

厚生労働科学研究研究費補助金
感覚器障害研究事業

内耳プロテオーム解析を応用した外リンパ瘻の
新たな診断法の開発・治療指針の作成に関する研究

平成 16 年度 総括研究報告書

主任研究者 池 園 哲 郎

平成 17 (2005) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

内耳プロテオーム解析を応用したリンパ瘻の
新たな診断法の開発・治療指針の作成に関する研究

平成 16 年度 総括研究報告書

主任研究者 池 園 哲 郎

平成 17 (2005) 年 3 月

目 次

I. 総括・分担研究報告

内耳プロテオーム解析を応用した外リンパ瘻の
新たな診断法の開発・治療指針の作成に関する研究
主任研究者 池園哲郎

----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 6

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

総括・分担研究報告書

内耳プロテオーム解析を応用した

外リンパ瘻の新たな診断法の開発・治療指針の作成に関する研究

主任研究者 池園哲郎 日本医科大学講師

研究要旨

背景：難聴・平衡障害の原因疾患「外リンパ瘻」は迅速に手術治療を行うことで劇的な治療効果が得られる疾患である。本研究の目的は外リンパ瘻の新たな確定診断法を開発して、早期に確定診断し、治癒率の向上をもたらすことにある。背景：外リンパ瘻の生化学的診断マーカーが確立していないため、確定診断がなされず治癒率の低下をもたらしている。我々は内耳プロテオーム解析を行い、外リンパ瘻の生化学的確定診断マーカーCTPを発見し国内・国際特許出願した。

方法：確実にCTPを検出するためには、高い検出感度、特異度が求められる。数種類の抗CTPペプチド抗体を使用し、ウェスタンブロット法、サンドイッチ・エライザ法の基礎研究を行い、至適条件を設定する。従来の診断基準に則り、外リンパ瘻の疑い例に試験的鼓室開放手術を行い、術中サンプルを採取してCTPの存在を判定する。（倫理面の配慮）検体提供者に対しては試料採取前に研究の趣旨を説明し検体採取による不利益や危険性の無いことを説明、理解を得たうえで同意を得る。本学倫理委員会承認済みである。

研究成果・考察：A. サンドイッチ・エライザ法の基礎実験を行い、至適抗体組み合わせを検討した。B. ウェスタンブロットで下記のサンプルを解析した。(1) CTP検出特異性の検討 各種手術（人工内耳、外側半規管瘻孔、アブミ骨手術、聴神経腫瘍）で採取された外リンパを検査したところ全検体陽性であった。中耳に存在するその他の体液（血清、脳脊髄液、唾液、正常中耳洗浄液、中耳貯留液として滲出性中耳炎、慢性中耳炎）を検査したところ全検体陰性であった。CTPは外リンパ瘻診断マーカーとして最適な100%の特異性をもっている。(2) CTP検出感受性の検討 実際の臨床症例の中耳洗浄液を検討した。その結果、特発性外リンパ瘻では約50%、外傷性外リンパ瘻、側頭骨骨折では100%の症例から検出された。また基礎実験の結果、中耳洗浄液100ulあたり約0.1ul以上の外リンパ液の漏出のある場合に検出可能と試算された。検出感度のさらなる向上が望まれる。

結論（まとめ）：本検査は世界で初めて外リンパ瘻の生化学的確定診断を可能にするものであり、今後国内外でマルチセンタースタディーを行う予定である。

A. 研究目的

難聴・平衡障害の原因疾患「外リンパ瘻」は迅速に手術治療を行うことで劇的な治療効果が得られる疾患である。本研究の目的は外リンパ瘻の新たな確定診断法を開発して、早期に確定診断し、治癒率の向上をもたらすことにある。

B. 研究方法

背景：外リンパ瘻の生化学的診断マーカーが確立していないため、確定診断がなされず治癒率の低下をもたらしている。我々は内耳プロテオーム解析を行い、外リンパ瘻の生化学的確定診断マーカーCTPを発見し国内・国際特許出願した。

方法：確実にCTPを検出するためには、高い検出感度、特異度が求められる。数種類の抗CTPペプチド抗体を使用し、ウェスタンブロット法、サンドイッチ・エライザ法の基礎研究を行い、至適条件を設定する。従来診断基準に則り、外リンパ瘻の疑い例に試験的鼓室開放手術を行い、術中サンプルを採取してCTPの存在を判定する。

(倫理面の配慮) 検体提供者に対しては試料採取前に研究の趣旨を説明し検体採取による不利益や危険性の無いことを説明、理解を得たうえで同意を得る。本学倫理委員会承認済みである。

C. 研究成果

ウェスタンブロットによるCTP検出法を臨床現場で使用するための基礎的な検討を行った。

1. 検査のための標準品蛋白(標品)リコンビナントCTP蛋白を作製した。

2. 検査条件設定 (1)ウェスタンブロットの技法、転写膜の種類によって検出感度に与える影響を調べた結果、セミドライ法が最も効率がよく、シャープでバックグラウンドが低いシグナルを検出するためにはPVDF膜が最適であった。(2)高感度検出を可能にする為に、5種類の化学発光検出試薬の検討したところECL Advanceによる発光が最も検出感度が良かった。さらにこの発光をデジタル処理して定量解析するためLAS-3000を用いた。その結果、以前5時間を要していた露光時間を1時間に短縮することが出来た。

3. 検体検出限界設定：外リンパの段階希釈液を作製、中耳洗浄液100ulあたり約0.1ulの外リンパが含有されていれば検出できた。

4. 標準品検出下限：リコンビナントCTPの検出下限は $0.27\text{ng}/16\text{ul} = 16.74\text{ng/ml}$ であった。

5. 再現性と精度管理：標品の検出感度下限濃度(16.74ng/ml)及びその1/2濃度(8.37ng/ml)の点の2点を用いて再現性の確認を行った。その結果、再現性は良好であった。今後上記の2点を用いて検出感度が常に一定であることを確認することで、検査の精度管理が可能になった。

上記検査システムを用いて臨床サンプルを解析した。(1)CTP検出特異性の検討 各種手術で採取された外リンパを検査したところ全検体陽性であった。中耳に存在しうるその他の体液(血清、脳脊髄液、唾液、正常中耳洗浄液、中耳貯留液として滲出性中耳炎、慢性中耳炎)を検査したところ全検体陰性であった。CTPは外リンパ瘻診断マーカーとして最適な100%の特異性をもっている。(2)CTP検出感受性の検討実際の臨床

症例の中耳洗浄液を検討した。その結果、特発性外リンパ瘻では約 50%、外傷性外リンパ瘻、側頭骨骨折では 100%の症例から検出された。今後、検出感度のさらなる向上が望まれる。

サンドイッチ・エライザ法の基礎実験を行い、至適抗体組み合わせを検討した。その結果、今回作成した 4 種類の抗ペプチド抗体の組み合わせでは、標品希釈曲線の直線性が得られなかった。

D. 考察

1) 達成度について

今回の 1 年間の研究計画はほぼ達成された。まずウェスタンブロットを用いた CTP 検出検査の基礎実験を行った。検査のための標品を作製し、検査条件設定、再現性を確認し、検査精度管理法を確立した。検体検出限界、標準品検出下限を測定した。さらに検査の特異性を検討し、CTP の外リンパ特異性が 100%であることを証明した。この検査方法を用いて、実際の外リンパ瘻臨床症例を検査した。今後さらに検査感度のさらなる向上が求められる。また、検査の迅速化のためにサンドイッチ・エライザ法の基礎研究を行ったところ、さらに高品質な抗体が必要と判断し、現在モノクローナル抗体を作製中である。

2) 研究成果の学術的意義について

今まで不可能であった外リンパ瘻の確定診断が世界で初めて可能になり、その医学的意義は非常に高い。厚生省特定疾患急性高度難聴調査研究班が定めた外リンパ瘻診断基準に基づき診断された「特発性外リンパ瘻」症例から CTP が検出されたことで、従来その存在を疑問視する意見も

根強かった特発性外リンパ瘻症例の存在を初めて生化学的に確定診断した。また、以前は難聴の発症機序が特定できなかった「頭部外傷に伴う難聴症例」からも CTP が検出されたことで、今後は「外傷性外リンパ瘻」と診断して手術的に内耳窓閉鎖術を行う意義があることが示された。

また、いままで主観的な判断に頼っていた外リンパ瘻診断を客観的に診断できればマルチセンタースタディーが可能になり、新たな診断・治療指針作成が可能になる。治癒率の向上はきたるべき超高齢化社会におけるコミュニケーション障害の予防に貢献する。

E. 結論 (まとめ)

本検査は世界で初めて外リンパ瘻の生化学的確定診断を可能にするものであり、今後国内外でマルチセンタースタディーを行う予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・Pawankar R, Tomiyama S, Ikezono T, Nonaka M, Jinnouchi K, Yagi T. Interferon-gamma expression in the inner ear of rats following secondary immune reaction in the endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol Suppl.* 2004; (553):6-12.
- ・Baba S, Ikezono T, Pawankar R, Yagi T. Congenital malformations of the middle ear

with an intact external ear: a review of 38 cases. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2004;66(2):74-9.

・ Baba S, Fukumoto A, Aoyagi M, Koizumi Y, Ikezono T, Yagi T. A comparative study on the observation of spontaneous nystagmus with Frenzel glasses and an infrared CCD camera. *J Nippon Med Sch.* 2004;71(1):25-9.

・ Li L, Ikezono T, Watanabe A, Shindo S, Pawankar R, Yagi T. Expression of full-length Cochlin p63s is inner ear specific. *Auris Nasus Larynx* (in press)

・ 池園哲郎 内耳プロテオーム解析と COCH 遺伝子アイソフォーム—基礎研究の臨床応用をめざして— 耳喉頭頸 2004;76(12)838-849,

・ 池園哲郎 外リンパ瘻の診断 耳鼻咽喉科診療プラクティス 13 耳鼻咽喉科・頭頸部外科領域の外傷と異物 岸本誠司編 文光堂、東京 2004;p85-87

・ 高橋優二, 寺門万里子, 山野辺滋晴, 池園哲郎, 山本典生, 高橋晴雄. ブタ内耳抗原を用いた内耳特異的自己抗体の検索—内耳自己免疫疾患が疑われた 3 症例— 免疫アレルギー 2004;22(4):P25-29

2. 学会発表

・ Ikezono T, Shindo S, Lishu L, Omori A, Ichinose S, Watanabe A, Kobayashi T, Pawankar R, Yagi T. IDENTIFICATION OF A NOVEL COCHLIN ISOFORM IN THE PERILYMPH: INSIGHTS TO COCHLIN

FUNCTION AND THE PATHOGENESIS OF DFNA9 (HEREDITARY HEARING LOSS AND VESTIBULAR DISORDER) 23nd Barany Society Meeting (Paris, France, 2004.7.7-9)

・ Ikezono T, Shindo S, Li L, Hanprasertpong C, Pawankar R, Omori A*, Ichinose S, Watanabe A, Kobayashi T, Yagi T. PROTEOMIC ANALYSIS IDENTIFIED COCHLIN ISOFORMS IN THE INNER EAR AND PERILYMPH. *The Molecular Biology of Hearing and Deafness* (Bethesda MD, USA, 2004.9.30-10.3)

・ 池園哲郎, 李麗淑, 新藤晋, 小泉康雄, 馬場俊吉, 斎藤明彦, 小林俊光, 八木聡明 外リンパ特異的蛋白 Cochlin-tomoprotein(CTP)の外リンパろう診断における有用性 第 105 回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2004.5.13-15. 広島)

・ 池園哲郎 「教育講演」 めまいと分子生物学—基礎研究のトランスレーション— 第 62 回日本平衡神経科学会総会(2004.11.18-11.19, 群馬)

H. 知的財産権の出願状況

特許出願

国内出願

発明の名称：外リンパ瘻の検出方法

出願番号：特願 2003- 182860

出願日：平成 15 年 6 月 26 日

出願人：日本医科大学, 三菱化学株式会社

外国出願

国際出願番号：PCT/JP03/08123

出願日：2003 年 6 月 26 日

指定国：全指定

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	タイトル	書籍全体の編者	書籍	出版社名	出版地	出版年	ページ
池園哲郎	外リンパ瘻の診断	岸本誠司編	耳鼻咽喉科診療プラクティス 13 耳鼻咽喉科・頭頸部外科領域の外傷と異物	文光堂	東京	2004	p85-87

雑誌

発表者氏名	タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Pawankar R, Tomiyama S, Ikezono T, Nonaka M, Jinnouchi K, Yagi T.	Interferon-gamma expression in the inner ear of rats following secondary immune reaction in the endolymphatic sac.	Acta Otolaryngol Suppl	553	:6-12	2004
Baba S, Ikezono T, Pawankar R, Yagi T.	Congenital malformations of the middle ear with an intact external ear: a review of 38 cases	ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec	66(2)	:74-9	2004
Baba S, Fukumoto A, Aoyagi M, Koizumi Y, Ikezono T, Yagi T.	A comparative study on the observation of spontaneous nystagmus with Frenzel glasses and an infrared CCD camera	J Nippon Med Sch	71(1)	:25-9	2004
Li L, Ikezono T, Watanabe A, Shindo S, Pawankar R, Yagi T.	Expression of full-length Cochlin p63s is inner ear specific.	Auris Nasus Larynx (in press)	76(12)	:838-849	2004
池園哲郎	内耳プロテオーム解析と COCH 遺伝子アイソフォーム—基礎研究の臨床応用をめざして—	耳喉頭頸	76(12)	:838-849	2004
高橋優二, 寺門万里子, 山野辺滋晴, 池園哲郎, 山本典生, 高橋晴雄	ブタ内耳抗原を用いた内耳特異的自己抗体の検索—内耳自己免疫疾患が疑われた3症例—	免疫アレルギー	22(4)	:25-29	2004