

Cre/lox と調節性 Caspase を用いたモザイク様細胞死モデルの樹立
—両側特発性難聴の初期を再現するツールの開発—

主任研究者：小川 郁 (慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科)
共同研究者：藤岡 正人 (慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科)
共同研究者：戸叶 尚史 (東京医科歯科大学耳鼻咽喉科)
共同研究者：アルバート・エッジ (ハーバード大学医学部耳科喉頭科)

研究要旨

高度感音難聴の克服に向け、病態の解明と新規治療法の樹立に向けた基礎研究を展開している。その基盤となる実験系として、遺伝子工学・発生工学を用いて少数の有毛細胞がまばらにアポトーシスを起こす有毛細胞特異的的部分的アポトーシスモデルを樹立した。昨今の報告と考えあわせると、当該モデルは特発性難聴初期の病態を再現するモデルの一つとして有用であるものと考えられ、その病態生理の解明により「早期発見・早期治療」に向けた新規治療法探索が期待される。

研究目的

内耳性難聴の研究における最大のハードルの一つに、発症時の局所組織をリアルタイムで直接採取できないことが挙げられる。従って病態解明に向けた検索は、他病死による症例での側頭骨病理か、採血や画像診断などの間接的な推測に頼らざるを得ない。昨今側頭骨病理から、急性高度難聴発症直後に他病死した患者の側頭骨病理において有毛細胞や支持細胞に局限した変性像が報告されている (Marchant et al, 2005)。そこで当研究では有毛細胞のアポトーシスによる難聴を病態生理とし、その起こり始め (onset) を再現するモデルとして、有毛細胞特異的にしかし一部の有毛細胞だけが一定の割合でアポトーシスを起こす遺伝子改変動物マウスモデルを樹立した。

研究方法

アポトーシス実行シグナルの最下流にある自殺遺伝子カスパーゼ3は、元来細胞死のシグナルに応じて二量体することで活性化して核内に移行し、下流の細胞死実行遺伝子群を誘導する。今回我々は、FK506 アナログ剤 (AP20187: ARIAD 社) の投与で活性化される改変型カスパーゼ3 (Chen et al, 2002) を既報のモザイク様 flox/stop 発現ベクター (Moeller et al, 2005) に挿入して、時空間調節性のモザイク様細胞死誘導遺伝子を作成し (Mos-iCsp3)、この遺伝子を全身に発現するトランスジェニックマウスを樹立した。このマウスを有毛細胞特異的 Cre マウスである Pou4f3-Cre; Math1-nGFP 二重遺伝子改変マウスとの交配し、Cre と Mos-iCsp3 の双方を持つ多重遺伝子改変マウスを実験に用いた。(※当研究は米国

ハーバード大学耳科・喉頭科との共同研究により行われた。)

(倫理面への配慮) 本実験は、本大学および米国ハーバード大学の動物実験委員会(NIH ガイドラインに準拠)によって厳格な審査を受け受理されている。

研究結果

コルチ器器官培養系では AP20187 添加によりモザイク様に有毛細胞を 49%まで脱落せしめた。支持細胞の脱落は認めなかった。In vivo で AP20187 を投与したところ、DPOAE (ISO-DP)にて 27.5 ± 3.5 dB から 36.0 ± 9.2 dB へ、ABR で I 波の潜時において 1.35 ± 0.08 ms から 1.68 ± 0.14 ms への軽度延長、閾値にして 29.2 ± 2.2 dB から 44.2 ± 9.3 dB への軽度上昇を認めた。組織学的には、細胞死は有毛細胞に限局してモザイク様に生じており、 $24.6 \pm 1.8\%$ の消失を認めた。神経節細胞数は変化がなかった。

考察

多くの変性疾患が特定の細胞種の経時的脱落によって生じるにもかかわらず、標的細胞がモザイク様に細胞脱落「しはじめた」状態を再現する動物モデルはこれまで皆無だった。今回我々が樹立したモデルはベッドサイドでの「症状の起きはじめ(onset)」を再現し、疾患初期の病態生理を解析するツールとして有用であるものと考えられる。有毛細胞脱落を原因とする両側進行性難聴(特発性難聴)のごく初期を再現するモデルとして当モデルを今後解析することで、早期発見・早期治療に向けたトランスレショナルリサーチに応用したい。

結論

有毛細胞脱落を原因とする両側進行性難聴(特発性難聴)の病初期を再現するモデルを樹立した。今後はこのモデルを用い、

早期発見・早期治療に向けたトランスレショナルリサーチに応用していきたい。

健康危険情報

なし

研究発表

論文発表

なし(現在投稿中)

2. 学会発表

1) Cre/lox 系と調節性 Caspase を用いたモザイク様細胞死モデルの樹立 病気の「なりはじめ」を科学する

平成 22 年 5 月 第 111 回日本耳鼻咽喉科学会総会 藤岡正人, 戸叶尚史, 小川郁

2) Cre/lox Mediated in vivo Mosaic Cell Ablation to Investigate Early Stages of Degenerative Disease: Generating a Model for the "Onset" of Gradual Hearing Impairment 2010.2 第 33 回 Midwinter Research Meeting of Association of Researchers in Otolaryngology Fujioka M and Edge AS

知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中

CONDITIONAL-STOP DIMERIZABLE CASPASE TRANSGENIC ANIMALS (2009) 米国国際特許申請: 12/352,515; Pub.#: US 2009/0193533

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

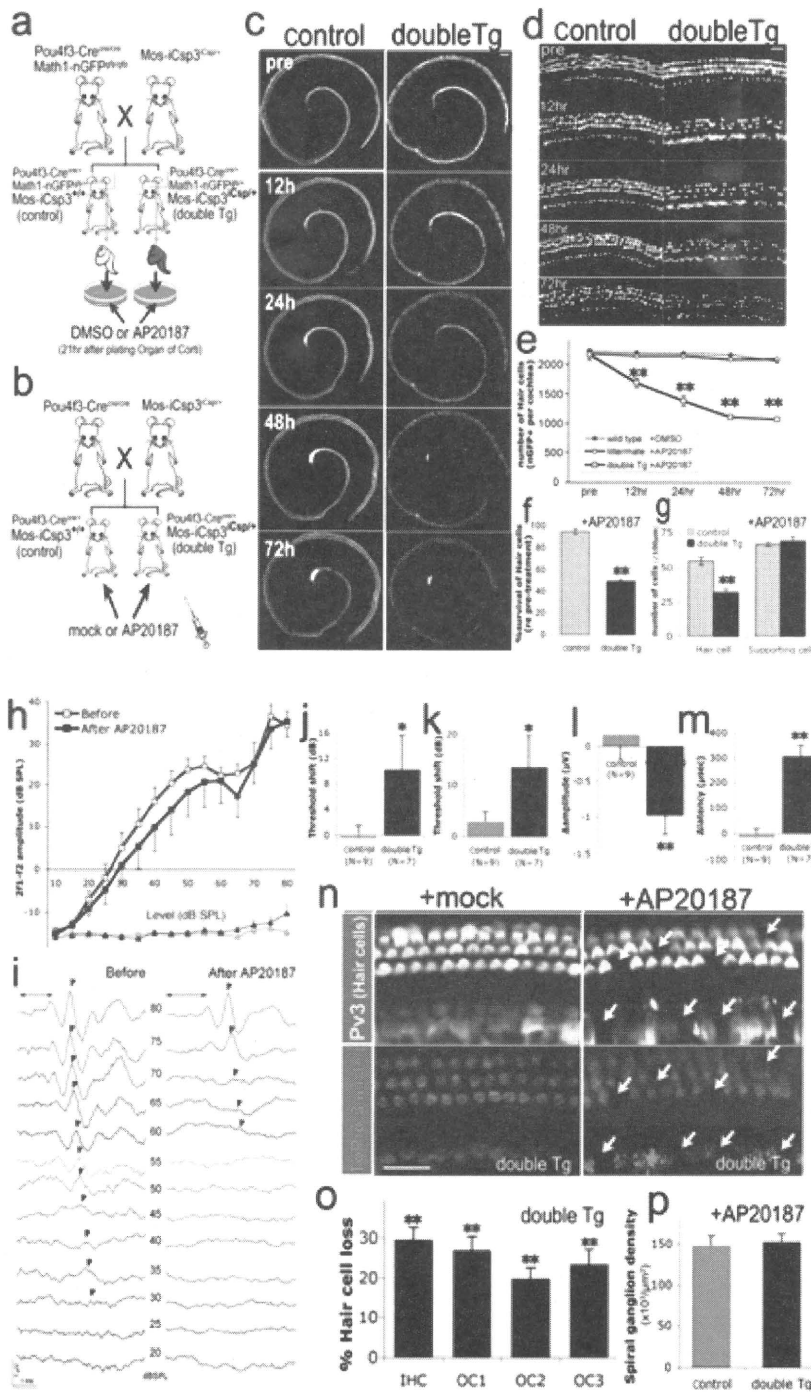


図1
培養蝸牛における
AP20187添付での
モザイク様有毛細胞
特異的細胞死の経時
的検討

図2

In vivoでのAP20187
投与における特異的
かつモザイク様有毛
細胞細胞死の検討

当モデルにより軽度
の両側難聴が誘導さ
れ、両側特発性難聴
初期の、症状の起こ
りはじめを再現しう
る動物モデルである
可能性が示唆された。

内耳有毛細胞への自己免疫寛容破綻による自己免疫性難聴モデルの樹立
—キラーT細胞における有毛細胞への免疫寛容の破綻を作用機序として—

分担研究者：小川 郁（慶應義塾大学耳鼻咽喉科・教授）
共同研究者：藤岡正人（慶應義塾大学耳鼻咽喉科・助教）
共同研究者：井上泰宏（慶應義塾大学耳鼻咽喉科・准教授）
共同研究者：水足邦雄（慶應義塾大学耳鼻咽喉科・助教）
共同研究者：和多田有紀子（慶應義塾大学耳鼻咽喉科・助教）
共同研究者：アルバート・エッジ（ハーバード大学耳科・喉頭科・准教授）

研究要旨

高度感音難聴の克服に向け、病態の解明と新規治療法の樹立に向けた基礎研究を展開している。その基盤となる実験系として、遺伝子工学・発生工学を用い有毛細胞への免疫寛容が破綻する自己免疫性難聴モデルマウスを樹立し、キラーT細胞による内耳有毛細胞への自己免疫の作動は、高音急墜型の内耳性難聴を誘導することを示した。病態生理として自己免疫が難聴を誘導することが前向き (prospective) に示されるとともに、自己免疫の原因となる免疫担当細胞 (subset) によって聴力型が異なる可能性が示唆された。

研究目的

内耳性難聴の研究における最大のハードルの一つに、発症時の局所組織をリアルタイムで直接採取できないことが挙げられる。従って病態解明に向けた検索は、他病死による症例での側頭骨病理か、採血や画像診断などの間接的な推測に頼らざるを得ない。昨今側頭骨病理から、急性高度難聴発症直後に他病死した患者の側頭骨病理において有毛細胞や支持細胞の一時的な変性が報告されはじめた (Marchant et al, 2005)。当研究では病態の一部を担っているとされる自己免疫による難聴に焦点を当て、有毛細胞への自己免疫の作動が難聴発症の機序となり得るか、その際はいかなる病態生理によるものかを解析することで、急性難聴の新規診断法・治療法を探索することを目的とする。

研究方法

免疫寛容の破綻を *in vivo* で再現する系として広く使われている血球凝集素 (H1N1,A/PR/8/34) 強制発現系は、標的臓器に HA 抗原を「自己」の一部として先天的に発現させた上で (免疫寛容)、同抗原を認識する遺伝子改変 T 細胞を

静注することで、体内に標的を「非自己」と見做す免疫担当細胞が後天的に出現する状態、すなわち「自己免疫」を誘導させる実験系である。我々はハーバード大学との共同研究で、昨年までに同分子を内耳有毛細胞特異的に発現する遺伝子改変マウス (Math-HA) を樹立した。他方リンパ球側の遺伝子改変動物として、CD8 陽性 T 細胞 (キラーT細胞) に HA を認識する遺伝子改変 TCR が過剰発現するマウスを用意した。本年度はこの両者を用いて、

1) 直接交配して二重遺伝子改変動物を作成し、聴力経過を長期にわたって検討した。

2) T細胞トランスジェニックマウス脾臓よりリンパ球を採取し、尾静脈から Math-HA マウスへ移植し急性期の聴力変化を検討した。

(倫理面への配慮)

本実験における実験計画は、本大学及び米国ハーバード大学の動物実験委員会 (NIH ガイドラインに準拠) により厳格な審査を

受け受理されている。

研究結果

1) 直接交配して得られた二重トランスジェニックマウスにおいては、極めて緩徐に進行する、高音急墜型の内耳性難聴を呈していた。

2) T 細胞移植から 12 時間以内に、高音域に局限して有意な内耳性難聴が誘導された。

考察

これまでの基礎・臨床的検討は、内耳性難聴の一部に自己免疫の関与がある可能性を示唆する間接的証拠の蓄積と、内耳への抗原接種による局所での炎症反応誘導、そして活性型ヘルパーT細胞が内耳へ到達し難聴を誘導することの証明に限られていた。

今回我々は自己免疫性疾患の本質である免疫寛容の破綻を病態生理として着眼し、まずキラーT細胞における免疫寛容破綻を模倣するモデルを樹立した。結果 2) から、末梢血に出現した自己反応性 T 細胞は速やかに内耳へ達して難聴を誘導すること、キラーT細胞が原因の場合は高音急墜型難聴を誘導することが示された。この聴力型に関する予想外の結果は、実際の臨床現場における高音急墜型感音難聴の中にキラーT細胞の自己免疫性難聴が含まれる可能性を示唆している。

他方、実験 1) の結果は、本来ならば

局所免疫寛容により自己攻撃性 T 細胞は除去されるにも関わらず、長い経過をたどると難聴が誘導されたものと考えられる。この結果は、実地臨床での特発性難聴患者で高音急墜型の症例中にキラーT細胞の自己攻撃を原因とする自己免疫性難聴が含まれている可能性を示唆すると同時に、自己反応性T細胞の除去を司る制御性 T 細胞の何らかの機能異常が病態生理に關与する可能性が強く示唆された。

結論

キラーT細胞による内耳有毛細胞への自己免疫は高音急墜型の内耳性難聴を誘導することが示され、病態生理として自己免疫が難聴を誘導することが前向きに(prospective)証明された。今後当モデルを用い、局所型自己免疫性難聴の詳細な病態解明を進め、新規治療標的の探索と治療法の開発を目指す。

健康危険情報

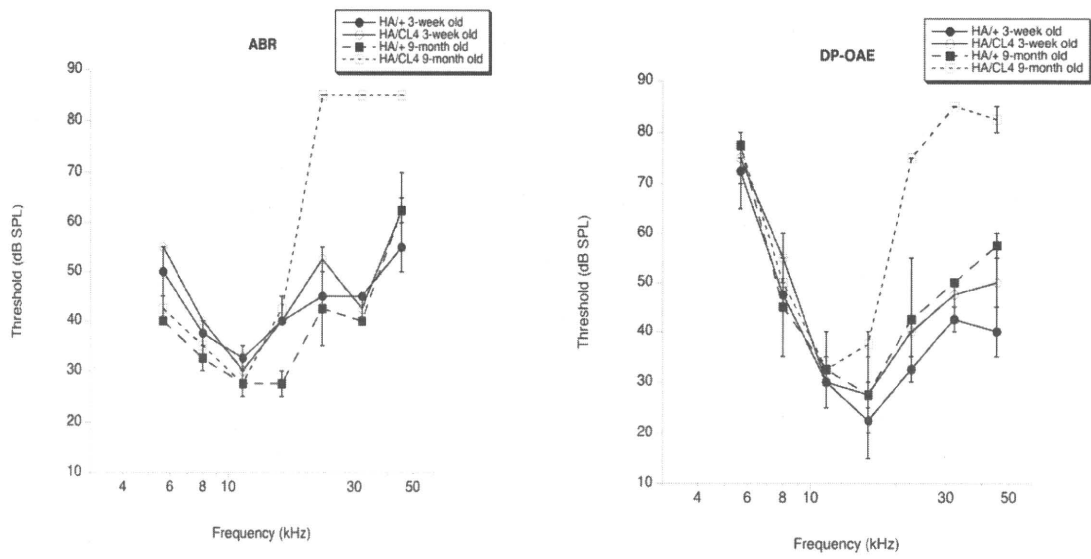
なし

研究発表

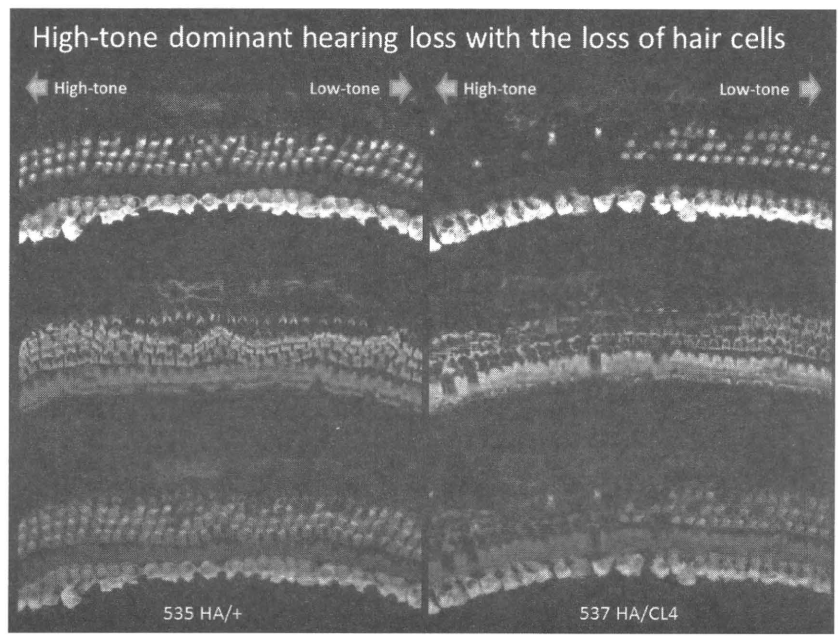
なし

知的財産権の出願・登録状況

米国特許出願を予定している



(図1) Math1-HA; TCR-CL4 の進行性聴力低下 (ABR, OAE)
 生後9ヶ月令において、二重トランスジェニックにおいてのみ高音急墜型の閾値上昇が見られた。



(図2)
 二重トランスジェニック(右)および陰性対照群(左)における、22kHz付近でのコルチ器の観察。

実験群においてのみ、同周波数付近から基底回転側で有毛細胞が消失していることが見て取れる。

質量顕微鏡による5種類のホスファチジルコリンの蝸牛における局在

分担研究者：水田邦博（浜松医科大学耳鼻咽喉科）

共同研究者：瀧澤義徳（浜松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：早坂孝宏（浜松医科大学分子解剖学研究部門）

共同研究者：瀬藤光利（浜松医科大学分子解剖学研究部門）

研究要旨

ホスファチジルコリン (PC) は、細胞膜二重層を構成するリン脂質の一つであり、コリンヘッドグループと二つの脂肪酸が結合した構造を持つ。脂肪酸には多くの種類があり、脂肪酸組成により異なる種類のPCが存在する。これまでに蝸牛におけるPCの局在を明らかにした報告はない。質量分析イメージングはここ数年で発展してきた研究分野であり、組織切片上で直接質量分析を行い、生体分子の同定とその局在も明らかにできる手法である。我々が開発した、 $10\mu\text{m}$ の高い空間分解能と高精度な質量分析能を持つ質量顕微鏡を用いて蝸牛切片の解析を行ったところ、蝸牛のそれぞれの部位に局在する5つのPCを明らかにすることができた。

研究目的

蝸牛において難聴にかかわる遺伝子やタンパク質などの生体分子の解析は多くの方法で行われてきた。タンパク質に加えて、生体膜の基礎的構造に含まれる脂質の役割も検討され、蝸牛内でのセカンドメッセンジャーとしての働きが示されている。しかしながら、それらの局在に関しては放射性標識を用いて培養された蝸牛組織において示されるにすぎなかった。

質量分析イメージングは直接組織切片にレーザーを照射することによって生体分子をイオン化しその質量を検出する。そのため、生体分子の質量と同時に位置情報を得ることが可能である。従来の方法では

抗体や緑色蛍光蛋白質などの標識を必要とするが、本手法では質量を測定するため標識を必要としない。質量分析 (MS: mass spectrometry) を繰り返し行う多段階質量分析 (MS/MS 解析) で生体分子の構造解析も可能であり、これにより生体分子を同定することもできる。

共同研究者である瀬藤教授と島津製作所らのグループが開発した質量顕微鏡は、これまでの質量分析イメージング装置では $50\mu\text{m}$ 程度であった空間分解能を $10\mu\text{m}$ に改良し、高精度な質量測定も

実現した。

今回我々は、この質量顕微鏡を用いてリン脂質の一種であるホスファチジルコリン (PC: Phosphatidylcholine) の局在が蝸牛内の部位により異なることを明らかにした。質量顕微鏡が蝸牛研究に応用可能か検討することを目的とした。

研究方法

プライエル反射正常である 3 週令のオスのモルモットの蝸牛を使用した。ペントバルビタールを腹腔内投与し麻酔したのち、断頭し内耳骨包から蝸牛を摘出した。これを無固定であらかじめ冷やしておいたイソペンタンで凍結させ、2%CMC (カルボキシメチルセルロース Na) に包埋、凍結し -80°C で保存した。

クライオスタットで蝸牛を切り出した。導電性のある酸化インジウムスズ (indium-tin-oxide; ITO) を表面にコートした ITO スライドガラスに接着させ、試料を分散保持するための有機化合物であるマトリックス溶液を組織切片上に霧状にスプレーした。これを質量顕微鏡で分析した。

5つの切片で解析を行い、それぞれの生体分子のシグナルの強度をシェッフエテストを用いて統計解析を行った。

(倫理面への配慮)

当研究は浜松医科大学「動物実験委員会」にて審査・承認されている。

研究結果

無固定無脱灰で切り出した蝸牛の構造が保たれていることを HE 染色で確認した (図 1)。これを質量顕微鏡で解析し 5 つの局在がことなる PC 種を明らかにすることができた (図 2)。PC (16:0/16:0) が蝸牛軸の蝸牛神経と骨らせん板内の神経に、PC(16:0/16:1) はコルチ器に、PC(16:0/18:1) はコルチ器と血管条に、PC(16:0/18:2) はらせん靭帯に、他の部位と有意差をもって局在傾向があると考えられた。PC(18:0/18:1) はコルチ器以外に多く存在するが全体的にシグナル強度は低かった。図 2 c と d を、色を変えて融合するとその局在の違いがより顕著に示された (図 2 f、g)。

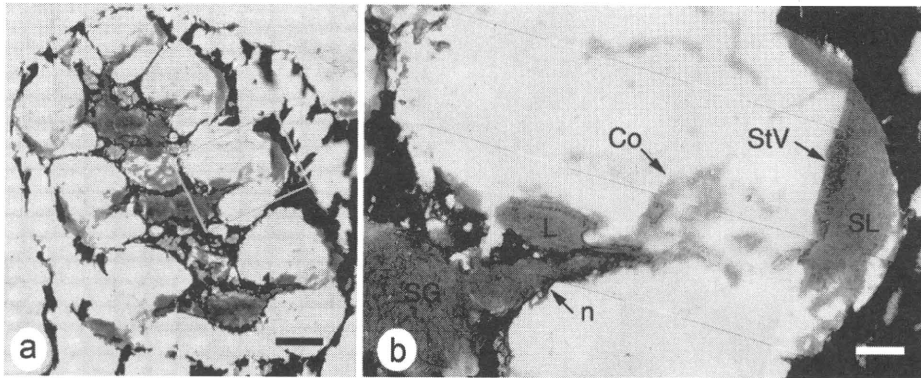


図1 モルモット蝸牛のHE染色標本。

a) 蝸牛標本、線は500 μ m。b) aの緑の部分の拡大図、線は100 μ m。SG：らせん神経節、n：骨らせん板の神経、L：らせん板縁、Co：コルチ器、StV：血管条、SL：らせん靱帯。

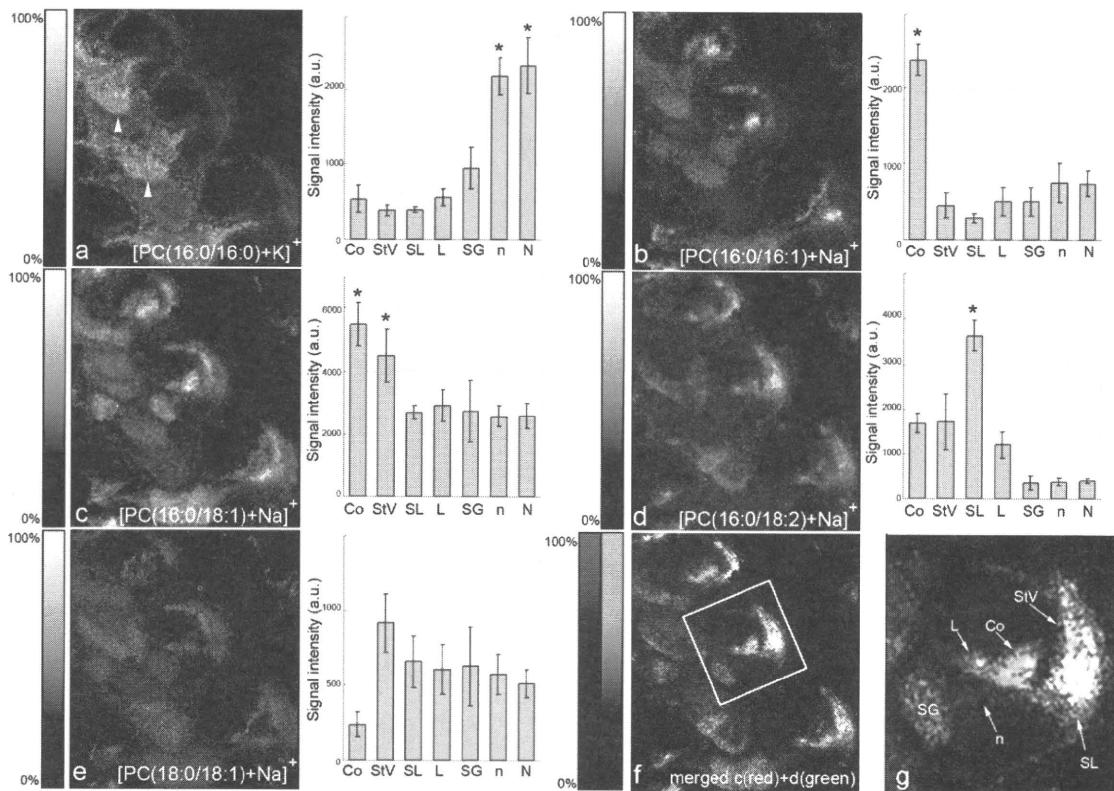


図2 MS/MS解析によって明らかにされた5つのPC種の蝸牛の各部位における局在。

矢頭は蝸牛軸の蝸牛神経(N)。* $P < 0.05$ で他の部位と統計学的有意差を認めた。エラーバーは標準偏差を表す。

考察

質量分析を用いた蝸牛の解析はこれまでもいくつか報告があるが、標識を用いずに生体分子とその分布を解析したものはない。我々は、顕微鏡レベルで局在を解析した。

5つのPC種の異なる局在を明らかにした。これらを含めたPC種が蝸牛のミトコンドリアの機能を保護したり、加齢性難聴を予防することが報告されている。PC種が様々なストレスからの保護のために蝸牛の恒常性の維持に関与していると推察される。

PCはコリンヘッドグループに二つの脂肪酸が結合した構造をもつ。脂肪酸組成の違いによる局在の相違を明らかにできる手法は質量分析イメージングのみである。今回明らかにされた、局在の違いをこれまでの脳や腎臓の報告と比較する。脳においては、PC(16:0/16:0)とPC(16:0/18:1)は嗅球の顆粒層や小脳分子層といった、神経的に可塑性が高い部位に局在傾向があり、蝸牛では前者は神経線維に多く、後者はコルチ器に多く分布していた。これらのPCが神経システムに関連していると考えられる。

また腎臓では、PC(16:0/18:2)が近位尿細管、ヘンレループ、遠位尿細管や集合管を含む腎髄質に局在している。これらの部位は腎臓において、Kイオンの循環に関連した部位であり、このPCが蝸牛のらせん靭帯に多いことはKイオンが循環する点で、相同性があることを裏付けて

いる。PC(16:0/16:1)は、脳や腎臓では示されていない。コルチ器の構造がより詳細に維持された切片が作成できれば、有毛細胞や支持細胞に局在のあるPCが明らかになる可能性がある。

PCの脂肪酸組成による局在の違いは、蝸牛の部位の細胞構造の違いと関連していると考えられた。

結論

質量顕微鏡が蝸牛研究に応用可能であることが示された。今後、薬物や加齢による聴力障害モデルの蝸牛を解析することで、それらに関与する生体分子の解明につながると考えられる。

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表

1) Takizawa Y, Mizuta K, Hayasaka T, Nakanishi H, Okamura J, Mineta H, Setou M. Specific Localization of Five Phosphatidylcholine Species in the Cochlea by Mass Microscopy. *Audiology & Neurotology*. 16:315-322, 2010.

2. 学会発表

1) 瀧澤義徳、水田邦博、中西啓、大和谷崇、姜洪仁、橋本泰幸、岡村純、早坂孝宏、瀬藤光利、峯田周幸：蝸牛における質量分析イメージングの試み。第111回日本耳鼻咽喉科学会総会：2010, 5, 22.

知的財産権の出願・特許情報

なし

V. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表
(○は研究成果に特に関わりの深い刊行物)

発表業績

研究代表者 (小川 郁)

1. ○Minami SB, Shinden S, Okamoto Y, Watada Y, Watabe T, Oishi N, Kanzaki S, Saito H, Inoue Y, Ogawa K. Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) for treatment of chronic tinnitus. *Auris Nasus Larynx* 2010 Oct 22. [Epub ahead of print]
2. ○Ide R, Harada T, Kanzaki S, Saito H, Hoshikawa M, Kawahara T, Ogawa K. Physical and physiological effects on otoacoustic emissions in hypobaric hypoxia. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2010, 72 (4): 225-32.
3. Okubo K, Saito K, Fukuda H, Watanabe K, Ogawa K, Shiotani A. Traditional Chinese Medicine for treatment of laryngeal papillomatosis. *J Altern Complement Med* 2010, 16 (4): 427-33.
4. ○Mizutari K, Matsunaga T, Inoue Y, Kaneko H, Yagi H, Namba K, Shimizu S, Kaga K, Ogawa K. Vestibular dysfunction in a Japanese patient with a mutation in the gene OPA1. *J Neurol Sci* 2010, 293 (1-2): 23-8.
5. ○Oishi N, Inoue Y, Saito H, Kanzaki S, Kanzaki J, Ogawa K. Long-term prognosis of low-frequency hearing loss and predictive factors for the 10-year outcome. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2010, 142 (4): 565-9.
6. ○Wakabayashi K, Fujioka M, Kanzaki S, Okano HJ, Shibata S, Yamashita D, Masuda M, Mihara M, Ohsugi Y, Ogawa K, Okano H. Blockade of interleukin-6 signaling suppressed cochlear inflammatory response and improved hearing impairment in noise-damaged mice cochlea. *Neurosci Res* 2010, 66 (4): 345-52.
7. ○Saito H, Nishiwaki Y, Michikawa T, Kikuchi Y, Mizutari K, Takebayashi T, Ogawa K. Hearing handicap predicts the development of depressive symptoms after 3 years in older community-dwelling Japanese. *J Am Geriatr Soc* 2010, 58 (1): 93-97.
8. ○小川 郁. よくわかる聴覚障害—難聴と耳鳴のすべて. 2010, 永井書店、大阪.
9. 五島史行, 堤知子, 新井基洋, 小川 郁. 長期にわたりめまいを訴える症例における他の身体的愁訴、心理状態について. *日耳鼻会報* 2010, 113 (9): 742-750.
10. 五島史行, 水足邦雄, 國弘幸伸, 小川 郁. 指尖脈波解析を用いためまい患者の自律神経機能評価. *Equilibr Res* 2010, 69 (4): 207-212.

11. 五島史行, 林賢, 堤知子, 小川 郁. 重心動揺計による心因性めまいの投薬治療評価の試み. *Equilibr Res* 2010, 69 (3): 141-146.
12. 小川 郁. 【私の経験した最悪症例(My worst case ever)】 私の経験した最悪のアブミ骨手術症例. *Otol Jpn* 2010, 20 (3): 231-237.
13. 小川 郁. 【めまいの up date】 突発性難聴とめまい. *クリニシアン* 2010, 57 (3): 253-258.
14. ○小川 郁. 耳鳴の成因とその治療戦略. *東京都医師会雑誌* 2010, 63 (5): 607-611.
15. 河奈裕正, 金子剛, 小川 郁, 臼田慎, 中川種昭. 【耳介の形成外科】 骨接合インプラントによる耳介エピテーゼ. *PEPARS* 2010, 42: 67-76.
16. 五島史行, 中井貴美子, 小川 郁. めまい、耳鳴り患者に対する投薬量減量を目的とした個人自律訓練法の導入とその成績. *日本心療内科学会誌* 2010, 14 (2): 124-128.
17. 五島史行, 中井貴美子, 村上正人, 小川 郁. 【線維筋痛症】 耳鼻咽喉科領域の線維筋痛症. *神経内科* 2010, 72 (5): 494-497.
18. 岡本康秀, 松永達雄, 泰地秀信, 守本倫子, 坂田英明, 安達のどか, 貫野彩子, 山口聡子, 仲野敦子, 高木明, 加我君孝, 小川 郁. 両側前庭水管拡大症の確実例とボーダーライン例の SLC26A4 遺伝子変異および臨床所見の特徴. *Audiology Japan* 2010, 53 (2): 164-170.
19. ○小川 郁. 【耳鼻咽喉科疾患の診療に関するガイドライン 解釈と有効な使い方】 急性感音難聴診断基準. *JOHNS* 2010, 26(5): 690-694.
20. 馬場優, 小川 郁. 小児頸部キャスルマン病の 1 例. *耳喉頭頸* 82(4): 309-311.
21. 宇野光祐, 齋藤康一郎, 大久保啓介, 稲垣康治, 長西秀樹, 池田達彦, 河野光智, 小林紘一, 小川郁. 深頸部・縦隔・腋窩膿瘍を併発した急性喉頭蓋炎の 1 症例. *耳喉頭頸* 82(4): 303-308.
22. 大石直樹, 小川 郁. 【初めての漢方 取り入れ方のコツ】 漢方薬の取り入れ方のコツ 耳鳴. *JOHNS* 2010, 26 (4): 577-580.
23. 五島史行, 中井貴美子, 小川 郁. 総合病院耳鼻咽喉科における心身症の割合と心療耳鼻咽喉科医の必要性. *心身医学* 2010, 50 (3): 229-236.
24. 小川 郁, 井上泰宏, 齊藤秀行, 神崎晶, 岡本康秀, 水足邦雄, 鈴木隆史, 大石直樹, 和多田有紀子, 渡部高久, 藤岡正人耳硬化症Update 治療と予防. *耳鼻臨床* 2010, 103 (2): 103-112.
25. 小川 郁. 診断の指針 治療の指針 耳鳴の再順応療法 TRT. *総合臨床* 2010, 59(1) 131-132.

26. Mochizuki E, Okumura K, Ishikawa M, Yoshimoto S, Yamaguchi J, Seki Y, Wada K, Yokohama M, Ushiki T, Tokano H, Ishii R, Shitara H, Taya C, Kitamura K, Yonekawa H, Kikkawa Y : Phenotypic and Expression Analysis of a Novel Spontaneous MYOSIN VI Null Mutant Mouse. *Exp Anim* 59(1) : 57-71, 2010
27. Fujikawa T, Noguchi Y, Ito T, Takahashi M, Kitamura K : Additional heterozygous 2507A>C mutation of WFS1 in progressive hearing loss at lower frequencies. *Laryngoscope* 120:166-171, 2010
28. Ariizumi Y, Hatanaka A, Kitamura K : Clinical prognostic factors for tinnitus retraining therapy with a sound generator in tinnitus patients. *J Med Dent Sci* 57 : 45-53, 2010
29. Abe S, Noguchi Y, Kitamura K : What do patients with hereditary deafness think of genetic studies? *Auris Nasus Larynx* 37 : 422-426, 2010
30. Takahashi M, Kimura Y, Sawabe M, Kitamura K : Modified paraffin-embedding method for the human cochlea that reveals a fine morphology and excellent immunostaining results. *Acta Otolaryngol* 130 : 788-792, 2010
31. Koda H, Kimura Y, Ishige I, Eishi Y, Takahashi K, Iino Y, Kitamura K : Quantitative cellular level analysis of mitochondrial DNA 3243A>G mutations in individual tissues from the archival temporal bones of a MELAS patient. *Acta Otolaryngol* 130 : 344-350, 2010 (電子出版 2009.8)
32. Kato T, Nishigaki Y, Noguchi Y, Ueno H, Hosoya H, Ito T, Kimura Y, Kitamura K and Tanaka M : Extensive and rapid screening for major mitochondrial DNA point mutations in patients with hereditary hearing loss. *J Hum Genet* 55 : 147-154, 2010 (電子出版 2010.1)
33. 伊藤 卓, 野口佳裕, 大野十央, 喜多村 健 : 突発性両側性感音難聴の検討 - 弧発例と家族例の違い -. *Audiology Japan* 53 : 150-157, 2010
34. 岩崎 聡, 喜多村 健, 福田 諭, 小林俊光, 熊川孝三, 宇佐美 真一, 土井勝美, 西崎和則, 暁 清文, 東野哲也 : 本邦における埋め込み型骨導補聴器 (Bone-Anchored Hearing Aid : BAHA) 治験 -補聴器との比較について-. *Audiology Japan* 53 : 224-231, 2010
35. Ohno K, Noguchi Y, Kawashima Y, Yagishita K, Kitamura K : Secondary hyperbaric oxygen therapy for idiopathic sudden sensorineural hearing loss in the subacute and chronic phases. *J Med Dent Sci* 57 : 127-132, 2010
36. Yashima T, Noguchi Y, Kawashima Y, Rai T, Ito T, Kitamura K : Novel ATP6V1B1 mutations in distal renal tubular acidosis and hearing loss. *Acta Otolaryngol*, 130 : 1002-1008, 2010
37. Tsunoda A, Takahashi N, Kitamura K : The relationship between the superior

- canal dehiscence syndrome and human evolution : Does human evolution cause vertigo? J Vestibul Res-Equil 20 : 278, 2010
38. 倉田 奈都子, 古宇田 寛子, 喜多村 健 : 急性中耳炎に合併したS状静脈洞血栓症および脳膿瘍の一例. Otol Jpn 30(3) : 180-185, 2010
 39. Iwasaki A, Tokano H, Kamiyama R, Suzuki Y, Kitamura K : A 24-month-follow-up study of argon plasma coagulation of the inferior turbinate in patients with perennial nasal allergy. J Med Dent Sci 57 : 11-15, 2010
 40. 矢部 多加夫, 村上信五, 時田信博, 喜多村 健 : 耳科診療のありかた - 1. 市中基幹病院における耳科診療の現状、医療機関連携について - . Otol Jpn 20(3) : 216-221, 2010
 41. 矢部 多加夫, 村上信五, 時田信博, 喜多村 健 : 耳科診療のありかた - 2. 市中基幹病院における後進指導、医事紛争、役割分担、病院オープン化、耳科診療の今後について - . Otol Jpn 20(3) : 222-227, 2010
 42. 渡邊 嶺, 岩崎朱見, 杉本太郎, 古宇田 寛子, 喜多村 健 : マイクロデブリッダーによる成人型多発性喉頭乳頭腫手術の2例. 耳鼻臨床 103 : 1115-1119, 2010
 43. Inaba Y, Tokano H, Ohtsu A, Kitamura K : A case of descending necrotizing mediastinitis penetrating to the esophagus. J Rural Med 5(2) : 190-193, 2010
 44. Ito T, Noguchi Y, Yashima T, Ohno K, Kitamura K : Hereditary hearing loss and deafness genes in Japan. J Med Dent Sci 57 : 1-10, 2010
 45. 喜多村 健 : 栃木の症例で始めた難聴遺伝子解析. 栃耳鼻会報 69 : 13-14, 2010
 46. 野口佳裕, 喜多村 健 : II. 症候編 5. 耳鳴・難聴. 総合臨床 59 増刊 : 707-711, 2010
 47. 野口佳裕, 喜多村 健 : Bone-anchored hearing aid. JOHNS 26(6) : 825-828, 2010
 48. 喜多村 健 : 人工中耳 - 埋め込み型骨導補聴器 (Bone-Anchored Hearing Aid : BAHA) - . 東京都医師会雑誌 63(4) : 416-419, 2010
 49. 野口佳裕, 喜多村 健 : 感音難聴とリウマチ性疾患. リウマチ科 44(2) : 248-253, 2010
 50. 喜多村 健 : 栃木の症例で始めた難聴遺伝子解析. 栃耳鼻会報 69 : 13-14, 2010
 51. 川崎夏子, 喜多村 健 : 平衡障害(1) - めまいの基礎 - . 臨床脳波 52(3) : 165-171, 2010
 52. 畑中章生, 角田篤信, 喜多村 健 : ジフテリア毒素を産生するコリネバクテリウム感染症. Modern Physician 30(5) : 711-713, 2010
 53. 喜多村 健 : 小児急性中耳炎診療ガイドライン. JOHNS 26(5) : 679-684, 2010
 54. 喜多村 健 : 渡邊 勲先生を偲んで. 日耳鼻東京都地方部会会報 63(5) : 7, 2010
 55. 喜多村 健 : 健康相談室 鼻血. 家庭画報(11) : 320, 2010
 56. 本田圭司, 喜多村 健 : 平衡覚と前庭皮質. Clinical Neuroscience 28(10) :

1184-1186, 2010

57. 喜多村 健 : 人工中耳. 小川 郁 (編) よくわかる聴覚障害 難聴と耳鳴のすべて 永井書店, 東京, 299-303, 2010
58. 喜多村 健 : D 感音難聴 2. 突発性難聴に対する抗ウイルス薬の根拠は?. 池田勝久, 武田憲昭, 井ノ口 昭, 原渕保明, 丹生健一 (編) 2010-2011 EBM 耳鼻咽喉科・頭頸部外科の治療 中外医学社, 東京, 155-157, 2010
59. 喜多村 健 : 言語聴覚士のための聴覚障害学 第6版 喜多村 健 (編) 医歯薬出版, 2010
60. 堤 剛, 喜多村 健 : 第IV章 感覚機能検査 1. 平衡機能検査, 3. その他の検査 (聴覚・味覚・嗅覚). 臨床検査学講座 第3版 生理機能検査学, 医歯薬出版, 東京, 295-319, 338-357, 2010
61. 本田圭司, 喜多村 健 : 上顎洞炎 耳鼻咽喉科での治療方法. 天笠光雄, 喜多村 健, 山田和男, 和気裕之, 中久木 康一 (編) この疾患 医科で診る? 歯科で診る? デンタルダイヤモンド社出版, 東京, 9, 2010
62. 牧野奈緒, 喜多村 健 : 顎関節症 耳鼻咽喉科での治療方法. 天笠光雄, 喜多村 健, 山田和男, 和気裕之, 中久木 康一 (編) この疾患 医科で診る? 歯科で診る? デンタルダイヤモンド社出版, 東京, 15, 2010
63. 石原明子, 喜多村 健 : 味覚障害 耳鼻咽喉科での治療方法. 天笠光雄, 喜多村 健, 山田和男, 和気裕之, 中久木 康一 (編) この疾患 医科で診る? 歯科で診る? デンタルダイヤモンド社出版, 東京, 21, 2010
64. 吉本亮一, 喜多村 健 : 口腔乾燥症 (ドライマウス) 耳鼻咽喉科での治療方法. 天笠光雄, 喜多村 健, 山田和男, 和気裕之, 中久木 康一 (編) この疾患 医科で診る? 歯科で診る? デンタルダイヤモンド社出版, 東京, 27, 2010
65. 高橋直人, 喜多村 健 : 顎下腺唾石症 耳鼻咽喉科での治療方法. 天笠光雄, 喜多村 健, 山田和男, 和気裕之, 中久木 康一 (編) この疾患 医科で診る? 歯科で診る? デンタルダイヤモンド社出版, 東京, 33, 2010
66. 和佐野 有紀, 喜多村 健 : 摂食・嚥下機能障害 耳鼻咽喉科での治療方法. 天笠光雄, 喜多村 健, 山田和男, 和気裕之, 中久木 康一 (編) この疾患 医科で診る? 歯科で診る? デンタルダイヤモンド社出版, 東京, 37, 2010
67. 山口 恵, 喜多村 健 : 睡眠時無呼吸症候群 耳鼻咽喉科での治療方法. 天笠光雄, 喜多村 健, 山田和男, 和気裕之, 中久木 康一 (編) この疾患 医科で診る? 歯科で診る? デンタルダイヤモンド社出版, 東京, 41, 2010
68. 田崎彰久, 喜多村 健 : 口臭症 耳鼻咽喉科での治療方法. この疾患 医科で診る? 歯科で診る? デンタルダイヤモンド社出版, 東京, 45 , 2010
69. 川崎夏子, 喜多村 健 : 平衡障害 (2) - めまいの臨床 -. 臨床脳波 52(4) : 225-229, 2010

70. 喜多村 健 : 耳. ブリタニカ国際大百科事典・小項目事典 2010
71. 清川佑介, 喜多村 健, 上田 稚代子 : 難聴. 佐藤千史, 井上智子 (編) 病態生理 ビジュアルマップ 5 : 医学書院, 213-220, 2010
72. 桑波田 悠子, 喜多村 健, 上田 稚代子 : 中耳炎. 佐藤千史, 井上智子 (編) 病態生理 ビジュアルマップ 5 : 医学書院, 221-228, 2010
73. ○Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hotta Y, Takizawa Y, Hosono K, Mizuta K, Mineta H, Minoshima S. Mutation analysis of the *MYO7A* and *CDH23* genes in Japanese patients with Usher syndrome type 1. *J Hum Genet* 55: 796-800, 2010.
74. ○Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hotta Y, Mizuta K, Mineta H, Minoshima S. Hair roots as an mRNA source for mutation analysis of Usher syndrome-causing genes. *J Hum Genet* 55: 701-703, 2010.
75. ○Nakanishi H, Mizuta K, Hamada N, Iwasaki S, Mineta H. Hereditary isolated ossicular anomalies in two generations of patients. *Auris Nasus Larynx*, Accepted.
76. ○Takizawa Y, Mizuta K, Hayasaka T, Nakanishi H, Okamura J, Mineta H, Setou M: Mass microscope revealed specific localization of phosphatidylcholine(16:0/16:1) in the organ of Corti. *Audiol Neurootol* 16: 315-322, 2010.
77. ○中西啓、岩崎聡、瀧澤義徳、橋本泰幸、水田邦博、峯田周幸. 非典型的臨床症状を示した *USH2A* 遺伝子変異例. *耳鼻臨床* 103: 413-419, 2010.
78. 水田邦博、中西啓. 耳管開放症の治療経験. *耳鼻咽喉科臨床* 103: 702-703, 2010.
79. 岩崎聡、中西啓、姜洪仁、水田邦博. BAHA 両耳装用の 1 症例 有効性の評価. *耳鼻咽喉科・頭頸部外科* 82: 475-478, 2010.
80. 福田 諭: 8. ウイルス性難聴とムンプス難聴. よくわかる聴覚障害 難聴と耳鳴のすべて, ed.小川郁, pp 199-202. 永井書店, 東京, 2010
81. 藤原圭志, 古田 康, 福田 諭: 特集:耳鼻咽喉科領域と感染症「1.聴器一風疹, サイトメガロ, ヘルペス, その他」. *耳喉頭頸* 82: 433-438, 2010
82. 福田 諭: <総説>ムンプス難聴と予防接種. *綜合臨牀* 59: 2145-2146, 2010
83. Obara N, Takeichi N, Fujiwara K, Akazawa S, Fukuda S: Prognosis of Hearing Loss with Vogt-Koyanagi-Harada Disease. AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO. Boston, Ma, 2010. 9. 26-29
84. Takeichi N, Obara N, Fujiwara K, Tsubuku T, Fukuda S: Intratympanic Dexamethasone Treatment for Inner Ear Disease as Salvage Treatment. Meniere's Disease and Inner Ear Disorders. kyoto, Japan, 2010. 11. 14-17
85. Yoshida T, Sone M, Naganawa S, Nakashima T Accuracy of 3.0 Tesla magnetic resonance imaging in the diagnosis of intracochlear schwannoma.

- Auris Nasus Larynx 2010 Dec 13 [Epub ahead of print]
86. Naganawa S, Yamazaki M, Kawai H, Bokura K, Sone M, Nakashima T.
Visualization of endolymphatic hydrops in Ménière's disease with single-dose intravenous gadolinium-based contrast media using heavily T(2)-weighted 3D-FLAIR.
Magn Reson Med Sci. 2010;9(4):237-42.
 87. Sone M., Kato T. Suzuki Y. Arao H. Sugiyama K. Ishida K. Izawa K. Takasu A. Nakashima T.
Relevance and characteristics of gastroesophageal reflux in adult patients with otitis media with effusion
Auris Nasus Larynx 2010 Oct 27 [Epub ahead of print]
 88. Uchida Y, Sugiura S, Ando F, Nakashima T, Shimokata H.
Diabetes reduces auditory sensitivity in middle-aged listeners more than in elderly listeners: a population-based study of age-related hearing loss
Med Sci Mont 16: 63-8, 2010
 89. Naganawa S. Ishihara S. Satake H. Kawai H. Sone M. Nakashima T.
Simultaneous three-dimensional visualization of the intra-parotid facial nerve and parotid duct using a three-dimensional reversed FISP sequence with diffusion weighting
Magn Reson Med Sc 9:153-8, 2010
 90. Naganawa S. Kawai H. Sone M. Nakashima T.
Increased sensitivity to low concentration gadolinium contrast by optimized heavily T2-weighted 3D-FLAIR to visualize endolymphatic space
Magn Reson Med Sci 9:73-80, 2010
 91. Yamazaki M. Naganawa S. Kawai H. Nihashi T. Nakashima T.
Signal alteration of the cochlear perilymph on 3 different sequences after intratympanic Gd-DTPA administration at 3 tesla: comparison of 3D-FLAIR, 3D-T1-weighted imaging, and 3D-CISS
Magn Reson Med Sci 9:65-71, 2010
 92. Yoshioka M. Uchida Y. Sugiura S. Ando F. Shimokata H. Nomura H. Nakashima T.
The impact of arterial sclerosis on hearing with and without occupational noise exposure: a population-based aging study in males
Auris Nasus Larynx 37; 558-564, 2010
 93. Kawai H. Naganawa S. Ishihara S. Sone M. Nakashima T.
MR imaging of the cochlear modiolus after intratympanic administration of Gd-DTPA
Magn Reson Med Sci 9; 23-9, 2010
 94. Naganawa S. Ishihara S. Iwano S. Kawai H. Sone M. Nakashima T.
Estimation of gadolinium-induced T1-shortening with measurement of simple signal intensity ratio between the cochlea and brain parenchyma on 3D-FLAIR: correlation with T1 measurement by T1 scout sequence
Magn Reson Med Sci 9; 17-22, 2010

95. Katayama N. Yamamoto M. Teranishi M. Naganawa S. Nakata S. Sone M. Nakashima T.
Relationship between endolymphatic hydrops and vestibular-evoked myogenic potential
Acta Otolaryngol 130; 917-923, 2010
96. Naganawa S. Ishihara S. Iwano S. Sone M. Nakashima, T
Three-dimensional (3D) visualization of endolymphatic hydrops after intratympanic injection of Gd-DTPA: optimization of a 3D-real inversion-recovery turbo spin-echo (TSE) sequence and application of a 32-channel head coil at 3T
J Magn Reson Imaging 31: 210-4, 2010
97. Uchida Y, Sugiura S, Ando F, Shimokata H, Nakashima T.
Association of the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gen with sudden sensorineural hearing loss
Laryngoscope 120; 791-5, 2010
98. Uchida Y, Sugiura S, Nakashima T, Ando F, Shimokata H.
The Ala54Thr polymorphism in the fatty acid-binding protein 2 (FABP2) gene is associated with hearing impairment: a preliminary report.
Auris Nasus Larynx 37; 496-9, 2010.
99. Sugiura S, Uchida Y, Nakashima T, Ando F, Shimokata H.
The association between gene polymorphisms in uncoupling proteins and hearing impairment in Japanese elderly.
Acta Otolaryngol 130; 487-92, 2010.
100. Sone M. Naganawa S. Yoshida T. Nakata S. Nakashima T.
Imaging findings in a case with cholesteatoma in complete aural atresia
Am J Otolaryngol 31; 297-299, 2010
101. Tagaya M. Teranishi M. Naganawa S. Iwata T. Yoshida T. Otake H. Nakata S. Sone M. Nakashima T.
3 Tesla magnetic resonance imaging obtained 4 hours after intravenous gadolinium injection in patients with sudden deafness
Acta Otolaryngol 130; 665-669, 2010
102. Iwata T. Nakata S. Tsuge H. Koide F. Sugiura M. Otake H. Teranishi M. Nakashima T.
Anatomy-based surgery to remove thyroglossal duct cyst: two anomalous cases
J Laryngol Otol
124; 443-446, 2010
103. Nakata S, Mizuno T, Naganawa S, Sugiura M, Yoshida T, Teranishi M, Sone M, Nakashima T.
3D-FLAIR MRI in facial nerve paralysis with and without audio-vestibular disorder.
Acta Otolaryngol. 130; 632-6, 2010
104. Nakashima T, Naganawa S, Teranishi M, Tagaya M, Nakata S, Sone M, Otake H, Kato K, Iwata T, Nishio N.
Endolymphatic hydrops revealed by intravenous gadolinium injection in