

200828020A

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

# サブタイプ分類に基づく小児難聴診断 療育システムの構築に関する研究

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 宇佐美 真一

平成 21 (2009) 年 4 月

# 目 次

I. 総括研究報告	
サブタイプ分類に基づく小児難聴診断療育システムの 構築に関する研究-----	1
宇佐美 真一	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	11
III. 研究成果の刊行物・別刷-----	13

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

## I. 総括研究報告書

サブタイプ分類に基づく小児難聴診断、療育システムの構築に関する研究

研究代表者 宇佐美 真一（信州大学医学部耳鼻咽喉科・教授）

分担研究者 工 穰（信州大学医学部耳鼻咽喉科・講師）

分担研究者 橋本繁成（信州大学附属病院先端予防医療センター・助教）

### 研究協力者

浅村賢二、鈴木伸嘉、茂木英明、我妻道生、鬼頭良輔、福岡久邦、鈴木宏明、呂旭原、塚田景大、菊池景子、古館佐起子、西尾信哉（信州大学医学部耳鼻咽喉科）、福田諭、武市紀人（北海道大学医学部耳鼻咽喉科）、新川秀一、南場淳司（弘前大学医学部耳鼻咽喉科）、佐藤宏昭、小林有美子（岩手医科大学医学部耳鼻咽喉科）、青柳優、渡辺知緒（山形大学医学部耳鼻咽喉科）、小林俊光、川瀬哲明（東北大学医学部耳鼻咽喉科）、古屋信彦、長井今日子（群馬大学医学部耳鼻咽喉科）、森山寛、小島博己、櫻井結華（東京慈恵会医科大学医学部耳鼻咽喉科）、池田稔、鳴原俊太郎、野村泰之（日本大学医学部耳鼻咽喉科）、岡本牧人、佐野肇（北里大学医学部耳鼻咽喉科）、八木聰明、池園哲郎（日本医科大学医学部耳鼻咽喉科）、阪上雅史、齋藤優子（兵庫医科大学医学部耳鼻咽喉科）、竹内万彦（三重大学医学部耳鼻咽喉科）、西崎和則、福島邦博（岡山大学医学部耳鼻咽喉科）、暁清文、羽藤直人（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科）、山中昇、藤原啓次（和歌山県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）、山下裕司、菅原一真（山口大学医学部耳鼻咽喉科）、小宗静男、賀数康弘（九州大学医学部耳鼻咽喉科）、中川尚志、菅村真由美（福岡大学医学部耳鼻咽喉科）、高橋晴雄（長崎大学医学部耳鼻咽喉科）、東野哲也、河野浩万（宮崎大学医学部耳鼻咽喉科）、黒野祐一、宮之原郁代（鹿児島大学医学部耳鼻咽喉科）、鈴木幹男、我那覇章（琉球大学医学部耳鼻咽喉科）、村井盛子（盛岡市民病院）、阿部聡子（あべ耳鼻咽喉科）、熊川孝三（虎ノ門病院）、富山俊一（日本医大多摩永山病院）、岩崎聡（浜松赤十字病院耳鼻咽喉科）、内藤泰（神戸市立医療センター中央病院）、神田幸彦（神田耳鼻咽喉科）、中井麻佐子（滋賀県立小児保健医療センター）

### 【研究要旨】

近年、新生児聴覚スクリーニングの普及により、早期に難聴が発見されるようになってきたが、難聴の原因に関しては多くの場合不明であり、予後の推測や随伴症状の

予測などは不可能である。また、乳児の聴力検査に関しては、技術的には確立しているものの測定の際の様々な条件の影響を受けるため、同様の測定を数回繰り返して行い、難聴を確定していくのが一般的である。

当研究室では全国 33 施設との共同研究により「All Japan」の研究体制で難聴の遺伝子解析を行っており、多数の難聴原因遺伝子変異を見出し報告してきた。その結果、原因遺伝子の種類あるいは変異部位の種類によって、臨床型（聴力・予後・随伴症状など）が異なることが明らかになってきた（Oguchi et al., 2005 ; Suzuki et al., 2007 ; Tsukada et al., submitted）。このように、原因となる遺伝子変異の種類により、臨床像が異なることより、従来の聴力検査に遺伝子診断を組み合わせることで、より正確に、より早期に聴力の程度を予測することが可能になることが期待される。また、遺伝子診断を組み合わせるによって、難聴をサブタイプに分類することが可能となり、サブタイプごとに適切なフォローアップや適切な介入法などのオーダーメイド医療の実現につながることを期待される。

本研究では、次の3つを主たる目標としている。(1) 先天性難聴患者を対象に、従来の聴覚検査に、遺伝子解析や先天サイトメガロウイルス感染の検査を組み合わせることで、難聴の原因を特定し、難聴の程度や進行性、随伴症状などの臨床情報、言語獲得の成績などの情報をデータベース化し、難聴のサブタイプ分類を行う。(2) サブタイプごとに、介入方法（補聴器、人工内耳）、装用年齢、その他の因子と言語獲得成績をデータベース化し、適切な介入、装用開始年齢、療育方法について検討する。(3) 遺伝子検査、先天性サイトメガロウイルス感染検査については、臨床応用した場合のメリットが報告されているが、日常臨床の現場では診断ツールとして用いられ

ていない。遺伝学的検査の分析的妥当性、臨床的妥当性、臨床的有用性、倫理的法的社会的課題について検討するとともに、問題点を整理し、臨床の現場で日常的に利用可能な検査手法として定着させる。

本研究の目的を達成するために、平成 20 年度は今までに集められた約 4000 人(1500 家系)の難聴患者とその家族に関して、遺伝子型と臨床像のとりまとめを行い、サブタイプ分類に必要な基盤情報の整備を行なうとともに、いくつかの原因遺伝子に関して統計学的解析を行った。その結果、6 歳前発症の pre-lingual 群と 6 歳以降発症の post-lingual 群に分けて比較した場合に、6 歳以前群では、*GJB2* 遺伝子変異の見つかる割合が有意に高く、また 235delC や 299-300del AT、176-191 del 16bp や Y136X などのフレームシフト変異が有意に多いのに対して、6 歳以降発症の post-lingual 群では *GJB2* 遺伝子変異による難聴患者の割合が低下するとともに、V37I 変異の頻度が有意に多いことが明らかとなった。また、その他の臨床症状との相関解析も行われ、めまいや耳鳴りを伴うケースは稀であること、内耳奇形を伴うケースも稀であることが明らかとなった。*GJB2* 遺伝子変異による難聴は、内耳のカリウムイオン循環の機能不全による難聴である可能性が高く、内耳奇形を伴うケースも少ないため、*GJB2* 遺伝子変異による難聴患者の場合には人工内耳による介入が有効であることが改めて示唆された。

また、6 歳以降に発症する難聴で頻度が高かったミトコンドリア A1555G 変異を有する 221 名の難聴患者に関して検討を行った結果、ミトコンドリア A1555G 変異を持つ

集団の4分法平均聴力は加齢とともに悪化するが、聴力正常の群と比較し、ミトコンドリア A1555G 変異を持つことにより、ある程度聴力が悪化するが、その後の加齢に伴う影響や、環境要因の影響の受けやすさに関しては聴力正常の群と同程度であることが明らかになった。また、アミノ配糖体抗生物質の投与を受けた群では年齢に関わらず一義的に聴力が悪いため、ミトコンドリア A1555G 変異を持つ患者に対するアミノ配糖体の投与が聴力悪化に及ぼすことが再確認された。また、本研究により得られた結果に関してとりまとめを行い、論文にて報告した (Ro et al., in press)。

また、新規難聴原因遺伝子の解析に先天サイトメガロウイルス感染による難聴の検査を組み合わせることで、診断率をより向上させることを目的に、新規の難聴原因遺伝子変異の候補として *CDH23* 遺伝子の解析を行った。当研究室で従来報告した日本人家系より見出された *CDH23* 遺伝子変異4種類 (Wagatsuma et al., 2007) の頻度調査を、従来の検査により遺伝子変異の認められなかった192人を対象に実施し、12人(6%)より *CDH23* 遺伝子変異を見出した。また先天性サイトメガロウイルス感染の検討に関しては、乾燥臍帯の収集を開始するとともに、検出技術の確立を行なった。また、パイロットスタディで4例/20例の割合で先天性感染を認めている。現在収集を継続するとともに、臨床情報を精査している。

また、全国33施設との多施設共同研究により、416名を対象に遺伝子検査および臨

床情報調査を行なった結果、先天性難聴の約35%から変異を見出すことが可能であることが明らかとなり、臨床的に有用であることが明らかとなった。本共同研究により10遺伝子47変異に関しては、遺伝子検査によりもたらされる情報が、臨床の現場で有用であること等が確認されたため、平成20年に厚生労働省に先進医療「先天性難聴の遺伝子診断」として申請し承認を受け、臨床応用を具体的に開始することが出来た。

## A. 研究目的

### (1) 原因遺伝子変異に基づく難聴のサブタイプ分類

先天性難聴は出生児1000人に1人の割合で認められる頻度の高い先天性障害のひとつである。従来、難聴の多くは原因不明であったが、近年の分子遺伝学的な解析手法の進歩により難聴の原因遺伝子変異が多数見出されるとともに、その原因遺伝子変異の種類と難聴の程度、聴力像、めまい等の随伴症状の有無などの臨床型の間に相関があることが明らかとなってきた (Oguchi et al., 2005; Suzuki et al., 2007; Tsukada et al., submitted)。のように、原因となる遺伝子変異の種類により、臨床像が異なることより、従来の聴力検査に遺伝子診断を組み合わせることで、より正確に、より早期に聴力の程度を予測することが可能になることが期待される。また、遺伝子診断を組み合わせるによって、難聴をサブタイプに分類することが可能となり、サブタイプごとに適切なフォローアップや適切な介入法などのオーダーメイド医療の実現につながることを期待される。

平成 20 年度は、今までに集められた約 4000 人(1500 家系)の難聴患者とその家族に関して、遺伝子型と臨床像のとりまとめを行い、サブタイプ分類に必要な基盤情報の整備を行なうとともに、いくつかの原因遺伝子に関して統計学的解析を行った。

### (2) 新規難聴原因遺伝子の探索および先天サイトメガロウイルス感染による難聴の調査

2007 年時点で日本人から見出されている難聴遺伝子 (10 遺伝子 47 変異) の網羅的な解析により、おおよそ 30% の難聴患者の原因遺伝子を特定可能であることが明らかとなっている (Abe et al., Genetic testing 11:334-341, 2007)。しかしながら、原因の特定できない遺伝子変異や、症例数が少なく臨床上有用な情報の得られていない遺伝子も多く存在しており、未だ約 70% は原因が不明のままである。本研究では新規難聴原因遺伝子の解析に先天サイトメガロウイルス感染による難聴の検査を組み合わせることで、診断率をより向上させることを目的に、新規の難聴原因遺伝子変異の候補として CDH23 の解析を行った。また、乾燥臍帯を用いた先天サイトメガロウイルス感染症の検査技術の確立と予備的な解析を実施した。

### (3) 先天性難聴の遺伝子診断の臨床応用

先天性難聴の遺伝子診断を、日常的に診療で利用可能なツールとして定着させるためには、遺伝学的検査の Analytic validity: 分析的妥当性、Clinical validity: 臨床的妥当性、Clinical utility: 臨床的有用性、Ethical, legal and

social issues: 倫理的法的社会的課題の 4 つ (ACCE) について検討するとともに、問題点を整理する必要がある。

本研究で利用しているインベーター法および直接シーケンス法は、既に他の疾患の診断にも利用されている技術であるため、分析的妥当性に関しては問題は無いことが明らかであるため、全国の 33 施設と多施設共同研究を行い、遺伝学的検査の臨床的妥当性 (感度、特異度、陽性的中率など)、臨床的有用性、倫理的法的社会的問題 (先天性難聴の遺伝学検査に関する倫理的な諸問題) を多施設共同研究にて実施し、結果を検討した。

## B. 研究方法

### (1) 原因遺伝子変異に基づく難聴のサブタイプ分類

平成 20 年度は、今までに集められた約 4000 人(1500 家系)の難聴患者とその家族に関して、遺伝子型と臨床像のとりまとめを行い、サブタイプ分類に必要な基盤情報の整備を行なった。また、GJB2 遺伝子およびミトコンドリア A1555G 変異に関して、約 4000 人(1500 家系)という大規模集団からの統計学的解析を行った。

### (2) 新規難聴原因遺伝子の探索および先天サイトメガロウイルスによる難聴の調査

新規遺伝子変異の探索に関しては、日本人家系より見出された CDH23 遺伝子変異 (4 種類: Wagatsuma et al., 2007) の頻度調査を、従来の検査により遺伝子変異の認められなかった 200 家系を対象に実施した。

先天性サイトメガロウイルス感染の検討に関しては、乾燥臍帯の収集を開始すると

ともに、検出技術の確立を行なった。またパイロットスタディとして 20 例の難聴患者の乾燥臍帯を用いて先天性サイトメガロウイルス感染の検討をおこなうとともに臨床情報の精査を行なった。

### (3) 先天性難聴の遺伝子診断の臨床応用

全国の 33 施設との多施設共同研究にて、難聴患者とその家族 416 名 (256 家系) を対象に遺伝子検査を行い、陽性的中率および臨床型との相関に関する検討、臨床的有用性に関する検討、倫理的法的社会的問題に関するアンケート調査を実施し結果を検討した。

#### (倫理面への配慮)

- (1) 遺伝子解析に際しては、研究協力者に対する十分な説明の後、書面で同意を得てから解析を行っている。
- (2) サンプルには ID 番号を付加して匿名化することで個人情報の漏洩を防止する手順を遵守して行っている。
- (3) 当該研究課題に関しては信州大学医学部遺伝子解析倫理委員会で審査を受け承認を得ている。

## C. 研究結果および考察

### (1) 原因遺伝子変異に基づく難聴のサブタイプ分類

平成 20 年度は、今までに集められた約 4000 人 (1500 家系) の難聴患者とその家族に関して、遺伝子型と臨床像のとりまとめを行い、サブタイプ分類に必要な基盤情報の整備を行なった。また、*GJB2* 遺伝子および

ミトコンドリア A1555G 変異に関して、約 4000 人 (1500 家系) という大規模集団からの統計学的解析を行った。

その結果、*GJB2* に関しては変異の頻度や各遺伝子型の平均聴力などの情報を取りまとめを行い、遺伝子型と臨床情報の相関解析を行った。

その結果、難聴患者を 6 歳前発症の pre-lingual 群と 6 歳以降発症の post-lingual 群に分けて比較した場合に、6 歳以前群では、*GJB2* 遺伝子変異の見つかる割合が有意に高く、また 235delC や 299-300del AT、176-191 del 16bp や Y136X などのフレームシフト変異が有意に多いのに対して、6 歳以降発症の post-lingual 群では *GJB2* 遺伝子変異による難聴患者の割合が低下するとともに、V37I 変異の頻度が有意に多いことが明らかとなった。また、V37I 遺伝子変異を保持する難聴患者の、2 から 5 年間のフォローの結果からは聴力の増悪は認められないことより、V37I 変異が進行性・遅発性の中等度難聴を呈すると考えるよりは、むしろ V37I 変異のような軽度～中等度難聴を起こす遺伝子変異では、3 歳児健診などの簡易な検査では検出できず、6 歳の入学健診の際に聴力検査を実施した際に難聴が指摘されるようなケースが多数存在する可能性が示唆された。

また、興味深いことに R143W 変異に関しては、ミスセンス変異であるにも関わらずフレームシフト変異である 235delC よりも聴力が悪い傾向があることが明らかとなった。このことは、235delC/235delC のホモ接合体群と 235delC/R143W のコンパウンドヘテロ群との比較だけでなく、V37I/V37I のホモ接合体群と V37I/235delC、

V37I/R143W のコンパウンドヘテロ群の比較からのどちらにおいても有意差があったため、143番目のR部位が *GJB2* 遺伝子の機能（特にコンパウンドヘテロの場合でも聴力が悪いことを考えると、複合体としての *GJB2* の機能）に重要であることが示唆される。また、その他の臨床症状との相関解析を行った結果、めまいや耳鳴りを伴うケースは稀であること、内耳奇形を伴うケースも稀であることが明らかとなった。*GJB2* 遺伝子変異による難聴では、内耳のカリウムイオン循環の機能不全による難聴である可能性が高く、内耳奇形を伴うケースも少ないため、*GJB2* 遺伝子変異による難聴患者の場合には人工内耳による介入が有効であることが改めて示唆された。現在得られた結果を取りまとめて投稿している (Tsukada et al., submitted)

また、6歳以降発症の難聴患者に多く認められるミトコンドリア A1555G 変異を有する221名に関して解析を行った。その結果ミトコンドリア A1555G 変異を持つ集団の4分法平均聴力は加齢とともに悪化するが、聴力正常の群と比較して、どの年代においても約20dB悪いことが明らかとなった。このことより、ミトコンドリア A1555G 変異+核遺伝子変異などの先天的要因により難聴となる可能性が示唆された。特に、どの年代においても平均聴力の差が20dB程度であり変化しないことより、ミトコンドリア A1555G 変異を持つことにより、ある程度聴力が悪化するが、その後の加齢に伴う影響や、環境要因の影響の受けやすさに関しては聴力正常の群と同程度である可能性が高いことが示唆された。また、アミノ配糖体抗生物質の投与を受けた群では年

齢に関わらず一義的に聴力が悪いため、ミトコンドリア A1555G 変異を持つ患者に対するアミノ配糖体の投与が聴力悪化に及ぼす影響が再確認された。また、ヘテロプラスミー率と聴力の相関についても検討を行なったが、有意な相関は認められなかった。また、本研究により得られた結果に関してとりまとめを行い、論文にて報告した (Ro et al., in press)。

## (2) 新規難聴原因遺伝子の探索および先天サイトメガロウイルスによる難聴の調査

新規遺伝子変異の探索に関しては、日本人家系より見出された *CDH23* 遺伝子変異のうち、難聴の原因遺伝子変異であることが明らかとなっている4種類：P240L、R301Q、Q1716P、R2029W (Wagatsuma et al., 2007) に関して頻度調査を実施した。対象としては、従来の検査により遺伝子変異の認められなかった先天性難聴患者192名に実施した。

その結果、192名中12名(6%)に *CDH23* 遺伝子変異を認めた。10名に認められた原因遺伝子変異の遺伝子型は、P240L のホモ接合体が3名、P240L と R301Q のコンパウンドヘテロ例が2名、P240L と R2029W のコンパウンドヘテロ例が2名、P240L のヘテロ接合体が3名、R2029W のヘテロ接合体が2名であった遺伝子変異の見つかる頻度的には P240L、R2029W の頻度が多く、R301Q はやや少ないことが明らかとなった。これは、*CDH23* 遺伝子変異の founder effect (創始者効果) によるものであることが示唆される。また、日本人難聴患者から比較的高頻度で見つかる P240L、R2029W 変異はヨーロッ



バ・アメリカ人からは見出されないことより日本人の民族的な背景を反映したものであることが示唆された。また、当研究室から報告されている *CDH23* 遺伝子変異解析の結果 (Wagatsuma et al., 2007, Usami et al., 2008) 難聴の原因であることがまだ不確実な遺伝子変異が、今回の 4 変異の他に 13 種類報告されているため、今回見出された P240L のヘテロ接合体が 3 名、R2029W のヘテロ接合体が 2 名に関しては、他の変異とのコンパウンドヘテロ例となっている可能性が考えられるため、直接シーケンス法により、*CDH23* 遺伝子の全エクソンを解析する必要がある。また、今回解析した難聴患者群の中には Q1716P 変異を持つ患者は認められなかった。したがって、Q1716P は遺伝子変異の頻度は低く、特定の家系特有の稀な遺伝子変異の可能性が考えられる。

また、先天性サイトメガロウイルス感染の検討に関しては、乾燥臍帯の収集を開始するとともに、乾燥臍帯からの DNA 抽出およびサイトメガロウイルスの検出技術の確立を行なった。パイロットスタディとして 20 例の難聴患者の乾燥臍帯を用いて先天性サイトメガロウイルス感染の検討を行い、20 例中 4 例 (20%) の割合で先天性感染を認めている。現在収集を継続するとともに、臨床情報を精査している。

(3) 先天性難聴の遺伝子診断の臨床応用  
全国 33 施設との協働研究で、インベーター法を用いた先天性難聴の遺伝子診断の手法に関して陽性的中率および臨床型との相

関に関する検討、臨床的有用性に関する検討、倫理的法的社会的問題に関するアンケート調査を実施し結果を検討した。

平成 20 年度は難聴患者とその家族 416 名 (256 家系) を対象に遺伝子検査を行い、インベーター法を用い 10 遺伝子 47 変異の有無について 1 次スクリーニングを実施、さらに必要に応じ直接シーケンス法を用いた 2 次スクリーニングを行い変異確認、新規変異検索を行った。検査結果は遺伝カウンセラーとともに返し、患者に対して遺伝や遺伝子検査に関するアンケート調査を実施した。

その結果、難聴患者 256 名のうち 89 名 (34.7%) に変異が見出され、多施設共同研究として実施した場合にも、単一施設で実施した場合の率 (30%, Abe et al., 2007) と同程度の検出率が得られたことから、インベーター法によるスクリーニングが臨床検査として有用であることが確認された。また、今回の解析症例で発症年齢が 6 歳以下の先天性難聴患者に限ると検出率は 44.3% (62/140) に上昇した。さらに、先天性かつ高度難聴に限ると検出率は 54.9% (39/71) とさらに高まり原因検索のための検査としての有用性が確認された。また内耳奇形を伴う難聴に限ると 48.4% (15/31)、さらに前庭水管拡大症例に限ると 76.2% (16/21) と検出率が高まり、耳鼻咽喉科医が聴覚検査や画像検査と組み合わせて行うことにより診断率が高まることが明らかになった。また、共同研究施設を中心に「難聴遺伝子の研究会」を実施し、遺伝子検査の有用性・問題点に関する検討を行なった。

また、各施設の遺伝子診療部門 (臨床遺

伝専門医)と連携し難聴の遺伝カウンセリングとともに結果を返すことを原則とした。遺伝カウンセリングの後、患者に対してアンケート調査を行ったが、遺伝子診断を受けて良かったという感想が 95.4%であり、具体的な感想として「原因がはっきりとして、気持ちがすっきりとした」「難聴を前向きにとらえられるようになった」「将来治療法が見つかる事に期待しています」など肯定的な意見が多かった。また原因を特定できなかった症例についても「難聴、遺伝について詳しく話を聞いて良かった」という回答が多かった。

このように、本遺伝学的検査の Analytic validity: 分析的妥当性、Clinical validity: 臨床的妥当性、Clinical utility: 臨床的有用性、Ethical, legal and social issues: 倫理的法的社会的課題の4つ(ACCE)について十分確認の取れた10遺伝子47変異に関しては、平成20年に厚生労働省に先進医療「先天性難聴の遺伝子診断」として申請し承認を受け、具体的に臨床応用を開始することが出来た。

#### D. 結論

本研究では4000人を超える大規模解析を行い、GJB2変異、ミトコンドリアA1555G変異による難聴の臨床像を改めて解析することにより、いくつかの新知見が得られた。これらの知見は今後、サブタイプ分類に応じた適切な介入法の検討を行う際に有用な情報となるであろう。また、先天性難聴の遺伝子診断の診断率を向上させるためにCDH23遺伝子および先天サイトメガロウイ

ルス感染の頻度調査をパイロットスタディとして実施した。いままでの先天性難聴の遺伝子スクリーニング検査(10遺伝子47変異)の解析にCDH23遺伝子および先天性サイトメガロウイルス検査を組み合わせることで、診断率がさらに10~15%程度向上することが示唆された。また、全国33施設との共同研究により、416名を対象に遺伝子検査および臨床情報調査を行なった結果、先天性難聴の約35%から変異を見出すことが可能であることが明らかとなり、臨床的に有用であることが明らかとなった。本共同研究により10遺伝子47変異に関しては、遺伝子検査によりもたらされる情報が、臨床の現場で有用であること等が確認されたため、平成20年に厚生労働省に先進医療「先天性難聴の遺伝子診断」として申請し承認を受け、臨床応用を開始することが出来た。

今後、難聴の遺伝子診断を従来の聴力検査と組み合わせて実施することで、より正確に、より早期に聴力の程度を予測することが可能になることが期待される。また、遺伝子診断を組み合わせるによって、難聴をサブタイプに分類することが可能となり、サブタイプごとに適切なフォローアップや適切な介入法などのオーダーメイド医療の実現につながることが期待される。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

[1] Fukuoka H, Tsukada K, Miyagawa M,

Oguchi T, Takumi Y, Sugiura M, Ueda H, Kadoya M, Usami S. Quantitative evaluation of endolymphatic hydrops by bilateral intratympanic Gd-DTPA administration with MRI imaging for Meniere's disease. Acta Otolaryngol(in press)

[2] Miyagawa M, Fukuoka H, Tsukada K, Oguchi T, Takumi Y, Sugiura M, Ueda H, Kadoya M, Usami S. Endolymphatic hydrops and therapeutic effects are visualized in "atypical" Meniere's disease Acta Otolaryngol(in press)

[3] Ro SY, Nishio S, Tsukada K, Oguchi T, Kobayashi K, Abe S, Usami S. Factors that affect hearing level in individuals with the mitochondrial 1555A>G mutation Clin. Genet. 2008 (in press).

[4] Usami S, Takumi Y, Suzuki N, Oguchi T, Oshima A, Suzuki H, Kitoh R, Abe S, Sasaki A, Matsubara A. The localization of proteins encoded by CRYM, KIAA1199, UBA52, COL9A3, and COL9A1, genes highly expressed in the cochlea. Neuroscience. 2008 Jun 12;154(1):22-8.

[5] 宇佐美真一、難聴の遺伝カウンセリング-先進医療としての「先天性難聴の遺伝子診断」をふまえて-耳鼻咽喉科臨床 2008; 101:727-738

[6] 宇佐美真一、小児難聴児への対応—難聴遺伝子診療外来、人工内耳センター、

難聴児支援センターにおけるチーム医療—耳鼻咽喉科・頭頸部外科 2008; 80:851-858

[7] Oshima A, Jaijo T, Aller E, Millan JM, Carney C, Usami S, Moller C, Kimberling WJ. Mutation profile of the CDH23 gene in 56 probands with Usher syndrome type I. Hum Mutat. 2008 Jun;29(6):E37-46.

[8] Usami S, Wagatsuma M, Fukuoka H, Suzuki H, Tsukada K, Nishio S, Takumi Y, Abe S. The responsible genes in Japanese deafness patients and clinical application using Invader assay. Acta Otolaryngol. 2008 Apr;128(4):446-54.

## 2. 学会発表

[1] 宇佐美真一、西尾信哉、工藤、茂木英明、菊池景子、古庄知己、福島義光、阿部聡子、長野誠、山口敏和「難聴の遺伝学的検査と遺伝カウンセリングに関する全国共同研究」第53回日本人類遺伝学会（横浜）

[2] 宇佐美真一、工藤、茂木英明、鬼頭良輔、菊池景子、西尾信哉「難聴の遺伝子検査と遺伝カウンセリングの全国共同研究：変異の検出頻度と患者アンケート調査について」第53回日本聴覚医学会総会・学術講演会（東京）

[3] 茂木英明、鬼頭良輔、菊池景子、工藤、宇佐美真一、内藤泰、前田麻貴、北野庸子「遺伝子と脳機能が評価できた先天性難聴症例」第53回日本聴覚医学会総会・学術講演会（東京）

[4] 茂木英明、塚田景大、橋本繁成、工穰、宇佐美真一「日本人難聴患者に見出された *TECTA* 遺伝子変異についての検討」第 18 回日本耳科学会総会・学術講演会（神戸）

[5] 林景子、塚田景大、工穰、新川秀一、南場淳司、熊川考三、岩崎聡、高橋晴雄、神田幸彦、宇佐美真一「人工内耳患者の遺伝的背景についての検討」第 18 回日本耳科学会総会・学術講演会（神戸）

[6] 塚田景大、菊池景子、工穰、宇佐美真一「1500 家系（3000 例）の難聴患者における *GJB2* 遺伝子解析—新規変異と臨床型について—」第 18 回日本耳科学会総会・学術講演会（神戸）

[7] 宇佐美真一、工穰、茂木英明、菊池景子「日本人難聴遺伝子データベースの構築：日本人に見出される変異と臨床応用について」第 18 回日本耳科学会総会・学術講演会（神戸）

[8] 福岡久邦、工穰、古舘佐起子、塚田景大、小口智啓、杉浦真、宇佐美真一「メニエール病におけるガドリニウム鼓室内投与を用いた診断の有用性についての検討（第 2 報）」第 67 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会（秋田）

[9] 塚田景大、福岡久邦、古舘佐起子、宮川麻衣子、工穰、宇佐美真一「遺伝性難聴患者における前庭機能評価について」第 67 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会（秋田）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 別紙4

## 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	出版地	出版年	ページ

## 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
Fukuoka H, Tsukada K, Miyagawa M, Oguchi T, Takumi Y, Sugiura M, Ueda H, Kadon ya M, Usami S.	Quantitative evaluation of endolymphatic hydropsol by bilateral intratympanic Gd-DTPA administration with MRI imaging for Meniere's disease.	Acta Otolaryng			2009
Miyagawa M, Fukuoka H, Tsukada K, Oguchi T, Takumi Y, Sugiura M, Ueda H, Kadon ya M, Usami S.	Endolymphatic hydrops and therapeutic effects are visualized in "atypical" Meniere's disease	Acta Otolaryng			2009
Ro SY, Nishio S, Tsukada K, Oguchi T, Kobayashi K, Abe S, Usami S.	Factors that affect hearing level in individuals with the mitochondrial 1555A>G mutation	Clinic. Gent.			2009

Usami S, Takumi Y, Suzuki N, Oguchi T, Oshima A, Suzuki H, Kitoh R, Abe S, Sasaki A, Matsubara A.	The localization of proteins encoded by CRYM, KIAA1199, UBA52, COL9A3, and COL9A1, genes highly expressed in the cochlea.	Neuroscience.	154 (1)	22-28	2008
宇佐美真一	難聴の遺伝カウンセリング-先進医療としての床「先天性難聴の遺伝子診断」をふまえて	耳鼻咽喉科臨床	101	727-738	2008
宇佐美真一	小児難聴児への対応—難聴遺伝子診療外来、人工内耳センター、難聴児支援センターにおけるチーム	耳鼻咽喉科・頭頸部外科	80	851-858	2008
Oshima A, Jaijo T, Aller E, Millan JM, Carney C, Usami S, Moller C, Kimberling W J.	Mutation profile of the CDH23 gene in 56 probands with Usher syndrome type I.	Hum Mutat.	29 (6)	37-46	2008
Usami S, Wagatsuma M, Fukuoka H, Suzuki H, Tsukada K, Nishio S, Takumi Y, Abe S.	The responsible genes in Japanese deafness patients and clinical application using Invader assay.	Acta Otolaryngol.	128 (4)	446-454	2008

## ORIGINAL ARTICLE

**Semi-quantitative evaluation of endolymphatic hydrops by bilateral intratympanic gadolinium-based contrast agent (GBCA) administration with MRI for Meniere's disease**

HISAKUNI FUKUOKA<sup>1</sup>, KEITA TSUKADA<sup>1</sup>, MAIKO MIYAGAWA<sup>1</sup>,  
TOMOHIRO OGUCHI<sup>1</sup>, YUTAKA TAKUMI<sup>1</sup>, MAKOTO SUGIURA<sup>2</sup>,  
HITOSHI UEDA<sup>3</sup>, MASUMI KADOYA<sup>3</sup> & SHIN-ICHI USAMI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Otorhinolaryngology, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, <sup>2</sup>Department of Otorhinolaryngology, Kariya Toyota General Hospital and <sup>3</sup>Department of Radiology, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan

**Abstract**

**Conclusion:** Bilateral intratympanic administration of a gadolinium-based contrast agent (GBCA) in MRI was successfully performed and proved to be beneficial in the semi-quantitative evaluation of endolymphatic hydrops. Such image-based diagnosis will lead to re-evaluation and reclassification of the diagnostic criteria for Meniere's disease (MD). **Objective:** To visualize endolymphatic hydrops semi-quantitatively in patients with MD, by using bilateral intratympanic GBCA administration with MRI. **Patients and methods:** A total of 13 patients were evaluated, including 12 with MD and one with acute low-tone sensorineural hearing loss. Diluted gadodiamide (a kind of GBCA) was administered to the bilateral tympanic cavity by injection through the tympanic membrane. After 24 h, the endolymphatic hydrops was evaluated with a 3.0 T MR scanner. The areas enhanced by gadodiamide were measured semi-quantitatively. **Results:** Three-dimensional, fluid-attenuated inversion recovery (3D-FLAIR) MRI showed that the gadodiamide successfully penetrated the round window membrane, entering the perilymphatic space and delineating the gadodiamide-enhanced perilymphatic and gadodiamide-negative endolymphatic spaces of the inner ear. All the patients with MD showed a reduced gadodiamide-enhanced area representing the perilymphatic space, and the quantitative ratio was 0.15 to 0.85. Furthermore, endolymphatic hydrops was also demonstrated in the patient with atypical MD who had fluctuating low frequency sensorineural hearing loss without vertigo.

**Keywords:** Endolymphatic hydrops, Meniere's disease, semi-quantitative analysis, gadolinium, gadolinium-based contrast agent (GBCA), MRI

**Introduction**

Meniere's disease (MD) is an idiopathic disorder of the inner ear characterized by fluctuating sensorineural hearing loss (SNHL), tinnitus and aural fullness, and recurrent spontaneous episodic rotational vertigo (see Saftadi and Paparella for review [1]). MD has been thought to be attributable to endolymphatic hydrops, but this has only been confirmed histopathologically after death. Therefore, MD has been diagnosed on the basis of clinical symptoms and is classified into typical MD with all cochlear and vestibular symptoms, and atypical MD

with either cochlear symptoms (e.g. hearing loss, tinnitus, aural pressure) or vestibular symptoms (e.g. vertigo alone with aural pressure) [2]. Typical MD can further be classified into certain, definite, probable, and possible MD according to the nature of the hearing loss, tinnitus, aural fullness, and vertigo [2]. In addition, clinical diagnosis has sometimes been hampered by other conditions that closely resemble MD, such as acute low tone sensorineural hearing loss (ALSNHL) [3]. Therefore, along with clinical symptoms, clinical tests suggestive for endolymphatic hydrops are usually used for diagnosis. Functional

## 2 H. Fukuoka et al.

41 testing including electrocochleography (EcochG) or  
42 glycerol test has been used to estimate endolymphatic  
43 hydrops [1]. However, even if functional testing is  
44 performed, the results are still indirect proof.

45 Recent advances in imaging by three-dimensional,  
46 fluid-attenuated inversion recovery (3D-FLAIR) of  
47 magnetic resonance imaging (MRI), in association  
48 with enhancement by gadolinium-based contrast  
49 agents (GBCAs), enables visualization of endolymphatic  
50 hydrops in patients with MD [4–6]. In the  
51 present study, involving patients with typical MD,  
52 atypical MD, and ALSNHL, we evaluated endolymphatic  
53 hydrops in a semi-quantitative manner,  
54 through comparison of bilateral perilymphatic spaces  
55 enhanced by a GBCA.

### 56 Patients and methods

#### 57 Subjects

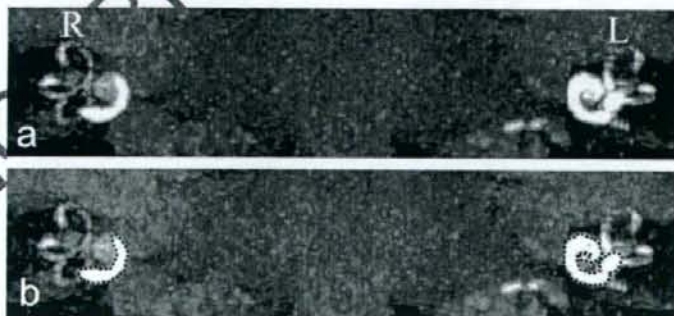
58 Ten patients with 'definite' MD and one with  
59 'possible' MD who met the American Academy of  
60 Otolaryngology-Head and Neck Surgery (AAO-  
61 HNS) criteria, one patient with atypical MD (who  
62 had fluctuated low frequency sensorineural hearing  
63 loss without vertigo), and one patient with acute  
64 low-tone sensorineural hearing loss (ALSNHL)  
65 participated in this study.

#### 66 MRI

67 Gadodiamide (Omniscan, Daiichi Pharmaceutical  
68 Co. Ltd, Tokyo) was diluted eightfold with saline,  
69 and 0.4–0.6 ml of the diluted gadodiamide was  
70 administered to the bilateral tympanic cavity by  
71 injection through the tympanic membrane using a  
72 23 G needle. The injection was carried out under a  
73 microscope. The patient then lay down in the supine  
74 position for 60 min. After 24 h, the endolymphatic  
75 hydrops was evaluated by MRI. We used a 3.0 T

MR scanner (Trio, Siemens, Erlangen, Germany)  
with a receive-only eight-channel phased-array coil.  
It can perform T1-weighted three-dimensional (3D)  
magnetization prepared rapid gradient echo (MP-  
RAGE). The parameters for MP-RAGE were: TR  
1500 ms, TE 3 ms, matrix size of  $320 \times 290 \times 320$ ;  
72 axial 0.8 mm thick slice,  $0.8 \text{ mm} \times 0.8 \text{ mm} \times 0.8$   
mm isotropic voxels, heavily T2-weighted 3D-TSE  
sequence, and 3D fluid-attenuated inversion recovery  
(FLAIR) with variable flip angle echo train  
(SPACE). The parameters for heavily T2-weighted  
SPACE were: TR 1350 ms, TE 199 ms, echo train  
length (ETL) 93, matrix size of  $320 \times 288 \times 278$ , 56  
axial 0.8 mm thick slice, and voxel size of  $0.6 \times 0.4 \times$   
0.8 mm. In addition to the methods described  
previously, we used 3D-FLAIR with higher in-plane  
spatial resolution. The scan parameters for the  
3D-FLAIR sequence were as follows: repetition  
time of 10 000 ms, echo time of 666 ms, inversion  
time of 2500 ms, single slab 3D turbo spin echo with  
variable flip angle distribution, echo train length of  
173, matrix size of  $320 \times 320 \times 52$  axial 0.8 mm thick  
slices to cover the labyrinth with a 20 cm square field  
of view, acceleration factor of two using the parallel  
imaging technique, and generalized autocalibrating  
partially parallel acquisitions. Voxel size was  $0.7 \times$   
 $0.8 \times 0.8$  mm. The number of excitations was one  
and the scan time was 9 min.

The multi-planar reconstruction (MPR) image  
was created from 3D-FLAIR images by imaging  
analysis software (Aquarius Net Viewer). The areas  
enhanced by gadodiamide in the cochlea and vesti-  
bule were traced and measured on the image in the  
plane perpendicular to the modiolus. Then, the  
affected side/contralateral side ratios were calculated  
(Figure 1). Semi-quantitative comparison of endo-  
lymphatic space in the vestibule was also calculated  
using Dicom Viewer software (EV Insite).



**AQI** Figure 1. The areas enhanced by gadodiamide in cochlea and vestibule were measured using multi-planar reconstruction (MPR) image by imaging analysis software (arrowhead), and the affected side/unaffected side ratios were calculated.



## Semi-quantitative MRI evaluation of endolymphatic hydrops 3

## Clinical testing

Pure tone audiometry (PTA) was performed before and after the experiment. The average of 0.5, 1, 2, and 4 Hz is shown in Table I. For vestibular testing, caloric testing and vestibular-evoked myogenic potential (VEMP) testing were performed. In caloric testing, maximum slow eye velocity was measured by cold water irrigation (20°C, 5 ml, 20 s). In VEMP testing, the electrographic signal from the stimulated side was amplified and averaged using a Neuropack evoked potential recorder (Nihon Kohden Co. Ltd, Tokyo, Japan). Clicks lasting for 0.1 ms at 105 dBnHL were presented through a headphone. The stimulation rate was 5 Hz, the band-pass filter intensity was 20–2000 Hz, and analysis time was 50 ms. The responses to 200 stimuli were averaged twice.

The Ethics Review Committee of Shinshu University School of Medicine approved the protocol of the study and all patients gave their informed consent to participation.

## Results

In this study, 3D-FLAIR MRI clearly showed that the gadodiamide successfully penetrated the round window membrane, entered the perilymphatic space, and delineated the gadodiamide-enhanced perilymphatic and gadodiamide-negative endolymphatic spaces of the inner ear. The endolymphatic space is comparatively small and difficult to identify as a vacant area in the normal side. In contrast, the endolymphatic space in an ear with endolymphatic hydrops is partially or entirely expanded, making

identification of the endolymphatic space easier (Figures 2 and 3).

Gadodiamide distribution patterns within the inner ear were variable and differed individually. In patient no. 3, who had definite MD, after 24 h the intratympanic gadodiamide moved toward the perilymphatic space, and the endolymphatic hydrops could be detected as a black area surrounded by the perilymphatic space filled with the gadodiamide in the basal turn of the left cochlea (Figure 2). In the unaffected side, the endolymphatic space (which was significantly small) may have been masked by the strong enhancement of perilymphatic space. In patient no. 6, who also had definite MD, the endolymphatic space in the vestibule on the affected side was significantly larger than that on the normal side (Figure 3). In this patient, in association with the imaging, VEMP was absent, but the caloric test showed normal response.

Table I summarizes imaging results and clinical data obtained for each patient. In the cases such as no. 3 or 6 mentioned above, endolymphatic hydrops could be easily identified qualitatively. However, in some cases, it was difficult to obtain supportive imaging for endolymphatic hydrops. Therefore, the present study tried to perform semi-quantitative analysis by using the MPR image, created from 3D-FLAIR images. Based on the semi-quantitative analysis, the gadodiamide-enhanced area representing the perilymphatic space ratio was 0.14 to 3.86 (Table II). In 9 of 10 patients with definite MD the ratio was reduced, and the quantitative ratio was 0.15 to 0.85 (Table II). In the exception, patient no. 4, gadodiamide was not introduced in the perilymphatic space even on the normal side, probably due to technical failure.

Table I. Summary of bilateral intratympanic gadolinium administration.

Patient no.	Age/sex	Diagnosis	Side	Caloric test CP%	VEMP	PTA-pre (dB)		PTA-post (dB)	
						Affected side	Unaffected side	Affected side	Unaffected side
1	51/M	MD	R	7.2	Depressed	38.8	15.0	38.8	15.0
2	41/F	MD	R	51.2	-	37.5	11.3	32.5	11.3
3	42/M	MD	L	41.3	Depressed	50.0	12.5	53.8	12.5
4	42/F	MD	L	19.9	ND	33.8	12.5	32.5	10.0
5	76/F	MD	L	39	ND	46.5	30.0	40.0	27.5
6	51/F	MD	R	11.9	Absent	22.5	13.8	28.8	12.5
7	53/M	ATMD	R	-	-	58.8	13.8	47.5	13.8
8	38/M	MD	R	22.6	Depressed	20.0	6.3	28.8	5.0
9	70/M	ALSNHL	R	-	-	17.5	46.3	13.8	43.8
10	69/F	MD	L	6.9	ND	55.0	28.8	52.5	26.3
11	52/F	MD	L	6.8	ND	65.0	12.5	62.5	13.8
12	53/F	MD	L	42.3	Depressed	53.8	22.5	47.5	20.0
13	33/M	pMD	R	50.6	Normal	12.5	6.3	6.3	6.3

ALSNHL, acute low tone sensorineural hearing loss; ATMD, atypical Meniere's disease; F, female; L, left; M, male; MD, 'definite' Meniere's disease; ND, not detectable; pMD, 'possible' Meniere's disease; PTA, pure-tone audiometry; R, right.

## 4 H. Fukuoka et al.



Figure 2. MRI imaging in patient no. 3 (definite Meniere's disease). The endolymphatic hydrops is detectable as a black area inside the perilymphatic space filled with the gadodiamide in the basal turn of the left cochlea. In the normal side, the endolymphatic space (a significantly small area) is not detectable, probably due to strong signal intensity in the perilymphatic space.

We measured the saccular endolymphatic space by bilateral comparison. Eleven of 13 patients, including 8 with definite MD, 1 with possible MD, 1 with atypical MD, and 1 with ALSNHL, showed differences in endolymphatic space in the saccules. Significant

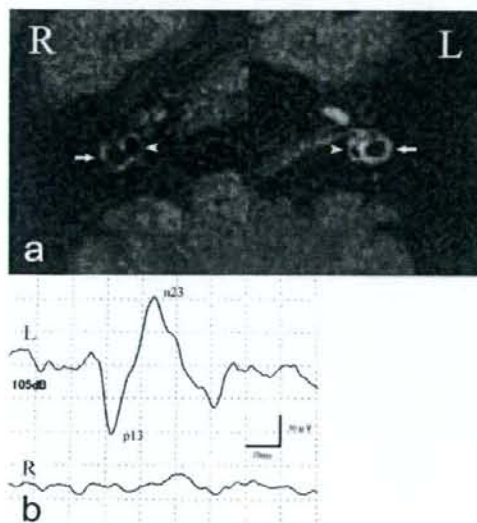


Figure 3. MRI imaging in patient no. 6 (definite Meniere's disease). The endolymphatic space in the saccules is detectable as a black area inside the perilymphatic space filled with gadodiamide in the vestibule (arrowheads). In the normal side (L), the endolymphatic space in the saccules is also detectable in the unaffected side, but is smaller than in the affected area. Arrows indicate lateral semicircular canals. In the affected side (R), enhancement by gadodiamide was weaker than in the unaffected side, indicating that endolymphatic hydrops may be present in the canal. VEMP testing showed no response in the affected side.

differences (Student's *t* test) in patient nos 6, 8, 10, and 11 were noted (Figure 4)

Concerning vestibular functional testing, caloric testing was performed in all but two patients (nos 7 and 9), and showed decreased response in five cases. VEMP testing was performed in all patients, except nos 2, 7, and 9. In 6 of the 10 patients who underwent the testing, VEMP was either absent on the affected side or depressed compared with the healthy side. VEMP amplitude could not be obtained because of low muscle contraction in patient nos 4, 5, and 10.

No adverse effects, such as vertigo, hearing deterioration, or tinnitus due to the intratympanic injection of gadodiamide were observed and there were no changes in hearing level (Table I).

### Discussion

The hallmark of MD diagnosis is to prove endolymphatic hydrops, but this has been achieved only in temporal bone histopathology after death. Initial attempts to identify endolymphatic hydrops involved visualization of the Reissner membrane, and it was successfully visualized in animals [7] and human cadavers [8]. The subsequent attempts to identify endolymphatic hydrops used intratympanic GBCA administration with 1.5 T MRI to visualize the endolymphatic/perilymphatic space [9]. Recent

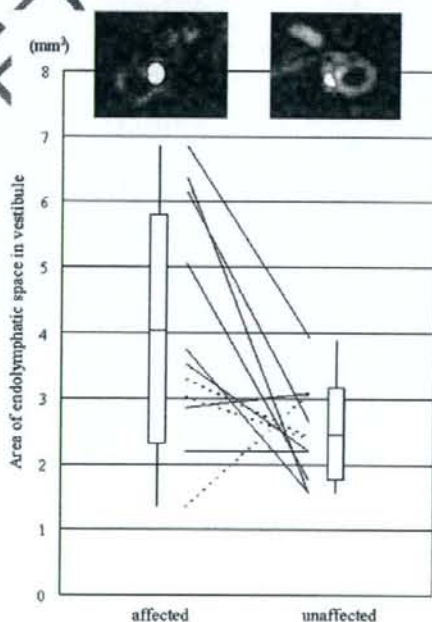


Figure 4. Semi-quantitative analysis of bilateral endolymphatic space in the sacculus.

## Semi-quantitative MRI evaluation of endolymphatic hydrops 5

Table II. Gadolinium distribution in inner ear.

Patient no.	Affected side				Unaffected side				Area					
	Semicircular canals		Vestibule		Semicircular canals		Vestibule		Affected side		Unaffected side		Area (vestibule)	
	Cochlea	Cochlea	Cochlea	Cochlea	Cochlea	Cochlea	Cochlea	Cochlea	Ratio	Affected side	Unaffected side	Affected side	Unaffected side	
1	Basal, second, apical	Whole	Whole	Basal, second, apical	Whole	Whole	Whole	Whole	17.6	0.65	26.8	2.86	3.08	
2	Basal, second, apical	Whole	Whole	Basal, second, apical	Whole	Whole	Whole	Whole	18.5	0.85	21.9	2.2	2.2	
3	Basal, second, apical	Whole	Whole	Basal, second, apical	Whole	Whole	Whole	Whole	19.6	0.53	36.8	3.74	1.57	
4	Faint	Faint	Faint	Faint	Faint	Faint	Faint	Faint	4.9	3.86	1.3	-	-	
5	Basal	Whole	Partial	Basal	Whole	Partial	Whole	Whole	15.9	0.81	19.7	-	-	
6	Faint	Faint	Partial	Basal, second, apical	Whole	Partial	Whole	Whole	4.6	0.15	30.8	6.84	3.92	
7	Basal	Faint	Whole	Basal, second, apical	Whole	Whole	Whole	Whole	15.0	0.50	30.0	3.02	2.38	
8	Basal, second, apical	Whole	Whole	Basal, second, apical	Whole	Whole	Whole	Whole	20.4	0.80	25.6	6.37	1.54	
9	Basal, second	Whole	Whole	Basal, second, apical	Whole	Whole	Whole	Whole	26.1	0.95	27.6	3.3	2.42	
10	Basal, second, apical	Whole	Whole	Basal, second, apical	Whole	Whole	Whole	Whole	18.1	0.55	33.1	5.05	1.76	
11	Basal, second, apical	Whole	Whole	Basal, second, apical	Whole	Whole	Whole	Whole	10.7	0.53	20.1	6.15	2.64	
12	Basal, second	Faint	Whole	Basal, second, apical	Whole	Whole	Whole	Whole	5.6	0.22	25.2	3.52	2.2	
13	Basal, second, apical	Whole	Whole	Basal, second, apical	Whole	Whole	Whole	Whole	21.2	1.01	20.9	1.32	3.08	

113 advances in imaging technology enabled visual-  
114 ization of human endolymphatic hydrops by intra-  
115 tympanic Gd-DTPA administration at 3.0 T MRI  
116 [4-6]. The present study adds supportive evidence  
117 that endolymphatic hydrops can be diagnosed by  
118 the same protocol and expands the findings by  
119 semi-quantitative analysis. As in the previous reports  
120 [4-6], we could recognize the existence of endolym-  
121 phatic hydrops as a decreased perilymphatic space,  
122 which may indicate an expanding endolymphatic  
123 space. Furthermore, semi-quantitative evaluation  
124 based on the ratio of the GBCA-enhanced area  
125 between affected/control sides represents the degree  
126 of endolymphatic hydrops.

127 **AQE** In all 10 patients who had definite Meniere's  
128 disease, except for 1 (patient no. 4 with failure due to  
129 technical error), the ratio was reduced, and the  
130 quantitative ratio was 0.14 to 0.85. The present  
131 data are the first to indicate that bilateral intratym-  
132 panic administration of GBCAs is beneficial in  
133 the semi-quantitative evaluation of endolymphatic  
134 hydrops.

135 There was inter-individual variation in the pattern  
136 of gadodiamide enhancement. For example, in pa-  
137 tient no. 3, endolymphatic hydrops was predom-  
138 inantly detected in the cochlea (Figure 2). In  
139 contrast, vestibular hydrops was predominantly iden-  
140 tified in patient no. 6 (Figure 3), in whom no VEMP  
141 response was found, suggesting that imaging findings  
142 are well correlated with the functional testing. A series  
143 of temporal bone studies also demonstrated that  
144 endolymphatic hydrops occurs either locally or en-  
145 tirely [10]. In the cochlea, the endolymphatic spaces  
146 too small to recognize compared with the perilym-  
147 phatic space, therefore endolymphatic space is usually  
148 undetected in the normal side. Thus, the existence of  
149 endolymphatic hydrops, which indicates abnormal-  
150 ity, can be qualitatively identified more easily. In  
151 contrast, saccular endolymphatic spaces can be iden-  
152 tified even in normal ears, disturbing precise diagnosis  
153 for endolymphatic hydrops without bilateral compar-  
154 ison. An additional advantage of the present proce-  
155 dure of bilateral intratympanic injection of a GBCA is  
156 the enablement of semi-quantitative comparison of  
157 endolymphatic space in the vestibule, which is diffi-  
158 cult to evaluate by unilateral injection. In this study,  
159 four cases with definite MD showed significant  
160 differences in endolymphatic space in the saccular  
161 region and all of these patients (except patient no. 10  
162 who could not be analyzed due to incomplete  
163 myogenic compression) showed decreased response.  
164 These correlations between imaging of sacculus  
165 associated with saccular functional testing such as  
166 VEMP will be of great help in precise diagnosis as well  
167 as therapeutic choice in MD.

In the present study, 6 of 11 patients who under-  
went caloric testing showed unilateral vestibular  
hypofunction. In comparison with VEMP, in some  
patients (nos 3, 8, and 12) both were decreased, but  
the others were shown to be abnormal in VEMP  
whereas normal in caloric responses (nos 1 and 3).  
Such discrepancy between the two testing methods,  
i.e. normal caloric test which is a function of the  
lateral semicircular canal, and a decrease in or  
disappearance of VEMP, has recently been reported  
in MD [11,12]. The present study confirms the  
saccular hydrops by imaging as well as VEMP,  
supporting the existence of such pathological con-  
ditions. In addition to general quantification, the  
advantage of bilateral intratympanic injection of  
GBCAs is semi-quantitative evaluation of saccular  
endolymphatic hydrops.

No adverse effects, such as vertigo, tinnitus, or  
hearing deterioration, were noted after intratym-  
panic injection of gadodiamide, indicating that the  
present protocol can be safely performed in ordinary  
clinical settings. This is also supported by a recent  
study using guinea pigs in which diluted GBCAs had  
no apparent effects on endocochlear potential [13].

EcochG and glycerol testing have been widely  
performed as useful, but indirect, tests for the  
detection of endolymphatic hydrops in MD. Because  
these are indirect tests, EcochG or glycerol testing  
cannot play a decisive role in determining the  
presence or absence of endolymphatic hydrops.  
Unfortunately, in this study, systemic comparison  
between these tests and imaging results could not be  
performed. Therefore, a final conclusion concerning  
the relationship between these previous findings and  
the current MRI findings await future systemic  
comparative study.

The number of cases other than MD in this study  
was limited, and the etiology of each category of  
disease was not conclusive. In previous studies, 8.5%  
of patients with ALSNHL progressed to 'definite'  
MD [14], indicating that some MD was previously  
diagnosed as ALSNHL. In this study, the patient  
with ALSNHL was not associated with endolym-  
phatic hydrops. Future study using many cases will  
subclassify ALSNHL whether it is associated with  
endolymphatic hydrops or not.

In this study, endolymphatic hydrops was also  
demonstrated in the patient with atypical MD who  
had fluctuated low frequency sensorineural hearing  
loss without vertigo, indicating the possibility that  
some atypical MD is a continuum clinical entity of  
MD. Therefore, in the future, the diagnostic criteria  
for MD may be expanded and reclassified according  
to image-based diagnosis.

In conclusion, bilateral intratympanic administra-  
tion of a GBCA was successfully performed and