

厚生科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

特異的遺伝性難聴の病態解明と直接治療法開発に 関する研究

課題番号 H12-感覚器-013

平成12年度 総括・分担研究報告書

平成13（2001）年 3月

主任研究者 稲垣真澄

目 次

I. 総括研究報告	
特異的遺伝性難聴の病態解明と直接治療法開発に関する研究	1
稲垣真澄	
II. 分担研究報告	
1. 遺伝性難聴bvの早期診断法の開発に関する研究	5
稲垣真澄	
(資料)遺伝性難聴マウスbvの聴力スクリーニングと中枢神経系病態	
2. 知的障害を伴う筋疾患症例の聴覚機能評価に関する研究	25
稲垣真澄	
3. 遺伝性難聴bvの原因遺伝子クローニングに関する研究	39
難波栄二	
4. 幼弱蝸牛器官への細胞治療法開発に関する研究	43
桜川宣男	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	47
IV. 研究成果の刊行物・別刷	53

I. 総括研究報告

特異的遺伝性難聴の病態解明と直接治療法開発に関する研究

主任研究者

稲垣真澄

厚生科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
総括研究報告書

特異的遺伝性難聴の病態解明と直接治療法開発に関する研究

主任研究者 稲垣真澄 国立精神・神経センター 精神保健研究所 知的障害部
診断研究室長

研究要旨

選択的内有毛細胞障害が生後早期に生じる Bronx waltzer mouse (bv)の臨床診断法の確立と原因遺伝子のクローニングをはかり、同時に内耳特異的な栄養因子投与などで細胞レベルでの障害の早期治療を行う目的で研究を行った。すなわち、主任研究者は研究施設内に有するマウスコロニーにおいて難聴が疑われるbvマウス例あるいは供与されたムコ多糖症VII型の先天代謝異常症マウス例の生後からの聴力を Otoacoustic emission (OAE)や Auditory brainstem response (ABR)により検討し、bvマウスでは ABR異常がより強く認められ、生後のラセン神経節ニューロン密度が漸減することから年齢依存性難聴のモデルともなりうる可能性を示した。また、ムコ多糖症VII型マウスは混合性難聴が存在することが明らかとなった。分担研究者の難波栄二は標的染色体上のマーカー遺伝子情報から原因遺伝子を positional cloning 法などの分子生物学的手法を用いて解明し、インターネット上に公開されている約 100 万塩基対に上る情報を検討し近接部位の遺伝子情報を獲得したが、候補遺伝子を挙げることはできなかった。また、bv マウスに特異的な発現を示す遺伝子を単離する目的で脳を材料に Differential Display 法を行った。30 通りのプライマーの組み合わせで発現の差のあるバンドが 70 以上発見され、本マウスの遺伝的バックグラウンドが均一でないと考えられた。分担研究者の桜川宣男はヒト羊膜から得られた不死化細胞を分離しカプセル化する治療法を開発し、難聴が合併することが明らかとなったムコ多糖症VII型(MPS VII型)への治療応用を目的として基礎実験を行った。その結果、ライソゾーム酵素が半透膜を通過することが証明された。特に MPS VII型の欠損酵素である β -glucuronidase はその透過性が最も高かった。これらの結果から細胞治療により聴力障害が改善する可能性があり、今後研究を進める予定である。

分担研究者 難波栄二 鳥取大学遺伝子実験施設 助教授
分担研究者 桜川宣男 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第5部 部長

そのため厚生行政上、新生児期からの聴覚スクリーニングが重要であり、かつ早期からの言語訓練法開発が必要である。従って厚生労働省によって新しくスタートしている「ALGO システム」による新生児聴力スクリーニングには大きな期待がかかっている。一方、早期に的確な診断が下され、その段階で根本的な治療法が開発されているならば従来のスクリーニングとリハビリテーション・システムよりも大きなコストダウンが見こめる事も充分予想される。

本研究では先天性難聴の純型モデル

A.研究目的

先天性の感覚器障害の中で聴覚器障害は生後の言語獲得に重大な問題を生じてくることはよく知られている。言語獲得の障害は著しいコミュニケーション障害を引き起こし、個人的にも社会的にも多大な時間的損失、経済的損失をもたらす。

としてマウスをその実験系を組むことで早期診断法を確立し原因遺伝子クローニングも進め、速やかな直接治療法を開発し、さらにヒト新生児での応用をはかり、ヒト難聴病態の診断・治療の新しいシステムを構築することを目的とするものである。

B. 研究方法

bvマウスの難聴病態を生理学的に検討するためマウスに対してOAEに加えてABR検査を行った。また、OAEに関しては知的障害を伴う筋疾患児の他覚的聴覚検査としての有用性も検討した。

原因遺伝子検索のため遺伝情報の検索と候補遺伝子の検討をおこない、さらに蛍光 Differential display 法 (Yoshikawa et al, 1998) で特異的な遺伝子発現を検討した。

治療的アプローチとして高分子半透膜製カプセル化に不死化ヒト羊膜細胞を封入して酵素活性を測定した。

C. 研究結果

1. bvマウスの生理学的検討

1) OAE:

DP growth 法の DP レベルは正常群 (ddy 系) では生後2ヵ月以降で左右差がなく安定して得られ、すなわち閾値 50~45dB SPL、レベル 18~24dB であり、成マウス値とほぼ等しいレベルになった。一方、bv マウスは 8000Hz 刺激音に対して生後1, 2ヵ月ですでに閾値上昇 (70~90dB 以上) があり、レベルは 7.3~10.8dB と低かった。その後2年間で反応値の漸減を示し (1 歳半 6.8、2 歳 2.8、2 歳以降 0.6dB)、ほとんど無反応となる例もあった。左右差例も見られた。一方、6000Hz 音には生後2歳でもわずかに反応が残っていた (ddy 系: 10~12 dB、bv: 4~12 dB)。加齢とともに閾値がやや悪化する傾向があった。

2) ABR:

波形は ddy 系で I、II、III、IV の 4 ピ

ークを持つパターンがみられた。IV波閾値は ddy 系で全年齢を通じて 20~30dB 以下であったが、ミュータントマウスでは閾値上昇 (70~90dB) が生後から見られた。また、波形が形成不良であり、I 波が遅延していた (ddy 系: 0.99~1.12 msec、bv: 1.89~2.03 msec)。IV波閾値は生後2年で 90~100 dB であり、閾値の悪化が疑われた。一方、MPS VII 型マウスでも IV波閾値の上昇が確認され、難聴を合併することが確認された。

3) 組織学的検討:

OAE 異常群のbvマウスは生後にラセン神経節ニューロン細胞数が減少し、半年でほぼ半減し、1歳以降も基底回転を主とした細胞数の減少がみられた。一方、OAE や ABR 正常のbvマウスはコントロールの細胞密度とほぼ同じであり、難聴例でのみニューロン数減少が見られた。

2. 筋疾患児の OAE

ABR の V波閾値の上昇が 15 耳で観察された。先天性ミオパチーを伴うすべての患者は OAE で正常あるいは値の減少が認められ、ティンパノメトリーではタイプ B であった。先天性筋線維タイプ不均等症患者の 1 耳において、正常の OAE が観察された。Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症の患者1名では、高周波数刺激で、ノイズに対し小さいながらも明らかな DP 値を有していた。

筋緊張性ジストロフィー症の成人患者において DPOAEs は高周波数領域において認められた。MELAS や Kearns-Sayre Syndrome といったミトコンドリア筋症では両 OAE とも異常を示し、蝸牛に原因がある聴覚障害を強く示唆していた。

3. bvマウスの遺伝子クローニング

1) 遺伝情報の検索と候補遺伝子の検討

bv 周辺のマウスゲノムのマップを作成したところ、bv 領域の塩基配列データや

EST (Expressed Sequence Tag) 情報は未だ公開されていなかった。もともと近傍のマーカーは D5Bir19 と考えられた。ヒトとの相同マップを検討したところ、この領域はヒト 12 番か 22 番染色体に位置することが判明した。さらに今回はヒト 22q11-13 領域の情報について検討した。この領域塩基配列データ約 100 万塩基対 (BAC 相当で 12 断片分) の情報を得た。この中の遺伝子領域を検討したが、マウス 5 番に相当する遺伝子は発見できず、候補遺伝子として明らかなものを得ることはできなかった。

2) bv 特異的発現遺伝子の検討

今回の検討で bv 特異的な発現バンドを 71 同定した。このうち 11 バンドの塩基配列を決定した。BLAST サーチを行った結果、6 種類の塩基配列は未知であり、5 種類は既知の遺伝子とホモロジーが高いと考えられた。

3. 治療法開発に関する研究

ヒト羊膜不死化細胞の細胞内および培養上清において、方法で述べた各種のライソゾーム酵素活性が認められた。 β -グルクロニダーゼ cDNA の遺伝子導入を行ったヒト羊膜不死化細胞からは、細胞内および細胞上清いずれにおいても、高濃度の β -グルクロニダーゼ活性が認められ、キャプセル化した場合にも、同様な高濃度の β -グルクロニダーゼ活性が培養上清に認められた。

D. 考察

遺伝性難聴マウスには多くの病型が知られているが、純粋に聴覚系に局限したものは少ない。内耳蝸牛の内有毛細胞に病変が局在する Bronx waltzer (bv) マウスは遺伝性難聴の病態解明研究に適当なモデルと思われる。bv マウス蝸牛組織の形態学的検討を行ったところ電顕上、生直後に細胞小器官の拡大と増加

を示し死細胞では核と細胞質の濃縮変化がみられ、最終的に heterophagy により処理されていた。また、求心性神経終末とのシナプス形成は形態異常の比較的軽度で、空胞化の少ない内有毛細胞に主に観察された。従って形態学的に apoptosis とも necrosis とも異なる選択的聴覚器細胞死を起こす可能性が示されているからである。

本年度の研究結果から bv マウスは OAE 検査異常があれば ABR 閾値上昇も伴っている事が確認できた。それらの発現は生後早期からみられ、異常の程度すなわち閾値上昇は ABR により強いことが判明した。したがって内耳の求心系機能障害がプライマリに存在し、外有毛細胞機能障害が加わる病態であり、比較的高周波数領域から先行するものと思われる。検査が簡便な OAE で臨床的な診断を下すことが可能で、さらに経過を追うことができると思われる。耳音響放射 OAE は重度の精神遅滞を有する患者においてもそれぞれの周波数領域に応じた聴覚の他覚的評価をする上で有用であると思われる結果であった。

一方、蝸牛の感覚系一次ニューロンの細胞数減少が生後にみられる事も今回明らかになった。これは老人性難聴あるいは神経性難聴でみられる変性現象であり、先天性難聴では今まで指摘されなかったものである。bv マウスの病態は生後早期に完成するものではなく、年齢依存性の要素をもつ進行性の聴覚系入力障害と考えるべきものと思われ、老化現象との関わりにおいても興味深いと思われた。

原因遺伝子解析では今回はヒトとの相同マップからヒト 22 番染色体領域を候補に検討を進めた。しかしながら約 100 万塩基対領域の遺伝子の中にマウス 5 番に位置する候補遺伝子を挙げることはできなかった。最近、ヒト 12 番染色体上の DFNA25 遺伝子が bv 遺伝子と相同では

ないかとの報告がなされた。しかしながら、DFNA25 遺伝子は未だ単離されておらず、今後の検討が必要である。

治療的アプローチとしては原因の判明しているマウスでの解析がまず有用と思われる。すなわち今回はムコポリ多糖体症のモデルマウスで OAE、ABR 検査により難聴が判明した。基礎的な実験結果から羊膜細胞のカプセル療法により *in vitro* のみならず *in vivo* でも酵素活性が増加することが期待できる。その治療により難聴が改善するか、その最適条件はまだ明らかでない。今後の研究課題と考えている。

E. 結論

特異的遺伝性難聴マウスbvの診断には OAE と ABR が有用であることが判明した。また、生後の進行性難聴も加わった複雑な病態である可能性も示された。原因遺伝子解析とあわせて治療的アプローチも一層進めていく必要があると思われる。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

学会発表

1) 遺伝性難聴マウス bv の聴力スクリーニング 稲垣真澄, 堀本れい子, 昆かおり, 加我牧子 第 42 回日本小児神経学会 大阪 2000.6.8-10.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅱ. 分担研究報告

1. 遺伝性難聴bvの早期診断法の開発に関する研究

稲垣真澄

厚生科学研究費（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

遺伝性難聴bvの早期診断法の開発に関する研究

分担研究者 稲垣真澄
国立精神・神経センター 精神保健研究所
知的障害部 診断研究室長

研究要旨

常染色体劣性遺伝性難聴マウス Bronx waltzer mouse (bv/bv)は選択的内有毛細胞障害が生後 1 週間に起きる点が他の遺伝性難聴マウスと異なりきわめて特徴的であるが、難聴病態がいつ完成するのかわかり不明であった。我々は OAE の両側 DP の低レベル所見により bv マウスの早期からの聴力スクリーニングが可能である事を以前より指摘してきた。本年度は聴性脳幹反応(ABR)を加えて聴力の経過を確認し、bv マウスの特徴を明らかにすることを目的に研究をおこなった。結果、OAE と ABR の閾値所見から bv では生後比較的早期から中等度以上の難聴があり、その進行がみられた。すなわちコルチ器の内毛細胞障害に加えて高音域外有毛細胞機能の悪化と伝音性障害も加味された難聴病態と思われ、比較的low周波数部分の聴力が残存すると推測された。ラセン神経節ニューロンの変化は生後生じており、年齢依存性の難聴病態も加わっている可能性もあり、今後の検討課題と思われた。

A. 研究目的

Bronx waltzer mouse (bv) マウスは約 20 年前に自然発症で見出された遺伝性難聴マウスで、5 番染色体に遺伝子座があることまで判明している。本マウスの特徴は内耳蝸牛の内毛細胞のみの選択的変性および細胞死であり、それが生後 1 週間で生じ、約 20 パーセントは生存する。電顕的に検討したところ核には著変がなく、細胞質主体の空胞化が進み、細胞死に至る過程が判明しました。その変化は形態学的にアポトーシスと異なっており、外有毛細胞には形態異常を示さず、聴覚求心系に限局した病変であり、先天難聴の純系モデルと考えられるが、難聴の生後の状態は不明な点が多く、原因遺伝子が確定されていないため現時点では難聴早期診断あるいは臨床病態解析も重要と考えられる。

分担研究者は後の資料に示すように本マウスの聴力スクリーニングのため耳

音響放射 OAE を用いて難聴状態を明らかにしてきた。本年度はさらに詳細な聴力評価を行うため聴性脳幹反応 ABR 検査を加えて、生後の変化に注目し、蝸牛病理所見も比較検討した。

B. 研究方法

対象は生後早期から 2 歳までの bv マウスとムコ多糖体症 VII 型 (MPS VII) ホモマウスとした。後者は研究協力者の国立小児病院奥山虎之博士より供与頂いた。Distortion Product Otoacoustic Emission (DPOAE) の DP growth 法 (f2 周波数 8000Hz と 6000Hz 使用) での DP レベルを求めた。併せてクリック音刺激での ABR 各波潜時と IV 波閾値を年齢別に検討した。コントロールとして ddy 系マウスと比較した。ddy 系マウスでは生後 3 カ月までの 16 匹と 8 カ月例 2 匹に行い、bv マウスでは生後 1 カ月から 2 歳 2 カ月までの 19 匹に検査した。詳細は以下の通りであ

る。

1) OAE および ABR

ILO92 (Otodynamics 社、英国)により歪成分 OAE 法 (DPOAE) のうち DP growth 法を行った。これは呈示する2種類の純音の周波数を固定し、音圧を 80 から 50dB までステップダウンさせて閾値を明らかにする方法である。マウスを対象にした先行研究で高周波数の場合に DP 値がよく得られることが分かっているため今回は f2 周波数を2種類 (7996Hz と 6006Hz) 用いた。

周波数比は $f2/f1=1.2$ として、各音圧における DP 値を求めた。検査に先立ちペントバルビタール腹腔内投与 (5mg/kg 体重) によって麻酔し、15 から 20 分後に体動が抑制された段階で刺激兼検出プローブをマウス外耳孔に挿入して DP growth 法を行った。

OAE 反応は環境音によって妨害されるため比較的静かな部屋で施行した。さらにノイズが安定するまで複数回検査し、再現性を確認した。1 匹当たり検査時間は約 30 分とした。一部のマウスは経時的に DP 値を求め、年齢変化を観察した。

ABR は日本光電製 MEB-9104 (ニューロパック μ) を用い、130dB SPL クリック音を片耳刺激し、対側はホワイトノイズでマスキングを行った。電極は針電極を皮下に刺入し、前頭部をアースとして、頭頂部と耳朶後方に置きそれぞれ不関、関電極とした。加算回数は 500 回、音圧をステップダウンし、各波潜時および IV 波閾値を視察で求めた。

統計学的には解析ソフト Stat View for Windows ver 4.5 で有意差検定を行った。

2) 組織学的検討

検査後に bv、MPS VII、ddy とともに 4% パラホルムアルデヒド溶液 (以下 4% PFA) で経心的に還流固定し側頭骨を 0.5M EDTA 水溶液 (pH 8.0) 中で 1 週間振盪することで脱灰し、両側内耳蝸牛を摘出後

コルチ器ラセン神経節の病理学的検討をおこなった。すなわち基底回転から中間部回転までのローゼンタール管内のニューロンをデジタルカメラで強拡大撮影後 50 マイクロメートル四方の枠 5、6 個の中に存在する数をカウントした (図 1)。詳細は以下の通りである。

顕微鏡下で蝸牛を摘出し、アルコール脱水に供した。摘出した蝸牛を PBS バッファー、50%、70%、80%、90%、純エタノールの順に各 1 時間づつ振盪してアルコール脱水を行い、さらに純エタノールを交換して一晩振盪した。次に純キシレンに移して 1 時間振盪する操作を 2 回繰り返す、脱アルコールを行った。さらに 60°C で融解した硬パラフィンに移し、1 時間後再度交換した。そのまま一晩 60°C に静置してパラフィンを組織に浸透させた。

加熱した包埋皿に融解したパラフィンを注ぎ、蝸牛組織を包埋して素早く氷上に移して固め、パラフィン包埋組織片とした。

パラフィン切片薄切はライカ回転マイクロームを用い、切片厚さ 5 μ とした。38~40°C の水中に切った切片を遊離させ、スライドグラスですくい、45°C に加温した伸展台の上で進展させた。さらに 45°C 恒温器で一晩乾燥した。

HE 染色はスライド切片を染色かごに設置し、キシレン I~III、純エタノール I~II (各 5 分間)、90% エタノール、70% エタノール (各 3 分間)、水 (2 分間) の入った染色バットに順次移して脱パラフィンを行った。つぎにヘマトキシリン液 (マイヤーヘマトキシリン溶液) で 2 分間静置染色後、1 分間流水バット中で洗浄し、エオジン液 (エオジンアルコール溶液) で 30 秒染色後、1 分間流水バット中で洗浄した。脱パラフィンと全く逆の行程で分別脱水および透徹を行い、非水溶性封入剤を用いて封入した。

免疫染色は VECTASTAIN \hat{a} ABC キッ

トを用いて行った。HE 染色と同行程で脱パラフィンを行った後、PBS バッファーで5分間洗浄した。次に10mM クエン酸バッファー (pH6.0) に移し、マイクロウェーブプロセッサを用いて、90°Cで9分間加熱固定し、室温に15分間おき粗熱を取った後、流水バット中で3分間冷却した。

PBSバッファーで3分間洗浄し、さらに内因性ペルオキシダーゼ活性を除くため、0.3%過酸化水素水-メタノール溶液に浸し、20分間静置した。PBSバッファーで3分間洗浄し、希釈正常血清を滴下し、20分間反応させた。余分な血清を捨て、0.1%BSA-PBS バッファーで500倍に希釈した一次抗体 (Monoclonal Anti-Parvalbumin Mouse Ascites Fluid; sigma) を滴下し、室温で30分間反応させた。PBSバッファーで5分間洗浄し、希釈ビオチン化二次抗体を滴下し室温で1時間反応させた。さらに、PBSバッファーで5分間洗浄し、ペルオキシダーゼ基質溶液を滴下し室温で30分間反応させた。さらに水道水で5分間洗浄し、本基質キットを用いて(ジアミノベンジジン四酢酸塩を発色基質とした対比染色キット) 染色した。反応時間は2分間とし、流水で反応停止した。HE 染色時と同様に脱水透徹を行い、非水溶性封入剤を用いて封入した。

C. 研究結果

1)OAE(図2):DP growth法のDPレベルは正常群(ddy系)では生後2ヵ月以降で左右差がなく安定して得られ、すなわち閾値 50~45dB SPL、レベル 18~24dB であり、成マウス値とほぼ等しいレベルになった。一方、bvマウスは8000Hz刺激音に対して生後1, 2ヵ月ですでに閾値上昇(70~90dB以上)があり、レベルは7.3~10.8dBと低かった。その後2年間で反応値の漸減を示し(1歳半 6.8、2歳 2.8、2歳以降 0.6dB)、ほとんど無反応となる

例もあった。左右差例も見られた。一方、6000Hz音には生後2歳でもわずかに反応が残っていた(ddy系: 10~12 dB, bv: 4~12 dB)。加齢とともに閾値がやや悪化する傾向があった。

2)ABR(図3):波形はddy系でI、II、III、IVの4ピークを持つパターンがみられた。IV波閾値はddy系で全年齢を通じて20~30dB以下であったが、ミュータントマウスでは閾値上昇(70~90dB)が生後から見られた。また、波形が形成不良であり、I波が遅延していた(ddy系: 0.99~1.12 msec, bv: 1.89~2.03 msec)。IV波閾値は生後2年で90~100dBであり、閾値の悪化が疑われた。一方、MPS VII型マウスでもIV波閾値の上昇が確認され、難聴を合併することが確認された。

3)組織学的検討(図4):OAE異常群のbvマウスは生後にラセン神経節ニューロン細胞数が減少し、半年でほぼ半減し、1歳以降も基底回転を主とした細胞数の減少がみられた。一方、OAEやABR正常のbvマウスはコントロールの細胞密度とほぼ同じであり、難聴例でのみニューロン数減少が見られた。

D. 考察

本年度の研究によりこの難聴マウスはOAE検査異常があればABR閾値上昇も伴っている事が確認できた。それらの発現は生後早期からみられ、異常の程度すなわち閾値上昇はABRにより強いことが判明した。したがって内耳の求心系機能障害がプライマリに存在し、外有毛細胞機能障害が加わる病態であり、比較的高周波数領域から先行するものと思われた。検査が簡便なOAEで臨床的な診断を下すことが可能で、さらに経過を追うことができると思われる。一方、蝸牛の感覚系一次ニューロンの細胞数減少が生後に見られる事も今回明らかになった。これは老人性難聴あるいは神経性難聴で見られる変性現象であり、先天性難聴では

今まで指摘されなかったものである。bvマウスの病態は生後早期に完成するものではなく、年齢依存性の要素をもつ進行性の聴覚系入力障害と考えるべきものと思われ、老化現象との関わりにおいても興味深いと思われた。

E. 結論

遺伝性難聴bvマウスの聴力は進行性に悪化し、蝸牛病理でラセン神経節ニューロンに神経性的変化があることから年齢依存性難聴も加わっている可能性が見いだされた。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

学会発表

1) 遺伝性難聴マウス bv の聴力スクリーニング 稲垣真澄, 堀本れい子, 昆かおり, 加我牧子 第 42 回日本小児神経学会 大阪 2000.6.8-10.

2 精神遅滞児における視覚性 mismatch negativity の検討 堀本れい子, 稲垣真澄, 佐田佳美, 加我牧子 第 42 回日本小児神経学会 大阪 2000.6.8-10.

3 前庭頸筋反射 (vestibular evoked myogenic potential; VEMP) による重症心身障害児(者)の前庭および脳幹機能評価の可能性 高橋純哉, 稲垣真澄, 昆かおり, 花岡 繁, 佐々木征行, 加我牧子 第 42 回日本小児神経学会 大阪 2000.6.8-10.

4. 新たな前頭葉機能検査としての Cognitive Bias Task (CBT)の有用性—近赤外線分光測定法(NIRS)を用いての評価—

佐田佳美, 金 樹英, 加我牧子, 稲垣真澄, 宇野彰, 佐々木征行, 須貝研司 第

42 回日本小児神経学会 大阪 2000.6.8-10.

5. 歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)における誘発電位の経時的変化

昆かおり, 稲垣真澄, 加我牧子, 下條由紀, 大沢由記子, 岩崎裕治 第 42 回日本小児神経学会 大阪 2000.6.8-10.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図の説明

1. ラセン神経節細胞数の計測: HE 染色切片のうち基底回転から中間部回転までのローゼンタール管内のニューロンをカウントした。また、同時にパルプアルブミン免疫染色を行い聴覚系ニューロンである事を確認した。
2. OAE 反応平均値: 正常群では20デシベル以上あり、bvマウスは生後半年から1年を過ぎてから漸減し、2歳以降にはほとんど反応がなくなった。6000ヘルツ音への反応はbvマウスでも比較的保持されていた。
3. ABR 波形: 正常群マウスでは4つあるいは5つのピークをもつ波形が得られた。一方、bvマウスではIV波の閾値上昇が生後早期から見られ、左右で閾値の異なる場合もみられた。
4. ラセン神経節細胞密度: 年齢毎にグラフで示すと OAE 異常群のbvマウスは生後に細胞数が減少し、半年でほぼ半減し、1歳以降も漸減する傾向がみられた。

图 1 Method of neuron counting in spiral ganglion

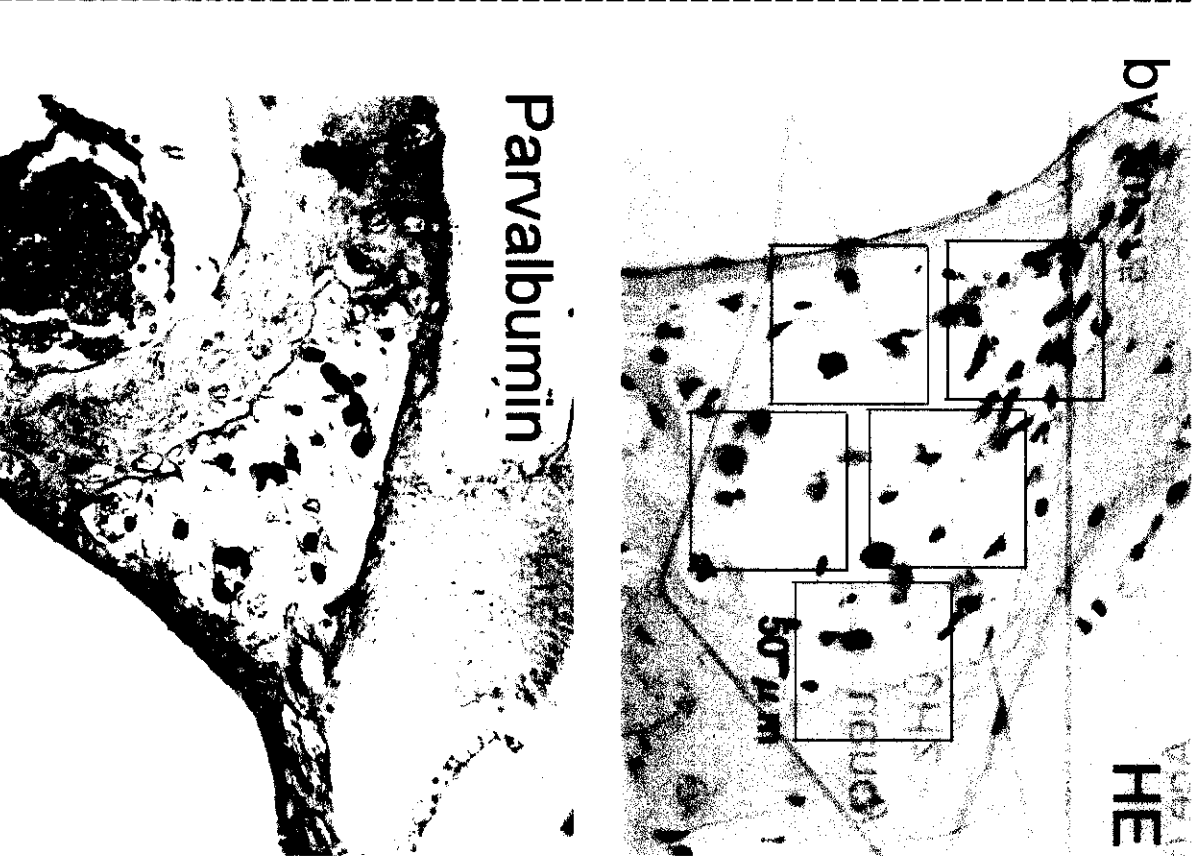
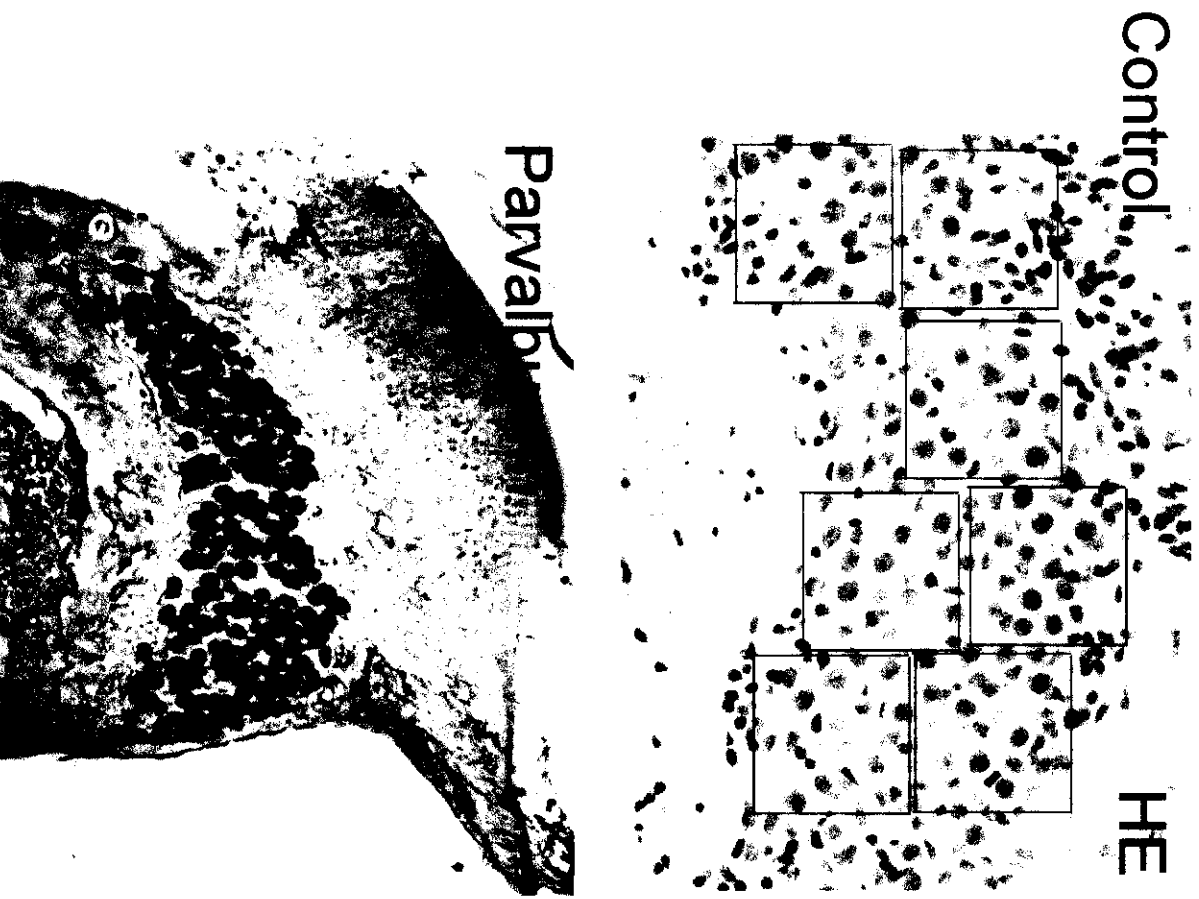


Figure 2 Change of DPOAE amplitude in bv mouse

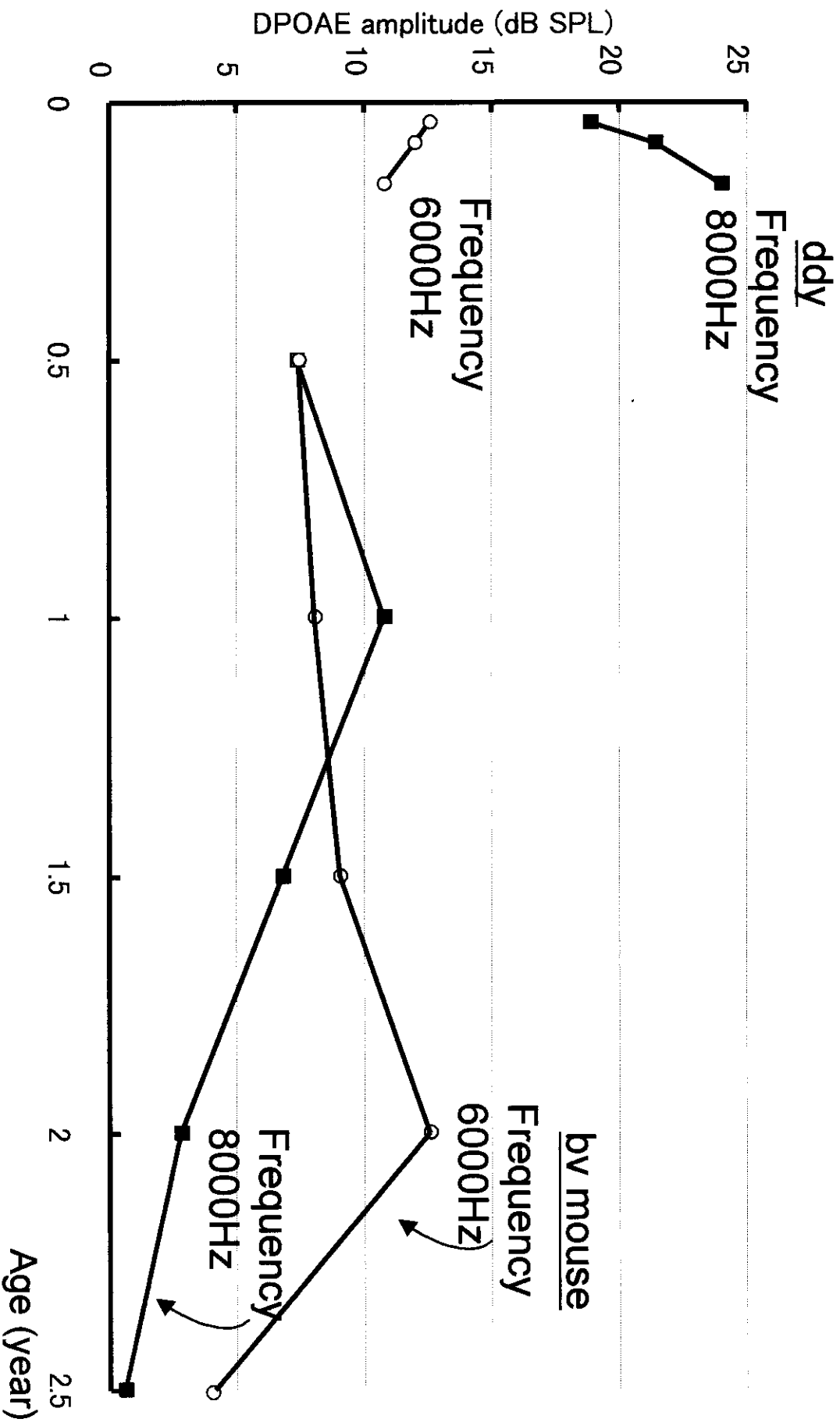
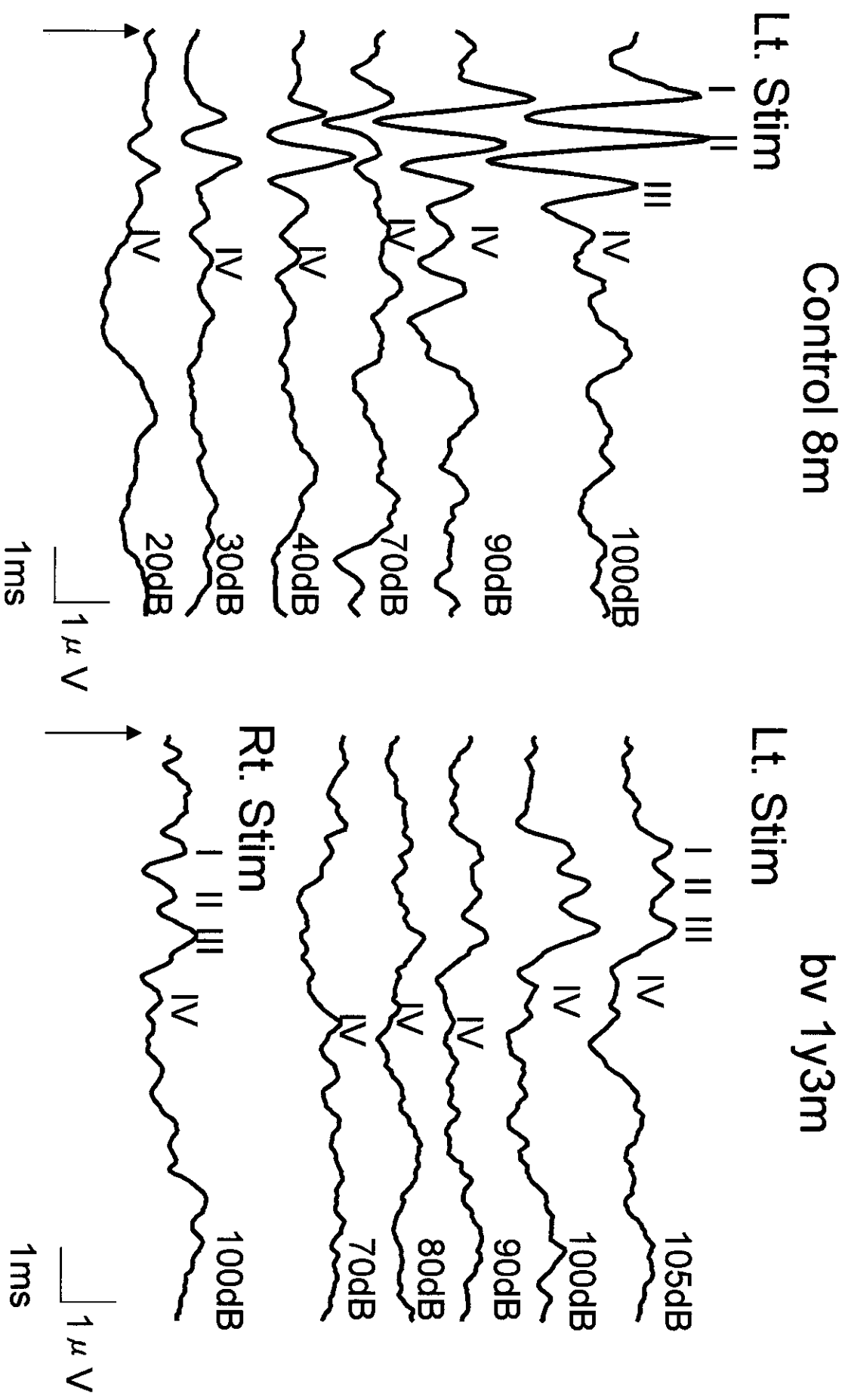
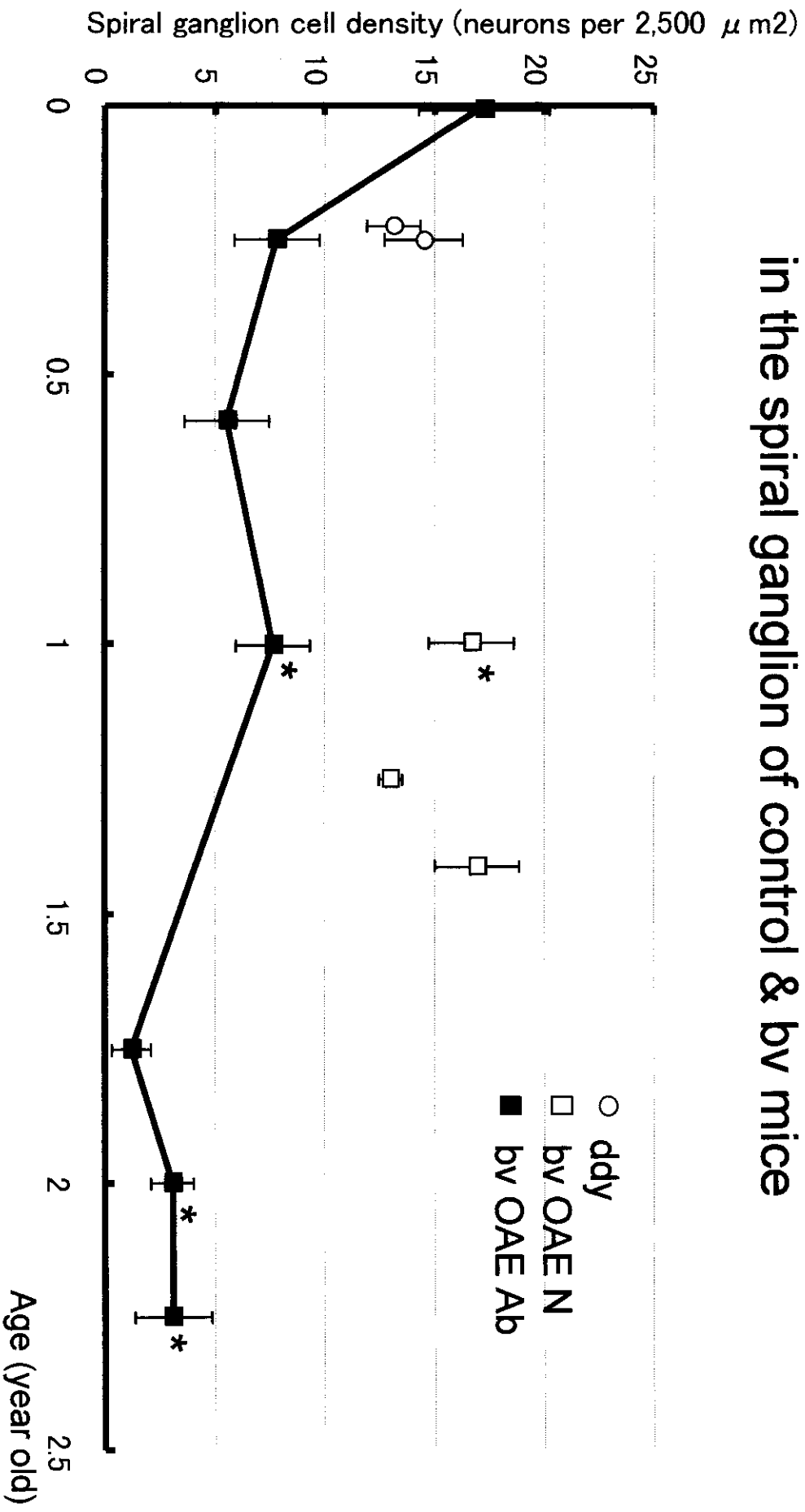


图3 ABR patterns of control & bv mouse



4 Age dependent changes of neuron density in the spiral ganglion of control & bv mice



資料

遺伝性難聴マウスbvの聴力スクリーニングと中枢神経系病態

遺伝性難聴マウス bv の聴力スクリーニングと中枢神経系病態

分担研究者 稲垣真澄*

研究協力者 昆かおり*、堀本れい子*、加我牧子**、伊藤雅之***

*国立精神・神経センター 精神保健研究所 知的障害部

**同 武蔵病院 心理・指導部

***同 神経研究所 疾病研究第二部

Bronx waltzer (bv) マウスは常染色体劣性遺伝性難聴マウスであり、生後1週間で内耳障害が生じる。従って聴覚情報が生後に遮断されるため生後における神経回路網の機能的変化を観察できるモデルと考えられる。内耳機能を評価した結果、耳音響放射 (OAE) の Dp growth rate は平均 15dB SPL 以上群と 5dB SPL 以下群に二大別され、5dB 以下群は聴覚反応が乏しく、回転運動を示す例が多かった。蝸牛ラセン神経節のニューロン数は少なかった。OAE 異常雄と正常雌から生まれた仔は生後 2 週で全例 OAE 値が低く、1.5 ヶ月から正常群と異常群に区別できた。OAE 異常群の Synaptophysin や SNAP 25 蛋白の免疫組織学的染色性や Western blot 法に明らかな差はなかった。G 蛋白質活性化型内向き整流性 K⁺チャネル免疫染色と遺伝子発現ではサブタイプ 2 と 3 の発現が軽度増加していた。本マウスは生後 1.5 ヶ月以降難聴の診断が可能で、両側 DP 低値が Homozygote のパターンと思われた。感覚系ニューロン興奮性の保持に関してシナプス形成異常に加えてニューロンや蝸牛細胞での膜電位機能亢進の可能性が推測された。

はじめに

常染色体劣性遺伝性難聴マウス Bronx waltzer mouse (bv/bv) はコルチ器の内毛細胞のみに選択的変性を生じる点が他の非症候群性遺伝性難聴マウスと異なる。われわれはこの変性～細胞死が生後 1 週間という短い期間に生じ、apoptosis とも necrosis とも異なった様式でおこることを電顕的に明らかにした¹⁾。

本マウスでは聴覚情報の多くが生後早期に遮断されるため体性感覚や視覚系など他の感覚系を介する情報処理が脳において優位であると推測できる。すなわち感覚遮断に基づく脳皮質神経回路網の機能的変化あるいは可塑性を生後に観察できるモデルと考えられる。

ポジショナルクローニング法によって遺伝子座がマウスの第 5 染色体上にあることは判明しているが²⁾、根本的な原因遺伝子が不明のため現状では遺伝的診断が

できない。したがって本研究ではまず bv マウスの聴力スクリーニング法の確立を目的として内耳有毛細胞機能を生理学的に検討した。さらに成熟期での難聴マウスの中枢神経系機能変化をシナプスあるいは膜機能の点から組織病理学的に検討した。

I 対象および方法

2) 耳音響放射 (Otoacoustic emission, OAE)

ILO92 (Otodynamics 社、英国) により歪成分 OAE 法 (DPOAE)³⁾ のうち DP growth 法を行った。これは呈示する 2 種類の純音の周波数を固定し、音圧を 80 から 50dB までステップダウンさせて閾値を明らかにする方法である。マウスを対象にした先行研究⁴⁾ で高周波数の場合に DP 値がよく得られることが分かっているため今回は f2 周波数を 2 種類 (7996Hz と 6006Hz)

用いた。周波数比は $f_2/f_1=1.2$ として、各音圧における DP 値を求めた。検査に先立ちペントバルビタール腹腔内投与 (5mg/kg 体重) によって麻酔し、15 から 20 分後に体動が抑制された段階で刺激兼検出プローブをマウス外耳孔に挿入して DP growth 法を行った。OAE 反応は環境音によって妨害されるため比較的静かな部屋で施行した。さらにノイズが安定するまで複数回検査し、再現性を確認した。1 匹当たり検査時間は約 30 分とした。一部のマウスは経時的に DP 値を求め、年齢変化を観察した。統計学的には解析ソフト StatView for Windows ver 4.5 で有意差検定を行った。

3) 組織学的検討

OAE 検査を行ったのち一部のマウスに対して 4%パラフォルムアルデヒドで経心的に還流固定し、パラフィン包埋薄切切片を作成し H-E 染色で内耳組織を観察した。また、大脳薄切切片を作成し脱パラ後、0.3%過酸化水素にて内因性ペルオキシダーゼを阻害し、一次抗体として抗 parvalbumin (PV) 抗体 (monoclonal 抗体; Sigma, St. Louis, MO)、抗 synaptophysin (SP) 抗体 (monoclonal 抗体; DAKO, Glostrup, Denmark)、抗 SNAP 25 (SN25) 抗体 (monoclonal 抗体; Transduction Lab., Lexington, KY)、抗 synaptotagmin (STG) 抗体 (monoclonal 抗体; Transduction Lab., Lexington, KY) を用いてシナプス関連蛋白質の免疫組織化学的検索を ABC 法にて、Diaminobenzidine にて発色、検出した。

Western blot 法はポリアクリルアミド濃度勾配ゲルを使用し、蛋白量 30 μ g を 1 レーン当たり泳動した後に Wet 法で転写し、上記各一次抗体へのバンドを検討した。サイズマーカーは 14k Da から 205k Da までの 7 本のブルーマーカーを用いた。

大脳皮質ニューロンの膜電位を規定している一部のイオンチャネル発現をみる

ため G 蛋白質活性型内向き整流性カリウムイオンチャネル (G protein activated inward rectifier potassium channel; GIRK) サブタイプ 1 から 4 まで (GIRK1, 2, 3, 4) の発現を DIG ラベルした cRNA プローブ (膜貫通部位の cDNA^{5, 6}) から作成した: サイズは 300-800bp) を用いて In situ hybridization 法にて観察し NBT と X-phosphate で発色した。さらに、GIRK1 と GIRK2 については一次抗体 (ともにウサギ由来の polyclonal 抗体; Alomone Labs., Jerusalem, Israel) を用いた免疫組織化学検討も行った。

II 結果

1) 耳音響放射 (Otoacoustic emission, OAE)

コントロールマウス (ddy 系) では f_2 周波数 7996Hz、 f_1 周波数 6628Hz の純音 (周波数比 1.20) に対して比較的低音圧まで DP 値が記録され、 f_2 周波数 6006Hz でも高音圧で 5dB 以上の反応を認めた (図 1)。

成熟 bv マウス 25 例に f_2 周波数 7996Hz と 6006Hz の 2 種類で DP growth 法によって DP 値を求めた (表 1)。うち 13 例は f_2 周波数 7996Hz の場合、80dB SPL 音に対して左右のいずれかの耳は 15dB 以上を示し、平均 17~22dB の DP 値が得られ、音圧 60dB SPL まで反応陽性であった。典型例を図 2 に示した。一方、残りの 12 例中 10 例は f_2 周波数 7996Hz、音圧 80dB SPL でも 10dB 以下の反応であり、DP 値の平均は 5dB であった。低反応例の一例を図 2 上段に示した。明らかな左右差を認めたのは 2 例であった。これら二つの群間に DP 値の明らかな有意差が統計学的に認められ、高値群は正常反応を示すと思われた ($p<0.001$)。行動学的には 5dB 以下の群は聴覚反応が乏しく、回転運動を示す例が多く方向性が一定の傾向を示した。また、bv マウスは腹腔麻酔の際、体動抑制まで時間がかかり、処置

への過敏性が強かった。

OAE 値が左 9dB、右 4.5dB の異常雄と左 6dB、右 30dB 正常雌から(ともに f2 周波数 7996Hz、音圧 80dB SPL での値)出生した仔マウス 9 例の生後 0.5 ヶ月から 3 ヶ月までの経時的 DP 値変化を観察した。生後半月では全例 7dB 以下の値であったが、1.5 ヶ月時には 10dB 以上のグループと 5dB 以下のグループに分けることが出来た。個々の動物でみても 2 ヶ月時、3 ヶ月時の DP 値はほぼ同じ値を示し、生後 1.5 ヶ月以降 DP 値が安定して得られた(図 3)。

2) 組織学的結果

OAE 正常と異常を示した雄マウスの蝸牛組織を HE 染色したところ内有毛細胞、外有毛細胞の列構造に明らかな相違は見いだせなかったが、ラセン神経節の一次神経節ニューロンが前者では充実して存在したのに対して後者はニューロンがまばらで数が少なく、一部空胞化所見を示した(図 4)。

HE 染色上 OAE 異常群は正常群と比べて側脳室が軽度拡大している印象があった。また、異常群の somatosensory cortex ではエオジン好性の錐体細胞のニューロンが層をなして観察されることがあったが、auditory cortex ではそれが明瞭でなかった。シナプス関連蛋白質の Synaptophysin や SNAP 25 の免疫組織学的染色性に OAE 異常群と正常群に明らかな差は見られず、Western blot での変化もなかった。Synaptotagmin は視床核群のニューロンで染色がごく軽度の違いがみられ、Parvalbumin は皮質直下の白質で染色性が強い所見を示したが Western 上での差はなかった(図 5)。

G 蛋白質活性型内向き整流性カリウムイオンチャネル(GIRK)の発現は聴覚野、体性感覚野、視覚野で比較検討したところ GIRK1 と 4 には大脳切片上 OAE 異常と正常群に染色性の違いはなかった。一

方、somatosensory cortex 錐体細胞での GIRK2 免疫染色性は軽度増加しており、in situ hybridization にて GIRK 3 遺伝子発現が正常群と比べて同部位でやや多い結果であった(図 6)。しかし、GIRK1 と 2 の Western blot ではコントロールと比べて著しい違いは得られなかった。

III 考察

本難聴マウスは自然発症で見いだされた難聴マウスである⁷⁾。常染色体劣性遺伝を示し、その障害の特徴は蝸牛の内有毛細胞が選択的に生直後から 1 週間にかけて変性～細胞死する事である。本研究者らは内耳の組織学的検討を行い、細胞死が apoptosis とも necrosis とも異なった様式でおこることを電顕的に明らかにした¹⁾。このマウスの内耳蝸牛や半器官の機能あるいは形態的な研究は今まで多くなされているものの⁸⁻¹⁰⁾中枢神経系の変化についての研究はない。本マウスの障害はコルチ器内有毛細胞に選択的であることから聴覚系求心路が病変の主座であると考えられる。早期に聴覚系情報の遮断があるため生後に他の感覚系機能の変化が生じている可能性がある。

本研究ではこの聴覚遮断がもたらす大脳皮質機能を解明するべく検討を行ったが、その前に聴覚機能障害を臨床検査的に把握する必要があった。すなわちマウス染色体 5 番に遺伝子座があることは判明しているものの、原因遺伝子が不明のため個々のマウスの遺伝子診断が不可能な状況であるためである。今回導入した OAE は内耳機能を評価する方法としてヒトや実験動物で広く用いられている^{3, 11-13)}。bv マウスの変化でも DPOAE の閾値上昇が以前報告されており⁴⁾、我々の用いた 8000Hz の DP growth 法でも反応良好と低値の二つの群に分けることができた。従って本マウスは OAE 異常を示すことが確認された。さらに生後 1.5 ヶ月以降 OAE 値が二つの群に分かれてくることが確認され、