

下顎神経切断によるラット耳管開放症モデルの確立

日本大学大学院医学研究科博士課程

外科系耳鼻咽喉科学専攻

原田 英誉

修了年 2019年

指導教員 大島 猛史

目次

第 I 章：研究の概要.....	1
第 II 章：緒言	
1. 耳管の解剖.....	3
2. 耳管の機能.....	4
3. 耳管開放症.....	5
4. ラット耳管.....	7
5. 本研究の着想と目的.....	7
第 III 章：対象と方法	
1. 動物種.....	8
2. 耳管圧測定方法.....	8
3. 下顎神経切断手術.....	10
4. 耳管圧の評価法.....	11
5. 体重測定.....	11
6. 組織標本の作成方法.....	11
7. 組織標本の評価方法.....	12
8. 統計学的解析.....	13

第 IV 章：結果	
1. 耳管圧の経時変化.....	13
2. 組織標本の評価.....	14
3. 体重の経時変化.....	15
第 V 章：考察.....	15
第 VI 章：まとめ.....	22
謝辞.....	23
表.....	24
図.....	25
図説.....	40
引用文献.....	44
研究業績.....	50

第 I 章 研究の概要

耳管開放症(patulous eustachian tube: PET)は体重減少、加齢、妊娠などの誘因で発症し、自声強聴、自己呼吸音聴取、耳閉感などの症状を呈する疾患である。PET に対してこれまで数々の保存的治療、外科的治療が行われてきた。しかし既存の治療法は効果の持続性や根治性などに関して解決されなければならない点がある。今後さらなる病態解明や新たな治療法の確立のためには、モデル動物の確立が必要である。再現性の高いモデルを作成するため、我々はヒトにおいて三叉神経切断後の耳管機能障害に関する報告に着目した。三叉神経第 3 枝である下顎神経を障害させることで再現性、持続性の高い PET モデル動物を確立できるのではないかと考えた。本研究では、ラットに対し外科的に下顎神経を切断し、術後の耳管機能を生理学的小よび形態学的に解析し、モデル動物としての妥当性を検証した。

ラット 8 匹に対し外切開による下顎神経切断術を行った。翼突窩で卵円孔より出る下顎神経本幹を確認し、各分枝を切断した。耳管機能の評価として加圧法による passive opening pressure (POP)の測定を術後 16 週まで行った。手術側と対照側の POP の経時変化を統計学的に解析した。また術後 16 週の時点で耳

管周囲の組織標本を作成し形態学的な評価を行った。

対照側の POP は術前と比べ、術後 16 週まで有意な低下を認めなかった。それに対し、手術側の POP は術後 2 週から有意に低下し、術後 16 週まで持続的に認められた。手術側の 10%以上の POP の低下は全個体で認められ再現性が高いことが確認された。組織学的には主に手術側の内側翼突筋の萎縮が観察された。下顎神経切断術を施行したこのラットが、今後 PET モデルとして病態解明や新たな治療法の検討に利用できる可能性が示唆された。本研究は再現性、持続性の高い PET モデル動物を確立し得た初めての報告である。

第 II 章 緒言

1. 耳管の解剖

耳管は上咽頭の耳管咽頭口と中耳腔の耳管鼓室口をつなぐ管状構造物である。ヒトでは長さ約 3.5 cm で、耳管咽頭口より約 3 分の 2 まで耳管軟骨に覆われた軟骨部耳管であり、耳管鼓室口寄りの約 3 分の 1 は側頭骨に囲まれた骨部耳管である。軟骨部と骨部の境界のやや軟骨部よりに耳管峡部があり、解剖学的に最も内腔が狭い部分である[1]。正常時の耳管上半部は C 字型あるいは逆 C 字型に彎曲し、平たい耳管腔として存在し、嚥下や欠伸などの換気するとき以外は機能的に閉鎖された状態を保っている。耳管下半部は主に排泄機能を有しており、皺状の上皮面と、耳管腺や粘膜上皮に存在する杯細胞から産生された粘液で耳管の保護作用を担っている。

耳管周囲にはオストマン脂肪体と呼ばれる脂肪組織、翼突筋静脈叢、筋組織などが存在しており、これらの組織が耳管外から静的圧力をかけ平常時に耳管がなるべく開かないように作用している(図 1)。耳管周囲の筋として口蓋帆張筋、口蓋帆挙筋、耳管咽頭筋、内側・外側翼突筋が挙げられる[2]。口蓋帆張筋は唯一の耳管開大筋であり、蝶形骨棘、舟状窩、耳管軟骨外側板を起始とし、腱となっ

て軟口蓋、硬口蓋後端に停止する。耳管軟骨に付着した口蓋帆張筋が収縮することで耳管を側方に捻げ、軟骨を偏位させ耳管内腔を開大させる作用を持つ。口蓋帆張筋、内側・外側翼突筋は三叉神経第 3 枝である下顎神経の支配を受けており、口蓋帆挙筋、耳管咽頭筋は咽頭神経叢支配である[3]。

2. 耳管の機能

耳管は大別して換気、排泄、防御の 3 つの機能を有していると考えられている[1]。換気とは外気圧の変化に対し中耳腔の圧を調節する機能であり、嚥下や欠伸などに伴って耳管が短時間開大し、中耳内圧と外気圧を等しくさせている。排泄は耳管周囲に存在する耳管線や耳管粘膜に存在する杯細胞で産生された粘液と、耳管上皮の繊毛運動により行われる。中耳腔内で産生された浸出液や膿を上咽頭へ送り出し、上咽頭から侵入した異物や細菌などを排泄させる作用がある。防御に関しては耳管は通常閉鎖しており、必要時にのみ開大することで、上咽頭から中耳腔への侵入を防ぐ役割を果たしている。

耳管機能の低下は様々な病態の原因となる。小児では耳管機能が未熟なため上咽頭からの細菌の逆行性感染により急性中耳炎を引き起こしやすい。急性炎症や腫瘍などにより耳管狭窄の状態となれば、換気・排泄機能が十分働かず中耳

腔内の陰圧を引き起こし、滲出性中耳炎(otitis media with effusion: OME)、真珠腫性中耳炎などの疾患の原因となる。また後述のとおり何らかの誘因で耳管閉鎖障害が起きれば、耳管開放症として様々な症状を呈するようになる。

3. 耳管開放症

耳管の開大が長時間持続すると、上咽頭と中耳腔を空気と音声可以自由に交通し、自声強聴（自身の声が耳に響く）、自己呼吸音聴取、耳閉感などの症状を呈する。このような状態を耳管開放症(patulous eustachian tube: PET)という。

PETの本邦での有病率は、小林が一般人口の1%程度であり、潜在的には数パーセントの有病率であると報告している[4]。男女比は女性に多く、男性は60～70代、女性は20～30代にピークを持つ。以前はまれな病態とされていたが、研究が進むにつれ、近年では日常診療でよく遭遇する疾患として知られるようになってきた。

PETの原因には様々なものがある。最多は体重減少であり、加齢、低血圧、発汗、妊娠、経口避妊薬、外傷、放射線照射、三叉神経障害などの誘因によって引き起こされる[4]。耳管周囲組織の縮小により耳管を閉鎖させる静的圧力が減弱することが主な機序として考えられており、体重減少によるオストマン脂肪体

の縮小、発汗・低血圧による翼突筋静脈叢への還流量低下、加齢や三叉神経障害による筋萎縮などがその代表である。妊娠は体重減少の次に多い原因であるが、病態生理は解明されていない[5]。経口避妊薬も原因になることから血中エストロゲン値の上昇が関与していると考えられている[6]。

PET は一般的に保存的に治療され、生活指導、薬物療法（自律神経調節薬、漢方薬）、耳管咽頭口への薬液噴霧、生理食塩水点鼻、鼓室換気チューブ留置などが行われてきたが[7-10]、中には保存的治療に抵抗する症例も少なくない。このような難治性の **PET** に対しては、これまで自家軟骨注入術[11]、自家脂肪注入術[12]、ハイドロキシアパタイト注入術[13]、耳管咽頭口結紮術[14]、耳管ピン挿入術[15]などの外科的治療が行われてきた。軟骨、脂肪、ハイドロキシアパタイトは経鼻的に耳管咽頭口粘膜下に注入し耳管を周囲から圧迫させ、耳管ピンは経鼓室的に耳管鼓室口からシリコンプラグを挿入し開大した耳管内腔を狭窄させる方法である。しかしこれらの治療法には耳管機能そのものを廃絶させる可能性、効果の持続性、人工物挿入による感染などのリスクが少なからず存在している。

4. ラット耳管

耳管の形態には動物差があり、哺乳類では両生類・爬虫類・鳥類には見られない耳管軟骨が存在する。ラット耳管は長さ約 4.5 mm であり、ヒトに比べ耳管骨部の割合が短く、完全に骨で囲まれてはいない。また耳管軟骨は耳管の頭側を被うに過ぎず、耳管鼓室口付近に限局していることが知られている[4,16]。しかし両者とも骨部と軟骨部から構成され、豊富な腺組織が存在しており、基本的な構造が類似していることが本研究で動物種にラットを選択した理由である。

5. 本研究の着想と目的

前述のように PET に対する既存の治療法には解決されなければならない点があり、耳管の生理的な機能を保ちながら根治性の高い新たな治療法の確立が今後望まれる。そのためには再現性の高いモデル動物を確立し、治療法を検証することが必要である。

ヒトでは体重減少が PET の最も大きな誘因である[9]が、食餌制限による体重減少 PET モデルの作成は再現性や動物倫理の点から適切でないかもしれない。そこで我々は、三叉神経切断による耳管機能障害に関する報告に着目した。Perlman は脳外科手術による三叉神経障害の後遺症として PET の発症を報告

した[17]。三叉神経第3枝である下顎神経は顔面、歯、頬粘膜や舌の知覚に加えて、咀嚼筋や口蓋帆張筋などの運動も支配している。下顎神経の切断により耳管周囲に存在するこれらの筋が萎縮することでPETが発症すると報告されている[18]。我々はこれまでの報告から、下顎神経を障害させることで再現性、持続性の高いPETモデル動物を確立できるのではないかと考えた。本研究の目的はラットに対し外科的に下顎神経を切断し、術後の耳管機能を生理学および形態学的に解析し、モデル動物としての妥当性を検証することである。

第III章 対象と方法

1. 動物種

8匹の雄性のCrl:CD(SD)ラット(Charles River Laboratories Japan, Yokohama, Japan)を用いた。すべての動物実験は、日本大学動物実験委員会によって承認された(承認番号: AP16M023)。

2. 耳管圧測定方法

耳管圧測定は過去の文献を参考に行った[19-21]。イソフルラン5%の吸入麻酔

で導入を行い、塩酸メドトミジン(0.15mg/kg)、ミダゾラム(2mg/kg)、酒石酸ブトルファノール(2.5mg/kg)の三種混合麻酔の腹腔内投与で麻酔を行った。水平な台の上にラットを腹臥位に寝かせた。22G カテラン針を用い顕微鏡下に鼓膜を切開し、ティンパノメトリー検査用の極小サイズのイヤーチップを外耳道に挿入した。イヤーチップは耐圧チューブを介して、シリンジポンプ(TERUMO Corporation, Tokyo, Japan)と圧トランスデューサーである BIOPAC MP100A (BIOPAC System, Santa Barbara, California)に接続し閉鎖回路を作成した (図 2A)。回路内は持続的な陽圧がかけられるようエアリークがないことを確認し、水銀圧力計で圧力を校正した。シリンジポンプより持続的に中耳腔に圧を負荷すると、耳管鼓室口を経由して耳管へ圧力をかけることができ、4.5ml/min の速度で加圧し続けた際の耳管圧をパソコンに記録した。シリンジポンプより圧を負荷し、耳管が開大した瞬間に圧力が急激に低下する点の圧を **passive opening pressure (POP)** とした (図 2B)。その後、負荷圧と耳管が閉鎖する圧力が平衡に達したところで回路を開放し圧力を 0 に戻した。再び回路を閉じ、圧を負荷すると 2 回目の POP が観察できた。POP は一連の測定を繰り返していくと徐々に低下していき、3 回目の測定以降はほぼ安定した。そのため測定は 5 回行い、3 回目から 5 回目の POP の平均値をデータとして用いた。

3. 下顎神経切断手術

耳管圧測定と同様の方法で麻酔を行った。全てのラットは週齢 12 週で右下顎神経を切断し、左を対照側とした。

手術は下記の方法で行った。前頸部やや右側を縦切開し、咬筋と顎舌骨筋の筋間を剥離した(図 3A)。視野にかかる血管は適宜バイポーラで焼灼離断した。その深部に内側翼突筋がみられ(図 3B)、さらにこの筋の深部に下顎神経が存在した。翼突窩に到達すると、下顎神経の分枝 4 本が確認できた。この分枝は頭側より舌神経、下歯槽神経、顎舌骨筋神経、耳介側頭神経であり、舌神経からは鼓索神経が分枝し中耳骨胞方向に走行しているのが確認できた(図 3C)。続いて翼突窩の骨面を露出させると卵円孔から出る下顎神経の本幹を認め、前述の 4 本の分枝と内側翼突筋神経が本幹から分岐しているのが確認できた(図 3D)。また内側翼突筋神経に並走するように翼突口蓋動脈(内頸動脈の末梢枝)を認め、卵円孔のやや尾側には白色楕円形の耳神経節を認めた[22]。

出来る限り卵円孔に近い位置で下顎神経の各分枝を切断した(図 3E)。各分枝は神経再生を防止するため約 2 mm の長さをもって切断した。止血を確認し皮膚を縫合して終了した。

4. 耳管圧の評価法

全てのラットは手術直前(0 週)、術後 2 週、4 週、8 週、12 週、16 週で手術側、対照側の POP を測定した。手術側、対照側それぞれで、0 週と術後各週の耳管圧を比較検討した。

5. 体重測定

手術の影響による成長発達障害の有無を体重の推移で判定した。耳管圧測定の際に体重測定を行い、Charles River が公表する SD ラットの平均体重と比較検討した。

6. 組織標本の作成方法

術後 16 週(週齢 28 週)の耳管圧測定後に 8 体の組織標本を以下の方法で作成した。三種混合麻酔の深麻酔下でラットを開胸し、右心耳を切開後、心尖部より 0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を注入して脱血した。次に 10%ホルマリン液を注入し還流固定を行った。末梢まで十分に固定されたことを確認し断頭した。さらに 10%ホルマリン液で頭部を常温で固定し、2 倍希釈した脱灰液 (K-CX®, FALMA, Tokyo, Japan)にて 4°Cで 3 日間脱灰を行い、パラフィンで包埋

した。切片は冠状断で中耳骨包から頭側方向に 300 μm 毎に 5 μm の厚さで作成し、耳管内腔が耳管咽頭口から最も長く検出されているスライスをピックアップした。染色はヘマトキシリン・エオジン染色 (HE) とマッソン・トリクローム染色 (MT) を行った。

7. 組織標本の評価方法

スライドを NanoZoomer-XR Digital slide scanner (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) を用いてデジタルスキャンし、同社の Viewing software NDP.view2 (ver 2.7.25) で解析した。内側翼突筋面積、外側翼突筋面積、口蓋帆張筋面積、口蓋帆挙筋面積、耳管径、耳管腺面積、耳管粘膜の杯細胞数の 7 項目について手術側と対照側で比較検討した。内側翼突筋面積、外側翼突筋面積、口蓋帆張筋面積、口蓋帆挙筋面積、耳管腺面積は HE 染色スライド上で各組織の輪郭をトレースし囲まれた範囲の面積を測定した。耳管径は耳管咽頭口より 800 μm 耳管内に入った点での耳管横径を測定した。杯細胞数は MT 染色スライド上で、耳管粘膜の杯細胞数を粘膜の総距離で割り、単位距離あたりの細胞数とした。

8. 統計学的解析

すべての解析は統計解析ソフト Statcel ver.4 (OMS publishing, Saitama, Japan)を用いた。耳管圧の評価に関しては平均値ウィルコクソン符号付順位和検定を用い、組織標本の評価に関してはマンホイットニーU 検定を用いた。結果は中央値（四分位範囲）で表記した。p<0.05 を統計学的有意差ありと判定した。

第 IV 章 結果

1. 耳管圧の経時変化

術前の POP は手術側で 40.9 (38.5, 48.8) mmHg、対照側は 40.0 (34.2, 42.4) mmHg であった(図 4A、4B)。手術側では術後 2 週から有意に低下し、16 週では 34.9 (30.7, 38.8) mmHg となった。これに対して対照側では 16 週で 37.8 (34.2, 41.7) mmHg であり術前と比べ有意差がなかった。

次に各個体の耳管圧の推移では、術前の圧力を 100%とした場合、手術側の術後 16 週での POP は 84.0 (79.3, 85.5) %であり全個体で圧力の低下を認めた(図 4C)。8 匹全てで 10 %以上の圧力低下を認め、その内の 5 匹は 15 %以上低下し

た。対照側の術後 16 週での POP は 97.7 (94.2, 101.1) %であり有意な低下は認めなかった(図 4D)。なお毎測定時に鼓膜を観察しているが、全ての個体で OME の所見は認めなかった。

2. 組織標本の評価

すべての標本で耳管内腔およびその周囲の構造物を明瞭に確認することができた。形態学的異常や組織壊死を認めた標本はなかった。耳管周囲の構造物については脱神経後の組織変化が認められた(図 5、6)。内側翼突筋面積は手術側で有意に低下していた(表 1)。外側翼突筋面積、口蓋帆張筋面積、口蓋帆挙筋面積、耳管径で明らかな有意差は認めなかった。分泌組織である耳管腺面積、杯細胞数にも有意差は認めなかった(図 7)。MT 染色では手術側の内側翼突筋の周囲や内部に膠原線維が増生しているのが確認された(図 8)。さらに頭側のスライスでは卵円孔より出る下顎神経本幹と、その分枝が切断されているのが組織学的に確認できた(図 9)。

3. 体重の経時変化

すべてのラットは術後正常に体重が増加した(図 10)。Charles River が公表する SD ラットの平均体重と比較し、全頭が $\pm 2SD$ 以内の体重であった[23]。

第 V 章 考察

本研究では再現性、持続性の高い PET モデル動物を確立することを目的とし、ラットに対し外科的に下顎神経を切断し、術後の耳管圧を経時的に測定した。POP は正常側に比べ手術側の有意な低下を認め、術後 16 週まで持続し、全個体で再現性高く POP が低下した。組織学的には主に内側翼突筋の萎縮を認め、耳管周囲の器質的変化が耳管圧に影響を与えることが確認された。今後新たな治療法を検証していく上で、このラットが PET モデル動物として利用でき得る可能性が示唆された。

1939 年 Perlman は三叉神経痛のために行った三叉神経切断術の術後に耳管開放症となった症例を報告した[17]。また、Gardikes は三叉神経節切除後の鼓室内血腫と耳管機能不全について報告し[24]、Ito は三叉神経鞘腫術後の難聴と耳管機能不全について報告した[25]。これらの報告から三叉神経切断により一時

的に OME の状態になるものの長期的には PET が発症することが示唆された。

これまで耳管に関する動物実験では Malm が妊娠ラットにおいて耳管開大圧が低下したとする報告 [26]があるものの、耳管開放症よりもむしろ多くは耳管狭窄による OME が注目されてきた。Cantekin はアカゲザルに対する口蓋帆張筋切断により耳管の機能的閉塞を認め、OME が発症したと報告した[27]。

Hamada は中耳にエンドトキシンを注入する OME モデルで、下顎神経切断後に OME が遷延したと報告した[28]。ここでは術直後に耳管圧が低下すると報告しているが、長期にわたる経過観察は行われなかった。我々はこれまでのヒトでの三叉神経切断の報告から、ラットでも同様に下顎神経切断後に慢性的に耳管の病的開大が生じ、PET モデルとなりうると想定した。本研究ではその手術法を確立するとともに、耳管機能の評価を行い、再現性、持続性の高いラット PET モデルの確立を試みた。

まず 8 匹のラットに対し下顎神経切断術を行い、術後 16 週まで経時的に POP を測定した。手術側では術後 2 週で POP の有意な低下を認め、これらは術後 16 週でも持続して観察された。また各個体で見ると、8 匹全てで 10%以上の圧力低下を認め、その内の 5 匹は 15%以上低下した。このことは下顎神経切断術が再現性高く耳管圧低下を引き起こしたことを意味している。対照側の POP でも

平均約 2%の低下が見られた。これは骨格が成長したことや、口腔などの組織が手術側に偏位し対照側の耳管圧に影響を及ぼした可能性がある。

本研究では耳管の機能を測定する方法として、加圧法による POP の測定を行った。この方法は臨床でも行われており絶対値で評価されている（正常値 150-550 daPa ⇔ 11-41 mmHg）[4]。ヒト PET では 150 daPa を下回る値を示し診断に有用であるが、鼓膜切開か鼓膜穿孔の存在が必要なため、主に慢性的な鼓膜穿孔を認める慢性中耳炎の患者で行われている検査法である。そのため臨床では健常群と PET 群の POP の変化率についての報告はほとんど無い。このモデルを用いての臨床応用を考える上で、動物実験で得られた POP の変化率を臨床とどう結びつけていくかが課題であり、今後実験頭数を増やし評価していく必要がある。またラットの耳管圧測定においては、腹臥位よりも頭上位で測定を行うと、翼突筋静脈叢の還流量が低下するため POP の変化が顕著に表れると報告されている[4]。今後は測定方法も改良し、より大きな変化率が得られるよう検証していきたい。

下顎神経は顔面、歯、頬粘膜や舌の知覚に加えて、咀嚼筋や口蓋帆張筋の運動も支配している。Ikeda らは下顎神経切断後、早期には耳管開大筋である口蓋帆張筋の機能喪失により耳管の開大障害が起き OME が発症したが、晩期には口

蓋帆張筋や内側・外側翼突筋などの耳管周囲の筋萎縮の進行とともに PET が発症したと報告した[18]。PET の発症には耳管周囲の組織の萎縮が大きく関わっており、体重減少によるオストマン脂肪体の縮小、発汗・低血圧による静脈叢への還流量低下、加齢や神経障害による筋萎縮などがその代表である。

耳管圧の変化の原因を調べるため組織学的検討を行った。術後 16 週の HE 染色標本では手術側の内側翼突筋面積の有意な低下を認めた。また同筋の起始部付近では脂肪組織の侵入を認め、MT 染色では筋周囲に膠原線維の増生が確認された。しかし術後 16 週においても耳管圧は持続的に低下しており、代償性の組織置換による耳管圧への影響は少なかったと考えられる。Kumai らはラットの反回神経切断後の甲状披裂筋の萎縮は術後 2 週以降で有意に認められ、Miyamaru らはそれが 58 週まで持続したと報告している[29,30]。本研究の耳管圧低下、筋萎縮を来した時期も妥当であると言え、術後 16 週以降も耳管圧低下が持続することが予想された。耳管径については有意差は認めなかったが、10 数%の POP 低下に対する径の変化は微細なものかもしれないし、ホルマリン固定後の影響もあるかもしれない。

POP の経時変化では術後 2 週から有意な低下を認めたが、その後は緩やかな圧力低下しか認められなかった。このことは術後早期には手術侵襲による交感

神経刺激により機能的に耳管開大が助長され、晩期には脱神経による筋萎縮が進み耳管周囲の器質的变化となって現れた可能性がある。自律神経と耳管機能の関係についてはこれまでも報告されており、交感神経刺激では主に上頸神経節の支配により耳管周囲に分布する血管の収縮が起こり、耳管が開大するとされている[31]。このラットをモデルとして用いる際には、耳管圧低下が一時的な機器的変化ではなく、持続的な器質的变化であることが求められると考える。そのため今後は各週数での組織評価を行い、モデルとして利用できる最適な週数を検証する必要がある。

耳管内腔の分泌液は耳管の疎通性に影響を与えらる。耳管分泌は自律神経により調節されており、副交感神経系は三叉神経、顔面神経、舌咽神経、迷走神経が連絡している[19,22]。自律神経障害による腺組織の変化はこれまでも報告されており、Nishijima はラットに対する後鼻神経切断術後に鼻腔外側壁の粘膜下腺が萎縮したと報告した[32]。しかし本実験では耳管腺と杯細胞に明らかな術後の変化は認めなかった。今回の手術で副交感神経系である耳神経節に障害が及んだと予想されたが、その他の神経による支配あるいは代償が働き分泌組織は変化しなかったのかもしれない。

耳管周囲の筋として主に口蓋帆張筋、口蓋帆挙筋、耳管咽頭筋、内側・外側翼

突筋が挙げられる[33]。ヒトにおいて口蓋帆張筋と内側・外側翼突筋は下顎神経支配、口蓋帆挙筋と耳管咽頭筋は咽頭神経叢支配であるが、これはラットにおいても同様である[34,35]。下顎神経切断術によって口蓋帆張筋と外側翼突筋の萎縮も予想されたが本研究では認められなかった。萎縮が得られなかった原因としては、下顎神経本幹の頭側で切断できていない分枝があった可能性がある。ここでは周囲の静脈からの出血が多く、翼突口蓋動脈が走行していたため、観察や処置が困難な場所であったためである。しかしラットにおいて口蓋帆張筋は内側翼突筋に比べ非常に小さな筋であり、外側翼突筋は解剖学的に耳管から離れているため、POPには大きな影響を与えなかったと考えられた。下顎神経切断後において、ヒトでは耳管近傍にある外側翼突筋の萎縮がPETの原因と考えられているが[18]、ラットでは内側翼突筋がよく発達しており、この筋の萎縮が耳管圧低下の大きな要因となることが判明した。

ヒトにおいて三叉神経切断後4週から8週以内にOMEが認められたと報告されているが[18]、これは耳管開大筋である口蓋帆張筋の機能喪失により耳管の開大障害をきたしたためと示唆される。しかし、本研究では経過中に手術側でのOMEの発症は認めなかった。これは術後16週の時点でも口蓋帆張筋の萎縮が見られず、前述の通り本研究の手術では支配神経を切断していないためと考え

られた。さらに耳管圧測定の際に毎回鼓膜を切開していたこと、術後早期に POP が低下してきたことも関係しているかもしれない。

モデル動物作製の上では、持続性、再現性に加え、動物に対する侵襲を考えなければならぬ。持続性と再現性に関しては前述の通り耳管圧と組織学的検討から確認できた。下顎神経切断術の侵襲は小さくないと考えたが、術後感染を起こしたり途中で死亡した個体はいなかった。また下顎神経切断により咀嚼筋麻痺や口腔内知覚の低下による経口摂取量低下、発育不全の恐れがあったが、全個体で体重は正常に増加した。今後はより低侵襲な方法として、下顎神経の感覚枝は温存し運動枝のみの切断を行うことを検討している。

本モデルは内側翼突筋を主とした筋萎縮による PET モデルのため、原因が多岐に渡るヒト PET の全ての病態に対応できるとは限らない。しかし耳管周囲組織の萎縮という PET の主な病態生理には沿っていると考えられ、モデルの有用性や適応性の検証は今後の課題である。難治性の PET に対する現在の外科的治療法は自家軟骨挿入術、自家脂肪注入術、耳管咽頭口結紮術、耳管ピン挿入術などが主流であるが、生理的な方法で根治性の高い治療法は未だ確立されていない。今後我々は新たな治療法として、この PET モデルラットを用いた細胞治療の検証を行っていく予定である。具体的には脱分化脂肪細胞という、脂肪細胞か

ら得られる間葉系幹細胞を、経鼻内視鏡下に耳管粘膜下に注入し耳管の病的開大を改善させる方法を検討している。この方法をヒト PET に対し臨床応用できれば、感染や効果の持続性の課題を克服し、より根治的な治療が期待できる。本研究において、PET の病態解明と新たな治療法の確立にあたり、再現性高く持続的な耳管圧の低下を認めたこのラットが、PET モデルとして利用できる可能性が示唆された。

第 VI 章 まとめ

ラットに対し外科的に下顎神経を切断し、術後の耳管圧を経時的に測定した。POP は正常側に比べ手術側の有意な低下を認め、術後 16 週まで持続した。各個体で見ると再現性が高く耳管圧が低下したことが判明した。組織学的には主に内側翼突筋の萎縮を認め、耳管周囲の器質的変化が耳管圧に影響を与えることが確認された。本研究は再現性、持続性の高い PET モデル動物を確立し得た初めての報告である。今後新たな治療法を検証していく上で、このラットが PET モデル動物として利用でき得る可能性が示唆された。

謝辞

本研究において終始御懇篤なるご指導を賜りました日本大学医学部外科学系耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野教授 大島猛史先生、助教 平井良治先生に心から厚く御礼申し上げます。また多大なる御指導、御助言を頂きました日本大学医学部機能形態学系 細胞再生・移植医学分野教授 松本太郎先生に心から深謝申し上げます。

表

	手術側	対照側	検定
内側翼突筋面積 (mm ²)	6.4 (6.2, 7.4)	30.3 (28.8, 32.2)	**
外側翼突筋面積 (mm ²)	7.4 (5.6, 8.1)	6.3 (4.8, 6.7)	NS
口蓋帆張筋面積 (×10 ⁻¹ mm ²)	8.5 (7.7, 11.2)	8.1 (7.7, 9.5)	NS
口蓋帆挙筋面積 (×10 ⁻¹ mm ²)	6.3 (5.8, 6.7)	7.3 (7.2, 7.6)	NS
耳管径 (×10 ⁻¹ mm)	2.9 (2.7, 3.0)	3.1 (2.7, 3.2)	NS
耳管腺面積 (×10 ⁻¹ mm ²)	8.3 (7.0, 9.4)	6.9 (6.7, 8.3)	NS
杯細胞数 (/mm)	17.7 (16.0, 18.6)	16.6 (15.9, 20.0)	NS

表1 組織標本の評価

** : p<0.01, NS : not significant difference

検定はマンホイットニーU検定を用いた。

表記は中央値 (四分位範囲)

図

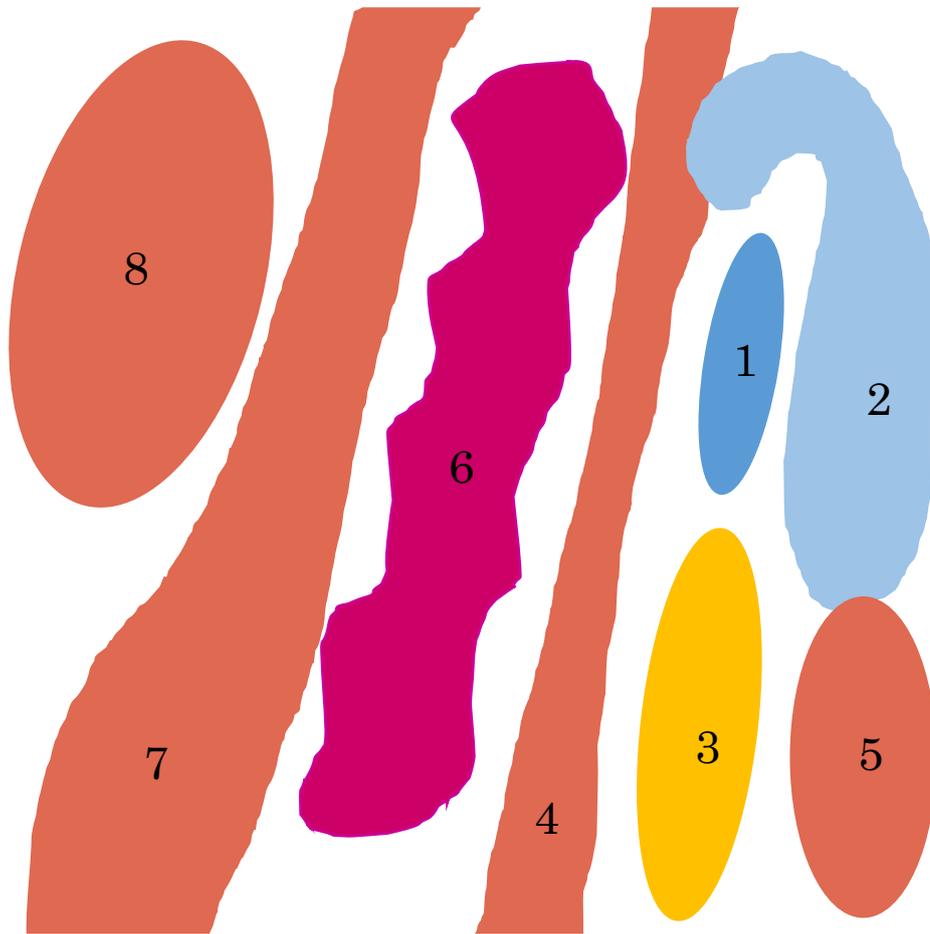


図1 ヒト耳管周囲組織のシェーマ

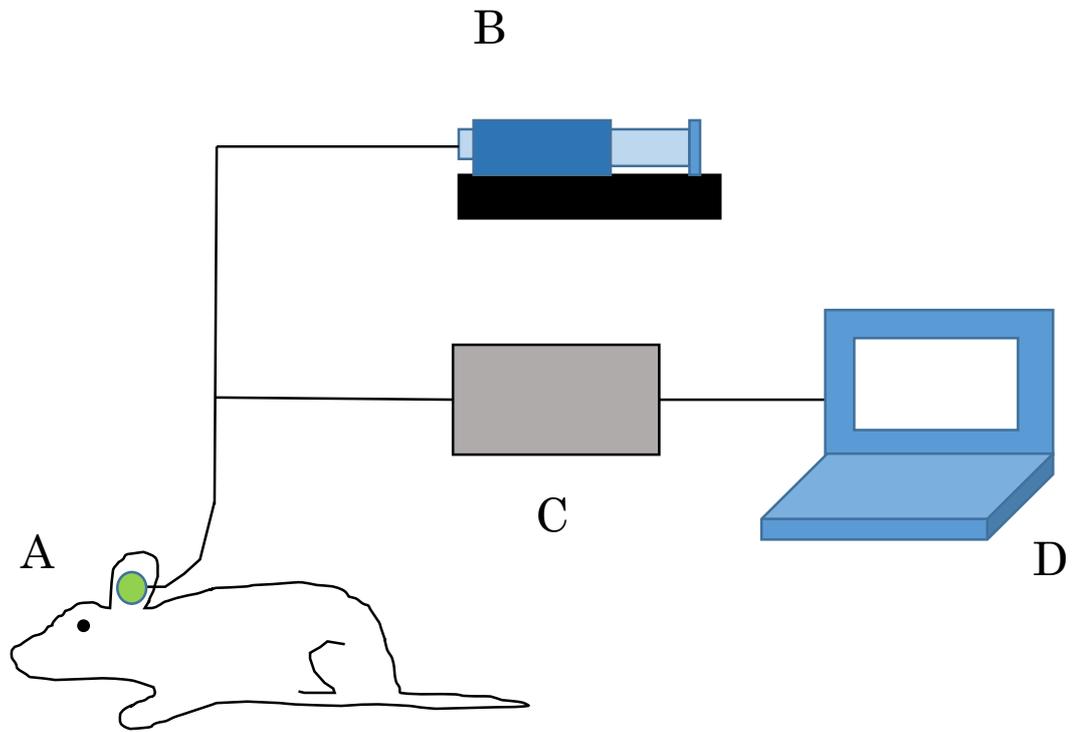


図2A 耳管圧測定回路

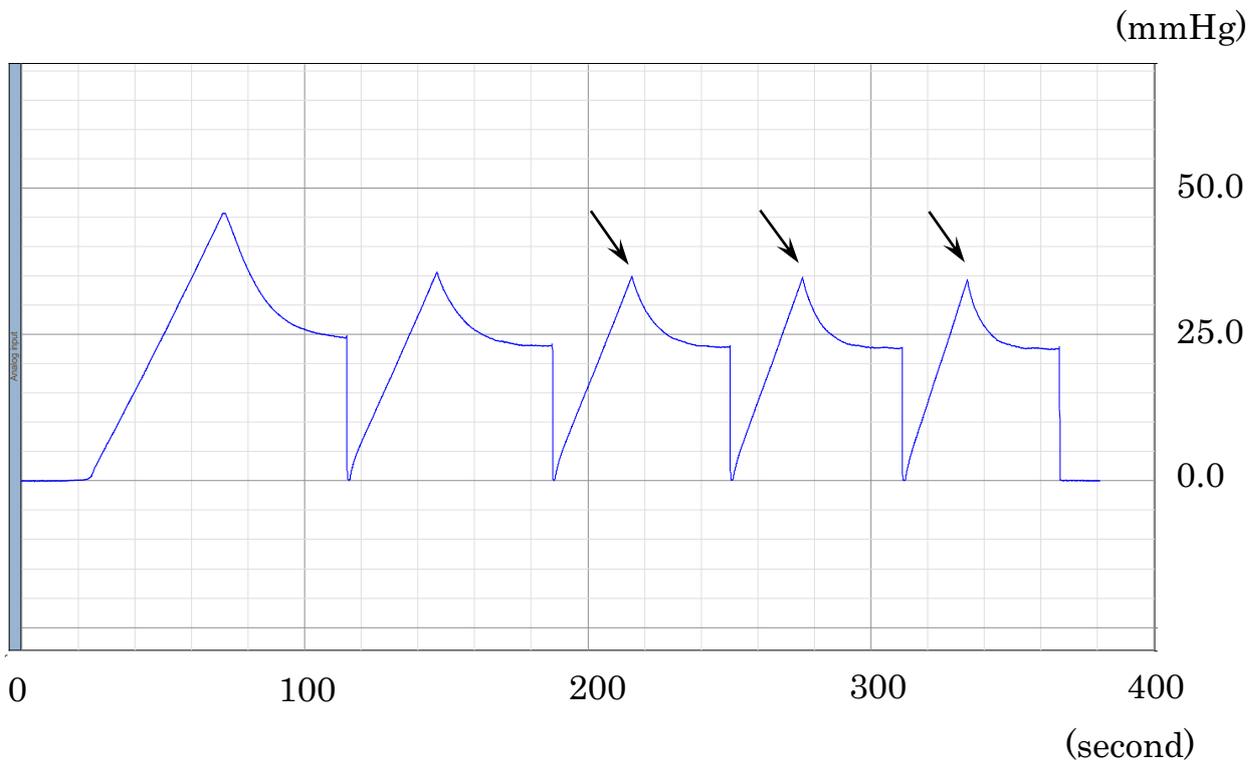


図2B 耳管圧測定グラフ

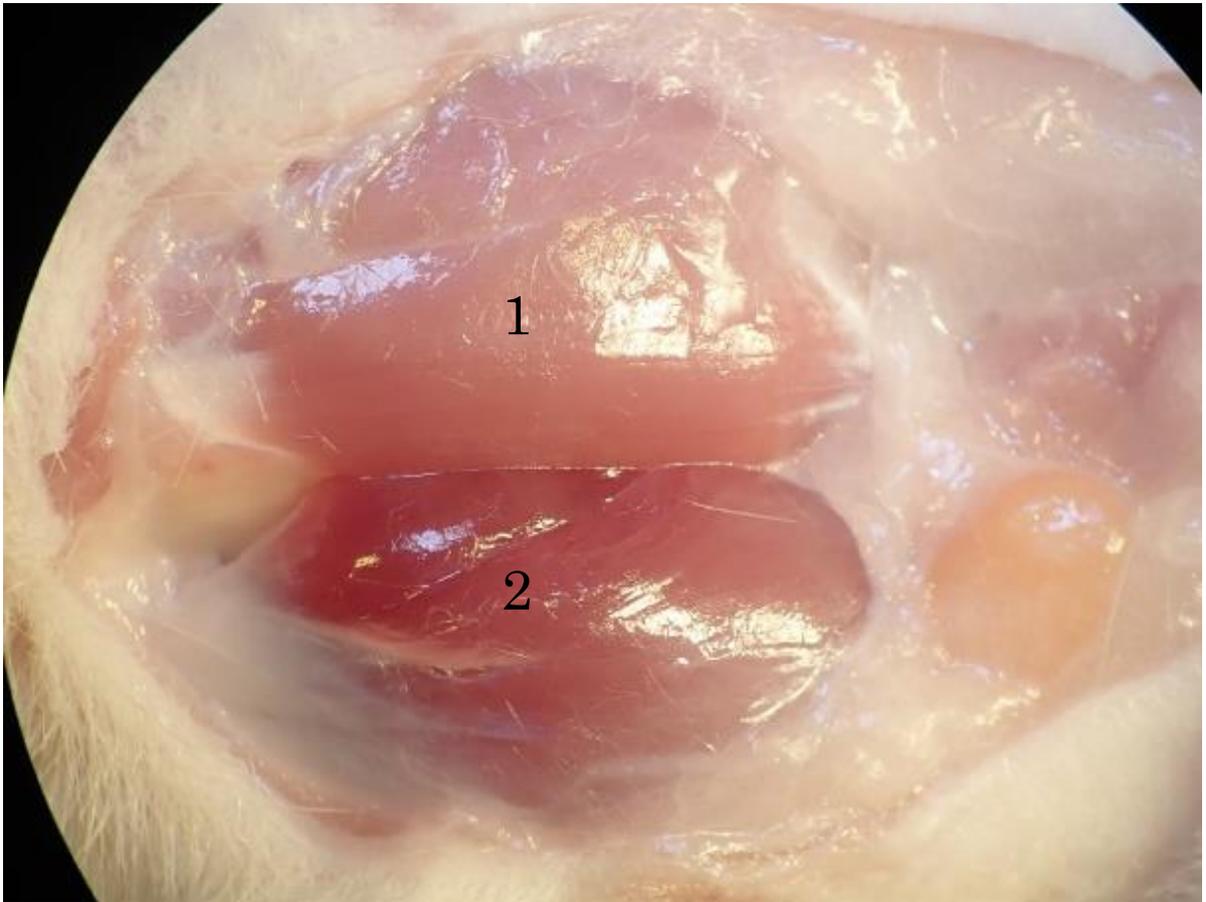


図3A 右下顎神経切断の術中写真

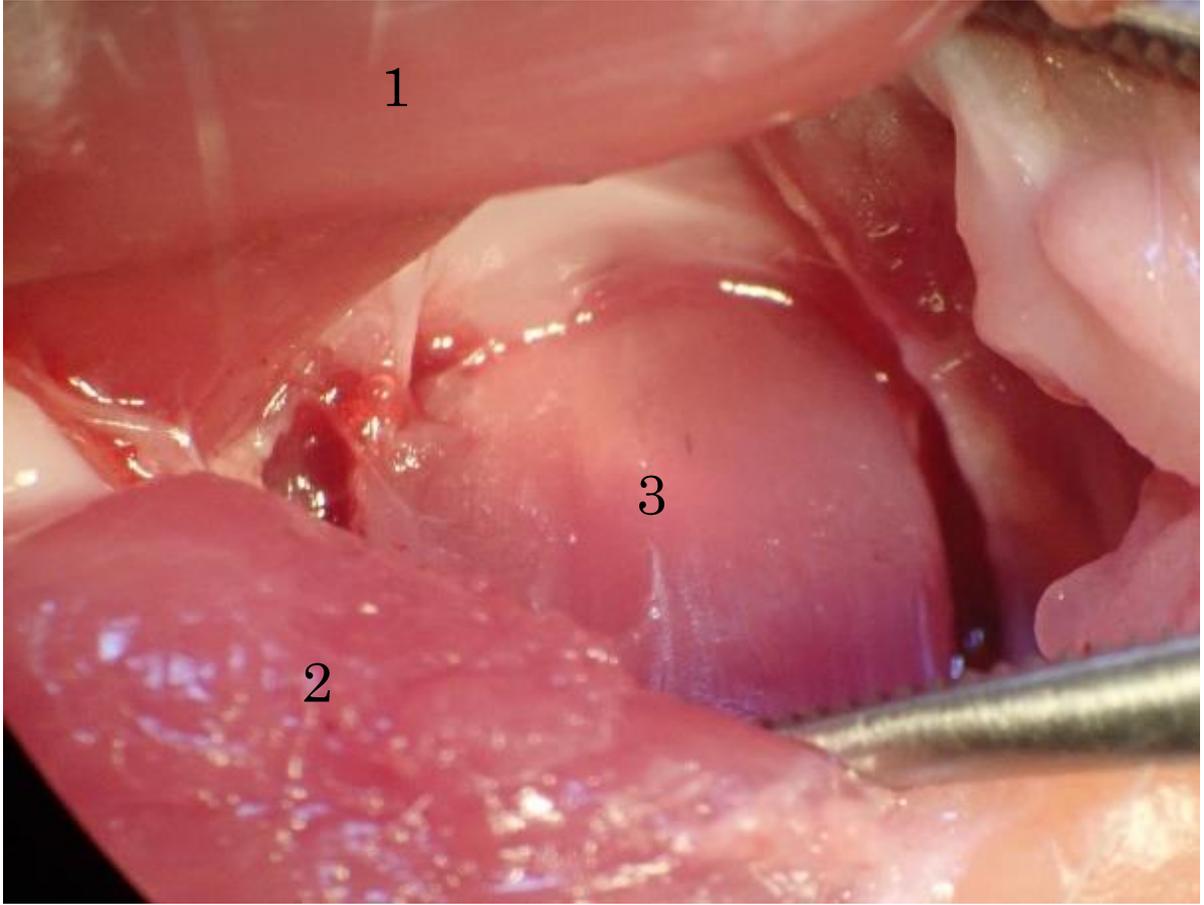


图 3B

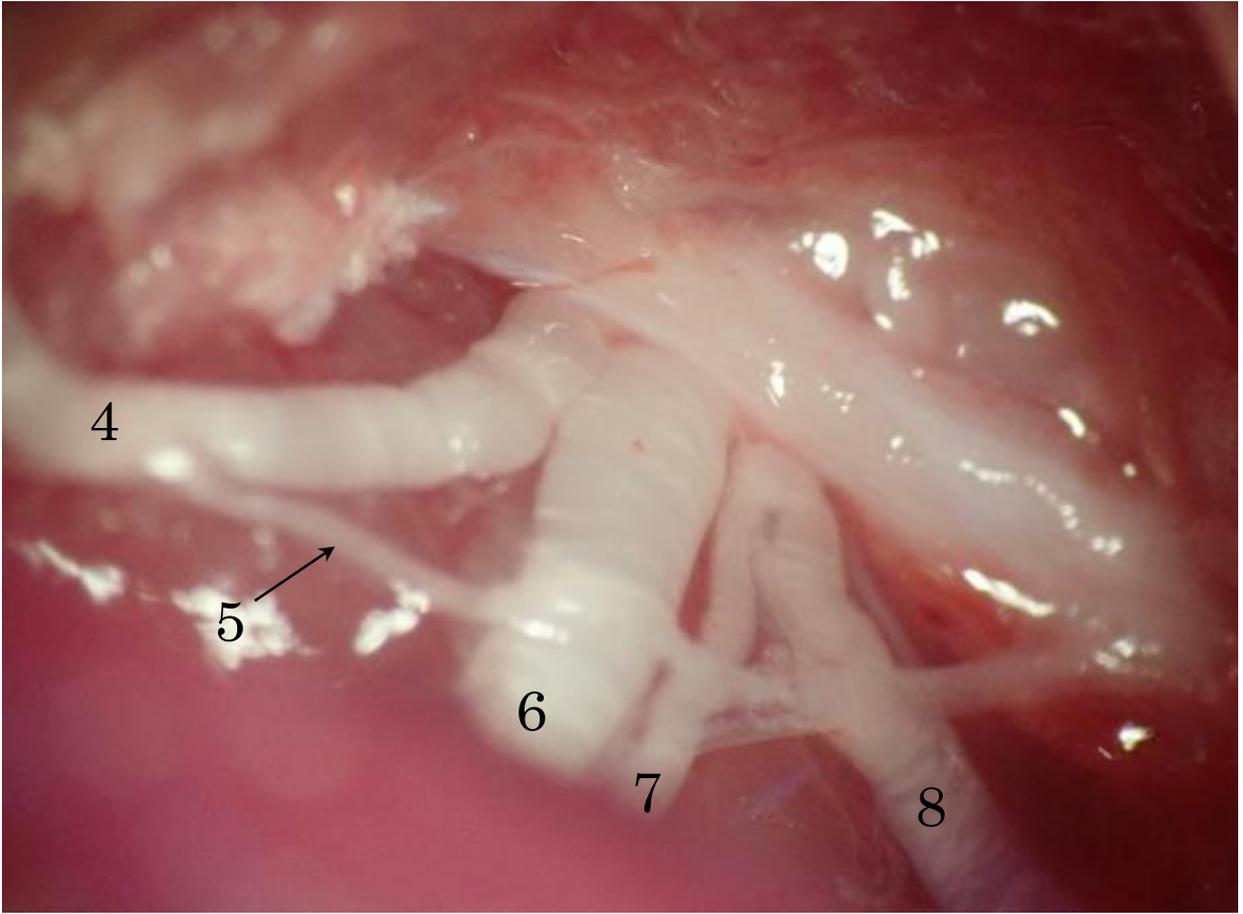
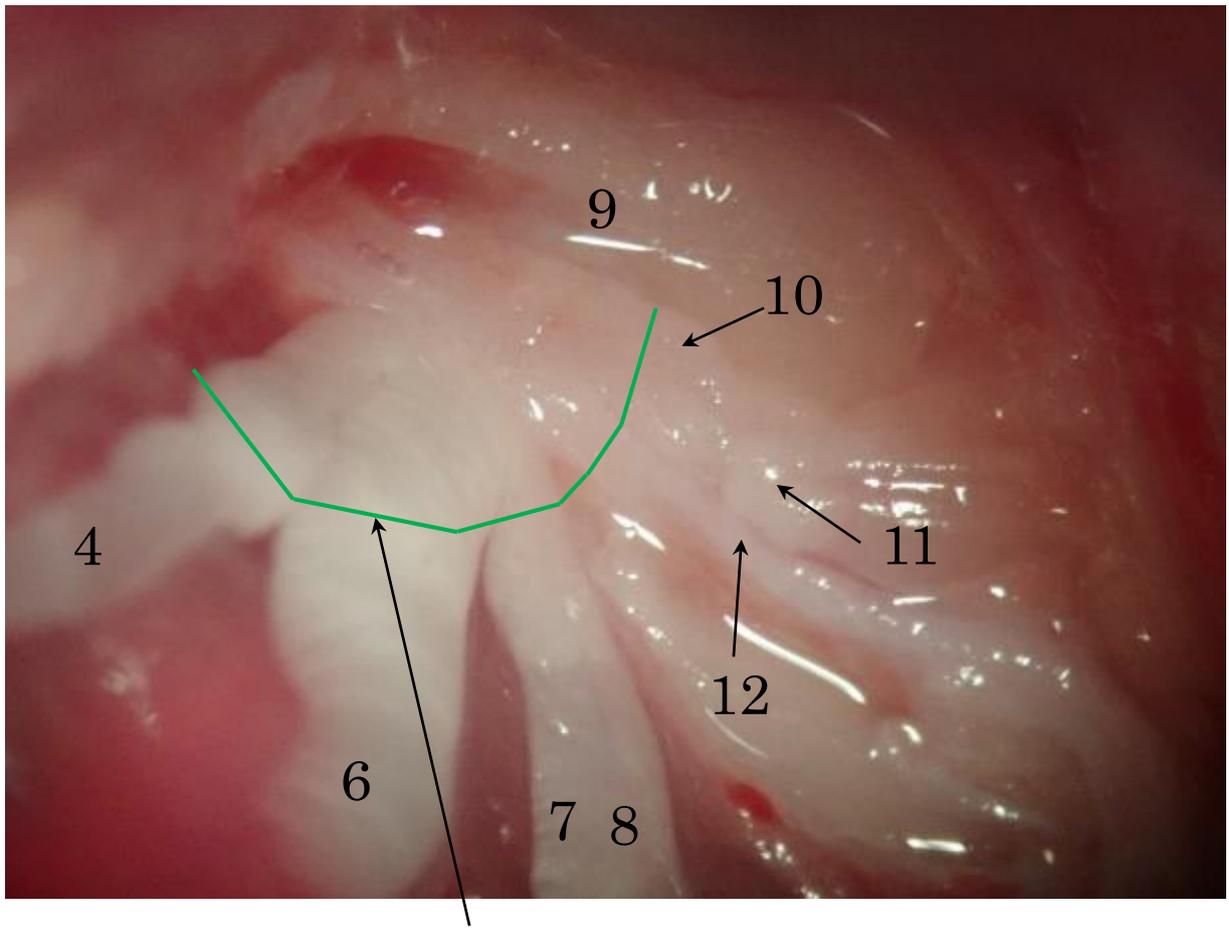
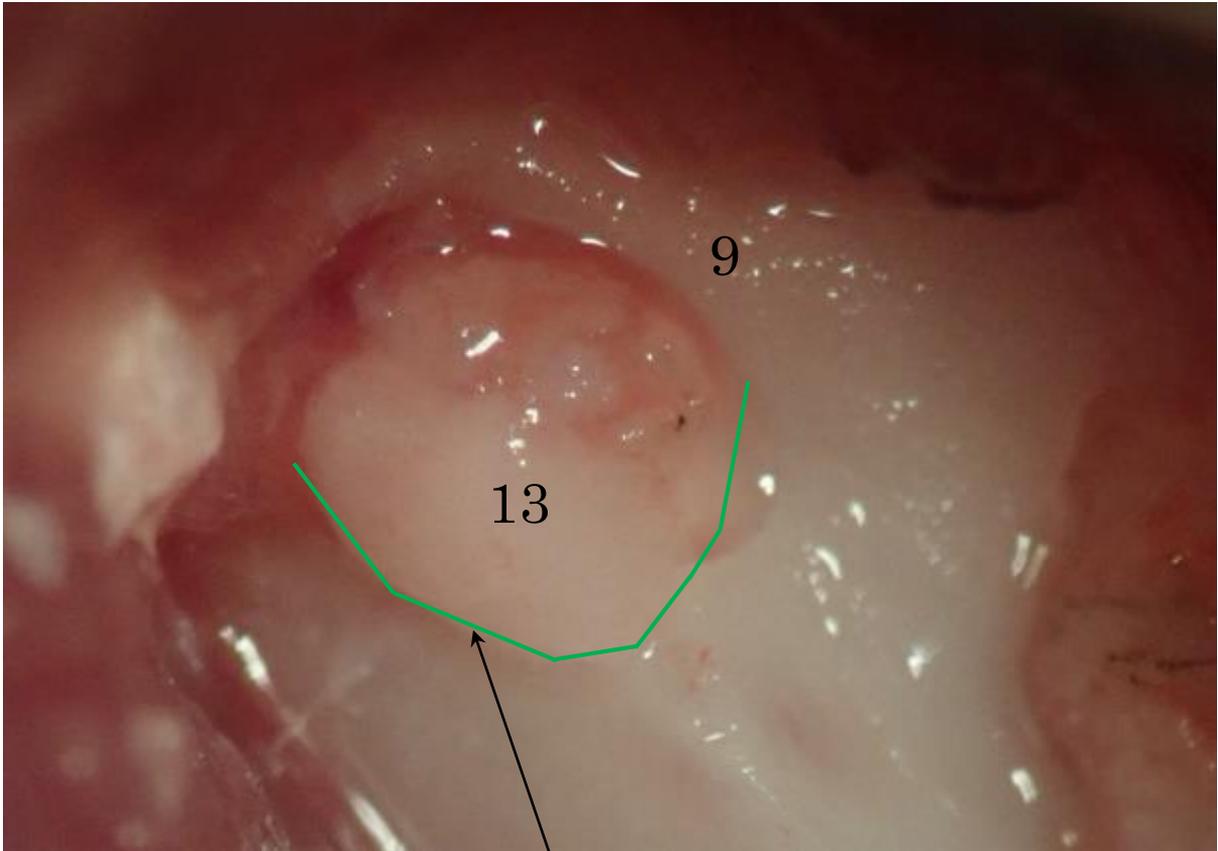


图 3C



各分枝の切断線

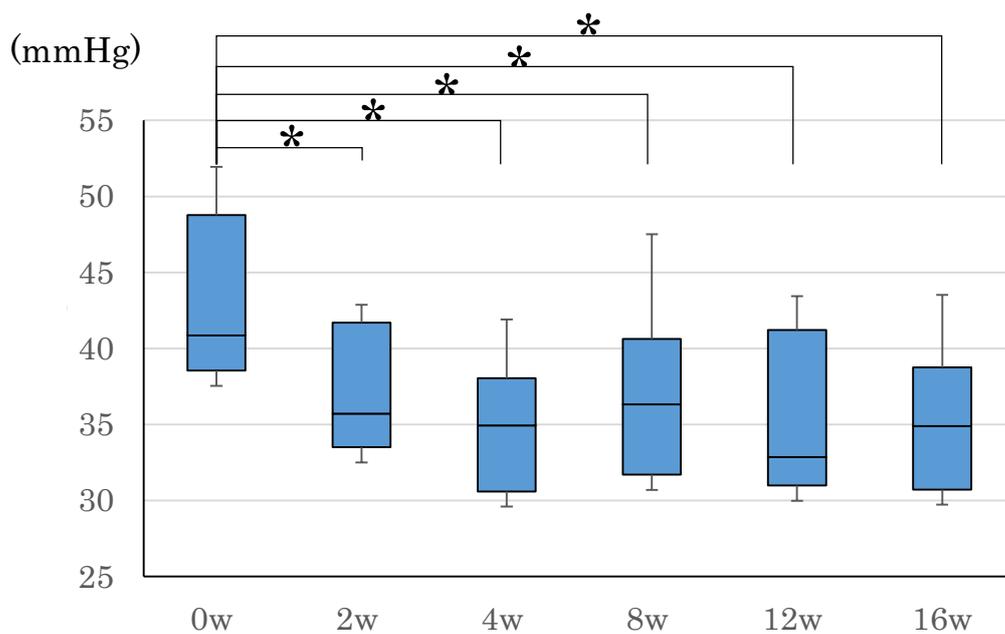
図 3D



各分枝の切断線

図 3E

(A) 手術側



(B) 対照側

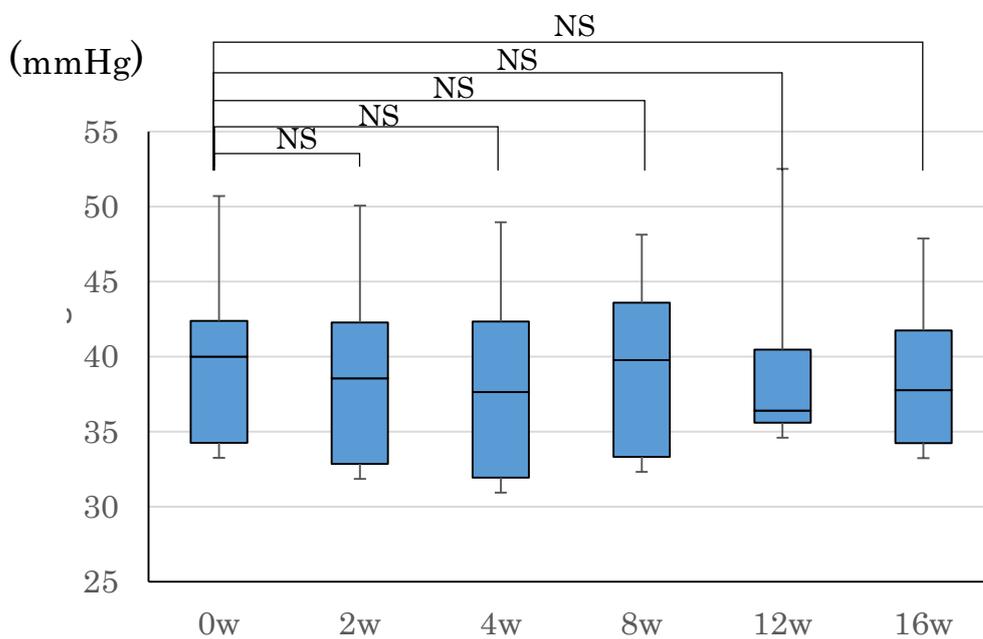
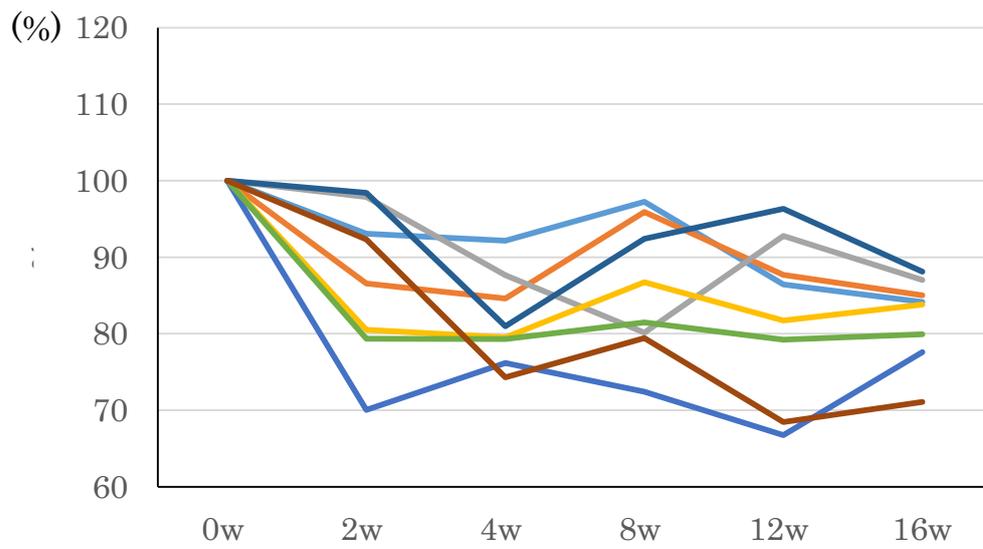


図4 POPの経時変化①

(C) 手術側



(D) 対照側

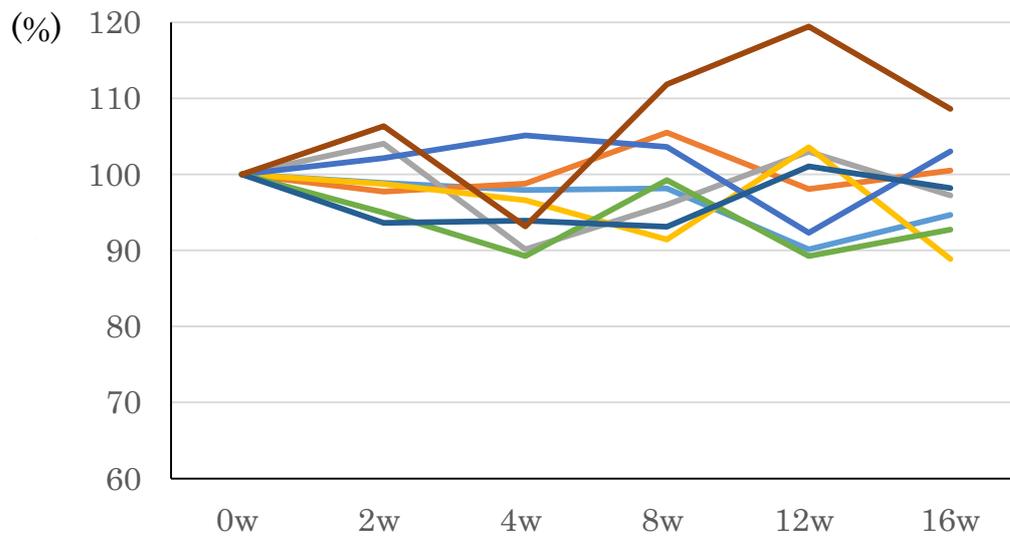


図4 POPの経時変化②

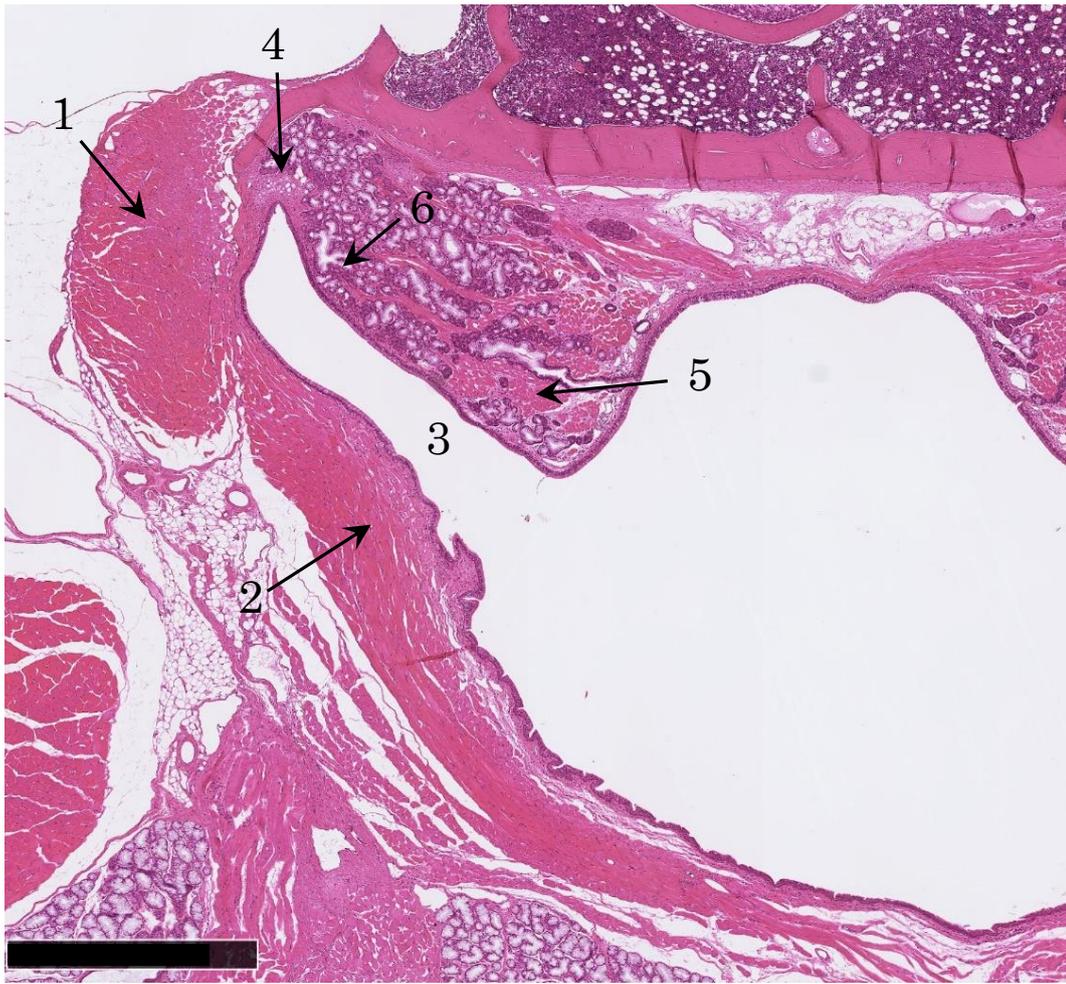


図5 対照側の耳管周囲組織 (HE染色、冠状断)

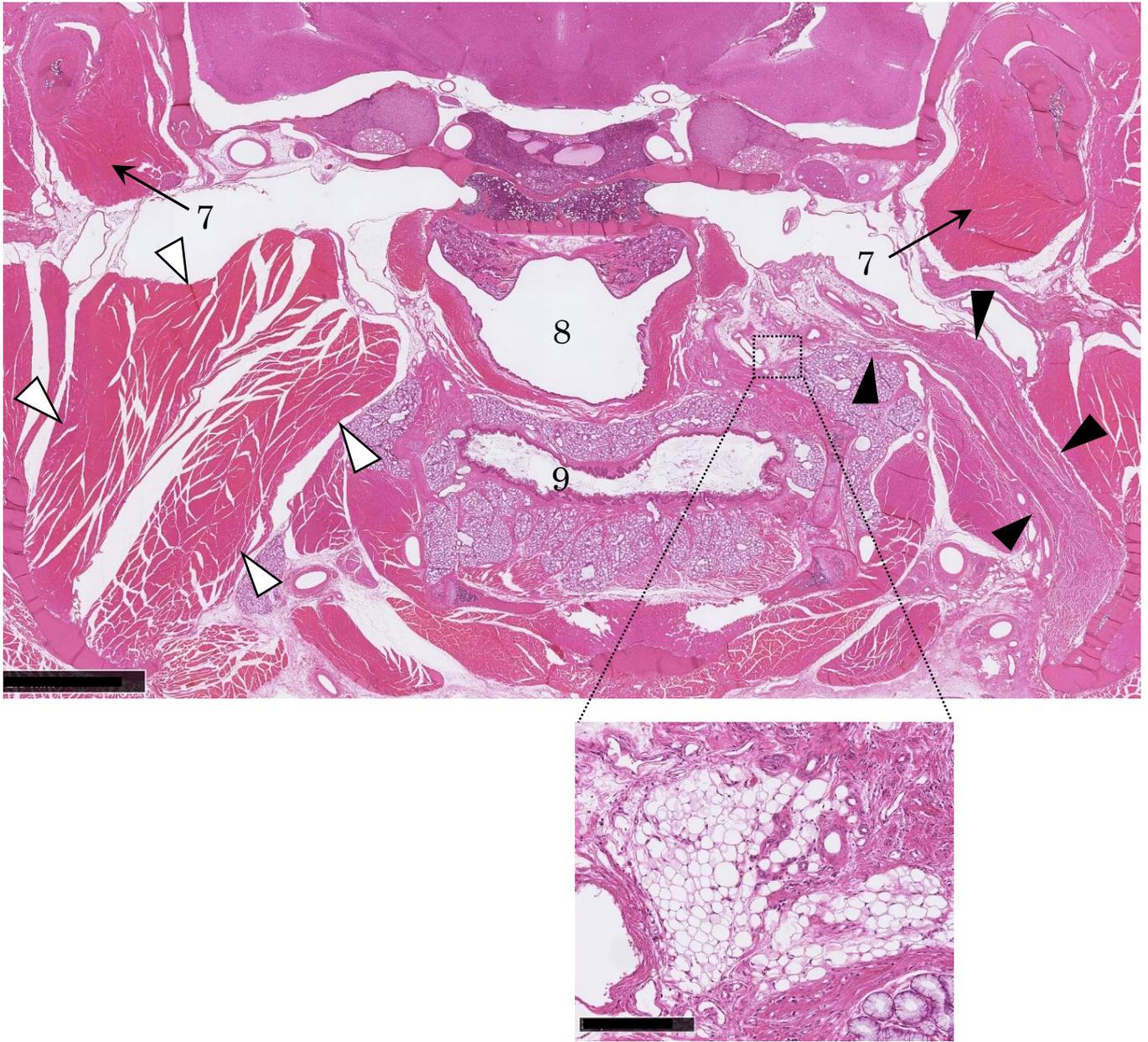
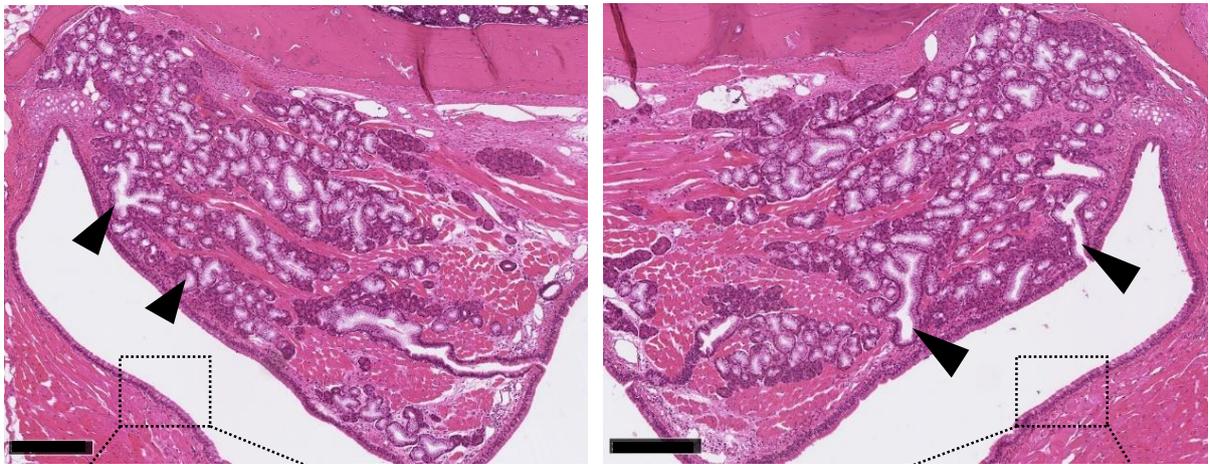


図6 耳管周囲組織の全体像 (HE染色、冠状断)

(A)



(B)

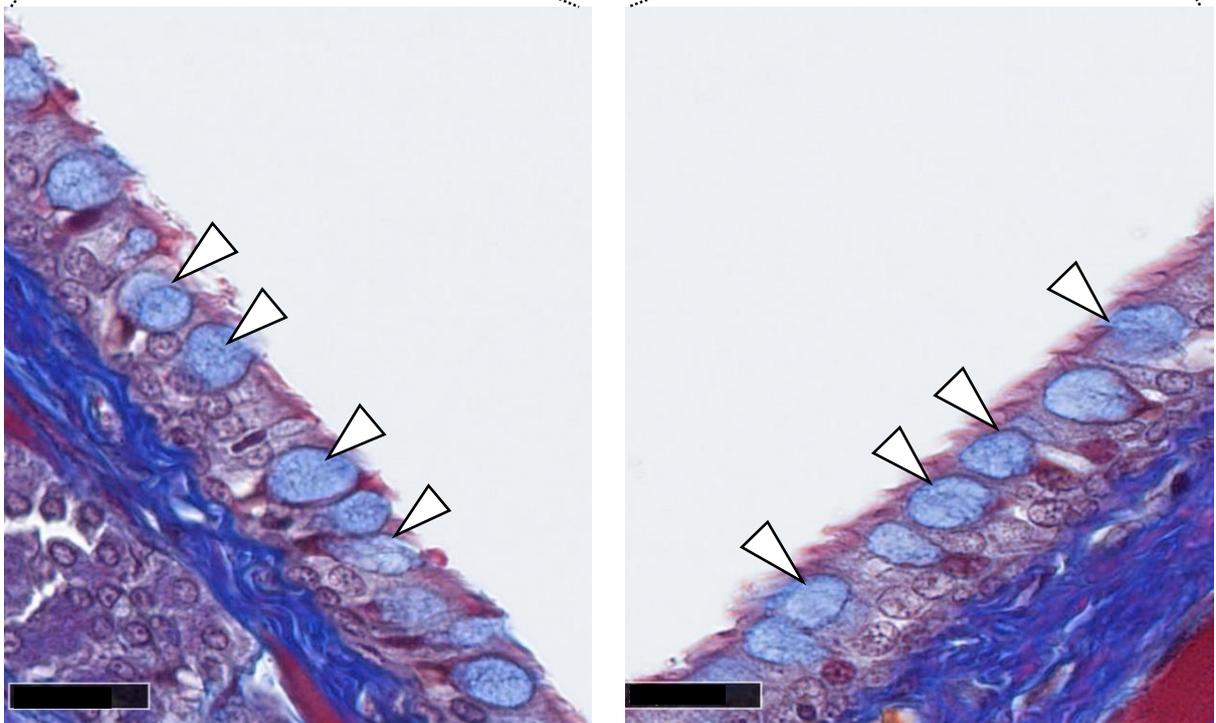
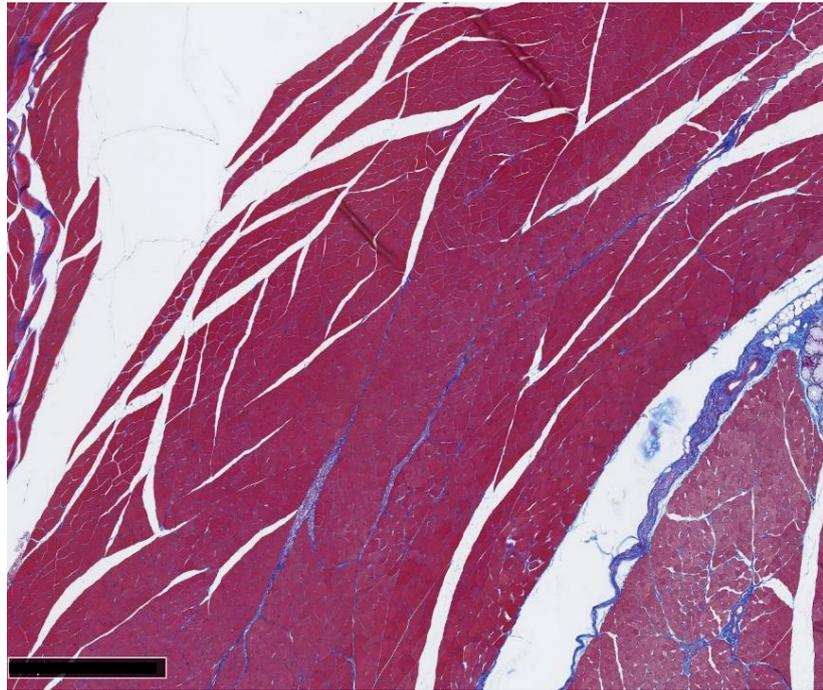


図7 分泌組織

対照側



手術側

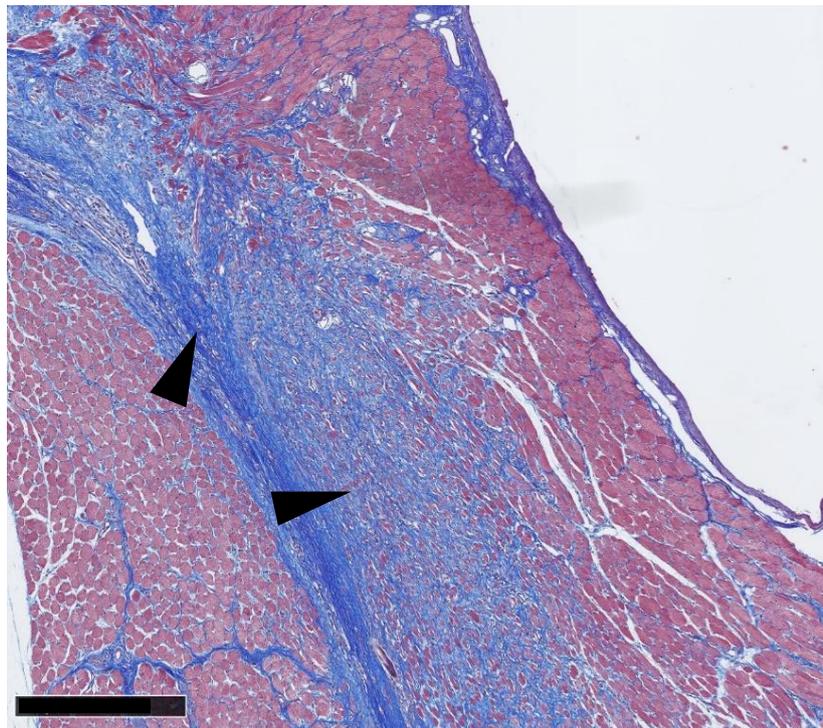


図8 術後16週での内側翼突筋(MT染色)

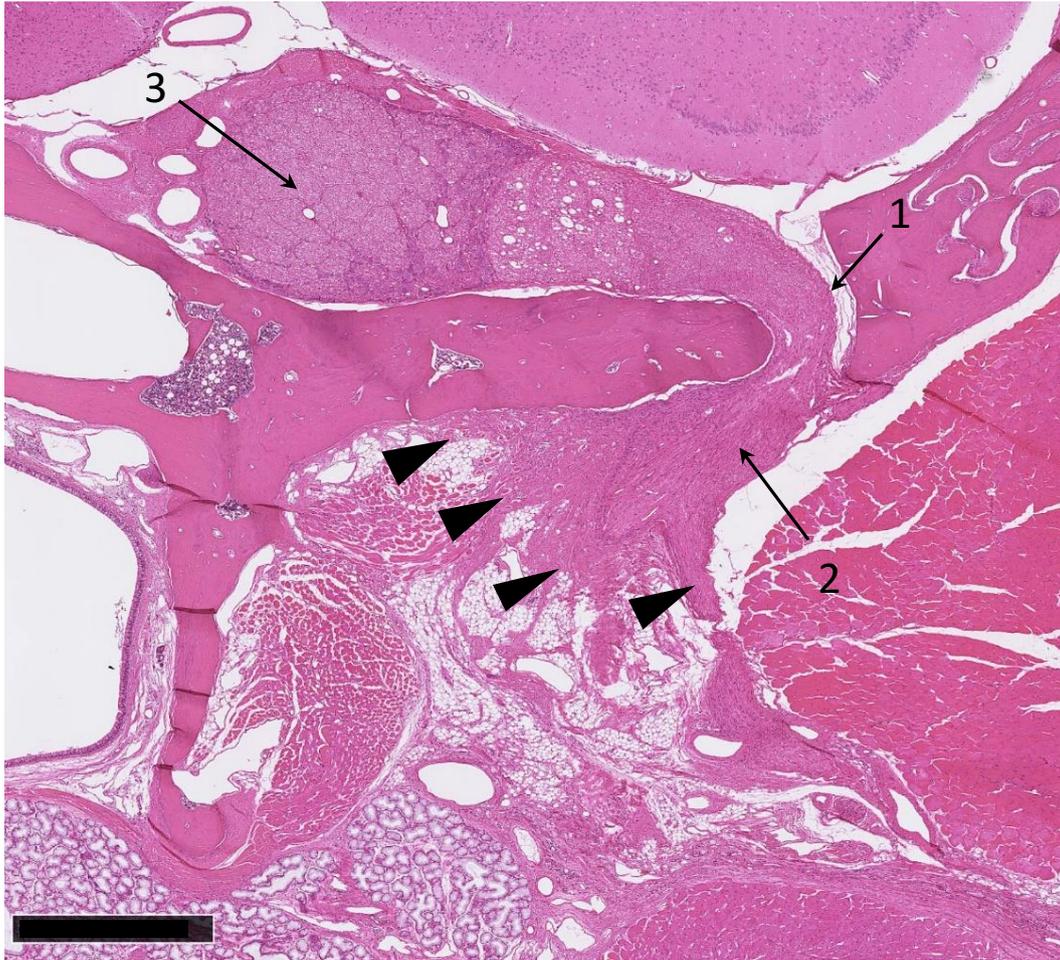


図9 卵円孔と下顎神経(HE染色、冠状断)

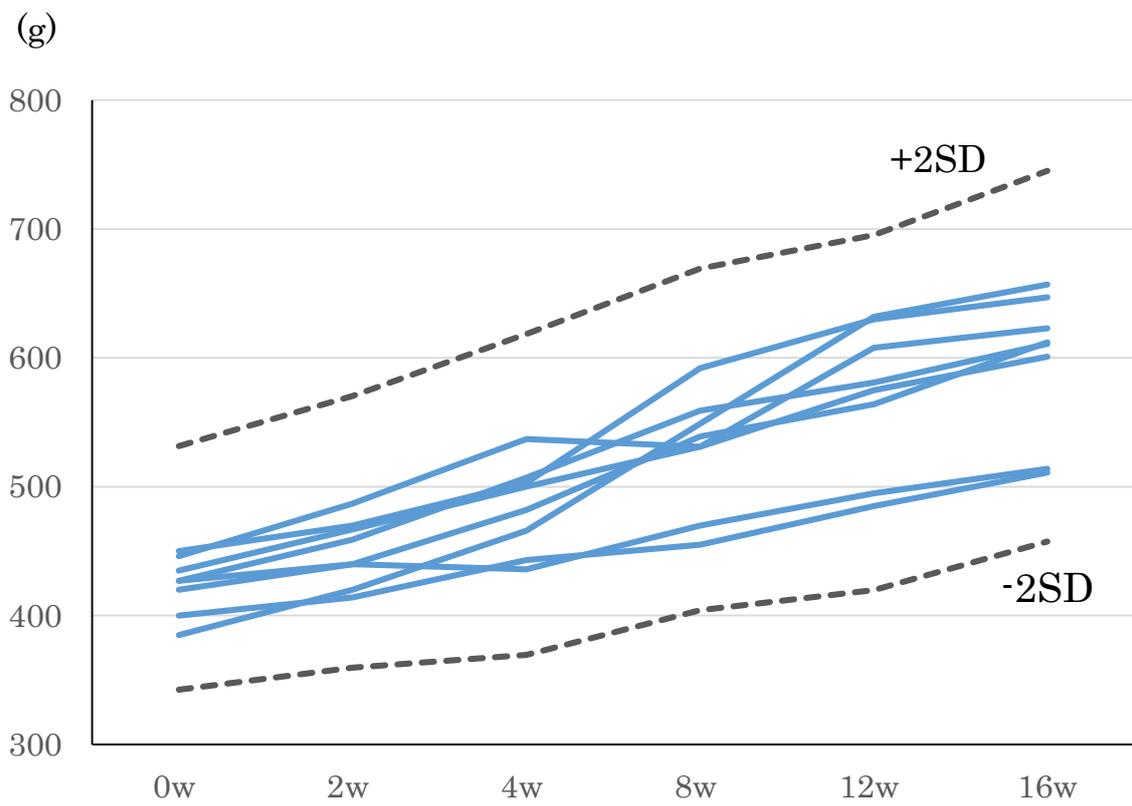


図10 体重の経時変化

図説

図 1 ヒト耳管周囲組織のシェーマ

耳管長軸に直交する平面での耳管周囲組織のシェーマを示す。

1. 耳管内腔、2. 耳管軟骨、3. オストマン脂肪体
4. 口蓋帆張筋、5. 口蓋帆挙筋、6. 翼突筋静脈叢
7. 内側翼突筋、8. 外側翼突筋

上：頭側、下：尾側、右：内側、左：外側

図 2A 耳管圧測定回路

ラットを腹臥位に寝かせイヤーチップを外耳道に挿入した(A)。イヤーチップは耐圧チューブを介して、シリンジポンプ(B)と圧トランスデューサー(C)に接続し閉鎖回路を作成した。計測された圧力はパソコン(D)に記録した。

図 2B 耳管圧測定グラフ

シリンジポンプより 4.5ml/min の速度で中耳腔へ圧を負荷していき、耳管が開大し急激に圧力が低下した点の圧を **passive opening pressure (POP)** とした。その後負荷圧と耳管が閉鎖する圧力が平衡

になったところで回路を開放し圧力を 0 に戻した。再び圧を負荷すると 2 回目の POP が観察された。このサイクルを 5 回繰り返して、3 回目から 5 回目の POP(矢印) の平均値をデータとして用いた。

図 3 右下顎神経切断の術中写真

1 : 顎舌骨筋、2 : 咬筋、3 : 内側翼突筋、4 : 舌神経、5 : 鼓索神経

6 : 下歯槽神経、7 : 顎舌骨筋神経、8 : 耳介側頭神経、9 : 翼突窩

10 : 内側翼突筋神経、11 : 耳神経節、12 : 翼突口蓋動脈、13 : 下顎神経本幹

上 : 内側、下 : 外側、左 : 頭側、右 : 尾側

図 4 POP の経時変化②

POP は手術側では術後 2 週から有意な低下を認め 16 週まで持続した(A)。

また全個体で 10%以上の圧力低下を認めた(C)。対照側では有意な低下は見ら

れなかった(B)(D)。 n=8 * : $p < 0.05$ NS : not significant difference

検定はウィルコクソン符号付順位和検定を用いた。

図5 対照側の耳管周囲組織 (HE 染色、冠状断)

術後 16 週での対照側の耳管周囲の構造物を示す。体軸に対し水平に筋束の走る口蓋帆張筋(1)と、垂直に筋束の走る口蓋帆挙筋(2)を耳管(3)の外側に認めた。口蓋帆挙筋腱は耳管軟骨(4)に停止しているのが確認できた。耳管の内上方には耳管咽頭筋(5)と耳管腺(6)が混在していた。

左：外側、右：内側 Bar：1mm

図6 耳管周囲組織の全体像 (HE 染色、冠状断)

口蓋帆張筋のさらに外側には内側翼突筋を認めた。内側翼突筋は対照側(▷)に比べ、手術側(▶)で著明な萎縮を認めた。同筋の起始部付近では脂肪組織の侵入が認められた(拡大図、Bar:250 μm)。内側翼突筋の上方には外側翼突筋(7)を認めた。鼻咽頭腔(8)、耳管に偏位は認めなかったが、口腔(9)は手術側に軽度偏位していた。全体として明らかな形態学的異常や組織壊死は認めなかった。 左：対照側、右：手術側、 Bar：2.5mm

図7 分泌組織

(A) 耳管腺(HE 染色) (▶) Bar：250μm

(B) 杯細胞(MT 染色) (▷) Bar：25μm 左：対照側、右：手術側

図 8 術後 16 週での内側翼突筋(MT 染色)

内側翼突筋の拡大像を示す。手術側では萎縮した筋の周囲や内部に膠原線維が
増生しているのが確認された(▶)。 Bar : 500 μ m

図 9 卵円孔と下顎神経(HE 染色、冠状断)

卵円孔(1)より出る下顎神経本幹(2)と、その分枝が切断されているのが組織学
的に確認できた (▶) 。

1 : 卵円孔、2 : 下顎神経本幹、3 : 三叉神経節

左 : 内側、右 : 外側 、 Bar : 1 mm

図 10 体重の経時変化

すべてのラットは術後正常に体重が増加し、Charles River が公表する SD ラ
ットの平均体重と比較し $\pm 2SD$ 以内の体重であった。n=8

引用文献

1. 土井 直. 耳管狭窄症の病態と治療. 耳喉頭頸 2013;85:404-409
2. 吉田 晴郎, 小林 俊光, 高崎 賢治. 耳管垂直断 CT による耳管及び耳管周囲組織の解析. Otol Jpn 2000;10(3):172-176
3. Neil S. Norton. 頭頸部・口腔顎顔面の臨床解剖学アトラス.
東京:医歯薬出版株式会社;2014.p.335-336
4. 小林 俊光. 耳管閉鎖障害の臨床. 日本耳鼻咽喉科学会 宿題報告 2005
5. Derkay CS. Eustachian tube and nasal function during pregnancy.
Otolaryngol Head Neck Surg 1988;99:558-566
6. Weissman A, Nir D, Shenhav R, Zimmer EZ, Joachims ZH. Eustachian tube function during pregnancy. Clin Otolaryngol 1993;13:212-214
7. 大島 猛史. 耳管開放症の臨床. 耳展 2016;59:118-123
8. Magnuson B. Tubal closing failure in retraction type cholesteatoma and adhesive middle ear lesions. Acta Otolaryngol 1978;86:408-417.

9. Oshima T, Kikuchi T, Kawase T, Kobayashi T. Nasal instillation of physiological saline for patulous Eustachian tube. *Acta Otolaryngol* 2010;130:550-553.
10. Endo S, Mizuta K, Takahashi G, Nakanishi H, Yamatodani T, Misawa K, et al. The effect of ventilation tube insertion or transtympanic silicone plug insertion on a patulous Eustachian tube. *Acta Otolaryngol* 2016;136:551-555
11. Kong SK, Lee IW, Goh EK, Park SH. Autologous cartilage injection for the patulous eustachian tube. *Am J Otolaryngol* 2011;32:346-348.
12. Doherty JK, Slattery WH. Autologous fat grafting for the refractory patulous eustachian tube. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;128:88-91.
13. Vaezeafshar R, Turner JH, MD, Li G, Hwang PH. Endoscopic Hydroxyapatite Augmentation for Patulous Eustachian Tube. *Laryngoscope* 2014;124:62–66.
14. Takano A, Takahashi H, Hatachi K, Yoshida H, Kaieda S, Adachi T, et al. Ligation of eustachian tube for intractable patulous eustachian tube: a preliminary report. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007;264:353–357.

15. Endo S, Mizuta K, Takahashi G, Nakanishi H, Yamatodani T, Misawa K, et al. The effect of ventilation tube insertion or transtympanic silicone plug insertion on a patulous Eustachian tube. *Acta Otolaryngol* 2016;136:551-555.
16. Albiin N. The anatomy of the Eustachian tube. *Acta Otolaryngol* 1984;414:34-37
17. Perlman HB. The Eustachian tube: Abnormal patency and normal physiologic state. *Arch Otolaryngol* 1939;30:212–238.
18. Ikeda R, Kobayashi T, Yoshida M, Yoshida N, Kikuchi T, Oshima T, et al. Patulous Eustachian Tube and Otitis Media With Effusion as Complications After Trigeminal Nerve Injury. *Otol Neurotol*. 2017;38:1125–1128.
19. Franz B, Anderson CR. A model of active Eustachian tube function in the rat: effect of modulating parasympathetic innervation. *Acta Otolaryngol* 2002;122:374-381.

20. Franz B, Shafton AD, Anderson CR. Topical application of betahistine improves eustachian tube function in an animal model. *Acta Otolaryngol* 2011;131:1155-1159.
21. Ebert CS Jr, Rose AS, Blanks DA, Eapen RP, Kandimalla ER, Agrawal S, et al. Immune modulatory oligonucleotides in prevention of nasal allergen-induced Eustachian tube dysfunction in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;137:250-255.
22. Al-Hadithi BA, Mitchell J. The otic ganglion and its neural connections in the rat. *J Anat* 1987;154:113-119.
23. [https://www.crj.co.jp/cms/pdf/info_common/62/3971076/survival_data_SD_mar_2009 ca.pdf](https://www.crj.co.jp/cms/pdf/info_common/62/3971076/survival_data_SD_mar_2009_ca.pdf)
24. Gardikes A, Kaufman RS. Otologic complications after gasserian ganglion surgery. *Arch Otolaryngol* 1972;95:437-441.
25. Ito CJ, Malone AK, Wong RH. Denervation of the Eustachian Tube and Hearing Loss Following Trigeminal Schwannoma Resection. *J Neurol Surg Rep* 2016;77:e56-61.

26. Malm L. The effect of gestation on Eustachian tube function in rats. *Acta Otolaryngol* 1989;457:154-158.
27. Cantekin EI, Phillips DC, Doyle WJ. Effect of surgical alterations of the tensor veli palatini muscle on Eustachian tube function. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1980;89:47-53.
28. Hamada E. Animal model of otitis media with effusion. *Acta Otolaryngol Suppl* 1993;500:70-74.
29. Kumai Y, Ito T, Matsukawa A, Yumoto E. Effects of denervation on neuromuscular junctions in the thyroarytenoid muscle. *Laryngoscope* 2005;115:1869-1872.
30. Miyamaru S, Kumai Y, Ito T, Yumoto E. Effects of long-term denervation on the rat thyroarytenoid muscle. *Laryngoscope* 2008;118:1318-1323.
31. 大八木章博. 中耳・耳管・咽頭の自律神経支配に関する研究. *耳鼻臨床* 1990;83:309-318.

32. Nishijima H, Kondo K, Toma-Hirano M, Iwasaki S, Kikuta S, Fujimoto C, et al. Denervation of nasal mucosa induced by posterior nasal neurectomy suppresses nasal secretion, not hypersensitivity, in an allergic rhinitis rat model. *Lab Invest* 2016;96: 981–993.
33. Mulder JJ, Kuijpers W. Rat eustachian tube and its musculature. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999;108:277-285.
34. Sonobe M. Studies on the development and innervation of the rat palatal muscles. *Jpn J Oral Biol* 1982;24:864-892.
35. Weijnen JA, Surink S, Verstralen MJ, Moerkerken A, De Bree GJ, Bleys RL, et al. Main trajectories of nerves that traverse and surround the tympanic cavity in the rat. *J Anat* 2000;197:247-262.

研 究 業 績

原 田 英 誉

I 発表	①一般発表	14
	②特別発表	なし
II 論文	①原著論文	2 (共 2)
	②症例報告	なし
	③総説	なし
III 著書	なし	

以上

I 発表

① 一般発表

1. 原田英誉, 野村泰之, 戸井輝夫, 岸野明洋, 木村優介, 増田毅,
鳴原俊太郎, 古阪徹: 医師国家試験めまい平衡模擬問題の作成体験,
第73回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 横浜, 2014年11月
2. 戸井輝夫, 野村泰之, 岸野明洋, 木村優介, 原田英誉, 増田毅,
鳴原俊太郎, 古阪徹: 高齢者の前庭神経炎の一例, 第73回日本めまい平
衡医学会総会・学術講演会, 横浜, 2014年11月
3. 鳴原俊太郎, 野村泰之, 浅川剛志, 増田毅, 友松裕貴, 三浦正稔,
木村優介, 岸野明洋, 原田英誉, 平井良治, 池田稔, 大島猛史: 当科にお
ける中耳真珠腫 second look operation の検討, 第116回日本耳鼻咽喉科
学会総会・学術講演会, 東京, 2015年5月
4. 田中真琴, 原田英誉, 浅居僚平, 森田優登, 田井道愛, 池田稔,
大島猛史: 最近2年間の当科味覚専門外来受診患者の検討, 第116回日
本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 東京, 2015年5月
5. 野村泰之, 戸井輝夫, 岸野明洋, 木村優介, 原田英誉, 森田優登,
鈴木啓誉, 澤田英沙子, 増田毅, 鳴原俊太郎, 大島猛史: ぐらぐら、ふわ

ふわめまいと加齢性平衡障害, 第 116 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術
講演会, 東京, 2015 年 5 月

6. 矢部健介, 松崎洋海, 工藤逸大, 高根智之, 石井崇平, 鈴木啓誉,
大内俊孝, 原田英誉, 牧山 清, 大島猛史: 2 種類の良性喉頭腫瘍を同時
に治療した一例, 第 208 回日本耳鼻咽喉科学会東京都地方部会学術講演
会, 東京, 2015 年 7 月
7. 松崎洋海, 牧山 清, 工藤逸大, 平井良治, 高根智之, 鈴木啓誉,
石井崇平, 大内俊孝, 原田英誉, 矢部健介, 大島猛史: 甲状軟骨形成術
I 型再手術例の検討, 第 67 回日本気管食道科学会総会・学術講演会, 福
島, 2015 年 11 月.
8. 嶋原俊太郎, 野村泰之, 増田 毅, 高根智之, 戸井輝夫, 池田篤生, 三浦正
稔, 岸野明洋, 木村優介, 原田英誉, 齋藤雄一郎, 荘司政利, 嶋原純子,
大島猛史: 内リンパ水腫症例のめまい発作に対する苓桂朮甘湯の効果,
第 74 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会, 岐阜, 2015 年 11 月
9. 嶋原俊太郎, 野村泰之, 浅川剛志, 平井良治, 増田 毅, 三浦正稔,
岸野明洋, 木村優介, 原田英誉, 池田 稔, 大島猛史: 両側性中耳真珠腫症
例の検討, 第 117 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 名古屋, 2016
年 5 月

10. 松崎洋海, 牧山 清, 工藤逸大, 平井良治, 高根智之, 鈴木啓誉, 石井崇平, 大内俊孝, 原田英誉, 矢部健介, 大島猛史 : 甲状軟骨形成術 I 型再手術例の検討, 第 68 回日本気管食道科学会総会・学術講演会, 東京, 2016 年 11 月
11. 原田英誉, 平井良治, 大島猛史 : 下顎神経切断によるラット耳管開放症モデル確立の試み, 第 27 回日本耳科学会総会・学術講演会, 横浜, 2017 年 11 月
12. 黄田忠義, 嶋原俊太郎, 野村泰之, 平井良治, 増田 毅, 木村優介, 岸野明洋, 原田英誉, 大島猛史 : Hyrtl's fissure からの耳性髄液漏症例, 第 27 回日本耳科学会総会・学術講演会, 横浜, 2017 年 11 月
13. 嶋原俊太郎, 野村泰之, 平井良治, 増田 毅, 木村優介, 岸野明洋, 原田英誉, 大島猛史 : 聴神経腫瘍内耳道底進展例の聴力予後, 第 27 回日本耳科学会総会・学術講演会, 横浜, 2017 年 11 月
14. 嶋原俊太郎, 野村泰之, 平井良治, 増田毅, 木村優介, 岸野明洋, 原田英誉, 原将太, 御子柴郁夫, 大島猛史 : 真珠腫 Canal wall down with canal reconstruction 手術症例の再発の検討, 第 119 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 横浜, 2018 年 5 月

②特別発表

なし

II 論文

①原著論文

1. 岸野明洋, 野村泰之, 戸井輝夫, 木村優介, 原田英誉, 増田毅,
鳴原俊太郎, 斎藤雄一郎, 大島猛史: メニエール病の入院症例について,
Equilibrium Research, 74(4)282-289, 2015
2. 野村泰之, 原田英誉, 鳴原俊太郎, 大島猛史, 地家真紀, 兼板佳孝, 藤
田之彦: 医学生の医師国家試験模擬問題作成による学習習熟度の評価の
試み, *日本大学 FD 研究*, 5号 15-25, 2017

②症例報告

なし

③総説

なし

III 著書

なし