

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第505号	氏名	川野利明
審査委員会委員	主査氏名	門田淳一	印
	副査氏名	村上和成	印
	副査氏名	濱田文彦	印
論文題目			
<p>Pili play an important role in enhancing the bacterial clearance from the middle ear in a mouse model of acute otitis media with <i>Moraxella catarrhalis</i>. (モラキセラ・カタラーリスによる急性中耳炎モデルにおいて pili は中耳内の細菌クリアランスに重要な役割を持つ)</p>			
論文掲載雑誌名			
FEMS, Pathogens and Disease			
論文要旨			
<p>小児中耳炎の主要原因菌として <i>Moraxella catarrhalis</i> があるが、<i>M. catarrhalis</i> の病原因子および中耳免疫応答に関する詳細な報告はみられていない。本研究では、<i>M. catarrhalis</i> 単独感染による中耳への影響を調査するため、マウス動物モデルの作成を試みるとともに細菌表面の pili の存在が中耳における炎症誘導に重要な役割を果たしているかどうかについて検討した。</p> <p>中耳炎患者からの pili (+) と pili (-) の <i>M. catarrhalis</i> 臨床分離株を用いて、Balb/c マウスの中耳骨胞に 10^9 cfu/ml の濃度で接種し、経時的に中耳腔への浸潤細胞をフローサイトメトリーで解析を行い、同時に組織学的な検討を行った。</p> <p>Pili(-) <i>M. catarrhalis</i> 株を接種したマウスでは、pili(+) に比して、接種後 24 時間以上にわたって菌の排除が遅れ、また好中球性炎症および膿性の中耳浸出液が持続した ($p < 0.05$)。一方、pili(+) <i>M. catarrhalis</i> 株を接種したマウスにおいては、pili(-) 群に比して炎症性サイトカインのうち tumor necrosis factor-α の産生亢進が認められ ($p < 0.05$)、また CD11b 陽性好中球表面上の TLR5 mRNA の発現や TLR5 蛋白が増加する傾向を認め ($p < 0.05$)、その発現と好中球による <i>M. catarrhalis</i> の食食能と相関する傾向にあった。</p> <p>以上の結果から、急性中耳炎における <i>M. catarrhalis</i> の早期の排除には pili が重要な役割を果たしており、TLR5 を介した好中球の食食が重要であることが示された。</p> <p>本研究は、動物モデルの作成が困難といわれていた <i>M. catarrhalis</i> による急性中耳炎モデルの作成に成功し、<i>M. catarrhalis</i> の pili がその感染防御に重要であることを示した。今後 pili を利用したワクチン戦略に応用できる可能性を示した重要な研究と考えられ、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

学 位 論 文 要 旨

氏名 川野 利明

論 文 題 目

Pili play an important role in enhancing the bacterial clearance from the middle ear
in a mouse model of acute otitis media with *Moraxella catarrhalis*

(モラキセラ・カタラーリスによる急性中耳炎モデルにおいて pili は中耳内の細菌ク
リアランスに重要な役割を持つ)

要 旨

1. 緒言 (目的)

中耳炎の主要な起炎菌は、*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), Nontypeable
Haemophilus influenzae (NTHi), *Moraxella catarrhalis* (*M. catarrhalis*)とされている。こ
れまで中耳炎研究においては *S. pneumoniae*, NTHi に関しては単独の感染モデルが作成さ
れ中耳免疫応答の検討がなされてきたが、*M. catarrhalis* に関しては詳細な報告は少ない。
M. catarrhalis は厳密にはヒトの病原菌であり、中耳疾患の動物モデルとしての作成は困難
である。今回、我々は *M. catarrhalis* 単独での中耳炎症病態への影響を検討するために動物
モデル作成を試み、中耳炎炎症病態の早期誘導に細菌表面に存在する pili の有無が関係し
ている可能性について検討を行った。

2. 研究対象及び方法

臨床分離した pili を有する B-88-152, B-87-94, Strain 75 と pili を有さない F strain の *M.*
catarrhalis 各 strain を用いて Balb/c マウスの中耳骨胞に 10^9 CFU/ml 10μ l 注入し、中耳炎
モデル作成後、それぞれ 6、12、24、72 時間、1、2 週間後のマウスの鼓膜を観察した。
また、中耳組織は HE 染色を行い炎症細胞浸潤や中耳粘膜の肥厚を観察した。中耳滲出液
中の菌数や炎症細胞数の計測および TNF- α 、IL-1 β などの炎症性サイトカイン濃度を ELISA
にて計測し、炎症細胞における *Toll like receptor (TLR) 2、4、5、9 mRNA* の表出について

Real time RT-PCR 法による検討を行った。また中耳腔に遊走した炎症細胞を用いて、Pili による TLR5 を中心とした自然免疫誘導性を調べるため、好中球を認識する CD11b および TLR5 にて蛍光染色を行い、フローサイトメトリーにて好中球表面における TLR5 の発現の解析を行った。

3. 結果

Pili を有する strain の 3 群間では中耳細菌クリアランスや炎症細胞の浸潤の程度に差は認めなかった。Pili を認めない F strain との比較においては、中耳細菌クリアランスは Pili を有する B-88-152 strain で早く、炎症細胞の中耳腔への誘導も B-88-152 strain では早期に誘導される傾向があり、その中心は好中球が担っていた。中耳滲出液中の TNF- α は B-88-152 strain で著明に高値であったが、IL-1 β では差を認めなかった。Real time RT-PCR では TLR-5 mRNA が 6,12 時間後に B-88-152 strain において有意に発現が亢進しており、中耳滲出液中の好中球における TLR5 発現においては、F strain と比較して B-88-152 strain において高発現であった。

4. 考察

今回 *M. catarrhalis* 中耳感染によるマウス動物モデルの作成を行った。中耳内で細菌により誘導される細胞の中心は好中球であった。Pili の存在により中耳細菌クリアランスは亢進しており、TNF- α を中心とした炎症誘導や、好中球の中耳局所への早期誘導が関与しているものと考えられた。また Pili により好中球表面の TLR-5 が早期誘導されることが mRNA レベルや蛋白レベルでも示され、*M. catarrhalis* の細菌クリアランスの促進に TLR5 が関与している可能性が示唆された。

5. 結語 (まとめ)

M. catarrhalis の中耳感染モデルを作成し、中耳粘膜免疫誘導の詳細な解析を行った。Pili は炎症反応を誘導し、特に中耳局所の早期免疫誘導を強く誘導することから、今後 pili 自体をターゲットとした *M. catarrhalis* に対する新しい治療法 (ワクチン作成などを含めて) の可能性が示唆された。