

Haemophilus influenzae 呼吸器感染症に関する 臨床的および基礎的検討

奈良県立医科大学第2内科学教室

辻 本 正 之

STUDY ON RESPIRATORY INFECTION DUE TO *Haemophilus influenzae*

MASAYUKI TSUJIMOTO

The Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received February 23, 1998

Abstract : The present study was performed to analyze the clinical features of respiratory tract infection due to *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) based on the study of bacteriology using the method of transtracheal aspiration (TTA) and that of outer membrane protein (OMP) profiles by SDS-PAGE. This study included an attempt to isolate the active moiety of cytotoxicity against bronchial epithelial cells from *H. influenzae*.

The following results were obtained :

(1) In acute respiratory tract infection due to *H. influenzae*, polymicrobial infection with *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) and *Neisseria* sp., as well as immunological status of patients were involved in contraction of pneumonia. In bronchitis cases, although many cases were monomicrobial infection, polymicrobial with α -*streptococcus* was found in some cases.

(2) In patients with chronic lower respiratory tract infection (CLRTI) due to *H. influenzae*, changes in OMP of this pathogen were closely associated with acute exacerbation of CLRTI.

(3) In patients with CLRTI due to *H. influenzae*, the administration of clarithromycin (CAM) resulted in decrease in serum IL-6 levels during the early phase of treatment. This effect lasted as long as treatment of CAM was continued.

(4) The protein with a molecular weight of 14 kDa, as determined by SDS-PAGE, was purified by ion-exchange chromatography, gel-filtration and chromatofocusing, and was found to exhibit cytotoxicity against cultured normal human bronchial epithelial cells.

These results suggest that respiratory infection caused by *H. influenzae* includes a variety of clinicopathological features, and that this pathogen may directly cause bronchial epithelial damage by releasing a cytotoxic protein. Moreover, treatment of CAM may relieve CLRTI patients from sustained inflammation in the airway by suppressing IL-6 production.

Index Terms

Haemophilus influenzae, acute respiratory infection, chronic lower respiratory tract infection, transtracheal aspiration, outer membrane protein

緒 言

Haemophilus influenzae (*H. influenzae*)は1892年にPfeifferがインフルエンザ患者の喀痰から分離した偏性好気性小グラム陰性桿菌¹⁾で、Pittmanが1931年、莢膜形成株と莢膜非形成株とに分類している²⁾。莢膜形成株は血清学的にa, b, c, d, e, fに分類される typable strainで、特にその中でtype 6株が全身感染症を含む主な*H. influenzae*感染症の起因菌とされている。莢膜非形成株は血清型のない non-typable strainで通常全身感染症の起因菌ではないが、呼吸器感染症では最も重要な起因菌であるとして知られている³⁾。本菌の呼吸器感染症には急性呼吸器感染症と慢性下気道感染症とがあり、前者では、*Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, 後者では、*S. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* とならんで主要検出菌である^{3,4)}。

しかし実際に本菌による呼吸器感染症の病態を詳細に検討した報告はなく、また呼吸器障害の機序の検討も行われていない。

本研究では*H. influenzae*呼吸器感染症の実態を解析しサイトカインの関与、*H. influenzae*の気道上皮障害の機序を検討し、新たな知見を得たので報告する。

対 象 と 方 法

I) *H. influenzae* 呼吸器感染症病態の検討

1) *H. influenzae* 急性呼吸器感染症病態の検討

A) 対象

対象は1987年5月から1995年4月の間に当科でTranstracheal aspiration(TTA)を施行し、*H. influenzae*を検出した急性呼吸器感染症26例27回(男性24例、女性2例平均年齢48.6±15.1歳)である。

B) 方法

症例を気管支炎例と肺炎例とにわけ、臨床所見、検出菌の状況、予後、改善までの治療期間を検討した。

気管支炎例とは(1)急性の膿性喀痰の出現、(2)胸部X線写真上新たな炎症性陰影がない、(3)37.5℃以上の発熱、(4)末梢血中白血球数10000/μl以上またはCRP 1.0 mg/dl以上の増加の4項目のうち(1)(2)を必須条件とし(3)または(4)を満たして慢性下気道感染症のない症例とした。肺炎例とは(1)胸部X線写真上新たな炎症性陰影の出現、(2)37.5℃以上の発熱、(3)末梢血中白血球数10000/μl以上またはCRP 1.0 mg/dl以上の増加を認めた症例とした。

TTAの方法は、前頸部をポピドンヨード溶液で消毒

し甲狀輪状靱帯部を1%リドカインで局所麻酔後、16Gベニューラ静脈留置針で穿刺、外針を気管内に送り、内針を抜去後50 mlの注射器に接続し気道分泌物を吸引、採取する。検体採取後直ちに嫌気ポータに移し、グラム染色と好気、嫌気細菌培養とを施行するものである。培養にはBTB培地、馬溶血培地、羊血液寒天培地、チョコレート寒天培地、BHK寒天培地、サブロー培地、PPLO培地を用いた。

2) *H. influenzae* 慢性下気道感染症病態の検討

A) 対象

対象は1987年5月から1995年4月の間に当科でTTAを施行し、*H. influenzae*を検出した明らかな慢性下気道感染症の病歴を有する38例40回(男性30例、女性8例、平均年齢43.6±17.3歳)、びまん性汎細気管支炎8例8回、気管支拡張症4例4回、慢性気管支炎26例28回である。

B) 方法

慢性下気道感染症とは慢性気管支炎、気管支拡張症、びまん性汎細気管支炎にみられる気道の持続的細菌感染とされるが⁵⁾、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、持続的膿性喀痰はあるが量は比較的一定で臨床症状が安定した時期を安定期と定義し、この二つの時期での病態、背景因子、検出菌の状態を検討した。特に検出菌の状況は単独菌と複数菌検出とを比較検討し、菌量は半定量法を用いて検討した(Table 1)。

II) *H. influenzae* 慢性下気道感染症の *H. influenzae* の outer membrane protein(OMP) profiles の変化と病態の関連性との検討

A) 対象

対象は、喀痰から*H. influenzae*を検出した慢性下気道感染症10例(男性7例、女性3例、平均年齢42.2±18.3歳)で、安定期で持続的に膿性喀痰を有する症例で、慢性気管支炎5例、気管支拡張症5例である。

Table 1. Grading of bacterial colonization in the sputum

Grade	CFU/ml
4+	>10 ⁵
3+	3×10 ⁴ —10 ⁵
2+	10 ⁴ —5×10 ⁴
1+	10 ⁴
S	<10 ⁴

B) 方法

H. influenzae 慢性下気道感染症を有する患者から1カ月間隔で喀痰を採取し, *H. influenzae* を分離, Fildes 寒天培地上で5% CO₂, 37°C下で24時間培養した. 培養後に培地上のコロニーを Tris-HCl buffer(pH 8.3)に懸濁し, 超音波破砕器(UP-200[®], TOMY 社製, 東京)で180 W, 1分間氷冷下超音波破砕を行った後, 4°Cで12000×g 40分間遠心した. この操作を3回繰り返す, 上清を蛋白濃度 5.0 mg/ml に調整して外膜蛋白(OMP)標品として保存した. 同一患者から1カ月間隔で得られた2株の *H. influenzae* の OMP を, SDS-poly-acrylamid gel electrophoresis(SDS-PAGE)で比較し, 菌株の同一性を検討した. また, 第2回目の株採取後2カ月までの臨床症状を比較し病態と菌株との変化の関連性を検討した. SDS-PAGE の泳動 sample(1 mg/ml)は sample buffer で可溶化後100°C5分加熱したものを, 1レーンあたり10 μl 量を泳動した. SDS-PAGE は12.5% non-gradient minigel PAGE(PAGE L 12.5[®], ATTO 社製, 東京)を用い, 4°C, 10 mA で電気泳動を行った. gel は Coomassie brilliant blue[®]で染色した.

III) *H. influenzae* 慢性下気道感染症の病態と炎症性サイトカインの変動との検討

1) 慢性下気道感染症の病態と血清中 inter leukin-6(IL-6), tumor necrosis factor α(TNF-α)との関連(*H. influenzae* と *P. aeruginosa* との比較)

A) 対象

対象は合併症のない慢性下気道感染症患 40 例(男性 25 例, 女性 15 例, 平均年齢 64.0±8.3 歳)で, びまん性汎細気管支炎 12 例, 気管支拡張症 13 例, 慢性気管支炎 15 例, 安定期 10 例, 急性増悪期 30 例である. *H. influenzae* 慢性下気道感染症 19 例, *P. aeruginosa* 慢性下気道感染症 21 例で, 3 カ月以上 Clarithromycin(CAM)200-400 mg/日もしくは Erythromycin(EM)600-1200 mg/日の経口投与を受けている.

B) 方法

患者に説明を行い同意を得た上で血液を採取し, 血清分離後測定まで-80°Cで保存した. 血清 IL-6, TNF-α 濃度の測定は, 高感度 ELISA キット(R & D 社製, Quantikine HS[®], 最低検出感度 0.1 pg/ml)で測定した.

2) 慢性下気道感染症の CAM 治療による血清 IL-6 の変動の検討

A) 対象

対象は, 過去にマクロライド系抗菌薬服用歴のない,

安定期 *H. influenzae* 慢性下気道感染症患者 8 例(男性 7 例, 女性 1 例, 平均年齢 65.4±3.8 歳), 慢性気管支炎 4 例, 気管支拡張症 4 例である. 対照群は, 1年以上 CAM を服用している安定期 *H. influenzae* 慢性下気道感染症患者 8 例(男性 8 例, 平均年齢 66.4±9.2 歳)と健康人 14 例(男性 12 例, 女性 2 例, 平均年齢 51.3.4±11.5 歳)である.

B) 方法

対象者全員に説明を行い同意を得た上で, 慢性下気道感染症症例には治療目的で CAM 400 mg/日を経口投与し, その直前と 28 日後に血液を採取し, 血清分離後測定まで-80°Cで保存した. 血清 IL-6 濃度の測定は, 高感度 ELISA キット(R & D 社製, Quantikine HS[®], 最低検出感度 0.1 pg/ml)を用いて測定した. 細菌学的効果は喀痰中菌量を半定量化して判定した(Table 1).

IV) *H. influenzae* 菌体蛋白精製と菌体蛋白とによる気道上皮細胞障害活性

(1) *H. influenzae* 菌体蛋白の精製

A ; 材料

慢性下気道感染症患者の TTA から分離し, X, V 因子要求性で同定した *H. influenzae* 臨床分離株を使用した. 分離株を 3%馬血液加 brain heart infusion broth[®] (Difco 社製, ミシガン州, アメリカ合衆国)で 37°C 5% CO₂環境下で 24 時間培養した.

B ; 方法

H. influenzae 菌体蛋白の精製: 菌浮遊培養液を 4000×g, 15 分間遠心し, 得た菌体を phosphate-buffered saline (PBS)に浮遊させ, 超音波破砕装置(UP-200[®], TOMY 社製, 東京)で菌体を 180 W, 2 分間破砕後, 12000×g, 40 分間遠心した. この操作を 3 回反復し, 上清を *H. influenzae* 菌体抽出標品としてプールした. *H. influenzae* 菌体抽出標品を phosphate buffer(PB)に対して 24 時間透析し, 同 buffer で平衡化した DEAE Sephacel[®] (スエーデン, Pharmacia Biotech 社製)を用いて 0.1-1 M NaCl の linea gradient 下で蛋白を分離した(1 次分画). 得られた各分画を PBS に対して 24 時間透析後培養気道上皮細胞に対する細胞障害活性を測定した. 細胞障害活性の認められた分画を, Sephadex G-100[®]を用いたゲル濾過(Pharmacia Biotech 社製)で分画(2 次分画)した. ゲル濾過で得られた分画を pH 8.3-0.025 M Tris-acetate buffer に対して 24 時間透析後, PBE 94 polybuffer exchanger[®](Pharmacia Biotech 社製)クロマトフォーカシングカラムに添加し 30% polybuffer 96 と 70% polybuffer 74 の混合液(希釈率 1:10, pH 5.0)で蛋白の溶出を行った(3 次分画). 分離蛋白分画は飽和

硫酸で24時間塩析して polybuffer を除去後, PBS に対して8時間以上透析し精製最終標品とした. 以上の過程はすべて4°C下に行った.

気道上皮細胞障害試験: ヒト培養気道上皮細胞はCryo NHBE(アメリカ合衆国, Clonetics 社製)を用いた. 培養気道上皮細胞(10^5 /ml)を96穴平底プレートにて24時間培養後, *H. influenzae* 蛋白分画各希釈液を培養液の10%の濃度で添加した. 培養にはBE-GM 無血清気管支上皮細胞増殖培養液[®](Clonetics 社製)を用いて, 37°C 5% CO₂下でサンプル添加後48時間培養し, 菌体抽出標品と1, 2次分画標品に対してMTT法のCell-Titer 96[®](アメリカ合衆国, Proigma 社製), 3次分画標品に対してはLDH測定法のCytotox 96[®](Proigma 社製)を用いて, 各蛋白分画の気道上皮細胞障害活性を測定した.

SDS-PAGE: 気道上皮細胞障害活性を認めた蛋白分画のSDS-PAGEは非還元下と β MEによる還元下で行った. SDS-PAGEは12.5% non-gradient minigel PAGEL 12.5 L[®](ATTO 社製)で, 10 mA, 4°C下で行った.

V) 統計学的検討

本研究の測定値は平均値±標準偏差で示し, 統計学的

検定には 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) *H. influenzae* 呼吸器感染症の臨床的検討

1) *H. influenzae* 急性呼吸器感染症病態の検討

検討症例中, 気管支炎例が14例15回, 肺炎例12例12回であった. 背景因子は, 気管支炎例, 肺炎例とも肺癌, 陳旧性肺結核など, 局所気道障害を示唆するものが多かった. 病態別には, 肺炎例は気管支炎例と比較して, 有意に体温, 末梢血白血球数が高値, 動脈血酸素分圧, 血清アルブミン濃度が低値, 改善までの治療期間が長かった($p < 0.05$)(Table 2).

検出菌の検討では, *H. influenzae* 単独検出は8例8回, *H. influenzae* を含む複数菌検出は18例19回であった. 気管支炎例と比較して肺炎例に有意に複数菌検出が多かった($p < 0.05$). 複数菌検出例での同時検出菌は, 気管支炎例で *α -streptococcus sp.*, 肺炎例で *S. pneumoniae*, *Neisseria sp.*, *M. catarrhalis* が多かった (Table 3). 検出菌と臨床指標との関連では, 複数菌検出例が単独菌検出例と比較して, 有意に高齢, 動脈血酸素

Table 2. Clinical features and background of patients with acute respiratory tract infection with *H. influenzae*

Factors	Number of episodes		
	Total	Bronchitis	Pneumonia
	27	15	12
Sex			
Male	19	10	9
Female	8	5	3
Age (years old)	66.9±11.1	65.8±8.6	68.3±13.9
Underlying disease			
(-)	2	2	0
(+)	25	12	13
Lung cancer	9	5	4
Old tuberculosis	5	3	5
Pulmonary emphysema	2	1	1
Interstitial pneumonia	2	1	1
Bronchial asthma	1	0	1
Non respiratory disease	6	3	3
Smoking Index	804.3±325.1	862.5±325.2	692.4±290.1
Fever (°C)		37.8±0.4	38.8±0.3 *
CRP (mg/dl)		5.7±3.9	11.4±9.3 *
WBC (/ μ l)		7945.5±2381.5	12290.1±5441.8 *
PaO ₂ (torr)		76.2±10.5	67.1±9.94 *
Albumin (g/dl)		3.7±0.4	2.9±0.6 *
Duration of illness (Day)		13.1±4.4	17.5±3.1 *

* $p < 0.05$

分圧, 血中アルブミン濃度が低値, 重喫煙であり ($p < 0.05$), また改善までの治療期間が長い傾向を認めた (Table 4). 気管支炎例に限ると, 複数菌検出例が単独菌

検出例と比較して, 有意に高齢, 血中 CRP 高値, 動脈血酸素分圧低値, 血清アルブミン濃度低値, 重喫煙であった ($p < 0.05$) (Table 5).

Table 3. Microorganisms of acute respiratory tract infection with *H. influenzae*

Type of infection	Number of episodes		
	Total	Acute bronchitis	Pneumonia
Monomicrobial cases	8	7	1
Polymicrobial cases	19	8	11
			* : $p < 0.05$
Bacteria co-isolated with <i>H. influenzae</i>			
<i>S. pneumoniae</i>	6	1	5
<i>Neisseria sp.</i>	5	0	5
<i>α-streptococcus subsp.</i>	5	5	0
<i>Moraxella catarrhalis</i>	3	1	2
<i>S. mitis</i>	2	1	1
<i>P. aeruginosa</i>	1	0	1
<i>Acinetobacter antratus</i>	1	1	0
<i>Citrobacter sp.</i>	1	0	1
<i>S. sangis</i>	1	0	1
<i>S. epidermidis</i>	1	0	1
<i>S. aureus</i>	1	0	1
<i>Providentia sp.</i>	1	0	1

Table 4. Relationship between clinical features and microorganism in acute respiratory infection with *H. influenzae*

Factors	Monomicrobial 9 episodes	Polymicrobial 18 episodes
Age	59.3 \pm 10.8	72.1 \pm 8.1 *
CRP (mg/dl)	5.8 \pm 6.3	10.2 \pm 8.9
WBC (/ μ l)	8525.0 \pm 2986.0	11028.6 \pm 5679.3
PaO ₂ (torr)	79.3 \pm 9.5	67.1 \pm 9.2 *
Fever (°C)	37.9 \pm 0.6	38.4 \pm 0.5
Albumin (g/dl)	3.8 \pm 0.5	3.2 \pm 0.3 *
Brinkman Index	530 \pm 112.2	878 \pm 257.2 *
Duration of illness (day)	13.8 \pm 3.8	16.8 \pm 4.1

* : $p < 0.05$ Table 5. Relationships between clinical features and microorganism in acute bronchitis with *H. influenzae*

	Monomicrobial 7 episodes	Polymicrobial 8 episodes
Age (years old)	61.2 \pm 9.2	40.4 \pm 6.4 *
CRP (mg/dl)	1.8 \pm 2.1	29.8 \pm 6.3 *
WBC (/ μ l)	7424.0 \pm 837.3	8420.2 \pm 3212.2
PaO ₂ (torr)	83.9 \pm 9.8	68.0 \pm 6.7 *
Fever (°C)	37.6 \pm 0.3	38.1 \pm 0.46
Albumin (g/dl)	3.7 \pm 0.3	3.2 \pm 0.4 *
Brinkman Index	574 \pm 212.2	645 \pm 425.2 *
Duration of illness (day)	12.3 \pm 6.2	19.0 \pm 5.4

* : $p < 0.05$

2) *H. influenzae* 慢性下気道感染症の病態の検討

(i) 感染型の検討；38例40回の内訳は、安定期12例13回、急性増悪期26例27回で、急性増悪期の病態は肺炎型7例7回、気管支炎型19例20回であった。急性増悪期の肺炎例では、気管支炎例に比較して基礎疾患を有する例が有意に多かった($p < 0.05$) (Table 6).

(ii) 検出菌の検討；検出菌は、*H. influenzae* 単独菌検出は20例21回(52.5%)、*H. influenzae* を含む複数菌検出は18例19回(47.5%)、安定期では、単独菌検出7例7回(53.8%)、複数菌検出5例6回(46.2%)と差を認めなかった。急性増悪期の肺炎型で単独菌検出1例1回(14.3%)、複数菌検出6例6回(85.7%)、気管支炎型で単独菌検出12例13回(65.0%)、複数菌検出7例7回

(35.0%)と、肺炎型に有意に複数菌検出が多かった($p < 0.05$)。同時検出菌は安定期で *S. pneumoniae*, *Neisseria sp.*, α -*streptococcus sp.*, *P. aeruginosa* が多く、急性増悪期の肺炎型で *S. pneumoniae*, 気管支炎型では *Neisseria*, α -*streptococcus sp.*が多かった (Table 7).

(iii) 臨床経過の検討；急性増悪例26例27回のうち、前後のTTAもしくは喀痰から検出菌が同定された24例25回を検討し、その臨床経過から *H. influenzae* が関与する臨床型を分類した。(1) I型(9例9型)(Fig. 1)；*P. aeruginosa* 単独の持続感染があり、急性増悪期に *H. influenzae* が出現するが、抗菌薬治療で再び *P. aeruginosa* 単独となった。*H. influenzae* 検出時に *P. aeruginosa* の菌量は減少した。(2) II型(8例8回)(Fig.

Table 6. Clinical features and background of patients with chronic lower respiratory tract infection with *H. influenzae*

Factors	Total	Stable	Acute Exacerbation	
			Pneumonia	Bronchitis
number of episodes	40	13	27	
underlying disease (-)	12	3	7	20
underlying disease (+)	28	10	0	9
Old pulmonary tuberculosis	8	2	7	11
Diabetes mellitus	8	4	2	4
Rheumatoid arthritis	4	1	1	3
Congestive heart failure	4	1	1	2
Idiopathic interstitial pneumonia	5	2	1	2
Laryngeal cancer	1		2	1
Pneumoconiosis	1		1	1

] $p < 0.05$ Table 7. Microorganism of chronic lower respiratory tract infection with *H. influenzae* (number of episodes)

	Total	Stable	Acute Exacerbation	
			Pneumonia	Bronchitis
Monobacterial infection of <i>H. influenzae</i>	21	7	1	13
Polybacterial infection of <i>H. influenzae</i>	19	6	6	7
Bacteria co-isolated with <i>H. influenzae</i>				
<i>S. pneumoniae</i>	10	3	5	2
<i>Neisseria sp.</i>	7	3	0	4
α - <i>streptococcus subsp.</i>	6	2	0	4
<i>S. aeruginosa</i>	4	2	1	1
<i>M. catarrhalis</i>	2	1	0	1
γ - <i>streptococcus subsp.</i>	1	0	0	1
<i>Fusobacterium sp.</i>	1	0	0	1

] $p < 0.05$

2) ; *H. influenzae* 単独で持続的に検出され、急性増悪期にも *H. influenzae* 単独で検出された。先行する virus 感染と考えられる上気道炎症状が 6 例 6 回に認められた。

(3) III型(4 例 5 回)(Fig. 3) ; *H. influenzae* が単独で持続的に検出され、急性増悪期には *H. influenzae* 以外の菌が重複感染するが、抗菌薬治療後再び *H. influenzae*

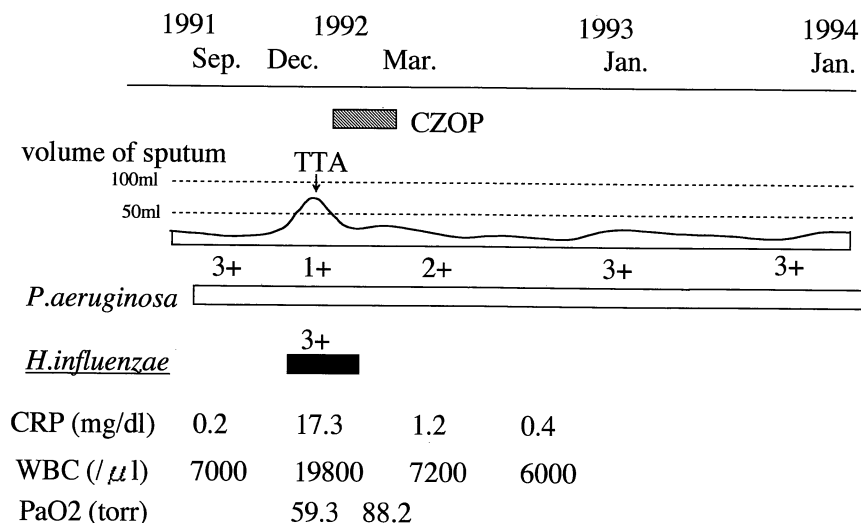


Fig. 1. A case of Type I (29 y/o, female) Bronchiectasis

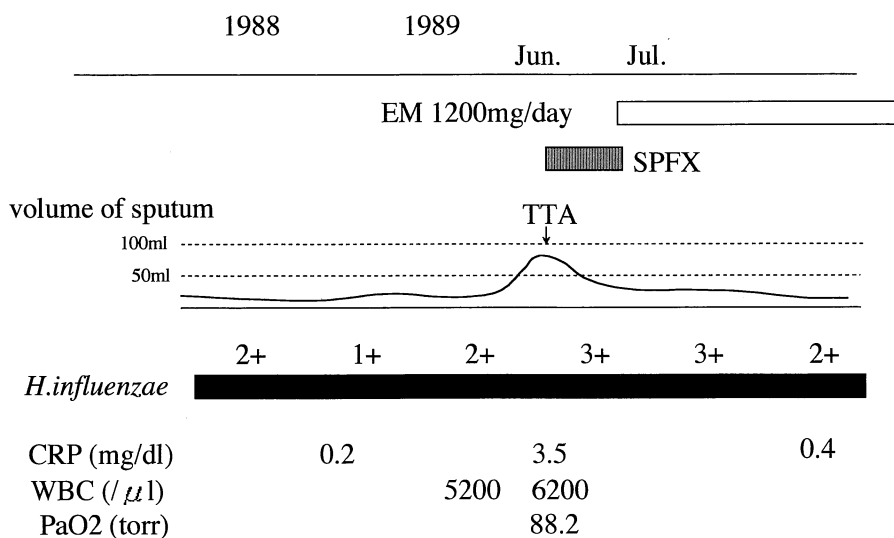


Fig. 2. A case of Type II (61 y/o, female) Bronchiectasis

単独検出となった。全例が同時に *S. pneumoniae* を検出し、*S. pneumoniae* の検出時に *H. influenzae* の菌量は全例で減少し、*S. pneumoniae* の菌量より少なかった。

(4)IV型(3例3回)(Fig. 4)；*H. influenzae* が持続的に単独検出され、急性増悪期にも *H. influenzae* が単独検出されるが抗菌薬治療の一カ月以内に、*P. aeruginosa* に

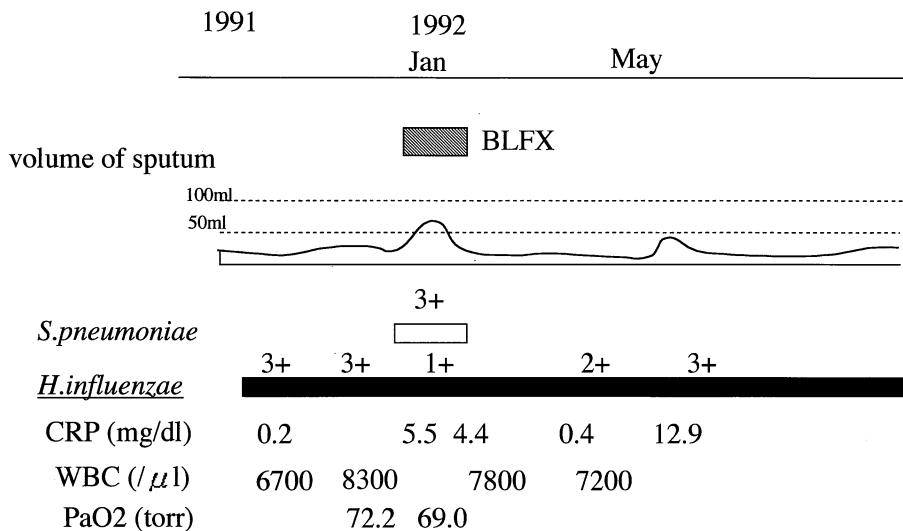


Fig. 3. A case of Type III (57 y/o, female) Chronic bronchitis

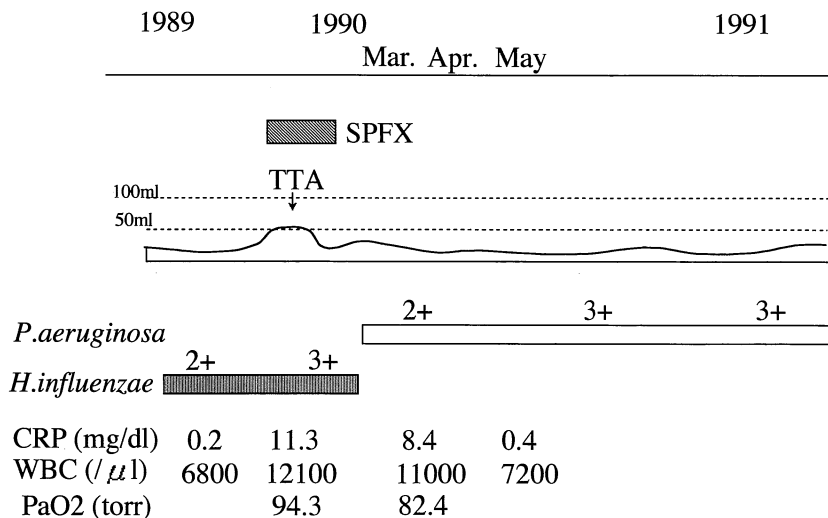


Fig. 4. A case of Type IV (78 y/o, male) Chronic bronchitis

菌交代した。急性増悪時、*H. influenzae* の菌量は全例で増加した。I型、II型は気管支炎型、III型は肺炎型が多かった。各臨床型間で病態と臨床検査所見とを比較すると、II型は他の型に比較して有意に動脈血酸素分圧低下が少なく($p < 0.05$)治療期間が短かった($p < 0.05$)。またII型は、III型、IV型とに比較して有意に末梢白血球数の増加が少なかった($p < 0.05$)。またIV型はIII型と比較して血清アルブミン値が有意に低値であった($p < 0.05$) (Table 8)。

II) 慢性下気道感染症の *H. influenzae* の OMP パターンの変化と病態との関連性の検討

SDS-PAGE による OMP パターンは、6例で変化し (Fig. 5-a) (変化群)、4例で同一であった (同一群) (Fig. 5-b)。株採取後2カ月の観察では、変化群では6例中4例がII型の急性増悪を生じたが、同一群では急性増悪を生じた症例はなかった (Table 9)。

III) *H. influenzae* 慢性下気道感染症病態と炎症性サイトカインの変動との検討

1) 慢性下気道感染症病態と血清 IL-6、TNF- α 濃度との関連 (*H. influenzae* と *P. aeruginosa* との比較)

血清 IL-6 濃度と血清 TNF- α 濃度とは安定期と比較して急性増悪期に有意に高値 ($p < 0.01$)、安定期でも対照と比較して有意に高値であった ($p < 0.05$) (Fig. 6, 7)。

検出菌別の比較では、*H. influenzae* 慢性下気道感染症

における血清 IL-6 濃度が急性増悪期に有意に高値であった ($p < 0.05$)。血清 TNF- α 濃度は急性増悪期と安定期とで差はなかった (Fig. 8)。*P. aeruginosa* 慢性下気道感染症では血清 IL-6、TNF- α 濃度が急性増悪期は安定期と比較して有意に高値であった ($p < 0.05$) (Fig. 9)。

病態別の *H. influenzae* と *P. aeruginosa* 慢性下気道感染症との血清 IL-6、TNF- α 濃度の比較では、急性増悪期では血清 IL-6、TNF- α 濃度は *H. influenzae* 慢性下気道感染症が有意に低値であった ($p < 0.01$) (Fig. 10)。安定期では血清 IL-6、TNF- α 濃度とも *P. aeruginosa* 慢性下気道感染症と *H. influenzae* 慢性下気道感染症との間に差を認めなかった (Fig. 11)。

2) 慢性下気道感染症の CAM 治療による血清 IL-6 濃度の変動の検討

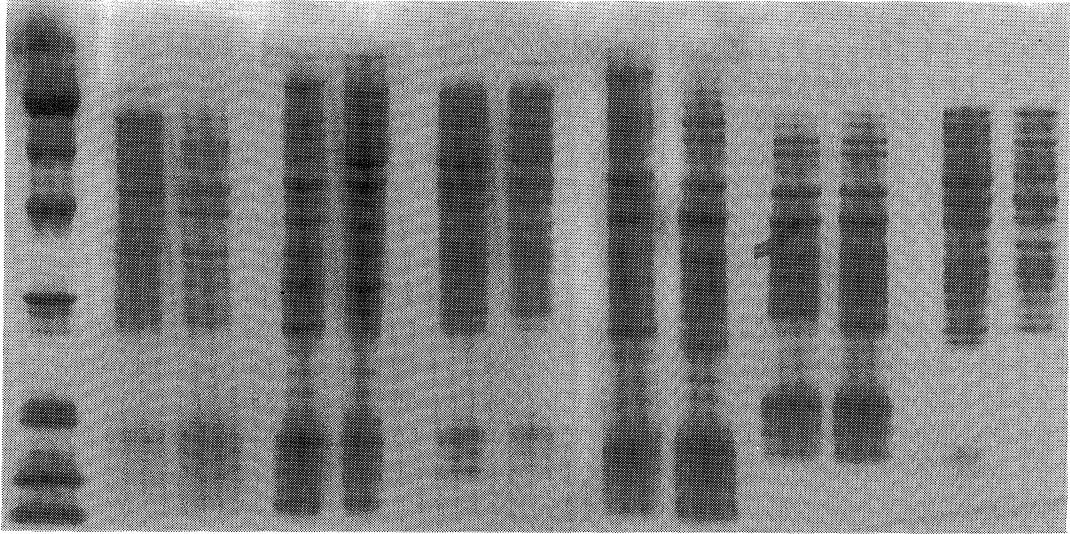
血清 IL-6 濃度は全例で測定可能で、*H. influenzae* 慢性下気道感染症の CAM 投与前の血清 IL-6 濃度は投与28日後の血清 IL-6 濃度と比較して有意な低下を認めた ($p < 0.001$) (Fig. 12)。また、投与28日後の血清 IL-6 濃度は、安定期 CAM 長期投与例との間に有意差を認めなかったが、対照と比較して、有意に高値であった ($p < 0.05$) (Fig. 13)。

なお全例で喀痰量は著明な減少を認めた。細菌学的効果は8例中2例で *H. influenzae* の消失、6例で菌量の低下を認めた (Table 10)。

Table 8. Classification of the exacerbation in chronic lower respiratory tract infections with *H. influenzae*

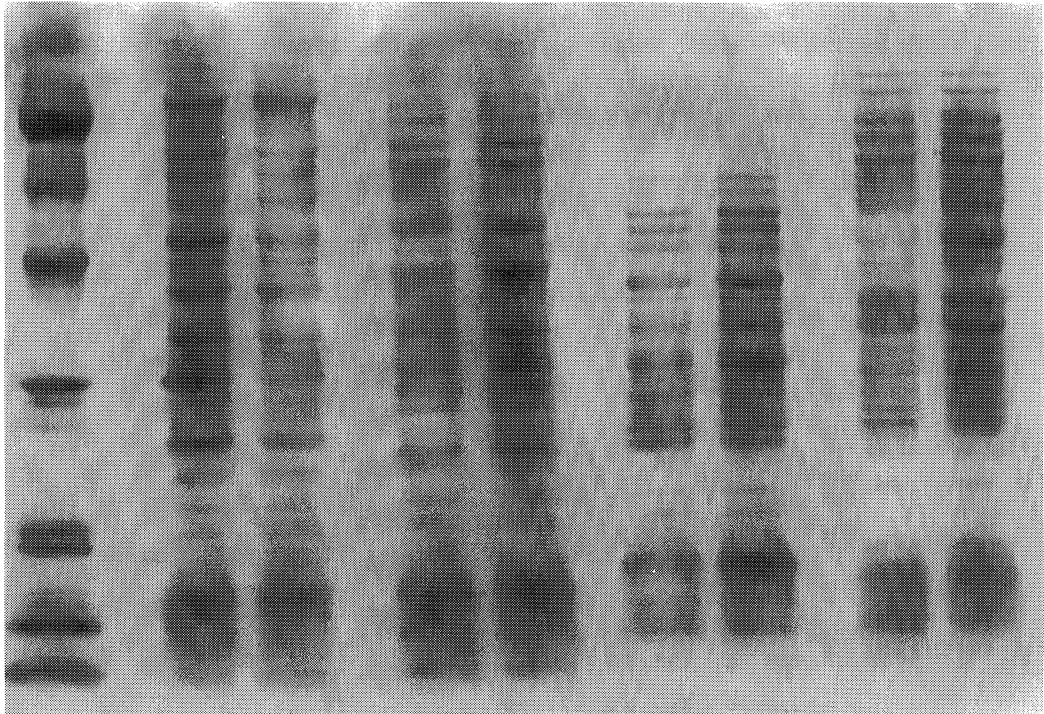
	Type I	Type II	Type III	Type IV
number of episodes	9	8	5	3
Disease				
Diffuse Panbronchiolitis	2	1	1	2
Bronchiectasis	2	2	0	1
Chronic bronchitis	5	5	4	0
Types of exacerbation				
Pneumonia	1	1	4	1
Bronchitis	8	7	1	2
Fever ($^{\circ}\text{C}$)	37.9 \pm 1.2	38.3 \pm 3.4	38.9 \pm 2.9	38.9 \pm 3.4
WBC ($/\mu\text{l}$)	10022.2 \pm 4783.0	9802.4 \pm 1278.8	15278.2 \pm 3519.2	15902.2 \pm 2987.5
CRP (mg/dl)	11.3 \pm 7.8	10.2 \pm 9.7	10.6 \pm 6.5	11.4 \pm 6.9
Albumin (g/dl)	3.6 \pm 0.4	3.7 \pm 0.4	3.8 \pm 0.7	2.6 \pm 0.4
ΔPaO_2 (torr)	15.2 \pm 2.9	6.3 \pm 1.8	16.3 \pm 4.1	18.3 \pm 3.7
Recovery time (day)	24.5 \pm 3.2	11.2 \pm 8.3	24.5 \pm 6.2	27.2 \pm 7.3

* $p < 0.05$



Case 1 2 3 4 5 6

Fig. 5-a. Six cases showing changes of OMP patterns in 1 month.



Case 7 8 9 10

Fig. 5-b. Four cases showing no changes of OMP patterns in 1 month.

Table 9. Relationship between the occurrence of acute exacerbation and the change in *H. influenzae* OMP patterns

OMP patterns	Case No.	Acute exacerbation
Changed	1	24 days after second examination
	2	37 days after second examination
	3	18 days after second examination
	4	9 days after second examination
	5	negative
	6	negative
Not Changed	7	negative
	8	negative
	9	negative
	10	negative

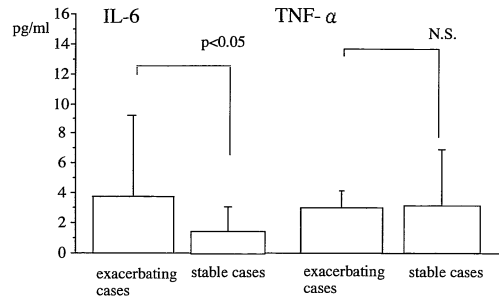


Fig. 8. Comparison of serum IL-6 and TNF- α level among exacerbating and stable cases of with chronic lower respiratory tract infection with *H. influenzae*

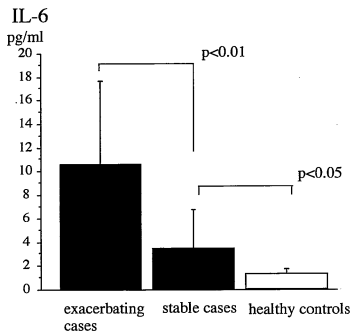


Fig. 6. Comparison of serum IL-6 levels in patients with chronic lower respiratory tract infection (exacerbating and stable cases) and healthy controls

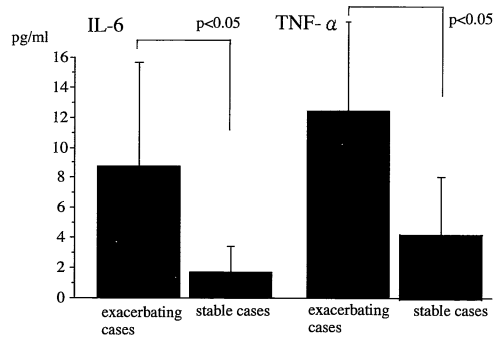


Fig. 9. Comparison of serum IL-6 and TNF- α levels among exacerbating and stable cases of patients with chronic lower respiratory tract infection with *P. aeruginosa*

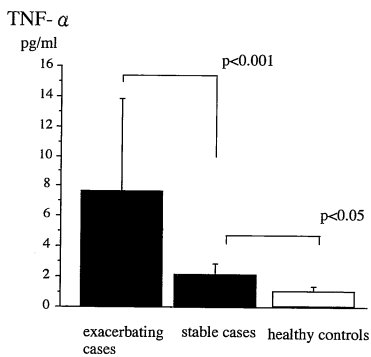


Fig. 7. Comparison of serum TNF- α in patients with chronic lower respiratory tract infection (exacerbating and stable cases) and healthy controls

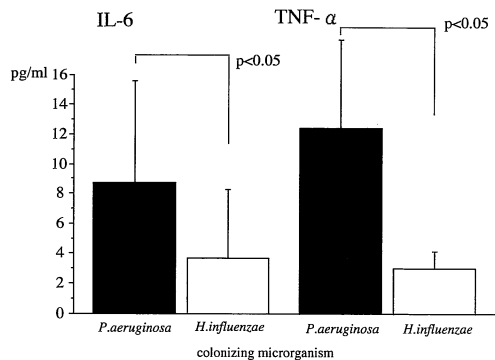


Fig. 10. Comparison of serum IL-6 and TNF- α levels in patients with chronic lower respiratory tract infection during acute exacerbation

IV) *H. influenzae* の気道上皮細胞障害活性を有する菌体蛋白の精製

DADE イオン交換クロマトグラフィー(1次分画)では NaCl 0.25 M 溶出分画 S と, 0.8 M 溶出分画 B が得られた(Fig. 14). MTT 法による気道上皮細胞障害試験では B 分画に気道上皮細胞障害活性が確認された(Fig. 15). B 分画はゲル濾過では1つのピークとして溶出され(2次分画)(Fig. 16), 気道上皮細胞障害活性がこのピー

クに一致して認められた(Fig. 17). PBE 94 polybuffer exchanger[®]による等電点カラムで, a(pI 9.4), b(pI 8.2), c(pI 5.4)の3分画(3次分画)が得られた(Fig. 18). Cytotox 96[®]による気道上皮細胞障害試験では pI 5.4 の c 分画に気道上皮細胞障害活性が認められた(Fig. 19). 精製の各段階で精製標品の比活性の上昇を認めた(Table 11). c 分画の SDS-PAGE は還元・非還元状態で 14 kDa 付近に single band を認めた(Fig. 20).

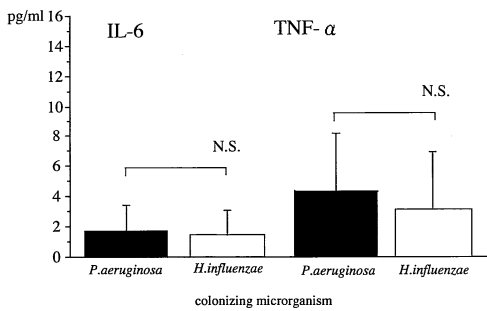


Fig. 11. Comparison of serum IL-6 and TNF- α level in patients with chronic lower respiratory tract infection during acute exacerbation.

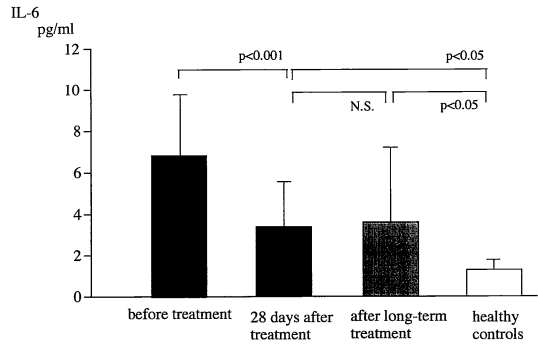


Fig. 13. Comparison of serum IL-6 level between normal controls, patients treated with clarithromycin, and patients before treatment by clarithromycin

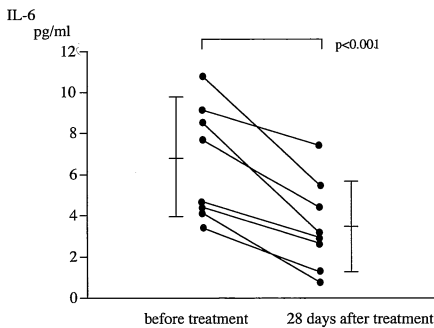


Fig. 12. Changes in serum IL-6 level of the patient with chronic lower respiratory tract infection of *H. influenzae* after treatment with clarithromycin

Table 10. Change in the colonization of *H. influenzae* after treatment with CAM

Case	Before treatment	28 days after treatment of CAM
1	3+	1+
2	2+	1+
3	2+	1+
4	1+	S
5	2+	1+
6	2+	1+
7	1+	negative
8	S	negative

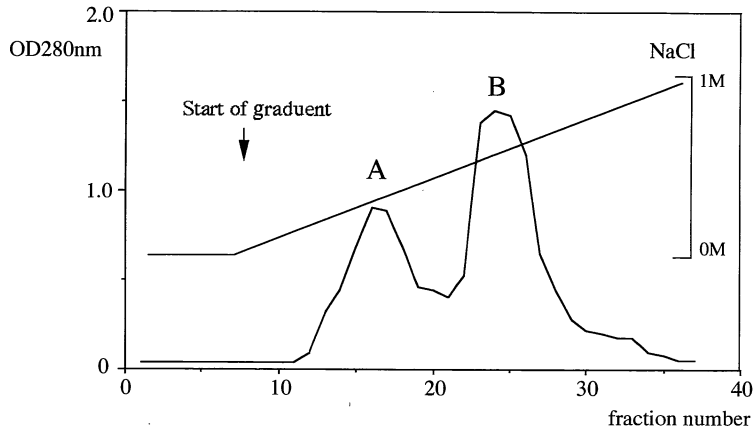


Fig. 14. Elution profiles of outer membrane proteins of *H. influenzae* on DEAE Sephacel, equilibrated with phosphate buffer. Each fraction was collected in 5-ml.

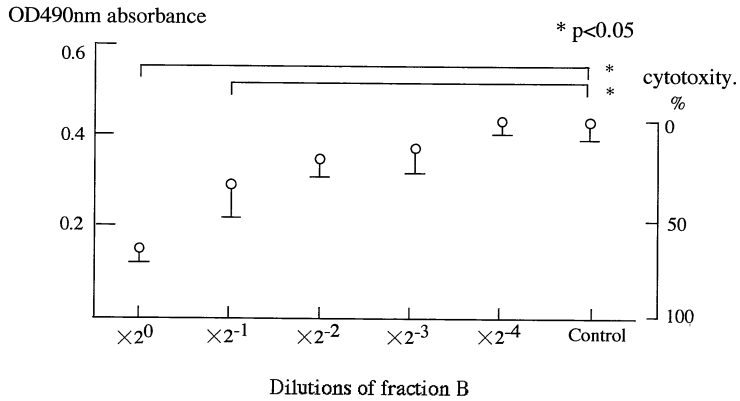


Fig. 15. Cytotoxic assay of fraction B by Celltiter 96^R

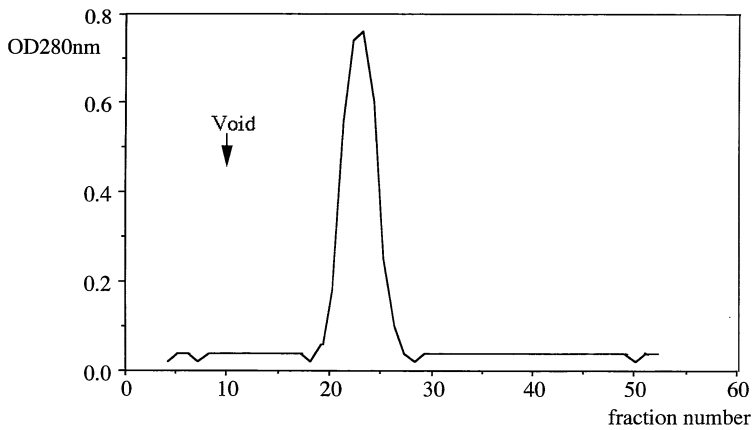


Fig. 16. Elution profiles of fraction B on Sephadex G-100^R, equilibrated with PBS. Each fraction was collected in 5-ml.

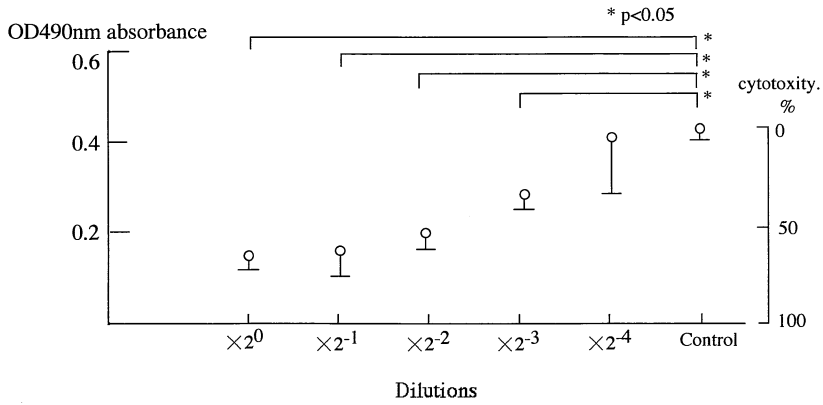


Fig. 17. Cytotoxic assay of the peak obtained from Sephadex G-100 by Celltiter 96^R

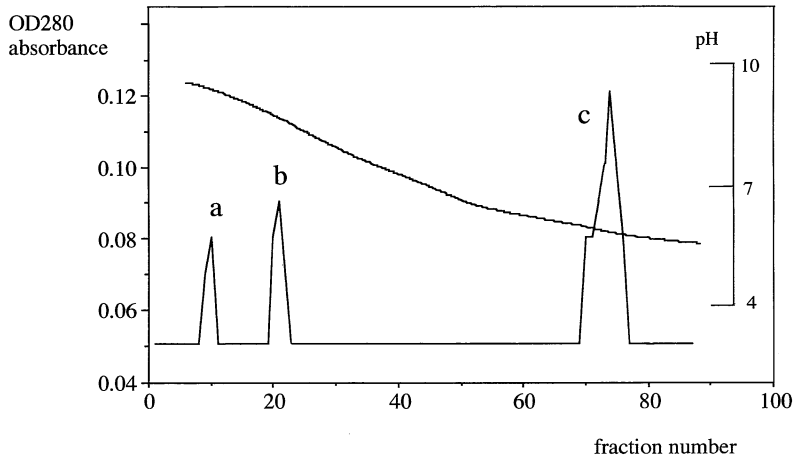


Fig. 18. Separation of the cytotoxic moiety by chromatofocusing using PBE94 equilibrated with pH8.3-0.025M Tris-Acetate. Elution was done with 300ml of the mixture containing 30% polybuffer and 70% polybuffer 74 (pH 5.0, dilution factor 10)

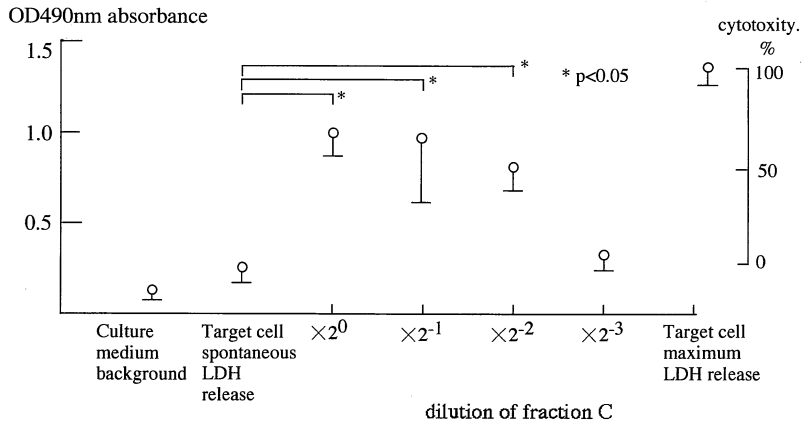


Fig. 19. Cytotoxic assay of fraction c by Cytotox 96^R

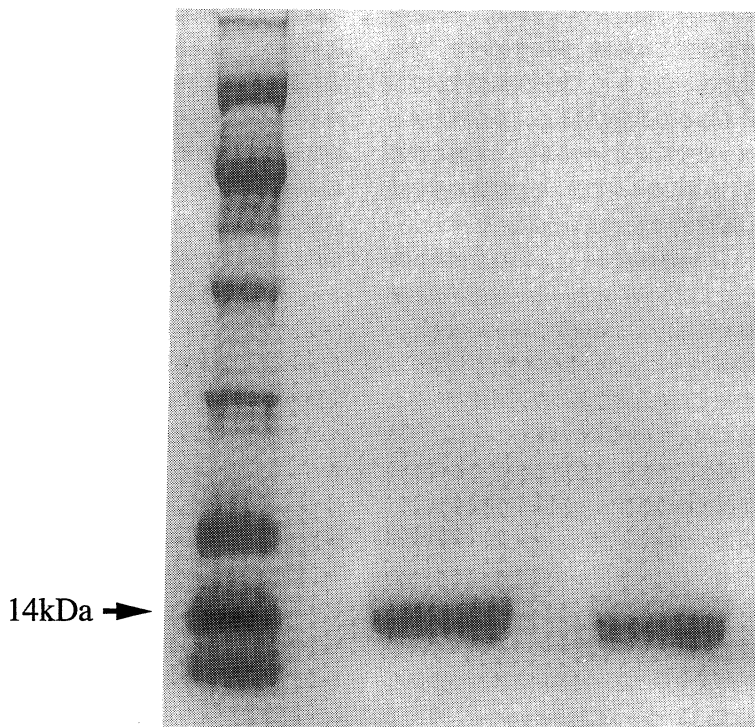


Fig. 20. SDS-PAGE of B-c fraction indicates molecular weights of 14 kDa

Table 11. Purification of the cytotoxic moiety of *H. influenzae* from crude protein

Purification step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification
Lysate	15	1200	14.4×10^8	0.012×10^2	
DEAE Sephacel	20	14.8	0.6×10^8	0.04×10^8	33.3
Sephadex G-100	16	4.8	0.38×10^8	0.08×10^8	66.6
Chromatofocusing	4	0.12	0.05×10^8	0.4×10^8	333.3

The amount of the sample required to induce half-maximal cytotoxicity of tested cells was assigned the value of 1 unit (U). The unit of each sample was expressed as the reciprocal of the dilution necessary to achieve 50% cell cytotoxicity.

考 察

1) *H. influenzae* 呼吸器感染症の臨床的検討

H. influenzae の中で血清型を有しない non-typable strain である莢膜非形成株は急性呼吸器感染症と慢性下気道感染症との重要な起因菌とされる。特に慢性下気道感染症は難治性で、時に急性増悪を生じて病態を悪化させる。このような *H. influenzae* 呼吸器感染症の治療の確立には正確な病態の把握が必要である。今回、上気道の菌の混入を回避できる TTA で、正確な起因菌を決定し、病態との関連性を検討した。

急性呼吸器感染症の検討では、主要な起因菌として以前から *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* が指摘されている。*S. pneumoniae* は細菌性肺炎で、*H. influenzae* は細菌性気管支炎で最も頻度が高い検出菌とされる⁵⁾。従来、*S. pneumoniae* は肺組織に、*H. influenzae* は気道上皮に親和性を有することが指摘されている^{6,7,8)}。また一般に細菌性肺炎では肺泡領域、細菌性気管支炎では末梢細気管支領域に炎症が波及すると低酸素血症が生ずるとされ⁹⁾、炎症所見や低酸素血症は症例の重症度を反映すると考えられる。本研究では、*H. influenzae* 急性呼吸器感染症の病態を正確に把握することを目

的に、病態と同時検出菌の検討を行っている。その結果、背景因子は気管支炎症例では肺癌、陈旧性肺結核、肺炎症例では陈旧性肺結核が最も多く、気道局所障害が宿主因子として重要であることが示唆される。全症例の検討では複数菌検出例は単独菌検出例に比較して有意に動脈血酸素濃度が低く、血中CRPが高値、白血球数高値の傾向がある。また肺炎例で *S. pneumoniae* や *Neisseria sp.*、気管支炎例で *α-streptococcus sp.* との複数菌検出例での重症度が高いことから、*H. influenzae* 急性呼吸器感染症では基礎疾患や喫煙による気道局所障害に加えて、*H. influenzae* 感染がさらに気道障害を増悪し、気道クリアランスを低下させて上気道常在菌の侵入を防げなくなり、さらに高齢者に加えて重喫煙者が多いことは、下気道粘膜線毛機構の障害¹⁰⁾が複数菌感染と関連する可能性が考えられ局所防御機構の低下との関係が示唆される。

また複数菌検出例では低アルブミン血症例、高齢者が多く全身性の宿主因子との関連性も存在することが考えられる。

次に *H. influenzae* 慢性下気道感染症の検討では、慢性下気道感染症には安定期と急性増悪期との二つの異なる時期が認められている¹¹⁾が、*H. influenzae* は、慢性下気道感染症安定期の持続感染主要菌とされている¹²⁾とともに急性増悪時単独あるいは複数菌として検出される場合があり¹²⁾急性増悪時にも *H. influenzae* は重要な細菌と考えられる。さらに *H. influenzae* が慢性下気道感染症の複数菌感染の主体をなしているとの指摘がある⁴⁾。従って本研究では、*H. influenzae* 慢性下気道感染症の急性増悪期を中心に複数菌検出に注意しつつ、前後の安定期からの検出菌の推移と臨床経過とを詳細に検討している。その結果、まず TTA の時点のみで検出菌を検討すると安定期、急性増悪期とも単独菌検出例、複数菌検出例がほぼ同数であるが、急性増悪期を肺炎型と気管支炎型にわけると、肺炎型に複数菌検出が多く、同時検出菌は肺炎型では *S. pneumoniae*、気管支炎型では *Neisseria sp.*、*α-streptococcus sp.*、*P. aeruginosa* が多いという特徴が認められる。肺炎型は気管支炎型と比較して、背景因子が有る例が多く、複数菌感染、同時検出菌、および宿主因子が急性増悪の病態に大きな意味をもつことが示唆される。特に *S. pneumoniae* の重複感染が肺炎の発症に重要であることが示唆される。次に、急性増悪期を中心として検出菌の推移と臨床経過とを検討し4型に分類できる。II型では *H. influenzae* 持続感染例への virus 重複感染が起こり、上気道炎が契機となり気管支炎型の急性増悪が認められる場合がある。従来、細菌性呼吸器感染症が virus 感染に続発すると報告され¹³⁾、virus 感染が急性

増悪の一因と考えられる。III型では *H. influenzae* 持続感染例に *S. pneumoniae* 重複感染による急性増悪が認められる。多くが肺炎型で、*S. pneumoniae* が急性増悪の中心をなしていると考えられるが、II型に比較して重症度が高く、臨床上注意が必要な病態である。*P. aeruginosa* が関係する急性増悪では、*P. aeruginosa* の持続感染に *H. influenzae* の重複感染が生じるI型と、*H. influenzae* による急性増悪の治療後1ヵ月以内に *P. aeruginosa* 持続感染に菌交代するIV型とがある。I型では宿主の既存の下気道病変や粘液線毛機構障害に加え、*P. aeruginosa* が産生する *elastase*, *protease*¹⁴⁾ 等による気道障害が影響するものと考えられ、IV型では低アルブミン血症などの宿主要因の不良を示唆する特徴が認められる。前田ら¹⁵⁾は近年慢性下気道感染症の TTA 検出菌は *H. influenzae* と *P. aeruginosa* とに二極化する傾向があること、また宿主要因が不良な症例では *H. influenzae* による急性増悪後に *P. aeruginosa* 単独での急性増悪が生じる可能性があることを指摘しており、本検討でもI型とIV型とはII型と比較して重症度が高いと考えられる。従って急性増悪時に *H. influenzae* が単独検出された症例でも宿主要因不良の症例では、*H. influenzae* 慢性下気道感染症の病態解析と治療とにおいて *P. aeruginosa* の存在に注意すべきであると考えられる。以上の検討から、*H. influenzae* は慢性下気道感染症では重要な役割を果たしており、その病態は *S. pneumoniae*、*P. aeruginosa* 等の細菌、virus 重複感染、宿主要因等に影響されることを明らかにし、さらに急性増悪時も前後の安定期検出菌を考慮して検討するべきであることを示唆したのは新しい知見である。

II) *H. influenzae* 慢性下気道感染症の OMP パターンの変化と病態との関連性の検討

H. influenzae などのグラム陰性桿菌には、内膜と最外層を構成する外膜とが存在し、ペプチドグリカンで結合されている。外膜はリン脂質、リポ多糖体、リポ蛋白および蛋白で形成され、外膜蛋白は4~5種の特有な機能をもつ主要蛋白と約20種類の微少蛋白とで構成され、外膜の機能に関与している。

H. influenzae では OMP は、*H. influenzae* 感染症に対する抗体産生の重要な抗原でと考えられ¹⁶⁾ SDS-PAGE によるパターンの解析は、株の同一性を判定するのに重要な方法であるとされる¹⁷⁾。*H. influenzae* 慢性下気道感染症では同一症例で喀痰中から同時に得られた全株の OMP パターンは一致することから感染している株は1株と考えてよいとされており^{18,19)} OMP パターンの

解析は、感染株の変化の検討には優れた方法であると考えられる。この方法での研究では、慢性下気道感染症で、*H. influenzae*の同一株が11カ月間持続感染する症例も認められるが、多くの症例では3-6カ月で株の変化が認められており²⁰⁾、また慢性閉塞性肺疾患でも*H. influenzae*株の変化が生じていることが明らかにされている^{18,20)}。以前から慢性下気道感染症では、*H. influenzae*株の変化が病態の変化の重要な要因であることが指摘されているが²¹⁾、慢性下気道感染症の安定期と急性増悪期という観点から、株の変化と病態との関係を論じた報告はない。本研究では、*H. influenzae*慢性下気道感染症の株の変化と病態との関連を明らかにする目的で、SDS-PAGEによるOMPパターンの解析で、安定期*H. influenzae*慢性下気道感染症のOMP profilesの変化と病態との関係を検討している。その結果、観察期間内にOMPパターンの変化が生じた群では、生じなかった群と比較して、継続観察期間内に急性増悪が生じやすいことが認められ、このことからOMPパターンの変化が*H. influenzae*慢性下気道感染症での急性増悪の要因となる可能性が示唆される。OMPパターンの変化に関与する要因の詳細な細菌学的検討が今後必要と考えられる。*H. influenzae*慢性下気道感染症例で、継続的に*H. influenzae*単独検出である場合でも、OMPパターンの変化にともない急性増悪する可能性があることが示され、治療上重要な知見である。

III) *H. influenzae*慢性下気道感染症病態と炎症性サイトカイン変動との検討

通常慢性下気道感染症では、*P. aeruginosa*慢性下気道感染症に先行して*H. influenzae*慢性下気道感染症が認められ、持続感染菌が*H. influenzae*から*P. aeruginosa*に菌交代することが知られている。一般に*P. aeruginosa*慢性下気道感染症がより難治性で、重症であるとされるが、二つの持続感染菌での病態の差は明らかにされていない。

一方、慢性下気道感染症にはEM, CAMなどの14員環マクロライド系抗菌薬長期投与の有用性がすでに報告されている。その有効性の機序は、宿主側への作用として、EMによるNK細胞活性の亢進²²⁾、抗炎症作用²³⁾、IL-1, 2, 4などのサイトカイン産生への影響²⁴⁻²⁷⁾が報告されており、マクロライド系抗菌薬は慢性下気道感染症で、宿主防御機能を増強し、炎症反応を改善していると考えられる。菌側への作用は、*P. aeruginosa*ではEMによる菌体外毒素の抑制²⁸⁾、EM, CAMによる付着抑制²⁹⁾、バイオフィーム形成阻子^{29,30)}などが報告されている。CAM

には*H. influenzae*に若干の抗菌作用が認められるが、CAM長期投与でも*H. influenzae*が消失しない症例も認められ³¹⁾、*H. influenzae*に対するCAMの抗菌力以外の作用に関しては十分な検討は行われておらず、CAMが*H. influenzae*慢性下気道感染症の病態改善にどう作用するかは明らかではない。

近年*H. influenzae*の菌体毒素で気道上皮からIL-6などの炎症性サイトカインが産生され³²⁾、またEMがその産生を抑制する³³⁾こと、また慢性下気道感染症患者にEM, CAMの投与で、血清IL-4濃度が上昇することが報告されている³⁴⁾。IL-4はTNF- α やIL-6などの炎症性サイトカイン産生を抑制する作用が知られているので³⁵⁾、*H. influenzae*慢性下気道感染症で、CAMが、その抗菌作用以外に、炎症性サイトカイン産生を抑制して宿主の病態を改善する可能性が考えられる。

IL-6は種々の生物活性を有するが、炎症の早期にIL-6が出現し急性期蛋白合成に関与していること³⁶⁾や急性炎症の際にも重要な役割を果たしていることが指摘されている^{36,37)}。TNF α は主としてマクロファージから産生される炎症担当細胞間のネットワークの中心となるサイトカインとして知られている。本研究では、急性増悪期では血清IL-6, TNF- α 濃度とも*P. aeruginosa*慢性下気道感染症に比較して*H. influenzae*慢性下気道感染症で有意に低値であったが、血清IL-6濃度は*P. aeruginosa*慢性下気道感染症と同様に、*H. influenzae*慢性下気道感染症でも急性増悪期は安定期と比較して高値であった。安定期では血清IL-6, TNF- α 濃度とも*P. aeruginosa*慢性下気道感染症と*H. influenzae*慢性下気道感染症との間で差を認めなかった。

また安定期*H. influenzae*慢性下気道感染症患者でCAMによる治療を行い、血清IL-6濃度の推移を検討したところ、投与28日後では、投与前と比較して有意に血清IL-6濃度の低下を認め、さらに、CAM長期投与中の*H. influenzae*慢性下気道感染症患者の血清IL-6濃度でも低値であった。

この結果、*H. influenzae*慢性下気道感染症の病態の変化には、*P. aeruginosa*慢性下気道感染症と同様、炎症性サイトカインの血清IL-6, TNF- α が関連していた。CAMの*H. influenzae*に対する抗菌作用が気道炎症改善の要因とすることも否定はできないが、CAM投与28日後では多くの症例では喀痰中*H. influenzae*の菌量の減少がみられても消失せず、持続感染が継続していた。一方CAM治療で血清IL-6濃度が低下したことは、*H. influenzae*慢性下気道感染症では、CAMが抗菌作用とは別に、血清IL-6濃度を低下させて宿主の病態を改善

する可能性が考えられた。長期投与患者でも血清 IL-6 濃度が低下したことと合わせて、この効果が継続し病態を安定させている可能性が考えられた。

IV) *H. influenzae* 菌体蛋白による気道上皮細胞障害活性

従来、*P. aeruginosa* による慢性下気道感染の成立、難治化に、elastase, protease などの菌体外酵素、毒素の産生¹⁴⁾、バイオフィーム形成³⁸⁾、産生される蛋白による気道上皮からのサイトカイン誘導³⁹⁾などが関与していることが明らかになっている。これに対し、*H. influenzae* 慢性下気道感染症の成立に関する機序の解析は十分には行われていない。*H. influenzae* は、気道領域に親和性を有し⁸⁾、慢性下気道感染症では気道上皮に局在することが認められている⁹⁾ので、慢性下気道感染の背景に、気道障害に関わる因子が存在していることが考えられる。*H. influenzae* の産生する蛋白は従来 IgA protease^{40,41)}が報告されているがこれは直接気道上皮細胞を障害するものではない。また培養気道上皮からの炎症性サイトカイン誘導³⁹⁾や、培養上清の気道上皮繊毛障害が報告されている⁴²⁾が、前者は内毒素である lipopolysaccharide(LPS) による障害であると考えられており、後者は障害物質の本体は明らかにされていず、*H. influenzae* が産生する蛋白による気道上皮細胞障害の詳細な検討はない。

本研究では、*H. influenzae* が産生する蛋白が気道上皮に及ぼす影響を検討する目的で、慢性下気道感染症患者から分離した *H. influenzae* 株の菌体抽出液とヒト気道上皮培養細胞とを用いて、気道上皮細胞障害活性を有する物質の分離を試みた。その結果、*H. influenzae* の菌体抽出液中に、培養気道上皮細胞に対する細胞障害活性を有する、分子量 14 kDa の蛋白を部分的に精製分離し得た。

臨床下慢性下気道感染症で、*H. influenzae* 持続感染が *P. aeruginosa* 持続感染に先行し、気道上皮に継続的な障害を及ぼすことで、予後不良な *P. aeruginosa* 慢性下気道感染成立の前段階として関与するとされている。従って *H. influenzae* 慢性下気道感染症では、気道状態の改善と *P. aeruginosa* への菌交代への防止とを目的とする臨床的、基礎的な病態の把握と適切な治療とが必要と考えられる。今回見いだされた *H. influenzae* が産生する蛋白は、現在は詳細な性状や、気道上皮障害活性に関する機序は明かでないが、*H. influenzae* 慢性下気道感染症で気道上皮を障害し持続感染を成立させ、*P. aeruginosa* への菌交代の背景因子となる可能性が推察される。

本研究の結果は、従来指摘されている内毒素による気道上皮細胞障害に加えて、*H. influenzae* の産生する蛋白

成分が慢性下気道感染症で気道上皮細胞障害に関与する事を捉えた新しい知見で、今後この性状のさらなる研究が必要と考えられ、本蛋白産生に及ぼすマクロライドの影響を検討することで、*H. influenzae* 慢性下気道感染症で気道障害を抑制する新たな治療法を考える上で非常に興味深いものと考えられる。

結 語

H. influenzae 呼吸器感染症の病態を解析し、また気道上皮細胞障害の機序を検討した。

I) *H. influenzae* 呼吸器感染症の病態の検討

H. influenzae 急性呼吸器感染症では、肺炎例で *S. pneumoniae* や *Neisseria sp.* 気管支炎例で α -streptococcus sp., などの複数菌検出が病態に関連し、また宿主の全身的、局所的因子が複数菌検出に関連することを新たに見いだした。

H. influenzae 慢性下気道感染症でもその急性増悪に複数菌検出が大きく関連し、また急性増悪前後での検出菌の変化と宿主要因とが重要であることを見いだした。

II) *H. influenzae* 慢性下気道感染症での OMP パターンの変化と病態との関連性の検討

H. influenzae 慢性下気道感染症の急性増悪には、OMP パターンの変化が関与することを明らかにした。これは *H. influenzae* 慢性下気道感染症の急性増悪と、*H. influenzae* の colonarity の変化が関与している可能性を示唆する新しい知見であると考えられた。

III) *H. influenzae* 慢性下気道感染症の病態と炎症性サイトカインの変動との検討

H. influenzae 慢性下気道感染症の急性増悪期には血清 IL-6 TNF- α 濃度は、安定期でも正常対照より高値であり、急性増悪期でさらに高値であった。*P. aeruginosa* 慢性下気道感染症との比較では、急性増悪期で有意に低値、安定期は差を認めなかった。

また安定期 *H. influenzae* 慢性下気道感染症患者に対する CAM 投与で、症状の改善とともに血清 IL-6 濃度は投与 28 日後で有意に低下し、長期投与後でも低下していた。以上から、*H. influenzae* 慢性下気道感染症で血清 IL-6, TNF- α の上昇が病態に関連し、CAM が血清中 IL-6 濃度を低下させることが、本症に対する CAM の有効性の機序の一つである可能性を見出した。

IV) *Haemophilus influenzae* 菌体蛋白による気道上皮細胞障害活性

慢性下気道感染症患者から TTA で得られた *H. influenzae* 菌体抽出液から DEAE イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、等電点カラムで細胞障害活性物質

を分離精製し、ヒト気道上皮細胞障害活性を測定した。部分精製した蛋白活性物質の分子量は約14 kDaであることを新たに見いだした。*H. influenzae* 慢性下気道感染症においてこの蛋白成分が気道上皮障害の成立に関与することが示唆された。

以上から *H. influenzae* 急性呼吸器感染症と慢性下気道感染症とでの *H. influenzae* と同時検出菌の病態との関連、*H. influenzae* 慢性下気道感染症での OMP パターンの変化と病態との関連、*H. influenzae* 慢性下気道感染症での血清サイトカイン濃度、病態、および CAM 治療の関連、*H. influenzae* 産生蛋白の気道上皮細胞障害活性の新たな知見を得た。

本論文の要旨は第36回日本胸部疾患学会総会(1996年, 宇都宮), 第70回日本感染症学会総会(1996年, 東京), 第71回日本感染症学会総会(1997年, 札幌), 第21回国際化学療法会議(1997年, シドニー, オーストラリア連邦), 第8回国際感染症学会議(1998年, ボストン, アメリカ合衆国), 第72回日本感染症学会総会(1998年, 大阪)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および臨床検査学教室中野 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頂きました第2内科学教室澤木政好助教授、三笠桂一助手、古西満助手、前田光一助手に感謝の意を捧げます。さらに本研究に御協力頂いた第2内科学教室、細菌学教室の諸兄姉に感謝致します。

文 献

- 1) CAMPOS, J. M. : Manual of clinical microbiology. 6th Ed., ASM Press, p.556 Washington D. C. 1994.
- 2) Pittman, M : J Exp Med. 53 : 43, 1931.
- 3) 澤木政好, 三上理一郎, 三笠桂一, 国松幹和, 成田亘啓 : 感染症誌. 59 : 389, 1985.
- 4) 澤木政好, 国松幹和, 三笠桂一, 成田亘啓, 濱田薫, 播金 収 : 感染症誌. 58 : 461, 1987.
- 5) 古西 満 : 奈良医誌. 45 : 520, 1994.
- 6) 濱田 薫, 国松幹和, 堅田 均, 三笠桂一, 澤木政好, 成田亘啓, 今井照彦, 三上理一郎 : 日胸会誌. 26 : 1154, 1985.
- 7) 国松幹和 : 感染症誌. 59 : 1175, 1985.
- 8) 宮崎修一, 大野 章, 北矢 進 : 感染症誌. 61 : 310, 1987.
- 9) 隆杉正和, 松本慶三, 石川秀文 : 化学療法の領域 6 : 1399, 1990.
- 10) Puchell, E. Zahn, J. and Bertrand, A. : Scand. J. Respir. Dis. 60 : 307, 1978.
- 11) 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.
- 12) 山本健一, 佐竹辰夫 : 呼吸 4 : 687, 1985.
- 13) 谷本晋一 : 呼吸器感染症の治療, 南江堂, 東京, p 31, 1987.
- 14) 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, 櫻葉周三, 成田亘啓 : 感染症誌. 67 : 1023, 1993.
- 15) van Alpen, L., Eijk, P., Geelen-van den Broek, L. and Dankert, J. : Infect. Immun. 59 : 247, 1991.
- 16) Barenkamp, S. J., Munson R. S. Jr. and Granoff, D. M. : Infect. Immun. 50 : 535, 1982.
- 17) Groeneveld, K., van Alphen, L., Eijk, P. P., Jansen, H. M. and Zanen, H. C. : J. Infect. Dis. 161 : 512, 1990.
- 18) 高橋 淳 : 感染症誌. 66 : 1502, 1992.
- 19) Groeneveld, K., van Alphen, L., Eijk, P. P., Jansen, H. M. and Zanen, H. C. : J. Infect. Dis. 158 : 360, 1988.
- 20) May, J. R. : Chemotherapy of chronic bronchitis and allied disorders, The English University Press Ltd., 2nd Ed., London, 29, 1972.
- 21) 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.
- 22) Mikasa, K., Kita, E., Sawaki, M., Kunimatsu, M., Hamada, K., Konishi, M., Kashiba, S. and Narita, N. : J. antimicrob. Chemotherapy 30 : 339, 1992.
- 23) 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 : 37, 1994.
- 24) Bally, S., Procida, J. J., Fay, M. and Pocidalo,

- M. A. G. : *Antimicrob. Agents Chemother.* **35** : 2016, 1991.
- 26) 片平潤一, 春木宏介, 柴田雄介, 菊池 賢, 長谷川裕美, 戸塚恭一, 清水喜八郎 : *Chemotherapy.* **39** : 320, 1991.
- 27) 滝沢 始, 大利隆行, 伊藤幸治 : 厚生省特定疾患びまん性肺炎患調査研究班平成4年度研究報告書. p 224, 1993.
- 28) Kita, E., Sawaki, M. Oku, D., Hamuro, A., Mikasa, K., Emoto, M., Takeuchi, S., Narita, N. and Kashiba, S. : *J. Antimicrob. Chemotherapy.* **27** : 273, 1991.
- 29) 武田博明, 大垣憲隆, 菊地直美 : *感染症誌.* **66** : 1097, 1992.
- 30) 前田光一, 喜多英二, 澤木政好, 三笠桂一, 古西満, 森 啓, 坂本正洋, 辻本正之, 竹内章治, 濱田 薫, 国松幹和, 奥 大介, 櫻葉周三, 成田亘啓 : *感染症誌.* **68** : 1223, 1994.
- 31) 三笠桂一, 澤木政好, 古西 満, 前田光一, 竹内章治, 濱田 薫, 国松幹和, 増谷喬之, 佐野麗子, 喜多英二, 櫻葉周三, 成田亘啓 : *感染症誌.* **65** : 561, 1992.
- 32) Khair, O. K., Devalia, J. L., Abdelaziz, M. M., Sapsford, R. J. and Davies, R. J. : *Eur. Respir. J.* **7** : 2109, 1994.
- 33) Khair, O. K., Devalia, J. L., Abdelaziz, M. M., Sapsford, R. J. and Davies, R. J. : *Eur. Respir. J.* **8** : 1451, 1995.
- 34) 前田光一, 澤木政好, 喜多英二, 三笠桂一, 古西満, 寺本正治, 森 啓, 坂本正洋, 辻本正之, 竹内章治, 濱田 薫, 国松幹和, 成田亘啓 : *日治療会誌.* **43** : 825, 1995.
- 35) 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.
- 36) Nishimoto, N., Yoshizaki, K. and Tagho, H. : *Clin. Immunol. Immunopathol.* **50** : 399, 1989.
- 37) Heinrich, P. C., Castle, J. V. and Andus, T. : *Biochem. J.* **265** : 621, 1990.
- 38) 小林宏行 : *日内会誌.* **80** : 663, 1991.
- 39) Oishi, K., Sar, B., Wada, A., Amano, S., Kobayashi, S., Sonoda, F., Hirayama, T., Nagatake, T. and Matsushita, K. : *Respir. Crit. Care Med.* **153** : 674, 1996.
- 40) Mulks, M. H., Kornfeld S. J. and Plaut, A. G. : *J. Infect. Dis.* **141** : 450, 1980.
- 41) Tsuiji, T., Alborn, R. M., Ehara, M., Honda, T. and Miwatani, T. : *Eur. J. Epidemiol.* **5** : 199, 1989.
- 42) Denny, F. W. : *J. Infect. Dis.* **129** : 93, 1974.