

200936237A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

新規診断マーカーCTPを用いた難治性内耳疾患の多施設検討

H21-難治一般-182

平成21年度 総括研究報告書

主任研究者 池園 哲郎

平成22 (2010) 年 3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

新規診断マーカーCTPを用いた難治性内耳疾患の多施設検討

H21-難治一般-182

平成21年度 総括研究報告書

主任研究者 池園 哲郎

平成22 (2010) 年 3月

目 次

I. 総括・分担研究報告

新規診断マーカーCTPを用いた難治性内耳疾患の多施設検討

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

----- 13

III. 研究成果の刊行物・別刷り

----- 15

新規診断マーカーCTPを用いた難治性内耳疾患の多施設検討

主任研究者 池園哲郎 日本医科大学准教授

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。また、特発性内耳疾患である突発性難聴、メニエール病などの発症原因として外リンパ瘻がどの程度含まれるのか検討する。

B. 研究方法

背景：外リンパ瘻の生化学的診断マーカーは、未だ普及していないため、確定診断がなされず治癒率の低下をもたらしている。

方法：我々は、検査結果を客観的な基準によって保証するため、下記3ポイントを実施しており、良好かつ適正な精度管理が得られている。

1. ヒト・リコンビナントCTPタンパクを内部標準（標品）として使用。
2. 最新式イメージアナライザーで最適なSN比をもつ結果画像を選定。
3. 臨床経過を知らない第三者的立場の担当者が結果判定。

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。

今回は前向き検討のための統計学的検討（1）と、CTP検出法の診断能評価、診断マーカーとしてのCTPの妥当性の評価を行った（2）。

C. 研究成果

1. 統計学的検討：

①.CTP検出法の診断性能を評価するために必要な項目は、特異度、感度、陽性尤度比、陰性尤度比、そしてそれぞれ値の95%信頼区間である。

②.感度が41検体、特異度が43検体必要である。

2. CTP検出法の診断能評価：検出限界をヒトリコンビナントCTP蛋白0.27ngと設定し、検査を規準化した。その検査法を用いて、CTP発現特異性、蛋白安定性、ヒト外リンパ検出感度、臨床検体の検出感度を検討した。

D. 考察 本年度1年間の本研究で、下記2点を明らかにした。研究は極めて順調に進んでいる。

A. 「前向き試験」として進めていくために、統計学的検討を行った。

B. CTP検出法検査を規準化し、CTP蛋白安定性、検査感度等を測定した。

<研究により得られた成果の今後の活用・提供>

短期的効果： 外リンパ瘻は手術により完治が望める疾患である。本検査の普及により早期診断・治療が可能になり、治癒率が大きく改善し、保険医療の適正な運用をもたらす。後遺障害に悩む症例が減り、健康で労働可能な成人数を増加させる。

今後、多施設の臨床データを比較検討する。今まで不明だった外リンパ瘻の発症率、自然治癒率の検討、至適手術時期や治療指針の確立が可能となる。

長期的効果： 難聴診断・治療のEBM確立に多大なる貢献をする。外リンパ瘻が原因となる可能性が指摘されている突発性難聴、特発性難聴、メニエール病、小児の難聴（奇形に伴う外リンパ瘻）などの治療に貢献する。その結果、適切な医療が施行され無駄な投薬、通院、入院が減り、医療費の軽減、適正使用を推進する。

萩森伸一

分担研究者

大阪医科大学感覚器機能形態医学

松田英樹

横浜市立大学大学院・頭頸部生体機能・病態

小川洋

医科学

福島県立医科大学耳鼻咽喉科学講座

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。また、特発性内耳疾患である突発性難聴、メニエール病などの発症原因として外リンパ瘻がどの程度含まれるのか検討する。

B. 研究方法

背景：内耳疾患のほとんどは特発性であり、原因診断はほとんどなされていない。患者は、まず、正確な原因診断を望んでおり、その診断に基づき診療（手術を含む）による完治を望んでいる。我々が内耳プロテオーム解析結果を応用し、開発したCTP検出法は、国内・国際特許を取得している。CTPとはコクリンのアイソフォームの1つである。本検査は、ほぼ臨床実用レベルに達しており、正確な診断により外科的治療の適応が判断される。外リンパ瘻の生化学的診断マーカーは、未だ普及していないため、確定診断がなされず治癒率の低下をもたらしている。

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、免疫クロマト法の基礎研究を行い、至適条件を設定し、検査システムのクオリティーコントロール (精度管理) を確立した。

臨床検査は厳密な品質管理の元で施行されなければならない。我々は、検査結果を客観的な基準によって保証するため、下記3ポイントを実施しており、良好かつ適正な精度管理が得られている。

1. ヒト・リコンビナント CTP タンパクを内部標準 (標品) として使用。
2. 最新式イメージアナライザーで最適な SN 比をもつ結果画像を選定。
3. 臨床経過を知らない第3者の立場の担当者が結果判定。

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。bの検出はウェスタンブロットの転写効率を推測するために用いた。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。

このように、本検査の「検査精度」は実際に臨床で活用できるレベルに達した。次に問題となる

のは「診断精度」である。診断技術の診断精度の評価には、国際的診断精度評価基準であるSTARD statement (STAndards for the Reporting of Diagnostic Accuracy studies) に沿って研究を行なう必要がある。STARDは前向き試験であり、さらに25項目からなるチェックリストがあり、以下に重要ポイントを記載する。

- ・ 検査対象、除外規定の明記
- ・ フローダイアグラムで表記
- ・ サンプルサイズ (計測すべきサンプル数) は研究開始前に統計学的に検討する
- ・ ゴールデンスタンドを当該検査を「同時に」施行し比較することが一つの大きな目標である
- ・ 検査の感度・特異度の算出 (すなわち診断精度)

今回は前向き検討のための統計学的検討(1)と、診断マーカーとしてのCTP妥当性評価のためにCTP検出法の診断能評価(2)を行った。

(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. 統計学的検討： 今後、外リンパ腫診断に関する研究を、国際基準STARDに則り「前向き試験」として進めていくために、統計学的検討を事前に行った。医学統計学の第一人者、森實敏夫先生(神奈川県川歯科大学附属横浜研修センター長)に統計学的解析を依頼した。

①CTP検出法の診断性能を評価するために必要な項目は、特異度、感度、陽性尤度比、陰性尤度比、そしてそれぞれ値の95%信頼区間である(文献a)。

②サンプルサイズ(計測すべきサンプル数)は、alpha-level 0.05、power 0.8として、one sample designで計算したところ、感度が41検体、特異度が43検体必要との結果である(文献b)。

a). Simel DL et al. J Clin Epidemiology1991.

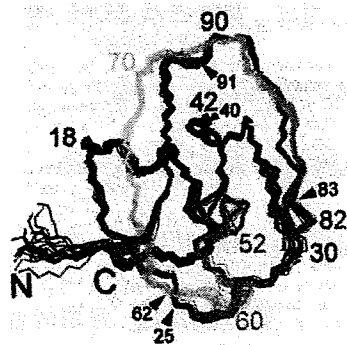
b). Chow SC et al. CRC Press, 2003.

2. CTP検出法の診断能評価： 検出限界をヒトリコンビナントCTP蛋白0.27ngと設定し、検査を規準化した。その検査法を用いて、CTP発現特異性、蛋白安定性、ヒト外リンパ検出感度、臨床検体の検出感度を検討した。

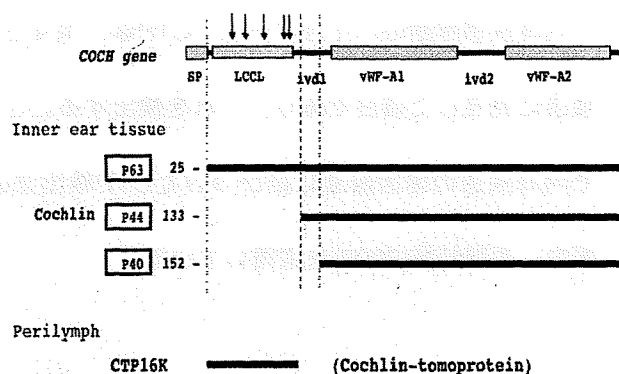
①CTP発現の特異性を検討した。その結果、外リンパサンプル85検体中、80検体がCTP陽性、脳脊髄液80サンプルはすべてCTP陰性だった。そのほか、血清28検体、唾液29検体が陰性であったことを報告した（業績文献1）。

②CTP蛋白の診断マーカーとしての安定性を検討した。室温25度と冷蔵4度に55日間放置したサンプルを測定したところ、検出反応に大きな変化は無かった。また、解凍凍結を10回反復しても変化はみられず、非常に安定した蛋白であることが判明した（業績文献4,5）。

③本検査の精度管理により達成された「検査精度」を評価する目的では、ヒト外リンパの検出下限を求めたところ、0.161 μ l/laneであった。換算すると、中耳腔に約3 μ l外リンパが存在すれば検出できることになる。また外リンパ瘻が否定される症例(non-PLF caess)における本検査の感度は、非炎症耳55検体で98.2%、炎症・感染耳46検体で93.5%であった（業績文献4）。



<CTPのNMR結晶構造>



<コクリンのアイソフォーム>

D. 考察

本年度1年間の本研究で、下記2点を明らかにした。研究は極めて順調に進んでいる。

A. 「前向き試験」として進めていくために、統計学的検討を行った。

B. CTP検出法検査を規準化し、CTP蛋白安定性、検査感度等を測定した。

診断基準については、我々が作成した「外リンパ瘻の生化学的診断基準（案）」「CTP検出法の結

果と診断」に加えて、過去に報告されている本邦の「特発性外リンパ瘻診断基準」、「術中外リンパ漏出判定基準」、北米の「外リンパ瘻分類」の4つを統合すべく、現在改訂を加えている。また、内耳疾患における外リンパ瘻の頻度を、各研究者の施設で検討し、実態把握に努める予定である。

<研究成果に対する国内外での評価>

内耳疾患診断のバイオマーカーCTPは、我々が独自に発見した蛋白であり、これを検出することで内耳疾患の原因診断に結びつけたCTP検出法は、国内・国際特許(2008)を取得している。

外リンパ瘻の正確な診断ができれば、すなわち手術によりこれを完治する道が開ける。単なる診断技術開発ではなく、治療へ直結することが高い評価を得ている。

本研究成果は、今年度、英文論文5編となり発表された。また、今年度、第20回 日本頭頸部外科学会総会において、シンポジウム「頭頸部外傷への対応：聴器外傷」、第111回 日本耳鼻咽喉科学会総会において、シンポジウム「感音難聴とめまい：病態はどこまで分かったか」を担当し、本研究の成果を発表する。

<研究により得られた成果の今後の活用・提供>

短期的効果： 外リンパ瘻は手術により完治が望める疾患である。本検査の普及により早期診断・治療が可能になり、治癒率が大きく改善し、保険医療の適正な運用をもたらす。後遺障害に悩む症例が減り、健康で労働可能な成人数を増加させる。

今後、多施設の臨床データを比較検討する。今まで不明だった外リンパ瘻の発症率、自然治癒率の検討、至適手術時期や治療指針の確立が可能となる。

長期的効果： 難聴診断・治療のEBM確立に多大なる貢献をする。外リンパ瘻が原因となる可能性が指摘されている突発性難聴、特発性難聴、メニエール病、小児の難聴（奇形に伴う外リンパ瘻）などの治療に貢献する。その結果、適切な医療が施行され無駄な投薬、通院、入院が減り、医療費の軽減、適正使用を推進する。

期待される社会的成果：

外リンパ瘻による難聴・平衡障害などの後遺障害は様々な社会的な不適合をもたらし、就労意欲を減退させ、鬱などの精神疾患発症のきっかけともなる。外リンパ瘻の治癒率改善は日本において減少する労働力の確保、増加する鬱などによる自殺問題の改善にも役立つ。また超高齢化社会における難聴・平衡障害の低減は、社会的に大きな意

味をもち、介護度の軽減に役立つ。

< 将来展望 >

A. 難治性内耳疾患の原因診断を行い、手術等の有効な治療戦略の多施設検討を行う。

結果欄で記載した、「STARDで評価し確立されたCTP検出検査」を実施することで国際評価に耐えうるエビデンスレベルが高い報告となる。難治性疾患臨床調査研究対象となっている突発性難聴、特発性両側性感音難聴、メニエール病、遅発性内リンパ水腫、特発性耳石器障害等（以下難治性内耳疾患と略記）、さらに小児の変動性進行性難聴では、その原因の一部が外リンパ瘻であることは以前から指摘されている。本研究班の組織の中で、これらの疾患に対する選択/除外基準を定め、統一された基準に基づいた症例をCTP検査対象とする。さらに術前術後の検査所見、治療効果を同時に解析する。これらの難治性内耳疾患の中に占める外リンパ瘻が的確に診断できれば、特異的治療法（手術など）へ道が開け、学術的、臨床的、社会的なインパクトは大きい。

B. 現在のCTP検出法はウェスタンブロットによっているため、検査に通常2日間を要する、技術的

に高度な熟練者が必要などの問題点がある。長期的には、どこの病院でも同じ診断能を有する検査を施行できるような、診断技術の開発を計画している。このためには産学連携により検査技術をキット化するなどの方法が考えられる。

C. CTP等の難聴関連蛋白の基礎研究

現在行っている難聴関連遺伝子と蛋白に関する基礎研究（ハーバード大学Robertson博士、マサチューセッツ工科大のGrannan研究員も研究協力者に含む）を継続しCOCH遺伝子の機能解明へ導く。また難聴や内耳障害、めまいに関連する内耳・中耳の遺伝子、蛋白、神経活性物質（神経ペプチドなど）に関する総合的な基礎研究を推進して、新たな診断・治療法へ結びつける。

現在、外リンパ瘻と確定診断がついても、内耳の細胞レベルではどこに障害があるか診断する方法がない。我々は、長期的には内耳、中耳のサンプルを用いて、内耳障害の詳細なメカニズムを解明し、診断する技術を開発する予定である。

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

文献リスト

1. Ikezono T, Sugizaki K, Shindo S, Sekiguchi S, Pawankar R, Baba S, Yagi T. CTP (Cochlin-tomoprotein) detection in the profuse fluid leakage (gusher) from cochleostomy. *Acta Otolaryngol.* 130(8):81-887, 2010.

2. Li L, Ikezono T, Sekine K, Shindo S, Matsumura T, Pawankar R, Ichimiya I, Yagi T. Molecular cloning of the Coch gene of guinea pig inner ear and its expression analysis in cultured fibrocytes of the spiral ligament. *Acta Oto-Laryngologica.* 130(8): 868-880, 2010.

3. Hosokawa S, Mizuta K, Nakanishi H, Hashimoto Y, Arai M, Mineta H, Shindo S, Ikezono T. Ultrastructural localization of cochlin in the rat cochlear duct. *Audiol Neurotol.* 15(4): 247-253, 2010.

4. Ikezono T, Shindo S, Sekiguchi S, Morizane T, Pawankar R, Watanabe A, Miura M, Yagi T. The performance of CTP detection test for the diagnosis of perilymphatic fistula. *Audiol Neurotol.* 15(3): 168-174, 2010.

5. Ikezono T, Shindo S, Sekiguchi S, Charuk H, Li L, Pawankar R, Morizane T, Baba S, Koizumi Y, Sekine K, Watanabe A, Komatsuzaki A, Murakami S, Kobayashi T, Miura M, Yagi T. Cochlin-tomoprotein (CTP), a novel perilymph-specific protein and a potential marker for the diagnosis of perilymphatic fistula.

Audiol Neurotol. 14: 338-344, 2009.

池園哲郎、清千鶴子、酒主敦子、小泉康雄、新藤晋、八木聰明 (2010) めまい及び随伴症状に対するカリジノゲナーゼとアデノシン三リン酸二ナトリウムの治療効果比較 *Equilibrium Research* 69(1):16-26.

池園哲郎(2009)【メニエール病を理解する】メニエール病と周辺疾患 急性低音障害型感音難聴 *JOHNS* 25(6): 895-898.

渡辺行雄、池園哲郎、伊藤壽一、柿木章伸、肥塚泉、鈴木衛、高橋克昌、工田昌也、武田憲昭、土井勝美、山下裕司、青木光広、宇佐美真一、高橋正紘、長沼英明、厚生労働省難治性疾患克服研究事業前庭機能異常に関する調査研究班(2009)メニエール病診断基準 *Equilibrium Research* 68(2):103-106.

小泉康雄、池園哲郎(2009)乗り物酔いの機序とその予防対策 *小児科.* 50(5): 629-635.

池園哲郎(2009)【訴えからみためまいの見分け方】外傷後のめまい. *ENTONI* 102: 53-59.

池園哲郎(2010)外リンパ瘻の診断と治療のEBMとは EBM耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍の治療(武田 憲昭編):2010-2011, 中外医学社 (印刷中)

池園哲郎(2010)外リンパ瘻『よくわかる『聴覚障害』 難聴と耳鳴のすべて』(小川 郁編):永井書店 (印刷中)

池園哲郎(2009)外傷による恒常性の破綻と内耳障害 日常臨床に役立つめまいと平衡障害(内野善生編):123-130, 金原出版

1. 学会発表

池園哲郎: シンポジウム 頭頸部外傷への対応 -聴器外傷- 第20回日本頭頸部外科学会2010.1(予定)

松田帆、池園哲郎ら: 当科における真珠腫初回手術例の進展度 第19回日本耳科学会. 2009. 10.

椎葉恭子、新藤晋、池園哲郎、関根久遠、八木聰明: 生後ラット内耳におけるCOCH 一蛋白と遺伝子発現の比較一 第19回日本耳科学会. 2009. 10.

池園哲郎、新藤晋、八木聰明：癒着鼓膜の再癒着防止効果と換気機能も併せ持ったH型換気ドレーンチューブ-その使用方法と治療効果-第19回日本耳科学会。2009. 10.

池園哲郎、新藤晋、八木聰明：癒着性中耳炎治療用のH型換気ドレーンチューブの開発 第110回日本耳鼻咽喉科学会2009. 5.

杉崎一樹、他(9人中2番目)：外リンパ瘻脳脊髄液ガッシャー噴出液の生化学的解析第110回日本耳鼻咽喉科学会。2009. 5.

新藤晋、池園哲郎他：経外耳道的中耳外傷のマルチセンタースタディー 第110回日本耳鼻咽喉科学会。2009. 5.

H. 知的財産権の出願状況

・特許
(特許取得)

1. 【日本】発明の名称：外リンパ瘻の検出方法
特許権者：学校法人日本医科大学・三菱化学株式会社
発明者：池園哲郎、八木聰明、大森彬
特許番号：特許第4172777号(2008年8月22日)
公開番号：特開2004-85552(2004年3月18日)
出願番号：特願2003-182860(2003年6月26日)

2. 【日本】発明の名称：耳治療用成型物
特許権者：学校法人日本医科大学・株式会社高研
発明者：池園哲郎、八木聰明
特許番号：特許第4172808号(2008年8月22日)
公開番号：特開2008-161545(2008年7月17日)
出願番号：特願2006-356080(2006年12月28日)

3. 【外国 中国】発明の名称：外リンパ瘻の検出方法
特許権者：学校法人日本医科大学

発明者：池園哲郎、八木聰明、大森彬
特許番号：ZL03815172.3(2007年9月5日)
公告番号：CN100335502-C(2007年9月5日)
出願番号：03815172.3(2003年6月26日)

4. 【外国 オーストラリア】発明の名称：外リンパ瘻の検出方法

特許権者：学校法人日本医科大学
発明者：池園哲郎、八木聰明、大森彬
特許番号：2003243985(2009年7月3日)
出願番号：2003243985(2003年6月26日)

特許申請状況

NO. 特許権者、発明者、特許番号等
(特許申請中)

1. 【外国 アメリカ合衆国】発明の名称：外リンパ瘻の検出方法

特許権者：学校法人日本医科大学
発明者：池園哲郎、八木聰明、大森彬
出願日：2003年6月26日
出願番号：10/517,778

2. 【外国 EP(ヨーロッパ特許)】発明の名称：外リンパ瘻の検出方法

特許権者：学校法人日本医科大学
発明者：池園哲郎、八木聰明、大森彬
出願日：2003年6月26日
出願番号：03736265.4

(特許審査請求中)

1. 【日本】発明の名称：眼振誘発装置

出願人：学校法人日本医科大学
発明者：加藤 政利、新藤 晋、野原 秀明、池園哲郎、八木聰明
特許出願番号：特願2005-179515(2005年6月20日)
特許公開番号：特開2006-346346(2006年12月28日)
審査請求日：2008年6月12日

★ 診断基準 (案)

外リンパ瘻の生化学的診断基準 (案) 「CTP検出法の結果と診断」

結果	診断
陽性	外リンパ瘻
陰性	他疾患
	外リンパ瘻 自然治癒
	外リンパ瘻 間欠的漏出

* ウェスタンブロットを用いた場合の検査感度

非炎症耳 98.2%

炎症・感染耳 93.5%

付表1 外リンパ瘻の原因

Neurotology, 2nd Edition, Robert K. Jackler, Derald E. Brackmann ed. Elsevier 2005

〈後天性acquired〉

・真珠腫*3、医原性(アブミ骨手術、中耳手術)、梅毒、腫瘍

・外傷

直達外力 :頭部外傷、側頭骨骨折、中耳(耳小骨)外傷

介達外力*2: implosive 中耳圧変化、圧外傷

explosive 脳脊髄圧の変化

音響外傷

全く誘因のみつからない狭義の特発性(idiopathic/spontaneous)

〈先天性congenital〉

- ・ Mondini dysplasiaなどの内耳奇形
- ・ 中耳奇形に伴うもの

〈先天・後天いずれか不明〉

上半規管裂隙症候群*3 (SCD)

*1 上記塗りつぶし部分が広義の特発性。本邦で用いられている診断基準はこれに該当

*2 微細な内因性、外因性圧外傷のこと。鼻かみ、かみ、飛行機搭乗などによるもの。

*3 外リンパ漏出の無い外リンパ瘻

付表2 試験的鼓室開放術における手術所見の解釈

(Nomura Y: Perilymph fistula: concept, diagnosis and management. Acta Otolaryngol Suppl 1994; 514: 52-54.)

漏出		診断
あり	外リンパか脳脊髄液と証明された場合	外リンパ瘻
あり	組織液	他疾患
なし		他疾患
なし	自然治癒	外リンパ瘻
なし	間欠的漏出	外リンパ瘻
なし	迷路内破綻 (collapse inside labyrinth)	外リンパ瘻

付表3 外リンパ瘻の診断基準平成2年度(案)

(厚生省特定疾患急性高度難聴調査研究班平成2年度研究業績報告書.p20 1991)

1、確実例

手術(鼓室開放術)、内視鏡等により前庭窓、蝸牛窓のいずれかまたは両者より外リンパあるいは髄液の漏出を確認できた例、又は瘻孔の確認できた例

2、疑い例

髄液圧、鼓室圧の急激な変動を起こすような誘因の後に、耳閉塞感、難聴、耳鳴、めまい、平衡障害などが生じた例

註1：かみ、思い物を持ち上げた、鼻かみ、怒責、潜水、飛行機旅行などが誘因となる。

註2：症状は全部そろわなくてもよい。いずれか一つのこともある。

註3：再発する症例もある。

註4：次のような症状を伴うことがある。

- 1) パチツという音 (pop音) が聞こえた。
- 2) 感音性難聴が、数時間あるいは数日かけて生じた。ときに変動する。
- 3) 急性発症の難聴があつて、「水の流れるような耳鳴り」あるいは「水の流れる感じ」がある。
- 4) 外耳、中耳の加圧、減圧などでめまいを訴える。
- 5) 動揺感が持続し、患側下で頭位眼振がみられる。

注；報告書には「海外では外傷や内耳奇形によるものも含めた報告が多いが、本研究班の対象は原因不明なものである」すなわち“特発性”を対象とすると記載されている。

別紙4

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
池園哲郎	外リンパ瘻	小川 郁	『よくわかる『聴覚障害』難聴と耳鳴のすべて』	永井書店		2010	印刷中
池園哲郎	外リンパ瘻の診断と治療のEBMとは	武田 憲昭	EBM耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍の治療	中外医学社		2010	2010-2011 印刷中
池園哲郎	外傷による恒常性の破綻と内耳障害	内野善生	日常臨床に役立つめまいと平衡障害	金原出版		2009	123-130

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
Ikezono T, Sugizaki K, Shindo S, Sekiguchi S, Pawankar R, Baba S, Yagi T	CTP (Cochlin-tomoprot ein) detection in the profuse fluid leakage (gusher) from cochleostomy.	Acta Oto-Laryngologica.	130 (8)	881-887	2010
Li L, Ikezono T, Sekine K, Shindo S, Matsumura T, Pawankar R, Ichimiya I, Yagi T.	Molecular cloning of the Coch gene of guinea pig inner ear and its expression analysis in cultured fibrocytes of the spiral ligament.	Acta Oto-Laryngologica	130 (8)	868-880,	2010

Hosokawa S, Mizuta K, Nakanishi H, Hashimoto Y, Arai M, Mineta H, Shindo S, Ikezono T.	Ultrastructural localization of cochlin in the rat cochlear duct.	Audiol Neurotol.	15(4)	247-253	2010
Ikezono T, Shindo S, Sekiguchi S, Morizane T, Pawankar R, Watanabe A, Miura M, Yagi T.	The performance of CTP detection test for the diagnosis of perilymphatic fistula	Audiol Neurotol.	15(3)	168-174	2009
Ikezono T, Shindo S, Sekiguchi S, Charuk H, Li L, Pawankar R, Morizane T, Baba S, Koizumi Y, Sekine K, Watanabe A, Komatsuzaki A, Murakami S, Kobayashi T, Miura M, Yagi T	Cochlin-tomoprotein (CTP), a novel perilymph-specific protein and a potential marker for the diagnosis of perilymphatic fistula.	Audiol Neurotol	14(5)	338-344	2009
池園哲郎、清千鶴子、酒主敦子、小泉康雄、新藤晋、八木聡明	めまい及び随伴症状に対するカリジノゲナーゼとアデノシン三リン酸二ナトリウムの治療効果比較	Equilibrium Research	69(1)	16-26	2010
池園哲郎	【メニエール病を理解する】メニエール病と周辺疾患 急性低音障害型感音難聴	JOHNS	25(6)	895-898	2009
渡辺行雄、池園哲郎、伊藤壽一、柿本章伸、肥塚泉、鈴木衛、高橋克昌、工田昌也、武田憲昭、土井勝美、山下裕司、青木光広、宇佐美真一、高橋正紘、長沼英明、厚生労働省難治性疾患克服研究事業前庭機能異常に関する調査研究班	メニエール病診断基準	Equilibrium Research	68(2)	103-106	2009
小泉康雄、池園哲郎	乗り物酔いの機序とその予防対策	小児科	50(5)	629-635	2009
池園哲郎	【訴えからみためまいの見分け方】外傷後のめまい	ENTONI	102	53-59	2009

ORIGINAL ARTICLE

CTP (Cochlin-tomoprotein) detection in the profuse fluid leakage (gusher) from cochleostomy

TETSUO IKEZONO¹, KAZUKI SUGIZAKI¹, SUSUMU SHINDO¹, SATOMI SEKIGUCHI², RUBY PAWANKAR¹, SHUNKICHI BABA¹ & TOSHIAKI YAGI¹

¹Department of Otorhinolaryngology, Nippon Medical School and ²R&D and Business Development Segment, Mitsubishi Chemical Medience Corporation, Tokyo, Japan

Abstract

Conclusions: By testing 125 samples, we confirmed that Cochlin-tomoprotein (CTP) is present in the perilymph, not in cerebrospinal fluid (CSF). Perilymph and CSF exist in two distinct compartments, even in the case of a malformed inner ear with a bony defect in the lamina cribrosa, as described here. Cochleostomy might have suddenly decreased the perilymph pressure, allowing the influx of CSF into the inner ear resulting in profuse fluid leakage, first perilymph then CSF. **Objectives:** The first purpose of this study was to further confirm the specificity of the perilymph-specific protein CTP that we reported recently. Secondly, we assessed the nature of the fluid leakage from the cochleostomy using the CTP detection test. **Methods:** A standardized CTP detection test was performed on 65 perilymph and 60 CSF samples. Samples of profuse fluid leakage collected from cochleostomy during cochlear implantation surgery of one patient with branchio-oto-renal (BOR) syndrome were also tested by the CTP detection test. **Results:** CTP was detected in 60 of 65 perilymph samples but not in any of the CSF samples. The leaked fluid was shown to contain CTP, i.e. perilymph, at the outset, and then the CTP detection signals gradually disappeared as time elapsed.

Keywords: Perilymph, CSF, cochlear implant, COCH gene, Cochlin isoform, branchio-oto-renal syndrome, sensorineural hearing loss

Introduction

Normally the cerebrospinal fluid (CSF) in the subarachnoid space extends laterally into the internal auditory canal (IAC) as far as the lateral fundus, where it is separated from the perilymph by the bony plate of the lamina cribrosa, the nerves that pass through the lamina cribrosa and the spiral ganglion. Profuse leakage of perilymph and CSF is the result of an abnormal bony defect in the lamina cribrosa, rather than enlargement of the cochlear aqueduct. In some congenitally dysplastic ears there is a deficiency in this barrier, allowing direct confluence between the CSF and perilymph [1,2].

In a large series of cochlear implants, the incidence of this profuse leakage of perilymph and CSF, i.e. a

'gusher', was approximately 1% of all cases. The term gusher is widely used in the literature to describe egress of clear fluid from the cochleostomy site. However, the term is variably applied and bears no explicit relation to the amount of fluid leaking, time elapsed until the flow ceases, pressure of the fluid column or origin of the fluid. The fluid may be CSF, perilymph, or a mixture of the two [3]. Even though the current level of diagnostic imaging technology is considerably advanced, at present it is unclear whether the perilymph and CSF spaces are separate and function as two distinct compartments or not. The fragile membranous tissue at the fundus of the IAC can be perforated after the fenestration of the cochlea due to a pressure decrease in the perilymphatic space resulting from the cochleostomy.

Correspondence: Tetsuo Ikezono MD PhD, Department of Otorhinolaryngology, Nippon Medical School, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8603, Japan.
E-mail: ctp16kdapl@nms.ac.jp

(Received 28 September 2009; accepted 19 November 2009)

ISSN 0001-6489 print/ISSN 1651-2251 online © 2010 Informa UK Ltd. (Informa Healthcare, Taylor & Francis AS)
DOI: 10.3109/00016480903508910

Alternatively, these liquid compartments may be mixed preoperatively because of a defect in the lamina cribrosa. The confluence of these two fluids could be one of the causes of the deterioration of hearing [2].

Recently, we reported the features of Cochlin-tomoprotein (CTP), a novel perilymph-specific protein. By proteomic analysis of inner ear proteins, we found certain unique properties of the cochlin isoforms. We detected three cochlin isoforms, p63s, p44s and p40s, in the inner ear tissue, and a short 16 kDa isoform, named Cochlin-tomoprotein (CTP), in the perilymph [4,5]. Since COCH gene/cochlin is known to be highly specific to the inner ear, we examined CTP expression in body fluid. CTP was selectively expressed in the perilymph of all 20 perilymph samples tested, but not in 77 samples of the body fluids, i.e. serum (28 samples), CSF (20 samples) or saliva (29 samples) [6]. Using CTP as a biomarker, we have established a standardized CTP detection test for the diagnosis of perilymphatic fistula (PLF), using a spiked standard of recombinant human (rh)CTP in Western blotting [7].

In the present study, we further analysed the specificity of CTP expression in body fluids, testing 65 perilymph and 60 CSF samples. The results confirm that CTP is present in the perilymph, but not in the CSF. Perilymph and CSF are distinguished by the presence or absence of a particular protein, CTP. Then we tested the samples of the profuse fluid leakage collected temporally from one case of cochleostomy during cochlear implantation surgery. The leaked fluid at the beginning of the cochleostomy contained CTP, i.e. perilymph, and the CTP signal gradually disappeared as time elapsed. These results indicate that even in the malformed inner ear of the case presented here, with a defect in the bony barrier at the fundus, the perilymph and CSF fluid spaces function as two separate compartments. Cochleostomy might have suddenly decreased the perilymph pressure and allowed CSF influx into the inner ear, resulting in profuse fluid leakage (perilymph then CSF) from the cochleostomy site. This is the first report of a temporal analysis of the CTP protein in gusher fluid.

Material and methods

Analysis of CTP expression in CSF and perilymph: collection and processing of body fluid samples

For the assessment of the specificity of CTP expression in body fluids, we collected perilymph during stapedectomy for otosclerosis or during cochleostomy for cochlear implant surgery. CSF was purchased

from Biotech (Valley Center, CA, USA). The CSF was collected from consenting donors at an FDA-licensed and registered facility. No adverse events were observed during sample collection. The samples were centrifuged at 1250 *g* for 1 min and the supernatants were frozen and stored at -80°C until use. All patients gave their full informed consent and the study was approved by the ethics committee of Nippon Medical School.

Samples of perilymph or CSF (4 μg) were mixed with 5 μl of sample buffer (150 mM Tris-HCl (pH 6.8), 6% SDS, 30% glycerol, 0.3% bromophenol blue, 300 mM DTT) after normalization per average protein concentration (perilymph 200 mg/dl, CSF 40 mg/dl) [8], then analysed by Western blot.

Analysis of CTP expression in the profuse fluid leakage from cochleostomy

We performed cochlear implantation in a 50-year-old male patient who was diagnosed as having branchio-oto-renal (BOR) syndrome (without renal manifestation) based upon the diagnostic criteria [9]. The patient started to use a hearing aid at the age of 8 years, and his hearing had progressively deteriorated. At the time of his first visit to our office, he had profound bilateral sensorineural hearing loss, right preauricular sinus and a slightly malformed left auricle. The tympanic membranes showed no anatomical abnormalities. High resolution computed tomography (HRCT) of the temporal bones (Fig. 1) presented findings typically seen in BOR cases; hypoplastic apical turn of the cochlea, a funnel-shaped IAC. The fundus of the IAC was wide, the lamina cribrosa was hypoplastic and no bony structure was seen [10]. Echogram and HRCT revealed no renal malformation. An 18-year-old daughter of the patient had bilateral profound sensorineural hearing loss and a history of surgical removal of bilateral cervical fistulas. She had similar HRCT findings. The patient's father also had bilateral progressive hearing loss.

During cochlear implantation in this case, profuse fluid leakage from the cochleostomy (gusher) was observed. We collected the leakage samples in a temporal manner at the following time points: 0 (immediately after fenestration), 0.5, 2, 3, 6, 15, 25, 35 and 40 min. It is the policy of this department to wait until the flow of the leakage weakens and then seal the cochleostomy with fascia and fibrin glue to avoid lumbar drainage. As a control, middle ear lavage (MEL), i.e. lavaging the middle ear cavity three to four times with the same bolus of 0.3 ml of saline and recovering the fluid, was

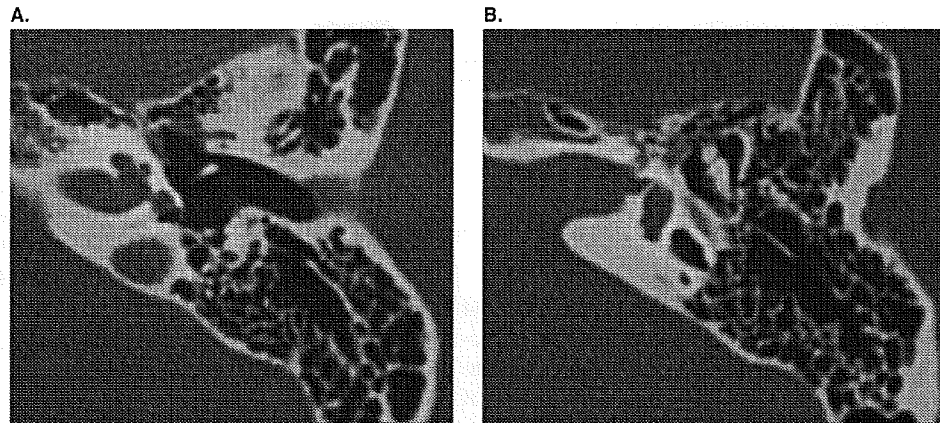


Figure 1. HRCT of the right ear in the axial plane. Both ears had findings typically seen in BOR cases: (a) the hypoplastic apical turn of the cochlea, the fundus of the internal auditory canal was wide, the lamina cribrosa was hypoplastic and no bony structure was seen; (b) the funnel-shaped internal auditory canal (IAC).

taken from the middle ear before cochleostomy. MEL (16 μ l) was mixed with 8 μ l of 3 \times concentrated sample buffer (150 mM Tris-HCl (pH 6.8), 6% SDS, 30% glycerol, 0.3% bromophenol blue, 300 mM DTT) for Western blot analysis.

Standardized CTP detection test by Western blot

Samples were tested by the standardized CTP detection test [6,7], with minor modifications. For Western blot analysis, the rabbit polyclonal anti-CTP antibody (formerly anti-LCCL-C Ab) was prepared as described previously. In brief, a 14-mer peptide (LSRWSASFTVTKGK) corresponding to residues 114–127 in the LCCL domain was used as an antigenic peptide to generate antibodies.

Samples were loaded onto 15% polyacrylamide gels and transferred onto PVDF membranes. Membranes were blocked overnight at 4°C in 5% skim milk and 0.2% polyoxyethylenesorbitan (Tween-20) dissolved in PBS (pH 7.5). Membranes were then incubated in PBS containing 1% skim milk and 0.1% Tween-20 for 2 h at room temperature with the primary antibody (anti-CTP antibody) diluted to 1:2000. After washing with 0.05% Tween-20 in PBS, membranes were incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-labelled goat anti-rabbit IgG antibody (Dako, Tokyo, Japan) diluted to 1:10 000 in the same buffer as used for the primary antibody reaction. They were washed again and the reaction was developed with a chemiluminescence reaction kit (ECL Advance, Amersham) and then analysed with an image analyser LAS-3000 (Fuji Film, Tokyo, Japan). Tests were performed and analysed

by well-trained personnel who did not have any information on the clinical background of the patients, to avoid any biased judgments. Test results were expressed qualitatively (positive or negative) by the presence or absence of the anti-CTP antibody reactive protein, with a molecular weight that exactly matched the molecular weight of native CTP (16 kDa) on Western blot.

rhCTP was used as a spiked standard on the Western blot. A putative CTP sequence predicted from our previous study, the 101–403 positions of the cDNA corresponding to amino acid residues 32–132, was amplified by PCR from a human expressed sequence tag clone, IMAGE ID 27789 (Kurabo, Japan). rhCTP was produced using pCR/T7/TOPO/TA expression kits (Invitrogen). To establish a clinical test for the diagnosis of perilymph leakage and avoid test variability, we standardized the CTP detection test using high (0.27 ng) and low (0.13 ng) spiked standard levels of rhCTP on Western blot. When the intensity of the band in the samples tested was below the high-level standard signal, the result was considered to be negative. The low spiked standard was used to estimate the protein transfer efficiency.

Diagnostic performance of the CTP detection test

To evaluate the specificity of the CTP detection test in the clinical setting, we previously reported the test results of samples from non-PLF cases. In that study, we defined non-PLF as those cases with otosclerosis (that had undergone stapedectomy), profound deafness (cochlear implant surgery), or conductive hearing loss (exploratory tympanotomy), without