

脳内を走る直径0.2～0.3mm位の細動脈の閉塞にて生じる、多くは無症状の微小脳梗塞である。迷路動脈は直径0.1～0.25mmであり、ラクナ梗塞と同様の機序で虚血を生じる可能性が十分にある。このように、突発性難聴症例におけるPRKCHの遺伝子型頻度の差は、突発性難聴発症に対する虚血の関与を示している。

SNP遺伝子診断は、血液一滴から40分で結果判定可能な診断手法が開発されており、近い将来、個々の患者の病態に合ったテーラーメイド医療を実践する手段として期待されている。突発性難聴患者でPRKCHのA塩基保持者は、健常者と比較すると31.6%と高頻度であった。突発性難聴患者でPRKCHのA塩基を認めれば、虚血が原因である可

能性が高いと考え、脳梗塞や心筋梗塞に準じて、緊急に循環改善治療を施すことも可能になると考える。また、健診にてPRKCHのA塩基保持者が判明するようになれば、血圧コントロール等の生活指導にて、ラクナ脳梗塞と共に突発性難聴の発症を抑制することが出来るかもしれない。

(羽藤直人)

#### 参考文献

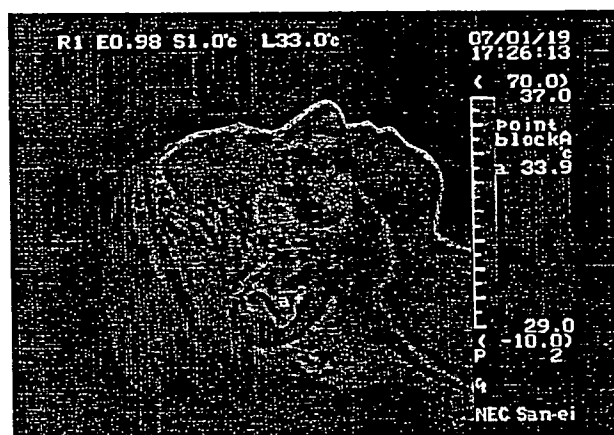
- 1) Kubo M, Hata J, Ninomiya T, Matsuda K, Yonemoto K, et al. A nonsynonymous SNP in PRKCH (protein kinase C eta) increases the risk of cerebral infarction. *Nat Genet* 2007; 39 (2): 212-217.

Gene Name	GenBankAcce No or SNP#rs	Position	Allele Type	Minor Allele Frequency (%)	
				突発性難聴(n=20)	コントロール(n=20)
PRKCH	rs2230500	-	A/G	31.6 *	13.2 *
TNF $\alpha$	AF129756	175514	T/C	15.8	20.0
TNF $\alpha$	AF129756	175340	C/T	27.5	15.0
TNF $\alpha$	AF129756	174859	G/A	0	0
TNF $\alpha$	AF129756	174721	G/A	0	0
MCP1	M37719	234	G/C	40.0	32.7
ICAM1	X59288	657	G/A	0	0
ICAM1	X59288	1548	G/A	37.5	30.0
ACE	rs3730032	-	G/T	0	0
ACE	rs7210859	-	C/G	45.0	37.5
ACE	rs7225766	-	C/T	47.5	37.7
ACE	rs4320	-	A/G	45.0	37.5
SOAT1	rs3753526	-	C/G	40.0	42.5
SOAT1	rs3753527	-	C/T	7.5	12.5
GP1BA	M22403	3064	C/T	36.8	26.3
PAI-1	X13323	135	G/-	37.5	42.5
uPA	X02419	3007	C/T	30.0	25.0

\*:  $p < 0.05$

## 第七章 虚血機序に基づく突発性難聴の治療

1. プロスタグランジンE1
2. エダラボン
3. 内耳低温療法



サーモグラム

突発性難聴を対象として、虚血障害に対する防御効果が期待できる薬剤や治療法による臨床治験を試みた。従来からのステロイドを中心とした治療に加えて、強力な血流改善剤であるプロスタグランジンE1、フリーラジカル消去剤であるエダラボン、あるいは内耳低温療法を併用した群と、従来療法群との効果を比較し、相乗効果の有無を検討した。



での期間は1～54日(平均8.2日)であり、31例が当院受診までに他院で治療を受けていた。基礎疾患としては高血圧が10例、糖尿病が2例、高脂血症が2例、虚血性心疾患が2例(重複を含む)であったが、脳梗塞例はなかった。治療前の聴力レベルは5分法で29～111dB(平均74.6dB)であった。聴力型は水平型12耳、高音漸傾型5耳、低音障害型16耳、山型4耳、谷型8耳、壟型15耳、その他3耳であった。治療法はステロイド、ビタミンB<sub>12</sub>、ATP、脳循環改善剤、カーボジェン吸入、高圧酸素療法、星状神経節ブロックであり、症例ごとにこれらを組み合わせて使用した。PGE1投与群、非投与群の群間比較を表1に示す。

治療効果の判定は厚生労働省急性高度難聴研究班の聴力回復判定基準に従った。判定基準のうち「治愈」と「著明回復」の合計を「有効」とし、PGE1投与群と非投与群間の有効率を比較した。有意差検定には $\chi^2$ 検定、あるいはFischerの直接確率検定法を使用した。

	PGE1投与群	PGE1非投与群
症例数	63例	63例
性別	男性29例、女性34例	男性32例、女性31例
年齢	11歳～78歳(平均51.2歳)	12歳～78歳(平均49.2歳)
聴力(5分法)	31dB～111dB(平均71.1dB)	29dB～111dB(平均74.6dB)
治療開始病日	1日～82日(平均11.6日)	1日～54日(平均8.2日)

表1 対象例の概要

結 果

PGE1投与群では治愈13例、著明回復20例、回復12例、不変18例であったのに対し、PGE1非投与群では治愈14例、著明回復13例、回復17例、不変19例であった(図1)。有効率はPGE1投与群が52.4%、PGE1非投与群が42.9%であり、両群間に統計学的な有意差はなかった。

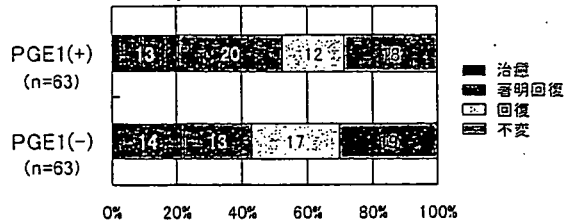


図1 症例全体の治療成績

PGE1 (+)はPGE1投与群、PGE1 (-)はPGE1非投与群を示す。

治療効果を周波数別に検討したところ、有意差は認められないものの、PGE1投与群は低音域の改善が優れていた(図2)。

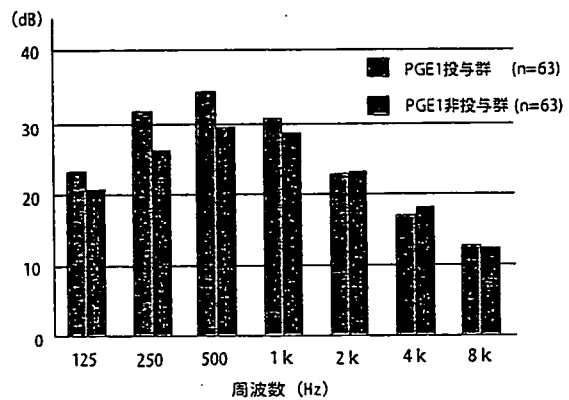


図2 周波数別の聴力改善

PGE1投与群は低音域の聴力改善が優れていた。

年齢別の治療成績を図3に示す。30歳未満、30歳以上60歳未満、60歳以上に分けて検討したが、いずれの年齢層においてもPGE1投与群と非投与群の有効率に統計学的な有意差は認めなかった。

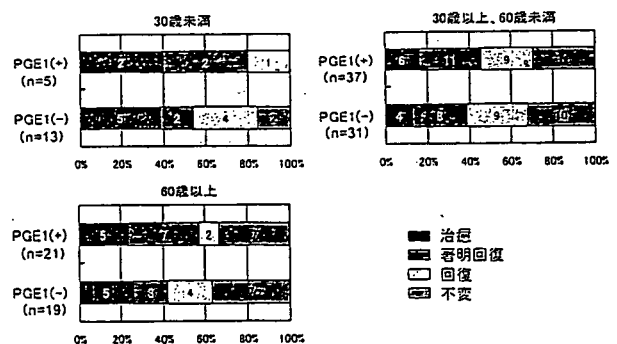


図3 年齢別の治療成績

難聴の重症度別の治療成績を図4に示す。統計学的な有意差はないもののGrade 3・4ではPGE1投与群の有効率が高い傾向がみられた。

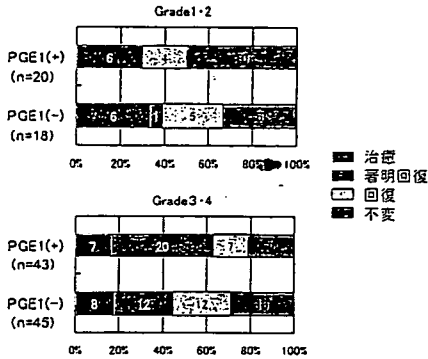


図4 難聴の重症度別治療成績

治療開始時期別の治療成績を図5に示す。発症3日以内に治療を開始した場合、PGE1投与群では19例中18例で聴力改善が得られ、不変は1例のみであったが、非投与群では20例中5例が不変であった。しかし、統計学的な有意差はなかった。

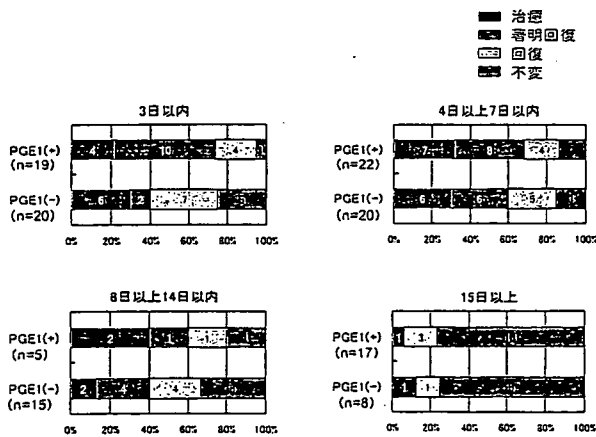


図5 聴力型別治療成績

PGE1投与群と非投与群を、高血圧や糖尿病、高脂血症、虚血性心疾患、脳梗塞などの基礎疾患の有無で分けて治療成績を比較した(図6)。PGE1非投与群では基礎疾患の有無に関わらず有効率にほとんど差を認めなかったが、PGE1投与群では基礎疾患を有する症例の方が治療成績は良い傾向にあった。

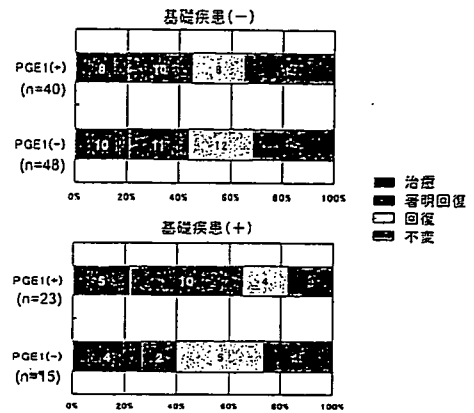


図6 治療開始時期別の治療成績

なお、PGE1投与中の点滴部位の発赤、疼痛が数例で認められたが、いずれも軽度で投与中止に至った例はなかった。その他の副作用は認められなかった。

### 考 察

突発性難聴は単一の疾患ではなく様々な原因による症候群的な疾患と考えられることから、その治療に当たっては、虚血、ウイルス、免疫異常など種々の病態を想定して作用機序の異なる複数の薬剤を併用する、いわゆるカクテル療法を行なうことが多い。PGE1を突発性難聴の治療薬として選択する理由は、その病態として虚血を想定しているからである。

PGE1は血管拡張、血小板凝集抑制、赤血球変形機能改善、血管内皮細胞保護などの薬理作用を有することから、末梢循環障害改善薬としての効果が期待できる。実際、PGE1はラットの蝸牛血流を増加させる<sup>9)</sup>ことが証明されており、ヒトにおいても内耳血流を増加させる作用も持つと推察される。臨床的にPGE1は慢性動脈閉塞症や振動病、血行再建術後など緩徐な虚血に対して効果を有しているが、心筋梗塞や脳梗塞など既に梗塞に至った組織に対する治療効果はない。したがって突発性難聴が梗塞によるものであればPGE1の効果は期待できないが、血管攣縮やスラッジ形成、autoregulation障害による内耳循環不全などが原因であればPGE1投与は効果が期待できる。また、PGE1には神経細胞をグルタミン酸毒性から保護する効果もあることが知られている<sup>10)</sup>。

グルタミン酸は一過性内耳虚血における内耳障害に関与しており<sup>11)</sup>、PGE1はこれを防御することでラセン神経節細胞や内毛細胞の細胞死を防ぐと考えられる。

今回、年齢、重症度、治療開始日、合併症の有無などに着目してPGE1投与群と非投与群の有効率を比較したが、いずれの項目においても有意差は認められなかった。しかし、Grade 3、4の重症例、あるいは治療開始3日以内の症例ではPGE1投与群の治療成績が良い傾向がみられた。このような重症度の高い症例では循環障害が病態の背景になっていた可能性があり、早期からPGE1を併用するのが良いと思われる。また、低音障害型におけるPGE1投与群の治療成績も良い傾向にあった。低音障害型の病態には内リンパ水腫が関与するとされているが、内リンパ水腫では内耳循環系が脆弱で、通常なら影響しない血圧低下や強大音負荷などでも内耳血流障害が惹起される<sup>12)</sup>。このような循環障害は血管条萎縮が生じる前であれば、PGE1などの循環改善剤の投与で回復する可能性がある<sup>13)</sup>。

高血圧や糖尿病、高脂血症、虚血性心疾患、脳梗塞など血管障害を来たしうる基礎疾患を持つ症例では、PGE1の効果が高い傾向にあった。このような症例の一部ではPGE1が奏効しやすい病態、すなわち内耳循環障害が原因になっていたのかもしれない。基礎疾患がある症例では元々動脈は狭窄気味で、ストレスにより血管攣縮やスラッジ形成などが生じ内耳虚血をきたしたのではないかと推測される。

PGE1は副作用が少ない薬剤で、ステロイド使用が禁忌となるような合併症を持つ症例にも投与できる。今回の検討ではPGE1の治療成績に統計学的な有意差は認められなかったが、突発性難聴に対してエビデンスが証明された薬剤が存在しない現状では、特に重症例や基礎疾患を伴う例に対してはPGE1は治療薬の1つになりうると考えられた。

(篠森裕介)

---

### 参考文献

---

- 211.
- 2) 成田慎一郎, 小林一豊, 新谷朋子, 小笠原英樹, 石井敬, 他: 突発性難聴300耳の治療に関する検討 Grade 2-4における多剤併用効果. 耳鼻咽喉科臨床 2002; 95: 123-129.
- 3) 井上庸夫, 山口晋太郎, 徳丸晶子, 大出茂典, 三須俊宏, 他: 突発性難聴におけるリボPGE1の有効性 ステロイド非使用例の検討. 耳鼻咽喉科臨床 2003; 96: 503-508.
- 4) Nakashima T, Kuno K, Yanagita N: Evaluation of prostaglandin E1 therapy for sudden deafness. Laryngoscope. 1989; 99: 542-546.
- 5) 深澤啓二郎, 阪上雅史, 小田隆道, 杉井亜也子, 佐々木良二, 他: 突発性難聴におけるパルクスの使用経験. 耳鼻咽喉科臨床 1998; 91: 415-420.
- 6) Ahn JH, Kim MR, Kim HC: Therapeutic effect of lipoprostaglandin E1 on sudden hearing loss. Am J Otolaryngol. 2005; 26: 245-248.
- 7) Kanzaki J, Inoue Y, Ogawa K, Fukuda S, Fukushima K, et al: Effect of single-drug treatment on idiopathic sudden sensorineural hearing loss. Auris Nasus Larynx. 2003; 30: 123-127.
- 8) Ogawa K, Takei S, Inoue Y, Kanzaki J: Effect of prostaglandin E1 on idiopathic sudden sensorineural hearing loss: a double-blinded clinical study. Otol Neurotol. 2002; 23: 665-668.
- 9) Jaffe BF: Clinical studies in sudden deafness. Adv Otorhinolaryngol 1973; 20: 221-228.
- 10) Umemura K, Nakashima M: Effect of prostaglandin E1 on the rat inner ear microvascular thrombosis. Gen Pharmacol. 1997; 28: 221-224.
- 11) Cazevielle C, Muller A, Meynier F, Dutrait N, Bonne C: Protection by prostaglandins from glutamate toxicity in cortical neurons. Neurochem Int. 1994; 24: 395-398.
- 12) Hakuba N, Koga K, Shudou M, Watanabe F, Mitani A, et al: Hearing loss and glutamate efflux in the perilymph following transient hindbrain ischemia in gerbils. J Comp Neurol. 2000; 418: 217-226.
- 13) Yamamoto K, Kubo T, Matsunaga T: Autoregulation of inner ear blood flow in normal and hydropic guinea pigs. Acta Otolaryngol. 1991; 111: 312-318.
- 14) 榎谷治彦: 突発性難聴と血管障害. Otolology Japan 1994; 4: 137-141.

1) 藤田豪紀, 大島収, 高橋光明: 突発性難聴に対するLipo-prostaglandinE1の使用経験. Otolology Japan 2002; 12: 208

## VII. 虚血機序に基づく突発性難聴の治療

### 2. エダラボン

【要約】フリーラジカル消去剤エダラボン（ラジカット®）の突発性難聴に対する臨床効果を検討する目的で、ステロイドを投与した場合と、ステロイドにエダラボンを併用投与した場合の治療成績を比較した。その結果、両群間に統計学的な有意差はみられなかったが、エダラボン併用群の方が治療成績がよい傾向にあり、特に50歳以上の症例やGrade 4の難聴例、めまい随伴例でその傾向が強かった。エダラボンは重症の突発性難聴に有用であることが示唆された。

#### はじめに

フリーラジカル消去剤エダラボン（3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one）は、本邦で開発された世界初の脳梗塞急性期の神経保護剤であり、病変部に生じたフリーラジカルを消去し、細胞膜脂質の過酸化を抑制することで脳梗塞の症状悪化を防ぐ。ラットの脳血管障害モデルにエダラボンを投与すると、脳浮腫や脳梗塞、神経症状の発現や遅発性神経細胞死が抑制される<sup>1) 2) 3)</sup>。現在、エダラボンは急性期脳梗塞の治療薬として保険承認を受け、臨床現場では第1選択薬剤として使用されている。本剤は外傷性頭蓋内損傷<sup>4)</sup>や虚血性心疾患<sup>5)</sup>にも有効である。

内耳疾患に対する効果については、動物実験によりエダラボンが一過性虚血による内耳障害を防御することは証明されている<sup>6)</sup>が、臨床例での報告はない。今回、突発性難聴に対するエダラボン（ラジカット®）の効果と、ステロイドを投与した場合と、ステロイドにエダラボンを併用投与した場合の治療成績を比較することで検討した。

#### 対象と方法

対象は2003年12月から2006年10月までの間に愛媛大学医学部附属病院耳鼻咽喉科を受診した発症8日以内の突発性難聴患者で、腎機能障害がなくエダラボン投与に同意が得られた15歳以上の16例とし

た。厚生労働省特定疾患急性高度難聴調査研究班（1999年）による突発性難聴の重症度分類によると、症例の内訳は、Grade 1が3例、Grade 2が2例、Grade 3が7例、Grade 4が4例であった。治療は入院の上、プレドニン1mg/kg（点滴静注）から開始し10日間で終了するステロイド漸減療法に加え、エダラボン60mg/日（点滴静注）を7日間、併用して投与した（エダラボン併用群）。

一方、コントロールは1991年12月から2005年11月までの間に当科を受診した発症8日以内の突発性難聴患者で、ステロイド（点滴静注）による入院治療を施行した15歳以上の症例のなかから、初診時の重症度をエダラボン併用群にマッチングさせて抽出した16例（ステロイド群）とした。結果の評価においては全体の治療成績を比較するとともに、治療開始時期、年齢、難聴重症度、めまい随伴の有無について検討した。なお両群ともにATP製剤やビタミン剤の投与の有無は問わないこととしたが、プロスタグランディン製剤や高圧酸素療法を施行した例は除外した。エダラボンは突発性難聴の治療薬としては保険承認を得ていないことから、愛媛大学医学部附属病院倫理委員会の承認を得て、その基準に従い投与した。

表1にステロイド群とエダラボン併用群の概要を示す。各項目で若干の差異はあるものの両群間の患者背景はほぼ同一と判断した。なお、Grade 4の症例は両群とも全例めまいを伴っていた。

	エダラボン併用群 (n=16)	ステロイド群 (n=16)
平均年齢	48.6歳 (17-67歳)	45.1歳 (18-64歳)
男性/女性	12例/4例	5例/11例
初診時平均聴力	68.0dB	75.0dB
治療開始病日	3.5日 (1-8日)	2.4日 (1-8日)
めまいの有無	有 8例 無 8例	有 6例 無 10例

表1 対象例の概要

治療効果は厚生労働省突発性難聴研究班による聴力予後判定基準に準じて、初診時聴力を「発症時聴力」、1ヶ月以上経過し固定したときの聴力を「固定時聴力」として、各々5周波数の平均聴力から判定した。判定基準のうち「治癒」と「著明回復」を「有効」とし、両群間の有効率を比較した。なお、有効率の有意差検定には $\chi^2$ 検定またはFischerの直接確率検定法を用いた。

結 果

両群の治療成績を比較すると、エダラボン併用群における聴力改善例の割合（有効率）は62.5%（16例中10例）であったのに対し、ステロイド群は43.8%（16例中7例）であった（図1）。両群間に統計学的有意差は認めなかったが、エダラボン併用群の有効率が高い傾向にあった。

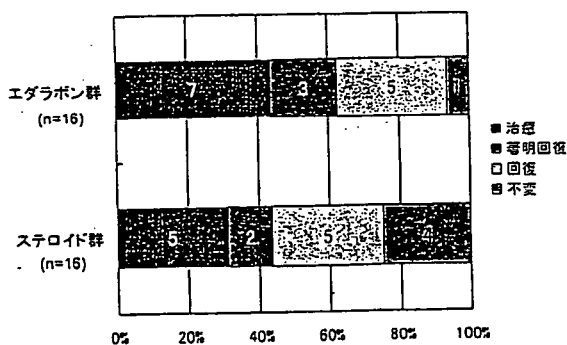


図1 症例全体の治療成績

発症3日以内の早期治療開始例はエダラボン併用群が10例、ステロイド群が14例であった。その有効率はエダラボン併用群が50.0%（10例中5例）、ステロイド群も50.0%（14例中7例）であり、両群間に差は認めなかった（図2）。

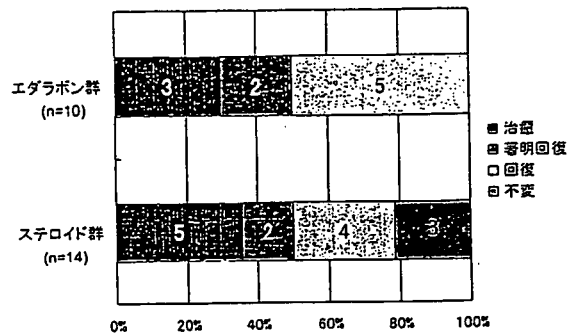


図2 発症早期例（発症3日以内例）の治療成績

年齢に関して、50歳以上の症例はエダラボン併用群が12例、ステロイド群が8例であった。その有効率はエダラボン併用群が66.7%（12例中8例）に対し、ステロイド群は25.0%（8例中2例）であった（図3）。エダラボン併用群で有効率が高い傾向にあった。

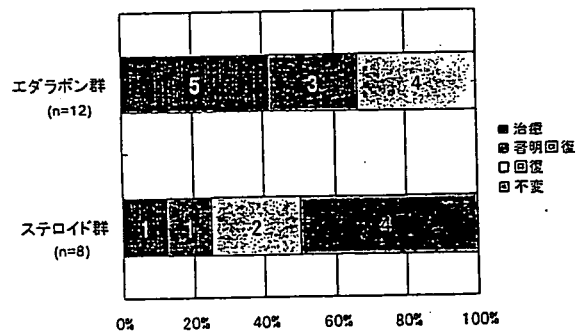


図3 50歳以上例の治療成績

難聴重症度別にみると、Grade 3症例の有効率は、エダラボン併用群が42.9%（7例中3例）であったのに対し、ステロイド群は85.7%（7例中6例）であり、ステロイド群の方が高かった。一方、Grade 4の有効率は、エダラボン併用群が75.0%（4例中3例）、ステロイド群は0.0%（4例中0例）であった（図4）。Grade 4ではエダラボン併用群の方が有効率は高かった。



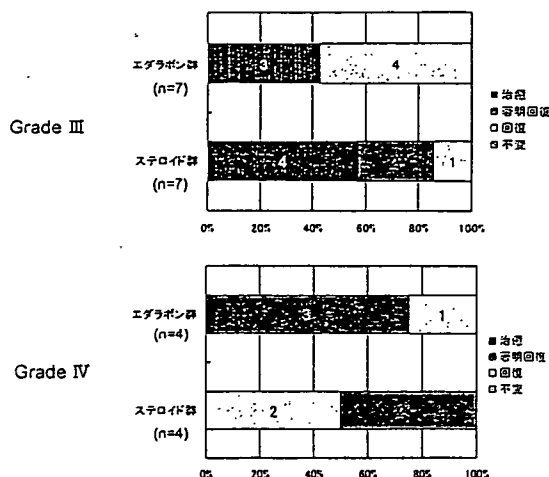


図4 重症例 (Grade 3、Grade 4) の治療成績

めまい随伴例についてみると、エダラボン併用群の有効率は37.5% (8例中3例)、ステロイド群は0.0% (6例中0例) であり、前者の有効率の方が高かった (図5)。しかし、エダラボン併用群においても治癒例はなく、めまい随伴例の予後は概して悪かった。

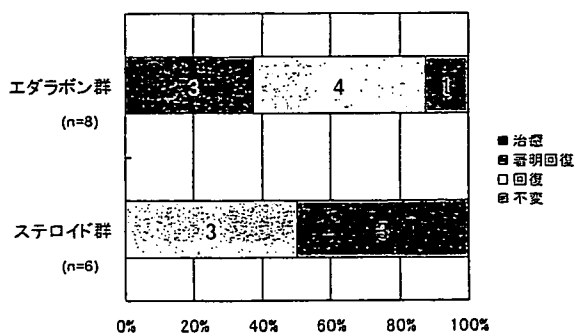


図5 めまい随伴例の治療成績

### 考 察

フリーラジカルは虚血や外傷、ウイルス感染など様々な障害に伴って発生し組織障害を増強する。内耳ではシスプラチン<sup>7) 8)</sup> やアミノグリコシド系抗生物質<sup>9) 10)</sup>、音響外傷<sup>11)</sup> がフリーラジカルを発生させることが知られている。エダラボンにはフリーラジカルを消去する効果があり、音響外傷<sup>12) 13)</sup> やアミノグリコシド系抗生物質<sup>14)</sup>、緑膿菌の外毒素<sup>15)</sup>、一過性虚血<sup>6)</sup> による内耳障害を防御する。ウイルス性内耳炎に

についての報告はないが、インフルエンザ肺炎マウスでは局所でのフリーラジカル発生が実験的に証明されており<sup>16)</sup>、内耳炎においてもフリーラジカル発生が内耳障害に関与している可能性がある。

今回、突発性難聴を対象にエダラボンの治療効果を検討したが、対象症例数が少なかったこともあり、ステロイド群とエダラボン併用群との間に明らかな有意差はみられなかった。脳虚血実験によるとフリーラジカルは虚血後、早期に発生することが証明されており、臨床的にエダラボン投与は脳梗塞発症24時間以内の急性期が適応とされている<sup>17)</sup>。今回、発症3日以内の早期治療例に限った比較では両群の有効率に差はなかった。一方、フリーラジカルは脳梗塞の発症早期だけでなく、14日後頃までの遅延性(炎症性)の梗塞体積増大にも深く関与するとされている<sup>18)</sup>。今回の検討では発症8日以内の症例を対象としたので、遅発相に対するエダラボンの治療効果については不明である。

50歳以上の症例ではエダラボン併用群の方が治療成績は良好な傾向にあった。50歳を過ぎると動脈硬化が進行し<sup>19)</sup>、脳卒中<sup>20)</sup> や脳梗塞<sup>21)</sup> の頻度も高く、虚血疾患の発症リスクは高まる。エダラボンの併用で突発性難聴の有効率が高かったことは、高齢者の突発性難聴には虚血が関与していることを間接的に示唆する結果でもある。

Grade 4の重症例やめまい随伴例ではエダラボン併用群の治療成績が良好な傾向にあった。一般に聴力障害が高度で、めまいを合併する例の聴力予後は悪いことから<sup>22)</sup>、このような例にはエダラボン併用は有効と考えられた。

突発性難聴には様々な治療法が用いられているが、現在のところ、エビデンスが確立された治療法はない。通常、ステロイドの点滴あるいは内服を主体とした治療を行うが、ステロイドには様々な副作用がある。糖尿病などの合併症によりステロイド投与が困難な例に対する治療薬としてエダラボンは有望な薬剤の一つと考えられた。

(兵頭 純)

## 参考文献

- 1) Yamamoto T, Yuki S, Watanabe T, Mitsuka M, Saito KI, et al : Delayed neuronal death prevented by inhibition of increased hydroxyl radical formation in a transient cerebral ischemia. *Brain Res* 1997 ; 762 (1-2) : 240-242.
- 2) Watanabe T, Yuki S, Egawa M, Nishi H : Protective effects of MCI-186 on cerebral ischemia : possible involvement of free radical scavenging and antioxidant actions. *J Pharmacol Exp Ther* 1994 ; 268 (3) : 1597-1604.
- 3) Mizuno A, Umemura K, Nakashima M : Inhibitory effect of MCI-186, a free radical scavenger, on cerebral ischemia following rat middle cerebral artery occlusion. *Gen Pharmacol* 1998 ; 30 (4) : 575-578.
- 4) Dohi K, Satoh K, Mihara Y, Nakamura S, Miyake Y, et al : Alkoxy radical-scavenging activity of edaravone in patients with traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2006 ; 23 (11) : 1591-1599.
- 5) Inatomi Y, Takita T, Yonehara T, Fujioka S, Hashimoto Y, et al : Efficacy of edaravone in cardioembolic stroke. *Intern Med* 2006 ; 45 (5) : 253-257.
- 6) Maetani T, Hakuba N, Taniguchi M, Hyodo J, Shimizu Y, et al : Free radical scavenger protects against inner hair cell loss after cochlear ischemia. *Neuroreport* 2003 ; 14 : 1881-1884.
- 7) Otto WC, Brown RD, Gage-White L, Kupetz S, Anniko M, et al : Effects of cisplatin and thiosulfate upon auditory brainstem responses of guinea pigs. *Hear Res* 1988 ; 35(1) : 79-85.
- 8) Yu HH, Seo SJ, Kim YH, Lee HY, Park RK, et al : Protective effect of *Rehmannia glutinosa* on the cisplatin-induced damage of HEI-OC1 auditory cells through scavenging free radicals. *J Ethnopharmacol* 2006 ; 107 : 383-388.
- 9) Garetz SL, Rhee DJ, Schacht J : Sulfhydryl compounds and antioxidants inhibit cytotoxicity to outer hair cells of a gentamicin metabolite in vitro. *Hear Res* 1994 ; 77 (1-2) : 75-80.
- 10) Takumida M, Popa R, Anniko M : Free radicals in the guinea pig inner ear following gentamicin exposure. *ORL* 1999 ; 61 : 63-70.
- 11) Seidman MD, Shivapuja BG, Quirk WS : The protective effects of allopurinol and superoxide dismutase on noise-induced cochlear damage. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1993 ; 109 (6) : 1052-1056.
- 12) Takemoto T, Sugahara K, Okuda T, Shimogori H, Yamashita H : The clinical free radical scavenger, edaravone, protects cochlear hair cells from acoustic trauma. *Eur J Pharmacol* 2004 ; 487 (1-3) : 113-116.
- 13) Tanaka K, Takemoto T, Sugahara K, Okuda T, Mikuriya T, et al : Post-exposure administration of edaravone attenuates noise-induced hearing loss. *Eur J Pharmacol* 2005 ; 522 (1-3) : 116-121.
- 14) Horiike O, Shimogori H, Yamashita H : Effect of edaravone on streptomycin-induced vestibulotoxicity in the Guinea pig. *Laryngoscope* 2004 ; 114 (9) : 1630-1632.
- 15) Takumida M, Anniko M : Protective effect of edaravone against the ototoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Acta Otolaryngol* 2006 ; 126 (1) : 15-19.
- 16) Oda T, Akaike T, Hamamoto T, Suzuki F, Hirano T, et al : Oxygen radicals in influenza-induced pathogenesis and treatment with pyran polymer-conjugated SOD. *Science* 1989 ; 244 (4907) : 974-976.
- 17) 橋本洋一郎, 米原敏郎, 平野照之 : [BRAIN ATTACK 今ここですべき最高の治療] 最適な治療を目指して 急性期の治療 今ここでできること 内科89 (4)、南江堂刊 2002 ; 632-640.
- 18) Zhang N, Komine-Kobayashi M, Tanaka R, Liu M, Mizuno Y, et al : Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain. *Stroke* 2005 ; 36 (10) : 2220-2225.
- 19) Kuller LH : AHA symposium/epidemiology meeting : Atherosclerosis. Discussion : Why measure atherosclerosis? *Circulation* 1993 ; 87 (3 Suppl) : 1134-1137.
- 20) Urakami K, Igo M, Takahashi K : An epidemiologic study of cerebrovascular disease in western Japan : with special reference to transient ischemic attacks. *Stroke* 1987 ; 18 (2) : 396-401.
- 21) Brown RD, Whisnant JP, Sicks JD, O'Fallon WM, Wiebers DO : Stroke incidence, prevalence, and survival : secular trends in Rochester, Minnesota, through 1989. *Stroke* 1996 ; 27 (3) : 373-380.
- 22) 立木 孝 : EBMからみた突発性難聴の臨床. SCOM 33 金原出版 2005 ; 90.

## VII. 虚血機序に基づく突発性難聴の治療

### 3. 内耳低温療法

【要約】内耳障害に対する局所低温療法の可能性を検討するとともに、急性期の突発性難聴患者に内耳低温療法を試み、その効果を検証した。局所低温療法は、全身冷却による本格的な低体温療法と比較して、簡便に施行でき副作用も少ない。15℃に設定した水枕を健康なボランティアに使用させて冷却効果を検討したところ、120分間の冷却で鼓膜温は1.4℃低下した。さらに多施設共同研究として、発症後早期の突発性難聴患者68例を対象として内耳低温療法の効果を検証した。冷却には水枕を使用、冷却期間は48時間とした。その結果、ステロイドを中心とした従来療法に比べ、従来療法に内耳低温療法を併用した場合には、Grade 3および4の高度難聴例や70歳以上の高齢者において、有意に有効率が高かった。

#### はじめに

血栓や塞栓により脳血流が急激に遮断されると、脳組織には浮腫が生じ、また様々なサイトカインやフリーラジカルが放出されてネクロシスやアポトーシスが進行し組織は徐々に破壊されていく<sup>1)</sup>。脳梗塞の救命率や機能予後を向上させるためには、このような進行性の脳組織破壊を抑制することが重要である。その対策の一つである脳低温療法は、虚血性脳障害に対し有効であることが確かめられており、多くの脳梗塞患者の機能回復や社会復帰の実現に貢献してきた<sup>2)</sup>。低温療法の作用メカニズムは、非特異的に細胞のエネルギー代謝や酸素消費量を減少させ、さらに有害な活性酸素の発生を抑制することで障害の進行を防止し、不可逆的な細胞変性を抑制することとされている<sup>3)</sup>。したがって脳梗塞や心筋梗塞などの虚血障害に限らず、原因が明らかでない急性疾患に対しても効果が期待できる。

われわれは一過性内耳虚血モデルを用いて内耳障害のメカニズムを検討し、脳虚血と類似点が多いことを報告してきた<sup>4) 5) 6)</sup>。この動物モデルを用いて低体温療法の効果を検討したところ、虚血1時間後までに低体温を開始するとABRや有毛細胞障害は有意に軽減された<sup>7) 8)</sup>。低体温療法は急性内耳障害の治療、

特に障害初期の治療に有効と考えられるが、臨床的に内耳低温療法を試みた報告はない。

局所低温療法は、全身冷却による低体温療法のように循環障害や免疫不全をきたさないため、重篤な副作用を起こさず、内耳疾患のような生命予後が良好な疾患の治療に適している。本研究では内耳の冷却を目的として、頸部から乳突部に15℃に設定した水枕を当てて、その効果を検討した。さらにその効果を臨床的に確認するため、多施設共同研究として急性期の突発性難聴患者を対象とした検証を行った。

#### 局所冷却の鼓膜温の変化

##### 1. 対象と方法

健康なボランティア7名(29～48歳、男性6名、女性1名)を対象とした。局所冷却は、皮膚組織への安全性を考慮して15℃に設定した水をゴム製水枕に入れ、これを一側頸部から乳突部上に持続的に密着させる方法を採用した。内耳温は鼓膜温と関連することから<sup>9) 10)</sup>、耳式体温計を用いて10分間隔で120分間にわたり冷却側の鼓膜温度をモニターした。対側の鼓膜温度や腋窩温度も同時に測定し、頸部冷却の影響を検討した。一部の症例ではサーモグラフィー検査を行い、冷却部や周囲皮膚の温度変化を観察した。

## 2. 結果

冷却後120分間にわたる鼓膜温の変化を図1に示す。冷却開始とともに鼓膜温は低下するが、10分後過ぎにリバウンドして一旦上昇し、その後、再び徐々に低下して35℃前後で安定した。最終的に鼓膜温度は冷却前の平均36.5℃から、120分後には平均35.1℃と1.4℃低下した。一方、対側耳の鼓膜温度は120分後も36.4℃であり変化はみられなかった。なお、腋窩温度は冷却前が36.6℃、120分後が36.4℃であり、わずかに低下した。

サーモグラフィ検査の代表例の所見を図2に示す。冷却前は赤く高温を示していた耳介部の皮膚表面温度が、冷却23分後には緑色の低温に移行した様子が確認できた。

### 突発性難聴に対する内耳低温療法の効果

#### 1. 対象

2006年4月1日から10月31日までの間に愛媛大学医学部附属病院ならびに協力施設の耳鼻咽喉科を受診した突発性難聴患者のうち、①発症から2週以内、②入院治療が可能、③15歳以上、④ステロイドによる治療が可能、⑤水枕を使用した低温治療に同意する、などの条件を全て満たす症例を対象とした。既治療の有無は不問とした。対象者は68例で、年齢は15～79歳（平均59.0歳）。男女比は30：38、発症から治療開始までの期間は平均3.0日、初診時聴力は5分法で74.0dBであった（表1）。

研究実施施設名ならびに症例数の内訳を表2に示

す。これら計68例を内耳低温群とした。

一方、冷却以外に内耳低温群と同様の治療を行い、聴力経過が明らかな突発性難聴患者をコントロールとした。これらコントロールは、各施設で内耳低温群と同数を年齢、性別、難聴Grade、冷却以外の治療法をマッチングさせて選択した68例とし、従来療法群とした。

#### 2. 方法

冷却方法は前述したように、患者を側臥位に寝かせ、15℃に設定した水枕を患側乳突部から頸部に当てて耳周囲を冷却した。患者にはできる限り患側頸部を冷やすように指示したが、不快な場合は寝返りを許容した。入院直後より最低48時間、持続的に冷却し、その間の入浴やシャワーは禁じたが、トイレ歩行や食事等の際の中断は許可した。水枕の水は適宜入れ替え、また夏季には氷を混入して水温上昇を防いだ。なお、過度の冷却のため低体温症や皮膚障害を起こさないよう十分な観察を行った。

内耳低温群に対する薬物治療は、各施設での治療プロトコルに従った。このため各施設間で投与薬剤や投与量、期間は異なったが、全例でステロイドが使用されていた。併用薬剤は多岐にわたるが、ビタミンB<sub>12</sub>やATP製剤の併用が多かった。

検討項目は、①発症から治療開始までの期間、②初診時の標準純音聴力（聴力型および5周波数平均聴力によるGrade分類：Grade 1 < 40dB、40dB ≤ Grade 2 < 60dB、60dB ≤ Grade 3 < 90dB、90dB ≤ Grade 4）、③最終診療時の標準純音聴力（5周波数

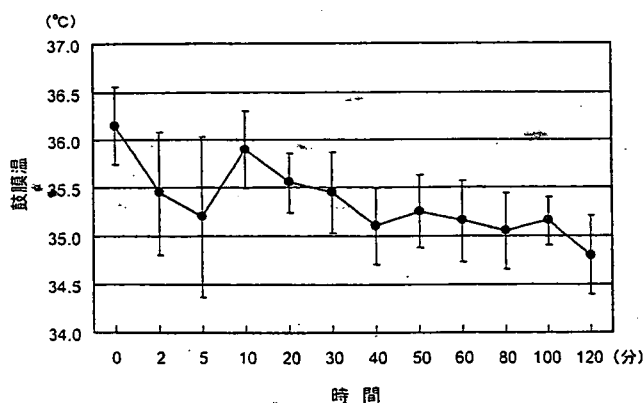


図1 水枕による頸部冷却時の鼓膜温の変化

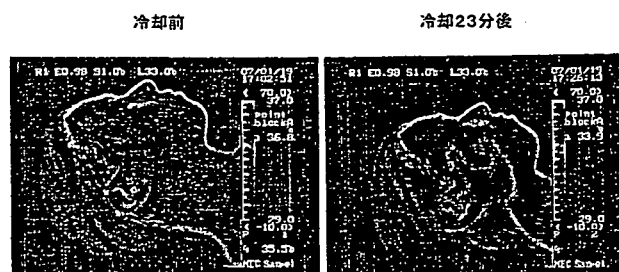


図2 頸部冷却時のサーモグラム

平均聴力)、④難聴治療効果の判定(厚生労働省急性難聴研究班による突発性難聴の聴力予後判定基準、治癒、著明回復、回復、不変)の4項目とした。また、問診および視診(冷却部の皮膚の異常、外耳、鼓膜所見)にて冷却による副作用の有無を検討した。

なお、治療成績に関する統計学的検討には、 $\chi^2$ 検定またはFischerの直接確率検定法を用いた。

### 3. 結果

聴力予後の結果を図3に示す。内耳低温群の治癒率は47.1%、治癒と著明回復をあわせた有効率は67.2%であった。一方、従来療法群の治癒率は33.8%、有効率は52.9%であり、両群間に統計学的な有意差は認めなかったが、内耳低温群の治療成績が良好な傾向にあった。

	内耳低温群(n=68)	従来療法群(n=68)
平均年齢	59.0歳(15-79歳)	56.3歳(15-80歳)
男性/女性	30例/38例	31例/37例
治療開始日	3.0日	3.1日
初診時聴力閾値	74.0dB	73.1dB
初診時聴力Grade	Grade1: 3例 Grade2: 18例 Grade3: 30例 Grade4: 17例	Grade1: 7例 Grade2: 14例 Grade3: 30例 Grade4: 17例
初診時聴力型	高音障害型: 4例 低音障害型: 17例 水平型: 20例 山型: 3例 谷型: 7例 混合型: 17例	高音障害型: 7例 低音障害型: 17例 水平型: 16例 山型: 6例 谷型: 4例 混合型: 18例

表1 対象症例の概要

施設名	症例数
愛媛大学医学部附属病院	17例
積善会十全総合病院	10例
大阪赤十字病院	9例
松山赤十字病院	7例
愛媛県立中央病院	5例
高松赤十字病院	5例
倉敷中央病院	4例
西条市立周桑病院	3例
西条中央病院	2例
愛媛県立今治病院	2例
市立宇和島病院	2例
新日鐵広畑病院	1例
市立八幡浜病院	1例
計	68例

表2 研究実施施設名および症例数

早期治療の効果を検討する目的で、発症24時間以内に治療を開始した内耳低温群の27例と従来療法群の29例で治療成績を比較した(図4)。その結果、内耳低温群の治癒率は48.1%、有効率は63.0%であり、従来療法群の治癒率は34.5%、有効率は51.7%と、内耳低温群の方が治療成績はやや良好であった。しかし両群間に有意差はなく、2日目以降に治療を開始した症例と比較しても有意差は認めなかった。同様に発症後3日以内に治療を開始した内耳低温群46例と従来療法群47例を比較したが、治癒率、有効率とも、有意差はなかった。

初診時聴力によりGrade別に検討した治療成績の結果を図5に示す。比較的軽症であるGrade 1と2の症例は各群21例であり、これらの治癒率は共に52.4%と両群とも同率であり差を認めなかった(図5a)。一方、難聴がより高度なGrade 3と4において各群47例を比較したところ、内耳低温群の有効率は有意に良好であった(内耳低温群: 74.5%、従来療法群: 53.2%、 $p < 0.05$ ) (図5b)。治癒率は内耳低温群が44.7%、従来療法群が25.5%であり、内耳低温群の成績が良好であったが有意差はなかった。

年齢別の治療成績を図6に示す。70歳未満では、内耳低温群の治癒率は45.8%、有効率は68.9%であ

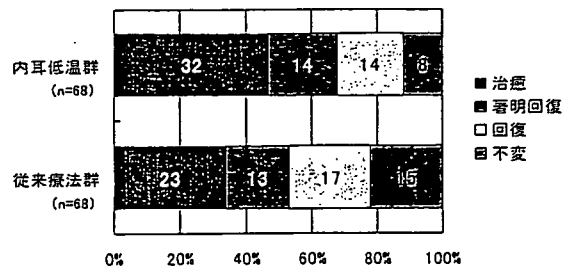


図3 症例全体の治療成績

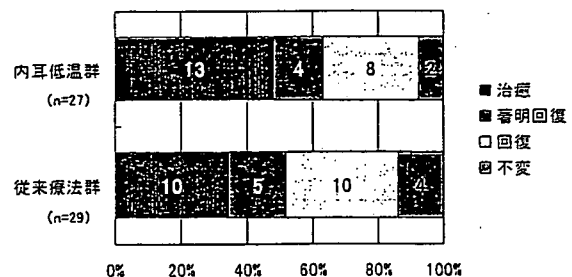


図4 発症24時間以内の治療開始例の成績

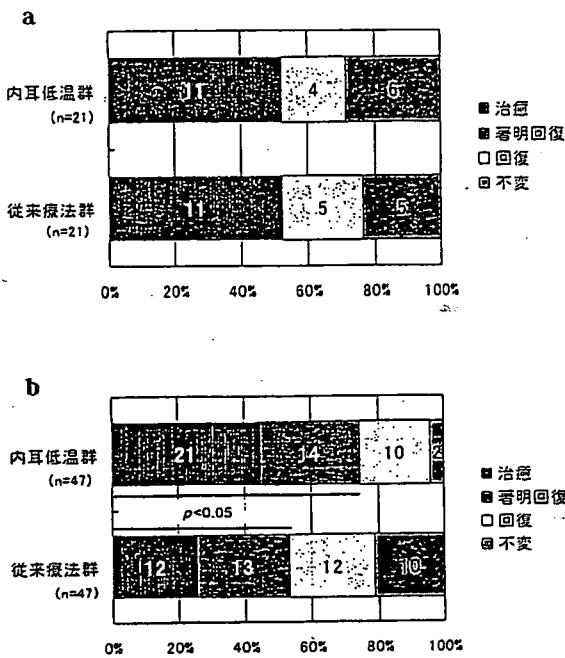


図5 難聴の重症度と治療成績

a: Grade 1、2の治療成績、b: Grade 3、4の治療成績

難聴が比較的軽度なGrade 1、2では両群間の治療成績に差はないが、難聴が高度なGrade 3、4では内耳低温群の有効率は従来療法群よりも有意に高かった。

た。一方、従来療法群の治癒率は36.4%、有効率は60.0%であり、内耳低温群がやや良好な成績であったが、両群間に有意差は認めなかった。一方、70歳以上では、内耳低温群の治癒率が50.0%、有効率が65.0%であったのに対し、従来療法群の治癒率は23.1%、有効率は38.5%であり、内耳低温群の方が有意に有効率は高かった ( $p < 0.05$ )。

なお、問診ならびに視診にて冷却による副作用を確認したが、冷却部皮膚、外耳、鼓膜所見に異常を認められた例はなく、15℃の水枕による冷却は48時間継続しても安全性の高い治療法であった。

### 考 察

患部の局所的な冷却治療は、古来より行われてきた医療技術の一つである。その多くは打撲や局所解熱、除痛、止血を目的としているが、近年スポーツ医学の領域では酷使された筋肉や関節を保護する手

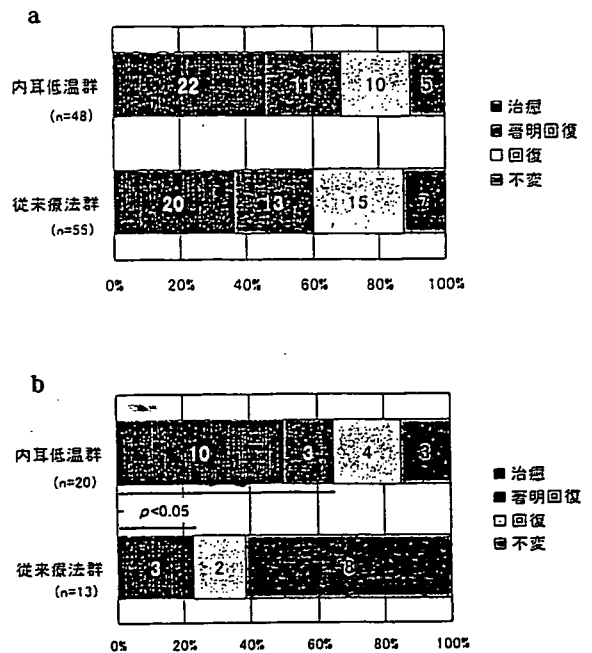


図6 年齢と治療成績

a: 70歳未満例の治療成績、b: 70歳以上例の治療成績

70歳未満例では治療成績に差はないが、70歳以上例では内耳低温群の有効率が有意に高かった。

段として局所冷却（アイシング）が一般的な治療として行われている。運動負荷部位は相対的に虚血状態となっており、局所冷却はダメージを受けた細胞のエネルギー代謝や酸素消費量を減少させ、二次的なエネルギー欠乏や低酸素症を抑制する。これにより炎症の進展・波及が軽減されるだけでなく、アイシング終了後も創傷治癒の促進やリバウンド現象に基づく血行改善効果が期待できる<sup>11) 12)</sup>。

アイシングには通常5℃以下の氷水を使用する。氷水冷却は数十分が限界であり、それ以上の冷却は凍傷を生じる。我々も当初、耳介や乳突部への氷水冷却を試みたが、疼痛のため持続冷却が困難であり、1.0℃の鼓膜温低下が限度であった。そこで水枕を利用することにより長時間の持続冷却を試みた。冷却温度は皮膚障害の危険性がない15℃を目安とし、乳突部から頸部への広い範囲を冷却した。その結果、120分の冷却で1.4℃の鼓膜温低下が得られた。長時間冷却した例の鼓膜温については2名で検討したが、

24時間後と48時間後の鼓膜温は1.0～1.5℃の低下に止まり、さらに低下することはなかった。トイレ歩行時や食事時には冷却は中断しており、厳密には持続冷却ができなかったことが原因と思われる。持続冷却のためには、座位や立位、歩行時でも使用可能な専用の冷却器具の開発が必要であろう。一方、今回のような結果としての断続的冷却は、冷却・復温の反復に伴う血流促進作用をもたらしていた可能性がある。

内耳冷却療法が有効であった機序としては、冷却による代謝抑制だけでなく、内耳におけるグルタミン酸の遊離やフリーラジカルの産生、細胞内へのカルシウム流入などの障害メカニズムが非特異的に抑制された結果と推測される。これらの機序がアポトーシスの進行を抑制して細胞障害を軽減し、回復・治癒へと導くのであろう。今回の研究で、内耳冷却療法は特に高度難聴例や70歳以上の高齢者において有効であることが示された。このような予後が悪いと予想された症例で有効率が向上した点は注目されるべきであろう。今後、冷却温度の設定や局所冷却方法の検討は必要であるが、突発性難聴に対する内耳低温療法のエビデンスを集積していくことが重要と考える。

(羽藤直人)

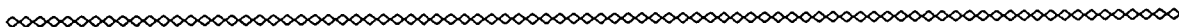
---

#### 参考文献

- 1) 野川 茂：低酸素適応応答機構と疾患. 神経と低酸素. 炎症と免疫2005；13 (5)：556-566.
- 2) 谷川元紀、間瀬光人、山田和雄：神経集中治療. 重症脳障害患者の集中治療の新たな展開. 脳浮腫・頭蓋内圧亢進の治療. ICUとCCU 2006；30 (4)：253-260.
- 3) 林 成之：神経集中治療. 重症脳障害患者の集中治療の新たな展開. 重症脳障害の脳低温療法とその進展ICUとCCU 2006；30 (4)：261-268.
- 4) Hakuba N, Koga K, Shudou M, Watanabe F, Mitani A, et al：Hearing loss and glutamate efflux in the perilymph following transient hindbrain ischemia gerbils. J Comp Neurol 2000；418：217-226.
- 5) Taniguchi M, Hakuba N, Koga K, Watanabe F, Hyodo J, et al：Apoptotic hair cell death after transient cochlear ischemia in gerbils. Neuroreport 2002；13 (18)：2459-2462.
- 6) Koga K, Hakuba N, Watanabe F, Shudou M, Nakagawa T, et al：Transient cochlear ischemia causes delayed cell death in the organ of Corti：an experimental study in gerbils. J Comp Neurol 2003；456 (2)：105-111.
- 7) Hyodo J, Hakuba N, Koga K, Watanabe F, Shudou M, et al：Hypothermia reduces glutamate efflux in perilymph following transient cochlear ischemia. Neuroreport 2001；12 (9)：1983-1987.
- 8) Watanabe F, Koga K, Hakuba N, Gyo K：Hypothermia prevents hearing loss and progressive hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils. Neuroscience 2001；102 (3)：639-645.
- 9) Eshraghi AA, Nehme O, Polak M, He J, Alonso OF, et al：Cochlear temperature correlates with both temporalis muscle and rectal temperatures. Application for testing the otoprotective effect of hypothermia. Acta Otolaryngol 2005；125 (9)：922-928.
- 10) 武信洋平：脳温測定法. 脳と循環 2006；11 (1)：69-72.
- 11) Bolin DJ：Transdermal approaches to pain in sports injury management. Curr Sports Med Rep 2003；2 (6)：303-309.
- 12) Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M：Muscle injuries：biology and treatment. Am J Sports Med 2005；33 (5)：745-764.

# 総 括

モノグラフの最終章では、全章を俯瞰した上で一過性内耳虚血に関する研究成果をまとめるとともに、モノグラフ原稿の執筆締め切り後に明らかとなった項目について概説する。全体を通読することにより、各論文を独立して校正している段階では気付かなかった事項の位置づけが明確になり、新たな視点から総括することができた。研究を通して浮かび上がった課題も多く、脱稿間際まで実験を重ねることになった。タイムリミットのあることが大きな研究の推進力になることをあらためて実感した。



## 1. 虚血病変の経時的変化

スナネズミに15分間の内耳虚血を負荷し、蝸牛神経複合活動電位（AP）の閾値を経時的に測定したところ、虚血中は高度の閾値上昇をきたしたが、血流再開後は改善し、翌日には20～30dB程度（8kHzの場合）にまで回復した。しかしその後は改善せず不可逆的な難聴が残った。組織学的には、血管条・ラセン靭帯では虚血直後から高度の障害が生じたが、その後は治癒傾向が強く、7日後にはほぼ回復した。コルチ器では3日後まで障害が進行、その後は安定するが、脱落した細胞は回復しなかった。コルチ器で特徴的なのは外有毛細胞ではなく内有毛細胞の障害が顕著なことで、虚血12時間後にアポトーシスはピークに達した。ラセン神経節では他の部位と比べ障害発現が最も遅く、4日後あたりから徐々に強く

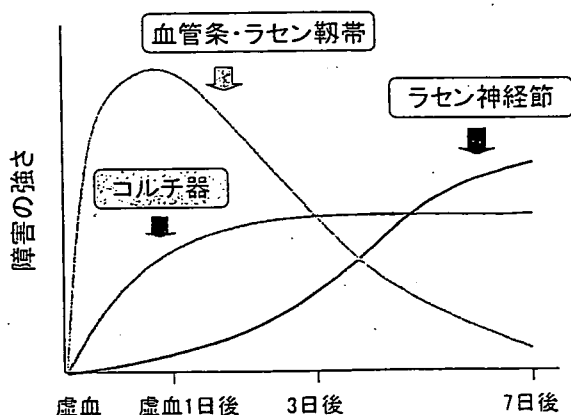


図1 蝸牛各部位の虚血障害の強さと経時的変化

なり、7日後でもなおアポトーシスは持続し終息していなかった。

難聴という現象だけ見れば、血流再開後からほとんど変わらないが、その背後にある各部位の病態は時間経過とともに大きく変化する。治療に当たっては時間経過が重要な因子となる（図1）。

## 2. 虚血性内耳障害のメカニズム

内耳血流が完全に遮断されると、内耳の細胞は酸素やグルコースの供給が絶たれエネルギー不全をきたして死滅する。しかし虚血が一過性の場合、障害メカニズムはエネルギー不全だけの単純なものではない。血流遮断時には内耳組織の酸素濃度は低下するが、再開通に伴い過剰の動脈血が流れ込み、酸素濃度は急激に上昇、多量の活性酸素が産生される。

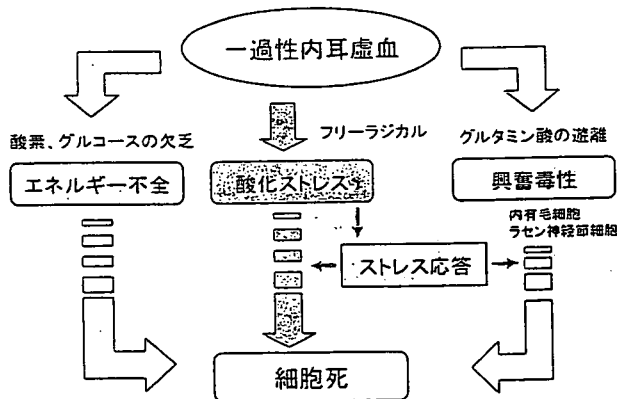


図2 一過性虚血による内耳障害のメカニズム



一方、障害部位では誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) が発現し、多量の一酸化窒素が合成される。一酸化窒素は直ちに周囲の活性酸素と反応して組織障害性の強い窒素酸化物 (NOx) となる。これらが酸化ストレスとして働き細胞膜を破壊して細胞死をきたす。

コルチ器の障害は外有毛細胞よりも内毛細胞の方が高度であった。この結果は実験を始めた当初、全く予想しなかった。通常、内耳性難聴では主に外有毛細胞が障害されるので、この所見は極めて特異的である。検討の結果、内毛細胞障害のメカニズムにはグルタミン酸が関与していることが分かった。グルタミン酸は内毛細胞の求心性シナプスにおける神経伝達物質であり、虚血が加わると、細胞外へ多量に放出されて神経毒性を示す。グルタミン酸の受容体は内毛細胞やラセン神経節細胞に豊富に存在するので、これらの細胞が特異的に障害される (図2)。

### 3. 内耳の虚血耐性について

ストレス応答はサイトカイン産生を誘導し、組織の障害にも防御にも働く。防御が優位であれば障害進行は止まり、劣れば細胞死が拡大する。ストレス応答による防御機構の一つとして虚血耐性が挙げられる。これは「先行して軽度の虚血を負荷しておく、その後、高度の虚血を負荷しても障害は軽減される」現象のことをいう。機序は異なるが免疫現象と似ている。虚血耐性は脳や心臓の分野では数多くの研究がなされているが、内耳での存在は知られていない。今回、一過性内耳虚血モデルを用いて虚血耐性の研究を行った。発表の間際になって結果が得られたため、モノグラフ原稿には間に合わなかったが、15分虚血を負荷する2日前に2分間の軽度虚血を先行させると、明らかに障害は軽減された。内耳にも虚血耐性のメカニズムが備わっていることが確認できた。

突発性難聴の再発は稀であるが、これに虚血耐性が関与しているか否かは今後の研究課題であろう。

### 4. 虚血障害メカニズムに基づいた難聴の治療

虚血障害治療の基本は循環障害の改善であり、血流再開なしには回復は期待できない。一過性虚血の場合、血流自体はまもなく回復しエネルギー不全は改善するが、他のメカニズムによる障害は進行する。グルタミン酸による興奮毒性は超急性期の数時間ほどは強いが、その後はグルタミン酸が拡散するため影響は収まる。これを防御する手段としてグルタミン酸拮抗剤が挙げられるが、虚血前から投与しなければ間に合わず、臨床的には役立たない。フリーラジカルの影響は酸化ストレスや炎症反応としてあらわれる。NOxやiNOSの実験結果によると、その影響は虚血1日後がピークで、4日後も高値を示すが、7日後には元に戻る。治療には抗酸化剤やステロイドが有効と考えられる。虚血障害によりアポトーシスが誘導されると、細胞は遅発性に死滅する。その防御にはAM 111などのアポトーシス抑制剤や栄養因子の投与が効果的であろう。低温療法は非特異的に作用するので、どの過程で用いてもよいが、障害が進んでいない早期の方が効果は大きい。高度難聴や高齢者など条件が悪い場合にも奏効することがある (図3)。

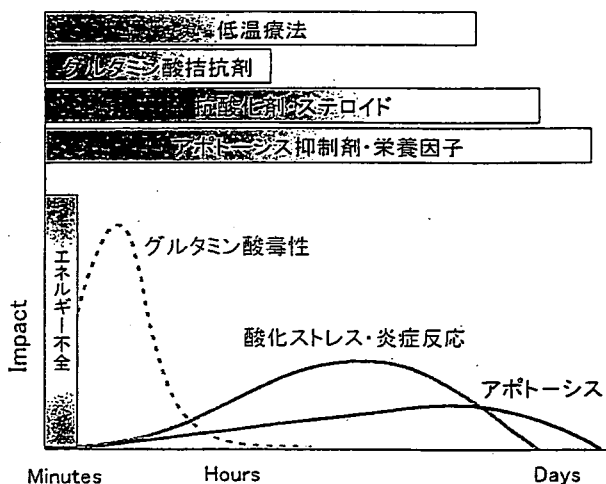


図3 虚血障害のメカニズムと治療

虚血障害のメカニズムは時間とともに変化するるので、それに合った治療法を選択する。

## 5. おわりに

一過性虚血をテーマに突発性難聴の研究を始めて10年が過ぎた。私たち臨床医であるという立場から、「基礎研究の成果を臨床現場に役立てる」というスタンスで研究をおこなってきた。今回、これまでの研究データをまとめるに当たり、改めて基礎研究の重要性を確認するとともに、エビデンスのある治療法開発の大切さを実感した。

基礎研究を始めた当時、本研究が臨床に役立つプロジェクトに発展するか、実はあまり考えてはいなかった。しかし研究を続けていく中で、多くの先生方からご助言を賜り、さらに議論を深めていく中で様々なアイデアも生まれ、研究は膨らんでいった。特に宿題報告という機会を得たことで、教室員が一体となってこの課題に取り組み、研究は大いに進展した。

一般に循環障害は虚血（動脈性循環障害）、鬱血（静脈性循環障害）、出血に分類されるが、誘因なく突然発症するという突発性難聴の特徴から、我々は本症の発症に循環障害が関与するならば虚血が中心であろうと考えた。鬱血や出血の際にも末梢の細胞レベルでは栄養供給障害が生じ虚血状態となるので、虚血をキーワードに研究を進めることとした。

実験動物にはスナネズミを用いたが、手技が安定するに伴い、長期間の実験ができるようになった。そこで様々な難聴治療候補薬を試すこととした。その一部（ジンセノサイドRb1、プロサポシン由来合成ペプチド）は愛媛大学の他の研究室で虚血性脳障害の治療薬として開発が進められていた薬剤である。それぞれ予想通りの効果が得られたが、これらの薬剤が臨床試験に至るには、まだまだ紆余曲折が予想される。IGF-1など動物実験で最も有効性が高いと思われた薬剤も、臨床応用となると倫理委員会の承諾が必要で、そのための事務作業量は膨大であり、結局、宿題報告の発表に間に合わせることはできなかった。余談になるが、薬剤検討の過程で、従来より突発性難聴に処方されてきたステロイドの薬効について、虚血の観点からもエビデンスが得られたことは大きな収穫であった。

今回、突発性難聴例において虚血関連マーカーや一

塩基多型（SNP）を調べたところ、虚血の関与が疑われる症例が見つかった。このような検査は10年前には容易に実施できなかった項目であり、技術の進歩に驚かされるとともに、今後、さらに検査技術が進歩すれば高頻度で虚血が検出されることになると予想された。最近の基礎医学的研究によると、様々な原因疾患（外傷、音響障害、薬物中毒、感染、自己免疫など）による障害プロセスの下流では共通の分子機構が働いているという。複雑な病的背景を持つ突発性難聴のような疾患においては、いくつかの発症原因が絡み、真因を同定することは困難である。原因にかかわらず下流では同じメカニズムが働くと仮定すれば、虚血を想定した急性難聴治療の研究は様々な原因による難聴治療にも応用できる。今後、ストレスの観点からの病態解明や再生医療の応用、診断技術の開発など、発展・進歩が期待される分野であり、若手研究者の新たな取り組みに期待したい。

（暁 清文）

# Pharmacological inhibition of Notch signaling in the mature guinea pig cochlea

Ryusuke Hori, Takayuki Nakagawa, Tatsunori Sakamoto, Yoshinori Matsuoka, Shinji Takebayashi and Juichi Ito

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

Correspondence to Takayuki Nakagawa, MD, PhD, Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kawaharacho 54, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan  
Tel: +81 75 751 3346; fax: +81 75 751 7225; e-mail: tnakagawa@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp

Received 4 September 2007; accepted 10 September 2007

Recent studies using explant cultures have demonstrated that pharmacological inhibition of Notch signaling by  $\gamma$ -secretase inhibitors generates supernumerary hair cells in embryonic or neonatal cochleae. The aim of this study was to examine the effects of such pharmacological inhibition on mature auditory epithelia *in vivo*. Normal adult guinea pig auditory epithelia exhibited weak or no immunoreactivity for Notch1 and Jagged1, whereas ototoxic

treatment caused the upregulation of these molecules in damaged auditory epithelia. Local application of a  $\gamma$ -secretase inhibitor in damaged cochleae generated ectopic hair cells in mature auditory epithelia. These findings indicate that pharmacological inhibition of Notch signaling is a possible strategy for hair cell regeneration in adult auditory epithelia. *NeuroReport* 18:1911–1914 © 2007 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

**Keywords:**  $\gamma$ -secretase inhibitor, hair cell, hearing loss, inner ear, regeneration

## Introduction

Hearing impairment is a common disability in industrialized countries. Hearing depends largely on the presence of hair cells (HCs) in the cochlea, defects of which result in hearing loss or deafness. HC regeneration in mammals occurs naturally over a limited time period during development [1], and many attempts have been made to restore HCs in adult mammals. Recent studies have demonstrated the existence of stem cell-like cells in the mature auditory epithelium that have the potential to differentiate into HCs [2,3]. Notch signaling plays a critical role during auditory epithelium development [4–6]. Even after maturation, viral overexpression of the Notch signaling transcription factor Atoh1 induces transdifferentiation of supporting cells (SCs) into HCs [7–9].

Atoh1 expression is regulated by the expression of Hes1 and Hes5 in Notch signaling [10]. In general, the binding of Notch ligands to their receptors induces the release of Notch intracellular domains from the plasma membrane to the nucleus, resulting in the activation of RBP-J in the nucleus [11]. This induces Hes1 and Hes5 transcription, which, in turn, suppresses Atoh1 expression. Therefore, suppression of Hes1 and Hes5 expression by inhibition of Notch signaling causes an increase in Atoh1 expression [12].

Gamma secretase plays a crucial role in the proteolytic release of Notch intracellular domains from the cytoplasmic membrane. Thus, the pharmacological inhibition of this process results in the inhibition of Notch signaling [12]. Recent studies using explant cultures of auditory epithelia have demonstrated that a  $\gamma$ -secretase inhibitor increases HC numbers in the auditory epithelia of embryonic [13] and newborn mice [14]. These findings prompted us to

investigate the potential for pharmacological inhibition of Notch signaling in inducing HC proliferation in mature auditory epithelia.

Our working hypothesis was that pharmacological inhibition of Notch signaling induces the transdifferentiation of SCs into HCs in the damaged cochleae of adult animals. We therefore examined the effects of this pharmacological inhibition in the damaged auditory epithelia of adult guinea pigs *in vivo*.

## Materials and methods

### Experimental animals

Hartley strain guinea pigs weighing 350–400 g were purchased from Japan SLC Inc. (Hamamatsu, Japan). The Animal Research Committee of the Graduate School of Medicine, Kyoto University, Japan, approved all of the experimental protocols. Animal care was supervised by the Institute of Laboratory Animals of the Graduate School of Medicine, Kyoto University. All of the experimental procedures were performed in accordance with the National Institutes of Health's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

### Ototoxic treatment

The animals were deafened bilaterally with a single intramuscular injection of kanamycin sulfate (KM; 500 mg/kg; Wako Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japan), followed 2 h later by an intravenous injection of ethacrynic acid (EA; 50 mg/kg; Wako Pure Chemical Industries Ltd). Measurements of auditory function were performed by recording auditory brain-stem responses at

frequencies of 4, 8 and 16 kHz on day 2 or 3 after ototoxic treatment. Animals that exhibited greater than 90 dB sound pressure level of auditory brain-stem response thresholds at all frequencies were used in the following experiments.

#### Immunohistochemistry for Notch1 and Jagged1

To evaluate Notch signaling activation, we determined the expression level of Notch1 and Jagged1 in auditory epithelia. Cochlear specimens from guinea pig embryos (embryonic day 50;  $n=4$ ), normal adult guinea pigs ( $n=4$ ) and adult guinea pigs on days 2 ( $n=4$ ), 4 ( $n=4$ ) and 7 ( $n=4$ ) following ototoxic treatment were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) at 4°C for 12 h. After decalcification with 0.1 M ethylenediamine tetra-acetic acid for 14 days at 4°C, 10- $\mu$ m thick cryostat sections were prepared. Four midmodiolus sections were chosen from each cochlea, and antigen retrieval was accomplished by boiling the slides for 5 min in 0.01 M citrate buffer (pH 6.0). Slides were incubated with antimyosin VIIa rabbit polyclonal antibody (1:500; Proteus Bioscience Inc., Romana, California, USA), anti-Notch1 goat polyclonal antibody (1:200; Santa Cruz Biotechnology Inc., California, USA) and anti-Jagged1 goat polyclonal antibody (1:200; Santa Cruz Biotechnology Inc.) as primary antibodies, followed by Alexa Fluor 555 donkey antirabbit immunoglobulin G (IgG; 1:500; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) and Alexa Fluor 488 donkey antigoat IgG (1:500, Molecular Probes) secondary antibodies. Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino,2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; 1  $\mu$ g/ml in PBS; Molecular Probes). Cochlear specimens obtained from mice at postnatal day 2 (P2) were used as positive controls for Notch1 and Jagged1. Nonspecific labeling was tested by omitting the primary antibody from the staining procedures. The specimens were viewed with a Nikon Eclipse E600 fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

#### Pharmacological inhibition of Notch signaling

On day 4 after ototoxic treatment, the  $\gamma$ -secretase inhibitor MDL28170 (MDL; Sigma-Aldrich, St Louis, Michigan, USA) was locally applied to the perilymph. Under ketamine (75 mg/kg) and xylazine (9 mg/kg) general anesthesia, a silicone tube (180  $\mu$ m in outer diameter) connected to a micro-osmotic mini pump (pumping 0.25  $\mu$ l/h for 14 days; Alzet, Cupertino, California, USA) was inserted into the scala tympani of the basal turn of the left cochlea of 15 guinea pigs. MDL was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted with PBS to give a final concentration of 1 mM containing 0.3% DMSO. The MDL solution was continuously injected through a micro-osmotic pump into the left cochlea of seven deafened and four normal animals, whereas the corresponding right cochlea received no local drug application ( $n=7$ ). An additional four deafened animals received PBS containing 0.3% DMSO in the left cochlea instead of MDL solution. On day 14 after local drug application, the temporal bones were collected and immersed in 4% paraformaldehyde in PBS at 4°C for 12 h. After decalcification with 0.1 M ethylenediamine tetra-acetic acid for 14 days at 4°C, the cochlea were subjected to histological analysis of whole mounts.

Cochlear specimens were permeabilized in 0.2% Triton X in PBS for 30 min at room temperature. Immunohistochemistry for myosin VIIa and F-actin labeling by phalloidin was

performed to determine the location of the HCs. After immunostaining for myosin VIIa, the specimens were stained with fluorescein-phalloidin (1:400; Molecular Probes), and viewed with a Leica TCS SP2 confocal microscope (Leica Microsystems Inc., Wetzlar, Germany). Quantitative analysis for numbers of ectopic myosin VIIa-positive cells and inner HCs (IHCs) was performed. Cochlear specimens treated with systemic KM and EA application followed by local MDL application and those treated with KM and EA alone were used. The numbers of ectopic myosin VIIa-positive cells and IHCs were counted in a 0.2-mm long region of the midbasal portion at 7-mm distance from the hook portion. The difference in numbers of ectopic myosin VIIa-positive cells or IHCs was examined by the unpaired *t*-test. Values of *P* less than 0.05 were considered statistically significant. Values are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

## Results

#### Immunohistochemistry for Notch1 and Jagged1

The expression of Notch1 and Jagged1 was identified in the auditory epithelium of guinea pig embryos, as previously reported in mouse embryos [15]. Strong expression of Notch1 was observed in SCs, and moderate expression was detected in the greater epithelial ridge, which is located between the spiral limbus and IHCs of immature cochlea (Fig. 1a). The expression of Jagged1 was distributed throughout the auditory epithelium of guinea pig embryos, similar to that of Notch1 (Fig. 1e). By contrast, with embryonic cochlea, the auditory epithelium of normal adult guinea pigs exhibited virtually no immunoreactivity for Notch1 or Jagged1 (Fig. 1b, f).

On days 2 and 4 after the systemic application of KM and EA, immunostaining for myosin VIIa demonstrated the loss of outer HCs (OHCs). Immunoreactivity for Notch1 was found in the inner sulcus cells, which are located between the spiral limbus and the IHCs of mature cochlea (Fig. 1c). We observed weak expression of Notch1 in the SCs of other regions of the auditory epithelium. Immunoreactivity for Jagged1 was also identified in the inner sulcus cells and SCs of the organ of Corti (Fig. 1g). Weak or no expression of Notch1 or Jagged1 was observed in the auditory epithelia on day 7 after ototoxic treatment (Fig. 1d, h).

#### Pharmacological inhibition of Notch signaling

Normal animals treated with local MDL application exhibited no loss of HCs, and no ectopic myosin VIIa-positive cells were seen in their auditory epithelia. Cochlear specimens treated with systemic KM and EA application followed by local DMSO application exhibited total OHC loss in each turn of the cochlea, and partial loss of IHCs in the basal turn similarly to those treated with KM and EA alone (Fig. 2a). Total OHC loss and partial IHC loss were also observed in cochlear specimens treated with systemic KM and EA application followed by local MDL application (Fig. 2b, c). No significant difference in the number of IHCs was found between cochlear specimens treated with KM and EA followed by MDL treatment and those with KM and EA alone (Fig. 2d).

No ectopic myosin VIIa-positive cells were found in the basal portion of cochlea treated with KM and EA alone (Fig. 2a) or followed by DMSO application, whereas in those treated with KM and EA followed by MDL application,