

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23249072

研究課題名(和文)術後および敗血症時の自然免疫機能低下に対する免疫強化療法の試み

研究課題名(英文) Immune modulating therapy to restore impaired innate immunity in patients with sepsis or after surgery

研究代表者

山田 芳嗣 (Yamada, Yoshitsugu)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30166748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,200,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症や重症感染症に引き続く急性呼吸窮迫症候群の予後は依然として悪く有効な治療薬は存在しない。敗血症疑いで入室した患者の入室後1日目の平均動脈圧、白血球数、血小板数がそれぞれ低く、血清LDH値が高いと死亡率が有意に高く、免疫抑制状態が、死亡率に上昇させていた。さらに、マウスの腹膜炎に引き続いて肺の日和見感染を誘導する臨床に近いモデルを検討したところ、腹膜炎後に肺の生体防御能が低下していることが、マウスの死亡率を上昇させており、サイトカインのインターフェロン $\beta$ はこの機能を復活させることで生存率を上昇させていた。今後の免疫賦活療法の候補となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sepsis and sepsis associated acute respiratory distress syndrome are diseases with high mortality without effective treatment options. Controversies to its pathogenesis and heterogeneity of the patient population are thought to be the failure of multiple clinical trials mainly aims to modulate hyperimmune state. Retrospective analysis of parameters from patients admitted in the intensive care unit (ICU) in a single institute revealed that lower mean arterial pressure, white blood cell / platelet count, and higher serum lactate dehydrogenase on 1 day after ICU admission associated with in-hospital death. Mouse model of peritoneal sepsis induced by cecal ligation and puncture revealed that septic mice fell into immune compromised state 4-days after CLP and were susceptible to death following nosocomial infection. Systemic interferon beta improved survival of septic pneumonia model and may work to restore impaired innate immunity.

研究分野：麻酔学、集中治療医学

キーワード：敗血症 急性呼吸窮迫症候群 サイトカイン 生体防御 インターフェロン $\beta$  免疫賦活 バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

・術後感染性合併症や、重症感染症に引き続き敗血症や急性呼吸窮迫症候群の予後は依然として悪く、現在のところ抗菌薬以外の治療法は維持療法にとどまる。抗菌薬の副作用や耐性菌の発生もあり、新規の対策が急務である。

・敗血症による死亡のメカニズムは、過剰免疫による組織破壊と引き続き多臓器不全との考えでこれまで免疫抑制療法が試みられてきたが、いずれも臨床試験では不成功であった。

・近年敗血症時には免疫機能が抑制されていることを示唆する報告があり、また自検例でもそれを示唆する所見が得られた。

・敗血症など重症感染状態や、侵襲の大きい手術後には、免疫状態を賦活する治療が有効である可能性がある。

・免疫賦活療法を行う上では、サイトカインである顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) は成熟免疫担当細胞の抗菌能を高めることが知られており、有望と考えられる。また、その際に IL-33 が連動して働く可能性が示唆される。さらに、他にも免疫機能の賦活や肺血管透過性を制御するサイトカインなど複数の候補がある。

### 2. 研究の目的

敗血症の病態評価と予後決定に役立つバイオマーカーを同定する。また免疫賦活効果が期待される GM-CSF の生物活性の測定系を確立する。さらに、敗血症動物モデルにおいて、サイトカインによる免疫調節療法を試み、そのメカニズムを明らかにすることで、臨床での治療戦略の基礎的知見を収集する。

### 3. 研究の方法

(1)敗血症の病態評価と予後予測に役立つバイオマーカーの同定

単施設の救命 ICU に敗血症の疑いで入院した 18 歳以上の症例を後ろ向きに抽出し、入室後 0, 1, 4, 7 日後の臨床的パラメータ、血液検査データと、28 日生存との関連を解析した。

(2)GM-CSF 生物活性測定法の確立と標準化

ヒト血液中 GM-CSF 活性を測定する方法として、GM-CSF 自己抗体の測定および GM-CSF 刺激に対する流血中の好中球の反応性を見るアッセイ系を確立した。抗体定量系は、中田らの考案した、サンドイッチ ELISA 法を標準化し、時間空間的に離れた測定値でも比較できるようにする。好中球の GM-CSF 刺激による反応性定量法は、好中球が低濃度の GM-CSF 刺激で細胞表面にインテグリン CD11b を高発現する性質を利用し、フローサイトメトリーで定量した。

(3)敗血症動物モデルの作成、免疫賦活療法の試み

回盲部結紮穿孔 (CLP) による、腹膜炎モデルを作成し、GM-CSF を投与することで生存率が変化するかどうかを検討する。また、腹膜

炎後の急性呼吸窮迫症候群のマウスモデルを作成し、血管透過性亢進抑制効果が言われているインターフェロンの治療効果を検討する。さらに、肺傷害の評価、および免疫担当細胞機能を検討して、メカニズムを明らかにする。

### 4. 研究成果

(1)敗血症の病態評価と予後予測に役立つバイオマーカーの同定

ICU 入室後 28 日以内死亡群 10 名と生存群 42 名の比較で、平均動脈圧、白血球数、血小板数、血清 LDH 値に有意差が認められ、単変量ロジスティック回帰でも、在院死亡のオッズ比が有意に高く、この 4 パラメータによる在院死亡の予測を行うと、ROC カーブの AUC が 0.94 と高い予測確率を示した。院外発生の敗血症では白血球数 10,000/mcl 以下が、在院死亡率をあげるため、積極的治療が予後改善につながる可能性が示唆された。

(2)GM-CSF 生物活性測定法の確立と標準化

96 穴の ELISA プレートに recombinant GM-CSF をコートし、サンプル中の GM-CSF 抗体を結合させ、結合 IgG をパーオキシダーゼラベルした抗ヒト IgG 抗体で検出する方法は、自己免疫性肺胞蛋白症患者の抗 GM-CSF 抗体測定法として、中田らが報告している。今回この方法の各試薬を標準化し、スタンダード抗体の安定度、再現性を検討した。またスタンダードカーブから抗体濃度を算出する方法を検討し、検出感度と再現性の高い測定方法へ標準化を行った。(文献 7)この方法を用いることで、時間的空間的に異なる場所での測定結果を比較することが理論上可能となり標準化の要を果たしたと考える。

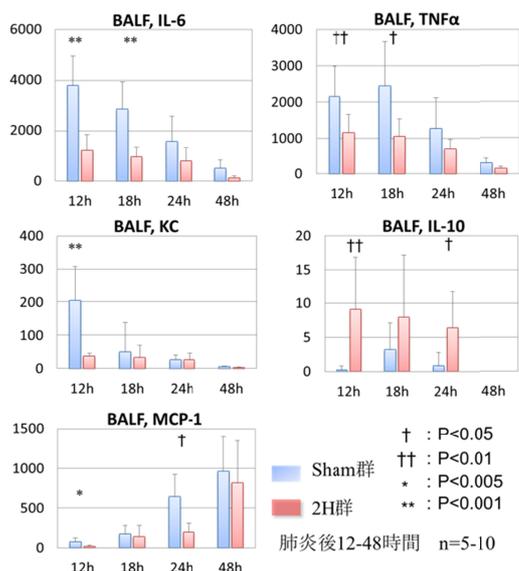
また、全血中の好中球の recombinant GM-CSF10ng/mL に対する接着因子 CD11b 上昇反応を定量し、baseline と比較した発現上昇率(% increase)を CD11b stimulation index と定義し、その再現性を検討した。採血方法やサンプルの保存による生細胞バイオアッセイの結果変動を最小化する方法を提唱した。(文献 2)。この方法は、抗 GM-CSF 自己抗体が高発現している自己免疫性肺胞蛋白症患者の診断にも有効と考えられる。また本アッセイの手法は犬など他の動物種でも適応可能であることを確認した(文献 3)。

(3)敗血症動物モデルの作成、免疫賦活療法の試み

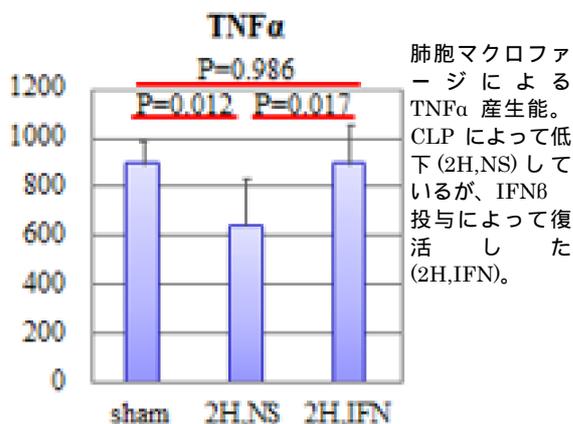
CLP による、マウス敗血症モデルを作成した。回盲部を先端から 75%の部分で結紮し、18 ゲージ針で 2 カ所に穴を通す生存率の低い (0-20%) モデルを用いて GM-CSF による治療的アプローチを行ったところ、5µg/kg 皮下投与を CLP 前あるいはほぼ同時に投与した群では、むしろ生存率が低下した。初期の炎症を抑える作用を期待し、多発性硬化症等で臨床使用されているインターフェロン (IFN )を 70 万 U/kg 投与したところ、CLP3 時間前投与は生存率をさらに下げたが、12 時

間後投与は、5日目の生存率を20% 60%に改善した。

引き続き、CLP後に、緑膿菌投与による肺炎モデルを作成した。CLPは23G針による軽微な腹膜炎（生存率100%）で、緑膿菌肺炎も単独では致死的是ではなかったが、CLP4日後に緑膿菌を投与すると、生存率が10%未満となり、感染防御能が高度に低下していることが示唆された。さらに、肺炎誘導後の肺内の炎症性サイトカインの発現量が、CLP後はコントロールと比較して有意に抑制されていた。



肺炎後の肺内サイトカインレベル Sham:CLP なし、2H:CLP あり。  
BALF:気管支肺胞洗浄液



CLP後4日目の肺胞マクロファージは、好中球遊走促進因子であるKCの発現量が低下しており、肺炎病理像からも、肺胞内への好中球浸潤の減少が認められた。IFN をCLP3日後に全

身投与すると、CLP後4日目の肺胞マクロファージ機能の低下を防止（下図）し、その後の肺炎病理像を改善し、生存率も40%台へ回復させた。これらの結果より、腹膜炎が遠隔臓器である肺内のマクロファージ機能を抑制しており、それがその後の日和見感染の重篤化に関わっている可能性、さらにIFN がその低下したマクロファージ機能の賦活効果を持っており、その結果生存率を上昇させているとのメカニズムが示唆された。

臨床研究でも、ARDS患者にIFN を投与することが、生存率改善に関連する報告が2014年に発表され（Bellingan et al. Lancet Respir Med. 2014;2:98-107）、本サイトカインの臨床応用の有効性を示唆した。

### 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 33 件)

[欧文]

1. Kariya T, Ito N, Kitamura T, Yamada Y. Recovery from extreme hemodilution (hemoglobin level of 0.6g/dL) in cadaveric liver transplantation. Anesth Analg 2015;10(4);132-6
2. Kusakabe Y, Uchida K, Yamada Y, et al. (9名中 2,8 番目) A standardized blood test for the routine clinical diagnosis of impaired GM-CSF signaling using flow cytometry. J Immunol Methods. 2014 :413;1-11. doi: 10.1016/j.jim.2014.07.009.
3. Nakagaki K, Nunomura Y, Uchida K, Nakata K, Tazawa R. Up-Regulation of Cluster of Differentiation (CD) 11b Expression on the Surface of Canine Granulocytes with Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF). Journal of Veterinary Medical Science. 2014 Aug;76(8):1173-6.
4. Uchida K, Yasunaga H, Sumitani M, Horiguchi H, Fushimi K, Yamada Y. Effects of Remifentanyl on In-hospital Mortality and Length of Stay Following Clipping of

- Intracranial Aneurysm: A Propensity Score Matched Analysis. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology*. 2014 Oct;26(4):291-8.
5. Kawamura G, Inoue R, Araki Y, Mori Y, Sato K, Yamada Y, Kitamura K: The effects of preoperatively administered carbamazepine and phenytoin on rocuronium-induced neuromuscular block under sevoflurane anesthesia: A retrospective clinical study. *Masui (Jpn J Anesthesiol)* 63(8):877-880, 2014
6. Uzawa Y, Otsuji M, Nakazawa K, Wei Fan, Yamada Y: Derivation of recruitment function from the pressure-volume curve in an acute lung injury model. *Respir Physiol Neurobiol* 205:16-20, 2014
7. Uchida K, Yamada Y, Trapnell BC, et al. (11 名中 1, 10 番目) Standardized Serum GM-CSF Autoantibody Testing for the Routine Clinical Diagnosis of Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Journal of Immunological Methods*. 2014 Jan;402(1-2):57-70
8. Sumitani M, Uchida K, Yamada Y, et al. (9 名中 3, 9 番目). Perioperative factors affecting the occurrence of acute complex regional pain syndrome following limb bone fracture surgery: Data from the Japanese Diagnosis Procedure Combination database. *Rheumatology*. 2014 Jul;53(7):1186-93
9. Uchida T, Ohno N, Asahara M, Yamada Y, Yamaguchi O, Tomita M, Makita K: Soluble isoform of the receptor for advanced glycation end products as a biomarker for postoperative respiratory failure after cardiac surgery. *PLoS ONE* 8(7):e70200. 2013
10. Sato K, Kitamura T, Kawamura G, Mori Y, Sato R, Araki Y, Yamada Y: Glucose use in fasted rats under sevoflurane anesthesia and propofol anesthesia. *Anesth Analg* 2013;117:627-633
11. Fukazawa K, Yamada Y, Nishida S, Hibi T, Arheart K, Pretto Jr. Determination of the safe range of graft size mismatch using body surface area index in deceased liver transplantation. *Transpl Int* 2013;26(7):724-733
12. Kohno S, Seki M, Yamada Y, et al. (7 名中 4 番目) Prediction of Requirement for Mechanical Ventilation in Community-Acquired Pneumonia with Acute Respiratory Failure: A Multicenter Prospective Study. *Respiration* 2013;85:27-35
13. Muroya M, Chang K, Uchida K, Bougaki M, Yamada Y. Analysis of cytotoxicity induced by proinflammatory cytokines in the human alveolar epithelial cell line A549. *Bioscience Trends*. 2012 Apr;6(2):70-80.
14. Uchida K, Yasunaga H, Yamada Y et al. (7 名中 1, 7 番目) Impact of remifentanyl use on early postoperative outcomes following brain tumor resection or rectal cancer surgery. *Journal of Anesthesia*. 2012;26(5):711-20
15. Uchida K, Yasunaga H, Yamada Y et al. (8 名中 1, 8 番目) Impact of remifentanyl introduction on practice patterns in general anesthesia. *Journal of Anesthesia*. 2011;25:864-71.
- [邦文]
16. 内田寛治. 誤嚥性肺炎の病態と治療. *麻酔* 2016 Jan;65(1):13-22
17. 長友香苗, 山田芳嗣. 呼吸管理の現況と展望. *最新医学* 69(7):24-29, 2014
18. 山田芳嗣. 高侵襲手術の麻酔と周術期管理 (術後集中治療). *麻酔* 63(5):496-497,

2014

19. 山田芳嗣. ARDS 診療の現在の状況と今後の展開. 麻酔 62(5):514-516, 2013
20. 内田寛治. 顆粒球マクロファージコロン-刺激因子(GM-CSF)シグナルと生体防御・臓器保護. 麻酔 2013 Mar;62(3):265-74.
21. 河村岳, 北村享之, 本間生夫, 山田芳嗣. 呼吸終末陽圧付加による酸素化能改善機序:セボフルラン麻酔下およびプロポフォル麻酔下手術症例での後ろ向き研究. 麻酔 2013;62(6):652-659
22. 山田芳嗣. 呼吸管理. 呼吸 31(10):958-961, 2012
23. 山田芳嗣. 麻酔管理と周術期アウトカム. 麻酔 61(5):462-464, 2012
24. 内田寛治. 手術患者リスク評価と周術期管理に関連した周術期アウトカム. 麻酔 2012 May;61(5):514-25

[学会発表](計 23 件)

1. 比留間 孝広, 内田 寛治, 日下部 良臣, 山村 睦朗, 矢作 直樹, 山田 芳嗣. 敗血症に引き続く緑膿菌肺炎のマウスモデルに対するインターフェロンの治療的効果とそのメカニズム. 日本麻酔科学会学術集会 2015年5月28日(神戸市)
2. 内田寛治. シンポジウム: 肺傷害発症と重症化のメカニズム 臨床応用への可能性 肺血管透過性の関与とその制御. 日本麻酔科学会学術集会 2015年5月29日(神戸市)
3. Hiruma T, Uchida K, Nakajima S, Yahagi N, Yamada Y. et al. Interferon Beta Improved Survival Of Septic Pneumonia Induced By Intratracheal Instillation Of Pseudomonas Aeruginosa By Increasing Neutrophil Recruitment Into The Lung. American Thoracic Society Annual Meeting (ATS)2014.5.19 (San Diego, USA)
4. Kusakabe Y, Uchida K, Yamada Y. et al. Protective Effect Of Interferon Beta To Murine Polymicrobial Sepsis May Not Be Explained By Simple Immunesuppression. ATS 2014.5.18 (San Diego, USA)
5. 日下部 良臣, 内田 寛治, 比留間 孝広, 山村 睦朗, 山田 芳嗣. マウス敗血症モデルに対するインターフェロンの効果は単純な免疫抑制性効果によらない. 日本麻酔科学会 2014年5月16日(横浜市)
6. 比留間 孝広, 内田 寛治, 日下部 良臣, 山村 睦朗, 中島 勲, 山田 芳嗣. 2次感染モデル(回盲部結紮穿孔後の肺炎)に対するイ

- ンターフェロンの効果. 日本麻酔科学会 2014年5月16日(横浜市)
7. 比留間 孝広, 内田 寛治, 中島 勲, 山田 芳嗣, 矢作 直樹. 院内感染マウスモデルにおけるインターフェロンを用いた炎症制御. 日本救急医学会 2014年10月29日.(福岡市)
8. 比留間 孝広, 内田 寛治, 松原 全宏, 中島 勲, 山田 芳嗣, 矢作 直樹. 回盲部結紮穿孔後の生体防御能低下に対するインターフェロンの効果. 日本集中治療医学会 2014年2月27日 (京都市)
9. 張京浩, 山田芳嗣. 炎症性サイトカインで誘導される細胞障害に対する長鎖不飽和脂肪酸の細胞保護作用. 日本集中治療医学会 2014年2月27日 (京都市)
10. Kusakabe Y, Uchida K, Yamamura Y, Suzuki Y, Hiruma T, Yamada Y. Effect Of Interferon Beta On Survival For Murine Polymicrobial Sepsis. ATS 2013.5.19 (Philadelphia, USA)
11. 日下部良臣, 内田寛治, 鈴木洋子, 山村睦朗, 比留間孝広, 山田芳嗣. マウス敗血症モデルでインターフェロンは生存率を改善する. 日本麻酔科学会 2013年5月23日(札幌市)
12. 長友香苗, 内田寛治, 松原全宏, 矢作直樹, 山田芳嗣. 救命救急センターICUにおける敗血症予後因子の検討. 日本集中治療医学会 2013年2月28日 (松本市)
13. 日下部 良臣, 内田 寛治, B.C. Trapnell, 山田 芳嗣. GM-CSF 刺激による好中球のCD11bの上昇率で術後患者や重症感染症患者の免疫能を評価する. 日本麻酔科学会学術集会 2012年6月8日(神戸市)
14. Kusakabe Y, Uchida K, Trapnell BC, Yamada Y. Validation And Mechanism Of Flow-Based Whole Blood Assay To Evaluate Phagocyte Immune Function. ATS 2012.5.22 (San Francisco, USA)
15. Carey B, Chalk C, Uchida K, Suzuki T, Nakata K, Inoue Y, Trapnell B. Dried Blood Spot Card Testing For Diagnostic, Epidemiological And Longitudinal Evaluation Of Pulmonary Alveolar Proteinosis: The US National PAP Registry Study. ATS 2012.5.23 (San Francisco, USA)
16. Uchida K, Yamada Y, et al. Can Specific Anesthetic Drug Affect Postoperative Recovery? From The Analysis Of Large Administrative Claim Database In Japan. ATS 2011.5.17 (Denver, USA)
17. Uchida K, Yamada Y, et al. Towards Global Standardization Of Serologic Blood Testing For The Diagnosis Of Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. ATS 2011.5.15 (Denver, USA)
18. 内田 寛治, 住谷 昌彦, 康永 秀生, 宮田 裕章, 山田 芳嗣. レミフェンタニルを使用した麻酔の術後予後に与える影響; 脳腫瘍手

術と大腸手術. 日本麻酔科学会 2011年5月19日(神戸市)

〔図書〕(計 1件)

- (1) 山田芳嗣: ARDS における肺保護戦略 pp.183-190、永井厚志他編 Annual Review 呼吸器 2012 中外医学社, 2012

〔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

山田 芳嗣 (YAMADA, Yoshitsugu)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号: 30166748

### (2) 研究分担者

瀬戸 泰之 (SETO, Yasuyuki)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号: 00260498

中島 勸 (NAKAJIMA, Susumu)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 40323597

松原 全宏 (MATSUBARA, Takehiro)  
東京大学・医学部附属病院・特任講師  
研究者番号: 40361498

張 京浩 (CHO, Kyohiro)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 50302708

矢作 直樹 (YAHAGI, Naoki)  
東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 60158045

内田 寛治 (UCHIDA, Kanji)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 60302709

八木 浩一 (YAGI, Koichi)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 90422310

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: