

## 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 6 月 21 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21592250

研究課題名（和文）上気道感染症難治化へのインフルエンザ菌、溶連菌の細胞内侵入機序と治療に関する研究

研究課題名（英文）the study of internalization of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pyogenes* into epithelial cells in upper respiratory infectious disease.

研究代表者 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：70305762

研究成果の概要（和文）：急性扁桃炎は A 群  $\beta$  溶連菌やインフルエンザ菌の感染と深く関連しているが近年、難治化する症例も増加している。急性扁桃炎の難治化、反復感染の原因の一つとしてインフルエンザ菌、溶連菌の細胞内侵入に関与すると考えられている遺伝子の検討を行った。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。

研究成果の概要（英文）：*Streptococcus pyogenes* and nontypeable *Haemophilus influenzae* are important causative pathogens of upper respiratory infectious disease. To examine the internalization of these pathogens into human epithelial cells, we investigate the gene that may cause the internalization. We detected 12.0% of sil gene in non-invasive infection and 17.7% in invasive infection.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2000000	0	2000000
2010 年度	1800000	0	1800000
2011 年度	1000000	0	1000000
年度			
年度			
総計	4800000	0	4800000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：咽頭科学、溶連菌、急性扁桃炎、急性鼻副鼻腔炎

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

急性扁桃炎は、ワルダイエル咽頭輪に所属する扁桃・リンパ組織に生じた急性炎症であり、A 群 β 溶血性連鎖球菌 (*S. pyogenes* , 溶連菌) やインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) は、急性扁桃炎の起炎菌のなかでも白血球数の増加あるいは CRP 上昇と良好に相関し、重要視されている。

近年、ペニシリン系抗菌薬あるいはセフェム系抗菌薬などの経口抗菌薬の投与にも関わらず、急性扁桃炎の臨床症状が十分に改善しない症例や再発・再燃を繰り返す症例も増加している。急性扁桃炎の難治化、反復感染の原因としては 1) 細菌の産生する β ラクタマーゼによる β ラクタム剤の活性低下 2) 服薬コンプライアンスの低下、3) 家庭内感染により同一菌株の再感染がおこる 4) 細菌の増殖がプラトーに達すると菌体表面のペニシリン結合蛋白が減少するイーグル現象のためペニシリン系抗菌薬によって完全に除菌できず、抗菌薬を中止すると再増殖を起こしてくる 5) 細菌のバイオフィーム形成などとともに起炎菌が宿主上皮細胞内に侵入し、抗菌薬が細胞に到達できず除菌されないことが注目されている。

1994 年に Forsgren らはインフルエンザ菌がアデノイド上皮細胞内に存在することを報告している。溶連菌の細胞内侵入に関与する分子としては溶連菌の菌体表面に存在するフィブロネクチン結合蛋白 (*FbaA*) やラミン結合蛋白 (*Lbp*) が知られており、溶連菌はこれらの蛋白を利用し、細胞表面に付着、さらに侵入すると考えられている。

また、溶連菌はその表面に存在するセリンプロテアーゼ (*ScpA*) や *FbaA*、システインプロテアーゼ (*SpeB*) などの蛋白の作用により補体活性系を介したオプソニン貪食から逃れることにより細菌感染の初期段階で生体の免疫防御機能を回避

する。

我々は溶連菌のバイオフィーム形成と細胞内侵入遺伝子、マクロライド耐性遺伝子の関係を比較検討すると細胞内侵入遺伝子 *prtF1* 陰性株では *prtF1* 陽性株に比較して有意にバイオフィーム形成が高値であった。また、*prtF1* 陰性株では *mefA* 陽性株とマクロライド感受性株ではバイオフィーム形成には差は認めないが、*prtF1* 陽性株では、*mefA* 陽性株の方が *erm* 陽性株に比較してバイオフィーム形成は有意に高値であった。さらに、溶連菌の細胞内侵入とバイオフィーム形成を比較検討した結果では、細胞内侵入能が弱い株で、細胞内侵入能が強い株に比べてバイオフィーム形成が強いことが判明した。

このようにして、細菌は宿主の分子を利用し、細胞に付着するとともに上皮細胞内に侵入する。さらに菌体表面に存在する様々な蛋白により補体活性系を抑制し巧妙に宿主の免疫防御機能から逃れ、局所に長期に存在することにより、急性扁桃炎の反復化・遷延化が引き起こされると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、急性扁桃炎の反復化・遷延化のメカニズムとして、溶連菌の宿主上皮細胞内への侵入に注目した研究を行い、急性扁桃炎の反復化・遷延化を抑制できる効果的な抗菌薬治療の検討を行う。急性扁桃炎重要な起炎菌である溶連菌およびインフルエンザ菌が扁桃炎の難治化、反復化に関する影響につき検討した。

### 3. 研究の方法

溶連菌およびインフルエンザ菌の細胞内侵入について臨床分離株を用いた分子生物学的検索をおこなった。先に示した図 3、図 4 の結果から、マクロライド感性菌では細胞内侵入能が弱い反面、バイオフィーム形成能が

高い一方、細胞内侵入能の強い株では、バイオフィーム形成能が低く、マクロライド耐性である。溶連菌は、自身の薬剤耐性化と細胞内侵入およびバイオフィーム形成を巧みに使い分けて感染すると考えられる。

一方 *sli* 遺伝子の発現とマクロライド耐性遺伝子との関係について検討した結果では、*sli* 陽性株では *ermA ermB ermTR* いずれの遺伝子も発現していないのに対して、*sli* 陰性株ではこれらのマクロライド耐性遺伝子の発現が認められており、マクロライド耐性遺伝子の発現と *sli* 遺伝子の発現は有意に相関することが判明した。

そこで溶連菌細胞内侵入遺伝子の検索を以下のように計画した。

溶連菌の細胞内侵入に関与すると考えられる Fibronectin binding protein (FBP)を中心に、細胞内侵入関連遺伝子である *fbp* 遺伝子、*prtF1* 遺伝子、*prtF2* 遺伝子、*speE* 遺伝子、*speB* 遺伝子、*scpA* 遺伝子の検出を PCR 法によりおこなう。予備実験ですでに *fbp* 遺伝子、*prtF1* 遺伝子、*prtF2* 遺伝子の検出を行っており、溶連菌の 21.9%が *prtF1* 遺伝子単独、13.0%が *prtF2* 遺伝子単独で発現しており、0.7%で *fbp* 遺伝子と *prtF1* 遺伝子が、50.7%で *prtF1* 遺伝子と *prtF2* 遺伝子が発現していた。無症候性キャリアーと侵襲性感染症由来の溶連菌の比較では、*prtF1* 遺伝子には差が認められなかったが、*fbp* 遺伝子と *prtF2* 遺伝子は侵襲性感染症由来の溶連菌で高率に発現していたと報告されており、これらの溶連菌細胞内侵入関連遺伝子と溶連菌の遺伝子型：*ermA/ermB* 遺伝子、*mefA* 遺伝子、*emm* 遺伝子との関係について検討を行った。さらに、パルスフィールド電気泳動法による溶連菌の遺伝子型多型性分類を行い、細胞内侵入関連遺伝子を有する溶連菌の遺伝子型分類をおこなった。

#### 4. 研究成果

242 例の非侵襲性溶連菌感染症患者（急性扁桃炎 170 例、急性鼻副鼻腔炎 51 例、急性中耳炎 21 例）より分離された溶連菌 242 株および侵襲性溶連菌感染症患者より分離された溶連菌 17 株について検討を行った。

非侵襲性感染症からの分離株では 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。

#### 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 7 件）

1. Evaluation of a Rapid Immunochromatographic ODK-0901 Test for Detection of Pneumococcal Antigen in Middle Ear Fluids and Nasopharyngeal Secretions, Hotomi M, Togawa A, 他 13 名; Plos One (7)3, 2012, (査読有り)
2. Clinical scoring system of Acute Pharyngotonsillitis, Togawa A, Hotomi M, Tamura S, Yamanaka N, Adv Otolaryngol. 72: 139-41, 2011 (査読無し)
3. A comparison of conventional and

molecular microbiology in detection of differences in pneumococcal colonization in healthy children and children with upper respiratory illness. Ogami M, Hotomi M, Togawa A, Yamanaka N. Eur J Pediatr. 2010 Oct; 169(10)1221-5. (査読有り)

4. 成人急性咽頭・扁桃炎に対するガレノキサシン (GRNX) の有用性に関する検討—スコアリングシステムを用いた重症度評価とその臨床効果—：山中昇, 耳展, (53)142-152, 2010, (査読有り)
5. Haemophilus influenzae and Haemophilus haemolyticus in tonsillar cultures of adults with acute pharyngotonsillitis, Hotomi M, Kono M, Togawa A (他 6 名) Auris Nasus Larynx, (37)594-600, 2010 (査読有り)
6. 急性中耳炎に対する Tebipenem pivoxil の有効性 スコアリング・システムを用いた重症度評価とその臨床効果：山中昇、保富宗城、戸川彰久、竹井慎、河野正充：耳鼻咽喉科臨床 103(1)77-84, 2010. (査読有り)
7. 成人急性咽頭・扁桃炎に対するガレノキサシン (GRNX) の有用性に関する検討—スコアリングシステムを用いた重症度評価とその臨床効果—山中昇、保富宗城、戸川彰久、池田頼彦、田村真司：耳展 53:2:142-152, 2010, (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

1. 小児急性中耳炎に対する新規抗菌薬 TBPM-PI と TFLX の有効性の検討：戸川彰久、兼定啓子、末武光子、他 7 名：第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会、平成 24 年 5 月 10-12 日 新潟

2. 成人急性鼻副鼻腔炎に対する LVFX 500mg 1 日 1 回投与の有用性に関する検討：戸川彰久、山中昇、杉田麟也、他 7 名：第 73 回耳鼻咽喉科臨床学会 平成 23 年 6 月 23 日—24 日、松本

3. Delayed Antimicrobial Treatment Does Not Change the Clinical Course of Non-Severe Acute Otitis Media. Togawa A, Hotomi M, Hiraoka M, 他 6 名 10<sup>th</sup> International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, Jun 5-9, 2011 New Orleans, USA

4. Clinical Efficacy of Middle Ear Ventilation Tube Insertion Against Intractable Acute Otitis Media. Togawa A, Hotomi M, Takei S, 他 5 名, 10<sup>th</sup> International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, June 5-9, 2011 New Orleans, USA

5. Treatment of pharyngo-tonsillitis: clinical scoring system of acute pharyngitis and acute tonsillitis Togawa A, Hotomi M, Takei S, Yamanaka N, 7<sup>th</sup> International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways, July 7-9, 2010 Asahikawa, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸川 彰久 (Akihisa Togawa )

研究者番号：70305762

和歌山県立医科大学 医学部 講師

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：