

*Review article***Glycative stress and the inner ear disorder**

Junko Tsuda, Kazuma Sugahara, Hiroshi Yamashita

Department of Otolaryngology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Yamaguchi, Japan

Glycative Stress Research 2020; 7 (3): 240-247
(c) Society for Glycative Stress Research

(総説論文：日本語翻訳版)

糖化ストレスと内耳障害

津田潤子、菅原一真、山下裕司

山口大学大学院医学系研究科 耳鼻咽喉科学

抄録

糖尿病患者に感音難聴が合併する割合が高いことは多く報告されているが、合併症として広く認識されるには至っていない。腎障害は糖尿病3大合併症として周知の通りであるが、腎糸球体と内耳蝸牛血管条は組織学的に類似性を有している。アミノ配糖体系抗生物質や白金系抗悪性腫瘍剤投与における聴器毒性と腎毒性が共通の有害事象であることはよく知られており、内耳疾患と腎疾患の関連は以前より指摘されている。我々は糖尿病における難聴発症の機序の解明を目的に、2型糖尿病モデルマウスである Tsumura Suzuki Obese Diabetes (TSOD) マウスを用いて検討を行った。TSODマウスは対照に比較すると、早期より難聴を発症することが確認され、また病理組織学的には内耳蝸牛血管条において毛細血管密度の有意な減少を認めた。これは内耳における糖尿病性細小血管障害の所見であると考えられる。糖尿病に起因する難聴の予防のために、カロリー制限および漢方製剤(防風通聖散と大柴胡湯)投与を行ったところ、聴力低下は有意に抑制され、蝸牛の血流も維持されていた。一方アンチエイジング領域で注目されるメトホルミン投与を行ったところ、TSODマウスでは効果が得られなかったものの、老人性難聴モデルDBA/2においては早期より聴力低下が抑制され、興味深い結果となった。糖尿病は背景に内臓脂肪の過剰蓄積に起因するメタボリックシンドロームが関与することが多く、様々な因子が関与するため複雑な病態といえ、機序の解明にはさらなる検討が必要である。

連絡先：教授 山下裕司
山口大学大学院医学系研究科 耳鼻咽喉科学
〒755-8505 山口県宇部市南小串 1-1-1
TEL: 0836-22-2281 e-mail: hiro-shi@yamaguchi-u.ac.jp
共著者：津田潤子 tjunko@yamaguchi-u.ac.jp;
菅原一真 kazuma@yamaguchi-u.ac.jp

Glycative Stress Research 2020; 7(3): 240-247
本論文を引用する際はこちらを引用してください。
(c) Society for Glycative Stress Research

KEY WORDS: 糖尿病、聴覚障害、聴性脳幹反応 (auditory brain stem response)、蝸牛 (cochlea)、血管条 (stria vascularis) メトホルミン

はじめに

食事や運動など生活習慣の変化から、わが国では糖尿病人口は増加の一途であるが、糖尿病合併症として感音難聴については現時点で広くは認識されていない。糖尿病に起因した難聴は、過去の疫学調査から若年で発症し、会話に重要な低中音域も障害されるため、生活の質 (quality of life: QOL) を著しく低下させる。また高齢者においても難聴が認知症発症のリスクとなることが近年多数報告されたことから社会的関心が高まっており、聴力低下への対応に加えて予防も注目されている。本稿では、我々がおこなってきた2型糖尿病モデルマウスを用いた検討から、糖尿病に起因する聴力障害における内耳変化、および聴力低下の予防について解説する。

内耳の解剖

耳の構造は、外耳、中耳、内耳から構成され、内耳には聴覚をつかさどる蝸牛と平衡感覚をつかさどる前庭・半規管がある。蝸牛は聴覚の末梢感覚器官であり、2回転半の

かたつむりのような形の構造をもつ。蝸牛を断面で見ると三つの区画にわけられ、中央の区画は蝸牛管とよばれ、中に内リンパ液をいれ、外側の前庭階と鼓室階には外リンパ液をいれる。外リンパ液の組成は細胞外液と同様の高 Na^+ ・低 K^+ 濃度であるのに対し、内リンパ液は細胞内液と同じく高 K^+ ・低 Na^+ と組成が異なっている。

空気振動として外耳に入力された音は、中耳の鼓膜と耳小骨を振動させ、内耳蝸牛においては内耳液を振動させ、神経の活動電位という電気エネルギーに変換され、蝸牛神経から中枢へと伝わる。変換する際に必要となるエネルギーを供給しているのが血管条 (stria vascularis) と呼ばれる部位である。血管条は豊富な毛細血管を有しており、蝸牛管の外側壁にあり蝸牛をらせん状に取り巻き、+80～+90 mVの内リンパ電位を生成している (Fig. 1)¹⁾。

内耳蝸牛血管条と腎糸球体との類似性

腎臓はネフロンという約100万個の構成単位からなり、ネフロンは糸球体と尿細管から構成される。糸球体は、糸玉のような構造の毛細血管とまわりにボウマン嚢という

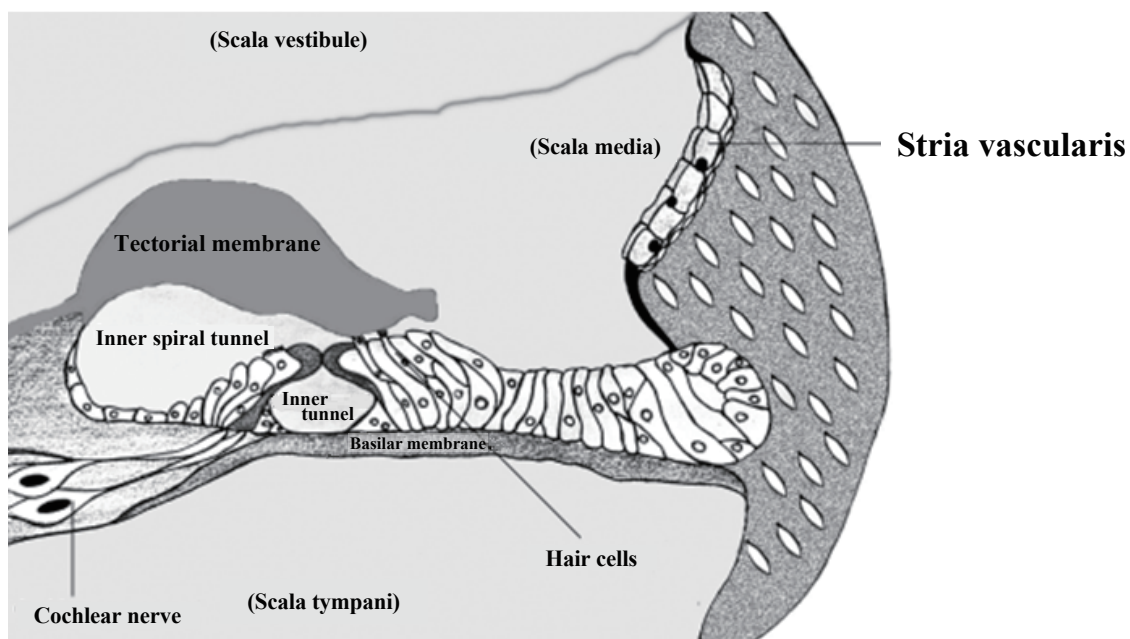


Fig. 1. Cross section of cochlear.

The stria vascularis is located on the lateral wall of the cochlea and is involved in endolymph production and maintenance of electric potential. It is rich in capillaries and composed of three types of cells: marginal cells, intermediate cells, and basal cells. Quoted from reference 1).

袋が取り巻き、毛細血管の血液はろ過され、ボウマン嚢が生成された尿を受け止める。糸球体から近位尿細管においてNaClやCa²⁺、Mg²⁺再吸収、遠位尿細管でNaClやCa²⁺、水の再吸収、さらに集合管へとつらなり、Na⁺、水再吸収、K⁺、H⁺分泌が行われる。

血管条もK⁺チャネルやNa, Cl, K共輸送体など多くのイオントランスポーターを有している。内リンパ液のK⁺はリサイクルされており、有毛細胞に流入したK⁺は血管条から再び内リンパ腔に循環するとされる。

内耳疾患と腎疾患の関係

内耳疾患と腎疾患の関連は以前から指摘されている。アルポート症候群は腎糸球体基底膜の4型コラーゲン遺伝子変異が病因とされる進行性遺伝性腎炎をきたす疾患であり、しばしば進行性両側感音難聴を合併することが知られている。また、アミノ配糖体系抗生物質や白金系抗悪性腫瘍剤を投与した際に聴器毒性と腎毒性は共通の有害事象であることも良く知られており、内耳と腎には類似性がみられることがかねてより報告されている。

病理学的には、Quick CAら²⁾はラットとモルモットにおいて抗蝸牛抗体と腎尿細管上皮が反応し、さらに抗腎糸球体基底膜抗体と内耳血管条、らせん靱帯毛細血管が反応することを報告した。Arnold Wら³⁾は、ラットにおいて抗基底膜抗体を用いて糸球体腎炎モデルを作成したところ、内耳血管条と腎糸球体ともに基底膜と内皮細胞の障害されていることを証明した。内耳の特に血管条と腎糸球体は類似の抗原性を有していることが考えられる。

糖尿病性腎症における典型的な組織変化は糸球体基底膜肥厚、メサングウム拡大、尿細管基底膜肥厚、間質拡大、細小血管滲出性病変であるが、糸球体毛細血管、尿細管周囲毛細血管、細動脈などの微小循環の内皮細胞が持続的に高血糖に暴露されることが要因となっているとの報告がある⁴⁾。

内耳蝸牛血管条は上皮細胞と毛細血管とからなる構造をしており、毛細血管を豊富に有するため、脈管構造に影響を与える因子があると障害されやすい部位といえる。

糖尿病と難聴

本邦における糖尿病人口は増加しており、2017年の厚生労働省による「国民健康・栄養調査」の結果によると本邦における糖尿病有病率は男性18.1%、女性10.5%であり、推計約1,000万人と報告されており、1997年以降増加の一途である⁵⁾。糖尿病三大合併症として網膜症、神経障害、腎症は周知されているものの、感音難聴は主要な合併症としては認識されていない。難聴が実際には過少評価されていることが示唆される。Lancet国際委員会チームに

よるメタアナリシスでは、三つの研究からいずれも聴力低下が認知症リスク要因であると有意に示され、統合相対リスク1.94(95% CI: 1.38～2.73)と高いことを報告した⁶⁾。2017年に同委員会は、難聴を医学的介入により認知症発症を予防できる要因の筆頭としたことから、世界中で急速に注目されることとなった。2019年WHOガイドライン“Risk reduction of cognitive decline and dementia”においても、難聴への早期からの対応が推奨されている⁷⁾。

糖尿病を有する患者に難聴が合併することは、2008年米国大規模疫学調査をはじめとして多数報告されている。同報告では糖尿病成人では聴力障害の有病率が有意に高く、また高音域の障害だけでなく中低音域においても難聴リスクが高いという⁸⁾。国内では2010年に国立長寿医療研究センターで大規模疫学調査が施行され、中高年齢の地域住民2,306人において糖尿病と聴力障害の関係が調査され、糖尿病は聴力に有意な負の影響を及ぼし、その効果は高齢者より中年齢者の方に顕著に現れると報告された⁹⁾。つまり、糖尿病による難聴は若年より発症し、会話に重要である低中音域も障害されるため、QOLを著しく低下させることが示唆される。

糖尿病による内耳蝸牛の形態学的変化は、これまでヒト側頭骨や動物モデルを用いて研究されてきているが、いまだに未明な点が多く共通した結論には至っていない。

Fukushima Hら¹⁰⁾は、ヒト側頭骨病理を検討し、2型糖尿病症例の蝸牛では非糖尿病症例に比較すると、血管条毛細血管の血管壁が有意に肥厚していることを指摘している。これは蝸牛における糖尿病性細小血管障害の所見であると結論した。

動物モデルでは、Smith TLら¹¹⁾は、ストレプトゾシンを投与して作成したラットを用いて検討したところ、糖尿病性細小血管障害と関与していると考えられる血管条毛細血管の基底膜肥厚を報告した。2型糖尿病モデルとされるレプチン遺伝子欠損マウス*ob/ob* miceでは、Lee H-Sら¹²⁾が聴覚について検討をおこない、対照群と比較して早期より聴性脳幹反応(auditory brain stem response: ABR)の閾値が上昇し、組織学的には外有毛細胞の変性および、らせん神経節細胞の消失を指摘した。

このように多くの研究で、糖尿病は加齢に伴い早期から難聴をきたし、内耳蝸牛では細小血管障害が生じていることが示唆される。ただ、糖尿病には多くの因子が関与するため、聴覚評価や内耳の組織学的変化は、モデルや報告者によって一定しておらず、様々な所見が混在する複雑な病態といえる。

2型糖尿病モデルTSODマウスと難聴の検討

我々が用いたTSOD(Tsumura Suzuki Obese Diabetes)マウスは、肥満と糖尿病を呈する、*ddY*系雄マウスの兄妹交配により確立された2型糖尿病モデルマウスである¹³⁾。

過食、高度肥満、高血糖、高インスリン血症、高脂血症が認められ、糖尿病合併症である末梢神経障害も報告されている。腎臓には糸球体係蹄壁肥厚やメサンギウム領域拡大・結節形成が報告されている。脂質異常症も確認され、総コレステロール値およびトリグリセリド値の上昇、LDLコレステロール高値であることが確認されている。CT画像の検討から、皮下脂肪は比較的少ないものの内臓脂肪の過剰な蓄積を認めており、内臓脂肪型肥満、耐糖能異常、高脂血症、高血圧症を伴うことから、メタボリックシンドロームモデルマウスといえる。

TSOD マウスおよび対照系統である TSNO (Tsumura Suzuki Non-obesity) マウスを用いて、体重、血糖値、および聴覚の評価として聴性脳幹反応 (ABR) を経時的に測定した¹⁴⁾。また各々の側頭骨を摘出し、病理組織学的に検討した。TSOD マウスでは体重と血糖値は2か月齢から著しい増加を認め、TSNO に比較して有意に高い値を示した (Fig. 2)。聴覚の評価である ABR 閾値は TSOD マウスで8か月齢より有意な上昇を認め、早期に難聴をきたした (Fig. 3)。病理組織学的には TSOD マウスでは蝸牛側壁の血管条毛細血管内腔の狭小化を認め、さらに血管染色を追加すると TSNO と比較して有意に血管密度が減少していることを確認した (Fig. 4)。これらの所見は内耳蝸牛における糖尿病性細小血管障害と考えられ、糖尿病内耳においては慢性的な血流低下が示唆される。先に述べたように、血管条は豊富な毛細血管で構成されるため、形態学的に細小

血管障害による影響を受けやすい部位と考えられる。1970 年代に Schuknecht¹⁵⁾ が老人性難聴を蝸牛病理所見から、①感覚細胞型 (Sensory presbycusis)、②神経細胞型 (Neural presbycusis)、③血管条型 (Strial presbycusis)、④蝸牛伝導障害型 (Cochlear conductive presbycusis) の四つに分類した。TSOD マウスはこの中の③血管条型 (Strial presbycusis) と考えられる。先に述べたように、血管条を主体とする蝸牛外側壁は内耳のイオン濃度の恒常性を保つ機能を有しており、障害されると有毛細胞は正常に機能できず感音難聴を生じると考えられている。

また TSOD マウス (12 か月齢) の内臓脂肪の遺伝子発現解析では炎症性サイトカインである TNF- α や IL-6 が高発現していることが報告されている¹⁶⁾。我々も TSOD マウス (14 か月齢) の内耳蝸牛における遺伝子発現解析をおこなったところ、176 の遺伝子発現増加、345 の遺伝子発現低下 ($n = 3$, $p < 0.01$, 発現比 > 1.5 [= Log2 ratio > 0.585] および発現比 < 0.66 [= Log2 ratio < 0.585]) を認めた。Igfl ははじめとした、Igfbp6, Tgfb2, Fgfr2, Fgfr2, Ctgf, Fgf7, Fgf12 など多くの成長因子や受容体の発現低下、IL1a, Icam4 など多数の炎症性サイトカインの発現増加を認めた。以上より、2 型糖尿病モデルマウス TSOD では加齢に伴い早期より難聴をきたし、内耳蝸牛ではヒト側頭骨標本と同様に糖尿病性細小血管障害による慢性的な血流不全が確認された。遺伝子網羅解析からは内耳蝸牛においても、慢性炎症が関与している可能性が示唆された。

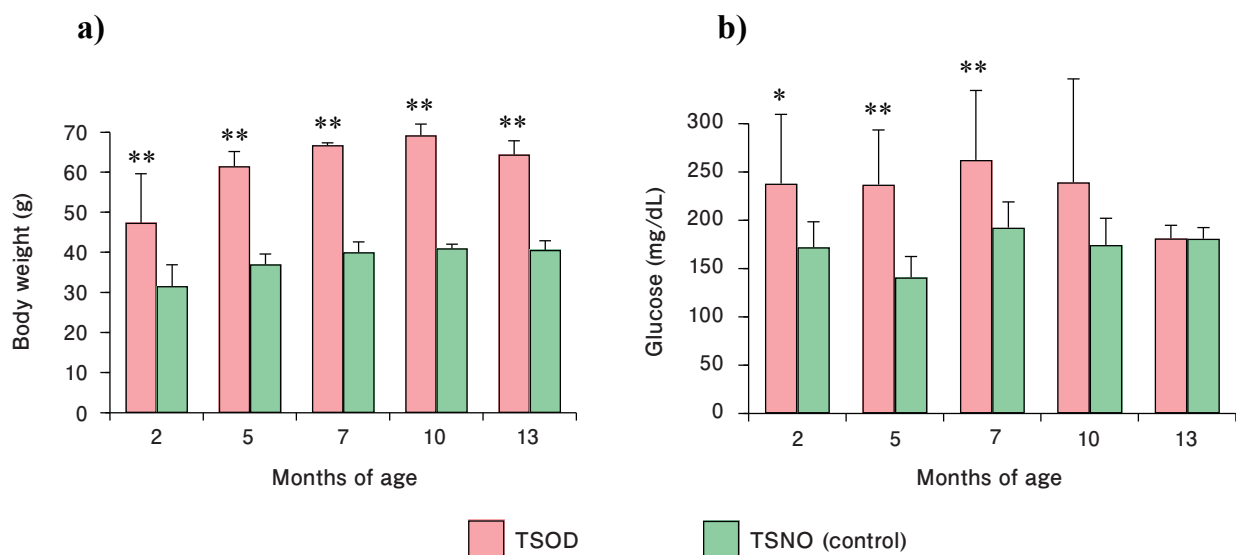


Fig. 2. Changes in body weight and blood glucose level in TSOD and TSNO mice.

a) Body weight. Diabetic model TSOD mice showed significant weight gain from 2 months of age, and exhibited severe obesity of more than 60 g at 5 to 10 months of age. Significant weight gain was observed compared to control TSNO mice. **b)** Diabetes model TSOD mice showed a blood glucose level of over 200 mg/dL from 2 months of age, and hyperglycemia persisted up to 10 months of age. Results are expressed as mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. TSNO (control), $n = 5$. TSOD, Tsumura Suzuki Obese Diabetes; TSNO, Tsumura Suzuki Non-obesity = control for TSOD; SEM, standard error mean. Quoted from reference 14).

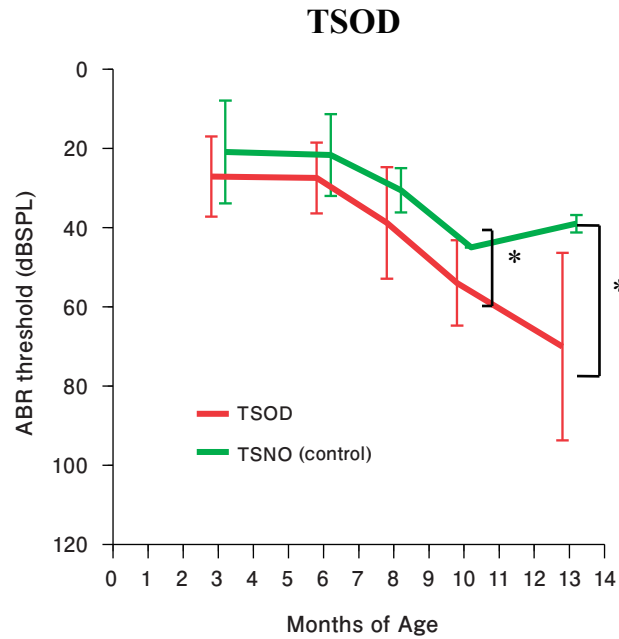


Fig.3. Auditory evaluation in TSOD and TSNO mice.

Auditory sense was evaluated by measuring the threshold of auditory brainstem response (ABR) at 8 kHz. Diabetes model TSOD mice showed a significant threshold increase from 10 months of age, and hearing loss occurred with aging earlier compared with control TSNO mice. Results are expressed as mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$ vs. TSNO (control), $n = 5$. TSOD, Tsumura Suzuki Obese Diabetes; TSNO, Tsumura Suzuki Non-obesity = control for TSOD; SEM, standard error mean. Quoted from reference 14).

Vascular area in the lateral wall of the cochlea

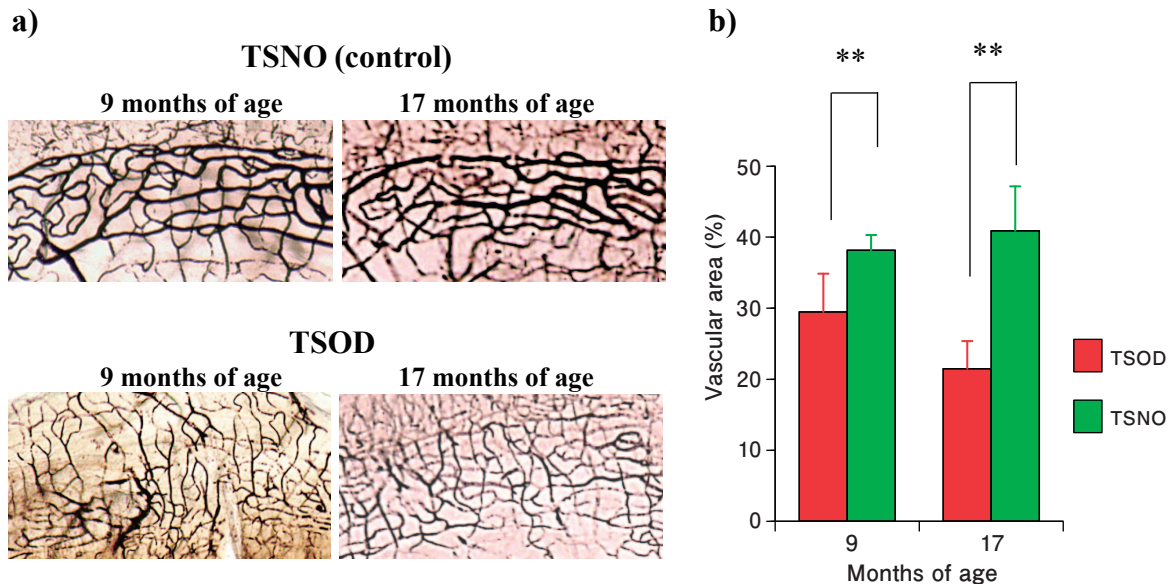


Fig.4. Evaluation of blood vessel area of outer wall of cochlea by blood vessel staining (India ink) in TSNO and TSOD mice.

a) At 9 and 17 months of age, capillaries in the cochlear stria vascularis were observed by blood vessel staining. In TSOD mice, a decrease in the distribution density of capillaries was observed. **b)** When the blood vessel area was evaluated using the image processing software “ImageJ,” the TSOD mice showed a significant reduction in the vessel area at any age compared to the TSNO mice. Results are expressed as mean $\pm$ SEM, ** $p < 0.01$ vs. TSNO (control), $n = 2$. TSOD, Tsumura Suzuki Obese Diabetes; TSNO, Tsumura Suzuki Non-obesity = control for TSOD; SEM, standard error mean. Quoted from reference 14).

内耳のアンチエイジングの試み

2型糖尿病モデルマウス TSOD の難聴に対する内耳保護の試みとして、我々はカロリー制限および漢方製剤（防風通聖散、大柴胡湯）投与を行った¹⁷⁾。実験動物を4群に分けた。対照群では、TSODマウスに無制限に通常の固形食を与えた。カロリー制限群では、固形飼料を隔日投与とした。防風通聖散群および大柴胡湯群は、各々3%含む固形飼料を自由に摂取させた。各群10匹とした。聴覚の評価として定期的にABR検査を行い、内耳蝸牛を摘出し病理組織学的に検討した。結果は、体重増加はカロリー制限群で有意に抑制され、血糖値はカロリー制限群および漢方薬（防風通聖散群、大柴胡湯）群で低下した。対照群と比較し、カロリー制限群および漢方薬群ではABR閾値上昇が抑制され、加齢にともなう聴力低下レベルを抑制した。内耳蝸牛の組織学的検査でも同様に、対照群と比較し、カロリー制限群および漢方薬群では蝸牛外側壁の毛細血管の血管密度は保たれており、糖尿病による内耳の血流不全が改善したことが示唆された（Fig. 5）。

また、糖尿病治療薬メトホルミンを用いた検討も行った。メトホルミンは2型糖尿病治療薬として1950年代から世

界中で広く使用されてきたが、寿命効果や抗腫瘍効果が近年数多く報告されており、アンチエイジング効果が注目されている。C57BL/6マウスにメトホルミン混合飼料を長期投与すると、対照群と比較し5.83%の寿命延長効果を認めたとの報告¹⁸⁾や、メトホルミンで治療された糖尿病患者78,241人は、非糖尿病90,463人に比べ死亡率が15%低下したとの報告がある¹⁹⁾。そこで、2型糖尿病モデルマウスTSODに対してメトホルミン混合飼料を4週齢から30週齢まで長期投与し、対照群と比較検討した。また、老人性難聴モデルマウスC57BL/6JおよびDBA/2にも同様に投与を行った。結果は、2型糖尿病TSODマウスではメトホルミン群と対照群でABR閾値に有意差は認められなかった。ところが、老人性難聴モデルC57BL/6マウスにおいて、メトホルミン群では有意差は得られなかったものの、10週齢と早期より対照群に比較してABR閾値上昇は低下する傾向にあった。さらに老人性難聴モデルDBA/2マウスでは、メトホルミン群では11週齢からABR閾値は有意に低く内耳保護効果を示した（Fig. 6）。有意差が得られたDBA/2マウスで内耳蝸牛の組織学的検討を追加したところ、メトホルミン群ではらせん神経節細胞および外有毛細胞がコントロール群に比較して保たれていることが確

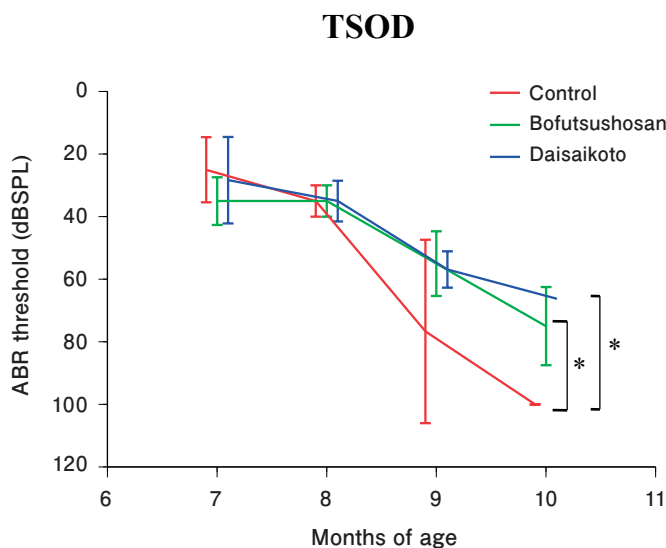


Fig. 5. Auditory evaluation of Kampo administration to TSOD mice.

Auditory sense was evaluated by measuring the threshold of auditory brainstem response (ABR) at 8 kHz. Compared with the control group, the increase in ABR threshold with age was ameliorated in the group treated with Kampo medicine: Bofutsushosan and Daisaikoto. Results are expressed as mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$ vs. control (without Kampo medicine), $n = 10$. TSOD, Tsumura Suzuki Obese Diabetes; SEM, standard error mean. Quoted from reference 17).

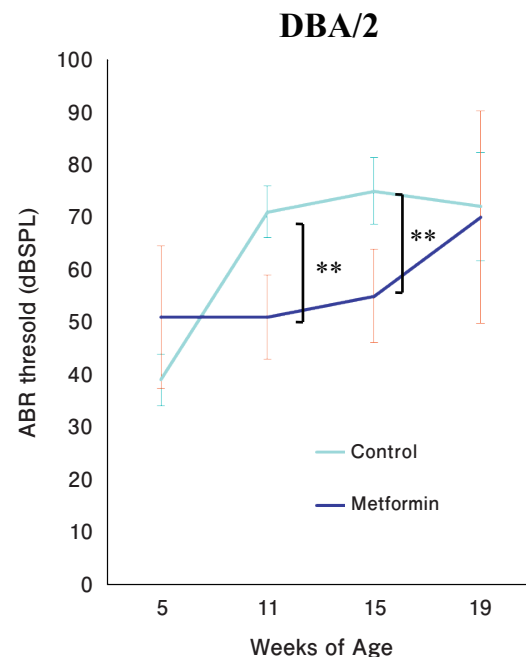


Fig. 6. Auditory evaluation of metformin administration to DBA/2 mice.

Auditory sense was evaluated by measuring the threshold of auditory brainstem response (ABR) at 8 kHz.

Compared with the control group, the ABR threshold was significantly lower in the metformin-administered group from 11 weeks of age, indicating a protective effect. Results are expressed as mean $\pm$ SEM, ** $p < 0.01$ vs. control (without metformin medicine), $n = 5$. DBA/2, presbycusis model; SEM, standard error mean.

認された。細胞老化マーカーである SA- β -gal 活性を全身諸臓器で観察したところ、肝臓・肺・脳において、対照群に比較するとメトホルミン群で活性低下を認め、細胞老化が抑制されていることが示唆された (Fig. 7)。メトホルミンの抗老化作用の機序として、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) を活性化することによって、老化促進シグナルである mTOR (mammalian target of rapamycin) を抑制し、また血管内皮細胞においては eNOS (endothelial nitric oxide synthase) を活性化させ、NO 産生を増加し血管機能を改善させることが報告されている²⁰⁾。内耳においても AMPK は外有毛細胞における K チャネルの調節因子であり、音響障害からの内耳保護に関係していることが報告されている。メトホルミン投与により内耳においても AMPK が活性化し保護作用を示した可能性があり、今後の検討課題である。一方、老人性難聴モデルマウスには保護効果を示したが、2 型糖尿病モデルマウスでは効果が得られなかった。TSOD マウスは高脂血症を伴うメタボリック症候群モデルであり、高度の動脈硬化を伴う難聴を抑制する効果はメトホルミン内服のみでは不十分であった可能性を考えている。

まとめ

難聴は糖尿病における合併症として広くは認識されていないが、加齢に伴い早期から難聴をきたすことが多く報告されており、また会話に重要である低中音域も障害されるため、QOL を著しく低下させる。

我々の 2 型糖尿病モデルマウス TSOD の検討から、加齢に伴い早期より聴覚低下をきたし、組織学的には内耳蝸牛側壁血管条における毛細血管内腔の狭小化を認め、糖尿病性細小血管障害による内耳の慢性的な血流不全が示唆された。漢方製剤 (防風通聖散と大柴胡湯) 投与およびカロリー制限により、加齢にともなう聴力低下は有意に抑制され、蝸牛の血流も維持されていた。アンチエイジング効果が期待されるメトホルミン投与においては、メタボリックシンドロームモデルで高度の内耳血管障害をきたす TSOD マウスでは効果が得られなかったが、老人性難聴モデル DBA/2 においては早期より聴力低下を抑制し、その機序としては内耳蝸牛有毛細胞およびラセン神経節細胞に保護効果を確認した。

SA- β -gal staining DBA/2

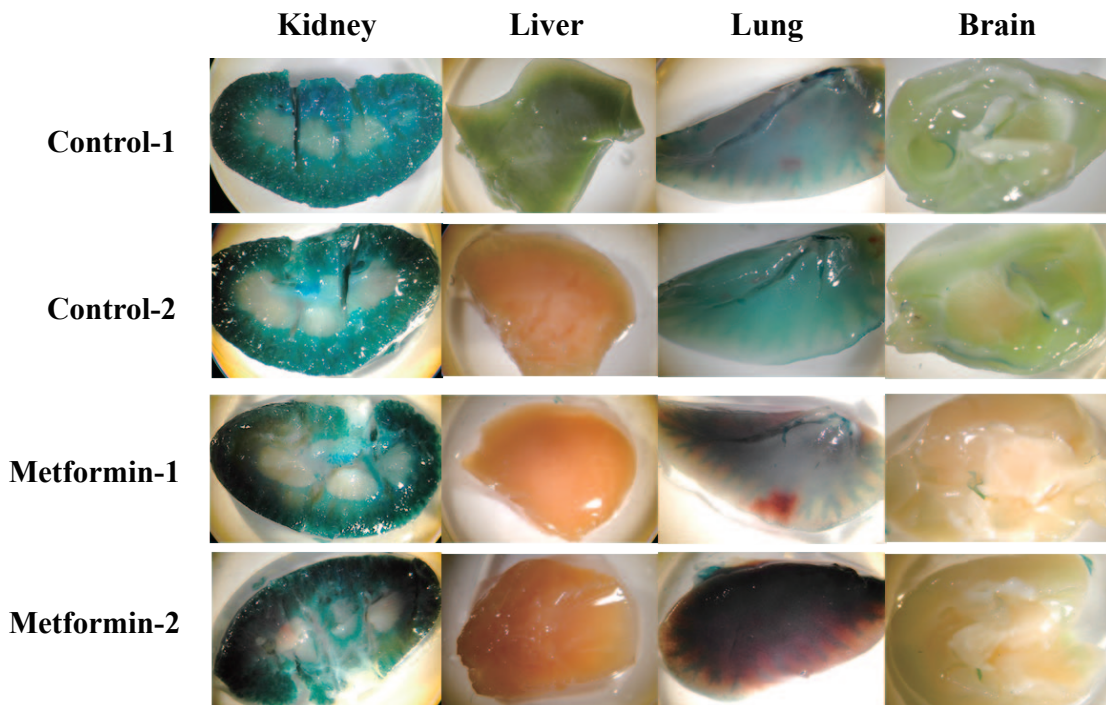


Fig. 7. Histological evaluation of metformin administration to DBA/2 mice by SA- β -gal staining of various organs.

The SA- β -gal activity, a marker of cellular senescence, was observed in various organs throughout the body. The stained cells turn blue. In the liver, lung, and brain, the findings suggestive of reduced activity in the metformin group compared with the control group.

利益相反申告

本論文に関して利益相反に該当する事項はない。

謝辞

本研究は文部科学省研究助成（#15K1075および#18K09321）を受けた。本論文の一部は日本抗加齢医学会講習会にて発表した（2019年3月10日大阪）。

参考文献

- 1) Akinpelu OV, Ibrahim F, Waissbluth S, et al. Histopathologic changes in the cochlea associated with diabetes mellitus: A review. *Otol Neurotol*. 2014; 35: 764-774.
- 2) Quick CA, Fish A, Brown C. The relationship between cochlea and kidney. *Laryngoscope*. 1973; 83: 1469-1482.
- 3) Arnold W. Inner ear and renal diseases. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl*. 1984; 112: 119-124.
- 4) Moriya T, Suzuki Y, Inomata S, et al. Renal histological heterogeneity and functional progress in normoalbuminuric and microalbuminuric Japanese patients with type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2014; 2: e000029.
- 5) 厚生労働省. 平成29年国民健康・栄養調査結果の概要. <https://www.mhlw.go.jp/content/10904750/000351576>.
- 6) Livingston G, et al. Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet*. 2017; 390(10113): 2673-2734.
- 7) World Health Organization (WHO). Guidelines for Risk reduction of cognitive decline and dementia. 2019. https://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/guidelines_risk_reduction/en/
- 8) Bainbridge KE, Hoffman HJ, Cowie CC. Diabetes and hearing impairment in the United States: Audiometric evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 to 2004. *Ann Intern Med*. 2008; 149: 1-10.
- 9) Uchida Y, Sugiura S, Ando F, et al. Diabetes reduces auditory sensitivity in middle-aged listeners more than in elderly listeners: A population-based study of age-related hearing loss. *Med Sci Monit*. 2010; 16: PH63-68.
- 10) Fukushima H, Cureoglu S, Schachern PA, et al. Effects of type 2 diabetes mellitus on cochlear structure in humans. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006; 132: 934-938.
- 11) Smith TL, Raynor E, Prazma J, et al. Insulin-dependent diabetic microangiopathy in the inner ear. *Laryngoscope*. 1995; 105(3 Pt 1): 236-240.
- 12) Lee H-S, Kim KR, Chung W-H, et al. Early sensorineural hearing loss in ob/ob mouse, an animal model of type 2 diabetes. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2008; 1: 211-216.
- 13) Suzuki W, Iizuka S, Tabuchi M, et al. A new mouse model of spontaneous diabetes derived from ddY strain. *Exp Anim*. 1999; 48: 181-189.
- 14) Tsuda J, Sugahara K, Hori T, et al. A study of hearing function and histopathologic changes in the cochlea of the type 2 diabetes model Tsumura Suzuki obese diabetes mouse. *Acta Otolaryngol*. 2016; 136: 1097-1106.
- 15) Schuknecht HF. Pathology of the ear. Harvard University Press, Cambridge, USA, 1974.
- 16) Nishida T, Tsuneyama K, Fujimoto M, et al. Spontaneous onset of nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in a mouse model of metabolic syndrome. *Lab Invest*. 2013; 93: 230-241.
- 17) Hori T, Sugahara K, Tsuda J, et al. Oral administration of an herbal medicine to prevent progressive hearing loss in a mouse model of diabetes. *Auris Nasus Larynx*. 2019; 46: 703-708.
- 18) Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, et al. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun*. 2013; 4: 2192.
- 19) Bannister CA, Holden SE, Jenkins-Jones S, et al. Can people with type 2 diabetes live longer than those without? A comparison of mortality in people initiated with metformin or sulphonylurea monotherapy and matched, non-diabetic controls. *Diabetes Obes Metab*. 2014; 16: 1165-1173.
- 20) Salt IP, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: A ubiquitous signalling pathway with key roles in the cardiovascular system. *Circ Res*. 2017; 120: 1825-1841.