

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791953

研究課題名(和文)重症救急患者における易感染状態と臓器不全発症の関連性の解明

研究課題名(英文) Immunophenotyping for detecting susceptibility to infection and organ failure in critically ill patients

研究代表者

多村 知剛 (Tamura, Tomoyoshi)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00571720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：重症患者は、感染症が契機となって多臓器不全で死亡することが多い。宿主免疫能評価方法の一つであるプロテインアレイ法による白血球表面抗原の網羅的解析システムは重症患者においても迅速・簡便に行うことが可能であった。臓器障害発症前後に網羅的解析を行うことで、臓器障害発症後に白血球表面抗原のうちCD4、CD36、CD16b、CD66bが有意に変化することが分かった。敗血症性ショック患者では臓器障害の重症度に反比例しCD4は直線的に減少した。白血球表面抗原の解析により臓器不全発症の予測が可能となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Critically ill patients often die of multiple organ failure following infection. Immunophenotyping (IP) method, a novel analysis system of diverse leukocyte surface antigens using the protein array method for evaluation of host immunological status, was sufficiently implemented in timely manner by bedside in critically ill patients. After the onset of organ failure, CD4 and CD36 decreased, CD16b and CD66b increased, respectively. Proportion of CD4 and the severity of the organ failure were inversely related in septic shock patients. The rapid bedside analysis of diverse leukocyte subsets with our IP method was applicable and could be useful for predicting organ failure in critically ill patients.

研究分野：救急医学、集中治療

キーワード：白血球表面抗原 プロテインアレイ法 重症患者 敗血症性ショック 多発外傷 広範囲熱傷

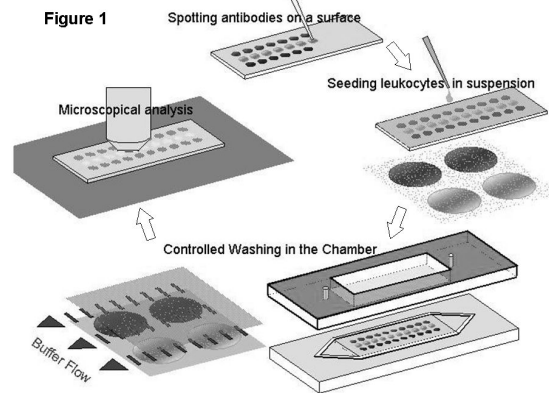
1. 研究開始当初の背景

重度外傷・熱傷患者は、受傷直後の死線期を乗り越えた後、数日からの数週間にかけて易感染宿主となり、感染症が契機となって多臓器不全で死亡することが多い。外傷・熱傷後の易感染性には細胞性免疫の低下が関与し、ヘルパーTリンパ球の機能不全(Th1型反応の減弱とTh2型反応の相対的亢進)と、単球・マクロファージにおける炎症性フェノタイプへのシフトが感染症の悪化や急性肺損傷をはじめとした臓器不全の発症と関連することが明らかにされている¹⁾²⁾。現在のところ宿主免疫能に関する免疫学的評価の方法は確立していないが、白血球表面抗原の解析(immunophenotyping: IP)は必須の評価法の一つである。このIPの定量的解析法として標準的であるフローサイトメトリー法にはいくつかの欠点がある(フローサイトメーターと操作技官が必要、白血球表面抗原の解析種類の制約、準備から解析・評価までに多大な時間を要する)³⁾。従って本法は、病態が短時間に変化する重症患者において、免疫能の評価や治療方針の決定に全く貢献しなかった。

これらの欠点を克服するために、我々はHarvard Medical school, Massachusetts General Hospitalと共同で簡便かつ網羅的IP解析のプラットフォーム(プロテインアレイ法: Fig.1)を開発した⁴⁾。このプロテインアレイ法は、一度に多種(25種類以上)の表面抗原が解析可能であるばかりか、その扱いが平易で30分以内に結果が判明するなどの長所を備えており³⁾⁴⁾、HIV感染患者におけるCD4陽性リンパ球数の簡易測定⁵⁾や、流血中の癌細胞の同定⁶⁾にも臨床応用され、良好な臨床成績を示した。我々は、このプロテインアレイ法による免疫学的評価に基づき、外傷・熱傷患者のIPの網羅的解析を行い、白血球表面抗原の経時的变化(リンパ球・単球マクロファージのフェノタイプシフト)と、宿主の易感染状態やCompensatory Anti-inflammatory Response Syndrome(CARS)との関連性を検討した。

ベッドサイドの網羅的IP解析は感染症のみならず臓器不全発症のスクリーニング法としても有用であることが予想される。これらの指標をもとに感染症や臓器不全発症が予測される患者群に対して、予防または早期治療的介入(患者 isolation, 抗菌化学療法の強化, 免疫賦活系経腸栄養剤の投与など)を重点的に行うことが可能となり、生存率の向上や集中治療室滞在期間の短縮に貢献すると考えられる。また、これまで客観的指標に乏しかった集中治療中の重症患者の免疫能低下や易感染状態の評価法になる可能性が期待される。現在我々は、宿主免疫能の強化による新たな治療法の確立を目指している。免疫強化療法は、免疫能が低下した患者以外に行われると、むしろ病態を悪化させる可能性がある。このプロテ

インアレイによる免疫状態の把握は、免疫強化療法の適否を判断するために必須の検査法となると考えられる。



(引用文献)

1. Sekine K, Fujishima S, Aikawa N: Plasma hepatocyte growth factor is increased in early-phase sepsis. *J Infect Chemother* 2004, 10(2):110-114.
2. Sekine K, Fujishima S, Sasaki J, et al: In vivo IL-18 supplementation ameliorates lethal acute lung injury in burn-primed endotoxemic mice: a novel anti-inflammatory role of IL-18. *Shock* 2009, 32(5):554-562.
3. Revzin A, Sekine K, Sin A, et al: Development of a microfabricated cytometry platform for characterization and sorting of individual leukocytes. *Lab Chip* 2005, 5(1):30-37.
4. Sekine K, Revzin A, Tompkins RG, et al: Panning of multiple subsets of leukocytes on antibody-decorated poly(ethylene) glycol-coated glass slides. *J Immunol Methods* 2006, 313(1-2):96-109.
5. Cheng X, Irimia D, Dixon M, Sekine K, et al: A microfluidic device for practical label-free CD4(+) T cell counting of HIV-infected subjects. *Lab Chip* 2007, 7(2):170-178.
6. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al: Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007, 450(7173):1235-1239.

2. 研究の目的

救急搬送される外傷・熱傷患者に加えて、重症非外傷患者に対するプロテインアレイ法によるIP解析が、感染症と臓器不全発症の予測や早期の治療的介入による救命率の向上に関して、有用か否かを前向きに評価すること。

3. 研究の方法

(1)対象患者:

慶應義塾大学病院，濟生会横浜市東部病院，川崎市立川崎病院，濟生会中央病院のICU(救命センター相当)に入院した重症患者。重症度の目安は，重症多発外傷は ISS 15 以上，重症熱傷は 15%BSA 以上，非外傷は APACHE score 25 以上の患者を対象とした。

(2)方法：

プロテインアレイの作成

2つの米国共同研究機関 (Harvard medical school, Massachusetts general hospital, Dept of surgery, Mehmet Toner Ph.D., Ronald Tompkins M.D.および University of California Davis, Biomedical engineering, Alexander Revin Ph.D.) から無償供与されたアレイ基材をもとに，慶應義塾大学医学部救急医学研究室で microarray 状に抗体(各抗体 0.4 μl)を乾燥固着させ，プロテインアレイを作成した。解析を行った白血球表面抗原は以下の通り。リンパ球・単球・好中球フェノタイプ：CD 4 / 8 / 11c / 16b / 25 / 36 / 66b / 68 / 123 / 127 / 161, Toll Like Receptor (TLR)- 2 / 4, C-Chemokine Receptor (CCR)- 2 / 4 / 5, CX-Chemokine Receptor (CXCR)- 3, Chemoattractant Receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells (CRTh2)。

プロテインアレイ法による IP 解析：

対象患者から血液をヘパリンナトリウム管に 3ml 採取し，当研究室でプロテインアレイ法による IP 解析を行った。初回解析は救急搬入時に採取した血液を用いて行い，以後 5 日毎に一度程度の間隔で解析を反復した。赤血球溶解液を用い，ヘパリン管に採血した全血検体 3ml を約 5 分間溶血させ，遠心分離した沈渣にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加え全量を 3ml とした。アレイ基板に検体 500 μl を滴下し抗体と 15 分間反応させた後に，シリンジポンプを用いて PBS で上清を洗浄 (15 分間) した。プロテインアレイ法によるフェノタイプの発現は，主にアレイ上の細胞接着を肉眼的に定性評価することによって判定するが，光学顕微鏡 (×100 倍) で 1 視野あたりの細胞数を定量的に評価することで裏づけを行った。

入院中にセプシス(感染性 SIRS)または臓器不全を発症したと判断される (あるいは ICU を退室する) まで，プロテインアレイによる解析を継続した。感染症の発症は SIRS 基準および臨床所見，検査所見から判断した。臓器不全の発症は，SOFA(sequential organ failure assessment) score が 1 点以上と定義した。前課題により多種フェノタイプの中で特に有用と考えられた CD4, CCR5, CXCR3, TLR2 フェノタイプの減少に注目し，各種リンパ球・単球・好中球のフェノタイプシフトとともに，健常人の標準範囲を参考として，各種フェノタイプの推移から感染症や臓器不全の発症を予知できるかどうかを Primary outcome として前向きに評価した。

急性肺損傷や血液凝固障害をはじめとした臓器不全の重症度は SOFA score と各種フェノタイプシフトの変化との関連性を secondary outcome として評価した。

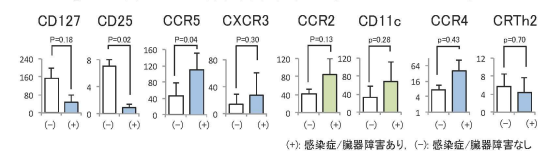
4. 研究成果

(1) 感染症発症の予測

重度外傷・熱傷患者 6 人から得られた

計 14 回のデータを解析し，全 18 種類の phenotype 抗体 (CD 4 / 8 / 11c / 16b / 25 / 36 / 66b / 68 / 123 / 127 / 161, Toll Like Receptor (TLR)- 2 / 4, C-Chemokine Receptor (CCR)- 2 / 4 / 5, CX-Chemokine Receptor (CXCR)- 3, Chemoattractant Receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells (CRTh2)) に接着した白血球数を評価した。全 18 種類の白血球 phenotype は，健常成人と同様に外傷・熱傷患者においても，迅速・簡便に解析可能であった。感染・臓器障害発症群 4 人 (男性 3 人，平均年齢 62 ± 17, 広範熱傷 3 人，多発外傷 1 人) における 8 解析 (熱傷巣感染 3 人 6 解析，肺炎敗血症 1 人 2 解析，発症までの日数 11.5 ± 4.5) と感染・臓器障害を伴わなかった群 3 人 (男性 3 人，平均年齢 46 ± 21) の 6 解析を比較すると，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 (Fig2.)。

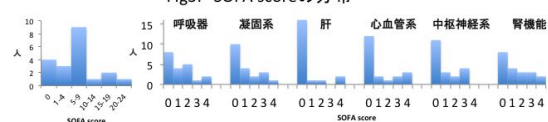
Fig2. 感染症および臓器障害発症の有無とフェノタイプ変化



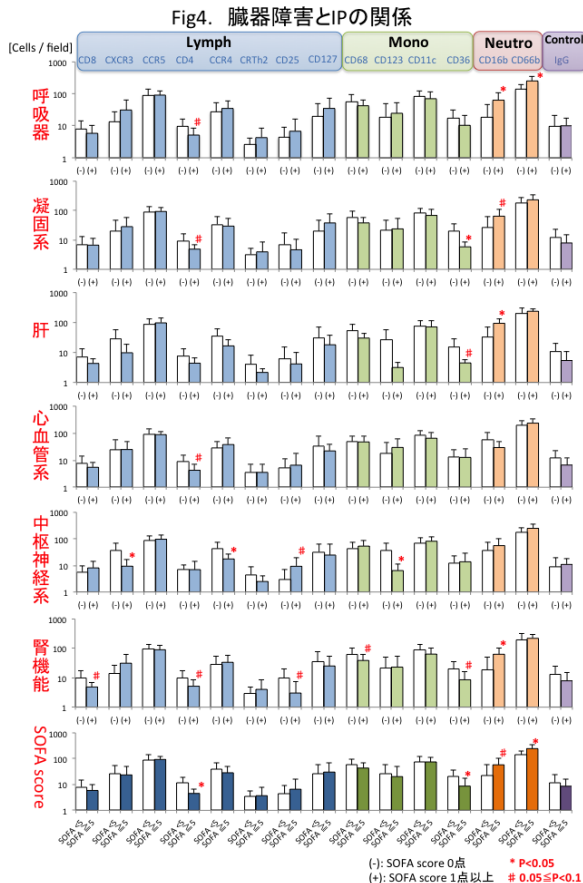
(2) 臓器障害発症の予測とフェノタイプシフトによる重症度評価

非外傷患者を含む重症患者 (ICU 入室患者) 10 人 (男性 5 人，平均年齢 49 ± 16, 敗血症性ショック 5 例，広範囲熱傷 1 例，急性肝不全 1 例，多発外傷 1 例，健常成人 2 例) から得られた計 20 回のデータ (敗血症性ショック 10 回，広範囲熱傷 3 回，急性肝不全 2 回，多発外傷 1 回，健常成人 4 回) を解析し，全 15 種類の phenotype 抗体 (CD 4 / 8 / 11c / 16b / 25 / 36 / 66b / 68 / 123 / 127, CCR- 4 / 5, CXCR- 3, CRTh2) に接着した白血球数と，SOFA score (Sequential Organ Failure Score) の関係性を評価した。SOFA Score の中央値は 5 で，分布は Fig3 の通りであった。

Fig3. SOFA score の分布

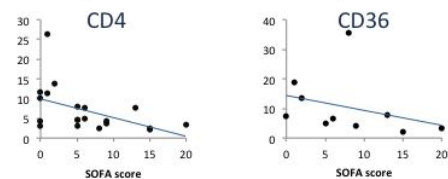


臓器障害発症時に各臓器に特異的なフェノタイプシフトは明らかではなかったが、SOFA score の総計と各フェノタイプの間では、SOFA score 5 点以上の群と 5 点未満の群の比較では、CD4 および CD36 は有意に低下、CD16b と CD66b は増加した(Fig4.)。



また IP 解析による CD4、CD36 細胞数は SOFA

Fig5. SOFA scoreとCD4、CD36



score の増加に伴って直線的に低下し、重症度と負の相関を示すことが明らかとなった(Fig5.)。

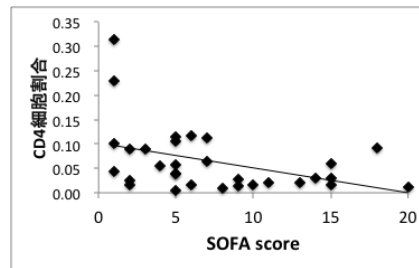
(3) 疾患別臓器障害発生予測

重症患者(ICU 入室患者)12 人(男性 5 人, 平均年齢 57 ± 20 , 敗血症性ショック 8 例, 広範囲熱傷 2 例, 急性肝不全 1 例, 多発外傷 1 例) および健常成人 2 例から得られた計 39 回分(敗血症性ショック 23 回, 広範囲熱傷 6 回, 急性肝不全 2 回, 多発外傷 3 回, 健常成人 5 回) に関する全 15 種類の phenotype 抗体の IP 解析結果を検討した。

末梢血白血球数が検体毎に異なるため、検体間での白血球分画の正確な比較のために、診療で同血液検体を用いて測定された

末梢血白血球数から、抗体スポットに吸着しうる白血球数を算出し、この白血球数で測定された各分画の細胞数を除することで、各分画の割合を算出し、検査毎、および患者間で比較検討を行った。

健常人と比較して敗血症性ショック患者では有意に CD4 の割合が減少し (0.05 ± 0.03 , 0.13 ± 0.55 ; $P < 0.01$), SOFA score の増加に反比例し CD4 は直線的に減少した ($y = -0.005x + 0.1$, $R^2 = 0.17$) (Fig6.)。多発外傷および広範囲熱傷ではこの変化は明らかではなかった。



非外傷患者を含む重症患者においても IP 解析は迅速・簡便に行うことが可能であった。また、臓器障害発症前後に網羅的解析を行うことで、臓器障害発症後に CD4、CD36、CD16b、CD66b が有意に変化することが分かった。臓器障害の重症度と CD4 の割合は負の相関を示した。Chen らの報告 (Microbiol Immunol 2011) によると、敗血症性ショック患者におけるフローサイトメトリー法を用いた白血球表面抗原の検討では、CD4+ の減少と CD16+ の増加が SOFA score 総計値と生命予後に相関していた。本研究では敗血症性ショックを含む重症患者を対象とした検討でも、CD4 の減少は臓器障害の重症度と相関を示したが、対象患者のうち死亡が少なかったことから、生命予後との関連性は検討が困難であった。易感染状態からの感染症発症の際には傷害性 T 細胞分画増加と抑制性 T 細胞分画の減少を認め、宿主防衛に理に適った変化であると考えられた。

救急患者から採取した末梢血を用いるため、検体の収集は昼夜を問わず、またさらに不定期に行わなければならないため、タイムリーな実験実施の困難性、症例数の確保が本研究の限界であった。今後は、凍結血漿の保存検体を用いて、同 IP 解析を行った際の再現性の確認を行う必要があると考えられた。またフェノタイプの変化と SOFA score の各項目との関連や、臨床経過を加味した経時的変化との関連を示すにはさらなる症例の蓄積が必要である。

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 1件)

多村知剛, 関根和彦. 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性状態と臓器不全の関連性の解明. 第41回日本集中治療医学会学術集会, 国立京都国際会館, 2014年2月27日.(京都・京都市左京区岩倉大鷲町)

〔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

多村 知剛 (Tomoyoshi Tamura)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 00571720

(2) 研究協力者

関根 和彦 (Kazuhiko Sekine)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号: 90296715