

平成30年6月21日現在

機関番号：87301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860778

研究課題名(和文) 自然免疫応答は人工呼吸器関連肺炎の予後を左右するか？

研究課題名(英文) Does the prognosis of ventilator-associated pneumonia (VAP) affected by innate immune response in the lung?

研究代表者

山本 和子 (Yamamoto, Kazuko)

独立行政法人国立病院機構(長崎医療センター臨床研究センター)・臨床研究センター・客員研究員

研究者番号：10398167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：人工呼吸器関連肺炎(ventilator associated pneumonia: VAP)は院内肺炎のうち、とくに死亡率が高く予後不良な疾患である。今回の研究成果から、VAPの予後不良となる因子として、人工呼吸器装着後5日以上経過した遅発性のVAPであること、成人呼吸促迫症候群：Adult Respiratory Distress Syndrome(ARDS)の合併があること、グラム陰性菌による肺炎であること、が抽出された。グラム陰性菌による肺免疫細胞の過剰サイトカイン産生によるARDSが肺傷害の原因となり、それらを保護調節する肺上皮細胞選択的産生物質が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ventilator associated pneumonia (VAP) is an important cause of morbidity and mortality in hospitalized patients. The aim of our study was to investigate whether the innate immune response in the lung critical for the prognosis of VAP. A total of 134 VAP patients was collected, and we found that, late VAP (whose onset was more than 5 days after mechanical ventilation started), occurrence of Adult Respiratory Distress Syndrome(ARDS) in the course of VAP, and VAP caused by gram-negatives, as factors which worsen the prognosis of VAP. Those results suggest that the lung injury in the clinical course of VAP are likely caused by gram-negatives and progress to ARDS lead to poor prognosis. The lung epithelial cell-derived cytokines might be important to protect lungs during VAP.

研究分野：呼吸器内科学、感染症学

キーワード：人工呼吸器関連肺炎 予後因子 サイトカイン 肺上皮 ARDS

1. 研究開始当初の背景

人工呼吸器関連肺炎 (ventilator associated pneumonia: VAP) は主にグラム陰性桿菌を原因とし、その罹患率 (12-17%)、死亡率 (35-51%) とともに高く重要な疾患である。VAP 患者の予後不良因子として高齢者、糖尿病、敗血症、薬剤耐性菌など基礎疾患や合併症についての報告は散見されるが、VAP 患者の自然免疫応答が予後にどう影響するかについて調査された研究はない。近年、小児のインフルエンザウイルス感染症において、血液中の自然免疫応答細胞から分泌される TNF- α が低い群で有意に死亡率が高いとの報告 (Hall et al. *Crit Care Med* 41:224-236, 2013) があり、自然免疫応答と患者の予後に焦点をあてた臨床研究は今後大いに期待される分野である。申請者はこれまで、細菌性肺炎において肺胞上皮細胞で選択的に産生されるサイトカインが NF- κ B 蛋白 RelA (p65) 依存性であり、自然免疫に不可欠であることをマウス肺炎モデルで報告してきた。これらの背景を踏まえて、本研究を通じて VAP 患者の予後に自然免疫応答が寄与するか、について明らかにしたい。

2. 研究の目的

本研究の目的は、VAP 患者の予後に自然免疫機構が重要であるか評価し、肺胞上皮サイトカインを VAP の治療応用へと展開するための研究基盤を確立することである。本研究では、自然免疫機構を評価する方法として肺胞上皮サイトカインと Toll-like receptor 4 (TLR4)-NF- κ B RelA シグナルを定め、2つの中心的仮説を提案する。

(1) 肺胞上皮サイトカインの分泌が低下している VAP 患者は予後不良である。

(2) TLR4-NF- κ B RelA シグナルが低下している VAP 患者は予後不良である。

3. 研究の方法

(1) VAP 患者の登録: 平成 26 年 4 月～平成 28 年 3 月 (2 年間) の期間中に、長崎医療センターの救急救命センターまたは呼吸器内科に新しく入院し、グラム陰性桿菌による VAP と診断された 20 歳以上の成人患者を対象とする。VAP の診断基準は、気管内挿管後 48 時間以降に新たな肺の陰影を呈し、 38°C 以上の発熱、 $10,000/\mu\text{L}$ 以上の白血球増加、膿性の気道分泌物のうち 2 つの項目陽性、下気道検体のグラム染色にて貪食像を伴うグラム陰性桿菌を認める、の 3 つを満たした患者とする。患者登録は 50 例を目標とする。

(2) VAP 患者の抽出: 長崎医療センターで人工呼吸器が開始された患者は人工呼吸ケアチーム (救急救命医師、看護師、臨床工学

技師にて構成) が自動的に患者を登録し、連日チェック表を用いて VAP の発生を迅速に抽出する。患者が発生した場合、速やかに申請者へ伝達される。

(3) 患者の除外基準: 基礎背景として、75 歳以上の後期高齢者、担癌患者、自己免疫疾患患者、ステロイドあるいは免疫抑制剤治療中の患者を除外する。また全身状態として重症呼吸不全 ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \text{ ratio} < 100$) の患者、昇圧剤使用下の収縮期血圧 $< 80\text{mmHg}$ の患者は除外する。

(4) 予後判定: VAP 発症後 14 日目、28 日目の生存の有無。

(5) 検体採取: VAP と診断後 48 時間以内に血液と気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar lavage fluid: BALF 50mL にて洗浄) を採取する。BALF は肺炎を認める肺の中葉または舌区より行う。

(6) 説明同意: VAP 患者または家族に対して、臨床上 BALF は VAP の原因菌同定、血液は炎症所見の評価のため有用な検査である点に加えて、本研究について説明し、同意を取得する。

(7) 検体の測定:

a) サイトカイン (Luminex): 分離した血清および BALF 上清は -80°C にて臨床研究センターに保存。肺胞上皮サイトカイン (GM-CSF, CXCL5, CCL20), 炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8) を測定。

b) 血液学的検査 (院内検査): CRP、プロカルシトニン、LDH

c) 血液細胞 TNF- α : ヘパリン採血管に採取された全血の 50 μL を LPS と 37°C で 4 時間反応させ、上清を -80°C で臨床研究センターに保存する。ELISA にて TNF- α 値を定量する。

4. 研究成果

(1) 本研究は 2015 年 2 月 2 日に長崎医療センターの倫理審査委員会によって許可された。また本研究専用の検体保存 -80°C 冷凍庫を長崎医療センター 臨床研究センター内に設置できた。まず、VAP の予後不良因子を解析するために、パイロット研究として 2010 年 12 月 1 日～2013 年 11 月 30 日の 36 ヶ月間に当院に入院した 42,993 名の患者を後方視的に調査し、48 時間以上の人工呼吸器管理を行った 1,034 名の成人患者を抽出した。VAP 患者は 134 名 (男性 85 名、女性 49 名) で、年齢中央値は 68.0 歳であった。VAP の発生率は 30.1% で、28 日以内の死亡率は 23.1% であ

った。アウトカムを 28日以内の死亡、入院日数30日以上、ICU入室10日以上、とした。解析因子としては、年齢、性別、基礎疾患、人工呼吸器装着からVAP発症までの日数(4日以内をearly VAP、それ以降をlate VAPとした)、PaO₂/FiO₂ ratio (P/F比)、成人呼吸促迫症候群：Adult Respiratory Distress Syndrome(ARDS)合併の有無、原因菌、使用抗菌薬を設定した。

(2)VAP発生時期は4日以内の早期が約60%を占め、再発率は29.9%であった。基礎疾患はARDS 26名、脳神経疾患 25名、消化器疾患 22名、外傷 19名、心肺蘇生後 12名、熱傷 8名であった。原因菌ではMRSA、*Stenotrophomonas maltophilia*、MSSA、*Klebsiella*属、*Neisseria*属、*Pseudomonas aeruginosa*の順に多かった。

(3)28日以内の死亡に関連する因子として単変量解析(連続変数：t検定、非連続変数：カイ二乗検定)では、P/F、装着日数、ARDS、グラム陽性菌、グラム陰性菌、セフェム系、クリンダマイシンの使用、が $p<0.1$ の有意性を示した。これらを多変量解析に投入すると、ARDSの合併($p=0.003$)とグラム陰性菌によるVAP($p=0.037$)が28日以内の死亡と関連する予後不良因子として抽出された。

(4)入院日数30日以上に関連する因子として、単変量解析では、P/F、装着日数、VAPまでの装着日数、early VAP、late VAP、外傷、ARDS、*S.maltophilia*、セフェム系抗菌薬、抗MRSA薬、が $p<0.1$ の有意性を示した。多変量解析では、ARDSの合併($p=0.033$)のみが入院日数30日以上に関連する予後不良因子として抽出された。

(5)ICU入室10日以上に関連する因子として、単変量解析では、装着日数、early VAP、late VAP、悪性腫瘍、ARDS、MRSA、*Neisseria*属、セフェム系抗菌薬、抗MRSA薬、が $p<0.1$ の有意性を示した。多変量解析では、late VAP($p=0.016$)と抗MRSA薬($p=0.017$)がICU入室10日以上に関連する予後不良因子として抽出された。

(6)以上の結果より、VAPは一概に、late VAPの原因となるグラム陰性菌が、過剰なサイトカインストームを惹起するARDSを合併すると、予後不良となりやすい、と結論づけられた。これらの結果と合わせて、我々が報告してきた肺上皮細胞選択的に産生されるサイトカイン(CCL20、GM-CSF、CXCL5)は肺上皮傷害を伴うARDSに保護的に働く

という仮説の元に、研究を進めた。

(7)2017年12月までに目標の50症例のVAP患者のBALF検体を集積できた。しかし平成28年11月/12月にELISA測定したサイトカインGM-CSFとIL-1に関して、大部分の検体において測定感度以下であったため、より測定感度の高いimmuno PCRを用いて測定を行う予定に変更し、研究機関の延長を申請した。immuno PCR法を用いて、CXCL5、GM-CSF、CCL20、IL-1、IL-1、TNF-、IL-6、IL-8の測定を行った。現在患者背景因子と予後項目(60日以内死亡、ICU入院期間、全入院期間、人工呼吸器装着期間)に対する各種サイトカインの関連性と、サイトカインの組み合わせによる予後項目との関連性について解析を行なっている最中である。

(8)パイロット研究については、その成果をRespirology(査読有)に投稿中である。また、本研究と関連した諸研究について、助成期間中に下記のとおり多くの論文発表および学会発表を行った。

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14件)

Oshima K, Yamamoto K, Izumikawa K, et al: Examination of cryptococcal glucuronoxylomannan antigen in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing pulmonary cryptococcosis in HIV-negative patients. 査読有、*Med Mycol.* 56(1):88-94, 2018.

Smith NMS, Yamamoto K, Mizgerd JP, et al. Regionally compartmentalized resident memory T cells mediate naturally acquired protection against pneumococcal pneumonia. 査読有、*Mucosal Immun* 11(1):220-235, 2018.

Tashiro M, Yamamoto K, Izumikawa K, et al. Adjunctive corticosteroid therapy for inpatients with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. 査読有、*BMC Pulm Med* 17(1):219, 2017.

Tashiro M, Yamamoto K, Izumikawa K, et al. Comparison of efficacy of

antimicrobial agents among hospitalized patients with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in Japan during large epidemics of macrolide-resistant *M. pneumoniae* infections: A nationwide observational study. 査読有、*Clin Infect Dis* 65(11):1837-1842, 2017.

Wasserman GA, Yamamoto K, Mizgerd JP, et al. Expression of Piwi protein MIWI2 defines a distinct population of multiciliated cells. 査読有、*J Clin Invest* 127(10):3866-3876, 2017.

Coleman FT, Yamamoto K, Mizgerd JP, et al. The capacity of pneumococci to activate macrophage NF- κ B determines necroptosis and pneumonia severity. 査読有、*J Infect Dis*, 216(4):425-435, 2017.

Nishikawa H, Yamamoto K, Izumikawa K, et al. *In vitro* and *In vivo* antifungal activities of T-2307, a novel arylamidine, against *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen. 査読有、*J Antimicrob Chemother*, 72:1709-1713, 2017.

Kamata H, Yamamoto K, Mizgerd JP, et al. Epithelial cell-derived secreted and transmembrane 1a (Sectm 1a) signals to activated neutrophils during pneumococcal pneumonia. 査読有、*Am J Respir Cell Mol Biol* 55:407-418, 2016.

Nagayoshi Y, Yamamoto K, Kohno S, et al. An autopsy case of lepidic pulmonary metastasis from cholangiocarcinoma. 査読有、*Intern Med* 55:2849-2853, 2016.

Takazono T, Yamamoto K, Kohno S, et al. Relapsed pulmonary cryptococcosis during tumor necrosis factor inhibitor treatment. 査読有、*Intern Med* 55:2877-2880, 2016.

Yoshida M, Yamamoto K, Kohno S, et al. Recurrent *Streptococcus agalactiae* toxic shock syndrome triggered by a tumor necrosis factor inhibitor. 査読有、

Intern Med 55:3211-3214, 2016.

Traber KE, Yamamoto K, Mizgerd JP, et al. Oncostatin M induces STAT3-dependent CXCL5 expression and neutrophil recruitment during pneumonia. 査読有、*Am J Respir Cell Mol Biol* 53: 387-390, 2015.

Hilliard KL, Yamamoto K, Mizgerd JP, et al. The lung-liver axis facilitates pulmonary innate immunity and hepatoprotection during pneumonia. 査読有、*Am J Resp Cell Mol Biol* 53:479-488, 2015.

Yamamoto K, Ayele-Nati A, Mizgerd JP, et al. Roles of lung epithelium in neutrophil recruitment during pneumococcal pneumonia. 査読有、*Am J Respir Cell Mol Biol* 50:253-262, 2014.

[学会発表](計 27 件)

Yamamoto K, Ideguchi S, Mizgerd JP, et al. The capacity of pneumococcus to stimulate macrophage NF- κ B activity dictates the severity of adult pneumococcal pneumonia. Gordon Research Conference 2018, Biology of Acute Respiratory Infection. Ventura, CA, USA. 2018 年 3 月 21 日.

井手口周平、山本和子、迎寛ほか. 肺炎球菌のマクロファージ NF- κ B 活性誘導能と肺炎の臨床像との関連性. 第 58 回日本呼吸器学会学術講演会. 大阪. 2018 年 4 月 28 日.

井手口周平、山本和子、迎寛ほか. 関節リウマチ患者における緑膿菌気道定着のリスク因子と予後の検討. 第 92 回日本感染症学会学術講演会. 岡山. 2018 年 6 月 1 日.

山本和子. 宿主免疫と感染症起因微生物. 第 28 回日本臨床微生物学会総会・学術集会. 長崎. 2017 年 1 月 20 日.

井手口周平、山本和子、迎寛ほか. 当科における膿胸の治療経過に関連する患者背景因子の検討. 第 91 回日本感染症学会総会. 東京. 2017 年 4 月 7 日.

山本和子、迎寛ほか. 縦隔リンパ節内好中球による肺炎球菌肺炎の侵襲性感染症の防御. 第 57 回日本呼吸器学会学

術講演会. 東京. 2017年4月22日.

Okuno D, Ideguchi S, Yamamoto K, et al. Significance of antimicrobial treatment-related factors for the outcomes of adult empyema in Japanese tertiary hospitals. 30th International Congress of Chemotherapy and Infection 2017. Taipei. 2017年10月25日.

Stauffer NM, Yamamoto K, Mizgerd JP, et al. Resolution of respiratory pneumococcal infection seeds the local lung tissue with CD4+ TRM cells that prevent future pneumonias. The American Thoracic Society 2016 International Conference. San Francisco, CA, USA. 2016年5月17日.

Ota K, Yamamoto K, Kohno S, et al: Characterizing secondary pneumococcal superinfection following seasonal influenza virus. The American Thoracic Society 2016 International Conference. San Francisco, CA, USA. 2016年5月16日.

山本和子. 「肺炎球菌肺炎と自然免疫応答」シンポジウム1. 知の未来. 第56回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 2016年4月8日.

太田賢治, 山本和子, 河野 茂ほか. 肺炎球菌肺炎のインフルエンザ感染合併の有無による臨床的特徴の差異に関する検討. 第56回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 2016年4月8日.

山本和子. 宿主免疫と感染症起因微生物. ベーシックレクチャー. 第28回日本臨床微生物学会総会学術集会, 長崎, 2017年1月20日.

Ota K, Yamamoto K, Kohno S, et al. Prognostic factors of patients with ventilator-associated pneumonia in ICU. The American Thoracic Society 2015 International Conference. Denver, CO, USA. 2015年5月20日.

Kamata H, Yamamoto K, Mizgerd JP, et al. Secreted and transmembrane 1a (Sectm1a) from pulmonary epithelial cells enhances phagocyte recruitment during pneumonia. The American Thoracic Society 2015 International

Conference. Denver, CO, USA. 2015年5月18日.

Traber KE, Yamamoto K, Mizgerd JP, et al. Oncostatin M induces STAT3-dependent CXCL5 expression in lung epithelium to increase neutrophil recruitment during pneumonia. The American Thoracic Society 2015 International Conference. Denver, USA. 2015年5月17日.

Stauffer NM, Yamamoto K, Mizgerd JP, et al. Respiratory infections with pneumococci establish multi-pronged heterotypic immunity that protects against pneumonia. The American Thoracic Society 2015 International Conference. Denver, USA. 2015年5月19日.

Coleman FT, Yamamoto K, Mizgerd JP, et al. Macrophage necroptosis and pneumonia caused by virulent pneumococcus. The American Thoracic Society 2015 International Conference. Denver, USA. 2015年5月18日.

山本和子. 肺感染症と肺上皮細胞免疫. シンポジウム「呼吸器疾患の免疫治療を考える」. 第55回日本呼吸器学会学術講演会. 東京. 2015年4月19日.

Coleman FT, Yamamoto K, Mizgerd JP, et al. Alveolar macrophage NF- κ B-driven lung defense is circumvented by virulent pneumococci. The American Thoracic Society 2014 International Conference. San Diego, CA, USA. 2014年5月20日.

Yamamoto K, Ahyi ANN, Mizgerd JP, et al. Neutrophil recruitment to mediastinal lymph nodes prevents bacteremia during pneumonia. The American Thoracic Society 2014 International Conference. San Diego, CA, USA. 2014年5月19日.

②Traber KE, Yamamoto K, Mizgerd JP, et al. Oncostatin M is required for maximal CXCL5 expression and neutrophil recruitment during pneumonia. The American Thoracic Society 2014 International Conference. San Diego, CA, USA. 2014年5月18日.

②Kamata H, Yamamoto K, Mizgerd JP, et al.

Epithelial-specific immune responses during pneumonia. The American Thoracic Society 2014 International Conference. San Diego, CA, USA. 2014年5月18日.

⑳ Hilliard KL, Yamamoto K, Mizgerd JP, et al. The lung-liver axis facilitates innate immunity and survival during pneumonia. The American Thoracic Society 2014 International Conference. San Diego, CA, USA. 2014年5月19日.

㉑ Stauffer NM, Yamamoto K, Mizgerd JP, et al. Respiratory exposures to pneumococcus confer Th17 memory and heterotypic lung protection. The American Thoracic Society 2014 International Conference. San Diego, CA, USA. 2014年5月20日.

㉒ 高島英昭, 山本和子. 急性脳卒中における肺炎. 第88回日本感染症学会総会. 福岡. 2014年6月18日.

㉓ 太田賢治, 山本和子, 山崎一美, ほか. 長崎医療センターにおける人工呼吸器関連肺炎の検討. 第88回日本感染症学会総会. 福岡. 2014年6月18日.

㉔ 太田賢治, 山本和子, 山崎一美, ほか. Prognostic factors of patients with ventilator-associated pneumonia in ICU. 第68回国立病院総合医学会. 横浜. 2014年11月14日.

〔図書〕(計3件)

山本和子、迎 寛. 特集 (Clinical Science) 呼吸器疾患と免疫, 重症肺炎と自然免疫. 炎症と免疫 24(4):34-43, 先端医学社, 2016.

山本和子、迎 寛. 私達の研究, 細菌性肺炎と肺上皮細胞免疫. 化学療法の領域 32(3):458-465, 医薬ジャーナル社, 2016.

山本和子. 肺上皮細胞が担う宿主防御機構の特異性. 肺炎球菌肺炎モデルにおいて. 特集/呼吸器病学 TOPICS 2014-15. 分子呼吸器病 19(1):9-12, 先端医学社, 2015.

〔産業財産権〕

なし

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 1件)

名称: 慢性肝疾患治療剤

発明者: テイジン、山本和子、八橋 弘、木

下明敏

権利者: テイジン、山本和子、八橋 弘、木下明敏

種類: 慢性肝疾患治療剤

番号: 特許第4695366号

取得年月日: 2011年3月

国内外の別: 国内

〔その他〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 和子 (YAMAMOTO, Kazuko)

長崎大学病院 呼吸器内科 助教

独立行政法人 長崎医療センター 臨床

研究センター 客員研究員

研究者番号: 10398167

(2) 研究分担者

井手口 周平 (IDEGUCHI, Shuhei)

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科

医療科学専攻 呼吸器内科学分野 大学

院生

研究者番号: 50796224

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

Mizgerd, Joseph P. (MIZGERD, Joseph P)

Director, Pulmonary Center, Boston

University School of Medicine, MA, USA

太田 賢治 (OTA, Kenji)

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科

病態解析・診断学 大学院生

山崎 一美 (YAMASAKI, Kazumi)

独立行政法人 長崎医療センター 臨床研

究センター 臨床疫学研究室長