

令和元年6月27日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16939

研究課題名(和文)反復性中耳炎の質的免疫能解析と免疫療法の適応基準の作成

研究課題名(英文)Qualitative immunocompetence analysis of otitis prone and and the establishment of eligibility criteria of the immunotherapy

研究代表者

武田 早織 (Takeda, Saori)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20644090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、免疫グロブリン製剤に含まれる抗肺炎球菌特異的抗体価およびオプソニン化能の検討を行った。結果、免疫グロブリン製剤10ロットには、PspAとP6に対する特異的IgG抗体が、健康成人血清と比較して約10～30倍多く含まれていることが判明した。抗体の質的評価では、オプソニン化貪食殺菌能評価法(OPK assay)に基づき行った結果、免疫グロブリンでも十分殺菌能が見られることがわかった。以上の2つの実験系が確立することができたため、今後は反復性中耳炎の患者を対象に臨床実験へと応用していく予定であり、既に現在開始している段階である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳幼児から2歳までは自身の免疫機構が未熟であり、この時期に急性中耳炎を含めた感染症が難治化、重症化することが問題となる。一方、急性中耳炎の起炎菌である肺炎球菌は様々な病原因子により薬剤耐性を獲得し再増殖により容易に再発する状態となる。本研究では、低年齢患児における肺炎球菌に対する宿主の特異的抗体価と、貪食細胞の殺菌を誘導する機能を評価した。免疫グロブリン製剤による莢膜の薄い肺炎球菌に対する貪食作用が容易であることが判明し、低年齢患児に対しては肺炎球菌が侵入、付着した早い段階で免疫グロブリンを投与するとさらに有効であることが推測され、難治性中耳炎の治療方法に対して貢献できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We examined antipneumococcus-specific antibody titers included in the immunoglobulin preparation and the opsonization ability in this study. For results, immunoglobulin preparation 10 lot, what a specific IgG antibody for PspA and P6 was included a lot in approximately 10-30 times as compared with healthy adults serum became clear. As a result of having gone based on an opsonization phagocytosis sterilization ability rating system (OPK assay) by the qualitative evaluation of the antibody, even immunoglobulin was found to have enough sterilization ability. Because two abovementioned experiments system was able to be established, we are going to apply it to clinical trial in the patients with iterative otitis media in future and are the stage when we have already started it now.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：反復性中耳炎 肺炎球菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性中耳炎は70%の小児が3歳までに1回は罹患する最も頻回に遭遇する小児感染症の一つであるが、2歳未満で罹患した場合には、容易に反復化・遷延化をきたし治療に難渋する。原因菌の一つである肺炎球菌に対しては、現在13価蛋白結合型肺炎球菌ワクチン(PCV13)が世界的にも普及している。しかし、PCV13は髄膜炎や敗血症などの侵襲性肺炎球菌感染症に対する予防効果が報告されている反面、急性中耳炎に対する著明な予防効果は確認されていない。最も臨床問題と考えられるのは、ワクチンによる十分な免疫応答が誘導できない2歳未満での急性中耳炎の罹患が、その後の反復性素因の獲得につながる危険因子の一つであることで、ワクチンが十分に普及した先進諸国においても反復性中耳炎は依然として临床上極めて重要な耳鼻咽喉科疾患である。これまでの当教室の研究および内外の研究からも、急性中耳炎の難治化に関する危険因子は低年齢、薬剤耐性菌、反復既往、集団保育、鼻副鼻腔炎合併、両側罹患などの様々な因子が考えられている。とりわけ、低年齢すなわち免疫学的に未成熟な2歳未満の乳幼児では、起炎菌特異的IgG抗体が低下しており、急性中耳炎の反復化から難治化のリスクが高い。その背景には、母乳栄養から経口摂取への移行により母体からの移行抗体がなくなることが大きな要因の一つと考えられる。急性中耳炎が反復化あるいは遷延化した場合には、伝音難聴の一因となり言語発達遅滞を招く大きな問題であり、外科的治療が必要となり、加えて頻回の通院や入院加療は患児に付き添う保護者の経済的負担も大きい。これらのことから、反復性中耳炎に対しては、ワクチンによる一定の予防効果は認めるものの、乳幼児期における急性中耳炎の罹患と反復性中耳炎に移行する危険因子の特定、さらにそれらに基づいた反復性中耳炎の有効な治療法の確立は急務である。

2. 研究の目的

(1)反復性中耳炎の免疫学的危険因子の特定

当教室では、反復性中耳炎の危険因子の一つとして、起炎菌に対する特異的抗体価の低下を解明してきた。一方、特異的抗体価が正常な難治性中耳炎症例も少なからず存在する。本研究では、反復性中耳炎患児の起炎菌に対する特異的抗体価のみでなく、オプソニン化による貪食細胞の殺菌を誘導する機能を評価する。

(2)反復性中耳炎に対する免疫グロブリン補充療法の有効性の証明

近年保険適応が認められたにも関わらず、実施臨床での使用が敬遠されがちである免疫グロブリン製剤の投与によるオプソニン化能の改善を *in vitro* で評価し、将来的には反復性中耳炎における免疫グロブリン製剤の明確な治療基準を提唱する。

3. 研究の方法

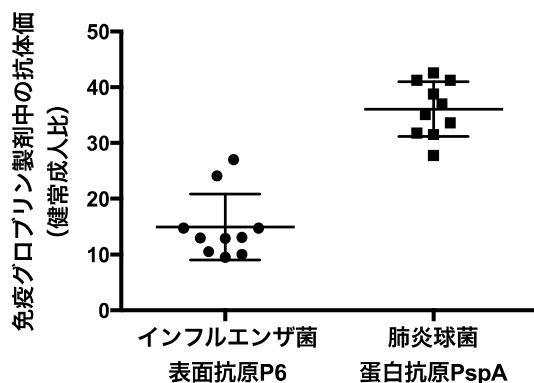
本研究では、反復性中耳炎患児の病原細菌に対する特異的抗体の量的・質的評価をおこなう。すなわち、反復性中耳炎患児の血清中の抗肺炎球菌特異的抗体(抗莢膜多糖体特異的IgG、抗PspA特異的IgG)の抗体価(量的評価)およびオプソニン化能(質的評価)をELISA法とオプソニン化貪食殺菌法(OPK assay)によって評価する。さらに抗体価が低いあるいはオプソニン化能が低い血清に免疫グロブリンを添加しオプソニン化能の改善程度を観察する。

4. 研究成果

免疫グロブリン製剤に含まれる抗肺炎球菌特異的抗体価およびオプソニン化能の検討
本研究では反復性中耳炎における起炎菌特異的免疫応答の量的・質的評価を行うことが目的であるが、その前段階として、ヒト免疫グロブリンのプール製品である免疫グロブリン製剤に含まれる抗肺炎球菌特異的抗体の抗体価とオプソニン化能を調べる必要がある。免

疫グロブリン製剤内には成人血清と比較してどの程度抗体が含まれているかを評価するために、免疫グロブリン製剤 10 ロットを収集し、免疫グロブリン製剤中の肺炎球菌共通表面蛋白抗原(PspA)とインフルエンザ菌共通表面蛋白抗原(P6)に対する抗体価をサンドイッチ ELISA 法で測定した。結果、免疫グロブリン製剤 10 ロットには、PspA と P6 に対する特異的 IgG 抗体が、健常成人血清と比較して約 10~30 倍多く含まれていることが判明した。(図 1)

図 1 .



免疫グロブリン製剤に含まれる抗肺炎球菌特異的抗体のオプソニン化能の評価
 抗体の質的評価すなわち抗体の機能評価は、アラバマ州立大学バーミンガム校微生物学教室 (Nahm 教授)より提唱されているオプソニン化貪食殺菌能評価法(OPK assay)に基づき行った。

必要材料として、健常成人血清サンプル、ワクチン株を AmericanType Culture Collection (ATCC)より入手した肺炎球菌標準株とヒト白血球細胞株 HL60 を白血球に分化誘導したヒト白血球細胞とウサギ補体を用意した。段階希釈した血清と肺炎球菌標準株を混合し、オプソニン化させた後、補体およびヒト白血球細胞とともに培養した。白血球は抗体の Fc receptor あるいは補体を介して C3 receptor を認識し、肺炎球菌を貪食する。十分な殺菌能がみられる血清の希釈濃度をオプソニン化能の客観的指標として評価した。その結果、免疫グロブリン製剤濃度が高いほど肺炎球菌コロニーは少なく、血清濃度が薄いほどコロニーは多く検出された。

この過程を免疫グロブリンを段階希釈し、同様の過程で機能評価を行った。その結果、免疫グロブリンでも十分殺菌能が見られることがわかった。

以上の2つの実験系が確立することができたため、今後は反復性中耳炎の患者を対象に臨床実験へと応用していく。現在、既に平成31年から申請した基盤研究「難治性中耳炎における抗体の量的・質的評価と免疫グロブリン療法適応基準の作成」にて臨床研究を開始している段階である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。