

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19791219

研究課題名（和文） 新種細菌アロイオコッカスに関する基礎的、臨床的研究

研究課題名（英文） Analysis of the bacterial characters and the pathogenesis of *Alloiooccus otitidis*

研究代表者

播摩谷 敦 (HARIMAYA ATSUSHI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90448605

研究成果の概要：中耳炎に高頻度に関与すると考えられている新種細菌アロイオコッカスの、中耳炎病態形成における役割、および同細菌に対する生体内の免疫応答について、新たな知見を得ることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	420,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：耳科学、中耳炎

## 1. 研究開始当初の背景

新種細菌アロイオコッカスは、小児中耳炎において高頻度に検出されることが欧米各国において報告されており、さらに本邦にお

いても欧米諸国と同様に高率に検出されることがわかってきた。

しかしながら、いくら高頻度に検出されるといっても、本細菌が実際に病原菌として中

耳炎を発症しているのか否かについてはいまだに不明であり、本細菌が中耳炎の病態形成にどのように関与しているのかについても不明のままであった。

## 2. 研究の目的

本細菌に対する、*in vivo* や *in vitro* における宿主免疫応答を詳細に解析することにより、本細菌の炎症病態形成についての理解を深める。また生体中に抗体が誘導されているか否かも調べることにより、本細菌の免疫原性、ならびに本細菌に対する免疫応答を総合的に解析し、本細菌の病原性についての検証を行う。

また生体中の抗体によって認識されている抗原を同定し構造解析などを含めた解析を行うことにより、より詳細な感染免疫に関する解析や、将来的なワクチン抗原として応用できるような基盤作りを行っていく。

## 3. 研究の方法

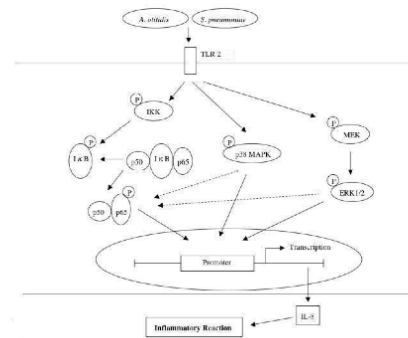
ヒト末梢血リンパ球やリンパ球系細胞株において、本細菌により刺激を行った際の、炎症性サイトカインやケモカイン産生の有無を ELISA 法にて調べる。また、サイトカイン産生に至るまでの細胞内シグナル伝達系に関して、ウエスタン・ブロッティング法や、ELISA 法を用いて解析する。

またさらに、患者中耳内における本細菌に対する抗体の有無をウエスタン・ブロッティング法などを用いて解析し、抗体にて認識される細菌抗原成分の同定・構造解析を、Mass Spectrometry 法や DNA シークエンシング法などを駆使しながら施行する。

## 4. 研究成果

アロイオコッカスが、リンパ球を活性化し、各種炎症性サイトカインやケモカイン産生を誘導していることが判明した。またこれらのサイトカイン産生は Toll-like receptor (TLR) を介して誘導されていることが判明し、リンパ球細胞内シグナル伝達分子として、NF-kappaB pathway ならびに、p38 MAP kinase や Erk1/2 などの MAP kinase pathway を介してサイトカイン産生が惹起されていることを初めて示した。これらのことから、本細菌が免疫応答を誘導し生体内にての炎症形成

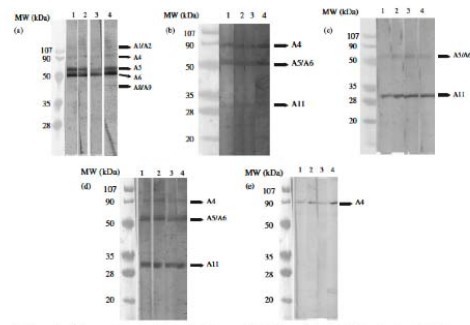
に関与している可能性が示唆された。



アロイオコッカスによるIL-8産生時の細胞内シグナル伝達経路 (Harimaya A et al. 2007)

さらに、本細菌に対する抗体が患者体内中に産生されていることを世界で初めて証明し、またこの抗体が認識する抗原成分について構造解析を行った。またこの抗原分子に対する免疫学的結果をもとに、将来的なワクチン産生への応用を目指して現在特許を出願中である。これは本細菌に対するワクチン研究に関しての世界で初めての特許となる見込みである。

## アロイオコッカス抗原の検出



以上の結果から、本細菌に対する宿主免疫応答機構ならびに本細菌の病原体としての中耳炎形成過程に関する役割が徐々に解明され、中耳炎における本細菌の重要性および診断治療に関してのさらなる理解ならびに進展が深まるものと推測される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Harimaya A, Yokota S, Sato K, Himi T, Fujii N. Remarkably high prevalence of *ftsI* gene mutations in *Haemophilus influenzae* isolates from the upper respiratory tract infections in children of the Sapporo district, Japan. *J Infect Chemother* 14:223-227, 2008. 査読有り。
2. Koizumi JI, Kojima T, Ogasawara N, Kamekura R, Kurose M, Go M, Harimaya A, Murata M, Osanai M, Chiba H, Himi T, Sawada N. PKC enhances tight junction barrier function of human nasal epithelial cells in primary culture by transcriptional regulation. *Mol Pharmacol* 74:432-442, 2008. 査読有り。
3. 播摩谷敦、氷見徹夫。髄膜炎を発症した内耳奇形の成人症例。日本耳鼻咽喉科感染症研究会会誌 26:173-176. 2008. 査読なし。
4. 播摩谷敦。新種細菌アロイオコッカス (*Alloiococcus otitidis*) の中耳炎における関与について。北耳報 118:1-7. 2008. 査読なし。
5. Harimaya A, Takada R, Himi T, Yokota S, Fujii N. Evidence of local antibody response against *Alloiococcus otitidis* in the middle ear cavity of children with otitis media. *FEMS Immunol Med Microbiol* 49:41-45, 2007. 査読有り。
6. Harimaya A, Koizumi J, Fujii N, Himi T. Interleukin-8 induction via NF-kappaB, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathways in human peripheral blood mononuclear cells by *Alloiococcus otitidis*. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 71:1465-1470, 2007. 査読有り。
7. Harimaya A, Yokota S, Sato K, Yamazaki N, Himi T, Fujii N. High prevalence of erythromycin resistance and macrolide-resistance genes, *mefA* and *ermB*, in *Streptococcus pneumoniae* isolates from the upper respiratory

tract of children in Sapporo district, Japan. *J Infect Chemother* 13:219-223, 2007. 査読有り。

8. Koizumi J, Kojima T, Kamekura R, Kurose M, Harimaya A, Murata M, Osanai M, Chiba H, Himi T, Sawada N. Changes of gap and tight junctions during differentiation of human nasal epithelial cells using primary human nasal epithelial cells and primary human nasal fibroblast cells in a non-contact co-culture system. *J Membr Biol* 218:1-7, 2007. 査読有り。

[学会発表] (計 7 件)

1. 播摩谷敦、Mario A Monteiro、氷見徹夫、藤井暢弘。新種細菌 *Alloiococcus otitidis* 菌体成分に対する抗体の検出、ならびに多糖体抗原の構造解析。第18回日本耳科学会総会・学術講演会。2008年10月16-18日。神戸。
2. 播摩谷敦。中耳炎好発児における鼻咽腔細菌叢の動態について。第5回札幌耳鼻咽喉科感染症フォーラム。2008年3月15日。札幌。
3. 播摩谷敦。耳鼻咽喉科領域感染症と抗菌剤。アステラス製薬社内勉強会。2007年11月13日。札幌。
4. 小笠原徳子、播摩谷敦、新谷朋子、氷見徹夫。小児鼻咽腔細菌叢における中耳炎起炎菌のアデノイド切除術前後の動態。第17回日本耳科学会総会学術講演会。2007年10月18-20日。福岡。
5. 播摩谷敦、三上毅、宝金清博、氷見徹夫。髄膜炎を発症した内耳奇形の2成人例。第37回日本耳鼻咽喉科感染症研究会。2007年9月21-22日。旭川。
6. 小笠原徳子、播摩谷敦、新谷朋子、氷見徹夫。アデノイド切除術前後における小児鼻咽腔細菌叢の動態に関する検討。

日本小児耳鼻咽喉科学会。2007年6月23-24日。仙台。

7. 黒瀬誠、小泉純一、亀倉隆太、高野賢一、郷充、播摩谷敦、氷見徹夫。テロメラーゼ遺伝子導入培養ヒト鼻粘膜上皮細胞におけるTGF- $\beta$ によるclaudin-4の発現誘導。第108回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会。2007年5月17-19日。金沢。

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称: Novel polysaccharide immunogens from *Alloicoccus otitidis* and synthesis of a glycoconjugate vaccine thereof.

発明者: Monteiro MA, Arar S, Harimaya A

権利者: 同上

種類: PCT

番号: CA2008/001594

出願年月日: 2008年12月7日

国内外の別: 国外 (アメリカ合衆国)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

播摩谷 敦 (HARIMAYA ATSUSHI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90448605

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

藤井 暢弘 (FUJII NOBUHIRO)

札幌医科大学・医学部・教授

横田 伸一 (YOKOTA SHIN-ICHI)

札幌医科大学・医学部・准教授

氷見 徹夫 (HIMI TETSUO)

札幌医科大学・医学部・教授

Mario A. Monteiro

カナダ・ゲルフ大学・教授

Sharif Alar

カナダ・ゲルフ大学・ポスドク

山口 博之 (YAMAGUTI HIROYUKI)

北海道大学大学院・保健科学研究院・教授

染川 幸裕 (SOMEKAWA YUKIHIRO)

札幌鉄道病院・主任医長