

聴であり現在軽度難聴の症例で言語性、非言語性意味理解の障害を認めた。本症例の言語発達および神経心理学的所見について検討を加えたので報告する。

症 例

現在通常小学校3年に在籍している右利きの男児である。教科教育は難聴学級にてフォローを受けている。

神経学的所見：異常所見を認めなかった。

頭部MRI所見：異常所見を認めなかった。

現病歴および経過：両側進行性難聴。近親者難聴のため聴力検査を中心としたフォローアップを新生児から受ける。5歳頃から聴力低下を認め7歳児より補聴器装用にいたる。就学前診断時では発達段階ではボーダー域との所見を得ている。小学校就学時1年次の教育相談にて小児神経科受診を進められAsperger症候群の診断を受ける。脳波異常は認められなかった。診断以降、保護者から具体的な対策を含めて言語訓練を希望し言語聴覚外来継続フォローとなる。聴覚心理学的検査：標準純音聴力検査結果を図1に示す。57式語音弁別検査では母音100%、子音で88%の聴取(A条件)が可能であった。GJB2変異(-)である。

家族歴：姉、母親高度感音性難聴(人工内耳装用)を認める。

方 法

症例の認知神経心理学的特性を把握すること、言語機能評価をを目的として、WISC-III知能検査、レイベン色彩マトリックス検査(以下RCPMとする)、イリノイ式言語学習能力検査(以下ITPA)、Kaufman Assessment Battery for Children(以下K-ABCとする)、音韻認識処理課題、Reys Auditory Verbal Learning Test(以下AVLTとする)、Reys複雑図形検査(以下RCFTとする)、標準失語症検査(以下SLTAとする)、絵画語彙検査(以下PVTとする)、抽象語理解力検査(以下SCTAWとする)を実施した。

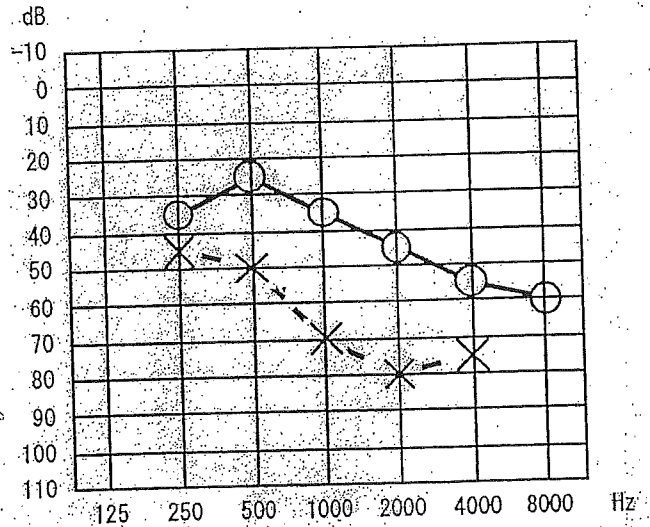


図1 標準純音聴力検査結果

結 果

WISC-III知能検査結果：FIQ: 65 (VIQ: 71, PIQ: 65, CA7: 2時点)であった。下位プロフィールでは特に類似課題でSS1, 単語でSS4であり、意味理解と言語的表現を要する項目での得点がひくかった。

小児の簡便な非言語性知能検査である、レイベン色彩マトリックス検査は28/36であり²⁾、本先行研究によれば3年生の値 30.4 ± 4.8 であり、本症例の値は ± 1 SD範囲と明らかな異常値は認められなかった。

ITPA検査結果：9歳時に実施した詳細結果を図2に示す。実施時生活年齢に比し言語学習年齢は6歳0カ月と低値であった。全体的に非言語性に比し言語性課題の得点が明らかに有意とはいえないが低い傾向が認められた。特に言語表出能力を反映するとされている「ことばの表現」が最も低く、非言語性の表出能力を反映している「動作の表現」に比し得点の低下は顕著であった。言語的な意味理解を反映するとされる「ことばの類推」が非言語的な意味理解を反映する「絵の類推」に比し得点低下が顕著であった。

K-ABC結果：各尺度の標準得点は認知処理尺度 77 ± 8 (継時処理尺度： 82 ± 11 , 同時処理尺度： 76 ± 9)、習得度尺度 74 ± 6 であった。各尺

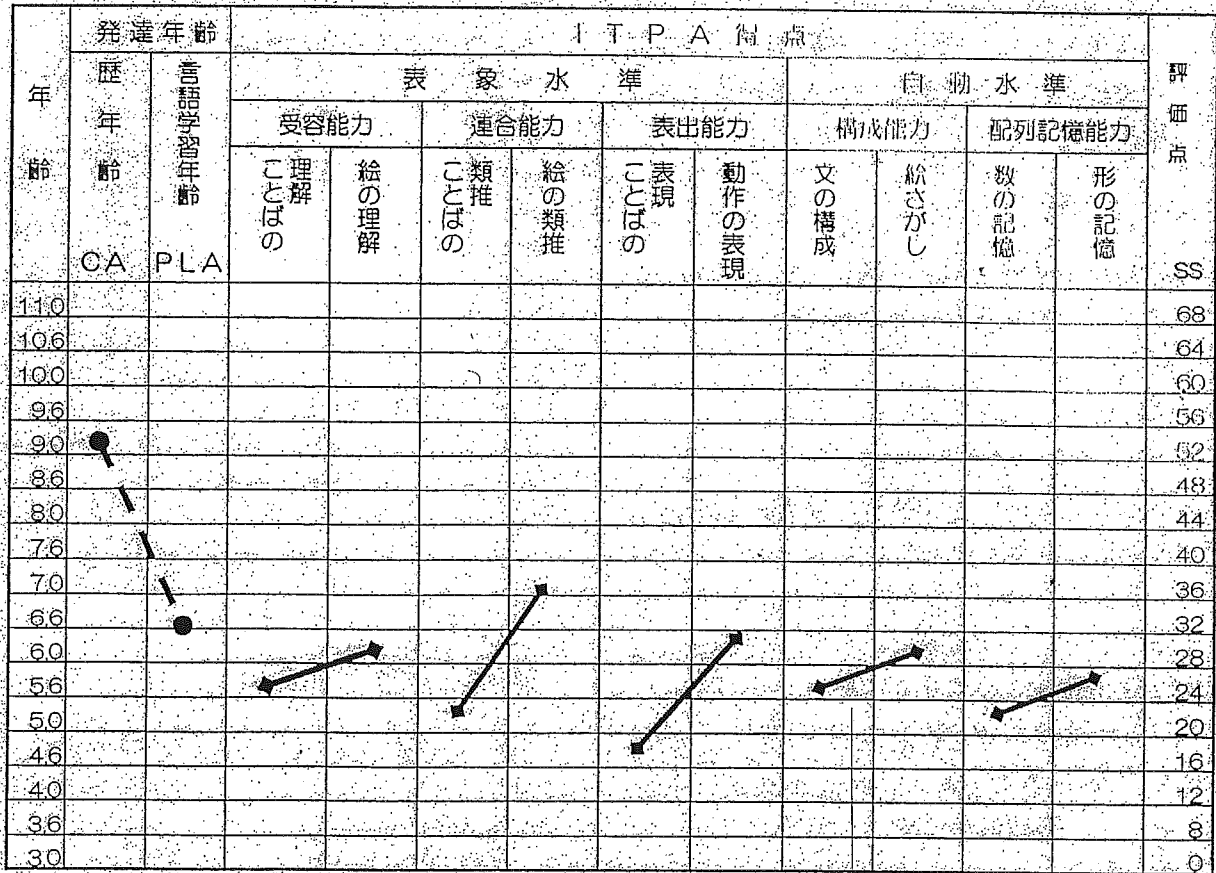


図2 ITPA プロフィール

度の中に有意な差は認められなかった。下位項目では習得度尺度の文の理解は比較適良好であった。

音韻認識処理課題：3モーラ、4モーラの親密度の高い名詞の逆唱課題と音韻分解抽出課題から構成されている³⁾。3モーラ課題4モーラ課題とも全問正答であった。反応開始に5 sec以上かかった設問は認められなかった。

Reys AVLT 検査：音声言語の長期記憶を反映するといわれている。最大再生数は10、遅延再生数6であった。

Reys 複雑図形検査：視覚認知能力を必要とする模写課題で9/36視覚運動系の学習効果を反映する遅延再生で3/36と低値を示した。

SLTA 検査結果：詳細を図3に示す。-1SD以下の明らかな低値を示したものは「語列挙」「漢字単語の理解」「文の復唱」であった。「漢字単語の書き取り」「漢字単語の書字」は本児のような年齢の場合標準誤差が大きいことが報

告されており^{4,5)}、明らかな所見とはいえなかった。

PVT 検査結果：生活年齢9歳0カ月時点での語彙年齢は6歳0カ月相当であった。相当であった。

SCTAW 検査結果：本検査は宇野らによって標準化され、軽度の言語性意味理解障害の検出が可能である。本児の正答数は16/32であり、当該年齢の-1SD近辺であった。誤反応傾向を図4に示した。本児の傾向として無反応が多く、PVTなどの他の語彙検査や知能検査でも言語化を避ける同様の傾向を認めた

考 察

本児は言語的類推と言語表現を要する項目の得点の低さが顕著であった。まず、言語性意味理解の障害があげられ、非言語性意味理解も代償するには十分では無いと考えられた。さらには言語表現を要する項目の得点低下は、K-

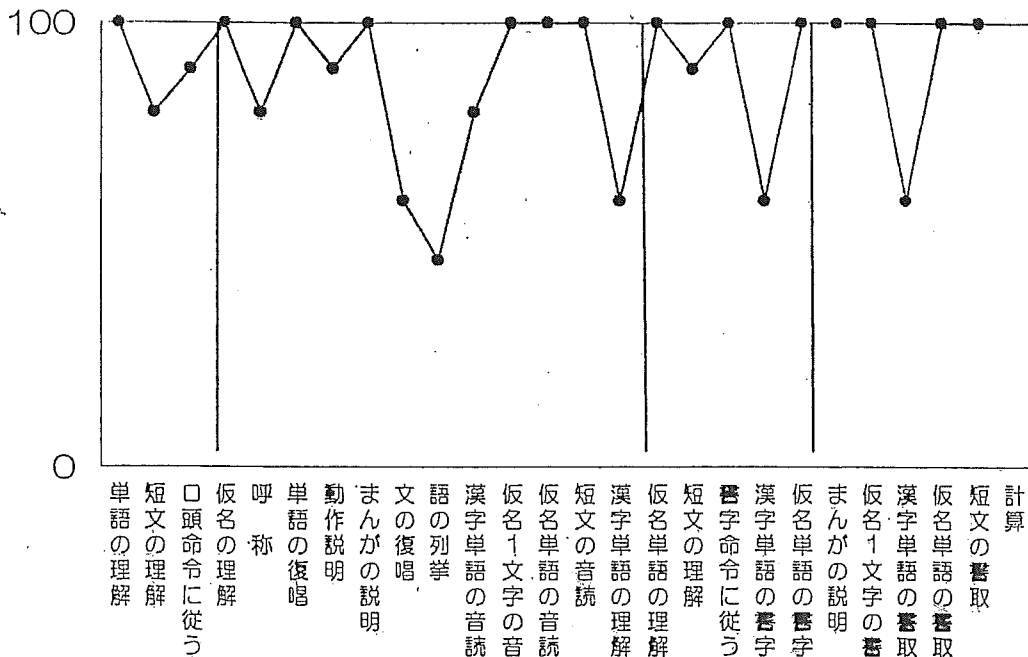


図3 SLTAプロフィール

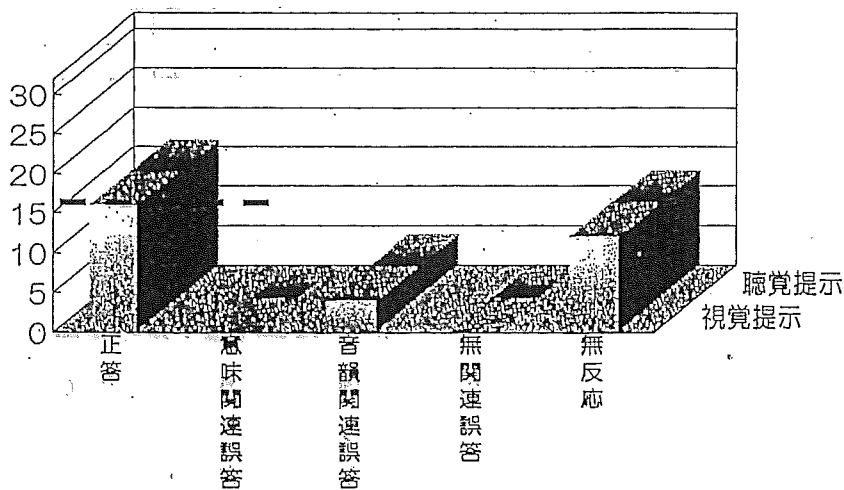


図4 抽象語理解力検査 (SC-TAW) 結果

ABCでの修得度尺度「文の理解」が良好であることから、状況に合わせた語用面の困難さのみの問題であると推測された。さらに誤り反応で無反応が顕著に多く認められたことから推測される。

意味理解障害を引き起こす要因としては、障害ベースで検討した場合、音韻処理障害を認めていないため特異的言語障害の受容性障害⁶⁾が相当する。また、自閉症スペクトラムに相当する児では語用の困難さや、言語性、非言語性両面の意味理解の障害を示し、特に非言語性意味

理解の障害を示すといわれている。また聴覚障害児の言語発達の先行研究においてもSLIに類する「意味理解の狭さ」を示すことが報告されている⁷⁾。しかしながら、結果として様相は近似しながらも聴覚障害の二次的要因としての意味理解の狭小さと、自閉症スペクトラムのイマジネーションの障害に起因し、非言語性に強く反映される意味理解の問題は対処や訓練方法は大きく異なる。本児は小児神経科専門外来にAsperger症候群の診断を受けている。学校教育場面においても友人関係とのディスコミュニ

ケーションが頻出し問題となっている。こういった、対人関係面での課題は意味理解の傷害による表現語彙の少なさの要因と語用面の困難さにより状況を人に上手に伝達できないこと非言語性意味理解の弱さによる状況認識の困難さによると考えられた。

本児は言語性意味理解の成績は良好とは言えず、さらに言語的類推は困難であり、本児の特性と言語発達上の課題を複雑にしたと考えられる。本児の場合、スペクトラム要因とも関連したコミュニケーションの質的障害の一部分である語用面の問題と言語性意味理解障害を合併した状況と考えられる。

本児の経過は既存の検査である WISC-III 知能検査において言語性知能の低下を示していたが、言語習得度である言語性知能が下がった原因の究明には役に立たなかった。しかも自閉症スペクトラムの診断が大きく遅れていた。本児は就学時点で統語方略助詞が未達成であり、川崎ら⁸⁾の言語学習上の問題を抱える児と同様の経過を示しており、就学前での精査の可能性が示唆された。さらに本児と同様の神経心理学的所見を示す児の場合、例えば言語性意味理解と中側頭回の関与が報告されるなど局所脳血流量による機能画像の所見の検討が今後必要である⁹⁾。

現在本児は、意味理解をターゲットとし、今回比較的良好であった特に定型的な言語的知識を手がかりとした機能的再編成による訓練を行っている。詳細は記載できないが、訓練効果の客観的検証を改めて報告したい。

ま と め

就学前に一定の習得度を達成していない児は、その背景に認知神経心理学的異常所見の存在が考えられる。あらかじめ就学前に神経心理

学的評価に基づいて言語学習能力を精査を必要に応じて介入や特別支援教育との連携を行うことが必要である。本児は、従来、既存の発達検査知能検査の結果から、『ボーダーから軽度発達障害児』として判断されるにとどまっていた。しかし、神経心理学的な評価を行うことによりそれぞれの児の障害特性を検出しそれに応じた介入の方針を立てることが可能であった

文 献

- 1) 山本恵美, 川崎聡大, 福島邦博: 発達障害を伴う言語習得期前難聴児における人工内耳装用後の経過. 小児耳鼻咽喉科 25: 51-55, 2004
- 2) 宇野 彰, 新家尚子, 春原則子: 健常児におけるレーヴン色彩マトリックス検査 学習障害児や小児失語症児のスクリーニングのために, 音声言語医学 46: 185-189, 2005
- 3) 大石敬子, 斎藤佐和子: 言語発達障害における音韻の問題—読み書き障害の場合. 音声言語医学 40: 378-387, 1999
- 4) 宇野 彰, 金子直人, 春原則子: スクリーニング検査を用いた学習障害児の出現率—I市における高率小学校2校での検査結果—, 脳と発達 34: 157, 2002
- 5) 宇野 彰, 豊島義哉: 注意欠陥/多動性障害の診断・治療ガイドライン研究 標準失語症検査 (SLTA) の小児への適用 小児用言語機能検査としての使用の試み, 厚生省精神・神経疾患研究委託費による11年度研究報告集: 422, 2000
- 6) 伊達健司, 宇野 彰: 特異的言語障害児1症例における認知神経心理学的障害構造, 小児の精神と神経 45: 71-76, 2005
- 7) 福島邦博: 人工内耳装用児の長期的な言語発達. JOHNS 21: 601-603, 2005
- 8) 川崎聡大, 福島邦博, 福本裕子他: 認知能力の個人内差が人工内耳装用後の言語発達に及ぼした影響, 小児耳鼻咽喉科 25: 46-50, 2004
- 9) 宇野 彰: 発達性読み書き障害, 特異的言語障害, 注意欠陥多動性障害, 高機能自閉症, アスペルガー症候群の局所脳血流量低下部位の検討. LD 研究 14: 34-41, 2005

別冊請求先:

〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科学 福島邦博

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

Yukihide Maeda,^{1,2} Kunihiro Fukushima,^{2,CA} Masashi Kakiuchi,² Yoriyoshi 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 subservise 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 otoancorin 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^{-8} M), selenium (3×10^{-8} 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 ($p<0.01$).

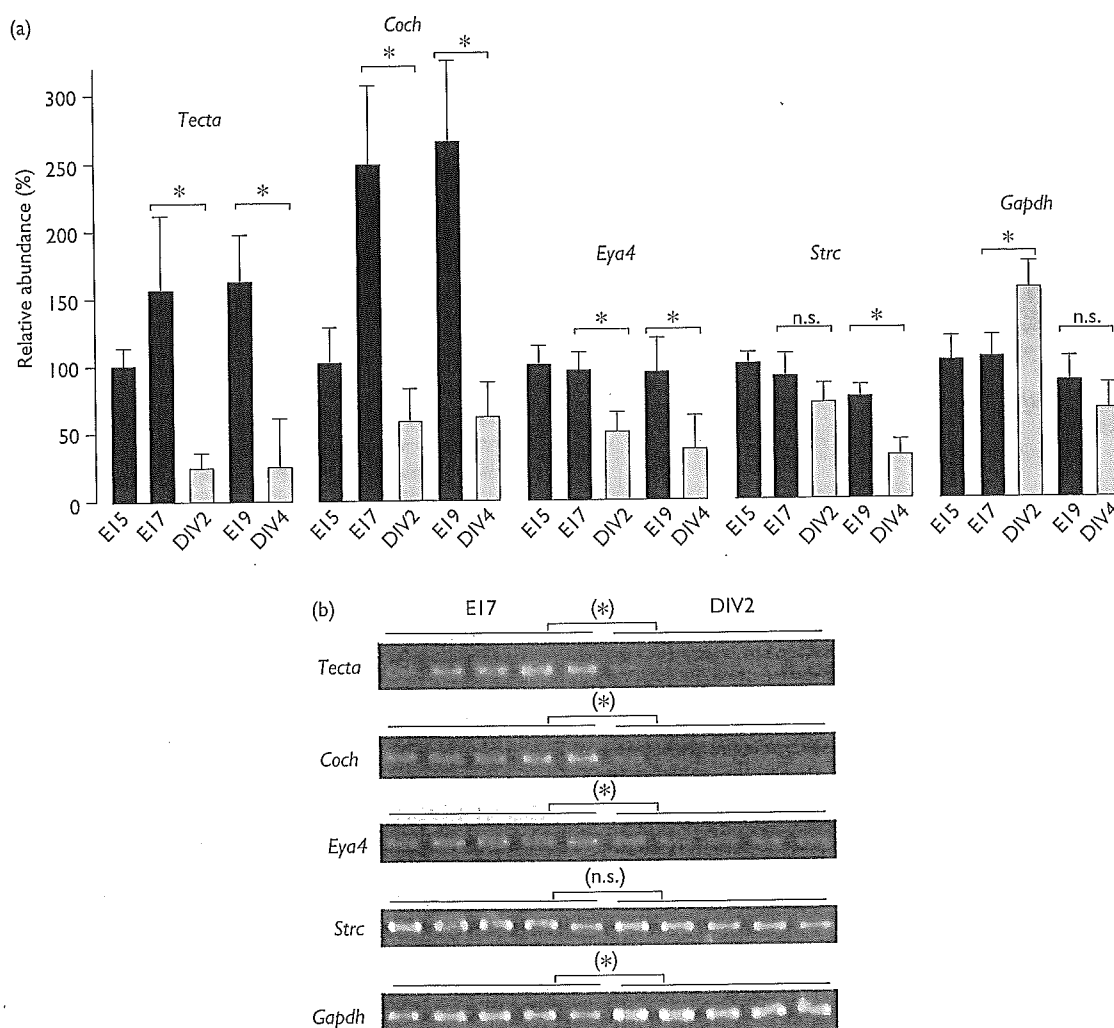


Fig. 1. (a) Relative abundance (RA) of *Tecta*, *Coch*, *Eya4*, *Strc* and *Gapdh* messenger RNA in cochlea on embryonic day 15 (E15), E17 and E19 (black bars) and at 2 days (DIV2, 48 h) and 4 days (DIV4, 96 h) *in vitro* following dissection on E15 (gray bars) expressed as a percentage of mean value 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

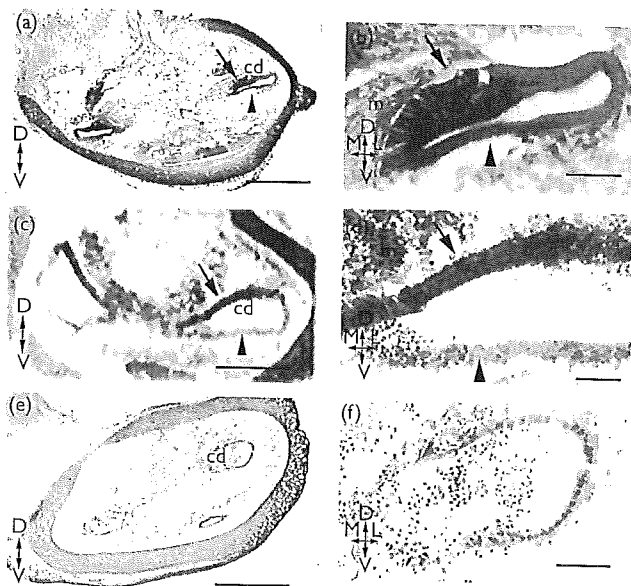


Fig. 2. Low-magnification image of cochlear tissue on embryonic day 15 (E15) (a), 2 days (DIV2, 48 h) (c) and 7 days (DIV7, 168 h) *in vitro* (e). High-power image of sensory epithelium of cochlear duct (cd) on E15 (b), DIV2 (d) and DIV7 (f). On DIV2, the premature organ of Corti comprising the dorsal 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, Schattman 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 I *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.
- Legan PK, Rau A, 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.

作成した。ダブルノックアウトマウスは著明な高インスリン血症をきたし、糖尿病を発症しなかった(図2-A, B)。さらに、ダブルノックアウトマウスの膵β細胞数は増殖亢進により著明に増加していた。この結果、これらの糖尿病マウスにおいて、膵β細胞内でのp27^{Kip1}の蓄積が膵β細胞不全を引き起こしていることが推定された⁵⁾。

糖尿病治療薬としての膵β細胞特異的p27^{Kip1}インヒビター

著者らの研究結果は、p27^{Kip1}インヒビターが膵β細胞を再生させる糖尿病治療薬として使用できる可能性を示唆している。しかし一方、薬剤による細胞周期の調節は癌化を含むさまざまな問題を引き起こす可能性があり、その組織特異性、使用量、治療期間など厳密な検討が必要である。さらに、いかなる病態が膵β細胞内のp27^{Kip1}の蓄積に関与しているかを解明することも重要な課題であることはいうまでもない。

- 1) Deng, S. et al.: Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes*, **53**: 624-632, 2004.
- 2) Kitamura, T. et al.: The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J. Clin. Invest.*, **10**: 1839-1847, 2002.
- 3) Vignetto, G. et al.: Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat. Med.*, **8**: 1136-1144, 2002.
- 4) Medema, R. H. et al.: AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*, **404**: 782-787, 2000.
- 5) Uchida, T. et al.: Deletion of Cdkn1b ameliorates hyperglycemia by maintaining compensatory hyperinsulinemia in diabetic mice. *Nat. Med.*, **11**: 175-182, 2005.

内田 亨, 春日雅人 / Tohru UCHIDA and Masato KASUGA
神戸大学大学院医学研究科糖尿病代謝・消化器・腎臓内科

検査時の注意点は少なく、同じ患者における施設間での結果の違いはほとんどない。一方、確定診断の際に行う従来からのABRでは、検査の特徴や限界などをいままでも増して十分注意しなければならなかった。検査結果は、検査状態、検査者、判読者によってかならずしも一致しない。同じ患者でABRが同一の機種でも施設によって結果が大きく異なることも少なくない。

精密検査としてのABRの意義

精密検査はまず顕微鏡下で耳内所見をチェックし、耳垢、中耳炎などの中耳伝音系を精査する。ABRはクリック、トーンバースト刺激(250 Hzあるいは500 Hz)を行う。BOA, CORは月齢で選択し骨導ABR, 聴性定常状態誘発反応(ASSR), 蝸電図は適宜行う。

つぎに症例を図1に呈示する。症例は2歳時のCORで難聴を指摘された。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た。5歳のとき著者の施設に来院し、気導ABR, 骨導ABR, 純音聴力検査を行った(骨導ABRは20 dBであるがこれはSPL, HLは14.5 dB)。純音でも気骨導差がはっきりわかる。この症例はCT検査の結果中耳奇形が判明し、手術により補聴器が不要となった。骨導ABRを精密検査でも用いれば、新生児期に伝音性難聴か感音性難聴かの診断がある程度可能となる³⁾。

聴性定常状態誘発反応(auditory steady-state evoked response: ASSR)

ASSRの最大の特徴はABRと同様、客観的に検査が可能で周波数特異性をもった詳細な聴覚評価が可能ということである。判定はアルゴリズムを用いて行われ、オーディオグラムの推定が可能であ

耳鼻咽喉科学

新生児聴覚スクリーニング後の精密聴力検査

Precision tests after UNHS

難聴の早期発見は言語獲得や人格形成などの面からきわめて重要である。しかし、難聴は本人の訴えが少なく目に見えない障害でもあることなどから早期の発見は困難であった。1970年JewettとSohmerにより聴性脳幹反応(auditory brainstem response: ABR)が発見され、新生児期の難聴の客観的診断が飛躍的に進歩した¹⁾。しかし、機器の操作は複雑であり、値段が高く、睡眠導入剤が必要で検査に時間がかかることなどから、一次スクリーニング用の機器としては十分な威力を発揮できなかった。

その後、1997年に新しい検査機器として自動ABRが登場した²⁾。検査は、従来のABRに比べきわめて簡単で睡眠導入剤が必要ないこと、短時間でできることなどから、全新生児を対象とした一次スクリーニングへの可能性ができた。これにより早期からの補聴器装着、コミュニケーションの選択肢(手話、人工内耳など)の幅が広がった。

一方、新生児聴覚スクリーニング後の耳鼻科医による聴覚の確定診断はきわめて重要となった。自動ABRは、シートにパス、要再検と結果が瞬時に出てくるため、

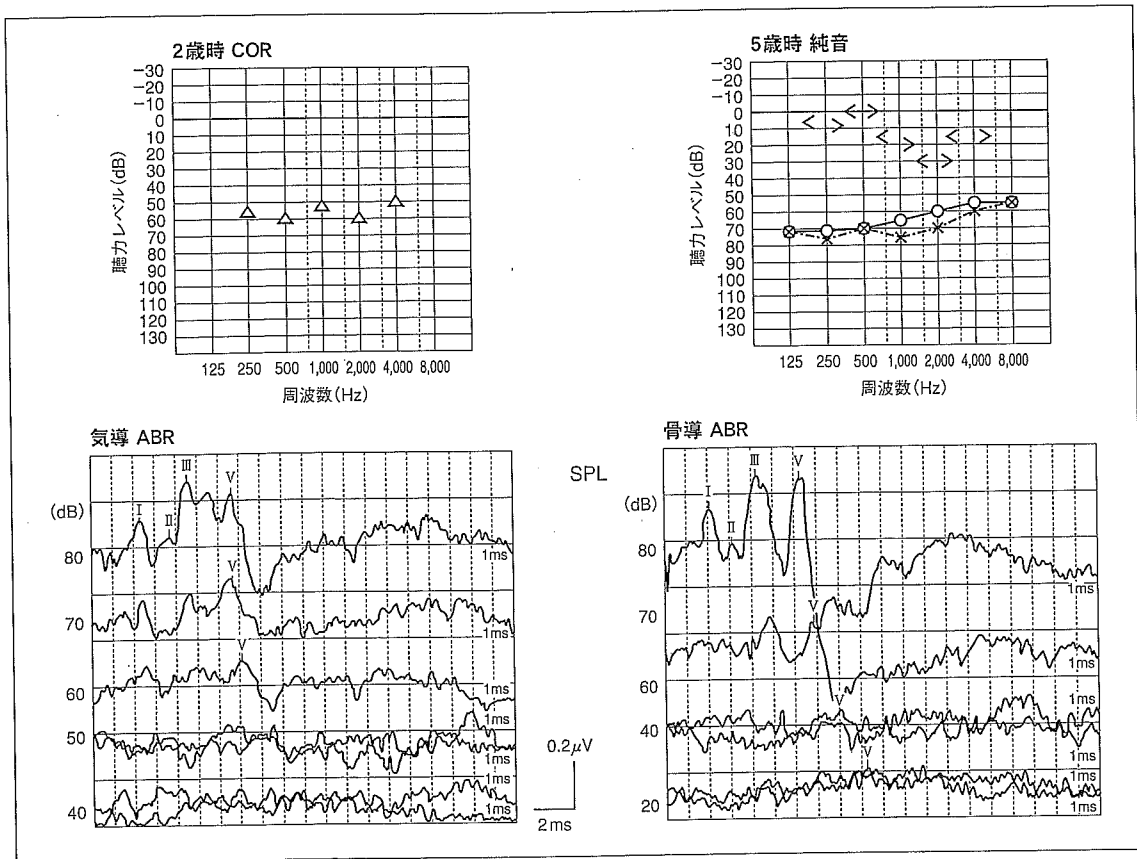


図 1 中耳奇形症例の各種聴覚検査

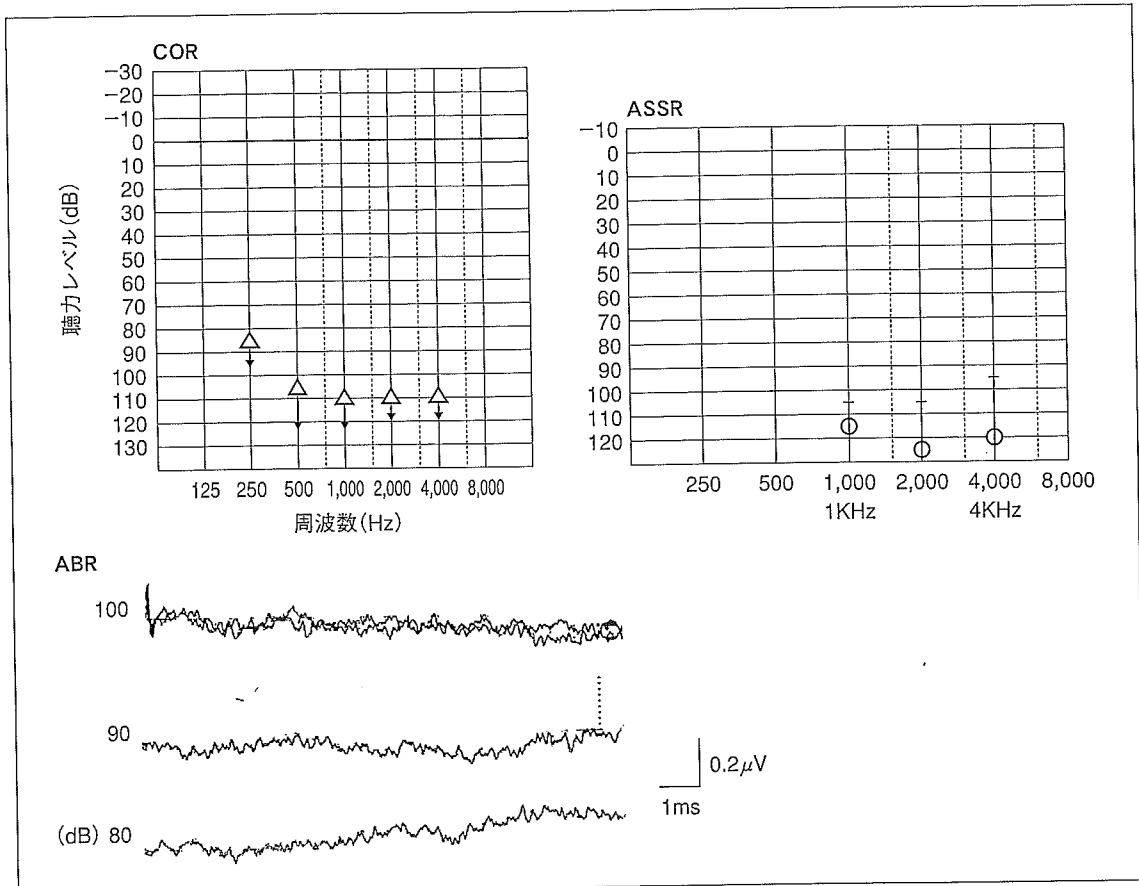


図 2 各種精密聴力検査

る。図2にABRでは100dBで無反応、CORで110dBでスケールアウトであったが、ASSRで115dB、125dBと閾値が確認できた症例を示す。ASSRについては新生児や乳幼児の症例を増やし今後さらに期待される⁴⁾。

1) Jewett, L.: Human auditory

evoked potentials—Possible brainstem components detected on the scalp. *Science*, 167: 1515-1518, 1970.

- 2) Judith, A. and Mason, S.: Universal Infant hearing screening by automated auditory brainstem response measurement. *Pediatrics*, 101(2): 221-228, 1998.
- 3) 坂田英明: 新生児聴覚スクリーニング, 第1版(加我君孝編).

金原出版, 2005, pp.31-36.

- 4) 坂田英明: 言語聴覚士のための新生児聴覚検査と早期ハビリテーションの手引き(日本言語聴覚士協会小児聴覚小委員会編). 2004, pp.14-21.

坂田英明, 安達のだか / Hideaki SAKATA and Nodoka ADACHI
埼玉県立小児医療センター耳鼻科

次号の特集予告(213巻12号)**

◆整形外科疾患でのヒストンデアセチラーゼ阻害剤の有用性

[企画: 井上 一 / 岡山大学大学院医歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(整形外科)]

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDAC阻害剤)はすでに抗腫瘍薬としての位置づけがなされた物質であり、アメリカではすでに臨床治験がはじまっているものもあり、実用性も高いことが期待される。ある種の細胞では特定の遺伝子発現を選択的に活性化することで、細胞周期やアポトーシスを制御することも判明している。今特集では、いち早く研究に取り組んでいる施設からの報告をお願いし、整形外科領域におけるHDAC阻害剤の可能性を探ってみたい。

難聴とことばの遅れ

内山 勉*

Tsutomu UCHIYAMA

● Key Words ● 難聴, 言語発達, 早期療育 ●

I. 聴覚と精神発達

健康な乳児は生まれてから聴覚を通じてさまざまな音や音声を聞きながら成長する。そして、形や色などを目で見る(視覚), 手が物に触れるときに感じるさまざまな皮膚感覚, 鼻で感じる匂い, 舌で感じる味などさまざまな感覚を刺激されながら, 同時に音や人の声を聞く経験を積み重ねる中で, 生活の中で聞こえる音や音声の意味が徐々に理解できるようになる¹⁾。

たとえば、「ミルクよ」との母親の声を聞く, 哺乳ビンと中の液体であるミルクを見る, 口の中でミルクの味を感じる, そして飲み込む動作と胃がミルクでいっぱいになる満腹感など, 乳児期初期には個々の感覚器で感じる感覚しか意識しない状態であったが, 発達とともに「ミルク」との音声を聞くことで満腹感を与える物, ビンに入っている白い液体を意識することが可能になる。そして, 空腹感を感じているとき「ミルク」の声を聞くことで, 空腹を満たす“ミルク”を意識の上でイメージできるようになる。この段階では, 乳児は“ミルク”を“感覚を超えた意味のあるもの”として, すなわち認知レベルで意識しているのである。

このように乳児が音や音声を認知するようになると, 乳児は意味のある音声(母親の声, 自分の名前, 食物の名称……など)に選択的に敏感となり, 騒音の中でも特定の音・音声に注意を集中して聴き取ることができる。すなわち, これまでは受身的に“聞く(hear)”状態から, 積極的に“聴

く(listen to)”状態へと変容する。

乳児は積極的に“聴く”ことで, 物理的にはひびく音や部分的に聴き取れない音声, さらに日頃聴き慣れない音声であっても, 音声を意味が付加されている言語音(音韻)として認知することで, 音声のもつ内容を理解できる。その結果, 母親以外の声, テレビからの声, 騒音の中や後からの声かけに反応が可能となるのである。

乳児の聴覚発達では, 音への反応は出産直後から認められているが, 言語音に反応ができるようになるには時間が必要である。6カ月以降では日常生活の中で言語音に敏感になるといわれている。9カ月以降になると乳児は言語音を理解できるようになり, 「ママは」との声に反応して母親の方を向くことができる。そして生後12カ月ごろに乳児の気の向いたときに「ママ」などの有意味発話が出現し, 1歳6カ月以降になると理解できる語彙が増大するにつれて飛躍的に発話量が増え, 2歳を過ぎると幼児は言語を使って物事を理解し, 考え, 記憶し, さらに音声言語を使って他者と活発にコミュニケーションするようになる²⁾。

4歳以降になると, 幼児は音声言語を手段として仲間と相互に“考え, 感情”を言語表現する中で, 相手に自分とは違う“考え, 感情”があることを意識できるようになる。そして, 仲間と共感し合う, 争う経験を積み重ねることで, 相手の“考え, 感情”を理解できるようになる。その結果, 幼児は自己中心的な行動から脱却して, 相手がどのように感じるかを考える, また自分の“考え, 感情”を抑えて相手に合わせる行動ができるようになる。

このように, 幼児が“相手とどのように協調す

* 富士見台聴こえとことばの教室

(〒177-0034 東京都練馬区富士見台 2-34-4)

るのか”を意識することで初めて、対人関係を含めた社会性の発達が可能となる³⁾。このような対人関係・社会性の発達を促すためには、相手の話を“注意を集中して聴き(傾聴態度)、内容を正確に理解できる(聴覚的言語理解)”ことが前提であり、対人関係・社会性の発達で聴覚機能の果たす役割は大きい。

II. 先天性難聴児と言語発達

先天性の難聴児では言語発達に遅れを生じる。70 dB以上の重度難聴児では、補聴器を装用しなければ音声言語の習得は不可能である。とくに100 dBを超える最重度の難聴児では、適切な治療教育(療育)を行わなければ、補聴器を活用しての音声言語の聴き取りは不可能である⁴⁾。

聴覚障害のない幼児(健聴児)では、自分の発する音声と他者の話す音声を聴き比べて声の高低・強弱や構音の調整を行っている。このような聴覚フィードバックによって幼児は母国語の構音を習得するのであり、さらに成人であっても、聴覚フィードバックにより場面に応じて自分の発する音声の音質・音量を調整することで、相手との円滑なコミュニケーションが可能となるのである。

一方、他者だけでなく自分自身の発声も聴くことができない重度難聴児では、補聴器を装用して適切な療育を受けなければ、言語音とは異なる無意味な声を発声し、その声の異様さにも気付かないままとなる。

70 dB未満の聴力では一部の音・音声は聴こえることから、ある程度音声言語の習得は可能である。このような難聴児では聴こえる範囲で音声言語を習得するため、明らかな言語発達遅滞が生じる。1000 Hzまでの低音の聴力が残存して高音の聴力が悪いタイプでは、サ行音がタ行音と聴こえるため機能性の構音障害と誤診された例がある。この場合、単語は聴き取れても、助詞を含む文レベルの聴き取りは困難な場合が多い。このため、聴き取れる範囲の単語もしくは単語のまとまり(単語連鎖)でしか理解できないため、結果として限られた単語および単語連鎖の言語表現しかできないことになり、言語発達は遅滞する。また相手

の発話を正確に聴き取れないことから、自己中心的で一方的な発話になりやすい。

聴力が49~40 dBの範囲では、静かな環境であるならば文レベルの発話でも聴き取れるが、騒音の中や小声での発話では聴き落としや聴き誤りが生じる。このため、言語発達に遅滞が生じるものの、難聴児の知的能力や家庭環境などにより言語発達にかなりの個人差が生じる。なお、さらに軽い難聴(25~39 dB)のある幼児でも言語発達に何らかの影響があるといわれているが、聴力と言語発達との相関関係は明確ではない⁴⁾。

III. 中途失聴児と言語発達

乳幼児で髄膜炎などにより急激に難聴が発症する場合があります。このような乳幼児では中途失聴により言語発達は重大な影響を受ける⁵⁾。乳児期(生後12~18カ月ごろ)に失聴した前言語期難聴(prelingual hearing impairment)では、先天性難聴とは言語発達上の差は少ない。ただし、補聴器装用効果に関しては、発症後まもない1, 2歳の中途難聴児と同年齢の先天性難聴児を比較すると、中途難聴児の方が補聴器を通じて聴こえる音に補聴器装用直後はより敏感に反応している。

4歳未満の失聴した幼児を観察すると、当初は当惑するが、聴こえない世界への順応は早い。失聴から時間が経過するにつれ、失聴幼児の発話量は減り、身振りでのコミュニケーションを積極的に試みるようになり、失聴するまでの間に習得した言語能力は低下し始める。

一方、4歳以降、ことに言語能力が高まった5, 6歳以降では、突然の失聴に幼児自身が困惑し、また音声言語によるコミュニケーションが不可能なため、自分の世界に閉じこもる傾向がみられる。また、自分の発話する音をフィードバックできないことから、文レベルでの発話が不明瞭になり、ついには発話自体が減少する。失聴するまでは他者の発話を聴き取ることで語彙や表現方法(構文)を習得してきたが、失聴したままの状態では音声言語の発話能力は低下していく。

中途失聴幼児の補聴器もしくは人工内耳の装用効果は、発症年齢に応じた言語力を習得していること、また聴覚を活用できる能力(聴能)が潜在

表 40～59 dB の難聴児の療育内容による言語力の差

言語性 IQ, 動作性 IQ 分布					
IQ	WPPSI 検査 言語性 IQ		WPPSI 検査 動作性 IQ		IQ
150～159	*				150～159
140～149					140～149
130～139	*		*		130～139
120～129	*		****		120～129
110～119	*		*****		110～119
100～109	*****		****		100～109
90～99	*				90～99
80～89	*****		*		80～89
70～79	*				70～79
60～69					60～69
50～59					50～59
40～49					40～49
	A 群 N 群		A 群 N 群		

U テスト p<0.01

両群に明らかな有意差あり

両群に差はない

A 群：適切な療育を受けた難聴児, N 群：不適切な療育を受けた難聴児

的に備わっていることから、先天性難聴児に比べ明らかに高い。このため、中途失聴の幼児では発症からできるだけ早く補聴器もしくは人工内耳を装着させる必要がある⁶⁾。

IV. 難聴児の療育効果

早期療育を受けた難聴児の言語発達は、さまざまな要因によって影響を受ける。難聴幼児通園施設で聴覚活用による就学前療育を受けた難聴児について療育効果を検討したところ、つぎの要因によって療育効果が影響を受けることが判明した⁷⁾。

- 1) 聴力
- 2) 療育開始年齢
- 3) 知能水準 (動作性知能)
- 4) 療育担当者の技量および療育内容
- 5) 他障害の有無
- 6) 親の教育力・協力

聴力については、聴力が重くなるほど言語習得は困難であるが、補聴器を装着して適切な療育を行えば、小学校就学時点 (6 歳時点) までに年齢相応の言語力を習得することが可能である。

一方、聴力的には軽い場合でも、適切な療育を

行わなければ、言語発達は遅滞する。すなわち、聴力だけが難聴児の療育効果を決定しているのではない。また近年人工内耳の幼児への適応により、最重度難聴児にとってより効率的に音声言語を習得することが可能になっている。

40～59 dB 程度の難聴児では補聴器を装着すれば聴き取りが改善されるため、療育は必要でない印象がある。しかしながら、6 歳時点での言語力 (表) を調べてみると、適切な療育を受けた群と療育を受けていない群とは言語力に明らかな差があり、難聴程度が軽い場合であっても早期療育は不可欠である⁸⁾。

早期療育効果と療育開始年齢との関係について、図に示すように療育開始年齢が高くなるにつれて、療育効果が低くなる傾向はある。しかし難聴児を個々に観察すると、早く療育を始めても言語発達が遅い難聴児がいる一方、療育開始が多少遅れても言語習得が早い難聴児もいる。このことから、療育開始年齢だけをもって難聴児の療育効果を決定することは誤りである⁹⁾。

療育担当者の技量は重要であり、難聴児の言語力を促進できる技量を習得するには、ベテラン担当者の下で指導を受けながら数年の実践経験が必

要である。さらに熟練した療育担当者となるには、長年の療育実践経験と自己研鑽が不可欠である。

また、親の教育力や療育活動への協力も欠かすことはできない。家庭での親の熱心な“ことばかけ、働きかけ”が難聴乳幼児の言語習得を促すことは間違いのない事実であり、療育施設だけが言語習得の場ではない。

難聴児の言語習得や社会性の発達を促進させる目的で、幼稚園・保育園での統合保育を希望する親は多い。しかし、難聴児が健聴児の発話を聴き取れない・理解できないならば、健聴児との交流による言語習得や健聴児との集団遊びは不可能に近い。すなわち、統合保育は難聴児だけの療育活動にはない健聴児との“かかわり合い”の機会を提供する療育活動の一部であり、専門的な療育活動と並行して行うことで始めて、難聴児の言語習得や社会性発達を促進できるのである。

他障害を合併する難聴児について、他障害の程度・様相により療育方法・効果は異なる。聴力および知的障害が重い場合には、手話・指文字・その他のサイン言語を日常生活のコミュニケーション手段とする必要がある。また自閉症を合併する難聴児ではサイン言語がコミュニケーション手段として有効な場合もある。しかし、聴覚を活用できる場合も少なからずあり、他障害に応じて個別のプログラムを工夫する必要がある¹⁰⁾。

おわりに

難聴児の言語習得に関しては、聴覚活用による早期療育・学校教育以外に、手話・指文字などのサイン言語による早期療育・学校教育も現実に必要である。現在ではパソコン・携帯電話などによる文字を使用する通信手段、さらにパソコンを活用する業務が普及しており、聴覚障害者が社会で活躍できる機会は増大している。しかし、職場・業務が要求する言語力（読解力、文章力）よりも難聴者の言語力が低ければ、便利なIT機器があっても仕事はできない。このため言語力の低い難聴者の就労できる業種は限られてしまう。すなわち、社会で自立に必要な言語力を難聴児に習得させることが早期療育・学校教育の最終目的で

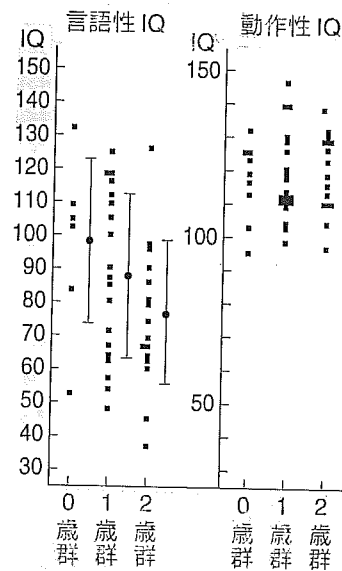


図 早期療育開始年齢の相違による言語力の差

6歳時点での WPPSI 知能検査言語性 IQ・動作性 IQ の比較。動作性 IQ は各群間に差はないが、療育開始年齢の相違により言語性 IQ に有意差 (0歳群と2歳群: $p < 0.05$) がみられる。

ある。

難聴児は早期療育によって年齢相応の言語力を習得することが可能であり、そのためには難聴児の早期発見と適切な早期療育が不可欠であることを改めて強調したい。

文献

- 1) Boysson-Bardies (Bd) : How Language Comes to Children. DeBevois MB (Trans), pp 13-125, The MIT Press, London, 1999.
- 2) Holzman M : The Language of Children. 2 ed, pp 78-143, Blackwell Publishers, Cambridge, 1997.
- 3) Nichols S, Stich SP : Mindreading. pp 150-199, Clarendon Press, Oxford, 2003.
- 4) Northern JL, Downs MP : Hearing in Children. 5 th ed, pp 1-89, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001.
- 5) Neely JG, Wallace MS : Medical and surgical treatment of cochlear hearing loss. Audiology Treatment. Valente M, Hosford-Dunn H, Roeser RJ (eds), pp 377-396, Thime, New York, 2000.
- 6) 池原由香, 遠間真希子, 加我君孝: 幼児の難聴とcritical age—人工内耳手術から—。中枢性聴覚障害の基礎と臨床, 加我君孝 (編), 144-146頁, 金原出

- 版, 東京, 2000.
- 7) 内山 勉, 伊集院亮子, 天道文子, 他: WPPSI 知能診断検査による難聴幼児の早期療育効果の検討. 音声言語医学 41(2): 120-129, 2000.
- 8) 内山 勉, 徳光裕子: 中等度難聴児の療育効果. 第49回日本音声言語医学会学術講演会予稿集, 93頁, 2004.
- 9) 内山 勉, 徳光裕子: 12ヵ月未満の難聴児の早期療育効果について. 音声言語医学 45(3): 198-205, 2004.
- 10) 内山 勉: 重複障害児. 新生児聴覚スクリーニング, 加我君孝(編), 160-165頁, 金原出版, 東京, 2005.

* * *

第29回 日本頭頸部癌学会・第26回 頭頸部手術手技研究会のご案内

第29回日本頭頸部癌学会(旧日本頭頸部腫瘍学会)・第26回頭頸部手術手技研究会を下記の通り開催致します。多数の先生方のご参加をお願い申し上げます。

記

会 期: 2005年6月15日(水)~17日(金)

会 場: 京王プラザホテル(東京都新宿区西新宿2-2-1, 03-3344-0111)

頭頸部手術手技研究会

特別講演(エキスパートに聞く): 波利井清紀, 永原 國彦

シンポジウム: 頭頸部癌術後の局所合併症の現状とその対策

日本頭頸部癌学会

招待講演: K. Thomas Robbins(南イリノイ大学), William I. Wei(香港大学)

特別講演(頭頸部癌治療をふりかえって): 海老原 敏

シンポジウム: 下咽頭癌の治療戦略, 頸部郭清術の標準化と今後の展開, 頭頸部癌治療における再生医療, 頭頸部癌の選択的動注化学療法—その適応と限界—

公開セミナー: 頭頸部癌術後の咀嚼嚥下のリハビリテーション

教育講演: 9題, ランチョンセミナー: 4題, サテライトシンポジウム: 2題

参加費用: 15,000円(当日), 14,000円(事前登録5/31まで)

*詳しくは学会ホームページ(<http://jshnc29.umin.jp>)をご参照ください。

事務局: 〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科頭頸部外科

杉本太郎(事務局長), 土佐真理子, 磯部知恵(秘書)

TEL: 03-5803-5913(直通), FAX: 03-5803-0215(直通)

E-mail: jshnc29.hns@tmd.ac.jp

第29回日本頭頸部癌学会・第26回頭頸部手術手技研究会会長 岸本 誠司

AUDIOLOGICAL FEATURES AND MITOCHONDRIAL DNA SEQUENCE IN A LARGE FAMILY CARRYING MITOCHONDRIAL A1555G MUTATION WITHOUT USE OF AMINOGLYCOSIDE

TATSUO MATSUNAGA, MD, PHD
TOKYO, JAPAN

HIROSHI KUMANOMIDO, MD
TOCHIGI, JAPAN
YU-ICHI GOTO, MD, PHD
TOKYO, JAPAN

MASAE SHIROMA, PHD
TOCHIGI, JAPAN
SHIN-ICHI USAMI, MD, PHD
MATSUMOTO, JAPAN

To elucidate the pathophysiological and genetic mechanisms of hearing loss associated with the homoplasmic mitochondrial A1555G mutation in the absence of aminoglycoside exposure, we conducted audiological and genetic analyses on 67 maternally related members of a large Japanese family carrying this mutation. A consistent pattern was evident in the audiograms, with features of sensory presbycusis, cochlear origin at all levels of hearing loss, and a high degree of vulnerability of outer hair cells. That the degree of hearing loss was similar in affected subjects within the same sibling group but differed between sibling groups suggests the involvement of nuclear modifier genes. Total mitochondrial DNA sequences were completely identical among subjects with various levels of hearing loss, and lacked additional pathogenic mutations. For the diagnosis of sensorineural hearing loss, the mitochondrial A1555G mutation should be considered when these features are present even in the absence of aminoglycoside exposure.

KEY WORDS — cochlea, hereditary hearing loss, mitochondria, nonsyndromic hearing loss.

INTRODUCTION

Various mitochondrial DNA mutations have been reported to cause hearing loss, either on their own or in association with other clinical symptoms such as neuromuscular disorders and diabetes.¹ The homoplasmic A1555G mutation in the mitochondrial 12S ribosomal RNA gene has been the first mitochondrial DNA mutation to be associated with nonsyndromic sensorineural hearing loss.² The A1555G mutation was initially identified primarily in subjects with hearing loss following aminoglycoside exposure. Indeed, it has been reported that the increased binding affinity of ribosomal RNA to aminoglycosides as a result of the mutation constitutes the pathogenetic mechanism underlying ototoxic susceptibility.³ Subsequently, this mutation was also found in subjects who developed hearing loss in the absence of aminoglycoside exposure.⁴⁻⁸ In these cases, the clinical phenotype ranged from profound congenital hearing loss to moderate progressive hearing loss of later onset to only slight hearing loss. Although these phenotypic differences may be the result of additional mutations in the mitochondrial or nuclear DNA, or of unknown

environmental factors, the exact mechanism has not been determined. Furthermore, the pathophysiological mechanism of hearing loss due to the A1555G mutation in the absence of aminoglycoside exposure has not been defined, because there are no reports on temporal bone histopathology in patients with this mutation, and the audiological evaluation of patients has been limited to pure tone audiometry (PTA) in most previous studies. Only one study carried out detailed audiological evaluations, but most subjects exhibited profound hearing loss.⁹ Thus, such detailed audiological evaluations of subjects with various levels of hearing loss, especially those with mild or moderate hearing loss, remain to be performed to uncover the pathophysiological mechanism underlying the development of hearing loss.

We previously identified a large Japanese family in which the A1555G mutation is prevalent. None of the family members were previously exposed to aminoglycosides, and the prevalence of hearing loss in maternally related members was much higher than that in the general population.¹⁰ To further elucidate the pathophysiological and genetic mechanisms of

From the Department of Otolaryngology, National Tokyo Medical Center (Matsunaga), and the Department of Mental Retardation and Birth Defect Research, National Center of Neurology and Psychiatry (Goto), Tokyo, the Department of Speech-Language Pathology and Audiology, School of Health Science, International University of Health and Welfare, Tochigi (Matsunaga, Kumanomido, Shiroma), and the Department of Otorhinolaryngology, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto (Usami), Japan. This work was supported by a Health Science Research Grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

CORRESPONDENCE — Tatsuo Matsunaga, MD, PhD, Dept of Otolaryngology, National Tokyo Medical Center, Higashigaoka 2-5-1, Mèguro-ku, Tokyo 152-8902, Japan.

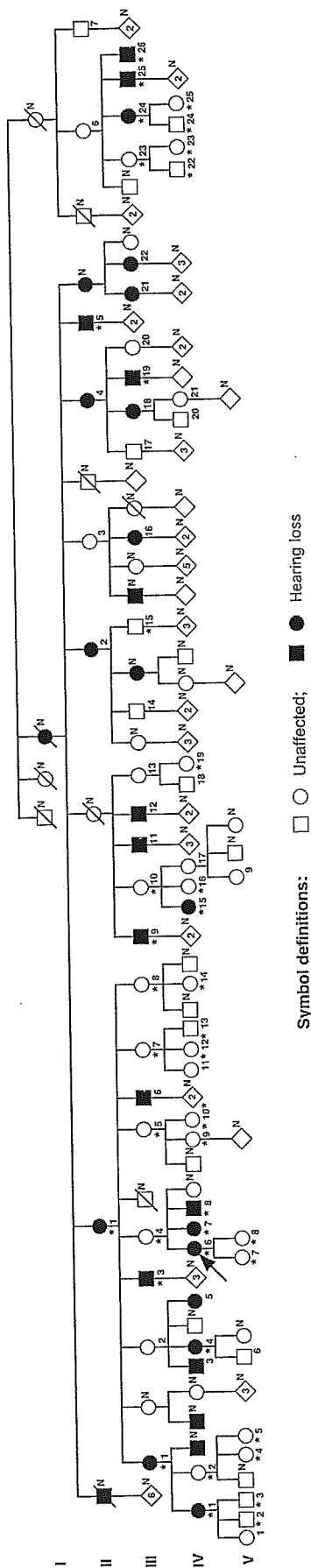


Fig 1. Part of pedigree shows intrafamilial relationship of subjects. Generations are indicated on left in roman numerals, and numbers under symbols represent identification numbers. Family members who were not subjects of this study are indicated by "N" to upper right of symbol. Subjects who reported hearing loss by interview are indicated by solid symbols. Asterisks indicate subjects who were previously tested for A1555G mutation. Arrow indicates proband of family.

the hearing loss due to this mutation, we conducted a battery of audiological tests and sequenced the entire mitochondrial DNA in maternally related members of this family.

MATERIALS AND METHODS

Subjects. The subjects were 67 maternally related members (23 male, 44 female) of a large Japanese family with the homoplasmic mitochondrial A1555G mutation (Fig 1). During interviews prior to PTA testing, 26 of the 67 subjects reported a hearing loss. The original family included 124 maternally related members in 6 generations. The medical histories, clinical phenotypes, and genetic features of these members have been reported previously.¹⁰ In 123 maternally related members whose information about hearing was reliably obtained by interviews, 33 members (penetrance, 26.8%) were considered to have a hearing disability and handicap. The inheritance pattern was maternal and not paternal in this family. Apart from hearing loss, no other significant defects related to mitochondrial mutations were noted in this family. None of the family members had a history of aminoglycoside exposure. All 41 maternally related members who were tested for the A1555G mutation exhibited the mutation in a homoplasmic form. All 41 of these subjects participated in the present study.

Evaluation of Auditory Function. After otoscopic examination, PTA testing was conducted on all subjects. An AA75 audiometer (Rion, Tokyo, Japan) was used in a soundproof room for most subjects. For some subjects, PTA testing was conducted with an AA72B audiometer (Rion) and circumaural earphones in quiet rooms in which background noise was lower than 40 dB sound pressure level (SPL; as measured with an NA29 sound level meter; Rion) with A-weighting. Both air-conducted and bone-conducted thresholds were measured. Subjects who exhibited a pure tone threshold of 30 dB hearing level (HL) or worse at any frequency were given further detailed audiological tests when possible (Table 1). A speech recognition test was conducted with the 67-S monosyllable list (Japan Audiological Society, Tokyo) in 19 subjects. The performance-intensity function was made separately for right and left ears in each subject, and both the maximum speech recognition score and the rollover index were determined.¹¹ The short increment sensitivity index (SISI) test was performed to examine cochlear dysfunction at 1 or 2 frequencies in 14 subjects. The level of sound stimulation was set at 20 dB above the level of the pure tone threshold at the tested frequencies. Transient evoked otoacoustic emissions (TEOAEs) and distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs) were examined to evaluate outer hair cell function with

TABLE 1. SUBJECTS OF DETAILED AUDIOLOGICAL TESTS

Test	Subjects
Speech recognition test	II-1, II-5, III-1, III-3, III-9, III-15, III-19, III-21, III-22, III-24, III-25, III-26, IV-1, IV-4, IV-5, IV-6, IV-7, IV-8, IV-15
Short increment sensitivity index test	III-1, III-3, III-9, III-15, III-19, III-22, III-24, III-25, III-26, IV-2, IV-5, IV-7, IV-8, IV-15
Transient evoked otoacoustic emissions and distortion product otoacoustic emissions	II-1, III-3, III-9, III-15, III-19, III-25, III-26, IV-15
Auditory brain stem response	II-1, III-3, III-9, III-26, IV-4, IV-6, IV-8

the ILO292 Otoacoustic Emission Systems (Otdynamics, Hatfield, England) in 8 subjects. For TEOAE analysis, a nonlinear click stimulus train was used at 80 dB SPL, and the number of responses to be averaged was set at 260. The DPOAE measurement was performed at 3 points per octave across the F2 stimulus frequency range of 1,000 Hz to 6,000 Hz with an F2-F1 ratio of 1.221 and at F1 and F2 levels of 70 dB SPL. Each DPOAE result was evaluated with a DP audiogram. The auditory brain stem response (ABR) was evaluated to locate the site of the lesion in the auditory pathway with the Neuropack Σ 5504 (Nihon Kohden, Tokyo) in 7 subjects. Alternating click stimulation was presented monaurally at a rate of 10/s through an earphone while the contralateral ear was masked with white noise. The responses were recorded with vertex-earlobe electrodes. A total of 1,000 sweeps were added for each measurement. Thresholds of wave I and wave V were determined, and the latencies of wave I and wave V were measured with the click stimulation presented at 90 dB normal hearing level (nHL).

Total Mitochondrial DNA Sequencing. Total mitochondrial DNA was sequenced for 8 subjects with various degrees of hearing loss. The 8 subjects consisted of the proband (IV-6), her daughter (V-7), her mother (III-4), her grandmother (II-1), and 4 siblings (III-23, III-24, III-25, III-26). Genomic DNA was isolated from peripheral leukocytes of the subjects by conventional methods. As in a previous study,¹² to avoid nuclear pseudogene amplification, we applied the long polymerase chain reaction-based sequencing method. With 96 primer sets designed for sequencing, we sequenced the polymerase chain reaction products using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (PE Applied Biosystems, Foster City, California). Each reaction product was then analyzed with an ABI 3700 automated sequencer (PE Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. The sequence data were compared with those in MITOMAP (<http://www.mitomap.org>),¹³ as well as those from 200 unrelated Japanese without hearing loss.

The study protocol was approved by the Ethics

Committee of the National Tokyo Medical Center, and the study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all individuals who participated in the study.

RESULTS

Pure Tone Audiometry. The results of PTA testing in all of the subjects are summarized in Fig 2. Hearing loss was categorized with respect to the mean air-conducted pure tone thresholds at 0.5, 1, and 2 kHz ("PTA 0.5-2 kHz"),¹¹ by which 59% of the subjects were classified as having normal hearing (≤ 15 dB HL), 14% had slight hearing loss (16 to 25 dB HL), 9% had mild hearing loss (26 to 40 dB HL), 4% had moderate hearing loss (41 to 55 dB HL), 5% had moderately severe hearing loss (56 to 70 dB HL), 3% had severe hearing loss (71 to 90 dB HL), and 5% had profound hearing loss (>90 dB HL). The PTAs were symmetric in the right and left ears in the majority of the subjects, in that 56 subjects exhibited the same category of hearing loss on both sides. The remaining 11 subjects showed somewhat asymmetric hearing loss, but the categories differed by only 1 level. All subjects with hearing loss exhibited sloping or sharp sloping audiograms except for 1 subject (III-1) who had a history of noise exposure. This subject's audiogram was typical of noise-induced hearing loss (ie, increased bone-conducted thresholds at 4 kHz). The degree of hearing impairment was similar in affected subjects within the same sibling group, but differed between sibling groups.

In 41 subjects who did not report any hearing loss at the time of interview, normal hearing was detected in both ears by PTA over 0.5, 1, and 2 kHz in 32 subjects, slight or mild hearing loss in one or both ears in 8 subjects, and slight hearing loss due to otitis media in 1 subject. The age of the 8 subjects (II-3, II-6, II-7, III-2, III-15, III-17, III-20, III-23) with slight or mild hearing loss ranged from 42 to 80 years. Considering the ages and the degree of hearing loss in these 8 subjects, the lack of reported hearing loss was considered to be reasonable in these subjects. In these 41 subjects, the results of PTA at 8 kHz were analyzed in order to find out whether any subclini-