

論文要旨

The role of vascular endothelial growth factor in pediatric otitis media

小児滲出性中耳炎における血管内皮増殖因子(VEGF)の役割

積山 幸祐

【序論および目的】

滲出性中耳炎(以下 OME)は小児の代表的な上気道感染症の一つであり、細菌感染によってもたらされ、その遷延化に interleukin 1(IL-1), IL-2, IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor alpha(TNF- α) エンドトキシンなどが関与することが知られている。また、耳管機能障害によって生じるガス交換障害が中耳の低酸素状態を引き起こし、難治化を招くことも報告されている。しかし、OME の遷延化や難治化の機序については未だ十分に解明されていない。

最近、エンドトキシン注入で作成された OME 動物モデルで血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor : VEGF)の mRNA の発現と VEGF 蛋白の産生が発見された。また、VEGF をラットの中耳に注入すると中耳貯留液が産生されることが証明された。VEGF は強力な血管透過性亢進作用や血管新生作用を有する分子量約 34-42kDa の蛋白質で、低酸素やエンドトキシン、炎症性サイトカイン等によって産生が促進されることが知られている。

これらの結果から VEGF が低酸素やエンドトキシン、サイトカイン等による刺激によって中耳で産生され、中耳粘膜の血管透過性を増強し、OME 形成に関係していることが示唆される。しかしヒトの OME における中耳貯留液中の VEGF の濃度そしてその意義に関する報告はない。

そこで今回我々は、小児 OME における中耳貯留液中の VEGF 濃度を測定し、その役割を検討する目的で本研究をおこなった。

【材料および方法】

滲出性中耳炎と診断され鼓膜切開を施行された 1 歳から 12 歳までの小児 33 人を対象とし、49 耳から得られた中耳貯留液を解析した。

中耳貯留液を採取直後の肉眼所見によって粘液性、漿液性に分類し、その重量を測定後、PBS で希釈・攪拌し、遠心分離のちその上清を採取し、測定まで -80°C で保存した。

そして、上清中の VEGF のほか、炎症や細菌感染の指標として IL-8、エンドトキシン、血管透過性の指標としてアルブミンの濃度を、それぞれ ELISA 法、Limulus Amebocyte Lysate test、免疫比濁法によって測定した。

さらに、中耳貯留液の性状別に VEGF、IL-8、エンドトキシン、アルブミン濃度を比較検討した。

【結果】

測定した中耳貯留液中の 61%が粘液性で 39%が漿液性であった。両群間で年齢、性別のばらつきはなかった。中耳貯留液中に VEGF とアルブミンは 100%検出され、エンドトキシンは 89%、IL-8 は 98%、検出された。粘液性貯留液中の VEGF、エンドトキシン、IL-8 濃度は漿液性に比して有意($p < 0.01$)に高値であった。

アルブミンは、有意差はなかった。

粘液性中耳貯留液中の VEGF とエンドトキシン ($R = 0.42$, $p < 0.05$)には正の相関が認められた。VEGF とアルブミンにはさらに強い正の相関 ($R = 0.81$, $p < 0.01$)がみられた。

【結論及び考察】

すべての中耳貯留液で VEGF が検出され、VEGF が小児滲出性中耳炎の病態に関与していることが示唆された。VEGF と同様にアルブミンもすべての中耳貯留液で検出され、粘液性中耳貯留液で VEGF とアルブミンには有意な正の相関がみられた。アルブミンは血清からの漏出で、中耳粘膜では産生されない。また VEGF は血清でも検出されるがその濃度は今回測定した中耳貯留液中の VEGF 濃度よりはるかに低い。これらのことから VEGF は中耳局所で産生され、粘液性中耳貯留液を有する OME 患者の中耳粘膜の血管透過性を亢進させることが示唆された。一方、漿液性中耳貯留液では、VEGF 濃度は粘液性中耳貯留液より有意に低く、VEGF とアルブミンの相関は見られなかった。ヒスタミンやプロスタグランジン、ロイコトリエン、血小板活性化因子などは血管透過性作用があり、中耳に存在することが証明されており、これらの VEGF 以外の因子が漿液性中耳貯留液形成に関与していることが推測された。

エンドトキシンと IL-8 はほとんどの中耳貯留液で検出されその濃度は漿液性のものより粘液性のもので有意に高値であった。これまで IL-8 が、ヒトの杯細胞の MAC5AC と MAC5B のムチン分泌を増強させることやエンドトキシんで誘導されたラットの OME モデルにおいて MAC5AC ムチンの遺伝子発現が亢進していることなどが報告されている。またインフルエンザ菌由来のエンドトキシンが NF κ B 活性を介して IL-8 産生を増強させることも報告されている。粘液性中耳貯留液中のエンドトキシンと IL-8 が有意に高値であったことは、これらのことと関係していると思われる。

粘液性中耳貯留液においてエンドトキシンと VEGF は有意な正の相関があった。漿液性のものでは相関はなく、IL-8 と VEGF、エンドトキシンと IL-8 はどのタイプの中耳貯留液でも相関はなかった。VEGF の産生に関しては、エンドトキシんで誘導されたラットの OME モデルで VEGF の強い発現が見られることやマクロファージではエンドトキシンが VEGF を直接的に産生することから、TRL4 を介した情報伝達経路がその産生機序の一つと考えられている。我々は以前、ヒトの鼻の線維芽細胞において、インフルエンザ菌由来のエンドトキシン刺激によって VEGF の時間依存的な産生が生じることを証明した。以上の所見から粘液性中耳貯留液の中耳粘膜における VEGF 産生は、エンドトキシンによって直接的に調節されていると推測される。

その他、VEGF 産生には低酸素や炎症性サイトカインも関与することが知られている。また、最近、低酸素因子が VEGF 産生を増強することが証明された。さらに OME の中耳貯留液の酸素分圧は外傷後の中耳貯留液より低値で、粘液性中耳貯留液を有するものは、漿液性のものよりさらに低値であったという報告がある。したがって、中耳換気障害による低酸素状態やエンドトキシンそして炎症性サイトカインなど様々な要因が相加的あるいは、相乗的に作用するために、粘液性中耳貯留液のほうが漿液性中耳貯留液よりも VEGF が高値になると推測される。

以上の結果から、小児滲出性中耳炎ではエンドトキシンや低酸素刺激により VEGF が産生され、これが粘液性中耳貯留液の形成に関係していると考えられた。

論 文 審 査 の 要 旨

報告番号	医論第 1478 号	氏名	積山 幸祐
審査委員	主査	河野 嘉文	
	副査	松山 隆美	井上 博雅

The role of vascular endothelial growth factor in pediatric otitis media with effusion
(小児滲出性中耳炎における血管内皮増殖因子(VEGF)の役割)

滲出性中耳炎(以下 OME)は小児の代表的な上気道感染症の一つであり、その遷延化に IL-8 等の炎症性サイトカインや endotoxin などが関与することが知られている。また、耳管機能障害によって生じるガス交換障害が中耳の低酸素状態を引き起こし、難治化を招くことも報告されている。しかし、OME の遷延化や難治化の機序については未だ十分に解明されていない。最近、endotoxin 注入で作成された OME 動物モデルで vascular endothelial growth factor(VEGF)の mRNA の発現と VEGF 蛋白の産生が発見された。また、VEGF をラットの中耳に注入すると中耳貯留液が産生されることが証明された。強力な血管透過性亢進作用を有する VEGF は低酸素や endotoxin、炎症性サイトカイン等によって産生が促進されることが知られており、中耳においても低酸素や endotoxin、サイトカイン等による刺激によって産生され、中耳粘膜の血管透過性を増強し、OME 形成に関係していることが示唆される。しかしヒトの OME における中耳貯留液中の VEGF の濃度そしてその意義に関する報告はない。そこで学位申請者らは、小児 OME における中耳貯留液中の VEGF 濃度を ELISA 法で測定し、IL-8 や endotoxin, albumin 濃度と比較検討を行った。

その結果、本研究では以下の知見が明らかにされた。

- 1) 測定した中耳貯留液中の 61%が mucoïd で 39%が serous であった。
- 2) 中耳貯留液中に VEGF と albumin は 100%検出され、endotoxin は 89%、IL-8 は 98%検出された。
- 3) 中耳貯留液中の VEGF 濃度は血清中のものより有意に高値であった。
- 4) mucoïd 貯留液中の VEGF、endotoxin、IL-8 濃度は serous に比して有意に高値であった。
- 5) mucoïd 中耳貯留液中の VEGF と endotoxin には正の相関が認められた。VEGF と albumin にはさらに強い正の相関がみられた。

すべての中耳貯留液で VEGF が検出され、その濃度は血清中より有意に高く、VEGF が中耳局所で産生され、小児 OME の病態に関与していることが示唆された。VEGF と同様に albumin もすべての中耳貯留液で検出され、mucoïd な中耳貯留液で VEGF と albumin には有意な正の相関がみられた。mucoïd な中耳貯留液を有する OME 患者の中耳粘膜の血管透過性を亢進させることが示唆された。mucoïd な中耳貯留液において endotoxin と VEGF は有意な正の相関があった。mucoïd な中耳貯留液における VEGF 産生は、endotoxin によって直接的に調節されていると推測された。以上より小児滲出性中耳炎では endotoxin や低酸素刺激により VEGF が中耳で産生され mucoïd な中耳貯留液の形成に関係していると考えられた。

本研究は、小児 OME における VEGF の発現とその役割を検討したものであり、その結果 VEGF は endotoxin や低酸素刺激により中耳局所で産生され、難治性の OME に多い mucoïd な中耳貯留液形成に関係していることを示した点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1478 号	氏名	積山 幸祐
審査委員	主査	河野 嘉文	
	副査	松山 隆美	井上 博雅

主査および副査の3名は、平成23年6月13日、学位請求者 積山 幸祐 君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

- 質問1) VEGF ファミリーのどのタイプを測定し、滲出性中耳炎にはどのタイプが一番関与しているのか。
 (回答) VEGF-A を測定し、他のタイプについては検討していない。VEGF-A 以外のタイプの滲出性中耳炎への関与は報告もなく不明であるが、その生理活性から VEGF-A の関与が最も大きいと考えられる。
- 質問2) 受容体はどのようなものがあって、どの細胞で発現しているか。
 (回答) 受容体としては VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 が知られている。ラットの滲出性中耳炎モデルでは、VEGFR-1, VEGFR-2 が中耳粘膜で発現していることが、報告されているがヒトでは不明である。ヒトでの研究が望まれるが、滲出性中耳炎患者とくに小児の中耳粘膜を採取することは、倫理的に許されないので、現時点では不可能である。
- 質問3) 中耳貯留液の分類で肉眼所見以外に何か、マーカーによる分類はないのか。
 (回答) これまでに滲出性中耳炎中耳貯留液の性状に関与すると思われる、たとえば糖タンパクなどのマーカーが検討されているが、肉眼的な分類との相関が無く、マーカーによる客観的な分類法はない。中耳炎の国際学会や過去の報告でも我々と同様の肉眼的な分類法が用いられている。
- 質問4) 中耳貯留液の白血球のカウントは実施したか。
 (回答) 過去に我々は中耳貯留液中の細胞成分を定量し、好中球優位のものリンパ球優位のもの、そしてこれら細胞成分が無いものと分類し、中耳貯留液中のサイトカイン濃度と比較した。その結果、好中球優位の中耳貯留液は比較的急性期のものであることを報告している。
 今回の研究でも遠心分離した沈渣をサイトスピンで処理しヘマトキシリン・エオジン染色後観察したが、検出された白血球はごく少数あり、今回の対象がすべて慢性期の滲出性中耳炎であったことによると思われる。
- 質問5) endotoxin をマーカーとしたのはなぜか。
 (回答) 急性中耳炎の検出菌は肺炎球菌とインフルエンザ菌が多いが、滲出性中耳炎に移行する症例ではインフルエンザ菌の関与が大きいことが知られている。また、過去の報告でも滲出性中耳炎の中耳貯留液から endotoxin が高率に検出されることが知られている。endotoxin を中耳腔内に投与すると実験的滲出性中耳炎モデルを作成することが可能であり、滲出性中耳炎における endotoxin の関与が大きいことから、本研究でも endotoxin をマーカーとして測定した。
- 質問6) 病悩期間と VEGF の関連性はあるか。
 (回答) 3カ月以上保存的な治療を行っても改善しなかった滲出性中耳炎症例のみを研究対象としていることから、すべて慢性的な状態にあると考えられる。病悩期間と VEGF との関連性は興味深い点であり、今後もう少し急性期の滲出性中耳炎や急性中耳炎で検討してみたい。
- 質問7) mucoid 型滲出性中耳炎の耳鏡所見の特徴は？鼓膜の色調で serous 型と鑑別ができるのか？
 (回答) mucoid 型滲出性中耳炎の鼓膜は、琥珀色や黒褐色を呈していることが多く、serous 型では黄褐色で気泡を認めることがあり、ある程度の鑑別は可能である。しかし、実際に採取された中耳貯留液は鼓膜所見と異なることは少なくない。
- 質問8) endotoxin 濃度が高いのはインフルエンザ菌由来であることを示すのか。
 (回答) 中耳炎の起炎菌のなかで endotoxin を産生するグラム陰性菌として、インフルエンザ菌のほかにモラ

クセラ・カタラーリスの関与も推測される。しかし、その検出頻度から考えて、インフルエンザ菌の影響が最も大きいと思われる。

質問 9) endotoxin の測定法は申請者が自ら行ったのか。

(回答) endotoxin を除去した PBS を使用し、申請者自身が注意深く定量した。

質問 10) mucoid 型の滲出性中耳炎動物モデルは確立されているのか。

(回答) マウスの耳管を結紮したうえで中耳骨法内にエンドトキシンを注入すると mucoid 型の滲出性中耳炎が発症したという報告がある。しかし、ヒトの mucoid 型の滲出性中耳炎とは全くその性状が異なる。

質問 11) 本研究成果を治療へ応用することは可能か。

(回答) 難治化や遷延化する滲出性中耳炎のほとんどが mucoid 型である。VEGF が mucoid 型の滲出性中耳炎に関係するのであれば、VEGF の産生や作用を制御することで mucoid 型の中耳貯留液の産生を抑制し、本症の遷延化を阻止できるかもしれない。

質問 12) 肺炎球菌は滲出性中耳炎を起こさないのか。

(回答) 肺炎球菌も頻度は少ないが滲出性中耳炎の中耳貯留液から検出される。したがって、滲出性中耳炎の発症に関与すると考えられるが、肺炎球菌ワクチンである PCV7 (プレベナー) が 10 年以上前から使用されている欧米において滲出性中耳炎の発生率は変わっていないことから肺炎球菌の関与は少ないかもしれない。

質問 13) 耐性菌の増加は滲出性中耳炎の発症に関与するのか。

(回答) 耐性菌によって急性中耳炎の治療成績が悪くなり、滲出性中耳炎の発症頻度が高くなることが推測される。しかし、耐性菌の検出率が非常に少ないスウェーデンと本邦の滲出性中耳炎の発生頻度はほとんど変わらないことから、耐性菌の滲出性中耳炎への関与は少ないと考えられる。

質問 14) 滲出性中耳炎の治療におけるチューブ留置の意義はなにか。

(回答) 鼓膜に留置されたチューブがドレーンとして働くのではなく、これが空気孔となって経耳管的な中耳貯留液の排泄や換気機能が改善される。

質問 15) 乳突蜂巣の含気化の程度は滲出性中耳炎の病態に関与するのか。

(回答) 成長とともに乳突蜂巣が発育し、含気化がよくなれば滲出性中耳炎や急性中耳炎が起こりにくくなることが知られている。また、乳突蜂巣の含気化が不良な症例は中耳炎を起こしやすいことが報告されている。

質問 16) VEGF の産生を抑制する遺伝子は 21 番染色体にあるといわれていることから、VEGF が滲出性中耳炎の発症に関与するのであれば、Down 症の小児は滲出性中耳炎になりにくいと思われるが、そのような傾向が実際にあるのか

(回答) 今回の症例には Down 症の症例は含まれていない。Down 症を基礎疾患とする滲出性中耳炎症例をみることは少ないが、両者の関連性については非常に興味深い指摘であり、今後注意深く見ていきたい。

質問 17) VEGF による血管新生に有効なことが知られているポリミキシン B や Cox2 inhibitor (セレコックス) が滲出性中耳炎の治療で使用されることはないのか。

(回答) 滲出性中耳炎の治療としてこれらの薬剤が使用されることはない。滲出性中耳炎では血管新生の所見をみることはほとんどなく、本症ではおもに VEGF の血管透過性作用が関与していると考えられる。

質問 18) VEGF の血管新生作用と血管透過性作用の差異はどこからきていると考えるか。

(回答) おそらく receptor の違いと思われるが、これについても今後検討してみたい。

質問 19) endotoxin と IL-8 の値が相関しなかったのはなぜか。

(回答) 我々がかつて行った研究では、両者の有意な相関が認められている。また、インフルエンザ菌由来の endotoxin が IL-8 産生を増強させることも知られている。したがって、今回の研究で有意な相関が得られなかったのは、検体数が少なかったためと思われる。

質問 20) 急性中耳炎では滲出性中耳炎よりも多くの VEGF が産生されると考えられるか。

(回答) VEGF が白血球やマクロファージから産生されることから、これらの炎症細胞の浸潤が多い急性中耳炎ではより多くの VEGF が産生されると推測される。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。