

THE ROLE OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (RS VIRUS) IN OTITIS MEDIA WITH EFFUSION

Yoshitaka Okamoto, Kazuo Kudo, Koji Shirotori
Eiko Ito, Kiyoshi Togawa

Department of Otolaryngology Akita University School of Medicine

Abstract

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nested polymerase chain reaction were used for detection of RS viral sequences in middle ear effusion collected from children with otitis media. RS viral sequences were detected in 21/34 samples tested. These sample were collected during

and/or after natural outbreak of RS virus infection in the community. In the patients whose nasopharynx RS virus were isolated from, the viral sequences were highly detectable (75%) in the effusions. These observations suggest RS virus as an important factor in the pathogenesis of otitis media with effusion.

小児滲出性中耳炎へのRSウイルスの関与について

岡本 美孝 工藤 和夫 白鳥 浩二
伊藤 永子 戸川 清

秋田大学医学部耳鼻咽喉科

はじめに

小児難聴の一大原因となっている滲出性中耳炎の成因については、耳管機能不全、I型アレルギー、細菌感染を引き金としたIII型アレルギー関与等が報告されているが¹⁾²⁾、ヒトでの本疾患の中耳免疫病態は複雑であり解明はいまだ十分ではない。今回、我々は、滲出性中耳炎との関連が従来より示唆されていたRespiratory syncytial virus (RS) ウィルスについて、reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)、nested polymerase chain reaction (Nested-PCR) 法を開発し、今回、本法を用いて小児滲出性中耳炎貯留液中に、RS ウィルスゲノムの存

在を明らかにしたので報告する。

方 法

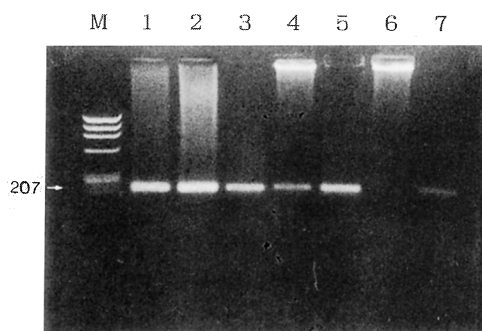
生後4ヶ月から9才までの小児滲出性中耳炎患者32症例より、鼓膜切開後貯留液34検体を採取した。貯留液の性状は、漿液性9例、粘液性21例、膿性4例であった。採取した貯留液よりRNAをChomczynskiら³⁾の方法に従い solution D を用いて抽出し、その4ngをRT-PCR法に用いた。Complementary DNA (cDNA) 合成は、検体に ribonuclease inhibitor (宝酒造)、10倍 PCR buffer (500 mM KCl, 200mM Tris-HCl buffer [pH8.4], 25mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA), 1.25mM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP: Phar-

macia), 10倍 hexanucleotide mixture (Boehringer Mannheim), Rous associated virus 2由来の reverse-transcriptase (RTase, 200 units/ml : 宝酒造) を加え, 40°Cで30分間反応させた. その後, 94°C 5分間過熱して反応を停止させた後, 水中で急冷した. RS ウイルスの RT-PCR 法に使用したプライマーはオリゴ合成機 (model 391 PCR-MATE : Applied Biosystems, Inc., USA) を用いて作製し, 高速液体クロマトグラフィー (東ソー社) 及び, カラムクロマトグラフィー (Sephadex G50 : Pharmacia) を用いて精製した. プライマーの塩基配列はヘアピンループを作らず, 少なくとも18塩基以上で GC contents を40~60%にし, 他の遺伝子と相同性が少ない部位を Gen bank と EMBL (European Molecular Biology Laboratory) のデータをもとにして決定した (Table 1).

合成した cDNA は94°C, 5分間過熱した後急冷し, 伸展したままの状態, これに10倍 PCR buffer, 20mM MgCl₂, 1.25mM dNTP's, 3'プライマー, 5'プライマー及び DNA 合成酵素として, 熱耐性菌である *Thermus aquaticus* より得たポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus) を加え, さらに蒸発を防ぐため, ミネラルオイルを積層した.

RT-PCR 法は Thermal cycler (MJ Research Inc.) を使用し, 94°C10分間 denature 後,

94°C30秒, 55°C30秒, 72°C60秒で35サイクル周期で変化させ, その後72°C10分間 re-extension した. さらに, RT-PCR 法で増幅した DNA を用いて Nested PCR 法を行った. すなわち, RT-PCR 法で使用したプライマー間で, さらに 5'プライマー, 3'プライマーを同様に作製し (Table 1), RT-PCR 産物の10 µlについて PCR 法を同様に行った. RT-PCR 法及び, Nested PCR 法で増幅した DNA の 1/10量 (10 µl) を用い loading buffer 1 µl を加えて ethidium bromide (和光純薬) を含む TAE (Trisma base, 0.5 M EDTA, 氷酢酸, DEPC-W) 泳動 buffer を使用し, 1.8%アガロースゲルで, サイズ



Lane M : Marker (ϕ X174HaeIII cut)
 Lane 1~6 : Samples
 Lane 7 : β -actin (202bp)

Fig 1 Results of nested-PCR

5'PRIMER : GGTGTTGGATCTGAATCGCCA

3'PRIMER : AACTTTTTCTGATCATTTGT

Primers for RT-PCR (1st PCR) (Product size 391bp)

5'PRIMER : AAGTGCTCTACTATCCACA

3'PRIMER : CACTAAATTCCTGGTAATC

Primers for Nested PCR (2nd PCR) (Product size 207bp)

Table 1 Primers for PCR

	No. of samples	No. of samples positive for RS viral genome
January~February	17	14
March ~ May	7	5
June ~ August	10	2

Table 2 The relationship between RS viral genome in otitis media effusions collected during or long after the RS virus outbreak in the community.

マーカー ($\phi \times 174$ /Hae III cut)とともに電気泳動した。

一方、中耳貯留液を採取した32症例のうち、18症例については、貯留液採取時に、上咽頭ぬぐい液も採取し、これを単層に培養したHep-2細胞に接種し、RSウイルスの分離・培養を試みた。RSウイルスの確認は、定法に準じてcytopathogenic effectの発現によった。

結 果

Table 1 に示す如く、34の中耳貯留液検体中、21検体にRSウイルスゲノムが、PCR法により検出された。貯留液の採取時期との関連をみると、1月~2月には17例中14例に、3月~5月には7例中5例に、6月~8月には10例中2例に検出された。貯留液の性状と検出頻度には明らかな関連は認められなかった。

貯留液採取時に上咽頭からRSウイルスの分離培養を試みた18症例についてみると、12例でRSウイルスが分離陽性で、このうち9例の中耳貯留液中にRSウイルスゲノムが検出された。一方、RSウイルス分離が陰性であった6例では1例で中耳貯留液中にRSウイルスゲノムが認められた。

まとめと考察

1. 小児滲出性中耳炎貯留液よりRSウイルスの検出をNested PCR法を用いて行った。
2. 34貯留液検体中21検体にRSウイルスゲノムが検出された。
3. 上咽頭からRSウイルスが分離・培養された症例では、83%の中耳貯留液にRSウイルスゲノムが認められた。
4. これらのことは、RSウイルスの小児滲出性中耳炎への関与を強く示すものである。もちろん、滲出性中耳炎がいわゆる古典的なウイルス感染症とは考え難いが、RSウイルス感染が、中耳粘膜局所での免疫の均衡に破綻を引き起こし、滲出性中耳炎の種々の病態像を呈している可能性が示唆される。

文 献

- 1) Bernstein JM : Recent advances in otitis media with effusion. Anal Allergy 55 : 544-551, 1985.
- 2) Phillips NJ, Knight NJ, Manning H et al : IgE in secretory otitis media, Lancet 11 : 1176-1178, 1975.
- 3) Chomczynski P, Sacchi W : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform

extraction. Analytical Biochem 162 : 156-159, 1987.

質 疑 応 答

質問 門脇敬一（鳥取大学）

イントロンを含む部分でのPCRを行っているのか。

質問 小川浩司（北里研究所病院）

- ① 検出率が非常に高いわけですが、アデノウイルスのように常在する可能性はないか。
- ② 病原性があるとしたら、抗体価が上がるはずですが、患者で血清抗体価の変動を調べていたら教えてほしい。

応答 岡本美孝（秋田大）

イントロンは含んでいない。（RNA）

応答 岡本美孝（秋田大）

- ① 常在はしない。
- ② 抗体価の測定はしていない。