

生後比較的早期に *in vivo* での難聴診断が可能と思われ、両側 DP 低値が Homozygote のパターンと思われた。

聴覚情報遮断に基づく感覚野の機能的な変化を形態学的に把握するため今回は感覚野におけるシナプス関連蛋白とイオンチャンネルに注目した。Parvalbumin は介在神経細胞に存在し、抑制性神経細胞と知覚神経の指標として知られ、GABAergic neuron に関連して発現している¹⁴⁾。SP と SN25 はシナプスに関連するタンパクで、SP は前シナプスの膜タンパクの 1 つであり、SN25 はシナプス小胞の膜タンパクである。いずれも、シナプスの指標と考えられている。一方、G 蛋白質で活性化される内向き整流性 K⁺チャンネルである GIRK1 と 2 は心臓や脳における主たる型であると考えられている¹⁵⁾。今回の検討により GIRK3 も脳における発現が多いことが判明した。そして大脳ニューロンレベルでの組織学的検討から感覚系の細胞興奮性の保持に関しては synaptotagmin や Parvalbumin 免疫染色性の点からシナプス形成機序に加えて、somatosensory cortex の GIRK3 発現増加が疑われた点からイオンチャンネルなど膜レベルの機能亢進も推測された。今後さらに詳細な評価が必要と思われる。

文献

- 1) Sobkowicz HM, Inagaki M, August BK, Slapnick SM. Abortive synaptogenesis as a factor in the inner hair cell degeneration in the bronx waltzer (bv) mutant mouse. *Journal of Neurocytology* 1999; 28: 17-38.
- 2) Bussoli TJ, Kelly A, Steel KP. Localization of the bronx waltzer (bv) deafness gene to mouse chromosome 5. *Mamm Genome* 1997; 10: 714-717.
- 3) Kon K, Inagaki M, Kaga M. Developmental changes of distortion product and transient evoked otoacoustic emissions in different age groups *Brain Dev* 2000; 22: 41-46.
- 4) Horner KC, Lenoir M, Bock GR. Distortion product otoacoustic emissions in hearing-impaired mutant mice. *J Acoust Soc Am* 1985; 78: 1603-1611.
- 5) Kobayashi T, Ikeda K, Ichikawa T, Abe S, Togashi S, Kumanishi T. Molecular cloning of a mouse G-protein-activated K⁺ channel (mGIRK1) and distinct distributions of three GIRK (GIRK1, 2 and 3) mRNAs in mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 208: 1166-1173.
- 6) Wickman K, Seldin MF, Gendler SJ, Clapham DE. Partial structure, chromosome localization, and expression of the mouse *Girk4* gene. *Genomics* 1997; 40: 395-401.
- 7) Deol MS, Gluecksohn-Waelsch S: The role of inner hair cells in hearing. *Nature* 1979; 278: 250-252.
- 8) Schrott A, Stephan K, Spoendlin H: Hearing with selective inner hair cell loss. *Hearing Research* 1989; 40: 213-220.
- 9) Whitlon DS, Sobkowicz HM: Patterns of hair cell survival and innervation in the cochlea of the Bronx waltzer mouse. *Journal of Neurocytology* 1991; 20: 886-901.
- 10) Whitlon DS, Gabel C, Zhang Xueli: Cochlear inner hair cells exist transiently in the fetal Bronx waltzer (bv/bv) mouse. *The Journal of Comparative Neurology* 1996; 364: 515-522.
- 11) Le Calvez S, Avan P, Gilain L, Romand R. CD1 hearing impaired mice. I: Distortion product otoacoustic emission levels, cochlear function and morphology. *Hearing Research* 1998; 120: 37-50.
- 12) Le Calvez S, Guillaume A, Romand R, Aran JM, Avan P. CD1 hearing impaired mice. II Group latencies and

- optimal f2/f1 ratios of distortion product otoacoustic emissions, and scanning electron microscopy. *Hearing Research* 1998; 120: 51-61.
- 13) Khvoles R, Freeman S, Sohmer H. Transient evoked otoacoustic emissions in laboratory animals. *Audiology* 1999; 38: 121-126.
- 14) Iai M, Takashima S. Thalamocortical development of parvalbumin neurons in normal and periventricular leukomalacia brains. *Neuropediatrics* 1999; 30: 14-18.
- 15) Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Heurteaux C, Fosset M, Romey G, Barhanin J, Lazdunski M. Molecular properties of neuronal G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *Biol Chem* 1995; 270: 28660-28667.

図の説明

- 図1 ddy マウスにおける DP growth curve (右). f2=7996Hz 刺激音 80dB SPL では 23dB の反応が得られた。f2=6006Hz 刺激音でも音圧 65dB SPL 以上で 5dB 以上の反応があった。網目以下の部分はノイズを表す。
- 図2 bv マウスの DP 値 上段が低値群で、f2=7996Hz 刺激音で 6dB 程度しか反応が得られなかった。下段の高値群は高周波数刺激において 35dB SPL 刺激でも良好な反応が得られ、ddy マウスのそれとほぼ一致していた。
- 図3 OAE 異常雄と正常雌から出生した 9 仔の DP 値年齢変化 生後半月では全例低い反応であったが 1.5 カ月以降良好群と不良群に分かれた。
- 図4 蝸牛病理像 上段の OAE 高値では

ラセン神経節ニューロンが充実して観察された。低値群ではニューロンが粗で一部空胞化を示した。(IHC; inner hair cell, OHC; outer hair cell)

- 図5 シナプス関連蛋白免疫組織化学所見と Western blot 所見 OAE 異常例の somatosensory cortex に HE 染色で濃染する錐体細胞層がみられた。parvalbumin 免疫染色性はやや亢進していた。SNAP25 と synaptophysin の immunoblot バンドは OAE 異常例とコントロールに差はなかった。(He; heterozygote, Co; control, Ho; homozygote)

- 図6 G 蛋白質活性型内向き整流性 K⁺ チャネル免疫染色と遺伝子発現 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。

Abstract

Diagnosis of bronx waltzer mouse by otoacoustic emission (OAE) and change of synapse related proteins and G protein activated inward rectifier K⁺ channel expression in sensory cortex.

Masumi Inagaki, Kaori Kon, Reiko Horimoto, Makiko Kaga, Masayuki Itoh

Distortion product otoacoustic emission (DPOAE) of bronx waltzer mutant mouse (bv) was evaluated and compared with those in controls. Thirteen bv animals showed normal DP values (mean ± SD = 17.2 ± 7.3 dB and 22.1 ± 5.9 dB at 7996 Hz f2 frequency) above noise floor, however other 12 mice had decreased levels (mean ± SD = 5.3 ± 6.7 dB and 4.6

± 6.2 dB at 7996 Hz f2 frequency). Cochlear pathology demonstrated that neurons in the spiral ganglion were sparse in OAE abnormality group. Nine babies whose father had abnormal OAE (L/R = 9 / 4.5 dB) and mother had normal OAE (L/R=6 / 30 dB) showed all decreased OAEs at half month of age, but they were divided into 2 groups showing normal OAE or abnormal OAE at 1.5 months old. Expression of synapse-related proteins such as synaptophysin, SNAP25 in abnormal OAE group was similar with

those in normal OAE group. Parvalbumin expression in the former group was slightly stronger than that in the latter group. Strong expression of G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channel type 2 and 3 (GIRK2 &3) mRNA was observed in somatosensory neurons in abnormal OAE group. There might be functional rearrangement such as synaptic formation and/or cell membrane stabilization in developing brain after interruption of specific sensory input.

表 1 DP growth 法による bv マウス DP 値 (dB SPL)

		高値群 N = 13 DP 値(平均±標準偏差)		低値群 N = 12 DP 値(平均±標準偏差)	
		f2 = 7996 Hz	f2 = 6006 Hz	f2 = 7996 Hz	f2 = 6006 Hz
80 dB	Lt	17.2±7.3	9.2±7.3	5.3±6.7	-1.3±3.8
	Rt	22.1±5.9	11.4±7.4	4.6±6.2	2.7±6.6
70 dB	Lt	13.3±7.6	5.0±8.8	-6.2±4.8	-6.7±3.9
	Rt	15.9±7.8	4.9±6.1	-8.3±6.6	-6.2±3.7
60 dB	Lt	6.8±6.0	-2.6±8.2	-12.5±3.5	-7.3±8.4
	Rt	9.0±6.4	-3.8±5.4	-10.8±5.1	-8.9±4.7
50 dB	Lt	-1.0±5.0	-5.3±3.9	-13.3±3.3	-6.9±6.0
	Rt	2.0±6.4	-5.1±4.6	-11.3±3.3	-5.9±4.8

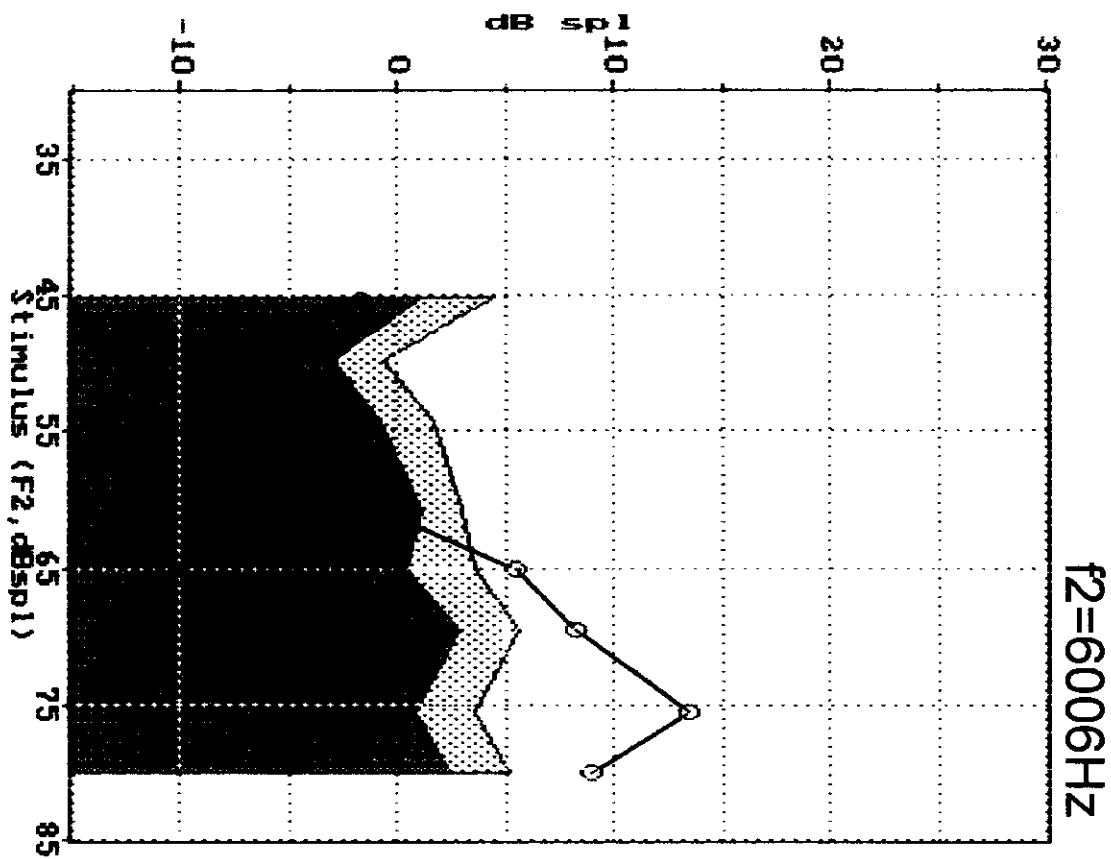
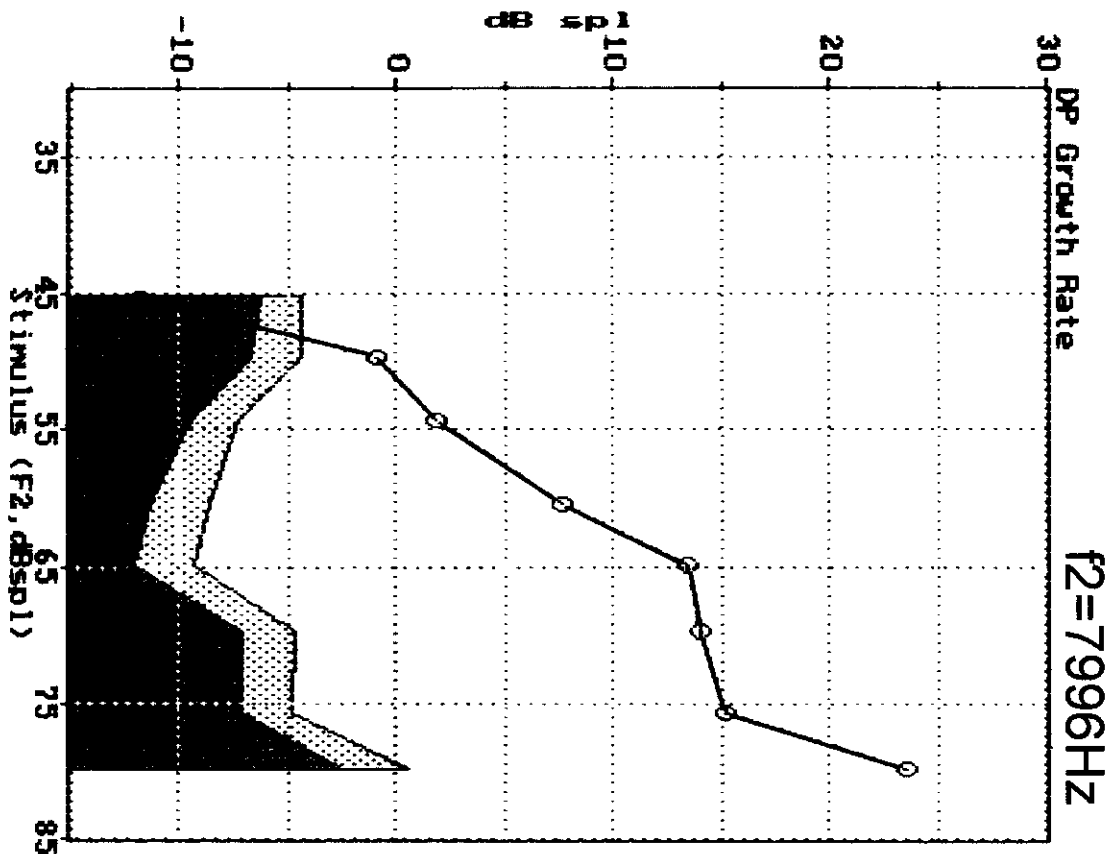
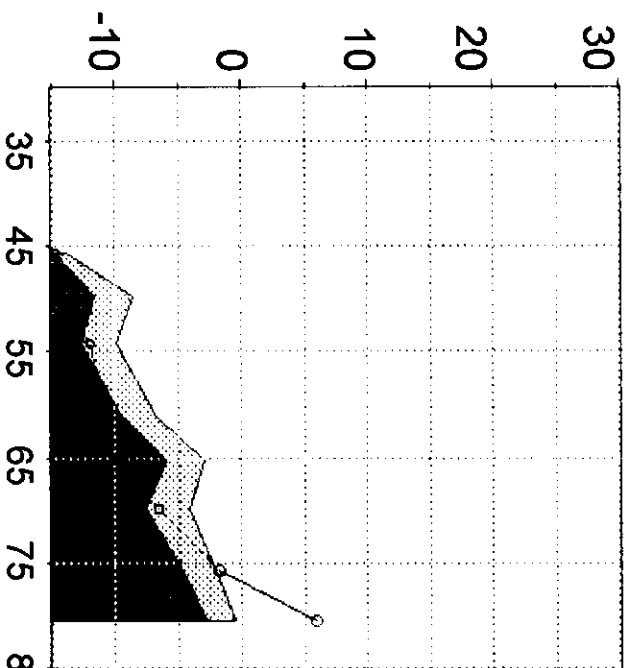


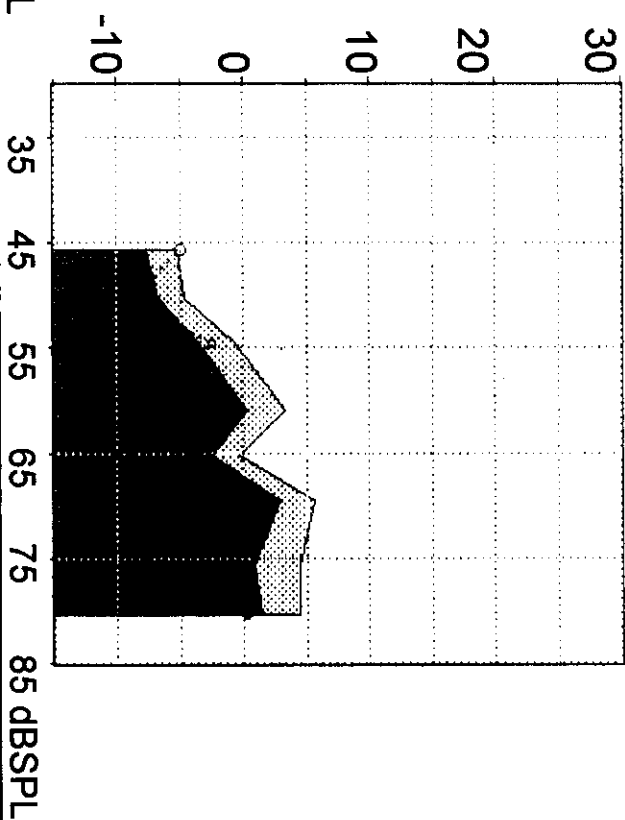
图 2

DP Growth
1 year old
低值群

f1=6628Hz, f2=7996Hz



f1=4968Hz, f2=6006Hz



高值群

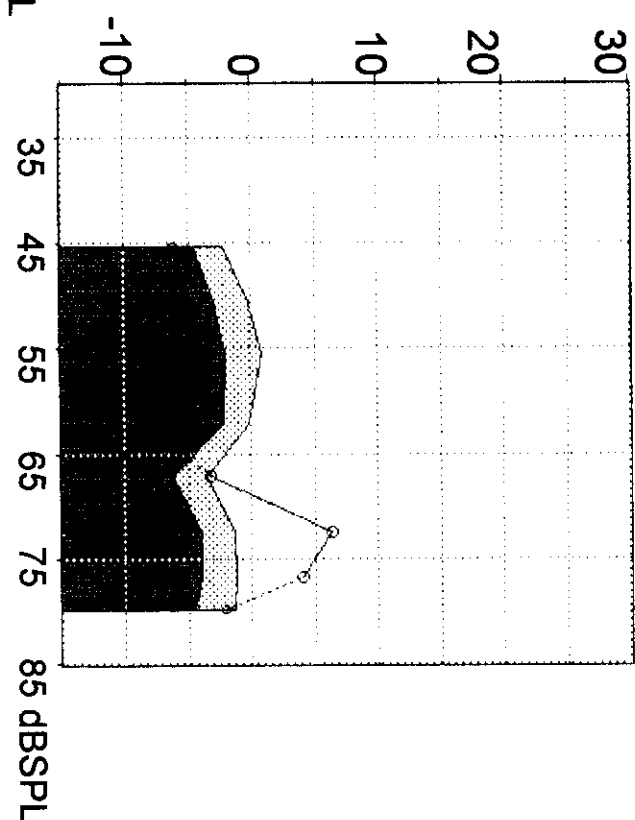
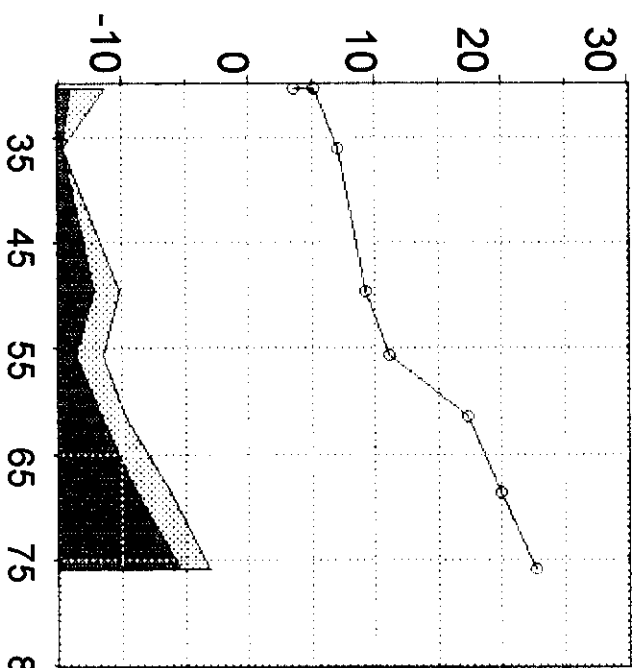
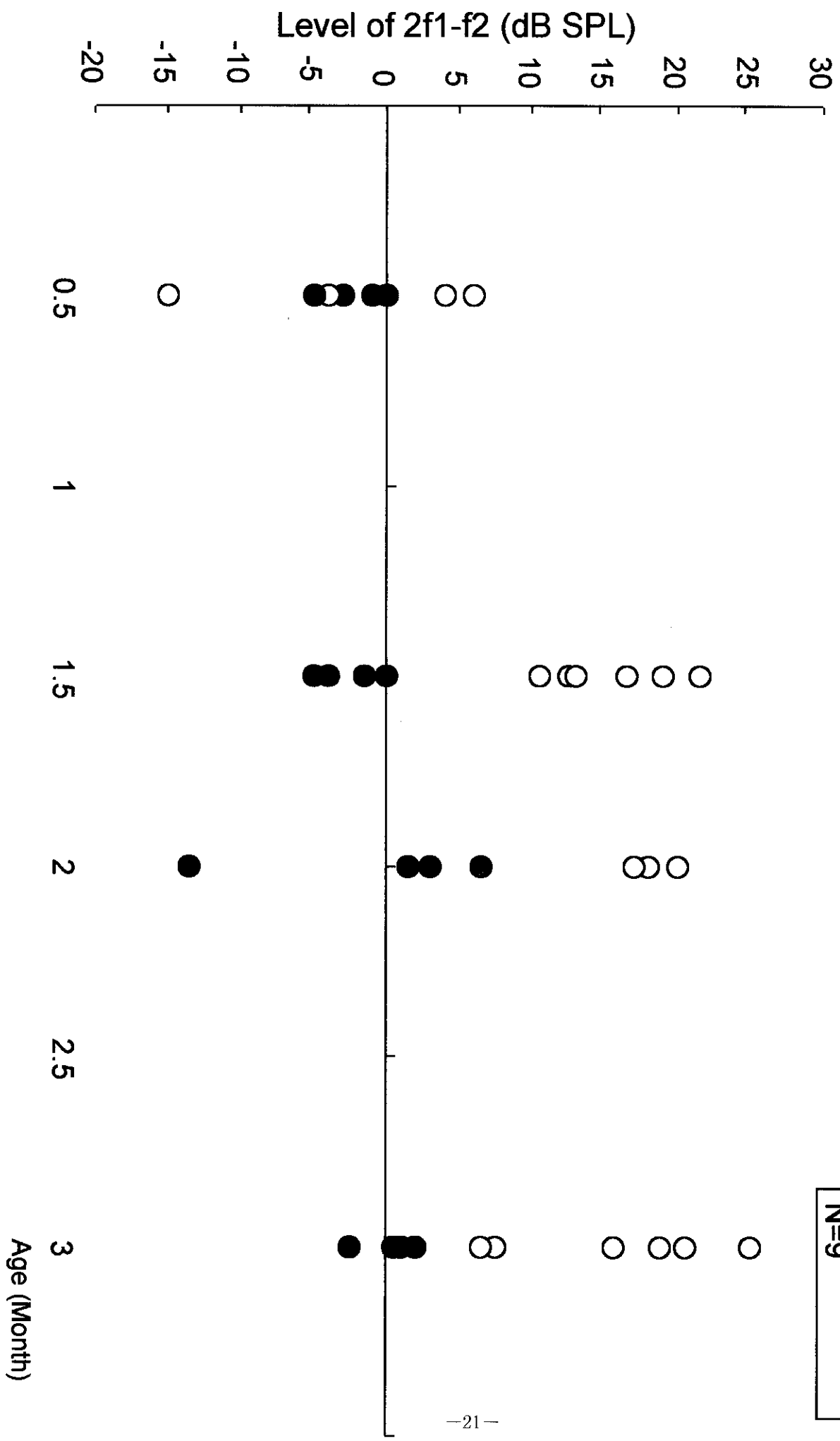


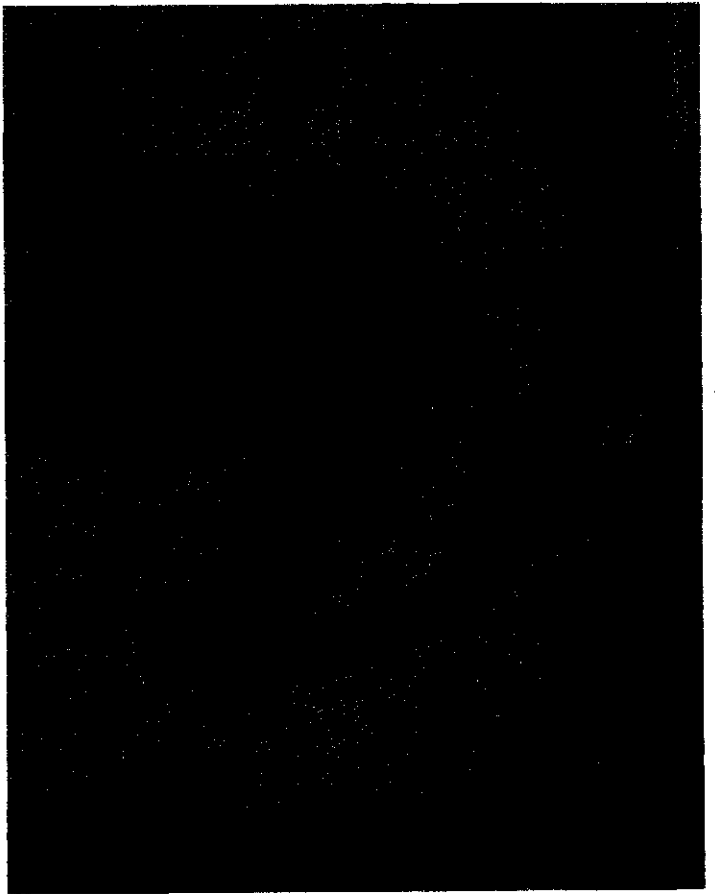
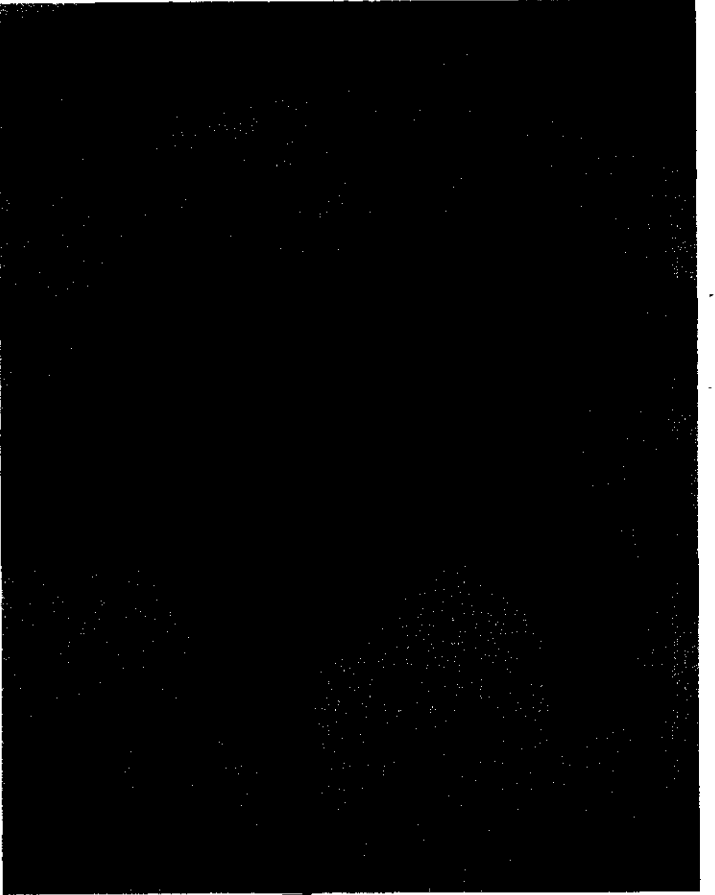
図 3

DP value 月齡変化 (f2=8000Hz, 75dB)

Father 9/4.5 dB
 Mother 6/30 dB
 N=9



OAE
高值群



低值群

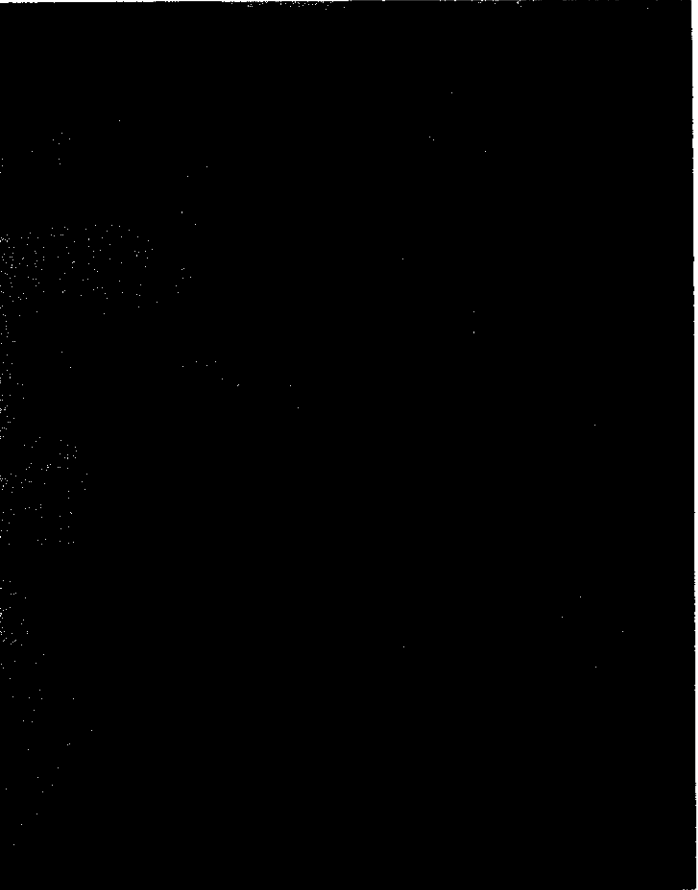
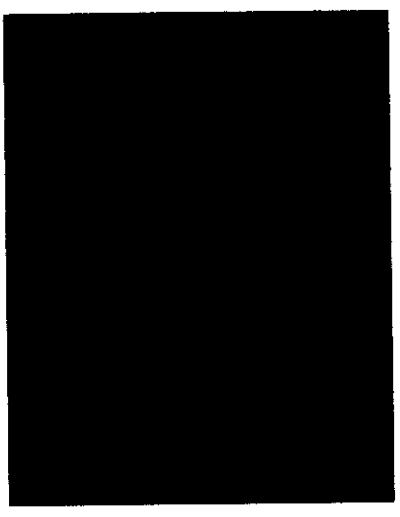


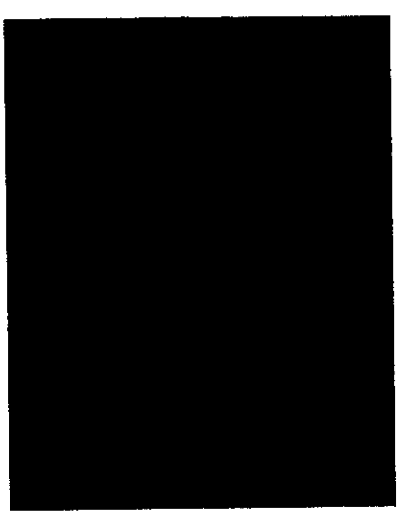
图 5



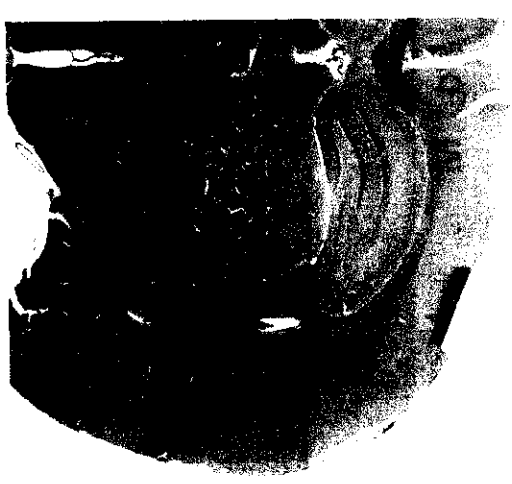
OAE Abnormal



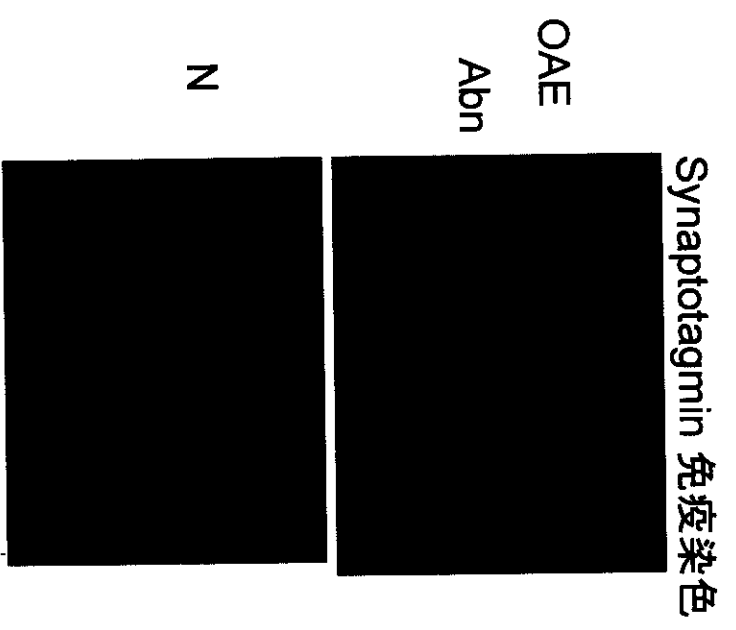
Somatosensory cortex
HE stain



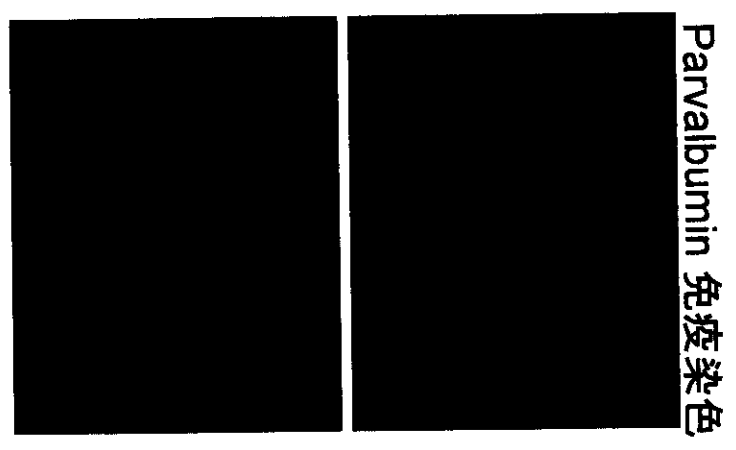
Auditory cortex
HE stain



OAE Normal



Synaptotagmin 免疫染色

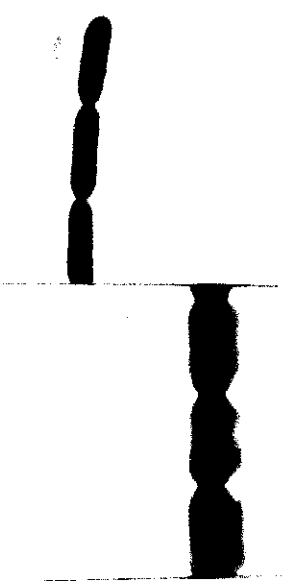


Parvalbumin 免疫染色

SNAP 25
Western blot

Synaptophysin
Western blot

He Co Ho He Co Ho M

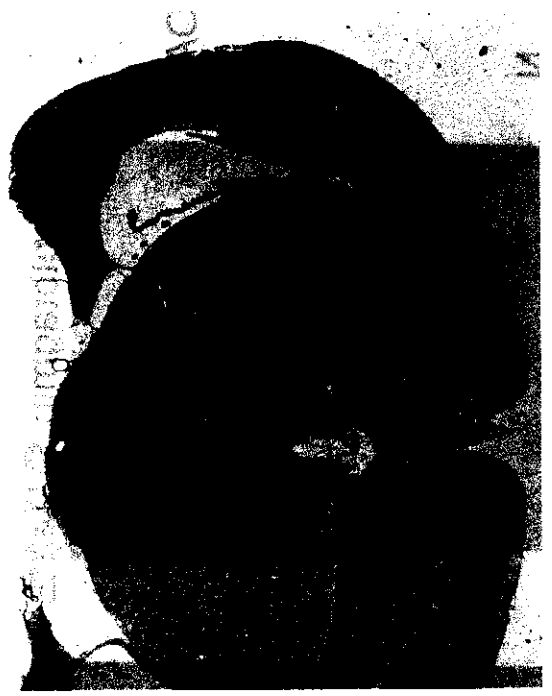


29 kDa

18 kDa

6

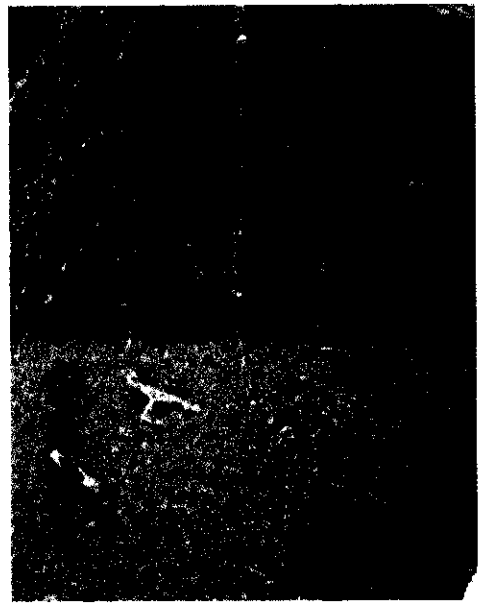
GIRK 1 ISH



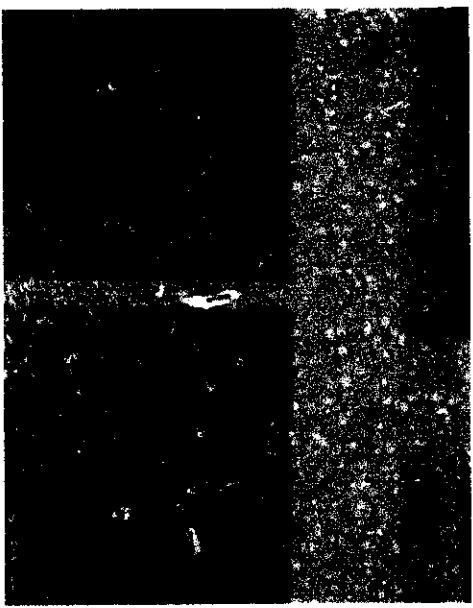
GIRK 4 ISH



GIRK 2 Immunohistology



GIRK 3 ISH



Western blot

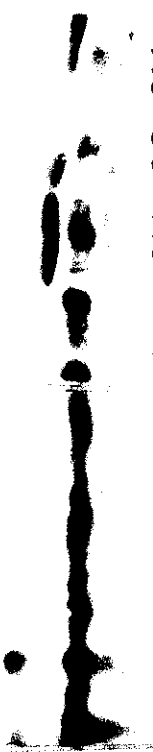
GIRK 1

GIRK 2

He Co Ho Po He Co Ho Po M

29 KDa

18 KDa



II. 分担研究報告

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

稲垣真澄

厚生科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

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

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

知的障害を伴う症例の聴覚機能評価は他覚的方法に依存する場合が多い。本研究は精神遅滞を伴う筋疾患患者における聴覚機能を聴性脳幹反応 (ABR) と耳音響放射 (OAE) を組み合わせて行い、OAE の有用性を検討した。先天性ミオパチー (CM)、進行性筋ジストロフィー (PMD)、ミトコンドリア筋症 (MM) などといった筋疾患を有する 23 例 (女性 12 名、男性 11 名) 45 耳に対し、2 種類の耳音響放射 (DPOAEs, TEOAEs) を実施した。年齢分布は 2~48 歳であった。大半が重度の精神遅滞が認められた。結果、ABR の V 波閾値の上昇が 15 耳で観察された。CM 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 PMD 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 MM 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。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。

A. 研究目的

精神遅滞を伴う筋疾患患者における聴覚悪化を評価することは、オージオメトリが適応できない際には難しい。本研究では、聴性脳幹反応 (ABR) と耳音響放射 (OAE) を組み合わせることにより、このような患者に対する聴覚機能の評価が可能かを検討することを目的とした。

B. 研究方法

対象は 23 患者の 45 耳を、ABR および

OAE の検査に対し用いた。患者の年齢分布は 2~48 歳であった。患者の内訳は、女性 12 人男性 11 人であった。患者を基礎的な病気により、次の 3 群に分けた：PMD、DM 群すなわち筋ジストロフィー群、先天性ミオパチー群、ミトコンドリア筋症群 (表 1, 2, 3) であった。本人および親権者に適応する聴力検査内容を説明し、同意を得た。

聴覚脳幹反応 (ABR)、耳音響放射 (OAE) : 歪成分 OAE (DPOAE) 及び誘発 OAE (TEOAE) とティンパノメトリーをそし

て純音オーディオメトリが可能な例では実施した(図1, 2)。

TEOAE は、486DXノートコンピュータでコントロールしたILO88 ver.3.94Lを用いて測定した。TEOAE は非線形状モードでの80sの非フィルタークリック音に対する応答を記録した。クリックレートは、50Hzで刺激後の測定時間は20msであった。検査者は騒音を除去するために、ノイズ除去レベルを設定した。TEOAEは260応答に対する平均波形をfastフーリエ変換したカスペクトルとして表現した。OAEの振幅はdB SPLで測定した。TEP中の加齢依存性変化、1,2,3,4,5kHzでの刺激エリアピーク力(FAPP1, FAPP2, FAPP3, FAPP4, 及びFAPP5)、及び2 TEOAEの波再現性(WR)を検査した。

DPOAEは同じコンピュータ上のILO92システム ver.1.354を用いて行った。最初に存在する2刺激(音圧 L1:65dB SPL、L2:60dB SPL、刺激比 $f_2/f_1=1.2$)を記録した。高周波数 primary を2、低周波数刺激 primary を1とした。歪成分は f_2 刺激を伴う DP-Gram を水平軸上に、 $2f_1-f_2$ の DPOAE 振幅を垂直軸上にプロットした。32-64回での応答を加算平均した。測定中に動いてしまう幼児においては、応答とノイズレベルが安定するまで平均化を延長した。DP-レベルとノイズ-floorにおける加齢依存性変化は、9刺激($f_2=1001, 1257, 1587, 2002, 2515, 3174, 4004, 5042, 6342\text{Hz}$)において測定した。OAEの測定は外来診察室もしくはベッドサイドの静かな部屋において行った。環境音圧は60dB以下とした。外耳道および鼓膜はOAE測定前に観察した。耳垢が存在していた場

合は、取り除いた。

聴覚テストとして、0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8kHzでの純音刺激での応答を、4歳以上の対象に対し30dB nHLにおいて測定した。正常応答が得られなかった場合において、純音オーディオメトリ閾値を測定した。ティンパノメトリー及び stapedial reflex recording も、測定の最後に全ての対象に対し実行した。

ABR 電極は次のところに配置した: 頭頂の関電極、同側耳朶の不関電極、反対側耳朶の接地電極であった。100dB SPL クリック音を10回/secの頻度でヘッドフォンから片耳に刺激された。100dB SPL に対し応答がない場合は、強度を110-136dB SPLの範囲で順々に増加させた。V波閾値を求めた。バンドパスフィルタは、50-3000Hz、分析時間は10msecで1000回加算した。

C. 研究結果

1. PMD、DM群(筋ジストロフィー群)(表1)

患者のほとんど(10人中7人)が重度の知的障害を伴っていた。Duchenne型PMD(#1, 3)の2人の患者及び福山型先天性筋ジストロフィー(#4)は、ほぼ正常のDPOAE及びTEOAEを示した。しかしながら、Nasal CPAP中の患者(#2)ではTEOAEのTEPは得られなかった。ABR閾値の上昇及び純音オーディオメトリにおいて中等度の聴覚悪化を有する顔面肩甲上腕型PMDの患者では、明確なOAEは認められなかった。筋緊張性ジストロフィーの幼少患者(#6, 7)は正常なOAEを示し、高齢患者(#9, 10)ではOAE及び

ABRにおいて中等度の異常性を有していた(図3)。

2. 先天性ミオパチー群(表2)

4例全てにおいて重度の知的障害を示していた。先天性筋繊維タイプ不均等症の患者(#2)においては、正常のOAE及びティンパノメトリーが認められた。またABR閾値は正常範囲内であった(図4)。人工呼吸管理が必要であり、片耳が正常なティンパノメトリーを有しているネマリンミオパチー患者(#4)は、TEPの減少およびDPOAEの中等度の異常性を示した(図5)。

3. ミトコンドリアミオパチー群(表3)

8患者で重度の知的障害が認められた。ABR閾値及びティンパノメトリーが正常を示している2患者(#1, 3)の3耳において、正常のOAEが示された(図6)。MELAS患者のABR及びOAEは、V波の上昇や高f2刺激でのDP-Gramやnegative TEOAEの異常パターンを示した。患者の母親は、オーディオグラフィ上において、低音域における中程度の聴覚障害と、高音域における重度の聴覚障害を示した(図7)。Kearns Sayre syndromeである男児患者では、重度のOAE異常性を伴う聴覚障害が示された。

D. 考察

MELAS、KSS及びFSH型進行性筋ジストロフィー(PMD)患者は、難聴を合併することがよく知られている。これらの患者のOAE結果は、2例が重度の知的障害のため臨床的な聴力評価できなかったものの、高刺激音中での値の減少あるいは消失が認められた。筋ジストロフィー群において

は、聴覚障害の度合いがジストロフィーの型に依存した。Duchenne型、福山型筋ジストロフィーは聴覚障害を有さないと考えられ、筋緊張性筋ジストロフィーのとくに高齢患者については、聴覚機能に緩やかな進行・悪化が存在すると思われる。ネマリンミオパチーといった、特定の先天性ミオパチータイプには、蝸牛外毛細胞中の進行性機能障害の可能性がある。ティンパノメトリーが正常の場合、OAEを伴わないABR欠如は、蝸牛が原因の聴覚障害を示していると考えられた。

E. 結論

OAEは筋疾患及び精神遅滞を伴う患者におけるそれぞれの刺激レベルにおける聴覚評価に有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特記するべきことなし

G. 研究発表

1. Kon K, Inagaki M, Kaga M: Developmental changes of distortion product and transient evoked otoacoustic emissions in different age groups. *Brain & Development* 22: 41-46, 2000.
2. Maegaki Y, Akaboshi S, Inagaki M, Takeshita K: Unilateral involuntary movement associated with streptococcal infection: Neurophysiological investigation. *Neuropediatrics* 31: 70-74, 2000.
3. Kon K, Inagaki M, Kaga M, Sasaki M, Hanaoka S: Otoacoustic emission in

patients with neurological disorder who have auditory brainstem response abnormality. *Brain & Development* 22: 327-335, 2000.

2. 学会発表

Hearing impairment in muscle disorders with severe mental retardation. Masumi Inagaki, Kaori Kon, Makiko Kaga, Ikuya Nonaka: 11th World Congress of the International Association for the Scientific Study of Intellectual Disabilities 2000 August 1-6, Seattle WA USA.

H. 知的財産権の出願。登録状況なし

図の説明

1. 検査風景。
2. OAE 検出機序
3. 筋緊張性ジストロフィー症の OAE
4. 先天性筋線維不均等症(症例2)の OAE
5. ネマリンミオパチー(症例4)の OAE
6. ミトコンドリアミオパチー(MERRF; 症例3)の OAE
7. ミトコンドリアミオパチー(MELAS)母娘の OAE

表 1 PMD and DM group

No.	Diagnosis	age (yr.)	Sex	L/R t	Intellectual disability	ABR threshold (dBHL)	Tympanometry	TEOAE TEP (dB SPL)	DPOAE points (/9)	Comments (Average hearing level)
1	Duchenne PMD	8	m	L	Severe	N.D.	A	20.4	9	
				R		N.D.	A	17.3	8	
2	Duchenne PMD	16	m	L	Severe	N.D.	A	*	N.D.	Nasal CPAP
				R		N.D.	A	*	N.D.	
3	Duchenne PMD	28	m	L	Severe	N.D.	A	7.8	8	
				R		N.D.	A	10	8	
4	FCMD	20	m	L	Severe	20	A	14	9	
				R		20	A	13.4	9	
5	FSH type PMD	23	f	L	Severe	70	A	*	0	(66.25 dB)
				R		80	A	*	0	(86.25 dB)
6	DM	2	f	L	Severe	N.D.	A	19.7	9	
				R		N.D.	A	12	8	
7	DM	2	f	L	Severe	N.D.	A	13.4	7	Child of No. 9
8	DM	12	m	L	Moderate	30	B	9	4	
				R		50	B	*	0	
9	DM	37	f	L	Normal	N.D.	A	*	4	(16.3 dB)
				R		N.D.	A	*	4	(15 dB)
10	DM	40	m	L	Mild	70	C	*	0	(78.8 dB)
				R		70	C	*	4	(48.8 dB)

PMD; Progressive muscular dystrophy, DM; Myotonic dystrophy, N.D.; Not done, FCMD; Fukuyama type congenital muscular dystrophy, FSH; Facioscapulohumeral
 *; Total echo power (TEP) of TEOAE was not obtained.

表2 Congenital myopathy

No.	Diagnosis	age (yr.)	Sex	Lt/ Rt	Intellectual disability	ABR threshold (dBHL)	Tympanometry	TEOAE TEP (dB SPL)	DPOAE points (/9)	Comments (Average hearing level)
1	CFTD	5	f	L	Severe	>100	N.D.	*	3	Respirator, Wave I only
				R		>101	N.D.	7.3	7	pattern of ABR
2	CFTD	16	m	L	Moderate	30	A	18.1	9	
				R		30	A	18.5	8	
3	NM	16	f	L	Severe	N.D.	B	*	0	Respirator
				R		N.D.	B	*	0	
4	NM	17	f	L	Moderate	30	C	*	2	Respirator
				R		30	A	1	5	

CFTD; Congenital fiber type disproportion, NM; Nemaline myopathy
 N.D.; Not done *; Total echo power (TEP) of TEOAE was not obtained.

表3 Mitochondrial myopathy

No.	Diagnosis	age (yr.)	Sex	Lt/ Rt	Intellectual disability	ABR threshold (dBHL)	Tympanometry	TEOAE TEP (dB SPL)	DPOAE points (/9)	Comments (Average hearing level)
1	Leigh	8	f	L	Severe	80	A	14.9	8	
				R		30	A	18	9	
2	Leigh	20	f	L	Severe	106	B	*	2	Respirator
				R		106	B	*	0	
3	MERRF	16	f	L	Severe	30	A	17.9	9	
				R		30	A	18.9	9	
4	MELAS	14	m	L	Severe	N.D.	A	13.9	7	
				R		N.D.	A	13.2	8	
5	MELAS	16	f	L	Severe	60	A	-4.7	6	Child of No. 6
				R		70	A	-3.7	5	
6	MELAS	48	f	L	Normal	50	A	*	0	(52.5 dB)
				R		50	A	*	0	(46.3 dB)
7	KSS	16	m	L	Severe	90	A	*	0	
				R		80	A	*	0	
8	CCO deficiency	18	m	L	Severe	N.D.	B	7.2	0	
				R		N.D.	B	*	0	
9	unknown	2	m	L	Severe	50	A	*	0	Respirator
				R		50	A	*	0	

MERRF; Myoclonus epilepsy with ragged red fibers, MELAS; Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes,

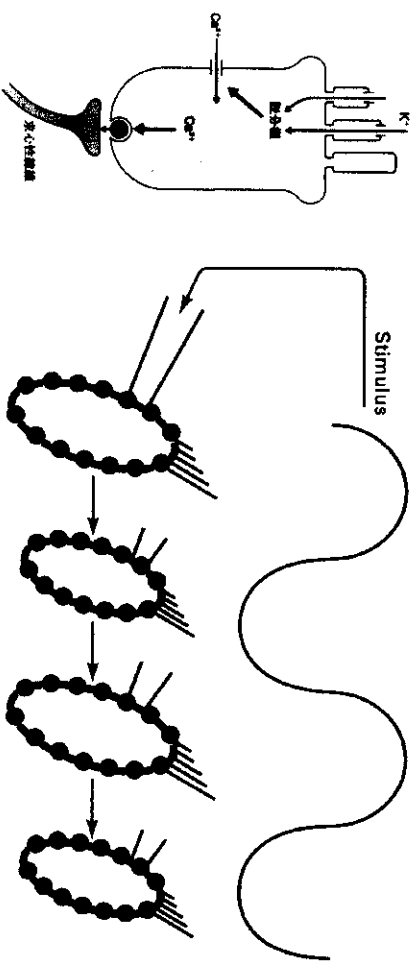
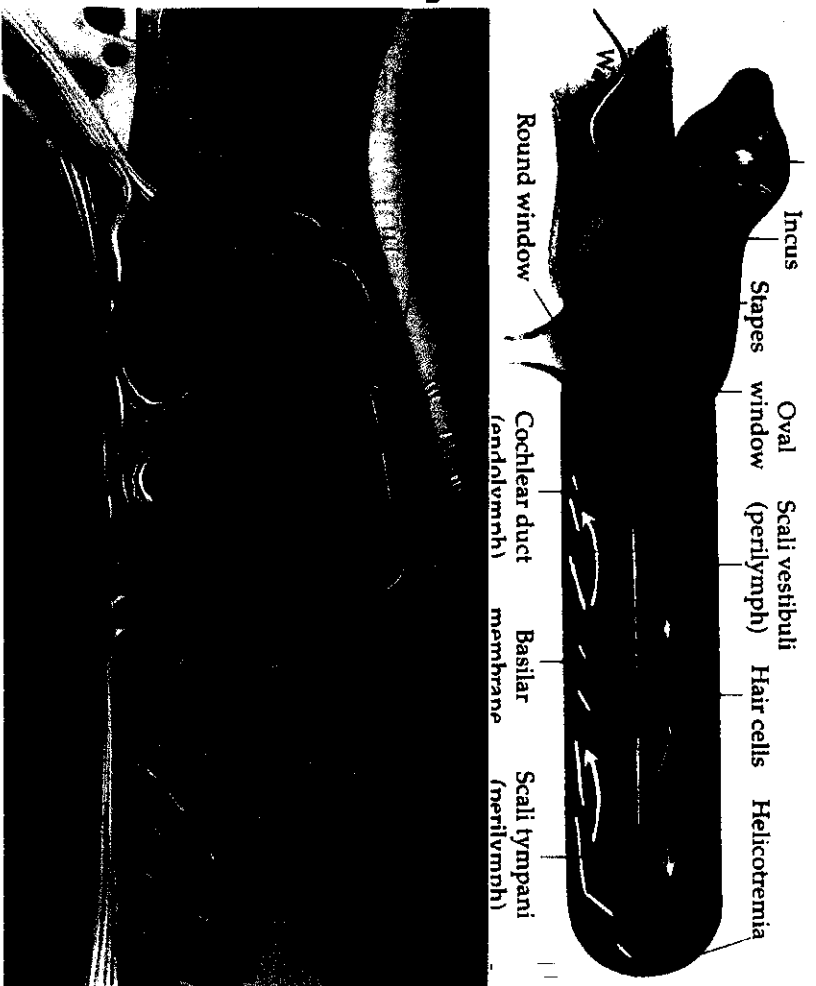
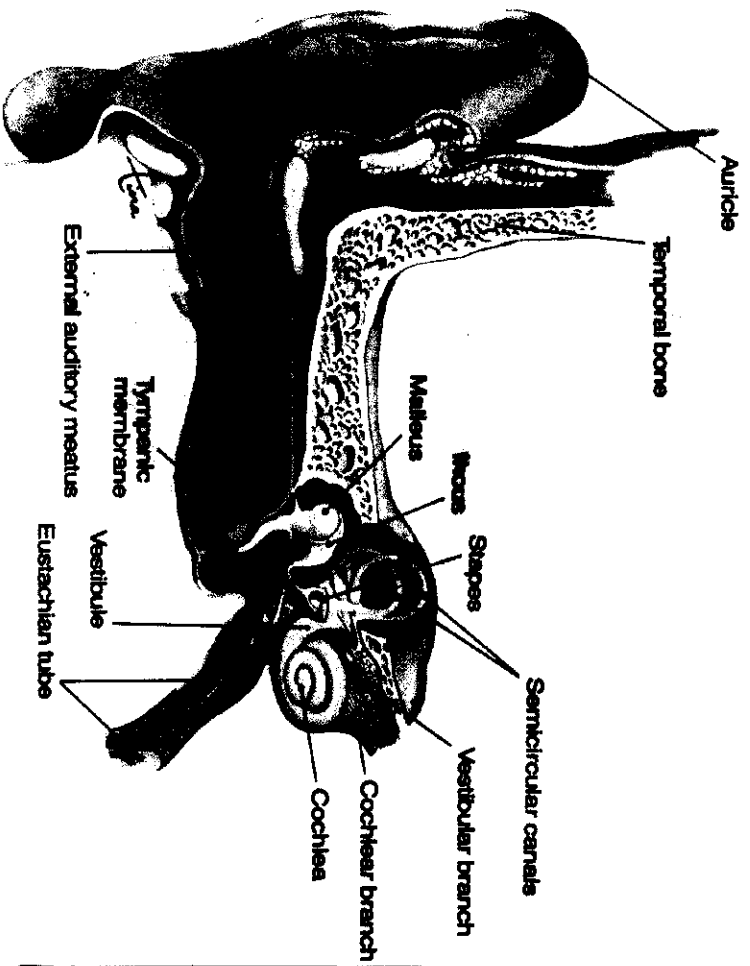
KSS; Kearns Sayre syndrome, CCO; Cytochrome c oxidase, N.D.; Not done

*; Total echo power (TEP) of TEOAE was not obtained.

图 1 OAE examination of a patient (DPOAE)



図2 Anatomical basis of otoacoustic emission



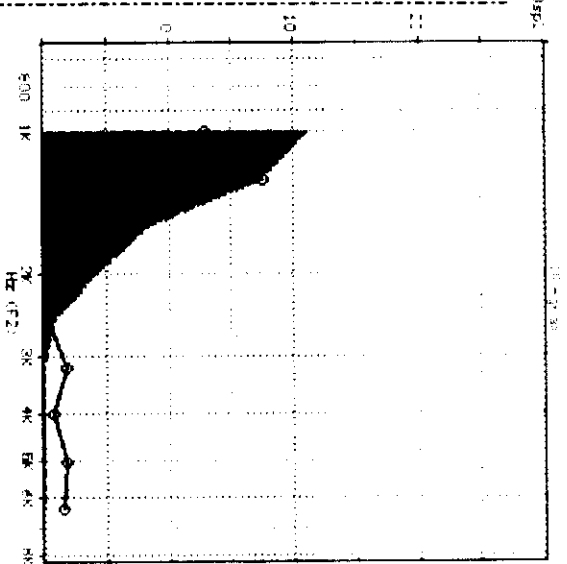
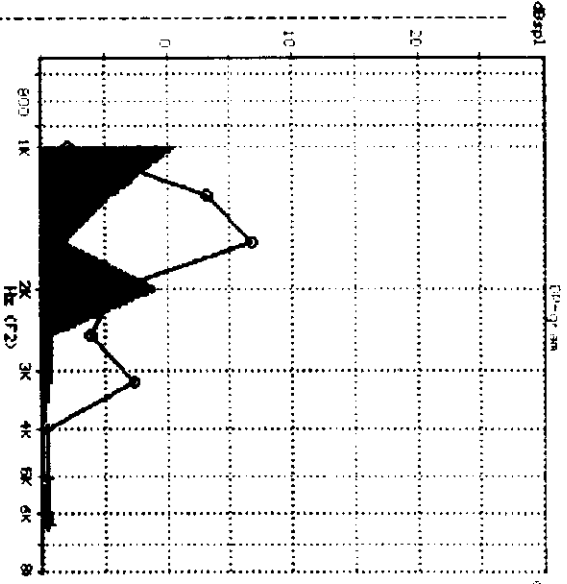
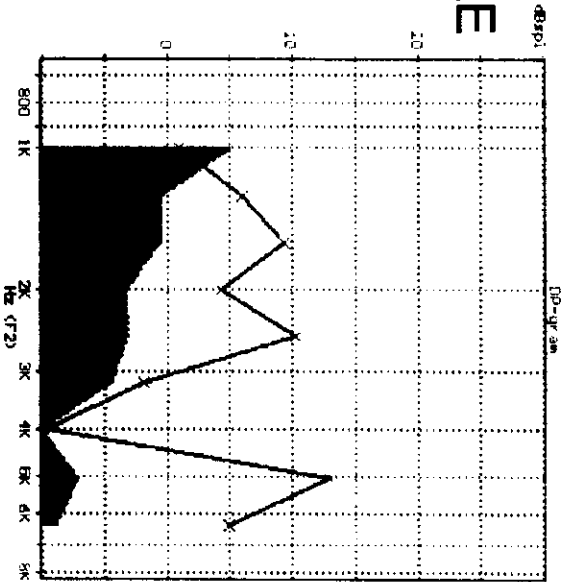
3 Myotonic dystrophy

Patient #7

Patient #9

Patient #10

DPOAE



TEOAE

Pure tone audiometry

