

(別紙2)

研究報告書表紙レイアウト(参考)

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13年度 総括分担研究報告書

主任研究者 石橋 敏夫

平成14(2002)年 3月

作成上の留意事項

分担研究報告書がある場合は、「総括・分担研究報告書」と表記すること。

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 ----- 1-4

石橋 敏夫

II. 分担研究報告

1. 小児急性中耳炎の中耳貯留液中に存在するヘルペスウイルスゲノム
--- 5-12

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-----13-21
竹内 直信

3. 小児急性中耳炎の予後に関与する環境因子の検討-----22-30
矢野 純、篠上 雅信

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

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 本研究では、急性中耳炎の予後を改善し、後に聴覚障害をひきおこしていく急性中耳炎の難治例を減らしていく目的で、中耳貯留液中の呼吸器ウイルス、ヘルペスウイルス、細菌などの病原微生物、そして急性中耳炎患者をとりまくさまざまな環境因子について解析し、小児急性中耳炎の予後を規定するさまざまな因子を検索した。ヘルペスウイルスゲノムの検索をおこなったところ、ヘルペスウイルスDNAは20検体(21%)に検出され、疫学的な検索からヘルペスウイルスが急性中耳炎のあるもので、病原微生物となっている可能性が示唆された。呼吸器ウイルスについては、43%の中耳貯留液検体から検出され、そのうちの73%はRSウイルスであった。呼吸器ウイルスと急性中耳炎の予後については、RSウイルスと肺炎球菌and/or インフルエンザ菌の混合感染においては、2才以下の年齢群においては混合感染群の方がそれぞれ単独の感染より有意に予後が悪かった。環境因子を検討では、2才以下の症例において高頻度で反復性中耳炎が認められ、さらに、治療1ヶ月後で中耳に貯留液の残る症例に反復性中耳炎が認められた。2才以下の患児は急性中耳炎に罹患、遷延しやすいとされており、その理由の一つとしてRSウイルス感染が深くかかわっている可能性が示唆された。ワクチンによるRSウイルスの感染防止により、急性中耳炎の罹患率の低下や予後の改善が期待できるものと思われる。

分担研究者 増田 道明
獨協医科大学微生物学講座教授

分担研究者 竹内 直信
東京大学医学部耳鼻咽喉科講師

分担研究者 矢野 純
日赤医療センター耳鼻咽喉科部長

分担研究者 篠上 雅信
日赤医療センター耳鼻咽喉科医員

A. 研究目的

急性中耳炎は耳鼻咽喉科で臨床的に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。感受性のある抗生剤の投与にもかかわらず、難治化、反復する原因としては、近年、発症や予後について影響を及ぼしていると考えられているウイルスの役割がいまだ明らかではなくそれに対する治療予防が不充

分なこと、低年齢での集団保育の増加や母乳栄養の減少等の環境因子の悪化してきていることなどがあげられる。

今回我々は、急性中耳炎の予後を改善し、後に聴覚障害をひきおこしていく急性中耳炎の難治例を減らしていく目的で、中耳貯留液中の呼吸器ウイルス、ヘルペスウイルス、細菌などの病原微生物、そして急性中耳炎患者をとりまくさまざまな環境因子について解析し、小児急性中耳炎の予後を規定するさまざまな因子を検索した。

B. 研究方法

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と環境因子の解析のながれを円滑に進めるために、今年度は以下の3つテーマにわけて分担して研究をおこなった。

1. 小児急性中耳炎の中耳貯留液中に存在するヘルペスウイルスゲノム

(分担研究者；増田 道明)

2. 呼吸器ウイルスと小児急性中耳炎の予後

(分担研究者；竹内 直信)

3. 小児急性中耳炎の予後に関する環境因子の検討

(分担研究者；矢野 純、

篠上 雅信)

C. 研究結果

1. 小児急性中耳炎の中耳貯留液中に存在するヘルペスウイルスゲノム

小児急性中耳炎の中耳貯留液94検体をMultiplex Nested PCR法で4種のヘルペスウイルスゲノムの検索をおこなったところ、ヘルペスウイルスDNAは20検体(21%)に検出された。内訳は、EBVが10例に、CMVが5例に、HSVが4例に、VZVが4例に検出された(表2)。このうち、3例にヘルペスウイルス同志の複合感染が認められた。いままでわかれわかれが検索した中耳貯留液における呼吸器ウイルス感染のデータをもとに、呼吸器ウイルス、ヘルペスウイルス、細菌感染と中耳炎の予後との関係解析した。呼吸器ウイルスか細菌か検出された検体群(66例)において、呼吸器ウイルスか細菌が検出された検体群に比べて、有意に高出い頻度でヘルペスウイルスが検出された。

2. 呼吸器ウイルスと小児急性中耳炎の予後

79人の小児急性中耳炎患者から採取した93耳の中耳貯留液検体についてMultiplex-nested RT-PCR法により呼吸器ウイルスの検出結果を行ったところ、39検体(42%)に呼吸器ウイルスゲノムが検出され、内訳は、RS-Aウイルスが29症例(31%)、アデノウイルスが8症例(9%)、RS-Aウイルスとアデノウイルスの混合感染が3例(3%)、インフルエンザウイルス(H3N2)が2症例、ライノウイルスが3症例であった。細菌は93耳の中耳貯留液検体中42検体に認められ、このうち肺炎球菌は20例に、インフルエンザ菌が16例に、モラキセラカタラーリスが4例に認められた。細菌陽性例のうち、81%に肺炎球菌もしくはインフルエンザ菌が検出されている。ウイルスRNAは51例の細菌感染陰性症例のうち、23例(45%)に、42例の細菌感染陽性症例のうち、16例(38%)に認められた。28症例30%の症例においてはウイルスRNAも細菌も検出されなかった。初診から1ヶ月後に中耳貯留液が存在していて鼓膜が正常化しなかった例を初期失敗例とし、いったん鼓膜が正常化するも初診から1ヶ月以内に中耳炎が再燃したものを初期再燃例と定義した。それら単独感染、ウイルスと細菌の混合感染、細菌単独感染、細菌とウイルスの両方に分けて検討したところ、初期失敗率、初期再燃率の両方において各群に有意の差は認められなかった。次に、急性中耳炎の中耳貯留液中に最も頻度が高く検出されたRSウイルスと同じく頻度の高い細菌である肺炎球菌とインフルエンザ菌に限って予後の解析を行った。RSウイルスと肺炎球菌and/or インフルエンザ菌の混合感染においては、全年齢においては結果に有意の差を認めないものの、2才以下の年齢群においては混合感染群の方がそれぞれ単独の感染より有意に初期治療失敗率が高かった。早期再燃群、反復性中耳炎に関しては各群に有意差を認めなかった。

3. 小児急性中耳炎の予後に関する環境因子の検討

①反復性中耳炎と環境因子、年齢、性別、集団保育、兄弟、母乳栄養の有無などの環境因子と反復性中耳炎の頻度との関係を検討し

た。2才未満では38人中13人(34%)、2才以上では23人中1人(4%)に反復性中耳炎が認められ、低年齢であることが危険因子となっていた。他の環境因子はいずれも統計学的に危険因子といえるものはなかった。

②治療1ヶ月後の中耳貯留液の有無と環境因子
各環境因子と治療1ヶ月後の中耳貯留液の有無について同様に2才未満と全年齢に分けて検討を行ったが、各項目でいずれも有意の差は認められなかった。

③早期再燃と環境因子
2才未満では38人中12人(32%)、2才以上では23人中2人(9%)において早期再燃が認められ、2歳未満において再燃しやすい傾向が認められたが、統計学的には有意の差ではなかった($p=0.08$)。集団保育下にある児では全年齢では31人中2人(6%)、集団保育下のない児では30人中12人(40%)が早期再燃しており、集団保育を受けていない児で早期再燃の頻度が高いという結果になった($p=0.005$)。2才未満での検討でも同様に、集団保育下の児は16人中2人(13%)が早期再燃、集団保育下のない児では22人中10人(45%)と集団保育下のない児で早期再燃が多かった($p=0.03$)。

④中耳貯留液分離菌と急性中耳炎の予後
中耳貯留液分離菌と早期再燃、治療1ヶ月後の中耳貯留液の頻度との関係について検討した。肺炎球菌、インフルエンザ菌、モラキセラ菌、菌陰性の各群において、それぞれの検討項目について有意の差は認められなかった。

⑤上咽頭分離菌と急性中耳炎の予後
同様に上咽頭分離菌と早期再燃、治療1ヶ月後の中耳貯留液の頻度との関係について検討した。肺炎球菌、インフルエンザ菌、モラキセラ菌、菌陰性の各群において、それぞれの検討項目について有意の差は認められなかった。

⑥乳児院症例での検討
乳児院症例12人(全て2才以下)での反復性中耳炎、早期再燃、治療1ヶ月後の中耳貯留液の頻度について、2歳以下の乳児院症例を除いた一般児を対照として比較検討した。乳児院症例では12人中11人(92%)と、一般児での38人中13人(34%)と比較し、反復性中耳炎の頻度が有意に高かった($p=0.0017$)。早期再燃、治療1ヶ月

後の中耳貯留液の頻度については、いずれも乳児院症例において高い傾向が認められたが、統計学的には有意ではなかった。

⑦治療1ヶ月後の経過と反復性中耳炎

乳児院症例を除く63人において治療1ヶ月後の経過と反復性中耳炎の頻度を比較した。早期再燃のあった群では14人中9人(64%)、早期再燃のなかった群では47人中5人(11%)に反復性中耳炎を発症しており、早期再燃のあった群において有意に高い頻度で反復性中耳炎をおこしていた($p=0.00013$)。2才以下の症例に限って検討しても、同様に、早期再燃のあった群において有意に高い頻度で反復性中耳炎をおこしていた($p=0.0002$)。次に治療1ヶ月後の時点での中耳貯留液の有無によって、反復性中耳炎の頻度を比較した。全年齢での検討では、中耳貯留液の有群で32人中12人(38%)に、中耳貯留液の無群で31人中2人(6%)に反復性中耳炎がおり、中耳貯留液の有群で有意に反復性中耳炎の頻度が高かった($p=0.008$)。2才以下でも同様に、中耳貯留液の有群で有意に反復性中耳炎の頻度が高かった($p=0.004$)。

考察

本研究では、小児急性中耳炎の中耳貯留液の21%においてヘルペスウイルスゲノムが検出された。ヘルペスウイルス感染と細菌、呼吸器ウイルス感染との関係を検討したところ、呼吸器ウイルスも細菌も検出されなかった群において、呼吸器ウイルスか細菌が検出された群よりも有意の高率でヘルペスウイルスが検出されことは興味深い。いままで、急性中耳炎の病原微生物は細菌と呼吸器ウイルスとされてきたが、ヘルペスウイルスも急性中耳炎において疫学的な役割をはたしている可能性が示された。

呼吸器ウイルスについては、43%の中耳貯留液検体から検出され、そのうちの73%はRSウイルスであった。小児急性中耳炎に関与するvirusはRSVが最も多いというこれまでの報告と一致するものであった。他のvirusが分泌物に伴って受動的に中耳へいくのに対し、RSウイルスは他のウイルスに比べて、中耳に浸潤しやすいためとおもわれる。

われわれは、2歳以下の患者において、RSウイルス感染が肺炎球菌 and/or インフルエンザ菌の細菌感染

に加わると、中耳貯留液が残存しやすくなり、治療後1ヶ月までに鼓膜が正常化しにくいことを示した。このことは、2才以下のRSウイルスと肺炎球菌 and/or インフルエンザ菌の混合感染群では、それぞれの単独感染より中耳滲出液のclearanceが遅れることを示唆している。このような混合感染群で治癒が遅延することについてはいくつかの報告があるが、その理由について、Chonmaitreらはvirusと細菌の混合感染の群ではそれぞれ単独感染群より抗生剤に対する反応が悪く、炎症が遅延化するためだという。今後、急性中耳炎の遅延化を阻止するには、肺炎球菌やインフルエンザ菌のワクチンによる感染防御と同様に、2歳以下の急性中耳炎においてはRSウイルスの感染防止が重要といえる。急性中耳炎の予後を規定している環境因子を検討では、2才以下の症例において高頻度で反復性中耳炎が認められ、さらに、治療1ヶ月後で中耳に貯留液の残る症例に反復性中耳炎が多かったことは興味深い。2才以下の患児は急性中耳炎に罹患、遅延しやすいとされており、その理由として免疫能の未成熟などが指摘されているが、われわれが前項でのべた、RSウイルスが深くかかわっているのではないだろうか。RSウイルス感染がおこり、引続き細菌感染がおこると、中耳滲出液のclearanceの遅延を引き起こし、中耳炎の遅延、反復の下地ができるのであろう。ワクチンによるRSウイルスの感染防止により、急性中耳炎の罹患率の低下や予後の改善が期待できるものと思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Toshio Ishibashi, Hiroko Monobe, Yuka Nomura-Ikeharai, Masanobu Shinogami, Jun Yano. Multiplex nested RT-PCR for respiratory viruses detection in acute otitis media
Toshio Ishibashi, Hiroko Monobe, Yuka Nomura-Ikeharai, Masanobu Shinogami, Jun Yano. *Anal Otol Rhinol Laryngol* (in press).

2. 学会発表

Detection of various respiratory virus genomic sequence in middle ear fluids from young children with acute otitis media. Hiriko MONOBE, Toshio ISHIBASHI, Yuka NOMURA-IKEHARA, Masanobu SHINOGAMI, Jun YANO, Kimitaka KAGA
Association for Research in Otolaryngology, 2002 MidWinter Meeting, St. Petersburg, FL, USA, Feb 4-8, 2002

An etiological role for human herpes viruses in young children with acute otitis media.

Toshio ISHIBASHI, Hiriko MONOBE, Yuka NOMURA, Masanobu SHINOGAMI, Jun YANO, Kimitaka KAGA
10th International Congress on Infectious Diseases, Singapore, March 11-14, 2002

Clinical isolates from children with upper respiratory infections in Japan: risk factors

for increasing prevalence of drug-resistant strain. Yoshinori FUJISHIRO, Masanobu SHINOGAMI, Asaya ICHIKAWA, Jun YANO
10th International Congress on Infectious Diseases, Singapore, March 11-14, 2002

Risk factors for recurrent acute otitis media in children. Hiriko MONOBE, Toshio ISHIBASHI, Yuka NOMURA-IKEHARA, Yuka NOMURA, Masanobu SHINOGAMI, Jun YANO, Kimitaka KAGA
10th International Congress on Infectious Diseases, Singapore, March 11-14, 2002

Development of antibiotic resistance in bacteria causing recurrent acute otitis media in children. Masanobu SHINOGAMI, Toshio ISHIBASHI, Hiriko MONOBE, Yuka NOMURA, Jun YANO, Kimitaka KAGA
10th International Congress on Infectious Diseases, Singapore, March 11-14, 2002

小児急性中耳炎に対する鼓膜切開による治療 非鼓膜切開群との比較
池原由香, 石橋敏夫, 矢野純, 市川朝也, 篠上雅信, 物部寛子, 加我君孝
第11日本耳科学会 神戸市 10/11-13, 2001

小児急性中耳炎における呼吸器ウイルスの役割
物部寛子, 石橋敏夫, 池原由香, 篠上雅信, 市川朝也, 矢野純
第11回日本耳科学会 神戸市 10/11-13, 2001

小児急性中耳炎へのvirusの関与
物部寛子, 石橋敏夫, 篠上雅信
日本感染症学会東日本地方会 11/1-2, 2001

急性中耳炎起因菌に対する上咽頭菌検査の有効性の再検討
物部寛子, 篠上雅信, 市川朝也, 矢野純
第102回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
福岡市 5/17-19, 2001

小児急性中耳炎の中耳貯留液中に存在するヘルペスウイルスゲノム

分担研究者 増田 道明 獨協医科大学微生物学講座教授

研究協力者 金 芸鋒 東京大学医学部微生物学教室

研究要旨 小児急性中耳炎の中耳貯留液94検体について、単純ヘルペス(HSV)、サイトメガロウイルス(CMV)、EBウイルス(EBV)、水痘ウイルス(VZV)の4種のヘルペスウイルスゲノムを検索した。ヘルペスウイルスゲノムは20検体(21%)に検出され、内訳は、EBVが10例、CMVが5例、HSVが4例、VZVが4例であった。ヘルペスウイルス感染と細菌、呼吸器ウイルス感染との関係を検討したところ、呼吸器ウイルスも細菌も検出されなかった群において、呼吸器ウイルスか細菌が検出された群よりも有意の高率でヘルペスウイルスが検出された。ヘルペスウイルスが急性中耳炎において疫学的な役割をはたしている可能性が示された。

A. 研究目的

急性中耳炎は小児において最も罹患率の高い感染症疾患であり、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。近年、ウイルスが急性中耳炎の発症や予後について、重要な役割を果たしていることを示唆する事実があいついで報告されている。急性中耳炎患者に検出される最も一般的なウイルスはライノウイルス、アデノウイルスを、インフルエンザウイルス、RSウイルスなどの呼吸器ウイルスである。

サイトメガロウイルス感染は乳幼児においてよくみられ、特に先天性サイトメガロウイルス感染はヒトにおいて胎生期における最も頻度の高い感染症であり、時に、難聴児が出生の原因になることがある。ま

た、ヘルペスウイルスの他のメンバーである水痘ウイルス、単純ヘルペスウイルスは小児においても、一般的な神経系のウイルス感染症の病原ウイルスであり、これらはしばしば無菌性髄膜炎をひきおこす。しかし、これらのヘルペスウイルスが急性中耳炎の中耳貯留液にどのくらいの頻度で検出されるのかは明らかではなく、また、中耳疾患でどのような役割を果たしているのかも明らかではない。

本研究では、multiplex-nested RT-PCR法により小児急性中耳炎患者から採取した中耳貯留液中に、4種類のヘルペスウイルスゲノムを検索し、急性中耳炎におけるこれらのウイルスの疫学的な役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

①臨床検体とポジティブコントロール:1999年から2001年までの冬の季節に、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94例を対象とした。初診時に、鼓膜切開により中耳貯留液を採取し、細菌検査の後、ウイルス検査用検体として、-80度で保存しておく。1症例から1検体とし、両側性中耳炎の場合は、より重症耳より検体を採取した。PCR反応のポジティブコントロールとして、HSV-1 Seibert, HSV-2 Wild, VZV Oka, EBV B95-8 and CMV Town をもちいた。これらは、大阪大学の山西先生から譲りうけた。

②Multiplex Nested RT-PCR:小児急性中耳炎の中耳貯留液50—140 mlから、QIAamp DNA mini kit (Quiagen) によりDNAを抽出した。検索したヘルペスウイルスは単純ヘルペス(HSV)、サイトメガロウイルス(CMV)、EBウイルス(EBV)、水痘ウイルス(VZV)の4種である。Table 1 にそれぞれのウイルスのouter primerと inner primer のシークエンスを示す。PCRの反応条件は1段階目が、denaturation 92度1分、annealing50度1分、extension72度1分30秒で35サイクル行い、2段階目が、denaturation 92度1分、annealing60度1分、extension72度1分30秒で35サイクル行った。PCR産物は2.5%のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、UVライト下で写真撮影を行った。

C. 研究結果

①コントロール検体を用いてのMultiplex Nested PCR:HSV、CMV、EBV、VZVのポジティブコントロール検体を用いてMultiplex Nested PCR法を行った。電気泳動の

写真をFig.1にしめす。HSV-1とHSV-2に相当する141-bpのバンド(lane 1, lane 2)、VZVに相当する189-bpのバンド(lane 3)、CMVに相当する305-bpのバンド(lane 4)、EBVに相当する392-bpのバンド(lane 5)が認められる。lane Mがmolecular size markerである。

②臨床検体を用いてのMultiplex Nested PCR:小児急性中耳炎の中耳貯留液94検体をMultiplex Nested PCR法で4種のヘルペスウイルスゲノムの検索をおこなったところ、ヘルペスウイルスDNAは20検体(21%)に検出された。内訳は、EBVが10例に、CMVが5例に、HSVが4例に、VZVが4例に検出された(Fig. 2)。このうち、3例に複合感染が認められた。ヘルペスウイルスRNAが検出された症例をTable IIIに示す。

③中耳貯留液におけるヘルペスウイルス感染と細菌、呼吸器ウイルス感染との関係:われわれは平成12年度にインフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、ライノウイルス、アデノウイルスを、RSウイルスなどの呼吸器ウイルスのゲノムをmultiplex nested RT-PCR法によって検索し、今回の対象検体については94検体中36検体(38%)において、呼吸器ウイルスRNAが検出された。呼吸器ウイルスか細菌が検出されている。検体(A群)は66あり、一方、呼吸器ウイルスも細菌も検出されなかった検体(B群)は28あった。A群とB群それぞれにおいて、ヘルペスウイルスの検出頻度を検索したところ、表3に示されるがごとく、B群においてはA群に比べ、有意に高かった($p < 0.05$; マンホイットニ検定)。

D. 考察

われわれは、小児急性中耳炎の中耳貯留液94検体中20検体(21%)ヘルペスウイルスゲノムを検出した。内訳は、EBVが10例に、CMVが5例に、HSVが4例に、VZVが4例で

あり、これらは呼吸器ウイルスや細菌と混合感染をおこしているもののほか、ヘルペスウイルス単独感染のものもあつた。

本研究の分担研究者である矢野らの報告では、急性中耳炎患者を呼吸器ウイルス単独感染、呼吸器ウイルスと細菌の混合感染、細菌の単独感染、呼吸器ウイルスと細菌ともに陰性の4つのグループに分類して予後を検討したところ、各群のあいだに有意の差は認められなかった。このことは、呼吸器ウイルスと細菌ともに陰性の例において、他の病原微生物などの他因子が小児急性中耳炎の発症予後に影響を及ぼしている可能性を示唆している。本報告において、呼吸器ウイルスも細菌も検出されなかった群において、呼吸器ウイルスか細菌が検出された群よりも有意の高率でヘルペスウイルスが検出されたことは興味深い。いままで、急性中耳炎の病原微生物は細菌と呼吸器ウイルスとされてきたが、ヘルペスウイルスも急性中耳炎において疫学的な役割をはたしている可能性が示された。

Table I: Primers used for multiplex nested PCR

Primary

HSVs	F: TGCTCCTACAACCTC R: CGGTGCTCCAGGATAAA
CMV	F: GCGTCACGCCACACGGAGCTG R: CGGTATTTCGGAAACAGCGTC
VZV	F: ACGGGTCTTGCCGGAGCTGGT R: AATGCCGTGACCACCAAGTATAAT
EBV	F: CAAAGTCCACCACCAGAACC R: CAGCATCAACCCAGCCTCTC

Secondary

HSVs	F: ATCCGAACGCAGCCCCGCTG R: TCTCCGTCCAGTCGTTTATCTTC	141 bp
CMV	F: TTGCAGGCCACGAACAACGT R: GTCTACGGATTGCTGACGCT	305 bp
VZV	F: ACCTTAAAACTCACTACCAGT R: CTAATCCAAGGCGGGTGCAT	189 bp
EBV	F: AGGGCATGGGCAGGATAAAG R: GCGGGCCAACACCAAGGT	392 bp

Table II

	Herpesvirus Infections (+)	Herpesvirus Infections (-)	Total
Group A: bacteria (+) and/or respiratory virus (+)	9 (14%)	57 (86%)	66
Group B: bacteria (-) and respiratory virus (-)	11 (39%)	17 (61%)	28

Table III

Number of patients	Age (year)	sex	Herpesviruses	Bacteria	Respiratory viruses
1	0.08	F	EBV	n.d.	
2	4	F	EBV	n.d.	RSV
3	2.11	M	EBV	n.d.	
4	1.06	M	EBV	n.d.	
5	1.04	M	HSV	S.pne	
6	0.1	F	VZV	S.pne	
7	1	F	CMV, EBV	S.pne, H.inf	
8	1.02	M	HSV	n.d.	
9	0.11	F	HSV	n.d.	
10	1.08	M	EBV	S.pne	
11	2.06	M	CMV, VZV	n.d.	
12	4.11	M	VZV	n.d.	
13	1.08	M	EBV	n.d.	
14	0.7	F	CMV	n.d.	
15	0.11	F	CMV	n.d.	RSV
16	1.05	F	EBV	n.d.	RSV
17	1	F	HSV, VZV	n.d.	
18	1.02	M	EBV	S.pne	RSV
19	0.06	M	EBV	n.d.	
20	1.1	M	CMV	H.inf	

M=male, F=female, n.d.=not detected, CMV=cytomegalovirus, HSV=herpes simplex virus,

EBV= Epstein-Barr virus, VZV=varicella-zoster virus

Fig. 1

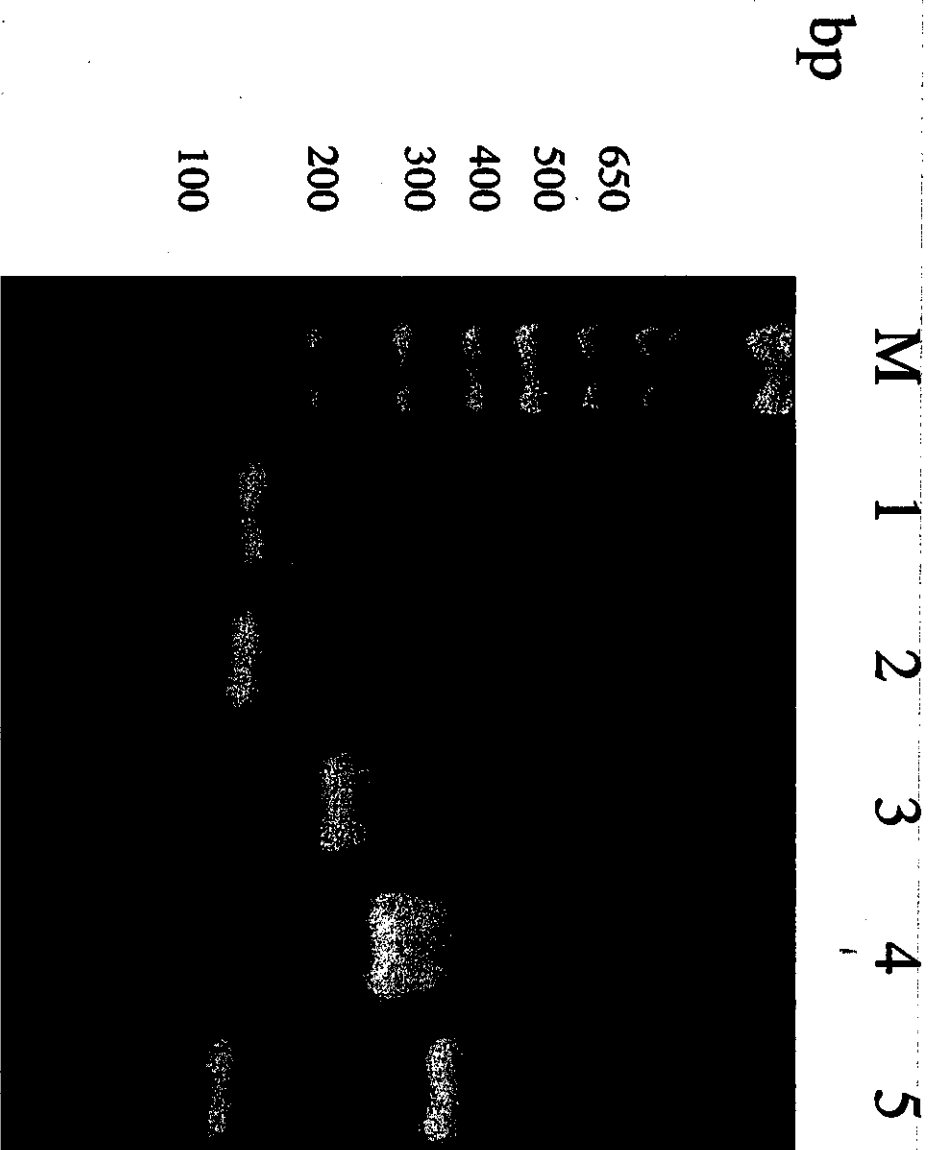
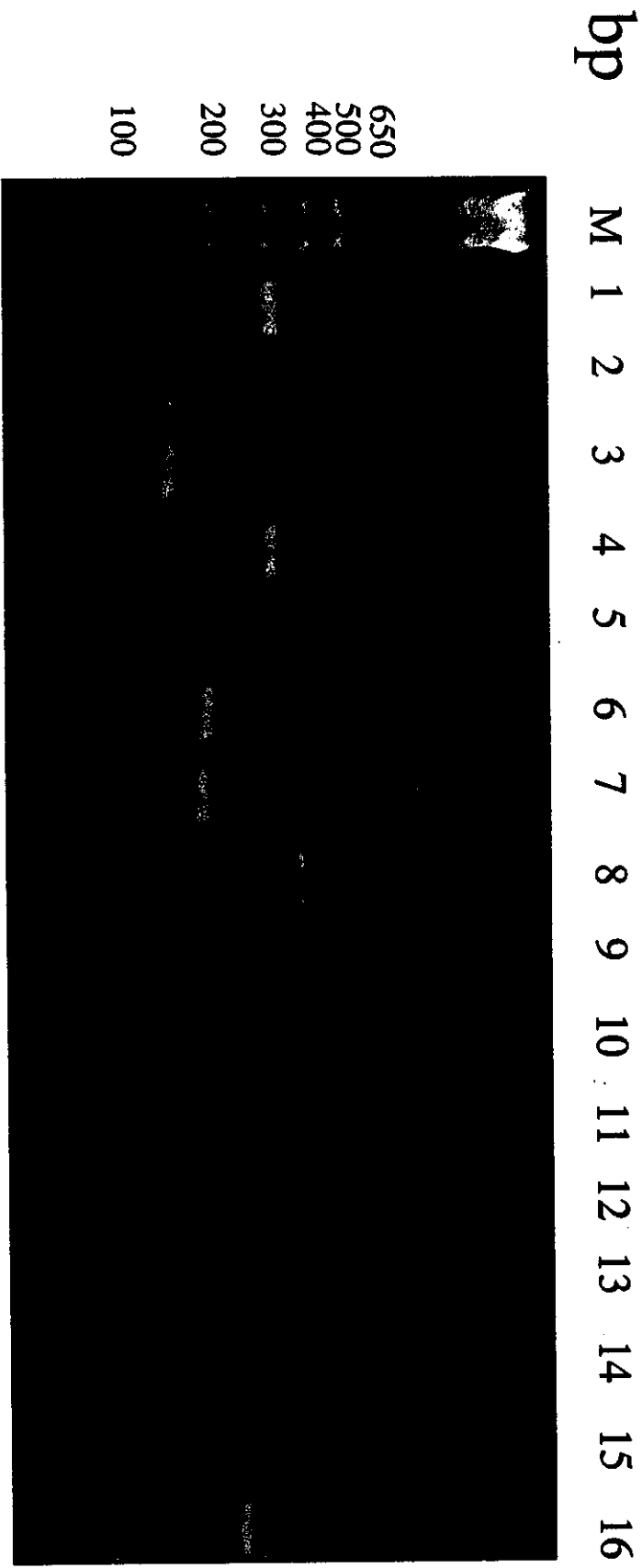


Fig. 2



呼吸器ウイルスと小児急性中耳炎の予後

分担研究者 竹内 直信 東京大学医学部耳鼻咽喉科講師
研究協力者 物部 寛子 東京大学医学部耳鼻咽喉科助手

研究要旨 小児急性中耳炎患者より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、ウイルス感染や細菌感染、およびそれらの混合感染が、中耳炎の遷延、反復にどのような影響をあたえるかを検討した。79人の小児急性中耳炎患者から採取した93耳の中耳貯留液検体のうち、39検体(42%)に呼吸器ウイルスゲノムが検出された。内訳は、RSウイルスが29症例(31%)、アデノウイルスが8症例(9%)、インフルエンザウイルスが2症例、ライノウイルスが3症例である。予後については2歳以下の症例で、RSウイルスと肺炎球菌またはインフルエンザ菌に混合感染した群において、それぞれの単独感染に比べて治癒が遷延化していた。肺炎球菌やインフルエンザ菌のワクチンによる感染防御と同様に、2歳以下の急性中耳炎においてはRSウイルスの感染防止が重要といえる。

A. 研究目的

急性中耳炎は小児に好発し、外来で小児へ抗生剤投与されることの多い疾患のひとつである。しかし、抗生剤投与にもかかわらず、再燃や反復、数週間または数カ月間中耳滲出液が持続することもよく経験される。この中耳炎難治化の原因として耐性菌についてもよく問題にされるが、病原と考えられる細菌が中耳貯留液から検出されるのは70%程度とされる。一方でvirusが中耳炎の原因となり、中耳炎の予後になんらかの影響をおよぼしていることを示唆する報告も多くされてきているが、その因果関係は明らかでない。本研究では、小児急性中耳炎患者より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、ウイルス感染やそれと細菌との混合感

染が、中耳炎の遷延、反復にどのような影響をあたえるかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

①対象と検体の採取

1999年から2001年までの冬の季節に、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(中央値;20ヶ月)までの小児の初回治療例79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、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。

②Multiplex Nested RT-PCR

小児急性中耳炎の中耳貯留液50—100mlから、guanidinum-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。平成12年度に増田らが報告したように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、Multiplex Nested RT-PCRを行った。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サイクルである。

③予後調査

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、貯留液を除去した。初診から一ヶ月以内に鼓膜が正常化しなかった例を治療失敗例とし、いったん鼓膜が正常化するも初診から一ヶ月以内に中耳炎が再発したものを初期再発例とした。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した。そして、治療失敗例、初期再発例、反復性中耳炎のそれぞれの頻度を、ウイルス単独感染、ウイルスと細菌の混合感染、細菌単独感染、細菌とウイルスとも陰性の各グループにわけて比較した。統計処理はマンホイットニ法を用いて行った。

C. 研究結果

①患者

79名の患者(男子41人、女子38人)の年齢分布は表1に示すごとくであり、5ヶ月から6才1ヶ月まで中央値1才8ヶ月である。47人は2才以下である。初診時に肺炎もしくは気管支炎を併発していた11人(14%)に認められた。このうち2才以下は8人であり、2才以下では17%で下気道病変を併発していたことになる。79人中14人の患者においては両耳から中耳貯留液が利用できた。

②ウイルス感染;

79人の小児急性中耳炎患者から採取した93耳の中耳貯留液検体のMultiplex-nested RT-PCR法による呼吸器ウイルスの検出結果を表2に示す。39検体(42%)に呼吸器ウイルスゲノムが検出され、内訳は、RS-Aウイルスが29症例(31%)、アデノウイルスが8症例(9%)、RS-Aウイルスとアデノウイルスの混合感染が3例(3%)、インフルエンザウイルス(H3N2)が2症例、ライノウイルスが3症例である(表2)。

③ウイルス感染と細菌感染;

細菌は93耳の中耳貯留液検体中42検体に認められ、このうち、*Streptococcus pneumoniae*(Spn)は20例に、*Nontypeable Hemophilus influenzae*(NTHi)が16例に、*Moraxella*が4例に認められた(表3)。したがって、細菌陽性例のうち、81%(42例中34例、のべ46例中37耳80%)にspnもしくはNTHiが検出されている(double infectionを一つ一つ別として数にいれる)。ウイルスRNAは51例の細菌感染陰性症例のうち、23例(45%)に、42例の細菌感染陽性症例のうち、16例(38%)に認められた。28症例30%の症例においてはウイルスRNAも細菌も検出されなかった。

④予後;

初診から1ヶ月後に中耳貯留液が存在していて鼓膜が正常化しなかった例を初期失敗例とし、いったん鼓膜が正常化するも初診から1ヶ月以内に中耳炎が再燃したものを早期再燃例と定義した。そして、それらの頻度を、ウイルス単独感染、ウイルスと細菌の混合感染、細菌単独感染、細菌とウイルスとも陰性のグループに分けて検討したところ、初期失敗率、早期再燃率の両方において各群に有意の差は認められなかった(表4)。対象を2才以下にかぎっても、同様に各群の差は認められなかった(表5)。次に、急性中耳炎の中耳貯留液中に最も頻度が高く検出されたRSウイルスと同じく頻度の高い細菌であるspnとNTHiに限って予後の解析を行った。RSウイルスとSpn and/or NTHiの混合感染においては、全年齢においては結果に有意の差を認めないものの(表6)、2才以下の年齢群においては混合感染群の方がそれぞれ単独の感染より有意に初期治療失敗率が高かった。(表7)早期再燃群、反復性中耳炎に関しては各群に有意差を認めなかった。

D. 考察

本研究では、小児急性中耳炎患者より採取した中耳貯留液について、multiplex nested RT-PCR法によりさまざまな呼吸器ウイルスRNAを同定し、急性中耳炎にいける呼吸器ウイルスの感染状況を把握し、中耳の呼吸器ウイルス感染と細菌感染の状況と急性中耳炎の予後との関係を調べ、virus感染が予後にどうように関与するかを明らかにすることを目的とした。われわれの結果では、93の中耳貯留液検体のうち43%から呼吸器ウイルスゲノムが検出され、そのうちの73%はRSウイルスであ

った。小児急性中耳炎に関与するvirusはRSウイルスVが最も多いと報告され、influenza A virus, adenovirus, parainfluenza virusがこれにつづくとされる。今回の報告でも93耳中29耳(31%)、virus感染を認めた39耳中29耳(74%)と最も多く、これまでのものと一致するものとなった。上咽頭と中耳からのvirus検出を検討した報告では、RSウイルスは他のparainfluenza virus, Influenza virusに比較して中耳から検出されやすく、他のvirusが分泌物に伴って受動的に中耳へいくのに対し、RSウイルスは中耳にinvadeしやすいのだろうと報告されている。

そして、われわれは、特に2歳以下の患者において、RSウイルス感染がSpn and/or NTHiの細菌感染に加わると、中耳貯留液が残存しやすく、初診から1ヶ月までに鼓膜が正常化しにくい例が多いことを示した。このことは、2才以下ではRSVとSpn/Nhiの混合感染群ではそれぞれの単独感染より中耳滲出液のclearanceが遅れることを示唆している。このことはGiebinkらのchinchillaでの実験モデルでの結果でも裏づけられる。混合感染で炎症反応が遷延化するメカニズムははっきりしないが、virus自体もIL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF α などのサイトカインを産生し、またvirusと細菌を含む中耳貯留液中に炎症性mediatorが多く含まれるという報告もある。

近年、小児急性中耳炎の予後に関しては、個々の免疫能の問題、低年齢での初感染、や集団保育や母乳栄養の期間などさまざまな因子が関わっているが、virus感染が中耳炎の予後にどう影響するかについて一定の見解はまだ得られていない。

Chonmaitreeらはvirusと細菌の混合感染の群ではそれぞれ単独感染群より抗生剤に対する反応が悪く、炎症が遷延化したと報告している。また、Arolaらも48時間の初期治療に対し、virus陽性群では熱発や耳痛などの炎症症状が持続したと報告している。これに対し、virus感染の有無で中耳炎の予後に差を認めなかったとする報告もある。中耳炎におけるvirus感染の効果が報告により異なることの一つには対象としている年齢が数ヶ月-10才前後という広い層が対象となっていることが多く、呼吸器virus全てが対象となっているなど、対象の抽出にも関係があるように思われる。小児急性中耳炎では2才以下の年齢層で得に難治化、遷延化することが多いのでこの年齢層でわけて検討することが必要ではないかと考える。

今回我々のstudyでは2才以下で検討したところ、RSVがSpnまたはNH₂Tiに混合感染した群で治癒が遷延化していたが、1ヶ月以内に再燃した例(早期再燃)、反復性中耳炎の頻度ではそれぞれの群に差はなかった。このことから、virus感染は中耳炎に対する抗生剤の効果を弱めるものではないのではないかと考えられ、このことは、Mooreらの報告によっても支持される。今回示した結果の臨床上の意義として、1つは、中耳貯留液の病原微生物の種類により、初期の急性中耳炎の予後を予想できる可能性があることである。2つめには、virus、細菌の混合感染でも1ヶ月以内の再燃には差がなかったのだから、ウイルスによる混合感染の有無で抗生剤選択を変更する必要はないだろう

と考えられる。また、3つめにSpnやNTHiのvaccinationによる感染防御と同様に、小児中耳炎においてはRSVの感染防止が重要といえるだろう。

G. 研究発表

1. 論文発表

Toshio Ishibashi, Hiroko Monobe, Yuka Nomura-Ikeharai, Masanobu Shinogami, Jun Yano. Multiplex nested RT-PCR for respiratory viruses detection in acute otitis media

Toshio Ishibashi, Hiroko Monobe, Yuka Nomura-Ikehara, Masanobu Shinogami, Jun Yano. *Anal Otol Rhinol Laryngol* (in press).

2. 学会発表

Detection of various respiratory virus genomic sequence in middle ear fluids from young children with acute otitis media. Hiriko MONOBE, Toshio ISHIBASHI, Yuka NOMURA-IKEHARA, Masanobu SHINOGAMI, Jun YANO, Kimitaka KAGA
Association for Research in Otolaryngology, 2002 MidWinter Meeting, St. Petersburg, FL, USA, Feb 4-8, 2002

Risk factors for recurrent acute otitis media in children. Hiriko MONOBE, Toshio ISHIBASHI, Yuka NOMURA-IKEHARA, Yuka NOMURA, Masanobu SHINOGAMI, Jun YANO, Kimitaka KAGA
10th International Congress on Infectious Diseases, Singapore, March 11-14, 2002

小児急性中耳炎における呼吸器ウイルスの役割
物部寛子, 石橋敏夫, 池原由香, 篠上雅信, 市川朝也, 矢野純
第11回日本耳科学会 神戸市 10/11-13, 2001

小児急性中耳炎への virus の関与
物部寛子, 石橋敏夫, 篠上雅信
日本感染症学会東日本地方会 11/1-2,
2001

急性中耳炎起因菌に対する上咽頭菌検
査の有効性の再検討
物部寛子, 篠上雅信, 市川朝也, 矢野純
第 102 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学
術講演会
福岡市 5/17-19, 2001

年齢	人	MEF
≤1	20	25
1<, ≤2	27	31
2<, ≤3	15	17
3<, ≤4	6	6
4<, ≤5	8	10
5<, ≤6	2	3
6<	1	1
total	79	93

呼吸器ウイルス/年齢	Age ≤2(%)	2 < Age (%)	total
RSV	19(34)	10*(20)	29(27)
Adenovirus	2(4)	6*(12)	8(8)
Rhinovirus	1(2)	2(4)	3(3)
Influenza virus	1(2)	1(2)	2(2)
negative	33(59)	21(42)	54(51)
total	56	50*	106

*; RSV + Adenovirusのdouble infection 3例を含む