

機関番号：32644

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21791627

研究課題名 (和文) 新種細菌アロイオコッカスに関する臨床研究、免疫学的研究および抗原構造解析

研究課題名 (英文) Clinical studies, immunological analysis, and antigen structure analysis about *Alloiococcus otitidis*

研究代表者

播摩谷 敦 (HARIMAYA ATSUSHI)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：90448605

研究成果の概要 (和文)：

中耳炎に関する新種細菌アロイオコッカスについての、発育至適条件や臨床症例における頻度、ならびに本細菌に対する宿主免疫応答の詳細について、新たな事実を発見した。また、本細菌の抗原を同定、さらには抗原構造の解析を遂行し、新たな知見を得た。

研究成果の概要 (英文)：

Optimal growth condition of *Alloiococcus otitidis* was analyzed and the frequency of this organism was investigated. In addition, host immune response against *Alloiococcus otitidis* was investigated and the antigen structure of the organism was analyzed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科臨床医学・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 (*Alloiococcus otitidis*)は、小児中耳炎において高頻度に検出されることが判明しつつある。

しかしながら、本細菌は発育速度が非常に遅く、また培地条件も特殊であり、通常の培養で検出することは極めて困難であること

が知られている。

さらには、中耳における炎症形成過程についての本細菌の役割ならびに病原的意義については、まだ不明な点が非常に多い。

## 2. 研究の目的

そこで本研究においては、本細菌の細菌学的性状の解析、さらに本細菌の免疫原性ならびにそれに対する宿主免疫応答を中心とした免疫学的解析を行う事により、本細菌によって引き起こされる炎症反応形成機序ならびに本細菌の病原的意義に関しての理解を深めることを目的とする。

また、本細菌の抗原を同定しさらには抗原構造を解析する事により、より詳細な免疫反応の解析・病原性の解析をすすめる。

これらの結果をもとにして、将来的に本細菌の関わる中耳炎に関しての、診断・治療・ワクチン開発などによる予防、などへ応用できるような基盤作りを行う。

## 3. 研究の方法

本細菌の生存性に関して、培地組成、酸素濃度、中耳液成分の存在、などの条件を変えて培養することにより、発育至適条件の検討を行った。

また、本細菌にてヒト細胞を刺激した後に、ELISA 法や flow cytometer を用いて、ヒト細胞における炎症性サイトカイン・ケモカインの産生誘導の有無について解析、またサイトカイン・ケモカイン産生に至るまでの細胞内シグナル伝達経路を ELISA やウエスタン・ブロット・Luciferase assay などを用いて解析することにより、本細菌の免疫原性についての考察を行った。

さらには、中耳炎患者の生体内、および本細菌を感染させた動物モデルにおいて、ウエスタンブロットやELISAなどを駆使することにより、本細菌に対する抗原抗体反応についての解析を行った。生体内にて認識されている抗原については、抗原成分を同定し、抗原構造を Mass spectrometry などを用いて解析した。

## 4. 研究成果

アロイオコッカスの生存性を規定する要因に関して、酸素分圧や栄養条件の詳細を解明した。またさらに中耳炎患者より得られた中耳貯留液内では本細菌の生存性が高まる事が判明し、本細菌のより効率的な培養検出法に関しての基礎が明らかになった。

免疫学的解析に関しては、ヒト上皮細胞やヒトリンパ球における種々の炎症性サイトカイン・ケモカイン産生を本細菌が誘導し、炎症病態形成に関与している可能性が示唆された。ヒト細胞内、中でもリンパ球内においては本細菌が TLR を介して NF-kappaB pathway や MAP kinase pathway を activate しており、炎症性サイトカインの産生を誘導していることが明らかとなった。

さらに本細菌は、中耳炎患者および感染動物において、抗原抗体反応を惹起していることも我々の研究で初めて明らかとなり、本細菌の一部の抗原については構造も解明された。これらの結果や先述の免疫学的結果を踏まえてより詳細な免疫原性・病原性に関しての理解を深め、さらには本細菌による中耳炎に関しての診断・治療・予防へ向けた研究体制を整えていきたい。

## 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 3 件)

1. Matsuo J, Harimaya A, Fukumoto T, Nakamura S, Yoshida M, Takahashi K, Iida M, Fujii N, Yamaguchi H. Impact of anaerobic and oligotrophic conditions on survival of *Alloiococcus otitidis*, implicated as a cause of otitis media. *J Infect Chemother* 査読有り。印刷中。
2. Harimaya A, Fujii N, Himi T. Preliminary study of proinflammatory cytokines and chemokines in the middle ear of acute otitis media due to *Alloiococcus otitidis*. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 73:677-80, 2009. 査読有り
3. Kamekura R, Kojima T, Koizumi JI, Ogasawara N, Kurose M, Go M, Harimaya A, Murata M, Tanaka S, Chiba H, Himi T, Sawada N. Thymic stromal lymphopoietin enhances tight-junction barrier function of human nasal epithelial cells. *Cell Tissue Res* 338:283-93, 2009. 査読有り。

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Harimaya A, Fujii N, Himi T, Iida M. *Alloiococcus otitidis* induces interleukin-8 via NF-kappaB, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathways in human cells. 13th Korea-Japan Joint Meeting of Otorhinolaryngology=Head and Neck Surgery. 9-11, Sep, 2010. Seoul, Korea.
2. 播摩谷敦。小児中耳炎の新種細菌に関する話題について。川崎市耳鼻咽喉科医会。2010年12月18日。川崎市。
3. 播摩谷敦。新種細菌アロイオコッカスの中耳炎における臨床的意義について。第73回相武耳鼻科研究会。2010年4月17日。厚木市。
4. 播摩谷敦。新種中耳起炎菌アロイオコッカスの至適発育条件に関する検討。感染症治療フォーラム。2010年9月2日。伊勢原市。
5. 福元達也、播摩谷敦、松尾淳司、秋沢宏次、清水力、飯田政弘、藤井暢弘、山口博之。小児中耳炎の新たな原因菌と考えられる *Alloiococcus otitidis* の生存性を規定する要因に関する基礎的な検討。第84回日本感染症学会総会。2010年4月5-6日。京都。
6. 播摩谷敦、新谷朋子、濱田昌史、小田桐恭子、関口美也子、塚原桃子、飯田政弘。反復性中耳炎小児におけるアデノイド切除前後の鼻咽腔細菌叢の動態について。日本耳鼻咽喉科学会神奈川県地方部会。2010年6月12日。横浜。
7. 福元達也、播摩谷敦、松尾淳司、鈴木春樹、清水力、松野一彦、飯田政弘、藤井暢弘、山口博之。小児中耳炎の新たな原因菌と考えられる *Alloiococcus otitidis* の生存性。第57回日本臨床検査医学会学術集会。2010年9月9-12日。東京。

8. 播摩谷敦、新谷朋子、氷見徹夫、濱田昌史、小田桐恭子、関口美也子、塚原桃子、飯田政弘。中耳炎好発児におけるアデノイド手術前後の鼻咽腔細菌叢動態に関する検討。第20回日本耳科学会総会・学術講演会。2010年10月7-9日。松山市。
9. 播摩谷敦。新種細菌アロイオコッカスの中耳炎における臨床的意義について。URIEM。2009年8月22-23日。東京。
10. 播摩谷敦、Mario A Monteiro、横田伸一、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110回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会。2009年5月14-16日。東京。

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

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

発明者: Montero MA, Arar S, Harimaya A

権利者: 同上

種類: PCT

番号: CA2008/001594

取得年月日: 2009年3月19日

国内外の別: 国外

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

播摩谷 敦 (HARIMAYA ATSUSHI)

東海大学・医学部・講師

研究者番号: 90448605

〔研究協力者〕

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

飯田 政弘 (IIDA MASAHIRO)  
東海大学・医学部・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

山口博之 (YAMAGUCHI HIROYUKI)  
北海道大学・保健科学研究所・教授

Jukka Ylikoski  
フィンランド・ヘルシンキ大学

Petri Mattila  
フィンランド・ヘルシンキ大学

Jussi Tarkkanen  
フィンランド・ヘルシンキ大学