

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670795

研究課題名(和文)敗血症性免疫不全対策としての血液浄化療法の意義に関する研究

研究課題名(英文)Blood purification for sepsis-induced immunoparalysis

研究代表者

小野 聡 (ONO, SATOSHI)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：30531355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症では、CD4+T細胞におけるTregの割合の増加や、末梢血単核球でのIFN- $\gamma$ 産生能の低下を認め免疫不全状態にある。敗血症性ショックに対する治療法としてのポリミキシンB(PLB)固定化カラムによる血液浄化療法は、循環動態の改善のみならず、末梢血Treg細胞、血中IL-10濃度を減少させ、末梢血単核球でのIFN- $\gamma$ 産生能を改善した。その機序としてPLBがNK細胞と直接接することにより、IFN- $\gamma$ 産生能の改善していることが分かった。以上から、PLB固定化カラムによる血液浄化療法は、敗血症性免疫不全からの回復に大きく寄与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Sepsis is a common and frequently fatal clinical condition in critically ill patients. This profound proinflammatory state is rapidly counterbalanced by an anti-inflammatory response, which may adversely affect immune functions. This state of secondary immunoparalysis is first characterized by monocytic deactivation: decreasing antigen presenting capacity, phagocytic function, and proinflammatory cytokine release. Polymyxin B has long been known to neutralize the various biological activities of endotoxin. We found a major increase in the percentage of Tregs in peripheral blood circulating CD4+T cells from patients with septic shock. We revealed that Polymyxin B might decrease peripheral blood circulating Treg cells and directly increase the IFN- $\gamma$  production from peripheral blood mononuclear cells. Removal of Tregs by hemoperfusion with Polymyxin B-immobilized fibers might represent a novel strategy for inducing recovery from the immunosuppression associated with sepsis.

研究分野：集中治療医学

キーワード：敗血症 免疫麻痺 エンドトキシン 血液浄化療法

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症の病態形成には細菌の毒素、特にグラム陰性菌の菌体成分であるエンドトキシン(LPS)の役割が注目され、LPSを血液浄化療法によって中和するためのポリミキシンB(PLB)固定化カラムが本邦において開発された。血液浄化療法は全身管理の一手段として本邦において高く評価されている治療方法である。一方、敗血症や敗血症性ショックにおいては生体の感染防御能が低下し免疫不全状態(immunoparalysis)に陥っている。つまり自然免疫、獲得免疫能いずれもが低下していることが指摘されているが詳細な検討はない。この免疫不全の病態解明とその対策こそが敗血症の予後を改善する上で極めて重要なテーマである。しかしながら、敗血症時の免疫不全対策は現段階では皆無である。

### 2. 研究の目的

我々は以前から重症敗血症性例を対象に血液浄化療法(エンドトキシン吸着療法: PLB固定化カラム)を施行し、その有効性発現機序に関して各種分子生物学的手法を用いて免疫学的見地から検討してきた。その結果、エンドトキシン吸着療法はエンドトキシンに対する直接的な作用だけでなく、末梢血中に存在し機能不全状態にある免疫担当細胞の吸着や機能回復に関与していることが明らかになってきた。そこで本研究では、敗血症性免疫不全病態の解析と血液浄化療法、特に PLB 固定化カラムによる免疫担当細胞への直接的な作用について明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、重症敗血症時の免疫不全の病態解析とその対策としての血液浄化療法の意義に関して新しい視点から詳細に検討する。重症敗血症の病態を末梢血免疫担当細胞の機能解析と PLB 固定化カラムによる血液

浄化療法が免疫不全対策になり得るかを臨床的に明らかにすること、またそのメカニズムについて明らかにするため、PLBの免疫担当細胞に対する直接作用についてサイトカイン産生能やアポトーシス細胞の変化について検討すること、またマウスの敗血症モデルを用いて、PLB固定化カラムに吸着されている細胞集団の形態学的、機能的解析を行う。

重症敗血症時の末梢血免疫担当細胞の機能解析と PLB 固定化カラムによる免疫担当細胞の機能変化に関する検討

重症敗血症患者を対象に末梢血の白血球分画(単球: MHC class-II 発現、TLR2-4、リンパ球: CD4<sup>+</sup>T cells, CD8<sup>+</sup>T cells, Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T cells, PD-1)、末梢血単核球でのサイトカイン産生能(TNF-、IFN- など)、血中 TNF-、IFN-、TGF-、IL-10、GM-CSF 濃度を解析する。特に免疫抑制因子として Treg 細胞、CD4<sup>+</sup>T 細胞での PD-1 発現に注目する。さらにこれらの免疫学的マーカーがエンドトキシン吸着療法を施行した重症敗血症患者を対象に施行前、終了直後、終了 24 時間後に採血し上記免疫学的マーカーの変化について検討する。

抗菌薬 PLB の免疫担当細胞への直接作用に関する検討

PLB はグラム陰性菌に対する溶菌作用やエンドトキシンの中和作用が報告されているが、我々は PLB の免疫担当細胞に対する直接作用に注目し以下の検討を行った。

敗血症患者の末梢血を採取し、小動物用の PLB 固定化ミニカラムの中にある膜を細切し患者血液に加え 2 時間振盪する PMX 膜群、患者血液を無処置で 2 時間振盪する敗血症群、PLB(50ug/mL)を添加し 2 時間振盪する PLB 群、健常人血液を 2 時間振盪する健常人群、の 4 群を作成し、2 時間後に全血から単核球(PBMC:  $2 \times 10^6$  個)を分離し、1) 非刺激、2) anti-CD3 刺激、3) IL-2+IL-12 刺激、4)

IL-2+IL-12+IL-15 刺激、の 4 群を作成しサイトカイン(TNF-、IFN-、IL-10, GM-CSF) 産生能について検討した。

ラット敗血症モデルを用いた PLB 固定化カラムによる血液浄化療法の有効性発現機序に関する検討

Wistar 系雄性ラット(約 300g)に *E. coli*( $5 \times 10^8$ CFU)を静脈内投与する敗血症モデルを作成した。尚本モデルでの末梢血単核球での IFN- 産生能低下など免疫不全状態にあることは確認できている。

本ラット敗血症モデルを用いて、*E. coli* 投与 4 時間後に小動物用 PLB 固定化ミニカラムを用いて 2 時間体外循環を行い循環動態、肺の酸素化能の変化、末梢血中単核球でのサイトカイン産生能、フローサイトメトリーによるレセプター発現の変化、アポトーシス細胞の変化について解析する。さらに PLB 固定化カラムに吸着されている細胞集団を光顕、電顕にて確認する。さらにこれらの細胞の特徴を明らかにするため、フローサイトメトリー法や免疫染色等で解析する。

#### 4. 研究成果

敗血症では健常人と比較して、CD4+T 細胞数は有意に減少していた。一方、CD4+T 細胞における Treg の割合は有意に高かった。また敗血症患者の単核球では、IL-2 + IL-12、Anti-CD3 抗体、あるいは LPS で刺激をすると、健常人の IFN- 産生能に比べ有意に低下していた。次に PLB 固定化カラムによる血液浄化療法前後での免疫不全の変化について検討した。その結果、施行前後で白血球数やリンパ球数に有意差は認めなかったが、Treg 数および CD4+T 細胞における Treg の割合は施行前に比べ、施行直後に有意な減少を認めた。さらに、CD4+T 細胞における Treg の割合は、血液浄化施行 24 時間後でも有意に低下していた。またサイトカイン産生能については、IL-2 + IL-12 刺激による IFN- 産生能は施

行直後から有意に改善したのに対し、Anti-CD3 抗体刺激による IFN- 産生能は、施行直後には改善しなかったが、施行 24 時間後に有意な改善が見られた。なお、TNF- 産生能には各刺激による有意差を認めなかった。

敗血症患者の単核球を IL-2 + IL-12 あるいは Anti-CD3 抗体で 24 時間刺激した後の上清中 IFN- 濃度は、健常人の単核球に比べ有意に低かった。同様の刺激を PMX 膜群の単核球に加えた後の上清中 IFN- 濃度は、 $649.5 \pm 357.6$  pg/ml、 $1201.2 \pm 507.7$  pg/ml で、PLB 群では、 $784.3 \pm 424.7$  pg/ml、 $1446.8 \pm 604.7$  pg/ml と同程度であった。すなわち PMX 膜群および PLB 群では敗血症群に比べ、IL-2 + IL-12 刺激による IFN- 産生能が有意にかつ両群ほぼ同程度に改善された。一方、Anti-CD3 抗体刺激では、敗血症群、PMX 膜群、PLB 群間で上清 IFN- 濃度に有意差を認めなかった。

PLB 固定化ミニカラムを HE 染色で観察すると、膜繊維に多数の血球が付着していた。また、走査電子顕微鏡による観察でも、多数の血球が付着しているのが観察された。触手を伸ばしたリンパ球と考えられる血球や、活性化した血小板も観察された。

また敗血症モデルの末梢血単核球上清中 IFN- 濃度は、正常マウスに比べ有意に低下していた。しかし PLB 固定化ミニカラムを用いて 2 時間体外循環後には、IL-2 + IL-12 刺激による末梢血単核球の IFN- 産生能は改善する傾向を認めた。また肝臓での IFN- 濃度を比較すると、PLB 固定化ミニカラム施行群で非施行群に比べ有意に高値を示した。さらに血液、肝臓、肺での *E. coli* 細菌数について検討した。その結果、敗血症群に比べ PLB 固定化ミニカラム施行群では、血中、肝組織において細菌のコロニー数は有意に減少していた。また肝単核球の Annexin V 発現量は敗血症群で有意に多かったが、PLB 固定化ミ

ニカラム施行群では、減少する傾向を認めた。

## 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 11 件 )

Takahata R, Ono S, Tsujimoto H, Hiraki S, Aosasa S, Yamamoto J, Hase K. High serum levels of high mobility group box-1 correlate with postoperative pulmonary complications following thoracic esophagectomy. *Dis Esophagus* 29: 70-78, 2016 . 査読有

Kubo T, Ono S, Miyazaki H, Saitoh D, Yamamoto J, Hase K. Perioperative programmed death-1 expression on CD4+ T cells predicts the incidence of postoperative infectious complications. *Shock* 44:323-329. 2015. 査読有  
Miyazaki H, Kinoshita M, Ono S, Seki S, Saitoh D. Burn-evoked reactive oxygen species immediately after injury are crucial to restore the neutrophil function against post-burn infection in mice. *Shock* 44, 252-257, 2015. 査読有

Matsumoto Y, Tsujimoto H, Ono S, Shinomiya N, Miyazaki H, Hiraki S, Takahata R, Yoshida K, Saitoh D, Yamori T, Yamamoto J, Hase K. Abdominal Infection Suppresses the Number and Activity of Intrahepatic Natural Killer Cells and Promotes Tumor Growth in a Murine Liver Metastasis Model. *Ann Surg Oncol* 23:257-265, 2015. 査読有

Kubo T, Ono S, Ueno H, Shinto E, Yamamoto J, Hase K. Impact of the perioperative neutrophil-to-lymphocyte ratio on the long-term survival following an elective resection of colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis* 29 : 1091-1099, 2014. 査読有

小野 聡。セブシス治療薬 セブシス治療薬の日本での活用。敗血症 ( セブシス ) 救命治療の最前線 竹末芳生編 医薬ジャーナル社、p197-207、2014。査読無

Ono S, Kimura A, Hiraki S, Takahata R, Tsujimoto H, Kinoshita M, Miyazaki H, Yamamoto J, Hase K, Saitoh D. Removal of increased circulating CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in patients with septic shock using hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fibers. *Surgery* 153: 262-271, 2013, 査読有

Kubo T, Ono S, Ueno H, Shinto E, Yamamoto J, Hase K. Elevated preoperative C-reactive protein levels are a risk factor for the development of postoperative infectious complications following elective colorectal surgery. *Langenbeck's Arch Surg* 398:965-971, 2013, 査読有

Tsujimoto H, Takahata R, Nomura S, Kumano I, Matsumoto Y, Yoshida K, Hiraki S, Aosasa S, Ono S, Yamamoto J, Hase K. Predictive value of pleural and serum interleukin-6 levels for pneumonia and hypo-oxygenations after esophagectomy. *J Surg Res* 182: e61-67, 2013, 査読有

Kinoshita M, Miyazaki H, Ono S, Seki S. Immunoenhancing therapy with interleukin-18 against bacterial infection in immunocompromised hosts after severe surgical stress. *J Leukoc Biol* 93: 689-698, 2013, 査読有

Takigawa T, Miyazaki H, Kinoshita M, Kawarabayashi N, Nishiyama K, Hatsuse K, Ono S, Saitoh D, Seki S, Yamamoto J. Glucocorticoid receptor-dependent immunomodulatory effect of ursodeoxycholic acid on liver lymphocytes in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305: G427-438, 2013. 査読有

[ 学会発表 ] ( 計 8 件 )

小野 聡、辻本広紀、平木修一、他。( シンポジウム ) 外科侵襲時の炎症・免疫担当細

胞の役割と機能評価。日本外科代謝栄養学会  
第 52 回学術集会(品川) 2015 年 7 月 3 日。

Ono S, Tsujimoto H, Kinoshita M, et al.  
Perioperative programmed death-1 expression on  
CD4+ T cell predicts the incidence of  
postoperative infectious complications following  
gastrointestinal surgery. 35th International  
Symposium on Intensive Care and Emergency  
Medicine. Brussels, Belgium. 2015 年 3 月 17 日。

小野 聡、辻本広紀、平木修一、他。(パ  
ネルディスカッション)重症敗血症時の免疫  
不全対策としてのエンドトキシン吸着療法  
の意義。第 51 回日本腹部救急医学会(京都)  
2015 年 3 月 5 日。

小野 聡。(教育セミナー)免疫機能から  
みた術後感染性合併症のリスク評価と予測  
因子に関する検討。第 27 回日本外科感染症  
学会総会学術集会(東京)2014 年 12 月 4 日。

小野 聡、辻本広紀、平木修一、木下 学、  
青笹季文、山本順司、齋藤大蔵。(パネルデ  
ィスカッション)食道癌術前治療が周術期生  
体反応に及ぼす影響とその対策に関する検  
討-HMGB-1 に注目して-。第 114 回日本外科学  
会定期学術集会(京都)2014 年 4 月 4 日。

小野 聡、平木修一、辻本広紀、齋藤大蔵。  
(シンポジウム)外科侵襲後の生体反応の特  
性-免疫担当細胞の役割に注目して-。第 41 回  
日本集中治療医学会学術集会(京都)2014  
年 2 月 27 日。

小野 聡、平木修一、辻本広紀、青笹季文、  
他。消化器外科周術期の病態解析における  
Endotoxin Activity Assay 測定の意義に関す  
る検討。第 68 回日本消化器外科学会総会(宮  
崎)2013 年 7 月 19 日。

小野 聡、辻本広紀、平木修一、青笹季文、  
木下 学、山本順司、齋藤大蔵、他。(シンポ  
ジウム)外科侵襲後の免疫応答の病態解析と  
その対策に関する研究。第 113 回日本外科学  
会定期学術集会(福岡)2013 年 4 月 11 日。

〔図書〕(計 1 件)

小野 聡。セブシス治療薬 セブシス治療  
薬の日本での活用。敗血症(セブシス)救命  
治療の最前線 竹末芳生編 医薬ジャーナ  
ル社、p197-207. 2014 年 1 月。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小野 聡(ONO Satoshi)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号:30531355

### (2)研究分担者

辻本 広紀(TSUJIMOTO Hironori)  
防衛医科大学校・医療安全・感染対策部・  
教授  
研究者番号:80554998

木下 学(KINOSHITA Manabu)  
防衛医科大学校・免疫・微生物学・准教授  
研究者番号:70531391

青笹 季文(AOSASA Suefumi)  
防衛医科大学校・外科学・講師  
研究者番号:40649034

平木 修一(HIRAKI Shuichi)  
防衛医科大学校・外科学・助教  
研究者番号:40638839

宮崎 裕美(MIYAZAKI Hiromi)  
防衛医科大学校・防衛医学研究センター外  
傷研究部門・助教  
研究者番号:30531636

齋藤 大蔵(SAITOH Daizoh)  
防衛医科大学校・防衛医学研究センター外  
傷研究部門・教授  
研究者番号:90531632

山本 順司(YAMAMOTO Junji)  
防衛医科大学校・外科学・教授  
研究者番号：40342654

池田 寿昭(IKEDA Toshiaki)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90246182