

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861424

研究課題名(和文)慢性副鼻腔炎難治化におけるマクロライド耐性ブドウ球菌の関与

研究課題名(英文)Involvement of macrolide-resistant staphylococci in chronic sinusitis difficulty

研究代表者

兵 行義 (HYO, YUKIYOSHI)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：80412203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：鼻副鼻腔炎は日常する疾患であるが、通常ペニシリン系抗菌薬やマクロライド系抗菌薬の投与により改善することが多い疾患である。特に本邦において慢性鼻副鼻腔炎に対してマクロライド系抗菌薬の少量長期に投与することにより、改善する場合が多い。一方、このような治療法により改善しない場合も認められ、これらが難治性として言われる場合が多い。特に近年難病指定になった、好酸球性副鼻腔炎はブドウ球菌の関与があると言われている。

そこで、我々はマクロライド耐性化した形態変化を及ぼしている病態が難治化の一因を担っているのではないかと研究を遂行した。

研究成果の概要(英文)：Rhinosinusitis is a common disease, but it is a disease that is often improved by administration of penicillin antibiotics or macrolide antibiotics in general. Especially in Japan, it is often improved by administering a small amount of macrolide antibacterial drug for a long period to chronic rhinosinusitis. On the other hand, there are cases where improvement is not achieved by such a treatment method, and these cases are often referred to as refractory. Especially it has been said that eosinophilic sinusitis, which became difficulty designation, has involvement of staphylococci. Therefore, we carried out a study to see if the pathological condition exerting macrolide tolerance-induced morphological change plays a role in refractory.

研究分野：鼻科学

キーワード：ブドウ球菌 マクロライド 形態変化 エアロゾル療法

1. 研究開始当初の背景

(1) 細菌の形態変化と薬剤耐性

抗菌薬の使用が増加したところから、薬剤耐性菌が猛威を振るいだしている。それにより、通常の抗菌治療では改善しない場合も多い。

従来薬剤耐性菌と感受性菌には形態的变化はおこらないと報告されていたが、バンコマイシン耐性ブドウ球菌の細胞壁が形態変化をおこすと1997年に報告された。これが薬剤耐性化するメカニズムとまでいわれるようになり、薬剤耐性菌と形態変化は注目されるようになった。

(2) 鼻副鼻腔炎とマクロライド系抗菌薬

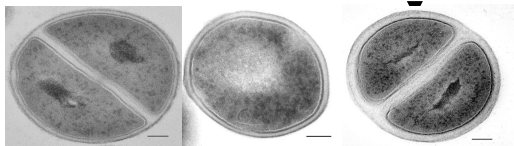
鼻副鼻腔炎は耳鼻咽喉科ではしばしば遭遇する疾患である。本邦から報告されたもので、慢性鼻副鼻腔炎に対するマクロライド療法の治療法は確立されており、本治療法により改善しなかった場合は内視鏡下副鼻腔手術を行う方向性が確立された。しかし、中にはマクロライド療法と内視鏡下副鼻腔手術で改善しない難治性副鼻腔炎があり、近年好酸球性副鼻腔炎なども難病指定をうける疾患である。

(3) 鼻副鼻腔炎と耐性菌

耳鼻咽喉科領域で頻用されている治療法に前述のマクロライド系抗菌薬少量長期療法と同じく抗菌薬をエアロゾル化して噴霧するネブライザー療法がある。1958年に保険認可をうけてから現在まで、日常臨床で使用されているものであるが、これにより薬剤の耐性化を議論されている。

(4) 耐性菌と形態的变化

前述のようにマクロライド療法無効の菌種において形態的变化があることを報告した。



(右) マクロライド耐性菌
(左・真ん中) 感受性菌

2. 研究目的；

以下の4点を目的とした。

鼻副鼻腔に常在する菌種や起炎菌がマクロライド療法をはじめとした抗菌薬療法によりどのような影響を受けるのか？

それにより難治化の因子が増強するのか

バイオフィームなどの形成能はあるのか？

従来のネブライザー療法はどのように行われ、耐性化を助長するかを目的とした。

3. 研究の方法

1) 表皮ブドウ球菌の耐性化と形態的特徴

本学附属病院中央検査部より譲渡された外来患者から得られた臨床材料由来の表皮

ブドウ球菌を集積、継代培養し、各種抗菌薬感受性検査を施行し、感受性の有無について検討する。それらの菌株をもとに臨床由来黄色ブドウ球菌の顕微科学的解析を常法に従って固定・脱水・包埋後ダイヤモンドナイフによる超薄切片をウルトラミクロトームを用いて作成し、透過型電子顕微鏡(TEM, JEM1400, 同センター設置)にて超微形態を観察する。菌体観察像に対し赤道面で切れているものを選択し、その菌体の細胞壁の厚さを3か所以上計測した上で平均化して菌体の細胞壁の厚さと判定し、10菌体以上において得られた値を集積・平均化しその菌株の細胞壁の厚さとする。

また、従来報告されている耐性遺伝子の所有の有無を検索し、エリスロマイシンの最少発育阻止濃度(MIC)と関係性を確認する。

2) バイオフィーム形成能：

Microtiter plate assay を用いて検討した。96穴プレート(Nunc)にTSB液体培地150μlに一晩培養した菌液50μlと接種し、37、48時間静置培養を行い、培地を除去しPBSで3回洗浄後、乾燥、1% Crystal violet 150μl 30分後、PBSで4回洗浄する。その後95% isopropanol 200μlで抽出し、吸光度(490nm)測定。O.D.>0.11でバイオフィーム形成ありと判断する。

3) ネブライザー療法実態調査

日本耳鼻咽喉科学会の7地方部会会員をもとにネブライザー療法の実態調査を行った。アンケートでの郵送法にてのお願いをした。

ネブライザー療法を実施しているか、副鼻腔自然口開大処置を施行しているか、使用している薬剤は何か、抗菌薬、ステロイド、血管収縮薬の有無を求めた。

4. 研究成果

1) 表皮ブドウ球菌の耐性化と形態的特徴

今回の対象は48菌株であったが、耐性株は34株、感受性株は14株であった。その感受性菌の中で従来報告されている耐性遺伝子の *erm C* 1菌株であった。一方耐性化菌種では *erm A* 5菌株、*erm C* 17菌株、*msr A* 6菌株であった。1菌種のみが *erm C* + *msr A* を所持していた。従来報告されていない unknown Gene が7菌種いた。

耐性遺伝子とMICの判定を行うと *erm A*、*erm C* とともにリボゾームの変位を起こす耐性遺伝子を所有しているものはすべて256μg/mL以上であり、薬剤排出ポンプの亢進を促す *msr A* を保持している菌種は6菌株あり、64μg/mLは2菌株、128μg/mLが2菌株、256μg/mL以上が2菌株あり、リボゾームの変位を来すものとは抗菌薬のMICに変化を認めた。

また従来報告されている耐性遺伝子を所有していない菌種が7菌種いたが、これらも64μg/mLが3菌種、128μg/mLが2菌種、256

μg/mL以上が2菌種であることからおそらく未知の遺伝子は薬剤排出ポンプ系の遺伝子の耐性機構が残存していることが示唆された(図1)。

形態的特徴では感受性菌とそれぞれの耐性遺伝子を所有している菌種をそれぞれ確認を行った。

細胞壁の厚さを測定したところ、感受性菌は 20.6 ± 5.5 nmであり *erm A* を所持している菌体では 36.4 ± 5.6 nm であり、*erm C* は 35.2 ± 8.3 nm、*msr A* は 40.3 ± 8.5 nm であった。また両者をもっている *erm C+msr A* を所持している菌体では、 37.5 ± 14.5 nm であり、感受性菌と比較し、有意に細胞壁肥厚という特徴を有していた(図2)。

2) バイオフィルム形成能:

マイクロプレートアッセイ法および電子顕微鏡を用いてバイオフィルムの形成の有無を確認をした。

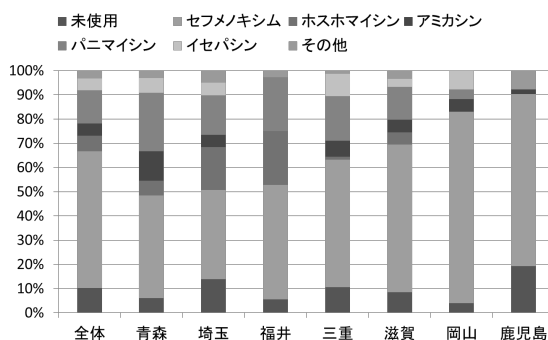
対照群としてブドウ球菌 ATCC35984 株を用いた。

対照群では図3のようにバイオフィルムの形成を確認したが、マクロライド耐性株ではやはりバイオフィルムの形成を確認することが出来なかった。

3) ネブライザー療法実態調査

7 地方部会(青森、埼玉、福井、三重、滋賀、岡山、鹿児島)でアンケート形式で行ったところ、96%の施設でネブライザー療法を施行していた。手術メインの施設や緩和施設は施行されていなかったが、大部分の施設でネブライザー療法を施行していた。

抗菌薬の使用に関しては図のとうりであり、セフメノキシムの使用が最も多く、アミノグリコシド系抗菌薬の使用が次いで多かった。



以前、我々のグループによりアミノグリコシド系抗菌薬の耐性化ではマクロライド系の形態変化と同じように細胞壁肥厚という特徴を有することから、ネブライザー薬液での使用は他の耐性化を助長することになるために使用は控えるべきであると考え。

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 5 件)

1. 兵行義. 副鼻腔炎とネブライザー療法. MB ENTONI 219. 7-15.2018. 査読なし

2. 兵行義, 原 浩貴. 耳鼻咽喉科における新生児・乳幼児・小児への投薬 update-症状から処方する薬物. 鼻がつまっていたも口を開けている MB ENTONI218. 7-15.2018. 査読なし

3. 兵行義. 副鼻腔炎に対するネブライザー療法. 日耳鼻 120. 147-148, 2017. 査読なし

4. 宇野 雅子, 兵行義, 原田 保. 頭頸部癌放射線治療に伴う口腔乾燥と QOL(原著論文)

.耳鼻臨床 補 149 220-226.2017. 査読なし

5. 兵行義. 【耳鼻咽喉科と慢性炎症】耳鼻咽喉科疾患における慢性炎症とバイオフィルム(解説/特集)別冊 BioClinica: 慢性炎症と疾患(5) 70-75. 2016. 査読なし

[学会発表](計 4 件)

1. 兵行義, 松原 篤, 大木 幹文, 竹内 万彦, 藤枝 重治, 清水 猛史, 原田 保, 黒野 祐一. 副鼻腔炎に対するネブライザー療法実態調査(第一報) 第 124 回日本耳鼻咽喉科学会 2017 年 5 月 17-19 日 広島

2. 兵行義, 大木 幹文, 黒野 祐一, 原田 保. 鼻疾患におけるネブライザー療法実態調査 第 55 回日本鼻科学会, 宇都宮, 2016 年 10 月 3 日-5 日.

3. 兵行義. 急性副鼻腔炎に対するネブライザー療法の手引きの概要とその活用法. 適応と前処置. 第 4 回日本耳鼻咽喉科感染症エアロゾル学会, 倉敷, 2016 年 9 月 2-3 日

4. 兵行義, 山田 作夫, 雑賀 太郎, 田中 浩喜, 福島 久毅, 齊藤 峰輝, 原田 保. ブドウ球菌によるバイオフィルム形成に及ぼすブロー液の影響, 第 3 回日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会, 札幌, 2015 年 9 月 3-4 日

[図書](計 2 件)

1. 急性副鼻腔炎に対するネブライザー療法の手引き 2016 年 金原出版 東京 55 頁

2. みみ・はな・のど 感染症への上手な抗菌薬の使い方 知りたい、知っておきたい、知っておくべき使い方 咽喉頭炎 分担執筆. 2016 年 全日本病院出版会. 東京. 235 頁

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

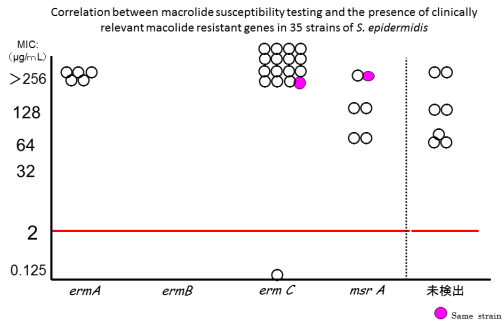
6. 研究組織

(1) 研究代表者

兵行義 (Yukiyoshi Hyo)

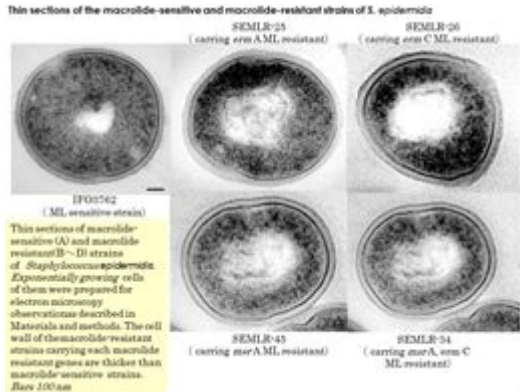
川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号: 80412203

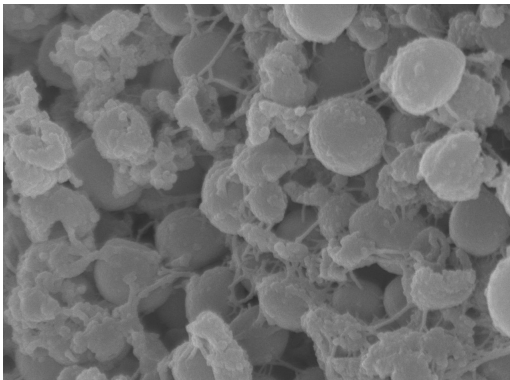


Macrolide resistant (MIC > 256 µg/mL) was noted in 24 isolates, of which 5 isolates carried *ermA*, 16 carried *ermC*, 1 carried *msrA* and 2 resistant isolates did not present with either genes

(㊦ 1)



(㊦ 2)



(㊦ 3)