

学位論文

「Panton-Valentine leukocidin induces cytokine release and cytotoxicity mediated
by the C5a receptor on rabbit alveolar macrophages」

(ウサギ肺胞マクロファージを用いた Panton-Valentine leukocidin
による C5a 受容体を介したサイトカイン放出と細胞障害の検討)

DM18022 原田 真也

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
臨床医科学群 呼吸器内科学
指導教授 横場 正典

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要 旨

【背景】

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) が産生する Panton-Valentine leukocidin (PVL) は白血球溶解毒素である。市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (CA-MRSA) およびメチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) に起因する肺炎は、いずれも PVL 陰性例と比較して PVL 陽性例で致死率が高い。PVL は LukS-PV と LukF-PV から成る 2 成分毒素であり、標的細胞の受容体を介して LukS-PV と LukF-PV が交互に会合し細孔を形成することで細胞内成分の流出を来し、標的細胞を壊死に導く。PVL は血中の好中球に対して細胞障害性を示し、また PVL に対する好中球の受容体としては、C5a receptor (C5aR) が同定されている。さらに、好中球は PVL 刺激によりサイトカインを産生することも報告されている。PVL の特徴として、ヒトおよびウサギにのみ感受性を持ち、細胞については好中球と単球には感受性を有するが、リンパ球には感受性が無いことが報告されている。現在までのところ、肺炎における肺胞腔の初期免疫に中心的な役割を持つ肺胞マクロファージに対する PVL の作用を検討した報告は少なく、詳細な検討は未だ充分ではない。

【目的】

PVL 陽性 CA-MRSA による肺炎の病態を解明するため、肺胞腔の初期免疫に重要な役割を持つ肺胞マクロファージを用いて、PVL による刺激実験を行い、PVL の細胞障害性を評価し、さらに、PVL 刺激に対する肺胞マクロファージからのサイトカイン産生について検討する。

【方法】

(1) リコンビナント蛋白作成

PVL 産生 CA-MRSA である USA300 株由来の LukS-PV および LukF-PV の塩基配列をそれぞれ pRSET ベクターに導入する。さらにそれらと塩基配列を導入していない pRSET を大腸菌 DH5 α に形質導入し、それぞれ LukS-PV-pRSET、LukF-PV-pRSET および Empty vector (EV) -pRSET を増幅する。それらをさらに大腸菌 BL21 (DE3) に導入し、LukS-PV-pRSET、LukF-PV-pRSET および EV-pRSET 由来のリコンビナント蛋白をそれぞれ発現させる。発現させたリコンビナント蛋白は Cobalt Affinity Resin を用いて精製し、DetoxiGel カラムを用いて Lipopolysaccharide (LPS) を除去する。

精製したリコンビナント蛋白 (rLukS-PV、rLukF-PV および rEV) はドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびウエスタンブロッティング (WB) でその発現を確認し、凍結融解による蛋白の凝集・析出を避けるためグリセリンと 1 : 1 で混合する。

(2) ウサギ肺胞マクロファージの回収

実験用ウサギ (New Zealand white) をイソフルラン吸入で麻酔導入し、ペントバルビタールを腹腔内注射することで麻酔を維持する。麻酔後、頸部切開し、気管と頸動脈を同定後、頸動脈穿刺により放血致死させる。その後、同定した気管を切開し、生理食塩水によって気管支肺胞洗浄を行う。得られた気管支肺胞洗浄液を遠心分離し、沈殿物を 10%ウシ胎児血清 (FBS) 含有 RPMI1640 に再懸濁し、孵卵器で 2 時間培養後、接着細胞を肺胞マクロファージとする。マクロファージの純度はメイギムザ染色とフローサイトメトリーで確認する。

(3) 肺胞マクロファージ培養と刺激実験および C5aR 阻害実験

回収した肺胞マクロファージは細胞培養用プレートに 1×10^5 細胞/well ずつ播種し、孵卵器で一晩培養し、細胞を接着させる。培養液には 10%FBS 含有 RPMI1640 を用いる。刺激実験の場合、接着した肺胞マクロファージを 5、100 nM の rLukS-PV、rLukF-PV、rEV、rPVL (rLukS-PV と rLukF-PV を 1 : 1 で混合して作成) および Positive control (PC) として LPS 100 ng/mL で 24 時間刺激する。

C5aR 阻害実験の場合、細胞接着後、C5aR の阻害剤である PMX205 100 μ M で 15 分間前処理をし、5、100 nM の rLukS-PV、rPVL および LPS 100ng/mL で 24 時間刺激する。

(4) 細胞障害性評価

リコンビナント蛋白で刺激後および無刺激 (Negative control ; NC) の細胞に対して MTT assay を行い、マイクロプレートリーダーを用いてそれぞれの細胞の吸光度を測定する (測定波長 : 570 nm、基準波長 : 655 nm)。刺激後と NC の細胞の吸光度を比較することで、刺激による細胞障害性を評価する。

(5) サイトカイン測定

リコンビナント蛋白で刺激後、PC および NC の細胞上清を用いて、ELISA を用いて、サイトカイン (刺激実験の場合 : TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 β C5aR 阻害実験の場合 : TNF- α を測定) を測定し、刺激後と NC でのサイトカイン値とを PC でのサイトカイン値の比で比較する。

(6) C5aR 発現確認

細胞溶解液 (滅菌水にトリス 20 mM、スクロース 0.25 M、トリトン 1%、グリコールエーテルジアミン四酢酸 10 mM、エチレンジアミン四酢酸 2 mM で溶解し pH 8.2 に調整して作成) を用いて、肺胞マクロファージを氷冷下で 1 時間処理し、C5aR に対するモノクローナル抗体を用いて WB により C5aR の発現を確認する。

(7) 統計解析

3群以上の比較の場合、一元配置分散分析を用い、post hoc には Bonferroni 法を用いる。2群間の比較の場合、F検定が等分散であると仮定し、t検定を行う。統計分析には統計解析ソフト EZR を使用する。すべての値は平均値±標準誤差で表し、 $p<0.05$ を統計的に有意であると見なす。サイトカインの測定において濃度が検出感度よりも低い場合、各 ELISA の検出感度の下限を用いて統計解析を行う。

【結果】

リコンビナント蛋白に関しては、LukS-PV と LukF-PV の分子量はそれぞれ、32 および 34 kDa であることから、SDS-PAGE および WB で rLukS-PV と rLukF-PV が発現し、rEV には発現していないことが確認された。肺胞マクロファージの純度に関しては、メイギムザ染色では 89%、フローサイトメトリーでは 88%の純度が確認できた。

細胞障害性に関しては、MTT assay で、NC に対し、5nM、100nM の rPVL 刺激でそれぞれ有意な吸光度低下 ($p<0.01$) を認め、濃度依存的な細胞障害性を示した。一方で rLukS-PV、rLukF-PV および rEV による刺激ではいずれも NC と比較して吸光度に有意差は認めなかった。

サイトカインの測定において、ELISA の検出感度の下限は TNF- α : 31.3 pg/mL、IL-6 : 12.5 pg/mL、IL-1 β : 49.15 pg/mL であった。サイトカイン産生に関しては、ELISA の結果、PC とのサイトカイン比は 100nM LukS-PV 刺激でいずれのサイトカインも NC に対して有意に上昇した ($p<0.01$)。一方で、rLukF-PV、rPVL、rEV ではいずれの刺激によっても NC と有意差を認めなかった。

C5aR 阻害実験に関しては、ウサギ C5aR は 50 kDa であり、WB で肺胞マクロファージにおける C5aR の発現が確認された。細胞障害性については、PMX205 で細胞を前処理することにより、5nM PVL 刺激の場合、未処理の細胞よりも吸光度低下が改善 ($p<0.05$) し、細胞障害の抑制が示された。サイトカインについても PMX205 での前処理により、100nM LukS-PV 刺激による TNF- α の産生が有意に抑制された ($p<0.01$)。

【考察】

これまでに C5aR を介したヒト初代培養好中球に対する PVL 細胞障害性が報告されているが、肺胞腔における PVL の作用機序を解明する上で、血中の好中球のみでは不十分であった。そのため本研究は、肺胞腔の自然免疫において主要な役割を担う肺胞マクロファージに焦点を当て、PVL の作用を検討した。本研究結果は LukS-PV が肺胞マクロファージからの炎症性サイトカインの放出を誘発し、LukS-PV と LukF-PV が C5aR を介して会合し孔形成をすることで細胞障害を来すことを示した。この PVL の作用による肺胞マクロファージの貪食作用の障害およびサイトカイン放出作用の抑制が、病原因子の除去の遅延を来し、壊死性肺炎の長期化および重篤化の一因である可能性が考えられた。

ヒト好中球では、PVL により TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-1 β などのサイトカインが放出されることが報告されている。一方、本研究では、ウサギ肺胞マクロファージにおいて PVL

の構成要素である LukS-PV の存在下で同様のサイトカイン放出がみられたものの、PVL 存在下では肺胞マクロファージそのものが障害されることが明らかとなった。今後、PVL とその構成要素である LukS-PV の作用に関して、宿主種と細胞種の違いを考慮した検討が必要であると考え。本研究ではサイトカイン放出に関連する受容体に関し、ヒト好中球と同様にウサギ肺胞マクロファージにおいても C5aR が関与していることが示された。好中球においては C5aR 以外に Toll-like 2 receptor が関与したサイトカイン放出経路の報告もあり、今後肺胞マクロファージに関しても複数の受容体を評価する必要性が考えられる。

【結語】

ウサギから回収した初代培養肺胞マクロファージに対して、PVL は C5aR を介してその構成成分が会合することで肺胞マクロファージを障害し、LukS-PV は単独で C5aR を介して肺胞マクロファージからのサイトカイン放出を誘導した。

目次

	頁
1. 序論 -----	1
1.1 MRSA 感染症について-----	1
1.2 Panton-Valentine leukocidin (PVL) について-----	2
2. 研究目的 -----	3
3. 方法 -----	4
3.1 リコンビナント蛋白作成 -----	4
3.2 ウサギ肺胞マクロファージの回収-----	5
3.3 肺胞マクロファージ培養と刺激実験および C5aR 阻害実験 -----	5
3.4 細胞障害性評価 -----	5
3.5 炎症性サイトカインの測定 -----	6
3.6 C5aR 発現確認 -----	6
3.7 統計解析 -----	6
4. 結果 -----	7
4.1 リコンビナント蛋白の発現とウサギ肺胞マクロファージの回収 -----	7
4.2 ウサギ肺胞マクロファージに対する rPVL の細胞障害性 -----	9
4.3 リコンビナント蛋白による刺激に対するウサギ肺胞マクロファージの細胞 応答 -----	10
4.4 PMX205 を用いた細胞障害性および細胞応答の検討 -----	11
5. 考察 -----	14
6. 結語 -----	16
7. 研究の限界および今後の課題 -----	17
8. 謝辞 -----	18
9. 引用文献 -----	19
10. 業績目録 -----	22

1. 序論

1.1 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 感染症について

黄色ブドウ球菌は、損傷した皮膚や粘膜部位から体内に侵入し、さまざまな毒素を産生し、皮膚や軟部組織の感染症、肺炎、感染性心内膜炎、骨髄炎などの感染症を引き起こす。1961年に院内感染を引き起こす原因菌として Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) が初めて報告 (1) されて以降、1960年代から1970年代にかけて、MRSA に関して多数の報告がなされた (2)。

さらに1990年代には、従来の院内感染型 MRSA に対して、市中の健常人に感染する市中感染型 MRSA (CA-MRSA) が出現した (3)。その後、CA-MRSA による重篤な感染症は、西欧諸国、オーストラリア、さらには日本でも報告されるようになり (4-6)、特に、USA300株は、壊死性肺炎 (7) や敗血症 (8) などの重篤な感染症を引き起こすことが報告されている。USA300株を含む CA-MRSA の特徴として、白血球溶解毒素の1つである Panton-Valentine leukocidin (PVL) の保有が挙げられる (9)。PVL 陽性 MRSA によって引き起こされる肺炎は、PVL 陰性 MRSA による肺炎よりも死亡率が高いことが報告されている (Figure 1) (10)。また、近年メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) による市中肺炎においても PVL 陽性 MSSA は PVL 陰性 MSSA よりも死亡率が高いことが報告された (11)。すなわち、PVL は MRSA および MSSA による肺感染症の重症度に影響を与える要因の1つと言える。

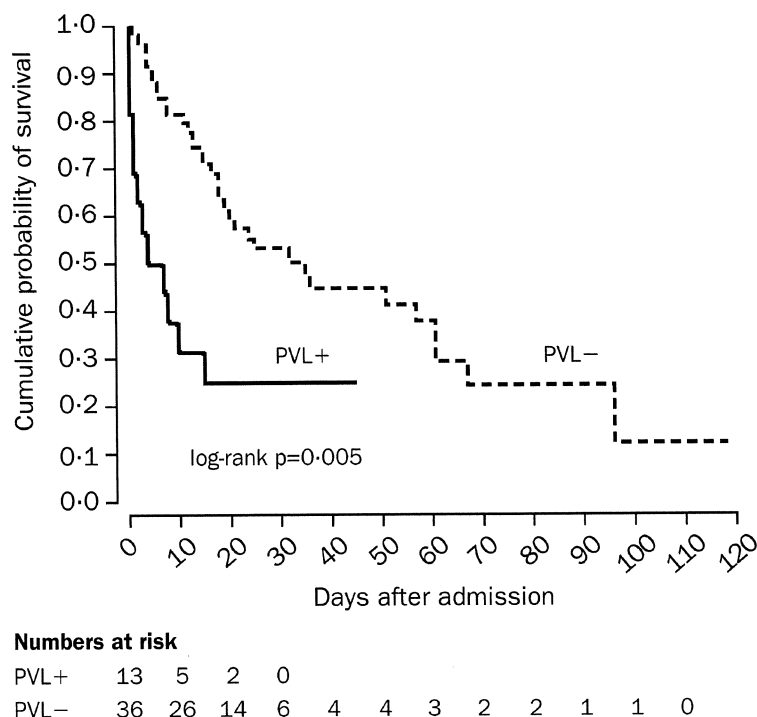


Figure 1 PVL 陽性および陰性 MRSA 肺炎患者の入院後の生存期間 (文献 10 より引用)

1.2 Panton-Valentine leukocidin (PVL) について

PVLは LukS-PV と LukF-PV からなる 2 成分毒素で、ヒト好中球、単球 (12)、肺マクロファージ (13) の細胞死を誘導する。細胞死の誘導は、Figure 2 で示す様に、まず標的細胞の受容体に LukS-PV が結合し (14)、次に細胞膜上の LukS-PV が LukF-PV と二量体を形成し (15)、その後、LukS-PV および LukF-PV によるオリゴマー化が起こり、8 量体となり標的細胞膜に細孔を形成する (16, 17)。これにより標的細胞は細胞内成分の流出により細胞膜内の恒常性が喪失し、細胞死が引き起こされる (18)。さらに、好中球およびマクロファージにおいては、LukS-PV が結合する受容体として C5a 受容体 (C5aR) が同定されている (19, 20)。

また、細胞死以外に PVL が標的細胞に及ぼす影響として、Holzinger らは、PVL が標的細胞に孔形成することにより、nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing gene family and pyrin domain containing 3 protein inflammasome が活性化され、標的細胞からのインターロイキン(IL)-18 の放出を誘導すると報告した(21)。一方で、Zivkovic らは、標的細胞が PVL による孔形成とは無関係に腫瘍壊死因子 (TNF- α) を放出することを示した (22)。

上記のように PVL の作用に関していくつかの報告がなされているが、一方で PVL の持つ宿主種および細胞種に対する特異性 (12, 20) により、PVL の標的細胞に対する細胞死やサイトカイン放出に関するメカニズムはさらなる研究の余地があると考えられる。

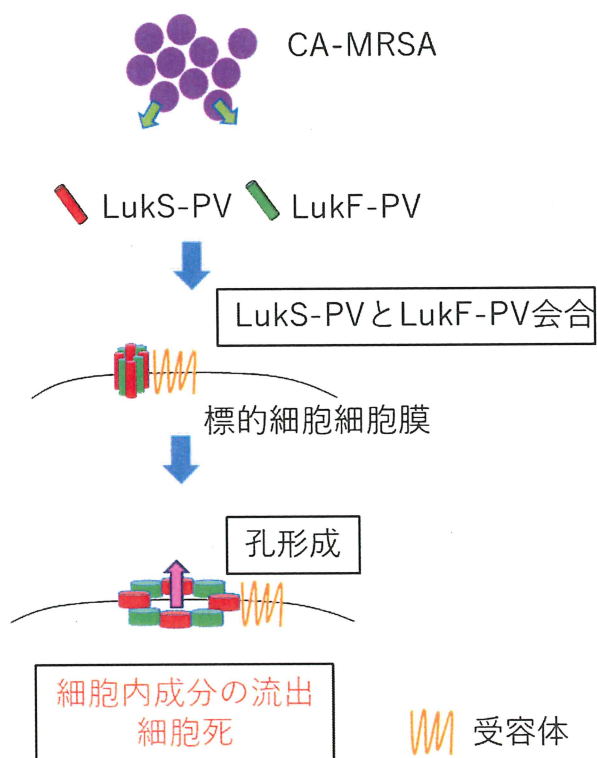


Figure 2 細胞死誘導における PVL の作用機序 (文献 11~16 をもとに作成)

2. 研究目的

黄色ブドウ球菌感染症の中でも、PVL 陽性 MRSA 感染症による壊死性肺炎は特に致死率の高い感染症である。その病態を解明するためには、肺組織を構成する個々の細胞に対する PVL の作用を明らかにすることが重要である。中でも肺胞マクロファージは、病原因子の貪食や抗原提示、さらには好中球やリンパ球などの様々な細胞の遊走を促進するなど、肺感染の初期段階で特に重要な役割を果たしている。

ここで、本研究では、よりヒトの生体内に近似した細胞の反応を評価するため、株化細胞は用いず、PVL が感受性を有する宿主種であるウサギから回収した初代培養肺胞マクロファージを使用して、PVL による刺激実験を行い、PVL の細胞障害性を評価し、さらに、PVL 刺激に対する肺胞マクロファージからのサイトカイン産生について検討することにした。

3. 方法

3.1 リコンビナント蛋白作成

本研究では、大腸菌を用いて、PVLの構成要素であるLukS-PVとLukF-PVのリコンビナント蛋白を作成し、実験に使用した。リコンビナント蛋白の作成は文献24をもとに一部改変し作成した。まずは、PVL産生CA-MRSAであるUSA300株由来のLukS-PVおよびLukF-PVの塩基配列に制限酵素の認識配列を株式会社医学生物学研究所（愛知，日本）にて作成し、それぞれをpRSETベクター(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)に導入した。導入の際にはBamHI（タカラ，滋賀，日本）、XhoI（タカラ）、HindIII（タカラ）を制限酵素として用いた。さらに、毒素の塩基配列を導入したpRSETと塩基配列を導入していないpRSETを大腸菌DH5 α (Thermo Fisher Scientific)に形質導入し、それぞれLukS-PV-pRSET、LukF-PV-pRSETおよびEmpty vector (EV) -pRSETを作成した。LukS-PVとLukF-PVの塩基配列はユーロフィン (Luxembourg, Luxembourg) のゲノムDNAシーケンスサービスにて確認した。

次に、LukS-PV - pRSET、LukF-PV - pRSETおよびEV - pRSETを大腸菌BL21(DE3) (Thermo Fisher Scientific)に導入し、イソプロピル- β -D-チオガラクトシド（タカラ）を用いて、37℃で2時間培養し、リコンビナント蛋白を発現させ、BL21 (DE3)を遠心分離し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (-)に再懸濁し、超音波処理した。リコンビナント蛋白は、TALON Cobalt Affinity Resin (タカラ)を使用して精製した。透析膜 (Spectrum Laboratories, New Brunswick, NJ, USA)を使用して、溶媒をPBS (-)に置換した。Lipopolysaccharide (LPS)の除去はDetoxiGelカラム (Thermo Fisher Scientific)を使用して2回行い、LPSの濃度はLimulus Color KY Test (FUJIFILM, 東京, 日本)を使用して0.005 EU/mL未満であることを確認した。リコンビナント蛋白の濃度はNanoDropTM Lite (Thermo Fisher Scientific)を使用して測定した。

リコンビナント蛋白であるLukS-PV (rLukS-PV)、LukF-PV (rLukF-PV)、およびEV (rEV)の発現は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびウエスタンブロッティング (WB) によって確認した。rEVは、上記の精製プロセスで得られたEV-pRSETを導入した大腸菌BL21 (DE3)由来の6 \times Hisタグペプチドを含む溶媒である。WBの場合、rLukS-PV、rLukF-PVおよびrEVをポリフッ化ビニリデン膜 (Immobilon-P 転写膜[®]) (Merck, Darmstadt, Germany)にブロットし、1次抗体には、抗6 \times ヒスチジンモノクローナル抗体 (FUJIFILM)、2次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ヤギ抗マウスIgG (BioLegend, San Diego, CA, USA)をそれぞれ用いた。発現したリコンビナント蛋白は、化学発光基質 (ECL) (GE healthcare, Little Chalfont, UK)との反応後、X線フィルム (FUJIFILM)で視覚化した。リコンビナント蛋白は凍結融解に伴う凝集を防ぐため、グリセリンと1:1で混合した。リコンビナントPVL (rPVL)はrLukS-PVとrLukF-PVを1:1で混合することで作成した。

すべての毒素刺激実験では、上記工程で最初に作成したリコンビナント蛋白を使用した。

3.2 ウサギ肺胞マクロファージの回収

ウサギ肺胞マクロファージは、文献 25 をもとに一部改変した方法にて回収した。まずは、実験用ウサギ(New Zealand white メス, 体重 2.82 ± 0.06 kg, 年齢 14.71 ± 0.53 週, $n=14$) をイソフルラン吸入で麻酔導入し、ペントバルビタールを腹腔内注射することで麻酔を維持した。麻酔後、頸部正中切開を置き、気管と頸動脈を同定後、頸動脈穿刺により放血致死させた。その後、同定した気管を切開し、50mL の滅菌生理食塩水 (フソー, 大阪, 日本) によって 3 回気管支肺胞洗浄を行った。得られた気管支肺胞洗浄液 (BALF) を遠心分離し、沈殿物を 10%ウシ胎児血清 (FBS ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 含有 RPMI1640 (Sigma-Aldrich) に再懸濁し、37°C、5% CO₂ の孵卵器で 2 時間培養後、接着細胞を肺胞マクロファージとした。

回収した細胞集団のうち、肺胞マクロファージの純度は May-Giemsa 染色によって形態学的に評価するとともに、免疫学的にはフローサイトメトリーにて、細胞表面マーカーである CD11b が陽性な集団を肺胞マクロファージと定義し、CD11b を蛍光色素結合モノクローナル CD11b 抗体 (フィコエリトリン : PE, BioLegend) で染色し、MACSQuant フローサイトメーター (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) を使用したフローサイトメトリーで分析した。

すべての手順は、北里大学医療衛生学部の動物実験委員会によって承認された上で施行した (承認番号 : 18-53)。

3.3 肺胞マクロファージ培養と刺激実験および C5aR 阻害実験

ウサギ肺胞マクロファージは、組織培養プレート (IWAKI, 静岡, 日本) の各ウェルに 1×10^5 個ずつ播種し、10%FBS (Sigma-Aldrich) を含む RPMI1640 (Sigma-Aldrich) で一晩培養した。毒素による刺激時に、液体培地を交換し、肺胞マクロファージを 5 および 100 nM の rLukS-PV、rLukF-PV、rPVL または rEV によって刺激した。炎症性サイトカインの測定のために、Positive control (PC) として LPS (100 ng / mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で刺激した。24 時間後、細胞を細胞障害性の評価に使用し、培養上清を炎症性サイトカインの測定に使用した。C5aR 阻害実験では、ウサギ肺胞マクロファージを PMX205 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) で 15 分間前処理した後、5、100 nM の rLukS-PV、rPVL および LPS (100ng/mL) で 24 時間刺激した。

3.4 細胞障害性評価

リコンビナント蛋白で刺激後および無刺激 (Negative control ; NC) の細胞に対して MTT assay を行い、マイクロプレートリーダー (Benchmark, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いてそれぞれの細胞の吸光度を測定した (測定波長 : 570 nm、基準波長 : 655 nm)。刺激後と NC の細胞の吸光度を比較することで、刺激による細胞障害性を評価した。MTT assay には Cell Proliferation Kit I (MTT) (Merck) を用いた。

3.5 炎症性サイトカインの測定

培養上清中の炎症性サイトカインは、酵素免疫測定法（ELISA）を用いて測定した。TNF- α および IL-6 は RabbitTNF-alpha および RabbitIL-6 DuoSet ELISA キット（R&D Systems, Minneapolis, MN, USA）を、IL-8 および IL-1 β は Rabbit ELISA キット（RayBiotech, Peachtree Corners, GA, USA）を用いてそれぞれ評価した。各刺激実験における細胞の反応の違いを標準化するために、サイトカイン放出の程度は、各毒素で得られた値を LPS 刺激時に得られた値で除し、百分率（%）で示した。

3.6 C5aR 発現確認

細胞溶解液（滅菌水にトリス 20 mM, スクロース 0.25 M, トリトン 1%, グリコールエーテルジアミン四酢酸 10 mM, エチレンジアミン四酢酸 2 mM で溶解し pH 8.2 に調整して作成）を用いて、肺胞マクロファージを氷冷下で 1 時間処理し、WB により C5aR の発現を確認した。その際、1 次抗体には、ヒト C5aR モノクローナル抗体（clone S5/1, Hycult® Biotech, Uden, The Netherlands）を、2 次抗体には、HRP 結合ヤギ抗マウス IgG（BioLegend）をそれぞれ使用した。

3.7 統計解析

3 群以上の比較の場合、一元配置分散分析を用い、post hoc には、Bonferroni 法を用いた。2 群間の比較の場合、F 検定が等分散であると仮定した上で t 検定を行った。統計分析には統計解析ソフト EZR（埼玉メディカルセンター，自治医科大学）を使用した。すべての値は平均値 \pm 標準誤差で表し、 $p < 0.05$ を統計的に有意であると見なした。サイトカインの測定において濃度が検出感度よりも低い場合、各 ELISA の検出感度の下限（TNF- α : 31.3 pg/mL, IL-6 : 12.5 pg/mL, IL-1 β : 49.15 pg/mL）を用いて統計解析を行った。

4. 結果

4.1 リコンビナント蛋白の発現とウサギ肺胞マクロファージの回収

SDS-PAGE (Figure 3A) および WB (Figure 3B) により、LukS-PV および LukF-PV の分子量に対応するバンド (それぞれ 32 および 34 kDa) (17) が出現し、リコンビナント蛋白が発現していることが確認された。rEV に関しては、WB にてバンド形成は見られなかった (Figure 3B)。

細胞の純度に関しては、BALF から回収された細胞のうち、形態学的に 89%が肺胞マクロファージであることを確認した。また、フローサイトメトリーでは、CD11b に対する蛍光色素結合モノクローナル抗体を用いた検討で、その純度が 88%であることを確認した (Figure 3C)。

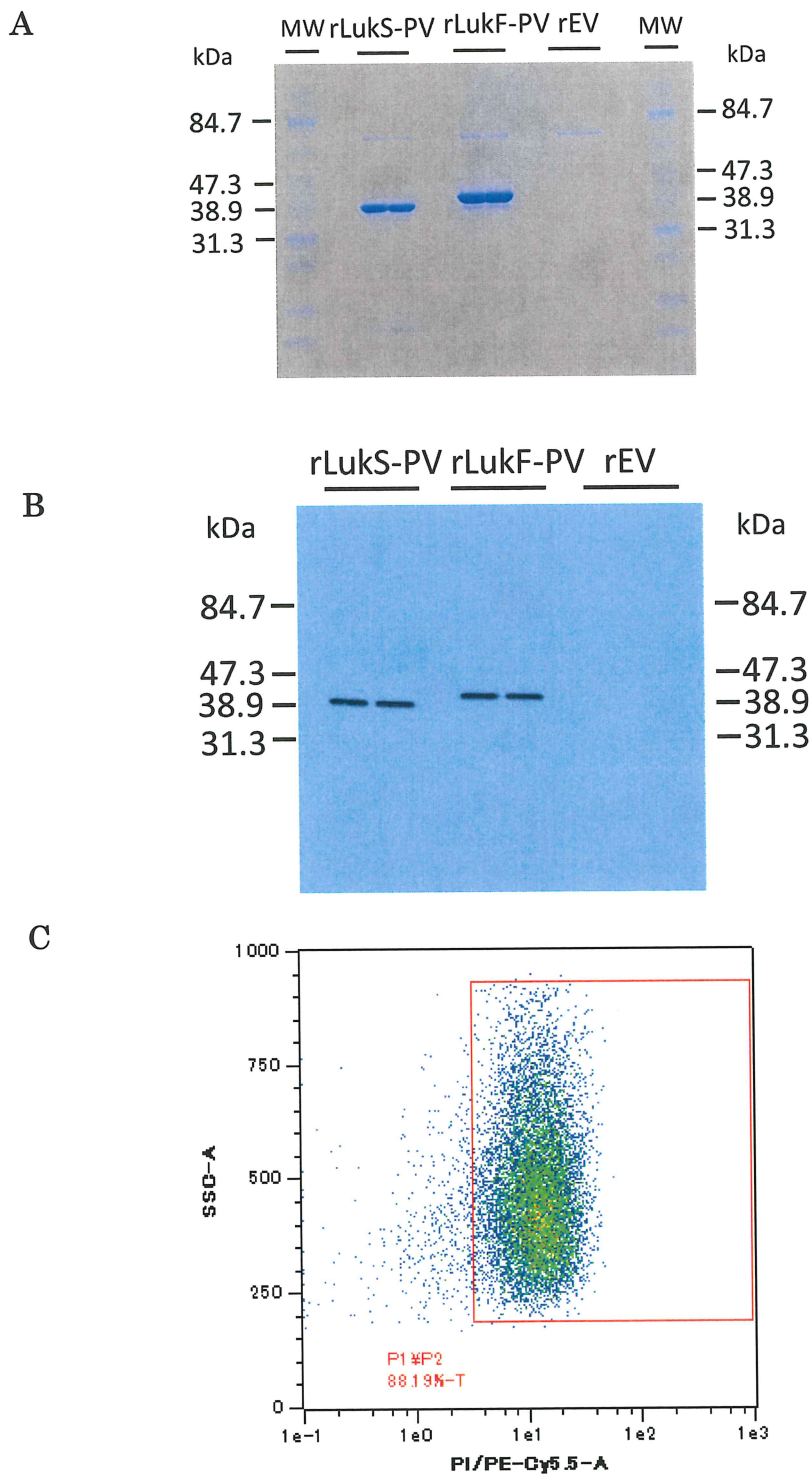


Figure 3 リコンビナント蛋白の発現と肺胞マクロファージの純度確認

大腸菌から抽出されたリコンビナント蛋白は (A) ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動および (B) ウェスタンブロッティングによって発現を確認した。(C) フローサイトメトリーによる免疫学的評価では肺胞マクロファージはBALF回収細胞の88%であった。

4.2 ウサギ肺胞マクロファージに対する rPVL の細胞障害性

rPVL、rLukS-PV、rLukF-PV および rEV の細胞障害性は、MTT assay を用いて評価した。肺胞マクロファージを rLukS-PV および rLukF-PV 単独または rEV で刺激した場合、無刺激の肺胞マクロファージと比して吸光度 (OD 値) に有意差は認めなかった。一方で、rPVL で刺激した場合、その OD 値は、無刺激の肺胞マクロファージと比較して有意にかつ濃度依存的に低下した (Figure 4)。

これらの結果から、肺胞マクロファージの細胞障害性を誘導するために rLukS-PV と rLukF-PV のオリゴマー化が必要であることが示された。

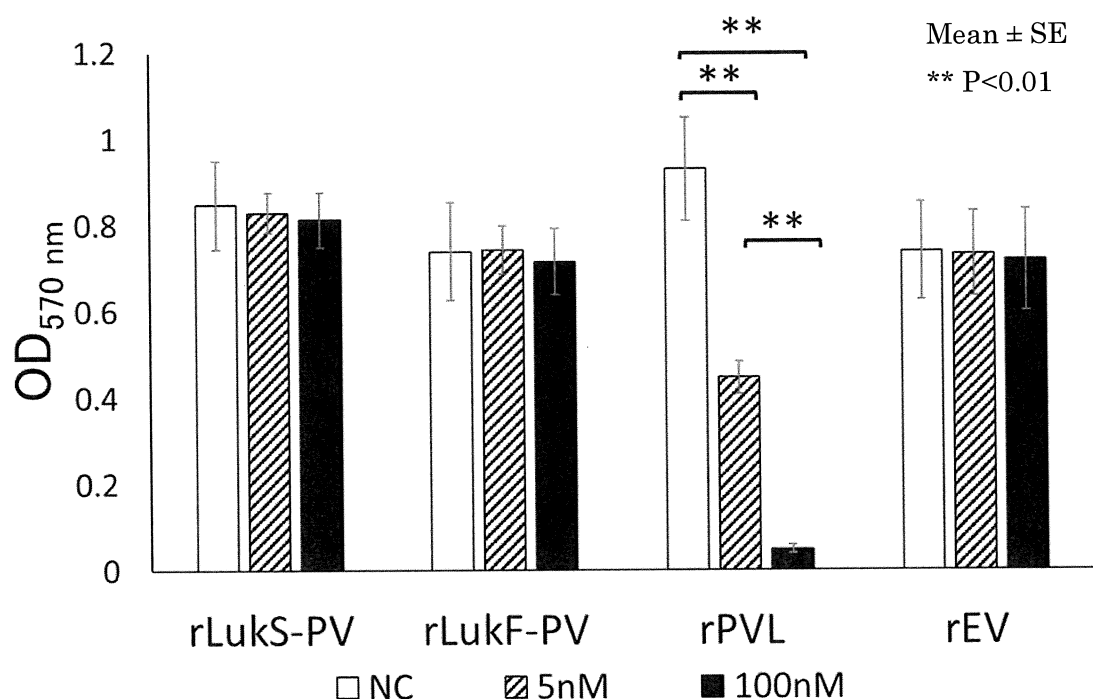


Figure 4 肺胞マクロファージに対するリコンビナント蛋白の細胞障害性の評価

rLukS-PV、rLukF-PV 単独では 5、100 nM いずれの刺激でも無刺激 (negative control; NC) と比較して OD 値に有意差を認めなかった。一方で rPVL では 5、100 nM いずれの刺激でも NC と比較して OD 値が有意に低下した。

4.3 リコンビナント蛋白による刺激に対するウサギ肺胞マクロファージの細胞応答

rPVL、rLukS-PV、rLukF-PV および rEV で刺激された肺胞マクロファージから放出される炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6、IL-8、および IL-1 β) を測定した。すべての炎症性サイトカインの放出の程度は、rLukS-PV で刺激することにより無刺激と比較し、有意かつ濃度依存的に増加した。一方、rLukF-PV あるいは rPVL による刺激の場合、無刺激と比較して炎症性サイトカインの放出の程度には有意差は認められなかった (Figure 5)。

したがって、肺胞マクロファージの細胞反応は PVL の構成要素のうち、LukS-PV に起因する可能性が考えられた。

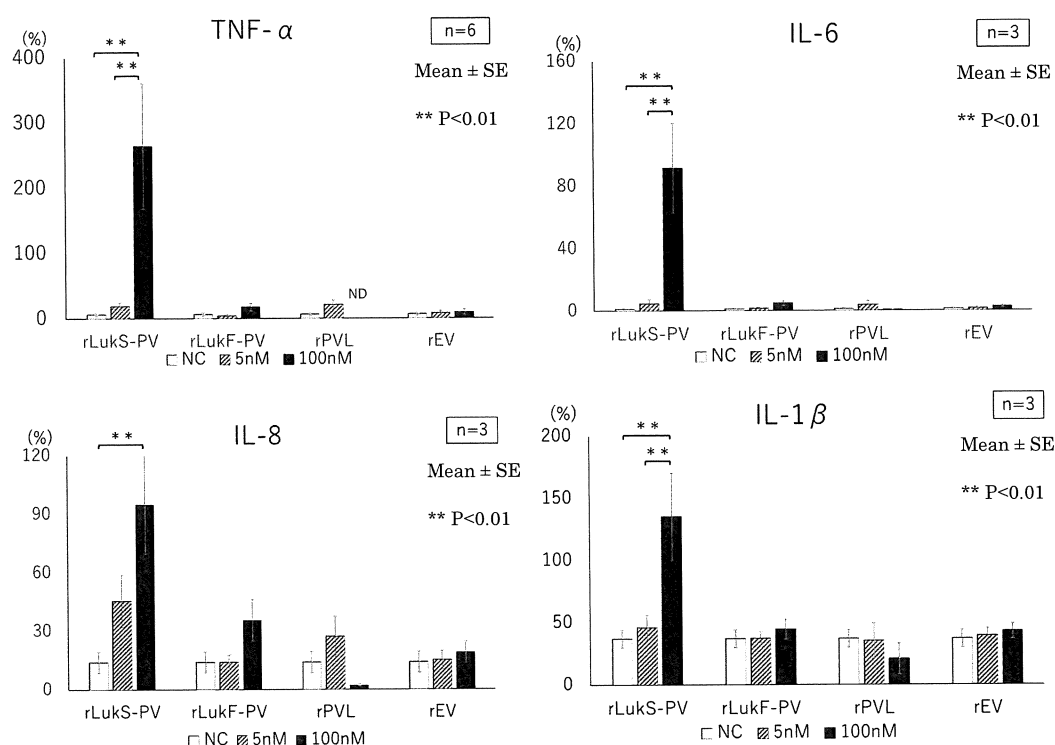


Figure 5 リコンビナント蛋白刺激に対する肺胞マクロファージからの炎症性サイトカイン産生

いずれのサイトカインについても 100 nM の rLukS-PV で刺激した場合、無刺激 (negative control; NC) と比較して、サイトカイン放出の程度が有意に増加した。一方で、rLukF-PV 単独や rPVL の刺激ではいずれのサイトカインも NC と比較して有意な増加は認めなかった。n : ウサギの数, ND: 検出せず。

4.4 PMX205 を用いた細胞障害性および細胞応答の検討

ウサギ C5aR の分子量は 50 kDa であり、WB にてウサギ肺胞マクロファージに C5aR の発現が確認された (Figure 6A)。

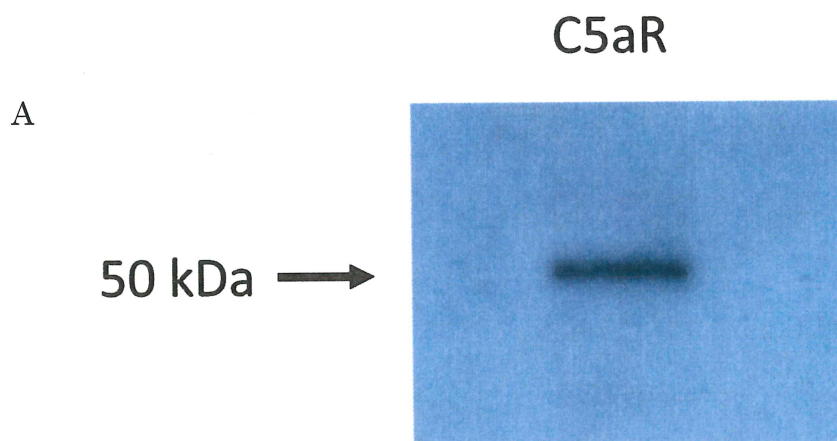
C5aR が PVL 誘発細胞毒性に必要などうかを判断するために、PMX205 を使用して C5aR を阻害した。

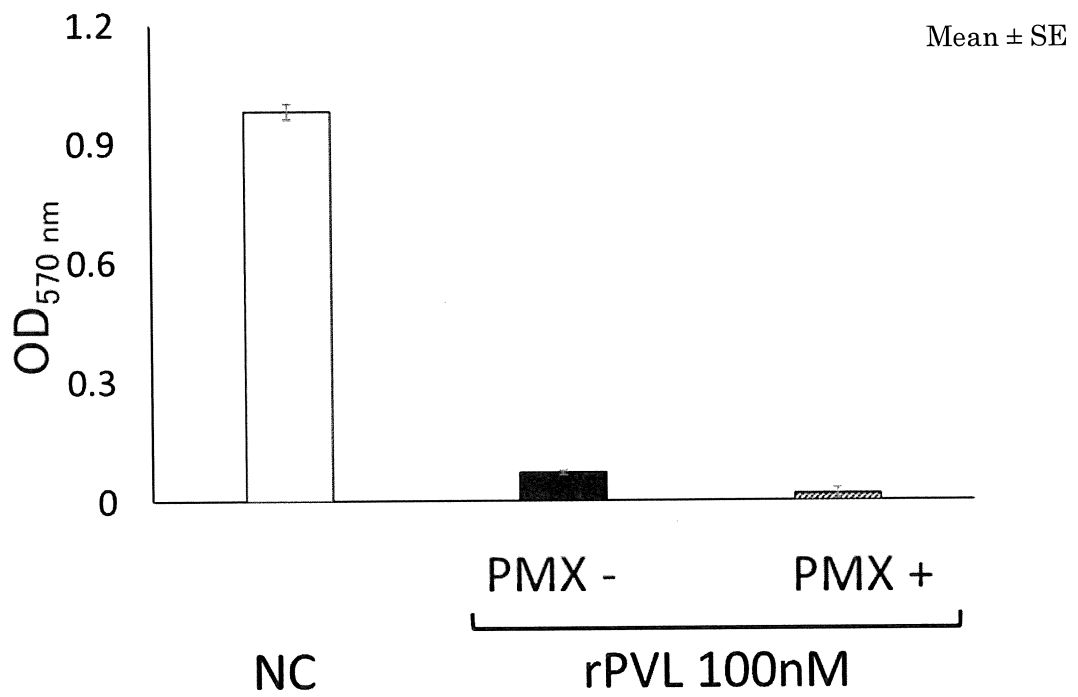
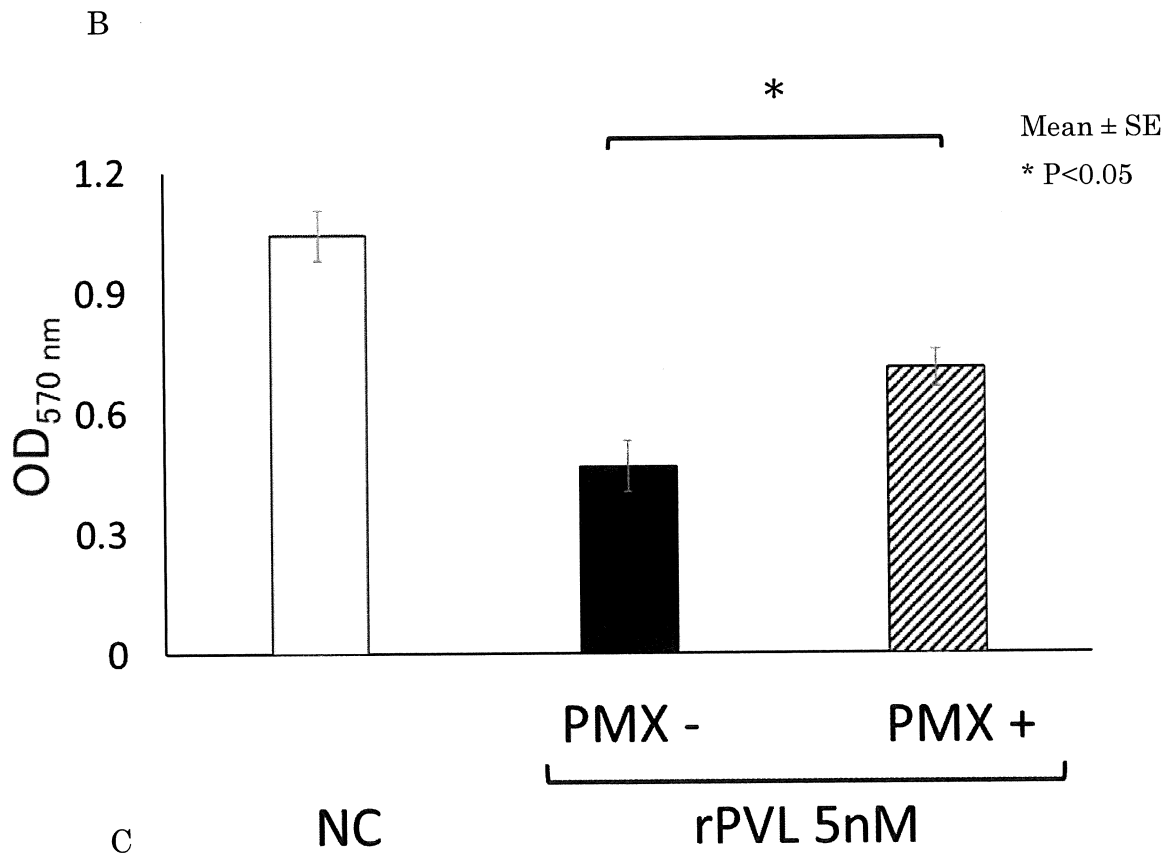
まず、ウサギ肺胞マクロファージに対する PMX205 の影響の有無について検討を行った。細胞障害性に関しては、NC と比較し、PMX205 の前処理のみを行った場合の OD 値に有意差は認めなかった。一方、PC による TNF- α の放出の程度が PMX205 の前処理によって有意に低下した。これにより、本実験に用いた PMX205 がウサギ肺胞マクロファージの C5aR に対して阻害作用を有することが確認された。

次に、阻害実験について、5 nM rPVL 刺激細胞における OD 値の低下は、PMX205 による前処理によって有意に回復し、rPVL による細胞障害性には C5aR の関与が示唆された (Figure 6B)。一方、100 nM rPVL で刺激した場合、PMX205 による前処理に関係なく OD 値に差は認めなかった (Figure 6C)。細胞障害性に関しては、C5aR 以外の要因の寄与を示した。

また、細胞応答に関しては、PMX205 によって、C5aR への rLukS-PV の結合を阻害することにより、TNF- α レベルの低下が引き起こされた (Figure 6D)。

100 μ M PMX205 の前処理で、5 nM の rLukS-PV で刺激された場合、放出された TNF- α は 4.0% から ELISA の感度下限未満に減少した。同様に、100 nM の rLukS-PV で刺激された場合、TNF- α 放出の程度は、前処理をすることで 128.0% から 32.2% に減少した。





D

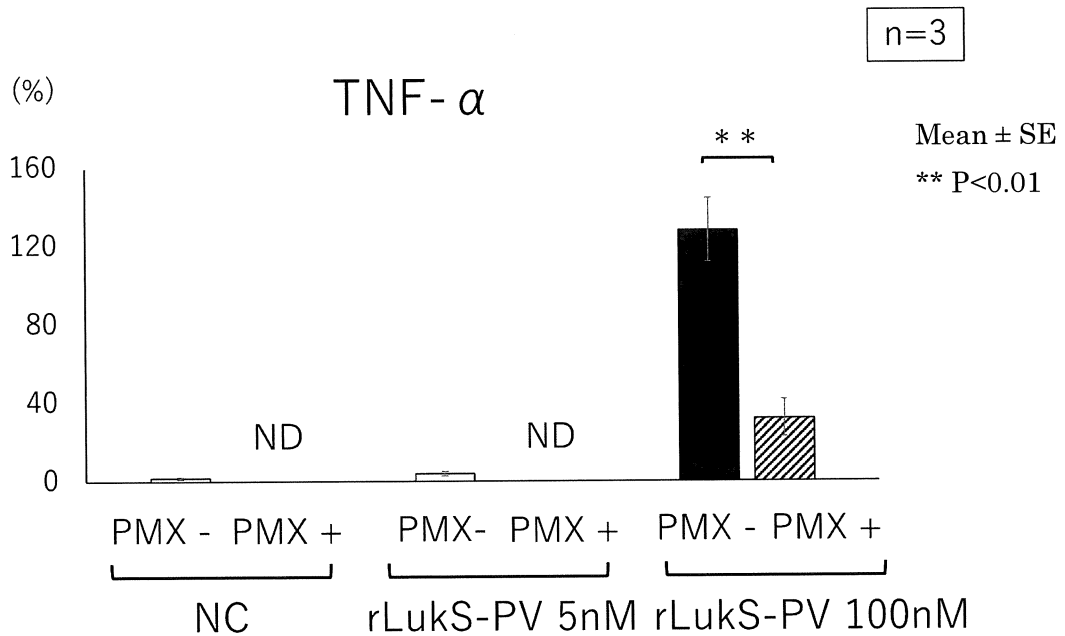


Figure 6 PMX205 を用いた細胞障害性の阻害と炎症性サイトカインの産生抑制の確認
(A) WB によって肺胞マクロファージにおける C5aR の発現が確認された。
(B) PMX205 の前処理で 5 nM rPVL 刺激による OD 値の低下が有意に回復した。
(C) PMX205 の前処理で 100 nM rPVL 刺激による OD 値の低下に有意な回復は認めなかった。
(D) PMX205 の前処理で 5 nM rLukS-PV 刺激でのサイトカイン値が ELISA の検出感度未満に低下した。100 nM rLukS-PV 刺激によるサイトカイン放出の程度は PMX205 による前処理で有意に低下した。n : ウサギの数, ND : 検出せず。

5. 考察

PVLによって引き起こされる細菌性肺炎のメカニズムを理解することは重要である。肺胞マクロファージは正常な肺胞の主要な免疫細胞であるため、細菌性肺炎の初期段階の肺胞腔に焦点を当てて研究を行った。結果は、LukS-PVのみが肺胞マクロファージからの炎症性サイトカインの放出を誘発し、LukS-PVとLukF-PVが肺胞マクロファージの表面に膜孔を形成し、細胞障害性を誘発することが明らかとなった。さらに、これらの作用がC5aRによって媒介されることが示された。Zivkovicら(22)およびWuら(13)は、PVLが初代培養ヒト肺胞マクロファージに対して細胞障害性があることを報告したが、PVLの受容体に関しては不明であった。また、Spaanら(20)は、ヒト初代培養好中球に対するPVLの細胞障害性にC5aRが関与していることを報告した。しかし、好中球に対するPVLの作用の解明のみでは、肺胞腔における局所免疫の誘発についての十分な理解は得られなかった。本研究の結果は、ウサギ肺胞マクロファージに対するPVLの作用の詳細を明らかにし、PVLの作用機序のより詳細な理解に有益であると考えられる。

肺胞マクロファージは、外因性抗原を認識し、TNF- α などの炎症性サイトカインを放出するため、初期免疫に不可欠な要素である(26)。PVLは、血中のヒト好中球(21, 22, 24)および単球(21)からの炎症性サイトカインの放出を誘導することが報告されている。一方、低濃度のPVL刺激において、初代培養ヒト肺胞マクロファージからはTNF- α 放出が誘導されなかったとの報告もある(13)。本研究において、PVLの構成成分であるLukS-PVのみで刺激した場合、ウサギ肺胞マクロファージはTNF- α 、IL-6、IL-8、およびIL-1 β を放出することが示された。しかし、肺胞マクロファージ表面のC5aRにLukS-PVが結合した状態で、続いてLukF-PVを添加してPVLとして作用させた場合にはTNF- α は放出されなかった。これは、PVLにより肺胞マクロファージの細胞死が誘発されたために炎症性サイトカインの誘導が起こらなかったためと考えられた。Magallら(27)はPVL刺激によりヒト肺胞マクロファージからIL-1 β が放出されることを報告したが、本研究とは細胞の宿主種や毒素濃度、および刺激時間などの条件が異なっていたためと考えられた。PVLの作用に関して、さまざまな毒素濃度と刺激時間で細胞障害性とサイトカインの測定を行う必要があると考えられる。また、PVLによる孔形成性の細胞死に要する時間と、PVL刺激によるサイトカイン放出に要する時間に関しても、より詳細なデータ収集と解析が必要と考える。LukS-PV刺激によって引き起こされる標的細胞からのサイトカイン放出に関して、Zivkovicら(22)はToll-like 2 receptor (TLR2)を介したメカニズムで、C5aRに関連する孔形成とは無関係にTNF- α とIL-8の放出が促進されることを示した。標的細胞によるサイトカイン放出のメカニズムをさらに解明するには、C5aRに加えてTLR2を含む複数の要因を評価する必要がある。

細菌性肺炎に対する先天性免疫では、肺胞マクロファージは貪食作用を行い(28)、ケモカインやTNF- α (29)、IL-6(30)、IL-1 β (31)およびIL-8(30, 32)などのサイトカインを放出することにより、好中球を含む免疫細胞の肺胞腔への移動を促進する。今回の研

究結果に基づいて、PVL は次のように肺胞腔の局所免疫に影響を与えると予測される。LukS-PV が単独で作用すると、C5aR を介して肺胞マクロファージからの炎症性サイトカインの放出が促進される。しかし、LukS-PV と LukF-PV が結合して PVL を形成すると、C5aR を介した細胞障害により貪食作用とサイトカイン放出能が障害され、病原因子の排除遅延を来し、感染が長期化すると考える (Figure 7)。本研究から、自然免疫において中心的な役割を果たす肺胞マクロファージに対して PVL は炎症誘発作用を示すことが明らかとなった。これらの結果は、PVL によって引き起こされる壊死性肺炎のメカニズムを理解するのに有用であると考えられる。

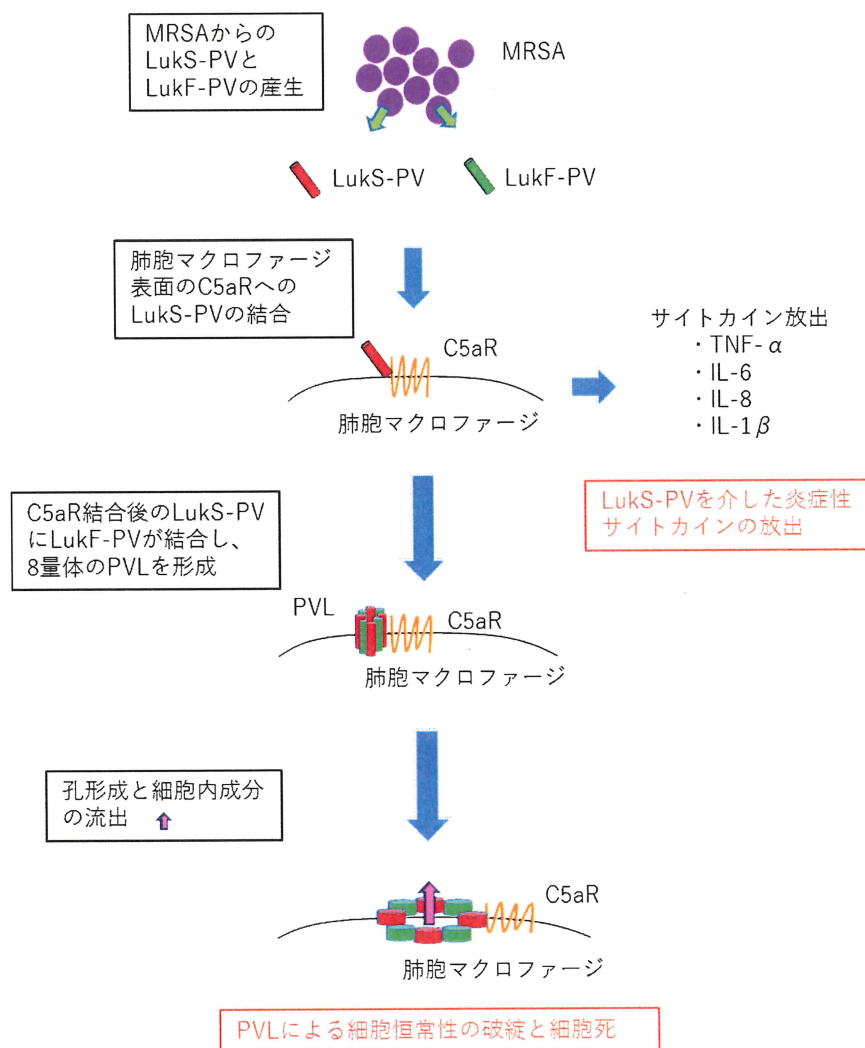


Figure 7 本研究より類推される肺胞マクロファージに対する PVL の作用機序

6. 結語

PVL は、ウサギ肺胞マクロファージに対して、細胞膜表面の C5aR に先ず LukS-PV が結合し、次に LukF-PV が結合し、その後は LukS-PV と LukF-PV が交互に会合することで細胞膜に孔を形成して肺胞マクロファージを障害したと考えられた。

LukS-PV は単独で炎症性サイトカイン放出を誘導するが、特に TNF- α の放出に関しては C5aR が関与していることが明らかとなった。

7. 研究の限界および今後の課題

本研究はウサギ由来の肺胞マクロファージを用いて PVL の作用を *in vitro* で検討したものである。PVL の作用は宿主種によって異なる (12) ため、本研究の結果がヒト MSSA 肺炎および MRSA 肺炎において PVL が重症化を来す (11) メカニズムと同一であるかは明らかではない。また、病原微生物による肺炎において、PVL 以外にも α -Hemolysin や CHIPS などの細胞障害性毒素は報告されている (34) が、それらに関して今回は検討していない。

肺炎における炎症応答には、本研究で用いた肺胞マクロファージの他、肺胞上皮細胞や遊走する好中球などの種々の細胞が関わっており、様々なサイトカインが放出される (26, 33)。また、サイトカイン放出のメカニズムに関しても、TLR2 などの C5aR 以外の経路に関しては今回の研究では明らかにはできておらず、今後さらなる検討が必要と考えられる。しかしながら、1羽のウサギから回収できる肺胞マクロファージの数は多いとは言えず、一度に測定することが可能な項目には限りがあるため、今後も実験の測定条件の設定には十分な検討が必要と考える。

ヒト肺胞マクロファージの初代培養細胞を用いて研究を行う場合、通常の BAL では一つの区域あるいは亜区域枝より末梢範囲における BALF 内の肺胞マクロファージのみが得られることになるため、研究に必要な肺胞マクロファージの細胞数が得られるかどうかは課題となると考えられ、実験系を確立したウサギを用いて予め十分な基礎的研究を重ねる必要があると考える。

今後はウサギを用いて肺胞上皮細胞や好中球を対象に、PVL や他の細胞障害性毒素の作用および細胞からの応答を検討し、さらには各細胞間の相互作用を評価することで肺炎が重症化するメカニズムをより明確化し、効果的な治療法の基礎研究としたいと考える。

8. 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導、ご助言を賜りました多くの方々に深く感謝申し上げます。

北里大学医療衛生学部臨床生理学研究室・大学院医療系研究科の片桐真人教授と横場正典教授には大学院博士課程の指導教授をご快諾いただき、大学院生活を送る上での環境の整備に多大なるご高配を賜りました。さらに、国内の学会に留まらず、国際学会での発表も経験させていただきました。

また、本研究遂行にあたり必要不可欠であった微生物学研究室の使用に際し、北里大学医療衛生学部微生物学研究室・大学院医療系研究科の北里英郎教授にも多大なるご高配を賜りました。

さらに、北里大学医療衛生学部薬理学研究室の小島史章准教授、再生医療・細胞デザイン研究施設の久保誠准教授、微生物研究室の前花祥太郎先生、同大学医学部寄生虫学・熱帯医学研究室的の川田逸人先生には、実験方法から論文作成に至るまで多岐にわたり数多くのご指導をいただき、この4年間で研究者として必要な知識および技術を学習させていただきました。

本研究は多くの方々にご指導、ご助言を賜り、支えられてきたことによりまとめ上げることができました。改めて心より感謝申し上げます。

9. 引用文献

1. Brumfitt W, Hamilton-Miller J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med. 1989;320:1188-96.
2. Keane CT, Cafferkey MT. Severe infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol. 1983;2:299-302.
3. Buescher SE. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pediatrics. Curr Opin Pediatr. 2005;17:67-70.
4. Peleg AY, Munckhof WJ. Fatal necrotising pneumonia due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Med J Aust. 2004;181:228-9.
5. Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine Leukocidin. Clin Infect Dis. 2002;35:819-24.
6. Yonezawa R, Kuwana T, Kawamura K, Inamo Y. Invasive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Japanese girl with disseminating multiple organ infection: a case report and review of Japanese pediatric cases. Case Rep Pediatr. 2015;2015:291025.
7. Francis JS, Doherty MC, Lopatin U, Johnston CP, Sinha G, Ross T, et al. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine Leukocidin genes. Clin Infect Dis. 2005;40:1100-7.
8. Gonzalez BE, Martinez-Aguilar G, Hulten KG, Hammerman WA, Coss-Bu J, Avalos-Mishaan A, et al. Severe staphylococcal sepsis in adolescents in the era of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Pediatrics. 2005;115:642-8.
9. Nakagawa S, Taneike I, Mimura D, Iwakura N, Nakayama T, Emura T, et al. Gene sequences and specific detection for Panton-Valentine Leukocidin. Biochem Biophys Res Commun. 2005;328:995-1002.
10. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotizing pneumonia in young immunocompetent patients. Lancet. 2002;359:753-9.
11. Gillet Y, Tristan A, Rasigade JP, Saadatian-Elahi M, Bouchiat C, Bes M, et al. Prognostic factors of severe community-acquired staphylococcal pneumonia in France. Eur Respir J. 2021;58:2004445.
12. Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Brück M, Holzinger D, Varga G, et al.

- Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. PLoS Pathog. 2010;6:e1000715.
13. Wu B, Zhang W, Huang J, Liu H, Zhang T, et al. Effect of recombinant Panton-Valentine leukocidin in vitro on apoptosis and cytokine production of human alveolar macrophages. Can J Microbiol. 2010;56:229-35.
 14. Gauduchon V, Sandra W, Gilles P, Henri M, Didier AC, et al. Flow cytometric determination of Panton-Valentine leucocidin S component binding. Infect Immun. 2001;69:2390-5.
 15. Oliveira D, Borges A, Simões M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. Toxins (Basel). 2018;10:252.
 16. Miles G, Movileanu L, Bayley H. Subunit composition of a bicomponent toxin: Staphylococcal leukocidin forms an octameric transmembrane pore. Protein Sci. 2002;11:894-902.
 17. Jayasinghe L, Bayley H. The leukocidin pore: evidence for an octamer with four LukF subunits and four LukS subunits alternating around a central axis, Protein Sci. 2005;14:2550-61.
 18. Aman MJ, Karauzum H, Bowden MG, Nguyen TL. Structural model of the pre-pore ring-like structure of Panton-Valentine leukocidin: providing dimensionality to biophysical and mutational data. J Biomol Struct Dyn. 2010;28:1-12.
 19. Spaan AN, Schiepers A, de Haas CJC, van Hooijdonk DDJJ, Badiou C, Contamin H, et al. Differential interaction of the Staphylococcal toxins Panton-Valentine leukocidin and γ -hemolysin CB with human C5a receptors. J Immunol. 2015;195:1034-43.
 20. Spaan AN, Henry T, van Rooijen WJM, Perret M, Badiou C, Aerts PC, et al. The staphylococcal toxin Panton-Valentine leukocidin targets human C5a receptors. Cell Host Microbe. 2013;13:584-94.
 21. Holzinger D, Gieldon L, Mysore V, Nippe N, Taxman DJ, Duncan JA, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin induces an inflammatory response in human phagocytes via the NLRP3 inflammasome. J Leukoc Biol. 2012;92:1069-81.
 22. Zivkovic A, Sharif O, Stich K, Doninger B, Biaggio M, Colinge J, et al. TLR 2 and CD14 mediate innate immunity and lung inflammation to staphylococcal Panton-Valentine leukocidin in vivo. J Immunol. 2011;186:1608-17.
 23. March DR, Proctor LM, Stoermer MJ, Sbaglia R, Abbenante G, Reid RC, et al. Potent cyclic antagonists of the complement C5a receptor on human polymorphonuclear leukocytes: relationships between structures and activity. Mol Pharmacol. 2004;65:868-79.

24. Ma X, Chang W, Zhang C, Zhou X, Yu F, et al. Staphylococcal Panton-Valentine leukocidin induces pro-inflammatory cytokine production and nuclear factor-kappa B activation in neutrophils. *PLoS One*. 2012;7:e34970.
25. Morito T, Oishi K, Yamamoto M, Matsumoto K. Biphasic regulation of Fc-receptor mediated phagocytosis of rabbit alveolar macrophages by surfactant phospholipids. *Tohoku J Exp Med*. 2000;190:15-22.
26. Quinton LJ, Walkey AJ, Mizgerd JP, Integrative physiology of pneumonia. *Physiol Rev*. 2018;98:1417-64.
27. Perret M, Badiou C, Lina G, Burbaud S, Benito Y, Bes M, et al. Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. *Cell Microbiol*. 2012;14:1019-36.
28. Nagre N, Cong X, Pearson AC, Zhao X. Alveolar macrophage phagocytosis and bacteria clearance in mice. *J Vis Exp*. 2019;145:10.3791/59088.
29. Soni S, Wilson MR, O'Dea KP, Yoshida M, Katbeh U, Woods SJ, et al. Alveolar macrophage-derived microvesicles mediate acute lung injury. *Thorax*. 2016;71:1020-9.
30. Larsson BM, Larsson K, Malmberg P, Palmberg L. Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells. *Inflammation*. 1999;23:217-30.
31. Peiró T, Patel DF, Akthar S, Gregory LG, Pyle CJ, Harker J, et al. Neutrophils drive alveolar macrophage IL-1 β release during respiratory viral infection. *Thorax*. 2018;73:546-56.
32. Miller EJ, Nagao S, Carr FK, Noble JM, Cohen AB, et al. Interleukin-8 (IL-8) is a major neutrophil chemotaxin from human alveolar macrophages stimulated with staphylococcal enterotoxin A (SEA). *Inflamm Res*. 1996;45:386-92.
33. Diep BA, Chan L, Tattevin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, et al. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* pantonvalentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:5587-92.
34. Thomsen IP, Liu GY. Targeting fundamental pathways to disrupt *Staphylococcus aureus* survival: clinical implications of recent discoveries. *JCI Insight*. 2018;3:e98216.

10. 業績目録

1. 原著

- 1) Harada S , Kawada H , Maehana S , Matsui H , Kubo M , Kojima F, Kitasato H, Katagiri M : Panton-Valentine Leukocidin Induces Cytokine Release and Cytotoxicity Mediated by the C5a Receptor on Rabbit Alveolar Macrophages. *Jpn J Infect Dis*,74(4):352-358,2021.
- 2) Yokoba M , Ichikawa T , Harada S , Shiomi K , Mikubo M , Ono M , Sonoda D , Satoh Y , Hanawa H , Naoki K , Katagiri M : Comparison between quantitative computed tomography, scintigraphy, and anatomical methods for prediction of postoperative FEV₁ and DLCO: effects of chronic obstructive pulmonary disease status and resected lobes. *J Thorac Dis*, 12(10):5269-5280,2020.
- 3) Shirasawa M , Fukui T , Kusuhara S , Harada S , Nishinarita N , Hiyoshi Y , Ishihara M , Kasajima M , Igawa S , Yokoba M , Mitsufuji H , Kubota M , Katagiri M , Sasaki J , Naoki K : Prognostic differences between oligometastatic and polymetastatic extensive disease-small cell lung cancer. *PLoS One*,14(4):e0214599,2019
- 4) Yokoba M , Ichikawa T , Harada S , Naito M , Sato Y , Katagiri M : Postoperative pulmonary function changes according to the resected lobe: a 1-year follow-up study of lobectomized patients. *J Thorac Dis*,10(12):6891-6902,2018
- 5) Igawa S , Nishinarita N , Takakura A , Ozawa T , Harada S , Kusuhara S , Niwa H , Hosotani S , Sone H , Nakahara Y , Fukui T , Mitsufuji H , Yokoba M , Kubota M, Katagiri M , Sasaki J , Naoki K : Real-world evaluation of carboplatin plus a weekly dose of nab-paclitaxel for patients with advanced non-small-cell lung cancer with interstitial lung disease. *Cancer Manag Res*, 10:7013-7019, 2018.
- 6) Nishinarita N , Igawa S , Kasajima M , Kusuhara S, Harada S , Okuma Y , Sugita K , Ozawa T , Fukui T , Mitsufuji H , Yokoba M , Katagiri M , Kubota M , Sasaki J , Naoki K : Smoking History as a Predictor of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Harboring EGFR Mutations. *Oncology*,95(2):109-115,2018.

2. 学会発表

- 1) Shinya Harada, Hayato Kawada, Shotaro Maehana, Hidehito Matsui, Makoto Kubo, Fumiaki Kojima, Hidero Kitasato, Masato Katagiri, Masanori Yokoba : Action of Panton-Valentine leukocidin on rabbit alveolar macrophage. The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (Kyoto Japan) 2021.11.20-21
- 2) 原田真也、川田逸人、前花祥太郎、松井秀仁、久保誠、小島史章、北里英郎、片桐真人 :

ウサギ肺胞マクロファージ (AM)を用いた Panton-Valentine leukocidin(PVL)の作用.
第 61 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2021.4.23-25.

- 3) 原田真也、三藤久、片桐真人、石原未希子、小野泰平、大熊友梨子、小澤貴裕、西成田
詔子、楠原政一郎、中原善朗、横場正典、久保田勝、猶木克彦：1 箇所の下区域気管支
mucoid impaction の所見のみで診断に時間を要した肺放線菌症. 第 41 回日本呼吸器内
視鏡学会学術集会, 東京, 2018.5.24-25.