

急性中耳炎の難治化とインフルエンザ菌のバイオフィルム形成との関連に関する研究

竹井 慎 保富宗城 森山智美
田村真司 藤原啓次 山中昇
和歌山県立医科大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

Roles of biofilm produced by *Haemophilus influenzae* on intractable otitis media among children.

Shin Takei, Muneki Hotomi, Satomi Moriyama, Shinji Tamura, Keiji Fujihara, Noboru Yamanaka
Department of Otorhinolaryngology Head & Neck Surgery in Wakayama Medical University, Japan

Purpose Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) is a human-specific respiratory commensal bacteria and causes localized airway infections such as otitis media, sinusitis and bronchitis. Recently, Costerton et al. showed involvement of biofilm into the persistent infections with NTHi. In this work, we evaluated formations of biofilm by NTHi isolated from children younger than 2 years old with acute otitis media (AOM) in comparison with clinical outcome of the disease.

Methods NTHi strains were collected from patients younger than 2 years old with AOM. Productions of biofilm were evaluated by microtiter assay stained with crystal violet and the image of biofilm produced by control strains were obtained from confocal laser scanning microscopy. We evaluated a relationship between biofilm formation ability and clinical outcome.

Results and Discussion We examined biofilm formation ability of 38 AMPC sensitive NTHi strains from children younger than 2 years old with AOM. We treated patients with AMPC, and divided patients into two groups, improvement group and non-improvement group. Biofilm production of NTHi strains from non-improvement group was significantly higher than improvement group. These results suggested that production of biofilm by NTHi was associated with clinical outcome of AOM. It was thought that the biofilm formation influenced treatment failure of AOM as well as immunocompetence of host and drug resistance of bacteria.

目 的

Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) はヒト鼻咽腔常在菌であるとともに、中耳炎、気管支炎、副鼻腔炎などの上・下気道感染症の起炎菌となる。また、Costertonらにより中耳炎、気管支炎などの慢性 NTHi 感染症において高密度の biofilm が形成されていることが報告されている。今回我々は2歳以下の乳幼児における急性中耳炎より分離されたインフルエンザ菌の biofilm 形成と急性中耳炎の臨床経過を比較検討した。

方 法

急性中耳炎患児より分離されたインフルエンザ菌を用い、crystal violet 染色、共焦点レーザー顕微鏡により、biofilm 形成能の検討を行い、急性中耳炎の臨床経過との比較検討を行った。

結 果 と 考 察

2歳以下の急性中耳炎患児から分離された AMPC 感受性のインフルエンザ菌 38 株について biofilm 形成能を検討した。AMPC 投与による急性中耳炎改善群と非改善群に分けると、非改善群から分離されたインフルエンザ菌では、改善群から分離された株より biofilm 形成能が有意に高かった。以上のことから、インフルエンザ菌による biofilm 形成が中耳炎の反復化、難治化の一因と考えられた。急性中耳炎の難治化・反復化には、宿主の免疫能や起炎菌の薬剤耐性化のみでなく、起炎菌自体の持つ特徴も関与することが考えられた。

Key words : biofilm, *Nontypeable Haemophilus influenzae*, acute otitis media, clinical outcome

近年、乳幼児期の急性中耳炎のなかに、抗菌薬治療にもかかわらず、改善しない遷延例や感染を繰り返す反復例などの難治例が増加し問題となっている。難治化の原因として起炎菌の薬剤耐性化、集団保育児の低年齢化および乳幼児期における低免疫能などが挙げられる。急性中

耳炎の起炎菌は、肺炎球菌、インフルエンザ菌、モラクセラ・カタラーリスであるが、なかでも肺炎球菌、インフルエンザ菌が全体の90%以上を占める¹⁾。とりわけ難治性中耳炎においては、インフルエンザ菌が持続的に検出されることが多い。インフルエンザ菌は莢膜を有する a～f の血清型と無莢膜型に分類されるが、気道内に常在し、中耳炎や気管支炎のような局所感染症を引き起こすのは無莢膜型インフルエンザ菌 (*nontypeable Haemophilus influenzae*: NTHi) である。近年、NTHi が起炎菌となっている気管支炎などの慢性感染症においては高密度の biofilm が形成されることが明らかとなっており²⁾、難治性中耳炎においても NTHi が biofilm を形成している可能性が注目されている。

今回我々は、急性中耳炎の難治化の一因としてインフルエンザ菌の biofilm 形成に視点を置き、急性中耳炎の臨床経過とインフルエンザ菌の biofilm 形成について比較検討した。

材 料 と 方 法

実験 1. biofilm 形成能の測定

対象

2002年～2005年に和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科および関連施設を受診した2歳以下の急性中耳炎患児28例の鼻咽腔より分離されたNTHi計70株を用いた。

crystal violet 法による Biofilm 形成能の定量的検討

biofilm 形成能を crystal violet 法³⁾により定量的に評価した。インフルエンザ菌を Haemin および Nicotinamide dinucleotide (NAD) 含有 Brain heart infusion 培養液にて OD₆₆₀=0.3 まで振蕩培養した後、同培養液にて OD₆₆₀=0.1 まで希釈し、96 ウェルマイクロプレートにて 37℃、5% CO₂ 下に 8～18 時間培養した。マイクロプレートを滅菌 PBS で洗浄し、形成された biofilm を 0.5% crystal violet を用いて染色。30% acetic acid で crystal violet を溶出し吸光度 (OD₅₇₀) を測定

した。陽性コントロールには NTHi 株 No.139 を、陰性コントロールには NTHi 株 No.102 (長崎大学熱帯研究所より分与) を用いた。

共焦点レーザー顕微鏡による biofilm 形成の検討

共焦点レーザー顕微鏡を用いて biofilm 形成を画像的に評価した。インフルエンザ菌を 96 ピンレプリケーターつき 96 ウェルプレートにて 18 時間振蕩培養してピンに biofilm を形成させ、lectin 染色および SYTO9 による核酸染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて確認した。biofilm の菌体外多糖の染色には、糖鎖末端のシアル酸に特異的に結合する lectin で染色を行い、biofilm 内部の生菌を染色するため、核酸に結合する SYTO9 で染色した。

実験 2. 急性中耳炎臨床経過と biofilm 形成能の関係

対象

2002 年～2005 年に和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科および関連施設を受診した 2 歳以下の急性中耳炎患児 28 例の鼻咽腔より分離された NTHi 株のうち、biofilm 形成があり、アンピシリン (ABPC) MIC $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ の 38 株を対象とした。

biofilm 形成能の評価

初回治療として amoxicilin 40mg/kg の 3～5 日間投与を行い、治癒した症例を改善群、抗菌薬投与にもかかわらず鼓膜所見の改善しない症例を非改善群として、crystal violet 染色による定量法で biofilm 形成能を評価した。

結 果

実験 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。陽性コントロール株の OD₅₇₀ 平均値 - 2SD を平均値で除したものを陽性下限と定めた。陽性・陰性のカットオフ値は BFI=0.4 となった。

crystal violet 法によって 70 株の BFI について検討したところ、70 株のうち、59 株 (84.3%) が陽性となった。

陽性コントロール株および陰性コントロール株における共焦点レーザー顕微鏡像を Fig.1 に示す。シアル酸染色では biofilm 形成が示され、SYTO9 による核酸染色像ではインフルエンザ菌生菌が示される。陽性コントロール株では、ピン上にインフルエンザ菌が biofilm 形成をし、菌が多数存在するのに対し、陰性コントロールでは、biofilm 形成、菌の付着はわずかであった。crystal violet 染色法による biofilm 定量的評価と、共焦点レーザー顕微鏡による画像評価の比較を Fig.2 に示す。crystal violet 染色法による biofilm formation index が高くなるほど、シアル染色および核酸染色像がつよく、biofilm を多く形成し、付着菌が増加していることが分かった。

実験 2.

急性中耳炎改善例、非改善例におけるバイオフィーム形成能の結果を Fig.3 に示す。急性中耳

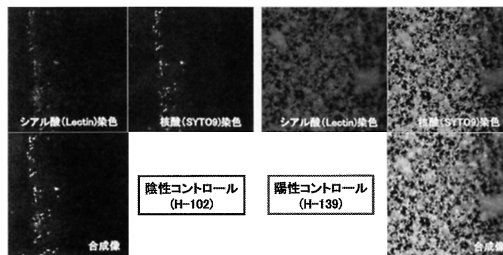


Fig.1 evaluation of NTHi biofilm formation with confocal laser scanning microscopy

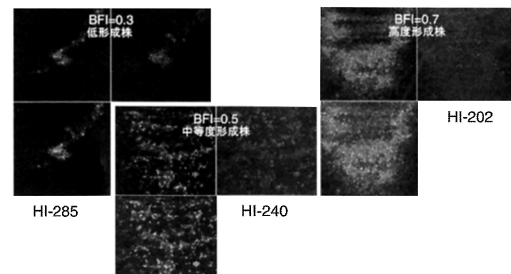


Fig.2 correspondence with confocal laser scanning microscopy and biofilm formation index (BFI)

炎改善例より分離された無莢膜型インフルエンザ菌に比較して、非改善例より分離された無莢膜型インフルエンザ菌では、biofilm 形成が有意に高かった (Mann-Whitney U test $p < 0.01$).

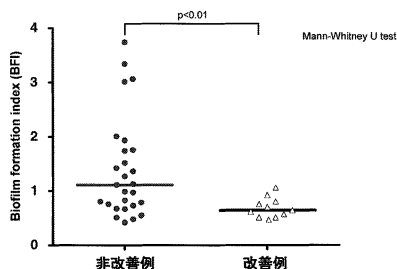


Fig.3 comparison with biofilm formation of ABPC sensitive NTHi in the improvement group by AMPC treatment and non-improvement group

考 察

NTHi は上気道常在菌の一つであり鼻咽腔細菌叢を形成するとともに生体へ持続感染し、難治性の慢性気道感染症を起こしうる⁴⁾。マウス肺感染モデルでは、NTHi 持続感染株に対しての炎症反応が弱いことや、持続感染を来たした NTHi 株は慢性閉塞性肺疾患の急性増悪に関与する頻度が低いことが報告されている^{5, 6)}。

本研究では小児急性中耳炎患児鼻咽腔から分離された NTHi 株を用いて biofilm 形成能を検討した。crystal violet 法にて定量的に biofilm 形成能が評価できることが分かり、小児急性中耳炎患児 28 例の鼻咽腔より分離された NTHi 計 70 株において検討すると、59 株 (84.3%) が biofilm 陽性となった。共焦点レーザー顕微鏡にて biofilm を実際に観察し、biofilm formation index と比較すると、共焦点レーザー顕微鏡像における biofilm 形成の程度と biofilm formation index が一致し、crystal violet 法が biofilm 形成能の定量的評価法として有用であると考えられた。

感染症の臨床では MIC による評価では抗菌薬感受性があるのに、臨床経過が良くない症例をよく経験する。これは MIC が分離された浮遊菌を

用いた検討であり、実際の生体における細菌に対する有効性を反映しないためと考えられ、原因の一端として biofilm によって細菌が抗菌薬に抵抗性を持つことが考えられる。今回の研究で小児急性中耳炎患児の臨床経過と NTHi の biofilm 形成能を検討した結果、biofilm 形成が抗菌薬治療に対する抵抗性に関与する可能性が示唆された。ABPC に感受性のある 38 株において症例を改善例と非改善例の 2 群に分けると、非改善例において、biofilm 形成能が有意に高かった。ABPC 耐性を持たない感受性株でも biofilm を形成して抗菌薬に抵抗する可能性が示唆された。急性中耳炎の難治化の一因として、抗菌薬耐性、宿主免疫能の他に、biofilm が関与することが示唆された。

参 考 文 献

- 1) 山中昇, 保富宗城; 小児中耳炎のマネジメント; 医薬ジャーナル社 2006.
- 2) Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.
- 3) O'Toole, G. A., R. Kolter. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol.* 28:449-461.
- 4) Barnette, S. W., A. Rockel, W. E. Swords. 2006. Biofilm growth increases phosphorylcholine content and decreases potency of nontypeable *Haemophilus influenzae* endotoxins. *Infect. Immuni.* 74:1828-1836.
- 5) Murphy, T. F., A. L. Brauer, A. T. Schiffmacher, and S. Sethi. 2004. Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170:266-272.
- 6) Sethi, S., N. Evans, B. J. Grant, and T. F. Murphy. 2002. New strains of bacteria

and exacerbations of chronic obstructive
pulmonary disease. N. Engl. J. Med.
347:465-471.

連絡先：竹井 慎

〒640-8510

和歌山県和歌山市紀三井寺811-1

和歌山県立医科大学 耳鼻咽喉科

TEL 073-447-2300 (内線 5417)