

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590911
 研究課題名（和文） マイコプラズマ肺炎におけるリンパ球関連宿主免疫応答の解析
 研究課題名（英文） Analysis of host-defense mechanism in association to lymphocytes in *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia
 研究代表者
 後藤 元 (GOTO HAJIME)
 杏林大学・医学部・教授
 研究者番号：80134617

研究成果の概要：

これまでの医学臨床の現場での観察から「マイコプラズマ肺炎は患者の免疫反応が過剰に起こっているのではないか、また、マクロライド系抗菌薬は、抗菌薬としてではなく、その過剰な免疫反応を抑制しているのではないか」と予想された。そこで、マイコプラズマ肺炎マウスモデルを3種類作成し解析した結果、重症のマイコプラズマ肺炎では免疫反応が関与していること、さらに、クラリスロマイシンには免疫調整作用があることが判った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,400,000	420,000	1,820,000
20年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：感染症・シグナル伝達・微生物・内科・網羅的解析

1. 研究開始当初の背景

マイコプラズマ肺炎は市中肺炎の病原微生物の一つ肺炎マイコプラズマ *Mycoplasma pneumoniae* による呼吸器感染症である。肺炎マイコプラズマの感染症は一般には自然経過で治癒するが一部の患者で重篤化することが知られている。近年、肺炎マイコプラズ

マが喘息の原因となる可能性が指摘されている。さらに、最近では、ステロイドが有効な治療であることが報告され始めている。以上より、マイコプラズマ肺炎は一般の細菌性肺炎とは異なり、肺炎マイコプラズマによる肺炎は、実は、宿主免疫防御 Host defense による免疫の異常ではないかと考えられる。

さて、マイコプラズマ肺炎はマクロライドが抗菌薬の選択肢に選ばれる。マクロライド投与により気管支肺胞洗浄液中のリンパ球のCD4/CD8 比が変化したり、少量マクロライド長期投与することによりびまん性汎細気管支炎 diffuse panbronchiitis (DPB)が改善することが知られており、マクロライドにも抗菌薬以外の作用として免疫調整作用 immunomodulatory effect の存在が想定されている。このように考えると、我々が「マイコプラズマ肺炎をマクロライド系抗菌薬を用いて治療してきた」と信じてきたことは、実は「マイコプラズマが惹起した宿主・ディフェンスの免疫異常をマクロライド系抗菌薬の免疫調整作用で整えた」と考えられた。さらに、マクロライド耐性マイコプラズマによる感染症がマクロライドで治療可能であることも報告も理解できる。そこで

- ①マイコプラズマ肺炎は生菌でなくても菌体成分のみで発症する
- ②上記の炎症は、マクロライド系抗菌薬の免疫調整作用で治療可能であると仮説がたてた。

2. 研究の目的

上記の仮説「マイコプラズマ肺炎は生菌でなくても菌体成分のみで発症し、マクロライド系抗菌薬の免疫調整作用で治療可能である」を証明するため、菌体成分のみによるマイコプラズマ肺炎モデルをマウスを用いて作成し解析することを目的とした。

3. 研究の方法

マイコプラズマ肺炎モデル C・S・K の3種類のモデルマウスを用いて、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞の数およびサイトカイン濃

度を検討した。

方法

(1) マイコプラズマ抽出液

マイコプラズマ菌体は、培養増殖させたマイコプラズマを超音波破碎し、遠心して得られた上清を「マイコプラズマ抽出液」として使用した。

(2) マウス

マウスは BALB/c マウス (♀) を用いた。マウスは SPF の状態で飼育し、杏林大学の規定に従い倫理的かつ動物愛護の観点から取り扱われた。

1) マウスモデルの作成

マウスモデル C・・・上記で作成したマイコプラズマ抽出液を気管内投与した。

マウス K・・・マイコプラズマ抽出液をマウス腹腔内に前投与し、その後さらにマイコプラズマ抽出液を気管投与した

マウスモデル S・・・マイコプラズマ抽出液をアジュバントとともに2回マウス腹腔内に前投与する。その後、気管よりマイコプラズマ抽出液を投与した。

2) マウスの解析

マイコプラズマ抽出液を気管投与を施行した日より第 1, 2, 4, 7 日に採材・解析した。また、薬剤投与を行う場合は、気管投与した日から採材まで毎日、薬剤を経口投与する。薬剤は、クラリスロマイシンを投与し検討した。また、比較の為、デキサメサゾンも投与し検討した。

採材と解析は、気管支肺胞洗浄を行い、洗浄液中の炎症細胞の数的評価を施行し、さらにサイトカインの測定を施行した。また、肺の組織学的評価を免疫染色も含めて施行した。

3) 気管支肺胞洗浄液の解析

気管支肺胞洗浄液中の細胞は、総数と細胞分画を検討し、さらにリンパ球については表面マーカーをフローサイトメトリを用いて解析した。

気管支肺胞洗浄液中のサイトカインは主として Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて測定した。さらに、網羅的な測定も行った。

肺の組織学的検討は、パラフィン切片（厚さ = 3 μm）を作成し、抗サイトカイン抗体で染色した。

4. 研究成果

(1) マイコプラズマ肺炎マウスモデルの作成

1. マウスモデル C

菌体成分を単回投与したところ、大きな炎症反応は得られなかった。

2. マウスモデル K

大腸菌のリポ多糖類 lipopolysaccharide とはことなり、肺炎マイコプラズマには炎症を惹起する物質はあまり含まれない為、マイコプラズマの持続感染と似た病体を作成する為、マイコプラズマ抽出液の3回投与を行ったところ、炎症反応は大きくなり、リンパ球の集簇も認められた。

3. マウスモデル S

さらに免疫学的なメカニズムも検討するため、アジュバントを併用した。その結果、形質細胞とリンパ球の浸潤を認め、重症のヒトマイコプラズマ肺炎の肺組織と非常に類似した組織所見となった。

以上3種類のマウスモデルを比較すると表1の通りとなる。

表1. 各マイコプラズマ肺炎モデルの比較

モデル名称	C	K	S
投与回数	単回	3回	3回
アジュバント	なし	なし	あり
好中球 & マクロファージ	—	+	++
リンパ球	—	+	++
形質細胞	—	—	+

さらに、モデル S のリンパ球について検討を行ったところ、CD4/8 比が著明に低下し CD8 優位であることがわかった (図1)。

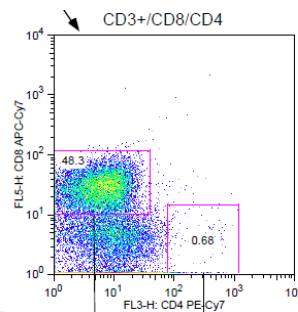


図1. モデル S のリンパ球の解析

興味深いことに、本マウスにマクロライド系抗菌薬であるクラリスロマイシンを投与するとリンパ球の数の減少のみならず、以下の通り、CD4/8 比が増加した (図2)。

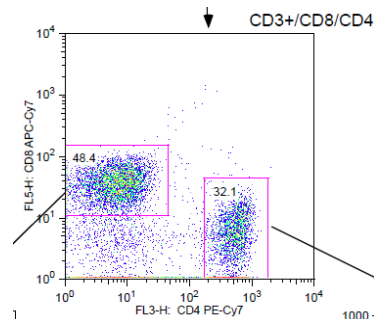


図2. マウス S にクラリスロマイシン投与し多彩のリンパ球の解析

このようにクラリスロマイシン投与により CD4/8 比が改善した。このことから、クラリスロマイシンが免疫調整作用を有することが判った。

以上の研究より、以下の結果が得られた。

(1) 肺炎マイコプラズマの菌体成分により肺炎モデルを作成することが出来た。投与方法によりモデル C、モデル S、モデル K と名付けた。その概要は下表の通りである。

(2) その肺炎モデルには、リンパ球が関与していることが示された。

(3) リンパ球は CD4 優位であるが、クラリスロマイシン投与により CD4/CD8 比を変化させることが可能である

そして、「マイコプラズマ肺炎の菌体成分が惹起した過剰な宿主免疫反応をマクロライド系抗菌薬の免疫調整作用で抑制」しているという臨床現場から得られた仮説がマウスモデルのレベルでは正しいことが証明された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

平成 20 年度

1. Sekine H, Taguchi H, Watanabe H, Kawai S, Fujioka Y, Goto H, Kobayashi H and Kamiya S “Immunological analysis and pathological examination of gnotobiotic mice monoassociated with Mycoplasma pneumoniae” J Med Microbiol 2009; 58: 697-705 査読有

2. 皿谷健、倉井大輔、平尾晋、加藤愛香、和田裕雄、石井晴之、飯原久仁子、藤岡保範、蔵田訓、田口晴彦、神谷茂、岡輝明、明石敏、中垣和英、中田光、後藤元「マイコプラズマ肺炎マウスモデルに対する Clarithromycin の免疫調節作用の検討」Jpn J Antibios 2008; 61 (Supple A): 9-13. 査読有

3. 倉井大輔、皿谷健、和田裕雄、平尾晋、明石敏、神谷茂、後藤元「マイコプラズマ肺炎マウスモデルにおける IL-17 の関与の検討」日本感染症学雑誌 2008; 82:739-740 査読有

4. 皿谷健、後藤元「マイコプラズマ肺炎」日本臨床 2008; 別冊呼吸器症候群 I:249-252 査読無

平成 19 年度

5. 倉井大輔、和田裕雄、皿谷健、石井晴之、田口晴彦、神谷茂、明石敏、後藤元「細菌感染の病原因子マイコプラズマ可溶性抗原を用いた肺炎モデルの検討」感染症学雑誌 2007; 81: 492-493 査読有

[学会発表] (計 6 件)

平成 20 年度

1. 倉井大輔、皿谷健、和田裕雄、平尾晋、明石敏、神谷茂、後藤元「マイコプラズマ肺炎マウスモデルにおける IL-17 の関与の検討」第 83 回日本感染症学会総会 (東京、平成 21 年 4 月 24 日)

2. Hirao S, Saraya T, Kurai D, Wada H, Ishii H, Kurata S, Taguchi H, Kamiya S, Akashi T, Nakagaki K, Nakata K and Goto H “Comparison of immune-modulating effects

among clarithromycin, dexamethasone, and levofloxacin on the murine model of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia.” (Abstract presented in ERS 2008 in Berlin, Germany, 14 Oct 2008)

3. 平尾晋、和田裕雄、皿谷健、三倉真一郎、倉井大輔、石井晴之、中垣和英、明石敏、後藤元「マイコプラズマ菌体抽出物による炎症反応に対するクラリスロマイシンの効果について」第83回日本感染症学会(東京、2009年4月23日)

平成19年度

4. 倉井大輔、和田裕雄、皿谷健、石井晴之、田口晴彦、神谷茂、明石敏、後藤元「細菌感染の病原因子マイコプラズマ可溶性抗原を用いた肺炎モデルの検討」第82回日本感染症学会総会(松江市、2007年4月17日)

5. Kurai D, Saraya H, Wada H, Ishii H, Goto H, Iihara K, Fujioka Y, Taguchi S, Kmiya S, Oka T, Nakagaki K, Nakata K and Akashi T “Involvement of lymphocytes in *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia is associated with elevation in KC, IL-6 and TNF-alpha levels in bronchoalveolar lavage fluid.” *Eur Respir J* 2007; 30: 722s (Presented in ERS 2007 in Stockholm, Sweden, 19 September 2007)

6. Saraya T, Wada H, Kurai D, Ishii H, Aoshima M, Horie S, Oka T, Iihara K, Fujioka Y, Kurata S, Taguchi H, Kamiya S, Nakata K, Nakagaki K, Akashi T and Goto H “Involvement of lymphocytes in the murine model of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia” *Am J Respir Crit Care Med*

2007; 176: A876 (Presented in ATS 2007 in San Francisco, 22 May 2007)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕
特記事項なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
後藤元 (Goto Hajime)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号:

(2) 研究分担者
(平成19年度)
和田裕雄 (WADA HIROO)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号: 50407053

飯原久仁子 (IIHARA KUNIKO)
杏林大学・医学部・准教授
研究者番号: 40306676

中垣和英 (NAKAGAKI KAZUHIDE)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授
研究者番号: 00247082

(3) 連携研究者
(平成20年度)
和田裕雄 (WADA HIROO)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号: 50407053