

平成 21 年 4 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (c)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591888
 研究課題名 (和文) 嗅粘膜分泌異常における活性化好酸球の関与-嗅覚障害の発症と改善のメカニズムの解明-
 研究課題名 (英文) Contribution of activated eosinophil for secretion in the olfactory mucosa-The elucidation of the mechanism of the onset and the improvement of the dysosmia
 研究代表者
 春名 真一 (HARUNA SHINICHI)
 獨協医科大学・医学部・教授
 研究者番号：60198934

研究成果の概要：

副鼻腔呼吸粘膜に好酸球浸潤が高度になると嗅覚障害を呈する割合が高く、かつ治療にて副鼻腔炎が改善し嗅覚障害の改善も認められた例では、好酸球浸潤も低下した。しかし、手術にて採取した副鼻腔粘膜と嗅粘膜の好酸球浸潤の程度を比較すると、嗅粘膜に好酸球浸潤する割合は呼吸粘膜ほど高度ではなかった。一方、嗅粘膜の分泌腺であるボーマン腺の増生が認められ、レクチン染色でも ConA や SNA の発現を示し分泌異常を来している可能性が示唆された。これらのことから、好酸球浸潤した副鼻腔炎での嗅覚障害の病因は、直接の好酸球組織障害蛋白による嗅粘膜障害よりも分泌異常による嗅粘膜表面での嗅分子の接着障害によることが考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,000,000	0	2,000,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：鼻科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 鼻副鼻腔は呼吸粘膜上皮と嗅粘膜上皮で覆われ、呼吸上皮表面の粘液層は粘液線毛機能を円滑に作用させるために必須であり、一方、嗅粘膜上皮では、上皮を構成する支持細胞、基底細胞、嗅細胞や外界の化学物質の受容体としての細胞表面および粘膜下のボーマン腺に複合糖質が分布し、嗅覚の化学情報

伝達に大いに関与していると考えられる。我々は嗅粘膜および嗅覚障害時の複合糖質の分布に注目し、これまで人嗅粘膜と呼吸粘膜上皮の細胞表面において糖蛋白分布の異なることをレクチン組織化学で証明し、さらに兔実験的副鼻腔炎モデルにて、正常嗅粘膜に比べて、炎症時に嗅覚の receptor である嗅粘膜細胞表面でのシアル酸複合糖質の分布の変化やConcanavalin A の発現を観

察した。この結果は Stephen. G. Shirley が Concanavalin A 処理後のラット嗅粘膜に electro-olfactogram での amplitude が有意に減少したという報告 (Biochem. J. (1987) 245, 175-184) と関連する興味深い知見であり、嗅粘膜における複合糖質分布の変化は嗅粘膜機能障害に強く関与すると考えられる。

(2) 鼻副鼻腔における慢性炎症の主体に好酸球が最も重要な炎症細胞と認識されている。実際に慢性副鼻腔炎の副鼻腔粘膜において、活性好酸球浸潤が多数認められるものは、上皮細胞の細胞間隙の離開、剥奪が起こり、多数の分泌細胞に置換され、線毛細胞障害と粘液の分泌異常が起こり粘液線毛機能と嗅粘膜機能不全が生じている。同時にこのような副鼻腔炎では早期から嗅覚障害を呈し、活性好酸球の組織障害蛋白による嗅粘膜障害を引き起こしているとともに、組織障害蛋白のひとつの ECP は分泌亢進作用があると報告されており嗅粘膜上での粘液の過剰分泌を惹起させ、臭い分子の嗅粘膜上の接着を抑制している。しかしながら、副鼻腔炎でのステロイド薬で好酸球浸潤が抑制されても、必ずしも嗅覚障害の改善は認められない。今回の研究では、嗅覚障害を呈した副鼻腔炎での治療前後における嗅粘膜分泌の変化について検討したい。

2. 研究の目的

本研究では、好酸球浸潤時における嗅粘膜上皮障害と過剰分泌病態の解明ひいてはその障害の改善のメカニズムを解明するために、人および動物の嗅粘膜障害時および改善時の嗅粘膜の複合糖質と分泌機能を調節する NO との関連を *in vivo* と *in vitro* で組織生化学的に対比検索することにある。そのために以下の3項目を検討する。

(1) 慢性副鼻腔炎等にて嗅覚障害を訴える人の手術前後に血中および副鼻腔粘膜局所の好酸球顆粒蛋白 (ECP, MBP) を計測する。

(2) 慢性副鼻腔炎等にて嗅覚障害を訴える人嗅粘膜と好酸球浸潤性兎実験的副鼻腔炎モデルの嗅粘膜を用いて、NOS の存在とレク

チンおよび EG2 抗体を用いた光顕および電顕的観察やシアル酸糖転移酵素等の発現を In Site Hybridization 法で行い分泌糖蛋白の変化を検索する。

3) 正常および嗅粘膜障害時の嗅粘膜上皮を細胞培養し、単離末梢好酸球を添付し糖蛋白分布と NO 合成能を把握し、嗅粘膜の修復能力を検討する。

3. 研究の方法

(1) 患者に本研究について十分に説明し、登録を行う。慢性副鼻腔炎等にて嗅覚障害を呈する患者の治療前と改善時の血中および副鼻腔粘膜局所での好酸球顆粒蛋白 (ECP, MBP) を計測する。中鼻道に細胞診用ブラシを挿入し、生食中に落下させ、副鼻腔粘膜局所での ECP, MBP をファルマシアの計測キットを用いて、血中同様に測定する。

(2) 慢性副鼻腔炎等にて嗅覚障害を呈する患者の嗅粘膜と改善時の嗅粘膜を採取し好酸球の存在と複合糖質の変化を観察する。そのために、光顕にて AB-PAS 染色、レクチン (WGA, ConA, UEA-1, DBA, SNA, MAA, PNA とニューラミダーゼ処理後の PNA) とムチンに対する抗体やレクチン電顕を用いて、嗅粘膜上皮の支持細胞、基底細胞、嗅細胞、細胞表面および Bowman 腺の染色像を正常嗅粘膜と対比する。またシアル酸糖転移酵素に対するプローブを用い In Site Hybridization 法にて糖蛋白分泌の増減を判定する。ついで兎を用いて実験的副鼻腔炎モデルを作製し、嗅粘膜を経時的に採取観察する。

(3) 人における嗅覚障害時、および兎実験的副鼻腔炎モデル時の嗅粘膜を細胞培養し、正常嗅粘膜細胞の増殖および分化能と比較する。そのために、なるべく生体内に近づける目的で、嗅粘膜上皮と繊維芽細胞や脳アストログリアの再構成による嗅粘膜の三次元培養を試みる。その特徴は嗅細胞の新生、増殖を支持する脳アストログリアと上皮細胞の分化を支持する繊維芽細胞を埋め込んだ収縮コラーゲンゲル上に嗅粘膜上皮を移植したままで培地の中に入れ、空気に触れさせながら培養する点にある。コラーゲンゲルが粘膜下のモデルとなり、繊維芽細胞や脳アストログリアと嗅粘膜上皮が上皮・間質間相互作用を作り出し、表面を空気に触れさせることで細胞の分化を促す。また、上皮細胞の分化を支持すると言われる Vitamin A 加無血清培地と血清培地を用い、両者の培地での増殖および分化能を比較観察する。培養細胞に対して種々の cytokeratin 抗体や抗 Neurofilament 抗体を用い嗅上皮であることを同定する。さらに培地に種々の濃度の単離末梢好酸球を添付し、培養細胞の増殖時に分布する糖蛋白の変化をレクチンや抗体を用いて光顕、電顕やシアル酸糖転移酵素に対するプローブを用い In Site Hybridization 法にて観察する。

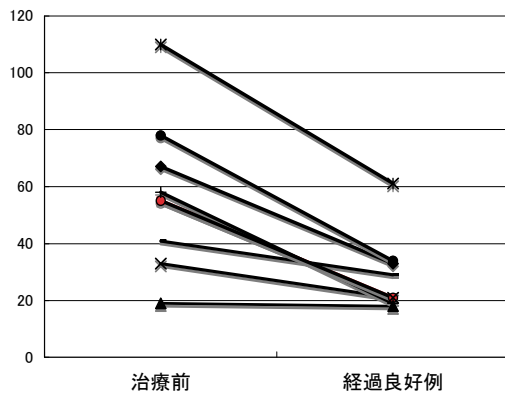
(4) 呼気中 NO 濃度の測定

化学発光式 NO 測定装置 (CLM-500 島津製作所製) を用い、呼気 NO 濃度の測定を安静座位で同時間帯に測定する。人および兎嗅粘膜と NO 合成酵素 (iNOS, eNOS) を用い、光顕的検討を行う。

4. 研究成果

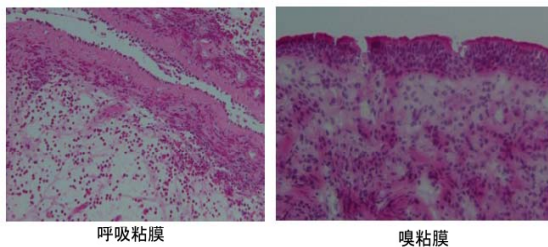
(1) 血中好酸球顆粒蛋白 (ECP) 濃度の推移

嗅覚障害を伴った副鼻腔炎での治療後に改善を認められた場合には、血中 ECP 濃度も優位に改善を認めた。



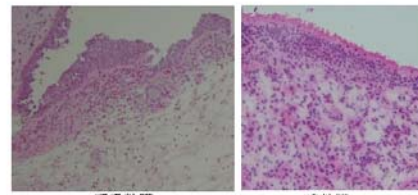
(2) 人嗅粘膜障害の評価

好酸球浸潤の著明な副鼻腔炎 (19 例) において、呼吸粘膜と嗅粘膜の好酸球浸潤の程度と呼吸粘膜および嗅粘膜障害を比較した。呼吸粘膜で多数の好酸球が浸潤しているが、嗅粘膜での浸潤は少ない例が 6 例 / 13 例認められた。嗅粘膜障害はほとんどない。



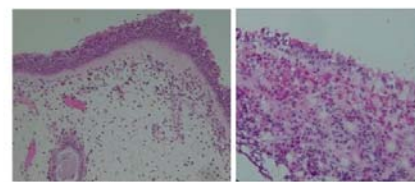
好酸球浸潤:呼吸粘膜>>嗅粘膜 6例/13例

嗅粘膜にも好酸球浸潤が認められ例は 5 例 / 13 例に認められ、嗅粘膜上皮の障害も認められた。



好酸球浸潤:呼吸粘膜≧嗅粘膜 5例/13例
呼吸粘膜障害>>嗅粘膜障害

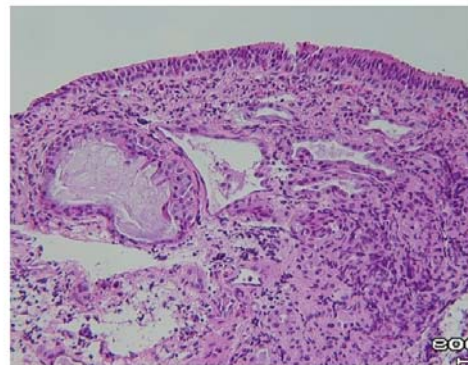
呼吸粘膜同等に嗅粘膜に好酸球浸潤の認められたものは 2/13 例に認められ、呼吸上皮と嗅粘膜上皮ともに剥奪の所見が認められた。



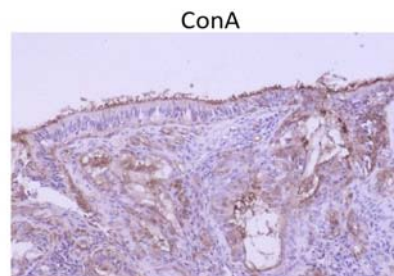
好酸球浸潤:呼吸粘膜≒嗅粘膜 2例/13例
呼吸粘膜障害≒嗅粘膜障害

(3) 嗅粘膜分泌状態の評価

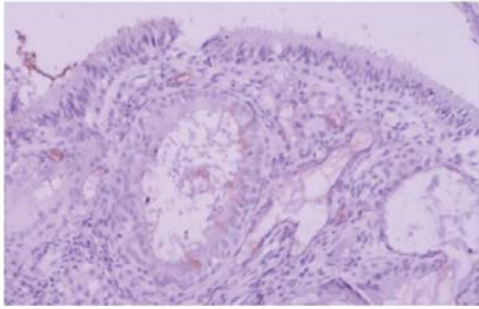
一方、多くの症例で粘膜下の粘液腺のボーマン腺の拡大および増勢が観察された。



さらにレクチン免疫染色にて ConA、SNA の発現を認め、粘液の変化が観察された。



SNA



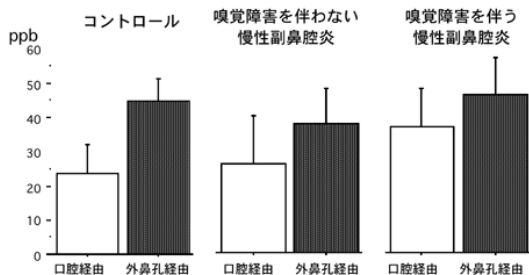
呼吸粘膜と嗅粘膜での組織学的な変化をまとめると以下のごとくになる。

好酸球浸潤	呼吸粘膜>嗅粘膜
上皮細胞障害	呼吸粘膜>嗅粘膜
分泌腺の増大	呼吸粘膜=嗅粘膜(ボーマン腺)
杯細胞の増勢	呼吸粘膜>>嗅粘膜
基底膜の肥厚	呼吸粘膜>嗅粘膜
線維化の増生	呼吸粘膜、嗅粘膜ともに少ない
嗅細胞の障害	少ない

呼吸粘膜と嗅粘膜との好酸球炎症状態

(4) 兔実験的副鼻腔炎モデル時の嗅粘膜を嗅粘膜上皮と繊維芽細胞や脳アストログリアの再構成による嗅粘膜の三次元培養を試みている。しかし、現在まで嗅細胞は培地の中では、抗体を用いた嗅細胞の生存の確認は数日間のみであり、明らかな嗅細胞の cell line の確立には至っていない。

(5) 化学発光式 NO 測定装置による鼻腔および口腔経由の呼気中 NO 濃度の測定慢性副鼻腔炎症例で嗅覚障害の有無で検討すると両者の明らかな差異は認められなかった。



慢性副鼻腔炎症例では、iNOS 抗体では嗅粘膜

線毛、ボーマン腺に強陽性像が観察された。また、嗅覚障害を伴い、手術後に嗅覚の改善例で、術前と比較すると、iNOS で線毛周囲の減弱が観察された。

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 8 件)

1) Haruna S, Shimada C, Ozawa M, Fukami S, Moriyama H, A study of poor responders for long-term, low-dose macrolide administration for chronic sinusitis. *Rhinology*, 47, 66-71, 2009, 査読有

2) Fukami M, Baba K, Hirabayashi H, Haruna S, Ichimura K, Ishikawa K. Community-based hearing screening project in Tochigi prefecture and results thorough audiometric test. *Nippon Jibiinkouka Gakkai Kaiho* 112:66-72, 2009, 査読有

3) Yoshimura T, Yoshikawa M, Otori N, Haruna S, Moriyama H, Correlation between the prostaglandin ratio in nasal polyps and the recalcitrant pathophysiology of chronic rhinosinusitis associated with bronchial asthma. *Allergol Int* 35:587-91, 2008, 査読有

4) Iimura Konno W, Koizumi S, Hirabayashi H, Haruna S. A case of laryngeal sarcoidosis difficult to diagnose. *Nippon Jibiinkouka Gakkai Kaiho* 111:701-4, 2008, 査読有

5) Kanaya H, Saito Y, Gama N, Konno W, Haruna S, Intramuscular hemangioma of masseter muscle with prominent formation of phlebolitis. *ANL* 35:587-91, 2008, 査読有

6) Haruna S, Otori N, Moriyama H, Kamio M, Endoscopic transnasal transethmosphenoidal approach for pituitary tumors, *ANL* 34:57-63, 2007, 査読有

- 7) Morikawa H. The effects of montelukast on tissue inflammatory and bone marrow responses in murine experimental allergic rhinitis; interaction with interleukin-5 deficiency. *Immunology* 122:438-444, 2007、査読有
- 8) Haruna S. Olfactory dysfunction in sinusitis with infiltration of numerous activated eosinophils. *ANL* 33:23-30, 2006、査読有

[学会発表] (計 10 件)

- 1) 春名眞一. 慢性副鼻腔炎の病態と下気道疾患との関連について. 山口アレルギー耳鼻咽喉科会. 山口. 2008. 11. 27
- 2) 春名眞一. 好酸球性副鼻腔炎の病態と手術的治療について. 北海道耳鼻咽喉科. 札幌. 2008. 8. 23
- 3) Haruna S. Endonasal Endoscopic Repair for Meningoencephalocele. 27th ISIAN. Greece. 2008. 6. 15
- 4) Haruna S. Endoscopic Revision Surgery for Eosinophilic sinusitis. 第 12 回日韓耳鼻咽喉科頭頸部外科学会. 奈良. 2008. 4. 4
- 5) 春名眞一. 好酸球浸潤した嗅粘膜組織障害の検討-好酸球性副鼻腔炎の嗅覚障害の解明. 関湊賞受賞講演. 栃木. 2008. 12. 6
- 6) Haruna S., Moriyama H. Olfactory dysfunction in sinusitis with infiltration of numerous activated eosinophils. 11th ARSR Symposium Seoul 2007. 11. 30
- 7) 春名眞一. 上下気道関連から見たアレルギー性鼻炎の治療戦略. 第 57 回日本アレルギー学会イブニングシンポジウム. 横浜 2007, 11. 2
- 8) 春名眞一. 鼻内視鏡手術の適応と限界. 第 9 1 回日耳鼻栃木地方部会. 宇都宮 2007, 9. 17
- 9) 春名眞一. 飯村慈朗、平林秀樹. 嗅裂病変に対する内視鏡手術. 第 46 回日本鼻科科学会. 宇都宮. 2007, 9. 27
- 10) 春名眞一. 鼻副鼻腔炎に対する内視鏡手術の効果. 第 13 回新潟耳鼻咽喉科免疫アレルギー研究会. 新潟 2007, 8. 26

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春名 眞一 (HARUNA SHINICHI)

獨協医科大学・医学部・教授

(2) 研究分担者

盛川 宏 (MORIKAWA HIROSHI)

獨協医科大学・医学部・講師

(3) 連携研究者

なし