

厚生科学研究研究費補助金

感覚器障害及び免疫アレルギーなどに係る研究事業

急性中耳炎による聴覚障害発生機構の解明とその予防に関する疫学的実験的研究

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 石橋 敏夫

平成13(2001)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

急性中耳炎による聴覚障害発生機構の解明とその予防に関する疫学的
実験的研究

1-3

石橋 敏夫

II. 分担研究報告

1. Multiplex nested RT-PCR法による呼吸器ウイルスゲノムの検索

—反応条件の設定—

4-13

増田 道明

2. 呼吸器ウイルス感染と小児急性中耳炎の予後に関する疫学的研究

14-21

矢野 純

厚生科学研究費補助金(感覚器障害及び免疫アレルギーなどに係る研究事業)
(総括)研究報告書

急性中耳炎による聴覚障害発生機構の解明とその予防に関する疫学的
実験的研究に関する研究

主任研究者 石橋 敏夫 社会保険中央総合病院耳鼻咽喉科部長

研究要旨

Multiplex nested RT-PCR 法という迅速かつ簡便に、しかも同時に複数のウイルスゲノムを同定するシステムを社会保険中央総合病院病院内の検査部中に確立し、小児急性中耳炎患者54例より採取した中耳貯留液84検体についてさまざまな呼吸器ウイルスゲノムの検索をし、ウイルス感染と小児急性中耳炎の予後に関する疫学的研究をおこなった。その結果、ウイルス感染は、急性中耳炎の反復には関与していないが、滲出性中耳炎の移行に関して関与している可能性が、臨床疫学的に明らかになった。

分担研究者 増田 道明
東京大学微生物学教室助教授

分担研究者 矢野 純
日赤医療センター耳鼻咽喉科部長

システムを用いて、社会保険中央総合病院、日赤医療センターで採取した小児急性中耳炎の中耳貯留液について、呼吸器ウイルスゲノムの検索を行い、これらの結果と小児急性中耳炎の予後との関係を明らかにすることを今年度の研究の目的とした。

A. 研究目的

急性中耳炎は、近年、その発症や予後について先行する呼吸器ウイルスとの関わりを示唆する事実が報告されているが、その因果関係は明らかでない。したがって、急性中耳炎患者より耳漏中に、そのような呼吸器ウイルスが検出されるかを検索することは、急性中耳炎の予防、予後の推定、および治療のうえで重要と思われる。急性中耳炎患者の多くは一般に大学病院よりも、一般病院や開業医を訪れる場合が多い。われわれは、市中病院で急性中耳炎患者の診療にあたる耳鼻科医として、中耳貯留液を用いて、迅速かつ簡便に、同時に複数のウイルスゲノムを同定するシステムを病院の検査部中に確立しようと試みた。そして、このシ

B. 研究方法

迅速かつ簡便なウイルスゲノムの検索システムの確立から、小児急性中耳炎患者からの耳漏の採取、ウイルスゲノムの検索、急性中耳炎の予後調査のながれを円滑に進めるために、今年度は以下の2つテーマにわけて分担して研究をおこなった。

1. Multiplex nested RT-PCR 法による呼吸器ウイルスゲノムの検索

—反応条件の設定—

(分担研究者;増田 道明)

2. 呼吸器ウイルス感染と小児急性中耳炎の予後に関する疫学的研究

(分担研究者;矢野 純)

C. 研究結果

1) **Multiplex nested RT-PCR** 法による呼吸器ウイルスゲノムの検索 — 反応条件の設定 —:

増田は小児急性中耳炎耳漏検体40例を用いて、呼吸器ウイルスゲノムの検索のための **Multiplex Nested RT-PCR** の条件を確立した。この方法により、1つのチューブ内での2段階のPCR反応と電気泳動により、同時に5つのウイルスゲノムを同定することができる。A群ではパラインフルエンザウイルス1型、2型、3型、ライノウイルス、アデノウイルスを、B群ではインフルエンザウイルスA型(H1N1)、A型(H3N2)、B型、RSウイルスA型、B型を同定するシステムとした。感度についてしらべたところ、オリジナルサンプルの100倍から10000倍希釈まで検出できる感度の高いアッセイ方法であることがわかった。また、耳漏液40検体についてインフルエンザA型、RSウイルスA型、アデノウイルスのウイルス抗原をELIZAキットを用いておこない、**Multiplex Nested RT-PCR** の結果と比較したところ、ELIZA法によるウイルス抗原検出率は30%であり、**Multiplex Nested RT-PCR** による検出率43%であった。したがって、**Multiplex Nested RT-PCR** はより感度の高いウイルス検出法であることが明らかとなった。

2) 呼吸器ウイルス感染と小児急性中耳炎の予後に関する疫学的研究 : 矢野らは増田の確立した**Multiplex-nested RT-PCR**法という新しい方法を用いて、小児急性中耳炎患者54例より採取した中耳貯留液84検体についてさまざまな呼吸器ウイルスゲノムの検索をし、ウイルス感染と小児急性中耳炎の予後に関する疫学的研究をおこなった。その結果、32症例(59%)にウイルスゲノムが検出された。内訳は、RS-Aウイルスが29症例、アデノウイルスが10症例、RS-Aウイルスとアデノウイルスの混合感染が6例、インフルエンザウイルス(H3N2)が4症例、ライノウイルスが2症例である。反復性中耳炎とウイルス感染、ペニシリン耐性肺炎球菌との関係を調査したところ、ウイルス感染は反復性中耳炎を引き起こす危険因子となっていないが、ペニシリン耐性肺炎球菌感染症例においては有意に反復性中

耳炎発生率が高いことがわかった。さらに、ウイルス感染の有る症例と無い症例で6ヵ月後の滲出性中耳炎への移行について検索したところ、ウイルス感染の有る症例において、有意に高く滲出性中耳炎が認められた。年齢と反復性中耳炎との関係については、2歳以下の患児において有意に高い頻度で、反復性中耳炎が認められた。

D. 考察

急性中耳炎は耳鼻咽喉科で臨床的に数多く遭遇する疾患の一つであり、抗生物質が発達したにもかかわらず経過が遷延、反復、再発したりする例も少なくない。滲出性中耳炎や慢性中耳炎に移行する例もあり、治療に難渋し、難聴などの後遺症が残ることもある。

急性中耳炎は、近年、その発症や予後について、先行する呼吸器ウイルス感染との関わりが示唆される事実が報告されているが、その因果関係は明らかでない。また、内耳障害をとる急性中耳炎症例においては、以前からウイルスの関与が報告されているが、いまだ原因ウイルスも同定されていない。

急性中耳炎の中耳貯留液に呼吸器ウイルスが検出されることは、欧米を中心にいくつかの報告があり、1999年のHeikkinenらの報告では、RSウイルスが小児急性中耳炎発症時に中耳に検出されるウイルスのうち、最も一般的なものであることが示された。しかし、わが国では、数多くの検体を用いたこの種の疫学的研究は今までにない。

本報告では、反復性中耳炎には、ペニシリン耐性肺炎球菌感染と患児の低年齢が、滲出性中耳炎の移行に関してはウイルス感染が関与している可能性が、臨床疫学的に示唆された。ペニシリン耐性肺炎球菌感染と患児の低年齢は急性中耳炎の遷延反復に関与しているということについては、国内外にいくつかの報告があり、広く認められている。しかし、滲出性中耳炎の移行例についてウイルス感染が高頻度で認められることについての報告はきわめて少なく、本報告は貴重なデータといえる。今後、ウイルス感染がどのようなメカニズムで滲出性中耳炎をおこす

のか、中耳貯留液中の炎症性サイトカイン、ヒスタミンなどのケミカルメディエーターの濃度を測定するとともに、ウイルス中耳注入動物モデルの作成とその病理組織学的検索が必要となる。

中耳炎による難聴は環境因子によってひきおこされる聴覚障害の中では最も頻度の高いものであり、急性中耳炎発症の予防、慢性化の阻止、内耳障害の予防は重要な課題である。ウイルスによる急性中耳炎の発症、遷延化のメカニズムが明らかになれば、ウイルスワクチン接種による、急性中耳炎罹患の予防、抗ウイルス剤の使用による中耳炎慢性化の阻止などが可能になることが期待される。このことは、今後、中耳炎による難聴者の発生率を減らし、国民の医療、福祉に貢献するのみならず、急性中耳炎、慢性中耳炎の治療についやされる抗生物質の量、そして手術にかかる費用を大きく減らすことができものと思われる。

E. 研究発表

1. 学会発表

Multiplex nested RT-PCR for respiratory viruses detection in acute otitis media

Toshio Ishibashi, Hiroko Monobe, Yuka Nomura-Ikehara, Masanobu Shinogami, Jun Yano. Association for Research in Otolaryngology, 2001 Mid Winter Meeting St. Petersburg, FL, USA, Feb 4-8, 2000

Presence of various respiratory viral RNA in the middle ear fluids from young children with acute otitis media. Hiriko MONOBE, Toshio ISHIBASHI, Yuka NOMURA-IKEHARA, Masanobu SHINOGAMI, Jun YANO. Association for Research in Otolaryngology, 2001 MidWinter Meeting St. Petersburg, FL, USA, Feb 4-8, 2000

小児急性中耳炎の中耳貯留液における風邪症候群ウイルスの診断システム

—Multiplex Nested RT-PCR法によるウイルスRNAの同定—

石橋敏夫 篠上雅信 池原由香 矢野純
第10回日本耳科学会 浜松市 10/19-21

小児急性中耳炎における起炎菌と治療法に関する検討

野村由香, 石橋敏夫, 矢野純, 市川朝也, 篠上雅信, 平井良治, 物部寛子, 加我君孝 第10回日本耳科学会 浜松市 10/19-21, 2000

市中病院における風邪症候群原因ウイルスの診断システム

—Multiplex Nested RT-PCR法によるウイルスRNAの同定—

石橋敏夫 篠上雅信 池原由香 矢野純 第39回日本鼻科学会 金沢市 9/28-30, 2000

Multiplex nested RT-PCR法による呼吸器ウイルスゲノムの検索
—反応条件の設定—

分担研究報告書

分担研究者 増田 道明 東京大学微生物学教室助教授

研究要旨 Multiplex Nested RT-PCR法を用いて小児急性中耳炎の耳漏液検体40例について呼吸器ウイルスゲノムの検索を行った。この方法はELIZA法にくらべ、感度が高く、2ステップのPCR反応で同時に数種のウイルスゲノムを1つの反応チューブの中で同定できる優れたシステムで、コスト的にも経済性が高く、一般病院の検査部レベルで導入可能なシステムである。

A. 研究目的

呼吸器ウイルスの主なものはRNAウイルスであり、風邪症候群をおこすウイルスであるが、その種類は多い。したがって、ELIZA法により、臨床検体から原因ウイルスを同定個々のウイルスについて個別にウイルス抗原を同定する必要があり、経費と労力がかかり、実用的ではない。そこで、われわれは、臨床検体から、迅速かつ簡便に、しかも同時に数種類のウイルスゲノムを同定する方法、Multiplex nested RT-PCR法を、呼吸器ウイルス同定に導入しようと考えた。

今回、小児急性中耳炎の耳漏液検体40例を用いて、予備実験を行い、反応条件を設定し、ウイルス検出の感度と特異性について、ELIZA法と比較し、検討した。さらに、得られたPCR産物について塩基配列を決定した。

B. 研究方法

1) Multiplex Nested RT-PCR

小児急性中耳炎の中耳貯留液50—100 mlから、guanidium-phenol-chloroform法によりRNAを抽出し、RT(reverse transcription)反応を37度で1時間行った。5種類のウイルスずつ2群(A群、B群)にわけMultiplex Nested RT-PCRを行った(表1)。A群ではパラインフルエンザウイルス1型、2型、3型、ライノウイルス、アデノウイルスを、B群ではインフルエンザウイルスA型(H1N1)、A型(H3N2)、B型、RSウイルスA型、B型を混合PCRプライマーをもちいて、1段階目のRT-PCRを行い、それぞれのプライマーの内側のプライマーを混合

プライマーとして2段階目のPCRを行いウイルスゲノムを同定した(図1)。PCRの反応条件は1段階目が、denaturation 92度1分、annealing 50度1分、extension 72度1分30秒で35サイクル行い、2段階目が、denaturation 92度1分、annealing 60度1分、extension 72度1分30秒で35サイクル行った。

2) ウイルス抗原の検出

ウイルス抗原の検出は市販のインフルエンザA型、RSウイルスA型、アデノウイルスのELIZAキットを用いておこなった。

3) PCR産物の塩基配列の決定

PCR産物はアガロースゲルで電気泳動後、QIAEX2 gel extraction kitを用いて精製し、PCRプライマーの一方をシーケンスプライマーにしてダイレクトシーケンスを行った。

C. 研究結果

1) 小児急性中耳炎の中耳貯留液40検体をMultiplex Nested RT-PCR法で呼吸器ウイルスの検索をおこなったところ、ウイルスRNAは17検体(43%)に検出された。内訳は、RSウイルスA型が12例に、アデノウイルスが4例に、ライノウイルスが2例に、インフルエンザウイルスA(H3N2)が1例に検出された(表2)。このうち、アデノウイルスとRSウイルスの二重感染は1例あり、いずれのウイルスも同定されなかったものは9例あった。2段階目のPCR産物のアガロースゲル電気泳動の例を図2、3に示す。図2 AはインフルエンザウイルスA(H3N2)の591 bpのバンド(レーン5)とRSウイルスA型の370bpのバンド(レーン1,2,6)を示している。

図3Aはアデノウイルスの141bpのバンド(レーン1,5)とライノウイルスの366bpのバンド(レーン3,6)を示している。図2B, 2C, 3B, 3Cではそれぞれの個別のウイルスについて行ったuniplex nested RT-PCRの結果である。すべての検体についてMultiplex Nested RT-PCRとuniplex nested RT-PCRの結果は一致していた。

2) RSウイルス、インフルエンザウイルス、ライノウイルス陽性のサンプルRNA 1mgを10倍ずつ希釈して同様の条件でMultiplex Nested RT-PCRを行った。RSウイルスは100倍、インフルエンザウイルスは10000倍、ライノウイルスは1000倍に希釈したサンプルでも目的のサイズのバンドが検出された(図4)。したがって、Multiplex Nested RT-PCRはオリジナルサンプルの100倍から10000倍希釈まで検出できる感度の高いアッセイ方法であることがわかった。

3) 耳漏液40検体についてインフルエンザA型、RSウイルスA型、アデノウイルスのウイルス抗原をELIZAキットを用いておこない、Multiplex Nested RT-PCRの結果と比較した(表3)。ウイルス抗原は30%にされ、Multiplex Nested RT-PCRによる検出率43%と比較すると、その感度は71%であった。

4) 7つのウイルス陽性についてダイレクトシーケンスを行い、Genbank data baseに対しその相同性について比較した。表4にその結果を示す。それぞれが目的のゲノムであったことがわかる。

D. 考察

Multiplex Nested RT-PCR法はELIZA法にくらべ、感度が高く、2ステップのPCR反応で同時に数種のウイルスゲノムを1つの反応チューブの中で同定できる優れたシステムで、コスト的にも経済性が高く、呼吸器ウイルスなどのいくつかの対象となるウイルスがある場合などのウイルスゲノムの検索に適している。一般病院の検査部レベルで導入可能なシステムである。

表1: Primers used for Multiplex Nested RT-PCR

I

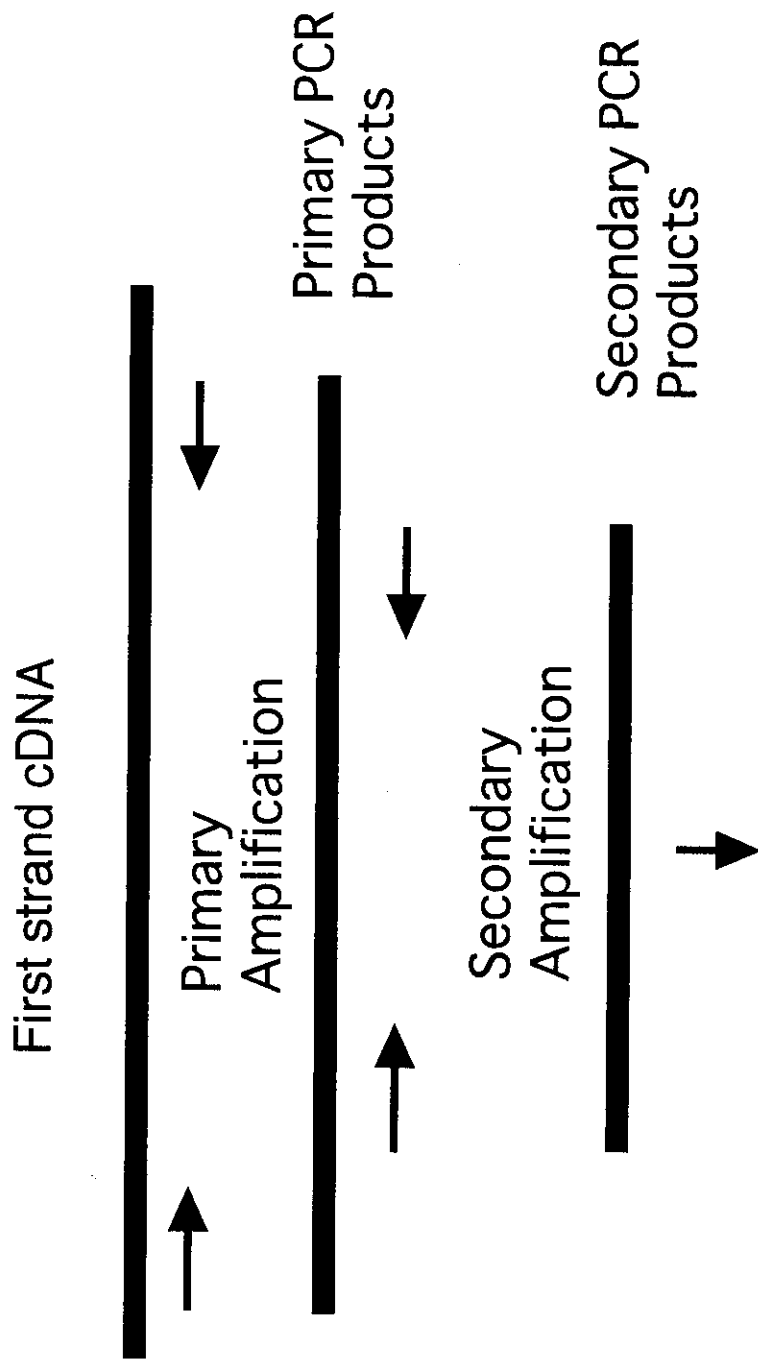
Primary			
Influenza A (H1N1)	F	CAGATGCAGACACAATATGT	
	R	AAACCCGGCAATGGCTCCAAA	
Influenza A (H3N2)	F	CAGATTGAAGTGACTAATGC	
	R	GTTTCTCTGGTACATTCCGC	
Influenza B	F	GTGACTGGTGTGATACCACT	
	R	TGTTTTCAACCCATATTGGC	
RSVAB	F	GTCTTACAGCCGTGATTAGG	
	R	GGGCTTTCTTTGGTTACTTC	
Secondary			
Influenza A (H1N1)	F	ATAGGCTACCATGCGAACA	944 bp
	R	CTTAGTCTGTAAACCATCCT	
Influenza A (H3N2)	F	AGCAAAGCTTTCAGCAACTG	591 bp
	R	GCTTCCATTTGGAGTGATGC	
Influenza B	F	CATTTTGCAAATCTCAAAGC	767 bp
	R	TGGAGGCAATCTGCTTCACC	
RSVA	F	GATGTTACGGTGGGGAGTCT	334 bp
	R	GTACACTGTAGTTAATCACA	
RSVB	F	AATGCTAAGATGGGGAGTTTC	183 bp
	R	GAAATTGAGTTAATGACAGC	

II

Primary			
PIV1	F	GTTCCAGGAGAAGTGAGAGCA	
	R	GGACTACGTATGGCCATTGC	
PIV2	F	CACTGCAAGAGAGGGACATAG	
	R	GGAGCAGTCATACACTTGCA	
PIV3	F	GGATATTTGGAAGTGACCTGG	
	R	CCAAGCTCTGTTGAGACCCG	
HRV	F	CAATAGGGAGCACCATATCC	
	R	CGGACACCCAAAAGTAG	
Adeno	F	FAACAAGTTTAGGAACCCACC	
	R	TGTAGGCAGTGCCGGAGTAGGG	
Secondary			
PIV1	F	TCTGGCGGAGGCAATTATACCTGG	131 bp
	R	ATCTGTGTCCAATGAGTGAG	
PIV2	F	GCAGCTATGAGTAATCACATC	281 bp
	R	CCATGCCTGCATAAGCACACTGTAGC	
PIV3	F	ACCAGGAACTATGCTGCAGAACGGC	234 bp
	R	GATCCACTGTGTACCCGCTCAATACC	
HRV	F	GCACCTCTGTTTCCCC	366 bp
	R	CGGTCCCACCCAGAAATTAC	
Adeno	F	CCTACCCACGATGTGACCCCGACCG	141 bp
	R	GCACGCCCGCGGATGTCAAAGTA	

RT-PCR=reverse transcription-polymerase chain reaction
 RSV=respiratory syncytial virus, PIV=parainfluenza virus,
 HRV=human rhinovirus

图 1: Principle of Nested RT-PCR



RT-PCR=reverse transcript polymerase chain reaction

表 2: Respiratory viruses in middle ear fluid from children with acute otitis media detected by multiplex nested RT-PCR (n=40)

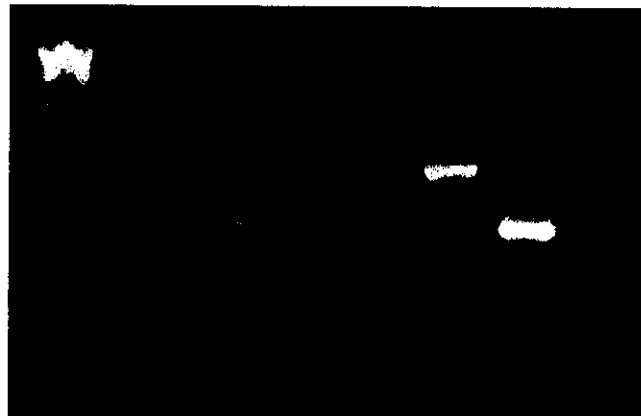
RSV type A	1	2	(3 0 %)
Adenovirus	4		(1 0 %)
Rhinovirus	2		(5 %)
Influenza A virus(H3N2)	1		(2.5 %)

RSV=respiratory syncytial virus

图 2

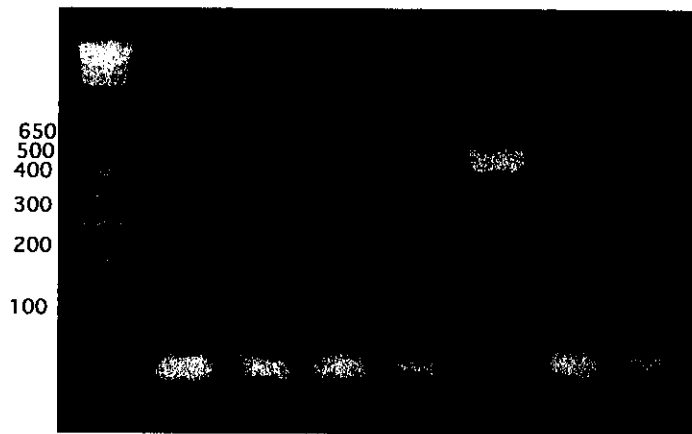
M 1 2 3 4 5 6 7

A



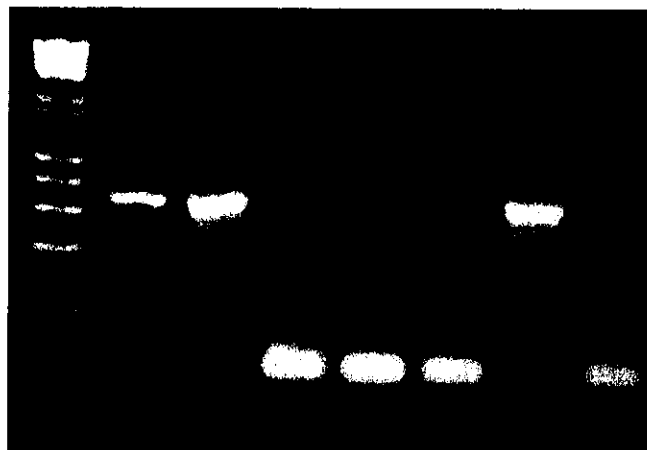
Multiplex PCR results using multiple primers I

B



Uniplex PCR results using Influenza A primers

C

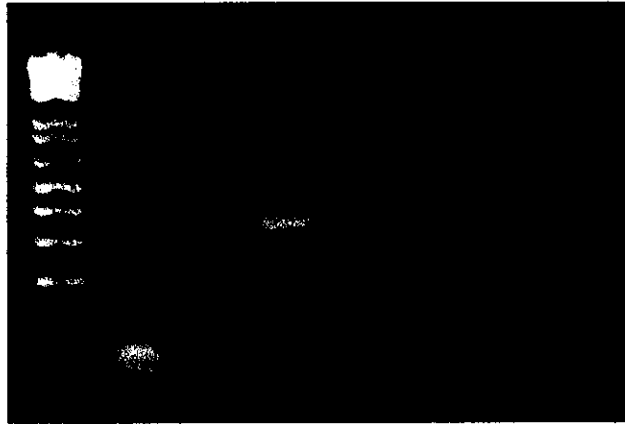


Uniplex PCR results using RSV-A primers

M 1 2 3 4 5 6 7

3

A



Multiplex PCR results using multiple primers II

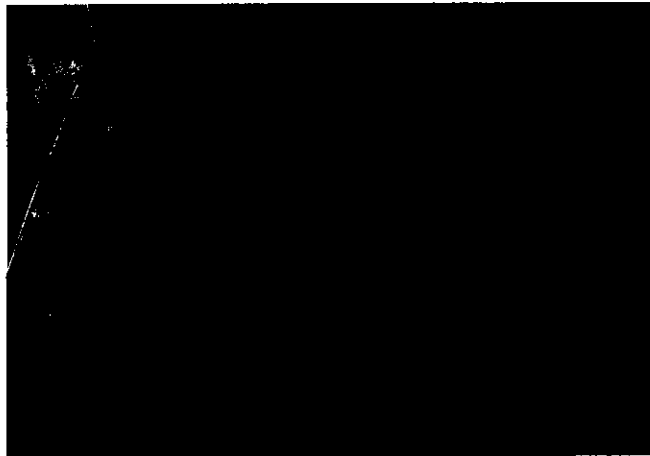
B

650
500
400
300
200
100



Uniplex PCR results using rhinovirus primers

C



Uniplex PCR results using adenovirus primers

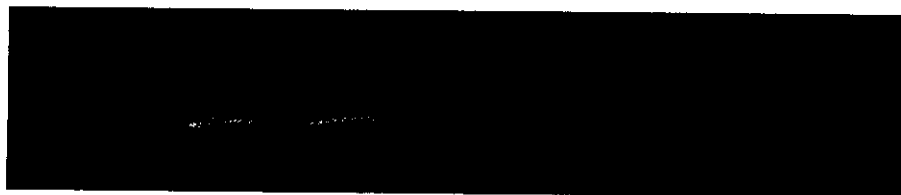
☒ 4 : Sensitivity of multiple RT-PCR

M 1 2 3 4 5 6 7 bp



591

influenza A



334

RSV-A



366

Rhinovirus



141

Adenovirus

表 3: Antigen detection and multiplex RT-PCR detection of respiratory viruses in middle ear fluid specimens

Results (RT-PCR/ELIZA)	RSV-A	Influenza A	Adenovirus
+ / +	8	1	3
+ / -	4	0	1
- / -	28	39	36
- / +	0	0	0

表 4: Sequencing analysis of 7 PCR products

Sample	highest homology sequence	
Influenza -1	InfluenzaA(A/Swine/Colorado/23619/99(H3N2))	98%
RSA -1	RS virus, complete genome(NC_001803.1)	98%
RSA- 2	RS virus, complete genome(NC_001803.1)	98%
HRV-1	Human Rhinovirus serotype 72 5'	89%
HRV-2	Human Rhinovirus serotype 72 5'	88%
Adeno-1	Adenovirus type 41 hexon gene	99%
Adeno-2	Adenovirus type 2 hexon gene	100%

厚生科学研究費補助金(感覚器障害及び免疫アレルギーなどに係る研究事業)
分担研究報告書

呼吸器ウイルス感染と小児急性中耳炎の予後に関する疫学的研究

分担研究者 矢野 純 日赤日医療センター耳鼻咽喉科部長

研究協力者 物部 寛子 日赤医療センター耳鼻咽喉科医員

研究要旨

小児急性中耳炎患者より耳漏もしくは中耳貯留液を採取し、呼吸器ウイルスゲノムの発現をRT-PCR法で検索し、これらの結果と中耳炎の予後との関係を検討した。その結果、反復性中耳炎には、ペニシリン耐性肺炎球菌感染と患児の低年齢が、滲出性中耳炎の移行に関してはウイルス感染が関与している可能性が、臨床疫学的に示唆された。

A. 研究目的

急性中耳炎は、近年、その発症や予後について、先行する呼吸器ウイルス感染との関わりが示唆される事実が報告されているが、その因果関係は明らかでない。本研究では、疫学的な研究として小児急性中耳炎患者より耳漏もしくは中耳貯留液を採取し、呼吸器ウイルスゲノムの発現をRT-PCR法で検索し、これらの結果と中耳炎の予後との関係を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

10月から3月までの冬の季節に、日赤医療センターを受診し、急性中耳炎と診断された5ヶ月から6歳までの小児の初回治療例54例を対象とする。初診時に、鼓膜切開により中耳貯留液を採取し、あわせて上咽頭よりも同様に検体を採取する。検体は細菌検査の後、ウイルス検査用検体を採取し、-80度で保存しておく。全例において、抗生物質が投与され、耳鼻咽喉科専門医によって、経過観察、治療がなされ、平均経過観察期間は5ヶ月であった。中耳炎の反復症例および滲出性中耳炎への移行例では必要に応じて鼓膜切開を行い、

貯留液を除去し耐性菌の有無、ウイルス感染の有無を検索した。反復性中耳炎は、6ヶ月間に3回以上の反復する急性中耳炎と定義した。

Multiplex nested RT-PCRの方法の詳細については、分担研究者の増田が報告した条件にしたがって、パラインフルエンザウイルス1型、2型、3型、ライノウイルス、アデノウイルスを、B群ではインフルエンザウイルスA型(H1N1)、A型(H3N2)、B型、RSウイルスA型、B型について検索した。

(倫理面への配慮)本研究では、研究の過程において、通常我々が急性中耳炎に対しておこなってきた最良考えている治療法はなんら変更されていることはなく、疾患の治療、患者の苦痛の軽減を第一に考えている。たとえば、鼓膜切開は治療上必要と認められたときのみ施行している。また、<急性中耳炎の診療にあたって>というパンフレットを作成した。そこには、急性中耳炎の疾患の概念、薬剤耐性菌、ウイルス感染の関与にことのほか、聴力検査、レントゲン検査、鼓膜切開などの検査および処置がどんなときに必要であるかがわかりやすく記載されている。このパンフレットを配布するとき

に、その内容を十分に説明し、インフォームドコンセント得た後、検体の採取を行った。

結果

Multiplex-nested RT-PCR法という新しい方法を用いて、臨床検体から同時に5種類のウイルスゲノムを同じチューブ内で、迅速かつ簡便に同定するシステムを社会保険中央病院検査部の中に確立した。このシステムを用いて、小児急性中耳炎患者54例より採取した中耳貯留液84検体についてさまざまな風邪症候群ウイルスゲノムの検索を行ったところ、32症例(59%)にウイルスゲノムが検出された。内訳は、RS-Aウイルスが29症例、アデノウイルスが10症例、RS-Aウイルスとアデノウイルスの混合感染が6例、インフルエンザウイルス(H3N2)が4症例、ライノウイルスが2症例である(表1)。反復性中耳炎とウイルス感染、ペニシリン耐性肺炎球菌との関係を調査したところ、ウイルス感染は反復性中耳炎を引き起こす危険因子となっていないが(表2)、ペニシリン耐性肺炎球菌感染症例においては有意に反復性中耳炎発生率が高いことがわかった(表3)。さらに、ウイルス感染の有る症例と無い症例で6ヵ月後の滲出性中耳炎への移行について検索したところ、ウイルス感染の有る症例において、有意に高く滲出性中耳炎が認められた(表4)。年齢と反復性中耳炎との関係については、2歳以下の患児において有意に高い頻度で、反復性中耳炎がみとめられた(表5)。

C. 研究結果

Multiplex-nested RT-PCR法という新しい方法を用いて、臨床検体から同時に5種類のウイルスゲノムを同じチューブ内で、迅速かつ簡便に同定するシステムを社会保険中央病院検査部の中に確立した。このシステムを用いて、小児急性中耳炎患者54例より採取した中耳貯留液84検体についてさまざまな風邪症候群ウイルスゲノムの検索を行ったところ、32症例(59%)にウイルスゲノムが検出された。内訳は、RS-Aウイルスが29症例、アデノウイルスが10症例、RS-Aウイルスとアデノウイル

スの混合感染が6例、インフルエンザウイルス(H3N2)が4症例、ライノウイルスが2症例である(表1)。反復性中耳炎とウイルス感染、ペニシリン耐性肺炎球菌との関係を調査したところ、ウイルス感染は反復性中耳炎を引き起こす危険因子となっていないが(表2)、ペニシリン耐性肺炎球菌感染症例においては有意に反復性中耳炎発生率が高いことがわかった(表3)。さらに、ウイルス感染の有る症例と無い症例で6ヵ月後の滲出性中耳炎への移行について検索したところ、ウイルス感染の有る症例において、有意に高く滲出性中耳炎が認められた(表4)。年齢と反復性中耳炎との関係については、2歳以下の患児において有意に高い頻度で、反復性中耳炎がみとめられた(表5)

D. 考察

本報告では、反復性中耳炎には、ペニシリン耐性肺炎球菌感染と患児の低年齢が、滲出性中耳炎の移行に関してはウイルス感染が関与している可能性が、臨床疫学的に示唆された。ペニシリン耐性肺炎球菌感染と患児の低年齢は急性中耳炎の遷延反復に関与しているということについては、国内外にいくつかの報告があり、広く認められている。しかし、滲出性中耳炎の移行例についてウイルス感染が高頻度で認められることについての報告はきわめて少なく、本報告は貴重なデータといえる。今後、ウイルス感染がどのようなメカニズムで滲出性中耳炎をおこすのか、中耳貯留液中の炎症性サイトカイン、ヒスタミンなどのケミカルメディエーターの濃度を測定するとともに、ウイルス中耳注入動物モデルの作成とその病理組織学的検索をおこなっていきたいと考えている。

G. 研究発表

1. 学会発表

Presence of various respiratory viral RNA in the middle ear fluids from young children with acute otitis media. Hiriko MONOBE, Toshio ISHI BASHI, Yuka NOMURA-IKEHARA, Masanobu SHINOGAMI, Jun YAN O. Association for Research in Otolaryngology, 2001 MidWinter Meeting St.Petersburg, FL, USA, Feb 4-8, 2000

小児急性中耳炎の中耳貯留液における風
邪症候群ウイルスの診断システム

—Multiplex Nested RT-PCR法によるウ
イルスRNAの同定—

石橋敏夫 篠上雅信 池原由香 矢野純

第10回日本耳科学会 浜松市 10/19-2
1,2000

小児急性中耳炎における起炎菌と治療法
に関する検討

野村由香, 石橋敏夫, 矢野純, 市川朝也,
篠上雅信, 平井良治, 物部寛子, 加我君

孝 第10回日本耳科学会 浜松市 10/19
-21,2000

Table 1. Presence of respiratory viruses in 87 middle ear fluid samples in 54 children with acute otitis media. (n=87)

VIRUS	no.of cases(%)
RSV-A	29(33.3)
Adenovirus	10(11.5)
RSV-A/adenovirus	6(6.9)
Influenzavirus A(H1N3)	4(4.9)
Rhinovirus	2(2.3)

Table 2. Occurrence of recurrent otitis media related to presence of viral or bacterial infection in middle ear.(n=87)

pathogen in MEF	recurrent otitis media (%)
Virus / bacteria (n=31)	19 (61.2)
Virus only (n=8)	1 (13)
Bacteria only (n=36)	23 (64)
Negative (n=12)	7 (58)

Recurrent otitis media was defined as repeated acute otitis media more than three times within 6 months.
MEF=middle ear fluid