

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
朝井章	主査教授 森脇 真一 副査教授 佐野 浩一 副査教授 吉田 龍太郎 副査教授 上田 晃一
主論文題名 Pathogenic Role of Macrophages in Intradermal Infection of Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> in Thermally Injured Mice (重症熱傷マウスモデルの MRSA 皮膚感染におけるマクロファージの役割に関する検討)	
学位論文内容の要旨	
《背景》 重症熱傷患者は損傷部位のみならず、全身において易感染性であり、感染症はそのような患者における死因の第一位を占める。また熱傷患者における感染の原因菌のひとつとして methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)がよく知られている。MRSA に対する治療は菌の抗生剤に対する耐性が問題となることが多い。以上のことから感染症に対して抗生剤を使わない、新しい治療法の確立が求められている。また感染における膿瘍形成は、局所における生体の重要な防御反応の一つであり、急性期における感染においては全身播種を防ぐ意味合いを持つ。近年その膿瘍形成において MΦの関与が報告されている。 局所の MRSA の感染に対しては、自然免疫が重要であり、マクロファージ(MΦ)はその中心的な役割を果たす。近年 MΦには2つの subtypeがあると報告されており、ひとつが抗菌活性と IL-12 の産生能を持つ M1MΦ であり、もうひとつが抗菌活性をほとんど持たず IL-10 産生能をもつ M2MΦ である。熱傷個体ではこの M2MΦ が優位であり、	

さらにこの M2MΦ から産生されるサイトカインが M1MΦ の形成を阻害する。

今回 MRSA 皮膚感染重症熱傷マウスモデルを使用し、感染局所における MΦ の役割について検討を行った。

《方 法》

対象には雄の 8-10 週齢の BALB/c マウスを用いた。MRSA は 21777 株、BAA-44 株、33591 株を使用、methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) は 29213 株を使用した。熱傷は正常マウスの背部に麻酔下にて 3 度熱傷、総熱傷面積 25% の熱傷を作成した。熱傷マウスと正常マウスの左鼠径部に 1×10^8 CFU/mouse の MRSA を皮内感染させ、膿瘍の容積を測定した。また感染部位及び血液における菌の増殖能を colony forming method にて調べた。MRSA 感染モデルにおける IL-10 の作用を調べるために IL-10 antisense oligodeoxynucleotides (ODN) を使用した。また IL-12 の作用を見るために anti-IL-12 mAb を使用した。

熱傷マウスおよび正常マウスの MRSA 感染部位より MΦ を単離した。単離した MΦ を別の熱傷および正常マウスの MRSA 又は MSSA 感染部位に移植し、膿瘍形成、菌の増殖について検討を行った。

MΦ の subtype の検討として、IL-12、CXCL9 の産生、iNOS の発現があれば M1MΦ とし、IL-10 の産生、FIZZ1、Mannose receptor (MR) の発現があれば M2MΦ とした。IL-12、IL-10、CXCL9、MR の発現は flow cytometry にて検討し、iNOS、FIZZ1、MR に関しては reverse transcriptase PCR 法にて検討した。また MΦ を 48 時間培養し、その培養液中の IL-12、IL-10 量を ELISA にて測定した。

《結 果》

熱傷マウスに MRSA を皮内感染させたところ、膿瘍は形成されず、菌が全身に播種し、5 日以内にすべてのマウスが死亡した。ところが正常マウスでは膿瘍が形成され、菌は全身に播種せず、全てのマウスが生存した。様々な *Staphylococcus aureus* にて同

じ実験を行ったが、いずれも同様の結果を得た。正常マウス感染組織からは IL-12 の産生を認め、熱傷マウス感染組織からは IL-10 が産生されていた。また熱傷マウスの MRSA 感染部位から分離した MΦ は IL-10 産生能を持っていたが、正常マウスの MRSA 感染部位から分離した MΦ は IL-12 産生能を持っていた。正常マウスに anti-IL-12 mAb を投与し、MRSA 皮内感染させたところ、膿瘍形成は消失した。逆に熱傷マウスに IL-10 antisense ODN 治療を行い、MRSA 感染させたところ、膿瘍形成を認めた。以上のことから、MΦ から分泌される IL-12、IL-10 が膿瘍形成には重要であることが判明した。

正常マウス感染部位から分離した MΦ は M1MΦ であり、熱傷マウス感染部位より分離した MΦ は M2MΦ であった。MRSA 感染熱傷マウスから分離した M2MΦ を正常マウスの MRSA 感染部位に移植したところ、膿瘍は形成されず、菌は全身に播種した。また正常マウスから分離した M1MΦ を熱傷マウスの MRSA 感染部位に移植したところ、膿瘍は形成され、菌は全身に播種しなかった。

《考 察》

今回の研究で感染局所における M1MΦ が局所の MRSA 感染をコントロールしうる、さらには全身に感染が播種することを防ぐことができることを証明した。また局所における感染をコントロールする上で MΦ から分泌される IL-12、IL-10 が重要であることを証明した。膿瘍形成は MRSA 皮膚感染に対し防御的に働き、またその膿瘍形成には MΦ の subtype が重要であると考えられた。以上のことより、局所における MΦ の subtype をコントロールすることにより、重症熱傷などの免疫力の低下した患者において、局所の感染をコントロールできる可能性がある。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲第号	氏名	朝井章
論文審査担当者		主査教授 森脇 真一	
		副査教授 佐野 浩一	
		副査教授 吉田 龍太郎	
		副査教授 上田 晃一	
主論文題名			
<p>Pathogenic Role of Macrophages in Intradermal Infection of Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> in Thermally Injured Mice</p> <p>(重症熱傷マウスモデルの MRSA 皮膚感染におけるマクロファージの役割に関する検討)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>マクロファージ(MΦ)は自然免疫の中心を担う免疫細胞の一つである。近年そのMΦには抗菌活性をもつM1MΦと抗菌活性をほとんど持たないM2MΦの2種類の subtype があると報告されている。申請者は今回、重症熱傷マウスをモデルとし、methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) 感染局所におけるMΦの役割について検討を行った。</p> <p>熱傷マウスにMRSAを皮内感染させたところ、膿瘍は形成されず、菌が全身に播種し、5日以内にすべてのマウスが死亡したが、正常マウスでは膿瘍が形成され、菌は全身に播種せず、すべてのマウスが生存した。正常マウスにおけるMRSA感染巣からはM1MΦを認め、熱傷マウスの感染巣では、M2MΦを認めた。また熱傷マウスに正常マウスから分離したM1MΦを移植したのち同部にMRSAを感染させたところ、膿瘍が形成され感染に対し抵抗性を示した。逆に正常マウスに熱傷マウスから分離したM2MΦを移植したのちMRSAを感染させたところ、膿瘍は形成されずMRSAは全身に播種した。</p>			

以上の結果より、膿瘍形成はMRSA皮膚感染に対し防御的に働き、またその膿瘍形成にはM1MΦのsubtypeが重要であると考えられた。つまり局所におけるMΦのsubtypeをコントロールすることにより、熱傷と同じような免疫状態を呈した患者において、局所の感染をコントロールしうる可能性があると考えられた。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Infection and Immunity 78(10): 4311-4319, 2010