

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09875

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) The quantitative and qualitative evaluation of the specific antibody in otitis prone and the establishment of eligibility criteria for custom-made immunoglobulin therapy

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺炎球菌ワクチン普及後の急性中耳炎はごく短期間で治癒する症例と難治化、反復化する症例に2極化する傾向が見られ、乳幼児ではワクチン接種後も抗体価の上昇が見られないノンレスポーターのみでなく、誘導された抗体の機能が不十分である集団が存在する。本研究では、これまで困難であった病原細菌に対する特異的抗体の機能評価法を導入し、難治性中耳炎の原因菌である肺炎球菌と無莢膜型インフルエンザ菌に対する抗体の量的評価(抗体価)とともに質的評価(機能評価)を行うことで、難治性中耳炎患児の免疫能を2つのパラメーターによって評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、難治性中耳炎患児の原因菌に対する免疫能を特異的抗体価の評価のみではなく、抗体機能の評価をおこなった。従来まで免疫応答については量的評価(ELISA法)が主であったがOPK法による質的評価をあわせて行うことで、難治性中耳炎患児の免疫能を正確に予測することができる。難治性中耳炎に対して、免疫グロブリン補充療法は有効と考えられており、保険適応されているにも関わらず、血液製剤ゆえに敬遠される場合が多い。本研究結果は個々の患児の抗体機能を客観的に評価し、それに基づいた必要な免疫グロブリン補充量を算出でき、様々な危険因子を持つ難治性中耳炎患児に対するオーダーメイド療法を提案することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Acute otitis media cases after the worldwide introduction of pneumococcal vaccine tends to be divided into two groups that cure in a very short period and that become intractable. Among infants, in particular, some population shows the low function of pathogen-specific antibody even after the vaccination. In this study, we introduced a method for evaluating the function of specific antibodies against pathogenic bacteria, and quantitatively evaluated antibodies against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*, which are the causative pathogens of intractable otitis media. By these two parameters, qualitative evaluation (functional evaluation) and quantitative evaluation were performed to the children with intractable otitis media.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：中耳炎 肺炎球菌 インフルエンザ菌

## 1. 研究開始当初の背景

現在、蛋白結合型肺炎球菌ワクチン(PCV13)が世界的に普及し、髄膜炎や敗血症などの侵襲性肺炎球菌感染症に対する著明な予防効果(Moberley S, et al. *Cochrane Database*. 2013)が報告されている反面、急性中耳炎をはじめとした上気道感染症に対する予防効果は不十分である。ポストワクチン時代の中耳炎は十分な免疫誘導により容易に治癒する症例と、不十分な免疫賦活により難治化を来す症例に2極化している。難治化を来す原因は、宿主側の要因としてワクチンにより十分な抗体が誘導されない、いわゆるノンレスポonderに加え、近年十分な抗体があるにも関わらず抗体の機能不全による免疫能低下の可能性が指摘されている。宿主免疫による肺炎球菌の最も有効な殺菌機構は、菌体に抗体と補体が結合し(オプソニン化)、貪食細胞により消化される opsonophagocytic killing である。そのため、抗体のオプソニン化を誘導する機能が低下することによって貪食細胞は肺炎球菌を認識できず、殺菌処理できない。

さらにワクチンによる圧力により原因菌側にも変化が生じている。すなわち、無莢膜型インフルエンザ菌の台頭である。無莢膜型インフルエンザ菌は肺炎球菌と比較し、病原性は低く、オプソニン化のみで殺菌が可能である一方で、バイオフィーム産生や細胞内寄生など宿主免疫から巧みに逃避する機構を有し、中耳炎の難治化の主要因となっている。また無莢膜型インフルエンザ菌に対するワクチンは臨床導入されておらず、宿主免疫応答の賦活が難治性中耳炎予防の鍵を握っていると言える。免疫学的に未成熟な乳幼児に効率的な免疫賦活を行うためには、抗体補充による受動免疫が効率的であると考えられ、免疫グロブリン補充療法は理想的な治療法である。しかし、すでに保険適応となっているにも関わらず、血液製剤ゆえにその使用は敬遠される傾向にあり、免疫グロブリン治療の明確な適応基準の作成が求められている。

## 2. 研究の目的

難治性中耳炎患児の原因菌に対する免疫能を特異的抗体価の評価のみではなく、抗体機能の評価をおこない、難治性中耳炎患児の免疫能を正確に予測することを目的とする。さらに、難治性中耳炎に対する免疫グロブリン補充療法は有効と考えられているにも関わらず、血液製剤ゆえに敬遠される場合が多く、個々の患児の抗体機能を客観的に評価し、それに基づいた必要な免疫グロブリン補充量を算出することで、様々な危険因子を持つ難治性中耳炎患児に対するオーダーメイド療法を提案する。

本研究課題では、(1)反復性中耳炎の免疫学的危険因子の特定、(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を目的とする。また、低年齢による免疫学的未成熟が病態に関与している反復性中耳炎の治療には、オプソニン化能を持つ抗体の補充療法が効果的であると考えられており、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を検討するため、反復性中耳炎患児の血清に免疫グロブリンを添加し、肺炎球菌標準株に対するオプソニン化能の改善を *in vitro* で評価する。これにより、反復性中耳炎患児の起炎菌特異的抗体の抗体価と機能の2つのパラメーターで中耳炎の反復化の原因をより正確に評価し、免疫グロブリン補充療法の適応を明確に判断できる。

## 3. 研究の方法

当教室の小児中耳炎専門外来に通院中の3~5歳の鼓膜換気チューブ挿入術を要する反復性中耳炎患児と、対照群として同年齢の非反復性中耳炎患児(反復性中耳炎の既往がない小児睡眠時無呼吸症候群に対し口蓋扁桃摘出術およびアデノイド切除術を要する症例)を評価対象とした。反復性中耳炎は、2018年版小児急性中耳炎診療ガイドラインの定義に従い、「過去6カ月以内に3回以上、12カ月以内に4回以上の急性中耳炎に罹患」した症例とした。両群ともに侵襲を可能な限り低くするため、術前検査あるいは手術時のルートキープ時に血液を採取し、血清を凍結保存するとともに、鼻咽腔および中耳貯留液の細菌学的評価を行い、肺炎球菌およびインフルエンザ菌の関与を確認した。

反復性中耳炎患児および健常児の血清中の肺炎球菌及び無莢膜型インフルエンザ菌に対する特異的抗体価は従来どおりのELISA法により測定する。抗肺炎球菌特異的抗体の機能評価は、WHOの肺炎球菌セロタイピングの研究室に指定されている米国アラバマ州立大学バーミングハム校(UAB)微生物学教室(本研究の共同研究施設)より提唱されているヒト白血球の細胞株(HL60)ウサギ補体に患児の血清を添加培養し、各血清型の肺炎球菌標準株の発育を評価する方法(Opsonophagocytic Killing Assay) (Protocol for multiplexed opsonophagocytic killing assay (UAB-MOPA) for antibodies against *Streptococcus pneumoniae* : <https://www.vaccine.uab.edu/uab-mopa/pdf> (参照ウェブサイト))を用いることで、国際的な基準にのっとった客観的な評価が可能となる。一方で、インフルエンザ菌の殺菌はオプソニン化のみで起こるため、抗インフルエンザ菌特異的抗体の機能評価は、ウサギ補体と患者血清を添加した培地でインフルエンザ菌の発育を評価する bactericidal assay により評価する。

【反復性中耳炎における起炎菌特異的免疫応答の質的評価】

サンドイッチ ELISA 法にて抗体価を測定する。肺炎球菌は 13 価蛋白結合型ワクチンに含まれる血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F の莢膜多糖体および肺炎球菌表面蛋白抗原 PspA に対する抗体価を、インフルエンザ菌は共通蛋白抗原である Protein 6 および Protein D に対する抗体価を測定し、反復性中耳炎群と単純性急性中耳炎群における血清中抗体価を量的比較する。

#### 【反復性中耳炎における起炎菌特異的免疫応答の量的評価】

抗体の質的評価すなわち抗体の機能評価は、UAB 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 (Opsonophagocytic Killing Assay) に基づき行う。一方、インフルエンザ菌の殺菌は貪食細胞を必要とせず、好中球は添加せず、オプソニン化による殺菌能を評価する。

#### 【免疫グロブリン製剤における特異的抗体の量的検討】

血清サンプルと同様に ELISA 法にて免疫グロブリン製剤 (ヴェノグロブリン IH<sup>®</sup>) に含まれる抗肺炎球菌・抗インフルエンザ菌特異的抗体価を評価する。

#### 【免疫グロブリン製剤における特異的抗体の質的検討】

血清サンプルと同様に Opsonophagocytic Killing Assay にて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肺炎球菌に対するオプソニン化能を評価する。また bactericidal assay にて免疫グロブリン製剤に含まれる抗インフルエンザ菌特異的抗体のインフルエンザ菌に対するオプソニン化能を評価する。

#### 【反復性中耳炎に対する免疫グロブリン補充療法の適応基準の作成】

反復性中耳炎患児の血清に免疫グロブリン製剤 (ヴェノグロブリン IH<sup>®</sup>) を段階希釈して添加し、Opsonophagocytic Killing Assay によりオプソニン化能の改善を客観的に評価し非反復性中耳炎群と同等の殺菌能を得るために必要な免疫グロブリンの添加量を算出する。次に反復性中耳炎に対する免疫グロブリン療法の適応および投与量の基準を検討する。反復性中耳炎患児の個々の血清サンプルを単純性急性中耳炎群と比較し、以下のグループに亜分類する。

- 1) 特異的抗体価 正常/オプソニン化能 正常
- 2) 特異的抗体価 低下/オプソニン化能 正常
- 3) 特異的抗体価 正常/オプソニン化能 低下
- 4) 特異的抗体価 低下/オプソニン化能 低下

上記 4 群のうち、1) を除く 3 群では免疫グロブリン補充療法が奏効する可能性が高く、抗体価およびオプソニン化能の 2 つのパラメーターの低下の程度と、非反復性中耳炎群と同程度の抗体価およびオプソニン化能を獲得するために必要な免疫グロブリンの補充量との相関を検討する。

#### 4. 研究成果

ELISA 法による肺炎球菌、インフルエンザ菌の特異的抗体価の量的評価法とともに、Opsonophagocytic Killing Assay 法および Bactericidal assay 法による肺炎球菌、インフルエンザ菌の特異的抗体の量的評価法を確立した。一方で、2019 年からの COVID-19 の影響により小児の反復性中耳炎に対する専門外来の中断および手術が制限、中止となった時期が長期間あり、血液サンプルの収集が慢性的に停滞したため、時間を要した。現在、健常児 10 例、中耳炎患児 20 例のサンプルを収集を完了し、比較可能なサンプル量に到達したため、肺炎球菌、インフルエンザ菌の特異的抗体の量的評価、質的評価を開始している。研究は遅延しているが、今年度中の成果発表を予定している。

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉田 玄  (Sugita Gen)  (20407274)	和歌山県立医科大学・医学部・講師    (24701)	
研究分担者	河野 正充  (Kono Masamitsu)  (20511570)	和歌山県立医科大学・医学部・講師    (24701)	
研究分担者	平岡 政信  (Hiraoka Masanobu)  (80423945)	和歌山県立医科大学・医学部・助教    (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関