

# 論文内容の要旨

## The relationship between respiratory infections caused by *Haemophilus influenzae* and the biofilms

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 加地 千春

### [目的]

昨今、高齢化や耐性菌の増加に伴い、難治性感染症は増加の一途をたどっている。感染症の難治化には様々な要因が関与しているが、これまで十分解明されていなかった。近年、病原体側の難治化要因に細菌が形成するバイオフィーム (BF) の関与が報告され、難治性感染症や院内感染症の重大な要因と考えられるようになった。現在では自然界に存在する菌は浮遊菌として存在するのではなく、BF を形成し生存していると考え直されつつある。細菌性 BF は、細菌が作り出す多糖体を主成分とする膜と細菌の集合体であると定義され、薬剤や免疫機構から回避する要因となるため治療難治化の一因となる。

一方、我々はこれまでに本邦をはじめアジア諸国において中耳炎や下気道感染症の主要な起炎菌である非莢膜保有インフルエンザ菌 (*Nontypeable H. influenzae*: NTHi) の分子疫学的解析を行った結果、 $\beta$ -lactamase-negative ampicillin (AMP) - resistant (BLNAR) - NTHi 株が増加傾向であることを報告している (Watanabe et al. 2005, 2007)。また NTHi が引き起こす難治性副鼻腔炎や慢性中耳炎の病態が、NTHi 産生 BF と難治化に深く関与している可能性があることが報告された (Greiner LL et al. 2004)。

これらの耐性化と細菌性 BF 感染症の背景より、耳鼻科・小児科領域では治療難治例が増加し、臨床上極めて大きな問題となっている。しかしながら、BLNAR - NTHi 株をはじめ NTHi 産生 BF における抗菌薬の影響や効果を裏付ける十分な研究が未だなされていないのが現状である。そこで我々は、遷延性の NTHi 感染症における新たな治療法を探るために臨床分離株を用い、BF に及ぼす各種抗菌薬の影響を明らかにする目的で下記の研究を行った。

### [実験方法]

各種抗菌薬の BF 形成に与える影響を測定するために、 $\beta$ -lactamase-negative AMP - susceptible (BLNAS) 及び BLNAR - NTHi 臨床分離株を 48 時間培養し BF を形成後、AMP, cefotaxime (CTX), erythromycin (ERY), clarithromycin (CLR), levofloxacin (LVX), gatifloxacin (GAT) を 0.1, 1, 10 $\times$  Minimum Inhibitory Concentration (MIC) 濃度 BF に添加し、Microtiter biofilm assay を用い各抗菌薬添加群と非添加群間を比較した。また BF 内生菌に及ぼす効果と BF 産生量を検討するため、Continuous flow cell chamber を用いて BLNAR-NTHi 株を 48 時間培養し BF を形成後、AMP, CTX, ERY, GAT を 0.1, 1, 10 $\times$  MIC 濃度添加し、各抗菌薬添加群と非添加群間における BF 内の生育菌数を測定し、COMSTAT assay を用いて BF 産生量を性状とし比較検討した。なお比較には、Student's *t* 検定を用いた。

#### [結果]

Microtiter biofilm assay では BLNAS-NTHi および BLNAR-NTHi 株に対し、各 AMP, CTX, ERY, CLR 添加群は非添加群と比べ、すべての低濃度から高濃度の  $10\times\text{MIC}$  においても有意差を示す BF 形成抑制効果は認められなかった。しかしながら、LVX 添加群においては、低濃度  $1\times\text{MIC}$  以上から、GAT 添加群は更に低濃度の  $0.1\times\text{MIC}$  以上で有意差をもって非添加群に比べ BF 形成抑制効果を認めた。

一方、Continuous flow cell chamber を用いた検討では、各抗菌薬群と非添加群間の BF の性状に関して違いを示さなかったが、GAT 添加群は  $1\times\text{MIC}$  で優位な BF 内生菌量の減少がみられ、 $10\times\text{MIC}$  では菌の生育は認められなかった。

#### [結論]

本研究により、フルオロキノロン剤である LVX, GAT が、*in vitro* で NTHi 感受性株および耐性株産生 BF に対して、BF 性状へ影響を与えずに、BF 内生菌を低濃度で殺菌する効果が AMP, CTX, ERY, CLR に比べ極めて高いことが明らかとなった。現在ほとんどのフルオロキノロン剤は小児への適応が認められていないが、いくつかのフルオロキノロン剤は小児の難治性中耳炎、肺炎症例への臨床試験が実施あるいは検討されているところであり、これらの結果は、耳鼻科、小児科領域で重大な問題となっている難治性 NTHi 感染症克服への新たな治療戦略の一つとして重要な基礎的知見となるものと考えられる。

#### [参考文献]

- (1) Greiner LL, Watanabe H, Phillips NJ, Shao J, Morgan A, Zaleski A, Gibson BW, and Apicella MA. Nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 2019 produces a biofilm containing *N*-acetylneuraminic acid that may mimic sialylated O-linked glycans. *Infect. Immun.* 72: 4249-4260 (2004)
- (2) Watanabe H, Kaji C, Anh DD, Huong Ple T, Anh NT, Huong VT, Phuong HV, Thi NT, Suu PT, Nguyet NT, Rusizoka OS, Watanabe K, Nagatake T, Oishi K. Comparative molecular analysis of *Haemophilus influenzae* isolates from young children with acute lower respiratory tract infections and meningitis in Hanoi, Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 43: 2474-2476(2005)
- (3) Watanabe H, Batuwanthudawe R, Thevanesam V, Kaji C, Qin L, Nishikiori N, Saito W, Saito M, Watanabe K, Oishi K, Abeysinghe N, Kunii O. Possible prevalence and transmission of acute respiratory tract infections caused by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* among the internally displaced persons in tsunami disaster evacuation camps of Sri Lanka. *Intern. Med.* 46: 1395-1402. (2007)