

平成 30 年 5 月 27 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462609

研究課題名(和文)扁桃周囲膿瘍発症機序解明と予防戦略の確立

研究課題名(英文)Elucidating the onset mechanism and establishment of the prophylaxis of peritonsillar abscess

研究代表者

渡辺 哲生 (Watanabe, Tetsuo)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：50231709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：扁桃周囲膿瘍の発症機序解明、扁桃周囲膿瘍、ひいては深頸部膿瘍の予防戦略を確立する一助とするため、扁桃周囲膿瘍と反復性扁桃炎の口蓋扁桃組織についてリアルタイムPCR法によりTLR2、IL-6、TNF- α 、ICAM1、CD4、FOXP3、IL-17A、IL17FのmRNA発現を比較検討した。扁桃周囲膿瘍の口蓋扁桃組織に発症機序を説明できるようなRNA発現の違いはみられなかった。扁桃周囲膿瘍症例はもともと反復性扁桃炎の既往のみられない症例の方が多く、今回の結果は膿瘍形成の原因が口蓋扁桃自体以外にあることを示唆すると考えた。

研究成果の概要(英文)：The purposes of this study are to elucidate onset mechanism of peritonsillar abscess and to help establish preventive strategy of peritonsillar abscess and deep neck infection. We investigated mRNA expression of TLR2, IL-6, TNF- α , ICAM1, CD4, FOXP3, IL-17A and IL17F in palatine tonsils from patients with peritonsillar abscess and recurrent tonsillitis using real time PCR method. The significant differences were not seen in mRNA expressions between two groups. Many patients with peritonsillar abscess do not have the history of recurrent tonsillitis. Our results suggested that there might be a cause of abscess formation in other than palatine tonsil.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：扁桃周囲膿瘍 反復性扁桃炎 口蓋扁桃 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

扁桃周囲膿瘍は耳鼻咽喉科臨床において深頸部膿瘍のひとつとして最も頻繁にみられる重症感染症で、急性扁桃炎の重症型といえる。経過によっては膿瘍の副咽頭間隙などの周囲の間隙や縦隔への波及、咽喉頭粘膜の浮腫による窒息など致死的にもなり得る疾患である。起炎菌はA群溶連菌が多く、バクテロイデスなどの嫌気性菌も30%弱検出される。急性扁桃炎の重症型といえるものの急性扁桃炎を反復する症例は約30%である。再発例は約10%にみられる。一側性の症例が多く、両側性に膿瘍が形成されるのは5~10%である。海外では扁桃周囲膿瘍に対して口蓋扁桃摘出術を即時に行う(即時扁桃摘)という治療法もあるが、わが国では口蓋扁桃に急性炎症がある場合の手術的治療は禁忌とされており穿孔・切開排膿と抗菌薬の投与といった保存的治療が選択され、消炎後に再発予防のため口蓋扁桃摘出術(待機扁桃摘)を施行するのが通常である。

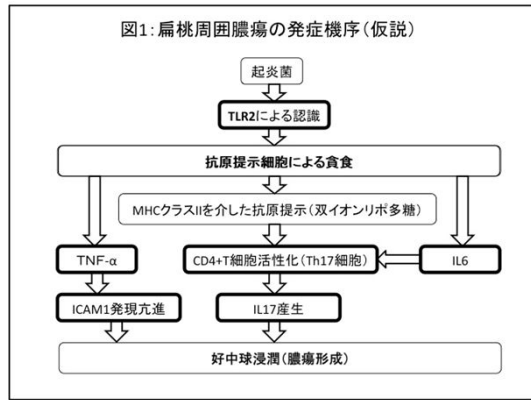
耳鼻咽喉科に限らず膿瘍形成は重篤な病態であるため、発症機序の解明、予防法・治療法の確立のため多くの基礎的研究が行われており、特に腹腔内膿瘍、脳膿瘍については多くの報告がみられる。これらの報告ではA群溶連菌やバクテロイデスなど起炎菌がTLR2を介して抗原提示細胞に認識され、貪食される。貪食した抗原提示細胞から炎症性サイトカインであるTNF- α が産生され、この作用によりICAM1発現亢進し好中球浸潤を誘導し膿瘍形成につながる。また、近年、A群溶連菌やバクテロイデスの細胞壁成分である双イオンリポ多糖がMHCクラスII抗原を介してCD4陽性T細胞を活性化しIL17を産生する反応経路が証明されている。これはTh17細胞からのIL17産生ということになり、好中球浸潤、膿瘍形成につながる。さらに抗原提示細胞から産生されるIL6はTh17細胞を活性化する作用があり、IL6も膿瘍形成に促進的に作用する。

扁桃周囲膿瘍については我々を含めて多くの臨床的な報告があるが、基礎的研究はほとんどみられない。急性扁桃炎の既往がない症例の方が多いため、急性扁桃炎は両側性であるのに、扁桃周囲膿瘍は通常一側性であるのはなぜか、など、疑問点が多い。基礎的研究がみられないひとつの理由として、先に述べたように保存的治療が選択されるため通常、扁桃周囲膿瘍の状態にある組織標本の入手が困難であることが挙げられる。しかし、われわれの講座では20年以上前から扁桃周囲膿瘍に対して即時扁桃摘を治療の選択肢のひとつとして施行しており、標本の入手が可能である。

2. 研究の目的

図1に示す扁桃周囲膿瘍発症機序の仮説を証明することにより扁桃周囲膿瘍の発症機序の解明、治療戦略の確立の一助とすること

を目的とする。



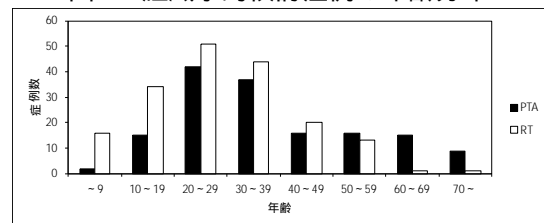
3. 研究の方法

1. 組織学的検討

1) 対象

2008年から2012年に扁桃周囲膿瘍(PTA)に対して即時扁桃摘を施行した152例と反復性扁桃炎(RT)に対して待機扁桃摘を施行した180例について検討した。対象の年齢分布は図2に示す。性別はPTA症例が男性107例、女性45例、RT症例が男性90例、女性90例であった。なお、PTA症例で反復性扁桃炎の既往がある症例は40例(26%)、約1/4であった。

図2 組織学的検討症例の年齢分布



2) 方法

以下の項目について評価した。いずれも扁桃周囲膿瘍症例の膿瘍側(PTA+)と非膿瘍側(PTA-)口蓋扁桃組織、扁桃周囲膿瘍症例と年齢、性別を一致させた反復性扁桃炎症例の口蓋扁桃組織(RT)に区別した。

(1) 口蓋扁桃基部の好中球浸潤

(-):浸潤なし、(+):散在性に浸潤、(++):密集して浸潤。

(2) 陰窩の好中球浸潤

(-):浸潤なし、(±):散在性に浸潤、(+):1つの陰窩を閉塞するまで浸潤、(++):複数の陰窩を閉塞するまで浸潤。

(3) 陰窩の細菌塊

(-):なし、(+):あり。

(4) 扁桃実質への好中球浸潤

PTA症例において扁桃実質への好中球浸潤がみられる症例の割合。

II 分子生物学的検討

1) 対象

新規に採取した口蓋扁桃組織と、過去にパラフィン包埋した口蓋扁桃組織を用いた。

いずれも扁桃周囲膿瘍症例の膿瘍側(PTA+)と非膿瘍側(PTA-)口蓋扁桃組織、扁

桃周囲膿瘍症例と年齢、性別を一致させた反復性扁桃炎症例の口蓋扁桃組織 (RT) に区別した。

新規組織は PTA+ が 15 検体、PTA- が 12 検体、RT が 26 検体、パラフィン組織は PTA+ が 32 検体、PTA- が 24 検体、RT が 53 検体対象となった。

2) 方法

(1) RNA 抽出・cDNA 作成

新規組織は RNA 保存液に浸漬し、-80 に保存した後、QIAGEN 社製 RNeasy® Mini Kit、パラフィン組織は QIAGEN 社製 RNeasy® FFPEM Kit を用いて抽出した。

cDNA 作成は RNA 0.5 µg から invitrogen 社製 SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit を用いて作成し、-20 に保存した。

(2) リアルタイム PCR

PCR 反応は applied biosystem 社製 StepOnePlus™ リアルタイム PCR システムにより applied biosystem 社製 TaqMan® Universal PCR Master Mix と ABI 社製標識プライマーを用いて行った。TLR2、IL-6、TNF-、ICAM1、CD4、FOXP3、IL-17A、IL-17F に対するプライマーを用いた。cDNA は 1 µl 使用した。

定量は比較 Ct 法により Ct 値で評価した。

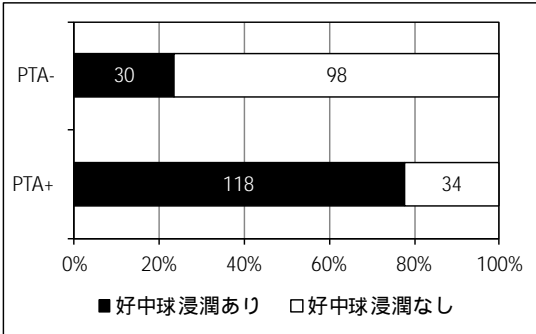
4. 研究成果

I 組織学的検討

(1) 口蓋扁桃基部の好中球浸潤

RT 症例では口蓋扁桃基部への好中球浸潤がみられなかった。PTA 症例では非膿瘍側にも浸潤がみられる症例が 205 程度存在した (図 3)。

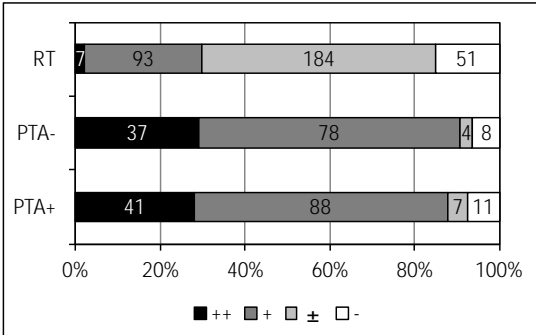
図 3 口蓋扁桃基部の好中球浸潤



(2) 陰窩の好中球浸潤

PTA の方が高度であったが PTA+ と PTA- はどう程度であった (図 4)。

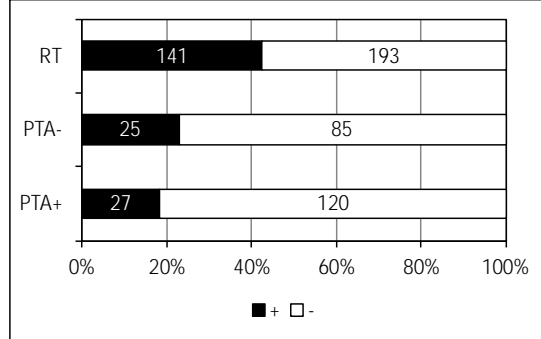
図 4 陰窩の好中球浸潤



(3) 陰窩の細菌塊

PTA 症例よりも RT 症例の方に多くみられた。PTA+ と PTA- はどう程度であった (図 5)。

図 5 陰窩の細菌塊



(4) 扁桃実質への好中球浸潤

PTA 症例にて扁桃実質への好中球浸潤がみられたのは 152 例中 12 例 (7.9%) のみであった。

II 分子生物学的検討

結果を図 6 (新規組織) と図 7 (パラフィン組織) に示す。

新規組織では各群で RNA 発現に有意差はみられなかった。

パラフィン組織では PTA+ よりも RT で TLR2 発現が亢進、PTA- よりも PTA+、RT で IL-6 発現亢進がみられた。

PTA の口蓋扁桃組織では陰窩の好中球浸潤が RT に比べて高度であり口蓋扁桃組織の炎症反応亢進が示唆される。PTA- よりも PTA+ で IL-6 発現亢進が見られたことと一致する。しかし RT で TLR2 発現亢進も IL-6 発現亢進もみられ、膿瘍形成に TLR2、IL-6 が関与しているとは言い難かった。

Th17 細胞、調節性 T 細胞の変動をみるため新規組織、パラフィン組織とも FOXP3/CD4、IL17A/CD4、IL17F/CD4 の発現比をみても有意差はなかった。

今回の検討では当初の仮説を証明するような PTA+ の口蓋扁桃組織に想定していた変化はみられなかった。PTA 症例はもともと反復性扁桃炎の既往のみられない症例の方が多こと (我々のデータでも約 1/4)、扁桃実質に好中球浸潤が見られた症例は 7.9% のみであったこと、口蓋扁桃の炎症反応の亢進はあるが陰窩に細菌塊が見られる症例は RT よりも PTA で少なかったことを考えると膿瘍形成の原因が口蓋扁桃自体以外にあることを示唆する可能性があるかもしれない。また、RT においても口蓋扁桃に慢性炎症が存在し有意差まで出なかった可能性も考えられる。今回は症例数の関係で RT を対照として設定したが、RT のない口蓋扁桃肥大のみの症例を対照として比較すれば何らかの知見が得られるか、Laser Microdissection Microscopes を使用して口蓋扁桃を実質、間質に区別して評価することを検討する必要があると考えた。

図6 新規組織

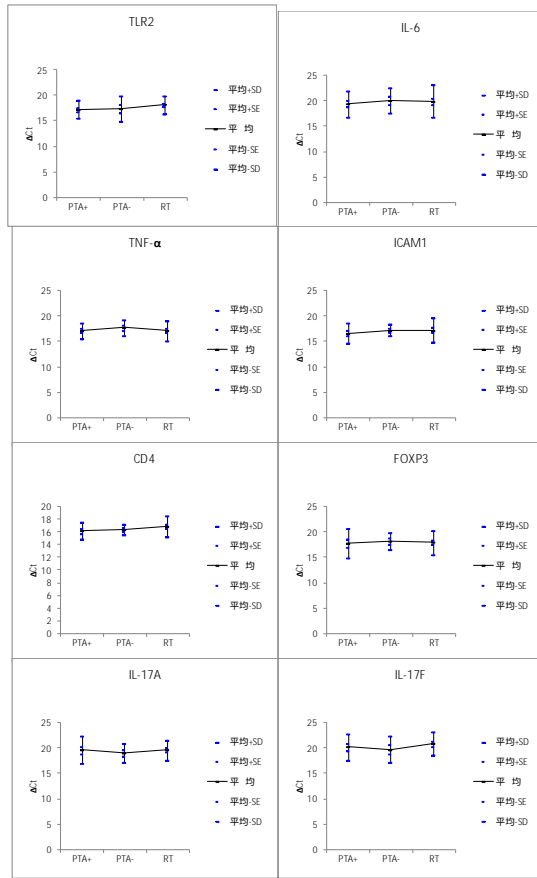


図7 パラフィン組織

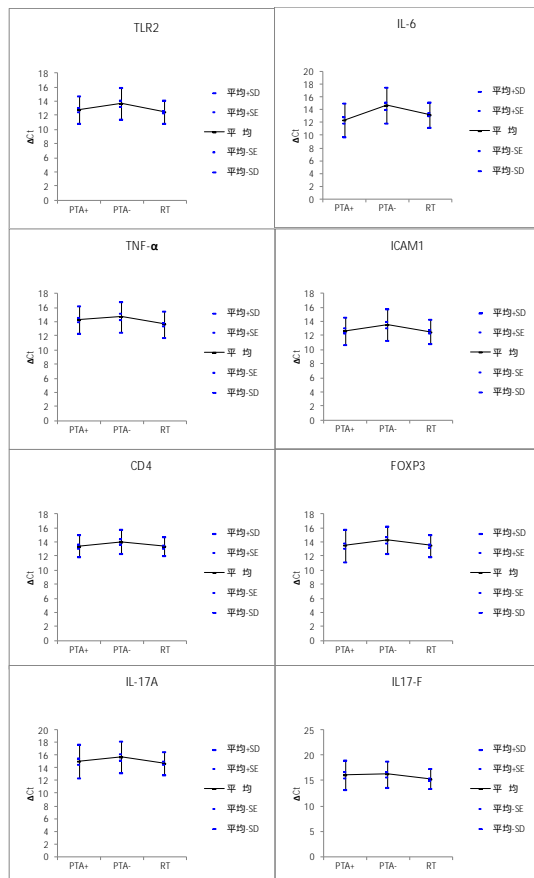
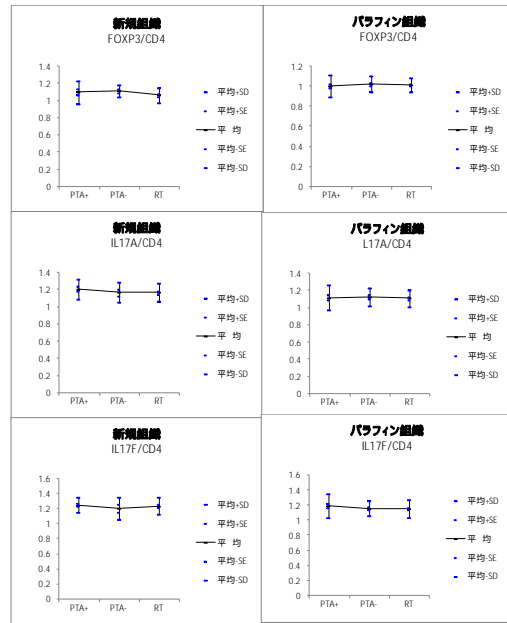


図8 Th17細胞・調節性T細胞



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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 哲生 (WATANABE, Tetsuo)

大分大学・医学部耳鼻咽喉科学講座・准教授

研究者番号: 50231709

(2)研究分担者

鈴木 正志 (SUZUKI, Masashi)

大分大学・医学部耳鼻咽喉科学講座・教授

研究者番号: 60211314