

研究種目：若手研究 B

研究期間： 2008 ～ 2009

課題番号：20791219

研究課題名（和文）細菌のバイオフィーム形成が中耳炎の難治化に及ぼす影響と治療に関する研究

研究課題名（英文）Study on intractable otitis media caused by Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) biofilm formation

研究代表者

池田 頼彦 (IKEDA YORIIHIKO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20423949

研究成果の概要（和文）：

近年、無莢膜型インフルエンザ菌(Nontypeable *Haemophilus influenzae* : NTHi) のバイオフィームが、中耳炎の難治化に影響を与えることが報告されている。抗菌薬の抗菌作用の指標として頻用される MIC は試験管内における浮遊菌に対する効果を示しており、臨床的效果と乖離することが少なくない。最小バイオフィーム抑制濃度(minimal biofilm eradication concentration : MBEC) はバイオフィームを形成した細菌の抗菌薬に対する感受性を表したものである。種々の抗菌薬の臨床的有効性を示す指標として、NTHi に対する MBEC を検討した。方法は、小児急性中耳炎症例から分離された NTHi 株を 96 ウェルプレートで培養し、バイオフィームを形成させた。段階希釈した抗菌薬を加え、バイオフィームに対する抑制効果および殺菌効果を検討したところ、MIC 測定による感受性に比べ、バイオフィーム状態の細菌は抗菌薬に対して非常に強い抵抗性を示した。マクロライド系やニューキノロン系抗菌薬では、臨床的に効果が期待できる濃度において MBEC が得られたので、マクロライド系やニューキノロン系抗菌薬の急性中耳炎に対する有用性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) has been shown to form biofilm in vivo. The biofilm is defined as a group of bacteria growing as a community in a self-produced polymeric matrix. Several studies show that the ability to form biofilms contributes the persistence of acute otitis media caused by NTHi. The biofilm formations and adherence of NTHi were evaluated by a 96-well pin-replicator assay with a confocal laser scanning microscopy. Bacteria in biofilms were highly resistant to antibiotics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：バイオフィーム、急性中耳炎、難治化

1. 研究開始当初の背景

急性中耳炎は、幼小児期に最も頻回に罹患する感染症であり、鼻咽腔に生着しコロニーを形成した起炎菌が、経耳管的に中耳腔に感染し発症すると考えられている。細菌感染症における起炎菌の感染メカニズムについての研究は、従来までは分離された菌、すなわち planktonic な状態での細菌を用い検討されてきた。しかし、これらの手法は細菌の持つ病原因子の役割の検討には有用であるが、感染症本来の成立機序とは異なるものである。すなわち、急性中耳炎の起炎菌の感染源となる鼻咽腔は、線毛上皮に覆われ絶えず外界からの抗原を排除する機構を有している。細菌感染の機序から考えた場合、細菌の付着とコロニー形成に非常に不利な場であると考えられる。このような細菌の生存に不利な場であるにもかかわらず、上気道で感染症が好発する要因としては、細菌の上皮粘膜への付着には、pili や fimbriae に代表される付着因子のみでなく、細菌の持つ様々な因子が関与すると考えられる。とりわけ、インフルエンザ菌では、細菌自体が Planktonic な単一の状態で上気道粘膜に生着しコロニーを形成するのではなく、細菌相互間で菌塊状のバイオフィームを形成し、宿主の防御因子であるラクトフェリンやリゾチームなどの抗菌ペプチドや分泌型 IgA による排除機

構に対する抵抗性を獲得することがあげられている。バイオフィームに関する研究は、形成を制御する因子に関するものがほとんどであり、バイオフィーム形成が細菌感染症の成立にどのような意味を持つのか、またバイオフィームを形成した細菌に対してどのような治療を行うべきかなどの臨床的な視点に立った研究は少ない。

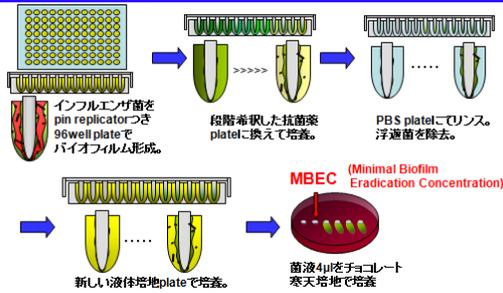
2. 研究の目的

本研究では、従来の感染症研究と異なった視点に立ち、生体での感染症成立に近い状態で細菌の感染メカニズムを検討することで、急性中耳炎の起炎菌であるインフルエンザ菌の臨床分離菌におけるバイオフィーム産生について検討するとともに、その治療対策について検討した。

3. 研究の方法

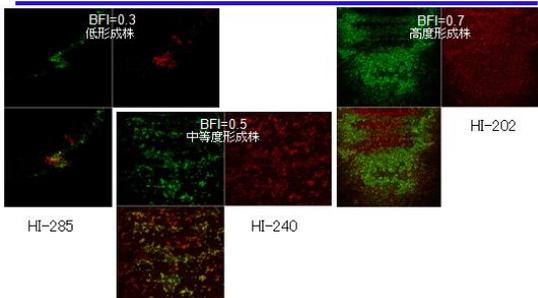
(1) 抗菌薬によるバイオフィーム抑制の検討
 最小バイオフィーム抑制濃度(MBEC) の検討
 小児急性中耳炎患児の中耳貯留液または鼻咽腔より分離された NTHi 株(計 16 株)を 96 ウェルプレートで培養し、バイオフィームを形成させ、種々の抗菌薬 (AMPC、CDTR-PI、LVFX、OFLX、CAM、14-OH CAM(CAMの代謝産物)) のバイオフィーム内インフルエンザ菌を殺菌する濃度を評価した。

方法: MBEC (Minimal Biofilm Eradication Concentration)



(2) 抗菌薬によるバイオフィーム抑制の検討
 クリスタルバイオレット法による検討
 小児急性中耳炎患児の中耳貯留液または鼻咽腔より分離された NTHi 株 (計 5 株) を 96 ウェルプレートで培養し、バイオフィームを形成させ、種々の抗菌薬 (AMPC、CDTR-PI、LVFX、OFLX、CAM、14-OH CAMCAM の代謝産物) を反応させ、クリスタルバイオレットにて染色し、吸光度を測定した。

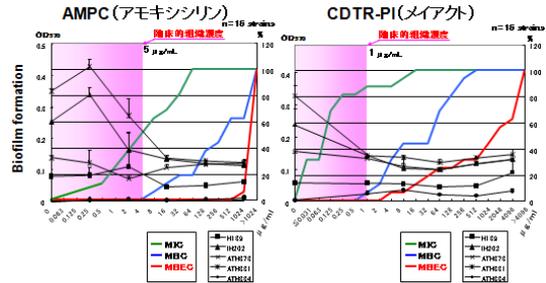
インフルエンザ菌のバイオフィーム形成の定量的検討
 共焦点レーザー顕微鏡と
 クリスタルバイオレット染色法 (Biofilm formation index) の比較



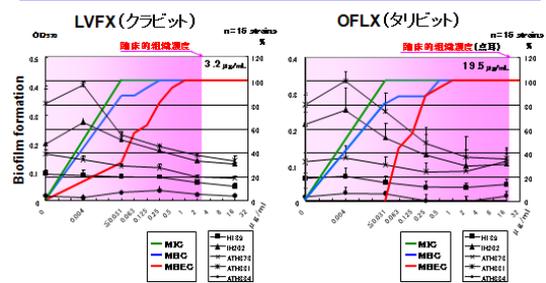
4. 研究成果

- (1) インフルエンザ菌によるバイオフィーム産生およびバイオフィーム内細菌 (BIB) に対する抑制・殺菌効果には、抗菌薬によって大きな差があることが分かった。
- (2) LVFX、OFLX は良好な最小バイオフィーム抑制濃度 (MBEC) を示した。CAM は臨床的組織濃度 $6.3 \mu\text{g/ml}$ で 17% の株で MBEC に達した。さらに代謝産物にもバイオフィーム抑制効果が見られた。AMPC、CDTR-PI では高濃度でも MBEC に達しなかった。
- (3) 各抗菌薬とも用量依存性にバイオフィーム量を減少させた。LVFX、OFLX、CAM およびその代謝産物では臨床的組織濃度でバイオフィーム抑制効果がみられた。AMPC や CDTR-PI は臨床的組織濃度では効果が少なかった。

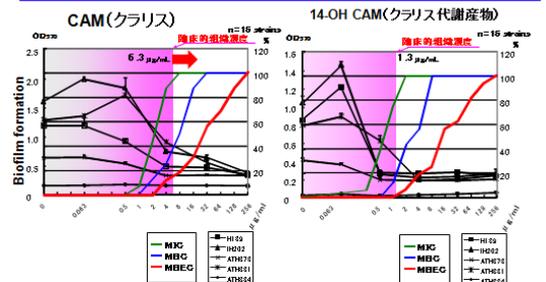
抗菌薬のバイオフィーム内細菌に対する効果
 MBEC (Minimal Biofilm Eradication Concentration)
 バイオフィーム量抑制効果 (クリスタルバイオレット法)



抗菌薬のバイオフィーム内細菌に対する効果
 MBEC (Minimal Biofilm Eradication Concentration)
 バイオフィーム量抑制効果 (クリスタルバイオレット法)



抗菌薬のバイオフィーム内細菌に対する効果
 MBEC (Minimal Biofilm Eradication Concentration)
 バイオフィーム量抑制効果 (クリスタルバイオレット法)



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 1 件)

Satomi Moriyama, Muneki Hotomi, Jun Shimada, Dewan S. Billal, Keiji Fujihara, Noboru Yamanaka. Formation of biofilm by *Haemophilus influenza* isolated from pediatric intractable otitis media. *Auris Nasus Larynx* 36 (2009) 525-531

[学会発表] (計 4 件)

- ① 竹井慎他:小児急性中耳炎におけるインフルエンザ菌のバイオフィルム形成と臨床経過の検討 第 110 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2009.5.14 東京都
- ② Shin Takei, Muneki Hotomi, Satomi Moriyama, Dewan S. Billal, Yorihiko Ikeda, Noboru Yamanaka Minimal biofilm eradication concentration of antibiotics against *Haemophilus influenzae* isolated from otitis media. May 6-10,2009 Seoul, Korea
- ③ 竹井慎他:急性中耳炎の難治化とインフルエンザ菌のバイオフィルム形成との関連 第 56 回日本化学療法学会西日本支部総会 2008.12.6 広島市
- ④ 竹井慎他:急性中耳炎の難治化とインフルエンザ菌のバイオフィルム形成との関連に関する研究 第 38 回日本耳鼻咽喉科感染症研究会、第 32 回日本医用エアロゾル研究会 2008.9.5 松江市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 頼彦 (IKEDA YORIHICO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20423949

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: