

第40回小島三郎記念文化賞

臨床微生物学の確立と普及に向けた基盤研究

—基礎と臨床の接点を求めて—

A fundamental research towards the expansion and establishment of clinical microbiology.

やま ぐち けい ぞう
山 口 恵 三
Keizou YAMAGUCHI

はじめに

今回の受賞は「感染症領域における基礎と臨床の橋渡しの仕事」を高く評価していただいたものと理解し，“感染実験モデルを用いた感染症病態の解明”に関する研究を中心にこれまでの仕事の概略について紹介させていただく。

I. 微生物学領域における臨床検査医学の向上

長崎大学附属病院検査部細菌室の室長時代、微生物検査室の近代化を目的に、検査室の自動化と迅速診断、およびシステム化を完成させた。自動化の一端としてスパイラルシステムを初めて臨床に応用し、定量培養の精度向上と簡易化に貢献、現在では各検査室で広く導入されている。さらに、日常の薬剤感受性試験に定量的検査法である微量液体希釈法を全国に先駆けて導入、これらをルチン検査として定着させ、結核菌にも応用した。また、検査部を中心とした院内感染対策ネットワークに着手し、現在の耐性菌サーベイランスのモデルを構築した。

II. 動物感染実験モデルを用いた感染症病態の解明

院内感染症や市中肺炎を対象とした感染実験モデルを作成し、それぞれの病態について基礎的観点からアプローチを行い、臨床における応用を試みてきたので、その主なものについて概説する。

1. 顆粒球減少マウスおよび熱傷マウスモデルを用いた内因性敗血症の解析

敗血症は早期に適切な治療を開始しなければしばしば死に至る予後不良な感染症で、多くは基礎疾患を有する患者に日和見感染症として発症する。近年の優れた抗菌薬の開発により、大腸菌、肺炎桿菌などによる敗血症の死亡率は著明に低下したものの、緑膿菌敗血症の死亡率は未だに高い施設が多い。このような日和見感染症の発症機序を解明することを目的に、臨床上のデータに基づき、ヒトにおける敗血症の病態に極めて類似した白血球減少および熱傷マウス実験モデルを作製し、種々の検討を加えてきた。その結果、いずれのモデルにおいても内因性敗血症を高頻度で発症し、その原因菌としては抗菌薬によって選択され過増殖した腸管内細菌叢の一部の菌、特に緑膿菌が重要な役割を果たしていることを確認した（図1, 2）。内因性緑膿菌敗血症の発症には、原因菌となる緑膿菌の腸管における定着・増殖が必須となるが、臨床分離株を用いた実験により、血液由来株は非血液由来株（主に喀痰由来）に対し定着・増殖率が高いことを明らかにした。そこで、次のステップとして重要な腸管上皮から血液中への菌の侵入性に関して、緑膿菌鞭毛の運動性を中心に検討を加えた。運動性の強いB-16株を親株として、これから得られた運動性低下変異株を用いてその病原性を比較してみた（図3）。運動性が活発なB-16、B-16-52は、熱傷時敗血症モデルにおいて高い死亡率を示したのに対して、運動性を低下させたB-16-40、B-16-46株ではいずれも有意な死亡率の低下を示した（図4）。同様の実験を顆粒球減少マウス

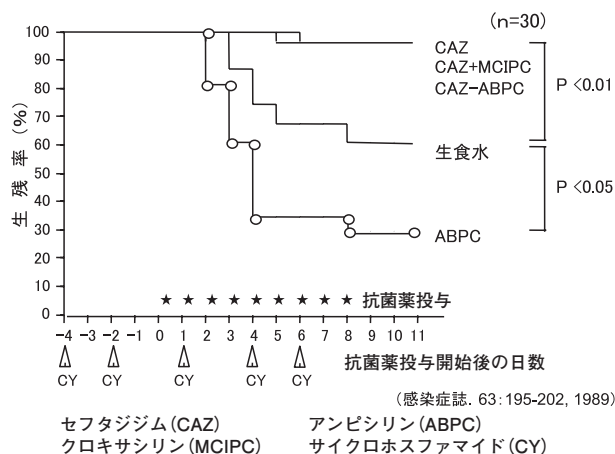


図1 各種抗生薬投与下でのサイクロホスファミド処理マウスの生残率

分離菌種	生食水	ABPC	CAZ	CAZ MCIPC	CAZ ABPC MINO	計
<i>P. aeruginosa</i>	10(10)	21(21)	1(1)			32(32)
<i>E. coli</i>	1(6)			(1)		1(7)
<i>E. cloacae</i>		2(4)		(1)		2(5)
<i>S. aureus</i>	1(1)		(1)			1(2)
Other <i>Staphylococci</i>	(1)		(2)			3
<i>E. faecalis</i>			(1)	(2)		(3)
<i>E. faecium</i>			(1)	(2)	(2)	(5)
Other <i>Streptococci</i>			(1)			(1)
総分離株数	12(18)	23(25)	1(7)	(6)	(2)	6(58)

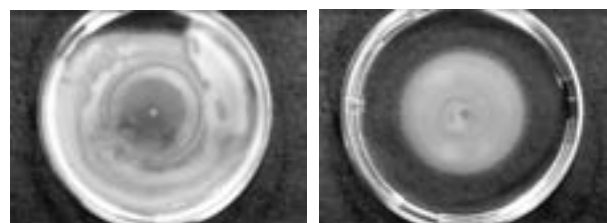
() ; 肺胞洗浄液からの分離株数, 各群30匹

(感染症誌. 63:195-202, 1989)

図2 死亡した白血球減少マウスの心血と肺からの分離菌とその内訳

モデルを用いて行ったが、運動性低下変異株の病原性は熱傷モデル同様明らかに低く、また、抗鞭毛抗体を投与することによって有意な死亡率の低下が観察されたことから、内因性敗血症の発症には緑膿菌の運動性が重要な役割を果たしていることが確認された。

抗生薬の投与により、腸管内で選択的に過増殖を引き起こした細菌群の一部は、腸管より門脈血中に侵入するが、大部分は肝臓の Kupffer 細胞で捕捉され循環血中には侵入し難いものに対して、緑膿菌はこのような異物排除機構に抵抗し、容易に全身性敗血症を引き起こす。また、敗血症を起こしやすい緑膿菌は exotoxin A および alkaline protease の産生性が高い。このような菌体外酵素と腸管における緑膿菌の定着・増殖性、あるいは Kupffer 細胞によるクリアランスに対する抵抗性との関係に関しては未だ不明の部分が多く、今後解明されるべき点の1つである。また、サイクロホスファミド (CY) 投与は



P. aeruginosa B-16
運動性(著明)

P. aeruginosa B-16-40
運動性(低下)

(JIC: 1:193-196, 1996)

図3 寒天平板上の緑膿菌の運動性

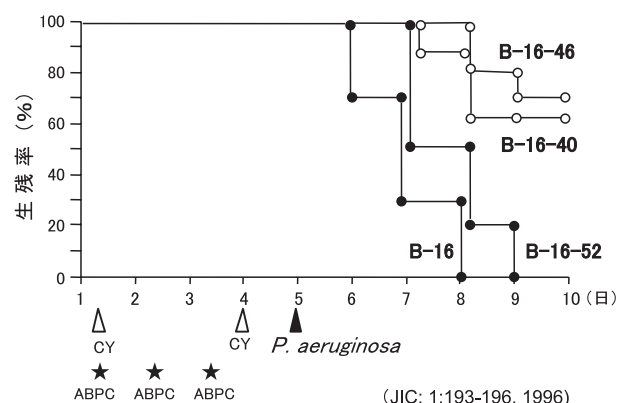


図4 *Paeruginosa* B-16 およびその変異株による敗血症における熱傷マウスの生残率の比較

末梢血液中の白血球以外に、腸管のリンパ球にも作用していると考えられ、腸管局所の防御機構と敗血症発症の関係も今後の研究課題である。さらに、敗血症の発症や死亡率に関与していると考えられる exotoxin A は、種々の免疫系細胞に作用し、エンドトキシンショックの主要なメディエーターである TNF などのサイトカインの産生性等の変化を起こすことが近年報告されている。内因性敗血症モデルにおけるこれらのサイトカインとの関係についても今後検討を行わなければならない。以上のように、緑膿菌による内因性敗血症は、幾つものステップを経て発症に至る。したがって、本感染症のコントロールには、抗生薬の投与のみでは十分な効果が期待出来ないことは明らかであり、発症機構を正しく解明し、それに基づいた適切な予防・治療法の確立が必要となる。

2. 呼吸器感染症

1) 肺炎球菌性肺炎

肺炎球菌性肺炎は、市中肺炎の最も重要な原因菌

であり、敗血症や髄膜炎を併発しやすく、しばしば重篤な経過をとる。特に近年、ペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)が問題となっているが、ペニシリン系以外にもマクロライド系やテトラサイクリン系抗菌薬などにも耐性を示す多剤耐性化が急速に進んでいることから、治療法の再検討が強く求められている。

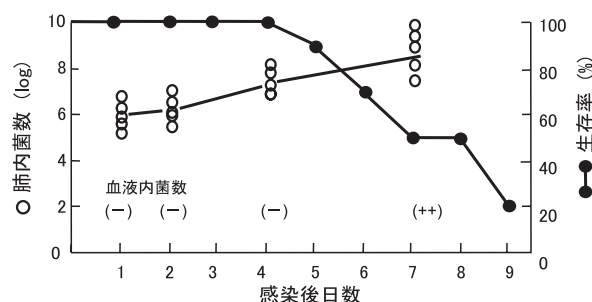
PRSP 感染モデルを作製するにあたり、ヒトの病態に類似したモデルを作製するためにはマウスの系の選択が重要となる。種々の検討を重ねた結果、PRSP 感染モデルの作製には CBA/J マウスが適切であることを見出した(図 5)。CBA/J マウス PRSP (19 型) 肺炎モデルにおける肺内菌数と生存率の関連をみると、肺内菌数の増加に伴い 4~5 日目頃から死亡するマウスが観察されるようになり、約 1 週間後には敗血症や髄膜炎を合併し死に至るが、この病態はまさにヒトにおける経過と類似している(図 6, 7)。本モデルを用いて病態形成に関わる因子について検討した結果、PRSP(19 型)に対して CBA/J マウスが高い感受性を示すのは、マウスにおける補体や一酸化窒素の反応性の低下が何らか

マウス系統	肉眼所見(陽性/全数)	死亡数/感染数
ICR	0 / 5	0 / 5
C3H/HeN	3 / 11	0 / 11
C3H/HeJ	3 / 10	0 / 10
C57BL/6	0 / 5	0 / 5
CBA/N	4 / 10	0 / 10
CBA/J	—	11 / 11

経鼻的に約 10^7 CFU のペニシリン耐性肺炎球菌を感染させた後、14 日後の肺肉眼所見および生存率を観察した。

(JMM. 45: 319-322, 1996)

図 5 CBA/J マウスは PRSP (19 型) に特異的に感受性が高い



(AAC. 40:1520-25, 1996)

図 6 CBA/J マウス肺炎モデルにおける肺内細菌と生存率の関連

の形で関わっているものと考えられた。なお、病態悪化への $\text{TNF-}\alpha$ の関与も示唆されたが、詳細は明らかになっていない。

次に、PRSP 肺炎に対する効果的な抗菌薬療法について、CBA/J マウス肺炎モデルを用いて検討した。各種抗菌薬を 1 日 2 回、6 日間皮下投与して生存率を観察した。無投与群ではすべてが約 1 週間以内で死亡したが、バンコマイシン 40mg/kg あるいはイミペネム 40mg/kg を投与した場合には約 90% の優れた生存率が得られた。また、ペニシリン G 40mg/kg を投与した場合には約 10 日ですべてが死亡したが、4 倍量の 160 mg/kg を投与した場合には約 40% が生存した(図 8)。この成績は、「PRSP 肺炎に対してはペニシリンの増量によって効果を期待できる」とする臨床成績とよく合致するものであった。さらに、イミペネムにゲンタマイシン 10mg/

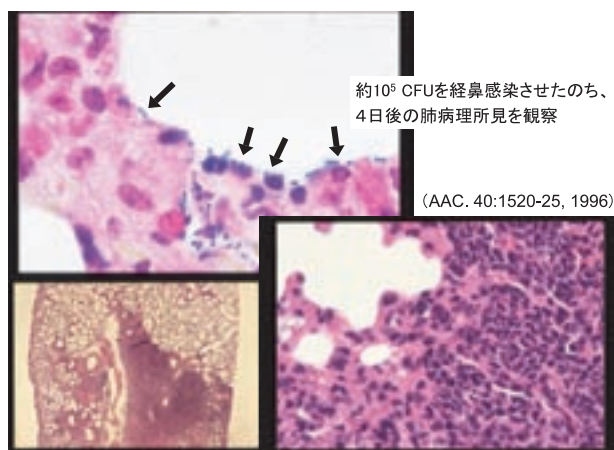
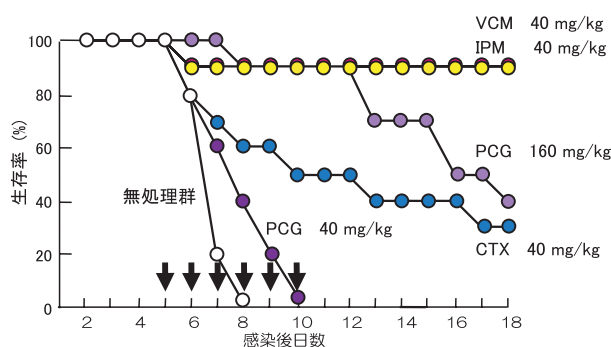


図 7 CBA/J マウスでみられる PRSP 肺炎



CBA/Jマウスにペニシリン耐性肺炎球菌を経鼻的に感染させた後、5日目から1日2回6日間、抗菌薬を皮下投与し生存率を観察した。

(AAC. 40:1520-25, 1996)

バンコマイシン(VCM) イミペネム(IPM) ペニシリンG(PCG) セフトキシム(CTX)

図 8 CBA/J マウス肺炎モデルを用いた抗菌薬有効性の評価

kg を併用することで、極めて優れた相乗的臨床効果が得られており、 β ラクタム剤とアミノ配糖体との併用による治療効果の可能性が示されたものであり、実際の臨床の場での応用が期待される (図 9)。

2) レジオネラ肺炎

レジオネラ肺炎の歴史は、1976 年、米国フィラデルフィアにおいて在郷軍人の全米大会が開催された際、221 人に原因不明の重症肺炎が発生し、このうち 34 人が死亡したことにさかのぼる。その後の調査で、剖検肺から新しい細菌が分離され、*Legionella pneumophila* と命名された。

わが国では、1981 年、レジオネラ肺炎の第 1 例が報告された後、本症に対する認識の高まりとともに分離頻度も増加してきた。1992 年 10 月～2002 年 9 月までの 11 年間に、肺炎の原因が特定できないとして当教室に送られてきた 1,146 症例の検査結果では、239 症例 (20.9%) がレジオネラ肺炎と診

断されており、潜在的患者はかなりの数にのぼるものと推察される (図 10)。本肺炎は、市中肺炎としてみられることが多いが、胸部 X 線写真所見に比し低酸素血症の程度が著明で ARDS を高率に合併し、レスピレーターの使用を余儀なくされる場合が多く、その際の高酸素療法が急性肺傷害を助長している可能性もある。そこで、マウスレジオネラ肺炎モデルを用いて、高酸素投与が生存率に及ぼす影響を検討した。A/J または B6 マウスに *L. pneumophila* を経気管的に接種した後、高酸素投与群 (90% O_2 , 3 日間) と「通常環境下群」に分けて生残率を比較した結果、「高酸素投与群」において著明な死亡率の増加が認められた。一方、肺炎桿菌を用いて同様の実験を行ってみたが、「高酸素投与群」と「通常環境下群」間の死亡率には差は認められなかった (図 11)。そこで、レジオネラ肺炎モデルマウスの肺重量および BALF 中アルブミン量について測定してみたところ、「感染+高酸素群」で有意に

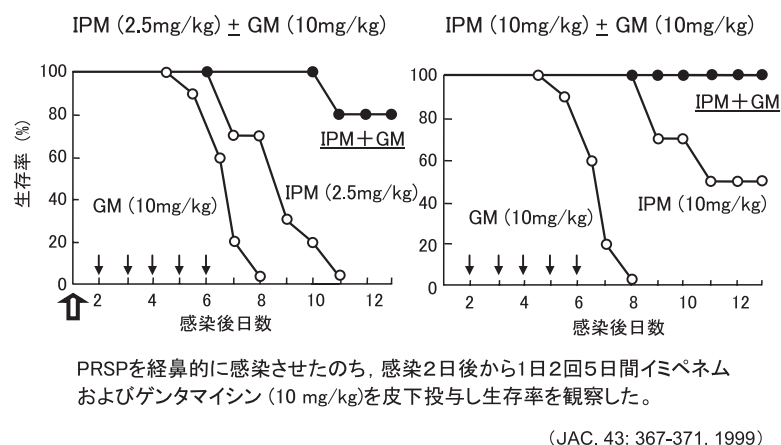


図 9 PRSP 肺炎に対する IPM+GM の併用効果

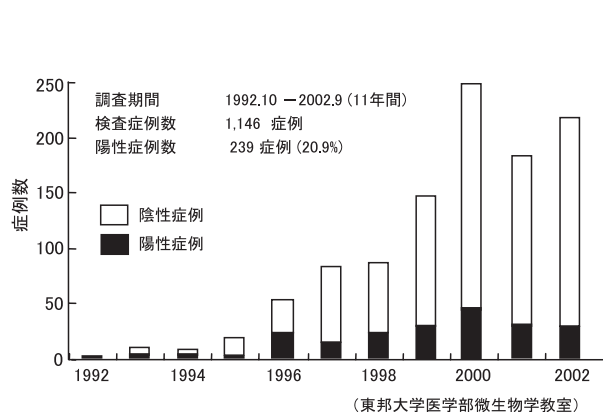


図 10 レジオネラ肺炎の疫学調査

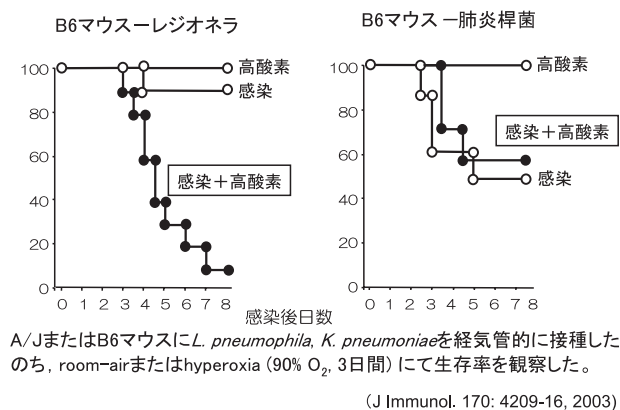
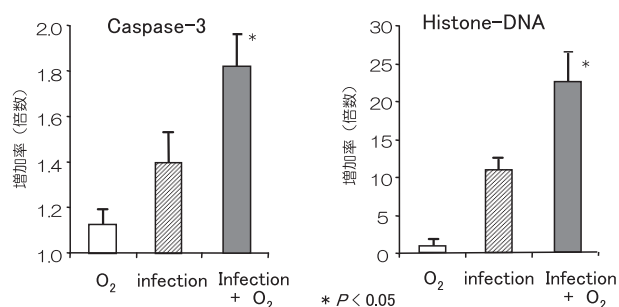


図 11 高酸素療法のレジオネラ肺炎生存率に及ぼす影響

増加しており、死因には血管透過性の亢進と炎症の関与が示唆された。しかし、肺内菌数に関しては「通常環境下」と「高酸素投与群」とでは差が認められず、肺内で増殖したレジオネラの菌数が死亡率に直接関連しているものではないと考えられた。急性肺傷害は、血管内皮傷害、肺胞上皮傷害、好中球集積・活性化、アポトーシスなどさまざまな要因が複雑に絡み合っ引き起こされると考えられる。そこで私たちは、急性肺傷害の原因としてアポトーシスの可能性を検討した。その結果、アポトーシス・マーカーとして知られている Caspase-3, と Histone-DNA が、いずれも「感染+高酸素群」で有意に高く、アポトーシスが誘導されていることが示唆され (図 12), これは病理学的所見によっても確認された。今後はアポトーシス亢進メカニズムのさらなる詳細な検討や Caspase 阻害剤, HGF, Super Oxide Dismutase などの予防的有用性, そしてこれ



B6マウスに*L. pneumophila*を経気管的に接種したのち、room-airまたはhyperoxia(90% O₂)状態で観察、感染2日後の肺homogenate中のhistone-DNAおよびcaspase-3を測定した。

(J Immunol. 170: 4209-16, 2003)

図 12 高酸素療法のアポトーシス・マーカーに及ぼす影響

らのヒトへの応用に関心を持っている。

3) 緑膿菌感染症治療への新たなアプローチ

緑膿菌は日和見感染症の原因菌として非常に重要で、最近では特に多剤耐性化による治療抵抗性が問題となっている。そこで、緑膿菌感染症治療への新たなアプローチの可能性について研究を進めた。

a) マクロライドと Quorum-sensing 機構

近年、呼吸器感染症領域ではマクロライド系薬の Biological Response Modifier としての新しい作用が明らかにされ、びまん性汎細気管支炎を中心とする慢性気道感染症などに対する少量長期投与の有効性が実証されつつある。一方、私たちは当初より緑膿菌に対するマクロライドの直接的抗菌作用、すなわち、バイオフィルムの破壊、菌体毒素・酵素の産生抑制など別の角度から検討を加えてきたが、その過程の中で緑膿菌の Quorum-sensing 機構に注目した。細菌は autoinducer (AI 蛋白) と呼ばれるホルモン様物質を産生し、それによって増殖環境における自らの菌数を感知し、その菌数に応じて病原因子の発現を巧妙に調節している。このシステムは Quorum-sensing 機構と呼ばれ、いわゆる菌同士の cell-to-cell signaling system とも呼ばれている。図 13 は、緑膿菌の Quorum-sensing 機構を模式的に表したものである。緑膿菌の情報伝達系として las 系と rhI 系がよく知られており、I 遺伝子が刺激を受けると AI 合成酵素が活性化され、AI 蛋白を産生し、菌体外へ放出する。一定濃度に達した AI 蛋白を認識した R 遺伝子は R 蛋白を産生して AI/R-蛋白複合体を形成する。そして、この AI/R-蛋白複合体が病原因子遺伝子群を活性化し、緑膿菌の菌体成

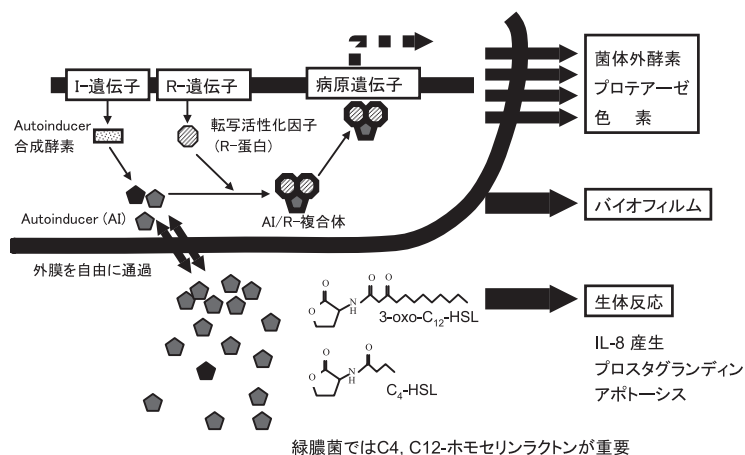


図 13 緑膿菌における Quorum-sensing 機構

分や菌体外物質の産生を促す。そこで、マクロライド系薬の緑膿菌 Quorum-sensing 機構に及ぼす影響を検討するために、アジスロマイシン含有液体培地で緑膿菌を培養したのち、AI 合成酵素の発現を β -galactosidase 活性により観察した。その結果、*las-I*、*rhl-I* のいずれも発現が抑えられ、AI 蛋白として知られる C12、C4 ホモセリンラクトンの産生量も減少していた (図 14)。以上の成績から、マクロライドは緑膿菌の病原因子として重要な Quorum-sensing 機構を直接抑制することが明らかとなり、臨床における治療効果の一因として大きくクローズアップされることになった。一方、ホモセリンラクトンはマクロファージや上皮細胞にも作用し、さまざまなケモカインを放出させ好中球の遊走を促進するとともに、好中球に対してはアポトーシスを誘導することも明らかにした。臨床的には、ホモセリンラクトンの産生を抑えるマクロライドやホモセリンラクトン誘導体の開発、およびホモセリンラクトンワクチンの開発などが注目される。

b) 緑膿菌感染症における NKT 細胞の役割

最近、特異免疫の成立に、糖脂質断片を抗原として呈示する CD1 分子の関与が明らかになった。CD1 分子は、抗腫瘍作用や感染症防御効果があることで知られる NKT 細胞と結合し免疫作用を発揮することが知られている。そこで、この CD1d を欠損したマウスの肺内に緑膿菌を接種し、その生残率を観察したところ野生株に比較し明らかに高い致死率を示した。肺内菌数を調べてみたところ、CD1d 欠損マウスでは野生型マウスに比較し約 100 倍ほど緑膿菌が多く観察され、これが高い致死率に

関連しているものと考えられた。この結果に基づき、気管支肺胞洗浄液中の好中球数とその走化因子である MIP-2 を測定してみたところ CD1d 欠損マウスでは野生型マウスに比べて有意に低いことが明らかになった。このことから、CD1d 欠損マウスでは、MIP-2 の産生低下に伴う好中球遊走の抑制により、緑膿菌の肺からのクリアランスが抑制されたものと考えられた。そこで、「NKT 細胞を活性化することにより緑膿菌感染を防げるのではないか？」との仮定の下、NKT 細胞を活性化する α ガラクトシルセラミド (α GalCer) を投与してみた。その結果、 α GalCer の投与により肺内菌数は著しく低下することが明らかとなり (図 15)、その理由として肺胞マクロファージ付着・貪食能の亢進などが考えられた。今後、 α GalCer などの NKT 細胞を活性化する物質の Biological Response Modifier (BRM) としての臨床応用に期待が寄せられる。

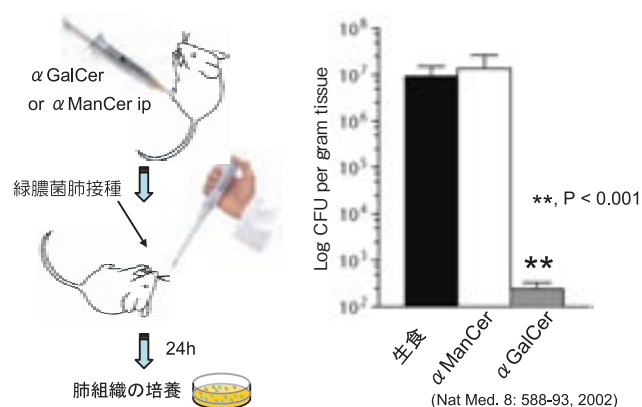


図 15 α ガラクトシルセラミド (α GalCer) による肺の緑膿菌クリアランスの増強

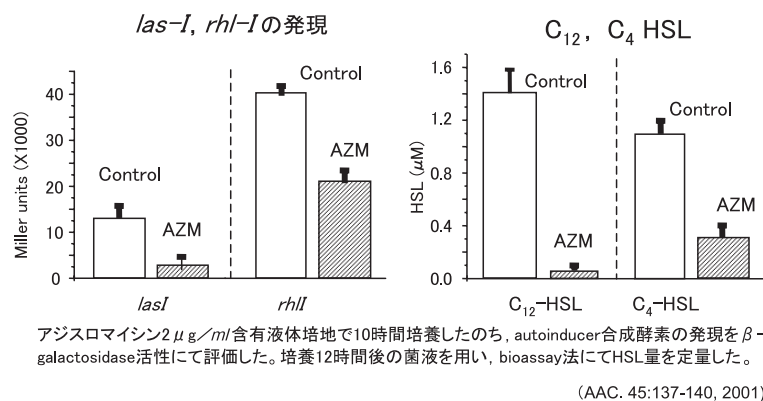


図 14 マクロライド剤の緑膿菌 Quorum-sensing 機構に及ぼす影響

Ⅲ. 新規抗菌薬の評価

新規抗菌薬の開発に際しては臨床試験に入る前に基礎的研究が不可欠となる。各種抗菌薬の試験管内抗菌力や小動物を用いた治療効果について検討を加え、これまでに20種類以上の新規抗菌薬の評価を行ってきたが、そのうち2/3は実用化され、現在臨床で使用されている。

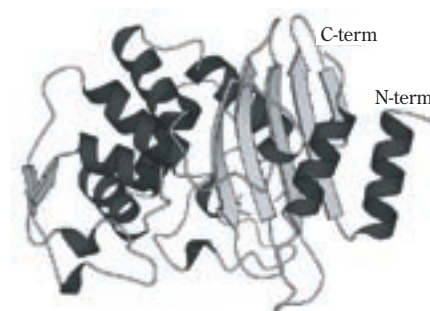
Ⅳ. 耐性菌に関する研究

1. 薬剤感受性（耐性菌）サーベイランス

抗菌薬耐性菌に関する市販後調査の責任者としていくつかの幅広い疫学調査を行い、耐性菌の出現状況を監視するとともに耐性メカニズムの解析にあたっている。一方、国の事業として行われている全国規模での耐性菌サーベイランス事業においても、検査部領域の担当者として深く関わっている。

2. 薬剤耐性菌機序の解明

院内感染症の原因菌としては、MRSA, PRSP, VRE, VRSAそしてextended spectrum beta-lactamase (ESBL) 産生菌などの耐性菌が大きな問題となっている。これらの中で、ESBL産生菌に関する研究には特に力を入れており、私達が遺伝子配列を明らかにしたTOHO-1は本邦で最初に報告されたESBLとして広く知られている（図16）。



Toho-1は他のクラスAに属するβラクタマーゼと同様、αヘリックスに富む部分とαヘリックスとβシートが混在する部分から構成されており、その間に活性中心が存在する。

(Biochemistry, 42:10634-10643, 2003)

図16 ESBL “TOHO-1” の三次元構造

おわりに

このたび、伝統と名誉ある小島三郎記念文化賞をいただくことになった。この賞はこれまで共に仕事を続けてきた教室や検査室の仲間を代表して私がいただいたものであり、この喜びを皆で分かち合いたい。また、この場を借りて本賞にご推薦をいただいた東京大学大学院医学系研究科の中原一彦教授に感謝申し上げるとともに、私たちのこれまでの仕事にご理解いただいた選考委員および関係各位の皆様方にも深くお礼申し上げる次第である。

今回の受賞は、同じ領域で頑張っている若い研究者に対しても大きな勇気と希望を与えるものであり、この受賞を機に、さらに臨床微生物学の発展に努力を続け、若手人材の育成に力を注ぎたいと考えている。