

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 元 年 5 月 2 9 日現在

機関番号：3 2 6 4 4

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：1 6 K 2 0 4 0 2

研究課題名（和文）細菌由来フェノール酸に注目した新たな敗血症マーカーの探索と治療への応用

研究課題名（英文）The search of the new septicemic marker which paid attention to phenol acid derived from bacteria and application to treatment

研究代表者

辻 友篤 (TSUJI, Tomoatsu)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：5 0 5 8 0 3 1 2

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：細菌が産生するフェノール酸に注目し、重症敗血症患者における新規マーカーを同定し、より鋭敏に感染を把握するため新たな診断方法の確立を目指した。敗血症患者と健常者の血液検体を比較検討ところ、4-hydroxyphenyllactic acidが有意に上昇していた。しかしICU滞在期間やAPACHスコアなどの相関関係は認められなかった。本研究で敗血症と関連付けるにふさわしいフェノール酸は同定できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では敗血症と関連付けられるフェノール酸の同定はできなかった。しかし4-hydroxyphenyllactic acidは健常患者と比較し敗血症患者では有意に上昇することがわかった。重症度との相関は見いだせなかったが、今後データが増えれば、新たな敗血症の指標になる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of the study is to identify new markers in septic patients following to a new rapid diagnostic system of sepsis, with focusing on the phenolic acid produced by bacteria, In this study, we have found that 4-hydroxyphenyllactic acid (4-HPA) in septic patients was significantly elevated compared with those in healthy subjects. However, no correlation was found between serum level of 4-HPA and ICU stay period / APACH score. Further study is needed to identify phenolics that would be relevant for sepsis.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症 フェノール酸

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 高齢化社会と敗血症の増加

少子高齢化は日本が抱える大きな社会問題である。2030年には65歳以上人口は約3500万人に達し、総人口の約30%を占めるといわれている。自然免疫・獲得免疫ともに低下している高齢者では、風邪などの軽微な感染に罹患しやすく、また軽度な外傷や熱傷、脳梗塞、悪性腫瘍等の侵襲から重篤な感染症に陥りやすい。とくに高齢者や基礎疾患のある患者では重症な肺炎や、その感染が全身に波及する敗血症に陥りやすい (Hotchkiss et.al., New Eng. J. Med. 2003)。敗血症は感染に伴う全身性炎症反応で、多臓器不全を伴い、その死亡率は極めて高い。米国では年間約75万人が敗血症に罹患し、年間死者数は約20万人で集中治療室における死亡原因の第2位である。また敗血症の原因の約60%を占める肺炎による本邦の年間死亡者数は激増し脳卒中による死亡を超え、現在悪性腫瘍、心筋梗塞に続いて本邦の死亡原因第3位である。

### (2) 敗血症診断の限界と問題点

しかしながら敗血症の診断は臨床症状や一般血液検査に基づいて診断されており、感染の状況を十分に反映していない可能性がある。敗血症の定義は、急性炎症反応症候群（白血球数・脈拍・呼吸数・体温）& “感染の疑い”のみで（日本集中治療医学会 日本版敗血症ガイドライン 2012）、身体所見や血液検査、画像検査により総合的に診断される。このような臨床所見に基づいた診断基準には以下の様な問題点がある。

- 1) 診断が医師の技量や主観に基づくため、診断の精度にバイアスが生じる。
- 2) 細菌培養陽性率が低く、原因菌特定しにくい（敗血症患者の血液培養陽性率は約25%）
- 3) 不十分な診断基準による病態の認知・診断・初期治療の遅れ
- 4) 不正確な診断基準により広域スペクトラムな抗生剤の過剰投与と多剤耐性菌の出現

不十分な臨床的バイオマーカー  
この4つの問題点を補完するため、現在まで白血球やCRPなど様々なバイオマーカーが補助診断に活用されてきた。従来の炎症マーカーのみならず近年はプロカルシトニンや可溶性CD14（プレセプシン<sup>TM</sup>）などが開発され臨床応用されている。しかしながら従来の臨床的バイオマーカーは「炎症」および「感染に起因した炎症」のマーカーであり、感染そのものを反映するものではない。また尿中肺炎球菌や各ウイルス抗体価などは感染をターゲットにしているものの、特定の病原体を対象としており、様々な病原体の複合感染が多い重症肺炎や敗血症の包括的な感染症診断ではない。さらに現在のバイオマーカーは擬陽性・擬陰性率が高い。このため、感染症の原因病原体の種類と量を正確に反映する迅速かつ簡便な診断ツールの開発が急務である。

### (3) 細菌由来フェノール酸の感染症診断への可能性

このような問題点を解決するために申請者は細菌由来フェノール酸の敗血症診断への応用を考えている。フェノール酸はグラム陽性球菌、グラム陰性桿菌、嫌気性菌などにより産生され、菌株により産生するフェノール酸の種類と量は異なる。また肺炎患者においてフェノール酸は有意に上昇していることが報告されている (Beloborodova et al. J Biomed. Science 2012)。このため申請者はガスクロマトグラフィー・質量分析計（以下 GC-MS）を用いて細菌由来フェノール酸の定量分析を行うことで、感染性病原体の種類や程度を同定でき、感染症診断および治療の改善につながると考えている。本研究の目的は、GC-MSを用いた細菌由来フェノール酸の定量分析を活用し、特異的な迅速で簡便なバイオマーカーの開発につながる基盤となる研究を展開することである。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、細菌が産生するフェノール酸に注目し、臨床で活用できる高速かつ簡便な敗血症診断キット開発と治療のための基盤となる研究を展開することである。日本人の死因の上位を占める深刻な疾患である肺炎や敗血症は、超高齢化社会の本邦で増加している。しかし敗血症患者における細菌培養の感度・特異度は低く、現在の診断マーカーの多くが感染ではなく炎症を反映しているため、感染に特異的なバイオマーカーの探索が望まれる。そこで今回、細菌が産生するフェノール酸に注目し、マウス敗血症モデルおよび重症敗血症患者における新規マーカーを同定し、より鋭敏に感染を把握する新たな診断方法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 敗血症患者の血液中のフェノール酸の検出

東海大学医学部付属病院高度救命救急センターに救急搬送され、かつ入院した敗血症患者のうち同意が得られた血液検体を用い、Benzoic acid、2-Phenylpropionic acid、3-Phenylpropionic acid、3-Phenyllactic acid、Hydroxyphenyl acetic acid、4-Hydroxyphenyllactic acidのうち血液中からどのフェノール類が検出されるか検討する。また、敗血症患者と健常者の検体とを比較検討し、かつ各フェノール酸濃度と敗血

症患者の臨床病態（ICU 重症度スコア、ICU 滞在期間、院内死亡率）との相関を検討する。

C57/B6L マウスを用いて、敗血症モデルを 24 時間後に sacrifice し、血液を採取し、GS-MS にて敗血症との関連が疑われるフェノール類を測定、各フェノール酸の血中濃度を Sham マウスと比較検討した。

血液中フェノールの分析を内部標準法によって正確に測定を行い比較した。【方法】はじめに、内部標準物質として Benzoic acid-d5 を選択して上記 5 種類の化合物の定量用の検量線を作成した。抽出は、前年度までと同じく珪藻土カラムを用いた。フェノールの分析は、TMS 誘導体化後、GS-MS で行った。フェノールの定量法の設定後、敗血症患者 5 例と健常者 9 例の血液中フェノールの定量を実施した。また敗血症群で ICU 滞在期間や APACH スコア、SOFA スコアといった ICU 重症度スコアとの相関関係を評価した。

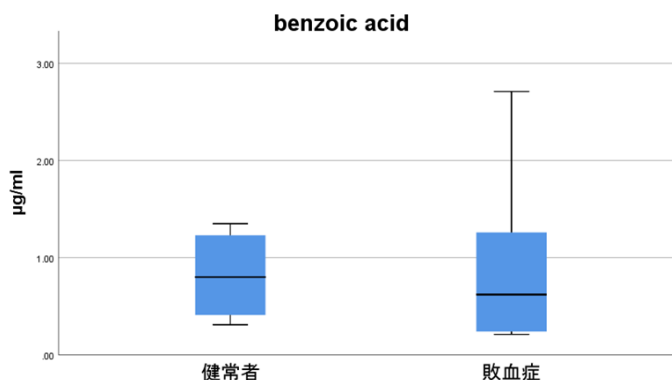
#### 4. 研究成果

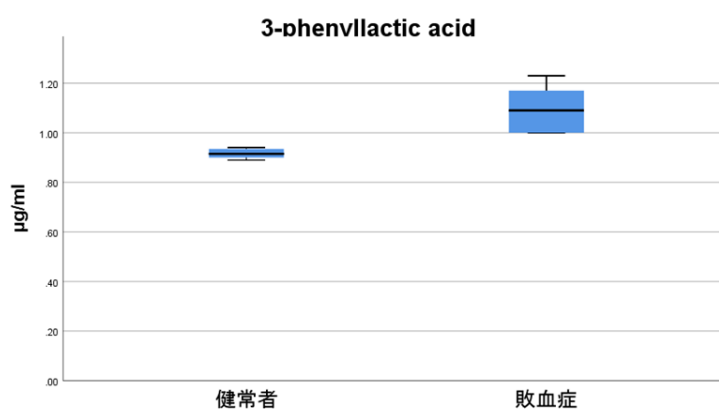
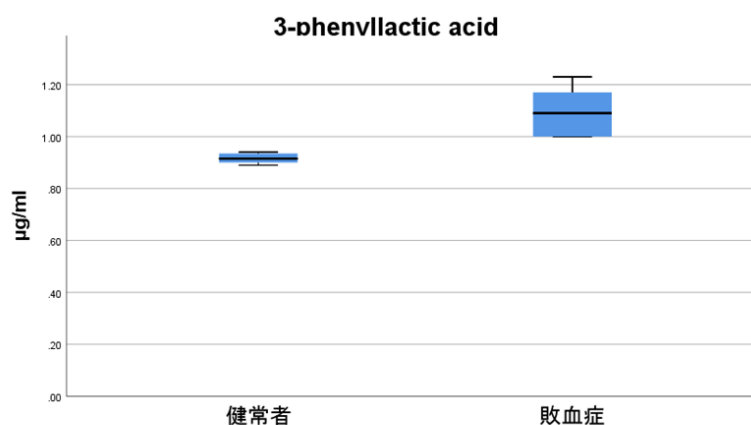
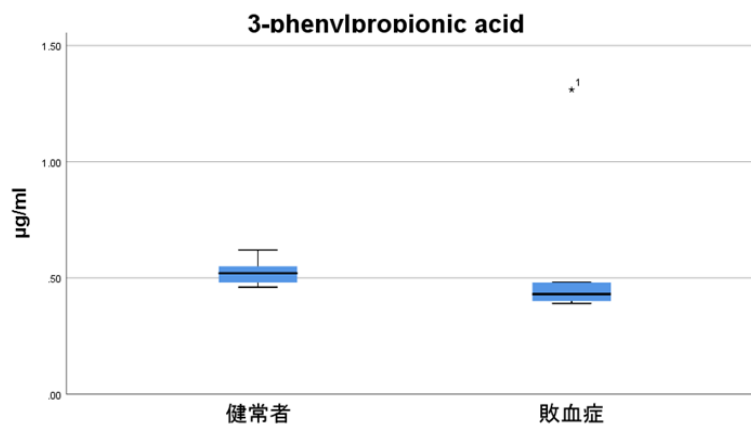
##### (1) 敗血症患者の血液中のフェノール酸の検知

10 例の敗血症患者の検体を採取した。対象の背景として、平均年齢 75.8 歳、男性 9 名（90%）、ICU 重症度スコア（APACHE score）平均 31.3 点、急性期 DIC スコア 2.9 点であった。また敗血症の原因として、肺炎 5 名（50%）、尿路感染症 1 名（10%）、創感染 4 名（40%）であった。敗血症患者からは対象となるフェノール類のうち、Benzoic acid（BA）、3-Phenylpropionic acid（3-PPA）、3-Phenyllactic acid（3-PLA）、Hydroxyphenyl acetic acid（HAA）、4-Hydroxyphenyllactic acid（4-HPA）が検出された（それぞれ平均 192ng/ml、21ng/ml、1765ng/ml）。健常者 10 名〔平均年齢 29.2 歳、男性 7 名（70%）〕の血液検体と比較したところ 4-HPA が有意に上昇していた（ $p < 0.01$ ）。また BA・3-PPA はそれぞれ ICU 滞在期間と有意に相関していた（BA；相関係数 0.73,  $p < 0.05$ , 3-PPA；相関係数 0.83,  $p < 0.01$ ）。さらに生存群と比較して、死亡群の 4HPA は有意に上昇していた（相関係数 0.64,  $p < 0.05$ ）。

Benzoic acid、3-phenylpropionic acid、4-hydroxyphenyllactic acid について比較した。マウス敗血症モデルの血清からは、フェノール酸は検出されず、Sham マウスと比較しても有意な上昇は認められなかった。

5 例の敗血症と 9 例の健常者の検体を比較した。対象の背景として平均年齢 48.2 歳（敗血症 76.4 歳、健常者 30.4 歳）、敗血症患者の ICU 重症度スコア（APACH score）平均 19.2 点であった。敗血症患者と者の検体を比較したところ、3-PLA と 4-HPA において有意差が得られた（ $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ）。敗血症患者における各フェノール酸と ICU 滞在期間との相関関係を認めるものなかった。3-PPA は APACH スコアに相関関係はみられた（相関係数 0.98）ものの、他のフェノール類に相関関係は認められなかった。





本研究では敗血症と関連付けるにふさわしいフェノール酸の同定はできなかった。これは敗血症の検体数が少なく、十分な比較検討ができなかった可能性がある。一方、フェノール酸のうち 4-hydroxyphenyllactic acid (4-HPA) は敗血症の指標になる可能性があると考えられ、今後もデータの集積を続け、敗血症のマーカーとなるべきフェノール酸の同定を行っていきたい。

## 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等：なし

## 6．研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。