

## 考 察

有毛細胞には直接血行がなく有毛細胞に到達するには内リンパ内へのエダラホノの移行が必要なため、内リンパでのエダラホノ濃度が十分でなかった可能性があった。

障害間の有毛細胞障害がみられるまで2～3日あり、遅発性の障害であるためエダラホノ投与期間の検討が必要と思われた。

実際の臨床では14日以内の連続投与となっているが、今回我々は1回投与であった。

しかし、臨床上腎障害のリスクが報告されている為、多量投与も難しいと思われた。

これらを踏まえ、今後薬剤投与経路や時間、量などの検討が必要と考えられた。

## 結 論

蝸牛多発血管条障害モデルにおけるフリーランカルスカヘンジャーの効果を形態的に検討した。

今回のエダラホノ経静脈投与の条件では、血管条障害部位、障害間の有毛細胞に形態的な障害改善傾向は認められなかったが、今後、投与方法など更なる検討が必要と思われた。

## 健康危険情報

なし

## 研究発表

- 1 論文発表  
なし
- 2 学会発表  
なし

## 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得  
なし
- 2 実用新案登録  
なし
- 3 その他  
なし

## 虚血性内耳障害に対する再生治療の基礎的研究

分担研究者 暁 清文 (愛媛大学耳鼻咽喉科)  
共同研究者 白馬 伸洋、谷口 昌史、前谷 俊樹  
清水 義貴、盛実 勲  
(愛媛大学耳鼻咽喉科)

### 研究要旨

虚血性内耳障害の動物モデルを用いて、蝸牛内に投与した神経幹細胞がコルチ器へ移行し有毛細胞に分化していく、内耳における再生治療の可能性についての検討を行った。その結果、内耳虚血翌日に神経幹細胞を蝸牛内に投与すると、虚血4日目のコルチ器において脱落した内有毛細胞の部位に、幼弱な神経細胞のマーカータであるネスチン陽性の細胞の存在が確認された。すなわち虚血性内耳障害に対し、神経幹細胞は脱落した有毛細胞として再生する可能性があることが証明された。

### 研究目的

様々な細胞に分化していく神経幹細胞は、内耳においても有毛細胞に分化していく可能性が報告されている<sup>1)</sup>。本研究では、神経幹細胞を蝸牛内に注入し、一過性内耳虚血動物モデルにおける内有毛細胞再生効果について検討を行った。

### 研究方法

(スナオズミ神経幹細胞採取 培養)

妊娠17日目のスナオズミより胎児を摘出。実体顕微鏡下に胎児の大脳 中脳より海馬および線条体を摘出。BFGFを含む培養液中にて、海馬は3日間、線条体は7日間の培養を行い、colony 形成しているものからsubcultureし、パパイン処理の後、神経幹細胞を採取する。

(スナオズミ幹細胞蝸牛内注入および一過性虚血負荷)

ハロセン吸入麻酔下に仰臥位にて耳胞を開放し、マニピュレータを用いて先端300 $\mu$ m径の微細カラス管を正円窓に挿入し固定した。マイクロインフュージョンポンプによって、神経幹細胞50,000/4 $\mu$ lを鼓室階に注入した。注入翌日に頸部正中切開

を施行して両側の椎骨動脈を露出し、血流を15分間遮断、再開通することにより一過性内耳虚血を負荷した。

(ネスチン染色)

虚血4日後に4%パラホルムアルデヒドにて経心灌流固定の後、速やかに蝸牛骨胞を摘出した。さらに同液にて2時間浸漬固定後、surface preparationにて基底回転のコルチ器を採取し、ネスチン抗体を用いてDAB染色を行い、内有毛細胞における幼弱な神経細胞について染色を行った。

また反対側の蝸牛は、虚血障害の判定を行うためRhodamine-PhalloidinおよびHoechst33342による二重染色を行い、蛍光顕微鏡下に有毛細胞の脱落細胞割合の測定を行った。

(倫理面への配慮)

実験は十分な麻酔下で行い、断頭時も多量の麻酔下で苦痛を与えずに行った。

### 研究結果

(スナオズミ神経幹細胞採取 培養)

培養されたスナオズミ神経幹細胞を図1に示した。海馬では培養3日目、線条体では培養7日目に良好なcolonyの形成が認められた。

(ネスチン染色)

Rhodamine-PhalloidinおよびHoechst33342による二重染色により、蝸牛基底回転における25%の内有毛細胞脱落が認められた。

ネスチン抗体を用いたDAB染色では、内有毛細胞が脱落していると思われるほとんどの部位に、DAB陽性細胞が認められた。

以上の結果から スナオズミ神経幹細胞は一過性内耳虚血障害後の脱落した内有毛細胞の部位に移行していくことが示された。

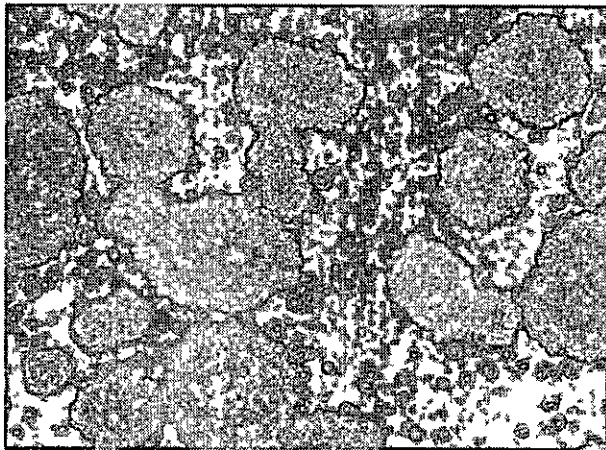


図1 スナネスミ神経幹細胞

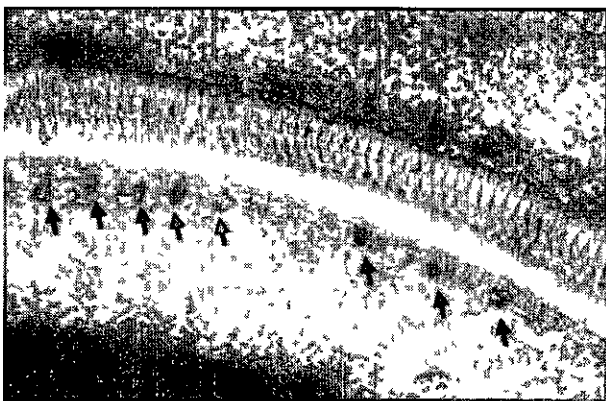


図2 有毛細胞におけるネスチン染色

## 考 察

ヒトの有毛細胞は一旦障害されて消失した場合、鳥類のような自己再生能力は持たない。胎児の神経幹細胞は自己複製能と分化能を有することからもし神経幹細胞移植により有毛細胞の再生が可能となれば、様々な原因による高度難聴の治療が可能になる。今回、スナネスミ胎児より海馬および線条体由来の神経幹細胞の採取・培養を行い、これを虚血負荷後の内耳に投与した結果、脱落した有毛細胞の部位に神経幹細胞の発現が認められた。

今後は移行した神経幹細胞が成熟な有毛細胞に分化していくかについて検討を進める予定である。これにより今まで有効な治療法がなかった虚血性内耳障害の新たな治療法の開発をめさす。

## 結 論

今回の研究により、内耳虚血障害後にスナネスミ神経幹細胞を投与した場合、虚血により脱落した内有毛細胞の部位に移行していくことより、将来虚血性内耳障害に対して神経幹細胞を用いた再生治療が有効である可能性が示唆された。

## 参考文献

- 1) Ito J, Kojima K, Kawaguchi S Survival of neural stem cells in the cochlea  
Acta Otolaryngol 2001 Jan,121(2) 140-2

## 研究発表

### 1 論文発表

- 1) Taniguchi M, Hakuba N, Koga K, Watanabe, Hyodo J, Gyo K Apoptotic hair cell death after transient cochlear ischemia Neuroreport 20,13 2459-62 2002
- 2) Koga K, Hakuba N, Watanabe F, Shudou M, Gyo K Transient cochlear ischemia causes delayed cell death in the organ of Corti: an experimental study in gerbils J Comp Neurol 2003 Feb 3,456(2) 105-11
- 3) Hakuba N, Watabe K, Hyodo J, Ohashi T, Etou Y, Taniguchi M, Yang L, Tanaka J, Hata R, Gyo K Adenovirus-mediated overexpression of a gene prevents hearing loss and progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils Gene Therapy 2003 Mar,10(5) 426-33

### 2 学会発表

未発表

## 知的財産権の出願・登録状況

### 1 特許取得

なし

### 2 実用新案登録

なし

### 3 その他

なし

## 内耳における水チャンネルの局在、分布の検討

分担研究者 星野 知之 (浜松医科大学耳鼻咽喉科)  
共同研究者 名倉三津佳、岩崎 聡、竹下 有  
橋本 泰幸、大嶋 吾郎、臼井 広明  
(浜松医科大学耳鼻咽喉科)

### 研究要旨

内耳における水チャンネル(aquaporins AQP)の局在および発達過程における発現量の変化を検討した。これまで報告のあったAQP1、4、5に加えて、AQP3、7、9の発現を認め、多くの場合細胞特異的な局在を認めた。また、AQP1、4の発現量は生後劇的に増加した。

### 研究目的

内耳における内リンパ 外リンパ間の水輸送は、内耳の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。内耳においても水チャンネル(aquaporins AQP)が発現していることは既に報告されているが<sup>1)2)3)</sup>、その発現量の差や局在における詳細な検討は未たなされていない。今回我々は、蝸牛、前庭、内リンパ嚢におけるAQPの局在、発生学的な発現量の変化を検討した。

### 研究方法

成熟および胎生14、18日、生後1、3、5、10、15日のマウスを使用した。AQP1~9のmRNAの発現を、トットプロットアッセイ、半定量的PCRにて検討した。AQPの局在は免疫染色にて検討した。(倫理面への配慮)

一連の実験は十分な麻酔下に行い、組織採取時多量の麻酔下で苦痛を与えずに断頭した後に行った。

### 研究結果

これまで報告のあったAQP1、4、5に加えて、AQP3、7、9の発現を認めた。AQP3は蝸牛では基底板付近のラセン韌帯およびラセン板縁のfibrocyteに認めた。AQP7はライソネル膜に強く、

支持細胞、基底板、血管条辺縁細胞に中等度発現していた。AQP9はライソネル膜、歯間細胞、内ラセン溝に発現を認めた。また、AQP1、4の発現量は生後劇的に増加した。との発達段階においても蝸牛における発現量は、前庭における発現量を上回っていた。

### 考 察

腎臓、気道、眼球など組織間の水輸送が非常に重要な臓器では、幾種類ものAQPが発現し、それぞれ特異的な役割を果たしている。内耳でも内リンパ、外リンパという組成の異なる液体が存在し、80mVもの強大なendocochlear potentialを発生させるために強力な電解質輸送システムがあるという特異な環境にあり、多数のAQPの存在が予想されていたか、今回の結果はそれを裏付けるものであると思われた。また、内リンパ外リンパが整然と局在している蝸牛におけるAQPの発現量が前庭の発現量より多いという事実も興味深い。以上より、内耳におけるAQPのほとんどオーバーラップのない局在 分布は、その高度に洗練された水輸送に重要な役割を果たしていると思われた。

### 参考文献

- 1) Mahtre, A N, Steinbach, S, Kambridge, H, Shamsul Hoque, A S, Identification of aquaporin 5 (AQP5) within the cochlea cDNA cloning and in situ location Biochem Biophys Res Comm 264, 157-162, 1999
- 2) Stankovic, K M, Adamas, J C, Browb, D Immunolocalization of aquaporin CHIP in the guinea pig inner ear Am J Physiol 269, C1450-C1456, 1995

- 3) Takumi, Y, Nagelhus, EA, Eidet, J, Matsubara, A, Usami, S, Shinkawa, H, Neilsen, S, Ottersen, OP Select types of supporting cell in the inner ear express aquaporin-4 water channel protein Eur J Neurosci 10, 3584-3595, 1998

#### 研究発表

- 1 論文発表  
なし
- 2 学会発表  
なし

#### 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得  
なし
- 2 実用新案登録  
なし
- 3 その他  
なし

## 実験的内リンパ水腫動物の聴覚に対する脱水負荷の影響

分担研究者 岡本 牧人 (北里大学耳鼻咽喉科)  
共同研究者 長沼 英明 (北里大学耳鼻咽喉科)  
河原 克雅、鈴木 喜郎 (北里大学生理学)  
山科 正平 (北里大学解剖学)

### 研究目的

これまで内リンパ水腫の発生メカニズムは解明されていない。しかし内リンパ水腫の発生に、内リンパ嚢における Vasopressin に対する V-2 receptor や水チャネル AQP-2 が関与している報告 (Takedaら<sup>1)</sup>) が散見される。

我々はこれまでの報告で Vasopressin の腹腔内投与における実験的内リンパ水腫動物モデルが、聴覚障害を起こしうるかを検討し、聴覚障害を確認してきた。この結果より、実際のメニエール病の発生においても Vasopressin、V-2 receptor、水チャネル AQP-2 が関与している可能性が示唆された。

そこで本研究では、

- 1) 実験 1 Vasopressin の腹腔内投与による実験的内リンパ水腫動物モデルにおける聴覚障害の経時的変化、
  - 2) 実験 2 同実験動物モデルの聴覚に対する脱水負荷の影響、
- について検討した。

### 研究方法

#### 実験 1

5 匹 (コントロール群は 5 匹) の 100-240g の Wistar 系ラットを用いた。35mg/kg のノンフタルによる麻酔下に頭頂骨に銀メッキを施した直径 1mm のヒスを頭頂部正中耳介付着部前縁、外眼角の高さの前額部に固定しそれぞれ関電極、不関電極とした。ABR の測定は Click を用い、加算回数は 512 回で、70dB から 10dB 毎に 0dB まで測定し、第 1 波の出現最低音圧を ABR 閾値とした。測定後、0.02units/g の AVP (Pitressin, Arg-vasopressin, Sankyo, Japan) を腹腔内に投与した。(コントロール群 同量の生理食塩水) その後 10 分後、30 分後、

60 分後、以後 30 分毎に 210 分後まで ABR 閾値を測定した。投与前に比して 20dB 以上の閾値の上昇を聴覚の低下 低下後投与前の 10dB 以内に改善した場合を回復とした。

#### 実験 2

4 匹の Wistar 系ラット (100-240g) に対して 24hr の水分摂取制限を行い (その前後で尿の浸透圧を測定) 実験 1 と同様に ABR 閾値を測定した。

### 研究結果

#### 実験 1

- 1 Vasopressin の投与後に聴覚が低下した耳は 6 耳/10 耳 (60%) であった。(5 例/5 例)
- 2 ABR 閾値の上昇が最大に達する時間は多くか 30 分-120 分後であった。
- 3 聴覚の低下した耳のうち回復が認められた耳は 3 耳/6 耳 (50%) であった (3 例/5 例 60%)。またこの聴覚の低下の程度、閾値が最大値に達するまでの時間に両側耳の間で差が存在した。
- 4 Vasopressin の投与は腹腔内に行っているにもかかわらず一側だけに聴覚の低下が認められる例が多かったこと (4 例/5 例、80%)、聴覚低下の程度、閾値の最大に達するまでの時間に両側の耳の間で差が存在したことも 実際のメニエール病に類似した反応と考えられた。
- 5 コントロール群では聴覚が低下した耳はなかった。

#### 実験 2

水分制限前後の尿浸透圧の平均はそれぞれ

877mosm/kg, 3031mosm/kgで有意( $p < 0.0001$ )に尿浸透圧は上昇した。

- 1 Vasopressinの投与後に聴覚が低下した耳は4耳/8耳(50%)であった。(3例/4例)
- 2 聴覚の低下した耳のうち、回復が認められた耳は4耳/4耳(100%)であった。またこの聴覚の低下の程度は実験1に比して高度で、また閾値が上昇するまでの時間は、ほぼ10分であり実験-1に比して早期であった。
- 3 また、一側のみ聴覚の低下が認められる例は2耳/3耳(66%)であった。

## 考 察

### 実験1

Vasopressin投与後に聴覚が低下する現象を本研究では経時的に観察した。これまでの報告により実験動物においてVasopressin投与後に内リンパ水腫関連疾患において血中Vasopressinが高値であること(Takedaら<sup>2)</sup>)などが報告されているがこの報告に今回の本研究の結果を加え、総合的に考えると実際のメニエール病においてその発作には血中Vasopressinが関与していることが想定された。

本研究において一度聴覚が低下した後再び回復がみられたことは本実験動物に生じた病態は実際のメニエール病と非常に類似していると考えられた。

また、Vasopressinを腹腔内に投与したことは全身投与したことになるか、にもかかわらず、聴覚の低下か一側のみ存在した理由は今後の課題であるが一つの仮説としてV-2 receptorの感受性または閾値に左右差があるのではないかと考えられた。

### 実験2

脱水負荷実験的内リンパ水腫動物モデルではその多くでVasopressin投与後10分以内に一側の聴覚が低下した。脱水負荷をしない場合、Vasopressinを投与した後30~120分で聴覚が低下したことに比べて非常に早期に聴覚が低下していた。そのことは脱水負荷により、水チャンネルAQP-2が細胞内に合成され、Vasopressinの投与でAQP-2が細胞内に移動し、その結果水が血中から内リンパに移動して内リンパ水腫が形成されたものと考えられた。

脱水負荷は内リンパ水腫の発生準備状態を生じさせる可能性が示唆された。

## 結 論

- 1 内リンパ水腫動物モデルを作製し、聴覚の経時変化を観察した。
- 2 また、同モデルにおける脱水負荷の聴覚に対する影響について検討した。
- 3 Vasopressinか内リンパ水腫疾患における聴覚低下発作に関係する可能性が示唆された。
- 4 脱水負荷は内リンパ水腫の発生準備状態を生じさせる可能性が示唆された。

## 参考文献

- 1) Takeda, T, Takeda S, Kitano, H et al Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin Hear Res 140 1-6, 2000
- 2) Takeda, T, Kakiki, A, Saito, H Antidiuretic Hormon (ADH) and Endolymphatic Hydrops Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl 519 219-222, 1995

## 健康危険情報

なし

## 研究発表

- 1 論文発表  
なし

- 2 学会発表

本研究は第61回日本めまい平衡医学会総会 学術講演会にて口演発表した。

## 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得  
なし
- 2 実用新案登録  
なし
- 3 その他  
なし

## 聴覚路におけるCdk5によるシナプス伝達の制御

分担研究者 喜多村 健 (東京医科歯科大学耳鼻咽喉科)  
共同研究者 鷹合 秀輝 (東京医科歯科大学耳鼻咽喉科)  
高橋 智幸 (東京大学大学院神経生理)

### 研究要旨

Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk 5) は細胞分裂を行わない神経細胞に特異的に分布し、成長円錐の伸長<sup>1,2)</sup>、タウ蛋白のリン酸化によるapoptosis<sup>3)</sup>の誘導などに関与することが知られている。また最近、海馬においてCdk 5 がシナプス伝達を制御していることが報告された<sup>4)</sup>。今回、聴覚伝導路においてCdk 5 がシナプス伝達の制御に関与している可能性について検討した。

### 研究目的

聴覚伝導路において、Cdk 5 がグルタミン酸を神経伝達物質とするシナプス伝達に関与している可能性について検討する。

### 研究方法

Wister-rat (生後13-15日齢) を対象とした。実験系としてパッチクランプ法を用い、上オリブ複合体の台形体核 (MNTB) を標的とした。脳幹スライス (厚さ 150-250  $\mu$ m) を 36°C の artificial CSF にて 1 時間 incubation してから室温に戻し、正立顕微鏡 (Axoskop Carl-Zeiss) のステーン上に固定した。Bipolar 刺激電極により前腹側蝸牛神経核 (AVCN) の軸索から活動電位を誘発し (0.1 Hz)、電極抵抗 2-4 M $\Omega$  の patch pipette を用い、台形体核から Evoked EPSC を記録した。(EPC-7 List-Electronic) 細胞外還流液 (CSF+Bicuculline+Strychnine) に Cdk 5 inhibitor (roscovitine, olomoucine) を投与し、その前後での EPSC の変化を解析した。(pClamp8.1 Axon Instruments) また、DAT に保存したデータを用い、Spontaneous EPSC の解析も行った。(Minianalysis Synaptosoft)  
Artificial CSF の組成 (mM) NaCl 120, KCl 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 26, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> 1, D-

glucose 10, myo-inositol 3, sodium pyruvate 2, ascorbate 0.5

ピペレット内液の組成 (mM) CsF 110, CsCl 30, HEPES 10, EGTA 5, MgCl<sub>2</sub>, QX-314 5  
(倫理面への配慮)

本研究は東京大学大学院医学系研究科機能生物学専攻神経生理学教室にて実施された。実験動物の取り扱いについては、東京大学大学院の倫理委員会により承認を受けている。

### 研究結果

- (1) Roscovitine (50  $\mu$ M) の Evoked EPSC への影響  
Roscovitine (50  $\mu$ M) により、Evoked EPSC は  $174 \pm 12\%$  (n=4) に増大された。(図 1)
- (2) Roscovitine (50  $\mu$ M) の Spontaneous EPSC への影響  
Roscovitine (50  $\mu$ M) により、Spontaneous EPSC のイヘント間の潜時が短縮した。(図 2) 振幅については、Control の平均が 56 pA、Roscovitine 投与後の平均が 58 pA であり、Kolmogorov-Smirnov 検定にて p=0.065 と有意差は認められなかった。(図 3)
- (3) Olomoucine (100  $\mu$ M) の Evoked EPSC への影響  
Olomoucine (100  $\mu$ M) により Evoked EPSC は  $118 \pm 3\%$  (n=4) に増大された。(図 4)

### 考察

Cdk 5 inhibitor により台形体核の Evoked EPSC が増大した。これにより、Cdk 5 が聴覚伝導路においてシナプス伝達に関与している可能性が示唆された。Spontaneous EPSC の解析により、シナプス後部でのグルタミン酸受容体への影響はなく Cdk 5 はシナプス前部で制御を行っている可能性が高いと考えられた。



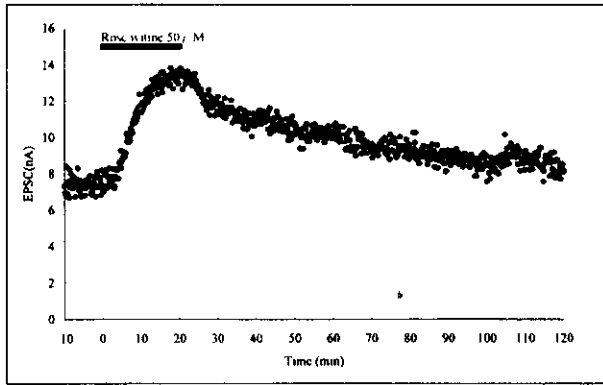


図1 RoscovitineのEvoked EPSCへの影響

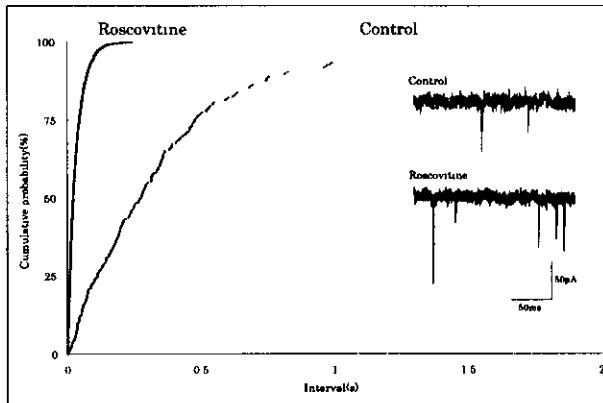


図2 RoscovitineによるSpontaneous EPSCのイベント間潜時の変化

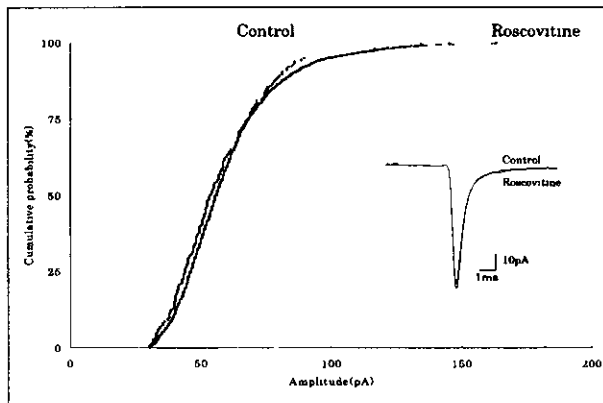


図3 RoscovitineによるSpontaneous EPSCの振幅の変化

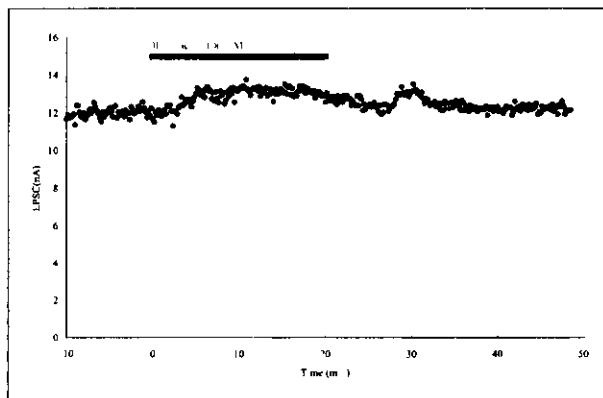


図4 OlomoucineのEvoked EPSC

### 参考文献

- 1) Chae T, Kwon Y, Bronson R et al Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality *Neuron* 18 29-42, 1997
- 2) Ohshima T, Ward JM, Huh CG et al Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death *Proc Natl Acad Sci USA* 93 11173-11180, 1996
- 3) Ahljanian MK, Barrezueta NX, Williams RD et al Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5 *Proc Natl Acad Sci USA* 97 2910-2915 2000
- 4) Tomizawa K, Ohta J, Matsushita M et al Cdk5/p35 regulates neurotransmitter release through phosphorylation and downregulation of P/Q-type voltage-dependent calcium channel activity *J Neurosci* 22(7) 2590-2597, 2002

### 研究発表

- 1 論文発表  
なし
- 2 学会発表  
なし

### 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得  
なし
- 2 実用新案登録  
なし
- 3 その他  
なし

# マウスミュータジェネシスによる難聴モデルマウス樹立の試み

研究協力者 美野輪 治 (理化学研究所 ケノム科学総合研究センター)

## 研究要旨

聴覚異常変異体マウスの樹立とその詳細な解析は、症候群性、非症候群性いずれの場合のヒト難聴モデルとしても、その、原因と治療法を考える上で極めて有用である。本研究において、我々はマウスENUミュータジェネシスプロジェクトの一環として、多岐にわたる優性表現型検索法の中で、効率的に聴覚異常マウスの検索・解析を実施することが可能な方法を確立した。これを用いて、多数の新規聴覚変異体マウスの単離を試み、現在までのところ、22の優性聴覚異常系統の樹立に成功した。

## 研究目的

ENU誘発マウス突然変異体の開発を体系的に行い、効率的に聴覚変異体マウスを単離・解析する事によりヒト難聴モデルたりうる新規マウス系統を多数樹立する。

## 研究方法

G0マウスの作製のために、8週齢のC57BL/6J雄マウスに100mg/kgの変異原ENUを週1回計3回投与し4週間単飼後、ICR雌マウスに対する不妊テストを4週間行った。これらG0マウスの初回ENU投与13週後からG1マウス生産のためのDBA/2J雌マウスとの交配を実施した。本研究全般は、コンピューターネットワークにより管理され、マウス育成管理ソフトウェア(動物搬入、個体カート管理、出生登録、死亡記録、交配記録等の系統管理)、ミュータジェネシス管理ソフトウェア(ENU投与情報、G0個体記録、テスト交配記録)、表現型スクリーニングソフトウェア(Modified-SHIRPA, 聴覚テータ入力)を、テータ記録管理のために用いた。Modified-SHIRPA法スクリーニングにおける驚愕反応検査(クリックボックス)により見出されたG1聴覚異常マウスの解析(primary

characterization)のために、聴性脳幹反応(ABR)測定装置を用いて、これらの変異体候補の聴覚異常の特性を解析した。

(倫理面への配慮)

ヒト及びヒト由来材料は扱わない。実験用マウスに関しては、手術、屠殺、その他取り扱いについて、苦痛除去に留意し、実験開始の前に、その方法、計画について理化学研究所実験動物委員会の承認を受けている。

## 研究結果

### (1) 聴覚変異体スクリーニング法の検討

MRC(英国)で実施されている、クリックボックスによる驚愕反応検査法は、極めて簡便であるため、スクリーニングには適している反面、軽度の難聴を検知できない恐れがある点や、周波数依存性が調べられない点が、欠点であり、装置に改良の余地があるとされた。一方、小型の聴覚ボックスを防音できるように設計し、音圧20—100dB周波数500—30KHzの範囲で可変的に適用することにより、聴覚閾値の周波数依存性を半定量的にしらへる事は可能と考えられたが、マウスの反応を目視で判定するため、経験と校正テータの蓄積が必要である。耳音響反射は、大別してDPOAE, SOAE, EOAEの3種が知られているが、マウスの大規模スクリーニングに用いるのには、DPOAEを用いる耳音響反射測定法が最適と考えられる。この方法は、内耳機能の周波数特性を、短時間に簡便に、しかも高感度で検索できる方法であり、ヒトではすでに、簡便な測定装置が完成している。しかしながらこれをマウスに適用するには、probeの形態・性状を最適化する必要があり、またマウスの可聴領域に合わせて解析周波数の高周波領域への拡大が必要と考えられた。

### (2) 聴覚変異体解析法の検討

得られた変異体について、聴覚異常の特性を解

析する方法として、ABR法、AP法、Endochoclear Potential, choclear microphonics 等の生理学的測定が、考えられたが、primary characterizationとしての解析にはABR法を採用した。また、これは、驚愕反応試験の結果を閾値という形で厳密に定量化できるので、スクリーニングの信頼性を高めるのにも大きく貢献した。

### (3) 系統間格差の問題

G1の系統である、DBF1、その親系統である、C57BL/6J, DBA/2Jについて、系統間差、加齢による聴力低下の傾向を、ABRの閾値の測定により評価した。10週齢に於ける閾値は、C57BL/6J, 19.6dB(N=56), DBF1, 15.3dB(N=6), DBA/2J, 68.6dB(N=6)であり、DBA/2Jは、この週齢ですべてに難聴であった。C57BL/6J, DBF1ともに、50週齢では、難聴を示した。従って、少なくとも変異体単離のためのG1のスクリーニングは10週齢前後で行う事が必須である。

### (4) 聴覚変異体の単離

早期表現型のスクリーニング法であるModified-SHIRPA法における驚愕反応検査(クリックホックス)によりG1を10236匹スクリーニングした。驚愕反応に異常が認められた25匹のG1について、聴性脳幹反応(ABR)測定装置を用いて、各変異体候補の聴覚異常の特性を解析した。25匹中ABR測定により、聴覚異常と判定されたのは、22候補であった。これら各候補の表現型は全て遺伝性を示した。

## 考 察

ヒト遺伝性非症候群性難聴は、現在まで、優性、劣性、X染色体連鎖遺伝様式を合わせて、70以上のlociが知られている。この内、原因遺伝子の同定されたものは、半数以下であるが、これらの遺伝子の産物から推定される内耳における障害は、それぞれ、コルチ器、血管条、ラセン靭帯、ラセン神経節等、の形態、機能異常に及び、これらの非症候群性難聴の一次的な原因が、著しく多様であることを示唆している。従来の難聴の表現型を示す変異体マウス(自然発生、ノックアウトマウス等)は、既にかなりの数が知られているが、多くは、運動の異常を伴い他の表現型と併存する場合が多い事を考えると本研究により樹立された聴覚変異体は表現型解析の結果から、明瞭に非症候群性である点で、ヒトの遺伝性非症候群性遺伝性難聴の良いモデルである可能性が高い。こうしたマウス変異体系統の樹立はヒト難聴モデルとして

も、その原因と治療法を考える上で極めて有用であるのみならず、聴覚信号変換機構における基礎的問題解明の有力な手がかりになることが期待される。

## 結 論

- (1) ENU mutagenesisによる優性変異体スクリーニングにおいて、クリックホックスによる驚愕反応試験による一次スクリーニングと聴性脳幹反応(Auditory Brain stem Response, ABR)の測定による解析の組み合わせにより、マウス遺伝性聴覚異常系統の効率的単離樹立が可能であった。
- (2) 多種のスクリーニングを同時に実施する事により得られたマウス聴覚異常変異体は、全て非症候群性の難聴であると考えられるので、ヒト遺伝性非症候群性難聴のモデルとしての妥当性の検討が急務である。

## 健康危険情報

なし

## 参考文献

- 1) Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE Behavioral and functional analysis of mouse phenotype SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment Mamm Genome 10 711-713, 1997
- 2) Kiernan AE, Erven A et al ENU mutagenesis reveals a highly mutable locus on mouse chromosome 4 that affects ear morphogenesis Mammalian Genome 13 142-148, 2002

## 研究発表

- 1 論文発表  
なし
- 2 学会発表  
なし

## 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得  
なし
- 2 実用新案登録  
なし
- 3 その他  
なし

## 老齢マウスにおけるミトコンドリア遺伝子変異の出現

分担研究者 岡本 牧人 (北里大学耳鼻咽喉科)  
共同研究者 鐵田 晃久、佐野 肇 (北里大学耳鼻咽喉科)

### 研究要旨

老化にはいろいろな因子の関与がいられているが、その一つにフリーラジカルがある。ミトコンドリアDNAはヒストンのようなタンパク質で保護されておらずまたミトコンドリア内でもフリーラジカルが産生されるため、その影響を受けやすい。今回、我々は内耳の実験の前段階として、正常老齢マウスの臓器よりミトコンドリアDNAを抽出し数種類の遺伝子欠損を同定した。その結果、4236、3867、3723、3660bp欠失を認めた。

### 研究目的

老齢マウス臓器において、ミトコンドリアDNA変異(欠失)を明らかにし、その種類を明らかにする。

### 研究方法

正常c57BLマウス、メス1匹を使用し、エーテル麻酔下にて4%PFAにて還流固定後に肝臓、脳を摘出。それぞれから和光純薬社製ミトコンドリアDNA抽出専用キットを使用しミトコンドリアDNAを抽出、PCR法にて増幅しPGEMT Easyを使いサブクローニングを行い、シーケンシングを確認し欠失変異を同定。

### (倫理面への配慮)

断頭は十分な麻酔下に行い、苦痛を与えずに行った。

### 研究結果

肝臓、脳いずれからもミトコンドリアDNA欠失(4236、3867、3723、3660bp)を確認してきた。(図1)

### 考察

今回、行った実験は内耳の実験の前段階として、過去の報告(4236、3867、3723bp)以外に新たに3660bpをてきた。今後、他の種類の存在も示唆される。

またフリーラジカルによるミトコンドリアDNAの影響に対する一つの指標となると思われる

### 結論

老齢正常マウスの脳、肝臓からミトコンドリアDNAを抽出、ミトコンドリアDNA欠失(4236、3867、3723、3660bp)を確認した。フリーラジカルによるミトコンドリアDNAの影響に対する一つの指標となると考えられた。

### 健康危険情報

なし

### 研究発表

- 1 論文発表  
なし
- 2 学会発表  
なし

### 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得  
なし
- 2 実新案登録  
なし
- 3 その他  
なし

## 結果

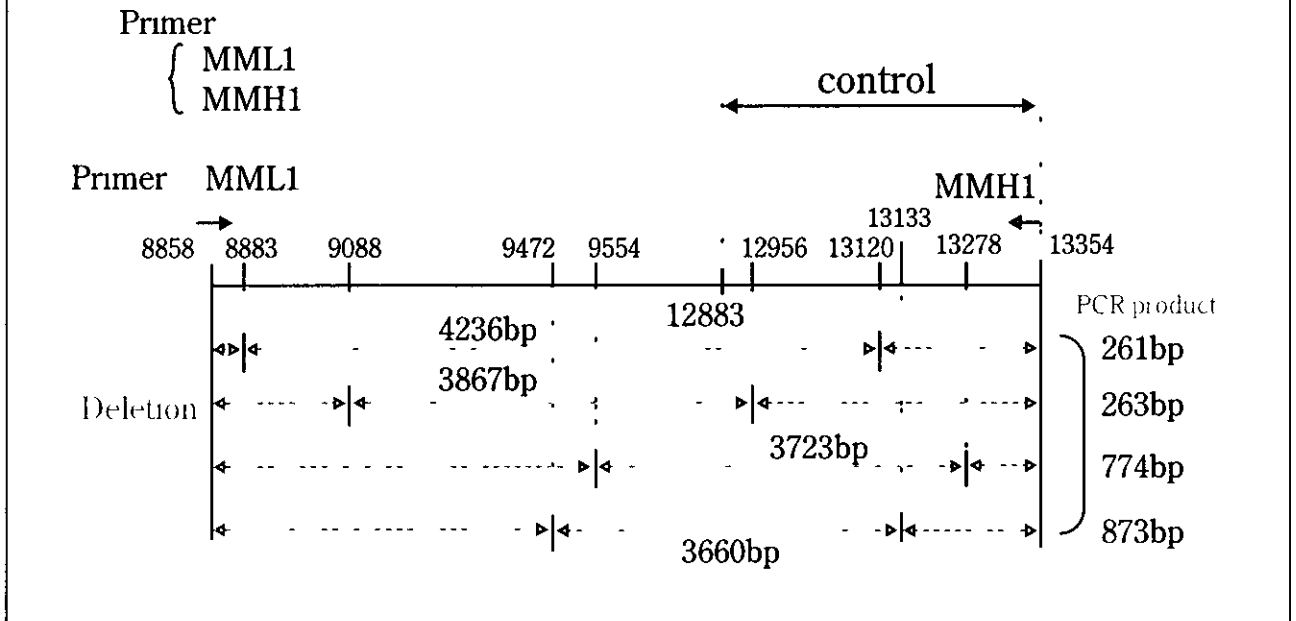


図1 4236、3867、3723、3660bpの4種類のミトコンドリアDNA欠失を確認することができた。  
このうち4236、3867、3723bpは過去にも報告されているものであり、新たに3660bpの欠失を確認した。

## siRNAを用いた培養細胞におけるGJB2発現抑制

分担研究者 福島 邦博 (岡山大学 耳鼻咽喉・頭頸部外科)  
研究協力者 前田 幸英、西崎和則 (岡山大学 耳鼻咽喉 頭頸部外科)

### 研究要旨

GJB2 (コネキシン26) はヒトの言語習得期前難聴の原因としては最も頻度の高いものの一つとして知られている。近年、短鎖のdsRNAであるsiRNAを用いてその遺伝子の機能についての解析が進んでいる。今回我々は、GJB2遺伝子に対するsiRNAを設計し、ヒト腎由来の培養細胞293細胞でのGJB2発現抑制効率について検討した。その結果、最大で80%の遺伝子発現が抑制され、この方法がGJB2の*in vitro*機能解析の手段として有用であることが示された。

### 研究目的

今回我々は、*in vitro*で作成したdsRNAを用いて、培養細胞での特異的なGJB2遺伝子発現の阻害実験を行ったので報告する。

### 研究方法

#### siRNAのデザイン及び合成

ヒトGJB2のmRNAに対する21塩基siRNAの配列をデザインし、他の遺伝子との相同性を持たないことをデータベース検索 (BLAST) で確認した。Ambion社の化学合成オリゴRNAをアニーリングし、二本鎖RNAを形成させて実験に用いた。GJB2に対するsiRNAの配列として4つの異なる配列 (siRNA 1-4) を作成し、それぞれの遺伝子発現抑制効率の変化について検討した。また既知の遺伝子配列との相同性を持たないsiRNA (Ambion社) を陰性コントロールとして用いた。

#### 細胞への導入

抗生物質を含まない完全培地内で、ヒト胎児腎細胞 (293細胞) を培養し、導入時の細胞密度が一定になるようsiRNA導入用の細胞を調整した。様々な濃度のsiRNA、ポリアミン系導入試薬

(Ambion社)、およびOpti-MEMI (invitrogen社) を混合し、15分間室温でインキュベートした後、培地にsiRNA混合試薬を加えた。12時間経過後に過剰量の完全培地を加え、計72時間培養後にRNAを精製した。

#### RNA精製および定量

培養細胞のtotal RNAを精製し、DNaseI処理した後に分光光度計を用いて定量した。一定量のRNAを鋳型としてRT-PCRを行い、特異的増幅産物のシグナル強度をデントメトリで数値化した。同一量の293細胞RNAから得られたシグナル強度が指数関数的に増加するPCRサイクル数において、各サンプルでのGJB2発現を比較検討した。またGJB2 mRNAに対するsiRNAの特異的作用を検討するため、GAPDH発現を同様に検出した。

### 研究結果

#### 1) siRNAのGJB2特異的遺伝子発現抑制効果

ヒト胎児腎細胞由来の培養細胞293細胞に導入されたsiRNAにより、本来この細胞で認められたGJB2の遺伝子発現は有意に抑制された。その間、コントロールとして検討したGAPDHの発現は全く抑制されておらず、この発現抑制は遺伝子特異的に生じたものと考えられた。

#### 2) 配列による遺伝子発現抑制効率の変化について

GJB2の遺伝子領域にsiRNAとして、siRNA 1から4という異なる塩基配列を有するものを設計し、それぞれの遺伝子発現抑制効率の違いを検討した。今回検討した中では、この4種類全てで遺伝子発現の抑制効果が確認できたが、それぞれの塩基配列によって、最大80%。最小35%の発現抑制効率の違いが認められた。

## 考 察

RNA干渉(RNAi: RNA interference)は、二本鎖RNA(dsRNA)が相補的な配列を持つ遺伝子の発現を特異的に阻害する現象である。この機構はウイルス感染などに対する細胞の防衛機構として進化してきたと考えられており、作用機序としてdsRNA分子が内在性リボヌクレアーゼにより21から23塩基長に切断され、次いでヌクレアーゼ複合体と結合して相補的mRNAを分解するモデルが提唱されている。哺乳類細胞の場合には、長鎖RNAでは抗ウイルス応答を誘導するため、こうした実験系は*C. elegans*などでの導入実験に限られていたが、最近、21から23塩基長の短鎖dsRNA(siRNA: small interfering RNA)を用いることによって抗ウイルス反応を引き起こすことなく、哺乳動物細胞での遺伝子発現阻害が可能であることが報告された。このsiRNAは、導入が容易であるため、幅広い種類の細胞に応用され、ターゲットとする遺伝子の機能解析に広く使われている。今回、我々はヒトの遺伝性難聴の原因遺伝子として最も頻度の高い*GJB2*遺伝子をノックダウンする方法を確立するために、ヒト腎細胞由来の培養細胞をもちいて、この方法の遺伝子発現抑制効率について検討した。少なくとも今回検討したsiRNAの配列の中では、それぞれの遺伝子配列によって発現抑制効果は異なるものの、最大80%の遺伝子発現が抑制できることが確認できた。今後は、この技術を用いて、細胞における機能変化やアレル特異的な遺伝子発現抑制などについても検討してみたい。

## 結 論

*in vitro*で作成したdsRNAを用いて、培養細胞での特異的な*GJB2*遺伝子発現の阻害実験を行った。siRNAによって特異的遺伝子発現が観察できた。

## 健康危険情報

なし

## 研究発表

- 1 論文発表  
現在投稿中
- 2 学会発表  
なし

## 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得  
なし
- 2 実用新案登録  
なし

## RT-PCR を用いた *Tecta*, *Coch*, *Eya4* および *Strc* 遺伝子の培養マウス内耳における発現

分担研究者 福島 邦博 (岡山大学 耳鼻咽喉 頭頸部外科)  
共同研究者 前田 幸英、垣内 仁、木林 並樹、西崎 和則  
(岡山大学 耳鼻咽喉 頭頸部外科)

### 研究要旨

マウス蝸牛の器官培養を行い、その遺伝子発現の経時的な変化を検討した。内耳に比較的特異的に発現する、*tecta*, *coch*, *eya 4* および *strc* 遺伝子とコントロールとしての *GAPDH* の遺伝子発現を RTPCR法を用いて半定量的に検討した。その結果、*TECTA* など、相当する胎生期に発現量が急速に増加する遺伝子では、こうしたサーノは認められず、むしろ低下する傾向が認められ、*eya 4* でも同様に発現の有意な低下が認められた。*strc* 遺伝子では明らかな低下は認められなかった。コントロールの *gapdh* では短期的にはむしろ発現が増強していた。こうした遺伝子発現の変化を追うことは、器官培養の効率や、治療モデルとしての妥当性、さらには薬剤などによるインターヘンノンの効果判定に有益であると考えられた。

### 研究目的

マウス蝸牛の器官培養は、内耳発達段階の研究に関するモデルとして古くから知られており、胎生期の蝸牛は *in vitro* で 6 日間以内では生存し続けることが報告されている。形態学的には、こうした器官培養蝸牛は、広く解析されており、その発達の状態についての検討も行われている。こうしたマウス器官培養の実験系は、内耳性難聴に対する新しい薬物治療 遺伝子治療の実験系として有望であり、その機能についても十分に検討される必要がある。

ヒトの遺伝性難聴の原因遺伝子 *TECTA*, *COCH*, *EYA 4* および *STRC* 遺伝子は、非症候群性難聴 DFNA8/12、DFNA 9、DFNA10 および DFNB16 の原因遺伝子であり 従って聴覚の生理的な機能の上では必要不可欠の働きをしているものと考え

られる。マウス内耳の発生過程において、これらの遺伝子のマウスにおけるカウンターパートは内耳で特異的に発現している。*in vitro* の蝸牛器官培養においては、しかし、その発現の状態がどのように変化しているのかについては、全く知られていない。こうした疑問に答えるために、胎生 15 日目のマウス内耳を摘出し、器官培養を行い、その変化を mRNA レベルの発現の状態にて検討した。

### 研究方法

#### 蝸牛培養

妊娠 E15 (vaginal plug, E0) の BALB/C マウスを sodium pentobarbital (150mg/kg) を用いて深麻酔した後、胎児蝸牛を摘出した。Dalbecco's Modified Eagle Medium および Ham's F-12 に、insulin (15  $\mu$ g/ml), transferrin (20  $\mu$ g/ml), progesterone ( $2 \times 10^{-8}$  M), selenium ( $3 \times 10^{-8}$  M), putrescine ( $10^{-4}$  M) および ampicillin (100mg/ml) を加えた培養液の中で 5% CO<sub>2</sub> 37°C の条件下で 2 日間 (Div2, n=6) から 4 日間 (Div4, n=6) 培養した後、RNA を抽出した。胎生 15 日 (E15, n=5)、17 日 (E17, n=7) および 19 日 (E19, n=6) からそれぞれ蝸牛を摘出し、同様に RNA を抽出した。RNA 抽出には、RNeasy column および DNaseI (Qiagen, Holden, Germany) を用いた。さらに、昨年度報告した RT-PCR を用いて半定量 RT-PCR を行った。3% アガロースゲルでの電気泳動後、エチノウムフロマイト染色を行い、UV-CCD カメラ (EU-2000LS, Aisan Cosmos, Tokyo, Japan) によってバンドの検出と定量を行った。定量には、Luminous Imager software (Aisan Cosmos) を用い、その強度の単位には band intensity values (BIVs) を用いた。異なるケルからの BIV の値は、スタンダードとなるサンプルの強



度によって補正した。グループ間の発現強度の比較にはone-way ANOVA と post-hoc Bonferroni methodを用い、有意性の検討には 99%信頼区間を用いた。

## 研究結果

### 形態的観察

*in vivo* での胎生15日目の蝸牛では、Kolliker の器官が蝸牛管の尾側に認められた。中回転を高倍率で観察すると、ライスネル膜に分化していく立方上皮の1から2層の壁が確認できる。蓋膜はこのころまた確認できない。2日間の培養の後、光学顕微鏡レベルでは、Kolliker 器官等は十分保存されている。培養系ではその後も蝸牛管自体は保たれるか、Kolliker 器官の細胞は変化を始め、培養7日目では明らかに障害を示すようになる。

### 半定量的PCR

BIVの対数を取ると *Tecta*, *Coch*, *Eya4*, *Strc* およびコントロールとしての *Gapdh* では増幅サイクルが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 ( $r=0.968$ ,  $p<0.01$ ) 15-24 ( $r=0.972$ ,  $p<0.01$ )の間は線形の増加を示していた。これに基づいて、それぞれのサンプルのBIVsはそれぞれ26 (*Tecta*), 25 (*Coch*), 28 (*Eya4*), 28 (*Strc*) および20 (*Gapdh*) 回の増幅で検討した。

*Tecta* 遺伝子の平均発現量比 (mean relative abundance MRA)は E15 を100%とすると、E17では157%まで上昇し、E19でも161%と高値を維持する。これらの所見は、すでに報告した*Tecta* 遺伝子発現がE15からP3の間で50-60%上昇した所見と一致した。その一方で、蝸牛器官培養では、DIV2のMRAは著明に(25%)E15と比較して減少した。*Coch* のMRAは、E15 (100%)からE17 (246%)までに2倍程度に増強する。*in vivo*では、E19までそのまま高いレベルでの発現が続く(264%)。DIV2のMRAはE15と比べて55%まで低下し、その後も同じ様に低いレベルが持続している。

*Eya4* のMRAは、前2者と異なり E15 (100%), E17 (95%)および E19 (93%)ではほとんど変化がない。DIV2のMRAは、E15と比較して有意に(51%)低下し、DIV4では、さらに(36%)低下した。*Strc*でも、E15 (100%)から E17 (92%) E19 (74%)では、平均値でわずかに減少するものの有意な変化はない。DIV2でも、MRAは71%とわずかに減少するものの有意な変化はない ( $p>0.05$ )。

*Gapdh* のMRAは、E15 (100%), E17 (103%)、

E19 (85%)では一定であるが、培養蝸牛では、DIV2で一時的に発現増強し(154%)、その後DIV4にかけて減少に転じる(64%)。

## 考 察

本報告では、蝸牛全体が胎生15日目で摘出され、器官培養の系によって培養された。培養2日目までは、構造としてのKolliker 器官やその周辺の間葉組織は保たれていた。今回検討した様々なタイプの遺伝子は、異なる様式で蝸牛内での発現をコントロールされている。*Tecta* mRNAは、greater epithelial ridgeを主体に発現しており、E12から生後一週間までで発現が増強すること知られている。*Coch* はspiral ligamentやspiral limbusの間葉組織から産生される。マウスの *Eya4* mRNAは greater および lesser epithelial ridges で発現しており、その時期は、有毛細胞の分化と一致すると言われる。Stereocilin様の反応は分化した有毛細胞のhair bundleから検出されるという。

*Tecta* の発現は、*in vivo*では同じ時期に急速に増強することに反して培養2日目で急速に減少していた。従って、正常な*in vivo*での発現と比較した場合、著明な減少が確認できた。同様に、*Coch* の発現レベルも培養2日目で減少しており *in vivo*で同じ時期に2倍程度増強することとはっきりしたコントラストを示していた。*Eya4* の発現は、培養2日目で胎生17日目と比較するとやはり有意に減少していたが、前2者の遺伝子ほどの大きな差は認められなかった。*Strc* 遺伝子の発現は、培養2日目でも、胎生17日のレベルと有意な差が認められなかった。従って、培養48時間の時点では、*Tecta*, *Strc*, *Eya4* などの遺伝子はいずれも感覚上皮で発現されるが、全て異なった様式で変化していた。遺伝子のsurgeは、この時期*in vivo*では*Tecta* や*Coch* で認められるが、培養蝸牛ではいずれも同様の現象は見られなかった。*Coch* mRNAは、間葉組織で発現することが知られているが、培養組織では、正常な遺伝子のsurgeが見られないと言う現象は、感覚上皮だけでなく、間葉組織でも同様に生していることが確認された。

*Gapdh* の発現レベルは、これらに反して、培養2日目で一時的に上昇した。通常、同じ時期の*in vivo*の蝸牛では、この遺伝子は一定に保たれている。*Gapdh* は通常、*in vivo*でも*in vitro*でも一定のレベルに保たれているが、低酸素状態、執拗ノック、細胞増殖、insulin 成長因子等の条件でup regulateされる。*Gapdh* のinductionは、今回我々

が用いた培養系での低酸素状態が引き金になったものかもしれない。逆に言えば、培養方法を検討することによって多くの酸素を提供できれば、より通常に近い遺伝子発現を維持できていた可能性がある。更に言えば、培養条件により多くの影響を与えうる様々な物質、たとえばacidic fibroblast growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3, retinoic acid, corticosteroids and thyroid hormonesなどをこの系に作用させて、それによる遺伝子発現を検討することか可能である。また、様々な遺伝子の機能自体にinterventionする方法があるが、こうした手法、たとえば、antisense oligonucleotides, adenovirus and lentivirus-mediated reporter genes, small interfering RNAs, and fusion peptides with the 11 arginines protein transduction domainなどが、この実験系によって蝸牛内に容易に投与可能である。培養蝸牛をRT-PCRを用いて遺伝子発現の点から評価する方法は、これらの様々なintervention方法の評価法としても有用であると考えられる。

## 結 論

蝸牛器官培養での遺伝子発現を経時的に変化を追うことによって、形態学的検討では不明であった遺伝子サージの消失や、保たれている細胞機能、亢進している細胞機能の推定が可能であった。

## 健康危険情報

なし

## 研究発表

- 1 論文発表  
現在投稿中
- 2 学会発表  
なし

## 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得  
なし
- 2 実用新案登録  
なし
- 3 その他  
なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

Tamagawa Y, Ishikawa Ka, Ishikawa Ko, Ishida T, Kitamura K, Makino S, Tsuru T, Ichimura K Phenotype of DFNA11 A nonsyndromic hearing loss caused by a myosin VII A mutation Laryngoscope 112 292-297,2002

Mizukawa Y, Nishizawa T, Nagao T, Kitamura K, Urushidani T Cellular distribution of parchorin , a chloride intracellular channel-related protein, in various tissues Am J Physiol Cell Physiol 282 C786-C795,2002

Tsutsumi T, Ishida A, Fukuoka Y, Inaoka S, Kitamura K. Contribution of vestibular apparatus to postural control during chair rise J Vest Res 11 220,2001/2002

高瀬由美, 古宇田寛子, 堤剛, 喜多村 健 air caloric検査における至適刺激条件について Equilibrium Res 61(4) 216-220,2002

野澤真理子, 野口佳裕, 堤剛 岡村洋冲 戸叶尚史, 喜多村 健 エアバンクによる音響外傷の一例 Audiology Japan 45 692-696,2002

Kikkawa Y, Shitara H, Wakana S, Kohara Y, Takada T, Okamoto M, Taya C, Kamiya K, Yoshikawa Y, Tokano H, Kitamura K, Shimizu K, Wakabayashi Y, Shiroishi T, Kominami R, Yonekawa H Mutations in a new scaffold protein Sans cause deafness in Jackson shaker mice Hum Mol Genet 12 453-461,2003

Sugawara K, Kitamura K, Ishida T, Sejima T Insertion of tympanic ventilation tubes as a treating modality for patients with Meniere's disease a short-and long-term follow-up study in seven cases Auris Nasus Larynx 30 25-28,2003

Tsutsumi T, Komatsuzaki A, Noguchi Y, Mitsuhashi M, Kitamura K Effects of visual input on galvanic body sway test of unilateral vestibular deficiency in patients with unilateral vestibular schwannoma Auris Nasus Larynx 30 35-40,2003

喜多村 健 神経耳科学 日本醫事新報 4060 37-42,2002

喜多村 健 難聴遺伝子 医学のあゆみ200(13) 1218-1219, 2002 4 1

黒石川泰, 喜多村 健 遺伝子検査のためのインフォームトコンセント 日本耳鼻咽喉科学会会報 105 (7) 820-821,2002

喜多村 健 遺伝性難聴の概要 Audiology Japan 45(4) 283-288,2002

喜多村 健 耳鳴の発生機序と治療 総合臨牀 51(9) 2691-2692,2002

喜多村 健 「たかがめまい」の落とし穴 日経ピンネス 2002 9 30 P152

Takagi D, Nakamaru Y, Maguchi S, Furuta Y, Fukuda S Otologic manifestations of Wegener's granulomatosis Laryngoscope 112 1684-1690, 2002

福田 諭 ウイルス性内耳炎 耳鼻咽喉科 頭頸部外科 74 668-676, 2002

福田 諭 特集 急性感音難聴,5 ムンプス難聴 耳鼻咽喉科 頭頸部外科 74 856-861, 2002