

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861519

研究課題名(和文)高齢者敗血症患者におけるB細胞機能低下のメカニズムを探る

研究課題名(英文)Mechanism of B cell function in elderly patients with sepsis

研究代表者

鈴木 浩大(SUZUKI, KODAI)

岐阜大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80724583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：宿主免疫においてB細胞は重要な働きをするにも関わらず、敗血症急性期におけるB細胞の役割や老化との関連については十分にわかっていない。本研究では敗血症急性期におけるB細胞の免疫能を解析することと老化との関連を検討することを目的とした。敗血症急性期には疲弊B細胞が増加していた。高齢敗血症患者では血清IgM濃度は重症度スコア、臓器障害スコアと負の相関関係にあった。B細胞を単離培養し産生されるIgMは、高齢者、敗血症患者で低下していた。敗血症時における疲弊B細胞の増加によりIgM産生が低下し、敗血症患者、中でも特に高齢者においては重症度、二次感染と関連している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：While B cells are known to play pivotal roles in sepsis, changes in B cell-mediated humoral immunity have not been evaluated. We aimed to investigate changes in humoral immunity caused by defective B cell function during sepsis. Blood was collected to measure B cell subtypes, serum IgM concentration, and CpG-B oligodeoxynucleotide-induced IgM production ex vivo. The fraction of CD21-/low exhausted B cells in septic patients was higher than that observed in healthy donors. Significantly, serum IgM in elderly septic patients was negatively correlated with APACHE II score. Consistently, in B cells stimulated ex vivo, both aging and sepsis induced significant reductions in supernatant IgM. Reduced immunocompetent B cells may be related to increased severity and secondary infection after sepsis, especially in the elderly. Finally, impaired humoral immunity with increased CD21-/low exhausted B cells and insufficient IgM production may be a critical immunological change in sepsis.

研究分野：救急・集中治療

キーワード：敗血症 B細胞 疲弊

1. 研究開始当初の背景

敗血症は感染による全身炎症反応であり、高い死亡率をきたすことが臨床上的の問題である。その原因の一つに急性期からの免疫抑制状態と、それによる感染の遷延があると考えられている。特に高齢者においては加齢に伴い免疫能は低下しており、敗血症死亡患者に占める、高齢者の割合は高い。高齢敗血症患者におけるT細胞の数、免疫能低下についてはすでに報告があり(Inoue et al. Crit Care Med. 2013)、これらが高齢敗血症患者で死亡率が高い一因となっていることが明らかとなっている。しかし、B細胞は免疫グロブリン等の抗体を産生し、微生物に対する免疫応答で重要な役割を果たすにも関わらず、高齢敗血症患者とB細胞の老化免疫についての研究はまだない。

その一方で敗血症に対する免疫グロブリン投与は歴史が長く、特に重症敗血症においてその投与は積極的に行われてきた。その効果は最新の敗血症診断治療ガイドライン(SSCG: Surviving Sepsis Campaign Guideline 2012)では、多クローン性免疫グロブリン(IgG)の有効性は否定されている。一方、IgGと比べて感染初期にその産生されるIgMを多く含んだ免疫グロブリンの投与では治療効果があったと報告されており、また我々は予後不良の高齢者敗血症患者で血清中のB細胞およびIgM濃度が若年敗血症患者と比較して有意に低下していることを明らかにしていた。

しかしながら、高齢敗血症患者におけるB細胞の加齢に伴う機能変化については十分な検討がなされておらず、敗血症の重症化や死亡との関連については依然不明な点も多い。このため、敗血症発症時における免疫能の加齢変化を詳細に解析し、その結果を元に免疫グロブリン産生能を検討することで高齢敗血症患者に対する治療応用が展開される可能性があると考えた。

2. 研究の目的

高齢者におけるB細胞の老化免疫とその抗体産生能について解析し、高齢者敗血症の新たな治療戦略を開発する。

3. 研究の方法

敗血症患者における免疫機能解析

(1) 高齢敗血症患者における末梢血B細胞の機能解析

高齢者(65歳以上)・若年成人(18-64歳)各々の敗血症患者と健常ボランティアから血液を採取し、Ficoll比重遠心法を施行、血

清と末梢血単核球(PBMC)を分離した後、血清中Ig濃度測定、末梢血中B細胞数測定・サブタイプ解析を行った。さらに分離した末梢血単核球から磁気ビーズを用いてB細胞分離し、B細胞刺激物質であるCpG-B oligodeoxynucleotideを添加。7日間培養した後の上清中IgM濃度を測定した。

(2) 敗血症罹患後における末梢血B細胞の機能解析

重症敗血症罹患後、約1週間後に(1)同様の免疫機能解析を行った。

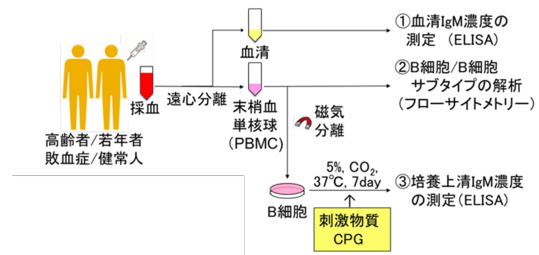


図1 高齢敗血症患者の末梢血B細胞の機能解析 (雑誌論文①改変)

敗血症モデルマウスにおける免疫機能解析

(3) 敗血症モデルマウスの作製

マウスの糞便よりシングルコロニーを培養し、そこで得られる菌体を吸光度OD600nm程度となる菌体数となるよう希釈し、次いで、250ulを尾静脈より静注し、菌血症による敗血症モデルを作製した。敗血症モデルの検証は、サバイバルスタディーと静注後6時間後の敗血症モデルマウスより採取した血液をLB培地上で培養し、大腸菌コロニーを確認することで行った。

4. 研究成果

敗血症患者における免疫機能解析

(1) 高齢敗血症患者における末梢血B細胞の機能解析

予備実験から予想された高齢敗血症患者でのB細胞数の低下は認められなかった。

しかしながら、慢性炎症で増加するとされる疲弊B細胞と同様のサブタイプ(CD19+CD5+CD27-CD21-/low)を有するB細胞の割合、数ともに、健常成人と比較し敗血症患者において有意に増加していた。(それぞれ、 $P < 0.05$)

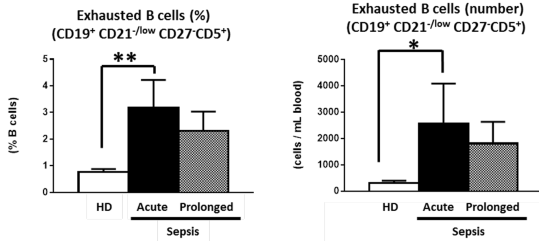


図2 敗血症患者では疲弊B細胞の割合、数が有意に増加する (雑誌論文①改変)

血清 IgM 濃度に関しても予備実験から予想された高齢敗血症患者での有意な低下ではなく、若年健常成人と比較して高齢健常成人、若年敗血症患者で血清 IgM 値が有意に低下していることを認めた ($P < 0.05$)。血清 IgG に関してはいずれの群でも有意な差は認めなかった。

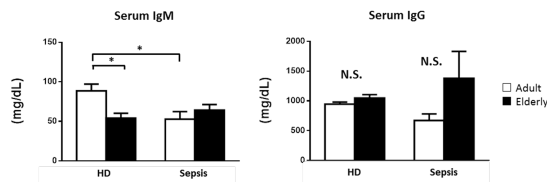


図3 高齢敗血症患者で血清IgM値が有意に低下するわけではない (雑誌論文①改変)

しかし、高齢敗血症患者において、血清 IgM 値は患者の重症度を示す APACHE II スコアと強い有意な負の相関関係にあり ($r = -0.57$, $P < 0.05$)。敗血症患者の臓器障害を示す SOFA スコアも負の相関傾向にあることがわかった ($r = -0.456$, $P = 0.066$)。

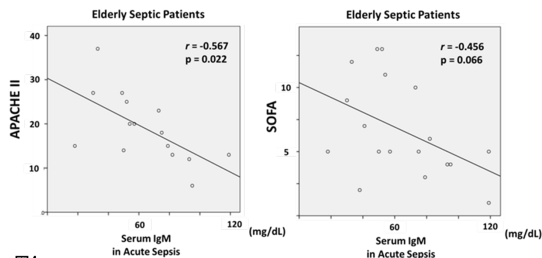


図4 高齢敗血症患者では血清IgM値は重症度、臓器障害と負の相関関係にある (雑誌論文①改変)

各患者群の PBMC より分離した CD19+B 細胞を 7 日間刺激培養し得られた上清中の IgM 値をみると、老化、敗血症ともに有意に IgM 値を減じる、すなわち IgM の産生が抑制されることがわかった ($P < 0.01$)。

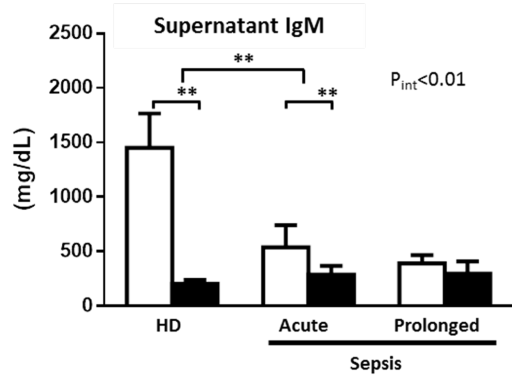


図5 老化、敗血症はIgMの産生を抑制する (雑誌論文①改変)

(2) 敗血症罹患後における末梢血 B 細胞の機能解析

敗血症亜急性期における B 細胞中のナイーブ B 細胞の占める割合は健常成人、敗血症急性期におけるナイーブ B 細胞の占める割合と比較し有意に低下していた。

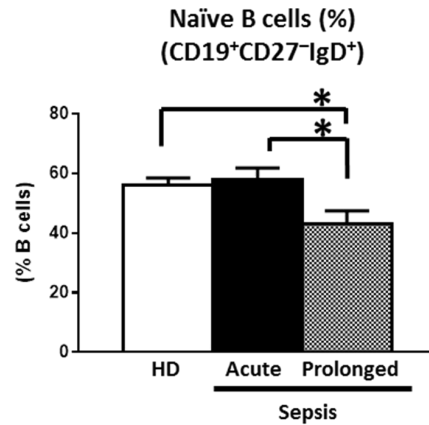


図6 亜急性期にナイーブB細胞は低下する (雑誌論文①改変)

本検討で、これまで慢性炎症疾患を有する患者に報告されていた疲弊 B 細胞が敗血症急性期に増加することがわかった。これは、ナイーブ B 細胞の低下、IgM 産生低下に関連している可能性が示唆され、高齢者においては重症度に関連している可能性が考えられた。

敗血症モデルマウスにおける免疫機能解析

(3)敗血症モデルマウスの作製

ヒトにおいて発症時の血清 IgM 値が重症度と相関していることが示唆されたことから、敗血症モデルマウスに対して、IgM 投与を行うことで生存率が改善するかどうか検討することとした。

当初、敗血症モデルマウスとして盲腸結紮穿刺法を用いたモデルを作製した。しかし、穿刺孔の大きさ、穿刺回数、穿刺部位などで信州の大きさが変わることに加え、それらを同様にしても個体ごとの糞便の性状、腹膜に排出される菌体数が異なるためか、腹膜炎の重症度が異なり、生存率が安定しなかった。

次いで、リポ多糖 (LPS) を 20 mg/kg 腹腔内投与して作成する LPS 投与モデルマウスを作製した。投与後 48 時間での生存率は 20% 程度で、その後の生存率は 1 週間後も安定していることが確認できた。しかし、LPS 投与は実際の感染症とは異なり、短期間のシグナル伝達となるため、自然免疫より遅れて生じる B 細胞の誘導を見ることに適していなかった。

本研究を遂行するため、マウスの糞便よりシングルコロニーを培養し、そこで得られる菌体を吸光度 OD600nm 程度となる菌体数となるよう希釈し、次いで、250ul を尾静脈より静注する、菌血症による敗血症モデルを作製した。

本モデルでは大腸菌投与 48 時間での生存率が 30% 程度で安定していた。本モデル作製 6 時間後のマウスより採血し、LB 培地上で培養すると大腸菌コロニーの形成が確認できた。

引き続き、本敗血症モデルマウスを用いて、敗血症と IgM に関する研究を継続する。

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 1 件)

Suzuki K, Inoue S, Kametani Y, Komori Y, Chiba S, Sato T, Inokuchi S, Ogura S. Reduced Immunocompetent B Cells and Increased Secondary Infection in Elderly Patients with Severe Sepsis. SHOCK. 2016; in press. 査読有

[学会発表](計 2 件)

鈴木浩大、井上茂亮、亀谷美恵、猪口貞樹、小倉真治 敗血症患者における B 細

胞の免疫機能解析 第 29 回日本 Shock 学会 松山コミュニティーセンター(松山市) 愛媛 2014 年 5 月 17 日

鈴木浩大、井上茂亮、小倉真治 B 細胞から見た敗血症急性期の免疫応答 第 30 回日本 Shock 学会 京王プラザホテル八王子(八王子市) 東京 2015 年 5 月 23 日

[その他]
ホームページ等

岐阜大学医学部附属病院 高次救命治療センター

<http://www1.gifu-u.ac.jp/^qqa/index.htm>
↓

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 浩大 (SUZUKI KODAI)
岐阜大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：80724583