

DETECTION OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* IN NASOPHARYNX BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Tomoyo Ueyama¹, Yuichi Kurono¹, Komei Shirabe², Masazumi Takeshita²,
and Goro Mogi¹

Departments of Otolaryngology¹ and Biochemistry², Oita Medical University

DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR) is a new technology for microbiological diagnosis. The assay has exquisite specificity and sensitivity to detect microorganisms. The primer set was selected from the DNA sequence of gene encoding outer membrane protein P6 of *Haemophilus influenzae*. One hundred and sixty eight samples of nasopharyngeal secretions were collected from patients with otitis media with effusion (OME) and control subjects by aspiration through the nose. The samples were subjected to PCR analysis to detect DNA of the P6 gene and conventional culture method.

Positive rate of the P6 gene DNA by PCR was about two times higher than that of *H. influenzae* by culture method. All of the samples having *H. influenzae* were also positive in the PCR test. The percentage of P6-positive decreased as the age advanced. Dividing the samples into two groups, patients with OME and subjects without OME, the percentage of P6-positive was greater in patients with OME than in control subjects without OME. The findings suggest that nasopharyngeal colonization of *H. influenzae* is more dominant than previously reported and plays an important role in the persistence of OME.

鼻咽腔細菌検査における PCR 法の応用

植山 朋代¹ 黒野 祐一¹ 調 恒明²
竹下 正純² 茂木 五郎¹

大分医科大学耳鼻咽喉科学教室¹

大分医科大学第二生化学教室²

はじめに

上気道感染症の起炎菌の一つであるインフルエンザ菌は、滲出性中耳炎患者の中耳貯留液からも検出され、滲出性中耳炎の病因の一つとして重要であることはすでに知られている。しかし、その検出率は約20%となお低値

である¹⁾。一方、無菌の中耳貯留液から高頻度にエンドトキシンが検出されることが報告されており²⁾、細菌検出率が示す以上の頻度で中耳においてインフルエンザ菌感染があったと思われるが、推察の域を脱し得ない。また鼻咽腔細菌叢としてのインフルエンザ菌の

役割も重要である。インフルエンザ菌は健常者よりも滲出性中耳炎患者の鼻咽腔から多く検出されることが報告されている³⁾。しかし、中耳貯留液と同様にその検出率はなお低値である。そこで我々は、従来の細菌培養法よりも感度が高い分子生物学的手法の一つであるポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction : PCR) を利用して、中耳炎患者および健常者の鼻咽腔液についてインフルエンザ菌外膜蛋白である P 6 をコードする DNA の有無を検討した。

方 法

滲出性中耳炎患者74例と、対照として同疾患および鼻咽腔に疾患を有しない者94例から鼻咽腔液を採取し、検体に供した。

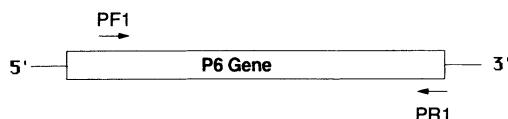
検体の採取：鼻咽腔液は Juhn Tym-Tap (Xomed, Jacksonville, FL) を経鼻的に鼻咽腔へ挿入し、吸引採取した。

細菌検査法：血液およびチョコレート寒天平板培地に滅菌綿棒で検体の一部を塗布し、37°Cにて24時間、5% CO₂ インキュベーターで培養した後、グラム染色及びV, X因子要求性により、インフルエンザ菌を同定した。

PCR法：採取した貯留液より van Ketel, et al.⁴⁾の方法に従ってDNAを抽出し、総抽出量の1/20量をPCR法に供した。

P 6のプライマーはクラボウ社(大阪)に依頼し、作製した。プライマーの塩基配列は Deich, et al.⁵⁾の報告したインフルエンザ菌 P 6 遺伝子の塩基配列をもとに、8あるいは9個のグアニンもしくはシトシンを含む20塩基の配列で、ヘアピンループを作らず、互いに相補性のない部位を用いた (Fig. 1 A)。

PCR法は、carry overによる偽陽性を防ぐため、carry over prevention kit (Perkin-Elmer Cetus Instrument, Norwalk, CT) を用いて以下の条件で行った。得られたDNA 10 μl を鋳型とし、50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5mM MgCl₂, 0.01 %



PF1: 5'-AACTTTTGGCGGTTACTCTG-3'

PR1: 5'-CTAACACTGCACGACGGTTT-3'

Fig. 1 A Sequences of the primers. The thin lines and open box in the upper part indicate noncoding and coding region of the P6 gene, respectively. Arrows denote positions of the primers. The lower part shows the nucleotide sequences of the forward and reverse primers (PF1 and PR1).

gelatin, 200 μM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dUTP), 200 μM PF1 プライマー, 200 μM PR1 プライマー, Taq ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus Instrument, Norwalk, CT) 2.5units, 及び Uracil-N-Glycosylase (Perkin-Elmer Cetus Instrument, Norwalk, CT) 5.0units を含む溶液 (100 μl) を作製した。増幅反応は、95°C 30秒, 55°C 1分, 72°C 2分の変化を30回、最後に72°C 5分間さらに加熱することにより行った。反応には Thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus Instrument, Norwalk, CT) を使用した。PCR法にて増幅したDNA 6 μl に、loading buffer 3 μl を加えて、TBE 泳動バッファー (89mM Tris-HCl, 89mM Boric acid, 2 mM Na-EDTA) を使用し、5% ポリアクリルアミドゲルでサイズマーカー (pHY マーカー: 宝酒造, 京都) と共に電気泳動した。電気泳動によりDNAのバンドが得られたものを陽性、得られなかったものを陰性と判断した。DNAの塩基配列の決定は Sanger, et al.⁶⁾の方法により行った。即ち、予め5'端をリン酸化したプライマーを用い、PCR法を行った後、

4%アガロースゲル電気泳動を行い、目的のバンドを切り出し、Klenow 処理を行った後、M13mp18のSmaI部位にクローンし、DNA塩基配列を決定した。

結 果

ポリアクリルアミドゲル電気泳動で291bpの長さのPCR産物がFig. 1Bの如く観察された。さらに、増幅されたDNAの塩基配列を決定して、インフルエンザ菌P6遺伝子DNAが増幅されたことを確認した。

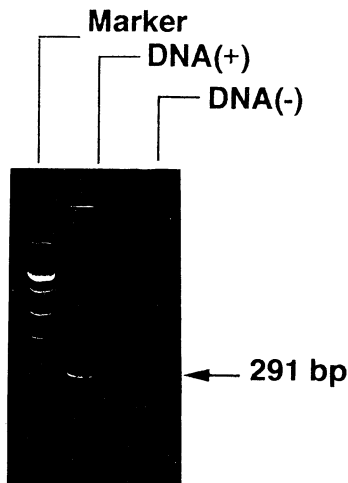


Fig. 1 B Polyacrylamide gel electrophoresis of the P6 gene DNA.

Lane 1: pHY marker.
Lane 2: DNA positive.
Lane 3: DNA negative.

鼻咽腔液を採取した168例中の111例(66%)がP6遺伝子DNA陽性であった。一方、培養法によりインフルエンザ菌を検出したものは49例(29%)であった。培養法によりインフルエンザ菌が検出された症例は全例PCR法で陽性であり、PCR法にてP6陰性であった症例は全て培養法でもインフルエンザ菌陰性であった。

滲出性中耳炎患者の鼻咽腔液におけるP6遺伝子DNAおよびインフルエンザ菌陽性率

を年齢別に見ると(Fig. 2), 全年齢層でPCR法の方が高い検出率を示しており、PCR法、培養法ともに6~10歳の検出率が最も高値で、以後年齢が進むにつれて低下した。

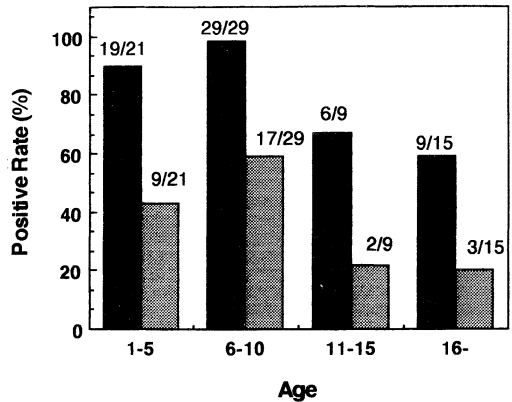


Fig. 2 Positive rates of *H. influenzae* and the P6 gene DNA of nasopharyngeal secretions of the patients with OME.

■, positive rate of the P6 gene DNA detected by PCR.
▨, positive rate of *H. influenzae* detected by conventional culture method;

PCR法によるP6検出結果を滲出性中耳炎群と健常者群とに分け、年齢別にみても(Fig. 3), 全年齢層において滲出性中耳炎患

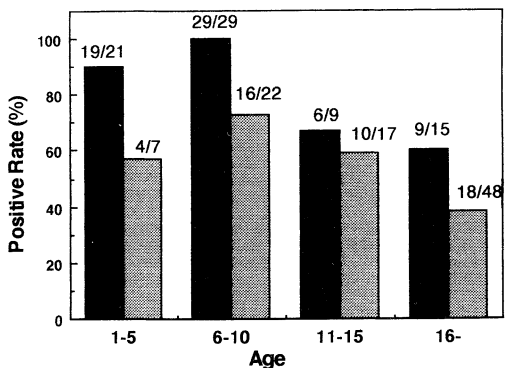


Fig. 3 Positive rates of the P6 gene DNA by PCR in nasopharyngeal secretions of patients with OME (■) and control subjects without OME (▨).

者群の方が健常者群より高値で、6～10歳の症例ではその検出率は100%であった。

考 察

PCR法は分子学的手法の一つであるが、近年、感染症の分野においても利用されるようになってきた。インフルエンザ菌に関しては、まず1988年に、Deich, et al.⁵⁾がインフルエンザ菌外膜蛋白であるP6をコードするDNAの塩基配列を明らかにし、1990年にvan Ketel, et al.⁴⁾が細菌性髄膜炎患者の脳脊髄液中のインフルエンザ菌の検索をPCR法を用いて行っている。彼等はPCR法の感度並びに特異性を検討し、細菌培養法に勝るとも劣らぬ細菌学的検査手段となり得る事を報告している。van Ketel, et al.⁴⁾は、P6遺伝子DNAはインフルエンザ菌にのみ検出されるのではなく、ヘモフィルス属の他の細菌の一部にも検出されると述べている。そこで我々は、細菌培養によって分離されたインフルエンザ菌以外のすべての細菌についてもPCR法を行ったところ、これらの細菌からはP6遺伝子DNAは検出されなかった。さらに分離されたすべてのインフルエンザ菌からP6遺伝子DNAが検出された。以上の事から、鼻咽腔液から検出されたP6遺伝子DNAはインフルエンザ菌由来のものであると考えられる。今回我々はヒト鼻咽腔液についてP6遺伝子DNAの検出を行い、その検出率は66%であった。これは、同時に行った細菌検査の2倍の感度であり、PCR法の感度が優れていることが示された。これまでの報告をみると、ヒト鼻咽腔液からのインフルエンザ菌の検出率は、約20%であり、その多くが中耳貯留液から検出されるインフルエンザ菌と一致する¹⁾。この事実よりインフルエンザ菌が滲出性中耳炎の起炎菌の一つとして見なされている。今回の我々の研究では鼻咽腔液からのP6遺伝子DNA検出率は66%と極めて高値であり、さらに滲出性中耳炎の好発年齢で

ある6～10歳の滲出性中耳炎患者全例からこれが検出されており、インフルエンザ菌の滲出性中耳炎への関与がさらに強く示唆された。

参 考 文 献

- 1) Kurono Y, Tomonaga K, and Mogi G : *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* in otitis media with effusion, Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 114 : 1262-1265, 1988.
- 2) DeMaria TF, Prior RB, Briggs BR, and Lim DJ : Endotoxin in middle ear effusions from patients with chronic otitis media with effusion, Lim DJ (ed) Recent advances in otitis media with effusion, Burlington, Ontario, Canada, BC Decker Inc, 1983 : pp123-125.
- 3) 茂木五郎 : 中耳炎と免疫-滲出性中耳炎の成因と経口ワクチンによる予防へのアプローチ, 佐伯印刷株式会社, 1989 : pp49-54.
- 4) van Ketel RJ, ter Schegget J, and Zanen HC : Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1, J Clin Microbiol, 20 : 362-364, 1984.
- 5) Deich RA, Metcalf BJ, Finn CW, Farley JE, and Green BA : Cloning of genes encoding a 15000-dalton peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein and an antigenically related 15000-dalton protein from *Haemophilus influenzae*, J Bacteriol, 170 : 489-498, 1988.
- 6) Sanger F, Nicklen S, and Coulson A R : Proc Natl Acad Sci USA 76 : 5463-5467, 1977.

質 疑 応 答

質問 田村真司（和歌山医大）

PCR法と従来の培養法との検出率の差は、Sensitivityだけによるものか。鼻咽腔液中の何らかの菌の発育阻止物質の関連はないのか。

応答 植山朋代（大分医大）

滲出性中耳炎等で、既に抗生剤の投与を受けている症例では、培養法にて細菌が検出されない可能性がある。