

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462565

研究課題名(和文) インフルエンザ菌バイオフィームに対する抗菌薬の薬物動態についての研究

研究課題名(英文) effect of antibiotics against biofilm formation of H.influenzae

研究代表者

竹井 慎 (Takei, Shin)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：40347589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：無莢膜型インフルエンザ菌はバイオフィームを作り、急性中耳炎を難治化させる要因となっている。今回我々はバイオフィーム内の細菌に対する抗菌薬の効果を検討したバイオフィーム形成後の経過に伴う抗菌薬効果の変化について検討した。浮遊菌に比べてバイオフィーム状態の細菌ははるかに強い抗菌薬抵抗性を示し、アモキシシリン(AMPC)添加ではMIC以上の濃度でも抗菌作用を示さなかった。クラリスロマイシン(CAM)は抗バイオフィーム作用を示した。CAMの併用効果を検討した。小児急性中耳炎患児に対してAMPC単独治療群とAMPC/CAM併用群とで治療効果を検討したところCAM併用群は主治医判定で治癒率が高くなった。

研究成果の概要(英文)：Haemophilus influenzae(HI)is one of major causative pathogens of acute otitis media(AOM)and biofilm formation of nontypeable HI cause intractable AOM. We investigated effect of antibiotics against HI in vitro. amoxicilin(AMPC) did not show bacteriocidal effect at concentration over MIC but Clarithromycin(CAM) showed anti biofilm effect . We also investigated effect of concurrent therapy of CAM and AMPC against moderate AOM patients. group A is treated with AMPC, and group B was treated AMPC and CAM concurrently. group B showed significantly better effect with judgement of ENT clinicians.

研究分野：感染症

キーワード：インフルエンザ菌 バイオフィーム 急性中耳炎 抗菌薬

1. 研究開始当初の背景

急性中耳炎は、小児が高頻度に罹患する代表的な上気道の感染症であり、鼓膜の痛みが主症状で、38~39 の高熱を伴うことも多い疾患である。感染症の重要な起炎菌として肺炎球菌とインフルエンザ菌などが挙げられることから、本疾患の治療には、主としてアモキシシリン（以下、AMPC）を使用した治療が行われている。しかし一方で、本疾患の特徴として症状が反復したり遷延化したりして罹患が長期化することが多い。

その一つの原因として無莢膜型インフルエンザ菌がバイオフィームを作り、急性中耳炎を難治化させている。バイオフィームは細菌が作り出す粘性の物質であり、生体内ではほとんどすべての細菌がバイオフィームを形成していると考えられている。バイオフィームにより細菌は抗菌薬の殺菌作用から逃れたり、免疫・貪食細胞などから身を守ることにより感染症の難治化・遷延化に強く影響を及ぼしている。AMPC に感受性のあるインフルエンザによる急性中耳炎においてバイオフィームを形成しているインフルエンザ菌による中耳炎は非形成インフルエンザよりも有意に非改善例が多い(Moriyama 2009)。臨床の現場での抗菌薬の効果の指標としては MIC（最小発育阻止濃度）値が用いられることが多いがこの値は浮遊菌を目標としているため細胞内に侵入している菌やバイオフィームで守られている菌が存在する臨床上乘離が生じることもあるため完全な指標とはなりにくい。よってこれからの感染症に対しては MIC 以外の指標も考慮した戦略をもって対応してゆかなければならない

クラリスロマイシン（以下 CAM）はマクロライド系抗菌薬であり、急性中耳炎に対する耐性率が高く、抗菌作用を期待しての使用は難しいがそれ以外の免疫修飾作用、抗バイオフィーム作用などが報告されている。

2. 研究の目的

我々はまず小児急性中耳炎患児から分離されたバイオフィーム内の細菌に対する抗菌薬の効果を実験室で検討した。今回抗菌薬としては AMPC および CAM を使用した。CAM は肺炎球菌の病原因子である莢膜を菲薄化させ、インフルエンザ菌の産生するバイオフィーム形成を抑制することにより中耳炎の病態を改善する可能性が示唆される。また臨床的に急性中耳炎の治療に従来の AMPC を中心とした治療に CAM の併用効果があるかどうか臨床的に検討を行った。

3. 研究の方法

小児急性中耳炎症例から分離された無莢膜型インフルエンザ菌を培養してバイオフィームを形成させた。インフルエンザ菌を 96 ウェルプレートおよび 96 ピンカバーを用い培養しピンカバー上にバイオフィームを形成した。ピンカバーを移動させそこに段階希釈した抗菌薬を加えた。PBS で洗浄して浮遊菌を除去した後さらに培養を行い、クリスタルバイオレット法で、バイオフィーム内の細菌を殺菌する最小抗菌薬濃度を最小バイオフィーム抑制濃度 (minimal biofilm eradication concentration: MBEC) として評価した

一方、臨床的に急性中耳炎患児における AMPC と CAM の併用効果を調べるために研究を行った。小児急性中耳炎ガイドライン 2013 年版で中等症の小児中耳炎と診断された患児、すなわち急性中耳炎において症状スコアと鼓膜スコアの合計点が 6 点から 11 点までの症例を AMPC 治療群 (AMPC 治療群; AMPC 70 mg/kg/日, 5 日間投与) と治療開始時から CAM を 3 日間併用した群 (CAM/AMPC 治療群; CAM 15mg/kg/日 3 日間投与 + AMPC 70 mg/kg/日, 5 日間投与) に無作為割り付けで分けて中耳炎の症状スコアと、急性鼻副鼻腔炎合併例では、その症状スコアの比較検討を行った。

4. 研究成果

バイオフィルム形成後の経過に伴う抗菌薬効果の変化について検討した。浮遊菌に比べてバイオフィルム状態の細菌ははるかに強い抗菌薬抵抗性を示し、AMPC 添加ではMIC以上の濃度でも抗菌作用を示さなかった。一方CAMを添加したインフルエンザ菌では抗バイオフィルム作用を示した。CAMは肺炎球菌の病原因子である莢膜を菲薄化させ、インフルエンザ菌の産生するバイオフィルム形成を抑制することで急性中耳炎の病態を改善する可能性が示されたため、CAM併用群は主治医判定で治癒率が高い結果となった。

また、安全性解析対象集団146例(CAM/AMPC治療群:72例, AMPC治療群:74例)に対して、集計解析を実施した結果、有害事象(発現率:CAM/AMPC治療群19.4%, AMPC治療群21.6%), 副作用(発現率:CAM/AMPC治療群4.2%, AMPC治療群1.4%)ともに両群間に有意差は認められなかった。

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 2件)

1. Initial exposure to sub-MIC levels of macrocodes reduces biofilm of nontypeable *Haemophilus influenzae* isolated from acute otitis media. Togawa A, Hiraoka M, Sugita G, Kono M, Takei S, Takeda S, Yamanaka N, Hotomi M. *Folia microbiologica*. In submission
2. Antimicrobial effect of tosufloxacin for eradicating biofilm forming otopathogenic nontypeable *Haemophilus influenzae* Akihisa Togawa, Sugita G, Hiraoka M, Kono M, Yamanaka N, Hotomi M. *Folia microbiologica*. In submission

〔学会発表〕(計 7件)

1. 戸川彰久. クラリスロマイシンとアモキシシリンの併用療法による小児急性中耳炎および急性鼻副鼻腔炎の治療効果. 第1回和歌山耳鼻咽喉科臨床フォーラム, 平成28年12月17日, 和歌山
2. 戸川彰久, 山中昇, 内園明裕, 宇野芳史, 上出洋介, 兼定啓子, 國本優, 澤田正一, 新谷朋子, 鈴木聡明, 杉田麟也, 福島邦博, 松原茂規, 保富宗城. 小児急性中耳炎に対するクラリスロマイシン・アモキシシリン併用療法の有効性の検討. 第4回日本耳鼻咽喉科感染症エアロゾル学会, 平成28年9月2日-3日, 倉敷
3. 戸川彰久, 保富宗城. 小児中耳炎に対するクラリスロマイシン・アモキシシリン併用療法の有効性の検討. マクロライド新作用研究会 平成28年7月29日-30日 東京
4. 戸川彰久. 小児急性中耳炎患児に対するクラリスロマイシン・アモキシシリン併用療法の検討. 第64回日本化学療法学会総会, 平成28年6月9日-11日 神戸
5. 戸川彰久, 保富宗城, 平岡政信, 山中昇. 難治性感染症に対する抗菌薬併用療法. 第12回和歌山感染症・アレルギーフォーラム: 平成28年4月2日. 和歌山
6. 戸川彰久, 内園明裕, 宇野芳史, 上出洋介, 兼定啓子, 國本優, 澤田正一, 新谷朋子, 鈴木聡明, 杉田麟也, 福島邦博, 松原茂規, 保富宗城, 山中昇. 小児中耳炎に対するAMPC/CAMコンビネーション治療の可能性. URIEM 平成27年8月1-2日 東京
7. 戸川彰久, 内園明裕, 宇野芳史, 上出洋介, 兼定啓子, 國本優, 澤田正一, 新谷朋子, 鈴木聡明, 杉田麟也, 福島邦博, 松原茂規, 保

富宗城、山中昇．小児急性中耳炎患児に
対するクラリスロマイシン・アモキシシ
リン併用療法の検討．第117回日本耳鼻
咽喉科学会総会．平成27年5月18-21

日 名古屋

〔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

竹井 慎 (Shin Takei)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：40347589

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()