

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591495

研究課題名(和文)インフルエンザ菌感染症難治化の要因解析と治療戦略

研究課題名(英文) Analysis of treatment failure and relapse in young children with acute otitis media caused by Haemophilus influenzae

研究代表者

渡邊 浩 (Watanabe, Hiroshi)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：90295080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：繰り返し中耳炎が発症した小児患者から分離されたbeta-lactamase-negative ampicillin-resistant (BLNAR)インフルエンザ菌を用い、薬剤耐性、バイオフィルム及び細胞内侵入の解析を行い、抗生剤による菌体の変化をfocused ion beam (FIB/SEM) システムを用いて観察した。気道上皮細胞表面上の菌だけではなく、細胞内侵入していた菌株も菌体の変形や破裂などの著しい形態変化像が観察され、キノロン系抗生物質であるトスフロキサシンの殺菌作用が高いことが証明され、同剤の小児への使用が難治性小児中耳炎の有効な治療となる可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Drug susceptibility testing, biofilm productions, and the intracellular invasion rate were investigated. Furthermore, human respiratory epithelial cells were previously infected by beta-lactamase-negative ampicillin-resistant Haemophilus influenzae (BLNAR) strains, and the morphological changes of BLNAR strains were observed using a focused ion beam (FIB / SEM) system after the continuous administration of cefotaxime and tosylloxacin. As a result, significant morphological changes, such as deformation and rupture were observed from not only bacteria on the surface of epithelial cells, but those invaded the cells. According to our results, a high bactericidal action of tosylloxacin has been proven, which suggested that it may become an effective agent for treating refractory pediatric otitis media.

研究分野：感染症

キーワード：インフルエンザ菌 感染症難治化 薬剤耐性 バイオフィルム 細胞内侵入 BLNAR

## 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ菌は人の上気道に定着し、時に中耳炎などの耳鼻咽喉科領域感染症、髄膜炎および下気道感染症を引き起こす細菌である。近年、わが国ではβ-lactamase-negative ampicillin-resistant (BLNAR) 株などの耐性菌の増加に伴い、難治例、再燃例が増加している。最近、本菌は細胞内に寄生することが認識されるようになり、我々もインフルエンザ菌が気道上皮細胞上や鼓膜などでバイオフィームを産生することを報告してきた。慢性中耳炎をもつ小児の中耳粘膜の生検により、難治性あるいは遷延化する中耳炎ではバイオフィームの関与が疑われるに至り、本菌感染症難治化には薬剤耐性のみならず、細胞内寄生やバイオフィームなどの他の要因が関わっていることが考えられるようになったが、現時点では難治化の要因は明確にはなっておらず、難治例や再燃例に対する治療方針も定まっていない。そのような背景の下で、インフルエンザ菌感染症難治化の要因を明らかにし、かつ効果的な治療戦略をたてるために本研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、本邦において臨床的に問題となっている BLNAR 株などの薬剤耐性菌を含めたインフルエンザ菌の難治化の要因を薬剤耐性、細胞内寄生およびバイオフィームのそれぞれについて、どの程度難治化の要因となっているかを解析し、かつ治療戦略をたてることである。

## 3. 研究の方法

本研究は久留米大学医療に関する倫理委員会の承認を得て行われた（承認番号：07002）。

(1) 臨床分離株のバイオフィームの産生度について調べた。Blood heart infusion with hemin and NAD (sBHI) をインフルエンザ菌の培養液として使用し、37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件下で一晩培養する。生えた菌液を 1:200 に希釈し、96 穴マイクロプレートに 1 菌種 3 穴ずつ、それぞれ 200μl ずつ接種し、再び 37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件下で一晩培養する。OD<sub>490</sub> を用いて菌の増殖を評価する。1%のクリスタル紫 20μl をそれぞれの穴に加えて、常温で 15 分待つ。蒸留水でプレートを洗浄し、乾燥させる。95%のエタノール 230μl をそれぞれの穴に加える。OD<sub>600</sub> を用いてバイオフィームの増殖を評価する。

(2) インフルエンザ菌の細胞内寄生の評価は Gentamicin killing assay にて行う。単層になった気道上皮細胞 (BEAS-2B 細胞) を含む溶液中にインフルエンザ菌を接種し、37℃、

5%CO<sub>2</sub> の条件下で 4 時間培養する。Gentamicin 200mg/ml を添加し、再び 2 時間をインキュベートする。Triton-X100 で細胞を破壊し、回収できた溶液を寒天平板にコンラージし、一晩培養してから菌数カウントし侵入率を算出する。

(3) FIB/SEM システムにて、視覚的観察を行う。プレート内に cover slip を入れた状態で気道上皮細胞をプレート内で培養し、単層になったところで実験を開始する。発育用の溶液にそれぞれのプレートに菌株を接種し、37℃、5%CO<sub>2</sub> で培養する。抗生剤を一日 2 回、毎回 2 時間投与し、全部で 3 日間に渡って抗生剤の投与を行う。菌発育用の溶液は毎回取り替える。72 時間後に、それぞれのプレートから cover slip を取り出し、2%Osmium 処理をし、エタノールで洗浄した後、FIB/SEM システムを用いて観察する。

## 4. 研究成果

(1) 2006 年 7 月から 2011 年 6 月までに、小児急性中耳炎患者より分離されたインフルエンザ菌株の内、繰り返し中耳炎が発症した患者（再燃患者）から分離された BLNAR 株である Ok-9, Ok-30, 及び Ok-80 株を用い、解析を行った（表 1）。

(2) 薬剤感受性試験結果では、Ok-9, Ok-30, 及び Ok-80 株に対し、全部で 8 種類の抗生剤の最小発育阻止濃度 (μg/ml) を測定した。その内、エリスロマイシン、セフジニル、セフトキシム、ゲンタマイシン及びトスフロキサシンのそれぞれ、0.5, 1, 2, 0.5, 0.03; 4, 0.5, 2, 2, 0.03 及び 0.125, 0.5, 2, 0.06, 0.03 であった（表 2）。

(3) 96 穴マイクロプレートを用い、各菌株のバイオフィーム産生度について調べた。Ok-9, Ok-30, 及び Ok-80 株において、バイオフィーム産生度を評価する OD<sub>600</sub> 値の平均がそれぞれ 2.34, 0.81, 0.68 であった。何れの菌株はバイオフィームを産生する株であることが明らかにされた（表 1）。

(4) Gentamicin killing assay を行い、この 3 株とも細胞内寄生株と判明され、平均細胞内侵入率はそれぞれ 2.9%, 5.44%, 1.86% であった（表 1）。上記の結果より、これらの菌株は強いバイオフィーム産生能を示し、同時に高い細胞内侵入性を有することが示唆された。

(5) in vitro での気道上皮細胞 (BEAS-2B 細胞) への感染実験を行い、また上記の菌株を対象とし、セフトキシム及びトスフロキサシンの投与を行い、抗生剤による菌体の変化を focused ion beam (FIB/SEM) システム

(Quanta 3D FEG, FEI)を用いて観察した。結果として、気道上皮細胞表面上の菌だけではなく、大量の細胞内侵入していた菌株も菌体の变形や破裂などの著しい形態変化像が総合的に観察され、データはFIB/SEMにて動画化された(図1)。今後、小児中耳炎の治療薬剤として承認された各種抗生物質の投与を試み、どのタイプの抗生物質をどのように投与すれば殺菌効果が高いかを培養検査で解析するとともに、FIB/SEM システムを用い、インフルエンザ菌側における形態変化などの比較検討することが期待される。

表1 菌株について

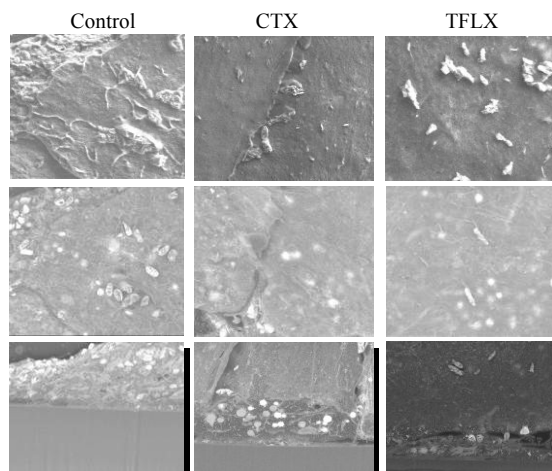
No.	年齢	薬剤耐性型	抗生物質治療	Relapse	判定	BIOFILM (OD <sub>600</sub> )	侵入率 (%)
OK-9	3歳	BLN AR	CDTR	再燃	難治	2.34	2.99
OK-30	3歳	BLN AR	CDTR	再燃	難治	0.81	5.44
OK-80	0歳	BLN AR	AMPC/CVA	再燃	難治	0.68	1.86

表2 薬剤感受性試験成績一覧

Antibiotics	Strains		
	OK-9	OK-30	OK-80
MICs (μg/ml)			
PCG	32	32	>32
CTX	2	2	2
CFDN	1	0.5	0.5
MEPM	0.5	2	1
CAM	32	16	32
TFLX	0.03	0.03	0.03
EM	0.5	4	0.125
GM	0.5	2	0.06

PCG= Penicillin  
 CTX= Cefotaxime  
 CFDN= Cefdinir  
 MEPM= Meropenem  
 CAM= Clarithromycin  
 TFLX= Tosufloxacin  
 EM= Erythromycin  
 GM= Gentamicin

図1 FIB/SEMによる観察



上段より細胞表面、細胞内部(上から)、細胞内部(横から)(12000x)

### 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20件)

- 1) Sakai Y, Naito T, Arima C, Miura M, Qin L, Hidaka H, Masunaga K, Kakuma T, and Watanabe H. Potential drug interaction between warfarin and linezolid. Intern Med, 査読有 54: 459-464, 2015. (DOI: 10.2169/internalmedicine.54.3146)
- 2) 秦 亮, 酒井義朗, 渡邊 浩. 「Biofilm produced Corynebacterium spp. isolated from blood cultures in Japan」 Bacterial Adherence & Biofilm, 査読有 28: 53, 2014. (<http://www.jamas.or.jp/user/database/Search/detail/scode/J03765>)
- 3) Zhou ZY, Hu BJ, Qin L, Lin YE, Watanabe H, Zhou Q, and Gao XD. Removal of waterborne pathogens from liver transplant unit water taps in prevention of healthcare-associated infections: a proposal for a cost-effective, proactive infection control strategy. Clin Microbiol Infect, 査読有 20: 310-314, 2014. (DOI: 10.1111/1469-0691.12299)
- 4) Qin L, Kida Y, Ishiwada N, Ohkusu K, Kaji C, Sakai Y, Watanabe K, Furumoto A, Ichinose A, and Watanabe H. The relationship between biofilm formations and capsule in Haemophilus influenzae. J Infect Chemother, 査読有 20: 151-156, 2014. (DOI:10.1016/j.jiac.2013.06.001)
- 5) Yano H, Yamazaki Y, Qin L, Okitsu N, Yahara K, Irimada M, Hirakata Y, Kaku M, Kobayashi T, and Watanabe H. Improvement rate of acute otitis media

caused by *Haemophilus influenzae* at one week is significantly associated with the time to recovery. *J Clin Microbiol*, 査読有 51: 3542-3546, 2013.  
(DOI 10.1128/JCM.01108-13)

- 6) Uemura Y, Qin L, Gotoh K, Ohta K, Nakamura K, and Watanabe H. Comparison study of single and concurrent administrations of carbapenem, new quinolone, and macrolide against in vitro nontypeable *Haemophilus influenzae* mature biofilms. *J Infect Chemother*, 査読有 19: 902-908, 2013.  
(DOI 10.1007/s10156-013-0598-5)
- 7) Hidaka H, Miura M, Masunaga K, Qin L, Uemura Y, Sakai Y, Hashimoto K, Kawano S, Yamashita N, Sakamoto T, and Watanabe H. Infection control for a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in an advanced emergency medical service center, as monitored by molecular analysis. *J Infect Chemother*, 査読有 19: 884-890, 2013.  
(DOI 10.1007/s10156-013-0587-8)
- 8) Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, and Miyazaki Y. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. *Jpn J Infect Dis* 査読有 66: 51-55, 2013.  
(<http://doi.org/10.7883/yoken.66.51>)
- 9) Qin L, Kida Y, Imamura Y, Kuwano K and Watanabe H. Impaired capsular polysaccharide is relevant to enhanced biofilm formation and lower virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Chemother*, 査読有 19: 261-271, 2013.  
(DOI 10.1007/s10156-012-0495-3)

〔学会発表〕(計 71 件)

- 1) Watanabe H. Infection control for needlestick and sharps injuries. Joint Meeting of the 24rd National Conference on Healthcare-associated Infection Control of Chinese Preventive Medicine Association (CPMA) and the 11th Shanghai International Forum of Infection Control (SIFIC). Xian, China, 2015.6.5.
- 2) 渡邊 浩「ミニシンポジウム 8、熱帯医学と渡航医学の連携～いま何が求められているか、熱帯医学分野からみた渡航医学の必要性」第 55 回日本熱帯医学会大会・第 29 回日本国際保健医療学会学術大会 合同大会、東京女子医科大学(東京都) 2014.11.3.
- 3) 渡邊 浩「ICD 講習会、高齢重症救急患者における感染症対策、高齢重症患者に対する院内感染対策」第 42 回日本救急医学会総会・学術集会、福岡国際会議場(福岡市) 2014.10.30.
- 4) 渡邊 浩「教育講演 8、新興感染症の脅威と対応」第 42 回日本救急医学会総会・学術集会、福岡国際会議場(福岡市) 2014.10.29.
- 5) 秦 亮、酒井義朗、渡邊 浩「Biofilm produced *Corynebacterium* spp. isolated from blood cultures in Japan」第 28 回 Bacterial Adherence and Biofilm 学術集会、都市センターホテル(東京都) 2014.7.9.
- 6) 秦 亮、渡邊 浩「多剤耐性肺炎球菌臨床分離株による biofilm の産生及び関連遺伝子発現への影響についての検討」第 88 回日本感染症学会学術講演会、第 62 回日本化学療法学会総会 合同学会、ヒルトン福岡シーホーク(福岡市) 2014.6.18.
- 7) Watanabe H. Infection control practice in Kurume university hospital. Joint Meeting of the 23rd National Conference on Healthcare-associated Infection Control of Chinese Preventive Medicine Association (CPMA) and the 10th Shanghai International Forum of Infection Control (SIFIC). Tianjin, China, 2014.5.24.
- 8) Qin L. Microbes in hospital environment, and infection control. Joint Meeting of the 23rd National Conference on Healthcare-associated Infection Control of Chinese Preventive Medicine Association (CPMA) and the 10th Shanghai International Forum of Infection Control (SIFIC). Tianjin, China, 2014.5.23.
- 9) Watanabe H. Medical system and infection control system in Japan. Japan-Korea infection control symposium. Fukuoka, Japan, 2013.12.15.
- 10) 秦 亮、酒井義朗、渡邊 浩「中国上海市中病院における *Acinetobacter baumannii* の水平伝播及び薬剤耐性状況についての研究」第 61 回日本化学療法学会西日本支部総会・第 56 回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第 83 回日本感染症学会西日本地方会学術集会共同開催、大阪国際会議場(大阪市) 2013.11.8.
- 11) 酒井義朗、秦 亮、三浦美穂、升永憲治、日高秀信、渡邊 浩「血液培養から分離された *Corynebacterium* spp. についての臨床背景および細菌学的検討」第 61 回日本化学療法学会西日本支部総会・第 56 回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第 83 回日本感染症学会西日本地方会学術集会共同開催、大阪国際会議場(大阪市) 2013.11.6.

- 12) 渡邊 浩「教育セミナー10、MRSA 肺炎を考える；MRSA 肺炎をどのように診断するか」第 62 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 60 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、東京ドームホテル（東京都）2013.10.31.
- 13) 秦 亮、山本太郎、渡邊 浩「中国上海市における市中気道感染症由来インフルエンザ菌の薬剤感受性及び水平伝播についての研究」第 54 回日本熱帯医学会 大会、長崎ブリックホール（長崎市）2013.10.05
- 14) 秦 亮、酒井義朗、日高秀信、升永憲治、渡邊 浩「血液培養由来 Corynebacterium spp. についての細菌学的検討」第 87 回日本感染症学会学術講演会、パシフィコ横浜（横浜市）2013.6.5.
- 15) Qin L, Bao R, Xie H, Sakai Y, Masunaga K, Hidaka H, Miura M, Hashimoto K, Tanamachi C, Hu B, and Watanabe H. Microbiological analysis of Corynebacterium spp. isolated from patients with nosocomial bacteremia. The 6th International Congress of the Asia Pacific Society of Infection Control (APSIC). Shanghai, China, 2013.4.12.
- 16) Watanabe H. keynote lecture 4: Environment disinfection and infection control. Infection control practice for hospital-acquired resistant organisms in Japan. The 6th International Congress of the Asia Pacific Society of Infection Control (APSIC). Shanghai, China, 2013.4.11.
- 17) Watanabe H and Qin L. The relationship between biofilm formation and capsule in Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae. United States-Japan Cooperative Medical Science Program. 16th US-Japan Acute Respiratory Infections Panel Meeting. Singapore, 2013.3.13.
- 18) Qin L「Study of causative pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infections in Shanghai, China」The Forth International Forum for Sustainable Vector Management & the First International Forum for Control of Important Infectious Diseases and Tropical Diseases in Asia-Pacific Region. Haikou, China. 2012.11.27.
- 19) 秦 亮、上村勇作、酒井義郎、渡邊 浩「Gene Expression Relevant to CPS Impaired Streptococcus pneumoniae in Biofilms and Planktonic Conditions」第 55 回日本感染症学会中日本地方会学術集会、第 82 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、第 60 回日本化学療法学会西日本支部総会 合同大会、アクロス福岡（福岡市）2012.11.7.
- 20) Qin L and Watanabe H「Hospital Environmental Microbiology and Nosocomial Infections」The annual joint congress of 21st National Conference on Nosocomial Infection of Chinese Preventive Medicine Association and 8th Shanghai International Forum of Infection Control (SIFIC). Ji'nan, China. 2012.5.25.
- 21) 渡邊 浩「教育講演 8、インフルエンザ菌感染症とバイオフィーム；その治療」第 60 回 日本化学療法学会学術集会、長崎新聞文化ホール（長崎市）2012.4.27.
- 22) 秦 亮、日高秀信、渡邊 浩「肺炎球菌バイオフィーム産生についての臨床的検討」第 60 回 日本化学療法学会学術集会、長崎新聞文化ホール（長崎市）2012.4.27.
- 〔図書〕（計 20 件）
- 1) 渡邊 浩「院内で問題となる微生物と感染症、4 輸入感染症」感染症制御標準ガイド、株式会社じほう、357 頁(49-53)、2014.
- 2) 渡邊 浩「外来で遭遇する日和見感染症・耐性菌感染症：ペニシリン耐性肺炎球菌」インフォームドコンセントのための図説シリーズ、医薬ジャーナル社、76 頁（14-19）、2014.
- 3) 秦 亮、渡邊 浩「病原体別感染症編 II. 細菌感染症 グラム陰性球菌感染症 モラクセラ感染症」日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.24 感染症症候群（第 2 版）94-98, 07.20.2013.
- 4) 秦 亮、渡邊 浩「3 章 細菌感染症：3-2 インフルエンザ菌感染症」感染症事典、オーム社、619 頁（57-62）、2012.
- 〔産業財産権〕
- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）
- 〔その他〕
- ホームページ等  
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/virol/jp/index.html>
6. 研究組織
- (1)研究代表者 渡邊 浩 (Watanabe, Hiroshi)  
 久留米大学・医学部・教授  
 研究者番号：90295080
- (2)研究分担者 秦 亮 (Hata, Ryou)  
 久留米大学・医学部・助教  
 研究者番号：40461404
- (3)連携研究者 なし