

機関番号：24701
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791638
 研究課題名（和文）
 肺炎球菌性中耳炎における細菌のフェーズ変化と重症化病態の解明
 研究課題名（英文）
 Clarification of phase variation and severity of *Streptococcus pneumoniae* with acute otitis media.
 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）：

急性中耳炎患児より得られる鼻咽腔および中耳貯留液から分離される肺炎球菌株において catalase 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、フェーズを評価すると、肺炎球菌は中耳貯留液中で Opaque 型で存在する割合が有意に増加していた。さらに PFGE 法を用いて 3 症例の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。

研究成果の概要（英文）：

The rate of opaque-phase strains *S. pneumoniae* isolated from middle ear fluids of pediatric patients with acute otitis media were highly variable than that from nasopharynx. We evaluated clinical isolates from three cases with acute otitis media regarding to the phase variation and clonality of strains isolated from middle ear fluids and nasopharyngeal swabs. We observed the identical PFGE pattern on the strains showing different phase variation pattern in the middle ear fluid and in the nasopharynx.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：急性中耳炎、肺炎球菌、フェーズ変化

1. 研究開始当初の背景

急性中耳炎は乳幼児期に最も頻回に罹

患する細菌感染症の一つであり、3歳までに約70%の小児が本疾患に罹患すると考えられている。肺炎球菌は、急性中耳炎をはじめとする非侵襲性の上気道感染症から重症肺炎や髄膜炎などの致死性侵襲性感染の起炎菌となる。とりわけ、急性中耳炎菌肺炎球菌による代表的な起炎菌であり、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急性中耳炎を発症すると考えられている。肺炎球菌は、従来まで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、1996年頃より、本邦において肺炎球菌の薬剤耐性化すなわちペニシリン耐性肺炎球菌が急増するにともない、急性中耳炎の臨床像が大きく変化した。現在では肺炎球菌臨床株の約40%が多剤耐性を示すのが現状であり、肺炎球菌が最も頻回に検出される2歳以下の乳幼児において、経口抗菌薬治療に十分に反応しない薬剤耐性難治性中耳炎あるいは急性乳様突起炎に進展する症例が増加しており、日常臨床における大きな問題となっている。このような急性中耳炎の難治化には、これまで起炎菌の薬剤耐性化のみが注目されてきたが、細菌自体の病原性も大きく関与すると考えられる。急性中耳炎の臨床経過を起炎菌別に見た場合には、肺炎球菌では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く、急性中耳炎の臨床経過が他の細菌と比較した場合遷延化・難治化

する。肺炎球菌の病原性について、1996年に Weiser らは、肺炎球菌は莢膜構造の差により2つのコロニー形態を示すことを報告している。すなわち、莢膜構造が薄く、透光性の高い Transparent 型コロニーと、莢膜構造が厚く、透光性の低い Opaque 型コロニーに分類される。Opaque 型肺炎球菌は、その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すとともに、局所組織内に長期に存在することに適する。一方、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。このように、肺炎球菌は鼻咽腔に定着することで、様々な感染症の引き金となり、鼻咽腔は感染症の carrier focus(感染源)であるといえる。

2. 研究の目的

Weiser らの報告によると Transparent 型と Opaque 型の肺炎球菌はフェーズ変化があるとされる。マウス新生児では Transparent 型のみが鼻咽腔にコロニー形成し Opaque 型ではコロニー形成がない。また、マウス敗血症モデルの50%致死率ではどちらの型を腹腔内投与しても有意な差は発生しない。Opaque 型では嫌気下で細菌の発達が強い。敗血症患者を調べると鼻咽腔では89%が Transparent 型、血液中では63%が

Opaque 型で存在していると報告されている。しかし、急性性中耳炎患児でのフェーズ変化の報告はなく、本研究では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ことを目指した。

3. 研究の方法

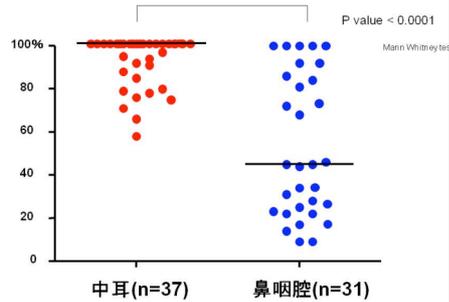
肺炎球菌のフェーズ分類について、標準株(TIGR4 株)を基準として Transparent 型、Opaque 型の評価の確立を行った。すなわち TIGR4 株を *catarase* を含有した Tryptic soy agar 寒天培地(TSA-C 培地)にて37°Cで16時間培養した後にフェーズを評価した。フェーズの評価法は実顕微鏡:オリンパス株式会社製研究用実顕微鏡システムSZX16-3151にて80倍の拡大鏡下での評価した。肺炎球菌の形態は、莢膜の厚さにより Transparent 型と Opaque 型の2つのタイプに分類した。次に急性中耳炎患児の鼻咽腔洗浄液および中耳貯留液より分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% CO₂にて37°C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同一性を

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°C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)

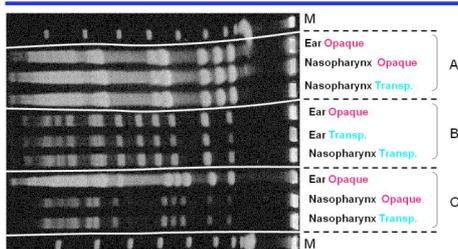
図1 中耳・鼻咽腔由来の肺炎球菌Opaque型の割合



3) PFGEをA,B,Cの3症例から得られた菌株に対して施行した。その結果から症例Aの中耳由来のOpaque型、鼻咽腔洗浄液由来のOpaque型、鼻咽腔洗浄液由来のTransparent型は遺伝子学的に同一であった。症例Bからの中耳由来のOpaque型、中耳由来のTransparent型、鼻咽腔洗浄液由来のTransparent型は遺伝子学的に同一であった。さらに症例Cからの中耳由来のOpaque型、鼻咽腔由来のOpaque型、鼻咽腔由来のTransparent型も遺伝子学的に同一であった。

(図2)

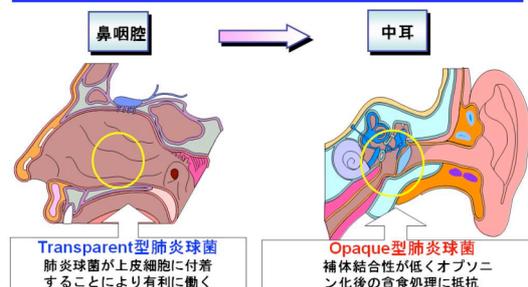
図2 中耳・鼻咽腔由来肺炎球菌において、同一の菌株がフェーズ変化を示しているかをPFGEパターンにより検討



以上よりこれら3症例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た。

肺炎球菌は、莢膜構造を変化させることで肺炎球菌が上皮細胞に付着することにより有利に働くTransparent型から補体結合性が低く、オプソニン化後の貪食処理に抵抗するOpaque型にフェーズ変化を起こし、鼻咽腔から中耳に適合し、巧妙に宿主の免疫防御機能から逃れ急性中耳炎を発生すると示唆された(図3)。

図3 鼻咽腔と中耳腔(感染状態)において肺炎球菌がフェーズ変化を起こしている



本研究にて、感染の初段階である鼻咽腔粘膜への細菌の付着から定着に莢膜が関与することが明らかになった。さらに、肺炎球菌が局所において形態を変化させ病原性を発揮する点を明らかにすることが可能であった。

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 1 件)

- ①Arai J, Hotomi M, Hollingshead SK, Ueno Y, Briles DE, Yamanaka N. *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Middle Ear Fluid and Nasopharynx of Children with Acute Otitis Media Exhibit Phase Variation. ; J Clin Microbiol. Apr;49(4):1646-9. 2011 査読あり

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：10445091

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：