

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592556

研究課題名(和文)急性中耳炎難治化に対する肺炎球菌フェーズ変化の抑制による治療戦略に関する研究

研究課題名(英文)Reduction of capsular production of S.pneumoniae in children of acute otitis media

## 研究代表者

戸川 彰久(Togawa, Akihisa)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70305762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：急性中耳炎の重要な起因菌である肺炎球菌には莢膜が薄く、細菌の付着因子の発現が高いとされ、肺炎球菌が上皮細胞に付着することにより有利に働くと考えられるTransparent型と、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するOpaque型がある。今回莢膜多糖体に対するモノクローナル抗体を作成してinhibition assayを行うことにより莢膜多糖体の定量化を実現した。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus pneumoniae, a leading cause of acute otitis media (AOM), undergoes spontaneous intra-strain phase variations such as transparent or opaque in colony morphology depending on the capsular production synthesis. Most isolates of S.pneumoniae are mixed population of transparent and Opaque colony phenotypes. The pneumococcus exhibit spontaneous phase variation between transparent variants with thin capsule and Opaque variants with thick capsule. Sub-MIC levels of clarithromycin reduced the capsule of inter-cellular invaded pneumococci. The effect of clarithromycin against pneumococcal phase variation will suggest that clarithromycin would reduce the virulence of pneumococci

研究分野：感染症

キーワード：肺炎球菌 フェーズ変化 莢膜

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、従来まで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、臨床上的大きな問題となっている。小児急性中耳炎の起炎菌としては、肺炎球菌、インフルエンザ菌、モラクセラ・カタラーリスが3大起炎菌であるが、とりわけ肺炎球菌は病態の重症化に関係している。肺炎球菌は、髄膜炎や敗血症や肺炎のような全身性・侵襲性感染症および急性中耳炎や急性鼻副鼻腔炎の重要な起炎菌であるとともに、幼小児期の鼻咽腔に広く存在している常在細菌でもある。従来まで肺炎球菌は、ペニシリン経口菌薬に良好な感受性を示したため、急性中耳炎の臨床経過は良好なものであった。しかし近年、PISP(penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae) や PRSP(penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae) などの薬剤耐性肺炎球菌の急増が問題となり、特に肺炎球菌が頻回に検出される2歳以下の乳幼児において、急性中耳炎の難治化さらにはその治療に大きな問題が生じるようになった。急性中耳炎の臨床経過を起炎菌別に検討した結果では、肺炎球菌性中耳炎は、他の細菌が起炎菌である急性中耳炎に比較して初診時における臨床症状および鼓膜所見が重症である場合が多い。すなわち、肺炎球菌による急性中耳炎の臨床経過は重症を示すことが多く、遷延化すると考えられる肺炎球菌は急性中耳炎に重要な起炎菌であり、近年の薬剤耐性化による急性中耳炎の難治化が問題となっている。肺炎球菌は病原性が強いことが特徴であり、その主な病原因子としては肺炎球菌の表面を覆う莢膜に由来すると考えられている。1994年に Weiser らは肺炎球菌が莢膜の形成度の差により、Transparent 型と Opaque 型の2つのコロニー形態を示すことを報告している。肺炎球菌は、莢膜構造を変化させることにより(フェーズ変化)、病原性を変化させるが、その臨床的意義は十分に検討されていない。

2. 研究の目的

肺炎球菌は病原性が強いことが特徴であり、その主な病原因子としては肺炎球菌の表面を覆う莢膜に由来すると考えられている。1994年に Weiser らは肺炎球菌が莢膜の形成度の差により、Transparent 型と Opaque 型の2つのコロニー形態を示すことを報告している(Weiser JN et al. Infect Immun. 62:2582-9 1994)。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への付着に有利と考えられる一方、Opaque 型肺炎球菌は厚い莢

膜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すことで、局所組織内に長期に存在することに有利に働くと考えられる(図2・図3)。しかし、このような肺炎球菌の変化(フェーズ変化)が、急性中耳炎の病態にどのように関与しているかについては十分に解明されていない。

急性中耳炎の発症機序は、鼻咽腔に生着した肺炎球菌が経耳管的に中耳腔に感染し発症すると考えられる。我々はこれまでに、肺炎球菌のフェーズ変化が経耳管感染の過程においてどのようにおこるのか検討してきた。本研究では、教室の今までの研究成果を踏まえ、肺炎球菌の莢膜構造の変化であるフェーズ変化に注目し、鼻咽腔および中耳腔といった環境因子の肺炎球菌フェーズ変化に与える影響を検討することで肺炎球菌性中耳炎の遷延化機序を明らかにすると共に、病原性を考慮した抗菌薬治療すなわち、抗菌薬による肺炎球菌フェーズ変化の抑制効果について解明し、遷延化する肺炎球菌に対する新しい治療戦略を構築したい。**平成 24 年度**には、肺炎球菌を様々な培養条件でおこなうことで、環境変化に対応し肺炎球菌がどのようにフェーズ変化するかについて invitro での検討をおこなう。さらにヒト培養上皮細胞を用い、上皮細胞に付着した肺炎球菌と培養液に浮遊した肺炎球菌のフェーズ変化を比較検討する。また、平成 24 年では、肺炎球菌のフェーズ変化の定量化すなわち、莢膜多糖体(capsular polysaccharide)特異的モノクローナル抗体を作成し、inhibition ELISA 法による莢膜量の定量化を確立する。**平成 25 年度以降**には、肺炎球菌のフェーズ変化について、肺炎球菌標準株 Tiger4 株(血清型 4 型)、L82016 株(6B 型)、EF3030 株(血清型 19F 型)を用いて、抗菌薬による肺炎球菌のフェーズ変化への影響について invitro での検討を行う。また、肺炎球菌の増殖時期すなわち緩やかな増殖・環境への適応時期である対数前期増殖期(Early log phase)および活発な増殖・代謝活性の最も高い対数中期期(Mid log phase)の2つの時点でのフェーズ変化について比較検討を行う。平成 26 年度には、平成 24 年度および 25 年度に得られた知見をもとに、マウス感染モデルを用いて、抗菌薬による in vivo での肺炎球菌フェーズ変化の抑制と肺炎球菌感染の経時的変化について検討し、抗菌薬によるフェーズ変化の抑制効果について in vivo での検討を行う。本研究は、急性中耳炎の中耳貯留液内での肺炎球菌のフェーズ変化が引き起こされる要因と、抗菌薬の肺炎球菌フェーズ変化への影響について検討することにより、肺炎球菌による急性中耳炎の難治化の病態を解明すると共に、肺炎球菌の莢膜すなわち病原性をコントロールする抗菌薬作用についての知見を得ることで、難治化する急性中耳炎に

対する新しい治療の開発に寄与することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、鼻咽腔および中耳腔といった環境因子の肺炎球菌フェーズ変化に与える影響と抗菌薬による肺炎球菌フェーズ変化の抑制効果について検討する。まず肺炎球菌のフェーズ変化について温度、pHといった環境因子による影響について in vitro での検討を行うとともに、フェーズ変化とヒト培養上皮細胞への付着についての検討を行う。さらに、肺炎球菌標準株を用い肺炎球菌の増殖とフェーズ変化への抗菌薬の影響について検討する。さらに、マウス感染モデルを用い、抗菌薬による肺炎球菌フェーズ変化への影響について in vivo での検討をおこなった。近年、薬剤耐性肺炎球菌の急増と急性中耳炎の遷延化・反復化といった難治化が日常臨床において大きな問題となっている。とりわけ肺炎球菌性中耳炎は重症であることが多く、遷延化する傾向が強いとされ、効果的な抗遷延化治療法および遷延化対策の確立が望まれている。このような肺炎球菌性中耳炎の特徴を、従来までの起炎菌種の違いにのみよる評価から、肺炎球菌の病原性に着目した点が本研究の特色である。とりわけ、肺炎球菌における主要な病原因子である莢膜量の変化に着目し、感染時における莢膜の変化と遷延化の病態を解明する試みは、極めて独創的である。本研究は肺炎球菌の莢膜が抗菌薬や環境の変化によって減弱することが可能であることを示すことで、従来まで難治化する感染症に対して新鋭い抗菌薬の開発に向けられていた視点を大きく変化させ、現存の抗菌薬を効果的に使用することで病原性より見た感染症治療を試みる点で、極めて独創的である。また、このような抗菌薬治療の新しい評価を行うことは、今後の医療費の増加を抑制する上においても極めて重要であり、医療経済学的にもその意義は大きいと考える。

### 4. 研究成果

急性中耳炎患児において中耳貯留液由来と鼻咽腔由来の肺炎球菌における opaque 型の割合を比較すると中耳貯留液由来の opaque 型の割合が統計学的に有意に上昇していた。肺炎球菌の血清型別も調べたが、この結果には血清型による差は見られなかった。Pulse-field gel electrophoresis (PFGE) 法による検討では各症例間で異なったバンドパターンを示したが個別症例での中耳貯留液と鼻咽腔の比較をすると肺炎球菌のバンドは高い相同性を示した。ま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 opaque 型の割合を比較した場合、中耳貯留液由来の肺炎球菌 opaque 型の割合が有意に上昇していた。今後肺炎球菌による急性中耳炎の治療においてこのフェーズの変化させることができれば有効な治療が可能になると考えられる。

## 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 4 件)

1. 肺炎球菌性中耳炎における病原性因子の発現と抗菌薬の影響. 武田早織、平岡政信、山内一真、戸川彰久、保富宗城、山中昇. 第 3 回日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会. 2015.9
2. 肺炎球菌ワクチンと新規抗菌薬は小児急性中耳炎にどのような影響を与えているか. 戸川彰久、保富宗城、河野正充、池田頼彦、山中昇. 第 116 回日本耳鼻咽喉科学会総会. 2015.5
3. クラリスロマイシンの肺炎球菌のフェーズ変化に与える影響の検討. 武田早織、保富宗城、河野正充、山内一真、戸川彰久、山中昇. 第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会. 2014.5
4. 急性中耳炎患児における肺炎球菌の莢膜フェーズ変化と抗菌薬の使用に関する検討. 荒井潤、保富宗城、杉田玄、上野ゆみ、竹井慎、戸川彰久、山中昇. 日本耳鼻咽喉科感染症エアロゾル学会. 2013.5

〔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

戸川彰久 (Akihisa Togawa )  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70305792

(2)研究分担者

山中昇 (Noboru Yamanaka)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10136963

池田頼彦 (Yorihiko Ikeda)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20423949

小上真史 (Masashi Ogami)  
和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：90423946

(3)連携研究者

( )

研究者番号：