

Method B. A solution of aq. HCl (6 M, 10 mL) was added to a solution of azlactone **7**, **8**, **10** or **11** (1 mmol) in 5 mL THF at room temperature in a 25 mL round flask. The reaction mixture was heated at 70 °C for 1 h and the formation of the products was monitored by TLC. The solvents were evaporated under vacuum to yield a white solid of the crude product which was purified by preparative TLC using CH₂Cl₂/methanol (90 : 5) as eluent to yield colorless solids.

Methyl(1-benzoylamino-6-phenyl-cyclohex-3-enecarboxylate) (12). Yield (134 mg, 40%); white solid; *R_f* 0.57 (CH₂Cl₂/MeOH = 90 : 5); mp = 153–155 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.67 (d, 2H, *J* = 6 Hz), 7.47–7.16 (m, 8H), 6.79 (s, 1H), 5.9 (m, 1H), 5.82 (m, 1H), 3.72 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.15 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 2.74 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 2.61 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 172.7, 166.8, 140.2, 134.7, 131.5, 128.5, 128.4, 128.1, 127.5, 126.9, 125.3, 125.0, 61.7, 43.8, 29.9, 29.3; IR (KBr disc) 3389, 3059, 2929, 1725, 1685, 1645, 979, 882, 742 cm⁻¹; MS, *m/z* (ESI) 358 [100, M + Na]⁺; Anal. Calc. for C₂₁H₂₁NO₃: C, 75.2; H, 6.31; N, 4.18%. found: C, 74.93; H, 6.15; N, 4.07%.

1-Benzoylamino-6-phenyl-cyclohex-3-enecarboxylic acid (13). Yield (253 mg, 79%); white solid; *R_f* 0.15 (CH₂Cl₂/MeOH = 90 : 5); mp = 219–221 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.69 (d, 2H, *J* = 6.3 Hz), 7.54 (m, 2H), 7.43 (m, 2H), 7.28 (m, 6H), 6.73 (s, 1H), 6.01 (m, 1H), 5.85 (m, 1H), 4.06 (m, 1H), 2.77 (t, 2H, *J* = 8.0 Hz), 2.60 (t, 2H, *J* = 8.0 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 175.5, 165.8, 141.1, 135.6, 131.9, 128.5, 128.4, 128.2, 127.5, 126.9, 125.3, 124.9, 61.7, 43.9, 30.2, 30.1; IR (KBr disc) 3391, 3057, 2931, 1727, 1681, 1642, 974, 887, 740 cm⁻¹; MS, *m/z* (ESI) 344 [100, M + Na]⁺; Anal. Calc. for C₂₀H₁₉NO₃: C, 74.75; H, 5.96; N, 4.36%. found: C, 74.71; H, 5.93; N, 4.34%.

1-Benzoylamino-6-(3,4-dimethoxy-phenyl)-cyclohex-3-enecarboxylic acid (14). Yield (305 mg, 80%); white solid; *R_f* 0.42 (CH₂Cl₂/MeOH = 90 : 5); mp = 195–197 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.68–7.49 (m, 4H), 6.86–6.72 (m, 4H), 6.25 (s, 1H), 5.90 (m, 1H), 5.75 (m, 1H), 3.83 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.21 (d, 1H, *J* = 12.0 Hz), 2.75–2.62 (m, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 172.8, 167.5, 147.6, 146.3, 135.2, 131.5, 127.2, 125.0, 116.6, 62.2, 54.3, 42.0, 39.5, 28.4; IR (KBr disc) 3395, 3062, 2932, 1727, 1682, 1647, 975, 886, 741 cm⁻¹; MS, *m/z* (ESI) 382 [100, M + 1]⁺; Anal. Calc. for C₂₂H₂₃NO₃: C, 69.28; H, 6.08; N, 3.67%. found: C, 69.24; H, 6.03; N, 3.65%.

1-Benzoylamino-6-furan-2-yl-cyclohex-3-enecarboxylic acid (15). Yield (214 mg, 69%); white solid; *R_f* 0.23 (CH₂Cl₂/MeOH = 90 : 5); mp = 201–203 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.73 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz), 7.53–7.31 (m, 4H), 7.26 (s, 1H), 6.29 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz), 6.20 (s, 1H), 5.85 (m, 2H), 4.14 (bs, 1H), 2.96 (bs, 1H), 2.74–2.52 (m, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 175.5, 162.1, 139.5, 136.4, 130.3, 128.7, 126.0, 63.9, 38.8, 33.8, 25.2; IR (KBr disc) 3397, 3056, 2935, 1725, 1686, 1645, 975, 886, 745 cm⁻¹; MS, *m/z* (ESI) 334 [60, M + Na]⁺; Anal. Calc. for C₁₈H₁₇NO₄: C, 69.44; H, 5.50; N, 4.50%. found: C, 69.40; H, 5.48; N, 4.47%.

6-Benzo[1,3]dioxol-5-yl-1-benzoylamino-cyclohex-3-enecarboxylic acid (16). Yield (259 mg, 71%); white solid; *R_f* 0.26 (CH₂Cl₂/MeOH = 90 : 5); mp = 187–189 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.63–7.25 (m, 5H), 6.78–6.59 (m, 4H), 5.79 (m, 4H),

3.91 (bs, 1H), 3.00 (bs, 1H), 2.58 (m, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 174.1, 163.5 (C=N), 151.5, 148.1, 140.2, 135.7, 131.7, 128.2, 127.0, 125.5, 122.3, 115.6, 107.8, 100.6, 64.4, 44.6, 34.2, 30.3, 21.1; IR (KBr disc) 3400, 3065, 2935, 1724, 1685, 1643, 977, 885, 742 cm⁻¹; MS, *m/z* (ESI) 366 [100, M + 1]⁺; Anal. Calc. for C₂₁H₁₉NO₃: C, 69.03; H, 5.24; N, 3.83%. found: C, 69.00; H, 5.21; N, 3.79%.

General procedures for debenzoylation of compounds **13** and **16**

Ammonium hydroxide solution (3 mL) was added to a solution of **13** or **16** (1 mmol) in methanol (15 mL) at room temperature. The mixture was refluxed for 24 h. When the reaction mixture had reached room temperature, the solvents were evaporated under vacuum and the crude substance was purified by TLC using CH₂Cl₂/methanol (80 : 20) as the mobile phase to give cream colored solids.

1-Amino-6-phenyl-cyclohex-3-enecarboxylic acid (17). Yield (165 mg, 76%); white solid; *R_f* 0.24 (CH₂Cl₂/Methanol = 9 : 1); mp = 219–221 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.73, 7.63, 7.40 (m, 5H), 6.08 (m, 1H), 5.81 (m, 1H), 4.51 (bs, 2H), 4.05 (m, 1H), 2.85 (m, 2H), 2.60 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 178.5, 138.2, 129.2, 129.0, 127.8, 126.8, 126.0, 71.1, 46.8, 31.1, 27.5; IR (KBr disc) 3512, 3052, 2937, 1705, 1645, 979, 882, 743 cm⁻¹; MS, *m/z* (ESI) 240 [100, M + Na]⁺; Anal. Calc. for C₁₃H₁₅NO₂: C, 71.87; H, 6.96; N, 6.45%. found: C, 71.84; H, 6.93; N, 6.41%.

1-Amino-6-furan-2-yl-cyclohex-3-enecarboxylic acid (18). Yield (134 mg, 65%); white solid; *R_f* 0.21 (CH₂Cl₂/Methanol = 9 : 1); mp = 179–181 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.39 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.08 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz), 5.95 (m, 1H), 5.73 (m, 1H), 4.68 (bs, 2H), 3.38 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz), 2.98–2.77 (m, 2H), 2.41–2.35 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 175.6, 139.6, 136.5, 63.9, 38.8, 33.8, 25.2; IR (KBr disc) 3507, 3058, 2931, 1697, 1641, 976, 884, 742 cm⁻¹; MS, *m/z* (ESI) 230 [97, M + Na]⁺; Anal. Calc. for C₁₁H₁₃NO₃: C, 63.76; H, 6.32; N, 6.76%. found: C, 63.61; H, 6.27; N, 6.71%.

Synthesis of 1-benzamido-2-phenylcyclohexanecarboxylic acid (19)

To a mixture of **13** (0.16 g, 0.5 mmol) and Pd/C (0.058 g) in dry MeOH (10 mL) solution was added one drop of AcOH under hydrogen atmosphere, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 6 h. The palladium catalyst was removed by filtration through Celite, and the solvent was evaporated. The white solid was washed with CH₂Cl₂ to afford **19**. Yield (153 mg, 95%); mp = 208–210 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.69–7.40 (m, 5H), 7.16 (m, 5H), 3.85 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz), 2.75 (q, 1H, *J* = 8.0 Hz), 2.46 (q, 1H, *J* = 8.0 Hz), 2.10 (t, 2H, *J* = 14.0 Hz), 1.93 (d, 1H, *J* = 12.0 Hz), 1.78 (t, 2H, *J* = 12.0 Hz), 1.57 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 174.5, 166.1, 145.1, 134.0, 133.2, 127.0, 126.9, 126.4, 125.7, 62.0, 45.5, 29.3, 24.9, 20.5; IR (KBr disc) 3393, 3059, 2932, 1725, 1682, 975, 885, 741 cm⁻¹; MS, *m/z* (ESI) 346 [100, M + Na]⁺; Anal. Calc. for C₂₀H₂₁NO₃: C, 74.28; H, 6.55; N, 4.33%. found: C, 74.24; H, 6.51; N, 4.30%.

1-Amino-2-phenyl-cyclohexanecarboxylic acid (20). This compound was prepared from **19** (323 mg, 1 mmol) and ammonium hydroxide solution (3 mL), using the debenzoylation procedure described for **13** to give **20** as a white solid.

Yield (140 mg, 64%); white solid; R_f 0.17 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol} = 9:1$); mp = 165–167 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.00 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz), 7.62 (m, 3H), 4.21 (m, 1H), 3.85 (bs, 2H), 2.83 (t, 1H, $J = 12.0$ Hz), 2.43 (m, 1H), 2.20 (t, 2H, $J = 12.0$ Hz), 1.91–1.76 (m, 4H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ = 176.0, 147.1, 128.0, 126.5, 126.4, 63.5, 43.0, 29.0, 25.1, 19.3; IR (KBr disc) 3503, 3062, 2933, 1706, 973, 885, 742 cm^{-1} ; MS, m/z (ESI) 242 [93, M + Na] $^+$; Anal. Calc. for $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_2$: C, 71.21; H, 7.81; N, 6.39%. found: C, 71.20; H, 7.81; N, 6.37%.

Crystal structure determination of 9, 12 and 13

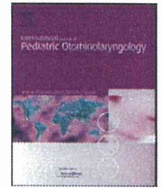
Colorless single crystals of **9** suitable for XRD analyses were obtained from slow evaporation of a $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{hexanes}$ solution at room temperature. However, colorless crystals of **12** and **13** were obtained by slow evaporation of methanol solutions at room temperature. Each crystal was mounted on a glass fiber, and the diffraction data of all the complexes were collected on an AXS APEX II CCD detector using graphite monochromated Mo-K α radiation at 123 K. The crystal data and experimental details are listed in Table 3. All the structures were solved by the combination of direct methods and Fourier techniques, and all the non-hydrogen atoms were anisotropically refined by full-matrix least-squares calculations. The atomic scattering factors and anomalous dispersion terms were obtained from the International Tables for X-ray Crystallography IV.⁵³ Since the reflection data for the abovementioned crystals were insufficient for refining all the parameters of the hydrogen atoms, they were obtained from difference Fourier maps.

Acknowledgements

We thank Dr Hidekazu Arii (Gakushuin University) for the crystal structure artwork.

References

- (a) J. Tsuji, *Transition Metal Reagents and Catalysts: Innovations in Organic Synthesis*, Wiley, New York, 2002; (b) L. S. Hegedus, *Transition Metals in the Synthesis of Complex Organic Molecules*, 2nd ed. University Science Books, Sausalito, CA, 1999; (c) J. Montgomery and Acc. *Chem. Res.*, 2000, **33**, 467; (d) S. I. Ikeda, *Acc. Chem. Res.*, 2000, **33**, 511.
- (a) Z. Wang, X. Lu, A. Lei and Z. Zhang, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 3806; (b) N. Chatani, N. Amishiro and S. Murai, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 7778; (c) S. A. Codleski, In *Comprehensive Organic Synthesis*, M. F. Semmelhack, Ed.; Pergamon Press, Oxford, 1991, **4**, 585.
- J. P. Collman, L. S. Hegedus, J. R. Norton and R. G. Finke, In *Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, 1987, 417.
- S. A. Godleski, *Comprehensive Organic Synthesis* B. M. Trost and I. Fleming, Ed.; Pergamon Press, New York, 1991, **4**, Chapter 3.3.
- P. J. Harrington, *Comprehensive Organometallic Chemistry II*, E. W. Abel, F. Gordon, A. Stone, G. Wilkinson and R. J. Puddephatt, ed.; Elsevier, New York, 1995, **12**, 797.
- J.-E. Bäckvall, *Metal-catalyzed Cross Coupling Reactions*, VCH, Weinheim, 1998, 339.
- B. M. Trost, *Acc. Chem. Res.*, 1980, **13**, 385.
- J. Tsuji, *Palladium Reagents and Catalysts: Innovations in Organic Synthesis*, Wiley, Chichester, 1995; Chapters 3 and 4.
- H. Nakamura, J.-G. Shim and Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 8113.
- H. Nakamura, K. Nakamura and Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 4242.
- K. Nakamura, H. Nakamura and Y. Yamamoto, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 2614.
- K. Ohno and J. Tsuji, *J. Chem. Soc. D*, 1971, 247.
- J. Kiji, K. Yamamoto, H. Tomita and J. Furukawa, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1974, 506.
- K. Ohno, T. Mitsuyasu and J. Tsuji, *Tetrahedron*, 1972, **28**, 3705.
- Y. Tamaru, *Eur. J. Org. Chem.*, 2005, **13**, 2647.
- M. Jeganmohan, M. Shanmugasundaram and C.-H. Cheng, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 4053.
- H. Nakamura, K. Aoyagi, J.-G. Shim and Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 372.
- M. Nambo, A. Wakamiya, S. Yamaguchi, K. Itami and K. Szabó, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 15112.
- G. A. Molander and R. Figueroa, *Aldrichim. Acta*, 2005, **38**, 49.
- S. Darses and J. P. Genet, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 288.
- R. A. Batey, A. N. Thadani, D. V. Smil and A. J. Lough, *Synthesis*, 2000, 990.
- R. A. Batey, A. N. Thadani and D. V. Smil, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 4289.
- K. Takenaka and T. Tsuji, *J. Heterocycl. Chem.*, 1996, **33**, 1367.
- J. T. Konkel, J. Fan, B. Jayachandran and K. L. Kirk, *J. Fluorine Chem.*, 2002, **115**, 27.
- F. Caveller and J. Verducci, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 4425.
- A. Avenzoza, J. H. Pusto, C. Cativiela and J. M. Peregrina, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **36**, 4167.
- S. Kozima, H. Ohkawa, T. Hirano, S. Maki, H. Niwa, M. Oshashi, S. Inouye and F. I. Tsuji, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 5239.
- J. Penalva, R. Vuchades, A. Maquieira, S. Gee and B. D. Hammock, *Biosens. Bioelectron.*, 2000, **15**, 99.
- K. Gottwald and D. Seebach, *Tetrahedron*, 1999, **55**, 723.
- T. L. Ho, *Carbocycle Construction in Terpene Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, 1988.
- K. -I. Takao, R. Munakata and K. -I. Tadano, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 4779.
- M. E. Jung and D. G. Ho, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 375.
- M. E. Krafft and T. F. N. Haxell, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 10168.
- R. H. Grubbs, S. J. Miller and G. C. Fu, *Acc. Chem. Res.*, 1995, **28**, 446.
- H. Kim, S. D. Goble and C. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 1030.
- D. Enders, M. R. M. Huttli, C. Grondal and G. Raabe, *Nature*, 2006, **441**, 861.
- Y. S. Tran and O. Kwon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 12632.
- M. Scholl, T. M. Trnka, J. P. Morgan and R. H. Grubbs, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 2247.
- M. Scholl, S. Ding, C. W. Lee and R. H. Grubbs, *Org. Lett.*, 1999, **1**, 953.
- Q. Yang, H. Alper and W.-J. Xiao, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 769.
- D. B. Berkowitz, J. M. McFadden and M. K. Sloss, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 2907.
- S. E. Gibson, N. Guillo and M. J. Tozer, *Tetrahedron*, 1999, **55**, 585.
- K. N. Koch, A. Linden and H. Heimgartner, *Helv. Chim. Acta*, 2000, **83**, 233.
- J. R. Cronin and S. Pizzarello, *Science*, 1997, **275**, 951.
- T. Kan, Y. Kawamoto, T. Asakawa, T. Furuta and T. Fukuyama, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 168.
- (a) E. Benedetti, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone and A. Santini, *Biopolymers*, 1989, **28**, 175; (b) P. K. C. Paul, M. Sukumar, R. Bardi, A. M. Piazzesi, G. Valle, C. Toniolo and P. Balaram, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 6363.
- E. Erlenmeyer, *Annalen*, 1893, **275**, 1.
- P. A. Conway, K. Devine and F. Paradisi, *Tetrahedron*, 2009, **65**, 2935.
- H. Nakamura and K. J. Shimizu, *Tetrahedron Lett.*, 2011, **52**, 426.
- E. Yoshikawa, K. V. Radhakrishnan and Y. Yamamoto, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 729.
- N. Solin, S. Narayan and K. J. Szabó, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 1686.
- M. Jeganmohan, M. Shanmugasundaram and C.-H. Cheng, *Org. Lett.*, 2003, **5**, 881.
- J. A. Ibers, W. C. Hamilton, *International Tables for X-ray Crystallography*, Kynoch Press, Birmingham, 1974.



Prevalence of *GJB2* causing recessive profound non-syndromic deafness in Japanese children

Chieri Hayashi^{a,*}, Manabu Funayama^b, Yuanzhe Li^c, Kazusaku Kamiya^a, Atsushi Kawano^d, Mamoru Suzuki^d, Nobutaka Hattori^{b,c}, Katsuhisa Ikeda^a

^a Department of Otorhinolaryngology, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

^b Research Institute for Diseases of Old Age, Juntendo University School of Medicine, Japan

^c Department of Neurology, Juntendo University School of Medicine, Japan

^d Department of Otorhinolaryngology, Tokyo Medical University School of Medicine, Tokyo, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2010

Received in revised form 18 October 2010

Accepted 2 November 2010

Available online 26 November 2010

Keywords:

Congenital deafness
Cochlear implantation
Japanese children
p.P225L
Connexin 26
GJB2

ABSTRACT

Objective: *GJB2* (gap junction protein, beta 2, 26 kDa: connexin 26) is a gap junction protein gene that has been implicated in many cases of autosomal recessive non-syndromic deafness. Point and deletion mutations in *GJB2* are the most frequent cause of non-syndromic deafness across racial groups. To clarify the relation between profound non-syndromic deafness and *GJB2* mutation in Japanese children, we performed genetic testing for *GJB2*.

Methods: We conducted mutation screening employing PCR and direct sequencing for *GJB2* in 126 children who had undergone cochlear implantation with congenital deafness.

Results: We detected 10 mutations, including two unreported mutations (p.R32S and p.P225L) in *GJB2*. We identified the highest-frequency mutation (c.235delC: 44.8%) and other nonsense or truncating mutations, as in previous studies. However, in our research, p.R143W, which is one of the missense mutations, may also show an important correlation with severe deafness.

Conclusion: Our results suggest that the frequencies of mutations in *GJB2* and *GJB6* deletions differ among cohorts. Thus, our report is an important study of *GJB2* in Japanese children with profound non-syndromic deafness.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

People with any degree of sensory impairment may encounter problems such as discrimination within the education system or when looking for work, and a reduced life expectancy. Sensorineural hearing loss (SNHL) is the most common sensory impairment in developed societies [1,2], where one child in 1000 presents at birth with severe or profound deafness [3].

Recent advances in human genetics have indicated that more than half of congenital SNHL cases involve a genetic factor [4]. In 75–80% of genetic cases, SNHL is the result of autosomal recessive inheritance, and both parents have normal hearing [5]. Mutations of *GJB2* are the most frequent cause of autosomal recessive non-syndromic deafness. Indeed, previous studies have shown that *GJB2* mutations account for up to 50% of non-syndromic deafness cases [6]. Hearing-impaired subjects with biallelic *GJB2* mutations range widely but most commonly follow a severe to profound and non-progressive pattern [7–9]. About 100 different *GJB2* muta-

tions have been reported globally [the Connexin-Deafness homepage: <http://davinci.crg.es/deafness/>], and these mutations show a relatively high local dependence (founder effect). A high prevalence of c.35delG has been found among Caucasians; c.235delC among Eastern Asians, including Japanese [10–13]; c.167delT among Ashkenazi Jews [14]; p.R143W among certain Africans [15]; and p.W24X among Indians [16,17] and European Gypsies [18–20]. Some recent reports have indicated a genotype-phenotype correlation: children with two truncating mutations, such as c.35delG or c.235delC, are profoundly deaf, while children with a truncating and missense mutation, or two missense mutations, show better hearing [9,21,22]. Since improved speech performance after cochlear implantation in early childhood is usually observed in hearing-impaired subjects with *GJB2* mutations [23], the genetic testing of newborn babies will provide useful prognostic information when selecting appropriate treatment for such children.

In the present study, to clarify the frequency and genotype-phenotype correlation of *GJB2* mutations in children with profound non-syndromic deafness, we performed genetic testing for *GJB2* mutations involving 119 Japanese children who had undergone cochlear implantation with congenital deafness.

* Corresponding author. Tel.: +81 3 5802 1229; fax: +81 3 5840 7103.
E-mail address: chieri-h@juntendo.ac.jp (C. Hayashi).

2. Materials and methods

2.1. Subjects

We enrolled 119 Japanese children, who were unrelated to each other, with non-syndromic deafness for genetic analysis. Of these, 107 were sporadic cases (with only one affected individual in the family); the remaining 12 patients were autosomal recessive cases (with normal hearing parents and at least two affected children). The study sample consisted of 70 males (58.8%) and 49 females (41.2%). All of their hearing impairment levels were severe (71–95 dB) to profound (>95 dB); impairments were detected between 0 and 3 years old. All children had undergone cochlear implantation at Tokyo Medical University School of Medicine.

All cases underwent otoscopic examination and audiometric testing. Subjective tests of hearing acuity were assessed based on the auditory brain-stem response (ABR) and auditory steady-state response (ASSR) in infants and children. Behavioral observation audiometry (BOA) was used as a subsidiary measure to ABR and ASSR. A detailed history was taken to exclude other possible causes of deafness (such as neonatal complications, bacterial meningitis or other infections, use of ototoxic medication, or head trauma). Extended pedigrees were elicited from each family to exclude interfamilial relations. Temporal bone computed tomography was used in children to exclude any anomalies. The control group was carefully chosen to determine the carrier frequency, and consisted of 150 unrelated individuals with normal hearing.

Informed consent was obtained from the parents or guardians when necessary, and these were approved by the Ethical Committees of Juntendo University School of Medicine.

2.2. Genetic analysis

All samples from the children and normal controls were extracted from peripheral blood using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA). The coding region of *GJB2* was amplified from DNA samples by the polymerase chain reaction (PCR) using the primers *GJB2*-F 5'-GTGTGCATTCGCTTTTCCAG-3' and *GJB2*-R 5'-GCGACTGAGCCTTGACA-3'. PCR products were sequenced using the PCR primers and sequence primers *GJB2*-A 5'-CCACGCCAGCGCTCCTAGTG-3' and *GJB2*-B 5'-GAAGATGCTGCTGCTTGTTAGG-3'. The sequencing reaction products were electrophoresed on an ABI Prism 310 Analyzer (Applied Biosystems). When no mutation or a single heterozygous mutation in *GJB2* was confirmed, we performed the multiplex PCR assay and direct sequencing for the coding region of *GJB6*. Multiplex PCR was carried out according to the method of Del Castillo et al. [24] to confirm the presence of the del(*GJB6*-D13S1830) and del(*GJB6*-D13S1854) deletions in *GJB6*.

Samples with no mutation or a single heterozygous mutation in *GJB2* and *GJB6* were analyzed for the gene dosage using real-time quantitative PCR (qPCR) to detect exon rearrangements in *GJB2* and *GJB6*. qPCR was performed with TaqMan Gene Expression Assays (Hs00269615_s1 for *GJB2*, and Hs00272726_s1 for *GJB6*, Applied Biosystems) and the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

We obtained blood samples from the family which had one of two unreported mutations, pP225L, and the unreported one was confirmed as follows. The samples were subjected to mutation screening by PCR and direct sequencing for *GJB2*. The PCR product was subcloned into pCR 2.1 vecto-TOPO by TOPO TA cloning (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and independent subclones were sequenced employing M13forward (5'-TTGTAAAACGACGGCCAG) and reverse (5'-ACACAGGAAACAGCTATG) primers. The sequence data using in this study have been submitted to the GenBank

databases under accession numbers X65361, AB098335, NM_000816, and NM_001037.

2.3. Statistical analysis

A Z-test was used to calculate the difference in the allele frequency. In all statistical analyses, P-values of 0.01 or less were considered significant.

3. Results

3.1. Mutation screening of *GJB2*

GJB2 mutations were found in 45 of the 119 affected individuals, and, of these, 35 patients were homozygous or compound heterozygous (29.4%). *GJB2*-related deafness patients, who had two *GJB2* mutant alleles, were found in 7 of 12 familial cases (58.3%), and there were 28 of 107 sporadic cases (26.2%). Eight mutations, including two unreported ones (p.R32S and p.P225L), were identified in these patients (Table 1). Three mutations were truncating mutations [one was a nonsense mutation (p.Y136X), and two were frameshifts (c.235delC and c.176-191del)]. The remaining five were missense mutations (p.R143W, p.G45E, p.T86R, p.R32S, and p.P225L). Among these mutations, c.235delC was the most frequent. The c.235delC mutation accounted for 52.9% (37 of 70) of the *GJB2*-mutated alleles (Table 1).

We identified 10 subjects who had three or more mutations. All of them had p.G45E and p.Y136X, including one homozygous child. TA cloning and sequencing of subcloned PCR products revealed that all subjects had both mutations in the same allele (data not shown). G45E accompanied with Y136X has been reported as a pathogenic mutation in previous reports, especially in Japanese patients [11,25], although it remains unclear which mutation is more related to the pathogenicity.

We compared the allele frequency for each mutation with that in Ohtsuka's study [25] (Fig. 1). The frequency of c.235delC and three mutations (p.R143W, p.G45E/Y136X, and c.176-191del) in this study were significantly different from that in Ohtsuka's study ($P < 0.01$). While the p.V37I mutation was reported to be the second most frequent autosomal recessive deafness allele in Asian countries [11,12], the present subjects did not follow this pattern.

In one subject, we identified a missense mutation, p.P225L, which has not previously been reported (Fig. 2). The sister and father of the proband had this mutation, while they showed a normal hearing function. The mother, with a normal hearing function, showed no mutation at this site, while she revealed only heterozygous p.G45E/Y136X mutation as a known pathogenic mutation of *GJB2*. The sequencing results of TA cloning further confirmed the existence of the pP225L nonsense mutation in this patient. We also identified another unreported mutation, p.R32S, in another subject. The patient had p.R32S/p.G45E/Y136X mutations. The amino acid positions of two unreported mutations

Table 1

Mutations identified in the *Cx26* gene, *GJB2* (NG_008358.1), in child cases of congenital deafness.

Nucleotide change	Amino acid change	Allele (%)
c.235delC	p.Leu79CysfsX3	37 (52.9)
c.427C>T	p.Arg143Trp(p.R143W)	15 (21.4)
c.134G>A/c.408C>A	p.Gly45Glu/p.Tyr136X(p.G45E/Y136X)	10 (14.3)
c.176-191del	p.Gly59AlafsX18	4 (5.7)
c.257C>G	p.Thr86Arg(p.T86R)	2 (2.9)
c.94C>A	p.Arg32Ser ^a (p.R32S)	1 (1.4)
c.674C>T	p.Pro225Leu ^a (p.P225L)	1 (1.4)
Total mutations		70 (100)

^a Novel mutations detected in this study.

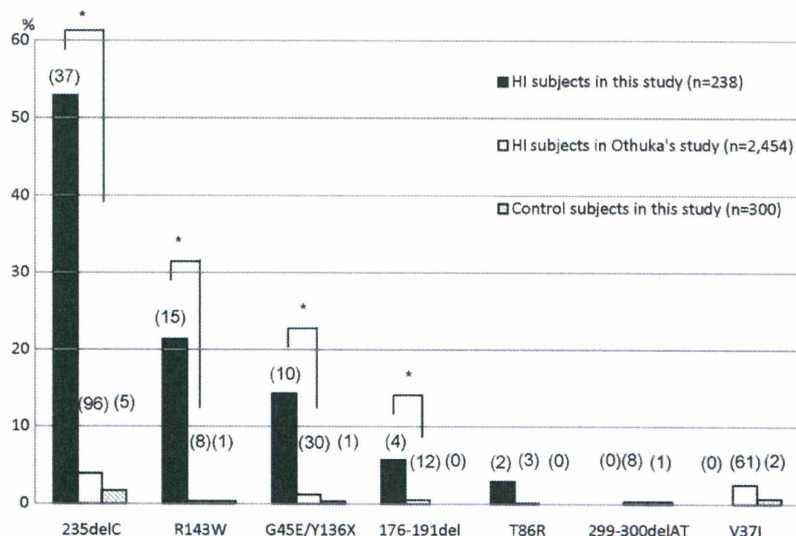


Fig. 1. Allele frequency for each mutation in three groups. A Z-test was used to assess the difference in frequency. Note the *P*-value of <0.01 between the two deafness groups for c.235delC, p.R143W, p.G45E/Y136X, and c.176-191del. **P* < 0.01.

(p.R32S and p.P225L) are highly conserved among various species, and we did not detect any of these mutations in 300 chromosomes in normal Japanese controls.

4. Discussion

In this study, *GJB2*-related deafness patients accounted for 29.4% of non-syndromic deafness cases. This frequency was less than in a previous report, which pointed to a frequency of around 50% [6]. Familial cases were twice as prevalent as sporadic cases. In most of the previously reported studies, the prevalence of *GJB2* mutations was significantly higher in familial non-syndromic deafness than in sporadic cases [7,26,27]. The frequent mutations of *GJB2* (c.235delC, p.R143W, p.G45E/Y136X, and c.176-191del) in this study were partly different from previous reports [25]. It is assumed that all of our subjects had severe to profound deafness,

as they had received cochlear implants, whereas Ohtsuka's subjects had mild to profound deafness and included heterozygous mutations. A few studies have confirmed that some genotypes are correlated with clinical phenotypes in *GJB2*-related deafness. Further, truncating mutations are associated with a greater degree of deafness than non-truncating mutations [9,21,22]. For this reason, three of these cases might be truncating mutations. In contrast, p.R143W mutation was previously implicated in an extraordinarily high prevalence of profound deafness in Ghana [15,28] and Caucasians [9]. This missense mutation may also show an important correlation with severe deafness in Japan. On the other hand, an effect of geography on the allele frequency may have been present, because most of our subjects were from a different area compared to a previous report [25].

The relation between p.V37I mutation of *GJB2* and SNHL is controversial. While some reports suggest that this mutation is

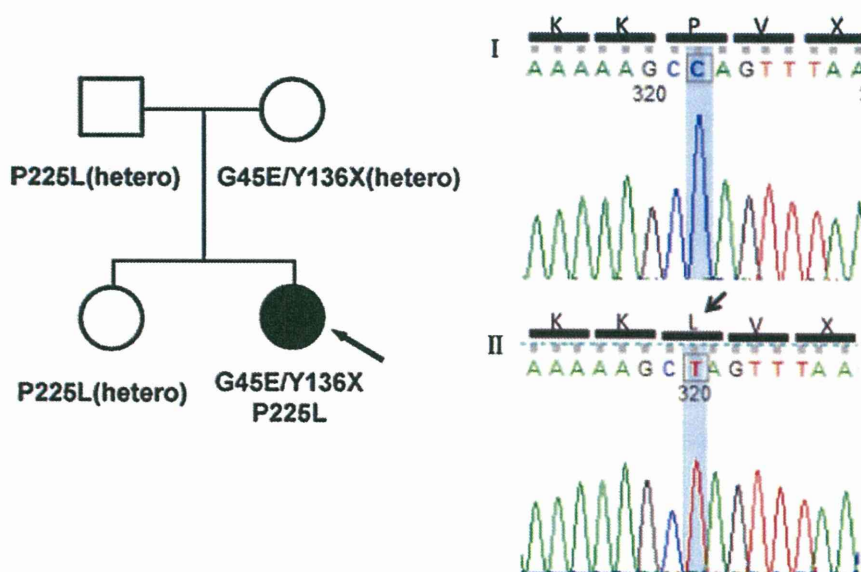


Fig. 2. (A) The pedigree and PCR direct sequencing results for the family; the arrow indicates the proband. (B) The sequencing results on TA cloning. Genomic PCR products were subcloned into a plasmid vector and sequenced separately (see Section 2). The sequences from independent clones are shown in the above two examples. I shows wild-type sequence, whereas II shows mutated sequence in which the proline residue is changed to leucine. Three of 8 subclones showed a missense mutation similar to that in II.

more common among individuals of Asian ancestry [11,12,29], others suggest that homozygous p.V37I is associated with slight/mild hearing loss [22,30,31]. In this study, no cases of homozygous p.V37I were observed. These findings support that this mutation is associated with mild hearing loss, because all of our subjects showed severe deafness.

The two unreported *GJB2* mutations, p.R32S and p.P225L, were not detected in normal hearing controls. These appeared in amino acid residues that were highly conserved. Additionally, three types of mutation were seen in arginine as the thirty-second amino acid, such as p.R32C, p.R32L, and p.R32H. Therefore, R32 is thought to be a mutation “hot spot.” Thus, it is likely that these are pathological mutations, rather than rare or functionally neutral polymorphic changes. On the other hand, the mutation site of p.P225 located at the C-terminus of Connexin26 has not previously been reported. As the C-terminus region of connexins is thought to be an important region for intracellular molecular signaling and interaction with scaffolding proteins and the cytoskeleton [32–34], p.P225L mutation found in this study may affect important intracellular molecular networks to maintain the normal function of the cochlear gap junction.

5. Conclusion

In conclusion, this study identified significant genotypic features of Japanese children with profound non-syndromic deafness. Further research is required covering a broader range of genes in the subjects in this study with either single heterozygous or no mutation, in order to better understand the epidemiology of deafness in Japan.

Acknowledgements

We thank all the subjects who participated in the present study. We also thank Ms. Naoko Tamura and Ms. Tomoko Kataoka (Tokyo Medical University School of Medicine), for recruiting families with non-syndromic deafness, and Ms. Junko Onoda (Juntendo University School of Medicine) for assisting in our experiments.

References

- [1] A.C. Davis, The prevalence of deafness and reported hearing disability among adults in Great Britain, *Int. J. Epidemiol.* 18 (1989) 911–917.
- [2] D.H. Wilson, P.G. Walsh, L. Sanchez, The epidemiology of deafness in an Australian adult population, *Int. J. Epidemiol.* 28 (1999) 247–252.
- [3] N.E. Morton, Genetic epidemiology of deafness, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 630 (1991) 1631.
- [4] M.L. Marazita, L.M. Ploughman, B. Rawlings, E. Remington, K.S. Arnos, W.E. Nance, Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population, *Am. J. Med. Genet.* 46 (1993) 486–491.
- [5] V. Kalatzis, C. Petit, The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss, *Hum. Mol. Genet.* 7 (1998) 1589–1597.
- [6] A. Kenneson, K. Van Naarden Braun, C. Boyle, *GJB2* (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review, *Genet. Med.* 4 (2002) 258–274.
- [7] F. Denoyelle, S. Marlin, D. Weil, L. Moatti, P. Chauvin, E.N. Garabedian, et al., Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: Implications for genetic counselling, *Lancet* 353 (1999) 1298–1303.
- [8] A. Murgia, E. Orzan, R. Polli, M. Martella, C. Vinanzi, E. Leonardi, et al., Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability, *J. Med. Genet.* 36 (1999) 829–832.
- [9] R.L. Snoeckx, P.L. Huygen, D. Feldmann, S. Marlin, F. Denoyelle, J. Waligora, et al., *GJB2* mutations and degree of hearing loss: a multicenter study, *Am. J. Hum. Genet.* 77 (2005) 945–957.
- [10] Y. Fuse, K. Doi, T. Hasegawa, A. Sugii, H. Hibino, T. Kubo, Three novel connexin26 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic deafness, *Neuro Report* 10 (1999) 1853–1857.
- [11] S. Abe, S. Usami, H. Shinkawa, P.M. Kelley, W.J. Kimberling, Prevalent connexin 26 gene (*GJB2*) mutations in Japanese, *J. Med. Genet.* 37 (2000) 41–43.
- [12] T. Kudo, K. Ikeda, S. Kure, Y. Matsubara, T. Oshima, K. Watanabe, et al., Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) responsible for childhood deafness in the Japanese population, *Am. J. Med. Genet.* 90 (2000) 141–145.
- [13] H.J. Park, S.H. Hahn, Y.M. Chun, K. Park, H.N. Kim, Connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss, *Laryngoscope* 110 (2000) 1535–1538.
- [14] P. Gasparini, R. Rabionet, G. Barbujani, S. Melchionda, M. Petersen, K. Brondum-Nielsen, et al., High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations, Genetic Analysis Consortium of *GJB2* 35delG, *Eur. J. Hum. Genet.* 8 (2000) 19–23.
- [15] G.W. Brobby, B. Muller-Myhsok, R.D. Horstmann, Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa, *N. Engl. J. Med.* 338 (1998) 548–550.
- [16] M. Maheshwari, R. Vijaya, M. Ghosh, S. Shastri, M. Kabra, P.S. Menon, Screening of families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment (ARNSHI) for mutations in *GJB2* gene: Indian scenario, *Am. J. Med. Genet. A* 120A (2003) 180–184.
- [17] M. RamShankar, S. Girirajan, O. Dagan, H.M. Ravi Shankar, R. Jalvi, R. Rangasayee, et al., Contribution of connexin26 (*GJB2*) mutations and founder effect to non-syndromic hearing loss in India, *J. Med. Genet.* 40 (2003) e68.
- [18] G. Minárik, V. Ferák, E. Feráková, A. Ficek, H. Poláková, L. Kádasi, High frequency of *GJB2* mutation W24X among Slovak Romany (Gypsy) patients with non-syndromic hearing loss (NSHL), *Gen. Physiol. Biophys.* 22 (2003) 549–556.
- [19] P. Seeman, M. Malíková, D. Rasková, O. Bendová, D. Groh, M. Kubálková, et al., Spectrum and frequencies of mutations in the *GJB2* (Cx26) gene among 156 Czech patients with pre-lingual deafness, *Clin. Genet.* 66 (2004) 152–157.
- [20] A. Alvarez, I. del Castillo, M. Villamar, L.A. Aguirre, A. González-Neira, A. López-Nevo, et al., High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (*GJB2*) in Spanish Romani (gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss, *Am. J. Med. Genet. A* 137A (2005) 255–258.
- [21] K. Cryns, E. Orzan, A. Murgia, P.L. Huygen, F. Moreno, I. del Castillo, et al., A genotype-phenotype correlation for *GJB2* (connexin 26) deafness, *J. Med. Genet.* 41 (2004) 147–154.
- [22] T. Oguchi, A. Ohtsuka, S. Hashimoto, A. Oshima, S. Abe, Y. Kobayashi, et al., Clinical features of patients with *GJB2* (connexin 26) mutations: Severity of hearing loss is correlated with genotypes and protein expression patterns, *J. Hum. Genet.* 50 (2005) 76–83.
- [23] K. Fukushima, K. Sugata, N. Kasai, S. Fukuda, R. Nagayasu, N. Toida, et al., Better speech performance in cochlear implant patients with *GJB2*-related deafness, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 62 (2002) 151–157.
- [24] F.J. Del Castillo, M. Rodriguez-Ballesteros, A. Alvarez, T. Hutchin, E. Leonardi, C.A. de Oliveira, et al., A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(*GJB6*-d13s1854), found in trans with mutations in the *GJB2* gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic deafness, *J. Med. Genet.* 42 (2005) 584–594.
- [25] A. Ohtsuka, I. Yuge, S. Kimura, A. Namba, S. Abe, L. Van Laer, et al., *GJB2* deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation, *Hum. Genet.* 112 (2003) 329–333.
- [26] J. Löffler, D. Nekahm, A. Hirst-Stadlmann, B. Gunther, H.J. Menzel, G. Utermann, et al., Sensorineural hearing loss and the incidence of Cx26 mutations in Austria, *Eur. J. Hum. Genet.* 9 (2001) 226–230.
- [27] A. Pampanos, J. Economides, V. Iliadou, P. Neou, P. Leotsakos, N. Voyiatzis, et al., Prevalence of *GJB2* mutations in prelingual deafness in the Greek population, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 65 (2002) 101–108.
- [28] C. Hamelmann, G.K. Amedofu, K. Albrecht, B. Muntau, A. Gelhaus, G.W. Brobby, et al., Pattern of connexin 26 (*GJB2*) mutations causing sensorineural deafness in Ghana, *Hum. Mutat.* 18 (2001) 84–85.
- [29] WangYC, C.Y. Kung, M.C. Su, C.C. Su, H.M. Hsu, C.C. Tsai, et al., Mutations of Cx26 gene (*GJB2*) for prelingual deafness in Taiwan, *Eur. J. Hum. Genet.* 10 (2002) 495–498.
- [30] C. Huculak, H. Bruyere, T.N. Nelson, F.K. Kozak, S. Langlois, V37I connexin 26 allele in patients with sensorineural hearing loss: Evidence of its pathogenicity, *Am. J. Med. Genet. A* 140 (2006) 2394–2400.
- [31] H.H. Dahl, K. Saunders, T.M. Kelly, A.H. Osborn, S. Wilcox, B. Cone-Wesson, et al., Prevalence and nature of connexin 26 mutations in children with non-syndromic deafness, *Med. J. Aust.* 175 (2001) 191–194.
- [32] L.A. Elias, D.D. Wang, A.R. Kriegstein, Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex, *Nature* 448 (2007) 901–907.
- [33] P.E. Martin, G. Blundell, S. Ahmad, R.J. Errington, W.H. Evans, Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 3845–3855.
- [34] K.A. Schalper, N. Palacios-Prado, M.A. Retamal, K.F. Shoji, A.D. Martínez, J.C. Sáez, Connexin hemichannel composition determines the FGF-1-induced membrane permeability and free $[Ca^{2+}]_i$ responses, *Mol. Biol. Cell* 19 (2008) 3501–3513.

III. 臨床応用の進歩

多能性幹細胞を用いた遺伝性難聴に対する
内耳細胞治療法の開発

神谷和作 池田勝久

Inner ear cell therapy for hereditary deafness with multipotent stem cells

Kazusaku Kamiya, Katsuhisa Ikeda

Department of Otorhinolaryngology, Juntendo University School of Medicine

Abstract

Congenital deafness affects about 1 in 1,000 children and the half of them have genetic background such as connexin26 gene mutation. The strategy to rescue such hereditary deafness has not been developed yet. Inner ear cell therapy for hereditary deafness has been studied using some laboratory animals and multipotent stem cells, although the successful reports for the hearing recovery accompanied with supplementation of the normal functional cells followed by tissue repair and recovery of the cellular/molecular functions have been still few. To succeed in hearing recovery by inner ear cell therapy, appropriate cell type, surgical approach and the stem cell homing system to the niche are thought to be required.

Key words: hereditary deafness, mesenchymal stem cell, inner ear, cochlea, connexin26

はじめに

先天性難聴は1,000出生に1人と高頻度に発症し聴覚・言語発育障害の極めて高度なQOLの低下をもたらすが、その半数以上は遺伝性と考えられている。遺伝性難聴の原因遺伝子は代表的なコネキシン26遺伝子(connexin26, Cx26, GJB2)をはじめとして多くが同定されている。しかしその根本的治療法は皆無であり、近年では再生医療の遺伝性難聴への応用が大きく期待されている。著者らは蝸牛線維細胞を標的とした感音性難聴モデルへの内耳細胞治療法に成功し、幹細胞導入により感音性難聴の聴力回復が可能であることを実証した¹⁾。一方でヒト遺伝

性難聴の臨床症状に近いとされる遺伝子改変モデルマウスの開発も進めてきた。ヒト非症候性難聴DFN3モデルBrn4欠損マウス(Brn4KO)は遺伝性難聴の遺伝子改変モデルの先駆けとして報告され、蝸牛線維細胞の変性とそれに伴う内リンパ電位(endocochlear potential: EP)と呼ばれる内耳特異的な電位形成のシステムに異常が生じることが初めて発見された(図1)²⁾。更に世界で最も高頻度に変異が検出される代表的な難聴遺伝子、コネキシン26(Cx26)遺伝子(GJB2)の優性阻害変異型トランスジェニック(Tg)マウス(Cx26Tg)³⁾の作製によっても、高頻度に発生する遺伝性難聴に対する分子病態が明らかになってきた。このマウスは生後発達期に

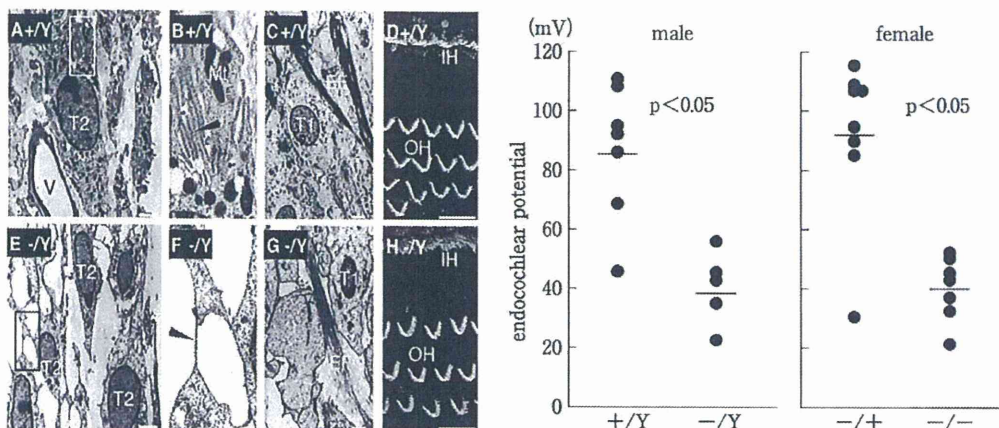


図1 ヒト遺伝性難聴モデル Brn4 遺伝子欠損マウスにおける
蝸牛線維細胞変性の発見(文献²⁾より引用)

蝸牛有毛細胞を含むコルチ器に変性がないにもかかわらず(H), 蝸牛線維細胞に変性がみられ(F, 矢頭), その結果蝸牛内リンパ電位が著しく低下する(右グラフ)。→すなわち蝸牛線維細胞を正常細胞に置換することができれば聴力が回復する可能性が非常に高い。

有毛細胞を含む感覚上皮領域であるコルチ器において, コルチトンネルやヌエル腔などの特殊細胞構築(cytoarchitecture)が正常に形成されないという病理的特徴があるが⁴⁾, 外有毛細胞を単離すると正常と同等の有毛細胞特有の運動能を示すことが明らかとなり⁵⁾, 残存した有毛細胞を活用した細胞治療により, 聴力回復の可能性が十分に考えられる。

著者らの研究チームでは Cx26 の内耳特異的欠損マウス(Cx26cKO)を新規開発し, 同モデルマウスによる更なる分子病態の解明とそれに応じた細胞治療法の開発を進めている。

1. 内耳細胞治療の必要性

遺伝性難聴では一部の患者に人工内耳の有用性も報告されているが, 本来の聴覚機能を回復させる根本的治療法はいまだ存在しない。遺伝性難聴の第一次的な原因細胞は有毛細胞以外にも蝸牛線維細胞や支持細胞などであることが明らかとなっている。この多様な異常変異細胞を修復するには, 新たな治療戦略として多能性幹細胞を用いた効率的細胞治療法の開発が必要であると考えられる。内耳再生医療の技術開発により, これまで補聴器や人工内耳などの適用で

根本的治療が存在しなかった遺伝性難聴患者の日常生活における負担は大幅に減り, 細胞が永続的に生着すればその後の手術や投薬の頻度が軽減し, 極めて現実的な高度医療への発展が期待できる。

2. 内耳への細胞治療とそのアプローチ

近年の内耳再生医療に関する基礎研究分野は, *in vitro* での有毛細胞への分化誘導においては年々進歩している。最近では *in vitro* においてマウス胚性幹(ES)細胞や人工多能性幹(iPS)細胞から聴毛を有する有毛細胞へ分化誘導することも可能となっており⁶⁾, 細胞工学的分野では大きな成果が得られている。しかしながらそれらの細胞を移植により内耳組織へ生着させ, 同時に機能的補足や組織修復によって聴力回復を誘導する細胞治療の試みは成功例が少なく, 引用度の高い論文での報告も少ない。聴力回復を目的とした内耳細胞治療法を開発するためには移植細胞の生着と機能発現を同時に考慮し, 内耳の解剖学的特徴および各細胞の生理学的特徴を十分に理解することが重要であると考えられる。

内耳は特殊なリンパ液で満たされた独特な構造をもち, 血液-脳関門と同様に「血液-内耳関

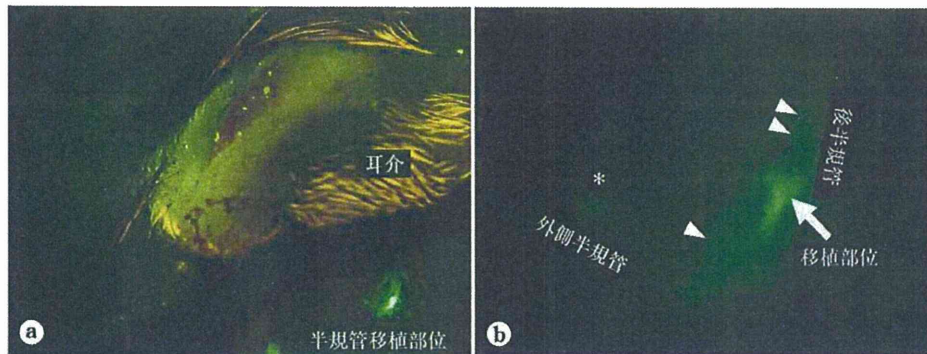


図2 マウスへの間葉系幹細胞移植2週間後の移植部蛍光実体顕微鏡像

- a. 耳後部切開により半規管を露出し、移植細胞塊が拒絶されずに生着していることを確認。
 b. 更に移植部位より播種性に進展し、コロニーを形成(矢頭)。後半規管から外側半規管への移行も確認された(*)。

門'と呼ばれる血管系を有するため内耳有毛細胞やその周辺細胞への薬物的アプローチが難しい。しかし移動能・多分化能を兼ね備えた幹細胞による内耳細胞治療の方法が確立すれば、難聴の根本的治療への有効なツールになると考えられる。

著者らの初期の検討実験では、蝸牛管付近より細胞液投与を試みた際はどの部位でも手術による永続的な聴力低下がみられ、蝸牛組織には線維化が認められた。著者らはIguchiらの方法⁷⁾を参考にラットの後半規管および外側半規管に小孔を開け⁷⁾、片側から微小チューブを挿入し細胞液の外リンパ腔還流(1×10^6 cells/20 μ L \times 10 min)を行い、良好な結果が得られている。この方法では手術による聴力低下はほとんどみられず、大量の細胞を蝸牛内に導入することができるため、内耳細胞治療に適した投与方法であると思われる。著者らは細胞液環流後に骨髓間葉系幹細胞の細胞塊を半規管の小孔に挿入することにより、内液の漏出を防ぎ、細胞生着にも良好な結果を得ている(図2)。

3. *in vitro* での内耳有毛細胞作製法の開発

体外で未分化細胞より内耳有毛細胞を作製しようとする試みは数多く行われてきたが、*in vitro* において有毛細胞特異的マーカーを発現

させた報告はこれまで複数報告されてきた。それらを発展させ、遺伝子発現だけではなく特殊な巨大繊毛をもつ内耳有毛細胞に特殊形態を形成させ、最終的には音の振動を感知する機械的刺激受容チャネル(機械電気シグナル変換チャネル: mechano-electrical transduction (MET) channel)を併せ持つ細胞を作製させる試みが行われてきた。2007年にCorwinらの研究チームはニワトリの間葉系細胞から動毛、不動毛をもつ有毛細胞を作製した⁸⁾。次段階として、哺乳類細胞から有毛細胞を*in vitro* で作製する技術が期待されてきた。そして2010年、スタンフォード大学のOshima, Hellerらの研究チームによりマウスのES細胞およびiPS細胞から*in vitro* で内耳有毛細胞を作製する画期的技術が発表され、作製された細胞が音の振動を感知できる有毛細胞特有のMET機能を有することが明らかとなった⁹⁾。これにより内耳有毛細胞を体外で人工的に増殖・分化させることが可能であることが示された。この報告では、未分化細胞から内耳前駆細胞へ、段階的に分化を進めているため、これを応用すればすべての内耳構成細胞への分化能をもつ内耳細胞を*in vitro* にて作製し内耳移植に最適な細胞を選抜することが可能となる。同方法ではES/iPS細胞の浮遊培養後に接着培養を行い分化制御因子としてDkk1, SIS3, IGF-1の添加培養、その後の

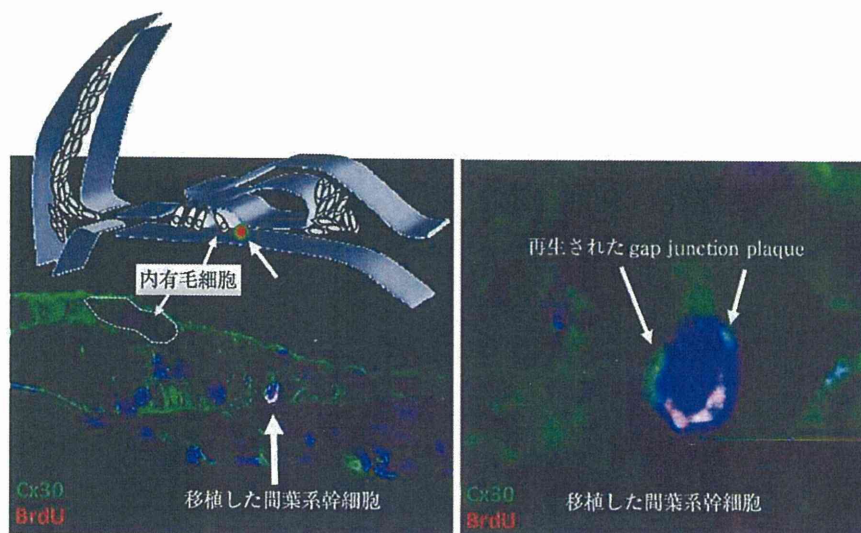


図3 移植した間葉系幹細胞において再生されたギャップ結合プラーク
半規管外リンパ液領域より移植され、コルチ器の内毛細胞近傍に侵入した間葉系幹細胞(左)。同細胞は蝸牛支持細胞の機能構造であるコネクシン複合体で構成されるギャップ結合プラークを形成している(右)。

bFGF 添加後に鶏杯卵形囊細胞との共培養を行うことで、動毛や機械電気シグナル変換が可能な不動毛をもつ内耳有毛細胞様細胞を得ることを可能としている。

4. 蝸牛標的組織への幹細胞の誘導

前述のように体外で内耳細胞を作製する技術は大きく進展しているが、内耳細胞治療において、作製された細胞を蝸牛組織へ直接的に挿入することは蝸牛の構造上困難であり、適切な箇所へ幹細胞を導入できる細胞誘導システムが必須であると考えられる。特に有毛細胞やその支持細胞および内リンパ液に接する血管条細胞、蝸牛線維細胞など、適切な箇所へ幹細胞を導入し、その微小環境(niche, ニッチ, ニッシェ)に応じて分化させることが必要である。そのためには適切な幹細胞ホーミング(標的組織へ遊走し微小環境に生着)の分子機構を理解し応用することが重要であると考えられる。

マックスプランク研究所の研究チームは、心筋虚血後に骨髄由来間葉系幹細胞が癒痕層へ効率的にホーミングされるには走化性因子 MCP1

とその受容体 CCR2 およびその下流において細胞遊走を制御している FROUNT による分子経路が重要な役割を担っていることを明らかにした⁹⁾。著者らの研究チームでは、実験的に誘発した蝸牛線維細胞損傷部においても MCP1 が高発現することを発見している(文献⁹⁾および未発表データ)。これを応用し CCR2 を共発現する骨髄間葉系幹細胞株を作製して内耳細胞治療実験に用いることで、良好な細胞誘導効果が得られている。これまで蝸牛線維細胞領域に軽度損傷を与えた難聴動物では蝸牛線維細胞に移植細胞が侵入しており、一部は有毛細胞の近傍の支持細胞領域に侵入し、同領域の主な機能構造であるギャップ結合プラークを形成した(図3)。

おわりに

将来的に内耳細胞治療への活用が期待できる細胞は、患者の骨髄より樹立可能な骨髄間葉系幹細胞、iPS細胞およびES細胞由来の内耳前駆細胞などであるが、これらの細胞と適切な幹細胞ホーミングの分子機構を応用し適切な遺伝性難聴モデル動物において方法を選抜することに

より、細胞を補うだけではなく遺伝子変異をもつ異常細胞を正常細胞に置換するという全く新しい観点での方法論を確立できる。この方法論の発展により、将来的には多様な遺伝性難聴患者に対し薬物治療などとは異なる、組織損傷の種類と度合いに対応した低リスクで高い効果をもつ新規難聴治療法の開発が期待できる。

■ 文 献

- 1) Kamiya K, et al: Mesenchymal stem cell transplantation accelerates hearing recovery through the repair of injured cochlear fibrocytes. *Am J Pathol* 171: 214-226, 2007.
- 2) Minowa O, et al: Altered cochlear fibrocytes in a mouse model of DFN3 nonsyndromic deafness. *Science* 285: 1408-1411, 1999.
- 3) Kudo T, et al: Transgenic expression of a dominant-negative connexin26 causes degeneration of the organ of Corti and non-syndromic deafness. *Hum Mol Genet* 12: 995-1004, 2003.
- 4) Inoshita A, et al: Postnatal development of the organ of Corti in dominant-negative Gjb2 transgenic mice. *Neuroscience* 156: 1039-1047, 2008.
- 5) Minekawa A, et al: Cochlear outer hair cells in a dominant-negative connexin26 mutant mouse preserve non-linear capacitance in spite of impaired distortion product otoacoustic emission. *Neuroscience* 164: 1312-1319, 2009.
- 6) Hu Z, Corwin JT: Inner ear hair cells produced in vitro by a mesenchymal-to-epithelial transition. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 16675-16680, 2007.
- 7) Iguchi F, et al: Surgical techniques for cell transplantation into the mouse cochlea. *Acta Otolaryngol Suppl* (551): 43-47, 2004.
- 8) Oshima K, et al: Mechanosensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell* 141: 704-716, 2010.
- 9) Belema-Bedada F, et al: Efficient homing of multipotent adult mesenchymal stem cells depends on FROUNT-mediated clustering of CCR2. *Cell Stem Cell* 2: 566-575, 2008.

聴覚障害理解のための新規教育方法の考案

嶋田 麻美*・石原 研治**

(2011年9月15日受理)

Promotion of the Understanding of Deafness Using "HearLoss"

Asami SHIMADA and Kenji ISHIHARA

キーワード：聴覚，聴覚障害，HearLoss

聴覚障害には、生まれつき障害がある先天性聴覚障害と、生後何らかの原因で障害が生じる後天性聴覚障害がある。先天性聴覚障害は新生児の 1000 人に 1 人の割合で誕生している。また、近年、後天性聴覚障害の一種である騒音性難聴や突発性難聴などが注目されている。しかし、健聴者は、「音が聞こえづらい」という状態がどのようなものであるか想像しづらいために、その症状と派生して生じる聴覚障害者の悩みや不便に感じることを状況に応じて判断しにくいようである。健聴者が聴覚障害を理解し、より身近に感じられるようになるためには、難聴を疑似体験することが一番の近道になるのではないかと考えた。そこで、本研究では、難聴を疑似体験できるソフト HearLoss を利用し、聴覚障害者の QOL 向上のために授業例を考案することを目的とした。作成した授業例を用いて模擬授業を行ったところ、「聴覚障害者の聞こえを知ることができた」や「興味を持てた」などのアンケート結果が得られた。「聞こえない・聞こえにくい」という障がいとは、身体的な障がい、つまり聴覚障がい者自身の障がいだが、そこから生じるコミュニケーションの障がいは、健聴者の誤った認識や誤解が生み出しており、社会が作った障がいである。聴覚障がいという障がいそのものの治療には限界があったとしても、コミュニケーション障がいは周囲の人々によって改善できるのではないかと考えられる。

はじめに

聴覚障がいには、生まれつき障がいがある先天性聴覚障がいと、生後何らかの原因で障がいが生じる後天性聴覚障がいがある¹⁾。先天性聴覚障がいは様々な先天性疾患の中でも最も頻度の高い疾患に属し、実に新生児の 1000 人に 1 人の割合で誕生している²⁾。また、近年、後天性聴覚障が

*株式会社シティーヒル (茨城大学教育学部養護教諭養成課程 卒業生)

**茨城大学教育学部教育保健教室

い的一种である騒音性難聴や突発性難聴などが注目されている。しかし、聴覚障がい者の「聞こえない・聞こえにくい」という症状は健聴者にとって具体的にイメージしづらいものであり、聴覚障がいに対する正しい知識や認識が、未だ得られていない。また、聴覚障がい者は一見してその障がい分が分からず、そのため周囲の人々に気づいてもらえないばかりか、「話しかけたのに無視をされた」と誤解されてしまうことや、自分の伝えたいことを周囲に正確に伝えられないという経験をしていることが多い。

聴覚障がいには、聞こえにくい声や音があったり、状況によって聞き取りづらいことがあったりと、人によって様々な聞こえ方がある。聞こえの程度も軽度から重度まで様々である。当教室で行った調査では、「聴覚障がいを持つ人は音がどのように聞こえていると思いますか。」という質問に対して、「音が小さく聞こえる」と回答した者は 65.3%、「ぼやけて聞こえる」と回答した者は 59.8%と過半数に達したのに対し、「途切れて聞こえる」や「雑音が入って聞こえる」と回答した者はともに 20% 前後であり認知度が低いということが明らかになった³⁾。補聴器の効果についても正しく回答した者は少なく認識が低かった。補聴器は音を大きくする機械であるため、難聴の症状や、状況によっては効果を十分に発揮できないことがある。聴覚障がい者は補聴器をつけていれば音が明確に聞こえていると誤解されることが多いが、健聴者は「補聴器は難聴者の支援として万能ではない」ということを理解する必要がある。

このように、健聴者は「音が聞こえづらい」という状態がどのようなものであるか想像しづらいために、その症状と派生して生じる聴覚障がい者の悩みや不便に感じることを状況に応じて判断しにくいようである。このような点を改善していくことによって、健聴者と聴覚障がい者はもっと歩み寄り、お互いを理解しあうことができるのではないだろうか。こうした現状を踏まえ、健聴者が聴覚障がいという症状や聴覚障がい者の心に対して理解を深められるようにするためには、学校という場を活用して聴覚障がいを知る機会を持つことが一つの手段となり得ると考えられる。

健聴者が聴覚障がいを理解し、より身近に感じられるようになるためには、難聴を疑似体験することが一番の近道になるのではないかと考えた。その体験から、健聴者が聴覚障がい者のニーズや自分自身にできる支援について考えることが重要である。そこで、本研究では、難聴を疑似体験できるソフトを有効に利用し、聴覚障がい者の QOL 向上のために学校教育でどのような働きかけができるかを考案することを目的とした。

方法

難聴体験ソフト「HearLoss」を改良し、それを用いた授業例を考案した。

[1] HearLoss

HearLoss とは

HearLoss は、Department of Speech, Hearing and Phonetic Sciences, Division of Psychology and Language Sciences, University College London で開発された Windows PC 用のパソコンプログラムであり、健聴者に対して聴力損失の影響を示すためのものである。つまり、HearLoss を用いて、健聴者が難聴を

疑似体験することができるのである。小さい音が聞こえないとどのように聞こえるのか、高音が聞こえないとどのように聞こえるのか、音が明瞭に聞こえないとはどのような感じなのかということを経験できる。

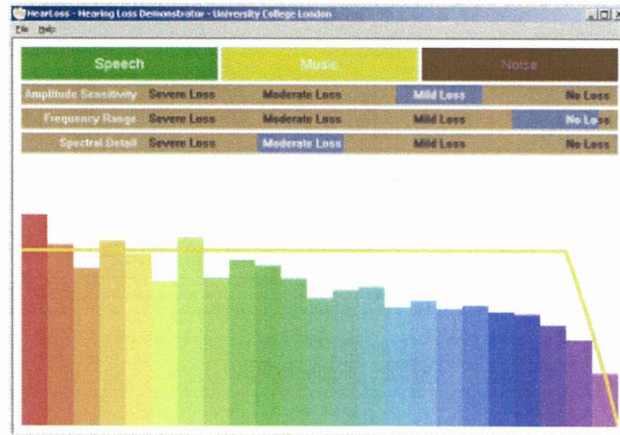


図 1. HearLoss

HearLoss の使用方法

HearLoss は、Department of Speech, Hearing and Phonetic Sciences, Division of Psychology and Language Sciences, University College London のホームページ (<http://www.phon.ucl.ac.uk/resource/hearloss/>) 内からダウンロードした。プログラムには以下の 2 種類がある。

音声サンプルデータの入ったプログラム

<ftp://ftp.phon.ucl.ac.uk/pub/sfs/hearloss/hearloss100.exe>

音声サンプルデータの入っていないプログラム

<ftp://ftp.phon.ucl.ac.uk/pub/sfs/hearloss/hearloss.exe>

音声サンプルデータの入ったプログラムをダウンロードすると、そのプログラムには Speech、Music、Noise の音声サンプルがすでに入っているためそのまま再生することができる。ただし、これらの音声は日本語ではない。一方、音声サンプルデータの入っていないプログラムをダウンロードした場合、利用者が音声データを入れることができるため目的に応じたオリジナルのデータを作ることができる。

オリジナルのデータを設定するには、サウンドファイルの保存形式を WAV ファイルにする必要がある。変換方法の一例は以下の通りである。

- ① パソコンに CD 等から音源を取り込む。この時、CD から取り込んだファイルの形式は Open MG Audio となっている。
- ② Rip!AudiCO (ver 4.03 フリーウェア版) を <http://www.vector.co.jp/soft/win95/art/se202196.html> からダウンロードし、音源を WAV ファイルに変換する。Rip!AudiCO は、MP3 や WMA

ファイル形式から WAV ファイルへの変換も可能である。

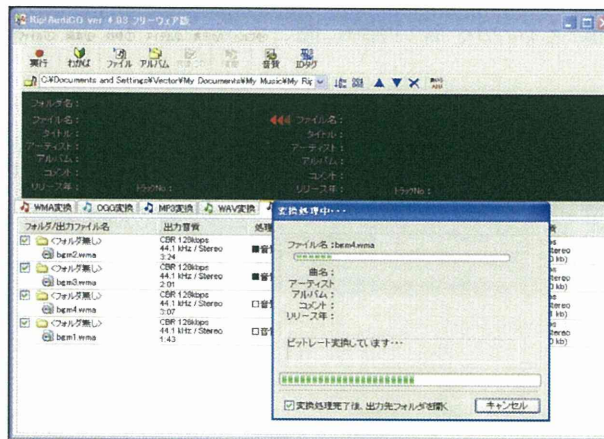


図 2. Rip!AudiCO

- ③ ファイル名を「speech」「music」「noise」のいずれかに設定する。
- ④ 変換したオーディオファイルは、HearLoss が保存されているフォルダ内に保存する。
- ⑤ Zoom 社製録音機器「Handy VideoRecorder Q3」で音声等を録音した。この場合、パソコンにデータを取り込むと、WAV ファイル形式になるため、そのまま HearLoss に用いることができる。

本研究では、上述した方法で音声サンプルデータの入っていない HearLoss プログラムファイルダウンロードして以下の音声ファイルを使用した。

Speech : 女子学生二人による朗読

Music : ドラマ「ライアーゲーム」より サウンドトラック

Noise : 休み時間中の教室の雑音

これらの設定したオーディオファイルを再生し、以下の項目をコントロールすることで、聴力障がいの影響を擬似的に再現した。

表 1. HearLoss において変化させることのできる項目

Amplitude Sensitivity	音の大きさへの感度 これを下げると小さい音から聞こえなくなっていく。
Frequency Range	周波数帯 これを下げると大きい音から聞こえなくなっていく。
Spectral Detail	スペクトル情報 これを下げると音の明瞭度が下がっていく。

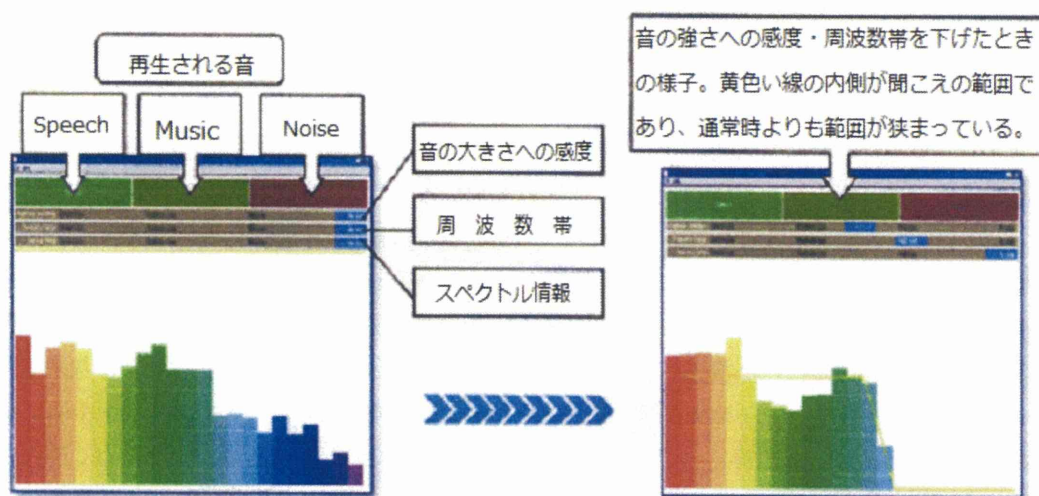


図3. HearLoss による聞こえの範囲の変化

[2] 作成した授業例を用いた模擬授業

HearLoss を活用した授業例を考案し、当学部養護教諭養成課程に在籍する学生に対して模擬授業を行った。授業後にアンケートを行い集計した。内容は理解度と感想である。

結果

[1] HearLoss での音声ファイルの作成

HearLoss をダウンロードする際、音声サンプルデータの入ったプログラムをダウンロードすると、その音声サンプルデータの Speech は英語となる。そこで、日本人がより分かりやすいものとなるように日本語での朗読を録音して Speech に用いた。Music には、低音から高音まで音域が幅広いものを選曲し、聴力障がいの影響が顕著に感じられるものにした。また、Noise には、聴覚障がい児・生徒が普段どのような音の中で学校生活を送っているのかを少しでも想像できるように教室の休み時間の様子を録音した音源を作成した。

[2] 授業例の作成

健聴者が聴覚障がい者に対しての支援のあり方を考えるきっかけとして、HearLoss を有効に利用するために一つの授業例を作成した。

今回の授業例は、小学校高学年を対象としており、複雑な聴覚器の構造や音の伝わり方を簡単な言葉に置き換えて説明している。当教室で行った調査において、これまでの生活の中で聴覚障がいを「知る機会があった者」と「知る機会がなかった者」では、「知る機会があった者」の方が聴覚障がい者や聴覚障がいに関する認識が高いということ明らかになった。そこで、できるだけ早期から

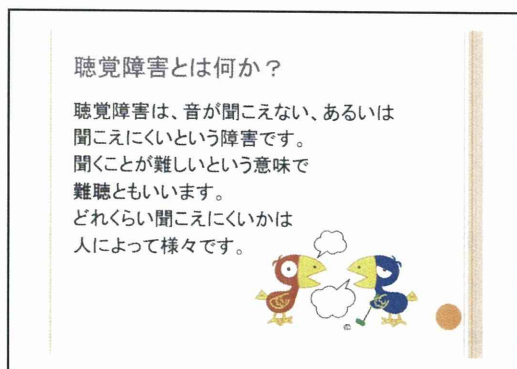
教育することによって健聴者の中で聴覚障がいというものが身近に感じられ、受け入れやすいものになるのではないかと考えて小学校高学年を対象とした。スライドを作成するにあたり、聴覚障がいを子どもにも分かりやすく説明している絵本「ふしぎだね!?聴覚障がいのおともだち」⁴⁾を参考にした。聴覚器の構造や難聴の種類については、言葉だけでなくイラスト等を用いて説明するなどの工夫をし、難しい内容にも興味を持てるようにした。十分に授業時間が取れるのならば、聴覚障がい者のコミュニケーション方法についての説明の中で、実際に子どもたちが手話や読話を行ってみると、それぞれの難しさなども実感でき有効であると思われる。

本研究での一番の目的は HearLoss による難聴の疑似体験であり、聴覚障がい者がどのような聞こえの中で生活しているのか、どのようなことに不便さや困難を感じているのか、ということ想像できるような体験にしたいと考えた。そこから、子どもたち自身が自分にできることを考えていけるよう、聴覚障がい者と会話をする際に心がけることなど、関わり方についての説明を中心に取入れた。最終的には、聴覚障がいは決して特別なものではなく、共に生活していくために自分にできることがまだまだあるという意識を子どもたちが持つようになることが目的である。説明をより詳しくし、言葉遣いを変えることで、中高生や教職員にも応用できるのではないかと考えられる。

スライドは全部で 10 枚作成した。次項から順にスライドを提示し、口頭で説明する内容を記述していく。

[3] 授業例スライド

スライド ①



皆さんは、聴覚障がいと聞いて、どのようなことをイメージしますか？

聴覚障がいは、音が聞こえない、あるいは聞こえにくいという障がいです。聞くことが難しいという意味で、難聴ともいいます。どれくらい聞こえにくいかは人によって様々ですが、聞こえないことでコミュニケーションや日常生活に困ったことがあるときに障がいと捉えます。

スライド ②



聴覚障がい者のコミュニケーションの方法はいくつかあります。

補聴器は、耳につけると音を大きくしてくれる機械です。音が大きくなるからといって、すべての音が聞こえるようになるわけではありません。また、雑音なども大きくなってしまいうるさい場所では聞き取ることが難しいです。右の写真を見て下さい。上が耳かけ型補聴器で、下が耳穴型補聴器といえます。

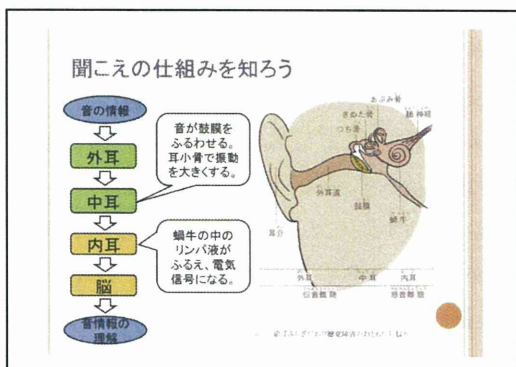
読話は、口元の動きを見て、相手が何を話しているか読み取ります。正面を向いてゆっくり話していると、

読話は理解の助けになります。

筆談は、お互いに文字を書いて言いたいことを伝え合うことです。時間はかかりますが、言いたいことを正確に伝えることができます。

手話は、手や指や腕を動かしたり、顔の動きを使ったりして、意味や思いを伝えます。例えば「ありがとう」はこう表現します。(実際に手話を行う。)聴覚障がいのある人みんなが手話を使うわけではありません。

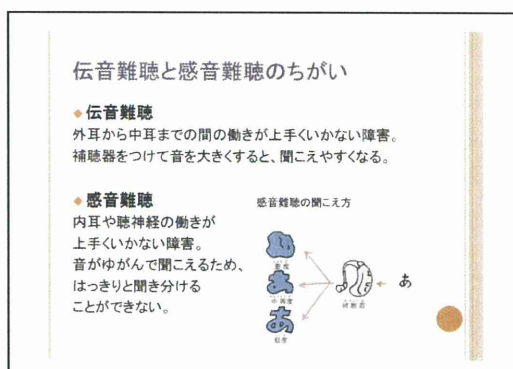
スライド③



ここで、音が聞こえる仕組みを理解しましょう。

私たちが耳と言っている、外から見えている部分は耳介といいいます。音はこの耳介から入ってきて、外耳道、つまり耳の穴を通して鼓膜にぶつかります。耳介と外耳道の部分を外耳といいいます。音というのは、空気の振動です。鼓膜を震わせた振動は次に、その奥の中耳へと伝わります。中耳には、ツチ骨・キヌタ骨・アブミ骨という3つの小さな骨があり、まとめて耳小骨といいいます。耳小骨は、音がよく聞こえるように振動を大きくする働きがあります。振動はさらに奥の内耳へと伝わります。内耳は音を感じる場所で、カタツムリのような形をした蝸牛があります。中にはリンパ液が入っていて、振動はここで液体の揺れとなり、さらに電気信号となって聴神経に伝わります。聴神経から脳に信号が届くと、音が聞こえたと感じるのです。

スライド④



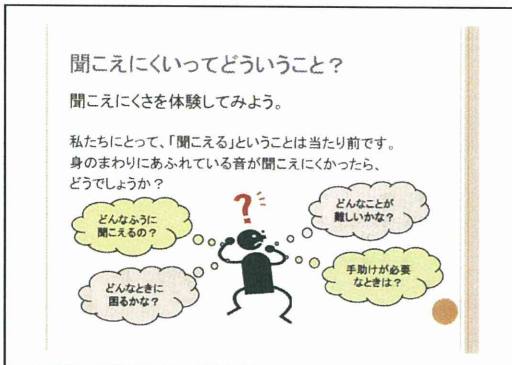
外耳から中耳までの間の働きが上手くいかない聴覚障がいを「伝音難聴」といいます。音を伝えるのが難しくなるからです。伝音難聴の人は、耳鼻科で治療し、補聴器をつけて音が大きく聞こえるようにすると、聞こえやすくなります。

内耳や聴神経の働きが上手くいかない聴覚障がいのことを「感音難聴」といいます。音を感じ取るのが難しくなるからです。感音難聴の程度が重くなると、補聴器で音を大きくするだけでは、すぐによく聞こえるようにはなりません。図のように音が歪んで聞こえてしまうからです。

「あ」という言葉を補聴器で大きく聞こえるようにすると、難聴が軽い場合には「あ」と分かりますが、難聴が少し重くなると「あ」という形が崩れてしまっていますね。難聴がもっと重くなるともう「あ」だと分からなくなってしまいます。補聴器は言葉をはっきりと聞こえるようにすることはできないのです。

伝音難聴と感音難聴が合わさった「混合難聴」もあります。

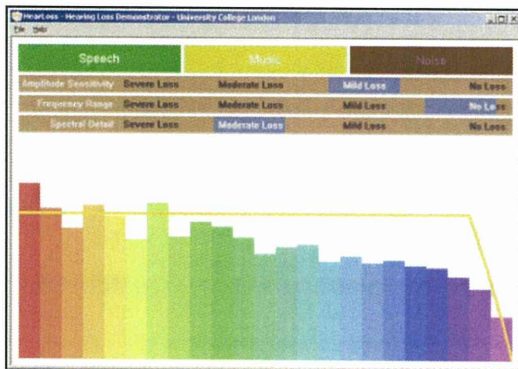
スライド ⑤



私たちの身の回りにはたくさんの音が溢れています。その音が聞こえなかったり、聞こえにくかったりしたらどうでしょうか。

これから、みなさんには難聴を疑似体験してもらいます。聞こえにくいということがどのようなことなのか、どのようなときに不便を感じるのか、考えてみましょう。そして、私たちにできることは何か、それぞれ考えてみてください。

(ここで一度スライドを閉じ、HearLoss を起動する)



これは HearLoss といいます。まずは、普通に音楽を流してみます。

(Music を再生する)

この音楽が、伝音難聴の人にはこう聞こえています。

(Amplitude Sensitivity を下げていく)

音楽がどんどん聞こえなくなっていくますね。また、高音が聞こえなくなると、このように聞こえます。

(Frequency Range を下げていく)

高音が聞こえなくなるとするのは、感音難聴の症状です。そして、音が歪んで聞こえるというのは、このような感じになります。

(Spectral Detail を下げていく)

これも感音難聴の症状です。音がぼやけて雑音のようなものが混ざって聞こえます。

(Frequency Range と Spectral Detail を下げ、音楽を流したままスライド④を開く)

この図のように、音が歪み、はっきりと聞こえなくなっているのがわかりますか?音が歪んで聞こえるというのはこのような状態なのです。

それでは、難聴の人はどのような世界で生活しているのか、少しだけ体験してみましょう。

(Speech を再生し Frequency Range を下げる)

例えば大きな声で話しても、高音が聞こえないという状態では聞き取るということがとても難しいということがわかりますか?これが、聞き間違いや聞き漏らしに繋がります。きちんと内容が伝わるまで、根気強く話し、伝わったことを確認することが大切です。では、話し声などがうるさい場所を想像してみてください。

(Speech と Noise を同時に再生する)

みなさんなら Speech を聞き取ることが出来ますね。難聴の人はどうでしょうか。

(Frequency Range と Spectral Detail を下げる)

難聴者にとって雑音の中で話し声を聞き取ることはとても大変です。

(この状態で Noise を消す)

静かになると少しだけ声が聞き取りやすくなったのがわかりますか?先生が大事な話をしているときに、みなさんがざわざわしていたら、聴覚障がいのある人は大事な話を聞きそびれてしまうかもしれません。

「静かな環境を作る」ということは、私たちにすぐできる支援の一つです。


今、みなさんが体験したものは、聞こえ方の一つの例です。聞こえ方や聞こえにくさは一人一人違うということを忘れないで下さい。

(HearLoss を閉じ、スライドを再開する。)

スライド ⑥

聴覚障害があるとこんなことが苦手

- ◆ 後ろや横から話しかけられること
- ◆ 何かをしながら同時に聞くこと
- ◆ よく似た言葉を聞き分けること
- ◆ 二人以上の声を聞き分けること
- ◆ 子音を聞くこと、話すこと





聞こえない・聞こえにくいということが少しはイメージできましたか？

聴覚障がいがあると、次のようなことが苦手だと感じます。まず、聴覚障がいがある人は、聞く準備ができていないと、なかなか人の話を正しく聞き取ることができません。そのため、後ろや横から話しかけられたり、何かをしながら同時に聞いたりするということが苦手です。また、聞く準備ができていても、音がはっきりと聞こえないため、よく似た言葉を聞き分けることが難しいです。特に「さしすせそ」などの子音は聞き取りにくく、自分の声も聞こえにくいことから、子音を正しく発音することが苦手です。次に、補聴器をつけていると、みんなの音が全部同じように聞こえてしまいます。そのため、二人以上の声を聞き分けることが苦手です。グループで話し合うときなどは、誰が話しているのかきちんと示すようにしましょう。

スライド ⑦

話すときはこうしよう

- ◆ **相手の注意を向けてから**
まずは相手の正面にまわってから目を合わせ、相手がこちらに気付いてから話しましょう。
- ◆ **何について話すか示してから**
例えば、消しゴムを借りたいときにはその消しゴムをかかげて、目の前に見せてから「かして」と言えば伝わりやすくなります。

聴覚障がいの人と話すときは次のようすると、お互

いに話しやすくなります。

「相手の注意を向けてから」

まずは相手がこちらに気付いてから話しましょう。

「何について話すか示してから」

例えば、消しゴムを借りたいときには、その消しゴムをかかげて、目の前に見せてから「かして」と言えば伝わりやすくなります。

スライド ⑧

- ◆ **相手にわかるように話す**
話が複雑にならないよう、短い文に区切りながら話しましょう。口を大きく開けてゆっくりめに話すと、読話がしやすくなります。
- ◆ **伝わったかどうか確認する**
言ったことがちゃんと伝わったかどうか、きちんと確認するようにしましょう。




「相手にわかるように話す」

話が複雑にならないよう、短い文に区切りながら話しましょう。口を大きく開けてゆっくりめに話すと、読話がしやすくなります。

「伝わったかどうか確認する」


言ったことがちゃんと伝わったかどうか、きちんと確認するようにしましょう。

スライド ⑨

相手の話をきちんと聞くことも大切

聴覚障害のある人の中には、ときどき言葉の発音が違っている人がいます。そのような人と話す場合でも、相手の言いたいことを分かるようにする姿勢がとても大切です。

決してさげすんだりからかたりしないようにして下さい。こちらがきちんと聞こうとしていれば相手も気持ちよく話すことができます。



分かりやすく伝えることも大切ですが、相手の言っていることをきちんと聞くことも大切です。お互いに