

# ジーンターゲティングによる高度難聴モデルマウスの樹立と解析

研究協力者 野田 哲 生 (癌研究所細胞生物部、東北大学医学部細胞生物学教室)

共同研究者 美野輪 治 (癌研究所細胞生物部)  
池田 勝久 (東北大学医学部耳鼻咽喉科)  
高坂 知節 (東北大学医学部耳鼻咽喉科)

## [はじめに]

ヒト遺伝性非症候群性難聴(Human hereditary nonsyndromic deafness)の原因と考えられる遺伝子座は、DFNA (常染色体優性)として19, DFNB (常染色体劣性)で22を数えるが、現在までに遺伝子として同定されたのは表1に示す11種類である(99年1月現在)。これらの遺伝性難聴の発症機構を解明すると同時に、聴覚の分子レベルでの機構解明に資するため、遺伝性難聴モデル動物の作製を試みた。表1中のPOU3F4 (Brn-4), POU4F3 (Brn-3.1)<sup>(1-3)</sup>については、標的遺伝子組換えによる遺伝子欠損マウスを樹立した。Cx26 (connexin26)、DIAPH1 (diaphanous)は、現在欠損マウスを作製中である。

X染色体に連鎖するヒトの混合難聴(DFN3)の原因遺伝子であるBrn-4は、よく保存されたDNA結合領域を有するPOU遺伝子ファミリーのClassIIIに属する転写因子である<sup>(4)</sup>。既に、昨年、POU3F4/Brn-4の欠損変異マウスが高度難聴である事を報告したが、以下にその解析についてまとめ、更に、その加齢にともなう変化についての知見を述べる。

## [対象と方法]

マウスBrn-4遺伝子の全翻訳配列をpgk-neo遺伝子に置換したtargeting vectorを作製し、胚性幹細胞に導入した。相同組換え変異体よりキメラマウスを作製し、交配によって変異マウスを得た。

聴性脳幹反応 Auditory Brainstem Responce (ABR)測定のために、マウスはベントバルビタール(70mg/Kg)で麻酔し頭架台上に保持した。測定は電氣的絶縁室内で行った。ステンレス製針電極を鼓室胞 Tympanic bulla 上と、頭頂皮内に設置した。ABRは、誘発電位記録システム(NEC)により記録した。音刺激は、クリック音をラウドスピーカーで発生させた。振幅は、波形頂一谷の差で測定し、1mVを与える音圧を閾値とした。

in situ Hybridizationのためのマウス(P0)は、麻酔下水冷した4%PFAで経心的に灌流し、断頭後更に

4℃4%PFAで後固定した。頭部サンプルはOCT基質に凍結包埋し、凍結切片(20μm)をシランコートしたスライド上にマウントした。マウスBrn-4の3'非翻訳配列390bpを鋳型としてT3とT7RNAポリメラーゼ、Digoxigenin (DIG) -11-UTP (Boehringer)を用い、DIGラベルされたantisenseとsenseリボプローブを合成した。組織切片は、4%PFA、室温15分、PBS洗浄後、プローブと72℃24時間保持し、洗浄後、免疫学的方法でシグナルを検出した。どのステップでも、切片のRNase処理は行なわなかった。

光顕による組織学的観察には11週齢の野生型(+ / Y)とBrn-4変異体(- / Y)のマウスを用いた。4%パラホルムアルデヒドによる外リンパ灌流で4℃、一晚固定した。その後、0.12M EDTAで脱灰、エタノールによる脱水、パラフィン包埋し、ヘマトキシリン-エオジン染色にて観察した。電顕観察には2.5%グルタルアルデハイドによる経心灌流で固定した蝸牛を用い、常法により標本作製した。

内リンパ液電位 Endocochlear Potential (EP)の測定のためには、各マウスを麻酔し、筋弛緩を確認後、気管経路で空気人工呼吸を実施した。直腸温度を、37℃に保ち心電計を装着した。150MM KClで満たしたガラス微小電極を、蝸牛基底回側壁を通して蝸牛管内に挿入し、出力を、高インピーダンス二重電位計(WPI)で記録した。

## [結 果]

我々は、遺伝性の非症候群性難聴の一つであるヒトDNF3のマウスモデルを樹立する事によりその病態を解明する事を目的として、Brn-4の標的遺伝子組換え法による欠失変異体を作製して聴覚能の解析を試み、その結果を昨年報告した。即ち聴性脳幹反応(ABR)において、野生型マウスのABR波形や閾値は正常であったが、Brn-4欠失変異体マウスでは90dB SPLまでABRの反応を認めなかった。即ち、Brn-4欠損マウスは、高度の難聴であり、波形(ホモ

接合体-/Yで、第一波以降全て消失)から難聴の原因が、聴神経もしくは、これより末梢側に存在する事が推測された。巨視的及び顕微鏡による組織学的観察では中耳伝音系に形態の異常は認められず、耳小骨の可動性も保持されており、Brn-4欠失変異体の難聴は感音性と考えられ、その原因として、内耳の異常が推測されたが、蝸牛の顕微鏡的観察では、明瞭な異常を検出できなかった。異常部位推測のため、蝸牛内でのBrn-4の発現を mRNA in situ hybridization法で調べたところ、spiral ligament fibrocyte (ラセン靱帯線維細胞)に最も強い発現が見られた。他方、血管条 (SV)、コルチ器等の上皮系細胞には発現が見られなかった。

そこで、Brn-4の最も強い発現の見られる spiral ligament の電顕による観察を行い、その fibrocyte に著しい形態異常を見出した。11週齢の欠失変異体では、血管条より前庭階方向に位置するラセン靱帯 (suprastrial zone) の fibrocyte 細胞表面に見られる発達した突起構造が消失し、ミトコンドリアがほとんど失われ、細胞質容積が減少し、変性過程を示唆した。野生型は形質膜の無数の突起を伴う高度に屈曲した形を呈しており、細胞質には豊富なミトコンドリアを認めた。一方、内有毛細胞、外有毛細胞、支持細胞の電顕像では、各々良く分化した形態を示し、聴毛のアクチン構築、内有毛細胞基底部の求心性シナプス、外有毛細胞基底部の遠心性シナプスも観察しうる限りでは野生型と変異体で差異は認められなかった。血管条の電顕像でも、野生型と変異体の両者ともに、辺縁細胞、中間細胞、基底細胞の三層構造を形成し、辺縁細胞の側底膜は良く発達した皺襞を示し、その細胞質は豊富にミトコンドリアを含んでいた。

Spiral ligament fibrocyte が、蝸牛内の陽イオン供給経路になっているとの仮説を考慮し、蝸牛外側壁経由で内リンパ静止電位 (Endocochlear Potential; EP) を測定したところ、野生型マウスでは約 90mV であったが、変異体マウスでは 40mV と顕著な EP の低下を認めた。これらの結果から、EP の低下が Brn-4 欠損マウスの難聴の主原因であると考えられた。

次に、1年以上経過した雌の Brn-4 欠損ヘテロ接合体の聴覚異常について調べた。雌のヘテロ接合体の ABR の閾値は、11週齢前後では正常で全く異常を示さないが、1年以上経過すると、その1部のマウスが、高度の難聴を示すようになった。野生型マウスも1年以上経つと軽度の難聴傾向を示したが、ヘテロ接合体の一部が示す難聴は、はるかに強度であり、

ホモ接合体の難聴に匹敵する。

更に、1年以上経つと、顕微鏡レベルでも変異体の suprastrial zone での著明な異常が観察された。即ち、ライスネル膜の付着部の線維細胞の変性により、その部分は前庭階に向かって膨隆し、結合織が疎となっていた。1年以上のヘテロ接合体の内、強度の難聴を示すものと、軽度のもの顕微鏡による組織学的観察によると、強度のマウスでは、Suprastrial fibrocyte の死滅による剥離が観察された。この剥離は、1年以上のホモ接合体 (O Old) でも見られたが、同週齢の野生型 (W Old) では認められない。軽度の難聴傾向のヘテロ接合体は、野生型と同じく剥離は認められなかった。これらの結果は、雌の Brn-4 欠損ヘテロ接合体の一部で Late onset の高度難聴が発症する事を示している。

### [考 察]

Brn-4 変異体マウスの内耳の形態学的観察によって蝸牛外側壁のラセン靱帯の線維細胞の異常が明らかとなった。蝸牛機能の維持に必須な他の重要な細胞に形態学的異常は認められなかった。野生型マウスで、Brn-4の発現はラセン靱帯で最も強く、有毛細胞、血管条では見られない事から、Brn-4の欠失によりラセン靱帯の線維細胞が正常機能を保てなくなり、EPが低下する事が Brn-4 変異体の感音難聴の一次的原因であると推論できる。近年、ラセン靱帯の線維細胞 Spiral ligament fibrocyte はギャップ結合によって血管条の基底細胞と連結しており、EP形成の主要イオンである K<sup>+</sup>イオンの供給の経路であることが提唱されている<sup>(5-8)</sup>。従って、Brn-4 変異体で認められる線維細胞の変性により血管条への K<sup>+</sup>イオンの供給が阻害され、EPの形成に異常が生じたと推定される。換言すれば、上記の結果は、EPの形成維持にラセン靱帯の線維細胞が必須であることを示している。

本研究において樹立した Brn-4 変異体マウスは、現在までに知られている他の3種類のヒト非症候性難聴のモデルマウス、即ち Myosin 7A, Myosin 15, Brn-3.1 と併せて4種類の内の一つである。このモデルマウスの解析により、ヒト DFN3 の混合難聴の感音成分の障害機序が明確に提示されたと考えられる。更に、雌の Brn-4 欠損ヘテロ接合体の一部で Late onset の高度難聴が発症する事が明らかになり、これはヒト DFN3 において報告された女性症例に極めてよく対応する。Brn-4 遺伝子はヒトでもマウスでも X 染色体上に存在する事を考慮すると、この晩発性難聴は共通の発症機構によると考えられ、これを解明す

る上でも、Brn-4 欠損マウスは非常にユニークな難聴モデルである。

### [参考文献]

- 1) Y.J. de Kok et al., Science, 267, 685 (1995)
- 2) W.E. Nance et al., Birth Defects 7, 64 (1971).
- 3) C.W. Cremers et al., Arch Otolaryngol. 111, 249 (1985)
- 4) Y. Hara, A.C. Rovescalli, Y. Kim, M. Nirenberg, Proc Natl Acad Sci U S A 89 3280 (1992)
- 5) T. Kikuchi, R.S. Kimura, D.L. Paul, J.C. Adams, Anat Embryol (Berl) 191, 101 (1995)
- 6) S.S. Spicer and B.A. Schulte, Hear Res., 100,80 (1996)
- 7) Goto S, Oshima T, Ikeda K, Ueda N, Takasaka T. Expression and localization of the Na-K-2Cl cotransporter in the mammalian cochlea. Brain Res 765:324-326, 1997.
- 8) Ikeda K, Oshima T, Katori Y, Suzuki M, Furukawa M, Kikuchi T, Kawase T, Zheng J, Asada Y, Watanabe K, Takasaka T, Sugitani Y, Nakai S, Kuno J, Minowa O, Noda T. Auditory function in mice lacking POU transcription factor Brn-4. 34th Workshop on Inner Ear Biology, Abstract p. 34, 1997.

表 1

### Cloned Genes For Human Hereditary Nonsyndromic Deafness (Jan.99)

Human deafness	Gene	Location	Product	Model Mouse
DFNA3 DFNB1	Cx26	13q12 13q12	Connexin 26, gap junction protein	gene targeting in progress
DFNA1	DIAPH1	5q31	Diaphanous, bind to Rho and profilin	gene targeting in progress
DFN3	POU3F4	Xq21.1	Brn-4, ClassIII POU-domain transcription factor	Brn-4 KO mouse
DFNA15	POU4F3	5q31	Brn 3.1, ClassIV POU-domain transcription factor	Brn-3.1 KO mouse
DFNA11 DFNB2	MYO7A	11q12.3-q21 11q13.5	Myosin VIIA, unconventional myosin, required for normal stereocilia bundle organisation	shaker-1
DFNB3	MYO15	17p11.2	Myosin XV, unconventional myosin, involved in actin organization in the hair cells	shaker-2
DFNB4	PDS	7q31	Pendrin, sulphate transporter	not established
DFNA8 DFNA12	TECTA	11q22-q24 11q22-q24	$\alpha$ -tectorin, non-collagenous matrix of the tectorial membrane	not established
DFNA9	COCH	14q12-q13	COCH, isolated from a human fetal cochlear cDNA library, unknown function	not established
DFNA5	DFNA5	7p15	unknown	not established
N.D.*	Cx31	1p33-p35	Connexin 31, gap junction protein	not established

\*N.D.; not serially numbered

## V 研究成果の刊行に関する一覧表

〈雜 誌〉

Hoshino T, Mizuta K, Araki S, Araki K, Takeshita T et al.: Cochlear findings in the white spotting (Ws) rat. *Hear Res* (in submitting)

Mizuta K, Saito A, Watanabe T, Nagura M, Arakawa M, Hoshino T et al.: Ultrastructural localization of megalin in the rat cochlear duct. *Hear Res* in press

Morita H, Mizuta K, Hoshino T, Iwasaki S: Scanning electron microscopic study of the postnatal development of the rabbit cochlea, with an emphasis on innervation. *Scanning Microsc* 10: 165-176, 1996.

Iwasaki S, Mizuta K, Gao J, Wu R, Hoshino T: Focal microcirculation disorder induced by photochemical reaction in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 108: 55-64, 1997.

Iwasaki S, Nagura M, Miyashita H, Umemura K, Hoshino T: Focal damage to cochlear microcirculation measured using a non-contact laser blood flowmeter in guinea pigs. *Acta otolaryngol (Stockh)* 118: 666-672, 1998.

Iwasaki S, Mizuta K, Hoshino T: Tone burst-evoked otoacoustic emissions in cats with acoustic overstimulation and anoxia. *Hear Res* 118: 83-89, 1998.

Adachi M, Hoshino T, Mizuta K, Wu R: Ultrastructural findings of the macula utriculi in a case of a petrous apex cholesteatoma: a comparison with findings in a patient with an acoustic neuroma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 254: 255-258, 1997.

Ocho S, Iwasaki S, Umemura K, Hoshino T: Secondary degeneration of the organ of Corti due to photochemically induced strial degeneration. *Hear Res* (in submitting)

Nagura M, Iwasaki S, Wu R, Mizuta K, Umemura K, Hoshino T et al.: Effects of corticosteroid, contrast medium and ATP on focal microcirculatory disorders of the cochlea. *Eur J Pharmacol.* 366: 47-53, 1999.

Wu R, Hoshino T and Nagura M: Endocochlear potential in focal lesions of the guinea pig cochlea. *Hear Res* 128: 103-111, 1999.

Nagura M, Iwasaki S, Mizuta K, Umemura K, Hoshino T et al.: Role of nitric oxide in focal microcirculatory disorders in the guinea pig cochlea. *J Physiol (London)*. in submitting.

Fukushima K, Ueki Y, Smith RJH: DFNB5, 6, 7 -Homozygosity mapping to localize genes causing autosomal recessive non-syndromic hearing loss-. *Advances in Oto-Rhino-laryngology* in printing

Kawarai H, Nishizaki K, Fukuda S, Akagi S, Inokuchi I, Gunduz M, Masuda A, Nakashima T, Fukushima K, Masuda Y: Hearing immaturity found by ABR and its clinical impact on otoneurological evaluation. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl.* in printing

Nishizaki K, Fukushima K, Oda Y, Masuda A, Hayashi S, Nagayasu R, Masuda Y: Cochlear implantation for symptomatic hereditary deafness. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl.* in printing

福島邦博: 感音性難聴と遺伝子異常 専門医通信 56:16-17, 1998.

Matsuda K, Ueda Y, Haruta A, Tono T, Mitsuyama Y: Calcium-dependent and -independent release of glutamate in guinea pig perilymph measured by continuous fluorometry. Proc Sendai Ear Symposium 7 :63-65, 1997

Tono T, Ushisako Y, Kiyomizu K, Usami S, Abe S, Shinkawa H, Komune S: Cochlear implantation in a profound hearing loss patient with the 1555 A → G mitochondrial mutation. Am J Otol 19:754-757,1998

Usami S, Abe S, K. Tono T, Komune S, Shinkawa H: Isepamicin sulfate induced sensorineural hearing loss in patients with the 1555 A → G mitochondrial mutation - Case report - ORL 60:164-169,1998

Matsuda K, Ueda Y, Haruta A, Tono T, Komune S: High potassium-induced glutamate release in the cochlea: In vivo microdialysis study combined with on-line enzyme fluorometric detection of glutamate. Brain Res 794(2):343-346, 1998

Tono T, Ueki Y, Nagata N, Haruta A, Komune S: Effect of trimetaphan-induced deliberate hypotension on human cochlear blood flow. Acta Otolaryngol (Stockh) in press

Haruta A, Matsuda K, Tono T, Komune S, Matsubara A, Usami S: Changes of Perilymphatic Glutamate and Cochlear Blood Flow following Ischemia. Acta Otolaryngol (Stockh) in press

Matsubara A, Kawabata Y, Takumi Y, Usami S, Shinkawa H, Haruta A, Matsuda K, Tono T: A quantitative immunoelectron microscopic analysis of the glutamate-like immunoreactivity in the guinea pig organ of corti during ischemia. Acta Otolaryngol (Stockh) in press

Matsuda K, Ueda Y, Doi T, Tono T, Haruta A, Toyama K, Komune S: Increase in glutamate-aspartate transporter (GLAST) mRNA during kanamycin-induced cochlear insult in rats. Hear Res in submitting

Matsuda K, Komune S, Tono T, Yamasaki M, Haruta A, Kato E: A role of glutamate in drug-induced ototoxicity: In vivo microdialysis study combined with on-line enzyme fluorometric detection of glutamate. Brain Res in submitting

落合秀信、山川勇造、池田徳郎、東野哲也、杉本精一郎：蝸牛神経への神経血管減圧術にて耳鳴が消失した同側性三叉神経痛の1例 宮崎医学会誌 21:173-176, 1997

松田圭二、春田 厚、東野哲也、小宗静男、植田勇人、三山吉夫：微小透析法を用いたモルモット外リンパグルタミン酸測定. 頭頸部自律神経 Vol. 12, 26 ~ 29, 1998

堀之内謙一、東野哲也、外山勝浩、小池弥生、小宗静男：突発難聴で発症した橋、小脳脚梗塞の一例. Audiology Japan 41:249-254,1998

大迫 廣人、東野哲也、山崎正幸、牛迫泰明、小宗静男：アミドトリゾアート単剤療法に早期反応を示す突発性難聴症例の検討. Audiology Japan 41:112-117,1998

清水謙祐、東野哲也、楊 特文、春田 厚、小玉隆男、加藤栄司、小宗静男：耳硬化症における病的CT所見と聴力像の関係について. 耳鼻 44:757-763,1998

外山勝浩、東野哲也、牛迫泰明、森満 保、小宗静男：インターフェロンによるマウスABRの変化. 耳喉頭頸 70 : 529-523、1998

鍋倉 隆、東野哲也、植木義裕、坪井康浩、小宗 静男：突発性難聴再発例の蝸電図所見。Audiology Japan 投稿中

Hiyama S, Abe K, Mikuni H, Fukuda S, Inuyama Y: Type A fibril of the mouse tectorial membrane shows D-periodicity: an atomic force microscopic examination. Hear Res 124: 118-123, 1998

Hiyama S, Abe K, Mikuni H, Fukuda S, Inuyama Y :Imprints of outer hair cell stereocilia on the mouse tectorial membrane:an atomic force microscopic study. Proc Sendai Ear Symposium 7: 87-89,1997

Furuta Y, Fukuda S, Chida E, Takasu T, Ohtani F, Inuyama Y, Nagashima K :Reactivation of herpes simplex virus type 1 in patients with Bell' s palsy. J Med Virol 54:162-166,1998

Ohtani F, Furuta Y, Iino Y, Inuyama Y, Fukuda S : Amplification of RNA from archival celloidin-embedded human temporal bone sections by reverse transcription-polymerase chain reaction. Laryngoscope 109,1999 in press

坂本 徹、白土博樹、福田 諭、佐藤 信清、柏村正明、犬山征夫、影井兼司、加藤 功、澤村 豊、中川 雅史、鈴木恵士郎、北南和彦、井須豊彦：聴神経鞘腫に対するリニアック分割定位的放射線療法。耳喉頭頸 69：772-776,1997

福田 諭、古田 康 専門講座・耳鼻咽喉科の分子生物、分子遺伝学－内耳ウイルス感染－。日耳鼻 101：856-859、1998

坂本 徹、白土博樹、佐藤 信清、福田 諭、影井兼司、加藤 功、鈴木恵士郎：聴神経鞘腫に対するリニアック定位分割照射後の聴力変化。定位放射線治療 2：35-42、1998

坂本 徹、福田 諭、佐藤 信清、柏村正明、千田英二、犬山征夫：聴神経腫瘍の臨床像の10年間の推移。耳喉頭頸 70：579-583、1998

福田 諭：化膿性中耳炎 今日の治療指針1999 863-864、1999

古田 康、大谷文雄、福田 諭、犬山征夫：歯科治療後に発症した末梢性顔面神経麻痺症例におけるヘルペスウイルス再活性化 Facial N Res Jpn 18：135-137、1998

喜多村 健、田中秀隆、高橋克昌 指骨癒合症を伴う先天性アブミ骨癒着症。耳鼻臨床 91:218-219,1998.

玉川雄也、萩原秀夫、石田 孝、喜多村 健 地域集団における遺伝性感音難聴の分子遺伝学および聴覚医学的研究。平成9年度へき地住民の健康増進に関する研究等 財団法人地域社会振興財団 13-25,1998.

萩原秀夫、喜多村 健、芳賀雅士、石田 孝、梶 博幸、山際華子、石川和宏 前庭水管症候群9例の検討。耳鼻臨床 91:575-580,1998.

安田豊稔、石田 孝、喜多村 健 鼻アレルギーに対するKTPレーザー治療。耳鼻臨床 91:679-685,1998.

石川和宏、阿部弘一、西野 宏、五十嵐丈人、宮田 守、森田 守、喜多村 健 聴器癌の診療と予後の検討。耳喉頭頸 70(9)：568-572,1998.

佐藤貴恵, 松本千織, 喜多村 健, 横田英典, 藤井丈士, 石田 孝 両側小脳橋角部に発生した星状膠細胞腫例. 耳鼻臨床 91:1091-1095,1998.

Nishino H, Miyata M, Kitamura K: The effect of interleukin-6 on enhancing the invasiveness of head and neck cancer cells in vitro. Eur Arch Otorhinolaryngol 255:468-472,1998.

Hagiwara H, Tamagawa Y, Kitamura K, Kodera K: A new mutation in the POU3F4 gene in a Japanese family with X-linked mixed deafness (DFN3). Laryngoscope 108:1544-1547,1998.

西野 宏, 田中秀隆, 石川和宏, 金澤丈治, 宮田 守, 喜多村 健 少量 Cisplatin 併用 Tegafur · Uracil 投与が効果を示した喉頭癌頸部リンパ節再発の1例. 癌と化学療法 25:1973-1975,1998.

Yasuda T, Sakata Y, Madoiwa S, Mimuro J, Matsuda M, Kitamura K Fibrinolytic components in nasal secretion. Histochem Cell Biol 110:449-455,1998.

金澤丈治, 瀬嶋尊之, 石川和宏, 西野 宏, 宮田 守, 喜多村 健, 森田 守, 浦崎晃司, 加納紅代 高齢者の副鼻腔に原発した横紋筋肉腫の2例. 耳鼻臨床 92 : 51-55,1999.

喜多村 健, 石川和宏, 田中秀隆 当科におけるめまい・慢性中耳炎の診断と治療. 30の大学病院による診断と治療シリーズ めまい・慢性中耳炎の診断と治療. 真興交易医書出版部. 東京 31-41, 1998.

喜多村 健 遺伝子異常と難聴. 日医雑誌 119(6):2-3,1998.

Takahashi K, Kitamura K, Osawa N Age-dependent degeneration in the cochlea of Wriggle Mouse Sagami. Sendai Symposium Takasaka T (ed). Sendai 7:57,1997.

石田 孝, 喜多村 健 高齢者の聴覚障害. 高齢者の急性感音難聴. 高齢者の耳鼻咽喉科・頭頸部疾患-治療とリハビリのてびき増刊号 70:12-17,1998.

喜多村 健 遺伝子異常と難聴 毎日ライフ7月号特集企画 「耳鼻咽喉科の病気を治す」 15-17,1998.

玉川雄也, 喜多村 健 専門講座 耳鼻咽喉科領域の分子生物学, 分子遺伝子学. 日耳鼻会報 101:932-935,1998.

Sejima T, Kitamura K, Sugawara K Insertion of the transtympanic ventilation tube alleviates vertiginous attack of Meniere's disease. The International Tinnitus Journal 4 Suppl 1 66, 1998.

Kitamura K, Tamagawa Y, Kakoi H. Neurootological findings of autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. The International Tinnitus Journal 4 Suppl 1 38, 1998.

玉川雄也, 喜多村 健 分子モニター異常による感音難聴. 細胞 30:476-479,1998.

喜多村 健 遺伝子による臨床診断-難聴を例に 大宮市医師会報 514, 98 頁

Aoyagi M, Yoshida M, Makishima K : Different effects of noise and salicylate and their interactions on the guinea pig cochlea. Eur Arch Otorhinolaryngol 253:429-434,1996.



藤村和伸, 吉田雅文, 牧嶋和見 : CM 及び耳音響放射の  $2f_1-f_2$  歪成分に対する第 3 音の抑圧効果. 日耳鼻 100(8):839-845,1997.

吉田雅文, 藤村和伸, 牧嶋和見 : 電気刺激により誘発される耳音響放射. 日耳鼻 100(12):1459-1464,1997.

吉田雅文, 藤村和伸, 牧嶋和見 : 音受容機構に及ぼす音響曝露の影響. 北九州医工学会誌 19(1):15-16,1998.

Sagara T, Fujimura T, Furukawa H, Doi Y, Nishino T, Makishima K, Fujimoto S : Apical tubules in marginal cells of the differentiating stria vascularis. Anatomical Record 247(3):426-431,1997.

Fujimura T, Furukawa H, Doi Y, Makishima K, Fujimoto S : Immunoreactivity of Endothelins and Endothelin Receptor in the Stria Vascularis of the Mouse Cochlea. Hear Res 128:135-146,1999.

白石 剛, 佐藤祐司, 牧嶋和見 : 高気圧酸素療法による突発性難聴の治療. 日耳鼻 101(12):1380-1384,1998.

牧嶋和見, 吉田雅文, 藤村和伸 : 高周波数域オーディオメータの開発とその臨床応用. Audiology Jpn 39(2) : 158-163,1996.

花栗 誠, 牧嶋和見, 吉田雅文, 藤村和伸 : 高周波数域オーディオメータの臨床応用 ; シスプラチン投与時の聴覚障害の評価. Audiology Japan 41:304-308,1998.

清水 隆, 牧嶋和見, 吉田雅文, 山岸豪敏 : 日本人に対する英語語音聴力検査の試み. 日耳鼻 101(7):879-883,1998.

Nakashima T, Fukuta S, Yanagita N Hyperbaric Oxygen Therapy for Sudden Deafness. Adv Otorhinolaryngol 54; 100-109, 1998

Naganawa S, Itoh T, Fukatsu H, Ishigaki T, Nakashima T, Kassai Y, Miyazaki M, Takai H Three-dimensional Fast Spin-Echo MR of the Inner Ear: Ultra-Long Echo Train Length and Half-Fourier Technique. AJNR Am J Neuroradiol 19; 739-741, 1998

Naganawa S, Ito T, Fukatsu H, Ishigaki T, Nakashima T, Ichinose N, Kassai Y, Miyazaki M MR Imaging of the Inner Ear: Comparison of a Three-dimensional Fast Spin-Echo Sequence with Use of a Dedicated Quadrature-Surface Coil with Gadolinium-enhanced Spoiled Gradient-recalled Sequence. Radiology 208; 679-685, 1998.

中島 務, 加地美千子, 伊藤彰英, 朝日清光  
突発性難聴の長期経過. Audiology Japan 41; 89-93, 1998

中島 務 内耳窓破裂症 日本醫事新報 No.3851, 33-36, 1998.

中島 務 気圧変化の内耳への影響 JOHNS 14; 1502-1503, 1998.

中島 務 日常生活での聴機能の推定 日本醫事新報 No.3850, 113-114, 1998.

Usami S, Abe S, Tono T, Komune S, Kimberling WJ, et al. Isepamicin sulfate-induced sensorineural hearing loss in patients with the 1555A → G mitochondrial mutation. ORL. 1998;60:164-169.

Usami S, Abe S, Shinkawa H, Kimberling WJ. Sensorineural hearing loss caused by mitochondrial DNA mutations: special reference to the A1555G mutation. *J Commun Disord.* 1998;31:423-434.

Tono T, Ushisako Y, Kiyomizu K, Usami S, Abe S, et al. Cochlear implantation in a patient with profound hearing loss with the 1555A → G mitochondrial mutation. *Am J Otol.* 1998;19:754-757.

宇佐美真一、阿部聡子、工穰、コネキシン(CX)26と難聴、細胞;1998 ; 30 : 472 - 475 .

新川秀一、宇佐美真一、ミトコンドリア DNA1555 変異による難聴、耳鼻臨床 ; 1998 ; 91 : 661 - 668 .

Usami S, Abe S, Weston M, Shinkawa H, Van Camp G, et al. Non-syndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct is caused by PDS mutations. *Hum Genet.* 1999 in press.

Abe S, Usami S, Shinkawa H, Weston MD, Overbeck LD, et al. Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA in Japanese pedigrees of sensorineural hearing loss associated with the A1555G mutation. *Eur J of Hum Genet.* 1999 in press.

Abe S, Usami S, Hoover D, Cohn E, Shinkawa H, et al. Fluctuating sensorineural hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct maps to 7q31, the region containing the Pendred gene. *Am J Med Genet.* 1999 in press.

Usami S, Abe S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ. A new connexin 26 gene (GJB2) mutational hot spot in Japanese nonsyndromic hearing loss patients, submitted.

Usami S, Abe S, Shinkawa H, Deffenbacher K, Kimberling WJ. et al. Nonsense mutation of EYA1 in Japanese Branchio-Oto-Renal syndrome family, submitted.

J. Aruga, O. Minowa, H. Yaginuma, J. Kuno, T. Nagai, T. Noda, and K. Mikoshiba. (1998) Mouse *Zic1* is involved in cerebellar development. *J. Neurosci.*, 18(1):284-293.

J. Toshima, K. Nakagawara, M. Mori, T. Noda and K. Mizuno. (1998) Structural organization and chromosomal localization of the mouse *Tesk1* (testis-specific protein kinase 1) gene. *Gene*, 206:237-245.

Y. Doi, M. Kurita, M. Matsumoto, T. Kondo, T. Noda, S. Tsukita, S. Tsukita and T. Seya. (1998) Moesin is not a receptor for measles virus entry into mouse embryonic stem cells. *J. Virol.*, 72(2): 1586-1592.

Y. Yonekawa, A. Harada, Y. Okada, T. Funakoshi, Y. Kanai, Y. Takei, S. Terada, T. Noda and N. Hirokawa. (1998) Defect in synaptic vesicle precursor transport and neuronal cell death in *DIF1A* motor protein-deficient mice. *J. Cell Biol.*, 141: 431-441.

M. Saitou, K. Fujimoto, Y. Doi, M. Itoh, T. Fujimoto, M. Furuse, H. Takano, T. Noda and S. Tsukita. (1998) Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J. Cell Biol.*, 141(2) : 397-408.

H. Kawate, K. Sakumi, T. Tsuzuki, Y. Nakatsuru, T. Ishikawa, S. Takahashi, H. Takano, T. Noda and M. Sekiguchi. (1998) Separation of killing and tumorigenic effects of an alkylating agent in mice defective in two of the DNA repair genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 5116-5120.

H. Takeshima, S. Komazaki, K. Hirose, M. Nishi, T. Noda and M. Iino. (1998) Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *EMBO J.*, 17: 3309-3316.

T. Manabe, Y. Noda, T. Mamiya, H. Katagiri, T. Houtani, M. Nishi, T. Noda, T. Takahashi, T. Sugimoto, T. Nabeshima and H. Takeshima. (1998) Facilitation of long-term potentiation and memory in mice lacking nociceptin receptors. *Nature*, 394: 577-581.

S. Hiratsuka, O. Minowa, J. Kuno, T. Noda and M. Shibuya. (1998) Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 9349-9354.

H. Okada, T. Watanabe, M. Niki, H. Takano, N. Yanai, K. Tani, H. Hibino, S. Asano, Y. Ito, T. Noda and M. Satake. (1998) The AML1(-/-) embryos do not express a set of hematopoiesis-related gene transcripts including that of PU.1. *Oncogene*, 17: 2287-2293.

S. Katamine, N. Nishida, T. Sugimoto, T. Noda, S. Sakaguchi, K. Shigematsu, Y. Kataoka, A. Nakatani, S. Hasegawa, R. Moriuchi and T. Miyamoto. (1998) Impaired motor coordination in mice lacking prion protein. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 18(6):731-742.

K. Shiba, H. Motegi, M. Yoshida and T. Noda. (1998) Human asparaginyl-tRNA synthetase: Molecular cloning and the inference of the evolutionary history of Asx-tRNA synthetase family. *Natl. Acad. Res.*, in press.

佐藤美奈子、神崎 仁. 突発性難聴グレーディングの試み. *Audiology Japan* 41:130-134,1998.

保谷則之、小川 郁、井上泰宏、斎藤秀行、原田竜彦、佐藤美奈子、神崎 仁. 聾型突発性難聴の臨床像. *Audiology Japan* 41:765-769,1998.

神崎 仁、松永達雄. 聴神経腫瘍. 五十嵐 真監修「神経耳科学」金芳堂、東京、pp227-247,1998.

神崎 仁、原田竜彦. 耳音響放射. *JOHNS* 15:11-17,1999.

J. Kanzaki, K. Ogawa, Y. Inoue, R. Shiobara, S. Toya. Quality of hearing preservation in acoustic neuroma surgery. *Am J Otol* 19:644-648,1988.

Y. Inoue, J. Kanzaki, K. Ogawa, K. Hashiguchi, M. Masuda. Hearing in the MRL/lpr mouse as a possible model of immune-mediated sensorineural hearing loss. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 255:240-243,1998.

Y. Sato, J. Kanzaki, T. O-Uchi, S. Yoshihara. Age-related changes in transiently evoked otoacoustic emissions and distortion product otoacoustic emissions in normal-hearing ears. *Auris Nasus Larynx* 25:121-130,1998.

#### <単行本>

岩崎 聡、星野知之：当科における耳鳴の治療－難治性耳鳴に対する岬角電気刺激療法－. 30の大学病院による診断と治療シリーズ、耳鳴・難聴の診断と治療. 真興交易医書出版：146-154頁, 1998.

Smith RJH, Ramesh A, Srisailapathy CRS, Fukushima K, Wayne S, Chen A, Van Laer L, Ashley J, Zbar RIS, Lovett M, van

Camp G: Homozygosity mapping applied to hereditary hearing impairment - localizing recessive deafness genes (Chpt. 13).  
Developments in Genetic Hearing Impairment., ed.by Stephens D, Read A, Martini A. Whurr Publishers: pp77-90,1998.

宇佐美真一、難聴の遺伝子解析、「神経耳科学」高橋正紘、武田憲昭、金芳堂、57-66、1998

Usami S, Abe S, Akita J, Shinkawa H, Kimberling WJ. Sensorineural hearing loss associated with the mitochondrial mutations. In: Adv Otolaryngol. (Karger) 1999 in press.

Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kimberling WJ. Sensorineural hearing loss caused by the A1555G mutation in the mitochondrial DNA. In: Hirosaki International Forum of Medical Sciences (Elsevier) 1999 in press.