

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 5 月 10 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791622

研究課題名（和文） 滲出性中耳炎の病態の分子生物学的検討

研究課題名（英文） Molecular biological analysis of otitis media with effusion

研究代表者

森山 智美（MORIYAMA SATOMI）

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：70423944

研究成果の概要（和文）：

滲出性中耳炎の起炎菌の一つである、無莢膜型インフルエンザ菌はバイオフィルムを形成する。我々は、新しく minimal biofilm eradication concentration (MBEC) 法を用い、臨床分離株のバイオフィルム内の抗菌薬感受性を検討した。また、抗菌薬暴露タイミングの検討を行った。

無莢膜型インフルエンザ菌のバイオフィルムの感受性は抗菌薬間で大きな差異があった。 β ラクタム薬はバイオフィルム内細菌の殺菌およびバイオフィルム量にほとんど効果がなかった。しかし、マクロライドは比較的效果が見られた。バイオフィルム形成早期での抗菌薬投与ではバイオフィルムは抑制されたが、成熟バイオフィルムを抑制することはできなかった。

研究成果の概要（英文）：

Nontypable *Haemophilus Influenzae* (NTHi) is one of the causative pathogen of otitis media with effusion and form biofilm. We determined antimicrobial agents susceptibility of NTHi from clinical isolates in biofilm with the new minimal biofilm eradication concentration (MBEC) method. In addition, we have assessed the effect of antimicrobial exposure timing.

There were large differences in susceptibility of NTHi biofilm between antimicrobial agents. Beta-lactams had little effect on eradication bacteria in biofilm and biofilm volume. However, macrolides were comparatively effective. Biofilm was inhibited by antimicrobial agents in the early stage of biofilm. However, antimicrobials did not decrease mature biofilm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：滲出性中耳炎 バイオフィルム インフルエンザ菌

1. 研究開始当初の背景

小児滲出性中耳炎は幼小児期の代表的な感染症である。起炎菌としてとくに無莢膜型インフルエンザ菌 *Nontypeable Haemophilus influenzae* (NTHi) は遷延性、反復性の中耳炎と関係が深い。中耳炎難治化には、薬剤感受性の低下、小児免疫機能の未熟が指摘されていたが、バイオフィーム形成も関与することが報告されている。

当施設で採取した無莢膜型インフルエンザ菌 70 株のバイオフィーム形成能をクリスタルバイオレット法で検討すると、バイオフィーム形成能は株によって大きく異なり、様々なバイオフィーム形成能を持つことが判明した。また、アモキシシリン治療に難治性である症例では、治療により改善した群と比べ、バイオフィーム高形成のインフルエンザ菌が多く検出された。

従来 MIC は抗菌薬感受性検査のスタンダードであるが、浮遊菌に対して、増殖を阻害するのに必要な濃度を計測しているだけである。いくつかの抗菌薬では付着細菌を殺菌するには同じ株でも浮遊菌の 1000 倍以上の濃度を要することがある。そのため、*in vitro* の感受性と臨床効果の相違が生じ、MIC はある条件下では不適合である可能性がある。

滲出性中耳炎の難治化機序の解明において、インフルエンザ菌バイオフィームの性質の解明、とくに MIC だけではなく、バイオフィームに対する抗菌薬感受性を考慮することが、重要になると思われる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、無莢膜型インフルエンザ菌臨床分離株のバイオフィーム内細菌の殺菌濃度を検討し、また、バイオフィームの成熟度によって抗菌薬感受性に変化が起こる

か明らかにすることである。

3. 研究の方法

バイオフィーム細菌の感受性を評価できる新しい方法として最小バイオフィーム抑制濃度 *minimal biofilm eradication concentration* (MBEC) を検討した。これは *in vitro* でバイオフィームを形成した細菌に対して抗菌薬を段階希釈して投与し、感受性を表したものである。

また、無莢膜型インフルエンザ菌バイオフィームの早期段階および成熟段階において、抗菌薬濃度を変化させて反応させ、クリスタルバイオレット法で抗菌薬効果について検討した。

4. 研究成果

(1)各菌株の OD570 値を陽性コントロール株の OD570 値で除したものを *biofilm formation index*(BFI)と定義して、*biofilm* 形成能を評価した。*crystal violet* 法によって 70 株の BFI について検討したところ、図 1 のようになり、株によってバイオフィーム形成能には大きく異なることが明らかになった。

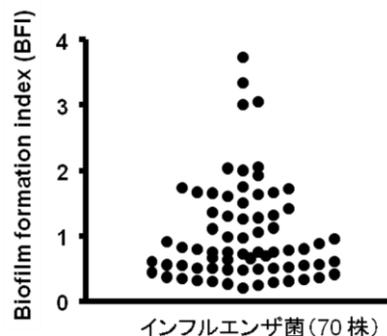


図 1 バイオフィーム形成能

(2)インフルエンザ菌バイオフィームに対する抗菌薬の効果

インフルエンザ菌 16 株における最小発育阻止濃度 MIC, 最小殺菌濃度 MBC、MBEC の累積 100 分率を図 2 に示す。β ラクタム系薬では高濃度でも MBEC に達しないことが分かる。マクロライド系薬では通常量投与における組織内濃度で MBEC に達する株が見られる。ニューキノロン系薬では低濃度でも MBEC に達することが示された。

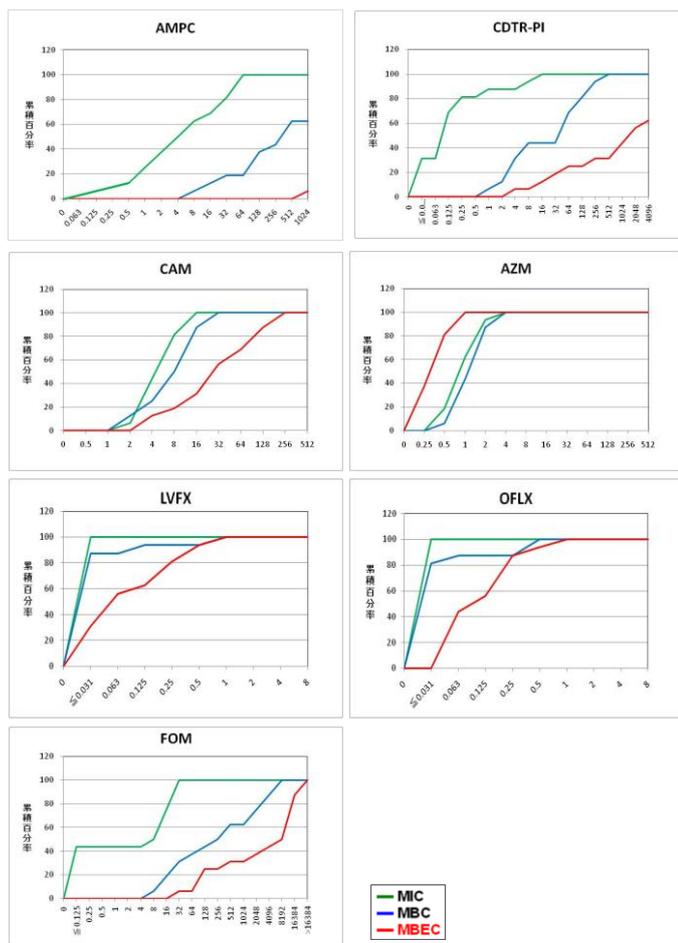


図 2 MIC, MBC, MBEC の累積 100 分率

インフルエンザ菌 4 株でのバイオフィルムに対する抗菌薬の効果を図 3 に示す。すべての抗菌薬で容量依存性にバイオフィルムを減少させた。しかし、アモキシシリンでは臨床的容量では効果はなかった。クラリスロマイシン、アジスロマイシンといったマクロライド系抗菌薬、レボフロキサシン、オフロキサ

シンといったニューキノロン系薬は低濃度で効果が認められた。

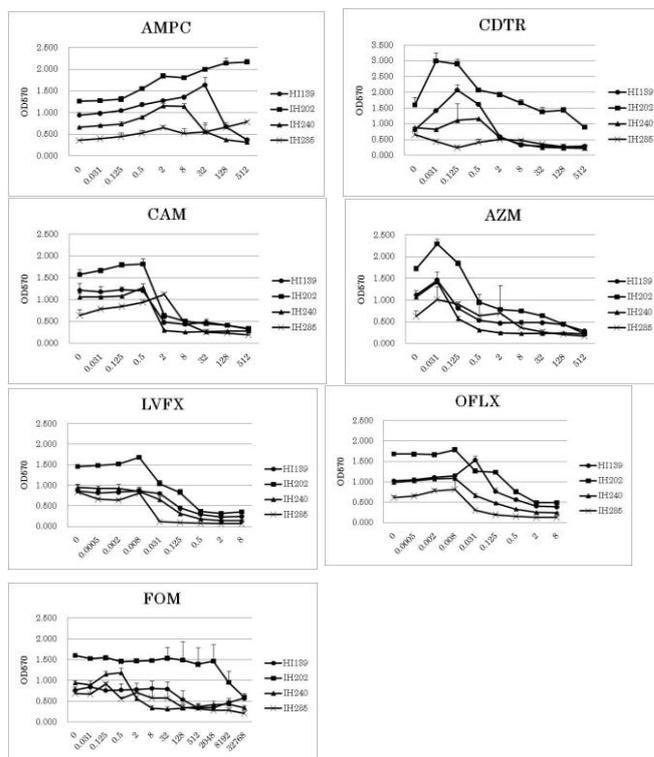


図 3 抗菌薬のバイオフィルムに対する効果の定量的検討。

96 well plate 上に形成させたバイオフィルムに抗菌薬の各濃度を反応させ、走査型電子顕微鏡で観察した。図 4 に示すように、アモキシシリン (AMPC) ではほとんど効果が見られず、クラリスロマイシン (CAM)、アジスロマイシン (AZM) では 0.5MIC にてもバイオフィルム抑制効果が見られ、図 2, 3 の結果と一致した。

(3) 抗菌薬投与タイミングの検討

in vitro で形成させたバイオフィルムの抗菌薬処置を次のように 3 種類に分類した。

- i 抗菌薬処置 24 時間後に更に抗菌薬処置 24 時間を行った持続的処置。
- ii 抗菌薬処置 24 時間後、抗菌薬を含まない培地のみで 24 時間培養した早期処置。
- iii 24 時間培地のみで培養

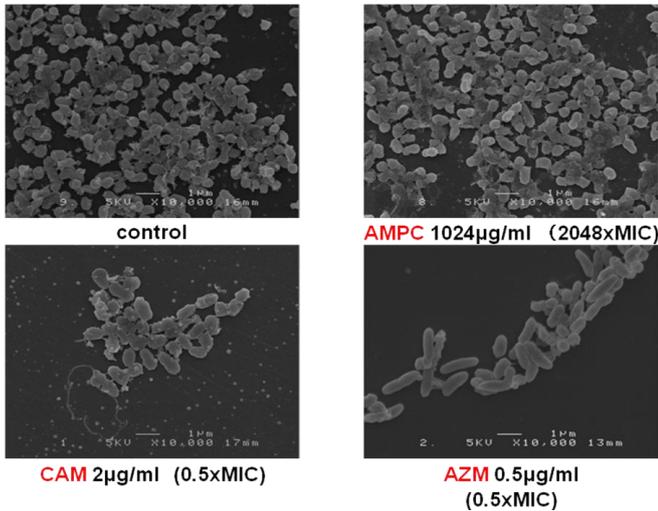


図4 抗菌薬によるバイオフィーム抑制効果の走査型顕微鏡による観察

し、バイオフィームを成熟させてから抗菌薬を24時間投与した遅滞処置。

これらの3法を各抗菌薬濃度で行いクリスタルバイオレット法で評価すると、図5のように、i 持続的処置、ii 早期処置ではバイオフィーム抑制効果が見られるのに対し、iii 遅滞処置では明らかにバイオフィーム抑制効果が減弱した。以上よりバイオフィームに対して抗菌薬の早期使用が有効であることが示唆された。

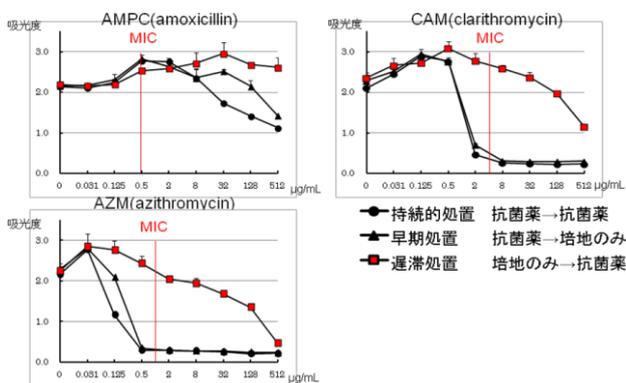


図5.各処置法によるバイオフィーム抑制効果

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)

[学会発表] (計3件)

10th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media

New Orleans, USA, 2011.6.5

Minimal biofilm eradication concentration of antimicrobial agents against *Haemophilus influenzae* isolated from otitis media.

Shin Takei, Muneki Hotomi, Satomi Moriyama, Masaki Hayashi, Yorihiro Ikeda, Shunji Tamagawa, Noboru Yamanaka

第112回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会

京都、H23.5.19

無莢膜型インフルエンザ菌バイオフィームに対する抗菌薬の効果

竹井 慎、保富宗城、森山智美、戸川彰久、田村真司、山中 昇

The 7th International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways

Asahikawa Japan, 2010.7.7

Minimal biofilm eradication concentration of antimicrobial agents against *Haemophilus influenzae* isolated from otitis media.

Shin Takei, Muneki Hotomi, Satomi Moriyama, Akihisa Togawa, Noboru Yamanaka

6. 研究組織

(1)研究代表者 森山 智美 (MORIYAMA SATOMI)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：70423944