

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592169

研究課題名（和文） 内耳疾患診断のバイオマーカーCTP -迅速検出法の開発と臨床応用-

研究課題名（英文） CTP, a biomarker for the diagnosis of inner ear diseases. rapid test and its clinical applications-

## 研究代表者

池園 哲郎 (IKEZONO TETSUO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：80277491

## 研究成果の概要（和文）：

nativeCTP 蛋白を検出する検査法を開発することが目的である。適度な還元処理をおこなう新たな方法を選択し、強い還元剤ジチオスレイトールを用いてまずサンプルを前処理し、余剰還元力を打ち消す能力があるヨードアセトアミドを加えてからエライザを行う方法を検討した。その結果、ヒト外リンパとヒト血清の間に十分な反応性の違いが見られた。これは Native CTP 検出法の将来を開く画期的な結果である。

## 研究成果の概要（英文）：

The CTP detection test can be used to make a definite, objective diagnosis of traumatic PLF, and therefore offers valuable information on patient selection for surgical treatment. We intend to make a novel test to detect CTP protein by ELISA as POCT (Point of Care Testing). We pretreated CTP with reducing agent DTT and Iodoacetamide (IAA).

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 耳鼻咽喉科学

キーワード：耳科学 トランスレーショナルスタディ

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト内耳疾患の病態はいまだ不明の点が多く、肝や腎など生体バイオプシーが出来る臓器の疾患と比較してその解明が遅れている。なぜなら、生体内耳のバイオプシーは禁忌であり、内耳で実際にどのような病変が生じているかを病理学的に調べるためには、死後の病理組織標本に頼るしか方法がないからで

ある。

今まで、内耳疾患の病態把握には、生理学的検査、画像検査に限られていたが、これには限界があることは従来から指摘されていた。我々は、新たな診断技術を開発する目的で研究を進め、難聴・めまいを生化学的に診断する世界初のバイオマーカーとして外リンパ特異的蛋白 CTP(cochlin tomo-protein)

を発見した。2008年度に国内特許を取得し、さらに海外特許も申請中である。内耳特異的遺伝子として同定された COCH 遺伝子が作る蛋白のうち、外リンパに発現しているアイソフォームが CTP である (Robertson 1998, Ikezono 2004)。CTP は外リンパには含まれているが、血清、唾液、髄液、中耳粘液等には含まれていない。CTP が中耳から検出されれば、内耳の外リンパが中耳に漏出している、すなわち外リンパ瘻と確定診断できる。

本研究課題の具体的な目的は、CTP の迅速検出システムの開発を行うことにある。

外リンパ瘻は、本邦では特発性(いわゆる鼻かみ型)が有名であるが、先天性(内耳奇形、中耳奇形に伴うもの)や、後天性真珠腫、腫瘍、梅毒、医原性(アブミ骨手術、中耳手術)、外傷性(直達外力:頭部外傷、側頭骨骨折、中耳(耳小骨)外傷、介達外力)など原因で発症する。その臨床症状は多種多様で、様々なタイプの難聴、めまい・平衡障害の原因となっていると考えられており、突発性難聴、変動性難聴、メニエール病などと誤診されていることが従来から指摘されている (Friedland 1999)。

現在我々は、ウェスタンブロット法による CTP 検出検査を全国的に行っている。しかし、この検査の結果が出るまでには2~3週間を要することが問題であった。外リンパ瘻による内耳障害は早期診断・治療によってより良く治ることが知られており、今回我々は迅速診断検査法を開発することを主な目標とする。エライザ法であれば、検査はより簡便で、数時間で結果が出る。

## 2. 研究の目的

POCT (Point of Care Testing) で native 蛋白を検出することが目的である。今まで、抗体と CTP 蛋白が「非還元状態で」反応するかどうかを検討してきたが、今回は適度な還元処理をおこなう新たな方法を選択した。

さらに、2. ELISA 系の最適化 3. ポジティブコントロールとしてのブタ外リンパの採取、4. 同時並行で CTP の内耳発現特異性に関する分子生物学的研究を行った。

## 3. 研究の方法

還元剤として抗原抗体反応阻害しないマイルドな還元剤 2-MEA を用いた場合、DTT+ヨードアセトアミド (IAA) を用いた場合の2種類を検討し、エライザ法による検討を行った。その結果、強い還元剤ジチオスレイトール (DTT) を用いてまずサンプルを前処理し、余剰還元力を打ち消す能力があるヨードアセトアミド (IAA) を加えてからエライザを行う方法を検討した。

上記の結果を基に、抗 CTP ペプチド・ポリクローナル抗体 12 種類を、エライザプレ

ートの固相、捕捉抗体としてそれぞれ使用し、CTP との反応性をエライザ法で測定する。外リンパと、コントロールの溶血血液を比較して、反応性がもっとも高い組み合わせを検証する。

## 4. 研究成果

その結果、Urea, NP40, DTT を用いた前処理を加えたヒト外リンパとヒト血清の間に十分な反応性の違いが見られた。native CTP を検出する方法が本来の理想であるが、この研究では適度な還元を加えた CTP に対して、さらに余剰還元力を打ち消す能力があるヨードアセトアミド (IAA) を加えてからエライザを行う方法を検討している。その成果としてヒト外リンパと血清の間に反応性の差を検出できた。ウエスタンと比較するとエライザは検査者によるバイアスが入りずらく、誰が検査を施行しても「客観的なシグナル強度で判定」出来るメリットがある。これは Native CTP 検出法の将来を開く画期的な結果である。

将来的に陽性コントロールとして使用するため、ブタ頭蓋を屠畜場から購入し、手術用顕微鏡を用いて削開し、内耳から外リンパを採取している。

同時並行で CTP の内耳発現特異性に関する分子生物学的研究

ラットなどの齧歯類などでも外リンパを採取し、外リンパ内のアイソフォーム発現に関して発生学的な検討をおこないそのユニークな発現パターンを解析した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)全て査読あり。

1. 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 Otolaryngol. 131(9):937-44, 2011

2. 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.

- 3 . 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.
- 4 . 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.
- 5 . 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.
- 6 . 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. *Acta Otolaryngol.* Clinical characteristics of delayed endolymphatic hydrops in Japan: A nationwide survey by the Peripheral Vestibular Disorder Research Committee of Japan. 130(10):1135-40. 2010
- 7 . Sekine K, Ikezono T, Matsumura T, Shindo S, Watanabe A, Li L, Pawankar R, Nishino T, Yagi T. Expression of cochlin mRNA splice variants in the inner ear. *Audiol Neurotol.* 15(2): 88-96, 2009.
- 8 . 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.
- 9 . Shojaku H, Watanabe Y, Yagi T, Takahashi M, Takeda T, Ikezono T, Ito J, Kubo T, Suzuki M, Takumida M, Takeda N, Furuya N, Yamashita H. Changes in the characteristics of definite Meniere s disease over time in Japan: a long-term survey by the Peripheral Vestibular Disorder Research Committee of Japan, formerly the Meniere s Disease Research Committee of Japan. *Peripheral Vestibular Disorder Research Committee of Japan. Acta Otolaryngol.* 129:155-160, 2009.
- 〔学会発表〕(計 25 件)
1. 池園哲郎, 新藤晋, 杉崎一樹, 松田帆, 関根久遠, 椎葉恭子, 加瀬康弘: 公募シンポジウム 耳科診療における新技術 難聴・めまいのバイオマーカーCTP の新展開, 第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会(沖縄宜野湾市) 2011.11.24-26
2. 堤内亮博, 中嶋正人, 新藤晋, 平岩文, 和田伊佐雄, 柴崎修, 善浪弘善, 坂本圭, 加瀬康弘, 池園哲郎: 受傷後 1 年 3 ヶ月経過後も迷路気腫が残存している右耳かき外傷の 1 症例, 第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会(沖縄宜野湾市) 2011.11.24-26
3. 新藤晋, 池園哲郎, 杉崎一樹, 松田帆, 柴崎修, 伊藤彰紀, 加瀬康弘: 携帯型眼球運動記録装置の開発 第一報, 第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会(沖縄宜野湾市) 2011.11.24-26
4. 杉崎一樹, 池園哲郎, 新藤晋, 松田帆, 小川洋, 堤内亮博, 平岩文, 和田伊佐雄, 柴崎修, 中嶋正人, 善浪弘善, 坂本圭, 加瀬康弘: CTP 検査を用いた中耳真珠腫による内耳瘻孔深達度診断の工夫, 第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会(沖縄宜野湾市) 2011.11.24-26

5. 関根久遠, 池園哲郎, 木村百合香, 椎葉恭子, 喜多村健, 八木聰明, 松根彰志, 大久保公裕: 高齢者及び超高齢者における内耳 microRNA 発現の比較検討, 第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会(沖縄宜野湾市) 2011.11.24-26
6. 小川洋, 小林徹郎, 松井隆道, 野本幸男, 今泉光雅, 大森孝一, 池園哲郎: 中耳真珠腫における迷路瘻孔, 外リンパ瘻分類における診断基準作成へ向けての検討, 第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会(沖縄宜野湾市) 2011.11.24-26
7. 野口佳裕, 高橋正時, 初山直子, 池園哲郎, 岸本誠司, 喜多村健: 側頭骨 Giant Cell Reparative Granuloma の 1 例, 第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会(沖縄宜野湾市) 2011.11.24-26
8. 木村百合香, 池園哲郎, 加藤智史, 喜多村健: 高齢者ヒト蝸牛ラセン靱帯における Cochlin の発現と年齢に関する検討, 第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会(沖縄宜野湾市) 2011.11.24-26
9. 吉村豪兼, 岩崎聡, 西尾信哉, 工穰, 宇佐美真一, 熊川孝三, 東野哲也, 佐藤宏昭, 長井今日子, 武市紀人, 石川浩太郎, 池園哲郎, 内藤泰, 福島邦博, 君付隆, 中西啓, (Usher 症候群に関する調査研究班) Usher 症候群の全国アンケート調査結果とタイプ分類における課題 第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会(沖縄宜野湾市) 2011.11.24-26
10. 岩佐陽一郎, 岩崎聡, 西尾信哉, 工穰, 宇佐美真一, 熊川孝三, 東野哲也, 佐藤宏昭, 長井今日子, 武市紀人, 石川浩太郎, 池園哲郎, 内藤泰, 福島邦博, (優性遺伝形式をとる遺伝性難聴に関する調査研究班) 「優性遺伝形式をとる遺伝性難聴に関する調査研究」 第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会(沖縄宜野湾市) 2011.11.24-26
11. 柴崎修, 堤内亮博, 中嶋正人, 善浪弘善, 池園哲郎, 伊藤彰紀, 加瀬康弘: 外耳スプレーによる外耳道および中耳への薬液浸透 第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会(沖縄宜野湾市) 2011.11.24-26
12. 畑裕子, 小嶋康隆, 松本有, 田中友佳子, 桑内麻也子, 馬場美雪, 奥野妙子, 池園哲郎: ダイビングが誘因となった急性聴覚前庭障害の 2 症例 第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会(沖縄宜野湾市) 2011.11.24-26
13. 松田帆, 池園哲郎, 杉崎一樹, 坂本圭, 伊藤彰紀: 外リンパ瘻診断基準改訂案について, 第 56 回日本聴覚医学会総会・学術講演会(福岡県福岡市) 2011.10.27-28
14. 池園哲郎, 杉崎一樹, 松田帆, 坂本圭, 伊藤彰紀: 正円窓アプローチによる人工内耳電極挿入についての考察, 第 56 回日本聴覚医学会総会・学術講演会(福岡県福岡市) 2011.10.27-28
15. 坂本圭, 池園哲郎, 新藤晋, 岩崎千明, 城間将江, 小淵千絵, 大金さや香, 大久保公裕: 人工内耳装用者の語音聴取能と背景要因に関する検討, 第 56 回日本音声言語医学会(東京都新宿区) 2011.10.6-7
16. 池園哲郎, 新藤晋: バイオマーカーを用いた外リンパ漏出の診断法の実際とその限界, 第 73 回耳鼻咽喉科臨床学会(長野県松本市) 2011.6.23-24
17. 新藤晋, 池園哲郎, 森美穂子, 大久保公裕: 人工真皮とシリコン板を用いた外耳道皮膚再生療法, 第 73 回耳鼻咽喉科臨床学会(長野県松本市) 2011.6.23-24
18. 片岡祐子, 池園哲郎, 福島邦博, 結縁晃治, 濱田浩司, 菅谷明子, 前田幸英, 西崎和則: CTP 検出により術前診断が可能であった外リンパ瘻例, 第 112 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会(京都府京都市) 2011.5.19~21
19. 平岡美紀, 池園哲郎, 平岡満里, 黒田呈子, 高田昌彦, 宮地重弘, 大黒浩: 分子のサル眼組織における局在とアイソフォームの検討, 第 115 回日本眼科学会総会(東京都千代田区) 2011.5.12~15
20. 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(京都府京都市) 2010.11.18-19
21. 新藤晋, 池園哲郎, 岩崎聡, 稲井俊太, 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 回日本耳科学会総会・学術講演会(愛媛県松山市) 2010.10.7-9
22. 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 回日本耳科学会総会・学術講演会(愛媛県松山市) 2010.10.7-9

23. 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: いわゆる"特発性外リンパ瘻"症例 15 例の検討: 第 20 回日本耳科学会総会・学術講演会(愛媛県松山市) 2010.10.7-9

24. 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(宮城県仙台市)2010.5.20-22

25. 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(東京都新宿区)2010.1.28-29

[ 産業財産権 ]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 7 件)

1.名称:外リンパ瘻の検出方法  
発明者:池園哲郎、八木聰明、大森彬  
権利者:学校法人日本医科大学・三菱化学株式会社  
種類:特許  
番号:特許第 4172777 号  
取得年月日:2008 年 8 月 22 日  
国内外の別:国内

2.名称:耳治療用成型物  
発明者:池園哲郎、八木聰明  
権利者:学校法人日本医科大学・株式会社高研  
種類:特許  
番号:特許第 4172808 号  
取得年月日:2008 年 8 月 22 日  
国内外の別:国内

3.名称:外リンパ瘻の検出方法  
発明者:池園哲郎、八木聰明、大森彬  
権利者:学校法人日本医科大学  
種類:特許  
番号:ZL03815172.3  
取得年月日:2007 年 9 月 5 日  
国内外の別:国外(中国)

4.名称:外リンパ瘻の検出方法  
発明者:池園哲郎、八木聰明、大森彬  
権利者:学校法人日本医科大学  
種類:特許  
番号:2003243985  
取得年月日:2009 年 7 月 3 日  
国内外の別:国外(オーストラリア)

5.名称:外リンパ瘻の検出方法  
発明者:池園哲郎、八木聰明、大森彬  
権利者:学校法人日本医科大学  
種類:特許

番号 : US 7,863,005 B2  
取得年月日:2011 年 1 月 4 日  
国内外の別:国外(アメリカ)

6.名称:外リンパ瘻の検出方法  
発明者:池園哲郎、八木聰明、大森彬  
権利者:学校法人日本医科大学  
種類:特許  
番号 : EP 1533319 B1  
取得年月日: 2011 年 1 月 12 日  
国内外の別:国外(ヨーロッパ)

7.名称:眼振誘発装置  
発明者:加藤政利、新藤晋、野原秀明、池園哲郎、八木聰明  
権利者:学校法人日本医科大学  
種類:特許  
番号 :特許第 4625973 号  
取得年月日: 2010 年 11 月 19 日  
国内外の別:国内

[ その他 ]  
ホームページ等 無し

6 . 研究組織  
(1)研究代表者  
池園 哲郎(IKEZONO TETSUO)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 80277491

(2)研究分担者 無し

(3)連携研究者 無し