

平成21年 6月 24日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007年～2008年
 課題番号：19591987
 研究課題名（和文） 小児中耳炎の難治化の病態解明と自然免疫および特異的免疫の賦活に関する研究
 研究課題名（英文） A study of pathogenesis of intractable otitis media and activation of natural and specific immunities against pathogens.
 研究代表者 山中 昇（YAMANAKA NOBORU）
 和歌山県立医科大学・医学部・教授
 研究者番号：10136963

研究成果の概要：急性中耳炎患児から分離された無莢膜型インフルエンザ菌がバイオフィルム形成を行うことが明らかとなり、加えて無莢膜型インフルエンザ菌のバイオフィルム形成が、抗菌薬治療に抵抗し遷延・難治化する急性中耳炎の臨床経過に重要な役割を果たすことが示された。さらに溶連菌の細胞内侵入遺伝子の検討では、sil 遺伝子の発現が12%の株に認められ、抗菌薬治療後の感染再発が上気道粘膜内に侵入した細菌の再活性化による可能性が示唆された。免疫予防の可能性として、肺炎球菌菌株共通抗原である PspA の母体経鼻免疫により、免疫能の未熟な乳幼児期に特異的免疫応答が誘導可能であり、乳幼児期における肺炎球菌感染症の予防方法として有用と考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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（7309）

キーワード：中耳炎、バイオフィルム、自然免疫、特異的免疫、難治化、細胞内侵入、ワクチン

1. 研究開始当初の背景

近年、急性中耳炎の臨床像は大きく変貌しており、経口抗菌薬の治療にも関わらず改善しない遷延例や反復例といった難治例が増加し、日常臨床において大きな問題となっている。このような変貌する急性感染症に対しては、感染症が病原微生物とそれに対する生体の防御能すなわち免疫とのバランスの上に成り立つものであると考え、宿主と病原微生物の相互作用を分子レ

ベルで検討するとともに、宿主を取り巻く環境や病原微生物を取り巻く微小環境、さらに集団における伝播様式などを含めた総合的な研究が必要である。

2. 研究の目的

①中耳炎患児から分離されたインフルエンザ菌の細胞内寄生およびバイオフィルム産生能の検討：遷延化した中耳貯留液からはPCR法で効率

にインフルエンザ菌が検出されることや、インフルエンザ菌検出例では、中耳貯留液が遷延化する(右図)ことから、インフルエンザ菌感染症の病態の特徴、特に細胞内寄生およびバイオフィーム産生について明らかにし、その対策法を検討する。

②上気道感染症、特に急性咽頭・扁桃炎から分離されたβ-溶連菌の細胞内侵入遺伝子をPCR法により検討する。

③肺炎球菌菌株共通抗原であるPspAの母体免疫による乳幼児における肺炎球菌特異的免疫能の賦活に関する検討:肺炎球菌の次世代の蛋白抗原ワクチンとして注目されているPspAおよびPspCに注目し、肺炎球菌の鼻咽腔における感染機序の解明と、これらの抗原をもちいた経鼻免疫による肺炎球菌特異的免疫応答の誘導と肺炎球菌感染症に対する予防効果について検討する。

3. 研究の方法

①インフルエンザ菌バイオフィーム検出法の確立:インフルエンザ菌によるバイオフィームの検出は、O'toolらの原法に従いクリスタル・バイオレット染色により検出する。すなわち、インフルエンザ菌をブレインハート・インフュージョン培養液にてOD650が0.5まで前培養したのち、ブレインハート・インフュージョン培養液でインフルエンザ菌液をOD650=0.1に調整した後、96ウェル・ポリスチレン培養プレート(菌液量:各ウェル100μl)にて37度にて炭酸ガス培養を行う。培養中経時的にポリスチレン・ウェルを滅菌リン酸緩衝液(PBS)にて洗浄する。この操作により、ポリスチレン非付着細菌(バイオフィーム非産生菌)が洗い流される一方、ポリスチレン付着菌(バイオフィーム産生菌)は、ウェルに付着残存する。洗浄後に付着細菌をクリスタル・バイオレットにて染色する。染色液を十分に洗浄した後に、30%酢酸溶液によりクリスタル・バイオレットを溶出し、各ウェルについてクリスタル・バイオレットの吸光度を評価する。バイオフィームの形成は、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、24時間培養により経時的に評価する。

②インフルエンザ菌臨床分離株によるバイオフィーム産生の検討:急性中耳炎患児より分離同定されたインフルエンザ菌臨床分離株を用い、バイオフィーム産生株の検出をおこなうとともに、バイオフィーム形成と急性中耳炎の臨床経過をスコアリング・システムにより評価し、両者の比較検討を行う。鼻咽腔および中耳貯留液より分離

されたインフルエンザ菌のバイオフィーム形成の検討と、インフルエンザ菌によるバイオフィームの急性中耳炎の臨床経過に与える影響についての検討をおこなう。

③β-溶連菌の細胞内侵入遺伝子の検討:非侵襲性溶連菌感染症および侵襲性溶連菌感染症患者より分離された溶連菌を用い、細胞内侵入に関与すると考えられている*speA*、*speB*、*speC*、*speF*、*speG*、*speH*、*speI*、*ssa*、*smeZ* 遺伝子の発現をPCR法により検討する。

④肺炎球菌表面蛋白抗原(PspA)を用いた経鼻免疫による特異的免疫応答の誘導:肺炎球菌PspA;1μgをコレラトキシン;2μgとともに雌マウス(BALB/cおよびCBA/N、6週齢)に1週間に2回、3週間の経鼻免疫を行う。最終免疫より3週間後に、鼻洗浄液、血液を採取し、それぞれに含まれる抗PspA抗体(IgA、IgG、IgM)の誘導をELISA法にて検討する。コントロールとしては、コレラトキシンおよび生理食塩水のみを投与する。

⑤肺炎球菌表面蛋白抗原(PspA)を用いた経鼻免疫による肺炎球菌感染予防:雌マウス(BALB/cおよびCBA/N、6週齢)にPspAによる経鼻免疫を行う。最終免疫より3週間後に、眼窩底静脈叢より採血を行った後に、肺炎球菌野生株をマウスに経鼻接種する。経鼻接種より2-7日後にマウスを屠殺し、気管切開後に鼻咽腔洗浄液、鼻粘膜組織、肺組織、血液、嗅神経、大脳を採取し、それぞれの肺炎球菌コロニー数を検討する。

④肺炎球菌表面蛋白抗原(PspA)を用いた母体経鼻免疫による新生児マウス肺炎球菌感染症の予防:肺炎球菌PspA;1μgをコレラトキシン;2μgとともに雌マウス(BALB/cおよびCBA/N、6週齢)に1週間に2回、3週間の経鼻免疫を行う。経鼻免疫終了より2週間、雄マウスと交配、免疫終了後約3~4週間で新生児マウスを出産する。私生児マウス1週齢の時点で、肺炎球菌野生株を新生児マウスに接種する。接種方法は、i 経鼻接種、ii 腹腔内投与、iii 肺接種の3手法で行う。肺接種は、菌液量(10μl)をジエチルエーテル麻酔下に経鼻接種し肺炎感染を引き起こす。それぞれの接種菌量は、新生児マウスを用いた予備実験で設定する。現在までの予備実験では、TIGR4株では、10⁴ CFUが適量と考える。肺炎球菌接種後2~7日後に新生児マウスを接種後2~7日後にマウスを屠殺し、気管切開により鼻咽腔洗浄液を採取する。同時に鼻粘膜組織、嗅神経、脳、肺、血液を採取し、それぞれの

肺炎球菌コロニー数を検討する。

4. 研究成果

① インフルエンザ菌のバイオフィーム形成能の検討

a. クリスタルバイオレット染色法による定量的評価を行った。すなわち 96 well プレートを用い、クリスタルバイオレット染色法によるバイオフィームの定量的評価を行った。バイオフィーム形成の評価は、測定菌株 OD₅₇₀ 値/陽性コントロール株 OD₅₇₀ 値を biofilm formation index (BFI) と定義し、BFI ≥ 0.4 の株をバイオフィーム形成株とした。

b. 共焦点レーザー顕微鏡による画像評価を行った。すなわち 96 ピン付き 96 well プレートを用い、共焦点レーザー顕微鏡によりバイオフィーム形成(シアル酸染色)とインフルエンザ菌(核酸染色)の観察を行った。

クリスタルバイオレット染色法によるバイオフィーム形成の定量的評価は、共焦点レーザー顕微鏡による画像評価を反映することが判明し、小児急性中耳炎症例より採取した無莢膜型インフルエンザ菌臨床分離株において、安定したバイオフィーム測定システムを確立することができた。この測定システムにより中耳炎分離株 70 株のうち 59 株 (84%) にバイオフィーム形成を認めた。薬剤感受性とバイオフィーム形成との関連を見ると、ABPC の耐性株に比較して、感受性が高い株ほどバイオフィーム形成株を多く認めた。急性中耳炎の臨床経過とバイオフィーム形成との関連について検討すると、抗菌薬治療非改善例から分離されたインフルエンザ菌では、抗菌薬治療改善例からの分離菌よりも有意に高いバイオフィーム形成能を認めた(図1)。

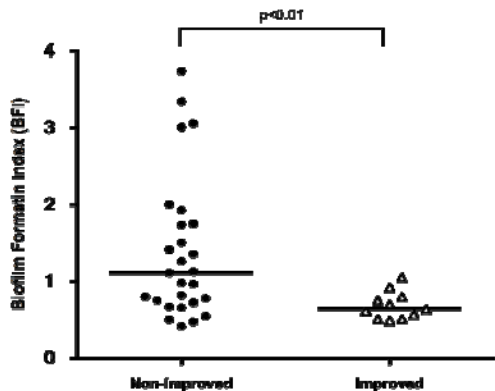


図1 臨床経過とバイオフィーム形成能

② 溶連菌の細胞内侵入に関する遺伝子検索:
242 株の非侵襲性感染症分離株では、12.0%

に *sil* 遺伝子が検出された。すべての *sil* 遺伝子陽性株では、*speB* 遺伝子陽性であり、69.0%で *speC* 遺伝子陽性であった。一方、17.7%の侵襲性感染症分離株で *sil* 遺伝子陽性であった。76.5%の *sil* 遺伝子陽性株では *speA* 遺伝子を有していたが、*sil* 遺伝子陰性株では、すべての株で *speA* 遺伝子は陰性であった。また、すべての *sil* 遺伝子陽性株では azithromycin に感受性を示し、マクロライド耐性遺伝子は保有していなかった。

以上の成績により、小児から得られた臨床分離株から初めてバイオフィーム形成を証明し、さらに非浸潤性株の溶連菌において細胞内侵入関連遺伝子の発現を証明した。

③ 肺炎球菌共通抗原である PspA を用いた得的免疫の誘導:PspA の母体経鼻免疫により、母マウス母乳及び血清、新生児マウスの血清中に抗 PspA 特異的 IgG 抗体が誘導された。また PspA 免疫群の新生児マウスは、非免疫群に比べて全身感染後の生存時間が延長された(図2)。

本動物実験により、PspA の母体経鼻免疫により、免疫能の未熟な乳幼児期に特異的免疫応答が誘導可能であり、肺炎球菌感染症の予防方法として有用と考えられた。

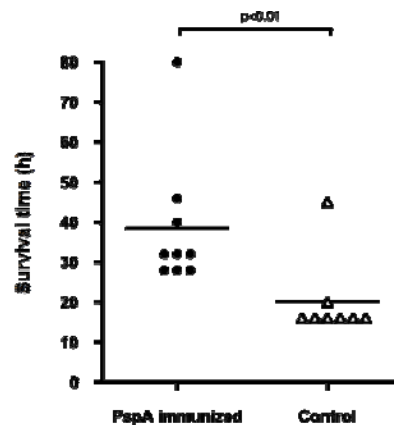


図2 PspA 経鼻免疫による新生児マウスの全身感染後の生存期間

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 11 件)

1. Yamanaka N, et al. Clinical bacteriology and immunology in acute otitis

- media in children. *J Infect Chemother* 2008;14:180-187.
2. Hotomi M, et al. Serotype distribution and penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates from middle ear fluids of pediatric patients with acute otitis media in Japan. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3808-3810
 3. Katsurahara T, et al. Protection against systemic fatal pneumococcal infection by maternal intranasal immunization with pneumococcal surface protein A (PspA). *J Infect Chemother* 2008; 14: 393-398.
 4. Billal DS, et al. Prevalence of *Streptococcus invasive locus (sil)* and its relationship with macrolide resistance among group A *Streptococcus* strains. *J Clin Microbiol* 2008;46:1563-1564.
 5. Billal DS, et al. Determination of pneumococcal serotypes/genotypes in nasopharyngeal secretions of otitis media children by multiplex polymerase chain reaction. *Eur J Pediatr* 2008;167:401-407.
 6. Hotomi M, et al. Efficacy of a novel oral carbapenem pivoxil against experimental otitis media caused by penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* in chinchilla. *Vaccine* 2007;25:2478-2484.
 7. Billal DS, et al. In vitro induction and selection of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pyogenes* strains with multiple emm types. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:28-34.
 8. Billal DS, et al. Rapid identification of nontypeable and serotype b *Haemophilus influenzae* from nasopharyngeal secretions by the multiplex PCR. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007;71:269-274.
 9. Hotomi M, et al. Genetic characteristics and clonal dissemination of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains isolated from the upper respiratory tract of patients in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3969-3976.
 10. Billal DS, et al. Can the Etest correctly determine the MICs of beta-lactam and cephalosporin antibiotics for beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*? *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3963-3964.
 11. Konno M, et al. Study of nasopharyngeal bacterial flora. Variations in nasopharyngeal bacterial flora in school children and adults when administered antimicrobial agents. *J Infect Chemother* 2007;13:235-254.
- [学会発表] (計 9 件)
1. Yamanaka N, et al: Burden of illness and cost-effective analysis of PCV7 for acute otitis media. SPIKER 2008. 12. 13 Tokyo, Japan
 2. Yamanaka N, et al: Maternal intranasal immunization against *H. influenzae* and *S. pneumoniae*. 6th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases 2008. 6. 8 Reykjavik, Iceland
 3. Yamanaka N, et al: Rapid Detection of Pneumococcal Antigen by Immuno-chromatography Test. 108th General Meeting 2008. 6. 1 Boston, USA
 4. Yamanaka N, et al: Molecular identification and clonal dissemination of *Hemophilus haemolyticus* in acute pharyngotonsillitis. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2008. 4. 19 Barcelona, Spain
 5. Yamanaka N: How to select and use antimicrobial agents for intractable otorhinolaryngological infections? 12th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology- Head and Neck Surgery. 2008. 4. 3 Nara, Japan
 6. Yamanaka N: Acute rhinosinusitis: Medical therapy. 12th Congress of the International Rhinologic Society, 2007. 12. 5-8 Venezia, Italy

7. Yamanaka N : Clonal spread of drug-resistant *S. pneumoniae* and *H. influenzae* and disease burden for children in Japan. 12th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. 2007.12.4-6 Haikou, Hainan, China
8. Yamanaka N, et al. : Bacteriological Efficacy of Azithromycin on Nontypeable *Haemophilus Influenzae* Adhered to and Entered Cultured Human Epithelial Cells. Asia RTI Forum 2007.6.9-10 Hanoi, Vietnam
9. Yamanaka N, et al. : Bacteriological Efficacy of Azithromycin on Nontypeable *Haemophilus Influenzae* Adhered to and Entered Cultured Human Epithelial Cells. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases and 25th International Congress of Chemotherapy. 2007.3.31-4.3 Munich, Germany

[図書] (計 4 件)

- ①山中 昇 : 医学書院、今日の耳鼻咽喉科・頭頸部外科治療指針 2008年 663 ページ
- ②山中 昇、南江堂、今日の治療薬 2008、2008年 1323 ページ
- ③田村真司、山中 昇 : 全日本病院出版会、すぐに役立つ外来耳鼻咽喉科疾患診療のコツ、2008年 353 ページ
- ④島田 純、山中 昇 : 東京医学社、小児内科 2008年 1574 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 昇 (YAMANAKA NOBORU)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 10136963

(2) 研究分担者

藤原 啓次 (FUJIHARA KEIJI)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 80326371
田村 真司 (TAMURA SINJI)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 10244724
保富 宗城 (HOTOMI MUNEKI)
和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 90336892

島田 純 (SHIMADA JUN)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 90326372

(3) 連携研究者