

## 実験動物の進歩 2

## 日本産野生由来マウスに発見した新しい疾患モデル動物

The new disease model mouse, originated from Japanese wild mouse

まつ しま よし ぶみ  
松 島 芳 文  
Yoshibumi MATSUSHIMA

## はじめに

前回は東北地方で日本産野生マウスを捕獲し、近交系化を始めたきっかけと、その過程で自然発症のアポE欠損高脂血症マウスを発見したことを述べた。

郡山市由来の系統はKOR1からKOR8までであったが、現在はKOR1の他に、KOR5とKOR7が残っているのみで、5系統は繁殖不可能となり継代が途絶えた。繁殖性の悪い系はそのこと自体、モデルに向いていないと考え、あきらめるようにしている。

アポE欠損高脂血症マウスが見つかったKOR1には、その後もアトピー性皮膚炎マウス、2型糖尿病マウス、小眼球症マウスなどが見つかる。不思議なことに、KOR5とKOR7からは、これまで疾患モデルとなる変異個体はなにも認められていない。しかしこれらの系は、採取地点の野生遺伝子を保持している正常コントロール系として有用である。

野生マウスの採取と維持を始めてから20年以上経って振り返ると、KOR1は、野生由来の変異遺伝子が特に多く蓄積されていて、近交系化の過程でホモ個体となり、目に見える表現型の疾患として認められる。あるいは、近交系になってからも変異個体が見つかるので、たまたまKOR1に突然変異が高率に起きるのかも知れない。

見つかった疾患モデルは、本当に新規のモデルなのか、またそれぞれの専門分野にとって有用なモデルであるか否かを問うため、実験動物学会や疾患モデル学会などで報告した。

学会場では、毎年異なった疾患モデルを報告するので、「KOR1は親孝行なマウスですね」などと冷やかされたり、羨ましがられたりした。子供をほめ

られているようで、悪い気もしない。「運が良いだけですから」、などといって「幸運」を強調してきた。

一方、疾患モデルはラボラトリーマウスにも見つかっていて、幸運というより強運といった方が良いような、「発見の連鎖」を経験した。

今回は、次々と見つかった3種類の眼科領域のモデルと巨大結腸マウス、ワールデンブルグ症候群4型モデルについて紹介する。

## I. 脱臼型白内障マウス RLC

白内障、小眼球症、眼形成不全など眼科領域の疾患モデルマウスは多数報告されている。これらの異常は、ほとんどの場合、目で見て容易に気付くので発見されるケースが多いのだと思われる。

筆者は1985年にオランダ国立癌研究所のJ. Hilgersから、唾液と涙液のタンパク多型の調査を依頼され、送られてきたマウスの中に、水晶体核が脱臼し、その結果として白内障になるマウスを見つけた(写真1)。

この変異マウスはBALB/cとSTS/Aから樹立されたリコンビナント近交系CXSマウス14系統のうちの1系統であるCXSN/Aに発見した<sup>1)</sup>。

変異マウスは生後30日頃からレンズ後縫合部から後極にかけて皮質繊維の変性、膨化を起こし赤道部レンズ細胞では空胞形成が著明となり白内障となる。進行とともにレンズ囊の変性、破綻をきたす。その結果、生後4、50日頃からレンズ核は硝子体内、ときには前眼房内に脱出する(写真1)<sup>2)</sup>。このような表現型からRupture of lens cataract mouse : RLCマウスと名付け、原因遺伝子を $rlc$ とした。

原因遺伝子 $rlc$ の染色体マッピングは国立遺伝学研究所で樹立された日本産野生マウス由来のMSM

を交配相手に用いた。ラボラトリーマウスに突然変異が見つかった場合、系統間で遺伝的多型率の高い日本産野生マウスを交配相手に選ぶのが有利である。ラボラトリーマウス間では遺伝的多型率が50%前後であるのに対して日本産野生マウスとでは80%にもなり、それだけ遺伝子マーカーが有効に使えることになる。

当時、KORはまだ近交系になっていなかったの  
で、遺伝学研究所からMSMを分与してもらって使用した。

RLCマウスにMSMを交配し、そのF1をRLCマウスに戻し交配して、約700匹を得て染色体マッピングを行った。原因遺伝子の染色体マッピングの際、水晶体の脱臼、角膜の白濁の有無など表現型の判定は、1匹でも誤判定があればマッピングの精度に大きく影響するために注意深い観察が必要である。BALB/cはアルビノなので、写真1のように水晶体の変性が容易に観察できる。しかし、戻し交配マウスの約半数は、MSM由来の野生色であり、当然虹彩も黒色である。そのままでは水晶体の病変判定が出来ないので、散瞳剤を用いることにした。マウスに散瞳剤を点眼すると数分で瞳孔が開く、開いた瞳孔からペンライトの光が網膜の方向に入るようにマウスを保定し、発症の有無を判定した。このようにして判定した表現型とマイクロサテライトマーカーとの連鎖解析から、原因遺伝子*nlc*を第14染色体上にマッピングした<sup>3)</sup>。

現在のところ、ヒトでは水晶体が脱臼した結果として白内障になる遺伝疾患は報告されていない。し

たがって、疾患モデルとして直接ヒトの病気に応用可能ではない。しかし、ポジショナルクローニングにより、原因遺伝子が特定され、前述のような水晶体の変性と破綻の仕組みが解明されれば、生物学的な大きな成果となる。

## II. 円錐角膜様マウス SKC

RLCマウスの解析以来、自然とマウスの目に注意を払うようになり、1995年には、CF#1 (CFナンバー1と読む) というクローズドコロニー由来の近交系マウスのなかに角膜が円錐状に突出している個体を見つけた (写真2)。

発症個体は成熟雄に限られ、雌は発症しなかった。雄性ホルモンの関与が予測されたので、幼若雌マウスに雄性ホルモンを投与した。その結果、雌マウスの角膜に同様の病変が認められ、逆に、3週齢頃の発症前の雄マウスを去勢すると発症が認められなかった。これらのことから角膜が円錐状に突出してくる病変は雄性ホルモン依存性であることがわかり、交配実験の結果から常染色体性劣性に遺伝していることがわかった<sup>4)</sup>。

疾患モデルとしての有用性を探るためにこのような症状をヒトの眼科疾患から探した結果、円錐角膜という疾患に似ていることがわかった (写真3)。

ヒトの円錐角膜は、角膜の中心部が突出するために視力が落ち、検診で発見されることが多い。円錐角膜は不正乱視のためにメガネでは視力矯正ができず、ハードコンタクトレンズによる治療を施される



写真1 脱臼型の白内障マウス RLC

水晶体核が前房に脱落している。

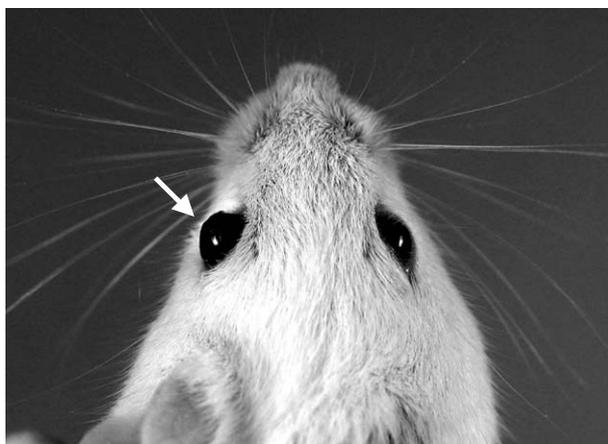


写真2 自然発症円錐角膜様マウス SKC

左眼発症、右眼非発症。成熟雄にのみ発症する。写真は片側性。



写真3 ヒト円錐角膜、初期例(左)と進行例(右)  
(日本医科大学 大原國俊先生提供)

が、進行性の場合には、円錐部が混濁し極度に薄くなり、ついには孔があいてしまうことがあり、角膜移植を行う。

円錐角膜の原因は不明とされていて、遺伝性疾患という認識は低いようである。日本での家族内発症の報告は約1.4%、欧米では約6~8%である。多くは両眼性で、男性は6,500人に1人、女性では17,500人に1人といわれ、男子の発症率は女子の3倍となり、性差が認められる。

円錐角膜マウスとの共通点を探ると、性と関係していることと発症年齢がいずれも性成熟期以降であることで似ていた。ヒト円錐角膜は遺伝性が認められていないようであるが、家族内発症例の詳細な家系調査を行うことにより遺伝性が確認できるのではないかと思われた。

CF#1に見つけた円錐角膜様病変は、CF#1があまり一般的な系統ではないので、原因遺伝子をBALB/cに導入して突然変異系を樹立し、系統名をSpontaneous keratoconus mouse : SKCマウスと名付けた。

原因遺伝子の染色体マッピングはRLCの時と同様に再び日本産野生由来のMSMを用いた戻し交配実験を行い、第17染色体のH-2付近にマッピングして遺伝子名を*skc*とした<sup>4)</sup>(その後MGI: Mouse Genome Informaticsによって*Krcn*: keratoconuに改名)。

### Ⅲ. 日本産野生由来マウスMSMとKOR

MSMは日本産野生マウス由来の近交系のなかで

も種々の遺伝的特性について、最もよく調べられているマウスであり、マイクロサテライトマーカー等の多型情報のデータベースも公開されている。1980年より近交系化が開始され、今ではF80代を超えている(写真4)。前述のように、脱臼型白内障マウスRLCと円錐角膜様マウスSKCの原因遺伝子をマッピングするための交配相手としてMSMを使用したのもそのためである。

最近、MSMの由来が雑誌に紹介されていた<sup>5)</sup>。それによると、1978年に国立遺伝学研究所の当時の森脇和郎先生の研究室に、市内在住の母娘が自宅で捕まえた3ペアのネズミを菓子箱に入れて持参し、「研究所で面倒を見てもらえませんか」と渡されたネズミが由来だという。これまで筆者は、学生や研究員を総動員して、近郊の田園地帯でマウスを捕獲したのだろうと勝手に想像していたので大変意外だった。一方、郡山由来のKORは、菓子箱を持って農家を回り、大変苦労して捕らせてもらったマウスがもともになっている。今でも、幾人かの方とは年賀状のやりとりがあり、KORの活躍ぶりを報告している。

MSMと郡山由来のKORを比較すると、いずれも日本産野生マウスでありマイクロサテライトマーカーの遺伝的多型率はわずかである。しかし、俊敏さはだいぶ異なり、KORに比べてMSMは非常に俊敏で、ケージ交換の際によく逃げられる。逃げたマウスは直ちに捕まえないと、次のケージ交換ができないので大変である。

ただし、東北のネズミはのんびりしているわけで

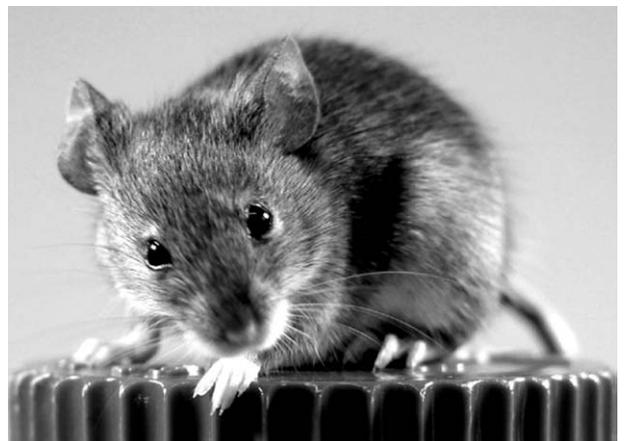


写真4 国立遺伝学研究所で近交系化された日本産野生由来マウスMSM

写真は円錐角膜非発症個体。

はなく、KORでも慣れていない人では取り扱いが難しい。また、今では途絶えてしまったが秋田由来のマウス AKT は MSM より一回りサイズが大きくて、行動は MSM と同じような俊敏さを持っていた。このように行動だけを見ても地域差があり、郡山と秋田でさえ、「東北」でひとくくりには出来ない。

遺伝子素材としてはできる限り多くの地点から樹立された系統が必要であり、またこれらは相互に遺伝的多型を比較することによって有用性を発揮する。

#### IV. MSM に見つかった 円錐角膜様マウス JKC

ラボラトリーマウスに白内障と円錐角膜を見つけ、眼科領域の疾患モデル発見が続いたが、MSM のなかにも円錐角膜様の変異が見つかった。発見した円錐角膜様疾患は SKC の円錐角膜とは異なり、雌雄両性に発症した（写真5）。

MSM は、遺伝研から入手して5年が経過していたので、入手後に突然変異が起きたのだろうと考え、遺伝研から新たに正常コントロールマウスとして MSM を分与してもらった。ところが驚いたことに、送られてきた MSM にも円錐角膜が見つかった。少なくとも5年前に分与してもらった時点で遺伝研においてこの病変の突然変異が起きていたことになる。

MSM は前述のように俊敏で取り扱いが大変なためか、筆者も含めて5年間以上、誰も角膜の変異に気付かなかったことになる。

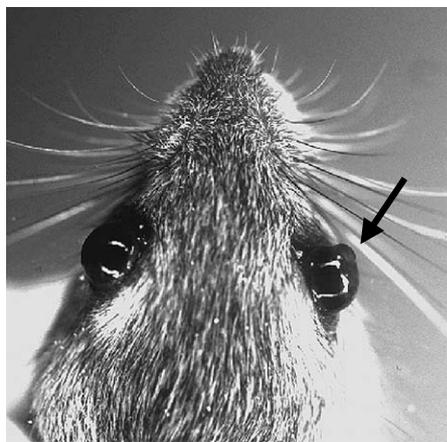


写真5 日本産野生マウス由来 MSM に自然発症した円錐角膜様病変（右眼）

円錐角膜は加齢に従い発症頻度が高くなるが発症率は85%程度であり、雌雄ともに発症する。

MSM における円錐角膜様疾患の発症頻度は85%前後であり、片眼性と両眼性が認められた。突出した角膜の頂点には血管が進入し、ヒト円錐角膜とは逆に角膜が肥厚していた（写真6）。

この円錐角膜様病変の論文報告に際して、「MSM はヒト円錐角膜様のモデルマウスであった」と報告するのは遠慮して、日本産野生マウスに見つかった円錐角膜マウスという意味で、JKC (Japan keratoconus) マウスと名付けて報告した<sup>6)</sup>。原因遺伝子 *jk*c の染色体マッピングは、この場合は逆にラブラトリーマウスの BALB/c を交配相手に選んで、F1 を MSM に戻し交配して遺伝解析し、第13染色体にマッピングした<sup>6)</sup>。

JKC とヒト円錐角膜との共通点は SKC よりも少なく、モデルとしての有用性は未知である。その後、理化学研究所つくばリソースセンターで維持している MSM には円錐角膜様変異が全く認められないとの連絡があり、原因遺伝子 *jk*c のほかに発症を左右する遺伝的あるいは環境因子の存在が示唆された。したがって、JKC と命名したことは正解であったかも知れない。

疾患モデルの開発においては、常にヒト疾患との共通性を念頭に置いて研究を進めなくてはならない。表現型がヒトと似ているからといって真のモデルとならないこともあり、またその逆もある。ヒトとマウスとの種差を考慮し、マウスに見つけた突然変異疾患がヒトの疾患に見あたらない場合でも変異マウスの原因遺伝子を特定しておくことが大切であ

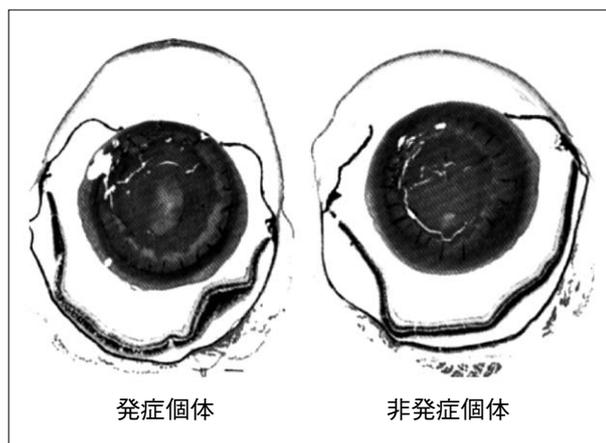


写真6 JKC の病理像

5ヵ月齢雄発症個体（左）、正常5ヵ月齢雄非発症個体（右）

る。ヒトとマウスで表現型が大きく異なっているにもかかわらず、原因遺伝子は共通であるかも知れないからである。

## V. ワールデンブルグ症候群4型（ヒルシュスプルング病）モデルマウス WS4

前述のように、MSM マウスに発見した円錐角膜の原因遺伝子の染色体マッピングは、MSM が日本産野生由来なので交配相手にはラボラトリーマウスの BALB/c マウスを選んだ。染色体マッピングの成功は運にも左右されるが、ラフマッピングでも 1,000 匹ぐらいの戻し交配マウスが必要である。1,000 匹の戻し交配マウスは、30 ペアに 4、5 産させてようやく得られる数であり、大変な飼育スペースと時間と労力を要する。

ある時、戻し交配マウスの雌雄を分離するのが遅くて、戻し交配マウスの雌雄間で予定外の仔が生まれていることに気付いた。手が回らなかったことを心でわびて、処分しようとしたその瞬間、数匹の仔マウスのなかに「黒目で白色被毛」の個体が混ざっていることに気付いた。

マウスの新生児の皮膚の色は赤い。特に1日目は赤くて将来白色のアルビノ被毛になるか、野生色や黒色などの有色被毛になるかわからない。しかし、有色被毛の個体は皮膚を透かして見える眼球の色が黒いので、アルビノか有色かがわかる。

極めて幸運なことに、「予定外出産の仔」は生後5日ほど経っていて、眼球は黒いにもかかわらず、うっすら生えてきた毛の色はアルビノ個体のように白く見えた。もし、数日早く「予定外出産の仔」に気付いていたら、変異個体はそのまま不要なマウスとして淘汰されていた。

さっそく変異マウスとこれを産んだ雌雄個体を分離して、解析を始めた。この雌雄からはその後、2産、3産と子供が生まれた。子供の毛色は野生色とアルビノが3:1ぐらいであり、さらに、約1/4ぐらいの割合で、黒目白色の変異個体が生まれた。

この被毛変異マウスはいずれも下腹部が膨大し3、4週齢で幼若死した。いずれの個体も下痢で肛門付近が汚れていた。死亡した個体を解剖した結果、巨大結腸であることがわかった（写真7）。病理所見から、巨大結腸は膨満部より遠位側の Auerbach 神経節細胞を欠失していることに起因することが確

認できた。

この黒目白色個体は、雌雄ともに巨大結腸で死亡してしまうので、変異系の維持は、変異個体と同腹の見かけ上正常な雌雄を交配し、変異個体が生まれれば、その両親はいずれもヘテロ個体であると判定し、変異系の維持を始めた。

次に、この被毛変異マウスと同様の所見を示す既存のモデルマウスを入手し、相補性テストによる原因遺伝子の同定を行った（写真8）。

日本産愛玩用マウスに由来する JF1 マウスはエンドセリン受容体 B 遺伝子 *Ednrb* の変異により、特徴のある被毛を持ち（黒い部分が少ないが黒斑ではなく白斑）、難聴であることが知られている（写真9）。また、*piebold-lethal/+* も同様に *Ednrb* の変異により白斑を有し、ホモ個体は致死性である（写真8）。

写真8に示すように、被毛変異のヘテロ個体（WS4/+）と JF1、および *piebold-lethal/+* と交配した結果、それぞれの F1 に白斑をもつ変異個体が認められた。したがって、本変異マウスの原因はいずれの結果からも *Ednrb* の変異であることがわかった。そこで、腎臓および脳から RNA を抽出し、RT-PCR 法でエンドセリン受容体 B の cDNA を調べたところ、第2、第3エクソンでコードされている部分が欠損していることがわかり、ゲノムレベルで

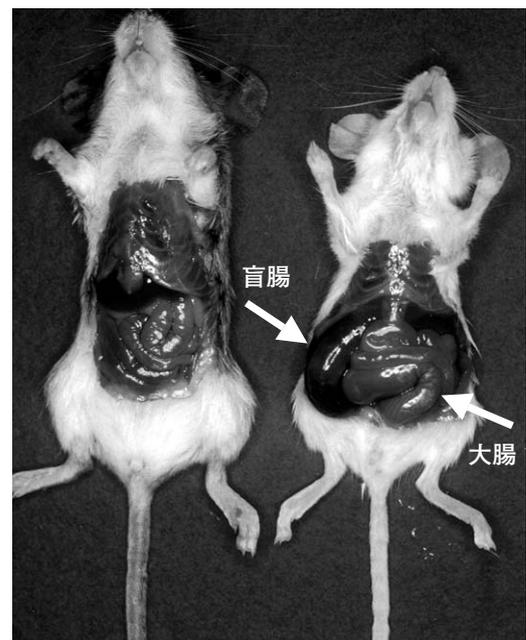


写真7 WS4 マウスの巨大結腸症（右）、矢印は盲腸と大腸を指す。正常マウス（左）

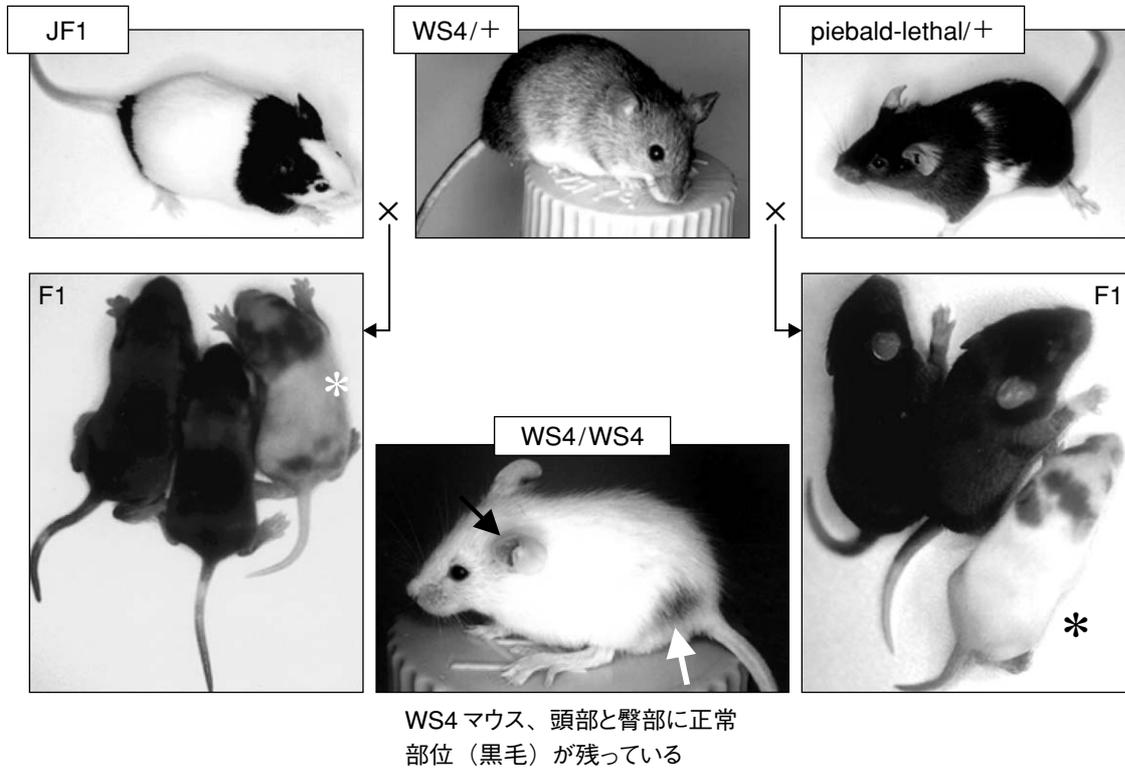


写真8 WS4マウスの白斑被毛の原因遺伝子を相補性テストによって検討した

WS4/+個体と白斑被毛の原因がエンドセリン受容体B (*Ednrb*)の変異によることわかっているJF1マウスおよびpiebald-lethal/+マウスと交配した結果、いずれの交配のF1個体にも白斑被毛個体(\*印)が認められた。したがってWS4の原因遺伝子は*Ednrb*であることがわかった。



写真9 江戸時代の愛玩用マウスに由来するJF1マウス  
江戸時代の愛玩用マウスに由来するJF1マウス。浮世絵、郷土玩具のモデルにもなっている。最近ではパンダマウスと呼ばれ、ふたたび愛玩用として人気がある。エンドセリン受容体B遺伝子の変異により、大きな白斑が特徴で難聴、まれに巨大結腸症を発症する。

も*Ednrb*の変異が確認できた。エンドセリン受容体BはGタンパク結合型の7回膜貫通型タンパクであるが、第2、第3エクソンはこのうち第3および第4膜貫通部をコードしており、変異タンパクは機能

していないと思われた。

また、この被毛変異マウスは、巨大結腸のほかに音に対する驚愕反応がなかったため、JF1と同様に難聴であることもわかった。病理学的にはライスネル膜がコルチ器の方に偏位し、内リンパ虚脱をきたしていた(写真10)。

これらの表現型から本変異マウスは、次に記載したワールデンブルグ症候群(Waardenburg syndrome)のうち、ワールデンブルグ症候群4型とよく一致していることがわかり、WS4モデルマウスと名付けた<sup>7)</sup>。

ワールデンブルグ症候群の臨床症状は、内眼角が外側に位置する内眼角の解離、髪、虹彩、皮膚の色素異常および感音性難聴などである。WSは内眼角の解離の有無によって、さらにタイプ1および2に分けられる。WS1型に上肢の異常を伴ったものをKlein-Waardenburg syndromeないしはWS3と呼ぶ。常染色体劣性遺伝を示すWS2型にHirschsprung病(先天性巨大結腸症)の特徴を示すものをWaardenburg-Shah syndromeないしはWS4と呼ぶ。巨大結腸の原因は、正常であれば腸管内のAuerbach神経

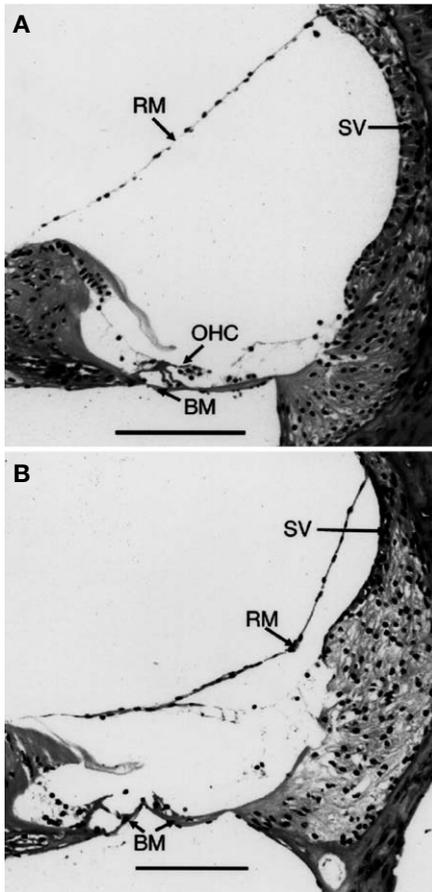


写真10 (A) BALB/c マウス; 正常個体の蝸牛では血管条 (SV) の中間細胞に由来するメラニン顆粒が認められ、ライスネル膜 (RM) は伸展している。(B) WS4 マウス; 変異個体の蝸牛では血管条にメラニン顆粒が認められず、ライスネル膜は血管条にへばりつくように存在する。(OHC) 外有毛細胞、(BM) 基底膜、バーは100 $\mu$ m

節細胞が胎生6週頃に移動し、胎生12週頃までに直腸の最下端部に到達するが、エンドセリン3 (EDN3) あるいはEDN3の受容体であるEDNRBの変異により、種々の程度で神経節を欠如し、胎便排泄遅延を起こし、巨大結腸を呈する。

これらヒトワールデンブルグ症候群の病型と遺伝形式、症状、遺伝子座位および原因遺伝子を表1にまとめた。

WS4のモデルマウスは表2に示すようにこれまでに原因遺伝子が*Edn3*とその受容体である*Ednrb*の変異による4系が報告されていたが、今回WS4マウスを加えることが出来た。

ところが、相補性テストに用いたJF1はWS4および*pie-bold*などと同様に*Ednrb*の変異による被毛異常と難聴を呈するにもかかわらず、巨大結腸を起こすという報告もなく通常2年以上生存する。したがって、WS4の疾患モデルとはいえない。しかし、筆者はこれまで数例の加齢したJF1に巨大結腸を観察している。これらの系統差は、原因遺伝子の変異箇所の違いによる*Ednrb*タンパク発現量の差異、あるいは遺伝的背景の差異によるものと推定される。また、WS4のなかには巨大結腸を免れて成育し、まれに繁殖可能な個体すらある。このこともWS4がMSMとBALB/cに由来し、個体ごとに遺伝的背景が異なることに起因していると推定される。

ワールデンブルグ症候群の原因遺伝子は1990年以降、表1に示したように次々とクローニングされ

表1 Waardenburg 症候群の各型の臨床症状と原因遺伝子

病型	遺伝形式	症 状	遺伝子座位	原因遺伝子
WS1	常染色体性優性	WS2+内眼角側方偏位	2q35	<i>PAX3</i>
WS2	常染色体性優性	皮膚白斑、早発性白髪、虹彩色素異常	3p12.5-14.1	<i>MITF</i> <i>EDN3, EDNRB?</i>
WS3	常染色体性優性	WS1+上肢の骨格異常	2q35	<i>PAX3</i>
WS4	常染色体性劣性	WS2+Hirschsprung病 (先天性巨大結腸)	13q22 20q13.2-13.3	<i>EDNRB</i> <i>EDN3</i>

表2 Waardenburg 症候群4型のモデルマウス

モデルマウス	遺伝形式	原因遺伝子	ホモ個体の表現型*
<i>Ednrb</i> <sup>-</sup> / <i>Ednrb</i> <sup>-</sup>	(ノックアウト)	<i>Ednrb</i>	巨大結腸、白斑
<i>s</i> <sup>l</sup> ( <i>pie-bold</i> )	(自然発症)	<i>Ednrb</i>	巨大結腸、白斑
<i>edn3</i> <sup>-</sup> / <i>edn3</i> <sup>-</sup>	(ノックアウト)	<i>Edn3</i>	巨大結腸、白斑
<i>ls</i> ( <i>lethal spotting</i> )	(自然発症)	<i>Edn3</i>	巨大結腸、白斑
WS4	(自然発症)	<i>Ednrb</i>	巨大結腸、白斑

\*ヘテロ個体はすべて正常

てきた。これには変異マウスの遺伝子解析の成績が大いに役立っている。しかし、ワールデンブルグ症候群すべての原因遺伝子が解明されたわけではない。今後とも変異マウスとの出会いを大切に、表現型の観察から既存のモデルがあるからといって、「自然からの贈り物」をみすみす無駄にしてはいけない。

### おわりに

最近、ある研究会に招かれ「自然発症疾患モデルマウス」について講演する機会があった。少々気恥ずかしかったが、一瞳で見つけてモデルを夢見る—という副題を付けた。瞳という字は童（わらべ）の目を意味する。小さな生き物の小さな違いを見つけるのは子供の方が得意である。新しい疾患モデルの誕生は、ひとえに幸運と根気がうまくかみ合うかどうかである。子供の目を持って観察し、少しでも変だと思ったら子供のように調べる。変なマウスがスーパーモデルに育つかも知れない。その際、大人が「だめ」といわない環境も大切である。もちろん内なる大人も含めてである。

### 文 献

- 1) Iida, F., Matsushima, Y., Hiai, H., Uga, S., Honda, Y.: Rupture of lens cataract model in the mouse. *Exp Eye Res.*, **64**: 324-327, 1997.
- 2) 日合 弘：白内障(カタラクト), *Mo1. Med.*, 別冊 自然発症疾患モデル動物, 森脇和郎, 樋野興夫編: 50-53, 中山書店, 東京, 1999.
- 3) Matsushima, Y., Kamoto, T., Iida, F., Abujiang, P., Honda, Y., Hiai, H.: Mapping of rupture of lens cataract (*rlc*) on mouse chromosome 14. *Genomics*, **36**: 553-554, 1996.
- 4) Tachibana, M., Adachi, W., Kinoshita, S., Kobayashi, Y., Honma, Y., Hiai, H., Matsushima, Y.: Androgen-dependent hereditary mouse keratoconus: linkage to an MHC region. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, **43**: 51-57, 2002.
- 5) 城石俊彦: 1枚の写真館 野生の証明. *細胞工学*, **23**: 525, 2004.
- 6) Tachibana, M., Okamoto, M., Sakamoto, M., Matsushima, Y.: Hereditary keratoconus-like keratopathy in Japanese wild mice mapped to mouse Chromosome 13. *Mamm Genome*, **13**: 692-695, 2002.
- 7) Matsushima, Y., Shinkai, Y., Kobayashi, Y., Sakamoto, M., Kunieda, T., Tachibana, M.: A mouse model of Waardenburg syndrome type 4 with a new spontaneous mutation of the endothelin-B receptor gene. *Mamm Genome*, **13**: 30-35, 2002.