

インフルエンザ菌の細胞内寄生と AZM の抗菌作用

島田 純¹⁾ 鈴木 正樹¹⁾ 平岡 政信¹⁾ 小上 真史¹⁾
田村 真司¹⁾ 富田 努²⁾ 斉藤 夕絵²⁾ 山中 昇¹⁾

1 和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科

2 シネ・サイエンス研究所

Antibiotic Effect of AZM on Intracellular-infected *H. influenzae*

Jun SIMADA¹⁾, Masaki SUZUMOTO¹⁾, Masanobu HIRAOKA¹⁾, Masashi OGAMI¹⁾,
Shinji TAMURA¹⁾, Tsutomu TOMITA²⁾, Sachie SAITO²⁾, Noboru YAMANAKA¹⁾

1 Department of Otolaryngology-Head & Neck Surgery Wakayama Medical University

2 Cine-science Institute

As the reason for persistent upper-respiratory-tract infection by *H. influenzae*, this bacteria is assumed to reside in the upper respiratory tract cells and child adenoid cell. In this paper, we investigated the antibiotic effect of AZM on intracellular-infected *H. influenzae* using in vitro infection model. Non-typeable *H. influenzae* (NTHi) was infected to the human epithelial cells and Azithromycin (AZM) or Ceftriaxion (CTR) were added to the cells for 12 hours following the washing of supernatant bacteria. The bacterial growth in the crushed cells were examined using microscope after incubation for 12 hours. The growth of NTHi was not seen in the AZM- treated cells, while NTHi multiplied in the crushed cells in the CTR- treated cells. It was indicated that AZM has the strong killing effect on the intracellular NTHi, while CTR can not kill the intra- or extra- cellular NTHi.

本 文

中耳炎や副鼻腔炎などの小児上気道感染症が反復・遷延化した場合、鼻咽腔からはインフルエンザ菌が継続的に検出され、抗菌薬治療によってなかなか除菌されない症例に遭遇することがある。もともと上咽頭はこうした上気道感染症の carrier focus として働いており、インフルエンザ菌が生息する部位であることが Goldman らによって早くから提唱されている¹⁾。アジスロマイシン (AZM) は 15 員環マ

クロライド系抗菌薬で組織移行性に優れ、食細胞内にも取り込まれることから、感染局所に食細胞が遊走することで細胞内に寄生した細菌にも作用するという特徴がある。今回我々はこのような細胞内に寄生したインフルエンザ菌に対する AZM の抗菌作用について in vitro 実験感染モデルを用いて検討した。

材 料 と 方 法

感染細胞にはヒト喉頭癌由来細胞である

HEp-2 細胞を使用し、感染菌には nontypeable *H. influenzae* 臨床分離株 (I-171 株) を用いた。HEp-2 細胞を 24well マルチプレート (SUMILON) に 1×10^5 cell/well まきセミコンフルエント状態になるまで培養し、インフルエンザ菌を 2×10^6 /well 添加した上で 3 時間培養して感染させ、AZM を 12 時間作用させた。細胞内に感染した細菌に増殖能があるのかどうかを判定するために、AZM を洗い流し寒

天フィルムで培養上皮細胞をつぶしたのち、さらに 12 時間培養を行い位相差顕微鏡にて細菌の増殖の有無を観察した。また培養細胞にギムザ染色を行い、生菌の有無を確認した。感染した培養細胞に薬剤を作用させる際には、in vitro での血中と同様に薬物濃度をシュミレーションする方法として Gross らによる希釈法式 one コンパートメントモデルを用いた²⁾。AZM の対照薬にはセフトリアキソン

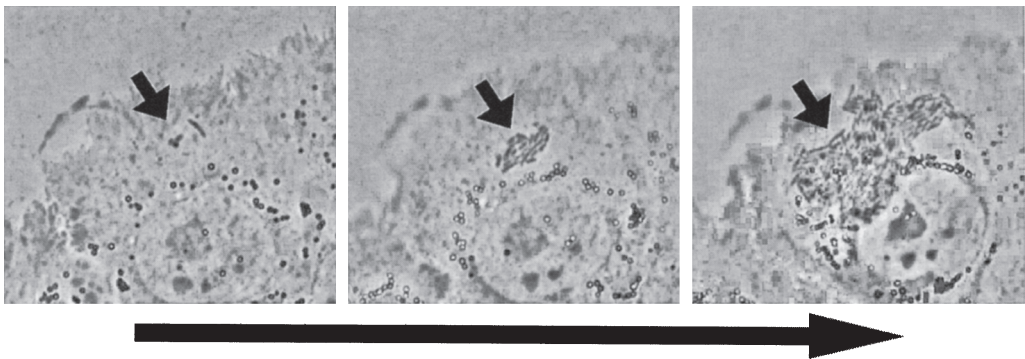


Fig. 1 The effect of CTRX on *H. influenzae* - infected cells

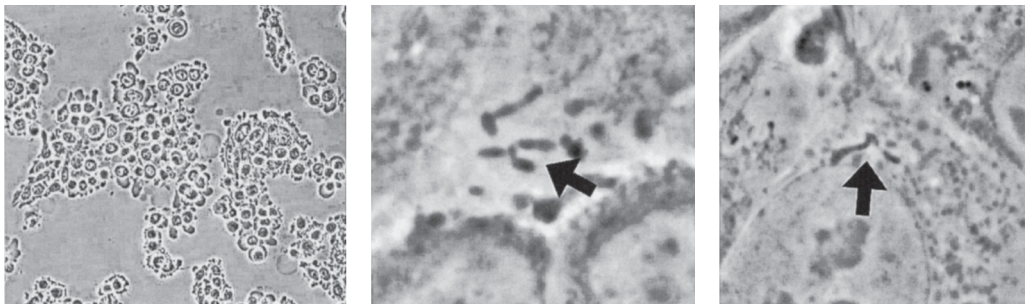


Fig. 2 The effect of AZM on *H. influenzae* - infected cells

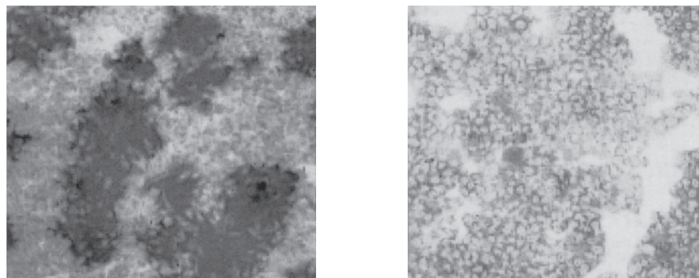


Fig. 3 The effect of CTRX and AZM on *H. influenzae* - infected cells with Giemsa staining (left and right respectively)

(CTRX) を使用した。今回用いた I-171 株の MIC 値は CTRX $4 \mu\text{g}/\text{mL}$, AZM が $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

結 果

2 MIC の CTRX を作用させ、つぶれた培養上皮細胞を経時的に観察すると、培養上皮細胞の中からインフルエンザ菌は増殖し始め、さらに細胞外へと広がっていくのが観察された (Fig. 1)。一方、1 MIC の AZM を作用させた場合では、12 時間培養してもつぶれた細胞内から菌の増殖はみられず、つぶれた細胞の周囲には死滅した菌の残骸が観察された (Fig. 2 矢印)。さらにギムザ染色を行ったところ CTRX 投与群では増殖した細菌コロニーがみられているのに対して、AZM 投与群ではコロニーがみられなかった (Fig. 3)。

考 察

Forsgren らはアデノイド細胞内にインフルエンザ菌が寄生していることを *in situ hybridization* にて証明しており³⁾、小児のアデノイドにおいてインフルエンザ菌が除菌されにくいのは、インフルエンザ菌が細胞内に寄生することで宿主の免疫システムから逃れているのではなかと考察している³⁾。今回我々は、*in vitro* においてヒト上皮培養細胞にインフルエンザ菌を感染させ CTRX, AZM を作用させた場合、細胞内に寄生したインフルエンザ菌に対して抗菌作用を有するのかどうかを検討した。CTRX を作用させた場合寒天フィルムで押しつぶした細胞からは菌の増殖がみられたことより、CTRX は細胞内のインフルエンザ菌に対して抗菌効果を示さなかったと考えられる。ところが、AZM の場合、つぶれた細胞から菌の増殖はみられなかったことより、細胞内のインフルエンザ菌に対して AZM は殺菌的に作用していたと考えられる。以上より *in vitro* において CTRX は細胞に侵入したインフルエンザ菌を

殺菌できないが、AZM は細胞に付着・侵入した菌を共に殺菌できることが視覚的に示された。AZM は他のマクロライド系抗菌薬に比べて、食細胞であるヒト多核白血球内に高濃度に移行し⁴⁾、感染病巣に、より高濃度に分布することがいわれている (ファゴサイトデリバリー)⁵⁾。一般に鼻咽腔で増殖した細菌に対しては主に β -ラクタム薬が使用されるが、細胞内に寄生した細菌に対しては抗菌作用が期待できない。従って、完全な除菌を図る場合には、 β -ラクタム薬に加えて、今回示されたように、細胞内に寄生した細菌に対しても殺菌的に作用する様なマクロライド系抗菌薬を組み合わせた治療法を今後検討して行く必要があると思われる。

参 考 文 献

- 1) GOLDMAN JL, BLOOM SM, HERSCHBERGER C.: Bacteriologic and clinical interpretation of the flora of the nose and nasopharynx in children. *J Pediatr.* 44 (3): 299-303, 1954.
- 2) Grasso S, Meinardi G, de Carneri I, Tamassia V.: New *in vitro* model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 13 (4): 570-6, 1978.
- 3) Forsgren J, Samuelson A, Ahlin A, Jonasson J, Rynnel-Dagoo B, Lindberg A.: *Haemophilus influenzae* resides and multiplies intracellularly in human adenoid tissue as demonstrated by *in situ hybridization* and bacterial viability assay. *Infect Immun.* 62 (2): 673-9, 1994.
- 4) Gladue RP, Bright GM, Isaacson RE, Newborg MF.: *In vitro* and *in vivo* uptake of azithromycin (CP-62, 993) by phagocytic cells: possible mechanism of delivery and release at sites of infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 33 (3): 277-82, 1989.
- 5) Retsema JA, Bergeron JM, Girard D, Milisen WB, Girard AE.: Preferential concentration of

azithromycin in an infected mouse thigh model. J Antimicrob Chemother 31 Suppl E: 5-16, 1993.

質 疑 応 答

質問 上出洋介（かみで耳鼻咽喉科クリニック）

上気道，特にアデノイド組織に寄生したインフルエンザ菌が落下して下気道のインフルエンザ菌感染を作成するモデルがありましたが，同じような機序で中耳におきるものでしょうか。遷延化したインフルエンザ菌感染においても粘膜に寄生したインフルエンザ菌が増悪させているとしたらセフェム系と AZM の併用は効果的でしょうか。

応答 島田 純（和歌山医大）

鼻腔のインフルエンザ菌は中耳腔検出インフルエンザ菌と一致することが PFGE 解析で判明しているが，直接侵入したものか，寄生した細胞が移行したかはわからない。おそらく前者によるものと思われる。

連絡先：島田 純（鈴木 正樹）
〒641-0012
和歌山市紀三井寺 811-1
和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科
TEL 073-441-0651 FAX 073-446-3846