

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。

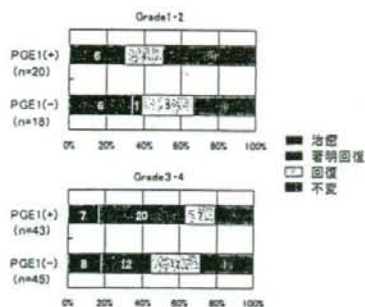


図4 難聴の重症度別治療成績

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。

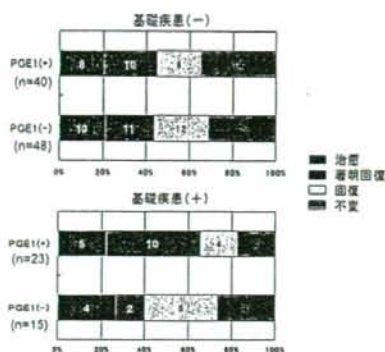


図6 治療開始時期別の治療成績

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⁹⁾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¹⁰⁾。

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¹¹⁾、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¹²⁾。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¹³⁾。

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

1) 藤田素紀, 大島収, 高橋光明: 突発性難聴に対するLipo-prostaglandin E1の使用経験. *Otology Japan* 2002; 12: 208

- 211.
- 2) 成田慎一郎, 小林一豊, 新谷朋子, 小笠原英樹, 石井敦, 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の有用性 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, 小田隆造, 杉井亜也子, 佐々木良二, 他: 突発性難聴におけるバルクスの使用経験. *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. *Otology Japan* 1994; 4: 137-141.

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^{1) 2) 3)}。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⁴⁾や虚血性心疾患⁵⁾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⁶⁾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®）の効果を、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、プロスタグランジ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 χ^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。

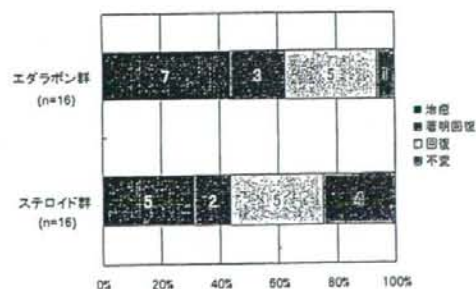


図1 症例全体の治療成績

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）。

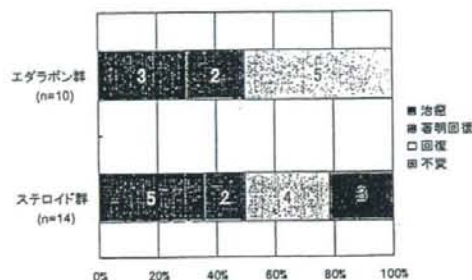


図2 発症早期例（発症3日以内例）の治療成績

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。

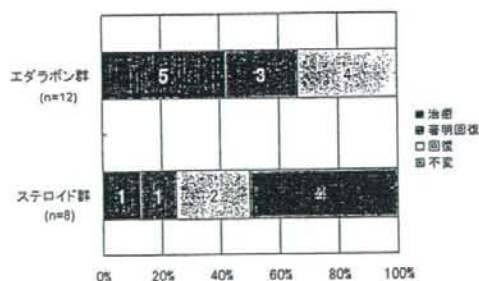


図3 50歳以上例の治療成績

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が高かった。

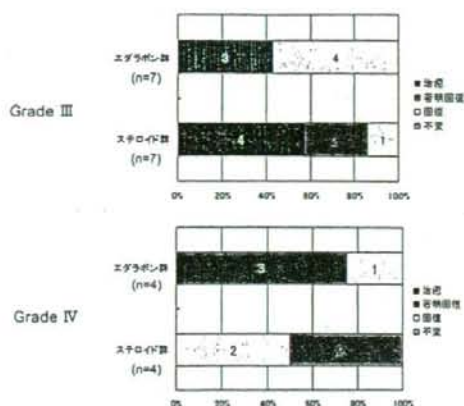


図4 重症例(Grade 3、Grade 4)の治療成績

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。

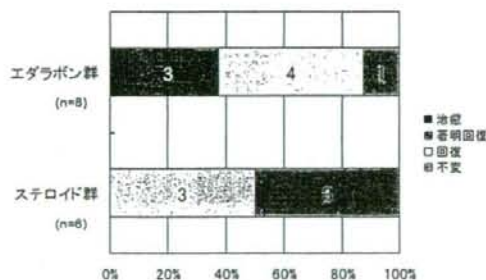


図5 めまい随伴例の治療成績

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⁷⁾ 8) やアミノグリコシド系抗生物質⁹⁾ 10)、音響外傷¹¹⁾ 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¹²⁾ 13) やアミノグリコシド系抗生物質¹⁴⁾、緑膿菌の外毒素¹⁵⁾、一過性虚血⁶⁾ 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¹⁶⁾、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¹⁷⁾。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¹⁸⁾。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¹⁹⁾、脳卒中²⁰⁾ や脳梗塞²¹⁾ 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²²⁾、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 : Alkoxyl 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) Horilke 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ー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¹⁾。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²⁾。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³⁾。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^{4) 5) 6)}。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^{7) 8)}。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^{9) 10)}、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。

サーモグラフィー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部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、冷却以外は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、不快な場合は覆返りを許容した。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B₁₂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

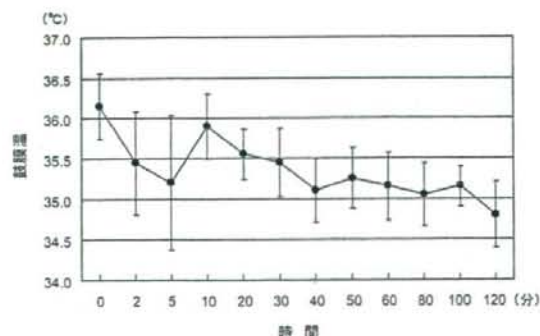


図1 水枕による頸部冷却時の鼓膜温の変化

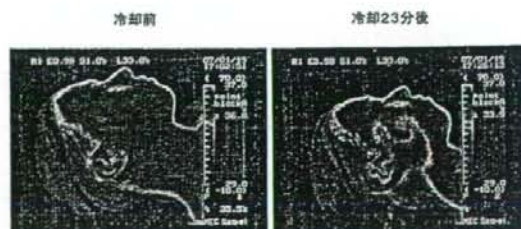


図2 頸部冷却時のサーモグラム

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、 χ^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 整型: 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 整型: 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%であっ

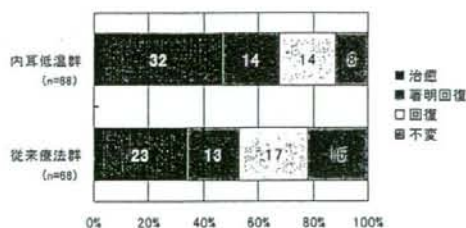


図3 症例全体の治療成績

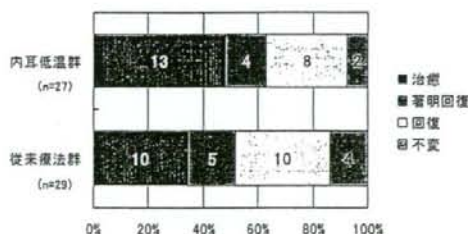


図4 発症24時間以内の治療開始例の成績

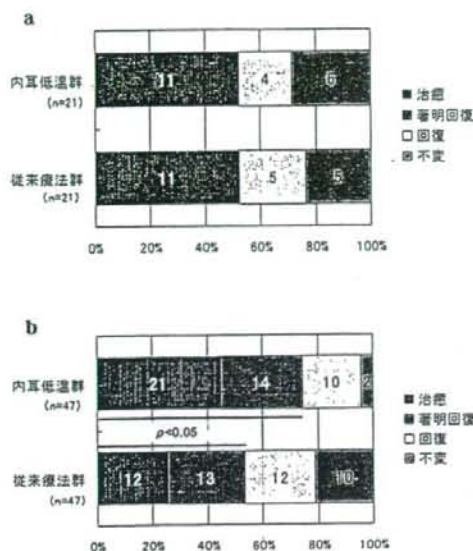


図5 難聴の重症度と治療成績

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

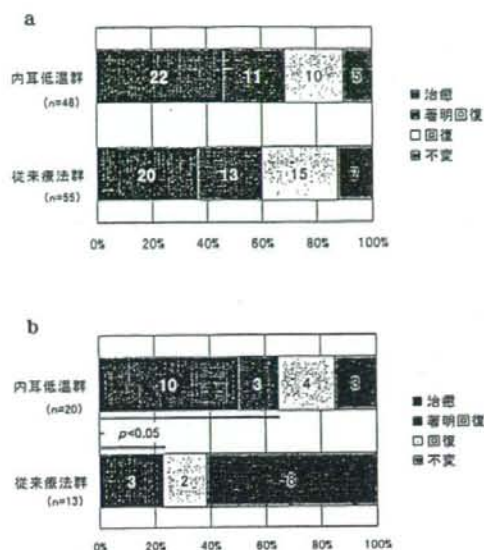


図6 年齢と治療成績

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^{11) 12)}。

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・治療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

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 武信洋平：脳温測定法。脳と循環 2006；11（1）：69-72。
- Bolin DJ：Transdermal approaches to pain in sports injury management. Curr Sports Med Rep 2003；2（6）：303-309。
- 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. 虚血病変の経時的变化

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(A P)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・ラセン韧带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

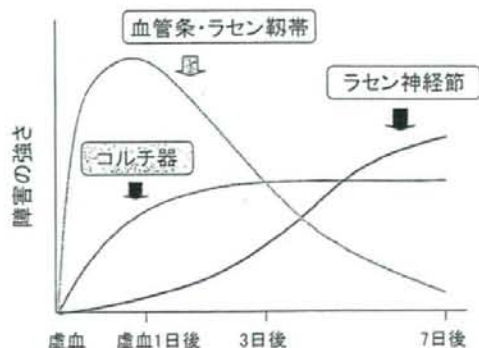


図1 蝸牛各部位の虚血障害の強さと経時的变化

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。

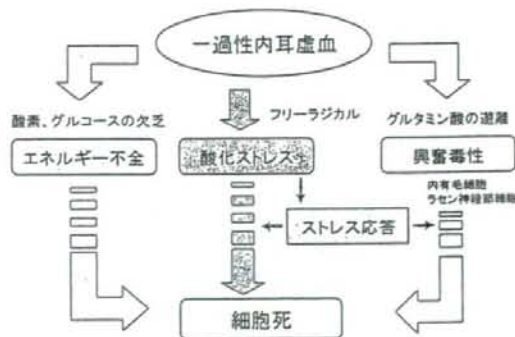


図2 一過性虚血による内耳障害のメカニズム

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有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、内有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。グルタミン酸は内有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有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、細胞は選発的に死滅する。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效することがある (図3)。

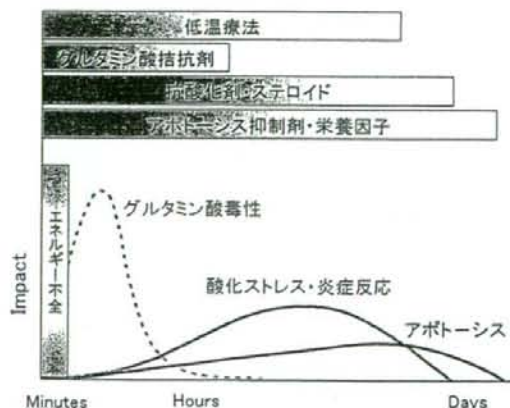


図3 虚血障害のメカニズムと治療

虚血障害のメカニズムは時間とともに変化するもので、それに応じ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。私たちは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どうか、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、プロサボ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ことと予想された。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）

Cochlear Protection by Local Insulin-Like Growth Factor-1 Application Using Biodegradable Hydrogel

Koji Iwai, MD; Takayuki Nakagawa, MD, PhD; Tsuyoshi Endo, MD; Yoshinori Matsuoaka; Tomoko Kita, PhD; Tae-Soo Kim, MD, PhD; Yasuhiko Tabata, PhD; Juichi Ito, MD, PhD

Objective: The aim of this experimental study was to examine the potential of local recombinant human insulin-like growth factor-1 (rhIGF-1) application through a biodegradable hydrogel for the treatment of cochleae. **Methods:** A hydrogel immersed with rhIGF-1 was placed on the round window membrane of Sprague-Dawley rats while a hydrogel immersed with physiological saline was applied to control animals. On day 3 after drug application, the animals were exposed to white noise at 120 dB sound pressure level (SPL) for 2 hours. Cochlear function was monitored using measurements of auditory brain stem responses (ABRs) at frequencies of 8, 16, and 32 kHz. The temporal bones were collected 7 or 30 days after noise exposure and the loss of hair cells was quantitatively analyzed. **Results:** Local rhIGF-1 treatment significantly reduced the elevation of ABR thresholds on days 7 and 30 after noise exposure. Histologic analysis revealed that local rhIGF-1 treatment significantly prohibited the loss of outer hair cells. **Conclusions:** These findings demonstrate that local IGF-1 application through the biodegradable hydrogel has the potential for protection of cochleae from noise trauma. **Key Words:** Drug delivery, cochlea, hair cell, protection, growth factor, acoustic trauma, rat.

Laryngoscope, 116:529-533, 2006

From the Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery (K.I., T.N., T.E., Y.M., T.K., T.-S.K., J.I.), Graduate School of Medicine and the Institute for Frontier Medical Science (Y.T.), Kyoto University, Kyoto, Japan.

Editor's Note: This Manuscript was accepted for publication December 5, 2005.

This study was supported by a Grant-in-Aid for Regenerative Medicine Realization from the Ministry of Education, Science, Sports, Culture and Technology of Japan.

Send Correspondence to Dr. Takayuki Nakagawa, Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kawaharacho 54, Shogoin, Sakyo-ku, 606-8507 Kyoto, Japan. E-mail: tnakagawa@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp

DOI: 10.1097/01.mlg.0000200791.77819.eb

INTRODUCTION

In recent years, there has been increasing interest in the treatment of inner ear disorders using the local, rather than systemic, application of therapeutic agents, because the former has fewer side effects and is more target-specific. The establishment of clinically applicable strategies for the local application of therapeutic agents should therefore open a new window for the treatment of inner ear disorders. For methods of drug delivery to be viable in clinical settings, it is crucial for the procedure to be technically undemanding and as minimally invasive as possible. Based on such a background, the use of biodegradable polymers for cochlear drug delivery has been investigated.¹⁻³ Biodegradable polymers, which enable the sustained release of drugs to the cochlear fluid space, can be applied through an intratympanic injection. Among biodegradable polymers, we have reported the efficacy of the biodegradable hydrogel, which is made from porcine type-I collagen, for delivery of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) into the cochlear fluid and successful protection of spiral ganglion neurons (SGNs) from degeneration as a result of the loss of cochlear hair cells.³

Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) is a mitogenic peptide that plays essential roles in the regulation of growth and development in various parts of the body, including the inner ear.⁴ IGF-1 is also known to be a neuroprotective agent.⁵ In addition, previous studies on the inner ear have suggested the possibility of inner ear protection by IGF-1.^{6,7} Moreover, recombinant human IGF-1 (rhIGF-1) has already been approved for clinical use. Our ultimate goal is for local neurotrophin application to be clinically approved for the treatment of inner ears. In the present study, we then selected rhIGF-1 as a suitable neurotrophin for local application to the cochlea using a biodegradable hydrogel as a vehicle for drug delivery. We evaluated whether the application of rhIGF-1 in this manner was effective in protecting against noise-induced hearing loss.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Animals

Sprague-Dawley rats (Japan SLC Inc., Hamamatsu, Japan) at 10 weeks of age were used as experimental animals. The Animal Research Committee of the Graduate School of Medicine, Kyoto University, Japan, approved all experimental protocols. Animal care was conducted under the supervision of the Institute of Laboratory Animals at the Graduate School of Medicine, Kyoto University. All experimental procedures were performed in accordance with the U.S. National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animals.

Preparation of Hydrogels

The biodegradable hydrogels were prepared as described previously.⁸ Briefly, the gels were generated by the glutaraldehyde crosslinking of porcine type-I collagen (Gunze, Ayabe, Japan). The rates of degradation were determined according to the concentration of glutaraldehyde. The present study used a hydrogel that was made with 60 mol/L glutaraldehyde, which could release basic fibroblast growth factor⁶ and BDNF⁹ for 7 days in vivo.

Local Application of Insulin-Like Growth Factor-1

RhIGF-1 was provided by Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan. After measuring the auditory brain stem responses (ABRs), the otic bulla of the left temporal bone was exposed using a retroauricular approach under general anesthesia with ketamine (100 mg/kg intramuscularly [IM]; Sankyo Co., Tokyo, Japan) and xylazine (9 mg/kg IM; Bayer, Tokyo, Japan). A small hole was made on the left bulla to expose the round window niche. A hydrogel in dry condition was cut into the size of 2 mm³ under the microscope and immersed with rhIGF-1 (400 µg dissolved in 40 µL physiological saline) 30 minutes before application. The hydrogel was then placed on the round window membrane (RWM) of the IGF group animals (n = 10). The animals applied a hydrogel-immersed physiological saline were used as controls (n = 10).

Noise Exposure and Measurement of Hearing

On day 3 after the IGF-1 application, we measured the ABRs to eliminate animals that showed threshold shifts of more than 10 dB at any frequencies from the experiments. In consequence, no animals showed threshold shifts over 10 dB after local drug application in the present study. The animals were then exposed to white noise at 120 dB sound pressure level (SPL) for 2 hours in a ventilated sound exposure chamber. The sound levels were monitored and calibrated at multiple locations within the sound chamber to ensure uniformity of the stimulus.

Auditory function was assessed by recording ABRs. The measurements of ABR thresholds were performed at frequencies of 8, 16, and 32 kHz before noise exposure and days 7 and 30 after noise exposure. Animals were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (9 mg/kg) and kept warm with a heating pad. Generation of acoustic stimuli and subsequent recording of evoked potentials were performed using a PowerLab/4sp (AD Instruments, Castle Hill, Australia). Acoustic stimuli, consisting of tone-burst stimuli (0.1 ms cos² rise/fall and 1-ms plateau), were delivered monaurally through a speaker (ES1spc; Bioresearch Center, Nagoya, Japan) connected to a funnel fitted into the external auditory meatus. To record bioelectrical potentials, subdermal stainless steel needle electrodes were inserted at the vertex (ground), ventrolateral to the measured ear (active) and contralateral to the measured ear (reference). Stimuli were calibrated against a ¼-inch free-field microphone (ACO-7016; ACO Pacific, Inc., Belmont, CA) connected to an oscilloscope (DS-8812

DS-538; Iwatsu Electric, Tokyo, Japan) or a sound level meter (LA-5111; Ono Sokki, Yokohama, Japan). The responses between the vertex and mastoid subcutaneous electrodes were amplified with a digital amplifier (MA2; Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL). Thresholds were determined from a set of responses at varying intensities with 5-dB SPL intervals and electrical signals were averaged for 1024 repetitions. Thresholds at each frequency were verified at least twice.

Histologic Analysis

On day 7 or 30 after noise exposure, five cochleae from each experimental group were provided for histologic analysis. The animals were anesthetized with ketamine and xylazine, and the left cochleae were exposed. After removal of otic vesicles, 4% paraformaldehyde in 0.01 mol/L phosphate-buffered saline (PBS)

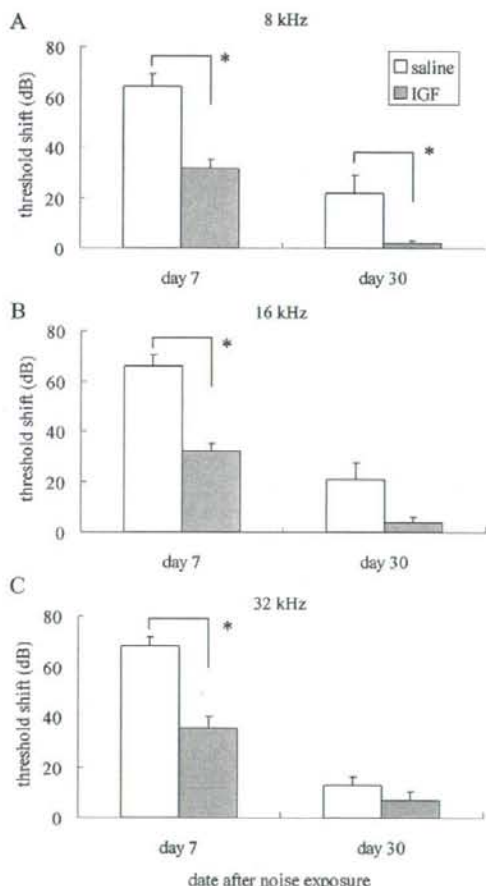


Fig. 1. Auditory brain response threshold shifts for recombinant human insulin-like growth factor-1- (rhIGF-1) and saline-treated cochleae at 8, 16, and 32 kHz on days 7 and 30 after noise exposure. An overall effect of local rhIGF-1 treatment is significant at 8, 16, or 32 kHz (two factorial analysis of variance). Asterisks are indicated significant differences in pairwise comparisons with Fisher's protected least-significant difference. Bars represent standard error (SE).

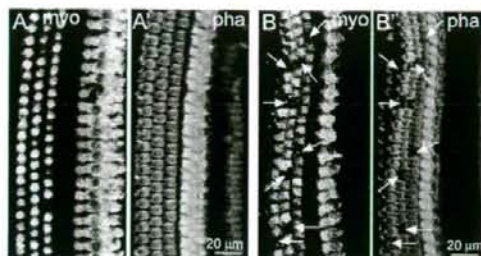


Fig. 2. Photomicrographs of surface preparations stained with myosin VIIa and phalloidin from the second turn of cochleae treated with recombinant human insulin-like growth factor-1 (A) or physiological saline (B) on day 30. Figures A and B show immunostaining for myosin VIIa (myo), and Figures A' and B' show F-actin labeling by phalloidin. Arrows indicate missing outer hair cells.

at pH 7.4 was gently introduced into the perilymphatic space of the cochlea. The temporal bones were then excised and immersed in the same fixative at 4°C for 12 hours. After rinses with PBS, the cochleae were dissected from the temporal bones and subjected to histologic analysis in whole mounts. We used three regions of cochlear sensory epithelia at a distance of 30% to 40% (apical), 50% to 60% (middle) or 80% to 90% (basal) from the apex for quantitative assessments of hair cell loss.

Immunohistochemistry for myosin VIIa and F-actin labeling by phalloidin were used to label the surviving inner hair cells (IHCs) and outer hair cells (OHCs). Anti-myosin VIIa rabbit polyclonal antibody (1:300; a gift from Tama Hasson, San Diego, CA) was used as the primary antibody, and Alexa-594-conjugated antirabbit goat IgG (1:400; Molecular Probe, Eugene, OR) was used as the secondary antibody. After immunostaining for myosin VIIa, specimens were stained with FITC-conjugated phalloidin (1:300; Molecular Probe). Specimens were viewed using a Leica TCS SP2 confocal microscope (Leica Microsystems Inc., Wetzlar, Germany). Nonspecific labeling was tested by omitting the primary antibody from the staining procedures. We counted the numbers of IHCs and OHCs in 0.2-mm long regions of the apical, middle, or basal portion of cochlea, respectively.

Statistical Analyses

An overall effect on ABR threshold shifts of application of rhIGF-1 was examined by the two-way factorial analysis of variance. When the interaction was significant, multiple comparisons with Fisher's protected least-significant difference (PLSD) were used for pairwise comparisons. The differences in OHC numbers

in each region of the cochlea between the rhIGF-1- and saline-treated cochleae were examined using the Student *t* test. A *P* value less than .05 was considered statistically significant. Values are expressed as the mean \pm standard error.

RESULTS

Functional Protection

The time course of alterations in ABR threshold shifts after noise exposure at 8, 16, or 32 kHz is shown in Figure 1. Local rhIGF-1 treatment demonstrated significant effects on ABR threshold shifts at each frequency. An overall effect on data for 8 kHz of rhIGF-1 application was significant ($P < .001$). The differences in threshold shifts between rhIGF-1- and saline-treated cochleae on days 7 and 30 were significant at multiple comparisons with Fisher's PLSD ($P < .001$ for day 7, $P = .039$ for day 30). An overall effect on data for 16 or 32 kHz of rhIGF-1 application was significant ($P < .001$ for 16 kHz, $P = .005$ for 32 kHz). The difference in threshold shifts at 16 kHz between rhIGF-1- and saline-treated cochleae was significant on day 7 ($P < .001$), but not on day 30 ($P = .051$). The difference in threshold shifts at 32 kHz between rhIGF-1- and saline-treated cochleae was significant on day 7 ($P < .001$), but not on day 30 ($P = .48$).

Histologic Protection

Immunostaining for myosin VIIa and phalloidin staining demonstrated degeneration of OHCs in the apical, middle, and basal portions of saline-treated cochlea (Fig. 2B), whereas OHC degeneration was very limited in rhIGF-1-treated cochleae (Fig. 2A). Conversely, IHC loss was not apparent in every region of both saline- and rhIGF-1-treated cochleae. Quantitative assessments revealed the significant differences in the degree of OHC loss between saline- and rhIGF-1-treated cochleae on days 7 and 30 (Fig. 3). The differences in the degree of OHC loss between the saline- and rhIGF-1-treated cochleae were significant in the apical ($P = .0006$), middle ($P < .0001$), and basal portion ($P < .0001$) of cochlea on day 7, and in the apical ($P = .0006$), middle ($P < .0001$), and basal portion ($P = .002$) of cochlea on day 30. IHC loss was $2.7 \pm 1.3\%$ in the basal, $1.0 \pm 0.5\%$ in the middle, or 1.1 ± 0.8 in the apical portion of saline-treated cochlea, and $2.0 \pm$

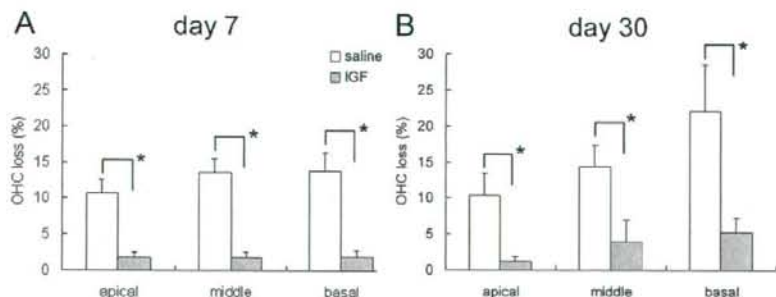


Fig. 3. Means of the percentage outer hair cell loss in the apical, middle, and basal portions of insulin-like growth factor-1- and saline-treated cochleae on days 7 (A) and 30 (B). Asterisks indicate significant differences with unpaired *t* test. Bars represent standard error (SE).

1.4% in the basal, $1.2 \pm 0.9\%$ in the middle, or $0.6 \pm 0.6\%$ in the apical portion of rhIGF-1-treated cochleae on day 30. No significant differences in the loss of IHCs were identified between the two experimental groups.

DISCUSSION

Our findings demonstrate that local rhIGF-1 application using a hydrogel before noise exposure has significant effects on reduction of ABR threshold shifts and of OHC loss. Our previous study has demonstrated the efficacy of local BDNF delivery to the cochlea by the biodegradable hydrogel.³ The present findings therefore indicate that the biodegradable hydrogel can be used for local rhIGF-1 application to the cochlea. Our previous findings³ demonstrate that high concentrations of BDNF in the cochlear fluid are maintained during days 3 to 7 after local BDNF application using this system. We then locally applied rhIGF-1 3 days before noise exposure to obtain sufficient concentrations of rhIGF-1 in the cochlear fluid. As expected, the pretreatment with rhIGF-1 demonstrated sufficient protective effects against noise trauma in the present study. However, in clinical settings, drug application after the onset of hearing loss is usually performed. Hence, we should examine the efficacy of local rhIGF-1 treatment after onset of hearing loss in the near future.

In the present study, we focused on degeneration of sensory hair cells in histologic analysis, because the degree of hair cell loss has traditionally been used to evaluate both the extent of noise-induced injury and the efficacy of protective treatments.^{9,10} Quantitative assessments in the present study demonstrated significant protection of OHCs from noise trauma by local rhIGF-1 treatment. As for mechanisms of OHC protection by rhIGF-1, several possible explanations are aroused. One possible explanation is the rescue of OHCs from apoptosis resulting from noise by rhIGF-1. IGF-1 is known to inhibit apoptosis by downregulating the expression of proapoptotic genes,¹¹ and apoptosis is involved in OHC degeneration resulting from noise.¹² Another mechanism is the regulation of glucose transporters in OHCs by rhIGF-1. The expression of glucose transporter-5 (GLUT-5) in OHCs and its importance in their function have been reported.^{13,14} GLUTs operate in the first step of glucose utilization by promoting the transport of glucose across the plasma membrane.¹⁵ IGF-1 can regulate the expression of GLUT-5, thereby promoting neuronal cell survival.¹⁶ Such mechanisms might be involved in the rhIGF-1-induced protection of OHCs against noise-induced injury. Further studies are required for elucidation of detailed mechanisms for the rhIGF-1-induced protection of OHCs.

ABR threshold shifts observed on day 7 remarkably recovered on day 30, whereas the damage in the organ of Corti moderately progressed until day 30. This indicates that ABR threshold shifts observed on day 7 may be caused not only by the damage in the organ of Corti, but also by reversible damages in other regions of the cochlea. In addition, the damage in the organ of Corti on day 7, 10% to 14% loss of OHCs and limited loss of IHCs, is not compatible with over 60 dB ABR threshold shifts. Recent studies have indicated involvement of damages in the

cochlear lateral wall in noise-induced HL.¹⁷ Local rhIGF-1 treatment significantly reduced ABR threshold shifts on day 7. IGF-1 has also effects on promotion of survival of fibroblasts.¹⁸ Therefore, protective effects of IGF-1 on the fibrocytes in the spiral ligament may be involved in mechanisms for significant reduction of ABR threshold shifts on day 7.

CONCLUSION

This report demonstrates the efficacy of local rhIGF-1 application using a biodegradable hydrogel for the protection of cochleae from noise-induced hearing loss. Because the materials used in the present study are suitable for clinical application, the present findings encourage us to conduct further studies for clinical application of local rhIGF-1 treatment using the biodegradable hydrogel. However, the exact mechanisms by which rhIGF-1 acts in the cochlea are presently unclear and require further research. Furthermore, rhIGF-1 was applied before the onset of noise-induced hearing loss in the present study. The ability of rhIGF-1 to ameliorate cochlear damages when applied locally after the onset of hearing loss should therefore be examined in an experimental model in the near future.

Acknowledgments

The authors thank T. Hasson for providing the antibody for myosin VIIa.

BIBLIOGRAPHY

1. Arnold W, Senn P, Hennig M, et al. Novel slow- and fast-type drug release round-window microimplants for local drug application to the cochlea: an experimental study in guinea pigs. *Audiol Neurotol* 2005;10:53-63.
2. Tamura T, Kita T, Nakagawa T, et al. Drug delivery to the cochlea using PLGA nanoparticles. *Laryngoscope* 2005;115:2000-2005.
3. Endo T, Nakagawa T, Kita T, et al. A novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel. *Laryngoscope* 2005;115:2016-2020.
4. Varela-Nieto I, Morales-Garcia JA, Vigil P, et al. Trophic effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the inner ear. *Hear Res* 2004;196:19-25.
5. Linseman DA, Phelps RA, Bouchard RJ, et al. Insulin-like growth factor-I blocks Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim) induction and intrinsic death signaling in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 2002;22:9287-9297.
6. Staecker H, Van De Water TR. Factors controlling hair-cell regeneration/repair in the inner ear. *Curr Opin Neurobiol* 1998;8:480-487.
7. Malgrange B, Rigo JM, Coucke P, et al. Identification of factors that maintain mammalian outer hair cells in adult organ of Corti explants. *Hear Res* 2002;170:48-58.
8. Iwakura A, Fujita M, Kataoka K, et al. Intramyocardial sustained delivery of basic fibroblast growth factor improves angiogenesis and ventricular function in a rat infarct model. *Heart Vessels* 2003;18:93-99.
9. Keithley EM, Ma CL, Ryan AF, et al. GDNF protects the cochlea against noise damage. *Neuroreport* 1998;9:2183-2187.
10. Shoji F, Miller AL, Mitchell A, et al. Differential protective effects of neurotrophins in the attenuation of noise-induced hearing loss. *Hear Res* 2000;146:132-142.
11. Linseman DA, Phelps RA, Bouchard RJ, et al. Insulin-like growth factor-I blocks Bcl-2 interacting mediator of cell

- death (Bim) induction and intrinsic death signaling in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 2002;22:9287-9297.
12. Pirvola U, Xing-Qun L, Virkkala J, et al. Rescue of hearing, auditory hair cells, and neurons by CEP-1347/KT7515, an inhibitor of c-Jun N-terminal kinase activation. *J Neurosci* 2000;20:43-50.
 13. Nakazawa K, Spicer SS, Schulte BA. Postnatal expression of the facilitated glucose transporter, GLUT 5, in gerbil outer hair cells. *Hear Res* 1995;82:93-99.
 14. Belyantseva IA, Adler HJ, Curi R, et al. Expression and localization of prestin and the sugar transporter GLUT-5 during development of electromotility in cochlear outer hair cells. *J Neurosci* 2000;20:RC116.
 15. Bell GI, Kayano T, Buse JB, et al. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 1990;13:198-208.
 16. Asada T, Takakura S, Ogawa T, et al. Overexpression of glucose transporter protein 5 in sciatic nerve of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurosci Lett* 1998;252:111-114.
 17. Hirose K, Liberman MC. Lateral wall histopathology and endocochlear potential in the noise-damaged mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol* 2003;4:339-352.
 18. Heron-Milhavet L, Karas M, Goldsmith CM, et al. Insulin-like growth factor-I receptor activation rescues UV-damaged cells through a p38 signaling pathway. *J Biol Chem* 2001;276:18185-18192.

Age-Dependent Degeneration of the Stria Vascularis in Human Cochleae

Teruhisa Suzuki, MD; Yukio Nomoto, MD; Takayuki Nakagawa, MD, PhD; Naofumi Kuwahata, MD; Hiroshi Ogawa, MD, PhD; Yukie Suzuki, MD, PhD; Juichi Ito, MD, PhD; Koichi Omori, MD, PhD

Objective: Aging is a common cause of acquired hearing impairments. This study investigated age-related morphologic changes in human cochleae, with a particular focus on degeneration of the stria vascularis (SV) and the spiral ganglion (SG). **Study Design:** Retrospective case review. **Methods:** The study group comprised 91 temporal bones from individuals aged 10 to 85 years who had no history or audiometric findings suggestive of specific causes of cochlear degeneration. We quantified the SV and SG atrophy at each cochlear turn using morphometric measurements. Correlations of the SV and SG atrophy with age, audiometric patterns of hearing loss, and auditory thresholds were statistically investigated. **Result:** The SV and the SG both showed a tendency for progressive atrophy to develop with age. However, statistically significant correlations were observed between aging and SV atrophy only in the apical and basal cochlear turns. These findings were consistent with those reported previously in gerbils. No significant correlations were detected between SV or SG atrophy and audiometric findings. **Conclusion:** SV atrophy appears to be the most prominent anatomic characteristic of aged human cochleae. **Key Words:** Aging, atrophy, cochlea, human, pathology, spiral ganglion, stria vascularis.

Laryngoscope, 116:1846–1850, 2006

INTRODUCTION

Age-related degenerative hearing loss (HL) is known as presbycusis and is the most common cause of hearing impairments in adults. As human populations age, this condition is expected to become more prevalent. At present, the therapeutic options for presbycusis are limited to the use of hearing aids. Until recently, mammals were thought to be unable to regenerate cochlear elements; however, recent medical advances have highlighted the potential for the regeneration of cochlear elements through gene or cell therapy.^{1,2} In addition, animal experiments have identified various molecules that might be applied therapeutically to protect cochlear cells.^{3–5} Although these experimental findings have not yet been applied clinically, they could help to establish novel therapeutic strategies for presbycusis.

It is crucial to determine the cells or tissues in aged cochleae that should be targeted by future therapies. Several animal experiments have indicated that degeneration of the stria vascularis (SV) or the spiral ganglion (SG) is a prominent pathologic, age-related cochlear change.^{6–12} However, studies on human temporal bones will be necessary to confirm the precise targets for therapeutic strategies. Previous research has demonstrated several age-related histopathologic changes in human cochleae.^{13–18} However, the general features of aged cochleae have not yet been established for humans. This is partly because the subjects of previous studies have tended to include patients with ear diseases or profound hearing impairments. In such cases, cochlear degeneration might be caused by ototoxic pathogens or an ototoxic internal environment, which makes it difficult to distinguish the specific abnormalities caused by aging. Recently, two articles^{19,20} carefully excluded temporal bones of subjects with a history of ear diseases. However, previous authors have examined insufficient numbers of human temporal bones to allow the general histopathologic characteristics of aged cochleae to be determined. To address these issues, we conducted a quantitative analysis of age-related histopathologic changes of the SV and SG using a large sample of human temporal bones.

From the Department of Otolaryngology (T.S., Y.N., N.K., H.O., Y.S., K.O.), Fukushima Medical University, School of Medicine, Fukushima, and the Department of Otolaryngology–Head and Neck Surgery (T.N., J.I.), Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan.

Editor's Note: This Manuscript was accepted for publication June 14, 2006.

This study was supported by Health and Labour Science Research Grants for Research on Sensory and Communicative Disorders from the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan.

Send correspondence to Dr. Koichi Omori, Department of Otolaryngology, Fukushima Medical University, School of Medicine, Hikarigaoka 1, Fukushima 960-1295, Japan. E-mail: omori@fmu.ac.jp; or Dr. Takayuki Nakagawa, Department of Otolaryngology–Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kawaharacho 54, Shogoin, Sakyo-ku, 606-8507 Kyoto, Japan. E-mail: tnakagawa@ent.kuhp.kyoto-u.ac.jp

DOI: 10.1097/01.mlg.0000234940.33569.39