

鼻咽腔中の無莢膜型インフルエンザ菌の位相変異の検討

平野 隆 前田 一彦 鈴木 正志

大分大学医学部耳鼻咽喉科

茂木 五郎

大分医科大学

The Phase Variation of Nontypeable *Haemophilus influenzae* From Nasopharynx in Children with Otitis Media with Effusion

Takashi HIRANO, Kazuhiko MAEDA, Masashi SUZUKI

Department of Otolaryngology, Faculty of Medicine, Oita University

Goro MOGI

Oita Medical University

Nontypable *Haemophilus influenzae* (NTHi) has now become well established as an important pathogen in children and adults, and the bacterium is a frequent cause of acute otitis media and otitis media with effusion (OME) in children. The surface of NTHi is composed of outer-membrane proteins and lipooligosaccharide (LOS), and LOS undergoes phase variation in expression of the phosphorylcholine (ChoP) epitope, a structure present on several invasive pathogens residing in the human respiratory tract. In this study, we examined the phase variation of NTHi from nasopharynx in children who suffer from OME, and investigated the relation of the phase variation to pathogenesis of OME. Our data indicated that NTHi strains expressing ChoP+ LOS glycoforms account for 63% of all of NTHi tested, and are related to prolongation of OME. Based on this result, ChoP may be one of the important factors of pathogenesis of persistent OME.

はじめに

小児の滲出性中耳炎において、無莢膜型インフルエンザ菌は主たる起炎菌の1種であり、その菌体外膜の主要な成分の1つであるリポオリゴ糖 (LOS) は、多様な生理活性を認め、細菌の気道粘膜上皮への定着および浸潤に関与していることが報告されている。近年、インフル

エンザ菌の LOS において、位相変異により phosphorylcholine (Chop) を epitope に表出すること事が報告されており、これらの位相変化が細菌の組織浸潤に関わり、病原性に大きく寄与している事が示唆されている。今回、我々は滲出性中耳炎に罹患した小児を対象とし、鼻咽腔よりインフルエンザ菌を分離し、その位相

変異について検討を行ったので報告する。

対象および方法

1992年4月から2003年5月までの期間に、大分大学医学部付属病院耳鼻咽喉科外来を受診し、臨床症状、検査および鼓膜所見より滲出性中耳炎と診断された小児を対象とし、外来にて経過観察を行い、細菌検査用スワブを用いて、鼻咽腔より細菌を分離し、インフルエンザ菌を同定した40症例について検討した。同定したインフルエンザ菌は各種抗血清を用いてタイピングを行い、無莢膜型と判定した。分離した無莢膜型インフルエンザ菌のChopの表出の有無については、チョコレート寒天培地にて培養後、ニトロセルロース膜にコロニーを転写後、Chopに対するモノクローナル抗体であるTEPC-15 (sigma社製)を反応させた後に、HRP標識抗マウスIgA抗体 (southern biotechnology社製)にて反応後に発色を行った。染色性の相違により、すべてのコロニーが染色されるインフルエンザ菌を (+)、一部のコロニーが染色される菌を弱陽性 (±)、すべてのコロニーが染色されない菌を陰性 (-) と分類し、症例を以上の3群に分け、中耳貯留液の性状などを含めた中耳炎の臨床所見、および臨床経過との比較検討を行った。

結 果

鼻咽腔からの菌検上、滲出性中耳炎罹患児のインフルエンザ菌陽性率は45%であり、男児16名、女児24名、年齢は2才から11才であり、平均年齢は4.9才であった。位相変異にともなうChopの表出の程度を基にした分類では、Chop陽性例は40人中20名であり、弱陽性例5名をあわせて全体の63%がChopの表出を認めた。各群間において、年齢、性別、菌検の施行時期といった各因子について比較検討を行ったが、3群間に有意差は認められなかった (Table 1)。菌検施行時の滲出性中耳炎の罹病

Table 1 Expression of Chop on NTHi and clinical factors

Chopの発現	症例数	平均年齢 (才)	性別 (人数/男女)	採取時期 (月)
(+)	20	4.5±1.5	7:13	4.5±2.9
(±)	5	6.4±3.0	3:2	2.6±1.9
(-)	15	5.3±1.3	5:10	5.9±3.1

There is no relation between expression of Chop and clinical factors, such as age, gender, and the time at which samples were taken.

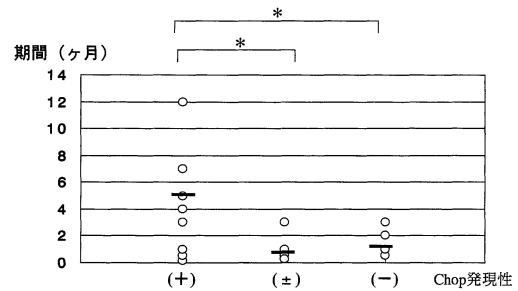


Fig. 1 The period of otitis media with effusion (OME)

This shows the period of OME since samples were taken from nasopharynx. The average of existent period of middle ear effusion is 5.3 months in Chop positive group: (+), but the average period of OME is 1.2 months and 1.5 months in weakly positive group: (±) and negative group: (-). There is statistical difference between positive group and other groups. (*: p<0.05)

Table 2 Expression of Chop on NTHi and complications

Chopの発現	慢性副鼻腔炎の合併例 (合併数/総数)	鼻アレルギーの合併例 (合併数/総数)
(+)	5/20 (25%)	8/20 (40%)
(±)	2/5 (40%)	4/5 (80%)
(-)	3/15 (20%)	8/15 (53%)

There is no relation statistically between expression of Chop and other complications, such as nasal allergy and chronic sinusitis.

期間、および菌検施行時までの中耳炎の反復回数については、陽性群においては罹病平均期間が5.3ヶ月であり、弱陽性群1.2ヶ月、陰性群1.5ヶ月であり、陽性群では明らかに罹病期間の遷延化が認められた (Fig. 1)。中耳炎の反復回数においては、陽性群においては平均罹患回数が3.6回であり、弱陽性群1.5回、陰性群3.3回であり、各群間において、有意差は認められなかった。Chopと合併症との関連におい

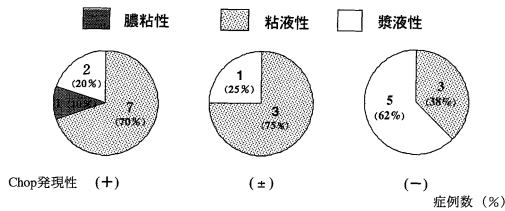


Fig. 2 Expression of Chop on NTHi and the character of middle ear effusions

The character of middle ear effusions in Chop positive group: (+), and weakly positive group: (±) tend to mucoid type, but that in negative group: (-) is inclined to serous type.

ては、各群で慢性副鼻腔炎の合併例および、アレルギー性鼻炎の合併例は弱陽性群を除き比較的少なく、各群間に有意差は認められなかった (Table 2).

当科において、滲出性中耳炎の治療として、マクロライド系抗生剤、およびカルボシステインを中心とした去痰剤の内服を主体とした保存的療法と共に、鼓膜切開術や鼓室換気ベンチレーションチューブ留置術といった外科的療法を施行している。切開時における中耳貯留液の性状については、陽性および弱陽性群は粘液性貯留液を多く認めるのに対して、陰性群においては漿液性貯留液を多く認める傾向があった (Fig. 2)。しかし、統計学的な有意差は見られなかった。

考 察

従来、ChoP は肺炎球菌のリポタイコ酸や糖脂質といった細胞壁の構成成分の1つであり、細菌の気道粘膜上皮への定着および浸潤に関与し、敗血症や髄膜炎などの全身感染を来す因子としてあげられている¹⁾。Weiserらはインフルエンザ菌においても、遺伝学的上、licI領域中のCAATの縦列配列の反復により位相変異を来し、ChoPをLPSに表出することを報告しており²⁾、またSwordらも無莢膜型インフルエンザ菌においても同様の位相変異が、

PAFレセプターを介して気道上皮への定着および浸潤に関与していることを報告している³⁾。また、TongらはChopをLOSに表出した無莢膜型インフルエンザ菌を用いてチンチラに経鼻投与を行ったところ、鼻咽腔での細菌クリアランスが遷延化し、中耳炎の発症に関与すると述べている⁴⁾。以上のように、インフルエンザ菌の位相変異と病原性との関連について報告されている。しかし、実際の臨床場において、特に滲出性中耳炎における検討は全くなされていないのが現状である。今回、我々は滲出性中耳炎に罹患した小児の鼻咽腔よりインフルエンザ菌を分離し、その位相変異について検討を行ったところ、検出された無莢膜型インフルエンザ菌の内、ChoP陽性率が63%であり、ChoP陽性例においては明らかに中耳炎の罹患期間の遷延化が認められ、外科的治療時において粘稠性の貯留液を多く認める傾向が見られた。このことから、Chopが滲出性中耳炎の難治化の要因の1つとして挙げられるものと推測される。一般に無莢膜型インフルエンザ菌そのものは1つの範疇として扱われる事が多いが、今後はインフルエンザ菌自体の性状においても十分に検討を加える事が、難治性滲出性中耳炎の治療に結びつくものと考えられる。

ま と め

滲出性中耳炎に罹患した小児の鼻咽腔よりインフルエンザ菌を分離し、その位相変異について検討した。無莢膜型インフルエンザ菌の内、ChoP陽性率が63%であり、ChoP陽性例においては明らかに中耳炎の罹患期間の遷延化が認められ、外科的治療時において粘稠性の貯留液を多く認める傾向が見られた。このことから、Chopが滲出性中耳炎の難治化の要因の1つとして挙げられるものと推測される。

参 考 文 献

- 1) Kolberg J., Hoiby E.A., Jantzen E Detection of

- the phosphorylcholine epitope in streptococci, haemophilus and pathogenic Neisseriae by immunoblotting. *Microbial Pathogenesis* 22: 321-329, 1997.
- 2) Weiser, J. N., Love, J. M., Moxon, E. R. The molecular mechanism of phase variation of *H. influenzae* lipopolysaccharide. *Cell* 59: 657-665, 1989.
- 3) Swords, W. E., Buscher, B. A., Ver Steeg, I. K., Preston, A., Nichols, W. A., Weiser, J. N., Gibson, B. W., Apicella, M. A. Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol Microbiol* 37: 13-27, 2000.
- 4) Tong, H. H., Blue, L. E., James, M. A., Chen, Y. P., DeMaria, T. F. Evaluation of phase variation of nontypeable *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide during nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model. *Infect Immun* 68: 4593-4597, 2000.

質 疑 応 答

質問 黒野祐一（鹿児島大）

フォスホリールコリンが表出される機序は、

応答 平野 隆（大分大）

epitope の表出の機序は、遺伝子的に *lic1* 領域の 5-CAAT のタンデムリリピートによる変化がもたらされる事は判明しているが、それらの臨床像との関連と免疫ワクチンの可能性としてはまだ十分な検討が必要だと思う。

連絡先：平野 隆

〒879-5593

大分県大分郡挾間町大ヶ丘 1-1

大分大学医学部耳鼻咽喉科

TEL 097-586-5913 FAX 097-549-0762

E-mail thirano@med.oita-u.ac.jp