

論文内容要旨

研究目的

緑膿菌は慢性気道感染症の主要起炎菌の一つで、主に免疫の低下した宿主へ侵入するが、呼吸器系もその主要標的部位の一つで、局所で種々の外毒素を産生し病原性を発揮する。一般に抗菌薬に抵抗性であり、種々の抗菌薬が開発された現在でもその治療に難波することが多い。マクロライド系抗菌薬は一般に緑膿菌には無効であり臨床的に到達可能な投与量では殺菌不可能であるが、殺菌作用を発揮しないとされる最小発育阻止濃度以下 (sub-MIC) において *in vitro* で緑膿菌の病原因子の産生を抑制し、かつ菌の外膜や LPS の組成を変化させることが報告されている。以上の背景から、本研究では sub-MIC の臨床的に到達可能な濃度の抗菌薬、特にマクロライド系抗菌薬に曝露された緑膿菌について、その *in vivo* での病原性をマウス経鼻感染モデルにより検討した。

研究方法

抗菌薬は、クラリスロマイシン、エリスロマイシン、アジスロマイシン、ジョサマイシン、オレアンドマイシン、トブラマイシン、ミノサイクリン、クリンダマイシン、オフロキサシン、セフトジジムを用いた。標準株 PAO-1 および臨床分離株 8 株の緑膿菌を用い、sub-MIC の臨床的に充分到達可能な濃度 (MIC の 1/4-1/32) の上記抗菌薬を含有する培地上で菌を培養した。生理食塩水で菌液を調製してマウスへ 3.0×10^7 CFU を経鼻接種し、接種 48 時間後までのマウスの致死率を求めた。さらに、接種から 3, 6, 9 時間後に気管支肺胞洗浄を行い洗浄液 (BALF) 中の蛋白量、TNF- α 、NO を測定して血管透過性の指標とした。また、緑膿菌の病原因子の一つであるエラスターゼ、exotoxin A の 1/2LD50 相当量を経鼻接種した。エラスターゼについては、緑膿菌接種後のマウス BALF 中の濃度を測定した。

研究結果

sub-MIC でのクラリスロマイシン、エリスロマイシン、アジスロマイシンの存在下で培養された緑膿菌 PAO-1 を接種されたマウスは、48 時間以内に約 80% 以上が死亡した。その他の抗菌薬の前処置群や対照群では、マウスは全て生存していた。クラリスロマイシンの存在下で培養した PAO-1 を加熱殺菌後に接種したがマウスの死亡は見られなかった。複数の臨床分離株においてクラリスロマイシンと比較すると、前処置群は対照群と比較してマウスの致死率が上昇し、接種 6 時間後の BALF 中の蛋白量は増加していた。以後は PAO-1 で比較すると、クラリスロマイ

シン処置群では、BALF中のTNF- α は接種から3時間後に、NOの産生と蛋白量は6、9時間後に、対照群と比較して有意に増加していた。接種24時間後のマウス肺の組織所見では対照群と比較して出血性変化が著明であった。緑膿菌エラスターゼ接種後に肺の出血性変化がみられたがexotoxin Aの接種時にはみられなかった。また、エラスターゼの濃度も前処置群で6、9時間後に増加していた。しかしこの測定系では緑膿菌由来のエラスターゼとマウス由来のエラスターゼとを区別できなかった。

考察および結論

以上の結果から、sub-MICのクラリスロマイシン、エリスロマイシン、アジスロマイシンに曝露された緑膿菌は菌の外膜組成を変化させ、宿主の呼吸器系細胞との相互作用により局所でエラスターゼの産生が誘導され、肺での血管透過性が亢進し、病原性を増強させると考えられた。

クラリスロマイシンやエリスロマイシンと同じ14員環構造を有するオレアンドマイシンではこのような現象は見られなかったが、15員環のアジスロマイシンでは認められ、16員環のジョサマイシンでは認められなかった。従って成因は単なる員環構造の差異からは説明できない。疎水性抗菌薬であるマクロライドにおいても一部の薬剤は緑膿菌のようなグラム陰性菌の細胞質の中へ流入することが報告されているため、マクロライド系抗菌薬が菌の細胞質へ入りリボゾームなどの蛋白合成部位に作用している可能性が考えられる。

この成績は実験上のものであり、詳細な機序や臨床的意義についてはさらに検討を要するが、これまでもマクロライド系抗菌薬は抗菌以外の作用を示すことが多数報告されており、なお未知の多彩な作用を菌へ及ぼしていることが示唆される。さらに、抗菌薬は一般に病原性を抑制する方向へ作用するとされてきたが、今回の結果は従来の考え方に再考を求めるものである。

審査結果の要旨

緑膿菌は慢性気道感染症の主要起炎菌の一つであり、局所で種々の外毒素を産生し病原性を発揮するが、多くの抗菌薬に抵抗性である。一方、マクロライド系抗菌薬は、臨床的に緑膿菌には無効であるが、最小発育阻止濃度以下 (sub-MIC) で緑膿菌の病原因子産生を抑制し、菌外膜や LPS 組成を変化させる。本研究はかかる sub-MIC 濃度のマクロライド系抗菌薬に曝露された緑膿菌を用い、*in vivo* での病原性をマウス経鼻感染モデルにより検討したものである。

標準緑膿菌株 PAO-1, 臨床分離株 8 株の緑膿菌を用い、臨床的に充分到達可能な sub-MIC 濃度 (MIC の 1/4~1/32) の抗菌薬 (クラリスロマイシン, エリスロマイシン, アジスロマイシン, ジョサマイシン, オレアンドマイシン, トブラマイシン, ミノサイクリン, クリンダマイシン, オフロキサシン, セフトジジム) を含有する培地で培養した。生理食塩水で菌液を調製後, 3.0×10^7 CFU をマウスへ経鼻接種し, 48時間後までのマウスの致死率を検討した。血管透過性の指標として, 接種 3, 6, 9 時間後の気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中蛋白量, TNF- α , NO, elastase を測定した。

その結果, sub-MIC のクラリスロマイシン, エリスロマイシン, アジスロマイシン処置緑膿菌 PAO-1 接種マウスは, 48時間以内に80%以上が死亡した。しかし他の抗菌薬前処置群や, クラリスロマイシン処置後加熱殺菌した PAO-1 接種ではマウス死亡はなかった。クラリスロマイシン処置群では, BALF 中の TNF- α は接種 3 時間後に, NO 産生, 蛋白量, elastase 濃度は 6, 9 時間後に, 有意に増加した。接種24時間後マウス肺組織所見では出血性変化が著明であった。臨床分離株でも同様な結果を得た。マウスに緑膿菌産生 elastase を経鼻接種すると肺出血性変化をみたが, exotoxin A 接種では変化はなかった。

以上の結果は, sub-MIC のクラリスロマイシン, エリスロマイシン (共に14員環), アジスロマイシン (15員環) 処置緑膿菌は菌の外膜組成を変化させ, 宿主の呼吸器系細胞に作用し, 局所で elastase (由来は確定できず) が産生され, 肺血管透過性亢進・肺出血をきたすと考えられた。疎水性抗菌薬であるマクロライドの一部は緑膿菌等グラム陰性菌の細胞質へ流入し, リボゾームなどの蛋白合成部位に作用する可能性が考えられる。本研究は動物実験の成績であり, 詳細な機序や臨床的意義についてはさらに検討を要するが, マクロライド系抗菌薬の抗菌作用以外の多くの作用の一つとして注目される。ことに抗菌薬が病原性を抑制する方向へ作用するという理念に対し, 再考を求める斬新な結果を示した点で, 優れて学位に値する。