

うに行うのか、などの問題が不明確なまま取り残されている印象が強い。実際には、こうした各種の問題を回避するためのシステムを確立し、負の影響と混乱を最小限に押さえるための手段を整えることが必須であり、その部分を構築することこそが「システム」としての聴覚スクリーニングを考える際には重要であるといえる。また、こうした問題解決のためには日本の医療制度や風土に根ざしたシステム構築が必須であるため、海外に範を求めない、日本独自のシステムを考える必要がある。

今回我々は、岡山県において新生児聴覚スクリーニングのための事業「新生児聴覚検査事業」を立ち上げ、その一部である「新生児聴覚検査推進協議会」として様々な問題点の解決を図ってきたので、その現状について報告する。

対 象

2001年7月～2003年3月現在までにこのモデル事業に参加することを表明した病院で出生し、かつ岡山県在住者の子供を対象とした。モデル事業参加産婦人科施設は、岡山県下の産婦人科医院ないしは総合病院の産婦人科であり、医師会報による公募の結果、参加を表明し、かつ2回行われた講習会を履修した施設を対象とした。最終的には41の医療施設が参加を表明した。該当期間におけるこれらの病院の累積出生数は21,444人であった。そのうち、書面によるインフォームドコンセントの結果、聴覚検査を希望しないものは375名(1.75%)、岡山県に個人名を含む個人情報を知ることによって同意しなかったものが43名(0.2%)であった。これらを除き、最終的に21,026名(98.05%)の児の保護者が新生児聴覚検査を希望し、以後に示す検査を受けた。2002年度のみに限定するとスクリーニングを受けている人数は12,665人であるが、同じ期間の人口動態統計月報で報告されている概数出生数は、18,500人であり、これを基準に考えた「県民全体のカバー率」は、68.46%であった。30%強の岡山県民の出生児

がスクリーニングを受けていない事になるが、これは①県外の里帰り分娩例、②スクリーニング事業に参加していない病院・産院・助産所での出生例などが含まれると推定している。

スクリーニング方法

検査法は全例が自動ABRによる検査であり、一度の検査で両側とも「パス」となったものは、その旨を説明するとともに、「お子さんの聞こえのために」と題されたパンフレットを渡し、以後の聴力および言語発達のためのチェックリストを手渡した。「要再検査」となった場合には、入院中に少なくとももう一度確認検査として再度自動ABRを行った。2回以上の確認検査の上でも「要再検査」となった例を「要精密検査」例として以下の精密検査を行った。

精密検査

精密検査としては、社団法人日本耳鼻咽喉科学会認定専門医がおり、かつ乳幼児に対する聴力検査が可能な施設を岡山県地方部会から推薦し、最終的に岡山県が指定する精密検査施設として認定された。これらの施設でconventional ABRを中心にした検査と耳鼻科視診を行い、こうした検査でも難聴の存在が否定できない場合には難聴幼児通園施設「岡山かなりや学園」と併設する診療施設「大元寮診療所」に紹介の上、再度BOAやOAEなどの聴覚検査を反復して行い、必要に応じてABRやASSR(AMFR)を再検して難聴の有無を診断した。難聴の有無の決定までには少なくとも3か月の観察期間をおき、難聴が確認できた例にはまず補聴器の装用を開始して早期介入を開始した。補聴器などを用いた教育的介入の開始は、6か月までに行うことを目標としているが、これは重複障害などがある場合や、軽度難聴例などの場合には必ずしも容易ではない。

スクリーニングの結果

21,026人のスクリーニングの結果、第一回目の

検査で「要再検査」となったものは368人(1.75%)であり、2回の検査の上で「要精密検査」となったものは97人(0.46%)であった。これらのうち、「両側」例は40例で、優先的に難聴幼児通園施設「岡山かなりや学園」に紹介の上、さらに継続的な検査とフォローアップを受けた。

精密検査の結果

97例の要再検査例のうち、現時点までに確定診断のつけられているものは、72例あり、ここまでに何らかの形で難聴の存在が確認されたのは、33例(45.8%)であった。39例は精密検査の結果正常と判定された。臨床的に問題となる両側難聴疑い例40例だけに限って検討すれば、正常13例(32.5%)、聴覚障害18例(45%)、経過観察3例、片側難聴疑い例1例、未受診5例であった。未受診例の内訳は、①精密検査前に死亡したケースや、②全身状態不良ないしは他科疾患の治療を優先しており、現時点に至るもまだ精密検査が行えていないケースなどが含まれる。現状までに追跡調査が全く不可能な「脱落例」は発生していないが、これには岡山県保健所の保健師による精力的な追跡調査が効果を上げていると考えられる。

検査の精度についての問題

岡山県で行われている、自動ABRのみを用いて検査を繰り返す2重スクリーニング方式の結果、精密検査施設に紹介されてくる児、すなわち「非パス率」に相当する児は全体で33名(0.4%)であり、欧米の先行報告の結果と比較しても格段に低い非パス率にとどまっている²⁾。この傾向は厚生労働省班研究の結果ともよく類似しており、日本国内で行うスクリーニングがきわめて効率よく行っていることを示しているものと考えられる。本邦における特殊性としては、生後5日程度の入院期間であるため、再検査のための時間がゆっくりとれること、また、生後数日が経過する内に羊水による中耳の影響が軽減されることなどが考えられる。少なくとも自動ABR装置でスクリーニング

を行えば、多施設が参加した地域ベースのスクリーニングであってもこの程度のパス率でのスクリーニングが行いうるということが今回初めて示されたことになる。しかし、岡山県におけるスクリーニングでも、一部では病院ごとにより異なるパス率が経験されており、スクリーニング精度の管理は、地域ベースでのスクリーニングを行う際には非常に重要な問題となりうるということが考えられる。岡山県のように、ほぼ同じシステムの自動ABRを用いた場合でもある程度のばらつきが出ることから、OAEによるスクリーニングが混在したシステムの場合には、スクリーニング精度の管理については特に重要な問題となりうると思われる。

難聴児の頻度

今回対象となった21,026人のスクリーニングの結果、現時点までに18名の両側難聴児が検出された。一部には安定しない全身状態のために、未だに聴力の最終的な結論が出せていない症例があるため、最終的な難聴の有病率については判定が困難であるが、おおざっぱに従来言われている「1,000人に1人」程度の難聴の出現頻度となることが予測される。

ここまでの段階での陽性反応的中率は、両側難聴疑い例に限れば40%超であり、スクリーニング検査としてはまずまずの数字であると言える。逆に言えば、「難聴疑い」として紹介されてくる児の中で、真に難聴が存在するのはそのうちの約半数ほどで、最終的に療育の対象となる両側難聴例はさらにその半分程度、すなわち最初に紹介されてくる数の4人に1人弱の割合でしかなかったことを改めて指摘したい。「スクリーニング」は決して「スクリーニング」以外の何者でもなく、その後の精密検査の重要性について再度強調しておく必要がある。また、この事実は、スクリーニングの時点で保護者に伝えるべき情報として、スクリーニング例のうちどの程度の割合で「真の難聴」が含まれているのか、という点を、それぞれのスクリー

ニング単位ごとにきちんと検証するべきであることを示している。

保護者の精神的な負担についての 問題とトラッキング

岡山県では、スクリーニングの結果「要精密検査」という診断を受けたケースに関する情報は、県庁から所轄の保健師に連絡が入るシステムになっており、報告を受けた担当保健師は、訪問指導を行い、心理的援助と、適切な受診行動に結びつくための支援を行っている。スクリーニングによる精神的負担が、どのような影響を与えているかについては現在追跡調査中であるが、同時進行としてその心理的援助にも努めている。こうした訪問指導のためには、担当する保健師自身に言語習得期前難聴を早期発見する意義は何であるか、ということ十分に啓発しておく必要がある。岡山県では、毎年スクリーニング検査を担当する病院で講習会を開いているが、同時に保健師の講習会も開催しており、こうした場面での説明が非常に重要な意義を持っていると考えている。

現時点までに具体的に岡山県庁に報告されている問題点については、「検査結果を大部屋の中で告知され、非常に苦しい思いをした」という問題点が一件、また「検査結果が出てから精密検査が行われるまで3か月も待たされ、非常に苦しい思いをした」というものが1件あった。こうした県庁にまであがっている「声」の裏側にはさらに多くの苦痛や、心的な影響が隠れていることが予測されるため、今後の訪問指導による詳細な検討を行い、その反省を行うことは必須の経過となることであろう。岡山大学自体も精密検査期間であり、自験例からの聞き取り調査でもスクリーニング結果の告知から精密検査までの時間が精神的には最も苦しい時間帯であるようである。保健師による追跡調査は、検査後のトラッキングに関しても非常に重要な働きをしている。岡山県では現在までにすでに5例の「要精密検査」未受診児がいるが、これら全てについてどのような状況のために未受

診となっているかがすでに確認されている。病院ベースのスクリーニングを行う場合には、多発奇形などのために、複数の病院を転々とするケースでは対応することが困難である。この点は行政主導のスクリーニングにおける典型的なメリットであり、こうした情報の管理が非常に有益であることの一例である。

要精密検査児の精密検査と療育について

岡山県下における難聴幼児療育施設としては、岡山かなりや学園がある。当施設は、1969年ろうあ児援護協会大元寮難聴幼児母子訓練部門として発足し、1975年には難聴幼児通園施設として本邦では初めて厚生省からの認可を受け、岡山かなりや学園となった³⁾。かなりや学園には併設する診療施設「大元寮診療所」があり、この施設での外来通院と検査を繰り返しながら確定診断に至るシステムとなっている。岡山県の場合、実際のスクリーニング開始に当たっては、こうした既存の診断・療育施設をスクリーニングの枠組みに組み合わせるだけで受け皿ができあがる状況にあった。

かなりや学園での基本的な療育スケジュールとしては、難聴乳児に対して、3か月以内にまず診断を確定するように検査のスケジュールを立てる。難聴が高度である場合には比較的診断は容易であり、診断と平行して初期介入が開始される。この初期介入には、①周波数別、耳別の難聴の程度を可能な限り評価すること、②補聴器の装用をすすめること、③両親に対するカウンセリングを行うこと、の3点である。これら3つの介入のステップはしばしば同時進行で行う必要がある。すなわち、スムーズな療育開始のためにはカウンセリングによる障害受容は不可欠であり、また、診断過程で音に対する反応を保護者に見せることそのものがカウンセリングの過程と直結する。また、補聴器の装用は聴覚レベルの正確な推定なしにはあり得ないが、特に高度難聴児の場合、最初に装用閾値が測定可能となることは稀ではない。聴力の評価によって、少なくとも両側に中等度以上の難

聴が存在することが強く疑われた場合には、生後6か月までに補聴器装用を開始することを目標として準備を行う。難聴の程度が中等度～軽度であった場合には、その後に聴力閾値が改善してくる例も散見されるため、診断には注意が必要である。しかし、一方で診断に時間がかかるようであれば、保護者の混乱は目に見えて大きくなるため、「どうして診断に時間がかかっているのか」という事実をきちんと説明する必要がある。

言語習得期前難聴児の両親は、聴者のカップルであることが大多数である。これは保護者とその子どもとの間には、コミュニケーション上の壁があるケースが大部分を占めることを意味しており、保護者の側に「接し方」を指導することが、とりわけ言語的なメッセージの伝達のために重要な意味を持っている事を示している。さらにコミュニケーションの取り方の具体的な手法を両親に指導することは、難聴児を持った保護者が、良好な親子関係を形成する上でも重要である。基本的コミュニケーション態度の確立、すなわち話しかけるときには必ず注意を引いてから話す、口をはっきりと開ける、コミュニケーションに意味を持たせるなどの指導はその後の療育にも特に重要で、必要な場合には積極的に手話も取り入れながら「伝える方法」を指導する必要がある。

関連所部門との連携

システムがシステムとして総体的に機能するためには、必要な情報を必要なタイミングで伝達するための仕組みが必須である。行政単位を中心としたスクリーニングシステムの明らかなメリットは、すでに述べたように行政を中心とした情報の流れがスムーズに運ぶことである。しかし、スク

リーニング結果についての情報は重要な個人情報を含んでいるためにその管理には細心の注意を払う必要がある。またこうした情報を扱うためには、検査自体とは別に、典型的な個人情報である検査結果を、必要に応じて関連機関へと通報することの是非についての同意を取得する必要がある。

産婦人科との連携で特に重要となるのは、紹介ルートの確立である。地域における信頼できる精密聴力検査機関を指定することは、その後の検査・療育を順調に運ばせるための鍵であり、また産婦人科医療施設からももっとも期待される情報である。また、可能であればスクリーニング結果の非パス率や陽性反応的中率についての情報を産婦人科医療機関にフィードバックすることもスクリーニング検査の精度を上げることに役立つと考えられる。

新生児期に存在する難聴の70%は、非症候群性であると言われるが、逆に言うと30%は何らかの全身症状を持つものが含まれることになる。特に、当初難聴疑いとされて紹介されてくる児の50%には、周産期の何らかの「リスク」を有するものであり、全身状態に問題を持つ児が必ずしも稀ではない。こうした場合には必要に応じて小児科と連携を取ることが重要である。

参考文献

- 1) 三科 潤：新生児聴覚スクリーニング。日母医報、平成12年3月1日発行。
- 2) 福島邦博、福田章一郎、御牧正義ほか：難聴精査機関から見た新生児聴覚ユニバーサルスクリーニング—効率性の検討とスクリーニング検出児に対する療育の現状—。Otol Jpn, 11: 184-189, 2001.
- 3) 福島邦博、福田章一郎、問田直美ほか：岡山県における0歳難聴児の療育。小児科, 42: 89-96, 2001.

RT-PCR analysis of *Tecta*, *Coch*, *Eya4* and *Strc* in mouse cochlear explants

Yukihide Maeda,^{1,2} Kunihiro Fukushima,^{2,CA} Masashi Kakiuchi,² Yori-hisa Orita,² Kazunori Nishizaki² and Richard J. H. Smith¹

¹Molecular Otolaryngology Research Laboratory, Department of Otolaryngology, The University of Iowa Hospitals and Clinics, Iowa City, IA 52242, USA;

²Department of Otolaryngology – Head and Neck Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Okayama 700-8558, Japan

^{CA}Corresponding Author: kuni@cc.okayama-u.ac.jp

Received 15 December 2004; accepted 17 December 2004

Tecta, *Coch*, *Eya4* and *Strc* are mouse orthologs of four human deafness-associated genes. Their expression is markedly restricted to specific cell types in cochleae. Cochleae were dissected on embryonic day 15 and cultured *in vitro*. Relative messenger RNA abundance of each gene was quantified by RT-PCR and compared *in-vivo* cochleae of equivalent embryonic age. After 48 h in culture, *in-vivo* and explant *Strc* expression levels were equivalent,

Eya4 level reduced in explanted tissues, and expression of *Tecta* and *Coch* did not show the expected temporal rise. Expression of these genes was detectable even after 96 h. These results suggest that it is feasible to test the expression of inner ear specific genes in explanted cochleae. *NeuroReport* 16:361–365 © 2005 Lippincott Williams & Wilkins.

Key words: Deafness-associated genes; Embryonic cochlea; Organ culture of cochlea; Quantitative RT-PCR

INTRODUCTION

The mammalian cochlea is unique in its architecture and variety of highly specialized cells that subserve the physiological process of sound transduction. This degree of cellular and function specificity is reflected by the number of genes that are expressed only or predominantly in the inner ear. Included in this list are *TECTA*, *COCH*, *EYA4* and *STRC*, allele variants of which cause nonsyndromic hearing loss at the DFNA8/12 [1], DFNA9 [2], DFNA10 [3] and DFNB16 [4] loci, respectively.

TECTA encodes α -tectorin, the major noncollagenous extracellular matrix protein of the tectorial membrane. *Tecta* messenger RNA is expressed in supporting cells of the mouse premature organ of Corti from embryonic day 12 (E12) and reaches its highest levels of expression on postnatal day 3 (P3). Thereafter, expression dramatically decreases although low levels persist from P45 to P67, with mean messenger RNA abundance after P15 being <25% of P3 levels [5–7].

COCH (coagulation factor C homolog) is also an extracellular matrix protein. It is expressed in fibrocytes of the spiral limbus and spiral ligament, and in fibrocytes of the connective tissue stroma underlying the sensory epithelium of the crista ampullaris of the semicircular canals. These sites correspond to the regions of the inner ear that show histological abnormalities in persons with DFNA9-related deafness [8,9]. Although it is the most abundant inner ear protein, its function is still unknown.

EYA4 encodes a transcriptional activator that is initially preferentially expressed in the ventral wall of the cochlear duct within cells that develop into the stria vascularis and

Reissner's membrane. Expression peaks at E18.5, when *EYA4* is found preferentially in the dorsal half of the duct epithelium and in the greater and lesser epithelial ridges, especially in the basal turn. At older ages, expression becomes more restricted to cells derived from the spiral limbus, organ of Corti and spiral prominence [3].

STRC (stereocilin) is an integral protein of hair cells, where it is associated with the stereocilia. Expression in the murine cochlea appears first in the inner hair cells and then in the outer hair cells, probably reflecting earlier differentiation of stereocilia in the former. *STRC* is related in sequence to otoanchorin and, on the basis of predicted GPI anchoring, may mediate attachment of the tectorial and otoconial membranes to sensory hair bundles [4].

During mouse development, the cochlear duct starts to differentiate from the otocyst at approximately E12. From the dorsal wall of its neuroepithelia, sensory hair cells and supporting cells differentiate between E13 and E18 [10], with ultrastructural maturation of hair cell stereocilia continuing until the second postnatal week [11]. The ventral wall of the immature cochlear duct and its lateral part are the anlage of Reissner's membrane and the epithelial wall of the stria vascularis that develop between E16 and P3 [10]. Components of the tectorial membrane are produced in the supporting cells in the premature organ of Corti between E15 and P5 [12]. The spiral limbus develops from the epithelial layer and underlying mesenchyme from E16 to P3 [10], and in the lateral wall of the cochlea, cells in the spiral ligament form the spiral prominence from E19 to P1 [11].

According to developmental stage and process of interest during morphogenesis, several types of *in-vitro* organ

culture of murine cochleae have been introduced. When fetal cochleae are dissected with the entire otocyst on E13 [13], either in their entirety at the level of the ductus reunions or with the vestibule and surrounding tissue on E15 [14,15], the premature cochlear duct and the neuroepithelia continue normal development *in vitro* for short time periods, typically under 6 days. Microdissection and culture of the neonatal organ of Corti also demonstrate that *in-vitro* morphology is comparable to that seen during normal development, including the innervation pattern to the organ of Corti [16] and the ultrastructure of the sensory hair cells [17].

These observations suggest that explanted cochleae should be valuable for investigating expressions of cochlear-specific genes. To test this hypothesis, we examined expression of *Tecta*, *Coch*, *Eya4* and *Strc* after explanting cochleae on E15 – a time when the cochlear duct has formed and the sensory and supporting cells have begun to differentiate. Relative messenger RNA abundance of these genes was determined by semiquantitative RT-PCR and compared with *in-vivo* cochleae of the corresponding embryonic age. As a control, we studied expression of *Gapdh*, a housekeeping gene encoding a glycolytic enzyme.

METHODS

Tissue dissection and culture of the mouse cochlea: Timed-pregnant female BALB/C mice were sacrificed using sodium pentobarbital (150 mg/kg, intraperitoneal) on E15 (vaginal plug, E0). The fetal cochleae were promptly dissected in ice-cold Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) under a binocular microscope, identifying the cochlear duct at its basal and medial turns by removing the cochlear capsule. The isolated tissue contained the cochlear duct and immature sensory epithelium, nonneuronal mesenchymal tissues, lateral wall of cochlea and spiral neurons.

Explanted cochleae were placed in 500 μ l of a serum-free medium that contained DMEM and Ham's F-12, supplemented with insulin (15 μ g/ml), transferrin (20 μ g/ml), progesterone (2×10^{-6} M), selenium (3×10^{-6} M) and putrescine (10^{-4} M). The medium was maintained at 37°C in 5% CO₂ and changed daily. Cochleae were maintained for 2 days (DIV2, for 48 h, $n=6$) and 4 days (DIV4, for 96 h, $n=6$) *in vitro* before extracting RNA. Control cochleae on E15 ($n=5$), E17 ($n=7$) and E19 ($n=6$) were dissected, immediately frozen in liquid nitrogen, and processed for RNA extraction. Usually, 8–12 cochleae from a single litter were processed in each sample. Formalin-fixed cryostat sections (10 μ m) were obtained from cochleae on E15, DIV2 and DIV7. Sections were stained with 0.1% toluidine blue.

RNA extraction and reverse transcription: Total RNA was purified, treated with DNaseI (RNase-Free DNase set, Qiagen, Hilden, Germany), and quantified by measuring absorbance at 260/280 nm as previously described [7]. Total RNA (3.5–7 μ g) was typically purified from each *in-vitro* and *in-vivo* tissue sample. Total RNA (500 ng) was reverse transcribed in a 20 μ l reaction; reverse transcriptase was omitted as a negative control.

PCR and data analysis: We followed a previously described protocol of semiquantitative RT-PCR with CCD

imaging in which quantified band intensity is correlated linearly with the amount of RNA template [7,18]. Primer pairs for *Coch* (c.c.1346–1365 sense; c.c.1549–1568 antisense), *Eya4* (c.c.1705–1724; cc.1908–1927) and *Strc* (c.c.4934–4953; c.c.5166–5185) spanned the cDNA sequences in their conserved regions of the vWFA2 domain, *eya* homology region and C-terminal hydrophobic segments, respectively. The *Tecta* (c.c.6074–6093; cc.6254–6273) and *Gapdh* (c.c.650–669; cc.976–995) primers have been previously described. Each PCR (50 μ l) was performed using 4 μ l of the RT mixture [7].

After thermocycling in exponential phases, band intensity value (BIV) was determined by densitometry of the ethidium bromide luminescence of the PCR products on 3% agarose gels. After subtraction of background values as determined in an adjacent band-free area, BIVs from different gels were standardized to those of the same samples loaded on each gel. To assess expression of each gene, relative abundance (RA) of messenger RNA was expressed as the percentage of BIV to mean BIVs observed in E15 samples. Differences between groups were tested using one-way ANOVA and the post-hoc Bonferroni method. Significance was tested by confidence intervals of 99%, or as otherwise specified.

RESULTS

RT-PCR of *Tecta*, *Coch*, *Eya4*, *Strc* and *Gapdh* generated products of appropriate lengths; negative control RT-PCR resulted in no amplified product. Log[BIVs] of *Tecta*, *Coch*, *Eya4*, *Strc* and *Gapdh* linearly correlated with the number of amplification cycles in the exponential ranges of 22–30 ($r=0.973$, $p<0.01$), 21–29 ($r=0.956$, $p<0.01$), 23–31 ($r=0.976$, $p<0.01$), 23–31 ($r=0.968$, $p<0.01$) and 15–24 ($r=0.972$, $p<0.01$), respectively, using 100 ng of E15 RNA per PCR reaction. In addition, when 25, 50, 100, 200 or 400 ng of E15 RNA was used for each RT-PCR with *Tecta* primers, BIVs correlated with the amount of RNA added per PCR reaction ($p<0.05$). Therefore, BIVs of each sample were determined following 26 (*Tecta*), 25 (*Coch*), 28 (*Eya4*), 28 (*Strc*) and 20 (*Gapdh*) thermocycles, using 100 ng of total RNA per PCR reaction.

Figure 1a summarizes RT-PCR results as a percentage of the RA of *Tecta*, *Coch*, *Eya4*, *Strc* and *Gapdh* messenger RNA. Representative PCR bands obtained for each gene on E17 and DIV2 are shown in Fig. 1b.

The mean relative abundance (MRA) of *Tecta* increased between E15 ($100 \pm 15\%$, RA, mean \pm SD) and E17 ($157 \pm 55\%$) and remained at this level on E19 ($161 \pm 37\%$), consistent with observations that *Tecta* expression increases between E15 and P3 by 50–60% [7]. In cochlear explants, in contrast, MRA of *Tecta* on DIV2 ($25 \pm 12\%$) was significantly reduced compared with E15, and thus lower than E17 ($p<0.01$; Fig. 1b, row 1). MRA on DIV4 ($11 \pm 11\%$) remained at a level equivalent to expression on DIV2 ($p>0.05$) and was significantly lower than on E19 ($p<0.01$).

MRA of *Coch* increased more than two-fold from E15 ($100 \pm 26\%$) to E17 ($246 \pm 62\%$) *in vivo* ($p<0.01$), and remained at this level on E19 ($264 \pm 60\%$). In contrast, MRA on DIV2 ($55 \pm 26\%$) decreased from E15 and was significantly lower than on E17 ($p<0.01$; Fig. 1b, row 2). MRA on DIV4 ($60 \pm 27\%$) remained constant and was significantly lower than on E19 ($p<0.01$).

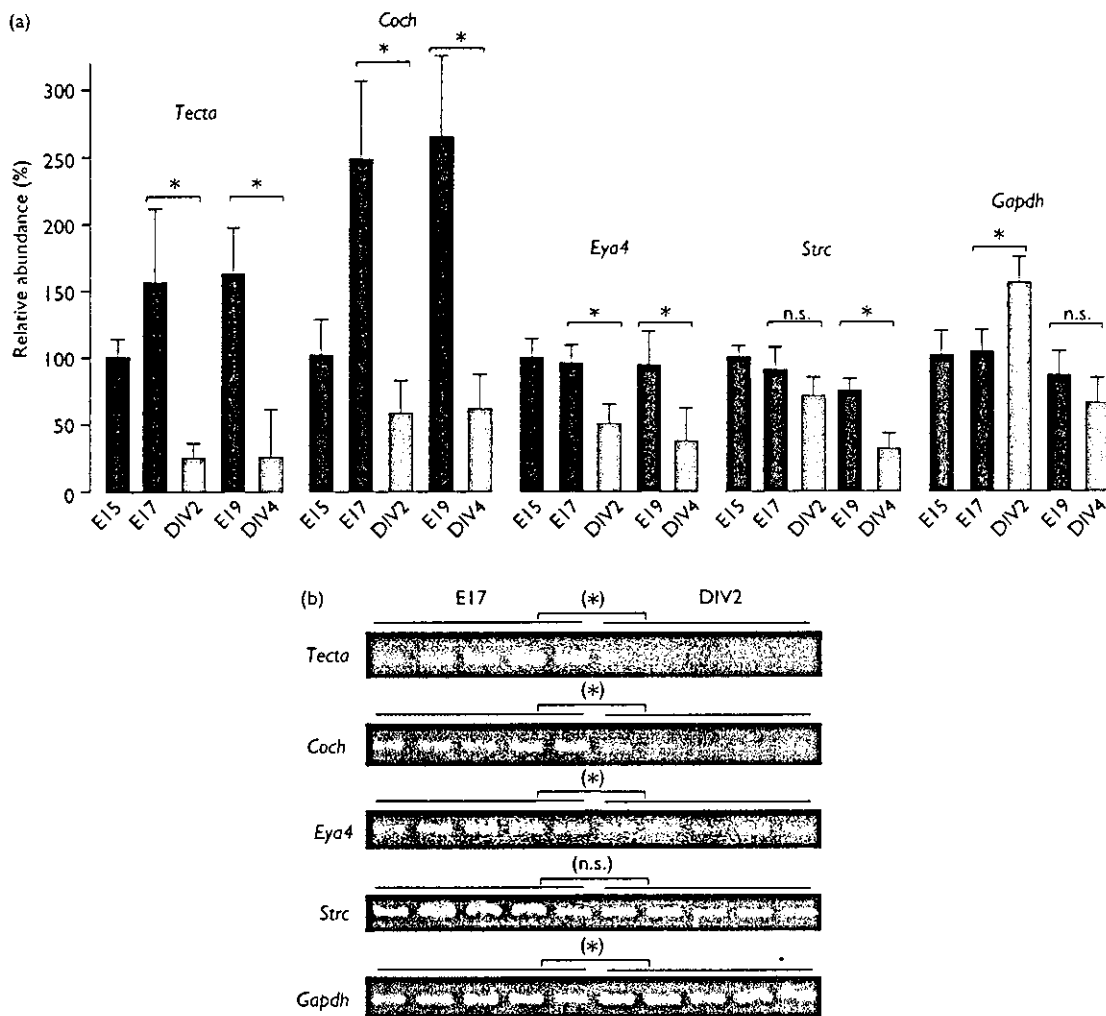


Fig. 1. (a) Relative abundance (RA) of *Tecta*, *Coch*, *Eya4*, *Strc* and *Gapdh* messenger RNA in cochlea on embryonic day 15 (E15), E17 and E19 (black bars) and at 2 days (DIV2, 48 h) and 4 days (DIV4, 96 h) *in vitro* following dissection on E15 (gray bars) expressed as a percentage of mean value on E15. RAs of *Tecta*, *Coch* and *Eya4* on DIV2 were significantly lower than that on E17. Mean RA of *Tecta* and *Coch* increased from E15 to E17 *in vivo* but not *in vitro*. RA of *Strc* on DIV2 was equivalent to that on E17. RA of *Gapdh* was significantly higher on DIV2 than on E17, and then returned to near-*in vivo* level on DIV4 (one-way ANOVA and post-hoc Bonferroni method; $p < 0.01$, $n = 5-7$). Error bars represent SD. (b) Representative RT-PCR bands of *Tecta*, *Coch*, *Eya4*, *Strc* and *Gapdh* expression in cochlea on E17 and at DIV2. PCR was performed with number of thermocycles in mid-range of exponential phase. *Tecta*, *Coch* and *Eya4* expressions on DIV2 were less intense than on E17; *Strc* expressions on DIV2 and E17 were equivalent. *Gapdh* expression was more intense on DIV2.

MRA of *Eya4* did not change from E15 ($100 \pm 14\%$) to E17 ($95 \pm 15\%$) or E19 ($93 \pm 26\%$), but was significantly reduced on DIV2 ($51 \pm 14\%$) and DIV4 ($36 \pm 26\%$). Differences between DIV2 and E17 ($p < 0.01$; Fig 1b, row 3), and DIV4 and E19 ($p < 0.01$) were significant.

MRA of *Strc* showed no significant difference between E15 ($100 \pm 9\%$), E17 ($92 \pm 17\%$) and E19 ($74 \pm 10\%$), with mild reduction from E15 to E19. MRA of *Strc* on DIV2 ($71 \pm 16\%$) also showed mild reduction, not significantly different from that on E15 ($p > 0.01$). No difference was observed in MRA between DIV2 and E17 ($p > 0.05$; Fig. 1b, row 4). MRA on DIV4 ($31 \pm 13\%$) was significantly reduced compared with E15 and DIV2, and significantly lower than on E19 ($p < 0.01$).

MRA of *Gapdh* was constant between E15 ($100 \pm 18.6\%$), E17 ($103 \pm 16\%$) and E19 ($85 \pm 13\%$). In the cultured cochlea, MRA increased significantly on DIV2 ($154 \pm 18\%$) ($p < 0.01$) and was significantly higher than on E17 ($p < 0.01$; Fig. 1b,

row 5). MRA decreased from DIV2 to DIV4 ($64 \pm 20\%$) and was equivalent to E19 on DIV4 ($p > 0.05$).

As represented in the low-power and high-power images, the cochlear capsule and sensory epithelium, including a premature organ of Corti, are substantially preserved at DIV2 (Fig. 2c, d), in agreement with previous observations in studies with entire cochlear tissue explanted on E15. [14,15]. By DIV7, although the cochlear capsule and duct appear relatively undamaged (Fig. 2e), cells in the premature organ of Corti have begun to degenerate (Fig. 2f).

DISCUSSION

This cochlear explant protocol permits detection of the cochlear-specific genes *in vitro* at 48 h after dissection. Premature organ of Corti was preserved after 48 h at the light-microscopic level. We could easily verify expression of

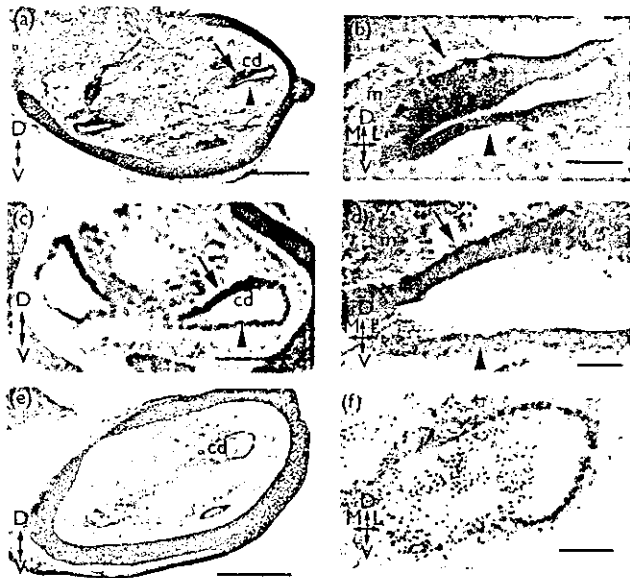


Fig. 2. Low-magnification image of cochlear tissue on embryonic day 15 (E15) (a), 2 days (DIV2, 48 h) (c) and 7 days (DIV7, 168 h) *in vitro* (e). High-power image of sensory epithelium of cochlear duct (cd) on E15 (b), DIV2 (d) and DIV7 (f). On DIV2, the premature organ of Corti comprising the dorsal wall of the immature cochlear duct (arrow), the ventral wall of the cochlear duct (arrowhead) and surrounding mesenchyme (m) are substantially preserved at the light-microscopic level. (a) and (b) represent the premature organ of Corti in the dorsal wall of the cochlear duct on E15, and one to two layers of cuboidal epithelium on the ventral wall *in vivo*. Tectorial membrane is not discernible at this stage. Dorsal (D), ventral (V), modiolar (M) and lateral (L) directions are indicated. Scale bar represents 300 μ m (a, c, e) and 50 μ m (b, d, f).

the cochlear-specific genes; however, we found that transcript levels were not necessarily equivalent to those found in the *in-vivo* condition. Specifically, *Strc* expression at DIV2 was equivalent to that *in vivo*, although *Eya4* expression was significantly lower, and *Tecta* and *Coch* expression did not demonstrate the normal surge observed between E15 and E17.

Recent techniques such as RNA interference [19] and antisense oligonucleotide inhibition [20,21] have made the controlling of expression levels of specific genes a reality. One drawback to the evaluation of these techniques for inner ear gene therapy is the lack of intrinsic expression of many of these genes in readily available cell lines. Our demonstration of expression of cochlear-specific genes in explanted tissue is significant, and makes these explants a valuable tissue source in which to investigate various techniques to regulate gene expression.

We used RT-PCR analysis to quantify expression levels of four genes and documented differential modulations in levels at DIV2. The expression of each gene, however, was reduced after an additional 48 h in culture when compared with *in-vivo* levels. In contrast, expression levels of *Gapdh* temporarily increased at DIV2, as compared with levels at E15 and E17. *Gapdh* encodes a glycolytic protein that catalyzes oxidative phosphorylation of glyceraldehyde-3-phosphate. Its expression is usually constant under experimental conditions both *in vivo* and *in vitro*, but increases do occur under conditions of hypoxia, heat shock and cellular proliferation, and exposure to some growth factors [22].

In this study, it is possible that *Gapdh* induction reflects relative hypoxia after isolation of the entire cochlear tissue. The microdissected organ of Corti is reported to maintain normal morphogenesis for more than 7 days in culture, suggesting that more limited dissection may lead to better maintenance of gene expression. Sobkowicz *et al.* [16] have observed that cytodifferentiation and innervation of the organ of Corti are maintained for more than 7 days when the neonatal organ of Corti is microdissected with its corresponding sector of spiral ganglion. The isolated organ of Corti has also been utilized to study the influence of dissociated mesenchymal cells [23], retinoic acid [24,25] and Notch receptor activation [20] in hair cell differentiation [6].

To address the ultimate question of how faithfully the explanted cochlea recapitulates the *in-vivo* cochlea at the gene-expression level, the use of microarray-based technologies would be valuable. However, PCR-based analysis offers the ability to detect precise changes in the expression of specific genes in small tissues of cochleae. Our study shows that it is feasible to quantify the expression of cochlear-specific genes in explanted tissue, especially within 48 h of explantation. Further studies are warranted, as cochlear explants will be a useful tool for assessing modulation in the expression of cochlear-specific genes under different experimental conditions.

CONCLUSION

The expressions of *Strc*, *Eya4*, *Tecta* and *Coch* were verified *in vitro* at 48 h in this explant protocol. Semiquantitative RT-PCR revealed that *Strc* expression at DIV2 was equivalent to that *in vivo*, *Eya4* expression was lower, and *Tecta* and *Coch* expression did not demonstrate the normal surge observed between E15 and E17. Although transcript levels were not necessarily equivalent to those *in vivo*, the present result demonstrates feasibility of explanted cochleae for testing modulation of expression of the cochlear-specific genes *in vitro*.

REFERENCES

- Verhoeven K, Van Laer L, Kirschhofer K, Legan PK, Hughes DC, Schatteman I *et al.* Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat Genet* 1998; 19:60-62.
- Robertson NG, Lu L, Heller S, Merchant SN, Eavey RD, McKenna M *et al.* Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat Genet* 1998; 20:299-303.
- Wayne S, Robertson NG, DeClau F, Chen N, Verhoeven K, Prasad S *et al.* Mutations in the transcriptional activator *EYA4* cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet* 2001; 10:195-200.
- Verpy E, Masmoudi S, Zwaenepoel I, Leibovici M, Hutchin TP, Del Castillo J *et al.* Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nat Genet* 2001; 29:345-349.
- Wayne S, Robertson NG, Keen JN, Richardson GP. The mouse tectorins. Modular matrix proteins of the inner ear homologous to components of the sperm-egg adhesion system. *J Biol Chem* 1997; 272:8791-8801.
- Rau A, Legan PK, Richardson GP. Tectorin mRNA expression is spatially and temporally restricted during mouse inner ear development. *J Comp Neurol* 1999; 405:271-280.
- Maeda Y, Fukushima K, Kasai N, Maeta M, Nishizaki K. Quantification of *TECTA* and *DFNA5* expression in the developing mouse cochlea. *Neuroreport* 2001; 12:3223-3226.

8. Khetarpal U. DFNA9 is a progressive audiovestibular dysfunction with a microfibrillar deposit in the inner ear. *Laryngoscope* 2000; 110:1379-1384.
9. Robertson NG, Resendes BL, Lin JS, Lee C, Aster JC, Adams JC *et al*. Inner ear localization of mRNA and protein products of *COCH*, mutated in the sensorineural deafness and vestibular disorder, DFNA9. *Hum Mol Genet* 2001; 10:2493-2500.
10. Sher AE. The embryonic and postnatal development of the inner ear of the mouse. *Acta Otolaryngol Suppl* 1971; 285:1-77.
11. Lim DJ, Anniko M. Developmental morphology of the mouse inner ear. A scanning electron microscopic observation. *Acta Otolaryngol Suppl* 1985; 422:1-69.
12. Anniko M. Embryogenesis of the mammalian inner ear. III. Formation of the tectorial membrane of the CBA/CBA mouse *in vivo* and *in vitro*. *Anat Embryol (Berl)* 1980; 160:301-313.
13. Van De Water TR. Effects of removal of the statoacoustic ganglion complex upon the growing otocyst. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1976; 85:2-32.
14. Anniko M, Van de Water TR, Nordemar H. Organ culture of the 16th gestation day mouse labyrinth. A model suggestion for pre- and post-partum development. *Acta Otolaryngol* 1978; 86:52-55.
15. Tamura K, Nishizaki K, Takeda Y, Sumida S, Masuda Y. Suspension organ culture of the fetal mouse ear. *Auris Nasus Larynx* 1993; 20:239-246.
16. Sobkowicz HM, Loftus JM, Slapnick SM. Tissue culture of the organ of Corti. *Acta Otolaryngol Suppl* 1993; 502:3-36.
17. Sobkowicz HM, Rose JE. The ultrastructure of the developing organ of Corti of the mouse in culture. In: Friedmen BJI (ed.). *Ultrastructural Atlas of the Inner Ear*. London: Butterworths; 1984. pp. 61-97.
18. Utsugisawa K, Tohgi H, Yoshimura M, Nagane Y, Ukitsu M. Quantitation of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha 4 and beta 2 messenger RNA in postmortem human brain using a non-radioactive RT-PCR and CCD imaging system. *Brain Res Brain Res Protoc* 1999; 4:92-96.
19. Caplan NJ. Gene therapy progress and prospects. Downregulating gene expression: the impact of RNA interference. *Gene Therapy* 2004; 11:1241-1248.
20. Zine A, Van De Water TR, de Ribaupierre F. Notch signaling regulates the pattern of auditory hair cell differentiation in mammals. *Development* 2000; 127:3373-3383.
21. Delprat B, Boulanger A, Wang J, Beaudoin V, Guitton MJ, Venteo S *et al*. Downregulation of otospiralin, a novel inner ear protein, causes hair cell degeneration and deafness. *J Neurosci* 2002; 22:1718-1725.
22. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 2000; 29:332-337.
23. Montcouquiol M, Kelly MW. Planar and vertical signals control cellular differentiation and patterning in the mammalian cochlea. *J Neurosci* 2003; 23:9469-9478.
24. Kelley MW, Xu XM, Wagner MA, Warchol ME, Corwin JT. The developing organ of Corti contains retinoic acid and forms supernumerary hair cells in response to exogenous retinoic acid in culture. *Development* 1993; 119:1041-1053.
25. Lefebvre PP, Malgrange B, Staecker H, Moonen G, Van de Water TR. Retinoic acid stimulates regeneration of mammalian auditory hair cells. *Science* 1993; 260:692-695.

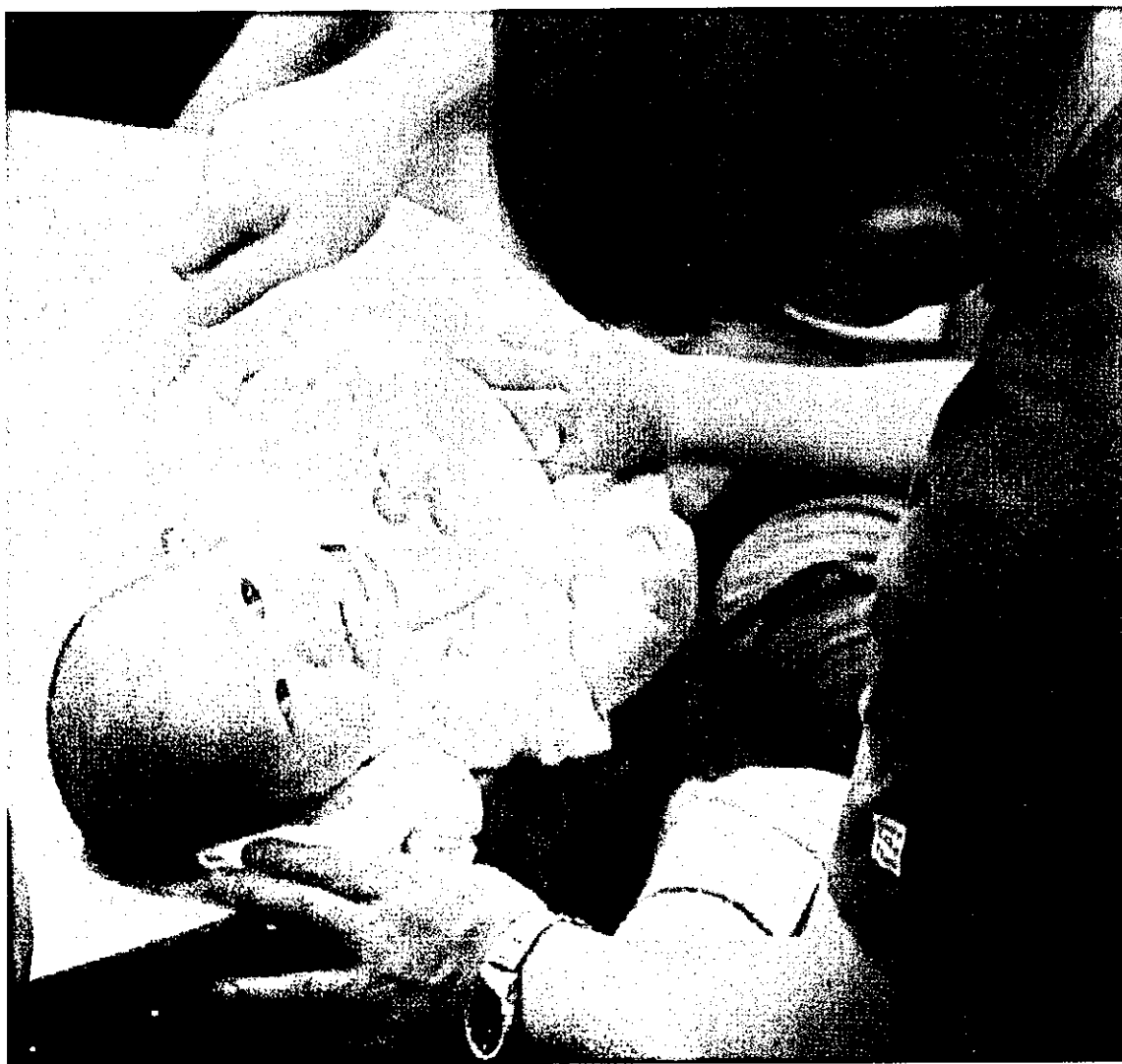
Acknowledgements: This work was partly supported by a grant from Ministry of Health, Welfare and Labor and Ministry of Science, Sports and Education of Japan and ROI-DC02842 (R.J.H.S.). There is no conflict of interest on this manuscript, including financial, consultant, institutional and other.

埼玉県立小児医療センターにおける 新生児聴覚スクリーニング後の精密検査と療育について — 療育としての音楽療法を中心として —

坂田 英明¹⁾ 白井 芳幸¹⁾ 北 義子¹⁾
赤星 建彦²⁾ 赤星 多賀子²⁾ 井上 聡子²⁾ 村上 か乃²⁾

¹⁾ 埼玉県立小児医療センター 耳鼻咽喉科

²⁾ (財)東京ミュージック・ボランティア協会



埼玉県立小児医療センター 耳鼻咽喉科
(財)東京ミュージック・ボランティア協会

埼玉県立小児医療センターにおける 新生児聴覚スクリーニング後の精密検査と療育について

—療育としての音楽療法を中心として—

坂田 英明¹⁾ 白井 芳幸¹⁾ 北 義子¹⁾
赤星 建彦²⁾ 赤星 多賀子²⁾ 井上 聡子²⁾ 村上 か乃²⁾

¹⁾ 埼玉県立小児医療センター 耳鼻咽喉科
²⁾ (財)東京ミュージック・ボランティア協会

はじめに

難聴は目に見えない障害であり、周囲に気付かれずに放置されると言葉は遅れ、人格形成に影響を及ぼすこともあります。

1997年に新しい検査装置自動ABRが日本にも導入され、スクリーニングとして全新生児を対象とした難聴の検査が可能になりました。この問題には厚生労働省も1999年から取り組み始め、全新生児を対象としたユニバーサルスクリーニングを目指しています。

新生児聴覚スクリーニング (Universal Newborn Hearing Screening: UNHS) の目的としては、高度難聴の早期発見は当然のことながら、もうひとつの柱があります。それは中等度難聴、すなわち50dB前後の難聴の早期発見です。従来、中等度難聴の発見はほとんどが6歳前後の就学時で、無声子音を中心とした音が聴き取りづらく、言語発達の遅れが目立ちましたが、この問題もUNHSにより解決が期待されています。

しかし問題点がいくつかあります。検査は産科、精密検査は耳鼻科で行い、難聴が確定した場合は療育ということになりますが、療育が整備されていないと、このスクリーニングシステムは意味をなさなくなってしまいます。

過去においては高度難聴の発見は平均2歳頃であり、その時点から気導補聴器を装用した療育が開始されてきました。しかし、新生児聴覚スクリーニングでは生後2週間ほどで難聴が診断されるため、超早期に療育を開始できるという利点があります。

私たちは、まず初めに胎内環境をできるだけ再現すべく、骨導補聴器を使用して、加工した母親の声を難聴児に聴かせています。さらに骨導補聴器を使用した療育音楽療法も施行しています。音楽療法の開始からは4年が経過し、症例によっては聴力の改善がみられました。未熟な脳幹が成熟した自然軽快も考えられますが聴覚の髄鞘化の完成が約1歳半であることから、音楽療法が脳の可塑性を引き出してい

ることを示しているのかも知れません。

今回は新生児聴覚スクリーニング後の精密検査と療育に関わるさまざまな問題について、スクリーニング、精密検査、療育（音楽療法を中心として）といった観点から具体的に詳述します。

小児難聴の歴史

小児難聴の歴史は、18世紀頃の手話法と、その後の口話法の登場、補聴器の開発、そして難聴の早期発見が大きなテーマでした。表1に示すように、18世紀末は手話法がほとんどで、日本では1898年にグラハム・ベルが来日し、口話法が紹介されました。

その後はいかに早期に小児難聴を発見するかが重要なテーマのひとつでした。1970年のABRの発明は画期的でしたが、値段が高く時間がかかり、操作も複雑なため、スクリーニングには不向きでした。1986年に自動ABRが発明され、新生児聴覚スクリーニングが可能になりました。これにより今後、手話法・口話法・人工内耳などのコミュニケーションツールの選択肢が広がることが期待されます。

表1：小児難聴の歴史

18世紀末	パリ聾啞学校 (手話教育)
1874 (明7)	京都聾啞院 (手話法)
1898 (明31)	グラハム・ベル来日 (口話法紹介)
1913 (大2)	名古屋聾啞学校で口話法
1921 (大10)	真空管による補聴器
1960 (昭35)	岡山で最初の難聴学級
1969 (昭44)	岡山で最初の通園施設
1970 (昭45)	ABR発明
1993 (平5)	小児で人工内耳 (日本)
1997 (平9)	自動ABR日本に導入
1999 (平11)	新生児聴覚スクリーニング

新生児聴覚スクリーニングの歴史

表2に新生児聴覚スクリーニングの歴史を示します。1960年 Froeding は、眼瞼反射に着目、1965年 Marion Downs は聴性反射で新生児聴覚スクリーニングを行いました。1970年 Jewett や Sohmer らによってABRが発明され、小児難聴の早期発見が客観的に可能となりました。1974年には Crib-O-Gram が開発され、1978年ケンブによりOAEが発見、1986年自動ABRが開発されています。

1997年自動ABRが日本にも導入され1999年厚生省により国家プロジェクトが開始されました。

表2：新生児聴覚スクリーニングの歴史

1960	Froeding による報告(眼瞼反射に注目)
1965	Marion Downs による主観的検査法(聴性反射)
1970	ABRの発明
1974	Crib-O-Gramの開発(聴性反射の自動判定)
1978	OAEの発明
1983	ABRによるUNHSプログラム(米)
1986	自動ABRの開発
1999	自動ABRによるUNHSプログラム(日)

感音性難聴の原因

以前は感音性難聴の原因は不明とされることが多かったのですが、現在ではある程度診断が可能となりました。原因は大きく3つに分類できます。

第一は周産期の異常で、低出生体重児、仮死、胎内感染などです(表3)。特にPPHN(Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn)、先天性サイトメガロウイルス感染症は当初ABRの検査結果が正常でも徐々に難聴が悪化することがあり、経過観察が重要となります。

第二は器質的異常です。表4に示すように、蝸牛神経管の狭小、前庭水管拡大、蝸牛の奇形などがあります。

第三は遺伝学的異常で、ミトコンドリア遺伝子異常、Co26欠損などが挙げられます。

これらの原因が、全体の約4割程度に認められています。

表3：感音性難聴の原因—周産期の異常 (NICU 1990~2000 n = 2,274) 埼玉県立小児医療センター

1	低出生体重児(特に1,500g以下)	49
2	重症呼吸障害	20
3	新生児仮死(Apgar score 3以下)	19
4	高ビリルビン血症(20mg/dL)	17
5	重症感染症、耳毒性薬剤	5
6	頭頸部奇形	3
7	サイトメガロ感染(妊娠中のウイルス感染)	2
8	染色体異常	1

表4：感音性難聴の原因—器質的異常(2000~2004 n = 229) 埼玉県立小児医療センター

器質的異常(CT)		
一側性		42例(68%)
両側性		20例(32%)
計		62例(27%)
内容		
蝸牛神経管狭小	26例	(42%)
内耳道狭窄	8例	(13%)
蝸牛回転異常	6例	(9.7%)
前庭水管拡大	6例	(9.7%)
内耳道欠損	1例	(1.6%)
蝸牛骨化	1例	(1.6%)
蝸牛全欠損	1例	(1.6%)
蝸牛septum異常	1例	(1.6%)
半規管異常	12例	(19%)

難聴の発現率

難聴の発現率は、軽度を含めると1,000人に2~3人です。療育が必要となる両側高度感音難聴は1,000人に約1人の割合で発生します。これは現在行われている新生児の代謝スクリーニングで発見される他の疾患全ての合計の約7倍の発生率です(図1)。

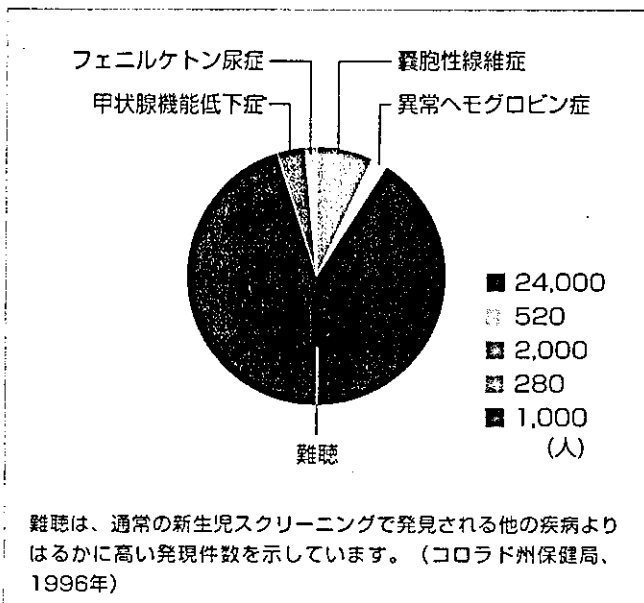


図1：新生児スクリーニングにおける異常の発現数(全米の年間出生率を元にした見直し)

獲得言語指数

図2は1998年に報告されたYoshinaga-Itanoのデータです。療育開始時期の違いによる、3歳時点での獲得言語指数を表しています。難聴が生後6ヵ月までに発見された場合とそれ以降の発見とでは、3歳時点での獲得言語指数に大きな差がみられます。この報告によれば、療育開始時期は生後6ヵ月までが有効ということになります。

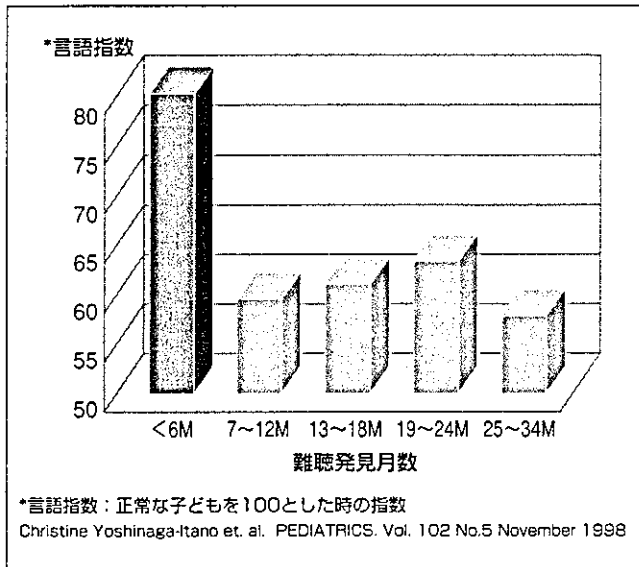


図2：療育開始時期による獲得言語指数

小児難聴の検査

難聴の検査は、新生児期に行うスクリーニング、10ヵ月・1歳6ヵ月・3歳時などの集団検診の際親を対象として行う質問紙、精密検査の3つに大きく分けられます(表5)。

表5：小児難聴の検査

検診(10ヵ月、1歳半、3歳時)	精密検査
<ul style="list-style-type: none"> ●質問紙 ●絵カード ●指こすり 	<ul style="list-style-type: none"> ●BOA ●COR (Conditioned Orientation Response Audiometry) ●Play Audio ●純音聴力
スクリーニング(新生児期)	
<ul style="list-style-type: none"> ●自動ABR ●OAE (TEOAE, DPOAE) 	<ul style="list-style-type: none"> ●ABR ●ASSR (Auditory Steady-State Evoked Response) ●OAE (DPOAE)

1. 質問紙法

質問紙法とは、集団検診の際、母親に子供の音に対する反応についての質問表を配り、当てはまる項目をチェックしてもらうものです。後に判定医が質問表の回答を見て精密検査を行うかどうか判断します。

2. スクリーニング検査(新生児期)

現在行われている新生児期のスクリーニング機器は、大きく分けて自動ABRとOAEの2種類です。OAEはDPOAEとTEOAEがよく使用されています。自動ABRとOAEはどちらも簡易ですが、OAEは後迷路性難聴の診断が不可能であること、またプローベの挿入の仕方や耳垢などによって要再検率が高くなるといった特徴があります。しかし値段が

安いことから使用されることが多く、検査にあたっては機器の特徴を熟知していることが望まれます。

図3に自動ABR装置を示します。これはポータブル型です。検査は生後2、3日の間に行われます。操作は非常に簡単で、カプラーを耳に取り付け、スイッチを押すだけでだれでも可能です。

図4に結果票を示します。結果は、パスまたは要再検とプリントされ出てきます。正常の場合、約1分で結果が出ることになります。

図5はDPOAEです。

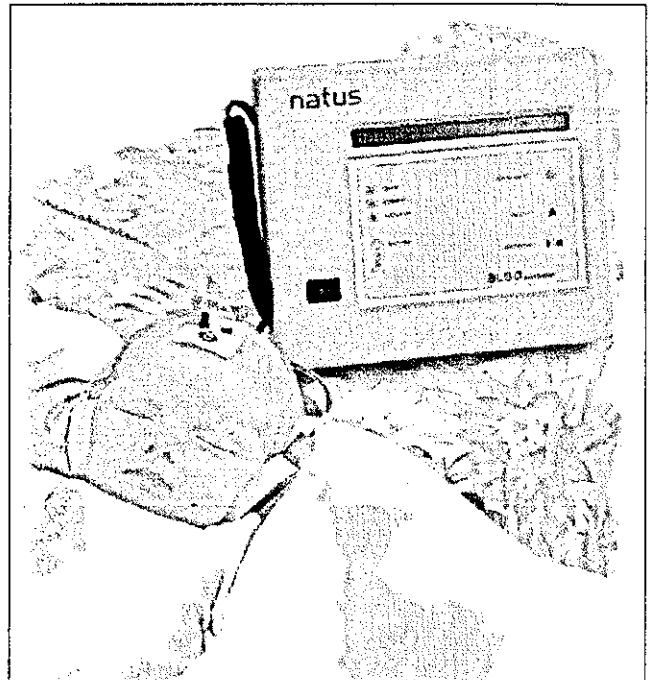


図3：自動ABR

natus ALGO3i 検査結果		natus ALGO3i 検査結果	
赤ちゃんID: 123	生年月日: 12月-13-2004	赤ちゃんID: 124	生年月日: 12月-13-2004
氏名:	性別:	氏名:	性別:
コメント:	検査機関ID:	コメント:	検査機関ID:
検査機関ID:	日付: 12月-13-2004	検査機関ID:	日付: 12月-13-2004
時刻: 10:41am	検査継続時間: 0:36	時刻: 10:43am	検査継続時間: 7:53
ユーザーID:	%筋電妨害: 0%	ユーザーID:	%筋電妨害: 0%
%周囲雑音: 1%		%周囲雑音: 0%	
右耳 35 dBnHL	パス	右耳 35 dBnHL	要再検
左耳 35 dBnHL	パス	左耳 35 dBnHL	要再検
赤ちゃんID: 123		赤ちゃんID: 124	
Natus Medical Inc.		Natus Medical Inc.	

図4：ABRのテスト結果



図5：DPOAE

3. 精密検査

産科でのスクリーニング検査の後、耳鼻科で確定診断が行われます。表6に確定診断の項目を示しました。顕微鏡下での耳内所見観察、ABR検査が行われます。難聴例では、画像検査としてCT、MRI等が行われます。

表6：確定診断の検査項目

<ul style="list-style-type: none"> ● 顕微鏡下で耳内所見チェック (耳垢、中耳炎) ● ABR (クリック、トーンバースト500Hz、ASSR) ● 骨導値測定 (骨導補聴器下で骨導ABR測定) ● OAE (DPOAE)
田中式質問表
BOA、COR

3-1 ABR (気導・骨導)

図6は気導ABRと骨導ABRです。気導ABRだけでは中耳炎・中耳奇形など伝音性の難聴か感音性難聴かの判別が困難であるため、骨導ABRも行っています。

3-2 ABR (クリック、トーンバースト)

図7は、クリック刺激のABRとトーンバースト500HzのABRです。クリック刺激だけでは4KHz周囲の高音部だけを現しているに過ぎないため、低音部の難聴を見逃すことがあり、トーンバースト500Hzも検査します。

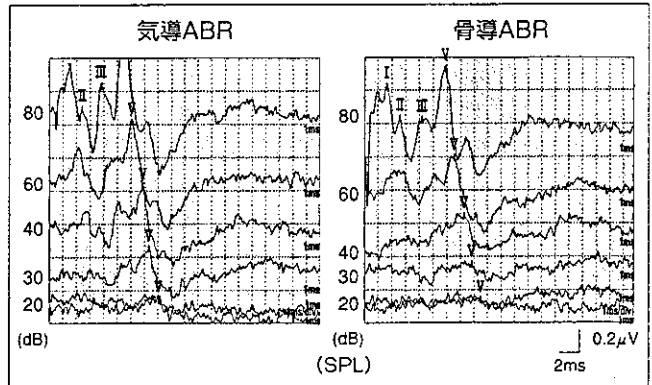


図6：気導・骨導ABR

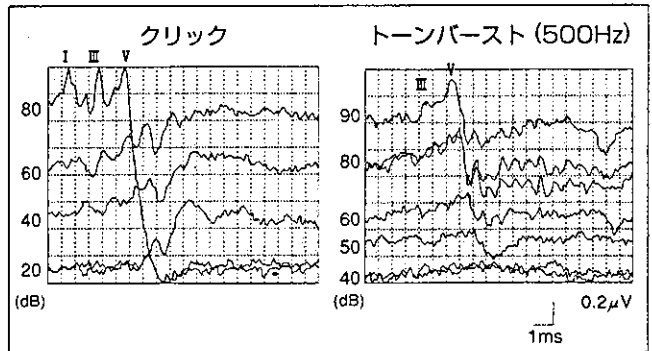


図7：クリック刺激・トーンバーストABR

3-3 各種聴覚検査の結果比較

図8はCOR、ABR、ASSR検査の結果です。ABRで反応がみられなくてもASSRでは120dBで反応がみられており、かつ周波数別の閾値もわかり、補聴器の装着人工内耳の適応などで効果を発揮します。

3-4 画像検査

3-4-1 症例1

図9に感音性難聴の器質的異常で最も多い蝸牛神経管狭小化例のCTスキャンを示します。右側は軸位 (axis) ・冠状断 (coronal) 共に正常側の左に比べ狭小化していることがわかります。

3-4-2 症例2

図10に画像検査であるCTを示します。写真左は拡張した前庭水管拡大症で、反復するめまい、難聴を呈しています。

3-4-3 正常例

図11は正常内耳と、内耳道の断面の3D-MRIです。蝸牛

神経、顔面神経、上下前庭神経がよくわかります。

運動発達は正常な運動発達に比べ遅れていましたが、5歳の時点でcatch upしています。

3-4-4 症例3

図12は難聴と平衡障害を主訴とする内耳奇形症例の運動発達の成長曲線と3D-MRI、Off vertical axis rotation 検査(回転検査)の結果です。前出の正常画像と比べると、三半規管が全欠損しており、内耳道で蝸牛神経管と前庭神経の低形成があることがわかります。この症例はCTで三半規管の全欠損がみられましたが、眼振(OVAR検査の丸印部分)もあり耳石の関与が考えられます。当初、定額、おすわりなどの

埼玉県におけるUNHS

埼玉県は人口700万人の県で、年間出生は約66,000人です。今回の対象は、1999年から2004年までの間に自動ABRまたはOAEによって検査を受けた新生児46,141例です(表7)。要再検となったのは312例(0.67%)、30dB以上の難聴例は137例(0.29%)でした。

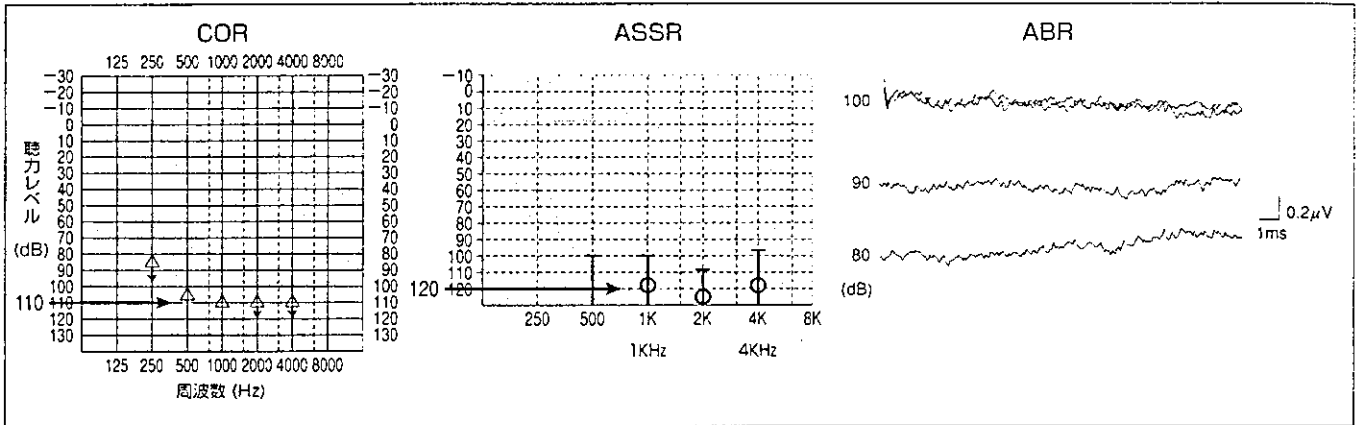


図8: 各種聴覚検査の結果比較 (COR、ASSR、ABR)

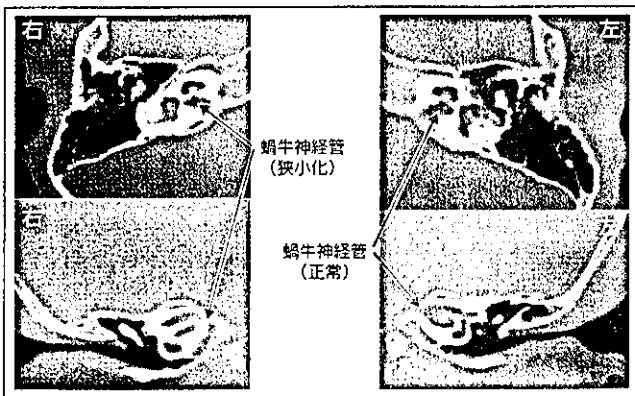


図9: 蝸牛神経管狭小化例 (聴力 [ABR]: 右: 無反応; 左: 20dB)

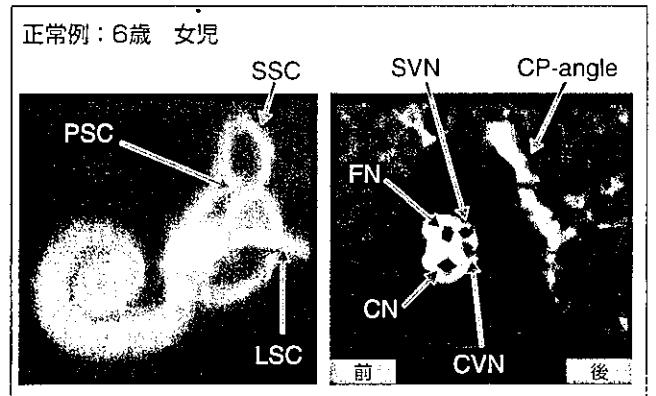


図11: 正常な内耳と内耳道断面 (3D-MRI)

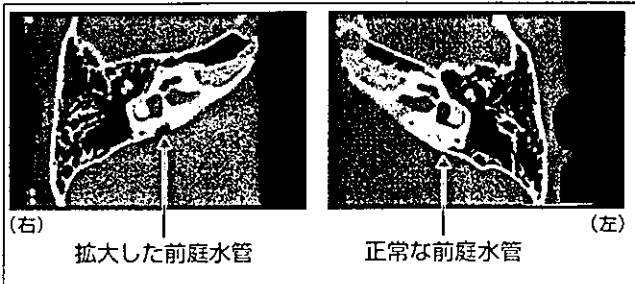


図10: 前庭水管拡大症例 (主訴: 難聴、めまい)

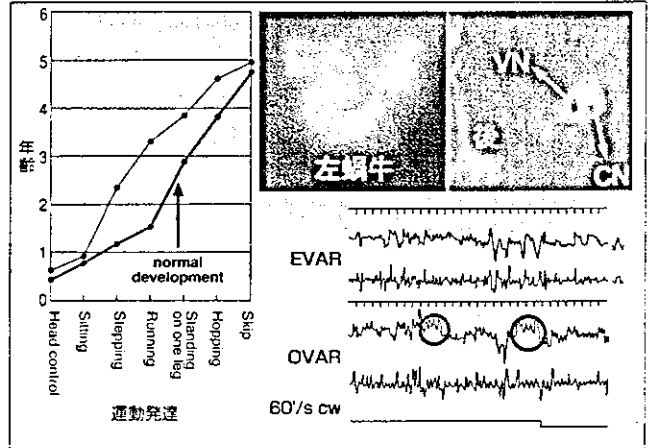


図12: 運動発達の経過

表7：対象症例（1999年8月～2004年10月）

自動ABR、OAEを受けた新生児：46,141例	
要再検となり当科受診	：312例（0.67%）
難聴例	：137例（0.29%）
療育対象例	：49例（0.10%）
要再検312例の内訳	
性別	：男児166例、女児146例
平均受診月齢	：生後19日（生後5日～7ヵ月）

聴覚スクリーニングと精密検査の結果

聴覚スクリーニングと精密検査の結果を図13に示します。312例が要再検査となり、うち178例は精密検査の結果正常で偽陽性でした。85例は一側難聴か、両側50dB未満の軽度難聴であり、経過観察としました。両側50dB以上の感音性難聴は49例で、これらが療育対象となりました。

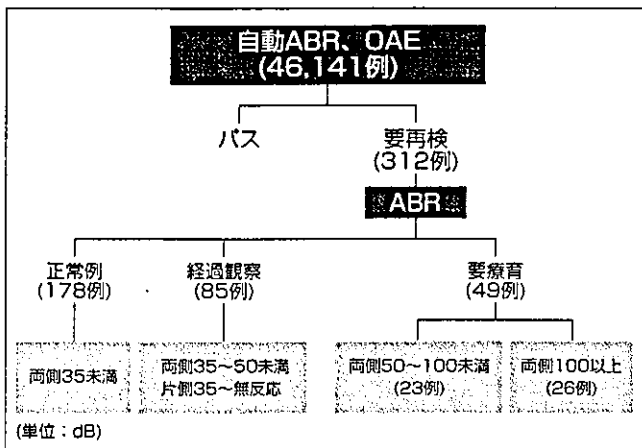


図13：聴覚スクリーニングと精密検査の結果

難聴児特別外来

表8に当院での難聴児を対象とした特別外来のスタッフを示しました。耳鼻科医による、診断・治療、小児神経科医による発達評価、言語聴覚士による補聴器装着、言語指導、音楽療法士による音楽療法、社会福祉士による医療保障の説明、看護師による育児支援などが主なものです。月1～2回の特別外来を約1年間行っています。

表8：特別外来のスタッフ構成

耳鼻科医	：検査、診断、治療
小児科医	：発達評価
言語聴覚士	：聴覚学習、補聴器管理
音楽療法士	：音楽療法
社会福祉士	：医療費、社会補償の説明
看護師	：育児相談（24時間対応）
地域保健師	：同伴訪問、育児相談
先輩	：体験談、集団討論

新生児聴覚スクリーニングとその後の流れ

図14に新生児聴覚スクリーニングとその後の流れを示しました。産科でスクリーニングを行い、退院後耳鼻科でその日のうちに精密検査をします。その結果、偽陽性・経過観察・療育症例に分かれます。療育の内容は、両親へのホームトレーニングの指導、補聴器フィッティング、骨導補聴器を使用した音楽療法です。精神的ケア、育児相談は看護師が行います。地域保健師にも連絡し家庭訪問を行います。行政官は、スクリーニングの円滑な流れを監視します。

日本では、乳幼児を対象とする検診システムが生後1ヵ月、

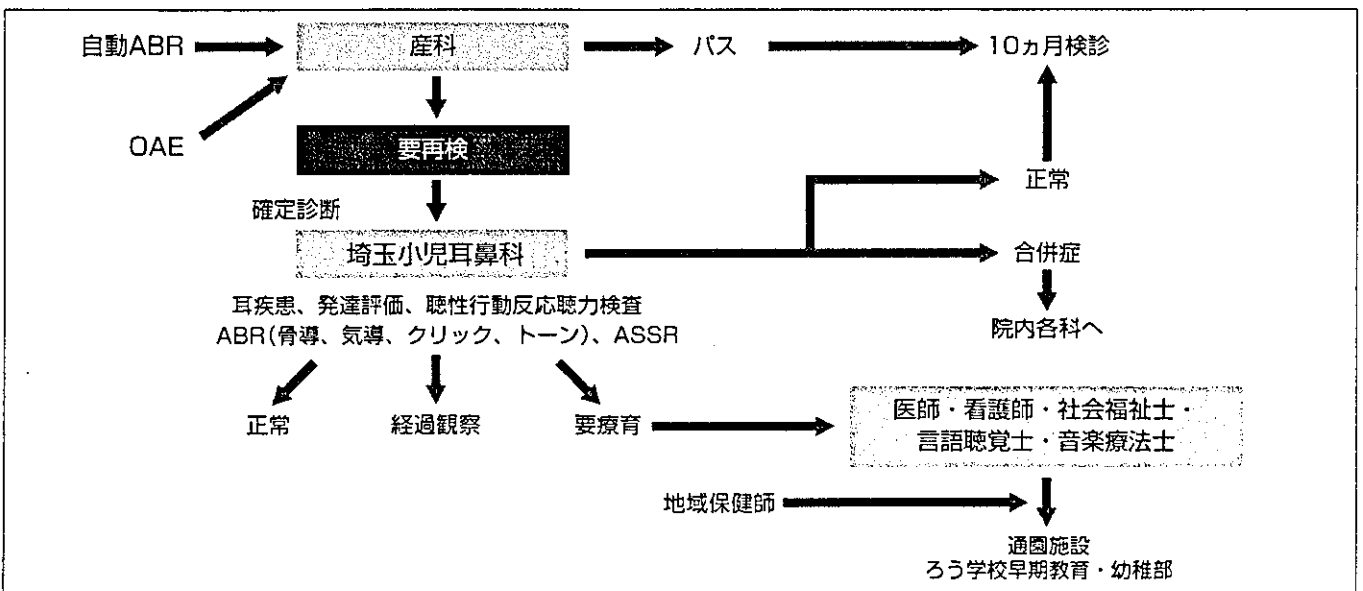


図14：新生児聴覚スクリーニングとその後の流れ

10ヵ月、1歳半、3歳時点などに存在しています。産科での検査で合格した乳児の中には、非常にまれですが偽陰性が含まれることがあります。言語の臨界期は生後1歳までと考えられており、難聴の発見が1歳半検診の時点では遅いため、新生児聴覚スクリーニングにパスした人にも10ヵ月検診の際に、再度質問紙法でスクリーニングを行っています。

療育

新生児聴覚スクリーニングで最も重要なことは、難聴発見後の療育です。療育の整備がされていなければ、スクリーニングを行っても全く意味がありません。

療育の基本は“健全な母子関係の構築”です。親の“情緒の安定”が最も重要で、母親の子供への関わりが全てといっても過言ではありません。

私たちはUNHS後の難聴児に対し、療育プログラムとして月1~2回の特別外来を行っています。大きく3つのポイントがあります。

第一は親の教育です。これは各1時間の講義の12回コースとなっており、内容は「難聴について」「ことばについて」「音楽療法とは」「育児の仕方」「補聴器のこと」などです。

第二は音楽療法です。これは五感を使い脳を刺激するプログラムで、骨導補聴器を使用して全身を刺激します。自宅では15分間の音楽療法のビデオを見ながら訓練を行います。また親の普段の声を（通常の話し方で）録音し、これを加工したものを難聴児に骨導補聴器下で聞かせています。これにより胎内に近い環境が再現され、脳が刺激されます。この療法については、現在質問紙法、音楽療法中のビデオ分析、唾液によるストレス評価等を通して評価を行っています。

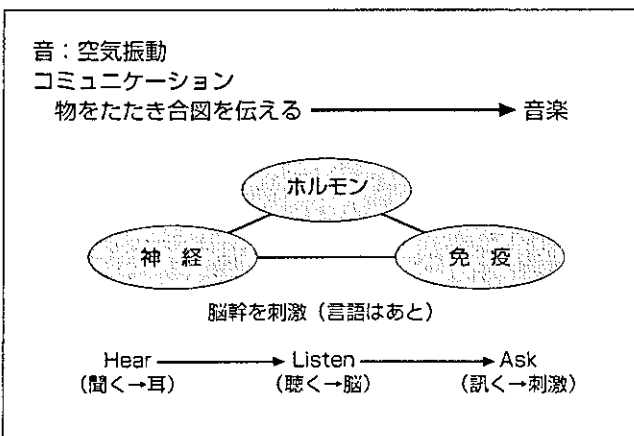


図15：音楽と聴こえ

第三は補聴器の装用です。私たちは難聴児が発見されてから最初に聴く音が気導であるということに対し疑問を抱き、まず生後2ヵ月より骨導補聴器の使用を開始しています。そしてABR、COR、ASSRなどを用いて聴覚を判定し、生後4~5ヵ月より気導補聴器をフィッティングしています。ま

た外来で、聴覚管理、診察、発達評価、育児支援なども行っています。中でも親への精神的サポートは重要です。

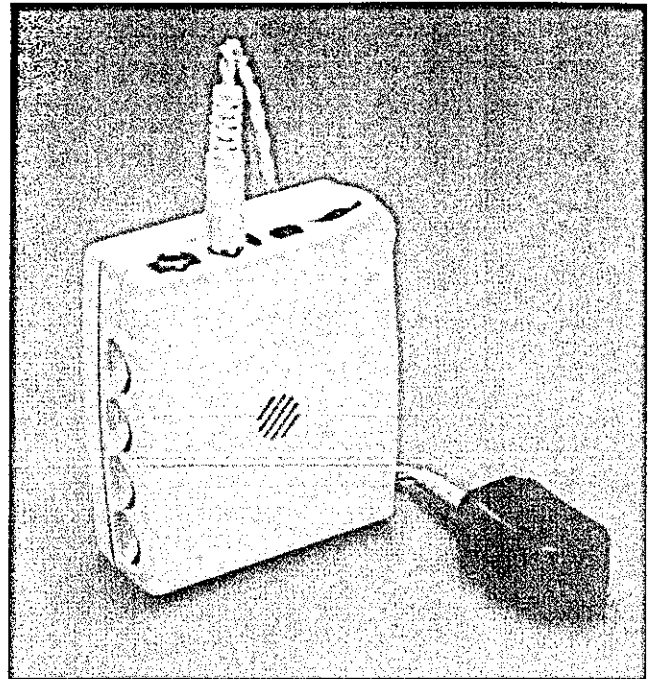


図16：骨導補聴器

音楽療法

音楽療法が戦後アメリカで広まった大きなきっかけは、1950年に退役軍人の精神的・身体的ケアから始まりました。日本ではその約10年後、1960年代に心理学の分野でいくつかの音楽療法の手法が使われるようになりました。1970年代には、赤星式音楽療法および(財)東京ミュージック・ボランティア協会の創始者である赤星建彦が、日本の音楽を用いた高齢者のための音楽療法を開始し、さらに2000年には日本では初めての試みとして、乳幼児期の聴覚障害を対象とした音楽療法が行われました。

音楽療法は子供から老人まで幅広い年齢層を対象としており、精神的ケア・発育および学習障害・アルツハイマー病・加齢に起因する様々な病気・薬物乱用・脳損傷・身体障害・急性/慢性疼痛・妊婦のケアに対して効果があります (AMTA: American Music Therapy Association)。

音楽療法は年々認知度が増してきており、高齢者・障害児・障害児を持つ家族に対する心理学的、生理学的ケアの一手段となってきています。

1. 療育音楽の基本的概念

赤星式音楽療法(療育音楽)(Ryouiku Ongaku Akaboshi Method: ROAM)の基本は、能動的音楽療法を媒体として心身機能の低下を防ぐことにあります。すなわち、歌唱、楽器の演奏および集団で音楽を楽しむことが基本的な療育方法となります。目的は音楽を極めることではなく、音楽

を通して他との関わりを楽しむことが優先されます。

これにより音楽と接することにより、心身機能を最大限の機能レベルに保ちつつ、家族や友人との身体的、精神的、社会的、文化的交流を行うことが可能となるということです。

療育音楽療法の基礎となる重要な指針：

1. 繊細な手や指の動きは脳を細胞レベルで刺激する。
2. 歌を歌う時の自然な呼吸による音量および音質の調整は、呼吸器官を強化し、体全体に与えるプラス効果がある。
3. リズムに反応することは人間に元来備わった性質であり、これを行うことにより健康で正常な状態を保つことができる。

これらの基本的指針は従来の音楽療法のそれと一致するものですが、従来の音楽療法が個を中心とした評価・観察を行うのに対し、ROAMは確立されたカリキュラムを参加者全員に実行し、音楽療法士のみならず、横のつながりを深めながら療育につなげていきます。

2. 音楽療法の位置付け

高齢者に対する音楽療法の効果は、身体的、生理学的効果があることが実証されていましたが、早期に聴覚障害が発覚した乳幼児に対して音楽療法を行うことは新しい試みです。

これまでの研究により、高齢者難聴においては、音楽および振動は人間の脳に対して刺激となることが実証されていることから、新生児難聴において、音の振動を体を感じさせ、音を認知させることは、脳の可塑性を引き出し乳幼児期の成長に役立てられると考えています。

音楽療法の目的は以下の3点です。

- ・聴覚のリハビリテーション
- ・乳幼児およびその家族の心身的ケア
- ・コミュニケーションツール

療育音楽の実践：

月1～2回音楽療法を45分間行い、音楽を使って乳幼児の五感を刺激しました。また、低音（ドラム）を使い、乳幼児の体を通して脳に刺激を与えています（振動伝達）。

療法が行われている間は乳幼児の両親に快適な環境を提供することを心がけ、グループセッションに参加することでお互いにコミュニケーションを取りやすく促しています。

被験者は37名の乳幼児とその家族を対象としました。

被験者37名の乳幼児は全て初診が0歳児であり、ABR値は両側50dBの感音性難聴から反応なしまでです。

以下の4つのパラメータを療育音楽の評価対象としています。

1. 音楽療法ビデオテープ評価スケール
2. ABR

3. 親へのアンケート

4. クロモグラニンA唾液検査

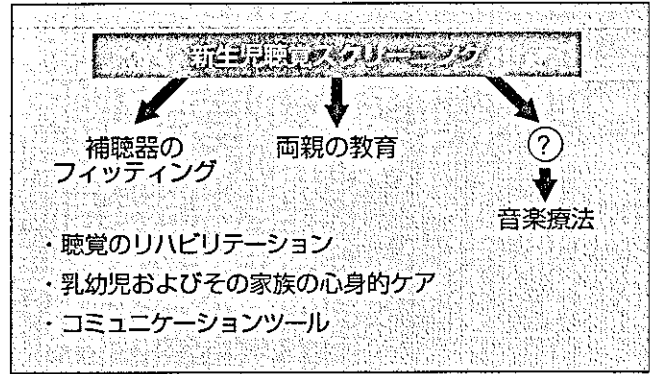


図17：音楽療法の位置付け

3. 結果

3-1 ビデオテープ評価スケール

全てのセッションをビデオテープに撮影し、セッション終了後に評価を行っています。乳幼児とその家族または音楽療法士とのコミュニケーションについて、45分間を15秒毎に観察し統計をとったところ、療法を行う前はわずか15%のコミュニケーションしか確認できませんでした（図18）。また、多数の乳幼児が泣くか眠っている状態でしたが、表に示すように音楽療法の回数を重ねるとともにコミュニケーションを取っている率が増加しました。

この事実から、ドラムからの振動と音楽を伴うアプローチが何らかの影響を乳幼児に与えたと考えられます。

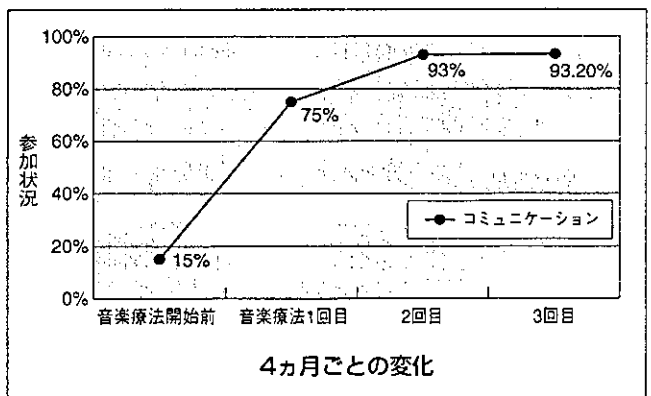


図18：ビデオテープ分析における親と子供のコミュニケーションの変化

3-2 アンケート調査

音楽療法士および乳幼児の親に音楽療法実施時の子供の反応について1～5段階（1=全くみられない～5=常にみられる）においてアンケート調査を行いました。（図19）。音楽療法を行う以前は全てのカテゴリーで反応が認められなかったが、音楽を使用すると、その刺激が乳幼児の表情に影響を与えたことが確認できました。

*注意点として、徐々に多くなる反応が発育によるものか否かを判断する必要があります。

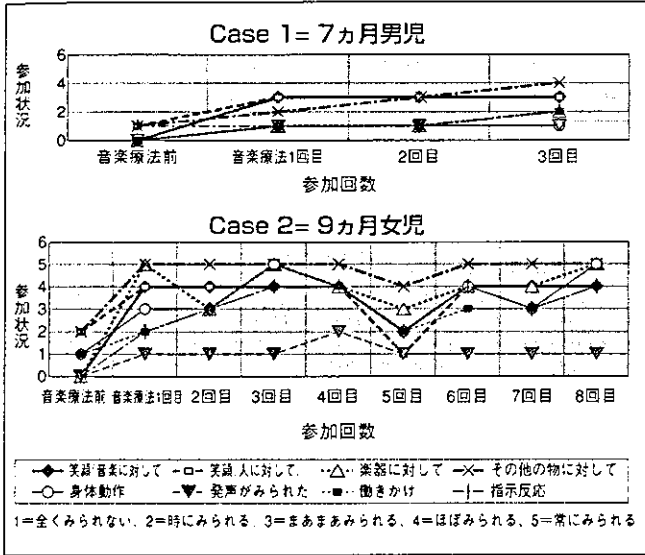


図19: アンケート調査

3-3 唾液検査

図20のクロモグラニンA（副腎髄質から分泌されるホルモン）検査によると、音楽療法はストレスに効果があり、ストレスを軽減する効果がみられました。クロモグラニンAは音楽療法の前後に脱脂綿を乳幼児の口に含ませて採取しました。

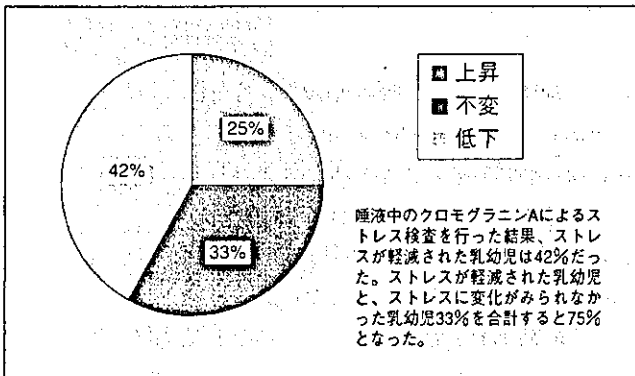


図20: 唾液中クロモグラニンA ストレス検査 (N=24)

4. 結論

今回の研究による結論は以下の通りです。

- ・日本で医療チームと音楽療法士が共同研究を行ったことは画期的であった。さらに乳児期だけでなく幼児期・児童期・青年期と子供の成長過程において、言語習得、学習能力、人格形成など、長期のフォローアップは不可欠であることから、子供の発達に対し音楽療法の観点よりこの研究を続ける必要がある。
- ・音楽療法はストレスを軽減する良い効果がある。
- ・PET検査によると音楽はアルツハイマー患者の前頭皮質に良い刺激を与えることから、これを乳児・幼児の療育法にも応用することができる。

今回の研究から、音楽療法は乳幼児の聴覚の発達に効果があり、乳幼児とその家族に心身的にも良い影響を与えることがわかりました。もうひとつの効果として、音楽を通して親が子供とコミュニケーションを取り易くなれると知ったことも特筆すべき点です。

今回の音楽療法は、新生児聴覚スクリーニングの発展に伴い、聴覚障害児の療育方法のひとつとして耳鼻咽喉科の医師と音楽療法士との共同研究により行われましたが、さらなる音楽療法における療育方法の確立のために、これからも継続した研究が不可欠であると考えられます。

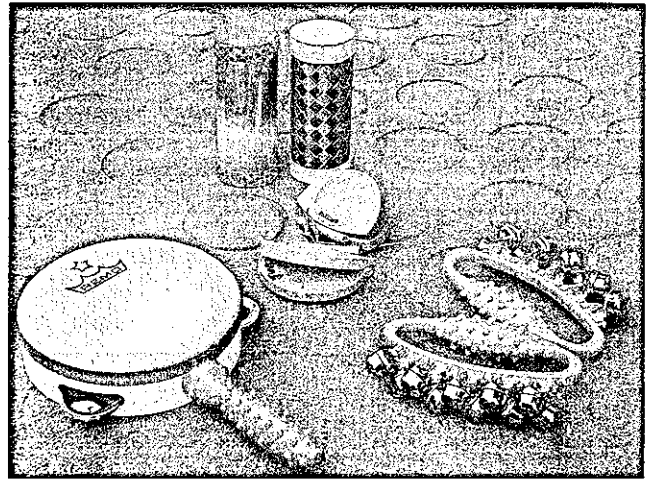


図21: 音楽療法で使用した楽器



図22: 音楽療法中の様子

聴力推移

表9は初診時と、1年後聴力がほぼ確定した時点での聴力推移です。50dBから100dB群と無反応群に分けて検討を行ったところ、聴力閾値の改善がみられたのは13例（35.1%）、不変は21例（56.7%）、悪化は3例（8.1%）でした。ここで特記すべきことは、無反応群で5例に反応が出てきたことです。これは、生後2ヵ月という超早期から療育を行ったことにより、脳の可塑性を引き出した結果であると推測しています。

表9：初診時と1年後の聴力推移 (n=37)

		50～100dB	100dB 無反応
改善 (35.1%)	30dB 以上	4	2
	30dB 以下	4	3
変化なし (56.7%)		6	15
悪化 (8.1%)		3	

1. 脳幹の未熟性の改善例

下部脳幹から上部脳幹にかけての髄鞘化がほぼ完成するのはおよそ1歳半頃です。下部脳幹は出生時すでに髄鞘化が完成しており、ABRの1波、II波の潜時変化は少なくなります。しかし、上部脳幹すなわち上オリブ核より上位の下丘、内側膝状体は、出生時には髄鞘化しておらず、発達と共に潜時が短縮し、1歳半で髄鞘化が完成し安定します (図23)。

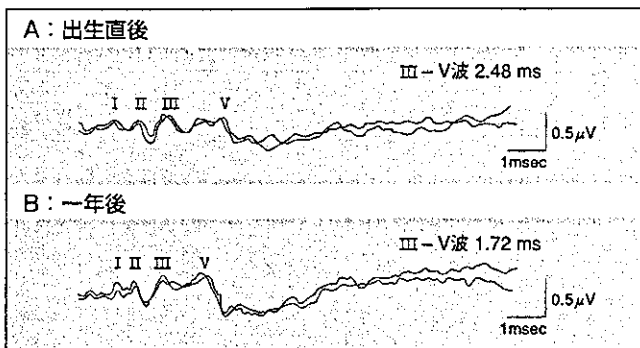


図23：脳幹の未熟性の改善例

2. 聴力が改善した例

聴力の確定診断は1歳から1歳半で行います。図24のように生後1ヵ月で50dB、1年半で20dBと正常化する例も少なくありません。

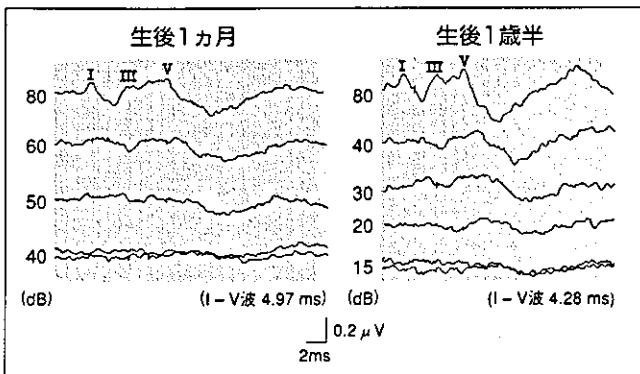


図24：ABR値の変化

3. 聴力が悪化した例 (PPHN)

最初の検査でABR閾値が正常でも、リスクファクターや重篤な合併症を伴う場合は経過観察が重要となります。

また、新生児期のABRが正常でも、発達と共に異常を示すこともあります。Cockayne症候群やミトコンドリア脳筋症、染色体異常の一部の疾患、PPHNなどは進行性難聴を示すことがあります (図25)、注意を要します。一部のサイトメガロウイルス感染症や前庭水管拡大症なども、当初のABRが正常でも徐々に聴力低下が進行する症例もあるため注意が必要です。

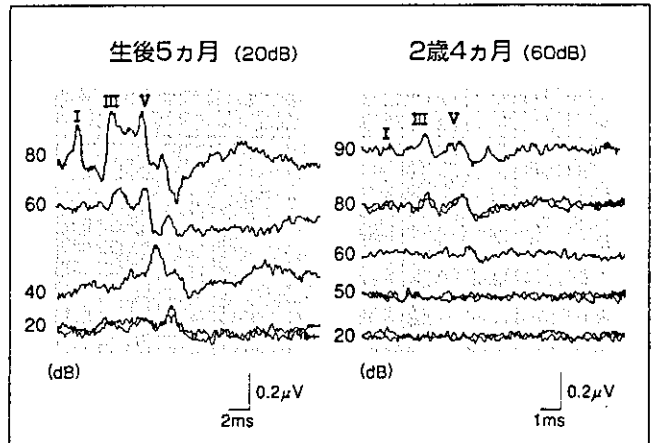


図25：PPHNのため後に聴力低下をきたした症例

4. 後迷路性難聴例 (Pelizaeus-Merzbacher病)

図26にPelizaeus-Merzbacher病の症例を示します。DPOAEは両側パス、CORは80dB前後の閾値でした。ABRはI波のみ20dBでみられました。したがって症例は後迷路性難聴が疑われその後、小児神経科医によりPelizaeus-Merzbacher病と診断されました。

この症例は新生児聴覚スクリーニングをOAEで行っており、両側パスであったために放置されていたが、2歳になってもことばが出なかったため耳鼻科受診となりました。

5. 骨導ABRが有効であった例

図27の症例は1歳時のCORで難聴を指摘され、耳内所見がなかったことから感音性難聴と診断されていました。3歳時に筆者の施設に来院し、気導ABR、骨導ABR、純音聴力検査を行った結果、純音聴力検査では気導値が50dB、骨導値が15dB程度でした。気導ABRはおおよそ65dB、骨導ABRは図では30dBですが、これはSPLであり、HLは25dBです。

この症例はCT検査の結果中耳奇形が判明し、後の手術により補聴器が不要となりました。確定診断に骨導ABRを用いていれば、新生児期にある程度伝音性難聴か感音性難聴かの鑑別が可能となります。