

201446012A

厚生労働科学研究委託費

障害者対策総合研究事業（障害者対策総合研究開発事業（感覚器障害分野））

老人性難聴に対する詳細な聴取評価法と聴覚認知訓練の開発

平成26年度 委託業務成果報告書

研究代表者 **山 唄 達 也**

平成27（2015）年3月

本報告書は、平成26年度厚生労働科学研究委託事業
（障害者対策総合研究事業（障害者対策総合研究開
発事業））による委託業務として、東京大学が実施
した「老人性難聴に対する詳細な聴取評価法と聴覚
認知訓練の開発」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費

障害者対策総合研究事業（障害者対策総合研究開発事業（感覚器障害分野））

老人性難聴に対する詳細な聴取評価法と聴覚認知訓練の開発

平成 26 年度 委託業務成果報告書

研究代表者 山 唄 達 也

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

老人性難聴に対する詳細な聴取評価法と聴覚認知訓練の開発に関する研究

----- 1

山唄達也

資料) 各年齢層における騒音下s67式語音検査の成績及び聴力像

長文節文章聞き取り成績

若年健聴者を対象とした事象関連電位

リハビリトレーニングプログラム画像

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 目的文節数文章の抽出プログラム作成に関する研究

----- 7

小町守

III. 学会等発表実績

----- 9

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 11

老人性難聴に対する詳細な聴取評価法と聴覚認知訓練の開発に関する研究

研究代表者 山嵜 達也 東京大学耳鼻咽喉科教授

研究要旨

老人では末梢性の聴覚障害のほかに、音信号の分析・抽出・認知・記憶・理解といった中枢における聴覚処理の障害が大きく影響していることが明らかとなっている。しかしながら、これらを評価する手法や、中枢聴覚処理への治療的アプローチを行った穿孔研究は本邦にはない。このような背景から本研究では、中枢聴覚機能の評価方法の開発及び、中枢聴覚機能のリハビリ・トレーニングを目的としたハード・ソフト両面の開発に取り組んだ。中枢聴覚機能の評価方法として、雑音下における67s式語音聴取能検査・長文節聞き取り検査・事象関連電位検査を確立した。リハビリトレーニングのプログラムとしてはiPadを用いたゲーム形式のプログラムを作成し、音の変化弁別・音の途切れの判別・複雑な構文を判別する訓練を組み入れた。来年度はこれら検査・プログラムを被験者対象に施行することで、基準値の確定を行う予定である。雑音下67s式語音聴取能検査ではすでに一部データを取得しており、加齢に伴い騒音下での聴取能が悪化する傾向が認められており、検査としての有用性が期待される。

山嵜 達也

国立大学法人東京大学
耳鼻咽喉科教授

A. 研究目的

本邦の高齢者難聴有病者数は1655万人と推測され（内田ら、2013）、老人性難聴に対する対策は重要な課題である。老人性難聴では「音は聞こえるが、内容が聴きとれない。特に雑音下での聞き取りが困難」という特徴がある。老人性難聴では末梢聴覚障害による聴覚閾値上昇に加え、中枢聴覚処理の障害が会話聴取に大きく影響する。会話聴取では内耳からの信号を聴覚神経回路で迅速に処理し、併存する環境音（雑音）から必要な会話情報を抽出・理解することが求められ、会話情報への注意・一連の情報の保持といった記憶・認知作用も重要な役割を果たす。老化に伴い聴覚神経回路における伝達速度・刺激回復時間などの機能低下が起こるため、雑音下など複雑な音入力変化に処理が対応できなくなり、さらに記憶・認知機能の低下も起こるため、会話情報の保持・理解が一層困難になる。

老人性難聴への治療戦略として、末梢聴覚障害に対しては騒音曝露や酸化ストレスの予防、抗酸化物質の摂取などが予防として提唱され（Yamasoba et al. *Hear Res* 2013）、内耳再生医療・ハイブリッド型人工内耳の適応拡大などの研究も進められている。一方中枢聴覚処理について、神経の可塑性に着目したトレーニングが海外で報告されてきており、聴覚を用いた認知トレーニングが高齢者の聴覚の維持・回復の手段として有効であると示唆されている。最近Andersonら（PNAS, 2013）が高齢者を対象に聴覚を用いた認知トレーニングを行い、対照群と比べ騒音下での聴覚神経反応が速くなり、聴取成績が向上すると報告した。残念ながら本邦では中枢聴覚処理が重要であることは認知されているが、その評価法は確立されておらず、また中枢聴覚のリハビリに対する取り

組みはない。聴取能の評価では単音節による語音聴取能検査がまだ本邦では主流であるが、このような単純課題では中枢聴覚機能の評価することはできない。聴覚を用いた認知トレーニングは本邦にはなく、言語的な違いから海外のプログラムの直接導入は不可能である。

このような背景から本研究では本邦独自の日常生活を反映する聴覚機能の評価法および中枢聴覚機能の強化を目的とした聴覚を用いた認知トレーニングを開発することを目的とした。

B. 研究方法

1. 中枢聴覚機能の評価方法の開発

中枢聴覚機能の評価方法として、下記3項目を検討する。

1-1 雑音下におけるs67式語音聴取能検査

通常臨床において使用しているs67式語音聴取能検査の検査音にスピーチノイズを挿入し、ノイズの大きさに伴うその正答率を評価した。静寂下において正答率が最高となる音圧を用いて、S/N比+10より開始し正答率を測定する。その後正答率が20%をきるまでS/N比を5dBずつ下げてゆき、S/N比と正答率の関係を被験者の年齢に応じて解析する。

1-2. 長文節文章聞き取り検査

長文節の文章・音声を作成するに当たり日本音響学会 新聞記事読み上げ音声コーパス（JNAS）を用いた。JNASは新聞記事文16176文を306名の話者により録音した音源である。この音源より、5～7文節という比較的長文の文章を抽出するプログラムを作成・抽出を行う。抽出した文章の聞き取りを若年健聴者・高齢者に対して施行し、正答率を比較する。

1-3. 事象関連電位の測定

2種類の異なった音刺激を連続して聞かせ、

経頭皮的に脳電位変化を測定した。健聴者を対象に様々な音刺激を聞かせることで電位変化の測定を試みた。

2. 中枢聴覚機能リハビリ・トレーニングプログラムの開発

高齢者でも操作性がよく、かつプログラム開発も容易なApple社のi-Padをインターフェースとして採択し、開発を行った。

(倫理面への配慮)

開発した評価方法、リハビリプログラムを被験者を対象として行うに当たり、次のようなことを行う旨を、東京大学倫理委員会へ届け出、承認を得た。1. 対象者には事前にインフォームドコンセントを行い、同意書を得る。2. 被験者資料については連結可能な匿名化を行い、対応表を厳重に管理する。データは施錠可能なロッカーあるいは外部と接続しないパスワードのかかったコンピュータに保管する。3. 研究結果の発表においても、個人が特定できない形で行う。

C・D. 研究結果及び考察

1-1. 雑音下におけるs67式語音聴取能検査

現在までに、49名のデータを取得した。感音難聴では静寂下での最高語音明瞭度が80%以上の耳に絞ると、若年者ではS/N=10dBまでは比較的正確率が保たれるのに対して、高齢者ではS/N=10dBより正確率の大幅な低下が認められた。(図1参照) これらは高齢者の認知機能低下の要因を反映していることが考えられる。しかしながら、各年齢層の聴力図を比較すると高齢群の方で聴力が悪い症例が多く含まれる傾向もあり(図1参照)、若年層・難聴者、高齢群・健聴者のデータを積極的に収集して解析してゆく必要があると考えられた。

1-2. 長文節文章聞き取り検査

コーパスより長文節文章を抽出するプログラムを完成した。ここより試験的に5文節、6文節、7文節の文章を抽出し、健聴者対象に施行した(図2)。文節数によっても難易度は異なるが、文節における単語の難易度も影響があることが推測された。今後候補対象とする文章を増やし、正確率を検討することで、検査として適切な文章を選択することができると考えられた。

1-3. 事象関連電位の測定

事象関連電位の測定システムを完成させた。完成したシステムを用いて、a-o, u-iの音声におけるACCを健聴者を対象に計測できることを確認した(図3)。今後刺激音を変更(母音・母音、母音・子音、後続母音が同一の子音など)し電位の変化の確認を行うとともに、高齢者を対象に同様の刺激に対する電位の変化を確認する予定である。

2. 中枢聴覚機能リハビリ・トレーニング

プログラムの開発

音高変化の弁別を行う課題、音の途切れ(Gap)の弁別を行う課題を基礎的な訓練プログラムとして、複雑な構文(～している～が～を～した)を実践的なプログラムとして聞き、それに合う絵を選択するプログラムを作成、ゲーム形式で行えるようにした(図4)。得られたデータはネットを介して回収も将来的には可能であり、プログラムをネットで配布することで全国から膨大なデータの集積も可能となりうる。難易度はその正答率に応じて上昇するプログラムとなっており、継続して訓練が可能なものになっている。今後順次被験者を募集し施行しプログラムをかりようしていく予定である。

E. 結論

中枢聴覚機能を評価するための検査方法及び中枢聴覚機能のリハビリプログラムの基本的骨格を作製した。今後被験者を対象に検査及びプログラムを行い、その質を高めてゆく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Suzuki M, Sakamoto T, Kashio A, Yamasoba T. Age-related morphological changes in the basement membrane in the stria vascularis of C57BL/6 mice. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology in press*.
- Fujimoto C, Yamasoba T. Oxidative stresses and mitochondrial dysfunction in age-related hearing loss. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;582849.
- 山嵜達也, 越智 篤: 聴覚に関わる社会医学的諸問題「加齢に伴う聴覚障害」. *Audiology Japan* 571: 52-62, 2014
- 山嵜達也. 耳鼻咽喉科のアンチエイジング. 老人性難聴の予防. *Therapeutic Research* 35:808-810, 2014
- 山嵜達也. 聴覚のアンチエイジング. 女性の聴覚を保つには. *Modern Physician* 34:1287-1290, 2014
- 山嵜達也. 難聴の基礎と臨床, *Anti-aging medicine* 10:916-924, 2014
- Ochi A, Furukawa S, Yamasoba T. Factors that account for inter-individual variability of lateralization performance revealed by correlations of performance among multiple psychoacoustical tasks. *Frontiers in Neuroscience*; *Front Neurosci*. 2014 eCollection
- Amemiya K, Karino S, Ishizu T, Yumoto M, Yamasoba T. Distinct neural mechanisms of tonal processing between musicians and non-musicians. *Clin Neurophysiol*. 2014;125:738-47.

2. 学会発表

伊藤 健. 「純音閾値モデル」を使用した聴力検査(マスキング)法の量的評価の試み. 日本聴覚医学会総会・学術講演会, 11.27-28, 2014. 下関

Akinori Kashio, Viral Tejani, Rachel Schepeler, Carolyn

Brown, Paul Abbas. Exploring the Source of Neural Responses in Cochlear Implant Users. The Annual Scientific and Technology Conference of the American Auditory Society. 3.6-8, 2014. USA.

樫尾 明憲, 尾形 エリカ, 赤松 裕介, 柴崎 仁志, 岸本 めぐみ, 松本 有, 坂本 幸士, 狩野 章太郎, 柿木 章伸, 岩崎 真一, 山嵜 達也. 日本語版 UW-CAMP 音楽聞き取り評価テスト(J-CAMP)の作成. 日本耳鼻咽喉学会総会・学術講演会. 5.14-17,2014. 福岡

樫尾 明憲, 尾形 エリカ, 赤松 裕介, 狩野 章太郎, 柿木 章伸, 岩崎 真一, 山嵜 達也. University of Iowa における人工内耳患者の聴力レベルと術後成績. 日本聴覚医学会総会・学術講演会. 11.27-28, 2014. 下関

狩野 章太郎, 山嵜 達也. 両耳間位相差の知覚に対する注意の影響. 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会. 5.14-17,2014. 福岡

Karino S, Joris PX A Cochlear Origin for Binaural Time and Phase Delay? Inner Ear Biology Workshop 2014 in Kyoto. 11.1-4, 2014. Kyoto, Japan.

狩野章太郎 赤松裕介 越智篤 山嵜達也. 雑音負荷時の子音聴取一信号音源と雑音音源の空間的配置との関連 第3報 日本聴覚医学会総会・学術講演会. 11.27-28, 2014. 下関

山嵜達也. 加齢に伴う聴覚障害. 第59回日本聴覚医学会 11.27-28, 2014. 下関

山嵜達也. 老人性難聴の予防と治療. ラジオ日経「医学講座」 12.18, 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

資料

図1 各年齢層における騒音下 s67 式語音検査の成績及び聴力像

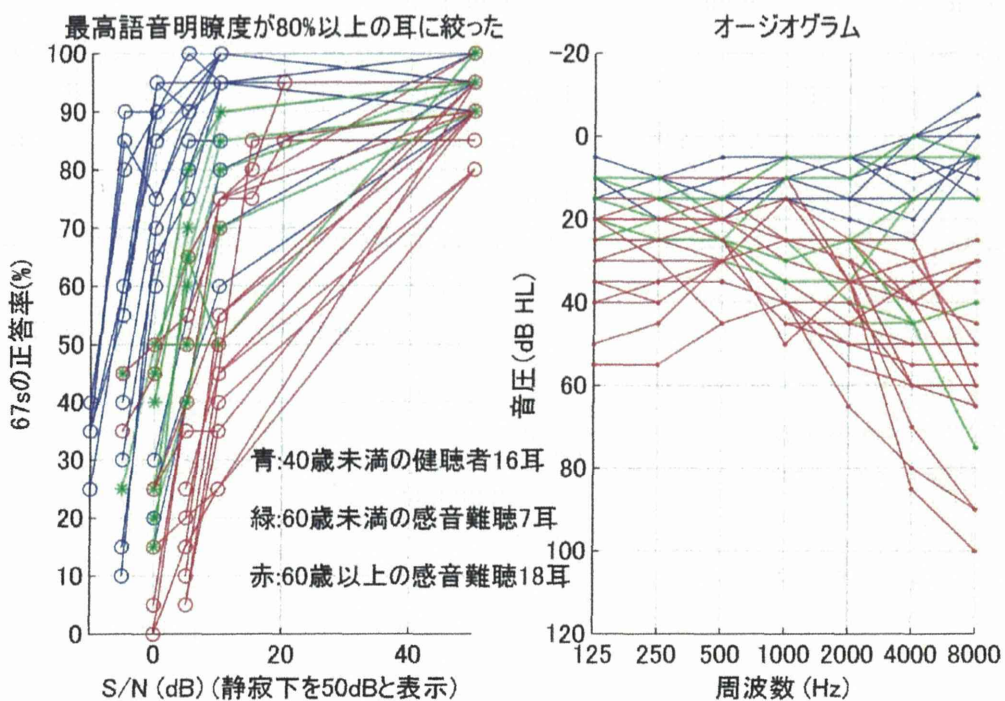


図2 長文節文章聞き取り成績 (健聴者 6名の平均値)

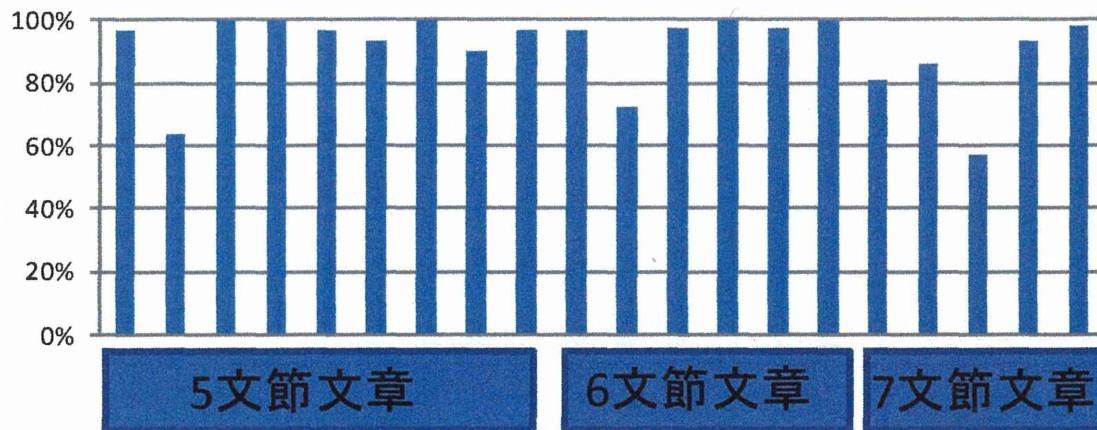


図3 若年健聴者を対象とした事象関連電位

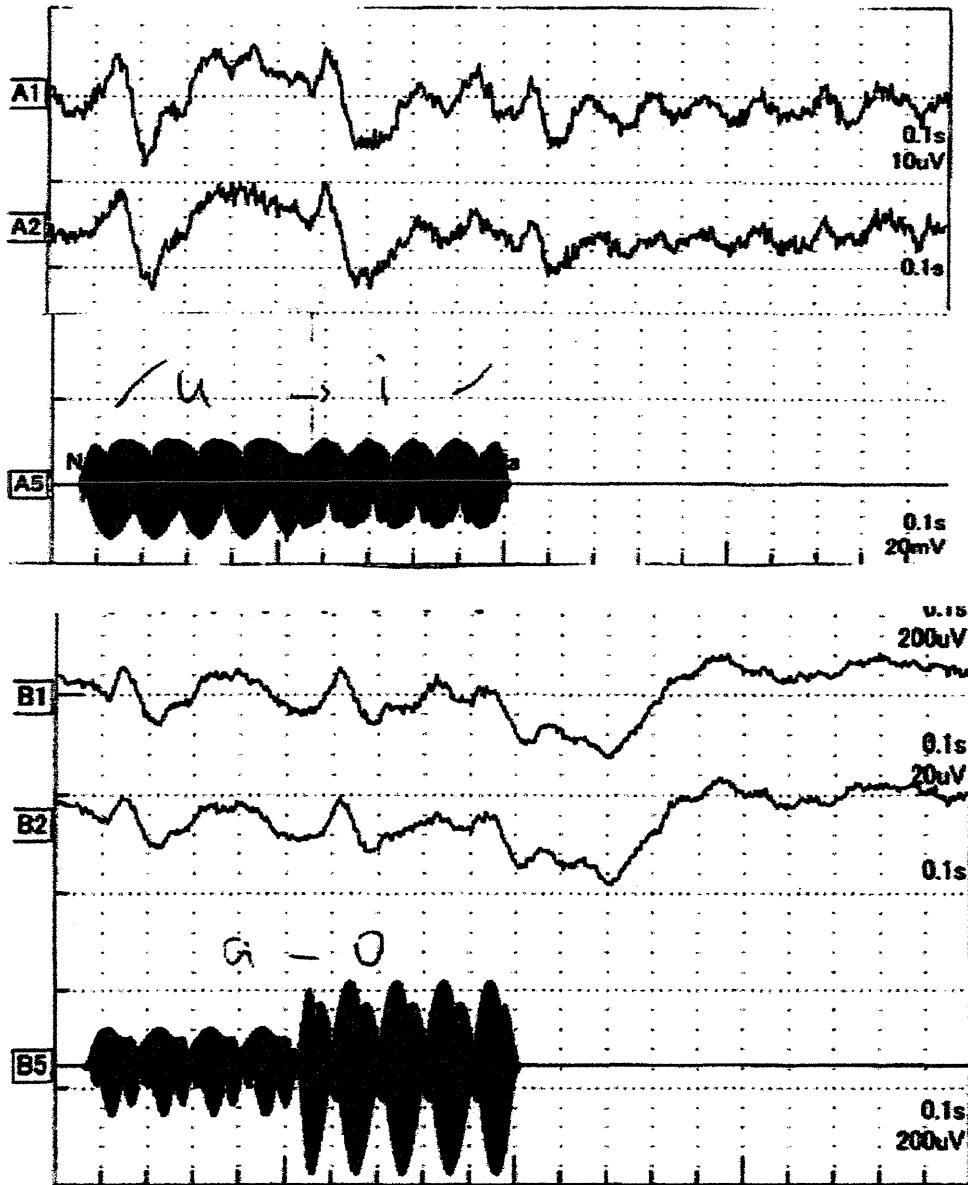
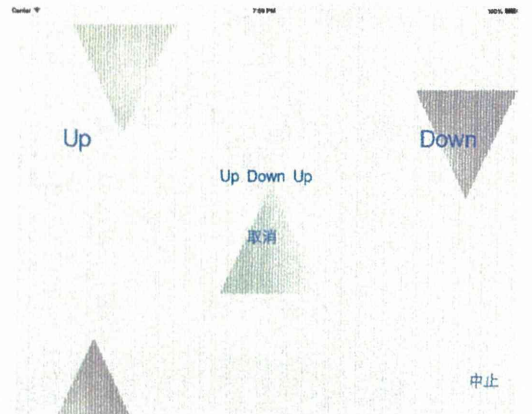


図4 リハビリトレーニングプログラム画像



目的文節数文章の抽出プログラム作成に関する研究

業務主任者又は担当責任者 小町守 首都大学東京システムデザイン学部准教授

研究要旨

長文節文章の聴取検査は、中枢聴覚機能を反映させることが期待される。長文節文章の聴取検査を作成するに当たり、長文節の文章及びその音声を多数収集する必要がある。今回我々は、日本語係り受け解析器 CaboCha を用い音声コーパスより目的の文節数の文章を抽出するプログラムを作成した。本プログラムにより、指定した文節数の文章及び音声をコーパスより抽出することが可能となった。

A. 研究目的

老人では末梢性の聴覚障害のほかに、音信号の分析・抽出・認知・記憶・理解といった中枢における聴覚処理の障害が大きく影響していることが明らかとなっている。しかしながら、従来の聴力検査では中枢における聴覚処理は測定が不可能であった。一般に文章の聴取は文節数が多くなるにつれ困難になる。これは文節数が増加するにつれ、単音節・単語レベルの聴取・理解に加え、それらを認知・記憶し総合的に理解する必要が出てくるためである。長文節文の聴取の検査は聴覚の中枢処理能力を反映することが期待される。長文節文章の聞き取り検査を作成するに当たり、長文節の文及びその音声を多数収集する必要がある。このような背景から今回、文章と音声のデータベースである、音声コーパスより各種文節数の文を抽出するためのプログラム開発を行った。

B. 研究方法

本研究で用いた日本音響学会新聞記事読み上げコーパス（JNAS コーパス）には単語境界が付与されているが、文節境界が付与されていないため、日本語文章から長文節文章を抽出するに当たって、以下のアルゴリズムを採用した。

日本語テキストに対して1文ずつ形態素解析（単語分割）および係り受け解析（文節境界推定）を行う。文節数をカウントし、指定した文節数の文章を抽出する。

抽出した文章のIDにより、文章データおよび音声データを対応づける。

プログラムはプログラミング言語 Python および Bash を用いて実装した。形態素解析には MeCab 0.996 (UniDic 2.1.2)、チャンキングには CaboCha 0.68 を用いた。CaboCha は MeCab の出力を入力とする前提で動作するため、JNAS コーパスに付与されている単語境界は使用せず、MeCab で付与した。

（倫理面への配慮）プログラムの作成であり被験者などの資料は扱わない。

C. 研究結果

前節で作成したアルゴリズムを（JNAS）に対して適用した。JNAS コーパスには16,178文が含まれ、5-7文節の文を抜き出し、5,322文が得られた。

実際に得られた文の例を以下に示す。

（5文節の文）

新 外国人 選手 の プレー が ファン の 注目 を 集め そう だ

（6文節の文）

米 国 の 復 興 援 助 に 加 え 朝 鮮 戦 争 特 需 の 神 風 も 吹 い た

（7文節の文）

場 合 に よ っ て は 衆 院 本 会 議 で の 同 法 案 の 趣 旨 説 明 を ボ イ コ ッ ト す る 構 え も 見 せ て いる

D. 考察

5-7文節の文を抽出することにより、コーパスの大きさが約1/3となったが、5,000文あれば聴取テスト作成には十分と考えられる。また、本研究で作成したプログラムは任意の文節数の文を抽出できるが、予備実験の結果5-7文節の文でも従来の聴取テストより難易度が高いと推測されるため、8文節以上のものは取り除いた。

一般に、形態素解析や係り受け解析は自動付与されるため、解析誤りが存在することが多いが、今回用いた日本語テキストが比較的整った文章である新聞記事であったため、形態素解析・係り受け解析誤りによる長文節文の抽出への影響は見られなかった。

一方、前節で例文を示したように、今回用いたコーパスが新聞記事の読み上げコーパスであるため、文節数が5-7文節でも比較的単語数の多い文章が含まれる。また、政治やスポーツの記事など、新聞に比較的多く見られるジャンルのテキストが多い。聴取テスト作成の際にはジャンルの影響を考慮する必要があると考えられるが、聴取テストに適したジャンルの音声コーパスはこういったものか、今後検討していく必要がある。

E. 結論

音声コーパスより指定した文節数の文章・音声を抽出するプログラムを作製した。

G. 研究発表

1. 論文発表

林部祐太, 小町守, 松本裕治. 述語と項の位置関係ごとの候補比較による日本語述語項構造解析. 自然言語処理, Vol. 21, No. 1, 3-26, 2014.

2. 学会発表

Budi Irmawati, Mamoru Komachi, Yuji Matsumoto. Towards Construction of an Error-Corrected Corpus of Indonesian Second Language Learners. 6th International Conference on Corpus Linguistics. 5.22-24, 2014. Spain

Yinchen Zhao, Mamoru Komachi and Hiroshi Ishikawa. Extracting a Chinese Learner Corpus from the Web: Grammatical Error Correction for Learning Chinese as a Foreign Language with Statistical Machine Translation. The 22nd Conference on Computers in Education. 11.30-12.4, 2014. Nara, Japan.

Kenichi Ohwada, Ryosuke Miyazaki and Mamoru Komachi. Predicate-Argument Structure-based Preordering for Japanese-English Statistical Machine Translation. The 1st Workshop on Asian Translation. 10.4, 2014. Tokyo, Japan.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

III. 学会等発表実績

委託業務題目「老人性難聴に対する詳細な聴取評価法と聴覚認知訓練の開発に関する研究」

機関名 国立大学法人東京大学 山岨達也

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
「純音閾値モデル」を使用した聴力検査（マスキング）法の量的評価の試み。（口頭）	伊藤 健.	日本聴覚医学会総会・学術講演会	2014	国内
Exploring the Source of Neural Responses in Cochlear Implant Users.（ポスター）	Akinori Kashio, Viral Tejani, Rachel Scheperle, Carolyn Brown, Paul Abbas.	The Annual Scientific and Technology Conference of the American Auditory Society.	2014	国外
日本語版 UW-CAMP 音楽聞き取り評価テスト（J-CAMP）の作成。（口頭）	樫尾 明憲, 尾形 エリカ, 赤松 裕介, 柴崎 仁志, 岸本 めぐみ, 松本 有, 坂本 幸士, 狩野 章太郎, 柿木 章伸, 岩崎 真一, 山岨 達也.	日本耳鼻咽喉学会総会・学術講演会.	2014	国内
University of Iowaにおける人工内耳患者の聴力レベルと術後成績。（口頭）	樫尾 明憲, 尾形 エリカ, 赤松 裕介, 狩野 章太郎, 柿木 章伸, 岩崎 真一, 山岨 達也.	日本聴覚医学会総会・学術講演会.	2014	国内
両耳間位相差の知覚に対する注意の影響（口頭）	狩野 章太郎, 山岨 達也	日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会	2014	国内
A Cochlear Origin for Binaural Time and Phase Delay?（ポスター）	Karino S, Joris PX	Inner Ear Biology Workshop	2014	国外
雑音負荷時の子音聴取—信号音源と雑音音源の空間的配置との関連 第3報（口頭）	狩野章太郎 赤松裕介 越智篤 山岨達也	日本聴覚医学会総会・学術講演会.	2014	国内
加齢に伴う聴覚障害。（口頭）	山岨達也	日本聴覚医学会総会・学術講演会.	2014	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 （学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Age-related morphological changes in the basement membrane in the stria vascularis of C57BL/6 mice. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology	Suzuki M, Sakamoto T, Kashio A, Yamasoba T.	Eur Arch Otorhinolaryngol	in press	国外
Oxidative stresses and mitochondrial dysfunction in age-related hearing loss.	Fujimoto C, Yamasoba T.	Oxid Med Cell Longev.	2014	国外
聴覚に関わる社会医学的諸問題「加齢に伴う聴覚障害」	山嵜達也、越智篤	Audiology Japan	2014	国内
耳鼻咽喉科のアンチエイジング。老人性難聴の予防。	山嵜達也	Therapeutic Research	2014	国内
難聴の基礎と臨床	山嵜達也	Anti-aging medicine	2014	国内
Factors that account for inter-individual variability of lateralization performance revealed by correlations of performance among multiple psychoacoustical tasks.	Ochi A, Furukawa S, Yamasoba T.	Front Neurosci.	2014	国外
Distinct neural mechanisms of tonal processing between musicians and non-musicians.	Amemiya K, Karino S, Ishizu T, Yumoto M, Yamasoba T.	Clin Neurophysiol.	2014	国外
述語と項の位置関係ごとの候補比較による日本語述語項構造解析。	林部祐太、小町守、松本裕治。	自然言語処理	2014	国内

Age-related morphological changes in the basement membrane in the stria vascularis of C57BL/6 mice

Mitsuya Suzuki · Takashi Sakamoto ·
Akinori Kashio · Tatsuya Yamasoba

Received: 16 January 2014 / Accepted: 25 December 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Basement membrane anionic sites (BMAS) are involved in the selective transport of electrically charged macromolecules in cochlear capillaries. Using cationic polyethyleneimine (PEI), we examined age-related changes in BMAS in the cochleae of C57BL/6 mice. The mice were grouped according to age as follows: 3 days, 4 weeks, 8 weeks, 6 months, and 12 months. In the right bony labyrinths, widths of the stria vascularis were measured in paraffin-embedded sections using light microscopy. The left bony labyrinths were immersed in a 0.5 % cationic PEI solution and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections of the left cochlea were examined using transmission electron microscopy. A significant difference in stria vascularis width was observed between the 4-week-old and 12-month-old mice. The PEI distribution in the capillary and epithelial basement membranes (BMs) of the cochlea was observed. In all animals, PEI particles were evenly distributed in the capillary BM of the spiral ligament and in the subepithelial BM of Reissner's membrane. In the stria vascularis, PEI particles were evenly distributed in the capillary BM in 3-day-old mice. In 4- and 8-week-old mice, PEI particle sizes were markedly lower than those observed in 3-day-old mice. In 6- and 12-month-old mice, PEI particles were hardly detected in the stria capillary BM. In the stria capillary BM in these mice, the laminae rarae externa and interna disappeared, but the lamina densa

became larger. We speculated that age-related changes of stria capillary BMAS may affect electrically charged macromolecule transport systems in the stria vascularis of C57BL/6 mice.

Keywords Presbycusis · C57BL/6 mice · Stria vascularis · Basement membrane anionic sites · Polyethyleneimine · Transmission electron microscope

Introduction

The incidence of presbycusis, i.e., sensorineural hearing loss associated with aging, has increased as society has aged. Although presbycusis can be caused by cochlear dysfunction or retrocochlear disturbance, the main pathologic changes seem to occur in the stria vascularis and the organ of Corti [1].

The stria vascularis is a tissue compartment located in the mammalian cochlea and is composed of three main cell types (marginal, intermediate, and basal cells), with a dense capillary network in the intermediate cells. This structure is responsible for the development of large ion gradients between the endolymph and perilymph and maintains stable cochlear function. The spiral ligament plays important roles in maintaining cochlear fluid and ion homeostasis [2]. In addition, Reissner's membrane is also responsible for maintaining sodium ion gradients between the endolymph and perilymph [3].

Anionic sites have been detected on the glomerular and cochlear capillary basement membranes (BM) of rodents. Basement membrane anionic sites (BMAS) play an important role in the transport of charged macromolecular and ionic species [4–6]. Since polyethyleneimine (PEI) is a cationic tracer that electrically attaches to BMAS, assessment

M. Suzuki (✉)
Department of Otolaryngology, Toho University Sakura Medical Center, 564-1 Shimo-shizu, Sakura City, Chiba 285-0841, Japan
e-mail: misuzuki-iky@umin.ac.jp

T. Sakamoto · A. Kashio · T. Yamasoba
Department of Otolaryngology, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-Ku, Tokyo 113-8655, Japan

of PEI distribution is useful for evaluating BMAS changes in the inner ear and the glomerulus [4, 6, 7].

Although C57BL/6 mice are well known as a model of early-onset age-related hearing loss because of cadherin 23 mutations, an age-related morphological study in C57BL/6 mice also revealed atrophic changes in the stria vascularis and a reduced number of fibrocytes in the spiral ligament [8]. In gerbils, it was demonstrated that the BM of stria capillaries undergoes age-related thickening [9]. Although some alterations in capillaries may occur in the stria vascularis and spiral ligament with age in C57BL/6 mice, no data have demonstrated any age-related changes in the capillary BM in the stria vascularis or spiral ligament in C57BL/6 mice. In the current study, we used cationic PEI to evaluate age-related changes in the capillary BMAS in the stria vascularis, spiral ligament, and the subepithelial BMAS in Reissner's membrane in C57BL/6 mice.

Materials and methods

The experimental protocol was approved by the University Committee for the Use and Care of Animals at the University of Tokyo (Medicine-P12-15) and conformed to the guidelines of EU Directive 2010/63/EU for animal experiments.

Experimental animals

To examine age-related changes in BMAS in the cochlea, 25 healthy C57BL/6 mice, supplied by CLEA Japan, Inc., were used. The mice were grouped according to age: 3 days ($n = 5$), 4 weeks ($n = 5$), 8 weeks ($n = 5$), 6 months ($n = 5$), and 12 months ($n = 5$).

Surgical procedure, administration of PEI solution, and tissue preparation

Animals were anesthetized with a mixture of 90 mg/kg ketamine hydrochloride and 20 mg/kg xylazine. All animals were decapitated and the bony labyrinths on both sides were removed. After small fenestrations were performed at the apex of the cochleae, the stapes were removed.

The right bony labyrinths were briefly rinsed with phosphate buffered saline (PBS) and then fixed with 4 % paraformaldehyde at 4 °C for 3 h. Each labyrinth was decalcified by immersion in 10 % ethylenediaminetetraacetic acid solution. After decalcification, the right bony labyrinths were divided into two sections along the cochlear modiolus. The right bony labyrinths were dehydrated and embedded in paraffin, and sectioned in the radial plane at 7 μ m with a microtome. In paraffin-embedded sections, the widths of the

stria vascularis in the cochlear basal turn were measured using light microscopy (Nikon, ECLIPSE E800M, Japan).

A 0.5 % cationic PEI solution (M.W., 1800; Polyscience, Warrington, PA, USA) was dissolved in 0.1 M cacodylate buffer and adjusted to pH 7.4 with HCl. Cacodylate buffer was used because phosphate buffer can precipitate PEI [4]. The 0.5 % cationic PEI solution was perfused into the left cochlear turn via the apex, and then the left bony labyrinths were quickly immersed in a 0.5 % cationic PEI solution. Fifteen minutes later, the left bony labyrinths were rinsed with 0.1 M cacodylate buffer to remove the remaining PEI solution. Next, they were immersed in 2 % phosphotungstic acid and 2.5 % glutaraldehyde at 4 °C for 3 h to stain the PEI particles and fix the tissues. Each labyrinth was decalcified by immersion in 10 % ethylenediaminetetraacetic acid solution. After decalcification, the left bony labyrinths were rinsed with 0.1 M cacodylate buffer and postfixed in 2 % osmium tetroxide at 4 °C for 2 h. The bony labyrinths were then divided into two sections along the cochlear modiolus. All specimens were dehydrated and embedded in epoxy resin (Quetol 812; Nisshin EM, Tokyo, Japan). Ultrathin sections of the cochlear basal turn were double stained with uranyl acetate and lead citrate and examined by transmission electron microscopy (Nihon Denshi, JEOL, JEM-1010, Japan).

Data analysis

To compare age-related changes in stria vascularis width, the thickest portions of the stria vascularis were selected and measured. To analyze changes in PEI distribution in each area, we evaluated both the number and size of the PEI particles located in three layers: the lamina densa, lamina rara externa, and lamina rara interna. A tissue block was randomly selected, and the capillary BMs in the stria vascularis and spiral ligament and the subepithelial BM in Reissner's membrane were examined. Several photographs (magnification 12,000 \times) of each ear were obtained, and two films were randomly selected for determining the numbers and sizes of the PEI particles from a 1 μ m BM segment. Each film (12,000 \times) was enlarged four times for electron microphotography (48,000 \times). The numbers and sizes of the PEI particles were measured on the micrograph using a magnifying glass and ruler. Small particles (diameter ≥ 0.4 μ m) located along the BM were counted as PEI particles. To obtain a measurement reflecting the numbers and sizes of the PEI particles in a given area of the BM, we used the following formula: $\sum [(PEI \text{ particle radius})^2 \pi \times \text{number of PEI particles}] / 1 \mu\text{m BM}$.

Sigma Stat software (Jandel Scientific Software; SPSS, Chicago, IL) was used for statistical analyses. A one-way

analysis of variance (ANOVA) was used to compare changes in stria vascularis width and PEI particle area among all groups. When the ANOVA results showed significant differences, multiple pairwise comparisons were performed using a *t* test with a Bonferroni correction or Dunnett's test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

There was a trend of greater stria vascularis widths in the 4-week-old mice ($n = 5$) than in the 3-day-old mice ($n = 5$); however, the difference was not significant. In addition, there was a trend towards narrower stria vascularis widths in 6-month-old mice ($n = 5$) compared to 4-week-old mice ($n = 5$); however, the difference was not significant. A significant difference in stria vascularis widths was observed between 4-week-old and 12-month-old mice ($n = 5$) (Figs. 1, 2). In 3-day-old mice, PEI particles were evenly distributed on the laminae rarae externa and interna of the capillary BM in the stria vascularis and spiral ligament (Fig. 3a, b). A similar distribution of PEI particles was observed on the laminae rarae externa and interna of the subepithelial BM of Reissner's membrane (Fig. 3c). The numbers of PEI particles in the stria vascularis were much greater than those in the spiral ligament. In the stria vascularis, the numbers of PEI particles did not markedly differ between 3-day-old and 4-week-old mice; however, the PEI particle sizes in 4-week-old mice were smaller than those in 3-day-old mice

Fig. 1 The stria vascularis in 4-week-old mice were thicker than those in 3-day-old mice, and those in 12-month-old mice were thinner than those in 4-week-old mice

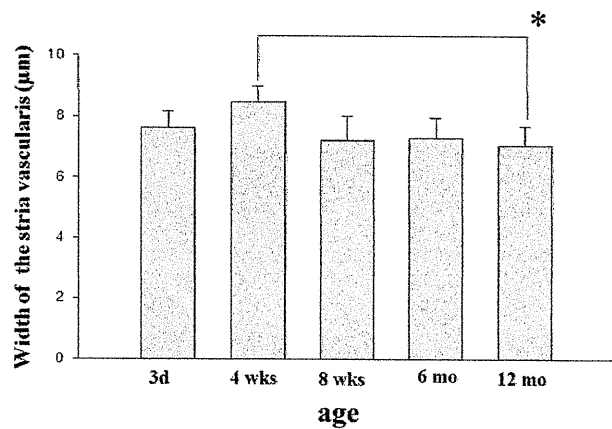
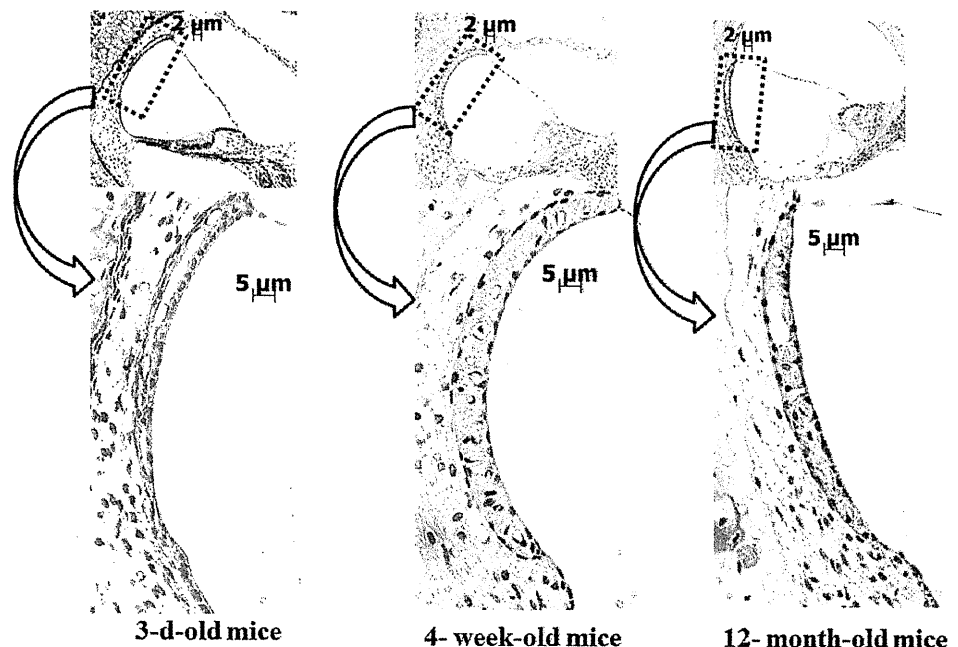


Fig. 2 There was a trend for greater stria vascularis widths in 4-week-old mice compared to 3-day-old mice; however, the difference was not significant. There was a trend for narrower stria vascularis widths in 6-month-old mice compared to 4-week-old mice; however, the difference was not significant. A significant difference in stria vascularis widths was observed between 4-week- and 12-month-old mice. *t* test with a Bonferroni correction; *significant difference ($p < 0.05$)

(Figs. 3a, 4a). The extent of the area containing PEI particles (PEI area) in 4-week-old mice did not differ significantly from that in 3-day-old mice (Fig. 5). However, the PEI areas in 8-week-old mice were significantly smaller than those in 3-day-old mice (Figs. 3a, 4b). In 6- and 12-month-old mice, PEI particles were hardly detected in the strial capillary BM. The laminae rarae externa and interna had disappeared in these mice, but the lamina densa became larger (Fig. 4c, d). No significant difference was

Fig. 3 Localization of polyethyleneimine (PEI) particles on the capillary and epithelial basement membrane (BM) observed in the cochlea from a 3-day-old mouse. PEI particles are evenly distributed on the laminae rarae externa and interna of the capillary BM, in the stria vascularis, spiral ligament, and epithelial BM in Reissner's membrane. *Arrows* indicate PEI particles

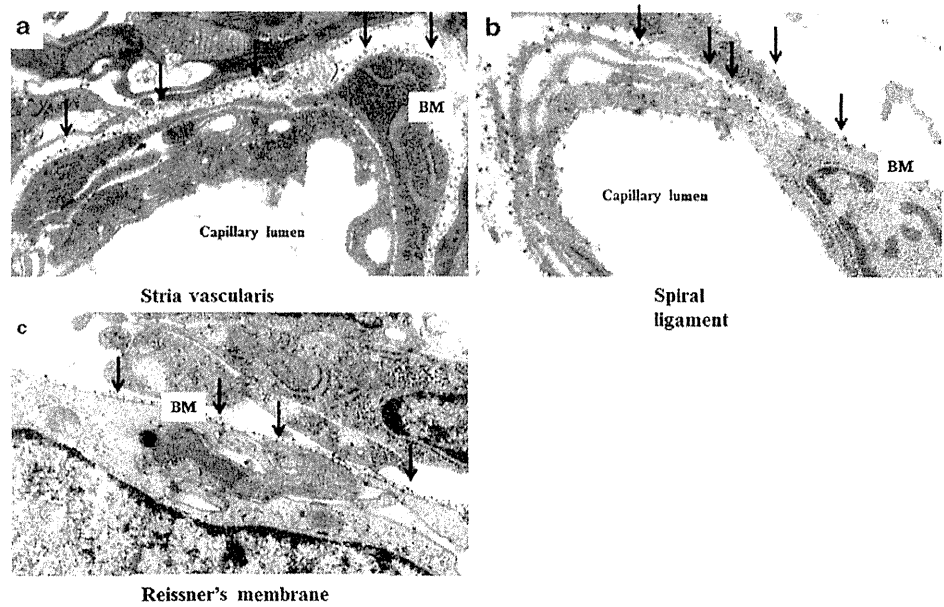
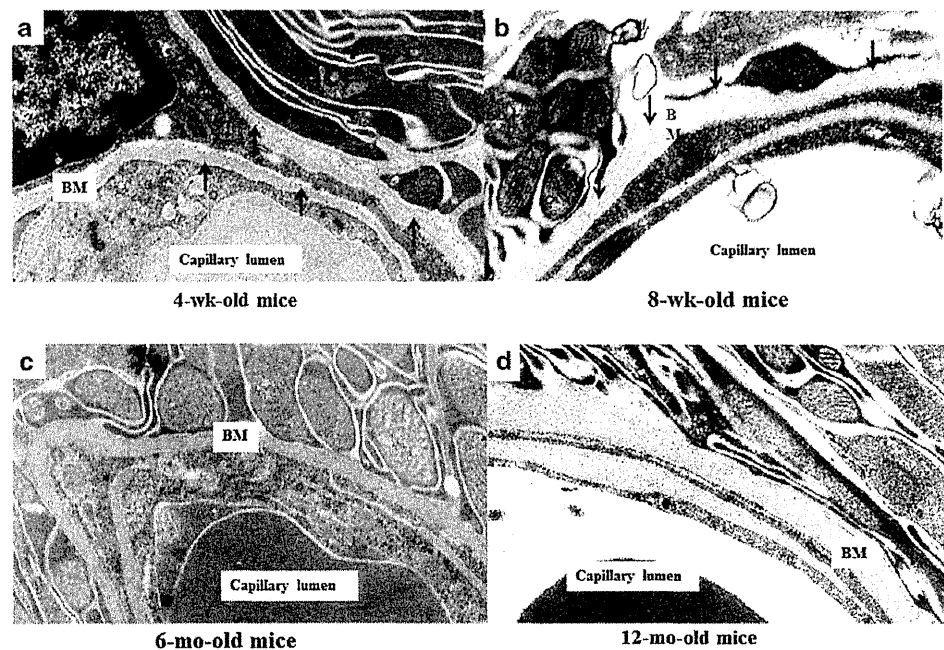


Fig. 4 **a** Distribution of polyethyleneimine (PEI) particles on the capillary basement membrane (BM) observed in the cochlea from a 4-week-old mouse. **b** The PEI distribution on the capillary BM in the stria vascularis from an 8-week-old mouse. **c** The PEI distribution on the capillary BM in the stria vascularis from a 6-month-old mouse. **d** The PEI distribution on the capillary basement membrane (BM) in the stria vascularis from a 12-month-old mouse. *Arrows* indicate PEI particles



observed in the capillary BM of the spiral ligament or in the subepithelial BM of Reissner's membrane between 3-day-old mice and mice in other age groups (Figs. 6, 7).

Discussion

The current study demonstrates that a significant difference in stria vascularis width occurs between young adult and aging C57BL/6 mice. Additionally, a decrease in anionic

sites and the disappearance of the laminae rarae externa and interna occurs in the capillary BM in the stria vascularis in accordance with aging in C57BL/6 mice.

It has been reported that bony labyrinths continue to develop up to a few weeks after birth in mice [10]. In the current study, widths of the stria vascularis in 4-week-old mice tended to be greater than those in 3-day-old mice. Ohlemiller reported that endocochlear potential (EP) did not reduce until 15 months after birth in C57BL/6 mice [11]. Morphological studies of C57BL/6 mice cochleae

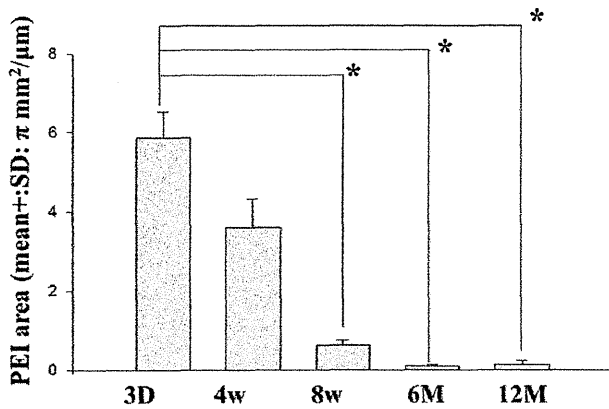


Fig. 5 The polyethyleneimine (PEI) area of the capillary basement membrane in the stria vascularis. The PEI areas in 8-week-old mice and mice over 6 months of age were significantly smaller than those in 3-day-old mice. Dunnett's test; *significant difference ($p < 0.05$)

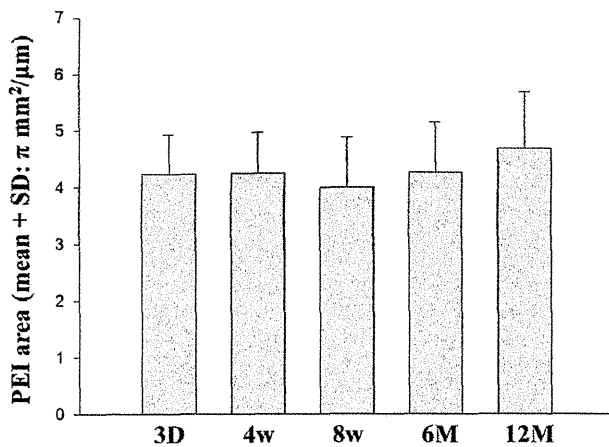


Fig. 6 The total area of polyethyleneimine particles observed on the capillary basement membrane (BM) in the spiral ligament. No significant difference was observed in the capillary BM of the spiral ligament between 3-day-old mice and mice in other age groups. Dunnett's test: $p < 0.05$

showed atrophy of the stria vascularis after 6 months of age [8, 12]. In the current study, widths of the stria vascularis tended to be narrower in 6-month-old mice than in 4-week-old mice. In addition, widths of the stria vascularis in 12-month-old mice were significantly lower than those in 4-week-old mice. These findings suggest that the width of the stria vascularis reduces gradually in accordance with aging after the cochlea reaches a young adult size, and that atrophic changes in the stria vascularis have already occurred before the EP begins to reduce.

We demonstrated age-related changes in BMAS in the stria vascularis, spiral ligament, and Reissner's membrane in C57BL/6 mice. In the stria vascularis, the PEI areas in 8-week-, 6-month-, and 12-month-old mice were

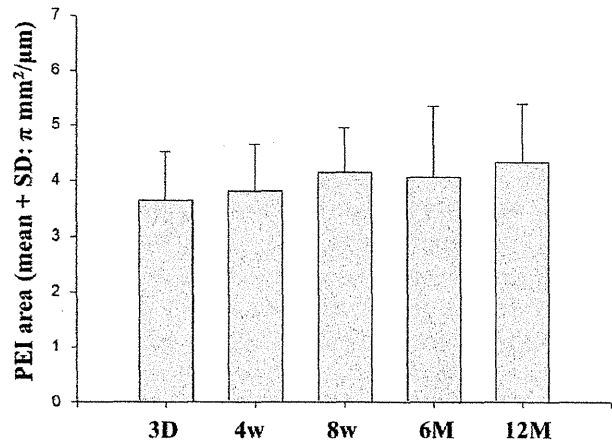


Fig. 7 The total area of polyethyleneimine particles observed on the subepithelial basement membrane (BM) in Reissner's membrane. No significant difference was observed in the subepithelial BM of Reissner's membrane between 3-day-old mice and mice in other age groups. Dunnett's test: $p < 0.05$

significantly smaller than those in 3-day-old mice. However, no significant difference was observed between animals in each age group in either the capillary BM of the spiral ligament or the subepithelial BM of Reissner's membrane. These findings suggest that age-related changes in BMAS start from at least 8 weeks after birth in the stria vascularis in C57BL/6 mice. In the current study, widths of the stria vascularis tended to be narrower in 6-month-old mice than in 4-week-old mice. In addition, widths of the stria vascularis in 12-month-old mice were significantly lower than those in 4-week-old mice. In C57BL/6 mice, age-related changes in BMAS in the stria vascularis seem to begin before atrophic changes of the stria vascularis.

In the gerbil, age-associated degeneration of the stria vascularis was reported to begin before the onset of the auditory threshold shift [13]. In addition, strial capillaries in aged gerbils are reported to be smaller than those in young gerbils [14]. It is reported that capillary BM thickening also appears in diabetes [15]. Capillary BM thickening in diabetes is caused by a fundamental structural alteration of small blood vessels [15]. It was also reported that high glucose-induced excess extracellular matrix accumulation and altered compositions result in structural and functional changes that allow increased permeability [16]. The thickening of the capillary BM induced by structural changes in BM composition may allow an increase in capillary permeability. The current study demonstrated that the laminae rarae externa and interna in the capillary BM of the stria vascularis disappear in 6- and 12-month-old mice. These changes indicate a failure of the BM structure in the strial capillary, i.e., destruction of the strial blood-labyrinth barrier.

BMAS are thought to act as negative charge barriers, which are associated with selective permeability for ionic molecules and ions in the blood-labyrinth barrier. Lin and Trune reported that a systemically administered ferritin tracer leaked extensively into the perivascular tissue in C3H/1pr autoimmune mice, suggesting a breakdown of the stria blood-labyrinth barrier [17]. Since the disruption of the charge barrier in the cochlea may result in an increase in capillary permeability for anionic macromolecules and ions, cochlear homeostasis could be disturbed by a decrease in BMAS [6]. We speculated that the stria capillary BMAS changes that occur with age may influence the selective transport system of electrically charged macromolecules and ions in the stria vascularis in C57BL/6 mice, which may be associated with the progression of age-related hearing loss.

Acknowledgments We thank Mr. Yoshiro Mori and Ms. Atsuko Tsuyuzaki for their technical assistance in electron microscopy. This work was supported by a grant from the Ministry of Education (23592500).

Conflict of interest None declared.

References

- Schuknecht HF, Gacek MR (1993) Cochlear pathology in presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 102:1–16
- Spicer SS, Schulte BA (2002) Spiral ligament pathology in quiet-aged gerbils. *Hear Res* 172:172–185
- Ohlemiller KK, Gagnon PM (2004) Apical-to-basal gradients in age-related cochlear degeneration and their relationship to “primary” loss of cochlear neurons. *J Comp Neurol* 479:103–116
- Schurer JW, Kalicharan D, Hoedemaeker PJ, Molenaar I (1978) The use of polyethyleneimine for demonstration of anionic sites in basement membranes and collagen fibrils. *J Histochem Cytochem* 26:688–689
- Kanwar YS, Farquhar MG (1979) Anionic sites in the glomerular basement membrane. In vivo and in vitro localization to the laminae rarae by cationic probes. *J Cell Biol* 81:137–153
- Suzuki M, Kitamura K, Nomura Y (1995) Influence of changed blood pH on anionic sites in the labyrinth. *Acta Otolaryngol* 115:747–753
- Harvey SJ, Miner JH (2007) Breaking down the barrier: evidence against a role for heparan sulfate in glomerular permselectivity. *J Am Soc Nephrol* 18:672–674
- Ichimiya I, Suzuki M, Mogi G (2000) Age-related changes in the murine cochlear lateral wall. *Hear Res* 139:116–122
- Thomopoulos GN, Spicer SS, Gratton MA, Schulte BA (1997) Age-related thickening of basement membrane in stria vascularis capillaries. *Hear Res* 111:31–41
- Lim DJ, Anniko M (1985) Developmental morphology of the mouse inner ear. A scanning electron microscopic observation. *Acta Otolaryngol Suppl* 422:1–69
- Ohlemiller KK (2006) Contributions of mouse models to understanding of age- and noise-related hearing loss. *Brain Res* 1091:89–102
- Hequembourg S, Liberman MC (2001) Spiral ligament pathology: a major aspect of age-related cochlear degeneration in C57BL/6 mice. *J Assoc Res Otolaryngol* 2:118–129
- Gratton MA, Schulte BA (1995) Alterations in microvasculature are associated with atrophy of the stria vascularis in quiet-aged gerbils. *Hear Res* 82:44–52
- Gratton MA, Schulte BA, Smythe NM (1997) Quantification of the stria vascularis and stria capillary areas in quiet-reared young and aged gerbils. *Hear Res* 114:1–9
- Roy S, Ha J, Trudeau K, Beglova E (2010) Vascular basement membrane thickening in diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 35:1045–1056. doi:10.3109/02713683.2010.514659
- Chronopoulos A, Trudeau K, Roy S, Huang H, Vinoses SA, Roy S (2011) High glucose-induced altered basement membrane composition and structure increases trans-endothelial permeability: implications for diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 36:747–753. doi:10.3109/02713683.2011.585735
- Lin DW, Trune DR (1997) Breakdown of stria vascularis blood-labyrinth barrier in C3H/1pr autoimmune disease mice. *Otolaryngol Head Neck Surg* 117:530–534