

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 加藤 秀哉

### 論文題目

Intravenous Immunoglobulin for Acute Lung Injury and Bacteremia in *Pseudomonas Aeruginosa* Pneumonia

### 論文内容の要旨

緑膿菌性肺炎は、免疫不全患者や人工呼吸管理中の患者に発生し、急性肺傷害や続発性敗血症を引き起こす。また、人工呼吸管理中の患者における肺炎の合併は、ventilator-associated pneumonia (VAP)と呼ばれ高い死亡率を認めるが、VAPの起炎菌が緑膿菌である場合には死亡率がさらに上昇する。

一方、緑膿菌を含めて多くのグラム陰性桿菌は、相同性の高いⅢ型分泌システムと呼ばれる毒素分泌を介してその病原性を発揮することが近年解明されてきた。このⅢ型分泌システムでは、病原性グラム陰性桿菌は特殊な分泌装置を通して標的眞核細胞の細胞質内に毒素を直接注入することで病原性を発揮する。緑膿菌では、これまでに4つのⅢ型分泌毒素、ExoS、ExoT、ExoU、ExoYが発見されている。特にExoUはホスホリパーゼA<sub>2</sub>活性を持ち、肺上皮細胞や肺胞マクロファージに注入されることで、細胞の壊死を誘導し、急性肺傷害を引き起こす。さらに緑膿菌Ⅲ型分泌システムをブロックできる標的としてV抗原(PcrV)と呼ばれるタンパク質が発見され、ヒト化された抗PcrV抗体が開発され、現在欧米で臨床試験が行われてきた。

本研究では、市販のガンマグロブリン製剤がこれらのⅢ型分泌システムに起因する病原毒性にどの程度対抗できうるかについて、マウス緑膿菌性急性肺傷害モデルを用いて検討した。致死量( $1.5 \times 10^6$  CFU/mouse)の緑膿菌PA103株をマウス(ICR、雄)の肺内に経気管的に投与し緑膿菌性肺炎モデルを作製した。ガンマグロブリン製剤(献血ヴェノグロブリンIH5%静注®、最大量2.5 mg/mouse、日本血液機構)を、1) 緑膿菌と混ぜた上で経気管的(premixed)、2) 緑膿菌投与1時間前に静脈内(予防的)、3) 緑膿菌投与1時間後に静脈内(治療的)と、計3通りの方法で投与し、その効果についてアルブミンを投与されたコントロール群との比較検討を行った。

緑膿菌投与から24時間に渡って生存率・体温経過をモニタリングした。また、血中の細菌数・サイトカイン(インターロイキン-1 $\beta$ 、インターロイキン-6、Tumor necrosis factor- $\alpha$ )濃度・白血球数と肺内の細菌数を測定し、肺浮腫の程度を評価し対照群(アルブミン投与群)との比較検討を行った。ガンマグロブリン

製剤投与群では、上記3通りいずれの方法においても24時間後の生存率の有意な改善を認めた。また、肺浮腫の悪化、肺内細菌数、血中細菌数の有意な減少を認めた。

次に、京都府立医科大学附属病院で分離された耐性緑膿菌2株(PAR001、PAR004株)(ともにカルバペネム、アミノグリコシド、フルオロキノロンの3剤耐性)についてもガンマグロブリン製剤投与の効果について検討を行った。ガンマグロブリン製剤を静脈内投与した1時間後に、致死量( $1 \times 10^7$  CFU/mouse)の臨床株を経気管的に投与して、生存率・体温経過を含む各評価項目について、アルブミンを投与されたコントロール群との比較検討を行った。その結果、臨床2株に対してもガンマグロブリン製剤投与は生存率・体温経過の改善を認め、肺浮腫の改善、肺内・血中細菌数の減少を認めた。

最後に、特異抗体分画を除去したガンマグロブリン製剤の効果を検討した。遺伝子組み換え緑膿菌PcrVタンパクを精製して、アフィニティカラムを作成し、ガンマグロブリン製剤中の抗PcrV抗体を吸着させ、製剤中に含まれる抗PcrV抗体分画を除去した。ELISA法を用いて抗体価を測定して特異抗体の除去を確認した。この製剤を致死量のPA103株とともに気管内投与し効果を検証したが、緑膿菌性急性肺傷害に対する保護効果は残存していた。次に、ホルマリンを用いて緑膿菌PA103株の表面抗原に結合するガンマグロブリン製剤中の抗体分画を除去した。この製剤についても緑膿菌性急性肺傷害に対する保護効果は残存していた。最後に、ガンマグロブリン製剤中の上記2抗体分画を除去した製剤を用いて効果を検証した。その結果、2抗体分画を除去した製剤では通常ガンマグロブリン製剤と比較して有意に生存率の低下を認め、肺浮腫悪化や肺内細菌数増加を認めた。

本研究では、ガンマグロブリン製剤の気管内、予防投与、そして治療投与は緑膿菌性急性肺傷害を有意に改善させた。その効果は、多剤耐性の臨床分離株においても確認された。メカニズムとして、緑膿菌のⅢ型分泌毒性に対する改善のメカニズムとして、ガンマグロブリン製剤中に含有される緑膿菌V抗原に対する抗体分画と緑膿菌の表面抗原に対する抗体分画の両者が協調的に作用して緑膿菌のⅢ型分泌毒性に対抗していることが示唆された。

ガンマグロブリン製剤は、これまで重症感染症や敗血症に対しての補助的治療としての位置付けがなされてきた。一方、近年、重症化した緑膿菌性肺炎では、多剤耐性でかつ緑膿菌のⅢ型分泌毒性の高い菌株の分離が増加してきている。抗菌薬だけに頼らない緑膿菌性肺炎に対する予防・治療方法のひとつとしてガンマグロブリン製剤の投与が有用であることが示唆された。