

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461502

研究課題名(和文) 新規肺炎診断法開発を目指した痰中好中球の細胞死の解析

研究課題名(英文) Analysis of cell death of sputum neutrophils aiming at development of a diagnostic method for new pneumonia

研究代表者

吉田 寿雄 (YOSHIDA, HISAO)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80598574

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)：肺炎の正確な診断は現在でも困難である。我々は光学顕微鏡で観察するために肺炎患者から採取した喀痰のグラム染色スライドをスペクトルデータを詳細に解析することができる専用のカメラを用いて観察した。このカメラにより、好中球中の画像を光の波長の400nm～1000nmの範囲で5nm毎に分割するデータを得ることが出来た。得られたデータを専用ソフトで解析することで、人間の目では判別できない色調の違いを区別することができる。色の違いが好中球の活性化の違いとして区別し分類出来る可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The diagnosis of pneumonia is still difficult now. We observed Gram stained slides of sputum collected from patients with pneumonia for observation with an optical microscope using a dedicated camera that can analyze spectral data in detail. With this camera we were able to obtain data dividing the image in the neutrophils every 5 nm in the wavelength range of 400 to 1000 nm of light. By analyzing the obtained data with dedicated software, it is possible to distinguish differences in color tone that can not be discerned by human eyes. It was shown that the difference in color can be distinguished and classified as the difference in activation of neutrophils.

研究分野：感染症治療

キーワード：肺炎 好中球 グラム染色 NETs hyper spectral imaging

1. 研究開始当初の背景

好中球は、病原体が体内に侵入するのを防ぐ最前線の細胞の一つである。呼吸器感染症の患者において、喀痰中には多数の好中球が含まれ、感染を契機にその多くが細胞死を起こした状態で喀出されることが以前から知られている。好中球の抗菌能として、2004年にBrinkmannらがNeutrophil Extracellular Traps(NETs)と呼ばれる新たな好中球の自然免疫能を報告された(Brinkmann, V. et al. Science.303, 1532-1535,2004)。我々は、呼吸器感染症患者における喀痰中の好中球とNETsについて研究をおこなっており、2014年には肺炎患者におけるNETsの動態について報告している(Hamaguchi, S. et al. Eur Respir J. 2014 Jun;43(6):1709-18.)。本研究では、呼吸器感染症患者における喀痰中の好中球の働きについて明らかにすることを目的としている。

2. 研究の目的

呼吸器患者において、喀痰のグラム染色は検査に用いられ、痰中に含まれる細菌の性状から、原因菌を予想し治療薬の選択に用いられる。しかしながら、同じ痰中で観察される好中球の性状についてはなんら分析されることはない。我々は以前から好中球の性状に注目しており、好中球の活動性が上がる場合において、細胞が膨化することが観察されている。しかし、客観的な指標は存在しないため、本研究において、喀痰のグラム染色をハイパースペクトラムカメラにより観察することを目的としている。

3. 研究の方法

大阪大学医学区部附属病院高度救命救急センターに入院中の患者において、呼吸器感染症発症時の喀痰を継時的に採取し、グラム染色を行い、ハイパースペクトラムカ

メラで撮影された画像のスペクトル解析を行う。

グラム染色については、ハッカーの変法を用いたが、染色の均一性についても調整を行うために、各染色液の単染色などについても試行した。ハイパースペクトラムカメラによる撮影については、対応カメラを顕微鏡に直接増設し、400nm-1000nmの波長区間を5nm毎に撮影を行なった。撮影画像はフリーソフトであるMultiSpecを用いて解析を行った。

図1：ハイパースペクトラム撮影のイメージ図 Computerized Medical Imaging and Graphics 38 (2014) 171-178

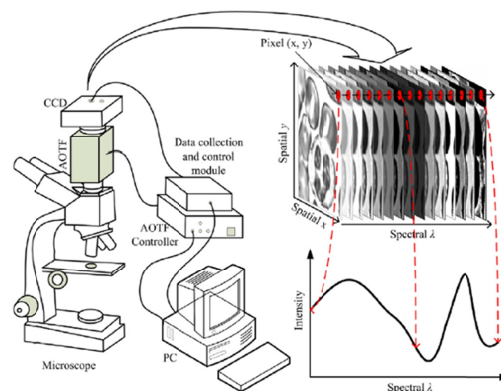
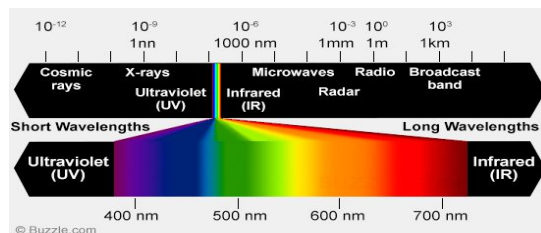


図2：ハイパースペクトラムにおける撮影波長領域



NETs 産生実験については、以下の通りに行った。エチレンジアミン四酢(EDTA)を抗凝固剤としてヒト血液を約7mlx4本採取する。採取した血液の一部を用いて、予め血球計算機で血球数の測定を行っておく。ファルコンチューブ(15ml)2本にそれぞれ6mlずつのモノポリ溶液(DSファー

マバイオメディカル)を入れた後に抗凝固剤処理した全血 6mL を静かに重層する。室温(15 ~30°C)でスイング式の遠心分離機を用いて 400g, 20 分間遠心する。上層の黄色・透明の層を破棄し、ピンク色の層(顆粒球を含む)を 4-5ml を取り出し、PBS を加え約 10ml とし、細胞を洗浄する。遠心分離(300g、10 分間)を行い、細胞のみ採取する。赤血球が多数存在する場合は、0.2% 塩化ナトリウム溶液を用いて溶血させたのち、再度細胞を PBS で洗浄した。最後に培養液を加えて好中球懸濁液とした。ここで、最終の好中球の濃度を測定し、培養実験を行った。

好中球を約 $2.0 \times 10^5/\text{ml}$ になるようにアルブミン入り RPMI 培養液で調整し、ウェルに投与後、1 時間静置培養を行い、好中球をウェルに固着させた。その後、phorbol myristate acetate(PMA)による好中球刺激を行いさらに 3 時間培養を行った。終了後に、グラム染色を行い、刺激の有無による差異について観察を行なった。

4 . 研究成果

高度救命救急センターに入院中の患者 2 名より喀痰サンプルを継時的に採取し、観察を行なった。また、尿路感染症患者より得たカテーテル尿のサンプルについても解析を行なった。

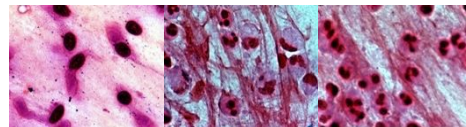
< 症例 1 >

悪性症候群の疑いで転院搬送された患者で、挿管の上、人工呼吸器管理となっていた。39 度の発熱、炎症高値 (WBC 6260/ μl ・CRP 15.25 mg/dl) 痰のグラム染色(下図)では、複数菌種を認めたことから、人工呼吸器関連肺炎と診断し、アンピシリンスルバクタムを投与した。4 日目には繊維状の構造物である NETs を認め、好中球が膨化していたが、5 日目には縮小傾向にあった。

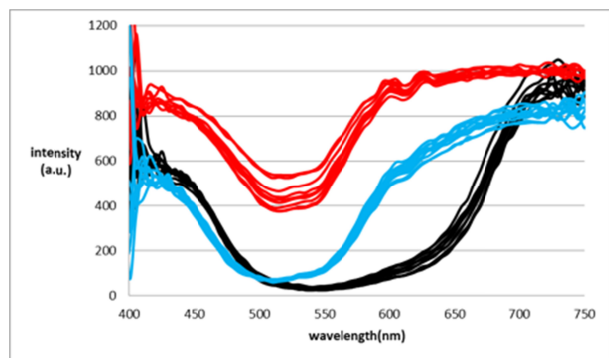
ハイパースペクトラムカメラによる解析を行なったところ、500-550nm 付近において、光強度が 1 日目から 4 日目にかけて上昇し、炎症が改善するに従い 5 日目に 1 日目と同レベルまで減少した。

図 3 : 喀痰のグラム染色と光強度の推移

Day1 Day4 Day5



Day1 : 黒 Day4 : 赤 Day5 : 青



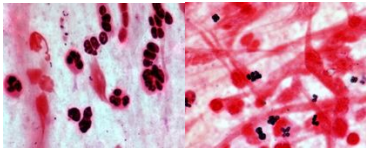
< 症例 2 >

心室細動による心停止のため救急搬送された。すでに両側肺野において呼吸音は減弱しており、黄色の痰を多量に喀出していた。喀痰グラム染色では、複数菌種とともに分葉化した好中球が確認された。誤嚥性肺炎との診断からアンピシリンスルバクタムを投与した。5 日目の喀痰からグラム陽性球菌を認め、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌による肺炎と診断しバンコマイシンを追加投与した。13 日目には、38 度発熱と、喀痰において、再度グラム陰性菌と分葉・膨化した好中球を認めたためセフトリアキソンへと変更を行なった。

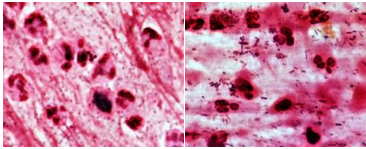
ハイパースペクトラム解析において、500-550nm 付近の光強度が 10 日目に上昇していた。

図 4 : 喀痰のグラム染色と光強度の推移

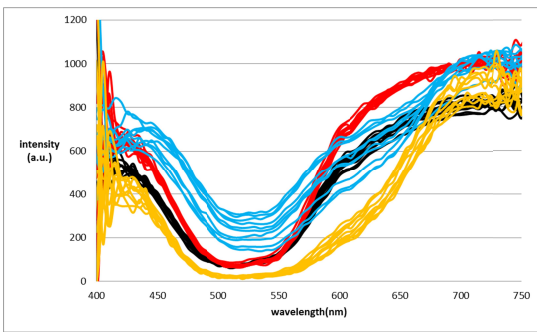
Day1 Day5



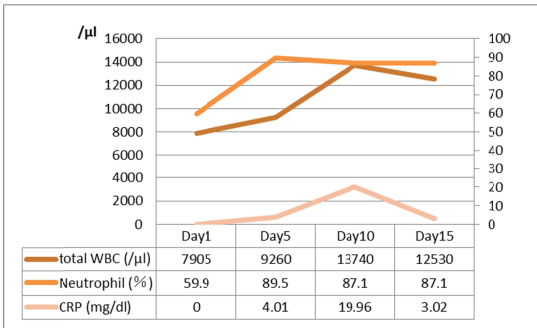
Day10 Day15



Day1 : 黒 Day5 : 赤 Day10 : 青 Day15 : 黄



血液検査 炎症数値の推移

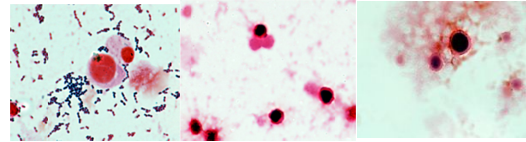


< 症例 3 >

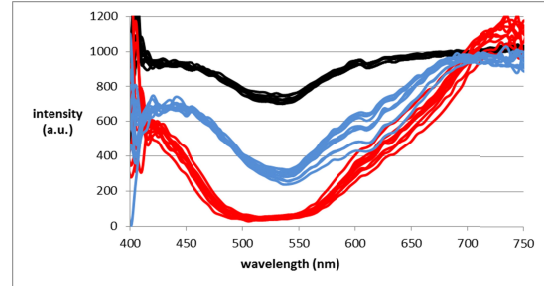
脊髄損傷のため救急搬送された。入院中に 39 度の発熱と炎症高値を認め、尿中から多数の細菌を認めたため尿路感染と診断しアンピシリンスルバクタムの投与が開始された。尿中の細菌は速やかに排除された。ハイパースペクトラム解析において、500-550nm 付近の光強度が 1 日目に最も上昇しており、抗菌薬の投与により改善するに従い、減少していった。

図 5 : 尿のグラム染色と光強度の推移

Day1 Day2 Day3



Day1 : 黒 Day4 : 赤 Day5 : 青



< 考察 >

呼吸器感染症のなかで、肺炎を正確に診断することは画像診断や各種尿中抗原迅速キットの普及にもかかわらず依然として困難を伴う。肺炎の診断を正確に他の診断と鑑別しうる喀痰からの非侵襲的な検査方法を確立することは、適切な抗菌薬の選択、治療期間の指標になり、臨床現場における有用性が高い。本研究では、好中球の活性度を客観的に測定できるかについて研究をおこなってきた。上記に示した肺炎患者 2 例において、炎症の最盛期において、好中球の 500-550nm 付近のスペクトラムが上昇していることが明らかとなった。これまでは、好中球の大きさの相対評価により、活動レベルを推定していたが、光強度を調べることで客観的に測定できる可能性が示唆された。また、尿路感染患者においても、同様の傾向が観察できたことから、感染症における好中球の活動として一般化できる可能性を示すことができた。これまでは、好中球の貪食像の有無などで、感染症・炎症状態を推定していた。好中球の活動度を客観的に判断することができれば、抗菌薬の投与時期・投与期間の判断材料となる上に、治療効果の判定にも使うことができる

と考えられる。今後も症例を増やすとともに、感染症全般に適応できるかについて調べたい。また、現在は高額なハイパースペクトラムカメラを用いた撮影を行なっているが、撮影するスペクトル範囲を縮小するなどして低コストで汎用性の高い撮影装置の実現に向けても研究を続けたい。

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 1件)

36th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine, Analysis of Neutrophil by Hyper Spectral Imaging, Ryosuke Takegawa, Hisao Yoshida, Tomoya Hirose, Norihisa Yamamoto, Hideharu Hagiya, Masahiro Ojima, Yukihiro Akeda,, Osamu Tasaki, Kazunori Tomono, Takeshi Shimazu

[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] 該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田寿雄 (YOSHIDA HISAO)

大阪大学大学院医学系研究科感染制御学講座 助教 研究者番号：80598574

(2)研究分担者

朝野和典 (TOMONO KAZUNORI)

大阪大学大学院医学系研究科感染制御学講座 教授 研究者番号：40202204

明田幸宏 (AKEDA YUKIHIRO)

大阪大学大学院医学系研究科感染制御学講座 講師 研究者番号：60444527

萩谷英大 (HAGIYA HIDEHARU)

大阪大学大学院医学系研究科感染制御学講座 助教 研究者番号：30718531

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

竹川良介 (TAKEGAWA RYOSUKE)

大阪大学医学部附属病院 医員

濱口重人 (HAMAGUCHI SHIGETO)

ニューヨーク市立大学 研究員

山本倫久 (YAMAMOTO NORIHISA)

大阪大学医学部附属病院 医員