

エンドトキシン・ 自然免疫研究 23

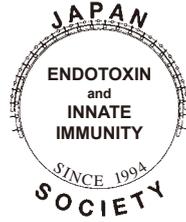
エンドトキシン研究の基礎から臨床へ、新しい時代へのアプローチ

編集

日本エンドトキシン・自然免疫研究会

木下 学

長岡 功



エンドトキシン・自然免疫研究 23

—エンドトキシン研究の基礎から臨床へ、新しい時代へのアプローチ—

編集

一般社団法人 日本エンドトキシン・自然免疫研究会

木下 学
長岡 功

執筆者一覧（敬称略）

- 清水 智治（滋賀医科大学医学部附属病院医療安全管理部）
三宅 亨（滋賀医科大学医学部外科学講座消化器外科）
北村 直美（滋賀医科大学医学部総合外科学講座）
遠藤 善裕（滋賀医科大学医学部臨床看護学講座）
谷 徹（滋賀医科大学医学部革新的医療機器・システム研究開発講座）
谷 眞至（滋賀医科大学医学部外科学講座消化器外科）
多田 浩之（東北大学大学院歯学研究科口腔分子制御学分野）
齋藤 雅史（神戸大学医学部医学研究科外科系講座災害・救急医学分野先進救命救急医学部門）
井上 茂亮（神戸大学医学部医学研究科外科系講座災害・救急医学分野先進救命救急医学部門）
藤浪 好寿（神戸大学医学部医学研究科外科系講座災害・救急医学分野先進救命救急医学部門）
大野 雄康（神戸大学医学部医学研究科外科系講座災害・救急医学分野先進救命救急医学部門）
大山 正平（神戸大学医学部医学研究科内科系講座小児科学分野）
小谷 穰治（神戸大学医学部医学研究科外科系講座災害・救急医学分野先進救命救急医学部門）
藤岡 一路（神戸大学医学部附属病院総合周産期母子医療センター小児科）
田中 智基（滋賀医科大学医学部附属病院救急集中治療部）
若尾 雅広（鹿児島大学大学院理工学研究科）
新地 浩之（鹿児島大学大学院理工学研究科）
馬場 暁士（鹿児島大学大学院理工学研究科）
Michael Chan（カリフォルニア大学サンディエゴ校ムーアがんセンター）
林 公子（カリフォルニア大学サンディエゴ校ムーアがんセンター）
Howard B. Cottam（カリフォルニア大学サンディエゴ校ムーアがんセンター）
Dennis A. Carson（カリフォルニア大学サンディエゴ校ムーアがんセンター）
隅田 泰生（鹿児島大学大学院理工学研究科）
高村(赤司)祥子（愛知医科大学医学部感染・免疫学講座）
南 和（草加市立病院救急科）

宮崎 紘子 (草加市立病院救急科)
鈴木 恒夫 (草加市立病院救急科)
加藤 理絵 (草加市立病院泌尿器科)
吉永 敦史 (草加市立病院泌尿器科)
鎌田 成芳 (草加市立病院泌尿器科)
土谷 正和 (Charles River, Microbial Solutions)
鈴木 香 (順天堂大学大学院医学研究科生化学・生体防御学)
長岡 功 (順天堂大学大学院医学研究科生化学・生体防御学)
川原 一芳 (関東学院大学理工学部理工学科生命学系)
尾之上さくら (関東学院大学理工学部理工学科生命学系)
松村 和典 (国立国際医療研究センター研究所疾患制御研究部)
祝 弘樹 (国立国際医療研究センター研究所感染症制御研究部)
切替 照雄 (順天堂大学大学院医学研究科微生物学, 順天堂大学医学部微生物学講座)
田村 弘志 (LPS コンサルティング事務所)
Johannes Reich (Microcoat Biotechnologie GmbH)
小路 久敬 (東レ・メディカル株式会社)
白川 嘉門 (株式会社 LSI メディエンス 診断薬事業本部学術部)
竹中 玲 (株式会社日立ハイテク アナリティカルソリューション事業統括本部事業戦略本部事業戦略部開発薬事グループ)

(執筆順)

序

2019年11月29,30日に所沢の防衛医科大学校キャンパスにて、第25回日本エンドトキシン・自然免疫研究会が開催されました。首都圏ではありますが、都心から少々離れた不便な場所での開催にもかかわらず(学会の達人?には最も不評となるロケーションですが)、大勢の先生方に御参加頂き、本当に感謝しております。研究会では、イブニングセミナー、教育講演、シンポジウム、受賞講演、優秀賞選考セッション、一般演題、そしてラウンドテーブルディスカッションと、数多くの演題発表と活発な討論がございました。そして、この度、御発表頂いた先生方から16題の発表内容を主体とする総説を執筆して頂き、これらをまとめて「エンドトキシン・自然免疫研究23」を発刊することができました。イブニングセミナーで御講演頂いた滋賀医科大学清水智治教授にも「エンドトキシン吸着療法の歴史と今後の展開」を執筆して頂き、他にもエンドトキシンに関する研究や臨床の第一線で御活躍中の先生方に執筆して頂くことができ、重厚感あふれるものとなりました。御執筆頂いた先生方、編集にあられた医学図書出版の担当の方に、熱く御礼申し上げます。

第25回の研究会が開かれた直後の2019年の12月初旬には、すでに武漢で新型コロナ肺炎が原因不明の肺炎として拡がり始めていました。僅か数カ月後には世界中を震撼させるパンデミックとなり、この影響で会員が楽しみにしていた、神戸で今秋開催される予定であった深瀬先生主催の国際エンドトキシン自然免疫学会が延期せざるを得なくなってしまいました。この新しいタイプのコロナウイルス感染症の克服には、自然免疫を中心とした生体防御能の強化が重要な鍵となって来ることは間違いないと思います。日本エンドトキシン・自然免疫研究会が発足以来、脈々と「エンドトキシン・自然免疫研究」という刊行物を出し続けている意義は、この分野に興味を持つ研究者に広く情報提供するためであると、長岡功理事長がおっしゃっていました。幸いにも、病原体への自然免疫応答とその制御に関する深い知見が、この本には詰まっていると思います。新型コロナで話題に上ることが多い、「サイトカインストーム」という言葉は、エンドトキシン血症の病態を言い現わすものに他ならず、新型コロナ肺炎の克服にも多くのヒントが、この「エンドトキシン・自然免疫研究」のシリーズの中にあるのではないのでしょうか。そういう視点で、これまでのものを含めて「エンドトキシン・自然免疫研究」を今一度、小生も読んで見ようと考えております。

2020年9月

第25回日本エンドトキシン・自然免疫研究会

当番世話人 木下 学

(防衛医科大学校免疫・微生物)

も く じ

第1章 イブニングセミナー

エンドトキシン吸着療法の歴史と今後の展開……………清水智治 他…1

第2章 令和元年度日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞・最優秀賞

歯周病原細菌に対する自然免疫応答がもたらす慢性炎症と生体バリア破綻……………多田浩之 ……7

第3章 令和元年度日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞・優秀賞

敗血症下において脳内に浸潤した T 細胞は敗血症性脳症と
うつ様症状の緩和に寄与する……………齋藤雅史 他…12

第4章 シンポジウム「エンドトキシン研究：ベンチサイドとベッドサイドからの メッセージ」

1. 糞便懸濁液投与法を用いた早産児マウス敗血症モデルの作成と
臨床課題への応用……………藤岡一路 ……16
2. Endotoxin Activity Assay 異常値症例の検討……………田中智基 ……22

第5章 一般演題

1. TLR7 リガンド複合体の合成と免疫増強活性……………若尾雅広 他…28
2. ハチ毒由来 PLA2 の皮膚角化細胞における免疫応答への影響……………高村（赤司）祥子 ……34
3. 経尿道的前立腺切除術・膀胱結石破碎術後に敗血症性ショックを来し
エンドトキシン吸着療法および持続的血液灌流濾過を施行した1例……………南 和 他…39
4. リムルス試薬とリコンビナント Factor C 試薬の相違点に関する考察……………土谷正和 ……43
5. グラム陰性菌 LPS および抗菌ペプチド LL-37 による老化血管内皮細胞の
炎症性応答の増強……………鈴木 香 他…47
6. 過ヨウ素酸酸化と質量分析によるリポド A 脂肪酸結合位置の解析……………川原一芳 他…54
7. 結核菌タンパク質 PE_PGERS の機能解析……………松村和典 他…59

第6章 ラウンドテーブルディスカッション「エンドトキシンや関連メディエーター をいかに測るか」

1. Limulus amoebocyte lysate (LAL) 凝固因子を利用する敗血症の
補助診断マーカーの特徴と展望……………田村弘志 他…64
2. ポリミキシン B 固定化繊維カラムを用いたエンドトキシン吸着療法の
進展……………小路久敬 ……73
3. 敗血症マーカー「プレセプシン」—生化学と臨床診断—……………白川嘉門 ……77
4. 自動多項目同時遺伝子関連検査システム Verigene[®] システム 敗血症パネル
……………竹中 玲 ……83

御案内

第1章

イブニングセミナー

エンドトキシン吸着療法の歴史と今後の展開

清水 智治¹⁾, 三宅 亨²⁾, 北村 直美³⁾, 遠藤 善裕⁴⁾, 谷 徹⁵⁾, 谷 眞至²⁾

¹⁾滋賀医科大学医学部附属病院医療安全管理部,

²⁾同 外科学講座消化器外科, ³⁾同 総合外科学講座,

⁴⁾同 臨床看護学講座, ⁵⁾同 革新的医療機器・システム研究開発講座

History and future in endotoxin adsorption therapy

Tomoharu Shimizu¹⁾, Toru Miyake²⁾, Naomi Kitamura³⁾, Yoshihiro Endo⁴⁾, Tohru Tani⁵⁾, Masaji Tani²⁾

¹⁾Medical Safety Section, Shiga University of Medical Science Hospital

²⁾Department of Surgery, Shiga University of Medical Science

³⁾Department of Comprehensive Surgery, Shiga University of Medical Science

⁴⁾Department of Clinical Nursing, Shiga University of Medical Science

⁵⁾Department of Research and Development for Innovative Medical Devices and Systems, Shiga University of Medical Science

Abstract

Toraymyxin® (Toray Medical Co., Ltd, Tokyo, Japan) has been developed as a direct hemoperfusion column that contains polymyxin B-immobilized fiber to bind endotoxins in the patients' blood. Toraymyxin was approved by the Japanese National Health Insurance system for the treatment of endotoxemia and septic shock in 1994. We reviewed and analyzed clinical history and evidence of Toraymyxin, and assessed the current status of Toraymyxin use for the treatment of severe sepsis and septic shock.

Our review shows that Toraymyxin appeared to be effective in improving hemodynamics and respiratory function in septic shock requiring emergency abdominal surgery. The recent large-scale RCTs could not demonstrate whether prognosis is improved by Toraymyxin. The clinical studies based on large-scale data-base from Japan revealed that Toraymyxin appeared to have a survival benefit in patients with severe condition of septic shock. We also commented on the revised version of health insurance adaptation of Toraymyxin in April, 2020.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 1~6, 2020

Key words : endotoxin, septic shock, PMX

はじめに

ポリミキシンB固定化繊維を用いたエンドトキシン吸着器(トレミキシン;東レ・メディカル)は、滋賀医科大学旧外科学第一講座の谷徹前教授らが開発した血中のエンドトキシンを特異的に吸着する血液浄化用医療機器である。1994年に保険適用となり、本邦では、すでに四半世紀のあいだ臨床使用され続けている。

本稿では、トレミキシンの歴史について振り返り、エビデンスを検証して、PMXの今後について解説する。

トレミキシンの歴史、臨床成績と将来

教室では、元々、繊維にエンドトキシンを固定化した制癌作用を目的とした免疫賦活材料の開発をしていた。この開発の途中でエンドトキシンと特異的に結合するポリミキシンBという抗菌薬の情報を入手し、逆の発想からポリミキシンBを繊維に固定化してエンドトキシン除去することを目的とした材料開発を行うことを1981年11月に谷前教授が提案したことからトレミキシンの開発が始まった¹⁾。1980年代前半にポリミキシンB固定化繊維が開発され*in vitro*, *in vivo*での実験が進められた。1989年2月より臨床治験が行われ、1994年7月には保険

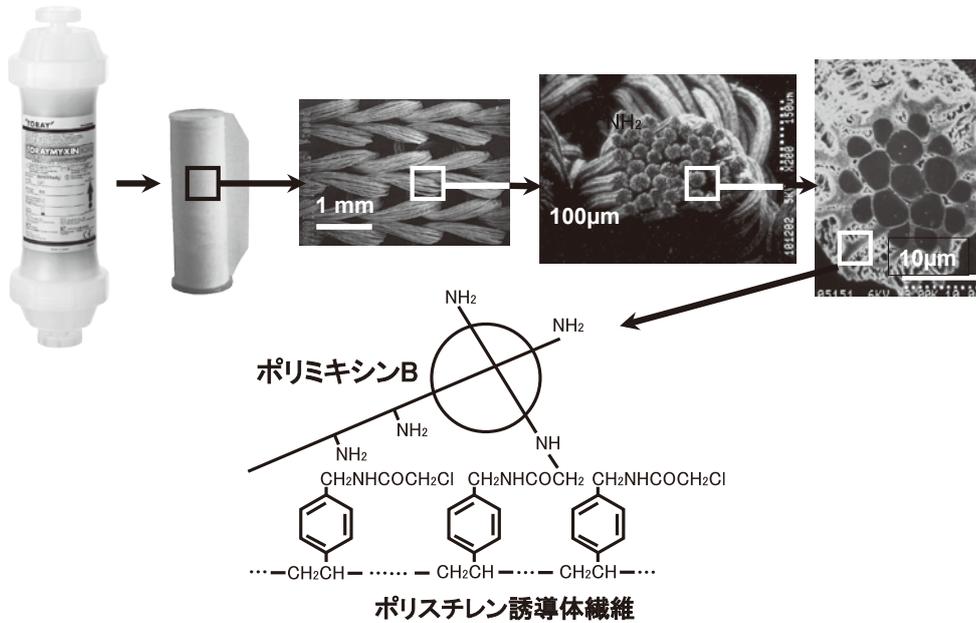


図 1 トレミキシンの構造と機能（東レ・メディカルの資料より引用）

取載され、トレミキシンが上市されることとなった。

ポリミキシンBはエンドトキシンと高い親和性を持つ物質であるが、薬物として全身に注射投与すると、腎臓毒性や神経毒性が生じることが知られている。トレミキシンのカラム内には直径約20ミクロンの極細繊維から作られた編地シートが充填されており、この繊維の表面にポリミキシンBが、化学結合で固定化されている。したがって、トレミキシンでは、ポリミキシンBが体内に遊離することはなく、副作用を起こさずにエンドトキシンを血中から除去することができる（図1）。

第1相臨床試験は細菌感染が確認されるか血中エンドトキシンが検出された多臓器不全を有する16例に施行された。最大で7回までトレミキシンによる直接血液灌流（PMX）が施行され循環動態の改善とエンドトキシン値の低下、安全性が確認された。PMXによる有害事象としては、血小板減少を認めたが、出血が関連する有害事象はなかった²⁾。

第2相臨床試験（臨床治験）として標準治療群との比較も行われた。PMX治療群では生存率は有意に改善し、循環動態の改善とエンドトキシン値の改善が示された³⁾。

本邦からは、ランダム化比較試験（RCT）としては2001年にNemotoらからの発表がある⁴⁾。PMX治療群で標準治療群に比較して生存率が改善することが示された。重症度の高い症例（APACHE II >30）では、その効果は発揮されなかった（図2）。

一方、海外では1998年にCEマークを取得して2002年にはイタリアで臨床使用が開始された。海外では、EUPHAS, ABDO-MIX, EUPHRATESという3つの大規模RCTが行われた。EUPHAS試験ではPMX治療群

で生存率の有意な改善を認めたが、それ以外の試験ではnegativeな結果であったので、国内のガイドラインの推奨度は現状より下がる可能性も考えられる（表1）。最大規模のRCTであったEUPHRATES試験の後解析の結果が2018年に発表された。EUPHRATES試験の症例のうち、EAA値0.9以上の重症例を除き、2回PMXが完遂できた症例で検討をしたところ、PMX群で死亡率の有意な改善、循環機能、呼吸機能、腎機能の改善も認められた（図3）。この結果を受けて、米国FDAはTIGRIS試験（EUPHRATES試験の追加検討）を承認し、現在進行中である。この試験では、EUPHRATESの登録基準に準じ $0.6 \leq EAA < 0.9$, $MODS > 9$ の症例で28日後死亡率が主要評価項目として設定されている。2020年には試験が終了して、2021年にはFDA承認を取得し北米で販売開始される予定となっている。新型コロナウイルス感染症の影響で試験進行が遅れる可能性もあるが、その結果が期待される場所である（図4）。

国内では、DPCや学会などの大規模データベースを用いた臨床研究の成果が発表されている。2014年にIwagamiらにより発表されたDPCを用いた下部消化管穿孔による敗血症性ショックを対象とした傾向スコアマッチング法を用いた解析では、28日死亡率はPMX治療群17.1%、標準治療群16.3%と有意差を認めなかった（表2）。フランスで行われたABDO-MIX試験でも腹膜炎に伴う敗血症性ショックを対象としていたが、標準治療群の死亡率は19.5%程度であり、同様に有意差を認めなかった（表1）。さらに、Iwagamiらは敗血症性ショックを呈した急性腎障害に対して持続式腎代替療法を併用した患者で、PMX治療の効果を検討し、28日死亡率で

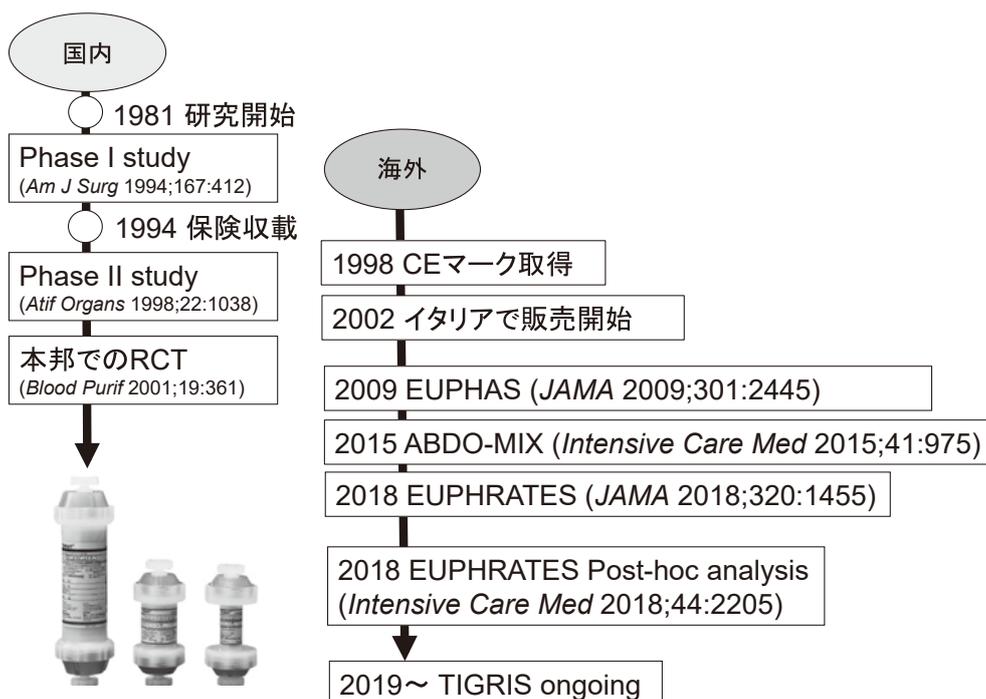


図 2 国内外でのトレミキシンに関連する主なエビデンス

表 1 トレミキシンの海外での大規模ランダム化比較試験の成績

	EUPHAS	ABDO-MIX	EUPHRATES
Trial method	Open-label RCT	Open-label RCT	Double-blind RCT
Country	Italy	France	USA, Canada
Case number	64 (PMX 34, Cont. 30)	232 (PMX 119, Cont. 113)	450 (PMX 224, Cont. 226)
Patients	Severe sepsis/Septic shock after emergency abdominal surgery	Septic shock due to peritonitis after emergency surgery	Septic shock New onset organ dysfunction EAA \geq 0.6, MODS \geq 9
PMX treatment	PMX-2 hr \times 2 (24h interval)		
Primary end-point	Baseline to 72 hours in MAP and vasopressor requirement	28-day mortality	28-day mortality
28-days mortality	PMX 32.4% Cont. 53.3% (Log-rank p=0.03)	PMX 27.7% Cont. 19.5% (p=0.14)	PMX 44.5% Cont. 43.9% (p=0.92)
Other results	MAP and vasopressor requirement, SOFA score at 72 hr significantly improved	No statistical significance in SOFA score variation first 3days, time to withdraw catecholamine	MAP, Ventilator free-day : significantly improved
Cartridge clotting	5.9% (4/68)	11.4% (25/220)	8.0% (17/212)
Reference	JAMA 2009 ; 301 : 2445	Intensive Care Med 2015 ; 41 : 975	JAMA 2018 ; 320 : 1455

は、PMX 治療群 40.2%、標準治療群 46.8%と有意差を認めた(表2)。2017年に発表されたNakamuraらのJSEPTIC DIC registryのデータでは、敗血症性ショックでSOFAの心血管スコアが3以上の症例で、在院死亡率はPMX治療群32.8%、標準治療群41.2%と有意に改善を認めた(表2)。以上の海外でのRCTの結果や国内での大

規模データベースからの臨床研究の結果を踏まえると、敗血症性ショックの症例のなかでも重症度の高い症例がPMX治療の生存への効果が発揮される可能性が示唆される。

1994年の保険収載時の適用条件としては、表1のように、エンドトキシン血症であるものもしくはグラム陰性

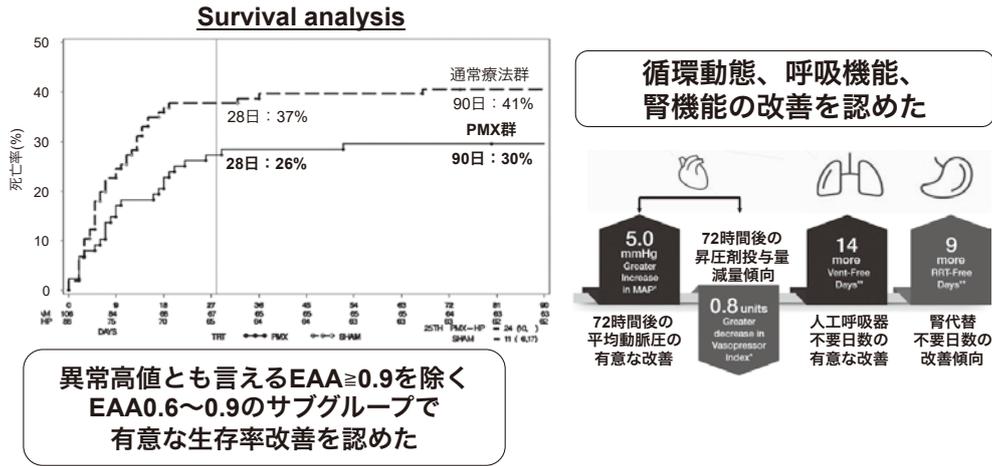


図 3 EUPHRATES 試験の後解析のデータ (Intensive Care Med 2018 ; 44 : 2205-2212)

Toraymyxin use to Information Gather Regarding Its efficacy and Safety for patients with endotoxemic septic shock

Spectral Medical Inc. プレスリリース 2019.2.19

TIGRIS試験のプロトコル

- 登録基準は EUPHRATESに準拠 (患者群はサブグループ解析で有効性が認められた群に準ずる)
条件: EA値: $0.6 \leq EAA < 0.9$, 臓器障害: MODS > 9
- 施設は米国のみ (PMXの使用実績があり高い登録率の施設を選定)
- ランダム化比率 2 : 1 (PMX群100例: 通常治療群50例), Open-label: Shamカラムは用いない
- 主要評価項目 28日後死亡率

試験の見通し

2019年2月: FDAの承認取得 (試験プロトコル)
2019年4~6月: TIGRIS試験 患者登録開始
2020年: 試験終了 FDA申請
2021年: FDA承認取得 北米での販売開始

Spectral Medical Inc. 投資家向け情報を改変 2019.1

図 4 TIGRIS trial (EUPHRATES の追加検討) の概要

表 2 トレミキシンの国内での大規模データベースを用いた臨床研究

Database	DPC (Diagnosis Procedure Combination)	DPC	JSEPTIC DIC registry
Patients	Septic shock with lower gastrointestinal tract perforation	Septic shock + AKI requiring CRRT	Septic shock + Cardiovascular SOFA \geq 3
Statistical Method	Propensity Score Matching		
Patients number	1,180 (590 : 590)	1,956 (978 : 978)	524 (262 : 262)
Mortality	28-day mortality PMX : 17.1% Control : 16.3% (p = 0.696)	28-day mortality PMX : 40.2% Control : 46.8% (p = 0.003)	Hospital mortality PMX : 32.8% Control : 41.2% (p = 0.042)
Other results		Mortality : PMX 2 session < 1 session < control	ICU-free days : Significantly longer in PMX group
Publication	Iwagami et al.(2014) Crit Care Med 42 : 1187-93	Iwagami et al.(2016) Blood Purif 42 : 9-17	Nakamura et al.(2017) Crit Care 21 : 134

表 3 トレミキシンの保険適用条件 (1994~2020 年 3 月)

エンドトキシン選択除去用吸着式血液浄化法は、次のアからウのいずれにも該当する患者に対して行った場合に算定する。

- ア) エンドトキシン血症であるもの又はグラム陰性菌感染症が疑われるもの
- イ) 次の (イ)~(ニ) のうち 2 項目以上を同時に満たすもの (SIRS の基準)
 - (イ) 体温が 38 度以上又は 36 度未満
 - (ロ) 心拍数が 90 回/分以上
 - (ハ) 呼吸数が 20 回/分以上又は PaCO₂ が 32 mmHg 未満
 - (ニ) 白血球数が 12,000/mm³ 以上若しくは 4,000/mm³ 未満又は桿状核好中球が 10% 以上
- ウ) 昇圧剤を必要とする敗血症性ショックであるもの
(肝障害が重症化したもの (総ビリルビン 10 mg/dL 以上かつヘパプラスチンテスト 40% 以下であるもの) を除く。)

吸着式血液浄化用浄化器 (エンドトキシン除去用) は 2 個を限度として算定

SIRS : Systemic Inflammatory Response Syndrome (全身性炎症反応症候群)

表 4 トレミキシンの保険適用条件改訂 (2020 年 4 月~)

【18 歳以上】 次のいずれにも該当する患者

ア エンドトキシン血症が強く疑われる状態であり、次のいずれかの項目に該当するもの。

なお、診療報酬明細書の摘要欄に ① から ③ までのいずれかの要件を満たす医学的根拠について記載すること。

- ① 細菌感染症を疑ってから当該治療が終了するまでに、エンドトキシン選択除去用吸着式血液浄化法の開始前までに行った区分番号「D018」細菌培養同定検査の「3」血液又は穿刺液血液 (血液に限る。) において、グラム陰性桿菌の陽性が確認されている場合。
- ② 細菌感染症を疑ってから当該治療が終了するまでに、他の保険医療機関においてグラム陰性桿菌の感染が疑われ抗菌薬投与が行われていたことが証明されている患者であって、当該医療機関において初回に実施した区分番号「D018」細菌培養同定検査の「3」血液又は穿刺液血液 (血液に限る。) が陰性である場合。
- ③ 細菌感染症を疑ってから当該治療が終了するまでに、当該医療機関において初回に実施した区分番号「D018」細菌培養同定検査の「3」血液又は穿刺液血液 (血液に限る。) が陰性であるものの、グラム陰性桿菌による敗血症性ショックであることが区分番号「D018」細菌培養同定検査の「3」血液又は穿刺液血液 (血液に限る。) 以外の細菌培養同定検査において強く疑われ、日本救急医学会急性期 DIC 診断基準が 4 点以上の場合又はこれに準ずる場合。

イ 次のいずれも満たすもの。なお、診療報酬明細書の摘要欄に ① 及び ② の要件を満たす医学的根拠について記載すること。

- ① 「日本版敗血症診療ガイドライン 2016」に基づき、quick SOFA で 2 項目以上の項目を満たし、敗血症を疑った時から臓器障害評価を行った間で、総 SOFA スコアの 2 点以上の上昇を認めること。
- ② 適切な輸液負荷にもかかわらず、平均血圧 \geq 65 mmHg を維持するために循環作動薬を必要とし、かつ血清乳酸値 $>$ 2 mmol/L (18 mg/dL) を認めること。

菌感染症が疑われる症例で、SIRS の基準を満たし、昇圧剤を必要とする敗血症性ショックの症例である (表 3)。つまり、グラム陰性菌感染症に起因する Sepsis-1 の Septic shock が対象となっていた。

この適用条件は、2020 年 4 月に大幅に変更された。18 歳以上では、日本版敗血症診療ガイドライン (Sepsis-3) の Septic shock の定義を満たす症例で、血液培養などでグラム陰性菌感染が証明されている症例に原則として適用される。血液培養が陰性であっても、血液培養以外の胸水・腹水などの細菌培養でグラム陰性菌感染が強く疑われ、日本救急医学会急性期 DIC 診断基準が 4 点以上である場合が対象となる (表 4)。今回の改訂にて、これまでの対象者より重症患者に適用されることは明白である。現状の国内外のエビデンスから考えると、重症の敗血症性ショックを対象とすることは適切であると考え

る。エンドトキシンを吸着することを目的とした治療器具であるので、グラム陰性菌の感染の確認を求められていることも致し方ないと思える。しかし、エンドトキシン血症を迅速に評価する適切な診断法が本邦には存在しないために、今回の改訂では、グラム陰性菌感染の確認として、血液培養や胸水・腹水などの培養検査が必須項目となっていることが非常に残念である。培養検査は細菌感染の治療を行う上で Gold standard であるが、迅速な治療対応が必要とされる集中治療の場において、PMX 治療の適用の判断基準としては現実的でないと感じる。

今回の改訂によって、治療効果が発揮できる患者に PMX 治療が用いられるようになり、患者生存に寄与できることを期待している。また、PMX 治療適用のコンパニオン診断となるエンドトキシンを評価する適切な臨

床検査が本邦にも導入されることも望まれるところである。

謝 辞

本発表の一部は、科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）基盤研究（C）（一般）課題番号 19K07936, 20K09285 による。

文 献

- 1) 谷徹, 清水智治, 遠藤善裕 : PMX の開発経緯と臨床治験の結果. 日外感染症会誌 4 : 173-179, 2007
- 2) Aoki H, Kodama M, Tani T, et al. : Treatment of sepsis by extracorporeal elimination of endotoxin using polymyxin B-immobilized fiber. *Am J Surg* 167 : 412-417, 1994
- 3) Tani T, Hanasawa K, Endo Y, et al. : Therapeutic apheresis for septic patients with organ dysfunction : hemoperfusion using a polymyxin B immobilized column. *Artif Organs* 22 : 1038-1044, 1998
- 4) Nemoto H, Nakamoto H, Okada H, et al. : Newly developed immobilized polymyxin B fibers improve the survival of patients with sepsis. *Blood Purif* 19 : 361-368, 2001

第2章

令和元年度日本エンドトキシン・
自然免疫研究会奨励賞・最優秀賞

歯周病原細菌に対する自然免疫応答がもたらす慢性炎症と生体バリア破綻

多田 浩之

東北大学大学院歯学研究科口腔分子制御学分野

Periodontal bacteria induce innate immune response, resulting in induction of the chronic inflammation and the mucosal barrier dysfunction

Hiroyuki Tada

Division of Oral Immunology, Tohoku University Graduate School of Dentistry

Abstract

Periodontal disease is one of the major diseases afflicting human beings and is caused by a bacterial infection leading to gingival inflammation, periodontal tissue destruction, alveolar bone loss, and eventually to tooth loss. Chronic periodontitis is one of the major periodontal diseases, and the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* is frequently isolated from diseased sites in the patients with this disease. The major virulence factors produced by *P. gingivalis* induce cysteine proteinases, gingipains. We found that gingipains cleave CD14 on human monocytes and human gingival fibroblasts and ICAM-1 on human gingival epithelial cells, resulting in immune evasion by the bacterium in periodontal tissues. Furthermore, gingipains are capable of inducing the production of proinflammatory molecules, such as IL-33 by human gingival epithelial cells, and IL-31 by human mast cells. *Porphyromonas gingivalis*-induced IL-33 and IL-31 attenuated the production of LL-37, an antimicrobial peptide, and the expression of claudin-1, a tight junction molecule, respectively, in gingival epithelial cells. These findings suggest that IL-33 and IL-31 induced by gingipains resulted in the induction of chronic inflammation and the dysfunction of epithelial barrier. On the basis of our findings, the pathogenicity of gingipains is divided into two phases : (a) the acute inflammation during severe infection, where *P. gingivalis* produces a large amount of gingipains resulting in the proteolytic degradation of the host molecules, and (b) chronic inflammation during mild infection, where *P. gingivalis* produce a small amount of gingipains, resulting in the induction of chronic inflammatory conditions and the consequent impairment of innate immunity.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 7~11, 2020

Key words : 歯周病, *Porphyromonas gingivalis*, ジンジパイン, 慢性炎症, 生体バリア破綻

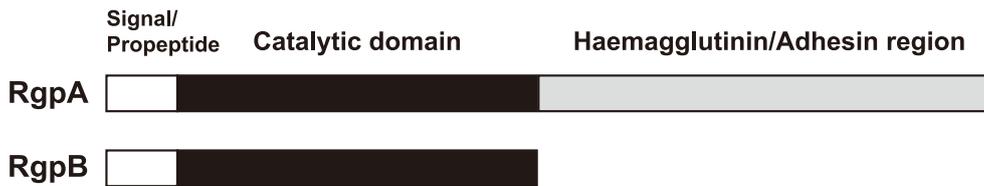
はじめに

歯周病は、口腔に常在する歯周病原細菌による感染症の総称である。歯周病は歯周組織の炎症を主徴とするが、近年は糖尿病、アルツハイマー病、関節リウマチや動脈硬化性疾患など全身疾患の病態形成に影響を及ぼすことが証明されつつあり注目されている。

歯周病は、歯周組織の破壊を伴わない歯肉炎と歯周組織の不可逆的な破壊により歯の喪失に至る歯周炎に大別され、歯周炎は30歳以上の成人が罹患する慢性歯周炎と比較的若年者に好発する侵襲性歯周炎に二分される。ア

メリカ歯周病学会は、2018年に歯周炎の分類から慢性歯周炎と侵襲性歯周炎の別を廃止する改定を行い、歯周組織の破壊度を量的に4段階で評価する“stage”と歯周組織破壊の速度、デンタルプラークバイオフィルムの病原性、全身疾患ならびに喫煙や糖尿病など生活習慣が及ぼす歯周組織破壊の速度にかかわるリスクファクターを3段階で評価する“grade”の2つのカテゴリーを設けた¹⁾。この新たな分類は、歯周病の病態がデンタルプラークバイオフィルムを構成する歯周病原細菌の種類と病原因子、全身疾患、遺伝性疾患ならびに生活習慣などにより修飾されることを受けており、歯周病が通常の感染症と

Gingipain-R (Arg-gingipain, Rgp)



Gingipain-K (Lys-gingipain, Kgp)



図 1 ジンジパインの構造

は異なる複合的な要素で構築されることを示している。

1. 歯周病と歯周病原細菌

口腔細菌叢は出生と同時に定着を始め、口腔内環境や加齢に伴う感染防御能の低下により変遷する。16S rRNA クローニング解析から、ヒト口腔細菌叢は約 1,000 種を超える細菌で構成される²⁾。歯と歯肉の境界に位置する歯肉溝には、1 mg あたり 1 億個を超え約 400 種類から成るデンタルプラークバイオフィルムが局在し、直接的に歯周病とう蝕を引き起こし、間接的に糖尿病、アルツハイマー病、関節リウマチや動脈硬化性疾患など他臓器の病態に影響を及ぼす。

歯周病原細菌のなかで red complex に分類される *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* と *Treponema denticola* の 3 菌種は、重度の慢性歯周炎罹患者に高頻度で検出され³⁾、その病原因子は歯周炎の惹起と進行に大きく影響する⁴⁾。とくにグラム陰性偏性嫌気性桿菌である *P. gingivalis* は、トリプシン様システインプロテアーゼであるジンジパインを始め、リポ多糖 lipopolysaccharide (LPS)、リポタンパク質、線毛や peptidyl arginine deiminase (PAD) など多様なビルレンス因子により自然免疫応答ならびに獲得免疫応答を誘導する⁵⁾。歯周炎の臨床症状はトリプシン様プロテアーゼ活性と相関を示すことから、ジンジパインは本菌の主要な病原因子である。ジンジパインは *P. gingivalis* の総プロテアーゼ活性の少なくとも 85% を占め、宿主タンパク質のアルギニン残基の C 末端側を切断する gingipain-R (Rgp) とリジン残基の C 末端側を切断する gingipain-K (Kgp) に大別される⁶⁾。すべてのジンジパインは signal/propeptide と酵素活性を有する catalytic domain から構成され、さらに RgpA と Kgp は本菌と宿主細胞の接着を担う赤血球凝集/接着活性領域 (haemagglutinin/adhesin region) を持つ (図 1)。*P. gingivalis* は糖分解能を持たず鉄要求性を示すことから、ジンジパインによる宿主タンパク質の分解は本菌の代謝や赤血球からのヘム鉄の摂取に必須となる。歯周炎の臨床経過は、歯周ポ

ケットからの出血ならびに急激な歯肉腫脹を示す急性発作期と、軽微な炎症が長期間持続する慢性期が繰り返され、この反復により歯周組織は徐々に破壊される。急性発作期の歯周ポケットの出血は本菌に格好の発育条件となり、歯周ポケット内のジンジパイン濃度は上昇する。

P. gingivalis は免疫応答を攪乱するという特殊な病原性を示すことから、キーストーン病原体と提唱されている⁷⁾。例えば *Salmonella enterica* serovar Typhimurium のように一般的な細菌感染症では、始めに病原菌自身が増殖し次に病原因子を放出することで疾患が惹起されるのに対し、*P. gingivalis* はジンジパインにより免疫応答を攪乱することで dysbiosis を誘導し疾患を惹起する。

2. ジンジパインによる自然免疫関連分子の分解

2-1. ジンジパインによる CD14 分解と LPS 不応答性の誘導

われわれはジンジパインによる自然免疫応答の攪乱と慢性炎症の誘導について研究に取り組んできた。始めにジンジパインが自然免疫にかかわる宿主分子を破壊する可能性に着目し、ジンジパインはヒト単球やヒト歯肉線維芽細胞の LPS 受容体 CD14 をタンパク分解し、LPS による炎症性サイトカイン産生を喪失させることを見出した^{8,9)}。ジンジパインによる CD14 分解作用には選択性があり、CD14 と同様に GPI アンカー型分子である CD59 や CD157 は分解されず、TLR4 もまた分解を受けなかった。CD14 は LPS、リポタンパク質やリポタイコ酸など多様な菌体成分をパターン認識する受容体であることから、ジンジパインによる CD14 分解は、本菌における自然免疫応答の回避と持続的感染を維持するために必要な戦略と捉えられる。また、ジンジパインはヒト血管内皮細胞の AKT や RIPK1 をタンパク分解し、下流のサイトカイン産生を減弱させることで自然免疫の活性化も抑制させる¹⁰⁾。

2-2. ジンジパインによる ICAM-1 分解と LPS 不応答性の誘導

細胞接着分子や上皮細胞バリアもジンジパインのターゲットとなる。ジンジパインはヒト歯肉上皮細胞に発現する接着分子である ICAM-1 を分解することで ICAM-1-LFA-1 を介する歯肉上皮細胞と好中球の細胞接着を阻害し、好中球の炎症局所への遊走を抑制する¹¹⁾。また、ジンジパインは上皮細胞バリアを担うタイトジャンクション分子の junctional adhesion molecule-1 を分解し、上皮内への LPS 侵入を可能にする¹²⁾。

ジンジパインによる宿主分子群のタンパク分解は、高濃度のジンジパインを要する。つまり、歯周炎の急性発作期において増殖した *P. gingivalis* はジンジパインにより自然免疫の認識回避と上皮バリア破綻を誘導し、持続的な感染へ移行すると考えられる。

3. ジンジパインによる自然免疫におけるアレルギー炎症誘導と生体バリア破綻

3-1. ジンジパインによる歯肉上皮細胞の IL-33 誘導

ジンジパインは宿主分子をタンパク分解する以外に、宿主細胞を活性化させ炎症も誘導する。次に、われわれはジンジパインによるアレルギー炎症の誘導について検討した。アレルギー炎症は、上皮細胞から産生される IL-33、IL-25 ならびに TSLP などが肥満細胞、好酸球や好塩基球などに作用して惹起される¹³⁾。アレルギー炎症を惹起する多くの自然アレルゲンはプロテアーゼ活性を持ち、protease-activated receptors (PARs) を介して細胞を活性化させる。核内に局在する IL-1 ファミリーサイトカイン IL-33 は Th2 型炎症を誘導し、気管支喘息、炎症性腸疾患や慢性関節リウマチなどにおけるアレルギー炎症の誘導にかかわる。ジンジパインは口腔上皮細胞に発現する PAR により認識され¹⁴⁾、歯周炎罹患者の歯肉溝浸出液では PAR-2 mRNA 発現が亢進する¹⁵⁾ことから、PAR-2 発現レベルは歯周炎の炎症症状と相関する。われわれは、慢性歯周炎罹患者の炎症歯肉上皮に IL-33 が発現し、ジンジパイン刺激によりヒト歯肉上皮細胞は IL-33、IL-25 ならびに TSLP 産生することを示した¹⁶⁾。しかしながら、歯肉上皮細胞の IL-33 細胞外放出は微量であり、蛍光免疫染色において IL-33 は *P. gingivails* 刺激により核内から細胞質へ移行したことから、IL-33 は歯肉上皮細胞の生体バリア機能を減弱させる可能性について検討した。その結果、IL-33 は *P. gingivalis* 感染による歯肉上皮細胞からの抗菌ペプチドである LL-37 産生を著明に減弱させることを見出した¹⁷⁾。ジンジパインは LL-37 をタンパク分解するが、唾液存在下では同作用が抑制される¹⁸⁾ことから、ジンジパインによる歯肉上皮細胞の IL-33 誘導は、合目的的に *P. gingivalis* が歯肉上皮細胞の化学的バリアによる排除を逃れるメカニズムと捉えられる。

3-2. ジンジパインによるマスト細胞の IL-31 誘導

慢性歯周炎では炎症歯周組織にマスト細胞が集積するが¹⁹⁾、慢性歯周炎におけるマスト細胞の役割は不明である。われわれは歯周炎マウスモデルを用いた実験から、*P. gingivalis* 口腔感染により歯肉の IL-31 発現が亢進することを見出した²⁰⁾。IL-6 ファミリーサイトカインである IL-31 は、皮膚、肺や腸管などに発現し、Th2 細胞、マスト細胞、単球/マクロファージや樹状細胞などから産生され慢性炎症性疾患の惹起にかかわる²¹⁾。*P. gingivalis* 感染による IL-31 誘導はマスト細胞欠損マウスではみられず、ヒトマスト細胞株を *P. gingivalis* で刺激するとジンジパイン依存的に IL-31 が産生された²⁰⁾ことから、ジンジパインはマスト細胞に IL-31 産生を誘導することが明らかとなった。加えて、歯肉上皮細胞は構成的に IL-31 受容体を発現し、同細胞に IL-31 が作用すると歯肉上皮バリアを構成するタイトジャンクション分子 claudin-1 発現が減弱し、歯肉上皮バリア機能は低下した²⁰⁾。歯肉上皮細胞に *P. gingivalis* を重度 (MOI 1,000) で感染させると、高濃度ジンジパインのプロテアーゼ活性により claudin-1 は分解される²²⁾のに対して、軽度の感染 (MOI 1) では低濃度ジンジパインにより claudin-1 発現は亢進する²⁰⁾。しかしながら、*P. gingivalis* は低濃度ジンジパインでマスト細胞から IL-31 産生を誘導することができ、claudin-1 発現を減弱させ上皮バリア破綻を導く。

これらの知見から、*P. gingivalis* が増殖する急性発作期では歯周ポケット内のジンジパイン濃度が高まり、宿主分子群 (受容体、炎症性サイトカイン、補体や抗体など) はタンパク分解されることで自然免疫応答が攪乱される。一方、*P. gingivalis* 感染が軽度になる慢性期では低濃度のジンジパインにより宿主細胞が活性化され、アレルギー炎症 (IL-33 や IL-31) や neutrophil extracellular traps 誘導など免疫応答を巧妙に操る。その結果、慢性炎症と生体バリア破綻に至ると考える (図 2)。

4. ジンジパインと全身疾患

歯周病原細菌は、糖尿病、アルツハイマー病、関節リウマチや動脈硬化性疾患など他臓器の病態形成に影響を及ぼす報告²³⁾に大きな関心が寄せられている。本稿で個々の詳細は言及できないが、*P. gingivalis* が産生する PAD は関節リウマチを悪化させ、PAD を欠損する *P. gingivalis* では関節リウマチマウスモデルのコラーゲン誘導関節炎における病態悪化がみられない²⁴⁾。他方、アルツハイマー病罹患者の脳にはジンジパインが蓄積し、ジンジパインはタウのタンパク分解による神経細胞障害ならびにアミロイド β 42 生成を誘導する²⁵⁾ことが報告された。加えて、*P. gingivalis* 口腔感染マウスモデルにおける脳へのジンジパイン蓄積は、ジンジパイン阻害薬により抑止されることが示された。アルツハイマー病は根

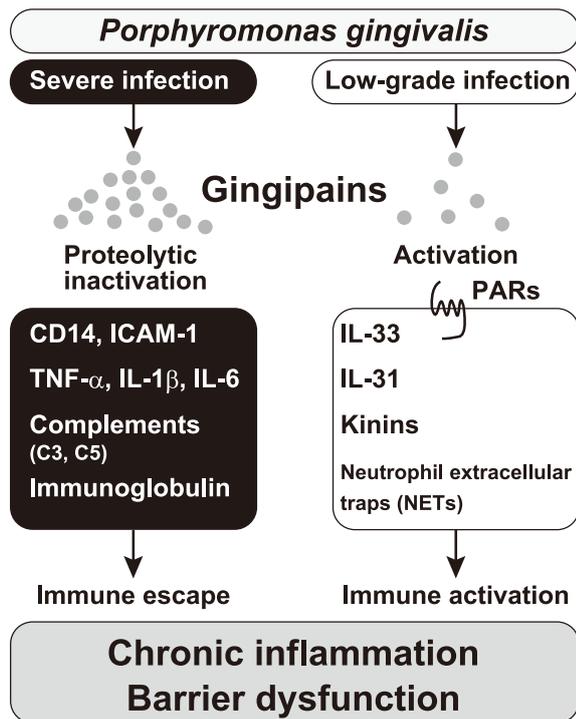


図 2 ジンジパインによる自然免疫応答がもたらす慢性炎症と生体バリア破綻

治的治療薬が無く、エステラーゼ阻害薬の効果は病状進行の遅延に留まることから、ジンジパインは有効な治療ターゲットとなる可能性がある。現在、米国ではアルツハイマー病患者に対するジンジパイン阻害薬の第Ⅱ/Ⅲ相試験が実施されており、将来的に歯周病治療がアルツハイマー病を含む全身疾患の発症予防となる時代の到来が期待される。

おわりに

近年の多くの研究成果により口腔細菌による免疫応答が解明され、歯周病の病態形成に歯周病原細菌の病原因子が深くかかわることが証明された。今後、歯周病原細菌の病原因子がどのように歯周病と全身疾患や生活習慣に双方向的に影響を及ぼすかを解明する必要がある、新たな展開が予測される。歯周病と全身疾患のかかわりが明らかにされることで、今後予知性の高い診断と治療が開発されると考える。

謝辞

第25回日本エンドトキシン・自然免疫研究会において日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞・最優秀賞を受賞するにあたり、受賞対象となった自然免疫に関する一連の研究は多くの研究機関との共同研究により実施されたものであり、さまざまなご助力をいただいた多くの共同研究者の方々に心から感謝する。最後に、ジンジパイン研究に着手する機会を与えていただいた高田春比古博士、菅原俊二博士（東北

大学大学院歯学研究科）ならびに松下健二博士（国立長寿医療研究センター）に深甚なる感謝を捧げる。

文献

- 1) Caton JG, Armitage G, Berglundh T, et al. : A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. J Clin Periodontol 45 : S1-S8, 2018
- 2) Dewhirst FE, Chen T, Izard J, et al. : The human oral microbiome. J Bacteriol 192 : 5002-5017, 2010
- 3) Socransky SS, Haffajee AD : Dental biofilms : difficult therapeutic targets. Periodontol 2000 28 : 12-55, 2002
- 4) Feres M, Teles F, Teles R, et al. : The subgingival periodontal microbiota of the aging mouth. Periodontol 2000 72 : 30-53, 2016
- 5) Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC : Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. Periodontol 2000 52 : 218-237, 2010
- 6) Pike R, McGraw W, Potempa J, et al. : Lysine- and Arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. Isolation, characterization, and evidence for the existence of complexes with hemagglutinins. J Biol Chem 269 : 406-411, 1994
- 7) Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA : The key-stone-pathogen hypothesis. Nat Rev Microbiol 10 : 717-725, 2012
- 8) Sugawara S, Nemoto E, Tada H, et al. : Proteolysis of human monocyte CD14 by cysteine proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* leading to lipopolysaccharide hyporesponsiveness. J Immunol 165 : 411-418, 2000
- 9) Tada H, Sugawara S, Nemoto E, et al. : Proteolysis of CD14 on human gingival fibroblasts by arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* leading to down-regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production. Infect Immun 70 : 3304-3307, 2002
- 10) Barth K, Genco CA : Microbial degradation of cellular kinases impairs innate immune signaling and paracrine TNF α responses. Sci Rep 6 : 34656, 2016
- 11) Tada H, Sugawara S, Nemoto E, et al. : Proteolysis of ICAM-1 on human oral epithelial cells by gingipains. J Dent Res 82 : 796-801, 2003
- 12) Takeuchi H, Sasaki N, Yamaga S, et al. : *Porphyromonas gingivalis* induces penetration of lipopolysaccharide and peptidoglycan through the gingival epithelium via degradation of junctional adhesion molecule 1. PLoS Pathog 15 : e1008124, 2019
- 13) Saenz SA, Taylor BC, Artis D : Welcome to the neighborhood : epithelial cell-derived cytokines license

- innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunol Rev* 226 : 172-190, 2008
- 14) Loubakos A, Potempa J, Travis J, et al. : Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. *Infect Immun* 69 : 5121-5130, 2001
 - 15) Holzhausen M, Cortelli JR, da Silva VA, et al. : Protease-activated receptor-2 (PAR2) in human periodontitis. *J Dent Res* 89 : 948-953, 2010
 - 16) Tada H, Matsuyama T, Nishioka T, et al. : *Porphyromonas gingivalis* gingipain-dependently enhances IL-33 production in human gingival epithelial cells. *PLoS One* 11 : e0152794, 2016
 - 17) Tada H, Shimizu T, Matsushita K, et al. : *Porphyromonas gingivalis*-induced IL-33 down-regulates hCAP-18/LL-37 production in human gingival epithelial cells. *Biomed Res* 38 : 167-173, 2017
 - 18) Gutner M, Chaushu S, Balter D, et al. : Saliva enables the antimicrobial activity of LL-37 in the presence of proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 77 : 5558-5563, 2009
 - 19) Steinvoll S, Halstensen TS, Schenck K : Extensive expression of TGF- β 1 in chronically-inflamed periodontal tissue. *J Clin Periodontol* 26 : 366-373, 1999
 - 20) Tada H, Nishioka T, Takase A, et al. : *Porphyromonas gingivalis* induces the production of interleukin-31 by human mast cells, resulting in dysfunction of the gingival epithelial barrier. *Cell Microbiol* 21 : e12972, 2019
 - 21) Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, et al. : Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol* 5 : 752-760, 2004
 - 22) Groeger SE, Meyle J : Epithelial barrier and oral bacterial infection. *Periodontol* 2000 69 : 46-67, 2015
 - 23) Olsen I, Potempa J : Strategies for the inhibition of gingipains for the potential treatment of periodontitis and associated systemic diseases. *J Oral Microbiol* 6 : 24800, 2014
 - 24) Sakkas LI, Daoussis D, Lioussis SN, et al. : The infectious basis of ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Front Microbiol* 8 : 1853, 2017
 - 25) Dominy SS, Lynch C, Ermini F, et al. : *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains : evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv* 5 : eaau3333, 2019

第3章

令和元年度日本エンドトキシン・
自然免疫研究会奨励賞・優秀賞

敗血症下において脳内に浸潤した T 細胞は敗血症性脳症と うつ様症状の緩和に寄与する

齋藤 雅史¹⁾, 井上 茂亮¹⁾, 藤浪 好寿¹⁾, 大野 雄康¹⁾, 大山 正平²⁾, 小谷 穰治¹⁾

¹⁾神戸大学医学部医学研究科外科系講座災害・救急医学分野先進救命救急医学部門

²⁾同 内科系講座小児科学分野

Infiltrated T cells in the brain contribute to attenuation of sepsis-associated encephalopathy and alleviation of anxiety-like behavior in septic mice

Masafumi Saito¹⁾, Shigeaki Inoue¹⁾, Yoshihisa Fujinami¹⁾, Yuko Ono¹⁾, Shohei Ohyama²⁾, Joji Kotani¹⁾

¹⁾Department of Disaster and Emergency and Critical Care Medicine, Kobe University Graduate School of Medicine

²⁾Department of Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine

Abstract

Emerging data suggest that sepsis survivors frequently experience long-term mental impairment after discharge. This is assumed to be caused by sepsis-associated encephalopathy (SAE); however, the relationship between the onset of long-term mental impairments and SAE is still unclear. In addition, several studies have revealed that the development of mental impairment results in neuroinflammation, which is induced by aberrant activated immune cells, including glial cells and T cells. However, it is still unclear how these immune cells contribute to the pathogenesis and attenuation of SAE. In this study, we performed animal behavioral tests and found that anxiety-like behavior was exacerbated in mice with sepsis. Furthermore, these mice had elevated levels of pro-inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 β in the brain, depending on the severity of sepsis. Interestingly, sepsis induced an increase in microglia and a decrease in astrocytes in mice during the acute/subacute phase; T cell numbers also increased in the brains of mice with sepsis. To investigate how brain-accumulated T cells influence the development of SAE and mental impairments, we treated mice with sepsis with FTY720 to inhibit recruitment. This immunomodulator delayed the recovery of anxiety-like behavior, and the number of astrocytes in the brain remained reduced during the chronic phase of sepsis in mice. Additionally, the expression of *Il1b* in the brains of FTY720-treated mice with sepsis had increased during the chronic phase. Our findings suggest that infiltrated T cells contribute to the attenuation of SAE and alleviate SAE-induced mental disorders by alleviating neuroinflammation in the chronic phase of sepsis.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 12~15, 2020

Key words : 敗血症, 敗血症性脳症, うつ, T 細胞

はじめに

敗血症は、感染に対する制御不能な宿主応答に起因した生命を脅かす多臓器障害と定義される。敗血症はいまだ集中治療において最も死亡率の高い疾患の一つであるものの、先進国における敗血症患者の救命率は改善されている。そのため、敗血症は、患者の救命から長期予後の改善に着目した治療が求められるようになってきた。実際、敗血症患者の長期予後における重篤な認知症や精

神疾患の発症、あるいは運動機能の低下が新たな問題として認知され始めている。敗血症患者を含めた、集中治療を受けた患者に認められるこれらの症状は集中治療後症候群 (Post intensive care syndrome : PICS) と呼ばれており、退院後の患者の生活の質 (Quality of life : QOL) を著しく低下させる¹⁾。とりわけ、敗血症患者は PICS が重篤化することが知られており²⁾、その対策は急務である。

近年、感染症に伴う脳炎が認知症や精神疾患の引き金

齋藤 雅史 神戸大学医学部医学研究科外科系講座災害・救急医学分野先進救命救急医学部門 〒650-0017 兵庫県神戸市中央区楠町 7-5-2

TEL : 078-382-6521 FAX : 078-341-5254 E-mail : msaito@med.kobe-u.ac.jp

となることが示されてきた。敗血症に認められる脳炎は敗血症性脳症 (Sepsis-associated encephalopathy : SAE) と呼ばれ、約 70% の患者に発症する。SAE は敗血症の予後不良因子であることから、適切かつ早期の介入が患者の予後を改善するためには必要不可欠であるが、その詳細な発症機序は不明であり、治療方法は確立されていない。われわれは、SAE の病態形成の解明が敗血症患者に認められる重度の精神疾患や認知症の発症機序解明および治療法の開発に貢献できると考えて、これまで研究を進めてきた。敗血症マウスを用いた研究結果から、われわれは SAE の病態形成やうつ様症状の発症と回復には、脳内で増加する T 細胞が重要であることを明らかにした。本稿では、精神疾患の発症と脳内の免疫細胞の関連性、敗血症時における免疫細胞の動態について概説した後、われわれの研究結果をもとに敗血症に伴ううつ様症状の発症と回復の機序について考察する。

1. 精神疾患の発症と脳内の免疫細胞

1-1. グリア細胞

グリア細胞は脳を構成する細胞群の一つであり、ミクログリア、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトの 3 種類に分類される。近年の研究から、脳内炎症の制御およびうつや不安障害をはじめとした精神疾患の発症機序におけるミクログリアとアストロサイトの重要性が示されている³⁾。ミクログリアは中枢神経系においてマクローファージ様の活性を示す免疫担当細胞であり、Interleukin (IL)-1 β や IL-6, Tumor necrosis factor (TNF)- α などの炎症性サイトカイン産生や貪食活性を示すことで炎症を惹起する。Steiner らの研究によると、うつ病や統合失調症、自閉症スペクトラム症の患者、さらには、自殺者の脳内でミクログリアの過剰な活性化が認められている⁴⁾。ミクログリアの過剰活性はニューロンの細胞死の誘導、正常な神経伝達の阻害、神経新生の傷害など、脳の恒常性維持にさまざまな障害を与える。一方、アストロサイトは最も豊富に存在するグリア細胞であるが、これまで神経細胞への栄養の運搬や脳の構成支持をしている細胞として知られていた。しかし、近年の研究から、この細胞が血液脳関門の維持に寄与することや、神経伝達物質の受容体を多く発現することなどが明らかにされてきており、脳の恒常性維持により本質的に関与すると考えられている。アストロサイトの機能不全は、精神疾患の発症にも関与している。アストロサイトはグリア伝達物質として Adenosine triphosphate (ATP) を産生するが、これは細胞内の Ca²⁺ 依存的シグナルにより産生される。慢性ストレスの曝露により作製されたうつ病モデルマウスは対照群と比較して脳中の ATP 量は約 1/3 であることが示され、それは、ATP を腹腔内あるいは脳室から投与することでうつ様症状の改善が認められている⁵⁾。また、うつ病患者や自殺者の前

頭葉におけるこの細胞の減少が認められており、アストロサイトが精神疾患の病態形成において重要な役割を果たすことが示されている。

1-2. リンパ球

リンパ球には大別すると T 細胞と B 細胞があるが、これらの細胞と脳内炎症、あるいは精神疾患との関連性を示した研究は少ない。近年、アルツハイマー病などの神経変性疾患の患者における精神疾患の発症に、脳内に浸潤した病原性 CD8⁺ T 細胞の関与が示唆されている⁶⁾。また、脳梗塞モデルマウスを用いた研究においては、慢性期の不安様行動の回復に脳内に浸潤した制御性 T 細胞が寄与していることが報告されている⁷⁾。このように、脳内に浸潤した T 細胞は疾患の時期やそのフェノタイプによって病態形成における役割が異なる可能性がある。

2. 敗血症時における脳内での免疫細胞の動態

では、敗血症罹患時、免疫細胞は脳内においてどのような挙動を示すのだろうか？ 敗血症において脳は最も早くダメージを受ける臓器の一つであることから、SAE は罹患後かなり早期に起こっていることが推測される。実際、敗血症モデルマウスを用いた研究において、発症から 24 時間以内で血液脳関門が崩壊し、末梢血中の好中球や炎症性単球の脳内への浸潤が認められている。SAE の主要病態である神経炎症はこれらの細胞により惹起されると考えられており⁸⁾、神経細胞やグリア細胞のアポトーシスを誘導する一方で、ミクログリアやアストロサイトを活性化し、脳内での炎症応答をさらに充進する。この結果、脳の恒常性が失われることとなる。

敗血症におけるミクログリアの過剰な活性化は、SAE の病態形成、さらには認知機能障害やうつ病の発症に致命的な役割を成すことが明らかにされている。抗菌薬の一種であるミノサイクリンは、*in vitro*, *in vivo* レベルでミクログリアの活性を抑制することが知られている。敗血症モデルラットにミノサイクリンを投与することで、脳内の炎症性サイトカインレベルの低下および血液脳関門の維持が認められ、さらには長期の認知機能の低下やうつ様症状が改善されることが報告されている⁹⁾。また、近年の研究から、ミクログリアに発現する CX3C chemokine receptor 1 (CX3CR1) の遺伝子変異が統合失調症などの精神疾患の発症に関連することが示された。ミクログリアは CX3CR1 を介してニューロンとコミュニケーションをとっており、CX3CR1 ノックアウトマウスに lipopolysaccharide を投与したエンドトキシンショックモデルを用いた研究では、うつ様症状の増悪が認められている¹⁰⁾。

敗血症に罹患すると末梢における T 細胞が減少することはよく知られており、また、ヘルパー T (Th) 細胞のバランスが崩れることも明らかにされている。しかし

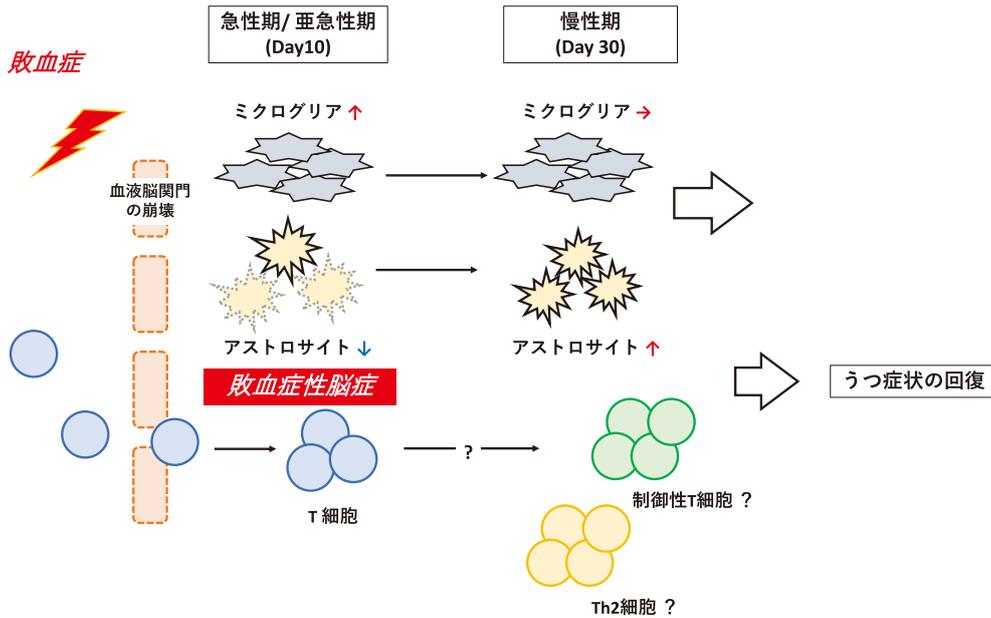


図 1 敗血症性脳症およびうつ様症状の発症と回復のメカニズムにおける T 細胞の役割

敗血症による脳炎は、罹患後、早い段階で認められ、脳の恒常性を破壊する。敗血症モデルマウスの脳において、敗血症重症度依存的に炎症性サイトカインの増加が認められ、マイクログリアの増加とアストロサイトの減少が認められた。また、脳内に T 細胞の増加も認められた。この T 細胞は、敗血症罹患から経過時間的に増加した。FTY720 の投与により、脳内への T 細胞の浸潤を阻害すると、マウスのうつ様症状の回復は遅れた。すなわち、脳内に浸潤した T 細胞は、敗血症性脳症により誘発されるうつ様症状の回復に寄与していると示唆された。

ながら、SAE の病態形成や、それに起因したうつ様症状、あるいは認知障害の発症に対する T 細胞の役割について調べた研究は極めて少ない。

3. 脳内に浸潤した T 細胞が敗血症性脳症およびそれに伴う不安様症状の回復に果たす役割

上記からも分かるように、SAE における T 細胞の役割はほとんど分かっていない。そこで、われわれは T 細胞が SAE の病態形成およびそれに伴う不安様症状の発症にどのような影響を与えるか検討するため、敗血症マウスモデルを用いて研究を進めてきた。これまでの研究から、敗血症を誘導して 10 日目において、敗血症の重症度依存的にマウスの脳中の T 細胞数の増加が認められ、また、炎症性サイトカインの増加が認められた (投稿中)。同時に、敗血症マウスにおいてマイクログリアの増加とアストロサイトの減少が認められ、これはヒトのうつ病患者と類似した特徴であった。このマウスの不安様行動は、敗血症誘導から 1 カ月程度で回復した。この結果から、われわれは脳内で増加した T 細胞が敗血症後の不安様行動の回復に寄与していると考え、脳へのリンパ球の浸潤を阻害するために、敗血症マウスに対して FTY720 を投与した。その結果、敗血症を誘導して 30 日目において、FTY720 を投与した敗血症マウスの不安様行動の回復が遅延し、なおかつ、脳内の炎症も遷延して

いた (投稿中)。さらに、FTY720 を投与した敗血症マウスではアストロサイトは減少したままであり、マイクログリアにおける CX3CR1 発現も減少していた (投稿中)。以上の結果から、敗血症の慢性期において脳内に浸潤した T 細胞は、アストロサイトの回復に寄与し、脳の恒常性を回復することで、敗血症マウスの不安様行動の改善に寄与したと考えられた (図 1, 投稿中)。

おわりに

SAE の病態形成や回復における T 細胞の役割についての研究は、まだ始まったばかりである。FTY720 は Sphingosine-1-phosphate receptor 依存的に作用するため、T 細胞と B 細胞の両方の体内循環を阻害する。よって、SAE 後のうつ様症状の回復に B 細胞も寄与している可能性が示唆される。また、T 細胞が脳内炎症の抑制に寄与したことから、制御性 T 細胞ないしは Th2 細胞であることが予測された (図 1, 投稿中)。今後は、敗血症モデルマウスの脳内で増加した T 細胞の表現型を明らかにする必要がある。さらに、興味深いことに敗血症下においてアストロサイトが増減することが示された。FTY720 の投与試験の結果から、脳内に浸潤した T 細胞が減少したアストロサイトの回復を促すことが示唆され、今後は、T 細胞とアストロサイトのクロストークに興味をもたれる。

先述したように, SAE は敗血症患者の予後不良因子であることから早期の適切な介入が必要である。SAE の病態形成および回復における T 細胞の役割を明らかにすることで, 敗血症患者の長期予後の改善に貢献したい。

文 献

- 1) Inoue S, Hatakeyama J, Kondo Y, et al. : Post-intensive care syndrome : its pathophysiology, prevention, and future directions. *Acute Med Surg* 6 : 233-246, 2019
- 2) Prescott HC, Angus DC : Enhancing Recovery From Sepsis : A Review. *JAMA* 319 : 62-75, 2018
- 3) Rial D, Lemos C, Pinheiro H, et al. : Depression as a glial-based synaptic dysfunction. *Front Cell Neurosci* 9 : 521, 2016
- 4) Steiner J, Gos T, Bogerts B, et al. : Possible impact of microglial cells and the monocyte-macrophage system on suicidal behavior. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12 : 971-979, 2013
- 5) Cao X, Li LP, Wang Q, et al. : Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors. *Nat Med* 19 : 773-777, 2013
- 6) Gate D, Saligrama N, Leventhal O, et al. : Clonally expanded CD8 T cells patrol the cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Nature* 577 : 399-404, 2020
- 7) Ito M, Komai K, Mise-Omata S, et al. : Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery. *Nature* 565 : 246-250, 2019
- 8) Andonegui G, Zelinski EL, Schubert CL, et al. : Targeting inflammatory monocytes in sepsis-associated encephalopathy and long-term cognitive impairment. *JCI Insight* 3 : e99364, 2018
- 9) Michels M, Vieira AS, Vuolo F, et al. : The role of microglia activation in the development of sepsis-induced long-term cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 43 : 54-59, 2015
- 10) Corona AW, Huang Y, O'Connor JC, et al. : Fractalkine receptor (CX3CR1) deficiency sensitizes mice to the behavioral changes induced by lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation* 7 : 93, 2010

第4章

シンポジウム

「エンドトキシン研究：ベンチサイドと
ベッドサイドからのメッセージ」

糞便懸濁液投与方法を用いた早産児マウス敗血症 モデルの作成と臨床課題への応用

藤岡 一路

神戸大学医学部附属病院総合周産期母子医療センター小児科

The current status of application of preterm sepsis mouse model to elucidate the clinical questions

Kazumichi Fujioka

Department of Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine

Abstract

Recently, a cecal slurry (CS) method was established by Wynn JL, in which a fecal suspension (CS) was prepared from contents of the appendix of adult mice and intraperitoneally administered to the subject mice. In addition, by creating and storing a large amount of CS preservation solution at once following the method reported by Starr ME, the experimental reproducibility of CS model has been improved.

We have applied these techniques to 4-day old newborn mice and created preterm sepsis mouse model. We believe that CS model is the best solution for modeling neonatal sepsis in the condition comparing between same-age newborn pups. In this paper, the current status of our application of this model to elucidate clinical questions will be outlined.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 16~21, 2020

Key words : 早産児, 敗血症, 新生児敗血症, モデルマウス, 敗血症モデル, Cecal Slurry (CS)

はじめに

新生児敗血症は、全身性の細菌感染と続発する多臓器不全を本態とする予後不良疾患である。その病態は、感染侵襲への免疫応答の破綻を主とし、生後に獲得する獲得免疫のみならず、先天的に備わった自然免疫まで未熟な早産児においては、高い致死率・後遺症発症率を認める。一方、新生児敗血症の治療としては、いまだ抗菌薬を中心とした支持療法が主体であり、この致命的感染症の新規治療法の開発は喫緊の課題である¹⁾。しかしながら、治療法開発に欠かせないモデル動物に関しては、生後早期の新生児マウスに対して盲腸結紮穿刺 (Cecal ligation puncture : CLP) モデルを応用することは侵襲性の観点から不可能であり、近年まで早産児敗血症の病態を模するマウスモデルは確立されていなかった²⁾。

著者は、2013~2016年にかけて新生児黄疸の新規治療法の開発を研究テーマとして、米国スタンフォード大学の David Stevenson 研究室に留学したが、その期間を通

じて日齢3~7の新生児マウスに対し、薬剤を腹腔内、皮下、胃内などさまざまな経路で投与する実験に従事した。当初の研究課題である「ヘムオキシゲナーゼ (HO) 制御を介したビリルビン産生抑制」に関しては、ZnPP-Lipid という薬剤が、内服可能な、副作用の乏しい、短時間作用型の HO 阻害薬であり、新生児黄疸治療薬として有望であることを明らかにすることができた³⁾。しかしながら、アフリカなど途上国と異なり、日本では新生児黄疸は通常的新生児集中治療および LED 機器を用いた光線療法により治療可能な疾患であり⁴⁾、臨床的有用性の観点からは当該研究の意義を見出しづらい状況であった。そのような最中の2014年末に、2007年に James Wynn らが発表した糞便懸濁液投与方法による敗血症モデルマウス作成に関する論文を偶然目にする機会があった。これは、成獣マウスから摘出した虫垂内容物から糞便懸濁液 (Cecal Slurry : CS) を作成し、腹腔内投与することで腹膜炎性敗血症を誘導するモデルであり、5~7日齢の新生児マウスにおける新生児敗血症モデルの作成

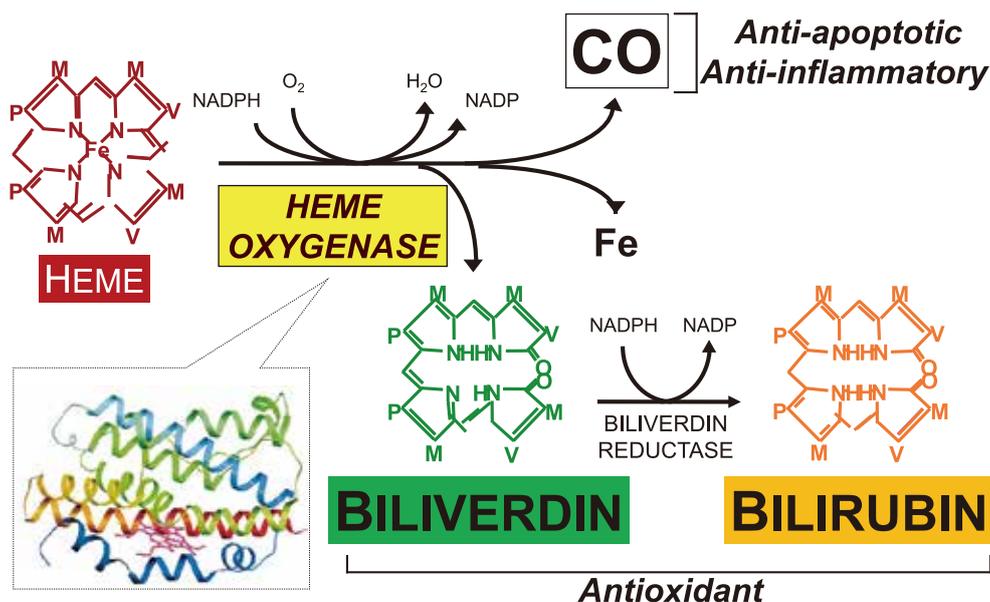


図 1 Heme 代謝経路と Heme Oxygenase の働き

が報告されていた⁵⁾。そこで、本法に加えて自らの慣れ親しんだ新生仔マウスへの注射手技を応用すれば、より幼弱な早産児相当のマウス（日齢 3~4）においても敗血症モデルが作成できるのではないかと考えた。さらに幸運なことに、ちょうど同時期の 2014 年 12 月に、Hiroshi Saito らのグループによって新たな CS 保存法が報告され、長期間（~6 カ月）の CS 冷凍保存が可能となった⁶⁾。以上の経緯により、CS 法を用いた早産児マウス敗血症モデルの確立に至った。本モデルの作成方法に関しては、過去に複数の総説で解説済みであるため詳細は別稿に譲る^{7~9)}。

1. 早産児マウス敗血症モデルにおける Heme Oxygenase-1 誘導療法の保護効果

前述の新生児黄疸治療の開発研究において、3 日齢の新生仔マウスに Heme を皮下投与して作成する新生児溶血性黄疸モデルマウスを用いていたが、Heme によって誘導される Heme 代謝の律速段階酵素である HO の誘導型アイソフォームである HO-1 は、ストレス応答蛋白であり、ストレス環境下において多様な組織保護作用を発揮することが知られていた（図 1）¹⁰⁾。また、新生児慢性肺疾患、新生児壊死性腸炎などの動物モデルにおいては、HO-1 の保護効果がすでに報告されていた¹¹⁾。一方、早産児敗血症における HO-1 の働きに関する報告は認めなかったため、本敗血症モデルに対する薬物治療実験の手始めとして、Heme を用いた HO-1 誘導の敗血症保護効果を検討することにした。

方法は、HO-1 誘導薬である Heme (30 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) または Vehicle (Veh) を、3 日齢の野生型マウスに皮下投与し、24 時間後（4 日齢）に CS 法により敗血症を誘導

し（H-CS 群）、敗血症重症度を敗血症単独群（CS 群）と比較検討した（図 2）。結果として、Heme による薬物的 HO-1 誘導は、敗血症死亡率を改善させ（図 3）、末梢血好中球を増加させ、体重増加率を改善させ、脾臓細菌数を有意に減少させることが明らかになった。また、薬物的 HO-1 誘導により、敗血症により誘導される炎症性サイトカインおよび免疫関連遺伝子発現を有意に抑制することができた^{9,12)}。また HO-1 のヘテロノックアウトマウスを用いた実験を行い、恒常的に HO-1 発現の低下している状態においては、敗血症死亡率が増加することも明らかにした¹³⁾。

一方で本研究課題の臨床応用に向けては、HO-1 誘導薬として用いた Heme は、体内に過剰蓄積された場合 Fenton 反応を介してヒドロキシラジカルを産生するため、酸化ストレスの影響が危惧される点など、克服すべき課題が山積していた。

2. 早産児マウス敗血症モデルにおけるヒトリコンビナントトロンボモジュリン（rh-TM）の保護効果

そこで留学から帰国後は、実臨床で使用可能な薬剤や、臨床現場で日常的に経験する病態の研究を行うことを指向した。帰国後、治療候補薬剤の検討を行っていたところ、HO-1 の敗血症保護効果に Thrombomodulin の発現上昇が関与するとの論文に行き当たり¹⁴⁾、DIC 治療薬として臨床応用されていたヒトリコンビナントトロンボモジュリン（rh-TM）を敗血症治療薬として用いるという計画を着想した。幸いなことに旭化成より原末提供の許諾が得られたため、rh-TM を用いた検討を開始することにした。

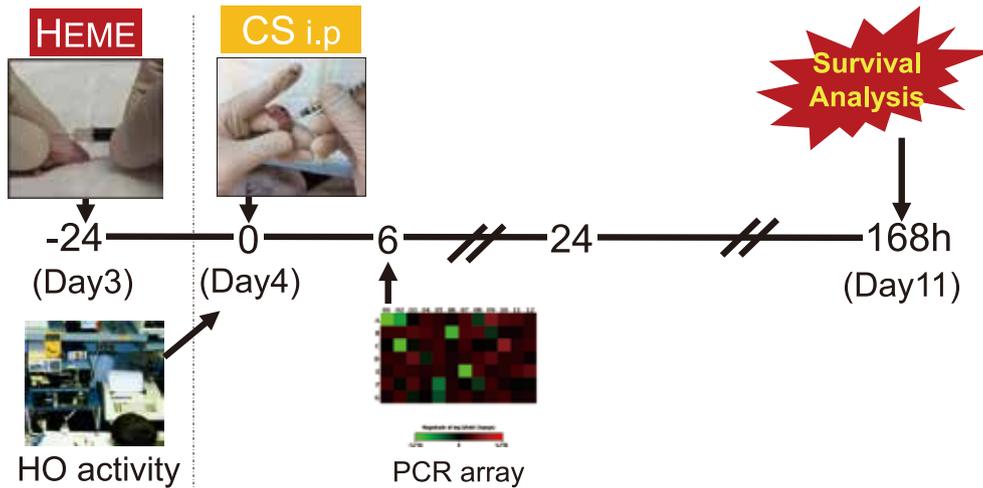


図 2 HO-1 誘導実験のプロトコール

3日齢マウスにHO-1誘導薬のHeme (30 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) を皮下投与した上で、24時間後(4日齢)に敗血症を作成する。

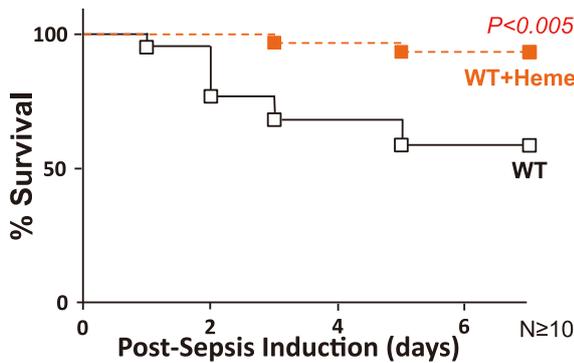


図 3 HO-1 誘導実験の生存曲線 (文献¹²⁾より引用改変)

rh-TM は、抗凝固・抗炎症作用を有し、敗血症治療薬として合目的な薬理作用を有することに加えて、実際に、DICを伴う成人敗血症患者において敗血症死亡率および呼吸機能障害を改善したとの報告がすでに存在した¹⁵⁾。また、成獣敗血症モデルマウスにおいて、rh-TMが炎症性サイトカインおよびHMGB-1産生を抑制し、敗血症死亡率を改善したとの報告もあった¹⁶⁾。そこで、以下の方法で本敗血症モデルに対するrh-TMの保護効果を検討した。

まず、rh-TMの投与経路・タイミングについて検討した。新生仔マウスにおいては静脈ルート確保が困難であることから、皮下投与を選択することとした。旭化成からrh-TMの血中動態シミュレーションデータの提供を受けて、皮下投与における至適投与量・タイミングを検討した結果、既報の動物モデルにおけるrh-TM静注投与と同等の血中濃度を得るためには、皮下投与では3倍量を敗血症誘導6時間前に投与する必要があることがわかった。そこで、4日齢マウスに対して敗血症誘導の6時間前にVehまたはrh-TM 3 mg/kgまたは10 mg/kg

を皮下投与し、CS法により敗血症を誘導し、生存率を比較検討することにした(図4)。結果は、Veh群(21%, $n=11$)と比較してrh-TM 3 mg/kg投与群(53%, $n=17$)では有意に生存率が改善した一方、rh-TM 10 mg/kg群(0%, $n=16$)では有意に生存率が低下した(図5)¹⁷⁾。rh-TM 10 mg/kgで生存率が低下した原因として、外表所見の観察からは死亡個体で多くの腹腔内出血を認め、凝固障害の併発が示唆された。

以上より、臨床的観点からは、rh-TMはヒト早産児の敗血症においても効果が期待されるが、使用にあたっては抗凝固作用への配慮が必要であると思われる。

3. 早産児マウス敗血症モデルにおけるストレス誘導性高血糖に対するインスリン療法

前述の実験において呼吸循環動態の評価目的に敗血症誘導後のマウスの血液ガス分析を行っていたところ、敗血症群において高い再現性をもって著明な高血糖を認めることに気づいた。そこで、本モデルにおいて経時的に血糖測定を行っていくと、敗血症誘導3時間後にピークをとる一過性の高血糖を呈することが明らかとなり、これはヒト敗血症患者におけるストレス誘導性高血糖を反映しているものと考えた(図6)。

ストレス誘導性高血糖は、一般に成人敗血症の合併症として広く認知されている一方¹⁸⁾、新生児とりわけ早産児の敗血症においても著明な高血糖がしばしば経験される¹⁹⁾。しかし、成人の敗血症ガイドラインにおいては高血糖の是正が推奨されているが²⁰⁾、新生児敗血症においてはエビデンスがなく、またヒト早産児に対する厳格な血糖コントロールは低血糖リスクを増加させるとの報告もあり²¹⁾、新生児敗血症に対するインスリン療法の是非は不明であった。そこで、本モデルを用いて早産児敗血

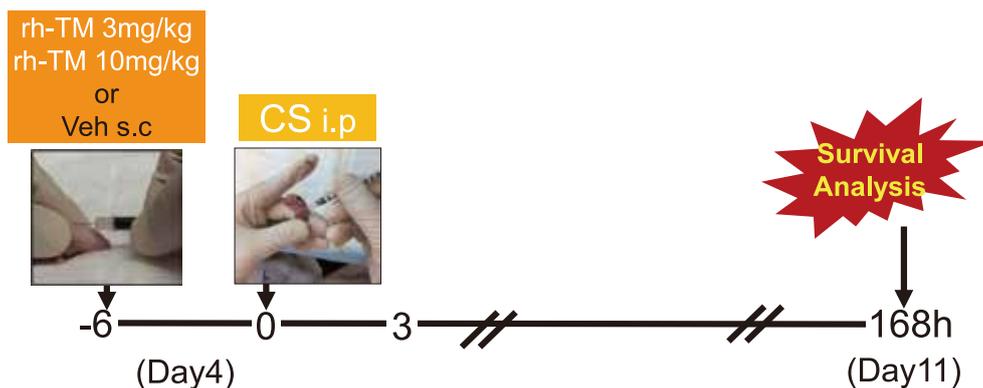


図 4 rh-TM 投与実験のプロトコール

4日齢マウスに rh-TM (3 or 10 mg/kg) または Vehicle を皮下投与した上で、6時間後に敗血症を作成する。

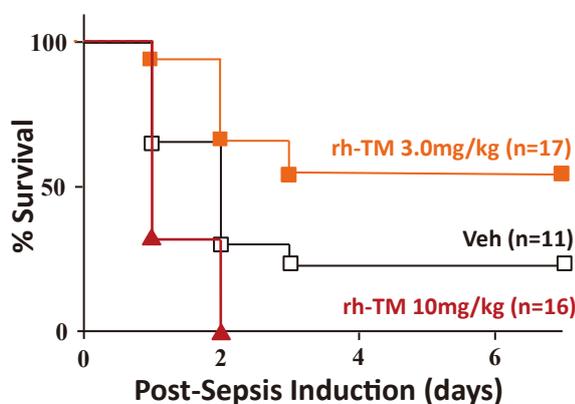


図 5 rh-TM 投与実験の生存曲線(文献¹⁷⁾より引用改変)

症におけるストレス誘導性高血糖に対するインスリン療法の保護効果について検討することを着想した。

まず、4日齢マウスにおいて敗血症誘導3時間後の高血糖を抑制するインスリン量を決定する目的で、超速効型インスリン製剤であるノボラピッドを1~20単位/kgの用量で、敗血症誘導と同時に皮下投与して、3時間後に血糖測定を行った。その結果、敗血症誘導3時間後の血糖値はインスリン投与量依存性に低下を認めた。ただし、インスリン10単位、20単位/kg投与群では明らかな低血糖を認めたため、以降の生存率評価はインスリン1単位、5単位/kgを用いて行うこととした(図7)。

生存率評価の結果は、敗血症単独群の61%と比較して、インスリン1単位/kg投与群では50%と改善なく、インスリン5単位/kg投与群では22%と有意な悪化を認めた(図8)²²⁾。また、インスリン投与後の各群における血糖値推移については、5単位/kg投与群において敗血症誘導6時間後以降に明らかな低血糖傾向を呈し、これが有意な生存率の悪化の原因となったと考察した(表1)。

以上の結果より、臨床的観点からは、早産児における敗血症時の高血糖は、免疫応答や脳活動のエネルギー源

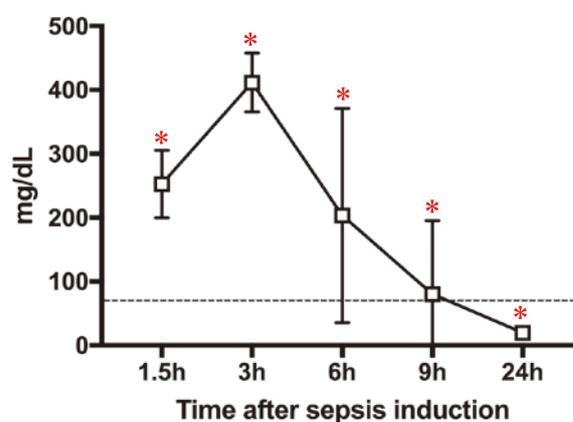


図 6 早産児マウス敗血症モデルの血糖推移(文献²²⁾より引用改変)

* ; P<0.01, vs control.

として保護的に働いている可能性があり²³⁾、積極的なインスリン治療は不要なのではないかと考えた。

結 語

われわれの確立した早産児マウス敗血症モデルの臨床課題への応用につき、現在までの進捗状況につき概説した。今後も本モデルの活用により、早産児敗血症の病態解明および新規治療法開発の展開に貢献したい。

謝 辞

CS法を用いた敗血症モデルマウスの作成に関して貴重なご助言を頂いたUniversity of Florida, James L. Wynn先生、University of Kentucky, Hiroshi Saito先生、本研究の全般にわたり御指導頂いたStanford University School of Medicine, Ronald J. Wong先生、David K. Stevenson教授に深謝します。また、動物実験の実務を担ってくれた神戸大学小児科の芦名満理子助教、小児外科の宮内玄徳大学院生に感謝しています。

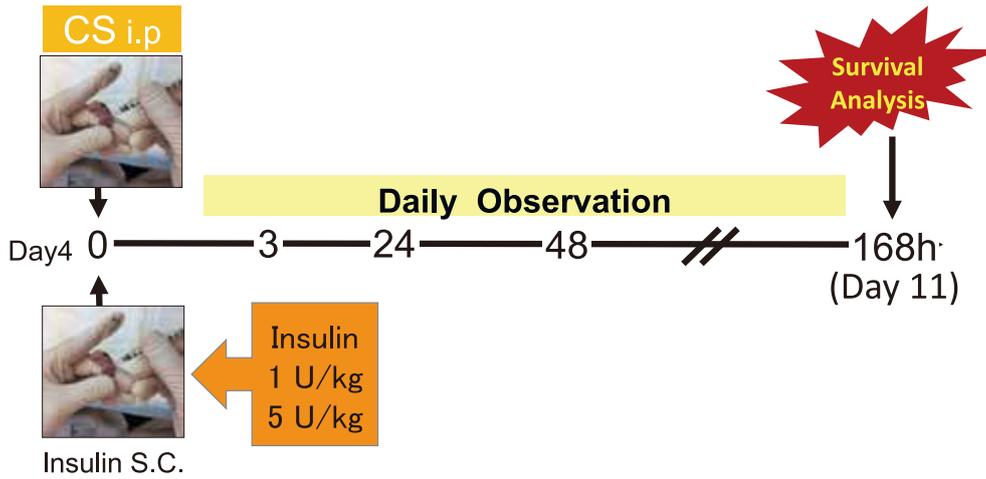


図 7 インスリン投与実験のプロトコール

4日齢マウスの敗血症誘導時に、インスリン (1 or 5 U/kg) を皮下投与し生存率を比較する。

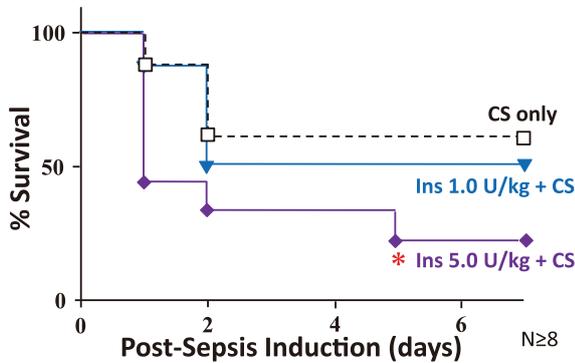


図 8 インスリン投与実験の生存曲線 (文献²²⁾より引用
改変)

* : P<0.05, vs CS 単独

本研究は、小児医学研究振興財団 日本イーライリリー海外留学フェローシップ、上原記念生命科学財団 リサーチフェローシップ、文部科学省科学研究費補助金、神緑会 研究助成金、母子健康協会 小児医学研究助成の助成を受けて行われた。

文 献

- 1) Wynn JL, Wong HR : Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. Clin Perinatol 37 : 439-479, 2010
- 2) Fujioka K, Kalish F, Zhao H, et al. : Induction of Heme Oxygenase-1 Attenuates the Severity of Sepsis in A Non-Surgical Preterm Mouse Model. Shock 47 : 242-250, 2017
- 3) Fujioka K, Kalish F, Wong RJ, et al. : Inhibition of heme oxygenase activity using a microparticle formulation of zinc protoporphyrin in an acute hemolytic newborn

表 1 インスリン投与実験の血糖推移

Group	1.5 h (mg/d)	3 h (mg/d)	6 h (mg/d)	9 h (mg/d)
Basal levels	72 ± 14 (13)			
CS-only	253 ± 53 * *	412 ± 46 * *	203 ± 168	80 ± 115 *
CS+Ins1	146 ± 37 * *, ##	277 ± 134 * *, #	279 ± 148	115 ± 154
CS+Ins5	115 ± 38 * *, ##	159 ± 24 * *, ##	84 ± 49	41 ± 25 * *

CS-only : cecal slurry (CS) 3.0 mg/kg body weight (bw) treated group, CS+Ins1 : CS 3.0 mg/kg bw + Insulin 1 U/kg bw treated group, CS+Ins5 : CS 3.0 mg/kg bw + Insulin 5 U/kg bw treated group.

* p<0.05, * * p<0.01, vs basal levels.

##p<0.05, ###p<0.01 vs CS-only group at each timepoint.

- mouse model. *Pediatr Res* 79 : 251-257, 2016
- 4) 阿部真也, 森本紗代, 藤岡一路 : 【新生児医療 67 の臨床手技とケア タイミング, 流れ&コツ, 評価まで見える】(第3章) 新生児ケアの手技 (6 節) 検査, 治療時のケア 黄疸計の使い方と光線療法. with NEO (2019 秋季増刊) : 254-260, 2019
 - 5) Wynn JL, Scumpia PO, Delano MJ, et al. : Increased mortality and altered immunity in neonatal sepsis produced by generalized peritonitis. *Shock* 28 : 675-683, 2007
 - 6) Starr ME, Steele AM, Saito M, et al. : A new cecal slurry preparation protocol with improved long-term reproducibility for animal models of sepsis. *PLoS One* 9 : e115705, 2014
 - 7) 藤岡一路 : 早産児マウス敗血症モデルの作成. *Shock* 31 : 17-21, 2017
 - 8) 藤岡一路 : Cecal Slurry 法を用いた早産児マウス敗血症モデルの利点と課題. *Shock* 33 : 28-33, 2019
 - 9) 藤岡一路 : 早産児敗血症においてヘムオキシゲナーゼ-1 が果たす役割の解明. *神緑会誌* 33 : 61-64, 2017
 - 10) Maines MD : Heme oxygenase : function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 2 : 2557-2568, 1988
 - 11) Schulz S, Wong RJ, Jang KY, et al. : Heme oxygenase-1 deficiency promotes the development of necrotizing enterocolitis-like intestinal injury in a newborn mouse model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304 : G991-G1001, 2013
 - 12) Fujioka K, Kalish F, Zhao H, et al. : Induction of Heme Oxygenase-1 Attenuates the Severity of Sepsis in a Non-Surgical Preterm Mouse Model. *Shock* 47 : 242-250, 2017
 - 13) Fujioka K, Kalish F, Zhao H, et al. : Heme oxygenase-1 deficiency promotes severity of sepsis in a non-surgical preterm mouse model. *Pediatr Res* 84 : 139-145, 2018
 - 14) Kang K, Nan C, Fei D, et al. : Heme oxygenase 1 modulates thrombomodulin and endothelial protein C receptor levels to attenuate septic kidney injury. *Shock* 40 : 136-143, 2013
 - 15) Ogawa Y, Yamakawa K, Ogura H, et al. : Recombinant human soluble thrombomodulin improves mortality and respiratory dysfunction in patients with severe sepsis. *J Trauma Acute Care Surg* 72 : 1150-1157, 2012
 - 16) Nagato M, Okamoto K, Abe Y, et al. : Recombinant human soluble thrombomodulin decreases the plasma high-mobility group box-1 protein levels, whereas improving the acute liver injury and survival rates in experimental endotoxemia. *Crit Care Med* 37 : 2181-2186, 2009
 - 17) Ashina M, Fujioka K, Nishida K, et al. : Recombinant human thrombomodulin attenuated sepsis severity in a non-surgical preterm mouse model. *Sci Rep* 10 : 333, 2020
 - 18) Xiu F, Stanojic M, Diao L, et al. : Stress hyperglycemia, insulin treatment, and innate immune cells. *Int J Endocrinol* 2014 : 486403, 2014
 - 19) Ahmad S, Khalid R : Blood glucose levels in neonatal sepsis and probable sepsis and its association with mortality. *J Coll Physicians Surg Pak* 22 : 15-18, 2012
 - 20) Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. : Surviving Sepsis Campaign : International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock : 2016. *Crit Care Med* 45 : 486-552, 2017
 - 21) Alsweiler JM, Harding JE, Bloomfield FH : Tight glycaemic control with insulin in hyperglycemic preterm babies : a randomized controlled trial. *Pediatrics* 129 : 639-647, 2012
 - 22) Miyauchi H, Fujioka K, Okubo S, et al. : Insulin Therapy for Hyperglycemia in Neonatal Sepsis Using a Preterm Mouse Model. *Pediatr Int* 62 : 581-586, 2020
 - 23) Marik PE, Bellomo R : Stress hyperglycemia : an essential survival response! *Crit Care Med* 41 : e93-94, 2013

Endotoxin Activity Assay 異常値症例の検討

田中 智基

滋賀医科大学医学部附属病院救急集中治療部

The abnormally high levels of endotoxin activity assay in septic patients

Tomoki Tanaka

Shiga University of Medical Science Hospital

Abstract

Rates of mortality due to sepsis remains high. Endotoxin is the cell wall of gram negative bacteria and it is one of the most major mediators of inflammation in sepsis. Therefore, the measurement of endotoxin in blood is important to select clinical treatment for sepsis/septic shock patients. The standard assay for determination of endotoxin has been the limulus amoebocyte lysate assay. However, some reports founded that the usefulness of this assay was limited. Endotoxin activity assay (EAA) is another method for measurement of endotoxin levels in blood. Some studies reported that EAA had a significant correlation with mortality, severity and other biomarkers. Moreover, the EUPHRATES trial showed the possibility that EAA had an usefulness for selecting responsive patient population to PMX-DHP. However, it remains unclear whether EAA is useful for septic patients and we need more research to evaluate its potential. This report serves to present the available knowledge concerning EAA while referencing to previous reports and data from our intensive care units.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 22~27, 2020

Key words : EAA, PMX-DHP, DIC, 敗血症

はじめに

敗血症の病態は「感染に対する制御不能な宿主応答により、生命を脅かすような臓器障害を引き起こした状態」と定義されている。この反応を引き起こす物質として病原微生物由来の Pathogen-associated molecular pattern があり、そのひとつとしてグラム陰性菌の細胞壁成分であるエンドトキシン Lipopolysaccharide (LPS) がある。臨床現場で病態把握やエンドトキシン吸着療法 polymyxin B-immobilized fiber column direct hemoperfusion (PMX-DHP) などの治療方法の選択にエンドトキシンの測定は重要である。その測定法としてはカプトガニの血液を用いたリムルス試験 Limulus amoebocyte lysate (LAL) が本邦では最も普及している。しかし、この方法には測定時間や感度などの問題点があり現在もその臨床的有用性は確立されていない。他の測定方法として Endotoxin Activity Assay (EAA)¹⁾がある。EAA は患者血液中の好中球の CR1, CR3 レセプターを介した活性酸素の産生反応を利用した血中エンドトキシン測定

法で、0 から 1 の相対的反応値として結果を得る。簡便かつ迅速に測定でき、早期介入が必要とされる重症患者で利便性が高く、そのような重症患者において、重症度との相関、死亡率との相関などの EAA 値の有用性が報告されている。また米国・カナダで行われていた、EUPHRATES trial²⁾では、 $0.6 < EAA < 0.9$ かつ Multiple Organ Dysfunction Score (MODS) > 9 の患者において PMX-DHP による予後改善が認められ、PMX-DHP の施行基準として EAA 値が再度注目されている。しかしながら、日本では EAA の測定は保険収載で認められていない。また LAL 法との解離や EAA 値が 1 以上となる異常高値例も散見され、好中球の反応でエンドトキシン値を正確に反映してよいか疑問が残る。この Mini Review では当施設での EAA 測定結果を含め、これまでの EAA に関する研究を報告する。

1. EAA とは

EAA は Romaschin ら¹⁾により 1998 年に発表された測定方法であり 3 段階の反応系から成る。まず患者血中

LPSと抗LPSモノクローナル抗体により免疫複合体を形成させ、これらが補体と結合しオプソニン化される。オプソニン化により貪食されやすくなった免疫複合体を好中球が取り込み活性酸素が産生され、同時に試薬に含まれるザイモザンも好中球に取り込まれ活性酸素産生を増強させる。その活性酸素を試薬に含まれるルミノールとの化学発光として検出する。この化学発光を3つの条件で行い (Tube1:ルミノール, ザイモザン; Tube2:ルミノール, ザイモザン, 抗LPS抗体; Tube3:ルミノール, ザイモザン, 抗LPS抗体, 過剰LPS (*E. coli* 055:B5, 4,600 pg/mL)), それらの結果から (Tube2発光量 - Tube1発光量) / (Tube3発光量 - Tube1発光量) = EAA値として算出する。原理上, EAA値は0~1.0までの値となる。

EAAを用いた最初の大規模研究であるMEDIC study³⁾では, 857名の集中治療入室Intensive Care Unit (ICU)患者(入室24時間以内)と97名の健常人のEAA値に関する報告がなされた。健常人のうち93%が0.4未満で0.6以上は存在しなかったことから, EAA値の0~0.39を低値, 0.4~0.59を中等値, 0.6以上を高値と分類すると提唱された。857名のICU患者のEAA値は, 0.4未満が42.8%, 0.4以上0.6未満が26.6%, 0.6以上が30.6%であった。グラム陰性菌 gram negative bacteria (GN)感染症に対して感度85.3%, 特異度44.0%と報告され, 特異度は低い結果であった。しかしGNに対する陰性適中率は98.6% (95% CI, 97.5%~99.8%), また全感染症に対する陰性適中率は94.8% (95% CI, 92.6%~97.1%)と感染症の有無の予測としてEAA値は有用な可能性が示唆された。その他にICU入室後24時間以内の重症敗血症発症リスク, APACHE II, MODS, SOFAなどの重症度とEAA値が有意に相関すること, そしてICU死亡率は3群でそれぞれ低値:10.9%, 中等値:13.2%, 高値:16.8%とEAA値に伴って上昇することが示された。これらの結果よりEAA値が重症患者管理において有用な指標となると報告された。

2. EAAの検討

それ以降, EAAに関する多くの報告がある。安宅らの報告ではICUに入室した64例ではEAAとLAL法の結果に相関は認めず, Satoらの報告⁴⁾でも98例の胆道系感染症例で同様の結果であった。またSanadaらは小児肝移植例の門脈血と末梢静脈血を用いてEAAとLAL法を測定し, 2つの結果に関連性はなく, EAA値の方が低濃度のエンドトキシンを反映していると報告している⁵⁾。つまり, EAAとLAL法はともにエンドトキシンの反応を測定した検査であるが, 異なった指標として考える必要がある。

2014年にIkedaらが314名のICU入室患者のEAA値に関して報告した⁶⁾。この報告においてEAA値はICU

入室患者で 0.39 ± 0.25 (平均 \pm SD), 61名の健常人で 0.10 ± 0.09 であった。MEDIC studyでは健常人のEAA中央値が0.26とIkedaらの報告より約4倍高値を示しており, 理由としては人種差や環境要因があると考察されている。また28日死亡率, APACHE II, 重症敗血症と敗血症性ショックの割合が, EAA値が高い群で有意に高値であった。重症度の予測能ではAUCがProcalcitonin (PCT), APACHE II, EAA, CRPにおいてそれぞれ0.871, 0.811, 0.764, 0.706とEAA値が他のマーカーと同等の高い予測能を有していた。またEAA値とPCTが弱く相関し ($r=0.35$), 重症度予測にPCTとEAA値の組み合わせが有用とも報告している。その後, 2019年にもIkedaらは敗血症もしくは敗血症疑いでICUに入室した142名のEAA値について報告しており⁷⁾, EAA値とAPACHE II, 28日死亡率が有意に相関していたと報告している。またPCTに加え, プレセプシン, 乳酸値, IL-6とEAA値が相関し, この内EAA値が最も培養結果と相関していたことも報告されている。

また感染症だけでなく, 外傷や術後症例などでもEAAの有用性の報告があり, Charbonneyら⁸⁾は48例の多発外傷患者でEAAを測定し, 死亡例で有意にEAAが高値を示し(死亡群 vs 生存群: 0.48 vs 0.28 ; $p=0.048$), 入院時にショック状態であった患者でも有意にEAAが高値であったと報告している(ショックあり群 vs ショックなし群: 0.34 ± 0.19 vs 0.24 ± 0.13 ; $p=0.049$)。Yarostovskyら⁹⁾は開心術後の敗血症81例のEAA値がPCT, APACHE IIと相関していた ($r=0.27$, $r=0.33$)と報告し, Ricciら¹⁰⁾は25例の先天性心疾患児の心臓血管術後ではEAA値が術後有意に上昇し, 術後1日目のEAA値は乳酸値, 昇圧薬投与量などとも相関していたと報告している。

これらの報告より, 敗血症だけではなく多岐にわたる重症患者においてEAAはリスク評価や感染症の指標として有用であると考えられている。

3. EAA異常値

先も述べたように, 原理上, EAA値は0~1.0までの値をとるといわれているが, 実臨床では1.0以上の異常高値症例であったり, リムルス法で高値で重症度が高い症例でもEAA値は0.1以下となるような相対的異常低値も散見される。原因としてはEAAの測定過程にあると考えられている。EAA値の測定には複数の過程が必要で, さまざまな要素に影響を受ける可能性がある。患者と検査キットのLPSの株の違い, 好中球や補体の活性化, LPS結合蛋白によるLPSとIgMと結合能への影響などが考えられる。例えば, EAA値はステロイド使用患者において低値を示すという報告がある¹¹⁾。その報告では健常人の血液を用いて, メチルプレドニゾロン添加前後でのEAA値とLAL法でのエンドトキシン値を測定

したところ、LAL法では変化を認めなかったが、EAA値は前後で有意に低下したと報告している。このことから、ステロイドにより好中球の活性が抑制されたことがEAA値に影響を与えたと考えられる。ステロイドに限らず免疫抑制状態にある患者の場合には同様にEAA値に影響を受けている可能性も考えられる。一方で、異常高値に関してはTube3には過剰LPSが添加されているため、EAA値は1.0以下になるといわれているが、実際には1.0を超える異常高値例も存在する。1.0以上を示す症例では好中球や補体の異常活性化、LPSの株の違いが影響し異常値となっている可能性があるが、エンドトキシンに対する宿主反応が過剰である可能性は高いと考え加療にあたる必要がある。

4. 異常値に関する滋賀医科大学の検討

われわれの施設では2016年7月よりEAAの測定を前向き観察研究として実施している。2016年7月から2018年10月までに当院救急外来受診、もしくは集中治療室入室患者を対象として100名の患者でEAA値を測定し、そのうち敗血症(Sepsis3)でかつPMX-DHPを施行する前に測定できた症例が80例あった。80例の患者背景、EAA値の分布を表1に示した。EAA値(中央値(Q₁~Q₃))は0.42(0.28~0.60)であり、Ikedaらの報告⁶⁾と同様の分布であった。Marshallらの報告³⁾と比較すると分布としては0.2から0.4の症例が多く、欧米人より日本人は低い傾向にあるのかもしれない。また80例中23例がEAA測定前にステロイドや免疫抑制剤を使用しており、使用群と非使用群のEAA値はそれぞれ0.35(0.28~0.61)、0.44(0.28~0.61)(中央値(Q₁~Q₃))であった。2群間で有意差は認めない(p=0.602)が、使用群で低値を示しており、ステロイドや免疫抑制剤を使用している症例ではEAA値の判断に注意が必要である。またそのような薬剤を使用していない症例で、明らかにエンドトキシン血症が疑わしいがEAA値が低値の場合には免疫機能異常の可能性があるとわれわれは考えている。

また80例中にEAA値が1.0以上の異常高値が6例含まれていた。この異常高値例について表2にまとめた。EAA異常高値例がすべて重症度が高いというわけではないが、ここで示すSOFAやAPACHEはICU入室時の値であり、生存日数としては6例中3例が28日以内に死亡している。つまりSOFAやAPACHEよりもEAAが早期に重症度を反映する症例もあると考えられる。また起因菌として*Streptococcus*や*Enterococcus*などのグラム陽性菌(gram positive bacteria: GP)でもEAA高値例があることも分かる。この6例だけではEAA値異常高値となる要因は明らかにはできないが、EAA異常高値を示す患者に対しては、今後重症化する可能性や培養陰性でも重度のエンドトキシン血症の可能性を十分考慮して治療にあたる必要があると考えられる。

表1 患者背景(80例)・EAA値分布

症例数	80
年齢(歳)	73.0(66.5~78.0)
性別、男性(%)	54(67.5)
身長(cm)	160.7(155.4~167.0)
体重(kg)	56.5(48.4~64.3)
SOFA score	9(5~12)
EAA値*	0.42(0.28~0.60)
EAA分布(n)	
<0.2	9
0.2~0.39	26
0.4~0.59	25
0.6~0.79	14
0.8~0.99	0
≥1.0	6
28日死亡、n(%)	22(27.5)
感染部位(n)	
腹部	36
肺	22
軟部組織	8
血液	8
不明	6

中央値(Q₁~Q₃)

SOFA: sequential organ failure assessment

EAA値の測定機序が複数の過程が必要であり、上述したさまざまな要素に影響を受けてしまう可能性が高いことから、実臨床においてわれわれは血中のLPS量によって治療適応を判断するのではなく、個々の患者のLPSに対する反応が過剰な場合に適切な治療を行うことが必要であると考えている。同量のLPSでも各患者で反応は異なり、それが過剰な患者では臓器障害を呈する敗血症に進展する可能性がある。EUPHRATESの結果は、エンドトキシンに対する全身反応がEAAとして0.6から0.9の患者においてPMX-DHPが有意に死亡率を低下させたとも捉えられる。この視点から、リムルス法よりもEAA値の方が臨床での治療方法の選択には有用なのかもしれない。EAA値がより臨床的に正確かつ有用に用いられるよう今後も症例を重ね検討していく必要がある。

5. 他マーカーとの相関に関する滋賀医科大学の検討

EAAの測定は2回の操作で約30分程で結果を得られるため、簡便、迅速という点から臨床現場において有用である。しかし、日本ではEAAの測定は保険適応がないため現在使用することはできない。また、上述したようにEAAの測定はいくつかの過程を経ておりエンドトキシン以外の病態を反映している可能性もある。そこで一般的な血液検査と病態との関連を調査した。表1に示した80例のうち、集中治療室に入室し、EAA測定を入

表 2 EAA 異常値症例 (EAA>1.0)

	原疾患	EAA	年齢	SOFA	APACHE	起因菌	CKD (KDIGO)	免疫抑制剤	生存日数
No. 1	頸部膿瘍・壊死性降下性縦隔炎	1.83	85	6	16	<i>Streptococcus pyogenes</i>	stage 3	なし	35 日
No. 2	サイトメガロ腸炎(C7-HRP 陽性, 下部内視鏡検査で潰瘍多発あり) 重症筋無力症	1.45	61	10	19	不明	Stage 3	なし	90 日以上
No. 3	脳内悪性リンパ腫 (化学療法中) NOMI (小腸結腸切除術)	1.36	67	10	33	<i>Citrobacter freundii</i> (<i>metallo β lactamase</i> 産生菌)	なし	MTX リンデロン 0.5 mg	90 日以上
No. 4	脳梗塞・脳出血 壊死性胆嚢炎 (胆嚢摘出術) 肝壊死肝 (区域切除) 上腸間膜動脈血栓症・小腸壊死 (小腸大量切除術)	1.13	73	20	31	<i>Enterococcus faecium</i>	stage 1	なし	6 日
No. 5	上部胆管癌術後 誤嚥性肺炎	1.11	84	15	20	<i>Serratia</i>	stage 3	なし	14 日
No. 6	胆管癌 (膵頭十二指腸切除術) 創部壊死性筋膜炎	1.03	74	14	20	<i>Aeromonas hydrophila</i>	stage 3	なし	2 日

室から 24 時間以内に施行し、さらに EAA 測定から 3 時間以内に一般血液検査も施行できていた 68 例を対象とした。関連項目は WBC, CRP, PCT, Platelet, PT-INR, Antithrombin (AT), SOFA, APACHE II とした。これらの検査結果とスコアは入室前後 3 時間以内で直近のものを用いた。また 28 日, 90 日死亡率を集計し、予後との関係を検討した。

表 3 に 68 例の患者背景を示す。EAA 値の中央値 ($Q_1 \sim Q_3$) は 0.42 (0.27~0.625) で、感染部位は腹腔内が最も多く ($n=31$, 45.6%), 次いで肺 ($n=17$, 25%) であった。起因菌は GN が 23 例 (33.8%), GP が 19 例 (27.9%), 真菌が 1 例 (1.5%), 不明が 25 例 (36.8%) であった。GN 群と GP 群のそれぞれの EAA 値は GN vs GP : 0.43 (0.23~0.67) vs 0.42 (0.24~0.59) であり有意差は認めなかった ($p=0.799$)。EAA 値と 28 日死亡のリスクに関して、単変量解析で EAA は有意にリスクであり (odds ratio 1.226 ; 95% CI 1.015~1.482 ; $p=0.035$)、多変量解析では共変数を年齢, APACHE II, PMX-DHP の有無として強制投入法で検討した結果, EAA 値は有意なリスクであった (odds ratio 1.227 ; 95% CI 1.013~1.487 ; $p=0.037$)。次に各種血液検査との相関関係について、EAA 値は Plt, WBC, AT と負の相関を示し ($r=-0.412$, $r=-0.246$, $r=-0.277$)、Lac, PT-INR とは正の相関を示した ($r=0.266$, $r=0.243$)。また CRP, PCT, SOFA, APACHE II とは相関を示さなかった ($r=0.046$, $r=0.073$, $r=0.002$, $r=0.021$)。

APACHE II, SOFA, CRP が EAA 値と相関するという報告^{3,6,7)}はあるが、今回は異なる結果となった。本検

表 3 患者背景 (68 例)

症例数	68
年齢 (歳)	73.5 (67.2~78)
性別, 男性, n (%)	50 (73.5)
身長 (cm)	160.75 (155.6~167.0)
体重 (kg)	56.0 (48.2~64.3)
APACHE II score	23 (17~29)
SOFA score	9 (6~12)
PaO ₂ /F _i O ₂	251.4 (146~326)
乳酸値 (mg/dL)	20 (12~38.7)
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	9.5 (4.2~16.6)
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	112.5 (60.5~163.5)
CRP (mg/dL)	14.4 (7.7~22.6)
Procalcitonin (ng/dL)	12.27 (2.0~51.6)
PT-INR	1.29 (1.16~1.51)
Antithrombin (%)	55 (47~67)
EAA 値 : 全例	0.42 (0.27~0.625)
EAA 値 : グラム陽性菌感染症例	0.42 (0.24~0.59)
EAA 値 : グラム陰性菌感染症例	0.43 (0.23~0.67)
28 days mortality, n (%)	19 (27.9)
感染部位	
腹部	31
肺	17
軟部組織	7
血液	8
不明	5

中央値 ($Q_1 \sim Q_3$)

SOFA : sequential organ failure assessment, APACHE II : Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II

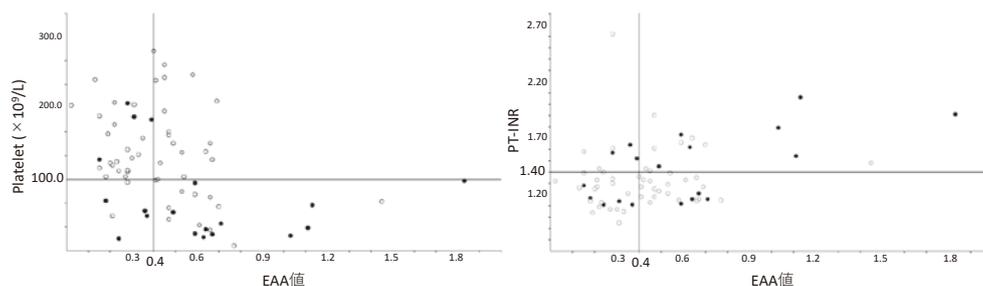


図 1 EAA 値と Platelet, PT-INR の相関
(● : 28 日以内死亡, ○ : 28 日生存)

討は対象が Sepsis3 で敗血症と診断された患者という点で他検討と異なっているため、臓器障害を伴う感染症という群では相関関係に何らかの影響があるものと考えられている。その他に、Plt, AT, PT-INR の凝固マーカーと相関する傾向がある。凝固系と EAA 値の関係を検討した報告はいくつかあり、Koch ら¹²⁾は 49 名の SIRS もしくは敗血症患者の EAA 値を測定し、EAA 値が血小板、PT-INR, APTT, フィブリノーゲン、AT と相関はしなかったが、ROTEM の各パラメーターとの関係性を比較したところ、Clot formation time, Clotting Time, maximum clot firmness と相関し ($r = -0.38$, $r = -0.29$, $r = 0.27$)、EAA 高値であれば血栓形成もより加速し強固となる可能性を報告している。次に、図 1 に EAA 値と Plt, PT-INR の相関図を示した。白色丸が生存、黒色丸が死亡を示している。EAA > 0.4 の患者において血小板が $10 \text{ 万}/\mu\text{L}$ で 2 群に分けた時、血小板高値群の方が 28 日死亡率は有意に低い結果となった (Plt High vs Plt Low = 0% vs 50.0%, $p = 0.001$)。また同様に EAA > 0.4 の患者において PT-INR が 1.4 で 2 群に分けた時、PT-INR 低値群の方が 28 日死亡率は低い結果となったが、有意差は認めなかった (PT-INR High vs PT-INR Low = 40.0% vs 17.3%, $p = 0.052$)。

これらの結果より、EAA 値は凝固異常の病態を反映している可能性があり、また EAA 値が高値でもまだ凝固異常を発症していない症例は死亡リスクが低いと考えられる。つまり、感染と凝固のクロストークといわれるように、エンドトキシン血症だけでなく、それによる凝固異常、臓器障害を引き起こす DIC 状態になった時に死亡につながると考えられる。そのため、EAA 値は単独で用いるのではなく、凝固異常と合わせて病態を判断することで敗血症予後改善に対し適切な治療を選択する因子になり得るのではないかと考えている。

おわりに

EAA 値は EUPHRATES trial で示されたように PMX-DHP の適応判断の指標として有用な可能性が高いものとする。われわれは EAA 値が凝固亢進時に敗

血症の予後を反映していることを見出した。このことから EAA 値はより臨床に即したマーカーの可能性がある。しかし EAA 値にはいまだ不明な点が多く、その値を的確に臨床に用いる判断はいまだ試行錯誤の状態である。適切な患者に適切なタイミングで PMX-DHP を施行する判断を含め、敗血症の予後を改善するためには、臨床研究に加えて基礎研究を含めた更なる検討が必要である。

文 献

- 1) Romaschin AD, Harris DM, Ribeiro MB, et al. : A rapid assay of endotoxin in whole blood using autologous neutrophil dependent chemiluminescence. *J Immunol Methods* 212 : 169-185, 1998
- 2) Klein DJ, Foster D, Walker PM, et al. : Polymyxin B hemoperfusion in endotoxemic septic shock patients without extreme endotoxemia : a post hoc analysis of the EUPHRATES trial. *Intensive Care Med* 44 : 2205-2212, 2018
- 3) Marshall JC, Foster D, Vincent JL, et al. : Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness : results of the MEDIC study. *J Infect Dis* 190 : 527-534, 2004
- 4) Sato M, Matsuyama R, Kadokura T, et al. : Severity and prognostic assessment of the endotoxin activity assay in biliary tract infection. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 21 : 120-127, 2014
- 5) Sanada Y, Mizuta K, Urahashi T, et al. : Impact of hepatic clearance of endotoxin using endotoxin activity assay. *Hepato Int* 6 : 778-782, 2012
- 6) Ikeda T, Ikeda K, Suda S, et al. : Usefulness of the endotoxin activity assay as a biomarker to assess the severity of endotoxemia in critically ill patients. *Innate Immun* 20 : 881-887, 2014
- 7) Ikeda T, Kamohara H, Suda S, et al. : Comparative Evaluation of Endotoxin Activity Level and Various Biomarkers for Infection and Outcome of ICU-Admitted Patients. *Biomedicines* 7 : 47, 2019

- 8) Charbonney E, Tsang JY, Li Y, et al. : Endotoxemia Following Multiple Trauma : Risk Factors and Prognostic Implications. *Crit Care Med* 44 : 335-341, 2016
- 9) Yaroustovsky M, Plyushch M, Popov D, et al. : Prognostic value of endotoxin activity assay in patients with severe sepsis after cardiac surgery. *J Inflamm (Lond)* 10 : 8, 2013
- 10) Ricci Z, Haiberger R, Pezzella C, et al. : Evaluation of Endotoxemia After Pediatric Cardiac Surgery With the Endotoxin Activity Assay : An Exploratory Prospective Cohort Study. *Pediatr Crit Care Med* 17 : e76-80, 2016
- 11) Matsumoto N, Takahashi G, Kojika M, et al. : Interleukin-8 induces an elevation in the endotoxin activity assay (EAA) level : does the EAA truly measure the endotoxin level? *J Infect Chemother* 19 : 825-832, 2013
- 12) Koch A, Meesters MI, Scheller B, et al. : Systemic endotoxin activity correlates with clot formation : an observational study in patients with early systemic inflammation and sepsis. *Crit Care* 17 : R198, 2013

第5章

一般演題

TLR7 リガンド複合体の合成と免疫増強活性

若尾 雅広¹⁾, 新地 浩之¹⁾, 馬場 暁士¹⁾, Michael Chan²⁾, 林 公子²⁾,
Howard B. Cottam²⁾, Dennis A. Carson²⁾, 隅田 泰生¹⁾

¹⁾鹿児島大学大学院理工学研究科, ²⁾カリフォルニア大学サンディエゴ校ムーアがんセンター

Synthesis and immunostimulatory activity of TLR7 ligand conjugate

Masahiro Wakao¹⁾, Hiroyuki Shinchi¹⁾, Akihito Baba¹⁾, Michael Chan²⁾, Tomoko Hayashi²⁾,
Howard B. Cottam²⁾, Dennis A. Carson²⁾, Yasuo Suda¹⁾

¹⁾Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University

²⁾Moore's Cancer Center, University of California, San Diego

Abstract

Toll-like receptors (TLRs) are transmembrane proteins classified into pattern recognition receptors (PRRs). TLRs are found in cell surface and/or endocytic vesicles in immune cells. TLRs activate innate immunity by recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) derived from bacteria and viruses and damage-associated molecular patterns (DAMPs) produced by damaged tissue. The activation of innate immunity induces adaptive immunity that plays an important role in the host defense against pathogenic infection. On the other hand, abnormal activation of innate immunity causes immune disorders such as autoimmune disease. Therefore, TLRs are important molecules in the immune system. So far, 10 types of TLRs (TLR1 to TLR10) in humans and 12 types of TLRs (TLR1 to TLR9, TLR11 to TLR13) in mice have been found. TLR1, TLR2, TLR4, and TLR6 are found on the cell surface, and TLR3, TLR7, TLR8, and TLR9 are found in the endosomal compartment. Each TLR recognizes specific PAMPs and DAMPs; lipopeptides for TLR1/2 and TLR2/6; nucleic acid structures for TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9; lipopolysaccharide (LPS) structures and heat-shock proteins for TLR4. In recent years, various ligands activating TLRs signal have also been chemically synthesized and have been utilized as effective adjuvants in antiviral and anticancer therapy. Regarding TLR7 ligand (TLR7L), conjugates with peptides, polymers, proteins, glycans, and nanoparticles have attracted much attention because they have great potencies on the humoral and cellular immune response. In this paper, we describe recent progress in the synthesis and biological property of TLR7 ligand conjugate containing our recent study.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 28~33, 2020

Key words : Toll-like receptor, TLR7, conjugate, immunostimulant

はじめに

Toll 様受容体 (Toll-like receptors : TLRs)¹⁾は、パターン認識受容体 (pattern recognition receptor : PRRs) に分類される膜貫通型タンパク質で、自然免疫を活性化する受容体の一つとして知られる。TLRs は、主に免疫細胞にみられ、ウイルスやバクテリアなどの病原体由来の分子パターン (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) や、自己細胞の損傷などによって生じる内因性の分子パターン (damage-associated molecular patterns : DAMPs) を認識することで自然免疫を活

性化する。自然免疫の活性化は、獲得免疫を誘導し、病原体などの異物を排除する生体防御において重要な役割を担う。一方、異常な自然免疫の活性化は、自己免疫疾患などの免疫異常を引き起こすため、TLRs は免疫システムにおいて重要な分子として捉えられている。

TLRs は、これまでに、ヒトでは 10 種類 (TLR1 から TLR10)、マウスでは 12 種類 (TLR1 から TLR9, TLR11 から TLR13) が明らかにされている。TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 は細胞表層に、TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 は細胞内オルガネラの小胞体 (ER) やエンドソームにみられ、それぞれの TLR は特定の PAMPs, DAMPs

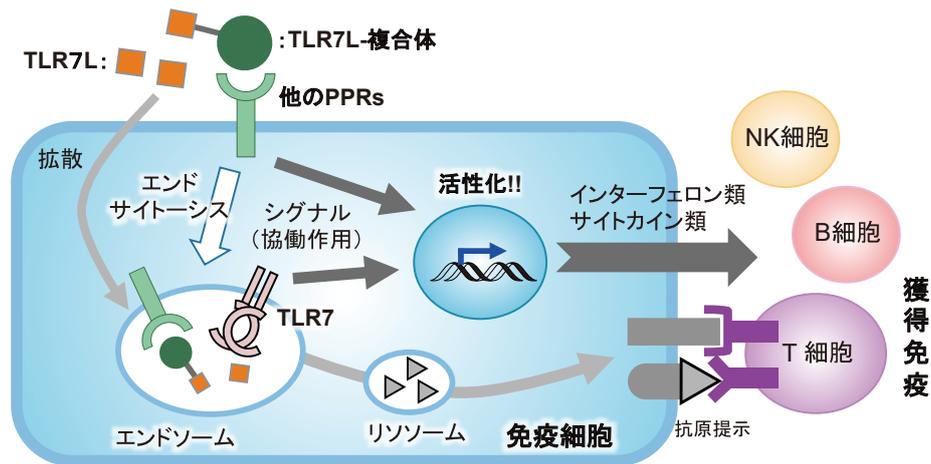


図 1 TLR7 のシグナル伝達経路

を認識する。すなわち、TLR1/2, TLR2/6 はリポペプチド構造を、TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 は核酸構造を、TLR4 は細菌由来のリポ多糖構造や熱ショックタンパク質などを認識する。近年、合成化学的手法によっても TLR に作用するさまざまなリガンド分子 (TLR-L) が開発されており、これらを活用した抗ウイルス療法や抗がん療法が注目されている²⁾。TLR7 のリガンド分子 (TLR7L) においては、ペプチド鎖やポリマー、タンパク質、糖類、ナノ粒子などとの複合体化が、抗体産生などの免疫応答を大きく増強できることから、感染症やがんなどのワクチン開発において有用なアジュバントとして期待されている。本稿では、TLR7 リガンド複合体に焦点をあて、最近の研究について概説する。

1. TLR7 のシグナル伝達

TLR7 は、細胞内小胞である ER やエンドソームに局在しており、病原体由来の一本鎖 RNA (ssRNA) を認識し二量化することで活性化される。TLR7 の活性化は、アダプタータンパク質である MyD88 を介して NF- κ B または IRF7 に作用し、炎症性サイトカインや I 型インターフェロン類の産生を誘導する (図 1)。これらのサイトカインやインターフェロン類は、NK 細胞や T 細胞などの他の免疫細胞を活性化し、獲得免疫を誘導する。TLR7 は細胞内小胞に局在するため、TLR7 を効果的に活性化するためには、TLR7L の細胞内小胞への輸送が重要である。薬物輸送システム (DDS) で応用されている、細胞の食作用の一つであるエンドサイトーシスを介した輸送は、TLR7L の輸送においても有用であり、細胞接着分子との複合体化やナノサイズ効果などを利用した TLR7L 複合体の設計が行われている。PRRs の一つである C 型レクチン受容体 (C-type lectin receptors : CLRs) に認識されるリガンドとの複合体化は、複数の PRRs を共刺激する病原体ミメティック分子であり、シグナルのクロストーク (協働作用) による免疫増強が期待される。

またペプチドやタンパク質などの抗原との複合体化は、TLR7 の刺激に加え、抗原提示が可能になるため、セルフ・アジュバント機能による免疫増強が期待される。

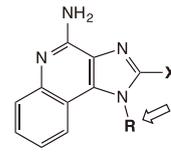
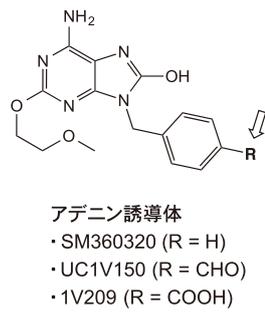
2. TLR7L 複合体

これまでに低分子化合物の TLR7L として、抗ウイルス、抗がん薬として使われているイミダゾキノリン類 (イミキモド³⁾、レシキモド⁴⁾: TLR8 活性も有する)をはじめ、グアノシン骨格を持つロキソリビン⁵⁾やアデニン様骨格を持つ SM360320⁶⁾、UC-1V150⁷⁾、1V209⁸⁾などが開発されている (図 2)。これらの TLR7L は、アゴニスト作用を保持させたまま複合体化が可能で、置換基 R にアミノ基やカルボキシル基などの種々の官能基を導入し、脂質や糖質、ペプチド、タンパク質、ポリマーなどと縮合することによって、さまざまな複合体が合成できる。これらの複合体では、複合体化していない TLR7L に比べ、生理条件下での薬物動態の改善による全身性炎症反応の低減、免疫応答の増強などが報告されている⁹⁾。例えば、TLR7L とアルブミンなどのタンパク質複合体では、TLR7L の免疫刺激活性を 10 倍から 100 倍程度増強することが報告されている⁸⁾。また、pH 応答性ポリマーやアルブミン結合性ポリマーとの複合体では、リンパ節選択的な輸送とがん組織周辺での免疫細胞の活性化が達成されている⁹⁾。さらに、がん抗原ペプチドとの複合体では、複合体のサイズを制御することによって、細胞性免疫の誘導とがん細胞の増殖抑制ができることが報告されている¹⁰⁾。

3. TLR7L-糖鎖複合体

糖鎖は、すべての細胞上に発現しており、細胞接着やタンパク質輸送に関与する。免疫細胞においては、CLRs などの受容体を介して病原体などの異物糖鎖の認識に関与する。免疫細胞に特異的に結合する糖鎖は、TLR7L を免疫細胞へ選択的に輸送するための有用なキャリアとな

TLR7に結合するリガンド(TLR7L)



- ・イミキモド (R = , X = H)
- ・レシキモド (R = , X = エトキシエチル)
- ・N1-ベンジル誘導體 (R = アミノメチルベンジル, X = ブチル)

TLR7L 複合体

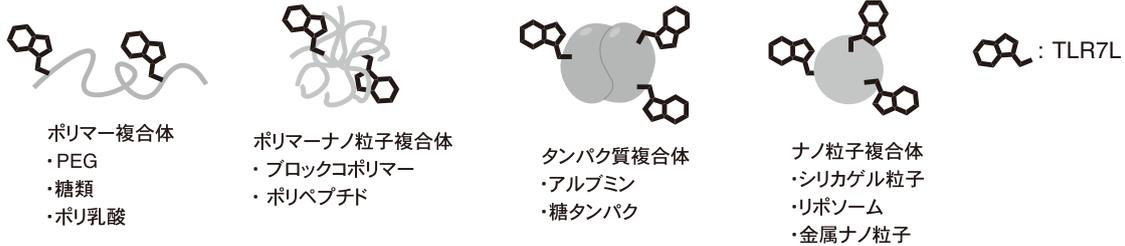


図 2 TLR7L および TLR7L 複合体

ることから、TLR7Lと糖鎖とを複合化したワクチンアジュバントの開発が進んでいる。TLR7Lとデキストランなどの多糖との複合体では、元のTLR7Lに比べ、免疫増強活性の大きな向上がみられた¹¹⁾。また、マンノースを固定化した金ナノ粒子との複合体では、免疫増強活性に加え、抗体産生などの液性免疫の向上がみられた¹²⁾。さらに、マンノースを複合化したTLR7L-抗原タンパク質複合体においては、セルフ・アジュバント活性により効果的に抗原提示が行われ、液性免疫と細胞性免疫が向上することが報告されている¹³⁾。一方、キャリアとして用いる糖鎖の構造やサイズについては、免疫細胞の活性化にどのように関与しているかほとんど分かっていない。本節では、低分子量から中分子量の糖鎖を持つ糖鎖複合体の免疫増強作用¹⁴⁾について紹介する。

3-1. TLR7L-糖鎖複合体の合成

TLR7Lには1V209を用い、糖鎖成分には市販のグルコサミンやガラクトサミン、3A-アミノシクロデキストリン(CD)類、また簡便に合成できる単糖と二糖のアミノ糖、6A-アミノCD類を使用した。TLR7L-糖鎖複合体は図3に示す経路で合成した。1V209とアミノ糖の複合体化は、HATUを用いたアミド化反応によって行った。合成したTLR7L-糖鎖複合体は、親水性の糖鎖の導入によって1V209に比べ高い水溶性を示した。

3-2. TLR7L-糖鎖複合体の免疫増強活性評価

合成した複合体の免疫増強活性は、マウスマクロファージ様細胞株(RAW264.7)、マウス骨髄由来樹状細胞(murine Bone Marrow Derived Dendritic Cells :

mBMDC)、ヒト末梢血単核細胞(human Peripheral Blood Mononuclear Cells : hPBMC)を用いて評価した。RAW細胞とhPBMCでは腫瘍壊死因子- α (TNF- α)の産生活性を、mBMDCではインターロイキン-6 (IL-6)の産生活性を指標にした。結果を図4と表1に示す。単糖成分を有する糖鎖複合体1~5では活性の向上がみられなかったが、二糖成分を導入した糖鎖複合体6, 7においては、2~4倍程度の活性の向上がみられた(図4A, B, E, F)。またCDを導入した糖鎖複合体8~13では、全体的に活性の向上が観察されたが、6位複合体8~10に比べ3位複合体11~13の活性が高かった(図4C, D, G, H)。とくに、CD複合体11においては、IL-6の産生活性において約15倍の増強がみられた。糖鎖の構造とサイズによって活性の強弱があることから、細胞表面の受容体を経由して取り込まれると考えられる。続いて、糖鎖構造の異なる単糖複合体1、二糖複合体6、CD複合体11を用いて、hPBMCでのTNF- α 産生能を評価した。その結果、CD複合体11が1V209に比べ3倍のTNF- α 産生能を持つことがわかった(図4I)。

次に、TLR7L-糖鎖複合体の活性の増強がエンドソーム移行性に起因するか調べるため、エンドサイトーシスを阻害するサイトカラシンDを用いて活性評価を行った。糖鎖複合体には単糖複合体3、二糖複合体6、CD複合体11を用いた。細胞には、RAW細胞を用いた。免疫増強活性は、サイトカラシンD存在下、または非存在下でTNF- α 産生量を指標にEC₅₀値で評価した。結果を表2に示す。糖鎖複合体では、サイトカラシンDの添加により、EC₅₀値が大きくなり活性化能が低下することがわかった。とくに、糖鎖構造が大きいCD複合体11では活

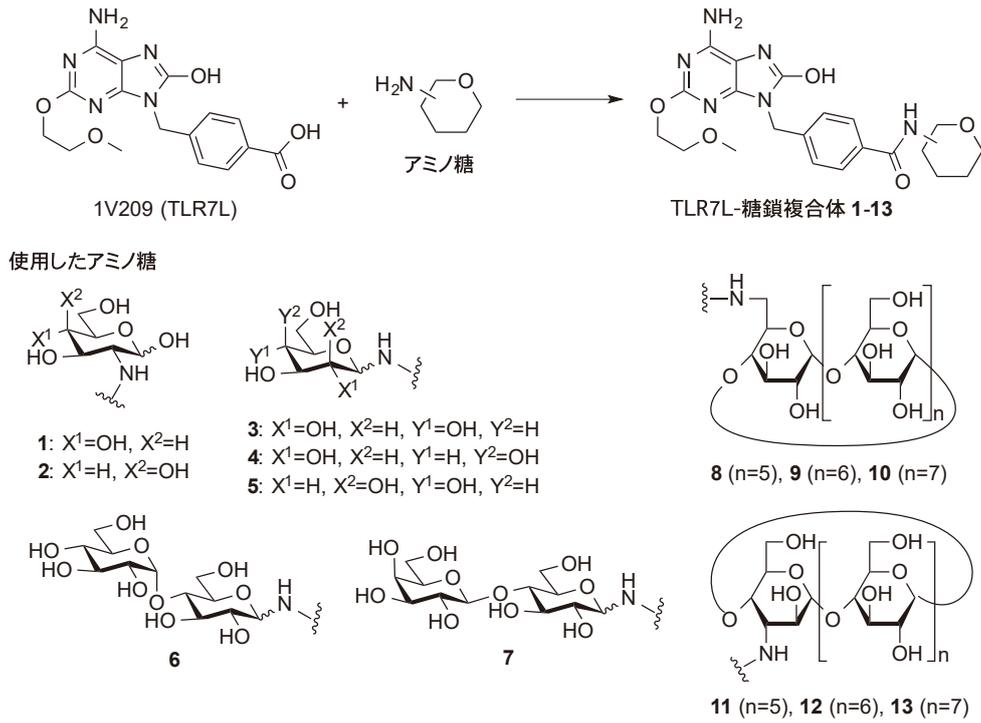


図 3 TLR7L-糖鎖複体の合成

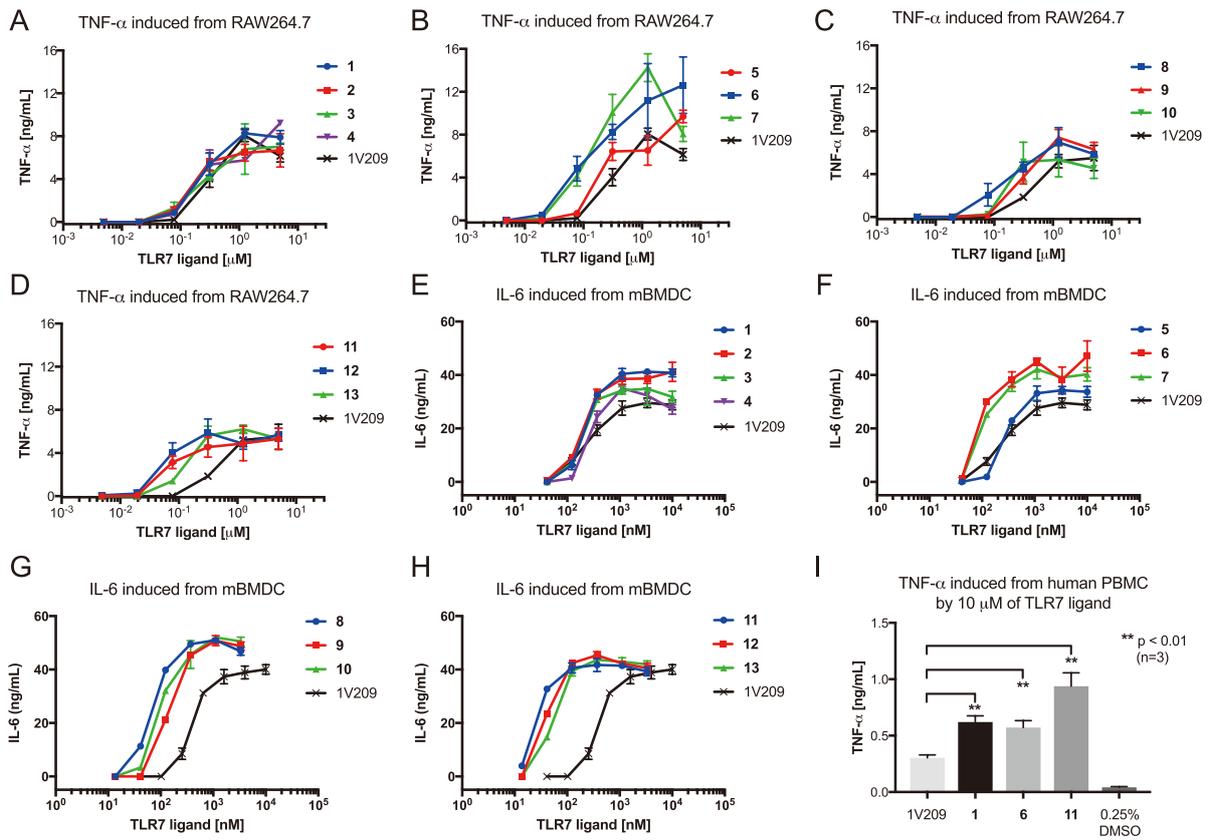


図 4 TLR7L-糖鎖複体の免疫増強活性

性が大きく低下した。一方、複合体化していない 1V209 では、サイトカラシン D の添加の有無にかかわらず同程度の EC_{50} 値を示した。本結果から、1V209 は受動拡散により細胞内移行し（エンドソームに移行し）TLR7 を活性化すること、また糖鎖複合体は、エンドサイトーシスを介してエンドソームに移行し TLR7 を活性化すると考えられる。

3-3. TLR7L-糖鎖複合体のドッキング解析

TLR7 に対して糖鎖複合体がどのように作用するか調べるため、分子モデリングによる評価を行った（図 5）。TLR7 にはサル由来の TLR7（PDB：5GMH¹⁵⁾ の結晶

構造を、糖鎖複合体には単糖複合体 3、二糖複合体 6 を用いた。MOE によるドッキング解析を行ったところ、どちらの複合体においても、1V209 成分は共結晶中の TLR7L であるレシキモドと同様の結合ポケットに位置し、レシキモドに類似した配向をとることがわかった。また糖鎖成分は、結合ポケットの外側に位置しており、TLR7 二量体との相互作用はほとんどみられなかった。したがって、糖鎖成分は TLR7 の二量化にはほとんど関与しておらず、活性化にも影響しないと考えられる。糖鎖複合体の免疫増強活性は、細胞表層の糖鎖結合性受容体を介してエンドサイトーシスにより、エンドソームに取り込まれ、TLR7 を活性化すると考えられる。

おわりに

本稿では、TLR7L 複合体に焦点をあて最近の研究について紹介した。イミダゾキノリン類やグアノシン類、アデニン類の低分子 TLR7L は、他の TLR-L に比べ、簡便かつ容易で安価に複合体化が可能である。われわれはアデニン類の 1V209 を利用して、低分子量から中分子量の糖鎖を有する TLR7L-糖鎖複合体を合成し、その免疫

表 1 糖鎖複合体の免疫増強活性評価

化合物	TNF- α		IL-6	
	EC_{50} (nM)	E_{max} (%) ^a	EC_{50} (nM)	E_{max} (%) ^a
1V209	252	100	434	100
1	234	103	239	139
2	153	83	210	139
3	230	87	198	118
4	316	115	258	118
5	252	121	303	116
6	136	157	99	159
7	80	177	110	142
8	128	126	71	127
9	287	135	153	127
10	132	97	108	130
11	57	96	27	104
12	40	106	40	113
13	107	113	56	109

^a E_{max} は 1V209 を基準に算出した。

表 2 サイトカラシン D 存在下/非存在下での TNF- α 産生活性

化合物	TNF- α ($EC_{50}/\mu M$)	
	サイトカラシン D (-)	サイトカラシン D (+)
1V209	2.15	2.11
3	0.490	0.909
6	0.277	0.585
11	0.186	1.06

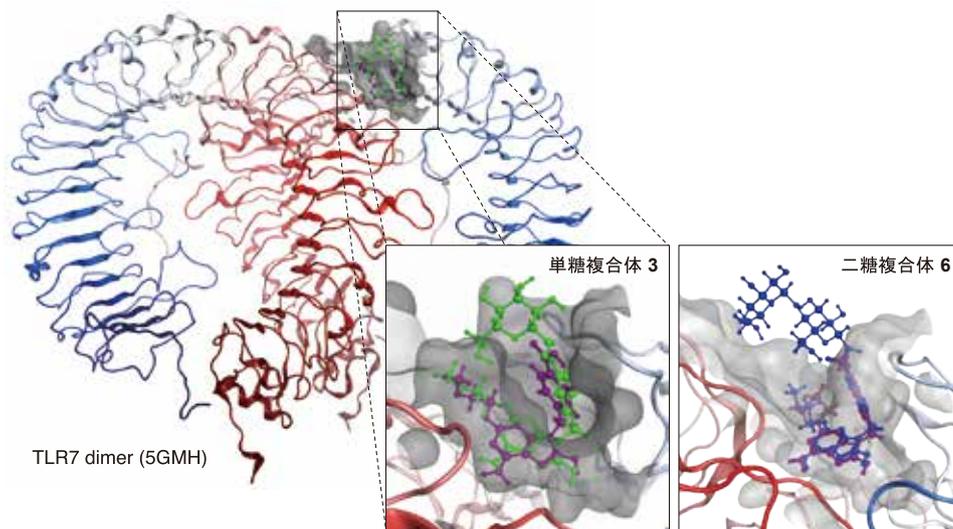


図 5 サル由来 TLR7 構造（PDB：5GMH）を用いた分子モデリング
紫：レシキモド，緑：単糖複合体 3，青：二糖複合体 6。

増強活性を評価した。糖鎖複合体は1V209に比べ高い免疫増強活性を示した。分子モデリングでは、糖鎖部分がTLR7の二量体に関与しないことが示唆されたことから、エンドサイトーシスによるエンドソーム移行性の向上によって活性が増強すると考えられた。糖鎖複合体の作用機構の解明が今後の課題である。

謝 辞

本研究の一部は、「[知]の集積と活用による研究開発モデル事業」、「公益財団法人高橋産業経済研究財団研究助成事業」、「公益財団法人米盛誠心育成会研究助成事業」の支援を受けて行われた。

文 献

- 1) Kawai T, Akira S : The role of pattern-recognition receptors in innate immunity : update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11 : 373-384, 2010
- 2) Ignacio BJ, Albin TJ, Esser-Kahn AP, et al. : Toll-like Receptor Agonist Conjugation : A Chemical Perspective. *Bioconjug Chem* 29 : 587-603, 2018
- 3) Dockrell DH, Kinghorn GR : Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators. *J Antimicrob Chemother* 48 : 751-755, 2001
- 4) Meyer T, Surber C, French LE, et al. : Resiquimod, a topical drug for viral skin lesions and skin cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 22 : 149-159, 2013
- 5) Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, et al. : The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 sub-family. *Eur J Immunol* 33 : 2987-2997, 2003
- 6) Lee J, Wu CC, Lee KJ, et al. : Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 : 1828-1833, 2006
- 7) Wu CC, Hayashi T, Takabayashi K, et al. : Immunotherapeutic activity of a conjugate of a Toll-like receptor 7 ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 : 3990-3995, 2007
- 8) Chan M, Hayashi T, Kuy CS, et al. : Synthesis and immunological characterization of toll-like receptor 7 agonistic conjugates. *Bioconjug Chem* 20 : 1194-1200, 2009
- 9) Nuhn L, De Koker S, Van Lint S, et al. : Nanoparticle-Conjugate TLR7/8 Agonist Localized Immunotherapy Provokes Safe Antitumoral Responses. *Adv Mater* 30 : e1803397, 2018
- 10) Lynn GM, Sedlik C, Baharom F, et al. : Peptide-TLR-7/8a conjugate vaccines chemically programmed for nanoparticle self-assembly enhance CD8 T-cell immunity to tumor antigens. *Nat Biotechnol* 38 : 320-332, 2020
- 11) Shinchi H, Crain B, Yao S, et al. : Enhancement of the immunostimulatory activity of a TLR7 ligand by conjugation to polysaccharides. *Bioconjug Chem* 26 : 1713-1723, 2015
- 12) Shinchi H, Yamaguchi T, Moroishi T, et al. : Gold Nanoparticles Coimmobilized with Small Molecule Toll-Like Receptor 7 Ligand and α -Mannose as Adjuvants. *Bioconjug Chem* 30 : 2811-2821, 2019
- 13) Wilson DS, Hirose S, Raczky MM, et al. : Antigens reversibly conjugated to a polymeric glyco-adjuvant induce protective humoral and cellular immunity. *Nat Mater* 18 : 175-185, 2019
- 14) Baba A, Wakao M, Shinchi H, et al. : Synthesis and immunostimulatory activity of sugar-conjugated TLR7 ligands. *Bioorg Med Chem Lett* 30 : 126840, 2020
- 15) Zhang Z, Ohto U, Shibata T, et al. : Structural analysis reveals that Toll-like receptor 7 is a dual receptor for guanosine and single-stranded RNA. *Immunity* 45 : 737-748, 2016

ハチ毒由来 PLA2 の皮膚角化細胞における免疫応答への影響

高村 (赤司) 祥子

愛知医科大学医学部感染・免疫学講座

An effect of immunological response in keratinocyte by bee venom PLA2

Sachiko Akashi-Takamura

Microbiology and Immunology, Aichi Medical University, School of Medicine

Abstract

Bee venom (BV) induces skin inflammation, characterized by erythema, blisters, edemas, pain, and itching. Although BV has been found to have an inhibitory effect on toll-like receptors (TLRs), we here show that BV enhances keratinocyte responses to polyinosinic-polycytidylic acid (poly (I : C)), a ligand for TLR3. Our results revealed that the enhanced TLR activity was primarily induced by secretory phospholipase A2 (sPLA2), a component of BV (BV-sPLA2). PLA2 mediates the hydrolysis of membrane phospholipids into lysophospholipids and free fatty acids. We demonstrated that BV-sPLA2 increased the intracellular uptake of poly (I : C), phosphorylation of the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinases (MAPKs), and poly (I : C)-mediated interleukin 8 (IL-8) production in human keratinocytes. We further showed that the enzymatic activity of BV-sPLA2 was essential for the increased uptake of poly (I : C). These findings suggest that BV-sPLA2 may induce a modification of the cell membrane structure, leading to enhanced poly (I : C) uptake in keratinocytes. BV-sPLA2 might be able to promote wound healing by enhancing TLR3 responses.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 34~38, 2020

Key words : ハチ毒, PLA2 (phospholipase A2), IL-8 (Interleukin 8), TLR (Toll-like receptor)

はじめに

ハチ毒は紅斑, 水膨れ, 浮腫, 痛み, かゆみなどの皮膚の炎症を誘導する一方, 抗炎症作用, 抗ガン作用などももちさまざまな民間療法に利用されてきた。しかし病原体認識受容体の一種である TLR を介した免疫応答との関係については, 抑制性作用の報告があるもののまだ定かではない。われわれはハチ毒が, 合成二本鎖 RNA・poly (I : C) に対するヒト皮膚角化細胞の TLR3 を介する免疫応答を増強することを見出した。またこの増強作用は, ハチ毒構成成分の一つである分泌型 PLA2 によるものであることが分かった。PLA2 は細胞膜グリセリン脂質をリゾリン脂質と遊離脂肪酸とに加水分解する酵素である。われわれはハチ毒 PLA2 がヒト皮膚角化細胞での poly (I : C) の細胞内取り込みを増強させ, NF- κ B や MAPKs のリン酸化を増強し, その結果角化細胞による IL-8 産生量を増加させることを示した。さらにわれわれはハチ毒 PLA2 の酵素活性が poly (I : C) の細胞内

取り込み増強に必要であることを明らかにした。これらの結果から PLA2 が角化細胞の細胞膜の構造を修飾し角化細胞への poly (I : C) 取り込みを増強させたことが考えられた¹⁾。本稿では以上の結果を紹介し PLA2 による角化細胞の免疫応答増強機構や臨床応用に関して考察する。

1. Poly (I : C) による皮膚免疫活性化機構

皮膚は, さまざまな外敵から体を守る重要な器官である。皮膚の外層は主に角化細胞から成り立っている。角化細胞は外壁バリアとして機能するだけでなく TLR など介するサイトカイン産生など, 皮膚の免疫応答にも積極的に参加している。サイトカインのなかでも IL-8 は好中球を炎症部位に遊走させる CXC ケモカインファミリーに属し, 自然免疫応答の誘導や調整を中心的に行う。IL-8 産生量の増減は角化細胞活性化の鋭敏なセンサーにもなりうる。

Poly (I : C) は合成二本鎖 RNA で, TLR3 や retinoic

acid inducible gene-I-like receptors (RLRs) などの受容体を介して宿主細胞に認識される。TLR3 はエンドソームに局在しエンドライソソームで二本鎖 RNA を認識する。一方で RLRs は retinoic acid inducible gene-I (RIG-I) や melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) などの受容体から成る細胞質局在センサーである。これら TLR および RLRs の下流では NF- κ B や MAPKs, Interferon regulatory factor (IRF) 3/7 などのシグナルが活性化され、IL-8 や I 型インターフェロンなどの炎症性サイトカインが誘導される。Poly (I : C) は IL-8 産生を誘導し創傷治癒を促進することが最近報告されている²⁾。また TLR3 や poly (I : C) の創傷治癒促進作用も報告されている³⁾。

2. ハチ毒の構成成分と作用について

ハチ毒はメリチンやアパミンといったペプチドや、PLA2、ヒアルロニダーゼなどの酵素や、ヒスタミン、エピネフリン、アミンなどのさまざまな構成成分から成る。ヒスタミンはアレルギー反応誘導物質として知られている。メリチンは26個のアミノ酸から成る抗菌ペプチドで、ハチ毒の40~50%を占める主要な溶血毒成分であり、抗細菌作用や抗炎症作用のような多彩な作用をもつ。

PLA2 は生体膜主要成分であるグリセロリン脂質を加水分解し、遊離脂肪酸とリゾリン脂質を産生する酵素群の総称である。PLA2 はハチ毒のみならずわれわれ哺乳類も産生し、30種類以上の分子種が認められ構造や局在、進化などから細胞質型、細胞外分泌型など複数のグループに大別される。最大の PLA2 サブグループである分泌性 PLA2 (sPLA2) には細胞分布や基質リン脂質に対する選択性の違いから哺乳類では10種類の活性型分子種が存在する。ハチ毒 PLA2 は分泌型 PLA2 のグループⅢに分類され、ハチ毒の10~12%を占める主要なアレルゲンとされている。PLA2 酵素で誘導される加水分解反応は細胞膜の構築を修飾し、細胞膜の形や脂質含有量や結合タンパクの量を変えることによって膜の機能に影響を与える。

3. ヒト皮膚角化細胞株 HaCaT 細胞におけるハチ毒の作用

皮膚での TLR を介する免疫応答へのハチ毒の影響を明らかにするため、まずはヒト皮膚角化細胞株 HaCaT 細胞にハチ毒を添加し、同時に TLR リガンドを加えて刺激し産生される細胞上清中の IL-8 の量を ELISA で測定した (図 1A)。ハチ毒のみでわずかに IL-8 産生が誘導されたが、TLR4 (LipidA) および TLR7 リガンド (Gardiquimod) のみによる IL-8 産生はほとんど認めず、これらは以前の報告と同様 HaCaT 細胞においては TLR4 や TLR7 が発現していない可能性が考えられた。TLR9 リガンド (CpGDNA) 刺激では IL-8 産生はわずかに認

めるものの明らかなハチ毒添加による産生増強は認めなかった¹⁾。いっぽう TLR1/2 リガンド (Pam3CSK4) および TLR2/6 リガンド (FSL-1) 刺激による IL-8 産生に関してはハチ毒添加で少し増強することが分かった。さらに TLR3 リガンド (poly (I : C)) 刺激ではハチ毒添加により2倍以上の IL-8 産生増強を認め最も高い増強作用が認められた (図 1A)。ハチ毒添加量を増やすと増強作用も強まることから、ハチ毒は明らかに poly (I : C) 刺激による HaCaT 細胞の IL-8 産生量を増やすことが分かった。

4. IL-8 産生増強にかかわるハチ毒構成成分の検討

次にわれわれは、ハチ毒のどの成分が poly (I : C) 刺激の増強効果を生じたのか調べることにした。ハチ毒成分からメリチンやヒスタミン、PLA2 がその候補と考え、それぞれを HaCaT 細胞に添加し poly (I : C) 刺激に対する増強効果が生じるかどうか IL-8 産生量で調べたところ、PLA2 で最も高くなることが分かった¹⁾。この作用は HaCaT 以外のヒト皮膚角化細胞でも認められたが、ヒト末梢血単核球 (PBMC) では認めなかったため皮膚角化細胞特有であることが考えられた。さらに poly (I : C) 以外の TLR リガンド刺激においても、ハチ毒添加時同様 PLA2 添加で TLR1/2 および TLR2/6 リガンド刺激で軽度の、TLR3 リガンドである poly (I : C) 刺激で最も強い増強作用が示された (図 1B)。以上の結果から、IL-8 産生増強作用はハチ毒内の PLA2 によるものであることが考えられた。さらに PLA2 の酵素活性がこの増強作用に関係するかどうか調べるため、PLA2 の代わりに熱処理して酵素機能を失わせた PLA2 を添加したり、PLA2 の活性部位を直接阻害する PLA2 インヒビター (MJ33) を PLA2 と混合して加えたりして poly (I : C) 刺激を行ったところ (図 1C)、いずれも IL-8 産生増強作用は消失あるいは低下したことが分かった。以上より PLA2 の酵素活性が poly (I : C) 刺激による IL-8 産生の増強作用に必要であることが判明した。

5. PLA2 が増強させる poly (I : C) 刺激経路の検討

前述のように poly (I : C) はエンドソームに局在する TLR3 や細胞質内に局在する RIG-I や MDA5 などの RLR に結合する。RIG-I は短い種類の poly (I : C) に結合し、MDA5 は長い種類の poly (I : C) に結合する。今回使用した poly (I : C) は長い種類の poly (I : C) であったため MDA5 および TLR3 に対する抗体を用いて蛍光顕微鏡でどちらの受容体と標識 poly (I : C) とが共局在するか検討した。まず MDA5 と poly (I : C) との共局在は検出できなかった。また TLR3 に関しては抗体による TLR3 の局在が明らかにできずそのため共局在も検出で

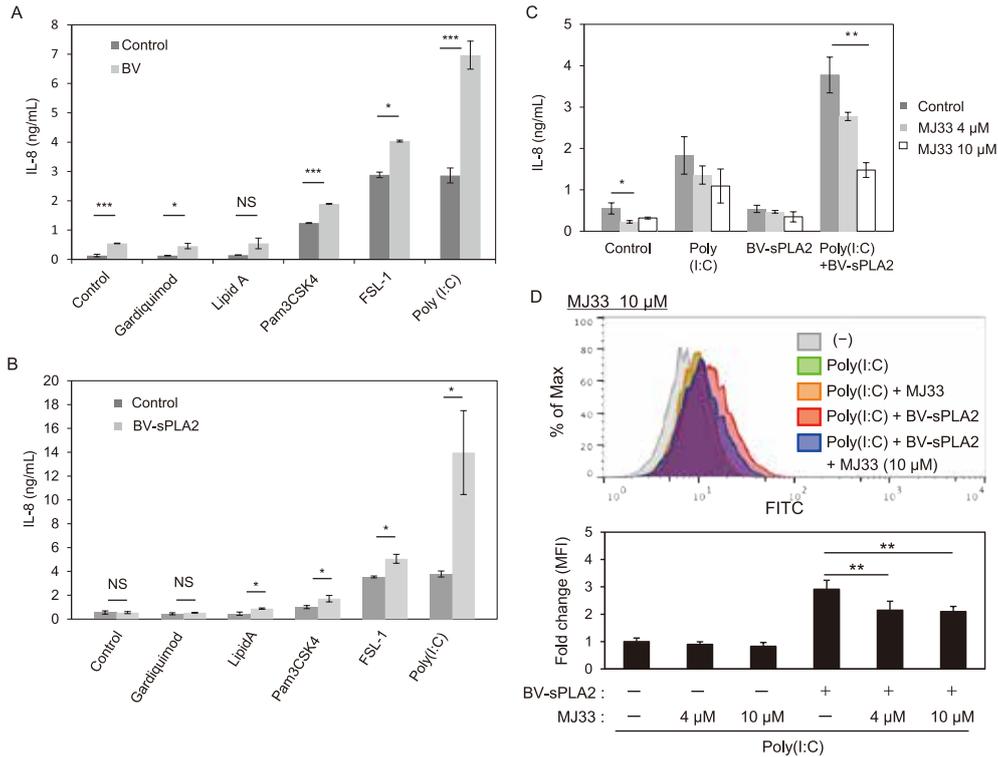


図 1 ハチ毒 (BV) およびハチ毒 PLA2 (BV-sPLA2) 添加による角化細胞での免疫応答への影響
 角化細胞に各種 TLR リガンドおよびハチ毒 (A) あるいはハチ毒 PLA2 (B) を添加し、
 産生される IL-8 の量を ELISA で測定した。ハチ毒あるいはハチ毒 PLA2 添加によりとく
 に Poly (I : C) 刺激による IL-8 産生が増加した。さらに Poly (I : C) 添加と同時に、PLA2
 インヒビターを PLA2 と混合後角化細胞に添加し、IL-8 産生量を ELISA で測定したり (C)
 標識 Poly (I : C) の角化細胞取り込みをフローサイトメトリーで測定したりした (D)。
 Poly (I : C) による IL-8 産生量は PLA2 添加により増強するが、PLA2 インヒビター添加
 検体では PLA2 による増強作用が抑制された。標識 Poly (I : C) の角化細胞取り込みも
 PLA2 添加により増強するが、PLA2 インヒビター添加検体では PLA2 による取り込み増強
 作用が抑制された。以上より Poly (I : C) の角化細胞への取り込みや IL-8 産生の増加には
 PLA2 の酵素活性が必要であることが分かった。(NS : $P \geq 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,
 *** $P < 0.005$) (文献¹⁾を引用, Oxford University Press より使用許諾取得済み)

きなかった。しかしライソソームマーカーである Lyso Tracker と標識 poly (I : C) との共局在は認められ、ハチ毒 PLA2 によりその共局在が経時的に増強したことから、少なくとも poly (I : C) の一部はエンドライソソーム認識受容体である TLR3 に認識されることが考えられた¹⁾。

また PLA2 がどのような活性化シグナルを増強させるのか調べたところ、PLA2 および poly (I : C) 刺激では poly (I : C) 単独よりも Erk, JNK, Ikk α/β , I κ B α の増強が認められたため、PLA2 添加により poly (I : C) 刺激で誘導される MAPK や NF- κ B の活性化シグナルが増強されることが分かった¹⁾。

6. Poly (I : C) 刺激増強における PLA2 酵素作用の必要性

標識 poly (I : C) は PLA2 添加により細胞内に経時的に取り込まれていくことが分かったため、熱処理した PLA2 や前述の PLA2 インヒビターを用いて PLA2 の酵素作用が poly (I : C) 取り込み増強に必要かどうかを共焦点顕微鏡やフローサイトメトリーにて調べたところ、いずれも PLA2 酵素作用が必要である結果を示した (図 2A, 図 1D)。さらにハチ毒 PLA2 添加により細胞膜から細胞上清に分泌される脂肪酸 (C18 : 1, オレイン酸) の量を LC/MS で測定比較したところ、PLA2 添加で増加し、熱処理後の PLA2 では増加しないことが分かった (図 2B)。以上よりハチ毒 PLA2 添加により細胞膜のリン脂質が分解され、それに伴い同時添加した poly (I : C)

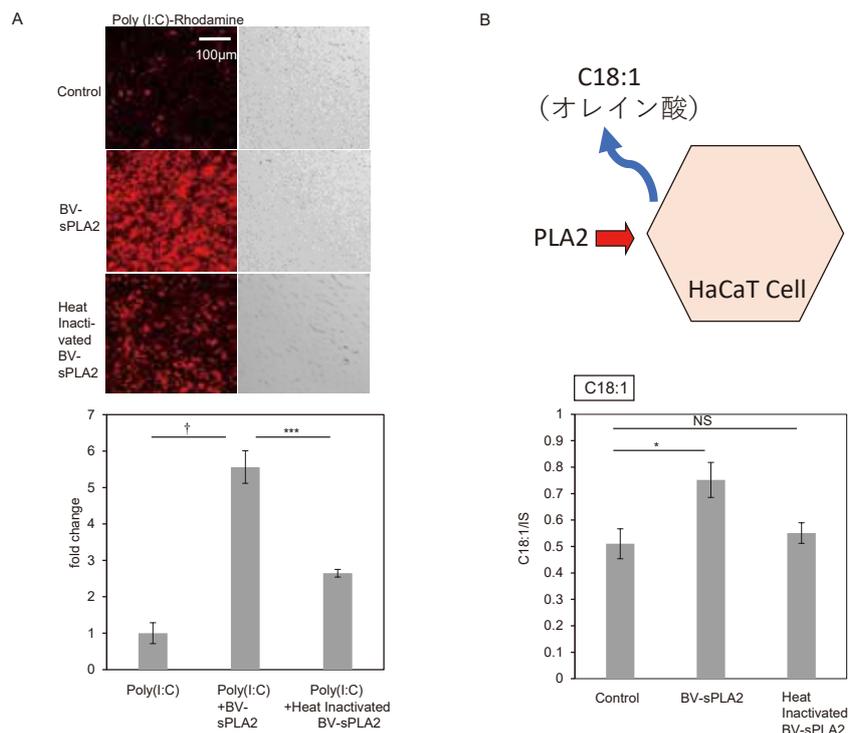


図 2 ハチ毒 PLA2 添加による細胞上清への脂肪酸（オレイン酸・C18:1）分泌促進と Poly (I : C) 細胞内取り込み上昇との関連

A : 角化細胞に PLA2 あるいは熱処理して活性を失った PLA2 を加え、標識 Poly (I : C) の角化細胞取り込みを共焦点顕微鏡で調べた。酵素活性がある PLA2 添加の場合で最も取り込みが上昇し、それに対して熱処理後の PLA2 では取り込みが大きく減少していた。B : 角化細胞に PLA2 あるいは熱処理して活性を失った PLA2 を加え、細胞上清に分泌されるオレイン酸量を調べた。酵素活性がある PLA2 添加の場合のみオレイン酸分泌上昇がみられた。以上よりハチ毒 PLA2 添加による角化細胞の細胞膜の変化が³, Poly (I : C) 細胞内取り込みを誘導し活性化シグナル上昇や IL-8 産生増加を来したことが考えられた。(NS : $P \geq 0.05$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.005$, † $P < 0.001$) (文献¹) を引用, Oxford University Press より使用許諾取得済み)

の細胞内取り込みが上昇し、エンドライソソームに局在する TLR3 により認識されて活性化シグナルが上昇し IL-8 産生が上昇したことが分かった。

7. PLA2 酵素によるヒト皮膚角化細胞での免疫応答増強機構

われわれは熱処理した PLA2 や PLA2 特異的インヒビターを用いて、poly (I : C) 刺激による免疫応答活性化にハチ毒 PLA2 の酵素作用が必要であることを示した。PLA2 酵素は細胞膜のグリセリン脂質の sn-2 位置を切断することで細胞膜の形態や構成脂質の量や質、あるいは結合タンパクを変え細胞膜機能に影響を及ぼす。ハチ毒 PLA2 は角化細胞上清中の脂肪酸の中のオレイン酸 (C18:1) を増やしたがこれは細胞膜が加水分解されたことを示唆している。この細胞膜の変化が poly (I : C) の角化細胞内取り込みを促進させた可能性がある。オレイン酸分泌レベル上昇とハチ毒 PLA2 による poly (I :

C) の角化細胞内取り込み上昇とは相関し、熱処理後の PLA2 ではこのレベルは減少していた。これは PLA2 酵素が触媒する加水分解反応が細胞膜構築修飾を誘導したことを示唆している。以前の報告によれば、ホスホリパーゼの一種であるスフィンゴミエリナーゼが細胞膜のスフィンゴミエリンの加水分解を誘導し素早いエンドサイトーシスを誘導したことが示されている⁴⁾。さらなる調査が必要ではあるが、PLA2 による加水分解反応もエンドサイトーシスを誘導した可能性が考えられる。さらにはほかの報告によれば、細胞膜内膜側に素早く侵入できる C6-リン脂質添加により内膜側に脂質量が増加するような膜の非対称が生じ、これがエンドサイトーシスを誘導したという報告がある⁵⁾。この報告では内膜側の脂質量増加ではエンドサイトーシスが促進され、いっぽう外膜側の脂質量増加によりエンドサイトーシスが抑制されることが示されている。これらの報告から考えると、PLA2 添加で分泌された細胞上清中のオレイン酸濃度上

昇からは角化細胞外膜側の脂質量減少が考えられ、内膜側脂質量の相対的な増加となり poly (I : C) のエンドサイトーシスを誘導したと考えられる。リゾリン脂質添加では内膜側へ侵入できないためエンドサイトーシスを誘導できず、poly (I : C) 刺激増強作用もみられなかった¹⁾。

さらに PLA2 による lipid raft 形成促進を介した増強作用も考えられる。豚の膵臓の分泌型 PLA2 は脂質の構成を変えたり lipid raft 形成を促進したりすることが以前報告されている⁶⁾。また Raftlin という細胞内 lipid raft タンパクはヒト樹状細胞や上皮細胞における poly (I : C) 細胞内取り込みに必要であることも報告されている⁷⁾。これらの報告を勘案すると、PLA2 による細胞膜の脂質構成要素の変化が lipid raft 形成を促進し Raftlin 依存性のエンドサイトーシスを介して poly (I : C) 刺激による活性化を増強させた可能性も考えられる。

PLA2 による増強作用は TLR1/2 や TLR2/6 リガンド応答においても認められた。最近の報告によれば TLR2 はマクロファージの lipid raft で TLR1 や TLR6 と共局在する。ハチ毒 PLA2 は lipid raft の総量を増やすことで細胞表面 TLR を介した活性化に影響を及ぼしているかもしれない。総合するとハチ毒 PLA2 はその酵素活性により細胞膜の修飾に影響を及ぼし、TLR を介した免疫応答に影響している可能性がある。

われわれの研究は潜在的な臨床応用の可能性を含んでいる。TLR3 欠失マウスでは創傷治癒が著しく遅れることや³⁾、poly (I : C) がヒトおよびマウスの皮膚で IL-8 産生により白血球の集積を強め創傷治癒を促進することなどが近年報告されてきている²⁾。IL-8 は生体レベルでも創傷治癒を増強させるような角化細胞の遊走を誘導するので、ハチ毒 PLA2 はさまざまな皮膚の状況に対する治療に有効である可能性が考えられる。ハチ毒 PLA2 と poly (I : C) との相乗効果を介して角化細胞での IL-8 産生を増加させることで創傷治癒を促進することが考えられる。

おわりに

われわれはハチ毒 PLA2 が TLR リガンドで誘導され

るヒト皮膚角化細胞活性化反応を増強させることを示した。この過程は PLA2 により触媒される加水分解反応による膜の修飾がエンドサイトーシス頻度や lipid raft 形成を促進することを示唆している。これらの結果は将来的に皮膚の創傷に対する新しい治療方法開発に有用である可能性が考えられた。

文 献

- 1) Nakashima A, Tomono S, Yamazaki T, et al. : Phospholipase A2 from Bee Venom Increases Poly (I : C)-induced Activation in Human Keratinocytes. *Int Immunol* 32 : 371-383, 2020 (Oxford University Press より Abstract, Figure 1, 2, 6, 7, 8 使用の許諾取得済み)
- 2) Lin Q, Wang L, Lin Y, et al. : Toll-like receptor 3 ligand polyinosinic : polycytidylic acid promotes wound healing in human and murine skin. *J Invest Dermatol* 132 : 2085-2092, 2012
- 3) Lin Q, Fang D, Fang J, et al. : Impaired wound healing with defective expression of chemokines and recruitment of myeloid cells in TLR3-deficient mice. *J Immunol* 186 : 3710-3717, 2011
- 4) Zha X, Pierini LM, Leopold PL, et al. : Sphingomyelinase treatment induces ATP-independent endocytosis. *J Cell Biol* 140, 39-47, 1998
- 5) Farge E, Ojcius DM, Subtil A, et al. : Enhancement of endocytosis due to aminophospholipid transport across the plasma membrane of living cells. *Am J Physiol* 276 : C725-733, 1999
- 6) Simonsen AC : Activation of phospholipase A2 by ternary model membranes. *Biophys J* 94 : 3966-3975, 2008
- 7) Watanabe A, Tatematsu M, Saeki K, et al. : Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly (I : C)-mediated TLR3 activation. *J Biol Chem* 286 : 10702-10711, 2011

経尿道的前立腺切除術・膀胱結石破碎術後に 敗血症性ショックを来しエンドトキシン吸着療法および 持続的血液灌流濾過を施行した1例

南 和¹⁾, 宮崎 紘子¹⁾, 鈴木 恒夫¹⁾, 加藤 理絵²⁾, 吉永 敦史²⁾, 鎌田 成芳²⁾

¹⁾草加市立病院救急科, ²⁾同 泌尿器科

A case report of septic shock following transurethral resection of prostate and cystolitholapaxy successfully treated with PMX-DHP and CHDF

Kazu Minami¹⁾, Hiroko Miyazaki¹⁾, Tsuneo Suzuki¹⁾, Rie Kato²⁾, Atsushi Yoshinaga²⁾, Shigeyoshi Kamata²⁾

¹⁾Emergency Medicine, Soka Municipal Hospital

²⁾Department of Urology, Soka Municipal Hospital

Abstract

We present a case of 71-year-old man who developed severe septic shock following transurethral resection of prostate (TURP) and cystolitholapaxy (CLL), showing favorable response after multidisciplinary treatment consisting PMX-DHP and CHDF. The patient underwent TURP for prostatic hypertrophy and CLL for bladder stone. The operation was completed with no intraoperative complications. 3 days after operation, a 39.8°C fever, blood pressure decreased and clouding of the consciousness were observed. The patient was transferred to the intensive care unit (ICU) and treated with mechanical ventilation and appropriate drug therapy. 5 hours after admission to the ICU, first PMX-DHP treatment was performed for 16 hours, but hemodynamics was not improved and became no urination. Second PMX-DHP and CHDF treatment performed 9 hours after first PMX-DHP. After second PMX-DHP the patient got stable hemodynamics and sufficient urine volume. Mechanical ventilation was ended 9 days after the ICU admission and moved to the general ward.

Due to the impaired peripheral perfusion during hemodynamic crisis, all toes and 2 fingers were necrosis and amputated. After 6 months of rehabilitation, he discharged to home.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 39~42, 2020

Key words : 経尿道的手術, 敗血症, エンドトキシン吸着療法, 持続的血液灌流濾過

はじめに

経尿道的手術は年々適応が広がり, 泌尿器科疾患に対する標準的な術式となっている。術後感染症は経尿道的手術の主要な合併症の一つで, 重症化して敗血症や敗血症性ショックを来すことがある。今回, われわれは経尿道的前立腺切除術 transurethral resection of the prostate (TURP) および経尿道的膀胱結石破碎術 cystolitholapaxy (CLL) 後に敗血症性ショックを来した症例に対し, エンドトキシン吸着療法 (PMX-DHP) および持続的血液灌流濾過 continuous hemodiafiltration (CHDF) を行い救命したので報告する。

1. 症 例

患 者 : 71 歳, 男性。

主 訴 : 排尿障害, 腎機能低下。

既往歴 : 虫垂炎 (13 歳), 胃潰瘍 (66 歳)。

現病歴 : 排尿障害を主訴に前医を受診, 腹部 CT にて前立腺肥大・膀胱結石・両側水腎症を認めた。1 カ月後に水腎症の改善がなく, 血液検査にて腎機能低下 (Cr 4.79 mg/dL) を認めたため, 当院泌尿器科紹介となった。排尿障害による腎後性腎不全として尿道カテーテルを留置し, 待機的に経尿道的前立腺切除術 (TURP) および経尿道的膀胱結石破碎術 (CLL) を行う方針となった。

現 症：身長 160.0 cm，体重 43.6 kg，血圧 152/79 mmHg，脈拍 61 回/分整，体温 35.7°C。

術前検査所見：血液検査；RBC 336 万/mm³，Hb 11.4 g/dL，Ht 33.3%，WBC 8,300/mm³，Plt 35.1 万/mm³，AST 17 U/L，ALT 12 U/L，BUN 31.9 mg/dL，Cr 2.40 mg/dL，CRP 0.4 mg/dL。尿沈査：赤血球<1/H，白血球 1~4/H，尿培養；陰性。

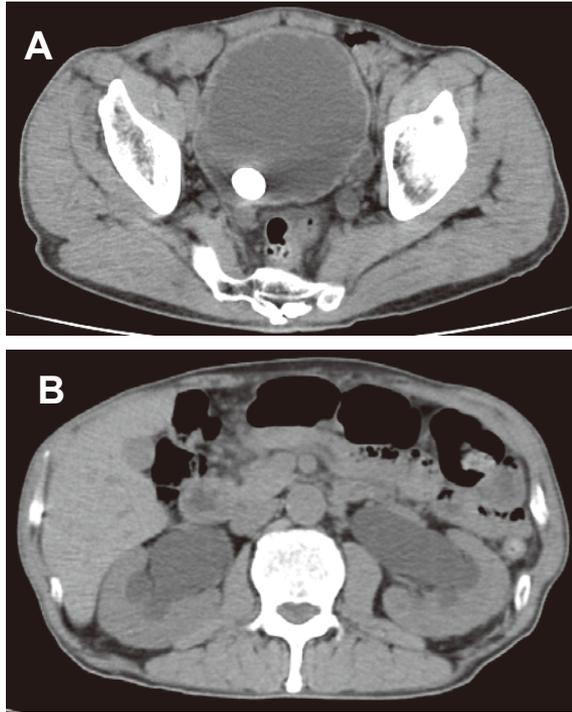


図 1 術前の腹部 CT 検査所見

A：直径 23 mm の結石を膀胱内に認める。
B：両側水腎症を認める。

腹部 CT 検査所見 (図 1)：直径 2.3 cm の膀胱結石，両側水腎症を認める。

入院後経過：入院 3 日目に全身麻酔下で TURP および CLL を施行，手術時間は 1 時間 42 分で問題なく終了した。手術開始直前よりセフォチアム塩酸塩 2 g/日点滴を開始し，術後 3 日目に尿道カテーテルを抜去した。術後 4 日目午前 3 時に 39.8°C の発熱を認め，午前 7 時に意識レベルが低下，収縮期血圧が 60 mmHg 台となった。急速輸液や昇圧薬点滴を開始，敗血症性ショックの診断のもと ICU 管理となった。

ICU 入室時血液検査所見：RBC 307 万/mm³，Hb 10.2 g/dL，Ht 30.4%，WBC 1,900/mm³，Plt 6.8 万/mm³，AST 160 U/L，ALT 68 U/L，BUN 43.0 mg/dL，Cr 3.64 mg/dL，CRP 10.4 mg/dL，pH 7.39，HCO₃⁻ 12.5 mmol/L，BE -10.8 mmol/L，Lactate 6.5 mmol/L。

ICU 入室後経過 (図 2)：鎮静下に人工呼吸管理 (SIMV, F_iO₂ 0.4)，ドパミン 10 μg/kg/分・ノルアドレナリン 0.1 μg/kg/分持続点滴，メロペネム 1 g/日・ガンマグロブリン製剤 5 g/日投与を開始，ICU 入室 5 時間後よりエンドトキシン吸着療法 (PMX-DHP) を行った。速やかに収縮期血圧は 120 mmHg 台に上昇したが徐々に開始前の血圧まで低下，16 時間後 (ICU 入室 21 時間後) に初回 PMX-DHP を終了した。PMX-DHP 終了後の収縮期血圧は 60~80 mmHg で無尿が継続していた。初回 PMX-DHP 終了から 9 時間後 (ICU 入室 30 時間後) に，2 回目の PMX-DHP および持続的血液濾過透析法 (CHDF：UT-1100S フィルタ) を行った。収縮期血圧は 120 mmHg に上昇し，昇圧薬や輸液の減量が可能となり自尿を認めた。PMX-DHP は 16 時間後 (ICU 入室 46 時間後) に終了，CHDF は開始から 5 日後 (ICU 入室 7 日目) に終了した。ICU 入室 11 日目に抜管，12 日目に一

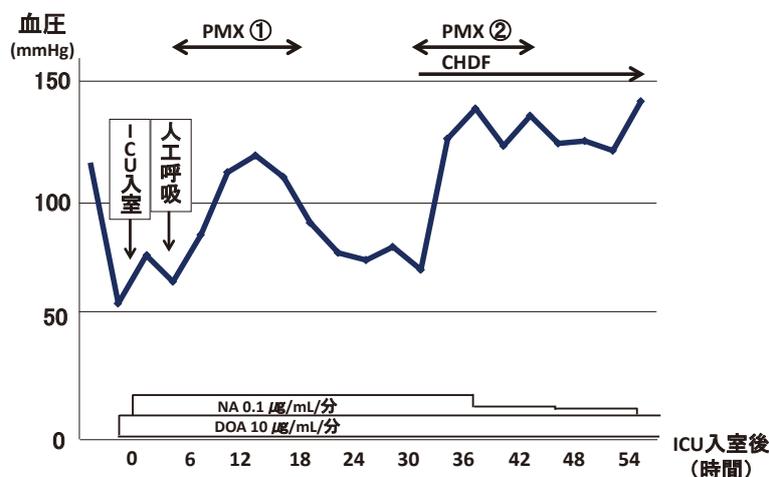


図 2 ICU 入室後経過

NA：ノルアドレナリン，DOA：ドパミン，PMX：エンドトキシン吸着療法，CHDF：continuous hemodiafiltration

般病棟へ転棟した。ICU入室直後に採取した血中エンドトキシン（ES法、正常5 pg/mL以下）は1,689 pg/mLで、血液と尿培養から *Proteus vulgaris*（グラム陰性桿菌）が検出された。

手指および足趾の壊死（図3）：ICU入室直後から末梢循環不全によるチアノーゼ・皮膚剥離を手指や足趾・鼻翼や耳介に認め、壊死が進行した。手指や顔面は皮膚脱落後に軽快傾向であったが、炭化を来した左右全足趾および手指2本に対し、発症4カ月後に切断・断端形成術を行った。リハビリなど長期加療を経て、術後7カ月で自宅へ独歩退院となった。

2. 考 察

泌尿器科疾患に対する経尿道的手術は年々適応が広がり標準的な術式となっているが、術後感染症は経尿道的手術の主要な合併症の一つで、重症化して敗血症や敗血症性ショックを来すことがある。術後感染症を来す危険因子として、高齢者・基礎疾患の有無・尿路感染症や前立腺炎の既往、尿道カテーテル留置や術前細菌尿、手術時間などが報告されている¹⁾。日本泌尿器科学会発行の「泌尿器科領域における周術期感染予防ガイドライン2015」では、TURP後の発熱は手術症例の2.6~13.5%、菌血症は0~4.4%にみられるとし、感染症予防のためBLI配合ペニシリン系や第1・2世代のセファロスポリン系抗菌薬の72時間以内の投与が推奨されている²⁾。本症例は70歳代の基礎疾患がない男性で、ガイドラインに基づき術前より第2世代セフェム系の抗菌薬が投与されていたが、術後4日目に敗血症性ショックを来し重篤な経過をたどった。感染の機序として、術前より留置された尿道カテーテルを介し、前立腺や尿路に潜在的な感染があり、手術操作により血行性に播種し敗血症性ショックを来したと考えられた。

本症例では、敗血症性ショックの治療として昇圧薬や抗菌薬投与・人工呼吸管理などの集中治療に加え、PMX-DHPやCHDFなどの血液浄化療法を行った。PMX-DHP開始直後より収縮期血圧が上昇し、とくに2回目では昇圧薬や輸液の減量が可能になるなど、全身状態の改善に有用であった。PMX-DHPはグラム陰性桿菌の細胞壁に存在するエンドトキシンを吸着除去する装置で、エンドトキシン血症あるいはグラム陰性桿菌感染が疑われる重症症例に対する治療として用いられている。しかし、その有用性に関する評価は定まっておらず、真弓らの報告のなかでは、「PMX-DHPが有用であるのは、極めて限定された患者群であり、適応をよく考慮して使用すべき」と述べられている³⁾。本症例の血中エンドトキシンは1,600 pg/mL（正常5 pg/mL以下）と高値であり、エンドトキシン吸着除去が全身状態の改善に有用な治療であったと思われた。

敗血症の病態生理として、感染により病原微生物由来



図3 末梢循環不全により壊死した手指と足趾
すべての足趾と第2・3指に対して後に切断・断端形成術を行った。

の外因性物質 pathogen associated molecular patterns (PAMPs) や体内で産生される内因性物質 alarmins が出現し、これらが pattern recognition receptor に感知されて、細胞内シグナル伝達が起こり、各種 cytokine が産生される。Cytokine は endothelial hyperpermeability や DIC、免疫麻痺、組織酸素代謝失調など多様な病的変化を引き起こし、多臓器不全となる⁴⁾。仲村らは、敗血症において中心的役割を果たしているのは hypercytokinemia であり、敗血症の治療として cytokine 吸着能を有する polymethyl methacrylate (PMMA) 膜や AN69ST 膜からなる hemofilter を用いた CHDF が有用であると述べている⁵⁾。本症例では尿量低下とオーバーバランスに対して UT1100S 膜を用いて CHDF を行ったが、今後敗血症症例に対する血液浄化療法では、腎代替療法に加え cytokine 吸着を目的に PMMA 膜や AN69ST 膜を用いることが望ましいと思われた。

おわりに

今回、経尿道的前立腺切除術・膀胱結石破砕術後に敗血症性ショックを来した症例に対し、血液浄化療法を中心とした集中治療により救命した症例を報告した。

文 献

- 1) Rudi AJ : Transurethral resection of prostate and UTI. Therapeutic Reserch 15 : 4649-4653, 1994
- 2) 泌尿器科領域における周術期感染予防ガイドライン 2015. 日本泌尿器科学会編. メディカルレビュー社, 2016, pp36-38
- 3) 真弓俊彦, 首藤瑠里, 椎野明日実, 他 : エンドトキシン吸着カラム (PMX-DHP) は有用か? 日外感染症会誌 15 : 242-247, 2018
- 4) 平澤博之 : 敗血症の病態生理における Hypercytokinemia と Endothelial Hyperpermeability. ICU と CCU 40 : 635-643, 2016
- 5) 仲村将高, 織田成人, 貞広智仁, 他 : 急性血液浄化の治療戦略—救急集中治療医の立場から. 体液・代謝管理 28 : 13-24, 2012

リムルス試薬とリコンビナント Factor C 試薬の 相違点に関する考察

土谷 正和

Charles River, Microbial Solutions

Consideration on difference between limulus amoebocyte lysate and recombinant Factor C reagents

Masakazu Tsuchiya

Charles River, Microbial Solutions

Abstract

Limulus amoebocyte lysate (LAL) is widely used for detection of endotoxin, one of the most potent pyrogen. Recent studies revealed the mechanism of activation of Factor C and Factor B, endotoxin binding proteins in LAL cascade. It is well known that Factor C is the first factor to bind endotoxin aggregates. The second coagulation factor, Factor B is important to achieve specificity of LAL to endotoxin because activated Factor C on endotoxin aggregates are essential for its activation. The endotoxin-specific signal is amplified after the Factor B activation in LAL. On the other hand, recombinant Factor C reagents rely on only the specificity of Factor C to endotoxin, and amplifies the trypsin-like activity of activated Factor C that may not be specific to endotoxin. This mechanism seems not to be as specific to endotoxin as LAL. More evaluation and improvement are necessary for recombinant reagents for endotoxin measurement as a safety test.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 43~46, 2020

Key words : endotoxin, Limulus amoebocyte lysate, recombinant Factor C, Bacterial Endotoxins Test

はじめに

カプトガニの血球から調製されるリムルス試薬は、エンドトキシンの測定に用いられ、1980年代にはエンドトキシン試験法として各国局方に収載された。エンドトキシン試験法は、かれこれ40年に渡り医薬品や医療機器のエンドトキシン検出に使用されてきたが、その不具合による製品の発熱事故は報告されていない¹⁾。エンドトキシン試験法が採用される前はウサギを用いた発熱性試験が行われていたが、その採用にあたっては、実検体測定を含む数多くの比較検討が行われ信頼性が確かめられた²⁾。その結果、エンドトキシン試験法では、ウサギ発熱性試験で陽性判定された検体のほとんどすべてを検出することができた。また、GMP規制下における医薬品や医療機器製造で混入する発熱性物質として、エンドトキシンが最も可能性が高く活性も強いと考えられたこともあり、エンドトキシン試験法がウサギ発熱性試験の代替

法として採用された。その後、リムルス試験自体は種々の改良が行われ、その性能も非常に向上している。ただ、これほど長く医薬品や医療機器の安全性試験として信頼されているのは、リムルス試薬のエンドトキシンに対する特異性と高い感度ゆえであろう。

リムルス試薬の活性化が複数の酵素前駆体が順次活性化されるカスケード機構であることは、1980年代に日本の研究グループによって解明されていた³⁾。最近、エンドトキシン感受性因子である Factor C や Factor B の活性化の詳細が明らかにされた^{4,5)}。これらの研究は、リムルス試薬のエンドトキシンに対する特異性がどのようにして実現されているかを示した点で非常に興味深い。リムルス試薬の活性化は、以前に考えられていたような単純な酵素反応によるカスケード機構ではなく、巧妙な分子間相互作用によって、エンドトキシンに対する特異性を維持していることが示唆されたのである。

最近、エンドトキシンを測定する試薬としてリコンビ

ナント Factor C 試薬が開発された⁶⁾。欧州では動物を使用した試験の禁止や動物由来の試薬を使用しない動きがあり、リコンビナント Factor C 試薬もこの点で注目されている。本稿では、リムルス試薬とリコンビナント Factor C 試薬の特異性とシグナル増幅機構について比較する。

1. リムルス試薬のエンドトキシンに対する特異性

リムルス試薬のエンドトキシンに対する特異性において、Factor C のエンドトキシンに対する強く特異的な親和性が重要な働きをしていることは明らかであろう。ただ、リムルス試薬のエンドトキシンに対する特異性は、これだけで担保されているわけではない。最近の研究では、Factor C の活性化は、エンドトキシン凝集体上にある少なくとも 2 分子の分子間相互作用で起こり、1 分子では活性化が起こらないこと、2 分子はお互いに相手を活性化することなどが示されている⁴⁾。1 分子活性化モデルと 2 分子活性化モデルをシミュレーションした結果も、2 分子活性化モデルを支持している⁷⁾。また、種々のリコンビナント Factor C ミュータントを用いた研究⁴⁾で、Factor C の活性化機構の詳細が明らかにされている。Factor C は Phe⁷³⁷-Ile⁷³⁸が切断されて活性化する。フェニルアラニンを切断するプロテアーゼとして、キモトリプシンがよく知られているが、キモトリプシンでも Factor C のプロテアーゼ活性を発現することができる^{4,8)}。Factor C のプロテアーゼ活性は、トリプシントイプの活性で、通常 Val-Pro-Arg-発色基のような合成基質で測定される。キモトリプシンで活性化された Factor C (β -Factor C) は、エンドトキシンに結合する能力を失っているが、この合成基質を分解する活性は持っている。しかし、この β -Factor C は、次の因子である Factor B を活性化することができない^{4,5)}。Factor B が活性化されるのは、エンドトキシンによって活性化された Factor C (α -Factor C) とエンドトキシンが共存する場合である。Factor B もエンドトキシン結合能力が強く、その活性化は、活性化した Factor C と同じエンドトキシン上で起こると考えられる⁵⁾。また、Factor B の活性化には、2 カ所の切断が必要である⁵⁾。トリプシントイプのプロテアーゼは、1 カ所目の Arg¹⁰³-Ser¹⁰⁴は切断するが、2 カ所目の Ile¹²⁴-Ile¹²⁵は切断しないと思われる。すなわち、こちらも何らかの分子間相互作用によって活性化が起こると予想され、リムルス試薬の活性化が、単純な酵素反応ではないことが分かる。この Factor B の活性化こそ、リムルス試薬がエンドトキシンに対する特異性を実現する上で最も重要な機構と思われる。単純な酵素反応による偽陽性が起こらないよう、Factor B の活性化は、活性化した Factor C とエンドトキシンが共存した場合に起こるよう設計されている。これらのことから、リムルス試薬のエンドトキシンに対する特異性は、Factor C

のエンドトキシンに対する強い親和性のみではなく、Factor B という因子の存在によって実現されていると考えられる。

2. リムルス試薬のシグナル増幅機構

リムルス試薬によるエンドトキシンの高感度測定の機構は、これまでカスケード機構の各因子が活性化される毎にシグナル増幅を行うと考えられてきた。しかし、Factor C と Factor B が強くエンドトキシンに結合しているとすれば、これらの活性化によるシグナル増幅作用はあまり期待できない。すなわち、リムルス試薬のシグナル増幅は、プロクロッティングエンザイムの活性化以降で起こっていることになる。筆者の実験でも、Factor C に Factor B を添加しても、エンドトキシンに対する感度は上がらなかったが、さらにプロクロッティングエンザイムを添加すると約 1,000 倍の感度上昇が認められた⁹⁾。すなわち、リムルス試薬のシグナル増幅は、プロクロッティングエンザイムがクロッティングエンザイムに変換される段階以降で行われていることが分かる。このことは、リムルス試薬のシグナル増幅が、エンドトキシンに特異的なシグナルに対して行われていることを示しており、リムルス試薬によるエンドトキシンの高感度測定における有効性を示唆している。これらの機構を含んだリムルス試薬のカスケード機構を図 1 に示す¹⁰⁾。

3. リコンビナント試薬の特異性

リコンビナント Factor C 試薬は、リムルス試薬のエンドトキシン感受性因子である Factor C のみを利用した試薬で、エンドトキシンによって活性化された Factor C のセリンプロテアーゼ活性を測定するという原理である⁶⁾。リコンビナント Factor C 試薬は、リムルス試薬のエンドトキシン感受性因子を使用しているため、リムルス試薬と全く同じ反応を見ているという意見もあるが、活性化型 Factor C の一つの性質であるセリンプロテアーゼ活性を Val-Pro-Arg-発色基で測定することは、リムルス試薬の活性化における Factor B の活性化と同じとは言い難い。前述のように、Factor B の活性化は、Val-Pro-Arg 基質を水解する β -Factor C では起こらない。Factor B は、リムルス試薬のエンドトキシンに対する特異性に大きく寄与していると考えられ、Factor C のみを使用したエンドトキシン測定の特異性は、Factor B とプロクロッティングエンザイムを含んだ試薬と比較して低いと考えられる。このことから、リコンビナント試薬を用いてエンドトキシンを測定するのであれば、これら 3 種類の因子を含んだフルリコンビナント試薬を目指すべきであろう。

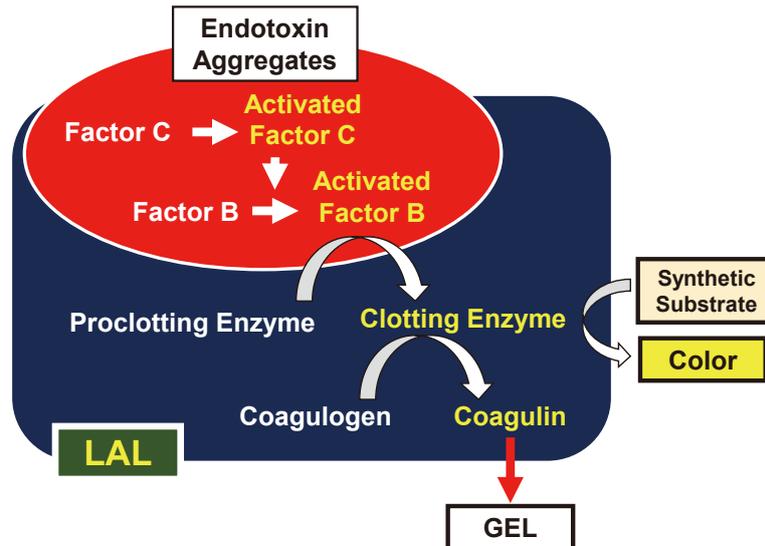


図 1 リムルス試薬のカスケード機構 (文献¹⁰より引用)

Factor C および Factor B の活性化は、エンドトキシン凝集体上で起こり、シグナル増幅はプロクロッティングエンザイムの活性化以降で行われる。

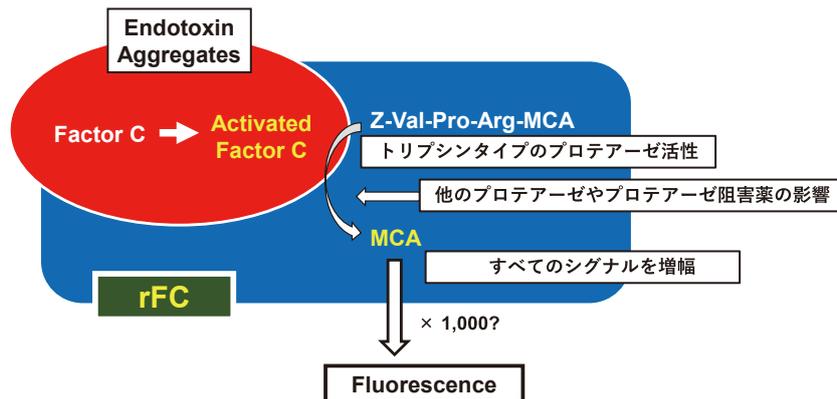


図 2 リコンビナント Factor C 試薬の反応機構 (文献¹⁰より引用改変)

Factor C 様の活性をすべて蛍光で増幅する。

4. リコンビナント Factor C 試薬のシグナル増幅

現在市販されているリコンビナント Factor C 試薬は、リムルス試薬と同等の標準エンドトキシン検出感度を実現している。リムルス試薬では、プロクロッティングエンザイムの活性化が主要なシグナル増幅機構であるが、リコンビナント Factor C 試薬では、蛍光基質を用いてシグナル増幅を行っている (図 2)。活性化された Factor C の僅かな活性を蛍光基質で増幅することは、測定に影響を及ぼす共存物質の影響も増幅するということを意味している。例えば、トリプシントypesのプロテアーゼの微量混入による偽陽性やプロテアーゼ阻害薬や活性に影響を及ぼす物質の混入による偽陰性の可能性である。リムルス試薬では、このような影響はシグナル増幅の後に出

ることが多いと考えられるので、その影響はリコンビナント Factor C 試薬より少ないと考えられる。

5. 天然のエンドトキシンに対するリムルス試薬とリコンビナント試薬の反応性

リコンビナント試薬は、エンドトキシン試験法代替法として期待されており、バリデーションの試みがなされている^{11,12})。これらのバリデーションには標準エンドトキシンが使用されているが、実際に製品中に混入するエンドトキシンが大腸菌から精製された標準エンドトキシンとは違うことを考えると、天然のエンドトキシンを用いた比較データは有用である。天然のエンドトキシンを用いてリムルス試薬とリコンビナント試薬を比較した例として、菊池らの報告がある¹³)。この報告の中で天然水の結果を見ると、湖沼水、河川水、ミネラルウォーター、

水道水などで、リコンビナント試薬の測定値の多くがリムルス試薬の測定値より著しく低い値を示している¹⁰⁾。われわれが行った製造用水のエンドトキシン測定でも、リコンビナント Factor C 試薬の値が低い傾向が認められた⁹⁾。これらの結果は、標準エンドトキシンと天然エンドトキシンの反応性の比率が、リムルス試薬とリコンビナント試薬で異なっている可能性を示すもので、リコンビナント試薬による偽陰性の可能性も示唆している。どの活性が発熱性と近いのかは、今後の研究を待たなければならないが、リコンビナント Factor C 試薬が、これまでの実績があるリムルス試薬のエンドトキシン値より明らかに低い値を示すのであれば、更なる検討が必要であろう。

おわりに

2018年に欧州薬局方では、蛍光法を用いたリコンビナント Factor C 試薬の Chapter 案 (EP 2. 6. 32.) を作成し、2021年にはこれを正式に収載の予定である。日本薬局方と米国薬局方でも、リコンビナント試薬に関する参考情報案を作成したが (2019年)、リコンビナント試薬の位置付けは、エンドトキシン試験法の代替法である。このように各国でリコンビナント試薬に対する考え方が異なるが、今後リコンビナント試薬の使用検討が進んでいくという方向は明らかであろう。ただし、医薬品や医療機器の安全性試験としてのエンドトキシン試験法でも「患者の安全」が最優先事項であることを忘れてはならない。本稿で紹介したように、リムルス試薬のエンドトキシンによる活性化は、以前に考えられていたモデルよりはるかに複雑であり、リコンビナント Factor C 試薬は原理的にリムルス試験と異なる結果を出す可能性がある。リコンビナント試薬をリムルス試験と同等に使えるようにするためには、種々のエンドトキシンに対してリムルス試験と同等の特異性を有していることを確認する必要がある。天然水や製造用水中のエンドトキシン測定で観察されているようなリコンビナント試薬による偽陰性の可能性を考えると、リコンビナント試薬は、リムルス試験の代替法として十分に確立されたとは言いがたい。リコンビナント試薬をエンドトキシン試験に使用するためには、実際に混入する可能性のある天然のエンドトキシンに対する反応性について、さらにデータを収集し、その安全性を検証する必要がある。今後の検証を基に、より良いリコンビナント試薬が開発されることが望まれる。

文 献

1) McCullough KZ : Current USP perspectives on low

- endotoxin recovery (LER). *Am Pharm Rev Endotoxin Suppl* 2016 : 4-7, 2016
- 2) 土谷正和 : ウサギによる発熱性試験とエンドトキシン試験の相関. “改訂第2版エンドトキシン試験—どのように実施し、どのように理解するか—” 情報機構, 2015, pp34-37
- 3) Iwanaga S, Miyata T, Tokunaga F, et al. : Molecular mechanism of hemolymph clotting system in *Limulus*. *Thromb Res* 68 : 1-32, 1992
- 4) Shibata T, Kobayashi Y, Ikeda Y, et al. : Intermolecular autocatalytic activation of serine protease zymogen factor C through an active transition state responding to lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 293 : 11589-11599, 2018
- 5) Kobayashi Y, Takahashi T, Shibata T, et al. : Factor B is the second lipopolysaccharide-binding protease zymogen in the horseshoe crab coagulation cascade. *J Biol Chem* 290 : 19379-19386, 2015
- 6) Ding JL, Ho B : A new era in pyrogen testing. *Trends Biotechnol* 19 : 277-281, 2001
- 7) Miyagawa Y, Kikuchi K, Tsuchiya M, et al. : A statistical model for activation of Factor C by binding to LPS aggregates. *Eur Biophys J* 48 : 743-747, 2019 (<https://doi.org/10.1007/s00249-019-01400-4>)
- 8) Kobayashi Y, Shiga T, Shibata T, et al. : The N-terminal Arg residue is essential for autocatalytic activation of a lipopolysaccharide-responsive protease zymogen. *J Biol Chem* 289 : 25987-25995, 2014
- 9) 土谷正和 : エンドトキシンよもやま話 (その3) リムルス試薬の特異性とリコンビナント試薬. *日防菌防黴会誌* 48 : 205-208, 2020
- 10) Tsuchiya M : Innovative mechanism of *Limulus* amoebocyte lysate activation to achieve specificity and sensitivity to endotoxin ; Comparison with recombinant Factor C reagents. *Int J Dev Res* 10 : 36751-36756, 2020
- 11) Loverock B, Simon B, Burgenson A, et al. : A recombinant Factor C procedure for the detection of Gram-negative bacterial endotoxin. *Pharmacopeial Forum* 35 : 1613-1621, 2009
- 12) Bolden J, Smith K : Application of recombinant Factor C reagent for the detection of bacterial endotoxins in pharmaceutical products. *PDA J Pharm Sci Technol* 71 : 405-412, 2017
- 13) 菊池裕, 靄島由二, 福井千恵, 他 : 平成 27 年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」研究報告, エンドトキシン試験法に用いる組換え試薬の評価に関する研究. *医薬品医療器レギュラトリーサイエンス* 48 : 252-260, 2017

グラム陰性菌 LPS および抗菌ペプチド LL-37 による 老化血管内皮細胞の炎症性応答の増強

鈴木 香, 長岡 功

順天堂大学大学院医学研究科生化学・生体防御学

Gram-negative bacterial lipopolysaccharide and antimicrobial LL-37 enhance ICAM-1 expression and NF- κ B activation in senescent endothelial cells

Kaori Suzuki, Isao Nagaoka

Department of Host Defense and Biochemical Research, Juntendo University Graduate School of Medicine

Abstract

Cellular senescence is associated with the induction of a proinflammatory phenotype. Previous studies revealed that senescent endothelial cells are localized at the sites of atherosclerotic lesions, suggesting the involvement of endothelial cell senescence in atherogenesis. Importantly, bacterial infection has been speculated to contribute to the pathogenesis of atherosclerosis; however the effect of bacterial components or host-derived antimicrobial substances on senescent endothelial cells has not fully understood. Here, we investigated the effects of Gram-negative bacterial lipopolysaccharide (LPS) and antimicrobial peptide LL-37, which is deposited at the atherosclerotic loci, on senescent endothelial cells using serially passaged human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). The results indicated that senescent endothelial cells basally exhibited proinflammatory phenotype, as evidenced by increased expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and activation of NF- κ B (phosphorylation of p65), compared with non-senescent cells. Of note, senescent endothelial cells more potently responded to the stimulation of LPS or LL-37, as evidenced by further enhanced ICAM-1 expression and NF- κ B activation, compared with non-senescent cells. Moreover, expression levels of the receptors for LPS (TLR4) and LL-37 (purinergic receptor P2X7) were upregulated in senescent endothelial cells, suggesting that both LPS and LL-37 enhance the ICAM-1 expression and NF- κ B activation in senescent endothelial cells possibly via the upregulated TLR4 and P2X7. Together these observations indicate that senescent endothelial cells may contribute to the pathogenesis of atherosclerosis via the basal proinflammatory phenotype and the enhanced inflammatory responses against atherogenic factors including bacterial LPS and host-derived antimicrobial LL-37.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 47~53, 2020

Key words : LL-37, cellular senescence, senescence-associated secretory phenotype (SASP), NF- κ B

はじめに

細胞老化 (cellular senescence) は, *in vitro* 培養系において細胞が分裂を停止し, 増殖しない状態が不可逆的に引き起こされた現象として見出された¹⁾。老化細胞は加齢関連疾患の病変部位などで認められ, 生体内での老化を一部反映すると考えられている。近年, 老化細胞は炎症性の形質 (senescence-associated secretory phenotype : SASP) をもつことが明らかになり, 動脈硬化などの慢性炎症の病態形成にもかかわると考えられてい

る²⁾。一方, 動脈硬化を増悪する要因として細菌感染の影響が示唆されているが, そのメカニズムはほとんど明らかにされていない。また, LL-37 は感染刺激によって宿主細胞から放出される抗菌ペプチドであるが, 動脈硬化の増悪因子としても注目される。われわれは, 動脈硬化における細胞老化, 細菌感染および宿主由来の抗菌ペプチドという3つのリスクファクターに着目し, 老化血管内皮細胞を用いて細菌の菌体成分であるリポポリサッカライド (lipopolysaccharide : LPS) と宿主細胞から放出される抗菌ペプチド LL-37 の影響を検討した。その結

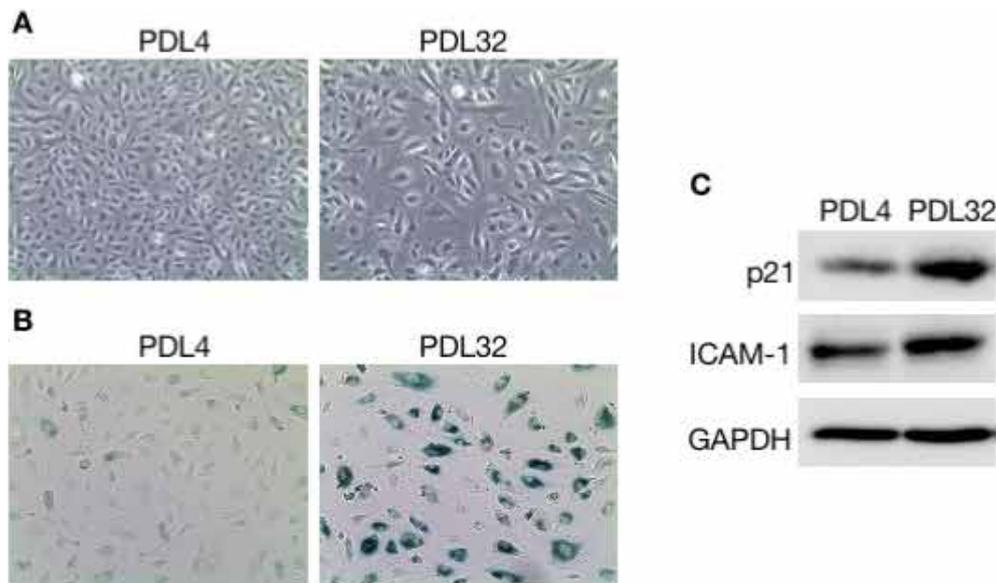


図 1 HUVEC の長期継代培養によって調整された老化細胞の特徴

HUVEC を血管内皮細胞用培地 EGM-2 で培養し、3~4 日毎に継代した。Population doubling level (PDL) 4 (継代回数 4 に相当) と PDL32 (継代回数 12 に相当) の細胞を比較した。A) 位相差顕微鏡像：PDL32 の細胞は扁平化・大型化し、不均一な形態をとった。B) PDL32 の細胞は SA- β -Gal 染色に陽性であった。C) PDL32 の細胞において、PDL4 に比べて p21 と ICAM-1 の発現が増強した。本研究では PDL32 以上を老化細胞 (senescent cells)、PDL4 以下を非老化細胞 (non-senescent cells) として実験に用いた。

果、LPS と LL-37 は老化血管内皮細胞に対して炎症性応答の増強を誘導することを見出した。本稿では、SASP の誘導に中心的な役割をもつシグナル伝達分子 NF- κ B と、LPS および LL-37 の作用とそれぞれの受容体発現に着目して、老化血管内皮細胞における炎症性応答の増強について概説したい。

1. 細胞老化について

細胞老化はヒト初代培養細胞において、増殖期を経たのちに細胞増殖が不可逆的に停止する現象として 1961 年に Hayflick らによって報告された¹⁾。現在では、長期培養のほか酸化ストレス、DNA 損傷、炎症性因子などによっても細胞老化が誘導されることがわかっている。老化した細胞の特徴として、増殖能の低下に加えて形態の扁平化・大型化、細胞周期停止にかかわるタンパク質の発現上昇、酸性 β -ガラクトシダーゼ活性の増加などがある。従来、細胞老化はがん化を抑制する防御機構であると考えられていたが、近年では老化細胞が炎症性の形質 (SASP) をもつことが明らかになり、これが加齢にともなう慢性炎症の病態に関与するとして注目される²⁾。

動脈硬化は血管の慢性炎症が原因となって起こる加齢関連疾患である。動脈硬化巣では老化した血管内皮細胞や血管平滑筋細胞が観察されており、これらの細胞が動脈硬化の病態形成や増悪にかかわると考えられている。

しかしながら、細胞老化がどのような機序で動脈硬化の病態形成にかかわるのか、また病態形成における他の増悪因子との関係については十分に解明されていない。

2. 血管内皮細胞の長期培養で誘導される細胞老化

われわれはまず、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells : HUVECs) を長期間培養して細胞老化の誘導を試みた³⁾。Lonza 社より購入した HUVECs を血管内皮細胞培養培地 EGM-2 を用いてカルチャーディッシュ (直径 100 mm) で培養し、コンフルエントに達する前に (3~4 日毎)、トリプシン/EDTA 溶液で細胞を剥離、回収して継代した。約 80 日間の継代培養後、細胞分裂回数を示す population doubling level (PDL) が 30 を過ぎる頃には細胞増殖が遅くなり、形態は扁平化・大型化して不均一になった (図 1A)。また、細胞老化を評価する方法のひとつとして老化関連酸性 β -ガラクトシダーゼ (senescence-associated beta-galactosidase : SA- β -gal) アッセイが一般的に用いられ、この試験では老化した細胞が青く染色される。図 1B に示すように、われわれの調製した PDL32 の細胞は継代回数の少ない PDL4 の細胞に比べて強く青色に染色された。さらに、細胞老化関連タンパク質の発現変化を検討した。p21 (Waf1/Cip1) はサイクリン依存性キナーゼの阻害タンパク質であり、細胞周期を抑制して増殖を遅らせ

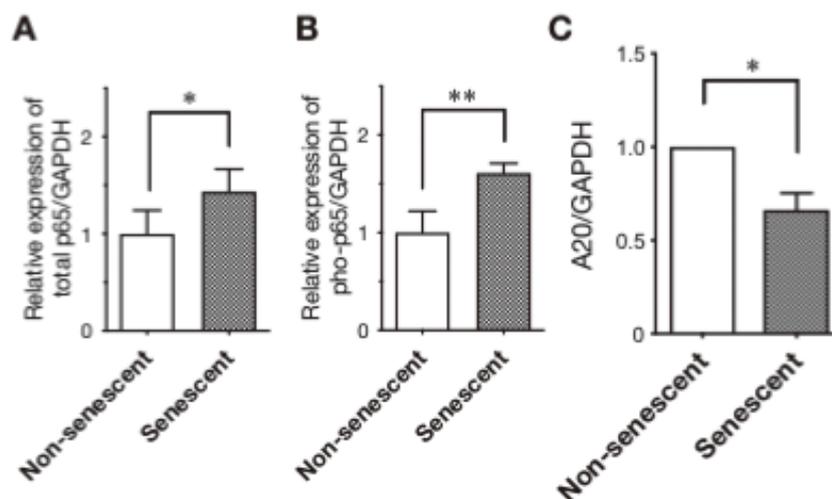


図 2 未刺激時の老化細胞における NF- κ B の活性化

老化細胞および非老化細胞における total p65 (A), リン酸化 p65 (B), A20 (C) の発現をウェスタンブロット法で解析し、非老化細胞に対する相対値で示した。p65 の発現量とリン酸化 p65 (pho-p65/GAPDH) は非老化細胞に比べて老化細胞で多かった。一方、NF- κ B シグナルの抑制因子である A20 の発現は老化細胞で低下していた。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

る働きがある。ウェスタンブロットの結果、PDL32 の細胞では p21 の発現が亢進していた (図 1C)。これらの結果から、PDL32 の細胞は老化細胞の特徴を有することがわかった。したがって、本研究では PDL32 以上を老化細胞 (senescent cells)、対照として PDL 4 以下を非老化細胞 (non-senescent cells) として以下の実験に用いた。

老化細胞では接着因子、サイトカイン、プロテアーゼなどの産生が増加し (炎症性の形質である SASP の誘導)、これが炎症の増強にかかわることが示されている²⁾。Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) は血管内皮細胞が産生する接着因子であり、動脈硬化を含めたさまざまな炎症の場において、単球の血管内皮細胞への接着と浸潤に重要な働きをしている。そこで、老化細胞における ICAM-1 の発現変化を調べた結果、PDL32 の細胞では PDL4 に比べて発現亢進しており、SASP の誘導が確認された (図 1C)。

3. 老化血管内皮細胞における NF- κ B の活性化

次に、老化血管内皮細胞における NF- κ B の活性化状態を調べた。NF- κ B 分子の中で p65 (RelA) は、ICAM-1 の発現を含めた幅広い炎症応答に関与する。さらに、p65 は老化細胞における SASP の恒常的な誘導にかかわることが報告される⁴⁾。そこで、p65 の発現量とその活性化 (リン酸化) を老化細胞と非老化細胞で比較した。その結果、老化細胞において p65 の発現が増加しており (図 2A)、リン酸化 p65 も増加していた (図 2B)。また、NF- κ B の活性は活性化因子と抑制性因子のバランスに

よって調節される。A20 は NF- κ B シグナルの過剰な活性化を抑える抑制性因子である⁵⁾。興味深いことに、老化細胞において A20 の発現低下がみられた (図 2C)。これらの結果から、老化血管内皮細胞の恒常的な SASP の誘導には、p65 の発現亢進とそのリン酸化の亢進、さらに A20 の発現低下による NF- κ B の活性化がかかわると考えられた。

4. LPS に対する老化血管内皮細胞の炎症性応答

細菌感染が動脈硬化の増悪にかかわるとする報告がある。そこで、老化した血管内皮細胞に細菌の病原因子である LPS を作用させ、老化細胞と非老化細胞における応答性を比較した。LPS を作用させて 24 時間後に ICAM-1 の発現をみたところ、老化細胞と非老化細胞のどちらにおいても ICAM-1 の発現誘導が確認された。興味深いことに、LPS による ICAM-1 の発現誘導は老化細胞においてより増強していた (図 3A)。LPS による ICAM-1 の発現は NF- κ B 経路によって誘導される⁶⁾。そこで p65 の活性化を老化細胞と非老化細胞で比較したところ、LPS は老化細胞と非老化細胞において p65 のリン酸化を誘導したが、誘導の程度は老化細胞においてより強かった (図 3B)。これらの結果から、老化血管内皮細胞において LPS による ICAM-1 の発現誘導が増強しているが、それには NF- κ B p65 の活性化がかかわると考えられた。

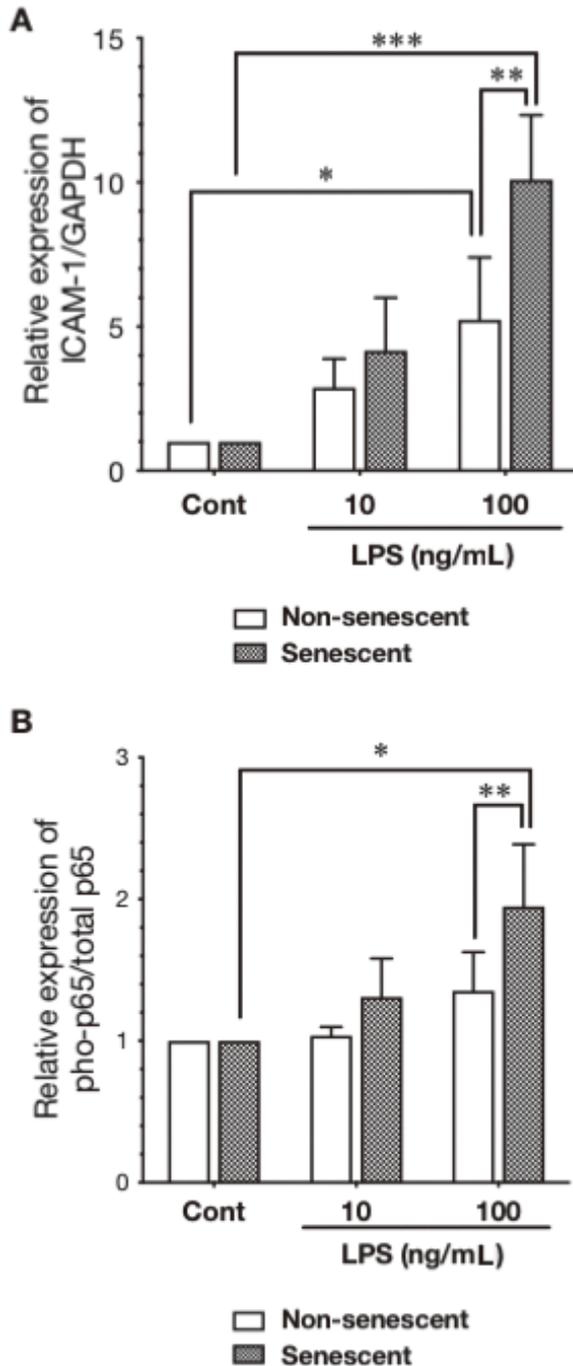


図 3 LPS 刺激時の老化細胞における ICAM-1 の発現誘導および NF- κ B の活性化

老化細胞および非老化細胞を LPS (*E. coli* O111 : B4, 10 or 100 ng/mL) で刺激し, ICAM-1 の発現 (A, 24 時間後) と p65 のリン酸化 (pho-p65/total p65, B, 1 時間後) をウェスタンブロット法で解析した。結果は老化細胞および非老化細胞のそれぞれにおいて, 未刺激時に対する相対値で示した。LPS (100 ng/mL) は老化細胞および非老化細胞に対して ICAM-1 の発現と p65 のリン酸化を誘導したが, その効果は老化細胞においてより強かった。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

5. LL-37 に対する老化血管内皮細胞の炎症性応答

LL-37 はヒト好中球, 単球, 腸管上皮細胞などが産生する抗菌ペプチドであり, 感染刺激によってこれらの細胞から放出される。そして, 興味深いことに, LL-37 が動脈硬化巣に高発現すること⁷⁾, さらに, 動脈硬化モデルマウスでは CRAMP (ヒト LL-37 のマウス相同体) を欠損させることにより病態の改善が認められること⁸⁾から, LL-37 が動脈硬化の増悪因子として注目される。そこで, 老化血管内皮細胞に LL-37 を作用させ, 老化細胞と非老化細胞における応答性を比較した。LL-37 は血管内皮細胞に作用して ICAM-1 の発現を誘導することが知られているが⁹⁾, LL-37 を作用させると, 老化細胞と非老化細胞のどちらにおいても ICAM-1 の発現が誘導されることが確認された。興味深いことに, LL-37 による ICAM-1 の発現誘導は老化細胞において増強していた (図 4A)。次に, LL-37 刺激のシグナル経路を調べるために, LL-37 が NF- κ B 経路を活性化するか, p65 の核移行を指標として免疫細胞染色法で調べた¹⁰⁾。その結果, LL-37 により p65 の核移行が誘導されたことから, LL-37 が NF- κ B を活性化することがわかった (図 4B)。そこで p65 の活性化を老化細胞と非老化細胞で比較した。LL-37 は老化細胞と非老化細胞において p65 のリン酸化を誘導したが, 誘導の程度は老化細胞においてより強かった (図 4C)。これらの結果から, LL-37 は老化血管内皮細胞において NF- κ B p65 をより活性化し, それにともなって ICAM-1 の発現が増強されることが示唆された。

6. 老化血管内皮細胞における LPS および LL-37 受容体の発現変化

LPS および LL-37 による炎症性応答 (ICAM-1 の発現誘導, NF- κ B p65 の活性化) は老化細胞において増強していた (図 3, 4)。このメカニズムを明らかにするため, LPS および LL-37 の受容体の発現をフローサイトメトリ法で調べた。その結果, LPS の受容体である TLR4 は非老化細胞に比べて老化細胞において強く発現することがわかった (図 5A)。一方, LPS の共受容体である CD14 の発現は老化細胞で低下していた (図 5B)。

LL-37 の受容体としていくつかの分子が報告されているが, 血管内皮細胞においてはホルミルペプチド受容体である formyl peptide receptor 2 (FPR2) とプリン受容体である P2X7 が LL-37 受容体として報告されている。老化細胞と非老化細胞でこれらの発現を調べたところ, FPR2 の発現は老化細胞と非老化細胞で差が認められなかったが (図 5C), P2X7 は老化細胞に強く発現することがわかった (図 5D)。

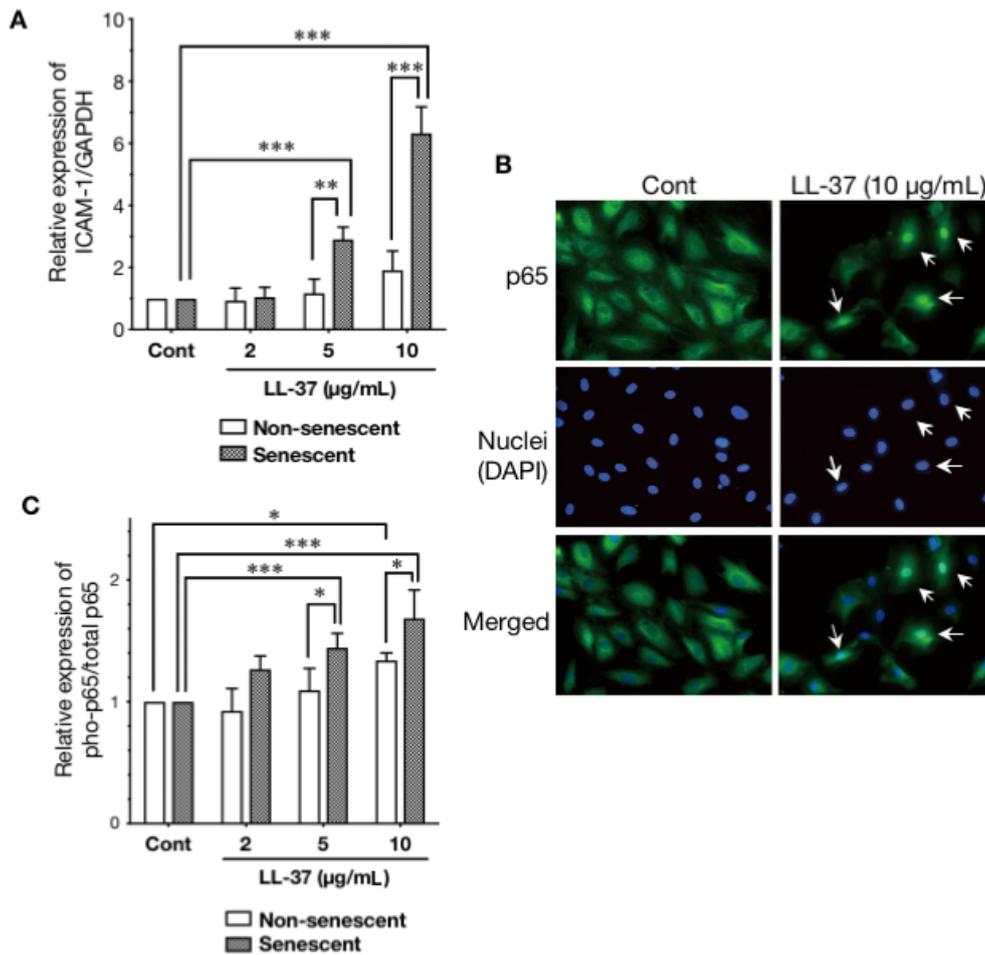


図 4 LL-37 刺激時の老化細胞における ICAM-1 の発現誘導および NF-κB の活性化
 老化細胞および非老化細胞を LL-37 (2, 5 or 10 μg/mL) で刺激し、ICAM-1 の発現 (A, 24 時間後) と p65 のリン酸化 (pho-p65/total p65, C, 4 時間後) をウェスタンブロット法で解析した。結果は老化細胞および非老化細胞のそれぞれにおいて、未刺激時に対する相対値で示した。LL-37 は老化細胞および非老化細胞に対して ICAM-1 の発現と p65 のリン酸化を誘導したが、その効果は老化細胞においてより強かった (LL-37 5 and 10 μg/mL)。B) 非老化細胞を LL-37 (10 μg/mL, 4 時間) で刺激し、p65 の局在を免疫細胞染色法で観察した。LL-37 は p65 の核移行を誘導した。矢印は p65 が核局在する細胞を示す。(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)

おわりに

細菌感染は動脈硬化症の増悪因子とされているが、その詳細はほとんど明らかにされていない。われわれは、グラム陰性細菌の膜成分である LPS と宿主細胞から産生される抗菌性ペプチド LL-37 の老化血管内皮細胞に対する効果を検討したところ、LPS と LL-37 がどちらも老化血管内皮細胞に作用して炎症性応答を増強させることを見出した。そして、その機序として、老化血管内皮細胞において NF-κB が p65 のリン酸化を介して恒常的に活性化されており、LPS や LL-37 の刺激に対してさらに活性化されることが考えられた。老化細胞における恒常的な (未刺激時の) 炎症性形質の発現と、われわれが

見出した LPS および LL-37 の刺激に対する炎症性応答の増強がどちらも NF-κB シグナル経路の活性化を介しているという知見は、老化細胞における炎症性応答の増強メカニズムを理解するうえで興味深い。

老化血管内皮細胞において、LPS 受容体である TLR4 と LL-37 受容体である P2X7 の発現が亢進していたことから、LPS と LL-37 に対する炎症性応答の増強に、これら受容体 (TLR4, P2X7) の発現亢進がかかわることが考えられた。動脈硬化症モデルマウスを用いた研究では、TLR4¹¹⁾あるいは P2X7¹²⁾を欠損させることにより動脈硬化の病態改善が報告されていることから、これらの受容体の下流で働くシグナル経路が動脈硬化の病態形成に重要であると考えられる。実際、TLR4¹³⁾や P2X7¹⁴⁾は

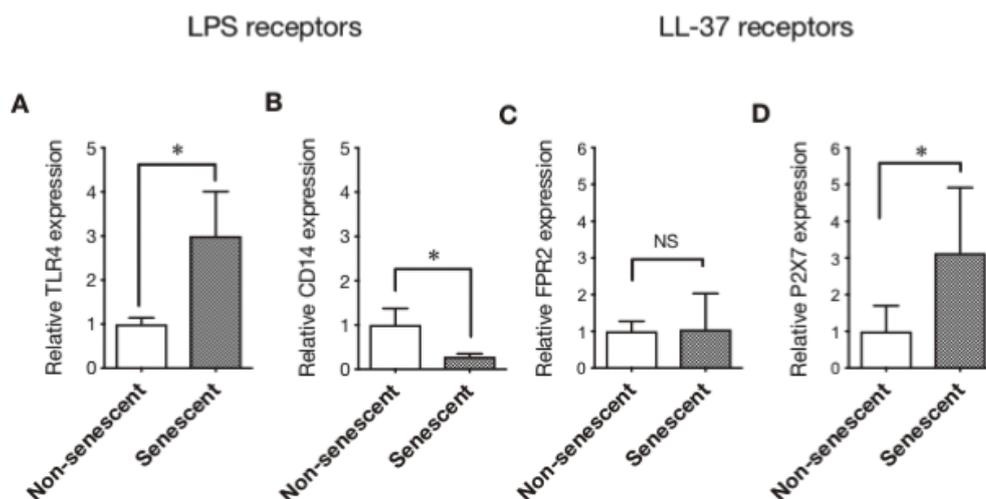


図 5 老化細胞における LPS および LL-37 受容体の発現変化

老化細胞および非老化細胞における TLR4 (A), CD14 (B), FPR2 (C), P2X7 (D) の発現をフローサイトメトリー法で解析した。結果は非老化細胞に対する相対値で示した。LPS 受容体である TLR4 の発現は老化細胞で亢進する一方、CD14 の発現は減弱した。LL-37 受容体である P2X7 の発現は老化細胞で亢進する一方、FPR2 の発現は変化しなかった。(* $p < 0.05$, NS not significant)

動脈硬化患者あるいはモデルマウスのプラーク部位の血管内皮細胞において強く発現していることが報告されている。したがって、動脈硬化の病態形成において、細菌由来の LPS や宿主由来の LL-37 がそれぞれ TLR4 や P2X7 を介して老化血管内皮細胞を刺激し、NF- κ B シグナル経路を介して炎症を増悪させる可能性が考えられる。さらに、このことから、細胞老化が炎症性応答を増強するメカニズムのひとつとして、老化細胞における炎症関連分子に対する受容体の発現誘導が考えられる。動脈硬化の病態形成における細胞老化、細菌感染、さらには宿主由来分子のかかわりについてはいまだ解明の途上であり、今後の研究が期待される。

本稿は、Int J Mol Med 44 : 1187-1196, 2019 (Suzuki, et al.) にて報告された研究に基づく総説論文である¹⁵⁾。

謝 辞

本研究は文部科学省学術研究助成基金助成金（課題番号 JP16K08789）および私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（事業番号 S1411007）の支援を受けて行われた。

文 献

- Hayflick L, Moorhead PS : The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25 : 585-621, 1961
- Childs BG, Durik M, Baker DJ, et al. : Cellular senescence in aging and age-related disease : from mechanisms to therapy. *Nat Med* 21 : 1424-1435, 2015
- Yanaka M, Honma T, Sato K, et al. : Increased mono-
- cytic adhesion by senescence in human umbilical vein endothelial cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 75 : 1098-1103, 2011
- Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K : Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Signal* 24 : 835-845, 2012
- Shembade N, Harhaj EW : Regulation of NF- κ B signaling by the A20 deubiquitinase. *Cell Mol Immunol* 9 : 123-130, 2012
- Dauphinee SM, Karsan A : Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* 86 : 9-22, 2006
- Edfeldt K, Agerberth B, Rottenberg ME, et al. : Involvement of the antimicrobial peptide LL-37 in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 : 1551-1557, 2006
- Döring Y, Drechsler M, Wantha S, et al. : Lack of neutrophil-derived CRAMP reduces atherosclerosis in mice. *Circ Res* 110 : 1052-1056, 2012
- Ju Y, Hua J, Sakamoto K, et al. : Glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide modulates LL-37-induced endothelial cell activation. *Int J Mol Med* 22 : 657-662, 2008
- Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, et al. : An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest* 111 : 1665-1672, 2003
- Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, et al. : Lack of toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in

- mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 : 10679-10684, 2004
- 12) Stachon P, Heidenreich A, Merz J, et al. : P2X₇ deficiency blocks lesional inflammasome activity and ameliorates atherosclerosis in mice. *Circulation* 135 : 2524-2533, 2017
 - 13) Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, et al. : Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions : a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 105 : 1158-1161, 2002
 - 14) Green JP, Souilhol C, Xanthis I, et al. : Atheroprone flow activates inflammation via endothelial ATP-dependent P2X₇-p38 signalling. *Cardiovasc Res* 114 : 324-335, 2018
 - 15) Suzuki K, Ohkuma M, Nagaoka I : Bacterial lipopolysaccharide and antimicrobial LL-37 enhance ICAM-1 expression and NF- κ B p65 phosphorylation in senescent endothelial cells. *Int J Mol Med* 44 : 1187-1196, 2019

過ヨウ素酸酸化と質量分析による リピド A 脂肪酸結合位置の解析

川原 一芳, 尾之上さくら

関東学院大学理工学部理工学科生命学系

Determination of fatty acid-localization in lipid A molecules by periodate oxidation and mass spectrometry

Kazuyoshi Kawahara, Sakura Onoue

Department of Biosciences, College of Science and Engineering, Kanto Gakuin University

Abstract

The immunological activity of LPS is closely related with the localization of fatty acids and the acyloxyacyl structures formed by them in lipid A molecules. MALDI-TOF mass spectrometry (MS) is commonly used to determine the fatty acid localization by detecting oxonium ions derived from non-reducing end glucosamine by the split of glucosamine disaccharide of lipid A. However, alternative method is required because the sensitivity in MS is reduced when the purity of lipid A preparation is not enough. To solve this problem, we developed the method of periodate oxidation. The glucosamine disaccharide of lipid A was split by sodium periodate after reduction with NaBH₄ and hemiacetal ring of reducing end glucosamine was opened. Through this oxidation, non-reducing end glucosamine with fatty acids bound to it remained, and could be detected by MALDI-TOF MS. This method was applied to the wild-type lipid A, and the modified lipid A of *Escherichia coli* strains KGU0485 and KGU0496 constructed in the previous study by the introduction of *Klebsiella acyltransferase* gene. The results indicated that the method was useful for the determination of fatty acid-localization in lipid A molecules.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 54~58, 2020

Key words : リピド A, 脂肪酸結合位置, 質量分析, 過ヨウ素酸酸化, 大腸菌

はじめに

エンドトキシン (LPS) の活性中心であるリピド A の化学構造, とくに脂肪酸の鎖長, および結合位置が, LPS の免疫活性に重要であることは, 1980 年代の大阪大学のグループによるリピド A の化学合成研究で明らかになった¹⁾。これは, LPS 分子内で脂肪酸が形成する疎水領域の特定の形状がレセプターである TLR4 との特異的な会合に必要とされるからである。したがって, リピド A 分子内の脂肪酸の結合位置を決定することは, LPS の活性を予測するために極めて重要であると考えられる。

免疫活性が最も強いとされる大腸菌リピド A の疎水領域は, 還元末端グルコサミンおよび非還元末端グルコサミンの C2 位 (アミノ基) および C3 位 (水酸基) (それぞれ C2 位, C3 位, C2' 位, C3' 位と表現) に酸アミド結合およびエステル結合した 3-ヒドロキシミリステン

酸 (3-OH-C_{14:0}) と, さらに非還元末端グルコサミンに同様に結合した 3-OH-C_{14:0} の水酸基にエステル結合した 2 種類の非ヒドロキシ脂肪酸, すなわちラウリン酸 (C_{12:0}) とミリステン酸 (C_{14:0}) から形成される。われわれはこのような脂肪酸の分岐鎖構造 (アシロキシアシル構造) を形成する大腸菌の C_{12:0} 転移酵素遺伝子, あるいは C_{14:0} 転移酵素遺伝子の破壊変異株を作製し, これらの変異株に他の菌種の非ヒドロキシ脂肪酸転移酵素遺伝子を導入することで, 人工的な構造をもつリピド A を作出することを試みてきた^{2,3)}。このような研究においては, 得られた変異リピド A 中の非ヒドロキシ脂肪酸の結合位置を正確に決定することが必要とされる。われわれは最近の研究において, 従来用いられてきた方法に加えて, 過ヨウ素酸酸化を利用した結合位置の解析方法を開発したので, その方法と有効性について従来法と比較して解説する。

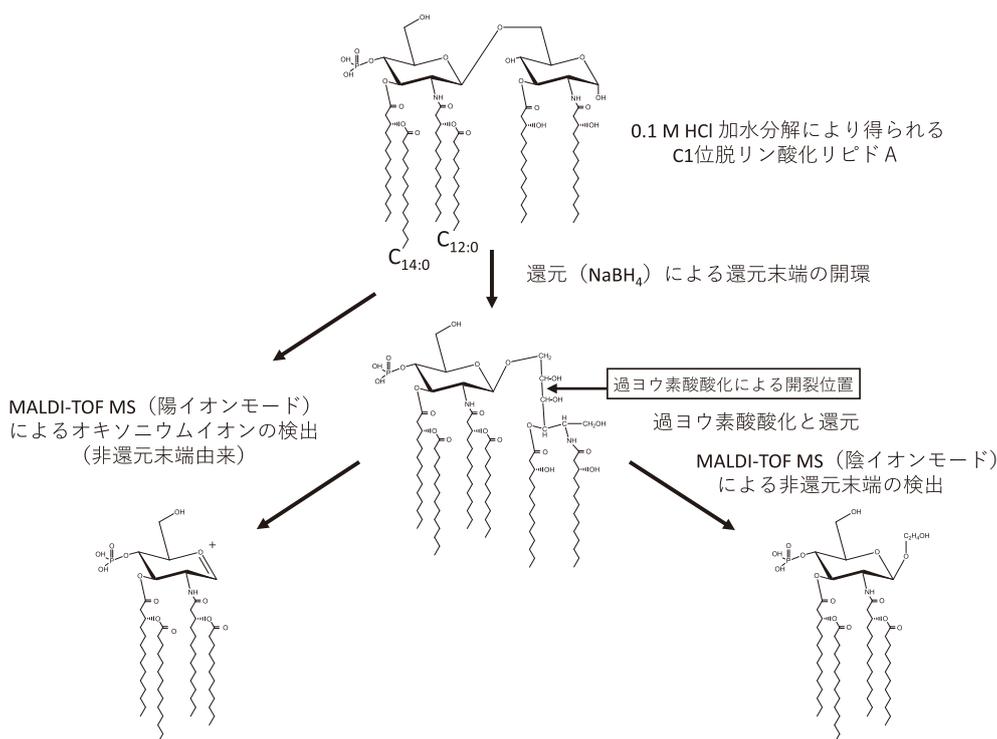


図 1 非還元末端側グルコサミン脂肪酸複合体の検出方法概略

1. 従来法：非還元末端グルコサミン由来オキシニウムイオンの検出

LPS からリポド A を調製するためには、リポド A の糖骨格 (グルコサミン二糖) とコア糖鎖間の結合を比較的弱い酸で加水分解する必要がある。この処理で、還元末端側のグルコサミンの C1 位に結合するリン酸の一部は遊離する。われわれは加水分解産物を単純化するために通常、0.1 M HCl, 100°C, 30 min という条件を用いて、上記のリン酸をほぼ完全に遊離させた脱リン酸化リポド A を調製し、分析に用いている。なお、この条件では非還元末端側グルコサミンの C4 位 (C4' 位) に結合するリン酸基は遊離しない。

C1 位のリン酸基の有無にかかわらず、リポド A 分子を Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) で質量分析すると、グルコサミン二糖の間の結合が切れ、陽イオン検出モードで非還元末端側のグルコサミンから生じた陽電荷をもつイオン (オキシニウムイオン) が検出できる。このイオンは非還元末端側グルコサミンに結合した脂肪酸をすべて含んでいるため、この分子量から、結合している脂肪酸の種類が判別できることになる。このような分析の流れを図 1 に示した。なお、非ヒドロキシ脂肪酸が、C2' 位、C3' 位に結合した 3-OH-C_{14:0} のどちらに結合しているか、について、弱いアルカリ条件下の加水分解処理により決定できることは、昨年記述したと

おりである⁴⁾。

2. 過ヨウ素酸酸化法：還元末端グルコサミンの開裂と得られる産物の検出

前述のように、オキシニウムイオンを検出することによって、非ヒドロキシ脂肪酸のリポド分子内での結合位置を調べることができるが、試料の純度や夾雑物の影響により検出感度が低下し、オキシニウムイオンが明瞭に検出できない場合がある。そこで、われわれは脱リン酸化リポド A の還元末端側グルコサミンの C1 位を水素化ホウ素ナトリウムで還元して開環し、糖アルコールにすることで、グルコサミン二糖の開裂を起しやすくする改良法を考案したが、さらに、より確実に非ヒドロキシ脂肪酸の局在を調べる方法を検討した。

図 1 に示したように、C1 位の還元により得られる糖アルコールには C4 位と C5 位に結合した隣接する水酸基が生じており、このような隣接する水酸基間の炭素結合は過ヨウ素酸による酸化を受けて切断されることが古くから知られている。このような化学反応は予期せぬ非特異的反応を伴うことも多く注意が必要であるが、本研究ではこの酸化法を利用して還元末端側グルコサミンの切断を試みた。最初に野生型リポド A をもつ大腸菌 KGU0107 株の LPS から脱リン酸化リポド A を調製し、C1 位を還元して開環した後、過ヨウ素酸酸化 (0.025 M NaIO₄, 4°C, 5 日間) を行った。酸化反応の後、常法に従って、生じるアルデヒド基を還元し、得られた産物を

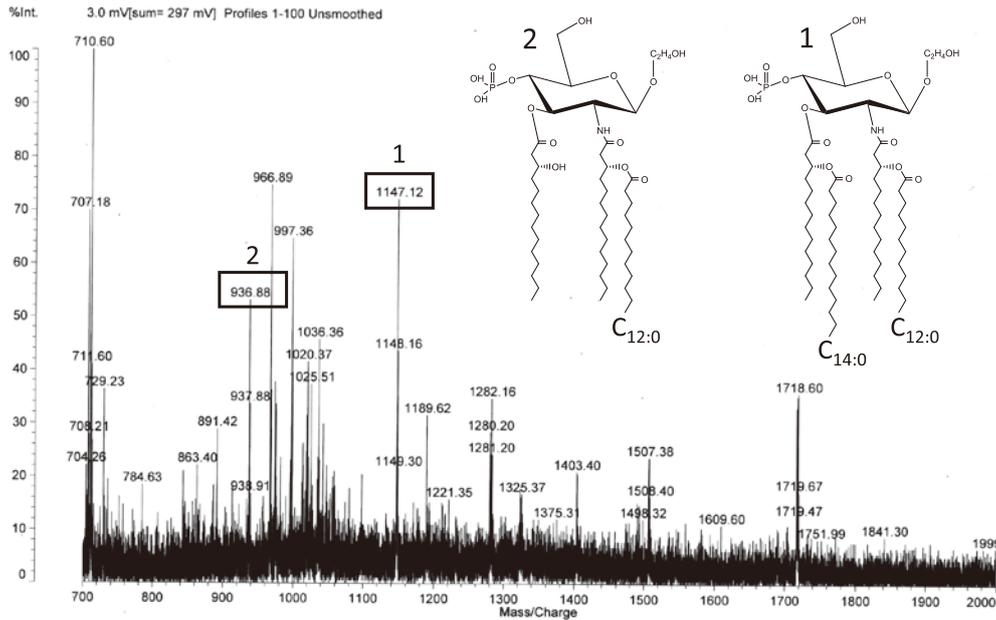


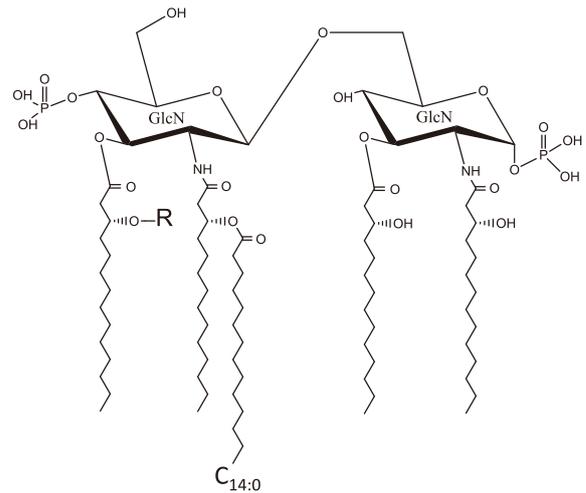
図 2 KGU0107 株 (野生株) リピド A から得られた過ヨウ素酸酸化物の MALDI-TOF マスペクトル

MALDI-TOF MS で分析 (陰イオン検出モードで分析) したところ, 図 2 に示したマスペクトルが得られた。スペクトル中には m/z 1718.60, m/z 1507.38 などの酸化を受けなかった脱リン酸化リピド A 由来のいくつかのピークもみられたが, その中で m/z 1147.12, および m/z 936.88 はそれぞれ図中に示した 1 および 2 の構造をもつ非還元末端グルコサミン由来の陰イオンであると推定された。この結果から, このような過ヨウ素酸酸化法は非ヒドロキシ脂肪酸の局在を調べる方法として使用可能であると考えられた。

3. 脂肪酸転移酵素遺伝子の導入により得られた改変リピド A の構造解析への適用

上記の過ヨウ素酸酸化法を, *Klebsiella pneumoniae* の $C_{14:0}$ 転移酵素遺伝子導入により得られた KGU0485 株および KGU0496 株のリピド A に適用し, その有効性をさらに検証した。これらの株のリピド A は図 3 に示した構造をもっていると推定されている^{4,5)}。

まず, KGU0485 株の脱リン酸化リピド A を還元, および過ヨウ素酸酸化した後, 上記と同様に質量分析したところ, 図 4 に示したスペクトルが得られた。この場合も, 酸化されずに残ったリピド A 由来のピークが多くみられるが, m/z 1175.10 は図 2 の m/z 1147.12 と比較して約 28 mass unit (mu) (CH_2 2 個分) 大きいため, 非ヒドロキシ脂肪酸として $C_{14:0}$ を 2 分子もつイオンであると推定された。すなわち, $C_{14:0}$ は 2 分子とも非還元末端側に存在することがわかった。一方, m/z 964.90 のピークについては, m/z 1175.10 よりも約 210 mu 小さいため, $C_{14:0}$ が 1 分子脱離したピーク ($C_{14:0}$ の分子量 228 から H_2O



KGU0485 株リピド A, R: $C_{14:0}$ ($\text{CO-C}_{13}\text{H}_{27}$)
KGU0496 株リピド A, R: H

図 3 KGU0485 株および KGU0496 株リピド A の推定構造

を差し引いて計算) であると考えられた。

さらに, KGU0496 株由来の脱リン酸化リピド A についても同様の処理をした後に分析したところ, 図 5 に示したように m/z 964.81 の明瞭なピークが主要ピークとして検出された。したがって, この物質はやはり図中に示したような, $C_{14:0}$ を 1 分子もつ構造であると推定された。これにより $C_{14:0}$ が KGU0496 株リピド A の非還元末端側に存在することを証明することができた。

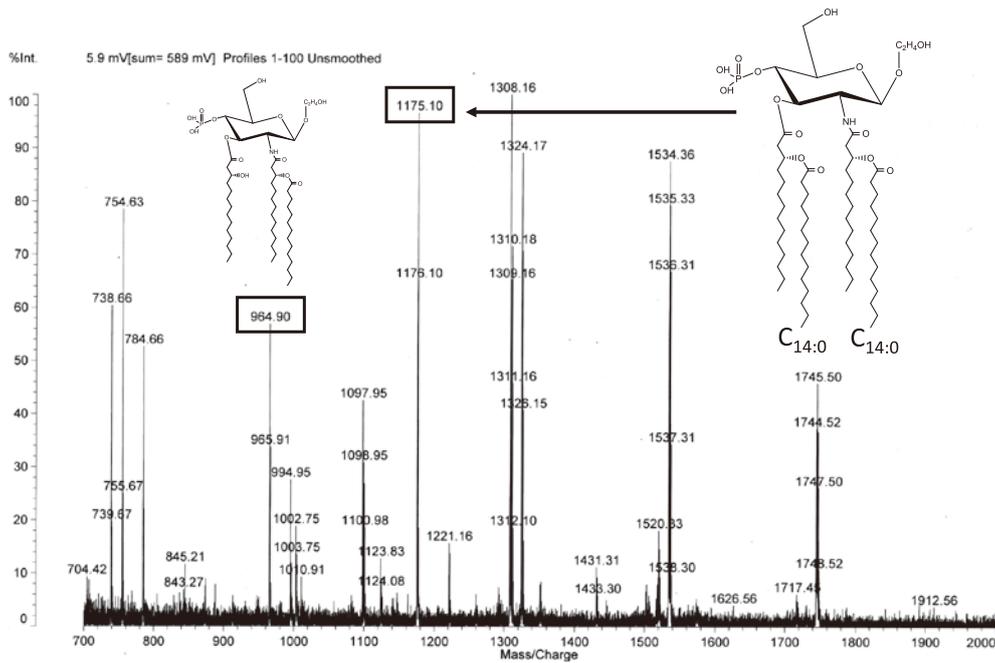


図 4 KGU0485 株リポド A から得られた過ヨウ素酸化物の MALDI-TOF マススペクトル

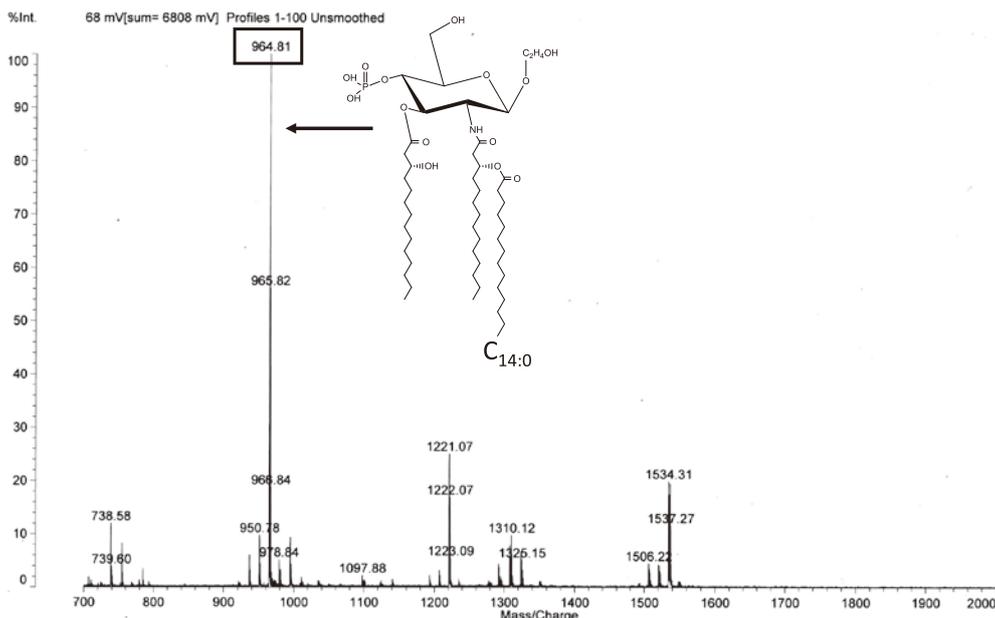


図 5 KGU0496 株リポド A から得られた過ヨウ素酸化物の MALDI-TOF マススペクトル

おわりに

本解説の前半部分で述べた、グルコサミン二糖の開裂により生ずるオキシニウムイオンを検出する方法は有効であるが、試料の純度などにより検出が難しい場合もある。また、研究環境によっては MALDI-TOF MS が使用できないことも考えられる。それに比較して、過ヨウ素酸化により得られるリポド A 非還元末端側由来のグルコサミンと脂肪酸から成る化合物は、より一般的な

分析装置である液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC-MS) でも検出可能であると予想される。したがって、より広く使用することができるのではないと思われる。また、図 5 の図中に示した構造は、以前エンドトキシンの活性の一部を示す化合物として研究された物質⁶⁾と類似している。そこで、この物質が示す免疫活性についても興味を持たれる。図 4 や図 5 でわかる通り、この試料は過ヨウ素酸で酸化、開裂されなかったりリポド A 分子を含んでいるため、このままでは活性測定に用いることが

できないが、精製法の検討と精製物のサイトカイン産生活性測定が今後の研究課題となるだろう。

謝 辞

関東学院大学在学中に本研究で用いた変異株の作製とリピド A の構造解析にかかわった伊藤瑞穂氏、大澤絵美里氏、菅原健広氏、谷口千穂氏をはじめとするすべての学生諸君に深く感謝致します。

文 献

- 1) Imoto M, Yoshimura H, Kusumoto S, et al. : Total synthesis of lipid A, active principle of bacterial endotoxin. Proc Jpn Acad Ser B 60 : 285-288, 1984
- 2) Sugawara T, Onoue S, Takimoto H, et al. : Modification of lipid A structure and activity by the introduction of palmitoyltransferase gene to the acyltransferase-knockout mutant of *Escherichia coli*. Microbiol Immunol 62 : 497-506, 2018
- 3) 川原一芳, 菅原健広, 大澤絵美里, 他 : リピド A 脂肪酸転移酵素遺伝子を利用した新しい構造を有する LPS の作出. エンドトキシン・自然免疫研究 21 : 51-55, 2018
- 4) 川原一芳, 谷口千穂, 菅原健広, 他 : *Klebsiella pneumoniae* のミリスチン酸転移酵素遺伝子を利用した大腸菌リピド A の改変. エンドトキシン・自然免疫研究 22 : 49-53, 2019
- 5) Taniguchi C, Sugawara T, Onoue S, et al. : Structural modification of *Escherichia coli* lipid A by myristoyltransferase gene from *Klebsiella pneumoniae*. Microbiol Immunol 63 : 334-337, 2019
- 6) Matsuura M, Yamamoto A, Kojima Y, et al. : Biological activities of chemically synthesized partial structure analogues of lipid A. J Biochem 98 : 1229-1237, 1985

結核菌タンパク質 PE_PGRS の機能解析

松村 和典¹⁾, 祝 弘樹²⁾, 切替 照雄³⁾

¹⁾ 国立国際医療研究センター研究所疾患制御研究部

²⁾ 同 感染症制御研究部

³⁾ 順天堂大学大学院医学研究科微生物学, 同 医学部微生物学講座

Functional analysis of mycobacterial protein PE_PGRS

Kazunori Matsumura¹⁾, Hiroki Iwai²⁾, Teruo Kirikae³⁾

¹⁾ Department of Diseases Control, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine

²⁾ Department of Infectious Diseases, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine

³⁾ Department of Microbiology, Juntendo University School of Medicine

Abstract

Tuberculosis (TB) remains an important infectious disease, causing ten million new cases and 1.4 million deaths a year in worldwide. Elucidating pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of TB, will contribute to development of new drugs, vaccines and treatments. Proline-glutamic acid (PE)/proline-proline-glutamic acid (PPE) family accounts for approximately 10% of the coding region of *M. tuberculosis* genome and its functions are largely unknown. PE proteins having polymorphic GC-rich repetitive sequences (PGRS) in carboxyl-terminal are members of PE_PGRS family. PE_PGRS62 and PE_PGRS30 are members of PE_PGRS family and homologues of MAG24, the virulence factor of *M. marinum*. We are in the process of analyzing the functions of PE_PGRS62 and PE_PGRS30, and have results suggesting that PE_PGRS62 regulates autophagy, whereas PE_PGRS30 induces cell death.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 59~63, 2020

Key words : 結核菌, PE_PGRS, オートファジー, 細胞死

はじめに

結核は、世界人口の 1/3 が感染していると推計され、年間約 1,000 万人が新規に罹患し、約 140 万人が亡くなる、今なお重要な感染症である¹⁾。近年では、薬剤耐性結核菌の出現や、HIV 感染者の主要な死亡原因が結核であることが問題となっており、新規薬剤やワクチンの開発が急務である¹⁾。結核菌の病原因子を同定・解析することは、それらの開発に重要である。結核菌標準株 H37Rv ゲノムでは、プロリン-グルタミン酸 proline-glutamic acid (PE) およびプロリン-プロリン-グルタミン酸 proline-proline-glutamic acid (PPE) ファミリーが、ゲノムコード領域の約 10% を占めている²⁾。PE/PPE タンパク質は、H37Rv で 99 の PE 遺伝子と 69 の PPE 遺伝子を有し、N 末端で保存された PE/PPE ドメインにより特徴づけられる。PE ファミリーは、C 末端に多型 GC

リッチ配列 polymorphic GC-rich repetitive sequences (PGRS) をもつ PE_PGRS と、特徴のない PE 遺伝子を含む。PPE ファミリーは、主要な多形タンデムリピート major polymorphic tandem repeats (MPTR) をもつ PPE_MPTR, Gxx-SVPxxW モチーフを持つ PPE_SVP, PxxPxxW モチーフを持つ PPE_PPV, および特徴のない PPE 遺伝子に分けることができる。PE/PPE ファミリータンパク質の C 末端は高度に可変的であることから、病原性、抗原多様性、または免疫回避における役割が示唆されている³⁾。

1. PE_PGRS ファミリータンパク質の機能

PE_PGRS タンパク質の機能として、マクロファージへの接着・侵入の増強、抗生物質などストレスへの耐性の調節、感染マクロファージのサイトカイン産生の制御、感染細胞のアポトーシス制御、樹状細胞活性化の調

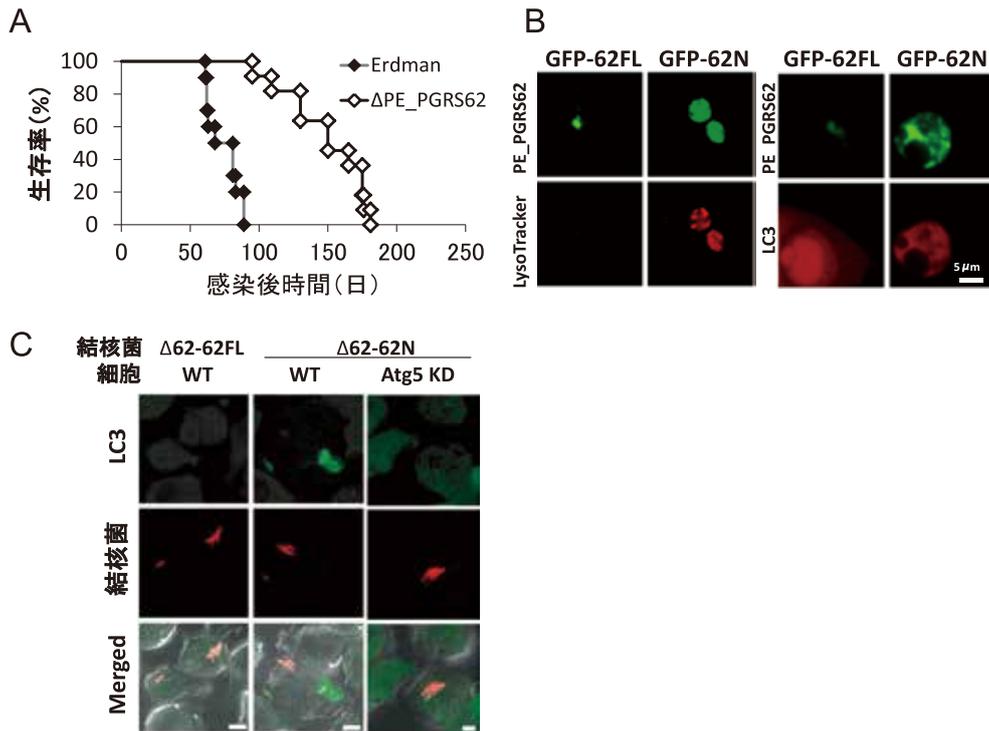


図 1 PE_PGRS62 の機能解析

A: 結核菌 Erdman 株由来 *PE_PGRS62* 遺伝子破壊株を BALB/c マウスに尾静脈より感染させた。平均生存日数は、野生株感染群 (◆: n=10) が 73.9 ± 11.1 日, *PE_PGRS62* 遺伝子破壊株感染群 (◇: n=11) が 148.7 ± 28.0 日であった。B: *PE_PGRS62* 全長 (1~504aa: 62FL) と, C 末端領域を欠損させた *PE_PGRS62N* (1~350aa: 62N) の N 末端に GFP を融合し (GFP-62FL, GFP-62N), 哺乳類細胞に発現させ, リソソームおよび LC3 との共局在を観察した。リソソームは, LysoTracker で染色し, LC3 は抗体で検出した。C: 結核菌 *PE_PGRS62* 遺伝子破壊株に対して, 62FL を発現させた補完株 ($\Delta 62-62FL$) および, 62N を発現させた株 ($\Delta 62-62N$) を, マウス単球様細胞株 J774 (WT) もしくは, J774 の *Atg5* 遺伝子ノックダウン細胞 (*Atg5* KD) に感染させ, LC3 との共局在を観察した。結核菌には蛍光タンパク質 mCherry を発現させた。

節, 感染マウスの臓器内もしくは感染マクロファージ内での生存・増殖の増強などが報告されている。また, 複数の機能を有する *PE_PGRS* も報告されている。機能を推定するため, 同じマイコバクテリウム属であるが, *PE_PGRS* 遺伝子がなく, 非病原性の近縁菌 *M. smegmatis* に発現させて種々の検討を行う方法が, よく用いられている。

1-1. マクロファージへの接着・侵入の増強

PE_PGRS3 を発現する *M. smegmatis* は, アルギニンリッチ C 末端ドメインを介して, マウスマクロファージやヒト上皮細胞への接着とマウス脾臓における菌の生存を増強した⁴⁾。

1-2. ストレスへの耐性の調節

PE_PGRS41 を発現する *M. smegmatis* は, 細胞壁の透過性を増し, 複数の抗生物質に対する感受性を亢進した⁵⁾。

1-3. 感染マクロファージのサイトカイン産生制御

PE_PGRS16 を発現する *M. smegmatis* をマクロファージに感染させるとインターロイキン Interleukin (IL)-12 の産生が増加した⁶⁾。*PE_PGRS18* を発現する *M. smegmatis* をマクロファージに感染させると, IL-6・IL-1 β ・IL-10 の産生が減少し, IL-12p40 の産生が増加した⁷⁾。*PE_PGRS33* を発現する *M. smegmatis* をマクロファージに感染させると, *PE_PGRS33* が Toll 様受容体 Toll-like receptor (TLR) 2 と相互作用することで, 腫瘍壊死因子 tumor necrosis factor (TNF) α の産生が増加した⁸⁾。*PE_PGRS33* と *PE_PGRS61* は, グリシンに富む配列モチーフ GGXGXGXDX/NXUX を有しており, Ca^{2+} に結合する特性がある。それらを発現する *M. smegmatis* をヒト単球様細胞株 THP-1 に感染させると, Ca^{2+} 依存的に TLR2 と結合し, 抗炎症性サイトカイン IL-10 産生を増強した⁹⁾。

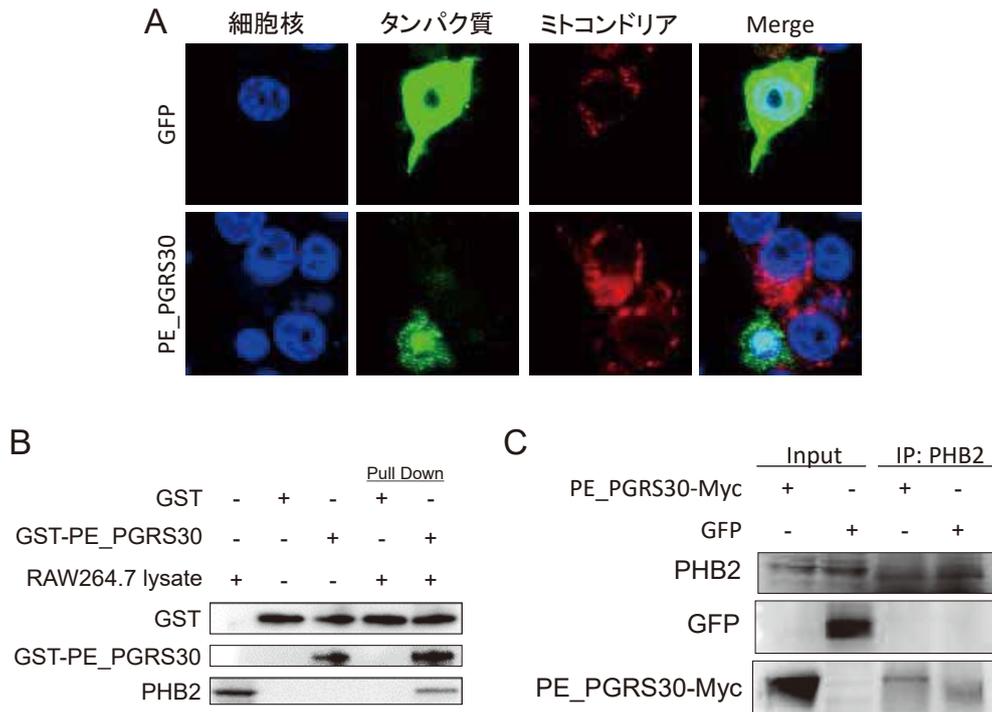


図 2 PE_PGRS30 の機能解析

A : GFP および PE_PGRS30-myc をマウス単球様細胞株 RAW264.7 に発現させ、細胞核 (Hoechst 33342) およびミトコンドリア (MitoTracker) を染色した。PE_PGRS30 は抗 myc 抗体で検出した。B : 大腸菌で発現・精製した GST および PE_PGRS30 の N 末端に GST を融合した GST-PE_PGRS30 に対して RAW264.7 の細胞破砕液を混合してプルダウンアッセイを行った。抗 GST 抗体および抗 PHB2 抗体で検出した。C : RAW264.7 に GFP および PE_PGRS30-myc を発現させ、抗 PHB2 抗体を用いて免疫沈降を行った。GFP は抗 GFP 抗体、PE_PGRS30-myc は抗 myc 抗体を用いて検出した。

1-4. 感染細胞のアポトーシス制御

PE_PGRS5 は、結核菌感染患者の感染後期の肉芽腫に存在し、宿主細胞の ER ストレス媒介アポトーシスを誘発していた¹⁰⁾。PE_PGRS33 は、宿主細胞のミトコンドリアを標的とし、マクロファージまたはマウス脾細胞においてアポトーシスを引き起こした¹¹⁾。また、PE_PGRS33 を発現する *M. smegmatis* をマクロファージに感染させると壊死マーカー乳酸デヒドロゲナーゼの放出が増加した¹²⁾。

1-5. 樹状細胞活性化の調節

PE_PGRS17 および PE_PGRS11 は TLR2 と相互作用し、ヒト樹状細胞の成熟および活性化を誘発した。活性化樹状細胞は IL-6・IL-8・IL-12 を産生し、CD4+ T 細胞の増殖を誘導した¹³⁾。

1-6. 感染マウスの臓器内もしくは感染マクロファージ内での生存・増殖の増強

PE_PGRS47 遺伝子破壊結核菌は、マウスおよびマクロファージ内で、増殖が減弱し、感染マウスにおいて MHC クラス II 制限抗原提示が増加していた。また、PE_

PGRS47 は感染マクロファージにおけるファゴソーム成熟およびオートファジーを阻害した¹⁴⁾。

2. PE_PGRS62 の機能

マウス単球様細胞株 J774 内で増殖できない魚類結核菌 *M. marinum* のトランスポゾン変異株 L1D は、PE_PGRS タンパク質をコードする遺伝子 *mag* 24-1 に変異が入っており、その結核菌ホモログ PE_PGRS62 および PE_PGRS30 について、マクロファージ内増殖に関する機能を有する可能性が示唆された¹⁵⁾。

PE_PGRS62 の発現について、結核菌感染マクロファージを低酸素条件で培養すると、PE_PGRS62 の転写量が増加していた¹⁶⁾。また、結核菌感染モルモット肺の菌体内において、PE_PGRS62 の発現が確認された¹⁷⁾。さらに、PE_PGRS62 は菌体表面に局在していた¹⁸⁾。PE_PGRS62 の機能については、牛型結核菌弱毒化株 *M. bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) の PE_PGRS62 遺伝子変異株が、マクロファージ内での生存について、野生株と比較して困難になった¹⁹⁾。PE_PGRS62 を発現する *M. smegmatis* をマクロファージに感染させると、IL-1・IL-6 の発現が低下し²⁰⁾、ファゴソームの成熟が阻

害され^{21,22)}、iNOS産生が減少した²²⁾。PE_PGRS62のPGRSドメインはユビキチン-プロテアソーム依存的分解からPEドメインを保護していた。これはCD8⁺T細胞によるPE_PGRS62の認識に影響し、結核菌感染細胞の免疫認識と殺菌を回避する可能性を示唆する²³⁾。PE_PGRS62を発現する*M. marinum*は、界面活性剤に対して感受性を亢進した²²⁾。

結核菌標準株 Erdman を用いて PE_PGRS62 遺伝子欠損株を作製し、マウスに感染させたところ、親株に比べ弱毒化していたことから、PE_PGRS62 は結核菌の病原因子であることが示唆された (図 1)。PE_PGRS62 の機能を探るため、哺乳類細胞に PE_PGRS62 を発現させると、リソソームや LC3 と共局在しておらず、C 末端領域を削った PE_PGRS62N は、それらと共局在していた。さらに Atg5 ノックダウン J774 細胞を用いた解析から、PE_PGRS62 が ATG5 依存的なオートファジーを抑制することが示唆された。

3. PE_PGRS30 の機能

PE PGRS30 は、1,011 アミノ酸長のタンパク質であり、その中に PGRS ドメイン (506 アミノ酸長) と、ユニークな 306 アミノ酸長の C 末端ドメインが続いている。PE_PGRS30 は、菌体の極に局在することが見出され、PGRS ドメインがその局在に寄与していた²⁴⁾。PE_PGRS30 を発現する *M. smegmatis* をマクロファージに感染させると、IL-12・TNF- α ・IL-6 の産生が減少した²⁵⁾。結核菌 PE_PGRS30 遺伝子変異株をマウスに感染させると、慢性期の肺が、野生株感染群と比較して、組織障害が少なかった。PE_PGRS30 を発現する *M. smegmatis* をマクロファージに感染させると野生株と比較して細胞死が増加した。これらの結果から、PE_PGRS30 は、結核菌の病原因子であることが示唆された²⁶⁾。PE_PGRS30 をマウス単球様細胞 RAW264 に発現させると、アポトーシスが誘導された (図 2)。PE_PGRS30 との相互作用因子を探索した結果、ミトコンドリアの構造維持や分解に関与するプロヒビチン prohibitin (PHB) 2 が同定された。PE_PGRS30 は PHB2 と相互作用することで、アポトーシスを誘導することが考えられる。

おわりに

結核菌ゲノムコード領域の約 10% を占める PE/PPE ファミリー、その PE ファミリーの中で最も大きなサブファミリーである PE_PGRS タンパク質の機能は、少しずつ明らかになっているが、同じ機能を示すファミリータンパク質間でも、その機能を担う領域について共通点は見出されていない。また、PGRS 領域のアミノ酸配列の多型性を反映しているのか、機能の範囲が幅広い。そのため現在まで、PE_PGRS タンパク質の機能予測は進んでおらず、個々の PE_PGRS について、その機能を解

明していく必要がある。これは、PE_PGRS だけでなく、残りの PE/PPE ファミリーについても同様である。結核菌の病原性を明らかにするため、これらタンパク質の機能の一つ一つ解明していき、共通点を見出し、予測に寄与することが今後の課題である。

文 献

- 1) World Health Organization : Global tuberculosis report 2019. 2019
- 2) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. : Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393 : 537-544, 1998
- 3) Yu X, Feng J, Huang L, et al. : Molecular Basis Underlying Host Immunity Subversion by *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE Family Molecules. *DNA Cell Biol* 38 : 1178-1187, 2019
- 4) De Maio F, Battah B, Palmieri V, et al. : PE_PGRS3 of *Mycobacterium tuberculosis* is specifically expressed at low phosphate concentration, and its arginine-rich C-terminal domain mediates adhesion and persistence in host tissues when expressed in *Mycobacterium smegmatis*. *Cell Microbiol* 20 : e12952, 2018
- 5) Deng W, Long Q, Zeng J, et al. : *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS41 Enhances the Intracellular Survival of *M. smegmatis* within Macrophages Via Blocking Innate Immunity and Inhibition of Host Defense. *Sci Rep* 7 : 46716, 2017
- 6) Singh PP, Parra M, Cadieux N, et al. : A comparative study of host response to three *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS proteins. *Microbiology* 154 : 3469-3479, 2008
- 7) Yang W, Deng W, Zeng J, et al. : *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS18 enhances the intracellular survival of *M. smegmatis* via altering host macrophage cytokine profiling and attenuating the cell apoptosis. *Apoptosis* 22 : 502-509, 2017
- 8) Zumbo A, Palucci I, Cascioferro A, et al. : Functional dissection of protein domains involved in the immunomodulatory properties of PE_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Pathog Dis* 69 : 232-239, 2013
- 9) Yeruva VC, Kulkarni A, Khandelwal R, et al. : The PE_PGRS Proteins of *Mycobacterium tuberculosis* Are Ca²⁺ Binding Mediators of Host-Pathogen Interaction. *Biochemistry* 55 : 4675-4687, 2016
- 10) Grover S, Sharma T, Singh Y, et al. : The PGRS Domain of *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS Protein Rv0297 Is Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis through Toll-Like Receptor 4. *mBio* 9 : e01017-18, 2018
- 11) Basu S, Pathak SK, Banerjee A, et al. : Execution of macrophage apoptosis by PE_PGRS33 of *Mycobacte-*

- rium tuberculosis* is mediated by Toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor- α . J Biol Chem 282 : 1039-1050, 2007
- 12) Dheenadhayalan V, Delogu G, Brennan MJ : Expression of the PE_PGRS 33 protein in *Mycobacterium smegmatis* triggers necrosis in macrophages and enhanced mycobacterial survival. Microbes Infect 8 : 262-272, 2006
 - 13) Bansal K, Elluru SR, Narayana Y, et al. : PE_PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis* induce maturation and activation of human dendritic cells. J Immunol 184 : 3495-3504, 2010
 - 14) Saini NK, Baena A, Ng TW, et al. : Suppression of autophagy and antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS47. Nat Microbiol 1 : 16133, 2016
 - 15) Ramakrishnan L, Federspiel NA, Falkow S : Granuloma-specific expression of Mycobacterium virulence proteins from the glycine-rich PE-PGRS family. Science 288 : 1436-1439, 2000
 - 16) Vipond J, Vipond R, Allen-Vercoe E, et al. : Selection of novel TB vaccine candidates and their evaluation as DNA vaccines against aerosol challenge. Vaccine 24 : 6340-6350, 2006
 - 17) Kruh NA, Trout J, Izzo A, et al. : Portrait of a pathogen : the *Mycobacterium tuberculosis* proteome *in vivo*. PLoS One 5 : e13938, 2010
 - 18) Vani J, Shaila MS, Trinath J, et al. : *Mycobacterium tuberculosis* cell wall-associated Rv3812 protein induces strong dendritic cell-mediated interferon γ responses and exhibits vaccine potential. J Infect Dis 208 : 1034-1036, 2013
 - 19) Stewart GR, Patel J, Robertson BD, et al. : Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification. PLoS Pathog 1 : 269-278, 2005
 - 20) Huang Y, Wang Y, Bai Y, et al. : Expression of PE_PGRS 62 protein in *Mycobacterium smegmatis* decrease mRNA expression of proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 in macrophages. Mol Cell Biochem 340 : 223-229, 2010
 - 21) Huang Y, Zhou X, Bai Y, et al. : Phagolysosome maturation of macrophages was reduced by PE_PGRS 62 protein expressing in *Mycobacterium smegmatis* and induced in IFN- γ priming. Vet Microbiol 160 : 117-125, 2012
 - 22) Thi EP, Hong CJ, Sanghera G, et al. : Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* protein PE-PGRS62 as a novel effector that functions to block phagosome maturation and inhibit iNOS expression. Cell Microbiol 15 : 795-808, 2013
 - 23) Koh KW, Lehming N, Seah GT : Degradation-resistant protein domains limit host cell processing and immune detection of mycobacteria. Mol Immunol 46 : 1312-1318, 2009
 - 24) De Maio F, Maulucci G, Minerva M, et al. : Impact of protein domains on PE_PGRS30 polar localization in Mycobacteria. PLoS One 9 : e112482, 2014
 - 25) Chatrath S, Gupta VK, Dixit A, et al. : PE_PGRS30 of *Mycobacterium tuberculosis* mediates suppression of proinflammatory immune response in macrophages through its PGRS and PE domains. Microbes Infect 18 : 536-542, 2016
 - 26) Iantomasi R, Sali M, Cascioferro A, et al. : PE_PGRS30 is required for the full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Cell Microbiol 14 : 356-367, 2012

第6章

ラウンドテーブルディスカッション

「エンドトキシンや関連メディエーターをいかに測るか」

Limulus amebocyte lysate (LAL) 凝固因子を利用する 敗血症の補助診断マーカーの特徴と展望

田村 弘志¹⁾, Johannes Reich²⁾, 長岡 功³⁾

¹⁾LPS コンサルティング事務所, ²⁾Microcoat Biotechnologie GmbH, ³⁾順天堂大学医学部生体防御学

Characteristics and future prospects of sepsis biomarkers using limulus clotting enzymes

Hiroshi Tamura¹⁾, Johannes Reich²⁾, Isao Nagaoka³⁾

¹⁾LPS Consulting Office

²⁾Microcoat Biotechnologie GmbH

³⁾Department of Host Defense and Biochemical Research, Juntendo University School of Medicine

Abstract

It is widely recognized that an early detection of life-threatening sepsis or septic shock using biomarkers is of great importance for successful treatment of diseases. Bacterial endotoxins in human blood are one of the target analytes to identify sepsis patients. It has been half a century since endotoxin determination techniques with Limulus Amebocyte Lysate (LAL) were applied to human plasma using the gel-clot method. Thereafter, chromogenic and turbidimetric techniques with high specificity to endotoxin or β -D-glucan were successfully developed, and these technologies enable detection of trace amounts of the analytes in blood. With reference to FDA-approved β -D-glucan detection, it became a global standard to aim for early diagnosis of invasive fungal diseases. A number of questions and problems with endotoxin detection, however, still remain unsolved from the standpoint of clinical significance.

In this review, firstly we focus on development history, recent advances and limitations of LAL techniques coupled with extraction methodologies from blood, and secondly, we suggest a new approach to the solution of the above for biomarker-guided therapy and clinical investigations.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 64~72, 2020

Key words : エンドトキシン (1 \rightarrow 3)- β -D-グルカン, LAL, 敗血症, バイオマーカー

はじめに

感染症は、病原微生物が生体内に侵入・増殖して発症する疾患であり、病原微生物により、主たる感染巣や症状が異なり、宿主の全身状態や基礎疾患および生体防御能によっても予後が異なる。臨床現場では、多種多様な病原微生物をいかに迅速に検出し、早期に適切な治療を施すかが、感染症に起因する敗血症の病態を制御するうえで極めて重要である。近年、病原体に特徴的な遺伝子領域を増幅する迅速診断技術、検査機器の進歩に伴い、分離培養された菌株を迅速かつ正確に同定しつつ、固有の毒素や薬剤感受性遺伝子の高感度検出が可能となっている。一方、感染症の非侵襲的なスクリーニングや補助診断、重症度や予後予測、ならびに治療効果判定の指標

として種々のバイオマーカーが開発されてきた。感染症領域におけるバイオマーカーには以下に示すように幅広い活用が期待されている。これらは、菌体の構成成分、代謝物質、炎症性サイトカイン、特徴的な遺伝子領域などに基づいているが、いずれも単独で診断に寄与できるほど信頼性の高いものではなく、その特性と限界を理解しつつ総合的な感染症診断と治療介入、予後・効果の予測を行うことが重要である。本稿においては、グラム陰性菌および真菌の構成成分である lipopolysaccharide (LPS : エンドトキシン) および (1 \rightarrow 3)- β -D-グルカン (β -グルカン) を指標とする迅速診断法(補助診断法)の特徴と進歩にフォーカスし、あわせて今後の課題と展望を述べたい。

【感染症領域におけるバイオマーカーに期待するもの】

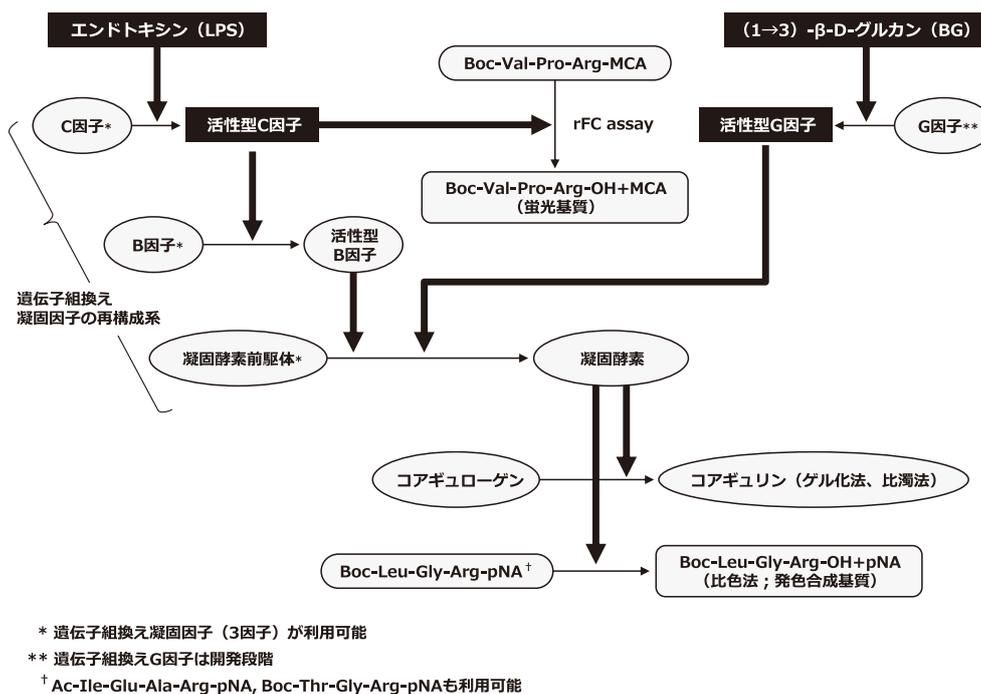


図 1 カプトガニ凝固因子を用いたエンドトキシンおよび (1→3)-β-D-グルカンの測定原理

1. 全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome : SIRS)における感染と非感染性の早期鑑別
2. 感染起因菌・薬剤耐性菌の早期検出・同定 (proven diagnosis)
3. 菌体成分の早期検出・菌血症の補助診断(エンドトキシン/β-グルカン, probable or possible diagnosis)
4. 炎症反応のトリガー・メディエーターを標的とする補助診断
5. 早期治療介入・病態のモニタリング・投与中止のタイミング
6. 予後・治療効果・副作用の予測 (prognostic/predictive marker)
7. 治療転帰・重症化リスクの判別(ゲノム・エピゲノム解析)
8. 臨床試験におけるクリニカルエンドポイントの代替 (surrogate marker)

* 本稿と関連する部分を太字・アンダーラインで示す。

1. カプトガニ凝固因子を用いたエンドトキシンおよびβ-グルカン測定法の進歩

エンドトキシン (グラム陰性菌内毒素) は, グラム陰性菌の細胞壁外膜を構成する成分であるリポ多糖 (LPS) であり, 発熱作用, 致死毒性, 炎症反応など生体内において多彩な生物活性を示す。1964年, LevinとBangにより, カプトガニの血球抽出液 (Limulus amoebocyte lysate : LAL) を用いたエンドトキシン検出法 (リムル

ステスト : LAL test) が創案された¹⁾。その後, 1983年に岩永らにより解明されたLALの詳細な反応機構(図1)を基に, エンドトキシンにより最終的に活性化された凝固酵素 (clotting enzyme : CE) のアミダーゼ活性を利用する高感度比色法LAL試薬 (トキシカラー, 生化学工業) が開発された^{2,3)}。一方, LALは, 酵母・カビ・キノコなどの真菌, 一部の藻類, 高等植物の細胞壁を構成する主要成分β-グルカンにも極微量で反応することが明らかとなり, 通常のLAL試薬は必ずしもエンドトキシンに特異的ではないことが判明した⁴⁾。そこで, われわれは, LALに共存するβ-グルカン感受性因子 (G因子) の除去または不活化を試み, 1986年に, C因子, B因子, 凝固酵素前駆体 (proCE) の再構成系による高感度エンドトキシン特異的比色法LAL試薬 (エンドスペシー, 生化学工業), さらにはG因子とproCEから成るβ-グルカン測定試薬G-test (グルスペシー, 生化学工業) を世界に先駆けて開発した⁵⁾。一方, エンドトキシンとβ-グルカンに特異的な比濁法LAL試薬 (リムルスES-Jテストワコー/βグルカントテストワコー, 富士フィルム和光純薬) が比色法の後に市場に投入され, これらはいずれも日本で誕生し, その後半世紀を超えた今日まで, 局方一般試験法による注射薬・医療機器などの製造・品質管理, 免疫学・細胞生化学・分子生物学領域の基礎および応用研究, 種々の臨床応用ならびに深在性真菌症の新たな診断・治療アルゴリズムの確立 (ファンゲテックGテスト, 生化学工業) などグローバル市場を牽引する原動力になっている⁶⁾。

表 1 血中エンドトキシンおよび関連バイオマーカーの測定法

手法/分析対象	原理	方法	試料	文献 筆頭著者	出版年
LAL	Activation of pro-clotting enzyme in Limulus ameocyte lysate	Gel-clot	Plasma	Levin J ⁷⁾	1970
GC/MS	β -Hydroxymyristic acid content of lipid A	Gas chromatograph-Mass spectrometer	Serum (Rabbit)	Maitra SK ⁸⁾	1978
Anti-endotoxin antibody	Anti-bacteroides lipopolysaccharide IgG	Inhibition ELISA	Serum	Allan E ⁹⁾	1995
LBP (LPS Binding Protein)	Endotoxin-LBP-sCD14 complexes	ELISA	Serum	Opal SM ¹⁰⁾	1999
EAA (Endotoxin Activity Assay)	Human neutrophil-Complement opsonized LPS-IgM complexes	Chemiluminescent emission	Whole blood	Marshall JC ¹¹⁾	2002
MAT (Monocyte Activation Test)	In vitro activation of human monocytoic cells in response to pyrogens	ELISA	NA*	Hoffmann S ¹²⁾	2005
NF- κ B activation	Toll-like receptor 4/MD-2/CD14	NF- κ B-dependent luciferase reporter assay	Plasma (Rat)	Nishida M ¹³⁾	2007

*NA : not applicable

2. LAL test の臨床応用

2-1. 血中エンドトキシン測定法の進歩と課題

敗血症とは重症感染症に伴い種々の病態を呈する症候群であり、その定義に関しては複数の学会により幾度も議論がなされてきた。現在敗血症は「感染に対する制御不十分な生体反応に起因する生命に危機を及ぼす臓器障害」と定義されており、エンドトキシンは、敗血症、とくにグラム陰性菌敗血症の病態形成に強く関与していることが明らかにされている。エンドトキシンの血中濃度の推移を把握するには、生物材料を用いてエンドトキシン活性を *in vitro* で測定する方法に加え、エンドトキシン分子を構成する 3-O- β -ヒドロキシミリスチン酸などを機器分析により直接定量するか、あるいは LPS-binding protein (LBP) や抗エンドトキシン抗体など関連分子を測定するかなどの方法が知られている。表 1 にこれまで開発された血中エンドトキシン測定法をまとめて示す⁷⁻¹³⁾。ウサギ発熱性物質試験の *in vitro* 代替法 (monocyte activation test : MAT) はエンドトキシン以外のパイロジェンにも反応するが、医薬品・医療機器の品質管理にはむしろ適した方法といえる。表中の種々測定法のなかで、検出感度、測定精度、再現性、経済性などの観点から LAL test が最も優れていることは論をまたず、国際調和エンドトキシン試験法としてすでに三極薬局方に収載されている。しかし、臨床的意義については評価が定まらず、測定法の信頼性に加え、血中エンドトキシンの存在様式やクリアランスも含め議論すべき点が多く残されている¹⁴⁾。これまで FDA 認可 (510k, Endotoxin Activity Assay Device) を取得した血中エンドトキシン測定法は EAA だけであり、本邦では主にポリミキシン B を固定化したエンドトキシン吸着カラム (polymyxin B-immobilized fiber column-direct hemoperfusion :

PMX-DHP) の適応基準など、治療効果の検討に用いられている。しかし、LAL test と EAA は測定原理が全く異なるため、両者の測定値を単純に比較することはできない。また、敗血症の領域に留まらず、動脈硬化性疾患、肥満症、メタボリックシンドロームのような慢性疾患との関連も指摘されており、技術的要因も含め更なる検討を要すると思われる。

LAL test を臨床に応用する試みは古くから続けられ、1960 年代より、Levin や Fine, Cooperstock らにより血中エンドトキシンの測定と臨床的意義に関する検討が開始された。最初に解決しなければならない問題は、LAL の酵素反応を妨害するさまざまな干渉因子をあらかじめ不活化することであり、有機溶媒、酸処理、希釈加熱法などの種々の前処理法ならびに測定法 (ゲル化、定量法) が開発された^{1,15)}。わが国においては、1985 年に LAL test (合成基質法) と過塩素酸 (PCA) 前処理による血中エンドトキシンの高感度測定がはじめて保険適用され、望月らは重症感染症の重篤さや病態を把握するうえで極めて意義の大きなものであると指摘している^{3,23)}。その後、エンドトキシン特異的 LAL test を用いた合成基質法および比濁法によるカイネティック法が本邦で開発され、より簡便で迅速な検査システム (いずれも体外診断用医薬品) へと発展を遂げた。現在では、比濁時間分析法のみが利用可能 (検査実施は本邦のみ) であるが、臨床的感度が低く、保険請求上同一区分であるプロカルシトニンのほうが有用とされる。表 2 にこれまで開発された血中エンドトキシン測定法をまとめて示すが¹⁵⁻¹⁹⁾ グラム陰性菌敗血症の早期診断・治療に貢献するには、解決すべき課題は少なくない。その後、Shimizu らにより LAL をベースとする超高感度エンドトキシン測定法 (endotoxin scattering photometry : ESP 法) が考案され、従来まで検出できないレベルの測定が可能となった

表 2 LAL test による血中エンドトキシン測定法

原材料	反応系に 関与する成分	天然/遺伝子 組み換え	エンドトキシン に対する特異性	方法	試料	抽出法/前処理法	文献	出版年		
LAL (Limulus amoebocyte lysate)	Extracts of blood cells (amoebocyte) Purified fractions	Non-recombinant	Non-specific	Gel-clot	Plasma	Chloroform	Levin J ⁽⁵⁾	1970		
			Non-specific	Gel-clot	Plasma	Acetic acid	Reinhold RB ⁽⁵⁾	1971		
			Non-specific	Gel-clot	Plasma	Dilution-heating	Cooperstock MS ⁽⁵⁾	1975		
			Non-specific	Turbidimetric	Plasma (PRP*)	Dilution-heating	Fink PC ⁽⁵⁾	1981		
			Non-specific	Chromogenic	Plasma (PRP)	PCA	Tamura H ⁽⁶⁾	1982		
			Non-specific	Nephelometric/ Chromogenic	Plasma (PRP)	Dilution-heating	Pearson FC ⁽⁵⁾	1985		
			Non-specific	Chromogenic	Plasma (PRP)	Chloroform/Dilution-heating/PCA	Obayashi T ⁽⁷⁾	1984		
			Specific	Chromogenic	Plasma (PRP)	PCA	Obayashi T ⁽⁵⁾	1985		
			Non-specific	Chromogenic	Plasma (PRP)	Dilution-heating	Dolan SA ⁽⁵⁾	1987		
			Non-specific	Chromogenic	Plasma (PRP)	Dilution-heating	van Deventer SJH ⁽⁵⁾	1987		
			Non-specific	Chromogenic	Plasma (PRP)	Dilution-heating/Trifluoroacetic acid/Chloroform	Roth RI ⁽⁵⁾	1990		
			Specific	Chromogenic	Whole blood	Nitrate-detergent	Tamura H ⁽⁵⁾	1991		
			Specific	Chromogenic	Plasma (PRP)	New PCA	Inada K ⁽⁸⁾	1991		
			Specific	Turbidimetric	Plasma (PRP)	Dilution-heating/detergent	Kabayashi J ⁽⁹⁾	1991		
			Specific	Chromogenic	Plasma (PRP)	KOH-detergent	Tamura H ⁽⁵⁾	1992		
			Specific	Turbidimetric/ ESP**	Plasma (PRP)	Dilution-heating	Shimizu T ⁽²⁰⁾	2013		
			Coagulation enzymes (LAL)	Factor C	Recombinant	Specific (Fluorometric)	Chromogenic	No published paper	Ding JL ⁽²¹⁾	2001
				Factor C & B, pro-CE		Specific	Chromogenic		Mizunuma H ⁽²²⁾	2017

* PRP : Platelet Rich Plasma, ** ESP : Endotoxin Scattering Photometry

が、未承認、保険適用外のため、大規模なコホート研究や臨床試験が望まれる²⁰⁾。また、遺伝子組換え LAL 試薬については、Ding らに続き、筆者らも 2000 年代中頃から検討を重ねてきたが、現在リコンビナント C 因子のみを用いるシンプルな測定系とすべてのリコンビナント凝固因子 (C 因子, B 因子, proCE) の再構成系の 2 種類が開発・市販されている^{21,22)}。いずれも LAL test の代替法 (公定法) としての位置づけにあるが、臨床応用に関しては今後の検討が待たれるところである。

2-2. 血中エンドトキシン測定の際に考慮すべき重要な要因

LAL を用いるエンドトキシン定量法は、LAL 凝固系の活性化能を指標としたエンドトキシン分子の生物活性に基づく間接的測定法であり、前述したように、lipid A を構成する脂肪酸を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離後に物理化学的に検出する直接的測定法とは明確に区別する必要がある。両者の感度は LAL test のほうが格段に優れており、血中に存在する pg オーダーの極微量のエンドトキシン測定には物理化学的測定法では太刀打ちできない。一方、試料にエンドトキシンを添加して回収率を検証する際に、回収率に影響を与える要因が多々存在するので注意を払う必要がある。作用機序別に以下の 3 種に分けられる。

1. アナライトであるエンドトキシンの分子構造が変化するか、もしくは修飾を受け、反応性に影響を与える場合 (A)
2. LAL の反応系 (セリンプロテアーゼ前駆体か活性化型セリンプロテアーゼ) に直接作用する場合 (B)
3. 生成したプロダクト (ゲル化および比濁法: 不溶性コアギュリングまたはコアギュリン粒子; 比色法: 遊離のパラニトロアニリンまたは蛍光の 4-メチルクマリンなど) の安定性やシグナル強度に影響する場合 (C)

リムルス反応は、ヒトの血液凝固系活性化機序と類似した一連の酵素反応であり、反応温度, pH, イオン強度などに加え、被検試料またはそれに共存するタンパク質分解酵素やインヒビター、金属イオン、タンパク質変性剤などがしばしばリムルス反応を阻害あるいは促進する (B)。また、蛍光基質の場合、キノリン誘導体のような薬物により蛍光強度の低下が生じる場合があり (C)、このようなクエンチングと薬物の構造要因についても事前に検証するのが望ましい。反応干渉因子を除去または不活化する際に、最も厄介なのが (A) であり、被検試料または共存物質がエンドトキシンの物性を変化させ、リムルス反応の活性化に影響を及ぼす場合あるいは被検試料または共存物質がエンドトキシンの存在様式を変化させ、リムルス反応の活性化に影響を及ぼす場合 (塩基性タンパク質、塩基性ペプチド、両親媒性ペプチドなど)、

acyloxyacyl hydrolase (AOAH) による lipid A アシル鎖の加水分解などがあげられる^{24,25)}。また、会合体 (高分子ミセル) を形成したエンドトキシン分子は高い LAL 活性化能を有し、界面活性剤などで乖離したエンドトキシン分子は LAL 活性化能が失われるため、しばしば偽陰性の原因となる。なかでも胆汁酸のような界面活性作用を有する生体成分の影響によるエンドトキシン分子の乖離やエンドトキシン結合タンパク質との結合が引き起こすマスキング (偽陰性) など、LAL test のデータ解釈には注意すべき点が少なくない²⁶⁾。

さらに、測定結果に及ぼす影響として、異なる操作段階における以下の 3 つの要因があげられ、いずれも偽陰性または偽陽性の原因になり得る。

1. 試料採取と保存法 (血漿・血清/保存温度・時間)
2. 前処理法 (分離/非分離, 加熱/非加熱, 希釈/酸・アルカリ)
3. 測定試薬・測定法 (ゲル化/比色法, エンドトキシン特異的/非特異的, エンドポイント/カイネティクス, 天然/遺伝子組み換え)

その他に、使用器具類、測定環境、手技などがもたらすエンドトキシン汚染も異常値や偽陽性の原因となるが、上記要因のなかでは、3 の測定試薬 (LAL の特異性; β -グルカンに対する反応性) ならびに測定法 (反応時に生じる濁りや着色) が原因でしばしば偽陽性が生じるため注意が必要である。

3. 敗血症とエンドトキシン血症(endotoxemia)

LAL test は、培養法に代わる迅速検査法として、緊急度や重症度の高い敗血症の早期診断や効果的な治療法の選択に役立てることが期待されている。1970 年代後半より、玉熊らを中心に、微量のエンドトキシンの生体作用、バクテリアトランスロケーションの解明とあわせ、LAL test 陽性 (エンドトキシン血症, endotoxemia) の臨床的意義に関する議論が積み重ねられてきた。Yoshida らは、重篤な血液疾患を対象に菌血症とエンドトキシン血症の相関および予後との関連性についてエンドトキシン特異的 LAL 試薬を用いて検討した。その結果、菌血症の 70% がエンドトキシン血症であり、エンドトキシン血症の 40% は血培陰性であることが判明し、両者とも高いショック合併率と死亡率 (>40%) を示した²⁷⁾。一方、菌血症とエンドトキシン血症に関する臨床研究のメタアナリシスが、Hurley らにより 2015 年に報告された。2009 年の横断的レビューに続く臨床的に貴重な解析結果であるが、グラム陰性菌感染例以外のエンドトキシン血症 (両者間の不一致例) が顕著である。さまざまな要因があげられるが、使用した LAL 試薬がエンドトキシンと同様に β -グルカンにも反応することが主たる原因と考えられる。本レビューでは LAL 試薬の感度と測定法 (ゲル化法/合成基質法) に言及しているもの

表 3 血中 (1→3)- β -D-グルカン測定法の臨床的有用性

臨床論文	感度	特異度	エビデンス		β グルカン 定量キット	文献
Obayashi, et al. (Lancet, 1995)	90%	100%	多施設臨床試験	日本	Fungitec G-test	31
Ostrosky, et al. (CID, 2005)	70%	87%	多施設臨床試験	米国	Fungitell	32
Lu, et al. (Intern Med, 2011)	76%	85%	抽出論文数 メタ解析 (meta-analysis)*		13 Fungitell (9/13) WAKO (2/13)	6
Karageorgopoulos, et al. (CID, 2011)	77%	85%			23 Fungitell (10/23) Fungitec G-test (7/23) WAKO (5/23) GKT-5M (China) (1/23)	6
Onishi, et al. (J Clin Microbiol, 2012)	80%	82%			36 Fungitell (17/36) Fungitec G-test (9/36) WAKO (6/36) GKT-5M (China) (3/36)	6

*Multicenter cohort study, Multicenter case-control study, Prospective cohort study, Prospective case-control study, Retrospective cohort study, Retrospective case-control study, etc.

の、反応特異性や血液前処理法に関しては考慮に入っていない²⁸⁾。とくに欧米においては、LAL test で検出されるエンドトキシン血症の評価は、エンドトキシンに対する特異性が担保されていない報告が多数を占め、今後とも注意が必要である。さらに、循環血中の極微量のエンドトキシンは、フリーの状態と白血球・血小板に吸着した状態で混在しており、現行のLAL test では、検出感度、診断精度が不足しており、臨床的重要性を欠く場合が多い。今後はエンドトキシンの選択的吸着剤（不溶性担体、ビーズ）にエンドトキシンを結合させた後、干渉因子を洗浄除去、LAL 試薬で測定する analyte trapping により、極微量のエンドトキシンを濃縮して測定する改良法など更なる検討および臨床研究が望まれる。

一方、近年、ごく微量のエンドトキシンの長期的な暴露が、動脈硬化、2型糖尿病など種々の生活習慣病を発症増悪するリスク要因と考えられ、慢性炎症 (chronic low grade inflammation) との関連が注目されるようになった。これと関連し、metabolic endotoxemia (ME) という概念が提唱されてきた²⁹⁾、肥満、非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis : NASH)、慢性炎症と ME との関連については明確な科学的根拠に乏しい。Ramendra らは、腸管のバリア機能の破壊 (leaky gut syndrome : LGS) が、バクテリアルトランスロケーションに起因する慢性炎症や多様な疾患の引き金になると考え、そのリスク評価にLAL test を用いた新たなアプローチ、バイオマーカーの創出に向けた検討を進めている³⁰⁾。このように、エンドトキシンは、感染に伴う重篤な臓器障害を引き起こされる敗血症だけでなく、感染を伴わない慢性炎症 (生活習慣病、がん) においても、重要な役割を果たしていると考えられ、LAL をベースと

したより高感度かつ高精度のエンドトキシン測定プラットフォームの再構築と新たな臨床展開が期待される。

4. わが国で開発された血中 β -グルカン測定法と国際化

これまで述べたように、LAL を用いたエンドトキシン測定法は1980年以降大きな進歩を遂げたが、臨床応用では、開発から半世紀が経った今も臨床現場で求められるニーズを満たしているとは言い難く、とくに欧米においては日常の補助診断や臨床試験に用いられることはまれである。これに対して、同じLAL凝固因子を利用する血中 β -グルカン測定法は、世界に先駆けわが国で開発された深在性真菌症の体外診断薬で、多施設共同臨床研究の成績がObayashi らにより Lancet 誌に掲載されると、いち早く欧米の臨床家の注目を集めることとなった³¹⁾。1995年には本邦における保険適用が開始され、米国マサチューセッツ州 Associates of Cape Cod 社に技術移管された後に、北米における多施設共同臨床研究の成果をもとに、2004年にFDA認可を取得した。その後、米欧の各種診療ガイドラインに掲載されるとともに、深在性真菌症 (カリニ肺炎含む) の早期診断と治療、抗真菌薬の臨床開発ならびにそれらのグローバル展開に大きく貢献している³²⁾。表3は、ファンギテック G テスト (日本) と Fungitell (米国) の臨床的感度と特異度、さらには、これらの診断薬を用いて実施された臨床成績のメタ解析 (3報) の結果であるが、感度76%から特異度85.3%と良好な診断精度を示している⁶⁾。また、陰性予測率 (NPV) の高さも本法の大きな特徴であり、不適切な抗菌薬投与を控えることで医療費の抑制が期待できる。このように、血中 β -グルカンは深在性真菌症の早期診

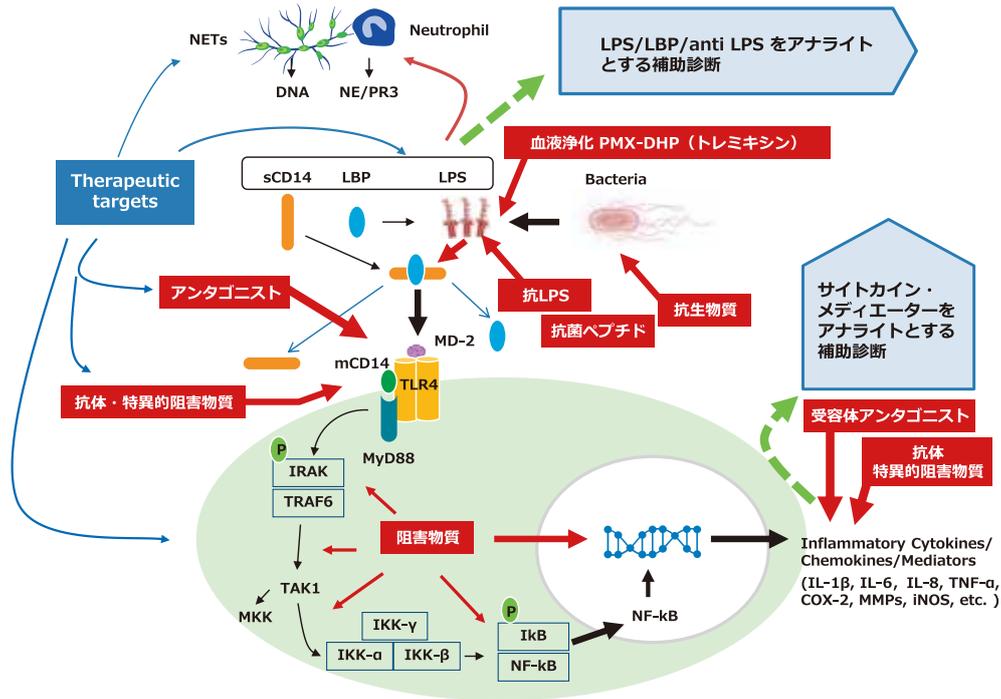


図 2 抗エンドトキシンおよび抗サイトカインに基づく敗血症の治療戦略とバイオマーカー

断と治療効果の判定に加え、抗菌薬の適正使用、スチュワードシッププログラムの推進に寄与している。

5. 敗血症治療薬開発へのバイオマーカーの活用

敗血症の制御には、感染の開始から炎症の引き金となる菌体の増殖を抑えつつエンドトキシンなどの菌体成分をいかに効率よく中和または吸着（体外循環）するか、エンドトキシン受容体である TLR4 との結合をいかに抑制し（アンタゴニスト）、細胞内の情報伝達機構をいかに制御するか、毒性の発現を抑えつつどのように安全性を担保するか、治療有効濃度をいかに維持するかなどがポイントになる。エンドトキシンをターゲットとする創薬研究と臨床試験は、SIRS という概念が提唱された 1990 年代の初めに米国で試みられた。抗 LPS 抗体 (XOMA, Centocor) の開発に始まり、TLR4 アンタゴニスト (Eritoran (E5564), Eisai)、細胞内情報伝達阻害薬 TAK-242 (Takeda)、抗血栓作用を有する組換え型ヒト活性化プロテイン C 製剤 (recombinant activated protein C : rAPC (Xigris), Eli Lilly) などの大型新薬候補が次から次へと登場したが、いずれも開発を断念したり、大規模無作為比較試験 (randomized controlled trial : RCT) の結果を受け市場から撤退した。適切なバイオマーカーを有効に活用できなかったことも要因の一つであり、重症敗血症および敗血症性ショックの治療戦略ならびに補助診断に役立つと期待されるバイオマーカー (アナライト) を図 2 に示す。

バイオマーカーのバリデーションとその情報に基づく適切な患者の確保 (accrual) が新薬開発の成否を左右する重要な要素であるが、上記の抗 LPS 抗体においては、LAL test (エンドトキシン非特異的) を用いて選定された治療群にエンドトキシン血症の偽陽性例 (β -グルカン高値の深在性真菌症) が含まれていたことも治療薬が奏功しなかった原因のひとつと推定される。莫大な費用を要する新薬開発において、バイオマーカーが重要な役割を果たすことは広く認識されており、的確なデザインのもと、臨床開発のスピードアップ、コスト削減に寄与することが可能となる。既知のバイオマーカーの有用性に加え、新たな視点でのバイオマーカー開発 (がんゲノム医療におけるコンパニオン診断の観点)、敗血症病態のイメージング手法など革新的技術を活用した診断薬の臨床試験を治療介入とともに展開していくことが、ブレイクスルーにつながる大きなポイントと考えられる。

おわりに

内科、外科、救命救急・集中治療領域だけでなく、今般の新型コロナウイルス感染症においても、血管障害と血栓形成の抑制など敗血症対策は極めて重要な課題である。敗血症は、院内死亡率が 30~60% にも達するため、バイオマーカーを用いる早期の補助診断と治療開始の時期が生死に影響する。敗血症に対するこれまでの創薬研究戦略の行き詰まりを打破するためには、図 2 を考慮しつつ新しい視点での開発戦略、治療の最適化のためのバイオマーカー探索が求められる。たとえば、長岡らの研

究グループによる抗菌ペプチドの多様性に関する最新の知見 (pyroptosis, neutrophil extracellular traps (NETs), ectosome)³³⁾やゲノム情報とバイオインフォマティクスならびに人工知能 (artificial intelligence : AI) を融合したイノベティブかつチャレンジングなアプローチと実践が待たれるところである。

文 献

- Levin J, Bang FB : The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. *Bull Johns Hopkins Hosp* 115 : 265-274, 1964
- Harada T, Morita T, Iwanaga S, et al. : A new chromogenic substrate method for assay of bacterial endotoxins using Limulus hemocyte lysate. *Prog Clin Biol Res* 29 : 209-220, 1979
- 大林民典, 田村弘志, 田中重則, 他 : 血中エンドトキシン測定のための新しい血液前処理法 (過塩素酸法) とその臨床的応用. *臨床病理* 31 : 285-288, 1983
- Morita T, Tanaka S, Nakamura T, et al. : A new (1→3)- β -D-glucan-mediated coagulation pathway found in Limulus amoebocytes. *FEBS Lett* 129 : 318-321, 1981
- Obayashi T, Tamura H, Tanaka S, et al. : A new chromogenic endotoxin-specific assay using recombinated limulus coagulation enzymes and its clinical applications. *Clin Chim Acta* 149 : 55-65, 1985
- 田村弘志 : (1→3)- β -D-グルカン測定法の進歩と将来展望. “ β グルカンの基礎研究と応用・利用の動向” 大野尚仁 監修, シーエムシー出版, 2018, pp113-128
- Levin J, Poore TE, Zauber NP, et al. : Detection of endotoxin in the blood of patients with sepsis due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med* 283 : 1313-1316, 1970
- Maitra SK, Schotz MC, Yoshikawa TT, et al. : Determination of lipid A and endotoxin in serum by mass spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 : 3993-3997, 1978
- Allan E, Poxton IR, Barclay GR : Anti-bacteroides lipopolysaccharide IgG levels in healthy adults and sepsis patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 11 : 5-12, 1995
- Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, et al. : Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 180 : 1584-1589, 1999
- Marshall JC, Walker PM, Foster DM, et al. : Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence. *Crit Care* 6 : 342-348, 2002
- Hoffmann S, Peterbauer A, Schindler S, et al. : International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoid cells. *J Immunol Methods* 298 : 161-173, 2005
- 西田正人, 畑尾忠彦, 比企直樹, 他 : TLR4 強制発現細胞による血中エンドトキシン生物活性測定の試み (Lipopolysaccharide Biological Activity Assay (LBA)). *エンドトキシン研* 10 : 126-132, 2007
- Munford RS : Endotoxemia—Menace, Marker, or Mistake? *J Leukoc Biol* 100 : 687-698, 2016
- Novitsky TJ : Limulus amoebocyte lysate (LAL) detection of endotoxin in human blood. *J Endotoxin Res* 1 : 253-263, 1994
- Tamura H, Obayashi T, Takagi K, et al. : Perchloric acid treatment of human blood for quantitative endotoxin assay using synthetic chromogenic substrate for horseshoe crab clotting enzyme. *Thromb Res* 27 : 51-57, 1982
- Obayashi T : Addition of perchloric acid to blood samples for colorimetric limulus test using chromogenic substrate : comparison with conventional procedures and clinical applications. *J Lab Clin Med* 104 : 321-330, 1984
- Inada K, Endo S, Takahashi K, et al. : Establishment of a new perchloric acid treatment method to allow determination of the total endotoxin content in human plasma by the limulus test and clinical application. *Microbiol Immunol* 35 : 303-314, 1991
- Kambayashi J, Yokota M, Sakon M, et al. : A novel endotoxin-specific assay by turbidimetry with limulus amoebocyte lysate containing beta-glucan. *J Biochem Biophys Methods* 22 : 93-100, 1991
- Shimizu T, Obata T, Sonoda H, et al. : Diagnostic potential of endotoxin scattering photometry for sepsis and septic shock. *Shock* 40 : 504-511, 2013
- Ding JL, Ho B : A new era in pyrogen testing. *Trends Biotechnol* 19 : 277-281, 2001
- Mizumura H, Ogura N, Aketagawa J, et al. : Genetic engineering approach to develop next-generation reagents for endotoxin quantification. *Innate Immun* 23 : 136-146, 2017
- 望月英隆, 小野聡, 青笹季文, 他 : エンドトキシンの測定法をめぐる問題点と測定の意義. *救急医* 14 : 1421-1426, 1990
- Tamura H, Reich J, Nagaoka I : Bacterial endotoxin assays relevant to host defense peptides. *Juntendo Med J* 62 : 132-140, 2016
- 田村弘志 : バイオ医薬品, とくに抗体医薬におけるエンドトキシン試験. *Pharm Stage* 19 : 32-39, 2020
- Reich J, Tamura H, Nagaoka I, et al. : Investigation of the kinetics and mechanism of low endotoxin recovery in a matrix for biopharmaceutical drug products. *Biologicals* 53 : 1-9, 2018
- Yoshida M, Obayashi T, Tamura H, et al. : Diagnostic and prognostic significance of plasma endotoxin determination in febrile patients with haematological malignancy.

- nancies. *Eur J Cancer* 30 : 145-147, 1994
- 28) Hurley JC, Nowak P, Öhrmalm L, et al. : Endotoxemia as a diagnostic tool for patients with suspected bacteremia caused by gram-negative organisms : a meta-analysis of 4 decades of studies. *J Clin Microbiol* 53 : 1183-1191, 2015
- 29) Boutagy NE, McMillan RP, Frisard MI, et al. : Metabolic endotoxemia with obesity : is it real and is it relevant? *Biochimie* 124 : 11-20, 2016
- 30) Ramendra R, Isnard S, Mehraj V, et al. : Circulating LPS and (1→3)- β -D-Glucan : a folie à deux contributing to HIV-associated immune activation. *Front Immunol* 10 : 465, 2019 (doi : 10.3389/fimmu.2019.00465)
- 31) Obayashi T, Yoshida M, Mori T, et al. : Plasma (1→3)- β -D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* 345 : 17-20, 1995
- 32) Ostrosky-Zeher, L, Alexander BD, Kett DH, et al. : Multicenter clinical evaluation of the (1→3) β -D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis* 41 : 654-659, 2005
- 33) Kumagai Y, Murakami T, Kuwahara-Arai, et al. : Antimicrobial peptide LL-37 ameliorates a murine sepsis model via the induction of microvesicle release from neutrophils. *Innate Immun* 1753425920936754, 2020

ポリミキシン B 固定化繊維カラムを用いた エンドトキシン吸着療法の進展

小路 久敬

東レ・メディカル株式会社

Progress of endotoxin adsorption therapy with polymyxin B fixed fiber column

Hisataka Shoji

Toray Medical Co., Ltd.

Abstract

Evidence for endotoxin removal therapy with polymyxin B immobilized column (PMX) has been accumulated these more than two decades. However, the evidence level is still weak. RCT is currently on going in US. The targeted patient's population with high, but some definitive range of blood endotoxin level and organ dysfunction score who is likely to benefit from PMX therapy could be clarified through this trial.

Recently, PMX has been used for the different kind of patients' population such as acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis (AE-IPF) and septic shock due to viral infection such as H1N1. Improvement of hemodynamics and oxygenation have been reported in these patients' population as same as the case of endotoxemic septic shock. Under the current SARS-CoV-2 pandemic, it is reported PMX was applied for COVID-19 patient. The reduction of inflammatory state of the patient and the improvement of chest radiographic findings were observed.

Interestingly, the effective action of PMX therapy looks happening in a similar fashion for these different kinds of patient's population. The comprehensive mechanism of action to explain this clinical effectiveness is urgently needed to be studied.

PMX has a multi-faceted action such as endotoxin removal, removal of pro- and anti-inflammatory mediators, improvement of coagulation abnormality, removal of proapoptotic factor and immunomodulatory effect due to monocyte and neutrophil removal. It is required to study how these actions could lead to the improvement of each organ dysfunction.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 73~76, 2020

Key words : Septic shock, Endotoxin removal, polymyxin B fixed column, EUPHRATES, COVID-19

はじめに

エンドトキシンと結合親和性の高い抗生物質ポリミキシン B を固定化した吸着材から構成される吸着型血液浄化用浄化器 (エンドトキシン除去向け) トレミキシン (PMX) は, 1994 年 8 月の健康保険取載以来, エンドトキシン血症が強く疑われる敗血症性ショック患者に対し, 臨床で広く使用されてきた。海外では, 1998 年の欧州認証 CE マーク取得を経て 2003 年頃からイタリアでの臨床使用が始まり, 2020 年現在では, 他の欧州諸国 (ロシア, スペイン, スイスなど), アジア諸国 (韓国, 台湾, インド, タイなど) でも臨床使用されている。また北米では, カナダ (Health Canada) での承認が得られ

ている。

PMX の臨床使用の進展に伴い, 国内外から数多くの研究論文が発表され, 治療に伴う生体応答反応, 循環動態など臨床症状の改善, ビッグデータ解析やシステムティックレビューによる生命予後の改善効果などが示されてきた。一方, 近年の Evidence Based Medicine (EBM) を追求する動きに伴い, 無作為比較対照試験によって, 生命予後の改善効果を証明することがより一層求められ, EUPHAS (Italy, 2009 年), ABDOMIX (France, 2015 年), EUPHRATES (North America, 2018 年) などの比較対照試験が, それぞれ実施されてきた。しかしながら, PMX 治療 28 日後の生命予後の改善については, いまだ一定の結論を得ていないのが現状で

ある。EUPHRATES 試験については、post hoc 解析によって PMX 治療群で生命予後の有意に改善したサブグループが見出された。現在、同様の症例を対象とした TIGRIS 試験が米国で進行中である。

敗血症性ショックへの PMX 適用において血圧上昇を伴う循環動態の改善は、顕著な臨床効果として報告されてきた。血中エンドトキシン除去の結果として、どのような生体応答反応が惹起され恒常性の回復に至るのか、その機序は明確ではない。

外科系疾患のなかでも穿孔性腹膜炎に伴う敗血症性ショックは、エンドトキシン血症の関与が強く疑われ、PMX の良い適用とされてきた経緯がある。一方でエンドトキシン血症の関与が必ずしも明確になっていない特発性肺線維症の急性増悪 (Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis : AE-IPF) 症例においても、PMX 適用による循環動態や肺酸素化能の改善が報告されてきた。さらには、H1N1 などウイルス感染由来の敗血症に対しても PMX が使用され、有効例が報告された歴史がある。最近では、COVID-19 症例においても使用され、有効性が報告されている。

本稿では、PMX 治療の EBM 構築に向けた臨床研究の結果と現状についてレビューし、また最近の AE-IPF やウイルス感染症への PMX の臨床使用も含めて観察されてきた臨床効果、そこから考えられる作用機序の推定、解明へ向けたアプローチについて考察する。

1. PMX 治療のエビデンスの集積

1-1. EUPHRATES 試験から TIGRIS 試験へ

EUPHRATES 試験は米国、カナダで実施された PMX の二重盲検法による無作為比較対照試験である¹⁾。昇圧薬が必要な敗血症性ショック、新たな 1 個以上の臓器障害の発症、感染またはその疑いがあり、EAA (Endotoxin Activity Assay) 法によるエンドトキシンレベルが 0.6 以上である症例を対象とした。PMX 群は、従来の標準治療に加えて PMX が 2 回施行され、対照群は、標準治療のみを受けた。中間解析の結果、MODS (Multi Organ Dysfunction Score) が 10 以上である条件が追加された。試験を完了した 449 症例において、治療 28 日後での死亡率は、PMX 群、対照群で有意な差異を認めなかった (PMX 群 84/223 (37.7%)、対照群 78/226 (34.5%))。また MODS スコアが 10 以上の症例に限っても、両群間に死亡率の差異は無かった。

しかし、post hoc 解析によって、EAA レベルが 0.6 以上 0.9 未満の症例に限ると、28 日後死亡率に、両群間に絶対値で 10% の有意な差異が検出された (PMX 群 23/88 (26.1%)、対照群 39/106 (36.8%))。さらに、PMX 群における有意な平均動脈圧の上昇や人工呼吸器装着日数の短縮を認めた²⁾。EAA レベル 0.9 以上では体内のエンドトキシン負荷量が過剰であり、PMX の 2 回治療で

は不十分な可能性が示唆された。

Post hoc 解析結果を踏まえて、TIGRIS 試験が米国で進行中である。EUPHRATES 試験と同様の患者群を対象とし、EAA レベルが 0.6 以上 0.9 未満、MODS が 10 以上であることを入症条件としている。目標症例数 150 例のオープンラベル比較対照試験である。Post hoc 解析結果を再現できるか否か、結果が待たれる。

1-2. プロペンシティスコアマッチングによるコホート研究

Nakamura らは、国内 42 の ICU が参加して実施された JSEPTIC DIC Study のデータセットを用い、3,195 例の重症敗血症および敗血症性ショック症例から、条件を満たす 1,723 例 (PMX 施行 1,201 例、非施行 522 例) を選択した。さらにプロペンシティスコアマッチング法により、おのおの 262 症例を抽出し解析した³⁾。院内死亡率は、PMX 施行群で有意に低かった (PMX 施行群 32.8%、非施行群 41.2%、 $p=0.042$)。また ICU 滞在を必要としない日数は、PMX 施行群で有意に長くなっており (PMX 施行群 18 日、施行無し群 14 日、 $p=0.045$)、PMX 治療による臓器不全の改善効果が寄与していることが示唆された。

岩上らは、2007 年 7 月～2012 年 3 月 (39 カ月) の DPC (Diagnosis Procedure Combination) データを用いて PMX 治療の生命予後に及ぼす影響を検討した。ICU において敗血症と診断され、昇圧薬の投与があり、加えて CRRT (Continuous Renal Replacement Therapy) を施行した症例を対象とした。適格症例 3,759 例の内、1,068 例が PMX 治療を受けていた。プロペンシティスコアマッチングにより、それぞれ 978 例を抽出し解析した。28 日後での死亡率は、PMX 治療群で有意に低かった (PMX 群 40.2% (393/978)、PMX 非施行群 46.8% (458/978)、 $p=0.003$)。また回帰分析では、PMX の施行と 28 日後の死亡率との間に有意な相関を認めた (Odds 比 0.75, Confidence Interval (CI) 0.62～0.91)。DPC という日常診療での大規模データを用いた解析において効果が検出された意味は大きい。

1-3. システマティックレビュー

国内外から、幾つかの論文が報告されている。Tzu-Chang らは、PMX 治療の生命予後に及ぼす効果に言及した 17 報の論文を採用して解析を行った。全体での死亡率 (各試験によって 28 日後、院内、ICU、90 日後、2 週間後など評価期間が異なるため) のリスク比は 0.81 (95% CI, 0.70～0.95) であり、PMX 治療を施行しなかった比較群に比べて PMX 治療に有利であった。さらに重症度の異なるサブグループで解析すると、比較群の死亡率が 60% 以上の高リスク群、30～60% の中等度リスク群で、死亡率のリスク比は、それぞれ 0.84 (95% CI, 0.77～

0.92), 0.64 (95% CI, 0.52~0.78) となり, 中等度以上の重症度患者群に対して, PMX 治療が救命効果を示すことが示唆された。一方, 比較群の死亡率が 30% 未満の低リスク群では, リスク比は, 1.278 (95% CI, 0.888~1.839) となり, 救命効果は示唆されなかった。

寺山らのシステマティックレビューおよびメタ解析論文でも, 7 報の論文を採用し, Tzu-Chang らと同様に, PMX 治療による死亡率の低減効果を認めている。

藤井らは, 寺山らが採用した論文と同一の論文 3 件と, 最近の EUPHRATES 試験および従来採用されてこなかった 1 報を含めた計 5 報の論文を用いてメタ解析を行った。28 日後の死亡率のリスク比が 1.03 となり, PMX 治療による死亡率のリスク低減効果を検出することはできなかった。システマティックレビューでは, 採用する論文が異なることによって, 導かれる結果が異なってくるのは事実であり, 解釈には注意が必要である。

2. PMX の各種疾患への適用

2-1. エンドトキシン血症を伴う敗血症性ショックへの適用

血中エンドトキシンレベルを低下させることが, 予後の改善に関係しているか否かについて大規模臨床試験で証明された結果は少ない。Rachoin らは, EUPHRATES 試験の post-hoc 解析における 194 症例を対象として興味深い結果を報告した⁴⁾。血中エンドトキシン EAA レベルの治療前値から day 3 (PMX カラム 2 本目施行後 24 時間後) での全症例における低下率の中央値, および day 3 までに達成する目標 EAA レベルに対する, 各群の EAA レベルの変化の影響について検討した。

全体の EAA レベル低下率の中央値は 10.4% であった。PMX 群, 対照群を問わず EAA レベルの低下率が中央値を超えた症例の死亡率は 26% (25/95), 10.4% 低下を達成できなかった症例の死亡率は 38% (36/96) ($p=0.1$) と死亡率が高くなる傾向にあった。さらに day 3 の EAA レベルが死亡率と最も良く関連し, その数値は 0.65 と算出されたことから, day 3 の EAA レベルが 0.65 以下を達成した群と 0.65 を超えていた群とで比較した。0.65 以下を達成できた群の 28 日後死亡率は, 25% (23/91), 一方達成できなかった群では 38% (38/100) ($p=0.06$) であった。Day 3 で EAA レベル 0.65 以下を達成した PMX 治療群は, 対照群に比して死亡率が低くなる傾向を示した (16% vs 33%, $p=0.06$)。さらに人工呼吸器無装着日数の増加 (20 vs 16, $p=0.05$), Kaplan-Meier 法での死亡率低下 (17%) を認めた。

エンドトキシン血症を伴う敗血症性ショックの治療において, PMX によってエンドトキシンレベルを低下させることが, 死亡率の低減に通じるという仮説を提案する結果であり, 前向き比較対照試験によって証明される必要があると提案されている。

2-2. 特発性肺線維症の急性増悪 (AE-IPF) への適用

AE-IPF の予後は, 極めて不良であると報告されている。Abe らは, 国内の 18 施設において標準治療に加えて PMX 治療を施行した急性増悪を伴う間質性肺炎 160 症例 (73 例の特発性肺線維症を含む) について, レトロスペクティブに検討した⁵⁾。AE-IPF 症例では, $\text{PaO}_2/\text{F}_i\text{O}_2$ 比が 2 回の PMX 治療後に有意に改善した (173.9 ± 105.4 から 195.2 ± 106.8 Torr, $p=0.003$)。また治療 1 カ月後, 3 カ月後の生存率は, それぞれ 70.1%, 34.5% であり, 生存率の従来報告値 80%, および 96% に比べて大いに改善されていた。

Oishi らは, 自施設で治療を受けた AE-IPF の 50 症例 (PMX 治療: 27 例, 非 PMX 治療: 23 例) についてレトロスペクティブに検討した。両群ともステロイドパルス療法を受けていた。多変量解析では, PMX 治療が 12 カ月生存の良好な予後予測因子であった ($\text{HR}=0.442$, 95% CI 0.223~0.873, $p=0.019$)。12 カ月後の生存率は, PMX 治療群で有意に高かった (41.7% vs. 9.8%, $p=0.040$)。AE-IPF に対する PMX 治療の作用メカニズムは, いまだ明確ではない。

2-3. H1N1 ウイルス, SARS-CoV-2 感染による重症肺炎への適用

Araki らは, 2010 年に発生した H1N1 ウイルス感染による重症肺炎に対し, PMX 治療を行った症例を報告した。発熱, および 100% 酸素下での人工呼吸管理にもかかわらず低酸素血症が持続した。胸部 X 線写真では, 両側に浸潤影, すりガラス状の陰影を認めた。気管内吸引検体検査で H1N1 ウイルス陽性が確認され, H1N1 感染による重症肺炎と診断された。薬剤治療と併せて PMX 治療を施行したところ, 施行開始と同時に動脈血酸素分圧が 65 mmHg から 195 mmHg に急速に回復した。患者は, 第 16 病日に抜管し, 合併症も無く退院できた。著者らは, サイトカインストームの病態と考え, PMX 治療による高サイトカイン血症の改善を意図したと報告している。

国内での COVID-19 に対して PMX や CHDF などの血液浄化法が使用され, 炎症の低減や胸部 X 線写真での陰影改善などが報告されている。海外でも PMX が使用されたとの情報があるが, 詳細は報告されていない。

3. 作用機序の解明に関するアプローチ⁶⁾

敗血症性ショックに対する PMX 施行によって, 血中エンドトキシン, メディエータ類や各種臓器不全に関連するマーカーの血中レベルが変化することが多数報告されてきた。IL-6, IL-10, HMGB-1 などのサイトカイン類, 心筋傷害に関連した心筋トロポニン-T, 肺傷害に関連する顆粒球エラスターゼ, 血管新生因子であるアンギオ

ポエチン-1, -2のバランス, 腎傷害マーカーとしての尿中L-FABP (liver-type fatty acid-binding protein), 血管内皮細胞の傷害を示すマーカーとしてのエンドセリン-1, 血液凝固, 血小板系に関係するPAI-1, PF-4, トロンボモデュリン, フォン・ヴィレブランド因子などである。メディエータや臓器傷害マーカーの推移から作用機序に迫るアプローチが試みられてきたが, その過程は複雑で, 解明に至っていない。

敗血症における臓器傷害の機序として, 細胞の壊死やアポトーシスが推定されている。PMX 施行による血中のアポトーシス促進因子の除去が, 敗血症に伴う急性腎障害の改善に関与するとする臨床研究や動物実験結果が報告されている。

また, PMX 治療後の免疫細胞機能の修飾作用が報告されてきた。敗血症では, 炎症性反応と抗炎症免疫抑制反応が発生しているとされ, 炎症惹起性のCD16陽性単球の割合がPMX カラム通過後に低下することや免疫不応答状態を反映するHLA-DR陰性の単球の割合がPMX 治療後に低下し, 免疫不応答状態が改善することが示唆されている。PMX カラムによる異常な単球や好中球の吸着除去の結果とも推定される。

AE-IPF へのPMX 治療の有効性機序について, Abeらは, 活性化白血球の吸着除去による機序を推察している。臨床使用後のPMX カラム吸着体にHLA-DR, CD14, CD62L, CD114を高度に発現した好中球が大量に吸着されていたこと, さらにMMP-9 (Matrix metalloproteinase) の血中レベルがPMX 治療後に有意に低下することなどを観察した。

エンドトキシンの吸着除去の結果としての間接的なメディエータレベルの低下, また, ある種のメディエータの直接的な吸着除去, アポトーシス促進因子の除去, 活性化された単球や好中球の除去による免疫調節反応や炎症反応の抑制など, PMX 治療は多面的な作用を発揮していると推定される。これらの作用が, どのように臓器不全の改善に結びついて行くのか, その過程を明らかにする必要があると思われる。

おわりに

PMX の臨床使用の進展に伴い数多くの臨床研究が実

施され, 臓器不全の改善に関する一定のエビデンスは, 蓄積されてきたと考えられる。しかしながら, 生命予後の改善については, 比較対照試験での明確な証明に至っておらず, エビデンスレベルは低い。現在, 米国で進行中の臨床試験に期待したい。PMX は, 血中エンドトキシンの吸着除去をベースとして, 多面的な作用を発揮することが報告されている。臓器不全の改善に至る経路を明らかにして行くことが, 作用機序の解明につながるものと考えられる。

文 献

- 1) Dellinger RP, Bagshaw SM, Antonelli M, et al. : Effect of Targeted Polymyxin B Hemoperfusion on 28-Day Mortality in Patients with Septic Shock and Elevated Endotoxin Level : The EUPHRATES Randomized Clinical Trial. *JAMA* 320 : 1455-1463, 2018
- 2) Klein DJ, Foster D, Walker PM, et al. : Polymyxin B hemoperfusion in endotoxemic septic shock patients without extreme endotoxemia : a post hoc analysis of the EUPHRATES trial. *Intensive Care Med* 44 : 2205-2212, 2018
- 3) Nakamura Y, Kitamura T, Kiyomi F, et al. : Potential survival benefit of polymyxin B hemoperfusion in patients with septic shock : a propensity-matched cohort study. *Crit Care* 21 : 134, 2017
- 4) Rachoin JS, Foster D, Giese R, et al. : Importance of Endotoxin Clearance in Endotoxemic Septic Shock : An Analysis from the Evaluating Use of Polymyxin B Hemoperfusion in a Randomized Controlled Trial of Adults Treated for Endotoxemic Septic Shock (EUPHRATES) Trial. *Crit Care Explor* 2 : e0083, 2020
- 5) Abe S, Azuma A, Mukae H, et al. : Polymyxin B-immobilized Fiber Column (PMX) Treatment for Idiopathic Pulmonary Fibrosis with Acute Exacerbation : A Multicenter Retrospective Analysis. *Intern Med* 51 : 1487-1491, 2012
- 6) 小路久敬 : 血中エンドトキシン除去カラム (PMX) の有用性と意義の確立に向けた多角的アプローチ. *日アフェリス会誌* 31 : 109-117, 2012

敗血症マーカー「プレセプシン」—生化学と臨床診断—

白川 嘉門

株式会社 LSI メディエンス 診断薬事業本部学術部

Sepsis marker “PRESEPSIN” —biochemistry and clinical diagnosis—

Kamon Shirakawa

LSI Medience Corporation

Abstract

Presepsin (P-SEP), an approximately 70-amino-acid fragment of CD14 : a lipopolysaccharide (LPS) receptor that transmits signals through CD14-MD-2/TLR4 to cells, was first discovered as a sepsis marker in 2002 when high concentrations of a protein with soluble CD14-like immunoreactivity were detected in the blood of sepsis patients. We used an immunoassay to measure the serum concentrations of the new peptide, which was initially named soluble CD14-subtype (sCD14-ST) and later renamed presepsin.

Rabbit sepsis models revealed that presepsin is induced by the cecal ligation and punctual (CLP) sepsis model but not by the LPS injection model. In vitro experiments using human monocytes and neutrophils suggested that presepsin is produced when bacteria are phagocytosed by immune cells. The first clinical study was initiated by Professor Shigeatsu Endo (Iwate Medical University, Japan) ; it demonstrated that sepsis patients have higher presepsin levels compared with Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) patients, indicating that presepsin could be useful for sepsis diagnosis. This interesting marker is not only helpful for the diagnosis of sepsis but is also indicative of disease severity, as measured by the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score.

More research remains necessary, as understanding of the fundamental aspects of presepsin is still limited. Presepsin is elevated in high mortality elective cardiac surgery and in severe COVID-19 patients, but the mechanism by which presepsin production is increased during severe COVID-19 disease is unknown. In this article, presepsin biochemistry is described, then the application of presepsin in clinical diagnosis is discussed.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 77~82, 2020

Key words : Presepsin, Sepsis, Severity, CD14, Diagnostic marker

はじめに

敗血症は年間約 2,700 万人が罹患する世界的なヘルスケア上の問題である。敗血症は感染症に対する制御不能な宿主反応に起因した生命を脅かす臓器障害と定義され、熱傷、免疫不全患者、外傷患者、入院患者における主な合併症である。敗血症治療は早期診断と早期治療が最も効果的な方法とされるが、病原菌を検出するための血液培養は陽性率が低く、結果が出るまでに時間がかかることから、新しい診断方法が望まれている。

近年、血液培養方法の改良や質量分析装置を用いて菌の同定方法が実用化され、結果が出るまでの時間は短くなってきている。しかし、敗血症の重症度や予後予測な

どの情報を得られない。従来のマーカー（C 反応性タンパク質、白血球数、インターロイキンなど）は敗血症でも上昇するが、敗血症特異的ではない。プロカルシトニン (PCT) は甲状腺 C 細胞から産生されるカルシトニンの前駆体であり、細菌感染では体全体の細胞から産生され、敗血症の診断マーカーとして利用されている。しかし、PCT も炎症の影響を受けやすく、感染初期には上がりにくいなど、理想的な敗血症バイオマーカーではない。

プレセプシンは単球や好中球、マクロファージの膜上に存在する CD14 分子の N 末断片として同定された。血中には可溶性 CD14 (sCD14) が存在し、敗血症でも上昇するが、各種疾患でも上昇するため敗血症の診断薬にはならなかった。一方、プレセプシンは敗血症で特異的

に上昇することが遠藤らにより確認され、敗血症診断薬として臨床応用されることになった。その後の臨床評価において、敗血症早期に上昇し、炎症の影響を受けにくく、患者の状態を反映しやすいことが明らかになった。最近では、待機的心臓手術患者の高死亡率群や重症のCOVID-19患者でも上昇することが報告され、新たな有用性も見出されるようになってきている。しかしながら、これら疾患でのプレセプシンの上昇がどのような機序に基づいているのかについては明らかではない。

本稿では、プレセプシンの生化学をはじめに紹介し、その後最近のデータを踏まえ、プレセプシンの臨床診断への応用について考察する。

1. プレセプシンの発見

CD14は、自然免疫を司る単球や好中球、マクロファージの細胞膜上に存在する糖タンパク質であり、細菌の膜表面に存在するエンドトキシンに代表されるリポポリサッカライド (LPS) のレセプターである。LPSはCD14を介して細胞膜上のTLR4/MD-2に結合し、細胞を活性化する。また、血中にはsCD14が数 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で存在し、細胞膜上にCD14を持たない血管内皮細胞の活性化にも関与している。このようにCD14は細菌の感染を認識する機構の一部であり、生体防御における重要な分子である。そこで、CD14に関連して敗血症で特異的に上昇するマーカーを探索した結果、分子量の小さい可溶性CD14 (sCD14-ST) を敗血症患者の血中に発見した。sCD14-STはその後、pre-sepsis-protein「敗血症の前に増えるタンパク質」の意味を込めてPRESEPSIN (プレセプシン) と命名された。

2. プレセプシンの構造

プレセプシンは、CD14のN末ペプチドで約70個のアミノ酸からなる分子量約13 kDaの糖タンパク質である。プレセプシンはLPSとの結合能を持たず、また抗CD14抗体である3C10やMEM18抗体では認識されないことから、CD14とは異なった新規のタンパク質である。現在利用されている標準品は組換え体としてCOS-1細胞で生産された1~64アミノ酸の配列を有するポリペプチドである (図1, 2)。

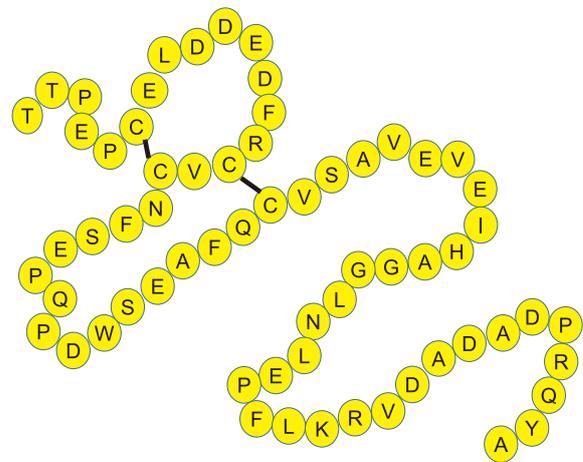


図1 プレセプシンのアミノ酸配列模式図
C末は決定されていないため、標準品として使用されている1~64アミノ酸配列を示した。

項目	プレセプシン	sCD14
アミノ酸数	約70アミノ酸	356アミノ酸
分子量	13 kDa	56 kDa
産生臓器	単球、顆粒球	単球、好中球、肝臓
産生刺激	細菌感染、真菌感染	細菌感染, サイトカイン, LPSなど
LPS結合能	なし	あり
抗CD14抗体	結合せず	結合
抗プレセプシン抗体	結合	結合せず
健常人血中濃度	50~150 pg/mL	2~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

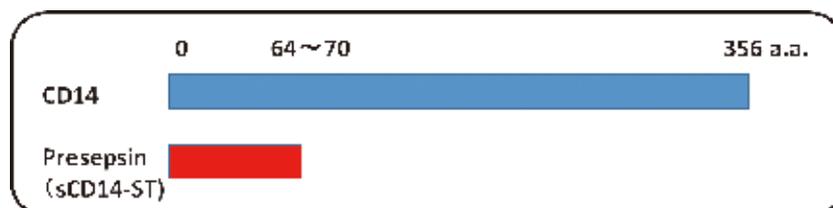
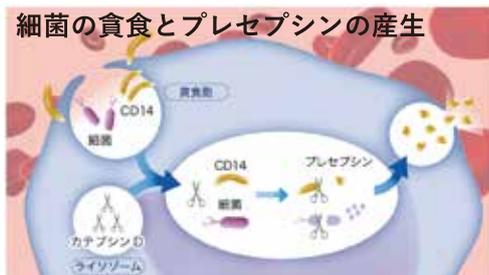
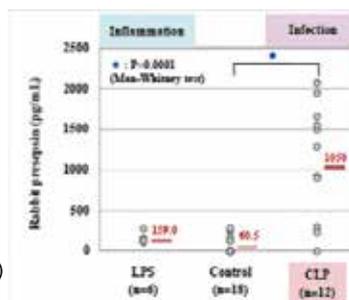


図2 プレセプシンとsCD14の比較

LPSモデルとCLPモデルによるプレセプシンの産生

	LPSモデル	CLPモデル
刺激剤	LPS(エンドトキシン)	腸内細菌
モデル	炎症	感染
菌血症	No	Yes
体温	上昇	上昇
白血球数	上昇	上昇
サイトカイン	上昇	上昇

CLP(cecal ligation and puncture: 盲腸結紮穿刺)



細菌が血中の顆粒球に貪食された時にCD14も取り込まれ、顆粒球内で酵素消化される際にプレセプシンがCD14より産生され、血中に放出される

図3 ウサギの敗血症モデルとプレセプシンの産生

(出典: Naitoh K, Shirakawa K, Hirose J, et al.: SEPSIS 2010: Poster: P-19 より作図)

3. プレセプシンの産生

プレセプシンがなぜ敗血症特異的に上昇するのかを明らかにするため、ウサギ敗血症モデルを用いて検討した。まず、LPSを投与したウサギ敗血症モデル(LPSモデル)および腹膜炎を起こす盲腸結紮穿刺Cecal Ligation and Puncture (CLP)モデルの2種類の敗血症モデルを作製した。興味深いことに、LPSモデルではプレセプシンは上昇せず、CLPモデルでのみプレセプシンの産生が確認された。また、プレセプシンはインターロイキン(IL)-6よりも早期に上昇した。さらに、顆粒球を用いて作製した*in vitro*の系に大腸菌を添加したところプレセプシンの産生が確認されたが、LPS添加では産生が認められなかった。そこで、この系に貪食阻害薬であるワルトマンニンとサイトカラシンDを別々に添加したところ、プレセプシンの産生が抑制され、プレセプシンの産生は「CD14を持つ細胞が細菌を貪食する際にCD14が切断され、プレセプシンが産生される」ものと推定された(図3)。ウサギモデル系に引き続き、Araiらにより、ヒトの血中から分離した単球、好中球、リンパ球を用いた*in vitro*系によるプレセプシンの産生機序が研究され、LPSなどの細胞活性化剤ではプレセプシンは産生されず、大腸菌の添加でプレセプシンの産生を確認し、とくに単球で強く産生された¹⁾。

4. プレセプシンの測定法

プレセプシンの測定には、免疫学的測定法が利用される。プレセプシンはCD14のN末断片であり、CD14と

全く同じアミノ酸配列を有していることから、CD14のN末断片を認識する抗体はプレセプシンを認識する可能性がある。KimらはCD14のC末領域がLPSの結合領域であるN末側の構造を維持するのに重要であり、また、Juanらは152アミノ酸より短いCD14はLPS結合能力がないことを報告した^{2,3)}。このことからプレセプシンのような短いCD14断片は本来の立体構造を維持していないと考えられ、立体構造を認識しない抗体がプレセプシンを特異的に認識すると考えられた。この仮説に基づき抗体の作製を試みたところ、プレセプシンに特異的な抗体の作製に成功し、2種類の抗体を用いてプレセプシン特異的測定法を完成した。この測定法を用いることで、血中に存在するsCD14の影響を受けず、プレセプシンのみを特異的に測定することが可能となり、2011年に化学発光酵素免疫測定法を用いた高感度測定試薬(PATHFAST-Presepsin)を開発し、17分という短時間で血中のプレセプシンを測定可能とした。

5. プレセプシンの正常値と基準範囲

Giavarinaらは18歳から75歳までの健常人200例におけるプレセプシン濃度が55~184 pg/mL (90%CI)の範囲にあることを報告し、また男女差はみられなかった⁴⁾。一方、本邦の臨床試験において敗血症患者103例とSystemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) 47例の測定より算出された、有病正診率(94.2%)、無病正診率(68.1%)により算出した診断効率(86.0%)より敗血症のカットオフ値が設定され、敗血症カットオフ値500 pg/mLが採用されている。

6. プレセプシンの安定性と血中動態

臨床検体は全血では室温で採血後4時間以内、血清では2~8℃で8時間、血漿では2~8℃で3日間、-20℃以下で1年間安定である。Hamらは検体を自動血球計測機で振とうさせるとプレセプシン値が上昇することを報告した⁵⁾。また、血漿をVortexで強力的に振とうさせることでプレセプシン値が上昇することから、物理的刺激によりプレセプシン値が上昇する。坂本らは血液を凝固させた状態でエアシュータにより搬送しても、プレセプシン値が上昇しないことを報告した⁶⁾。これらの結果は、プレセプシンは比較的安定したタンパク質であるが、血液中に存在するsCD14の影響を受ける可能性があることを示している。

血中プレセプシンの代謝については、イヌへの組換えプレセプシンの投与による検討において、プレセプシンが尿へ速やかに代謝され、その血中の半減期は約0.5~1時間と推定されている。また、プレセプシンの臨床的半減期は約4~8時間と報告されている。ウサギ敗血症モデルから、CLP手術後約2時間でプレセプシンは上昇し、感染早期に上昇することが示唆された。また、Ebisawらは血液腫瘍患者の解析から、プレセプシンは発熱後の1~18時間以内に上昇しプロカルシトニンよりも早く感染を診断できることを報告した⁷⁾。

7. プレセプシンの臨床応用

臨床現場でプレセプシンを用いる場合は、次に示すプレセプシンの特性を生かした運用が望まれる。

7-1. 敗血症の診断に際し、より早期に上昇する

遠藤らは、広範囲熱傷、尿路感染症、大腸穿孔による敗血症などの症例を提示し、プレセプシンはIL-6、プロカルシトニン、CRP、白血球より先行して上昇すると報告した⁸⁾。

7-2. 侵襲の大きい外傷・熱傷・外科手術など 影響を受けにくい

重症熱傷の入院初期はIL-6、CRPやPCTが上昇するため、感染との鑑別が困難である。高橋らは、重症熱傷患者を経時的に観察することで炎症に影響されず、プレセプシンが敗血症性ショック前に上昇することを報告した⁹⁾。また、Takeuchiらは食道がんにおける食道切除術でプレセプシンが他のマーカーに先駆けて手術後5日目に感染を検出できることを示した¹⁰⁾。

7-3. 臨床経過（重症度）をよりよく反映する

Yuらは敗血症患者の90日死亡率における生存者と死亡者におけるプレセプシンおよびPCT濃度を入院日、3、5、7および12日後で比較したところ、プレセプシン

は生存例で日ごとに低下し、死亡例では維持または上昇したのに対してPCTは生存例、死亡例ともに一過性に低下し、プレセプシンが患者の経過をよく反映したことを報告した¹¹⁾。また、FujiiらはICU入院日のプレセプシン値が6日目に50%低下しない患者では死亡率が56% (10/18)であったのに対して50%以上低下する患者では死亡率が0%であったことを報告した¹²⁾。

8. 敗血症（細菌性）の診断マーカーとしてのプレセプシン

理想的なバイオマーカーは、早期かつ迅速な診断のために、高い診断精度を備えている必要がある。プレセプシンは、敗血症を含むさまざまな感染症に対して優れた診断精度を有している。敗血症では病原菌の貪食により早期にプレセプシンが上昇し、微生物の侵入の程度と重症度を関連付けることが示されている。また、プレセプシンは、敗血症の転帰の予測に使用できる。Kloucheらは、市中肺炎患者を対象に研究を実施し、血清プレセプシン濃度は、敗血症と非感染性呼吸不全を区別することを報告している¹³⁾。Bambaらは、深在性真菌症においてもプレセプシンは高値を示し、Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) スコアとの相関性が良好であったと報告し、さらに*in vitro*系を使用し、プレセプシンが真菌による刺激で上昇すると報告している¹⁴⁾。Apiratwarakulらは細菌感染とウイルス感染（インフルエンザおよびデング）についてプレセプシンレベルを比較したところ、中央値は細菌感染 (n=22) で2,904 (1,334~4,474) pg/mL、ウイルス感染 (n=66) で204 (164~245) pg/mLであった¹⁵⁾。このように、プレセプシンは細菌感染、真菌感染で上昇し、一般的なウイルス感染では上昇しない。

Tamboらは、閉塞性急性腎盂腎炎患者における敗血症 (Sepsis-3により定義) の早期診断としてのプレセプシンとPCTの能力を評価した。彼らは61人の患者を敗血症に該当する患者 (11人, 18%) と非該当の2つのグループに分け、解析した。敗血症患者におけるプレセプシンとPCT濃度はそれぞれ1,080 (696~1,550) pg/mL (中央値, IQR), 31.57 (1.83~134.40) ng/mLであり、非敗血症387 (313~558) pg/mL, 0.54 (0.14~4.86) ng/mLに比較して有意に高値であった (p<0.001)。また、多変量解析において、プレセプシンのカットオフ値515 pg/mL (オッズ比=13.13, p=0.044) は敗血症の独立した予測因子であることを報告した¹⁶⁾。

9. 重症化因子、予後予測因子としてのプレセプシン

Bombergらは、待機的心臓手術患者 (856例) の手術前プレセプシン、PCT、NT-proBNP、シスタチンC濃度を測定し、手術後の30日、6カ月、2年後の死亡率を

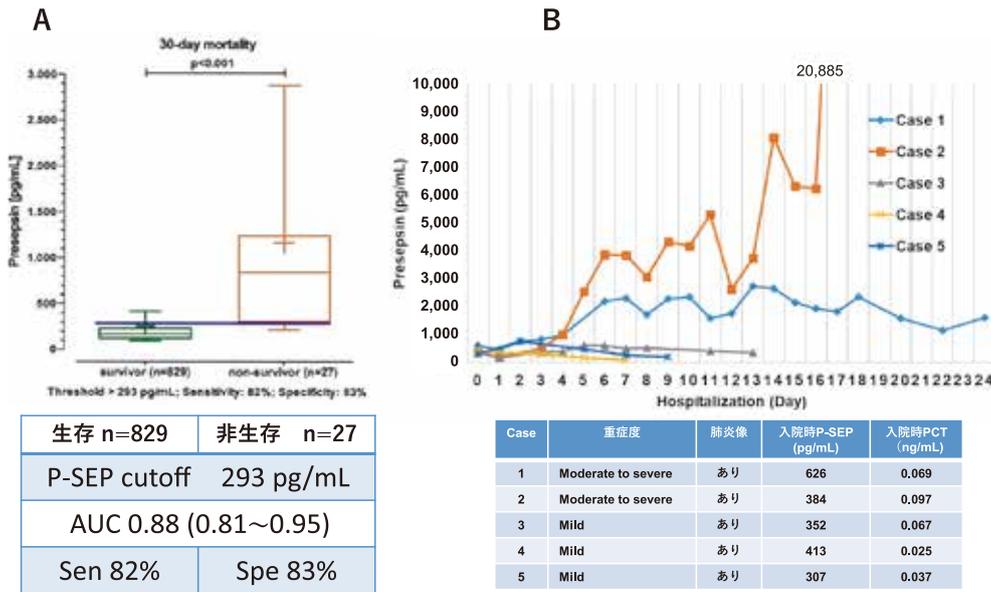


図4 重症化、予後予測とプレセプシン濃度

A：心臓手術前のプレセプシン値によるリスク評価（30日死亡率比較）（出典：文献¹⁷より作図）

B：COVID-19の重症化とプレセプシン濃度（出典：文献¹⁸より作図）

調査した。その結果、手術前のプレセプシン濃度が高い患者では30日後の合併症による死亡率（27例、3.15%）が高いことを明らかにした（カットオフ値293 pg/mL、感度82%、特異度83%、AUC 0.88）。この結果より、手術前のプレセプシン濃度の上昇が心臓手術患者のリスク層別解析のための独立した予後予測因子であると報告している（図4A）¹⁷。深田らはCOVID-19患者（5例）において発症から経時的にプレセプシン濃度を測定した。その結果、重症化した2例ではプレセプシン濃度が上昇し、死亡した患者では20,885 pg/mLまで上昇した。一方、軽症例3例はプレセプシン濃度が一時的に500 pg/mLを超えることもあったが、その後低下した¹⁸（図4B）。

本結果は、プレセプシンが敗血症患者の重症度予測だけでなく、待機的心臓手術患者やCOVID-19などの重症化予測因子としても有用である可能性を示している。

おわりに

プレセプシンは、従来の敗血症マーカーと比較して、医療分野で幅広い用途を持つユニークなバイオマーカーである。感染症を診断し、患者の重症度診断や予後予測の推定に役立つ可能性がある。しかしながら、プレセプシンを評価するだけでは不十分な場合がある。したがって、実際の臨床現場では、各種バイオマーカーを組み合わせることで総合的に診断することが重要である。プレセプシンは敗血症の診断マーカーであると同時に重症化や予後予測のリスク因子として期待される。今後、その産生機序が明らかになり測定意義の確立が望まれる。

文献

- 1) Arai Y, Mizugishi K, Nonomura K, et al. : Phagocytosis by human monocytes is required for the secretion of presepsin. *J Infect Chemother* 21 : 564-569, 2015
- 2) Kim JI, Lee CJ, Jin MS, et al. : Crystal Structure of CD14 and Its Implications for Lipopolysaccharide Signaling. *J Biol Chem* 280 : 11347-11351, 2005
- 3) Juan TS, Kelley MJ, Johnson DA, et al. : Soluble CD14 Truncated at Amino Acid 152 Binds Lipopolysaccharide (LPS) and Enables Cellular Response to LPS. *J Biol Chem* 270 : 1382-1387, 1995
- 4) Giavarina D, Carta M : Determination of Reference Interval for Presepsin, an Early Marker for Sepsis. *Biochem Med (Zagreb)* 25 : 64-68, 2015
- 5) Ham JY, Song KE : Impact of specimen mixing methods on presepsin point-of-care test results using whole blood. *Clin Chem Lab Med* 54 : e151-154, 2016
- 6) 坂本大典, 小山田崇, 宮城博幸, 他 : エアシュータ[®] 搬送による物理的衝撃がプレセプシン値に及ぼす影響. 医療検査と自動化 (投稿中)
- 7) Ebisawa K, Koya J, Nakazaki K, et al. : Usefulness of presepsin for early detection of infections in patients with hematologic disorders. *Clin Chim Acta* 486 : 374-380, 2018
- 8) 遠藤重厚, 小豆嶋立頼, 高橋学, 他 : 敗血症バイオマーカー「プレセプシン」の特徴と有用性. *感染症* 46 : 10-15, 2016
- 9) 高橋学, 遠藤重厚, 小豆嶋立頼, 他 : 「プレセプシン」—症例を通して学んできたこと—. 岩手医科大学医学部教

- 急・災害医学講座, 2016, p10
- 10) Takeuchi M, Yokose T, Kawakubo H, et al. : The Perioperative Presepsin as an Accurate Diagnostic Marker of Postoperative Infectious Complications After Esophagectomy : A Prospective Cohort Study. *Esophagus* 2020. doi : 10.1007/s10388-020-00736-7
 - 11) Yu H, Qi Z, Hang C, et al. : Evaluating the value of dynamic procalcitonin and presepsin measurements for patients with severe sepsis. *Am J Emerg Med* 35 : 835-841, 2017
 - 12) Fujii E, Fujino K, Eguchi Y : An Evaluation of Clinical Inflammatory and Coagulation Markers in Patients With Sepsis : A Pilot Study. *Acute Med Surg* 6 : 158-164, 2019
 - 13) Klouche K, Cristol JP, Devin J, et al. : Diagnostic and Prognostic Value of Soluble CD14 Subtype (Presepsin) for Sepsis and Community-Acquired Pneumonia in ICU Patients. *Ann Intensive Care* 6 : 59, 2016
 - 14) Bamba Y, Moro H, Aoki N, et al. : Increased presepsin levels are associated with the severity of fungal bloodstream infections. *PLoS One* 13 : e0206089, 2018
 - 15) Apiratwarakul K, Srimookda N, Phungoen P, et al. : Presepsin Levels in Emergency Patients with Bacterial and Viral Infection. *Open Access Maced J Med Sci* 8 : 20-23, 2020
 - 16) Tambo M, Taguchi S, Nakamura Y, et al. : Presepsin and procalcitonin as predictors of sepsis based on the new Sepsis-3 definitions in obstructive acute pyelonephritis. *BMC Urol* 20 : 23, 2020
 - 17) Bomberg H, Klingele M, Wagenpfeil S, et al. : Presepsin (sCD14-ST) Is a Novel Marker for Risk Stratification in Cardiac Surgery Patients. *Anesthesiology* 126 : 631-642, 2017
 - 18) 深田愛, 中別府奈穂子, 松岡優, 他 : COVID-19 におけるプレセプシンの有用性. 感染症学会 COVID-19 症例報告集. 2020 年 4 月 23 日公開

自動多項目同時遺伝子関連検査システム Verigene[®] システム 敗血症パネル

竹中 玲

株式会社 日立ハイテク アナリティカルソリューション事業統括本部事業戦略本部事業戦略部開発薬事グループ

The Verigene tests for Gram-positive and Gram-negative organisms in blood culture are multiplex, automated molecular diagnostic test

Rei Takenaka

Hitachi High-Tech Corporation Business Development Dept. Business Strategy Planning Div.
Analytical & Medical Solution Business Group

Abstract

Sepsis Panel of Verigene[®] System is an automated multi-item genetic testing system that is able to simultaneously detect bacteria and drug resistance genes for the purpose of selecting therapeutic agents for patients with sepsis.

Verigene[®] System started selling in 2016 and is covered by insurance in June 2017.

Compared to the conventional method that took a long time, the Verigene[®] system enables 24-48 hours earlier than the existing method to identify major bacteria and to rapidly detect drug resistance genes. This enables faster and more effective and appropriate antibacterial drug selection in the treatment for sepsis.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 83~86, 2020

Key words : Verigene, 敗血症, 抗菌薬

はじめに

遺伝子検査は一般的に従来からの培養検査や抗原検査に比べて、高い検出感度を持ち、短時間で結果を出すことができる。そのなかでも、同時多項目遺伝子検査は、多項目の感染因子を一度に検出することができるといったメリットがある。

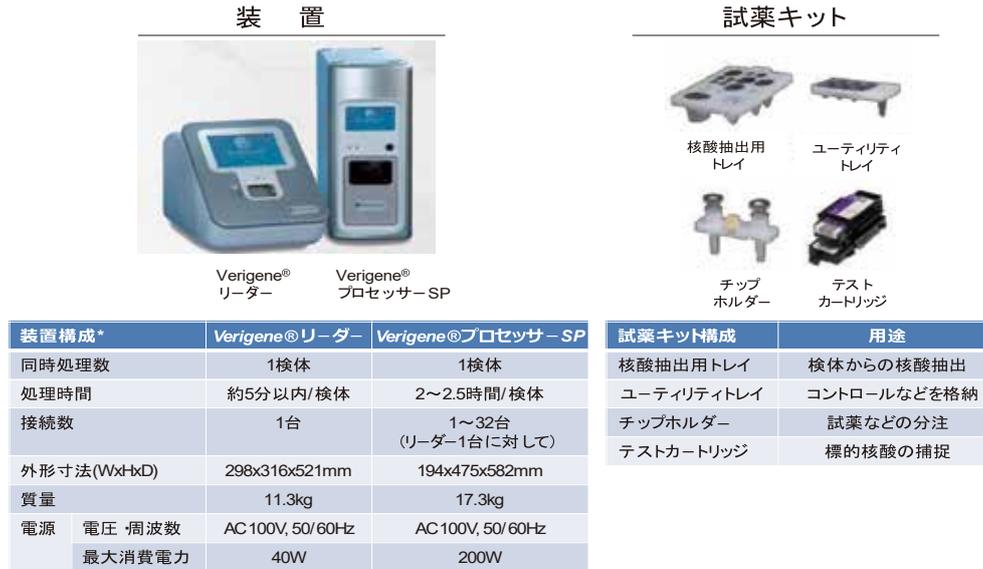
2018年に日本感染症学会感染症遺伝子検査委員会が感染症遺伝子検査について実施したアンケート¹⁾では、全自動遺伝子検査システムについてその必要性は認識されているものの、実際にはコストやインフラといった検査室の環境や保険適用がないために導入に至っていない現状がうかがえる。保険については、すべての感染症遺伝子検査に適用されている訳ではない。日本は諸外国に比べ、大幅に遅れているといわれており、早期の保険適用や適用拡大については学会と厚生労働省双方の取り組みが必要である。

施設内で実際の使用に際して、臨床検査技師からあ

がっている声として、「高額な試薬ですべての検体を測定するのは現実的ではない」、「検査対象の検体の選定や検査結果の解釈に感染症専門医との連携が必要である」、「検査結果を臨床医にどのように伝えれば良いのか」といった意見が聞かれる。検査結果の解釈の仕方については、日本感染症学会と日本臨床微生物学会が合同で作成した「多項目遺伝子関連検査の実施指針²⁾」にも関連の記載がある。敗血症などの重症感染症では、検査結果を適正に判断するために、感染症専門医もしくは臨床検査専門医の存在が必須だと明示されており、検査結果の判断については専門性が必要だといえる。

また、臨床医の場合、迅速性を求められる感染症治療では empiric therapy を開始しているケースが多く、検査結果に基づいた適切な抗菌薬への切り替えに迅速かつ適切な情報を入手することは必要不可欠である。

つまり、検査室、感染症専門医、臨床医との連携によって適切な治療をいかに早く開始できるかということが非常に大きなカギとなる。



*リーダーとプロセッサー-SPは個別販売です。

図 1 Verigene® システムおよびその試薬

今後、こういった課題を踏まえ、製品の特徴を良く理解した上で適切かつ効果的な検査の運用が必要とされる。

1. Verigene® システム敗血症パネルの紹介

Verigene® システムの敗血症パネルは血液中の病原性細菌感染および薬剤耐性菌感染の診断補助に用い、BC-GP (グラム陽性菌用)、BC-GN (グラム陰性菌用) の2種類から成る。血液培養試験で陽性となった培養液を検体とし、BC-GP はグラム陽性菌の核酸同定および薬剤耐性遺伝子の検出、BC-GN はグラム陰性菌の核酸同定および薬剤耐性遺伝子の検出を目的とする。検体の前処理はどちらも不要である。

1-1. 構成

Verigene® システムは専用の装置と試薬キット (パネル) により構成される (図1)。

1-1-1. 装置

本装置は、Verigene® プロセッサー SP (プロセッサー) と Verigene® リーダー (リーダー) から構成される。プロセッサーは、検体の核酸抽出、核酸増幅、ハイブリダイゼーション反応などの機能を有する自動反応装置である。リーダーは、システムコントロールと散乱光の検出と解析などの機能を有する自動検出解析装置である。プロセッサー1台で1度に処理できる検体は1検体であるが、複数検体を同時に処理する場合は、リーダー1台に対してプロセッサーを最大32台まで接続することができる。

1-1-2. 試薬

検査に必要なすべての消耗品が、試薬キットに準備されている。試薬キットの試薬には、反応に必要な各種試

薬や内部コントロールがすべて充填されている。そのため試薬を事前に準備することなく、すぐに検査を開始することができる。1回の検査で、全項目に対する測定が実施され、全行程は内部コントロールにより管理されている。

1-2. 試薬の測定項目

本システムの試薬の測定項目は血流感染症の主要な原因菌と薬剤耐性遺伝子であり (表1)、BC-GP は細菌12、薬剤耐性3の合計15遺伝子、BC-GN は細菌9、薬剤耐性6の合計15遺伝子。

とくに、Verigene® システムの特徴の一つとして検出することが可能な薬剤耐性遺伝子の多さがあげられる。

BC-GP では、MRSA (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) と MRSE (Methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis*) が保有する *mecA* および VRE (Vancomycin resistant enterococci) が保有する *vanA*, *vanB* を検出することができる。BC-GN では、日本の血流感染症の起原因菌で多くみられる CTX-M, IMP を始め KPC, NDM, VIM, OXA といった薬剤耐性遺伝子を同定することが可能である。

例えば、重要視されている薬剤耐性菌の一つである ESBL 産生菌 (Extended-spectrum β -lactamase 産生菌) の場合、国内外でみられる多くの型は CTX-M であり、主要なサブグループとして、1 グループ、2 グループ、9 グループが全体の9割以上を占めている³⁾。

また、CPE (Carbapenemase-producing Enterobacterales) では、日本で検出される型には IMP が多い。一方、海外は国内と異なり、KPC や OXA などが多く報告されている。海外渡航者の数も多くなっている昨今、広

表 1 敗血症パネルの測定項目

種類	BC-GP	BC-GN
細菌	<i>Staphylococcus</i> 属 <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus lugdunensis</i> <i>Streptococcus</i> 属 <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus anginosus</i> Group <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Listeria</i> 属	<i>Acinetobacter</i> 属 <i>Citrobacter</i> 属 <i>Enterobacter</i> 属 <i>Proteus</i> 属 <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>Klebsiella variicola</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i>
薬剤耐性遺伝子	<i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i>	CTX-M KPC, NDM, VIM, IMP, OXA

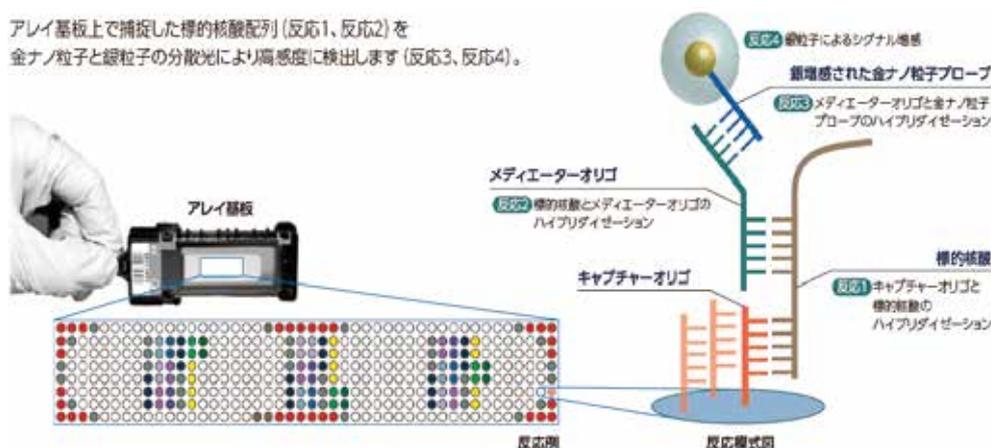


図 2 Verigene® システムの測定原理

く薬剤耐性遺伝子を検出することが望まれる。こういった点においても敗血症パネルは、国内および海外で主流とされる薬剤耐性遺伝子を検出することが可能であり、日本の状況に合致しているといえる。

1-3. 測定原理と機序

測定原理は、ガラスのアレイ基板上で相補的な核酸配列の反応特性を利用したハイブリダイゼーションにより、標的核酸を捕捉するマイクロアレイ法である(図2)。

細菌、ウイルスおよび薬剤耐性などに関する多種類の標的核酸(遺伝子)を、一枚のアレイ基板上で同時かつ迅速に捕捉する。捕捉した標的核酸配列を金ナノ粒子と銀粒子により増感し、その散乱光を高感度に検出する。

[核酸の抽出から判定までの主な機序]

- ① 核酸の抽出、精製および断片化
- ② ハイブリダイゼーションによる標的核酸の捕捉(アレイ基板上)

- ③ 捕捉された標的核酸とメディエーターオリゴヌクレオチドを介した金ナノ粒子標識プローブとのハイブリダイゼーション
- ④ 銀イオンの金ナノ粒子へのコート(銀増感)
- ⑤ LED光源から634nmの光を照射し、散乱光を計測
- ⑥ 判定アルゴリズムに従い、標的核酸の有無を判定

2. Verigeneの有用性

本システムを導入した場合、血液培養試験で陽性が判明後グラム染色試験と併せて約3時間以内に、主要な菌名および薬剤耐性遺伝子情報を、臨床の現場へ報告することができる(図3)。

従来法と比べると結果報告までの時間を1~2日短縮することが可能となる。

敗血症などの血流感染症では、抗菌薬投与の遅れが患者死亡率に大きく影響する。

とくに、薬剤耐性菌(多剤耐性菌)感染患者に対する

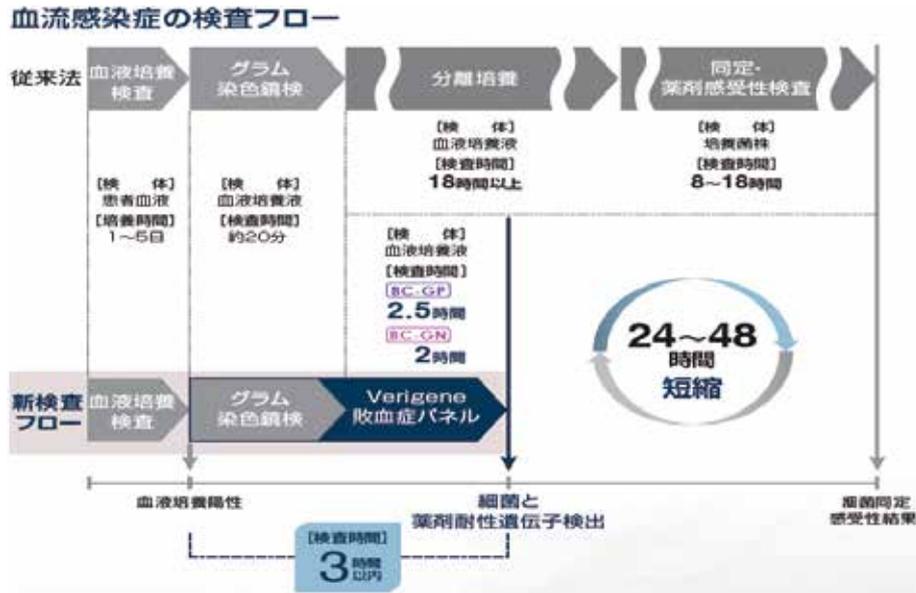


図 3 Verigene[®] システムの検査のワークフローにおける位置づけ

適正かつ有効な抗菌薬による治療は重要である。また、早期に適切な抗菌薬へ変更することは、不適切な抗菌薬の長期投与による薬剤耐性菌の誘発を防ぐことにもなり、院内感染対策上においても重要である。

敗血症パネルと従来法を比較した日本の介入試験において血液培養試験開始から結果報告までの検査時間は3.84日から21.7時間と短縮された。

その結果、抗菌薬の費用は患者一人あたり¥8,505から¥3,618と約半分に削減、30日死亡率は13%から3%の約1/4に減少したことが報告されている⁴⁾。

おわりに

Verigene[®] システムの敗血症パネルは敗血症診療における起因菌の同定および薬剤耐性遺伝子の検出に非常に有用な検査である。敗血症パネルの導入により従来法に比べて、1~2日早く検査結果を出すことができる。期待できる効果として、有効な狭域スペクトラムの薬剤に切り替えることが可能になる。また、薬剤耐性遺伝子を検出した場合、感受性薬剤に切り替えることができる。

その結果として、病態の早期改善、死亡率の低減、薬剤耐性菌の感染制御に貢献することができると考えら

れ、医療経済的にも投薬費用の削減や、治療・入院費用の削減などが見込まれる。

文 献

- 1) 柳原克紀, 賀来敬仁, 鈴木広道, 他: 感染症遺伝子検査についてのアンケート調査結果. 感染症誌 92: 331~338, 2018
- 2) 一般社団法人日本感染症学会 感染症遺伝子検査委員会, 一般社団法人日本臨床微生物学会 感染症領域新規検査検討委員会: 多項目遺伝子関連検査の実施指針 (2018年4月1日改訂)
- 3) Suzuki S, Shibata N, Yamane K, et al.: Change in the prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. J Antimicrob Chemother 63: 72-79, 2009
- 4) Suzuki H, Hitomi S, Yaguchi Y, et al.: Prospective intervention study with a microarray-based, multiplexed, automated molecular diagnosis instrument (Verigene system) for the rapid diagnosis of bloodstream infections, and its impact on the clinical outcomes. J Infect Chemother 21: 849-856, 2015

御 案 内

日本エンドトキシン・自然免疫研究会

日本エンドトキシン・自然免疫研究会は、エンドトキシン研究の基礎、臨床、治療研究から応用までの広い領域の研究者が参加、発表、情報交換を行える研究会組織とする主旨のもと、平成6年11月に「日本エンドトキシン研究会」として発足しました。平成22年10月に「一般社団法人 日本エンドトキシン・自然免疫研究会」として法人化され、現在に至っています。定期研究会は年1回開催され、特別講演、シンポジウム、研究発表など、会員の情報交換、親睦を図っています。

研究会会員は正会員、賛助会員で構成され、機関誌「エンドトキシン・自然免疫研究（年1回出版）」がweb上で閲覧できます。

また毎年、50歳未満の研究会会員を対象に「日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞・最優秀賞」を設け、エンドトキシン・自然免疫研究に関する学術及び技術の進歩に貢献したと認められる学術および技術の業績に対して表彰を行っています。さらに、40歳未満の会員の定期研究会当日の発表を対象として「日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞・優秀賞」を審査・表彰しております。

入会を希望される方（年会費：正会員 5,000円、大学院・学部学生 3,000円、賛助会員 100,000円）は下記事務局までご連絡下さい。

なお、第26回研究会は、大阪大学 深瀬浩一教授がプレジデントを務められる IEIIS 2020 (16th Biennial Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society) と、本年10月に神戸国際会議場で共同開催する予定でした。しかしながら、皆様のご存じの通り新型コロナウイルスの感染拡大を鑑み、IEIIS 2020は2021年に延期されることが決定されました。これにともない、共同開催の予定でありました第26回日本エンドトキシン・自然免疫研究会についても、本年の開催を見送り、IEIISと共同開催の形で延期し、2021年10月12日～15日に、神戸国際会議場で開催される予定となっております。

日本エンドトキシン・自然免疫研究会 事務局
〒113-8421 東京都文京区本郷2-1-1
順天堂大学医学部生化学第二講座 内
TEL：03-5802-1033 FAX：03-3813-3157
E-mail：jeiis@juntendo.ac.jp

「Innate Immunity」

日本エンドトキシン・自然免疫研究会の公式英文雑誌であった「Journal of Endotoxin Research」は「Innate Immunity」に雑誌名が変更されました。「Innate Immunity」は、国際エンドトキシンと自然免疫学会（IEIIS：International Endotoxin and Innate Immunity Society; <http://ieiis.org/Home>）の Official Journal であり、エンドトキシンをはじめ、自然免疫など広い分野の論文を受け付けています。また、エンドトキシンについて優れた総説も魅力的です。現在、「Innate Immunity」のインパクトファクターは2.198（JCR Science Edition 2019）とレベルの高い雑誌です。本研究会の役員から Editorial Board が選任されています。詳しい情報は、ウェブサイト（<http://ini.sagepub.com>）をご覧ください。

Editor-in-Chief：Dr Otto Holst, Associate Professor and Head of the Division of Structural Biochemistry at the Research Center Borstel.

エンドトキシン・自然免疫研究 23

—エンドトキシン研究の基礎から臨床へ、新しい時代へのアプローチ—

令和2年10月30日 第1版発行

発行 一般社団法人日本エンドトキシン・自然免疫研究会

〒113-8421 東京都文京区本郷2-1-1

順天堂大学医学部生化学第2講座内

TEL : 03-5802-1033 FAX : 03-3813-3157

編集 木下 学 長岡 功

製作 医学図書出版株式会社

代表者 鈴木 文治

東京都文京区本郷2-29-8 大田ビル

〒113-0033 電話 (03)3811-8210 (代)

FAX (03)3811-8236



Better Health, Brighter Future

タケダから、世界中の人々へ。
より健やかで輝かしい明日を。

一人でも多くの人に、かけがえのない人生をより健やかに
過ごしてほしい。タケダは、そんな想いのもと、1781年の
創業以来、革新的な医薬品の創出を通じて社会とともに
歩み続けてきました。

私たちは今、世界のさまざまな国や地域で、予防から
支援活動にわたる多様な医療ニーズと向き合っています。
その一つひとつに答えていくことが、私たちの新たな使命。
よりよい医薬品を待ち望んでいる人々に、少しでも早く
お届けする。それが、いつまでも変わらない私たちの信念。

世界中の英知を集めて、タケダはこれからも全力で、医療の
未来を切り拓いていきます。

武田薬品工業株式会社
www.takeda.com/jp

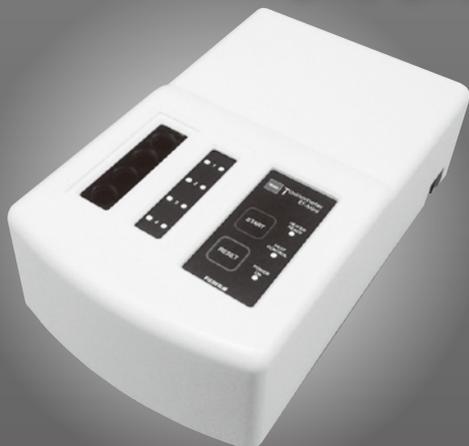


簡便性と信頼性を融合

簡易型エンドトキシン測定システム

トキシノメーター® ET-Mini

※本システムは日本薬局方のエンドトキシン試験法には準拠していません。



&

簡便法試薬キット

リムルス ES-II プラス CS シングルテストワコー

※トキシノメーター® ET-6000、トキシノメーター® ET-7000 でも使用可能。
※本システムは日本薬局方のエンドトキシン試験法には準拠していません。



標準液調製と検量線の測定が不要

試薬キットに添付のデータシートから QR コードを読み込むことで保存検量線データシートを自動的に登録可能

陽性コントロール (PC) と陽性製品コントロール (PPC) の調製が簡単

試薬キットに付属の低含量 CSE※から 1 ステップで調製可能 ※CSE：コントロールスタンダードエンドトキシン

簡単操作!

プロトコル読み込み

検量線読み込み

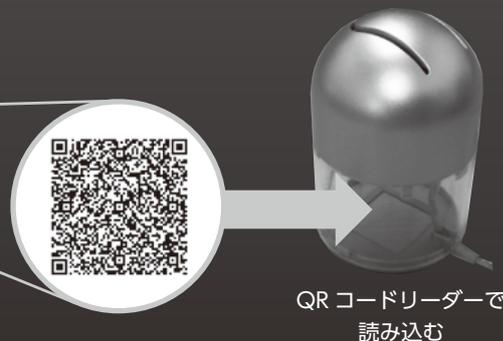
試料溶液情報入力

試料調液、PC、PPC 調製

測定



検量線データシート



QR コードリーダーで読み込む

お役立ち情報

Wako LAL システム

エンドトキシンについての基礎知識から技術資料、
セミナー／講習会開催情報まで幅広い内容をご提供しております。
是非ご利用ください!

Wako LAL システム

検索

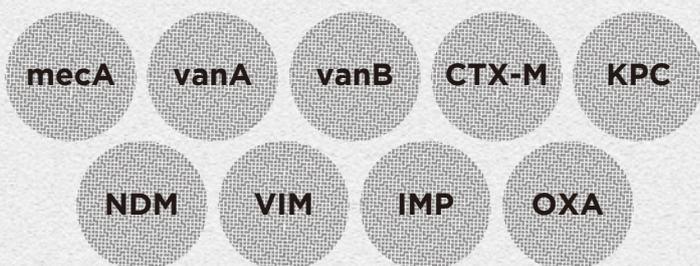
富士フイルム 和光純薬株式会社

本社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 TEL: 06-6203-3741 (代表)
東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号 TEL: 03-3270-8571 (代表)

フリーダイヤル 0120-052-099

Wako LAL システム: www.wako-chem.co.jp/lal/
お問い合わせ先: <https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/question/others>
営業所: 九州・中国・東海・横浜・筑波・東北・北海道

敗血症 抗菌薬選択の 早期決定*が可能に



*血液培養試験で陽性判定後、2・5時間以内で細菌と薬剤耐性遺伝子を同時に検出。

ICUでいち早く薬剤耐性遺伝子を検出し、
伝播リスクへの早期対策につなげる

薬剤耐性 (AMR) 対策

院内感染 対策の一手



自動多項目同時遺伝子関連検査システム

Verigene® システム 敗血症パネル

保険点数 1,700点 2017年 6月より 保険適用

製品情報は
こちらから



Verigene® リーダー Verigene® プロセッサー SP
製造販売届出番号：22B3X10009000001

Verigene® 血液培養グラム陽性菌・薬剤耐性核酸テスト (BC-GP)
承認番号：22900EZ00040000

Verigene® 血液培養グラム陰性菌・薬剤耐性核酸テスト (BC-GN)
承認番号：22800EZ00025000

株式会社 日立ハイテック

本社 〒105-6409 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門ヒルズ ビジネスタワー
お客様サポートセンタ (03)3504-7211
www.hitachi-hightech.com/jp/science/

北海道(札幌) (080)8021-5427 東北(仙台) (080)8438-0969 中部(名古屋) (080)8420-6408
関西(大阪) (080)8020-3544 九州(福岡) (080)9564-0285

株式会社日立ハイテクノロジーズは2020年2月12日より株式会社日立ハイテックに社名変更、および、本社を上記へ移転しました。

ヒト化マウスモデルに最適な 次世代 NOG マウスラインをご提供いたします！

ヒト化マウスモデルに最適な重度免疫不全 NOG マウス



いわゆるヒト化マウスのさきがけとして、免疫不全SCIDマウスにヒト造血系組織 (McCune JM *et al.*, Science 1988)、もしくはヒト末梢リンパ球 (Mosier DE, *et al.*, Nature 1988) を移植したSCID-huマウスが1988年に開発されました。

その後、SCIDマウスを改良したNOD/scid マウスが開発され、SCIDマウスを上回るヒト細胞の生着が見られましたが、*in vivo* 解析モデルとしては不十分な点が多く残されておりました。

(公財)実験動物中央研究所では、NOD/scid マウスと、各種のサイトカインレセプター共通ドメインであるIL-2レセプター γ 鎖遺伝子のノックアウト(IL-2R γ KO)マウス(Ohbo K *et al.*, Blood 1996)を組み合わせることにより、極めて重度な複合型免疫不全を呈する“NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ null) マウス”の樹立に成功しました(Ito M *et al.*, Blood 2002)。

■ 特徴

- T, B細胞の欠失
- ナチュラルキラー(NK)細胞の欠失
- 樹状細胞機能の低下
- マクロファージ機能の低下
- 補体活性の欠失
- 老化に伴うT, B細胞 leaky 現象が認められない

■ 主な研究用途

- ヒトの各種正常細胞とがん細胞および組織の移植
- 免疫システムの再構成
- 血球新生
- 幹細胞研究
- ヒト型感染症研究
- 組織再生
- ヒト化モデルの開発

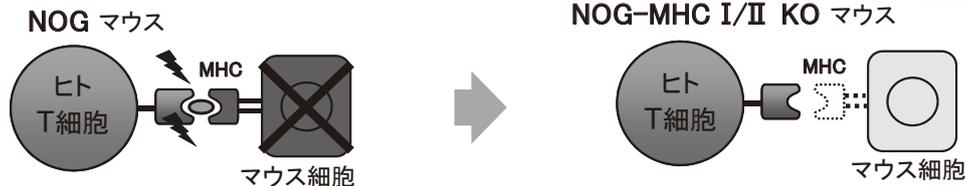
広がるヒト免疫システム再構築モデル ポートフォリオ

New



NOG-MHC I/II KO マウス

- ヒトT細胞が認識するマウス MHCのClass I 分子の $\beta 2m$ および Class II 分子のIa β を欠損させたモデル
- ヒト末梢血単核細胞(hPBMC)移植後のXenogenicなGraft Versus Host Disease(GVHD)が緩和され、長期の試験が可能
- 免疫チェックポイント阻害剤の研究に使用可能



NOG マウス

- ヒト化マウスの基盤となる超免疫不全マウス
- 多様な異種移植およびヒト細胞の生着が可能
- がん、感染症、免疫学、CAR-T、iPS、およびヒト化免疫系移植に関する研究に使用される
- hHSC(ヒト造血幹細胞)を移植したNOG(huNOG)として納品することも可能



NOG-EXL マウス

- ヒトGM-CSFおよびヒトIL-3を発現するNOGマウス
- hHSC生着後、優れた骨髄性細胞への分化
- huNOG-EXLとして納品することも可能
- ヒト急性骨髄性白血病の移植のための適切な宿主
- ヒトマスト細胞を介したアレルギーモデル



NOG-hIL-2 マウス

- ヒトIL-2を発現するNOGマウス
- hHSC生着後、ヒトNK細胞を優勢分化



NOG-hIL-6 マウス

- ヒトIL-6を発現するNOGマウス
- ヒト多発性骨髄腫移植の適切な宿主
- hHSC生着後、ヒト単球を優勢分化



NOG-hIL-15 マウス

- ヒトIL-15を発現するNOGマウス
- hPBMCに由来するCD56陽性NK細胞の移植により、ヒトNK細胞が生着および増殖

お問い合わせ

インビボサイエンス株式会社

〒210-0821 神奈川県川崎市川崎区殿町3丁目25番12

TEL: 044-201-8518

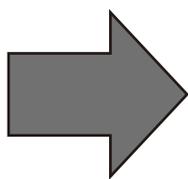
FAX: 044-201-8519

WEB: www.invivoscience.com

e-mail: sales@invivoscience.com

検査技術で医療に貢献 常光は医療機器・体外診断メーカーです

血液分析用医療機器



電解質分析装置 EX-G

世界 40 か国への実績と優れた性能

自社特許技術の血液分析センサ

遺伝子検査用体外診断用医薬品



赤血球沈降速度測定装置

自社製造の採血管と一緒に世界へ



HER2 FISH キット

HER-2/neu 遺伝子増幅検査キット



愛とまごころの
株式会社

常光

営業サービス部：神奈川県川崎市高津区宇奈根731-1 Tel:(044)811-9211(代)

支店・営業所 札幌・仙台・東京・名古屋・大阪・福岡

ホームページURL <https://jokoh.com>

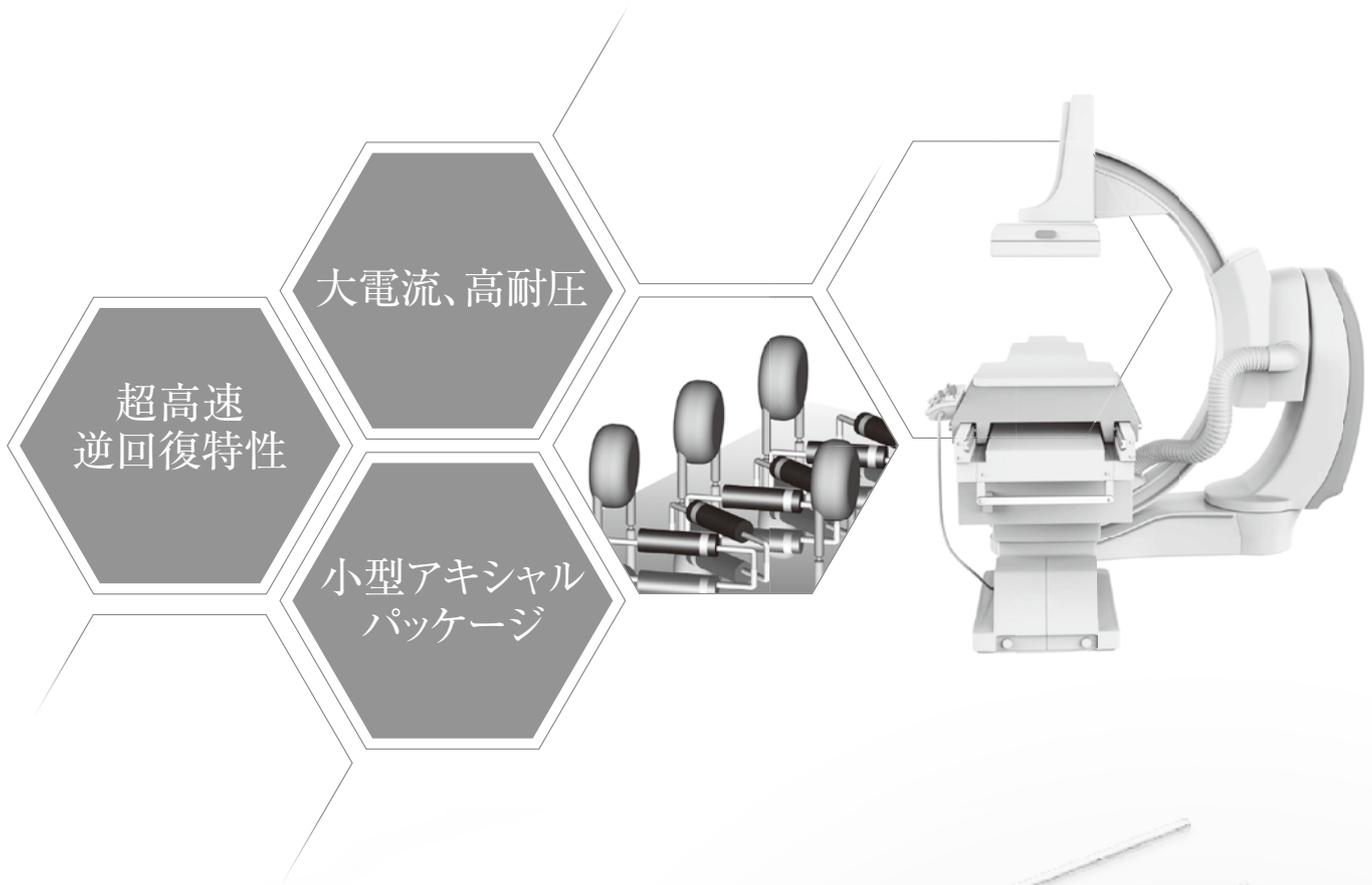
問い合わせ <https://jokoh.com/contact/>

ホームページURL ⇒

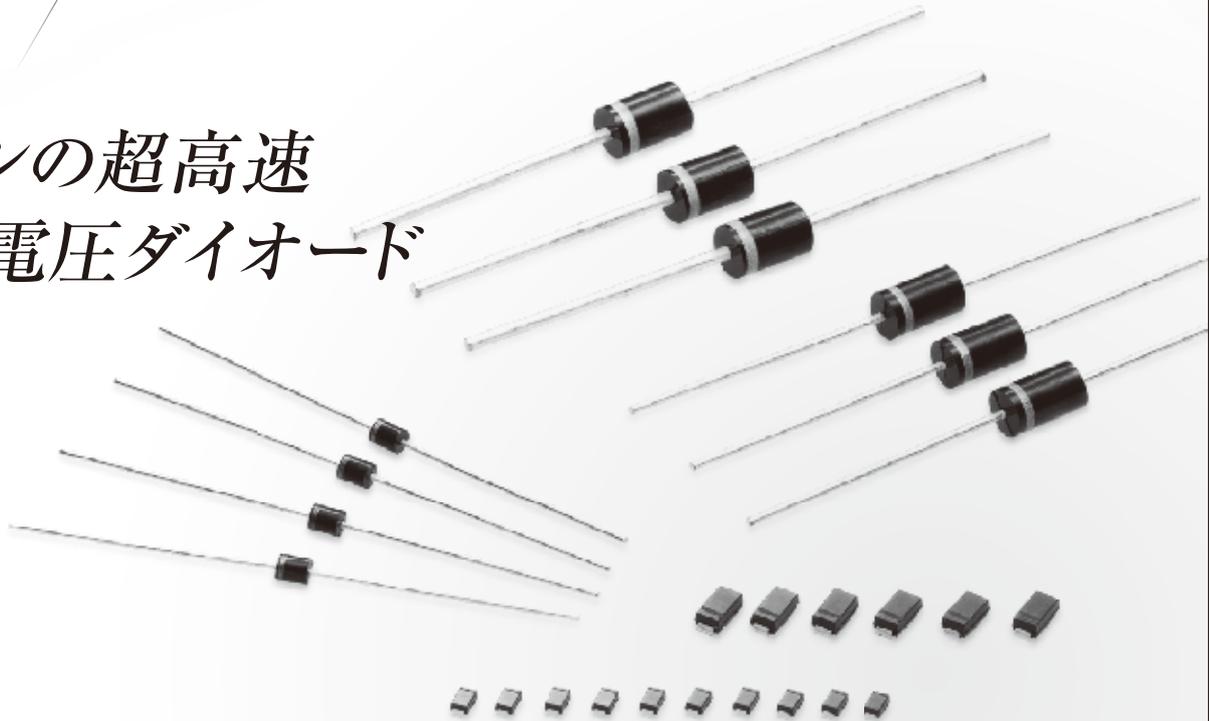




半導体技術で医療に貢献



オリジンの超高速 高電圧ダイオード



私たちは緊急医療に迅速に、
誠実に、的確に対応する
循環器のエキスパート集団です。

Advanced Science & Technology



株式会社アスト

本 社	〒355-0063	埼玉県東松山市元宿 2 丁目 36 番地 20 TEL 0493 (35) 1811 (代) FAX 0493 (35) 1860
さいたま営業所	〒336-0926	埼玉県さいたま市緑区東浦和 9 丁目 18 番地 11 TEL 048 (873) 2000 (代) FAX 048 (873) 0500
東京営業所	〒160-0007	東京都新宿区荒木町 23 番 15 TEL 03 (3225) 3588 (代) FAX 03 (3225) 3566
栃木営業所	〒320-0842	栃木県宇都宮市京町 15 番 16 号 TEL 028 (639) 9088 (代) FAX 028 (639) 9035
群馬営業所	〒371-0024	群馬県前橋市表町 1 丁目 21 番地 9 TEL 027 (220) 4366 (代) FAX 027 (220) 4367
神奈川営業所	〒210-0024	神奈川県川崎市川崎区日進町 9 番地 1 TEL 044 (221) 6720 (代) FAX 044 (221) 6725
千葉営業所	〒260-0045	千葉県千葉市中央区弁天 1 丁目 12 番 8 号 TEL 043 (290) 1855 (代) FAX 043 (290) 1066
松戸営業所	〒270-2231	千葉県松戸市稔台 7 丁目 2 番地 22 TEL 047 (710) 3111 (代) FAX 047 (710) 3188

命を救う医療機器

医療機器を通じ、健康の増進と地域医療の発展に寄与することを心がけています。



弊社は、ISO9001 を取得し

品質管理及び顧客満足度を最優先として

営業活動を行っております。

主な営業品目

画像診断機器・生体現象監視用機器・麻酔科関連機器

外科、整形外科、脳外科、産婦人科手術用機器・臨床検査機器

検査試薬・体外診断薬・I.C.U、C.C.U、N.I.C.U 関連機器

医学教育技術トレーニング機材

医療機器 介護用品



株式会社

ヘルス

<http://health-co.jp/>

〒359-0043 埼玉県所沢市弥生町 2992-3

TEL : 04-2995-0555

FAX : 04-2995-5516

分 室

埼玉県所沢市弥生町 2867-4

医療関連事業

疾病の診断から治療までを担う

ニュートラシューティカルズ関連事業

日々の健康維持・増進をサポートする

両輪で身体全体を考える

世界の人々の健康に貢献する
トータルヘルスケアカンパニーを目指します。

Otsuka-people creating new products for better health worldwide

<https://www.otsuka.co.jp/>



私たちは人びとの健康を高め
満ち足りた笑顔あふれる 社会づくりに貢献します。

 大鵬薬品工業株式会社
TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.
<https://www.taiho.co.jp>



末梢性神経障害性疼痛治療剤 薬価基準収載

タリージェ錠 2.5mg・5mg
10mg・15mg

一般名：ミロガバリンベシル酸塩 (Mirogabalin Besilate)
処方箋医薬品 注意—医師等の処方箋により使用すること



効能・効果、用法・用量、禁忌を含む
使用上の注意等の詳細については、
添付文書をご参照ください。



製造販売元 (資料請求先)

第一三共株式会社

Daichi-Sankyo 東京都中央区日本橋本町3-5-1

2019年4月作成

183864_A5



生菌製剤

ミヤBM[®] 細粒
MIYA-BM[®] FINE GRANULES

生菌製剤

ミヤBM[®] 錠
MIYA-BM[®] TABLETS

酪酸菌(宮入菌)製剤

効能・効果、用法・用量、使用上の注意等については
添付文書をご参照ください。

薬価基準収載

Miyarisan

製造販売元
ミヤリサン製薬株式会社

資料請求先：[学術部] 東京都北区上中里 1-10-3
TEL: 03-3917-1191 FAX: 03-3940-1140

人も地球も健康に Yakult

薬価基準収載

抗悪性腫瘍剤(イリノテカン塩酸塩水和物)
劇薬・処方箋医薬品※

カンプト® 点滴静注 40mg/100mg

抗悪性腫瘍剤/上皮成長因子受容体(EGFR)
チロシンキナーゼ阻害剤(ゲフィチニブ) 劇薬・処方箋医薬品※

ゲフィチニブ錠 250mg「ヤクルト」

抗悪性腫瘍剤(シスプラチン)
毒薬・処方箋医薬品※

シスプラチン 点滴静注 10mg/25mg/50mg「マルコ」

骨吸収抑制剤(ゾレドロン酸水和物)
劇薬・処方箋医薬品※

ゾレドロン酸 点滴静注 4mg/100mLパケジ 4mg/5mL「ヤクルト」

副腎癌化学療法剤、副腎皮質ホルモン合成阻害剤(ミトタン)
劇薬・処方箋医薬品※

オペプリム®

抗悪性腫瘍剤(オキサリプラチン)
毒薬・処方箋医薬品※

エルプラット® 点滴静注液 50mg/100mg/200mg

代謝拮抗性抗悪性腫瘍剤(ゲムシタピン塩酸塩)
劇薬・処方箋医薬品※

ゲムシタピン 点滴静注用 200mg 1g「ヤクルト」

抗悪性腫瘍剤/チロシンキナーゼインヒター(イマチニブメシル酸塩)
劇薬・処方箋医薬品※

イマチニブ錠 100mg/200mg「ヤクルト」

活性型葉酸製剤(レボホリナートカルシウム水和物)
処方箋医薬品※

レボホリナート 点滴静注用 25mg/100mL「ヤクルト」

抗悪性腫瘍剤(カペシタビン)
劇薬・処方箋医薬品※

カペシタビン錠 300mg「ヤクルト」

タキソイド系抗悪性腫瘍剤(ドセタキセル)
毒薬・処方箋医薬品※

ドセタキセル 点滴静注 20mg/1mL/80mg/4mL「ヤクルト」

アロマトーゼ阻害剤、閉経後乳癌治療剤(レトロゾール)
劇薬・処方箋医薬品※

レトロゾール錠 2.5mg「ヤクルト」

前立腺癌治療剤(フルタミド)
劇薬・処方箋医薬品※

フルタミド錠 125「KN」

※注意一医師等の処方箋により使用すること

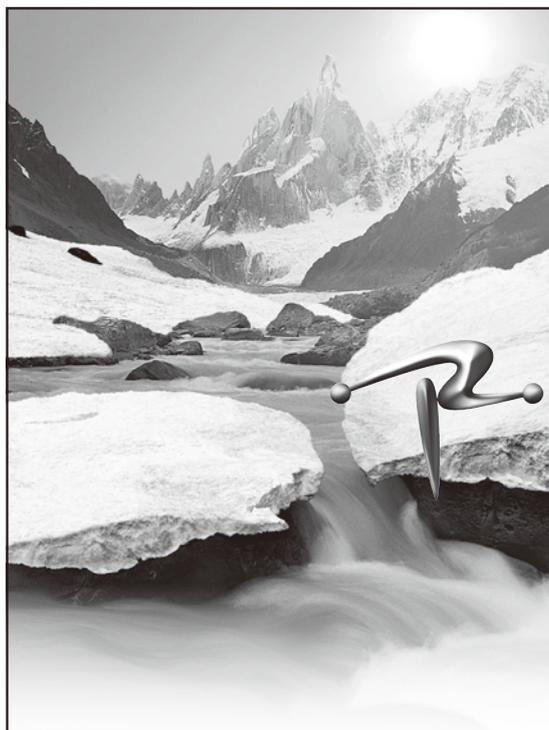
●「効能・効果」、「用法・用量」、「警告・禁忌を含む使用上の注意」等については添付文書をご参照ください。

〈資料請求先〉

株式会社ヤクルト本社

〒104-0061 東京都中央区銀座7-16-21 銀座木挽ビル
☎0120-589601 (医薬学術部 くすり相談室)

2019年6月作成



血液凝固阻止剤

薬価基準収載

リコモジュリン® 点滴静注用12800

トロンボモデュリン アルファ(遺伝子組換え)製剤 生物由来製品 処方箋医薬品※
Recomodulin® Inj. 12800

※注意一医師等の処方箋により使用すること

効能・効果、用法・用量、禁忌を含む使用上の注意等については製品添付文書をご参照ください。

製造販売元 **旭化成ファーマ株式会社**
(資料請求先)

〒100-0006 東京都千代田区有楽町一丁目1番2号
くすり相談窓口 ☎0120-114-936

AsahiKASEI

2018年9月作成

TEIJIN
Human Chemistry, Human Solutions

患者さんの Quality of Lifeの向上が テイジンの理念です。

帝人ファーマ株式会社 帝人ヘルスケア株式会社

〒100-8585 東京都千代田区霞が関3丁目2番1号

PAD005-TB-2002

高機能バイオ素材の事業化支援・産官学連携コーディネート・技術人材育成

より高い価値を創造し

未来への扉を開く

お手伝いをいたします

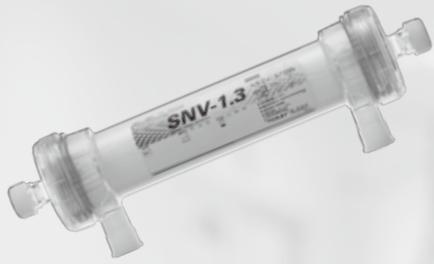


経済界 2019.11月号



LPS (Laboratory Program Support) コンサルティング事務所
〒160-0023 東京都新宿区西新宿 4-7-13 モアエミネンス西新宿 104
TEL: 03-6383-3919 FAX: 03-6383-3928

東レの急性血液浄化製品ラインナップ



東レ独自の NV ポリマー技術により性能劣化を防ぎ
持続性の向上を図りました

HEMOFEEL® SNV

高度管理医療機器
持続緩徐式血液濾過器
承認番号：23000BZX00297000
販売名：ヘモフィール SNV



東レ独自の膜設計により、
各種の病因物質除去特性を有します

HEMOFEEL® CH

高度管理医療機器
持続緩徐式血液濾過器
承認番号：20300BZZ00624000
販売名：ヘモフィール CH



グラム陰性菌感染症あるいはエンドトキシン血症に伴う
重症病態の改善に

トレミキシン®

高度管理医療機器
エンドトキシン除去向け吸着型血液浄化用浄化器
承認番号：20500BZZ00926000
販売名：トレミキシン

使用目的または効果、使用方法、警告・禁忌及び使用上の注意等については製品添付文書をご参照ください。



トレミキシン専用
ウェブサイト

製造販売業者：東レ株式会社 <https://www.toray.co.jp/>

販売業者：東レ・メディカル株式会社 <https://www.toray-medical.com/>

TORAY

Innovation by Chemistry

SONY



Multi-Application Cell Sorter MA900

- ・ SH800 シリーズの上位モデル
- ・ レーザーの異軸照射により最大カラー数を 12 に拡張
- ・ “4 方向ソーティング” 対応で、希少サンプルから 4 種類のポピュレーションの並行ソートが可能

アプリケーションの幅が一層広がります

仕様は予告なく変更されることがあります。 本製品は研究用であり、診断および治療にはご利用いただけません。

お問合せ先：ソニーイメージングプロダクツ&ソリューションズ(株) ライフサイエンス営業部
〒243-0014 神奈川県厚木市旭町4-14-1
TEL: 0120-667-010 / FAX: 0120-388-060
MAIL: cytometry@sony.co.jp HOMEPAGE : <http://www.sony.co.jp/LS>





あっ



試薬から機器まで

思い出したら、利根化学。

利根化学株式会社

TONECHEMICAL CO.,LTD

tel 03-3862-6666 fax 03-3851-9224

mail sales@tonekagaku.co.jp

http://www.tonekagaku.co.jp/

移動式免疫発光測定装置 パスファースト

届出番号 13B3X10041000021

PATHFAST®

パスファーストは

カンタン | 迅速 | 高性能

“シンプル”にこだわりました

測定項目 (全血・血漿可能)

緊急検査項目

17分!

BNP	cTnl	CK-MB	ミオグロビン
プレセプシン	Dダイマー	TAT*	

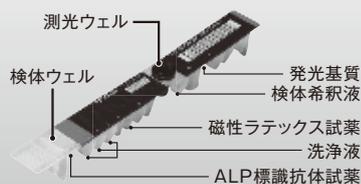
* TATは血漿検体のみ。測定時間30分。

性腺ホルモン
マーカー
26分!

HCG preg	LH	FSH	PRL
E2	プロゲステロン	テストステロン	

オールインワン試薬カートリッジ

すべての試薬はカートリッジに入っているため
洗浄液、基質液、廃液ボトル等は不要です。



3色のカラーバリエーションをラインアップ

製造販売元



株式会社LSIメディエンス

〒101-8517 東京都千代田区内神田1-13-4
お問い合わせ先 TEL.03-5994-2516(平日9:00~17:45)

神戸天然物化学株式会社

会社概要

- 商号 : 神戸天然物化学株式会社
- 設立 : 1985年1月22日
- 上場 : 東京証券取引所 マザーズ(2018年3月15日上場)
- 代表者 : 代表取締役社長 宮内 仁志
- 売上高 : 63億円(2020年3月末)
- 社員数 : 294名(2020年4月1日現在)



研究分業化ニーズの高まりに呼応
モノづくりの専門家として、
お客様の研究分野の拡大と
貴社事業の発展に寄り添います。

高い先端技術力

先端技術力を磨くため、アカデミアとの
新薬共同開発や国家プロジェクトへ
積極的に参加するとともに、
独自の開発も行っています。

当社の強み

研究・開発・量産の各層に対応可能
お客様が目指す商品化までの各ステージに対応し、
シームレスなサービスを提供しています。

ソリューション

神戸天然物化学は、低分子医薬品からペプチド、核酸、遺伝子組み換え微生物・たんぱく質の作製などワンストップで対応でき、さらに研究初期(創薬)からGMP製造までシームレスに対応できることを強みとしている。神戸天然物化学は、研究開発体制の強化に向けて、神戸ポートアイランドに新本社・研究所用の土地および建物を取得、2019年12月に稼働入りしました。新たな研究開発拠点とすることで開発本部の機能を強化し、CMO的企業から、開発を強化することによりCDMO(医薬品受託開発・製造企業:(CDMO(Contract Development Manufacturing Organization)))的企業として創薬から量産段階にいたるまでシームレスにソリューションを提供します。

PR

アカデミアとの研究成果多数あり

- ✓ ものづくりでお困りならお役に立てます
- ✓ アカデミアとの共同研究も積極的に取り組んでおります
- ✓ お気軽に問い合わせ下さい

連絡先

神戸営業所 650-0047 神戸市中央区港島南町7-1-19
TEL:078-955-9898 FAX:078-955-9899
東京営業所 101-0035 東京都千代田区神田紺屋町6 大矢ビル5F
TEL:03-3251-1861 FAX:03-3251-1862
<http://www.kncweb.co.jp/>

SCAS Sumika Chemical Analysis Service Total Analysis Solution

医薬品の R & D から商用生産のあらゆるステージをサポート

SCAS は国内最大規模の総合分析会社として、幅広い分野にわたる分析受託を行っています。



すべては分析に始まる。



受託試験内容

生体試料中薬物濃度測定

- 低分子から中高分子、バイオ医薬品、バイオマーカー(エクソソームを含む)に対応
- 種々のマトリックスに対応
血液、血清、血漿、尿、糞、各種組織
- 多様な測定手法
HPLC、GC/MS、LC/MS、LC/MS/MS、ICP-発光、ICP/MS
表面プラズモン共鳴(SPR)、電気化学発光(ECL)
イムノアッセイ(ELISA)

非臨床安全性評価

- 非臨床試験施設
(株)イナリサーチ、(株)Biototech(BTT)による安全性試験
- トキシコキネティクス測定
- *in vitro*安全性スクリーニング

創薬初期(探索)評価

- *in vivo* PK 測定
- 溶解度・分配係数
- 膜透過性
- 酵素阻害・誘導
- 代謝安定性
- 蛋白結合率
- 反応性代謝物

海外施設

- (株)SCAS-BTT Bioanalysis(SBB,韓国)での高品質バイオアナリシスサービス

その他サービス

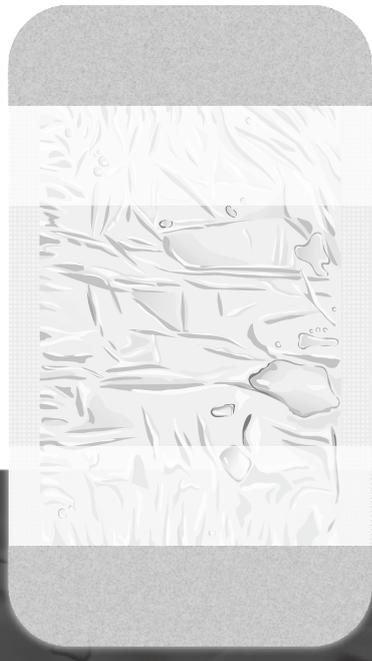
- 申請資料作成支援サービス(分析とセットでも対応可)
- 非臨床 PET 分子イメージング試験
日本メジフィジックス(株)との連携

安定性評価(原薬、製剤及び治験薬)

- 国内外の申請用安定性試験の他、開発初期~市販後の各種安定性試験に対応
- 錠剤、注射剤、貼付剤等の各種剤型に対応
- 低分子から中高分子、バイオ医薬品にも対応

品質・物化性評価 他

- 試験法設定及び分析法バリデーション
- 品質試験(出荷試験含む)
- 微生物関連試験
- 構造解析、異物分析、不純物分析、金属分析 etc.
- バイオ医薬品、再生医療等製品の品質評価



創周囲の浸軟に刮目せよ

キズにやさしい
湿潤環境のコントロール

日本製 浸透圧吸水性ドレッシング材
Osmotic Pressure absorbency dressing

この商品はオカモト(株)との共同開発商品です。

製造販売元：日進医療器株式会社 〒541-0045 大阪市中央区道修町 1-4-2

大きなサンプルのためのフローサイトメーター・ソーター

COPAS FP™



BioSorter®



細胞クラスター

スフェロイド

オルガノイド

最大 1500µm のサンプルを解析&ソーティング

- 大きく壊れやすいサンプルに最適
- ダメージレスでサンプル回収
- BioSorter はフローセル交換可能の上位機種
1台で幅広いサイズのサンプルに対応

■ サンプル例

- ・各種細胞、幹細胞クラスター、胚葉体
- ・がんスフェロイド、ニューロスフェア
- ・脾臓、集合尿管
- ・線虫、ハエ、ゼブラフィッシュ
- ・植物の種、プロトプラスト 等



株式会社 池田理化

<http://www.ikedarika.co.jp>

本社 〒101-0044 東京都千代田区鍛冶町1-8-6 神田KSビル
TEL:03-5256-1811 FAX:03-5256-1818

八王子支店 TEL:042-642-0570
小金井支店 TEL:0422-39-5441
鶴見支店 TEL:045-501-5881
横浜支店 TEL:045-983-0491
藤沢支店 TEL:0466-54-0300
平塚支店 TEL:0463-37-4711
三島支店 TEL:055-975-0975
藤枝支店 TEL:054-644-5551
名古屋支店 TEL:052-249-8350

大阪支店 TEL:06-6136-1255
岩国支店 TEL:0827-21-6701
千葉支店 TEL:043-290-4055
つくば支店 TEL:029-836-6611
埼玉支店 TEL:049-245-7831
宇都宮支店 TEL:028-610-3722
仙台支店 TEL:022-217-7037
札幌支店 TEL:011-208-2822

企画・デザインから印刷・製本まで迅速・正確に、あらゆるニーズにお応えいたします

学会
運営

事務局代行業務/会場運営
プログラム編集・作成

IT
事業

印刷で培ったノウハウを用いて情報を
様々なチャンネルで加工し、お客様の
ニーズに沿ったご提案をいたします。

- Webサイト製作
- Webシラバス
- 名簿管理システム
- 名刺作成システム
- 動画製作

ISO9001 認証取得
プライバシーマーク取得
グリーンプリンティングマーク取得
FSC森林認証取得
ジャパンカラー標準印刷認証取得

印刷
事業

企画・デザインから印刷・製本・発
送まで、情報に付加価値をつけ、
あらゆるニーズにお応えします。

- オフセット事業
- オンデマンド事業
- インプラント事業
- 同窓会運営サービス
- 自費出版事業

FM
事業

地域みっちゃく
フリーマガジンの
発行



速記
事業

音声をテキスト化し、整文や検閲を
行った上で記録や読み物として最
適化した形でお届けいたします。

- 現場速記、テープ起こし
- 音声機械反訳
- 議事録、講演録作成
- 翻訳業務
- 音声即時反訳



共立速記印刷株式会社
KYORITSU STENOGRAPHY & PRINTING CO., LTD.

本社 〒102-0072 東京都千代田区飯田橋3-11-24
PHONE 03-3234-5511 (代) FAX 03-3263-2740
E-mail: info@ksi21.com http://www.ksi21.com

共立速記印刷は、印刷産業を通して皆様のお役に立ちたいと願っています。

笑顔が集うライフステーション
オレンジタウン



お互いに、支えあって生きてゆく所沢へ。

小さなお子様から、はたらく世代、ご年配の方まで。

わかさクリニックの在宅医療課や居宅介護支援事業所なども設置し、

この街で生活するすべての人々に開かれた「オレンジタウン」は、

医療と介護の一体的なサービスもご提供いたします。

わかさクリニックグループがご提案する新しいコミュニティスペースです。

お互いに、支えあって生きてゆく地域づくりに貢献し、

カフェやセミナールームの開設とともに、

所沢のみなさまから愛される「オレンジタウン」をめざします。