

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659743

研究課題名(和文) 残存聴力温存を目的とした新規人工内耳モデルの確立

研究課題名(英文) Establishment of a new cochlear implant model for preservation of residual hearing

研究代表者

小林 俊光 (KOBAYASHI, Toshimitsu)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：80133958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、モルモットにおいて蝸牛内リンパ電位を記録することにより急性期における人工内耳模擬電極挿入の影響を検討した。残存聴覚の保存が求められる場合においては人工内耳電極の挿入方向が重要であり、可能なかぎり吸引の使用は最小限にすべきである。また中耳内視鏡時に用いられる曇り止め液(Ultrastop)のモルモット中耳腔への局所投与により、深刻な中耳の炎症がみられた。曇り止め液が中耳に達する可能性がある場合には細心の注意を払わなければならない。

研究成果の概要(英文)：This study investigated changes in endocochlear potential (EP) during simulated cochlear implant (CI) electrode insertion. EP was well preserved during carefully performed surgical procedures of simulated CI electrode insertion, but it decreased significantly if the simulated CI electrode was inserted toward the modiolus. Careful attention is necessary to ensure the correct direction of CI electrode insertion to preserve residual hearing. Use of suction should be minimized if possible. Anti-fog agent is necessary for endoscopy because moisture and blood make blurred vision. Ultrastop is one of the most widely used anti-fog agents. The current study examined the ototoxic effect of Ultrastop in topical applications to guinea pig ears. Anti-fog solution (Ultrastop applied topically to the guinea pig middle ear caused significant middle ear inflammation and hearing impairment. Great care must be taken when there is a chance that anti-fog solution reaches the middle ear.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科

キーワード：人工内耳 内耳電位 イオン モルモット 耳毒性 曇り止め液

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、高度感音難聴に対する人工内耳手術を始めとして、蝸牛に対し侵襲的操作を加える機会が増加している。そのモデルとしては、その操作の容易性から主にネコ、ラット、モルモットが用いられ、かつ正常聴力の動物が用いられている。遺伝難聴モデル動物としては、近年遺伝子導入の容易さなどの理由で主にマウスが用いられるが、手技の困難さからマウスによる人工内耳モデルの確立には未だ至っていない。しかし例えば我々がこれまで研究してきたPendred症候群などは、軽微な頭部外傷や音響外傷により聴力の悪化を来すことが臨床的に言われており、遺伝難聴の種類によっては、人工内耳手術による侵襲そのものが聴力悪化の原因となりうる可能性がある。申請者は、実験動物を用いて同じ外リンパ腔でも前庭階と鼓室階では大きな相違があることを明らかにしてきた。さらに申請者の教室の最新の内耳生理学的研究手法の新規応用並びに、最近当科で確立したモルモットにおける人工内耳モデルを応用し、内耳へ侵襲を加えたときの蝸牛機能の変化を、さらに体系的に検討し発展させることで臨床の喫緊のニーズに対応できると考えた。

## 2. 研究の目的

人工内耳手術における長期にわたる残存聴力温存を目指す。近年では従来以上に、内耳操作の慎重さが求められ、同時に蝸牛操作の限界に関する知識が必要とされている。特に人工内耳挿入症例では、遺伝難聴の特質により手術中あるいは長期の経過中に残存聴力が悪化する可能性が十分に考えられ、その対応は急務である。今回我々は、人工内耳モデルを確立し、その影響について検討を加え、臨床へのフィードバックを目指す。

(1) 人工内耳埋め込み術における電極挿入によるEPの変化を解明するため、蝸牛開窓時におけるEPの変化、蝸牛開窓部からの外リンパ吸引によるEPの変化、人工内耳模擬電極挿入におけるEPの変化、について検討をおこなった。

(2) 近年、低侵襲に行われる内視鏡下中耳手術が広く普及し様々な耳科手術に応用されている。人工内耳挿入術においても、低侵襲な操作や良好な視野を必要とすることも多く、内視鏡の利用が必要になる場合も想定される。内視鏡使用においては曇り止めが必要であるが、曇り止め液による中耳、内耳への影響は検討されていない。内視鏡下手術に広く使われる代表的な曇り止め液の一つであるUltrastop®による中耳、内耳への影響を調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) 4.1 対象 (動物実験)

実験には、雄のハートレーモルモット (200g~250g) を用いた。モルモットはケタミン40 mg / kgおよびキシラジン10 mg / kgを

腹腔内注射により麻酔し、気管切開をした後に自発呼吸下に室内空気にて維持した。さらに、手術施行部位に1%リドカイン局所注射を追加した。動物の疼痛反応は随時監視し、必要に応じて追加の麻酔薬を投与した。実験は東北大学における動物実験等に関する規程に基づき行った。

### 人工内耳模擬電極の作製

人工内耳模擬電極は過去の報告<sup>13)</sup>の設計を参考に作成した。外径0.4 mm、内径0.3 mmのシリコンカテーテル (Vesta, Franklin, WI) と、その内腔に模擬スタイレットとなる銀線 (Clark Electromedical Instruments, Pangoburne, UK) を挿入し、人工内耳模擬電極とした。

### EPの測定

手術は耳後切開にて施行した。側頭骨骨壁を削除して中耳腔にアプローチし正円窓から蝸牛の基底回転および第二回転を完全に明視下にした。

すべての測定において蝸牛の第二回転より経血管条法にて行った<sup>14)</sup>。ガラス管電極の作成はフィラメント入りのガラス管 (1B100F-4; World Precision Instruments, Sarasota, FL) をマイクロピペットプーラー (PD-5; Narishige Group, Tokyo, Japan) にて熱しながら左右に180度ずつ回してから引き伸ばし作成した<sup>11)</sup>。先端は、外径約3µmに成形した。作成したガラス管には1 M KClを充填し記録電極とした。信号はFD223a Electrometer (World Precision Instruments, New Haven, CT, USA) にて増幅させ、converted with an analog-to-digital converter (Power Lab/4s; Power Lab, Gladstone, Australia) で変換、その後ハードディスクにデジタル保存した。ガラス管電極は、銀塩化銀電極のワイヤ電極を介してgrounded dual electrometer (FD223a) の入力端子に接続した。腹部筋上においた銀塩化銀電極を不関電極とした。

### 人工内耳電極挿入のシミュレーション

ダイヤモンドバーを用いて、正円窓の辺縁近くで、蝸牛基底回転の鼓室階に1mmの蝸牛開窓を行った。その後、動物を下記のように4群に分けそれぞれEPを測定した。

グループ1: 蝸牛開窓のみ (N = 4) 蝸牛開窓し、それ以外は何も操作を加えずにEPを測定した。EPの測定は蝸牛開窓後に開始し、記録は約20分間続けた。

グループ2: 蝸牛開窓した後に鼓室階の外リンパを吸引 (N = 5) 蝸牛開窓後、フィラメント含有ガラスチューブ (1B100F-4, World Precision Instruments, Sarasota, FL) を使用して<sup>12)</sup>、蝸牛開窓部から外リンパを直接吸引した。ガラス管の先端は外径が0.3 mmである。吸引圧は約20kPaに調整した。EP記録は蝸牛開窓後に開始し、EP測定を開始して2分後に約1分間吸引した。EPの記録は約20分間続けた。

グループ3: 蝸牛開窓した後に、人工内耳模

擬電極を蝸牛鼓室階の長軸方向と平行に挿入 (N = 7) 人工内耳模擬電極を蝸牛開窓部から挿入した。挿入においては、鼓室階内の構造物との接触を避けるように鼓室階の長軸方向と平行にマイクロ鑷子を用いて3mm挿入した (図4; A-1,2)。人工内耳模擬電極には先端から3mmの位置にマークを付け、挿入の深さの基準とした。挿入時に外リンパは吸引しない。人工内耳模擬電極を挿入後、丁寧に抜去してからEP測定を開始した。EPの記録は約20分間続けた。

グループ4：人工内耳模擬電極を蝸牛軸の方向に挿入。(N = 7)人工内耳模擬電極を蝸牛開窓部から蝸牛軸方向にマイクロ鑷子を用いて3mm挿入した(図4; B-1,2)。人工内耳模擬電極には先端から3mmの位置にマークを付け、挿入の深さの基準とした。挿入時に外リンパは吸引しない。人工内耳模擬電極を挿入後、丁寧に抜去してからEP測定を開始し、EPの記録は約20分間続けた。

#### 組織学的検討

EP測定後、すべての動物におい蝸牛の病理組織標本作製した。PBS (Phosphate Buffered Saline) 並びに4%パラフォルムアルデヒドにて還流固定を行った後に側頭骨を摘出した。標本は、

10%EDTA(ethylenediaminetetra-acetic acid)溶液にて脱灰を行い、エタノールにて脱水しパラフィンにて包埋したのちヘマトキシジン・エオジン染色を行った。蝸牛組織切片の厚さは5 $\mu$ mとした。作成したスライドは光学顕微鏡 (Axio Scope; Carl Zeiss, Tokyo, Japan) を用いて観察した。

#### 統計解析

EPの測定値は、Kruskal-Wallis検定により群間で比較した。また、多重比較法として Scheffe's testを用いた。統計分析には、Statview Ver. 5.0 (SAS Inc., Cary, NC, USA) を用い、 $p < 0.05$ を有意とみなした。

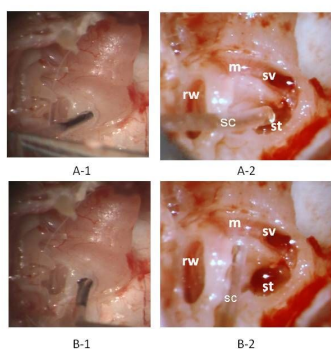


Fig. 1

(2) 実験には雄のハートレーモルモットを用いた。ケタミンおよびキシラジンで麻酔を行った後に電磁シールド聴力測定室にて ABR を測定した。陰性対照群(生理食塩水)、陽性対照群(ゲンタマイシン 50mg/ml)、実験群(Ultrastop<sup>®</sup>)の三群に分け、耳後切開にて乳突蜂巣に1mmの小穿孔を作成し、そこからそ

れぞれの液体を鼓室内に投与した。2週間後に ABR を測定し聴力を評価した。さらに側頭骨を採取し、中耳侵襲の程度を評価しスコア化した。Friedman ANOVA および Scheffé post hoc test を用いて検定した。

#### 4. 研究成果

(1) グループ1では、EPにはほとんど変化がみられなかった。グループ2において、EPは外リンパの吸引後に若干変化がみられた。吸引直後は低下したがその後EPは徐々に回復し、最終的には吸引前よりわずかに低い値まで回復した。グループ3において、EPはわずかに減少する程度であったが、グループ4においては、著大な減少を示した。

Kruskal-Wallis検定においてグループ4に有意な差が認められた。Scheffe's testを用いた多重比較法では、グループ4では測定開始20分後のEPの値が他の群より有意に低かったことを示した。組織学的検査では、すべてグループにおいて蝸牛構造の明らかな変化はみられなかった。残存聴覚の保存が求められる場合においては人工内耳電極の挿入方向が重要である。人工内耳模擬電極を蝸牛軸の長軸方向に挿入した際にはEPはよく保存されたが、人工内耳模擬電極が蝸牛軸に向かって挿入された場合、EPは有意に減少した。そのため残存聴力をよく維持するためには、電極挿入時に蝸牛軸方向へ向けた挿入を避けるといった細心の注意が払われるべきである。また可能なかぎり、吸引の使用は最小限にすべきである。

(2) 生理食塩水を投与した群は、ABR 閾値の変化を示さなかった。曇り止め投与群およびゲンタマイシン投与群は、ABR 閾値の有意な上昇を示した。また、組織学的検討では曇り止め投与群では他の二群にくらべて明らかな中耳への障害がみられた。モルモットにおいて曇り止め液(Ultrastop<sup>®</sup>)の中耳への局所投与は、中耳に深刻な炎症を引き起こし聴覚障害を引き起こした。曇り止め液が中耳に達する可能性がある場合には細心の注意を払わなければならないということが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Oshima H, Ikeda R, Nomura K, Yamazaki M, Hidaka H, Katori Y, Oshima T, Kawase T, Kobayashi T.: "Change in endocochlear potential during experimental insertion of a simulated cochlear implant electrode in the guinea pig." *Otol Neurotol*. 2014 Feb; 35(2):234-40. doi:10.1097/MAO.0b013e3182a36018. (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

1.Oshima H, Ikeda R, Nomura K, Yamazaki M, Hidaka H, Katori Y, Oshima T, Kawase T, Kobayashi T. : “ Change in endocochlear potential during experimental insertion of a simulated cochlear implant electrode in the guinea pig. ” Inner ear biology. (20130910-20130913). Alcalá de Henares, Madrid/Spain

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 俊光 (KOBAYASHI TOSHIMITSU)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：80133958

### (2) 研究分担者

大島 猛史 (OSHIMA TAKESHI)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：40241608

### (3) 研究分担者

野村 和弘 (NOMURA KAZUHIRO)  
東北大学・病院・助教  
研究者番号：60466563