

別表1 流れ図

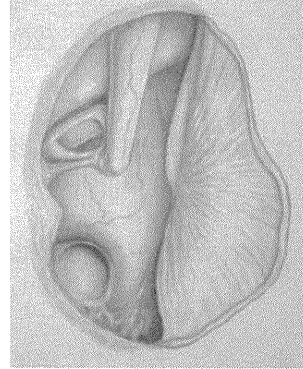
国際基準に準じたCTP検出検査の評価
(STARD statement: STAndards for the Reporting of Diagnostic Accuracy studies)

■ CTP検出法の測定手順書SOP<Standard operating procedure>を公開

■ 具体的診断方法→
0.3cc生理食塩水を注入
洗浄液を回収
→ウェスタンブロット

■ 検査精度: 3μlの外リンパを検出
(漏出として目に見えれば陽性となる)
ヒト外リンパの平均検出下限は0.161 ul/ml
ヒトリコンビナントではCTP蛋白0.27ng

■ 診断精度: 感度100%、特異度は83%



外リンパ瘻確定診断法 CTP 検出検査の確立

1. 確実例 下記項目のうちいずれかを満たすもの

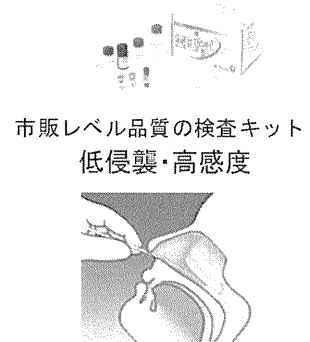
- (1) 顕微鏡、内視鏡などにより中耳と内耳の間に瘻孔を確認できたもの。瘻孔は蝸牛窓、前庭窓、骨折部、microfissure、奇形、炎症などによる骨迷路破壊部などに生じる。
- (2) 中耳からCochlin-tomoprotein (CTP)が検出できたもの。

◆ 真珠腫による瘻孔診断にも応用

◆ 今まで外リンパ瘻の客観的な確定診断法が無かったことから、国内外でその実体が十分に認知されていない → 診療ガイドライン作成の前段階としてFAQを作成

◆ 平成23年度、高感度・迅速エライザキットが完成
感度数十倍 機械化により正確で早い測定

→ 感度の向上で上咽頭スワブからの診断に期待
カットオフ値設定でヒューマンバイアスの軽減



将来的に診療ガイドライン作成
適切な診療で医療費削減へ貢献

別表 2

外リンパ瘻FAQ Frequently Asked Questions

★一般

Q. 外リンパ瘻にはどのようなものがありますか？

Ans. 以下の4つのカテゴリーに大別されます。

- A 外傷、中耳・内耳疾患(真珠腫、腫瘍、奇形、半規管裂隙など)、中耳・内耳手術など。
- B 外因性の圧外傷、すなわち、爆風、ダイビング、飛行機搭乗など。(antecedent events of external origin)
- C 内因性の誘因、すなわち、はなかみ、くしゃみ、重量物運搬、カみなど。(antecedent events of internal origin)
- D 明らかな原因、誘因がないもの。(idiopathic)

文献)

Labyrinthine fistulae: pathobiology and management. Minor LB. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2003 Oct;11(5):340-6. Review

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

Q. 外リンパ瘻診断基準は特発性外リンパ瘻を対象にしていますか？

Ans.

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) に、「外リンパ瘻の診断基準平成2年度(案)」が掲載されています。ここには、「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」と記載されています。すなわち本邦で有名な診断基準は、“特発性外リンパ瘻”を対象としています。今年度予定されている改定では、“特発性外リンパ瘻”のみではなく、全ての外リンパ瘻を対象とする予定です。

Q. 鼻かみを契機に発症したのに特発性外リンパ瘻という診断名は不適切ではないですか？

Ans.

「軽微な圧外傷(はなかみ、ダイビング、飛行機搭乗、りきみなど)で発症したという明らかなエピソードがあるのに、これを特発性と呼ぶのは不適切。」という指摘をよく耳にします。1993年にMeyerhoffは論文で同様の指摘をしており、その議論は今でも続いています。そこで我々は外リンパ瘻診断基準の付記でこの点を下記の通り明記しました。

文献)

Spontaneous perilymphatic fistula: myth or fact. Meyerhoff WL. Am J Otol. 1993 Sep;14(5):478-81.

(付記)外リンパ瘻の原因・誘因を表記する用語について国内外で多少の混乱があった。その経緯を概説し、外リンパ瘻診断の一助としたい。

外リンパ瘻の原因・誘因はおおむね上記4項目に大別される。

1980-90年代に海外で報告されたSpontaneous Perilymphatic Fistulaは、おおむね上記のB、C、Dを対象としていた。一方、本来の言葉の定義から、Spontaneous 症例はCとDの2項目のみとするか、もしくはDのみを対象とすべきとの報告がある*。すなわち、少なくとも Spontaneous 症例から Bは除くべきであるとの意見である。平成2年に作成した本邦の外リンパ瘻診断基準案が対象としたのは、sPLFと同様にB、C、Dであった。国内の論文・学会報告では、これらの症例を「特発性外リンパ瘻」と表記して報告されることが多い。これらの報告では、必ずしも特発性の本来の定義であるDのみを対象としているとは限らず、B、Cが含まれている。近年、確定診断法がより明確になったため、本診断基準ではA、B、C、D全てを対象とした。

Q. 北米では特発性外リンパ瘻という疾患が批判されていると聞きます。日本とは考え方が違うのですか、それとも人種差でしょうか。

Ans.

1980年代には、特発性を含めた“外リンパ瘻”が大変注目を集めました。しかし、特発性外リンパ瘻の確定診断法が開発されず、もっぱら、外リンパ漏出・瘻孔を視認する方法に頼っていたため、これが主観的と批判されました。1990年代初頭には外リンパ瘻はmyth(神話、作り話)であると言われ、ついには耳鼻咽喉科の癌とまで呼ばれました。これは主に特発性外リンパ瘻に対する論争であったにもかかわらず、その他の外傷性、奇形に伴うものなどのカテゴリーにおいてもこの用語はつかわれぬ傾向にあります。最近はこれを見直す動きも出てきています。

一方国内においては、外リンパ瘻の存在は否定されることなく、優れた研究が行われ、主に突発性難聴の鑑別診断として常に念頭におかれる疾患となっています。

文献)

The myth of spontaneous perilymph fistula. Shea JJ. Otolaryngol Head Neck Surg. 1992 Nov;107(5):613-6.

Myths in neurotology. Schuknecht HF. Am J Otol. 1992;13:124-126.

Spontaneous perilymphatic fistula: myth or fact. Meyerhoff WL. Am J Otol. 1993;14:478-81.

Perilymph fistula: concept, diagnosis and management. Nomura Y. Acta Otolaryngol Suppl. 1994;514:52-4.

Q. 外リンパ瘻診断基準は今後改訂されるのでしょうか？

Ans. 外リンパ瘻の診断基準は昭和58年（1983年）に厚生省特定研究急性高度難聴班によって作成されましたが、来年度の改訂版において、「GTP(Cochlin-tomoprotein)検査陽性」が含まれる予定です。（別紙外リンパ瘻診断基準案参照）

Q. 外リンパ瘻の診断基準の項目には「内耳窓閉鎖術によって聴力改善が得られる」という記載がありませんが、これを取り入れては如何でしょうか。

Ans.

このような診断を、治療的診断と言います。診断的治療とは症状の原因が明らかになっていない場合、特定の原因を想定して、治療を行い、予想通りの治療結果が得られたら、想定した疾患が正しいと考える、というものです。日常臨床ではしばしば行われていますが、“診断基準”には通常そぐわない考え方です。

★検査・症候・診断

Q. 外リンパ瘻の生理学的検査・症候の診断精度は？ 特異度・感度は？

Ans. 外リンパ瘻に関連した生理学的検査・症候としては下記が挙げられています。その診断精度があきらかになっているものはまだありません。

- ・ 座位、臥位での聴力変動検査
- ・ 瘻孔眼振 瘻孔症状
- ・ ポップ音 流水耳鳴
- ・ その他

Q. 瘻孔眼振の検査方法や結果の表記のしかたは標準化されていますか？

Ans.

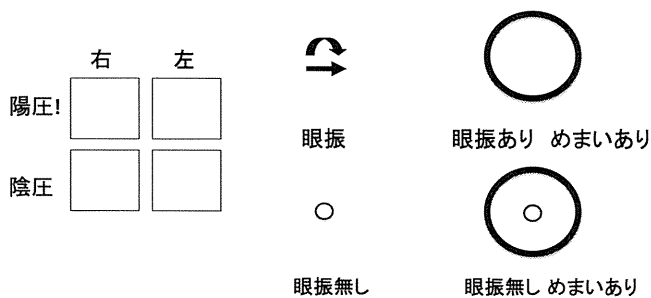
外耳道に陽圧、陰圧をかける検査ですが、その検査適応、手技、結果の表記は標準化されていません。

施設によって、ポリッツェル球、加圧球付き耳鏡（ジーゲル耳鏡、ブリューニング耳鏡）、手動式ティンパノメトリー等が使われています。

「加圧球付き耳鏡」を用いた場合、鼓膜の状態を確認しながら加圧出来るのでより安全です。既製品では加圧球が小さく、十分加圧できないため、その容量を大きくした製品もあり、研究班ではこの機器をもちいた評価を行う予定になっております。通常ゴム球 23cc のところ特注ゴム球は 70cc です。

また手動式ティンパノメトリーを用いれば圧を定量的に変化させることができます。北米ではかつて外耳道加圧による重心動揺検査 (a fistula test with dynamic posturography) が行われていました。

表記の方法ですが、下記の表記法が案として提案されております。



文献)

Black FO, Lilly DJ, Peterka RJ, Shupert C, Hemenway WG, Pesznecker SC. The dynamic posturographic pressure test for the presumptive diagnosis of perilymph fistulas. *Neurol Clin.* 1990 May;8(2):361-74.

Q. 外リンパ漏出の生化学的検査にはどのようなものが知られていますか？

Ans.

- ・ Beta 2 transferrin
- ・ Beta-trace protein (prostaglandin D synthase)
- ・ CTP
- ・ その他

<解説> 過去に外リンパ漏出のマーカーとして検討された beta-2 transferrin, Beta-trace protein (prostaglandin D synthase), 髄腔内蛍光色素投与などはすべて脳脊髄液漏出のマーカーである。脳脊髄液に比較的特異的に検出される蛋白である beta-2 transferrin は外リンパ漏出のマーカーとして流用され多くの論文が報告された[Bassiouny et al., 1992; Buchman et al., 1999; Weber et al., 1994]。しかし、外リンパが漏出していたとしても、これをサンプルとして採取する過程で希釈されること、さらに beta-2 transferrin を少なからず含む血清が混入することで、外リンパ漏出診断はさらに難しくなり、transferrin バリエーションを診断マーカーとして利用するこ

とは否定されている[Levenson et al., 1996; Rauch, 2000]。

Beta-trace protein (prostaglandin D synthase) も脳脊髄液の漏出診断マーカーであるが[Bachmann et al., 2002]、内耳液にはさらに高濃度の Beta-trace protein が含まれているという報告もあり、外リンパ漏出診断のマーカーとなり得る。しかしながら外リンパ中の Beta-trace protein 濃度が知られていないことから適度なカットオフ値が決められないこと、脳脊髄液漏出と外リンパ漏出の区別がつかないという欠点がある[Olaf et al., 2005a, 2005b; Risch et al., 2005]。蛍光色素を髄注して外リンパ漏出のマーカーに使用とする試みも報告されたが、蛍光色素が中耳全体に検出されるなど、診断法としては確立しなかった。[Poe et al., 1993; Rauch, 2000; Gehrking et al., 2002]。

CTP は外リンパのみに検出されており、外リンパ瘻診断マーカーとなり得る物質である。

Q. CTP検出法の診断精度は？ 特異度・感度は？

Ans. ウェスタンブロット法を用いたCTP蛋白検出法の検出限界を泳動 1 wellあたり hrCTP蛋白0.27 (ng/well) と設定し、これをspiked standardとすることで精度が管理されています。この標準化した検査法を用いて、蛋白安定性、ヒト外リンパ検出感度、臨床検体の検出感度が報告されています（数値は現在改訂中）。

Q. ウェスタンブロット法を用いたCTP検出法の欠点はどのようなところですか？

Ans.

1. 中耳洗浄液には蛋白量が極めて少ないサンプルと、溶血や膿の混入により蛋白濃度が高いサンプルがあります。ウェスタンブロット法を用いた検出法では、蛋白濃度が高いサンプルでは擬陽性が出やすい傾向にあることが知られています。炎症や感染の無い中耳から採取された中耳洗浄液55検体を用いた場合の偽陽性率は1.8%ですが、炎症や感染を伴う中耳の中耳洗浄液では6.5%となります。
2. 現行の検査法ではある一定の蛋白濃度を越えたサンプルについては希釈して検査します。高濃度サンプルでは泳動の乱れや隣のレーンへのはみ出し、ブロッティング効率の低下などが生じるからです。希釈されたサンプル中にCTPが含まれていても、検出感度以下となってしまう場合があります。
3. 2次抗体に抗免疫グロブリンH鎖抗体を使用しているため、サンプル中に含まれる免疫グロブリンH鎖は陽性バンドとして検出されてしまい、これを消すことは不可能です。幸いなことにCTPは16kDaと低分子のため、免疫グロブリンに対する反応が偽陽性の原因となることはありません。

免疫グロブリンのサイズ Sigma社HP 引用

Property	IgG				IgA		IgM	IgD	IgE
H chain class (heavy chain)	γ				α		μ	δ	ε
H Chain Subclasses	γ1	γ2	γ3	γ4	α1	α2	None	None	None
H chain MW	50 kDa	50 kDa	60 kDa	50 kDa	55 kDa	55 kDa	70 kDa	62 kDa	70 kDa
L chain MW * (light chain κ & λ)	23 kDa	23 kDa	23 kDa	23 kDa	23 kDa	23 kDa	23 kDa	23 kDa	23 kDa
Total MW	150 kDa	150 kDa	170 kDa	150 kDa	160 kDa (serum) 600 kDa (secretory)	160 kDa (serum) 600 kDa (secretory)	970 kDa	180 kDa	190 kDa
Ext. Coeff. 0.1%@280nm	1.4	1.4	1.4	1.4	1.32	1.32	1.18	1.7	1.53
Complement fixation	weak	weak	strong	no	no	no	strong	no	no
Fc receptor binding	strong	weak	strong	weak	yes	yes	yes	no	yes
Mast cell / basophil degranulation	no	no	no	no	no	no	no	no	yes
Placental transfer	strong	weak	strong	strong	no	no	no	no	no

* Light chains are present on all immunoglobulin classes. In humans, κ chains are found 67% of the time, and λ chains are found 33% of the time. For ratios in other species (see Table, Immunoglobulin Light Chain Ratios)

Q. 特発性外リンパ腫疑い例におけるCTP検査の陽性率はどれくらいですか？

Ans. 厚生省特定研究急性高度難聴班の診断基準に基づいて特発性外リンパ腫疑いとされた症例で、CTP検査を施行した症例における陽性率は7%程度です。ですから、100例検査しても93例は陰性となる計算です。

Q. 中耳外傷性外リンパ腫疑い例（耳かき外傷、平手打ち外傷）におけるCTP検査の陽性率は？

Ans. 52%です。今まで検査した症例の中では、直達外力（耳かきや釘）のみ陽性となり、介達外力（平手打ち）では全例陰性です。

Q. CTP検査が陰性だった場合は、外リンパ腫ではないのですか？

Ans. 検査結果が陽性の場合には、CTP検査上からは外リンパ腫と診断できます。一方、結果が陰性だった場合下記の可能性が考えられます。

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

本検査を「参考所見」と考えて頂き、臨床所見からご診断するようお願いいたします。

Q. CTP検出法の迅速検査が開発中と聞きましたがどんなものですか？

Ans. 現在エライザ法の開発が進んでいます。この方法のメリットは下記で、上記のウェスタンブロット法による検査のデメリットはほぼ全て解決されると考えています。

- ・ 検査サンプルを検査機関（埼玉医大）まで送付する手間がない
- ・ カットオフ値を定めるので、判定にヒューマンバイアスが入り込みにくい
- ・ 検査結果を術者施設で直接確認できる
- ・ 検査結果が出るまで今までのように数週間も待たなくて良い
- ・ 感度、特異度ともに向上する
- ・ 蛋白濃度の高いサンプルでも比較検査しやすい。

平成23年度に評価したエライザの性能を列記します（診断精度の第2次検討）。

① 平成23年度、エライザ法による高感度CTP検出検査の開発に成功した。検査感度は従来の約数十倍であり、希釈試験および添加回収試験（Human CTP標準品を血液や尿に添加し測定性能を評価）ともに良好な結果が得られた。本研究では平成24年度からこの高感度エライザ法を用いてその検査方法の評価を行い、平成25年度から実用化し実際の臨床サンプルの検討を行う。中耳洗浄液のみならず上咽頭スワブの検査も行うことでより低侵襲な検査が可能となる可能性がある。

② エライザとウェスタンの結果を総合的に検証した。H21.7.24から平成23年度まで3年間に全部で552検体を検査した。そのうち、エライザでも再検査できた検体417検体について検査性能、診断性能を検討した。417検体のうち、ウェスタンブロットの判定基準に従い判定した結果、判定不能検体（スメアー状のバンド、spiked standard や外リンパ陽性コントロールとの泳動度の違いから近傍バンドと判定されたもの）が28検体7%あった。一方、結果を判定した389検体のうち、サンプルの詳細が判明している国内の検体287検体を対象にウェスタンブロットとエライザの検査結果一致率を算出した。その結果、陽性一致率86%、陰性一致率が91%であった。

正常中耳33検体（人工内耳手術で内耳の開窓前28、伝音難聴の試験的鼓室開放術5）、外科的外リンパ瘻確実例（人工内耳電極挿入後）32検体を対象としてエライザ法を用いたCTP検出検査の外リンパ瘻診断能を算出したところ、感度が特異度97.0%、感度87.5%であった。同じ症例をウェスタンブロットで検査した場合の感度は100.0%、特異度は83.3%となる。

Q. CTP検出法の迅速検査はどの施設でも施行できますか？

Ans. 平成24年度には検査を開始する予定です。開始当初は厚労省研究班を中心としたコンソーシアムの中で行われます。そこで、検査の精度を確認してから一般に公開される予定です。

Q. CTP検出法で陽性であった症例の特徴を教えてください。

Ans.

1. 特発性外リンパ瘻（いわゆる鼻かみ型）では感音難聴が数日かけて生じる、徐々に進行する、聴力が変動する、変動しながら悪化する、一度治った難聴が再発する、など

の特徴が7割の症例にみられました。残りの3割は突発性難聴とは区別がつかない経過でした。眼振・めまいは2/3の症例にみられ、突発性難聴の過去の臨床統計より頻度が高いようです。また、末梢性眼振の方向が麻痺性・刺激性と頻繁に変動する特徴もあります。流水様耳鳴は25%、圧迫眼振は15%の症例にみられるという暫定的なデータがあります。これらの所見は外リンパ瘻診断における感度が高いとは言えないかもしれませんが、現在多施設検討を進めております。

2. 外傷性外リンパ瘻 頭部打撲やアブミ骨直達外力で発症すると言われております。特に耳かき習慣が根付いている本邦においてその発生頻度が高く、海外からの報告は稀です。消防庁救急隊が扱う年間70万件の救急事故のうち、平均で77例が耳かき外傷という統計があります。CTP検査を行った症例からわかったことは、直達外力(耳かきなど)では当然ながらCTP陽性となった症例もありその頻度は、約50%です。一方介達外力(平手打ち)ではCTP陽性となった症例はありませんでした。直達外力症例では後上象限に鼓膜穿孔がある、難聴がありさらにめまいがあり回転性である、という2点が外リンパ瘻を積極的に疑う所見です。CTで迷路気腫(内耳に気泡)があれば外リンパ瘻と診断できます。手術を行うかどうかは、外リンパが漏れ続けているかどうかのポイントです。漏れ続けている場合には、髄膜炎、内耳炎、失聴などのリスクがあります。CTによる迷路気腫の診断は難しく、骨迷路と外リンパの境界線ではアーチファクトによりCTが欠損値となりやすいことが知られています。気腫の診断のために体位を変換してCTを撮影する方法もあります。

3. 炎症性外リンパ瘻(中耳炎) 真珠腫にともなう半規管瘻孔、蝸牛瘻孔の進達度診断に用いることが可能です。例えば、術後の骨導悪化要因の解析に用いることができます。また、中鼓室真珠腫においては蝸牛瘻孔からの漏出の有無が判定できます。

4. 奇形に伴う外リンパ瘻 海外では小児進行性難聴の原因として外リンパ瘻が注目されています。

文献)

Perilymph fistulas in infants and children. Supance JS, Bluestone CD. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1983;91:663-671.

5. 耳科手術 下記のような用途が考えられます。

- ・耳小骨の操作により外リンパ瘻をきたしたかどうかの判定
- ・術中副損傷による内耳瘻孔の判定
- ・内耳奇形での人工内耳電極挿入の指標

6. その他 通気 耳処置など

★治療

Q. 外リンパ瘻の保存治療について教えてください。

Ans.

原因が明確ですぐに診断がついた場合にはベッド上安静となります。体位は30-40度の頭部挙上で安静期間5日間となります。5日後に症状が落ち着いたならば、さらに10日間の運動制限と睡眠時の頭部挙上を行います。努責予防のために軟便剤を使用します。(Scott-Brown's Otolaryngologyより)

内耳障害に対し突発性難聴に準じて、ステロイド、ビタミンB12、ATP剤が使用されることが多いがエビデンスは確立していない。ベッド上安静でも症状が悪化するようであれば、出来るだけ早く手術治療を行うことが望ましい。症状が不変の場合には、6日目以降に手術を検討することとなります。

Q. 外リンパ瘻の手術治療について教えてください。

Ans. 種々の術式が考えられます。

- ・ 内耳窓閉鎖術
- ・ 骨迷路骨折線の修復
- ・ アブミ骨外傷による前庭窓破綻の修復ならびに伝音再建
- ・ 半規管デヒーセンスのプラジング、リサーフェーシング

Q. 特発性外リンパ瘻に対する内耳窓閉鎖術について、手術適応、手術時期、手術方法、治療効果について教えてください。

Ans.

手術適応、手術時期

特発性外リンパ瘻診断基準に基づいて、外リンパ瘻が疑われる症例に手術が行われています。CTP検査は現在、術後に確定診断を下すために用いられています。検査の迅速性などの問題から、術前には行っていません。従来は、発症後2週間以内に手術しないと治療効果が低いとされてきましたが、最近、発症後2ヶ月経過してから手術して著明な改善効果が得られた症例も報告されています。

手術方法

漏出の確認が出来たかどうかに関わらず、前庭窓、蝸牛窓を筋膜や結合組織で閉鎖します。前庭窓前方にあるmicrofissure (fistula ante fenestram) にも筋膜を置く場合があります。この手術は安全な手術ですが、頻度は低いものの味覚障害や聴力の悪化がみられることがあります。

治療効果

難聴を主訴とするCTP陽性13例の報告では、聴力改善が平均27dB、著明回復・治癒が4割にみられました。めまいは全例数日程度で改善しています。しかしながら、術後聴力

が悪化する場合もあり、これは手術治療による効果が出ず、内耳障害の進行を止められなかったと考えられます。

Q. 内耳窓閉鎖術について、治療効果があるとすればそれはなぜですか。

Ans.

外リンパ瘻においては、外リンパ圧低下による相対的内リンパ水腫となっている、膜迷路が虚脱している、などの病態が考えられ、手術による瘻孔閉鎖がこれを是正していると考えられます。有毛細胞などの障害がすでに進行している場合には手術によって改善することは考えづらいです。

★基礎・解剖

Q. ヒトで特発性外リンパ瘻が生じやすい部位を教えてください。

Ans.

前庭窓、蝸牛窓、microfissureなどです。

Q. 外リンパ瘻動物モデルの所見について教えてください。

Ans. 外リンパ腔と脳脊髄液腔の疎通性などに、ヒトと動物では異なる点も多く、また動物においても種差が大きいとおもわれます。この点について十分に留意しながら実験結果の臨床的意義について考えなければなりません。正円窓の開窓のみでは、難聴がほぼ改善する、外リンパ瘻の吸引や前庭窓へのair注入では難聴モデルが作成できる、などが知られています。

その他

Q. 突難、メニエール病など特発性疾患に占める外リンパ瘻の割合はどの程度ですか？

Q. 特発性外リンパ瘻の自然治癒率について教えてください。

Q. 内耳と脳脊髄液腔との交通に関しては現在どのように考えられていますか？

key word : 内耳道底の疎通性、蝸牛小管、ガッシャー

Q. 外リンパの産生と内リンパの産生については現在どのように考えられていますか？

別表3 Cochlin-tomoprotein(CTP) 検出法 Westernblot 法 測定手順と品質管理

A. Standard operating procedure (SOP) 測定手順

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化物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°Cインキュベーター、電気泳動装置（ATTO, AE-6531P, パジェラン）、ブロッティング装置（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. ブロッティング
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

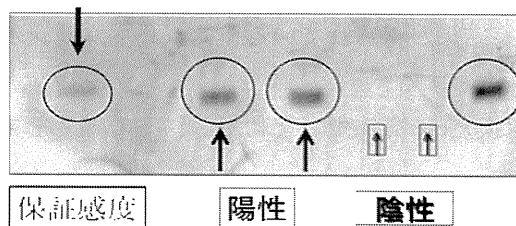
- ① High control のバンドが検出できなかった場合（感度不足）。
- ② バックグラウンドが高く、パターンが分かり難い場合。
- ③ 泳動像が乱れている場合。

B. 検査の品質管理 検査精度の評価と精度向上への取り組み

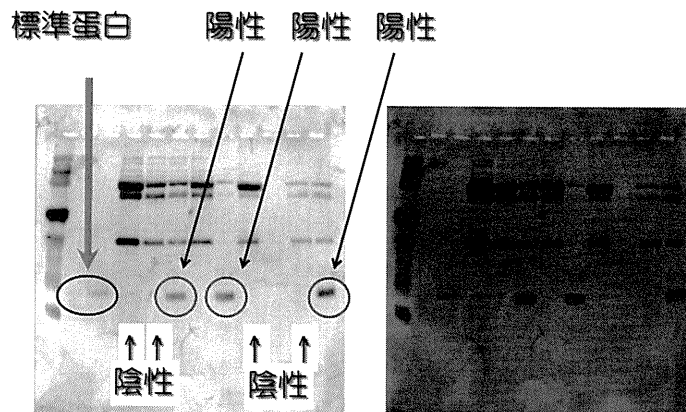
臨床検査には厳密な品質管理が求められる。さらにその検査を行うにあたり、国際基準(STARD statement: STANDards for the Reporting of Diagnostic Accuracy studies)では、検査の精度、診断精度、検査の欠点を明らかにすることが求められている。以下に我々が行っている具体的な品質管理と注意点を記載した。

1. 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 GTP 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三者的立場の担当者が結果判定。



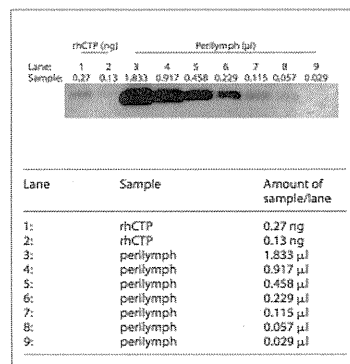
(図1) 標準蛋白(リコンビナント蛋白)を毎回泳動し保証感度とする



(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。

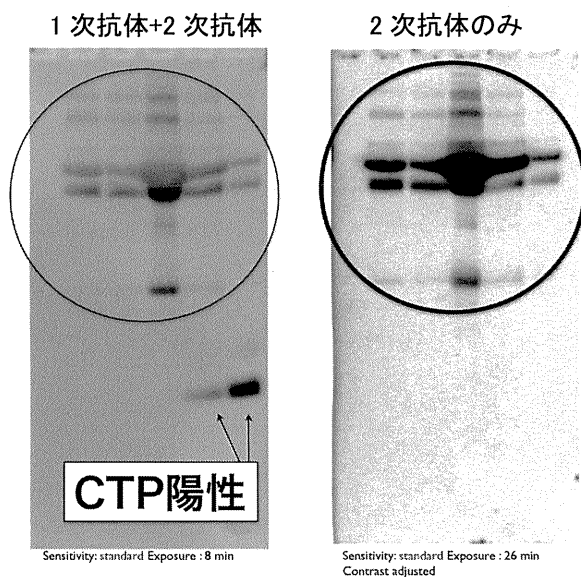
2. 上記方法で行ったウェスタンブロット検査の感度と非特異反応について

1.) 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。



(図 3) ヒト外リンパの希釈系列の測定

2.) ヒトサンプルを用いたときに検出される非特異バンドの検討を行った。その結果、非特異バンドは主に抗 IgG 抗体 (2 次抗体) に対する反応と考えられた (図 4)。



(図 4) 2 次抗体による非特異反応の検討

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に関する研究

研究分担者 宇佐美真一 信州大学耳鼻咽喉科
共同研究者 鈴木 宏明 信州大学耳鼻咽喉科

研究要旨

2006年10月から2010年5月までに信州大学医学部附属病院耳鼻咽喉科にて手術加療（経外耳道的内視鏡下内耳瘻孔閉鎖術）を施行した外リンパ瘻疑い12例の検討を行なった。初診時、11症例（91%）で70dB以上の高度難聴が認められた。手術加療により8症例（66%）が治癒あるいは著明回復し良好な治療成績が得られた。良好な治療成績が得られた8例に関して、突発性難聴で治癒あるいは著明回復した群と比較した結果、外リンパ瘻疑い群ではめまいの頻度が多く（50%）、一次治療（ステロイド全身投与）に対して反応しない（0%）という点で明らかな差を認めた。手術加療で高い改善率が認められたこと、内視鏡下手術であれば低侵襲であることから、内視鏡下手術は外リンパ瘻が疑われる症例に対して積極的に提示できる選択肢であると考えられた。

A. 研究目的

外リンパ瘻は外リンパ液の漏出に伴う内耳障害により、蝸牛症状、前庭症状を来すと考えられている。突発性難聴、メニエール病と臨床症状が類似し鑑別が困難な症例も多いことから積極的な手術加療に躊躇する症例も存在する。一方、外リンパ瘻は適切に診断し手術を施行すれば難聴、めまいといった障害の治癒を期待できる内耳疾患である。

我々は臨床経過から外リンパ瘻が疑われる症例に対し、経外耳道内視鏡下瘻孔閉鎖術を積極的に施行しているが、今回当科において12例について臨床像、手術所見、手術成績について詳細な検討を行った。

B. 研究方法

2006年10月から2011年5月に当科にて外リンパ瘻が疑われ手術加療を施行した12例（経外耳道10例、経耳後部2例）を対象に、臨床像（発症契機、耳鳴、めまい、初診時聴力像）、手術所見、術後経過について検討した。

C. 研究結果

聴発症契機としては介達外力9症例、直達外力（外傷）2症例、その他が1症例であった。症状としては耳鳴が7症例（58%）、めまいが7症例（58%）に認められた。めまいを自覚した症例のうち6症例において眼振が認められた。瘻孔眼振は1例に認められた（表1）。聴力は11症例（91%）で70dB以上の高度難聴が

認められ、手術までの経過中に6症例 (50%) において難聴の増悪が認められた (図1)。

表 1

年齢/性別	40/M	12/M	61/F	19/M	37/M	80/F	61/F	69/F	45/M	38/M	13/F	85/M
発症様式	ダイビング	高所ヘドドライブ	トイレでいきむ	新幹線トンネル	水上スキー転倒	鼻かみ	大声を出した	高所ヘドドライブ	鼻かみ	トイレでいきむ	外傷性(耳かき)	鼻かみ
初診時 (dB)	Lt. 105	Lt. 105	Rt. 105	Lt. 98	Rt. 90	Lt. 77	Rt. 77	Lt. 76	Rt. 70	Rt. 70	Rt. 60	Rt. 46
耳鳴	あり(キーン)	なし	なし	なし	なし	あり(シーン)	あり	なし	あり(ジー)	なし	あり	あり
めまい	あり	あり	あり	あり	なし	なし	あり	なし	なし	なし	あり	あり
眼振	左向き水平回転	左向き水平回転	右向き回転性	なし	なし	なし	右向き水平性	なし	圧迫眼振	なし	右向き水平性	なし
聴力変化	増悪(前医)	なし	なし	増悪	なし	なし	増悪	増悪	なし	増悪	なし	増悪(前医)
術前治療	1クール	1クール	なし	近医	近医	1クール	なし	1クール	近医	近医	なし	1クール
時間経過	19日	16日	4日	13日	7日	8日	5日	10日	6日	8日	2日	18日
術中所見		なし				なし	なし		なし			なし

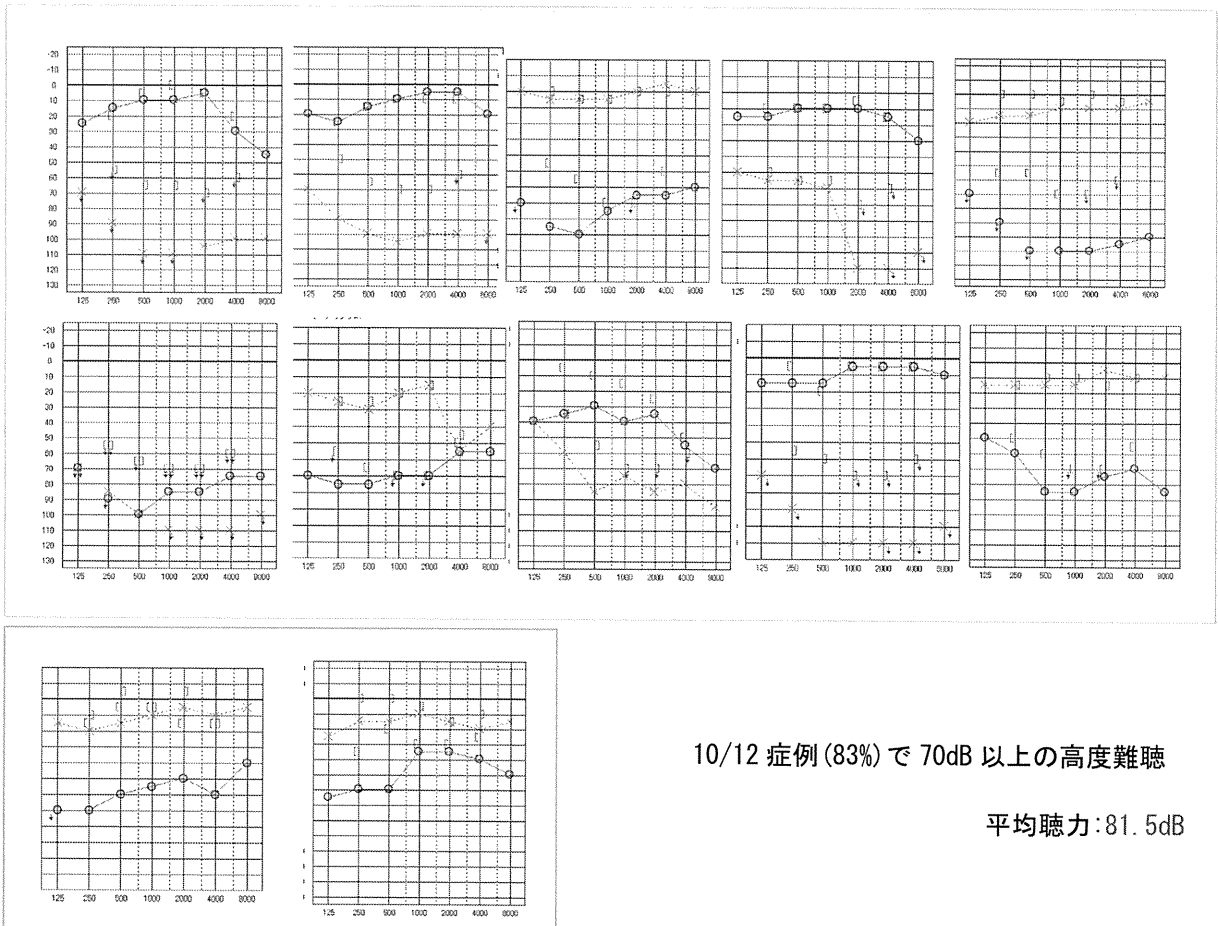


図 1 初診時聴力像

術中所見では正常と異なる所見が7症例に認められた (図2)。12例すべてで中耳洗浄液を採取しCTP検出を試みたところ、外傷

による外リンパ瘻例でCTP陽性として検出された。

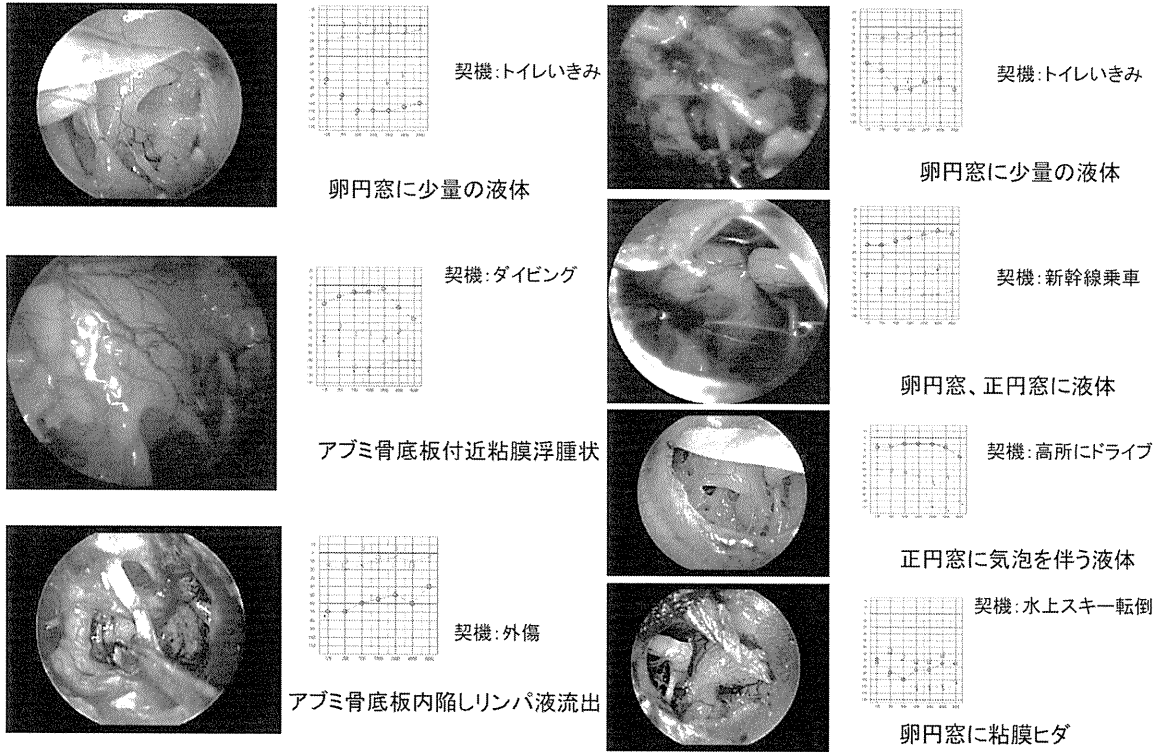


図2 術中所見
手術方法 経外耳道:10例 耳後部:2例

表2

年齢/性別	37/M	45/M	38/M	13/F	65/M	40/M	19/M	80/F	61/F	69/F	12/M	61/F
発症様式	水上スキー 転倒	鼻かみ	トイレでいきみ	外傷性 (耳かき)	鼻かみ	ダイビング	新幹線 トンネル	鼻かみ	大声を出した	高所へドライブ	高所へドライブ	トイレでいきみ
術前 (dB)	Rt 90	Rt 70	Rt 70	Rt 60	Rt 46	Lt 105	Lt 98	Lt 77	Rt 77	Lt 76	Lt 105	Rt 105
耳鳴	なし	あり(ジー)	なし	あり	あり	あり(キーン)	なし	あり(シーン)	あり	なし	なし	なし
めまい	なし	なし	なし	あり	あり	あり	あり	なし	あり	なし	あり	あり
眼振	なし	圧迫眼振	なし	右向き水平性	なし	左向き水平回旋	なし	なし	右向き水平性	なし	左向き水平回 旋	右向き回旋性
聴力変化	なし	なし	増悪	なし	増悪(前医)	増悪(前医)	増悪	なし	増悪	増悪	なし	なし
術前治療	近医	近医	近医	なし	1クール	1クール	近医	1クール	なし	1クール	1クール	なし
手術までの 時間経過	7日	6日	8日	2日	18日	19日	13日	8日	5日	10日	16日	4日
術中所見	粘膜ヒダ	なし	浸出液	流出液	なし	浮腫状	浸出液	なし	なし	浸出液	なし	浸出液
術後治療	1クール	1クール	1クール	1クール	なし	2クール	1クール	1クール	2クール	1クール	1クール	1クール
術後聴力変化 までの期間	1日	4日	4日	2日	2日	4M	4日	6日	6日	なし	なし	なし
術後 (dB)	17	30	16	19	18	49	28	44	65	54	105	105
固定までの期間	1M	1M	1M	3M	1M	8M	2M	3M	3M	なし	なし	なし

術後経過の聴力の変化については術後1日〜4ヶ月と幅を認めたが4ヶ月の症例を除くと平均4.3日であった。治癒・著名回復症例は8症例（66%）であり良好な成績と考えられた（表2）。

治癒例と回復／不変例を比較した結果、手術までの期間において両者に差は認められなかったが、初診時平均聴力において治癒例では初診時聴力が回復・不変例に比して良く、めまいの合併が少ない傾向が認められた（図3）。

また外リンパ瘻を疑い手術を行った結果治癒あるいは著明回復した例を、当科での突発性難聴症例における治癒あるいは著明回復群と比較したところ初診時聴力、めま

いの有無、一次治療に対する反応において差が認められた（図4）。

これはおそらく両群の病態が異なることを示している興味ある所見と思われた。経外耳道による内視鏡下瘻孔閉鎖術を施行した12例において、全例において明らかなリンパ液の漏出は認められなかったが、術中内視鏡所見で5例で正常中耳と異なる所見が認められた。術後に合併症（聴力の増悪、顔面神経麻痺、感染、鼓膜穿孔残存など）を生じた症例はなかった。

術後聴力成績では8症例（66%）が治癒、あるいは著明回復し、10症例（83%）回復以上であった。めまい症状は全例で改善した（表3）。

年齢/性別	37/M	45/M	38/M	13/F	65/M	年齢/性別	61/F	69/F	12/M	61/F
発症様式	水上スキー転倒	鼻かみ	トイレで思む	外傷性(耳かき)	鼻かみ	発症様式	大声を出した	高所へドライブ	高所へドライブ	大便秘け
耳鳴	なし	あり(ジーン)	なし	あり	あり	耳鳴	あり	なし	なし	なし
めまい	なし	なし	なし	あり	あり	めまい	あり	なし	あり	あり
眼振	なし	圧迫眼振	なし	右向き水平性	なし	眼振	右向き水平性	なし	左向き水平回旋	右向き回旋性
聴力変化	なし	なし	増悪	なし	増悪(前医)	聴力変化	増悪	増悪	なし	なし
術前治療	近医	近医	近医	なし	1クール	術前治療	なし	1クール	1クール	なし
手術までの時間経過	7日	6日	8日	2日	18日	手術までの時間経過	5日	10日	18日	4日
術中所見	粘膜炎	なし	浸出液	流出液	なし	術中所見	なし	浸出液	なし	浸出液
術後治療	1クール	1クール	1クール	なし	なし	術後治療	2クール	1クール	1クール	1クール
回復までの期間	1日	4日	4日	2日	2日	回復までの期間	6日	6日	なし	なし
術後 (dB)	17	30	16	19	18	術後 (dB)	65	54	105	105
固定までの期間	1M	1M	1M	3M	3M	固定までの期間	3M	3M	なし	なし
CTP	-	-	-	+	-	CTP	-	-	-	-

初診時平均聴力

67.2dB

90.75dB

めまいの有無

2.5 症例:40%

3/4 症例:75%

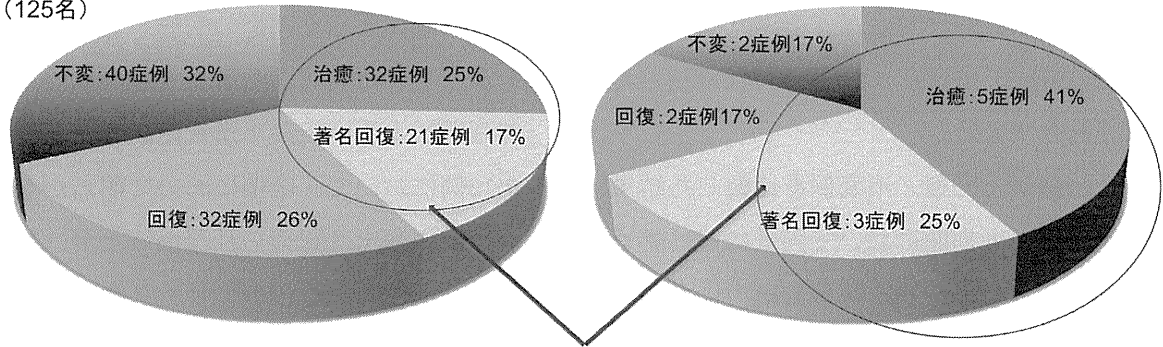
手術までの時間経過

8.2 日

8.75 日

図3 治療症例と回復、不変症例との比較

2005年～2010年までに当科にて副腎皮質ステロイド剤全身点滴治療を第1選択として入院加療を行なった患者(125名)



初診時聴力	67.5dB	77dB
治療開始までの期間	3日	4.4日
めまいの有無	あり 9症例(16%)	あり 4症例(50%)
一次治療に対する対応	あり 43症例(81%)	あり 0症例(0%)

図4 突発性難聴との比較

表3

年齢/性別	37/M	45/M	65/M	40/N	52/M	19/M	40/M	80/F	61/F	69/F	12/M	61/F
発症様式	水上スキー転倒	鼻かみ	鼻かみ	鼻かみ	鼻かみ	新幹線トンネル	ダイビング	鼻かみ	大声を出した	高所へドライブ	高所へドライブ	大便いきみ
術前 (dB)	Rt 90	Rt 70	Rt 46	Rt 83	Rt 89	Lt 98	Lt 105	Lt 77	Rt 77	Lt 76	Lt 105	Rt 105
耳鳴	なし	あり(ジー)	あり	あり	あり	なし	あり(キーン)	あり(キーン)	あり	なし	なし	なし
めまい	なし	なし	あり	なし	あり	あり	あり	なし	あり	なし	あり	あり
眼振	なし	圧迫眼振	なし	なし	なし	なし	左向き水平回旋	なし	右向き水平性	なし	左向き水平回旋	右向き回旋性
聴力変化	なし	なし	増悪(前医)	増悪	増悪(前医)	増悪	増悪(前医)	なし	増悪	増悪	なし	なし
術中所見	聴神経腫大	なし	なし	なし	なし	聴神経腫大	聴神経腫大	なし	なし	聴神経腫大	なし	聴神経腫大
術後 (dB)	17	30	18	15	38	28	49	44	65	54	105	105

D. 考察

外今回検討した症例のうち、介達外力が75%と高く、特発性と考えられる症例は1症例のみであった。

術後成績では治癒あるいは著明回復が8症例(66%)、回復以上は10症例(83%)であり、深谷ら1)の43%、瀬尾ら2)の67%、Gotoら3)の20%に比較して良好な成績と思われた。

術中所見、手術による治癒率からも問診、聴力経過より外リンパ瘻を疑い、手術加療を選択したことは妥当と考えられた。

急性の感音難聴を主訴に受診した場合、臨床像のみで突発性難聴と外リンパ瘻を鑑別することは困難である。しかし経過中に難聴が進行する症例、一次治療に対して反応しない症例に対しては外リンパ瘻の存在を考慮し手術を選択肢に入れるのが良いと思われた。今回施行した経外耳道内視鏡下内耳瘻孔閉鎖術は低侵襲、かつ術野汚染が少なく正確な所見が得られる利点がある。今回良好な手術成績が得られたことから、外リンパ瘻が疑われた症例に対して積極的に提示できる治療法と考えられた。

E. 結論

急性感音難聴を来した症例の中で誘因が認められ一次治療(ステロイド全身投与)による改善が認められない症例では外リンパ瘻を疑い、積極的に手術加療を行うことで聴力の改善が期待できることが明らかになった。

参考文献

- 1) 深谷ら, 日耳鼻 91:233-239, 1998
- 2) 瀬尾ら, 日耳鼻 104:1135-1142, 2001
- 3) Goto F et al., Auris Nasus Larynx. 28:29-33, 2001

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Usami S, Nishio S, Nagano M, Abe S, Yamaguchi T, the Deafness Gene Study Consortium. Simultaneous Screening of Multiple Mutations by Invader Assay Improves Molecular Diagnosis of Hereditary Hearing Loss: A Multicenter Study. PLoS ONE. 2011 in press.
- [2] Usami S, Moteki H, Suzuki N, Fukuoka H, Miyagawa M, Nishio S Y, Takumi Y, Iwasaki S, Jolly C. Achievement of hearing preservation in the presence of an electrode covering the residual hearing region. Acta Otolaryngol 131: 405-412, 2011.
- [3] 宇佐美真一 難聴の遺伝子診断 日本臨床 69: 357-367. 2011
- [4] 宇佐美真一 難聴の遺伝子診断 Audiology Japan 54: 44-55. 2011
- [5] Tsukada K, Nishio S, Usami S. A large cohort study of GJB2 mutations in Japanese hearing loss patients. Clin Genet 78: 464-470, 2010.
- [6] Usami S, Suzuki N, Moteki H, Nishio S, Takumi Y, Iwasaki S. Genetic