様式Ｆ－１９

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成　25　年　6　月　18　日現在

機関番号：24701
研究種目：若手Ｂ
研究期間：　２０１１　～　２０１２
課題番号：23791926
研究課題名（和文）　肺炎球菌とインフルエンザ菌の混合感染時のフェーズ変化と急性中耳炎難治化の研究
研究課題名（英文）　Study of phase variation and intractable acute otitis media at the time of mixed infection of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*

研究代表者
上野　ゆみ（UENO YUMI）
和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：10445091

研究成果の概要（和文）：
急性中耳炎患児において鼻咽腔・中耳という異なった環境下で分離された肺炎球菌 68 株（中耳 37 株、鼻咽腔 31 株）において、中耳貯留液中で Opaque 型肺炎球菌で存在する割合が有意に増加していた。また、PFGE 法を用いて鼻咽腔と中耳に存在する肺炎球菌の遺伝子学的検討をおこなうとそれらは遺伝子学的に同一菌であった。このことから肺炎球菌は感染プロセスにおいて莢膜構造を変化させており、上皮細胞への付着に有利に働く莢膜の薄い Tranparent 型から、病原性が高く莢膜の厚い Opaque 型にフェーズ変化を起こし、鼻咽腔から中耳に適合することで、宿主の免疫防御機能から逃れ急性中耳炎を発症すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：
Pneumococcal phase variation of 37 middle ear and 31 nasopharyngeal isolates obtained from children with acute otitis media was examined in the absence of intervening culture. The fraction of the opaque colonies was significantly higher in middle ear isolates than in nasopharyngeal isolates. We observed the identical PFGE pattern on the strains showing different phase variation pattern in the middle ear fluid and in the nasopharynx.The difference is probably the result of the pneumococci adapting to differential selective environments.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科
キーワード：急性中耳炎　肺炎球菌　インフルエンザ菌　フェーズ変化

１．研究開始当初の背景

従来まで、肺炎球菌は抗菌薬に対して良好な感受性を示していたため、これらが起炎菌となる疾患の臨床経過は良好なものがほとんどであったが、薬剤耐性

肺炎球菌による難治化が注目される一方、起炎菌の薬剤耐性化のみが難治化に関与するのではなく、細菌自体の病原性も大きく関与すると考えられるようになってきた。肺炎球菌はその病原性が非常に強く上気道感染症を引き起こす主役であり、これらは莢膜という頑丈な防御機構を持つのが特徴である。それに対して上気道炎を発症するインフルエンザ菌は肺炎球菌のような莢膜は持たない（無莢膜型）ものが多いが、バイオフィルムを形成したり、細胞内寄生をしたりして宿主の免疫能から逃れようとする。しかし近年ではインフルエンザ菌のみではなく、肺炎球菌もバイオフィルムを形成することが明らかにされ、難治化・遷延化の原因と考えられるようになった。

２．研究の目的

肺炎球菌は髄膜炎のような侵襲性感染症のみならず、急性中耳炎や肺炎などの主要起炎菌であり、同時に小児の鼻咽腔に存在している常在細菌でもある。

1994 年に Weiser は、肺炎球菌が莢膜構造の差により、Transparent 型と Opaque 型の 2 つのコロニー形態を示すことを報告した。すなわち、Transparent 型肺炎球菌は莢膜が薄く、細菌の付着因子の発現が高いために上皮細胞に付着しやすいと考えられ、一方、Opaque 型肺炎球菌は厚い莢膜構造のため、補体結合性が低くオプソニン化後の貪食処理に抵抗を示し、局所組織内に長期に存在することに適していると考えられている。このような肺炎球菌のフェーズ変化が小児の急性中耳炎の病態においてどのような役割を演じているのかはまだ不明である。本研究では急性中耳炎患児において中耳貯留液および鼻咽腔で肺炎球菌のフェーズ変化が存在するかを検討した。

３．研究の方法

肺炎球菌のフェーズ分類について、標準株（TIGR4 株）を基準として Transparent 型、Opaque 型の評価の確立を行った。すなわち TIGR4 株を catarase を含有した Tryptic soy agar 寒天培地（TSA-C 培地）にて 37℃で 16 時間培養した後にフェーズを評価した。フェーズの評価法は実体顕微鏡：オリンパス株式会社製研究用実態顕微鏡システム SZX16-3151 にて 80 倍の拡大鏡下での評価した。肺炎球菌の形態は、莢膜の厚さにより Transparent 型と Opaque 型の 2 つのタイプに分類した。次に急性中耳炎患児の鼻咽腔洗浄液および中耳貯留液より分離される肺炎球菌株におけるフェーズ変化の検討を行うため、まず鼻咽腔および中耳貯留液の細菌培養検査として、採取した検体を滅菌綿棒にてヒツジ血液寒天培地、およびチョコレート寒天培地に塗布し、5％ CO_2 にて 37℃で 20 時間培養を行った後単一コロニーを分離した。肺炎球菌の同定は、ヒツジ血液寒天培地上のコロニーの形態、α溶血およびオプトヒン試験により行った。そこから分離される肺炎球菌株に上記の方法でフェーズの評価を行った。次にこれらの症例を遺伝子学的相同性を示す PFGE 法を用いて検討した。肺炎球菌分離株から 3×10^8 cfu/ml の細菌浮遊液を調整した後、100μl のアガロースを用いプラグを作成した。アガロースプラグを proteinase K にて 52℃で一晩反応させ

DNA を抽出した。その後アガロースプラグを制限酵素 *Sma* I と 18 時間反応させ DNA を断片化した後、0.8%アガロースゲルにて電気泳動（Gene Path system）（日本バイオ・ラッド,東京）を行った。電気泳動条件は、電圧：6 V/cm、角度 120 度、Initial switch time：1 秒、Final switch time：14 秒、泳動時間 18.5 時間とした。断片化した DNA はエチジウムブロマイドで染色した後、検出した DNA バンドパターンを比較した。

４．研究成果

１）肺炎球菌のフェーズ分類について、Transparent 型、Opaque 型の評価の確立が可能となった。

２）急性中耳炎患児の中耳貯留液および鼻咽腔洗浄液より分離される肺炎球菌 68 株の Opaque 型の比率を比較すると中耳由来の肺炎球菌株の Opaque 型の割合が統計学的に有意に高かった。

（図１）肺炎球菌の血清型別には一定の傾向は認められなかった。同一患児から同時に採取した中耳貯留液由来の肺炎球菌と鼻咽腔由来の肺炎球菌の Opaque 型の割合を比較した場合、中耳貯留液由来の肺炎球菌の Opaque 型の割合が有意に上昇していた（図2）

図1. 急性中耳炎患児における肺炎球菌の血清型とフェーズ変化

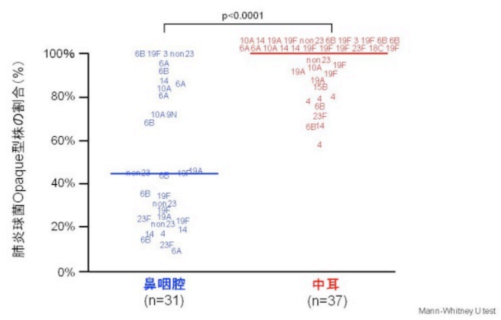
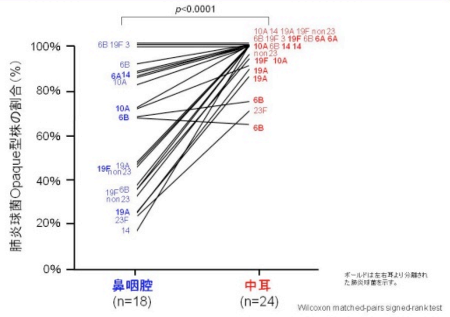


図2. 同一患児より分離された肺炎球菌の血清型とフェーズ変化



PFGE を同一患児から同時に採取した中耳貯留液由来の肺炎球菌と鼻咽腔由来の肺炎球菌株に対して施行した。この検討では各症例間で異なったPFGEのバンドパターンを示したが、各症例の中耳貯留液と鼻咽腔由来の肺炎球菌は高い相同性を示した。

以上よりこれらの症例では鼻咽腔と中耳の菌が遺伝子学的に同一であることが証明された。すなわち同一患児の急性中耳炎症例の中耳と鼻咽腔から分離された肺炎球菌は異なったフェーズ変化を示すことが示され、急性中耳炎患児において鼻咽腔・中耳という異なった環境下で分離されたフェーズの異なった肺炎球菌において、高い遺伝子学的相同性が証明された。このことから肺炎球菌は感染プロセスにおいて莢膜構造を変化させており、上皮細胞への

付着に有利に働く莢膜の薄いTranparent 型から、病原性が高く莢膜の厚いOpaque型にフェーズ変化を起こし、鼻咽腔から中耳に適合することで、宿主の免疫防御機能から逃れ急性中耳炎を発症すると考えられた。本研究では急性中耳炎の初期段階である鼻咽腔粘膜への肺炎球菌の付着に莢膜の形態が関与することが明らかになり、さらに、中耳局所においてその形態を変化させ、病原性を発揮し中耳炎を発症する過程を明らかにすることができたと考えられる。今回肺炎球菌単独感染の病態について詳細な検討をくわえることが可能であったが、インフルエンザ菌との混合感染においては、さらなる検討が必要であり、研究の進展が望まれる。

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０件）

〔学会発表〕（計２件）
１．中耳および鼻咽腔分離肺炎球菌の莢膜フェーズ変化と抗菌薬の作用に関する検討　荒井 潤　保富 宗城　河野 正充　杉田玄　上野 ゆみ 竹井　慎　戸川 彰久　山中 昇
第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会･学術講演会（新潟）２０１２年5月１１日
２．急性中耳炎における肺炎球菌のフェーズ変化に関する検討　荒井 潤　保富 宗城　河野 正充　杉田玄　上野　ゆみ 竹井　慎 山中 昇
第 112 回日本耳鼻咽喉科学会総会･学術講演会（京都）２０１１年5月２０日

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
上野　ゆみ（UENO YUMI）
和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：1044591

(2)研究分担者
（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
（　　）

研究者番号：