

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592492

研究課題名(和文)好酸球性中耳炎による内耳障害機序の解明と予防戦略の確立

研究課題名(英文)Clarification for the etiology of the inner ear dysfunction of eosinophilic otitis media

研究代表者

吉田 尚弘(Yoshida, Naohiro)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90291260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球性中耳炎の内耳障害機序を明らかにするため、外リンパ灌流するシステムを確立し好酸球誘導サイトカイン、産物であるIL-5, Eosinophil Cationic Protein(ECP)、eotaxinなどの好酸球遊走因子などを外リンパ灌流し電気生理学的特性の変化を検討した。ECPで、経時的なCAP amplitudeの減少が見られた。一方、抗IgE抗体の外リンパ灌流では内耳障害をきたさなかった。抗IgE抗体の鼓室内投与への臨床実用への基礎実験になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of the inner ear dysfunction due to the eosinophilic otitis media, IL-5, Eosinophil Cationic Protein(ECP)、eotaxin、leukotoruene (LT) and PAF were perfused through the perilymph by the precise peristaltic pump. By measuring the compound action potential(CAP) for a long period of time, the run down of the CAP was measured when the ECP was perfused. The anti IgE antibody is one of the important strategy for the sever bronchial asthma, which has the effectiveness of the eosinophilic otitis media was perfused through the perilymph. The results of no effect on the CAP by anti IgE perfusion represented the possibility for the newly therapeutic approach for the eosinophilic otitis media.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：好酸球性中耳炎 抗IgE抗体 外リンパ灌流

1. 研究開始当初の背景

好酸球性中耳炎は、粘性の極めて高いニカワ状の中耳貯留液を特徴とし、中耳貯留液、粘膜には多数の好酸球が浸潤する難治性中耳炎である。気管支喘息や好酸球性副鼻腔炎と合併することが多い。1995年 Tomioka により本邦からはじめて報告された本疾患は、近年新たな疾患概念として国外でも報告されるようになり、広く知られ受け入れられるようになった¹。本疾患の最も重要な問題点は約半数で感音難聴が進行し、最終的に約1割が聾に至ることである。好酸球性中耳炎症例の中耳貯留液から好酸球誘導サイトカイン、産物である IL-5, Eosinophil Cationic Protein (ECP)、eotaxin が血中濃度よりも高い濃度で存在していることを明らかにした²。また、聴力閾値上昇は高音域より生じ、4000、8000Hz で好酸球性中耳炎の罹患期間と相関して優位に閾値上昇が見られることが明らかとなった³。しかし、最も大きな問題点は、徐々に進行する感音難聴と聾に至る急激な内耳障害である。高音域より始まり全周波数域へと進行する聴力閾値上昇の機序、内耳の障害部位は明らかにされていなかった。また、好酸球性中耳炎は主としてトリアムシノロンアセトニド(ケナコルト[®])の鼓室内投与、あるいは症状悪化、増悪時には副腎皮質ステロイドの全身投与で治療されるが、このような治療で比較的良好にコントロールできる症例と一方で難治化する症例があり、難治化する因子は不明であった。

2. 研究の目的

モルモットを実験動物として用いて、好酸球性中耳炎の中耳貯留液、粘膜に高濃度に存在する好酸球誘導サイトカイン、産物である IL-5, Eosinophil Cationic Protein(ECP)、eotaxin、ロイコトルエン(LT)、PAF などの好酸球遊走因子などを外リンパ灌流することによる急性内耳障害、および耳管、骨髄経路による慢性的に内耳へ投与し、経時的な聴覚閾値変化を測定し内耳障害の詳細、難治化の要因を好酸球性中耳炎罹患の中耳貯留液に存在するメディエーターの急性、慢性の内耳障害機序を電気生理学、生化学、形態学的手法を用いて明らかにし、また、ヒトにおける難治化因子、先行することの多い好酸球性副鼻腔炎との関連も検討し、動物実験との結果との相同性を検討することから治療戦略を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

実験動物としてモルモットを用いて外リンパ灌流を内耳に影響をきたさないように精密かつ一定の低速で行うため、高精度な peristaltic pump と灌流システムを作成した。薬物を外リンパ灌流と同時に compound potential(CAP)を測定した。また、経耳管、経鼓膜的に薬物を内耳腔に投与し好酸球性中耳炎の発現の有無を検討し

た。

さらに、好酸球性中耳炎における難治化因子を多変量解析し検討すると同時に中耳貯留液中の細菌、真菌培養および特異的 IgE の検討した。

4. 研究成果

1) ケモカイン投与による内耳機能の変化

投与した薬物は好酸球遊走、アレルギー反応に関与するケモカインである。血小板活性化因子(platelet-activating factor、PAF)は、血小板凝集や脱顆粒、炎症、アナフィラキシーを含む多くの白血球機能の強力なリン脂質活性化剤・メディエーターでアラキドン酸代謝の増強に関与し分子量 523.68 g/mol であるが、そのほか好酸球に特異的に発現する CCR3 の特異的リガンドで、アレルギー性炎症で特徴的に見られ好酸球の集積を示すケモカインである eotaxin などは分子量が大きく(IL-5: 45-60kDa、ECP: 18-22 kDa、eotaxin: 8.4 kDa)従来の外リンパ灌流に用いる灌流装置では dead space や、チューブの内腔に薬物が付着してしまう可能性があり少量液で投与可能ななるべくガラス管を多く用いた少量で灌流可能なシステムを作成した。薬物外リンパ灌流後は positive control として高濃度の K⁺とした外リンパ液を灌流し動作を確認した。IL-5, ECP、eotaxin を外リンパ液に溶解し連続的に CAP を測定したが、高濃度 ECP (20 μg/mL)において、約 10%の CAP の減少を認めしたが、他の物質では変化は認めなかった。ECP が急性灌流実験では内耳機能障害に関与する可能性が示唆された。急性灌流実験での大きな CAP 変化は認められないため、慢性実験として、耳管経路に正確・確実に薬物を投与する目的で、設備費として購入した径約 0.9 mm 内視鏡をガイドにして微小カテーテルを挿入し薬物投与を行った。ECP を鼓室内に投与すると、好酸球遊走を一部伴う中耳炎が惹起された。一方コントロールとして生理食塩水を鼓室内投与した場合も中耳炎が 60%に惹起され、経耳管の鼓室内投与では耳管機能障害による中耳炎により ECP による直接的な効果判定は困難であった。

2) 中耳腔の細菌、真菌の存在の検討と特異的 IgE の検討と抗 IgE 抗体投与による内耳機能の変化

好酸球性中耳炎における中耳貯留液中どのような細菌、真菌が存在するかを検討したところ明らかな真菌は培養検査では認められなかった(図1)。しかし、一方で特異的 IgE が存在するかを検討したところ、血中には特異的真菌の抗体は認められないものの、中耳貯留液に認めることが明らかとなった⁴。そこで、抗 IgE 抗体の全身投与が重症気管支喘息患者において効果を認めること、さらに好酸球性中耳炎においても全身投与で

Bacteria and fungi detected from MEE or otorrhea in patients with eosinophilic otitis media.

MEE (n=26)	
Pathogen positive	18 (69.2%)
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	12 (4)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
<i>Hemophilus influenzae</i>	0
<i>Candida</i>	0
Non-pathogen only	1 (3.8%)
Negative	7 (26.9%)

MEE: middle ear effusion; MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

図1：中耳貯留液の細菌、真菌検査所見

効果を認めることから⁵、抗IgE抗体を鼓室内投与する際の内耳障害の有無についてモルモットを外リンパ灌流し、直接の内耳障害の可能性を検討した。

図2に示すように、蝸牛の頂回転と基底回転に小孔を作成し、perfusion pipetteを挿入し、音響システムを用いて持続的にCAPを測定した。経時的にCAPを測定したところ、抗IgE抗体(オマリズマブ[®])はCAPには影響を与えず、その後に灌流した高K⁺リンパ液ではCAPの減少がみられ、外リンパ液灌流と比して有意なCAPの減少は認められなかった。

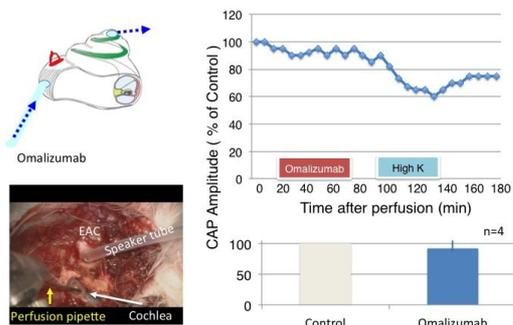


図2：抗IgE抗体の外リンパ灌流による急性内耳障害の検討(左：外リンパ灌流の実際、右：抗IgE抗体(オマリズマブ[®])を投与した際のCAPの変化。)

さらに、抗IgE抗体(オマリズマブ)を鼓室内投与し、投与前後の聴力を聴性脳幹反応(ABR)で測定した(図3)。投与前、投与後、24時間後、1週間後の聴力閾値をABRで測定した。投与直後は、中耳貯留液により聴力閾値の上昇を認めるが、その後改善した。しかし、投与後1週間では1例に中耳炎の合併を認め、経鼓室投与では反復投与による感染の制御は临床上重要であると考えられた。

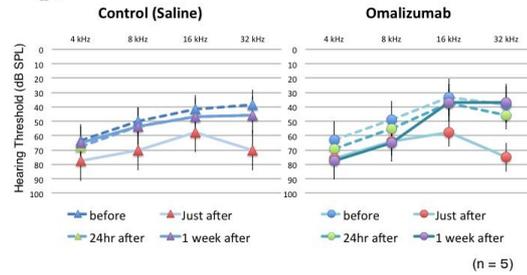
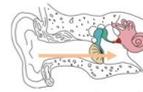


図3：抗IgE抗体経鼓室投与による経時的な聴力変化(慢性実験)

3) 難治化因子の検討

モルモットに投与した急性実験ではケモカインの直接的な内耳障害、重症度との相関は認められなかったが、好酸球性中耳炎における難聴、難治化因子の検討を行った。その結果、肥満、アスピリン喘息の合併、喘息の罹病期間に強く相関することが明らかとなった⁶。

Relationship between the severity score and variables tested by partial correlation analysis.

Variable	Partial correlation coefficient	p value
Body mass index	0.58	0.02
Duration of bronchial asthma	0.55	0.03
Lund-Mackay score	-0.49	0.05
Aspirin-intolerant asthma	0.46	0.07
Sex	0.40	0.12 (ns)
Allergic rhinitis	0.39	0.13 (ns)
Lateromedial width of the Eustachian tube	0.37	0.16 (ns)
Age	-0.33	0.22 (ns)
Total serum IgE level	0.18	0.50 (ns)
Percentage of eosinophils (peripheral)	-0.11	0.68 (ns)
Pneumatization of the mastoid	0.07	0.81 (ns)

ns, not significant.

図4：好酸球性中耳炎の難治化因子

本研究の結果から、好酸球性中耳炎の内耳障害には、ECPを介した内耳障害が示唆され、また抗IgE抗体の鼓室内投与治療の可能性が示唆された。さらに難治化因子の検討から、難治化すると内耳障害を引き起こすことから、今後は肥満によるケモカインの変化、periostinなどと好酸球性中耳炎の内耳障害との関連の検討は今後機序解明へのアプローチになると考えられた。

引用文献

- Iino Y. Eosinophilic otitis media: a new middle ear disease entity. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2008;8(6):525-30.
- Iino Y, Kakizaki K, Katano H, Saigusa H, Kanegasaki S. Eosinophil chemoattractants in the middle ear of patients with eosinophilic otitis media. *Clin Exp Allergy.* 2005; 35(10):1370-6.
- Nakagawa T, Matsubara A, Shiratsuchi H, Kakazu Y, Nakashima T, Koike K, Umezaki T, Komune S. Intractable otitis media with

eosinophils: Importance of diagnosis and validity of treatment for hearing preservation. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2006; 68(2):118-22.

Kanazawa H, Yoshida N, Shinnabe A, Iino Y. Antigen-specific IgE in middle ear effusion of patients with eosinophilic otitis media. Ann Allergy Asthma Immunol 査読有、113 巻、2014、88-92

Iino Y, Yoshida N Hara M, Hasegawa M, Matsuzawa S, Shinnabe A, Kanazawa H. Effect of omalizumab on biomarkers in middle ear effusion in patients with eosinophilic otitis media. Acta Otolaryngol. 2014;134: 366-72

Kanazawa H, Yoshida N et al. Risk factors associated with the severity of eosinophilic otitis media. Auris Nasus Larynx 査読有、41 巻、2014、513-517

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3件)

Kanazawa H, Yoshida N et al. Risk factors associated with the severity of eosinophilic otitis media. Auris Nasus Larynx 査読有、41 巻、2014、513-517

Kanazawa H, Yoshida N, Shinnabe A, Iino Y. Antigen-specific IgE in middle ear effusion of patients with eosinophilic otitis media. Ann Allergy Asthma Immunol 査読有、113 巻、2014、88-92

吉田尚弘 好酸球性中耳炎の診断と治療 - 特に局所ステロイドの使い方 - ENTONI、査読無、139 巻、2012、44-48

〔学会発表〕(計6件)

吉田尚弘 ANCA 関連血管炎性中耳炎の診断と治療を考える 第24回日本耳科学会 2014/10/16-18 (新潟)

Yoshida N. Eosinophilic Otitis media-pathogenesis, clinical features and management. 25th Congress of the European Rhinologic Society 2014/6/22-26 (Amsterdam)

金沢弘美、吉田尚弘、飯野ゆき子 好酸球性中耳炎における中耳炎貯留液中の特異的 IgE 抗体について 第32回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2014/2/6-2/8 (徳島)

金沢弘美、吉田尚弘、飯野ゆき子 好酸球性中耳炎における増悪因子について 第31回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2013/2/7-2/9 (倉敷)

吉田尚弘 Patulous eustachean tube

develops the eosinophilic otitis media followed by chronic sinusitis. 9th international conference of cholesteatoma and ear surgery. 2012/6/3-6/7 (長崎)

Yoshida N. Reversible hearing loss due to MPO-ANCA associated vasculitis initially localized in temporal bone. ANCA workshop 2012/3/29-30 (東京)

〔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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 尚弘 (YOSHIDA, Naohiro)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 90291260

(2)研究分担者

飯野 ゆき子 (IINO, Yukiko)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号: 30108534

日高 浩史 (HIDAKA, Hiroshi)

東北大学大学院・医学研究科・講師

研究者番号: 40302103

金沢 弘美 (KANAZAWA, Hiromi)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40570643

(3)連携研究者

なし