

## IMMUNOLOGICAL STUDY OF RECURRENT PAROTITIS IN CHILDREN

Kenjiro Kitao, Takeru Ishikawa

Department of Otolaryngology, Kumamoto University Medical School

Fiftyfive children with recurrent parotitis were investigated immunologically. Culture from the patients frequently yielded *Streptococcus mitis*, *Neisseria sicca* and *Haemophilus influenzae*. In the serum, the antibody level to *Neisseria sicca* was significantly lower ( $P < 0.005$ ) in the antibody titers of all bacteria examined were significantly higher ( $P < 0.005$ ) in the patients. On the lymphocyte blastogenesis stimulated by the soluble antigen of *Ne-*

*isseria sicca*, the patients showed a significantly lower value ( $P < 0.025$ ) than the controls. No significant differences were observed between the patients and controls when the cells were stimulated with PHA-M. The frequency of HLA-Cw1 showed a significant difference (corrected  $P$  value  $< 0.024$ ) between the patients and controls. These observations suggest that low responsiveness of lymphocytes in patients to *Neisseria sicca* may be important in the pathogenesis of recurrent parotitis.

### 小児反復性耳下腺炎の免疫学的研究

熊本大学医学部耳鼻咽喉科学教室

北尾健二郎・石川喙

#### はじめに

小児期から学童期にかけて耳下腺部に腫脹を来す疾患に流行性耳下腺炎と小児反復性耳下腺炎がある。小児反復性耳下腺炎は口腔内常在菌が起炎菌であり、そのワクチンが有効であること、思春期までに腫脹を見なくなる<sup>1)</sup>ことなどの特徴があるが以上の事実は本疾患の発症に免疫学的メカニズムの関与を示唆させる。現在までの報告では重篤な免疫不全は

ないこと、またEBvirusとの関係で興味深いデータも示されている。今回著者らは本疾患についてリンパ球を中心に検討したので概要につき報告する。

#### 対象及び方法・結果

対象：昭和57年6月から昭和60年6月迄の3年間に当院耳鼻咽喉科を受診した患者のうち、下記のcriteriaを満たす55例（男：34例，女：21例）を対象とした。

- a) 小児で反復性耳下腺腫脹をおこす。
- b) 化膿性炎症である。
- c) sialographyで点状陰影をみとめる。

上記患児の急性期にStenon 管開口部からの排膿について調べた細菌検査では(Table 1)のごとくstreptococcus mitisが最も多くついでNeisseria属がみられた。Neisseria属16例のうち9例について同定した結果、Neisseria sicca 5例、Neisseria mucosa 3例、同定不能1例となった。そこでS.mitis、N.sicca、H.influenzaeについて血清と唾液の抗体価測定を行なった。方法はShanson<sup>2)</sup>らの方法にしたがって間接蛍光抗体法で施行した。結果は血清ではN.siccaで、疾患群がControl群に比べ有意(P<0.005)に低値を示した。また唾液では3菌ともControl群に比し疾患群で有意(P<0.005)に高値を示した(Fig 1)。次にリンパ球の反応性を探る目的からリンパ球幼若化反応を施行した。

1) まず、急性期の患児のStenon 管開口部から分離培養したN.siccaを1.5gまで増菌し、PBS(0.01M, pH7.2)で3回洗浄したのち、25mlのPBSを加え、氷冷下で15KH、30分の超音波処理を行なった。これを4℃、15000rpm 20分間遠沈し上清と沈さを分離し、上清を可溶性Neisseria sicca抗原とした。これを孔径0.45 $\mu$ mのMillipore filterに通し、Lowryらの方法<sup>3)</sup>に準じて牛血清アルブミンを標準としてタンパク量を測定し、PBSにタンパク量10mg/mlとなるように調整した。2) つぎに、末梢血リンパ球を凍結保存した。患者5例、対照5例の末梢血をFicoll-Hypaque比重法にて、リンパ球分画を採取、complete medium(RPMI 1640, 20%fetal calf serum, 20mM Hepes buffer, penicillin 100IU/ml, streptomycin 100 $\mu$ g/ml)に3-10 $\times$ 10<sup>6</sup>/mlの濃度に浮遊させ、DMSOを10%の濃度になるように、細胞浮遊液に滴かした。これを-192℃に凍結保存しておき、

使用時に42℃で急速融解した(Fig 2)。

3) 急速融解したリンパ球をcomplete mediumにて希釈し、トリパンブルーによりcell viabilityを計り、生存リンパ球数を2 $\times$ 10<sup>6</sup>/mlに調整してFalcon microplate 3042に100 $\mu$ l/well(2 $\times$ 10<sup>5</sup>/well)ずつ分注した。可溶性N.sicca抗原を各wellに0.01 $\mu$ gずつ、Phytohemagglutinin-M(PHA-M)を10 $\mu$ g/well添加した。対照としてcomplete mediumのみを添加した。CO<sub>2</sub> incubator(37℃, CO<sub>2</sub> 5%, 湿度100%)にて6日間培養後、<sup>3</sup>H-thymidinを0.5 $\mu$ Ci/wellずつ加え、さらに24時間培養後、cell harvesterでリンパ球を採取し、液体シンチレーションカウンターで $\beta$ 線を測定した(Fig 3)。その結果はN.siccaの刺激では疾患群のほうが対照に比して有意(P<0.025)に低値をしめした。PHA刺激では、両者間に有意差はなかった(Fig 4)。

つぎにgene regulationに関して検索するためHLA typingを施行した。患者血液よりリンパ球をFicoll-hypaque法により分離し、microlymphocyte cytotoxicity test<sup>4)</sup>にてHLA-A, B, C Locusについて検索した。結果はTable 2のごとくなり、HLA-CW1において対照群との間に有意さが認められた。

## 考 察

Sialoangiectasis についてはその病因の解明に種々のアプローチがされcongenital malformation, infection, allergy, immunological disorder<sup>5)~7)</sup>などの可能性が考えられてきたが、最近まで推測の域をでなかった。1983年にAkaboshi<sup>8)</sup>らが本疾患についてEpstein-Barr virus(EBV) infectionの立場から報告したが要約すると、本疾患群の約60%において正常者には見られないEBV capsid antigenに対するIgA抗体やEBV early antigenのRcomponentに対するIgG抗体がみとめられ、その他のEBV抗体も正

Table 1 Culture from 23 patients with recurrent parotitis in Childreo

Organism	No. of patients
Streptococcus mitis	21
Neisseria (Genus)	16
Neisseria sicca	5
Neisseria mucosa	3
Other Neisseria	1
Haemophilus influenzae	6
Streptococcus pneumonia	2

9 cultures are further examined

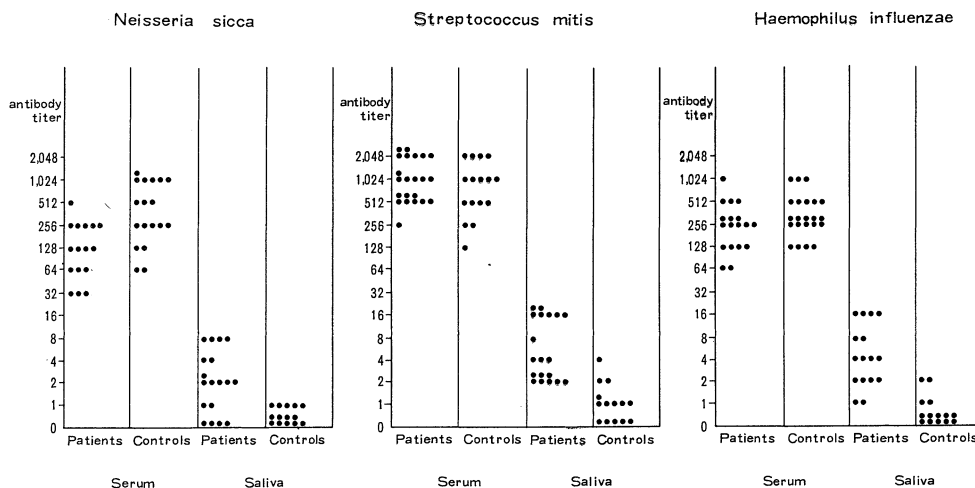


Fig. 1 Antibody titer against *Neisseria sicca*, *Streptococcus mitis*, *Haemophilus influenzae* in patients and controls

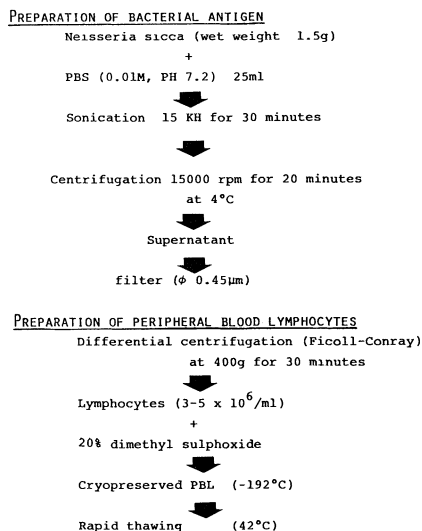


Fig. 2 Preparation of bacterial antigen and Preparation of peripheral blood lymphocytes

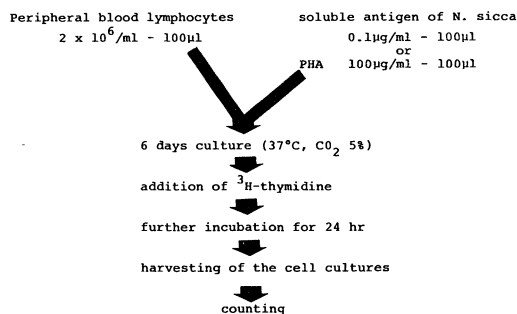


Fig. 3 Blastoid transformation study

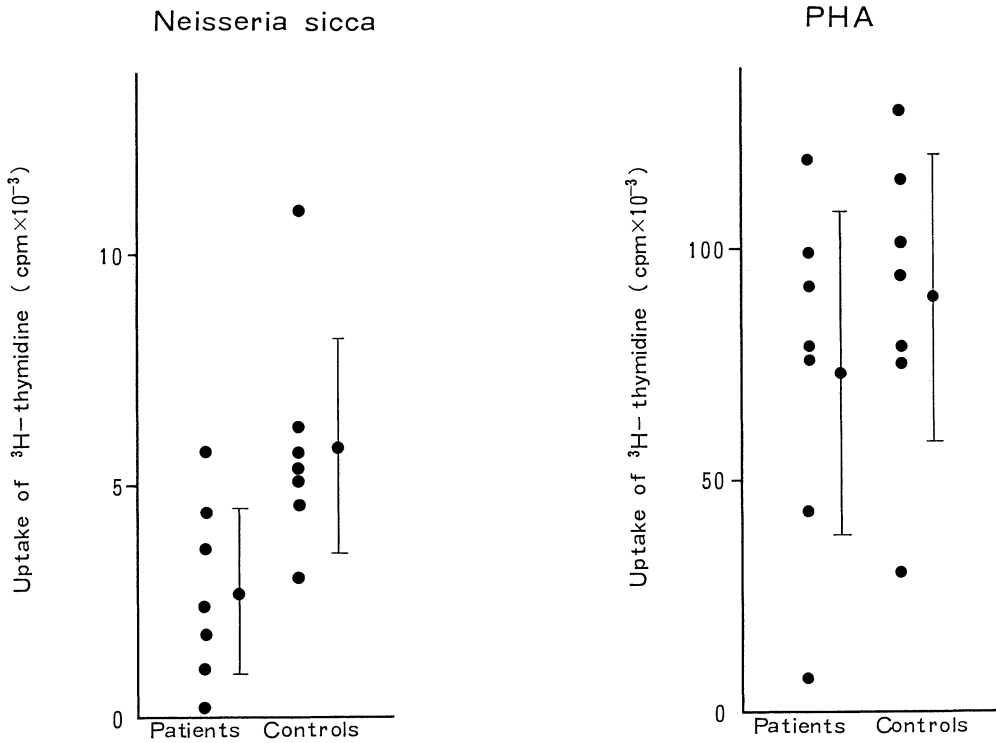


Fig. 4 Lymphocyte blastogenesis in patient and controls

Table. 2 HLA phenotype frequencies of patients and controls.

HLA antigen	Frequency (%)	
	Patients (n:23)	Controls (n:207)
A1	0.0	1.0
2	4.78	4.64
3	0.0	1.4
11	4.4	1.50
W19(W31, W33)	2.60	1.3.5
W24	7.3.9	5.9.9
26	1.3.0	2.0.3
B5 (W51, W52)	3.4.8	3.9.6
7	9.0	1.9.8
8	0.0	0.0
12	1.7.4	1.1.1
13	0.0	3.9
14	0.0	0.0
15	3.4.8	1.7.9
16	0.0	2.4
17	4.4	1.4
W35	2.1.7	1.8.8
37	0.0	0.1
40	3.0.4	2.5.6
W54	2.6.1	1.8.8
CW1	4.3.4	9.7
W2	0.0	0.0
W3	4.7.8	2.9.0
W4	1.7.4	1.0.6

HLA-CW 1		
HLA	Patients (n=23)	Controls (n=207)
CW 1 (+)	10	20
CW 1 (-)	13	187
$\chi^2=20.9$	$P < 0.001$	Corrective $P < 0.024$

常者に比して高値をしめす。以上のように本疾患とEBVとはなんらかの関連があることを示す興味深いデータである。しかし本疾患においては急性化膿性炎症像が前面にみとめられること、EBVとの関係が認められない症例も多いことを考慮するとEBVのみでは本症の病因を説明できない。本疾患の特徴に1, 2才から発症し始め, 10才前半で自然緩解するということが挙げられる。これは免疫能のmaturation との関係を示唆する所見である。Kalm<sup>9)</sup>がRecurrent acute purulent otitis media (rAOM) について報告しているが, rAOMは生後6ヶ月から2.5才までをピークとして10才までに多発する疾患であり, 検索の結果, Streptococcus pneumoniaeのcapsular polysaccharide に対する血中1g G抗体の不足のため発症する。またIgG抗体の不足はその産生能の遅延が本体であり, 加齢により同年齢の健康人と同レベルの抗体産生にたつする。以上のようにrAOMは抗体産生系の未熟が発症に深くかかわっている。我々のデータでもPatientsでは弱毒菌であるN. sicca に対する抗体価がひくいとの結果がでたが, これはlymphocyte blastogenesis の結果を考慮すると患者リンパ球のN. sicca にたいする低応答性が抗体産生低下を来しN. siccaのinfection を生じたと推測できる。HLA-CWIの結果はリンパ球の低応答性がgene regulationと係わり合いがあるかどうか今後の問題である。

#### ま と め

- 1) 起炎菌はS. mitis, Neisseria 属が多数を占めた。
- 2) S. mitis N. sicca H. influenzaeについて, 血清と唾液中の抗体価を測定した。血清抗体価はN. sicca で疾患群が対照群に比して低値をしめた。唾液中では測定した3菌とも疾患群が対照群より高値を示した。
- 3) 疾患群ではN. sicca に対するリンパ球幼

若化反応の低下が認められた。

- 4) HLA-CW1においてControl との間に頻度差が見られた。

#### 参 考 文 献

- 1) 宮下久夫他: Sialoangiectasis の免疫学的研究, 日耳鼻, 77: 1~7, 1974
- 2) Shanson, D.C. et al.: An immunofluorescent method for detecting antibodies against viridans streptococci in Streptococcus viridans endocarditis, J. Clin. Pathology, 31: 292~293, 1978
- 3) Lowry, O.H. et al.: Protein measurement with Folin phenol reagent, J. Biol. Biochem., 193: 265~275, 1951
- 4) Ray, J. G. et al.: Manual of tissue typing Techniques, DHEW Publication No. (NIH): 74~545, 1976
- 5) Blatt, I. M. : On sialoangiectasis and benign lymphoepitheliadenopathy. Laryngoscope, 74: 1684~1746, 1964
- 6) Hemenway, W. G. : Chronic punctate parotitis, Laryngoscope, 81: 485~509, 1971
- 7) Kcenno, A. et al.: A study on the pathogenesis of recurrent parotitis in childhood, Ann. Otol. Rhinol. (Suppl. 63): 1~20, 1979
- 8) Akaboshi, I., et al.: Unique pattern of Epstein-Barr virus specific antibodies in recurrent parotitis. Lancet, 1: 1049~1051, 1983
- 9) Kalm, O. et al.: Pneumococcal antibodies in families with recurrent otitis media, Int. Archs Allergy appl. Immun., 75: 139~142, 1984

---

質 疑 応 答

**質問** 茂木五郎（大分医大）

- ① 幼小児耳下腺唾液の採取法は？
- ② リンパ球in vitro検査に用いた細菌抗原はどのようなものか？

**応答** 北尾健二郎（熊大）

- ① 唾液は Stenon 管開口部にスポイトを当て、陰圧をかけて、Vitamin Cを含ませて採取している。少量の不純物もあり、純粋な耳下腺液とは言えないと思う。
- ② 以前、Bacteriaをsonicationしないで、幼若化反応を施行したが、S.aureusのみ幼若化がおり他のBacteriaでは幼若化しなかった。現在、N.sicca soluble antigenの分析を行っている。