

表	題	好酸球性中耳炎における難聴進行の機序の解明
副	題	Classification and Treatment strategy of Eosinophilic otitis media according to the progress of middle ear mucosa patholog

論 文 の 区 分	博士課程
-----------	------

著 者 名	江洲 欣彦
-------	-------

担当指導教員氏名	吉田尚弘 教授
----------	---------

所 属	自治医科大学大学院医学研究科 地域医療学系 専攻 総合医学 分野 外科系総合医学
-----	---

2018 年 1 月 10 日申請の学位論文

目次

略語一覧	4
------	---

第 1 章 はじめに	5
------------	---

第 2 章 粘膜肥厚と難聴の関係

A 粘膜肥厚 Grade と聴力の関係	8
---------------------	---

2-1. 目的

2-2. 研究デザイン

2-3. 対象と方法

2-4. 結果

2-5. 考察

B 粘膜肥厚と骨導閾値	10
-------------	----

2-6. 目的

2-7. 研究デザイン

2-8. 対象と方法

2-9. 結果

2-10. 考察

C 感染と難聴	12
---------	----

2-11. 目的

2-12. 研究デザイン

2-13. 対象と方法

2-14. 結果

2-15. 考察

D 粘膜肥厚と鼓膜穿孔	16
-------------	----

2-16. 目的

2-17. 研究デザイン

2-18. 対象と方法

2-19. 結果

2-20. 考察

第 3 章 粘膜肥厚とバイオマーカー

A 好酸球性中耳炎患者の血液学的評価・・・・・・・・・・ 19

3-1. 目的

3-2. 研究デザイン

3-3. 対象と方法

3-4. 結果

3-5. 考察

B 中耳肥厚粘膜の免疫学的評価・・・・・・・・・・ 22

3-6. 目的

3-7. 研究デザイン

3-8. 対象と方法

3-9. 結果

3-10. 考察

C 中耳粘膜における Periostin の発現分布・・・・・・・・・・ 24

3-11. 目的

3-12. 研究デザイン

3-13. 対象と方法

3-14. 結果

3-15. 考察

第 4 章 好酸球性中耳炎に対する治療

A 鼓膜形成術・・・・・・・・・・ 30

4-1. 目的

4-2. 研究デザイン

4-3. 対象と方法

4-4. 結果

4-5. 考察

B 経外耳道的肉芽除去術・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 31

4-6. 目的

4-7. 研究デザイン

4-8. 対象と方法

4-9. 結果

4-10. 考察

第 5 章 今後の展望・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 35

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 36

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 37

略語一覽

G1 : Grade 1

G2 : Grade 2

G3 : Grade 3

ANOVA : One way analysis of variance (一元分散分析)

MRSA : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Eos : Eosinophil granulocyte

ECP : Eosinophilic cationic protein

IgE : Immunoglobulin E

IL : Interleukin

LPS : Lipopolysaccharide

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

RANTES : Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule-1

TGF- β : Transforming growth factor- β

IFN : Interferon

第 1 章 はじめに

近年、アレルギー疾患や好酸球に関わる疾患が多臓器に渡り指摘されている。成人発症の気管支喘息に伴う難治性の中耳炎において好酸球浸潤が指摘され 1994 年に好酸球性中耳炎の概念が提唱された(1)。2004 年に日本耳科学会により全国疫学調査が行われ(2)、2011 年に飯野らにより診断基準が示された(表 1)(3)。今日では、好酸球性中耳炎は気管支喘息や好酸球性副鼻腔炎などの好酸球性気道炎症に合併する難治性中耳炎として知られるようになった。日常診療において経験する疾患であるが、その病態及び難聴進行の程度は様々で治療に難渋することは少なくない。

(表 1) 好酸球性中耳炎診断基準

大項目

- ・ 好酸球優位な中耳貯留液が存在する滲出液中耳炎／慢性中耳炎

小項目

- ・ 1) 膠状の中耳貯留液
- ・ 2) 中耳炎に対する従来の治療に抵抗
- ・ 3) 気管支喘息の合併
- ・ 4) 鼻茸の合併

確実例：大項目＋小項目 2 つ以上

除外例：好酸球性多発血管炎性肉芽腫症・好酸球性増多症

(EOM study group. ANL, 2011, 38: 456-61) (3)

好酸球性中耳炎の臨床病態は単一の原因ではなく複数の要因により進行すると考えられる。耳漏や治療中に生じた鼓膜穿孔から細菌や真菌感染を伴い難聴が進行する例や好酸球性炎症のコントロールが困難で細胞障害性顆粒蛋白による炎症が増悪する例などが存在すると報告されているが十分な検討がなされていない。

好酸球性中耳炎における難聴進行のリスク因子やメカニズムは複雑であり、中耳炎及び難聴進行に関わる分子カスケードの詳細は未解明な部分が多い。好酸球性中耳炎は好酸球を含む膠状の耳漏を認める。主たる治療は副腎皮質ステロイドの鼓室内投与であるが、鼓膜穿孔の残存や難聴改善が乏しく治療に抵抗

する症例も存在する。好酸球性中耳炎は慢性中耳炎と比較し難聴進行例において以下のような特徴がある。

- 1) 外耳道にまで進展する中耳粘膜肥厚を来す
- 2) 感音難聴が進行する

本研究では好酸球性中耳炎症例の中耳粘膜肥厚に着目し好酸球性中耳炎の重症度の Grade 分類を提唱し(図 1)、粘膜肥厚と聴力経過や病態進行の関連を解析した。本研究は自治医科大学附属さいたま医療センターにて、臨床研究『好酸球性中耳炎における難聴進行機序の解明』に基づいて行った(臨床研究 第 14-94 号)。対象として中耳貯留液の病理学的検査及び合併症、血液検査における好酸球(%)の上昇、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症(MPO-ANCA 陽性)などを除外し、表 1 を満たす好酸球性中耳炎と診断された症例を解析し、また、この重症度分類 Grade に応じた好酸球性中耳炎の治療法を検討した。

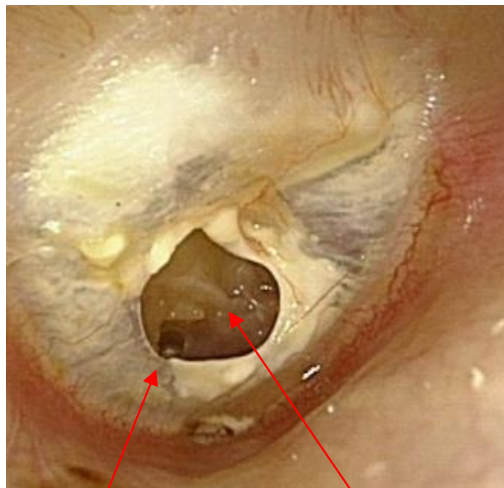
(図1) <粘膜肥厚による重症度 Grade 分類>

Grade1 (G1) : 中耳粘膜の肥厚が殆どみられない

Grade2 (G2) : 中耳粘膜がみられるが中鼓室内に局限している

Grade3 (G3) : 中耳粘膜が鼓膜を越え外耳道側へ進展している

Grade1

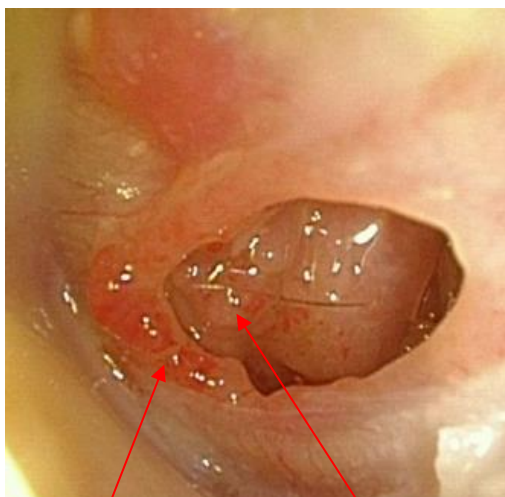


鼓膜穿孔 正常中耳粘膜肥厚



鼓膜から透見される膠状耳漏

Grade2



鼓膜穿孔 肥厚中耳粘膜肥厚

Grade3



耳漏 外耳道に進展する中耳粘膜肥厚

2 章 粘膜肥厚と難聴の関係

A 粘膜肥厚 Grade と聴力の関係

2-1. 目的

好酸球性中耳炎は進行すると、中耳粘膜が肥厚し基底膜下に好酸球をはじめとする炎症細胞浸潤や杯細胞の過形成、基底膜下組織の線維化を認めるようになる。好酸球性中耳炎に特徴的な粘膜肥厚と聴力について解析した。

2-2. 研究デザイン プロスペクティブなコホート研究

2-3. 対象と方法

対象 好酸球性中耳炎と診断された 68 例 136 耳(女性 38 人, 男性 30 人 平均年齢 56.1 32-80 歳) G1 96 例, G2 22 例, G3 18 例

方法 聴力を各粘膜肥厚 Grade 別に評価し、平均聴力の推移を比較した。

気導聴力及び骨導聴力のいずれにおいても会話領域 3 分法(500, 1000, 2000 Hz)を用いた。観察期間は平均 21.6 か月(8-27 か月)、全症例に対して、トリアムシノロンアセトニド(ケナコルト-A®)の鼓室内投与を施行し、外来にて観察を行った。治療中、内耳障害が懸念された際は副腎皮質ステロイド、中耳感染を認めた際には抗菌薬の全身投与を施行した。

リスク因子：感染、副鼻腔根本術(ESS)の既往、コントロール不良な気管支喘息($FEV_{1.0\%} < 70\%$)の合併、コントロール不良の糖尿病の合併($Hb A1c > 6.5\%$)、喘息治療のために継続的内服副腎皮質ステロイド使用の 5 因子について、粘膜肥厚の進行(G3)との関連を検討した。

2-4. 結果

図 2 に粘膜肥厚 Grade 別の聴力を示した。粘膜肥厚が進行($G1 \rightarrow G2 \rightarrow G3$)するにつれて、気導及び骨導聴力いずれの閾値上昇を認めた。会話領域三分法(500, 1000, 2000 Hz)における気導平均聴力±標準偏差はそれぞれ G1, G2, G3 で 31.4 ± 17.3 dB, 41.6 ± 22.4 dB, 70.5 ± 28.4 dB であり、G3 は G1 および G2 と比較し一元配置分散分析の結果有意に高値を認めた ($p < 0.001$, $p < 0.001$)。骨導聴力についても同様に (500, 1000, 2000 Hz)骨導平均聴力±標準偏差はそれぞれ G1, G2, G3 で 15.8 ± 14.6 dB, 26.2 ± 20.3 dB, 50.9 ± 29.7 dB であり、G3 は G1 および G2 と比較し一元配置分散分析の結果有意に高値を認め

た (G2 - G1, $p=0.043$, G3 - G1, $p<0.001$, G3 - G2, $p<0.001$)。

(図 2) 粘膜肥厚と聴力の関係

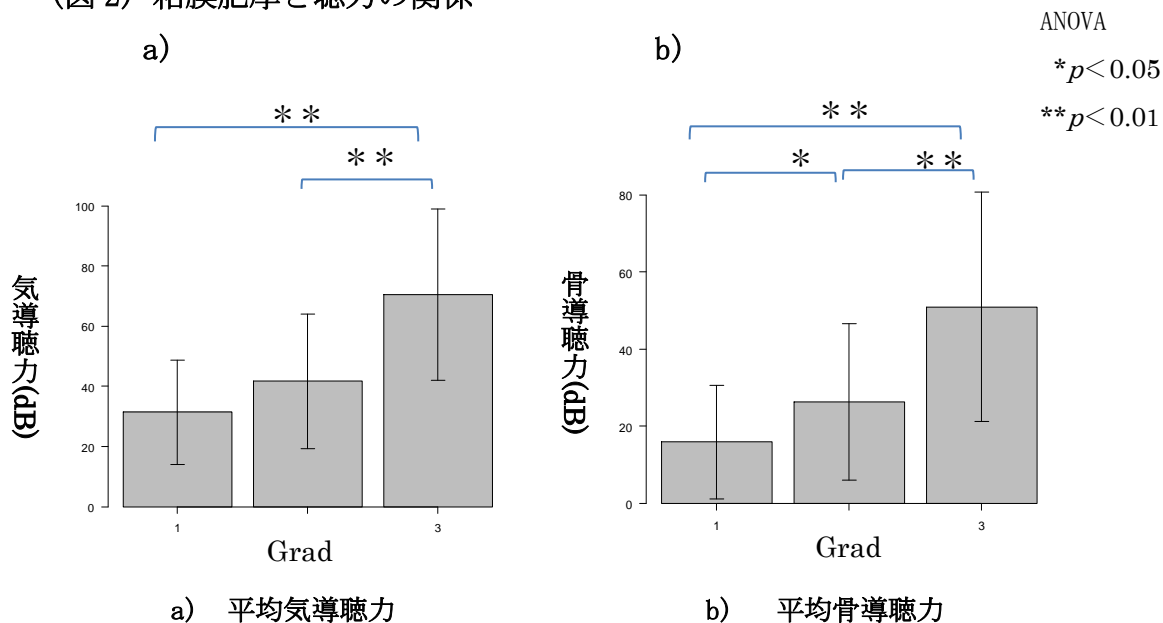


図 3 に各群における聴力経過を示した。気導聴力は G1 において 31.4 から 29.0 dB と改善を認めたが、G2 では 41.6 から 47.2 dB、G3 では 70.5 から 79.1 dB と悪化し、反復分散分析の結果有意に群間差を認めた ($p=0.0076$)。骨導聴力は観察期間中にいずれの群においても閾値に変化を認めなかった ($p=0.45$)。

(図 3) 各粘膜肥厚 Grade における聴力経過

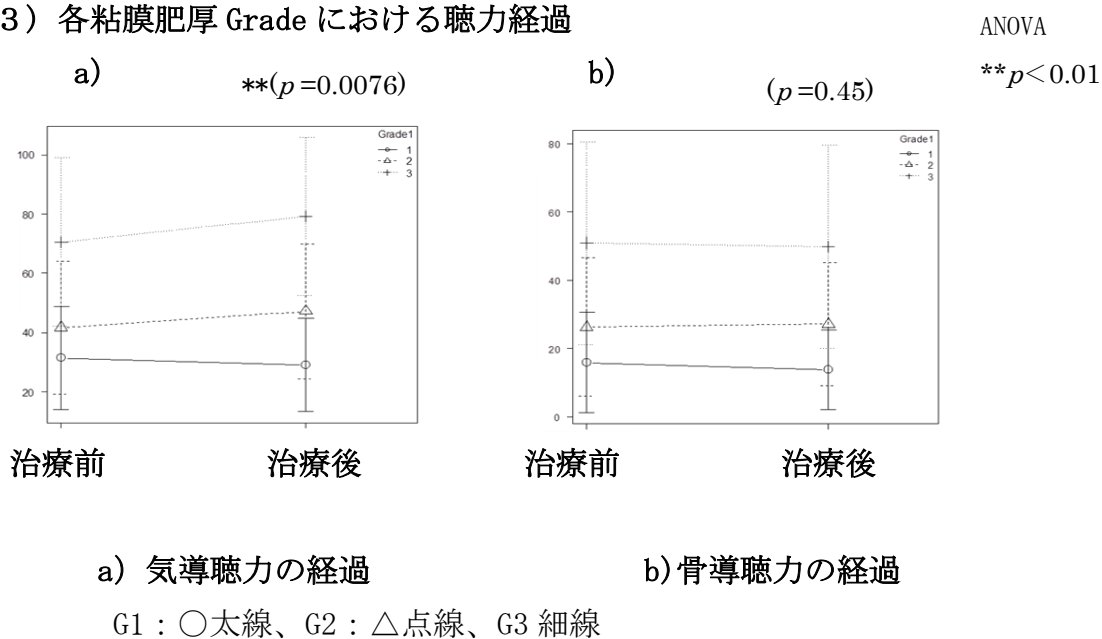


表2に中耳粘膜肥厚のリスク因子の解析結果を示した。Grade3の好酸球性中耳炎において、感染及びコントロール不良の糖尿病の合併(HbA1c>6.5%)がロジスティック回帰分析の結果 odds 比 4.55 倍、3.95 倍を示し、高度な粘膜肥厚のリスク因子と考えられた。

(表2) リスク因子

ロジスティック回帰分析 * $p < 0.05$

	Odds 比	<i>p</i> 値	95%信頼区間
感染	4.55	0.017 *	1.31-15.8
ESS の既往	0.0595	1.05	0.289-0.0796
HbA1c >6.5%	3.95	0.039 *	1.07-14.6
FEV _{1.0%} <70%	3.8	0.119	0.709-20.4
副腎皮質ステロイドの内服	1.63	0.427	0.489-5.41

2-5. 考察

中耳の粘膜肥厚の進行は気導及び骨導聴力の閾値上昇と相関があることが示唆された。気導聴力は G1 では治療により改善傾向を示したが G2 及び G3 では気導聴力の閾値上昇を認めた。治療継続中に有意な骨導閾値上昇は認めなかったが、G3 の高度に進行した粘膜肥厚のリスク因子として、中耳の感染が関連していることが明らかとなった。コントロール不良の糖尿病の合併は感染制御に関連していると考えられる。

B 粘膜肥厚と骨導閾値

2-6. 目的

2000 年から 2004 年に国内の多施設調査において、好酸球性中耳炎症例の 47% に骨導聴力の悪化が認められ、聾に至った症例が 6% と報告された(2)。感音難聴の罹患側は、聾に関わらず、両側罹患が約 2/3 を占めており難聴による生活障害は著しく QOL を低下させる。このような骨導閾値上昇をきたした症例を解析するため、好酸球性中耳炎に特徴的な粘膜肥厚と骨導の推移について検討した。

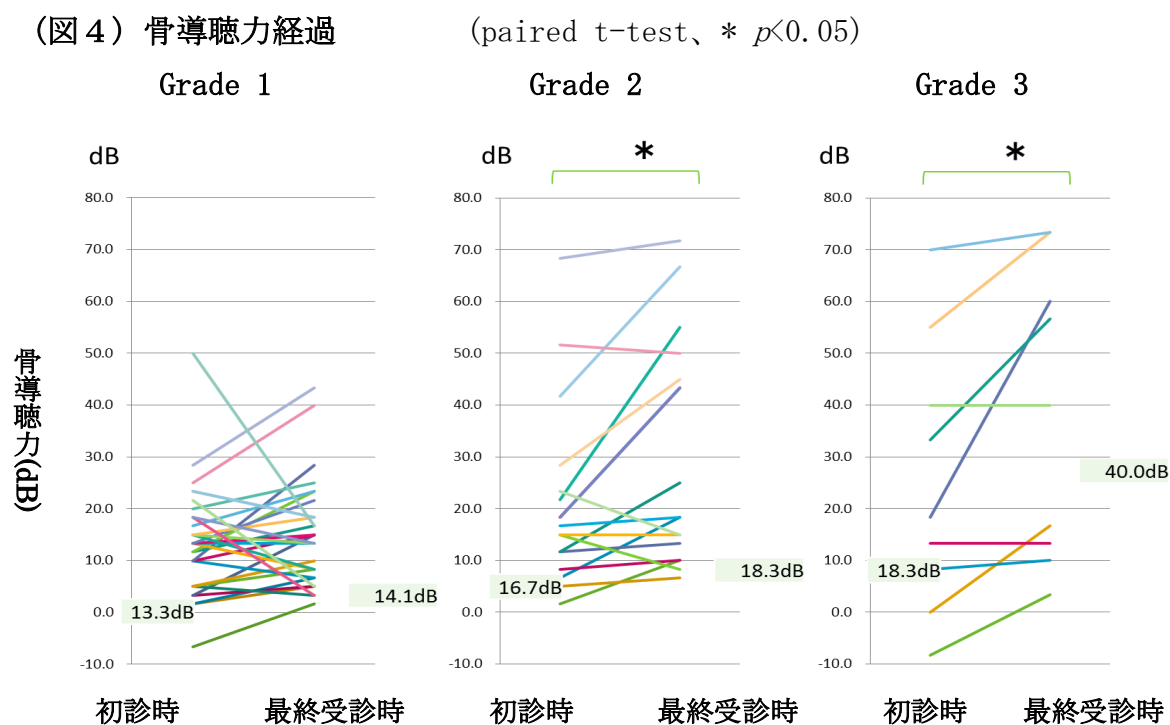
2-7. 研究デザイン 症例対象研究

2-8. 対象と方法

5年以上経過を観察した28例56耳を対象に骨導聴力変化と中耳粘膜肥厚(Grade1~3)との相関を調べた。観察期間中に15dB以上の骨導閾値上昇を認めた群を骨導閾値上昇群として骨導維持群と比較した。

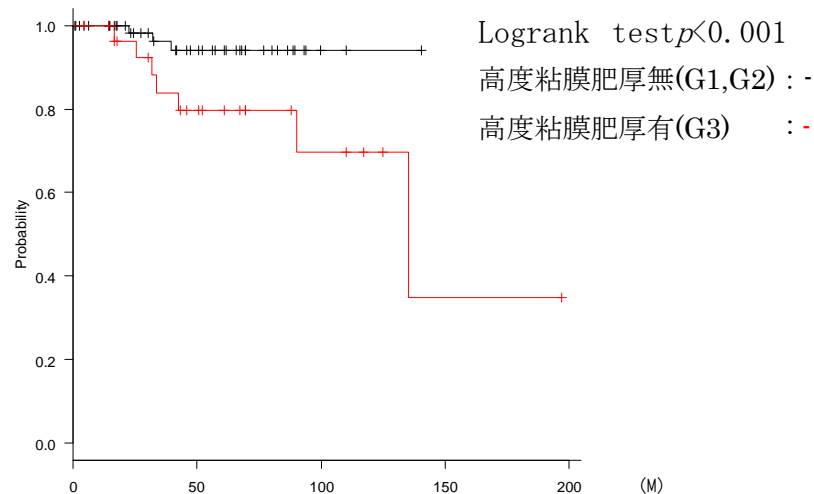
2-9. 結果

56耳中12耳(21.4%)に骨導閾値上昇(15dB以上)を認めた。図4に粘膜肥厚Gradeにおける骨導の推移を図示した。G1では聴力が維持されるものの、粘膜肥厚を有するG2およびG3では骨導の閾値上昇を認めていた



また、感音難聴を骨導聴力3分法40dB以上及びspeech80%未満と定義して生存回帰曲線にて粘膜肥厚と感音難聴進行について解析した。logrank検定を行った結果を図5に示した。高度粘膜肥厚(G3)症例は有意に感音難聴をきたすことが示された($p<0.001$)。

(図 5) 高度粘膜肥厚症例と感音難聴



2-10. 考察

好酸球性中耳炎には治療抵抗性の骨導閾値上昇例が存在する(5)。粘膜肥厚を有した群では長期経過において骨導閾値上昇を認め、骨導閾値上昇と粘膜肥厚は関連があることが示された。G3 症例など高度に粘膜肥厚を有した群はそれ以外と比較し有意に感音難聴が進行しており粘膜肥厚は不可逆的感音難聴のリスクと考えられる。粘膜肥厚も形成する因子が好酸球性炎症の病勢などの内的因子なのか、それとも感染などの外的因子なのか明らかにする必要があると考えた。

C 感染と難聴

2-11. 目的

好酸球性中耳炎は膠状の好酸球を有する中耳貯留液を認める。しかし、感染を生ずると中耳貯留液の性状が変化する。観察期間中に鼓膜穿孔があり耳漏を認めた症例における起炎菌について検討した。

2-12. 研究デザイン 後ろ向きコホート研究

2-13. 対象と方法

対象 好酸球性中耳炎症例 104 耳において、耳漏培養の結果をもとに中耳感染における起炎菌を検討した。観察期間は平均 21.6 か月(8-27 か月)であった。

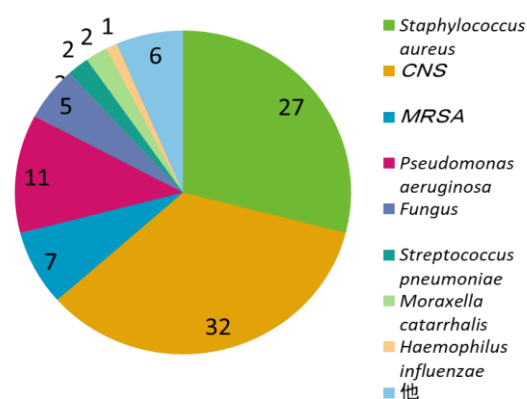
方法 耳道より無菌スワブ (Copan Diagnostics, Corona, CA) を用い耳漏を採取した。採取された耳漏はトリプトンソイ 5 % ヒツジ血液寒天培地、チョコレート II 培地、デオキシコール酸塩-硫化水素-ラクトース (DHL) 培地、卵黄加マンニット食塩培地 (MSEY)、MRSA-CI 培地 (Kyokuto Pharmaceutical Industrial, Tokyo, Japan) は 35° C にて 48 時間、サブロー寒天培地は常温で 2 週間培養した。トリプトンソイ 5 % ヒツジ血液寒天培地、チョコレート II 培地は 5.6% 二酸化炭素下にて培養された。

また、感音難聴を骨導聴力 3 分法 40dB 以上及び speech80% 未満と定義して COX ハザード解析を用い難聴のリスクとなる菌種及び、生存回帰曲線を用い感染の有無と感音難聴について解析した。

2-14. 結果

104 耳中 62 耳において培養が陽性であった。図 6 に検出した菌種を示した。黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、コアグララーゼ 陰性ブドウ球菌 (*Coagulase-negative staphylococci*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、MRSA、真菌 (*Fungus*) の順に多く検出された。

(図 6) 中耳感染の起炎菌



観察期間中、感音難聴を来した症例を 11 耳認めた。検出された菌種のうち 5 耳以上の感染を認めた病原体である黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、コアグララーゼ 陰性ブドウ球菌 (*Coagulase -negative staphylococci*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、MRSA、真菌 (*Fungus*) について COX ハザード解析を

行った結果を表 2 に示した。緑膿菌に感染した症例はハザード比 8.39 にて有意に感音難聴をきたしていることが分かった。

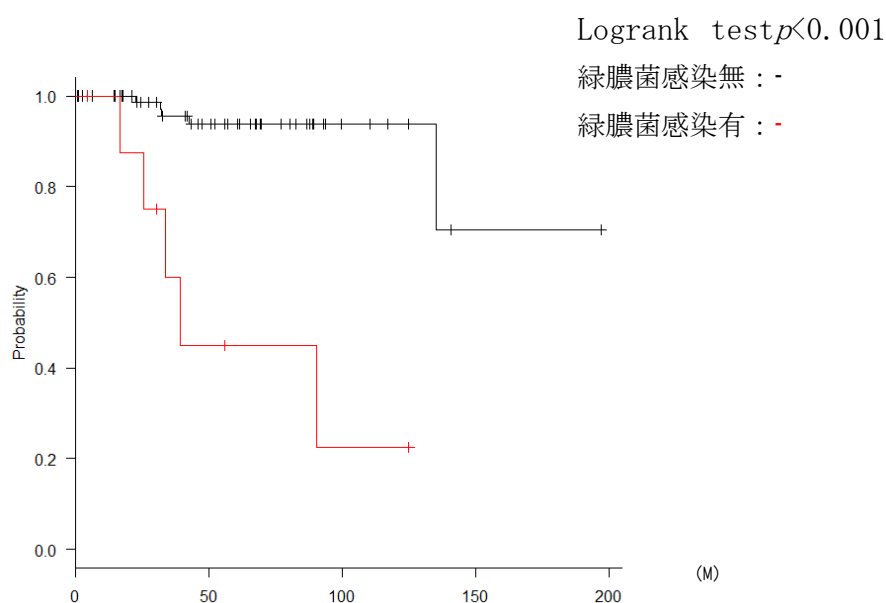
(表 3) 起炎菌別のハザード比

Cox 比例ハザード回帰分析 * $p<0.01$

起炎菌	ハザード比	95%信頼 区間下限	95%信頼 区間上限	p -value
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.39	1.931	36.450	0.004537**
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.63	0.857	15.380	0.079910
MRSA	0.40	0.030	5.356	0.491700
<i>Coagulase-negative staphylococci</i>	1.28	0.266	6.240	0.752400
<i>Fungus</i>	3.85	0.475	0.475	0.47590

さらに、緑膿菌感染の有無の 2 群間にて検定を行った結果を図 7 に示した、緑膿菌感染症例は有意 ($p<0.001$) に感音難聴をきたしており、緑膿菌感染は感音難聴発生のリスク因子と考えられる。

(図 7) 緑膿菌感染と感音難聴

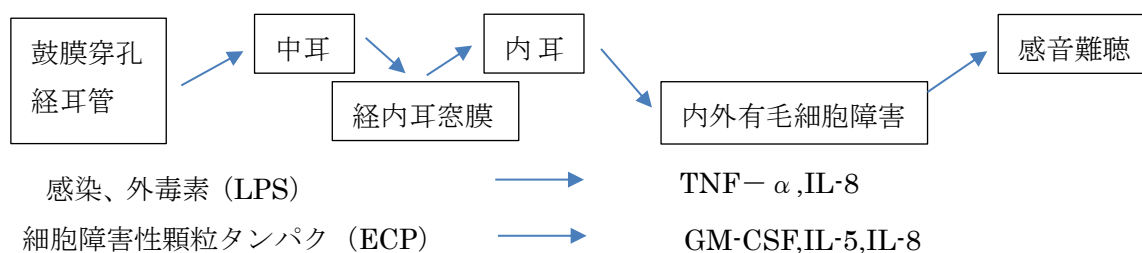


2-15. 考察

病原体の感染による好中球性炎症は IL-8 などのサイトカインを介して好酸球性炎症を活性化することは報告されている (4)。惹起された炎症は細胞障害性を有し経内耳窓的に蝸牛の有毛細胞に障害を誘導していると考えられる。本検討にて感染の多かった菌種は CNS, *Staphylococcus aureus* の感染であった。また、真菌を 5 耳に認めた。過去の報告でも *Staphylococcus aureus* や真菌は中耳貯留液中からその特異的 IgE 抗体が検出されており、難聴との因果関係が指摘されている (5)。しかし、本検討では好酸球性中耳炎において不可逆的感音難聴のリスク因子として、緑膿菌がハザード比 8.39 倍であり最も注意に必要な菌であると示された。緑膿菌はグラム陰性桿菌であり、他の菌種と比較し細胞毒性の高い LPS を有している。LPS による炎症が遷延すると TNF- α , IL-8 を誘導される。LPS は動物実験からも蝸牛の有毛細胞のアポトーシスを誘導することが知られている (6)。好酸球性中耳炎において、緑膿菌感染は内耳の細胞に障害を与え、感音難聴を引き起こすと考えられる。

本検討から、高度な粘膜肥厚 (G3) 及び緑膿菌感染の両因子が骨導閾値上昇 (内耳障害) のリスクであることが示された。図 8 に感音難聴の発生の仮説を示した。中耳粘膜の線維化が進行しリモデリングが生じると粘膜肥厚が進展する。粘膜肥厚が進行すると内耳窓膜への炎症を波及させ経内耳窓膜経由に炎症が内耳に進展すると考えられる。このような症例において感音難聴が生じていると考えた。しかし、好酸球性中耳炎の臨床経過は単一の原因ではなく時間軸を持った複数の要因により影響を受ける。前述の感染などの外毒素のみならず、好酸球性の細胞障害性顆粒蛋白の双方がサイトカイン活性をもたらすと考えられる。中耳炎及び難聴進行に関わる分子カスケードの詳細は未解明な部分が多い。感音難聴は両側例が多い (2) ことから、G1 のような軽症例と G3 のような中耳粘膜が進行し、感音難聴 (内耳有毛細胞障害) が生じている例では全身および局所における好酸球性炎症反応の病態が異なる可能性があると考えられる。

(図 8) 感音難聴の発生：有毛細胞の障害機序 (6) 参考

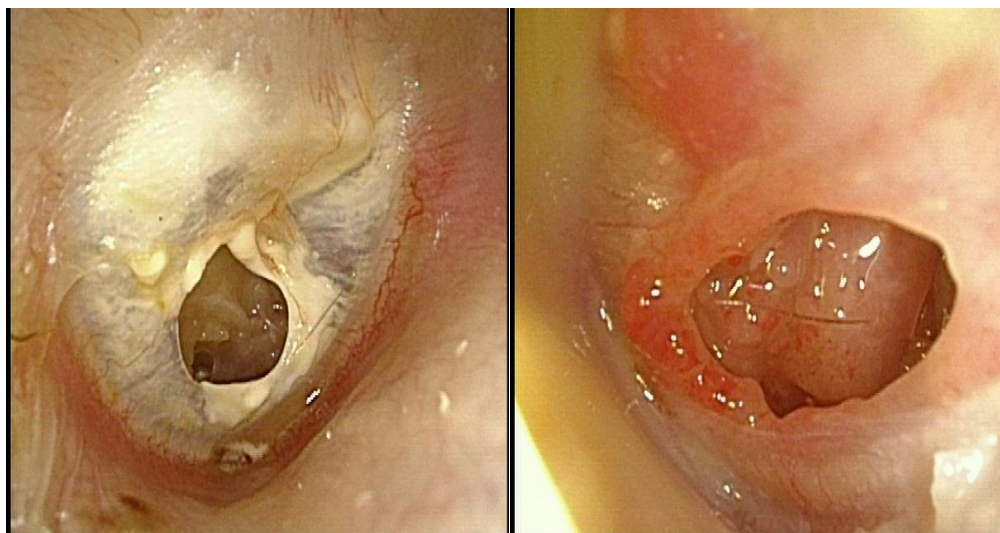


D 粘膜肥厚と鼓膜穿孔

2-16. 目的

好酸球性中耳炎は治療経過において鼓膜穿孔を認めることがある。これらの穿孔は膠状の耳漏産生に伴う中耳圧の上昇および細菌感染、または、反復される経鼓膜的薬剤投与により残存することが多いと考えられてきた。一方、慎重に好酸球性中耳炎の臨床経過を観察すると、粘膜肥厚を認める症例では中耳粘膜の変化のみならず鼓膜の器質的変化が生じている例が存在することに気が付いた。図 9 に粘膜肥厚を有さない鼓膜穿孔症例と G2 の粘膜肥厚を有する鼓膜穿孔症例の鼓膜写真を提示した。粘膜肥厚と鼓膜穿孔の関連について解析した。

(図 9) 粘膜肥厚の有無と鼓膜穿孔



G1 症例 鼓膜穿孔を認める

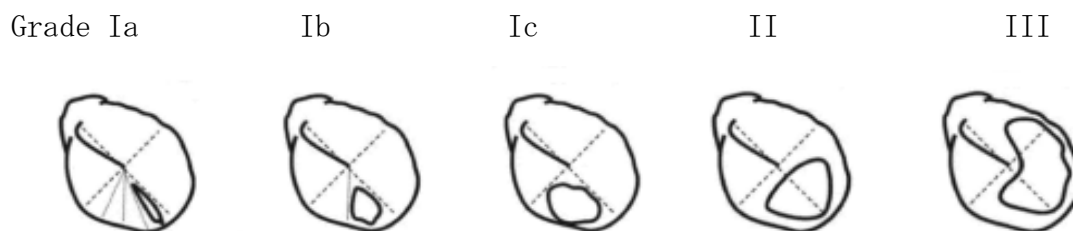
G2 症例 鼓膜発赤、穿孔縁に肉芽を認める

2-17. 研究デザイン 横断研究

2-18. 対象と方法

好酸球性中耳炎の診断にて 1 年以上継続してトリアムシノロンアセトニドの鼓室内投与治療が行われ、鼓膜の詳細な観察が行われた 100 例を対象とした。平均観察期間は 62 カ月、平均年齢 53.1 歳 (36 歳～79 歳) に対して穿孔の大きさを吉川の分類 (図 10) を用い検討した。また、粘膜肥厚 Grade 別の穿孔の大きさと鼓膜穿孔残存率について検討した。

(図 10) 鼓膜穿孔の大きさの分類(吉川の分類) (7)

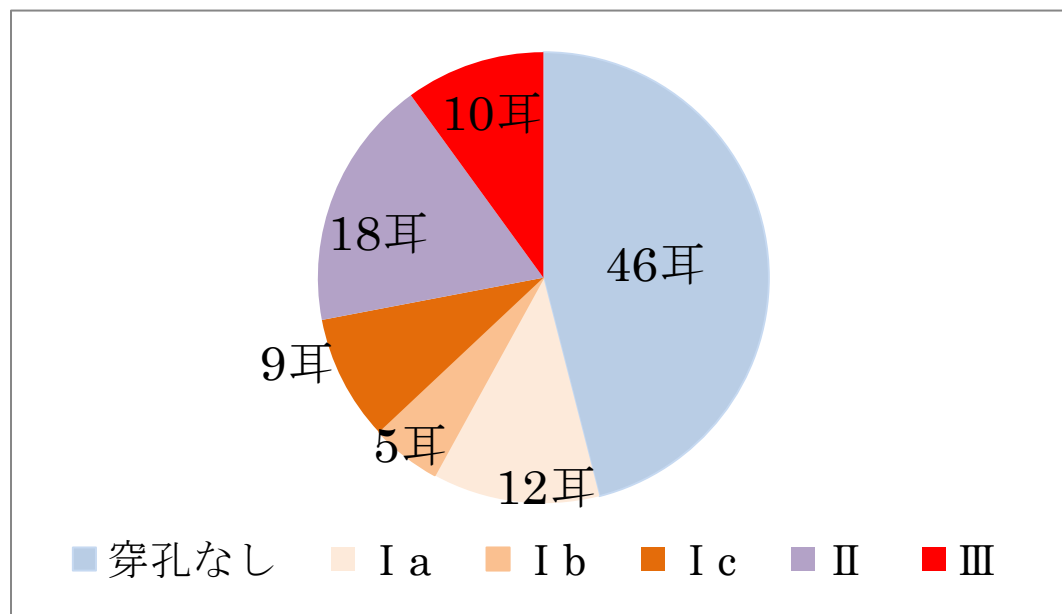


1/4 象限以内の大きさの穿孔を Grade Ia, 1/4 以上 1/2 象限以内のものを Grade Ib, 1/2 以上 1 象限以内のものを Grade Ic, 2 象限にわたるものを Grade II, 3 象限にわたるものを Grade III, 4 象限にわたるものを Grade IV とした。

2-19. 結果

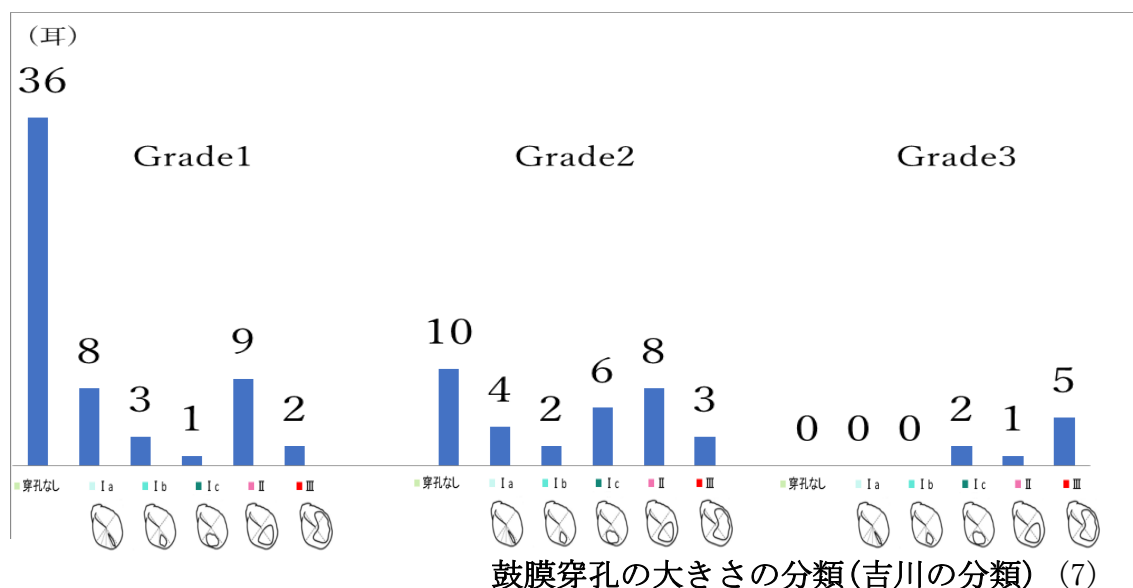
鼓膜穿孔を認めたのは 100 耳 54 耳(54%)で Grade II(一象限を超える穿孔)以上の穿孔を認めた症例は 28 耳(28%)であった(図 9)。

(図 11) 鼓膜穿孔の大きさ



次に、図 12 に粘膜肥厚 Grade 別の残存鼓膜穿孔の大きさを表す。鼓膜穿孔率は G1 では 20/56 耳(37.7%)、G2 は 23/33 耳(69.7%)、G3 は 8/8 耳(100%)であった。穿孔の大きい症例は G2、G3 に多く、Grade II、Grade III(一象限を超える穿孔)の穿孔を認めた症例は G1 で 11/59(18.6%)、G2 で 11/33(33.3%)、G3 では 6/8(75%)であった。

(図 12) 粘膜肥厚 Grade 別の鼓膜穿孔の大きさ



2-20. 考察

好酸球性中耳炎治療中の約半数に鼓膜穿孔を認め、中耳の粘膜肥厚 Grade が進行した症例では穿孔残存率が高かった。また、中耳の粘膜肥厚 Grade が進行した症例では穿孔が大きい傾向にあった。Grade が G2 以上に進行した症例では穿孔残存率が高くなり、穿孔も大きくなる傾向は粘膜肥厚の病態に関わる好酸球性炎症が鼓膜にも影響を与えている可能性を示唆する。

穿孔残存率の上昇が感染によるものか明らかでない。しかし、中耳粘膜に肥厚を有した症例は鼓膜にも炎症波及し鼓膜の閉鎖起点になんらかの影響をきたしていると考えられる。その結果、穿孔が残存し中耳感染のリスクとなっていると考えられる。好酸球性中耳炎において、感染予防は難聴の進行を予防するために不可欠であり、鼓膜穿孔の残存は無視できない問題と考えられる。

第 3 章 粘膜肥厚とバイオマーカー

A 好酸球性中耳炎の全身バイオマーカー

3-1. 目的

好酸球性中耳炎は気管支喘息に合併する難治性中耳炎である。慢性炎症が継続し、気管支喘息や好酸球性副鼻腔炎など他の好酸球性気道炎症と同様に増悪と寛解を繰り返す。近年、好酸球性気道炎症を評価する上で様々な好酸球性気道炎症バイオマーカーが指摘されている。気管支喘息ではバイオマーカーに着目しフェノタイプ分類を行うことで、個別化医療へのアプローチが進められている。好酸球性気道炎症を反映する全身のマーカーとして血中の好酸球、また血清 ECP、IgE などが報告されており、好酸球性中耳炎患者においても議論された (8,9)。Periostin は気管支喘息患者において、ゲノム解析によって最も発現が認められたタンパクである (10)。また、気管支喘息患者の肺の組織のリモデリングを反映することからも注目されたバイオマーカーである (11)。中耳においても肥厚粘膜ではリモデリングが指摘されており、各好酸球性気道炎症のマーカーと好酸球性中耳炎の粘膜肥厚重症度との相関を解析した。

3-2. 研究デザイン 横断研究

3-3. 対象と方法

好酸球性中耳炎と診断した 124 例中両側病変を有し、外来にて 1 ヶ月～3 ヶ月毎で副腎皮質ステロイド鼓室内投与継続を一年以上行った患者 (観察期間：12 ヶ月～14 年 10 ヶ月 平均 59.2 ヶ月) 男性 17 人、女性 33 人を対象とした。その内、喘息にて副腎皮質ステロイドの全身投与が行われていたのは 19 人含んでいた。対照として、慢性中耳炎において手術加療を行った男性 7 人、女性 3 人の計 10 の検体を採取した。

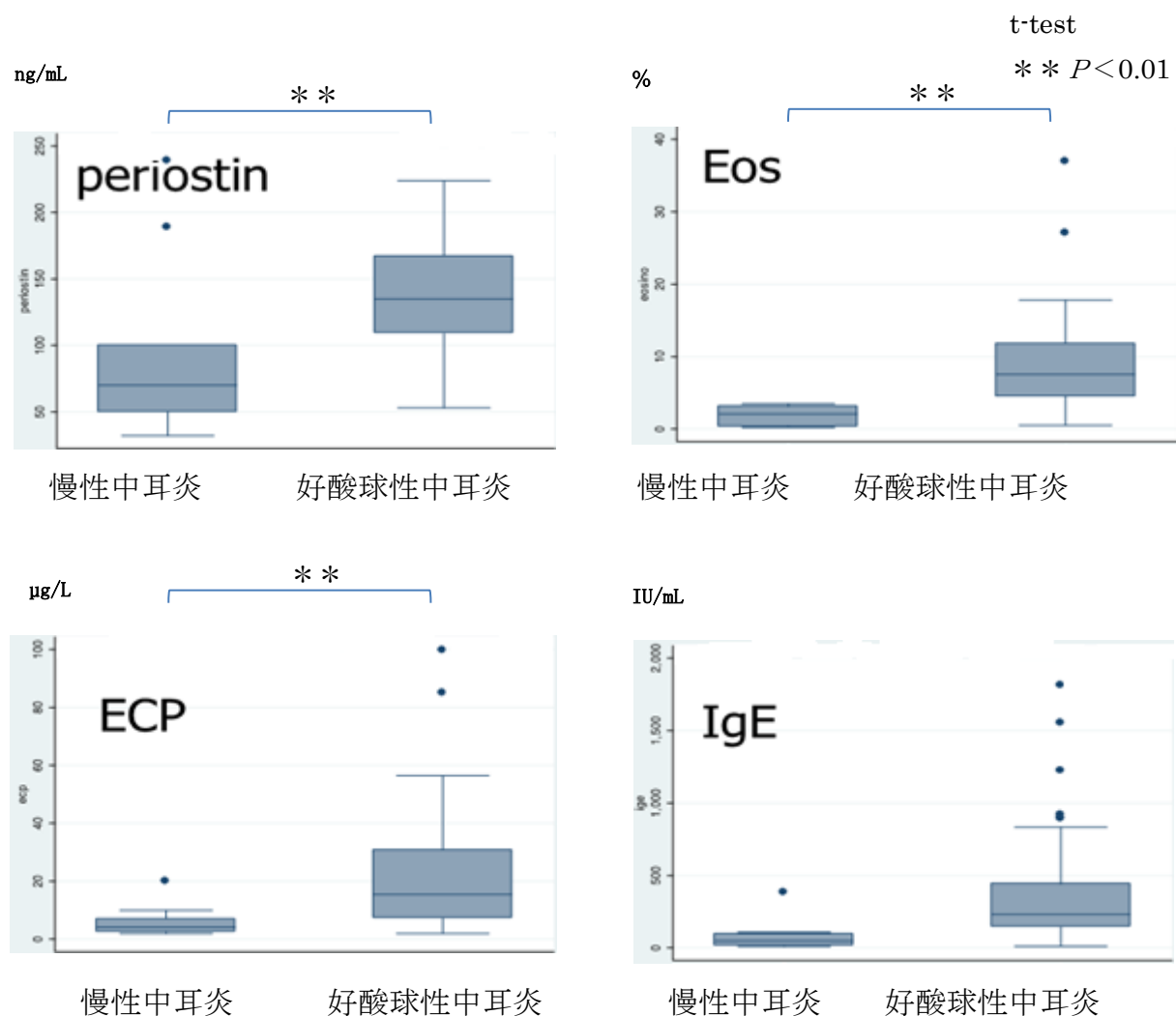
方法：血中好酸球 (=Eos) (%)、血清 ECP 値 (μ g/L)・血清 IgE 値 (IU/ml)・血清 Periostin 値 (ng/mL) を測定した。

3-4. 結果

各バイオマーカーにおける慢性中耳炎と好酸球性中耳炎結果を図 13 に示した。好酸球性中耳炎患者群の血中好酸球、血清 ECP 値、血清 Periostin 値は慢性中耳炎群のそれと比較し有意に高値を示した。血清総 IgE 値は慢性中耳炎と有意

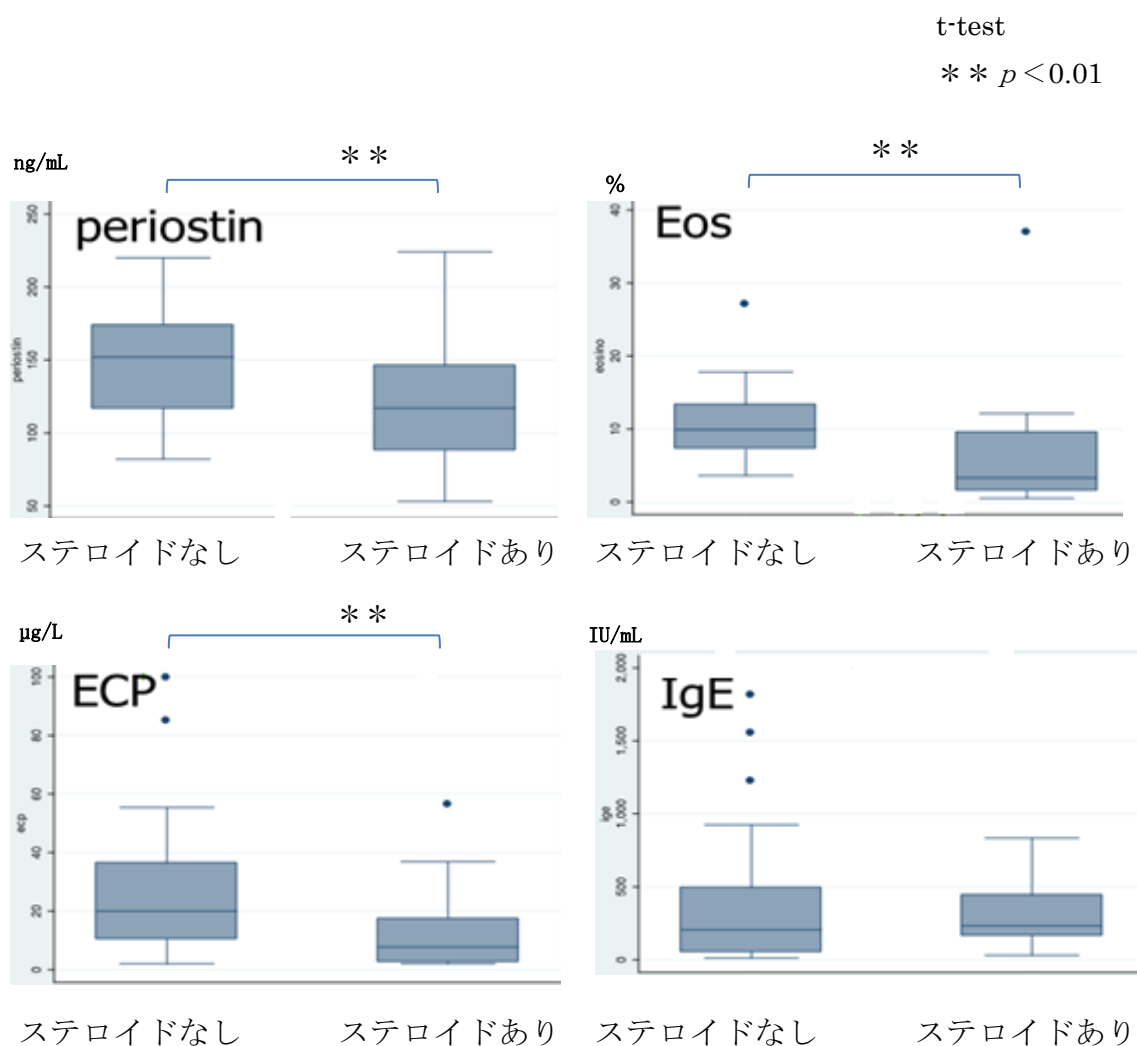
差を認めなかった。

(図 13) 慢性中耳炎と好酸球性中耳炎における各バイオマーカーの比較



次に副腎皮質ステロイドの影響を考慮するため、気管支喘息の治療のために副腎皮質ステロイド全身投与が行われていた症例と行われていない症例を比較した(図 14)。副腎皮質ステロイド全身投与が行われていた群において血中好酸球(%)、血清 ECP 値、血清 Periostin 値は有意に低値を示した。

(図 14) 副腎皮質ステロイドの有無と各バイオマーカーの比較



慢性中耳炎患者と比較し、好酸球性中耳炎患者は気管支喘息や好酸球性副鼻腔炎を有していることが多く、これらのバイオマーカーは全身の好酸球性炎症を反映していると考えられる。血中好酸球、血清 ECP 値、血清 Periostin 値は副腎皮質ステロイドの全身投与により抑制されていた。しかし、粘膜肥厚 Grade の進行した症例の多くが副腎皮質ステロイドの全身が行われているのにも関わらず、耳漏が抑制できない症例が存在していた。これらの症例では中耳粘膜における肉芽組織のコントロールも困難なことが多く局所における好酸球性炎症に着目する必要があると考えた。表 4 に好酸球の炎症サイクルと粘膜病態に関わる分子を示した(12. 13)。G3 などの高度粘膜肥厚 Grade 進行例では局所の Periostin の働きが炎症サイクルに関わり、治療抵抗性に関与している可能性が

あると考えた。

(表 4) 好酸球の炎症に関わるサイトカイン(11, 12, 13)

好酸球前駆細胞の選択的分化	IL-5
好酸球の血管壁接着	TNF- α ・IL-1・RANTES・CMP-1
好酸球の血管内皮細胞間移行	Eotaxin・ICAM-1・Periostin
好酸球の組織上皮側への移行および生存	GM-CSF、IL-8
LPS 存在下での免疫誘導	IL-6・IL-8
粘膜肥厚と線維化	Periostin・TGF- β

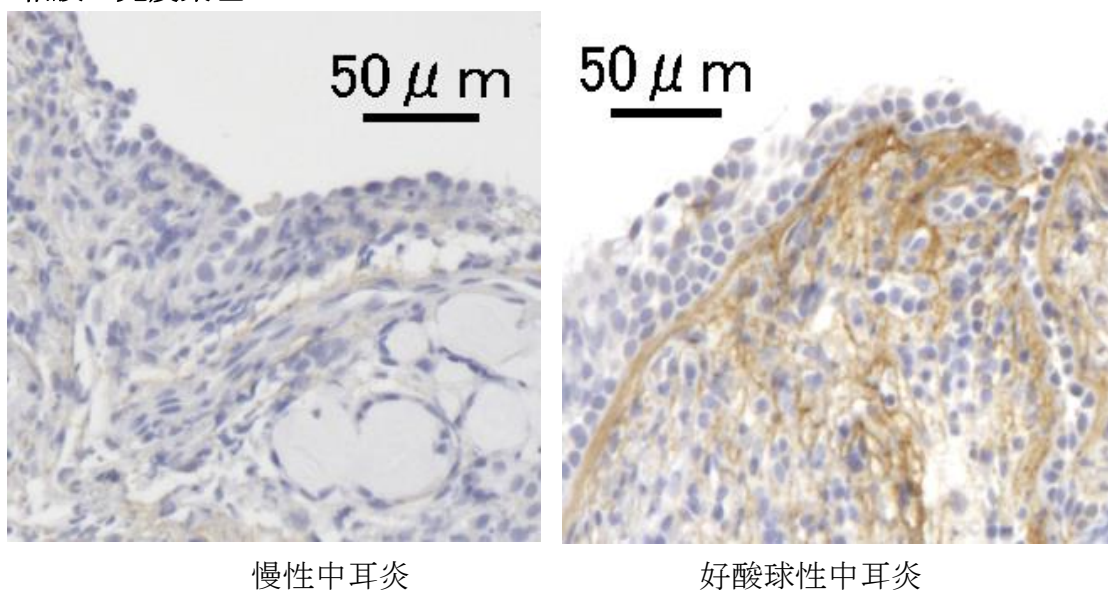
B 中耳肥厚粘膜の免疫学的評価

3-6. 目的

Periostin は好酸球疾患の組織肥厚に関わる重要なタンパク質であり、好酸球性副鼻腔炎や好酸球性中耳炎など、耳鼻科領域の多岐にわたる疾患で粘膜肥厚、肉芽形成における働きが指摘されている(14, 15)。Periostin は接着因子として働く matrix protein の一つである。線維化とコラーゲン形成に関わる一方、matricellular protein として細胞と基質間の相互作用を仲介し、好酸球性炎症のステロイド治療抵抗性との関わりが指摘されている(11)。気管支喘息患者では Periostin は気道上皮基底膜下に沈着し、サイトカインとして炎症サイクルに関わることが示されておりバイオマーカーとしても臨床運用が進められている。

好酸球性中耳炎の中耳粘膜において Periostin の沈着を認めることが報告されている(14)。慢性中耳炎と好酸球性中耳炎の粘膜を抗 Periostin 抗体にて染色したところ、本研究室での検体においても同様の結果であった(図 15)。好酸球性中耳炎では中耳粘膜基底膜周囲に Periostin の発現を認めるが慢性中耳炎では Periostin はほとんど発現していなかった。中耳粘膜肥厚を有する G2 及び、進行例である G3 に含まれる Periostin 発現を定量し、粘膜肥厚と Periostin の関連について検討した。

(図 15) 慢性中耳炎及び好酸球性中耳炎における抗 Priostin 抗体を用いた中耳粘膜の免疫染色



3-7. 研究デザイン

中耳粘膜 13 耳 (G2 : 5 耳、G3 : 8 耳) に発現している Periostin を定量した。

3-8. 対象と方法

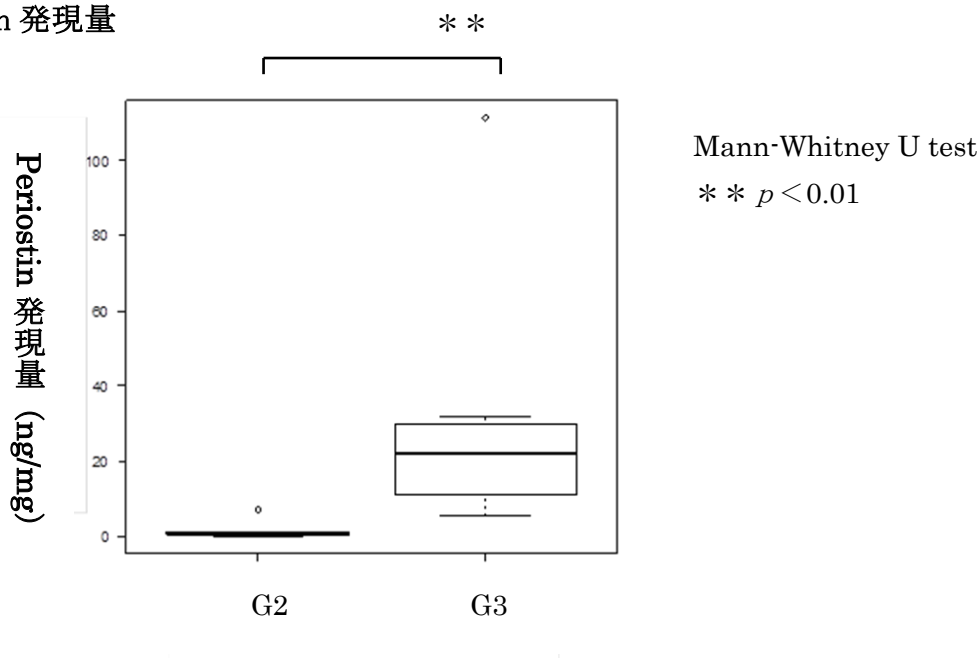
好酸球性中耳炎の G2 及び G3 中耳粘膜採取し、組織を 1 mm 角に裁断し他後、gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) を用い human_tumor のプロトコールに従いサンプルをホモジナイズした。MACSmix を用いてそれぞれ 3 回の 37°C で 30 分間酵素反応とホモジナイズを実施した。7 mL の medium を添加し、再懸濁 15 mL チューブに Pre-separation filter をセットし、細胞懸濁液を通し、5 mL の medium で filter を洗浄した。4°C にて 10 min 安置した後、上清採取した。酵素溶液には Tumor Dissociation Kit, human (Miltenyi Biotec : 130-095-929) 使用 4.7 mL の medium に 200 μ L の Enzyme H, 100 μ L の Enzyme R および 25 μ L の Enzyme A を添加して作製した。

Periostin の発現量は Periostin ELISA Kit (Human) (SHINO-TEST Co JAPAN) を用いて測定した。

3-9. 結果

Periostin 発現量 G2=1.96 ng/mL , G3=30.2 ng/mL ($p = 0.0031$) であり、G2

(図 16) Periostin 発現量



3-10. 考察

慢性中耳炎と異なり、好酸球性中耳炎の粘膜には Periostin の発現が認められた。また、G2 と比較しより病態の進展した G3 にて Periostin 発現量が行進していることは、好酸球性中耳炎において、Periostin が粘膜肥厚病態の進行や炎症の増悪に関与している可能性を示唆すると考えられる。

C 中耳粘膜における Periostin の発現分布

3-11. 目的

好酸球性中耳炎患者の耳粘膜組織への発現を明らかにし、中耳粘膜肥厚の重症度と治療抵抗性について検討する。

3-12. 研究デザイン

好酸球性中耳炎 18 耳(治療前の G1 : 4 耳、G2 : 6 耳、G3 : 4 耳及び治療後 4 耳)の Periostin の発現面積割合を検討した。

3-13. 対象と方法

経外耳道的に中耳粘膜を採取し4%ホルマリン固定した。パラフィン包埋し5 μ m に切片を作成した。各サンプルは脱パラフィンしたのちそれぞれ

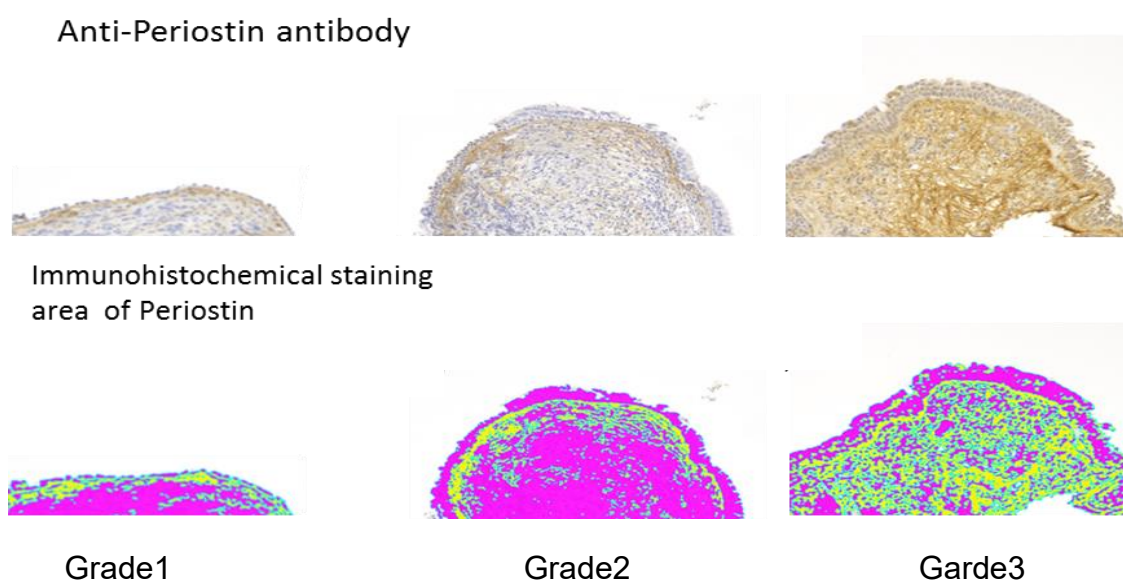
hematoxylin and eosin (H&Estain)染色した。免疫染色には anti-Periostin rabbit polyclonal antibody (ab14041)を用い ENVISION+/HRP (DAB) kit system (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)にて行われた。

以下に免疫染色法を示す。

- 1 脱パラフィン
- 2 抗原不活化: トリス塩酸緩衝液 加熱処理 98° 30 分 自然冷却→42°
- 3 脱ペルオキシダーゼ処理 (メタノール+過酸化水素)
- 4 流水洗浄
- 5 一次抗体: anti-Periostin rabbit polyclonal antibody (2000 倍希釈)
- 6 PBS 洗浄
- 7 二次抗体: anti Rabbit IgG (H),
- 8 PBS 洗浄
- 9 Diaminobenzidine (DAB)発色 10 分
- 10 水洗
- 11 染色: 核染
- 12 封入

組織は Biozero BZ-X700 microscope (Keyence)を用いて観察した。BZ-H3C software color extractionを用い Periostin発現面積割合を算出した(図17)。

(図 17) Periostin 発現面積割合の算出

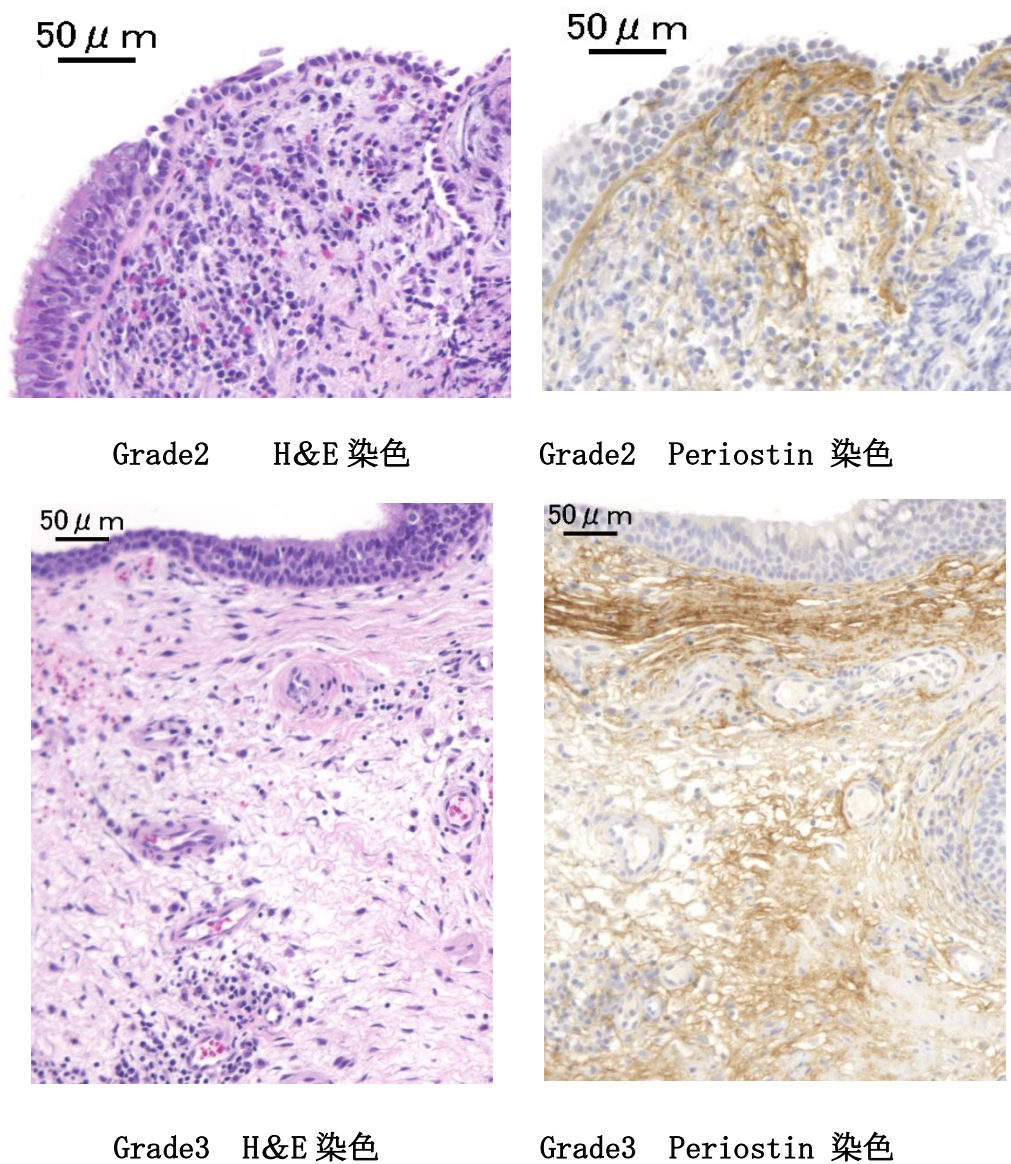


Periostin 発現面積割合の算出=ペリオスリン染色(黄)/サンプル総面積

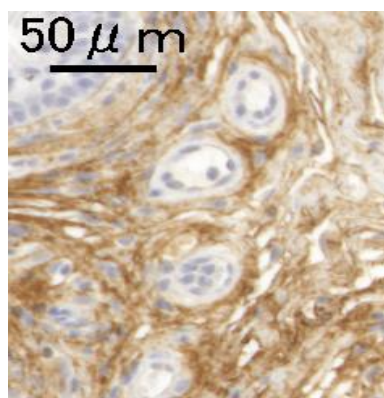
3-14. 結果

図18に各粘膜肥厚GradeにおけるH&E染色とPeriostin 染色の結果を示した。好酸球性中耳炎中耳粘膜において、粘膜肥厚 Grede の程度にかかわらず、全ての Grade において好酸球浸潤を認めた。Periostin はG1 では粘膜基底膜直下に淡く染色像を認め、G2 では肥厚した基底膜に、Grade3 では粘膜固有層まで進展した高度な沈着像を認めた。また、G3 において粘膜固有層に発現していた Periostin は固有層の微小血管周囲によく発現していた(図19)。

(図18) 好酸球性中耳炎の粘膜肥厚における H&E 染色と Periostin 染色



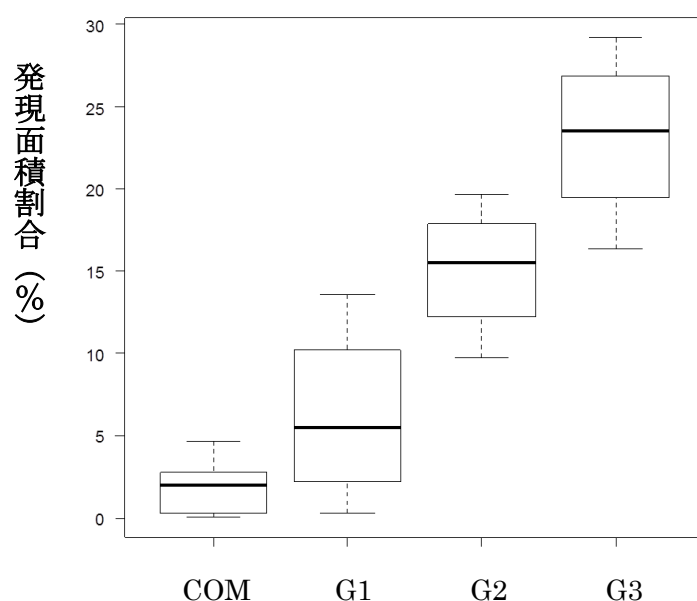
(図 19) Grade3 における中耳粘膜固有層の血管周囲の Periostin 染色像



次に Periostin の発現面積割合を図 20 にて示す。慢性中耳炎と比較し好酸球性中耳炎では G1 では Periostin の発現面積割合は有意に多いとは言えない結果であったが、G2、G3 のいずれも慢性中耳炎及び G1 と比較し Periostin の発現面積割合は有意に多かった。Periostin の発現面積割合の平均値は G1 で平均 6.20% (0.27-13.5%)、G2 平均 15.1% (9.74-19.6%)、G3 平均 23.1% (16.3-29.2%) と粘膜肥厚 Grade に相関し上昇した。

また、G3 において経外耳道的肉芽除去治療を行い治療後 G2 へ改善を認めた 4 例の Periostin の分布面積を測定した (図 21)。術後の Periostin の発現面積割合は 8.05% (2.7-14.7%) であり術前と比較し有意に減少していた ($P < 0.028$)。

(図 20) 粘膜 Grade と Periostin の発現面積割合



ANOVA

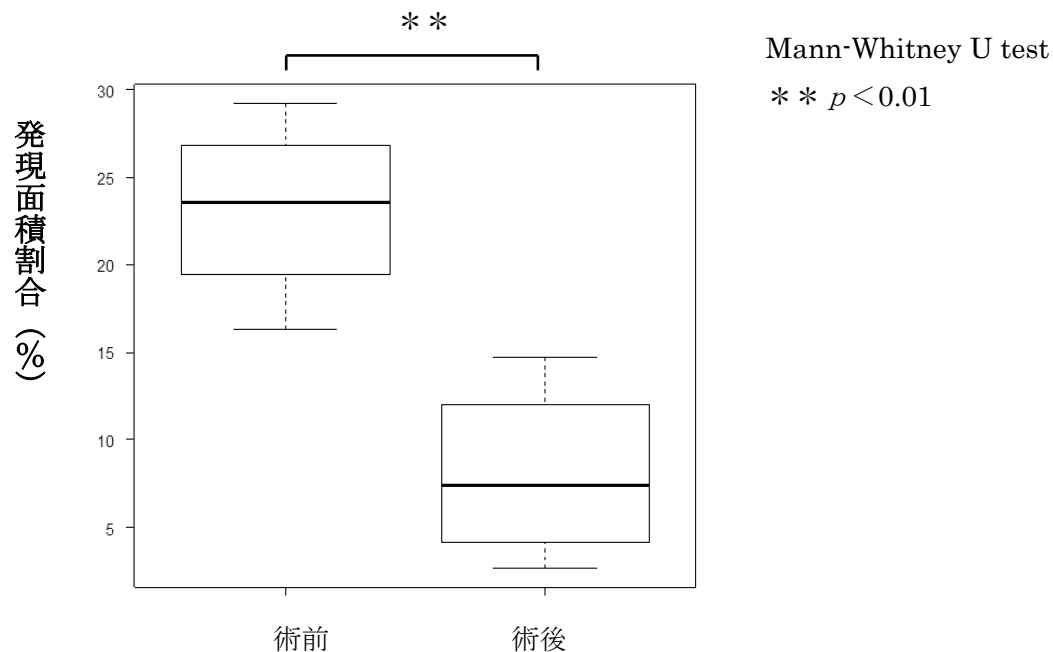
* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

	CI	<i>P</i> value
G1-COM	-1.46-10.1	0.189
G2-COM	8.20-18.3	<0.001
G3-COM	15.4-27.1	<0.001
G2-G1	2.45- 15.3	0.0048
G3-G1	9.89-24.0	<0.001
G3-G2	1.60-14.4	0.011

COM:慢性中耳炎

(図 21) 経外耳道的肉芽除去前後と Periostin の発現面積割合



3-15. 考察

Periostin は好酸球性気道炎症疾患に広く認められるタンパクであり (11)、中耳炎に特徴的な所見ではない。しかし、中耳粘膜は耳管から連続した上気道組織であり、好酸球性副鼻腔炎と同様に病態進行に関わっていると考えられる。好酸球性副鼻腔炎鼻粘膜においては、過去の研究より Periostin の異なる 2 つの存在形式 (superficial type、diffuse type) が報告されている (16)。本検討により、好酸球性中耳炎の中耳粘膜においても Periostin の発現が認められ、また好酸球性中耳炎重症例では Periostin 発現が亢進していることを明らかにした。また、好酸球性中耳炎中耳粘膜においても、Periostin の異なる発現形式が確認された。Periostin はリモデリングの過程において重要なタンパク質であることから、炎症の程度が強い場合にその分泌が促進され、さらに炎症を遷延化させていると考えられている。中耳粘膜においての Periostin が少量または基底膜周囲にのみに発現している G1 および G2 は好酸球性副鼻腔炎における “superficial type”、Periostin が広範に発現している G3 が “diffuse type” と考えられる。

Periostin は気道上皮細胞や線維芽細胞において、IL-4、IL-13 刺激で発現が亢進され、副腎皮質ステロイドにより mRNA レベル、タンパクレベルで抑制されることが知られているが、最近の新たな研究では、IL-4、IL-13 で刺激した

血管内皮細胞由来の Periostin は副腎皮質ステロイドで抑制されないことが報告された(17)。この Periostin の副腎皮質ステロイド感受性の差は Periostin の産生細胞に由来され“cell type-dependent effects” と言われている(17)。

本検討では好酸球性中耳炎において G1, G2 では Periostin は基底膜周囲にのみ発現しており、これらは線維芽細胞由来 Periostin と考えられる。線維芽細胞由来の Periostin は副腎皮質ステロイドにより発現が抑制され炎症サイクルは抑制される。しかし、G3 では Periostin は基底膜のみならず固有層に広範に発現しており、肥厚中耳粘膜の固有層の血管内皮細胞由来の Periostin が多く存在すると考えられる。血管内皮細胞由来の Periostin は副腎皮質ステロイド治療を行ってもその炎症サイクルは抑制されず、結果、肉芽存在下では好酸球性炎症は副腎皮質ステロイドでは抑制されない。G3 のような好酸球性中耳炎重症例における副腎皮質ステロイド治療抵抗性はこのようにして生じていると考えた。

Periostin は好酸球性気道炎症疾患に広く認められるタンパクであり(11)、中耳炎に特徴的な所見ではない。しかし、中耳粘膜は耳管から連続した上気道組織であり、好酸球性副鼻腔炎と同様に病態進行に関わっていると考えられる。好酸球性中耳炎の発症が副鼻腔の炎症に由来するのか、また、副鼻腔炎の病勢や副鼻腔根本術が好酸球性中耳炎の病勢に関連があるのかは耳鼻咽喉科にとって非常に興味のあるところである。慢性中耳炎と比較しても、好酸球性中耳炎の病勢は複雑であり本研究は好酸球性中耳炎に特徴的に発現する Periostin と本疾の進行例における副腎皮質ステロイド治療抵抗性は粘膜肥厚の進展 Periostin の発現形式が関与していることを明らかにした点は本疾患の治療を考える上で大変有効だと考えられる。

第 4 章 好酸球性中耳炎に対する治療

第 2 章では、粘膜肥厚と聴力の関係、そして、中耳の感染と LPS の存在が難聴進行のリスクであることを明らかにした。第 3 章では、粘膜肥厚を来した重症例のステロイド治療抵抗性のメカニズムを明らかにした。本章ではそれを踏まえ、好酸球性中耳炎の粘膜肥厚 Grade 分類を踏まえた好酸球性中耳炎に対する新たな治療法を検討した。

A 鼓膜形成術

4-1. 目的

好酸球性炎症のコントロール良好な症例では感染リスクを減少させるために鼓膜形成術を施行した。手術成績について検討する。

4-2. 研究デザイン 好酸球性中耳炎 6 例の手術成績

4-3. 対象と方法

トリアムシノロンアセトニドの鼓室内投与を 2 年以上施行し、加療後、鼓膜穿孔が 1 年以上残存した症例の内、治療により膠状耳漏が停止しかつ感染が制御されており、3 ヶ月以上鼓室内投与及び抗菌薬投与を必要としなかった症例でかつ、鼓膜穿孔が 2 象限以内に限局する症例の内、鼓膜閉鎖を希望した 6 例に鼓膜閉鎖術を施行した。

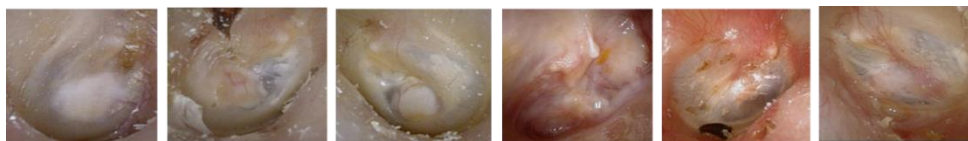
4-4. 結果

鼓膜形成術を施行 6 例すべてにおいて鼓膜穿孔閉鎖を認めた(表 5)。しかし、G2 であった case 2 および case3 において術後 1 年にて再度膠状の耳漏を認め再建鼓膜辺縁より再穿孔を認めた。Case5、case6 では術後 6 か月と 8 か月にて中耳貯留液を認め、トリアムシノロンアセトニドの鼓室内投与を必要としたが再穿孔は認めなかった。

(表 5) 鼓膜形成術施行 6 例の結果

	case1	case2	case3	case4	case5	case6
性別	女性	女性	女性	女性	男性	女性
年齢	74	64	64	59	39	74
患側	左	左	右	左	左	左
穿孔の大きさ	G II	G II	G I c	G I c	G I c	G II
感染	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negative (-)	<i>CoagulaseNeg. Staphylococcus</i> <i>Corynebacteria</i>	Negative (-)	<i>CoagulaseNeg. Staphylococcus</i>
肥厚粘膜G	G2/G1	G2/G2	G2/G2	G2/G1	G1/G1	G1/G1
術式	myringoplasty	myringoplasty	myringoplasty	All-inlay	TERUDERMIS	myringoplasty
術前聴力	30.0dB	31.7dB	43.3dB	61.7dB	26.7dB	53.3dB
術後聴力	18.3dB→36.7dB	16.7dB	15.0dB	46.7dB	23.3dB	45dB
ABG	15dB	10dB	11.7dB	25dB	16.7dB	8.3dB
観察期間	8y10m	3y	3y	4y7m	6m	2y6m
鼓室内投与回数	50回以上	25回以上	25回以上	25回以上	19回	16回

鼓膜
所見



4-5. 考察

粘膜肥厚が軽度な症例は高度な症例より耳漏コントロールがしやすく、3 ヶ月以上、膠状耳漏が停止しかつ感染が制御され、鼓室内投与及び抗菌薬投与を必要としなかったコントロール良好な好酸球性中耳炎症例に対して鼓膜形成は有効であった。また、2 象限にまたがる穿孔症例も穿孔閉鎖可能であった。粘膜肥厚があり、中耳粘膜にリモデリングが生じている例では病勢が増悪する可能性が考えられ、穿孔の可能性があるため適応に慎重になる必要があると考えた。

B 経外耳道的肉芽除去術

4-6. 目的

副腎皮質ステロイド治療に抵抗した進行症例には中耳粘膜肥厚病変に肉芽形成を認めていた。感染巣であり、炎症サイクルの増悪に関与していると考えられる肉芽組織を切除することによって、中耳の炎症をコントロールしやすくすることが可能であれば、難聴の進行を抑制できると考えた。

4-7. 研究デザイン 好酸球性中耳炎 14 例の手術成績

4-8. 対象と方法

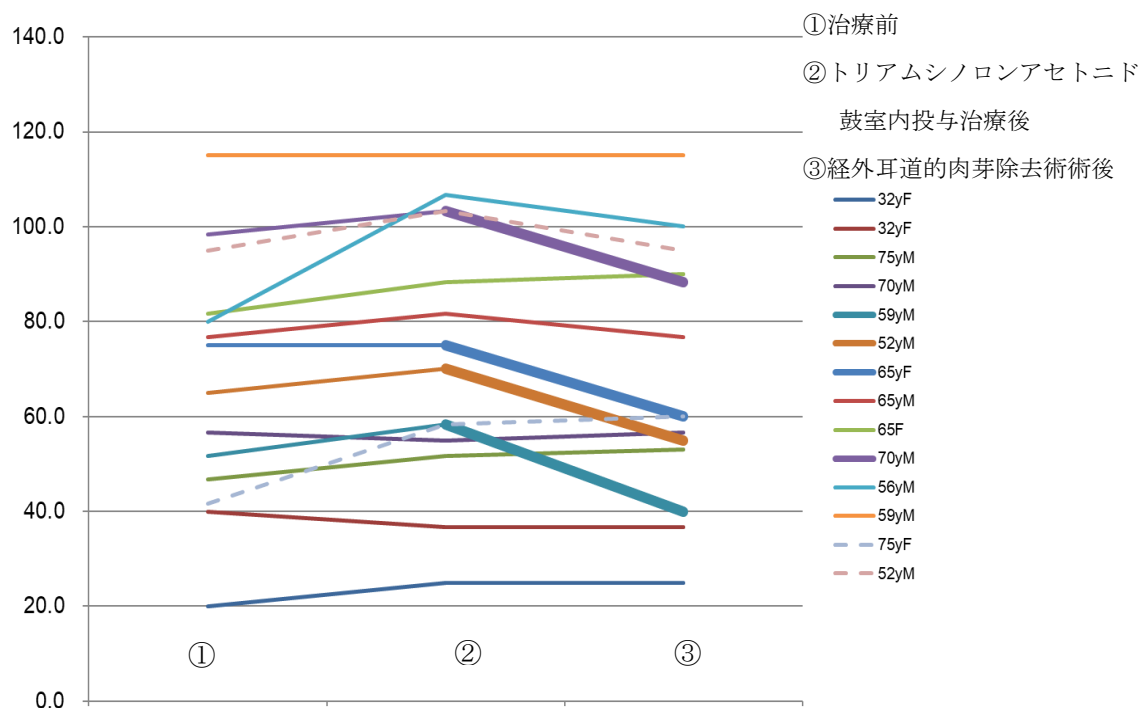
対象 中耳粘膜が外耳道に突出した G3 の好酸球性中耳炎症例にてトリアムシノロンアセトニドの鼓室内投与を 2 年以上施行も改善しなかった 12 例。

方法：中耳肥厚粘膜及び肉芽を除去し、同部位にトリアムシノロンアセトニドを浸した gelatin sponge で覆った。周術期間中はプレドニゾロン 1 mg/kg/day から 7 日間で 0.25 mg/kg/day 漸減した。また、感受性のある抗菌薬を併用した。観察期間は平均 8.6 か月（6 -14 か月）。

4-9. 結果

図 22 に経外耳道的肉芽除去術を行った 14 例の聴力推移を示した。12 例において粘膜肥厚は G3 から G2 へ改善した。4 例において 15 dB の気導聴力の改善を認めた。観察期間中に気導聴力が 15dB 以上悪化した症例はなかった。7 例において継続的耳漏の消失を認め、補聴器の使用が可能になった。また、図 23 に外耳道的肉芽除去術を施行した G3 症例の中耳所見を提示した。

（図 22）経外耳道的肉芽除去術を行った 14 例の聴力推移



（太線：15dB 気導聴力改善例、単純線：粘膜肥厚改善例、点線：粘膜肥厚非改善例）

(図 23) 外耳道的肉芽除去術を施行した G3 症例の中耳所見



治療前

(外耳道に進展する肉芽)



術中所見

(gelatin sponge 挿入)



術後

(再生した鼓膜)

外耳道に進展した病的中耳粘膜は除去され、中耳腔が確認できる。中耳腔に gelatin sponge を挿入しトリアムシノロンアデトニドを浸みこませる。術後 3 ヶ月にて鼓膜が再生した。

4-10. 考察

好酸球性中耳炎に対する多施設調査において 6%の症例が聾に至ったと報告されている。これらの症例において Tympanomastoidectomy が施行されていたことから本邦において好酸球性中耳炎の外科手術は否定的な意見が多かった(2)。

本検討では、局所麻酔下に経外耳道的に岬角から耳管方向の肉芽を中心に肉芽除去術を施行した。経外耳道的肉芽除去術は副腎皮質ステロイドによる治療に対して反応が乏しい炎症回路をコントロールする目的で行われた。術後の消炎及び好酸球の再組織遊走を阻害する目的で同部位にトリアムシノロンアセトニドを浸した gelatin sponge で覆った。

近年では飯野ら(18, 19)により抗 IgE 抗体治療 や Neff ら(20)による pegylated interferon- α 2a and 2b 治療がなされた。いずれも好酸球性炎症を抑制し、耳漏の消退を認めたと報告された。しかし、本検討における G3 に該当するような肉芽型の難治例に対する有効性は示されなかった。G3 のように高度の中耳肥厚を有する症例において、中耳の炎症サイクルに関わる Periositin の発現分布から考察された治療抵抗性の観点からも経外耳道的肉芽除去は好酸球性中耳炎の有効な治療法と考えられる。

以上の結果をふまえて中耳粘膜肥厚 Grade に応じた好酸球性中耳炎の治療戦略を下記のように提案したい。

- G1： 膠耳漏を認めた際の副腎皮質ステロイド鼓室内投与
残存鼓膜穿孔に対する経外耳道的鼓膜形成術
- G2： 副腎皮質ステロイド鼓室内及び全身投与
- G3： 経外耳道的肉芽除去術
副腎皮質ステロイドの全身投与と抗菌薬の併用

第 5 章 展望

近年、気管支全喘息に対する分子標的薬の臨床試験が散見される。抗 IgE 抗体 (18, 19) や抗 IL-5 抗体療法 (21) はすでに臨床現場で使用され、その有効性が示されている。気管支喘息や好酸球性副鼻腔炎のサブ解析も進められており、その病態メカニズムにあった治療法が模索されている。しかし、好酸球性中耳炎において、病期分類や病態メカニズムの解明は十分ではなく、新規治療薬の適応についても、まだ十分に議論されているとは言えない。前述した抗 IgE 抗体治療 IFN 治療も一部の症例への有効性が示されているが、高度粘膜肥厚や肉芽伴う重症例には有効性が示されていない。本研究結果は中耳粘膜肥厚に着目し難聴の進行やリスク因子を明らかにした。また、治療法においても局所制御に着目し、トリアムシノロンアセトニドの鼓室内投与の有効性や鼓膜形成術、経外耳道的肉芽除去術の有効性について議論した。顕微鏡や内視鏡が発達した今日において、中耳所見は耳鼻科咽喉科医にとって観察が容易である。中耳粘膜所見に基づいた好酸球性中耳炎の重症度分類は、その治療方針および聴力予後を考える上で有効である。

本研究室では好酸球性中耳炎モデル動物の作成にも試みている。卵白アルブミン感作後、下気道への抗原曝露による作成される喘息モデルマウスは気管支周囲の細胞浸潤や杯細胞の過形成、基底膜下組織の線維化が確認されており、下気道の肥厚病変や気道リモデリングを観察する上で広く用いられているモデル動物である。現在我々は鼻腔や中耳への抗原曝露及び薬剤投与を繰り返すことが可能な経乳突洞的反復感作モデルマウス作成に取り組んでいる。モデル動物は卵白アルブミン感作後、反復して炎症を誘導することが可能であり、長期経過の炎症を繰り返す、好酸球性中耳炎進行例に類似する。また、外毒であるエンテロトキシンや LPS を反復曝露することが可能であり好酸球性中耳炎の難聴進行に則したモデル動物であると考えられる。モデル動物では現行の副腎皮質ステロイドのみならず免疫抑制薬など局所治療の新たな戦略を模索することが可能である。モデル動物の作成及び解析は、好酸球性中耳炎における難聴進行の機序解明と新規治療の開発にとって極めて有効だと考えられる。引き続き本研究を継続し、好酸球性中耳炎における新たな治療法の確立に努めたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、丁寧にご指導いただきました自治医科大学附属さいたま医療センター耳鼻咽喉科 吉田尚弘教授、飯野ゆき子名誉教授に深く感謝致します。

また、実験方法の取得及び研究を共に進めさせていただきました自治医科大学附属さいたま医療センター循環器病医学研究所の研究スタッフの皆様に心より御礼申し上げます。

参考文献

1. Tomioka S, Yuasa R, Iino Y, Intractable otitis media in cases with bronchial asthma. Recent Advances in Otitis Media with Effusion. Proceedings of the Second Extraordinary. *International Symposium in Recent Advances on Otitis Media*. Amsterdam: Kugler 6:183, 1994
2. 鈴木 秀明, 松谷 幸子, 川瀬 哲明, 飯野 ゆき子, 川内 秀之, 暁 清文, 黒野 祐一, 新川 秀一, 高橋 姿, 福田 諭, 森山 寛, 山下 敏夫. 小林 俊光. 好酸球性中耳炎全国疫学調査. *Otol Jpn* 14(2):112-117, 2004
3. Iino Y, Tomioka-Matsutani S, Matsubara A, Nakagawa T, Nonaki M. Diagnostic criteria of eosinophilic otitis media, a newly recognized middle ear disease. *Auris Nasus Larynx* 38:456-61, 2011
4. Matsushima K, Baldwin ET, Mukaida N. Interleukin-8 and MCAF: novel leukocyte recruitment and activating cytokines. *Kishimoto T, (ed), Interleukins: molecular biology and immunology. Karger, Basel;* 236-265, 1992
5. Hiromi Kanazawa, Naohiro Yoshida, Akihiro Shinnabe, Yukiko Iino. Antigen-specific IgE in middle ear effusion of patients with eosinophilic otitis media. *Ann Allergy Asthma Immunology* Jul;113(1):88-92, 2014
6. Yukiko Iino. Inner Ear Damage Caused by Otitis Media. *耳鼻臨床* 98:6;429～437, 2005
7. 吉川兼人, 瀧本勲, 石神寛通: 外傷性鼓膜穿孔症例の検討. *耳鼻臨床* 78: 1293—1301, 1985
8. 神田晃, 茆原順一 アレルギーとケモカイン— 好酸球関連ケモカインを中心に— *臨床化学* 33:79-89, 2004.

9. Yukiko Iino. Role of IgE in Eosinophilic Otitis Media. *Allergology International* 59:233-238, 2010
10. Woodruff PG1, Boushey HA, Dolganov GM, Barker CS, Yang YH, Donnelly S, Ellwanger A, Sidhu SS, Dao-Pick TP, Pantoja C, Erle DJ, Yamamoto KR, Fahy JV. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* Oct 2;104(40):15858-63, 2007
11. Izuhara K, Arima K, Ohta S, Suzuki S, Inamitsu M, Yamamoto K. Periostin in allergic inflammation. *Allergol Int* 63:143-51, 2014
12. Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 105:651, 2000
13. 荏原順一. 山口一考 好酸球・リンパ球の動向とその治療への応用 *日呼吸会誌* 41(9):589, 2003
14. Nobuo Ohta, Akihiro Ishida, Kazuya Kurakami, Yusuke Suzuki, Seiji Kakehata, Junya Ono, Hiroki Ikeda, Kimihiro Okubo, Kenji Izuhara. Expressions and roles of periostin in otolaryngological diseases. *Allergol Int* 63:171-80, 2014
15. Go Takayama, Kazuhiko Arima, Taisuke Kanaji, Shuji Toda, Hiroyuki Tanaka, Shunsuke Shoji, Andrew N.J. McKenzie, Hiroichi Nagai, Takao Hotokebuchi, Kenji Izuhara. Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J Allergy Clin Immunol* 118:98-104, 2006
16. Osamu Shiono, Yasunori Sakuma, Masanori Komatsu, Mariko Hirama, Yukiko Yamashita, Junichi Ishitoya, Nobuhiko Oridate. Differential expression

of periostin in the nasal polyp may represent distinct histological features of chronic rhinosinusitis. *Auris Nasus Larynx* 42:123-7, 2015

17. Shoda T, Futamura K, Kobayashi F, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A Cell type-dependent effects of corticosteroid on periostin production by primary human tissue cells. *Allergy* Nov;68(11):1467-70, 2013
18. Iino Y, Hara M, Hasegawa M, Matsuzawa S, Shinnabe A, Kanazawa H, Yoshida N. Effect of omalizumab on biomarkers in middle ear effusion in patients with eosinophilic otitis media. *Acta Otolaryngol* 134:36-72, 2014
19. Iino Y, Hara M, Hasegawa M, Matsuzawa S, Shinnabe A, Kanazawa H, Yoshida N. Clinical efficacy of anti-IgE therapy for eosinophilic otitis media. *Otol Neurotol* 33:1218-24, 2012;
20. Neff BA, Voss SG, Carlson ML, O'Brien EK, Butterfield JH. Treatment of eosinophilic otitis media with pegylated interferon- α 2a and 2b. *Laryngoscope* 127:1208-16, 2017
21. Haasler I, Taube C. Biologicals in the Treatment of Bronchial Asthma. *Pneumologie* Oct;71(10):684-698, 2017