







## 学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第650号	氏名	門脇嘉宣
審査委員会委員	主査氏名	平松 和史	
	副査氏名	村上 和成	
	副査氏名	加来 信久	
論文題目 Phase variation with altering phosphorylcholine expression of nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i> affects bacteria clearance and mucosal immune response in the middle ear and nasopharynx (無莢膜型インフルエンザ菌の phosphorylcholine 発現による位相変異が、中耳及び鼻咽腔での細菌クリアランスと粘膜免疫反応に与える影響)			
論文掲載雑誌名 Auris Nasus Larynx			
論文要旨 目的 無莢膜型インフルエンザ菌 (NTHi) は、菌体外膜の lipooligosaccharide に phosphorylcholine (ChoP) を発現し、ChoP は上気道上皮への接着や浸潤、バイオフィーム形成に関与していると考えられている。ChoP の発現は位相変異により変化するが、その意義は明らかになっていない。本論文では中耳腔や鼻腔における NTHi の ChoP の有無による細菌クリアランスと粘膜免疫反応について検討した。 方法 マウスの中耳腔と鼻腔に NTHi ChoP(+) および(-) の菌を投与後、中耳腔洗浄液 (MEW)、鼻腔洗浄液 (NW) の細菌培養を行い、各種サイトカイン (IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、IL-17) および炎症性蛋白の CRP 濃度を測定した。また中耳組織の HE 染色を行い、局所粘膜の炎症を検討した。 結果 MEW では感染1日目の菌数は ChoP(+) 群が有意に多かったが、7日目には ChoP(-) 群のみで検出された。NW では1日目に ChoP(+) 群で生菌を検出したが、その後両群で菌数は非常に少なくなっていた。MEW のサイトカイン濃度ではその多くで ChoP(-) 群が高値で、経時的にその傾向は顕著となった。一方、NW ではいずれも低値であった。CRP 濃度は MEW で、当初は両群間で差はなかったものの、7日目には ChoP(-) 群で高値であり、NW ではいずれの群でも低値であった。病理所見では、ChoP(-) 群で中耳粘膜の肥厚と炎症細胞の浸潤を強く認めた。 考察 今回の研究において、NTHi は ChoP の有無により上気道での細菌クリアランスに差を認め、病理学的にみても ChoP(-) 群の中耳粘膜でのみ炎症がみられた。こうしたことは CRP 濃度の高い中耳腔において ChoP(-) 群の中耳からの細菌クリアランスは強い抵抗性を示し、また ChoP(-) 群では MEW での抑制性サイトカインである IL-10 の発現が増強し、細菌クリアランスへの抵抗性に関与することが考えられた。一方、鼻腔では ChoP の有無による生菌数や炎症に大きな違いを認めなかった。これは ChoP の位相の変異や粘膜部位により免疫反応と細菌クリアランスに相違が生じることを示している。この ChoP の位相変異の機序の解明が、NTHi などの ChoP を菌体表面に有する細菌による上気道感染に対し、より有効な治療方法に繋がる可能性を有する。			
本研究は、無莢膜型インフルエンザ菌における phosphorylcholine の有無により、in vivo での菌のクリアランスや免疫応答の違いについて詳細に検討され、今後の同菌による病態の解明や治療の開発に役立つものと思われる。このため、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。			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 課・論	第650号	氏名	門脇嘉宣
審査委員会委員	主査氏名	平松和史	
	副査氏名	村上和成	
	副査氏名	加来信広	
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 中耳炎の起炎菌は変化しているのか。</li> <li>2. Phosphorylcholine (ChoP)陽性と陰性の臨床分離株の割合は中耳炎でどうか。</li> <li>3. ChoP 陽性株のほうが重症化、遷延化するのか。</li> <li>4. 培養されやすいのはどちらの株か。</li> <li>5. 研究を始める前の仮説について説明しなさい。</li> <li>6. 同一個体の異なる箇所（中耳と鼻咽腔）で研究を行うことに対しての意義と問題点は何か。</li> <li>7. Cho 陽性株は、培養条件などが変化しても陽性であり続けるのか。陽性から陰性、あるいは陰性から陽性へと変化することはないのか。</li> <li>8. 病理組織所見で炎症の評価を HE 染色だけで行っているが、炎症を惹起する細胞を判別するには細胞表面抗原を認識する抗体で識別する免疫染色などは行ったか。</li> <li>9. ChoP 陽性株か、陰性株かを 40 株の臨床分離株を用いて、検討している。これら 40 株の中で、陽性、陰性はどのような頻度で検出されたのか。</li> <li>10. Figure 2 で ChoP 陽性株は減ってゆき、陰性株が増えていくのはどう考えるか。</li> <li>11. Table 1 で ChoP 陰性株のほうが炎症が持続するのは菌が残存するからか。つまり陰性株のほうがクリアランスが悪いのか。</li> <li>12. 他のグラフや図と異なり、Figure 1 および Table 1 については、鼻咽腔の結果はなく、中耳だけの結果を示した理由は何か。</li> <li>13. Figure 1 において菌を含まない対照群においても、一日目の急性中耳炎の重症度が高いものが存在するのはなぜか。</li> <li>14. 今回実験に用いた 2 株は、他の病原因子や菌の増殖能などに差はないのか。ChoP 陽性、陰性以外の要因が、この実験に影響を及ぼした可能性はないのか。</li> <li>15. 今回のモデルは急性感染のモデルであると思われる。慢性のモデルでの検討はなされていないのか。または行う予定はないのか。</li> <li>16. 本研究の結果は、CRPの影響が高いことを示しているが、推定されるCRPの役割について、説明しなさい。</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 門脇嘉宣

## 論 文 題 目

Phase variation with altering phosphorylcholine expression of nontypeable *Haemophilus influenzae* affects bacteria clearance and mucosal immune response in the middle ear and nasopharynx

(無莢膜型インフルエンザ菌の phosphorylcholine 発現による位相変異が、中耳及び鼻咽腔での細菌クリアランスと粘膜免疫反応に与える影響)

## 要 旨

## 目的

無莢膜型インフルエンザ菌 (NTHi) は急性中耳炎や滲出性中耳炎の主要な原因菌である。Phosphorylcholine(ChoP)は同菌の菌体外膜を構成する lipooligosaccharide の表面に発現しており、上気道粘膜上皮への接着や浸潤のほか、バイオフィルムの形成に関与していると考えられている。ChoP の発現は位相変異により活性が変化するが、その意義について詳細はまだ明らかになっていない。我々はこの度、モデルマウスの中耳腔と鼻腔に NTHi の ChoP(+)株と ChoP(-)株を投与し、それぞれの比較を行うことで中耳腔および鼻腔からの細菌クリアランスと粘膜免疫反応の機序について検討を行った。

## 方法

6週令の雄性 BABL/c マウスを対象とし、その中耳腔と鼻腔に ChoP 陽性および陰性の各細菌を投与後、1、3、7 日目に中耳腔の洗浄液と鼻腔の洗浄液を採取した (各群の個体数を 6 とした)。生食のみ投与

したコントロール群も作成した。中耳洗浄液 (MEW)、鼻腔洗浄液 (NW) の原液の一部で細菌培養を行い、上清を用いて各種炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-17)および炎症性タンパクである C-reactive protein (CRP) を測定した。いずれのマウスも洗浄液を採取後に中耳組織の薄切組織切片を作成し、H-E 染色を行って局所粘膜の炎症の程度を量った。

## 結果

MEW では 1 日目の培養菌数は ChoP(+)群の方が有意に多かったが、経時的にその数は逆転し、7 日目には ChoP(-)群のみが生菌として得られた。NW でも 1 日目は ChoP(+)群の菌数が多かったが、3 日目、7 日目で両群とも生菌はほとんど得られなくなった。炎症性サイトカインの測定については、MEW ではその多くで ChoP(-)群が高値となり、これも経時的にその傾向は顕著となった。一方、NW では ChoP(+),(-)群いずれもほとんどで低値であった。CRP の測定でもサイトカインの結果と同様、MEW では当初は ChoP(+),(-)群間で差はなかったものの、7 日目には ChoP(-)群のみで高値を認めた。また、NW ではこれも同様に、いずれの群でも低値であった。局所粘膜の所見では、MEW の 7 日目で ChoP(-)群でのみ粘膜肥厚と炎症細胞の浸潤を強く認めた。

## 考察・結語

今回の研究において、NTHi は上気道の環境に応じて ChoP の発現により細菌クリアランスの感受性が変化した。即ち、CRP 濃度の高い中耳腔において ChoP(-)群の中耳からの細菌クリアランスは強い抵抗性を示した一方、CRP 濃度の低い鼻腔においては ChoP(+)群の鼻粘膜への定着性の優位性を示唆するが、ChoP の有無による相違は認めなかった。サイトカインの発現については、MEW での ChoP(-)群では抑制性サイトカインである IL-10 の発現が増強し、細菌クリアランスへの抵抗性に関与することが考えられた。病理組織学的にみても 7 日目の ChoP(-)群での中耳粘膜でのみ炎症反応がみられた。

これは ChoP の位相の変異及び粘膜の部位により粘膜の免疫反応と細菌クリアランスに相違が生じることを生体で示した最初の報告である。この ChoP の位相変異の機序の解明が、NTHi などの ChoP を菌体表面に有する細菌による上気道感染に対し、より有効な治療方法に繋がる可能性を有する。