

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 7 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791571

研究課題名（和文） 好酸球性副鼻腔炎の病態機序解明に対する真菌を用いたアプローチ

研究課題名（英文） Investigation of pathological mechanism of eosinophilic chronic rhinosinusitis using fungi

研究代表者

米倉 修二（YONEKURA SYUJI）

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20400939

研究成果の概要（和文）：好酸球性副鼻腔炎の病態機序は解明されておらず、今回の研究では真菌を用いたアプローチでその機序解明を目標とした。鼻の局所病変から検出された真菌が、好酸球性副鼻腔炎の病態に関係するかを調べた。一部の好酸球性副鼻腔炎では真菌の関与が認められた。しかし、真菌の種類は多種にわたり、どのコンポーネントが関与するかについては更なる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：Pathological mechanism of eosinophilic chronic rhinosinusitis has not been clarified. The purpose of the present study was to investigate the contribution of fungi detected by nasal polyp to eosinophilic chronic rhinosinusitis. The present study suggested fungi contributed to a part of eosinophilic chronic rhinosinusitis. However, the further study is needed to know what kinds of fungi and what components of them contribute.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：鼻科学

キーワード：好酸球、副鼻腔炎、真菌

1. 研究開始当初の背景

難知性副鼻腔炎で知られる好酸球性副鼻腔炎⁽¹⁾は、局所における抗酸球浸潤を主体とする炎症像が特徴である。好酸球性副鼻腔炎に関してこれまでの研究では、①IL-5 の強い関与⁽²⁾、②局所における IgE 産生亢進⁽³⁾、③ COX2 低下に伴う PGE2 産生低下⁽⁴⁾、④ CysLTs 過剰産生⁽⁵⁾が状況証拠して明らかに

なっている。その病因としてアルテルナリアのような真菌の関与⁽⁶⁾、黄色ブドウ球菌の外毒素であるスーパー抗原の関与⁽⁷⁾、好酸球自身の autocrine 様の活性⁽⁸⁾などが報告されているが、未だに好酸球性副鼻腔炎の正確な病態形成はわかっていない。

真菌に関連して、1999年に Ponikau らは、慢性副鼻腔炎の 96%の症例で鼻汁や副鼻腔

貯留液から真菌が検出されたと報告した。さらに同じ Mayo Clinic の Inoue らのグループは、常在する真菌のなかでもアルテルナリアのみが好酸球の脱顆粒を生じ、気管支喘息患者から採取した好酸球では（副鼻腔からの採取かは不明）それがより著明であることを示した⁹⁾。このように、真菌特にアルテルナリアが鼻・副鼻腔粘膜の好酸球性炎症の契機として注目されている。しかし、好酸球性副鼻腔炎症例の鼻茸・鼻粘膜中のリンパ球や好酸球に対してアルテルナリアを中心とする真菌がどのような影響を与えているかは十分な検討は成されていない。

（参考文献）

- (1) 春名真一, 鴻信義, 柳清: 好酸球性副鼻腔炎. 耳展 44:195-201, 2001
- (2) Gevaert P, Bachert C, Holtappelles G, et al. Enhanced soluble interleukin-5 receptor alpha expression in nasal polyposis. Allergy 2003;61:1275-1279
- (3) Zang N, Gevaert P, van Zele T, et al. An update on impact of Staphylococcus aureus enterotoxins in chronic sinusitis with nasal polyposis. Rhinology 2005;43:162-168
- (4) Mullol J, Fernandes-Morata JC, Roca-Ferrer J, et al. Cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 expression is abnormally regulated in human nasal polyps. J Allergy Clin Immunol 2002;109:824-830
- (5) Perez-Novo CA, Watelet JB, Claeys C, et al. Prostaglandin, leukotriene, and lipoxin balance in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis. J Allergy Clin Immunol 2005;115:1189-1196
- (6) Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, et al. The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. Mayo Clin Proc 1999;74:877-884
- (7) Gevaert P, Holtappelles G, Johansson SG, et al. Organization of secondary lymphoid tissue and local IgE formation to staphylococcus aureus enterotoxins in nasal polyptissue. Allergy 2005;60:71-79
- (8) 石戸谷淳一, 佐久間康徳, 佃守. 好酸球性副鼻腔炎の原因 MB ENT 34:33-39:2004

2. 研究の目的

好酸球性副鼻腔炎の病態機序は解明されておらず、今回の研究では真菌を用いたアプローチでその機序解明を目標とした。

3. 研究の方法

(1) 好酸球性副鼻腔炎の病態解明を目的とした鼻茸・病的粘膜に浸潤するリンパ球の解析

嗅覚障害、副鼻腔CTでの両側病変がある

症例であること、鼻茸の組織中、炎症細胞の多い場所に好酸球が1視野100個以上有るものを好酸球性副鼻腔炎と定義し、その他の好酸球浸潤の少ない副鼻腔炎を従来型副鼻腔炎とした。

① □I型アレルギーの関与についての検討

対象症例に関して血清総IgE、末梢血中好酸球数、組織好酸球数、組織好中球数を調べた。

② 鼻茸、病的粘膜に浸潤している細胞を分離と、その特徴の検討

T細胞、B細胞を分離し、その特徴を調べた。リンパ球はは、採取された組織を細切し collagenase 処理し、組織から細胞を分離、回収した。その後、比重分離法を用いて、リンパ球を回収した。

(2) 鼻茸合併慢性副鼻腔炎における真菌の関与についての検討

① 鼻茸からの検出菌についての検討

培養方法クロラムフェニコール添加ポテトデキストロース寒天(PDA)プレートを1検体につき4枚用意し、検体の量を少量と多量、約10倍差をつけて塗ったものを2枚ずつ作り1枚ずつ、25℃と35℃の孵卵機で培養した。1週間観察して、1週間たつて何も生育しなかった場合は、室温に出して更に1週間観察、何も生育しなければ陰性とした。

② 検出真菌の末梢血中単核細胞との反応

末梢血中単核細胞を、局所から検出された真菌を含めた数種類の抗原で72時間刺激し、培養上清中のIL-5値を検討した。刺激真菌は *Candida*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alrternaria* の5種とした。

4. 研究成果

(1) 好酸球性副鼻腔炎の病態解明を目的とした鼻茸・病的粘膜に浸潤するリンパ球の解析

当科で副鼻腔炎手術を施行した51例の血液あるいは鼻茸を用いて免疫学的検討を施行した。51例のうち、鼻茸中に好酸球の浸潤を認めない従来型副鼻腔炎は26例、好酸球の浸潤を認める副鼻腔炎は25例であった。

① □I型アレルギーの関与についての検討

対象をアトピー素因を持つものと、持たない者に分けたとき、血清総IgEに関してはアトピー素因を持つ患者に増加傾向を認めた。その他、末梢血中好酸球数、組織好酸球数、組織好中球数は差を認めなかった。

一方、組織中の好酸球数で分類した場合、末梢血中の好酸球数は好酸球性副鼻腔炎症例で有意に増加していた。末梢血の好酸球数増加は好酸球性副鼻腔炎を疑う指標になることが示唆された。好中球数に関しては分類に関わらず少なく、従来型、好酸球性に差は認めなかった。

② 鼻茸、病的粘膜に浸潤している細胞を分離

と、その特徴の検討

鼻茸に浸潤している T 細胞の検討では、従来型、好酸球浸潤型ともに 95%が CD45RO 陽性であり、memory T 細胞であることが明らかとなった。そこで、T 細胞で発現されている cytokine あるいは regulator について mRNA のレベルで比較してみると、IL-5、IL-13 では従来型に比較して、好酸球浸潤型では有意な発現増加を認めた。INF- γ 、IL-17A、IL-25、T-bet、GATA3、RORC では有意差を認めなかった。鼻茸中の B 細胞の検討では、鼻茸中で IgE を産生しており、 ϵ GLT の発現も認めることから、鼻茸局所でのクラススイッチの可能性も示唆された。好酸球浸潤型副鼻腔炎の病態として Th2 系の免疫機構の関与が考えられる結果であった。

(2) 鼻茸合併慢性副鼻腔炎における真菌の関与についての検討

当科で副鼻腔炎手術を施行した症例のうち、真菌の検討に耐えうる検体量を得ることのできた 18 例について検討した。

① 鼻茸からの検出菌についての検討

真菌検出は、18 例中 15 例に認められた。検出された菌は *Candida* が最も多く 5 例、*Cladosporium* が 4 例、*Aspergillus* 2 例、*Penicillium* 2 例、スエヒロ茸 (*Schizophyllum commune*) 1 例、その他多数の子嚢菌、担子菌など多数検出された。米国で検出されるといった報告の多い *Alrternaria* は今回検出されなかった。好酸球性副鼻腔炎と考えられる症例は真菌検出 15 例中 8 例、未検出 3 例中 2 例であった。スエヒロ茸 (*Schizophyllum commune*) が検出された症例はアレルギー性真菌性鼻副鼻腔炎と考えられた。

② 検出真菌の末梢血中単核細胞との反応

検出された真菌種に対する反応が 3 群に分かれた。一つ目は検出された真菌の種にも反応しない群で、4 例認めたが、この群では好酸球性副鼻腔炎症例は含まれなかった。検出真菌は、*Aspergillus*、*Candida*、*Aspergillus*、*Cladosporium* であったが、いずれにも反応がほぼ見られなかった。この群で検出された真菌は単なる contamination かもしくは bystander の可能性があると考えられた。

2 つ目の群は、検出された真菌の種で特異的に反応していた。この群ではそれぞれ検出された真菌種にのみ、特異的に産生誘導が認められた。検出真菌は *Candida* 検出例で高率であった。4 症例中 3 症例で好酸球性副鼻腔炎であり、高い傾向であった。1 例は従来型の副鼻腔炎であった。

このような群での、真菌の検出は単なる検出菌ではなく、病態への関与の可能性が考えられた。3 つ目の群は、検出された真菌種を含む多数の真菌種に反応していた。検出真

菌は *Penicillium* が検出例で高率であった。この群ではそれぞれ検出された真菌の意義については判断が難しいとが、一部においては真菌の検出は単なる検出菌ではなく、病態への関与の可能性が示唆された。この群は 4 例中 3 例が好酸球性副鼻腔炎で、アスピリン喘息症例 2 例、アレルギー性真菌性鼻副鼻腔炎が 1 例であった。残りの 1 例は従来型副鼻腔炎であった。

最後に真菌が検出されなかった症例の反応と、検討した 5 種類の真菌以外の真菌が検出された症例の *Aspergillus*、*Candida*、*Alrternaria*、*Cladosporium*、*Penicillium* に対する反応について検討した。真菌が検出されなかった 3 症例の内 2 症例 (従来型 1 例、好酸球性 1 例) は反応をほぼ認められなかった。しかし 1 症例 (好酸球性) は真菌が検出されていないにもかかわらず非特異的に反応していた。その他の真菌が検出された 3 症例は好酸球性 2 例、従来型 1 症例であったが、これらの症例においても、検出されない真菌に対して反応が見られた。

従来型と好酸球浸潤型を比較すると、検出された真菌抗原で刺激した際の cytokine 産生において、好酸球浸潤型の方が産生量が高い傾向にあった (図 1、2)。

図 1

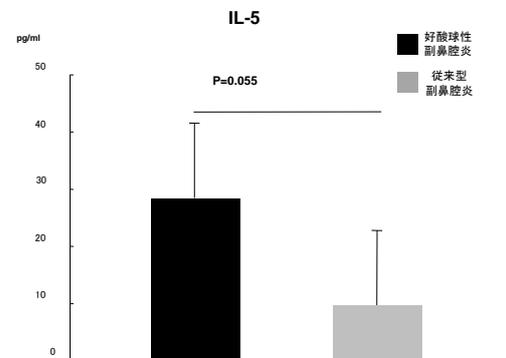
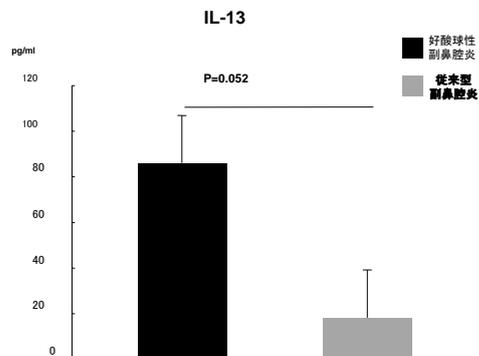


図 2



一部の好酸球浸潤型副鼻腔炎で、真菌の関与が示唆された。しかし、実際の真菌の種類は多種にわたり、どのコンポーネントが関与するかについては更なる検討が必要である。

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

①山本陸三朗、米倉修二、花澤豊行、岡本美孝：鼻茸合併慢性副鼻腔炎における真菌の関与の検討 第50回日本鼻科学会総会・学術講演会 平成23年12月3日 岡山

②米倉修二：アレルギー性鼻炎の発症・増悪を修飾する因子 第47回小児アレルギー学会 平成22年12月5日 横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米倉 修二 (YONEKURA SYUJI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20400939