

# 耳管開放症と耳管の水代謝 -- マウス耳管における アクアポリンの発現様式とシェ-グレン症候群患者 の耳管開放症--

著者	高橋 悦
学位授与機関	Tohoku University
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/48148">http://hdl.handle.net/10097/48148</a>

博士論文

## 耳管開放症と耳管の水代謝

—マウス耳管におけるアクアポリンの発現様式と  
シェーグレン症候群患者の耳管開放症—

高橋 悦

## 第 I 章

## 要約

耳管は、上咽頭と中耳腔を連結する管腔状の構造物で通常安静時には閉鎖しており嚥下動作などに伴い瞬間的に開大する。耳管開放症は安静時に閉鎖しているべき耳管が常時開放状態となり咽頭から中耳腔へと自由に空気と音声が交通することにより発症する。

安静時の耳管内腔の閉鎖を保つ為には、さまざまな規定要因が考えられているが耳管粘膜の湿潤状態や耳管内腔粘膜に豊富に存在する耳管腺からの粘液などの分泌状態も重要な寄与要因の一つと思われる。

そこで今回、耳管における湿潤・乾燥に注目し、腺組織からの粘液の分泌や水輸送に関係の深い「アクアポリン」の耳管での発現様式、ならびにアクアポリンの機能障害と関係の深いとされるシェーグレン症候群患者における耳管開放症の合併に関する検討を行った。

耳管のアクアポリンの発現様式は、マウスを対象に免疫組織学的的手法を用いて 9 種類のアクアポリンサブタイプについてその発現の有無、部位を検討した。その結果、マウス耳管周囲組織において、4 種類のアクアポリンサブタイプ (aquaporin-1, 3, 4, 5) の発現が局在特異性をもって確認された。すなわち、耳管粘膜上皮細胞においてその頂面にアクアポリン-5 が基底側面にアクアポリン 3 および 4 が豊富に発現していることが判明したことから粘膜上皮細胞内においてアクアポリンを介在し活発な水分子の移動が行われているのが予測された。また、耳管粘膜上皮細胞内においては

アクアポリン-1, 5 の発現が認められた。アクアポリン-1 は、結合組織系細胞を中心として繊維芽細胞に豊富に、軟骨細胞は中等度に、そして一部の毛細血管内皮細胞に弱く発現していることが確認された。アクアポリン-5 は、漿液腺細胞にも豊富に発現していることが判明した。一方、粘液腺細胞にはいずれのアクアポリンサブタイプは有意な発現は認められなかった。

次に、アクアポリンの異常とも関連が深いと予想されているシェーグレン症候群における耳管開放症の頻度を調査した。当院、血液・免疫内科通院中のシェーグレン症候群の患者 54 症例を対象に耳管開放症の合併頻度を検討した。耳管開放症確実例を 3 例認め（有病率 5.5%）、我々の施設で行った一般検診における耳管開放症の有病率と比較しても高頻度であることが示唆された。

耳管開放症は、耳管のもともとの開きやすさ（素因）と複数の付加要因（誘因）によって発症するものと考えられているが、今回の二つの研究結果は、耳管におけるアクアポリンの機能異常が耳管開放の寄与要因になり得ることを強く示唆するものと考察した。

## 第Ⅱ章

## 研究背景

耳管は、上咽頭と中耳腔を連結する約 3.5cm の管腔状の構造物であり、中耳側 1/3 は骨で咽頭側の 2/3 は軟骨で形成されており、古くから中耳を換気・調圧する主な器官と言われてきた。耳管の機能はまだ不明な点もあり、山藤ら<sup>1)</sup> は耳管を構成する関連組織を機能と部位に関して仮説をたて、耳管は換気、排泄（咽頭側に向かう繊毛上皮細胞の繊毛運動）、防御の 3 つの機能が存在しそれぞれの役割が独立して機能するのではなく互いの役割を協調しながら同時に機能しているのであろうと予想している。耳管は通常、安静時は閉鎖しており、嚥下などの際に耳管のすぐ外側に位置する口蓋帆張筋が収縮して耳管軟骨部が開き、その瞬間だけ耳管が全長に亘って開くことで中耳圧を外界と等しくしている。耳管は、外界からの音刺激を円滑に内耳に伝える中耳環境を確保するために換気、調圧を協調しながら機能していると考えられている。

生理的な耳管機能が障害されるとヒト中耳にはさまざまな病的状態が生じ得る。

上気道炎などにより換気、排泄が障害された状態になると、いわゆる耳管狭窄症が発症し、中耳腔の換気不全が中耳腔の陰圧解除の障害を引き起こし、さらに障害が進むと耳管の排泄能の低下が出現し急性中耳炎、滲出液の貯留（滲出性中耳炎）を来す。

一方、耳管が常時開放状態となると、咽頭より中耳腔へ自由に空気と音声が交通することになり、耳閉感（耳詰まり）、自声強聴（自分の話し声が、耳に不快に響く）、呼吸音聴取などの症状を引き起こしてしまう。このような病状を耳管開放症という。この不快な症状は、仰臥位や頭部の前屈などの体位変化によって一時的ではあるが改

善することもあり、このことは耳管周囲組織の翼突筋静脈叢のうっ血効果により開放状態に陥った耳管内腔を、周囲から圧迫し閉鎖する為であると推測されている。<sup>2)</sup>

耳管開放症の原因には様々なものがある。背景的因子として最多なものは体重減少であり、耳管周囲にある脂肪組織（オストマン脂肪体）や耳管周囲の筋肉の volume の減少へ変化していくと、耳管内腔の閉鎖圧を減少する方向に作用し、耳管の閉鎖不全を引き起こすものと考えられている。<sup>3)</sup>

このほかの原因として、運動時の発汗によって生じた脱水等は耳管周囲の静脈叢の静脈圧の減少を引き起こすこと、三叉神経切断による三叉神経運動枝の神経支配の消失に伴う耳管周囲の筋肉の萎縮が耳管内腔を開放状態へと導く耳管周囲の構造的條件として関係しているものと考えられている。<sup>4)</sup> 一方、耳管内腔側自体の環境条件の新たな誘因として、照射による粘膜萎縮、妊娠や経口ピル服用時の血中エストロゲン値の上昇などが寄与要件として考えられている。<sup>5)</sup>

しかし、これらの誘因がある場合でも必ずしも耳管開放症が発症するわけではなく、耳管開放症は素因（もともとの開きやすさ）と付加要因（誘因）によって発症するものと考えられている（図 1）。また、単一因子では発症することはなくとも、素因や複数の因子の関与で、耳管開放症が発症すると考えることが出来る。

さらに、耳管内腔側の環境条件の因子においても検討の必然性があり耳管内腔の粘液貯留の有無や粘膜の湿潤状態も重要であることは予想される。すなわち、耳管においても耳管腺と呼ばれる分泌腺が存在し、内腔には粘液などの分泌物が湿潤した状態

となっており安静時の耳管閉鎖状態を維持するための寄与因子になっているものと思われる。

また、耳管内腔に貯留している分泌物は、明らかにはされていないが鼻腺から分泌される鼻汁と同様に気道防御能としての液性免疫に関与している可能性も考えられ、耳管内腔での湿潤した環境は重要であることも考えられた。

同機能の障害が起こる事により、耳管が開放状態となる一要因になり得る可能性があると思われた。このことは実際、臨床的にも生理的食塩水の点鼻を行うことで耳管咽頭口側から耳管内腔面を湿潤させることで、耳管開放症状が軽減することは経験的に知られている（生理的食塩水点鼻療法）。

そこで今回我々は、耳管内腔粘膜上皮ならびに上皮周囲組織における湿潤に関与すると思われる因子として、リン脂質二重層で構成された細胞膜細胞膜を介したより効率的な水分子の移動に重要な働きをしているアクアポリンに注目し検討を行う事とした。

アクアポリン(aquaporin: AQP)は、1993年 Agre ら<sup>6)</sup>が、赤血球の膜蛋白の解析をしていた際に発見した、水分子を特異的に通過させる一種のチャネル蛋白で、水輸送以外にも、小粒子、イオン、ガスなどの移送に関係し、細胞接着、細胞遊走能の促進、細胞増殖促進に働く作用が報告されている。<sup>8)</sup>

現在までに多くのアクアポリンがクローニングされているが、哺乳類では少なくともアクアポリン-0 から 12 までの 13 種類のサブタイプが発見され、構造的に以下の 4

群に分けられている。<sup>9)</sup>

- 1 狭義のアクアポリン（水選択性）：アクアポリン 0, 1, 2, 4, 5, 6
- 2 アクアグリセロポリン（水以外も輸送）：アクアポリン 3, 7, 9, 10
- 3 細胞内アクアポリン：アクアポリン 8
- 4 スーパーアクアポリン：アクアポリン 11, 12

上記の 3 は細胞内小器官（オルガネラ）にも分布し植物の液胞に局在すると言われ、4 は 1~3 群のアクアポリンとの構造的に類似性が乏しく、3 と同様に細胞内に限局し水以外のものを透過するかは不明であるものである。アクアポリンの機能は、分布部位から細胞膜アクアポリンと細胞内アクアポリンに大きく分けることもできるが、細胞内アクアポリンの存在が発見されているものの生理的役割は明らかになっていない。

また、アクアポリンの構造は 3 次元の構造解析がされ、ヒトにおけるアクアポリン-1 において 3.8 オングストロームの原子レベルの解明に成功している。<sup>10)</sup>

300 前後のアミノ酸から成る比較的小さな膜蛋白で、アスパラギン、プロリン、アラニンからなる NPA ボックスが配列中に 2 回存在している。細胞膜には 4 量体で存在するが 1 つの分子に 1 つ水通過の孔が開いている。

その後、アクアポリンの異常と関連した疾患についての研究も進歩しアクアポリン-0 と先天性白内障<sup>11)</sup>、アクアポリン-2 と腎性尿崩症<sup>12), 13)</sup>、アクアポリン-5 とシェーグレン症候群に伴うドライアイ<sup>14)</sup>、アクアポリン-4 と視神経脊髄型多発性硬化症

などの関係が報告されている。<sup>15)</sup>

このうちシェーグレン症候群は中高年女性に発症する涙腺、唾液腺を標的とした臓器特異的自己免疫性疾患で、眼、口腔内の乾燥を主症状としその他、多彩な全身性病変を発症する疾患であるが、耳管との関連においてはシェーグレン症候群患者において耳管機能異常を認めた報告もなされている。<sup>16)</sup>

前述したようにシェーグレン症候群は、アクアポリンの遺伝子異常の関与が考えられている疾患であるが、アクアポリンの異常が耳管の湿潤にも関与し、耳管機能異常（開放）を引き起こしている可能性も考えられる。

そこで、本研究では耳管開放症とアクアポリンの関与の可能性に着目し、耳管におけるアクアポリンの発現様式の研究を行い、さらにシェーグレン症候群と耳管開放症の有病率について検討を行う事とした。

### 第Ⅲ章

### 研究目的

本研究では、耳管開放症の発症機序解明のため以下の1、2の検討を行った。

- 1 マウス頭部矢状断標本における耳管内腔粘膜上皮のアクアポリンの発現様式について免疫組織学的的手法を用いて、同部位における発現部位について詳細に検討する。
- 2 当院、血液・免疫内科通院中のシェーグレン症候群の患者54症例を対象に、耳管開放症に関するアンケート調査を実施。有症と思われた対象者には耳鼻科外来にて二次検診を行った。アンケート、診察結果を集計し耳管開放症の合併頻度を検討する。

## 第IV章

## 研究方法

### 1 マウス耳管におけるアクアポリンサブタイプに関する免疫組織化学。

#### 1-a マウス耳管切片標本の作製

実験動物として鼓膜所見正常で8～12週齢のCBA/JNCrjマウス5匹を用いた。

ジエチルエーテル吸入による深麻酔下にマウスを開胸し、右心耳を切開した後に左心室から0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH 7.2)を注入して脱血させ、次に10%緩衝ホルマリン液をゆっくりと注入して還流固定を行った。さらに断頭したマウス頭部を1%酢酸加10%緩衝ホルマリン溶液で2時間、常温で浸漬固定した。0.01M PBSで洗浄後、マウス頭部を0.12M EDTA(エチレンジアミン四酢酸)・2Na水溶液に常温4日間、回転器上で浸漬し、脱灰とした。固定・脱灰したマウス頭部から耳管周囲の組織を切り出し、エタノール系列で脱水した後にパラフィンに包埋した。矢状断方向にマウス耳管を横切る厚さ4 $\mu$ mの切片を作成し、免疫組織化学染色の実験に用いた。

マウスの耳管は、形態的に下等哺乳動物のためヒトの耳管と類似していることや、標本作製にあたり小動物である頭蓋骨、顔面骨は比較的柔らかく脱灰処理を要する免疫組織化学実験用の切片標本の作製にあたり適していたこと、将来的にアクアポリンの機能異常などが出現する遺伝子異常を伴う動物の検討に実験が発展した際、遺伝子操作が広く行われているマウスが対象となることを想定した。

また、一般的に遺伝子レベルから考慮すると、マウスとヒトでは遺伝子配列が非常

に似ており、ヒトの遺伝子を導入したマウスやヒト型に遺伝子を置換した遺伝子改変マウスを作製すると、これらの改変型マウスは、薬剤や刺激に対する反応はヒト型になることなどから、ヒトへの影響が予想できマウスを実験動物として使用した。

#### 1-b 免疫組織化学

今回の実験ではアクアポリンサブタイプの検出感度を上げるために、高感度で汎用性の高い標識酵素ポリマー法を用いた。この方法は、はじめに無標識のアクアポリンサブタイプに対する一次抗体を用いて一度目の抗原抗体反応を行い、過剰な一次抗体を洗浄除去した後、一次抗体を抗原とする二次抗体（可視化を良くするために発色酵素の多数ついた高分子ポリマーで標識されている二次抗体）を反応させ二度目の抗原抗体反応を行うものである。今実験に使用したアクアポリンサブタイプに対する各々の一次抗体の一覧、二次抗体は表 1 に示している。

耳管組織を含むパラフィン切片を、60°Cで 15 分加熱、その後 5 分間冷却し、抗原性賦活化処理を行った。続いてキシレンによる脱パラフィン処理とエタノール系列による再水和処理を行い、0.01M PBS (pH 7.2) に浸漬・洗浄した。続いて内因性免疫グロブリンによる非特異的反応の防止目的に、二次抗体の宿主動物と同じ生物種であるヤギ血清に常温 1 時間浸漬した。1%ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin)で希釈した一次抗体を、常温 12 時間、標本に反応させた。抗体の希釈倍率は 1:50 から 1:1600 の間で調整した。続いて 0.01M PBS (pH 7.2) で 4 回洗浄後、二次抗体に浸漬し常温 30 分反応させた。

0.01M PBS で 3 回洗浄後、ジアミノベンチジンによる酵素反応発色を常温 10 分間行い、蒸留水で 2 回洗浄した。エタノール系列で脱水、キシレンで透徹後、プレパラートを封入し、光学顕微鏡(keyence 社、BZ900)により観察を行った。

## 2 シェーグレン症候群患者と耳管開放症に関する検討

1 対象:当病院、血液・免疫内科通院中のシェーグレン症候群の患者 54 名(男性 5 名、女性 49 名、平均年齢 50.7 歳)を対象に、耳管開放症罹患の有無を検討した。

2 スクリーニング:まずスクリーニングとしてアンケート調査を実施し、アンケートでは耳管開放症に特徴的な a)耳閉感 b) 自声強聴 c) 呼吸音聴取の有無と程度 d) 体位変化による症状の変化に焦点をおき調査を実施した。アンケートによる有症状者に対しては 2 次検診を行った。実際に使用したアンケートの調査内容を図 2 に示している。

3 二次検診:二次検診では、改めて耳鼻科医による問診をおこなった後、ティンパノメトリー(外耳道圧を変化させ、アブミ骨筋の反射的な収縮を、鼓膜の音響抵抗(インピーダンス)の変化として記録して、音の伝わり具合を調べる。)、顕微鏡下の鼓膜観察、耳管機能検査を行い、耳管開放症をはじめとする耳疾患の診察を行った。耳管開放症の診断は、これまでに行なった耳管開放症検診の診断基準に準じ<sup>17)</sup>、耳閉感、自声強聴、呼吸音聴取、体位による変化、鼓膜の呼吸性動揺、鼻すすりをさせ鼓膜の動揺の有無、バルサルバ(鼻咽腔を閉鎖し中耳腔を陽圧にする手技)

後にすぐに中耳腔陽圧が解除される所見、そして耳管機能検査結果などを元に評価した。

自覚症状の他に鼓膜の呼吸性動揺の認められるものを耳管開放症確実例、鼓膜の呼吸性動揺は認めないがその他の鼓膜所見、エピソード、耳管機能検査[a 耳管鼓室気流動態法：tubo-tympano-aerodynamic graphy (TTAG 法)、b 音響耳管法 (sonotubometry)] で陽性所見を認めるものを疑い例として診断した。

(耳管機能検査には、耳管機能検査装置 (RION JK-04) を用いて検査を行った。)

耳管機能検査は主に 2 種類の検査法で行い、

- a) 耳管鼓室気流動態法(tubo-tympano-aerodynamic graphy : TTAG 法) : TTAG 法では、鼻咽腔側の圧変化を外耳道に設置した圧トランスデューサーを用いて、中耳側への伝達を観察した。鼻すすりや深呼吸による鼻咽腔圧の変化に同期した圧変化が外耳道圧の動揺として観察された場合、開放耳管と診断とした。
- b) 音響耳管法 (sonotubometry) : 音響耳管法では、鼻咽腔側にプローブ音を提示しておき、外耳道に設置したマイクで計測される音圧が、嚙下により引き起こされる耳管開大時に増加することを指標に、耳管機能を評価する。嚙下によりいったん耳管が開大した後、閉鎖し難い所見や、耳管開放持続時間の延長がみられた場合、開放耳管と診断した。尚、本検査では、鼻腔提示プローブ音の音圧が、外耳道マイクロフォンレベルで一定になるように音圧調整されるが、鼻咽腔から中耳側への易伝達性のため、プローブ音の設定が低レベルになる場合も開放耳管と診断した。

## 第V章

## 研究結果

### 1-a マウス耳管の構造

マウス耳管のパラフィン切片矢状断の Hematoxyline-Eosin 染色像を図 3 に示す。

ヒト耳管の構造と比較すると、マウスの耳管軟骨は発達が少なく内側板が存在しないことや、耳管内腔の下方ではより粘膜上皮の襞が少ない傾向にあるといった特徴がある。また、耳管の内腔を被う多列線毛円柱上皮の深部には、漿液腺がやや優位な配列で粘液腺と混在している混合腺の存在が確認された。

### 1-b マウス耳管におけるアクアポリンの発現様式

今回の免疫組織化学的検討では、マウス耳管周囲組織において、4 種類のアクアポリンサブタイプ (aquaporin-1, 3, 4, 5) の発現が確認された。

アクアポリンサブタイプと耳管周囲組織の発現部位の要約は表 2 に示している。

アクアポリン-1 の発現様式は、図 4a (弱拡大)、4b (強拡大)、4c スキームで示した。

結合組織系細胞の線維芽細胞に強く、軟骨細胞は中程度のアクアポリン-1 の発現を認め、また一部の毛細血管内皮細胞に弱い染色性が認められた。スキームでは、図 3 のマウス耳管のパラフィン切片矢状断の Hematoxyline-Eosin 染色像に対応してアクアポリン-1 の発現部位を示している。(水色)

アクアポリン-3 の発現様式は、図 5a (弱拡大)、5b (強拡大)、5c スキームで示した。

上皮細胞の基底側細胞膜にアクアポリン-3の強い発現を認めた。同様にスキームでは、青色で発現部位を示している。

アクアポリン-4の発現様式は、図 6a (弱拡大)、6b (強拡大)、6c スキームで示した。

上皮細胞の基底側細胞膜に aquaporin-4 の強い発現を認めた。スキームでは、緑色で発現部位を示している。

アクアポリン-5の発現様式は、図 7a (弱拡大)、7b (強拡大)、7c スキームで示した。

粘膜上皮細胞の頂面細胞膜にアクアポリン-5の強い発現を認められ、粘膜上皮細胞の漿液腺細胞の頂面においては中程度の発現が認められた。スキームでは、黄緑色で発現部位を示している。また、今実験の Maus 耳管周囲において粘液腺細胞には、いずれのアクアポリンサブタイプは有意な発現は認められなかった。

図 8 は、今実験で発現を認めたすべてのアクアポリン 1,3,4,5 の発現様式を、図 3 の Maus 耳管のパラフィン切片矢状断の Hematoxyline-Eosin 染色像のスキームに示している。

表 2 は、Maus 耳管周囲組織において発現が確認されたアクアポリン - 1,3,4,5 の 4 種類のサブタイプごとに発現部位での発現の様子を 4 段階で評価し明記している。

## 2 シェーグレン症候群と耳管開放症

対象の性別、年齢分布を図 9 に示す。57 名中、男性 4 名、女性 53 名で、80%以上の症例が 40 歳以上と中年以降の女性に多い結果であった。

これらの患者に対するアンケート調査で、耳管開放症を疑う耳閉感、自声強聴、呼吸音聴のいずれかの症状を有する症例は 13 例であった。図 10 では 13 症例の各自覚症状の内訳を示す。耳閉感 12 例(22.2%)、自声強聴 8 例(14.8%)、呼吸音聴取 5 例(9.2%)となり、さらに二次検診で診察したところ、これらの自覚症状のある 13 症例中、耳管開放症確実例が 3 例、耳管開放症疑い例が 3 例診断された。その他の 7 例は、滲出性中耳炎 1 例、感音難聴 1 例、異常無し 5 例であった。

以下に、実際の代表的な症例を提示する。

症例：69 歳 女性 シェーグレン症候群

2001 年よりシェーグレン症候群の診断にて東北大学病院血液・免疫科通院加療をしていた。1994 年頃より、左耳に耳閉感、自声強聴、呼吸音の聴取を自覚し、鼻すすりをすることで症状が一時的に軽減するため、そのまま様子を見ていた。

今回、当施設でシェーグレン症候群患者を対象としたアンケート調査を行い、アンケートの結果で耳管開放症の可能性があり、2 次検診の目的で当科を受診となった。

初診時所見として、鼓膜所見にて左鼓膜の呼吸性動揺を認めた。オトスコープにて呼吸音聴取が確認された。ティンパノグラムは両耳とも A 型であり、聴力検査で他の耳疾患を疑わせる難聴等も認めなかった。

耳管機能検査では音響耳管法（Sonotubometry）で左耳管開放時間の延長所見を認められたが（図 11）、耳管鼓室気流動態法（TTAG 法）では、明らかな耳管開放所見を認められなかった。

以上より左耳管開放症の診断のもと、鼻すすり癖の中止の指導、ならびに生理的食塩水点鼻療法を開始し、治療後 2 週頃より自覚症状が改善した。（図 11）

## 第VI章

## 考察

### 1 マウス耳管におけるアクアポリンの発現様式

マウス耳管におけるアクアポリンの発現と、アクアポリン-1, 3, 4, 5 の 4 種類のサブタイプがそれぞれに特異的な部位に発現していることが判明した。その他のアクアポリンサブタイプについても同様の実験を行い検討したが、アクアポリン-2, 6, 8、アクアグリセロポリン 7, 9 については耳管周囲組織に明確な発現は観察されなかった。

耳管粘膜上皮細胞においては、その頂面側にアクアポリン-5 が基底側面にアクアポリン 3 および 4 が豊富に発現していることが判明したことから、粘膜上皮の細胞内においてはアクアポリンを介在した活発な水分子の移動が行われているのが予測された。

耳管粘膜上皮下の細胞内においては、アクアポリン-1,5 の発現が認められた。

アクアポリン-1 は、耳管粘膜上皮下の周囲の結合組織系細胞を中心として繊維芽細胞に豊富に、軟骨細胞は中等度に、また一部の毛細血管内皮細胞に弱く発現していることが確認された。

アクアポリン-1 は Minami ら<sup>18)</sup>の報告では、ラットの標本であるが耳管と連続している中耳粘膜上皮下の繊維芽細胞と、毛細血管内皮細胞に、Kang ら<sup>19)</sup>は、ラット耳管粘膜上皮下の繊維芽細胞に発現したとの報告があり同一での文献ではないが我々の実験結果と一致するものであった。

アクアポリン-3 は耳管粘膜上皮の基底側細胞膜に発現を認めたが、Kang ら<sup>19)</sup>の

報告ではラット耳管周囲には発現が認められなかった。逆に **Kreda** ら<sup>20)</sup>によれば、ラット等の咽頭、気管上皮細胞に発現を認めたとの報告がある。ヒトでの実験においては消化管、表皮、腎、脳、唾液腺に豊富に発現が確認されていることや、唾液腺細胞では粘膜上皮基底側に発現が認められたとの報告もある。<sup>21)</sup> このことは、従来の水のみを選択的に透過する狭義のアクアポリンと水だけでなくグリセオールなどの低分子物質も透過することができるアクアグリセロポリンの二つのうち、アクアポリン-3 は後者のアクアグリセロポリンに該当し、水輸送以外にも多様な役割の存在が推測され生理的意義も不明な点も多いことなどが関与していることが予想された。

アクアポリン-4 については、粘膜上皮基底側細胞膜に、アクアポリン-5 は漿液腺細胞の頂面側に発現が認められたことは **Kang** ら<sup>19)</sup>と同様の結果であった。

しかし、アクアポリン-5 に関しては耳管粘膜上皮の頂面細胞膜にも発現を認めたことは、**Kang** ら<sup>19)</sup>の報告とは異なる結果で同部位の発現は認めなかったと述べている。我々の実験結果に関する正否は、さらに詳細な実験、考察が必要と思われた。

## 2-a シェーグレン症候群と耳管開放症について

今回の調査の結果、シェーグレン症候群患者 54 症例中 3 例に耳管開放症の存在を認め、その有病率は 5.5%であった。耳管開放症の発症頻度は、報告者によりかなりの違いがあり、**Zöllner**<sup>22)</sup>は 0.3%と報告したが、多い報告では、**Flisberg** ら<sup>23)</sup>、**Münker** ら<sup>24)</sup>はそれぞれ、102 人中 7%、181 人中 6.6%としている。後者 (**Flisberg**

ら、Münkerら)の報告は詳しい耳管機能検査を用いて検出したものであるため、有病者が多すぎるという印象があり、一般的にはZöllner<sup>22)</sup>のものが妥当と考えられてきた。

当科では、以前に高齢者、一般事務職場、小・中学生を対象に(総数1982人)、今回とほぼ同様の方法(アンケートで有症者を選別し、二次健診で診断)、判定基準を用いて耳管開放症の有病率の調査を行ったことがある。全体の有病率は0.6%であったが、群間で多少の差があり、それぞれの群の有病率は、高齢者5/972(0.5%)、職場3/158(1.9%)、小・中学生3/852(0.4%)であった。そこで、シェーグレン症候群における耳管開放症の有病率と、これらの検診での耳管開放症の有病率を比較すると一般事務職場における有病率とは有意の差を認めなかったが、高齢者群、小・中学生群とは、統計学的にも有意に高い有病率であった( $\chi^2$ 二乗検定:  $p < 0.01$ )。

年齢構成や性別構成が異なるため考察には慎重を要するが、シェーグレン症候群における耳管開放症の頻度が高い可能性が示唆された。

シェーグレン症候群の患者に耳管機能異常については、近年、多田ら<sup>16)</sup>が耳管機能検査装置を用いて16例を対象に検討した結果を報告している。対象が20名以下であること、実際に症状を呈する耳管開放症での有病率の検討ではなかったため、今回の結果と直接比較することはできないがシェーグレン症候群が耳管開放症発症の寄与要因の一つになり得ることを支持する報告であると思われる。

一方、耳管腔の湿潤と耳管開放症という観点においては、薬物治療法の一つである

生理的食塩水の点鼻療法は、Shambaugh<sup>25)</sup>によって 1938 年に初めて提唱され、その後、吉田ら<sup>19)</sup>による症例報告が散見されているが検証は行われていない現況である。

当科、耳管外来でも耳管開放症と診断された 41 症例に対し生理的食塩水の点鼻療法のみでの治療を行った結果、34 症例(83%)で症状のコントロール可能であったという結果が得られた。生理的食塩水の点鼻療法の効果発現の機序には、不明な点もあるが生理的食塩水の耳管内腔への流入による内腔の狭小化や内腔の湿潤が考えられている。<sup>26)</sup>

今回、検診で診断されたシェーグレン症候群患者の耳管開放症は、比較的軽症例が多く提示した症例のように、生理食塩水の点鼻療法が有効な症例が多かった。一般に、生理的食塩水の点鼻療法は、比較的軽症の高齢者で有効な傾向があることが臨床経験的に知られており高齢者が一般的に分泌腺の分泌能が低下することを考慮すると、点鼻療法の効果発現がシェーグレン症候群に伴う耳管開放症との共通のメカニズムが存在し得る可能性も示唆された。

## 2-b シェーグレン症候群とアクアポリンの関係からの考察

ヒト唾液腺において分布しているアクアポリンサブタイプは、アクアポリン-1, 3, 5 が確認されており、その他のアクアポリン-4, 6, 7, 8 の分布は確認されていない。<sup>27)</sup> アクアポリン-1 に関しては、初期のシェーグレン症候群の患者と健常者の唾液腺細胞の筋上皮細胞の比較において、シェーグレン症候群の患者で、アクアポリン-1 の発

現の減少が認められたが血管内皮細胞では変化がなかったとの報告がある。<sup>28, 29)</sup>

アクアポリン-3はGreszら<sup>21)</sup>によれば、健常者において唾液腺の粘液腺、漿液腺細胞の基底側に免疫組織学的にのみ発現がみられた報告があるが、その後の文献で唾液分泌、唾液腺に関係しているとの報告がない。また、Beroukasら<sup>27)</sup>によると、健常者とシェーグレン症候群の患者の唾液腺細胞では免疫組織学的に発現の変化がなかったとの報告もあり、アクアポリン-3とシェーグレン症候群の病因との関連は不明となっている現況である。

Steinferdら<sup>30)</sup>がシェーグレン症候群によって口腔内乾燥が出現している症例における小唾液腺の免疫組織学的実験では、アクアポリン-5は腺房細胞の基底側細胞膜に発現し、口腔内乾燥症状のある健常者では、逆に腺房細胞の頂面側に発現していることを報告した。さらにTsubotaら<sup>14)</sup>は、ヒト涙腺におけるアクアポリン-5の遺伝子異常がシェーグレン症候群に存在しているとの報告をした。その後もアクアポリン-5は検証が行われているが、健常者との発現様式(局在部位)の違いや、アクアポリン-5の異常がなぜ出現するのかは解明されていない現況である。唾液腺の唾液分泌に関する研究解明は進んでおり、唾液分泌制御としてのアクアポリン-5は、唾液腺細胞の腺上皮頂面(管腔膜側)に豊富に局在していることは確認されている。<sup>21)</sup>

唾液分泌は自律神経系の制御を受けているためM<sub>3</sub>ムスカリン受容体からの刺激を受けると唾液腺内でダイナミックにアクアポリン-5が変動することは解明されている。

31)

また、ラットにおける角膜上皮、唾液腺におけるアクアポリン-5の免疫組織学的検討も過去に行われているが、腺腔上皮細胞の頂面細胞膜側、腺房上皮細胞の頂面細胞膜・基底側細胞膜、漿液腺細胞に発現するとのさまざまな報告があり結論は出ていない。<sup>32), 33)</sup>

唾液腺の機能が低下傾向にある高齢者やシェーグレン症候群の患者には、水代謝に関連した何らかの機能異常が予想される。そのことが解明されることにより、耳管には耳管腺が存在していることから考慮すると、耳管機能不全の病態や、耳管開放症に対する一つの治療法とされる生理的食塩水点鼻療法の有効性などの研究に役立つものと考察された。

### 3 耳管開放症と耳管の水代謝について

今回、我々は耳管粘膜にアクアポリンの発現を確認することができた。このことは、耳管粘膜において水移送が豊富に行われことを示唆するものである。アクアポリンの存在は、存在していない細胞、器官に比べ水分子をより効率よく供給されることを意味し耳管粘膜にとって非常に重要である。

アクアポリン-5の遺伝子異常で、シェーグレン症候群患者においてドライアイが出現することが発見された。この事と、シェーグレン症候群患者に当科で行った調査で耳管開放症の有病率とが我々の行った一般検診群に比べ統計学的に有意に高かったことを考慮すると、耳管開放症においてもアクアポリンの機能異常、もしくは耳管腺

の分泌障害等がある可能性が考えられるが詳細は今後の研究課題である。

耳管開放症の病因は未だに解明されていないが、耳管が正常の機能を保持するためには粘膜が湿潤状態である環境が不可欠であり、耳管機能が正常ではない閉鎖不全の耳管の環境下では、何らかの水代謝の異常が起きていることが予想される。

## 第VII章

## 結論

- 1) 耳管における水分調節に注目し、マウス耳管周囲におけるアクアポリンサブタイプの発現様式を免疫組織化学的に検討した。その結果、マウスの耳管周囲組織においては、4種類のアクアポリンサブタイプ (aquaporin-1, 3, 4, 5) の発現が局在特異性をもって確認された。
- 2) 耳管粘膜上皮細胞では、その頂面にアクアポリン-5 が、基底側面にアクアポリン-3 および4 が豊富に発現しており、粘膜上皮細胞内においてアクアポリンを介在し活発な水分子の移動が行われているのが予測された。
- 3) 耳管粘膜上皮細胞内では、アクアポリン-1, 5 の発現が認められた。アクアポリン-1 は、結合組織系細胞を中心として繊維芽細胞に豊富に、軟骨細胞は中等度に、また一部の毛細血管内皮細胞に弱く発現していた。
- 4) アクアポリン-5 は、漿液腺細胞にも豊富に発現していることが判明したが、粘液腺細胞にはいずれのアクアポリンサブタイプは有意な発現は認められなかった。
- 5) アクアポリンの異常とも関連が深いとされる、シェーグレン症候群の患者 54 症例を対象に、耳管開放症の合併頻度を検討した。耳管開放症確実例を 3 例認め (有病率 5.5%)、我々の施設で行った一般検診における耳管開放症の有病率と比較しても高頻度であることが示唆された。
- 6) 耳管開放症は、耳管のもともとの開きやすさ (素因) と複数の付加要因 (誘因) によって発症するものと考えられているが、今回の結果は、耳管におけるアクアポリ

ンの機能異常が、耳管開放の寄与要因になり得ることを強く示唆するものと思われた。

また、アクアポリンのサブタイプによっては、まだよく解明されていない領域もあり我々の実験結果に関しての正否は、さらなる詳細な実験と検証が必要であるがそのことがさらなる耳管開放症の病因究明の手掛かりになるものと思われた。

## 第Ⅷ章

## 文献

- [1] 山藤 勇 : 臨床医のための側頭骨・耳管アトラス. 金原出版, 1998
- [2] 小林 俊光: 耳管閉鎖障害の臨床. 宿題報告, 2005
- [3] 守田 雅弘: 耳管開放症—臨床像と病態—. JOHNS 12 : 374-382, 1996
- [4] Perlman HB : The eustachian tube : Abnormal patency and normal physiologic state. Arch Otolaryngol 30 : 212-238, 1939
- [5] Weissman A, Nir D, Shenhav R, Zimmer EZ, Joachims ZH, Danino J : Eustachian tube function during pregnancy. Clin Otolaryngol 18 : 212-214, 1993
- [6] Agre P: Clinical relevance of basic research on red cell membrans. Cln Res 40 : 176-186, 1992
- [7] Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P : Appearance of water channels in xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein. Science 256 : 385-387, 1992
- [8] Nozaki K, Ishii D, Ishibashi K : Intracellular aquaporins: clue for intracellular water transport? Pflugers Arch – Eur J Physiol 456 : 701-707, 2008
- [9] R Zardoya : Phlogeny and evolution of the major intrinsic protein family. Biol Cell 97 : 397-414, 2005

- [10] Kozuno D, Yasui M, King.L.S, Agre P : Aquaporin water channels:atomic structure and molecular dynamics meet clinical medicine. *J. Clin. Invest.* 109 : 1395-1399, 2002
- [11]Francis P, Chung JJ, Yasui M, Berry V, Moore A, Wyatt MK, Wistow G, Bhattacharya SS, Agre P: Functional impairment of lens aquaporin in two families with dominantly inherited cataracts. *Hum Mol Genet* 9 : 2329-2334, 2000
- [12] Deen PMT, Verdijk M, Knoers NVAM, Wieriga B, Monnens LAH, Van Os CH, Van Oost BA : Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* 264 : 92-95, 1994
- [13] Mulders SM, Bichet DG, Rijss JPL, Kamsteeg E-J, Arthus M-F, Longergan M, Fujuwara M, Morgan K, Leijiendekker R, Van der Sluijs P, van Os CH , Deen PMT : An aquaporin -2 water channel mutant which causes autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidud is retained in the golgi comlex. *J Clin Invest* 1021 : 57-66, 1998
- [14] Tsubota T, Hirai S, King LS : Defective cellular trafficking of lacrimal gland Aquaporin-5 in Sjögren's syndrome. *Lancet* 357 : 688-689, 2001

- [15] Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, Nakashima I, Weinshenker BG : A serum autoantibody marker in neuromyelitis optica : distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 364 : 2106-2112, 2004
- [16] 多田直樹, 南 豊彦, 中川のぶ子, 小野あゆみ, 井野千代徳, 金子明弘, 山下敏夫 : Sjogren 症候群と耳管疾患. *Otol Jpn* 13 : 314, 2003
- [17] 小林 俊光: 耳管開放症・閉鎖不全の検査. *耳鼻臨床* 93 : 897-907, 2000
- [18] Minami S, Kobayashi H, Yamashita A, Yanagita T, Uezono Y, Yokoo H, Shiraishi S, Saitoh T, Asada Y, Komune S, Wada A : Selective expression of aquaporin 1, 4 and 5 in the rat middle ear. *Hear Res* 58 : 51-56, 2001
- [19] Kang SH, Chang KH, Ohcho S, Lee HY, Cha K, Moon SK, Andalibi A, Lim DJ: Expression of water channel proteins (aquaporins) in the rat Eustachian tube and middle ear mucosa. *Acta Otolaryngol* 127 : 687-692, 2007
- [20] Kreda SM, Gynn MC, Fenstermacher DA, Boucher RC, Gabriel SE: Expression and localization of epithelial aquaporins in the adult human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24 : 224-234, 2001

- [21] Gresz V., T. H. Kwon, P.T. Hurley, G. Varga, T. Zelles, S. Nielsen, R.M. Case, M.C. Steward: Identification and localization of aquaporin water channels in human salivary glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol G* : 247- 254, 2001
- [22] Zöllner I: Die klaffende Ohrtrumpete, Störungen dadurch und Vorschläge zu ihrer Behebung. *Z Hals-Nasen-Ohren heilkde* 42 : 287, 1937
- [23] Flisberg K, Ingelstedt S : Middle-ear mechanics in patulous tube cases. *Acta Otolaryngol Suppl* 263 : 18-22, 1970
- [24] Munker G, Pedersen P, Grundmann S: Eustachian tube function test in a hyperbaric chamber: registration using a differential manometer. *Arch Klin Exp Ohren Nasen Kehlkopfheilkd* 201(3) : 249-57, 1972
- [25] Shambaugh GE: Continuous open Eustachian tube. *Arch Otolaryngol* 27 : 420-425, 1938
- [26] 吉田 耕, 日野 剛, 今野 昭義 : 音響耳管機能検査で興味ある所見を呈した耳管開放症例. *耳喉頭頸* 71 : 293-296, 1999
- [27] Beroukas D, Hiscock J, Ganon BJ, Jonson R, Gordon TP, Waterman SA : Selective down-regulation of aquaporin-1 in salivary glands in primary Sjögren's Syndrome. *Lab. Invest* 82 : 1547-1552, 2002

- [28] Delporte C, Steinfeld S : Distribution and roles of aquaporins in salivary glands. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758 : 1061-1070, 2006
- [29] Delporte C : Aquaporins in Secretory Glands and their Role in Sjögren's Syndrome. *Handbook of experimental pharmacology* 190 : 185-201, 2009
- [30] Steinfeld S, Cogan E, King LS, Agre P, Kiss R, Delporte C : Abnormal distribution of aquaporin-5 water channel protein in salivary glands from Sjögren's syndrome patients. *Lab.Invest.* 81 : 143-148, 2001
- [31] Ishikawa Y, Ishida H: Aquaporin Water Channel in Salivary Glands. *Jpn. J. Pharmacol* 83 : 95- 101 , 2000
- [32] Matsuzaki T, Tajika Y, Suzuki T, Aoki T, Hagiwara H, Takata K  
: Immunolocalization of the water channel, aquaporin-5, in the rat digestive system. *Arch Histol Cytol* 66 : 307- 315, 2003
- [33] Funaki H, Yamamoto T, Koyama Y, Kondo D, Yaoita E, Kawasaki K, et al  
: Localization and expression of AQP5 in cornea serous salivary glands and pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 275: 1151- 1157, 1998
- [34] Verkman AS, Alok K Mitra: Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F13- 28, 2000

## 第IX章

## 付図

図 1：ヒトにおける耳管開大圧の分布と耳管開放症の誘因(概念図)。

(小林ら<sup>2)</sup>より引用)

- ・ 正常人における耳管開大圧の分布(概念図)。正常人の耳管開大圧には素因といえる個人差がある。(上図)
- ・ 誘因が加わると、通常は症状のない人も耳管開大圧が低くなり(耳管が緩くなり)耳管開放症を発症する。(下図)

図 2：実際に使用した当病院(血液・免疫内科)通院中のシェーグレン症候群患者にアンケート調査として使用した調査票を示す。この調査票で有症者には二次検診を行っている。当科では、同様にアンケート調査を高齢者、一般事務職場、小・中学生にも行っている。

図 3：耳管が確認できるマウス頭部の矢状断標本のパラフィン切片の Hematoxyline - Eosin 染色像である。

ET(eustachian tube): 耳管、CA(cartilage): 耳管軟骨、SG(serous glands): 漿液腺、MG(mucous glands): 粘液腺、MU(muscles): 筋組織。

図 4-a, b, c：耳管周囲組織におけるアクアポリン-1(AQP 1)の局在。

図 4-a(弱拡大)、4-b(強拡大)、4-c スキーム。スキームではアクアポリン-1 は、水色の部分で示す。

耳管上皮下に存在する線維芽細胞 (→) に強い発現が一部の毛細血

管内皮細胞 (→ 灰色) に弱い染色を認める。\* : 耳管内腔; 黒矢尻 : 耳管軟骨。倍率は、標本写真右下方に基線で示し 50 $\mu$ m である。

図 5-a, b, c : 耳管周囲組織におけるアクアポリン-3 (AQP 3) の局在。

図 5-a(弱拡大)、5-b(強拡大)、5-c スキーム。スキームではアクアポリン-3 は、青色の部分で示す。

耳管内腔 (\*) を取り囲む上皮細胞の基底側細胞膜 (→) に強い発現を認める。黒矢尻 : 耳管軟骨。倍率は、標本写真右下方に基線で示し 50 $\mu$ m である。

図 6-a, b, c : 耳管周囲組織におけるアクアポリン-4 (AQP 4) の局在。

図 6-a(弱拡大)、6-b(強拡大)、6-c スキーム。倍率は、標本写真右下方に基線で示し 50 $\mu$ m である。スキームではアクアポリン-4 は、緑色の部分で示す。

耳管内腔 (\*) を取り囲む上皮細胞の基底側細胞膜に極めて強い発現を認める (→)。黒矢尻 : 耳管軟骨。

図 7-a, b, c : 耳管周囲組織におけるアクアポリン-5 (AQP 5) の局在。

図 7-a(弱拡大)、7-b(強拡大)、7-c スキーム。倍率は、標本写真右下方に基線で示し 50 $\mu$ m である。スキームではアクアポリン-5 は、黄緑色の部分で示す。

耳管内腔 (\*) を取り囲む上皮細胞の頂面側の細胞膜 (→) に発現を

認める。漿液腺細胞(▶)に中等度の発現が見られる。

黒矢尻：耳管軟骨

図 8：図 3 のマウス耳管のパラフィン切片矢状断の Hematoxyline-Eosin 染色像に対応して作成したスキーム上に、耳管周囲組織に発現が確認されたアクアポリンサブタイプの特異的な局在を色別で示す。アクアポリン-1 は水色、アクアポリン-3 は青色、アクアポリン-4 は緑色、アクアポリン-5 は黄緑色として表記している。

図 9：東北大学病院血液・免疫科に通院中のシェーグレン症候群患者の対象の性別、年齢分布を示す。

57 名中、男性 4 名、女性 53 名で、80%以上の症例が 40 歳以上と中年以降の女性に多い結果であった。

図 10：耳管開放症の診断症例における自覚症状の内訳と診断症例の年齢分布を示す。

自覚症状の内訳は、耳閉感 12 例 12/54(22.2%)、自声強調 8 例 8/54(14.8%)、呼吸音聴取 5 例 5/54(9.2%)であった。(上図)

：耳管開放症の診断症例の年齢分布をグラフで示すと、耳管開放症の診断症例数が 13/57 例のうち 40-60 歳に耳管開放症確実例が存在した。これらは、我が国のシェーグレン症候群の発症年齢と一致していた。(下図)

図 11 : シェーグレン症候群患者における耳管開放症代表症例の検査記録、自覚症状の経過を示す。(上図)

- ・ 耳管機能検査では音響耳管法 (Sonotubometry) にて左耳管開放時間の延長所見を認めている。

( 図の矢印の部分で、右耳側の検査記録と比較して示している。)

- ・ 耳管鼓室気流動体法 (TTAG) では、明らかな耳管開放所見を認めていない。

: シェーグレン症候群患者における耳管開放症代表症例の自覚症状経過。

(下図)

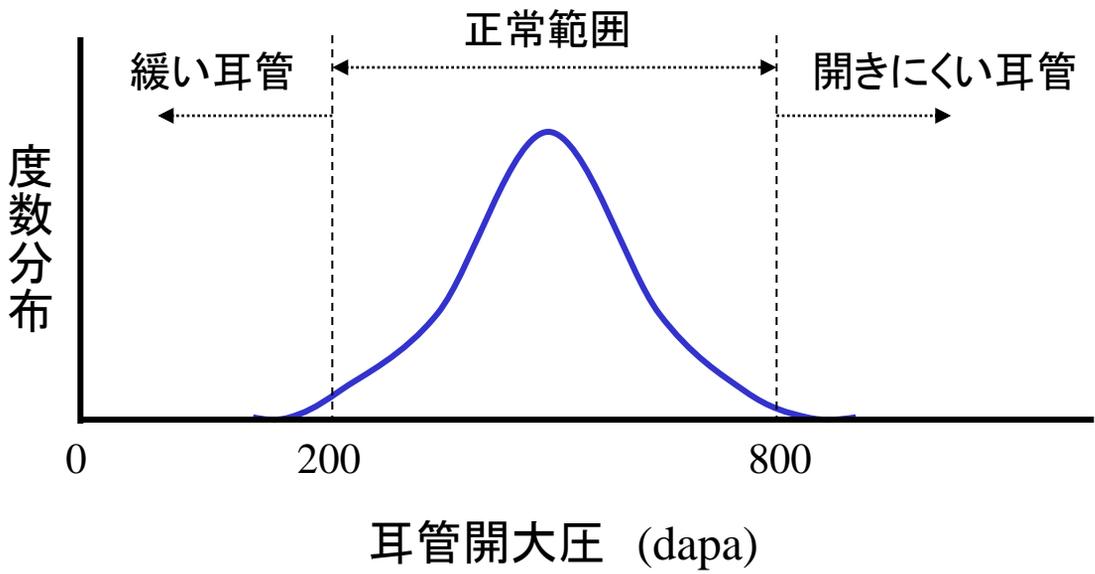
VAS (visual analog scale) スコアにて患者の自覚症状を評価し、耳管開放症の 3 症状のいずれも、治療 5 ヶ月後には軽減した。

## 第X章 付表

表1: 本研究1の実験に使用したアクアポリンサブタイプ(アクアポリン-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9)の一次抗体名とその販売元と製造番号。二次抗体の抗体名と販売元、製造番号を示す。

表2: マウス耳管周囲組織においてアクアポリン-1, 3, 4, 5の4種類のサブタイプでそれぞれ特異的な部位に発現していることが確認された。  
発現されたアクアポリンサブタイプ別に発現部位を明記している。  
また、発現の様子を4段階(++++) : strong expression, ++ : moderate, + : weak, - : none) で評価している。

A



B

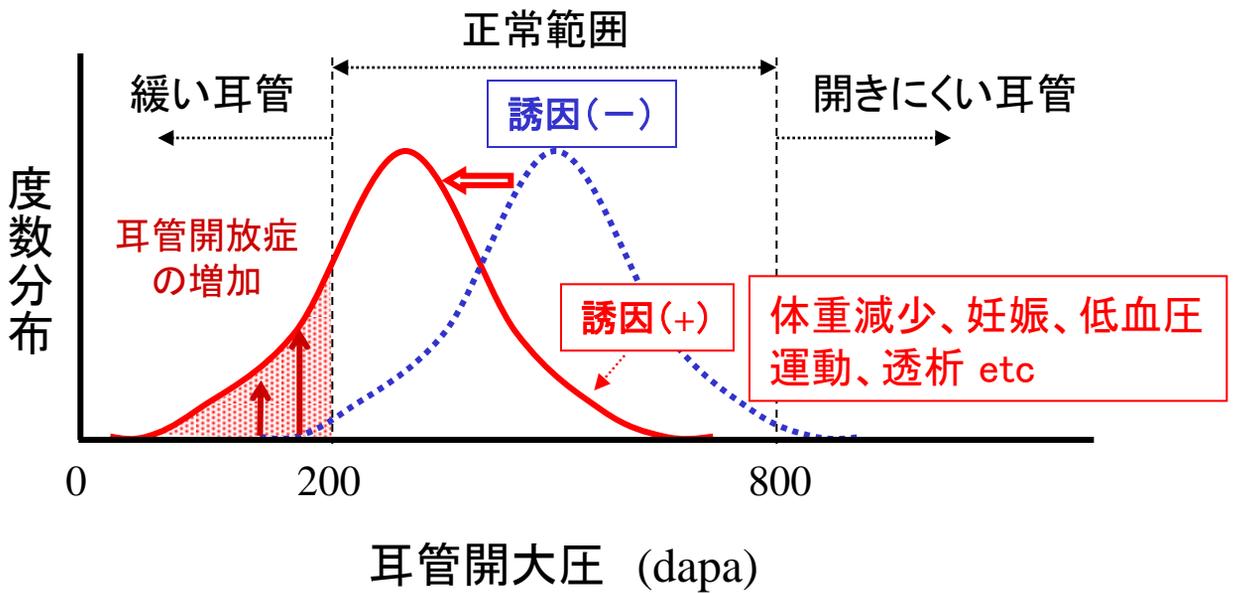


図1

当科では、耳管開放症の発生頻度について調査しております。  
よろしければアンケートにご協力ください。

1. 本日は 平成\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日
2. お名前 \_\_\_\_\_
3. 所属 \_\_\_\_\_
4. 生年月日 大正・昭和・平成 \_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日

◎あなたの耳の状態についてお答え下さい。

これまで以下のいずれかの症状がありましたか？

- ・耳がつまった感じ
- ・自分の声が耳に異常に響く
- ・自分の呼吸する音が耳に大きく響いて気になる

( ) ない → ご協力ありがとうございました。アンケート終了です。

( ) ある ↓

A. 「ある」とお答えになった方にうかがいます。

それはどちら側の耳ですか？ ⇒ (右、左、両方)

B. あった症状すべてに丸をつけてください。(いくつでも可)

( ) ①耳がつまった感じ

( ) ②自分の声が耳に異常に響く

( ) ③自分の呼吸する音が耳に大きく響いて気になる

C. その症状は立っているときに強く感じ、頭を下げたり、寝たりすることで楽になりましたか？

⇒ (はい、いいえ、わからない)

D. その症状の程度は？ ⇒ (わりと軽い、中くらい、気になるくらい重症)

E. その症状は

①いつ頃から始まりましたか？ ⇒ 平成\_\_\_\_年\_\_\_\_月頃から

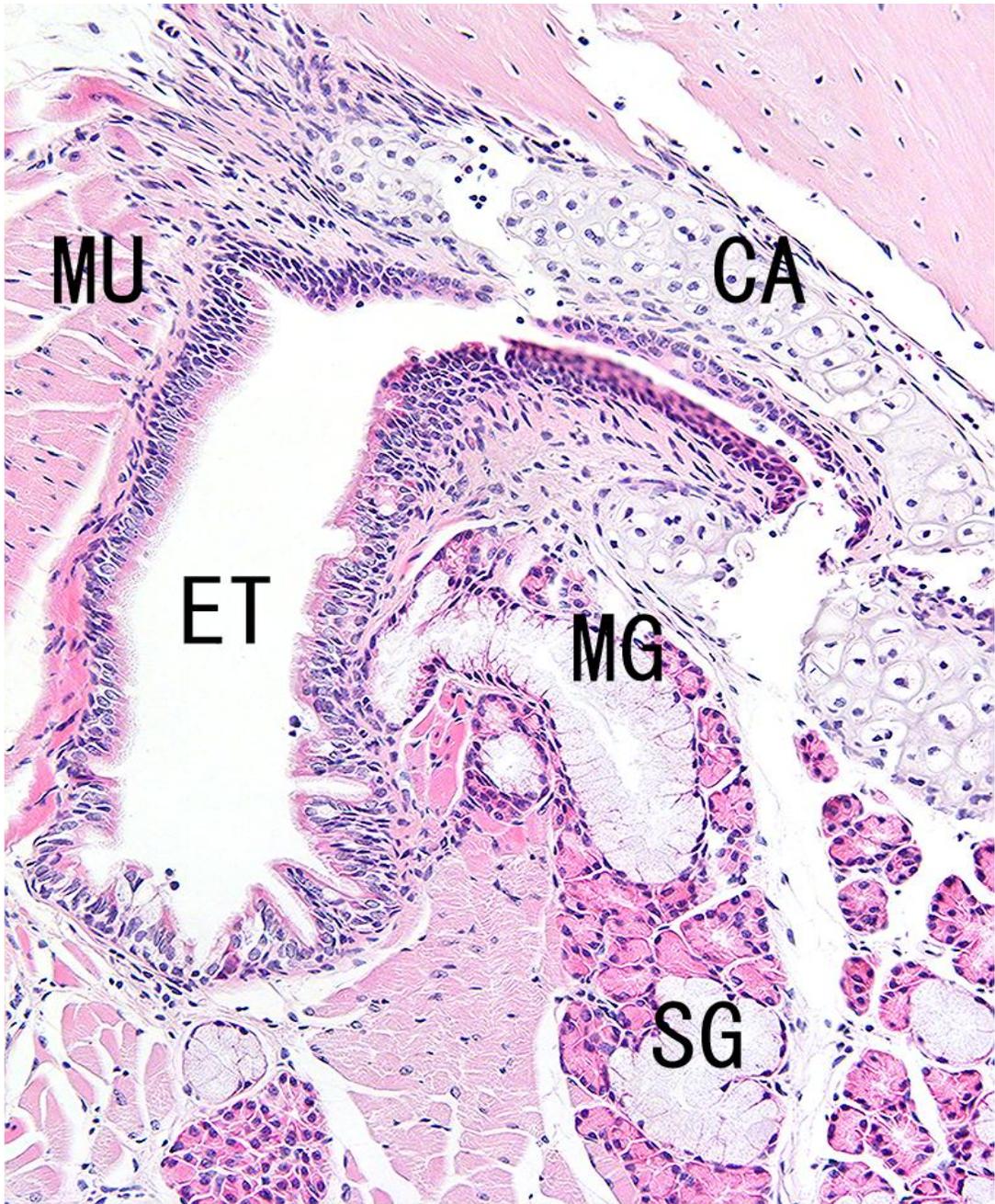
②いつ頃まで続きましたか？

⇒ ( ) 平成\_\_\_\_年\_\_\_\_月ごろまでであった

( ) 現在もある

ご協力ありがとうございました。

(東北大学耳鼻咽喉科、血液免疫科)



マウス耳管周囲組織のH.E標本  
ET:耳管 CA:耳管軟骨 SG:漿液腺  
MG:粘液腺 MU:筋組織

図3

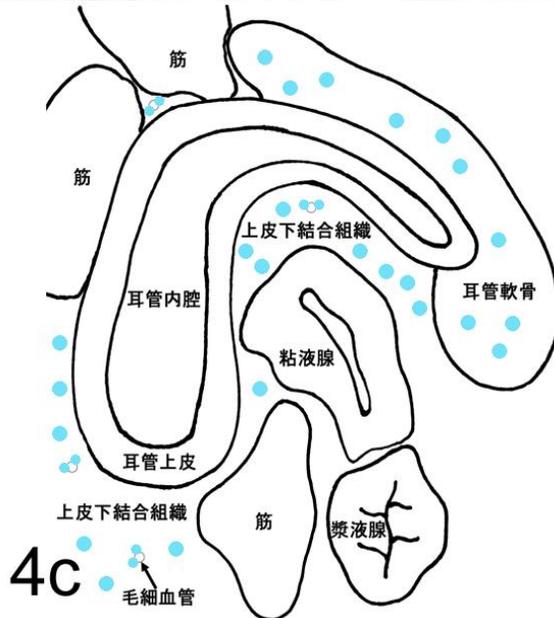
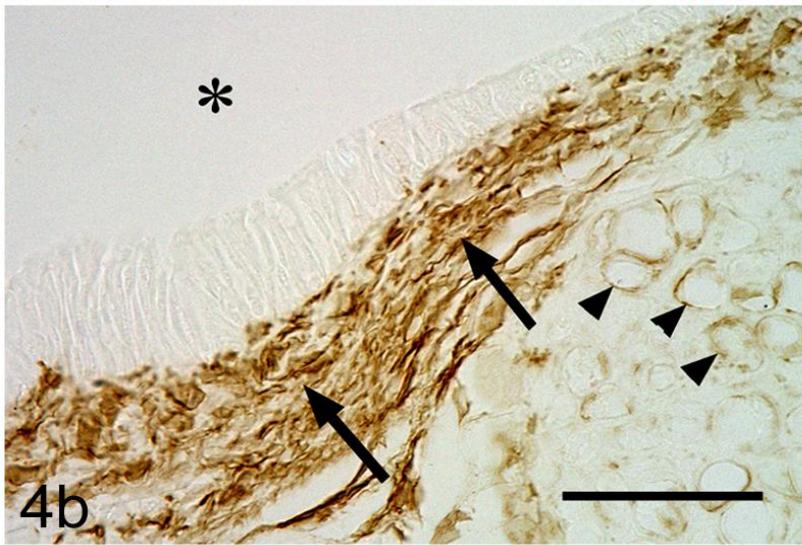
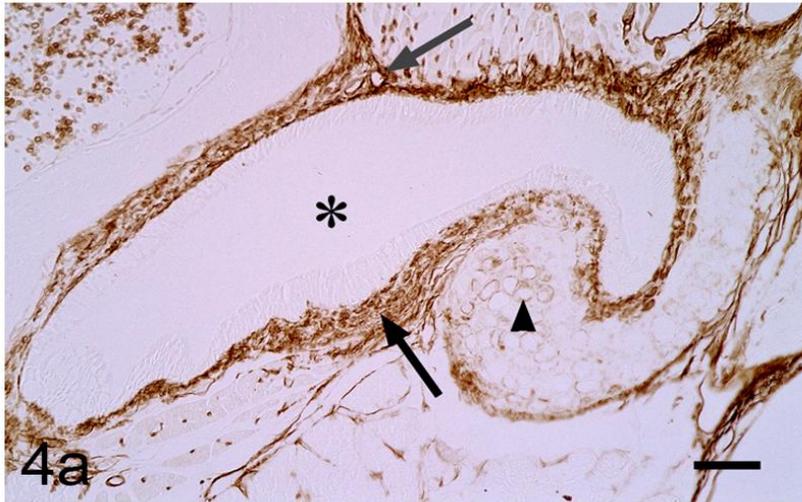


図4



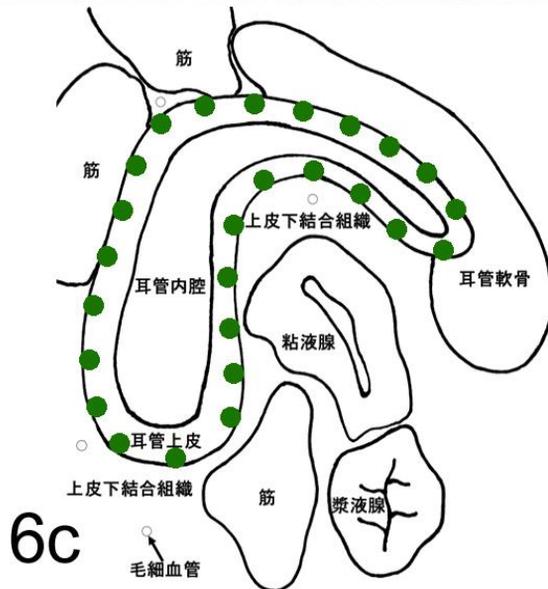
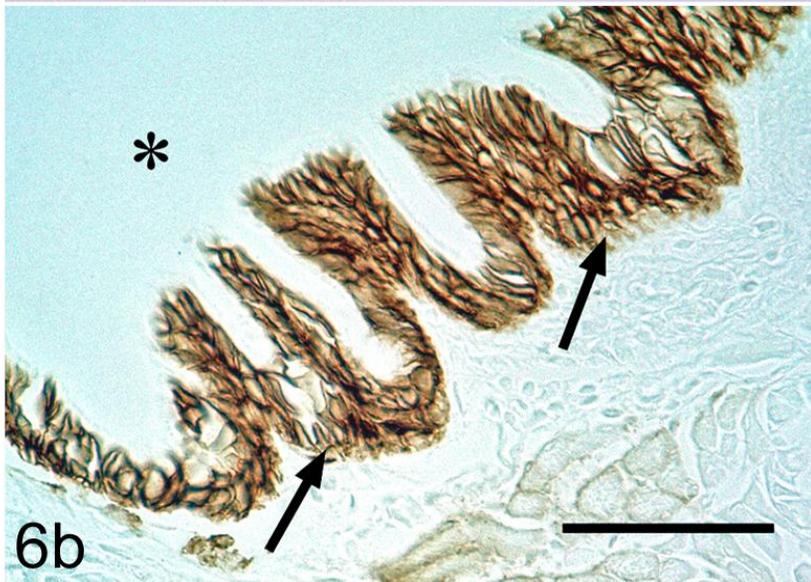


图6

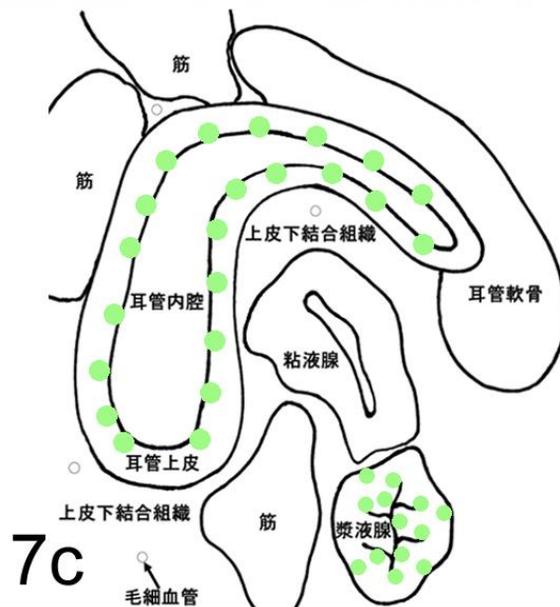
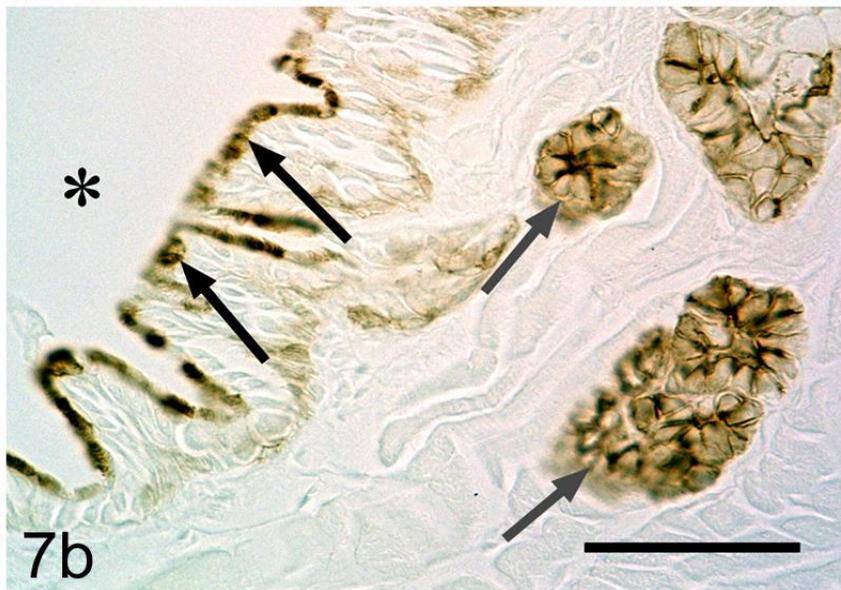


图7



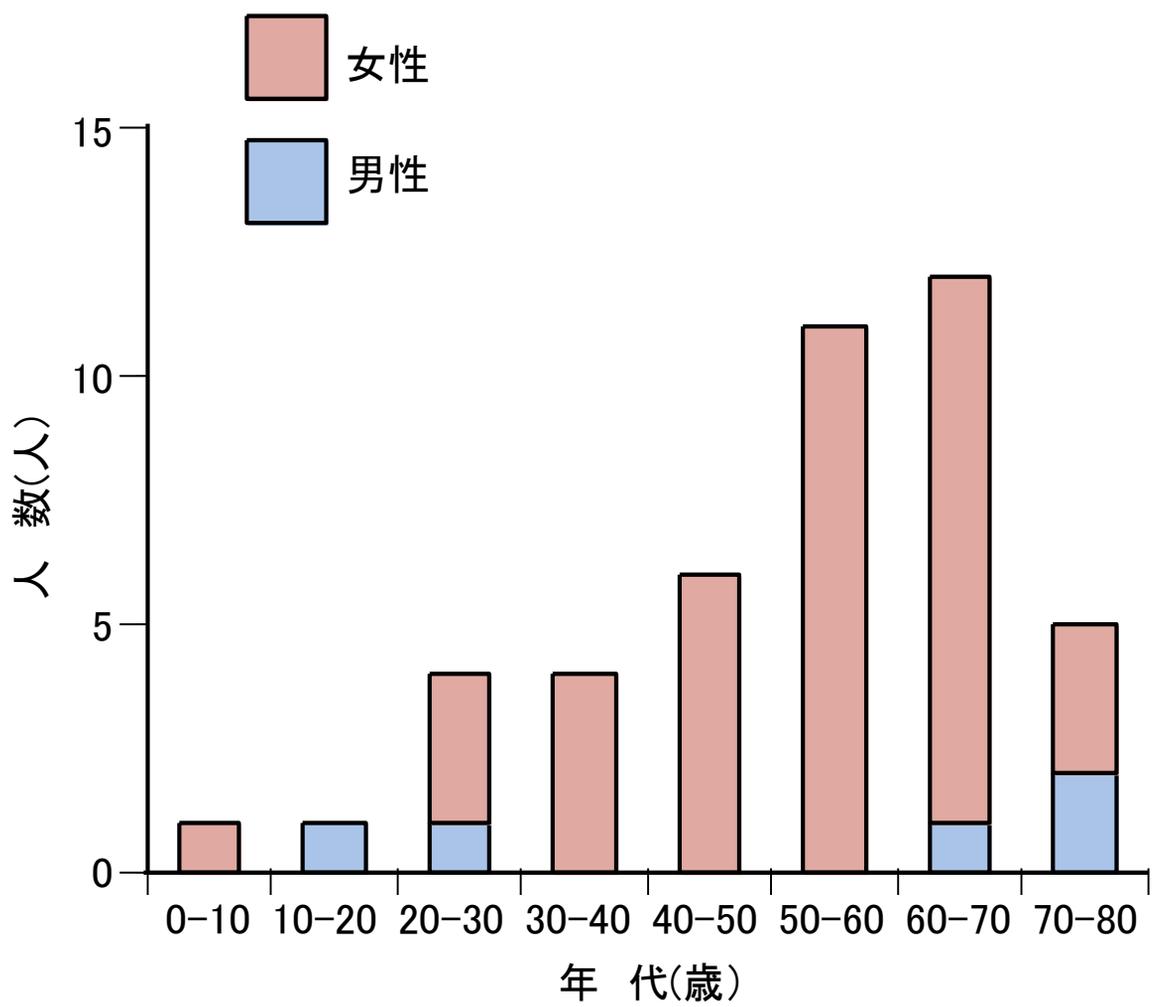
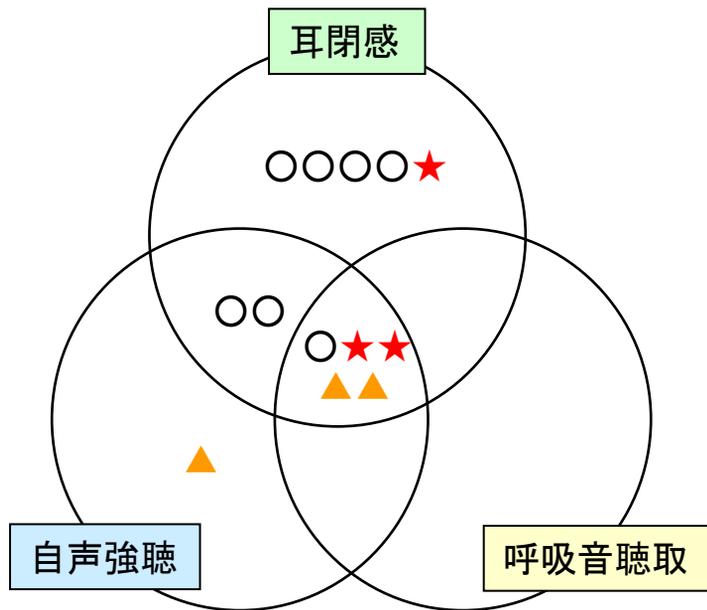


图9



対象：自覚症状のあった13例

耳管開放症：★ 3例

耳管開放症疑い：▲ 3例

開放所見なし：○ 7例

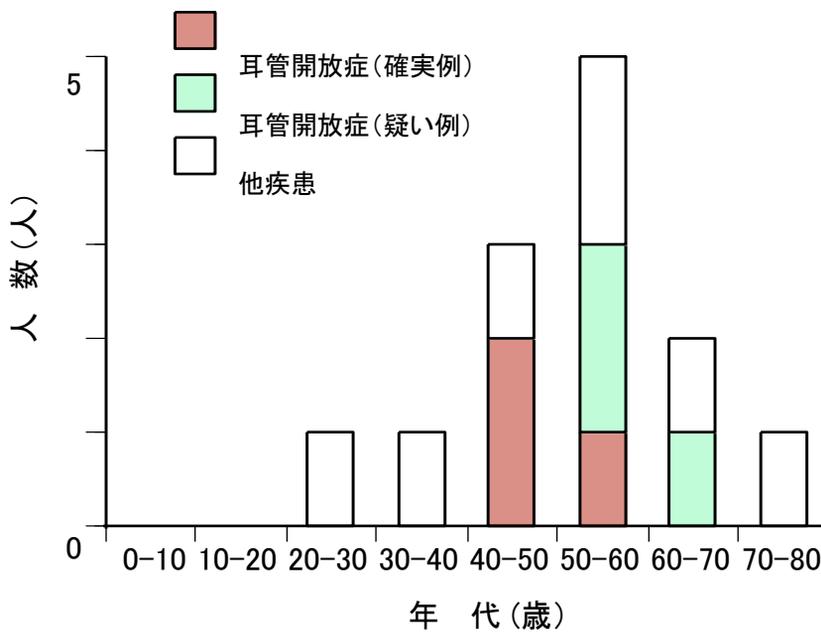
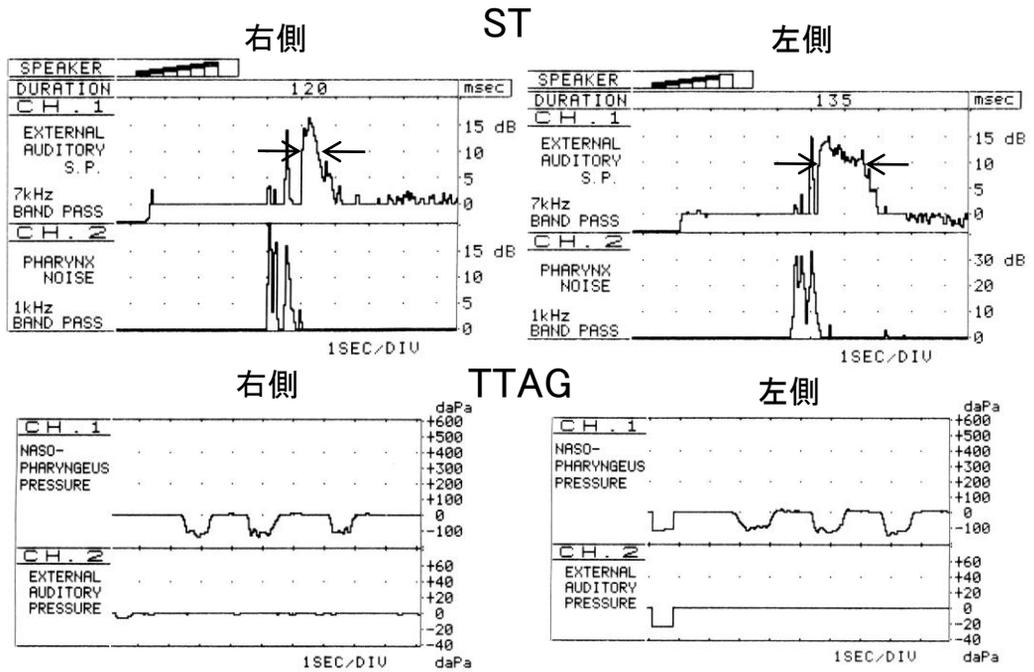


図10

耳管機能検査所見(初診時)



自覚症状の推移

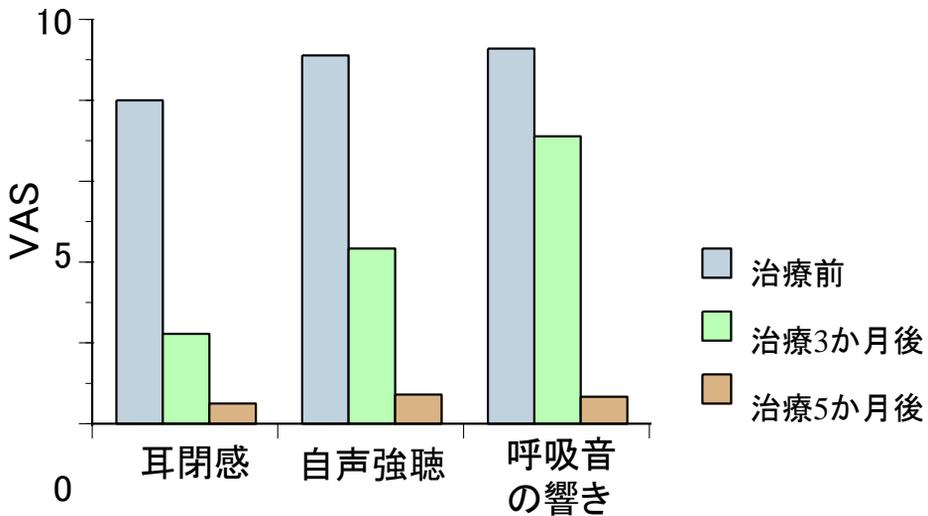


図11

種類	抗体名	販売元、#Lot number
一次抗体 (すべて家兎 由来のポリク ローナル抗体)	Anti-mouse aquaporin 1	CHEMICON, USA, #20080862
	Anti-mouse aquaporin 2	almone labs . , Israel, #AN-03
	Anti-mouse aquaporin 3	almone labs. , Israel, #AN-02
	Anti-mouse aquaporin 4	almone labs. , Israel, #AN-01
	Anti-mouse aquaporin 5	CHEMICON, USA, #20110670
	Anti-mouse aquaporin 6	ALPHA DIAGNOSTIC, USA #3237A2
	Anti-mouse aquaporin 7	CHEMICON, USA, #20060310
	Anti-mouse aquaporin 7	ALPHA DIAGNOSTIC, USA #3238A
	Anti-mouse aquaporin 7	CALBIOCHEM,USA,#B34100
	Anti-mouse aquaporin 8	ALPHA DIAGNOSTIC, USA #3238A3
	Anti-mouse aquaporin 9	CHEMICON, USA, #20070422
	Anti-mouse aquaporin 9	ALPHA DIAGNOSTIC, USA #3232A
	Anti-mouse aquaporin 9	CALBIOCHEM,USA, #B41003
二次抗体	Anti-rabbit immunoglobulin, ENVISON™+ System HRP	Dako Cytomation, USA, #K4003

表1

マウス耳管組織	Aquaporin- 1	Aquaporin- 3	Aquaporin- 4	Aquaporin- 5
線維芽細胞	++	-	-	-
軟骨細胞	++	-	-	-
毛細血管内皮細胞	+	-	-	-
粘膜上皮基底側 細胞膜	-	+++	+++	-
粘膜上皮頂面 細胞膜	-	-	-	+++
横紋筋細胞 細胞膜	-	-	-	-
漿液腺細胞の頂面 (管腔膜側)	-	-	-	++

+++ : strong expression, ++ : moderate, + : weak, - : none

表2