

別域値の平均 (n=5) は、4k:42.2dB, 8k:28.8dB, 16k:16.6dBであった。現在は上記研究方法にある3種のモデルを作製中である。次年度は各タイムポイントでの聴力測定、形態評価、また外リンパ液採取による質量分析での検討を行う予定である。

D. E. 考察と結論

これまでの多数の研究報告から、モルモットにおいては蝸牛窓膜や鼓室階開放のみでは高度な蝸牛障害を来さないことが分かっている。一方 McCure & Lycettの報告によると、ネコでは蝸牛窓膜除去後に進行性のABR閾値の上昇を認めたとある。また東野らは、チンチラはモルモットに比べて、外リンパ嚢に伴う蝸牛の受傷性が高いと報告している。このように動物を用いた基礎研究では、その種差による蝸牛回転数や蝸牛孔の大きさが異なることを考慮する必要があると思われる。

また質量分析を用いたメタボロミクス解析の利点としては、

- 1) 対象とする物質数が少ない
- 2) 表現形に近い
- 3) 低分子である
- 4) 動物種特異性が存在しない
- 5) 代謝の変化そのものが疾患の本質

次年度は、上記研究計画に沿って検討を行う予定である。また質量分析によるCTPのメタボローム解析予定である。詳細は分担研究報告書(山下大介)に記載した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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):881-887, 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 Neurootol.* 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 Neurootol.* 15(3): 168-174, 2010.
- 5) Ikezono T, Shindo S, Sekiguchi S, Sekine K, Shiiba K, Matsuda H, Kusama K, Kataoka R, Pawankar R, Baba S, Yagi T, Okubo K. Cochlin-tomoprotein

- (CTP) detection test identifies traumatic perilymphatic fistula due to penetrating middle ear injury. *Acta Oto-Laryngologica*. In press.
- 6) 池園哲郎、清千鶴子、酒主敦子、小泉康雄、新藤晋、八木聰明 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.
- 7) 新藤 晋、池園 哲郎 耳鼻咽喉・頭頸部画像アトラス 耳・側頭骨 外リンパ瘻. *JOHNS* 26. p330-331, 2010.
- 8) Ogawa Y, Hayashi M, Otsuka K, Shimizu S, Inagaki T, Hagiwara A, Yamada T, Suzuki M: Subjective visual vertical in patients with ear surgery. *Acta Otolaryngol* 130:576-582, 2010
- 9) Konomi U, Suzuki M, Otsuka K, Shimizu A, Inagaki T, Hasegawa G, Shimizu S, Motohashi R : Morphological change of the cupula due to an ototoxic agent -A comparison with semicircular canal pathology-. *Acta Otolaryngol* 130:652-658, 2010
- 10) Iimura Y, Suzuki M, Otsuka K, Inagaki T, Konomi U, Shimizu S: Effect of cupula shrinkage on the semicircular canal activity. *Acta Otolaryngol* 130:1092-1096, 2010
- 11) 品田恵梨子, 鈴木 衛, 河口幸江, 西山信宏, 萩原 晃, 小川恭生, 河野淳: 半規管瘻孔症例の臨床的検討. *耳鼻と臨床* 56:1-7, 2010
- 12) Imai T., Horii A., Takeda N., Higashi-Shingai K., Inohara H.: A case of apogeotropic nystagmus with brainstem lesion: An implication for mechanism of central apogeotropic nystagmus. *Auris Nasus Larynx*, 37: 742-746, 2010.
- 13) Shojaku H., Watanabe Y., Takeda N., Ikezono T., Takahashi M., Kakigi A., Ito J., Doi K., Suzuki M., Takumida M., Takahashi K., Yamashita H., Koizuka I., Usami S., Aoki M, Naganuma H.: Clinical characteristics of delayed endolymphatic hydrops in Japan: A nationwide survey by the Peripheral Vestibular Disorder Research Committee of Japan. *Acta Otolaryngol.*, 130: 1135-1140, 2010.
- 14) Imai T., Takeda N., Ito M., Inohara H.: Natural course of positional vertigo in patients with apogeotropic variant of horizontal canal benign paroxysmal positional vertigo. *Auris Nasus Larunx*, 2010, in press.
- 15) Umehara H., Mizuguchi H., Mizukawa N., Matsumot M., Takeda N., Senba E., Fukui H.: Innervation of histamine neurons in the caudal part of the arcuate nucleus of hypothalamus and their activation in response to food deprivation under scheduled feeding. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*,

- 32: 733-736, 2010.
- 16) Umehara H., Mizuguchi H., Mizukawa N., Matsumot M., Takeda N., Senba E., Fukui H.: Deprivation of anticipated food under scheduled feeding induces c-Fos expression in the caudal part of the arcuate nucleus of hypothalamus through histamine H1-receptors in rats: potential involvement of E3 subgroup of histaminergic neurons in tuberomammillary nucleus. *Brain Res.*, 2010, in press.
- 17) 関根和教, 今井貴夫, 立花文寿, 松田和徳, 佐藤 豪, 武田憲昭: 咀嚼によりめまいが誘発されたCosten症候群症例. *Equilibrium Res.*, 69: 47-51, 2010.
- 18) 戸田直紀, 高橋美香, 東 貴弘, 岩崎英隆, 中村克彦, 武田憲昭: Hunt症候群における聴力障害の検討. *Facial N. Res. Jpn.*, 30: 75-77, 2010.
- 19) 高橋美香, 戸田直紀, 東 貴弘, 岩崎英隆, 中村克彦, 武田憲昭: 上前庭神経障害によるめまいと考えられた不全型Hunt症候群症例. *Facial N. Res. Jpn.*, 30: 179-180, 2010.
- 20) 武田憲昭: めまい疾患の診断と治療メニエール病. *クリニシャン*, 587: 248-253, 2010.
- 21) 関根和教, 武田憲昭: 内科医が留意すべき耳鼻咽喉科疾患の診断と治療, 予防: めまい. *Prog. Med.*, 30: 1026-1029, 2010.
- 22) 武田憲昭: お母さんへの回答マニュアル: めまいはどのようにおこるのでしょうか? *JOHNS* 26: 1294-1295, 2010.
- 23) 武田憲昭: Meniere病. 今日の治療指針. 第6版. 医学書院: 1842-1643, 2010.
- 24) Cui Y, Sun G, Yamashita D, Kanzaki S, Matsunaga T, Fujii M, Kaga K, Ogawa K. Noise-induced apoptosis in fibrocytes of the cochlear spiral limbus of mice. *European Arch. Oto.* 2011; (in press)
- 25) Wakabayashi K, Fujioka M, Kanzaki S, Okano HJ, Shibata S, Yamashita D, Masuda M, Mihara M, Ohsugi Y, Ogawa K, Okano H. Blockade of interleukin-6 signaling suppressed cochlear inflammatory response and improved hearing impairment in noise-damaged mice cochlea. *Neuroscience Res.* 2010;66(4):345-352
- 26) 福留真二, 東野哲也: 前庭・蝸牛症状を呈したアブミ骨ならびに代用アブミ骨前庭陥入例の画像所見と治療経験. *Equilibrium Res* 69(4) : 218-224 2010
2. 学会発表
- 1) 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
- 2) 池園哲郎: 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 外リンパ瘻 ~その確定診断がもたらす新しい難聴・めまい診療~ 第111回日

- 本耳鼻咽喉科学会総会 2010.5
- 3) 池園哲郎: シンポジウム めまいの新しい疾患概念 外リンパ瘻の確定診断法とその臨床像 第69回日本めまい平衡医学会学会 2010.11
- 4) 関根久遠、池園哲郎、木村百合香、片岡遼平、椎葉 恭子、新藤晋、喜多村健、八木聰明、大久保公裕: 高齢者剖検例の内耳における microRNA の発現. 第20回日本耳科学会. 2010.10.
- 5) 松田帆、池園哲郎、新藤晋、関根久遠、椎葉恭子、八木聰明、大久保公裕: 人工内耳埋込術を施行した好酸球性中耳炎の1症例. 第20回日本耳科学会. 2010.10.
- 6) 新藤 晋、池園哲郎、岩崎聡、稲井俊太、八木聰明、大久保公裕: いわゆる“特発性外リンパ瘻”症例 15 例の検討. 第20回日本耳科学会. 2010.10.
- 7) 日高浩史、宮崎真紀子、菊地俊晶、川瀬哲明、小林俊光. 迷路気腫 (pneumolabyrinth) を伴った外傷性外リンパ瘻3症例の検討. 第20回日本耳科学会 (松山、2010.10/7-9)
- 8) Hidaka H, Miyazaki M, Kikuchi T, Kawase T, Kobatashi T. Assessment of Pneumolabyrinth after middle ear trauma: our experience and meta-analysis. 34th ARO Abstract 79, 2011 February.
- 9) Ogawa Y, Otsuka K, Inagaki T, Kondo T, Shimizu S, Suzuki M: Subjective visual vertical in vestibular neuritis and sudden deafness. 26th Barany Society Meeting 2010.8, Reykjavik
- 10) Konomi U, Suzuki M, Otsuka K, Inagaki T, Iimura Y, Kondo T, Ogawa Y: Morphological change of the cupula and its effect on the ampullary nerve potentials after mechanical rupturing of the membranous labyrinth. 6th International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Disorders 2010.11, Kyoto
- 11) 近藤貴仁、鈴木 衛、許斐氏元、大塚康司、稲垣太郎、清水重敬、小川恭生: 膜迷路障害モデルにおけるクプラの形態変化. 第69回日本めまい平衡医学会 2010.11, 京都
- 12) Sekine K., Sato G., Matuda K., Imai T., Takeda N. : Efficacy of Postural Restriction in Treated Patient with Benign Paroxysmal Positional Vertigo. The Sixth International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Disorders, 2010, 11, Kyoto.
- 13) 関根和教、今井貴夫、佐藤 豪、松田和徳、武田憲昭: 方向交代性頭位眼振の3次元主軸解析. 第111回日本耳鼻咽喉科学会, 2010, 5, 仙台.
- 14) 戸田直紀、高橋美香、東 貴弘、岩崎英隆、中村克彦、武田憲昭: Hunt症候群における聴力障害の検討. 第33回日本顔面神経研究会, 2010, 5, 福岡.
- 15) 高橋美香、戸田直紀、東 貴弘、岩崎

- 英隆, 中村克彦, 武田憲昭: 上前庭神経障害によるめまいと考えられたZoster Herpete症例. 第33回日本顔面神経研究会, 2010, 5, 福岡.
- 16) 神村盛一郎, 関根和教, 高橋美香, 合田正和, 武田憲昭: エアーカーリック検査の刺激条件の検討. 第36回中国四国地方部会連合学会, 2010, 6, 岡山.
- 17) 千田いづみ, 阿部晃治, 陣内自治, 宇高二良, 田村公一, 武田憲昭: 両側感音難聴と両側顔面神経麻痺を合併したMPO-ANCS陽性例. 第20回日本耳科学会, 2010, 10, 松山.
- 18) 関根和教, 佐藤 豪, 松田和徳, 武田憲昭: 小型無線モーションレコーダを用いた動的体平衡機能検査. 第69回日本めまい平衡医学会, 2010, 11, 京都.
- 19) 佐藤 豪, 松田和徳, 関根和教, 武田憲昭: 良性発作性頭位めまい症と睡眠習慣. 第69回日本めまい平衡医学会, 2010, 11, 京都.
- 20) 今井貴夫, 増村千佐子, 宇野敦彦, 西池季隆, 武田憲昭, 堀井 新, 北原 紘, 真貝佳代子, 猪原秀典: Epley 法で治療した後に前半規管型良性発作性頭位めまい症に変化したと思われる眼振の責任半規管の同定. 第69回日本めまい平衡医学会, 2010, 11, 京都.
- 21) 松岡百世, 高橋美香, 東 貴弘, 中村克彦, 関根和教, 佐藤 豪, 松田和徳, 武田憲昭: 上前庭神経障害によるめまいと考えられたZoster Sine Herpete 症例. 第69回日本めまい平衡医学会, 2010, 11, 京都.
- 22) 神村盛一郎, 千田いづみ, 阿部晃治, 田村公一, 宇高二良, 陣内自治, 武田憲昭: 両側感音難聴と顔面神経麻痺をきたしたMPO-ANCA陽性例. 第36回四国四県地方部会連合学会, 2010, 12, 香川.
- 23) Yamashita D. Watada Y. Kanzaki S. Hasegawa S. Nibu K. Ogawa K. Detection System for Transplanted Bone Marrow Stem Cells in Inner Ear by SPIO ARO (第33回) H22. 2. 8
- 24) 山下大介, 松永達雄, 藤田岳, 長谷川信吾, 丹生健一: 音響外傷性難聴に対するSA4503の内耳防御機能 日本耳鼻咽喉科学会総会(111回) H22. 5. 7
- 25) 山下大介, 和多田有紀子, 神崎晶, 小川郁: 内耳におけるOgg1ノックアウトマウスの機能解析 日本耳科学会 (20回) H22. 10. 7
- 26) 清水謙祐, 鳥原康治, 東野哲也, 中山明峰, 五島史行, 福留真二: 心因性めまい(精神疾患合併例)の検討-第2報-. 第69回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 2010年11月18-19日
- 27) 佐藤伸矢, 福留真二, 清水謙祐, 東野哲也: 上鼓室天盖骨欠損を合併した上半規管裂隙症候群例. 第69回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 2010年11月18-19日

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
 出願番号：2003243985(2003年6月26日)
 特許番号：2003243985(2009年7月3日)
5. 【外国 米国】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：US 7,863,005 B2(2011年1月4日)
 公開番号：US 2006/246516 A1(2006年11月2日)
 出願番号：10/517,778(2003年6月26日)
 ※A1：出願公開特許を意味します。
 ※B2：登録特許を意味します。
6. 【外国 欧州】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：EP 1533319 B1(2011年1月12日)
 公開番号：EP 1533319 A1(2005年5月25日)
 出願番号：03736265.4(2003年6月26日)
 ※A1：出願公開特許
 ※B1：登録特許
7. 発明の名称：眼振誘発装置
 出願番号：特願2005-179515
 出願日：2005年6月20日
 公開番号：特開2006-346346
 公開日：2006年12月28日
 特許番号：特許第4625973号
 登録日：2010年11月19日
 発明者：加藤政利、新藤晋、野原秀明、池園哲郎、八木聰明
 特許権者：学校法人日本医科大学
 特許満了予定日：2025年6月20日

II. 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」

1. 外リンパ瘻確実例の検討
2. 検査精度の評価と精度向上への取り組み

研究代表者 池園哲郎 日本医科大学准教授
研究協力者 新藤 晋 日本医科大学
松田 帆 海老名総合病院
関根久遠 日本医科大学
椎葉恭子 日本医科大学
坂本 圭 日本医科大学

研究要旨

1. 外リンパ瘻確実例の検討

21-22年度の研究で、各外リンパ瘻疾患カテゴリーごとの特徴が判明してきた。本邦で最も関心が高い特発性外リンパ瘻（鼻かみ型）について、その臨床像が明らかとなりつつある。厚生省特定疾患急性高度難聴調査研究班平成2年度外リンパ瘻診断基準により特発性外リンパ瘻疑いとされた212例を検討したところ、CTP (cochlin tomoprotein) 陽性は17例8%であった。このうち日本医科大学の症例を詳細に検討した。内耳窓閉鎖術は高度難聴症例、発症から時間が経過した症例に対しても有効であり、聴力改善効果が認められた。外リンパ瘻では内耳窓閉鎖術を積極的に考慮するべきであることがわかった。

外傷性外リンパ瘻においては直達外力症例のみにCTP陽性例が認められたことや、CTで迷路気腫、アブミ骨陥入などの所見を認めたり、後上象現に穿孔を有する症例にCTP陽性率が高い傾向が認められた。アブミ骨に外力が直接加わると、外リンパ瘻（CTP陽性）となりやすいことが客観的に示された。また「骨導が正常」「眼振がない」等、明らかな内耳障害を呈さない外リンパ瘻の存在は以前から指摘されていたが、本研究によりその存在が再確認された。一方で、受傷から長期間外リンパ漏出が続く外リンパ瘻の存在も明らかになった。

2. 検査精度の評価と精度向上への取り組み

CTP検出法を基準化して、検出限界をヒトリコンビナントCTP蛋白0.27ngと設定した。そ

の検査法を用いて、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測定した。

国際基準 (STARD statement : STAndards for the Reporting of Diagnostic Accuracy studies) では、検査の精度、診断精度、検査の欠点を明らかにすることが求められている。そこで我々も、CTP検出検査の方法、精度管理について検討を加えた。その結果、CTP検出法は、ほぼ臨床実用化レベルに達しており、現状の検査は臨床検査として十分な精度管理がなされていると考えられた。

内耳疾患のほとんどは特発性であり、内耳組織生検が禁忌であるため原因診断が確定されるケースは限られている。患者さんは、まず、正確な原因診断を望んでおり、その診断に基づく診療を望んでいる。CTP検出法は、ほぼ臨床実用化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の判断に寄与することが期待されている。

1. 外リンパ瘻確実例の検討

A. 研究目的

<特発性外リンパ瘻>

特発性外リンパ瘻の病歴、症状、検査所見は突発性難聴やメニエール病と類似する点が多く、確定診断が難しいが、客観的診断マーカーとして CTP (cochlin tomoprotein) を使用することにより外リンパ瘻の診断が可能となった。CTPが陽性であった15症例の臨床像を検討し、特発性外リンパ瘻の臨床的特徴を解析した。

<外傷性外リンパ瘻>

特に外傷性外リンパ瘻では、中耳腔により多くの組織液が滲みだしてくるため、組織液と外リンパの鑑別が困難とされてきた。従来、外リンパ瘻は漏出を視認することで確定診断するとされてきたことが問題であった。今回は外リンパの漏出診断にCTP法を用いることで、客観的に確定診断をすることで外傷性外リンパ瘻の臨床的特徴を解析した。

B. 研究方法

<特発性外リンパ瘻>

特発性外リンパ瘻が疑われてCTP検査を施行した日本医科大学症例180例200検体のうち、CTPが陽性であった15症例 (8%) の臨床像 (症状、眼振、聴力、誘因の有無) を検討した。

<外傷性外リンパ瘻>

多施設検討で、外傷性PLFが疑われた症例にCTP法を行ない、「CTP法の陽性率」、「外傷性PLFの臨床的特徴」等につき検討を行なった。今回は「受傷機転が明確」・「陽性率が高い」等の理由から経外耳道的中耳外傷の患者を対象とした。

(倫理面への配慮)

サンプルの採取、解析にあたり日本医科大学倫理委員会の承認を得た上で行ない、各分担施設でも倫理審査を行った。また中耳洗浄液の採取の際には、患者に十分に説明を行い、同意を得た上で施行した。

表 1

年齢/性別	前医診断	誘因	圧外傷	流水様耳鳴	聴力タイプ	
34男	SD	ダイビング	未施行	-	突発	症例 1
24男	SD	鼻かみ	未施行	-	突発	症例 2
60男	SD	自転車で登坂	-	-	進行	症例 3
61男	SD	飛行機搭乗	未施行	-	進行	症例 4
62女	SD	窓の壊れた車に乗車	-	-	進行	症例 5
63女	SD	咳嗽	-	+	変動	症例 6
48男	MD	飛行機搭乗	-	-	変動	症例 7
50男	SD	トイレでの力み	-	+	変動・進行	症例 8
38女	SD	ウォータースキー	-	-	再発性	症例 9
45男	眩暈	サーフィン	-	-	高音急壁	症例 10
46男	SD	無し	+	+	突発	症例 11
76男	SD	無し	-	-	突発	症例 12
46男	MD	無し	+	-	変動	症例 13
53女	SD	無し	-	+	変動	症例 14
68女	眩暈	無し	-	-	低音障害型	症例 15

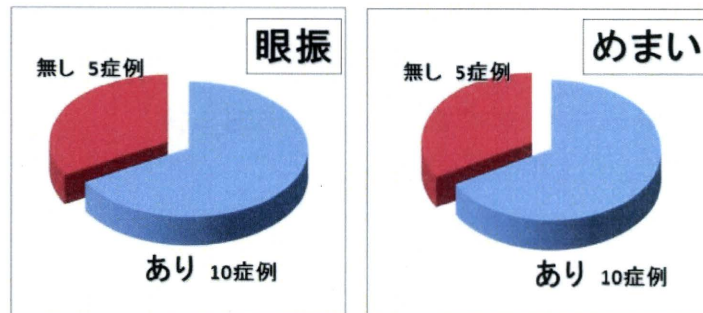


図 1

C. 研究結果

<特発性外リンパ瘻>

15症例中10例に圧外傷の既往を認めたとが3症例で圧外傷の既往が見逃されていた。2例で圧迫眼振、4例で流水様耳鳴を認めた。

(表1) 前医で突発性難聴と診断されていた症例は11例で、メニエール病と診断されていた症例、めまい症と診断されていた症例が2例ずつだった。(表1)

眼振、めまい共に10例、66%の症例で認めた。(図1) 難聴を主訴とする症例の聴力型

は、突発性が4例、変動進行する難聴を認めた症例が8例、再発性が1例だった。(図2)

手術は平均発症30日目に施行されており、平均27dBの聴力改善を認めた。術前の聴力を突発性難聴の重症度分類のgrade1、2とgrade3、4に分け、術後聴力改善を治癒、著明回復と軽度回復、不変に分けたところ、Grade3、4でも9例中5例で著明回復を認めた。(表2)

発症から手術までの日数を、14日目までに手術した症例と15日目以降に手術をした

症例に分けた。発症14日目までに手術を施行した症例は4例中3例で著明回復を認めた。

(表3) 発症15日目以降で手術を施行した症例でも2例は治癒もしくは著明回復を認めた。難聴を主訴とする13症例において、聴力を水平型、聾、聾型、低音障害型、高音漸傾型に分けた。水平型は6例中3例で改善を認め、術前聾でも3例中2例で著明回復を認めた。(表4)

<外傷性外リンパ瘻>

中耳外傷で外リンパ瘻を疑ってCTPを行なった症例18例のうち、9例にあてる50%がCTP要請であった(表5)。これは特発性外リンパ瘻を疑ってCTP検査を行なった患者の陽性率(10%未満)に比べ高い傾向が示された。また外力別にみると、直達外力14例の陽性例は9例(64%)であったのに対し、介達外力4例では陽性例は1例も存在しなかった(表6)。またCTP陽性率が高くなる所見・症状は「CTで迷路気腫やアブミ骨の陥入像を認める」、「後下象現に鼓膜穿孔を認める」であった(表7)。また受傷から検体採取までの期間が2週間以上経過しているにも関わらずCTP陽性となった症例が3例認められた(表8)。

D. 考察

<特発性外リンパ瘻>

圧外傷の既往は66%の症例で認めており、現在の診断基準通り外リンパ瘻を疑う症例として圧外傷の既往は重要である。しかし3症例で圧外傷の既往が見逃されており、詳細な問診が不可欠である。

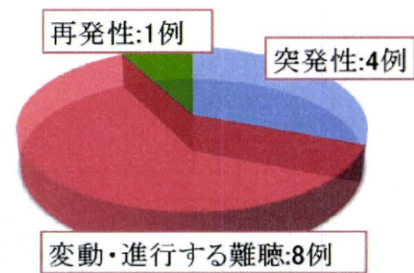


図 2

表 2

	治癒・著明回復	軽度回復・不変
grade1,2	0	4
grade3,4	5	4

表 3

発症から手術までの日数	治癒・著明回復	軽度回復・不変
1-14日	3	1
15日以後	2	7

表 4

	治癒・著明回復	回復・不変
水平型	3	3
聾	2	1
聾型	0	1
低音障害型	0	2
高音漸傾型	0	1

眼振、めまいは共に66%の症例で認めており、突発性難聴433症例中では、眼振を認めた症例が42%、めまいを訴えた症例が27%であり、外リンパ瘻の方がより多く前庭障害を認めた。

変動進行する難聴を認めた症例が8例と多く認められたため、突発性難聴としては

非典型的な、変動しながら悪化する難聴の
場合は特に外リンパ瘻を疑う必要がある。

術前の聴力が、突発性難聴の重症度分類
でGrade3、4でも9例中5例で著明回復を認め
ており、高度難聴症例に対しても手術による
聴力の改善を期待できる。

発症15日目以降で手術を施行した症例で
も、2例は治癒もしくは著明回復を認めてお
り、発症早期では無くても、手術をする意

義があると思われる。

<外傷性外リンパ瘻>

直達外力症例のみにCTP陽性例が認めら
れたことや、CTで迷路気腫、アブミ骨陥入
どの所見を認めたり、後上象現に穿孔を有
する症例にCTP陽性率が高い傾向が認めら
れたことから、アブミ骨に外力が直接加わ
ると、CTP陽性となりやすいことが示された。

表 5

特発性と中耳外傷症例の陽性率比較	
・ 特発性 P L F を疑った 88 症例の C T P 陽性率	15/180例⇒8%
・ 中耳外傷で P L F を疑った 18 症例の C T P 陽性率	9/18例⇒50%
中耳外傷の C T P 陽性率は特発性と比較して高い	

表 6

受傷機転による陽性率の比較	
直達外力（14症例）の陽性率	9/14例 64%
介達外力（4症例）の陽性率（全例平手打ち）	0/4例 0%
介達外力で C T P 検査を行った理由：	
骨導閾値上昇	2例
めまいを自覚	1例
耳鳴が持続	1例

表 7

症状・所見から見たCTP陽性例
《直達外力14症例から検討》

症状・所見	左記項目を満たす 症例数	うちCTP陽性例 (陽性予測値%)
CTで迷路気腫・アブミ陥入	6例	5例(83%)
後上象限に鼓膜穿孔	9例	7例(78%)
めまいを自覚	10例	7例(70%)
骨導閾値上昇	9例	6例(67%)
眼振あり	11例	7例(64%)

(陽性の平均は64%)

表 8

受傷から検体採取までの期間が2週間以上で、 CTP陽性となった症例 ⇒3例		
《検体採取の理由》		
・めまい持続	2例	(受傷30日後、9ヶ月後)
・耳鳴持続	1例	(受傷21日後)
症状が持続⇒持続的or間歇的漏出している可能性		

また「骨導が正常」「眼振がない」等、明らかな内耳障害を呈さない外リンパ瘻の存在は以前から指摘されていたが、本研究によりその存在が再確認された。一方で、受傷から長期間外リンパ漏出が続く外リンパ瘻の存在も明らかになった。

E. 結論

従来通り圧外傷の既往は外リンパ瘻を疑う病歴として重要である。変動進行性の難聴は特徴的な聴力検査所見と考えられる。内耳窓閉鎖術は高度難聴症例、発症から時間が経過した症例に対しても聴力改善効果があると考えられる。

外リンパ瘻の臨床像は従来から言われている通り多様であり（図3，4）、症例に応じた治療法は未だ確立されていない。今後、CTP法を用いて外リンパ瘻の臨床像を明らかにしていくことで、症例に応じた治療方

針の策定を進めていくことが望ましいと考えられた。

今後さらに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確立に役立てていきたい。

症例1;経過観察のみで治癒

症例: 9歳 男児
綿棒で耳かきをしていて受傷
直後は痛みのみ、
翌朝に激しいめまい(数時間)

鼓膜穿孔は後下象限
当科受診時はめまい治癒
骨導閾値上昇なし
わずかな麻痺性眼振のみ
⇒CTP陽性!



手術・投薬せず、経過観察で鼓膜穿孔閉鎖。眼振消失。
2年以上経過した現在も症状なし

図3

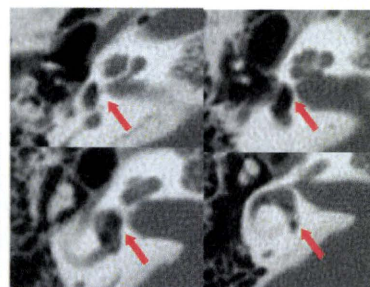
症例2;受傷後9ヶ月間めまいが続き、 手術でめまいが治癒

症例: 69歳 男性 (群馬大の症例)
主訴: 左難聴、めまい

症例の術前側頭骨CT

H18年1月、耳かきで受傷。
直後から左難聴、めまい。
めまいを反復し、同年9月初診
CTで迷路気腫。CTP検査⇒陽性

手術所見:
アブミ骨脱臼、外リンパ流出あり
キヌタ骨は正常
アブミ骨除去しテフロンピストンで
アブミ骨手術に準じた伝音再建



めまい治癒! (聴力は術後遅発性に悪化)

図4

2. 検査精度の評価と精度向上への取り組み

A. 研究目的

臨床検査には厳密な品質管理が求められる。さらにその検査を行うにあたり、国際基準 (STARD statement : STAndards for the Reporting of Diagnostic Accuracy studies) では、検査の精度、診断精度、検査の欠点を明らかにすることが求められている。

B. 研究方法

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として使用。(図1)
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。(図2)
3. 臨床経過を知らない第3者的立場の担

当者が結果判定。

上記精度管理により達成された「検査精度」は、recombinant human CTPの検出下限は0.27ng/lane、ヒト外リンパの検出下限は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。

今年度改訂した、CTP検出法の測定手順書<Standard operating procedure (SOP)>を別に示す(別掲資料1)。

この方法を用いてCTP検出検査の方法、品質管理について検討を加えた。

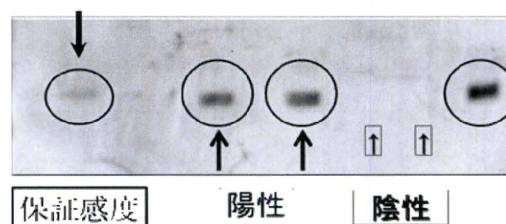


図1. 標準蛋白(リコンビナント蛋白)を毎回泳動し保証感度とする

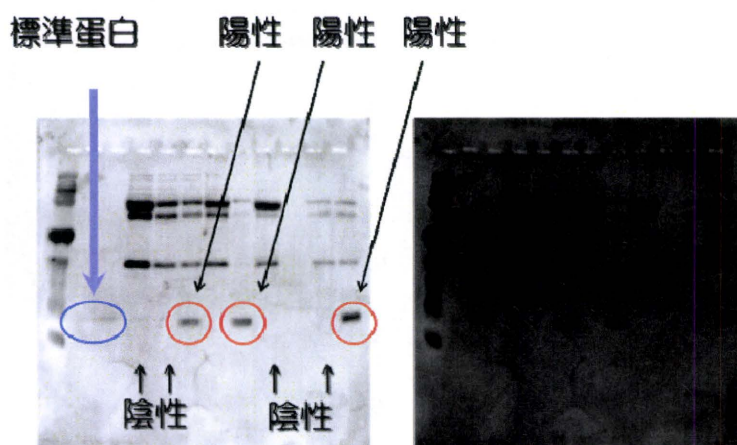


図2. 標準蛋白(リコンビナント蛋白)保証感度、陰性サンプル、陽性サンプルを示す。この例のような検査結果ではSN比が判定に適した左図を採用する。

C. 研究結果

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）。

③ヒト外リンパの平均検出下限は0.161 u1 / lane（ウェスタンブロットの1レーンあたりの泳動量）であった。（図3） 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）。

④ヒトサンプルを用いたときに良く検出される非特異バンドの検討を行った。（図4）

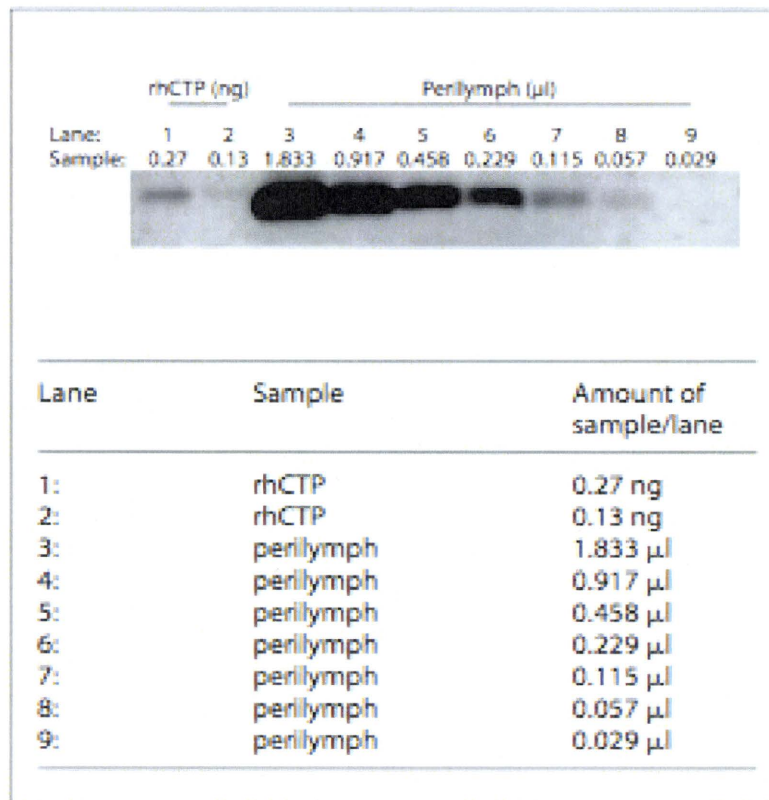


図3. ヒト外リンパの希釈系列の測定

⑤CTP検出法の欠点

- ・偽陽性：通常の偽陽性率は1.8%、炎症や感染を伴う中耳の中耳洗浄液では6.5%
- ・蛋白濃度：溶血、感染のあるサンプルは蛋白濃度が高すぎるため、ウェスタンブロット法に適していない。このため希釈して泳動する必要があり感度が低下する恐れがある。
- ・検査時間：検査の実施には通常2日間を要し、サンプル数、検査の頻度により結果が出るまで1〜3週間を要する。さらに精度管理上問題があれば再検査が必要となり、結果が出るまでそれ以上の時間を要する。

D. 考察

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。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。

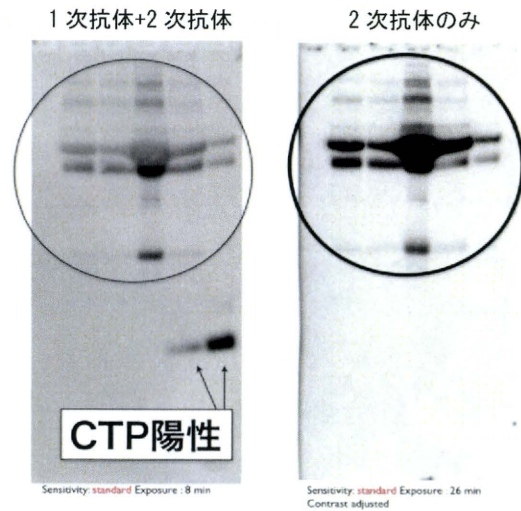


図4. 2次抗体による非特異反応の検討
非特異バンドは主に抗IgG抗体（2次抗体）に対する反応であった

E. 結論

現状の検査は臨床検査として十分な精度管理がなされている。内耳疾患のほとんどは特異性であり、内耳組織生検が禁忌であるため原因診断が確定されるケースは限られている。患者さんは、まず、正確な原因診断を望んでおり、その診断に基づく診療を望んでいる。CTP検出法は、ほぼ臨床実用化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ことが期待されている。

Cochlin-tomoprotein(CTP) 検出法 Westernblot 法 測定手順
Standard operating procedure (SOP)

1 測定原理

本測定法は、Westernblotに基づく測定方法である。すなわち、中耳洗浄液中に存在するタンパク質をSDS-PAGEで分離した後、PVDF膜上に転写する。続いて抗ヒトcochlinウサギ抗体を反応させた後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識抗ウサギIgGヤギ抗体を反応させる。HRPにより基質が酸化されるとアクリジニウムエステルが産生され、さらにアルカリ条件下で過酸化水素と反応すると化学発光を生じる。この発光をLAS-3000にて撮影することにより、分子量約15kDaのCTPの有無を見ることができる。

2. 検体

- (1) 検体の種類： 中耳洗浄液（中耳に0.3mlの生理食塩水を加えて洗浄・回収後、血球を除去した上清）
- (2) 検体量： 最適：100 ml、最小：16 ml
- (3) 検査結果に及ぼす物理的性質： 中耳炎などによる膿や滲出液が混入しているサンプルは、蛋白質濃度が高いために注意が必要。280nmの吸光度を測定し、適宜希釈してから用いる。
- (4) 輸送及び保存上の条件： 検体搬入時から検査開始まで凍結保存とする。
- (5) 薬剤の影響： 現在のところ測定値に影響をおよぼす薬剤に関する情報は得られていない。

3. キャリブレーション

- (1) スタンダード： 予め正しい判定結果が得られている検体（ヒト外リンパもしくは陽性中耳洗浄液）を利用し、判定基準とする。
- (2) コントロール： 濃度既知の組換えcochlin蛋白を利用し、その感度を見て各測定の精度管理を行う。

4. 試薬（詳細略）

- 4.1 抗体・標準品
- 4.2 購入試薬
- 4.3 調製試薬

5. 機器及び器具

100℃インキュベーター、電気泳動装置 (ATTO, AE-6531P, パジェラン)、プロットイング装置 (ATTO, AE-6688, ホライズプロット)、パワーサプライ (Bio-rad, MODEL200/2.0)、冷却CCDカメラ (FUJIFILM, LAS-3000, ルミノイメージアナライザー) など

6. 測定手順

1. サンプル準備
2. 変性処理
3. 電気泳動
4. プロットイング
5. ブロッキング
6. 抗体反応準備
7. 一次反応
8. 二次反応
9. 発色反応
10. 検出

7. 判定

ポジティブコントロールの約16kDaのバンドと比較し、シグナルの有無を判定する。

再検基準

- ①High controlのバンドが検出できなかった場合 (感度不足)。
- ②バックグラウンドが高く、パターンが分かり難い場合。
- ③泳動像が乱れている場合。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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):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 Neurootol.* 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 Neurootol.* 15(3): 168-174, 2010.
- Ikezono T, Shindo S, Sekiguchi S, Sekine K, Shiiba K, Matsuda H, Kusama K, Kataoka R, Pawankar R, Baba S, Yagi T, Okubo K. Cochlin-tomoprotein (CTP) detection test identifies traumatic perilymphatic fistula due to penetrating middle ear injury. *Acta Oto-Laryngologica.* In press.
- 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.
- 新藤 晋、池園 哲郎 耳鼻咽喉・頭頸部画像アトラス 耳・側頭骨 外リンパ瘻. *JOHNS* 26. p330-331, 2010.

2. 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
- 池園哲郎: 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 外リンパ瘻 ~その確定診断がもたらす新しい難聴・めまい診療~ 第111回日本耳鼻咽喉科学会総会 2010.5
- 池園哲郎: シンポジウム めまいの新しい疾患概念 外リンパ瘻の確定診断法とその臨床像 第69回日本めまい平衡医学会学会 2010.11
- 関根久遠、池園哲郎、木村百合香、片岡遼平、椎葉 恭子、新藤晋、喜多村健、八木聡明、大久保公裕: 高齢者剖検例の内耳における microRNA の発現. 第20回日本耳科学会. 2010.10.
- 松田帆、池園哲郎、新藤晋、関根久遠、椎葉恭子、八木聡明、大久保公裕: 人工