

Title	突発性難聴におけるストレス反応に関する検討
Sub Title	
Author	伊藤, まり(Ito, Mari) 小川, 郁(Ogawa, Kaoru)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2009
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.85, No.2 (2009. 4) ,p.T109- T119
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20090400-0236

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

突発性難聴におけるストレス反応に関する検討

慶應義塾大学耳鼻咽喉科教室

(指導: 小川 郁教授)

伊藤 まり

Key Words : sudden deafness, stress, neuropeptide Y, cochlear blood flow, Free Radical Analytical System 4

【緒 言】

突発性難聴は突然発症する高度の感音性難聴であり、明らかな原因が存在しない、または不確実なものをいう。現在有力視されている病態は内耳ウィルス感染と蝸牛血流障害であるが、複数の病態が混在している可能性も考えられている。もし突発性難聴が蝸牛血流障害のような循環障害を病態とするのであれば突発性難聴も心筋梗塞や脳梗塞などと同様にストレスや生活習慣と関連し、睡眠不足や疲労、精神的ストレスが発症リスクを高めている可能性がある¹⁾。最近のコホート研究でも突発性難聴罹患が脳卒中発症の危険因子であることが報告されている²⁾。Neuserら³⁾、Schmittら⁴⁾は突発性難聴患者では発症時点まで持続するストレスフルライフイベントが多かったことを報告しており、阿部ら⁵⁾は低音障害型急性感音難聴の誘因として精神的ストレスが多かったことを報告しているように、ストレスやそれに伴う心身機能の低下が突発性難聴の発症と直接的あるいは間接的に関連している可能性がある。

蝸牛は脳底動脈の枝である前下小脳動脈(AICA)から分枝した迷路動脈、総蝸牛動脈、さらにその分枝である固有蝸牛動脈、前庭蝸牛動脈の蝸牛枝により血流を受ける⁶⁾。またこれら蝸牛に分布する血管は終末動脈であり、梗塞、塞栓、血管攣縮、動脈硬化、血管炎などで蝸牛血流(以下CBF)が遮断されると急激に内耳機能が障害され難聴が生じる⁷⁾。また蝸牛は蝸牛動脈の血管周囲や蝸牛に交感神経が分布しておりストレスによる交感神経の緊張により蝸牛血管の収縮が惹起され蝸牛機能障害を起こしやすい可能性が考えられる。以上より内耳は解剖学的にもストレス下で血流低下を来し内耳機能障

害を生じやすい構造であると考えられる。Cannonのストレス説ではストレス反応として交感神経が緊張し、交感神経終末からノルアドレナリン(以下NA)が放出され α 受容体を介した末梢血管の収縮が生じることが挙げられており^{8,9)}、ストレスが大脳皮質(辺縁系)に認識されると視床下部、自律神経終末を経て交感神経終末よりノルアドレナリン以下NAが放出され蝸牛血管収縮に至る可能性が考えられる。蝸牛血管においても α 受容体を介した血管の収縮が起こるために、急性感音難聴を発症することが可能性が考えられる^{10,11)}。一方、ストレス時に交感神経終末よりNAと共に放出される神経伝達物質として、ニューロペプチドY(以下NPY)が知られている¹²⁾。NPYは36のアミノ酸残基のペプチドで脳、副腎髄質および交感神経系に広範かつ豊富に存在し、多様な生理機能への関与が報告されている。NPYの主な生理作用として摂食促進作用、抗不安作用および交感神経を介した血圧調節機構が挙げられ、ストレスによる交感神経刺激で交感神経終末からの放出は増加する^{13,14)}。現在判明している各受容体の作用として、Y5受容体は摂食行動調節作用¹⁵⁾、Y2受容体は血圧低下作用、心筋収縮抑制作用、冠血流低下作用に関与しているとされている¹⁶⁾。Y1受容体は抗不安作用を有し、ラットの寒冷ストレスでは血中NPY濃度が上昇し¹⁵⁾、NPYをラット脳室内に投与すると拘束ストレスによりもたらされる胃酸分泌の抑制や胃粘膜病変の減少が認められる¹⁷⁾。またY1受容体には血管収縮作用があり、NAによる血管収縮を遷延化する作用も有する。ストレス下ではNPYはNAと同時に放出されるが、NAによる血管収縮が急峻かつ短時間で回復期の血管拡張も急激であるのに対し、NPYはY1受容体を介した緩徐な血

管収縮の遷延化を引き起こす¹⁸⁾。

蝸牛における NPY 受容体の分布については明らかにされていないものの、骨ラセン板、蝸牛軸、蝸牛神経束¹⁹⁾、ラセン蝸牛軸動脈^{20, 21)}、前下小脳動脈、前前庭動脈¹⁹⁾の血管周囲交感神経に NPY 受容体が存在する報告があり、蝸牛においてはストレス反応により放出された NPY がラセン蝸牛軸動脈に作用し CBF 減少を増強する可能性が考えられる。

近年、フリーラジカルと様々な疾患や老化との関連性が報告されている²²⁾。内耳障害においてもその病態には共通した障害機構が存在し、一酸化窒素 (NO) や活性酸素 (ROS) をはじめとするフリーラジカルが関与しており^{23, 24)}、感染、耳毒性薬剤、騒音などの内耳障害性の刺激によりコルチ器有毛細胞や血管条でフリーラジカルが発生することが報告されている²⁵⁻²⁸⁾。内耳障害に対する治療薬としては Koppe²⁹⁾らが述べているように NO・ROS 消去薬を含む抗酸化薬、熱ショックプロテイン、エダラボン、グルタミン酸受容体アンタゴニスト、カルシウム拮抗薬などが挙げられるが、その詳細、特に治療効果、投与経路による効果などについては不明な点が多い。

フリーラジカルそのものは短い寿命と高い反応性のために生体内の状態を測定するのは極めて困難であるが、最近 Free Radical Analytical System 4 (Wismerll) (以下 FRAS4) による d-ROMs テスト (diacron-Reactive Oxygen Metabolites) を用いて酸化ストレス度を簡便定量的に測定できるようになった³⁰⁾。このテストは生体内のフリーラジカルを直接計測するのではなく、それらにより生じた血中の種々のヒドロペルオキシド濃度を呈色反応で計測し生体内のフリーラジカルの状態を総合的に評価するものである。フリーラジカルの関与する疾患として呼吸器では慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息、循環器では心筋梗塞、高血圧、代謝疾患では糖尿病、高脂血症などが挙げられる。Komatsu らは慢性閉塞性肺疾患症例の重症例では d-ROMs テストによる酸化ストレス度が高値であり、治療後に酸化ストレス度が減少したと報告している³¹⁾。動物実験ではマウスに熱ストレスの負荷を加えたところ、d-ROMs テストでフリーラジカルが上昇した³²⁾。しかし、現在までのところ、突発性難聴患者におけるフリーラジカルを定量的に測定した報告はない。

今回我々は突発性難聴発症の病態では心身のストレスが高度である可能性について評価するため以下の統計と基礎実験を施行した。

1) 統計として発症2週間以内の突発性難聴患者と耳鳴

を主訴に来院した慢性感音難聴患者に対して FRAS4 (d-ROMs) を用いて測定したヒドロペルオキシドをフリーラジカルの指標とし、酸化ストレス度と表記して比較検討した。

2) 基礎実験として蝸牛においてはストレス反応により放出された NA, NPY が CBF にどのような影響を与えるか調べるためにモルモットを用いて NA 単独 NPY 単独投与群, NA, NPY 同時投与群を比較検討し、CBF に対する影響を評価し、ストレスとの関連も含めた突発性難聴の発症時の病態について臨床的および基礎的に検討した。

【方 法】

(1) 突発性難聴とフリーラジカル

2006年4月より2007年3月までの1年間に当院を受診した突発性難聴13例(男性4例,女性9例)を対象とした(突発性難聴群)。また、発症から2ヶ月以上経過した慢性耳鳴または難聴21例(男性16例,女性5例)を対照とした(慢性耳鳴群)。突発性難聴群の平均年齢は54.2(±11.2)歳で、対照群は68.0(±10.5)歳であった。突発性難聴群13例の合併症は高血圧3例、糖尿病3例、高血圧と喘息を合併した1例であった。慢性耳鳴群の合併症は高血圧6例、喘息3例、高血圧、高脂血症と糖尿病を合併した症例2例、高脂血症1例、高尿酸血症1例、甲状腺疾患1例であった。他院で既に副腎皮質ステロイドによる治療を受けた症例、発症より1ヶ月以上経過した症例、突発性難聴の既往のある症例は今回の検討から除外した。また慢性耳鳴群に対して耳鳴順応療法(Tinnitus Retraining Therapy)(以下TRT)を施行し、治療前後のd-ROMsテストを測定し得た11例(男性10例,女性1例)(以下TRT群)につき比較検討した。耳鳴の自覚的苦痛度および生活障害度の評価としてTHI(Tinnitus Handicap Inventory)(以下THI)を用いた。検査方法は当院初診時に指先に針(Needle BD Genie Lancet 日本ベクトンディッキンソン社)を刺し、キャピラリー(キャピラリー:採血用毛細管ストロー H&D社)で20μlの全血を採血後、酢酸緩衝液入りエッペン(DIACRON社)に混合する。さらにドライクロモゲン入りキュベット(DIACRON社)に入れFRAS4にて分光度を測定しd-ROMsデータとした。突発性難聴の治療は点滴治療の場合ではリン酸デキサメタゾン16mgより1週間の漸減治療とし、内服の場合ではプレドニゾロン30mgより12日間の漸減治療を行った。また副腎皮質ステロイドに加えビタミ

ンB12剤，ATP製剤を点滴または内服で投与した．治療開始後3～4週後に再び指先からキャピラリーで20 μ lの全血を採血し，治療後のデータとした．副腎皮質ステロイドの半減期は8～54時間であり副腎皮質ステロイド終了後4～5日で副腎皮質ステロイドの影響はなくなるとされているが本検討では副腎皮質ステロイド終了後1～3週間後に採血しており治療後のデータは副腎皮質ステロイドの影響を受けていないと考えられた．なお，ビタミンB12剤，ATP製剤の影響も考慮する必要はあるが，それぞれの薬理作用からこれらの薬剤の抗酸化作用は少ないと考えた．FRAS4：d-ROMsテストの測定原理は血中のヒドロペルオキシド濃度をクロモゲン呈色反応で定量的に計測することによって生体内のフリーラジカル量の指標とするもので，d-ROMsテストの単位はU. CARR（ユニット・カール）とされる．欧州における約7000人のサンプリングの結果から測定数値が300 U. CARR以下を正常，それ以上は酸化ストレス度が高い状態を示すとされている³³⁾．評価法として突発性難聴群では初診時と治療開始後3～4週後のd-ROMs，平均聴力を測定して治療前治療後のデータとした．TRT群では初診時と治療後のd-ROMs，THIを測定して治療前治療後のデータとして比較検討した．また突発性難聴群のd-ROMs，平均聴力を治療前後で比較検討し，初診時聴力レベルと酸化ストレス度および聴力レベルの改善度と酸化ストレス度の変化に相関があるか検討した．

検定は，突発性難聴群と慢性耳鳴群の初診時酸化ストレス度の比較にはt testを，治療前後の酸化ストレス度，THI，平均聴力の比較，初診時聴力レベルと酸化スト

レス度および聴力レベルの改善度と酸化ストレス度の変化との相関にはpaired t testを用いた．

なお今回の酸化ストレス度測定による統計は日本鋼管病院倫理委員会においても承認され，測定に際し患者からは全例文書で同意を得た．

(2) NPYの内耳循環に対する影響

1. 実験動物

実験にはプライエル反射陽性のハートレー系有色モット（体重250～600g）74匹を用いた．実験動物は慶應義塾大学実験動物センター内で飼育し，実験は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに従って行った．

2. 実験方法

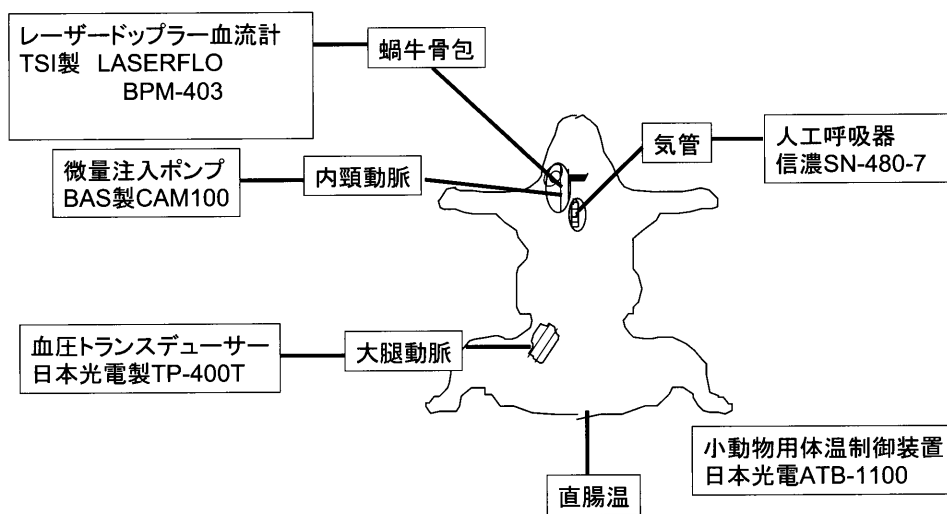
2-1. 麻酔と呼吸管理

ペントバルビタール（30～40 mg/kg）腹腔内投与で麻酔し，気管切開し人工呼吸器（信濃SN-480-7）を用いて調節呼吸下（一回換気量は0.8 ml/100g，換気数は80/min）においた後，臭化パンクロニウム（3 mg/kg）で不動化した．また，小動物用体温制御装置（日本光電ATB-1100）を用いて測定中の直腸温を38±1℃に維持した．

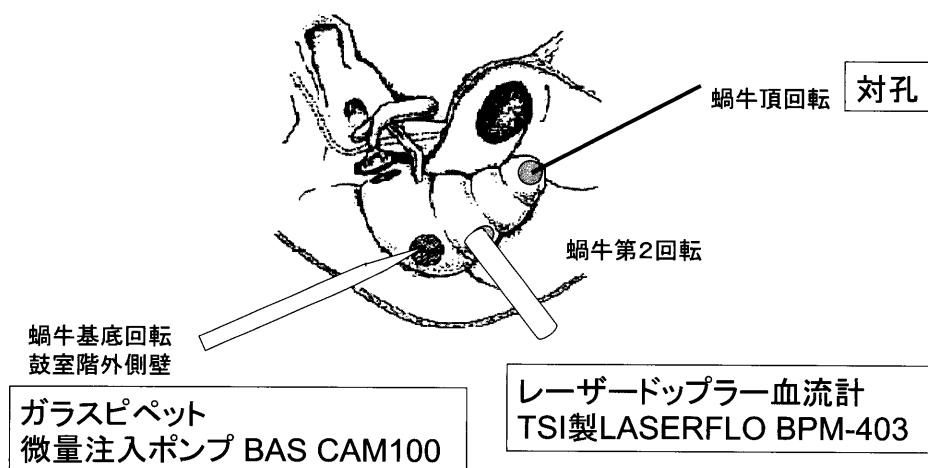
2-2. 大腿動脈圧（BP）と蝸牛血流（CBF）の測定（第1図）

大腿動脈にテフロンチューブを挿入し，血圧トランスジューサー（日本光電製TP-400T）を接続して，大腿動脈圧を測定しBPの指標とした．

CBFの測定に用いたレーザードップラー血流計は近赤外線（780 nm）低出力半導体レーザーによるレーザー



第1図 実験のブロックダイアグラム



第2図 局所投与の実験モデル
蝸牛基底回転鼓室階外側壁にガラス管を挿入し、微量注入ポンプを用いて薬剤を外リンパ灌流にて投与した。

ドップラー (LD) 血流計 (TSI 製 LASERFLO BPM-403) であり、プローブは先端径 0.8 mm のものを使用した。なお、血流測定の前平均加算時間は 5 秒とした^{34, 35)}。Ventral approach で中耳骨胞を開放後、テフロンチューブ挿入側の蝸牛外側壁を露出し、骨壁の粘膜を除去してから、蝸牛基底回転にレーザードップラー血流計のプローブを固定し CBF を測定した (第2図)。

3. 薬剤投与経路

3-1. 全身投与

薬剤の全身投与は左右いずれかの内頸動脈に挿入したテフロンチューブより行った。カテーテルを頭側から尾側に挿入し直接内耳血流に影響を与えないようにした。

3-2. 局所投与

局所投与の方法としては、NPY (porcine) nova biochem 社) は分子量 (4256 g/mol) が大きい正円窓膜を通過しないと考え、外リンパ灌流により投与した³⁶⁾。蝸牛基底回転鼓室階外側壁に 40 μm の小孔を作成し、外リンパ内にガラス管を挿入した後、頂回転外側壁に内耳圧上昇を防ぐため対孔を開け、微量注入ポンプ (BAS 製 CAM100) を用いて 3.3 μl/min の速度で 5 分間外リンパ灌流を行った。

3-3. 実験 1

CBF, BP を変化させる NA, NPY のおおよその投与量を測定するため、濃度を指数的に変えた NA, NPY の各溶液を内頸動脈より持続投与し、CBF, BP の変化を測定した。NA の総投与量はそれぞれ 0.1 μg/kg (n=4), 1 μg/kg (n=6), 10 μg/kg (n=3) とし³⁷⁾、それぞれの溶液を総量 3 ml となるように生理食塩水で希釈

し、同側内頸動脈より 0.6 ml/min の速度で 5 分間持続注入した。NPY の総投与量は 0.05 μg/kg (n=3), 0.5 μg/kg (n=3), 5 μg/kg (n=4) とし³⁸⁾、同様に希釈し、同様の速度で投与した。対照群 (n=9) としては生理食塩水 3 ml を、同様の速度で投与した。NA および NPY の持続投与では濃度依存性に CBF の増加と BP の上昇が認められ、以下の実験での投与量を NA が 50 μg/kg, NPY が 25 μg/kg とした。動物を NA 単独投与群 (n=10, 以下、全身 NA 群), NPY 単独投与群 (n=9, 以下全身 NPY 群), NA・NPY 同時投与群 (n=8, 以下全身 NA+NPY 群) の 3 群で CBF と BP を測定した。

3-4. 実験 2

NA, NPY を単独、または同時に蝸牛に局所投与した際の CBF と BP を測定した。NA 単独投与群 (n=7, 以下局所 NA 群), NPY 単独投与群 (n=9, 以下局所 NPY 群), NA・NPY 同時投与群 (n=8, 以下局所 NA+NPY 群) の 3 群に分け、それぞれ、NA 10 μg/kg, NPY 50 μg/kg, NA 10 μg/kg および NPY 50 μg/kg の混合溶液を生理食塩水で総量 16.5 μl に希釈し、既述の方法で、3.3 μl/min の速度で 5 分間かけて外リンパ灌流を行った。

4. 血圧、蝸牛血流量の測定間隔と評価

薬剤投与開始後、10 秒毎に BP と CBF を測定した。CBF は、蝸牛骨包を通して測定しているため、骨の厚さや、骨壁に対する角度などに影響される可能性があり、絶対量は測定できない。そこで血流の変化を見ることを主眼とし、薬剤投与前の初期値に対する相対量として表

示した。得られたデータは平均±標準誤差で示し、統計学的解析には ANOVA 検定を用いた。Post hoc (Fisher's PLSD, Sheffe's, Bonfferoni) にても検定施行した。

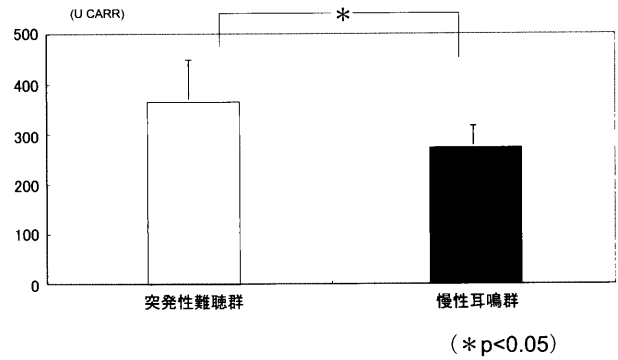
【結 果】

(1) 突発性難聴とフリーラジカル

突発性難聴群 13 例と慢性耳鳴群 21 例とで比較検討した。全血を用いた d-ROMs テストの結果に影響を与える可能性のあるヘマトクリット値は、突発性難聴群 41.1 (±3.1) %，慢性耳鳴群 44.2 (±2.1) % と両群間に有意差はなかった。

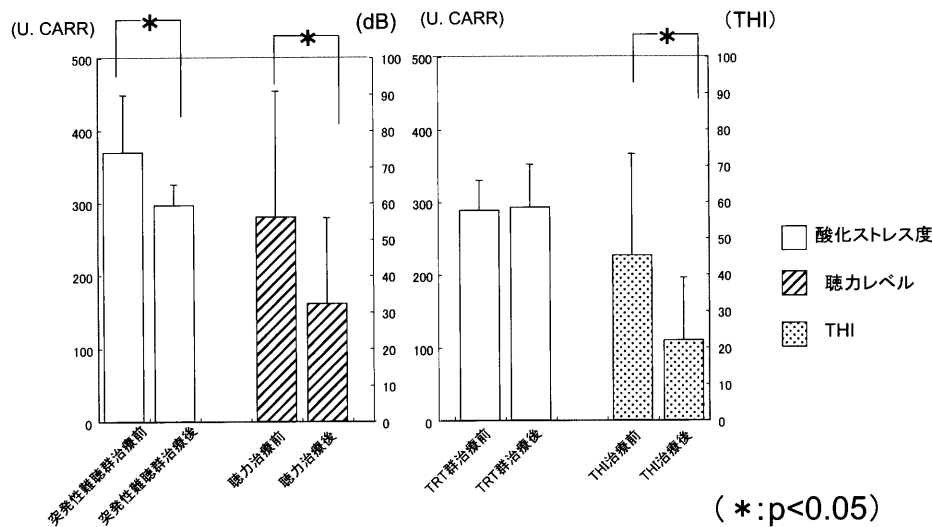
初診時酸化ストレス度は突発性難聴群 372.6 (±78.0) U. CARR，慢性耳鳴群 295.9 (±58.3) U. CARR と突発性難聴群が有意に高値を示した (p<0.05) (第 3 図)⁴⁰⁾。

突発性難聴群の治療前後のデータを比較した所，酸化ストレス度は治療前 372.6 (±78.0) U. CARR に対して治療後 299.6 (±93.7) U. CARR と治療後に有意な減少が認められた (p<0.05)。平均聴力レベル (4 分法) は治療前 56.1 (±34.7) dB，治療後 32.2 (±28.6) dB であり有意な改善が認められた (p<0.05) (第 4 図)。



第 3 図 突発性難聴群と慢性耳鳴群の初診時酸化ストレス度の比較
初診時 d-ROMs test による酸化ストレス度は突発性難聴群 372.6 (±78.0) U. CARR，慢性耳鳴群 295.9 (±58.3) U. CARR であり突発性難聴群の方が慢性耳鳴群と比較して有意に高値を示した (p<0.05)。2 群間の比較には t test を用いた。

また TRT 群 11 例では平均年齢 59.4 (±10.7)，酸化ストレス度は治療前 288.1 (±41.2) U. CARR 治療後 292.1 (±59.4) U. CARR であり治療前後で有意な変化は認められなかった。THI は治療前 45.1 (±28.1) 治療後 21.8 (±17.2) と有意な改善を認めた。平均聴力 (4 分法) は患側 23.2 (±10.7) dB，健側 20.4 (±9.6) dB であった。尚，治療後の聴力は今回測定していない (第 4 図)。



第 4 図：突発性難聴群と TRT 群における治療前後の酸化ストレス度の比較

図の左側は突発性難聴群，右側は TRT 群を表す。初診時 d-ROMs test による酸化ストレス度は突発性難聴群 372.6 (±78.0) U. CARR，対照群 295.99 (±58.3) U. CARR であり突発性難聴群が有意に高値を示した (p<0.05)。また，突発性難聴群の治療前後の酸化ストレス度は治療前 372.6 (±78.0) U. CARR，治療後 299.6 (±93.7) U. CARR と有意な減少が認められた (p<0.05)。聴力は平均年齢 4 分法で治療前 56.1 (±34.7) dB，治療後 32.2 (±28.6) dB と有意な改善が認められた (p<0.05)。TRT 群では酸化ストレス度は治療前 288.1 (±41.2) U. CARR，治療後 292.1 (±59.4) U. CARR であり治療前後で有意な変化は認められなかった。耳鳴の自覚的苦痛度 THI (Tinnits Handicap Inventory) は治療前 45.1 (±28.1) 治療後 21.8 (±17.2) で有意な改善が認められた (p<0.05)。2 群間の比較には paired t test を用いた。(伊藤まり，他：耳鼻臨床，101：10；743-748，2008 図 2 を許可を得て転載)

突発性難聴群 13 例の個々の症例の治療前、治療後の酸化ストレス度を比較した所、治療後では治療前と比較して酸化ストレス度の有意な減少がみられた ($p < 0.05$) (第5図)。

また突発性難聴群 13 例の個々の症例の治療前治療後の平均聴力を比較した所、治療後では治療前と比較して平均聴力の有意な減少がみられた ($p < 0.05$) (第6図)。

一方、初診時聴力レベルと酸化ストレス度および聴力レベルの改善度と酸化ストレス度の変化には、有意な関係は認められなかった。

(2) NPY の内耳循環に対する影響

実験-1

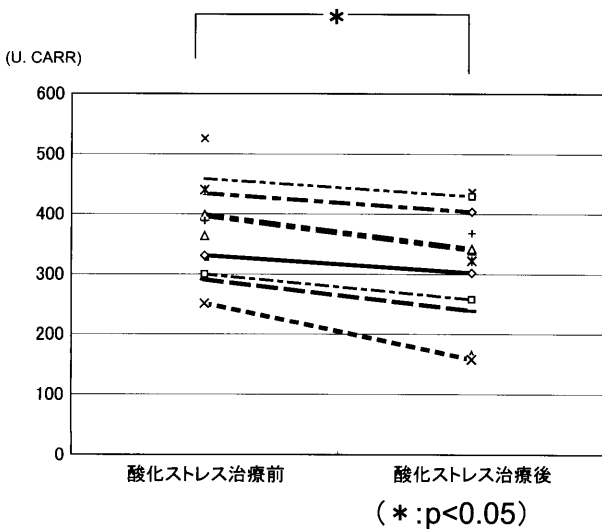
全身 NA 群, 全身 NPY 群, 全身 NA+NPY 群のいずれの群でも投与直後より CBF, BP ともに急激な上昇が見られたのち、減少に転じ、約 4~6 分で初期値まで回復した。CBF と BP の変化率を比較すると BP の上昇に伴って CBF の増加も見られた (第6図)。各群の CBF を比較すると同時投与ではゆっくり増加し、ピークに達する時間及び基線に戻る時間は全身 NA+NPY 群が全身 NA 群に比べて遅れていたが、CBF の最大値 (以下 CBFmax) には有意差は認めなかった (第1表)⁴¹⁾。CBF が増大のピークに達する時間を最大値到達時間 (以下 T1max), 基線まで再び戻るまでの時間を最小値到達時

間 (以下 T1min) として解析すると、T1max は全身 NA+NPY 群において他の 2 群より延長し、T1min は全身 NA+NPY 群において全身 NA 群に比べて延長していた (第1表)。

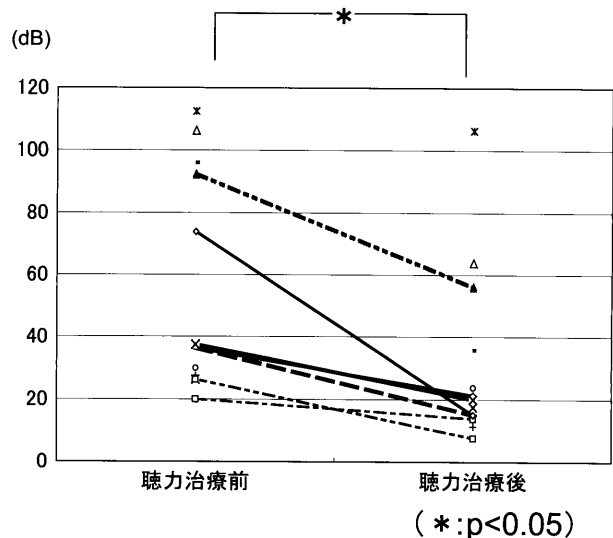
実験-2

局所・NA 単独群, 局所・NPY 単独群, 局所・NA+NPY 群のいずれにおいても外リンパ局所投与開始後より減少し、最小値に達した後に初期値まで増加する傾向が認められた (第7図)。一方、BP には明らかな変化は認められなかった。薬剤を投与してから、CBF が最小値に達するまでの時間を T2min として比較検討したところ、T2min は局所・NA+NPY 群において局所・NA 群より有意に長かった (第2表)。

局所・NA+NPY 群での CBF は、5 分間の投与終了後も減少し、CBF の最小値 (以下 CBF min) は、局所・NA+NPY 群が他の 2 群より有意に低下した ($p < 0.05$) (第2表)。一方、測定終了時の測定開始 20 分後の CBF (以下 CBF 20) は、局所・NA+NPY 群では 0.83 ± 0.11 と測定時間内に初期値にまで回復しなかった。局所・NA 群で 1.04 ± 0.14 , 局所・NPY 群で 1.00 ± 0.02 であり、局所・NA+NPY 群の 0.83 ± 0.11 と比べて有意差を認めた ($p < 0.05$) (第2表)。



第5図 突発性難聴群における治療前後の酸化ストレス度の比較
突発性難聴症例 13 例の個々の症例の酸化ストレス度の治療前治療後のグラフを示した。治療後では治療前と比較して酸化ストレス度の有意な減少が見られた ($p < 0.05$)。2 群間の比較には paired t test を用いた。
(伊藤まり, 他: 耳鼻臨床, 101: 10; 743-748, 2008 図3を許可を得て転載)

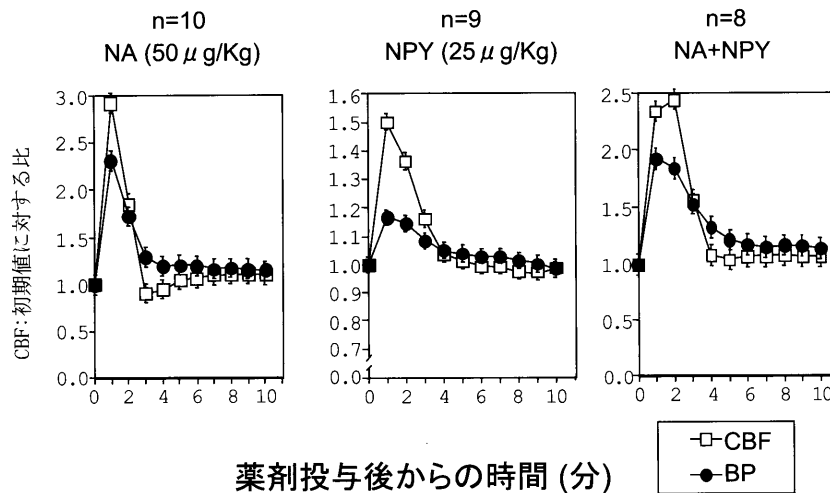


第6図 突発性難聴群における治療前後の平均聴力の比較
突発性難聴症例 13 例の個々の症例の平均聴力の治療前治療後のグラフを示した。治療後では治療前と比較して平均聴力の有意な減少が見られた ($p < 0.05$)。2 群間の比較には paired t test を用いた。
(伊藤まり, 他: 耳鼻臨床, 101: 10; 743-748, 2008 図4を許可を得て転載)

第1表 全身・NA群, 全身・NPY群, 全身・NA+NPY群におけるCBFの最大値に達する時間(T1max), CBFの最小値に達する時間(T1min)およびCBFの最大値(CBFmax)の比較

	T1max (分)	T1min (分)	CBFmax
NA	1.23±0.20	2.71±0.57	3.32±1.07
NPY	1.67±0.42	(5.07±1.60)	1.53±0.15
NA+NPY	2.05±0.71	4.38±1.96	2.65±1.19

(* : p<0.05)
 数値は平均値±標準誤差で表す (* : p<0.05). 3群間の比較にはANOVA検定を用いた. T1maxは全身・NA+NPY群が他の2群より有意に遅れた. T1minは全身・NA+NPY群で全身・NA群に比べて有意に遅れた. CBFmaxには有意差は認めなかった.



第7図 全身・NA群, 全身・NPY群, 全身・NA+NPY群におけるCBFとBPの変化
 NA (n=10), NPY (n=9), NA+NPY (n=8), コントロールとして生食 (n=10) を投与した. 全身・NA単独群, 全身・NPY単独群, 全身・NA+NPY群のいずれの群でも投与直後よりCBF, BPともに急激な上昇が見られたのち, 減少し, 約4分~6分で初期値まで回復した. 群間の比較にはANOVA検定を用いた.
 (Itou M et al : Acta Otolaryngol 121 : 573-578, 2001 の Fig. 3 より許可を得て転載)

【考 察】

突発性難聴の原因についてはウィルス感染説, 内耳循環障害説, 自己免疫説, 内リンパ水腫説などが唱えられているが³⁹⁾, 前庭器の病的変化について一酸化窒素(NO)や活性酸素(ROS)などのフリーラジカルが関わっていることが既に報告されている^{25, 26)}. 動物実験ではShimogoriらはAMPA (alpha-amino-3-hydro5-methyl-isoxazole-4-propionic acid) を用いて内耳障害を起こした後, 抗酸化薬であるエダラポンを投与した結果, 聴力障害の発現を抑制したと述べている²⁶⁾. その他, 音響外傷後の実験動物にエダラポンなどの抗酸化薬を投与した結果, 内耳機能の改善が見られた実験⁴²⁻⁴⁴⁾や難聴モデルモルモットにビタミンC剤, ビタミンE剤を投与した所, 上昇したABRの閾値の低下が認められ

た実験⁴³⁾などが報告されている. 感染, 耳毒性薬剤や騒音などの内耳障害性刺激によりコルチ器有毛細胞や血管条でフリーラジカルが発生することが報告されており²³⁻²⁵⁾, 抗酸化薬が内耳でのフリーラジカルの産生を制御したことが聴力の回復につながったと考察される^{44, 45)}. 工田らはメニエール病患者に抗酸化薬を投与し, 低音域と高音域で聴力改善が認められたと報告している⁴⁶⁾. 臨床例でフリーラジカルを消去するにはビタミンC剤, ビタミンE剤, ユビキノン等^{47, 48)}の抗酸化力のある物質の投与が効果的である. 突発性難聴の治療薬としては副腎皮質ステロイド⁴⁹⁾やプロスタグランジン⁵⁰⁾が挙げられるが, Joachins⁵¹⁾らは副腎皮質ステロイドを共通薬剤としてビタミンE剤の投与を行った所, 改善率が高くなったと報告している.

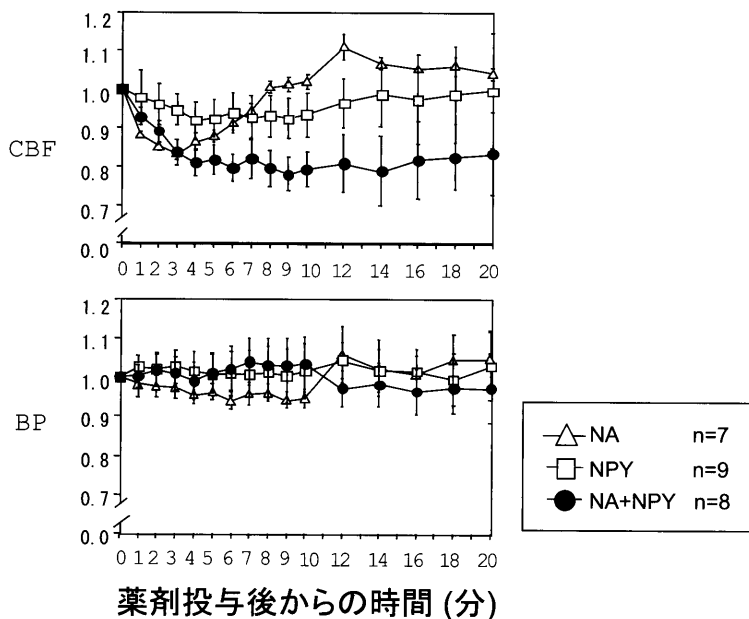
今回の検討では突発性難聴発症時の酸化ストレス度が

第2表 局所・NA群, 局所・NPY群, 局所・NA+NPY群におけるCBFの最小値に達する時間 (T2min) およびCBFの最小値 (CBFmin) とCBF測定終了時である20分値 (CBF 20) との比較

	T2min (分)	CBFmin	CBF 20
NA	3.3±0.74	0.83±0.02	1.04±0.14
NPY	6.5±0.87	0.92±0.05	1.00±0.02
NA+NPY	7.6±1.73	0.78±0.04	0.83±0.11

(* : p<0.05)

数値は平均値±標準誤差で表す (* : p<0.05). 3群間の比較にはANOVA検定を用いた. T2minは局所・NA+NPY群で局所・NA群より有意に遅れた. CBFmin局所・NA+NPY群でのCBFは5分間の投与終了後も減少し, CBFminは, 局所・NA+NPY群が他の2群より有意に減少した. 一方, CBF 20は局所・NA+NPY群では初期値まで回復せず, 局所・NA群, 局所・NPY群と有意差を認めた.



第8図 局所・NA群, 局所・NPY群, 局所・NA+NPY群におけるCBFとBPの比較

NA (n=7), NPY (n=9), NA+NPY (n=8), コントロールとして生食 (n=6) を投与した. 局所・NA単独群, 局所・NPY単独群, 局所・NA+NPY群のいずれにおいても外リンパ局所投与開始後より減少し, 最小値に達した後に初期値まで増加する傾向が認められた. 一方, BPには明らかな変化は認められなかった. (Itou M et al : Acta Otolaryngol 121 : 573-578, 2001 の Fig. 5 より許可を得て転載)

372.6 U. CARR と対照群と比較して有意に高値を示した. 突発性難聴群では治療後に酸化ストレス度の有意な減少と聴力の有意な改善を認めたことより, 突発性難聴の発症と治癒にフリーラジカルが何らかの関与をしていると考えられたが, d-ROMs test は全身の酸化ストレス度の評価であり, 突発性難聴における内耳でのフリーラジカルの発生の有無については言及できない. 神崎ら⁵²⁾が突発性難聴患者において血清NK細胞活性の低下傾向が認められたと報告していることから, 身体的, 精神的ストレスが高い状態では酸化ストレス度の増加が認められ, 突発性難聴を発症しやすい可能性が考えられ

た. 今回, 突発性難聴群では程度の差はあるものの全例で聴力の改善が見られたが, 今後は症例を重ねて聴力不変例も加えた検討が必要である.

TRT群では治療前後でTHIは改善したが酸化ストレス度に有意な変化が認められなかったことより, 耳鳴苦痛度が改善しても全身のフリーラジカルの変動は来さなかったと考えられ, 慢性の耳鳴ではフリーラジカルの関与は少ないと考察された. 今回急性難聴群の対象は程度の差はあるものの全例聴力の改善が見られたが, 今後は症例を重ねて聴力不変例を検討する必要がある. 一方急性感音難聴の発症時の酸化ストレス度が高値を示したこ

とより内耳疾患の発症時にフリーラジカルが発生している可能性や元々酸化ストレス度の高い状態に内耳疾患が起りやすいと推測された。

以上、突発性難聴発症時において心身のストレスが高い状態である可能性が考えられるが、ストレス関連ペプチド NPY の CBF に対する作用を初めとする高ストレス状態での内耳循環動態はいまだ明らかではない。今回の実験 1 の結果から全身投与において高濃度 NA 持続投与群では投与直後より CBF の増加傾向が認められたが、これは BP 上昇に伴う変化と推定された。Sugara⁵³⁾は NA 投与後血圧が上昇し、2次的に血管が拡張したため CBF が上昇したと報告し、本実験においても NA の全身投与にて CBF の増加が認められたが BP の上昇による2次的な CBF の増加と考えられた。同様に NPY 持続投与群では CBF, BP 共に濃度依存性に増加傾向が見られた。Edvinsson⁵⁴⁾は脳底動脈に NPY を投与した実験では脳皮質表面の細動脈で濃度依存性に血管収縮効果が上昇したと報告している。高濃度 NPY 持続投与においても、NA と同様に血管収縮による BP 上昇が生じ、結果として2次的な CBF の増加を生じたと考えられた。

NPY Y1 受容体の血管収縮作用については(1) NPY の直接作用と(2) NA による血管収縮を増強する間接作用がある。これまでの報告によれば Yang XP⁵⁵⁾はイヌの摘出脾動脈を用いた実験で、NPY は単独では NPY の Y1 受容体を介した弱い血管収縮反応を示すが、NA 存在下では NPY の Y1 受容体と NA の $\alpha 1B$ 受容体が共役することによってホスホリパーゼ C 経路を活性化し、カルシウムイオンの動員を促し、血管平滑筋の収縮を増強すると報告している。NA による血管収縮は急激で収縮時間も短く回復する際の血管拡張も急峻であるのに対して NPY は NA の血管収縮後、収縮を持続する作用があると考えられる。

本研究において、全身・NA 単独群では CBF は立ち上がり早く急激に増大し短時間で減少しているのに対し、全身・NA+NPY 群では増加減少は緩序であり CBF の T1max は全身・NA 単独群、全身・NPY 単独群に比べて遅く、NA の蝸牛における血管収縮を NPY が持続延長したと解釈された。また、全身・NA+NPY 群では T1max, T1min が延長し、収縮が遷延化したものの CBF の上昇には有意の差は認めなかった。これは血圧上昇の影響を受け Y2 レセプターを介した血圧低下作用が作動した可能性が考えられた。

局所投与における CBF は局所・NA+NPY 群では局所・NA 群、局所・NPY 群に比べてより減少し、また

CBF の最小値に達する時間 T2min は局所・NA+NPY 群では局所・NA 群に比べて遅く、血管収縮時間が延長したと考えられた。蝸牛中の NPY 受容体の分布はいまだ明確ではないが、NPY 含有神経線維がラセン蝸牛軸動脈およびその枝に分布するという報告があり^{20, 21)}、外リンパ腔に投与された NPY が蝸牛軸に達し、ラセン蝸牛軸動脈およびその周囲の血管に直接作用して CBF を低下させたと考察した。したがって、NPY は NA 下で内耳血管の NPY 受容体を介して持続性の血管収縮物質として働くと推測された。また、CBF の障害時間が長いほど内耳障害が発生しやすいという事実からは⁵⁶⁾、ストレス時には NPY の血管収縮持続作用による蝸牛血流障害の遷延化が引き起こされ、突発性難聴を始めとする急性感音難聴の病態に至る関与している可能性があると考えられる⁵⁷⁾。

本研究ではストレスとの関連も含めた突発性難聴の発症時の病態を臨床的および実験的に検討した。その結果、突発性難聴の発症時にはフリーラジカルが高い状態であると考えられ、実験的にはストレス反応下で NPY により CBF が持続的に低下させている病態が示唆された。

【総括】

1. 突発性難聴の発症時の病態ストレスとの関連についてヒトを対象とした臨床統計およびモルモットを対象とした蝸牛血流実験を施行し検討した。
2. ヒトを対象とした統計では、突発性難聴の発症時には酸化ストレス度が高く治療前後に酸化ストレス度の有意な減少を認めたことより突発性難聴発症に高ストレス状態が何らかの関与をしていると考えられ、突発性難聴発症時には心身のストレスが高い状態であると推測された。
3. モルモットを対象とした蝸牛血流実験では CBF に対する NPY の作用について実験的に検討した。実験から NANPY の相互作用により CBF 低下作用を持続遷延化すると考えられ、ストレス下で NPY は蝸牛血管収縮作用を持続遷延化すると考えられた。突発性難聴発症時に蝸牛においてはストレス反応で放出された NPY による CBF 減少作用が発現し、突発性難聴発症の誘因になり得ると示唆された。
4. 以上の結果により突発性難聴発症時には心身のストレスが高くこれによってフリーラジカル量が高値を示し、またストレス反応で放出された NPY による CBF 減少が発症の誘因になっていると考えられ、突発性難聴発症時にストレスが関与している可能性が考えられた。

稿を終えるにあたりご指導ご校閲を賜りました慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科教室小川郁教授に深甚なる謝意を表します。酸化ストレス度測定に関連する研究を御指導下さった日本鋼管病院耳鼻咽喉科相馬啓子部長に深甚なる謝意を表します。また本論文に有益な御助言を下さいました慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科教室井上泰宏准教授、斎藤秀行講師、東京電力病院耳鼻咽喉科佐藤美奈子科長に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Nakamura M, Aoki N, Nakashima T, Hoshino T, Yokoyama T, Morioka S, Kawamura T, Tanaka H, Hashimoto T, Ohno Y, Whitlock G : Smoking, alcohol, sleep and risk of idiopathic sudden deafness : a case-control study using pooled controls. *J Epidemiol* 11 : 81-86, 2001
- 2) Lin HC, Chao PZ, Lee HC : Sudden sensorineural hearing loss increases the risk of stroke. A 5-year follow-up study. *Stroke* 2008, Jun 26 [Epub ahead of print]
- 3) Neuser J, Knoop T : Sudden idiopathic hearing loss. Psychopathology and antecedent stressful life-events. *Br J Med Psychol* 59 : 245-251, 1986
- 4) Schmitt C, Patek M, Kroner-Herwig B : Stress and the onset of sudden hearing loss and tinnitus. *Int Tinnitus J* 6 : 41-49, 2000
- 5) 阿部 隆, 立木 孝 : 低音域の急性感音難聴と低音障害型突発難聴. *Audiology Japan*, 45 : 167-175, 2002
- 6) 野村恭也 : 内耳血管. 新耳科学アトラス形態と計測値 (平野皓正編集). シュプリンガー・フェアラーク社, p. 207-220, 1992
- 7) 田淵経司 : 内耳虚血再還流の病態解析. 耳鼻展, 50 : 208-213, 2007
- 8) Cannon WB : Stress and strains of homeostasis. *Am J Med Sci* 189 : 1-14, 1935
- 9) Martin DS, Appelt C : Acute stress increases venomotor tone in conscious rats. *Am Physiol Soc : H* 1375-1383, 1996
- 10) Wangemann P, Wonneberger K : Neurogenic regulation of cochlear blood flow occurs along basilar artery, the anterior inferior cerebellar artery and at the points of the spiral modiolar artery. *Hear Res* 209 : 91-96, 2005
- 11) Miller JM, Dengerink H : Control of inner ear blood flow. *Am J Otolaryngol* 9 : 302-316, 1988
- 12) Kuo L, Abe K, Zukowska Z : Stress, NPY and vascular remodeling : Implication for stress-related diseases. *Peptides* 28 : 435-440, 2007
- 13) Cui H, Sakamoto H, Higashi S, Kawata M : Effect of single-prolonged stress on neurons and their afferent inputs in the amygdala. *Neuroscience* 152 : 703-712, 2008
- 14) Kask A, Bago L, Harro J : NPY Y1 receptors in the dorsal periaqueductal gray matter regulate anxiety in the social interaction test. *Neuroreport* 9 : 2713-2716, 1998
- 15) 森 保道 : 血管作動性物質の分子生物学 ニューロペプチド Y. *日本臨床, 増刊号* : 85-89, 2000
- 16) 芝崎 保, 若林一二 : 神経ペプチド Y (NPY). 情動とホルモン (伊藤眞次編集). 中山書店, p. 201-222, 1997
- 17) Humphreys GA, Davin JS, Veale WL : Injection of neuropeptide Y into the paraventricular nucleus of the hypothalamus inhibits gastric secretion in the rat. *Brain Res* 456 : 241-248, 1988
- 18) 芝崎 保 : ストレス反応における神経ペプチドとノルアドレナリンの関与様式. *日内泌誌*, 71 : 241, 1995
- 19) Ylikoski J, Pirvolan U, Happola O, Panula P, Virtanen I : Immunohistochemical demonstration of neuroactive substances in the inner ear of rat and guinea pig. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 107 : 417-423, 1989
- 20) Carlisle L, Aberdeen J, Forge A, Burstock G : Neural basis of cochlear blood flow : Peptidergic and adrenergic innervation of the spiral modiolar artery of the guinea pig. *Hear Res* 43 : 107-114, 1990
- 21) Lyon JM, Payman RN : Comparison of the vascular innervation of the rat cochlea and vestibular system. *Hear Res* 141 : 189-198, 2000
- 22) 吉川敏一 : 炎症と酸化ストレス. *日内会誌*, 95 : 1870-1875, 2006
- 23) Neri S, Signorelli S, Pulvirenti D, Mauceri B, Cilio D, Bordonaro F, Abate G, Interlandi D, Misseri M, Ignaccolo L, Savastano M, Assolina R, Grillo C, Messina A, Serra A, Tsami A : Oxidative stress nitric oxide, endothelial dysfunction and stress. *Free Radic Res* 40 : 615-618, 2006
- 24) Yamane H, Takayama M, Sunami K, Iguchi H, Kanazawa A, Tokuhara Y, Nishiura H, Nishimura K, Tao SD : Nitric oxide induces apoptosis of the hair cells of cochlea. *Acta Otolaryngol Suppl* 554 : 6-11, 2004
- 25) Henderson D, Bielefeld EC, Harris KC, Hu BH : The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear* 27 : 1-19, 2006
- 26) Shimogori H, Takemoto T, Mikuriya T, Yamashita H : Edaravone protects the vestibular periphery from free radical-induced toxicity in response to perilymphatic application of (+/-) alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionic acid. *Eur J Pharmacol* 554 : 223-228, 2007
- 27) Takemoto T, Sugahara K, Okuda T : The clinical free radical scavenger, edaravone, protects cochlear hair cells from acoustic trauma. *Eur J Pharmacol* 487 : 113-116, 2004
- 28) Tanaka K, Takemoto T, Sugahara K, Okuda T, Mikuriya T, Takeno K, Hashimoto M, Shimogori H, Yamashita H : Post-exposure administration of edaravone attenuates noise-induced hearing loss. *Eur J Pharmacol* 522 : 116-121, 2005
- 29) Koppe RD, Coleman JK, Liu J : Candidate's thesis ;

- enhancing intrinsic cochlear stress defenses to reduce noise-induced hearing loss. *Laryngoscope* 112 : 1515-1532, 2002
- 30) 相馬啓子：フリーラジカルと抗酸化. *Equilibrium Res*, 65 : 252-253, 2006
- 31) Komatsu F, Kudoh H, Kagawa Y : Evaluation of oxidative stress and effectiveness of low-dose glucocorticoid therapy on exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62 : 459-464, 2007
- 32) Haffor AS, Al-Johany AM : Effect of heat stress, hypoxia and hypoxia-hyperoxia on free radical production in mice musculus. *J Med Sci* 5 : 89-94, 2005
- 33) Cornelli U, Cornelli M, Terranova R : Free-radical and vascular disease. *The International Union of Angiology's Bulletin* 15 : 7-10, 1999
- 34) Chung RS, Bruch D, Dearlove J : Endoscopic measurement of gastric mucosal blood flow by laser Doppler velocimetry : Effect of chronic esophageal variceal sclerosis. *Am Surg* 54 : 116-120, 1988
- 35) Talman WT, Nitschke-Dragon DM, Heistad DD, Ohta H : Cerebrovascular effects produced by electrical stimulation of fastigial nucleus. *Am J Physiol* 261 : H707-713, 1991
- 36) Ohlsen KA, Baldwin DL, Nuttall AL, Miller JM : Influence of topically applied adrenergic agents on cochlear blood flow. *Circulation Res* 69 : 509-518, 1991
- 37) Dengerink HA, Wright JW : Circulation of the inner ear : III. *The Physiology of Cochlear Blood Flow : Implications for treatment Physiology of the Ear*, (Ed by AF Jahn and J Santos-Sacchi), Raven Press, New York, pp. 590-606, 1988
- 38) Allen JM, Schon F, Todd V, Yeats JC, Crockard HA, Bloam SR : Presence of neuropeptide Y in human circle of wills and its possible role in cerebral vasospasm. *Lancet* 8 : 550-552, 1984
- 39) Nakashima T, Nagasawa S, Sone M, Tomonaga M, Hayashi H, Yamamoto H, Liu X, Nuttall AL : Disorders of cochlear blood flow. *Brain Res Brain Res Rev* 43 : 17-28, 2003
- 40) 伊藤まり, 相馬啓子, 安藤麗子 : 急性感音難聴症例における酸化ストレス度の検討. *耳鼻臨床*, 101 : 10 : 743-748, 2008
- 41) Ito M, Ogawa K, Inoue Y, Sato M, Kanzaki J : Effects of neuropeptide Y on cochlear blood flow in guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 121 : 573-578, 2001
- 42) Minami SB, Yamashita D, Ogawa K, Schacht J, Miller JM : Creatine and tempol attenuate noise-induced hearing loss. *Brain Res* 1148 : 83-89, 2007
- 43) Duan M, Qiu J, Laurell G, Olofsson A, Counter SA, Borg E : Dose and time-dependent protection of the antioxidant N-L-acetylcysteine against impulse noise trauma. *Hear Res* 192 : 1-9, 2004
- 44) Yamasoba T, Pourbakht A, Sakamoto T, Suzuki M : Ebselen prevent noise-induced excitotoxicity and temporary threshold shift. *Neurosci Lett* 380 : 234-238, 2005
- 45) Maruyama J, Yamagata T, Ulfendahl M, Bredberg G, Altschuler RA, Miller JM : Effects of antioxidants on auditory nerve function and survival in deafened guinea pigs. *Neurobiol Dis* 25 : 309-318, 2007
- 46) 工田昌矢 : 抗酸化剤によるメニエール病の病態と治療に関する研究. 厚生省特定疾患調査研究班平成 17 年度研究業績報告書 : 78-81, 2007
- 47) 広瀬敬信, 菅原一馬, 御厨剛史 : コエンザイム Q10 の音響保護効果のメカニズム. *Otol Jpn*, 17 : 267, 2007
- 48) 相馬啓子, 大築淳一, 吉田昭男, 佐藤彰芳 : ミトコンドリア遺伝子異常による糖尿病と聴力. *Audiology Japan*, 38 : 603-604, 1995
- 49) Haynes DS, O'Malley M, Cohen S, Watford K, Labadie RF : Intratympanic dexamethasone for sudden sensorineural hearing loss after failure of systemic therapy. *Laryngoscope*, 117 : 3-15, 2007
- 50) 小川 郁 : 突発性難聴の治療法. *耳喉頭頸*, 78 : 205-211, 2006
- 51) Joachins HZ, Segal J, Golz A, Netzer A, Goldenberg D : Antioxidants in treatment of idiopathic sudden hearing loss. *Otol Neurotol* 24 : 572-575, 2003
- 52) 神崎 晶, 増田正次, 佐藤美奈子, 齊藤秀行, 水足邦雄, 鈴木隆史, 大石直樹, 若林健一郎, 井上泰宏, 小川 郁 : 突発性難聴患者の末梢血におけるバイオマーカーの検討. *Audiology Japan*, 50 : 419-420, 2007
- 53) Suga F, Snow J : Adrenergic control of cochlear blood flow. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 78 : 358-374, 1969
- 54) Edvinsson L : Functional role of perivascular peptides in the control of cerebral circulation. *TINS* : 126-131, 1985
- 55) Yang XP, Chiba S : Interaction between neuropeptide Y1 receptors and 1B-adrenoceptors in the neurovascular junction of canine splenic arteries. *Eur J Pharmacol* 466 : 311-315, 2003
- 56) Ogawa K, Kanzaki J, Ogawa S, Tsuchihashi N, Inoue Y, Sato M, Ikeda S : Electrocochleography during experimental cochlear ischemia of the guinea pig. *Acta Otolaryngol* 116 : 253-256, 1996
- 57) Lamm K, Arnold W : Noise-induced cochlear hypoxia is intensity dependent, correlates with hearing loss and precedes reduction of cochlear blood flow. *Audiol Neurotol* 1 : 148-160, 1996