

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791637

研究課題名（和文） 難治性中耳炎におけるインフルエンザ菌のバイオフィーム形成に関する研究

研究課題名（英文） *Haemophilus influenzae* Biofilm in Intractable Otitis Media

研究代表者

竹井 慎 (TAKEI SHIN)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：40347589

研究成果の概要（和文）：

インフルエンザ菌は浮遊状態からバイオフィーム状態となることにより抗菌薬抵抗性が高まる。我々は小児急性中耳炎患児から分離されたインフルエンザ菌がバイオフィーム形成を行うことを明確にした。最小バイオフィーム抑制濃度の測定および抗菌薬暴露後のクリスタルバイオレット染色による定量法により、数種の抗菌薬は高濃度ではバイオフィームに対して有効であることが示唆された。最小バイオフィーム抑制濃度の測定は細菌バイオフィームに対する抗菌薬の有効な選択および新しい抗菌薬のスクリーニングに有用となる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

In the biofilm state, *H. influenzae* is much less susceptible to antimicrobial agents compared to the susceptibility in the planktonic state. We clearly showed the biofilm formation of clinical nontypable *H. influenzae* (NTHi) isolates from acute otitis media (AOM) children. The current results suggest that production of biofilm by NTHi would be associated with clinical outcome of AOM. The minimal biofilm eradication concentration assay and crystal violet assay after antimicrobial exposure demonstrated that higher concentration of a certain antimicrobial agent to be effective for biofilms. The MBEC assay would be helpful for the rational selection of antimicrobial agents effective against microbial biofilms and for the screening of new effective antimicrobial compounds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：急性中耳炎 バイオフィーム インフルエンザ菌

1. 研究開始当初の背景

急性中耳炎は、幼小児期の代表的な細菌感染症であり、従来、経口抗菌薬で十分に治癒していたが、近年では抗菌薬治療にも関わらず難治化・遷延化する例が増加し、大きな問題となっている。難治性中耳炎においては、特にインフルエンザ菌が持続的に検出されることが多い。インフルエンザ菌による急性中耳炎の難治化の機序としては、従来まで抗菌薬の無秩序な頻用による薬剤耐性の増加が要因と考えられてきた。しかし、薬剤耐性化によらない難治化の機序、すなわちインフルエンザ菌がバイオフィルムを産生することにより急性中耳炎の難治化に関与する可能性が考えられている。

従来まで抗菌薬の有効性の指標として用いられてきた最小発育阻止濃度 (MIC) は、分離された浮遊菌を用いた検討であり、実際の生体においてはバイオフィルムを形成しているほうが普遍的であるため、抗菌薬の有効性を反映しない可能性が考えられる。

2. 研究の目的

(1)小児急性中耳炎患児から分離されたインフルエンザ菌を用い、バイオフィルム形成能を検討し、臨床的影響について検討する。

(2)小児急性中耳炎患児から分離されたインフルエンザ菌を用い、各種抗菌薬のバイオフィルム状態のインフルエンザ菌に対する効果を検討する。

3. 研究の方法

(1)crystal violet 法による Biofilm 形成能の定量的検討

急性中耳炎患児 28 例の鼻咽腔より分離されたインフルエンザ菌計 70 株を用いた。biofilm 形成能を crystal violet 法により定量的に評価した。インフルエンザ菌を 96 ウェルマイクロプレートにて培養し、形成された biofilm を 0.5% crystal violet を用いて染色。30% acetic acid で crystal violet を溶出し吸光度 (OD570) を測定した。陽性コントロールにはインフルエンザ菌株 No. 139 を、陰性コントロールにはインフルエンザ菌株 No. 102 (長崎大学熱帯研究所より分与) を用いた。

(2)共焦点レーザー顕微鏡による biofilm 形成の検討

共焦点レーザー顕微鏡を用いて biofilm 形成を画像的に評価した。インフルエンザ菌を 96 ピンレプリケーターつき 96 ウェルプレートにて 18 時間振蕩培養してピンに biofilm を形成させ、lectin 染色および SYTO9 による核酸染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて

確認した。biofilm の菌体外多糖の染色には、糖鎖末端のシアル酸に特異的に結合する lectin で染色を行い、biofilm 内部の生菌を染色するため、核酸に結合する SYTO9 で染色した。

(3)急性中耳炎臨床経過と biofilm 形成能の関係

2歳以下の急性中耳炎患児 28 例の鼻咽腔より分離されたインフルエンザ菌株のうち、biofilm 形成があり、アンピシリン (ABPC) MIC $\leq 1\mu\text{g/ml}$ の 38 株を対象とした。初回治療として amoxicilin 40mg/kg の 3~5 日間投与を行い、治癒した症例を改善群、抗菌薬投与にもかかわらず鼓膜所見の改善しない症例を非改善群として、crystal violet 染色による定量法で biofilm 形成能を評価した。

(4)各種抗菌薬のインフルエンザ菌バイオフィルムに対する効果

無莢膜型インフルエンザ菌 4 株を用いた。抗菌薬はアモキシシリン、セフトロペンピボキシル、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、ホスミシン、レボフロキサシン、オフロキサシンを検討した。

インフルエンザ菌を 96 ウェルプレートで培養し、バイオフィルムを形成させた。ここに段階希釈した抗菌薬を加え、バイオフィルムに対する抑制効果を評価した。バイオフィルム内の細菌を殺菌する最小の濃度を最小バイオフィルム抑制濃度 minimal biofilm eradication concentration (MBEC) とした。また、クリスタルバイオレット染色法によって抗菌薬のバイオフィルムに対する効果を定量的に検討した。

4. 研究成果

(1)各菌株の OD570 値を陽性コントロール株の OD570 値で除したものを biofilm formation index (BFI) と定義して、biofilm 形成能を評価した。crystal violet 法によって 70 株の BFI について検討したところ、図 1 のようになり、株によってバイオフィルム形成能には大きく異なることが明らかになった。

(2)共焦点レーザー顕微鏡像において、シアル酸染色では biofilm 形成が示され、SYTO9 による核酸染色像ではインフルエンザ菌生菌が示される。crystal violet 染色法による biofilm 定量的評価と、共焦点レーザー顕微鏡による画像評価の比較を図 2 に示す。crystal violet 染色法による biofilm formation index が高くなるほど、シアル酸染色および核酸染色像がつよく、biofilm を多く形成し、付着菌が増加していることが分か

った。

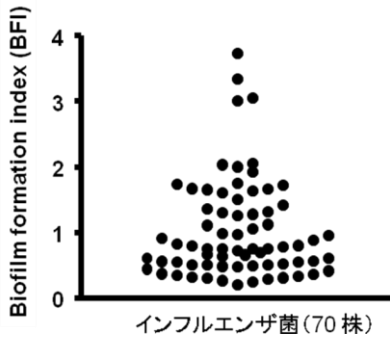


図1 バイオフィーム形成能

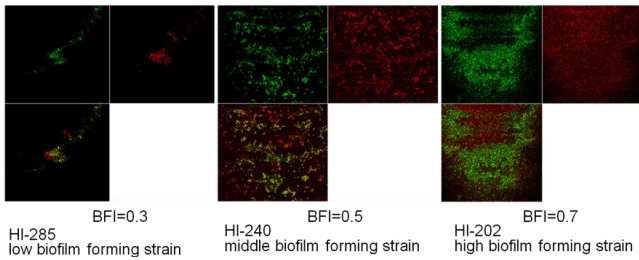


図2 共焦点レーザー顕微鏡とクリスタルバイオレット法の相関関係

(3) 急性中耳炎改善例、非改善例におけるバイオフィーム形成能の結果を図3に示す。急性中耳炎改善例より分離された無莢膜型インフルエンザ菌に比較して、非改善例より分離された無莢膜型インフルエンザ菌では、biofilm 形成が有意に高かった (Mann-Whitney U test $p < 0.01$)。

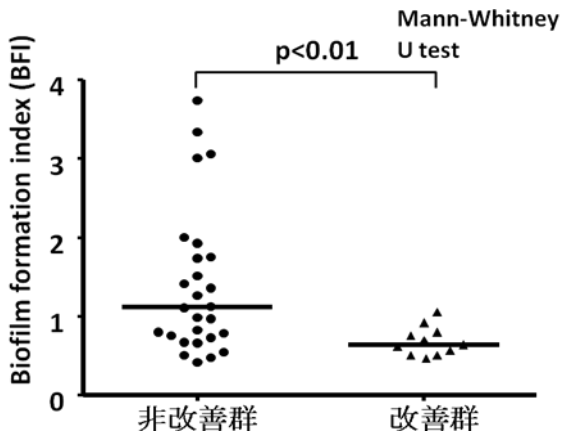


図3 アモキシシリン治療非改善群、改善群におけるインフルエンザ菌のバイオフィーム形成能

(4) インフルエンザ菌 16 株における最小発育阻止濃度 MIC, 最小殺菌濃度 MBC, MBEC の累積 100 分率を図4に示す。βラクタム系薬では高濃度でも MBEC に達しないことが分かる。マクロライド系薬では通常量投与における組織内濃度で MBEC に達する株が見られる。ニューキノロン系薬では低濃度でも MBEC に

達することが示された。

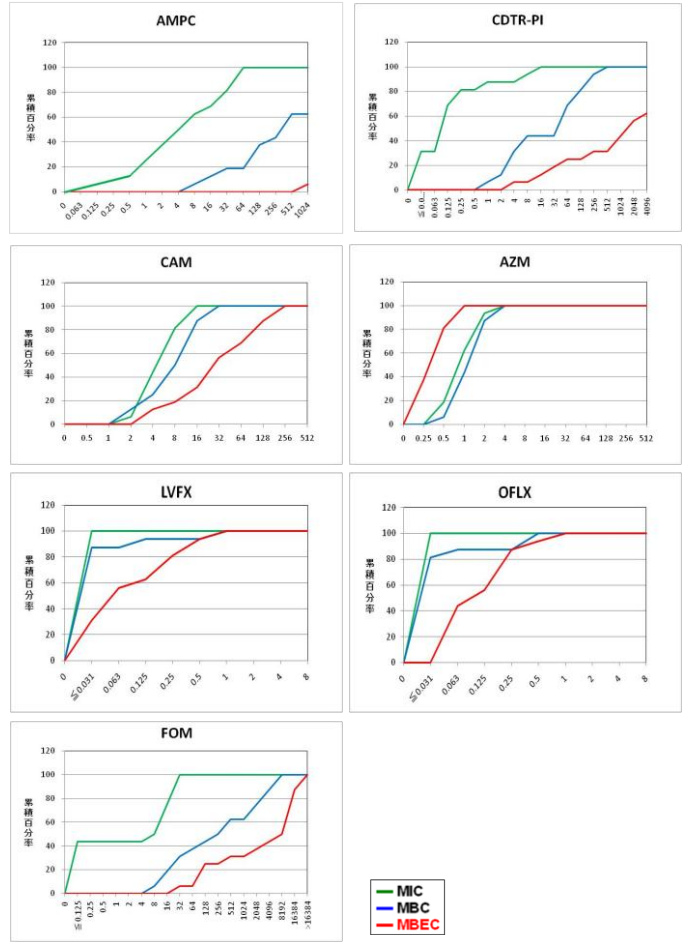
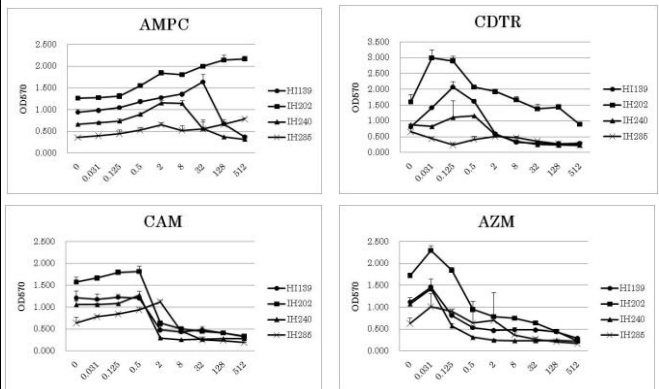


図4 MIC, MBC, MBEC の累積 100 分率

インフルエンザ菌 4 株でのバイオフィームに対する抗菌薬の効果を図5に示す。すべての抗菌薬で容量依存性にバイオフィームを減少させた。しかし、アモキシシリンでは臨床的容量では効果はなかった。クラリスロマイシン、アジスロマイシンといったマクロライド系抗菌薬、レボフロキサシン、オフロキサシンといったニューキノロン系薬は低濃度で効果が認められた。



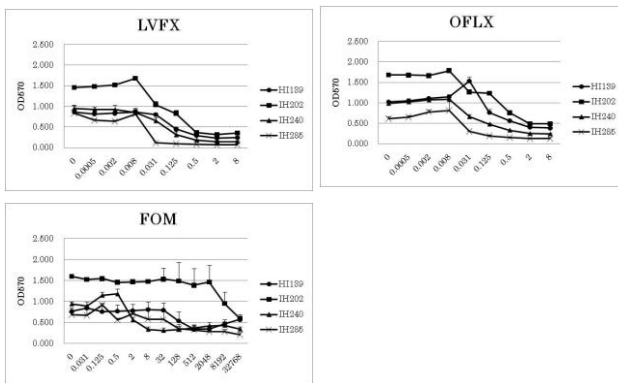


図5 抗菌薬のバイオフィルムに対する効果の定量的検討。

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)

[学会発表] (計7件)

①The 7th International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways
Minimal biofilm eradication concentration of antimicrobial agents against *Haemophilus influenzae* isolated from otitis media.

Shin Takei, Muneki Hotomi, Satomi Moriyama, Akihisa Togawa, Noboru Yamanaka
2010.7.8 Asahikawa, Japan

②第111回日本耳鼻咽喉科学会総会
難治性感染症におけるバイオフィルムの役割と治療に関する研究

竹井 慎、保富宗城、小上真史、河野正充、戸川彰久、山中 昇
2010.5.21 仙台市

③第41回日本小児感染症学会・学術集会
インフルエンザ菌に対する抗菌薬の最小バイオフィルム抑制濃度に関する研究

竹井 慎、保富宗城、戸川彰、山中 昇
2009.11.14 福井市

④第19回 日本耳科学会総会・学術講演会
バイオフィルムに対する点耳抗菌薬の有効性に関する検討

竹井 慎、森山智美、保富宗城、戸川彰、山中 昇
2009.10.8 東京都

⑤第39回日本耳鼻咽喉科感染症研究会
インフルエンザ菌に対する抗菌薬の最小バイオフィルム抑制濃度に関する研究

竹井 慎、戸川彰久、島田 純、保富宗城、山中 昇
2009.9.4 東京都

⑥ The 6th Extraordinary International Symposium on Recent Advances in Otitis Media

Minimal biofilm eradication concentration of antibiotics against *Haemophilus influenzae* isolated from otitis media

Shin Takei, M. Hotomi, S. Moriyama, D. S. Billal, Y. Ikeda, N. Yamanaka
2009.5.6-10, Seoul, Korea

⑦第83回日本感染症学会総会・学術講演会
小児急性中耳炎患児より分離されたインフルエンザ菌のバイオフィルム形成と急性中耳炎の臨床経過の検討

竹井 慎、保富宗城、河野正充、山中 昇
2009.4.23 東京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹井 慎 (TAKEI SHIN)

和歌山県立医科大学 医学部 学内助教
研究者番号：40347589

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：