

図2 POLG マウスの蝸牛基底回転組織所見
上段は2カ月齢, 下段は9カ月齢

リーでは59遺伝子中32遺伝子が発現低下していた。聴力に関しては24の遺伝子中9の遺伝子 (*Gjb6*, *Otog*, *Slc 26a4*, *Tecta* など) が発現低下し, イオントランスポートについては201の遺伝子中22の遺伝子が発現低下していた。

以上の結果から, DBA/2J マウスの加齢に伴う難聴の発現において, ミトコンドリア機能およびエネルギー代謝に関する遺伝子発現の著しい低下が関与することが示唆された⁷⁾。

ミトコンドリア DNA 変異の 老人性難聴発症機構への関与

筋肉や脳などの組織では加齢に伴いミトコンドリア DNA の欠失・変異が増加することが良く知られている。高齢者の側頭骨病理標本の検討では, 老人性難聴耳では正常聴力耳に比してミトコンドリア遺伝子4,977塩基対の欠失や点変異が増加すると報告されている⁸⁾⁹⁾。ただし, 逆にミトコンドリア DNA の欠失・変異が加齢に伴って増加した場合に難聴が生じるかどうかについてはわかっていない。この点を明らかにするため, ミトコンドリア DNA が加齢に伴って急速に増加する動物モデルを作成して検討した。

遺伝子には様々な障害によって生じた変異を修復する機能がある。Polg^{D257A D257A} (POLG) マウスは, DNA ポリメラーゼガンマのエキソヌクレアーゼ領域 (Proof Reading 活性領域) に特定の点変異を導入することによ

り作製されたトランスジェニックマウスである。このPOLG マウスではミトコンドリア DNA の修復機能が失われた DNA ポリメラーゼが発現されるため, ミトコンドリア DNA の変異が修復されず, 加齢に伴い加速的に蓄積する。その結果, 若い頃から脱毛, 白髪, 脊椎側彎, 筋肉減少など様々な老化関連症状を呈し, 寿命も野生型の半分以下となった¹⁰⁾。

このマウスの聴力について ABR を用いて計測したところ, 2カ月齢ではPOLG マウスも野生型も正常聴力であったが, 9カ月齢では野生型は正常聴力であったのに対し, POLG マウスは中等度の難聴を呈した。組織学的検討では, 2カ月齢のPOLG マウスと野生型には明らかな組織変性は見られず, 9カ月齢の野生型ではわずかにラセン神経節細胞の減少が見られたのみであった。一方9カ月齢のPOLG マウスでは有毛細胞やラセン神経節細胞の減少, 血管条の萎縮変性が見られ, ミトコンドリアも空胞化するなどの変化が見られた (図2)。

次に DNA マイクロアレイを用いて, 9カ月齢のPOLG マウスの蝸牛の遺伝子発現を野生型マウスのそれと比較したところ, 378の遺伝子が発現低下し, 446の遺伝子の発現が亢進していた。このうちアポトーシスに関与する2つのカテゴリーで発現が増加しており, *Pten* や *Bim* などアポトーシス誘導に関する遺伝子が含まれていた。また programmed cell death カテゴリーの13遺伝子, アポトーシスに重要な proteolysis カテゴリーの14遺伝子, stress response カテゴリーの15の遺伝子も発

現が亢進していた。一方エネルギー代謝に関与する遺伝子として mitochondrion カテゴリーの13遺伝子, carbohydrate metabolism カテゴリーの13遺伝子では発現が低下していた。聴力機能については6遺伝子 (*Col1a1*, *Otog* など), 細胞骨格調節については6 カテゴリーの計132遺伝子が発現低下していた。DNAマイクロアレイの結果の信憑性を確認するため, エネルギー代謝に関する遺伝子 *Eno3*, *Acs3*, アポトーシスに関する遺伝子 *Pten*, *Bim*, 細胞外マトリックスに関する遺伝子 *Col17a1*, 聴覚に関与する遺伝子 *Col1a1* について定量的 RT-PCR を行ったところ, それぞれの遺伝子の DNA マイクロアレイによる発現変化の結果が正しいことが確認された。

最後にラセン神経節細胞のアポトーシスについて caspase 3 の免疫染色および TUNEL 染色を用いて検討したところ, 2カ月齢の POLG マウス, 野生型, 9カ月齢の野生型に比べ, 9カ月齢の POLG の蝸牛では陽性細胞が有意に増加していた¹¹⁾。

以上の結果から, 加齢に伴ってミトコンドリア DNA 変異が蓄積して増加すると蝸牛のエネルギー代謝機能が障害され, ストレス反応などを介して聴覚機能の重要な細胞でアポトーシスが誘導され, 難聴が進行性に生じることが示唆された。

摂取カロリー制限による老人性難聴発症予防効果

カロリー摂取制限は種を超えて老化を抑制する方法として知られており, 老化関連疾患の抑制効果についても多くの報告がなされている。またパーキンソン病などのモデル動物を用いた研究でも, カロリー摂取制限により脳神経細胞の消失が抑制されることが報告されている¹²⁾。

老人性難聴におけるカロリー摂取制限の予防効果についてもいくつかの研究がなされている。マウスでは1986年の Henry¹³⁾ の報告を皮切りにいくつかの報告^{13)~16)} がある。Henry¹³⁾ はマウスの3つの系統 (AKR, CBA/J, AU/Ss, それぞれ寿命が短, 中, 長の代表として選択) に対し, 生後21-25日後から1-2週かけて週3日のみ餌を与えるように制限してカロリー摂取制限を行った。その結果, AKR マウスでは寿命は延びず, 加齢による聴力変化も対照群と差がなかった。一方 CBA/J と AU/Ss マウスでは寿命が延び, AU/Ss では平均501日から719日と44%延長した。聴力について2~64kHzの閾値を ABR で計測したところ, 対照群の AU/Ss マウスでは加齢により高音域から難聴が出現したが, カロリー摂取制限群では有意に抑制できたと報告している。Williot ら¹⁶⁾ は CBA/H-T6J, DBA/2J, C57BL/6J, BALB/cByJ,

WB/ReJ の5種の系統とそのかけ合わせ10種の F1 hybrid を用いて70%のカロリー摂取を行い, 23カ月齢において ABR 閾値と組織所見を評価した。その結果, 多くの系統で寿命は延長したが, その中には蝸牛組織の変性を予防できたものはなく, 逆に増悪したものも見られた。寿命の伸びなかった系統の中では C57BL/6 マウスにおいて難聴と蝸牛変性が抑制されている。

マウスの他にはラットとサルで研究がなされている。Seidman¹⁷⁾ は Fischer 344 ラットに対し, 2カ月齢から30%のカロリー摂取制限を行い, 健康状態が悪化する(18-28カ月, 平均25カ月)まで3カ月毎に3~18kHzの ABR を測定し, その後蝸牛組織の組織所見とミトコンドリア DNA の欠失について調べた。その結果, 26カ月齢の対照群では約110dB SPL の ABR 閾値を示したが, 27カ月齢のカロリー摂取制限群では約75-80dB SPL にとどまり, 蝸牛外有毛細胞の消失およびミトコンドリア DNA の欠失もカロリー摂取制限群において抑制されたとしている。アカゲサルに30%のカロリー摂取制限を行った研究では, メスで ABR の IV 波の振幅が対照群に比べてカロリー摂取制限群の方が大きいなど, 老人性難聴に対してそれなりの予防効果を示唆する報告が初期になされた¹⁸⁾ が, 歪成分耳音響放射, ABR, 中間潜時反応を用いたその後の詳細な検討では, オスにおいて明らかな効果は無いとされている¹⁹⁾。

われわれは Park ら¹⁵⁾ および Williot ら¹⁶⁾ がカロリー摂取制限による難聴予防効果を報告した C57BL/6 マウスを用い, その効果の発現機序について検討した。このマウスは最もよく用いられている老人性難聴モデル動物であり, 10カ月齢頃より高周波音域から難聴を発症し, 20カ月齢頃に高度難聴となることが知られている。

まず ABR 閾値を測定したところ, 若年齢群 (4カ月齢) では正常閾値であったが, 食餌を通常通り与えた中年齢群 (15カ月齢) では中等度の難聴が見られた。一方2カ月齢から26%のカロリー摂取制限をした群では15カ月齢においてもほぼ正常の ABR 閾値を示した。蝸牛の組織学的検討では, 若年齢動物に明らかな組織変性所見はなく, 一方通常食の中年齢動物では基底回転優位に有毛細胞とラセン神経節細胞の著明な消失, 蝸牛側壁の変性が見られた (図3)。同月齢のカロリー摂取制限群では有毛細胞とラセン神経節細胞の変性はほとんど無く, わずかにラセン靭帯の細胞数減少が見られるのみであった。

次に DNA マイクロアレイによる蝸牛の遺伝子発現のプロファイル解析を行った。4カ月齢に比べ15カ月齢の通常食群では199の遺伝子が発現亢進し, 284の遺伝子が発現低下していた。通常食群では加齢に伴い, ミトコン

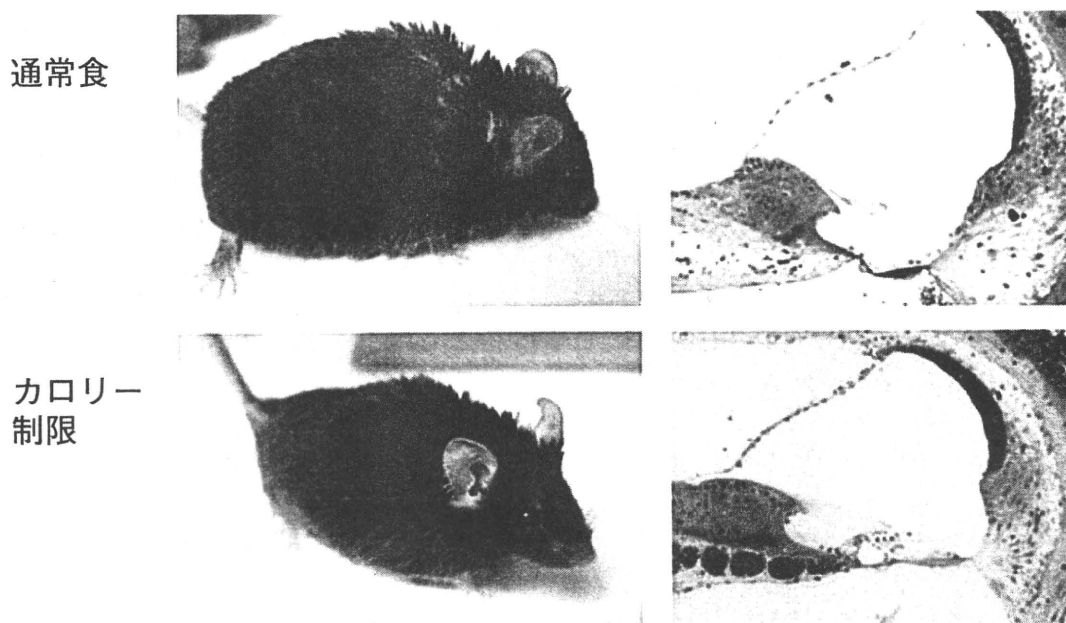


図3 C57BL/6 マウス15カ月齢の全身所見および蝸牛基底回転組織所見
上段は通常食を与えたマウス、下段は26%カロリー制限したマウス

ドリア機能, 細胞骨格, 神経生理学的機能などに関する遺伝子群が発現低下し, アポトーシス, タンパク融解, ストレス応答などに関する遺伝子発現が亢進していた。15カ月齢のカロリー摂取制限群を同月齢の通常食群と比較すると, 3,666の遺伝子が発現亢進し, 4,275の遺伝子が発現低下していた。カロリー摂取制限群では通常食群と比べ, 聴覚機能, ミトコンドリア機能, 細胞骨格, 神経生理学的機能, DNA修復などに関与する遺伝子群が発現亢進し, アポトーシス, タンパク融解, ストレス応答に関与する遺伝子発現が低下していた。個々の遺伝子を詳細に調べると, 例えば, regulation of programmed cell death カテゴリーの24の遺伝子 (*Bak*, *Bim*, *Il6* など) が発現低下していた。なおエネルギー代謝 (*Sirt1*, *Atp6v1a*), アポトーシス (*Il6*), 聴覚機能 (*Coch*, *Gja1*) に関与する代表的遺伝子について定量的 RT-PCRを行い, マイクロアレイ解析の結果の信憑性を確認している。最後にラセン神経節細胞のアポトーシスについて caspase 3 の免疫染色および TUNEL 染色を行ったところ, 15カ月齢では通常食群に比べカロリー摂取制限群において有意に陽性細胞が減少していた。

以上の結果から, 老人性難聴のモデルとして広く用いられている C57BL/6 マウスでは, 少なくとも15カ月齢までは26%のカロリー摂取制限をすることにより難聴の発症が抑えられること, 聴覚機能に重要な蝸牛内の細胞 (有毛細胞・ラセン神経節細胞など) のエネルギー代謝・ミトコンドリア機能が維持されてアポトーシスの出現が

抑制されることが示唆された²⁰⁾。

老人性難聴の発症機序 (仮説) と予防戦略

表1に, DBA/2J マウス, POLG マウス, C57BL/6 マウスにおける聴覚機能, 蝸牛組織所見, 蝸牛内遺伝子発現の加齢に伴う変化, および C57BL/6 マウスにおけるこれらの変化に対するカロリー摂取制限の効果をまとめた。これらの知見をもとに老人性難聴の発症機序を推測すると, ミトコンドリア DNA 変異・欠失の蓄積によるミトコンドリア機能・エネルギー代謝の低下が聴覚機能に重要な蝸牛内細胞 (有毛細胞・ラセン神経節細胞など) のアポトーシスを誘導し, 老人性難聴が引き起こされることが示唆された。一方カロリー摂取制限を行うと, ミトコンドリア DNA 変異・欠失の蓄積が抑制されてミトコンドリア機能・エネルギー代謝が維持され, その結果, 聴覚機能に重要な細胞の変性・消失の進行が抑制され, 老人性難聴の発現が抑制されることが示唆された。

ミトコンドリア DNA の障害は主にフリーラジカルの過剰産生などによって生じることが知られている。内耳でのフリーラジカルの過剰産生には, 騒音暴露, 動脈硬化などによる内耳循環障害などが関与していると考えられる。フリーラジカルは内在性のスカベンジャーにより除去されるが, 処理しきれなかったラジカルがミトコンドリア DNA の障害も引き起こす。障害された DNA はある程度修復されるが, 修復されないミトコンドリア

表1 三種のマウスの聴覚機能, 蝸牛組織, 蝸牛内遺伝子発現の変化とカロリー摂取制限の効果

	DBA/2J	POLG	C57BL/6	カロリー制限
ABR				
難聴	+++	++	++	-
組織障害				
有毛細胞	+++	++	+++	-
ラセン神経節	+++	+++	+++	-
蝸牛側壁 (血管条含)	+	+	+	-
遺伝子発現				
聴覚機能	↓	↓	↓	↑
ミトコンドリア機能	↓	↓	↓	↑
アポトーシス	↑	↑	↑	↓

DNAが蓄積して徐々にミトコンドリア機能が低下し、やがてエネルギー代謝の低下などを介してアポトーシスのシグナルを誘導し、有毛細胞やラセン神経節など聴覚機能に重要な細胞のアポトーシスが生じる。これらの細胞は再生しないため、脱落細胞数が増加した結果、不可逆性の難聴が進行性に生じると考えられる (図4)²¹⁾。

この仮説に立つと、蝸牛内にフリーラジカルを過剰産生するような原因、すなわち騒音に長期間暴露されることや動脈硬化など内耳の循環障害を来すような生活習慣を避けることが老人性難聴の予防として推奨されよう。またフリーラジカルを除去するようなビタミン類、ポリフェノール、ミトコンドリア代謝産物でもあるコエンザイムQ10などを補うことによる予防効果も期待できる。ただしこれらのサプリメントの効果に関するヒトでのエビデンスは乏しく、ヒトでの老人性難聴に対する効果については今後の検討課題である。

カロリー摂取制限をすることがヒトの老化や老人性難聴の進行を予防できるかについてはまだ明らかではない。霊長類の10年以上にわたる研究では若干の予防効果が示唆されるのみであり、C57BL/6マウスで見られた老人性難聴に対する著明な予防効果はヒトではあまり期待できないかもしれない。また、もしカロリー摂取制限がヒトでも有効として、その効果を最も引き出す方法(何歳から開始するか、何割のカロリー制限にするか、炭水化物・タンパク質・脂質の割合をどうするか、など)についてもほとんどわかっていない。これらの点を明らかにするには大規模な前向き臨床試験が必要であろう。

またこれらの点が解明されたとしても、カロリー摂取制限を行うことは現実的になかなか困難と思われるため、カロリー摂取制限と同じような効果を示す薬剤・サ

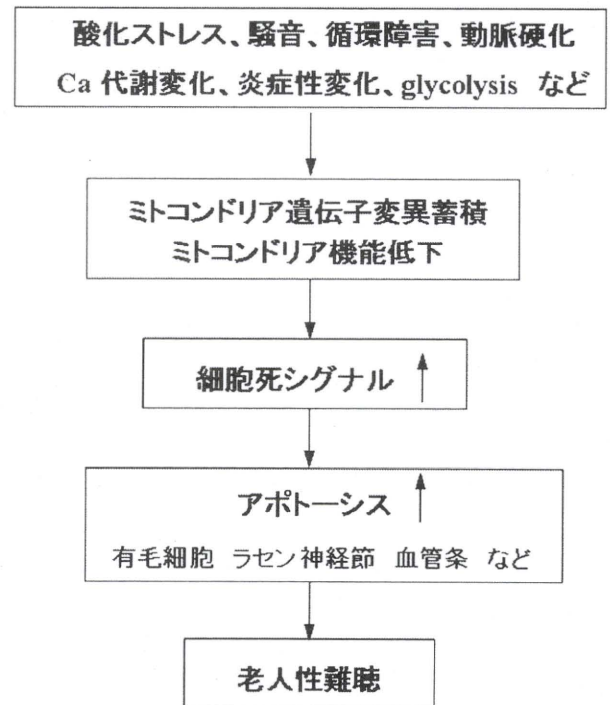


図4 老人性難聴の発症機序 (仮説)

プリメントの同定や精製も盛んに研究されている。赤ワインに含まれる resveratrol にはカロリー摂取制限による寿命延長効果の鍵遺伝子 *Sirt1* の発現を亢進させる働きがあり、また最近になって、resveratrol よりも強力に *Sirt1* の発現を亢進させる物質も報告されている²²⁾。これらの薬剤・サプリメント (の組み合わせ) によって老人性難聴が予防できるかどうか今後の重要な検討課題の一つである。

引用文献

- 1) 立木 孝, 笹森史朗, 南 吉昇, 一戸孝七, 村井和夫, 他: 日本人聴力の加齢変化の研究. *Audiology Japan* 2002; 45: 241-250.
- 2) Yuch B, Shapiro N, MacLean CH, Shekelle PG: Screening and management of adult hearing loss in primary care: scientific review. *JAMA* 2003; 289: 1976-1985.
- 3) Kim HN, Kim SG, Lee HK, Ohrr H, Moon SK, et al: Incidence of presbycusis of Korean population in Seoul, Kyunggi and Kangwon provinces. *J Korean Med Sci* 2000; 15: 580-584.
- 4) Schuknecht HF, Gacek MR: Cochlear pathology in presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993; 102: 1-16.
- 5) Van Eyken E, Van Camp G, Van Laer L: The complexity of age-related hearing impairment: contributing environmental and genetic factors. *Audiol Neurootol* 2007; 12: 345-358.
- 6) Noben-Trauth K, Zheng QY, Johnson KR: Association of cadherin 23 with polygenic inheritance and genetic modification of sensorineural hearing loss. *Nat Genet* 2004; 35: 21-23.
- 7) Someya S, Yamasoba T, Prolla TA, Tanokura M: Genes encoding mitochondrial respiratory chain components are profoundly down-regulated with aging in the cochlea of DBA/2J mice. *Brain Res* 2007; 1182: 26-33.
- 8) Bai U, Seidman MD, Hinojosa R, Quirk WS: Mitochondrial DNA deletions associated with aging and possibly presbycusis: a human archival temporal bone study. *Am J Otol* 1997; 18: 449-453.
- 9) Fischel-Ghodsian N, Bykhovskaya Y, Taylor K, Kahen T, Cantor R, et al: Temporal bone analysis of patients with presbycusis reveals high frequency of mitochondrial mutations. *Hear Res* 1997; 110: 147-154.
- 10) Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, et al: Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 2005; 309: 481-484.
- 11) Someya S, Yamasoba T, Kujoth GC, Pugh TD, Weindruch R, et al: The role of mtDNA mutations in the pathogenesis of age-related hearing loss in mice carrying a mutator DNA polymerase γ . *Neurobiol Aging* 2008; 29: 1080-1092.
- 12) Mattson MP: Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 120-129.
- 13) Henry KR: Effects of dietary restriction on presbycusis in the mouse. *Audiology* 1986; 25: 329-337.
- 14) Sweet RJ, Price JM, Henry KR: Dietary restriction and presbycusis: periods of restriction and auditory threshold losses in the CBA/J mouse. *Audiology* 1988; 27: 305-312.
- 15) Park JC, Cook KC, Verde EA: Dietary restriction slows the abnormally rapid loss of spiral ganglion neurons in C57BL/6 mice. *Hear Res* 1990; 48: 275-279.
- 16) Willott JF, Erway LC, Archer JR, Harrison DE: Genetics of age-related hearing loss in mice. II. Strain differences and effects of caloric restriction on cochlear pathology and evoked response thresholds. *Hear Res* 1995; 88: 143-155.
- 17) Seidman MD: Effects of dietary restriction and antioxidants on presbycusis. *Laryngoscope* 2000; 110: 727-738.
- 18) Fowler CG: Torre, P 3rd, Kemnitz JW. Effects of caloric restriction and aging on the auditory function of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): The University of Wisconsin Study. *Hear Res* 2002; 169: 24-35.
- 19) Torre P 3rd, Mattison JA, Fowler CG, Lane MA, Roth GS, et al: Assessment of auditory function in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): effects of age and caloric restriction. *Neurobiol Aging* 2004; 25: 945-954.
- 20) Someya S, Yamasoba T, Weindruch R, Prolla TA, Tanokura M: Caloric restriction suppresses apoptotic cell death in the mammalian cochlea and leads to prevention of presbycusis. *Neurobiol Aging* 2007; 28: 1613-1622.
- 21) Yamasoba T, Someya S, Yamada C, Weindruch R, Prolla TA, et al: Role of mitochondrial dysfunction and mitochondrial DNA mutations in age-related hearing loss. *Hear Res* 2007; 226: 185-193.
- 22) Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, et al: Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 2007; 450: 712-716.

本論文は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻食品工学研究室の染谷慎一博士および田之倉 優教授、Wisconsin大学のTomas A Prolla准教授 (Department of Genetics and Medical Genetics) およびRichard Weindruch教授 (Department of Medicine) との共同研究をもとにまとめられたものである。日本学術振興会科学研究費 (16390486, 20390440) および厚生労働科学研究費 (15110201) の援助を受けた。

連絡先 〒113-8655 文京区本郷7-3-1

東京大学医学部耳鼻咽喉科学教室 山唄達也

Molecular Mechanism of Age-related Hearing Loss : Toward its Prevention

Tatsuya Yamasoba, M.D.

Department of Otolaryngology and Head and Neck Surgery, University of Tokyo, Tokyo

Mitochondrial DNA (mtDNA) mutations/deletions and decline of mitochondrial function are considered to be associated with the development of age-related hearing loss (AHL). First, we examined age-related changes in gene expression profile in the cochlea of DBA/2J mouse. This mouse exhibited mild hearing loss at 2 months of age and became deaf by 8 months. Comprehensive gene expression analysis identified significant expression changes correlated with AHL in over 4000 cochlear genes. When compared to 2 month old mice, approximately 2,200 genes were downregulated and approximately 1,900 genes were upregulated in the cochlea of 8 month old mice. AHL-correlated genes in the cochlea of 8-month-old DBA/2J mice were statistically associated with 15 mitochondrial process categories, suggesting that AHL is associated with profound down-regulation of genes involved in the mitochondrial function in the cochlea of aged DBA/2J mice. Next, we assessed the role of accumulation of mtDNA mutations in the development of AHL using Polg (D257A) knock-in mouse, which exhibited increased spontaneous mtDNA mutation rates during aging and showed accelerated aging. They exhibited moderate hearing loss and degeneration and apoptosis in the cochlea by 9 months of age, while wild-type animals did not. MtDNA mutations were associated with transcriptional alterations consistent with impairment of energy metabolism, induction of apoptosis, and hearing dysfunction in the cochlea of aged mitochondrial mutator mice. Lastly, we examined if 26 % calorie restriction (CR) could prevent AHL in C57BL/6 mice. CR mice retained normal hearing and showed no cochlear degeneration by 15 months of age, whereas control mice developed moderate hearing loss and cochlear degeneration due to increased apoptosis at 15 months of age. CR mice also showed a significant reduction in the number of TUNEL-positive cells and cleaved caspase-3-positive cells. Microarray analysis revealed that CR upregulated the expression of genes involved in mitochondrial and hearing function and downregulated that of apoptotic genes. Taken together, these findings suggest that accumulation of mtDNA mutations during aging leads to mitochondrial dysfunction and induces an apoptotic program, thereby causing AHL.

Keywords : Apoptosis, Calorie restriction, Mouse, Mitochondrial DNA, Aging

低体温による虚血性内耳障害の防御： 低体温のタイミングと蝸牛内NO_x濃度

竹田将一郎*、白馬 伸洋**、兵頭 純*、羽藤 直人*、暁 清文*

*愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学教室

**大阪赤十字病院耳鼻咽喉科

Effect of mild hypothermia on the ischemic inner ear damage

Shoichiro Takeda*, Nobuhiro Hakuba**, Jun Hyodo*, Naohito Hato*, Kiyofumi Gyo*

*Department of Otolaryngology, Ehime University School of Medicine

**Department of Otolaryngology, Osaka Red Cross Hospital

Mild hypothermia is effective in preventing ischemic damage to the cochlea when applied during an ischemic insult; however, the effects of post-ischemic hypothermia remain unclear. This study addressed this issue by performing hypothermia at three different times in an animal model of transient cochlear ischemia. Furthermore, the effects of hypothermia on the concentrations of oxidative NO metabolites in the scala tympani were investigated.

Adult male Mongolian gerbils were divided into three groups (each n=8) based on the timing of the start and end of hypothermia (32°C) after reperfusion: 1-4, 3-6, and 6-9 hrs. Some animals were subjected to normothermia (n=8) or sham-operation plus hypothermia of 1-4 hrs. (n=4). Transient cochlear ischemia was induced by occluding both vertebral arteries at the neck for 15 min. Mild post-ischemic hypothermia was effective in attenuating the increase in the auditory brainstem response (ABR) threshold at 8 kHz and the loss of hair cells, when applied within 3 hrs. after reperfusion. The effects were more prominent with an earlier application of hypothermia. By contrast, no such attenuating effects were observed in the 6-9 hrs., normothermic group.

Oxidative NO metabolites were measured by titrating the nitrite (NO²⁻) and nitrate (NO³⁻) concentrations in the perilymph on the day following ischemia using in vivo microdialysis and an on-line high-performance liquid chromatography (HPLC) system. In this study, the animals were allotted to no-treatment (n=2), normothermia (n=5), sham-operation plus hypothermia (n=2), and three hypothermia groups (each n=5): 1-4, 3-6, and 6-9 hrs. Significant increases in the perilymph NO²⁻ and NO³⁻ concentrations were found in the normothermia group, while hypothermia prevented the increase. The earlier the hypothermia was applied, the more the increase was attenuated.

Key words : Transient cochlear ischemia, mild hypothermia, ABR, NO_x

論文要旨

一過性内耳虚血の動物モデルを用い、虚血後に様々なタイミングで低体温（32℃）を負荷することにより内耳障害が防御される限界点を探索するとともに、低体温の作用メカニズムを解明する目的で外リンパ中の窒素酸

化物濃度を測定した。実験にはスナネズミを用いた。その結果、虚血から3時間以内に低体温を負荷した群は常温群に比べ、有毛細胞脱落やABR閾値上昇は有意に軽減された。しかし6時間後に低体温を負荷した場合にはこのような効果はみられず、虚血による内耳障害は防御

されなかった。また、同様のプロトコールによってスナネズミの外リンパ中の窒素酸化物濃度を測定したところ、低温処置により虚血1日後の NO^{2-} 及び NO^{3-} の濃度上昇は有意に抑制され、その効果は低体温の開始時期が早いほど大きかった。

はじめに

突発性難聴は急激に発症する原因不明の感音難聴であるが、「なら誘引なく、ある日、突然に発症する」という臨床的特徴から、原因として内耳循環障害説が有力視されている^{1),2)}。我々は一過性内耳虚血の動物モデルを作成し³⁾、虚血障害のメカニズムを研究するとともに、新しい治療法開発に向けた研究を行ってきた。その一つとして内耳低温療法が挙げられる。低温療法はエネルギー代謝を抑制し非特異的に障害進行を防御することから、脳梗塞⁴⁾や心停止後の昏睡状態の治療法として研究が進められている⁵⁾。我々は低体温が神経保護効果を示すことから、虚血性内耳病変の抑止に応用できるのではないかと発想し、研究を進めてきた。これまでの実験により、虚血前から低体温を施行すれば虚血による内耳障害は防御できること⁶⁾、虚血によって誘導される外リンパ中のグルタミン酸濃度上昇は低体温により抑止されること⁷⁾、などを明らかにした。しかし障害前からの低体温は予定手術など限定された状況でのみ実施可能であり、その臨床的意義は限られる。実際の臨床の場合では障害発症後に治療を行うことがほとんどであり、低体温の臨床応用の可能性を確かめるためには、虚血後の低体温の効果を検討する必要がある。

本研究では、虚血後一定時間経過した後に低体温を付加して内耳障害が防御される限界点を検討するとともに、低体温の作用メカニズムを解明する目的で外リンパ中の窒素酸化物の濃度を測定した。

方 法

実験動物には体重60～80gのスナネズミを用いた。愛媛大学医学部動物実験指針に従い、以下の実験は愛媛大学医学部付属動物実験施設を利用して行った。

実験1 虚血性内耳障害と低体温のタイミング

(1) 一過性内耳虚血の負荷

動物を実験台に固定し、酸素30%、笑気70%の混合ガスにハロセン1%を加え全身麻酔を施した。経口挿管後、仰臥位にて前頸部正中切開にて両側椎骨動脈を剖出・剥離し、4-0絹糸をかけて滑車につるした。それぞれに

5gの重りを負荷し、椎骨動脈の血流を両側同時に遮断した⁸⁾。15分間の血流遮断後に絹糸をはずし、顕微鏡下に椎骨動脈の血流再開通を確認した。

(2) 低体温

実験中の直腸温は温度センサー (PTI-200, Unique Medical Corporation, Tokyo, Japan) を用いてモニターした。体温調節には温度コントローラー (TACT-2DF, Physitemp Corporation, New Jersey, USA) を用いた。低体温はアイスパックを動物の腹部に当てることにより行った。体温が低下しすぎた場合は、ヒーティングプレート (HP-1M, Physitemp Corporation, New Jersey, USA) で暖め、体温は $32 \pm 1^\circ\text{C}$ に保った。低体温の負荷時間はいずれの群も3時間とした。

実験動物は5群に分けた。一過性虚血のみで低体温を行わないものを常温群、椎骨動脈剖出のみで虚血は行わず術後1時間目から低体温としたものをシャム手術低体温群とした。また、一過性虚血の1時間後から低体温を開始したものを低体温1-4h群、3時間後から低体温3-6h群、6時間後から低体温6-9h群とした。体温調節時、特に低体温から常温に移行するときには急激な体温の変化を避け、約30分かけて復温を図った。なお、常温群では実験中の直腸温は $37 \pm 1^\circ\text{C}$ に維持した。

(3) ABR (Auditory Brainstem Response) の測定

記録電極には針電極を用い、それぞれ関電極を頭頂部に、不関電極を側頭部に、接地電極を対側頸部に刺入した。刺激音には周波数8kHzのトーンバースト(立ち上がり、立ち下り時間各0.5ms、持続時間10ms)を用い、イヤホンチューブを直接外耳道に密着させて音を与えた。記録電極から導出された反応は誘発反応測定装置 (Synax 1200, NEC medical system, Tokyo, Japan) にて300回の加算を行って記録した。刺激音圧は5dBステップで増減させて測定してABR閾値を求めた。実験前と一過性虚血の1、4、7日後のABR閾値を測定して、各群の聴力閾値の経時的変化を評価した。

(4) 有毛細胞の観察

虚血7日後のABR測定後、深麻酔下に4%パラホルムアルデヒドにて経心灌流固定を行い、迷路骨胞を摘出した。実体顕微鏡下にコルチ器を採取した後、聴毛を観察するためにPBSで250倍に希釈したRhodamine-phalloidin (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA; 0.25% Triton-X-100, 1%ウシ血清アルブミン) を用いて室温で30分間染色し、さらに核を観察するため、PBS洗浄後に $20 \mu\text{g/ml}$ のHoechst 33342 (Calbiochem-

Navabiochem Corporation, California, USA) で60分間染色した。プレパレーションを行い、グリセロールに封入後、蛍光顕微鏡下 (BX60, Olympus, Tokyo; 聴毛はグリーンフィルター: BP546, FT580, LP590、核はUVフィルター: BP365, FT395, LP397) に観察し、内外の有毛細胞ごとに脱落した有毛細胞率 (%) を算出し、組織学的な内耳障害の指標とした。

実験2 外リンパ中の窒素酸化物濃度への低温の影響

(1) 実験動物

一過性内耳虚血や低温負荷の方法は実験1で詳述した。本研究では実験動物を6群に分け、それぞれ無処置群 (n=2)、虚血を行い常温とした常温群 (n=5)、シャム手術低温群 (n=2)、低温1-4 h群 (n=5)、低温3-6 h群 (n=5)、低温6-9 h群 (n=5) とした。

(2) 蝸牛外リンパ中の NO^{2-} 、 NO^{3-} 濃度の測定

盛實ら⁹⁾の方法に従い、前頸部より耳胞にアプローチして蝸牛基底回転鼓室階に小孔を開けた。ここに微小透析膜付きのプローブ (A-I-8-005, Eicom, Kyoto, Japan) を挿入し、酸化窒素分析システム (ENO20, Kyoto, Japan) を用いて外リンパ中の NO^{2-} 、 NO^{3-} 濃度を測定した。なお測定は、無処置群を除き、いずれも処置後24時間後に行った。

3. 統計学的解析

ABR閾値、有毛細胞の脱落率および蝸牛外リンパ中の NO^{2-} 、 NO^{3-} 濃度のデータは一元配置型の分散分析を行い、群間の有意差を確認し、Dunnett法による多重比較検定を行った。

結 果

(1) ABR閾値の変化

実験前のABR閾値を基準とした場合の、虚血1日後 (図1)、虚血4日後 (図2)、虚血7日後 (図3) の閾値上昇の程度をそれぞれ図示した。常温群では閾値上昇の改善は限られ難聴は残存した。一方、低温処置を行った群では早期に低温処置を加えたものでは閾値上昇は軽微であったが、6時間後では保護効果は認められなかった。さらに虚血4日後でも同様に、早期に低温処置を加えたものでは閾値上昇は軽微であった。低温1-4 h群、3-6 h群と常温群との間には1、4、7日後いずれにおいても統計学的に有意差が認められた。一方、低温6-9 h群では閾値上昇は常温群と変わらず、低温の効果は認められなかった。なお、椎骨動脈剖出だけで虚血は行わず低温を負荷したシャム手術低温群ではABR閾値の変化はほとんど認められなかった。

(2) 蝸牛有毛細胞の脱落率

各群代表例における蝸牛基底回転の蛍光顕微鏡所見を図4に示す。いずれも虚血もしくはシャム手術7日後の所見である。常温群や低温6-9 h群では多数の内毛細胞の核と聴毛が一致して脱落していた。これに対し、低温1-4 h群や3-6 h群では有毛細胞の脱落は軽微であった。また、シャム手術低温群では有毛細胞の脱落はほとんど認められなかった。

基底回転における内毛細胞の脱落率を図5に示した。常温群と比べ低温群ではいずれも脱落率は軽減されており、常温群と低温1-4 h群との間には有意差が認められた。なお、外毛細胞の脱落率はいずれの群も3%以下と内毛細胞と比べ軽微であり、各群間に有

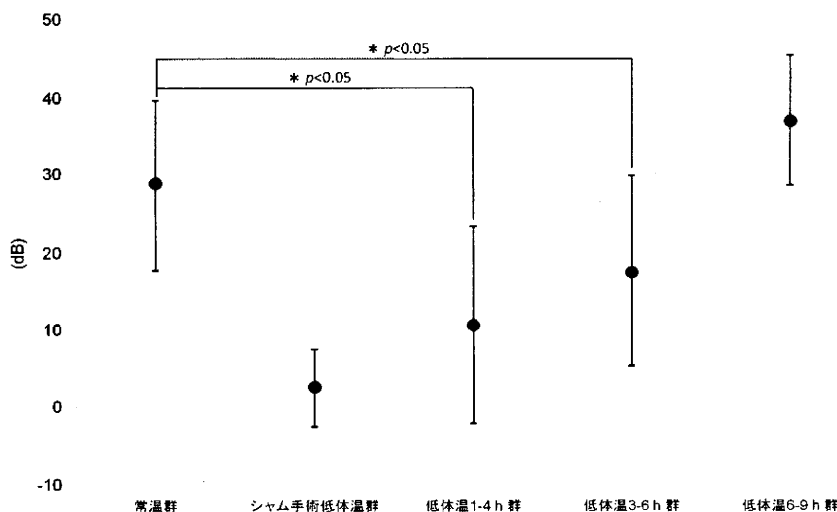


図1 虚血1日後のABR閾値 (平均±標準偏差)

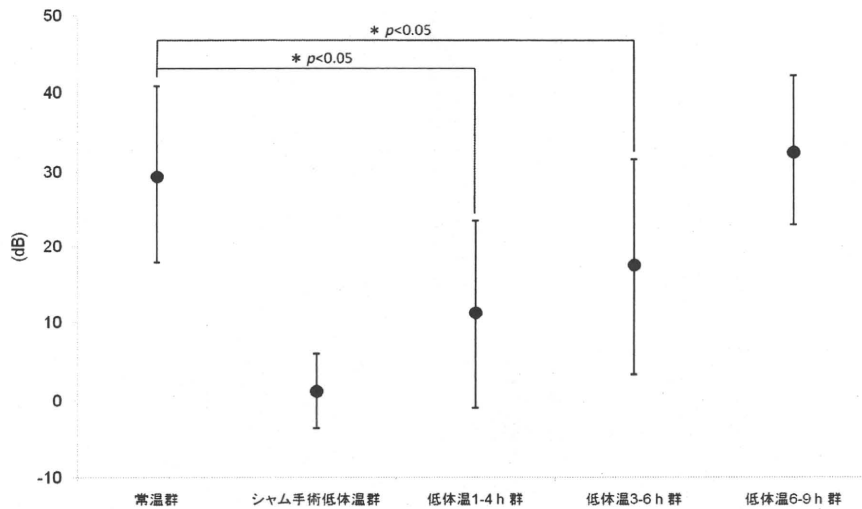


図2 虚血4日後のABR閾値 (平均±標準偏差)

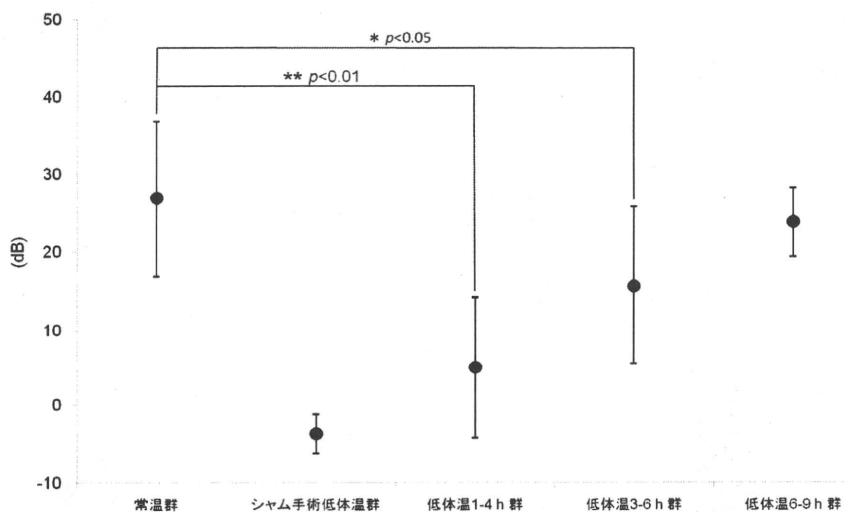


図3 虚血7日後のABR閾値 (平均±標準偏差)

意差は認められなかった (図6)。

(3) 蝸牛外リンパ中の NO^{2-} 、 NO^{3-} 濃度

各群の外リンパ中 NO^{2-} および NO^{3-} 濃度の平均値を図7に示す。各群とも NO^{2-} より NO^{3-} の割合が高く、窒素酸化物は主に NO^{3-} として存在すると考えられた。 NO^{2-} と NO^{3-} を合わせたものを NO_x とすると、無処置群および、虚血後も常温を保つコントロール群の NO_x 濃度はこれまでの報告⁹⁾と同程度であった。一方、低体温1-4h群、低体温3-6h群、低体温6-9h群では、いずれの群においても NO_x 濃度の上昇は軽減されていた。なお常温群と低体温1-4h群および低体温3-6h群との間には統計学的な有意差が認められた。

考 察

低体温による虚血性細胞障害の防御については、脳領域を中心に多くの研究がすでに行われている。これまでに、虚血による脳の神経細胞障害はわずか数℃体温を下げるだけで完全に防御され^{4), 10), 11)}、4時間以内(ラット)であれば虚血後の低体温でも効果が認められ^{12), 13)}、局所的な低体温でも効果が期待できること^{14), 15)}、などが明らかとなり、臨床応用に向けた研究が進められている。しかし、内耳障害に対する低体温の効果については、ほとんど検討されていない。

我々はスナネズミを用いた一過性内耳虚血モデルにおいて、虚血前から低体温を施行することで虚血性内耳障害が防御できることを報告した⁶⁾。今回、虚血後に低体

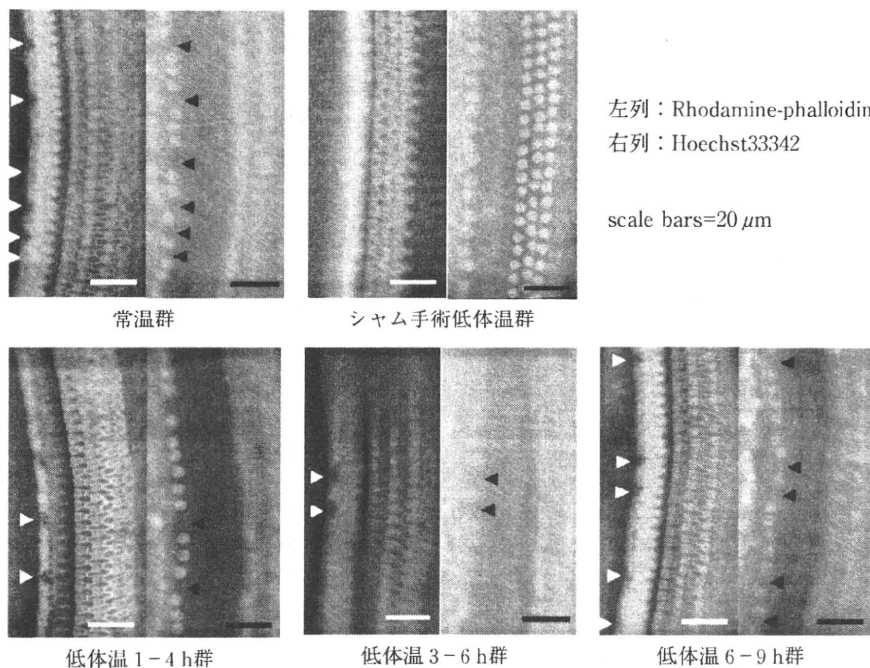


図4 各群における蝸牛基底回転の蛍光顕微鏡所見

常温群や低体温 6-9 h 群では主に内毛細胞の聴毛(右列)と核(左列)が多数脱落していた。それに対し、低体温 1-4 h 群や 3-6 h 群では脱落は軽度であった。

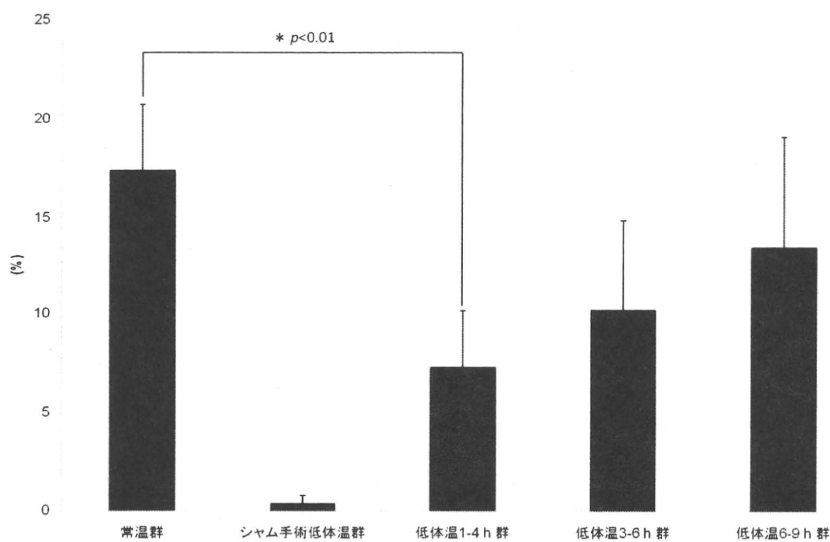


図5 虚血7日後における内毛細胞の脱落率(平均±標準偏差)

温を負荷したところ、虚血1時間後および3時間後に低体温とした群では障害は軽減されたが、6時間後に低体温とした群では効果が明らかでなかった。障害が一定時間以上進行すると低体温の効果は見込めないわけで、内耳への低温療法は発症早期でのみ有効であることが示された。

一過性虚血による内耳障害のメカニズムは複雑だが、

一般的に、①血液供給が絶たれることによるエネルギー不全、②虚血により遊離されるグルタミン酸の細胞毒性¹⁶⁾、③虚血再還流に伴う活性酸素や窒素酸化物の増加が挙げられる。我々の一過性内耳虚血モデルを用いた研究においては、内耳虚血により主に内毛細胞が障害されること、虚血後速やかに外リンパ中のグルタミン酸濃度が上昇し虚血後30分以内にピークに達すること、虚

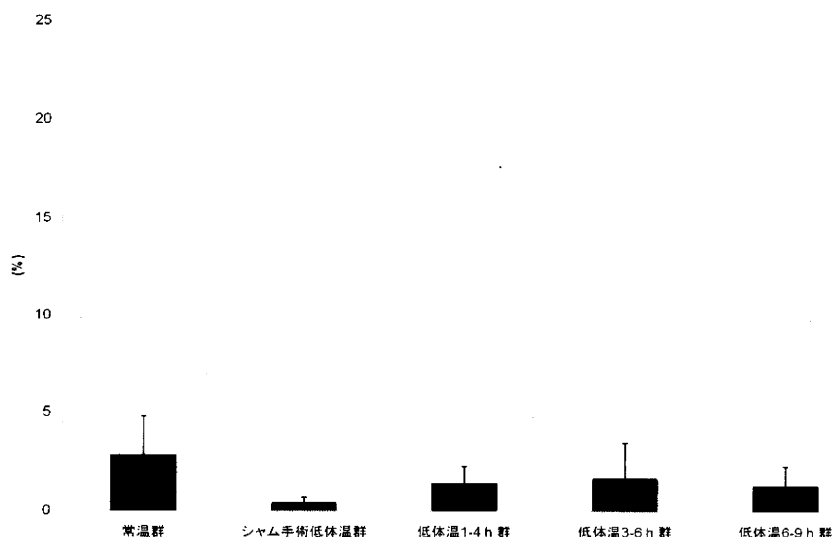


図6 虚血7日後における外有毛細胞の脱落率 (平均±標準偏差)

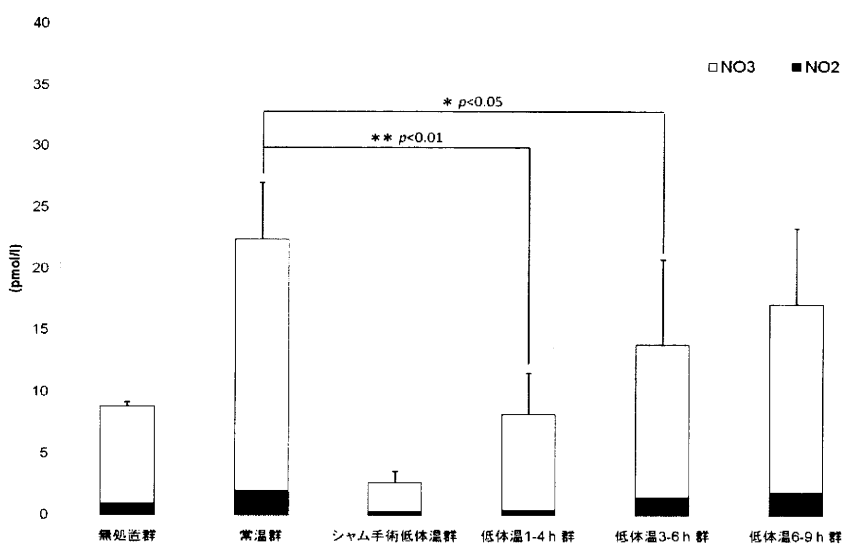


図7 蝸牛基底回転外リンパ液中のNO₂⁻、NO₃⁻濃度 (平均±標準偏差)

血中に32℃の低体温を行うと虚血後のグルタミン酸濃度上昇が完全に抑制されることを報告している⁷⁾。グルタミン酸は内毛細胞と求心性蝸牛神経間のシナプスにおける神経伝達物質と考えられており、虚血によりシナプス外に漏出し、興奮毒性を發揮して内毛細胞を障害すると考えられる。今回の実験の結果、虚血後低体温は虚血中低体温と比較すれば内耳保護効果が弱かった。虚血1時間後では、グルタミン酸はすでにかかなりの程度まで外リンパに漏出した後と考えられ^{3),7)}、低体温の効果は限られていた。

本研究では窒素酸化物に対する低体温の影響を検証した。一酸化窒素(NO)はNO合成酵素(NOS)の働き

によりL-アルギニンから産生される脂溶性のラジカルである。循環系や神経系における情報伝達や感染、炎症、免疫反応のケミカルメディエーターとしての生理機能を有しているが、過剰に産生されると他のフリーラジカルと反応して障害性を高める¹⁷⁾。Tabuchiら¹⁸⁾はモルモットを用いた虚血-再還流実験で、虚血前にNOSのアイソフォームの一つであるnNOSに対する選択的阻害薬である3-bromo-7-nitroindazoleを投与することで、虚血4時間後のCAP(compound action potential)の閾値上昇が抑制されたと報告している。また、Morizaneら⁷⁾は一過性虚血モデルにおいて、虚血1日目と4日目にiNOSが蝸牛内に発現し、蝸牛外リンパ中のNO_x濃度が

上昇することを示した。虚血後1時間後および3時間後に低体温を開始した群では有意に外リンパ液中のNOx濃度上昇が抑制されていたことより、低体温がNOSおよびNOを介した内耳障害メカニズムにも影響を及ぼしている可能性が示唆された。本研究では酸化窒素化合物の代謝変化と虚血性内耳障害の関連は検証されておらず、今後の課題としたい。

一過性内耳虚血モデルにおける聴力障害には、コルチ器のみならずラセン神経節や血管条の障害をも加味して考える必要がある。低体温(冷却)はその性質上、多くの部位の多様な機序に多面的に作用することから、効果が限定される薬剤とは異なり汎用性の高い治療法であると考えられる。今後、低温療法を突発性難聴の治療に応用する場合の問題点など、さらなる検討が必要であろう。

本論文の要旨は第18回日本耳科学会総会学術講演会(神戸)において口演した。

参考文献

- 1) Probst R, Tschopp K, Ludin E, et al.: A randomized double-blind, placebo-controlled study of dextran/pentoxifylline medication in acute acoustic trauma and sudden hearing loss. *Acta Otolaryngol* 112 (3): 435-443, 1992.
- 2) Yue WL, Li P, Qi PY, et al.: Role of low-molecular-weight heparins in the treatment of sudden hearing loss. *Am J Otolaryngol* 24 (5): 328-333, 2003.
- 3) Hakuba N, Kiyofumi G, Yanagihara N, et al.: Efflux of glutamate into the perilymph of the cochlea following transient ischemia in the gerbils. *Neurosci Lett* 230: 69-71, 1997.
- 4) Busto R, Dietrich WD, Globus MY, et al.: Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 7: 729-738, 1987.
- 5) The Hypothermia After Cardiac Arrest Study Group: Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med* 346: 549-556, 2002.
- 6) Watanabe F, Koga K, Hakuba N, et al.: Hypothermia prevents hearing loss and progressive hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils. *Neuroscience* 102 (3): 639-645, 2001.
- 7) Hyodo J, Hakuba N, Koga K, et al.: Hypothermia reduces glutamate efflux in perilymph following transient cochlear ischemia. *Neuroreport* 12: 1983-1987, 2001.
- 8) Hata R, Matsumoto M, Hatakeyama T, et al.: Differential vulnerability in the hindbrain neurons and local cerebral blood flow during bilateral vertebral occlusion in gerbils. *Neuroscience* 56: 423-439, 1993.
- 9) Morizane I, Hakuba N, Hyodo J, et al.: Ischemic damage increases nitric oxide production via inducible nitric oxide synthase in the cochlea. *Neurosci Lett* 391: 62-67, 2005.
- 10) Welsh FA, Sims RE, Harris VA: Mild hypothermia prevents ischemic injury in gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 10: 557-563, 1990.
- 11) Dietrich WD, Busto R, Alonso O, et al.: Intraischemic but not postischemic brain hypothermia protects chronically following global forebrain ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 541-549, 1993.
- 12) Ohta H, Terao Y, Shintani, et al.: Therapeutic time window of post-ischemic mild hypothermia and the gene expression associated with the neuroprotection in rat focal cerebral ischemia. *Neurosci Res* 57: 424-433, 2007.
- 13) Busto R, Dietrich WD, Globus MY, et al.: Postischemic moderate hypothermia inhibits CA1 hippocampal ischemic neuronal injury. *Neurosci Lett* 101: 299-304, 1989.
- 14) Eshraghi AA, Nehme O, Polak M, et al.: Cochlear temperature correlates with both temporalis muscle and rectal temperatures. Application for testing the otoprotective effect of hypothermia. *Acta Otolaryngol* 125: 922-928, 2005.
- 15) Smith LP, Eshraghi AA, Ehitley DE, et al.: Induction of localized cochlear hypothermia. *Acta Otolaryngol* 127: 228-233, 2007.
- 16) Hakuba N, Koga K, Shudou M, et al.: Hearing loss and glutamate efflux in the perilymph following transient hindbrain ischemia in gerbils. *J Comp Neurol* 418: 217-226, 2000.
- 17) Amae FR, Comis S, Osborne M, et al.: Possible involvement of nitric oxide in the sensorineural hear-

- ing loss of bacterial meningitis. *Acta Otolaryngol* 117 : 329-336, 1997.
- 18) Tabuchi K, Tsuji S, Hara A, et al. : Ischemia-reperfusion injury of the cochlea : effects of an iron chelator and nitric oxide synthase inhibitors. *Hear Res* 160 : 31-36, 2001.

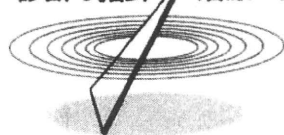
論文受付 20年11月21日
論文受理 21年3月16日

別刷請求先：〒791-0295 愛媛県松山市東温市志津川
愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学教室 竹田将一郎

ムンプス難聴と予防接種

Mumps hearing loss and prevention by vaccine

診断の指針 治療の指針



福田 諭
FUKUDA Satoshi

はじめに

ムンプスウイルスなどの全身ウイルス感染の際に、内耳炎が惹起され感音難聴が生じることは古くよりよく知られている事実である。

ムンプスは「流行性耳下腺炎」、「おたふく風邪」とも呼ばれる急性ウイルス性伝染性疾患である。感染型式はヒトキャリアよりの飛沫などによる直接接触感染で、ウイルスは呼吸器上皮細胞に侵入し、鼻咽頭粘膜上皮で一次増殖しつつで所属リンパ節でさらに増殖しウイルス血症を起こし、全身の易感受性の臓器に感染が拡大する。易感受性の臓器としては腺組織と中枢神経系があげられ、腺組織としては唾液腺、膵臓、睾丸、副睾丸、卵巣などが、そして中枢神経系の一つに内耳(蝸牛、前庭)があげられる。

潜伏期のピークは16~18日で、好発年齢は幼児・学童であるが、免疫を持たない場合には成人でも罹患する可能性はある。不顕性感染が約30~40%であるので、罹患歴のない者が感受性者であるとは必ずしも限らない。合併症としての難聴発症はよく知られており、ムンプス難聴と総称され、その一般的臨床像として、①一側性、②高度感音難聴~聾、③改善しない、の3点がある。ムンプス罹患時の難聴の発生頻度をみると、最近の成書では15,000人に1人という記載があるが、局地的な調査としては1:18,000(西岡, 1982), 1:6,700(西岡, 1985), 1:184(石丸, 1988), 1:225(木村, 1991), 1:250(児玉, 1995), 1:533(村井, 1995), 1:294(青柳, 1996), 1:91(高良, 1999)と決して低率ではない結果が報告されている。

厚生省急性高度難聴調査研究班の調査結果によると、ムンプス難聴は年間295例(1987), 400例(1993), 650人(2001)と増加傾向を示している。

1. 病 理

1960年、Lindsayにより初めて報告されたヒトムンプス難聴の側頭骨病理では、本態は蝸牛膜迷路に局限

した病変“内リンパ迷路炎”とし、ウイルスの内耳への到達経路として血行性であろうと推測した。1979年Westmoreらは、ムンプス罹患中に2日間で聾になった症例の鼓室内試験開放時に採取した外リンパ中からムンプスウイルスを検出した。われわれの系での実験的結果としては、やはり血管条、コルチ器にウイルス抗原が確認され、血行感染説を裏づける結果が示された。

2. ムンプスワクチン

わが国において、ムンプスワクチンは1981年から任意接種の形で開始され、また1989年からは三種混合MMR(麻疹・ムンプス・風疹)ワクチンが導入されたため、1回接種ですむことより接種率の向上に結びついた。しかし接種後の無菌性髄膜炎などの問題から、1993年4月にMMRワクチン接種は中止された。このような背景や公衆衛生・医療水準の向上、感染症の発生状況の変化などにより1994年4月より予防接種法が大きく変わった。こうした流れのなかで、厚生省感染症サーベイランスによるムンプスの定点観測の値を見ると図1に示すように3~4年の間隔で流行を起こしており、1982, 1985, 1989年に大きな山があった。1994年の流行の山は、前回の山の約2分の1の発生で、この減少は1989~1993年までの約180万人のMMRワクチン接種の影響が大きいとされている。ワクチンの影響も次第に小さくなっているのが、再び活性化するかもしれないと推測されていたが、現に1994年の流行の山の後、1998年, 2002年, 2006年にも山ができ、本2010年はふたたび流行傾向を示している(図1)。

ムンプスは任意接種であるため接種率の正確な把握は難しいが、厚生省薬務局によるとムンプスワクチン供給数はMMRワクチンが1989年4月から1993年4月までに183万人が接種された時期には単独を含め54~165万人分であったのに比し、2009年は任意接種の始まった1981年よりとほぼ同等の約60万人分となってお

北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻感覚器病学講座耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野 教授

Key words ムンプス 感音難聴 予防接種

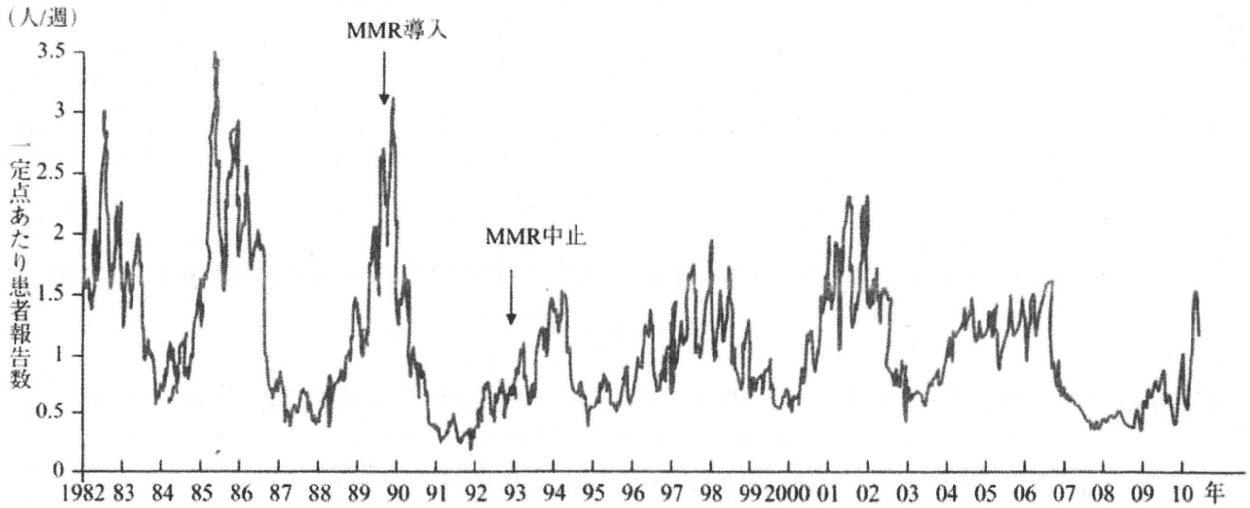


図1 流行性耳下腺炎患者報告数の推移(感染症発生動向調査:2010年8月15日現在報告数)

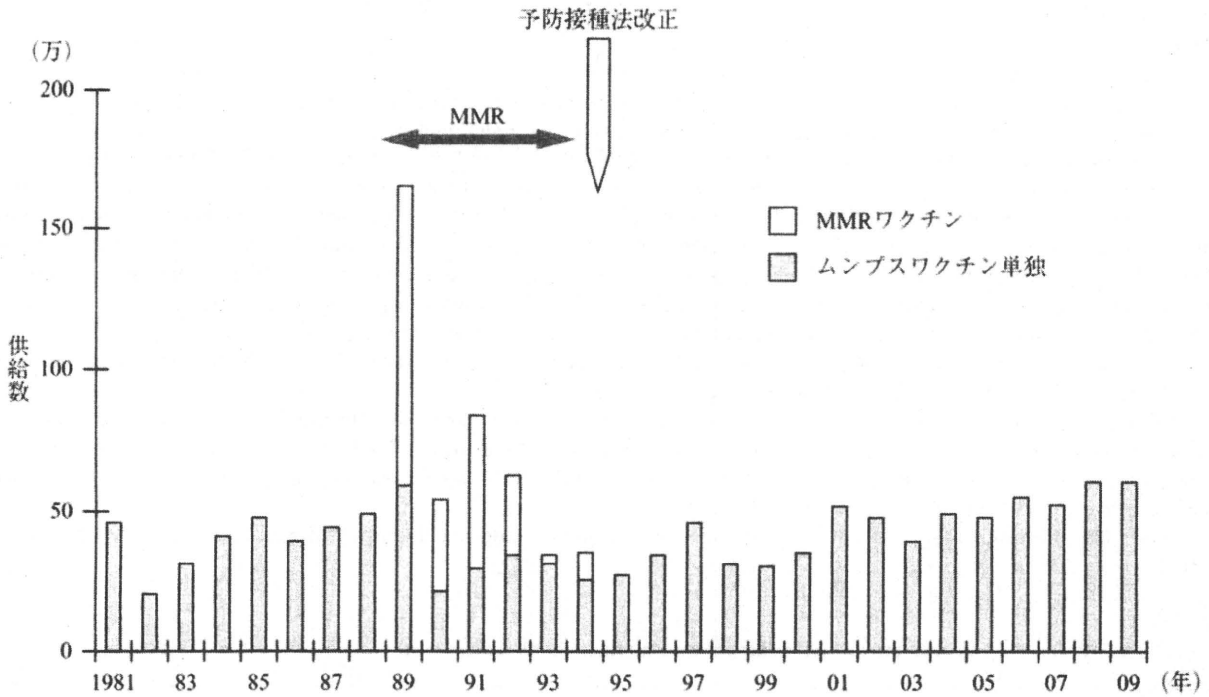


図2 ムンプスワクチン供給数(厚生省医薬食品局)

り(図2)一考が必要である。

1998年時点でのムンプスウイルスを含むワクチン、例えばMMRワクチンなど(MCV:mumps containing vaccine)の定期接種が行われている国は82カ国であり、世界の国の38%となる。これらの国のうち、1回接種が52カ国、2回接種が30カ国であり、いわゆる先進国で、MCVの定期接種を行っていないのは日本とフランスの2カ国だけである。ムンプスによる難聴は

一般的に予後が悪いとされるが、他の感音難聴と異なり明らかにワクチン接種で予防が可能である。ワクチン接種に伴いある確率で起こる、やむをえない副作用・合併症をどのように考えるかは非常に難しい問題であるが、難聴の予防という点からわれわれ耳鼻咽喉科医もウイルス感染症流行の把握、予防接種の実態にも注意を払うべきである。

Local hypothermia in the treatment of idiopathic sudden sensorineural hearing loss

Naohito Hato^{*}, Jun Hyodo, Shoichiro Takeda, Daiki Takagi, Masahiro Okada,
Nobuhiro Hakuba, Kiyofumi Gyo

Department of Otolaryngology, Ehime University School of Medicine, Shitsukawa Toon City, Ehime 791-0295, Japan

Received 14 July 2009; accepted 21 January 2010
Available online 18 February 2010

Abstract

Objective: The additive effects of local hypothermia and restricted activity in the treatment of idiopathic sudden sensorineural hearing loss (ISSHL) were investigated by case-matched study as a multicenter (13 hospitals) pilot trial.

Patients and methods: In a preliminary experiment, we evaluated the effects of cooled water pillow (15 °C). Cooling the neck and mastoid with the pillow decreased the tympanic membrane temperature for 1.4 °C in 2 h without causing uncomfortable sensation or frostbite. In this study, 86 patients with ISSHL were enrolled in the hypothermic group, which received hypothermic treatment with restricted activity in addition to medication, and 86 ISSHL patients constituted the control group, which received the same medication but without cooling and rest. Control patients were selected retrospectively from case records by matching the experimental patients with respect to age, gender, days until the start of treatment, hearing loss, shape of the audiogram, and accompanying vertigo. The patients in the hypothermic group were admitted and treated with a cooled water pillow for 48 h, in addition to conventional drug treatment (e.g., 60 mg of prednisone) for 7 days. The water pillow was cooled to 15 °C and was changed 4–5 times per day. The patients used the water pillow for the first 48 h after admission, with restricted activity. The control patients received only the medications.

Results: Hearing results were evaluated using criteria proposed by the Sudden Sensorineural Hearing Loss Research Group of the Japanese Ministry of Health and Welfare. The recovery rates were judged 6 months after onset. The recovery rate in the hypothermic group was significantly ($p < 0.05$) better than that in the control group. When the comparison was limited to younger patients, the use of the cooled water pillow was effective in facilitating the recovery of hearing.

Conclusions: Hearing restoration in ISSHL may be improved by adding mild hypothermia and restricted activity to the conventional treatment.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Local hypothermia; Cooling therapy; Idiopathic sudden sensorineural hearing loss

1. Introduction

Idiopathic sudden sensorineural hearing loss (ISSHL) usually presents as an acute idiopathic unilateral deafness. It affects 27,000 patients annually in Japan and involves otherwise healthy people, mainly between 50 and 60 years of age [1]. Various therapeutic options have been attempted, both alone and in combination; these include steroids, vasodilators, diuretics, anticoagulants, contrast medium, and

carbogen inhalation. According to recent double-blind randomized control studies [2–4], no specific agent or treatment dramatically restored hearing in this disease. The natural course of ISSHL is fairly good, although the rate of complete recovery remains 24–63% [5] even when treatment starts within 14 days after onset. Better treatment modalities are needed to improve the results, especially in cases of severe hearing loss.

The etiology of ISSHL remains unknown; theoretical causes of ISSHL include viral infection [6,7], immune-mediated disorder [8,9], rupture of the labyrinth membrane, and disturbed vascular circulation [10,11]. Given that ISSHL

^{*} Corresponding author. Tel.: +81 89 960 5366; fax: +81 89 960 5368.
E-mail address: nhato@m.ehime-u.ac.jp (N. Hato).

occurs suddenly without any preceding signs or symptoms, we believe that an acute interruption of the blood supply to the inner ear is the primary cause of ISSHL. Previously, we showed that occluding both labyrinthine arteries for 15 min caused profound deafness and a substantial loss of hair cells in Mongolian gerbils [12]. We found that post-ischemic hypothermia could reduce the profound cochlear damage induced by transient ischemia in the animal model [13]. Recent studies of ischemic damage in the brain have proven hypothermia to be effective for preventing the sequelae of ischemia-induced brain damage. These findings suggest that reducing the cochlear temperature may prevent the progression of hearing loss; however, the effects of hypothermia in ISSHL remain unclear.

The present study evaluated the effect of hypothermic treatment with restricted activity, when applied as an adjunct to conventional treatment, on the recovery of hearing in ISSHL.

2. Background and preliminary experiments

Unlike in other organs, localized cooling of the inner ear is technically difficult. The inner ear is located deep in the skull, within the pneumatic mastoid cavity, and is nourished solely by the labyrinthine artery, a branch of the basilar artery. Irrigation of the external ear canal with cool water decreases the temperature in the inner ear, but it causes severe rotational vertigo. Therefore, indirect procedures such as cooling a wide area of the neck and mastoid would be more suitable for clinical application. We used a cooled water pillow to reduce the inner ear temperature. The effects of a cooled pillow on body temperature and sleep have been studied extensively. Kawabata and Tokura [14] showed that the use of a pillow filled with a special cool medium consisting of sodium sulfate and ceramic fiber significantly lowered the forehead skin temperature and heart rate during sleep at night. They noted that mild cooling of the head decreased wakefulness at night and induced deeper sleep. Okamoto-Mizuno et al. [15] demonstrated that a cooled pillow decreased the temperature of the tympanic membrane, which is correlated with the temperature of the inner ear [16].

Therefore, we evaluated the effectiveness of using a cooled water pillow to reduce the ear canal temperature in seven volunteers, 29–48 years old, including six males and one female. A water pillow was filled with water at 15 °C, as this temperature is not thought to cause frostbite. The subject was asked to lie on a bed in the supine position with the pillow behind the neck and mastoid on one side. Using an ear thermometer (MC510, Omron), the tympanic membrane temperature was measured every 10 min for 2 h. The axillary temperature was monitored as a control. Fig. 1 shows the changes in the tympanic membrane temperature over time. With the water pillow, the tympanic membrane temperature decreased by 1.4 °C in the seven subjects, from an average of 36.5 °C to 35.1 °C, while the axillary temperature remained

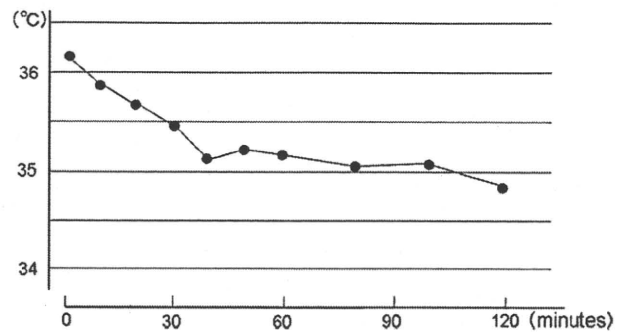


Fig. 1. Changes in the tympanic membrane temperature after using water pillow filled with water at 15 °C. Subject was asked to lie on a bed in the supine position with the pillow behind the neck and mastoid on testing side. The tympanic membrane temperature was decreased by 1.4 °C at 2 h after the local cooling.

stable. In two subjects, the temperature was monitored for 48 h. They were asked to stay in bed as much as possible but were allowed free access to a bathroom and to a bedside table for eating. The temperature decrease remained within the range of 1.0–1.5 °C for the 48 h. Encouraged by this result, we conducted the following clinical trial as a pilot study.

3. Patients and methods

The effects of hypothermia and restricted activity in the treatment of ISSHL were evaluated using a case-matched study, as a blind-control study was impossible for this experiment. Between April 2006 and January 2008, we recruited 86 patients with ISSHL at 13 public and private hospitals in Japan, including Ehime University Hospital, who met the following selection criteria: (a) older than 15 years of age, (b) hearing loss of more than 40 dB in pure tone average, (c) excluded acute low-tone sensorineural hearing loss, (d) treatment initiated within 14 days after onset, (e) accepted treatment by being admitted to a hospital, (f) followed until complete recovery or longer than 6 months, and (g) no systemic disease or contraindications to steroid use, including diabetes, peptic ulcer, pregnancy, and psychosis. These patients constituted the hypothermic group. As the control group, another 86 patients were selected by using case records to find patients matching those in the hypothermic group with respect to age, gender, starting day of treatment, hearing loss, shape of the audiogram, and accompanying vertigo. Detailed profiles showing the similarities between the hypothermic and control groups are presented in Table 1. In the hypothermic group (40 males and 46 females), patient age ranged from 15 to 82 years (mean, 59.9 years), the average time between the onset of hearing loss and the start of treatment was 3.7 days, and the average hearing level was 73.8 dB for the pure tone average of five frequencies (0.5, 1, 2, 4, and 8 kHz). No significant difference in age was found between the hypothermic group and the control group. Furthermore,

Table 1
Characteristics of two groups with or without cooled water pillow.

	Hypothermic group (n = 86)	Control group (n = 86)
Average age (years old)	59.9	59.0
Age range (years old)	15–82	18–78
Average hearing level (dB)	73.8	73.6
Period between onset and initial treatment (days)	3.7	4.2

there were no statistical differences in average hearing level, or the period from onset and the initial treatment between the two groups. The data were analyzed statistically using Mann–Whitney test.

As many studies have indicated that steroids are effective for restoring hearing in ISSHL, ethical considerations dictated that all of the patients in both groups be treated with steroids. Each patient received 60 mg of prednisone for 3 days, which was tapered subsequently over 7 days, and 60 mg of ATP plus 150 mg of methylcobalamin for 7 days. In the hypothermic group, hypothermia was applied by placing a cooled (15 °C) water pillow behind the neck and ipsilateral mastoid while the patient was in the supine position in bed. The patients used the water pillow for 48 h after hospital admission, and the water pillow was changed 4–5 times per day, as needed. The patients were asked to stay in bed as much as possible during the 48 h. They were allowed to free access to a bathroom, although bathing was not permitted. Great care was taken to avoid skin damage, which can result from long exposure to hypothermia below 15 °C. The control group was treated with the same drug regimen but not with a cooled water pillow and rest.

The hearing results were evaluated using the criteria proposed by the Sudden Sensorineural Hearing Loss Research Group of the Japanese Ministry of Health and Welfare [17]. At 6 months after the onset of ISSHL, each patient's hearing was evaluated as complete recovery, substantial recovery, slight recovery, or unchanged. Complete recovery was defined as hearing level recovered within 20 dB at five frequencies (0.5, 1, 2, 4, and 8 kHz) or hearing level recovered to that of the intact ear. Substantial recovery, slight recovery and unchanged were defined as more than 30 dB improvement in average hearing level at the five frequencies, 10–29 dB improvement of the average hearing level, and within 10 dB improvement of the average hearing level, respectively. The data were also analyzed by grading the degree of hearing loss based on the pure tone average of five frequencies (0.5, 1, 2, 4, and 8 kHz), as follows: grade 1 (<40 dB), grade 2 (40 to <60 dB), grade 3 (60 to <90 dB), and grade 4 (90+ dB). Possible complications related to the use of the cooled water pillow were also evaluated. The data were analyzed statistically using the χ^2 test or Fisher's test.

4. Results

No side effects related to the use of the cooled water pillow were noted. Most of the patients in the hypothermic

group stated that the cool pillow made them feel sleepy and comfortable.

Fig. 2 summarizes the hearing results in the two groups. The complete recovery rate was 41.9% in the hypothermic group (n = 86) and 25.6% in the control group (n = 86). The recovery rate (*i.e.*, complete recovery plus substantial recovery) differed significantly ($p < 0.05$) between the hypothermic (65.1%) and control groups (50.0%).

For patients treated within 24 h after onset, the complete recovery rates were 48.1% and 34.5% in the hypothermic (n = 27) and control groups (n = 29), respectively, and the recovery rates were 63.0% and 51.7%, respectively. These rates were not significantly different between the two groups. Similar results were seen for patients who were treated more than 2 days after onset.

The rates were also compared according to the degree of hearing loss. Among those with mild hearing loss (grades 1 and 2), the recovery rates were 47.8% (n = 23) and 34.8% (n = 23) in the hypothermic and control groups, respectively, and the respective complete recovery rates were 47.8% and 30.4%; the differences in rates were not statistically significant. For those with severe hearing loss (grades 3 and 4), the recovery rates were 52.3% (n = 63) and 40.1% (n = 63) in the hypothermic and control groups, respectively, and the respective complete recovery rates were 39.7% and 23.8%; the differences in these rates were not statistically significant.

The rates in patients older than 60 years also did not differ significantly between the hypothermic and control groups; the respective recovery rates were 60.8% and 53.5%, and the respective complete recovery rates were 37.2% and 25.6%. The complete recovery rate in patients younger than 59 years did not differ significantly between the hypothermic (48.6%) and control groups (25.6%). However, the recovery rate in

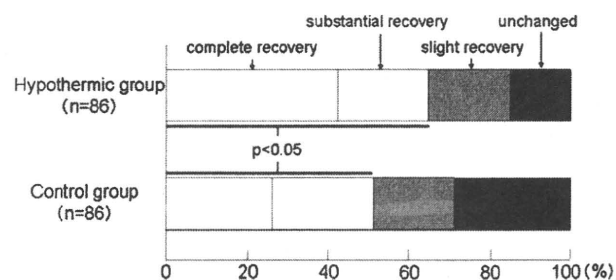


Fig. 2. Hearing results in local hypothermic group and control group. The recovery rate (*i.e.*, complete recovery plus substantial recovery) differed significantly ($p < 0.05$) between the hypothermic (65.1%) and control groups (50.0%).

patients younger than 59 years was significantly ($p < 0.05$) different between the hypothermic (71.4%) and control groups (46.5%). Thus, hypothermia and restricted activity was effective in helping to restore hearing in younger patients.

5. Discussion

Hypothermia is a proven strategy for preventing ischemia-induced damage and is currently applied clinically in various fields, including brain and cardiac surgery. Although deep hypothermia causes complications such as reduced blood flow, increased bacterial infection, and decreased cellular immunity [18], mild hypothermia (lowering the body temperature by 1–2 °C) was recently shown to be effective in preventing ischemic damage to the brain [19,20] and in facilitating the recovery of comatose survivors of cardiac arrest [21]. Mild hypothermia also reduced damage to the cochlea upon electrode insertion in cochlear implants or from exposure to loud noise [22,23]. However, no report has addressed the effect of hypothermia in ISSHL. Here, we demonstrated that some patients treated with a cooled pillow and rest in addition to drugs achieved better recovery of hearing, compared with patients treated only with drugs. Although the effects were limited, our findings are promising and warrant further studies investigating the best indications, optimal conditions, and appropriate medication for the treatment of ISSHL using mild hypothermia.

Historically, cooled water pillows have long been used in the palliative treatment of febrile disease. Another advantage of a cooled pillow is that it often causes a sleepy sensation by reducing brain function, and sleep may facilitate recovery from disease. We consider a water pillow to be an easy, inexpensive, and safe way of inducing mild hypothermia in the ear. This therapeutic option may be acceptable even to pediatric patients. Further clinical study in a large population is necessary to confirm the efficacy of mild hypothermia and restricted activity in the treatment of ISSHL.

The beneficial effects of hypothermia in preventing ischemic injury can be attributed to various mechanisms, including decreased metabolic rate, reduced tissue oxygen consumption, decreased metabolic acidosis, suppressed calcium influx into neurons, and reduced production of superoxide anion radicals. Recent experimental studies on brain ischemia have suggested that reduced glutamate toxicity is an important mechanism underlying the protective effects of hypothermia. Glutamate released from the ischemic core flows into the surrounding region, where it is toxic to neuronal tissues. The neuroprotective efficiency of hypothermia was influenced by the varying levels of age-related glutamate release [24]. Therefore, hypothermia was especially effective in younger patients. As glutamate is a neurotransmitter at the synapses between the inner hair cells

and primary afferent auditory neuron, it is released extensively in ischemia/reperfusion injury of the inner ear. Hyodo *et al.* [25] showed that hypothermia can reduce glutamate efflux into the perilymph and prevent ischemic neural damage that would otherwise spread in the inner ear. As mild hypothermia works non-specifically, it may be useful in the treatment of various causes of sensorineural hearing loss, including aminoglycoside ototoxicity, traumatic inner ear damage, and noise-induced hearing loss.

6. Conclusion

Hypothermic therapy is widely accepted in many fields of medicine, although its clinical application in the treatment of ISSHL has never been tested. We investigated the effects of mild hypothermia with restricted activity in the treatment of ISSHL by cooling the ear using a water pillow. In this pilot study, mild hypothermia and restricted activity was effective in helping to restore hearing in patients with severe hearing loss and in patients younger than 59 years. Although the effects were limited in some patients, we believe that the use of a cooled water pillow in the treatment of ISSHL is a promising approach with no apparent side effects.

Acknowledgement

This study was supported by KAKENHI (20390442) from the Ministry of Education, Science, Sports, Culture, and Technology of Japan.

References

- [1] Nakashima T, Itoh A, Misawa H, Ohono Y. Clinicoepidemiologic features of sudden deafness diagnosed and treated at university hospitals in Japan. *Otoraryngol Head Neck Surg* 2000;123(5):593–7.
- [2] Kronenberg J, Almagor M, Bendet E, Kushnir D. Vasoactive therapy versus placebo in the treatment of sudden hearing loss: a double-blind clinical study. *Laryngoscope* 1992;102:65–8.
- [3] Probst R, Tschopp K, Ludin E, Kellerhals B, Podvinec M, RudlfPfaltz C. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of dextran/pentoxifylline medication in acute acoustic trauma and sudden hearing loss. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1992;112:435–43.
- [4] Tucci DL, Farmer JC, Kitch RD, Witsell DL. Treatment of sudden sensorineural hearing loss with systemic steroids and valacyclovir. *Otol Neurotol* 2002;23:301–8.
- [5] Kanzaki J, Inoue Y, Ogawa K, Fukuda S, Fukushima K, Gyo K, et al. Effect of single-drug treatment on idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Auris Nasus Larynx* 2003;30(2):123–7.
- [6] Schuknecht HF, Benitez J, Beekhuis J, Igarashi M, Singleton G, Ruedi L. The pathology of sudden deafness. *Laryngoscope* 1962;72:1142–57.
- [7] Schuknecht HF, Kimura RS, Naufal PM. The pathology of sudden deafness. *Acta Otolaryngol* 1973;76:75–97.
- [8] Cadoni G, Fetoni AR, Agostino S, De Santis A, Manna R, Ottaviani F, et al. Autoimmunity in sudden sensorineural hearing loss: possible role of anti-endothelial cell autoantibodies. *Acta Otolaryngol* 2002;548:30–3.