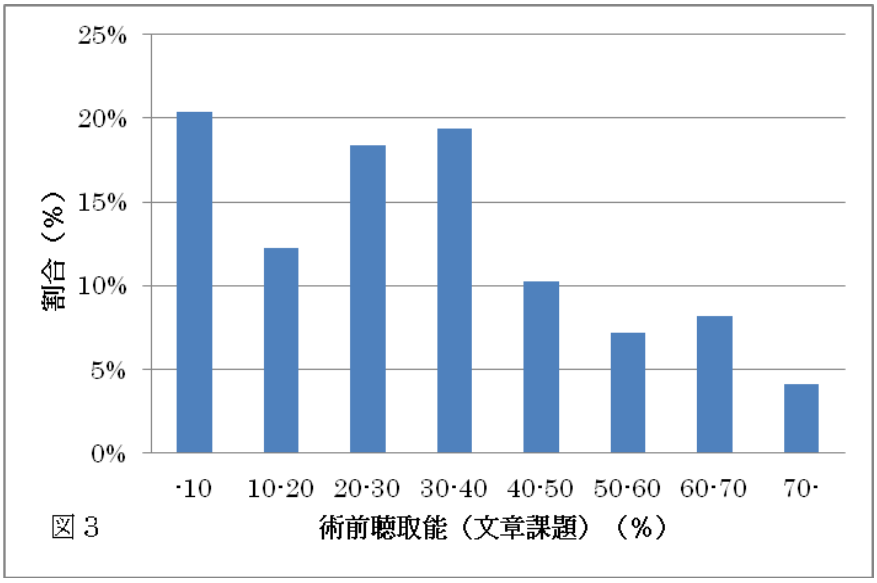


図 3

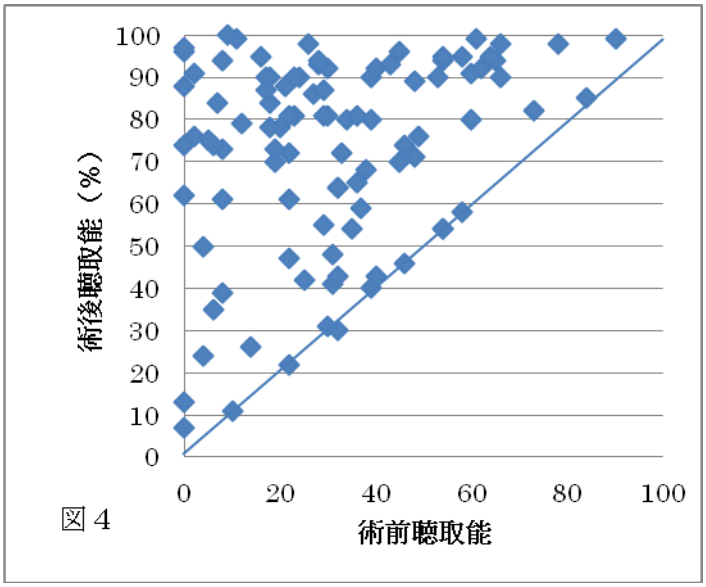


図 4

あるが、本邦における人工内耳適応基準ガイドラインの「聴力レベル 90dB 以上」という項目は今後見直しが必要と考えられる。また、米国では人工内耳適応基準が聴力レベルから文章聴取能に移行しており、文章課題テストも、従来の HINT テストから、日常生活の聞き取りをより反映できる、複数の話者による比較的早く・文章として長い文章課題である AZ Bio テストに移行しつつある。実際 AZ Bio テストの文章を聞いてみるとかなり難易度が高かった。本邦では聴取能は主に語音標準検査（単音）が用いられているが、難易度も低く、この検査は日常生活における聞き取りを反映しているとは考えにくい。本邦においても文章課題による検査などより日常生活に即した聴取能検査課題を開発が人工内耳適応判断には不可欠であることを強く実感した。聴力障害レベルが軽度である Hybrid 型電極の適応患者選択、評価においても適切な聴取能検査課題の開発はより重要性が増すと考えられ、その意味でも今後ただちに取り掛かるべき課題であると考えた。この結果については、本邦における聴取能の比較などのデータも加えて学会にて発表を予定している。

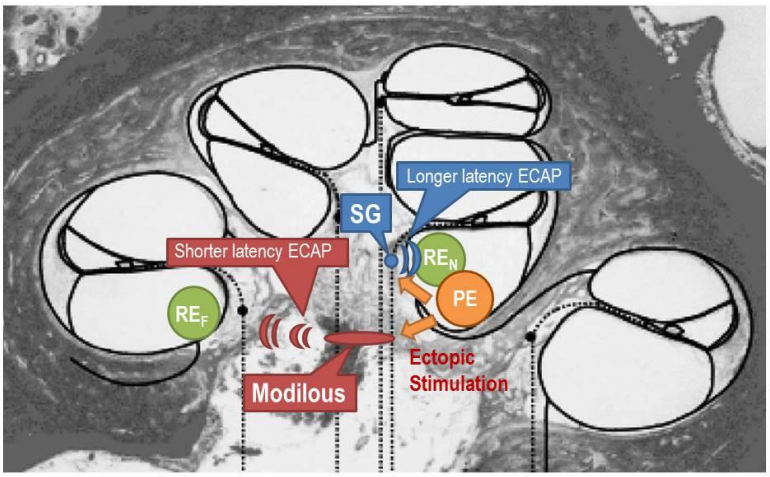
３．Evoked Compound Action Potential （ECAP）を用いた人工内耳患者における電極における聴神経刺激パターンの検討

＜はじめに＞

内耳に存在する聴神経群にはトノトピーが存在する。蝸牛の基底回転部分は、低音周波数の認識を行い、頂回転部は高周波数の知覚を行っている。人工内耳が単一電極から複数電極に移行することで、このトノトピーを電極刺激でも実現することが可能となり、人工内耳による聴取能の劇的な改善が認められた。しかしながら、電極数を単純に増やすだけでは隣接する電極同士が干渉しあう（同一の聴神経群を刺激してしまう）、減少が起こるため聴取能のさらなる向上のためには、電極間の干渉を評価・解決することが重要な課題となっている。近年では、コンピューターモデルなどから電極刺激が電極に近接する聴神経群のみならず、蝸牛軸への電流拡散から電極刺激部位とは異なる部位の聴神経群を刺激する（Ectopic stimulation）可能性も指摘されてきた。

ECAP は聴神経群の活動電位の名称で陰性派（N1）と陽性波（P1）からなる。人工内耳電極を記録電極として用いることで、活動電位の発生源からすぐ近くにおいて測定できることが可能となり、ABR（聴性脳幹反応）など頭皮電極から測定する場合に比べてより精密な聴神経の活動状況を評価できると期待されている。実際 ECAP を用いることで、人工内耳の電極間の干渉度合い（Channel interaction）を測定することが可能であることが分かり、研究が開始されている。Channel interaction の測定方法の詳細は割愛するが、目的とする刺激電極（Probe）の前に比較対象の電極刺激（Masker）を行うことで実現される（Forward-masking paradigm）。もし目的の電極と比較対象の電極が干渉しあっているとしたら、Masker 電極刺激により神経細胞が不応期に入るため Probe 電極刺激による反応が小さくなるという理論である。

Finley らは 2013 年 CIAP 学会において ECAP を刺激電極に近い部位から記録した場合と、遠方から記録した場合で N1 潜時に変化が起こる症例を報告した。刺激電極から遠方で測定した場合の N1 潜時が短くなるという結果であった。遠方から電位を測定した場合、潜時は長くなるのが通常でありこれに対する説明として、人工内耳電極刺激が、電極近隣のらせん神経節細胞体（発火に比較的時間がかかる）と蝸牛軸の軸索部分（発火に時間がかからない）の両者を刺激している可能性を指摘した。この場合、遠方からの記録の場合軸索からの ECAP が優位となり N1 潜時が短くなり近くからの記録では、らせん神経節細胞体からの ECAP が優位となり N1 潜時は長くなると説明できる（図 5）。今回我々は、Finely らに習って異なる記録電極において ECAP の N1 潜時を測定した。これに加えて Channel interaction を同様に複数の記録電極から計測した。もし仮に異なる記録電極からの ECAP が、らせん神経細胞体と蝸牛軸における軸索といった異なる発生源からの活動電位を表しているとしたら、異なる電極から Channel interaction を記録すれば、異なった形態の結果になる（軸索の刺激ではより広範な神経群の刺激が予想されるため、より Channel interaction が大きくなるものと思われる）と予測し実験を行った。



SG: らせん神経節
RE_N: Near 記録電極
RE_F: Far 記録電極
PE: Probe 刺激電極

Figure from Briaire JJ et al.
Hear Res, 2006 (改編)

図 5

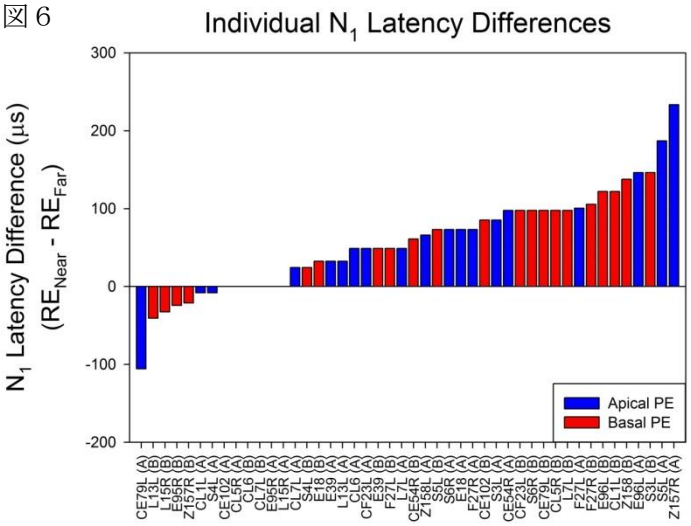
＜方法＞

今回人工内耳装用患者 22 名 23 耳を対象に行った。各被験者に対して、刺激電極（Probe）として人工内耳の基部および先端部の電極をそれぞれ 2 つずつ選択し実験を行った。これら電極に対して記録電極を変円ながら ECAP を測定し、N1 潜時を測定した。刺激電極周辺における記録電極（Near）からの N1 潜時と刺激電極と反対側（刺激電極基部であれば先端部、刺激電極が先端部であれば基部）の記録電極（Far）からの N1 潜時の差を比較した。続いて、刺激電極に対する Channel interaction を Near・Far それぞれの記録電極を用いて測定した。

＜結果＞

Near 電極の N1 潜時と Far 電極の N1 潜時の差を比較したのが図 6 である。ECAP の測定の分解能が 50 μs であることを考慮するとおおむね 100 μs 以上が優位な潜時短縮ととらえられるが、約 1/3 の患者で Far 電極の N1 潜時が早くなることが分かった。続いて、各 Probe に対する Near および Far 記録電極からの Channel interaction を比較したが、個々では Channel interaction のピーク電極の差（もっとも干渉しあっている電極）と Channel interaction 全体の面積の差を N1 潜時の差と比較した。ピーク・N1 潜時差の比較は図 7 の通りで、1 例を除いてピークの差はほとんど 0 に近く、N1 潜時との相関はほとんど認められなかった。一方、面積・N1 潜時差の比較においても明らかな相関は認められなかった。

図 6



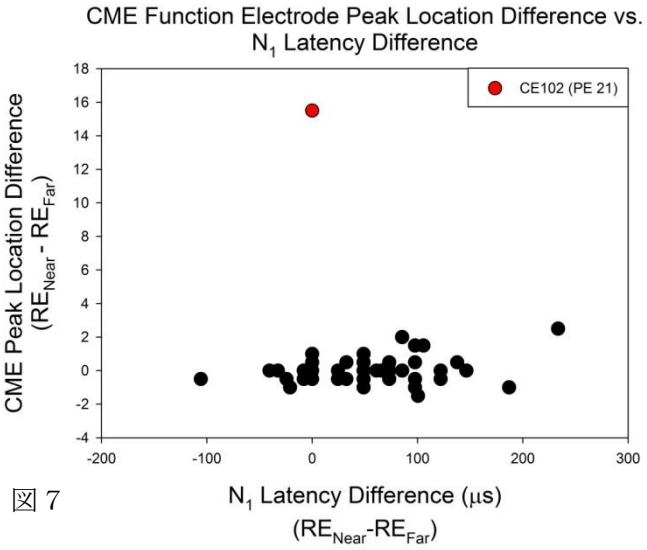


図 7

＜考察＞

Finley らが示したのと同様に、我々の検討においても刺激電極に対して遠方にある記録電極から ECAP を測定した場合、潜時の短縮という現象が認められた。このことは記録電極により異なる神経部位からの反応を測定していることを支持する内容であった。しかしながら、N1 潜時の短縮度合いと、Channel interaction の変化についての相関は認めず、N1 潜時短縮の有無にかかわらず Far・Near いずれからの記録でも同様の Channel interaction を得る結果となった。これに対する一つの説明として次のような仮説を考えた。電極による軸索への Ectopic Stimulation は実際に存在するが、その刺激は広範囲な刺激ではなく、らせん神経節群と類似した範囲の神経群に限られたものである。この場合、らせん神経節と軸索からの 2 つの活動電位を異なる記録電極で記録することにより異なった N1 潜時を測定することとなるが、刺激されるらせん神経節群も軸索群が同様の神経群の範囲であれば得られる Channel interaction が得られる。今後刺激電極の刺激強度の変化で N1 潜時に変化が起こるかなど追求していくことを考えている。

この研究成果は本年 3 月に行われた AAS 学会（Arizona, USA）にて発表した。

最後に、研修を通じ人工内耳を取り巻く外来環境、研究環境が本邦では IOWA 大学に比べて大きく立ち遅れていることを痛感した。IOWA 大学では人工内耳医療チームとして Audiologist が医師と対等の地位に存在している。Audiologist の多くは大学卒業後修士・博士号を取得しており、聴覚医学に対する知識が豊富で、人工内耳に関する臨床業務を行う者以外にも研究を専門に行う者も存在し、人工内耳医療・研究を引っ張っている。さらに、人工内耳コーディネーターなる人物が存在し、人工内耳の一般的な説明・人工内耳患者の予約管理などを行っており、患者外来受診日に合わせて多方面にわたる研究室の研究をスケジューリングし、効率的なデータの取得を可能としている。これにより、医師は人工内耳手術・術後管理に専念でき、数多くの症例を扱うことも可能である。症例数が増加することで研究の幅も広がり、より確実なデータの取得も可能となる。本邦においては、ST が Audiologist の役割を一部になっているが、従事している者は人数的にも少数であり、さらに ST を Audiologist と比較すると一般に Research mind を有するものは極少数である。コーディネーターも存在せず、日本の人工内耳医療・研究は医師に過度に頼りすぎているのが実情であり、現状ではアメリカとの臨床・研究レベルの開きは大きくなる一方であると思われる。IOWA 大学見学によって、人工内耳の適応はまだまだ拡大ことが可能、すなわちより多くの聴覚障害者が人工内耳により利益を得ることが可能であることを肌で実感した。ただ、人工内耳の適応拡大には、当然綿密な研究・評価が当然必要であり、言語的な差異も重要な要素となるため、海外における研究成果を待つだけではなく、本邦においても独自に人工内耳医療・研究を推し進めていく必要がある。残念ながら本邦ではそのような基礎が形成されていない。今後、ST の育成・人工内耳コーディネーターの導入などを含めたより多くのリソース開発が不可欠であると考えられた。

若手研究者育成活用事業

クロトリマゾール徐放デバイスの網膜保護効果に関する研究

Zhaleh KASHKOULI NEZHAD
東北大学大学院医学系研究科・細胞治療分野

１．研究要旨

臨床薬として承認されている既存薬ライブラリーを用いて、網膜神経節細胞の低栄養・低酸素負荷培養に対して細胞保護を示す薬剤のスクリーニングを行い、網膜保護新規薬剤候補として Clotrimazole（CLT）を発見した。昨年度の研究では、CLT の細胞保護メカニズムとして､CLT は低酸素負荷培養で上昇する Reactive oxygen-species (ROS)産生を抑制し、アポトーシスに関わる MAPK family (p38, MAPK, JNK)のリン酸化や Caspase-3 の活性化を抑制していることが示唆された。また、我々が過去に報告している光硬化性ポリエチレングリコールジメタクリレートで CLT の徐放デバイス化の可能性を示した。H25 年度は、ラット眼に移植可能な CLT 徐放デバイスを作成し、移植したデバイスが網膜光障害に対して網膜保護効果を示すかどうか検討した。その結果、CLT 徐放デバイスは、網膜光障害による網膜機能の低下を一部抑制することが網膜電図検査によって示された。また、摘出網膜の MAPK family のリン酸化や Caspase-3 の発現を評価した結果、In vitro 培養と同様にこれらの活性化が抑制されていることが示唆された。本デバイスによる CLT の経強膜投与によって網膜を保護できる可能性がある。

２．研究目的

視覚は外部情報の 8 割を占めるといわれており、難治性網膜疾患による視覚障害は患者の QOL を著しく低下させる。これらの疾患は、原因は様々であるが、最終的には視覚を司る視細胞や網膜神経節細胞がアポトーシス（細胞死）を起こすことで視力が失われる。そのため、最近は網膜神経細胞の細胞死を抑制する網膜保護の概念が浸透してきている。本研究はこれまで薬剤として上市されなかった薬剤ライブラリーから In vitro 細胞培養によって網膜保護を示す薬剤の網羅的スクリーニングを行い、さらに光硬化性樹脂を用いた徐放デバイス化を検討することを目的とした。本研究の徐放デバイスは眼球後方の強膜上に留置し、強膜を介して持続的に眼内に徐放する経強膜投与システムである。従来の点眼法に比べて、前眼部（角膜、結膜）への薬剤移行がほとんどないため、従来の点眼で見られるような副作用は小さいことが期待され、副作用で使用が難しかった薬剤を使用できる可能性がある。また持続性があるため、煩わしい点眼をする必要がなくなる。H25 年度は、ラットを用いた網膜光障害モデルによって、CLT 徐放デバイスの網膜保護効果を評価することを目的とした。

３．研究方法

（１）CLT 徐放デバイスの作製

徐放デバイス基材として、ポリエチレングリコールジメタクリレート（PEGDM）とトリエチレングリコールジメタクリレート（TEGDM）を使用した。PEGDM と TEGDM を 40:60 で混合したもの（P40）、60:40 で混合したもの（P60）を調製した。デバイスはリザーバー、薬物ペレット、徐放膜（カバー）の３つから構成される。まずリザーバー用の鋳型に TEGDM をキャストして UV 照射（11.6 mW/m^2、40 秒）してリザーバーを作成した。次に CLT を P40 に 250mg/ml で混合したものを TEGDM リザーバーに 1.2μL キャストし、UV 照射（11.6 mW/m^2、40 秒）して薬物ペレットを作成した。最後に P40 もしくは P60 を薬物ペレット状にキャストして UV 照射（11.6 mW/m^2、4 分）してカバーした。P40 でカバーしたデバイスを CLT-P40、P60 でカバーしたデバイスを CLT-P60 と省略する。また、Placebo として CLT を混合していない P40 を薬物ペレットとして充填したものを作成した。

（２）ラットへの移植

ラットの右眼の結膜を切開し、デバイスを強膜上に留置して、結膜を縫合して軟膏を塗って移植を終了した。左眼は未処理とした。

（３）ラットの網膜光障害

デバイス移植後 1 週間目に、ミドリン P 点眼で散瞳後に、光障害用の飼育チャンバー（NK システム）にラットを移動し、22℃で 8000Lux の照度で 24 時間飼育した。

（４）網膜電図（ERG）

光障害後 4 日間暗順応した後、暗室下でミドリン P 点眼で散瞳した。ラットに眼球に角膜電極（Mayo）を当てて固定し、-3.577、-2.577、-1.577、-0.577、0.477（log cd*s/m2）の光刺激で暗順応 ERG（Rod-ERG）を測定した。

（５）ウェスタンブロット

ERG 測定後 11 日目に眼球を摘出し、網膜を慎重に分離した。Lysis buffer で網膜ホモジネートを調製し、SDS-PAGE 後、セミドライ式ブロットで PVDF 膜に転写し、抗体（Cell signaling）で Cleaved caspase-3 と Phosphorylated JNK（p-JNK）の検出を行った。

４．結果

（１）ERG

ERG 振幅値の平均値を図１に示した。弱い光刺激（－3.577、－2.577）では CLT 徐放デバイスと Placebo デバイスの間に差は見られなかったが、強い光刺激（－1.577 以上）では CLT 徐放デバイスの ERG 振幅値は高い傾向を示した。特に CLT-P40 では b 波（Rod-b）、CLT-P60 では a 波（Rod-a）で有意に高い値を示した。

（２）ウェスタンブロット

摘出眼球から網膜を分離し、細胞死（アポトーシス）に関わる MAPK family の JNK の

リン酸化および Caspase-3 の活性体（cleaved caspase-3）を Western blot 法で測定した。CLT-P40 および CLT-P60 移植群では Placebo 対比、cleaved caspase-3 および p-JNK の有意に低い発現を示した。

５．考察

今回の研究で、ラットの網膜光障害モデルに対する CLT 徐放デバイスの網膜保護作用を見出した。CLT はイミダゾール系の抗真菌薬であり、皮膚真菌症の治療に広く使われている。CLT は真菌細胞膜に直接作用して殺菌するほか、真菌細胞膜の構造・機能の維持に重要なエルゴステロールの合成を阻害することで抗菌活性を発揮する。今回の研究で得られた網膜細胞保護の作用機序はいまだ詳細が不明ではあるが、今回の結果から光障害によって生じる酸化ストレス等の刺激によって発現が上昇すると考えらえる細胞死関連シグナルカスケードを、CLT 徐放デバイスが一部抑制することによって網膜を保護している可能性が示唆された。

本デバイスのような経強膜投与法は網膜への局所性が高く、全身への移行が少ないと期待されるため、CLT の投与量を徐放デバイス化によって厳密に制御できれば、全身性の副作用を減らし、網膜局所に持続徐放できる可能性がある。すなわち、眼科分野では適用が難しかった CLT を今回の持続投与デバイス化によって新たな網膜保護薬として使用できる可能性がある。

６．結論

本研究では、CLT 徐放デバイスは網膜光障害モデルに対して網膜保護効果を有することがわかった。網膜光障害モデルは加齢黄斑変性症のモデルとなっており、加齢黄斑変性症の治療または予防に有用であることが期待できる。

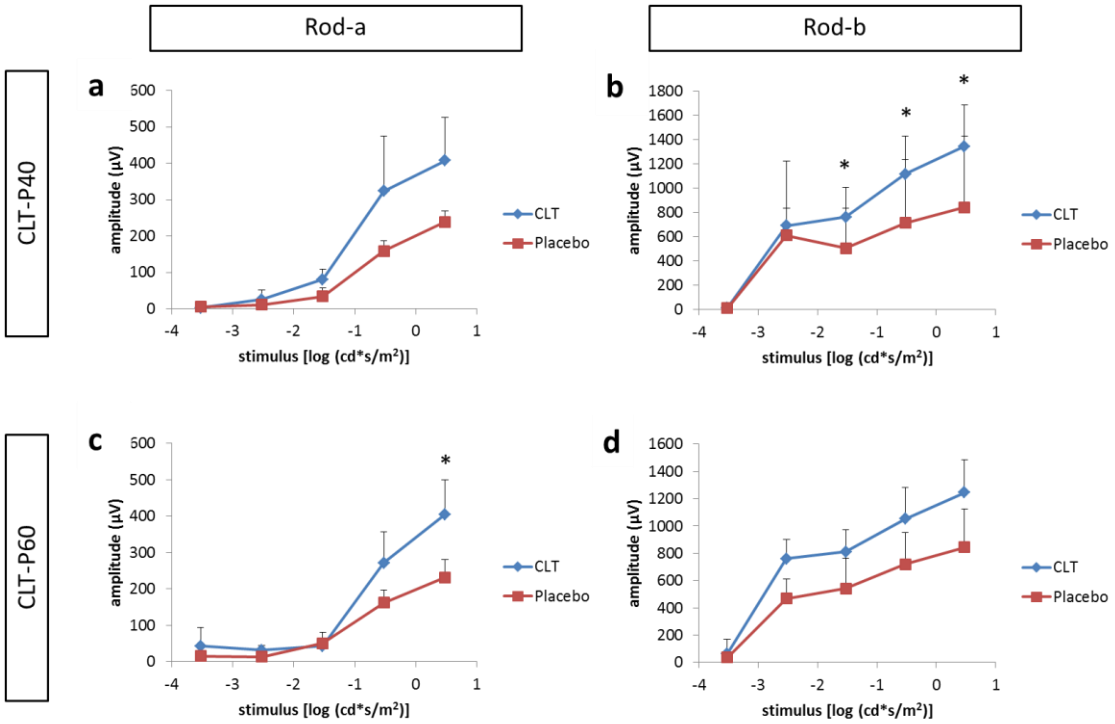


図 **1**. ERG 振幅値の平均値（N=4）

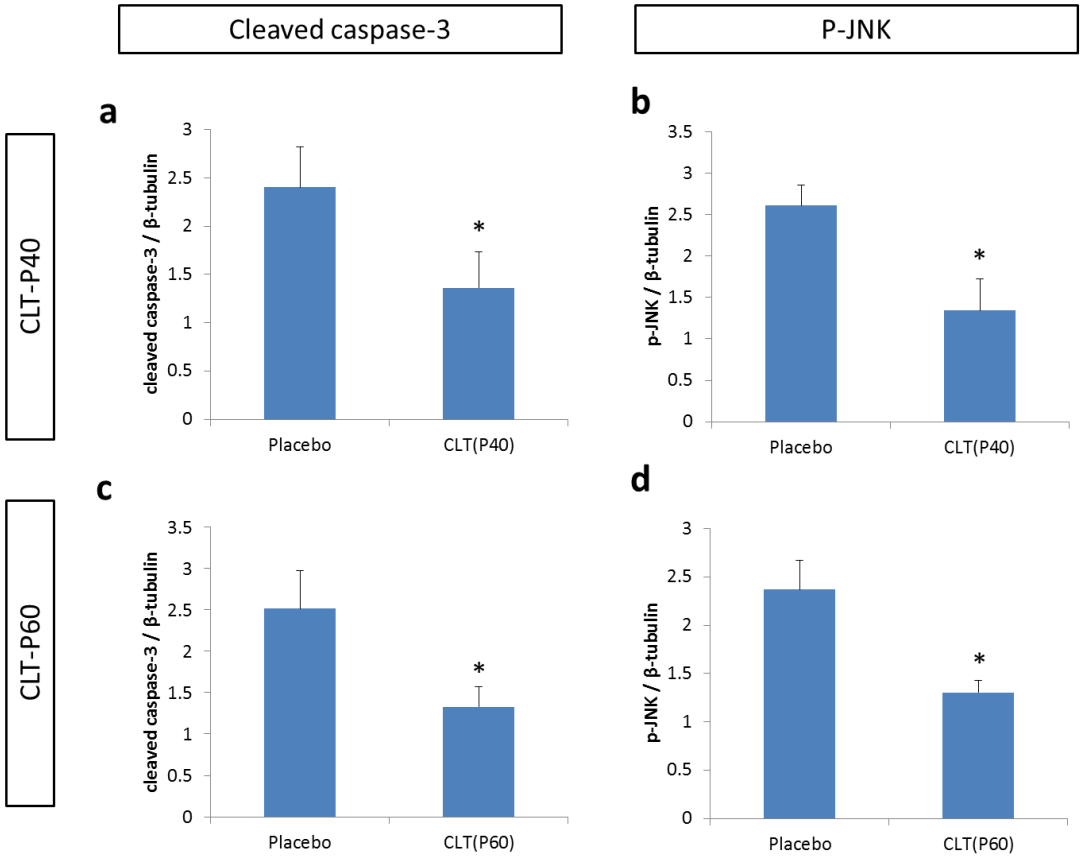


図 2. ウェスタンブロットの結果（N=4）

平成２５年度　障害者対策総合研究推進事業
（感覚器障害分野）

平成２６年３月　発行

発　行　　公益財団法人　日本障害者リハビリテーション協会
〒162-0052　東京都新宿区戸山１丁目 22 番１号
（戸山サンライズ内）
電　話　　(03) 5273-0601
ＦＡＸ　　(03) 5273-1523

印　刷　　株式会社　教文堂