

ストレスの関わり 内リンパ水腫n=120  
発症・増悪にストレスが深く関わる、関わる

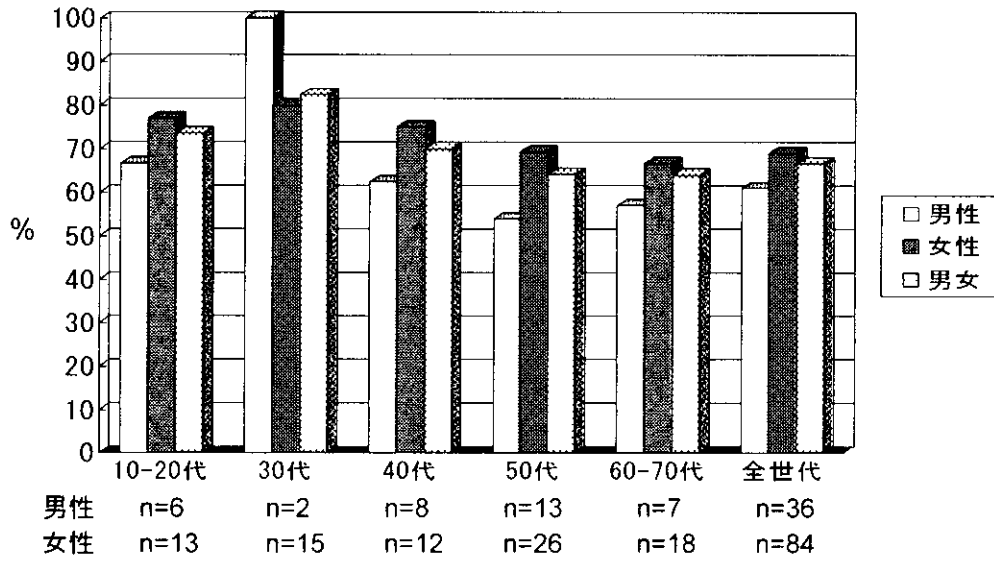


図 1

発症誘因の内訳 全世代 n=170 複数回答可

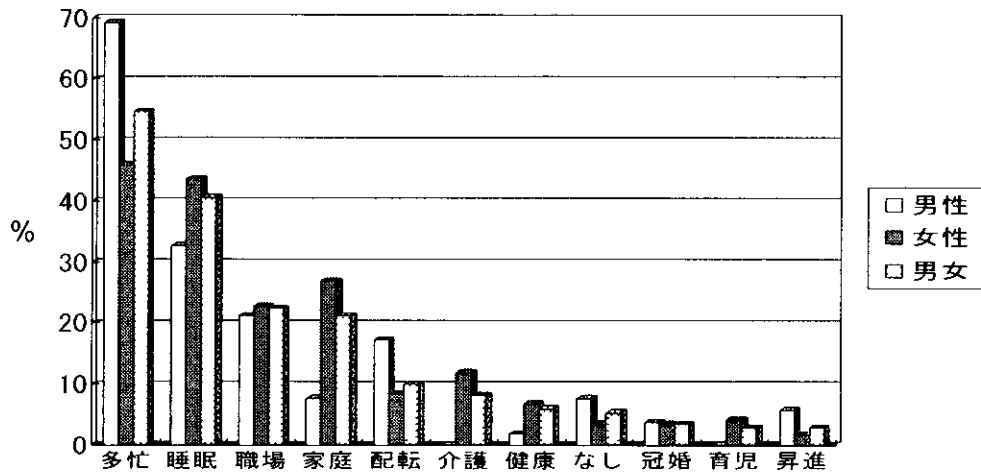


図 2-1

発症誘因の頻度%(n=32) 10-20歳代

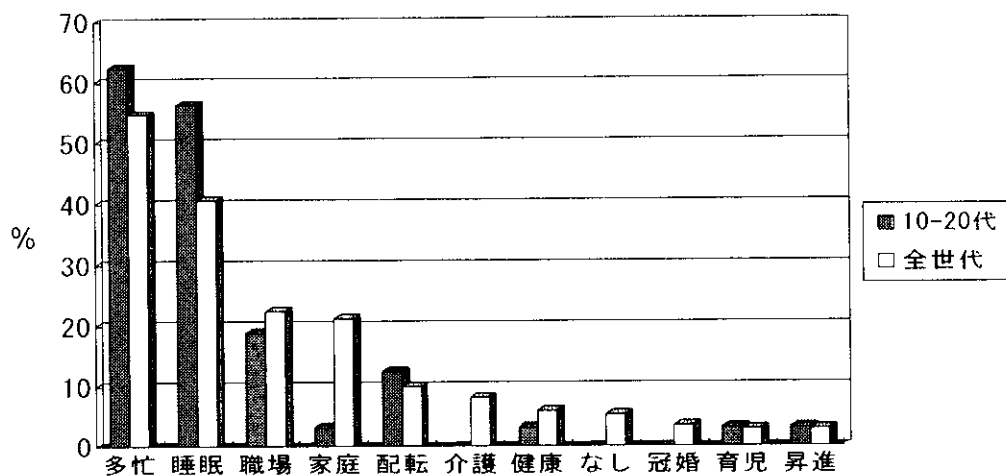


図 2-2

発症誘因の頻度%(n=27) 30歳代

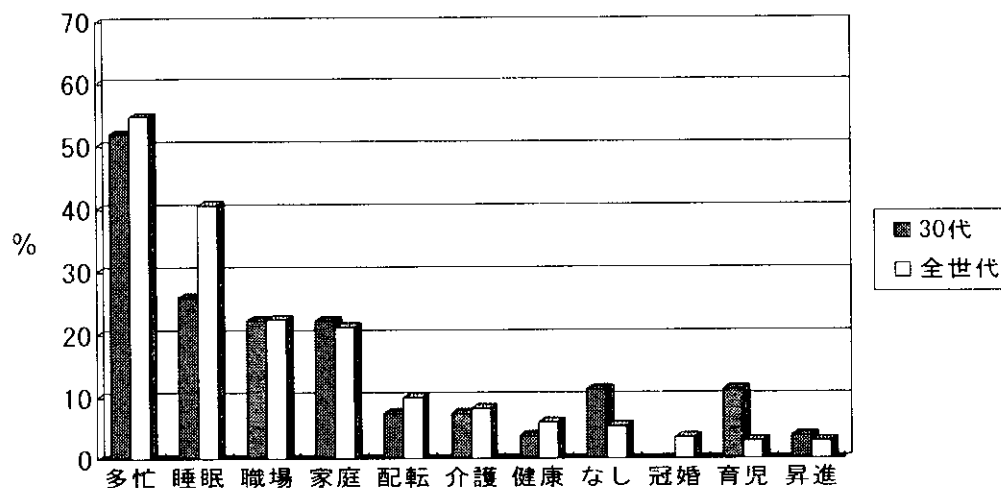


図 2-3

発症誘因の頻度%(n=33) 40歳代

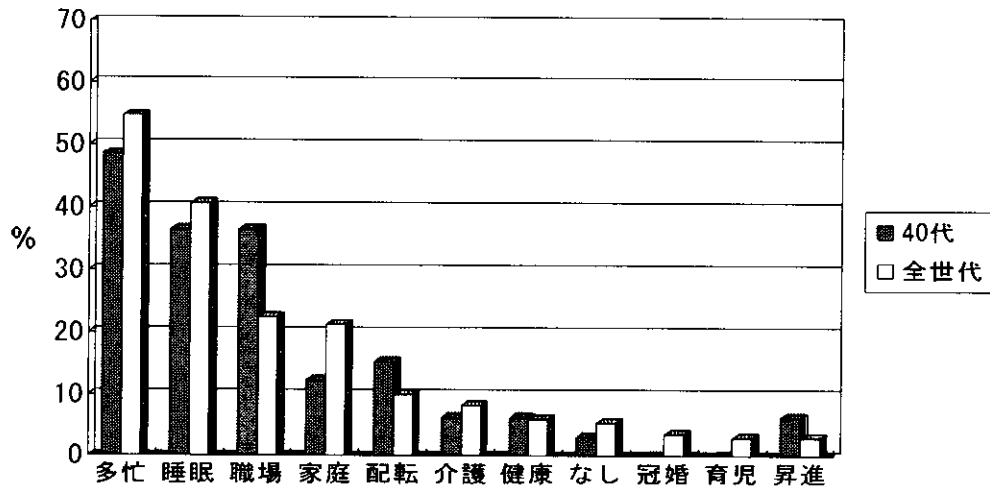


図 2-4

発症誘因の頻度%(n=52) 50歳代

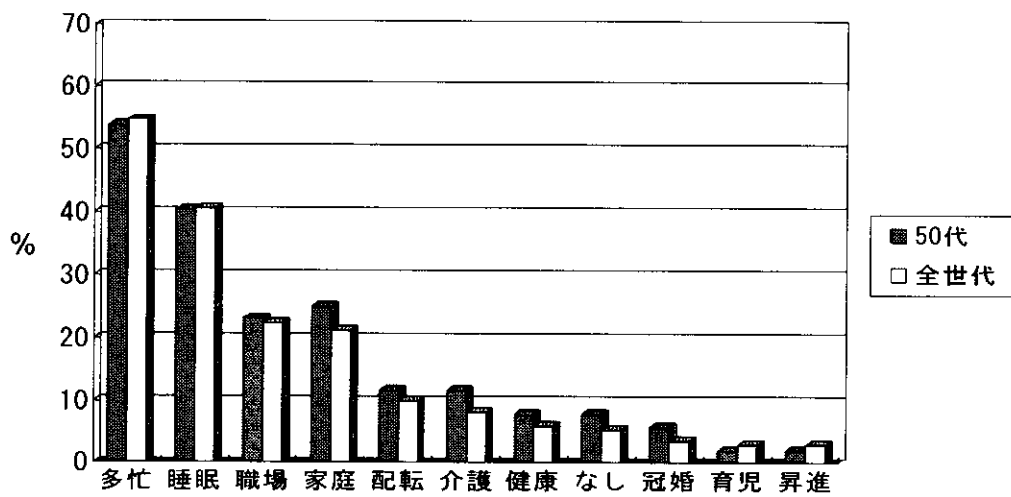


図 2-5

発症誘因の頻度%(n=27) 60-70歳代

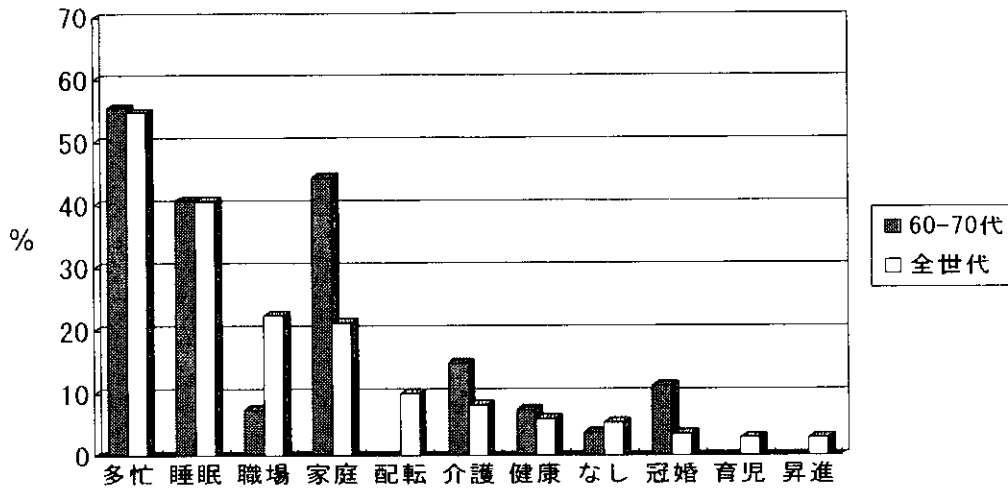


図 2-6

行動特性点数の比較 (2001年度報告)

一般集団n=3,410 内リンパ水腫n=127

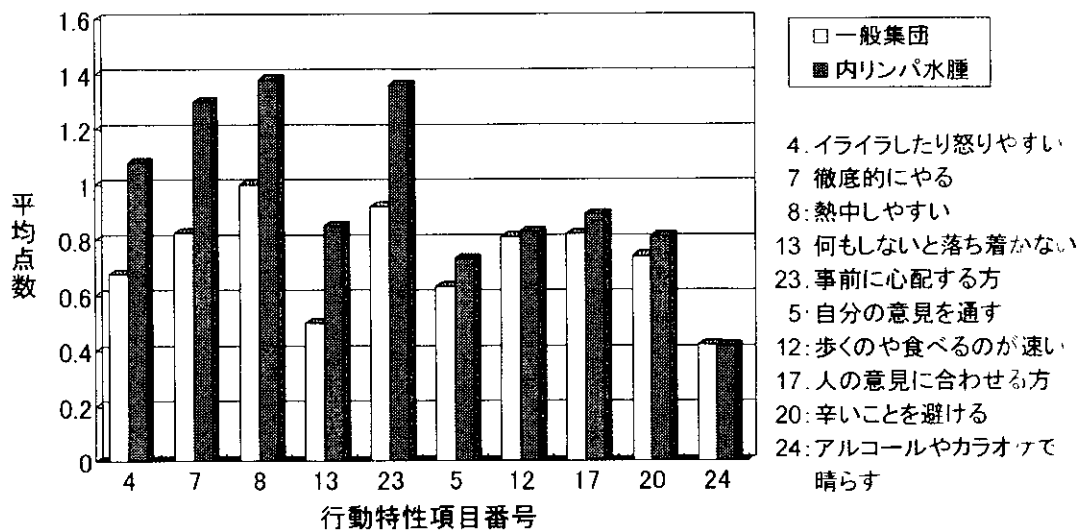


図 3

気分転換手段該当の割合(%) (2001年度報告)

一般集団n=3,410 内リンパ水腫n=127

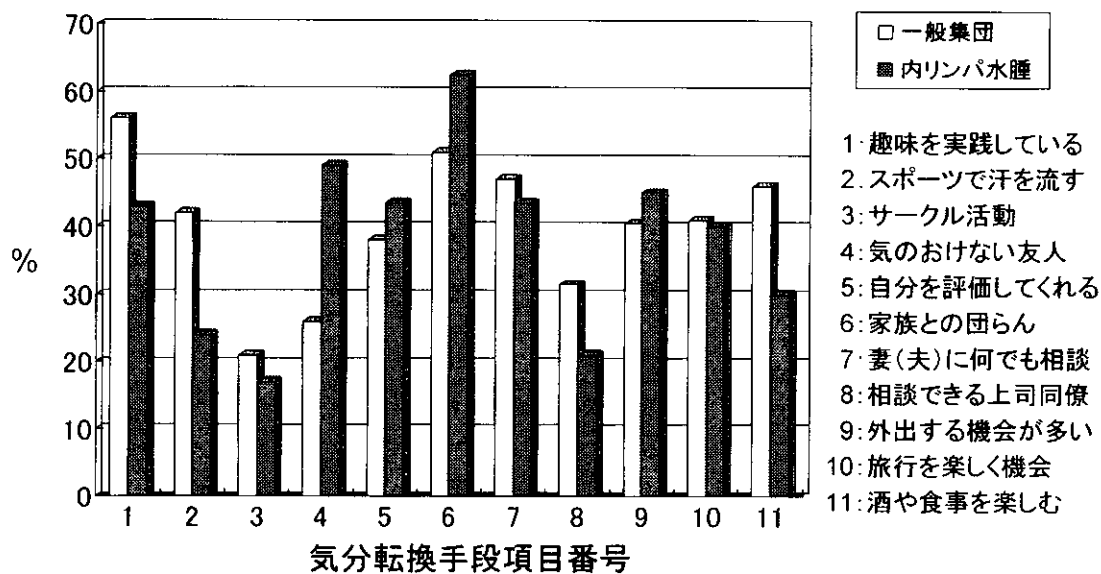


図 4

### 3. 内リンパ水腫治癒例の分析

小田桐恭子, 高橋正紘, 大貫純一, 一氏佳代子, 飯田政弘  
(東海大学耳鼻咽喉科)

#### [はじめに]

内リンパ水腫は早期には改善しやすいが再発も多く, 治癒と判定するには慎重にならざるを得ない。たとえ聴力が改善しても, しばしば種々の愁訴が訴えられる。治癒の判定が困難な理由は, 発症や増悪要因を明確に理解していないことと, 患者の苦痛を評価の対象に取り入れていないことによる。もし個々の患者の発症や増悪要因が特定でき, これを生活指導に取り入れて改善しその状態を持続できれば, 治癒と判定してよい筈である。

このような観点から, 我々は次の 3 項目を内リンパ水腫治癒の判定条件と考える。(1) 聴力が正常 ( $20\text{dB} \geq$  全音域), (2) 苦痛 (耳閉塞感, めまい, 耳鳴, 難聴, 日常生活の制限) がないかあっても軽微, (3) 再発がない。「再発がない」はどのくらいの期間を満たせばよいか, という疑問が生まれる。おそらく患者が発症増悪要因をはっきりと自覚し, ライフスタイルを改めることで改善すれば, 観察期間の長短は問題とならないであろう。今回は, これら該当例がどの程度実在するかを知るため, 自覚的苦痛度を尺度として, 病態進行度や罹病期間との関係を調べた。

#### [対象と方法]

複数施設で経過観察し, かつ郵送アンケートで有効回答の得られた内リンパ水腫 120 例である。内訳はメニエール病 90 名, 急性低音障害型感音難聴 30 名である。男性 35 名, 女性 85 名, 年齢は 15 歳から 77 歳 (平均 47.1 歳) であった。今回利用した項目は, 発症後経過 (3 ヶ月以内, 6 ヶ月以内, 1 年以内, 3 年以内, 10 年以内, 11 年以上), 耳の圧迫感 (無自覚, 時に苦痛, しばしば苦痛, 常に苦痛), めまい (前項と同様), 耳鳴 (前項と同様), 難聴 (前項と同様), めまいや揺らぎによる日常活動の制限 (ない, 時にある, しばしばある, 常にある) である。過去最重症と現在で分けて回答してもらった。

苦痛や制限がない, 時にある, しばしばある, 常にある, をそれぞれ 0 点, 1 点, 2 点, 3 点とし, 耳圧迫感, めまい, 耳鳴, 難聴, 日常活動制限の 5 項目の合計点を各例で求めた。患者のカテゴリーとして用いた病態進行度は, 1999 年の報告案を一部修正して, 一番最近受診した時の聴力に適用して用いた。病態進行度 0 点の聴力正常は  $20\text{dB} \geq$  全音域, 1 点の低音障害は中低音  $\geq 30\text{dB}$ , 2 点の高音障害は高音  $\geq 40\text{dB}$ , 3 点の全音域障害を全音域  $\geq 40\text{dB}$  とした。

#### [結果]

##### 1. 苦痛軽微例の割合 (図 1)

現在苦痛のまったくない例 (苦痛度合計が 0 点) は, 最新の聴力検査で聴力正常な群の 29.7%, 低音障害群の 22.7%, 高音障害群の 15.4%, 全音域障害群の 0% であった。同様に苦痛度の合計が 1 点, すなわちいずれかの症状が時に苦痛の例は, それぞれの群の 40.6%, 22.7%, 15.4%, 4.5% であった。苦痛度の合計が 2 点以下の例は, それぞれの群の 64.1%, 36.4%, 46.2%, 9.1% であった。これらより, 聴力正常は即, 苦痛ゼロを意味しないこと, 病態の進行と共に苦痛軽微例の割合が減少することが判明した。

##### 2. 苦痛合計点の平均 (図 2)

各病態進行度群別に, 過去最重症と現在の苦痛度の合計点の平均値を求めた。全音域障害を除き, 過去最重症は平均 7-8 点を示すが, 現在は 2 点から 4 点弱であった。これらに比べ, 全音域障害の苦痛度は突出して高値を示し, 過去最重症で 11 点以上, 現在でも平均 7-8 点であった。

### 3. 罹病期間別の苦痛軽微例の割合 (図 3)

罹病期間と共に苦痛軽微例の割合がどう変化するかを調べた。苦痛度ゼロは発症 3 ヶ月以内では 41.2%, 発症 6 ヶ月以内(合計)では 37.5%, 発症 1 年以内(合計)では 31.7%, 発症 1-3 年では 22.2%, 3-10 年では 17.5%, 10 年を超えると 0%であった。苦痛度合計が 2 点以下の割合は、発症 1 年以内では 70%以上に上るが、1 年を超えると 33.3%に急減した。これらより、罹病期間の延長と共に確実に苦痛軽微例が減少し、苦痛度の評価からも発症 1 年が治癒と進行の分岐点であることがわかる。

### 4. 症例 (表 1)

苦痛度が病態進行度と罹病期間とどう関わるかを見てきたが、具体例を提示したい。表 1 に症例番号、年齢と性、罹病期間、発症や増悪への自覚的なストレスの関わり、初診時と現在の病態進行度、苦痛度を示した。病態進行度の RoL1 は右耳が聴力正常(進行度 0 点)、左耳が低音障害(進行度 1 点)を示す。症例 179 以外はストレスの関わりを強く自覚している。初めの 4 症例は現在聴力正常であり、3 例は苦痛度合計が 1 点以下、1 例が 5 点である。一方、続く 7 例は罹病期間が長く、苦痛度も大きい症例である。

症例 79, 49, 54, 168 は初診時に聴力正常か低音障害であったが、現在は全音域障害を示す。症例 179, 56 は初診時に一側障害であったが、現在は両側に進行している。症例 112 は両側の低音障害であるが、罹病期間が長く苦痛も強い。これら罹病期間が長く進行した例では、苦痛度の合計も 6 点から 14 点と高い値を示している。しかし、初診時には症例 56 を除きすべて低音障害例であることに、注目すべきであろう。初めの 4 例と条件は等しい。

### [考察]

冒頭に述べた内リンパ水腫の治癒の条件、(1) 聴力が正常、(2) 苦痛がないかあっても軽微、(3) 再発がない、は内リンパ水腫患者にとって厳しい条件であることが判明した。現在聴力正常例であっても、苦痛ゼロの割合は 30%に過ぎず、苦痛度合計 2 点以下でも 64%に過ぎない。高音障害例では苦痛ゼロは 15%、苦痛度 2 点以下は 46%であった。聴力ばかりでなく自覚的な苦痛でも、罹病期間 1 年を超えると大変厳しくなることが判る。

苦痛度を指標として内リンパ水腫患者を調査した報告は、我々以外のものは見当たらない。従来は、メニエール病の予後や治療成績は、めまい発作頻度や聴力レベルで判定されてきた。医療者からの一方的な評価であり、患者の自覚や苦痛は考慮されていない。近年、これら一方的な評価は反省を強いられており、治療成績や長期成績にも患者サイドの評価を取り入れる必要がある。今回の調査からは、内リンパ水腫が長期化すると、いかに患者の苦痛が多方面にわたり強いかが理解できる。しばしば治療指標とされる、めまい発作や難聴の程度は、愁訴の一部に過ぎないと言える。

病態進行度が進むに従い、また罹病期間が長引くに従い、苦痛軽微例の割合は当然減少する。注目されるのは発症 3 ヶ月以内、6 ヶ月以内、1 年以内に分けても、苦痛 0 点の割合が 41%から 32%に減少している点である。この割合は 1 年を過ぎると 22%とさらに低下する。種々の指標から発症 1 年は治癒と進行の境界ではあるが、1 年以内でも早期ほど苦痛は改善しやすい、と言える。病態進行度よりも苦痛度はさらに鋭敏な指標なのであろう。

ほぼ治癒した症例と進行した症例を比べると、表 1 に一部示したように、明らかな違いを見つけることは難しい。多くの例が低音障害で受診し治療を受けるが、漫然とした投薬で進行しているのである。可逆病変は不可逆病変に、一側障害は両側障害に進行する。発症増悪要因を考慮し、適切な生活指導を行えば、かなりの症例が治癒した可能性がある。今後、この方面のエビデンスを積む必要がある。

### [結論]

1. 内リンパ水腫患者の治癒を (1) 聴力が正常、(2) 苦痛(耳閉塞感、めまい、耳鳴、難聴、日常生活の制限)がないかあっても軽微、(3) 再発がないと規定し、苦痛度を指標として、病態進行度と罹病期

間との関わりを調べた。

2. 聴力正常群でも苦痛ゼロは 30%，軽微（苦痛度合計 2 点以下）は 64%に過ぎなかった。これらの割合は病態が進行すると減少し，病態と密接に相関していた。
3. 苦痛度と罹病期間の関係では，発症 1 年以内においても早期ほど苦痛ゼロの割合が大きく，苦痛軽微（合計 2 点以下）の割合は発症 1 年を境に 70%から 33%に激減した。
4. 個々の症例の分析から，治癒例と進行例の間に，初診時の患者条件で明らかな違いを見出すことはできなかった。調査からは「発症増悪要因を考慮した生活指導により，発症早期に再発を予防する」ことが，治癒への最善の選択と思われた。

#### [参考文献]

- 1) 八木聡明ほか：メニエール病の重症度分類について。 *Equilibrium Res* 58:61-54,1999.
- 2) 高橋正紘ほか：内リンパ水腫患者の苦痛度。前庭機能異常に関する調査研究班平成 13 年度報告書。 68-72 頁，2002.
- 3) 高橋正紘ほか：内リンパ水腫患者の発症誘因。前庭機能異常に関する調査研究班平成 13 年度報告書。 73-76 頁，2002.



苦痛軽微例の割合（現在）

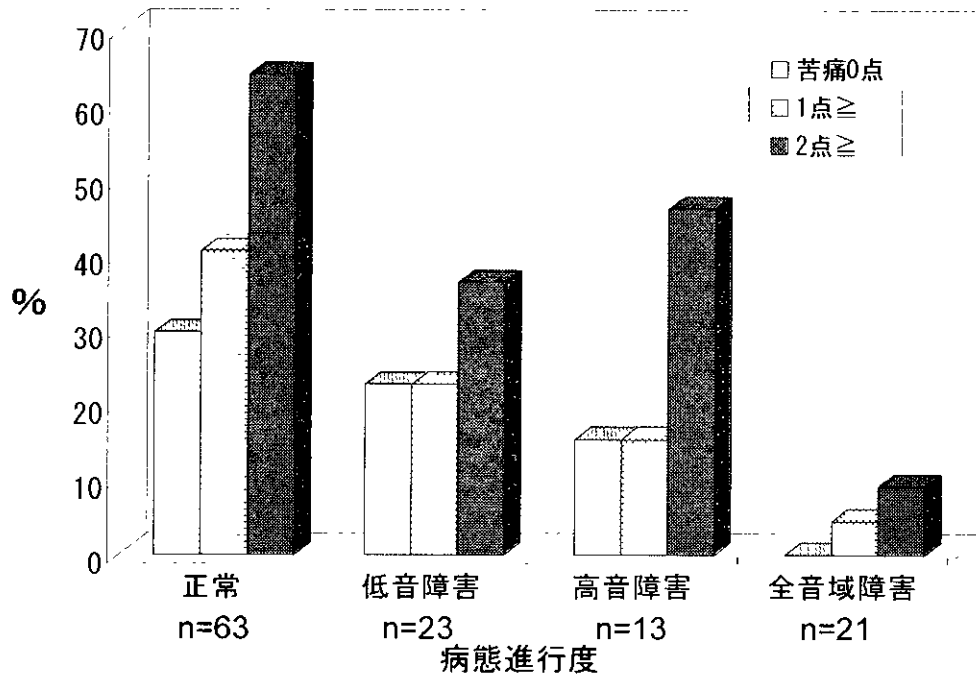


図1

苦痛度合計点の平均

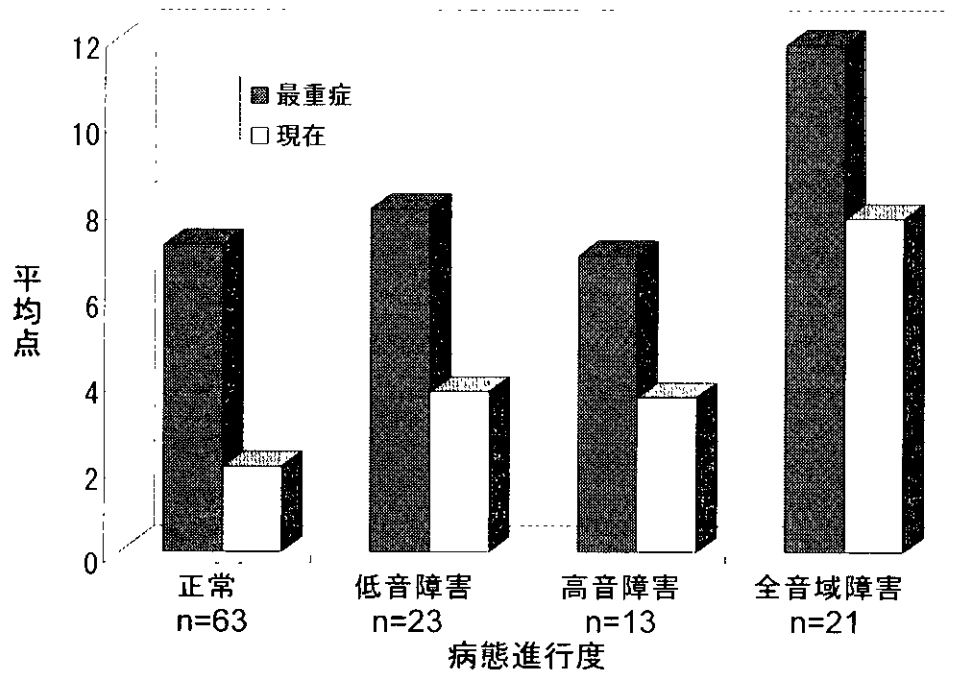


図2

### 罹病期間別の軽微例の割合

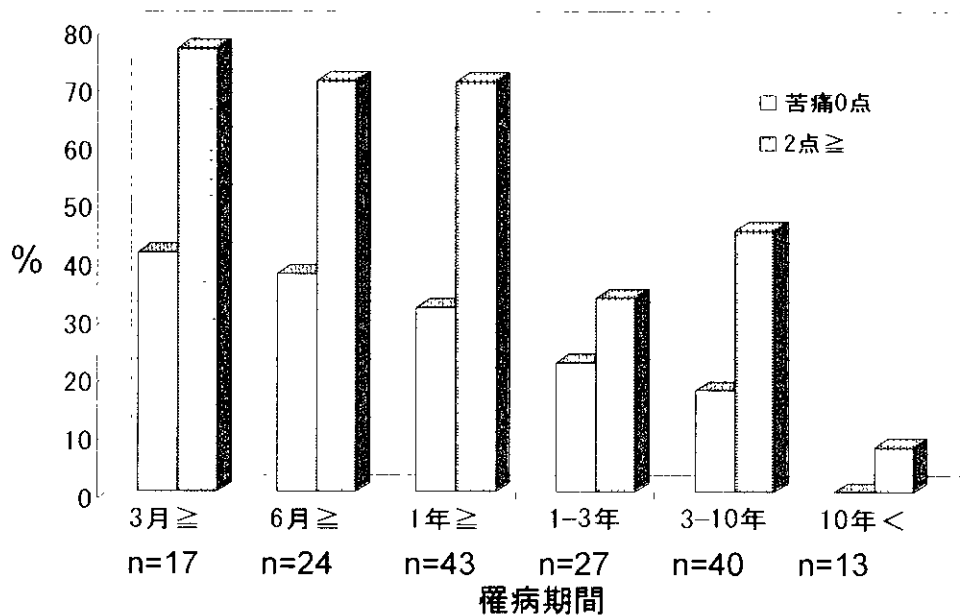


図 3

### 症例 罹病期間・ストレスの関わり・病態進行度・苦痛度

症例 番号	年齢性	罹病 期間	ストレス 関わり	病態進行度		苦 痛 度				
				初診	現在	圧迫	めまい	耳鳴	難聴	制限
127	24女	1年	+++	R1L1	R0L0	-	+	++	+	+
163	36女	2年	+++	R1L1	R0L0	-	-	-	-	-
96	36男	4年	++	R1L1	R0L0	-	-	-	+	-
145	38男	5年	+++	R1L0	R0L0	+	-	-	-	-
79	64女	5年	+++	R0L0	R0L3	+++	+++	+++	+++	+
49	57男	6年	+++	R0L1	R0L3	-	-	+	+	-
179	26女	7年	+	R0L1	R2L2	+++	+	+++	+++	++
112	57男	11年	+++	R1L1	R1L1	-	+	+++	+++	-
54	59女	11年	++	R1L0	R3L0	+	+	+	++	+
56	55男	15年	++	R3L0	R3L3	+++	+	+++	+++	+
168	60女	22年	+++	R0L1	R0L3	+++	++	+++	+++	+++

ストレスが発症・増悪と無関係(-)、少し関わる(+)、関わる(++)、深く関わる(+++)

表 1

## 4. 0G と 1G の空間識の比較

関根基樹, 高橋正紘 (東海大学耳鼻咽喉科)  
池田卓生, 綿貫浩一 (山口大学耳鼻咽喉科)

### 【はじめに】

三半規管が刺激されると, 地上の 1G 環境では回転移動感を覚え, 眼振と身体移動が起こる. この現象から前庭眼反射, 前庭脊髄反射の概念が生まれた. しかし重力のない  $\mu G$  環境ではどうであろうか. 筆者らは長らく「姿勢や動作は脳内に再現された外界空間 (空間識) を元に画一的に制御される」という仮説を主張してきた.  $\mu G$  環境では外界空間の方向付けが消失するため, 脳内の外界空間が姿勢や動作といかに関わるか, を調べる好都合な条件と言える. 航空機によるパラボラフライト実験で, 我々の仮説を実証する機会が得られたので, ここに報告する. 結果は明快かつ合理的であり, 従来の前庭脊髄反射の概念を覆すものであった.

### 【対象と方法】

被験者は 20-24 歳の健康な成人男子 5 名である. 限られたスペースで三半規管と耳石器を刺激する手段として, 回転中に頭部を傾斜するコリオリ刺激を用いた. 1G と  $\mu G$  を同一の刺激装置で実験するために, 航空機搭載可能な懸垂式回転装置を作製した. 本装置は小型電動モータで毎秒 50-150 度の速度で懸垂式椅子を回転できる, 単純構造の器械である. 搭載するガルフストリーム II の機内サイズに合わせ, また航空安全基準の厳しい基準を満たすよう設計された (図 1, 2). 実験計画は, 学内の倫理委員会ならびに宇宙フォーラムの倫理委員会の審査を受け, 許可された.

回転椅子に乗った被験者は, 腰部を安全ベルトで固定され, 眼球運動記録用の CCD ビデオカメラを装着された. 肩と頭部に頭部傾斜角度記録用のセンサを装着し, 前胸部には 3D 方向を同時に記録できる, 直線加速度センサを貼付した. 遮眼状態で原則として右方向に回転加速後, 回転速度が安定した状態で, 回転中に頭部を前屈するよう指示した. 地上では毎秒 0, 50, 100, 150 度の 4 条件で記録した. パラボラフライトでは  $\mu G$  に入る 10 秒前に (1.8G の状態) 毎秒 100 度の回転を開始し,  $\mu G$  開始 5 秒で頭部を傾斜させた.

同一被験者に 1 飛行 5 回, 計 2 回の飛行を実施し実験した. なお一部の被験者には左方向の回転でも実施した. 眼球運動をテープレコーダで, 頭部傾斜角度と身体移動の直線加速度をノート型パソコンで記録した. 眼球運動記録を, NIH の公開されている画像分析ソフトを用いて, 水平, 垂直, 回旋成分に分けて記録分析した. 身体移動については, 直線加速度記録を元に左右方向の移動距離を求めた. 今回は身体移動の結果を述べる.

### 【結果】

#### 1. 1G における身体移動

毎秒 100 度の右回転中に頭部を傾斜した時の, 左右の直線加速度記録から身体移動を求めた. 図 3 は毎秒 100 度における 5 名の被験者の 10 記録からの平均移動である. 頭部傾斜直後の 1 秒間に上体が明らかに左方向に移動している. 被験者の多くが奇妙な移動感覚を訴えた. 地上実験では毎秒 50, 100, 150 度の 3 つの速度で記録しているが, 回転速度が大きいほど最大直線加速度が, したがって直線移動距離も大きかった. 一方, 静止中に頭部を傾斜しても明らかな移動は見られなかった (図 4).

#### 2. $\mu G$ における身体移動

図 5, 6 は  $\mu G$  で毎秒 100 度の時の身体移動記録である. 右回転で右方向へ, 左回転で左方向へわずかな移動が見られた. 移動振幅は 1G に比べはるかに小さく, 1G における静止中の頭部傾斜にむしろ

近かった。しかし、波形が明らかに異なり、右回転と左回転では鏡像を示した。 $\mu G$ では移動感覚は希薄で、訴える場合は自分ではなく周囲が移動すると表現した。

### 3. $\mu G$ における酔い

1Gでは奇妙な移動感覚と共に強い不快症状が発現したが、 $\mu G$ では不快症状は弱かった。パラボラフライトでは $\mu G$ の前後に1.8Gがあるため、 $\mu G$ のコリオリ刺激単独の酔いを評価することは難しかった。図7に、2回のフライトで5回のコリオリ刺激後の不快症状を、Graybiel scoreの平均値で示した。1回目の飛行のパラボラ4回目にスコアが急減しているのは、酔いの強かった1被験者が抜けたための見かけ上の結果である。2回目の飛行では慣れの結果、不快の程度が減弱している。平均値を地上の同一刺激の値と比較すると、約40%の値であった。

### [考察]

すでにNASAのSpace LabやSpace Shuttleの体験記や実験から、 $\mu G$ では自分が移動しても自己の移動ではなく、周囲空間の移動として感じられる。前庭眼反射が弱くなり、地上帰還後少しの間持続し、起立や歩行が拙劣になる。パラボラフライト中のコリオリ刺激で不快症状が出にくいことも、すでに報告されている。これらの報告にも拘らず、宇宙酔いがなぜ起こるか、 $\mu G$ の空間識に1Gとどう異なるか、の問いは解決されていない。

筆者らは長らくコリオリ刺激を用いて、感覚統合の原理、空間識と動作や感覚との関係を実験的に研究してきた。この結果、視覚と前庭入力は単純にベクトル加算し、脳内に外界空間ベクトルを再現すること、外界座標に身体座標が画一的に変換され合目的な姿勢や動作が実現されること、を報告してきた。今回は、この実験手法を $\mu G$ に適用し、 $\mu G$ の空間識を調べた。眼球運動と身体移動を記録したが、今回は身体移動に注目した。

1Gでは脳内の外界ベクトルは三半規管からの慣性入力で移動させられ、眼球と身体がこれに忠実に反応する。しかし、 $\mu G$ ではまったく反応が異なっていた。眼球は1Gと類似した反応を示すが（本稿では省力した）、慣性入力に対する身体移動は記録されず、わずかな揺らぎが記録された。これは、無重力空間では頭部に加わる慣性力（コリオリの力）が上体をわずかに移動させたことで説明される。いわゆる前庭脊髄反射は $\mu G$ では起こらない、と言える。

今回の結果は次のように解釈できる。 $\mu G$ では脳内の外界座標のZ軸が欠けている。三半規管からの慣性入力は外界座標を移動させるが、座標方向が規定されないため、所属空間の移動の意味を持たない。この結果、外界座標から身体座標に変換されても、姿勢や動作の変化は起こらない。眼球も空間座標から画一的に変換されるが、空間内の頭部が介在する（ $g=h+e$ 、 $g, h, e$ は視線、頭部、眼球の運動ベクトルを表す）。 $\mu G$ では空間内の頭部移動には反応しないが、頭部内の眼球移動成分には反応するはずである。このため一見、1Gに類似したしかし弱い反応が起こる。

今回の $\mu G$ の結果から、耳石器の最重要な機能が脳内の外界座標のZ軸規定であること、が結論される。Z軸が規定されないと前庭器の刺激は身体移動を起こさないため、外界座標が身体制御の要であると結論できる。これより、いわゆる宇宙酔いの原因は明らかである。 $\mu G$ では外界空間を基準とする制御は成立せず、自分の頭部を中心とする自己中心型制御を強いられる。1Gの慣性入力から外界を再現した空間識から、 $\mu G$ の慣性入力の無効な空間識に適応が起こる。この間、動作は失調性となり、動作エラーが警報として不快症状を誘発する、これが宇宙酔いの実体であろう。

### [結論]

1. 航空機搭載用の懸垂式回転椅子を製作し、健康被験者にコリオリ刺激を与え、1Gと $\mu G$ における身体移動と眼球運動を記録した。結果より両環境の空間識の違いを考察した。
2. 1Gでは慣性入力に忠実な身体移動が記録されたが、 $\mu G$ では慣性入力に対する身体移動は記録されなかった。移動感覚や不快症状もはるかに弱かった。

3. 脳内の外界座標の Z 軸が規定されないと、慣性入力は身体移動を起こさない。これより、耳石器の最重要な機能は外界座標の規定にあると結論できる。
4.  $\mu G$  では外界依存型制御は成立せず、必然的に自己中心型制御に移行する。この間動作エラーが現れ、警報として不快症状が発現する、これが宇宙酔いの本体と考えられる。

**[参考文献]**

- 1) Watanuki K et al: Perception of surrounding space controls posture, gaze, and sensation during Coriolis stimulation. *Aviat Space Environ Med* 71:381-387,2000.
- 2) Hitouji K et al: Spatial reference and standing posture during high-speed Coriolis stimulation. *Aviat Space Environ Med* 73:865-871,2003.
- 3) Takahashi M: Vestibular function and the autonomic nervous system. *Handbook of clinical neurology* (Appenzeller O, ed) Elsevier, pp351-362,1999.

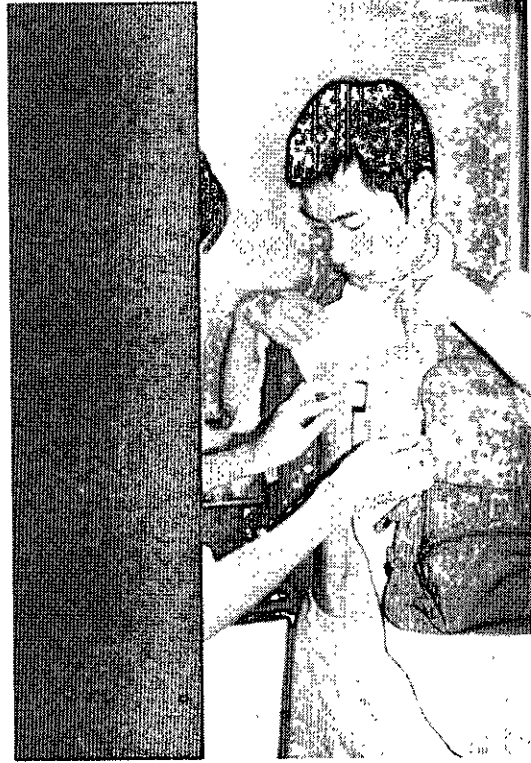


図1 身体移動記録用に前胸部に貼付した3D直線加速度センサ



実験に使用したDASの航空機と参加者一同

1G、100deg/s右回転、前屈 10 記録の平均

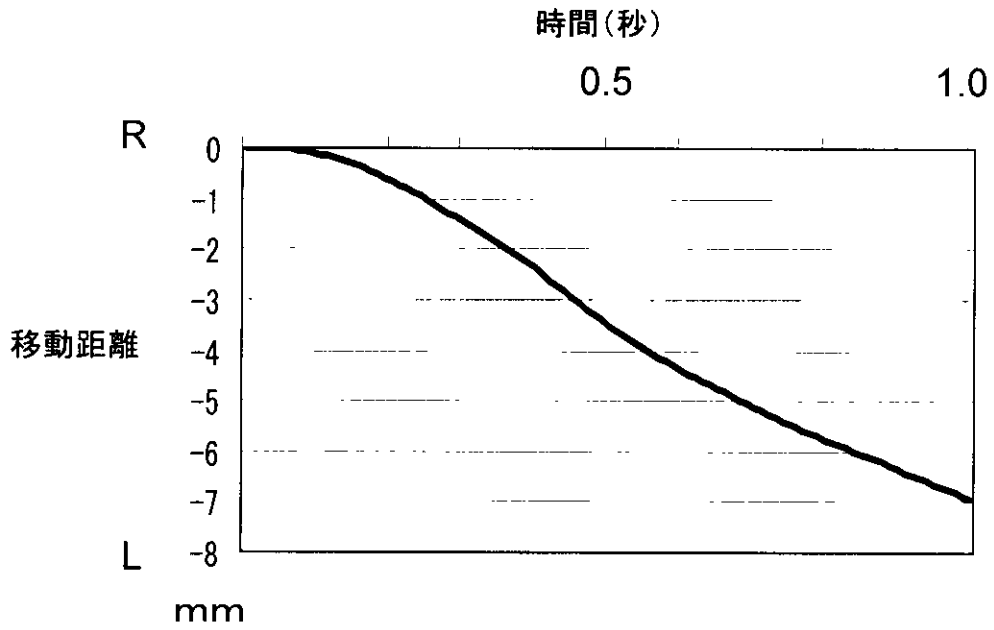


図 3

1G、静止中、前屈 10記録の平均

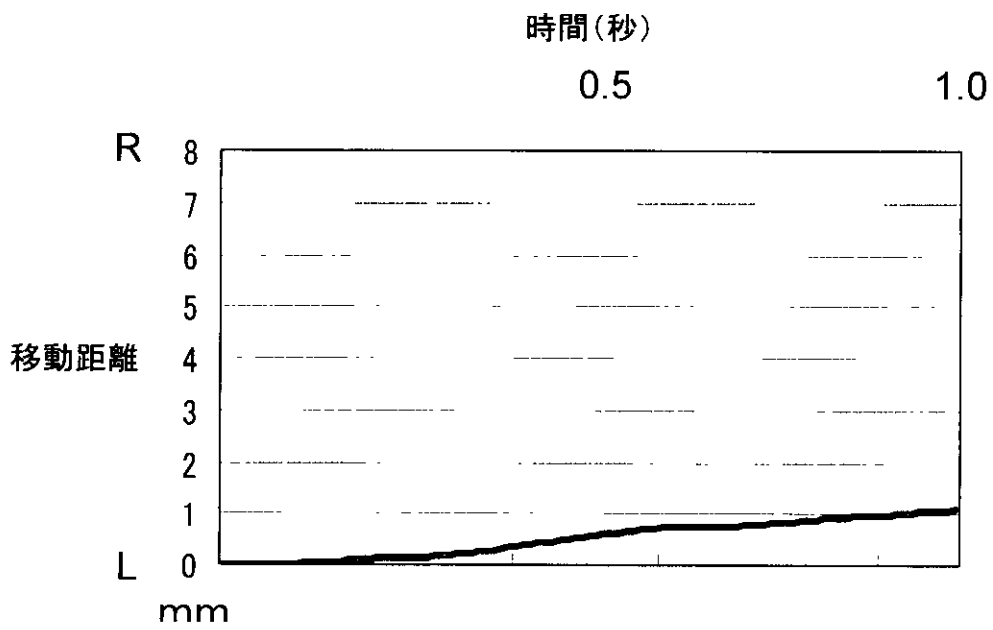


図 4

$\mu G$ 、100deg/s右回転、前屈 10 記録の平均

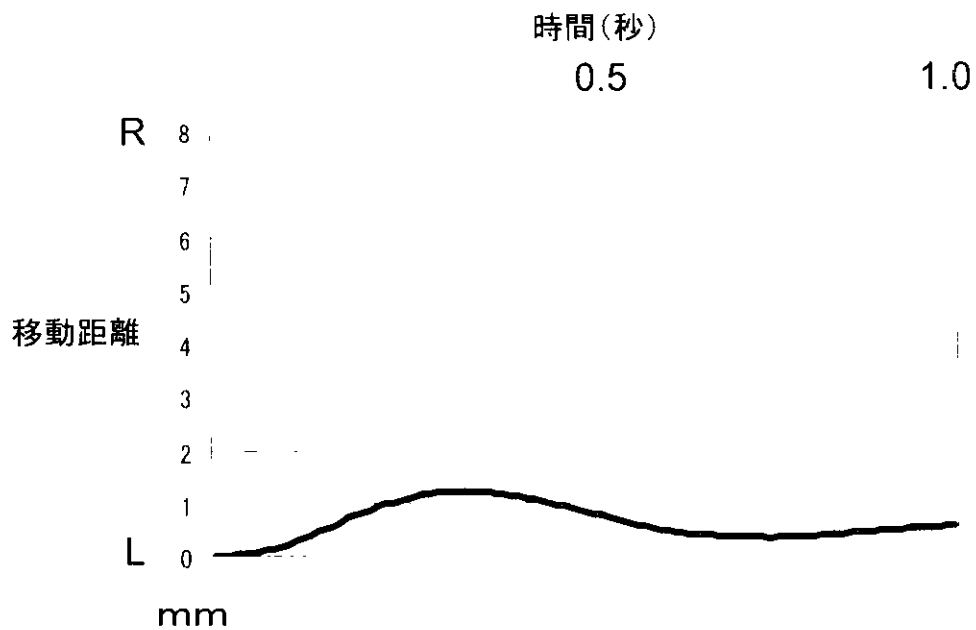


図 5

$\mu G$ 、100deg/s左回転、前屈 10 記録の平均

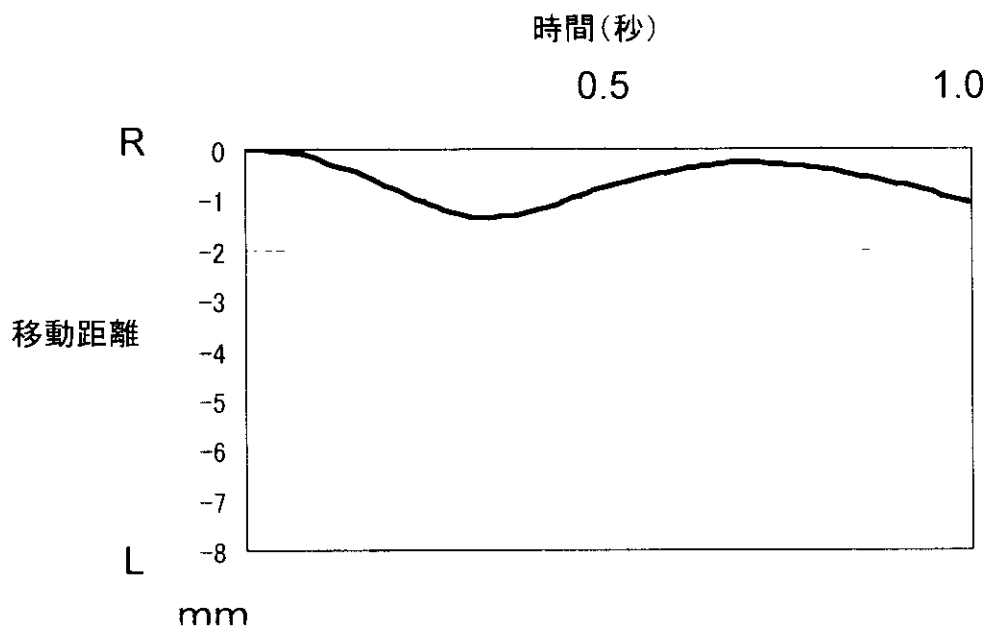


図 6



$\mu$  G下 Graybiel's Score 平均值

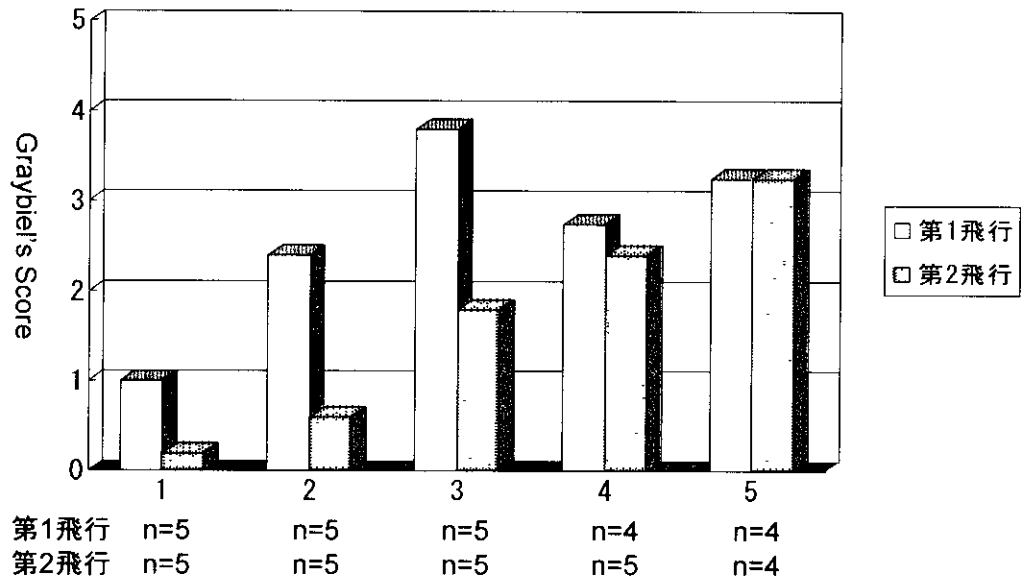


図 7

## 5. 外リンパ中の Cochlin-Tomoprotein

### (CTPの基礎と臨床応用)

池園哲郎, 新藤晋, 李麗淑, 齋藤明彦, 長谷川純, 八木聰明 (日本医大耳鼻咽喉科)  
大森彬 (三菱化学生命科学研究所), 渡辺淳 (日本医大第2生化)

#### [はじめに]

我々の研究目的は、メニエール病の早期診断・早期治療である。初期のメニエール病、すなわち病変がまだ可逆的である時期に、これを的確に診断し、治療を開始することがメニエール病治療のキーポイントである。初期メニエール病の重要な鑑別診断として外リンパ瘻があげられる。外リンパ瘻はその症状、病歴、検査所見が非常にメニエール病に似通っており、その鑑別診断が難しい症例があること、メニエール病と診断されている患者のなかには外リンパ瘻が含まれていること、等が以前から指摘されている(1,2)。さらに外リンパ瘻はその診断が難しく、外傷など明らかな誘因があるもの以外、診断に苦慮する事が多い。外リンパ瘻の診断基準では試験的鼓室開放術を行ない、外リンパ液の漏出を確認することで、診断を確定するとされている。しかし明らかな外リンパ漏出を認めない例があること、診断のために手術を受ける必要があることなどの問題も残されている。そこで、今までに外リンパ瘻の術前診断するための様々な技術が検討、報告されてきた(3-6)。しかし、広く臨床応用される技術は確立していない。的確に診断し早期に手術すれば、外リンパ瘻の難聴、めまい、平衡障害は改善する。内耳窓からの外リンパ漏出の視認以外に確定診断法が無い外リンパ瘻の生化学的診断法を確立したい。

#### [対象と方法]

##### <抗 Cochlin-N 末端抗体 (抗 LCCL 抗体) の作成>

Cochlin 全長蛋白 P63 アイソフォームの N 末端、LCCL 領域に特異的な抗体を作成した。LCCL 領域の抗原ポリペプチドの選択には、抗原性評価ソフトウェア「Epitope Adviser」(富士通九州システムエンジニアリング)を用いた。その解析の結果、抗 LCCL 抗体作製用の抗原ポリペプチドとして 15 アミノ酸よりなるポリペプチドを選択した。通常のポリクローナル抗体作成法に準じて、KLH (キーホール・リンペット・ヘモシアニン) を担体蛋白として用いて、マレイミド化により抗原ポリペプチドに結合させた。縮合剤には Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) を用いた。このように調製した免疫原を含む溶液を、アジュバントと混合し、ウサギの皮下に 2-3 週間毎に繰り返し免疫した。免疫後、採血を行って、ELISA 法により抗体価が十分に上昇していることを確認した。十分な抗体価の上昇が確認された動物から採血を行い、血清を分離、Protein A とアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。

##### <抗体の特異性の確認>

抗体の特異性は、ウシの内耳組織より調製した内耳蛋白質溶液(陽性コントロール)、を抗原としたウエスタンブロッティングにより確認した。

##### <検討対象となる試料>

ヒトの中耳に存在し得る外リンパ以外の体液として、CSF、血清、唾液を用いた。ヒト外リンパは、人工内耳の電極を挿入する際に漏出した外リンパを回収した。CSF は、髄膜炎及び脳炎の疑いで検査が行われ、結果が正常であった患者の CSF の一部を用いた。血清は、健常者の静脈血を用いた。唾液は健常者から採取したものをを用いた。試料提供者に対して研究目的の使用について十分な説明を行い、同意を得られた場合に用いた。

##### <ウエスタンブロッティング、一次、二次抗体反応、検出反応>

上記試料と抗体との反応性をウェスタンブロッティングで検査した。さらに 15%ポリアクリラマイドゲル (レディゲル J; 縦 73mm×幅 80mm×厚さ 1mm) に各試料溶液をアプライし、泳動を行った。泳動は 60 分, 27mA で行った。このゲルを, 100V で 90 分間, ニトロセルロース膜 (0.45 μm) に転写した。転写装置としてはウェット式プロッターを用いた。

転写後, ニトロセルロース膜をボンゾー染色液に 5 分間浸した後, MilliQ 水で脱色し, 各試料溶液中の蛋白質が染色された様子を確認した。確認後, 蒸留水中で 5 分間振動させながら脱色した。

次に, 化学発光法による検出及び解析を行った。転写後のニトロセルロース膜を, 非特異的の反応をブロックするために blocking buffer 中に 4°C で一晩浸した。これを washing buffer で 5 分間, 3 回洗浄し, 1 次抗体と反応させた。1 次抗体としては, 抗 LCCL 抗体を antibody dilution buffer で 1000 倍に希釈して, ニトロセルロース膜に添加した。反応は, 振動させながら 2 時間行った。2 次抗体としては, ヤギ由来 anti rabbit IgG antibody (HRP 標識) を, 前記 antibody dilution buffer で 1000 倍に希釈したものを用い, 振動させながら 1 時間反応させた。これを前記 wash buffer で 15 分間, 3 回洗浄した。その後, 化学発光キット (ECL plus) を用いて化学発光させ, 発生したシグナルをフィルム (Kodak Scientific Imaging Film) に感光させた。フィルムへの露光時間は 1 時間とした。

## 【結果】

陽性コントロールであるウシ内耳蛋白質溶液では, 約 63kDa の位置にバンドが見られ, アイソフォーム p63 を特異的に認識していることが確認された。

ヒト外リンパでは, 約 16kDa に明瞭な細目のバンドが検出され, これはその分子量から Cochlin-N 末端フラグメント蛋白と考えられた。ウシ外リンパではやや幅の広い 16kDa のバンドが検出された。

一方, ヒト CSF, ヒト血清, ヒト唾液には, この抗体で検出される蛋白は認められなかった。

## 【考案・結論】

我々は 1998 年より, 内耳に発現する遺伝子を蛋白レベルで解析するためウシ内耳を用いたプロテオーム解析を開始した。発現蛋白の種類, 量は各臓器に特異的なパターンを呈する事が知られている。我々は内耳蛋白の中でも特に Cochlin に着目しそのアイソフォーム, p63, p44, p40 を同定, 遺伝子発現の多様性を明らかにした (図 1) (7,8)。

これらの内耳組織アイソフォームパターンの解析の結果, 外リンパ中にも Cochlin のアイソフォームが存在することが予想されたため, 外リンパの解析を行った。その結果, 上記のように, 抗 Cochlin-N 末端抗体 (抗 LCCL 抗体) により検出される分子量 16kDa 蛋白をみいだした。この蛋白のサイズ, 抗体との反応性から, この蛋白は p63 アイソフォームの N 末端部分に相当する, Cochlin の新たなアイソフォームであることが推測された (図 1)。この蛋白は, 全長ヒト Cochlin の先端部分が切り取られた形 (Cochlin-N 末端フラグメント) をしていることから, この蛋白を, Cochlin-Tomoprotein (CTP) と名付けた。

今回我々は, CTP の発現パターンを解析した。COCH 遺伝子はもともと脳組織と内耳組織の subtraction library によって発見されたことから, 内耳特異性の高い遺伝子である。この COCH 遺伝子の蛋白産物の新たなアイソフォームの一つと考えられる CTP も内耳 (外リンパ) 特異的であることが推察された。我々の実験結果は, CTP が外リンパ特異的に発現していることが明らかにし, この推察を裏付けた。さらにこの結果は, CTP が外リンパ瘻診断に有用である可能性が高い事を意味している。今後, 我々は CTP 検出の感度と特異性を向上させる臨床検査を開発する予定である。

CTP の分子量は 16 kDa で, p63 と p44 の分子量の差に大体一致することから, CTP は, おそらく LCCL module そのものであることが推察される。LCCL module そのものが独立した蛋白として存在する例は他には知られておらず, 生物学的にも非常に興味深い分子である。さらに我々は今後, CTP の機能を探っていく計画を立てている。CTP の機能が判明すれば Cochlin の機能を推察する上でも非常

に役立つであろうと考えられる。また、CTP は非症候性優勢遺伝性難聴 DFNA9 の突然変異部位、全てを含んでいる可能性が高く、DFNA9 発症メカニズムを解明する上でも重要な蛋白である。

#### [参考文献]

- 1) 深谷卓, 野村恭也: 外リンパ瘻;メニエール病との鑑別診断.日本耳鼻咽喉科学会会報 93(12): 2009-2013, 1990.
- 2) Fitzgerald DC: Perilymphatic fistula and Meniere's disease. Clinical series and literature review. *Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.*, 110:430-436, 2001.
- 3) Bachmann G, Nekić M, Michel O: Traces of perilymph detected in epipharyngeal fluid: perilymphatic fistula as a cause of sudden hearing loss diagnosed with beta-trace protein (prostaglandin D synthase) immunoelectrophoresis. *J Laryngol Otol* 115(2):132-5, 2001
- 4) Thalmann I, Kohut RI, Ryu J, Comegys TH, Senarita M, Thalmann R: Protein profile of human perilymph: in search of markers for the diagnosis of perilymph fistula and other inner ear disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 111:273-80, 1994.
- 5) Rauch SD: Transferrin microheterogeneity in human perilymph. *Laryngoscope* 110(4):545-52, 2000.
- 6) 神崎仁, 井上康宏, 小川郁ら: GM1 を用いた外リンパ瘻診断の試み. 厚生労働省特定疾患対策研究事業・急性高度感音難聴に関する調査研究班・平成 11 年度報告書: 41-43, 2000.
- 7) Ikezono T, Omori A, Ichinose S et al: Identification of the protein product of the COCH gene - hereditary deafness gene - as the major component of inner ear protein. *Biochimica et Biophysica Acta (Molecular Basis of Disease)* 1535(3):258-265. 2001.
- 8) 八木聰明, 池園哲郎, 新藤晋, 李麗淑ら: 内耳プロテオーム解析による COCH 遺伝子発現の検討. 厚生労働省特定疾患研究対策事業 前庭機能異常に関する調査研究班 平成 12 年度報告書 pp42-44, 2000.