HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	メチシリン耐性黄色ブドウ球菌肺炎に嫌気的環境が与える病的影響の検討［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	山下, 優
Description	配架番号：2563
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14097号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77930
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yu_Yamashita_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　山　下　優

学位論文題名

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌肺炎に嫌気的環境が与える病的影響の検討

(Studies on effects of anaerobic environment on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia)

【背景と目的】メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は、院内肺炎の喀痰から分離される病原菌の10-30%程度を占め、その頻度は増加傾向である。MRSAは気道に定着する性質も持つため、院内肺炎発症時の喀痰培養におけるMRSAの分離の病的意義について、肺炎/気道定着の区別は難しく、診療上の課題とされる。MRSA 院内肺炎の診断に関する臨床研究で、MRSA肺炎例では偏性嫌気性菌の関与を考慮する、誤嚥性肺炎・肺化膿症に類似した胸部画像を高頻度に呈することが報告され、MRSA 肺炎が偏性嫌気性菌と何らかの共感染を起こしている可能性、MRSA 自体が嫌気的環境で病原性を増強する可能性が指摘された。嫌気的環境と肺炎の関連性については、肺炎球菌を用いた基礎研究で、嫌気培養により肺炎球菌の下気道への病原性が増強すること、歯周病原菌である *Prevotella intermedia* との共感染が肺炎球菌肺炎を重症化することなどが報告されている。しかし、MRSA と嫌気的環境の関係について検証した報告は乏しい。そこで我々は、院内感染型MRSA (HA-MRSA)株を用いた肺炎モデルを確立し、同モデルを応用し、MRSA肺炎と嫌気的環境の関連性を、MRSA自体の嫌気培養による病原性の変化、MRSAと偏性嫌気性菌との共感染に注目して検証した。

【材料と方法】MRSA菌株として、HUYM株(HA-MRSA株)、NU1516株(PVL産生株)、NU10-1643株(TSST産生株)を用いた。*P. intermedia* 菌株として、PINU499株を用いた。実験動物には、マウス(BALB/c、ddY)を使用した。マウス感染実験では、シクロフォスファミドの腹腔内投与により免疫抑制状態とし、サーフロー外筒の挿管による経気管投与の方法で菌液を接種した。抗菌薬治療実験では、アジスロマイシン(AZM)、バンコマイシン(VCM)、ダプトマイシン(DAP)をそれぞれ腹腔内投与した。*in vitro* の系における抗菌薬実験、*P. intermedia* 培養上清(Pi Sup)混合実験では、MRSA菌液をTSB培地に添加し、AZM、VCM、DAP、Pi Supを混合し、振盪培養した。生菌数は肺のホモジェネート、血液、振盪培養後の菌液の定量培養で評価した。マウスの気管支肺胞洗浄液(BALF)中の炎症性サイトカインは、ELISA法を用いて評価した。肺組織評価では、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。各検体の毒素 mRNAの発現は、定量RT-PCR法を用いて検証した。多形核白血球(PMN)は、健常者の血液から密度勾配遠心法を用いて分離した。PMNによる殺菌能の評価では、MRSAとPMNとPi Supを混合し、定量培養で生菌数を評価した。

【結果】本MRSA肺炎モデルでは、MRSA菌液投与により有意に生存率が低下し、菌液の濃度依存性に生存率が低下する傾向を認めた。感染4時間後と比較して感染16時間後に肺内生菌数の増加を認めた。抗菌薬治療実験では、各治療群で無治療群と比較して有意な生存率の

改善・肺内生菌数の減少を認めた。BALF 中炎症性サイトカイン、肺内毒素 mRNA 発現は、VCM 群で無治療群と比較して有意な減少を認め、DAP・AZM 群では有意な変化を認めなかった。*in vitro* の系では、培養 8 時間後に VCM・DAP・AZM 群で無治療群と比較して有意な生菌数の減少を認めた。培養 12 時間後には VCM 群のみで無治療群と比較した有意な生菌数の減少を認めた。各治療群で毒素 mRNA 発現への有意な影響を認めなかった。嫌気培養した MRSA を用いた MRSA 肺炎モデルでは、好気培養した MRSA による感染と比較して生存率が良好だった。*in vitro* の系では、好気培養と比較して、嫌気培養下で MRSA の増殖能・毒素 mRNA 発現が減弱する傾向を認めた。Pi Sup の混合感染により、MRSA 肺炎モデルで有意な生存率の減少、肺内生菌数増加、BALF 中炎症性サイトカインの増加、肺内毒素 mRNA 発現の亢進を認めた。肺病理組織所見でも、Pi Sup 混合感染群でより強い炎症所見を認めた。*in vitro* の系では、Pi Sup の混合により MRSA 菌増殖は遅延し、毒素 mRNA 発現は減弱した。PMN による MRSA 殺菌能の評価では、Pi Sup と PMN の混合により有意に生菌量が増加した。PVL 産生株、TSST 産生株では、Pi Sup 混合で MRSA 肺炎の重症化は認めなかった。マウスへの気道感染後の肺内生菌数は HUYM 株でのみ経時的な増加を認めた。

【考察】MRSA 肺炎の症例から得た臨床分離株で、院内感染型の MRSA 株 HUYM 株を用いて MRSA 肺炎モデルを確立した。今回のモデルは、(1)肺での増殖能が強い菌株を使用した、(2)挿管して直接肺に菌液を投与した、という点で、従来の MRSA 肺炎モデルと比較し、再現性のある安定した感染が確立できたものと考えられた。抗菌薬治療実験では、AZM は VCM/ DAP と比較して軽微だが、無治療群と比較して有意に MRSA 肺炎の生存率、生菌数を改善しえることが示された。*in vitro* の系では、AZM の MRSA の増殖初期に対する抑制効果を認めた。肺炎の初期における細菌増殖が MRSA 肺炎の病原性に重要であると考えられた。次に、同 MRSA 肺炎モデルを用いて、嫌気的環境による MRSA 肺炎の病原性への影響について検証を行った。嫌気培養した MRSA は下気道における病原性が減弱する傾向を示した。一方、MRSA と Pi Sup の混合感染による検証では、マウス肺炎モデルにおいて、Pi Sup の混合により MRSA 肺炎の重症化を認めた。その一方で、*in vitro* の実験系においては、Pi Sup 自体は MRSA の増殖、毒素産生に対して抑制的だったが、PMN による MRSA 殺菌能の減弱を認めた。Pi Sup は主に PMN を抑制し、MRSA 肺炎の初期感染に病的影響を及ぼすものと考えられた。PVL 産生株・TSST 産生株による追加検証では、Pi Sup はこれらの菌株による肺炎の重症化に寄与しなかった。Pi Sup の MRSA 肺炎重症化は、肺内での増殖能の促進によることが考えられ、PVL 産生株・TSST 産生株よりも肺内増殖能の強い HUYM 株のみ、Pi Sup 混合による重症肺炎が顕在化したものと考えられた。以上から、嫌気的環境と MRSA 肺炎の関連性の一つとして、下気道における *P. intermedia* の併存などが MRSA 肺炎のリスクとなることが示され、MRSA 肺炎の病態の理解に重要な結果と考えられた。

【結論】経気道感染による HA-MRSA 肺炎モデルを確立しえた。また、Pi Sup の混合により MRSA 肺炎重症化が起こることが示され、MRSA 肺炎の新たなリスクとして *P. intermedia* の併存があげられた。