

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20353

研究課題名(和文)敗血症性ショックにおける早期診断マーカーの研究

研究課題名(英文)Research of early diagnostic markers in septic shock

研究代表者

濱口 満英 (HAMAGUCHI, Mitsuhide)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：10550866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：アナンダマイド(ANA)は細胞外に放出された後、再び細胞内に取り込まれ、脂肪酸アミド加水分解酵素(FAAH)によってアラキドン酸とエタノールアミンに加水分解される。ANAの過剰蓄積を防止するためにこの代謝酵素が重要である。SOFAスコアやANAは入院後に治療の影響を受けるため治療経過においては敗血症の状態を正確に反映することはできないと考えられた。FAAHによって加水分解され放出されるアラキドン酸カスケードは特異的な所見を認めなかった。リノレン酸に関しては入院時に上昇しているものは予後が悪い結果であった。FAAHとリノレン酸系が敗血症の状態を反映するマーカーとなる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Anandamide (ANA) is released from the cell extracellularly, taken into the cell again, and is hydrolyzed to arachidonic acid and ethanolamine by fatty acid amide hydrolase (FAAH). This metabolic enzyme of ANA is important to prevent overaccumulation of the ANA. Since Sequential organ failure assessment (SOFA) score and anandamide are influenced by treatment such as Continuous hemodiafiltration (CHDF) after admission, it seems that it is not possible to reflect the condition of sepsis accurately in the course of treatment by SOFA and anandamide. The arachidonic acid cascade hydrolyzed and released by FAAH did not show any specific findings. When linolenic acid was increased at the time of admission, it was a result of poor prognosis. It seems that FAAH and linolenic acid system may be useful markers reflecting the condition of sepsis.

研究分野：救急医学、集中治療医学、敗血症、感染症

キーワード：敗血症 FAAH アナンダマイド

1. 研究開始当初の背景

敗血症とは、感染に起因する全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) と米国の ACCP/CCM で定義されています。

近年、抗生物質による治療が確立したにもかかわらず、アメリカでは1年間の敗血症の発症患者数は約75万人であり、そのうち21万人が死亡しています。近年、敗血症の発生頻度は増加傾向にあります。増減はあるものの、敗血症の死亡率はわずかに低下傾向にあります。死亡率減少の原因としては、抗生物質投与が従来よりも早期に開始されるようになった背景や、循環補助の技術が進歩したことなどがあげられます。しかしながら、これらによる死亡率の減少幅はわずかであり、十分とはいえません。

敗血症の病態には種々の炎症性メディエーターが関与しています。例えば、グラム陰性菌の細胞内成分であるエンドトキシンで単球/マクロファージが刺激されると、NF- κ B が活性化され TNF α や IL- β などの pro-inflammatory cytokine が産生されます。それが血管内皮細胞や単球/マクロファージ、顆粒球に作用して IL-6、IL-8 などの inflammatory cytokine のほか、エイコサイノイドや接着因子、組織因子、一酸化窒素、活性酸素、血小板活性化因子、顆粒球エラスターゼなどを遊離し、血圧低下や免疫不全などの臨床症状を惹起します (Wheeler AP et al. New England Journal Medicine, 1999)。

敗血症性ショックとなると、重要な臓器・組織が急速に機能不全に陥っていく病態となります。

LPS で刺激したラットの単球/マクロファージから放出される anandamide (ANA) と、血小板から放出される 2-arachidonyl glycerol (2-AG) の2種類の内因性大麻が、敗血症性ショック急性期の血圧低下に関与していると報告されています (Varga K et al. FASEB Journal, 1998)。

カンナビノイドとは、大麻に含まれる精神活性物質として知られているが、これに対する特異的受容体が脳などの動物組織で発見され (Matsuda LA et al. Nature, 1990)、その内因性作動物質として ANA が見いだされました (Barinaga M, Science, 1992)。

培養細胞を用いた基礎的研究では、グラム陰性菌の内毒素であるリポ多糖類刺激が ANA の代謝酵素である FAAH の合成を抑制し、その結果として ANA が増加するとされています (Maccarrone M et al. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001)。

ANA は細胞外に放出された後、再び細胞内に取り込まれて、脂肪酸アミド加水分解酵素 (fatty acid amide hydrolase; FAAH) によってアラキドン酸とエタノールアミンに加水分解されます。ANA の過剰蓄積を防止するためには、この代謝酵素 (FAAH) が重要です。

大阪府立母子保健総合医療センターとの研究において、FAAH に着目し、敗血症患者と健常者において *faah* mRNA の発現を検討しました。健常人の *faah* mRNA の発現は、男性では 14.2 ± 7.3 であり女性では 11.2 ± 3.6 でありました。敗血症患者においては、入院時に *faah* mRNA の発現は 0.21 ± 0.06 と健常人と比較して優位に低下していました ($P < 0.01$)。また、敗血症患者における入院7日目の *faah* mRNA の発現は 0.34 ± 0.06 であり軽度上昇がみられました。これらの結果から、FAAH が敗血症による有効なマーカーと成り得る可能性を発見しました (Tanaka M et al. Journal of Endotoxin Research, 2007)。

2. 研究の目的

今までに敗血症における診断・治療効果判定を目的とした多くのマーカーが報告されています。しかしいまだに早期に敗血症を診断することは困難な状態であることから、未だ早期診断マーカーとしては不十分であると考えられます。

敗血症患者においては、入院時にすでに *faah* mRNA の発現が低下しているという我々の知見から、FAAH が関与する ANA との関連性を検討する必要があると考えられます。

敗血症に伴う炎症反応は、生体防御において重要な生理機能であります。感染によって、起炎性シグナルが生じて、血管透過性の増大、内皮細胞活性化、好中球の浸潤と活性化が起こります。これらの過程においては、サイトカイン、ケモカイン、ロイコトリエン、プロスタグランジンなどの起炎性メディエーターがかかわっています (Samuelsson B et al. Science, 1987)。その一方で、炎症の収束過程においては、血管透過性の回復、好中球遊走の阻止、炎症性サイトカインの抑制、浸出性リンパの除去、アポトーシス細胞のクリアランスなどが重要です。この過程において、好中球を主体としたいろいろな細胞成分およびシグナル分子が生体防御の目的で同調することによって炎症反応がコントロールされます。

オメガ3脂肪酸は、構造の中に2つ以上の二重結合を持つ多価不飽和脂肪酸のひとつです。オメガ3脂肪酸にはイワシやサバなどの青魚に多く含まれている EPA (エイコサペンタンエン酸) や DHA (ドコサヘキサエン酸)、荏胡麻などの植物性油脂に含まれる γ -リノレン酸があります。EPA や DHA は γ -リノレン酸をもとに体内で合成されます。オメガ3脂肪酸を摂取することによる抗炎症作用や心臓血管系の保護作用があります。また、オメガ6脂肪酸であるアラキドン酸はプロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなどの活性エイコサイドの前駆体です。オ

メガ3脂肪酸、オメガ6脂肪酸はともに必須脂肪酸で恒常性維持に必要です。また、体内で生合成できないといった特徴があります。アラキドン酸と競合することで起炎症性エイコサノイドの産生を阻害する、EPA由来のエイコサノイドの活性がアラキドン酸由来のものに比べて弱いなどといった多彩な作用があります。

急性炎症反応では、白血球の組織への浸潤に伴う発熱、発赤などがありそれらの反応には、プロスタグランジンやロイコトリエンなどの脂質メディエーターが関与しています。炎症性脂質メディエーターの産生阻害剤であるシクロオキシゲナーゼ-2阻害剤が炎症の収束を遅らせるなど脂肪酸酸化物が炎症収束期に関与することが示唆されている (Gilroy DW et al. Nature Med,1999)(Fukunaga K et al.J.Immunol,2005)。このようなメカニズムから炎症反応の調節機構についても考えなくてはなりません。

今まで報告されていない敗血症における早期診断マーカーを発見すること、炎症反応における脂質メディエーターの関与について明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

FAAHは細胞内にANAが過剰蓄積するのを防止するために代謝酵素としては働きます。*faah* mRNAの発現は敗血症患者ではすでに低下している状態ではありますがこの時点におけるANA測定を行い、また入院7日後における*faah* mRNAの変化とANAの関係を調べるため測定しました。

今回の研究経過中の2016年に、Sepsis-3(Singer M et al. JAMA,2016)が発表され敗血症の定義・診断基準がかわりました。敗血症は、感染に対する調節不全の宿主反応を原因とする生命に危機を及ぼす臓器障害と定義されました。Sepsis-3で用いられるSOFAスコア(Vincent JL et al. Crit Care Med,1998)の算出を行いSOFAスコアとANAやFAAHの関連性についても検討する必要があると考えました。

敗血症患者の入院時と入院7日後におけるSOFAスコアの算出を行い個々の症例における臓器障害の程度を評価しました。

敗血症における病態を考えるにあたり、炎症に関与すると考えられる様々な脂質メディエーターを確認するため測定を行いました。

4. 研究成果

敗血症患者6症例に対し解析を行いました。6症例の敗血症の原因は、重症急性膵炎2例、産婦人科感染症2例、腹部外傷1例、不明1

例でした。

敗血症患者の入院時と入院7日後における変化を検討しました。入院時において健常者より著明に低下していた*faah* mRNAの発現は、5症例で増加し1症例で減少していました。またANAに関しては、5症例で減少し1症例で増加していました。今回測定した6症例においては*faah* mRNAの発現とANAは相関するものではありませんでした。

エンドトキシン吸着カラム PMX-DHP (polymyxin B-immobilized fiber column-direct hemoperfusion) や continuous hemodiafiltration (CHDF)などの透析が6症例中5症例において施行されていました。透析によって透析カラムへの吸着の影響を受けるため敗血症の状態を正確に反映することはできないと考えられます。しかし、*faah* mRNAの発現はSOFAスコアやAPACHE-IIスコアなどの改善とともに上昇がみられます。しかし、健常者と比較すると入院7日後でも明らかに低値でありました。さらなる敗血症の病態解明に、*faah* mRNAの発現が健常者の状態まで改善する時期やANAの推移を観察する必要があると考えます。

敗血症の病態解明のために、ANAだけでなく、ほかの脂質メディエーターも測定しました。GC/MSで面積比を確認できたメディエーターとしては、tetranor-PGEM、tetranor-PGDM、6-keto-PGF1 α 、TXB2、5-iPF2 α -VI、PGF2 α 、PGE2、11-dehydro-TXB2、PGD2、LTE4、11-trans-LTE4、PGJ2、14,15-DHET、12-HHT、11,12-DHET、20-carboxy-AA、16-HETE、15-HETE、11-HETE、12-HETE、5-HETE(アラキドン酸類)、TXB3、17,18-DiHETE、12-HEPE、EPA(エイコサペンタンエン酸)、15-KEDE(エイコサジエノエン酸類)、PGE1-EA(アタロールアミド類)、TXB1、12,13-DiHOME、9,10-DiHOME、9-HOTrE、13-HODE、9-HODE(リノレン酸類)、20-HDoHE、16-HDoHE、10-HDoHE、14-HDoHE、DHA(ドコサヘキサエン酸類)、ANA、OEA(エタノールアミド)、Lyso-PAFがありました。

FAAHによって加水分解され放出されるアラキドン酸カスケードは症例によって変化は様々であり本研究においては特徴的な結果は得られませんでした。

ドコサヘキサエン酸類においても特徴的な結果はみられませんでした。

リノレン酸類に関しては入院時に上昇している症例に関しては予後が悪い結果でありました。

これらの結果より、FAAHとリノレン酸系が初期における予後判定や治療経過における敗血症の状態を反映する有用なマーカーとなる可能性があると考えられました。

様々な脂質メディエーターは炎症反応と関係します。入院時においてはリノレン酸類が炎症状態に関与していると考えられます。入院7日後においては、透析などのカラムの影

響と炎症の収束過程がそれぞれの症例において様々であるため、結果として有意な所見が得られなかったものと考えます。

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

Mitsuhide Hamaguchi, Katsuyuki Maruyama, Tomohide Matsushima, Takami Nakao, Takuya Ishibe, Noriko Tsuda, Yoshinori Murao, The mRNA EXPRESSION OF FATTY ACID AMIDE HYDROLASE IN HUMAN WHOLE BLOOD CORRELATES WITH ANANDAMIDE IN PATIENTS WITH SEPSIS, 8 th Congress of the International Federation of Shock Societies, 2016年10月5日、東京ドームホテル(東京都文京区)

濱口満英、丸山克之、松島知秀、木村貴明、太田育夫、中尾隆美、石部琢也、村尾佳則、Sepsisを合併した重症急性膵炎2症例、第53回日本腹部救急医学会総会、2017年3月2日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

濱口満英、植嶋利文、松島知秀、一ノ橋紘平、村尾佳則、敗血症性患者における Sepsis3の検討、第43回日本集中治療医学会学術集会、2017年3月9日、さっぽろ芸文館(北海道札幌市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱口満英 (HAMAGUCHI Mitsuhide)
近畿大学・医学部・講師

研究者番号：10550866

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()