

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K09356

研究課題名(和文) 外耳・中耳の耳内環境 pH変化と中耳真珠腫発生および進行リスク

研究課題名(英文) pH in the external or middle ear related a risk factor of middle ear cholesteatoma

研究代表者

楠 威志 (Kusunoki, Takeshi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：30248025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに申請者らは、ABCC11遺伝子型に基づく耳垢の乾湿の違いが中耳真珠腫の発生リスクに影響を与える可能性を検討し、中耳真珠腫症例群では、健常者群と比べて有意に湿性耳垢の割合が高いことを見出した。さらに、中耳真珠腫発症リスクと関連する外耳環境因子の一つとして、耳垢のpHに着目している。今回、ABCC11遺伝子の多型に基づいて耳垢を湿性および乾性に分別し、耳垢水溶液のpHを測定したところ、湿性耳垢ではpH 5.6、乾性耳垢ではpH 5.2という結果が得られ、湿性耳垢の方が有意に中性寄りであった。さらに、興味ごととして、耳垢pHが中性寄りの程度と中耳真珠腫病期進展度と有意に相関関係がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中耳真珠腫は、骨破壊を伴う炎症性・腫瘍性の病態を呈する。また、中耳真珠腫の再発率は、～30%を示す。そのため、中耳真珠腫が進行すると、難聴や耳鳴に始まり、めまい、顔面神経麻痺、さらには脳髄膜炎が続発する。つまり、中耳真珠腫は、罹患者の肉体・精神に甚大な障害をきたす難治性中耳疾患である。本研究において中耳真珠腫の発症・進行におけるpHの耳内環境の重要性が実証された場合には、今後、中耳真珠腫に関してそのリスク診断/予防/治療が実現すれば、罹患者・罹患のリスクを有する人が受ける恩恵は極めて大きいと判断する命の延長に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Previously, we examined the possibility that differences in the dry and wet earwax based on the ABCC11 genotype would affect the risk of developing middle ear cholesteatoma, and found out that the proportion of wet earwax was significantly higher in the middle ear cholesteatoma case group compared to the control(healthy) group. Furthermore, we are focusing on the pH of earwax as one of environmental factors in the external ear canal associated with the risk of developing middle ear cholesteatoma. In this study, earwax was sorted into wet and dry by polymorphisms in the ABCC11 gene. On the measurement of the earwax pH, the pH of saline solution with suspended ear wax was measured by pH meter. In result, pH of the dry earwax group was 5.2, and the wet earwax group (pH of 5.6) was significantly more neutral. In addition, there was a significant correlation between the degree of neutral earwax pH and the progress of middle ear cholesteatoma staging.

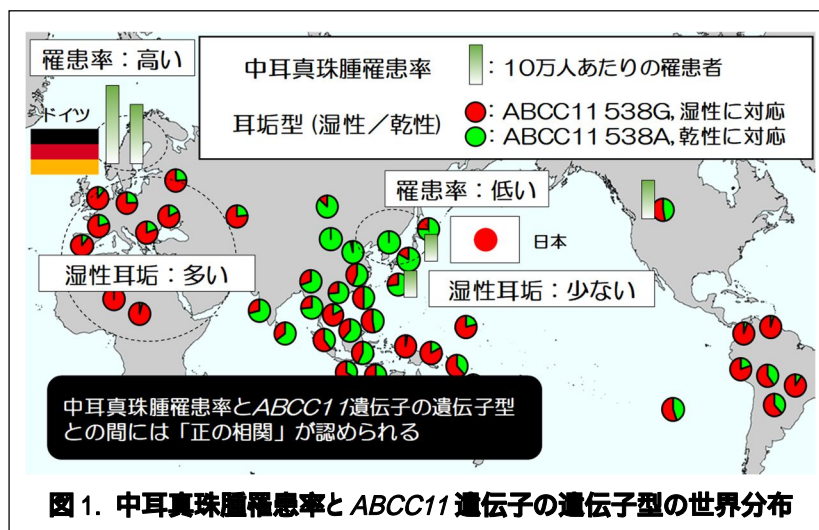
研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：ABCC11遺伝子多型 耳垢 中耳真珠腫 外耳道アポクリン腺 外耳道内pH環境 ABCC11 遺伝子多型 耳垢pH 湿性耳垢

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

外耳道に存在するアポクリン腺および皮脂腺からの分泌物が外耳道上皮と混ざり合って生成する耳垢は、その性状で湿性と乾性に分別することができる。Yoshiura らによって *ABCC11* 遺伝子の多型 (rs17822931、538G>A) が耳垢の性状 (湿性もしくは乾性) を決定することが報告され (*Nat Genet*, 38: 324–330, 2006) (538AA が乾性耳垢に対応、538GG/GA が湿性耳垢に対応)、分担者中川らによって *ABCC11* 遺伝子の多型が耳垢の性状を決定するメカニズムが解明されてきた (Toyoda et al., *FASEB J*, 23, 2001-2013, 2009.)。そして、申請者らは、独立した研究で示された「中耳真珠腫の罹患率」と「在住者の耳垢型」の世界分布 (図1) を重ね合わせて両者の間に相関があると考え (Ishikawa et al., *Frontiers in Genetics* 3:1-17, 2013 Nakagawa et al., *Med Hypotheses*, 114:19-22, 2018.) 耳垢の乾湿の性状が中耳真珠腫発症リスクに影響を与える可能性を *ABCC11* 遺伝子の多型に基づいて検討した。その結果、**中耳真珠腫症例群では、健常者群と比べて有意に湿性耳垢の割合が高いことを見出した**。また、申請者らは、中耳真珠腫発症リスクと関連する外耳環境因子の一つとして、耳垢の pH に着目し、「**耳垢決定遺伝子 *ABCC11* の多型によって外耳道環境の pH の偏り、それに伴う微生物叢の変化が中耳真珠腫発症リスクに関与するのではないか?**」という仮説を設け、本研究を立案した。



2. 研究の目的

中耳真珠腫は難聴をもたらす疾患のひとつであり、耳小骨の破壊を起点として、耳鳴りやめまい、顔面神経麻痺、ときには脳髄膜炎といった症状を伴う「罹患者の生命まで脅かす疾患」である。中耳真珠腫の治療法は手術が第一選択であるが、手術に伴う身体的・精神的負担に加え、その再発率が30%と難治性であることを踏まえると、中耳真珠腫の予防的ケアおよび保存的治療法を確立させることは耳鼻咽喉科領域における重要な課題のひとつであるが、十分に論じられていない。この点に着目した申請者らは、本疾患の発症リスクおよび進行を分子レベルで理解し、その予防的ケアおよび保存的治療法の確立に応用することを目指して研究を進めてきた。

本研究の目的は、耳垢を含めた耳内環境における pH 変化と中耳真珠腫の発症および進行リスクの関連性を解明することである。本研究では、耳内環境 pH 変化に関与する因子として、耳垢と真珠腫塊の細菌叢に注目した。前回の2015年度の基盤研究(C)では、耳垢型(湿性、乾

性)を決定する *ABCC11* 遺伝子多型と中耳真珠腫の罹患率と、両側真珠腫の発生率について研究した(研究課題番号 15K10763)。その結果、湿性耳垢の方が、中耳真珠腫になり易く、両側真珠腫の発生率も有意に高いと結果を得た。このことは、耳垢型あるいは *ABCC11* 538G>A 遺伝子型に応じて個人の中耳真珠腫リスクが異なる可能性を示している。岩崎ら(耳鼻、2011)は、湿性耳垢と乾性耳垢の違いは皮脂腺と耳垢腺からの分泌物の量や組成の違いが推測されているが、pH について比較した報告はない。そこで本研究では中耳真珠腫患者を耳垢型あるいは *ABCC11* 538G>A 遺伝子型と耳内環境 pH とを比較し、中耳真珠腫リスクとの関連を解明する。

本研究において中耳真珠腫の発症・進行における pH の耳内環境の重要性が実証された場合には、今後、中耳真珠腫に関してそのリスク診断/予防/治療が実現すれば、罹患者・罹患のリスクを有する人が受ける恩恵は極めて大きいと判断する命の延長に繋がると思われる。

3. 研究方法

中耳真珠腫罹患患者における *ABCC11* 遺伝子の遺伝子型判別

前回の研究方法研究(課題番号 15K10763)と同様に中耳真珠腫罹患患者および健常耳(コントロール)協力者の同意の下で採取した血液からゲノム DNA を抽出し、耳垢の乾・湿を決定する *ABCC11* 遺伝子上の 538 番目の一塩基が含まれる領域を PCR で増幅する。そして、この増幅産物にたいしてシーケンス解析を行い、*ABCC11* 遺伝子の遺伝子型を判別する。得られた結果は、耳垢の乾・湿および外耳道・中耳における臨床所見と照らし合わせて分類し、 χ^2 検定およびロジスティック回帰分析を用いて中耳真珠腫の発症・進行と *ABCC11* 遺伝子の遺伝子型との連関を解析する。症例を増やすことにより、さらに統計学的に有意に湿性耳垢の方が中耳真珠腫になり易く、両側真珠腫の発生率も高いものになることが期待できる。

湿性耳垢は日本人と比べて欧州人に多く(Yoshiura et al., *Nat Genet*, 2006)、欧州人における中耳真珠腫の発症頻度が、日本人のそれよりも高い傾向にあることが知られている。人種差が世界規模の疫学調査から報告されている。このことを踏まえ、申請者らは、日本と同レベルの生活・医療水準を有するドイツとの国際共同研究をすでに展開し、潜在的に競合する他の研究グループよりも優位な研究体制を築くことに成功している。今回、日本と同レベルの生活・医療水準を有するドイツと実際、どれだけ、湿性耳垢の割合を *ABCC11* 多型について比較した。

さらに本遺伝子検査により、厳密に湿性耳垢、乾性耳垢の判別を行い、以下に述べる研究にて両者間で pH を比較した。

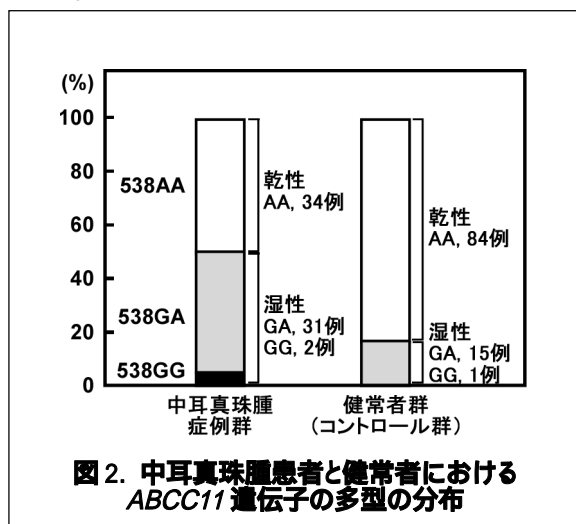
耳垢 pH の測定

Nguyen らの方法(Laryngoscope, 124, 245-250, 2014.)を参考にし、被験者から採取した耳垢を耳垢の重量の 4 倍量の生理食塩水に懸濁して、pH を測定する。pH の測定には、微量用 pH メーター(HORIBA, pH-22B)を用いて測定した。上述の遺伝子型にて判別した湿性耳垢、乾性耳垢の両群間で耳垢 pH を比較した。対象は、中耳真珠腫患者と健常耳と合わせた全症例と、健常耳のみで行った。また、中耳真珠腫患者群と健常耳群の両群間で耳垢 pH を比較した。さらに真珠腫症例においては、耳垢 pH と、中耳真珠腫病期分類の進展度の関連について検討した。

4. 研究成果

中耳真珠腫患者と健常者の耳垢決定遺伝子 *ABCC11* 遺伝子多型

上記について、前回より症例を増やし検討した。コントロール群では、100 例中乾性耳垢 84%、湿性耳垢 16%に対し 中耳真珠腫 67 例において乾性耳垢 51%に対し、湿性耳垢 49%であった。中耳真珠腫症例群は、コントロール群にくらべて有意に湿性耳垢の割合が高かった (図 2 $P < 0.001$)



ドイツにおいては、コントロール群では、336 症例中、乾性耳垢 (538AA:17 例) 5%、湿性耳垢 (538GA:100 例、538GG:17 例) 95%であった。中耳真珠腫 89 症例において、乾性耳垢 (538AA:0 例) が 0%、湿性耳垢 (538GA:21 例、538GG:68 例) は全例 100%であった。ドイツの場合、コントロール群、中耳真珠腫群共に、湿性耳垢が 95%以上を占め、両群に湿性、乾性耳垢の割合に有意差を認めなかった。日本の湿性耳垢において 538GG が占める割合は、コントロール (1%)、中耳真珠腫群 (3%) 共に僅かであり、それに対し、ドイツではコントロール群 (69%)、中耳真珠腫群 (76%) 共に有意に高率であった。

諸家の報告より、*ABCC11* 遺伝子の一塩基多型解析では、湿性耳垢がアフリカ人、ヨーロッパ人に多く (80 - 100%)、日本人は少ない (10-30%)。中耳真珠腫罹患率においては、ヨーロッパ人の方が日本人に比べは高いとされている。これらの報告と本研究結果を考慮すると、湿性耳垢が、中耳真珠腫の発症リスクになる可能性が示唆された。

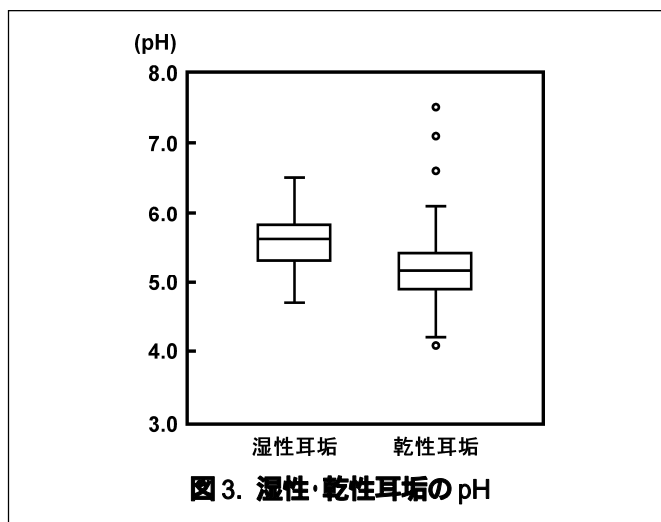
湿性耳垢と乾性の耳垢 pH

ABCC11 遺伝子の多型に基づいて耳垢を湿性および乾性に分別し、耳垢を懸濁させた水溶液の pH を測定したところ、湿性耳垢 pH 5.6、乾性耳垢 pH 5.2 という結果が得られ、湿性耳垢の方が有意に中性寄りであった (図 3 $p < 0.001$)

健常耳群においては、湿性耳垢 pH 5.6、乾性耳垢 pH 5.1 という結果が得られ、湿性耳垢の方が有意に中性寄りであった ($p < 0.001$)

中耳真珠腫患者群と健常耳群の両群間で耳垢 pH を比較した。中耳真珠腫患者群では pH 5.4、

健常耳群 pH 5.2 という結果が得られ、中耳真珠腫患者群の方が有意に中性寄りであった ($p < 0.01$) であった。



さらに真珠腫症例においては、耳垢pHと中耳真珠腫病期分類の進展度の関連について検討した。その結果、耳垢 pH が中性寄りの程度と、中耳真珠腫病期分類の進展度と有意に相関関係がみられた(図4 Spearman correlation, $r = .33, P = .037^*$ *, $P < .05$)。

図4 耳垢 pH と中耳真珠腫病期分類

Preoperative stage	Earwax pH
I	4.90 ± 0.01
II	5.44 ± 0.55
III	5.76 ± 0.79

現在、日本の耳鼻咽喉科の流れとして、耳垢はそのまま除去せず放置する流れになっている。積極的に耳垢除去すると、外耳炎をきたし、本来の外耳道感染防御能の低下をきたすとされている。その機序として前述の如く耳垢には、ライソゾーム、免疫グロブリンが含まれ、外耳道上皮を覆い抗菌作用および外耳道上皮の保護作用があるとされている。また、外耳道内は、pH4~5の弱酸性が保たれ常在菌叢(善玉菌)にて悪玉菌を抑制している可能性がある。乾性耳垢であれば、自浄作用にて、耳道上皮の線毛運動によって、外耳道の外へmigrationされる。しかし、湿性耳垢では、乾性耳垢よりライソゾーム、免疫グロブリンの含量は少ないと既に報告されている。さらに今回、我々は、湿性耳垢も弱酸性でありながら、乾性耳垢よりpH有意に中性寄りであることを検証した。それにより、湿性耳垢がある外耳道環境が、本来の常在菌叢が乱れ悪玉菌が繁殖することが考えられる。さらに、湿性耳垢は乾性耳垢とは違い、粘稠のため、自浄作用が働きにくく、外耳道内に堆積する。これらにより感染防御が低下して、なんらかの炎症反応が遷延化にて、鼓膜の脆弱化により、外耳道上皮の鼓室内への侵入をきたし真珠腫発症に至ることが予測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Satoshi Hara, Takeshi Kusunoki, Hiroshi Nakagawa, Yu Toyoda, Shuko Nojiri, Kazusaku Kamiya, Masayuki Furukawa, Yusuke Takata, Hiroko Okada, Takashi Anzai, Fumihiko Matsumoto, Katsuhisa Ikeda	4. 巻 166
2. 論文標題 Association between earwax-determinant genotypes and acquired middle ear cholesteatoma in a Japanese population	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Otolaryngol Head Neck Surg	6. 最初と最後の頁 139-145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/01945998211000374.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hara Satoshi, Kusunoki Takeshi, Nakagawa Hiroshi, Toyoda Yu, Nojiri Shuko, Kamiya Kazusaku, Furukawa Masayuki, Takata Yusuke, Okada Hiroko, Anzai Takashi, Matsumoto Fumihiko, Ikeda Katsuhisa	4. 巻 -
2. 論文標題 Association Between Earwax-Determinant Genotypes and Acquired Middle Ear Cholesteatoma in a Japanese Population	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Otolaryngology Head and Neck Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/01945998211000374	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kusunoki Takeshi	4. 巻 112
2. 論文標題 ABCC11, a Human Earwax Type Determinant, and Risk Factors of the Middle Ear Cholesteatoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Practica Oto-Rhino-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 478 ~ 479
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5631/jibirin.112.478	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa Hiroshi, Toyoda Yu, Albrecht Tobias, Tsukamoto Megumi, Praetorius Mark, Ishikawa Toshihisa, Kamiya Kazusaku, Kusunoki Takeshi, Ikeda Katsuhisa, Sertel Serkan	4. 巻 114
2. 論文標題 Are human ATP-binding cassette transporter C11 and earwax associated with the incidence of cholesteatoma?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Hypotheses	6. 最初と最後の頁 19 ~ 22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mehy.2018.02.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kusunoki T, Nakagawa H, Tsukamoto M, Toyoda Y, Kamiya K, Okada H, Hara S, Furukawa M,	4. 巻 12:3
2. 論文標題 Possible association between middle ear cholesteatoma and a single nucleotide polymorphism 538G>A in ABCC11, a human earwax type determinant.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Genetic Medicine	6. 最初と最後の頁 1000362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/1747-0862	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 楠 威志, 岡田 弘子
2. 発表標題 人種・民族の耳垢型決定遺伝子 ABCC11多型と中耳真珠腫発症リスク
3. 学会等名 第84回耳鼻咽喉科臨床学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 楠 威志, 原 聡, 岡田 弘子, 神谷 和作
2. 発表標題 人種・民族の耳垢型決定遺伝子 ABCC11 多型と中耳真珠腫の発症リスク～日独間における ABCC11 多型の比較～
3. 学会等名 第32回日本耳科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原 聡, 楠 威志, 神谷 和作, 高田 雄介, 岡田 弘子, 安齋 崇, 池田 勝久, 松本 文彦
2. 発表標題 耳垢型決定遺伝子ABCC11と後天性中耳真珠腫の関連性
3. 学会等名 第123回日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 楠 威志、原 聡、岡田 弘子、神谷 和作
2. 発表標題 人種・民族の耳垢型決定遺伝子ABCC11多型の差異と中耳真珠腫の発症リスク
3. 学会等名 第31回 日本耳科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田 弘子、楠 威志、原 聡、神谷 和作、高田 雄介、古川 正幸、池田 勝久
2. 発表標題 外耳道真珠腫と耳垢型：ABCC11遺伝子多型についての検討
3. 学会等名 第31回 日本耳科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原 聡、楠 威志、神谷 和作、高田 雄介、岡田 弘子、池田 勝久
2. 発表標題 耳垢型決定遺伝子ABCC11の後天性中耳真珠腫の関連性
3. 学会等名 第31回 日本耳科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 楠 威志
2. 発表標題 世界人種間のABCC11 遺伝子多型の差異と中耳真珠腫の発症リスクについて
3. 学会等名 第82回耳鼻咽喉科臨床学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 楠威志, 原聡, 岡田弘子, 古川正幸, 池田勝久
2. 発表標題 耳垢の決定遺伝子 ABCC11 と中耳真珠腫の発症リスク
3. 学会等名 第81回耳鼻咽喉科臨床学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠威志
2. 発表標題 耳垢の決定遺伝子ABCC11の発症リスク
3. 学会等名 第117回日本耳鼻咽喉科学会静岡県地方部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠威志
2. 発表標題 声帯ポリープに対する「腹式呼吸を重点に置いた簡易音声訓練法」の治療効果
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠 威志ほか
2. 発表標題 耳垢の決定遺伝子ABCC11と中耳真珠腫の発症リスク
3. 学会等名 第119回日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中川 大 (Hiroshi Nakagawa) (40397039)	中部大学・応用生物学部・准教授 (33910)	
研究分担者	豊田 優 (Yu Toyoga) (80650340)	東京大学・医学部附属病院・届出研究員 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------