

## B. 研究方法

1999年5月から2012年12月までの間に東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科で人工内耳手術を行った症例のうち、術前の側頭骨CT(computed tomography)でなんらかの内耳奇形を認めた34例を対象とした。対象を、Sennaroglu分類、術中のCSF gusherの発生の有無により分類し、CT水平断像・冠状断像において、内耳道入口部径・内耳道長・前庭水管径・内耳道底径・蝸牛軸の存在についてWelchの検定・ステップワイズ法を用いた多重ロジスティック回帰分析により比較検討した。すべての統計解析はR version 3.0.2を用いて行った。

遺伝解析については、対象症例は東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科の難聴外来を受診した難聴の家族歴のある症例で、かつ遺伝子解析の希望がある場合とし、得られた末梢血液DNAを用いてエクソーム解析を東京大学先端科学技術研究センター・ゲノムサイエンスで行った。新規に同定した遺伝子変異に関しては、より多くの先天性難聴症例のDNAを用いて変異頻度の検証を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は東京大学医学部倫理委員会の審査・認証を受けて行った。

## C. 研究結果

対象の全34症例中、Sennaroglu分類に該当する術側の内耳奇形は、common cavity (CC) が 5 例、enlarged vestibular

aqueduct(EVA) が 4 例、incomplete partition type I(IP-I) が5例、incomplete partition type II(IP-II)が15例であった。Sennaroglu分類に該当しない内耳奇形として、内耳道拡大のみを認めた症例が2例、内耳道狭窄のみを認めた症例が1例、外側半規管欠損のみを認めた症例が1例、三半規管欠損のみを認めた症例が1例あった。またIP-IIの症例群には、三半規管欠損を合併する症例が2例、内耳道狭窄を合併する症例が1例、三半規管欠損・内耳道狭窄を合併する症例が1例、Waardenburg症候群とCHARGE症候群の症例を1例ずつ認めた。術中のCSF gusherは全34症例中24%の8症例で認められ、Sennaroglu分類では、CC2例(40%)、IP-I1例(20%)、IP-II6例(33%)であった。

CSF gusherを認めた症例では、内耳道底の直径は1.7 mm～4.0 mm (平均2.74 ± 0.27 mm)であり、gusherを認めなかった症例(0.8 mm～3.2 mm ; 平均2.18 ± 0.13 mm)と比較して有意に長かった( $p = 0.048$ )。内耳道入口部径・内耳道長・前庭水管径については両群間で有意な差を認めなかった。蝸牛軸については、CSF gusherを認めなかった症例中62%の症例で蝸牛軸を認めたが、CSF gusherを認めた症例では13%の症例でのみ蝸牛軸を認めた( $p = 0.039$ )。

各因子間の多重共線性の検定において、水平断像と冠状断像との因子間に多重共線性が考えられたため、多変量解析においては水平断像のみを用いて行った。

ステップワイズ法を用いた多重ロジスティック回帰分析では、蝸牛軸の有無と前庭

水管径との因子が選択され、ROC曲線下面積(AUC)は0.851 (95% CI: 0.713-0.989)であった。蝸牛軸の有無と内耳道底直径とを選択した場合のAUCは0.798 (95% CI: 0.623-0.974)であり、蝸牛軸の有無と前庭水管径とを選択した場合のAUCとの有意差は認めなかった。

遺伝解析については難聴患者2人、その家族3人分の計5検体のヒトゲノム、遺伝子解析研究を行った。その2家族については現在日本人で報告されている難聴遺伝子には病因となるよう変異は見つからなかった。その他の96症例については、現在日本人で報告されている13遺伝子と *WFS1* *KIAA1199* *COL9A3* *CDH23* *SIX1*についてエクソーム上のターゲットリシーケンスを行った。ミトコンドリア染色体の難聴に関連する遺伝子変異については2症例で3243A>Gの変異を認め、ヘテロプラスミーは15%と33%であった。常染色体の変異については解析中である。

#### D. 考察

人工内耳手術中に、内耳奇形症例において好発すると言われているCSF gusherは、クモ膜下腔と外リンパ腔とに異常な交通があるために生じる。その主な原因として、蝸牛軸内部の蝸牛内腔と内耳道とを分離する構造の異常が推測されているが、他の原因として前庭水管の拡大もあげられている。今回の検討においては、CSF gusherを認めた群において、蝸牛軸の欠損・内耳道底の拡大が有意に認められた。前庭水管の直径

はCSF gusherの発生の有無による有意差を認めなかったが、CSF gusherの予測因子である可能性が示唆された。

#### E. 結論

術前CTにおける蝸牛軸の有無・内耳道底の直径・前庭水管径は、人工内耳手術中のCSF gusherを予測する重要な因子と考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

今井直子、熊川孝三、安達のどか、浅沼聡、大橋博文、坂田英明、山嵜達也、宇佐美真一: JB2 変異例における進行性難聴の特徴と遺伝子型の検討. 小児耳 34 : 352-359, 2013

鴨頭輝、狩野章太郎、山嵜達也. 視床-正常機能各論 聴覚. Clinical Neuroscience 31 : 66-67, 2013

Makizumi Y, Kashio A, Sakamoto T, Karino S, Kakigi A, Iwasaki S, Yamasoba T. Cochlear implantation in a patient with osteogenesis imperfecta. Auris Nasus Larynx. 40:510-3, 2013

##### 2. 学会発表

第 114 回日本耳鼻咽喉科学会 2013.5.15-18 札幌

「ミトコンドリア遺伝子異常 (MIDD) 6

症例に対する人工内耳埋込み術の成績」

石井阿弥子、樫尾明憲、狩野章太郎、坂本幸士、柿木章伸、岩崎真一、山嵜達也

第 58 回 日本聴覚医学会  
2013.10.24-25 松本

「GJB2 と SLC26A4 の複合ヘテロ遺伝子  
変異が見出された先天性難聴の一家系」

坂田阿希、熊川孝三、阿部聡子、宇佐美真一、山嵜達也

「当科における Neural Response  
Telemetry データの検討」

赤松裕介、尾形エリカ、樫尾明憲、狩野章太郎、柿木章伸、岩崎真一、廣田栄子、山嵜達也

「高音漸傾型感音難聴に対しハイブリッド  
型人工内耳埋め込みを行った 1 例」

尾形エリカ、赤松裕介、狩野章太郎、樫尾明憲、柿木章伸、岩崎真一、山嵜達也

第 23 回日本耳科学会 2013.11.24-26  
宮崎

「内耳奇形症例における人工内耳埋め込み  
術中の gusher の予測」

鴨頭輝、狩野章太郎、樫尾明憲、坂本幸士、  
柿木章伸、岩崎真一、山嵜達也

「人工内耳埋込み術を施行した Common  
Cavity の 5 症例」

五十嵐一紀、星雄二郎、樫尾明憲、狩野章太郎、尾形エリカ、赤松裕介、山嵜達也

「生体親和性ポリマーを用いた人工内耳電  
極の改良」

木下淳、吉川弥生、柿木章伸、近藤健二、  
山嵜達也

「高音急墜型感音難聴の純音聴力閾値と語  
音聴取能との関係」

狩野章太郎、宇佐美真一、熊川孝三、高橋  
晴雄、東野哲也、内藤泰、土井勝美、伊藤  
健、鈴木光也、坂田英明、工穰、岩崎聡、  
柿木章伸、山嵜達也

「細胞接着分子カドヘリン 11 は中耳の正  
常な発達に必須である」

吉川弥生、木下淳、松本有、山嵜達也

12<sup>th</sup> Taiwan-Japan Conference on  
Otolaryngology Head and Neck  
Surgery 2013.12.5-7 台湾

「Intravital Imaging of Drug Delivery  
Systems and Auditory Hair Cells」

Yu Matsumoto, Kazunori Kataoka,  
Tatsuya Yamasoba

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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

## 新生児聴覚スクリーニングが” pass” と評価された GJB2遺伝性難聴児14症例の検討

研究分担者 松永達雄 国立病院機構東京医療センター感覚器センター・耳鼻咽喉科室長  
加我君孝 国立病院機構東京医療センター感覚器センター名誉センター長  
研究協力者 南修司朗 国立病院機構東京医療センター耳鼻咽喉科医師

### 研究要旨

言語習得前難聴の過半数は遺伝子が関わり、その中でもGJB2遺伝子変異は多種の民族で最頻度の原因である。GJB2遺伝性難聴は通常、非進行性の先天性難聴で中等度から高度の感音難聴であるとされている。今回の研究では新生児聴覚スクリーニングがpassであったGJB2遺伝性難聴児に注目して、その臨床像及び遺伝子型について検討した。両アレルGJB2遺伝子変異を認めた175家系204人の中で13家系14人が新生児聴覚スクリーニングでpassの評価を受けていたことが判明した。偽陰性について検討したところ、その可能性はほぼ否定され、これらの難聴児では、生下時には実際に聴力正常あるいはごく軽度の難聴であり、生後に難聴が進んだと考えられた。生下時に聴覚が正常となる背景としては、遺伝因子と環境因子が考えられたが、詳細は不明であった。本研究結果は、新生児聴覚スクリーニングが” pass” した難聴児でもGJB2遺伝性難聴の可能性があること、そして生後に難聴が発症あるいは進む可能性があることを示している。このような難聴児の早期発見のための対策が必要であると考えられた。

### A. 研究目的

近年、新生児長聴覚スクリーニング検査が普及し、言語習得前難聴児の発見および療育開始等に大きな影響を及ぼしている。言語習得前難聴の過半数は遺伝子が関わり、その中でもGJB2遺伝子変異は多種の民族で最頻度の原因である。GJB2遺伝性難聴は通常、非進行性の先天性難聴で中等度から高度の感音難聴であるとされている。しかし、これまでの検討は難聴児の両親が音への反応が悪いことや、言語発達に遅れがあるため、医療施設を受診して、乳幼児聴力

検査あるいは他覚的聴力検査により難聴診断されてから、遺伝的原因が調べられていた。このため、難聴の発症時期や難聴診断前の経過については難聴児の両親の印象、記憶に基づいており不明確であった。しかし、新生児聴覚スクリーニングの普及により、難聴診断後であっても出生時の聴覚に関する情報が入手できるようになった。このため、今回の研究では新生児聴覚スクリーニングがpassであったGJB2遺伝性難聴児に注目して、その臨床像及び遺伝子型について検討したので報告する。

## B. 研究方法

2002～2012年に難聴をもつ924人（810家系）に対し、当施設でGJB2遺伝子解析を直接シーケンス法にて行った。175家系204人に両アレルGJB2遺伝子変異を認めた。このGJB2遺伝性難聴児の中で13家系14人が新生児聴覚スクリーニングでpassの評価を受けていることが問診で判明し、その結果を実際の記録で確認できた。その14人の新生児聴覚スクリーニング内容、GJB2遺伝子型、臨床像について後方視的検討を行った。

（倫理面への配慮）

本研究では難聴者、その親族および健聴者（正常コントロール）の遺伝子解析を行なうため、「ヘルシンキ宣言」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（文部科学省、厚生労働省、経済産業省）」、「疫学研究に関する倫理指針（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）」、「国立病院機構東京医療センター倫理委員会規定」を遵守して進めた。国立病院機構東京医療センター倫理委員会において承認を受けて行われた。

## C. 研究結果

新生児聴覚スクリーニングは自動ABR（AABR）をpassした児が6人、自動OAE（AOAE）をpassした児が8人であった。遺伝子型はc.235delCのホモ接合が3例、c.235delCとの複合ヘテロ接合が8例（c.235delC/p.Y136X-p.G45E 4例、c.235delC/c.512ins4 1例、c.235delC/c.176-191del16 1例、

c.235delC/p.V37I 1例、c.235delC/p.R143W 1例）、そしてp.Y136X-p.G45E/p.V37I複合ヘテロ接合が1例、c.512ins4/p.R143W複合ヘテロ接合が1例、p.V37I/p.R143W複合ヘテロ接合が1例であった。難聴診断時期は4ヶ月から6歳までであった。両側の500, 1k, 2k, 4kHzの平均聴力レベルが20～40dBの軽度難聴が1例、40～70dBの中等度難聴が5例、70～90dBの高度難聴が6例、90dB以上の重度難聴が2例であった。

## D. 考察

今回の検討では、GJB2遺伝性難聴の6.9%（204人中の14人）が新生児聴覚スクリーニングで”pass”の判定を受けていた。全対象者が新生児聴覚スクリーニングを受けていないこと、問診で”pass”の評価を伝えない可能性もあることなどから、実際には”pass”判定例はさらに多い可能性もある。GJB2遺伝性難聴において、新生児聴覚スクリーニングをパスする原因として、まず偽陰性の可能性がある。この場合、第一にauditory neuropathyの場合がある。これは、auditory neuropathyによる難聴ではOAEが正常であるため、AOAEによるスクリーニングでは正常と判定されるからである。しかし、GJB2遺伝性難聴ではauditory neuropathyを呈することは極めて稀である事が既に知られているため、この可能性は低いと考えられる。第二に高音域の域値が正常もしくは軽度上昇である場合がある。

表 1. 新生児聴覚スクリーニングで「Pass」と評価されたことを確認できた GJB2 遺伝性難聴

患者	新生児聴覚スクリーニング	難聴が確認された年齢	現在の聴力レベル	GJB2遺伝子型
1	AOAE	1歳	重度	235delC/235delC
2	AOAE	9ヶ月	重度	512ins4/R143W
3	AOAE	2歳	中等度	235delC/Y136X-G45E
4	AOAE	1歳6ヶ月	中等度	235delC/Y136X-G45E
5	AABR	1歳7ヶ月	中等度	V37I/R143W
6	AOAE	3歳	中等度	235delC/176-191del16
7	AABR	4ヶ月	高度	235delC/512ins4
8	AOAE	6ヶ月	高度	V37I/Y136X-G45E
9	AABR	1歳6ヶ月	高度	235delC/235delC
10	AABR	1歳6ヶ月	高度	235delC/Y136X-G45E
11	AABR	1歳1ヶ月	高度	235delC/235delC
12	AABR	6歳	軽度	235delC/V37I
13	AOAE	2歳	高度	235delC/Y136X-G45E
14	AOAE	7ヶ月	中等度	235delC/R143W

しかし、GJB2難聴ではほとんどが水平型もしくは高音漸傾型の難聴であり、今回の14例の乳幼児聴力検査によるオーディオグラム（実施できない例ではASSR）の結果も、軽度難聴で” pass” と” refer” の境界域を呈した1例を除いて、” pass” の可能性はないと考えられた。このため、これらの難聴児では、生下時には実際に聴力正常、あるいはごく軽度の難聴であり、生後に難聴が進んだと考えられた。生下時に聴覚が正常となる背景としては、遺伝因子と環境因子が考えられる。遺伝因子については、14人のGJB2遺伝子に認められた遺伝子型は多様であり、これ以外の遺伝的背景が関連している可能性が疑われる。

以上より、新生児聴覚スクリーニングが” pass” した場合でも、生後に難聴が進む可能性があることを伝えることは重要と考え

られた。そして、小児難聴の早期発見のためには1歳半検診での聴覚スクリーニングの充実が望まれた。海外では、GJB2遺伝子を対象とした新生児聴覚分子スクリーニングの報告があり、これも小児難聴の早期発見に向けた一つの方法であり、検討に値する。また、本研究結果は、新生児聴覚スクリーニングが” pass” した難聴児でもGJB2遺伝性難聴の可能性があることを認識して、診療に取り組む必要があることも示している。

## E. 結論

新生児聴覚スクリーニングを” pass” と評価されたGJB2遺伝性難聴児14人の検討を報告した。新生児聴覚スクリーニングは難聴児の早期発見・早期療育開始に有用であるが、両アレルにGJB2病的遺伝子変異を

持っていても、新生児期にはスクリーニングを”pass”する症例があると考えられる。”pass”例に対しても聴覚の発達に注意するように十分説明しておくことが大切であり、このような難聴児の早期発見のための対策が必要と考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表 (\*責任著者)

Mutai H, Suzuki N, Shimizu A, Torii C, Namba K, Morimoto N, Kudoh J, Kaga K, Kosaki K, Matsunaga T\*. Diverse spectrum of rare deafness genes underlies early-childhood hearing loss in Japanese patients: A cross-sectional, multi-center next-generation sequencing study. *Orphanet J. Rare Dis.* 2013;8(1):172

Minami SB, Mutai H, Nakano A, Arimoto, Y, Taiji H, Morimoto N, Sakata H, Adachi N, Masuda S, Sakamoto H, Yoshida H, Tanaka F, Sugiuchi T, Kaga K, Matsunaga T\*. GJB2-associated hearing loss undetected by hearing screening of newborns. *Gene* 2013; 532(1):41-45

Okamoto Y, Mutai H, Nakano A, Arimoto Y, Sugiuchi T, Masuda S, Morimoto N, Sakamoto H, Ogahara N, Takagi A, Taiji H, Kaga K, Ogawa K, Matsunaga T\*.

Subgroups of enlarged vestibular aqueduct in relation with SLC26A4 mutations and hearing loss. *Laryngoscope* 2013[Epub ahead of print]

Takiguchi Y, Sun G, Ogawa K, Matsunaga T\*. Long-lasting changes in the cochlear K<sup>+</sup> recycling structures after acute energy failure. *Neurosci Res* 2013;77(1-2):33-41

Matsunaga T\*, Mutai H, Namba K, Morita N, Masuda S. Genetic analysis of PAX3 for diagnosis of Waardenburg syndrome type I. *Acta Otolaryngol* 2013;133(4):345-351

Watabe T, Matsunaga T\*, Namba K, Mutai H, Inoue Y, Ogawa K. Moderate hearing loss associated with a novel KCNQ4 non-truncating mutation located near the N-terminus of the pore helix. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 432(3): 475-479

Nakano A\*, Arimoto Y, Matsunaga T. Cochlear nerve deficiency and associated clinical features in patients with bilateral and unilateral hearing loss. *Otol Neurotol* 2013; 34(3): 554-558

Masuda S\*, Usui S, Matsunaga T. High prevalence of inner-ear and/or internal

auditory canal malformations in children with unilateral sensorineural hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2013; 77: 228-232

Arimoto Y, Namba K, Nakano A, Matsunaga T\*. Chronic constipation recognized as a sign of a SOX10 mutation in a patient with Waardenburg syndrome. *Gene*(in press)

Fujioka M, Okamoto Y, Shinden S, Okano HJ, Okano H, Ogawa K, Matsunaga T\*. Pharmacological inhibition of cochlear mitochondrial respiratory chain induces secondary inflammation in the lateral wall: a potential therapeutic target for sensorineural hearing loss. *PLOS ONE* (in press)

松永達雄\*、藤岡正人、細谷誠 Pendred症候群研究の現況と展望 *日本臨牀* 2013; 71(12): 2215-2222

松永達雄、鈴木直大、務台英樹、難波一徳、加我君孝 次世代シーケンサーを用いた難聴の遺伝子診断に関する検討 *Otol Jpn* 2013;23(5):903-907

松永達雄\* Pendred症候群の診断と治療 *日耳鼻会報*2014; 117: 144-145

## 2. 学会発表

Mutai H, Suzuki N, Shimizu A, Torii C, Namba K, Kudoh J, Kosaki K, Matsunaga T. Target-captured next generation sequencing of reported deafness genes reveals variability of genetic background of hereditary hearing loss in Japan. 9th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference the Stanford School of Medicine in Stanford, California, USA 2013年6月22-25日

Namba K, Kaneko H, Masuda S, Mutai H, Usui S, Matsunaga T. Novel pathological model of Proximal symphalangism and conductive hearing loss revealed by docking simulation of Noggin and heparin. 9th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference the Stanford School of Medicine in Stanford, California, USA 2013年6月22-25日

Fujioka M, Morimoto N, Sakamoto K, Ohtsu M, Nakano A, Arimoto Y, Masuda S, Sugiuchi T, Masuda S, Kaga K, Matsunaga T. Spectrum of hearing level discrepancy in siblings with the same GJB2 mutation in Japanese. 9th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference the Stanford School of Medicine in Stanford, California, USA 2013年6月22-25日



阪本浩一、大津雅秀、松永達雄. 長期の聴力経過が観察可能であったPendred症候群の3例 第114回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 札幌市 2013年5月15-18日

松永達雄、渡部高久、南修司郎、守本倫子、阪本浩一、杉内智子、小川郁、加我君孝. 次世代シーケンサーを用いた難聴遺伝子解析と原因診断への活用 第114回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 札幌市 2013年5月15-18日

水足邦雄、仲野敦子、有本友季子、増田佐和子、阪本浩一、守本倫子、瀧口哲也、小河原昇、加我君孝、松永達雄. CDH23遺伝子変異による遺伝性難聴の臨床像 第114回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 札幌市 2013年5月15-18日

松永達雄、加我君孝、仲野敦子、有本友季子、杉内智子、泰地秀信、守本倫子、阪本浩一、大津雅秀、増田佐和子、小河原昇. 前庭水管拡大症で認められたSLC26A4遺伝子変異と臨床的特徴 第8回日本小児耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 前橋市 2013年6月20-21日

藤岡正人、守本倫子、阪本浩一、大津雅秀、仲野敦子、有本友季子、増田佐和子、杉内智子、益田慎、加我君孝、松永達雄. 同一のGJB2遺伝子変異を有する同胞（兄弟姉妹）の聴覚 第8回日本小児耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 前橋市 2013年6月20-21日

中村奈津子、藤波芳、野田徹、松永達雄、加我君孝、林孝彰、角田和繁. Auditory neuropathyを伴う常染色体優性視神経萎縮症の1例 第61回日本臨床視覚電気生理学学会 大阪 2013年10月4-5日

松永達雄、藤岡正人、加我君孝. 次世代シーケンシングでMYO15A遺伝子変異が認められた先天性難聴の孤発例の1例 第58回日本聴覚医学会総会・学術講演会 松本市 2013年10月24-25日

高橋優宏、荒井康裕、植草智子、中川辰雄、松永達雄、宇佐美真一. 遺伝子診断と術中EABR が人工内耳に有効であったAuditory neuropathy spectrum disorder症例 第58回日本聴覚医学会総会・学術講演会 松本市 2013年10月24-25日

有本友季子、仲野敦子、工藤典代、松永達雄. 難聴遺伝子解析を行った当科難聴症例の検討 第58回日本聴覚医学会総会・学術講演会 松本市 2013年10月24-25日

務台英樹、難波一徳、加我君孝、松永達雄. 孤発例の先天性難聴患者における稀少難聴原因候補の同定 第23回日本耳科学会総会・学術講演会 宮崎市 2013年11月24-26日

難波一徳、加我君孝、新谷朋子、藤井正人、松永達雄. Auditory Neuropathy患者で新たに同定された2種類の変異型OPA1蛋白質の構造予測と分子病態 第23回日本耳科

学会総会・学術講演会 宮崎市 2013年11月24-26日

福本一郎、仲野敦子、有本友季子、松永達雄、工藤典代. CDH23遺伝子変異が検出された難聴5症例の検討 第23回日本耳科学会総会・学術講演会 宮崎市 2013年11月24-26日

高橋優宏、植草智子、中川辰夫、松永達雄、宇佐美真一. 人工内耳埋め込み術中にEABRを施行したAuditory neuropathy spectrum disorder症例 第23回日本耳科学会総会・学術講演会 宮崎市 2013年11月24-26日

大友章子、南修司郎、永井遼斗、榎本千江子、松永達雄、藤井正人、新正由紀子、加我君孝、坂田英明. Waardenburg症候群Ⅱ型に対する小児人工内耳埋め込み術後の聴覚・言語発達について 日本耳鼻咽喉科学会東京都地方部会・学術講演会 東京 2014年3月15日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 「難聴遺伝子COCHのトランスレーショナルスタディー」に関する研究

研究協力者 池園哲郎 埼玉医科大学教授

### 研究要旨

内耳性難聴、めまいの多くは未だに原因不明であり、原因を特定し他疾患と鑑別、疾患特異的治療を行う事はすることは困難である。これに対して外リンパ瘻は原因に基づく診断名であり確定診断により根治が可能となる。昨年度、我々は「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」に関する研究班、急性高度難聴調査研究班との横断的研究によって外リンパ瘻の診断基準の見直しを行った。今年度は、受託検査企業と合同で、全国 110 施設を登録し多施設共同研究を実施した。また、平成 21 年度から凍結保存してあった検体を ELISA で再検査して検討した。その結果、日常臨床で突発性難聴、進行性難聴、内耳性めまいなどとの鑑別が必要となるカテゴリー 2、3、4 のケースで、おおむね 1-3 割程度の症例が CTP 陽性すなわち外リンパ瘻であることが判明した。

さらに、人工内耳症例の外リンパ漏出サンプルを採取当日に検査することで、凍結融解時、保存条件（室温、冷蔵、冷凍）での測定値を比較検討した。その結果、いずれにおいても影響は小さく、バイオマーカーとして理想的で安定なタンパク質であることが判明した。

以上の結果は、CTP検査が内耳性難聴・めまい診療に有用である事を強く示唆している。

### A. 研究目的

内耳リンパ腔と周囲臓器のあいだに瘻孔が生じ、生理機能が障害される疾患が外リンパ瘻（perilymphatic fistula）である。外リンパ瘻の症候は多彩であり確定診断は容易でなかった。これまでは中耳所見を手術的に確認して外リンパ漏出の有無を判断していたが、この診断法はきわめて主観的で、外リンパの漏出を確認できるか、疑問視されていた。我々は新たな診断マーカー CTP (cochlin-tomoprotein) が外リンパ特異的蛋白であることを見だし、CTP は室温放置や凍結融解の影響を受けにくい安定

した蛋白であり、診断マーカーとしては理想的な蛋白であることを報告してきた。

1) H21 年 4 月から H24 年度の凍結保存サンプルをレトロスペクティブに検討した。

2) CTP 検査が今後診断基準項目となることから検査へのアクセスをより容易にする必要がある。平成 24 年度より受託検査企業と合同検査の試験運用を開始し、平成 25 年度もこれを実施した。

3) 検査の信頼性を検討する目的で、外リン

パと中耳洗浄液を用いて、下記項目について CTP 検査の検証実験を行った。とくに今回は検体採取当日にも測定を実施し、翌日以後の検査結果と比較検討した。

- a. 中耳洗浄液の凍結融解時における安定性
- b. 中耳洗浄液の保存安定性（室温、冷蔵、冷凍）

## B. 研究方法

1) H21年4月からH24年度の検査総数は基礎的研究目的のサンプルも含めて780検体であった。これらはウェスタンブロットのみで検査した検体も含まれており、今回(株)免疫生物研究所IBLと共同開発した高感度エライザでの検査をELISAで再度検討した。

2) 今年度は9月から1月までの間 SRL と合同でサンプルを回収検査し、全国レベルでの検査を展開した。また、この期間以外は日本医科大学生化学において測定を実施した。全国の110施設を登録し検体は受託検査企業((株)エスアールエルが回収し検査を実施した。結果は多施設検討実施責任者である池園を介さずに、直接担当医へ報告した。

3) 今年度新規に手術した人工内耳症例の電極挿入時に内耳正円窓の開窓により漏出した外リンパを回収した。サンプルは採取から測定までの間、冷蔵で保存した。この外リンパ液の一部を、正円窓開窓前の中耳洗浄液（外リンパ液が混入していない中耳洗浄液）と混合して希釈し、測定サンプル

とした。測定サンプルは一回の測定に必要な量に分注し、室温、冷蔵、冷凍にてサンプルを保存し、それぞれの CTP 濃度を ELISA で測定した。

（倫理面への配慮）

倫理委員会の承認のもとで各研究を行った。

## C. 研究結果

1) 先ず data cleaning を行った。基礎的検討を目的とした血液、体液などの検体は除き、臨床情報の提出があり、評価可能なものは554検体であった。1人1サンプルに統一し、「中耳に0.3ml 入れ洗浄改修」というスタンダードプロトコールを採用している308検体を検討した。

各疾患カテゴリー分類の陽性率は、カテゴリー1は32%、2は23%、3は28%、4は12%であった。

2) 平成25年度1月現在で、カテゴリー1から4まで、に SRL と日本医科大学全ての検体合計で524検体を検査し、陽性は139検体、全体の陽性率は26%であった。

平成25年度、全国110施設から収集された検体は158検体であった。現在臨床情報との関連性を詳細に検討している。

### 3) 検査の信頼性

a) 測定サンプルの凍結融解時での数値比較

サンプル採取当日に1時間-80℃で凍結したもの（冷凍サンプル）を融解し、凍結

していないサンプル（冷蔵サンプル）と同時に測定したところ、表1に示す結果が得られた。測定した4症例いずれの場合でも、冷蔵サンプルと冷凍サンプルの間での差は10%以内であった

#### b) 保存条件（室温、冷蔵、冷凍）による CTP 測定値の比較

保存条件（室温、冷蔵、冷凍）を変えて保存したサンプルについて、採取した日（1日目）および、2日目、10日目、31日目にそれぞれのサンプルのCTP濃度を測定した。室温、冷蔵、冷凍のいずれの場合においても測定値が大きく変動することは無かった。

### D. 考察

CTP 蛋白を用いた外リンパ瘻確定診断法は、突発性難聴やメニエール病など、特発性疾患が主であった内耳性難聴・めまいの「病因診断」を可能とし、その病態解明、原因に基づく治療を可能とする。この診断マーカーが臨床の現場で使用可能な検査であるかどうかを検討し、外リンパ瘻に関する用語や分類についても検討を加えてきた。そして平成2年に改定された外リンパ瘻診断基準を改定した。

CTP 蛋白を用いた外リンパ瘻確定診断法は、突発性難聴やメニエール病など、特発性疾患が主であった内耳性難聴・めまいの「病因診断」を可能とし、その病態解明、原因に基づく治療を可能とする。また、今まではウェスタンブロット法による検査をおこなってきたが、より客観的な判定が可

能となるエライザ法が開発された。これらの検査法の進歩によって、めまいを主訴とする外リンパ瘻の存在が改めて明らかにされた。

CTP 検査は、中耳洗浄液という新しいバイオサンプルを用いる新規検査であり、OME や膿での偽陽性 夾雑物による偽陰性、さらに 保存、凍結、搬送などの問題などの基礎的検討を要する。今回の検討では、測定サンプルの凍結融解時、保存条件（室温、冷蔵、冷凍）での数値比較、いずれにおいても CTP に対する影響は小さく、安定なタンパク質であると考えられた。

さらに今後は、施設間の陽性率の差、有病率や治療効果判定のための前向き試験、治療効果の確認（保存治療と手術の比較など）を行っていく予定である。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

英文論文

原著

1.Kataoka Y, Ikezono T, Fukushima K, Yuen K, Maeda Y, Sugaya A, Nishizaki K. Cochlin-tomoprotein (CTP) detection test identified perilymph leakage preoperatively in revision stapes surgery. *Auris Nasus Larynx*. 40(4):422-4. 2013

2. Yoshimura H, Iwasaki S, Nishio SY, Kumakawa K, Tono T, Kobayashi Y, Sato H, Nagai K, Ishikawa K, Ikezono T, Naito Y, Fukushima K, Oshikawa C, Kimitsuki T, Nakanishi H, Usami S. Massively parallel DNA sequencing facilitates diagnosis of patients with usher syndrome type 1. PLoS One. 2014 Mar 11;9(3):e90688.

日本語

原著

1.杉崎 一樹, 小泉 康雄, 岩村 美生, 荒木 隆一郎, 加瀬 康弘, 池園 哲郎, 八木 聰明

頭部傾斜時の眼球運動の3次元解析 (3D analysis of binocular eye movement during head tilt)(英語) 埼玉医科大学雑誌 39(2):121-129 2013.03

2. 新藤 晋,杉崎 一樹,伊藤 彰紀,柴崎 修,水野 正浩,松田 帆,井上 智恵,加瀬 康弘,池園 哲郎 新しい半規管機能検査法 —video Head Impulse Test— Equilibrium Research 73(1) (ahead of print) 2014

総説

1. 池園 哲郎,

【検査結果をどう読むか?】 平衡覚領域の検査 圧刺激検査

JOHNS 29(9):1547-1550 2013.09

2. 池園 哲郎, 難治性めまいへのアプローチ 外リンパ瘻 診断基準の改定と臨床所見の特徴 Equilibrium Research 72(4):215-221 2013.08

3. 池園 哲郎, 【耳鼻咽喉科領域の外傷】 外傷性外リンパ瘻 ENTONI 155:17-22 2013.07

4. 池園 哲郎 外リンパ瘻 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 85(5):242-247, 2013.4

著書

池園 哲郎 外リンパ瘻 今日の治療指針 2014年度 福井次矢ら編集 医学書院 p1354-1355

2. 学会発表

国際学会

シンポジウムなど

1. Ikezono T Instruction course Perilymphatic fistula with high diagnosis accuracy : A novel perilymph specific protein “cochlin tomo-protein” : 2nd Meeting of European Academy of ORL-HNS and CE

ORL-HNS(Nice,FRANCE)2013.4.27-30

2. Ikezono T Symposium  
Inner ear proteomics identifies unique structures of cochlin isoforms -insights to cochlin function and pathophysiology of dfna9- : 20th World Congress of the International Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies iFOS (Seoul)2013.6.4

3. Ikezono T Symposium  
Inner ear trauma with perilymphleakage Clinical characteristics revealed by novel biochemical diagnostic marker : 20th World Congress of the International Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies iFOS (Seoul)2013.6.4

4. Ikezono T, Usami S, Suzuki M, Ogawa K Panel discussion  
What is special with perilymph? Clinical characteristics revealed by novel biochemical diagnostic marker Cochlin-tomoprotein(CTP) : 29th POLITZER SOCIETY MEETING the most prestigious meeting on Otology(Antalya TURKEY)2013.11.14-17

一般演題

1. Ikezono T, Usami S

Could post-CI perilymph leakage affect the hearing preservation?  
Clinical characteristics of perilymph leakage revealed by novel biochemikac diagnostic marker Cochlin - tomoprotein(CTP) : New Trends in Hearing Implant Science2013(長野県北安曇郡)2013.10.27

2. Mastuda H, Sakamoto K, Sugizaki K, Shindou S, Ikezono T, Kase Y  
Cochlear implantation in a case of Otitis Media with ANCA associated vasculitis : 29th POLITZER SOCIETY MEETING the most prestigious meeting on Otology(Antalya TURKEY)2013.11.14-17

3. Sakamoto K, Obuchi C, Shiroma M, Matsuda H, Sugizaki K, Shindou S, Ikezono T  
Auditory temporal processing in cochlear implant users - Effectiveness of time compressed speech and individual backgrounds- : 29th POLITZER SOCIETY MEETING the most prestigious meeting on Otology(Antalya TURKEY)2013.11.14-17

国内学会

シンポジウムなど

1. 池園哲郎

教育講演：外リンパ瘻の臨床－診断の  
バイオマーカーCTPの診断性能と診断

基準改定：第114回日本耳鼻咽喉科学  
会総会（北海道札幌市）2013.5.15-18

発表年月日 2013.5.16 発表場所

ロイトン札幌

2. 池園哲郎

International Panel discussion：

Decision making in ear surgery：第  
23回日本耳科学会総会（宮崎県宮崎  
市）2013.11.24-26

発表年月日 2013.11.24 発表場所

シーガイアコンベンションセンター

3. 池園哲郎 公募インストラクシ  
ョンコース 外リンパ瘻（CTP検査の  
有用性）第23回日本耳科学会総会（宮  
崎県宮崎市）2013.11.24-26

発表年月日 2013.11.24 発表場所

シーガイアコンベンションセンター

一般演題

1. 新藤晋，杉崎一樹，池園哲郎，松  
田帆，柴崎修，伊藤彰紀，水野正浩，  
加瀬康弘

ドライブレコーダーを利用した携帯型  
眼振記録装置の試作：第114回日本耳  
鼻咽喉科学会総会（北海道札幌市）

2013.5.15-18

発表年月日 2013.5.18 発表場所

ロイトン札幌

2. 松田帆，坂本圭，新藤晋，杉崎一  
樹，池園哲郎

中耳真珠腫初回手術例の検討：第114  
回日本耳鼻咽喉科学会総会（北海道札  
幌市）2013.5.15-18

発表年月日 2013.5.17 発表場所

ロイトン札幌

3. 杉崎一樹，松田帆，新藤晋，池園  
哲郎，加瀬康弘

滲出性中耳炎治療中に発症した外リン  
パ瘻確実症例：第114回日本耳鼻咽喉  
科学会総会（北海道札幌市）

2013.5.15-18

発表年月日 2013.5.17 発表場所

ロイトン札幌

4. 井上準，井上智恵，松田帆，杉崎  
一樹，中島正己，和田伊佐雄，新藤晋，  
上條篤，中嶋正人，池園哲郎，加瀬康  
弘

当科におけるIgG4関連疾患の症例：  
第114回日耳鼻埼玉県地方部会学術講  
演会（埼玉県さいたま市）2013.6.16

5. 松田帆，井上智恵，井上準，杉崎  
一樹，中島正己，和田伊佐雄，新藤晋，  
上條篤，中嶋正人，池園哲郎，加瀬康  
弘

抗酸菌性中耳炎の3症例：第114回日  
耳鼻埼玉県地方部会学術講演会（埼玉  
県さいたま市）2013.6.16

6. 池園哲郎，堤内亮博，松田帆，杉  
崎一樹，新藤晋，中嶋正人，加瀬康弘



耳科手術における CO2 レーザーの効  
用：第 75 回耳鼻咽喉科臨床学会（兵庫  
県神戸市）2013.7.11-12

発表年月日 2013.7.12 発表場所  
神戸国際会議場

7. 坂本圭，小淵千絵，城間将江，松  
田帆，池園哲郎

人工内耳装用者の聴覚情報処理に関す  
る研究—倍速音声と背景要因に関する  
検討—：第 58 回日本聴覚医学会総会  
（長野県松本市）2013.10.24-25

発表年月日 2013.10.25 発表場所  
ホテルブエナビスタ

8. 池園哲郎

外リンパ瘻診断基準の改定と診断精度  
評価：第 58 回日本聴覚医学会総会（長  
野県松本市）2013.10.24-25

発表年月日 2013.10.25 発表場所  
ホテルブエナビスタ

9. 新藤晋，池園哲郎，杉崎一樹，伊  
藤彰紀，柴崎修，水野正浩，井上智恵，  
加瀬康弘

民生用デジタルカメラを用いた covert  
catch up saccade 検出の試み：第 72 回  
日本めまい平衡医学会総会（大阪府大  
阪市）2013.11.13-15

発表年月日 2013.11.15 発表場所  
大阪国際交流センター

10. 小林泰輔，伊藤広明，兵頭政光，  
池園哲郎

当科における外リンパ瘻手術例の検  
討：第 72 回日本めまい平衡医学会総会  
（大阪府大阪市）2013.11.13-15

発表年月日 2013.11.14 発表場所  
大阪国際交流センター

11. 杉崎一樹，新藤晋，池園哲郎，伊  
藤彰紀，柴崎修，水野正浩，井上智恵，  
加瀬康弘

CT から予想された所見と異なる MRI、  
前庭機能所見を呈した内耳奇形症例：  
第 72 回日本めまい平衡医学会総会（大  
阪府大阪市）2013.11.13-15

発表年月日 2013.11.14 発表場所  
大阪国際交流センター

12. 松田帆，杉崎一樹，新藤晋，池園  
哲郎，加瀬康弘

CTP 検出法による迷路瘻孔の診断：第  
23 回日本耳科学会総会（宮崎県宮崎  
市）2013.11.24-26

発表年月日 2013.11.25 発表場所  
シーガイアコンベンションセンター

13. 新藤晋，池園哲郎，杉崎一樹，伊  
藤彰紀，柴崎修，水野正浩，加瀬康弘  
当科における video Head Impulse

Test の検討 第一報 温度刺激検査と  
の比較：第 23 回日本耳科学会総会（宮  
崎県宮崎市）2013.11.24-26

発表年月日 2013.11.26 発表場所  
シーガイアコンベン

## H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得  
（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：学校法人埼玉医科大学  
 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）  
 特許権者：学校法人埼玉医科大学  
 Saitama Medical University  
 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）
2. 【外国 中国】発明の名称：外リンパ瘻の検出方法  
 特許権者：学校法人埼玉医科大学  
 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）
3. 【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：学校法人埼玉医科大学  
 Saitama Medical University  
 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）
4. 【外国 米国】発明の名称：外リンパ瘻の検出方法  
 特許権者：学校法人埼玉医科大学  
 Saitama Medical University  
 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）
5. 【外国 欧州 EP/IT（イタリア）、EP/GB（イギリス）】  
 発明の名称：外リンパ瘻の検出方法  
 特許権者：学校法人埼玉医科大学  
 Saitama Medical University  
 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）
6. 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

(特許申請中)

【PCT】発明の名称：未変性 Cochlin-tomoprotein (CTP) に反応する抗体及びそれを用いた CTP の測定方法

出願人：学校法人埼玉医科大学

発明者：池園哲郎、志風沙登美

特許番号：無し

公開番号：WO/2012/133898 (2012年10月4日)

出願番号：PCT/JP2012/058988 (2012年4月2日：優先日：2011年3月31日)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

# 遺伝性難聴および外耳・中耳・内耳奇形に関する研究

研究分担者 福島邦博 岡山大学耳鼻咽喉科講師

## 研究要旨

鰓弓耳腎 (Branchio-oto-renal(BOR)) 症候群は、頸瘻・耳瘻孔・外耳奇形などの鰓原性奇形、難聴、腎尿路奇形を3主徴とする症候群である。常染色体優性遺伝形式をとり、わが国では推定3,000人の患者がいると見積られる。今回我々は母と三兄弟に発症したBOR症候群の症例を経験したので報告する。BOR症候群の臨床症状には多様性があり、我々の同一家系内での表現型にも難聴の程度、鰓原性奇形の様式、腎尿路奇形の有無などには違いがみられた。

## A. 研究目的

BOR症候群は、鰓原性奇形・難聴・腎尿路奇形の3徴を呈する常染色体優性遺伝性疾患であり、瘻孔の感染や難聴を契機に耳鼻咽喉科を受診することが多い。しかし、腎機能悪化の可能性もあるため、他科と連携した上で長期的に経過を見ていく必要がある。今回我々は、BOR症候群の家族例を経験したので報告する。

## B. 研究方法：症例報告

(倫理面への配慮)

本床例の診療活動は本人、保護者の同意を得て適正におこなわれている、また遺伝学的検査は施行されていない。

## C. 研究結果 (症例呈示)

症例は16歳、13歳、10歳の男児。母親と同胞(弟)2人がBOR症候群と診断されており、母親は難聴にて40歳時より補聴器装用を行っている。

長男は幼少期に他院で左耳瘻孔にて手術を施行されたが、その後6歳時に再手術を受け、瘻孔が頸部まで連続していることを指摘された。当科での聴力検査にて左混合性難聴がみられ、側頭骨CTを撮影したところ、左耳小骨奇形を認めた。現在当科にて聴力フォローを行っている。次男は幼少期に他院で正中頸嚢胞の手術を施行された。また、反復性中耳炎にて3歳時に両鼓膜チューブ留置術を施行されたが、左耳漏が持続、5歳時には左真珠腫性中耳炎と診断され、左鼓室形成術を施行、6歳時には二回目の手術を施行された。その後、両側高度難聴のため補聴器装用を開始したが、難聴の精査目的にて当科紹介となる。当科で撮影した側頭骨CTでは外耳道の前下壁と前方が連続する所見がみられ、第一鰓弓由来の嚢胞が考えられた。現在もこの嚢胞由来と推測される左耳漏が持続している。三男は幼少時に2回他院で耳瘻孔手術を受けたが、その際に右腎がないことを指摘され、腎機能のフ