



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14097
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77931
Type	doctoral thesis
File Information	Yu_Yamashita.pdf



学 位 論 文

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌肺炎に
嫌氣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)

2020年3月

北 海 道 大 学

山 下 優

学 位 論 文

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌肺炎に
嫌氣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)

2020年3月

北 海 道 大 学

山 下 優

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
第 1 章 MRSA 肺炎マウスモデルの検討	
第 1 節 研究背景	1 3 頁
第 2 節 実験方法	1 5 頁
第 3 節 実験結果	1 9 頁
第 4 節 考察	2 3 頁
第 5 節 本章の総括および結論	2 6 頁
第 2 章 MRSA 肺炎の病原性と嫌氣的環境の関係の検討	
第 1 節 研究背景	2 7 頁
第 2 節 実験方法	2 9 頁
第 3 節 実験結果	3 5 頁
第 4 節 考察	4 4 頁
第 5 節 本章の総括および結論	4 7 頁
第 3 章 総括および結論	4 8 頁
謝辞	4 9 頁
利益相反	5 0 頁
引用文献	5 1 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Yu Yamashita, Kentaro Nagaoka, Hiroki Kimura, Masaru Suzuki, Satoshi Konno, Tatsuya Fukumoto, Koji Akizawa, Norihito Kaku, Yoshitomo Morinaga, Katsunori Yanagihara

Efficacy of azithromycin in a mouse pneumonia model against hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2019; 63: e00149-19

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 山下 優、長岡 健太郎、今野 哲、西村 正治

経気道感染による MRSA 肺炎モデルにおける Azithromycin の治療効果の検討

第 92 回日本感染症学会総会・学術講演会、2018 年 5 月 31 日、岡山

2. 山下 優、長岡 健太郎、今野 哲

Prevotella intermedia が及ぼす MRSA 肺炎への病的影響の検討

第 93 回日本感染症学会総会・学術講演会、2019 年 4 月 5 日、名古屋

3. Yu Yamashita, Kentaro Nagaoka, Masaru Suzuki, Satoshi Konno

Synergic effect of *Prevotella intermedia* on virulence of MRSA pneumonia

American Society for Microbiology microbe 2019、2019 年 6 月 21 日、米国サンフランシスコ

要旨

【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、菌周病原菌である *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、嫌气的環境による 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。

略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下のとおりである。

<i>agr</i>	accessory gene regulator
AIP	Autoinducing peptide
AZM	Azithromycin
BAL	Bronchoalveolar lavage
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid
CA-MRSA	Community-acquired MRSA
cDNA	complementary DNA
CFU	Colony forming unit
CLDM	Clindamycin
DAP	Daptomycin
ELISA	Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay
ET	Exfoliative toxin
GAM	Gifu anaerobic medium
HA-MRSA	Hospital-acquired MRSA
IL-6	Interleukin-6
MIC	Minimum inhibitory concentration
MIP-2	Macrophage inflammatory protein 2
mRNA	messenger RNA
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NS	not significant
PBS	Phosphate-buffered saline
PMN	Polymorphonuclear leukocyte
PORT	Pneumonia Patient Outcomes Research Teams
PVL	Panton Valentine leukocidin
rRNA	ribosomal RNA
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse transcription PCR
SCC <i>mec</i>	Staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i>
SEC	Staphylococcal enterotoxin C
TSB	Trypticase Soy Broth
TSST	Toxic shock syndrome toxin
VCM	Vancomycin
VISA	VCM-intermediated resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

緒言

【黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) とは】

黄色ブドウ球菌は 1878 年に Koch が膿汁中に発見し、1880 年に Pasteur が培養に成功したとされる、細菌学の初期とされる時代から認められてきた細菌である。

黄色ブドウ球菌はブドウ球菌族に属する直径 0.5~1.5 μm 前後の通性嫌気性グラム陽性球菌であり、ブドウの房状に増殖する特徴を持つ。黄色ブドウ球菌はヒトの鼻腔や皮膚の常在菌として知られる (Wertheim et al., 2005) が、その一方で多彩な病原因子や毒素を保有しており、肺炎、皮膚軟部組織感染症、菌血症、骨髄炎など、種々の感染症の起炎菌として重要な細菌である。

黄色ブドウ球菌が産生する病原因子の一部は、特定の感染症と深い関連を持つ事が知られている。トキシックショック症候群毒素 (toxic shock syndrome toxin: TSST) はトキシックショック症候群を引き起こすことで知られ (Durand et al., 2006)、表皮剥奪毒素 (exfoliative toxin: ET) は小児の熱傷様皮膚症候群の原因となることが知られている (Bukowski et al., 2010)。また、エンテロトキシンは食中毒の原因となる (Argudín et al., 2010)。

黄色ブドウ球菌には、感染症の種類に関わらず病原性と関連性を有する病原因子も多数存在している。ヘモリジンは溶血毒素であり、赤血球など宿主の細胞膜に穴をあける作用をもち、多彩な病原性を発揮することが知られる (Tomita et al., 1997)。ロイコシジンは主に白血球の膜を傷害することで、白血球の機能を損なう作用を持つ (Tomita et al., 1997)。プロテイン A は黄色ブドウ球菌の細胞壁に分布しており、これが免疫グロブリン G の Fc 部位に結合することで、宿主の抗体による直接的な作用から逃避していることが知られている (Pauli et al., 2014)。

このように、黄色ブドウ球菌は多数の病原因子を持つが、黄色ブドウ球菌の菌株ごとに病原因子の産生性は異なることが知られている。黄色ブドウ球菌は産生された複数の毒素が総合的に作用することで、その病原性を発現しているものと考えられている。

【メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) とは】

黄色ブドウ球菌のうち、ペニシリン結合タンパク質 2' をコードする *mecA* 遺伝子を保有し、メチシリンを含む β ラクタム薬や、種々の抗菌薬に薬剤耐性を呈

するものを、MRSA と呼称する (Hiramatsu et al., 2001)。

MRSA は、1960 年代に院内感染の病原菌として同定され (Barrett et al., 1968)、以後医療関連感染を起こす主要な病原菌となった。1990 年代頃からは、MRSA による市中感染例も欧米を中心に報告されるようになり (Herold et al., 1998 ; Naimi et al., 2001)、現在では、全世界で市中/院内における主要な病原菌となっている。

MRSA は、staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) と呼ばれる染色体カセットの種類により、院内感染型 MRSA (Hospital-acquired MRSA: HA-MRSA) と市中感染型の菌株 (Community-acquired MRSA: CA-MRSA) に分類される。HA-MRSA は SCC*mec* type I, II, III、CA-MRSA は SCC*mec* type IV, V に分類される (Ma et al., 2002)。

HA-MRSA と CA-MRSA では病原性が異なり、一般的に CA-MRSA で強病原性がみられる。CA-MRSA 菌株の一部では、Panton-Valentine leukocidin (PVL) などの強毒素を保有する株が報告されている (Diep et al., 2006 ; Glaser et al., 2016)。PVL は主に CA-MRSA 株で産生されることがある毒素であり、その作用として好中球の表面に穴をあけることによる細胞障害性、ミトコンドリアに作用することによるアポトーシスの誘導などが知られている (Finck-Barbançon et al., 1993)。

PVL 産生株では、臨床上も致死的な壊死性肺炎を発症するなど、重症感染例が多く報告されている (Gillet et al., 2002)。一方で、HA-MRSA は院内感染例より多く分離され、肺炎、蜂窩織炎では軽症例も多くみられるが、しばしば重症菌血症を発症することもあり、臨床上の大きな課題となっている (Robinson et al., 2009)。

【MRSA の抗菌薬耐性機序、MRSA に対する治療薬剤について】

MRSA は上述のようにペニシリン結合タンパク質 2' を保有している。ペニシリン結合タンパク質 2' はペニシリン系やセフェム系などのβラクタム系抗菌薬に親和性が極めて低く、これらの抗菌薬の存在下でも細胞壁合成が維持される (Ubukata et al., 1985)。この結果、MRSA は *S. aureus* に対して用いられるβラクタム系抗菌薬に対しての汎耐性をもつ。このため、MRSA 感染症に対する治療は一部の抗菌薬に限定される。

現在使用可能である MRSA に対する治療薬剤としては、ペニシリン結合タンパク質には結合せず、細胞壁前駆体である D-アラニル-D-アラニンに作用する細胞壁合成阻害薬であるグリコペプチド系抗菌薬 (バンコマイシン (Vancomycin: VCM)、テイコプラニン) (Perkins et al., 1982 ; Somma et al., 1984)、細胞膜におけるイオンの透過性を変化させ、細胞膜の脱分極を介して細胞死をお

コスリポペプチド系抗菌薬（ダプトマイシン（Daptomycin: DAP））（Straus et al., 2006）、リボソームの 50 サブユニットに作用してタンパク質合成を阻害するオキサゾリジノン系抗菌薬（リネゾリド）（Shinabarger., 1999）、などがあげられ、これらの薬剤は抗 MRSA 薬と呼称される。

その他に、感染臓器や重症度、感染菌株の薬剤感受性によっては、クリンダマイシン（Clindamycin: CLDM）、ST 合剤、リファンピシン、ミノマイシンなどが治療薬剤として用いられる場合があり、これらの薬剤は MRSA に対するセカンドドラッグとして知られている（Mandell et al., 1980 ; Daivid et al., 2010）。

近年では、MRSA の VCM 低感受性が問題となっており、VCM に対する最小発育阻止濃度（minimum inhibitory concentration: MIC）が経年的推移で上昇する MIC creep という現象が知られている（Steinkraus et al., 2007）。さらに、抗 MRSA 薬である VCM に対して中等度耐性をもつ MRSA 菌株（VCM-intermediated resistant *S. aureus*: VISA）の報告も散見され（Hiramatsu et al., 2014）、MRSA への治療の難渋化が課題となっている。このため、MRSA の治療においては、セカンドドラッグの活用が重要とされる。

MRSA 感染症におけるセカンドドラッグに関する報告として、近年では MRSA 肺炎における CLDM、ST 合剤などについての有効性を示す報告が散見されるようになった。

MRSA 肺炎による入院症例において、VCM 単独治療と ST 合剤単独治療を比較した症例対照研究では、30 日死亡率のハザード比が 5.28 ($P < 0.05$)であり、VCM 単独治療において有意に 30 日死亡リスクが高かった。また、臨床的治療不応例は VCM 単独治療で 59%、ST 合剤単独治療で 35.7% ($P < 0.05$)であり、こちらも VCM 単独治療が臨床的治療不応と関連する結果だった。総じて MRSA 肺炎に対してセカンドドラッグである ST 合剤が有効である可能性が示唆された（Eliakim-Raz et al., 2017）。

さらに、成人の重症 MRSA 感染症（肺炎を含め）症例において、VCM 単独治療と ST 合剤単独治療を比較したランダム化比較試験では、治療失敗や全死亡率について、有意差を認めなかったことが報告されている（Paul et al., 2015）。

また、小児のインフルエンザ関連 MRSA 壊死性肺炎の多施設観察研究で、VCM 単剤治療と、VCM と 24 時間以内の CLDM などの併用治療を比較すると、死亡率の相対危険度が 5.5 ($P = 0.003$)となり、VCM 単剤治療で有意に死亡のリスクが増加したことが報告され、VCM とセカンドドラッグの併用の有効性が示唆されている（Randolph et al., 2019）。

このように MRSA 感染症におけるセカンドドラッグについては、今後も更なる検討が望まれる。

【肺炎とは】

肺炎は、その発症頻度、生命予後、生活の質、社会に与える損失などの点から、最も重要な感染症の一つである。成人肺炎診療ガイドライン 2017 では、肺炎は「肺実質の、急性の、感染性の、炎症」と定義されている（日本呼吸器学会成人肺炎診療ガイドライン作成委員会., 2017）。

肺炎による死亡率は、戦後の抗生物質の開発に伴い低下傾向に転じていた。しかし、1980 年代に入ると、高齢化社会となった背景に伴って肺炎の死亡率は再び上昇傾向に転じた。現在、肺炎は本邦における死亡原因の第 5 位となり、年間に 76.2/100,000 人が肺炎で死亡している（厚生労働省., 2018）。肺炎は特に高齢者で死亡頻度が高くなり、近年の本邦でのさらなる高齢化に伴い、より重症な肺炎患者の増加が予想されている。

現在本邦においては、肺炎はその罹患場所・臨床背景などにより、市中肺炎、医療・介護関連肺炎、院内肺炎に大別される。市中肺炎は、院外で発症した、免疫不全を伴う既往歴などのリスクを伴わない肺炎とされる。医療・介護関連肺炎は、長期療養型病床群もしくは介護施設に入所している、90 日以内に病院を退院した、介護を必要とする高齢者・身体障害者、通院で継続的に血管内治療（透析、抗菌薬、抗癌化学療法、免疫抑制薬など）を受けている、という背景をもつ対象者が院外で発症した肺炎とされている。院内肺炎は、入院後 48 時間以降に新しく発症した肺炎として定義されている（入院後 48 時間以内に発症した肺炎例については、市中肺炎となる）（日本呼吸器学会成人肺炎診療ガイドライン作成委員会., 2017）。

市中肺炎と院内肺炎では、その臨床像が大きく異なる。市中肺炎は、基礎疾患のない健常者に多く発症し、起炎菌には薬剤耐性菌がほとんど含まれない。一方、院内肺炎、医療・介護関連肺炎は、何らかの基礎疾患を有し、免疫不全を呈する患者に多く発症し、起炎菌には薬剤耐性菌が多く含まれるようになる。これらの肺炎では、誤嚥を契機とした肺炎発症例も多く、全身衰弱した高齢者の終末像としての肺炎例も含まれる（Komiya et al., 2015）。

市中肺炎、院内肺炎、医療・介護関連肺炎においては、起炎菌の菌種も異なる。市中肺炎では、肺炎球菌、インフルエンザ桿菌、モラキセラ、マイコプラズマが主要な病原菌となり、さらに全体の 10%前後にウイルス性肺炎も含まれる（日本呼吸器学会成人肺炎診療ガイドライン作成委員会., 2017）。一方、院内肺炎、医療・介護関連肺炎では、緑膿菌、大腸菌、クレブシエラなどのグラム陰性桿菌の頻度が増加し、多剤耐性緑膿菌、ESBL 産生株などの薬剤耐性菌が含まれるようになる。

院内肺炎、医療・介護関連肺炎において、薬剤耐性菌が起炎菌となるリスク因

子としては、①過去 90 日以内の経静脈的抗菌薬の使用歴、②過去 90 日以内の 2 日以上入院歴、③免疫抑制状態、④活動性の低下 (Performance status が 3 以上、歩行不能、経管栄養または中心静脈栄養など)、の 4 項目が挙げられており、これらの項目のうち 2 項目以上を満たすことで、耐性菌の高リスク群として分類される (日本呼吸器学会成人肺炎診療ガイドライン作成委員会., 2017)。

これまでに、肺炎症例における上述したような多剤耐性菌の高リスク群となる症例では、多剤耐性菌の検出頻度のみならず、初回治療失敗の頻度や 30 日死亡率が有意に高いとされている (Shindo et al., 2013)。このような観点から、現在院内肺炎、医療・介護関連肺炎の治療方針としては、起炎菌が特定されない初期治療において、重症度と耐性菌リスクの評価によって経験的治療を行うことが推奨される。すなわち、重症度・耐性菌のリスクが低い症例では、狭域抗菌薬から治療を開始し、治療効果が乏しい場合での広域抗菌薬への変更 (escalation) が推奨される。一方、重症度・耐性菌のリスクを中等度有する症例では、単剤の広域抗菌薬による治療を開始し、起炎菌同定後に感受性に応じた抗菌薬へ変更する治療 (de-escalation) が推奨される。重症度・耐性菌のリスクが高度となる症例では、初期治療失敗による致死的な転帰の可能性も考慮されるため、初期から広域抗菌薬の併用療法を行うことが推奨されている (Maruyama et al., 2013)。

こうした治療法が推奨されるなかで、市中肺炎、医療・介護関連肺炎、院内肺炎における死亡率は、市中肺炎で 6.3%、医療・介護関連肺炎で 15.5%、院内肺炎で 30.4%とされ、院内肺炎において死亡率が高い現状が知られている (日本呼吸器学会成人肺炎診療ガイドライン作成委員会., 2017)。その要因としては、院内肺炎例に免疫不全例、超高齢者が多く含まれる側面に加え、薬剤耐性菌による重症肺炎例が含まれることが指摘されている。

以上に述べたように、現在の肺炎の治療戦略においては、薬剤耐性菌への対策がますます重要視されるところとなっている。今後も薬剤耐性菌は増加することが予想されており、薬剤耐性菌の知見は肺炎診療において一層重要とされる。

【MRSA と院内肺炎】

MRSA 院内肺炎は、呼吸器検体の培養で MRSA が分離された院内肺炎と定義されてきた (Wunderink et al., 2003 ; Kohno et al., 2007)。

従来の MRSA 院内肺炎は、全院内肺炎の 10-30%程度とされ、近年その頻度は増加傾向とされている (Rubinstein et al., 2008 ; Kollef et al., 2005)。こうした MRSA 肺炎では高い死亡率 (30%) も報告されており (Haque et al., 2010)、その診断や治療方法についてさらなる検討が望まれている。

その一方で、MRSA は気道定着菌でもあり、院内肺炎例における喀痰からの MRSA

の分離は、全てが肺炎の原因菌であるとは限らない。実臨床においては、従来の定義における MRSA 肺炎のうち、MRSA が肺炎の真の原因菌ではなく、気道定着していた MRSA が喀痰培養時に混在していた例も少なからず含まれている。このような従来の MRSA 肺炎に MRSA 気道定着例が含まれる頻度は、40-50%にのぼるとする報告もある (Nagaoka et al., 2014a, Kawanami et al., 2016)。これらのことから、肺炎診療において MRSA が原因菌であると判断するにあたっては、従来の診断基準、定義に加えて、さらなる病態の理解や診断方法の検討が必要といえる。

これまでに MRSA 肺炎のリスク因子として、「Pneumonia Patient Outcomes Research Teams (PORT) クラス 5、MRSA 単独での検出、定量培養で 10^6 colony forming unit (CFU)/ml より多い菌量の検出、頭頸部・食道・胃の手術の既往歴が独立予測因子」とする報告 (Nagaoka et al., 2014a) や、「手術の既往、12 か月以内の入院、培養提出前の長期間の入院歴、レボフロキサシンの使用歴、マクロライド系抗菌薬の使用歴、経腸栄養、胸水貯留、MRSA の検出歴、施設からの入院、晩期発症型の院内肺炎、鼻腔における MRSA の定着、慢性閉塞性肺疾患の既往」とする報告 (Chastre J et al., 2014) などがある。しかしながら、これまでに院内肺炎症例の喀痰から MRSA が分離された際、感染/気道定着を明確に区別する方法は依然確立していない。

これまでに報告されている MRSA 肺炎に関する臨床研究の中で、国内の大学病院において、従来の MRSA 肺炎を、抗 MRSA 薬投与の要否により MRSA 肺炎群と MRSA 気道定着院内肺炎群にわけて、MRSA 肺炎の臨床的特徴を検討したものがある (Nagaoka et al., 2014a)。その中で、MRSA 肺炎群は MRSA 気道定着院内肺炎群と比較して、誤嚥性肺炎・肺化膿症に類似した胸部画像を呈する頻度が有意に多いことが示されている。

誤嚥性肺炎・肺化膿症は、いずれも偏性嫌気性菌により起こる肺感染症であり、画像所見から診断された場合、培養結果によらず偏性嫌気性菌の関与を考慮するものである。偏性嫌気性菌の肺内での増殖が可能であることより、いずれの画像所見も、肺内に局所的な嫌气的環境が形成されていることも示す。MRSA 肺炎群において、こうした肺感染症に類似した画像所見がみられたことより、MRSA 肺炎においては MRSA が偏性嫌気性菌と何らかの形式での共感染を起こしている可能性や、MRSA 自体が嫌气的環境において病原性を増強する可能性などが指摘されている。

MRSA は通性嫌気性菌であり、嫌気培養でも増殖が可能である。MRSA が嫌气的環境でどのような病原性の変化を持つかは、MRSA 肺炎の診断に寄与する病態解明につながる可能性もあり、さらなる検証が必要と考えられた。

これまでに MRSA の嫌気培養による病原性の変化を検証した研究は乏しく、さ

らに下気道における病原性を検討したものはない。また、MRSA 院内肺炎の多くでは先述の HA-MRSA 株が原因菌となるが、HA-MRSA 株は弱毒菌が多く、HA-MRSA 株による肺炎モデルを用いた基礎研究も乏しい。

そこで、今回は① HA-MRSA 株を用いた肺炎モデルを確立（第 1 章）し、②HA-MRSA 株を中心に MRSA 肺炎と嫌氣的環境の関連性を、MRSA 自体の嫌気培養による病原性の変化（第 2 章-1）、MRSA と偏性嫌気性菌との共感染（第 2 章-2）について検討することとした。

第1章 MRSA 肺炎マウスモデルの検討

第1節 研究背景

MRSA 院内肺炎の原因菌の多くは HA-MRSA 株によるが、弱病原性のものも多く、喀痰から分離される MRSA が気道感染まで至らず、気道定着にとどまるものも少なくない。こうした性状もあり、MRSA 肺炎マウスモデルの研究は PVL を有する強病原株である CA-MRSA を用いたものが多い。HA-MRSA 株を用いた MRSA 肺炎モデルは血流感染を介した肺膿瘍モデルでの報告がみられる (Harada et al., 2013 ; Yanagihara et al., 2009) が、HA-MRSA 株の気道感染を介した MRSA 肺炎モデルの報告は乏しい。実臨床における MRSA 肺炎のほとんどは気道感染を介するとされ (Nagaoka et al., 2014a)、MRSA 院内肺炎の病態を検討する上で、気道感染を介した MRSA 肺炎モデルの確立は重要と考えられた。

これまで、HA-MRSA 株を用いた経気道感染による MRSA 肺炎マウスモデルについては、免疫抑制の前処置を施行しない、経皮的に気管を穿刺して菌液を接種する手法を用いた MRSA 肺炎マウスモデルなどが少数報告されている (表 1) (Jacqueline et al., 2014 ; Jung et al., 2012 ; Akinnusi et al., 2011)。しかし、これらのモデルでは、HA-MRSA 株の病原性が低いことも相まって、 2×10^9 CFU/匹といった高用量の菌量を用いても感染が安定しないため、重症 MRSA 肺炎の検証が不十分となることや、腹腔内感染による敗血症の誘導の先行が MRSA 肺炎単独の病態評価を困難とするなどが課題となっていた。

表 1. HA-MRSA を用いた経気道感染 MRSA 肺炎モデルのまとめ

著者	Jaqueline C, et al.	Jung E, et al.	Akinnusi ME, et al.
雑誌	The Journal of Infectious disease	Shock	Critical Care Medicine
掲載年	2014	2012	2011
SCCmec	SCCmec type III (HA-MRSA)	SCCmec type II (HA-MRSA)	SCCmec type III (HA-MRSA)
感染経路	経気管投与	経気管投与	経気管投与
菌量	7.5×10^7 CFU/匹	7.8×10^7 CFU/匹	2×10^9 CFU/匹
前処置	なし	肺炎感染3日前：腹腔内敗血症	なし
備考	肺内生菌数の増加を認めない 非致死性MRSA肺炎モデル	腹腔内感染による敗血症後の MRSA肺炎モデル	致死性感染に高用量の菌量を 要するMRSA肺炎モデル

そこで、今回我々はより実臨床に即した MRSA 院内肺炎モデルの確立を目的として、マウスへの気管挿管により菌液を肺に接種する感染方法を用いたマウスモデル作製を行った。

さらに、この際の MRSA 肺炎モデルの実臨床との相関性を検証する目的で、抗 MRSA 薬による治療実験も行った。抗 MRSA 薬としては、VCM、DAP を選択した。VCM は現在 MRSA 肺炎に対する第一選択薬として広く用いられる薬剤である (Liu et al., 2011 ; Kalil et al., 2016)。DAP は MRSA 菌血症などの第一選択薬であるが、肺胞サーファクタントで不活化される性状があり、MRSA の気道感染の治療薬としては推奨されていない (Silverman et al., 2005)。

これらのことから、MRSA の経気道感染が成立した場合には、VCM と比較し、DAP での治療効果の減弱が確認されるものと期待された。

また、近年マクロライド系抗生物質であるアジスロマイシン (Azithromycin: AZM) が肺炎治療において注目されている。AZM は市中肺炎においてβラクタム系抗菌薬との併用で、その抗菌作用以上に治療効果が得られることが報告されている (Martin-Loeches et al., 2010 ; Martínez et al., 2003)。また、マウスモデルを用いた研究では、グラム陰性菌の毒素産生を減少させ、相加的な治療効果を発現することが知られている (Yamada et al., 2013)。その他に、マクロライド系薬剤の抗菌作用以外の効果として、炎症性サイトカイン産生抑制などといった免疫調整作用の報告 (Takizawa et al., 1997) もある。

AZM を含めたマクロライド系抗菌薬は抗 MRSA 薬ではなく、MRSA におけるマクロライド経抗菌薬の MIC の観点からも、一般には抗菌作用の面では MRSA には無効とされる。

これまでの AZM と黄色ブドウ球菌感染症との関連については、予防的な長期間の AZM 投与が再発性の AZM 耐性黄色ブドウ球菌感染症に有効とする報告があり (Grobost et al., 2014)、AZM が黄色ブドウ球菌に対して治療効果を発現する可能性が示唆されている。

しかしながら、AZM が MRSA に及ぼす薬理作用について検証した報告は乏しい。緒言にも記載したように、抗 MRSA 薬以外の MRSA 感染への治療薬 (抗 MRSA セカンドドラッグ) は、今後ますます重要とされる。これより、本研究では AZM の新たな抗 MRSA 効果について検証する目的で、VCM、DAP に加えて、AZM も用いた治療実験を行い、それぞれの効果について比較検討を行った。

第2節 実験方法

【微生物】

本研究では以下の細菌株を使用した。

MRSA)

HUYM 株（北海道大学病院内科 I 臨床分離株、SCC_{mec} type III、PVL 陰性、TSST 陰性、Staphylococcal Enterotoxin C (SEC) 陰性、ET 陰性、薬剤感受性：VCM 0.75 µg/mL, DAP 0.75 µg/mL, AZM > 128 µg/mL)

病原微生物実験については、北海道大学大学院医学研究院呼吸器内科学教室、今野 哲 教授の指導のもと、国立大学法人北海道大学病原体等安全管理規程に基づいて施行された。

【動物】

日本 SLC（静岡）から購入した BALB/c SPF マウス（オス、8 週齢）を用いた。全ての動物実験に関する手技及び実験プロトコールは国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定及び北海道大学動物実験実施マニュアルに基づき、北海道大学動物実験委員会の承認を経て施行された（19-1057）。

【マウス感染方法】

感染実験については、菌液接種 4 日前と前日にそれぞれシクロフォスファミド 150 mg/kg、100 mg/kg をマウスに腹腔内投与したのちに、経気管投与の方法で菌液を接種した。菌液接種後、生存個体数について、12～24 時間ごとに観察を行った。

・菌液作製方法

上記細菌株を血液寒天培地（日水製薬）に塗付し、CO₂ インキュベーターで 16～24 時間培養した。その後菌を釣菌し、Trypticase Soy Broth (TSB) 培地（Becton Dickinson）に添加し、各菌株の late log phase まで振盪培養した。

回収した TSB 培地を、3000 回転/分で 10 分間遠心し、上清を破棄した。これに滅菌された生理食塩水を加え、最終的に菌量が $5 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9$ CFU/mL となるよう比濁計を用いて調整した。

・気道感染方法

マウスを塩酸ケタミン・塩酸キタラジンで麻酔し、四肢をプラスチックの台に固定した。輪ゴムを用いて頸部を後屈固定した後、蛍光ライトを搭載した耳かきで喉頭展開し、24 G のサーフローカテーテル外筒を気管に挿入した。注射筒内の菌液が呼吸にあわせて振動されることを目視で確認後、菌液を気管内に注入

した。接種する菌液量は 0.05 mL/匹とし、接種菌量は $2.5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ CFU/匹とした。

ケタミンを使用した実験は、麻薬研究者である北海道大学大学院医学研究院呼吸器内科学教室、今野 哲 教授の指導の下に、麻薬及び向精神薬取締法に基づいて施行された。

【生菌数評価】

各菌液を接種されたマウスの臓器における生菌数を以下の方法で評価した。

・生菌数評価

マウス感染後に頸椎脱臼で安楽死させ、臓器（肺）を無菌環境下で採取し、2 mL の滅菌生理食塩水を注入したビーズ径 2.8 mm のホモジナイズ用チューブ (CK28; Bertin Technologies) 内に収集した。採取された臓器はビーズ式ホモジナイザー (Precellys; Bertin Technologies) を用いて 5500 回転/分、20 秒で計 2 回ホモジナイズした。血液はヘパリンコートしたシリンジを用いて右室穿刺で採取した。得られた検体（血液、ホモジナイズ後の臓器）は血液寒天培地に定量的に接種され、その後 CO₂ インキュベーター内で培養された。生菌数の検出下限は、50 CFU/mL であった。

【抗菌薬によるマウス治療実験】

AZM（ファイザー製薬）、VCM（和光純薬）、DAP（MSD）を使用した。それぞれ滅菌生理食塩水で溶解し、100 mg/kg を菌液接種 2 時間後のマウスに腹腔内投与した。

AZM 予防投与方法では、菌液接種 24 時間前・菌液接種 2 時間後の計 2 回、各 100 mg/kg をマウスに腹腔内投与した。

コントロール群（Untreated 群）には、同量の滅菌生理食塩水を投与した。

【気管支肺胞洗浄液（Bronchoalveolar lavage fluid: BALF）中炎症性サイトカインの Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay (ELISA) での評価】

各菌液を接種されたマウスの BALF における炎症性サイトカイン（Interleukin-6 (IL-6)・Macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2)) を以下の方法で評価した。

・気管支肺胞洗浄（Bronchoalveolar lavage: BAL）

各菌液を接種して 16 時間後にマウスを頸椎脱臼で安楽死させた。その後に気管を露出し、気管前面に切開をいれ、同部位から 22 G サーフローの外筒を挿入し、600 µl の生食の注入・回収を計 5 回施行して、BALF を収集した。

- ELISA

上記方法で得られた BALF について、Quantikine ELISA Mouse IL-6 (R&D systems)、Quantikine ELISA Mouse CXCL2/MIP-2 (R&D systems)を用いて ELISA を施行した。

【液体培地での振盪培養時の MRSA に対する抗菌薬治療による生菌数の評価】

細菌株を血液寒天培地に塗付し、CO₂ インキュベーターで 16~24 時間培養した。その後菌を釣菌して滅菌生理食塩水により菌液を作製した。比濁計を用いて調整した菌液を TSB 培地に添加し、培養開始前の最終濃度を 2×10^5 CFU/ml とした。この際に治療薬群ごとに AZM、VCM、DAP を各々混注し、最終的にそれぞれ AZM 100 µg/mL、VCM 0.5 µg/mL、DAP 8 µg/mL の濃度とした。各検体を 250 回転/分 37°C で振盪培養した。各検体は late log phase もしくは stationary phase で回収後に血液寒天培地に定量的に接種され、その後 CO₂ インキュベーター内で培養され、生菌数を評価された。

【毒素 messenger RNA (mRNA) 発現の定量 reverse transcription PCR (RT-PCR) による評価】

菌液を接種されたマウスの肺内、もしくは各種抗菌薬を混注した菌液を接種後の TSB 培地の振盪培養後の毒素 mRNA (hla) の発現を定量 RT-PCR 法を用いて以下の方法で検証した。

- 検体作製

マウス肺については、マウス感染後に頸椎脱臼で安楽死させ、臓器(肺)を無菌環境下で採取し、2 mL の滅菌された RNA later (Thermo Fisher Scientific) を注入したビーズ径 2.8 mm のホモジナイズ用チューブ (CK28) 内に収集した。ビーズ式ホモジナイザー (Precellys) を用いて 5500 回転/分、20 秒で計 2 回、ホモジナイズした。その後ビーズ径 0.1 mm のホモジナイズ用チューブ (CK01; Bertin Technologies) に検体 1 mL を注入し、ビーズ式ホモジナイザー (Precellys) を用いて 6000 回転/分、30 秒で計 2 回、ホモジナイズした。各検体の 100 µl とリゾチーム 20 µl を混合し、下記 RNA 抽出に用いた。

TSB 培地で培養後の菌液については、振盪培養 8 時間後もしくは 12 時間後に各 1 mL を回収し、3000 回転/分 10 分で遠心分離を施行した。上清を破棄した後に滅菌蒸留水 80 µl で溶解し、リゾチーム 20 µl を混合して下記 RNA 抽出に用いた。

- RNA 抽出、complementary DNA (cDNA) 合成、定量 RT-PCR

NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) を用いて得られた検体から全 RNA 抽出を行った。RNA (1 µg) は High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo

Fisher Scientific)を用いて Applied Biosystems 2720 thermal cycler (Thermo Fisher Scientific)により cDNA 合成へ逆転写した。合成された cDNA と SYBR green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)を用いてリアルタイム PCR を行い、DNA 量を評価した。

既報にならい、プライマーには以下のものを使用した。

- hla (Ferreira et al., 2013)

Forward primer: 5' -TTGTCATTTCTTCTTTTCCCA-3'

Reverse primer: 5' -AAGCATCCAAACAACAAAT-3'

- gyr (Goerke et al., 2000)

Forward primer: 5' -TTATGGTGCTGGGCAAATACA-3'

Reverse primer: 5' -CACCATGTAAACCACCAGATA-3'

リアルタイム PCR は、Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)により、40 サイクル (95°C 15 秒、55°C 60 秒) 行った。毒素 mRNA 発現の標準化のため、内因性因子として DNA ジャイレースβサブユニット (gyr) の mRNA 発現も測定した。mRNA についてのデータは、gyr に対する各毒素 mRNA 発現量の相対比で表記した。

【統計解析】

2 群間の比較を行う場合、Mann-Whitney U 検定を用いた。無治療群と各治療群の比較を行う場合、Steel 検定を用いた。生存率はカプランマイヤー法で示し、ログランク検定で統計学的解析をおこなった。P < 0.05 を統計学的有意とした。

第3節 実験結果

【MRSA 肺炎モデルの確立】

MRSA 肺炎モデルの確立を確認するため、MRSA 菌液を 2.5×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 CFU/匹の濃度に調整してマウスに感染させ、生存率を比較検討した。実験の際、菌液と同量の生理食塩水を投与した群をコントロール群（Control 群；Ctr）とした。さらに、MRSA 菌液を 1×10^8 CFU/匹の濃度として感染させ、感染 4 時間後・感染 16 時間後における肺内・血液中生菌数を測定し、比較検討した。これらの実験結果を、図 1 に示す。

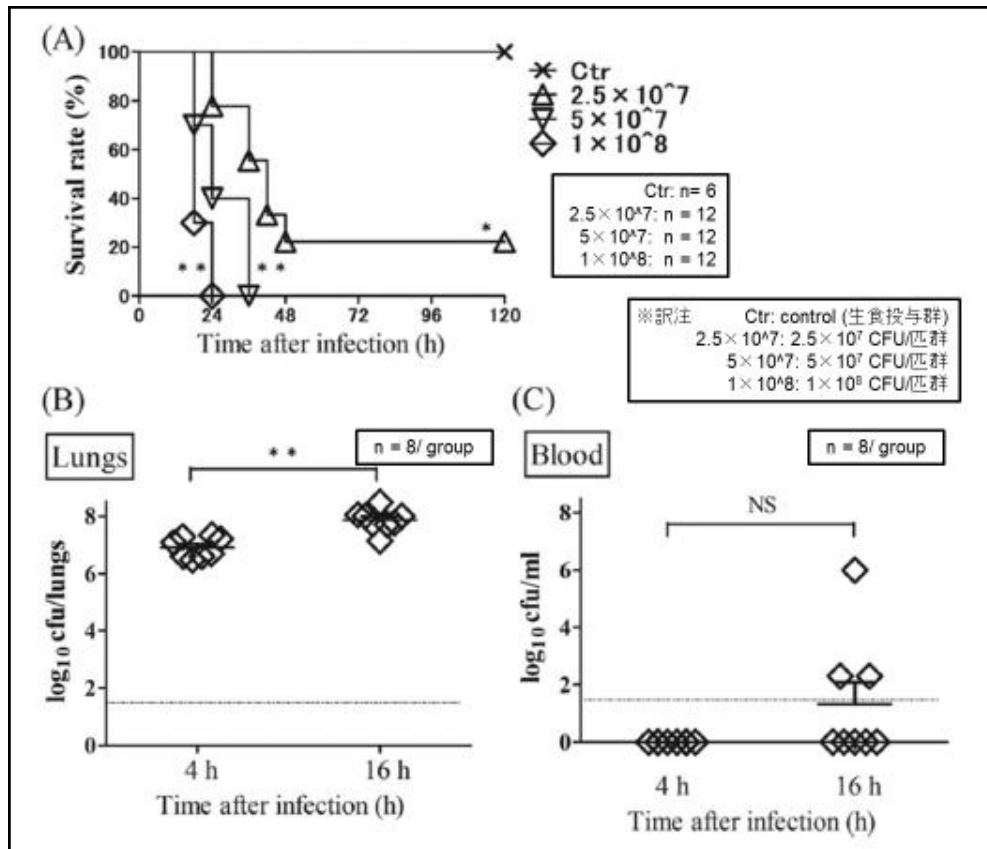


図 1. MRSA 肺炎モデル確立の検証。

A : MRSA 菌液濃度毎の生存率

(*: $p < 0.05$ vs control 群、**: $p < 0.005$ vs control 群)

B : 感染 4 時間後、16 時間後における肺内生菌数(**: $p < 0.005$)

C : 感染 4 時間後、16 時間後における血中生菌数(NS: not significant)

本 MRSA 肺炎モデルでは、MRSA 菌液投与により、Ctr 群と比較して有意に生存率が低下し、MRSA 菌液の濃度依存性に生存率が低下する傾向を認めた (図 1 A)。また、MRSA 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 (図 1 B)。感染後 4 時間・16 時間後ともに血液中の有意な菌の増加は認めなかった (図 1 C)。

【MRSA 肺炎モデルにおける VCM/ DAP/ AZM の治療効果】

次に VCM/ DAP/ AZM による MRSA 肺炎への治療実験として、MRSA 肺炎モデルを用いて、各治療薬投与群における生存率、肺内生菌数、BALF 中炎症性サイトカイン (IL-6、MIP-2)、肺内毒素 mRNA 発現量を測定し、比較検討した。その結果を図 2 に示す。

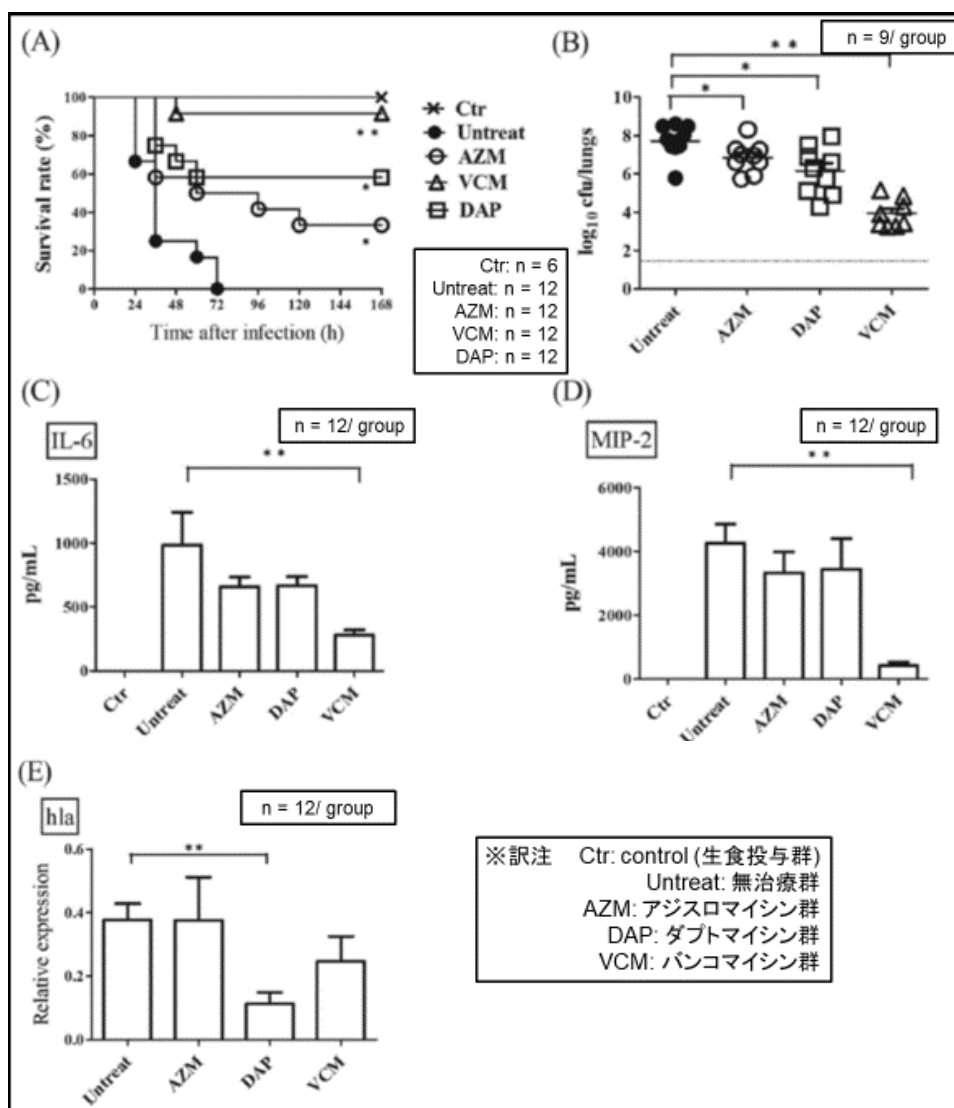


図 2. MRSA 肺炎モデルにおける VCM/ DAP/ AZM による治療効果の評価

A : 生存率 (*: $p < 0.05$ vs 無治療群、**: $p < 0.005$ vs 無治療群)

B : 感染 16 時間後の肺内生菌数 (*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.005$)

C, D : 感染 16 時間後の BALF 中炎症性サイトカイン (**: $p < 0.005$)

E : 感染 16 時間後の肺内毒素 mRNA 発現 (**: $p < 0.005$)

全治療群で、無治療群と比較して有意な生存率の改善を認めた (図 2 A)。また、全治療群で、無治療群と比較して有意な肺内生菌数の減少を認めた (図 2 B)。

BALF 中の炎症性サイトカイン (IL-6、MIP-2) は、VCM 群でのみ無治療群と比較して有意に減少を認めた (図 2 C、D)。肺内毒素 mRNA 発現に関しては、DAP 群でのみ無治療群と比較して有意に減少を認めた (図 2 E)。

【*in vitro* の実験系における VCM/ DAP/ AZM の MRSA への作用の評価】

最後に、*in vitro* の実験系での MRSA に対する VCM/ DAP/ AZM による治療実験を行い、生菌数、毒素 mRNA 発現量について比較検討を行った。その結果について図 3 に示す。

MRSA の振盪培養開始 8 時間後において、全治療薬群で無治療群と比較して有意な生菌数の減少を認めた。一方で、培養 12 時間後では、VCM 群のみが無治療群と比較して有意な生菌数の減少を認め、DAP 群、AZM 群では生菌数について明らかな効果を認めなかった (図 3 A)。また、本実験条件下では、毒素 mRNA 発現に対する抑制効果は、全治療薬群でみられなかった (図 3 B)。

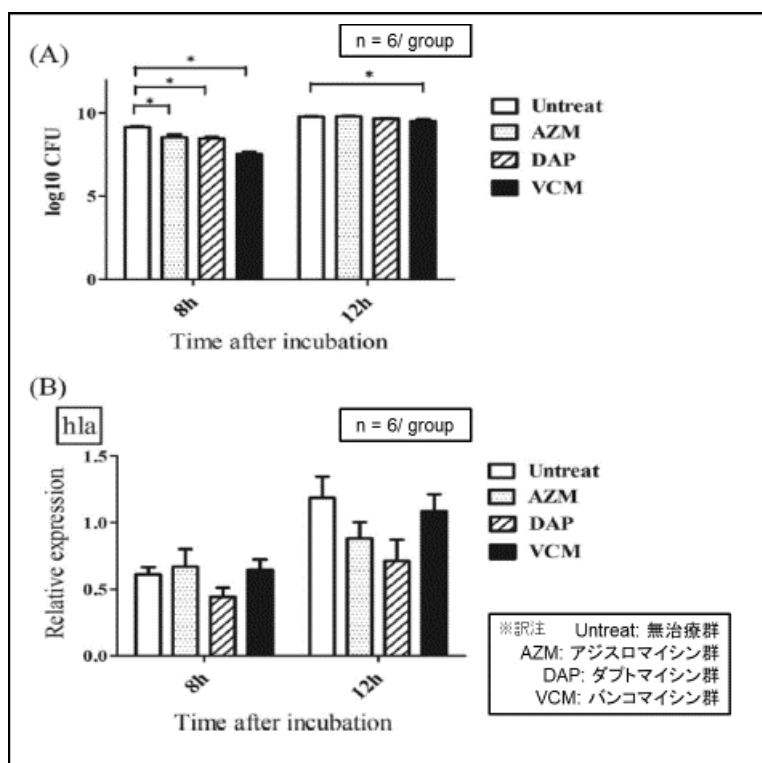


図 3. *in vitro* の実験系での VCM/ DAP/ AZM による MRSA への治療効果の評価

A : 培養 8 時間後、12 時間後における生菌数 (*: $p < 0.05$)

B : 培養 8 時間後、12 時間後における毒素 mRNA 発現

第4節 考察

本研究では、HA-MRSA 株の経気道感染を介した MRSA 院内肺炎モデルを確立した。さらに、本モデルを用いて AZM の新たな抗 MRSA 効果を検証することができた。

今回我々は、HA-MRSA 臨床分離株 (SCC*mec* type III) を用いて、MRSA 肺炎モデルを確立しえた。本モデルでの生存率の検証では、再現性をもって致死性の結果を得られ、投与する菌液の濃度依存性に生存率が低下する傾向を認めた (図 1 A)。また、肺内生菌数は経時的な増加を認め (図 1 B)、血中生菌数は有意な変化を認めなかった (図 1 C)。このことから、本モデルにおいては、肺内で経時的な MRSA 増殖が確立し、菌血症よりも肺炎による影響の強いモデルと考えられた。

これまで報告された研究手法と比較し、本モデルでは (1) HA-MRSA 株の中でも肺での病原性が強い菌株を使用しえた、(2) 菌液接種にサーフローの気管挿管を介したため、肺内に高菌量となる初期菌量摂取をせしめた、という点で、より再現性の安定した重症肺炎モデルを確立することができたと考えられた。

本研究では、SCC*mec* type III 株を使用した。この SCC*mec* タイプは、中東やアジアにおいて、院内感染での分離頻度増加が近年報告されている (Motallebi et al., 2016; Chu et al., 2013)。また、下気道検体から検出された MRSA 菌株のうち 81.3% が SCC*mec* type III とする報告もあり (Chu et al., 2013)、下気道感染により親和性がある SCC*mec* type と考えられる。SCC*mec* type III の日本での分離は稀であるが、本研究で使用した菌株が下気道感染において比較的強い病原性を持った要因の一つと考えられた。

本モデルでは、感染方法としてマウスへの気管挿管・菌液接種を選択した。本手法では、これまで報告されている気管穿刺などの手法と比較し、より低侵襲で、高菌量を直接肺に接種することが可能であった。実験結果の図 1 A で示したように、同手法による感染では、菌液の濃度に依存した生存率の変化も調整が可能であり、再現性の安定した肺炎モデルの確立に寄与したのと考えられた。さらに、本モデルでは感染後に肺内で経時的な菌量増加が認められ (図 1B)、本モデルでの致死性感染が、菌自体のもつ毒性への反応ではなく、肺内での菌増殖によることが示された。抗菌薬治療実験では、VCM で生存率・肺内菌量・気道内炎症性サイトカインが改善し、DAP では治療効果の減弱がみられ、MRSA 気道感染を反映した結果と考えられた。これらより、本モデルは従来の HA-MRSA 肺炎モデルと比較して、より実臨床に即したモデルとなりえたのと考えられた。

次に、本モデルを用いた抗菌薬治療実験では、全治療群で無治療群と比較して有意に生存率の改善を認めた。このうち、VCM 群で最も生存率の改善が顕著となり、続いて DAP 群、AZM 群の順に生存率改善効果を認めた（図 2 A）。肺内生菌数についても、全治療群で無治療群と比較し有意な生菌数減少がえられた。生存率と同様に、肺内生菌数減少は VCM 群、DAP 群、AZM 群の順に顕著な効果が認められた（図 2 B）。一方、BALF 中炎症性サイトカインについては、VCM 群のみで無治療群と比較した有意な減少がみられた（図 2 C、2 D）。肺内毒素 mRNA 発現量については、DAP 群のみで無治療群と比較した有意な減少が認められた（図 2 E）。これらの結果より、本 MRSA 肺炎モデルでは、VCM で最も強い治療効果がみられ、DAP では VCM と比較し治療効果が減弱した結果となった。こうした DAP の治療効果減弱がみられることから、本モデルは MRSA が気道を介した肺炎を起こしており、より実臨床に近いモデルと考えられた。

本モデルでは、AZM の MRSA 肺炎への治療効果についてもあわせて検証された。図 2 に示されるように、AZM は、VCM/ DAP と比較して軽微であるも、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。こうした AZM による抗 MRSA 効果の機序解明を目的として、*in vitro*での検証も追加したところ、AZM は MRSA の増殖初期に対する抑制効果を有する結果がえられた。

AZM は細菌の 70S リボソームの 50S サブユニットと結合し細菌のタンパク質合成を阻害することにより抗菌作用を示す、静菌効果を有する抗菌薬である (Champney et al., 1998)。通常の *in vitro*での抗菌薬・薬剤感受性試験は、培養 20-24 時間後に抗菌効果判定がなされるため、増殖初期への抑制効果は不明となる。本研究では、AZM により MRSA 肺炎の肺内生菌数の抑制もみられた。本モデルでは、MRSA 肺炎発症には肺内菌増殖が重要であり、AZM は MRSA 肺炎発症時の初期増殖を抑制することにより、抗 MRSA 効果を有した可能性が考えられた。

AZM は、抗菌効果以外に、炎症性サイトカイン産生抑制 (Takizawa et al., 1997) といった免疫調整作用や、細菌の毒素産生抑制 (Fukuda et al., 2006) などの治療効果を有することが知られている。AZM が、MRSA の初期増殖への抑制効果により肺炎において抗 MRSA 効果を有したとの報告は、本研究が初となる。こうした結果は臨床上も重要な知見となりうるため、AZM の抗 MRSA 効果についてはさらなる検討が必要と考えられた。

本研究では、AZM の投与方法として感染 2 時間後に加えて、感染 24 時間前にも AZM の投薬を行う予防投与の手法を選択した。これまでに AZM は肺胞細胞、肺胞上皮粘液、好中球や喀痰などといった肺組織で濃縮され、高濃度が維持されることが報告されており (Hoffmann et al., 2007)、マウス肺組織の AZM 濃

度は血清の AZM 濃度の 10 倍だったとする報告もなされている (Rivulgo et al., 2013)。これらのことから、本モデルでは感染 24 時間前の AZM の投与により、事前にマウス肺組織内で AZM 濃度が高くなっていたと想定され、このため肺内での初期の MRSA 増殖が抑制されたものと考えられた。

上述したように、今回の結果からは AZM による MRSA 肺炎への治療効果は弱く、AZM 単剤での MRSA 肺炎への治療は推奨できない結果であった。一方で、AZM の予防投与により MRSA 肺炎の発症を抑制しうることが示され、AZM の MRSA 肺炎に対する予防治療としてのポテンシャルが期待される結果であった。

本研究の問題点として、第一に、本研究ではシクロフォスファミド投与による好中球減少の前処置を行っていることが挙げられる。本 MRSA 肺炎モデルは、MRSA 肺炎の病態の一部を反映するにすぎず、AZM の免疫調整作用の検証なども不十分となっている可能性が考えられた。第二に、AZM、抗 MRSA 薬の MRSA 肺炎への治療効果の検証に、MRSA の菌株を一種類のみしか使用していないことが挙げられる。AZM の毒素産生抑制などの治療効果を検証するためには、PVL などの強毒素保有株を用いた検証も必要といえる。

本研究より、HA-MRSA 肺炎モデルを確立でき、MRSA 院内肺炎の病態理解のため、さらなる研究が可能となったものと考えられた。

第 5 節 本章の総括および結論

I 本研究から得られた新知見

HA-MRSA の経気道感染による MRSA 院内肺炎マウスモデルを確立しえた。本 MRSA 肺炎モデルでは、HA-MRSA 株のうち病原性の強い株を用いた気管挿管による菌液接種により、再現性の安定した感染が可能となった。本モデルでは、感染後に肺での経時的な菌増殖がみられ、抗菌薬の治療効果の検証により適したモデルとなった。

本モデルをもちいた抗菌薬治療実験により、新たに AZM の抗 MRSA 効果も明らかとなった。AZM の MRSA 肺炎への治療効果は、MRSA 増殖初期への抑制効果によることが *in vitro* の実験でも示された。

II 新知見の意義

HA-MRSA を用いた肺炎モデルの確立により、HA-MRSA 肺炎へのさらなる病態理解に寄与するものと考えられた。

AZM の MRSA 肺炎への治療効果は、今後の臨床上の MRSA 肺炎への治療戦略にも影響を与えうる。さらに、今回の研究で、MRSA 肺炎においては肺内での MRSA 増殖、特に増殖初期の抑制が重要であることが示された。これは、MRSA 肺炎の病態理解に寄与するものと考えられた。

III 本研究で得られた新知見に基づく今後の研究の展開

- ・本モデルを基盤として、MRSA 肺炎の病態をさらに検証する。
- ・様々な抗菌薬の MRSA 肺炎への治療効果について検証する。

IV 今後の課題

今回用いた菌株以外での、MRSA 肺炎モデルの検証。

第2章 MRSA 肺炎の病原性と嫌氣的環境の關係の検討

第1節 研究背景

第1章において、HA-MRSA の経気道感染による MRSA 院内肺炎モデルを確立した。第2章では、同モデルの菌株、実験手法を応用し、MRSA の嫌氣的環境における病原性変化を検証することとした。

緒言に記載したように、MRSA 院内肺炎例の一部に誤嚥性肺炎・肺膿瘍に類似した胸部画像所見を呈するものがみられ、肺内の局所的な嫌氣的環境における MRSA の病原性の検証が必要と考えられた。

肺内の偏性嫌氣性菌感染については、市中肺炎の 10-30%とする報告もあり、近年注目を集めている。偏性嫌氣性菌による肺炎の重要な課題が、従来の喀痰培養による病原菌の分離が困難な点である (Saito et al., 2006 ; Johansson et al., 2010 ; Cillóniz et al., 2011)。これに対し、近年考案された喀痰検体の遺伝子学的検査 (16S ribosomal RNA (rRNA)領域の PCR/シーケンス) を用いて肺炎の原因菌の同定を行ったところ、原因菌不明とされた症例 (全体の 20-30%前後) の原因菌が偏性嫌氣性菌、口腔内細菌であった、とする報告がなされた (Yamasaki et al., 2013)。正確な頻度は不明であるが、偏性嫌氣性菌による下気道感染の存在が明らかとなり、感染成立にあたり肺内に局所的な嫌氣的環境が形成されることが知られるようになった。

肺内に局所的な嫌氣的環境が形成されることにより、①通常の肺の病原菌 (通性嫌氣性菌) の病原性変化、②偏性嫌氣性菌と通性嫌氣性菌との共感染、などが起こることが示唆される。

これまでに肺炎球菌を用いた基礎研究において、嫌氣培養による病原性の変化と偏性嫌氣性菌との共感染の報告がなされている。

肺炎球菌の嫌氣培養についての報告では、嫌氣培養下の肺炎球菌は好氣培養下の肺炎球菌より viability が増強することが確認された。また、マウス肺炎モデルでは嫌氣培養された肺炎球菌を感染に用いることで、好氣培養された肺炎球菌の感染と比較して有意に生存率の低下、肺内生菌数の増加、血中生菌数の増加などを認め、嫌氣培養による病原性変化により肺炎球菌性肺炎が増強したとされた (Nagaoka et al., 2019)。

肺炎球菌と偏性嫌氣性菌の共感染についての報告では、マウス肺炎モデルにおいて、主要な菌周病原菌の一つである *Prevotella intermedia* の培養上清 (Pi Sup) と肺炎球菌を混合感染することで、生存率が有意に低下し、肺内生菌数・血中生菌数の増加、BALF 炎症性サイトカイン濃度の上昇などを認めたことが示さ

れており、偏性嫌気性菌と肺炎球菌の共感染により肺炎球菌肺炎が重症化した (Nagaoka et al., 2014b) ことが報告されている。

しかしながら、これまでに MRSA と嫌气的環境の関係について検証した報告は乏しい。

そこで、今回我々は嫌气的環境が MRSA の下気道病原性に与える影響を、①嫌気培養による MRSA 自体の病原性の変化、②MRSA と偏性嫌気性菌の混合感染による病原性の変化、の 2 点に注目して検証することとした。MRSA と偏性嫌気性菌の混合感染については、上述の既報を参考に、*P. intermedia* との混合感染モデルを用いて検証を行った。

第2節 実験方法

【微生物】

本研究では以下の細菌株を使用した。

MRSA)

HUYM 株（第1章で用いた臨床分離株）

NU10-1643 株（長崎大学病院検査部 臨床分離株、PVL 陰性、TSST 陽性、SEC 陽性）

NU1516 株（長崎大学病院検査部 臨床分離株、PVL 陽性、TSST 陰性、SEC 陰性）

Prevotella intermedia)

PINU499 株（長崎大学病院検査部 臨床分離株）

病原微生物実験については、北海道大学大学院医学研究院呼吸器内科学教室、今野 哲 教授の指導のもと、国立大学法人北海道大学病原体等安全管理規程に基づいて施行された。

【動物】

日本 SLC から購入した ddY SPF マウス（オス、6 週齢）を用いた。全ての動物実験に関する手技及び実験プロトコールは国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定及び北海道大学動物実験実施マニュアルに基づき、北海道大学動物実験委員会の承認を経て施行された（19-1057）。

【人由来の検体】

健常者から得た血液より分離した多形核白血球（polymorphonuclear leukocyte: PMN）を本実験中に使用した。全ての人を対象とした実験に関する手技及び実験プロトコールは、人を対象とした医学系研究に関する倫理指針に基づき、北海道大学大学院医学研究院医の倫理委員会の承認を経て施行された（医 19-008）。対象者全員に対して説明・同意文書を用いて説明し、書面での同意を得た。

【Pi Sup の作製】

上記 *P. intermedia* 細菌株を PV 加ブルセラ HK 培地（極東製薬）に塗付し、嫌気チャンバーで 48 時間培養した。その後菌を釣菌して変法 Gifu anaerobic medium (GAM) 培地（日水製薬）に添加し、late log phase まで嫌気チャンバー内で静置培養した。静置培養後に 4℃ 10,000 回転/分 50 分の条件で遠心分離

し、0.22 μm pore membrane filter (Merck Millipore)で濾過滅菌し、 -80°C で保存した。

【マウス感染方法】

感染実験については、第 1 章と同様の手法を用いた。菌液接種 4 日前と前日にそれぞれシクロfosファミド 150 mg/kg、100 mg/kg をマウスに腹腔内投与したのちに、経気管投与の方法で実験毎に作製した菌液を接種した。菌液接種後、生存個体数について、12～24 時間ごとに観察を行った。

・気道感染方法

マウスを塩酸ケタミン・塩酸キタラジンで麻酔し、四肢をプラスチックの台に固定した。輪ゴムを用いて頸部を後屈固定した後、蛍光ライトを搭載した耳かきで喉頭展開し、24 G のサーフローカテーテル外筒を気管に挿入した。注射筒内の菌液が呼吸にあわせて振動されることを目視で確認後、菌液を気管内に注入した。接種する菌液量は 0.05 mL/匹とした。

ケタミンを使用した実験は、麻薬研究者である北海道大学大学院医学研究院呼吸器内科学教室、今野 哲 教授の指導の下に、麻薬及び向精神薬取締法に基づいて施行された。

【マウス感染実験時の菌液調整法】

(MRSA の嫌気培養による影響の検討)

MRSA 細菌株 (HUYM) を血液寒天培地に塗付し、 CO_2 インキュベーターで 16～24 時間培養した。

システインを混注した TSB 培地に菌液を添加し、好気培養では 250 回転/分、 37°C で振盪培養した。嫌気培養では、嫌気チャンバー内で 37°C の条件で静置培養した。それぞれ late log phase まで培養して回収し、3000 回転/分で 10 分間遠心して上清を破棄した。これに滅菌された生理食塩水を加え、最終的に菌量が 2×10^9 CFU/mL となるよう比濁計を用いて調整した。

(MRSA の Pi Sup 混合感染実験)

各 MRSA 細菌株を血液寒天培地に塗付し、 CO_2 インキュベーターで 16～24 時間培養した。その後菌を釣菌し、TSB 培地に添加し、好気条件下で各菌株の late log phase まで振盪培養した。

回収した TSB 培地を、3000 回転/分で 10 分間遠心し、上清を破棄した。これに滅菌された生理食塩水を加えて菌液とした。感染実験の直前に菌液と 1:1 になるように Pi Sup もしくは変法 GAM 培地を混合して実験に使用した。最終的に菌量が 1×10^9 CFU/mL となるよう比濁計を用いて調整した。

・MRSA 菌株毎の致死性肺炎発症時の肺内生菌数評価

各 MRSA 細菌株を血液寒天培地に塗付し、CO₂ インキュベーターで 16～24 時間培養した。その後菌を釣菌し、TSB 培地に添加し、好気条件下で各菌株の late log phase まで振盪培養した。

回収した TSB 培地を、3000 回転/分で 10 分間遠心し、上清を破棄した。これに滅菌された生理食塩水を加えて菌液とした。最終的に菌量が 5×10^9 CFU/mL となるよう比濁計を用いて調整した。

【生菌数および組織学的評価】

各菌液を接種されたマウスの臓器における生菌数および組織は以下の方法で評価した。

・生菌数評価

第 1 章の生菌数評価の手法と同様に、マウス感染後に頸椎脱臼で安楽死させ、臓器（肺）を無菌環境下で採取し、2 mL の滅菌生理食塩水を注入したビーズ径 2.8 mm のホモジナイズ用チューブ（CK28）内に収集した。採取された臓器はビーズ式ホモジナイザー（Precellys）を用いて 5500 回転/分、20 秒で計 2 回ホモジナイズした。血液はヘパリンコートしたシリンジを用いて右室穿刺で採取した。得られた検体（血液、ホモジナイズ後の臓器）は血液寒天培地に定量的に接種し、その後 CO₂ インキュベーター内で培養した。

・組織評価

生菌数評価と同様に臓器（肺）を採取後、10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

【BALF 中の炎症性サイトカインの ELISA での評価】

各菌液を接種されたマウスの BALF における炎症性サイトカイン（IL-6・MIP-2）を、第 1 章と同様の以下の方法で評価した。

・BAL

各菌液を接種して 16 時間後にマウスを頸椎脱臼で安楽死させた。その後に気管を露出し、気管前面に切開をいれ、同部位から 22 G サーフローの外筒を挿入し、600 μ l の生食の注入・回収を計 5 回施行して、BALF を収集した。

・ELISA

上記方法で得られた BALF について、Quantikine ELISA Mouse IL-6（R&D systems）、Quantikine ELISA Mouse CXCL2/MIP-2（R&D systems）を用いて ELISA を施行した。

【嫌気的環境による液体培地での MRSA 振盪培養時の生菌数への影響の評価】

MRSA 細菌株（HUYM）を血液寒天培地に塗付し、CO₂ インキュベーターで 16～24

時間培養した。その後菌を釣菌して滅菌生理食塩水により比濁計を用いて菌液を調整した。

- ・嫌気培養と好気培養の比較

システインを混注した TSB 培地に菌液を添加し、好気培養では 250 回転/分、37℃で振盪培養した。嫌気培養では、嫌気チャンバー内で 37℃の条件で静置培養した。それぞれ培養開始前の最終濃度は 2×10^5 CFU/ml とした。各検体は late log phase、stationary phase、培養 24 時間後、培養 48 時間後にそれぞれ回収して血液寒天培地に定量的に接種し、CO₂ インキュベーター内で培養し、生菌数を評価した。

- ・Pi Sup 混合の評価（増殖曲線）

Pi Sup もしくは変法 GAM 培地と TSB 培地を 1:1 で混合し、液体培地とした。各液体培地に上記菌液を添加し、好気条件下で 250 回転/分、37℃として振盪培養した。培養開始前の最終濃度は 2×10^5 CFU/ml とした。各検体を培養開始後 3 時間、6 時間、8 時間、10 時間、12 時間、15 時間、18 時間、21 時間、24 時間の時点で回収して血液寒天培地に定量的に接種し、CO₂ インキュベーター内で培養し、生菌数を評価した。

【毒素 mRNA 発現の定量 RT-PCR による評価】

各菌液を接種されたマウスの肺内、及び Pi Sup もしくは変法 GAM 培地と混合した菌液の振盪培養後の毒素 mRNA (hla・pv1・tsst・sec) の発現を、第 1 章と同様の手法による定量 RT-PCR 法を用いて以下の方法で検証した。

- ・検体作製

マウス肺については、マウス感染後に頸椎脱臼で安楽死させ、臓器（肺）を無菌環境下で採取し、2 mL の滅菌された RNA later (Thermo Fisher Scientific) を注入したビーズ径 2.8 mm のホモジナイズ用チューブ (CK28) 内に収集した。ビーズ式ホモジナイザー (Precellys) を用いて 5500 回転/分、20 秒で計 2 回、ホモジナイズした。その後ビーズ径 0.1 mm のホモジナイズ用チューブ (CK01) に検体 1 mL を注入し、ビーズ式ホモジナイザー (Precellys) を用いて 6000 回転/分、30 秒で計 2 回、ホモジナイズした。各検体の 100 μ l とリゾチーム 20 μ l を混合し、下記 RNA 抽出に用いた。

Pi Sup もしくは変法 GAM 培地と混合した菌液については、好気条件下での振盪培養後の late log phase、stationary phase の時点で各 1 mL を回収し、3000 回転/分 10 分で遠心分離を施行した。上清を破棄した後に滅菌蒸留水 80 μ l で溶解し、リゾチーム 20 μ l を混合して下記 RNA 抽出に用いた。

- ・RNA 抽出、cDNA 合成、定量 RT-PCR

NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) を用いて得られた検体から全 RNA 抽出を行

った。RNA (1 µg)はHigh-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いてApplied Biosystems 2720 thermal cycler (Thermo Fisher Scientific)により cDNA 合成へ逆転写した。合成された cDNA と SYBR green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)を用いてリアルタイム PCR を行い、DNA 量を評価した。

既報にならない、プライマーには以下のものを使用した。

- hla (Ferreira et al., 2013)
Forward primer: 5' -TTGTCATTTCTTCTTTTCCCA-3'
Reverse primer: 5' -AAGCATCCAAACAACAAACAAAT-3'
- pvl (Li et al., 2011)
Forward primer: 5' -TGTATCTCCTGAGCCTTTTCA-3'
Reverse primer: 5' -CAGACAATGAATTACCCCCATT-3'
- tsst (Li et al., 2011)
Forward primer: 5' -TCGCTACAGATTTTACCCCTGT-3'
Reverse primer: 5' -CGTTTGTAGATGCTTTTGCAGT-3'
- sec (Motoshima et al., 2010)
Forward primer: 5' -AGGCGATAAGTTTGACCAAT-3'
Reverse primer: 5' -CATTCTTTGTTGTAAGGTGG-3'
- gyr (Goerke et al., 2000)
Forward primer: 5' -TTATGGTGCTGGGCAAATACA-3'
Reverse primer: 5' -CACCATGTAAACCACCAGATA-3'

リアルタイム PCR は、StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific)を用いて、40 サイクル (95°C 15 秒、55°C 60 秒) 行った。各毒素 mRNA 発現の標準化のため、内因性因子として DNA ジャイレースβサブユニット (gyr) の mRNA 発現も測定した。mRNA についてのデータは、gyr に対する各毒素 mRNA 発現量の相対比で表記した。

【PMN による MRSA 殺菌能の評価】

• PMN 分離

健常者から得た血液から、Percoll (GE healthcare)・Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare)を用いた密度勾配遠心法により PMN を分離した。PMN 分離後にリン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline: PBS)を用いて 2.5×10^6 cells/ml の濃度に調整した。

• 菌液作製

MRSA 細菌株 (HUYM)を血液寒天培地に塗付し、CO₂ インキュベーターで 16～24 時間培養した。その後菌を釣菌して TSB 培地に添加し、好気条件下で late log

phase まで振盪培養した。

回収した TSB 培地を 3000 回転/分で 10 分間遠心し、上清を破棄した。PBS で溶解した上で、37℃、30 分の条件で 5% ヒト血清によるオプソニン化を行った。その後 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地 (Sigma-Aldrich) を用いて最終的な菌量が 5×10^4 CFU/mL となるよう比濁計により調整した。

・殺菌能評価

24 ウェルプレートに PMN もしくは PBS 200 μ l、菌液 100 μ l、Pi Sup もしくは変法 GAM 培地 100 μ l をそれぞれ注入し、37℃ 2 時間の条件で CO₂ インキュベーター内で培養し、各々滅菌蒸留水 600 μ l を混注してから回収した。その後血液寒天培地に定量的に接種し、CO₂ インキュベーター内で培養した。各群の生菌数の結果により、PMN の殺菌能を評価した。

【統計解析】

2 群間の比較を行う場合、Mann-Whitney U 検定を用いた。3 群以上の比較を行う場合、対照群として MRSA + Pi Sup 群を選択し、Steel 検定を用いた。生存率はカプランマイヤー法で示し、ログランク検定で統計学的解析をおこなった。P < 0.05 を統計学的有意とした。

第3節 実験結果

<<MRSA の嫌気培養下における病原性の評価>>

嫌気環境が MRSA の下気道病原性に与える影響を評価するため、まず好気培養・嫌気培養した MRSA をそれぞれ用いて、MRSA 肺炎モデルでの生存率を評価した。その結果を図 4 に示す。

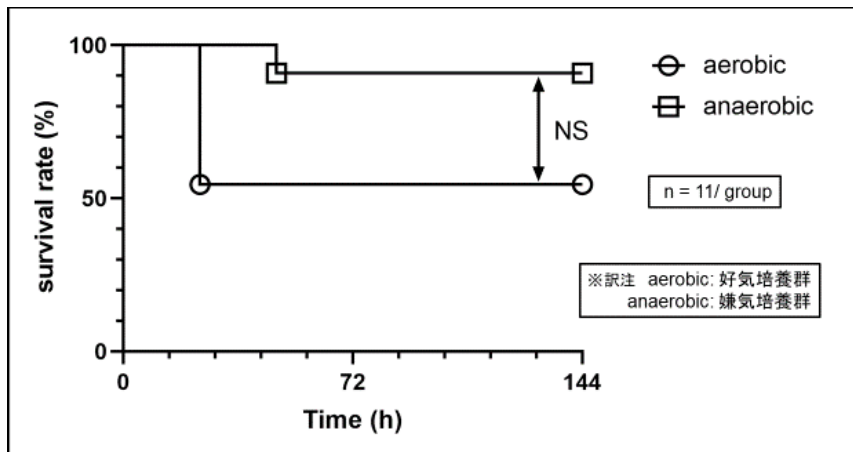


図 4. 好気培養・嫌気培養下の MRSA を用いた MRSA 肺炎モデルにおける生存率 (NS: not significant)

この *in vivo* の実験では、嫌気培養群は、好気培養群と比較して、生存率の改善傾向を示す結果となった (図 4)。本実験は、予備自験を含めて 3 回の実験で同様の結果がえられた。

次に、MRSA の嫌気培養下の増殖能の評価として、*in vitro* で嫌気培養・好気培養時の増殖曲線、および各増殖期における毒素 mRNA の発現量を比較検討した。図 5 にその結果を示す。

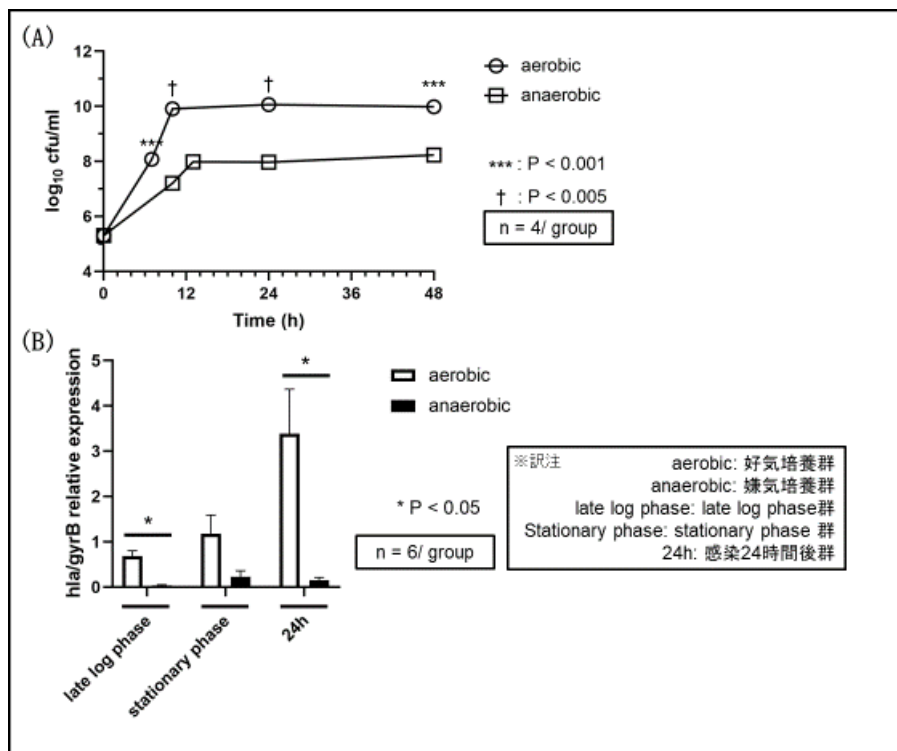


図5. *in vitro*の実験系での好気培養・嫌気培養がMRSAに与える影響の検証
 A: 好気培養・嫌気培養下での経時的なMRSA生菌量
 B: 好気培養・嫌気培養下での毒素mRNA (hla)発現 (*: p < 0.05)

好気培養/嫌気培養の増殖曲線を比較したところ、嫌気培養では生菌数の増加が8 log₁₀ CFU/mlにとどまり、好気培養と比較し、有意に菌増殖が抑制される結果となった(図5A)。また、毒素mRNA発現については、好気培養群と比較して、嫌気培養群で毒素mRNA (hla)の有意な発現減弱がみられた(図5B)。

<<Pi Sup が MRSA 下気道感染に及ぼす病的影響の検証>>

【Pi Sup 混合 MRSA 肺炎の *in vivo* での検証】

Pi Sup が MRSA の下気道病原性に与える影響を検証するため、MRSA 菌液と Pi Sup を混合してマウスに接種する混合感染モデルを作製し、Pi Sup 混合群と非混合群（Pi Sup の培地のみ混合）に分け、生存率、肺内生菌数、BALF 中炎症性サイトカイン（IL-6、MIP-2）、肺内毒素 mRNA（hla）発現について比較検討した。これらの実験結果について、図 6 に示す。

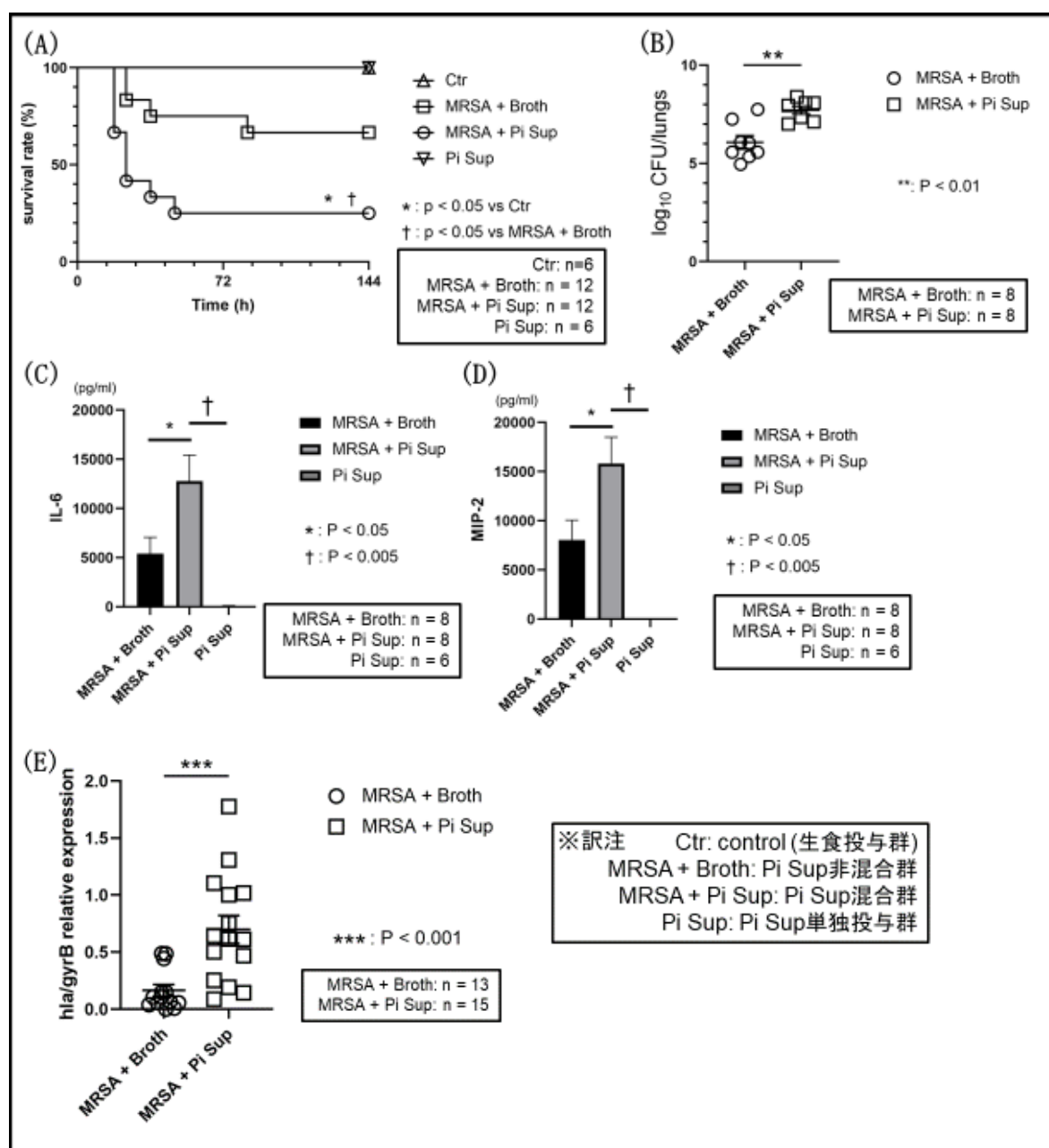


図 6. Pi Sup 混合による MRSA 肺炎の病原性への影響

A : 生存率 (*: $p < 0.05$ vs control 群、†: $p < 0.05$ vs MRSA + Broth 群)

B : 肺内生菌数 (**: $p < 0.01$)

C, D : 感染 20 時間後の BALF 中炎症性サイトカイン
(*: $p < 0.05$ 、†: $p < 0.005$)

E : 感染 20 時間後の肺内毒素 mRNA (hla) 発現 (***: $p < 0.001$)

非混合群と比較し、Pi Sup 混合群では、MRSA 肺炎モデルでの有意な生存率の減少 (図 6 A)、肺内生菌数の増加 (図 6 B)、BALF 中炎症性サイトカイン (IL-6、MIP-2) の増加 (図 6 C、D) がみられた。毒素 mRNA (hla) の発現についても、非混合群と比較し、Pi Sup 混合群で有意な発現亢進を認めた (図 6 E)。

次に、Pi Sup 混合感染による MRSA 肺炎モデルにおける肺病理組織所見について、非混合群、Pi Sup 単独群との比較検討を行った。その結果を図 7 に示す。

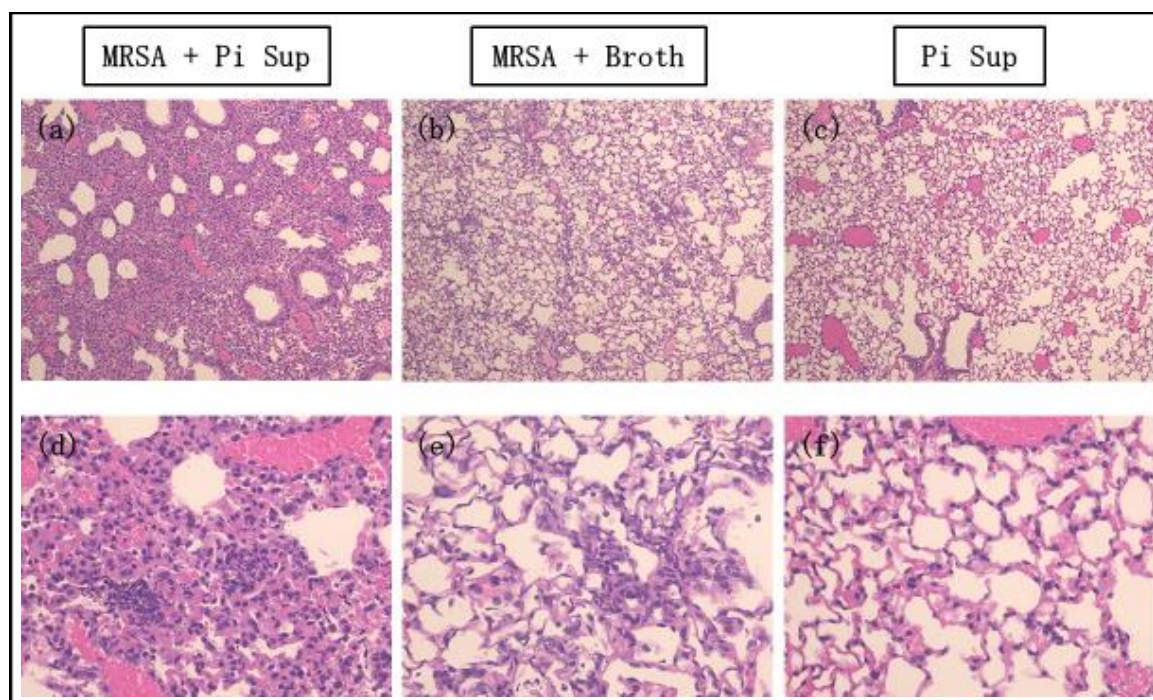


図 7. Pi Sup 混合による MRSA 肺炎の病理組織所見 (ヘマトキシリン・エオジン染色)、(a-c) 100 倍、(d-f) 400 倍

(a, d: Pi Sup 混合群 ($n = 6$))、(b, e: Pi Sup 非混合群 ($n = 6$))、(c, f: Pi Sup 単独投与群 ($n = 4$))

肺病理組織所見では、Pi Sup 混合群において、その他の群と比較して、より顕著に炎症細胞浸潤や肺胞壁肥厚、肺胞出血などの所見を認めた (図 7 a-f)。

【*in vitro* の実験系における Pi Sup が MRSA に及ぼす影響の検証】

次に、*in vitro* の実験系により、Pi Sup 混合群と非混合群における MRSA の菌増殖・毒素 mRNA の発現について比較検討した。その結果を図 8 に示す。

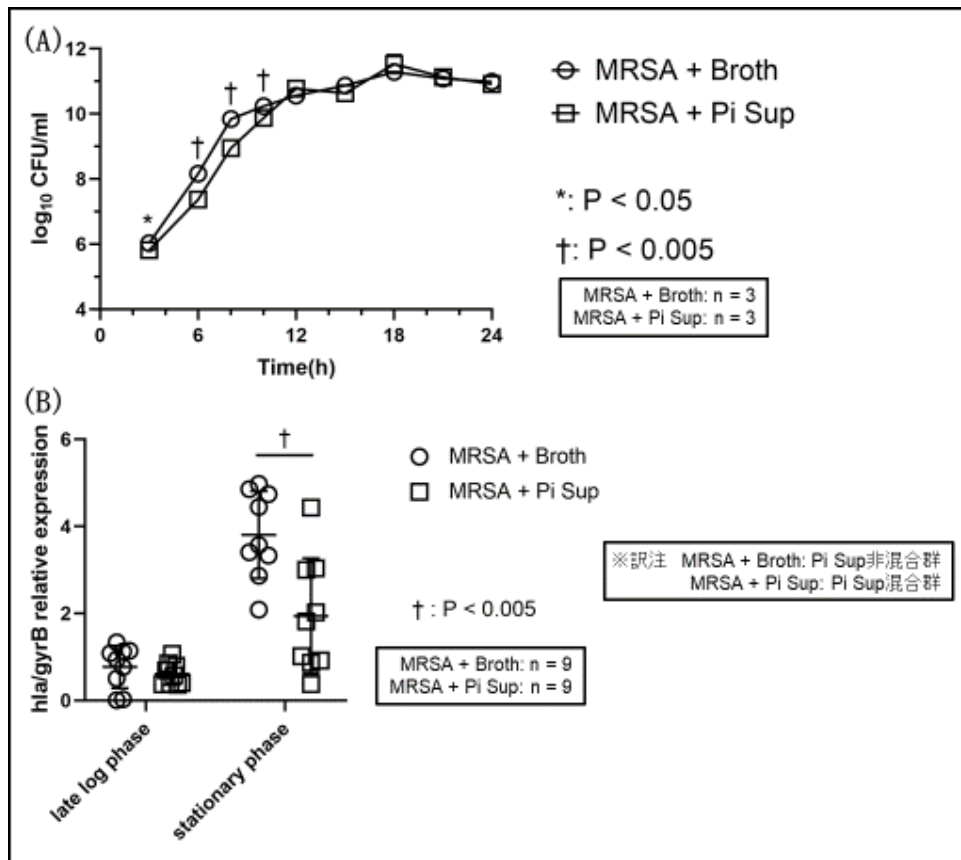


図 8. *in vitro* の実験系での Pi Sup 混合下の MRSA の増殖能・毒素 mRNA 発現
A: 菌増殖曲線 (*: $p < 0.05$ 、†: $p < 0.005$)
B: late log phase、stationary phase での毒素 mRNA (hla) 発現 (†: $p < 0.005$)

in vitro の実験系では、非混合群と比較して、Pi Sup 混合群では菌増殖の遅延を認めた (図 8 A)。また、Pi Sup 混合群では、非混合群と比較し、stationary phase で有意な毒素 mRNA (hla) 発現の減弱を認めた (図 8 B)。

【Pi Sup が PMN 殺菌能に与える影響の検証】

次に、PMN による MRSA の殺菌能に対する Pi Sup の病的影響を、*in vitro* の実験系を用いて検証した。その結果を図 9 に示す。

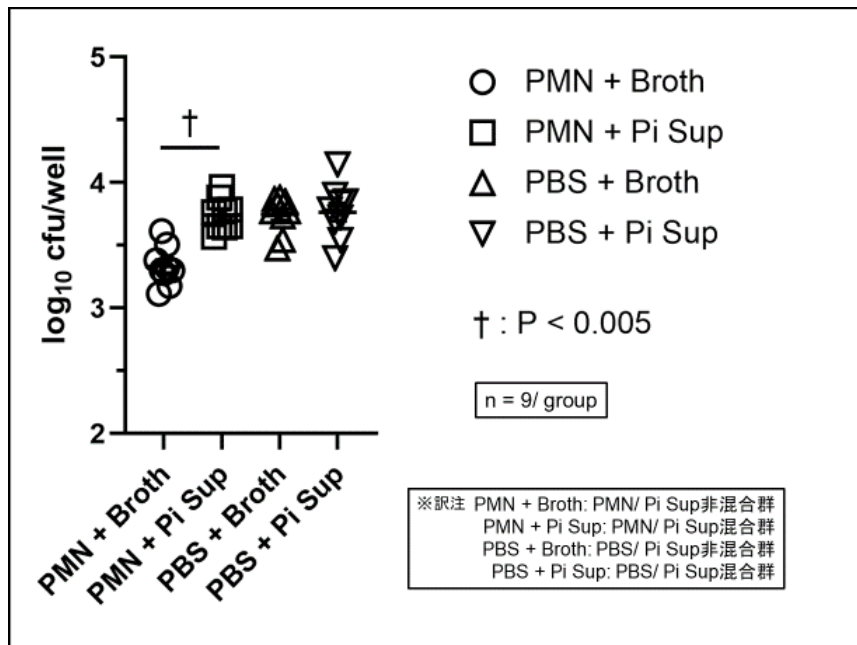


図 9. Pi Sup による PMN 混合 MRSA 菌液の生菌数への影響 (†: p < 0.005)

Pi Sup と PMN の混合群で、非混合群と比較し有意な生菌数の増加を認め、Pi Sup が PMN の殺菌能を減弱する効果をもつことが示された (図 9)。

【Pi Sup が PVL 産生株・TSST 産生株による MRSA 肺炎に及ぼす影響の検証】

次に、PVL 産生株と TSST 産生株について、前述の実験と同様の手法を用いて、Pi Sup による病的影響を検証することとした。

まず PVL 産生株 (NU1516 株)を用いて、Pi Sup 混合群と非混合群における、マウス肺炎モデルでの生存率、肺内生菌数、肺内毒素 mRNA (pv1)発現の比較検討を行った。それらの結果を図 10 に示す。

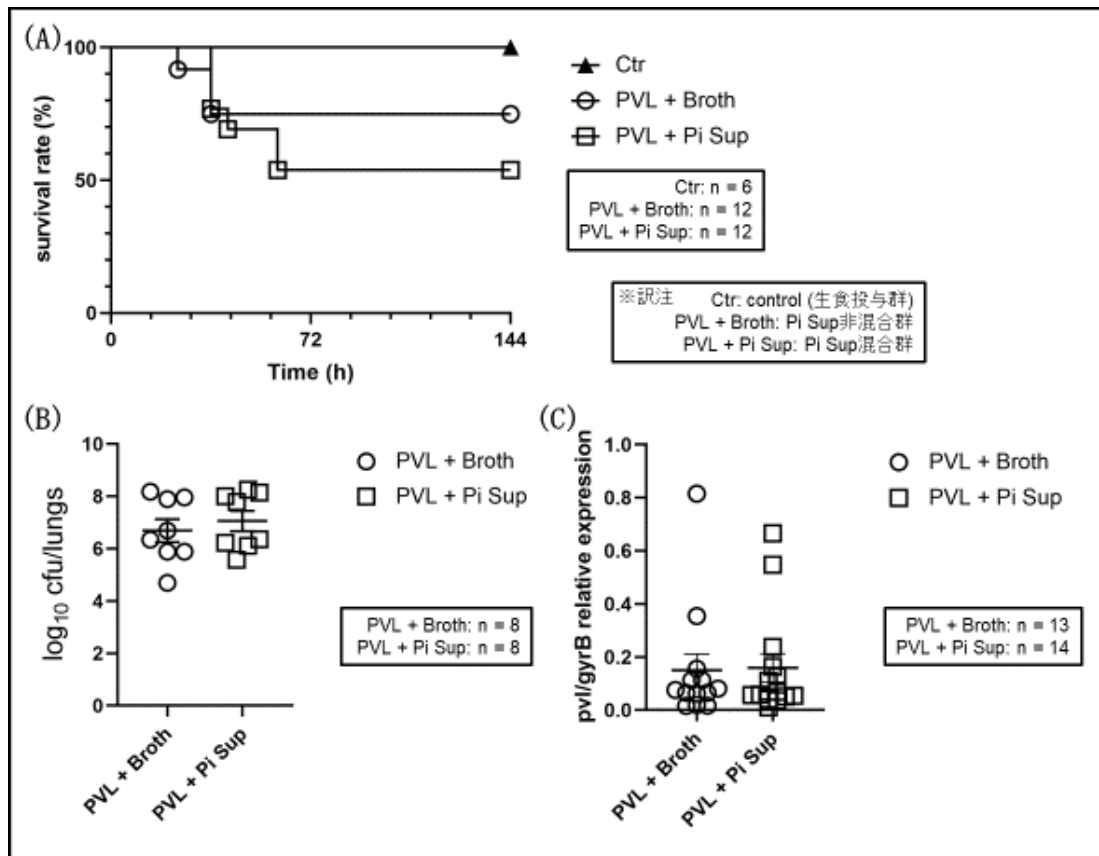


図 1 O. Pi Sup 混合による PVL 産生株による MRSA 肺炎の病原性への影響
A : 生存率、B : 肺内生菌数、C : 感染 20 時間後の肺内毒素 mRNA (pvl) 発現

PVL 産生株においては、MRSA 肺炎モデルにおける生存率 (図 1 OA)、肺内生菌数 (図 1 OB)、肺内毒素 mRNA (pvl) 発現 (図 1 OC) について、Pi Sup 混合群では、非混合群と比較して有意な変化を認めなかった。いずれの実験も、3 回以上の実験で同様の結果を得た。

次に、TSST 産生株 (NU10-1643 株) を用いて、Pi Sup 混合群と非混合群における、マウス肺炎モデルでの生存率、肺内生菌数、肺内毒素 mRNA (tsst、sec) 発現の比較検討を行った。その結果を図 1 1 に示す。

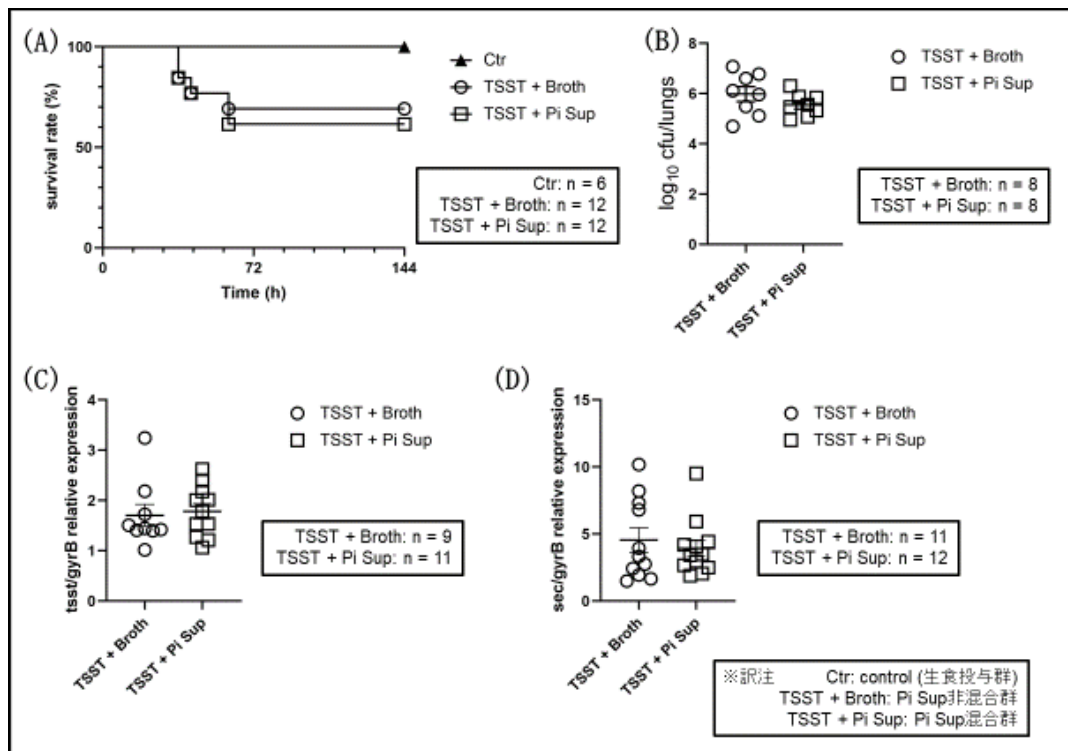


図 1 1. Pi Sup 混合による TSST 産生株による MRSA 肺炎の病原性への影響
A : 生存率、B : 肺内生菌数、
C, D : 感染 20 時間後の肺内毒素 mRNA (tsst、sec) 発現

PVL 産生株と同様に、TSST 産生株を用いた Pi Sup 混合群/非混合群では、生存率 (図 1 1 A)、肺内生菌数 (図 1 1 B)、肺内毒素 mRNA (tsst、sec) 発現 (図 1 1 C、D) における有意な差を認めない結果となった。

最後に、菌株毎の Pi Sup による MRSA 肺炎への病的影響の違いについて検討するため、各 MRSA 菌株の肺内増殖能について、*in vivo* の実験系を用いた検証を行った。実験は、各菌株の最大菌量 (5×10^9 CFU/ml) をマウスに接種し、感染後の肺内生菌数の経時的変化を検証した。その結果を図 1 2 に示す。

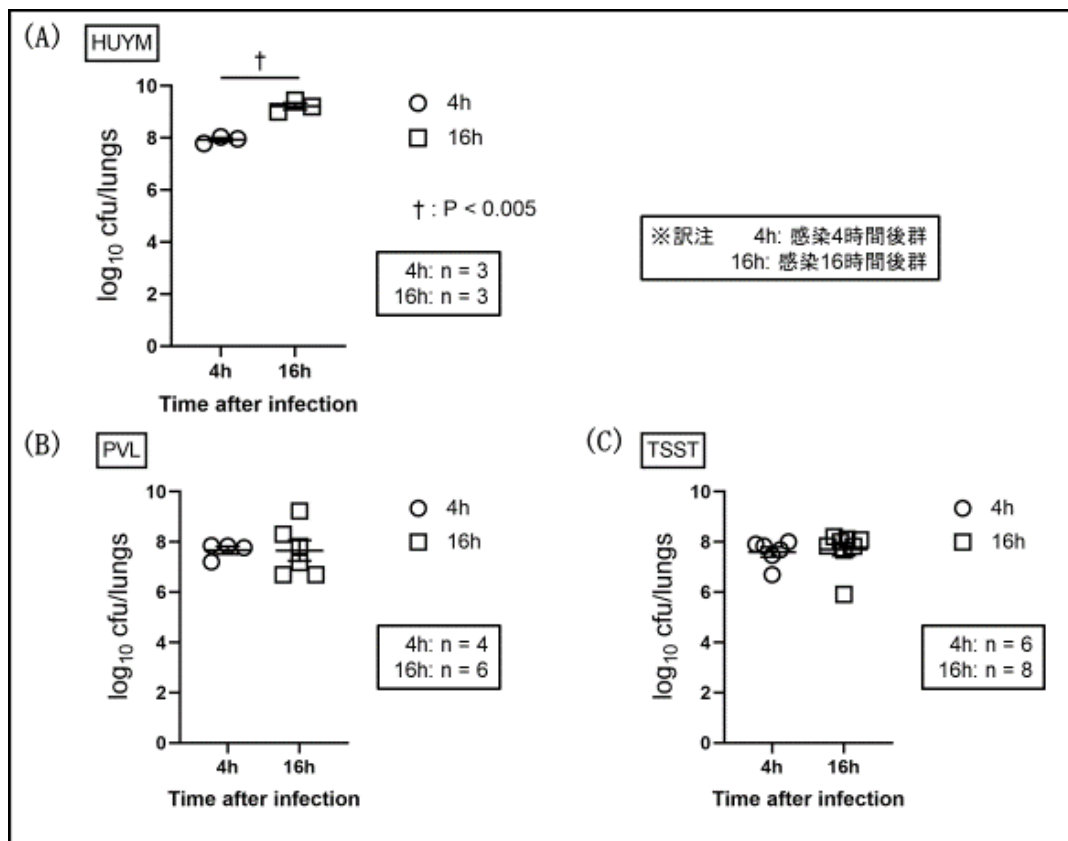


図 1 2. 各 MRSA 菌株における、MRSA 肺炎モデルでの感染 4 時間・16 時間後の肺内生菌数 (†: $p < 0.005$)

各菌株の感染マウス群には、いずれも致死性感染を呈する条件での菌量接種が行われた (HUYM 株: 致死率 100%, PVL 株, TSST 株: 80-100%)。感染後、HUYM 株感染群では経時的な肺内生菌数の増加がみられたが、PVL 産生株群、TSST 産生株群では、有意な経時的肺内生菌数増加がみられなかった (図 1 2 A、B、C)。これらの結果より、PVL 産生株/TSST 産生株と比較し、HUYM 株はより強い肺内増殖能を保有するものと考えられた。

第4節 考察

本研究では、嫌気的環境が MRSA の下気道病原性に与える影響について検証を行った。初めに、MRSA 自体の嫌気培養による病原性の変化について検討をおこなった。

嫌気培養した MRSA を用いた実験により、好気培養した MRSA と比較して、マウス MRSA 肺炎モデルでの生存率改善傾向 (図 4)、*in vitro* での増殖能低下 (図 5 A)、毒素 mRNA (hla) 発現抑制 (図 5 B) を示す結果が得られた。これらの結果から、嫌気培養した MRSA は好気培養時よりも病原性が減弱するものと考えられた。これより、嫌気的環境における MRSA 肺炎発症頻度の増加については、嫌気的環境下での MRSA 自体の病原性増強は考えがたく、別の病的機序の検証が必要と考えられた。

一方、*P. intermedia* の混合感染による MRSA の下気道病原性の検証については、Pi Sup の混合により、HA-MRSA 株による MRSA 肺炎モデルにおいて重症化がみられた (図 6、7)。*in vitro* の実験では、Pi Sup 自体は MRSA の増殖、毒素産生に抑制的である (図 8) も、好中球による MRSA 殺菌能の減弱を認めた (図 9)。

P. intermedia は偏性嫌気性グラム陰性桿菌で、歯周病の主要な病原菌とされる一方、下気道検体からも高頻度で検出されており、下気道感染への病的影響を有することが報告されている。(Tunney et al., 2008 ; Worlitzsch et al., 2009, Naito et al., 2017)。*P. intermedia* の病原性については、気道上皮細胞への障害性を有するとした研究報告 (Ulrich et al., 2010) や、好中球の貪食能を減弱させるという報告 (Shinzato et al., 1994) などがある。本研究では、Pi Sup は主に好中球の抑制により、MRSA 肺炎の感染初期に病的影響を及ぼすものと考えられた。

さらに、Pi Sup による MRSA 肺炎の重症化について、強毒素 (PVL・TSST) を発現する MRSA 株に対する効果も検証したところ、Pi Sup による PVL 産生株・TSST 産生株の肺炎の重症化は認めなかった (図 10、11)。いずれの菌株も、HUYM 株と比較して肺内増殖能が低く (図 12)、Pi Sup の好中球抑制を主体とした MRSA 肺炎の重症化では、肺内増殖能が重要であるものと考えられた。

また、本研究では、Pi Sup との混合感染により、肺内で HUYM 株の hla mRNA 発現亢進がみられた。hla は α ヘモリジンという毒素の mRNA である。本毒素は分泌型の細胞融解性毒素で、直接的な気道上皮の障害、IL-1 β を介した炎症の惹起により肺炎を誘発するとされる (Berube et al., 2013)。一方で、PVL、TSS については Pi Sup 追加による発現亢進はみられなかった。これらの毒素発

現は黄色ブドウ球菌の細胞密度依存的制御機構であるクオラムセンシングを介してコントロールを受けるものとされる (Queck et al., 2008 ; Andrey et al., 2010)。クオラムセンシングは、菌の増加に伴い活性化される代謝制御系である。今回 HUYM 株のみが MRSA 肺炎での肺内毒素 mRNA (hla) が発現亢進した理由としては、HUYM 株のみが Pi Sup との混合感染により肺内増殖が顕著に増強されたことによるものと考えられた。

黄色ブドウ球菌におけるクオラムセンシングは、4 つのタンパク質遺伝子 (*agrB*, *agrD*, *agrC*, *agrA*) と 1 つの制御系 RNA (RNAIII) をコードする遺伝子 (*hld*) から構成される accessory gene regulator: *agr* 制御系による。菌体密度の増加によって、菌体周囲に自己誘導ペプチド (autoinducing peptide: AIP) が増加すると、AIP が生体膜状に存在しているヒスチジンキナーゼ AgrC への結合を介し AgrA がリン酸化される。リン酸化された AgrA は RNAIII の転写を誘導し、RNAIII は RNA 分子のまま種々の標的遺伝子の発現を転写・翻訳レベルで制御するとされる (図 1 3)。hla、pvl、tsst は、全てクオラムセンシング (*agr* 依存) による制御を受け、RNAIII 依存性に発現が調節される。

これまで、MRSA 肺炎において hla を含めた毒素 mRNA の発現が、菌増殖依存性に促進するとした報告は乏しい。緒言でも述べたように、MRSA 肺炎は感染と気道定着の区別が困難であるが、本研究結果で示された HUYM 株による肺炎発症時の hla 亢進は、新たな診断の手がかりを示す可能性もある。今後は、RNAIII を含めたクラムセンシングにも注目し、肺炎発症時の *in vivo* での MRSA の毒素、病原性、代謝の解析を進める必要があるものと考えられた。

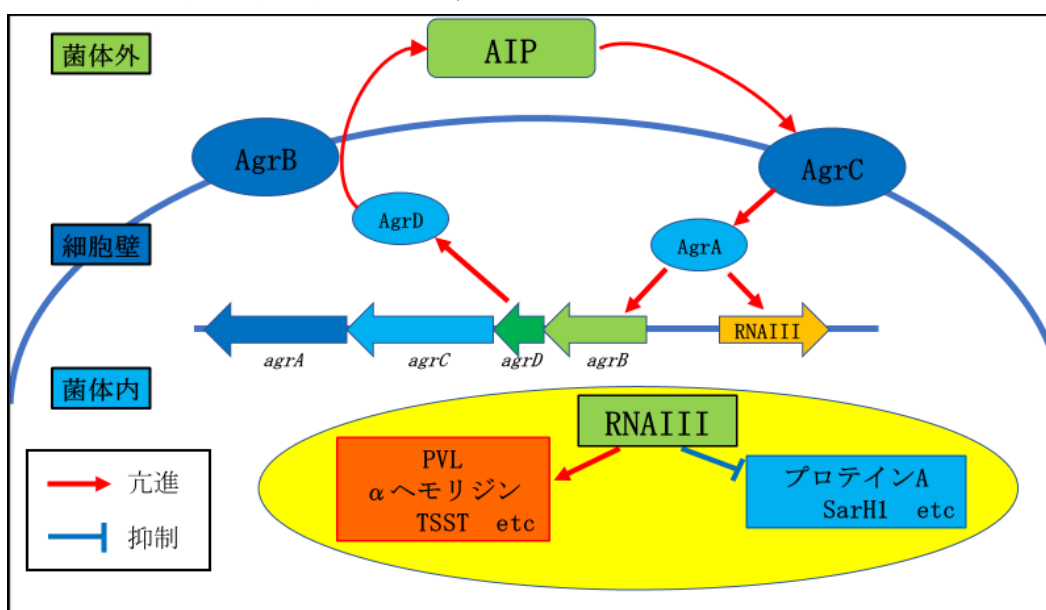


図 1 3. 黄色ブドウ球菌におけるクオラムセンシングの機序
(Queck et al., 2008 ; Andrey et al., 2010 より改変)

Pi Sup による肺内増殖の促進を介した MRSA 肺炎の重症化については、気道に *P. intermedia* が定着する症例や、歯周病の進行にて *P. intermedia* が口腔内で増殖した症例における *P. intermedia* の生成物の不顕性誤嚥などの機序で、MRSA 肺炎発症リスクの増加に寄与することが考えられた。

最近では、*Prevotella* と肺炎発症の関連を示唆する報告として、高齢者施設入所中の 343 症例を対象として、舌苔表面の細菌叢について 16S rRNA 解析を施行した臨床研究がある (Takeshita et al., 2010)。この研究では、16S rRNA 解析の結果から、クラスター解析を用いて症例を 4 つのクラスターに分類しており、舌苔に *Prevotella* 属などが増加していたクラスターでは、有意に肺炎や発熱を生じる頻度が高いことが報告された。本基礎研究で得られた Pi Sup による MRSA 肺炎の重症化という結果は、このような臨床研究とも相関性のある結果であり、口腔内の *Prevotella intermedia* と MRSA 肺炎の関連性についてはさらなる注意が必要であると考えられた。

今後は本研究で得られた Pi Sup と MRSA 肺炎の関連についての知見を、実臨床との相関性に注目して更に展開していくことが課題と考えられた。将来的には、Pi Sup の成分解析を行うことで Pi Sup の病原因子を特定し、実際の臨床症例における口腔内検体・BALF などを用いて、Pi Sup の病原因子の局在と肺炎発症との関連性などについての検証が望まれる。

本研究の問題点として、第一に、マウス肺炎モデルが免疫抑制モデルであり、炎症プロファイルの評価における免疫抑制への影響が挙げられる。しかし、HA-MRSA 株によるマウス肺炎モデルについては、免疫抑制を施行しなければ生存率の検証が困難であった。

第二に、毒素の検証が mRNA 発現のみとなった点が挙げられる。今後の課題として、毒素タンパク質を Western Blot あるいはサンドイッチ ELISA などでタンパク質量の検証も行うことが望ましいものと考えられた。

今回の研究の結果から、嫌氣的環境と MRSA 肺炎の病原性の関連として、口腔内もしくは下気道における *P. intermedia* の存在が MRSA 肺炎のリスクとなることが示唆され、MRSA 肺炎の病態の理解において重要な結果であると考えられた。

第 5 節 本章の総括および結論

I 本研究から得られた新知見

本研究では、嫌気的環境と MRSA 肺炎の関連性について検証をおこなった。嫌気培養下の MRSA では下気道への病原性が減弱し、歯周病原菌である *P. intermedia* の培養上清 (Pi Sup) との共感染では、MRSA 肺炎の重症化を認めた。MRSA 肺炎重症化は、Pi Sup による好中球の殺菌能抑制に伴う MRSA の肺内生菌数増加の促進と、それに伴う毒素 (hla) の産生亢進によりもたらされたものと考えられた。Pi Sup による病的影響は、MRSA 菌株の肺内増殖能に関連すると考えられる菌株間の個体差が認められた。

II 新知見の意義

本研究成果は、歯周病および偏性嫌気性菌による MRSA 肺炎の重症化について、新たな機序を示すところとなった。これにより、MRSA 肺炎発症の新たなリスク因子として、歯周病や偏性嫌気性菌との共感染を検討すべきと考えられた。

III 本研究で得られた新知見に基づく今後の研究の展開

- ・Pi Sup の成分解析を行い、MRSA 肺炎重症化に寄与する病原因子についてさらなる検証を行う。
- ・臨床検体を用いて、Pi Sup、および病原因子の局在と MRSA 肺炎の病態の関連性を検証する。

IV 今後の課題

MRSA 肺炎発症および重症化の病的機序について、複数株を用いたさらなる検証を行っていく。

第3章

総括および結論

MRSA 肺炎は、院内肺炎の中で高い割合を占め、死亡率も高いことが知られており、臨床上重要な疾患である。その一方で、喀痰培養から分離された MRSA の病的意義については、気道定着と感染の区別が難しく、肺炎の診断には課題が残る。特に HA-MRSA 株については、病原性が比較的弱い傾向があり、同株を用いた MRSA 肺炎モデルによる研究報告も乏しい。そうした背景の下、院内 MRSA 肺炎モデルの確立、および病原性の検証を行った。

本研究では、経気道感染を介した MRSA 肺炎モデルを新しく確立できた。VCM/ DAP などの治療効果の検証にて、既報の MRSA 肺炎モデルと比較し、より実臨床に近い感染モデルとなった。同モデルを応用し、臨床研究などで指摘された MRSA の嫌氣的環境における下気道病原性についても検証しえた。

以下に本研究で得られた新知見について記載する。

1. 経気道感染による HA-MRSA 肺炎モデルを確立した。(第1章)
2. 同モデルを用いて、AZM による MRSA 肺炎に対する新たな治療効果を証明した。また、その機序として、AZM による MRSA の増殖初期の抑制効果を示した(第1章)。
3. MRSA は嫌気培養により、下気道での病原性が減弱した。(第2章)
4. MRSA 肺炎モデルにおいて、Pi Sup との混合感染による重症化がみられた。その機序として、Pi Sup による好中球の殺菌能低下に伴う肺内生菌数増加への寄与が考えられた。(第2章)

今後の研究として、Pi Sup の MRSA 肺炎重症化に寄与する病原因子の抽出を目的として、代謝産物に注目したメタボローム解析や RNA transcriptome などのオミクス解析を検討する。また、病原因子抽出後は、下気道感染や呼吸器疾患を有する症例の臨床検体を用いて、口腔内や肺内における Pi Sup の病原因子の局在などを検証し、実臨床における嫌氣的環境と MRSA 肺炎の関連性についてさらなる検討を行いたい。最終的には、MRSA 肺炎の新規診断方法に寄与する研究展開を目標とし、MRSA 肺炎の病態解明を進めたい。

謝辞

本研究の機会を与えていただいた、北海道大学大学院医学研究院呼吸器内科学教室、今野哲教授に深謝致します。ならびに、本研究において直接のご指導を賜りました、北海道大学病院内科 I、長岡健太郎先生、および、適切な助言と菌株の提供など御助力を賜りました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座病態解析・診断学分野、柳原克紀教授に感謝の意を表します。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Akinnusi, M.E., Hattemer, A., Gao, W., and El-Solh, A.A. (2011). Does linezolid modulate lung innate immunity in a murine model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia? Crit. Care Med. *39*, 1944–1952.
- Andrey, D.O., Renzoni, A., Monod, A., Lew, D.P., Cheung, A.L., and Kelley, W.L. (2010). Control of the *Staphylococcus aureus* toxic shock *tst* promoter by the global regulator SarA. J. Bacteriol. *192*, 6077–6085.
- Argudín, M.Á., Mendoza, M.C., and Rodicio, M.R. (2010). Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. Toxins (Basel) *2*, 1751–1773.
- Barrett, F.F., McGehee, R.F., and Finland, M. (1968). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. Bacteriologic and epidemiologic observations. N. Engl. J. Med. *279*, 441–448.
- Berube, B.J., and Bubeck, Wardenburg, J. (2013). *Staphylococcus aureus* α -toxin: nearly a century of intrigue. Toxins *5*, 1140–1166.
- Champney, M.S., and Burdine, R. (1998). Azithromycin and clarithromycin inhibition of 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells. Curr. Microbiol. *36*, 119–123.
- Bukowski, M., Wladyka, B., and Dubin, G. (2010). Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. Toxins (Basel) *2*, 1148–1165.
- Chu, H., Zhao, L., Zhang, Z., Gui, T., Han, L., and Ni, Y. (2013). Antibiotic resistance and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from lower respiratory tract: multi-resistance and high prevalence of SCCmec III type. Cell Biochem. Biophys. *67*, 795–801.
- Cillóniz, C., Ewig, S., Polverino, E., Marcos, M.A., Esquinas, C., Gabarrús, A., Mensa, J., and Torres, A. (2011). Microbial aetiology of community-acquired pneumonia and its relation to severity. Thorax *66*, 340–346.
- David, M.Z., and Daum, R.S. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin. Microbiol. Rev. *23*, 616–687.
- Diep, B.A., Gill, S.R., Chang, R.F., Phan, T.H., Chen, J.H., Davidson,

M.G., Lin, F., Lin, J., Carleton, H.A., Mongodin, E.F., et al. (2006). Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 367, 731–739.

Durand, G., Bes, M., Meugnier, H., Enright, M.C., Forey, F., Liassine, N., Wenger, A., Kikuchi, K., Lina, G., Vandenesch, F., et al. (2006). Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. *J. Clin. Microbiol.* 44, 847–853.

Eliakim-Raz, N., Hellerman, M., Yahav, D., Cohen, J., Margalit, I., Fisher, S., Zusman, O., Shaked, H., and Bishara, J. (2017). Trimethoprim/sulfamethoxazole versus vancomycin in the treatment of healthcare/ventilator-associated MRSA pneumonia: a case-control study. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 882–887.

Ferreira, F.A., Souza, R.R., de Sousa Moraes, B., de Amorim Ferreira, A.M., Américo, M.A., Fracalanza, S.E., Dos Santos Silva Couceiro, J.N., and Sá Figueiredo, A.M. (2013). Impact of *agr* dysfunction on virulence profiles and infections associated with a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) variant of the lineage ST1-SCCmec IV. *BMC. Microbiol.* 13, 93.

Finck-Barbançon, V., Duportail, G., Meunier, O., and Colin, D.A. (1993). Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1182, 275–282.

Fukuda, Y., Yanagihara, K., Higashiyama, Y., Miyazaki, Y., Hirakata, Y., Mukae, H., Tomono, K., Mizuta, Y., Tsukamoto, K., and Kohno, S. (2006). Effects of macrolides on pneumolysin of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Eur. Respir. J.* 27, 1020–1025.

Glaser, P., Martins-Simões, P., Villain, A., Barbier, M., Tristan, A., Bouchier, C., Ma, L., Bes, M., Laurent, F., Guillemot, D., et al. (2016). Demography and Intercontinental Spread of the USA300 Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Lineage. *MBio.* 7, e02183–15.

Goerke, C., Campana, S., Bayer, M.G., Döring, G., Botzenhart, K., and Wolz, C. (2000). Direct quantitative transcript analysis of the *agr* regulon of *Staphylococcus aureus* during human infection in comparison

to the expression profile in vitro. *Infect. Immun.* *68*, 1304-1311.

Gillet, Y., Issartel, B., Vanhems, P., Fournet, J.C., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Piémont, Y., Brousse, N., Floret, D., et al. (2002). Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* *359*, 753-759.

Grobost, V., Rigal, E., Pavier, Y., Vidal, M., Mrozek, N., Beytout, J., Laurichesse, H., and Lesens, O. (2014). Suppressive therapy using azithromycin in 2 rare cases of recurrent staphylococcal infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* *79*, 90-92.

Haque, N.Z., Zuniga, L.C., Peyrani, P., Reyes, K., Lamerato, L., Moore, C.L., Patel, S., Allen, M., Peterson, E., Wiemken, T., et al. (2010). Relationship of vancomycin minimum inhibitory concentration to mortality in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hospital-acquired, ventilator-associated, or health-care-associated pneumonia. *Chest* *138*, 1356-1362.

Harada, Y., Yanagihara, K., Yamada, K., Migiyama, Y., Nagaoka, K., Morinaga, Y., Nakamura, S., Imamura, Y., Hasegawa, H., Miyazaki, T., et al. (2013). *In vivo* efficacy of daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a mouse model of hematogenous pulmonary infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* *57*, 2841-2844.

Herold, B.C., Immergluck, L.C., Maranan, M.C., Lauderdale, D.S., Gaskin, R.E., Boyle-Vavra, S., Leitch, C.D., and Daum, R.S. (1998). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA.* *279*, 593-598.

Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., and Ito, T. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* *9*, 486-493.

Hiramatsu, K., Kayayama, Y., Matsuo, M., Aiba, Y., Saito, M., Hishinuma, T., and Iwamoto, A. (2014). Vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* *2*, 213-224.

Hoffmann, N., Lee, B., Hentzer, M., Rasmussen, T.B., Song, Z., Johansen, H.K., Givskov, M., and Høiby, N. (2007). Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in *Cftr*(-/-) mice.

Antimicrob. Agents Chemother. *51*, 3677–3687.

Jacqueline, C., Broquet, A., Roquilly, A., Davieau, M., Caillon, J., Altare, F., Potel, G., and Asehnoune, K. (2014). Linezolid dampens neutrophil-mediated inflammation in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia and protects the lung of associated damages. *J. Infect. Dis.* *210*, 814–823.

Johansson, N., Kalin, M., Tiveljung-Lindell, A., Giske, C.G., and Hedlund, J. (2010). Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods. *Clin. Infect. Dis.* *50*, 202–209.

Jung, E., Perrone, E.E., Liang, Z., Breed, E.R., Dominguez, J.A., Clark, A.T., Fox, A.C., Dunne, W.M., Burd, E.M., Farris, A.B., et al. (2012). Cecal ligation and puncture followed by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia increases mortality in mice and blunts production of local and systemic cytokines. *Shock* *37*, 85–94.

Kalil, A.C., Metersky, M.L., Klompas, M., Muscedere, J., Sweeney, D.A., Palmer, L.B., Napolitano, L.M., O’ Grady, N.P., Bartlett, J.G., Carratalà, J., et al. (2016). Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin. Infect. Dis.* *63*, e61–e111.

Kawanami, T., Yatera, K., Yamasaki, K., Noguchi, S., Fukuda, K., Akata, K., Naito, K., Kido, T., Ishimoto, H., Taniguchi, H., et al. (2016). Clinical impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on bacterial pneumonia: cultivation and 16S ribosomal RNA gene analysis of bronchoalveolar lavage fluid. *BMC Infect. Dis.* *16*, 155.

Kohno, S., Yamaguchi, K., Aikawa, N., Sumiyama, Y., Odagiri, S., Aoki, N., Niki, Y., Watanabe, S., Furue, M., Ito, T., et al. (2007). Linezolid versus vancomycin for the treatment of infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.* *60*, 1361–1369.

Kollef, M.H., Shorr, A., Tabak, Y.P., Gupta, V., Liu, L.Z., and Johannes, R.S. (2005). Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: results from a large US database of culture-positive pneumonia. *Chest* *128*, 3854–3862.

Komiya, K., Ishii, H., and Kadota, J. (2015). Healthcare-associated

Pneumonia and Aspiration Pneumonia. *Aging Dis.* *6*, 27–37.

Li, Z., Stevens, D.L., Hamilton, S.M., Parimon, T., Ma, Y., Kearns, A.M., Ellis, R.W., and Bryant, A.E. (2011). Fatal *S. aureus* hemorrhagic pneumonia: genetic analysis of a unique clinical isolate producing both PVL and TSST-1. *PLoS One* *6*; e27246.

Liu, C., Bayer, A., Cosgrove, S.E., Daum, R.S., Fridkin, S.K., Gorwitz, R.J., Kaplan, S.L., Karchmer, A.W., Levine, D.P., Murray, B.E., et al. (2011). Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. *Clin. Infect. Dis.* *52*, 285–292.

Ma, X.X., Ito, T., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chongtrakool, P., Boyle-Vavra, S., Daum, R.S., and Hiramatsu, K. (2002). Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 1147–1152.

Mandell, G.L., and Moorman, D.R. (1980). Treatment of experimental staphylococcal infections: effect of rifampin alone and in combination on development of rifampin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* *17*, 658–662.

Martínez, J.A., Horcajada, J.P., Almela, M., Marco, F., Soriano, A., Gracia, E., Marco, M.A., Torres, A., Mensa, J. (2003). Addition of a macrolide to a beta-lactam-based empirical antibiotic regimen is associated with lower in-hospital mortality for patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* *36*, 389–395.

Martin-Loeches, I., Lisboa, T., Rodriguez, A., Putensen, C., Annane, D., Garnacho-Montero, J., Restrepo, M.I., Rello, J. (2010). Combination antibiotic therapy with macrolides improves survival in intubated patients with community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med.* *36*, 612–620.

Maruyama, T., Fujisawa, T., Okuno, M., Toyoshima, H., Tsutsui, K., Maeda, H., Yuda, H., Yoshida, M., Kobayashi, H., Taguchi, O., et al. (2013). A new strategy for healthcare-associated pneumonia: a 2-year prospective multicenter cohort study using risk factors for multidrug-resistant pathogens to select initial empiric therapy. *Clin. Infect. Dis.* *57*, 1373–1383.

Motallebi, M., Jabalameli, F., Asadollahi, K., Taherikalani, M., and Emaneini, M. (2016). Spreading of genes encoding enterotoxins, haemolysins, adhesin and biofilm among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains with staphylococcal cassette chromosome *mec* type IIIA isolated from burn patients. *Microb. Pathog.* *97*, 34–37.

Motoshima, M., Yanagihara, K., Morinaga, Y., Matsuda, J., Sugahara, K., Yamada, Y., Kohno, S., and Kamihara, S. (2010). Genetic diagnosis of community-acquired MRSA: a multiplex real-time PCR method for Staphylococcal cassette chromosome *mec* typing and detecting toxin genes. *Tohoku J. Exp. Med.* *220*, 165–170.

Nagaoka, K., Yanagihara, K., Harada, Y., Yamada, K., Migiyama, Y., Morinaga, Y., Izumikawa, K., Takeya, H., Yamamoto, Y., Nishimura, M., et al. (2014a). Predictors of the pathogenicity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia. *Respirology* *19*, 556–562.

Nagaoka, K., Yanagihara, K., Morinaga, Y., Nakamura, S., Harada, T., Hasegawa, H., Izumikawa, K., Ishimatsu, Y., Takeya, H., Nishimura, M., et al. (2014b). *Prevotella intermedia* Induces Severe Bacteremic Pneumococcal Pneumonia in Mice with Upregulated Platelet-Activating Factor Receptor Expression. *Infect. Immun.* *82*, 587–593.

Nagaoka, K., Yamashita, Y., Kimura, H., Suzuki, M., Konno, S., Fukumoto, T., Akizawa, K., Morinaga, Y., Yanagihara, K., and Nishimura, M. (2019). Effects of Anaerobic Culturing on Pathogenicity and Virulence-Related Gene Expression in Pneumococcal Pneumonia. *J. Infect. Dis.* *219*, 1545–1553.

Naimi, T.S., LeDell, K.H., Boxrud, D.J., Groom, A.V., Steward, C.D., Johnson, S.K., Besser, J.M., O'Boyle, C., Danila, R.N., Cheek, J.E., et al. (2001). Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 1996–1998. *Clin. Infect. Dis.* *33*, 990–996.

Naito, K., Yamasaki, K., Yatera, K., Akata, K., Noguchi, S., Kawanami, T., Fukuda, K., Kido, T., Ishimoto, H., and Mukae, H. (2017). Bacteriological incidence in pneumonia patients with pulmonary emphysema: a bacterial floral analysis using the 16S ribosomal RNA gene in bronchoalveolar lavage fluid. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* *12*, 2111–2120.

Paul, M., Bishara, J., Yahav, D., Goldberg, E., Neuberger, A., Ghanem-Zoubi, N., Dickstein, Y., Nseir, W., Dan, M., and Leibovici, L. (2015). Trimethoprim-sulfamethoxazole versus vancomycin for severe infections caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: randomised controlled trial. *BMJ.* *350*, h2219.

Pauli, N.T., Kim, H.K., Falugi, F., Huang, M., Dulac, J., Henry, Dunand, C., Zheng, N.Y., Kaur, K., Andrews, S.F., Huang, Y., et al. (2014). *Staphylococcus aureus* infection induces protein A-mediated immune evasion in humans. *J. Exp. Med.* *211*, 2331-2339.

Perkins, H.R. (1982). Vancomycin and related antibiotics. *Pharmacol. Ther.* *16*, 181-197.

Queck, S.Y., Jameson-Lee, M., Villaruz, A.E., Bach, T.H., Khan, B.A., Sturdevant, D.E., Ricklefs, S.M., Li, M., and Otto, M. (2008). RNAIII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell* *32*, 150-158.

Randolph, A.G., Xu, R., Novak, T., Newhams, M.M., Bubeck, Wardenburg, J., Weiss, S.L., Sanders, R.C., Thomas, N.J., Hall, M.W., Tarquinio, K.M., et al. (2019). Vancomycin Monotherapy May Be Insufficient to Treat Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Coinfection in Children With Influenza-related Critical Illness. *Clin. Infect. Dis.* *68*, 365-372.

Rivulgo, V., Sparo, M., Ceci, M., Fumuso, E., Confalonieri, A., Delpech, G., and Bruni, S.F. (2013). Comparative plasma exposure and lung distribution of two human use commercial azithromycin formulations assessed in murine model: a preclinical study. *Biomed. Res. Int.* *2013*, 392010.

Robinson, J.O., Pearson, J.C., Christiansen, K.J., Coombs, G.W., and Murray, R.J. (2009) Community-associated versus healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: a 10-year retrospective review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *28*, 353-361.

Rubinstein, E., Kollef, M.H., and Nathwani, D. (2008). Pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* *46*, S378-S385.

Saito, A., Kohno, S., Matsushima, T., Watanabe, A., Oizumi, K.,

Yamaguchi, K., Oda, H., and Study Group. (2006). Prospective multicenter study of the causative organisms of community-acquired pneumonia in adults in Japan. *J. Infect. Chemother.* *12*, 63-69.

Shinabarger, D. (1999). Mechanism of action of the oxazolidinone antibacterial agents. *Expert Opin. Investig. Drugs* *8*, 1195-1202.

Shindo, Y., Ito, R., Kobayashi, D., Ando, M., Ichikawa, M., Shiraki, A., Goto, Y., Fukui, Y., Iwaki, M., Okumura, J., et al. (2013). Risk factors for drug-resistant pathogens in community-acquired and healthcare-associated pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *188*, 985-995.

Shinzato, T., and Saito, A. (1994). A mechanism of pathogenicity of "*Streptococcus milleri* group" in pulmonary infection: synergy with an anaerobe. *J. Med. Microbiol.* *40*, 118-123.

Silverman, J.A., Mortin, L.I., Vanpraagh, A.D., Li, T., and Alder, J. (2005). Inhibition of daptomycin by pulmonary surfactant: in vitro modeling and clinical impact. *J. Infect. Dis.* *191*, 2149-2152.

Somma, S., Gastaldo, L., and Corti, A. (1984). Teicoplanin, a new antibiotic from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. *Antimicrob. Agents Chemother.* *26*, 917-923.

Steinkraus, G., White, R., and Friedrich, L. (2007). Vancomycin MIC creep in non-vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), vancomycin-susceptible clinical methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) blood isolates from 2001-05. *J. Antimicrob. Chemother.* *60*, 788-794.

Straus, S.K., and Hancock, R.E. (2006). Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochim. Biophys. Acta.* *1758*, 1215-1223.

Takeshita, T., Tomioka, M., Shimazaki, Y., Matsuyama, M., Koyano, K., Matsuda, K., and Yamashita, Y. (2010). Microfloral characterization of the tongue coating and associated risk for pneumonia-related health problems in institutionalized older adults. *J. Am. Geriatr. Soc.* *58*, 1050-1057.

Takizawa, H., Desaki, M., Ohtoshi, T., Kawasaki, S., Kohyama, T., Sato, M., Tanaka, M., Kasama, T., Kobayashi, K., Nakajima, J., et al. (1997). Erythromycin modulates IL-8 expression in normal and inflamed human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *156*, 266-271.

Tomita, T., and Kamio, Y. (1997). Molecular biology of the pore-forming cytolysins from *Staphylococcus aureus*, alpha- and gamma-hemolysins and leukocidin. *Biocsi. Biotechnol. Biochem.* *61*, 565-572.

Tunney, M.M., Field, T.R., Moriarty, T.F., Patrick, S., Doering, G., Muhlebach, M.S., Wolfgang, M.C., Boucher, R., Gilpin, D.F., McDowell, A., et al. (2008). Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *177*, 995-1001.

Ubukata, K., Yamashita, N., and Konno, M. (1985). Occurrence of a beta-lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* *27*, 851-857.

Ulrich, M., Beer, I., Braitmaier, P., Dierkes, M., Kummer, F., Krismer, B., Schumacher, U., Gräpler-Mainka, U., Riethmüller, J., Jensen, P.Ø., et al. Relative contribution of *Prevotella intermedia* and *Pseudomonas aeruginosa* to lung pathology in airways of patients with cystic fibrosis. *Thorax* *65*, 978-984.

Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., and Nouwen, J.L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* *5*, 751-762.

Worlitzsch, D., Rintelen, C., Böhm, K., Wollschläger, B., Merkel, N., Borneff-Lipp, M., and Döring, G. (2009). Antibiotic-resistant obligate anaerobes during exacerbations of cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Infect.* *15*, 454-460.

Wunderink, R.G., Rello, J., Cammarata, S.K., Croos-Dabrera, R.V., and Kollef, M.H. (2003). Linezolid vs vancomycin: analysis of two double-blind studies of patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia. *Chest* *124*, 1789-1797.

Yamada, K., Yanagihara, K., Kaku, N., Harada, Y., Nagaoka, K., Nakamura, S., Imamura, Y., Miyazaki, T., Izumikawa, K., Takeya, H., et al. (2013). Azithromycin attenuates lung inflammation in a mouse model of ventilator-associated pneumonia by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *57*, 3883-3888.

Yamasaki, K., Kawanami, T., Yatera, K., Fukuda, K., Noguchi, S., Nagata, S., Nishida, C., Kido, T., Ishimoto, H., Taniguchi, H., et al. (2013). Significance of Anaerobes and Oral Bacteria in Community-Acquired Pneumonia. *PLoS One* *8*, e63103.

Yanagihara, K., Kihara, R., Araki, N., Morinaga, Y., Seki, M., Izumikawa, K., Kakeya, H., Yamamoto, Y., Yamada, Y., Kohno, S., et al. (2009). Efficacy of linezolid against Panton-Valentine leukocidin (PVL)-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse model of haematogenous pulmonary infection. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34, 477-481.

Yoneyma, T., Yoshida, M., Matsui, T., and Sasaki, H. (1999). Oral care and pneumonia. *Lancet* 354, 515.

厚生労働省. (2018). 平成 30 年 (2018) 人口動態統計月報年計 (概数) の概況. <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai18/index.html> (最終閲覧日 2019 年 12 月 23 日).

日本呼吸器学会肺炎診療ガイドライン作成委員会. (2017). 成人肺炎診療ガイドライン 2017. (大阪: メディカルレビュー社).