

THE SUSCEPTIBILITY OF YOUNG GUINEA PIGS TO PNEUMOCOCCAL OTITIS MEDIA

Junichi Bundo M. D.
Noritake Watanabe M. D.
Hiroyuki Yoshimura M. D.
Goro Mogi M. D.

Department of Otolaryngology
Medical College of Oita
Oita, Japan

Pneumococcal otitis media was induced in young guinea pigs in order to investigate the relationship between the susceptibility to middle ear infection and an immature immune system.

Streptococcus pneumoniae 19F (10^4 CFU/100 μ l of PBS) were inoculated into the right tympanic cavity of the animals at the age of 0, 1, 2, 3, and 4 weeks. One week after intratympanic inoculation, the animals were bacteriologically and histopathologically investigated and found to have pneumococcal otitis media. In order to evaluate the maturity of immune systems in these young animals, serum IgG and IgA were measured by single radial immunodiffusion, and salivary IgA was measured by immunoelectrodifffusion (Rocket Method).

Pneumococcal otitis media was found in 27.3% (3/11) at the age of 0 week, in

45.5% (5/11) at 1 week, in 33.3% (3/9) at 2 weeks, and in 35.7% (5/14) at 3 weeks. None of the 10 animals (100%) were found to have otitis media at 4 weeks. *S. pneumoniae* was isolated from all middle ear effusions removed from those animals with otitis media.

Serum IgG at the age of 0 week was 69.5% of adult level, 48.4% at 1 week, 50.3% at 2 weeks, 61.8% at 3 weeks, and 89.6% at 4 weeks. Although IgA and IgM in serum were 23.5% and 23.3% of adult levels at birth, the amounts gradually increased and reached adult levels.

The results of the present study have demonstrated that the occurrence of pneumococcal otitis media is highest at the age of 1 week when serum IgG declines. These findings suggest that young animals with immature immune systems have susceptibility to middle ear infection.

幼若モルモットの感染抵抗性と中耳感染

分藤 準一 渡辺 徳武
吉村 弘之 茂木 五郎

大分医科大学耳鼻咽喉科学教室

1. はじめに

滲出性中耳炎、急性中耳炎やその反復は小児に多いが、小児では免疫能などの生体防御能が未発達であることが要因の1つと考えられる。^{1~3)}そこで、幼若モルモットを用いて肺炎球菌による感染性中耳炎の惹起を試み、幼若動物の免疫能の発達と中耳感染性抵抗性との関連を検討した。

2. 材料および方法

- 1) 実験動物；ハートレー系成熟雄(体重250-300g) および0、1、2、3および4週齢の幼若モルモットを用いた。
- 2) 細菌；小児急性中耳炎中耳貯留液より分離した*Streptococcus pneumoniae* 19F(*Sp*)を中耳炎惹起にもちいた。
- 3) 中耳感染の惹起；成熟モルモットの右中耳腔に、*Sp*の生菌 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 および 10^8 、個を100 μ Lの磷酸緩衝化生食水(PBS)に浮遊させ、それぞれ10匹ずつ経鼓膜的に接種した。左中耳腔にPBS100 μ Lのみを経鼓膜的に投与し、対照とした。

幼若モルモットの右中耳腔には Sp 生菌 10^4 個/100 μ Lを接種し中耳感染を惹起した。

中耳細菌接種1週間後、中耳骨胞を削開し、貯留液の有無や中耳粘膜の組織学的検討によって中耳感染成立の有無を判定した。

- 4) 唾液および血清中の各種免疫グロブリンの定量；中耳細菌接種1週間後、唾液ならびに血清を採取した。唾液は、塩酸ピロカルピンを体重100 g当たり1.0mg腹腔内に投与し、15分間に分泌される全唾液を採取、

遠沈により不溶物を除去して用いた。血液は心腔穿刺により採血し、血清として用いた。

血清IgG、IgAおよびIgMは、6週齢の成熟モルモットのプール血清を対照として、1次元免疫拡散法⁴⁾で測定した。

唾液IgAは免疫電気拡散法(ロケット法)⁵⁾で測定し、Folin-Lowry法⁶⁾による唾液蛋白濃度1mg当たりのIgA濃度を算定して、6週齢成熟モルモットのプール唾液中IgAと比較した。

- 5) 中耳粘膜の組織学的検討；中耳骨胞を採取し、ホルマリン固定・EDTA脱灰してパラフィン標本を作成し、耳管鼓室近傍、中央部および末梢部の3部に分けて、中耳粘膜の組織学的変化を対照耳と比較観察した。

3. 実験結果

- 1) 中耳感染と接種菌量；成熟モルモットでは、 Sp 生菌 10^4 個接種で全例に中耳貯留液を認めず、中耳粘膜の変化も対照と差が認められなかった。これに対して、 10^5 個接種群では10匹中7匹(70%)に、 10^6 、 10^7 および 10^8 個群では全例に膿性貯留液を認め、組織学的にも著明な変化が観察され、化膿性中耳炎の成立が認められた。

従って、*S. pneumoniae*の生菌 10^6 個をモルモットに感染性中耳炎を惹起できる最小細菌数とし、 10^4 個をモルモットに中耳炎を惹起させない最大菌数とした。

- 2) 幼若モルモットの中耳炎発生率と発育； Sp 生菌 10^4 個を幼若モルモット右中耳腔に

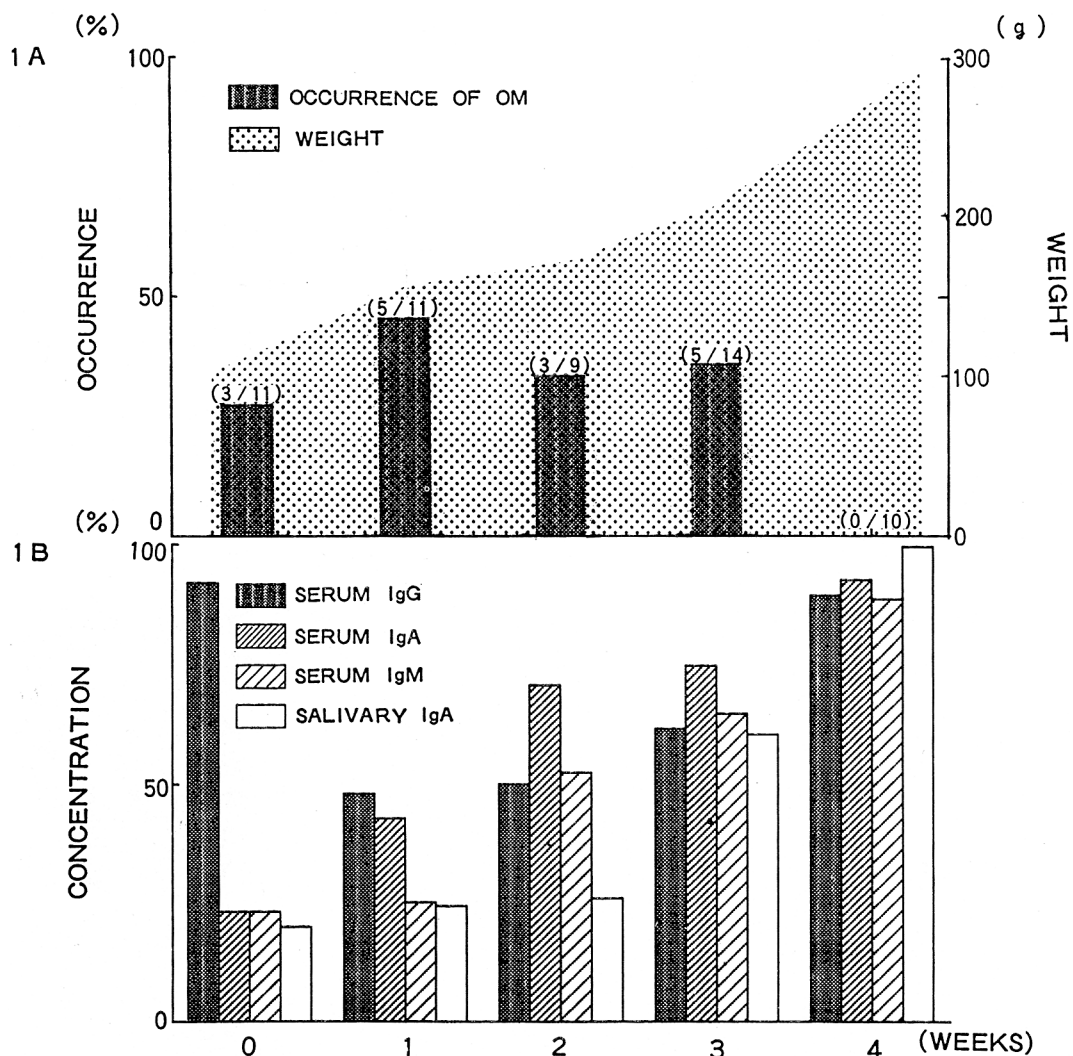


Fig-1 OCCURRENCE OF OTITIS MEDIA AND BODY WEIGHT (Fig-1 A)
SERUM AND SALIVARY IMMUNOGLOBULINS (Fig-1 B)

接種し、中耳炎を惹起した。

図1Aは幼若モルモットの体重推移と中耳炎の発生率を表したものである。4週齢で生殖可能に成熟するが、これら動物では10例全例に中耳炎は認められなかったが、生直後では27.3%、1週齢では45.5%、2週齢では33.3%、3週齢では35.7%に中耳貯溜液を認め、これら貯溜液の細菌培養では、

全例において接種菌である*S. pneumoniae*が陽性で、明らかに接種菌による感染性中耳炎の発生が確認された。

3) 免疫グロブリンの推移；血清IgGは生直後では成熟モルモットの69.5%であるが、1週齢で48.4%、2週齢で50.3%、3週齢で61.8%と次第に増加し、4週齢で89.6%に達していた。これに対してIgAおよび

IgMは生直後は成熟モルモットの23.5%、23.3%と低いが、成長とともに増加し、4週齢で成熟モルモットのレベルに到達していた。

成熟モルモットのプール唾液の総蛋白濃度は2.7mg/mlで、そのIgA濃度はプール血清IgAの11.1%であった。唾液IgAは、生直後では成熟モルモット唾液の20.2%であるが、成長とともに次第に増加し、4週齢では99.4%と成熟モルモットのレベルに達していた。(図1B)

4) 中耳粘膜の組織変化; 耳管鼓室近傍、中央部および末梢骨胞部に分けて、中耳粘膜の組織変化を観察した。

中耳粘膜の組織変化は、骨胞末梢部の骨膜肥厚や骨新生を伴った骨膜炎を主体とし、上皮破壊や粘膜下浮腫・肥厚であった(図2)。

多核球を主体とする炎症細胞浸潤も末梢部に多く認められた。膿性貯溜液を認めたものでは中耳腔に多核球等の多数の遊出細胞が認められた。これら中耳粘膜の変化は末梢骨胞で最も強く、耳管鼓室口近傍では軽微であった。図3は、中耳粘膜の組織変化を各週齢別にまとめたものである。しかし、これら変化は年齢によって差は認められなかった。

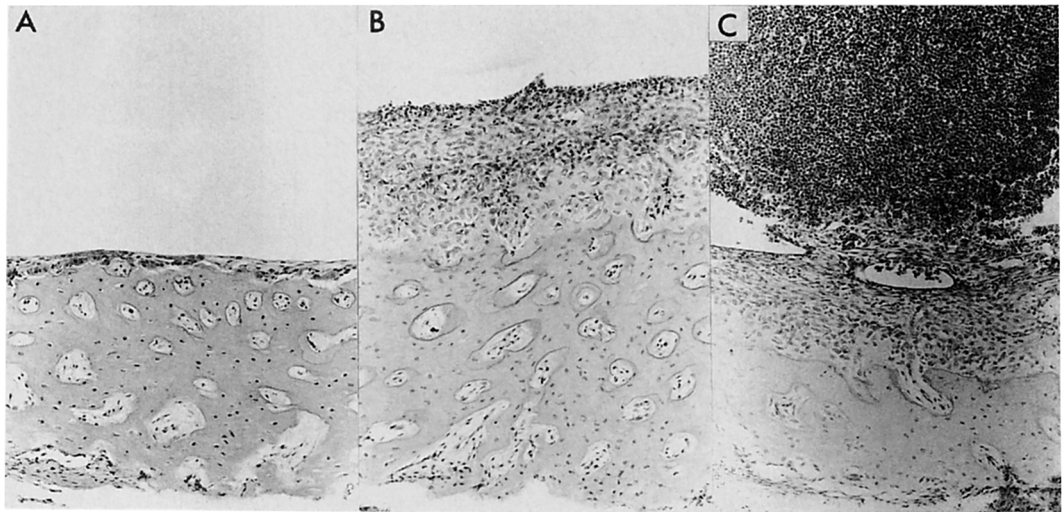


Fig-2

A : The middle ear mucosa is a distal portion of tympanic bulla from animals without pneumococcal otitis media at the age of one week. The epithelium is onelayered and the mucosa is thin, not having cell infiltration.

B : The middle ear mucosa is a mid portion of tympanic bulla from animals at the age of one week with purulent otitis media. The submucosa is hyperplastic with cell infiltration of PMN and lymphocytes. The periosteum and bony wall of the tympanic bulla are thick.

C : The middle ear mucosa is a mid portion of tympanic bulla from animals at the age of two weeks. The epithelial cells were destroyed, and many inflammatory cells and predominant neutrophils are seen in the tympanic cavity.

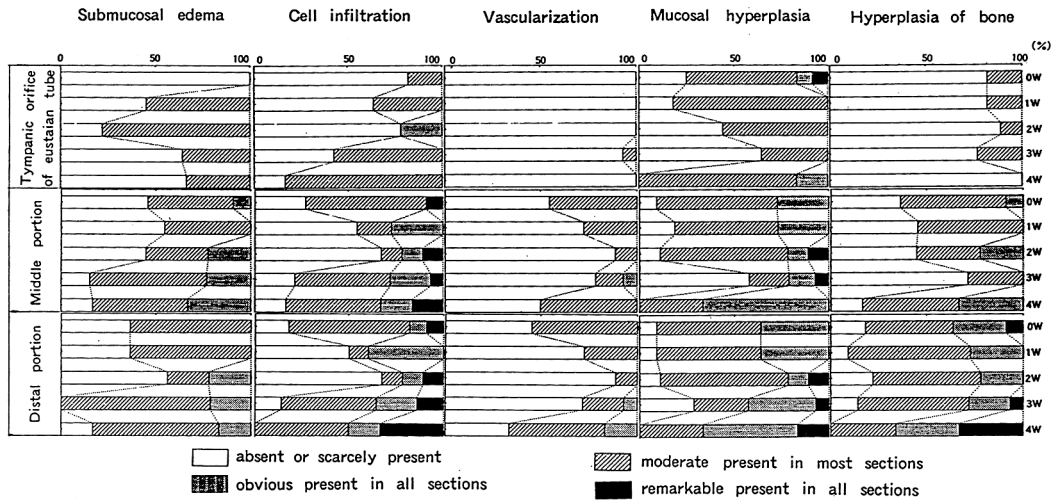


Fig-3 HISTOPATHOLOGICAL CHANGES OF MIDDLE EAR MUCOSA

4. 考 察

モルモットにおける実験的感染性中耳炎は、Lewisら⁷⁾が報告したように、中耳腔に接種した細菌数に依存する。本実験結果から成熟モルモットに感染性中耳炎を惹起させない *S. pneumoniae* の最大菌量が 10^4 個で、全例に中耳炎を惹起させ得る最小菌量は 10^6 個であった。

幼小児で急性および滲出性中耳炎の発症とその反復が多いことは、小児における生体防御能^{1~3)}、ことに、免疫防御能の未発達が原因として考えられる。本実験では、生後1週で中耳炎発症が最も多く、その後は成長とともに減少し、この時期に一致して血中IgG抗体の低下が認められた。

ヒト小児では生後6ヶ月から血中免疫グロブリンが生理的に減少するが、この期間に一致して *Haemophilus influenzae* や *S. pneumoniae* の感染を受けやすい⁸⁾。 *H. influenzae* や *S. pneumoniae* の多糖類抗原に対する抗体が主にIgG₂であり⁹⁾、このIgG₂抗体の未発達を易感染性の要因とする意見がある。

一方、Mogiら¹⁰⁾は1歳から16歳の小児の末梢血中のT helper細胞のSCW (streptococ-

cal cell wall) に対する増殖反応を観察し、抗原特異的免疫応答は遺伝的制御を受けるが、加齢とともに有意にこの増殖反応は増すとしている。これは抗原刺激の反復によりT helper細胞の反応性が次第に活性化される事を意味し、低年齢ほどこのT helper細胞の機能が低く、これが小児の易感染性の要因の1つであろうと推測した。

以上のことから、本実験では免疫能の未発達な幼若動物では中耳炎が成立しやすいことが明らかとされた。

参 考 文 献

1. 茂木五郎：反復性中耳炎、耳鼻臨床78：1009-1018、1985。
2. Liu YS, Lim DJ, Lang RW, et al：Chronic middle ear effusions. Immunoc hemical and bacteriological investigations. Arch Otolaryngol 101：278-283。
3. Mogi G, Maeda S, Watanabe N,：The development of mucosal immunity in guinea pig middle ears. Inf J Pled Otolaryngol 1：331-349, 1980。

4. Mancini G, Carbonara A.O, Heremans J.F, : Immunochemical Quantitation of Antigens By Single Radial Immunodiffusion. Immunochemistry 2 : 235-254,1965
5. 電気泳動学会 : 電気泳動実験法改訂版 : 文光堂 東京,1967
6. Lowry OH, Rowebrough NJ, Farr AL, et al : Protein measurement with the Folinphenol reagent. J Bio Chem 193 : 265-275,1965.
7. Lewis DM, Schram JL, Meadema SJ, et al : Experimental otitis media in chinillas. Ann Otol Rhinol Laryngol 89 (Suppl 68) : 344-350, 1980.
8. Pabst H, Kreth H : Ontogeny of the immune response as a basis of children disease. J Ped 97 : 519-534, 1980.
9. Yount W, Dorner M, Kunkel H, et al : Studies on human antibodies. VI. Selective variations in subgroup composition and genetic markers. J Exp Med 127 : 633-646, 1968.
10. Oxelius V: IgG subclass levels in infancy and children. Acta Paediatr Scand 68 : 23-27, 1979.
11. Mogi G, Kawauchi H, Kurono Y : Development of the immune system in children. Rhinology 24 : 15-24, 1986.

質 疑 応 答

質問 岡本美孝 (国立水戸)

- ①母親は抗肺炎球菌抗体を持っていなかったのか？
- ②離乳期は？
- ③モルモットでは、母体からの移行抗体は主に経胎盤で移行するのか？

応答 分藤準一 (大分医大)

- ①測定していません。
- ②生直後より離して飼育します。死ぬことはありません。
- ③ (茂木 教授)

我々が1970年に測定したときも、生後1週齢にて血清IgGはやはり一旦減少する結果を得ている。このような生理的減少が存在するため、IgGはヒトと同様に経胎盤由来であると考えている。