

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

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 池園 哲郎

平成19 (2007) 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

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

----- 9

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

主任研究者 池園哲郎 日本医科大学講師

研究要旨 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。

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。

方法：確実にCTPを検出するためには、高い検出感度と特異性が求められる。数種類のポリクローナル（polyAb）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. 従来の診断基準による、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. 小児変動性難聴、5. 医原性等の術中サンプル、6. 真珠腫性中耳炎内耳瘻孔、7. 慢性遅発性外リンパ瘻を採取して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博士と、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（精度管理）

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. 今年度作成したポリクローナル抗体の品質を検討

新たに作成したAnti-CTP polyAbの評価を行った。このpolyAbは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するに十分な精度管理が可能となった。

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、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) を作成し、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ーコントロール (精度管理) 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. 従来の診断基準による、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、5. 小児変動性難聴、6. 医原性等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博士と、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 (0.27ng/ well) 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。この方法で得られた希釈外リンパの検出限界は平均0.022 μ l/well であった。

[2]今年度作成したポリクローナル抗体の品質を検討

本検査法の精度は、CTPを検出する抗体の善し悪しに左右される。今回、様々な工夫をこらして作成した抗ペプチドポリクローナル抗体は、現行LCCL3抗体と比べて特異性・感受性ともに大きく改善した。この抗体を用いてベッドサイド検査キット(immunochromato法)の開発に着手した。

[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42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)100検体以上全例陰性で、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以下に記す。

■外リンパ瘻の分類別の結果の検討

CTP検査は発症早期の方が陽性に出やすく、瘻孔が自然閉鎖すると陰性になる。また、本検査は特異性が高いのが特徴で、検査結果がCTP陽性の場合、間違いなく外リンパ瘻と言ええるが、結果が陰性だった場合下記の可能性が考えられる。

1. 漏出なし 外リンパ瘻ではない
2. 瘻孔が自然治癒した 外リンパ瘻
3. 間欠的漏出であった 外リンパ瘻
4. 漏出外リンパが微量で検出できず 外リンパ瘻

上記を念頭に置いた上で、各カテゴリーにおける検査結果のまとめと、症例の検討、治療方針の概略を記す。

臨床の現場で遭遇する外リンパ瘻の分類

1. 頭部外傷性
2. 中耳外傷性
3. 特発性(いわゆる鼻かみ型)
4. 小児変動性難聴
5. 医原性
6. 真珠腫性中耳炎内耳瘻孔
7. 慢性 遅発性外リンパ瘻

1. 頭部外傷性

検査結果と症例の検討

難聴の程度、頭部外傷の程度様々だが7/20人が陽性であった。骨折が全くないのに聾の2名はともにCTP陽性だった。外傷後の難聴が軽度でも陽性の症例もあり、頭部外傷では外リンパ瘻を発症しやすいと言える。

当院の人工内耳手術症例（両側高度難聴）の病歴を調べてみると、22例中2例が交通外傷（全身打撲、頭部打撲）後の失聴であった。受傷当時には担当医師から原因不明で治療法が無いと説明されていた。外傷性難聴の原因として外リンパ瘻があることは、北米では有名であるが本邦ではほとんど認知されていないと思われる。

頭部外傷性外リンパ瘻治療方針

頭部外傷後の難聴では外リンパ瘻を積極的に疑い治療すべきである。CTで異常が無いからと言って、外傷と関連が無い、治療法が無いと思っはいけない。内耳窓閉鎖手術の治療効果については今後の検討課題である。内耳に骨折があると、将来的に同部位が3rd Mobile Window (Minor LB)となる可能性があり、骨折部位の修復は積極的に行う意義があろう。

2. 鼓膜・中耳外傷 5/14人 陽性

検査結果と症例の検討

本邦では耳かきが日常習慣的に行われており、中耳（鼓膜、耳小骨）外傷の最も多い原因となっている。当然ながら、アブミ骨に耳かきがあたるアブミ外傷が外リンパ瘻をきたしやすい。しかしアブミ付近に鼓膜外傷があっても、外リンパ瘻をきたしているとは限らず、CTP検査で外リンパ漏出をきたしたのか、それとも単にアブミ骨に外力が加わっただけなのか判定できる。外リンパ漏出をきたさなくても、外力が加わっただけで難聴をきたすことは以前より鼓室形成術における合併症などで広く知られており、この場合の原因としては音響外傷、内耳への直接の影響が考えられる。

アブミ骨直達外傷に関して、臨床上役立つ新知見を列記する。

- 急性例；聴力が正常で、めまいを主訴とするCaseが存在する。また進行性に聴力が悪化しない症例でも、めまいの増悪が病態の進行を敏感に反映する。
- 慢性化する場合；漏出が続いていてもゆっくりとした漏出なら聾にならない。過去に報告されている通り、長期間放置すればいずれ聾になること

が予想される。

アブミ骨輪状靭帯損傷・陥入 治療方針

漏出の持続がある、すなわちCTP陽性かどうかが決め手となる。

●急性例 アブミ骨を整復すべきか否か、迷う症例がある。すなわち輪状靭帯周囲組織が修復されて自然治癒する可能性があるからである。受傷後、外リンパの漏出が持続していれば迷わず手術する。

●慢性例 外リンパ漏出が続くと、数年の経過で聾になることが予想される。聾になる前にこれを診断して手術を行う必要がある。外傷部位の結合組織が修復され、漏出が停止していれば保存的に治療することも可能である。ただし、ここが3rd Mobile Windowとなっていれば慢性めまいの原因となる。

3. 特発性外リンパ瘻 11/55人

検査結果と症例の検討

本邦の厚労省急性高度難聴研究班 診断基準に基づいて診断された症例である。

病歴上、誘因が一切無い真の特発性外リンパ瘻も存在した。この症例は、水様性耳鳴、聴力・眼振の変動から外リンパ瘻が疑われ内耳窓閉鎖術を

行った。突難(突発性難聴)と診断されている症例の中に、外リンパ瘻が含まれているのは間違いなことが、初めて科学的に証明されたと言える。

北米では特発性外リンパ瘻が疾患として認められておらず、未だに議論の対象となっている。本邦の厚労省急性高度難聴研究班が診断基準を作成した当初の目的は、突発性難聴の鑑別診断として外リンパ瘻を診断し治療しようということであったが、その目的を側面から支持する結果となった。

特発性外リンパ瘻の発症リスクが高いのは、外気・水圧変動と高度炎症である。具体的には、飛行機搭乗、スキューバダイビング、そして高度炎症を伴う好酸球性中耳炎であった。中耳炎罹患中、もしくは、飛行機を乗り継ぐ間に中耳炎(航空性中耳炎)を発症し、そのまま旅行を続けることで外リンパ瘻が発症した症例があった。また、両側好酸球性中耳炎による高度慢性中耳炎症がある症例で、鼻かみにより突然聾なった症例もあった。

特発性外リンパ瘻治療方針

今後早期治療と聴力改善の関係、特発性外リンパ瘻でCTP陽性と確定診断された症例の詳細な解析を行うことで、治療方針を検討する予定である。

4. 小児変動性難聴の中にも外リンパ瘻が存在した。中耳の微細な奇形に伴って外リンパ瘻が発症し、変動性・進行性難聴を呈する可能性があることは以前からピッツバーグ小児病院ブルーストーンが提唱していた。本研究で、この疾患が実際に存在することが証明された。

5. 医原性外リンパ瘻

耳鼻咽喉科診療で行われる耳管通気治療による医原性外リンパ瘻と思われる症例を3例経験した。病歴上、通気直後から発症した3症例で、高度難聴となり補聴器を装用した症例、すでに数年前に聾となっており人工内耳埋め込み術を行った症例、進行性の高度難聴となり内耳窓閉鎖手術でほぼ正常まで改善した症例である。病歴上通気治療が原因になっていると考えられる。

6. 真珠腫性中耳炎内耳瘻孔

中耳真珠腫合併症の内耳瘻孔は5-10%の頻度で存在する。瘻孔の深達度は本疾患の治療を行う上で術後合併症の発症を左右する非常に重要なポイントである。Milewskiは瘻孔の大きさと深度によってこれを3度に分類した。1度は骨迷路が破壊されても内耳膜が保たれている、2度は内耳膜が開

放され(a)外リンパ漏出なく膜迷路は正常、(b)外リンパ漏出があり膜迷路の障害がある、3度は膜迷路の破壊がある、である。実際の術中所見を観察してもその深達度を正確に判定することは難しく、1度なのか2度なのか、実際に漏出があるのかないのか、正確に判定することは困難である。なぜなら瘻孔局所を操作して正確な判定を行おうとすればそれがすなわち内耳膜損傷、内耳障害をもたらすからである。我々は、外リンパ特異的蛋白CTPにより外リンパ漏出の有無を判定し、内耳瘻孔の深達度診断の参考にすることができた。術中所見で瘻孔が大きく骨欠損が明らかでも、内耳膜が保たれており、外リンパ漏出は見られなかった症例がある一方で、骨欠損が小さくても内耳膜が欠損し、外リンパが漏出していた症例があった。

深達度の正確な判定は、真珠腫による内耳機能障害のメカニズムの解明、術後の機能障害の予測、予防、治療など様々な分野に重要な示唆を与えると思われた。

7. 慢性・遅発性症例が存在することが判明した。

①頭部外傷後、3ヶ月後に感音難聴が悪化し、CTPが陽性であった症例。

②小児期の内耳骨折が原因で、一側聾となり、24

歳でめまいが発症 遅発性内リンパ水腫と診断されていた。30歳で当科で骨折線を骨パテで埋め、内耳（外リンパ）瘻孔を塞ぐことでめまいが完治した。CTPは陰性であり、外リンパ漏出が停止した状態で3rd mobile window となっていたと考えられる。

③交通外傷後、低音障害型難聴とめまい発作を回復し、メニエール病と診断されていた症例は内耳窓閉鎖手術で完治した。CTPは陽性であった。

[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

ウエスタンブロット法で、臨床サンプルの検討を開始した。今年度は150検体を検査（国内15病院）さらに北米、イタリア、韓国より検査依頼があった。

当初計画ではH19年度より一般の病院からの

検体受付を開始する計画であったが、計画を前倒しして、H18年度すでに一般病院からの検体受けを開始した。現在その結果に基づいて治療指針を作製中である。

また、検査の迅速化、臨床の現場で用いる検査法（POCT）確立のためイミュノクロマト法の基礎研究を行っている。

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。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様々な症例からも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。

今まで原因のはっきりしなかった外傷性難聴、小児の変動性感音難聴、突発性難聴、メニエール

病などに外リンパ瘻が含まれている事を明らかにした。さらに、めまいのみで難聴が無い外リンパ瘻も存在し、今までの常識を覆す結果だった。さらに、耳管通気治療による医原性外リンパ瘻と思われる3症例（病歴上、通気直後から発症した症例であり2/3症例がCTP陽性）を経験した。これらの結果は、難聴診断治療のEBM確立に多大なる貢献をすると期待されている。

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。

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。

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

・Robertson NG, Cremers CW, Huygen PL, Ikezo o T, Krastins B, Kremer H, Kuo SF, Liberman M C, 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, 15(7): 1071-85, 2006.

・池園哲郎: Dejerine syndrome (延髄傍正中中部syndrome). 耳鼻咽喉科・頭頸部外科, 78(5): 90-91, 2006.

・池園哲郎: 耳鼻咽喉科救急医療マニュアル 救急疾患の診断と治療 外リンパ瘻. JOHNS, 22(3): 345-350, 2006.

・池園哲郎: COCH遺伝子とcochlin蛋白- 外リンパ瘻の診断における有用性 日本耳鼻咽喉科学会専門医通信第90号: 14-15, 2007

2. 学会発表

・ Ikezono T, Shindo S, Ishizaki M, Li L, Tomiyama S, Takumida M, Pawankar R, Watanabe, Saito A, Yagi T: Expression of cochlin in the vestibular organ of rats. The 11th Japan-Korea joint meeting of Otorhinolaryngology-Head and neck surgery (Busan, Korea), 2006. 4.

・ 池園哲郎: 臨床セミナー 外リンパ瘻. 第107回日本耳鼻咽喉科学会. 2006. 5.

・ 池園哲郎, 新藤 晋, 李 麗淑, 関根久遠, 齋藤明彦, 八木 聡明: 前庭におけるCochlin発現. 第65回めまい平衡医学会. 2006. 11.

・ 関根久遠, 池園哲郎, 李麗淑, 新藤 晋, 八木聡明: Cochlin mRNAの解析. 第65回めまい平衡医学会. 2006. 11.

・ 池園哲郎, 新藤晋, 相田瑞恵, 李麗淑, 関根久遠, 稲井俊太, 八木聡明: アブミ骨奇形に伴う小児の変動性難聴. 第16回日本耳科学会. 2006. 10.

・ 新藤晋, 池園哲郎, 稲井俊太, 八木聡明: 迷路気腫を伴った術後性外リンパ瘻の一例. 第16回日本耳科学会. 2006. 10.

・ 荒井真木, 水田邦博, 池園哲郎, 橋本泰幸, 岩崎聡, 渡邊高弘, 峯田周幸: CochlinとCollagen ty

pe IIのラット半規管での局在. 第16回日本耳科学会. 2006. 10.

・ 関根久遠, 池園哲郎, 松田 帆, 中澤裕子, 新藤 晋, 李 麗淑, 小泉康雄, 齋藤明彦, 馬場俊吉, 八木聡明: 内リンパ水腫疾患と診断されていた慢性外リンパ瘻の2症例. 第6回耳鳴りと難聴の研究会. 2006. 07.

H. 知的財産権の出願状況

特許出願

①発明の名称: 外リンパ瘻の検出方法

国内出願中

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

②発明の名称: 眼振誘発装置

国内出願中

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 |
|------|---------|---------------|-------|------|-----|-----|
| 特になし | | | | | | |
| | | | | | | |

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 |
|--|--|----------------|-------|------------|------|
| 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 | 15(7) | p. 1071-85 | 2006 |
| 池園哲郎 | Dejerine syndrome (延髄傍正中中部syndrome) | 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 | 78(5) | p. 90-91 | 2006 |
| 池園哲郎 | 耳鼻咽喉科救急医療マニュアル | JOHNS, 22(3) | 22(3) | p.345-350 | 2006 |
| 池園哲郎 | COCH遺伝子と cochlin蛋白- 外リンパ瘻の診断における有用性 | 日本耳鼻咽喉科学会専門医通信 | 90 | p14-15 | 2007 |