

## Topics 8

## 基礎研究

—肺炎の基礎研究における  
最近のトピックスは？—

松本 哲哉

要旨：肺炎の基礎研究は多方面から行われており、これまで多くの成果をあげてきた。感染病態や病原体の病原性などを解明するためには、マウスなどを用いた動物実験モデルの確立が必須であり、肺炎球菌や緑膿菌をはじめさまざまな病原体による肺炎モデルが報告されている。さらに最近では単一の病原体による感染だけでなく、インフルエンザウイルスと肺炎球菌の混合感染について、その病態が注目を集めている。診断の面では抗原検出や遺伝子検出による迅速診断が活発に研究され、すでに臨床においても活用されている。治療面では各種耐性菌に対する新規抗菌薬の開発が期待されているが、現実的には既存の抗菌薬の併用療法など有効な活用法に重点が置かれている。予防については各種ワクチンの検討がなされているが、特に肺炎球菌については血清型との関連で構成成分や有効性が今後の検討課題となっている。

キーワード：病態、動物実験モデル、迅速診断、抗菌薬開発、ワクチン

Pathophysiology, Animal experimental model, Rapid diagnosis, Development of new antimicrobial agents, Vaccine

連絡先：松本 哲哉  
〒160-8402 東京都新宿区新宿 6-1-1  
東京医科大学微生物学講座  
(E-mail: tetsuya@tokyo-med.ac.jp)

## はじめに

肺炎は感染症の主要な疾患であり、高い頻度や重症度により一般的に高い関心が寄せられている。そのため、肺炎に関する基礎研究についても、感染のメカニズムや菌の病原性、診断、治療および予防までさまざまな角度から検討がなされてきた。そこで本稿においてはそれらの基礎研究を中心に、肺炎に関する最近のトピックスについて解説を行う。

## 肺炎の動物モデルの作製

ヒトの肺炎は、動物を用いた感染実験モデルがこれまで数多く検討されてきた。その多くはマウスやラットなど齧歯類を用いた検討が中心であるが、当然、齧歯類はヒトとの種差によって実験結果に及ぼす影響が少なくないという評価もある。ただしこれらの動物実験モデルを用いることによって、臨床的な研究では得られない多くの成果が得られていることも事実である。

### 1. 肺炎球菌性肺炎モデル

肺炎の動物実験モデルとしては肺炎球菌を用いた基礎研究がこれまで多くなされてきた。歴史をさかのぼると、肺炎の動物実験モデルとしては1915年にウサギを使った肺炎球菌性肺炎モデルが発表されている<sup>1)</sup>。さらにマウスを用いた肺炎球菌性肺炎モデルが1924年に報告<sup>2)</sup>されており、肺炎球菌の吸入により実験的に肺炎を発症させ、アルコールや免疫の影響がその時点ですでに検討されている。

最近の肺炎球菌性肺炎モデルを用いた研究では、各種抗菌薬による治療の効果<sup>3)</sup>や肺炎球菌のワクチンの評価<sup>4)</sup>などが報告されている。さらに肺炎を起こす最初のステップである肺炎球菌の鼻咽頭への定着についても、マウスモデルを用いた評価がなされている<sup>5)</sup>。マウスを用いた肺炎球菌性肺炎の実験系について注意すべきなのは、マウスの系統や肺炎球菌の血清型、さらに感染の方法など用いた実験条件によってその結果が異なる可能性がある点である。すなわち、肺炎球菌に対して感受性の高いマウスの系統や、病原性の強い血清型、感染を起こしやすい投与経路などがあり、これらの点を加味して実験結果の評価を行う必要がある<sup>6)</sup>。

### 2. 緑膿菌肺炎モデル

上記の肺炎球菌性肺炎モデルが市中肺炎の典型的な肺炎のモデルとするならば、院内肺炎のモデルとしては、緑膿菌性肺炎モデルが代表的である。緑膿菌による肺炎モデルを作製する場合、宿主が易感染性の状態となった実験系を作る必要があり、その一例としてブタを用いた人口呼吸器管理下の肺炎が検討されている<sup>7,8)</sup>。緑膿菌を経気管的に接種した後のBAL液や血液中のサイトカイン、および肺組織の病理所見はヒトにおける緑膿菌性肺炎と類似した所見を示し、有用な実験系であると結論づけられている。

さらに肺炎ではないが、嚢胞性線維症 (cystic fibrosis : CF) のマウスモデルも作製され、緑膿菌による慢性感染の病態が検討されている。実際にCFの患者から分離された複数の菌株を用いてマウスのCFモデルにおける感染実験を行った結果、ムコイド株は非ムコイド株に比べて病原性が強く、MIP-2やG-CSFなどサイトカインの誘導能も高く強い炎症反応を惹起することが明らかとなっている<sup>9)</sup>。

### 3. その他の肺炎モデル

上記の緑膿菌肺炎モデルは強制的に人口呼吸器関連肺炎 (ventilator-associated pneumonia : VAP) を起こさせたモデルともいえるが、よりヒトにおける病態に近づけたモデルも報告されている。それによると、ブタを麻酔状態として人口呼吸器で数日間管理することで口腔内に定着した菌による肺炎を発症させ、さらに緑膿菌やMRSAを加えることでヒトにおけるVAPと類似した状態を再現し、治療や病態の研究に有用であると報告している<sup>10)</sup>。

なお、肺炎に影響する宿主側の要因を調べる目的で、ノックアウト、ノックイン、トランスジェニックなど、各種の遺伝子組換えマウスを用いた実験系も用いられている<sup>11)</sup>。その領域は多岐にわたり、免疫反応やホルモン、薬剤の影響などの検討に有用であると評価されている。

## 感染病態の検討

### 1. 混合感染における病態

これまで述べてきたように、肺炎の動物実験モデルを用いることで肺炎に関する各種の評価が可能となっている。さらに最近では単独の病原体による感染だけでなく、複数の病原体による感染の評価も行われている。たとえ

表1 インフルエンザと細菌の感染形態による各種要因

要 因		同時感染	インフルエンザ後肺炎
ウイルス側		ノイラミニダーゼ, PB1-F2	明らかな関与なし
細菌側		pneumococcal surface protein A	不明
宿主側	機能面	上皮障害	線毛上皮機能低下
	免疫細胞	好中球, マクロファージ, 単球	好中球
	サイトカイン	IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , KC, MIP-2	IL-10
	病原体認識レセプター	MACRO	TLR-2, TLR-4, TLR-5
代謝		不明	indoleamine 2, 3-dioxygenase

(文献 12) より改変)

表2 微生物検査における新たな進歩

分 類	対象病原体	方 法	備 考
抗原検出	肺炎球菌, マイコプラズマ	イムノクロマト法	すでに市販化
遺伝子検査	各種病原体	multiplex PCR	臨床応用は試験段階
培養・同定	各種病原体	MALDI-TOF MS	海外では実用段階

ば、インフルエンザの合併症として細菌性肺炎があり、予後を悪化させる要因となっていることは有名である。ただし厳密にはインフルエンザウイルスと細菌が同時に感染を起こしている場合と、インフルエンザ後に細菌感染を発症する場合に分けることができる。細菌のなかでも特に肺炎球菌が重要な菌であり、同時感染かインフルエンザ後の肺炎球菌性肺炎かによって、病態に関与する要因が異なっている(表1)<sup>12)</sup>。このようにヒトに類似したモデルを用いることで、より詳細な病態が解明されるようになってきており、重症化を防ぐためのワクチンの検討や治療法の改善に結び付くことが期待されている。

## 2. アルコール多飲の影響

アルコール多飲が肺炎のリスクを高めることは周知の事実であるが、これまでその機序については明確な証明がなされておらず、酪酊などによる誤嚥のリスクの増加などが指摘されていた。今回、新たに報告された論文<sup>13)</sup>では、見かけ上の健常人であっても、大量のアルコールを慢性的に飲酒している場合は、肺胞領域における亜鉛の利用に障害が認められ、それによって肺胞マクロファージの機能が低下していることが明らかとなった。この機序だけで説明できるとは思えないが、アルコール多飲に伴う肺炎の機序を説明するものとして注目される。

## 肺炎の起因病原体の診断

### 1. 抗原検出, 遺伝子検出

肺炎における起因病原体の診断は、現在においても細菌培養が主体であり、ウイルスやマイコプラズマなどについては血清抗体価が主に用いられてきた。いずれの検査法も検査結果を得るまでに時間を要することが問題となっており、より短時間で高感度の検出を目指した基礎研究が活発に行われ、一部はすでに実用化されている(表2)。

迅速診断法のなかでも近年、特に広く活用されるようになってきたのが抗原検出法であり、肺炎球菌やレジオネラの尿中抗原はすでに一般的となっているが、さらに肺炎球菌については咽頭ぬぐいなどの抗原検出キットも市販されている。また、マイコプラズマについても咽頭ぬぐいを検体とした抗原検出法が開発され市販されるようになった。

さらに遺伝子検出法も基礎的研究が充実してきており、まずマイコプラズマについては loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による遺伝子検出法が実用化されている。さらに最近の遺伝子検出の方向性としては、複数の病原体の遺伝子を同時に検出する研究が活発である。その多くは multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) と呼ばれ、5~10 あるいはそれ以上の病原体の遺伝子を PCR で同時に検出する方法の研

究が進められている<sup>14)15)</sup>。すでにヨーロッパではこの方法を臨床で応用する段階に至っている。

## 2. 病原体の同定

病原体の同定はこれまで長い間、培養が基本となっ て行われてきた。ただし一般細菌の培養には通常、18~24 時間程度を有するため、検体から得られた細菌のコロニーをさらに純培養にて増やし、その後、同定の過程を経る必要があった。近年、この分野で画期的な進歩をもたらしているのが質量分析による同定法である。matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) と呼ばれるこの方法は、各菌が菌体中に保有する成分を分析することで菌名を確定することができる。この方法の利点としては、菌のコロニーを簡単な操作で分析器にかけて短時間で結果を得ることができ、コストが安価な点である。欠点としては、まだ対応できない菌種があることや、同定はできても薬剤感受性の評価が困難であること、高価な機器を導入する必要があること、などである<sup>16)</sup>。本検査法はフランスなどヨーロッパを中心に実際の臨床検査にも積極的に導入されており、さらに国内の施設にも少しずつ導入されるようになってきている。

# 肺炎の治療

## 1. 抗菌薬の開発

肺炎に限ったわけではないが、感染症治療の主体は抗菌薬である。残念ながら抗菌薬の開発は以前に比べて明らかに衰退しており、1980~1990年代のように製薬企業が開発にしのぎを削った状況は望めなくなっている。基礎研究もそれとともに停滞している状況であるが、それでもいくつかの有望な抗菌薬が報告されている。最近の研究の傾向としては、たとえば新しいβ-ラクタマーゼ阻害薬が発見され、単独では抗菌作用を持たないがβ-ラクタム系抗菌薬と組み合わせて感染症治療に用いられる可能性がある<sup>17)</sup>。また、これまででない機序を有する抗菌薬も基礎的な研究から見いだされている<sup>18)</sup>。耐性菌の問題をはじめとして感染症治療が困難になっている状況において、新たな抗菌薬の開発が望まれている<sup>19)</sup>。しかし、実際に基礎研究ではシーズと呼ばれる抗菌薬の種がいくつも報告されても、製品化には製薬企業の多大な投資と積極性が必要であり、現実の厳しい問題が立ちほだかっている。

## 2. 抗菌薬療法の見直し

新たな抗菌薬の開発が望めない状況において、既存の抗菌薬を活用する研究も進められている。特に耐性菌に対しては単独ではどの抗菌薬もほぼ無効な多剤耐性菌も出現しており、これらの菌に有効な併用療法の検討が進められている。たとえば現在、グラム陰性菌のなかでもNDM-1やKPCと呼ばれるメタロβ-ラクタマーゼ産生菌や多剤耐性アシネトバクターなどによる感染症は、難治性の点から深刻な状況となっている。そのため、一例としてKPC産生菌に対してドリペネム (doripenem : DRPM) とエルタペネム (ertapenem : ETPM) を併用したダブルβ-ラクタム療法<sup>20)</sup>や、コリスチン (colistin) とリファンピシン (rifampicin) の併用<sup>21)</sup>など、今までに通常用いられていなかった抗菌薬の併用療法が積極的に検討されている。

これら併用療法の研究は症例を中心とした臨床研究だけでは限界があるため、その土台となる基礎研究として、たとえば多剤耐性菌 (アシネトバクターおよび緑膿菌) によるマウスの肺炎モデルや試験管内殺菌の実験結果も報告されている<sup>22)</sup>。その結果によると、第4世代セファロスポリン [セフェピム (cefepime : CFPM)], ニューキノロン [レボフロキサシン (levofloxacin : LVFX)], アミノグリコシド [アミカシン (amikacin : AMK) の3系統の抗菌薬の組み合わせのなかで、総合的に判断してCFPMとAMKの併用が最も有効性が高く、次いでCFPMとLVFXで併用効果が認められた。しかしLVFXとAMKを併用した場合は、無治療の場合とあまり変わらなかった。このように抗菌薬の組み合わせによって併用療法の効果は大きく異なることに注意すべきである。

# 肺炎の予防

## 1. 肺炎球菌ワクチン

肺炎の予防に用いられるワクチンとしてすでに広く用いられているのが肺炎球菌ワクチンであり、各種の基礎研究の成果が臨床面に応用されてきた (表3)。肺炎球菌ワクチンの抗原には莢膜多糖体が用いられているが、90を超える血清型が存在するため、主要な血清型をいかに効率的にカバーできるかが課題となっている<sup>23)</sup>。すでに23価のワクチンが国内では主に成人、特に高齢者を中心に用いられ、7価のワクチンが小児を主体に利用

表3 肺炎球菌ワクチンの基礎研究と臨床の結びつき

項目	基礎研究	臨床応用
抗原性	莢膜多糖体の抗原性の低下	→ 莢膜抗原の増量, トキシドとの結合
血清型	各年代における血清型の頻度	→ 小児・成人など接種対象の決定
	各疾患における血清型の頻度	→ 肺炎, 髄膜炎など対象疾患の決定
	接種に伴う血清型の変化	→ 今後のワクチン改良
再接種	接種後の抗体価の推移	→ 再接種の時期の検討

されてきた。23 価のワクチンは莢膜多糖体のみが抗原として用いられているために抗体産生性が低く、肺炎に対する明確な予防効果は確立したとはいえない。一方、7 価のワクチンはジフテリアトキシドとの結合型であり抗体産生能が高いが、最近では 13 価の結合型ワクチンも開発され、すでに国内でも認可されている。肺炎球菌ワクチンの今後の課題として、13 価のワクチンが、高齢者の肺炎にも予防効果を示すことができるかどうか注目される点である<sup>24)</sup>。さらに基礎研究においては、国内で臨床的に分離される肺炎球菌の血清型にこれらのワクチンがうまくマッチしているかどうか、また、耐性菌が分離されやすい血清型への対応や臨床効果を高めるための接種法などが課題になると思われる。

## 2. その他のワクチン

肺炎球菌以外に、各種病原体をターゲットとしたワクチンは基礎研究ではこれまでいくつも報告されている。たとえば黄色ブドウ球菌<sup>25)</sup>や緑膿菌<sup>26)</sup>、さらにはサイトメガロウイルス (CMV)<sup>27)</sup>に対するワクチンも研究が進められており、基礎研究のみならず一部では、臨床的検討による有効性も報告されている。

## おわりに

これまで述べてきたように、肺炎の基礎研究は多岐にわたり、各領域においてさまざまな成果をあげている。

ただし基礎研究では有望な結果が得られても、そのまま終わってしまう多くの研究があることも事実である。今後は基礎研究の成果を臨床にいかに関与させていくかが、重要な課題と思われる。

## 引用文献

- 1) Kline BS, et al. Studies upon experimental pneumonia in rabbits. VII. The production of lobar pneumonia. J Exp Med 1915; 21: 304-10.
- 2) Stillman EG, et al. Experimental production of pneumococcus pneumonia in mice by the inhalation method. J Exp Med 1924; 40: 733-42.
- 3) Nuermberger E. Murine models of pneumococcal pneumonia and their applicability to the study of tissue-directed antimicrobials. Pharmacotherapy 2005; 25: 134S-9S.
- 4) Steinhoff MC; Pneumococcal Vaccine Animal Model Consensus Group. Animal models for protein pneumococcal vaccine evaluation: a summary. Vaccine 2007; 25: 2465-70.
- 5) Malley R, et al. Animal models of pneumococcal colonization. In: Siber GR, Klugman KP, Makela PH, ed. Pneumococcal Vaccines: The Impact of Conjugate Vaccine. Washington DC: ASM Press. 2008; 59-66.
- 6) Chiavolini D, et al. Animal models of Streptococcus

- pneumoniae disease. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 666-85.
- 7) Sibila O, et al. Experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia: evaluation of the associated inflammatory response. *Eur Respir J* 2007; 30: 1167-72.
  - 8) Luna CM, et al. Experimental severe *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia and antibiotic therapy in piglets receiving mechanical ventilation. *Chest* 2007; 132: 523-31.
  - 9) Moser C, et al. Novel experimental *Pseudomonas aeruginosa* lung infection model mimicking long-term host-pathogen interactions in cystic fibrosis. *APMIS* 2009; 117: 95-107.
  - 10) Luna CM, et al. Animal models of ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J* 2009; 33: 182-8.
  - 11) Baron RM, et al. Genetically manipulated mouse models of lung disease: potential and pitfalls. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 302: L485-97.
  - 12) van der Sluijs KF, et al. Bench-to-bedside review: bacterial pneumonia with influenza—pathogenesis and clinical implications. *Crit Care* 2010; 14: 219.
  - 13) Mehta AJ, et al. Alcohol abuse, the alveolar macrophage, and pneumonia. *Am J Med Sci* 2012; 343: 244-7.
  - 14) Thurman KA, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Legionella* spp. in clinical specimens using a single-tube multiplex real-time PCR assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70: 1-9.
  - 15) Sibley CD, et al. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infect Genet Evol* 2012; 12: 505-21.
  - 16) El-Bouri K, et al. Comparison of bacterial identification by MALDI-TOF mass spectrometry and conventional diagnostic microbiology methods: agreement, speed and cost implications. *Br J Biomed Sci* 2012; 69: 47-55.
  - 17) Buynak JD.  $\beta$ -Lactamase inhibitors: a review of the patent literature 2010-2013. *Expert Opin Ther Pat* 2013. [Epub ahead of print]
  - 18) Wang J, et al. Synthetic biology triggers new era of antibiotics development. *Subcell Biochem* 2012; 64: 95-114.
  - 19) Freire-Moran L, et al; ECDC-EMA Working Group. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria—Time to react is now. *Drug Resist Updat* 2011; 14: 118-24.
  - 20) Wiskirchen DE, et al. Impact of various conditions on the efficacy of dual carbapenem therapy against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 41: 582-5.
  - 21) Tascini C, et al. Synergistic activity of colistin plus rifampin against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 3990-93.
  - 22) Yuan Z, et al. Quantitative assessment of combination antimicrobial therapy against multidrug-resistant bacteria in a murine pneumonia model. *J Infect Dis* 2010; 201: 889-97.
  - 23) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National, state, and local area vaccination coverage among children aged 19-35 months—United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2013; 62: 733-40.
  - 24) Hollingsworth R, et al. Pneumococcal conjugate vaccination of older adults: Conjugate or polysaccharide? *Hum Vaccin Immunother* 10 (1) : 2013. [Epub ahead of print]
  - 25) Proctor RA. Challenges for a universal *Staphylococcus aureus* vaccine. *Clin Infect Dis* 2012; 54: 1179-86.
  - 26) Johansen HK, et al. Vaccines for preventing infection with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 6: CD001399.
  - 27) Chiurciu S, et al. Is HCMV vaccine an unmet need? The state of art of vaccine development. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2013; 26: 15-26.

## Abstract

### Recent topics in basic research of pneumonia

Tetsuya Matsumoto

Department of Microbiology, Tokyo Medical University

Basic research of pneumonia has been made from many aspects, and it has yielded many findings. To clarify the pathophysiology of pneumonia and the virulence of respiratory pathogens, an establishment of animal experimental models using mice and other animals is essential. Thus far, animal models of pneumonia in accordance with various pathogens have been reported, including *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Moreover, infection with a single pathogen, mixed infection of *S. pneumoniae*, and influenza virus have also recently attracted attention. Rapid diagnoses based on gene detection and antigen detection are actively studied, and many of these methods have already been used in clinical settings. The development of new antimicrobial agents for various antimicrobial resistant pathogens is expected, but studies of effective antimicrobial therapies with already available antibiotics have been widely studied previously. Various vaccines have also been studied for the prevention of pneumonia, especially infection with *S. pneumoniae*.