

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 7 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08871

研究課題名(和文) アルコールによるsCD14関連自然免疫破綻のオーミクス：飲酒者の感染死を予防する

研究課題名(英文) Omics of sCD14 related innate immune system disturbance due to ethanol

研究代表者

片田 竜一 (Katada, Ryuichi)

大阪大学・医学系研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：00423757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：法医学解剖事例において、血中soluble sCD14 subtype(プレセプシン)の平均値は臨床の基準値よりも高値であった。死因とプレセプシンとの関係においては、溺水、窒息事例や多発外傷及び失血などの損傷死では低く、頭部外傷及び感染事例では高値であった。アルコールとプレセプシンとの関連については敗血症及び感染症事例における血中アルコール濃度高値の事例がほとんど無く、関連性については判断できなかった。また実際の感染症検案事例において検討を行い、採取した感染巣組織からwhole genome sequenceを行い、新たな毒性菌種を同定して、死因診断の一助となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The mean of blood soluble sCD14 subtype (presepsin) in autopsy was higher than the clinical standard value. Presepsin was low in drowning and suffocation cases, and multiple injuries and blood loss cases. On the other hand, it was high in head injury and infection cases. The presepsin was useful for the differentiation of the cause of death and was shown to be useful for estimate of the hospitalization days. The association for alcohol and presepsin was not clear as alcohol concentration in sepsis and the infectious disease cases was not detected in blood. In addition, whole genome sequence from the infection nest organization was performed, which identified new toxicity species of bacteria and showed possibility to help the cause of death diagnosis.

研究分野：法医学

キーワード：アルコール 敗血症 sCD14

1. 研究開始当初の背景

敗血症は主に感染症によって生じる全身炎症反応症候群であり、重篤であることから、早期の診断、治療を要する病態である。臨床現場において、敗血症診断の補助としてプレセプシン(Presepsin)が敗血症マーカーとして利用されている。プレセプシンは2000年代に入って報告されはじめた、plasma中に存在する13kDaのポリペプチドである。白血球・マクロファージ系細胞に存在するLPS-LPS binding protein (LPS-LBP) complexesのレセプターであるCD14の2つのisoform (soluble CD14 (sCD14), membrane-bound CD14 (mCD14))のうち、sCD14が分解されて生じたsCD14 subtypeがプレセプシンである。CD14は、Toll-like receptor 4 (TLR4)を介してMAP kinaseなどを活性化し、NF- κ Bなどの転写制御因子を活性化して、TNF α やIL-1 β などのサイトカイン放出を促すことで炎症を惹起する。また、sCD14はTLR4を発現していない内皮細胞、上皮細胞などの免疫反応を生じさせるものの、その機序については明らかではない。また、エタノールは急性摂取、慢性摂取に関わらず、敗血症のリスク及び予後を悪化させる。しかしながら、その機序については明らかではない。脳については、主に小児の急死の原因であり、感染を契機に発症する急性脳症の機序にsCD14が関わっている可能性が示唆され、心臓については、心筋細胞に発現するTLR4がQT延長症候群をはじめとした心臓性突然死に関与することが知られている。敗血症例においてsCD14が活性化することがわかっているが、死に至る機序にどのように関わるのかについてはいまだ明らかでなく、また法医解剖における有用性についての報告はいまだ少ない。

2. 研究の目的

臨床において敗血症診断の補助としてプレセプシンが敗血症マーカーとして利用されている。白血球・マクロファージ系細胞に発現し、種々の細胞に炎症を惹起するCD14は2つのisoformがあり、その内のsCD14が分解されて生じたものがプレセプシンである。敗血症例においてsCD14が活性化することがわかっているが、死に至る機序にどのように関わるのかについてはいまだ明らかでなく、また法医解剖事例における有用性についての報告はいまだ少ない。以前、プレセプシンの法医解剖における有用性を報告しており、死因及びその他の生化学データとの関連性について検討した。

また重症感染症死亡はしばしば死後検査によって診断される。死後検査でも度々経験される肺炎、髄膜炎、下痢、軟部組織感染症などの一般的な感染症について病原微生物を同定することは公衆衛生上重要である。しかしながら、死後の微生物検査では様々な問

題点が以前から指摘されてきており、一番の問題点は、検出された微生物が真に病原性のものであると判断できるかどうかということである。このように死後の微生物検査は結果の解釈が困難であることが多いため、一般的に普及しているとは言えず、死因が感染症であると診断された場合においても、起因微生物が同定されていることは少ない。そこで、重症軟部組織感染症と診断され、死後の微生物検査及び次世代シーケンサーによる遺伝子解析を行い病原性について検討し、死因診断への応用の可能性についても検討した。

3. 研究の方法

大阪大学大学院医学系研究科法医学教室で行われた法医解剖事例において、血液でプレセプシンが測定できた事例を対象とした。解剖中に採取した大腿静脈血(採取できない場合は心臓血)を移動式免疫発光測定装置パスファースト(LSIメディエンス)で1ステップ化学発光酵素免疫測定法により検出した。

また、プレセプシンが高値を示した事例及び低値を示した事例につき、肺及び肝臓におけるsCD14免疫染色を行った。条件は下記である。1次抗体は抗CD14抗体(ab45870, abcam)、2次抗体はHistofine Simple-stain MAX-PO (M) kit (Nichirei, Tokyo, Japan)、発色試薬はSimple stain DAB (Nichirei, Tokyo, Japan)を使用した。

細菌検査として好気培養及び嫌気培養を施行し、得られた菌株を分離した。菌種検索のため、16SrRNA遺伝子解析を行った。菌株の確定と、毒性因子の検索のため、分離された菌株を用いて次世代シーケンサーによる完全長ゲノムを解析した。得られた完全長ゲノムから16SrRNA遺伝子及びhouse keeping遺伝子による菌株同定を行った。16S遺伝子による菌種同定からは*Streptococcus tigurinus*と同定されたが、house keeping遺伝子による解析からは登録された標準株とは異なる株であることが明らかになった。この細菌株を解析するため、純培養された細菌からwhole genome sequenceを行い(PacBio RS II)、決定した各遺伝子のアノテーションを行った(MiGAP)。

4. 研究成果

(1)Soluble sCD14 subtype と死因との関連性
プレセプシンの平均値は2126 pg/mLであり、中央値は1220 pg/mL、最大値は20000 pg/mL、最小値は66.8 pg/mLであった。CRPの平均値は1.89 mg/dLであり、中央値は0.5 mg/dL、最大値は7.0 mg/dL、最小値0.3 mg/dLであった。いずれの平均値も臨床の基準値よりも高値であった。死因とプレセプシンとの関係においては、溺水、窒息事例や多発外傷及び失血などの損傷死では低く、頭部外傷及び感染事例では高値であった(図1)。入院後死

亡事例では、入院後2週間で死亡した事例で最も高くなる傾向があった。死後経過時間とプレセプシンとでは有意な差は認めなかった。このことから、プレセプシンは死因の判定に有用であり、入院後死亡事例においては入院日数のある程度の推定にも有用であることが示された。アルコールとプレセプシンとの関連については敗血症及び感染症事例における血中アルコール濃度高値の事例がほとんど無く、関連性については判断できなかった。これは、アルコール摂取後、死亡まで時間がかかる事例が多いためと考えられる。

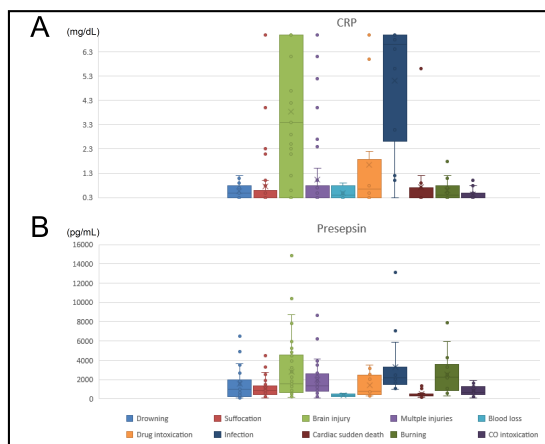


図 1

(2) Whole genome sequence による死因診断
細菌検査として好気培養及び嫌気培養を行い、得られた菌株を分離した。菌種検索のため、16SrRNA 遺伝子解析を行い、*Streptococcus tigurinus*、*Streptococcus anginosus*、*Peptostreptococcus anaerobius* が同定された。

菌株の確定と、毒性因子の検索のため、分離された菌株を用いて次世代シーケンサーによる完全長ゲノム解析を行い、得られた全長 16SrRNA 遺伝子による相同性解析では 99% の相同性で標準株の AZ_3a と一致し、系統解析より、既知の *S. tigurinus* と近縁株であることを確かめた (図 2)。

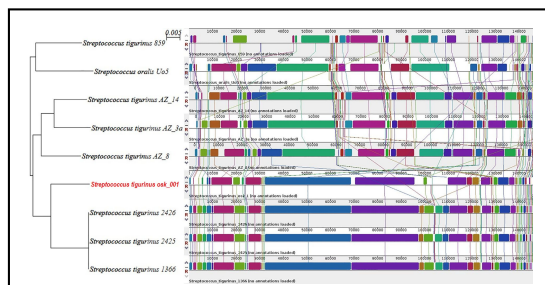


図 2

以上により、実際の感染症検案事例において検討を行い、採取した感染巣組織から whole

genome sequence を行い、新たな毒性菌種を同定して、死因診断の一助となる可能性を示した。

実験の一部については実験室の環境整備に時間がかかった関係で、今後の検討課題とした。

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 2 件)

Yoshizawa H, Motooka D, Katada R, Matsumoto Y, Nakamura S, Morii E, Iida T, Matsumoto H. A case of severe soft tissue infection due to *Streptococcus tigurinus* diagnosed by necropsy in which genomic analysis was useful for clarifying its pathogenicity. *Pathology International*, 査読有, 3, 2018, 1-6

Yoshizawa H, Motooka D, Katada R, Matsumoto Y, Nakamura S, Morii E, Iida T, Matsumoto H. Whole-genome sequence of *Streptococcus tigurinus* strain osk_001, isolated from the postmortem material. *Genome Announc*, 査読有, Vol.5, 2017, e00878-17

〔学会発表〕(計 11 件)

Matsumoto H, Ishida T, Yoshizawa H, Nakama K, Fujimoto H, Sugimoto K, Katada R. A new course for the cause of death investigation in the graduate school of medicine. The 10th International Symposium ADVANCES IN LEGAL MEDICINE, November 13, 2017, Dusseldorf, Germany

Yang C, Sugimoto K, Hirata Y, Kamakura Y, Katada R, Matsumoto H. Molecular mechanisms of Wischnewski spot under hypothermia: an experimental study in rats. The 10th International Symposium ADVANCES IN LEGAL MEDICINE, November 13, 2017, Dusseldorf, Germany

Sugimoto K, Yang C, Hirata Y, Kamakura Y, Katada R, Matsumoto H. Prevention of stroke-related death: an experimental study on one protective mechanism of oxytocin for injured neurons in the rat stroke model. The 10th International Symposium ADVANCES IN LEGAL MEDICINE, November 13, 2017, Dusseldorf, Germany
Hirata Y, Sugimoto K, Yang C, Kamakura Y, Katada R, Matsumoto H. Heat stress changes Cx43 disposition, leading to develop arrhythmia. The 10th International Symposium ADVANCES IN LEGAL MEDICINE, November 13, 2017,

Dusseldorf, Germany

吉澤秀憲, 片田竜一, 元岡大祐, 松本悠希, 中村昇太, 松本博志. *Streptococcus tigurinus* による重症軟部組織感染症の1例. 第64回日本法医学会学術近畿地方集会, June 11, 2017, 和歌山県立医大(和歌山県)

吉澤秀憲, 片田竜一, 元岡大祐, 中間健太郎, 石田季子, 中村昇太, 松本博志. 重症軟部組織感染症に対し起炎菌同定を行った一例. 第101次日本法医学会学術全国集会, 6/8, 2017, 長良川国際会議場(岐阜県)

吉澤秀憲, 元岡大祐, 片田竜一, 中村昇太, 森井英一, 松本博志. *Streptococcus tigurinus* による軟部組織感染症に対しネクロプシーを行った一例. 第106回日本病理学会総会, 4/28, 2017, 京王プラザホテル(東京都)

Matsumoto H, Nakatsuka T, Ujimoto D, Katada R, Nakama K, Yoshizawa H, Sugimoto K, Fujimoto H, Takahashi M, Yang S. Important role of autopsy in interpretation of medical accidents. The International Academy of Legal Medicine intersocietal symposium P5 Medicine & Justice, Jun 21-24 2016, Venice, Italy

Matsumoto H, Nakama K, Yoshizawa H, Ishida T, Sugimoto K, Katada R. Estimation of the number of alcohol-related death in Japan. International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA), Sep 2-5 2016, Verlin, Germany

片田竜一, 杉本香奈, 中間健太郎, 吉澤秀憲, 藤本秀子, 松本博志. sCD14の感染死に及ぼす影響. 第100次日本法医学会学術全国集会. 東京, 6月 2016

金澤唯, 田中剛, 楊志斌, 高橋真樹子, 吉澤秀憲, 藤本秀子, 杉本香奈, 中間健太郎, 片田竜一, 松本博志. 死亡機序における内在性レトロウイルスの役割に関する実験的検討. 第62回日本法医学会学術近畿地方集会. 京都, 11月 2015

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.legal.med.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片田 竜一 (KATADA, Ryuichi)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号: 00423757

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: