

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 17 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21591305

研究課題名（和文）

肺炎球菌感染症難治化の要因としてのバイオフィームと治療戦略

研究課題名（英文）

Study for biofilm formed by *Streptococcus pneumoniae* and the treatment strategy

研究代表者

渡邊 浩 (Hiroshi Watanabe)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：90295080

研究成果の概要（和文）：

本研究において、肺炎球菌によるバイオフィームの研究に適切な観察システムを確立した上で、臨床分離株及び標準株によるバイオフィーム産生能を比較し、同時に、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、バイオフィームの形態を観察した。また、meropenem (MEPM) の添加により、TIGR4 株に対して、Planktonic 状態及びバイオフィームにおける主要な薬剤耐性、病原性及び付着因子に関する遺伝子の発現を測定した。さらに、抗生剤を未投与時において、同様な方法にて測定された各遺伝子の発現と比較し、結果として、MEPM 投与後、バイオフィームにおける一部の病原因子や薬剤耐性遺伝子の発現が増加していたことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

There is still limited information about biofilm formed by *Streptococcus pneumoniae*, as well as the treatment of biofilm diseases is also controversial. To evaluate the characteristics of *S. pneumoniae* biofilm, we conducted the following study. A new system was designed to investigate the formation of *S. pneumoniae* biofilm, which includes newly defined biofilm culture condition, biofilm microtiter assay, and the utilities of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and scanning electron microscope (SEM). We detected the varieties of *S. pneumoniae* biofilm existed in the strains with different serotypes and antimicrobial susceptibilities. We also investigated the in vitro expression of genes relevant to antimicrobial resistance, pathogenicity and adherence in the planktonic or biofilm condition, with or without antibiotic treatment (meropenem) for TIGR4 strain. As a result, the higher expression of genes relevant to antimicrobial resistance and pathogenicity was detected in the biofilm condition after meropenem treated. In this study, we designed a new biofilm observation system, and our data indicated that *S. pneumoniae* is capable to produce biofilm, and many factors such as serotypes, and antimicrobial susceptibilities especially when *S. pneumoniae* is under antibiotics treatment may affect the biofilm formation. All these findings are supposed to be a part of new evidences to establish an effective biofilm diseases treatment strategy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：肺炎球菌、バイオフィーム、難治性感染症

1. 研究開始当初の背景

近年、臨床上問題となる多くの難治性感染症にバイオフィームが関係していると言われるようになり、様々な研究が行われる様になった。とりわけ緑膿菌においては、これまで詳細な研究がなされているものの、その他の菌種についてはまだ不明な部分が多い。最近、人の上気道に常在し、時に中耳炎などの耳鼻咽喉科領域感染症、髄膜炎、下気道感染症を引き起こす肺炎球菌が緑膿菌等と同様にバイオフィームを産生することが報告されてきた。我々は近年、インフルエンザ菌が人气道上皮細胞上や鼓膜などでバイオフィームを産生することを報告した。現在、インフルエンザ菌や肺炎球菌は耐性菌が増加傾向であり、臨床的にも難治例の増加が問題となっているが、難治化の要因として薬剤耐性に加えバイオフィームがどの程度関与しているかどうかは明らかになっていない。その様な背景の下で、本邦における市中肺炎の起炎菌として最も多く、かつ小児の中耳炎、髄膜炎の主要な起炎菌である肺炎球菌の難治化の要因としてバイオフィームがどの程度関与しているかを明らかにし、かつその治療戦略をたてるために本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は本邦において、臨床的に問題となっているペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP）を含めた肺炎球菌がバイオフィームを産生し、耐性化の一因となっているかどうかを明らかにし、かつ治療戦略をたてることである。

3. 研究の方法

- 肺炎球菌臨床分離株及び ATCC 標準株を 5%血液寒天培地上で発育し、臨床株の血清型及び最小発育阻止濃度（MICs）を確認する。分子生物学手法にて、該当菌株のペニシリン、マクロライド及びキノロン耐性遺伝子を調べ、比較する。
- Trypticase Soy broth (TSB), Mueller Hinton Broth (MHB), Brain heart infusion broth (BHI), 及び BHI にグルコース(10 mg/ml)を添加した sBHI 計 4 種類の液体培地を選定し、肺炎球菌によるバイオフィームの産生を測定した。
- 上記の培養液を用いて、96 wells マイクロプレートに 1 菌種 3 穴ずつ、200 μ l ずつ接

種し、37°C、5%CO₂ の条件下で培養し、各菌株のバイオフィームの産生能を microtiter biofilm assay (MBA) 法にて、測定した。

4) 肺炎球菌が産生したバイオフィームを confocal laser scanning microscopy (CLSM) にて、観察した。

5) バイオフィームを産生させた後、meropenem (MEPM) 添加の有無により、Real-time PCR 法にて、薬剤耐性、病原性及び付着因子に関する遺伝子発現の変化を検討した。

4. 研究成果

1) 今回の研究において、臨床分離株 K-112、K-116、K-129、K-29、TIGR4 (ATCCBAA-344) 及び ATCC49619 株を用い、解析を行った。MIC 結果により、K-116 株は多剤耐性菌株であることが判明された (表 1)。ペニシリン耐性に関わる pbp 遺伝子を確認した結果により、K-116 株はすべての pbp 遺伝子において、変異が見られ、重度なマクロライド耐性に関する遺伝子(ermAM)の変異も認められた。K-112 及び ATCC49619 株はキノロン耐性に関する parC, gyrA 遺伝子での変異が認められなかったが、K-116 株は gyrA の 81, 114 番目のアミノ酸、parC の 82, 94 番目のアミノ酸の変異が認められた。

Strain No.	Sero-type	MICs (μ g/ml)			
		PCG	EM	LVTK	MBPM
K-112	13F	0.03	0.25	2	-
K-116	13F	4	>128	16	0.5
K-129	14	0.25	0.03	1	0.125
K-29	19F	2	0.5	2	0.125
ATCC49619	19F	0.25-1	-	-	0.06
TIGR4	4	0.032	-	-	1

表 1

2) TSB, MHB, BHI、及び sBHI 計 4 種類の液体培地を用いて、薬剤非感受性株、TIGR4 及び ATCC49619 株を対象とし、MBA 法にて、バイオフィームの産生能を検討した結果により、いずれの菌株では、sBHI を培養液とした場合は、ほかの培養方法より、菌の増殖は安定し、より高いバイオフィーム産生能が測られた (図 1)。24 時間において、ATCC49619 株、K-116 株は K-112 株に対して、biofilm 産生における有意な差が認められたが(P=0.003)、K-116 と ATCC49619 株の間の差は認められなかった (図 2)。

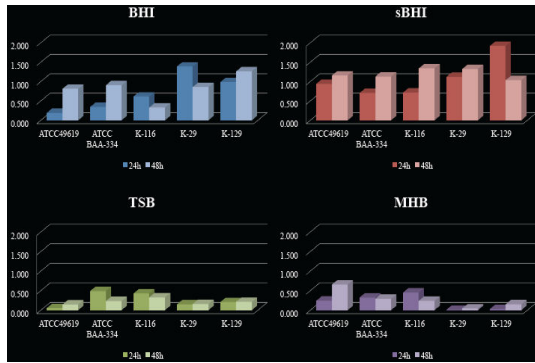


図 1

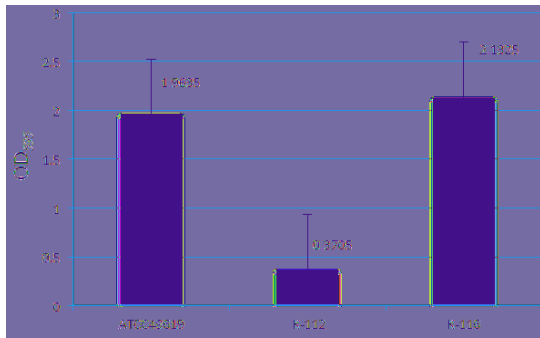


図 2

3) CLSMにて、上述した4種類の液体培地を用いて、TIGR4によるバイオフィルムの形態を観察し、MBA法による結果と一致することが示唆された(図3、図4)。

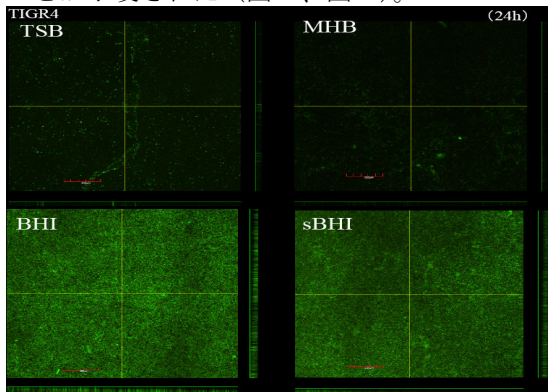


図 3

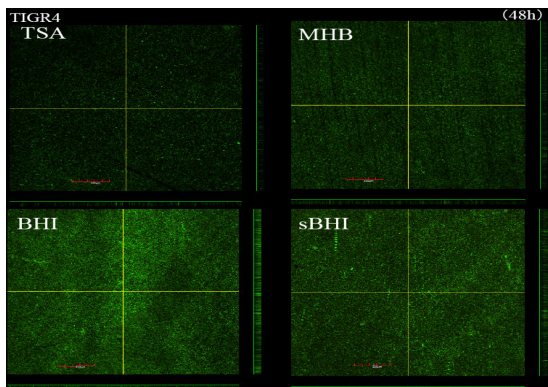


図 4

4) MEPM添加の有無により、TIGR4株に対し、Planktonic状態及びバイオフィルムにおける主要な薬剤耐性、病原性及び付着因子に関する遺伝子の発現を測定した。結果として、MEPMを投与後、Planktonic状態において、ermB以外殆どの遺伝子の発現は抗生剤未投与時により低くなっていたが、バイオフィルムにおける一部の病原因子や薬剤耐性遺伝子の発現が抗生剤未投与時により増加していたことが示唆された(図5、図6)。

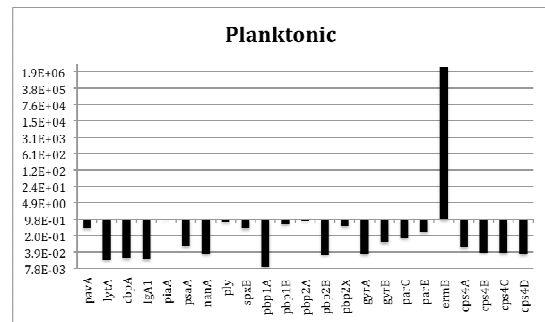


図 5

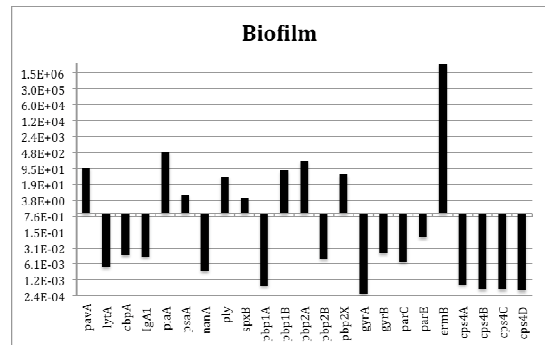


図 6

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 17 件)

- 1) Nakazono Y, Hara K, Kashiwagi T, Hamada N, and Watanabe H. The RNA polymerase PB2 subunit of influenza A/HongKong/156/1997 (H5N1) restricts the replication of reassortant ribonucleoprotein complexes. PLoS ONE, 査読有 7(2) e32634: 1-9, 2012.
- 2) Qin L, Zhou Z, Hu B, Yamamoto T, and Watanabe H. Antimicrobial susceptibilities and genetic

- characteristics of *Haemophilus influenzae* isolated from community acquired respiratory tract infection patients in Shanghai City, China. J Infect Chemother, 査読有 2012 [Epub ahead of print].
- 3) Toyotome T, Yamaguchi M, Iwasaki A, Watanabe A, Taguchi H, Qin L, Watanabe H, Kamei K. Fetuin A, a serum component, promotes growth and biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. Int J Med Microbiol, 査読有 302: 108-116, 2012.
 - 4) 安部秀幸、河原明彦、山口智彦、多比良朋希、渡邊 浩、鹿毛政義「感染対策を踏まえた病理解剖室の工夫」病理と臨床、査読有 Vol. 29, 2011.
 - 5) Zhou Z, Qin L, Hu B, and Watanabe H. Expression of *Legionella pneumophila* virulence genes under biofilm condition. Chinese journal of microbiology and immunology, 査読有 31(5): 413-416, 2011.
 - 6) Masaki H, Qin L, Zhou Z, Onizuka T, Watanabe K, Hu B, and Watanabe H. A prospective study of intrafamilial transmission and antimicrobial susceptibility for *Moraxella catarrhalis*. Microbiol Immunol, 査読有 55(9): 599-604, 2011.
 - 7) Hara K, Yahara K, Gotoh K, Nakazono Y, Kashiwagi T, Imamura Y, Hamada N, Khositsakulchai W, Sanchai T, Khantawa B, Tharavichitkul P, Maneekarn N, Sirisanthana T, and Watanabe H. Clinical study concerning the relationship between community-acquired pneumonia and viral infection in northern Thailand. Intern Med, 査読有 50: 991-998, 2011.
 - 8) 渡邊 浩 「Nontypeable *Haemophilus influenzae* が産生したバイオフィルムに対する抗生物質の効果についての基礎的検討」 Bacterial Adherence & Biofilm, 査読有 24: 89-91, 2010.
 - 9) Yahara K, Miura M, Masunaga K, Matsumoto K, Miyao T, Tanimachi C, Hashimoto K, Sagawa K, and Watanabe H. Comparison of two control measures of weatherstripping in reducing blowing dust during hospital renovations. J Infect Chemother, 査読有 16: 431-435, 2010.
 - 10) Kashiwagi T, Hara K, Nakazono Y, Hamada N, and Watanabe H. Artificial hybrids of influenza A virus RNA polymerase reveal PA subunit modulates its thermal sensitivity. PLoS ONE, 査読有 5(12) e15140: 1-11, 2010.
 - 11) Morinaga Y, Yanagihara K, Masunaga K, Hashiguchi M, Okamura T, Watanabe H, Kohno S, and Kamihira S. Invasive pneumococcal diseases in a traveler who returned from the philippines: A case report and in vivo study of the isolate. J Travel Med, 査読有 17: 63-65, 2010.
 - 12) 今村宜寛、濱田信之、大津 寧、原好勇、渡邊 浩「九州北部でのヒト・メタニューモウイルスに対する中和抗体保有調査」医学検査、査読有 59: 767-772, 2010.
 - 13) Qin L, Masaki H, Gotoh K, Furumoto A, Terada M, Watanabe K, and Watanabe H. Molecular epidemiological study of *Moraxella catarrhalis* isolated from nosocomial respiratory infection patients in a community hospital in Japan. Intern Med, 査読有 48:797-803, 2009.
 - 14) Kuroki R, Kawakami K, Qin L, Kaji C, Watanabe K, Kimura Y, Ishiguro C, Tanimura S, Tsuchiya Y, Hamaguchi I, Sakakura M, Sakabe S, Tsuji K, Inoue M, and Watanabe H. Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Intern Med, 査読有 48:791-796, 2009.
 - 15) 今村宜寛、濱田信之、大津 寧、原好勇、渡邊 浩「入院を必要とした乳幼児の下気道感染症に関与するウイルスの検討」医学検査、査読有 58: 287-293, 2009.
 - 16) 渡邊 浩「久留米大学病院における空気・飛沫感染対策の実際」Clinical Parasitology, 査読有 20: 114-117, 2009.
- [学会発表] (計 70 件)
- 1) 秦 亮、渡邊 浩 「*Haemophilus*

- influenzae isolated from community acquired respiratory tract infection patients in China」第 59 回日本化学療法学会西日本支部総会、奈良、2011.11.24.
- 2) 渡邊 浩 「教育セミナー、呼吸器感染症のトピックス、インフルエンザの基礎知識と対策」第 67 回日本呼吸器学会・日本結核病学会九州支部秋季学術講演会、福岡、2011.11.19.
 - 3) Qin L, Goto K, and Watanabe H. Concurrent administration of antibiotics, the role of antimicrobial effect of imipenem for the nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms. US-Japan Cooperative Medical Science Program Acute Respiratory Infections Panel. Wakayama, Japan, 2011.11.14.
 - 4) Miura M, Masunaga K, Qin L, Kawano S, Watanabe M, Yamashita N, Sakamoto T, and Watanabe H. Infection control for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in advanced emergency medical service center monitored by molecular analysis. The 5th International Congress of the Asia Pacific Society of Infection Control (APSIC). Melbourne, Australia, 2011.11.8-11.
 - 5) 渡邊 浩 「若手医師と看護師のためのセミナー、MRSA 感染症の実態とその対策」第 20 回日本脊椎インストゥルメンテーション学会、久留米、2011.10.29.
 - 6) 渡邊 浩 「ICD 講習会、他職種多領域の連携と感染制御、久留米大学病院における ICD 活動の現状」第 81 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、北九州、2011.10.8.
 - 7) 渡邊 浩 「シンポジウム 4、感染症ワクチン：日本人におけるワクチンマネジメント、海外渡航とワクチン」第 81 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、北九州、2011.10.8.
 - 8) 上村勇作、秦 亮、日高秀信、渡邊 浩 「肺炎球菌バイオフィーム観察システムの構築についての検討」第 81 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、北九州、2011.10.7.
 - 9) 秦 亮、渡邊 浩 「中国における市中気道感染症由来 *Haemophilus influenzae* の薬剤感受性及び水平伝播についての研究」第 59 回日本化学療法学会総会、札幌、2011.6.24.
 - 10) Watanabe H. 日本久留米大学附院の鋭器傷予防対策. Joint Meeting of the 20th National Conference on Nosocomial Infection of Chinese Preventive Medicine Association (CPMA) and the 7th Shanghai International Forum of Infection Control (SIFIC). Shanghai, China, 2011.5.26.
 - 11) Qin L and Watanabe H. ICT (Infection control team)在医院感染控制中的作用. Joint Meeting of the 20th National Conference on Nosocomial Infection of Chinese Preventive Medicine Association (CPMA) and the 7th Shanghai International Forum of Infection Control (SIFIC). Shanghai, China, 2011.5.26.
 - 12) 秦 亮、真崎宏則、渡辺貴和雄、渡邊 浩 「A Prospective Study of Intrafamilial Transmission and Antimicrobial Susceptibility for *Moraxella catarrhalis*」第 85 回日本感染症学会総会、東京、2011. 4. 21.
 - 13) 渡邊 浩 「インフルエンザ菌による小児急性中耳炎の難治化に関する検討」日米医学協力研究会急性呼吸器感染症専門部会会議、東京、2011.1.18.
 - 14) 秦 亮、渡邊 浩 「中国における市中気道感染症病原体についての臨床的調査」第 58 回日本化学療法学会西日本支部総会、大分、2010.11.26.
 - 15) 渡邊 浩 「教育講演 2、海外渡航関連感染症とトラベルクリニック」第 80 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、松山、2010.11.19.
 - 16) 上村勇作、秦 亮、後藤憲志、渡邊 浩 「The role of antimicrobial effect of imipenem for the nontypable *Haemophilus influenzae* biofilms in vitro」第 80 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、松山、2010.11.19.
 - 17) Qin L, Zhou Z, Hu B, and Watanabe H. Pilot study of causative pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection in China. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 59th Annual meeting, Atlanta, USA. 2010.11.4.
 - 18) 渡邊 浩 「Nontypable *Haemophilus influenzae* が産生したバイオフィームに対する抗生物質

- の効果についての基礎的検討」 第 24 回 Bacterial Adherence and Biofilm 学術集会、東京、2010.7.9.
- 19) Qin L and Watanabe H. Bacterial biofilms and hospital-acquired infection. Joint Meeting of the 19th National Conference on Nosocomial Infection of Chinese Preventive Medicine Association (CPMA) and the 6th Shanghai International Forum of Infection Control (SIFIC). Nanjing, China, 2010.6.19.
- 20) 秦 亮、渡邊 浩 「Haemophilus influenzae が産生したバイオフィルムに対する imipenem の抑制効果に関する基礎的検討」第 58 回日本化学療法学会総会、長崎、2010.6.4.
- 21) 渡邊 浩 「レクチャー3、呼吸器感染症の ABC、細菌性肺炎の診断と治療」 第 58 回 日本化学療法学会総会、長崎、2010.6.4.
- 22) Qin L, Goto K, and Watanabe H. Concurrent administration of antibiotics, the role of antimicrobial effect of imipenem for the nontypeable Haemophilus influenzae biofilms. 110th American Society for Microbiology General Meeting. San Diego, USA, 2010.5.26.
- 23) 秦 亮、木田 豊、渡邊 浩 「ワークショップ 29、バイオフィルム、Impaired Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharide promotes biofilm formation」 第 84 回日本感染症学会総会、京都、2010. 4. 6.
- 24) 矢野寿一、山崎善隆、沖津尚弘、後藤憲志、新井和明、平瀧洋一、賀来満夫、渡邊浩 「ワークショップ 29、バイオフィルム、急性中耳炎患児から分離されたインフルエンザ菌のバイオフィルム産生能と細胞内侵入性の検討」 第 84 回日本感染症学会総会、京都、2010. 4. 6.

[図書] (計 7 件)

- 1) 秦 亮、渡邊 浩 「インフルエンザ菌 (Haemophilus influenzae)」病原菌の今日的意味 改訂 4 版 341-352, 2011.
- 2) 秦 亮、渡邊 浩 「□. 抗微生物薬に関する疑問 2. ペニシリン / セフェム / カルバペネムはどう使い分ければいいのか？」 呼吸器感染症における不思議 50 8-13, 2011.

- 3) 秦 亮、渡邊 浩 「新版 感染症診療実践ガイド 有効な抗菌薬の使いかたのすべて: 抗ウイルス薬 (抗 HIV 薬を除く)」 Medical Practice 28 (増刊号) :142-149, 2011.
- 4) 秦 亮、渡邊 浩 「テーマ: 検査や画像から感染症の原因微生物に迫る—細菌感染症難治化とバイオフィルムの関連は?」 臨床感染症ブックレット 3, 129, 2011.
- 5) 秦 亮、渡邊 浩 「看護学テキスト: 疾病と治療 I 第二章: 呼吸器系の症状・兆候と疾患—かぜ症候群 (感冒), 急性気管支炎」 南江堂、48-49, 2010.
- 6) 原 好勇、渡邊 浩 「インフルエンザの最新知識 Q & A 2010 パンデミック H1N1 2009 第一波を振り返って— 一般的な予防法とその効能は?—」、医薬ジャーナル社、82-84, 2010.
- 7) 秦 亮、渡邊 浩 「肺炎球菌ワクチンの使い方。呼吸器感染症のすべて—私の治療のコツ—」 南江堂、172-173, 2009.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/virol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 浩 (Hiroshi Watanabe)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号: 9 0 2 9 5 0 8 0

(2) 研究分担者

秦 亮 (Qin Liang)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 4 0 4 6 1 4 0 4

(3) 連携研究者

()

研究者番号: