

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462747

研究課題名(和文) 院内感染に伴う重症敗血症の発症メカニズム解析

研究課題名(英文) Mechanism of severe sepsis associated with hospital acquired infection

研究代表者

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

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)：インターフェロン(IFN)がARDSの死亡率を低下させる報告がある。腹膜炎-肺炎の重症感染マウスモデルを作成し、IFNの生存率に与える影響を検討した。回盲部結紮穿孔(CLP)により腹膜炎をおこした後、4日後に緑膿菌肺炎を起こすモデル(PAIT)を作成した。PAITの18時間後の気管支肺胞洗浄液(BAL)中の肺内残存菌量、細胞数およびサイトカイン値を測定した。回盲部結紮穿孔後の肺炎モデルでは死亡率は著明に低下したが、IFNによりその生存率は改善した。IFNは肺への炎症性サイトカインおよび細胞数を回復し、肺内殺菌能力を挙げることで、生存率の改善に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluate therapeutic possibility of IFN β on murine model of septic pneumonia. Murine sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP) on mice. Four days later, pneumonia was made with intratracheal instillation of *Pseudomonas aeruginosa*. IFN β was given 24 hours before PA instillation. Survival was observed. Bronchoalveolar lavage (BAL) was done at 18 hours after PA instillation and remaining bacterial count, cell count, cytokine levels in the BALF were evaluated. Survival was significantly worse on murine model of septic pneumonia. Administration of IFN β significantly improved survival. TNF α and IL-6 in the BALF tended to be higher and remaining bacterial count tended to be lower in group treated by IFN β . Impaired host defense mechanism might associate with higher mortality in septic pneumonia mouse model. Subcutaneous IFN β may restore production of inflammatory cytokines in the lung and increased neutrophil recruitment and that may contribute to improve survival.

研究分野：救急

キーワード：敗血症 急性腎障害 免疫抑制

1. 研究開始当初の背景

Surviving Sepsis Campaign guidelines (SSCG) は敗血症治療におけるガイドラインであり、重症敗血症、敗血症性ショックに関する診断、治療に関して各種の推薦を提示しているものである (Crit Care Med. 2013; 41:580-637)。また本邦からも日本集中治療医学会により、日本版敗血症診療ガイドラインが発表されている (日集中医誌. 2013; 20:124-73)。これらのガイドラインの制定、および集中治療の発展に伴い、敗血症死亡は以前よりは減少しているとはいえ、敗血症は現在においても死因の主要な原因である。我が国では年間 38 万人以上、米国では毎年 75 万人以上が罹患し、約 25% が死亡しているといわれている。敗血症の発症が市中感染か院内感染かについて集中治療室に入室した重症敗血症を対象に調べた研究では、57% が市中感染、43% が院内感染と報告されており (Intensive Care Med. 2002; 28:108-21)、近年では多剤耐性菌の関与も指摘されている。集中治療に関わる我々としては院内感染の予防策の構築はもとより、早期治療介入による重症化の回避を図る戦略の構築は急務である。集中治療室には、敗血症、予定手術後、緊急手術後、腹膜炎、急性腎障害 (Acute kidney injury; 以下 AKI)、外傷、熱傷、瘻管など実に多様な疾患を抱えている重症患者が入室するが、これらの患者に新たな院内感染症が発生することは、容易に敗血症に至り、重症度をさらにあげ、その死亡率の上昇に寄与している。このような基礎疾患 (first attack) による免疫状態の変化が 2 次感染に対する防御能を低下させ、感染という second attack に対して極めて脆弱になるという考えは、second attack theory や two hit theory などと呼ばれている。動物実験でもこれに模した実験モデルが複数ある (Infect Immun. 2010; 78:1582-92) (Shock. 2012; 37:85-94)。我々は今回、臨床でしばしば遭遇し重症化に至ることが多い点から、腹膜炎、急性腎障害 (AKI) における 2 次感染に着目して、臨床研究及び動物実験で自然免疫機能の動態の究明を目指している。院内肺炎の起因菌としては本邦では黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) が 26.1%、緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa) が 21.6% を占め、両者で約半数を占めている (総合臨床 1998; 47: 3055-3060) ことから、これらの菌による肺炎及び菌血症に特に焦点をあてる。腹膜炎に緑膿菌肺炎を併せさせたモデルは比較的多いが (J Immunol. 2011; 186:195-202) (J Infect Dis. 2012; 206:932-42)、MRSA による second attack model や急性腎障害による second attack model の検討、報告はいまだ少ない。我々は回盲部結紮穿孔 (CLP) を施行し、4 日後に緑膿菌の気管投与による肺炎 (PAIT) を起

こす second attack model を作製したが、Sham-PAIT の生存率 85.2% に対して CLP-PAIT は 9.5% と低下し ($P < 0.001$)、肺炎に対する生体防御能が CLP 後に低下していた。CLP-PAIT に免疫系を賦活するサイトカインを投与することで、生存率は 40.9% に上昇し ($P < 0.05$)、immune modulation が予後改善に働く可能性が示唆された。また近年、敗血症と凝固機能異常との cross-talk の形成が、その重症化に関与しているとの報告もあり (J Trauma Acute Care Surg. 2012; 72:1150-7)、適正な凝固機能の回復が予後改善に働く可能性も示唆されている。我々の先行研究成果と既知の知見を合わせると、敗血症発症後に免疫機能・凝固機能を適正化することで重症化を回避できる可能性が考えられ、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

基礎疾患を背景に重症化する院内感染症について、その免疫機能・凝固機能の評価を行うことにより、適切な病態把握のバイオマーカーを決定する。

- (1) 集中治療室に入室する重篤な患者のうち、腹膜炎、急性腎障害患者を対象とし、院内肺炎、院内菌血症を併発した症例の背景因子、バイオマーカーを決定する。
- (2) 院内感染症を想定した Second attack model として first attack (腹膜炎、急性腎障害) + second attack (肺炎、菌血症) のモデルを確立し、自然免疫機能・凝固機能の動態を究明する。
- (3) Second attack 動物モデルにおける治療的介入を行い、臨床応用の基礎的知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 東大病院集中治療室に入室した急性腎障害の分析
東大病院集中治療室 (以下 ICU) は院内急変、院内の重症患者・多臓器不全患者に対応する第 1ICU、主に術後患者・単臓器不全患者に対応する第 2ICU、救命救急センターからの入院 (救急外来からの入院) に対応する救命 ICU と 3 つからなる。救命救急センターはこれらの重症患者管理を共同で施行している。院内感染症による敗血症、多臓器不全などを来した重症患者は第 1ICU に全例入室する。年間の第 1ICU 入室患者は平均 900 名から 1000 名である。第 1ICU に入室したということは院内発生した重症患者を意味し、効率よく院内感染症患者の重症例を収集できる。
2012 年の 1 年に ICU に入室した患者を抽出し、入室後のクレアチニンや AKI のバイオマーカーである尿中 NAG、尿中 L-FABP などの血液・尿中の各種検査項目と、生存率や重症度

などの関連性を検討した。患者基本情報（年齢、性別、基礎疾患、合併症）及び腹膜炎にいたった原因、重症度、AKIにいたった原因とその重症度、院内肺炎・院内菌血症の原因菌、使用された抗菌薬の種類と使用期間、入院期間、集中治療室滞在期間、入室時のAPACHE スコア、SOFA スコア、mechanical device の使用の有無とその期間（人工呼吸器、非侵襲的陽圧換気療法、持続的血濾過透析、人工心肺装置など）などにつき、詳細なデータ収集を行う。

集中治療室に入室時及び連日7日目までは採血を行い、以下のパラメータを測定する。

- ・血算、血液生化学、凝固能検査；白血球数とその分画、ヘモグロビン値、血小板数、PT%、APTT、FDP、Dダイマー、フィブリノゲン、CRP、プロカルシトニン、肝機能、腎機能、TP、Alb
- ・血清中の液性因子：炎症性/抗炎症性サイトカイン；IL-1、IL-6、TNF、IFN、IL-10、IL-12、MCP-1
- ・血漿中のヒストン/DNA断片複合体

健常者、予定腹部術後患者、AKI患者と、重症化にいたった院内肺炎・院内菌血症患者を比較することで、バイオマーカーにつながる因子を明らかにする。

（2）院内感染症を想定した、Second attack 動物モデルの作製

中等度の first attack に second attack を与えることで、重症の敗血症をきたす second attack 動物モデルを確立する。院内感染を想定し、腹膜炎+感染症（肺炎、菌血症）と、AKI+感染症（肺炎、菌血症）のモデルを確立する。

・ first attack

first attack としてはすでに当科で方法論が確立している腹膜炎モデルと AKI モデルを使用する。動物はマウスを使用する。腹膜炎モデルには回盲部結紮穿孔（CLP）を行う。穿孔に用いる針の太さを調節する事により、14日間の観察期間中に死亡しない程度の中等度腹膜炎モデルを作成する。AKI モデルには両側腎動脈を30分クランプし、再灌流することによる腎虚血再灌流モデルを使用する。24時間後に眼窩より採血を施行しBUNの上昇を確認し、AKIモデルが成立していることを確認する。これらのコントロールとしては sham operation のマウスを使用する。

・ second attack

CLP、腎虚血再灌流の first attack 施行後4日目に肺炎、菌血症を合併させる。菌は院内感染症を想定して *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*)、Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) を使用する。救急部集中治療部には感染実験が施行できる研究室が整備されており、上記2つの使用に関してはすでに大学より許可されている。肺炎、菌血症に使用する菌量は、正常マウスでは14日間の観察期間中に死亡しない程度の中等度感染

する量とする。肺炎に関しては菌の経気管投与（intratracheal instillation; IT）とする。菌血症に関しては眼窩静脈よりの静脈注射（intravenous injection; IV）により行う。これらの second attack 動物モデルと sham operation マウスとの経時的な生存率を比較する。

（3）Second attack 動物モデルにおける免疫学的検討

- ・ Second attack としての IT、IV 後 1・3・5 日後にマウスを犠牲させて、血液、気管支肺胞洗浄液（Bronchoalveolar Lavage; BAL）、腹腔内洗浄液、脾臓、肝臓の残存細菌量をホモジナイズした組織を段階希釈して、寒天培地でコロニーカウントして定量化する。

- ・ 各臓器（肺、腎、心、肝、腎）の組織学的評価を行う。

- ・ 血算の測定による白血球数とその分画、ヘモグロビン値、血小板数の変化

- ・ 血液生化学検査（BUN, GPT, GOT）の測定、凝固能の変化

- ・ 血清中、腹腔洗浄液、BAL 中のサイトカインの検討

- IL-1、IL-6、TNF、IFN、IL-10、IL-12、MCP-1 の経時的評価

- ・ 肺組織におけるミエロペルオキシダーゼ活性測定で定量する。

- ・ 血漿中のヒストン/DNA断片複合体

Sham operation, second attack モデルのデータを比較することで、自然免疫細胞機能・血液凝固能の動態、バイオマーカーにつながる因子と病態形成のメカニズムを明らかにする。

4．研究成果

院内感染に伴う重症敗血症の動物モデルとして、回盲部結紮穿孔（CLP）を施行し、4日後に緑膿菌肺炎を起こす two hit model を作成した。CLP、肺炎だけでは軽症だが、腹膜炎に肺炎が起こると重症となる two hit model を作成した。また作成した two hit model に治療薬として、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）を使用して、解析を行った。Sham 後に肺炎を起こした sham 群の生存率が90%強であったが、CLP+肺炎をおこし、CLP3日後に生理食塩水（NS）を投与した 2H, NS 群では生存率は9%強まで低下した。またこの two hit model に治療として IFN 70万 U/kg を CLP3日後に投与した 2H, IFN 群では、生存率を改善する結果を得た（40%強）

引き続き上記3群でメカニズム解析を行った。肺炎後の気管支肺胞洗浄液（BAL）の好中球数やサイトカインを評価したが、sham 群と比較して 2H, NS 群では BAL 中の好中球数や炎症性サイトカインは有意に低下し、2H, IFN 群では sham 群と同様のレベルまでそれら

が回復した。これらの結果からは院内感染に伴う重症敗血症を模した two hit model では免疫抑制が死亡率上昇の機序として考えられ、IFN による治療効果としては抑制された免疫機能を回復させることがそのメカニズムであることが推測された。

臨床研究では東京大学救急部・集中治療部の集中治療室（ICU）へ入院した患者において急性腎障害（AKI）のバイオマーカーと死亡率との関連性を検討した。2012年の1年にICUに入室した患者を抽出し、入室後のクレアチニンやAKIのバイオマーカーである尿中NAG, 尿中L-FABPなどの血液・尿中の各種検査項目と、生存率や重症度などの関連性を検討した。その結果クレアチニンの値によってAKIと診断された患者のうち、AKIのバイオマーカーである尿中NAG, 尿中L-FABPも陽性である患者は、有意に死亡率が上昇する結果を示すことを明らかにした。

マウスにおいて腹膜炎+肺炎の院内肺炎を模した、回盲部結節穿孔（CLP）+緑膿菌肺炎の two hit model を作成した。two hit model では生存率は著しく低下し、その重症化のメカニズムを解析した。また同モデルに対して、治療としてインターフェロン（IFN）を使用することで生存率が改善したことを先行実験では確認しているが、そのメカニズムを解析した。

肺炎後の気管支肺胞洗浄液（BALF）中のケモカインとしてKCが two hit model で有意に低下し、またインターフェロンの投与で有意に上昇していた。肺炎前後の肺病理において、KCの免疫染色を行い、病理学的にも同様の変化が見られるかを検討した。肺病理における免疫染色においても、肺胞マクロファージのKC発現が two hit model 群で低下しているが、治療薬としてIFNを投与した群ではKCの発現が復帰していた。

また腹膜炎4日後の肺炎直前にBALFより分離した肺胞マクロファージのKC分泌能を評価した。腹膜炎で各種サイトカインにさらされた肺胞マクロファージにおいて、KC分泌能は two hit model 群で低下しているが、治療薬としてIFNを投与した群ではKCの発現が復帰しており、肺病理と同様の傾向を示した。

two hit model やIFN投与群において肺胞中のKCの低下や上昇を伴っており、KCが肺胞内の好中球の動員に関与し、これらのモデルの結果に影響していることが推定された。KCの動態が先行実験における肺炎後の好中球の動員や生存率の改善につながっている可能性が示唆された。

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4件）

Hirayama I, Hiruma T, Ueda Y, Doi K, Nakajima S. Hamman syndrome: pneumomediastinum combined with hyperosmolar hyperglycemic state. *Am J Emerg Med.*

2016 ;34(10):2058.e1-2058.e2.
doi: 10.1016/j.ajem.2016.03.039

Nakamura K, Inokuchi R, Hiruma T, Tokunaga K, Doi K, Nakajima S. Switching therapy from intravenous beta blocker to bisoprolol transdermal patch for atrial fibrillation tachycardia.

J Anesth. 2016;30(5):891-4.
doi: 10.1007/s00540-016-2199-9.

Wada T, Yasunaga H, Horiguchi H, Fushimi K, Matsubara T, Nakajima S, Yahagi N. Ozagrel for Patients With Noncardioembolic Ischemic Stroke: A Propensity Score-Matched Analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis.*

2016 ;25(12):2828-2837.
doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.07.044.

Hiruma T, Asada T, Yamamoto M, Inokuchi R, Matsubara T, Ishii T, Sumida M, Isshiki R, Mayumi K, Noiri E, Nangaku M, Yahagi N, Doi K. Mortality prediction by acute kidney injury biomarkers in comparison with serum creatinine. *Biomarkers.*

2014 ;19(8):646-51.
doi: 10.3109/1354750X.2014.968209.

〔学会発表〕（計5件）

比留間孝広. Peritoneal sepsis impairs efficient recruitment of neutrophils into the alveolar space and augment lung injury after nosocomial infection. The American Thoracic Society 2016 International Conference. 2016年5月13日～18日. サンフランシスコ(アメリカ)

比留間孝広. 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効果. 第62回日本麻酔科学会. 2015年5月28日～30日. 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

比留間孝広. 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. 第42回日本救急医学会. 2014年10月29日. 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

比留間孝広. Interferon beta improved

survival of septic pneumonia induced by intratracheal instillation of Pseudomonas aeruginosa by increasing neutrophil recruitment into the lung. The American Thoracic Society 2016 International Conference. 2014年5月19日. サンディエゴ(アメリカ)

比留間孝広. 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. 第61回日本麻酔科学会. 2014年5月16日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 件)

該当ありません

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

該当ありません。

取得状況(計 件)

該当ありません。

〔その他〕

ホームページ等

該当ありません。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

土井 研人 (DOI, Kent)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 80505892

小宮山 雄介 (KOMIYAMA, Yusuke)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号 90586471

(3) 連携研究者

該当ありません。

(4) 研究協力者

比留間 孝広 (HIRUMA, Takahiro)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 40572277