

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791777

研究課題名(和文)

外傷・熱傷患者でのプロテインアレイを用いた白血球表面抗原の解析と感染症の予知

研究課題名(英文)

Leukocyte immunophenotyping by a novel method of array system to predict infectious complications in patients with burns or trauma

研究代表者

関根 和彦 (SEKINE KAZUHIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90296715

研究成果の概要(和文):

プロテインアレイ法はわれわれが開発した白血球表面抗原の解析法(immunophenotyping: IP法)であり、重度外傷・熱傷患者における免疫能の評価に臨床応用することを本研究の目的とした。健康人5人および熱傷・外傷患者10人に対して、全18種類(CD4/8/11c/16b/25/36/66b/68/123/127/161, TLR-2/4, CCR-2/4/5, CXCR-3, CRTh2)のIP解析を計22回施行した。本法は外傷・熱傷患者においても迅速・簡便に解析可能であった。本法によるIP解析は、外傷・熱傷患者における感染症や多臓器不全の予知に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): **Background and objectives:** Critically injured patients are susceptible to multi-organ failure and acute lung injury (ALI) in the presence of mounting infection. Yet no useful and convenient way to clinically predict the progression of organ failure is available, and the role played by the immune response in the gut has yet to be fully characterized. Thus, we conducted clinical research to apply a novel immunophenotyping (IP) method we developed in critically injured or burned patients. **Subjects and methods:** The novel IP method allows leukocytes fixed to microscope slides in an antigen-specific manner to be observed when a leukocyte suspension is incubated on slides with arrays of leukocyte surface antigens. The method was used for immunophenotyping (CD4, CCR5, CXCR3, CCR4, CRTh2, CD8, CD36 and CD16b) patients with multi-organ failure caused by critical trauma or burn who were treated in our department. **Results:** IP analysis was conducted in five patients (2 burn patients and 3 trauma patients). In the burn patients expression of the CD4 and CD8 phenotypes was much lower than in healthy adults. Th2 subset (CCR4) expression was particularly suppressed. In the trauma patients, Th1 subset (CCR5, CXCR3) expression was unchanged but Th2 subset (CCR) expression was lower. **Discussion:** Our IP method enables the comprehensive analysis of leukocyte surface antigens at the bedside of critical burn and trauma patients. We next hope to establish an IP method for clinically predicting organ failure following critical injury and to develop a therapeutic method for preventing organ failure by attenuating exaggerated immune response.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：外傷、熱傷、免疫、アレイ解析  
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学  
キーワード：外科、免疫学、臨床、外傷・熱傷、易感染性

### 1. 研究開始当初の背景

重度の熱傷・外傷患者は、感染症を契機として、急性肺損傷 (acute lung injury: ALI) から多臓器不全を合併しやすい。このような重度侵襲下に発症する臓器不全のメカニズムを解明するために、当教室では熱傷の一次侵襲後に、エンドトキシンによる感染性二次刺激を負荷する 2 段階刺激 (two-hit) 動物モデルを開発し、その病態解析を行ってきた。この two-hit モデルの解析によれば、熱傷侵襲後のマウスに lipopolysaccharide (LPS) を投与すると、肺内の過剰な炎症性サイトカイン産生による致死性 ALI と多臓器不全が惹起される。この外科的侵襲後の ALI 発症には、LPS に対する熱傷マウスの過剰反応性が関与しており、LPS による炎症性サイトカインの産生亢進がその原因と考えられる。一方で、熱傷や外傷の生体侵襲が、サイトカイン産生を司る免疫細胞、特に T リンパ球への変化をもたらすことが多数報告されており、IL-18 をはじめとした Th1 型サイトカインの産生低下や、それに伴う Th2 型反応の相対的亢進が、熱傷・外傷後の易感染性に関連すると考えられている。つまり、重度熱傷・外傷患者においては、白血球フェノタイプの変化を観察することによって易感染性の出現が予測できる可能性があると考えられる。

現在、重度熱傷・外傷患者における易感染性の指標として、リンパ球および単球のフェノタイプシフトが候補であるが、フローサイトメトリー法による解析では、一度に大量の検体と試薬が必要である。われわれが開発した新たな IP 解析の方法であるプロテインアレイ法は、フローサイトメトリーのような機器を必要とせず、迅速に白血球表面マーカーを網羅的に解析できる利点がある (Sekine K, et al: *J Immunol Methods* 2006 313:96-109)。

### 2. 研究の目的

重度外傷・熱傷患者の救命には感染症の早期診断やが必須であるが、免疫能の評価に有用な検査方法は現在まで確立されていない。我々が開発したプロテインアレイ法は、白血球表面抗原の網羅的解析 (immunophenotyping: IP) の一つであるが、外傷・熱傷患者の免疫能の評価に有用であり、病態悪化の予知に貢献すると考えられる。本研究では、この解析キットによる熱傷・外傷患者の IP と臨床経過との関連を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

我々は迅速な白血球表面抗原の解析を行うために、患者ベッドサイドでの解析を可能にする新たな基礎的方法を開発した (Sekine K, et al: *J Immunol Methods* 2006 313:96-109)。本法の原理は、解析予定となる白血球表面抗原をアレイ状に並べた特殊なスライドガラス上に、患者から調整した白血球浮遊液をインキュベーションし、その後スライドガラス表面を洗浄すると抗原特異的に固着した白血球がスライドガラス上に観察されることによる。当科で診療を行った重度外傷・熱傷による多臓器不全患者のうち、本法の解析に関する同意が得られた患者および健常成人から末梢血を採取した。対象患者および健常成人から採取された血液検体は、塩化アンモニウムによる赤血球除去の後、 $3.5 \times 10^6$  細胞/mL の白血球浮遊液に調整され、アレイ上で 15 分間 incubation される。その後アレイをリン酸緩衝液で洗浄し、抗体上に特異的に接着した白血球の有無を光学顕微鏡によって観察し、白血球サブセット毎にアレイ上の白血球数 (cells/mm<sup>2</sup>) を算定した。IP 解析に用いた白血球表面抗原は、全 18 種類 (CD4, CD8, CD11c, CD16b, CD25, CD36, CD66b, CD68, CD123, CD127, CD161, TLR-2, TLR-4, CCR-2, CCR-4, CCR-5, CXCR-3, CRTh-2) を用いた。T リンパ球フェノタイプのマーカーとして CD4, CD8 を用い、さらに、ヘルパー T (Th) リンパ球のサブセット解析のため、Th1 マーカーとして CCR5, CXCR3 を、また Th2 マーカーとして CCR4, CRTh2 を用いた。近年注目されている制御性 T 細胞 (Treg) のマーカーとして、CD25, CD127 を用いた。また Natural Killer (NK) 細胞のマーカーとして、CD161 を用いた。単球には CD36 を用い、マクロファージ解析に CD68, CCR2 を用いた。さらに樹状細胞の解析に CD123, CD11c を用いた。樹状細胞や NK 細胞に代表される自然免疫系担当細胞の解析に、TLR-2, TLR4 を用いた。好中球の解析に CD16b, CD66b を用いた。

### 4. 研究成果

同意が得られた熱傷患者 2 人と外傷患者 3 人、および健常人 5 人に対して、前述の全 18 種類の IP 解析を計 22 回施行した。本解析に用いたアレイ (この場合は全 12 種類) の一例を図 1 に示した。

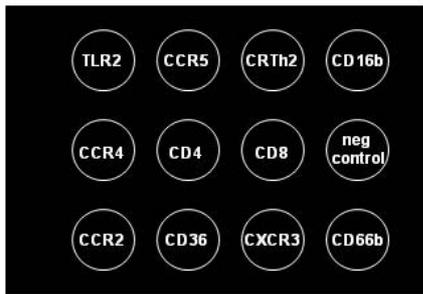


図 1. プロテインアレイ解析に用いた白血球表面抗原の配置

抗体上に固着した白血球の顕微鏡観察により、熱傷患者では健常成人と比較して明らかな CD4 および CD8 リンパ球フェノタイプの減少を呈したが、外傷患者ではこの傾向を認めなかった (図 2)。

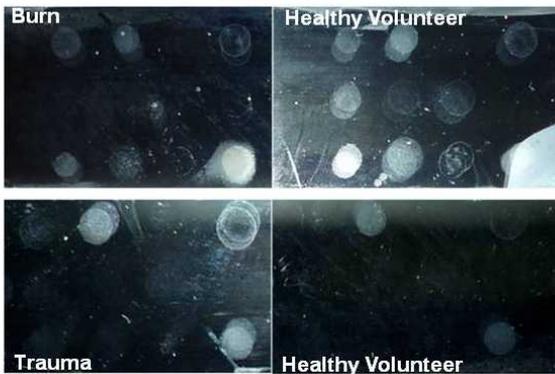


図 2. 熱傷・外傷患者におけるプロテインアレイによる immunophenotyping

熱傷患者における CD4 および CD8 リンパ球の接着は、健常成人と比較して著明に抑制され、Th2 フェノタイプである CCR4 陽性白血球の接着も同様に抑制された。外傷患者におけるサブセット解析では (図 3)、健常成人での発現を 100% として比較すると、Th1 型マーカーである CCR5 や CXCR3 フェノタイプに明らかな変化がなかった。一方で Th2 型マーカーに関しては、CRTh2 フェノタイプには著明な変化を認めなかったが、CCR4 フェノタイプは減少傾向を示した。

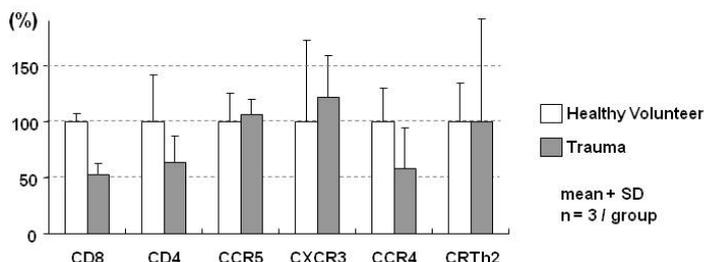


図 3. 白血球フェノタイプにおける外傷患者と健常人の比較

本研究で施行した新たな白血球表面抗原の解析法は、重度の熱傷および外傷患者に対する IP 解析法の一つとして、十分に臨床応用が可能であることが示された。本法による IP 解析の利点として、フローサイトメトリー法による解析と比較して、多種の白血球サブセットを迅速かつ簡便に解析することができることが最も大きな特徴である。さらに注目すべき点として、白血球表面抗原をマイクロアレイ状に配置することによって、ハイスループットな IP 解析を可能にする拡張性が挙げられる。このような網羅的 IP 解析を実現するためには、本法をマイクロアレイ化する基礎的技術を推進するとともに、更なる症例の蓄積が肝要である。本法によってベッドサイドでの多種多様な白血球サブセットの迅速な解析が可能になれば、重度侵襲下の患者における感染症や臓器不全発症の予測に資すると考えられる。

## 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 2 件)

1. Sekine K, Fujishima S, Yo K, Kurihara T, Abe S, Sato Y, Hori S, and Aikawa N: 15<sup>th</sup> International Society for Burn Injuries, Plasma interleukin-18 levels in patients with sublethal burns. 2010.6.21-25, Istanbul, Turkey.
2. 関根和彦、葉季久雄、安倍晋也、佐々木淳一、藤島清太郎、堀進悟、相川直樹: 第 25 回 日本 Shock 学会総会、重度外傷・熱傷患者に対する新たな immunophenotyping 法の開発、2010 年 5 月 29 日、東京。

〔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〕

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 和彦 (SEKINE KAZUHIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 90296715

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし