

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592748

研究課題名(和文) 重度外傷・熱傷患者における免疫学的モニタリングによる臓器不全発症の予知

研究課題名(英文) Anticipation of organ dysfunction by immunological monitoring in severe trauma and burns

研究代表者

関根 和彦 (Sekine, Kazuhiko)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：90296715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：重度熱傷・外傷患者において白血球フェノタイプ(LP)解析により感染合併症や臓器不全が予知できるかを検討した。重度外傷熱傷患者16人と健常人5人を対象としてLP解析した。解析LP:CD4/8/11c/16b/25/36/66b/123/127/161, TLR-2/4, CCR-2/4/5, CXCR-3, CRTh2。熱傷患者では、外傷患者よりもCCR5, CXCR3, CD68, CD123が低下した。熱傷患者では、感染発症後にCCR5が増加し、CD25が低下した。感染・臓器障害発症後にはCCR5, CXCR3, CCR2, CD11cが増加した。熱傷後のTh1再上昇は感染合併症や臓器不全の発症が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sepsis-induced organ dysfunction (SIOD) has been considered to be involved in leukocyte phenotypic changes in severely injured and burned patients. Our question is whether SIOD can be predicted by leukocyte immunophenotyping or not in these trauma or burned patients, using a new array method we developed. Among 16 patients with trauma/burns and 5 healthy volunteers, we analyzed the leukocyte phenotypes including CD4/8/11c/16b/25/36/66b/123/127/161, Toll like receptor (TLR)-2/4, CC-Chemokine receptor (CCR)-2/4/5, CXC-Chemokine receptor (CXCR)-3, and CRTh2. In burned patients, phenotypes were lower not only in CCR5 and CXCR3 than those in both trauma and healthy subjects, and also in CD68 and CD123 than those in trauma, whereas phenotypes in Th1 (CCR5, CXCR3) and monocytes /dendritic cells (CCR2, CD11c) were increased. Based on these results, re-increase of Th1 phenotypes may predict infectious complications or organ dysfunction after burn insults.

研究分野：救急医学

キーワード：免疫 侵襲 臓器不全 白血球 フェノタイプ解析

## 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。

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。これらの白血球フェノタイプを迅速かつ網羅的に評価するために、われわれは新たに簡易解析法を開発した (Sekine K, et al. *J Immunol Methods* 2006)。

我々が開発した白血球表面抗原の網羅的解析 (Immunophenotyping: IP) は、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。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、重度外傷・熱傷後の白血球フェノタイプの変化から感染性合併症による臓器不全が予知できるかを検討するこ

とである。

## 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。(1) 重度外傷・熱傷患者 16 人および健常人 5 人を対象として、以下の白血球フェノタイプを解析し (計 36 解析)、熱傷/外傷/健常人での比較検討を行った。

(2) 重度外傷・熱傷患者 6 人を対象として、以下の白血球フェノタイプを解析し (計 14 解析)、感染および臓器障害の発症との関連性を評価した。

### 【解析された白血球フェノタイプ】

CD4/8/11c/16b/25/36/66b/123/127/161, Toll like receptor (TLR)-2/4, CC-Chemokine receptor (CCR)-2/4/5, CXC-Chemokine receptor (CXCR)-3, CRTh2

## 4. 研究成果

結果 1: 熱傷患者においては、健常人や外傷

患者よりも CCR5 と CXCR3 が有意に低下し、外傷患者よりも CD68 や CD123 が有意に低下した(図1、図2)。熱傷患者では、感染発症後に CCR5 が増加し(p=0.04)、CD25 が低下した(p=0.02) (図1、図2)。

結果 2：感染、臓器障害発症後には抑制性 T 細胞(CD127, CD25)が減少し、ヘルパーT1 細胞(CCR-5, CXCR-3)、単球・マクロファージ・樹状細胞(CCR-2, CD11c)の分画が増加する傾向を認めた。ヘルパーT2 細胞(CCR-4, CRTh2)に関しては有意な変化を認めなかった(図3)。

解析結果をまとめると、熱傷患者では、ヘルパーT1(Th1)細胞分画(CCR5, CXCR3)や一部の単球系分画(CD68:M, CD123: 樹状細胞)が減少するが、感染により Th1 細胞分画(CCR5)の増加と抑制性 T 細胞(CD25)の減少が見られた。熱傷後の Th1 細胞分画の再上昇は感染合併症および臓器不全の発症を示唆し、本法による免疫学的モニタリングは感染や臓器不全の予測に有用となる可能性がある。

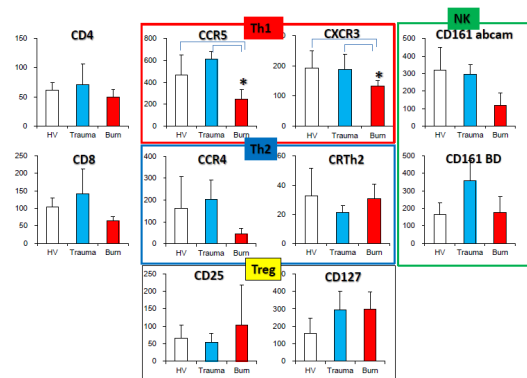


図1. 各群における T 細胞フェノタイプ

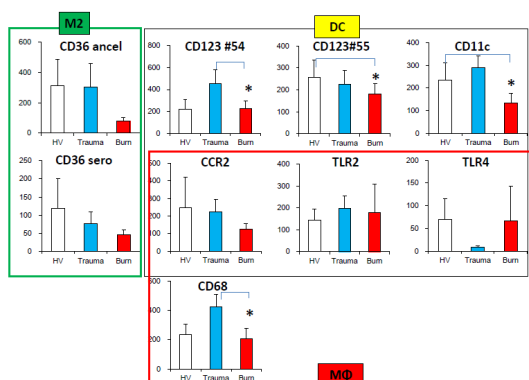


図2. 各群における単球系フェノタイプ

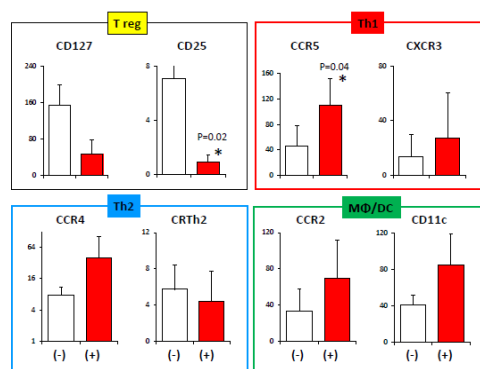


図3. 感染・臓器障害発症後のフェノタイプ

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

1.

発表者：関根和彦、多村知剛、栗原智宏、渋谷崇行、入野志保、武部元次郎、林田敬、並木淳、堀進悟

表題：パネルディスカッション「敗血症の病態と治療」新たな視点と展望：重度外傷・熱傷患者において白血球フェノタイプの変化から感染合併症が予測できるか？

第42回日本救急医学会総会

2014/10/28-30

福岡国際会議場(福岡県福岡市)

2.

発表者：関根和彦

表題：外科的侵襲による生体反応 - サイトカインと臓器障害 -

第6回日本 acute care surgery 学会

2014/9/20-21

ホテル青森(青森県青森市)

3.

発表者：多村知剛、関根和彦、小林陽介、渋谷崇行、林田敬、並木淳、堀進悟

表題：重症救急患者における白血球表面抗原  
解析による易感染状態と臓器不全の関連性  
の解明

日本集中治療医学会

2014/2/27-3/1

国立京都国際会館（京都府京都市）

〔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・客員講師  
研究者番号：90296715

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし