

## ELISA FOR DETERMINATION OF IMMUNOREACTIVE PSEUDOMONAS AERUGINOSA ELASTASE IN CHRONIC SUPPURATIVE OTITIS MEDIA

Yukiyoshi Hamaguchi, Chun Shun Jin, Hidehisa Suzumura, Yasuo Sakakura

Department of Otorhinolaryngology, Mie University School of Medicine,

Sensitive sandwich ELISA for *Pseudomonas aeruginosa* elastase (PE) has been developed in order to measure PE levels in ear discharges from chronic suppurative otitis media (CSOM) patients. Sample preincubation with EDTA-2 Na before ELISA was employed to inhibit PE activity which hydrolyzes anti-PE IgG antibody into smaller molecular form. PE levels in 10 middle ear effusions (MEE) from chronic otitis media with effusion (OME)

were also measured. In CSOM, 9 of 10 samples had significant PE levels ranged from 6.8 to 62.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  which was significantly higher than those in MEE ( $p < 0.01$ ), majority of which were under the detection limit. Two samples in CSOM with *Pseudomonas aeruginosa* infection had high PE levels. This sandwich ELISA for PE was very sensitive method to require only a small amount of samples.

## 酵素抗体法による慢性化膿性中耳炎分泌物中 緑膿菌エラスターゼの定量

浜口 幸吉 金 春 順  
鈴村 栄久 坂倉 康夫

三重大学耳鼻咽喉科

慢性化膿性中耳炎(慢中)は、鼓膜緊張部の中心性穿孔と、反復性または持続性の膿性粘膿性耳漏および難聴を呈する代表的中耳疾患である。耳漏の細菌培養結果などより、緑膿菌は慢中特に慢性期の主要起炎菌として知られている。緑膿菌が産生する菌体外酵素である緑膿菌エラスターゼ(PE)は非常に強力な蛋白分解能をもつ金属性プロテアーゼである。エラスチン、フィブロンectinやコラ

ーゲンといった結合組織蛋白を分解すると共に、IgGや補体の分解を介して免疫能にも影響し、緑膿菌感染における出血性、壊死性病変に深く関与している。また好中球由来のエラスターゼとはかなり性状が異なっている。

今回、慢中特に緑膿菌感染耳の中耳炎症病態にしめるPEの役割を検討するため、酵素抗体法を用いて慢中患者の耳分泌物中PE量の測定を行なった。精製PEを家兎に免疫し、

血中抗体価の上昇した時点で抗PE血清を採取した。この抗PE血清をアフィゲルプロテインAにかけて、IgG分画のみを回収した。抗PE抗体IgG分画を中根の方法に準じてHorseradish peroxidase (HRP)にて標識した。HRP標識後、セファクリルS200カラムにかけて、HRPを遊離型HRPとIgGとの結合型HRPとに分離し、高分子量の結合型HRP (HRP標識IgG)の方を回収した。

酵素抗体法の実験手順では、マイクロウェルプレートに抗PE抗体を一晩4℃下でコーティングし、洗浄後サンプルを加えた。1時間インキュベート、洗浄後にHRP標識抗PE抗体を加え、1時間インキュベートした。洗浄後、発色剤であるOPDAにて発色させ、吸光度490nmにて測定した。PEの標準曲線では、吸光度はPEの濃度依存性に増加した。10名の慢性化膿性中耳炎患者より耳内分泌物を吸引採取した。一部を細菌検査にまわし、残りを-70℃で凍結保存した。融解後、検体を0.5%トリトンX-100加リン酸バッファーにて10倍に希釈し、10分間ホモゲナイズした。遠心後の上清を回収して検体とした。これに対して、10名の小児浸出性中耳炎患者より鼓膜切開時に採取し得た粘性中耳貯留液も同様に処理し検体とした。なお、検体可溶化の為に5mMDTT加リン酸バッファーを用いて十分にホモゲナイズした。結果をTable 1示にした。

No	Age	Sex	Culture	Bacteria	PE level (μg/ml)
1	9	m	+	PA	57.0
2	67	f	-	no growth	11.8
3*	47	m	+	other GNB	6.8
4	73	m	+	PA	62.1
5	15	f	-	no growth	0
6*	52	f	+	S. aureus	35.4
7	11	m	+	Strept. pneum	7.8
8	54	f	+	Aspergillus	12.0
9	1	m	+	S. aureus	9.0
10	62	m	-	no growth	13.6

\* : post-operative state  
PA : Pseudomonas aeruginosa  
GNB : gram negative bacteria

Table 1 Results

10名の慢性化膿性中耳炎患者の内4名が小児患者で、2名が術後性であった。また細菌培養では7例で培養陽性であり、内2例に緑膿菌が検出された。PE量は0~62.1μg/mlにわたり、平均21.6μg/mlで、緑膿菌検出例2例では高いPE量を示した。しかしながら、培養陰性例でもかなりのPE量が検出された。これに対し、浸中中耳貯留液では2例にのみごく微量検出され、有意に低値を示した。培養にて緑膿菌を認めた症例で高いPE値を示した点は当然と思われる。しかしながら、培養陰性例でもかなりの量のPEが検出された点については、PEが菌体外酵素であり、溶菌した後でも存在し得るため。また、PEの抗原性はその活性より長く残存し得るため培養陰性例でもPEが免疫学的に検出されると考えられる。さらに、今回の慢性化膿性中耳炎患者のなかには局所加療を受けている患者もあり、たとえば抗生剤の点耳によって、細菌が死んだ状態になり、培養しても細菌が十分に増殖できないことも考えられる。また浸中中耳貯留液の2例でPEが少量ながら検出されたことより、PE以外に抗PE抗体と反応しえる細菌由来の抗原物質の存在も否定できない。ウェスタンブロッティングなどを用いた抗PE抗体の反応性の検討も必要と思われる。PEは前に述べた様に、強力な組織蛋白分解能を有し、直接的な粘膜損傷をきたすとともに、主要なインヒビターであるα<sub>1</sub>-アンチトリプシンを分解し不活化することでプロテアーゼの作用が遷延することにもなり、粘膜の炎症病態に果す意義はとても大きいと思われる。しかも、緑膿菌は現在気道粘膜における慢性難治性疾患の代表的起炎菌であり、PEの検討は非常に意義あるものと考えられる。

今回の研究では用いた慢性化膿性中耳炎症例に成人と小児患者が混在しており、また急性増悪期と慢性期の症例が区別されておらず、

対象としては検討すべき問題点が多い様に思われる。今後、より詳細な臨床経過および局所所見の追跡と共に、耳漏の免疫細胞診もあわせて行なう予定である。

---

#### 質 疑 応 答

追加 向井貞三（八尾市立病院）

Pyocyaninという酵素を産生してこれは他の菌を抑制してくれるので、私は緑膿菌の感染に対してはこの功罪を見守りながら時期を見計って硼酸末で酸性にすることにより青→黄になり消退させることもあります。