

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791623

研究課題名（和文） 小児鼻咽腔における肺炎球菌の定量解析と肺炎球菌細菌叢の成立に関する研究

研究課題名（英文） Quantitative analysis and the investigation of the pneumococcal nasopharyngeal colonization in children.

研究代表者

小上 真史（OGAMI MASASHI）

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：90423946

研究成果の概要（和文）：小児急性中耳炎や急性鼻副鼻腔炎において、原因菌として重要な鼻咽腔における肺炎球菌の定量解析をリアルタイム PCR 法を用いて行った。その結果、健康な子供では年齢と鼻咽腔肺炎球菌の菌量は逆相関することが分かった。その反面、上気道感染症においてはその菌量が増加することが分かった。また、日常臨床において、中耳貯留液や鼻汁より迅速に肺炎球菌を検出することができる新しい検査法が有用になりうる事を証明した。

研究成果の概要（英文）：*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) colonized in nasopharynx of children is an important pathogenic bacteria in pediatric acute otitis media and rhinosinusitis. In this study, we performed quantitative analysis of nasopharyngeal *S. pneumoniae* by using real-time PCR method. In the healthy children, the concentration of *S. pneumoniae* showed an inverse relation with the age. On the other hands, the concentration of *S. pneumoniae* in the children with upper respiratory infection was higher than the healthy children. Moreover, we revealed that a new rapid antigen test for detection of pneumococci in middle ear fluids and nasopharyngeal secretions can be an available tool for detection *S. pneumoniae*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,800,000	540,000	2,340,000
23年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：鼻科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、難治性の急性中耳炎、急性鼻副鼻腔炎が増加しており、その原因の一つとして薬剤耐性菌の増加が報告されている。肺炎球菌は鼻咽腔に常在する菌であるとともに、上気道感染症における原因菌の一つであるが、肺炎球菌においてもペニシリン非感性肺炎

球菌の割合が増加しており、日常臨床での大きな問題となっている。

(2) 2000年に米国で7価蛋白結合型肺炎球菌ワクチンが認可され、本邦でも2010年に認可された。すでに米国ではワクチンに含まれる血清型による急性中耳炎の罹患率の減少

や鼻咽腔における肺炎球菌血清型の変化が報告されている。本邦でも鼻咽腔肺炎球菌の血清型の変化や急性中耳炎の罹患率の変化などを調べる必要があり、そのためには現状を把握することが必要である。

(3) 分子生物学的な手法が発達し、近年リアルタイム PCR 法を用いた細菌ゲノムの定量解析が報告されている。この方法を応用し、鼻咽腔における肺炎球菌を定量解析し、従来まで十分な解明がなされずにきた鼻咽腔細菌叢のダイナミズムを定量的に解析できるようになった。

2. 研究の目的

(1) 健常児における鼻咽腔肺炎球菌の菌量を定量解析し、常在細菌叢における肺炎球菌の菌量と年齢の相関関係の検討を行う。

(2) 健常児の鼻咽腔肺炎球菌の菌量と急性中耳炎および急性鼻副鼻腔炎患児の鼻咽腔肺炎球菌の菌量の比較

(3) リアルタイム PCR 法と従来の培養法による肺炎球菌検出率における差異の検討

(4) 培養法、PCR 法、リアルタイム PCR 法による肺炎球菌検出にかかるコスト、時間面における比較

(5) イムノクロマトグラフィー法を用いた肺炎球菌検出キットの臨床における有用性の検討

3. 研究の方法

(1) インフルエンザワクチンを受けに小児科を受診した小児を対象に、急性中耳炎や急性鼻副鼻腔炎がないことを確認し、鼻汁を採取し、その検体から細菌の DNA を抽出して、肺炎球菌をターゲットとしたリアルタイム PCR 法で肺炎球菌の菌量を測定する。その後、年齢群に分けて、菌量と年齢の相関関係を検討する。

(2) 耳鼻科を受診した、急性中耳炎および急性鼻副鼻腔炎患児を対象に、鼻汁を採取し、その検体から DNA を抽出して、リアルタイム PCR 法で肺炎球菌の菌量を測定し、健常児の鼻咽腔肺炎球菌菌量と比較する。

(3) 上記の二つの群から採取した鼻汁検体を塗抹培養し、リアルタイム PCR 法と培養法での検出率の違いを検討する。

(4) 同一検体を用いて、培養法、PCR 法、リアルタイム PCR 法を行い、鼻咽腔の肺炎球菌の存在の有無およびその血清型判定までに

かかるコストおよび時間、費用を比較検討する。

(5) 中耳炎症例 232 例および副鼻腔炎症例 138 例より得られた、中耳貯留液および鼻咽腔ぬぐい液を開発中であったイムノクロマトグラフィー法による肺炎球菌抗原検出キット(ODK-0501)を用いて、肺炎球菌の有無を検討し、培養検査結果と比較することにより感度、特異度、一致率を検討する。さらに、肺炎球菌が検出された症例と検出されなかった症例において、リアルタイム PCR 法での定量比較および培養法での半定量結果との比較を行い、イムノクロマトグラフィーで検出された肺炎球菌が原因菌であるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) インフルエンザワクチンを受けに小児科を受診し、なおかつ急性中耳炎や急性鼻副鼻腔炎が認められなかった 136 名の健常児の鼻咽腔肺炎球菌の菌量をリアルタイム PCR 法で測定した。得られた結果を 1 才毎の年齢群に分けて年齢による菌量変化の検討を行った。その結果、健常児における鼻咽腔肺炎球菌の菌量は年齢と逆相関していることがわかった (図 1)。

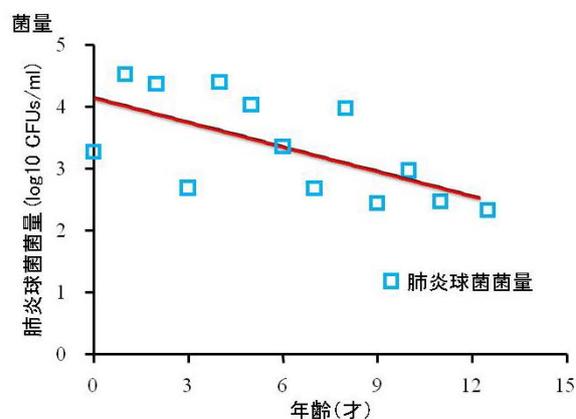


図 1. 健常児における鼻咽腔肺炎球菌の菌量と年齢の関係

(2) 急性中耳炎および急性鼻副鼻腔炎患児 (上気道感染症児) 51 名の鼻咽腔肺炎球菌の菌量をリアルタイム PCR 法で測定した。これ

と同時期に採取した健常児 68 名の鼻咽腔肺炎球菌の菌量と比較したところ、上気道感染症児において、健常児より有意に菌量が高いことが分かった (図 2)。

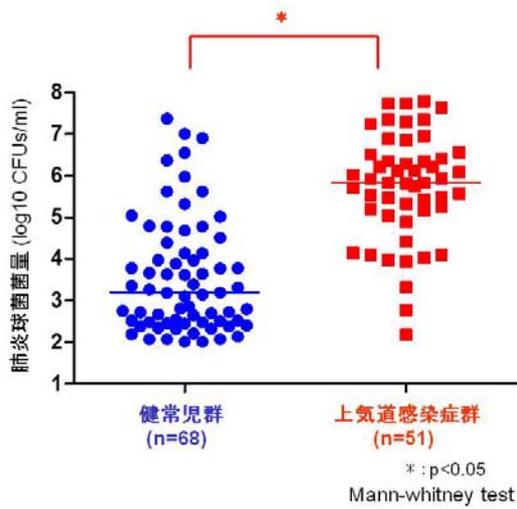


図 2. 健常児と上気道感染症児における鼻咽腔肺炎球菌菌量の比較

(3) 上気道感染症群と健常児群において、同一検体を用いて、培養法とリアルタイム PCR 法にて肺炎球菌の検出率を比較した。健常児では培養法よりリアルタイム PCR 法の方が有意に検出率が高く、リアルタイム PCR 法の感度のよさが原因と考えられた。上気道感染症群では両法で差は認められなかったが、これは上気道感染症群では肺炎球菌の菌量が増加しているため、培養法でも高頻度に検出できるためと考えられた (図 3)。

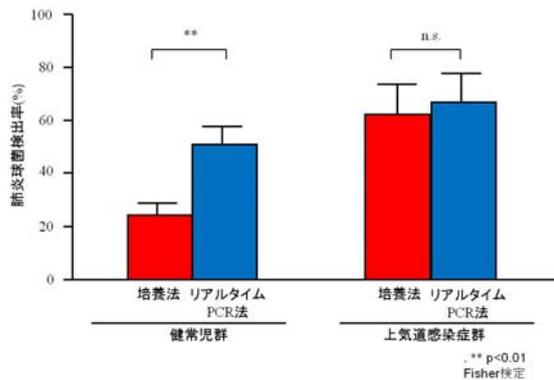


図 3. 健常児群と上気道感染症群における培養法とリアルタイム PCR 法の肺炎球菌検出率の比較

(4) 同一検体において、肺炎球菌の検出および血清型の判定における、培養法、PCR 法、リアルタイム PCR 法の利点、欠点を検討した。培養法は今まで最も用いられてきた検査法であり、生菌しか検出されないという利点があるが、PCR 法やリアルタイム PCR 法と比較して、検査結果が判明するまでに時間がかかり、また血清型判定にもある程度の習熟が必要であること、判定困難な場合、再度検査を行う必要があることから、もっとも時間が必要であった。PCR 法やリアルタイム PCR 法では検査自体に時間はかからず、判定も簡便であるが、検出された肺炎球菌が生菌であるか死菌であるかの判定は不可能であった。また、血清型判定では判明しているプライマーおよびプローブのみの検査しかできないといった欠点があった。

(5) 中耳炎症例 232 例および副鼻腔炎症例 138 例より得られた、中耳貯留液および鼻咽腔ぬぐい液をイムノクロマトグラフィー法によって、肺炎球菌の有無を検討し、培養検査結果と比較することにより感度、特異度、一致率を検討した。イムノクロマトグラフィー法では肺炎球菌の有無が判明するために要した時間は約 25 分であった。培養検査結果と比較すると、中耳貯留液を用いた検討では感度 50.9%、特異度 90.5%、一致率は 81.5%であり、鼻咽腔ぬぐい液を用いた検討では感度 45.3%、特異度 94.2%、一致率は 63.8%であった。また、培養検査の半定量的評価と比較すると、原因菌の可能性が高い、2+、3+の検体ではそれ以下での検体より感度が高くなることが分かった。

また、イムノクロマトグラフィー法では検出された肺炎球菌が原因菌かどうかは判定できない。そこで、イムノクロマトグラフィー法で陽性になった検体と、陰性になった検体をリアルタイム PCR で定量し、その菌量を比較した。イムノクロマトグラフィー法で陽性になった検体では陰性になった検体より、肺炎球菌の菌量が有意に多いことが分かった。以上のことより、イムノクロマトグラフィー法で検出された肺炎球菌は菌量が多く、原因菌となっている可能性が高いことが示唆され、日常臨床で抗菌薬の選択などの際に有用な検査であると考えられた。

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)

①Ogami M, Hotomi M, Togawa A, Yamanaka N.
A Comparison of Conventional and Molecular Microbiology in Detecting Differences in Pneumococcal Colonization in Healthy Children and Children with Upper Respiratory Illness, Eur J pediatr. 査読有、169(10)、2010、1221-5

[学会発表] (計2件)

①Masashi Ogami, Muneki Hotomi, Noboru Yamanaka.

Quantitative serotype determination of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*、

10th International Congress of the European Society of Pediatric Otorhinolaryngology、2010.6.8、Pamplona、Spain.

②小上真史、保富宗城、戸川彰久、田村真司、山中 昇

小児鼻咽腔細菌叢における肺炎球菌のダイナミズムに関する研究、日本耳鼻咽喉科学会総会、2010年5月19日、宮城県、日本

[図書] (計1件)

①小上真史、保富宗城、山中 昇 東京医学社、JOHNS、2010年、6ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小上 真史 (OGAMI MASASHI)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：90423946

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：