

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791800

研究課題名(和文)インフルエンザ菌に対する最小バイオフィーム抑制濃度に基づく新治療戦略の研究

研究課題名(英文) Minimal biofilm eradication concentration of antimicrobial agents against nontypeable *Haemophilus influenzae* isolated from middle ear fluids of intractable acute otitis media

研究代表者

竹井 慎 (Takei, Shin)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：40347589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：急性中耳炎は幼小児期の代表的な細菌感染症であるが、近年難治化・遷延化例が増加し、大きな問題となっている。難治化の機序として、従来まで抗菌薬の無秩序な頻用による薬剤耐性の増加が要因と考えられてきたが、薬剤耐性化によらない難治化の機序、すなわちインフルエンザ菌がバイオフィームを産生することにより急性中耳炎の難治化に關与する可能性が考えられている。本研究ではインフルエンザ菌のバイオフィーム形成および、バイオフィームに対する治療戦略を実験的、臨床的に検討することにより、急性中耳炎難治化の病態解明および治療につながるエビデンスが得られ、抗菌薬使用の減少につながり、医療経済的に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) makes the clinical course of acute otitis media (AOM) intractable by forming biofilm that may hamper the clearance of the bacteria from middle ear cavity. In this study, we evaluated the minimum biofilm eradication concentration (MBEC) of antimicrobial agents against biofilm-forming NTHi strains. Twelve NTHi strains isolated from middle ear fluids (MEFs) of Japanese children with intractable AOM prior to antimicrobial treatments were evaluated for MBEC of fluoroquinolones in comparison with those of β -lactams and macrolides. AMPC and CDTR required much higher concentration, i.e., high MBECs, to suppress the biofilm formation of NTHi. In contrast, fluoroquinolones followed by macrolides showed lower MBECs. The MBEC would be the good parameter to infer the efficacies of antimicrobials against NTHi in biofilm.

研究分野：細菌学

キーワード：バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

細菌は常に液体に浮遊した状態ではなく、生物や無生物の表面に付着した状態でも存在する。表面に付着した菌はマイクロコロニーを形成し、やがて菌体外多糖からなる粘着性の基質を分泌し、バイオフィームといわれる集合体を形成する。バイオフィーム内部では細菌は細胞壁が肥厚したり、代謝活性が低下しているため、浮遊状態よりも抗菌薬対し抵抗性が強く、バイオフィーム内の細菌を殺菌するには浮遊菌の1000倍以上の濃度を要することがある¹⁾。またバイオフィームで表面を覆うことによって菌体抗原を隠し宿主免疫細胞による認識・貪食を妨げる。そのため慢性感染症や医療機器感染症において難治性の原因となり、問題となっている。

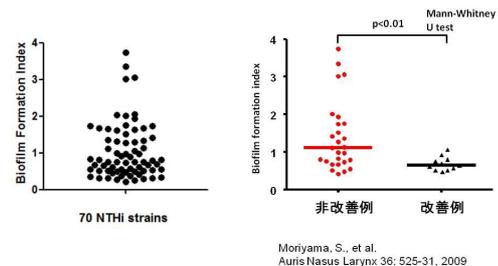
耳鼻咽喉科領域においても中耳炎、副鼻腔炎、扁桃炎などにおいてバイオフィームの関連が報告されている^{2,3,4)}。2002年 Ehrlichらはチンチラ中耳炎モデルにおいて中耳粘膜上に無莢膜型インフルエンザ菌がバイオフィームを形成することを確認し⁵⁾、また、2006年 Hall-Stoodleyらは中耳炎患児の中耳粘膜上にバイオフィームが形成されていることを確認した²⁾。侵襲性感染を引き起こす莢膜型b型インフルエンザ菌よりも中耳炎の起炎菌となる無莢膜型インフルエンザ菌でバイオフィーム形成能が高いことが指摘されている⁶⁾。

自然界においては、細菌はバイオフィーム状態のほうが普遍的で、感染巣においてもほとんどにバイオフィームが関係している。しかし従来まで抗菌薬の有効性の指標である最小発育阻止濃度(MIC)は、浮遊菌を用いた検討であり、実際の生体内におけるバイオフィーム内細菌に対する有効性を反映せず、このことがMICと臨床効果との乖離の要因と考えられる。感染症治療においては、バイオフィーム形成の影響を十分に考慮することが不可欠といえる。近年、急性中耳炎の難治化が指摘されており、原因として起炎菌の薬剤耐性化や、集団保育の低年齢化などが挙げられており、その研究が進められている。しかしながら、我々はバイオフィームも難治性中耳炎に関与している可能性があると考えている。とく

にインフルエンザ菌は肺炎球菌ほど重篤な症状は引き起こさないが、再発性、反復性の中耳炎と関係が深く⁷⁾、我々はインフルエンザ菌のバイオフィームを中心に研究を進めている。我々はすでに急性中耳炎の難治化にインフルエンザ菌バイオフィームが関与することを見出している。すなわち、当施設で中耳炎患児より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検討すると、バイオフィーム形成能はインフルエンザ菌の間でも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。さらに、アモキシシリン治療に難治性である群では、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統計学的有意に多く検出された。このことから、インフルエンザ菌のバイオフィームが臨床上で治療効果に影響することが示された(図1)⁸⁾。

図1. インフルエンザ菌のバイオフィームは臨床経過に影響する

対象: 小児急性中耳炎患児の鼻咽腔より分離された無莢膜型インフルエンザ菌70株
方法: クリスタルバイオレット法による検討。



2. 研究の目的

本研究では、当施設の以前の研究を踏まえ、急性中耳炎の難治化へのインフルエンザ菌のバイオフィームの関与とバイオフィームに対する抗菌薬治療について検討し、難治性中耳炎の治療戦略について考察を進める。

3. 研究の方法

インフルエンザ菌臨床株を用いてバイオフィーム形成をクリスタルバイオレット法にて定量的に測定する。また、現時点での抗菌薬の効果の指標である最小発育阻止濃度 MIC は浮遊菌に対する効果を的確に評価できるが、バイオフィーム状態の細菌に対する効果を評価することはできない。我々は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)**を検討している。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。MBEC 値を測定することで、抗菌薬のバイオフィーム形成に対する抑制効果を検討するとともに有効な抗バイオフィーム治療法について検討を行う。さらに、共焦点レーザー顕微鏡、走査型電子顕微鏡で抗菌薬によるバイオフィームの形態の変化を観察する。インフルエンザ菌のバイオフィーム形成と急性中耳炎の臨床経過、すなわち中耳炎の重症度、罹患期間、抗菌薬治療の有効性、鼻咽腔の保菌状態と比較検討する。detroit 562 (ヒト咽頭癌細胞株)上にバイオフィームを形成させ、抗菌薬の作用を視覚的に観察する

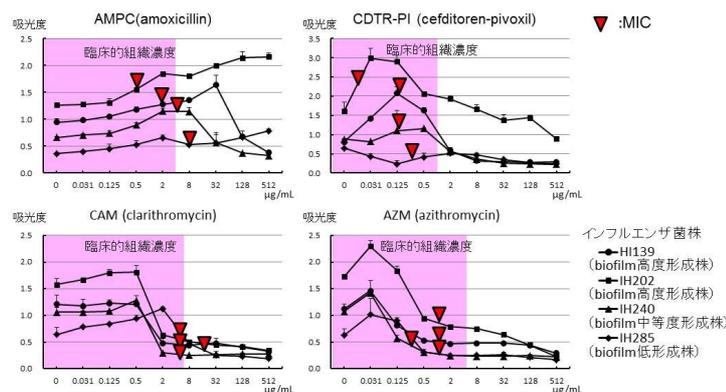
2種の抗菌薬のバイオフィーム形成したインフルエンザ菌に作用させ、チェッカーボード法にて、抗菌薬の相加・相乗効果を検討する。抗菌薬のPK/PD理論では時間依存性抗菌薬・容量依存性抗菌薬に分けられるが、バイオフィームにおいて、時間依存性・容量依存性が成立するのか検討する。また、チンチラを用いた実験的バイオフィーム中耳炎を作成し、抗菌薬の効果について検討する。

4. 研究成果

バイオフィーム内から菌が分離されない最小濃度が MBEC(minimal biofilm eradication concentration)である。我々は予備実験としてインフルエンザ菌臨床分離株で、バイオフィームに対するクリスタルバイオレット法による定量的評価とMBEC法によるバイオフィーム内細菌の抗菌

薬感受性の評価を行ったが、インフルエンザ菌のなかでも株によって様々な感受性を示し、また抗菌薬の種類によって感受性に大きな開きがあった(図6)。

図6. インフルエンザ菌にたいする各種抗菌薬の効果



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)

〔雑誌論文〕(計1件)

Takei S, Minimal biofilm eradication concentration of antimicrobial agents against nontypeable Haemophilus influenza isolated from middle ear fluids of intractable acute otitis media, J Infect Chemother, 査読有り、2013、504-509

〔学会発表〕(計3件)

竹井慎、中耳炎分離インフルエンザ菌のバイオフィームに対する抗菌薬に効果、第113回日本耳鼻咽喉科総会・学術講演会、2012年5月10日～5月12日、新潟市

Shin Takei、Minimal biofilm eradication concentration of antimicrobial agents against Haemophilus influenza isolated from acute otitis media, 11th International Congress of the European Society of Pediatric Otorhinolaryngology, 2012年5月20日～5月23日、Amsterdam
竹井慎、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に効果、第42回日本耳鼻咽喉科感染症研究会・第36回日本医用エアロゾル研究会、2012年9月7日～9月8日、下関市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

竹井 慎 (TAKEI, Shin)

和歌山県立医科大学医学部 博士研究員

研究者番号：40347589

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：