

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592562

研究課題名(和文) 中耳真珠腫におけるマイクロバイオームの検討

研究課題名(英文) analysis of cholesteatoma microbiome in the middle ear

研究代表者

比野平 恭之 (Hinohira, Yasuyuki)

昭和大学・医学部・客員教授

研究者番号：00238320

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)：近年、米国を中心として消化管や生殖器、皮膚組織などのmicrobiomeを検討し、疾患の発生や予防機序に応用する試みが行われている。中耳は気道粘膜の延長であり、中耳粘膜においても種々の細菌が棲み中耳炎の発症や遷延化に深く関わっていると考えられる。そこで手術時に得られた組織標本から中耳粘膜のmicrobiomeを真珠腫例、非真珠腫例との間で比較検討した。中耳真珠腫と非真珠腫性中耳炎の患者の真珠腫や中耳粘膜細菌コミュニティを比較した場合、両群で菌種の数に有意な差は認められなかったが、真珠腫群において嫌気性菌が真珠腫の形成に関わっているのではないかと推測された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to compare the difference between otitis media with cholesteatoma patients and those without cholesteatoma on microbial flora of the middle ear mucosa at DNA level. Bacterial samples were collected from 30 cholesteatoma patients and 30 non-cholesteatoma patients. Bacterial-specific 16s rRNA was amplified by PCR and then digested by restriction enzyme. T-RFLP and next generation sequence (Illumina HiSeq) were performed and the data was analyzed. About 20 bacterial species were contained in each sample. Cholesteatoma patients tended to contain more species of anaerobes compared to non-cholesteatoma patients. Anaerobes were considered to get involved with cholesteatoma development.

研究分野：耳科学

キーワード：真珠腫 microbiome 中耳 シーケンス

1. 研究開始当初の背景

中耳真珠腫は周囲の骨組織(聴器)の破壊を伴うため、高度の難聴、めまい、顔面神経麻痺、頭蓋内合併症など重篤な後遺症をもたらす疾患である。病理組織学的には異形性のない角化重層扁平上皮が中耳に進入した状態であり、手術的に角化重層扁平上皮(真珠腫上皮)を摘出すれば治癒する疾患である。従来から多くの手術方法が提示されているが、その再発率は5~40%と依然高値である。申請者らは再発率を減少させるために、手術方法に改良を加えてきたが、第2段階手術でまだ31.1%に真珠腫上皮の遺残による再発が見られた。これら第2段階手術での再発例において、遺残病変を除去しても、第2段階手術後の再発率は10.7%に達している。しかしこれら再々発例においては自家骨や人工骨を用いて中耳腔を充填した部分には再発が見られないという興味深い結果が得られた。

この結果は申請者らが開発した中耳真珠腫実験モデルを用いた真珠腫の病態に関する研究において、中耳腔内を人工骨で充填することにより真珠腫の増殖抑制傾向が得られるとの実験結果と一致した。この真珠腫増殖抑制効果は、人工骨の中でも硬性材料であるハイドロキシアパタイトの充填モデルで最も顕著に見られた。また平成21~23年度

基盤研究C: 実験的真珠腫モデルを用いた真珠腫上皮細胞のアポトーシスに関する研究で、この増殖抑制効果は主にアポトーシスによることが明らかとなった。これらの研究により、中耳真珠腫の再発予防に関して効果的な治療に対する手がかりが得られたことになる。

2. 研究の目的

一方で疾患の根絶には治療とともに、早期発見も重要である。近年、米国を中心として消化管や生殖器、皮膚組織などのmicrobiome(宿主に生存する微生物コミュニティの構成ゲノムの総称)を検討し、疾患の発生や予防機序に応用する試みが行われており、特に肥満や糖尿病などの代謝疾患で研究が進んでいる。中耳は気道粘膜の延長であり、中耳粘膜には種々の細菌が棲み中耳炎の発症や遷延化に深く関わっていると考えられる。ところが実際に培養できる微生物は10%以下であり、培養できない細菌が中耳炎の遷延化、中耳真珠腫の発症に影響を与えている可能性は大きい。しかしこれまでのところ中耳粘膜におけるmicrobiomeの検討はほとんど行われていない。

本研究では手術時に得られた組織標本から中耳粘膜のmicrobiomeを真珠腫例、非真

珠腫例との間で比較検討し、真珠腫に特異的な microbiome を明らかにすることを目的とする。

3 . 研究の方法

(1) 全身麻酔下の鼓室形成手術時に組織を採取した。真珠腫例では真珠腫上皮および表皮剝切物を一塊として約 3 × 3mm、非真珠腫例では中耳粘膜および肉芽を一塊として約 3 × 3mm 採取した。

(2) 滅菌綿棒を用いて組織表面から細胞を採取し、得られた細胞から DNA の精製を行った。得られた DNA は PCR に用いられるまで -20 で保存された。次いで PCR 法を用いて細菌特異的 16s rRNA 遺伝子を増幅し、PCR 産物を確認するために、アガロースゲル電気泳動を行った。PCR 産物を制限酵素 *MspI* で切断し、断片を末端標識制限酵素断片多型分析法 (T-RFLP) で解析、これによって断片のサイズ毎に得られるピークの数から検体に含まれる細菌種の数进行推定し、真珠腫例と非真珠腫例で比較検討を行った。

(3) 得られた DNA から細菌特異的 16s rRNA V3・V4 領域を増幅し、次世代シーケンス (Illumina HiSeq) にて解析、細菌種の同定を試みた。

4 . 研究成果

(1) 中耳真珠腫 30 例、非真珠腫 30 例から得られた検体を処理し、DNA を抽出した後にそれぞれ T-RFLP、HiSeq にて細菌群のプロファイルを解析した。

(2) 得られた DNA サンプルから 16s rRNA 遺伝子を増幅しアガロースゲル電気泳動にてバンドを確認したところ、全検体でバンドが確認された。

(3) PCR 産物を制限酵素 *MspI* で切断し、断片を T-RFLP にて解析したところ、断片の長さごとにピークがみられ、そのピーク 1 つを細菌 1 菌種とした場合、真珠腫群では平均 20.49 種類、非真珠腫群では平均 20.87 種類と、両群で菌種の数に有意な差は認められなかった。

(4) HiSeq を用いた細菌の同定を試みているが、一部検体から得られた結果では、真珠腫群において *Peptococcus* 属や *Bacteroides* 属といった嫌気性菌が検出され、非真珠腫群よりも高率に認められた。現在もなお解析中であり、今後解析結果がまとまった段階で学会・論文にて報告を行う予定である。

(5) これまでの結果から、中耳真珠腫と非真珠腫性中耳炎の患者の真珠腫や中耳粘膜細菌コミュニティを比較した場合、一部検体からの結果ではあるが、真珠腫群において嫌気性菌が真珠腫の形成に関わっているのではないかと推測された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Hinohira Y, Staged Canal Wall Up
Tympoplasty for Middle Ear
Cholesteatoma, Practica
Oto-Rhino-Laryngologica, 査読有、108 巻、
2015、426 - 427
DOI: 10.5631/jibirin.108.426

比野平恭之、【中耳真珠腫進展度分類を用
いた多施設共同研究】 進展度分類に応じた
真珠腫に対する鼓室形成術、Otology Japan、
査読有、24 巻、2014、801 - 804

〔学会発表〕(計6件)

Hinohira Y, Surgical management for
middle ear cholesteatoma according to the
staging, 30th Politzer Society Meeting、
2015 年 7 月 3 日、新潟

比野平恭之、中耳真珠腫に対する後壁保
存段階的鼓室形成術、日本耳鼻咽喉科学会総
会、2014 年 5 月、福岡

比野平恭之、中耳真珠腫進展度分類を用
いた多施設共同研究 進展度分類に応じた術

式分類の実際、日本耳科学会、2013 年 11 月、
宮崎

Hinohira Y, Matsuda K, Kobayashi H,
Tono T, Suzaki H, Yanagihara Y,
Postoperative management of residual
cholesteatoma and less invasive revision
surgery for the recurrence, 29th Politzer
Society Meeting、2013 年 11 月、アンタルヤ

比野平恭之、進展度分類に応じた真珠腫
に対する鼓室形成術、日本耳科学会、2012 年
10 月、名古屋

Hinohira Y, Scutum Plasty Using Sliced
Cartilage for Postoperative Retraction
Pocket of Middle Ear Cholesteatoma, The 9th
International Conference on Cholesteatoma
and Ear Surgery、2012 年 6 月 5 日、長崎

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

比野平 恭之 (HINOHIRA, Yasuyuki)

昭和大学・医学部・客員教授

研究者番号 : 00238320