

緑膿菌性慢性下気道感染症の病態と治療に関する 臨床的・基礎的研究

奈良県立医科大学第2内科学教室

前田 光 一

STUDIES ON CHRONIC LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTION DUE TO *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

KOICHI MAEDA

The Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received February 20, 1997

Abstract: The present study was addressed to analyze the clinical features of chronic lower respiratory tract infections (CLRTI) due to *Pseudomonas aeruginosa* in relation to bacteriological findings as determined by transtracheal aspiration (TTA), and also to evaluate clinically and basically a long-term chemotherapy of erythromycin (EM) or clarithromycin (CAM) against CLRTI.

The following results were obtained;

1. The isolation rate of *P. aeruginosa* among the total isolates from CLRTI patients by TTA increased year by year. As predisposing factors to exacerbate in CLRTI caused by *P. aeruginosa* alone, the early colonization by *P. aeruginosa* in the airway or immunological status of patients was very important. Mucoid *P. aeruginosa* was more important as a persistent infection in CLRTI than nonmucoid *P. aeruginosa*.

2. A Long-term treatment of EM benefited patients with CLRTI due to *P. aeruginosa* from improvement of purulent sputum, dyspnea on effort, and decreased PaO₂. CAM was able to substitute for EM when EM was not effective for CLRTI due to *P. aeruginosa*.

3. EM inhibited biofilm formation in culture of human epithelial cells and *P. aeruginosa*. In patients with CLRTI, the administration of EM or CAM enhanced the IL-2 producing ability of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and also elevated serum IL-4 levels in the early phase of treatment. Thereafter, the IL-2 producing ability of PBMC gradually decreased and returned to the levels of healthy controls.

The above are new findings on the clinical features of incurable CLRTI due to *P. aeruginosa*, and beneficial aspects of treatment with macrolides.

Index Terms

Pseudomonas aeruginosa, chronic lower respiratory tract infection, transtracheal aspiration, erythromycin, clarithromycin

結 言

緑膿菌は自然界に広く分布する偏性好気性ブドウ糖非

発酵性グラム陰性桿菌で、ヒトでは主に宿主感染防御機能が減弱した患者での難治性呼吸器感染症の起炎菌として重要視されている¹⁾。従来から本菌の呼吸器への感染

部位は肺実質と気道系との二つに大別されている。すなわち肺実質感染は急性感染症である肺炎として発症するが、気道系感染はびまん性汎細気管支炎や気管支拡張症などの慢性下気道感染症として発症する。特に後者の緑膿菌性慢性下気道感染症は長期的な持続感染となり非常に難治性で予後不良であるが、実際にその病態を詳細に検討した報告はなく、また病態の正確な把握に基づいた満足すべき治療法も確立されていない。

一般に呼吸器感染症の診断で喀痰は上気道・口腔での汚染を避け得ず、下気道に存在する起炎菌の正確な決定が困難な場合が多い²⁾。特に緑膿菌は上気道・口腔に定着・常在化しやすく喀痰からの本菌の分離は汚染菌の可能性を否定できないため、本菌の下気道感染症の病態解析には不適當である。そこで本研究では上気道常在細菌の汚染を防ぎ下気道の細菌を直接検出できる経気管吸引法 (transtracheal aspiration, TTA) を用い、本法で緑膿菌を分離した慢性下気道感染症の実態の解析を行うと共に、緑膿菌性慢性下気道感染症の治療としてマクロライド系抗菌薬 erythromycin (EM), clarithromycin (CAM) の長期投与療法の有用性と作用機序とを検討し、新しい知見を得たので報告する。

対象および方法

I) 緑膿菌性慢性下気道感染症の病態

1) 慢性下気道感染症における緑膿菌検出比率の検討

A) 対象

対象は通年性に膿性喀痰を有する慢性下気道感染症例で1978年12月から1993年3月までに当科でTTAを施行し細菌を検出した361回である。

B) 方法

当科で慢性下気道感染症にEM投与を開始する以前の1978年12月～83年3月と、それ以降を5年毎に分けた83年4月～88年3月、88年4月～93年3月との3期間でTTA全検出菌に対する各菌種の検出比率を求め、緑膿菌検出比率の推移を検討した。TTAは、前頸部をポビドンヨード溶液で消毒し甲状輪状靱帯部を1%リドカインで局所麻酔後、16ゲージベニューラ静脈留置針で穿刺し外針を気管内に送り、内針を抜去後50mlの注射器を接続し気道内分泌物を吸引、採取した。検体採取後直ちに嫌気ポータに移し、グラム染色による鏡検と好気・嫌気培養とを行った。培地はBTB培地、馬溶血PEA培地、羊血液寒天培地、チョコレート寒天培地、BHK寒天培地、gentamicin含有サブロー培地、PPLO培地を用いた。

2) 緑膿菌性慢性下気道感染症の急性増悪に関する要

因の検討

本症は経過中に急性増悪、すなわち急激に病態が悪化する時期があるが、この急性増悪の要因を検討した。

A) 対象

対象は通年性に膿性喀痰を有し、TTAで緑膿菌を検出した慢性下気道感染症例40例69回、男性21例、女性19例、平均年齢61.8歳、びまん性汎細気管支炎(diffuse panbronchiolitis, DPB)16例24回、気管支拡張症(bronchiectasis, BE)14例20回、慢性気管支炎(chronic bronchitis, CB)10例25回である。

B) 方法

重症度とは関係なく、個々の症例で喀痰量が急激に増加し臨床所見として発熱や呼吸困難・炎症所見の悪化を伴う時期を急性増悪期、持続性膿性喀痰はあるが量は比較的一定で臨床所見の変動の少ない時期を非急性増悪期と定義し、この二つの病期でのTTA検出菌状況を比較し急性増悪に関与した要因を検討した。

3) ムコイド型緑膿菌検出例の病態の検討

緑膿菌のコロニー形態にはムコイド型と非ムコイド型との二形態が存在するが、難治化に大きく関与するとされるムコイド型緑膿菌検出例と病態との関連を検討した。

A) 対象

対象はTTA採取検体培養でムコイド型緑膿菌を検出した呼吸器感染症患者20例33回、男性10例、女性10例、平均年齢58.0歳である。

B) 方法

ムコイド型緑膿菌を検出した呼吸器疾患の内訳、同時検出菌、慢性下気道感染症非急性増悪期例での臨床検査値を、TTAで非ムコイド型緑膿菌を検出した呼吸器感染症患者33例(男性20例、女性13例、平均年齢62.3歳)46回と比較した。緑膿菌性慢性下気道感染症での疾患別のムコイド型緑膿菌の検出比率も検討した。

II) 緑膿菌性慢性下気道感染症に対するマクロライド薬長期投与療法の有用性

当教室は慢性下気道感染症に対するマクロライド薬長期投与の効果の検討を行ってきたが、著者は特に予後不良とされる緑膿菌性慢性下気道感染症に対するマクロライド薬長期投与の有用性の検討をquality of life (QOL)の観点も含めて検討した。

1) EM長期投与療法の臨床的効果の検討

A) 対象

対象は通年性に多量の膿性喀痰と労作時呼吸困難(dyspnea on effort, DOE)とを訴え、動脈酸素分圧(PaO₂)の低下を認めた緑膿菌性慢性下気道感染症9例で、男性2例、女性7例、平均年齢72.8歳、DPB5例、

BE 4例である。

B) 方法

EM 600 mg/日または1200 mg/日を経口投与した。投与期間は8カ月から6年8カ月であった。臨床経過の観察は喀痰量、PaO₂、TTA 検出菌で行い、臨床効果の判定は当教室で作成、使用している response score (RS) を用いた。喀痰量、DOE、PaO₂ をそれぞれ著明改善・改善・やや改善・変化なしの4段階に区分して3, 2, 1, 0 点に点数化したものの総和をRSとし、総合効果はRS 9点を著効、8~4点を有効、3~1点をやや有効、0点を無効とした。QOLの評価にはEM治療前と比較して患者の満足度と生活範囲の変化とをそれぞれ4段階に区分して3, 2, 1, 0 点に点数化したものの総和をQOL scoreとし、QOL score が6点を著明改善、5・4点を改善、3・2点をやや改善、1・0点を不変としてQOLの改善度を判定した。

2) EM非有効例に対するCAM長期投与療法の臨床的効果の検討

EM治療が有効でない症例も一部に存在するが、これらの症例に新たな治療法としてEMと同じ14員環マクロライド薬のCAMの長期投与を試みた。

A) 対象

対象はEM投与中にもかかわらず低酸素血症と膿性喀痰とが認められ、RSによる判定でEM長期投与療法が無効あるいは臨床効果の少ない緑膿菌性慢性下気道感染症8例で、男性1例、女性7例、平均年齢57.8歳、疾患はDPB 4例、BE 3例、CB 1例、EM投与量は200~1200 mg/日で投与期間は2~9年である。

B) 方法

EMを中止しCAMを200 mg/日または400 mg/日経口投与し、その有用性を喀痰量、PaO₂、QOLで判定し、安全性も検討した。

III) 緑膿菌性慢性下気道感染症に対するマクロライド薬長期投与療法の作用機序

マクロライド薬の抗菌力以外の作用を細菌側と宿主側との両面から検討した。

1) EMの緑膿菌バイオフィーム形成抑制能の検討

A) 材料

使用細菌は臨床分離株 *Pseudomonas aeruginosa* N-42 から Hooke らの方法³⁾ に準じて誘導した温度感受性変異株 Ts 25 を用いた。すなわち緑膿菌に *N*-nitrosoguanidine を作用させ温度感受性変異株を誘導し、ceftazidime と imipenem/cilastatin とを用いて 37℃ 増殖菌を殺菌した後、replica 法により 25℃ でのみコロニーを形成し得る変異株を選択し、さらにこの中で 37

℃ では発育能を欠くが elastase, exoenzyme A などの菌体外酵素を産生し得る変異株 (Ts 25) を選択して実験に用いた。Ts 25 のこれら外毒素産生量は親株の約 45% であった。

培養細胞はヒト子宮内腺癌由来の細胞株で、気道粘膜に性状が類似したムチン様 glycoprotein を産生する Ishikawa 細胞⁴⁾ を用いた。

B) 方法

Ishikawa 細胞を 24 穴平底プレートに 10⁴/ml の濃度で 5% fetal bovine serum を含む 1 ml の minimal essential medium (MEM) と共に入れ、confluent monolayer が形成されるまで 37℃、5% CO₂ 下で培養した。その後 monolayer を 50 μg/ml の mitomycin C (MMC) で 37℃ で 30 分間処理し十分に洗浄後、MEM で 24 時間培養し実験に用いた。この MMC 処理 Ishikawa 細胞を 10% ヒト新鮮血漿と 10⁷ colony forming units (CFU) 量の Ts 25 株を含む MEM とで 37℃、5% CO₂ 下で 24 時間培養後、Hank's balanced salt solution で洗浄し非附着菌体を除去した。EM (0~5 μg/ml) および 10% ヒト血漿含有 MEM でさらに培養し、位相差顕微鏡で microcolony の形成状態を観察した。microcolony 数の算定は弱拡大による位相差顕微鏡下と写真撮影とによる測定を行い、二法の平均値を求めた。バイオフィーム内の生菌数の算定は、microcolony 形成後、monolayer を 0.05% Triton X 溶液で溶解し、音波処理を施し、種々の希釈濃度で tryptic soy agar に plate して 25℃ で 48 時間培養後 CFU 数を計測した。また培養上清中 glycoprotein, elastase, exoenzyme A の定量をロケット免疫電気泳動法⁵⁾ により行った。glycoprotein の分離は培養上清に 5 M NaCl を 50:1 の割合に加え、20000 G で 1 時間遠心後、遠心上清に 95% エタノールを加え、ゲラチン様の沈澱物を 5000 G、40 分間の遠心で回収し、95% エタノールで十分に洗浄したものを標品とした。緑膿菌 elastase は Nagase Biochemical 社、exoenzyme A は List Biochemical 社の標品を使用した。glycoprotein あるいは elastase に対する抗体は、Freund complete adjuvant (Difco 社) を用いて過免疫にした家兎の血清より硫酸沈澱法で得た免疫グロブリン分画から DEAE イオン交換クロマトグラフィーで分離した IgG 抗体を用いた。exoenzyme A に対する抗体は List Biochemical 社の抗 exoenzyme A 抗体を用いた。これらの精製標品とそれぞれの抗体とを用いてロケット免疫電気泳動法における標準曲線を作成し検体中の各蛋白を定量した。

2) 慢性下気道感染症のマクロライド薬投与によるサイ

トカインへの影響の検討

i) 末梢血単核球分画のIL-2産生能への影響の検討

A) 対象

慢性下気道感染症15例で、男性6例、女性9例、平均年齢50.9歳、DPB4例、BE7例、CB4例、投与薬剤はEMが5例、CAMが10例(うち6例はEM長期投与例からの変更例)、投与量はEMが600mg/日、CAMが400mg/日である。なおEMまたはCAM投与28日後の臨床効果はRS4点以上の有効例が13例、1~3点のやや有効例が2例である。

B) 方法

ヘパリン加末梢静脈血からConray-Ficoll比重遠心法で単核球分画を分離し、1×10⁶個/mlとなるようにRPMI 1640で調整した細胞浮遊液200μlにconcanavalin A(Sigma社)20μlを添加し37℃、5%CO₂下で24時間培養した。この培養上清中のIL-2を、Amersham Japan社の標品の標準IL-2、抗IL-2抗体、¹²⁵I標識IL-2を用い、サンドイッチ法によるradioimmunoassay法でIL-2産生能を測定した。

ii) 血清IL-4の変動の検討

A) 対象

慢性下気道感染症17例で、男性8例、女性9例、平均年齢55.9歳、DPB4例、BE8例、CB5例、投与薬剤はEMが6例、CAMが11例(うち6例はEM長期投与例からの変更例)、投与量はEMが600mg/日、CAMが400mg/日である。

B) 方法

遠心分離して得た血清中のIL-4濃度をヒトIL-4測定用enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)キット(Intertest-4[®], Genzyme社)でサンドイッチ法によるELISA法で測定した。この方法のIL-4の測定限界は45pg/mlで、抗菌薬投与前後の変動はこの値以上であった7症例、男性3例、女性4例、平均年齢61.6歳、DPB4例、CB2例、BE1例、投与薬剤はEMが4例、CAMが3例(うち1例はEM長期投与例からの変更例)で検討した。7症例のEMまたはCAM投与28日後の臨床効果は全例RS4点以上の有効例であった。

iii) EM長期投与例のEM投与期間とIL-2産生能との

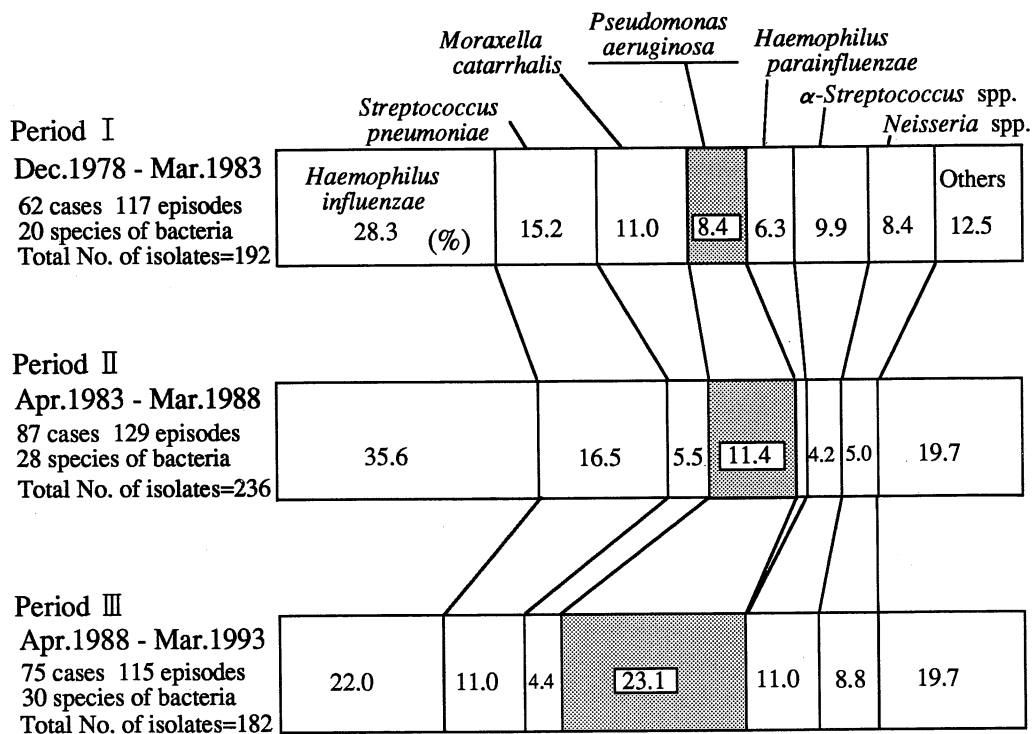


Fig. 1. Annual percentage of bacteria isolated from TTA specimens of patients with chronic lower respiratory tract infections (CLRTI) from December 1978 to March 1993.

関係の検討

A) 対象

EM 600 mg/日長期投与中の症状が安定した慢性下気道感染症 25 例で、男性 14 例、女性 11 例、平均 61.8 歳、DPB 11 例、BE 7 例、CB 7 例、EM 投与年数は 1 年 6 カ月～8 年 6 カ月(平均 5 年 4 カ月)である。

B) 方法

EM 投与期間と末梢血単核球分画の IL-2 産生能との相関を検討した。

IV) 統計学的処理

本研究での統計学的検討は paired または non-paired Student-t 検定を用い、危険率 5 % 未満で有意と判定した。

成 績

I) 緑膿菌性慢性下気道感染症の病態

1) 慢性下気道感染症における緑膿菌検出比率(Fig. 1)

1978 年 12 月～83 年 3 月, 83 年 4 月～88 年 3 月, 88 年 4 月～93 年 3 月の各 5 年間でそれぞれ第 1 期, 第 2 期, 第 3 期とすると, 各期間での全菌種の延べ検出総回数に対する緑膿菌検出回数の比率は第 1 期は 8.4 %, 第 2 期は 11.4 %, 第 3 期は 23.1 % と増加を示した。一方, インフルエンザ桿菌と肺炎球菌の検出比率は相対的に減少傾向がみられた。

2) 緑膿菌性慢性下気道感染症の急性増悪に関する要因

検討症例全体の検出菌は緑膿菌単独検出が 27 例 42 回(60.9%), 緑膿菌と同時に他菌を検出した複数菌検出は 18 例 27 回(39.1%)であった。急性増悪期の 19 例 29 回では緑膿菌単独検出が 12 例 15 回(51.7%), 複数菌検出が 9 例 14 回(48.3%)であったが, 非急性増悪期の 28 例 40 回では単独菌検出が 20 例 27 回(67.5%), 複数菌検出

Table 1. Comparison of the incidence and prevalence of *P. aeruginosa* between the monomicrobial infection and the polymicrobial infection

	At an acute exacerbation phase	At a non-exacerbation phase	Total
Monomicrobial infection of <i>P. aeruginosa</i>	12 cases 15 episodes (51.7%)	20 cases 27 episodes (67.5%)	27 cases 42 episodes (60.9%)
Polymicrobial infection containing <i>P. aeruginosa</i>	9 cases 14 episodes (48.3%)	12 cases 13 episodes (32.5%)	18 cases 27 episodes (39.1%)
Total	19 cases, 29 episodes	28 cases, 40 episodes	40 cases, 69 episodes

Table 2. Microorganisms isolated together with *P. aeruginosa* as causative agents for polymicrobial infections

Combination of organisms	Acute exacerbation phase	Non-exacerbation phase	Total
<i>P. aeruginosa</i> + <i>H. influenzae</i>	4 episodes	1 episode	5 episodes
<i>S. pneumoniae</i>	3	1	4
<i>N. pharyngis</i>	2	1	3
α - <i>Streptococcus</i> spp.	1	1	2
<i>K. pneumoniae</i>	1	1	2
<i>Micrococcus</i> spp.	1	1	2
<i>Bacteroides</i> spp.	1	1	2
<i>M. catarrhalis</i>	0	2	2
<i>S. aureus</i>	0	2	2
<i>Serratia</i> spp.	1	0	1
<i>Eikenella</i> spp.	1	0	1
<i>A. xyloxydans</i>	1	0	1
<i>S. pyogenes</i>	0	1	1
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	0	1	1
<i>Citrobacter</i> spp.	0	1	1
<i>Aspergillus</i> spp.	0	1	1
<i>Candida</i> spp.	0	1	1

が12例13回(32.5%)と、急性増悪期に複数菌検出が多い傾向がみられた(Table 1). 複数菌検出例での緑膿菌との同時検出菌は、急性増悪期ではインフルエンザ桿菌と肺炎球菌とが他菌より多く、非急性増悪期では菌種数が多いこと以外は明らかな傾向を認めなかった(Table 2). 一方、急性増悪期に緑膿菌を単独検出した12例15回で急性増悪に関与したと考えられる要因を検討すると、ウイルス感染による上気道炎に引き続いて急性増悪した症例が3例3回、他菌から抗菌薬使用後に緑膿菌に菌交代してから比較的早期の症例が4例4回にみられ、これら以外の急性増悪期緑膿菌単独検出例の5例8回は全例、副腎皮質ステロイド薬投与中や膠原病・悪性腫瘍などの基礎疾患をもつ症例であった(Table 3). 菌交代後早期の急性増悪例の4例は以前に緑膿菌の感染歴がなく、インフルエンザ桿菌から抗菌薬使用後に緑膿菌に菌交代した後約1カ月以内に急性増悪をきたしていた(Table 4).

上述した緑膿菌を検出した慢性下気道感染症の急性増

悪は4型に整理され、それぞれの典型例の臨床経過を示すと、Case 1は緑膿菌持続感染中に急性増悪をきたしTTAで緑膿菌とインフルエンザ桿菌とを検出した(Fig. 2 a). Case 2は緑膿菌持続感染中に上気道炎罹患後急性増悪をきたし、インフルエンザAウイルス抗体価の有意な上昇を認めた(Fig. 2 b). Case 3はインフルエンザ桿菌による気道感染に抗菌薬を投与し臨床症状の改善をみたが、その後直ちに急性増悪をきたしTTAで緑膿菌への菌交代を確認した(Fig. 2 c). Case 4は膠原病を基礎疾患にもち副腎皮質ステロイド薬の長期投与症例で、経過中に急性増悪をきたしTTAで緑膿菌を単独に検出した(Fig. 2 d).

3) ムコイド型緑膿菌検出例の病態

TTAでムコイド型緑膿菌を検出した呼吸器感染症は、33回中32回(97.0%)が慢性下気道感染症もしくは同症の急性増悪に伴う肺炎であり、慢性下気道感染症のない例は肺炎例1回(3.0%)のみであった。一方、非ムコイド

Table 3. Predisposing clinical factors to acute exacerbation due to monomicrobial infection of *P. aeruginosa*

Predisposing factor	No.	Host condition*		
		Steroid administration	Underlying disease	
			Malignancy	Collagen disease
After acute viral upper respiratory tract infections	3 cases (3 episodes)	7 cases (7 episodes)	—	1 case (1 episode)
During the early phase following the replacement by <i>P. aeruginosa</i>	4 cases (4 episodes)			
Unknown	5 cases (8 episodes)	4 cases (5 episodes)	2 cases (3 episodes)	2 cases (2 episodes)
Total	12 cases (15 episodes)			

*There are some overlap cases and episodes.

Table 4. Acute exacerbation cases at the early phase following the replacement by *P. aeruginosa*

Disease	Age & Sex	Bacteria isolated from TTA before therapy	Antibiotics (duration)	Interval between cessation therapy and exacerbation	Bacteria isolated from TTA at exacerbation
Bronchiectasis	59 F	<i>H. influenzae</i>	SBT/ABPC (14 days) AMPC (14 days)	2 days	<i>P. aeruginosa</i>
Diffuse panbronchiolitis	54 F	<i>H. influenzae</i>	SBT/ABPC (15 days)	10 days	<i>P. aeruginosa</i>
Chronic bronchitis	51 F	<i>H. influenzae</i>	CZOP (13 days)	34 days	<i>P. aeruginosa</i>
Diffuse panbronchiolitis	65 F	<i>H. influenzae</i>	LCBF (11 days) CZX (24 days)	22 days	<i>P. aeruginosa</i>

型緑膿菌は46回中、慢性下気道感染症と同症の急性増悪に伴う肺炎とを合わせて37回(80.4%)に検出され、慢性下気道感染症のない例では肺炎、膿胸および肺嚢胞内感染の9回(19.6%)に検出された(Table 5)。ムコイド型緑膿菌検出例は非ムコイド型緑膿菌検出例に比べ単独菌検出の頻度が高い傾向があり、また前者の複数菌検出は後者のそれに比べ慢性下気道感染症の急性増悪期である比率が高い傾向を認めた(Table 6)。ムコイド型緑膿菌との同時検出菌はインフルエンザ桿菌が最も多く、非ムコイド型緑膿菌と比較して菌種数が少ない傾向を認めた(Table 7)。非急性増悪期にTTAで緑膿菌を検出した慢性下気道感染症のTTA施行時の検査値をムコイド型・非ムコイド型検出例間で比較すると、炎症所見、呼吸機能、栄養状態では両群に明らかな差はなかった(Table 8)。慢性下気道感染症全体では緑膿菌検出例の47.5%がムコイド型で、疾患別では緑膿菌を検出したDPBの56.3%がムコイド型であったが、BEとCBとでもそれぞれ42.9%、40.0%にムコイド型を認めた(Fig. 3)。

II) 緑膿菌性慢性下気道感染症に対するマクロライド薬

長期投与療法の有用性

1) EM長期投与療法の臨床的効果

EM長期投与例9例でEM投与前に比べ投与後でPaO₂、喀痰量は有意に改善した(P<0.002, P<0.001)(Fig. 4)。RSを用いた臨床効果判定では有効8例、やや有効1例で、有効以上の有効率は89%であった。細菌学的効果は消失1例、存続8例で消失率は11%であった。QOL scoreによるQOLの評価では著明改善4例、改善3例、やや改善2例で改善以上の改善率は78%であった(Table 9)。EM長期投与による副作用、臨床検査値の異常変動は認めなかった。

2) EM非有効例に対するCAM長期投与療法の臨床的効果

EM投与時とCAMに変更後のPaO₂は、前者が64.1±7.5 torrに対し後者が75.3±13.4 torrと有意に改善していた(P<0.05)(Fig. 5)。喀痰量は前者に比較して後者では6例で減少を認めた。喀痰の性状で変化を認めたのは6例で、その内容は喀痰がきれやすくなったのが2例、膿性が改善したのが4例であった(Table 10)。EMからCAMへの変更前と変更後とのそれぞれ6カ月

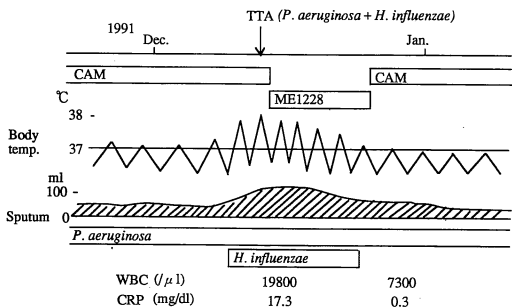


Fig. 2a. Case 1 30y. o. Female Bronchiectasis.

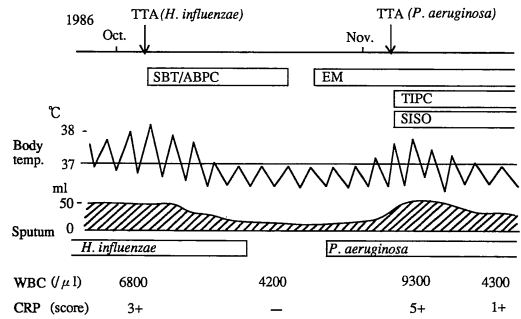


Fig. 2c. Case 3 54y. o. Female Diffuse panbronchiolitis.

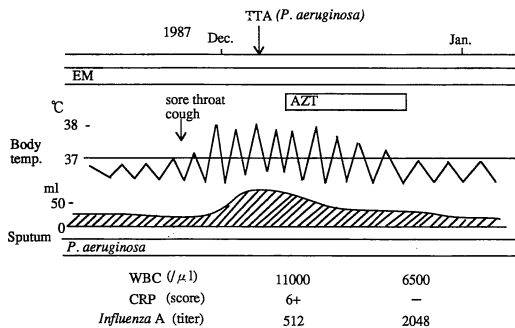


Fig. 2b. Case 2 40y. o. Male Diffuse panbronchiolitis.

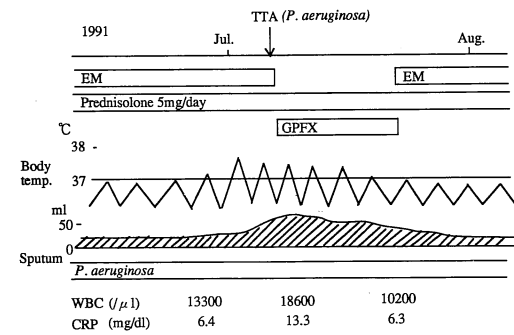


Fig. 2d. Case 4 42y. o. Female Chronic bronchitis, SLE.

間の抗菌薬使用回数は、EM 投与中は病状が不安定なため7例に各種抗菌薬を投与したが、CAM 変更後は他の抗菌薬を使用したのは2例に減少し、投与回数も減少した(Table 11)。QOL の面では、CAM に変更後の日常生活の変化は入院患者では1例が退院可能となり、外来患者では外出機会の増加や生活範囲の拡大が5例に認められた。しかし2例では変化なく、うち入院中の1例は退院できなかった(Table 12)。以上からEM 長期投与療法が非有効の緑膿菌性慢性下気道感染症に対してCAM 長

期投与療法はPaO₂、喀痰量、QOL などの面から8例中6例が有効と判定した。CAM 長期投与による副作用や臨床検査値異常は認めなかった。

III) 緑膿菌性慢性下気道感染症に対するマクロライド薬の作用機序

1) EM の緑膿菌バイオフィーム形成抑制能

Ishikawa 細胞培養系で緑膿菌 Ts25 変異株は、培養開始10日目で位相差顕微鏡下で十分に観察し得る microcolony(バイオフィーム)を通常約40個/well程度形

Table 5. Incidence of *P. aeruginosa* isolation in the respiratory infection upon TTA examination

	No. of episodes (%)		
	Mucoid	Nonmucoid	Total
CLRTI (+)	32 (97.0)	37 (80.4)	69 (87.3)
pneumonia (+)	5	6	11
pneumonia (-)	27	31	58
CLRTI (-)	1 (3.0)	9 (19.6)	10 (12.7)
pneumonia	1	6	7
others*	0	3	3
Total	33	46	79

CLRTI: chronic lower respiratory tract infection.

*pyothorax, intrabullal infection.

Table 6. Mono- and polymicrobial respiratory infections due to *P. aeruginosa*

	No. of episodes (%)	
	Mucoid	Nonmucoid
Monomicrobial infections	23 (69.7%) [6]	27 (58.7%) [16]
Polymicrobial infections	10 (30.3%) [7]	19 (41.3%) [9]

[]=No. of episodes with acute exacerbation phase of CLRTI.

Table 7. Microorganisms isolated together with *P. aeruginosa*

Microorganisms	No. of episodes		
	Mucoid 9 species of bacteria	Nonmucoid 15 species of bacteria	Total 18 species of bacteria
<i>H. influenzae</i>	4 (3)	1 (1)	5 (4)
<i>S. pneumoniae</i>	1 (1)	3 (2)	4 (3)
<i>Neisseria</i> spp.	1 (1)	2 (1)	3 (2)
<i>α-Streptococcus</i> spp.	1 (1)	2 (0)	3 (1)
<i>K. pneumoniae</i>		2 (1)	2 (1)
<i>Micrococcus</i> spp.	1 (1)	1 (0)	2 (1)
<i>M. catarrhalis</i>		2 (0)	2 (0)
<i>S. aureus</i> (MSSA)	1 (0)		1 (0)
(MRSA)		1 (0)	1 (0)
<i>B. melaninogenicus</i>	1 (1)		1 (1)
<i>Serratia</i> spp.		1 (1)	1 (1)
<i>Eikenella</i> spp.	1 (1)		1 (1)
<i>A. xylosoxydans</i>		1 (1)	1 (1)
<i>S. pyogenes</i>		1 (0)	1 (0)
<i>S. agalactiae</i>		1 (0)	1 (0)
<i>Citrococcus</i> spp.		1 (0)	1 (0)
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>		1 (0)	1 (0)
<i>Candida</i> spp.	1 (0)		1 (0)
<i>Aspergillus</i> spp.		1 (0)	1 (0)

(): No. of episodes at acute exacerbated phase of CLRTI.

成した(Plate 1 a~c). この系でEMは0.2 μg/mlの濃度からバイオフィーム形成を抑制し, 5 μg/mlで完全に抑制した(Table 13). バイオフィーム数の減少に伴いwell中の培養細胞付着緑膿菌数の減少が確認された(Fig. 6). 培養上清中のIshikawa細胞から産生されるglycoprotein量は1 μg/ml以上のEM濃度で有意に抑制され(Fig. 7), 緑膿菌の菌体外酵素であるelastase, exoenzyme Aは2 μg/ml以上のEM濃度で有意に抑

制された(Fig. 8, 9). EMのバイオフィーム形成抑制効果, Ishikawa細胞からのglycoprotein産生抑制効果, および緑膿菌の菌体外酵素産生抑制効果はいずれも5 μg/mlまで濃度依存的に認められた.

2) 慢性下気道感染症におけるマクロライド薬投与のサイトカインへの影響

i) 末梢血単核球分画のIL-2産生能への影響

検討症例15例中, マクロライド薬未投与の慢性下気道

Table 8. Laboratory data of the patients with CLRTI (non-exacerbation phase) due to *P. aeruginosa*

Laboratory findings	Type of <i>P. aeruginosa</i>	
	Mucoid	Nonmucoid
WBC (/μl)	7712.5±1653.3 (19)	7468.4±2224.5 (21)
CRP (score)	1.5±1.2 (19)	1.6±1.3 (21)
P _a O ₂ (torr)	74.9±12.9 (13)	72.1±10.2 (13)
%VC (%)	62.7±12.6 (11)	64.7±18.7 (11)
FEV _{1.0} (%)	66.2±14.2 (11)	66.2±7.7 (11)
Total protein (g/dl)	6.88±0.71 (15)	7.06±1.34 (18)
Albumin (g/dl)	3.82±0.53 (15)	3.77±0.42 (18)
ChE (IU/l)	452.4±115.4 (15)	418.3±132.8 (18)

Data are expressed as the mean±S.D.
Numbers in parenthesis are no. of episodes.

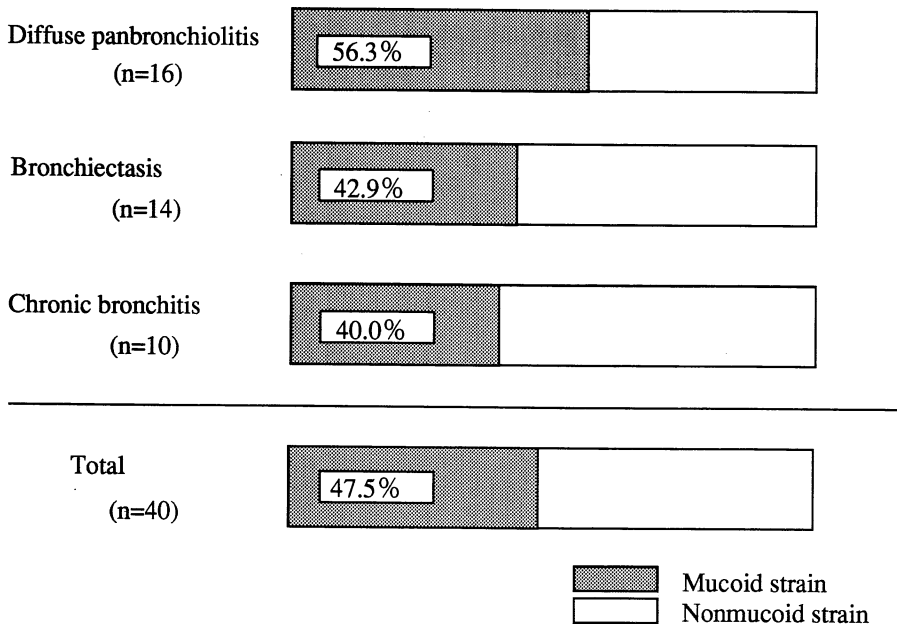
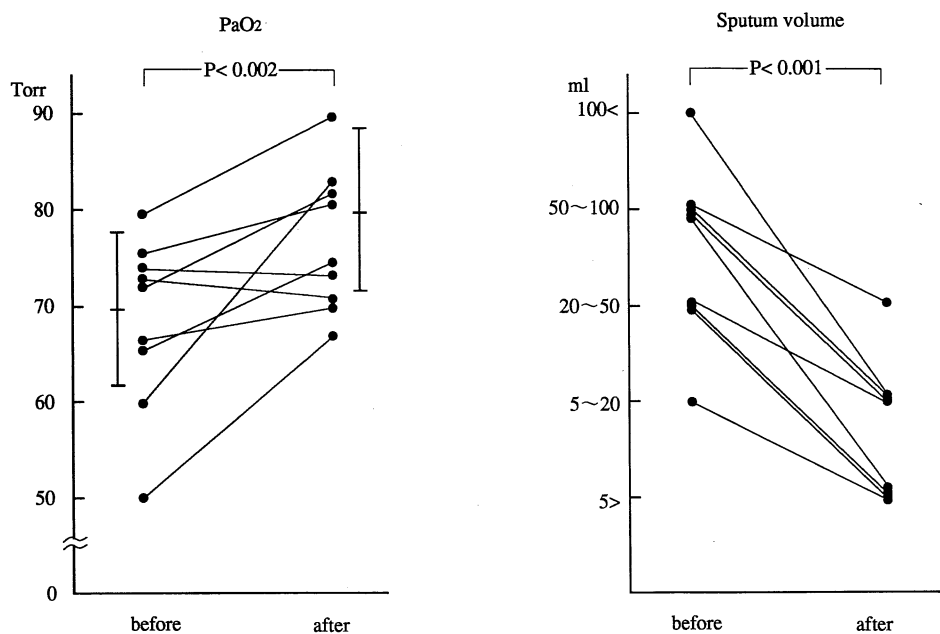


Fig. 3. Comparison of the recovery rate of mucoid *P. aeruginosa* from CLRTI patients colonized with *P. aeruginosa*.

Fig. 4. Changes in PaO₂ and sputum volume after EM therapy.Table 9. Clinical effects of long term administration of EM against CLRTI due to *P. aeruginosa*

Case no.	Diagnosis	Age	Sex	EM administration		Clinical effect					Bacteriological effect	QOL	
				dose (mg/day)	duration (months)	sputum volume	DOE	PaO ₂	RS	efficacy		score	QOL
1	DPB	73	F	600	72	2	1	2	5	good	persisted	5	improved
2	DPB	87	F	600	40	2	2	2	6	good	persisted	5	improved
3	DPB	58	F	1200	38	3	1	0	4	good	persisted	6	markedly improved
4	DPB	74	M	600	27	3	2	2	7	good	eradicated	6	markedly improved
5	DPB	87	M	600	16	3	2	2	7	good	persisted	6	markedly improved
6	BE	78	F	1200	71	1	1	2	4	good	persisted	2	slightly improved
7	BE	63	F	600	41	2	3	3	8	good	persisted	6	markedly improved
8	BE	62	F	600	18	1	0	0	1	fair	persisted	3	slightly improved
9	BE	73	F	600	8	2	2	2	6	good	persisted	4	improved

DPB: diffuse panbronchiolitis BE: bronchiectasis DOE: dyspnea on effort
RS: response score QOL: quality of life

Table 10. Changes in the volume and quality of sputum after replacing EM to CAM

Case no.	Age/Sex	Disease	Underlying disease or complications	Causative organism	sputum volume (ml/day)	Administration of EM		Administration of CAM		Sputum volume (ml/day)		Quality of sputum
						dose (mg/day)	duration (months)	dose (mg/day)	duration (months)	EM	CAM	
1	73/F	DPB	chronic sinusitis	<i>P. aeruginosa</i>	120	1200	81	400	23	120	70	softened (P)
2	66/F	DPB	chronic sinusitis	<i>P. aeruginosa</i>	20	600	102	400	18	20	10>	PM→M
3	76/F	DPB	chronic sinusitis	<i>P. aeruginosa</i>	50	600	108	400	14	50	20	P→PM
4	67/M	DPB	chronic sinusitis	<i>P. aeruginosa</i>	30	800	84	400	13	30	30	no change
5	30/F	BE	Kartagener syn.	<i>P. aeruginosa</i>	1000	200	24	400	19	1000	100	P→PM
6	62/F	BE	chronic sinusitis	<i>P. aeruginosa</i>	60	400	61	200	18	60	40	P→PM
7	35/F	BE	chronic sinusitis	<i>P. aeruginosa</i>	60	600	53	400	19	60	10	softened (P)
8	53/F	CB	PBC, IP, Sjögren syn. SLE, DM, hypertension	<i>P. aeruginosa</i>	40	600	77	400	21	40	40	no change

DPB: diffuse panbronchiolitis BE: bronchiectasis CB: chronic bronchitis PBC: primary biliary cirrhosis IP: interstitial pneumonia
 SLE: systemic lupus erythematosus DM: diabetes mellitus P: purulent PM: purulent mucous M: mucous

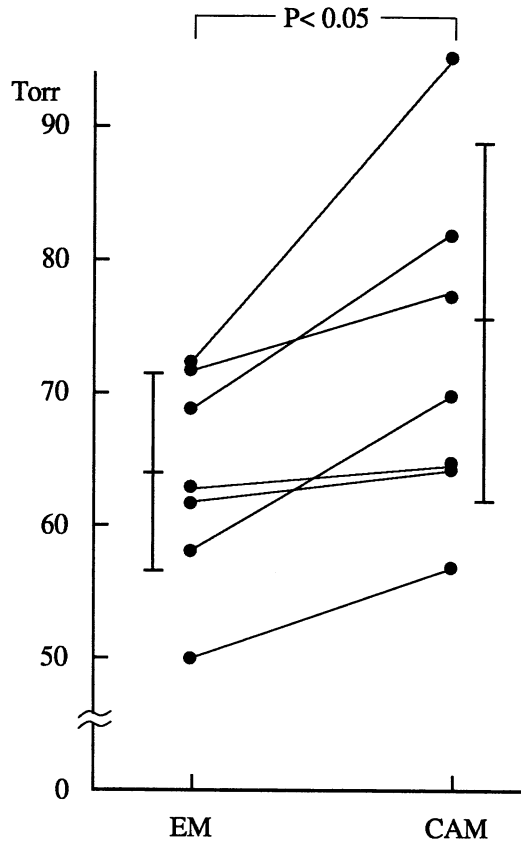


Fig. 5. Changes of PaO₂ after replacing EM to CAM.

Table 11. Number of incidence on installment of other antibiotics during 6 months before and after replacement of EM to CAM

Case no.	EM	CAM
1	6	0
2	3	0
3	3	0
4	1	0
5	long-term administration of NFLX	0
6	3	1
7	3	1
8	long-term administration of CPFX and antibiotics injection	0

NFLX: norfloxacin CPFX: ciprofloxacin

Table 12. Changes in QOL after replacement of EM to CAM

Case no.	QOL		Efficacy
	EM	CAM	
1	inpatient	<ul style="list-style-type: none"> • outpatient • enhanced ability to stay outside • doing much work 	+
2	outpatient	<ul style="list-style-type: none"> • outpatient • enhanced ability to stay outside • doing much work 	+
3	outpatient	<ul style="list-style-type: none"> • outpatient • enhanced ability to stay outside 	+
4	outpatient	<ul style="list-style-type: none"> • outpatient (not changed) 	-
5	outpatient	<ul style="list-style-type: none"> • outpatient • decreased episodes of fever • expanding the range of daily life 	+
6	outpatient	<ul style="list-style-type: none"> • outpatient • expanding the range of daily life 	+
7	outpatient	<ul style="list-style-type: none"> • outpatient • expanding the range of daily life 	+
8	inpatient	<ul style="list-style-type: none"> • inpatient (not changed) 	-

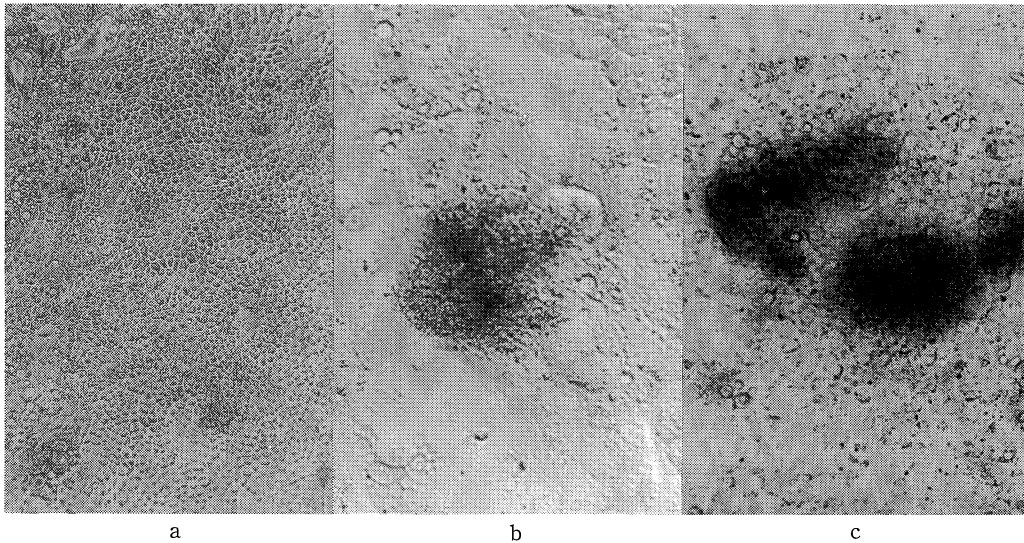


Plate 1 a : Normal appearance of Ishikawa cells
 b : Initial formation of biofilm(microcolony)
 c : Biofilm colonies($\times 600$)

感染症例 9 例の末梢血単核球分画 IL-2 産生能は、年齢を一致させた健常対照群と比較して高い傾向がみられた (Fig. 10). 慢性下気道感染症 15 例での EM または CAM 投与前の IL-2 産生能は 8.1 ± 4.1 U/ml, 投与 28 日後では 14.6 ± 11.3 U/ml と後者で有意な上昇を認めた ($P < 0.05$) (Fig. 11).

ii) 血清 IL-4 の変動

血清 IL-4 が測定可能であった症例の比率は年齢を一致させた健常対照群と比較して慢性下気道感染症例の方が高く, EM または CAM 投与 1 カ月後にはさらにやや増加した (Fig. 12). 血清 IL-4 が測定可能であった慢性下気道感染症 7 例での EM または CAM 投与前の血清 IL-4 は 118.8 ± 54.6 pg/ml, 投与 28 日後は 155.0 ± 63.7

Table 13. Effect of EM on biofilm formation in culture of Ishikawa cells

EM concentrations (μ g/ml)	No. of microcolonies (mean \pm SD/well)
0	43 \pm 15
0.2	18 \pm 6 ($P < 0.05$)
0.5	12 \pm 4 ($P < 0.05$)
1	3 \pm 2 ($P < 0.01$)
2	< 2
5	0

At each concentration, cultures were done in quadruplicate. Results were obtained from three different experiments. Data are expressed as the mean \pm S. D.

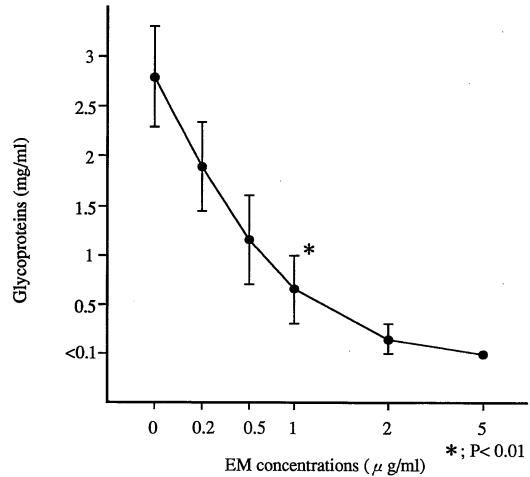


Fig. 7. Effect of EM on glycoprotein production by Ishikawa cells cultured with *P. aeruginosa* Ts25.

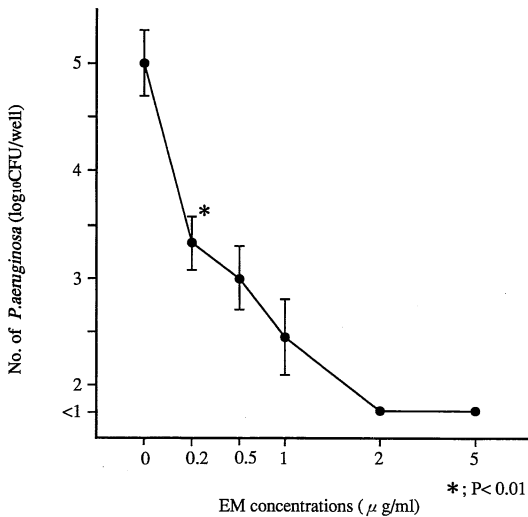


Fig. 6. The number of *P. aeruginosa* Ts25 colonizing the monolayers of Ishikawa cells in the presence of EM.

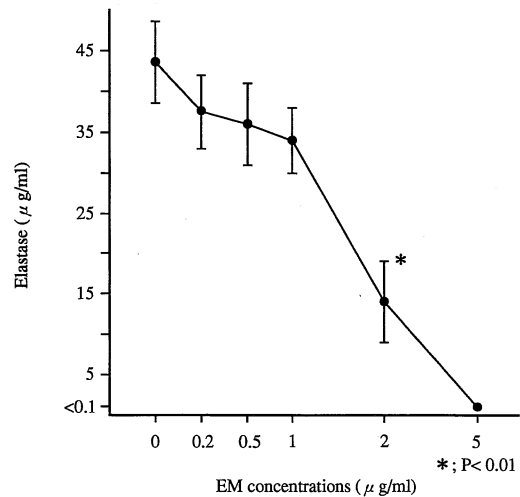


Fig. 8. Effect of EM on elastase production by *P. aeruginosa* Ts25 in culture with Ishikawa cells.

pg/ml と後者で有意な上昇を認めた($P < 0.05$) (Fig. 13).

iii) EM 長期投与例での EM 投与期間と IL-2 産生能の関係

EM 投与年数と末梢血単核球分画の IL-2 産生能の間には有意な負の相関($r = -0.46, P < 0.05$)を認め、EM の投与期間が長い症例ほど健常群の IL-2 産生能の値に近い傾向を認めた (Fig. 14).

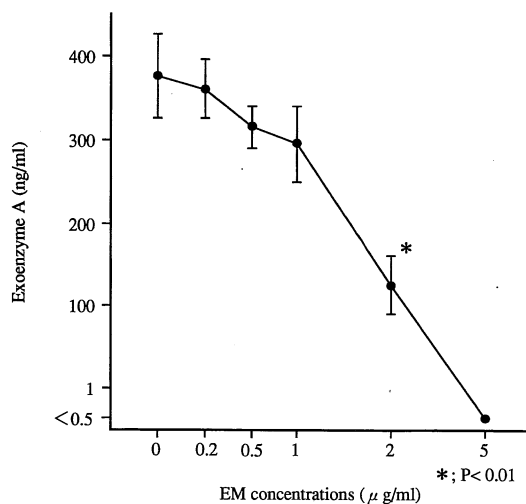


Fig. 9. Effect of EM on exoenzyme A production by *P. aeruginosa* Ts25 in culture with Ishikawa cells.

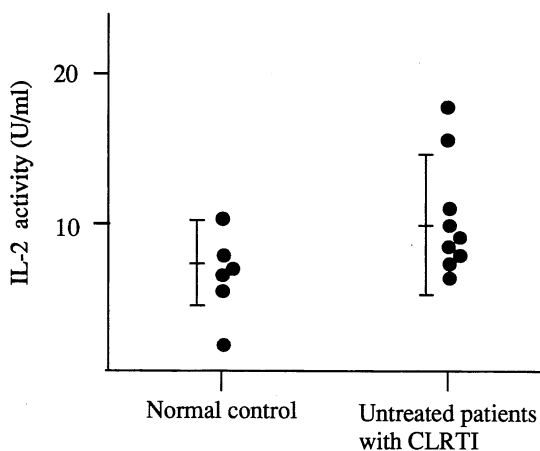


Fig. 10. Comparison of the IL-2 producing ability of peripheral mononuclear blood cells (PBMC) between normal controls and untreated patients with CLRTI.

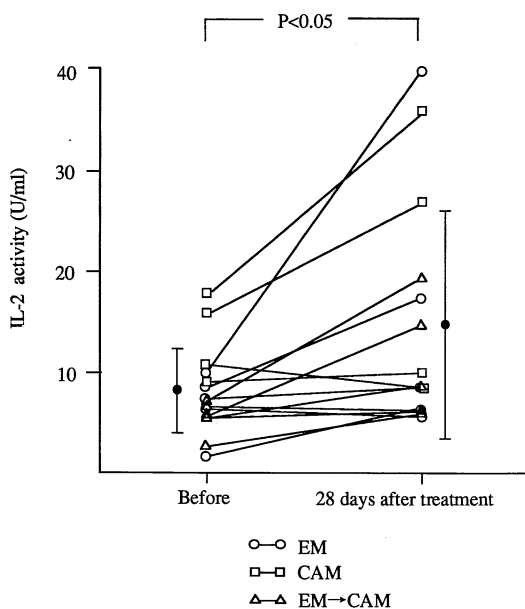


Fig. 11. Changes in the IL-2 producing ability of PBMC of the patients with CLRTI after treatment with macrolides.

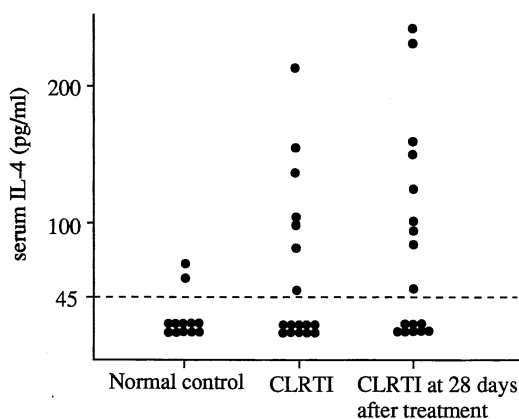


Fig. 12. Comparison of serum IL-4 levels between normal controls and patients with CLRTI.

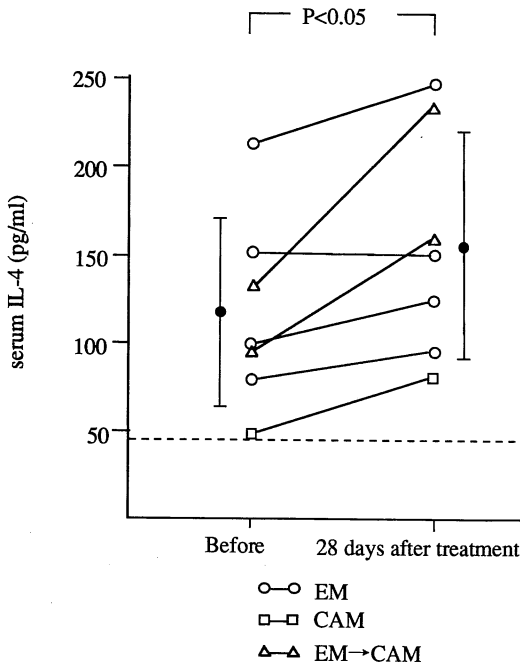


Fig. 13. Changes in serum IL-4 levels of the patients with CLRTI after treatment with macrolides.

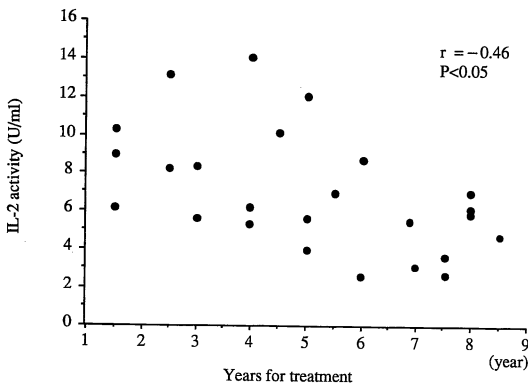


Fig. 14. Correlation between the IL-2 producing ability of PBMC from patients with CLRTI and the duration of EM administration.

考 察

緑膿菌の呼吸器感染のうち、肺実質感染は悪性疾患、血液疾患、膠原病など免疫的抵抗力の低下した患者に日和見感染症として肺炎を発症する⁶⁾。一方本菌の気道系

感染はDPB, BE, CBなどの慢性下気道感染症にみられしばしば持続感染化し、種々の治療に抵抗し非常に難治性である^{7,8)}。この難治性の要因として既存の下気道病変や粘液線毛輸送機構の障害⁹⁾などの宿主側要因と、緑膿菌の細胞壁の構造上多くの抗菌薬に対し自然耐性であること、elastase, proteaseなどの菌体外酵素・毒素の産生¹⁰⁾、バイオフィームの形成¹¹⁾などの細菌側要因とが挙げられている。このような難治性緑膿菌性慢性下気道感染症への対策の確立には正確な病態の把握が必要だが、本菌は上気道に付着しやすく起炎菌検索に際し喀痰からの本菌の検出のみで起炎菌と決定するには困難なことが多いため²⁾、本症の病態を詳細に検討した報告はない。

本研究では上気道の細菌の混入を回避し下気道の細菌を直接検出でき、正確な起炎菌の決定が可能なTTAを用いて、緑膿菌性慢性下気道感染症の頻度と病態、特にその急性増悪の要因とムコイド型緑膿菌の役割とを検討した。さらに澤木ら¹²⁾が見出した慢性下気道感染症に対するEM長期投与療法の有用性を発展させ、本研究では難治性緑膿菌性慢性下気道感染症に対するEM長期投与療法の有効性と共に、EM非有効例に対するCAMの長期投与療法の効果を検討し、その作用機序も解析した。

I) 緑膿菌性慢性下気道感染症の病態の解析

1978年から93年までの慢性下気道感染症のTTA検出菌を5年毎に3期に分けて各菌種検出比率の推移をみると、78年～83年には8.4%であった緑膿菌の検出比率は83年～88年には11.4%、88年～93年には23.1%と増加を認めた。従来から慢性下気道感染症ではインフルエンザ桿菌、肺炎球菌、緑膿菌の3菌種が主要検出菌とされる^{13,14)}が、この結果はこれらの細菌の中で特に緑膿菌の検出頻度が明らかに増加し、相対的にインフルエンザ桿菌、肺炎球菌の検出比率は低下していることを示した。この緑膿菌検出比率増加の原因は、抗菌薬投与による他菌から緑膿菌への菌交代と共に前述した要因による緑膿菌感染の難治性などが挙げられ、慢性下気道感染症での本菌の感染の重要性が増大していることを示唆すると考えられた。

また古西ら¹⁵⁾は慢性下気道感染症の病態の主体は持続的細菌感染であり、これを基礎に急性増悪期とそれ以外の比較的安定した時期という異なる病期が存在しそれぞれの病態も異なることを報告したが、本研究でも緑膿菌性慢性下気道感染症の病期を急性増悪期と非急性増悪期とに分け、各病期での検出菌と宿主要因との解析をもとに特に急性増悪に関与する要因を検討した。その結果、急性増悪期での複数菌検出比率は非急性増悪期に比べ高

い傾向を認め、その同時検出菌はインフルエンザ桿菌と肺炎球菌とが多く、緑膿菌が持続感染した慢性下気道感染症の急性増悪の起因为としてこれらの菌が重要であることを確認した。これに対し急性増悪期の緑膿菌単独検出を52%に認めたが、その要因としてまず緑膿菌持続感染例でウイルス感染による上気道炎に続いて急性増悪する例があり、この場合先行するウイルス感染が急性増悪の原因の主体と考えられ、次に緑膿菌未感染の慢性下気道感染症例で抗菌薬使用にて他菌から緑膿菌に菌交代後約1ヵ月以内という比較的早期に急性増悪する例があり、この場合機序は不明であるが菌交代直後の緑膿菌自体が急性増悪に関与した可能性が考えられた。これらの要因が明らかでなかった緑膿菌単独検出急性増悪例では、副腎皮質ステロイド薬投与や膠原病、悪性腫瘍のような基礎疾患などの宿主側要因が本菌による急性増悪に関与した可能性が高いと考えられた。以上をまとめると、緑膿菌性慢性下気道感染症の急性増悪には、①緑膿菌持続感染例にインフルエンザ桿菌や肺炎球菌などが重複感染する場合、②緑膿菌持続感染例でウイルス性上気道炎罹患後の場合、③他菌から抗菌薬の使用で緑膿菌に菌交代して間もなく急性増悪する場合、④宿主の免疫的抵抗力の減弱がある場合の4形式があることが明らかとなった。緑膿菌は慢性下気道感染症の持続感染菌として重要であるが、本研究によりその急性増悪には他菌の重複感染やウイルス感染が関与する以外に、緑膿菌への菌交代後早期や宿主の免疫的抵抗力の減弱がある症例では緑膿菌が単独で急性増悪に関与することが示唆され、新しい知見であると考えられた。

次に、緑膿菌の中で特にムコイド型緑膿菌は欧米でのcystic fibrosis(CF)で検出頻度が高く、本菌が気道に定着することで致死的な肺機能障害が惹起される^{16,17)}が、本邦ではDPBで検出頻度が高いという報告¹⁸⁾以外に本菌による呼吸器感染の臨床的な実態の詳細な検討はない。本研究でムコイド型緑膿菌の97%は慢性下気道感染症で検出され、基礎に慢性下気道感染症のない例ではほとんど検出されなかった。これは基礎に慢性下気道感染症がない例でも約20%検出された非ムコイド型緑膿菌とは対照的で、ムコイド型緑膿菌は非ムコイド型に比べ慢性下気道感染症での感染菌としてより重要であると考えられた。またCFでは黄色ブドウ球菌やインフルエンザ桿菌が感染した後に非ムコイド型緑膿菌に菌交代し、その後ムコイド型緑膿菌が出現するとされるが¹⁷⁾、このムコイド型への変化の機序はまだ解明されていない。CFの病態の悪化はしばしばこのムコイド型緑膿菌の出現に伴うとされるが¹⁷⁾、本研究で慢性下気道感染症の非急性

増悪期ではムコイド型と非ムコイド型緑膿菌検出例との検査値には差がなかった。ムコイド型緑膿菌感染による慢性下気道感染症の病態への影響は、今後個々の症例で非ムコイド型からムコイド型出現、定着の過程とその後の病態の変化とを長期に観察し検討する必要があると考えられた。さらに本研究で緑膿菌性慢性下気道感染症中約48%がムコイド型で、BEやCBでもムコイド型が約40%に検出されたことから、ムコイド型緑膿菌はDPBに限らず慢性下気道感染症全体の持続感染菌として非常に重要であることが明らかとなった。CFでムコイド型緑膿菌の気道感染が持続する機序は、本菌のmucoid exopolysaccharide(MEP)、すなわちalginateを介する気道上皮細胞への付着が非ムコイド型緑膿菌のpiliを介する付着に比べ易付着性であることが挙げられ¹⁹⁾、またMEPはその物理化学的性状から好中球やマクロファージの貪食作用に抵抗性で宿主の局所防御機能を抑制して毒性因子となり得るとされる²⁰⁾。さらにムコイド型緑膿菌は非ムコイド型に比べてバイオフィルムを形成しやすい²¹⁾こと、緑膿菌の抗原に対する免疫複合体が肺組織に慢性炎症を惹起すること²²⁾や粘液線毛輸送機構障害²³⁾などもCFでの本菌感染の難治化要因とされる。これらが慢性下気道感染症でのムコイド型緑膿菌の持続感染の機序としても同様に成立するかは今後の検討が必要だが、本症での粘液線毛輸送機構障害⁹⁾やバイオフィルム形成¹¹⁾などはすでに示されており、本菌は強い病原性はないが持続感染菌として病態の緩徐な悪化に関与する可能性が示唆され、本菌感染の対策を確立することが本症の治療に今後重要であると考えられた。

II) 緑膿菌性慢性下気道感染症に対するマクロライド薬の有用性

緑膿菌性慢性下気道感染症は非常に難治性で、本症に優れた抗緑膿菌作用を持つ抗菌薬を投与しても一時的な寛解が得られるのみでただちに再増悪し徐々に症状が進行することが多く、早期に耐性を獲得し有効性が低下するため十分な治療効果が得られなかった。しかしDPBにEM長期投与が臨床的に有効であること¹²⁾が見い出されてからはそれまで非常に不良であった予後²⁴⁾は改善され、またその他の慢性下気道感染症にも有効であることが明らかにされている^{25,26)}。本研究ではさらに、緑膿菌が持続感染した慢性下気道感染症に対するEM長期投与療法の有用性を詳細に検討する目的で、TTAで緑膿菌感染を証明した慢性下気道感染症にEMを長期投与しその効果を調査した。その結果、EM長期投与で喀痰量、PaO₂の有意な改善を認め、RSによる臨床的效果は有効以上が89%、QOLもQOL scoreで改善以上が78

%と良好であり、このことから緑膿菌性慢性下気道感染症に対するEM長期投与療法の有用性が明らかとなった。しかし緑膿菌の除菌率は11%と低く有効率との間に解離が認められ、その作用機序は直接緑膿菌に対するものだけではないと考えられた。

以上から緑膿菌性慢性下気道感染症に対するEM長期投与療法は非常に有用な治療法であるが、一部の症例にはEM無効例や臨床効果の低い症例が存在し、中にはEM治療を行っても不良の転帰をとる例を経験する場合もある。そこで本研究ではEMが非有効の緑膿菌性慢性下気道感染症に対してEMと同じ14員環マクロライド薬のCAMの長期投与を試みた結果、CAM投与後にPaO₂の有意な上昇と喀痰量、性状の改善とを認め、QOLの改善をみた症例も多く、本治療が有効であることが示唆された。これはEM非有効の緑膿菌性慢性下気道感染症に対するEMに替わる治療法としてCAM長期投与療法の有用性を明らかにした点で新たな知見である。またEM、CAMの長期投与による重篤な副作用は観察した範囲では認めなかったことも治療上重要と考えられた。

III) 緑膿菌性慢性下気道感染症に対するマクロライド薬の作用機序

緑膿菌性慢性下気道感染症に対するEMやCAMなどの14員環マクロライド薬長期投与療法の有効性の機序は、緑膿菌への抗菌力によるものだけでなくこれらの薬剤の緑膿菌に対するMICや有効率と除菌率との解離から考えても明らかであり、作用機序の解析は細菌側と宿主側との両面から検討する必要がある。本研究ではその機序を検討する目的で、マクロライド薬のバイオフィルムに対する作用を細菌と宿主との両面から解析し、また本薬投与が慢性下気道感染症での宿主のサイトカインに及ぼす作用を検討した。

緑膿菌バイオフィルムは本菌の気道粘膜への付着に続き、菌体表層のglycocalyxを介して互いに凝集し形成されるもので、欧米でのCFや本邦でのDPBなどの慢性下気道感染症で緑膿菌が持続的慢性感染を惹起し難治化する機序の一つとして近年注目されている^{27,28)}。このglycocalyxを介する組織への付着は緑膿菌のpiliを介した特異的付着に比べ非常に強固で²⁹⁾、さらにglycocalyxによる粘着・凝集に加えて血漿成分や粘液などが付着しバイオフィルムは一層強固になる³⁰⁾。こうして形成されたバイオフィルム内の細菌は各種抗菌薬や宿主の食細胞の影響を受けることなく、長期的に気道表面に定着し気道の排出機構を傷害して慢性的な症状が持続するようになるため³¹⁾、慢性下気道感染症の病態で気道粘膜表面での緑膿菌のバイオフィルム形成は本症の難治

化の一因として極めて重要であると考えられる。*In vitro*での緑膿菌バイオフィルムの形成は菌体表層のglycocalyxによる菌体同士の接着が大きな要因だが、気道粘膜表面ではバイオフィルムは緑膿菌と宿主細胞との相互作用で形成されると考えられる。近年EMやCAMの緑膿菌の付着に対する抑制作用が報告されているが³²⁻³⁵⁾、本研究ではEMの緑膿菌バイオフィルム形成に対する作用を細菌側と宿主細胞側との両面から検討する目的でIshikawa細胞の培養系を用いた緑膿菌バイオフィルムモデルを作成した。Ishikawa細胞はヒト子宮内膜腺癌由来の細胞株⁴⁾で、気道上皮細胞で産生される粘液に物理化学的性状が非常に類似したglycoprotein³⁶⁾を産生する性質を持ち、これに37℃では増殖し得ないが菌体外酵素産生能を保持する緑膿菌温度変異株(Ts25)³⁾を用いて、EMのバイオフィルム抑制効果を検討した。その結果、0.2 μg/mlのEM濃度からIshikawa細胞のmonolayer上に形成されるバイオフィルムの数とその中の生菌数との減少を認め、EMには比較的低い濃度から緑膿菌バイオフィルムの形成抑制効果があることが観察された。またEMは緑膿菌の菌体外酵素産生抑制作用がある³⁷⁾一方、ヒト気道上皮培養細胞からのglycoprotein産生を抑制することが示されているが³⁸⁾、この系での培養上清中のIshikawa細胞から産生されるglycoprotein量と緑膿菌からの菌体外酵素産生量とを測定すると、両者が最大に抑制されるEM濃度(5 μg/ml)でバイオフィルム形成抑制効果も最大であったことから、EMのバイオフィルム形成抑制はIshikawa細胞と細菌との双方に対する作用によるものと考えられた。しかしIshikawa細胞のglycoproteinと緑膿菌の菌体外酵素との産生抑制効果を発現するEMの最小量を比較すると、glycoprotein産生に対する抑制効果は菌体外酵素産生抑制効果を発現するEM濃度以下の1 μg/mlで認められ、この濃度よりさらに低い0.2 μg/mlでもバイオフィルム形成抑制がみられたことから、ヒト上皮細胞培養系でのEMの緑膿菌バイオフィルム形成抑制効果は宿主細胞により強く依存している可能性が示唆された。本研究でのこれらの結果は緑膿菌バイオフィルムの病態を細菌と宿主との両面から捉えた新しい知見であり、治療を考える上で非常に興味深いものと考えられた。

一方、マクロライド薬の宿主に対する作用として免疫・炎症担当細胞に対する種々の免疫的防御能の調節作用の重要性がいわれており、その一つとしてサイトカイン産生への影響³⁹⁻⁴²⁾が最近注目されている。三笠らはEMの慢性下気道感染症でのNK細胞活性の亢進作用⁴³⁾とそれに関与するサイトカインとして動物実験でマウス脾

細胞のEM, CAM投与によるIL-2, IL-4産生能亢進作用⁴⁴⁾とを報告しているが, 本研究ではヒトの慢性下気道感染症でのEM, CAM投与による末梢血単核球分画のIL-2産生能と血清IL-4との変動を検討した. 末梢血単核球分画のIL-2産生能は, DPBでは健常人と差異がないとの報告⁴⁵⁾もあるが, 今回の検討では慢性下気道感染症の方が健常群に比べて高値である傾向を認め, 血清IL-4も同様の結果を得た. そしてこの慢性下気道感染症例でEMまたはCAM投与28日後には投与前と比較してIL-2産生能と血清IL-4との有意な上昇を認めた. 一般にIL-2は活性化T細胞から産生され, 主にT細胞を増殖させると共にB細胞やNK細胞などの分化・増殖にも関与し, 生体の感染防御に重要な役割を果たすとされ⁴⁶⁾, IL-4はT細胞, 肥満細胞から産生され, B細胞の活性化・増殖誘導や免疫グロブリンのクラススイッチに関与し, また炎症性サイトカインのIL-1, IL-6, TNF- α などの産生を抑制する作用も知られている⁴⁷⁾. これらのサイトカインが慢性下気道感染症の病態改善にどう作用するかの詳細な機序は現在明らかではないが, EMとCAMとは投与初期にこれらのサイトカイン産生を高めることで全身性に免疫調節作用を発揮し, 感染に対する抵抗性を増強すると共に炎症反応を改善する可能性が考えられた. またEM長期投与例のCAM変更投与でもこれらサイトカインの産生の亢進が認められたことは, EM非有効例の慢性下気道感染症に対するCAMの有効性の機序を示唆する可能性があると考えられた. ただしサイトカインの産生と作用とはサイトカインネットワークで複雑に制御されており, マクロライド投与後無制限にサイトカイン産生が亢進し続けることは考えにくい. そこでEM長期投与によるサイトカインの変動の傾向を知る目的で, EM長期投与中の慢性下気道感染症例での投与期間とIL-2産生能との関係を検討した結果, EM投与期間が長い症例の方が健常対照群のIL-2産生能の値に近い傾向を示すことが明らかとなった. これらの症例は全例EM長期投与で病態が安定している有効例であり, 本治療による慢性下気道感染症の病態改善が反映された結果とも考えられた. これらの結果からEMまたはCAM長期投与は慢性下気道感染症例でIL-2, IL-4産生に影響を及ぼすことが示唆され, 本症に対する有効性の機序の一つである可能性が考えられた.

EMやCAMなどのマクロライド薬長期投与療法は緑膿菌性慢性下気道感染症の治療に大きな進歩をもたらしたが, まだすべてが解決されたわけではない. この難治性呼吸器感染症の完全な克服をめざして, 今後さらに病態の解析とマクロライド薬の新たな作用機序の解明とが

必要と考えられた.

結 語

TTAを用いて緑膿菌性慢性下気道感染症の病態を解析し, 本症に対するEMとCAMとによる治療効果と作用機序とを検討した.

I) 緑膿菌性慢性下気道感染症の頻度の推移と病態の解析

1) 慢性下気道感染症における緑膿菌の検出比率

慢性下気道感染症でのTTA検出菌全体に対する緑膿菌検出比率は1978年12月~83年3月は8.4%, 83年4月~88年3月は11.4%, 88年4月~93年3月は23.1%と大きく増加し, 慢性下気道感染症での本菌感染の重要性の増大が示唆された.

2) 緑膿菌性慢性下気道感染症での急性増悪に関わる要因の解析

緑膿菌性慢性下気道感染症の急性増悪にはインフルエンザ桿菌や肺炎球菌などの細菌の重複感染やウイルス感染が関与する以外に, 他菌から緑膿菌への菌交代後早期や宿主の免疫的抵抗力の減弱がある症例では緑膿菌が単独で急性増悪に関与する可能性があることを新たに見出した.

3) ムコイド型緑膿菌検出例の解析

ムコイド型緑膿菌は呼吸器感染症中ではほとんどが慢性下気道感染症で検出され, 本菌は慢性下気道感染症での持続感染菌として非ムコイド型緑膿菌に比べてより重要であることを明らかにした. また慢性下気道感染症全体で緑膿菌検出例の約48%がムコイド型で, DPB以外の疾患でもムコイド型緑膿菌感染が重要であることを明らかにした.

II) 緑膿菌性慢性下気道感染症の治療

1) EM長期投与療法の効果

TTAで緑膿菌の持続感染を証明した慢性下気道感染症にEM長期投与療法を行い, 有意なPaO₂の上昇, 喀痰量およびQOLの改善を認めたことから, 緑膿菌性慢性下気道感染症に対して本治療法が有用であることを明らかにした.

2) EM非有効例に対するCAM長期投与療法の効果

EM長期投与療法が無効あるいは臨床効果の低い緑膿菌性慢性下気道感染症にCAMを長期投与し, PaO₂の有意な上昇と, 喀痰量, 性状との改善を認めた. さらにQOLの改善がみられた症例も多く, EM非有効例に対するCAM長期投与療法の有用性を明らかにした.

III) 慢性下気道感染症に対するマクロライド系抗細菌薬の作用機序

1) EM の緑膿菌バイオフィーム形成抑制能

ムチン様 glycoprotein を産生する Ishikawa 細胞の培養系を用いて緑膿菌 Ts 25 変異株によるバイオフィームモデルを作成し、この系で EM が細胞への菌付着とバイオフィーム形成とを抑制することを証明し、細胞培養系での緑膿菌バイオフィーム形成抑制効果が EM に存在することを見出した。また菌体外酵素産生を抑制する EM 濃度以下でバイオフィーム形成抑制と Ishikawa 細胞からの glycoprotein 産生抑制とがみられたことから、EM のバイオフィーム形成抑制効果は宿主側因子への作用の関与がより大きいという新しい知見を明らかにした。

2) 慢性下気道感染症のマクロライド薬投与によるサイトカインの変動

慢性下気道感染症で末梢血単核球分画の IL-2 産生能と血清 IL-4 とは、EM, CAM の投与 28 日後に投与前に比べ有意な上昇を認めた。また EM 長期投与例では投与期間と IL-2 産生能との間に負の相関を認め、投与期間が長い症例ほど健常例の値に近い傾向を示した。以上から慢性下気道感染症でマクロライド薬が IL-2 と IL-4 との産生に影響を及ぼすことを新たに発見し、本症に対する有効性の機序の一つである可能性を示した。

以上から、慢性下気道感染症での緑膿菌感染の頻度の増大、急性増悪に関する要因、ムコイド型緑膿菌感染の重要性、さらに緑膿菌性慢性下気道感染症に対する EM, CAM 長期投与療法の有用性、およびこれらの治療の作用機序の新たな知見を得た。

本論文の要旨は第 66 回日本感染症学会総会(1992 年, 東京), 第 32 回日本胸部疾患学会総会(1992 年, 札幌), 第 67 回日本感染症学会総会(1993 年, 東京), 第 3 回アジア太平洋呼吸器学会議(1993 年, シンガポール), 第 41 回日本化学療法学会総会(1993 年, 東京), 第 41 回日本化学療法学会西日本支部総会(1993 年, 神戸), 第 33 回日本胸部疾患学会総会(1993 年, 東京), 第 91 回日本内科学会講演会(1994 年, 新潟)で発表した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました第 2 内科学教室成田亘啓教授に心から感謝致しますとともに、御校閲、御助言を賜りました細菌学教室喜多英二教授ならびに病態検査学教室中野 博教授に深謝致します。また日々の研究にあたり終始懇切なる御指導をいただきました第 2 内科澤木政好助教授、三笠桂一助手、古西 満助手に感謝の意を捧げます。さらに本研究に御協力いた

だいた第 2 内科学教室、細菌学教室ならびに中央臨床検査部の諸兄姉に感謝致します。

文 献

- 1) Neu, H. C. : J. Antimicrob. Chemother. **11**(Suppl. B) : 1, 1983.
- 2) 小林宏行, 高村研二 : 診断と治療, **67** : 2407, 1979.
- 3) Hooke, A. M., Oeschger, M. P., Zeligs, B. J. and Bellanti, J. A. : Infect. Immun. **20** : 406, 1978.
- 4) 西田正人, 笠原国武, 金子 實, 岩崎寛和, 林 一雄 : 日産婦誌. **37** : 1103, 1985.
- 5) Ganrot, P. O. : Scand. J. Clin. Lab. Invest. suppl. **124** : 39, 1972.
- 6) 前田光一, 澤木政好, 喜多英二, 三笠桂一, 古西 満, 坂本正洋, 辻本正之, 竹内章治, 濱田 薫, 国松幹和, 佐野麗子, 増谷喬之, 榎葉周三, 成田亘啓 : 感染症誌. **68** : 479, 1994.
- 7) 松本慶蔵, 宇塚良夫, 永武 毅, 野口行雄, 鈴木 寛, 力富直人 : 日内会誌. **70** : 38, 1981.
- 8) 澤木政好, 三上理一郎, 国松幹和, 三笠桂一, 成田亘啓, 播金 収 : 感染症誌. **59** : 389, 1985.
- 9) 今井照彦, 大石 元, 堅田 均, 澤木政好, 伊藤新作, 龍神良忠, 国松幹和, 三笠桂一, 藤村昌史, 渡辺裕之, 長 澄人, 濱田 薫 : 気管支学. **12** : 382, 1990.
- 10) 谷本普一 : 呼吸器感染症の治療. 南江堂, 東京, p.31, 1987.
- 11) 小林宏行 : 日内会誌. **80** : 663, 1991.
- 12) 澤木政好, 三上理一郎, 三笠桂一, 国松幹和, 伊藤新作, 成田亘啓 : 感染症誌. **60** : 37, 1986.
- 13) 澤木政好, 三上理一郎, 三笠桂一, 国松幹和, 成田亘啓, 濱田 薫, 播金 収 : 感染症誌. **58** : 469, 1984.
- 14) 澤木政好, 三上理一郎, 国松幹和, 三笠桂一, 成田亘啓, 播金 収 : 感染症誌. **59** : 389, 1985.
- 15) 古西 満, 澤木政好, 三笠桂一, 竹内章治, 柳生善彦, 前田光一, 濱田 薫, 国松幹和, 成田亘啓, 佐野麗子, 増谷喬之 : 感染症誌. **65** : 1593, 1991.
- 16) Doggett, R. G., Harrison, G. M. and Wallis, E. S. : J. Bacteriol. **87** : 427, 1964.
- 17) Pier, G. B. : J. Infect. Dis. **151** : 575, 1985.
- 18) 谷本普一, 立花昭生, 中森祥隆, 蝶名林直彦, 中谷龍王, 中田紘一郎, 岡野 弘, 松岡ひろ子 : 日胸. **40** : 485, 1981.

- 19) **Ramphal, R. and Pier, G. B.** : *Infect. Immun.* 47: 1, 1985.
- 20) **Mai, G. T., Seow, W. K., Pier, G. B., McCormack, J. G. and Thong, Y. H.** : *Infect. Immun.* 16: 559, 1993.
- 21) **Anwar, H. and Costerton, J. W.** : *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1666, 1990.
- 22) **Høiby, N., Doring, G. and Schiøtz, P. O.** : *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 29, 1986.
- 23) **Spock, A., Heick, H. M. C., Cress, H. and Logan, W. S.** : *Pediatr. Res.* 1: 173, 1967.
- 24) 稲富恵子：厚生省特定疾患間質性肺疾患調査研究班昭和57年度研究報告書：38, 1983.
- 25) 三笠桂一, 澤木政好, 喜多英二, 古西 満, 前田光一, 竹内章治, 濱田 薫, 国松幹和, 今井照彦, 佐々木義明, 櫻葉周三, 成田亘啓：感染症誌. 66: 1390, 1992.
- 26) 澤木政好, 三笠桂一：化学療法の領域. 6: 257, 1990.
- 27) **Lam, J., Chan, R., Lam, K. and Costerton, J. W.** : *Infect. Immun.* 28: 546, 1980.
- 28) 小林宏行, 大垣憲隆：呼吸. 11: 1266, 1992.
- 29) **Bryers, J. D. and Characklis, W. G.** : *Water Res.* 15: 483, 1981.
- 30) **Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. and Marrie, T. J.** : *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 435, 1987.
- 31) **Anwar, H. and Costerton, J. W.** : *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1666, 1990.
- 32) 山崎 透：感染症誌. 64: 575, 1992.
- 33) 武田博明, 大垣憲隆, 菊池直美, 小林宏行, 明石 敏：感染症誌. 66: 1454, 1992.
- 34) 中塩哲士, 須佐千尋, 邱 世林, 木島あゆみ, 岩崎博子, 下村晴信, 金光敬二, 堀 誠二, 水島 裕, 嶋田甚五郎：J. J. Antibiol. 46: 428, 1993.
- 35) 三笠桂一, 喜多英二, 澤木政好, 古西 満, 前田光一, 濱田 薫, 竹内章治, 坂本正洋, 国松幹和, 櫻葉周三, 成田亘啓：感染症誌. 67: 648, 1993.
- 36) **Amin, D. N., Goswami, S., Klein, T., Maayani, S. and Marom, Z.** : *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 4: 135, 1991.
- 37) **Kita, E., Sawaki, M., Oku, D., Hamuro, A., Mikasa, K., Emoto, M., Takeuchi, S., Narita, N. and Kashiba, S.** : *J. Antimicrob. Chemother.* 27: 273, 1991.
- 38) **Goswami, S. K., Shmuel, K. and Marom, Z.** : *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 72, 1990.
- 39) 門田淳一, 崎戸 修, 河野 茂, 阿部 航, 白井 亮, 川上かおる, 飯田桂子, 森川 透, 草野史郎, 原 耕平：感染症誌. 68: 27, 1994.
- 40) **Bailly, S., Pocardalo, J. J., Fay, M. and Pocardalo, M. A. G.** : *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 2016, 1991.
- 41) 片平潤一, 春木宏介, 柴田雄介, 菊地 賢, 長谷川裕美, 戸塚恭一, 清水喜八郎：Chemotherapy. 39, 320, 1991.
- 42) 滝沢 始, 大利隆行, 伊藤幸治：厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班平成4年度研究報告書. p. 244, 1993.
- 43) 三笠桂一, 澤木政好, 古西 満 江川信一, 米田尚弘, 柳生善彦, 藤村昌史, 濱田 薫, 国松幹和, 成田亘啓：感染症誌. 63: 811, 1989.
- 44) **Kita, E., Sawaki, M., Nishikawa, F., Mikasa, K., Yagyu, Y., Takeuchi, S., Yasui, K., Narita, N. and Kashiba, S.** : *Pharmacol.* 41: 177, 1990.
- 45) 竹内 実：日胸疾会誌. 24: 959, 1986.
- 46) 笠倉新平：サイトカイン. 日本医学館, 東京, p.21, 1991.
- 47) **Hart, P. H., Vitti, G. F., Burgess, D. R., Whitty, G. A., Piccoli, D. S. and Hamilton, J. A.** : *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 3803, 1989.