

## 肺炎球菌の検出率と bacterial biofilm に関する検討

小 関 晶 嗣   鈴 木 賢 二   宮 本 直 哉   馬 場 駿 吉

名古屋市立大学耳鼻咽喉科学教室

田 中 久 夫

厚生連長岡中央病院耳鼻咽喉科

金 子 陽 子

同細菌検査室

杉 山 和 子   吉 岡 真 理 子

名城病院耳鼻咽喉科

西 山 泰 暢

同細菌検査室

### Study of Detection Rate and Bacterial Biofilm of *Streptococcus pneumoniae*

Masashi OZEKI, Kenji SUZUKI, Naoya MIYAMOTO, Shunkichi BABA  
Department of Otolaryngology, Nagoya City University Medical School

Hisao TANAKA  
Department of Otolaryngology, Nagaoka Chuo Hospital

Yoko KANEKO  
Section of Microbiology, Nagaoka Chuo Hospital

Kazuko SUGIYAMA, Mariko YOSHIOKA  
Department of Otolaryngology, Meijo Hospital

Yasunobu NISHIYAMA  
Section of Microbiology, Meijo Hospital

We investigated the detection of *Streptococcus pneumoniae* in the case of acute nasopharyngitis and sinusitis. From 1994 to 1997, *S.pneumoniae* were isolated from the nasal discharge of 185 cases, which were acute nasopharyngitis and sinusitis. Penicillin-insensitive *S.pneumoniae* (Penicillin-insensitive *Streptococcus pneumoniae*:PISP) are isolated from 85 cases, Penicillin-resistant *S.pneumoniae* (Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*:PRSP) are isolated from 45 cases. The number of mucoid-type *S.pneumoniae* are 19 of all *S.pneumoniae*. These strains have the same

sensitivity against the antibiotics as Non mucoid-type *S.pneumoniae*.

And We observed the bacterial biofilm formed by *S.pneumoniae* in vitro. Furthermore, we found the bacterial biofilm formed by *S.pneumoniae* on infected pharyngeal tonsils. From the results We suggested that not only the drug-resistance but also the bacterial biofilm on *S.pneumoniae* may cause the infectious diseases intractable.

## 緒 言

近年、他科領域と同様に耳鼻咽喉科領域においても、肺炎球菌のうちでペニシリンG低感受性肺炎球菌（PISP）あるいは耐性肺炎球菌（PRSP）の検出される割合が増加しており、特に小児の急性中耳炎、急性副鼻腔炎の反復遷延化の一因として懸念されている<sup>1)2)</sup>。

また Bacterial biofilm は Penicillin binding protein の変化による機序とは別の耐性機序として、問題になっている。当教室において、ムコイドタイプの緑膿菌、黄色ブドウ球菌、化膿連鎖球菌等の bacterial biofilm を証明してきた<sup>3)4)</sup>。今回我々は、ムコイドタイプの肺炎球菌を用いて、これまで報告のない肺炎球菌の bacterial biofilm 形成能につき検討した。また低感受性、耐性肺炎球菌（PISP, PRSP）の検出状況の統計的検討を加え、肺炎球菌の耐性機序について考察検討し報告する。

## 対象と方法

### 1. 肺炎球菌の検出率の統計的検討

対象は平成6年～9年の4年間に当耳鼻咽喉科受診し、急性鼻咽頭炎及び鼻副鼻腔炎の診断をくだされ鼻汁より肺炎球菌が検出された185例であった。検体の採取法は患者の鼻汁からシードスワブにて採取した。

また分離培養された肺炎球菌を、MIPIC と CFIX の disk kit 法<sup>5)</sup>を用いて、ペニシリンの耐性度分類を施行した。阻止円の半径にて PSSP（阻止円 19mm以上）、PISP（阻止円 9mm以上 19mm未満）、PRSP（阻止円 9mm未満）とした。

### 2. ムコイドタイプの肺炎球菌の bacterial biofilm の形成能についての検討

慢性扁桃炎の患者から検出されたムコイドタイプの肺炎球菌をヒツジ血液寒天培地にて37度48時間培養し、細菌を培地とともに、2.5% グルタルアルデヒド（0.1%カコジル酸緩衝液 pH7.4）にて前固定し、四酸化オスニウムにて後固定後、50から100%エチルアルコールにて段階的に脱水し、臨界点乾燥後に白金パラジウムにてコーティングし走査電子顕微鏡にて観察した。また慢性扁桃炎の症例より摘出した咽頭扁桃を同様に走査電子顕微鏡にて観察した。

## 結 果

### 検討1

今回の肺炎球菌検出例の年齢分布は、0～15歳が119例、16～49歳が30例、50歳以上が36例であった。0～15歳の群で全体の64%を占めていた。性別は女性72例、男性113例、

### 鼻汁から検出された肺炎球菌の耐性度

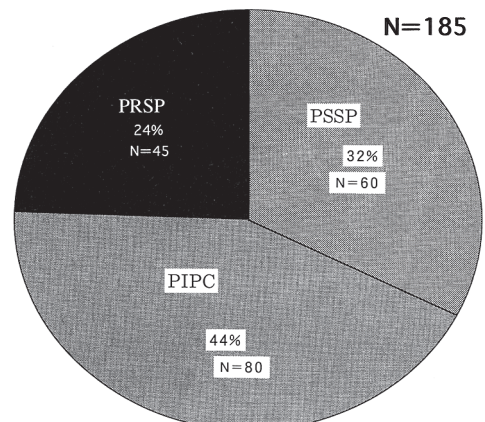


Table1

ムコイド型肺炎球菌検出の症例

疾患名	年齢	性別	耐性度	菌量	ムコイド産生の有無
急性咽喉炎	3	男性	PISP	3	+
急性咽喉炎	15	男性	PISP	2	+
急性咽喉炎	32	男性	PISP	2	+
急性咽喉炎	33	女性	PISP	1	+
副鼻腔炎	7	男性	PISP	3	+
副鼻腔炎	9	女性	PISP	3	+
副鼻腔炎	12	女性	PISP	1	+
副鼻腔炎	29	女性	PISP	3	+
副鼻腔炎	39	男性	PISP	2	+
副鼻腔炎	47	女性	PISP	3	+
副鼻腔炎	74	男性	PISP	2	+
急性咽喉炎	73	男性	PRSP	3	+
副鼻腔炎	11	女性	PRSP	3	+
副鼻腔炎	12	男性	PRSP	1	+
急性咽喉炎	54	男性	PSSP	2	+
副鼻腔炎	12	男性	PSSP	3	+
副鼻腔炎	28	女性	PSSP	1	+
副鼻腔炎	61	女性	PSSP	2	+
副鼻腔炎	67	女性	PSSP	1	+

Table2

ムコイド型肺炎球菌の薬剤耐性度

N=19

	株数	%
PSSP	5	26.3
PISP	11	57.9
PRSP	3	15.8
Total	19	

Table3

年齢は1歳から83歳，平均年齢は29.9歳であった。また疾患別にみると，急性鼻咽喉炎が60例，鼻副鼻腔炎が125例であった。検出菌185株をペニシリンの耐性度別に分類すると PSSP は60株32%，PISP は80株44%，PRSP は45株24%であった。(Table1)

また分離培養の過程において肉眼でムコイド型肺炎球菌とされた株は19株であった。それらの株の薬剤耐性度はPRSP15.8%，PISP57.9%，PSSP26.3%，であった。(Table2,3)

検討 2

培養後の走査電子顕微鏡の観察においてムコイド型の肺炎球菌は bacterial biofilm と思われる像が認められ，非ムコイド型とは明らかな違いが認められた。また臨床例から摘出した咽喉頭扁桃の走査電子顕微鏡像でも bacterial biofilm が得られた。(Fig.1~3)

考 察

National Committee for Clinical Laboratory

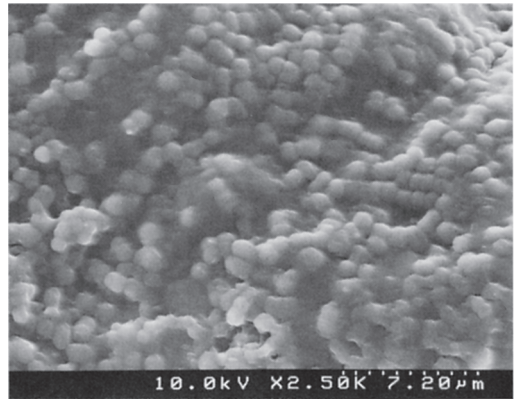


Fig.1 Bacterial biofilm formed by *S.pneumoniae* (in vitro)

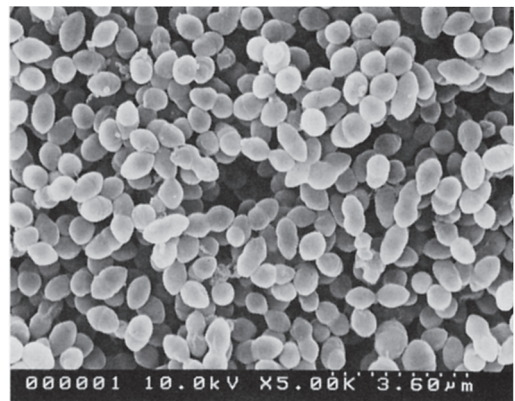


Fig.2 Photomicrograph of non-mucoid-type *S.pneumoniae* (in vitro)

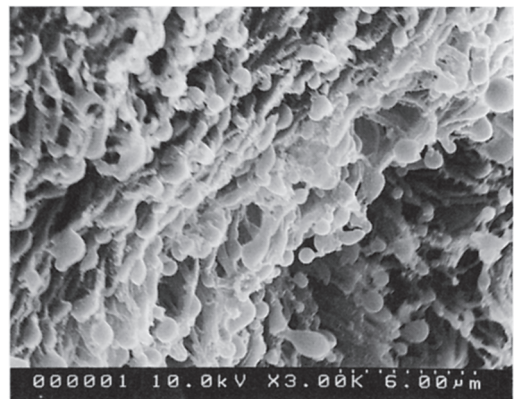


Fig.3 Bacterial biofilm in pharyngeal tonsil

Standards (NCCLS) によれば、肺炎球菌は最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) に基づき PCG の MIC 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  未満を PSSP, MIC 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を PISP, MIC 2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上を PRSP とするされているが、今回の分類においては我々は MPIPC と CFIX の Disk 法による分類法を採用した。検討1において、今回鼻汁から検出された肺炎球菌のうち PISP または PRSP の検出の割合は全検出株 185 株中 125 株の 68% であった。またムコイド型肺炎球菌は 185 株中 19 株の 10.3% であった。これは 98 年に同研究会における田中らの報告<sup>6)</sup> とほぼ同程度であった。

しかし今回、ムコイド型の薬剤感受性による分類ではムコイド型肺炎球菌にも PISP および PRSP が 73.8% 認められた。以前の杉田、出口らの報告によると、PISP および PRSP では莢膜が厚いムコイド型の肺炎球菌生物型 3 型は存在しないとされている<sup>7)</sup>。また田中らの報告<sup>6)</sup> においても杉田らと同様の結果がえられている。この結果の相違については、98 年の田中ら報告で 84 年の杉田、出口らの報告と同様の結果が出ており、年次によるムコイド型肺炎球菌の耐性化の進行も考えにくく、検体の種類、培養条件に差があることから今後引き続き統計的検討が必要と思われた<sup>8)</sup>。

PISP および PRSP は、Penicillin binding protein の変化による薬剤耐性機序とされ問題になっている。今回我々は、in vitro におけるムコイド型肺炎球菌の bacterial biofilm 形成、および習慣性扁桃炎、反復性急性中耳炎の咽頭扁桃における bacterial biofilm 形成を確認した。これは、肺炎球菌の耐性化の異なった機序の一つと考えられた。

今後、実臨床の場においても反復性の急性中耳炎、副鼻腔炎、習慣性扁桃炎等の治療にあたっては、PISP および PRSP だけでなく bacterial biofilm 形成の可能性も考慮に入れ、薬剤選択、

治療方法<sup>9)</sup> の選択していくべきと考えられた。

### 参 考 文 献

- 1) 馬場駿吉, 他: 中耳炎. 副鼻腔炎臨床分離菌全国サーベイランス 第2報—抗菌剤に対する分離菌の感受性—. 耳鼻咽喉科感染症研究会会誌 14:84-98, 1996
- 2) 鈴木賢二, 馬場駿吉, 杉山和子, 西山泰暢, 清水克祐: 耳鼻咽喉科領域における MRSA, PI(R)SP の検出率の動向と抗菌剤使用量の推移. 耳鼻咽喉科感染症研究会会誌 15:135-139, 1997
- 3) 小関晶嗣, 宮本直哉, 馬場駿吉: 鼓膜換気チューブに形成された biofilm の電顕的観察. 耳鼻咽喉科感染症研究会会誌 11:1-3, 1993
- 4) 小関晶嗣, 宮本直哉, 鈴木賢二, 馬場駿吉: bio film を考慮した扁桃感染症における病原性細菌と扁桃常在菌の考察. 耳鼻咽喉科感染症研究会会誌 12:195-198, 1994
- 5) 紺野昌俊らペニシリン耐性肺炎球菌研究会: ペニシリン耐性肺炎球菌. 株式会社協和企画通信, 1998
- 6) 田中久夫: M (ムコイド) タイプの肺炎球菌について. 日本耳鼻咽喉科感染症研究会会誌 16: 26-29, 1998
- 7) 杉田麟也, 市川銀一郎, 藤巻豊: 成人の急性中耳炎の細菌学的検討. 耳鼻咽喉科臨床 77:1119-1125, 1984
- 8) 出口浩一: 肺炎球菌とインフルエンザ菌, 病原性と検出法の問題点. 医薬ジャーナル 33:1092-1101, 1997
- 9) Masashi Ozeki, Naoya Miyamoto, Kenji Suzuki, Motoyuki Hashiba, Shunkichi Baba: Study of bacterial Biofilm infection in the field of otorhinolaryngology. Nagoya Med. J. 41:175-193, 1997

### 結 語

1. 平成6年~9年の4年間に当科関連病院にて検出された肺炎球菌における薬剤耐性度、ムコイド産性能について検討した。
2. 検出された肺炎球菌は 185 株、そのうち PSSP

- は60株, PISPは80株, PRSPは45株であった.
3. ムコイド産性株は19株で, 薬剤耐性度に関しては非ムコイド産性株と差は認められなかった.
4. 慢性上気道炎の症例において, 上咽頭(咽頭扁桃)

にも bacterial biofilm が認められ, 感染の反復, 遷延化の1つの原因であると示唆され, 今後の検討が必要と考えられた.

---

### 質 疑 応 答

質問 洲崎春海(昭和大)

上咽頭組織の走査電顕所見で, Biofilm が認められたと発表されていますが, 付着している粘液か Biofilm かの鑑別はどのようにするのですか.

応答 小関晶嗣(名市大)

細菌塊に付着して認められていることより, 粘液というより Biofilm と考えられると思われます.

連絡先: 小関晶嗣

〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1

名古屋市立大学医学部

耳鼻咽喉科学教室

TEL 052-853-8256 FAX 052-851-5300