

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-006

平成13年度 総括・分担研究報告書

平成14（2002）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	
2. 遺伝性難聴 bv にみられる回転性行動異常の病態解明に関する研究	----- 15
稲垣真澄	
3. 遺伝性難聴 bv の原因遺伝子クローニング	----- 47
難波栄二	
4. 虚血脳組織への細胞治療法開発に関する研究	----- 51
桜川宣男	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 55
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 59

## 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を生じる Bronx waltzer mouse (bv)の診断法の確立と細胞レベルの障害の早期治療を開発する目的で研究を行った。すなわち、主任研究者はbvマウス例の生後からの聴力を耳音響放射(OAE)や聴性脳幹反応(ABR)により検討した。bvマウスでは DP レベルが正常マウスや健常児・成人と逆のパターンを示すことが判明し、ABR の閾値所見異常がより強かった。以上より、生後早期に OAE の細かい所見を評価することで難聴の迅速診断が行える可能性が示され、bv では内耳求心系障害がより強い特徴が確認された。

主任研究者は回転性行動異常を示す bv マウスの存在を発見した。本グループは夜間行動時間が有意に長く、睡眠時間が短縮していた。回転群と非回転群の難聴程度に差はなかった。脳内モノアミン系代謝産物に変動があり、bv マウスは midbrain での DA 値が低下していたが、striatum のドパミン(DA)値の変化はなかった。bv の DA 代謝は亢進傾向があり、回転群 striatum では DOPAC 側にシフトした。回転性行動異常は難聴ではなく、DA 系自己受容体機能の失調が関わる可能性が示された。

分担研究者の難波栄二は bv 回転行動に脳内のモノアミンの代謝異常が関係することが推測されていることからその分子病態を解明するための方法として、リアルタイム PCR すなわち、脳の部位毎の多数遺伝子発現を正確に定量できるシステムを確立した。本システムは従来の方法よりも簡便で高精度に遺伝子発現を測定できると考えられ、今後 bv の原因遺伝子解明につなげたいと考えている。

分担研究者の桜川宣男はbvが生後に神経変性がみられることから羊膜上皮細胞の脳移植によって神経変性が治療可能か検討するため、まず脳虚血をモデル動物において作成し、移植によって病変が改善されるかどうかを検討した。ラット培養羊膜上皮細胞は nestin + / MAP2 + の性質を持ち、移植後は MAP2 強陽性細胞となった。脳虚血ラットの海馬に移植したところその細胞は CA1 pyramidal layer に遊走し、5 週間後も神経細胞様の形態を呈していた。以上のことから、虚血脳に対する羊膜上皮細胞移植は再生医療法として有望であり、幼弱蝸牛組織への応用も考えられた。今後さらに、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

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。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

A. 研究目的

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」による新生児聴カ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として bv マウスをその実験系を組むことで早期診断法を確立し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。すなわち、昨年度は耳音響放射 (OAE) 検査法などマウスでの臨床検査法の確立をおこなったため、2 年度はさらに発展させて、bv マウスの特徴を明らかにすることでヒトの聴カスクリーニングに役立つ知見を探求することとした。

## 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 に関しては健常成人、新生児においても検討した。

回転性行動異常を示すマウスの行動特徴並びに大脳モノアミン系代謝産物を測定した。その分子病態把握のため新しい測定システムを応用した。

治療的アプローチとして、ラット培養羊膜上皮細胞の虚血モデル動物への脳移植療法を行った。

(倫理面への配慮:対象マウスは処置や処分の配慮を注意深く行い、麻酔処置により疼痛を緩和し、苦痛を与えない方法によって臓器を摘出した。ヒトへの検査にあたり、内容の説明を行い本人および新生児の場合は保護者の了解を得た。)

## C. 研究結果

### 1. bvマウスの生理学的検討

#### 1) ABR および OAE:

クリック音及び 8~32kHz の各周波数での IV 波閾値は、コントロールマウスと比較し、bv マウスでは閾値の上昇を認めたが、各周波数における上昇の程度はほぼ一定であった。各マウス個体における ABR 閾値と DPOAE の閾値を比較すると、bv マウスではコントロールと比較して ABR 閾値がより高い傾向がみられた。

DP growth 法の DP レベルをコントロールマウスと比較したところ、bv マウスでは生後 2~3 ヶ月で既にレベルの低下(コントロール 18.8~30.3dB; bv -5.1~12dB)を認め、加齢に伴いコントロールとの差が明瞭になる傾向を認めた。また、bv マウスでは刺激音圧 80dB において DP レベルが検出されないことが多く、この割合(非検出率)は月齢とともに増加した。

2f2-f1 周波数での DP レベルを求めたところ、コントロールでは f2 周波数が 7996Hz, 6006Hz とともに 2f1-f2 値が 2f2-f1 値よりも大きい結果であったが、bv マウスでは、2f1-f2 < 2f2-f1 のパターンを認めた。健常成人、新生児とも 2f1-f2 > 2f2-f1 パターンであり、bv の特徴が得られた。

#### 2) 組織学的検討:

顔面神経横径は bv とコントロール間に差は認められなかったが、蝸牛神経の径は約 2 分の 1 であり、コントロールマウスと比較し有意に狭小化していた。また、ボディアン染色により蝸牛神経の軸索部の変性が認められた。

#### 2. 回転性行動異常マウスの中樞神経系病態

異常行動マウスの共通した行動特徴は持続性回転運動であり、circling あるいは rotational と表現されるものであった。回転行動が主であるが、8 の字様の動きもあった。回転方向性はマウスにより決まっているわけではなく、同じマウスに左右回転がみられた。夜間 12 時間行動総量は対照 (7702.1 ± 757.6) に比べて回転するグループ n=10 (60729.9 ± 3994.9) が有意 (p < 0.0001) に

増加しており、非回転群  $n=10$  ( $9900.7 \pm 2169.7$ ) は対照とほぼ同じ値であった。また、回転行動群と非回転群に難聴の程度に差はみられなかった。

脳内モノアミン測定結果は有意差検定の結果、striatum と midbrain のみに差が認められた。すなわち、bv マウスでは striatum においてドパミン(DA)値上昇はなかったが、midbrain においてコントロール値よりも低下していた。DA 代謝系の指標(DOPAC+HVA / DA)では striatum, midbrain とともに高く、代謝が亢進する傾向が示され、回転行動群の striatum では DOPAC 側にその代謝がシフトしていた。

### 3. bvマウスの分子病態

#### Light Cycler クイックシステムの検討

各遺伝子産物を 10 倍ずつ希釈することにより、定量用スタンダードを作成して検討した。tyrosine hydroxylase 遺伝子, Snap25 遺伝子では、それぞれ  $\text{slope}=-3.865$ ,  $\text{Error}=0.065$ ,  $r=-1.00$  と  $\text{slope}=-2.750$ ,  $\text{Error}=0.177$ ,  $r=-0.98$  の良好な定量直線を得ることができた。

また、tyrosine hydroxylase, Snap25 の脳内各部位での遺伝子発現は actin より少なく、特に Snap25 の発現は actin の 1/100 から 1/1000 と判明した。

### 4. 治療法開発に関する研究

ラット羊膜上皮細胞は NF, MAP2, nestin に陽性反応を示した。RT-PCR では nestin の当該バンドを検出した。脳内に移植した細胞はクラスター状に存在していた。虚血側の CA1 pyramidal layer に移植細胞が移動し、神経細胞様の突起を出していたことも観察された。また、移植前の細胞は nestin + / MAP2 + の特徴を示していたが、移植後は MAP2 強陽性であるものの nestin 陽性細胞はほとんどみられなかった。

## 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、純粋に聴覚系に限局したものは少ない。内耳蝸牛の内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切なモデルと思われる。

本年度の研究では同一個体を検討することで、bv では耳音響放射 OAE 検査異常よりも聴性脳幹反応 ABR 閾値上昇が強いことが確認できた。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、外毛細胞機能障害が加わる病態であると思われた。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。また、耳音響放射 OAE の  $2f_2-f_1$  DP 値に注目すると、難聴例では逆転パターンが得られた。健常人や新生児では 30 から 35dB の差を持って  $2f_1-f_2$  が高いにもかかわらず、bv では全く逆転している特徴があったのである。これらから生後早期に OAE の細かなサインを見逃さずに評価することで、難聴の進行が遅い例についても迅速な難聴診断が可能となる事が判明した。また、この逆転パターンはヒト新生児難聴をキャッチする上でも有用なデータと思われる。そして、OAE を ABR と相補的な評価を行う事でより詳しく確実な評価を行う事ができるとも考えられる。

一方、蝸牛の感覚系一次ニューロンの細胞数減少が生後も持続的にみられることから、bvマウスの病態は老人性難聴や神経性難聴と同様に進行性の障害であることが確認された。そして、蝸牛神経が顔面神経の約 2 分の 1 の細さになっていることが確認でき、軸索の変性もみられることが判明した。これらの所見から求心性の末梢神経障害を確認でき、その進行を阻止する治療法開発も進行性難聴の場合重要と思われる。

bv マウスにみられた回転性行動異常は難聴によるものではなく、脳内モノアミン系、とくに striatum レベルでの DA 系自己受容体機能の失調が関わる可能性が示された。一方、Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) は注意の持続困難、衝動性、多動

という臨床症状を示す発達障害であり、最近臨床的に注目されている。bvがADHDと同一病態とは未だ考えられないが、多動性障害の病態を考える上でも格好のモデルと思われる。従って、さらに研究の進展が必要とされている。

遺伝子発現の新しい解析システム、Light Cycler クイックシステムの検討によって、中枢神経系モノアミン神経伝達物質の変動を含めた研究が期待でき、今後の課題と考えている。

治療的アプローチとしては羊膜上皮細胞の細胞治療法としての有用性が明らかとなった。虚血性モデル動物への投与、すなわち脳移植が具体的に行われ、細胞生着が確認された。これにより、bv 難聴で判明しているラセン神経節ニューロンや蝸牛神経レベルの変性阻止に応用が期待できる。最終年度に向けての研究課題と考えている。また細胞治療・遺伝子治療を具体的なものにするためには難聴原因の判明しているマウスでの解析も有用と思われる。すなわち他の代謝異常マウスを用いた応用も行っていきたいと考えている。

#### E. 結論

特異的遺伝性難聴マウス bv の診断には OAE と ABR が相補的に有用であることが判明した。また、OAE の微細な所見の解析も聴力診断に役立つものと思われる。bv は生後の進行性難聴も加わるが、回転行動を呈するグループを出現しており、難聴病態とともに中枢神経系遺伝子発現を含めて多面的なアプローチによる病態解明そして治療法開発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) 稲垣真澄, 昆かおり, 堀本れい子, 加我牧子, 伊藤雅之: 遺伝性難聴マウス bv の病態進展に関する検討 第 43 回日本小児神経学会総会 岡山 2001.6.8.

#### 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)は選択的固有毛細胞障害が生後1週間に起きる点がきわめて特徴的である。我々は耳音響放射(OAE)および聴性脳幹反応(ABR)を用いて聴覚スクリーニングが早期から可能であることを以前から報告してきた。本年度は bv マウスにおける難聴病態の特徴とその発達および加齢変化について、OAE・ABR・病理検査によってさらに詳細に検討した。その結果、OAE における DP レベルは正常マウスや健常児・成人でみられるパターンと逆のパターン( $2f_2-f_1 > 2f_1-f_2$ )を示し、OAEとABRの閾値所見の比較では後者の異常がより強かった。これらのことから、生後早期に OAE の細かい所見を評価することにより迅速な難聴診断が行える可能性が示され、bv では内耳求心系障害がより強いという特徴が確認された。ラセン神経節ニューロンの生後変化に加えて、蝸牛神経レベルの軸索変性の所見も明らかにでき、難聴病態の加齢変化のモデルとして、今後も検討が必要と思われた。

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固有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週間で生じる。電顕的検討で核には著変がなく、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先天難聴の純系モデルと考えられている。しかし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、昨年度までの研究で本マウスの聴カスクリーニングのため耳音響放射 OAE に聴性脳幹反応 ABR 検

査を加えて難聴状態を明らかにしてきた。本年度はさらに詳細な病態評価を行うため OAE および ABR の発達および加齢変化に注目し、聴神経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 マウスとした。Distortion Product Otoacoustic Emission (DPOAE) の DP growth 法( $f_2$  周波数 7996Hz と 6006Hz 使用)での DP レベルを通常の  $2f_1-f_2$  に加えて  $2f_2-f_1$  の周波数についても求めた。併せてクリック音刺激および8~32kHz 高周波数刺激の ABR 各波潜時とIV波閾値を月齢別に検討した。

コントロールとして ddy 系マウスおよび bv との交配によるヘテロマウスで比較した。コントロールマウスでは生後1ヵ月から2歳2ヵ月までの34匹にのべ50回以上、bv マウスでは生後1ヵ月から2歳2ヵ月ま

での 62 匹に対し約 100 回以上検査した。健常成人 4 例と新生児 8 例について OAE 検査を加えた。また、bv7 匹、ddy3 匹については病理学的検討も行った。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 値を通常の  $2f1-f2$  に加えて  $2f2-f1$  の周波数についても求めた。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  $\mu$ ) 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。また、スピーカからの 8~32kHz 高周波数音で両耳刺激も行った。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、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, ddy とも 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 (pH8.0) 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。すなわち基底回転軸索断面をデジタルカメラで強拡大撮影後、径の長さを測定した。同時に顔面神経も摘出し、同様に横径の長さを測定し、これに対する蝸牛神経横径の比をとって比較した。また、神経変性を形態的にさらに詳細に確認するため、中枢神経組織に特異的な染色法をおこなった。詳細は以下の通りである。

顕微鏡下で蝸牛および顔面神経を摘出し、アルコール脱水に供した。摘出した蝸牛および顔面神経を PBS バッファー、50%、70%、80%、90%、純エタノールの順に各 1 時間ず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晚振盪した。次に純キシレンに移して 1 時間振盪する操作を 2 回繰り返し、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。そのまま一晚 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、蝸牛組織および顔面神経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。

パラフィン切片の薄切はライカ回転マイクロームを用い、切片厚さ 5  $\mu$  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 恒温器で一晚乾燥した。

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。

KB染色はHE染色と同様に脱パラフィンを行った後、ルクソールファーストブルー溶液中に56°Cで16時間静置した。95%エタノール、蒸留水で洗浄後、0.05%炭酸リチウム水溶液、続いて70%エタノールで分別し、蒸留水で洗浄後、クレシル紫液で3~5分染色した。95%エタノールで分別後、HE染色と同様に透徹を行い、非水溶性封入剤を用いて封入した。

ボディアン染色は脱パラフィン後水洗し、プロテイン銀溶液中で37°C、24~26時間鍍銀し、水洗後、ハイドロキノン、無水硫酸ナトリウムを含む還元液で還元し水洗した。0.5%塩化金酸水溶液で置換し、水洗後、2%シュウ酸水溶液で調色した。水洗後、5%チオ硫酸ナトリウム水溶液で定着させ、水洗後、透徹、封入した。(倫理面への配慮:対象マウスは処置や処分の配慮を注意深く行い、麻酔処置により疼痛を緩和し、苦痛を与えない方法によって臓器を摘出した。ヒトへの検査にあたり、内容の説明を行い本人および新生児の場合は保護者の了解を得た。)

### C. 研究結果

1) ABR(図1, 2): クリック音及び8~32kHzの各周波数でのIV波閾値は、コントロールマウスの平均値(20~45dB)と比較し、bvマウスでは閾値の上昇(81~110dB)を認めたが、各周波数における上昇の程度はほぼ一定であった(図1)。各マウス個体におけるABR閾値とDPOAEの閾値を比較すると、bvマウスではコントロールと比較してABR閾値がより

高い傾向が見られた(図2)。

2) OAE(図3, 4, 5, 6, 7): 各月齢におけるDP growth法のDPレベルをコントロールマウス(18.8~30.3dB)と比較したところ、bvマウスでは生後2~3ヶ月で既にレベルの低下(-5.1~12dB)を認め、加齢に伴いコントロールとの差が明瞭になる傾向を認めた(図3)。また、bvマウスでは刺激音圧80dBにおいてDPレベルが検出されないことが多く、この割合(非検出率)は月齢とともに増加した(図4)。

2f2-f1周波数でのDPレベルを求めたところ、コントロールではf2周波数が7996Hz, 6006Hzともに2f1-f2値が2f2-f1値よりも大きい結果であった、bvマウスでは、f2周波数7996Hzにおいては有意( $p < 0.001$ , Studentのt検定)の逆転、すなわち $2f1-f2 < 2f2-f1$ のパターンを認めた(図5)。健常成人および新生児においても2f1-f2周波数と2f2-f1周波数でのDPレベルを比較したが、各周波数において $2f1-f2 \geq 2f2-f1$ となっていた(図6, 7)。

3) 組織学的検討(図8, 9, 10): bvマウスは生後1~2ヶ月の間にラセン神経節ニューロン細胞数がほぼ3分の1に激減し、その後も徐々に減少し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。生後5ヶ月でコントロールマウスに比較すると50%以下であった(図8)。

顔面神経横径はbv(n=7)、コントロールマウス(n=3)間に差は認められなかった。しかしながらbvマウスの蝸牛神経の径は、顔面神経との比で $0.57 \pm 0.14$ と約2分の1であり、コントロールマウスの $1.01 \pm 0.21$ と比較し有意( $p < 0.05$ , Mann-WhitneyのU検定)に狭小化していた(図9)。また、ボディアン染色によりbvマウスの蝸牛神経の軸索部における変性が確認された(図10)。

### D. 考察

本年度の研究により、この難聴マウス

の ABR 閾値上昇は、各周波数で同程度であり周波数特異的な障害ではないことが確認できた。ABR 閾値上昇と OAE 閾値上昇では、ABR についてより上昇の程度が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ることが確認された。検査が簡便な DPOAE で生後早期に DP レベルの低下があり、年齢とともにさらに低下し、非検出率の上昇も認め、難聴の進行を生理学的に確認することができた。

一般に、正常のヒトおよびマウスでは、DPOAE による DP レベルは  $2f_1-f_2$  の周波数の場合最大値が得られ、 $2f_2-f_1$  の周波数と比較すると  $2f_1-f_2 > 2f_2-f_1$  のパターンとなる。しかし bv マウスでは、 $f_2$  約 8000Hz でこの周波数における DP レベルに有意な逆転すなわち  $2f_2-f_1 > 2f_1-f_2$  がみられ、本難聴マウスに特徴的な所見と考えられた。

以上のことから、生後早期に OAE の細かなサインを見逃さずに評価することで、難聴の進行が遅い例についても迅速な難聴診断が可能となる事が判明した。また、ABR との相補的な評価を行う事でより詳しく確実な評価を行う事ができるとも考えられる。一方、蝸牛の感覚系一次ニューロンの細胞数減少が生後も持続的にみられることから、bvマウスの病態は老人性難聴や神経性難聴と同様に進行性の障害であることが確認された。また、bvマウスでは蝸牛神経が顔面神経の約 2 分の 1 の細さになっていることが確認でき、軸索の変性もみられることが判明した。これらの所見から求心性の末梢神経障害を確認でき、その進行を阻止する治療法開発も進行性難聴の場合重要と思われる。

#### E. 結論

遺伝性難聴bvマウスの聴力障害の評価には ABR と OAE を相補的に用いるこ

とが有用であり、特に生後早期の OAE 検査において細かいサイン ( $2f_1-f_2 < 2f_2-f_1$ ) を見逃さずに評価することが早期診断・難聴スクリーニングにつながると考えられた。また、蝸牛病理でラセン神経節ニューロンおよび蝸牛神経軸索に神経性的変化があることから年齢依存性の神経性難聴の要素もあることが見いだされた。

#### 研究協力者

昆かおり、白根聖子、加我牧子、小林奈麻子、太田玲子、伊藤雅之:国立精神・神経センター

#### F. 健康危険情報

とくになし。

#### G. 研究発表

学会発表

1) 稲垣真澄、昆かおり、堀本れい子、加我牧子、伊藤雅之:遺伝性難聴マウスbvの病態進展に関する検討 第43回日本小児神経学会総会 岡山 2001.6.8.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### 図の説明

1. クリック音及び 8~32kHz での IV 波閾値を比較した。bv マウスでは閾値の上昇を認めたが、各周波数における上昇の程度はほぼ一定であった。
2. 各マウス個体における ABR と DPOAE の閾値を比較すると、bv マウスでは ABR 閾値がより高い傾向が見られた。
3. 各月齢における DP レベルをコントロールマウスと比較したところ、bv マウスでは生後 2~3 ヶ月で既にレベルの

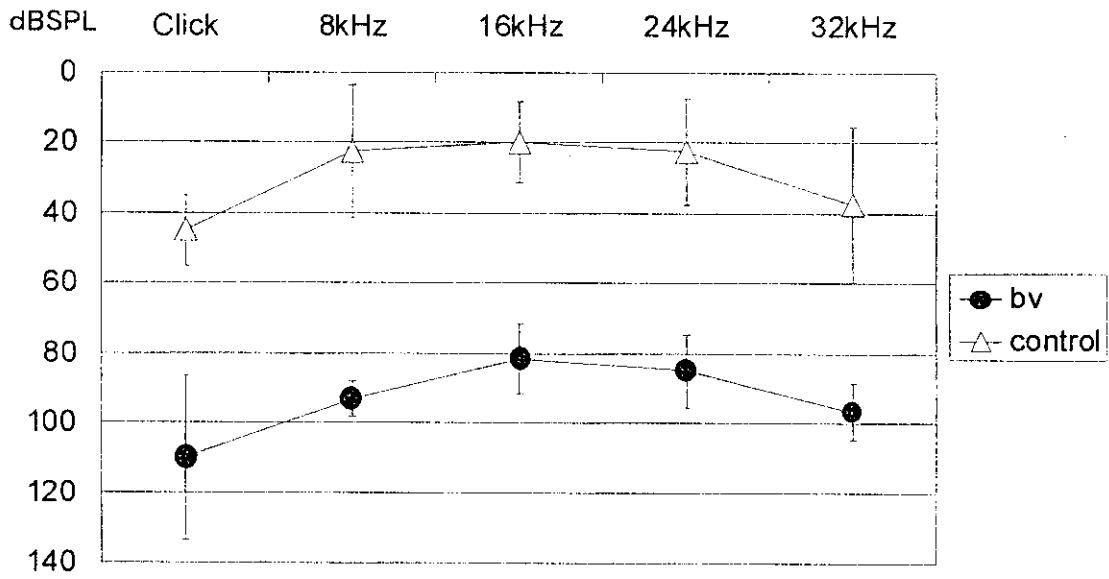
低下を認め、加齢に伴いコントロールとの差が開く傾向を認めた。

4. bv マウスでは刺激音圧 80dB において DP レベルが検出されないことが多く、この非検出率は月齢とともに増加した。
5.  $2f_1-f_2$  周波数に対し  $2f_2-f_1$  周波数での DP レベルを比較すると、コントロールでは  $f_2$  周波数 7996Hz, 6006Hz ともに  $2f_1-f_2 > 2f_2-f_1$  となるが、bv マウスでは、 $f_2$  周波数 7996Hz においては  $2f_1-f_2 < 2f_2-f_1$  と逆転していることが確認できた。
6. 健常成人において、刺激音圧 80dB において、 $f_2$  周波数を変化させた場合の  $2f_1-f_2$  周波数と  $2f_2-f_1$  周波数での DP レベルを比較した。各周波数において  $2f_1-f_2 \geq 2f_2-f_1$  となっていた。
7. 新生児 8 例においても刺激音圧 60dB において、 $f_2$  周波数を変化させた場合の  $2f_1-f_2$  周波数と  $2f_2-f_1$  周波数での DP レベルを測定した。8 例の平均で比較すると、周波数を変化させても常に  $2f_1-f_2 > 2f_2-f_1$  となっていた。
8. bv マウスは生後 1~2 ヶ月の間にラセン神経節ニューロン細胞数がほぼ 3 分の 1 に激減し、その後も徐々に減少がみられた。
9. bv マウス ( $n=7$ )、コントロールマウス ( $n=3$ ) の蝸牛神経の径を、顔面神経との比で比較した。コントロールマウスでは  $1.01 \pm 0.21$  と蝸牛神経径がやや太いのに対し、bv マウスでは  $0.57 \pm$

0.14 と約 2 分の 1 であり、有意に細かった。

10. ボディアン染色により bv マウスの蝸牛神経の軸索部における変性が確認された。

☒ 1. Threshold of ABR in bronx waltzer mouse (2.5-3 m)



☒ 2. Relation between ABR & OAE thresholds of bronx waltzer

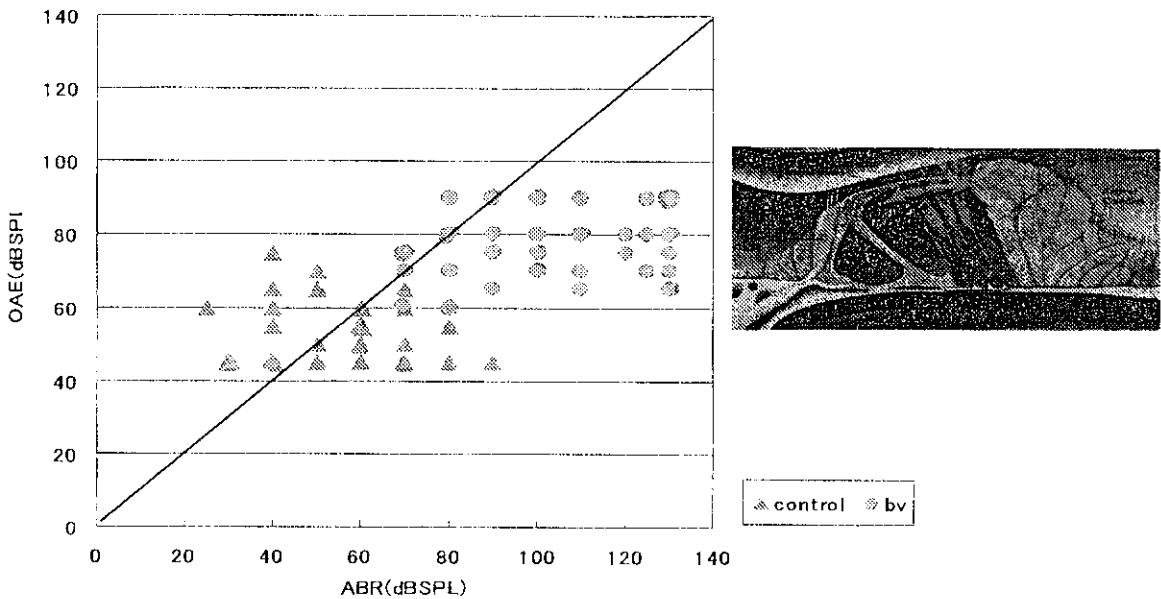


図3. マウスの月齢と DPOAE 値の関係  
(f2=7996Hz)

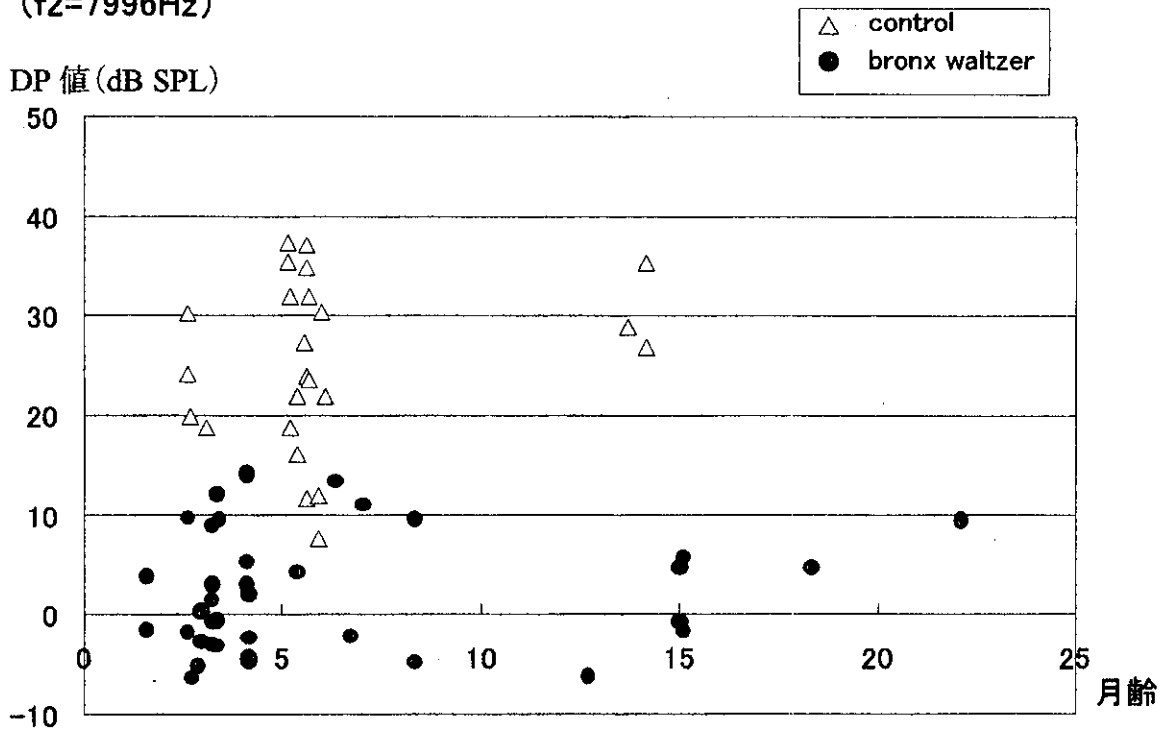


図4. マウスの月齢と DPOAE 値の関係 (f2=7996Hz)

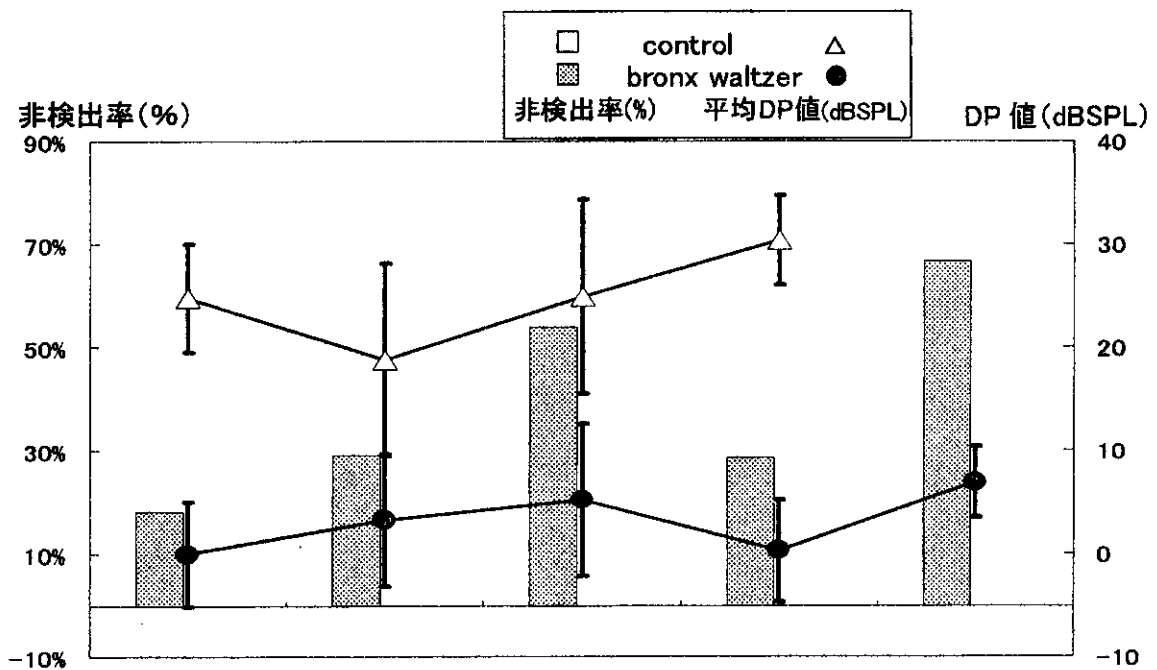


図5. 2F1-F2 と 2F2-F1 の比較

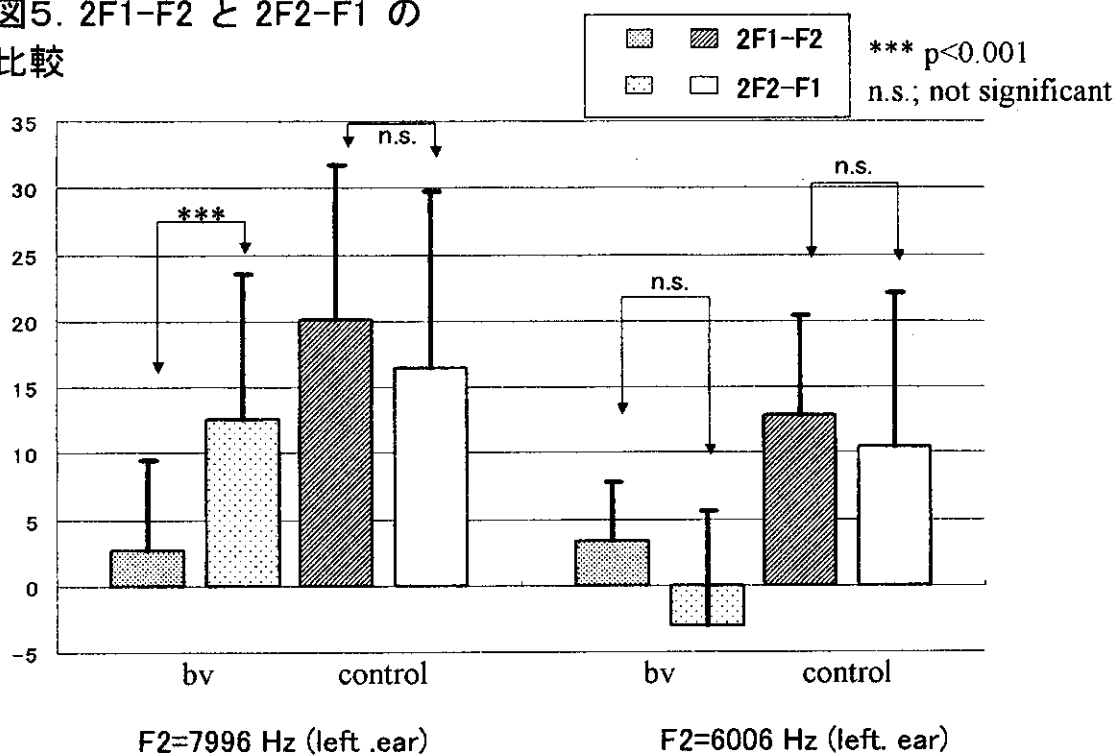


図6. 健常成人における 2f1-f2 値と 2f2-f1 値の比較(刺激音圧 80dB)

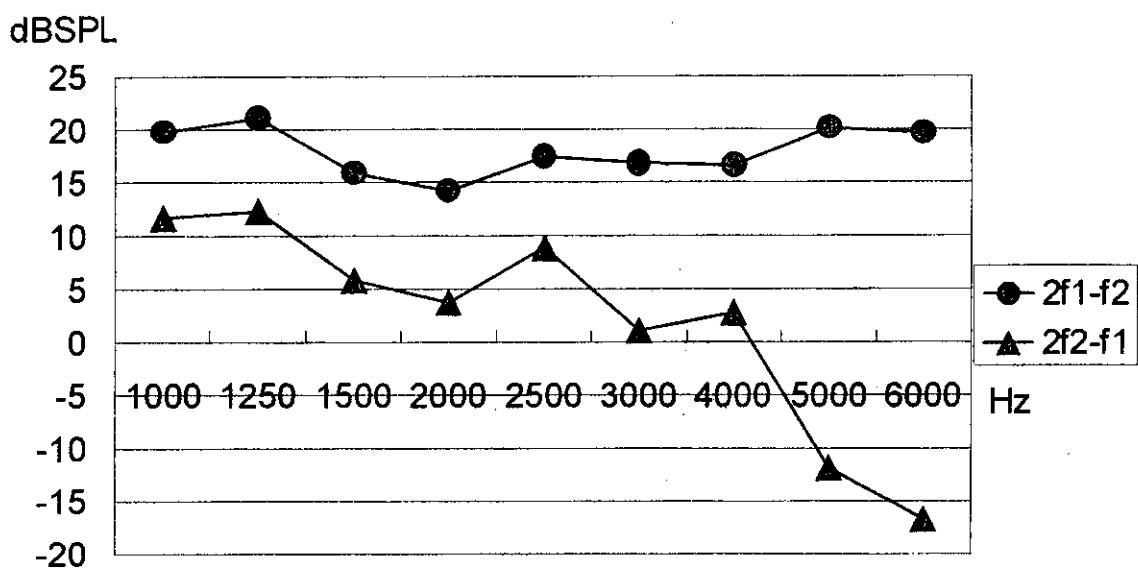




図7. 新生児の 2f1-f2 値と 2f2-f1 値の比較 (n=8 の平均値)

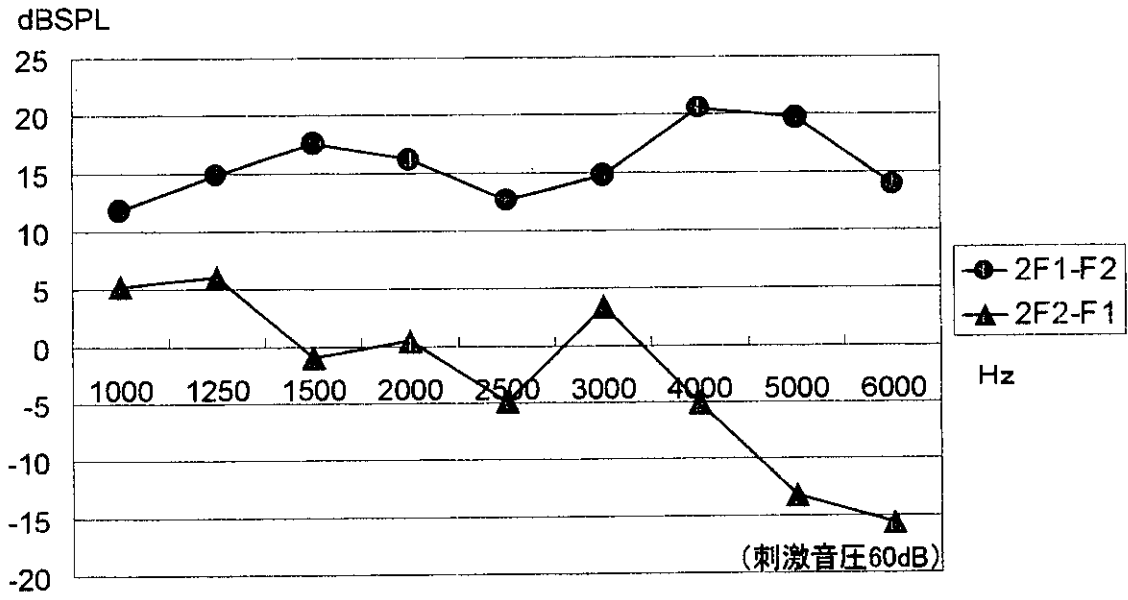


図8. Reduction of cell counts in the spiral ganglion of bronx waltzer mouse

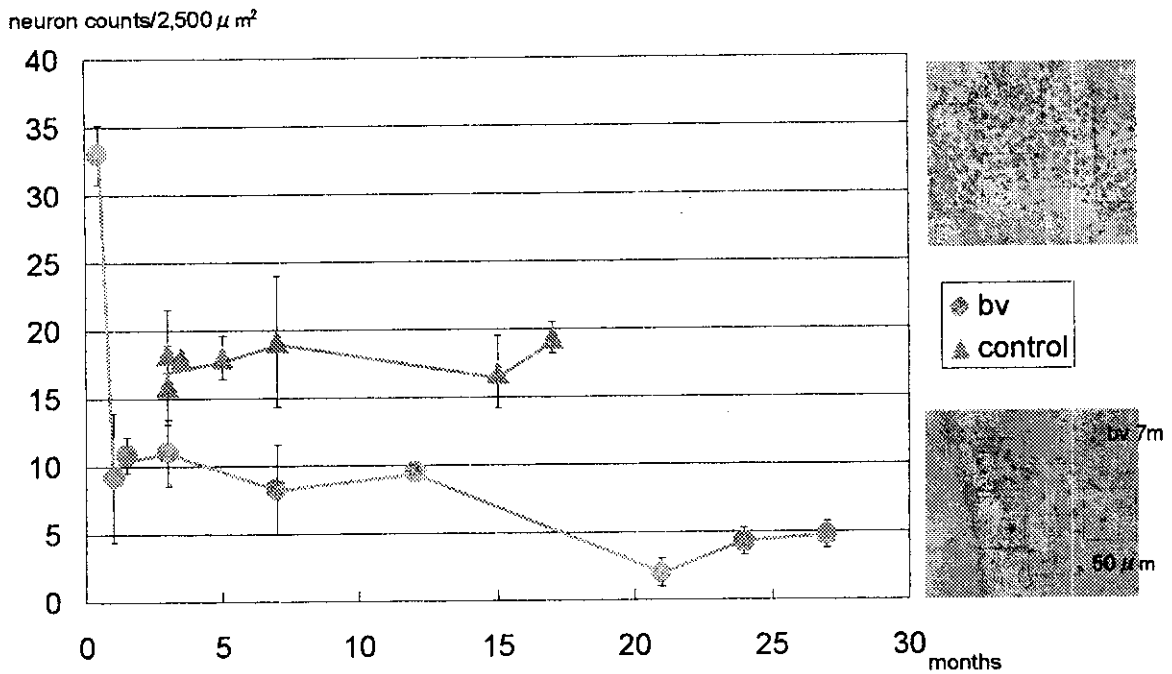


図9. Atrophy of cochlear nerve in bronx waltzer mouse

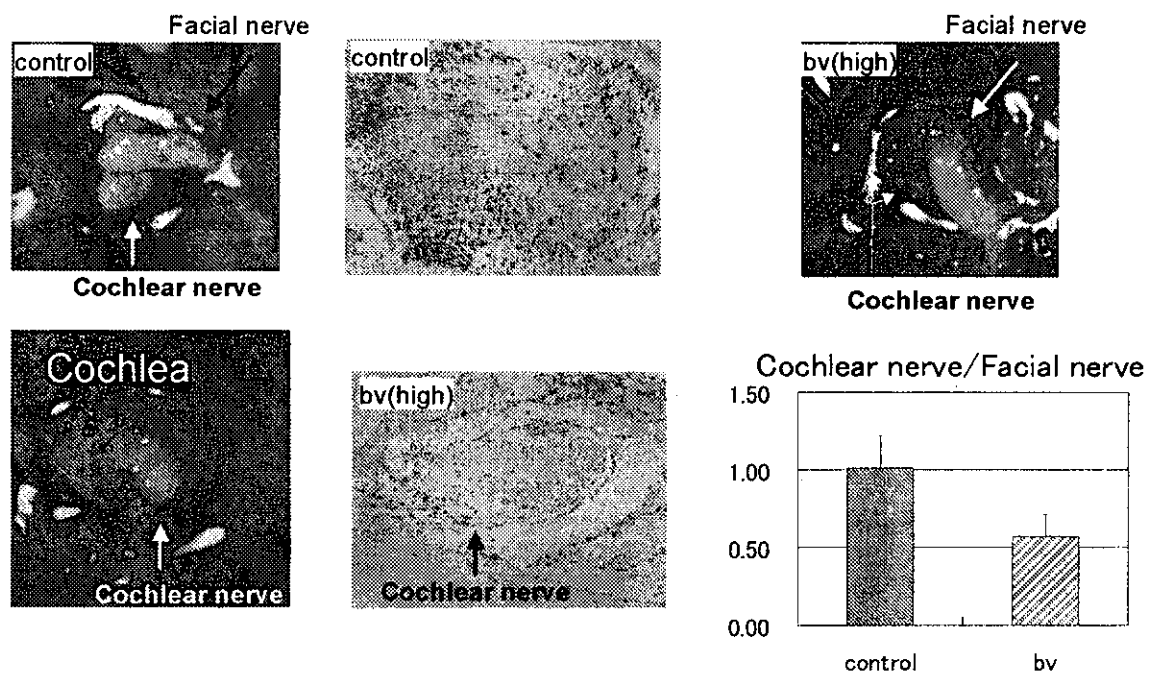
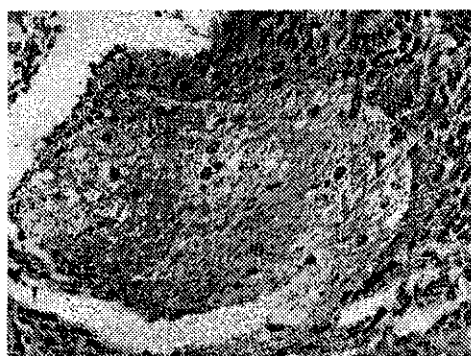


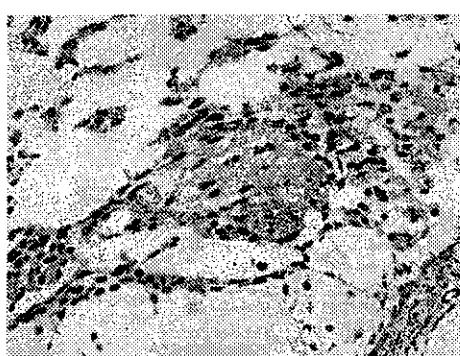
図10. 難聴マウスの蝸牛神経軸索部における変性 (Bodian 染色)

(各40×)

ddYマウス(2.5m)



bv マウス(4m)



## II. 分担研究報告

### 2. 遺伝性難聴 bv にみられる回転性行動異常の病態解明に 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 にみられる回転性行動異常の病態解明に関する研究

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)は蝸牛の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。そして本マウスには過剰回転行動を示すグループが存在する。この異常行動は回転運動を主とするもので、夜間行動時間が有意に長く、睡眠時間が短縮していた。行動異常のある群(回転群)と無い群(非回転群)についてOAEあるいはABRを指標として聴力を測定したところ、難聴の程度に差はなかった。そこで、中枢神経系異常とくに神経伝達物質の代謝変調が背景にあると考え、脳内モノアミン系代謝産物を測定したところ、bvマウスはmidbrainでのDA値が対照よりも低下していたが、striatumのドパミン(DA)値変化なかった。また、DA代謝系に関してはstriatum, midbrainともに亢進する傾向があり、回転群striatumではDOPAC側にシフトした。Apomorphine投与後striatumのDA値、代謝産物は対照群では不変ないし抑制傾向を示した。一方、回転群では逆にDA値が増加する異常パターンを示した。以上より、bvの夜間にみられる過剰回転運動は難聴によるものではなく、脳内モノアミン系、とくにstriatumレベルでのDA系自己受容体機能の失調が関わる可能性が示された。未だ原因遺伝子が不明であるため、難聴病態との関連からbvの中枢神経系における機能異常の解析が今後一層必要と思われる。

A. 研究目的

Bronx waltzer mouse (bv) マウスは自然発生で見出されて 1979 年に初めて報告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、外毛細胞には形態異常を示さず、聴覚求心系に局限した病変であり、先天難聴の純系モデルと考えられる。

bv の頭部を振る動作やワルツ様の行動は今まで難聴に伴うものとして理解されてきた。しかしながら、米国より本マウスの供与を受けて兄妹交配を繰り返したとこ

ろ、著しい行動量過多を示すグループが出現してきた。一般的にマウスの回転性行動異常に関しては、黒質線条体のドパミン系経路の片側性病変によりもたらされるものや Whirler mouse (Weltman AS et al, 1966) の circling behavior が報告されており、いずれも脳内モノアミン系とくにドパミン系機能障害に注目がなされ検討されている。なお、Whirler mouse 原因遺伝子は第4染色体にその座があることが判明し、bvとは全く別個のミュータントと考えられる。

本研究では、bv にみられる行動異常の内容を客観的に評価すること、すなわち Evidence based assessment を行い、その背景に難聴が関わるのか否かを明らかにすることと中枢神経系モノアミン代謝異