

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17年度 総括研究報告書

主任研究者 池園 哲郎

平成18 (2006) 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

----- 7

### III. 研究成果の刊行物・別刷り

-----

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

総括研究報告書

## 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。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療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。

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、治療率の向上をもたらすことにある。

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。数種類のポリクローナル（polyAb）、およびモノクローナル抗CTPペプチド抗体（moAb）を使用し、ウェスタンブロット法、イミューノクロマト法の基礎研究を行い、至適条件を設定、**検査システムのクオリティーコントロールを確立する**。このシステムを用いて**臨床症例の検討**を行う。対象疾患は、1. 従来診断基準による、特発性外リンパ瘻疑い例、2. 耳かきによる外傷性鼓膜穿孔、3. 側頭骨骨折、4. 真珠腫性中耳炎内耳瘻孔、等の術中サンプルを採取してCTPの存在を判定する。

また、**CTPの基礎研究**も行う。研究協力者のハーバード大学ロバートソン医師と、the Massachusetts Eye and Ear Infirmary、オランダNijmegenの Radboud University Medical Centerらと、正常内耳ならびにDFNA9症例のCochlinの発現を蛋白科学的に検討する。

（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：

##### 1. 現在の検査システムのクオリティーコントロール

良好な再現性が得られCTP検出法による外リンパ瘻診断検査の精度管理が可能になった。

##### 2. 今年度作成したモノクローナル抗体の品質を検討

免疫原に組換えCTPを用いて作製したAnti-rCTP moAbの評価を行った。

その結果、本moAbは二次抗体との反応性が不良であること、従来から使用しているLCCL3抗体と比べてCTPとの反応特異性に大きな改善が認められなかったことから、再度新たな方法で新たに抗体を作製することにした。

### 3. LCCL3抗体を用いたウェスタンブロット法によるCTP検出法の検査結果

CTPの外リンパ発現特異性は100%であった。さらに臨床例の検討を加えた結果、実際の臨床例で実用化される見通しがついた。

4. DFNA9の発症メカニズムを検討した。DFNA9患者の内耳組織にはSpiral ligament、limbus等に特徴的な好酸性物質の沈着、それに伴う神経の変性が見られる。我々は、沈着している好酸性物質がCochlinそのものであることを初めて証明した。

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、国内外の臨床家、基礎研究者から多くの注目を集めている。今後、本研究成果を広め、国内外でマルチセンタースタディーを行う予定である。

#### 分担研究者

斉藤明彦 日本医科大学耳鼻咽喉科学  
（日本医科大学附属多摩永山病院）  
助手

渡邊 淳 日本医科大学第2生化学  
（日本医科大学附属病院）  
助手

#### 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。数種類のポリクローナル（polyAb）、およびモノクローナル抗CTPペプチド抗体（moAb）を使用し、ウェスタンブロット法、イミュノクロマト法の基礎研究を行い、至適条件を設定、検査システムのクオリティコントロールを確立する。

このシステムを用いて臨床症例の検討を行う。対象疾患は、1. 従来診断基準による、特発性外リンパ瘻疑い例、2. 耳かきによる外傷性鼓膜穿孔、3. 側頭骨骨折、4. 真珠腫性中耳炎内耳

瘻孔、等の術中サンプルを採取してCTPの存在を判定する。

また、CTPの基礎研究も行う。研究協力者のハーバード大学ロバートソン医師と、the Massachusetts Eye and Ear Infirmary、オランダNijmegenのRadboud University Medical Centerらと、正常内耳ならびにDFNA9症例のCochlinの発現を蛋白科学的に検討する。

(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。動物実験は、日本医科大学動物実験倫理委員会の審査を経て許可を受けて行う。動物実験にあたっては、倫理的な動物実験を遂行し、動物の愛護的扱いに留意する。

## C. 研究成果

### 1. 現在の検査システムのクオリティーコントロール

標品の検出感度下限濃度a及びその1/2濃度bの点の2点を毎回検査サンプルと共に泳動し、aが陽性、bが陰性となった検査を精度管理上問題なしと判断して採用した。この方法で良好な再現性が得られ検査の精度管理が可能になった。

### 2. 今年度作成したモノクローナル抗体の品質を検討

免疫原に組換えCTPを用いて作製したAnti-rCTP moAbの評価を行った。Anti-rCTP moAbと反応

性の良い二次抗体(抗マウスIgG抗体)、CTPとの反応性および非特異反応、二次抗体(抗マウスIgG抗体)使用を回避するためにHRP標識moAbを新たに作成しサンプルとの反応性の検討、の3点について実施した。

結論としては、本moAbは二次抗体との反応性が不良であること、従来から使用しているLCCL3抗体と比べてCTPとの反応特異性に大きな改善が認められなかったことから、再度新たな抗体を作製することにした。

### 3. LCCL3抗体を用いたウェスタンブロット法によるCTP検出法の検査結果

ヒト外リンパ35検体全例陽性、陰性コントロール(アブミ手術前の中耳洗浄、人工内耳手術前、滲出性中耳炎、慢性中耳炎、血液、脳脊髄液等)90検体全例陰性で、CTPの外リンパ発現特異性は100%であった。さらに臨床例の検討を加えた結果を、各症例ごとにCTP陽性数/検査件数、陽性率(感度)で示す。特発性外リンパ瘻(8/18、44%)、耳かきによる外傷性鼓膜穿孔(3/3、100%)、側頭骨骨折(7/9、78%)、真珠腫性中耳炎内耳瘻孔(3/5、60%)などであった。

4. DFNA9の発症メカニズムを検討した。DFNA9患者の内耳組織にはSpiral ligament、limbus等に特徴的な好酸性物質の沈着、それに伴う神経の変性が見られる。我々は、患者側頭骨標本を用いた免疫染色、プロテオーム解析により沈着している好酸性物質がCochlinそのものであることを証明した。

## 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。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。検体検出限界、標準品検出下限を測定し、これをサンプルと毎回泳動することにより本検査のクオリティーコントロール（検査精度管理）が可能になった。毎回しっかりと精度を管理した本検査を用いて、125検体のCTPの発現特異性を検討し、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、臨床の現場で用いる検査法（POCT）確率のためイミュノクロマト法の基礎研究を行っている。本年度作成したモノクローナル抗体は残念ながら期待された特異性、感受性に達しなかった。抗体の作成は、実際に行ってみて初めてその品質が評価される。現在、新たな抗体を新たな方法で作製すべく検討中である。

## 2) 研究成果の学術的意義について

我々は外リンパ瘻の診断技術の開発ならびに診断マーカーCTPの基礎研究を同時に進行させている。CTPのプリカーサーであるCochlinの基礎研究の結果、実際のDFNA9臨床例で見られる病理組織学的変化の原因を解明した。この結果は、今後難聴の診断・治療に関して新たな展望を開く重要なものである。

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拠があった特発性外リンパ瘻症例の存在を改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、その手術時期、手術適応の判断に大きく寄与する事ができる。

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、国内外の臨床家、基礎研究者から多くの注目を集めている。今後、本研究成果を広め、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

・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*. 2005; 32(3): 219-23.

・Ikezono T, Shindo S, Ishizaki M, Li L, Tomiyama S, Takumida M, Pawankar R, Watanabe A, Saito A, Yagi T.: Expression of cochlin in the vestibular organ of rats. *ORL J*

Otorhinolaryngol Relat Spec. 2005; 67(5): 252-8.

・Robertson NG, Cremers CW, Huygen PL, Ikezono T, Krastins B, Kremer H, Kuo SF, Liberman MC, Merchant SN, Miller CE, Nadol JB, Jr., Sarracino DA, Verhagen WI, Morton CC.: Cochlin immunostaining of inner ear pathologic deposits and proteomic analysis in DFNA9 deafness and vestibular dysfunction. Hum Mol Genet, 2006.

・池園哲郎: 外リンパろうの診断マーカーとしてのCochlin-Tomoprotein(CTP). 臨床検査 2005; 49(11): 1259-1263.

・池園哲郎: 「末梢前庭器から前庭神経核へ-最近の知見-」1. COCH遺伝子とめまい. Equilib Res 2005; 64 (1) : 1-11.

・池園哲郎: 聴力改善手術 7. 外リンパろう. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 2005; 77(5): 162-173.

・池園哲郎 メニエール病と外リンパ瘻 内耳窓閉鎖術で改善する慢性外リンパ瘻を見逃さないために めまい診療のコツと落とし穴 中山書店 2005; p30-31.

・池園哲郎 良性発作性頭位めまい症 診療アップデート 日経メディカル編 日経BP社 2005; p132-135.

## 2. 学会発表

・Ikezono T: Round table discussion "Treatment of Meniere's Disease"

The importance of differential diagnosis of Meniere's disease, especially versus PLF.

The 18th World Congress of the International

Federation of Otorhinolaryngological

Societies(IFOS) (2005.6.25-6.30, Rome, Italy)

・Ikezono T: Inner Ear Proteomics and its Application as a Novel diagnostic test for PLF -Impact on the treatment of inner ear diseases. Nippon Medical School-Soul National University Joint Meeting (2005.6.4, Tokyo, Japan)

・池園哲郎 新藤晋 李麗淑 相田瑞恵 杉崎一樹 後藤裕一 馬場俊吉 八木聡明: 頭部外傷と内耳障害. 第106回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2005.5.19-21. 大阪)

・池園 哲郎、新藤 晋、李 麗淑、松田 帆、小泉 康雄、齋藤 明彦、馬場 俊吉、八木 聡明. 本当にメニエール病か 慢性外リンパ瘻との鑑別診断. 第2回東京メニエール病カンファレンス (2005.6.11, 東京)

・池園哲郎, 新藤晋, 李麗淑, 関根久遠, 八木聡明: CTP検出法を臨床検査として確立するためのクオリティーコントロール. 第63回日本平衡神経科学会総会(2005.11.24-11.25, 東京)

・新藤晋, 池園哲郎, 李麗淑, 八木聡明: 発生過程におけるCochlin発現の検討-ウェスタンブロッティングを用いて-. 第63回日本平衡神経科学会総会(2005.11.24-11.25, 東京)

・加藤政利, 野原秀明, 緒方たつ子, 斉藤公一, 本間博, 新藤晋, 池園哲郎, 八木聡明: エアーカロリックテストの検討. 日本医科大学医学会 (2005. 東京)

## H. 知的財産権の出願状況

### 特許出願

#### 国内出願中

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

#### 外国出願中

国際出願番号：PCT/JP03/08123

出願日：2003年6月26日

指定国：全指定

#### 国内出願中

発明の名称：眼振誘発装置

出願番号：特願2005- 179515号

出願日：平成17年6月20日

出願人：日本医科大学



## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版年	ページ
池園哲郎	メニエール病と外リンパ瘻 内耳窓閉鎖術で改善する慢性外リンパ瘻を見逃さないために	高橋正紘	めまい診療のコツと落とし穴	中山書店	2005	p30-31
池園哲郎	良性発作性頭位めまい症	日経メディカル編	診療アップデート	日経BP社	2005	p132-135

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
池園哲郎	聴力改善手術 7.外リンパろう	耳鼻咽喉科・頭頸部外科	77(5)	p.162-173	2005
池園哲郎	外リンパろうの診断マーカーとしてのCochlin-Tomoprotein(CTP)	臨床検査	49(11)	p.1259-1263	2005
池園哲郎	末梢前庭器から前庭神経核へ-最近の知見- J1.COCH遺伝子とめまい	Equilib Res	64(1)	p.1-11	2005
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	32(3)	p.219-23	2005
Ikezono T, Shindo S, Ishizaki M, Li L, Tomiyama S, Takumida M, Pawankar R, Watanabe A, Saito A, Yagi T.	Expression of cochlin in the vestibular organ of rats	ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec	67(5)	p.252-8	2005
池園哲郎	救急疾患の診断と治療 外リンパ瘻	JOHNS	22(3)	p.345-350	2006
Robertson NG, Cremers CW, Huygen PL, Ikezono T, Krastins B, Kremer H, Kuo SF, Liberman MC, Merchant SN, Miller CE, Nadol JB, Jr., Sarracino DA, Verhagen WI, Morton CC.	Cochlin immunostaining of inner ear pathologic deposits and proteomic analysis in DFNA9 deafness and vestibular dysfunction.	Hum Mol Genet		In press	2006