

スにて検索し、プライマー設計ソフトを用いてそれぞれエクソンに対して特異的なプライマーを設計する。

次に、臨床症状より Usher Syndrome Type2 と診断した患者より血液を採取する。DNA 抽出キットを用いてゲノム DNA を抽出し、ゲノム DNA をテンプレートにして PCR をおこなう。PCR 産物を精製しシーケンス反応後、オートシーケンサーを用いてシーケンスする。得られたシーケンスデータをデータ解析ソフトにて解析し遺伝子変異を検索した。

研究結果

臨床症状より Usher Syndrome Type2 と診断した患者 4 名を対象として USH2A の遺伝子解析をおこない、現在までに 1 名の患者で遺伝子変異を同定した。遺伝子変異は、全てヘテロ遺伝子変異 (IVS42-2A→G、D3515G ; Q4203R) であった。さらに、家族の検体を用いて遺伝子解析をおこない図 1 の結果を得た。これより、IVS42-2A→G、および D3515G または Q4203R によるコンパウンドヘテロ遺伝子変異によ

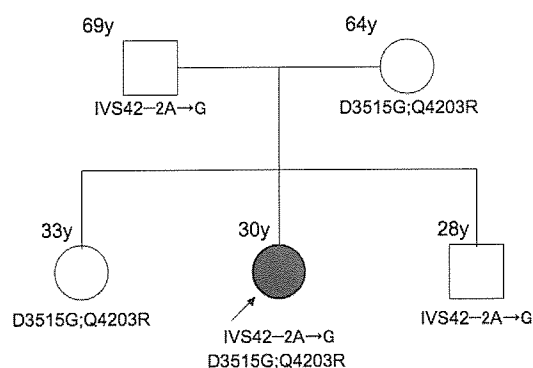


図 1 家系内における USH2A の遺伝子解析の結果

り発症した Usher Syndrome Type2A と診断した。

(倫理面への配慮)

当研究は浜松医科大学「ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会」にて審査・承認されている。

検体採取の前に説明文書を用いて十分なインフォームド・コンセントをおこない、同意が得られた患者から検体採取をおこなっている。解析を開始する前に、検体は全て連結可能匿名化し、匿名化した符号と患者を結びつける対応表は、個人情報分担管理者を設け厳重に保管するとともに、実験操作はすべて匿名化した符号を用いておこなっている。

考 察

欧米では、USH2A の遺伝子解析が進んでおり、様々な遺伝子変異が同定されている。特に、2299delG 遺伝子変異の報告が多く、欧米人に特有の遺伝子変異と考えられている。日本では現在までに、USH2A の遺伝子解析の報告はなく、今回の我々の報告が初めてである。また、IVS42-2A→G、D3515G、Q4203R は現在までに欧米を含めて報告されておらず新規の遺伝子変異と考えられる。

家族の遺伝子解析の結果より、IVS42-2A→G、および D3515G または Q4203R によるコンパウンドヘテロ遺伝子変異により発症した Usher Syndrome Type2A と診断した。D3515G と Q4203R ではどちらがパソジェニックであるか検討するため他種生物 (チンパンジー、イエイヌ、ハツカネ

ズミ、ニワトリ、ゼブラフィッシュ、ムラサキウニ) の相同遺伝子のホモロジー検索をおこなった結果、D3515G が同定された部位の方が全他種生物で高度に保存されていた。また、コントロールの検体 29 例を用いて遺伝子変異の有無を検討した結果、1 例に Q4203R が同定された。これより、D3515R の方がパソジェニックではないかと考えている。今後、コントロールの検体を増やし、さらに検討する必要がある。

Usher Syndrome Type2A は、Usher Syndrome の中で最も頻度が高い Subtype である。欧米人のように日本人特有の遺伝子変異があるのか検討するために今後さらに多くの検体を用いて遺伝子解析をおこなう必要がある。

結 論

Usher Syndrome Type2 の患者に対し、USH2A の遺伝子解析をおこない、IVS42-2A→G、D3515G、Q4203R ヘテロ遺伝子変異を同定した。

参考文献

- 1) Kremer H, van Wijk E, Marker T et al. Usher syndrome: molecular links of pathogenesis, proteins and pathways. Hum Mol Genet. 2006; 15: R262-70. Review
- 2) Aller E, Jaijo T, Beneyto M et al. Identification of 14 novel mutation in the long isoform of USH2A in Spanish

patients with Usher syndrome type II. J Med Genet. 2006; 43: e55

- 3) van Wijk E, Pennings RJ, te Brinke H et al. Identification of 51 novel exons of the Usher syndrome type2A (USH2A) gene that encode multiple conserved functional domains and that are mutated in patients with Usher syndrome type II. Am J Hum Genet. 2004; 74: 738-44

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表

Iwasaki S, Yamashita M, Maeda M, Misawa K, Mineta H: Audiological outcome of infants with congenital cytomegalovirus infection in a prospective study. Audiol Neurotol 12:31-36, 2007.

2. 学会発表

渡邊高弘・岩崎 聡・名倉三津佳・武林 悟・水田邦博・武林 悟・峯田周幸：先天性サイトメガロウイルス感染症の抗体陽性率と難聴。第 50 回日本聴覚医学会総会 東京 9,22-24,2005

知的財産権の出願・登録状況

なし

マウスミュータジェネシスによる難聴モデル系統の樹立と解析

分担研究者：美野輪 治（理化学研究所ゲノム科学総合研究センターゲノム機能情報研究グループ）

研究要旨

聴覚異常モデル動物は、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・発症機構および治療法を研究する上で有用である。特に遺伝的操作を適用するのに有利な実験用マウスにおける聴覚変異体の樹立とその解析は極めて重要と考えられる。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 (ENU 誘発変異体開発計画)、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、現在までのところ、28 の優性聴覚異常系統を樹立した。これらの系統に関して、マッピング、候補遺伝子の配列決定法等により原因遺伝子の探索を行い、4 系統について原因遺伝子における点突然変異を同定し更に 20 系統において原因遺伝子存在領域を確定した。

研究目的

Forward genetics の手法と概念を実験用マウスに適用し、ENU 誘発マウス突然変異体の開発を行い、効率的に聴覚変異体マウスを樹立・解析する事により、ヒト難聴モデルになり得る新規系統を樹立する。

研究方法

G0 マウスとしては、8週齢の C57BL/6JJ 雄マウスに 100-75mg/kg の変異原 ENU を週 1 回計 2-3 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 週間行い不妊を確認したものを使用した。これら G0 マウスの初回 ENU 投与後 13 週目から DBA/2J 雌又は、C3H 雌マウスとの交配を実施し、G1 マウスを生産した。Modified-SHIRPA 法スクリーニングにおける驚愕反応検査（8 週齢、click box を使

用）により異常が見出された G1 マウスについて、二次スクリーニングとして聴性脳幹反応 (ABR) の測定を実施した。ABR の測定においては、40kHz 以上の超音波領域における近交系マウスの正常基準値設定を試みた。ABR の測定結果は、聴覚異常の有無、難聴の程度の定量化、即ち正常・異常判定のみならず、初期解析 (primary characterization) として、これら変異体候補の聴覚異常の特性を記述するために使用した。原因遺伝子の探索は、以下の方法によった。

1. Rough mapping のための TaqMan PCR 法による SNP 解析
2. Semi-fine mapping のための Mit marker による SSLP 解析及び SNP の RFLP 解析
3. Candidate gene approach による候補

遺伝子の選択・配列決定

4. Fine mapping-positional cloning のための多交配産子生産。

(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、淘汰、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た。

研究結果

(1) 聴覚変異体の単離

11874 匹の G1 を驚愕反応検査によりスクリーニングした。驚愕反応に異常が認められた 49 匹の G1 について、聴性脳幹反応 (ABR) 測定装置を用いて、その特性を解析した。49 匹中、ABR 測定により聴覚異常と判定されたのは 36 匹であった。これら各候補の表現型のうち、現在までに遺伝性が確認されたのは 28 系統においてであった。又、これらの系統で旋回など行動異常を伴うものは、3 系統のみであった。

(2) 原因遺伝子の探索 ; Rough mapping

得られた 28 系統のうち 20 系統について、SNP 解析による rough mapping を実施した。この内、4 系統で、候補遺伝子が chromosome 6 に高い存在可能性を示した。又、別の 10 系統は、chromosome 10 に存在可能性を示した。

(3) 原因遺伝子の探索 ; 候補遺伝子配列決定

Atp2b2/Pmca2 遺伝子上の変異、及び chromosome 10 上の未知遺伝子上記 chromosome 6 に原因遺伝子を持つ 4 系統について、Mit marker による SSLP

解析を行った後、候補遺伝子の選別、配列決定を行ったところ、いずれも、Atp2b2/Pmca2 遺伝子上に変異を確認し、この変異が難聴表現型の原因であると結論した。それらは以下のような missense mutation であった ; K250R(M6-1), E412G(M6-2), V629E(M6-3), V657E(M6-4)。これらの系統の M2 表現型は、閾値の値で見ると同一ではなく、内耳の組織学的障害の程度もそれぞれ異なっており、Pmca2 遺伝子産物の変異の部位による機能変化の差異が、表現型に反映されると考えられた。又、chromosome 10 上に原因遺伝子を持つ 10 系統のうち、8 系統については、Cdh23 を原因遺伝子候補から排除出来なかったが、残りの 2 系統については、Cdh23 を含まない領域に未知の原因遺伝子が存在する事が推定された。

考 察

ヒト遺伝性非症候群性難聴において、現在まで、優性、劣性、X 染色体連鎖遺伝様式を合わせて、原因遺伝子の同定されたものは 40 近くに上り、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、これらの難聴の一次的な原因が、著しく多様であることを示唆する。既に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、かなり知られているが、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非症候群性と考えられる点で、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。

一方、症候群性、非症候群性いずれの場合のヒト難聴疾患の原因と治療法を研究する上でも、マウスモデルはやはり重要である。Chromosome 10 上に原因遺伝子が map された 8 系統は、cdh23 が原因遺伝子である可能性が強く、これらの遺伝子変異がヒトでは Usher Syndrome の原因ともなるし、非症候群性難聴の原因にもなる事を考慮すれば、より詳細な表現型解析により聴覚系以外での表現型を見い出せる可能性が残る。

結 論

1. ENU mutagenesis による優性変異体スクリーニングにおいて、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 (ABR) の測定による解析の組み合わせにより、28 系統の聴覚異常マウス系統を樹立した。
2. これらのうち、Chr6 に原因遺伝子の存在が確定したものが 4 系統、Chr10 が 5 系統存在した。

3. Candidate gene の存在しない領域にマップされる他の 4 系統は、新規遺伝子変異系統であることが期待される。

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) A large-scale mouse ENU mutagenesis project (2006-6) : Deafness Mutants with Hair Cell Impaired Calcium-Metabolism. IUBMB, (Jun.,2006)
 - 2) Intracochlear Injection of Adenovirus Vector to a Mouse Model Created by a Conditional Knockout of Gjb2 Gene, ARO, (Feb. 2006)

知的財産権の出願・登録状況

なし

新たな人工内耳音声コード化法（CSPE）の実装用による評価

分担研究者：岩崎 聡（愛知医科大学耳鼻咽喉科）

共同研究者：中西 啓（浜松医科大学耳鼻咽喉科）

共同研究者：浜田 登（浜松医科大学耳鼻咽喉科）

共同研究者：水田 邦博（浜松医科大学耳鼻咽喉科）

研究要旨

新たに考案した人工内耳音声処理方法（音声コード化法）に対して、Processor Control Interface（PCI）を介しての聴取実験を昨年施行した。今回はプログラムの入力可能な研究用スピーチプロセッサーを使用して実装用下での問題点、効果について検討した。処理能力の低いスピーチプロセッサーでも長期使用により同等の成績が得られた。

研究目的

重度感音難聴に対して一般的な治療法となっている人工内耳の語音聴取成績は年々向上しているが、その理由の1つは音声処理方法（音声コード化法）の改良・進歩である。現在本邦で広く使用されているコクレア社製人工内耳の音声コード化法はWSP法から始まり、MSP, SPEAK, 現在はACE（Advanced Combination Encoder）法となっている。我々は刺激頻度・刺激順序、選択するチャンネル数を可変型とした新たな音声コード化法を考案し、CSPE（Channel Selection Pulse Estimation）と命名した。これまでACE法とCSPE法の音声コード化法をパソコン上でCochlear Clinical Programming System（CPS）のProcessor Control Interface（PCI）を介して音声情報をスピーチプロセッサーに伝達させ、聴取実験を行い、CSPE法で良好な結果を得てきた。今回は

より実用化を目指し、研究用スピーチプロセッサーにCSPEコード化法を搭載させ、その問題点とACEとの比較検討を行った。

研究方法

Nucleus 24・ACEコード化法を1年以上使用している5名（55歳–69歳：男1名、女4名）を対象とした。コクレア社オーストラリア本社からプログラム入力可能な研究用スピーチプロセッサー（SPEAR3）（図1）を使用させてもらい、

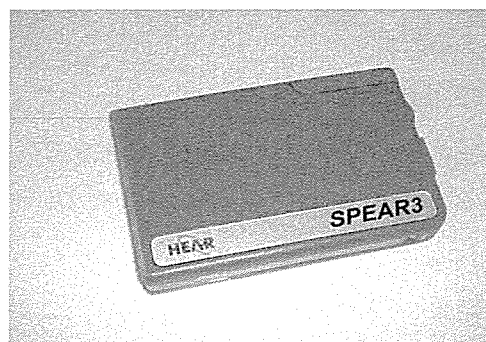


図1 オーストラリアコクレア本社から借用した研究用スピーチプロセッサー

静岡大学情報学部の北澤教授の協力のもと CSPE コード化法の入力をお願いした。

SPEAR3 の機能的問題もあり、CSPE 法そのままを入力できず、試行錯誤の上、可能な限りの機能を入力させた。ACE で測定したマップデーターを参考に T/C レベルが同一になるよう CSPE 法の刺激条件を設定した。今回使用した語音聴取検査は 57-S 語表による自由音場検査である。人工内耳装用者に対する聴取テストは防音室内にて、快適レベルのラウドネスで行った。CSPE 法による聴取テストは入力した直後と毎日装用して 1~2 週間後にも行った。

信号処理方法¹⁾；CSPE コード化法の場合、信号は 14400Hz まででサンプリングし、ACE コード化法で使用されている第 6 版度数分布表で指定するフィルタバンクを通過して処理した。10ms の信号フレーム内で刺激されることができる電極の最大数は 8、最大チャンネル刺激率は $Rc = 900pps$ と両者等しく設定した。ACE コード化法の場合、信号は Nucleus Implant Communicator stream (NICstream) を使用するため 16kHz までサンプリングした。音量は両コード化法とも NICstream の対数関数的音量コーディング機能により設定された。

(倫理面への配慮)

当施設の倫理員会で承認され、検査対象者からインフォームドコンセントを得ている。

研究結果

人工内耳装用者 5 名の ACE・CSPE コード化法による聴取テスト成績を図 2 に示す。

ACE 法の聴取成績は 27% から 63%、平均 40% であった。CSPE 法使用直後の成績は 17% から 53%、平均 31%、1~2 週間装用語の成績は 27% から 60%、平均 41% であった。

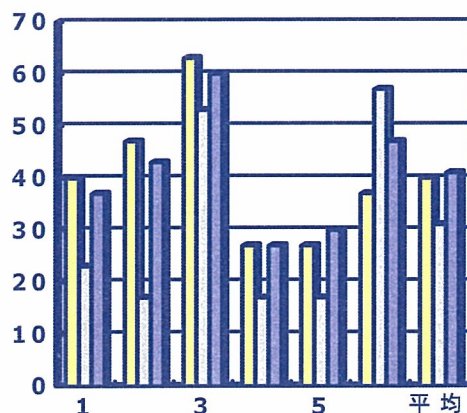


図 2 人工内耳装用者による ACE 法 (左側)、CSPE 法使用直後 (中央)、装用 1~2 週間後 (右側) の聴取成績

考察

CSPE (Channel Selection Pulse Estimation) と呼ぶ我々の戦略は、コクレア社製人工内耳 (CI24M) に 3 つの基本的パラメータ (選択するチャンネルの数・刺激頻度・刺激の順序) を変化させたものである。ある時間内で最大の振幅の周波数を担うチャンネルだけを選び、入力されるスペクトラムによって選択されるチャンネルの数も変えることが出来る。したがって、チャンネルの刺激頻度は変化するようになる。さらに、選択されたチャンネルの刺激順序は入力された周波数情報の順序に同調する。

前回の聴取実験システムはテスト用の音声を Processor Control Interface (PCI) を介して直接人工内耳に伝達させた。我々

の音声処理法はこれまでの方法より複雑な信号処理を行うため、time delay などが生じる可能性も疑われ、リアルタイムによるシステムを開発し、聴取実験を行って検証する必要があった。

今回使用した研究用スピーチプロセッサは現在使用されているスピーチプロセッサよりも 1 世代古いものであり、信号処理能力は下がる。したがって CSPE 法の能力を十分発揮することは出来ない条件下ではあったが、装用に慣れてくれば ACE と同等の成績が得られたことは十分価値のある結果であったと考える。

今後更に信号処理能力の高い研究用スピーチプロセッサに搭載できれば、より成績の向上が期待できる。

結 論

我々が考案した人工内耳音声処理方法（CSPE 法）はこれまでの方法よりさらに聞き取りの改善が期待でき、高度難聴者にとって有益なものとなりうると思われた。

参考文献

- 1) Dashtseren E, Kitazawa S, Iwasaki S, Kiriya S. : Evaluation of a novel signal processing strategy for cochlear implant speech processors. IEICE TRANS. INF. & SYST. E87-D (2) : 463-471, 2004.

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) E. Dashtseren, S. Kitazawa, S. Iwasaki : Evaluation of a novel signal processing strategy using the SPEAR 3 processor. The 9th International Conference on Cochlear implant) , Austria, 2006
- 2) E. Dashtseren, S. Kitazawa, S. Iwasaki : A channel selection by pulse estimation strategy for cochlear implant speech processors. International conference on electronics, information and communication. Mongolia, 2006.

知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

A method of speech conversion in a cochlear implant (PCT/JP2004/11077)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

聴覚系のグルタミン酸興奮毒性についてのパッチクランプ法による検討（第2報）

— 台形体における NMDA 受容体によるシナプス前抑制 —

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）

共同研究者：大島 知子（東京大学大学院神経生理）

共同研究者：高橋 智幸（東京大学大学院神経生理）

研究要旨

前回の研究報告にて台形体のシナプス前部 AMPA 受容体によるシナプス前抑制についての報告を行い、原著論文として発表した。

今回、我々は同じく台形体を対象として、シナプス前部とシナプス後部の両者からホールセル記録を行い、NMDA 受容体によるシナプス前抑制の可能性について検討した。その結果、シナプス前部 NMDA 受容体の活性化により電位依存性カルシウムチャンネルの抑制が起こり、グルタミン酸による興奮性シナプス伝達が抑制されるという新規知見を得た。

研究目的

シナプス前部 NMDA 受容体によるシナプス前抑制の可能性について探索し、聴覚系におけるグルタミン酸興奮毒性に対する自己防御機構について検討する。

研究方法

Wister-rat（生後 7-8 日齢）を断頭後、上オリーブ複合体を含む厚さ 200 μm の脳幹スライスを作成した。36°C の人工脳脊髄液にてスライスを incubation してから室温に戻し、正立顕微鏡のステージ上のチャンバー内に固定した。薬物の投与はチャンバーの環流液を切り替えることにより行った。台形体核（Medial nucleus of trapezoid body : MNTB）の興奮性シナプス後電流（Excitatory postsynaptic currents : EPSC）の導出の際

しては、バイポーラ刺激電極により前腹側蝸牛神経核の軸索から活動電位を誘発し、電気抵抗 3-5M Ω のガラス電極にてシナプス後部からホールセル記録を行った。一方、シナプス前部のカルシウム電流（ I_{pCa} ）の導出の際には、台形体シナプスの利点である巨大な神経終末から電気抵抗 5-8M Ω のガラス電極により直接ホールセル記録を行った。なお本文中に記載されているデータは、特に断りがなければ平均値±誤差平均で示されている。

（倫理面への配慮）

本研究は東京大学大学院医学系研究科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。また、すべての実験は日本生理学会ガイドラインに従って行われた。

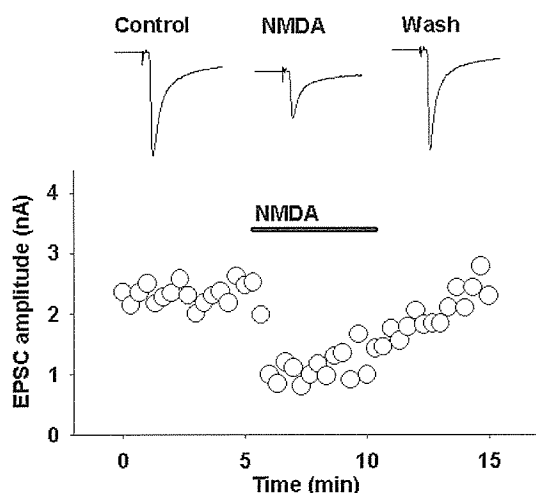


図 1 NMDA による AMPA-EPSC の抑制

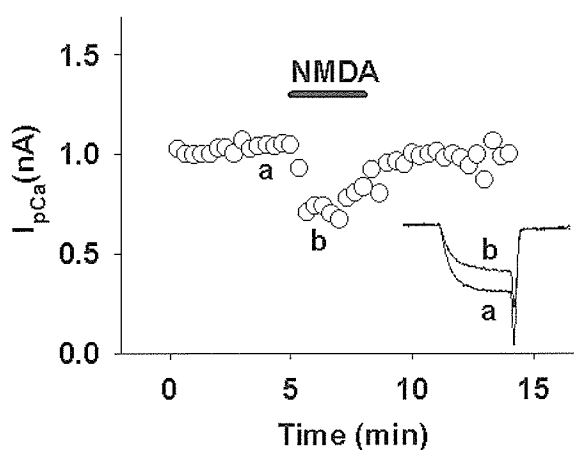


図 2 NMDA によるシナプス前カルシウム電流 (I_{pCa}) の抑制

研究結果

1. NMDA による AMPA-EPSC の抑制 (図 1)

NMDA (500 μ M) の投与により、AMPA-EPSC と NMDA-EPSC の両者とも抑制された。計 5 例の平均にて AMPA-EPSC の抑制は $58.2 \pm 4.2\%$ であった。AMPA-EPSC の抑制が認められたことより、NMDA がシナプス前部の NMDA 受容体に作用し、神経伝達物質 (グルタミン酸) の放出が抑制されることが示唆された。

2. NMDA 受容体によるシナプス前カルシウム電流 (I_{pCa}) の抑制 (図 2)

NMDA (500 μ M) により I_{pCa} が $26.0 \pm 3.7\%$ ($n=5$, 図 2) 抑制された。

考 察

今回我々の用いた条件下 (過剰量のグルタミン酸アゴニスト) では、本実験系は急性高度難聴の原因とされているグルタミン酸興奮毒性のモデルとなっている。その際

にシナプス前部からグルタミン酸の放出を抑制し、病態の悪化を回避するという防御的な役割を、AMPA 受容体だけでなく NMDA 受容体も持ち合わせているのが本研究で明らかとなった。

結 論

聴覚路の台形体シナプスにおいて、シナプス前部 NMDA 受容体の活性化により電位依存性カルシウムチャネルの抑制が起こり、グルタミン酸による興奮性シナプス伝達が抑制される。

参考文献

Takago H, Nakamura Y and Takahashi T.G protein-dependent presynaptic inhibition mediated by AMPA receptors at the calyx of Held.Proc Natl Acad Sci USA 102(20) 7368-73, 2005

健康危険情報

なし

研究発表

なし

知的財産権の出願・登録状況

なし

蝸牛培養による網羅的遺伝子発現について

分担研究者：福島 邦博（岡山大学大学院医歯薬学研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座）

共同研究者：前田 幸英（岡山大学大学院医歯薬学研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座）

研究要旨

蝸牛組織を *in vitro* で培養し、組織中の遺伝子発現が *in vivo* の状態をどの程度再現しているか、24787 遺伝子について網羅的に解析した。また、グルココルチコイド投与によって、蝸牛組織で発現量が増減する遺伝子をマイクロアレイを用いてスクリーニングした。

研究目的

当研究ではまず遺伝子発現の観点から蝸牛組織の培養系が分子生物学的解析に耐えるものであるかを検討した。蝸牛組織の培養系が確立できれば、多くの薬剤や生理活性物質の蝸牛における影響を解析する上で有用である。

次に、この培養系を用いて、グルココルチコイドを投与することにより発現量が著明に増減する遺伝子をスクリーニングした。ステロイドホルモンであるグルココルチコイドは急性高度感音難聴の治療に広くもちいられ、一定の効果があるものと考えられるが、その薬理学的機序はよく分かっていない。グルココルチコイドに制御される遺伝子ないし蛋白質が同定できれば、遺伝子治療の新しいターゲットともなりうる。

研究方法

妊娠 15 日目の Balb/C マウスを 200mg/kg のケタミン注射により麻酔し、胎児の蝸牛組織を蝸牛骨包ごと剖出した (Embryonic day 15, E15)。蝸牛組織を

10 % knockout serum replacement/DMEM 培地中で培養し、48 時間培養した後 (Day *in vitro*2, DIV2) 組織から Qiagen 社 RNAeasy column を用いて total RNA を抽出した。同様に胎生 15 日および 17 日 (E17) の蝸牛組織から RNA を抽出した。これらの RNA サンプルから cDNA 合成、標識反応をおこなって、Filgen 社 mouse32k マイクロアレイとの反応プローブとし、E15 と DIV2、あるいは E17 と DIV2 との間で遺伝子発現量がどの様に異なっているか解析した。

また上記の培養系に Dexamethasone 500ng/ml (Dexamethasone 25mg/50kg を静脈内投与した場合に相当すると概算) を加えた。コントロールとしては、同時に剖出した蝸牛培養組織を用い、同時に RNA 抽出、プローブ合成をして、マイクロアレイによるスクリーニングを行った。

研究結果

E15 と DIV2、あるいは E17 と DIV2 との間で、24787 全遺伝子の発現量には前者

で $r=0.914$ 、後方で $r=0.8993$ (いずれも $p < 0.0001$) と有意な相関がみとめられた。ただし、*Aggrecan core protein precursor*, *Collagen alpha(XI)chain precursor*, *Collagen alpha(IX)chain precursor*, *Sonic hedgehog protein precursor* (いずれも 3 倍以上) *Neurogenic differentiating factor 1* (3 分の 1 以下) などでは E15、E17 のいずれと比較しても発現量が変化していた。

グルココルチコイド投与については、投与群と非投与群の間で、遺伝子発現には $r = 0.9928$ と高い相関が維持されていたが、投与により著明な発現量の変化をしめすものもみられた。機能が既知の遺伝子のうちで、発現が増加するものとしては (表 1) のものが挙げられた。

発現が低下するものとしては (表 2) の

ものが挙げられた。

考 察

E15 と DIV2、あるいは E17 と DIV2 との間では全遺伝子の発現には有意な相関があり、*in vitro* の蝸牛組織での遺伝子発現は、*in vivo* の状態を十分に再現していると考えられた。ただし現在我々の用いている培養組織では、軟骨の発育に係る遺伝子や、感覚上皮の分化に係る転写因子では *in vitro* と *in vivo* では発現量が変化している場合があり、注意が必要である。

また Dexamethasone を投与した場合、投与しない場合とくらべて、遺伝子発現量が $r = 0.9928$ と高い相関をしめたことは、グルココルチコイドの遺伝子発現にたいする影響が全般的なものでないことを示すと

表 1

Dex+/- ratio	gene
42.275436	<i>Short-chain dehydrogenase/reductase 3</i>
35.913283	<i>TNFAIP3 interacting protein 2</i> ; binding inhibitor of NF-kappaB activation-2
28.011931	<i>CUB and sushi multiple domains protein 3</i>
24.92009	<i>oogenesis 3.</i>
21.359253	<i>Aryl sulfotransferase</i>
20.390111	<i>Apoptosis regulator Bcl-B</i>
17.631563	<i>chitinase 3-like 4.</i>
17.391795	<i>Vacuolar proton translocating ATPase 116 kDa subunit a isoform 4</i>
16.951707	<i>chymotrypsinogen B.</i>

表 2

Dex+/- ratio	gene
0.004735	<i>myelin transcription factor 1-like</i>
0.007831	<i>vomer nasal 1 receptor</i>
0.016435	<i>Serine/threonine-protein kinase 22C</i>
0.024741	<i>Baculoviral IAP(inhibitor of apoptosis)repeat protein</i>
0.03074	<i>T-box transcription factor TBX20</i>
0.031309	<i>IFN-beta</i>
0.042425	<i>plexin A4</i>
0.044481	<i>Testis expressed protein 12</i>
0.050201	<i>Moloney leukemia virus 10-like protein 1</i>

理解される。しかしながら個々の遺伝子については表に示した様に著明な発現量の変化をみとめるものもあり、今後さらに定量PCRによる確認や、*in vivo*での実験が必要である。

結 論

*in vitro*の蝸牛組織での全遺伝子発現は、*in vivo*の状態を十分に再現しており、蝸牛組織培養を用いて遺伝子発現の変化を検討することは可能と考えられた。また、機能が既知の遺伝子で、Dexamethasone 投与

によって10倍以上あるいは10分の1以下への発現量の変化を示すものが10以上同定された。

健康危険情報

なし

研究発表

なし

知的財産権の出願・登録状況

なし

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

1. Takagi D, Iwabuchi C, Maeda M, Nakamaru Y, Furuta Y, Fukuda S, Luc Van Kaer, Nishihara J, Onoe K: Natural killer T cells ameliorate antibody-induced arthritis in macrophage migration inhibitory factor transgenic mice. *Int J Mol Med* 18: 829-936, 2006
2. Tsubuku T, Akao T, Kurkin SA, Fukushima K: Prediction in the timing of pursuit eye movement initiation revealed by cross-axis vestibular-pursuit training in monkeys. *Exp Brain Res* 168: 427-435, 2006
3. Ohtani F, Furuta Y, Aizawa H, Fukuda S: Varicella-Zoster virus load and cochleovestibular symptoms in Ramsay Hunt syndrome. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 115: 233-238, 2006
4. 福田 諭: <総説> 耳鼻咽喉科とウイルス 2. 難聴とウイルス. *耳喉頭頸* 78: 25-30, 2006
5. 福田 諭, 中丸裕爾: 鼻科領域 Wegener 肉芽腫症. *JOHNS* 22: 1749-1752, 2006
6. 佐野 肇, 岡本牧人: 爆発音による急性音響外傷. *JOHNS* 22: 986-988, 2006
7. Naganuma H, Kawahara K, Tokumasu K, Okamoto M: Water May Cure Patients With Meniere Disease. *Laryngoscope* 116: 1455-1460, 2006
8. Sano H, Satoshi Y, Iwase H, Itoh A, Hashimoto D, Okamoto M: Effect of geranylgeranylacetone on gentamycin ototoxicity in rat cochlea culture. *Auris Nasus Larynx*. 34:1-4, 2007
9. Kanzaki S, Shiotani A, Inoue M, Hasegawa M, Ogawa K: Sendai virus vector-mediated transgene expression in the cochlea in vivo. *Audiol Neurootol* 12: 119-26, 2007.
10. Ozawa H, Saitou H, Mizutari K, Takata Y, Ogawa K: Hypothyroidism after radiotherapy for patients with head and neck cancer. *Am J Otolaryngol* 28: 46-9, 2007.
11. Saito H, Araki K, Ozawa H, Mizutari K, Inagaki K, Habu N, Yamashita T, Fujii R, Miyazaki S, Ogawa K: Pulse-oximetry is useful in determining the indications for adeno-tonsillectomy in pediatric sleep-disordered breathing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 71: 1-6, 2006.
12. Kanzaki S, Araki Y, Okamoto Y, Kurita A, Ogawa K. Cholesterol granuloma surrounding the endolymphatic sac. *Auris Nasus Larynx* 34: 95-100, 2007.
13. Kanzaki S, Ito M, Takada Y, Ogawa K, Matsuo K. Resorption of auditory ossicles and hearing loss in mice lacking osteoprotegerin. *Bone* 39: 414-9, 2006.

14. Moro K, Shiotani A, Watabe K, Takeda Y, Saito K, Mori Y, Ogawa K. Adenoviral gene transfer of BDNF and GDNF synergistically prevent motoneuron loss in the nucleus ambiguus. *Brain Res* 1076: 1-8, 2006.
15. Ikeda A, Shiotani A, Mori Y, Fujimine T, Tomifuji M, Takaoka T, Kameyama K, Ogawa K. Suitability of calcium phosphate cement for injection laryngoplasty in rabbits. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 68:103-9, 2006.
16. Fujioka M, Kanzaki S, Okano HJ, Masuda M, Ogawa K, Okano H. Proinflammatory cytokines expression in noise-induced damaged cochlea. *J Neurosci Res* 83: 575-83, 2006.
17. Masuda M, Nagashima R, Kanzaki S, Fujioka M, Ogita K, Ogawa K. Nuclear factor-kappa B nuclear translocation in the cochlea of mice following acoustic overstimulation. *Brain Res* 1068: 237-47, 2006.
18. Araki K, Shiotani A, Watabe K, Saito K, Moro K, Ogawa K. Adenoviral GDNF gene transfer enhances neurofunctional recovery after recurrent laryngeal nerve injury. *Gene Ther* 13: 296-303, 2006.
19. 小川 郁 : 耳鳴治療の最前線. *総合臨床* 56 : 159-160, 2007.
20. 小川 郁 : 【耳鳴診療のすべて】 耳鳴診療の歴史. *JOHNS* 23 : 99-103, 2007.
21. 小澤宏之, 富田俊樹, 田川崇正, 坂本耕二, 小川 郁, 藤井正人 : 前頭洞疾患に対する T チューブ留置法. *頭頸部外科* 16 : 155-161, 2006.
22. 富田俊樹, 小澤宏之, 田川崇正, 坂本耕二, 小川 郁, 藤井正人 : 頭頸部癌治療における我が国からの科学的根拠に基づいた情報発信に向けて 頭頸部癌手術療法のエビデンスと多施設共同研究に向けた今後の方策. *頭頸部癌* 32 : 300-305, 2006.
23. 小川 郁 : 音響性難聴の要因と予防. *日本医事新報* 4298 : 95-96, 2006.
24. 小川 郁, 齊藤秀行 : 【中耳真珠腫の治療 私はこうしている】 再発症例をどう取り扱うか. *ENTONI* 66 : 153-157, 2006.
25. 井上泰宏, 百島祐貴, 小川 郁 : 【3次元画像の実際】 耳科領域の3次元画像診断 聴神経腫瘍. *JOHNS* 22 : 1231-1235, 2006.
26. 大久保啓介, 塩谷彰浩, 齋藤康一郎, 茂呂和久, 荒木幸仁, 池田麻子, 福田宏之, 小川 郁 : 頸部経路にて治癒し得た深頸部膿瘍に併発した縦隔膿瘍の2例. *日気食会報* 57 : 385-392, 2006.
27. 富田俊樹, 小川 郁 : 副咽頭間隙の腺癌. *JOHNS* 22 : 1101-1106, 2006.
28. 小川 郁 : 高齢者の耳鳴り. *Geriatric Medicine* 44 : 741-746, 2006.06
29. 森有子, 塩谷彰浩, 池田麻子, 富藤雅之, 高岡卓司, 藤峰武克, 小川 郁, 緒方寿夫 : 喉頭狭窄への対応 硬口蓋粘膜移植と muscle-pedicle hyoid bone flap を用いた喉頭狭窄の手

- 術. 日気食会報 57 : 172-174, 2006.
30. 神崎晶, 小川 郁 : 音響性聴力障害と遺伝子. 22 : 1005-1007, 2006.
 31. 弓削 勇, 神崎 晶, 小川 郁 : 先天性心奇形に伴い両側顔面神経走行異常を認めた 1 症例. JOHNS 22 : 907-911, 2006.
 32. 小川 郁 : 他覚的聴覚検査法としての耳音響放射検査. *Audiology Japan* 49 : 219-226, 2006.
 33. 富藤雅之, 塩谷彰浩, 高岡卓司, 森 有子, 藤峰武克, 小川 郁 : 喉頭全摘術後の咽頭皮膚瘻, 頸部食道狭窄に対するシリコン製咽頭チューブの使用経験. 日耳鼻 109 : 530-534, 2006.
 34. 弓削 勇, 佐藤美奈子, 新田清一, 神崎 晶, 斉藤秀行, 岡本康秀, 栗田昭宏, 小川 郁 : TRT 早期における音響療法での治療法別効果比較. *Audiology Japan* 2 : 167-171, 2006.
 35. 小川 郁 : 【耳科画像診断マニュアル】 耳硬化症. ENTONI 61 : 38-45, 2006.
 36. 富田俊樹, 小川 郁 : 副咽頭間隙腫瘍に対する段階的な術式の選択. 口腔・咽頭科 18 : 297-304, 2006.
 37. 栗田昭宏, 小川 郁 : DPC に対応したクリニカルパスの実際 突発性難聴. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 78 : 249-255, 2006.
 38. 小川 郁 : 突発性難聴の治療法. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 78 : 205-211, 2006.
 39. 小川 郁 : 進化する人工中耳・人工内耳. 日本医事新報 4273 : 28-32, 2006.
 40. 岡本康秀, 小川 郁 : 症状からみた救急疾患の診断手順 急性難聴. JOHNS 22 : 282-285, 2006.
 41. 富田俊樹, 小川 郁, 田川崇正, 藤井正人, 行木英生 : 副咽頭間隙腫瘍の外科的治療. 日耳鼻 109 : 88-95, 2006.
 42. 小川 郁 : 耳鳴の新しい治療 TRT. 医学のあゆみ 216 : 315-316, 2006.
 43. Matsunaga T, Hirota E, Bito S, Niimi S, Usami S. Clinical course of hearing and language development in GJB2 and non-GJB2 deafness following habilitation with hearing aids. *Audiol Neurootol* 2006;11(1):59-68. Epub 2005 Nov 9.
 44. Oshima A, Suzuki S, Takumi Y, Hashizume K, Abe S, Usami S. CRYM mutations cause deafness through thyroid hormone binding properties in the fibrocytes of the cochlea. *J Med Genet* 2006;43(6):e25.
 45. Kainuma K, Katsuno S, Hashimoto S, Oguchi T, Suzuki N, Asamura K, Usami S. Differences in the expression of genes between normal tissue and squamous cell carcinomas of head and neck using cancer-related gene cDNA microarray. *Acta Otolaryngol* 2006;126(9):967-74.
 46. Iwasaki S, Tsukamoto K, Usami S, Misawa K, Mizuta K, Mineta H. Association of SLC26A4 mutations with clinical features and thyroid function in deaf infants with

- enlarged vestibular aqueduct. *J Hum Genet* 2006;51(9):805-10. Epub 2006 Aug 19.
47. Van Camp G, Snoeckx RL, Hilgert N, van den Ende J, Fukuoka H, Wagatsuma M, Suzuki H, Smets RM, Vanhoenacker F, Declau F, Van de Heyning P, Usami S. A new autosomal recessive form of Stickler syndrome is caused by a mutation in the COL9A1 gene. *Am J Hum Genet* 2006;79(3):449-57. Epub 2006 Jun 26.
 48. Suzuki H, Oshima A, Tsukamoto K, Abe S, Kumakawa K, Nagai K, Sato H, Kanda Y, Iwasaki S, Usami S: Clinical characteristics and genotype-phenotype correlation of hearing loss patients with SLC26A4 mutations. *Acta Oto-Laryngologica* (in press)
 49. 宇佐美 真一 : 内耳毒性と遺伝子. *JHONS VOL.22 NO.7* 2006
 50. 宇佐美 真一 : 難聴診断における遺伝子検査の現状. *Audiology Japan Vol.49* 346-352, 2006
 51. Iwasaki S, Nagura M, Mizuta K: Cochlear implantation in a patient with eosinophilic otitis media. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 263 : 365-369, 2006.
 52. Iwasaki S, Tsukamoto K, Usami S, Misawa K, Mizuta K, Mineta H: Association of SLC26A4 mutations with clinical features and thyroid function in deaf infants with enlarged vestibular aqueduct. *J Hum Genet* 51:805-810, 2006.
 53. Hashimoto Y, Iwasaki S, Nagura M, Mizuta K, Arai M, Mineta H: Pattern of cochlear damage caused by short-term Kanamycin application by using the Round Window Micro-catheter method. *Acta Oto-Laryngol.* 127:116-121, 2007.
 54. Iwasaki S, Yamashita M, Maeda M, Misawa K, Mineta H: Audiological outcome of infants with congenital cytomegalovirus infection in a prospective study. *Audiol Neurotol* 12:31-36, 2007.
 55. 岩崎 聡・橋本泰幸・浜田 登・渡邊高弘・名倉三津佳・水田邦博・峯田周幸 : アンケート調査による網膜色素変性症と難聴・耳鳴の頻度. *Otology Japan* 16 (1) : 37-41, 2006.
 56. 岩崎 聡 : 鼓膜炎の診断と治療. 研修ノート. *耳鼻臨床* 99 (7):602-603, 2006.
 57. 岩崎 聡 : 耳鳴の原因疾患. 耳鳴診療のすべて. 東京医学社 *JOHNS* 23(1) : 19-22, 2007.
 58. Nakashima T, Naganawa S, Sugiura M, Teranishi M, Sone M, Hayashi H, Nakata S, Katayama M, Ishida IM. Visualization of endolymphatic hydrops in patients with Meniere's disease. *Laryngoscope* 117: 415-420, 2007.
 59. Hayashi H, Sone M, Schachern PA, Wakamatsu K, Paparella M, Nakashima T. ; Comparison of the quantity of cochlear melanin in young and old C57/BL6 mice. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 133: 151-154, 2007.
 60. Sone M, Yamamuro Y, Hayashi H, Niwa Y, Nakashima T. Otitis media in adults as a symptom of gastroesophageal reflux. *Otolaryngol Head Neck Surg* 136: 19-22, 2007.

61. Sugiura M, Naganawa S, Sato E, Nakashima T. Hemorrhage or high concentration of protein in the cochlea in Ramsay Hunt syndrome. *Acta Otolaryngol* (in press)
62. Naganawa S, Sugiura M, Kawamura M, Fukatsu H, Nakashima T, Maruyama K. Prompt contrast enhancement of cerebrospinal fluid space in the fundus of the internal auditory canal observations in patients with meningeal diseases on 3D-FLAIR images at 3 Tesla. *Magn Reson Med Sci* 5: 151-155, 2006.
63. Sugiura M, Naganawa S, Teranishi M, Nakashima T. Three-dimensional fluid-attenuated inversion recovery magnetic resonance imaging findings in patients with sudden sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 116: 1451-1454, 2006.
64. Zou P, Muramatsu H, Sone M, Hayashi H, Nakashima T, Muramatsu T. Mice doubly deficient in the midkine and pleiotrophin genes exhibit deficits in the expression of betatectorin gene and in auditory response. *Lab Invest* 86: 645-653, 2006.
65. Tominaga M, Yamamoto H, Sone M, Teranishi M, Nakashima T. Response of cochlear blood flow to prostaglandin E1 applied topically to the round window *Acta Otolaryngol* 126: 232-236, 2006.
66. Sugiura M, Naganawa S, Teranishi M, Sato E, Kojima S, Nakashima T. Inner ear hemorrhage in systemic lupus erythematosus *Laryngoscope* 116: 826-828, 2006.
67. Sugiura M, Naganawa S, Sato E, Nakashima T. Visualization of a high protein concentration in the cochlea of a patient with a large endolymphatic duct and sac, using three-dimensional fluid-attenuated inversion recovery magnetic resonance imaging. *J Laryngol Otol*, 120: 1084-1086, 2006.
68. Otake H, Sugiura M, Naganawa S, Nakashima T. 3D-FLAIR magnetic resonance imaging in the evaluation of mumps deafness. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 70 : 2115-2117, 2006.
69. Yoshino T, Sato E, Nakashima T, Teranishi M, Yamamoto H, Otake H, Mizuno T. Distribution of pendrin in the organ of Corti of mice observed by electron immunomicroscopy. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 263 : 699-704, 2006.
70. Ishida IM, Sugiura M, Nakashima T, Naganawa S, Sato E, Sugiura J, Yoshino T. Lateral semicircular canal and vertigo in patients with large vestibular aqueduct syndrome. *Otol Neurotol*, 27 : 788-792, 2006.
71. Nakashima T, Sone M, Fujii H, Teranishi M, Yamamoto H, Otake H, Sugiura M, Naganawa S. Blood flow to the promontory in cochlear otosclerosis. *Clin Otolaryngol*, 31: 110-115, 2006.
72. Uchida Y, Ando F, Nakata S, Ueda H, Nakashima T, Niino N, Shimokata H.