

(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14年度 総括分担研究報告書

主任研究者 石橋 敏夫

平成15(2003)年 4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

石橋 敏夫 ----- 1-6

II. 分担研究報告

1. 中耳貯留液中に存在する病原微生物と小児急性中耳炎の予後
篠上 雅信 ----- 7-22

2. 小児急性中耳炎の予後における鼓膜切開の効果
矢野 純 ----- 23-26

3. 滲出性中耳炎における中耳貯溜液と上咽頭粘液の細菌学的検討
丹生 健 ----- 27

4. 感音難聴をともなう急性中耳炎の中耳貯留液中に存在する病原微生物
篠上 雅信 ----- 28

5. ラット中耳における肺炎球菌感染後の遺伝子発現の変化
増田 道明 ----- 29-37

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 multiplex PCR法により73症例小児急性中耳炎患者から採取した73例の中耳貯留液検体において、4種類のヘルペスウイルスゲノム、10種類の呼吸器ウイルスゲノム、3大中耳炎起炎菌（肺炎球菌、インフルエンザ菌、モラキセラカタラーリス）のDNAを検索した。ヘルペスウイルスは16検体（22%）に、呼吸器ウイルスゲノムは35検体（48%）に、細菌DNAのは51検体（70%）に検出された。中耳貯留液中のこれらの病原微生物の有無と急性中耳炎の予後との関係を検索した。治療後1月後の中耳貯留液の残存率、反復性中耳炎の発症率、滲出性中耳炎への移行率の3項目を予後の評価の指標とした。ヘルペスウイルス、呼吸器ウイルス、細菌DNAの有無により治療後1月後の中耳貯留液の残存率、反復性中耳炎の発症率については差が認められなかったが、ヘルペスウイルスDNAが認められた群において有意に高頻度で滲出性中耳炎への移行が認められた。ヘルペスウイルスDNAの陽性症例においては、免疫防御反応が低下しており、ヘルペスウイルスが中耳において再活性化された可能性が示唆された。感音難聴を伴う成人の急性中耳炎について中耳の貯留液中の病原微生物については、呼吸器ウイルスの検出率が低く、ヘルペスウイルス全例において陰性であったことから、感音難聴は細菌の強い炎症の内耳への波及によるものと考えられるとしている。

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：丹生 健一
神戸大学医学部耳鼻咽喉科教授

分担研究者 矢野 純
日赤医療センター耳鼻咽喉科部長

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（AOM）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、一方でウイルス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。AOM患者から検

出される病原微生物は、肺炎球菌、インフルエンザ菌などの細菌のほか、インフルエンザウイルス、RSウイルス、アデノウイルスなどの呼吸器ウイルスが知られていない。さらに、最近の2-3の報告によると、単純ヘルペスウイルス (HSV)、サイトメガロウイルス (CMV)、EBウイルス (EBV) などのヘルペスウイルスも検出されている。

本研究では、小児急性中耳炎の中耳貯留液中に存在するこれらの病原微生物と中耳炎の予後との関係を明らかにし、また、初診時の鼓膜切開は中耳炎の予後を改善できなかったかどうかについて検討が行った。さらに、病原微生物が中耳に侵入したときの中耳にどのような変化がおこるか急性中耳炎の分子生物学的な病態解明にアプローチするため、動物実験として、肺炎球菌中耳炎のモデル動物を作成し、cDNA microarrayを用いて、肺炎球菌によって中耳粘膜に発現誘導される遺伝子を検索した。

B. 研究方法

細菌、ウイルスゲノムの検索、急性中耳炎の予後調査と動物実験の進め方を円滑に進めるために、今年度は以下の5つテーマにわけて分担して研究をおこなった。

1. 中耳貯留液中に存在する病原微生物と小児急性中耳炎の予後 (分担研究者: 篠上 雅信)
2. 小児急性中耳炎の予後における鼓膜切開の効果 (分担研究者: 矢野 純)
3. 滲出性中耳炎における中耳貯留液と上咽頭粘液の細菌学的検討 (分担研究者: 丹生 健一)
4. 感音難聴ともなう急性中耳炎の中耳貯留液中に存在する病原微生物 (分担研究者: 篠上 雅信)
5. ラット中耳における肺炎球菌感染後の遺伝子発現の変化 (分担研究者: 増田 道明)

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病原微生物
multiplex PCR法により73症例小児急性中耳炎患者から採取した73例の中耳貯留液検体において、4種類のヘルペスウイルスゲノム、10種類の呼吸器ウイルスゲノム、3大中耳炎起炎菌 (肺炎球菌、インフルエンザ菌、モラキセラカタラーリス) のDNAを検索した。ヘルペスウイルスは16検体(22%)に検出され、内訳は、EBVが7例に、CMVが4例に、HSVが4例に、VZVが3例であった。呼吸器ウイル

スゲノムは35検体(48%)に検出され、内訳は、RS-Aウイルスが26検体、アデノウイルスが7検体、ライノウイルスが3検体、RS-Bウイルスが2検体、インフルエンザウイルスが1検体である。これらのうち、RS-Aウイルスとアデノウイルスの混合感染が4例であった。細菌DNAのは51検体(70%)に検出され、内訳は、*S. pneumoniae* が25検体(34%)に、*H. influenzae* が25検体(34%)に、*M. catarrhalis* が10検体(14%)に認められた。これらのうち、*H. influenzae* と *M. catarrhalis* の混合感染4検体、*S. pneumoniae* と *H. influenzae* の混合感染が検体、*S. pneumoniae* と *M. catarrhalis* の混合感染2検体が含まれていた。

2. 中耳貯留液中の病原微生物と小児急性中耳炎の予後

中耳貯留液中のヘルペスウイルスゲノム、呼吸器ウイルスゲノム、細菌DNAの有無と急性中耳炎の予後との関係を検索した。ヘルペスウイルスゲノムが認められた群において有意に高頻度で滲出性中耳炎への移行が認められた

($p=0.02$)。反復性中耳炎の発症率、治療後1月後の中耳貯留液の残存率についてはヘルペスウイルスの有無により有意の差は認められなかった。呼吸器ウイルスについてはそのゲノムの有無によって、滲出性中耳炎への移行率、反復性中耳炎の発症率、治療後1月後の中耳貯留液の残存率について有意の差は認められなかった。細菌についてもそれらのDNAの有無によって、滲出性中耳炎への移行率、反復性中耳炎の発症率、治療後1月後の中耳貯留液の残存率については両群の間に有意の差は認められなかった。

3. 滲出性中耳炎における中耳貯留液と上咽頭粘液の細菌学的検討
鼓膜換気チューブ留置術の際に中耳滲出液と上咽頭粘液を採取し、培養検査とPCR法により細菌の検出を行った。PCR法ではこれまでの報告で検出率が高いとされている肺炎球菌、インフルエンザ桿菌、ブランハメラの3大起炎菌を対象とし、肺炎球菌については更にpbp遺伝子を解析しペニシリンへの耐性についても検討した。27耳のうち細菌培養検査で常在菌を除き陽性であったのは、2耳のみで1耳は黄色ブドウ球菌のみ、もう1耳は黄色ブドウ球菌とモラキセラの2菌種であった。PCR法では

5耳において3大起炎菌のいずれかが検出され、すべて粘稠な貯留液より検出されていた。肺炎球菌が検出された2耳についてpbp遺伝子の解析を行った結果、2耳はPRSPであった。上咽頭粘液においては、採取できた12症例すべてにおいて細菌培養検査ならびにPCR法において3大起炎菌のいずれかが検出された。

4. 小児急性中耳炎の予後における鼓膜切開の効果
小児急性中耳炎患者59名に対し、鼓膜切開を行った群 [36例] と行わなかった群 [23例] にわけ、中耳炎の予後を比較検討した。鼓膜切開群においては6例 (16.7%) が滲出性中耳炎に移行し、11例 (30.6%) が早期再燃し、9例 (25.0%) が反復性中耳炎となった。非切開群においては10例 (43.5%) が滲出性中耳炎に移行し、8例 (34.8%) が早期再燃し、3例 (13.0%) が反復性中耳炎となった。早期再燃と反復性中耳炎の頻度において鼓膜切開群と非切開群との間に有意の差はなかった。しかし、滲出性中耳炎に移行率においては鼓膜切開群において有意に高かった ($P=0.036$)。

5. 感音難聴をともなう急性中耳炎の病原微生物と中耳貯留液中に存在する病原微生物を示す疾患と認識を合併することがある。感音難聴の成因についてはウイルス感染が疑われているが、定かではない。今回われわれは、急性中耳炎による内耳障害の原因にアプローチするために、感音難聴をともなう成人の急性中耳炎7症例より、中耳貯留液を採取し、4種類のヘルペスウイルスゲノム、10種類の呼吸器ウイルスゲノム、3大起炎菌 (肺炎球菌、インフルエンザ菌、モラキセラカタラーリス) のDNAについて検索した。全症例において、平均骨導聴力は30 db以上であり、中耳貯留液は黄色膿性で、中耳の炎症はきわめて強かった。3例にめまいがあり、うち2例は方向固定性の水平回旋性の眼振が認められた。1例にRSウイルスが検出されたが、他の6例はいずれのウイルスも検出されなかった。全例において細菌DNAが検出された。

4. ラット中耳における肺炎球菌感染後の遺伝子発現の変化
1176個のラット遺伝子のcDNAがスポットされたcDNA microarrayを用いて、肺炎球菌注入後6時間後、24時間後、72時間後のラット中耳粘膜とコントロール粘膜の発現パターンを比較を行った。肺炎球菌注入耳において発現上昇が認められた遺伝子群のうち、めだつて発現上昇が認められたものはmacrophage inflammatory protein (MIP) 1A、MIP2、IL-1betaといった炎症性サイトカインと転写因子Ikappa-B alpha chainであり、いずれも、6時間後に既に発現が亢進し、24時間後にピークとなっていた。

考察

1. 中耳貯留液中の病原微生物と急性中耳炎の予後について
急性中耳炎が上気道の呼吸器ウイルス感染に密接に関係していることは、われわれが臨床的にも経験するところである。急性中耳炎が上気道のウイルス感染に続発するおこり、ウイルス感染が頻発する年代に、高頻度で認められる。さらに、急性中耳炎は、呼吸器ウイルス感染が流行する冬の季節に高頻度でおこる。近年、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が、急性中耳炎の発症原因として報告されている。しかし、最近AOM患者の中耳貯留液から検出が報告されているヘルペスウイルス群が、AOMの発症や予後について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、小児急性中耳炎の中耳貯留液73検体をMultiplex PCR法でのヘルペスウイルスゲノム、呼吸器ウイルスゲノム、細菌DNAの検索をおこなったところ、ヘルペスウイルスゲノムは16検体 (22%) に、呼吸器ウイルスゲノムは35検体 (48%) に、細菌DNAは51検体 (70%) に検出された。呼吸器ウイルスゲノムか細菌DNAが検出された例は64例 (88%) であり、これらが大部分の急性中耳炎の病原微生物となっていることがわかる。なお、呼吸器ウイルスゲノムも細菌DNAも検出されなかった症例は9例あり、このうちヘルペスウイルスゲノムが検出された症例は2例のみ

であり、すなわち、ヘルペスウィルス単独感染は2.7%と低い。急性中耳炎の起炎微生物はヘルペスウイルスとされている。移行率、治療後1ヶ月後の中耳貯留液の残存率を急慢性中耳炎の予後に判定基準として、ヘルペスウイルスゲノム、呼吸器ウイルスゲノム、細菌DNAの有無によって、予後に差があるかどうか検索したところ、ヘルペスウイルスDNAが認められた群において、滲出性中耳炎への移行率有意に高かった。この理が移り管や中耳の上皮細胞に直接おこすか、耳の管と耳の管をひきおこすか、中耳炎を引き起こすか、ヘルペスウイルスが再活性化しやすくなる。ヒトを自然宿主とするヘルペスウイルスは現在までに8種類が確認されているが、いずれも初感染後、宿主の体内に潜伏感染し、宿主の免疫系を回避する。また、HSVは初感染後、三叉神経節や仙髄神経節などに潜伏し、免疫状態の低下の際に再活性化し、顔面、口唇などの皮膚粘膜で再活性化、増殖し、小水疱状の病巣をつくる。また、CMVは単球顆粒球、マクロファージ前駆細胞に潜伏感染し、終生体内に存在する。宿主の免疫が未熟あるいは低下したときは潜伏ウイルスが再活性化し、EBVについての最近の興味深い知見は、エリート水泳選手の1ヶ月間の集中トレーニング中に、唾液中のIg-Aの一過性の低下と潜伏したEBVの再活性化が一致して起こり、それに引き続いて上気道症状が出現するということである。このことは、病気の老化や薬剤などによる免疫低下の状態だけでなく、若トレスにより一過性の粘膜免疫の低下がおこることを示している。鼻咽腔や中耳の粘膜に細菌やウイルスが侵入したときに、感染が成立するかどうかは、宿主の免疫防御反応と微生物の増殖能のバランスによって異なる。従来滲出性中耳炎の中耳貯留液は無菌性のもの

が多いとされてきたが、近年のPCR法による解析の結果、*S. pneumoniae*、*H. influenzae*、*M. catarrhalis*のAOMの3大起炎菌のDNAが60-80%に検出されることが報告され、滲出性中耳炎の病態には中耳炎の起炎菌が深くかかわっていることが注目されている。もし、中耳貯留液におけるヘルペスウイルスDNA陽性が、中耳における免疫防御反応の低下を反映しているとする、こうした症例においては、急性感染の状態を過ぎたあとに、細菌が宿主の免疫力で排除されずに静菌的に中耳に存在し、滲出性中耳炎を遷延化の原因になっている可能性が示唆される。今回われわれは小児急性中耳炎の中耳貯留液73検体においてPCR法によりヘルペスウイルスDNAの検索を行い、22%に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DNAが検出された群において有意に高頻度で滲出性中耳炎への移行が認められた。ヘルペスウイルスDNAの陽性症例においては、免疫防御反応が低下しており、ヘルペスウイルスが中耳において再活性化されたもの推察された。さらに、こうした症例においては細菌が排除されずに静菌的に中耳にのこっているため、滲出性中耳炎を遷延化の原因になっている可能性が示唆された。

2. 小児急性中耳炎の予後における鼓膜切開の効果
近年、小児の難治性急性中耳炎の存在が問題となっている。原因としてペニシリン耐性肺炎球菌の増加が挙げられてきたが、倍量のペニシリンやセフェム系抗生剤など、感受性のある抗生剤の投与を行っても反復性中耳炎や滲出性中耳炎への転帰をとる症例も多い。耐性菌以外の中耳炎難治化のファクターとしては、低IgG、母乳投与の無、DAYCAREへの参加、親の喫煙、おしゃぶりの使用などが指摘されており、このような背景からは、小児急性中耳炎の治療については現在もまだ議論が多い。現在、米国のCenters for Disease for Control (CDC)公認の急性中耳炎治療ガイドラインではamoxicillin内服による治療が第一選択とされており、amoxicillin内服を3日間続けても効果がない場合に鼓膜穿刺を、10日後も改善のない場合は鼓膜切開を、としている。しかし鼓膜切開の意義は菌の同定であるとして、治療効果には否定的な報告が多い。

本研究においては、中耳貯留液を初耳貯留液を初めに、急性中耳炎に對して、切開した群と、切開しなかった群とを比較し、予後を比較し、早期再燃や反復性中耳炎の発症率に有意差がないが、12週間以上継続する滲出性中耳炎の発症率は鼓膜切開群において有意に低いが、滲出性結果が得られ、鼓膜切開の役割が示唆された。これに對し、Kaleidaらの報告では、長期経過観察において鼓膜切開群と非切開群間では反復性中耳炎および滲出性中耳炎の発症率に有意差はなかったとしている。この報告では、高熱や強い疼痛を伴う重症例に限定している点、切開の際中耳貯留液の吸引を行ったという記載がない点、本研究とは異なる。何らかの他の要因が影響しているか、切開の際に中耳液の排出が十分に行われなかった可能性が考えられ、これらとの影響が及んだと考へることもできる。これまでの報告で、中耳腔における滲出液の持続には、耳管閉塞だけでなく、局所免疫反応が関与していることが明らかになっている。細菌の代謝産物である peptidoglycan-polysaccharide (PG-PS) や endotoxin により Tumor necrosis factor- α (TNF- α) と interleukin- β (IL- β) などのサイトカインの局所産生が誘導され、TNF- α と IL- β が好中球浸潤、毛細血管透過性亢進、上皮下浮腫及び結果として生じる滲出液を誘発することが示されてきた。また、TNF- α が中耳内の mucous cell の異形成や過形成の発症において重要な役割を持つ可能性や、IL- β と TNF- α が goblet cells を target cells として、mucin 分泌を増大させて滲出性中耳炎発症の原因を作り、ここに IL-8 による刺激が加わると goblet cells からの mucin 分泌を延長して疾患が慢性化させているという可能性も示されている。これらのことから、急性中耳炎後の滲出性中耳炎を予防するには、早期に除菌を行うだけでなく、除菌後も貯留液内に残存している endotoxin および endotoxin に誘導される TNF- α 、IL- β および IL-8 の持続的発生を防ぐ必要があり、そのため、切開と滲出液の確実な除去は効果的であると考へられる。よって、本研究においては、切開の際に滲出液の確実な除去を

行ったことが滲出性中耳炎発症率を有意に低くした可能性が示唆された。

3. 感音難聴をともなう急性中耳炎の中耳貯留液中にも存在する病原微生物感音難聴をともなう成人の急性中耳炎症例の中耳貯留液中においては、呼吸器ウイルスの検出率が低く、ヘルペスウイルス全例において陰性であったことから、感音難聴は細菌の強い炎症の内示への波及によるものの可能性が示唆された。

4. ラット中耳における肺炎球菌感染後の遺伝子発現の変化
肺炎球菌注入後のラット中耳粘膜における MIP1A、MIP2、IL-1 β といった炎症性サイトカインの発現上昇は、細菌感染による急性炎症の初期の反応に compatible な所見かと思われる。Ikappa-B alpha chain の発現上昇は中耳粘膜の炎症と生体防御に中心的役割を果たしている転写因子である NF-kappa B をコントロールするための発現誘導である可能性が考へられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ishibashi T, Monobe H, Nomura Y, Shinogami M, Yano J: Multiplex nested RT-PCR for respiratory viruses detection in acute otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112, 2003;252-7.

Hiroko Monobe, Toshio Ishibashi, Yuka Nomura, Masanobu Shonogami and Jun Yano. Role of respiratory viruses in children with acute otitis media. *Int. J. Pediatr Otorhinolaryngol*. (in print)

Monobe H, Ishibashi T, Fujishiro Y, Shinogami M, Yano J Factors associated with poor outcome in children with acute otitis media. *Acta Oto-Laryngologica* (in press).

石橋敏夫：小児中耳炎における分子生物学的解析、耳鼻咽喉科診療ブラクティス 11, 中耳疾患治療の最前線、編集 加我君孝、文光堂、東京 (印刷中)

2. 学会発表

Ishibashi T, Monobe H, Nomura Y, Shinogami M, Yano J, Kaga K : An etiological role for human herpes viruses in young children with acute otitis media. 10th International Congress on Infectious Diseases, Singapore, Final programme and abstracts #67.005, 2002

Ishibashi T, Monobe H, Fujishiro Y, Shinogami M Yano J, Kaga K: Multiplex PCR for detection of three bacterial species in middle ear fluids from young children with acute otitis media. 8th International Congress of Pediatric Otolaryngology, Oxford, UK, Final programme and book of abstracts #1.13, 2002

Shinogami M, Fujishiro Y, Ichikawa T, Yano J, Ishibashi T, Kaga K: Correlation between allergic rhinitis and prognosis of acute otitis media in children. 8th International Congress of Pediatric Otolaryngology, Oxford, UK, Final programme and book of abstracts #1.12, 2002

Microarray Analysis of Gene Expression in Rat Middle Ear after Bacterial Pathogen Challenge. Yoshinori Fujishiro, M.D. Toshio Ishibashi, M.D. Kimitaka Kaga, M.D. Association for Research in Otolaryngology, 2003 MidWinter Meeting, St. Petersburg, FL, USA, Feb 23-27, 2003

Virus感染は中耳炎の予後にどう影響するか. 物部寛子, 池原由香, 篠上雅信, 市川朝也, 矢野純, 石橋敏夫, 加我君孝. 第12回日本耳科学会総会, 東京、平成14年10月10-12日

滲出性中耳炎における中耳貯留液と上咽頭粘液の細菌学的検討
濱本由記子, 後藤友佳子, 下屋聡子, 中上佳美, 丹生健一, 香山智佳子
第12回日本耳科学会総会、東京、平成14年10月10-12日

厚生科学研究費補助金（感覚器障害研究事業） 分担研究報告書

小児急性中耳炎におけるヘルペスウイルス感染と予後

分担研究者 篠上雅信

日赤医療センター耳鼻咽喉科

研究要旨 multiplex PCR法により73症例小児急性中耳炎患者から採取した73例の中耳貯留液検体において、4種類のヘルペスウイルスゲノム、10種類の呼吸器ウイルスゲノム、3大中耳炎起炎菌（肺炎球菌、インフルエンザ菌、モラキセラカタラーリス）のDNAを検索した。ヘルペスウイルスは16検体（22%）に、呼吸器ウイルスゲノムは35検体（48%）に、細菌DNAのは51検体（70%）に検出された。中耳貯留液中のこれらの病原微生物の有無と急性中耳炎の予後との関係を検索した。治療後1月後の中耳貯留液の残存率、反復性中耳炎の発症率、滲出性中耳炎への移行率の3項目を予後の評価の指標とした。ヘルペスウイルス、呼吸器ウイルス、細菌DNAの有無により治療後1月後の中耳貯留液の残存率、反復性中耳炎の発症率については差が認められなかったが、ヘルペスウイルスDNAが認められた群において有意に高頻度で滲出性中耳炎への移行が認められた。ヘルペスウイルスDNAの陽性症例においては、免疫防御反応が低下しており、ヘルペスウイルスが中耳において再活性化された可能性が示唆された。

A. 研究目的

急性中耳炎（AOM）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、一方でウイルス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。AOM患者から検出される最も一般的なウイルスは、インフルエンザウ

イルス、RSウイルス、パラインフルエンザウイルス、アデノウイルスなどの呼吸器ウイルスである。単純ヘルペスウイルス（HSV）、サイトメガロウイルス（CMV）、水痘ウイルス（VZV）、EBウイルス（EBV）などのヘルペスウイルス群は胎生期や小児におけるウイルス感染症の一般的な病原ウイルスである。たとえば、CMVはヒトにおいて最もありふれた胎生期の感染であり、新生児の0.4%～2.3%の率で発生し、先天性難聴を引き起こす。また、HSVは無菌性髄膜炎をしばしば引き起こす

ことが知られている。これらのヘルペスウイルス群は、いずれも初感染後、宿主の体内に潜伏感染し、宿主を害することなく共存するという性質をもつ。また、これらのウイルスは宿主の免疫状態の低下の際に再活性化するという特徴をもち、再活性化したウイルスは宿主の免疫能を狂わせ、あるいは組織を破壊し、病気を引き起こす。

最近、これらのヘルペスウイルス群が、AOM患者の中耳貯留液から検出されたという2-3の報告がある。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。そこで、われわれは中耳におけるヘルペスウイルス感染が、中耳粘膜における免疫防御反応の低下を反映しているのではないかと考え、中耳炎の予後に影響を及ぼしているのではないかと考えた。本研究では、multiplex nested-PCR法により73症例小児急性中耳炎患者から採取した73例の中耳貯留液検体において、4種類のヘルペスウイルスゲノムを検索し、これらと呼吸器ウイルス感染、細菌感染との関係および急性中耳炎の予後との関係を検索した。

B. 研究方法

患者

1999年10月から2000年3月に日赤医療センター耳鼻科を受診した5ヶ月から6才まで〔中央値、20ヶ月〕の急性中耳炎患者において、初診時鼓膜切開により中耳液を採取できた73耳73人を対象とした。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。中耳検体の採取にあたっては、文書及び口頭による説明のあと、インフォームドコンセントを得た。全例において、抗生物質が投与され、耳鼻咽喉科医によって、経過観察、治療がなされた。中耳貯留液における細菌やウイルス感染を集計するにおいて、ウイルスの重複感染あるいは細菌の重複感染はそれぞれ別個の感染とみなした。

ヘルペスウイルスDNA同定のためのMultiplex Nested PCR法
小児急性中耳炎の中耳貯留液50-140 microliter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。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。図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、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。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。

呼吸器ウイルス同定のためのMultiplex Nested RT-PCR法
小児急性中耳炎の中耳貯留液50-100 microliterから、guanidinium-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。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。詳細は平成12年度報告書において、増田が既に報告した。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サイクル行った。

細菌DNA同定のためのPCR解析
インフルエンザ菌、肺炎球菌、モラキセラカタラーリスについてのPCRによるゲノムの検索についてはHendolinらの方法(図2)にしたがって行った。細菌の16S rRNA遺伝子をターゲットにして、下流の共通プライマーとそれぞれの細菌の対する3つの特異的プライマーによりPCR反応を行い、増幅産物を2%アガロースゲルで電気泳動し、UV下で写真撮影を行った。

臨床経過の評価について

遷延する中耳貯留液は治療開始後1ヶ月まで中耳貯留液が認められるもの(persistent middle ear fluid)、6ヶ月以内に急性中耳炎の再発を3回以上繰り返した症例を反復性中耳炎(recurrent otitis media, ROM)、急性症状や急性の所見がなく3ヶ月以上中耳貯留液をみとめたものを滲出性中耳炎とした。persistent middle

ear fluid、反復性中耳炎、滲出性中耳炎への移行の3項目を予後の評価の指標とした。

統計学的方法

統計学的方法として、Fishers exact probability test と χ^2 test を用いた。解析にはSPSS 10 software [SPSS Inc, イリノイ州、米国] を用いた。p-value が 0.05 以下を有意とした。

C. 研究結果

1. ヘルペスウイルス感染

73名の小児急性中耳炎患者から採取した73の中耳貯留液検体のMultiplex-nested PCR法によるヘルペスウイルスの検出結果を表1に示す。16検体(22%)にヘルペスウイルスゲノムが検出された。内訳は、EBVが7例に、CMVが4例に、HSVが4例に、VZVが3例に検出された。このうち、2例に複合感染が認められた。

2. 呼吸器ウイルス感染

73の中耳貯留液検体のMultiplex nested RT-PCR法による呼吸器ウイルスゲノムの検索を行ったところ、35検体(48%)に呼吸器ウイルスゲノムが検出された。内訳は、RS-Aウイルスが26検体、アデノウイルスが7検体、ライノウイルスが3検体、RS-Bウイルスが2検体、インフルエンザウイルスが1検体である。これらのうち、RS-Aウイルスとアデノウイルスの混合感染が4例であった(表2)。

3. 細菌感染

73の中耳貯留液検体のMultiplex PCR法による3種類の細菌DNAの検索を行ったところ、51検体(70%)に3種類の細菌のいずれかのDNAが検出された。内訳は、*S. pneumoniae* が25検体(34%)に、*H. influenzae* が25検体(34%)に、*M. catarrhalis* が10

検体 (14%) に認められた (表3)。これらのうち、*H. influenzae* と *M. catarrhalis* の混合感染4検体、*S. pneumoniae* と *H. influenzae* の混合感染が検体、*S. pneumoniae* と *M. catarrhalis* の混合感染2検体が含まれる。

4. 細菌感染とヘルペスウイルス感染

細菌感染とヘルペスウイルス感染との関係を表4に示す。ヘルペスウイルスゲノムは51例の細菌DNA陽性症例のうち14例 (27%) に、22例の細菌DNA陰性症例のうち2例 (9%) に認められた。細菌DNA陽性例において、有意に高率にヘルペスDNAが検出された。

5. 細菌感染と呼吸器ウイルス感染

細菌感染と呼吸器ウイルス感染との関係を表5に示す。呼吸器ウイルスゲノムは51例の細菌DNA陽性症例のうち22例 (43%) に、22例の細菌DNA陰性症例のうち13例 (59%) に認められた。呼吸器ウイルスゲノムの検出率は細菌DNA陽性群、陰性群の間に有意の差は認められなかった。

6. ヘルペスウイルス感染と予後
中耳貯留液中のヘルペスウイルスゲノムの有無によって、中耳炎の予後に差があるかどうか検討した。ヘルペスウイルスDNAが認められた群において有意に高頻度で滲出性中耳炎への移行が認められた (表5)。反復性中耳炎の発症率、治療後1月後の中耳貯留液の残存率については両群の間に有意の差は認められなかった。

7. 呼吸器ウイルス感染と予後
中耳貯留液中の呼吸器ウイルスゲノムの有無によって、中耳炎の予後に差があるかどうか検討した。滲出性中耳炎への移行率、反復性中耳炎の発症率、治療後1月後の中耳貯留液の残存率については両

群の間に有意の差は認められなかった (表6)。

8. 細菌感染と予後

中耳貯留液中の細菌DNAの有無によって、中耳炎の予後に差があるかどうか検討した。滲出性中耳炎への移行率、反復性中耳炎の発症率、治療後1月後の中耳貯留液の残存率については両群の間に有意の差は認められなかった (表8)。

D. 考察

急性中耳炎が上気道の呼吸器ウイルス感染に密接に関係している事実は、われわれが臨床的にも経験するところである。急性中耳炎が上気道のウイルス感染に続発しておこり、ウイルス感染が頻発する年代に高頻度で認められる。さらに、急性中耳炎は、呼吸器ウイルス感染が流行する冬の季節に高頻度でおこる。近年、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が、急性中耳炎の小児の中耳貯留液半数以上に検出され、急性中耳炎の発症や予後に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。しかし、最近AOM患者の中耳貯留液から検出が報告されているヘルペスウイルス群が、AOMの発症や予後について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、小児急性中耳炎の中耳貯留液73検体をMultiplex PCR法でのヘルペスウイルスゲノム、呼吸器ウイルスゲノム、細菌DNAの検索をおこなったところ、ヘルペスウイルスゲノムは16検体 (22%) に、呼吸器ウイルスゲノムは35検体 (48%) に、細菌DNAは51検体 (70%) に検出された。呼吸器ウイルスゲノムが細菌DNAが検出された例は64例 (88%) であり、これらが大部

分の急性中耳炎の病原微生物となっていることがわかる。なお、呼吸器ウイルスゲノムも細菌DNAも検出されなかった症例は9例あり、このうちヘルペスウイルスゲノムが検出された症例は2例のみであり、すなわち、ヘルペスウイルスの単独感染は2.7%と低く、ヘルペスウイルスが急性中耳炎の起炎微生物となっている可能性は低いものと思われる。

また、滲出性中耳炎への移行率、反復性中耳炎の発症率、治療後1月後の中耳貯留液の残存率を急性中耳炎の予後についての判定基準として、ヘルペスウイルスゲノム、呼吸器ウイルスゲノム、細菌DNAの有無によって、予後に差があるかどうか検索したところ、ヘルペスウイルスDNAが認められた群において、滲出性中耳炎への移行率が有意に高かった。この理由としては、ヘルペスウイルスが耳管や中耳の上皮細胞に直接ダメージを与え耳管機能不全をひきおこしていること、もしくは、滲出性中耳炎を引き起こしやすい状態においてヘルペスウイルスが再活性化しやすいことなどが可能性として考えられる。

ヒトを自然宿主とするヘルペスウイルスは現在までに8種類が確認されているが、いずれも、初感染後、宿主の体内に潜伏感染し、宿主を害することなく共存するという性質をもつ。また、ウイルスは宿主の免疫状態の低下の際に再活性化するという特徴をもつ。たとえば、HSVは初感染後、三叉神経節や仙髄神経節などに潜伏し、免疫状態の低下の際に再活性化し、顔面、口唇などの皮膚粘膜で再活性化、増殖し、小水疱状の病巣をつくる。また、CMVは単球、顆粒球、マクロファージ前駆細胞に潜伏感染し、終生体内に存在する。宿主の免疫が未熟あるいは低下し

たときは潜伏ウイルスが再活性化し重篤な感染症をひきおこす。EBVについての最近の興味深い知見は、エリート水泳選手の1ヶ月間の集中トレーニング中に、唾液中のIg-Aの一過性の低下と潜伏したEBVの再活性化がおり、それに引き続いて上気道症状が出現するということである。このことは、病気や老化や薬剤などによる免疫低下の状態だけではなく、若い健康人においても、疲労やストレスにより一過性の粘膜免疫の低下がおり、EBVが一過性に再活性化しうることを示している。

鼻咽腔や中耳の粘膜に細菌やウイルスが進入したときに、感染症が成立するかどうかは、宿主の免疫防御反応と微生物の増殖能のバランスによっている。従来滲出性中耳炎の中耳貯留液は無菌性のものが多いとされてきたが、近年のPCR法による解析の結果、*S. pneumoniae*、*H. influenzae*、*M. catarrhalis*のAOMの3大起炎菌のDNAが60-80%に検出されることが報告され、滲出性中耳炎の病態には中耳炎の起炎菌が深くかかわっていることが注目されている。もし、中耳貯留液におけるヘルペスウイルスDNA陽性が、中耳における免疫防御反応の低下を反映しているとする、こうした症例においては、急性感染の状態を過ぎたあとに、細菌が宿主の免疫力で排除されずに静菌的に中耳に存在し、滲出性中耳炎を遷延化の原因になっている可能性が示唆される。

今回われわれは小児急性中耳炎の中耳貯留液73検体においてPCR法によりヘルペスウイルスDNAの検索を行い、22%に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DNAが検出された群において有意に高頻度で滲出性中耳炎への移行が認められた。ヘルペスウイルスDNAの陽性症例に

おいては、免疫防御反応が低下しており、ヘルペスウイルスが中耳において再活性化されたものと推察された。さらに、こうした症例においては細菌が排除されずに静菌的に中耳にのこっているため、滲出性中耳炎を遷延化の原因になっている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hiroko Monobe, Toshio Ishibashi, Yuka Nomura, Masanobu Shinogami and Jun Yano. Role of respiratory viruses in children with acute otitis media. Int. J. Pediatr Otorhinolaryngol. (in print)

2. 学会発表

Ishibashi T, Monobe H, Nomura Y, Shinogami M, Yano J, Kaga K: An etiological role for human herpes viruses in young children with acute otitis media. 10th International Congress on Infectious Diseases, Singapore, Final programme and abstracts #67.005, 2002

Ishibashi T, Monobe H, Fujishiro Y, Shinogami M, Yano J, Kaga K: Multiplex PCR for detection of three bacterial species in middle ear fluids from young children with acute otitis media. 8th International Congress of Pediatric Otolaryngology, Oxford, UK, Final programme and book of abstracts #1.13, 2002

Shinogami M, Fujishiro Y, Ichikawa T, Yano J, Ishibashi T, Kaga K: Correlation between allergic rhinitis and prognosis of acute otitis media in children. 8th International Congress of Pediatric Otolaryngology, Oxford, UK, Final programme and book of abstracts #1.12, 2002

Virus感染は中耳炎の予後にどう影響するか. 物部寛子, 池原由香, 篠上雅信, 市川朝也, 矢野純, 石橋敏夫, 加我君孝. 第12回日本耳科学会総会, 東京, 平成14年10月10-12日

図 1 : Multiplex nested PCR 法

Primers used for multiplex nested PCR

Primary	
HSV _s	F: TGCTCCTACTACCAACTC R: OGGTGGCTCCAGGATAAA
CMV	F: GGGTCAAGCCACACAOGGAGCTG R: OGGTATTGGGAAACACAGCGTC
VZV	F: ACGGGTCTTGGCCGGAGCTGGT R: AATGCCCGTGACCACCCAAAGTATAAT
EBV	F: CAAAAGTCCACCACCCAGGAACC R: CAGCATCAAAOCCAGCCCTCTC
Secondary	
HSV _s	F: ATCCGAACCGCAGCCCCCGCTG R: TCTCCGTTCCAGTTCGTTTATCTTC
CMV	F: TTGCAGGGCCACCGAACAACGTT R: GTCTAACGGATTTGCTGACCGCT
VZV	F: ACCCTTAAAACTGACT ACCAGT R: CTAATCCAAAGGGGGTGCAT
EBV	F: AGGGCATGGGCAGGATAAAG R: GCGGGCCCAACCCAAAGGT

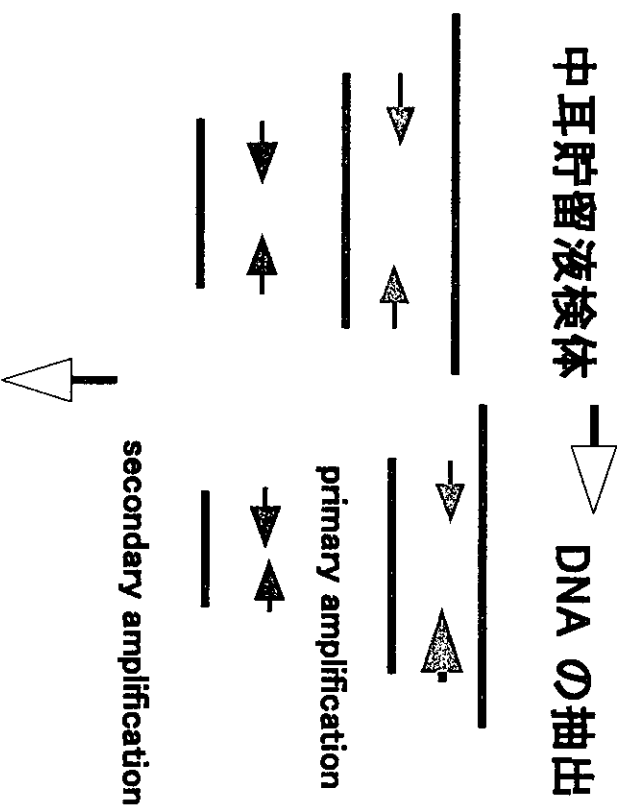


図2: Multiplex PCR法による細菌ゲノムの検索

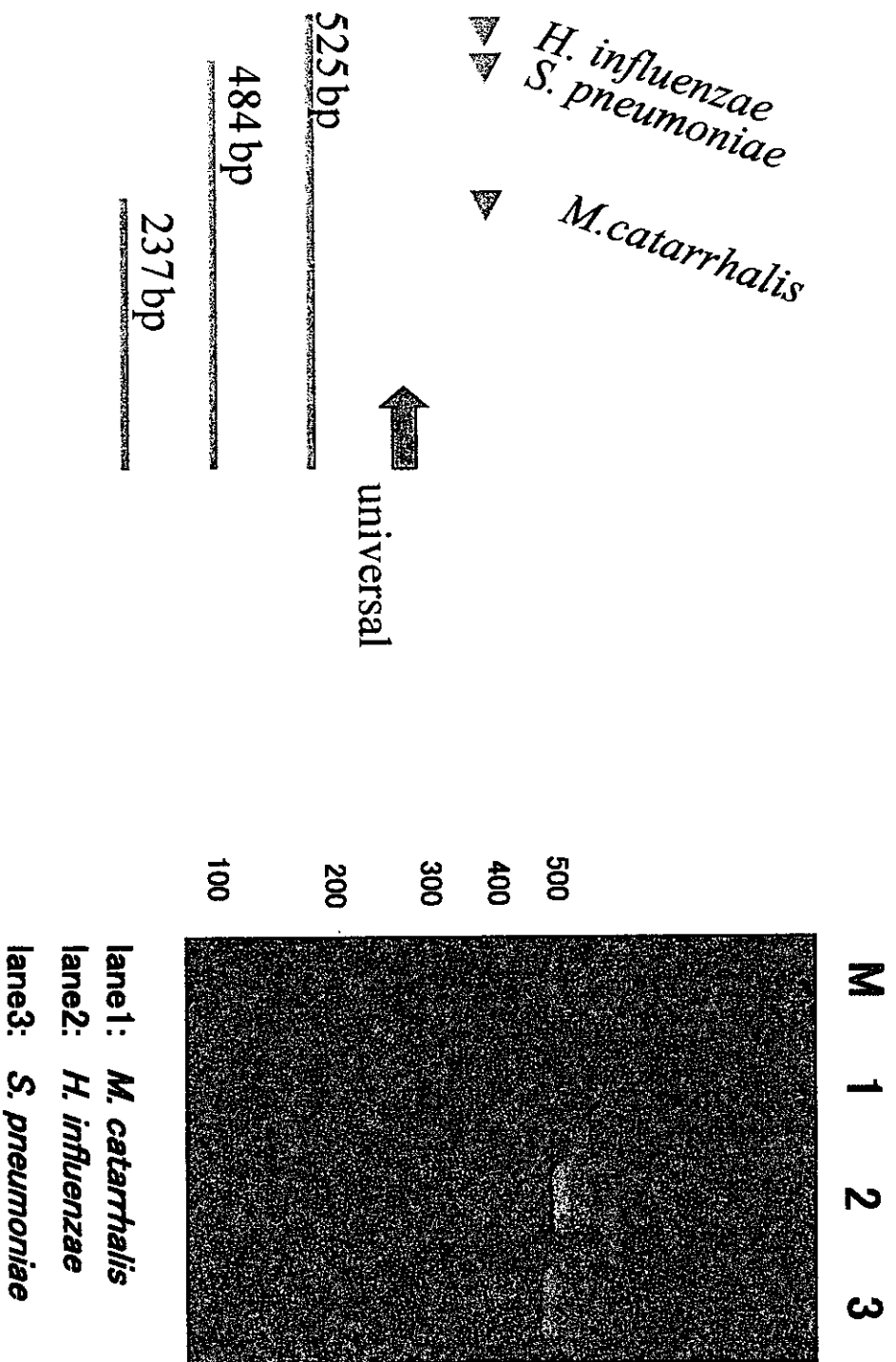


表 1: 小児急性中耳炎の中耳貯留液における
ヘルペスウイルスDNA (n=73)

virus	No. of cases (%)
Epstein-Barr virus	7 *(9.6)
cytomegalovirus †	4 *(5.5)
herpes simplex virus *	4 (5.5)
varicella-zoster virus * †	3 (4.1)
negative	57 (78)

*One middle ear sample were positive for both herpes simplex virus and varicella-zoster virus,
and †one sample was positive for both cytomegalovirus and varicella-zoster virus.

表2: 小児急性中耳炎の中耳貯留液における
呼吸器ウイルスRNA (n=73)

virus	No. of cases (%)
RSV type A	26 *(36)
adenovirus	7 *(9.6)
rhinovirus	3 (4.1)
RSV type B	2 (2.7)
influenza virus	1 (1.4)
negative	38 (52)

RSV=respiratory syncytial virus

*Four specimens contained both RSV type A and adenovirus

表3： 小児急性中耳炎の中耳貯留液における細菌DNA (n=73)

bacteria	No. of cases (%)
<i>S. pneumoniae</i>	25 (34%)
<i>H. influenzae</i>	25 (34%)
<i>M. catarrhalis</i>	10 (14%)
negative	22 (30)

Four specimens contained both *H. influenzae* and *M. catarrhalis* infection, 5 specimens contained both *S. pneumoniae* and *H. influenzae* infection, and 1 specimen contained both *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis* infection.

表4: 細菌感染とヘルペスウイルス感染との関係

	細菌DNA(+)	細菌 DNA(-)	
ヘルペスウイルス DNA (+)	14 (27%)	2 (9%)	16
ヘルペスウイルス DNA (-)	37 (73%)	20 (91%)	57
	51	22	73

Herpesvirus DNA was more common when bacterial infection was present than when it was not (P=0.071)