インフルエンザ菌 *Phosphorylcholine* の表出と中耳ムチン MUC5AC 及び MUC5B 産生への影響

平野 隆, 門脇 嘉宣, 川野 利明, 森山 宗仁, 児玉 悟, 鈴木 正志

大分大学医学部耳鼻咽喉科学講座

小児において無莢膜型インフルエンザ菌は滲出性中耳炎の主たる原因菌の一つであり, このインフルエンザ菌の外膜蛋白の成分の一つであるリポオリゴ糖は *phase variation* により *Phosphorylcholine* (ChoP) をエピトープに発現することが知られている。この *phase variation* による ChoP の発現により細菌の気道粘膜上皮への定着や組織浸潤, 宿主のリンパ球などの免疫応答の抑制や調整をすることが知られており, 滲出性中耳炎の遷延化に関与することが示唆されている。今回, インフルエンザ菌由来外膜における ChoP の表出と中耳ムチン, 特に MUC5AC 及び MUC5B 産生への影響について検討した。ChoP 陽性 (+) 及び ChoP 陰性 (-) インフルエンザ菌外膜溶液を中耳腔に注入し, 1, 3, 7 日目に顕微鏡下に中耳洗浄液を採取し中耳洗浄液中の MUC5AC 及び MUC5B ムチン濃度を測定した。ChoP の有無にかかわらず, インフルエンザ菌外膜により中耳粘膜に免疫応答を誘導し, 中耳局所に炎症を誘導することが判明した。中耳貯留液中の MUC5AC 濃度は中耳炎惹起後 7 日目に, MUC5B 濃度は中耳炎惹起後 3 日目に, ChoP(+) 群において ChoP(-) 群と比較して明らかに亢進していた。インフルエンザ菌は, *phase variation* により ChoP を表出し, 中耳炎惹起後早期にはなく, 炎症後期において中耳粘膜における粘液産生遷延化に関与している可能性が示唆された。

キーワード: インフルエンザ菌, フォスフォリルコリン, ムチン, 中耳

はじめに

小児において無莢膜型インフルエンザ菌は滲出性中耳炎の主たる原因菌の一つであり, このインフルエンザ菌において外膜蛋白の成分の一つであるリポオリゴ糖 (LOS) に *Phosphorylcholine* (ChoP) が取り込まれエピトープとして発現する *phase variation* を来すことが知られており, 宿主への細菌定着性や免疫応答に影響を与える。この *phase variation* を生じる原因として, インフルエンザ菌には真核生物の *choline kinase* と相同性を有する *Lic1* 遺伝子が存在し, *Lic1* 遺伝子における遺伝的変異により生じることが知られている¹⁾。この遺伝子領域において 5'-CAAT-3' のタンデムリピートによる分子スイッチが存在し, LOS における ChoP の発現を調整することが報告されている¹⁾。また, この *phase variation* により ChoP を表出したインフルエン

ザ菌は, ヒト気道上皮細胞に存在する PAF レセプターを介して上皮へ侵入することも報告されている²⁾。また, ChoP を発現した LOS を有するインフルエンザ菌は Biofilm 形成が促進するとも報告されており³⁾, ヒト気道病変におけるインフルエンザ菌の病原性を修飾していることが知られている。以前, 我々も, ヒト小児滲出性中耳炎罹患児の上咽頭から分離したインフルエンザ菌における *phase variation* と中耳炎病態について報告しており⁴⁾, 滲出性中耳炎罹患児の上咽頭から分離したインフルエンザ菌における ChoP の発現が強発現したインフルエンザ菌を検出した小児においては, 中耳炎の罹患期間の遷延化を認められている。この際, ChoP が強発現したインフルエンザ菌を検出した小児においては, 中耳貯留液 (MEE) の性状は粘液性が多数をしめているのに対して, ChoP が弱発現であるインフルエンザ菌では漿液性の MEE を認めていた。この結果から, *phase variation* が中耳ムチン産生への影響を与える可能性が示唆される。今回, インフルエンザ菌由来外膜における ChoP の表出と中耳ムチン, 特に MUC5AC 及び MUC5B 産生への影響について検討したので報告する。

2017 年 7 月 29 日受稿, 2017 年 12 月 7 日受理
別冊請求先: 平野 隆
〒879-5593 大分県由布市狭間町医大ケ丘 1-1
大分大学医学部耳鼻咽喉科講座
TEL: 097-586-5913
E-mail: thirano@med.oita-u.ac.jp

対象と方法

Specific Pathogen Free 下にて飼育した、雄性、BALB/c マウス 5～6 週齢を用いた。今回中耳炎誘導に用いたインフルエンザ菌外膜は、当科臨床にて中耳貯留液より分離されたものであり、serotype および X 因子 V 因子にて確認を行いインフルエンザ菌と同定している。インフルエンザ菌における phase variation を判断するために、Sword らの方法に準じて²⁾、ChoP 特異的 TEPC-15 抗体を用いた colony blotting 法により、50% 以上のコロニーが強陽性であり、Lic1 遺伝子での 5'-CAAT-3' のタンデムリピートが 3 の倍数であり in frame 状態である菌株を ChoP(+) とし (strain 91130)、50% 以上のコロニーが陰性かつ Lic1 遺伝子での 5'-CAAT-3' のタンデムリピートが 3 の倍数以外である out of frame 状態である菌株を ChoP(-) とした (strain 91135)。これらインフルエンザ菌 strain 91130 及び strain 91135 を Kurono ら⁵⁾の方法に準じて、ChoP(+) インフルエンザ菌及び ChoP(-) インフルエンザ菌から外膜成分を分離抽出している。

分離精製した外膜を PBS にて融解し中耳炎誘導を行なった。ケタミン・ザイラジン麻酔後に、下顎後方皮膚切開し、顕微鏡下に中耳骨胞を露出し、27G 針にて 2 個の小孔を作成し、ChoP(+) 及び ChoP(-) インフルエンザ菌外膜溶液 (各 5 µg/ml) を中耳腔に注入した。すべてのマウスは顕微鏡下に鼓膜の混濁、発赤、膨隆など中耳炎症所見を認めていないことを確認している。

中耳炎モデル作成後 1 日目、3 日目、7 日目に、各時点にて 6～8 匹のマウスから試料を採取しており、採取時には顕微鏡下に鼓膜所見を観察し、中耳所見の評価及び中耳貯留液の性状について評価を行った。中耳貯留液の量については、中耳骨胞全体に認める、部分的に認める、全く無いといった 3 段階で評価し、中耳貯留液の性状は中耳洗浄液を採取する際に評価している。中耳貯留液が白濁している場合は膿性、マイクロピペットでの吸引採取が粘稠でやや困難な場合は粘性、貯留液が水様性であり、吸引採取が容易な場合は漿液性と評価した。経鼓膜的に生理食塩水に

て中耳洗浄液 (200 µl) を採取し、中耳洗浄液を遠心後に上清を分離、中耳洗浄液中の MUC5AC 及び MUC5B ムチン濃度を ELISA kit (Flarebio Biotech LLC, および cloud-clone corp) にて測定した。

中耳粘膜組織における組織学的応答を調べるため、各時点 5 匹のマウス頭部を 10% 緩衝中性ホルマリン液にて固定後に、0.12 M ethylenediaminetetraacetic acid (pH 7.0) 溶液にて脱灰後にエタノール上昇系にてパラフィン包埋した。6 µm の中耳骨胞の連続切片粘膜を作成し、各 180 µm 毎に、ヘマトキシレン・エオジン染色を行い、またムチンの構成成分であるシアル酸と接着するレクチンであるペルオキシダーゼ標識 wheat germ agglutinin (WGA) レクチンを切片にて反応させた後に、DAB Peroxidase Substrate Kit (Vector Laboratories 社) にて WGA 染色を同様にを行った。中耳骨胞の断面積が最大となる水平面において、中耳骨胞の内側、外側、耳管鼓室口周囲、後方の 4 点を中心にイメージ画像を撮影したのちに Image J (National Institutes of Health) を用いて、中耳粘膜肥厚度を計測し解析を行い、WGA 染色により中耳粘膜の杯細胞数を数えている。

中耳粘膜における platelet-activating factor (PAF) レセプターの表出は抗 PAF レセプターポリクローナル抗体 (Bioss 社) を用いて、パラフィン切片の免疫染色を行なっている。

結 果

1. 鼓膜所見および中耳貯留液性状

中耳炎惹起後 1 日目から 3 日目までは、両群共に全例中耳貯留液を認めたが、7 日目には ChoP(-) 群では、中耳貯留液を認めた割合が 25% (2/8) であったが、ChoP(+) 群では 50% (4/8) に認められた。中耳貯留液の性状は炎症早期である 1 日目では両群共に膿性貯留液を主に認められたが、3 日目には粘性貯留液を認めた。7 日目では、ChoP(-) 群では漿液性貯留液を 25% (2/8) 認めており、ChoP(+) 群では 50% (4/8) が粘性貯留液であった (表 1)。

表 1 鼓膜所見及び中耳貯留液性状

ChoP	1 日目		3 日目		7 日目	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
全体	67% (4/6)	83% (5/6)	75% (6/8)	100% (8/8)	0% (0/8)	25% (2/8)
部分	33% (2/6)	17% (1/6)	25% (2/8)	0% (0/8)	25% (2/8)	25% (2/8)
無し	0% (0/6)	0% (0/6)	0% (0/8)	0% (0/8)	75% (6/8)	50% (4/8)

ChoP	1 日目		3 日目		7 日目	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
膿性	66% (4/6)	83% (5/6)	0% (0/8)	0% (0/8)	0% (0/8)	0% (0/8)
粘性	17% (1/6)	17% (1/6)	75% (6/8)	100% (8/8)	0% (0/8)	50% (4/8)
漿液性	17% (1/6)	0% (0/6)	25% (2/8)	0% (0/8)	25% (2/8)	0% (0/8)

図1 両群ともに中耳炎惹起後1, 3日目を中心に好中球を中心とした中耳粘膜への炎症細胞浸潤を認める (a)。中耳粘膜肥厚長 (μm) は、3日目には両群間に差を認めなかったものの、ChoP(+) 群は1日目, 7日目にChoP(-) 群と比較して明らかな粘膜肥厚を認めた (b)。(*: $p < 0.05$)

図2 両群共に中耳線毛上皮の粘液層や杯細胞に濃染像を認めた。中耳炎惹起後3日目が最も染色強度が強く認められた (a)。しかし、マウス1匹あたりの中耳粘膜中の杯細胞数では、ChoP(+) 群では中耳炎惹起後3日目で増加を認めたものの、両群間において明らかな差は認められなかった (b)。

2. 中耳炎症病態の組織学的変化

中耳粘膜の組織学的変化を図1に示す。H/E染色による組織学的評価では、両群ともに中耳炎惹起後に分葉核を有する好中球を中心とした中耳粘膜への炎症細胞浸潤、及び中耳粘膜の肥厚を認めた。NIH imageを用いて中耳粘膜肥厚長 (μm) を測定したところ、3日目には差を認めなかったものの、ChoP(+) 群では1日目の平均粘膜肥厚は $77.2 \pm 30.9 \mu\text{m}$ 、7日目においても $89.0 \pm 42.8 \mu\text{m}$ であるのに対して、ChoP(-) 群では、1日目 $57 \pm 22 \mu\text{m}$ 、であり、7日目においては $50.8 \pm 20.4 \mu\text{m}$ であり、明らかな両群間に相違を認めた。

3. WGA レクチン染色による組織学ムチン産生の評価

WGA レクチン染色 (図2) により、両群共に中耳上皮、特に線毛上皮に染色性を強く認めており、線毛上の粘液層や杯細胞に濃染像を認めた。中耳炎惹起後3日目が最も染色強度が強く認められた。しかし、マウス1匹あたりの中耳粘膜中の杯細胞数では、ChoP(+) 群では中耳炎惹起後3日目で増加を認めたものの、両群間において明らかな差は認められなかった。

4. MUC5AC 及び MUC5B ELISA

中耳洗浄液中の MUC5AC 及び MUC5B ムチン量について

図3 MUC5ACにおいて、ChoP(+)群ではChoP(-)群と比較して7日目において明らかに産生亢進を認め、MUC5BにおいてはChoP(+)群ではChoP(-)群と比較して3日目において明らかに産生亢進を認めた。(*: $p < 0.05$)

図4 両群ともにPAFレセプターは、主に線毛上皮の線毛直下、上皮先端部に表出を認めた。中耳炎惹起後3日目から7日目にかけて、線毛が一部消失し、中耳粘膜上皮の形態変化を認め、ChoP(+)群においては線毛消失の遷延化を認めた。しかし、両群共にPAFレセプターの発現は継続していた。

てELISAにて定量を行なったが(図3)、両群ともに1, 3日目のMUC5ACムチン濃度に差を認めなかったが、7日目において明らかにChoP(+)群ではChoP(-)群と比較してMUC5ACムチン産生を多く認め、ChoP(-)群では570 ng/mlに対してChoP(+)群では968 ng/mlと高値であった。またMUC5Bムチン濃度においては、3日目においてChoP(+)群ではChoP(-)群と比較して明らかに産生亢進を認め、ChoP(-)群では300 pg/mlに対してChoP(+)群では571 pg/mlと高値であり、7日目にもChoP(+)群にMUC5Bムチン産生を多く認めたが、有意差は認められなかった。

5. PAFレセプター染色

ChoPをリガンドとするPAFレセプターに対する組織学的評価を行なった(図4)。両群ともにPAFレセプターは、主に線毛上皮の線毛直下、上皮先端部に表出を認めた。中耳炎惹起後3日目から7日目にかけて、線毛が一部消失し、中耳粘膜上皮の形態変化を認め、ChoP(+)群においては線毛消失の遷延化を認めた。しかし、両群共にPAFレセプターの発現は継続していた。

考 察

中耳粘膜における粘液層は、粘液線毛輸送機能のみならず、中耳粘液に存在するリゾチームやラクトフェリンは非特異的防御機構として、また、分泌型 IgA をはじめとした粘膜免疫応答は抗原特異的に生体を防御し、上気道の恒常性を維持している^{6,7)}。その粘液の主要な構成成分としてムチンが代表的に挙げられるが、ムチンは MUC 遺伝子で規定されるコア蛋白に多数のシアル酸、N アセチルグルコサミン、フコース、ガラクトースなど糖残基が結合し、重合しながら集合体を形成している⁸⁾。ムチンのうち、MUC5AC と MUC5B は気道粘膜の恒常性維持に重要で、慢性炎症^{9,10)}やアレルギー性疾患¹⁰⁻¹²⁾の際に増加することが判明している。MUC5AC は上皮細胞の杯細胞で主に産生され、MUC5B は上皮細胞と粘膜下腺細胞で分泌されていると報告されている¹³⁾。諸家の報告において、急性中耳炎においては MUC5AC ムチン産生が中耳貯留液に多く認め、慢性中耳炎においては MUC5B ムチン産生が多く認められるとの報告がなされており⁹⁾、慢性炎症を認める中耳粘膜では腺組織様構造を認めるとの報告がある¹⁴⁾。

インフルエンザ菌含めたグラム陰性菌外膜には、lipopolysaccharide (LPS) や LOS などのエンドトキシンが含まれており、これらのエンドトキシンが気道上皮からの粘液産生を誘導することがよく知られている。ヒト鼻粘膜に LPS 刺激を加えると、IL-1 β の活性化と共に NF- κ B の活性化を認め、MUC5AC 産生が誘導され¹⁵⁾、インフルエンザ菌体溶解液により培養マウス中耳粘膜を刺激すると、培養 4 日目までの早期では MUC5AC が優位に、4 日目以降 3 週間までの後期においては MUC5B が優位に誘導されるとの報告がなされている¹⁶⁾。また、ラット気道上皮に LPS を投与したところ、Toll-like receptor 4 を介して気道上皮からの MUC5AC 産生に関与するとの報告も認めている¹⁷⁾。当科においても、中耳炎マウスモデルにおいても、インフルエンザ菌由来のエンドトキシン投与により、IL-1 β や TNF- α などの炎症性サイトカインの上昇と中耳貯留液の誘導と中耳炎の遷延化との関連を報告している^{18,19)}。また、炎症性サイトカインにより遺伝子レベルにおいても MUC5AC などのムチン遺伝子発現を誘導するとの報告がある²⁰⁾。これらの文献をもとにすると、インフルエンザ菌などの LOS を含むグラム陰性菌体成分により、MUC5AC や MUC5B などのムチン産生が様々な因子により誘導されることが示唆され、今回の結果、ChoP(+) 及び ChoP(-) 由来インフルエンザ菌外膜投与により、鼓膜所見や組織学的検討において中耳炎を惹起し、炎症に伴い両群共に投与後 3 日目にピークに WGA に濃染したムチンの産生が誘導され、中耳局所に MUC5AC 及び MUC5B ムチン産生を認めたことを支持するものと思われる。中耳洗浄液中の MUC5AC 及び MUC5B ムチン量を比較した場合、MUC5B よりも MUC5AC ムチン量が多いため、インフルエンザ菌外膜溶液投与後の

炎症においては杯細胞主体の MUC5AC ムチン産生が誘導されているものと推測される。MUC5B ムチンについては耳管周囲の粘膜下腺組織からの分泌の影響も考えられる。ChoP の有無における相違であるが、中耳粘膜における変化では ChoP(+) 群においては中耳粘膜の肥厚を ChoP(-) 群よりも認め、3~7 日目において、MUC5AC 及び MUC5B ムチン量は ChoP(+) 群において、ChoP(-) 群と比較してムチン産生が増強しており、ChoP が中耳粘膜炎症やムチン産生の遷延化に関与していることが示唆される。

ChoP を有する肺炎球菌や phase variation を起こしたインフルエンザ菌が PAF レセプターを介して気道上皮に接着侵入することが知られており^{2,21)}、PAF レセプターは ChoP をリガンドとしている事が知られている。ムチン産生を亢進する因子として、PAF と PAF レセプターの相互作用により、ムチン産生が誘導されることは知られており、PAF を培養気道上皮に投与することにより、気道炎症を惹起し、直接及び間接的機序により杯細胞からのムチン産生を誘導し、また PAF-receptor antagonist により、ムチン産生を抑制したとの報告があり²²⁾、また PAF がシクロオキシゲナーゼ 2 によるプロスタグランジン E2 を誘導し、MUC5AC 産生を増強することも報告されている²³⁾。今回、PAF レセプターは、線毛上皮の線毛直下、上皮先端部に表出しており、炎症と共に線毛の脱落を一部認めるものの、PAF レセプターの発現は継続していた。ChoP を有する菌体外膜が、PAF レセプターを介して速やかに宿主の様々な細胞に取り込まれ、生体に影響を与えることが報告されており²⁴⁾、ChoP(+) の菌体外膜がマウス中耳粘膜の PAF レセプターを介して、中耳粘膜の肥厚やムチン産生を増強させ中耳炎症病態を修飾している可能性が示唆された。今回は、ChoP の有無におけるインフルエンザ菌外膜注入によるマウス中耳炎モデルを用いて検討を行なっているが、生理食塩水などの注入による対照マウスを作成し比較検討を行うことも重要であり、今後さらなる詳細な実験が必要と考えられる。また、今回は in vivo での検討のみであり、詳細な機序については今後の細胞培養などの in vitro での検討が必要と考えられる。MUC5AC 及び MUC5B ムチンは末梢気道や中耳炎における増悪因子での側面について報告されているが、MUC5AC 対立遺伝子の変化により滲出性中耳炎の罹患率が増加することや²⁵⁾、MUC5B ムチンが末梢気道の防御において重要であることも報告されており²⁶⁾、今回、phase variation に伴うインフルエンザ菌外膜投与による中耳炎症に伴う粘液産生が、滲出性中耳炎の遷延化の弊害のみならず、粘膜防御に作用しているかは、今後のさらなる研究が必要である。

ま と め

ChoP の有無にかかわらず、インフルエンザ菌外膜により中耳粘膜に免疫応答を誘導し、中耳局所に炎症を誘導す

ることが判明した。中耳貯留液状の MUC5AC 及び MUC5B ムチン濃度は中耳炎惹起後、7 日目及び 3 日目において、ChoP(+) 群において ChoP(-) 群と比較して明らかに亢進していた。インフルエンザ菌は、phase variation により ChoP を表出し、気道上皮細胞に存在する PAF レセプターを介してムチン産生を促進し、中耳炎惹起後早期にではなく、炎症後期において中耳粘膜における粘液産生促進に関与している可能性が示唆された。

本論文に関して、開示すべき利益相反状態は存在しない。

文 献

- 1) Weiser JN, Love JM, et al. The molecular mechanism of phase variation of *H. influenzae* lipopolysaccharide. *Cell*. 1989; 59: 657–65.
- 2) Swords WE, Buscher BA, et al. Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol Microbiol*. 2000; 37: 13–27.
- 3) West-Barnette S, Rockel A, et al. Biofilm growth increases phosphorylcholine content and decreases potency of nontypeable *Haemophilus influenzae* endotoxins. *Infect Immun*. 2006; 74: 1828–36.
- 4) Fujita K, Hirano T, et al. Prognostic impact of phosphorylcholine expression in nontypeable *Haemophilus influenzae* in otitis media with effusion. *Acta Otolaryngol*. 2009; 129: 832–8.
- 5) Kurono Y, Suzuki M, et al. Effects of intranasal immunization on protective immunity against otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1999; Suppl 1: S227–9.
- 6) 黒野祐一, 福岩達哉. 経鼻粘膜ワクチンの現況と展望. 耳展 2007; 50: 136–141.
- 7) 茂木五郎, 黒野祐一, 他. 中耳貯留液の分泌型 IgA と血清型 IgA ならびに連鎖球菌膜抗原 (M 抗原) に対する抗体活性. 耳展 1985; 補 4: 371–5.
- 8) 稲垣冬彦. NMR によるオリゴ糖の糖鎖構造の解析. ムチンならびにムチン関連オリゴ糖を例として. 化学と生物 1990; 28: 410–4.
- 9) Preciado D, Goyal S, et al. MUC5B is the predominant mucin glycoprotein in chronic otitis media fluid. *Pediatr Res*. 2010; 68: 231–6.
- 10) Curran DR, Cohn L. Advances in mucous cell metaplasia: a plug for mucus as a therapeutic focus in chronic airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010; 42: 268–75.
- 11) Evans CM, Kim K, et al. Mucus hypersecretion in asthma: cause and effects. *Curr Opin Pulm Med*. 2009; 15: 4–11.
- 12) Shimizu S, Kouzaki H, et al. Eosinophil-epithelial cell interactions stimulate the production of MUC5AC mucin and profibrotic cytokines involved in airway tissue remodeling. *Am J Rhinol Allergy*. 2014; 28: 103–9.
- 13) Groneberg DA, Eynott PR, et al. Expression of MUC5AC and MUC5b mucins in normal and cystic fibrosis lung. *Respir Med*. 2002; 96: 81–6.
- 14) Lin J, Caye-Thomasen P, et al. Mucin production and mucous cell metaplasia in otitis media. *Int J Otolaryngol*. 2012; 2012: 745325.
- 15) Wang W, Xu X, et al. Lipopolysaccharide induces MUC5AC overproduction in human nasal epithelium. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013; 270: 541–7.
- 16) Val S, Kwon HJ, et al. Middle Ear Response of MUC5AC and MUC5B Mucins to Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015; 141: 997–1005.
- 17) Chen L, Wang T, et al. Toll-like receptor 4 relates to lipopolysaccharide induced mucus hypersecretion in rat airway. *Arch Med Res*. 2009; 40: 10–7.
- 18) Maeda K, Hirano T, et al. Cytokine expression in experimental chronic otitis media with effusion in mice. *Laryngoscope*. 2004; 114(11): 1967–72.
- 19) Watanabe T, Hirano T, et al. Role of interleukin-1beta in a murine model of otitis media with effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001; 110(6): 574–80.
- 20) Enss ML, Cornberg M, et al. Proinflammatory cytokines trigger MUC gene expression and mucin release in the intestinal cancer cell line LS180. *Inflamm Res*. 2000; 49: 162–9.
- 21) Rijnveld AW, Weijer S, et al. Improved host defense against pneumococcal pneumonia in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *J Infect Dis*. 2004; 189: 711–6.
- 22) Rieves RD, Goff J, et al. Airway epithelial cell mucin release: immunologic quantitation and response to platelet-activating factor. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992; 6: 158–67.
- 23) Gray T, Nettekheim P, et al. Interleukin-1beta-induced mucin production in human airway epithelium is mediated by cyclooxygenase-2, prostaglandin E2 receptors, and cyclic AMP-protein kinase A signaling. *Mol Pharmacol*. 2004; 66: 337–46.
- 24) Fillon S, Souliis K, et al. Platelet-activating factor receptor and innate immunity: uptake of gram-positive bacterial cell wall into host cells and cell-specific pathophysiology. *J Immunol*. 2006; 177: 6182–91.
- 25) Ubell ML, Khampang P, et al. Mucin gene polymorphisms in otitis media patients. *Laryngoscope*. 2010; 120: 132–8.
- 26) Roy MG, Livraghi-Butrico A, et al. MUC5B is required for airway defence. *Nature*. 2014; 505: 412–6.

Phase variation of nontypeable *Haemophilus influenza* affect mucin production in the middle ear

Takashi Hirano, Yoshinori Kadowaki, Toshiaki Kawano, Munehito Moriyama,
Satoru Kodama, Masashi Suzuki

Department of Otolaryngology, Faculty of Medicine, Oita University

ABSTRACT

Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) has become well established as an important pathogen of acute otitis media and otitis media with effusion (OME) in children, and OME is characterized by the production of mucin in the middle ear mucosa. The surface of NTHi is composed of outer-membrane (OM), including lipooligosaccharide (LOS), and LOS undergoes phase variation in the expression of the phosphorylcholine (ChoP) epitope, a structure present in several invasive pathogens residing in the human respiratory tract. In this study, we examined the relationship of the phase variation of NTHi to mucin production in the middle ear. We generated a murine model of OME by using OM inoculation. OM from ChoP-positive:ChoP(+) or -negative:ChoP(-) NTHi was injected into the tympanic bulla without Eustachian tube obstruction. Middle ear effusions and tissues were collected at day 1, 3, and 7 after inoculation. Both OM induced inflammation in the middle ear. MUC5AC levels were higher at day 7 and MUC5B levels were higher at day 3 in middle ear effusions in mice treated with ChoP(+)OM when compared to the mice treated with ChoP(-)OM. These results indicated that ChoP might be an important factor in the pathogenesis of persistent OME.

Key words: nontypeable *Haemophilus influenza*, phosphorylcholine, mucin, middle ear