

論文の内容の要旨

論文題目 高酸素吸入が急性緑膿菌感染肺炎に及ぼす影響
—そのメカニズムと治療法に関する研究

指導教員 滝澤 始助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 菊池 好晃

I. 背景と目的

人工呼吸器関連肺炎 (ventilator-associated pneumonia, VAP) は、気管挿管時には肺炎が認められなかった患者に、気管挿管による人工呼吸器管理開始後 48～72 時間以降に発症する肺炎と定義される。人工呼吸器が装着されている患者の 8～28% が肺炎に罹患し、VAP に罹患した挿管患者の死亡率は 24～50%、特殊な場合には 76% を超え、肺炎に罹患していない挿管患者の死亡率 1～4% と比較して、非常に高い死亡率を認めている。VAP の起炎菌の頻度としては、緑膿菌が約 25% と一番高く、重要な菌であることは既にわかっている。また、VAP に対して、高酸素投与が必要となる場合や、挿管された時点ですでに高酸素投与を施行されていることが多い。しかし、酸素自体には毒性があり、肺炎患者において高酸素を投与した場合、どのような悪影響が生じるかについてはわか

っていない。そこで今回、VAPにおける最も頻度の高い起炎菌である緑膿菌について、肺炎動物モデルを作製し、高酸素の影響やその病態およびメカニズムについて明らかにすることを目的とし、また、緑膿菌感染肺炎+高酸素に対する治療法として、緑膿菌感染をともなったびまん性汎細気管支炎 (diffuse panbronchiolitis, DPB) や嚢胞性線維症 (cystic fibrosis, CF) 患者に効果が認められているマクロライド系抗菌薬について検討した。

II. 材料および方法

1. 使用菌株および細胞

緑膿菌標準株として PAO1、肺上皮細胞として A549 cell line を使用した。

2. マウス感染モデル

PAO1 を Balb/cAnNCrJCrJ マウスに経鼻的に感染させ、酸素 90% を 24 から 60 時間暴露した。24 時間暴露した後、肺および肝臓の生菌数、肺重量、肺胞洗浄液中のアルブミン量、肺のサイトカイン濃度および M30 抗体活性を測定した。また、感染のみ、酸素 90% を 60 時間暴露のみ、または、感染+酸素 90% を 60 時間暴露の 3 群について、生存率を比較検討した。

3. サイトカイン、アルブミン量、M30 抗体活性(上皮細胞のアポトーシスマーカー)の測定

サイトカイン、アルブミン量、M30 抗体活性の測定は市販の ELISA キットを用いて測定した。

4. 細胞 viability の変化

PAO1 を Muller Hinton broth に加え、24 時間細菌培養し、その broth 中から、フィルターによって細菌を除去したものを上清液として作製した。この上清液を、A549 に添加し、酸素 21% または 90% の条件下にて 24 から 48 時間作用させ、viability をテトラカラー(生化学工業)にて測定し、培養液添加、非添加、あるいは酸素 21% と 90% の条件の違いについて比較検討した。また、病原因子を探索する実験では、上清液と同時に各種プロテアーゼインヒビターを A549 に添加し、同様に viability を測定した。

5. in vitro におけるマクロライド薬の効果

Muller Hinton broth 中で、各 2.5、5、10 μ g/ml の濃度になるようにアジスロマイシン(AZM)、エリスロマイシン(EM)、ロキシスロマイシン、クラリスロマイシン(CAM)、オレアンドマイシン、ジョサマイシン、ロキタマイシン、ミデカマイシンあるいはテリスロマイシン(TEL)を加え、この中で PAO1 を培養した。この培養液から同様に上清液を作製し、高酸素条件下で A549 に添加し、viability を評価した。

6. in vivo における AZM の効果

AZM を緑膿菌感染 2 日前から感染後 2 日まで計 5 回、あるいは、感染直後から感染後 2 日まで計 3 回経口投与し、60 時間 90% 酸素環境下で飼育した後、生存率を AZM 投与群と非投与群の間で比較検討した。また、感染 24 時間後の肺および肝臓の生菌数を測定した。

III. 結果

高酸素投与は緑膿菌感染肺炎モデルのマウスの死亡率を有意に増加させた。このとき、肺内生菌数、肺重量、肺胞洗浄液中のアルブミン量および肺サイトカイン濃度および M30 抗体活性について、室内気と高酸素環境下の飼育に有意な差は認められなかった。しかし、肝臓内の生菌数については、高酸素下飼育マウスは室内気と比較して、有意に生菌数の増加が認められた。このことから、病態として敗血症の関与が疑われた。

菌培養上清液を肺上皮細胞へ添加し、酸素 90% 条件下で細胞培養をした場合、21% で細胞培養をしたものと比較すると、早期から肺上皮細胞の剥離や細胞の形態変化が生じ、肺上皮細胞の *viability* の低下が増強された。しかし、緑膿菌自体を酸素 90% 条件下で細菌培養し作製した上清液と、酸素 21% で細菌培養し作製した上清液の間、あるいは、上清液自体に酸素 90% を暴露した場合と暴露していない場合の間には、細胞に与える影響に差は認めなかった。これらの結果から、高酸素の作用点は宿主(上皮細胞)側にあり、高酸素は上清液中の病原因子の上皮細胞に対する感受性を高めているものと考えられた。

次に細胞の *viability* を低下させる上清液中の病原因子について検討した結果、高酸素下での上清液による細胞の *viability* の低下は、各種プロテアーゼ阻害剤の中で、メタロプロテアーゼ阻害剤のみが *viability* の低下を抑制した。このことから、メタロプロテアーゼが重要な病原因子の 1 つである可能性が示唆された。

また、5~10 μ g/ml 濃度の EM、CAM、AZM、および TEL と緑膿菌と一緒に Muller Hinton broth の中に加え培養し作製した上清液は、肺上皮細胞

の剥離および viability の低下を示さなかった。さらに、AZM について *in vivo* で検討した結果、AZM を緑膿菌感染 2 日前から 2 日後まで計 5 回経口投与し、酸素 90% を 60 時間暴露した場合は、AZM を投与していない群と比較して有意に生存率の改善が認められた。また、AZM を投与したことによって、肝臓から認められていた生菌の検出が認められなくなった。しかし、AZM を緑膿菌感染直後から 2 日後まで計 3 回経口投与した場合には、有意な差は認められなかった。これらの結果から、14 員環、15 員環のマクロライドあるいはケトライド系抗菌薬は、高酸素 + 緑膿菌感染肺炎に対して肺上皮細胞傷害を防御する効果があり、予防的投与にて生存率を改善することが認められた。

IV. 考察

高酸素暴露は緑膿菌感染肺炎に対して死亡率を著明に増加させることが認められ、この病態として敗血症の関与が疑われた。病態のメカニズムの 1 つとして、緑膿菌が気道上皮細胞に感染すると、病原因子の 1 つであるメタロプロテアーゼを産生分泌する。このメタロプロテアーゼは肺上皮細胞の剥離や細胞傷害を引き起こす。しかも高酸素の存在下では宿主側のメタロプロテアーゼに対する感受性を高め、その結果、上皮細胞が強く傷害され、バリアー効果を失い、菌の浸透性が増強され、敗血症へと進展し死亡率が上昇すると推測された。しかし、メタロプロテアーゼのみでこの病態すべてを説明できるわけではなく、今後は、各病原因子の阻害剤の効果や他の菌種について検討する必要があると考えられた。

マクロライド系抗菌薬は緑膿菌のプロテアーゼ産生を抑制することが多数報告されている。今回の病原因子としてメタロプロテアーゼの関与が考えられることから、マクロライド系抗菌薬の効果について検討した。その結果、緑膿菌培養上清液を添加した肺上皮細胞を高酸素に暴露させて生じる細胞の形態変化や viability の低下を、14、15 員環のマクロライドやケトライド系抗菌薬が抑制し、また、緑膿菌感染肺炎+高酸素の動物実験モデルにおいて AZM の予防投与によって生存率を改善することが認められた。これらの結果から、14、15 員環のマクロライドやケトライド系抗菌薬の VAP の予後や発症率の改善を目的とした予防的投与が有効である可能性が考えられた。また、マクロライド系抗菌薬には、気道上皮における気道分泌の抑制作用、IL-8 やロイコトリエン B₄ など好中球遊走因子の産生抑制、活性化 T 細胞の減少、単球・マクロファージに対しては、分化、増殖を促進するなどの報告がなされている。このような宿主に対する作用も今回の緑膿菌感染肺炎マウス+高酸素の生存率の改善に関与している可能性もあり、マクロライド系抗菌剤投与における肺内のサイトカイン、ケモカインなどの変化など、今後、生体側の反応を検討していく必要があると考えられた。

現在、VAP における AZM の予防的投与の効果を確認するために臨床試験中である。すなわち、ICU に入院され挿管が必要となった患者を対象に、挿管時から AZM 投与する群と投与しない群の 2 群に分け、VAP の発症率、予後、起炎菌の頻度などを比較検討しているところである。VAP の死亡率改善や予防を目的とした挿管患者に対する AZM の予防的投与は、新しい治療法として有効であるか、結果が待たれるところである。