

平成 30 年 10 月 24 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10757

研究課題名(和文)急性中耳炎治療における肺炎球菌フェーズ変化と治療への応用

研究課題名(英文)Pneumococcal phase change in acute otitis media treatment and its application to therapy

研究代表者

戸川 彰久(togawa, akihisa)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：70305762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、*in vitro*実験系として、肺炎球菌株L82016、EF3030、TIGR4を用いて肺炎球菌の増殖とフェーズ変化、莢膜量におよぼす抗菌薬の影響についてinhibition ELISAで検討した。共培養系を用いて上皮培養細胞へ感染した肺炎球菌の組織侵入とフェーズ変化を観察した。
*vivo*実験系として、まずOpaqueおよびTransparent型固定株を用い、CBA/Nマウス鼻咽腔へ接種し、鼻咽腔への定着と宿主の免疫応答の検討を行った。次に、先の基準株3株をBalb/c byjマウスへ経鼻摂取し、各解剖学的部位に応じた定着とフェーズ変化を検討し、抗菌薬のフェーズ変化への影響も評価した。

研究成果の概要(英文)：In this study, the inhibition ELISA examined the effect of antibiotics on pneumococcal growth, phase change and capsule volume using pneumococcal strains L82016, EF3030, and TIGR4 as a *in vitro* experimental system. Tissue invasion and phase change of pneumococcus infected into epithelial cultured cells was observed using co-culture system.
As a *vivo* experimental system, Opaque and Transparent type fixed strains were first used and inoculated into the nasopharyngeal cavity of CBA / N mouse to study the establishment in the nasopharynx and the host immune response. Next, 3 strains of the above reference strains were intranasally ingested into Balb / c byj mice, and fixation and phase change corresponding to each anatomical site were examined, and the influence of antimicrobial agents on the phase change was also evaluated.

研究分野：感染症

キーワード：肺炎球菌 急性中耳炎 莢膜

1. 研究開始当初の背景

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、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ことが知られているが、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

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、肺炎球菌のフェーズ変化を抑制することで遷延化する肺炎球菌感染症の新たな治療につながる事が期待できる。

3. 研究の方法

まず肺炎球菌莢膜の定量のために莢膜多糖体に対するモノクローナル抗体を作成し、inhibition assayにて定量化も行った。また、浮遊菌でのフェーズ変化がどのような環境で起こるかに関して検討を行った。

また肺炎球菌のフェーズ変化は莢膜構造の変化によるため肺炎球菌血清型は、フェーズの変化に大きな影響を及ぼすと考える。急性中耳炎患児から得られた肺炎球菌の血清型は変化に富むことが知られており、血清型別に見た抗菌薬のフェーズにおける影響の検討を行った。本実験では、各血清型の培養条件を統一する必要があるため、臨床検体より分離同定された肺炎球菌を、C+Y培養液で37℃、5%CO₂下で16時間培養した後にTSA-C培地に塗布し16時間培養した後のフェーズの検討を行った。

肺炎球菌株 L82016 (血清型 6B 型)、EF3030 (血清型 19F 型)、TIGR4 (血清型 4 型)を用いて肺炎球菌の増殖とフェーズ変化、莢膜量におよぼす抗菌薬の影響について検討した。用いる抗菌薬としては、AMPC (アモキシシリン)単独による群および、AMPCにクラリスロマイシン (CAM)、アジスロマイシン (AZM)などのマクロライド系抗菌薬およびニューキノロン系抗菌薬のレボフロキサシン (LVFX)を加えて添加したものを比較した。

肺炎球菌と Detroit562 細胞との供培養系で樹立された Opaque および Transparent 型固定株 (フェーズロック株)を用い、肺炎球菌に易感染性を示す CBA/N マウス鼻咽腔へ接種した後の宿主免疫応答について検討した。すなわち、Opaque 株、/Transparent 株をそれぞれ経鼻腔接種した 1~28 日後にマウスを屠殺し、鼻咽腔洗浄液、鼻粘膜組織、嗅球、大脳および血液を採取し、経時的な肺炎球菌コロニー数の検討を行った。また同時に、血清中の type IFN および TNF、IL-10 の測定を ELISA 法で行なうとともに、各フェーズロック株の鼻咽腔への定着と宿主の免疫応答

の検討を行った。鼻汁および血清をウエスタンブロットで肺炎球菌破砕異物との反応を解析した。

肺炎球菌株 L82016 (血清型 6B 型)、EF3030 (血清型 19F 型)、TIGR4 (血清型 4 型)を用いて肺炎球菌の増殖とフェーズ変化、莢膜量におよぼす抗菌薬の影響について検討した。用いる抗菌薬としては、AMPC (アモキシシリン)単独による群および、AMPCにクラリスロマイシン (CAM)、アジスロマイシン (AZM)などのマクロライド系抗菌薬およびニューキノロン系抗菌薬のレボフロキサシン (LVFX)を加えて添加したものを比較した。

肺炎球菌と Detroit562 細胞との供培養系で樹立された Opaque および Transparent 型固定株 (フェーズロック株)を用い、肺炎球菌に易感染性を示す CBA/N マウス鼻咽腔へ接種した後の宿主免疫応答について検討した。すなわち、Opaque 株、/Transparent 株をそれぞれ経鼻腔接種した 1~28 日後にマウスを屠殺し、鼻咽腔洗浄液、鼻粘膜組織、嗅球、大脳および血液を採取し、経時的な肺炎球菌コロニー数の検討を行う。また同時に、血清中の type IFN および TNF、IL-10 の測定を ELISA 法で行なうとともに、各フェーズロック株の鼻咽腔への定着と宿主の免疫応答の検討を行った。鼻汁および血清をウエスタンブロットで肺炎球菌破砕異物との反応を解析した。

マウス (BALB/c byj、6 週齢、メス)に、肺炎球菌 TIGR4 株 (血清型 4 型)、L82016 株 (血清型 6B)、BG7322 株および EF3030 株 (血清型 19F)を至適感染量にて経鼻接種を行う。接種後 2~7 日後にマウスを屠殺し、鼻咽腔洗浄液を採取した。さらに同時に鼻粘膜組織、脳、肺、血液を採取し、それぞれの肺炎球菌コロニー数を階希釈してプレートカウントで評価するとともに、肺炎球菌のフェーズの検討を顕微鏡下で行い、さらに血清型別モノクローナル抗体によって inhibition ELISA 法でも定量的に行った。さらに鼻腔への長期定着すなわち carriage に関するかどうかについて 14~21 日目での評価を行った。

同様の実験をマウスに抗菌薬を経口投与した後に検討し、抗菌薬治療により肺炎球菌のフェーズがどのように変化するかを評価した。

また上皮培養細胞への感染した肺炎球菌のフェーズ変化を調べるために肺炎球菌と上皮細胞の共培養系を作成し細胞間隙に侵入したと推測される菌を観察し、検討を加えた。

4. 研究成果

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について検討を行った。

in vitro 実験系として、肺炎球菌莢膜の定量のために莢膜多糖体に対するモノクローナル抗体を作成し、inhibition assayにて定量化を行った。

次に肺炎球菌株 L82016 (血清型 6B 型)、EF3030 (血清型 19F 型)、TIGR4 (血清型 4 型) を用いて肺炎球菌の増殖とフェーズ変化、莢膜量におよぼす抗菌薬の影響について検討した。

vivo 実験系として、まずは肺炎球菌と Detroit562 細胞との培養系で樹立された Opaque および Transparent 型固定株 (フェーズロック株) を用い、肺炎球菌に易感染性を示す CBA/N マウス鼻咽腔へ接種した後の宿主免疫応答について検討した。各フェーズロック株の鼻咽腔への定着と宿主の免疫応答の検討も行った。

次に、先の基準株 3 株を Balb/c byj マウスへ経鼻摂取し、各解剖学的部位に応じたフェーズ変化を検討した。鼻腔への長期定着すなわち carriage に関するかどうかについては 14~21 日目での評価を行った。同様の実験をマウスに抗菌薬を経口投与した後に検討し、抗菌薬治療により肺炎球菌のフェーズがどのように変化するかを評価した。

最後に、組織侵入とフェーズ変化を検討する vitro 実験系として、上皮培養細胞への感染した肺炎球菌のフェーズ変化を調べるために肺炎球菌と上皮細胞の共培養系を作成し細胞間隙に侵入したと推測される菌を観察した。

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 件)

[学会発表](計 4 件)

1. 2017232413

莢膜変化による肺炎球菌の感染機序とクラリスロマイシンの影響

Author: 武田 早織(和歌山県立医科大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科), 河野 正充, 平岡 政信, 戸川 彰久, 保富 宗城

Source: 日本化学療法学会雑誌 (1340-7007)65 巻 2 号 Page260-261(2017.03)

論文種類: 会議録

シソーラス用語: *Streptococcus pneumoniae; *Clarithromycin(薬理学); *細菌莢膜

2. 2016358557

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

Author: 戸川 彰久(和歌山県立医科大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科), 山中 昇, 内菌 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

Source: 日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会会誌 (2188-0077)4 巻 3 号 Page42(2016.09)

論文種類: 会議録

シソーラス用語: *Amoxicillin(治療的利用); 多剤併用療法; *中耳炎(薬物療法); *Clarithromycin(治療的利用); 多施設共同研究; 治療成績; ランダム化比較試験
チェックタグ: ヒト; 小児(6~12)

3. 2016254872

抗微生物薬の併用療法 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

Author: 戸川 彰久(和歌山県立医科大学 耳鼻咽喉科頭頸部外科), 保富 宗城, 山中 昇

Source: 日本化学療法学会雑誌 (1340-7007)64 巻 Suppl.A Page153(2016.05)

論文種類: 会議録

シソーラス用語: *Amoxicillin(治療的利用); *Haemophilus Infection(薬物療法); 多剤併用療法; *中耳炎(薬物療法); *肺炎球菌感染症(薬物療法); *Clarithromycin(治療的利用)

チェックタグ: ヒト; 乳児(1~23 ヶ月); 幼児(2~5); 小児(6~12)

4. 2016242685

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

Author: 戸川 彰久(和歌山県立医科大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科), 内菌 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

Source: 日本耳鼻咽喉科学会会報 (0030-6622)119 巻 4 号 Page569(2016.04)

論文種類: 会議録

シソーラス用語: *Amoxicillin(治療的利用); 多剤併用療法; *中耳炎(薬物療法); *Clarithromycin(治療的利用); 治療成績
チェックタグ: ヒト; 小児(6~12)

[図書](計 0 件)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 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 (TOGAWA Akihisa)
和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：70305762

(2) 研究分担者

武田早織 (TAKEDA Saori)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：20644090

(3) 連携研究者

平岡政信 (HIRAOKA Masanobu)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：80423945

(4) 研究協力者

()