[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C07K 16/18
G01N 33/53

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03815172.3

[43] 公开日 2005 年 9 月 7 日

[11] 公开号 CN 1665841A

[22] 申请日 2003.6.26 [21] 申请号 03815172.3
[30] 优先权
[32] 2002. 6.27 [33] JP [31] 187479/2002
[86] 国际申请 PCT/JP2003/008123 2003.6.26
[87] 国际公布 WO2004/003020 日 2004.1.8
[85] 进入国家阶段日期 2004.12.27
[71] 申请人 学校法人日本医科大学
地址 日本东京都
[72] 发明人 池园哲郎 八木聪明 大森彬
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 郭 煜 王景朝

权利要求书 2 页 说明书 35 页 序列表 5 页
附图 10 页

[54] 发明名称 外淋巴瘘的检测方法

[57] 摘要

本发明的目的在于提供简便、可靠、且对患者的侵袭度低的外淋巴瘘的检测方法。本发明提供外淋巴瘘的检测方法，该方法包括检测存在于中耳的体液中是否存在 Cochlin。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

1. 外淋巴瘘的检测方法，该方法包括检测存在于中耳的体液中是否存在 Cochlin。

2. 如权利要求 1 所述的方法，该方法是检测存在于被疑为罹患外淋巴瘘患者的中耳的体液中是否存在 Cochlin，以检测出的 Cochlin 的存在作为外淋巴瘘可能性的指标。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中检测 Cochlin 是否存在是通过检测是否存在含有 Cochlin 的 N 末端片段的蛋白质而进行的。

4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法，其中检测 Cochlin 是否存是通过免疫学方法进行的。

5. 如权利要求 4 所述的方法，其中免疫学方法使用抗 Cochlin N 末端片段抗体进行。

6. 如权利要求 4 或 5 所述的方法，其中免疫学方法使用识别序列表 SEQ ID NO.1 的氨基酸编号 36-127 所表示的氨基酸序列中所含有的抗原决定基的抗体进行。

7. 如权利要求 4-6 中任一项所述的方法，其中免疫学方法使用抗 Cochlin N 末端片段抗体进行，所述抗 Cochlin N 末端片段抗体的特征在于：识别包含在序列表 SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6 或 SEQ ID NO.7 中记载的氨基酸序列所表示的多肽中的抗原决定基。

8. 抗 Cochlin N 末端片段抗体，其特征在于：识别序列表 SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6 或 SEQ ID NO.7 中记载的氨基酸序列所表示的多肽中所含有的抗原决定基。

9. 外淋巴瘘检测试剂，该试剂含有抗 Cochlin 抗体。

10. 如权利要求 9 所述的外淋巴瘘检测试剂，其中所述抗 Cochlin 抗体是抗 Cochlin N 末端片段抗体。

11. 如权利要求 9 或 10 所述的外淋巴瘘检测试剂，其中所述抗 Cochlin 抗体是识别序列表 SEQ ID NO.1 的氨基酸编号 36-127 所表示的氨基酸序列中所含有的抗原决定基的抗体。

12. 如权利要求 9-11 中任一项所述的外淋巴瘘检测试剂，其中所述抗 Cochlin 抗体是抗 Cochlin N 末端片段抗体，该抗 Cochlin N

末端片段抗体的特征在于：识别序列表的 SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6 或 SEQ ID NO.7 中记载的氨基酸序列所表示的多肽中所含有的抗原决定基。

13. 外淋巴瘘检测试剂盒，该试剂盒含有如权利要求 9-12 中任一项所述的外淋巴瘘检测试剂。

外淋巴瘘的检测方法

技术领域

本发明涉及外淋巴瘘的检测方法、该检测方法中使用的抗体、试剂和试剂盒。

背景技术

外淋巴瘘（Perilymph fistula）是存在于内耳组织的外淋巴由内耳窗（圆窗、卵圆窗其中之一或两者）或前窗小裂（内耳与外耳之间的骨裂隙）向鼓室内（中耳）漏出，从而产生听觉、平衡感障碍的疾病，其发生原因可能是先天性畸形、梅毒、镫骨手术、头部外伤（包括气压伤）、特发性（原因不明）等。已知例如由擤鼻涕、喷嚏、咳、憋劲、潜水、登山、外伤等日常生活中通常进行的行动所产生的脑脊液压、内耳压急剧变化而引起，是在急性感音性耳聋或眩晕·平衡障碍中占一定比例的疾病。

但一直以来，该外淋巴瘘的诊断是按照诊断基准（浅野等著“耳展”34，4；1991 年：p. 411-425），通过综合检查生理学诊察、症状、病史等的方法进行的，因此有很多不确定的情况，另外，为确诊而选择进行的鼓室开放术对患者的侵袭度也成为一个问题。并且，即使进行鼓室开放术，也无法通过目视确认外淋巴的漏出，有很多不能确诊的病例。

另一方面，突发性耳聋是急性感音性耳聋中尚不能明确原因、在急性感音性耳聋中所占比例最高的疾病。但是，有报告指出：对这种特发性耳聋患者进行试验性鼓室开放术，结果 11 例中有 8 例被证实为外淋巴瘘（吉冈邦英著“耳鼻咽喉科展望”Vol. 26，Suppl. 6；1983 年：p. 517-539）。另外有显示，已知作为急性感音性耳聋的一种、现代社会中有上升趋势的综合征—梅尼埃尔氏病中更是包含外淋巴瘘患者。实际上对多数梅尼埃尔氏病患者进行分析的结果显示，原本诊断为梅尼埃尔氏病的患者中也包含了外淋巴瘘患者，也有报告对其进行鉴别诊断的必要性进行了阐述（D. C. Fitzgerald 著“Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.”110；2001 年：p. 430-436）。以上

表明：与上述诊断基准不符的病例中也包含外淋巴瘘。但是，外淋巴瘘的确诊方法尚未建立，目前的现状是在临床现场还难以进行实质性的鉴别，这些问题尚未解决。外淋巴瘘是急性感音性耳聋中有望通过手术改善听觉、平衡感障碍的唯一的疾病，并且及时的治疗左右着治愈率，因此，人们强烈希望开发出简便、可靠、且对患者的侵袭度低的诊断方法。

目前，虽然已有下述报告：研究可用作外淋巴瘘诊断的标记物，提出使用 ApoD 和 ApoJ 作为指标的报告（Thalmann 等著“Otolaryngology-Head and Neck Surgery” 111，3,1；1994 年：p. 273-280）；以 GM1（单唾液酸四己糖神经节苷脂 1）为指标尝试诊断外淋巴瘘的报告（神崎仁等著“厚生劳动省特定疾患对策研究事业·急性高度感音难听に関する调查研究班·平成 11 年度报告书”；2000 年：p. 41-43）、提出使用前列腺素 D 合成酶（Prostagrandin D synthase）作为指标的报告（G.Bachmann 等著“J.Laryngol. otol.” 115；2001 年：p. 132-135）、以运铁蛋白为指标尝试诊断外淋巴瘘的报告（Rauch S.D.著“Laryngoscope” 110（4）；2000 年：p. 545-552）等，但都不是可临床应用的方法。

另一方面，COCH 是作为遗传性无综合征耳聋 DFNA9 的原因基因而鉴定出的基因，由该基因编码的 COCH 蛋白被命名为 Cochlin（N.G.Robertson 著“Narure Genet.” 20；1998 年：p. 299-303；以及 NCBI OMIM 主页；http://www.ncbi.nlm.nih.goy/）。

本发明人注意到该 Cochlin 是人类耳聋中重要的蛋白质，对牛内耳组织中的 Cochlin 进行了蛋白质组分析，明确了 Cochlin 具有 3 个不同的 N 末端，存在分别具有 63 kDa、44 kDa 和 40 kDa 分子量的 3 种异构体 p63、p44 和 p40。另外，有报告指出：N 末端有被称为 LCCL（Trexler 等著“Eur. J. Biochem.” 267；2000 年：p. 5751-5757）的模件（modules），迄今为止发现的 DFNA9 有关的突变全部存在与该模件内，且只包含在异构体 p63 中，在其它异构体中不存在（Ikezono 等著“Biochem. Biophys. Acta” 1535（3）；2001 年：p. 258-265）。但是，上述报告只是通过牛内耳组织的双向凝胶电泳法（2D-GE）进行蛋白质组分析所得，对于 Cochlin 的临床意义等并未进行充分的研究。

另外，N.G.Robertson 等人制备了抗 Cochlin 抗体，进行内耳组织的免疫组织染色等，对内耳组织中 Cochlin 表达进行了分析（N.G.Robertson 著“Hum. Mol. Genet.”10（22）；2001 年：p. 2493-2500）。但是该报告只是对蛋白质在内耳组织中的局部存在等进行了分析，并没认识到 Cochlin 在外淋巴中的存在。

发明内容

本发明要解决的课题是：提供简便、可靠、且对患者的侵袭度低的外淋巴瘘的检测方法。本发明的另一个要解决的课题是：提供本发明的检测方法中使用的抗体、试剂和试剂盒。

本发明人为解决上述课题进行了深入的研究，结果发现：以存在于被疑为罹患外淋巴瘘患者中耳中的体液为试样，以该试样中的 Cochlin 的存在作为指标，可以检测外淋巴瘘。本发明基于这些认识而完成。

即，本发明提供以下发明。

（1）外淋巴瘘的检测方法，该方法包括检测存在于中耳的体液中是否存在 Cochlin。

（2）（1）的方法，该方法是检测存在于被疑为罹患外淋巴瘘患者的中耳中的体液中是否存在 Cochlin，以检测的 Cochlin 的存在作为外淋巴瘘可能性的指标。

（3）（1）或（2）的方法，其中检测 Cochlin 是否存在通过检测含有 Cochlin 的 N 末端片段的蛋白质是否存在而进行。

（4）（1）-（3）中任一项的方法，其中 Cochlin 是否存在的检测通过免疫学方法进行。

（5）（4）的方法，其中免疫学方法使用抗 Cochlin N 末端片段抗体进行。

（6）（4）或（5）的方法，其中免疫学方法使用识别包含在序列表 SEQ ID NO.1 的氨基酸编号 36-127 所表示的氨基酸序列中的抗原决定基的抗体进行。

（7）（4）-（6）中任一项的方法，其中免疫学方法使用抗 Cochlin N 末端片段抗体进行，所述抗 Cochlin N 末端片段抗体的特征在于：识别包含在序列表 SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6 或 SEQ

ID NO.7 的氨基酸序列所表示的多肽中的抗原决定基。

（8）抗 Cochlin N 末端片段抗体，其特征在于：识别包含在序列表 SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6 或 SEQ ID NO.7 的氨基酸序列所表示的多肽中的抗原决定基。

（9）外淋巴瘘检测试剂，该试剂含有抗 Cochlin 抗体。

（10）（9）的外淋巴瘘检测试剂，其中所述抗 Cochlin 抗体是抗 Cochlin N 末端片段抗体。

（11）（9）或（10）的外淋巴瘘检测试剂，其中所述抗 Cochlin 抗体是识别包含在序列表 SEQ ID NO.1 的氨基酸编号 36-127 所表示的氨基酸序列中的抗原决定基的抗体。

（12）（9）-（11）中任一项的外淋巴瘘检测试剂，其中所述抗 Cochlin 抗体是抗 Cochlin N 末端片段抗体，该抗 Cochlin N 末端片段抗体的特征在于：识别包含在序列表 SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6 或 SEQ ID NO.7 的氨基酸序列所表示的多肽中的抗原决定基。

（13）外淋巴瘘检测试剂盒，该试剂盒含有（9）-（12）中任一项的外淋巴瘘检测试剂。

附图简述

图 1 表示用抗 p63/44/40 抗体、抗 p63/44 抗体和抗 LCCL 抗体 3 种抗体，通过蛋白质印迹法对人、牛、豚鼠的内耳组织提取液和外淋巴进行分析的结果。

图 2 表示用抗 LCCL 抗体，通过蛋白质印迹法对来自人的各种试样进行分析的结果。图中，1-12 孔号与表 1 的各孔号对应，照片下标示了该孔中的试样。各试样名下的“+”表示检出 16 kDa 的蛋白质，“-”表示未检出。

图 3 表示用抗 LCCL 抗体，通过蛋白质印迹法对来自人的各种试样进行分析的结果。图中，13-24 孔号与表 1 的各孔号对应，照片下标示了该孔中的试样。各试样名下的“+”表示检出 16 kDa 的蛋白质，“-”表示未检出。

图 4 表示用抗 LCCL 抗体，通过蛋白质印迹法对来自人的各种试样进行分析的结果。图中，25-36 孔号与表 1 的各孔号对应，照片

下标示了该孔中的试样。各试样名下的“+”表示检出 16 kDa 的蛋白质，“-”表示未检出。上面的照片表示通过化学发光发检测时，使膜感光 1 小时的结果，下面的照片表示使同样的硝基纤维素膜感光 10 秒的结果。

图 5 表示用抗 LCCL 抗体，通过蛋白质印迹法对来自人的各种试样进行分析的结果。图中，37-48 孔号与表 1 的各孔号对应，照片下标示了该孔中的试样。各试样名下的“+”表示检出 16 kDa 的蛋白质，“-”表示未检出。“±”表示无法判断。

图 6 表示用抗 LCCL 抗体，通过蛋白质印迹法对来自人的各种试样进行分析的结果。图中，49-60 孔号与表 1 的各孔号对应，照片下标示了该孔中的试样。各试样名下的“+”表示检出 16 kDa 的蛋白质，“-”表示未检出。

图 7 表示用抗 LCCL 抗体，通过蛋白质印迹法对来自人的各种试样进行分析的结果。图中，61-72 孔号与表 1 的各孔号对应，照片下标示了该孔中的试样。各试样名下的“+”表示检出 16 kDa 的蛋白质，“-”表示未检出。

图 8 表示使用抗 LCCL 抗体、抗 LCCL1 抗体、抗 LCCL2 抗体、抗 LCCL3 抗体四种抗体通过蛋白质印迹法对牛外淋巴及内耳组织提取液进行分析的结果。

图 9 表示使用抗 LCCL3 抗体通过蛋白质印迹法对来自人的各种试样进行分析的结果。下图是将上图 16 kDa 附近的分辨率提高得到的图。图中，73-83 孔号与表 2 的各孔号对应，照片下标示了该孔中的试样。各试样名下的“+”表示检出 16 kDa 的蛋白质，“-”表示未检出。

图 10 表示用于制备本发明的抗体的抗原多肽在 SEQ ID NO.1 的氨基酸序列上的位置关系。

具体实施方式

以下，对本发明的实施方式进行更为详细的说明。

本说明书中，如无特别说明，蛋白质的纯化和分析、以及抗体的制备等方法可按照新生化学实验讲座（日本生化学会编：东京化学同人）、Antibodies-A Laboratory Manual(E. Harlow, 等., Cold Spring

Harbor Laboratory（1988））等常规实验书记载的方法或参考它们进行。

1. 外淋巴瘘的检测方法

本发明中，外淋巴瘘（Perilymph fistula）是存在于内耳组织的外淋巴因某些原因由内耳窗（圆窗、卵圆窗其中之一或两者）或前窗小裂（内耳与外耳之间的骨裂隙）向鼓室内（中耳）漏出，从而产生听觉、平衡感障碍的疾病。该疾病可通过确认外淋巴向中耳漏出来检测。本发明的外淋巴瘘的检测方法的特征是：在存在于被疑为罹患该疾病的患者的中耳中的体液中，检测是否存在只存在于外淋巴中的 Cochlin，以作为该患者罹患外淋巴瘘的可能性的指标。根据本方法，无需依靠外淋巴瘘发病原因和机理即可进行检测。

Cochlin 是由作为遗传性无综合征耳聋 DFNA9 的原因基因而鉴定出的基因 COCH 所编码的蛋白质（N.G.Robertson，Nature Genet.，20，299-303（1998））。该蛋白质在人、牛、豚鼠、大鼠等动物种类中具有 3 个不同的 N 末端，以具有 63 kDa、44 kDa 和 40 kDa 分子量的 3 种异构体 p63、p44 和 p40 形式存在（Ikezono 等.，Biochem. Biophys. Acta，1535，3，258-265（2001））。本说明书中，序列表 SEQ ID NO.1 所示的 Cochlin 的氨基酸序列是 Narure Genet.，20，299-303（1998）中记载的人 Cochlin 的氨基酸序列，本说明书中的氨基酸编号采用该序列的氨基酸编号。例如：人中，具有最大的 63 kDa 分子量的异构体 p63 是包含该氨基酸序列中氨基酸编号 25-550 所表示的氨基酸序列的蛋白质。异构体 p44 是包含该氨基酸序列中氨基酸编号 133-550 所表示的氨基酸序列的蛋白质，异构体 p40 是包含氨基酸编号 152-550 所表示的氨基酸序列的蛋白质。另外，该氨基酸序列中，氨基酸编号 1-24 所表示的部分是信号序列。

本发明中，对于作为外淋巴瘘可能性的指标使用的 Cochlin，优选采用含有包括异构体 p63 N 末端的氨基酸序列的片段（以下将其称为“N 末端片段”）的蛋白质。该片段只要包含 Cochlin 的异构体 p63 N 末端的氨基酸序列即可，可以是具有任意大小的蛋白质，例如是 SEQ ID NO.1 中氨基酸编号 36-127 所表示的氨基酸序列，进一步优选由抗 Cochlin N 末端片段抗体所识别的、具有约 16 kDa 分子量

的 N 末端片段，其中所述抗 Cochlin N 末端片端抗体的特征是识别包含在后述的 SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6 或 SEQ ID NO.7 的氨基酸序列所表示的多肽中的抗原决定基；特别优选由抗体等识别的具有约 16 kDa 分子量的 N 末端片段，其中所述抗体等的特征是识别包含在 SEQ ID NO.2 和/或 SEQ ID NO.7 的氨基酸序列所表示的多肽中的抗原决定基。另外，除该片段之外，只要是在可存在于人的中耳中的其它体液中基本上不存在的、而只存在于外淋巴中、且具有序列表 SEQ ID NO.1 所示的氨基酸序列或其部分序列的蛋白质，则可以任意使用。具体地说，例如可以是异构体 p63，也可以是异构体 p44 或 p40，还可以是含有它们的片段的蛋白质。本说明书中，将上述蛋白质简称为“Cochlin”。上述 Cochlin 的三个异构体和 N 末端片段的分子量（kDa）均是采用双向电泳法，利用大小标记（size marker）进行校正，由此计算得到的值。

供给本发明的检测方法的试样采用存在于被疑为罹患外淋巴瘘的患者中耳中的体液。可存在于人中耳内的体液例如有外淋巴、脑脊液（erebro-Spinal Fluid；以下将其称为“CSF”）、血液、唾液、由中耳粘膜产生的中耳粘液等。例如已知 CSF 是由于手术等经由内耳道的第 8 脑神经通路或蜗小管流入内耳的脑脊液又流入中耳，或由于外伤、骨折、内耳畸形等而流入的。血液可因外伤导致的出血、中耳粘膜出血等而存在于中耳中。已知唾液是存在于上咽的唾液由耳管逆流流入中耳。另外渗出性中耳炎患者存在中耳渗出液、慢性中耳炎患者存在耳漏（脓）等。这些体液通过目视无法判别，但采集它们进行分析，通过分析该试样中 Cochlin 的存在，可以判别作为试样采集的体液是否为外淋巴，可以作为外淋巴瘘的可能性的指标。

采集存在于中耳内的体液的方法是尽量不混入血液、药剂等，也不混入其它蛋白质的可采集的方法，只要是对患者的侵袭度低的方法，可以采用任意方法。例如可以将鼓膜切开微小口子，插入针筒，直接吸取该体液进行采集，也可以插入棉棒等，拭取存在的体液进行采集。所采集的体液为极微量时，优选采用用针筒等适量注入生理盐水等适当的溶液，然后用针筒等回收该溶液的方法。本发明中，通过这样的方法回收的溶液称为“中耳洗涤液”。这里所使用的溶

液要选择在组成、pH、温度等方面为生理学可接受、对患者的负担少的溶液。另外，中耳经由咽鼓管与上咽、中咽相通，因此可以采集通过咽鼓管到达上咽、中咽的来自中耳的体液。具体来说，例如可以由口腔或鼻腔插入棉棒等，通过拭取存在于上咽或中咽的体液来进行采集。

上述采集的体液优选在采集后立即用于分析，也可以先在 4 至-80℃、优选-20 至-70℃等低温条件下保存。保存时，可以根据需要添加抑制蛋白质变性等的保存剂、防止腐败的防腐剂等。另外，这些试样还可以根据需要进行浓缩、纯化等前处理，然后用于分析。这些具体的方法可以采用其本身公知的常用的蛋白质浓缩、纯化等方法。

在通过如上所述的方法采集的、存在于被疑为罹患外淋巴瘘的患者中耳的体液中，作为检测 Cochlin 存在的方法，只要是公知的蛋白质检测、分析方法即可，可以使用任意的方法。具体来说，检测 Cochlin 是否存在，可以通过免疫学方法进行，也可以通过非免疫学方法（液相色谱、双向电泳、质量分析以及它们的组合等）进行。其中本发明中优选使用免疫学方法，该方法使用识别上述 Cochlin 或其部分多肽的抗体（以下将其称为“抗 Cochlin 抗体”）。作为蛋白质免疫学检测方法，例如蛋白质印迹法、酶联免疫测定法（ELISA 法）、化学发光免疫测定法、荧光抗体法、放射免疫测定法、胶乳凝集法、免疫比浊法、免疫层析法等其本身为公知的常用方法，可以采用任意的方法，其中优选采用蛋白质印迹法、ELISA 法等。

通过酶联免疫测定法（ELISA 法）、化学发光免疫测定法、荧光抗体法、放射免疫测定法等使用标记抗体的免疫测定法实施本发明的检测方法的情况下，可通过夹心法或竞争法进行。采用夹心法时，只要固相抗体和标记抗体中的至少一种为抗 Cochlin 抗体即可。

夹心法中使用的固相载体只要是可用于担载抗体的不溶性载体即可，例如可以例举（1）含有聚苯乙烯树脂、聚碳酸酯树脂、硅树脂或尼纶树脂等的塑料，或含有玻璃等所代表的水不溶性物质的板，试管或管等具有容积的物质，珠，球，滤器或膜等；以及（2）纤维素系载体、琼脂糖系载体、聚丙烯酰胺系载体、葡聚糖系载体、聚苯乙烯系载体、聚乙烯醇系载体、聚氨基酸系载体或多孔性二氧

化硅系载体等亲和层析中所使用的不溶性载体。

测定的操作方法可按照公知的方法（例如日本临床病理学会编“临床病理临时增刊特集第53号用于临床检查的免疫测定—技术和应用—”，临床病理刊行会，1983年；石川荣治等编“酶免疫测定法”，第3版，医学书院，1987年；北川常广等编“蛋白质核酸酵素分册No.31酶免疫测定法”，共立出版，1987年）进行。

例如，可以使固相抗体与试样反应，同时使标记抗体反应、或洗涤后使标记抗体反应，形成固相抗体-抗原-标记抗体的复合物。洗涤分离未结合的标记抗体，由结合标记抗体的量测定试样中的抗原量。具体地说，采用酶联免疫测定法（ELISA法）时，在最佳条件下使底物与标记酶反应，通过光学方法等测定该反应产物的量。采用荧光免疫测定法时，测定荧光标记物产生的荧光强度；采用放射免疫测定法时，测定发射性标记物产生的放射线量。采用化学发光免疫测定法时，测定发光反应系统产生的发光量。

像胶乳凝集反应或免疫比浊法等情形那样，通过由光学方法测定其透射光或散射光或目视测定等测定方法来测定免疫复合物的凝集物的生成，由此实施本发明的检测方法时，溶剂可以使用磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris缓冲液或good's buffer等，还可以含有聚乙二醇等反应促进剂或非特异性反应抑制剂。

使抗体担载在固相载体上使用时，固相载体可以使用含有聚苯乙烯、苯乙烯-丁二烯共聚物、（甲基）丙烯酸酯类聚合物、胶乳、明胶、脂质体、微胶囊、红细胞、二氧化硅、氧化铝、碳黑、金属化合物、金属、陶瓷或磁性体等材质的颗粒。

该担载的方法可以使用物理吸附法、化学结合法或这些方法结合使用等公知的方法。测定的操作方法可按照公知的方法进行，例如通过光学方法测定时，使试样与抗体、或使试样担载于固相载体上的抗体反应，通过终点法或比例法测定透射光或散射光。

另外，目视测定时，在孔板或微量滴定板等容器中，使试样与担载于固相载体上的抗体反应，目视判定凝集的状态。也可以使用酶标仪等仪器代替目视测定来进行测定。

采用上述方法，以存在于患者中耳内的体液为试样进行分析，当在该试样中检测出Cochlin的存在时，则可判定该患者有罹患了外淋

巴瘘的可能性。另外，通过其本身为公知的常用的蛋白质定量法进行定量，可以求出该体液中的 Cochlin 的存在量。

2. 用于检测 Cochlin 的抗体以及使用该抗体的试剂

在上述的免疫学方法中使用的抗体只要是识别 Cochlin 的抗体均可使用。即，本发明提供含有抗 Cochlin 抗体的外淋巴瘘检测试剂。

抗 Cochlin 抗体例如可以以具有序列表 SEQ ID NO.1 记载的氨基酸序列或其部分序列的多肽（以下也称为“抗原多肽”）作为抗原来制备。具体来说，例如优选使用识别包含在抗原多肽中的抗原决定基（以下也称为“表位”）的抗体（以下也将其称为“抗 Cochlin N 末端片段抗体”），其中所述抗原多肽在含有上述 N 末端片段的蛋白质中具有特异性的氨基酸序列。在抗 Cochlin N 末端片段抗体中，特别优选识别抗原多肽中含有的抗原决定基的抗体，其中该抗原多肽对含有具有约 16 kDa 分子量的 N 末端片段的蛋白质具有特异性。更具体地说，这样的抗体例如是识别包含在序列表 SEQ ID NO.1 中氨基酸编号 36-127 所表示的氨基酸序列中的抗原决定基的抗体。

本发明的如上所述的抗体优选不与存在于人中耳中除外淋巴以外的体液中所包含的其他蛋白质等反应，但如果与 Cochlin 的反应性足够高、可以将外淋巴与其它体液区别开，则也可以可使用。具体来说，例如使用蛋白质印迹法进行检测时，只要由该抗体检测出的谱带位置等能够将来自 Cochlin 的谱带和来自其它蛋白质的谱带明确区别开来即可。

抗原多肽可以根据其本身为公知的方法选择抗原性高、适合作为抗原决定基的序列使用。例如可以使用“Epitope Adviser”（富士通九州 System engineering 社制造）等市售的表位分析软件对 Cochlin 的氨基酸序列进行分析，综合预测立体结构上暴露部位、疏水性和亲水性、结构的柔软性、极性等，选择出推定具有容易变为表位的形状的序列。另外，例如可在制备在多种动物种类中反应的抗体时，用适当的序列分析软件等比对作为目标的多个动物种类所具有的 Cochlin 的氨基酸序列，从各动物种类中共通的氨基酸序列中选择容易成为表位的部分序列。另外，在制备与某一特定动物种类所具有的 Cochlin 特异性结合的抗体时，可以选择与其它动物种类所具有的 Cochlin 的氨基酸序列的同源性低的部分。

关于抗原多肽的长度，只要是根据后述的方法使用该多肽进行免疫时，可在被免疫的动物中具有作为抗原可被识别的长度即可，可以是任意长度。具体来说，例如可以使用 5-30 个残基的氨基酸，优选 10-25 个残基的长度。这样的抗原多肽可以是按照公知的方法化学合成的合成多肽，也可以是由天然物提取、纯化的多肽。

作为上述所选择的抗原多肽，只要含有存在于外淋巴的 Cochlin 所具有的氨基酸序列，则可从具有序列表 SEQ ID NO.1 的氨基酸序列或其部分序列的多肽中任意选择使用。例如作为用于制备抗 Cochlin N 末端片段抗体的抗原多肽，只要具有包含至少一个上述 N 末端片段中所具有的抗原决定基的氨基酸序列，则可以任意使用。具体来说，例如优选使用序列表 SEQ ID NO.1 中氨基酸编号 36-127 所表示的氨基酸序列中，具有包含至少一个抗原决定基的氨基酸序列的多肽。更具体地说，优选使用序列表 SEQ ID NO.1 中氨基酸编号 36-50（SEQ ID NO.2）、63-83（SEQ ID NO.5）、95-111（SEQ ID NO.6）、114-127（SEQ ID NO.7）所表示的多肽。其中特别优选氨基酸编号 36-50（SEQ ID NO.2）或 114-127（SEQ ID NO.7）所表示的多肽。

另外，例如作为制备可全部识别异构体 p63、p44、p40 三个异构体的抗体时所使用的抗原多肽，例如优选使用序列表 SEQ ID NO.1 中氨基酸编号 163-181（SEQ ID NO.4）所表示的多肽等。作为制备可识别异构体 p63、p44 两个异构体的抗体时所使用的抗原多肽，例如优选使用序列表 SEQ ID NO.1 中氨基酸编号 137-151（SEQ ID NO.3）所表示的多肽等。

这些抗原多肽在 SEQ ID NO.1 的氨基酸序列上的位置关系如图 10 所述。

抗体的制备可以采用其本身为公知的常用的方法进行。本发明的抗体可以是多克隆抗体也可以是单克隆抗体，优选使用多克隆抗体。具体来说，例如制备多克隆抗体时，使用碳化二亚胺、马来酰亚胺等适当的缩合剂，使上述抗原多肽与 KLH（匙孔血蓝蛋白）、BSA（牛血清白蛋白）、猪甲状腺球蛋白等载体蛋白结合，制备用于免疫的抗原（免疫原）。这里，抗原多肽与载体蛋白的结合可通过其本身为公知的常用方法进行，例如当采用以 KLH 作为载体蛋白，

通过马来酰亚胺化使抗原多肽结合的方法时，可优选使硫代-SMMC（4-（N-马来酰亚氨基甲基）环己烷-1-甲酸硫化琥珀酰亚氨基酯）等双官能性缩合剂与 KLH 反应，进行马来酰亚胺化，再使抗原多肽与其反应，其中所述抗原多肽是在 N 末端或 C 末端中成键一侧的末端上加成了半胱氨酸的抗原多肽，这样就可经由巯基容易地结合，制备免疫原。所选择的抗原多肽的氨基酸序列中含有半胱氨酸时，也可以利用它结合。另外，使用碳化二亚胺化的 KLH 时，可以通过与抗原多肽的脱水缩合形成肽键来结合。

根据需要，将含有这样制备的免疫原的溶液与佐剂混合，每隔 2-3 周对兔、小鼠、大鼠、豚鼠、绵羊、山羊、鸡等通常制备抗体所使用的动物的皮下或腹腔反复免疫。免疫后，优选进行适当的试验性采血，通过 ELISA 法、蛋白质印迹法等免疫学方法确认滴度（抗体滴度）充分增加。经确认滴度有足够增加后，由动物采血，分离血清，得到抗血清。当为鸡时，由鸡卵中采集卵黄，由卵黄中分离水溶性组分，制备卵黄提取液，这也同样可以用作抗血清。

本发明中，无需对所得抗血清进行纯化，可以直接使用，但优选通过以下的方法纯化使用。例如有使用 A 蛋白的纯化方法、用硫酸铵盐析的方法、通过离子交换层析等纯化免疫球蛋白组分的方法、或者通过使用固定有特定多肽的柱进行亲和柱层析纯化的方法等，其中优选使用 A 蛋白的纯化方法和使用亲合柱层析的方法其中之一或将它们组合进行。这里，固定于柱上、用于纯化的多肽可以根据所使用的抗原多肽的氨基酸序列，选择与其相同的序列或包含其一部分序列的多肽使用。

制备单克隆抗体时，与上述同样，从受免疫的动物的脾中采集抗体生成细胞，按照常规方法与来自同类动物等的骨髓瘤细胞等培养细胞融合，制备杂交瘤（Milstein 等., Nature, 256, 495（1975））。进行培养，适当地通过 ELISA 法、蛋白质印迹法等确认抗体滴度，生成识别目标表位的单克隆抗体，且选择抗体生成能力高的杂交瘤。由上述经选择的杂交瘤的培养上清中，可获得目标单克隆抗体。

上述所得抗体均是特异性识别 Cochlin 的抗体。这可如下确认：从适当的动物种类采集内耳组织等已知存在 Cochlin 的组织，将其制备成提取液，使用该提取液作为阳性对照；或者化学合成具有作为

抗原多肽使用的氨基酸序列的多肽，分析上述所得抗体与它们的反应性。另外，也优选以外淋巴作为试样，确认上述所得抗体与存在于外淋巴中的 Cochlin 的反应性。

本说明书中所述抗体不仅指全长度的抗体，也包括抗体的片段。抗体的片段优选功能性片段，例如有 F（ab’）$_2$、Fab’等。F（ab’）$_2$、Fab’是通过将免疫球蛋白用蛋白分解酶（例如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶等）处理来制备的，是在存在于铰链区的两条 H 链之间的二硫键的前后被消化而生成的抗体片段。抗体片段也包括包含抗原结合位点的蛋白质，其中所述抗原结合位点来自编码该抗体的基因。

例如，将 IgG1 用木瓜蛋白酶处理，可制备相同的 2 个抗体片段，所述相同的 2 个抗体片段是在存在于铰链区的 2 条 H 链之间的二硫键的上游被切断，由包含 VL（L 链可变区）和 CL（L 链恒定区）的 L 链，以及包含 VH（H 链可变区）和 CHγ1（H 链恒定区中的 γ1 区）的 H 链片段在 C 末端区通过二硫键结合而成。将该 2 个相同的抗体片段分别称为 Fab’。另外，将 IgG 用胃蛋白酶处理，在存在于铰链区的 2 条 H 链之间的二硫键的下游被切断，可制备比上述 2 个 Fab’在铰链区连接的片段稍大的抗体片段。将该抗体片段称为 F（ab’）$_2$。

本发明的抗体可以作为担载于固相载体等不溶性载体上的固定抗体使用，或作为用标记物标记的标记抗体使用。这样的固定抗体、标记抗体全部在本发明的范围内。

固定抗体是指通过物理吸附或化学结合等处于担载于不溶性载体上的状态的抗体。这些固定抗体可用于检测或定量存在于中耳的体液中所含有的 Cochlin。可用于担载抗体的不溶性载体例如有（1）含有聚苯乙烯树脂、聚碳酸酯树脂、硅树脂或尼龙树脂等的塑料，或含有玻璃等所代表的水不溶性物质的板，试管或管等具有容积的物质，珠，球，滤器或膜等；以及（2）纤维素系载体、琼脂糖系载体、聚丙烯酰胺系载体、葡聚糖系载体、聚苯乙烯系载体、聚乙烯醇系载体、聚氨基酸系载体或多孔性二氧化硅系载体等亲和层析中使用的不溶性载体。

标记抗体是指用标记物标记的抗体，这些标记抗体可用于检测或定量存在于中耳的体液中所含有的 Cochlin。可在本发明中使用的标

记物只要是通过物理结合或化学结合等与抗体结合，由此可检测它们的存在的物质即可，并没有特别限定。标记物的具体例子有酶、荧光物质、化学发光物质、生物素、抗生物素蛋白或放射性同位素等，更具体地说，有过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-D-半乳糖苷酶、葡糖氧化酶、葡糖-6-磷酸脱氢酶、醇脱氢酶、苹果酸脱氢酶、青霉素酶、过氧化氢酶、脱辅基葡糖氧化酶（apoglucose oxidase）、尿素酶、萤光素酶或乙酰胆碱酯酶等酶，异硫氰酸荧光素、藻胆蛋白、稀土类金属螯合剂、丹磺酰氯或异硫氰酸四甲基罗丹明等荧光物质，^{3}H、^{14}C、^{125}I 或 ^{131}I 等放射性同位素，生物素，抗生物素蛋白或化学发光物质。标记物与抗体的结合方法可以采用戊二醛法、马来酰亚胺法、吡啶基二硫化物（pyridyl disulfide）法或过碘酸法等公知的方法。

其中放射性同位素和荧光物质单独产生可检测的信号，但酶、化学发光物质、生物素和抗生物素蛋白不可单独产生可检测的信号，因此再与1种或以上其它物质反应，由此产生可检测的信号。例如，当使用酶时，至少需要底物，根据测定酶活性的方法（比色法、荧光法、生物发光法或化学发光法等）而使用各种底物。另外，当采用生物素时，通常至少要与抗生物素蛋白或酶修饰的抗生物素蛋白反应。还根据需要根据该底物的不同而采用各种显色物质。

上述抗 Cochlin 抗体（包括其片段、标记抗体、固相抗体等）可作为外淋巴瘘检测试剂使用。该试剂的形式并没有特别限定，可以是固体也可以是液体（溶液、悬浊液等）。当为液体时，可以通过将上述抗体溶解或悬浮于适当的溶剂（可稳定保存抗体的缓冲液等）来制备试剂。

3. 用于外淋巴瘘的检测的试剂盒

本发明的试剂盒至少含有用于检测试样中是否存在来自外淋巴瘘的 Cochlin 的抗体，以用于检测上述的外淋巴瘘。使用该试剂盒，可以在需要时简便、迅速地进行本发明的外淋巴瘘的检测，其结果可对与其它疾病的鉴别、治疗方案的确定等起到作用。

本发明的试剂盒只要可以进行本发明的检测方法，可以是任意的构成。例如，如果是用 ELISA 法进行 Cochlin 检测的试剂盒，则至少含有用于检测 Cochlin 是否存在的抗体、酶标记的二次抗体，其它

还可以含有使试样中的 Cochlin 吸附的固相、酶底物、稀释液或洗涤液等缓冲液、阳性对照等。这样，本发明的试剂盒至少含有用于检测试样中是否存在 Cochlin 的抗体，并可将本身为公知的常用试剂等组合制备。

实施例

以下通过实施例说明本发明，但本发明并不受这些实施例的任何限定。

下述实施例中，“SDS”代表十二烷基硫酸钠，“PBS”代表磷酸缓冲盐，“DAB”代表 3,3'-二氨基联苯胺，“HRP”代表辣根过氧化物酶。

实施例 1

1. 抗体的制备

制备只识别异构体 p63 的抗体（以下也称为“抗 LCCL 抗体”）、识别异构体 p63 和 p44 的抗体（以下也称为“抗 p63/44 抗体”）和识别全部异构体的抗体（以下也称为“抗 p63/44/40 抗体”）3 种抗体作为 Cochlin 的 3 种异构体的多克隆抗体。抗体的制备委托宝酒造株式会社。

（1）抗原多肽的氨基酸序列的选择

比对在 3 种抗体的制备中使用的抗原多肽，如人、牛、小鼠的 Cochlin 的氨基酸序列（N.G.Robertson，Nature Genet.，20，299-303（1998）；Ikezono 等.，Biochem. Biophys. Acta，1535，3，258-265（2001）），选择这些种的作为共同序列的、且抗原性优异的部分。选择时参考了用“Epitope Adviser”（富士通九州 system engineering 社制造）进行分析的结果。通过该结果，选择了含有存在于异构体 p63 的 N 末端的 15 个氨基酸的多肽（SEQ ID NO.2）作为制备抗 LCCL 抗体用的抗原多肽。这相当于序列表 SEQ ID NO.1 的氨基酸编号 36-50。选择了含有存在于异构体 p44 的 N 末端、在异构体 p63 和 p44 中共通的 15 个氨基酸的多肽（SEQ ID NO.3、相当于序列表 SEQ ID NO.1 的氨基酸编号 137-151）作为制备抗 p63/44 抗体用的抗原多肽。还分别选择了含有存在于异构体 p40 的 N 末端、全部异构体中共通

的 19 个氨基酸序列的多肽（SEQ ID NO.4、相当于序列表 SEQ ID NO.1 的氨基酸编号 163-181）作为制备抗 p63/44/40 抗体用的抗原多肽。

（2）抗体的制备

使用具有上述（1）中所选择的氨基酸序列的各抗原多肽制备多克隆抗体，将该工作委托给了宝酒造株式会社。宝酒造株式会社制备抗体的步骤如下。

首先通过化学合成分别制备 10 mg（80%）上述抗原多肽，通过经由 Cys(半胱氨酸)的马来酰亚胺法，使所述抗原多肽与 2 mg KLH 匙孔血蓝蛋白结合，制成免疫原。这里，由于制备抗 p63/44 抗体和抗 p63/44/40 抗体用的抗原多肽的氨基酸序列中不含有半胱氨酸，因此在用于制备抗 p63/44 抗体的抗原多肽的 C 末端、在用于制备抗 p63/44/40 抗体的抗原多肽的 N 末端加成半胱氨酸，合成多肽，并使用该多肽。每间隔 2 周将该免疫原对 1 只兔进行致敏，共致敏 4 次，第 3 次致敏后，通过 ELISA 法（酶联免疫测定法）进行滴度测定，确认滴度上升。致敏后，按照公知的方法采集 1 ml 抗血清，通过 A 蛋白纯化所得抗血清总量。预先使 5 mg 上述抗原多肽与 5 g 用 CNBr 活化的琼脂糖结合，制备肽亲和柱，接着将用 A 蛋白纯化的抗血清中 80%的量过该柱，进一步纯化。各操作按照其本身为公知的常用方法进行。

（3）抗体的特异性的确认

由牛内耳组织制备内耳蛋白质溶液(阳性对照)，以此作为抗原，通过蛋白质印迹法对上述（2）中制备的抗体的特异性进行确认。

首先，由牛颞骨（购自东京芝浦脏器（株））采集 180 mg 内耳膜迷走神经，向其中加入在冰中将 1 tab 的 1 ml 蛋白质提取液（Complete mini Ca(-)（Boehringer Mannheim 社制）溶解于 10 ml PBS、0.5% SDS 而得到的溶液（pH 7.4）），用试管混合器和ディスポ搅拌磨碎器（GHI 社制）进行匀浆，直至肉眼看不到残余组织，然后用 1000 g 离心 15 分钟，以所得上清作为内耳蛋白质溶液。使用 0.5 μl 该溶液作为阳性对照。蛋白质印迹法按照后面 2 中详述的方法进行。

结果，在使用抗 LCCL 抗体的分析中，在约 63 kDa 的位置可见

谱带，表明识别异构体 p63。在使用抗 p63/44 抗体的分析中，在约 63 kDa 和 44 kDa 的位置检测出谱带，表明该抗体识别异构体 p63 和 p44。另外在使用抗 p63/44/40 抗体的分析中，检测出异构体 p63、p44 和 p40 三条谱带，表明该抗体识别全部异构体。这样显示出使用制备的三种抗体，可区别存在于内耳组织的 3 种 Cochlin 的异构体。

2. 使用 1 的抗体对外淋巴及内耳组织进行的分析

使用上述 1 中制备的 3 种抗体，通过蛋白质印迹法对外淋巴及内耳组织进行分析。

（1）用于电泳和蛋白质印迹法的试剂的制备

（i）样品缓冲液的制备

在 18.75 ml 1 M Tris-HCL（pH 6.8）、15 ml 2-巯基乙醇、30 ml 甘油、6.9 ml 10% SDS、3 ml 0.1%溴酚蓝中加入蒸馏水，使总量为 100 ml。终浓度为 0.188 M Tris 缓冲液、2.39 mM SDS。

（ii）大小标记的制备

将 1 瓶市售的大小标记（prestained protein marker weight standards，高范围已染色蛋白质分子量标准品（高分子量用）；Cat.No.#36041-020（Gibco 社制造））溶解于 500 μl 的 1 mM DTT、10%甘油，煮沸 5 分钟，然后冷却，按照 20 μl/管分注，在-80℃保存。用时熔融使用。

（iii）电泳缓冲液（running buffer）的制备

将 15 g/l Tris 碱、72 g/l 甘氨酸、5 g/l SDS 溶解于 MilliQ（MILLIPORE 社制造）水，制备贮存用的 5 倍浓缩液。使用时将其稀释，以终浓度 25 mM Tris、192 mM 甘氨酸、1 g/l SDS（pH 8.3）使用。

（iv）转印缓冲液（transfer buffer）的制备

将 3.03 g Tris、14.4 g 甘氨酸、200 ml 甲醇溶解于蒸馏水，使终浓度为 25 mM Tris、192 mM 甘氨酸、20% v/v 甲醇（pH 8.3）。

（v）使用 0.1%吐温 PBS（pH 7.4）作为洗涤缓冲液。

（vi）封闭缓冲液（blocking buffer）的制备

将 dry milk(雪印社制造的脱脂乳)溶解于 0.2%吐温的 PBS(pH 7.4）溶液中，使终浓度为 5%。

（vii）抗体稀释缓冲液的制备

将 dry milk(雪印社制造的脱脂乳)溶解于 0.1%吐温的 PBS(pH 7.4)溶液中，使终浓度为 1%。

(viii)猩红染色液的制备

将 30 g 三氯乙酸、30 g 磺基水杨酸、2 g 猩红 S 溶解于 100 ml 的 MilliQ 水中，制成贮存用的 10×浓缩液。使用时用 MilliQ 水稀释 10 倍使用。

(ix)DAB 液的制备

DAB 溶液用时制备。将 10 mg DAB(10 mg 片剂; Cat.No.049-22831(Wako 社制造))溶解于 20 ml 的 50 mM Tris 缓冲液(pH 7.6)，然后加入 20 μl 30% H_2O_2。将其用 0.45 μm 的滤器(MILLIPORE 社制造)过滤之后使用。

(2)试样的制备

使用人、牛、豚鼠的内耳组织和外淋巴作为试样。

关于人的试样，将采集和研究的目的对患者进行了充分的说明，得到同意后使用。内耳组织的提取液的制备如下: 在听神经肿瘤手术时采集人内耳膜迷走神经并称量，向 180 mg 组织量中加入 1 tab 的 1 ml 蛋白提取液(Complete mini Ca(-)(Boehringer Mannheim 社制)溶解于 10 ml PBS、0.5% SDS 而得到的溶液(pH 7.4))，用试管混合器和ディスポ搅拌磨碎器(GHI 社制)进行匀浆，直至肉眼看不到残余组织，然后用 1000 g 离心 15 分钟，以所得上清作为内耳蛋白质溶液。使用 2 μl 和 0.5 μl 进行电泳。外淋巴是在人工内耳安装手术时，用钻在耳蜗的基底膜向蜗孔外淋巴腔开孔，插入电极，此时回收漏出的外淋巴，将其中 2 μl 进行电泳。

作为牛的试样，在内耳组织的提取液中，与 1 同样地使用 0.5 μl 由上述 1 的(3)制备的溶液。另外，用手术钻将牛颞骨(购自东京芝浦脏器(株))的外耳道切开，切除鼓膜，到达中耳，摘除镫骨，由卵圆窗采集外淋巴。此时要注意采集外淋巴时不要混入内耳组织。使用采集的外淋巴中的 2 μl 作为试样。豚鼠内耳组织的提取液如下制备: 由 Hartley 系豚鼠颞骨(购自三共ラボ-サビス(株))采集内耳膜迷走神经，向该 180 mg 内耳膜迷走神经中加入在冰中将 1 tab 的 1 ml 蛋白质提取液(Complete mini Ca(-)(Boehringer Mannheim 社制)溶解于 10 ml PBS、0.5% SDS 而得到的溶液(pH

7.4）），用试管混合器和ディスポ搅拌磨碎器（GHI 社制）进行匀浆，直至肉眼看不到残余组织，然后用 1000 g 离心 15 分钟，以所得上清作为内耳蛋白质溶液。使用 0.5 μl。外淋巴的采集是切除鼓膜，到达中耳，摘除镫骨，由卵圆窗采集外淋巴。使用其中的 2 μl。

相对于 200 份容量的各试样，按照上述（1）制备的样品缓冲液 85 份、2-巯基乙醇 15 份的比例混合并溶解。将制备的各试样溶液在 95℃ 15 分钟，然后冷却至室温，以 3000 rpm 离心 10 秒，各取 15 μl 进行电泳。

（3）聚丙烯酰胺凝胶电泳

对于各抗体的检测，将上述(2)中制备的各试样溶液点样于 15% 丙烯酰胺凝胶（レディゲル J; 长 73 mm × 宽 80 mmcm × 厚 1 mm（Bio-Rad 社制造））共 3 片上，置于电泳装置（Bio-Rad 社制造）上，使用上述（1）中制备的电泳缓冲液进行电泳。电泳以 60 分钟、27 mA[每片凝胶]进行。

（4）通过蛋白质印迹法进行的分析

使用上述（1）中制备的转印缓冲液，在 100V 下用 90 分钟将上述(3)中进行了电泳的 3 片凝胶分别转印到硝基纤维素膜(0.45 μm; Cat.no.#162-0145（Bio-Rad 社制造））上。转印装置采用湿式印迹仪（Bio-Rad 社制造）。

转印后，将硝基纤维素膜在猩红染色液中浸渍 5 分钟，然后用 MilliQ 水脱色，确认各试样溶液中的蛋白质被染色的情况。确认后，在蒸馏水中振荡 5 分钟进行脱色。

接着通过 DAB 染色法（酶显色法）进行检测和分析。首先将 3 片上述硝基纤维素膜在用于封闭非特异性反应的封闭缓冲液中、在 4℃浸泡 1 昼夜。将其用洗涤缓冲液洗涤 5 分钟，洗涤 3 次，使其与上述 1 中制备的一次抗体反应。一次抗体如下处理：抗 LCCL 抗体用抗体稀释缓冲液稀释 1000 倍，抗 p63/44 抗体和抗 p63/44/40 抗体用同一缓冲液稀释 500 倍，分别添加到各 1 片硝基纤维素膜上。一边振荡一边反应 2 小时。

将所得反应后的膜用上述洗涤缓冲液洗涤 15 分钟，洗涤 3 次，然后与二次抗体反应。将来自山羊的抗兔 IgG 抗体（HRP 标记; Cat.No.p-0448（Dako 社制造））用上述抗体稀释缓冲液稀释 1000

倍，使用该溶液作为二次抗体，一边振荡一边反应 1 小时。将其用洗涤缓冲液洗涤 5 分钟，洗涤 3 次，然后与上述（1）中制备的 DAB 液反应，使其显色。反应通过浸渍于蒸馏水中来终止。

各分析结果如图 1 所示。

使用抗 LCCL 抗体分析的结果显示，在人、牛、豚鼠的全部动物种类的内耳组织提取液中检出 63 kDa 的谱带（图中用箭头表示的谱带）。在全部动物种类的外淋巴中检出 16 kDa 的清晰的细谱带（图中用星号（*）表示的谱带）。在使用抗 p63/44 抗体的分析中，在全部动物种类的内耳组织提取液中检出 63 kDa 和 44 kDa 的谱带，在外淋巴中未见主要的谱带。在使用抗 p63/44/40 抗体的分析中，在全部动物种类的内耳组织提取液中检出 63 kDa、44 kDa 和 440 kDa 三条谱带，但在外淋巴中未见主要的谱带。

由这些结果表明三种抗体的每一种都显示同样的反应，可以区别 3 种异构体。另外可知外淋巴中存在约 16 kDa 的蛋白质，该蛋白质只由抗 LCCL 抗体识别，不被抗 p63/44 抗体和抗 p63/44/40 抗体识别，因此暗示是含有具有异构体 p63 的 N 末端部分的氨基酸序列（p44 和 p40 所不具有的序列）的片段的蛋白质。

本发明人着眼于只存在于该外淋巴中的 16 kDa 的蛋白质，使用抗 LCCL 抗体进行了进一步的研究。

3. 使用抗 LCCL 抗体检测外淋巴瘘

上述 2 中的分析结果显示，通过本发明的抗体检测出只存在于外淋巴的 16 kDa 的蛋白质，由此对以该蛋白质为指标的外淋巴瘘的检测方法进行了研究。使用抗 LCCL 抗体进行研究。

（1）用于电泳和蛋白质印迹法的试剂的制备

均与上述 2 的（1）同样进行。

（2）试样的制备

采用包含 CSF、血清、唾液、渗出性中耳炎的渗出液的中耳洗涤液，包含慢性中耳炎的耳漏的中耳洗涤液作为可存在于人中耳中的除外淋巴以外的体液。采用由患有急性感音性耳聋并疑为有外淋巴瘘的患者采集的中耳洗涤液作为外淋巴瘘检测试验样本。采用从梅尼埃尔氏病患者得到的中耳洗涤液作为要与外淋巴瘘区分的疾病。另外采用人工内耳手术、镫骨手术、外半规管瘘管、外伤的各

个患者的内耳漏出的外淋巴作为试样。各试样是将采集和研究的目的对患者进行了充分的说明，在得到同意后使用的。

CSF 采用因疑为患有髓膜炎和脑炎而进行检查，结果为正常的患者的 CSF 的一部分。血清采用健康人的静脉血。唾液是由健康人采集到的样本。包含渗出性中耳炎的渗出液的中耳洗涤液、包含慢性中耳炎耳漏的中耳洗涤液、以及来自梅尼埃尔氏病的患者的中耳洗涤液是将各自患者的鼓膜切开微小口子，用针筒注入微量生理盐水，然后再通过针筒将其回收而采集。疑为患有外淋巴瘘的患者的中耳洗涤液在进行鼓室开放术时采集。对于外淋巴瘘确诊操作前的中耳洗涤液，不开放鼓室，与由梅尼埃尔氏病患者采集中耳洗涤液同样，用针筒从鼓膜回收。

从各种伤病患者的内耳漏出的外淋巴的采集如下进行。首先，人工内耳手术患者的外淋巴是在人工内耳安装手术时，用钻在耳蜗的基底膜向蜗孔外淋巴腔开孔，插入电极，此时回收漏出的外淋巴。因耳硬化症而施行镫鼓手术的患者的外淋巴是在镫骨的底板（卵圆窗）打孔，插入人工听小骨，此时回收漏出的外淋巴。镫骨手术操作前的中耳洗涤液是在在镫骨上打孔之前用生理盐水洗涤中耳，回收该洗涤液。具有外半规管瘘管的患者的外淋巴，是在因外听道癌切除而进行的外听道全摘除手术时，用生理盐水洗涤中耳的外半规管凸的部分上的孔及其周边部分，回收洗涤液。作为外伤患者的外淋巴，采集了外伤导致内耳骨折而漏出的外淋巴（外伤性颞骨骨折血性中耳渗出液）。对于人工内耳手术患者的外淋巴，将其分别稀释 5 倍、50 倍、500 倍后再制备，同样地使用。

对于这些试样、以及上述例 2 中使用的牛外淋巴和牛内耳蛋白质溶液（阳性对照），分别按照下表 1 所示取样，相对于 200 份容量，按照上述（1）制备的样品缓冲液 85 份、2-巯基乙醇 15 份的比例混合并溶解。将制备的各试样溶液在 95℃孵育 3 分钟，然后冷却至室温，以 3000 rpm 离心 10 秒，各取 15 μl 进行电泳。

（3）聚丙烯酰胺凝胶电泳

将上述（2）中制备的各试样溶液加到 15%丙烯酰胺凝胶上（レディゲル J; 纵 73 mm × 宽 80 mmcm × 厚 1 mm（Bio-Rad 社制造））上，置于电泳装置（Bio-Rad 社制造）上，使用上述（1）中制备的

电泳缓冲液进行电泳。电泳以 60 分钟、27 mA[每片凝胶]进行。

（4）通过蛋白质印迹法进行的分析

使用上述（1）中制备的转印缓冲液，在 100V 下用 90 分钟将上述（3）中进行了电泳的凝胶分别转印到硝基纤维素膜（0.45 μm; Cat.no.#162-0145（Bio-Rad 社制造））。转印装置采用湿式印迹仪（Bio-Rad 社制造）。

转印后，将硝基纤维素膜在猩红染色液中浸渍 5 分钟，然后用 MilliQ 水脱色，确认各试样溶液中的蛋白质被染色的情况。确认后，在蒸馏水中振荡 5 分钟进行脱色。

接着通过化学发光法进行检测和分析。将转印后的硝基纤维素膜在用于封闭非特异性反应的封闭缓冲液中、在 4℃浸泡 1 昼夜。将其用洗涤缓冲液洗涤 5 分钟，洗涤 3 次，使其与一次抗体反应。一次抗体如下处理：抗 LCCL 抗体用抗体稀释缓冲液稀释 1000 倍，添加到硝基纤维素膜上。一边振荡一边反应 2 小时。

将来自山羊的抗兔 IgG 抗体（HRP 标记）（Dako 社制造; Cat.No.#p-0448）用上述抗体稀释缓冲液稀释 1000 倍，使用该稀释的溶液作为二次抗体，一边振荡一边反应 1 小时。将其用洗涤缓冲液洗涤 15 分钟，洗涤 3 次，然后用化学发光试剂盒（ECL plus; Amersham Pharmacia Biotech 社制造）使其化学放光，用产生的信号感光胶片（Kodak Scientific Imaging Film; Cat.No.#165-1454（Kodak 公司制造））。关于胶片的曝光时间，印迹有表 1 的孔 No.1-12 试样的第 1 片硝基纤维素膜约为 1 分钟，印迹有孔 No.13-24 试样的第 2 片硝基纤维素膜约为 1 小时。印迹有孔 No.25-36 试样的第 3 片硝基纤维素膜约曝光 10 秒和约曝光 1 小时，通过两个试验比较曝光时间带来的不同。印迹有孔 No.37-48 试样的第 4 片硝基纤维素膜、印迹有孔 No.49-60 试样的第 5 片硝基纤维素膜和印迹有孔 No.61-72 试样的第 6 片硝基纤维素膜分别曝光 5 分钟。

结果如图 2-7 所示。图中，照片上的数字表示表 1 的孔 No.，下面的内容表示供给该孔的试样。图 2-图 7 是通过化学发光法对以下的膜进行检测的结果照片：图 2 印迹有表 1 的孔 No.1-12 试样的第 1 片硝基纤维素膜，图 3 为印迹有孔 No.13-24 试样的第 2 片硝基纤维素膜，图 4 为印迹有孔 No.25-36 试样的第 3 片硝基纤维素膜，图 5

为印迹有孔 No.37-48 试样的第 4 片硝基纤维素膜，图 6 为印迹有孔 No.49-60 试样的第 5 片硝基纤维素膜，图 7 为印迹有孔 No.61-72 试样的第 6 片硝基纤维素膜。各试样用于电泳的样品量、孔 No.以及结果一览表示在表 1 中。

表 1:

试样名		孔 No.	注入的试样量（μl）	结果
人脑脊液（CSF）1-4		4-7	7	—
人血清 1-3		8-10	3/100	—
人唾液		12	7	—
人工内耳	1 × 1	3,14	2	+
	2 × 1	40	2	+
	1 × 5	15,47	2	+
	1 × 50	16,26	2	+
	1 × 500	17	2	—
外半规管瘘管		18	2	+
镫骨手术	1	19,27	2	+
	2	20,28	4	+
	3	32	0.5	+
	4	50	2	+
	5	52	2	+
	6	59	2	+
	7	63	2	+
	8	71	2	+
镫骨手术操作前	5	51	16	—
	6	58	16	—
	7	62	16	—
梅尼埃尔氏病	1	21,35,39	10	—
	2	36	10	—
	3	38,57	16	—
	4	54	16	—
	5	55	16	—

渗出性中耳炎	1	22	2	—
	2	23	2	—
	3	24	2	—
	4	46	0.5	—
慢性中耳炎		31	10	—
外伤性颞骨骨折血性中耳渗出液	1	34	2	+
	2	45	2	±
疑为外淋巴瘘	1	29	10	+
	2	30	16	—
	3	41	16	—
	4	42	16	—
	5	65	16	+
	6	66	16	+
	7	68	16	+
	8	69	16	+
疑为外淋巴瘘操作前	4	43	16	—
牛外淋巴		2	2	+
牛内耳组织提取液		11	0.5	—（63k为+）
大小标记		1,13,25,37,48,49,60,61,72		

孔 No.33,44,53,56,64,67,70 未加试样。

人外淋巴中（由人工内耳手术（图 2 之 3、图 3 之 14-17、图 4 之 26、图 5 之 40、47）、外半规管瘘管（图 3 之 18）、镫骨手术（图 3 之 19、20、图 4 之 27、28 和 32、图 6 之 50、52 和 59、图 7 之 63、71）、外伤（图 4 之 34）各患者得到的外淋巴），所有例子中均在约 16kDa 处检出清晰的细谱带。将来自人工内耳手术患者的外淋巴进行系列稀释，由孔的结果（图 3 之 14-17）可知采集自人的外淋巴稀释 50 倍左右仍可检出。由疑为外淋巴瘘的患者得到的中耳洗涤液

中，5 例为阳性，3 例为阴性（图 4 之 29、图 7 之 65、66、68 和 69 为阳性，图 4 之 30、图 5 之 41、42 为阴性）。镫骨手术操作前（图 6 之 51、58、图 7 之 62）、梅尼埃尔氏病（图 3 之 21、图 4 之 35、36、图 5 之 38、39、图 6 之 54、55 和 57）、渗出性中耳炎（图 3 之 22-24）、慢性中耳炎（图 4 之 31）的各患者的中耳洗涤液为阴性。人 CSF（图 2 之 4-7）、人血清（图 2 之 8-10）、人唾液（图 2 之 12）中未见用该抗体检出的谱带。

牛外淋巴中检出了稍宽的 16 kDa 谱带（图 2 之 2）。作为阳性对照的牛内耳蛋白质溶液中检出了可能是异构体 p63 的 63 kDa 的谱带，但蛋白量多，因此曝光过度，可见该部分泛白（图 2 之 11）。

如图 4 所示，进行 1 小时的曝光时（图 4 上面的照片），也检出约为 16 kDa 的 N 末端片段以外的谱带，但它们可明显与目标谱带区别。例如，特别是在外伤患者的外淋巴（图 4 之 34）等中，采集外淋巴时产生溶血，因此在约 60 kDa 处检出可能是白蛋白的谱带，但可以与被检测为 16 kDa 的目标谱带区别。另外还证实：即使曝光 10 秒钟，也可以检测出试样中的 Cochlin（图 4 下面的照片）。

由这些结果可知：该 16 kDa 的蛋白质在可能存在于人的中耳的体液中，即 CFS、血清、唾液、镫骨手术操作前的中耳洗涤液、渗出性中耳炎的中耳渗出液、慢性中耳炎的耳漏等中均未检出，另外在梅尼埃耳氏病患者的中耳洗涤液中也未检出，只在人外淋巴中检出，因此对于外淋巴瘘的检测是非常有用的。

另外，疑为外淋巴瘘的患者中，使用操作前用针筒从鼓膜回收的中耳洗涤液时、和使用实施骨膜开放术时回收的中耳洗涤液都产生相同的结果，由此可知通过本发明的检测方法，无需鼓膜开放术，仅通过微小切开和使用针筒的方法即可检测出外淋巴瘘。

实施例 2

1. 抗体的制备

与实施例 1 同样地制备 3 种与抗 LCCL 抗体不同的只识别异构体 p63 的抗体。抗体的制备委托宝酒造株式会社。

（1）抗原多肽的氨基酸序列的选择

在 3 种只识别异构体 p63 的抗体的制备中使用的抗原多肽分别如下选择：含有相当于序列表 SEQ ID NO.1 中氨基酸编号 63-83 的 21

个氨基酸的多肽（SEQ ID NO.5）（以其作为抗原多肽制备的抗体在以下也称为“抗 LCCL1 抗体”）、含有相当于同序列氨基酸编号 95-111 的 17 个氨基酸的多肽（SEQ ID NO.6）（以其作为抗原多肽制备的抗体在以下也称为“抗 LCCL2 抗体”）、含有相当于序列表 SEQ ID NO.1 中氨基酸编号 114-127 的 14 个氨基酸的多肽（SEQ ID NO.7）（以其作为抗原多肽制备的抗体在以下也称为“抗 LCCL3 抗体”）。

（2）抗体的制备

用具有上述（1）中所选择的氨基酸序列的各抗原多肽制备多克隆抗体，将该工作委托给了宝酒造株式会社。宝酒造株式会社制备抗体的步骤与实施例 1 的 1（2）相同。

由于所述氨基酸序列中不含有半胱氨酸，因此在分别用于制备抗体的抗原多肽的 C 末端加成半胱氨酸，合成由此形成的多肽，使用该多肽制备抗 LCCL2 抗体、抗 LCCL3 抗体。

（3）抗体的特异性的确认

上述（2）中制备的抗体的特异性按照与实施例 1 的 1（3）同样的方法确认。结果在对抗 LCCL1 抗体、抗 LCCL2 抗体、抗 LCCL3 抗体各个抗体的分析中，在约 63 kDa 的位置见到谱带，表明识别异构体 p63。

2. 使用由上述 1 制备的抗体对外淋巴及内耳组织进行的分析

使用上述 1 中制备的 3 种抗体，通过蛋白质印迹法对外淋巴及内耳组织进行分析。

（1）用于电泳和蛋白质印迹法的试剂的制备

全部与实施例 1 的 2（1）同样进行。

（2）试样的制备

使用牛的内耳组织和外淋巴作为试样。内耳组织的提取液按照与上述实施例 1 的 1（3）同样的方法制备，使用 0.3 μl。用手术钻将牛颞骨（购自东京芝浦脏器（株））的外耳道切开，切除鼓膜，到达中耳，摘除镫骨，由卵圆窗采集外淋巴。此时要注意采集外淋巴时不要混入内耳组织。使用采集的外淋巴中的 1 μl 作为试样。

相对于 200 份各试样的容量，按照上述（1）制备的样品缓冲液 85 份、2-巯基乙醇 15 份的比例混合并溶解。将制备的各试样溶液在 95℃孵育 3 分钟，然后冷却至室温，以 3000 rpm 离心 10 秒，各取

15 μl 进行电泳。

（3）聚丙烯酰胺凝胶电泳

制作 2 片 15%丙烯酰胺凝胶（レディゲル J; 长 73 mm × 宽 80 mmcm × 厚 1 mm（Bio-Rad 社制造）），用于各抗体的检测，只将上述（2）中制备的牛内耳试样溶液点样、和只将外淋巴溶液点样，置于电泳装置（Bio-Rad 社制造）上，使用上述（1）中制备的电泳缓冲液进行电泳。电泳以 60 分钟、27 mA[每片凝胶]进行。

（4）通过蛋白质印迹法进行的分析

使用上述（1）中制备的转印缓冲液，在 100V 下用 90 分钟将上述（3）中进行了电泳的 2 片凝胶分别转印到硝基纤维素膜（0.45 μm; Cat.no.#162-0145（Bio-Rad 社制造））。转印装置采用湿式印迹仪（Bio-Rad 社制造）。

转印后，将硝基纤维素膜在猩红染色液中浸渍 5 分钟，然后用 MilliQ 水脱色，确认各试样溶液中的蛋白质被染色的情况。

接着通过 DAB 染色法（酶显色法）进行检测和分析。首先将上述硝基纤维素膜在用于封闭非特异性反应的封闭缓冲液中、在 4℃浸泡 1 昼夜。将其用洗涤缓冲液洗涤 5 分钟，洗涤 3 次。抗 LCCL 抗体、抗 LCCL1 抗体、抗 LCCL2 抗体和抗 LCCL3 抗体均用抗体稀释缓冲液稀释 1000 倍，作为一次抗体，添加到硝基纤维素膜上。一边振荡一边反应 2 小时。

将所得反应后的膜用上述洗涤缓冲液洗涤 15 分钟，洗涤 3 次，然后与二次抗体反应。将来自山羊的抗兔 IgG 抗体（HRP 标记; Cat.No.p-0448（Dako 社制造））用上述抗体稀释缓冲液稀释 1000 倍，使用该溶液作为二次抗体，一边振荡一边反应 1 小时。将其用上述洗涤缓冲液洗涤 5 分钟，洗涤 3 次，然后与上述（1）中制备的 DAB 液反应，使其显色。反应通过浸渍于蒸馏水中来终止。

将切成短棒状的各泳道按照牛外淋巴和牛内耳的抗体顺序进行分析，结果如图 8 所示。

使用抗 LCCL 抗体、抗 LCCL1 抗体、抗 LCCL2 抗体和抗 LCCL3 抗体进行的分析中，结果在内耳组织提取液中检出 63 kDa 的谱带（图中用箭头表示的谱带）。外淋巴中，用抗 LCCL 抗体和抗 LCCL3 抗体在 16 kDa 检出明确的谱带。另外，抗 LCCL1 抗体和抗 LCCL2

抗体也检出谱带。由这些结果表明上述四种抗体识别异构体 p63，且证实使用抗 LCCL 抗体、抗 LCCL1 抗体、抗 LCCL2 抗体和抗 LCCL3 抗体各抗体，都可识别只存在于外淋巴的 16 kDa 蛋白质。

3. 使用抗 LCCL3 抗体检测外淋巴瘘

上述 2 中的分析结果显示，通过抗 LCCL1 抗体、抗 LCCL2 抗体和抗 LCCL3 抗体检测出只存在于外淋巴的 16 kDa 的蛋白质，由此对以该蛋白质为指标的外淋巴瘘的检测方法进行了研究。使用抗 LCCL3 抗体进行研究。

（1）用于蛋白质印迹法的试剂的制备

均与上述实施例 1 的 2（1）同样进行。

（2）试样的制备

采用从梅尼埃尔氏病患者得到的中耳洗涤液、由人工内耳手术、镫骨手术患者的内耳漏出的外淋巴试样和由疑为外淋巴瘘的患者采集的中耳洗涤液作为试样。各试样是将采集和研究的目的对患者进行了充分的说明，在得到同意后使用的。

试样与实施例 1 的 3（2）同样地采集，或使用由实施例 1 的 3（2）采集的试样。其制备方法完全与实施例 1 的 3（2）同样地进行。

（3）聚丙烯酰胺凝胶电泳

完全与实施例 1 的 3（3）同样地进行。

（4）通过蛋白质印迹法进行的分析

完全与实施例 1 的 3（4）同样地进行。只是胶片曝光的时间为 5 分钟。

结果如图 9 所示。图中，照片上的数字表示表 2 的孔 No.，下面的内容表示供给该孔的试样。图 9 是通过化学发光法对印迹有表 2 的孔 No.73-83 试样的硝基纤维素膜进行检测的结果照片。各试样用于电泳的样品量、孔 No.以及结果一览表示在表 2 中。为了比较，对于使用抗 LCCL 抗体的试样与由相同患者采集的试样，也记录了抗 LCCL 抗体下的试验结果。

表 2:

试样名		孔 No.		分注的试样量（μl）	结果	
		LCCL	LCCL3		抗 LCCL 抗体	抗 LCCL3 抗体
人工内耳 3			74	2		+
梅尼埃尔氏病 3		38、57	75	16	—	—
疑为外淋巴瘘	5	65	76	16	+	+
	6	66	77	16	+	+
	7	68	78	16	+	+
	8	69	79	16	+	+
	4	42	80	16	—	—
镫骨手术	9		82	2		+
	7	63	83	2	+	+
Siz e marker			73			

*: 孔 No.81 未点样。

在人外淋巴（人工内耳手术（图 9 之 74）、镫骨手术（图 9 之 82、83））中，在 16 kDa 处检出谱带，可确认为阳性。梅尼埃尔氏病（图 9 之 75）患者的中耳洗涤液为阴性。由疑为外淋巴瘘的患者得到的中耳洗涤液中，4 例为阳性，1 例为阴性（图 9 之 76、77、78 和 79 为阳性，80 为阴性）。该结果与由抗 LCCL 抗体得到的结果一致，抗 LCCL3 抗体和抗 LCCL 抗体都检出只存在于外淋巴中的 16 kDa 的蛋白质，由此可知抗 LCCL3 抗体也与抗 LCCL 抗体同样，对于检测外淋巴瘘有效。

实施例 3

如上述实施例 1 和 2 所详述，通过抗 LCCL 抗体和抗 LCCL3 抗体在人、牛、豚鼠等外淋巴中检出了约 16 kD 的蛋白质。这里，使用牛外淋巴，通过双向凝胶电泳（2D-GE）进行分析。

双向凝胶电泳（2D-GE）中，通过在第一向进行等电聚焦凝胶电泳，在第二向进行聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），可以更详细地分析蛋白质。例如因分子量接近而使单向的 SDS-PAGE 中无法分离的多个蛋白质，在双向凝胶电泳（2D-GE）中可以分离，可以对因

磷酸化、糖链的加成、氨基酸置换等各种因素使蛋白质受到的微妙的变化进行分析。2D-GE、印迹法、通过抗 LCCL 抗体和抗 LCCL3 抗体的染色法在以下详述。

1. 第一向的等电聚焦电泳

第一向的等电聚焦电泳采用 Amersham Bioscience 公司（Buckinghamshire，英国）制造的 IPG 凝胶（pH 6-9，18 cm）进行。作为试样的牛外淋巴使用与上述实施例 1 相同的试样。

首先向 1 容（约 16 μl）试样（牛外淋巴）中加入 7 容（112 μl）试样添加液（每片添加 7 M 尿素、2 M 硫脲、2% TritonX-100、2% Pharmalyte、40 mM DTT、蛋白质分解酶抑制剂（Complete mini EDA（-），Boehringer Mannheim 公司，Mannheim 德国）），以此作为试样溶液。将 IPG 凝胶（购入的干燥状态的商品）用约 10 ml 的溶胀液（7 M 尿素、2 M 硫脲、2% TritonX-100、2% Pharmalyte、40 mM DTT）溶胀，用于第一向电泳。

电泳通过 Amersham Bioscience 公司（Buckinghamshire，英国）制造的电泳装置（MultiphorII）进行，将 120μl 上述试样装入设置于阳极一侧的样品杯中，进行电泳。电泳在 300V 下进行 60 分钟，然后用 90 分钟将电压由 300V 缓慢升至 3500V，再在 3500V 下进行 18 小时。电泳过程中将装置冷却至 15℃。

2. 第二向的 SDS-PAGE 电泳

第一向的电泳结束后，将 IPG 凝胶用平衡液（7 M 尿素、25% 甘油、50 mM Tris-HCl 缓冲液（pH 6.8）、2% SDS、33 mM DTT、1.6%溴酚蓝平衡 30 分钟，将其用于第二向的 SDS-聚丙烯酰胺电泳（SDS-PAGE）。SDS-PAGE 凝胶使用 24 × 24 × 0.1cm 大小。用于浓缩的该凝胶中聚丙烯酰胺的浓度为 3%，用于分离的凝胶中聚丙烯酰胺的浓度为 15%，其它凝胶组成与通常的 SDS-PAGE 的条件相同。另外，电泳缓冲液使用 25 mM Tris、192 mM 甘氨酸、0.1% SDS 组成。在浓缩凝胶中以 50 mA 进行电泳，在分离凝胶中以 70 mA 进行电泳。

3. 印迹

第二向电泳结束后，立即将凝胶用印迹缓冲液（25 mM Tris、192 mM 甘氨酸、0.05% SDS、10%甲醇）平衡 30 分钟，用印迹仪装置

（日本 Eido 公司制造：NA-1515B）将其转印至 PVDF 膜（Applied Biosystems 公司制造：Pro-Blot）。

4. 通过抗 LCCL 抗体染色

将上述 3 中的印迹膜在封闭溶液（5%脱脂乳、0.2%吐温 20、PBS）中、在 4℃的冰箱中静置一昼夜，进行封闭，然后用洗涤液（吐温 20、PBS）振荡 5 分钟，振荡 3 次进行洗涤。

将上述实施例 1 中制备的抗 LCCL 抗体（6 μl）用稀释液（1%脱脂乳、吐温 20、PBS、6 ml）稀释 1000 倍，以此作为一次抗体溶液。在预先洗净的膜上添加一次抗体溶液，在室温下振荡 2 小时，使其反应，然后用洗涤液振荡 15 分钟，振荡 3 次进行洗涤。

将抗兔 IgG-HRP 共轭物（Chappel 公司制造、2.4 μl）用上述稀释液稀释 2500 倍，以此作为 2 次抗体溶液。在洗净的膜上添加该 2 次抗体溶液，在室温下振荡 1 小时，使其反应，然后用洗涤液振荡 15 分钟，洗涤 3 次。用 Amersham Bioscience 公司制造的 ECL 试剂盒对洗涤后的膜进行抗体识别斑点的检测。

结果，在等电点 7.7-7.9 附近、分子量 17.7-23.1 kD 附近检出一组蛋白质。其中主要的蛋白质是分子量 17.7-18.8 kD 的蛋白质。这一组蛋白质不是多种蛋白质的混合，而可能是一种蛋白质因例如磷酸化、糖链的加成、氨基酸置换等各种因素而产生了微妙的变化。

5. 通过抗 LCCL3 抗体染色

将上述 4 中通过 ECL 试剂盒进行检测的膜浸泡于剥离溶液（100 mM 2-巯基乙醇、2% SDS、62.5 mM Tris-HCl 缓冲液（pH 6.8）），在 50℃孵育箱中振荡 30 分钟，剥离（除去）抗 LCCL 抗体。

接着，用该相同的膜通过上述实施例 2 中制备的抗 LCCL3 抗体进行染色。染色的步骤与上述 4 中通过 LCCL 抗体进行的染色完全相同。一次抗体（抗 LCCL3 抗体）的稀释率为 1000 倍。

染色的结果，以与上述 4 中所得相同的谱图检测出蛋白质。

由上述 4 和 5 进行的 2 种抗体进行免疫染色的结果中，检测出的蛋白质的斑点谱图相同，由此表明上述实施例 1 中制备的抗 LCCL 抗体和上述实施例 2 中制备的抗 LCCL3 抗体检测出相同的蛋白质。即由此可知抗 LCCL 抗体和抗 LCCL3 抗体是在本发明的外淋巴瘘检测方法中可同等使用的抗体。

并且，制备抗 LCCL 抗体所用的抗原多肽是序列表 SEQ ID NO.1 中氨基酸编号 36-50 所表示的肽，制备抗 LCCL3 抗体所用的抗原多肽是氨基酸编号 114-127 所表示的肽，由此证实上述实施例 1-2 中，在外淋巴中检出的约 16 kD 的蛋白质是大致包括 SEQ ID NO.1 中氨基酸编号 36-127 所表示的氨基酸序列的、含有 Cochlin 的 N 末端片段的蛋白质。因此可知，本发明的外淋巴瘘的检测方法中，不只限于本实施例中制备的抗 LCCL 抗体、抗 LCCL1 抗体、抗 LCCL2 抗体和抗 LCCL3 抗体，只要是识别包含在 SEQ ID NO.1 中氨基酸编号 36-127 所表示的氨基酸序列中的抗原决定基的抗体，可以任意制备，选择使用抗体滴度优异的抗体。

实施例 4

在上述实施例 1 和 2 中，对通过本发明的方法进行了外淋巴瘘检测的 8 名疑为外淋巴瘘患者，除采用该方法外，也通过以往采用的外淋巴瘘鉴别方法——鼓室开放术（以下将其称为“以往方法”）确认了鼓室内是否有外淋巴的漏出。另外基于有瘘管的推定，同样对所有病例用纱布压迫采集自患者本人的筋膜，制备脱水筋膜小片，将该脱水筋膜小片与内耳窗（圆窗、卵圆窗）和前窗小裂叠合，将其用生理组织粘合剂（Beriplast P、Aventis Pharma（株）固定，使瘘管封闭（以下也称为“瘘管封闭术”）。外淋巴瘘是急性感音性耳聋中唯一有望通过手术恢复听力的疾病，及早治疗可提高治愈率。因此，对这 8 名患者的用本发明的方法的结果、以往方法的结果、以及施行瘘管封闭术是否恢复听力进行了比较研究。如前所述，疑为外淋巴瘘的患者均是对试样采集和研究目的的应用进行了充分的说明并得到同意的患者。

在瘘管封闭术前和术后，按照日本听觉医学会制定的听力检查方法，用测听计（Rion 公司制 AA-75 或 AA-75N）进行听力检查，使用 250Hz、500Hz、1000Hz、2000Hz、4000Hz 5 个频率的听力水平的平均值进行评价。根据厚生劳动省急性高度难听调查研究班的听力恢复判定基准，将手术前和手术后的检查值恢复至与正常耳朵或发病前相同水平的判定为“治愈”，将 5 个频率的平均值恢复 30 分贝（dB）或以上的判定为“明显恢复”，恢复 10 dB 或以上至 30 dB 或以下的判定为“恢复”，10 dB 以内的判定为“不变”。实施例 1

和 2 中的外淋巴瘘的检测结果已记于表 1 和 2，为与本实施例对比，再次记于表 3。

表 3

		本发明方法	漏出	判定	所见
疑为外淋巴瘘	1	+	无	不变	高度耳聋，难以改善的病例
	2	—	无	不变	
	3	—	有	不变	手术后 1 年，听力变坏。MRI 结果显示听神经肿瘤。
	4	—	明确有	治愈	
	5	+	有	治愈	
	6	+	有	明显恢复	
	7	+	有	不变	从发病至手术间隔了一定时间的病例
	8	+	有	明显恢复	

该结果中，在疑为外淋巴瘘的 8 例中，以往方法的诊断结果与本发明方法的结果一致的有 5 例，不一致的有 3 例。

该诊断结果不同的 3 例中，没有外淋巴漏出但本发明的方法却为阳性的疑为外淋巴瘘 1 是高度耳聋、难以通过手术改善的病例，未见听力的改善，被诊断为外淋巴瘘。

另外，确认有外淋巴漏出，但本发明的方法却是阴性的 2 例中，疑为外淋巴瘘 3 在鼓室开放术后 1 年，听力进一步恶化，由此研究了其它疾病的可能性，结果通过 MRI（核磁共振成像）确诊为听神经肿瘤。根据目前厚生劳动省诊断基准，由生理学诊察和症状疑为外淋巴瘘，在鼓室开放术时，在手术过程中通过显微镜目视确认外淋巴由卵圆窗、圆窗漏出，由此诊断为外淋巴瘘的病例中，也有可能是其它疾病，以及对该患者用本发明的方法检查则为阴性，由此显示了本发明的可靠性。

疑为外淋巴瘘 4 中，已明确外淋巴的漏出，但由于与通常的外淋巴漏出有明显不同的大量的液体，因此不是外淋巴漏出，可能是为采集本发明的试样而注入的生理盐水未充分除去造成。

疑为外淋巴瘘 7 中，也有外淋巴瘘的漏出，并且本方法也为阳性，但进行瘘管封闭术也未见改善。这可能是由于由发病到手术之间间隔了 17 天的时间。即使是外淋巴瘘，在由发病到手术之间时间太长组织侵袭进一步发展、症状严重、高龄、有并发症等的情况下，即使进行手术听力也由可能不会改善。

8 例疑为外淋巴瘘中，本发明的方法判定为阳性的 5 例，全部确认为外淋巴瘘，本发明判定为阴性的 3 例中 1 例确诊为其它疾病，因此可以说本发明的方法判定为阳性的即是外淋巴瘘。

工业实用性

本发明提供简便、可靠、且对患者的侵袭度低的外淋巴瘘的检测方法。通过该方法，无需诊断者主观判断，可以客观地进行以往不可能的外淋巴瘘的确诊，可在临床现场实质性地鉴别出梅尼埃尔氏病、突发性耳聋等其它急性感音性耳聋与外淋巴瘘。由此可施行迅速且适当的治疗方案，可大幅改善治愈率。

本申请要求基于 2002 年 6 月 27 日日本特许申请（特愿 2002-187479）的优先权，其内容作为参考被引入本说明书中。另外，本说明书援引的文献的内容也作为参考引入本说明书中。

<110> 日本医科大学

<120> 外淋巴瘘的检测方法

<130> A31253A

<160> 7

<210> 1

<211> 550

<212> PRT

<213> 人类

<220>

<221> 信号

<222> (1)..(24)

<400> 1

Met Ser Ala Ala Trp Ile Pro Ala Leu Gly Leu Gly Val Cys Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Pro Gly Pro Ala Gly Ser Glu Gly Ala Ala Pro Ile Ala Ile
20 25 30

Thr Cys Phe Thr Arg Gly Leu Asp Ile Arg Lys Glu Lys Ala Asp Val
35 40 45

Leu Cys Pro Gly Gly Cys Pro Leu Glu Glu Phe Ser Val Tyr Gly Asn
50 55 60

Ile Val Tyr Ala Ser Val Ser Ser Ile Cys Gly Ala Ala Val His Arg
65 70 75 80

Gly Val Ile Ser Asn Ser Gly Gly Pro Val Arg Val Tyr Ser Leu Pro
85 90 95

Gly Arg Glu Asn Tyr Ser Ser Val Asp Ala Asn Gly Ile Gln Ser Gln

100 105 110

Met Leu Ser Arg Trp Ser Ala Ser Phe Thr Val Thr Lys Gly Lys Ser

115 120 125

Ser Thr Gln Glu Ala Thr Gly Gln Ala Val Ser Thr Ala His Pro Pro

130 135 140

Thr Gly Lys Arg Leu Lys Lys Thr Pro Glu Lys Lys Thr Gly Asn Lys

145 150 155 160

Asp Cys Lys Ala Asp Ile Ala Phe Leu Ile Asp Gly Ser Phe Asn Ile

165 170 175

Gly Gln Arg Arg Phe Asn Leu Gln Lys Asn Phe Val Gly Lys Val Ala

180 185 190

Leu Met Leu Gly Ile Gly Thr Glu Gly Pro His Val Gly Leu Val Gln

195 200 205

Ala Ser Glu His Pro Lys Ile Glu Phe Tyr Leu Lys Asn Phe Thr Ser

210 215 220

Ala Lys Asp Val Leu Phe Ala Ile Lys Glu Val Gly Phe Arg Gly Gly

225 230 235 240

Asn Ser Asn Thr Gly Lys Ala Leu Lys His Thr Ala Gln Lys Phe Phe

245 250 255

Thr Val Asp Ala Gly Val Arg Lys Gly Ile Pro Lys Val Val Val Val

260 265 270

Phe Ile Asp Gly Trp Pro Ser Asp Asp Ile Glu Glu Ala Gly Ile Val

275 280 285

Ala Arg Glu Phe Gly Val Asn Val Phe Ile Val Ser Val Ala Lys Pro

290 295 300

Ile Pro Glu Glu Leu Gly Met Val Gln Asp Val Thr Phe Val Asp Lys

305 310 315 320

Ala Val Cys Arg Asn Asn Gly Phe Phe Ser Tyr His Met Pro Asn Trp
325 330 335
Phe Gly Thr Thr Lys Tyr Val Lys Pro Leu Val Gln Lys Leu Cys Thr
340 345 350
His Glu Gln Met Met Cys Ser Lys Thr Cys Tyr Asn Ser Val Asn Ile
355 360 365
Ala Phe Leu Ile Asp Gly Ser Ser Ser Val Gly Asp Ser Asn Phe Arg
370 375 380
Leu Met Leu Glu Phe Val Ser Asn Ile Ala Lys Thr Phe Glu Ile Ser
385 390 395 400
Asp Ile Gly Ala Lys Ile Ala Ala Val Gln Phe Thr Tyr Asp Gln Arg
405 410 415
Thr Glu Phe Ser Phe Thr Asp Tyr Ser Thr Lys Glu Asn Val Leu Ala
420 425 430
Val Ile Arg Asn Ile Arg Tyr Met Ser Gly Gly Thr Ala Thr Gly Asp
435 440 445
Ala Ile Ser Phe Thr Val Arg Asn Val Phe Gly Pro Ile Arg Glu Ser
450 455 460
Pro Asn Lys Asn Phe Leu Val Ile Val Thr Asp Gly Gln Ser Tyr Asp
465 470 475 480
Asp Val Gln Gly Pro Ala Ala Ala Ala His Asp Ala Gly Ile Thr Ile
485 490 495
Phe Ser Val Gly Val Ala Trp Ala Pro Leu Asp Asp Leu Lys Asp Met
500 505 510
Ala Ser Lys Pro Lys Glu Ser His Ala Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr
515 520 525
Gly Leu Glu Pro Ile Val Ser Asp Val Ile Arg Gly Ile Cys Arg Asp

530 535 540

Phe Leu Glu Ser Gln Gln

545 550

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> 人类

<400> 2

Thr Arg Gly Leu Asp Ile Arg Lys Glu Lys Ala Asp Val Leu Cys

1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 人类

<400> 3

Ala Val Ser Thr Ala His Pro Ala Thr Gly Lys Arg Leu Lys Lys

1 5 10 15

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> 人类

<400> 4

Lys Ala Asp Ile Ala Phe Leu Ile Asp Gly Ser Phe Asn Ile Gly Gln

1 5 10 15

Arg Arg Phe

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> 人类

<400> 5

Gly Asn Ile Val Tyr Ala Ser Val Ser Ser Ile Cys Gly Ala Ala Val

1 5 10 15

His Arg Gly Val Ile

20

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 人类

<400> 6

Leu Pro Gly Arg Glu Asn Tyr Ser Ser Val Asp Ala Asn Gly Ile Gln

1 5 10 15

Ser

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> 人类

<400> 7

Leu Ser Arg Trp Ser Ala Ser Phe Thr Val Thr Lys Gly Lys

1 5 10

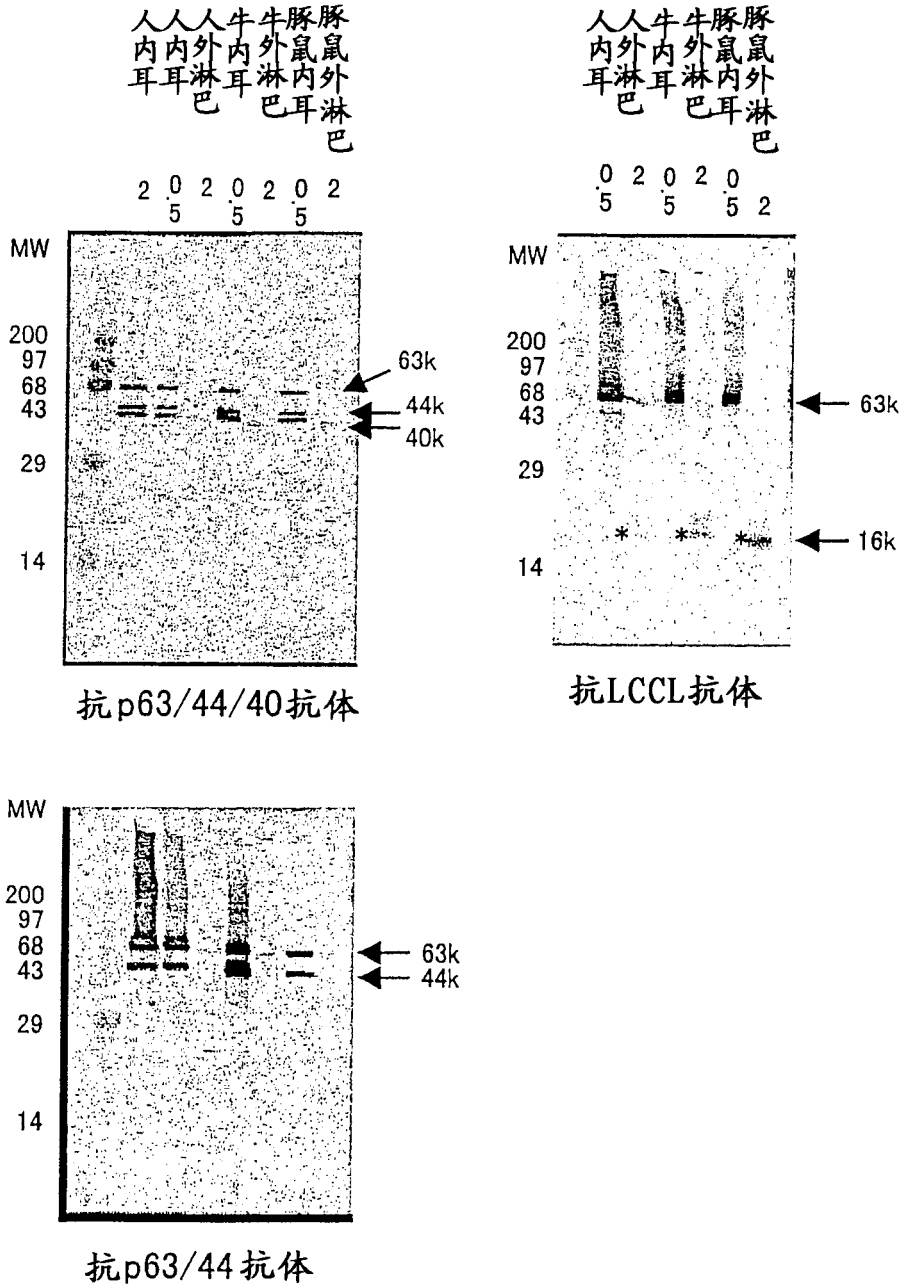
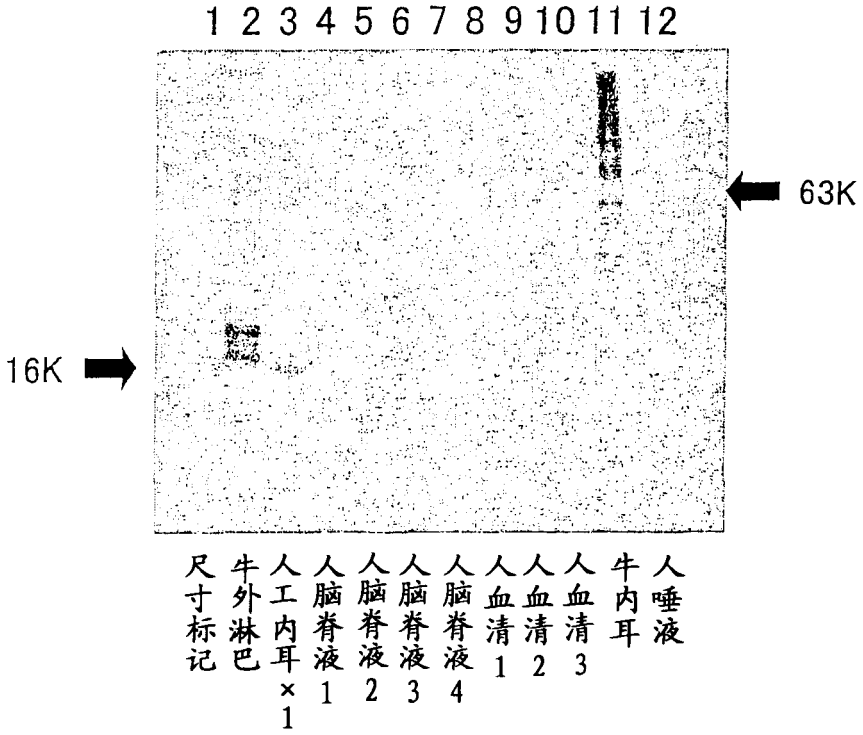

人内耳
人内耳
人外淋巴
牛内耳
牛外淋巴
豚鼠内耳
豚鼠外淋巴
2
0.5
2
0.5
2
0.5
2
MW
200
97
68
43
29
14
63k
44k
40k
抗p63/44/40抗体
人内耳
人外淋巴
牛内耳
牛外淋巴
豚鼠内耳
豚鼠外淋巴
0.5
2
0.5
2
0.5
2
MW
200
97
68
43
29
14
63k
16k
抗LCCL抗体
MW
200
97
68
43
29
14
63k
44k
抗p63/44抗体

图 1


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
63K
16K
尺寸标记
牛外淋巴
人工内耳×1
人脑脊液1
人脑脊液2
人脑脊液3
人脑脊液4
人血清1
人血清2
人血清3
牛内耳
人唾液

16K→ + + − − − − − − − − − −

图 2

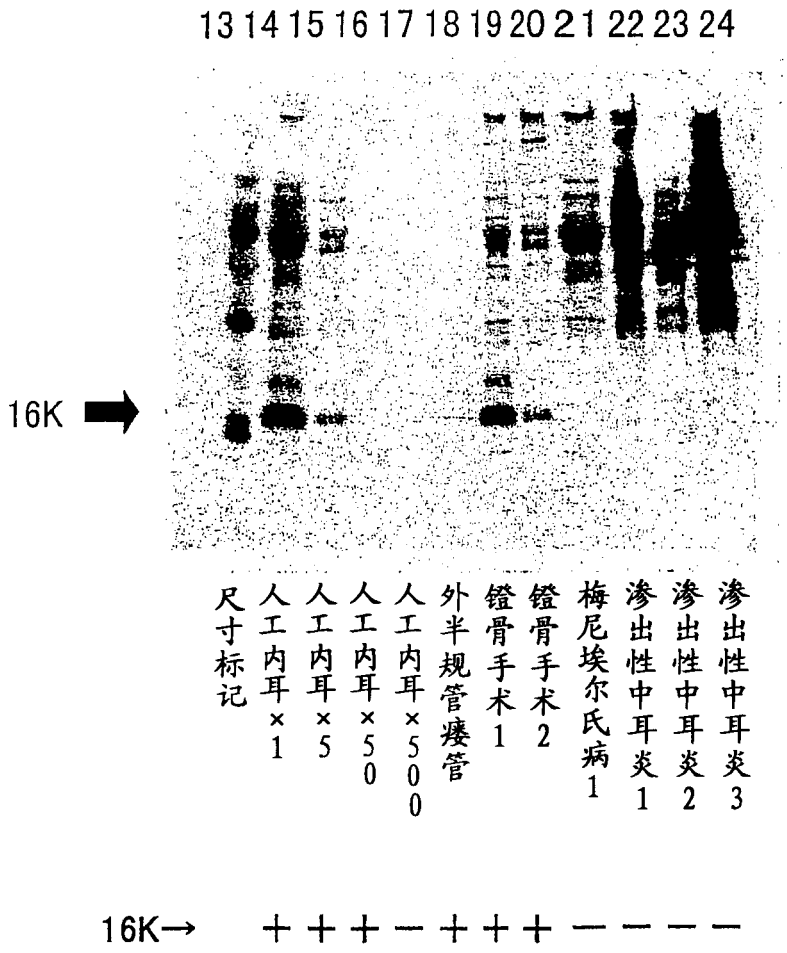
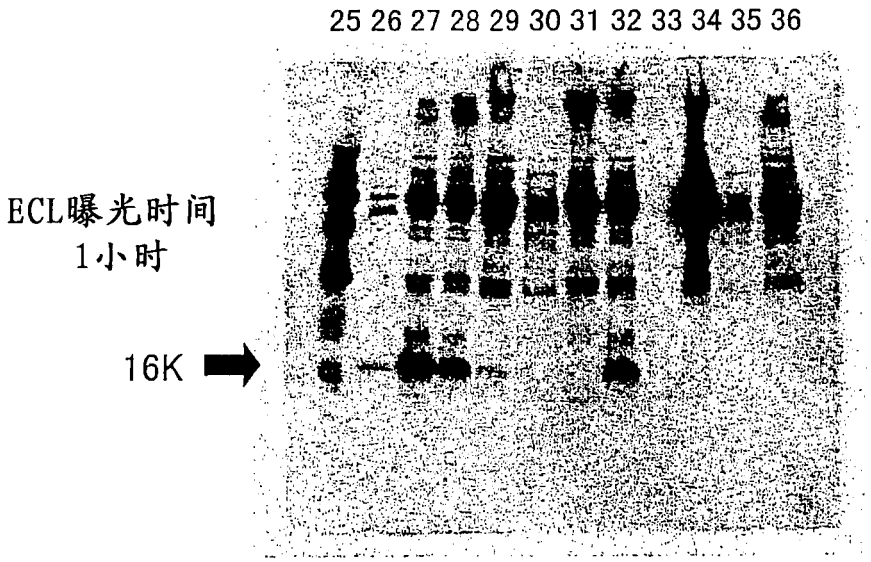
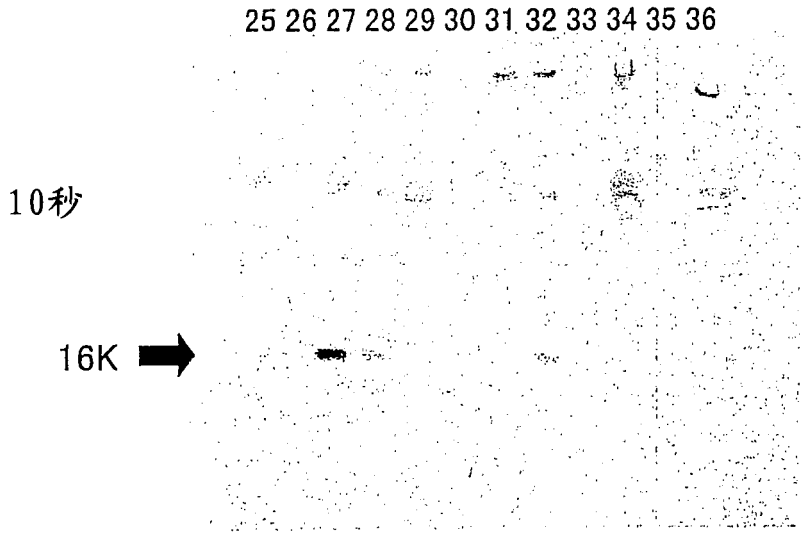

13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
16K
尺寸标记
人工内耳×1
人工内耳×5
人工内耳×50
人工内耳×500
外半规管瘘管
镫骨手术1
镫骨手术2
梅尼埃尔氏病1
渗出性中耳炎1
渗出性中耳炎2
渗出性中耳炎3
16K→ ＋＋＋－＋＋＋－－－－

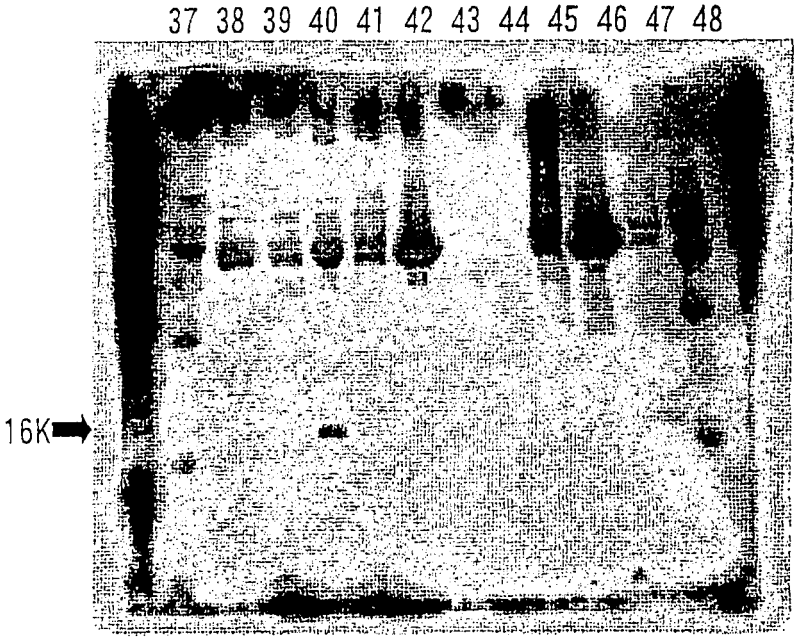
图 3





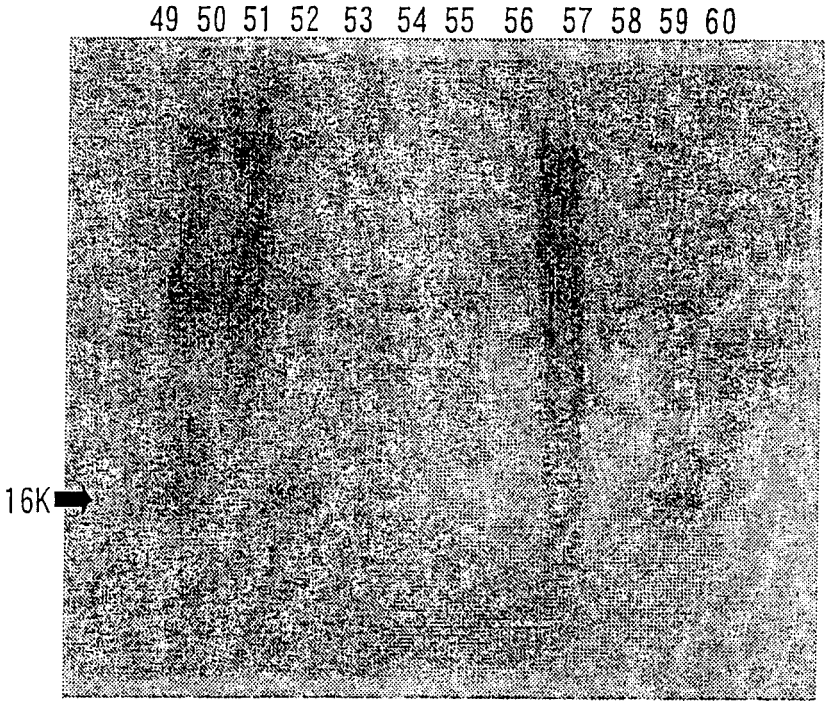
	尺寸标记	人工内耳×50	镫骨手术1	镫骨手术2	怀疑外淋巴瘘1	怀疑外淋巴瘘2	慢性中耳炎	镫骨手术3	外伤性颞骨骨折性	梅尼埃尔氏病1	梅尼埃尔氏病2
16K→		+	+	+	+	−	−	+	+	−	−

图 4



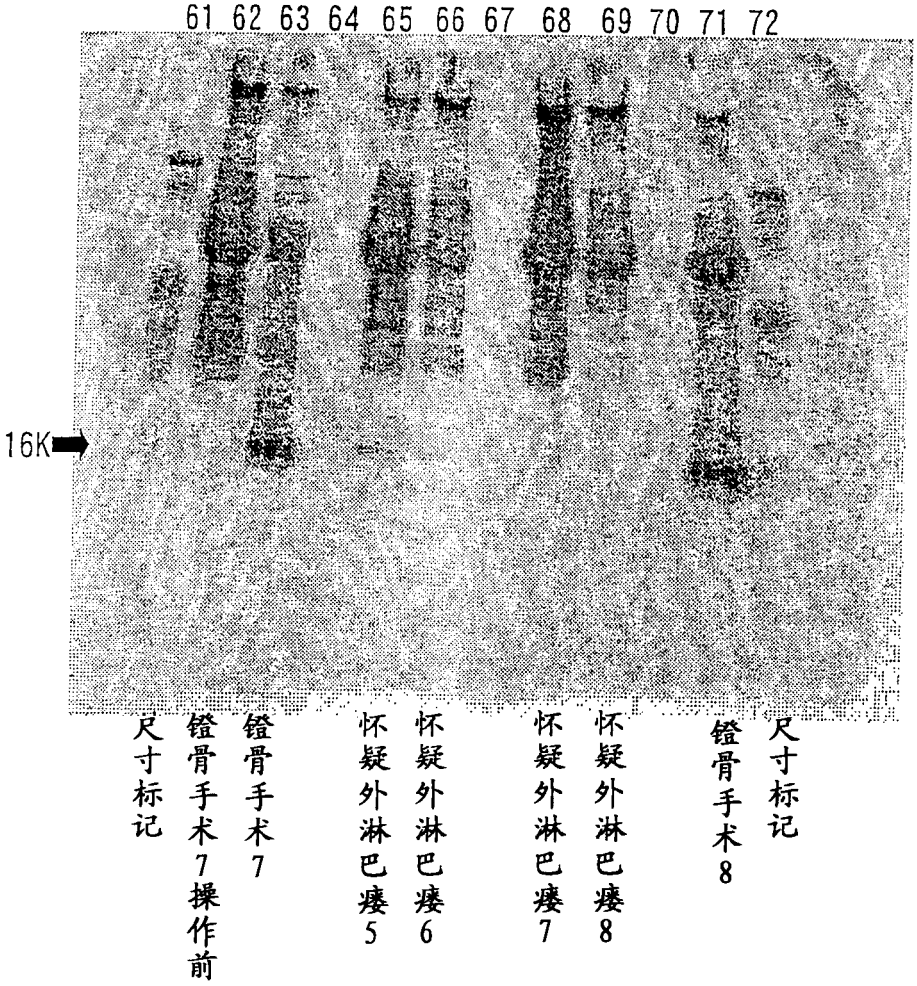
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
	尺寸标记	梅尼埃尔氏病3	梅尼埃尔氏病1	人工内耳2 ×1	怀疑外淋巴瘘3	怀疑外淋巴瘘4	怀疑外淋巴瘘4操作前		外伤性颞骨骨折2	渗出性中耳炎4	人工内耳 ×5	尺寸标记
16K→	−	−	+	−	−	−			±	−	+	

图 5



	尺寸标记	镫骨手术4	镫骨手术5操作前	镫骨手术5	梅尼埃尔氏病4	梅尼埃尔氏病5	梅尼埃尔氏病3	镫骨手术6操作前	镫骨手术6
16K→		+	−	+	−	−	−	−	+

图 6


61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72
16K
尺寸标记
镫骨手术7操作前
镫骨手术7
怀疑外淋巴瘘5
怀疑外淋巴瘘6
怀疑外淋巴瘘7
怀疑外淋巴瘘8
镫骨手术8
尺寸标记

16K→ − + + + + + +

图 7

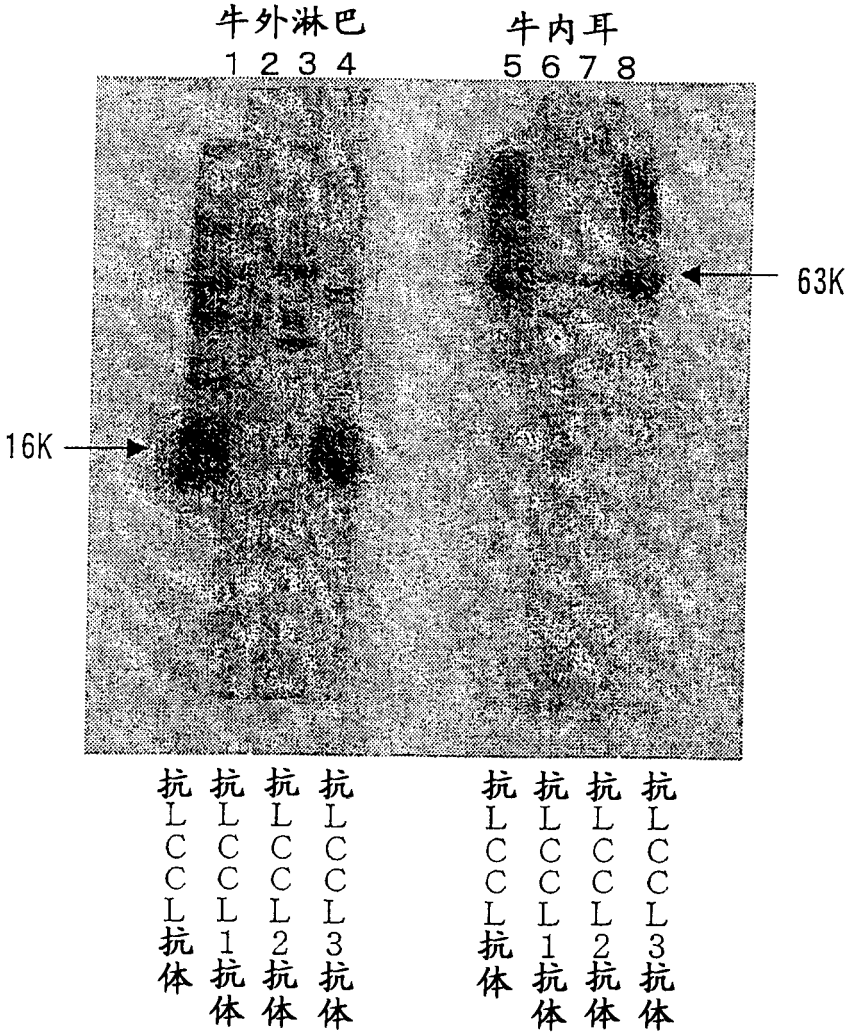
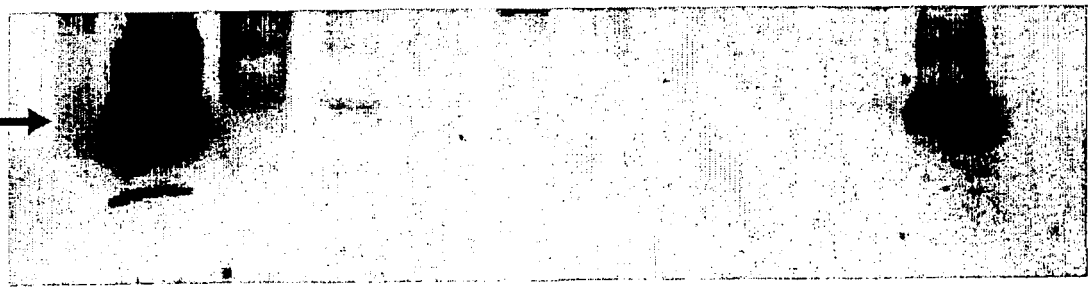

牛外淋巴
1 2 3 4
牛内耳
5 6 7 8
63K
16K
抗LCCL抗体
抗LCCL1抗体
抗LCCL2抗体
抗LCCL3抗体
抗LCCL抗体
抗LCCL1抗体
抗LCCL2抗体
抗LCCL3抗体

图 8



尺寸标记	人工内耳3	梅尼埃尔氏病3	怀疑外淋巴瘘5	怀疑外淋巴瘘6	怀疑外淋巴瘘7	怀疑外淋巴瘘8	怀疑外淋巴瘘4		镫骨手术9	镫骨手术7
	+	−	+	+	+	+	−		+	+

图 9

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0

M S A A W I P A L G L G V C L L L L P G P A G S E G A A P I A I T C F T R G L D I R K E K A D V L C

⇒63 36－50（抗LCCL抗体）

50 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0

P G G C P L E E F S V Y G N I V Y A S V S S I C G A A V H R G V I S N S G G P V R V Y S L P G R E N

63-83（抗LCCL1抗体） 95-111

100 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0

Y S S V D A N G I Q S Q M L S R W S A S F T V T K G K S S T Q E A T G Q A V S T A H P P T G K R L K

（抗LCCL2抗体） 114-127（抗LCLL3抗体） ⇒p44 137-151（抗p63／44抗体）

150 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0

K T P E K K T G N K D C K A D I A F L I D G S F N I G Q R R F N L Q K N F V G K V A L M L G I G T E

⇒p40 163-181（抗p63／44／40抗体）

200 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0

G P H V G L V Q A S E H P K I E F Y L K N F T S A K D V L F A I K E V G F R G G N S N T G K A L K H

图 10

专利名称(译)	外淋巴瘘的检测方法		
公开(公告)号	CN1665841A	公开(公告)日	2005-09-07
申请号	CN03815172.3	申请日	2003-06-26
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人日本医科大学		
申请(专利权)人(译)	学校法人日本医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	学校法人日本医科大学		
[标]发明人	池园哲郎 八木聪明 大森彬		
发明人	池园哲郎 八木聪明 大森彬		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6893 C07K16/18		
代理人(译)	郭煜 王景朝		
优先权	2002187479 2002-06-27 JP		
其他公开文献	CN100335502C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的在于提供简便、可靠、且对患者的侵袭度低的外淋巴瘘的检测方法。本发明提供外淋巴瘘的检测方法，该方法包括检测存在于中耳的体液中是否存在Cochlin。

渗出性中耳炎	1	22	2	—
	2	23	2	—
	3	24	2	—
	4	46	0.5	—
慢性中耳炎		31	10	—
外伤性颞骨骨折血性中耳渗出液	1	34	2	+
	2	45	2	±
疑为外淋巴瘘	1	29	10	+
	2	30	16	—
	3	41	16	—
	4	42	16	—
	5	65	16	+
	6	66	16	+
	7	68	16	+
	8	69	16	+
疑为外淋巴瘘操作前	4	43	16	—
牛外淋巴		2	2	+
牛内耳组织提取液		11	0.5	—（63k为+）
大小标记		1,13,25,37,48,49,60,61,72		