

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5月16日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592158

研究課題名（和文）実験的真珠腫モデルを用いた真珠腫上皮細胞のアポトーシスに関する研究

研究課題名（英文）Apoptosis expressed in the experimental middle ear cholesteatoma

研究代表者

比野平恭之（HINOHIRA YASUYUKI）

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：00238320

研究成果の概要（和文）：

中耳真珠腫は強い増殖能と周囲組織の破壊をもたらす疾患であるが、これまで成因が明らかにされておらず、手術治療を行っても高率に再発をきたしていた。本研究では中耳真珠腫増殖抑制モデルをモルモットにおいて作成し、増殖抑制効果にアポトーシスが関与している可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Middle ear cholesteatoma is an intractable disease which has strong epithelial proliferation potency and destroys the surrounding organs. The pathogenesis of cholesteatoma is still controversial, and the recurrence rate is high. This study demonstrates apoptosis plays some roles in dysfunction of the epithelial proliferation, using experimental animal models.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
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：中耳真珠腫、実験モデル、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

（1）中耳真珠腫は周囲の骨組織（聴器）の破壊を伴うため、高度の難聴、めまい、顔面神経麻痺、頭蓋内合併症など重篤な後遺症をもたらす疾患である。病理組織学的には異形性のない角化重層扁平上皮が、本来単層円柱上皮である中耳に進入した状態であり、手術的に角化重層扁平上皮（真珠腫上皮）を摘出すれば治癒する疾患である。従来から多くの手術方法が提示されているが、その再発率は5

～40%と依然高値である。我々は再発率を減少させるために、手術方法に改良を加えてきた（後壁保存段階的鼓室形成術）が、第2段階手術でまだ31.1%に真珠腫上皮の遺残による再発が見られた。これら第2段階手術での再発例において、遺残上皮を顕微鏡と内視鏡を併用して除去しても、第2段階手術後の再発率はまだ10.7%に達している。

（2）自験例の検討ではこれら再々発例においては自家骨や人工骨を用いて中耳腔を充

填した部分には再発が見られないという興味深い結果が得られた。この結果は我々が開発した中耳真珠腫実験モデルを用いた真珠腫の病態に関する研究において、中耳腔内を人工骨で充填することにより真珠腫の増殖抑制傾向が得られるとの実験結果と一致した。この真珠腫増殖抑制効果は、人工骨の中でも硬性材料であるハイドロキシアパタイトの充填モデルで最も顕著に見られた。

(3) 近年、中耳真珠腫の増殖機序とアポトーシス(細胞死)との関連が注目されている。異形性のない角化重層扁平上皮が中耳で増殖し、表皮剥屑物を多量に産生するプロセスにアポトーシスが関与しているという報告が増えている。ヒト真珠腫上皮においてアポトーシスが亢進する結果、細胞の増殖、分化のバランスが崩れて真珠腫上皮の増殖をもたらすメカニズムが考えられているが、再現性のある実験モデルがなかったため、実証されていない。

2. 研究の目的

本研究では、我々の確立した中耳真珠腫増殖抑制モデルを用いて中耳真珠腫の増殖に関与するアポトーシスの発現を検討し、中耳真珠腫に対する新たな手術治療の開発を目指す。

3. 研究の方法

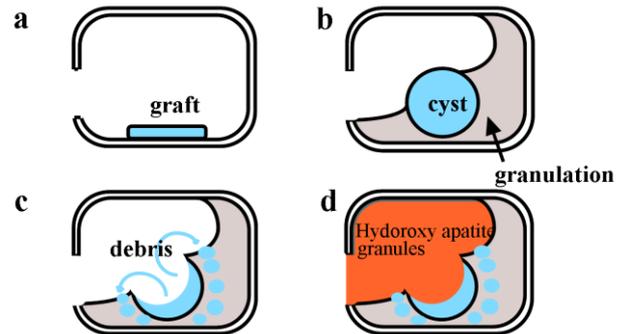
我々が開発した中耳真珠腫実験モデル (*Experimental cholesteatomas arising from autologous free skin grafting in the middle ear cavity. Acta Otolaryngol 114:533-538,1994.*) を用いて人工骨充填による真珠腫抑制モデルとコントロールモデルで比較検討を行った。

(1) 生後6~8週齢のモルモットを15匹用いた。全身麻酔後、左側中耳骨胞を手術用顕微鏡下に開放し、骨胞内の粘膜をダイヤモンド・バーを用いて可及的に除去した。予め採取した耳介基部皮膚(2×2 mm)の結合組織側を下に骨面へ全層移植した(図1 a)。デンタルセメントを用いて開放した骨胞を閉鎖し、創面を縫合した。手術中に疼痛のため3匹を安楽死させた。

(2) 皮膚移植3週後、全身麻酔後に再び左側中耳骨胞を開放した。皮膚嚢胞の形成を確認(図1 b)した後に嚢胞壁を破り、嚢胞内の表皮剥屑物(debris)を可及的に掻き出して上皮下の肉芽組織内に散布した(図1 c)。6匹ではハイドロキシアパタイト充填は行わずに骨胞を閉鎖し、創面を縫合した。これらをコントロール群とする。別の6匹ではdebris 散布後の中耳腔にハイドロキシアパタイトの顆粒を充填し(図1 d)創面を縫合した。これらを処置群とする。処置群、コントロール群で1匹ずつ感染などにより死亡した。

(3) 4週目と8週目に両群の動物はペントバルビタールの致死量投与により屠殺し、左側頭骨を摘出した。直ちに顕微鏡下に実験的真珠腫を摘出し、摘出標本を4%ホルマリンで固定した。固定後に脱灰、パラフィン包埋を行い、薄切切片を作成した。脱パラフィン処理、タンパク分解処理などを行って標識抗体に反応させ、脱水、透徹処理を行って検鏡し、観察組織100細胞中のアポトーシス細胞をカウントし、コントロール群と充填群で比較検討した。

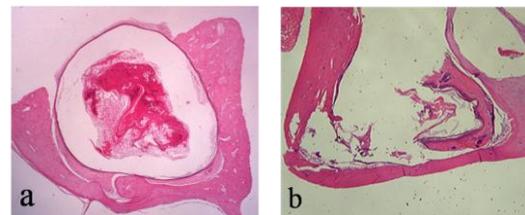
図1. 実験のシエーマ



4. 研究成果

(1) コントロール群の5匹ではすべてに嚢胞の再形成と増大が見られた(図2 a)。一方、処置群では嚢胞の再形成は見られず、萎縮し一部は壊死に陥った嚢胞壁が確認されたのみであった(図2 b)。

図2. a : コントロール群、b : 処置群



(2) 現在、アポトーシス細胞をカウントし、コントロール群と充填群で比較検討を行っているが、処置群でアポトーシスの発現が顕著である傾向が見られている。

(3) これらの成果から真珠腫の遺残性再発に対して乳突腔の充填が抑制効果を持つ可能性が示唆された。

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5件)

① 比野平恭之. 慢性中耳炎. MB ENT, 査読なし, 131: 21-24, 2011.

② Kashiba K, Komori M, Yanagihara N,

Hinohira Y, Sakagami M. Lateral orifice of Prussak's space assessed with a high-resolution cone beam 3-dimensional computed tomography. 査読あり. *Otology & Neurotology* 32:71-76, 2011.

- ③ 比野平恭之. 真珠腫性中耳炎の進展度分類. *J OHS*, 査読なし, 26:1041-1043, 2010.
- ④ Hinohira Y, Yanagihara N, Komori M. Residual recurrence following staged canal wall up tympanoplasty for middle ear cholesteatoma. 査読なし. *Laryngoscope* 120: s 74, 2010.
- ⑤ Yanagihara N, Komori M, Hinohira Y. Total mastoid obliteration in staged canal-up tympanoplasty for cholesteatoma facilitates tympanic aeration. 査読あり. *Otology & Neurotology* 30:766-770, 2009.

[学会発表] (計6件)

- ① 比野平恭之. 耳鼻咽喉科手術と3D画像システム. 第112回日本耳鼻咽喉科学会総会, 京都, 2011.
- ② Hinohira Y, Yanagihara N, Komori M, Suzuki H. Modified staged tympanoplasty for severe tympanosclerosis. 2010 AAO-HNSF Annual Meeting & OTO EXPO, Boston, USA, 2010.
- ③ Furuya A, Hinohira Y, Katsuno M, Suzuki H. Residual recurrence following staged canal wall up tympanoplasty for middle ear cholesteatoma. The 13th KOREA- JAPAN Joint Meeting of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Seoul, Korea, 2010.
- ④ Hinohira Y, Yanagihara N, Komori M,

Hato N. Residual recurrence following staged canal wall up tympanoplasty for middle ear cholesteatoma. The 113th annual meeting of the Triological Society, Las Vegas, USA, 2010.

- ⑤ 高橋 郷, 山田尚弘, 比野平恭之, 小林一女, 洲崎春海. 鼓膜真珠腫症例の検討. 第20回日本耳科学会総会, 松山, 2010.
- ⑥ 比野平恭之, 柳原尚明, 小森正博, 羽藤直人. 後壁保存鼓室形成術後の遺残性真珠腫に対する手術. 第19回日本耳科学会総会, 東京, 2009.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
比野平恭之 (HINOHIRA YASUYUKI)
昭和大学・医学部・講師
研究者番号: 00238320
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし