

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17053

研究課題名(和文)重症呼吸不全患者の気道および血液検体を用いた多角的病態解明および新規治療法開発

研究課題名(英文)Elucidation of various pathological conditions and development of new treatment methods using airway and blood samples of patients with acute respiratory distress syndrome.

研究代表者

田邊 優子(TANABE, YUKO)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：60793445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ARDS(重症呼吸不全)患者の気道上皮被覆液検体から細菌の全ゲノム核酸を抽出し、次世代シーケンシング法を用いてARDSの常在菌叢パターンを解析した。結果、Staphylococcus、Streptococcus、Enterobacteriaceaeの菌量と予後との相関が示された(Respir Res. 2019;20:246)。また、病原体が証明されているARDS患者の方が、病原体が証明されていないARDS患者よりも死亡率が有意に低かった。さらにARDS患者において、病原体の証明は院内生存率上昇の独立した因子であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性呼吸窮迫症候群(Acute respiratory distress syndrome: ARDS)は肺胞上皮傷害、肺血管透過性亢進を主体とする致死呼吸不全である。その原因はいまだ完全には明らかにされていないため確立された薬物的治療法も存在せず、死亡率は未だ40%と高いままである。このため、ARDSの病態解明・新規治療法開発はわが国が率先して行うべき重要性の高い課題であった。本研究はARDS患者に対してBALを含む診断ワークアップの予後への影響を調査した初の研究であり、社会貢献的意義があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Bacterial whole-genome nucleic acids were extracted from airway epithelial coat specimens of ARDS patients and the indigenous flora pattern of ARDS was analyzed using the next-generation sequencing method. The results showed a correlation between the amount of Staphylococcus, Streptococcus, and Enterobacteriaceae and the prognosis (Respir Res. 2019; 20: 246). Mortality was significantly lower in ARDS patients with proven pathogens than in ARDS patients with unproven. In addition, pathogen proof was found to be an independent factor in increased in-hospital survival in ARDS patients.

研究分野：救急集中治療

キーワード：ARDS pneumonia

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性呼吸窮迫症候群 (Acute respiratory distress syndrome : ARDS) は肺胞上皮傷害、肺血管透過性亢進を主体とする致死呼吸不全である。集中治療室に入院した患者の約 10% が ARDS を患っているという報告も存在するが、その原因はいまだ完全には明らかにされていない。したがって確立された薬物的治療法も存在せず、死亡率は未だ 40% と高いままである。このため、ARDS の病態解明・新規治療法開発はわが国が率先して行うべき重要性の高い課題であった。

次世代シーケンス法により、従来の培養方法では不可能であった呼吸器微生物叢の分析が可能となった。これまでに間質性肺疾患 (IP) の急性増悪、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、嚢胞性線維症 (CF) などのさまざまな呼吸器疾患において呼吸器微生物叢との関連についての報告がなされている。しかし、ARDS 患者の罹患率と死亡率に関連する特定の呼吸器微生物叢は不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ARDS の病態修飾をしている未知・微量病原体を同定すること、この病原体を治療標的とした ARDS の新規治療法開発を試みることに、である。

我々の研究グループは京都府立医科大学の研究グループと共同で、検体に含まれる細菌・真菌・ウイルスの全ゲノム核酸を抽出し、全遺伝子情報を短時間で解析するメタゲノム解析を応用した次世代シーケンス法を確立してきた。この手法により、塩基配列を網羅的に解析し、検体に含まれる全ての微生物を同定することが可能となる。この次世代シーケンス法を応用した本研究により、ARDS の発症・重症化において、これまで同定されていなかった新たな病原微生物あるいは微量の病原微生物を発見する。

3. 研究の方法

当院の集中治療室において、気管挿管・人工呼吸器管理を行った重症呼吸不全患者に対し、書面による同意を取得した上で気管支肺胞洗浄 (Bronchoalveolar lavage : BAL) 液および血液を採取し、研究検体として用いた。重症呼吸不全の定義は、2011 年に発表された ARDS についての Berlin 定義に沿ったものである。つまり、急性の経過を辿りかつ心不全や過剰輸液では説明のつかない呼吸状態の悪化であり、かつ 10 cm H₂O 以上の呼気終末陽圧換気を行っても動脈血酸素分圧と吸入酸素濃度の比が 100 以下の場合とした。

データ収集について：

年齢、性別、基礎となる臨床状態、Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)、および集中治療室入室時の Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II スコアを含む統計データを収集した。また、ARDS 患者が受けた治療および院内死亡率についても記録した。

サンプル採取について：

BAL 液は、気管挿管後 24 時間以内に 100~150 mL の滅菌等張食塩水を下気道に注入し、回収したものである。採取された BAL 液サンプルは直ちに -80°C で保管した。また BAL 液を採取してから 24 時間以内に採血を行った。血液サンプルは遠心分離し、得られた血清を直ちに -80°C で保存した。

病原微生物の同定について：

BAL 液を NucleoSpin Microbial DNA (Macherey-Nagel, Düren, Germany) を使用して 6000 rpm で 5 分間 4°C で遠心分離し、細菌 DNA をした。抽出した DNA を PCR にかけて増幅し、次世代シーケンスを用いて塩基配列をハイスループットに決定した。次世代シーケンスの方法は、Akiyama K らが報告した方法 (Am J Reprod Immunol. 2019;82:e13147.) を基に Ion One Touch, Ion One Touch ES, Ion Torrent Personal Genome Machine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて実施した。得られた塩基配列に対し Quantitative Insights Into Microbial Ecology : QIIME を用いて病原微生物を同定した。また、 α 多様性、 β 多様性についても解析した。

サイトカイン測定について：

Interleukin (IL) -6, IL-8, receptor for advanced glycation end products (RAGE) および angiopoietin-2 (Ang2) を、血清および BAL 液検体を用い enzyme-linked immunosorbent assay (R & D Systems, Inc., MN, USA) にて測定した。

またすべての統計分析は、JMP statistical software (version 14.0.0; SAS, Cary, NC, USA)を使用して実行した。

尚、本研究は広島大学(試験登録:E-447, 2016年8月5日登録)および京都府立医科大学(試験登録:ERB-C-973, 2017年10月19日登録)の施設内審査委員会にて承認されている。

4. 研究成果

ARDS患者では、下気道における細菌の量が増加する一方で多様性については減少していた。また炎症サイトカインの分析では、ARDSの死亡患者群においてIL-6の値が有意に高いことが示された。さらに死亡群では、細菌数とIL-6量の間に正の相関がみられた。

さらに Betaproteobacteria の減少, Staphylococcus, Streptococcus, Enterobacteriaceae の増加と血清IL-6値は相関し、院内死亡率と関連していることが示された。

また、当院のARDS患者70名を対象としてBALを用いた原因微生物検出の有無と予後との関連について検証した結果、死亡率は病原体が証明されているARDS患者の方が、病原体が証明されていないARDS患者よりも有意に低かった(集中治療室死亡率: 10% vs 50%, p値: 0.0006; 院内死亡率: 18% vs 55%, p値:0.0038)。さらにARDS患者において、病原体の証明は院内生存率上昇の独立した因子であることが判明した (adjusted hazard ratio,0.238:95% 信頼区間,0.096- 0.587;p = 0.0021)。

本研究はARDS患者に対してBAL液を含む診断ワークアップの予後への影響を調査した初の研究であり、本研究で得られた、IL-6と正の相関を示す病原体を治療標的とすることでARDSの予後改善につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kyo M, Hosokawa K, Ohshimo S, Kida Y, Tanabe Y, Ota K and Shime N	4. 巻 47
2. 論文標題 High serum potassium level is associated with successful electrical cardioversion for newonset atrial fibrillation in intensive care unit: a retrospective observational study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anaesth Intensive Care.	6. 最初と最後の頁 52-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0310057X18811815.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanabe Y, Ohshimo S, Shime N	4. 巻 44
2. 論文標題 Potential factors affecting lung inhomogeneity in acute respiratory distress syndrome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Intensive Care Med	6. 最初と最後の頁 125-126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00134-017-4897-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------