

博士論文

論文題目

脾摘後重症感染症(**Overwhelming PostSplenectomy
Infection (OPSI)**)を中心とした肺炎球菌感染症に対するガ
ンマグロブリン投与における、肺炎球菌特異抗体/非特異抗
体の意義の検討

氏名 中村謙介

要約

脾摘後重症感染症 Overwhelming postsplenectomy infection(OPSI) は肺炎球菌を主として急激に菌血症となる予後の悪い病態である。ガンマグロブリン投与 intravenous immunoglobulin (IVIG)などの特異抗体を補充する治療は理論的に有効であると考えられ、マウス OPSI モデルを作成し、IVIG の意義を検討した。また免疫沈降法により特異抗体を除去した IVIG 製剤を作成し非特異抗体と特異抗体の作用を分けて解析した。IVIG は特異抗体補充を介して、肝臓を中心とした貪食亢進により、OPSI の生存率を改善させることが示された。

この研究は雑誌 *Critical Care Medicine* に掲載されている。

(Crit Care Med. 2013 Aug;41(8):e163-70).

背景

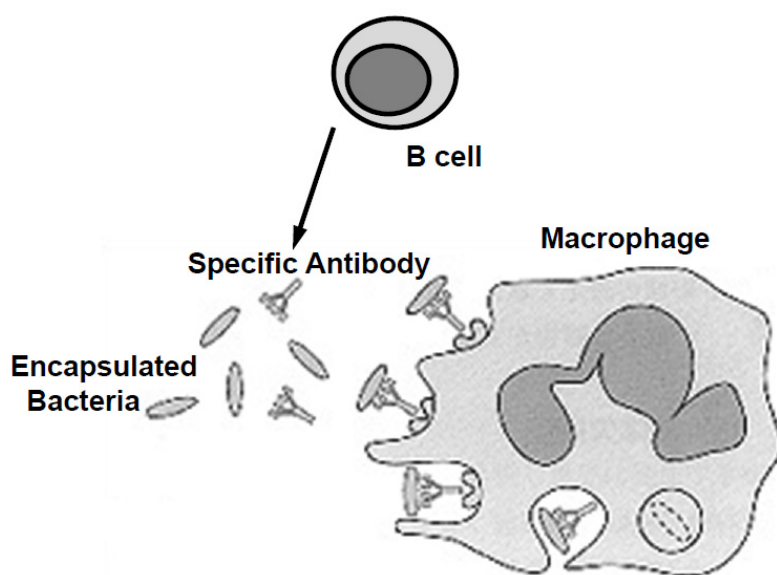
脾摘後重症感染症 Overwhelming postsplenectomy infection(OPSI)はひとたび発症すると適切な抗生剤を投与していても死亡率が 50～70% にも及ぶとされる非常に重篤な病態である (1, 2)。OPSI の症状は非常に急激で劇症であり、軽い発熱などの初発症状から数時間以内に敗血症性ショックになることが多い。

Overwhelming PostSplenectomy Infection OPSI

- ① Fulminant sepsis/bacteremia in splenectomized or asplenic patients
Spleen is necessary for protection to encapsulated bacteria in blood stream
 - (1) the main field of the phagocytosis
 - (2) production of specific antibody
 - ② Streptococcus Pneumoniae is the most frequent etiology
 - ③ Pneumococcus vaccination and prophylaxis are recommended
-

血液循環の関門として位置する脾臓は、血液中の病原菌をトラップし貪食するための臓器として最も重要であると考えられている。その機能は血管内の病原菌を貪食・除去するだけでなく、特に莢膜を持つ細菌を殺菌するために必要なオプソニン化のための抗体を産生する場としての役割もあるとされる。肺炎球菌 *Streptococcus pneumoniae* は莢膜を持つグラム陽性球菌であり、OPSI の起炎

菌として 50~90%を占めると言われ (1-3)、しばしば激症的に病態が進行する。肺炎球菌の莢膜は宿主の貪食に強く抵抗するため、その貪食には特に肺炎球菌特異抗体を必要とすると考えられている。これらの特異抗体は主に B 細胞が産生し、脾摘によってその大部分が失われることになる。

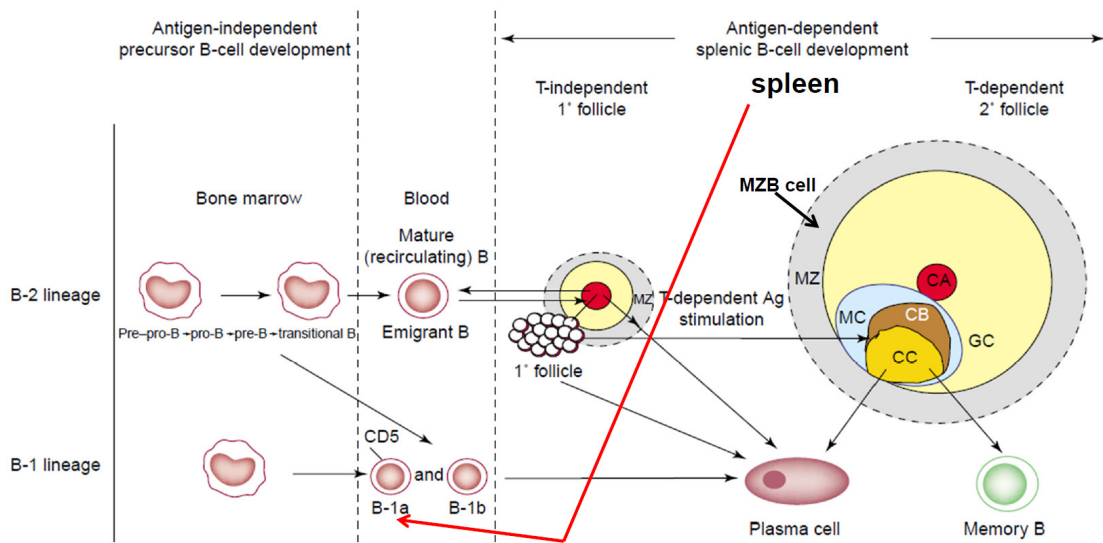


そこで本邦における OPSI の症例報告のレビューを行った (2010 年第 39 回日本集中治療医学会総会にて発表)。Pubmed、Medline 及び医学中央雑誌刊行会ホームページより Overwhelming postsplenectomy infection, postsplenectomy sepsis, splenectomy, 脾摘後重症感染症、脾摘後感染症、脾摘にて検索し、2010 年 2 月までの本邦における症例報告、case series を抽出した。その結果を次項に示す。実際に肺炎球菌は OPSI の最も頻度の高い起炎菌であり全体の 70%を超え、また全体の死亡率は 63%であった。

Case series of Overwhelming PostSplenectomy Sepsis in Japan

	reporter	year	age	sex	time after splenectomy	treatment start after onset	causative organism	antibiotics	sample	DIC	steroid therapy	IVIG	outcome
1	Dan	1979	41	M	6year	1day	-	-	-	+	PSL40mg	-	death
2	Tadenuma	1979	59	M	35year	2day	S.pneumoniae	ABPC,GM	blood	+	pulse	-	death
3	Kosaka	1986	54	M	26year	1day	S.pneumoniae	LMOX, FOM,AMK	liquor	-	-	-	survive
4	Sato	1987	26	F	17year	7day	S.pneumoniae	LMOX, ABPC,PCG	liquor	-	-	-	survive
5	Yamashita	1987	70	M	5day	1day	Pepto-streptococcus	LMOX, GM	pleural effusion	+	-	+	death
6	Yasuda	1987	49	F	-	-	P.aeruginosa	-	blood	-	-	-	death
7	Yasuda	1987	48	M	-	-	E.faecalis	-	blood	+	-	-	death
8	Yasuda	1987	42	M	-	-	S.epidermidis	-	blood	-	-	-	death
9	Sato	1989	65	F	5year	-	C.amalonatus	-	blood	-	-	-	death
10	Kobayashi	1989	30	M	1month	5hour	S.marcescens	PC系	liquor	-	-	-	survive
11	Aiboshi	1990	35	F	20year	3day	Pepto-streptococcus	-	blood	+	-	-	death
12	Tasaka	1992	38	M	20year	-	S.pneumoniae	CTX,FMDX, OMNX,IPM	-	+	MPSL0.5g	5g × 4day	death
13	Tasaka	1992	59	M	1year	-	S.pneumoniae	-	-	+	hydrocortisone	-	survive
14	Kawakami	1993	27	F	3year	16hour	S.pneumoniae	PIPC	liquor blood	+	-	-	death
15	Ikehara	1993	79	F	2year	19hour	S.pneumoniae	ABPC,TOB	-	-	-	-	survive
16	Mimura	1994	34	M	6year	10hour	S.pneumoniae	-	-	+	+	-	death
17	Kamata	1997	26	F	10year	1day	S.pneumoniae	multi drug	blood	+	+	+	death
18	Murao	1997	63	F	4year	23day	E.faecalis MRSA	PCG,CTX	-	+	-	-	death
19	Yamashita	1998	39	F	9year	4day	S.pneumoniae	CTX,ABPC	-	-	dexamethasone8g	+	survive
20	Mitsui	1999	77	M	13year	3day	S.pneumoniae	IPM/CS, ABPC, CTX	liquor	-	-	+	survive
21	Hayskawa	2001	23	F	2year	2day	S.pneumoniae	-	blood	+	-	-	death
22	Arimune	2002	30	M	1year	1day	S.pneumoniae	MEPM	blood	+	-	-	death
23	Takasawa	2003	39	M	30year	1day	S.pneumoniae	PAPM/BP	liquor blood	+	mPSL1,000mg	+	survive
24	Abe	2004	57	M	4year	3day	S.pneumoniae	PAPM/BP	liquor	-	dexamethasone	+	death
25	Kikuchi	2004	29	M	5year	1day	S.pneumoniae	PIPC, GM, MEPM	blood	-	-	+	survive
26	Kojima	2005	51	M	9year	1day	S.pneumoniae	-	sputum	+	-	-	death
27	Kojima	2005	75	M	9year	3day	H.influenzae	-	-	+	-	-	death
28	Kojima	2005	69	M	9year	2day	S.pneumoniae	-	blood	+	-	-	death
29	Kojima	2005	64	F	3year	2day	S.pneumoniae	-	urine	-	-	-	survive
30	Morita	2006	30	F	22year	3day	-	SBT/CPZ, MIND	-	+	MPSL1.0g	+	survive
31	Kikuchi	2007	20代	M	5year	2day	S.pneumoniae (PRSP)	MEPM, ABPC, CLDM	liquor	+	dexamethasone 6mg × 2日, 12mg × 3日, 8mg × 2日	2.5g1day, 5g × 2day	death
32	Hiramatsu	2008	50代	F	-	-	S.pneumoniae (PRSP)	TAZ/PIPC	blood	+	-	+	death
33	Okamura	2009	61歳	F	20year	1day	S.pneumoniae	-	blood	+	-	-	death
34	Kusumoto	2009	25歳	M	22year	1day	S.pneumoniae	PCG, MEPM, CTX	blood	+	+	5g × 3day	survive
35	Our case	2010	70歳	M	2year	6hour	S.pneumoniae	CTRX	blood sputum	-	-	5g × 3day	survive

脾臓はオプソニン化のための免疫グロブリンの分化にとっても中心的な役割を果たしている (4, 5)。例えば脾臓の辺縁 marginal zone に位置する marginal zone B (MZB) 細胞は莢膜を持つ細菌に対して急速に補体に対する受容体を発現し特異抗体を産生する (4)。脾摘は体全体における大部分の MZB 細胞を奪い減少させることになる。MZB 細胞は末梢血にも存在し (脾臓のない患者でも末梢血に存在する (6))、これらは IgM を産生するメモリーB 細胞であると認識されている (7)。これらの循環するメモリーB 細胞も脾臓外で肺炎球菌に対する特異抗体を主に IgM として産生しているが (5-7)、脾摘は分化に影響することで肺炎球菌に対するメモリーB 細胞として知られる循環する B1-a B 細胞を減らすともされている (8)。これらの理由から脾臓のない患者は、血管内細菌のフィルター機能と特異抗体産生の低下の2つの原因によって相乗的に OPSI を悪化させることになると言える。



MZB and B-1, B-2 cell maturation pathways

MZB 細胞は骨髄において B-2 lineage として幹細胞から分化し、血液および脾臓の marginal zone で分化・発達していく。一方で B-1a 及び B-1b 細胞の起源は未だわかっていない。これらの B 細胞は主には腹腔及び胸腔内で分化するが、その一部は血液中を循環している。

Trends of Immunology. Vol.24 No.10 2003, 546

脾摘患者のワクチン接種や予防に関して推奨されているが、OPSI が非常に致死的で重篤であるにもかかわらず一度 OPSI が発症した後に関する特異的な治療で推奨されるものは未だないのが現状である。免疫グロブリン療法 IntraVenous ImmunoGlobulin (IVIg) に代表される抗体補充療法は主に IgG 分画のガンマグロブリンを補う治療法であるが、前述する OPSI の発症機序から考察するに OPSI に有効と考えられる治療である。その有効性は動物モデルを用いていくらか検討されている。例えば、IVIg は肺炎球菌によるラットの OPSI モデルの生存を改善させ、脾摘ラットにおける typeB インフルエンザ桿菌の腹腔感染において IVIg は菌のクリアランスを改善させた (9, 10)。しかし脾摘後の感染において

IVIG がどのような作用機序で有効性を発揮しているかを検討した報告は調べた限りで存在しなかった。特に IVIG 中の起炎菌に対する特異抗体の意義と作用機序に関して十分に解析されたものはない。さらに、ヒト IVIG 製剤には肺炎球菌莢膜に対する特異抗体が非常に微量しか含まれておらず (11)、これが十分量かどうかとも評価されていない。一方で、IVIG には特異抗体補充以外にも肺炎球菌感染症に対して有効と考えられる作用があると報告されている。たとえば補体活性化の抑制、有毒なトキシンなどの中和作用(12, 13)、主に抗炎症に働く免疫修飾 (14–16)などであり、これらのうちいくつかは特異抗体でなくとも、すなわち非特異抗体であっても作用を発揮できると考えられる。

Effects of IVIG for infection

- ① specific antibody supplement
 - ② limitation of complements activity
 - ③ neutralizing toxins
 - ④ immunomodulation, mainly anti-inflammatory direction
-

実際に、先に調べた本邦における OPSI 症例のレビューにおいても、IVIG 治療を行ったとする報告では生存率がよい傾向がみられた。症例報告ゆえのバイアスにより多大な limitation が存在するが、転帰が生存であった率は IVIG 治療をしたとするものが 53.8%、IVIG をしていないあるいは言及されていないものが 27.3%、全体が 37.1%であり、IVIG 群が最もよい結果となっている。

以上の背景から、マウス OPSI モデルを用いて IVIG 中の肺炎球菌に対する特異抗体及び非特異抗体の作用をそれぞれ分けて研究した。蛍光顕微鏡を用いて細菌と投与した IVIG を視覚化し、免疫沈降法を用いて特異抗体の除去を行うことで、特異抗体による菌貪食が IVIG による OPSI 防御に最も重要な役割を果たしていることを示した。さらに IVIG の MZB 細胞と血中サイトカインに対する免疫修飾作用について解析を行った。

方法

マウス、細菌、試薬

本研究には 8 週令 C57BL/6Jcl オスマウス (CLEA Japan Inc.) を用いた。実験は東京大学の倫理審査の承認を受けて行った。細菌はセロタイプ 3 型の肺炎球菌 *Streptococcus pneumoniae* ATCC6303 (Microbiologics Inc.) を用いた。IVIg のための免疫グロブリン製剤として、ヒトガンマグロブリン製剤として臨床使用されている 5% ヴェノグロブリン IH (Benesis Corp., Japan) を使用した。

特異抗体除去のための免疫沈降法

感染に使用する肺炎球菌に対する特異抗体を除去するため、免疫沈降法を行った。*Streptococcus pneumoniae* ATCC6303 を 3.7% brain heart infusion 液体培地で培養増殖し、phosphate buffer saline PBS で 3 回 wash した上で 0.5% ホルマリンと混合し 4 °C overnight で失活させた。翌日 PBS で 3 回 wash し濃度調整したものを、5% IVIG 100 μ l に対し細菌 10^8 colony forming unit CFU となるように混合し 1 時間振動させながら incubate した。混合物を 3000 回転 15 分で遠心して菌を沈降させた後、上清を得る。この免疫沈降を 3 回繰り返す、最終的な上清を ATCC6303

に対する特異抗体を除去した IVIG 製剤(IVIG_{dep})として以降の実験で使用した。
最終産物に関して、タンパク濃度を Bradford method (Bio-Rad Laboratories Inc.) を
用いて、各 IgG サブクラスを IgG subclass BS-NIA IgG1-4 (The Binding Site Ltd.)
によるネフェロメトリーを用いて調べた。

ウェスタンブロット

上記免疫沈降反応を7回繰り返すことで現れる沈降物に対してhuman IgGに
対するウェスタンブロットを行い、各沈降産物にどれだけhuman IgGが含まれる
かを調べた。菌を主とする沈降物に含まれるIgGは菌に対する特異抗体と考えら
れるため、各回の免疫沈降で特異抗体がどれだけ除去できているかを評価する
ものである。連続7回で生じる各免疫沈降物をPBSで3回洗浄した上でaprotinin、
PMSF、sodium orthovanadate及びleupeptinから成るradioimmunoprecipitation assay
buffer と混合する。溶解物を10–20% gradient sodium dodecyl sulfate –
polyacrylamide gel上で電気泳動した。ゲルからタンパクをpolyvinylidene difluoride
membrane (Amersham Biosciences Corp.)に移したあと、1:1000に希釈した
horseradish peroxidase-labeled goat anti-human IgG F(c) antibody (Lot 25664;
Rockland Immunochemicals Inc.)を用いて1時間室温でウェスタンブロットを行
った。続けてECL Plus (Amersham Biosciences Corp.) を用いて染色しスキャナー

(LAS4000; Fujifilm)を用いて直接スキャンした。各バンドのDensitometric analysisはソフトウェア (Image J 1.45; open source)を用いて行った。

脾摘

マウス 8 週令に脾臓摘出術またはsham手術を施行した。ケタミン100 mg/kgとキシラジン15 mg/kgを腹腔投与し全身麻酔を行った。左側背部に1.5cmの皮膚切開の上で1.0 cmの腹膜を切開した。腹腔内から脾臓を単離し、栄養血管を2本の絹糸を用いて結紮した上で切除した。腹膜切開を吸収糸で、皮膚切開をクリップで縫合した。コントロールとしてのsham手術群は腹膜切開と脾臓単離までを行い、脾臓摘出はせずに創縫合した。これらのマウスは手術後次項の感染まで4週間をおいて通常の飼育を行った。

肺炎球菌感染、IVIG治療

脾摘またはsham手術の4週間後、37℃血液寒天培地で培養された肺炎球菌 ATCC6303 10^6 CFU を静注し、菌血症とした。これらのマウスは次の5つの群に分けられる。1) 脾摘Splenectomy (SPX) +IVIG; 2) SPX; 3) Sham手術 (control) +IVIG; 4) Sham手術 (control); and 5) SPX+IVIG_{dep}. +IVIGまたはIVIG_{dep}群には感染と同時に300 mg/kgのIVIGまたはIVIG_{dep}を腹腔投与した。これらのマウスに関

して14日間の生存解析を行った。

また特異抗体量を5段階に分けて投与し、5群の生存解析を別に検討した。オリジナルのIVIGおよび作成したIVIG_{dep}を適当な比で混合し、特異抗体除去%を振り分けて投与を行った。IVIG : IVIG_{dep} = 0 : 100 (0%IVIG_{dep}; IVIG_{dep}), 25 : 75 (25%IVIG_{dep}), 50 : 50 (50%IVIG_{dep}), 75 : 25 (75%IVIG_{dep}), 100 : 0 (100%IVIG_{dep}; original IVIG) (%はオリジナルに対する特異抗体含量を表す) として混合したIVIG製剤を投与し、生存時間の解析を行った。

細菌培養、菌量測定

各臓器における菌量測定のため、感染24時間後のマウスをサクリファイスした。マウスの血液、肝臓、脾臓を無菌的に摘出し、肝臓及び脾臓はPBS下にホモジナイズした。各サンプルは10倍ずつ段階希釈したものを37℃血液寒天培地で培養し、24時間後にCFUをカウントした。

血清IgG及びサイトカイン解析

マウス血液は採取後-80℃で保存した。血清マウスIgGレベルはmouse IgG ELISA kit (E90-131; Bethyl Laboratories Inc.)を用いて測定した。また血清IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-12p70, IL-6, KC/GRO, TNF- α レベルはmouse pro-inflammatory

multiplex kitとsector imager 2400 (MSD Sector Imager 2400; Meso Scale Diagnostics LLC)を用いて測定した。

免疫蛍光染色と蛍光顕微鏡解析

肺炎球菌を検出するための蛍光顕微鏡解析はすでに示されているように (17) CFDA/SE (341-06443; Wako Pure Chemical Industries Ltd.)を用いて行った。3.7% brain heart infusion液体培地で培養した肺炎球菌ATCC6303をPBSで3回washし、PBSで540 nm下にoptical density OD 1.0となるように濃度調整した。その上でCFDA/SEを20 μ Mとなるように混合し37 °C暗所にて30分間incubateした。その後PBSで3回washした上で、 10^8 CFU相当の菌量をマウスに静注投与した。マウスは1時間後にサクリファイスし、全身を10mlのPBSで環流した上で、肝右葉、右肺下葉、右腎及び脾臓 (sham群のみ) を摘出、各臓器を-80 °Cで保存した。

免疫蛍光多重染色はマクロファージ及び肝臓のKupffer細胞に対してrat anti-mouse F4/80 antibody (MCA497; Abd Serotec)を、投与したヒトIVIGに対してAlexa Fluor[®] 647 goat anti-human IgG antibody (A-21445; Invitrogen Corp.)を用いて行った。マクロファージによる貪食やヒトIgGの結合は共焦点蛍光顕微鏡LSM510 META NLO (Carl Zeiss Inc.)を用いて観察した。

Real-time polymerase chain reaction PCR解析

肺炎球菌の肝臓、脾臓でのトラップ量を評価するため、肺炎球菌のPCRを行い各臓器での菌の絶対量を評価した。肺炎球菌属に特異的とされる autolysin 遺伝子 LytA に関して real-time PCR を行った。LytA 遺伝子中の配列として以下のプライマー配列を用いた (Nagai K, et al. J Antimicrob Chemother 2001;48(6):915-918):

5'-₆₈₁CAACCGTACAGAATGAAGCGG₇₀₁-3' and

5'-₉₉₉TTATTCGTGCAATACTCGTGCG₉₇₈-3'。細菌DNAはQuickGene DNA tissue kit (Fujifilm)を用いて10mlPBSで環流された後の肝臓、脾臓のDNAとともに抽出した。PCR前に各サンプルのDNA濃度をOD 260 nm下に10 ng/μlに調整した。その上で、LytA遺伝子量をSYBR[®] Green PCR Master Mix (Life Technologies Inc.) と PCR system (Prism 7000; Applied Biosystems)を用いてreal-time PCRにて評価した。PCR反応条件としてdenaturation 95 °C 30 sec, annealing 54 °C 30 sec, extension 72 °C 30 sec 50 cyclesとした。増幅データはソフトウェア(Prism sequence detection ver. 2.1; Applied Biosystems)を用いて解析した。

フローサイトメトリー解析

感染前及び感染24時間後のマウスをサクリフェイスし末梢血及び脾臓を摘出した。脾臓細胞は23ゲージ針及びシリンジを用いてPBSで脾臓から洗い出した。

脾臓細胞及び末梢血は5mlのhemolysis buffer (155 mM NH₄Cl, 20 mM NaHCO₃, and 1 mM EDTA, pH 8.0) で5分間処理後し赤血球を除去した後、2回PBSで洗浄した。FITC-conjugated anti-mouse CD21/CD35 (123407; Biolegend), PE-conjugated anti-mouse CD23 (553139; BD Biosciences), APC-conjugated anti-mouse B220/CD45R (103212; Biolegend), biotin-conjugated anti-mouse CD69 (553235; BD Biosciences)とそれに伴う streptavidin-PECy7 (25-4317-82; eBioscience)により染色し、その後FACS LSR II (BD Biosciences)及びFACS Diva software (BD Biosciences)にて解析した。

各サンプルは同時に全血算計測機ERMAX-18 (Erma Inc.)にて血球測定した。全B細胞数はこれによるwhite blood cell countsとフローサイトメトリーのB細胞%の積により計算した。

統計解析

各群の有意差はStudent *t*検定 paired *t*検定, one-way analysis of varianceからのTukey–Kramer検定により多群の比較を行い検定した。生存解析の結果はログランク検定により行った。これらの計算はソフトウェア(JMP 9.0; SAS Institute Inc.)を用いて行った。結果は平均±平均の標準誤差で表し、 $p < 0.05$ を有意として記載した。

結果

IVIGは脾摘マウスの生存を著明に改善した

脾摘と肺炎球菌感染によりマウスOPSIモデルを作成した。生存解析の結果をFigure 1Aに示す。41.8%の非脾摘マウス(control)が全観察期間2週間の後に生存したのに対し、全ての脾摘マウス(SPX)は5日以内に死亡した。脾摘マウスにおいてIVIG治療により有意かつ著明に生存率の改善がみられた。IVIGによる生存の改善はcontrol群において(すなわちcontrol vs. control+IVIG)よりも脾摘群(すなわちSPX vs. SPX+IVIG)の方が有意に高く、脾摘マウスにより有利に働いていると考えられた。

IVIGからの特異抗体除去

特異抗体及び非特異抗体がそれぞれどのように重要かを検討するため、使用する肺炎球菌に対する特異抗体を除去したIVIG製剤 (IVIG_{dep})を免疫沈降法により作成した。特異抗体の除去が有効に行われているかはウェスタンブロットにより解析・確認した (Figure 1B)。Densitometry analysisにより免疫沈降1回目で62.2%、2回目で85.4%、3回目で97.9%の特異抗体が除去できるという結果とな

っており、3回の免疫沈降法でほとんど全ての特異抗体を除去できていると考えられた。IVIG_{dep}のタンパク濃度はオリジナルから2.0%以上落ちないように調整した。肺炎球菌に対する特異抗体は主にIgG2分画に存在するとされている(11)が、IVIG_{dep}におけるIgGのサブクラスはオリジナルのIVIGとほとんど同じであり(IVIG_{dep} — IgG1 53.8%, IgG2 42.9%, IgG3 2%, IgG4 1.1%; original IVIG — IgG1 58.2%, IgG2 39.3%, IgG3 2%, IgG4 0.5%)、除去した特異抗体の絶対量は大きくないと考えられた。

特異抗体除去IVIG_{dep}はOPSIにおけるIVIGの生存改善を完全に消失させた

特異抗体除去したIVIGであるIVIG_{dep}を用いた生存解析をFigure 1Cに示す。SPX群に比べSPX+IVIG_{dep}群は有意に長い生存時間を得ることができたが($p < 0.05$)、SPX+IVIG_{dep}群は感染後5日以上生存をすることができず、致死率を改善させることができなかった。よって特異抗体の除去はOPSIにおける生存改善を消失させる結果となった。

さらに特異抗体除去の割合によりSPXマウスにおいてどの程度死亡率の改善が維持されるのかを検討した (Figure 1D)。生存率は特異抗体除去率に直接相関して悪化する傾向がみられた。よって特異抗体はあればあるほどOPSIの生存を改善させると考えられた。一方で、50%IVIG_{dep}までは最終的な生存マウスが

観察されたのに対し、それ以下に特異抗体除去されたIVIG_{dep}製剤では全マウスが死亡するようになるため、菌量などの状況に左右されるはずだが生存改善に必要な最低限の特異抗体量があることが示唆された。

菌量はSPX マウスで著明に多く、IVIGは菌量を有効に低下させる

感染 24 時間後の末梢血、肝臓、脾臓（control のみ）の培養により菌量カウントを行った（Figures 2A, 2B, and 2C）。末梢血、肝臓いずれにおいても、肺炎球菌 CFU は SPX 群で control 群に比べ著明かつ有意に高かった。IVIG 治療はこれらの菌量を有意に低下させていたが、IVIG_{dep} 治療群では菌量の低下がみられなかった。IVIG による貪食亢進からの菌絶対量の低下が生存改善に大きく寄与しているものと考えられた。

IVIG により炎症性サイトカインは低下する傾向がみられた

血清マウス IgG レベルを感染前及び感染 24 時間後で測定した（Figure 3）。血清総 IgG 量は今回の感染により有意に減少していたが、IVIG 治療による変化はみられなかった。7 つの炎症性サイトカインについて感染 3 時間後、24 時間後の血清を用いて測定した（Figure 4）。各サイトカインレベルは LPS 静注モデルで見られるほどの高値ではないものの、IVIG 治療により各炎症性サイトカインが

減少する傾向がみられたが、IVIG_{dep}では同様に有意な変化はみられなかった。

中でも interferon gamma (IFN γ) は興味深い傾向を示した。感染 3 時間の時点で脾摘マウスでは IFN γ が上がらないのに対し脾臓のある control 群では IFN γ が早期に高値となっていた。24 時間後には脾摘群でも IFN γ が高値となるが IVIG により抑制されていた。

感染後の MZB 細胞の活性化が IVIG により抑制された

末梢血、脾臓中の MZB 細胞 (B220+ CD21^{high} CD23^{low}) 数及びその活性化 (CD69 positive) をフローサイトメトリーで評価した (Figures 5A–5G)。末梢血中の全 B 細胞数は各群で有意差がなかった (Figure 6A)。末梢血中の MZB 細胞数は感染 24 時間後に有意に増加しており (Figure 6B)、IVIG 治療による変化はみられなかった。これらの細胞は CD69 の発現がみられず、活性化されていないと考えられた (Figs. 5A–D, 6C)。これらの結果は肺炎球菌感染後の MZB 細胞のリクルートを表している可能性があるが、この議論にはさらなる研究が必要である。

脾摘の有無で感染前後の MZB 細胞分画の変化に有意差はみられなかったが、これは末梢血に動員されている MZB 細胞の起源が全身のリンパ節由来であり、脾臓、肝臓などの炎症の場へ動員されている可能性が考えられる。

脾臓における MZB 細胞の分画は感染前後で変化はなかった (Figure 6D) が

感染後に強い活性化が認められた (Figures 5E, 6E)。興味深いことにこれらの変化は IVIG 治療により著明に抑制され (Figures 5F, 5G, 6E)、また 菌絶対量を変化させなかった IVIG_{dep} 治療においても同様に MZB 細胞活性化の抑制がみられた (Figures 2A—2C)。これらの結果を合わせると、IVIG 治療は菌量減少を介さずに MZB 細胞の活性化を抑制し、この作用は特異抗体によらず非特異抗体で引き起こされることがわかる。

菌のトラップ率は IVIG 治療で変化しなかった

肺炎球菌の貪食に対する IVIG の影響を検討するために、まず臓器での菌のトラップ率を評価した。脾摘後病態においては肝臓が血管内病原菌のフィルターとして主たる場となっていると考えられる。肝臓と脾臓での菌のトラップ率を肺炎球菌属に特異的な autolysin 遺伝子 *LytA* の real-time PCR を用いて評価した。生菌も死菌も合わせた菌の絶対的総量を肺炎球菌遺伝子の PCR によって評価するものである。10⁸ CFU の肺炎球菌感染 1 時間後のマウス各群の肝臓、脾臓から抽出した DNA で PCR を行った (Figures 7A–7C)。control と SPX、IVIG 治療の有無による各群において、菌総量に有意な差はみられなかった。この結果は IVIG が脾臓、肝臓における菌のトラップ率には影響しないことを示している。

特に肝臓において、特異抗体を介した菌貪食の増加がみられた

肺炎球菌の貪食を、共焦点蛍光顕微鏡を用いた免疫蛍光染色で評価した。

FITCベースのCFDA/SEで標識された 10^8 CFUの肺炎球菌を感染させたマウスを1時間後にサクリファイスし、環流後に肝臓、肺、腎、脾臓（control群のみ）を摘出し検討した。FITC標識された細菌は脾臓で最も多く観察され、次いで肝臓にみられ (Figures 8A, 8B)、一方で肺、腎臓においてはほとんど検出できなかった。よって血管内細菌はそのほとんどが脾臓または肝臓でトラップされていることがわかる。

次に抗 F4/80 抗体及び抗ヒト IgG 抗体を用いてマクロファージ/Kupffer 細胞及び IVIG として投与したヒト IgG をそれぞれ二重蛍光染色した。共焦点蛍光顕微鏡下に、いくつかの FITC 標識された肺炎球菌(緑) (Figure 8C) が F4/80 (赤) (Figure 8D)やヒト IgG (青) (Figure 8E)に重なって観察され、肺炎球菌特異抗体を結合し用いたマクロファージの貪食が色を重ねて観察できる(白) (Figure 8F)。ヒト IgG と FITC 標識された細菌の overlap はオリジナルの IVIG 治療群で観察されたが (Figures 8H, 8J)、無治療群及び IVIG_{dep} 治療群ではこの overlap は観察されない (Figures 8G, 8I)。ヒト IgG は非特異的に一部のマクロファージ/Kupffer 細胞に重なって観察された (Figure 8J)。

CF4/80陽性マクロファージとCFSE標識された細菌がoverlapしたものは貪食

下にあると考えられる。またヒトIgG染色とoverlapする細菌は投与されたヒトIVIG中の菌特異抗体と結合していると考えられる。100個のCFSE陽性細菌を観察し、これらが飢食下にあるか（飢食率）投与ヒトIgG特異抗体と結合しているか（投与特異抗体結合率）を評価した（Figure 9）。IVIG治療群において有意に飢食率が高く（ $p < 0.05$ ）、IVIG治療による飢食の増加は特異抗体結合によって起きていると考えられた。IVIG_{dep}治療群と無治療群の間では飢食率に有意な差はみられなかった。特に、IVIG治療による特異抗体結合を介する飢食率の増加（Figure 4D gray box）は脾臓においてよりも肝臓においての方が有意に大きかったことは注目に値する。

考察

実臨床における OPSI は激症かつ重症となり、その死亡率は今もって非常に高い。脾臓のない患者あるいは脾臓低機能の患者に対しては、OPSI を発症しないようにガイドラインにおいてワクチン接種による免疫獲得と予防のための教育をすることが推奨されている(18, 19)。しかし一度 OPSI が発症した後には特異的な治療として推奨されるものがなかった。本研究は IVIG 治療が OPSI の病態を改善させる、その作用機序を世界で初めて明らかにしたものである。IVIG による肝臓での早期の菌貪食の亢進が、OPSI の侵襲的な血流感染における死亡率を改善させたと考えられた。

特異抗体は特に肝臓における菌貪食を亢進した

共焦点蛍光顕微鏡により特異抗体を介した肺炎球菌の貪食の亢進を明らかにできた。IVIG 治療により脾臓及び肝臓における有意な貪食率の増加が確認できた一方で、それらの臓器の肺炎球菌のトラップ率は変化しなかった。おそらく脾臓、肝臓における血管内病原菌の殺菌は、病原菌のフィルター/トラップと貪食という異なる、しかし連続する2つのステップによりなされていると考えら

れる。細菌をフィルターする能力は各臓器の機能によって決定し、IVIG 治療は
貪食を亢進するがフィルター能力は向上できないと考えられた。しかしこれら
の結果を合わせると IVIG 治療が菌貪食の総量を上昇させることを示唆し、血液
や組織培養の結果もこれを裏付ける結果となっている。また IVIG が肝臓の
Kupffer 細胞による菌貪食を特に亢進していることを示した。肝臓の Kupffer 細
胞が IVIG 治療により特に貪食を促される理由はなぜなのか。これまでに同様の
傾向を示す興味深い報告がある。Tuftsin という Thr-Lys-Pro-Arg から成るペプチ
ドが免疫グロブリンの一部として抽出されるが、この薬剤が肺炎球菌感染症に
有効性を示すという報告がある (20)。Tuftsin は *in vitro* において肝臓の Kupffer
細胞に非特異的に結合しその貪食能を亢進させる (21)。Tuftsin は免疫グロブリン
の一部であり IVIG によって同様の作用が期待できる。その結合は非特異的で
あるが、特異抗体との共役により IVIG が Kupffer 細胞の貪食を強く亢進させる
結果となった 1 つの理由である可能性が考えられた。

IVIG 中の特異抗体総量は肺炎球菌感染に十分であった

IVIG 製剤中の各病原菌に対する特異抗体の総量は、全量に対して一般に少量
しかなく、その病原菌の殺菌に十分か否かははっきりしていない。保険適応で
使用できるヒト IVIG 製剤は、肺炎球菌莢膜上のポリサッカライド抗原に対する

特異抗体を 0.05 – 0.5 μ g/mgIgG しか含んでいないという報告もある (11)。実際に、本研究における特異抗体除去でもそれが含まれる IgG2 分画をほとんど変化させていないことから、今回の研究に用いた IVIG 中の serotype3 型肺炎球菌の特異抗体はごく少量しか含まれていないと考えられる。しかし、300mg/kg の IVIG 治療は今回の OPSI モデルの死亡率を改善させるのに十分な量であり、これは実臨床での感染症に対する IVIG の総投与量とほぼ同じ量である。

免疫蛍光染色では生存解析に用いた感染菌量の 100 倍の菌量の肺炎球菌を投与しており、その際のヒト IgG 結合率が 20-50%であり十分な貪食率の増加に至っている。この結果は本来の OPSI モデルにおける IVIG 投与がこのモデルに対する特異抗体補充として十分な量となっていて、100 倍多い菌量でもある程度の有効性を発揮できる可能性が考えられ、OPSI に対して十分な量の特異抗体を含んでいることへの裏付けとなると考えた。

本研究は保険適応量のヒト IVIG 製剤投与が肺炎球菌感染に対して十分な効果を発揮しうることを示唆すると考えられたが、本邦における保険適応は 3 日間分割投与となっており、早期の菌貪食、菌量減少が重要と考えられた本研究からは総量を 1 回単独投与することのほうが有効であることを示唆しており、今後の検討を要する。

IVIG は serotype 3 以外の肺炎球菌のサブタイプに対しても有効と考えられる

本研究にはしばしば侵襲的となる serotype 3 の肺炎球菌を使用した。他の肺炎球菌のサブタイプも実臨床において OPSI を引き起こすことが知られている(22)。ヒト血清やヒト IVIG 製剤には serotype 3 肺炎球菌に対する特異抗体が他のサブタイプに対する特異抗体が同量程度に含まれていることが示されているため(23, 24)、他のサブタイプによる OPSI でも同様に有効性を発揮することが期待される。さらに、本研究では特異抗体量が多ければ多いほど OPSI の死亡率を改善させることが示した。肺炎球菌ワクチンの接種により、各 serotype の肺炎球菌に対する血清特異抗体量が著明に増加することが示されている(23)ため、ワクチン接種後の献血からの IVIG 精製が肺炎球菌感染症により有効な IVIG 製剤を作ることになることが考えられた。

非特異抗体も肺炎球菌感染においていくつかの有効な作用を持つ

特異抗体を除去し非特異抗体のみとした IVIG_{dep} 製剤は、貪食を亢進せず死亡率を改善させられなかった。しかし IVIG_{dep} 治療マウスは無治療群に対して有意に生存時間が長くなっていた。非特異的な抗炎症作用あるいはいくつかの toxin の中和作用により生存が延長した可能性がある。免疫蛍光染色において、投与されたヒト IVIG がマクロファージに非特異的に結合しているのが観察されたが、

これはマクロファージの Fc γ receptors (Fc γ Rs)に結合していると考えられる。免疫グロブリンは白血球上の多くの Fc γ Rs に結合し immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs)を介して白血球を活性化させるが、一方でマクロファージ上の Fc γ RIIB に結合し immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)を介してマクロファージを抑制する(25, 26)。また Fc γ receptors への結合に競合することでブロックに働くこともある。様々な Fc γ Rs への結合の強さの相対性が白血球への最終的な作用を決定するが、IVIG 治療は根本的にマクロファージの活性化を抑制する機能を有し(27, 28)、それは Fc γ receptors のブロックあるいは Fc γ RIIB への作用によるとされる(29–31)。これらの抑制と炎症性 mediator の抑制はさらなる抗炎症作用を発揮する (16) 。一方、streptococcus 属は superantigen exotoxin を放出し生体に有害に働くが (32, 33)、IVIG はこれを中和しうると報告されている(34)。これらの付加的作用が OPSI に対する IVIG の有用性に貢献しているか明確にするためにはさらなる検討が必要である。

脾臓における肺炎球菌早期認識は IFN γ を誘導する

感染後早期の IFN γ 応答は control マウスで観察されたが、脾摘マウスではみられなかった。IFN γ は細胞性免疫とマクロファージ活性化のためのシグナルとして NK 細胞と Th1 リンパ球によって産生される (35)。活性化されたマクロフ

マクロファージも自身が $\text{IFN}\gamma$ を産生する (36)。NK 細胞と Th1 リンパ球による $\text{IFN}\gamma$ 産生は、マクロファージによる Th1 リンパ球への抗原提示を介して IL-12 及び IL-18 により亢進する。ある研究において、末梢血のヒト単球と Th1 細胞が、*in vitro* の肺炎球菌生菌による刺激により共同ではより多くの $\text{IFN}\gamma$ を産生し、Th1 細胞に対する単球数の比を変えても同様の結果が得られたのに対し、単球または Th1 細胞単独では $\text{IFN}\gamma$ を産生できなかったとするものがある (44)。彼らは肺炎球菌刺激により単球の IL-12 産生を介して Th1 細胞が主に $\text{IFN}\gamma$ を産生しているのではないかと結論している。本研究において感染早期の $\text{IFN}\gamma$ 反応が脾臓の存在下でのみ観察されたことは、脾臓のマクロファージによる肺炎球菌認識（から続く抗原提示）が早期の $\text{IFN}\gamma$ 産生に結びついているのではないかと推測された。別の研究では肺炎球菌 OPSI モデルにおいて $\text{IFN}\gamma$ の腹腔投与が生存率を改善させている (45)。 $\text{IFN}\gamma$ は肺炎球菌菌血症に対する免疫に重要な役割を果たしていると考えられるが、その早期の産生には脾臓が必要であると考えられ、OPSI の病態形成に関わっている可能性が考えられた。

一方で $\text{IFN}\gamma$ は IVIG 治療により有意に抑制された。他のサイトカインでも一部 IVIG による抑制がみられた。これらの結果の一部は IVIG の免疫修飾作用によると考えられる。IVIG は本質的にマクロファージを抑制する方向に作用し、これは本研究で示した通りであり自己免疫疾患に対する IVIG の研究で示されて

いることと一致する (46, 47)。好中球とマクロファージ上には様々な種類の Fc γ receptors が存在し、免疫グロブリンはこれに結合してシグナルを送る (48)。IVIG のマクロファージへの抑制作用は Fc γ receptors の競合によるブロックと抗炎症シグナルへの受容体となる Fc γ RIIB への刺激によるものと考えられている (30, 31)。これまでの研究では、IVIG はマクロファージ表面の Fc γ RIIB 発現を増加させ (29)、IVIG は Fc γ RIII 依存的にマクロファージ上の IFN γ receptor2 を抑制することでマクロファージの IFN γ への反応を抑制することが報告されている (37)。よって IVIG はその抑制作用によりマクロファージ関連の IFN γ 産生を抑制することが考えられる。

IVIG は肺炎球菌感染に対する MZB 細胞の活性化を抑制する

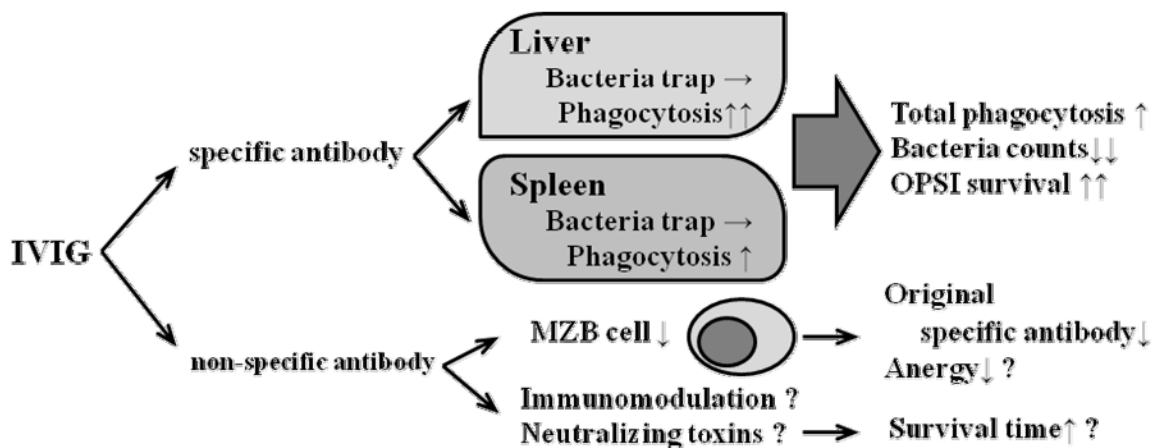
IVIG は本来病原菌に対する特異抗体を産生している MZB 細胞の活性化も抑制した。IVIG は B 細胞上の FC γ RIIB を介してシグナルを送り B 細胞の抗体産生を抑制するとされる (38–40)。IVIG 治療は MZB 細胞を抑制したが本研究の OPSI の生存率を control よりも (すなわち脾臓がある状態よりも) 改善させた。これは MZB 細胞の活性化による抗体産生が OPSI の菌増殖に対して遅すぎること、特異抗体産生量がこれだけでは足りないことなどが理由として考えられる。IVIG 治療による特異抗体補充は自身の B 細胞に特異抗体を産生させることより

も有効であると考えられ、一度 OPSI を発症した場合はワクチンなどによる免疫賦活よりも IVIG による特異抗体補充のほうが有効である可能性がある。さらに IVIG による B 細胞の抑制は B 細胞枯渇による遅発性 anergy を抑えることにつながるとされ、敗血症において有利になるとする考え方もある (41)。

肺炎球菌感染症に対する特異抗体を介した IVIG の有効性

本研究では特異抗体の総量があればあるほど肺炎球菌 OPSI の生存に有利となることを示した。よって莢膜を持つ病原菌に対する特異抗体を増量した免疫グロブリン製剤の方が臨床的に有効ではないかという考え方ができるかもしれない。しかし Altastaph[®] というブドウ球菌膜抗原に対する特異抗体をハイレベルに含んだヒト免疫グロブリン G 製剤が、海外でブドウ球菌菌血症を対象に臨床試験されたが、有効性を示すことはできなかった (43)。実臨床においては、起炎菌が同定できないことや多数の病原菌による同時感染などがよくみられる。もし単一の病原菌に対する特異抗体が起炎菌をはずしていたとしたら、本研究で示したような本来特異抗体を産生する B 細胞の非特異的抑制などを介して感染症をかえって悪化させることが十分に考えられ、Altastaph[®] が有効性を発揮できなかった 1 つの理由であるかもしれない。他方、本研究で用いたような実臨床で用いる IVIG 製剤はポリクローナルであり、様々な病原菌に対する特異抗体

を広く含有しており、その量は肺炎球菌感染には十分であることが本研究で示唆された。実臨床では単一の特異抗体製剤を用いるよりもポリクローナルな IVIG 製剤を用いる方が重症感染症に対し有効な可能性があると考えられる。実臨床での OPSI にポリクローナルな IVIG が十分に有効性を発揮できるかはさらなる臨床的検討が必要であるが、本研究は OPSI における IVIG の理論的な有効性を証明したものであり、劇症型の OPSI に対して IVIG を有効な治療の選択肢の1つとして考えることができる。



結語

IVIG は有意に肺炎球菌によるマウス OPSI モデルの生存を改善させ、これは肝臓での投与 IVIG 中の肺炎球菌特異抗体による菌貪食の亢進によるものであった。IVIG により、MZB 細胞活性化の抑制などいくつかの抑制方向の免疫修飾が非特異抗体により認められた。IVIG は特異抗体/非特異抗体により多くの作用を併せ持つが、本研究は IVIG による特異抗体補充が OPSI の病態改善に最も重要な役割を果たしていることを示した。実臨床にこの結果を translate するためにさらなる臨床的検討が必要である。

謝辞

本研究にあたり多くの助言をいただき研究環境を提供していただいた、

腎臓内科/血液浄化療法部

野入英世先生、土井研人先生、岡本好司先生、

分子予防医学教室

上羽悟史先生、

血液腫瘍内科

荒井俊也先生

に深く謝辞を申し上げます。

共焦点顕微鏡は東京大学ナノバイオ研究拠点の実験施設を使用した。

本研究は英雑誌 *Critical Care Medicine* (Crit Care Med. 2013 Aug;41(8):e163-70)

に掲載されている。

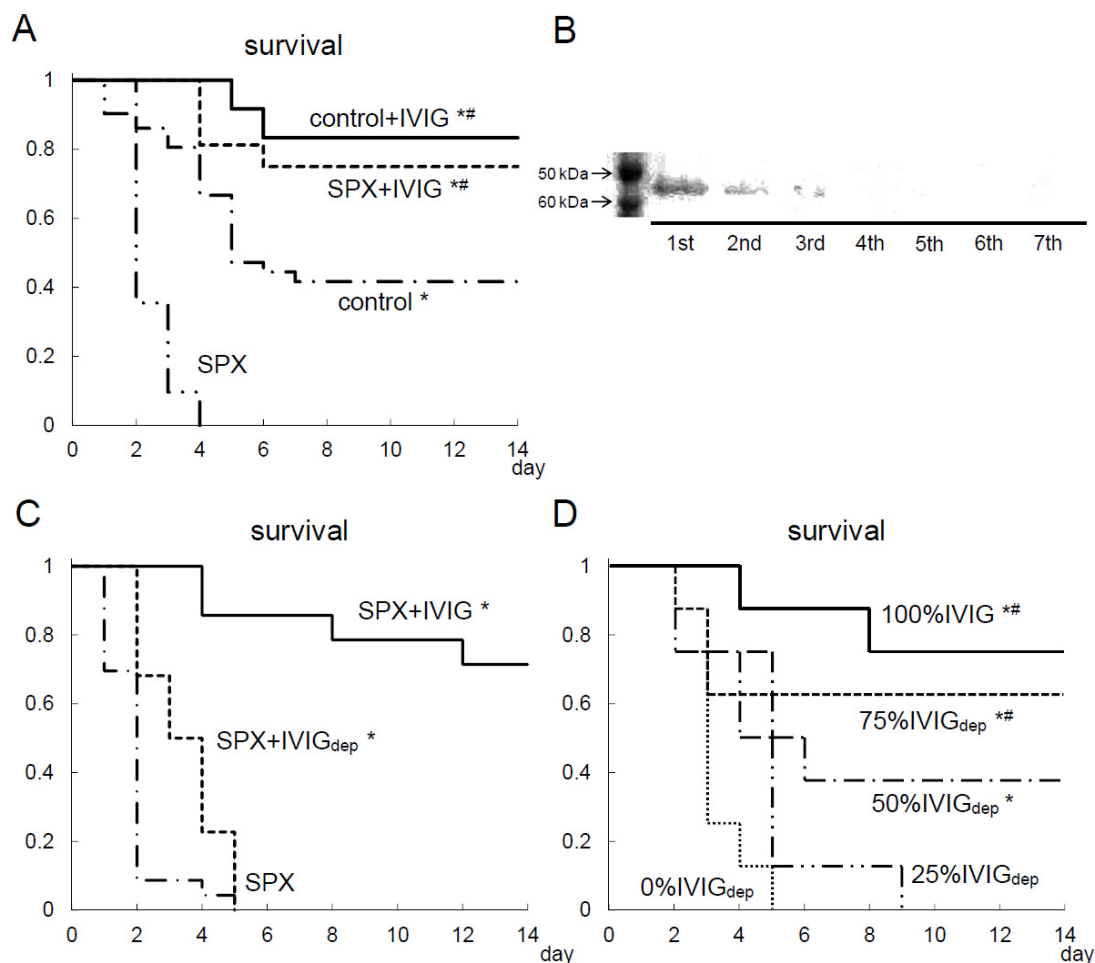


Figure 1 IVIG は脾摘マウスの生存を改善した、しかし特異抗体除去はこの改善を完全に打ち消した

IVIG_{dep}, 特異抗体除去 IVIG; SPX; 脾摘マウス

- A. SPX、sham 手術 (control) マウスへの肺炎球菌感染の生存解析。全ての SPX マウス($n=24$)は 5 日以内に死亡したが、control マウスの 14 日目の生存率は 41.8% (18/43)、SPX+IVIG 71.4% (10/14)、control+IVIG 83.3% (10/12): *, $p<0.05$ vs. SPX; #, $p<0.05$ vs. control.
- B. IVIG_{dep} 精製の際の免疫沈降物に対するヒト IgG の Western blot。バンドはヒト IgG 重鎖 (約 55kDa) を表しており、1 回目と 2 回目の沈降物にみられるが 3 回目以降にはほとんどみられない。
- C. SPX マウスへの IVIG_{dep} 投与マウスの生存解析。SPX+IVIG_{dep} ($n=22$)は SPX ($n=22$)と比較し有意に生存期間が長かったが、感染後 5 日以内に全て死亡した。: *, $p<0.05$ vs. SPX.
- D. 特異抗体含量を変えた IVIG_{dep} 製剤を投与した SPX マウスの生存解析。特異抗体の除去とともに生存率は悪化していった。: 全群 $n=8$, *, $p<0.05$ vs. SPX+0%IVIG_{dep}; #, $p<0.05$ vs. SPX+25%IVIG_{dep}.

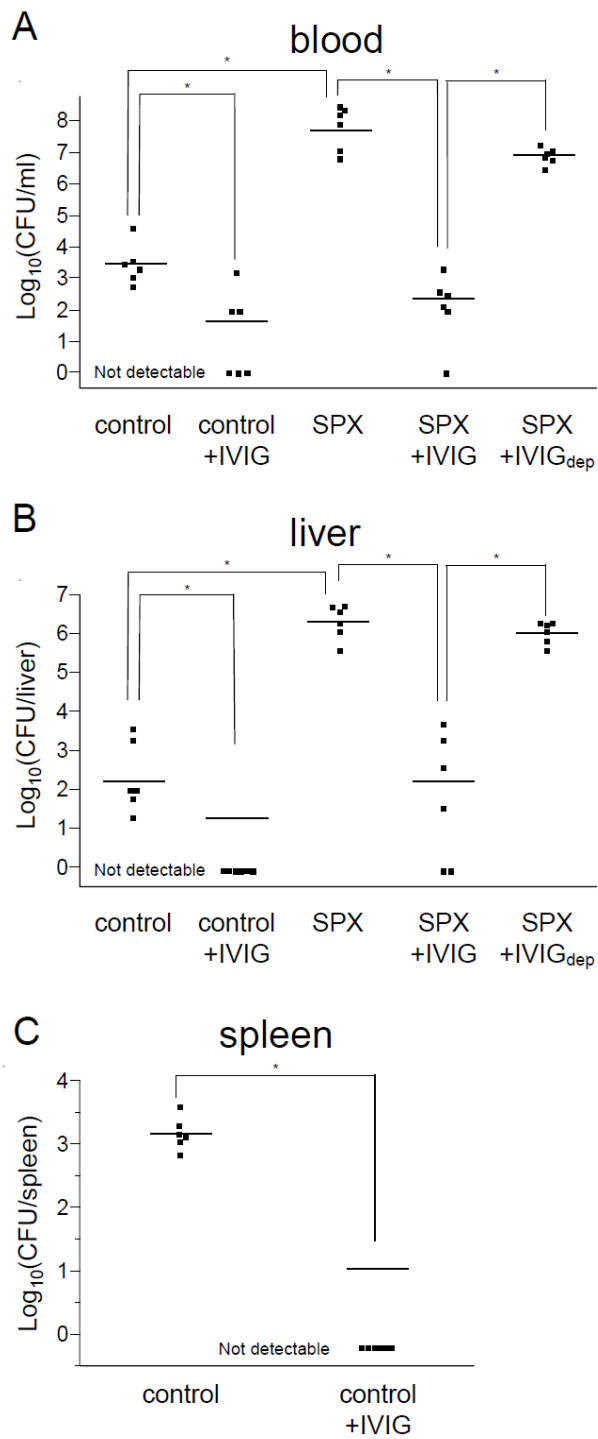


Figure 2 感染 24 時間後の血液、肝臓、脾臓の菌量
 $\log_{10}20$ (CFU カウントできる最も低い菌量) を検出以下とし統計解析を実施した。: 全群 $n=6$, *, $p<0.05$

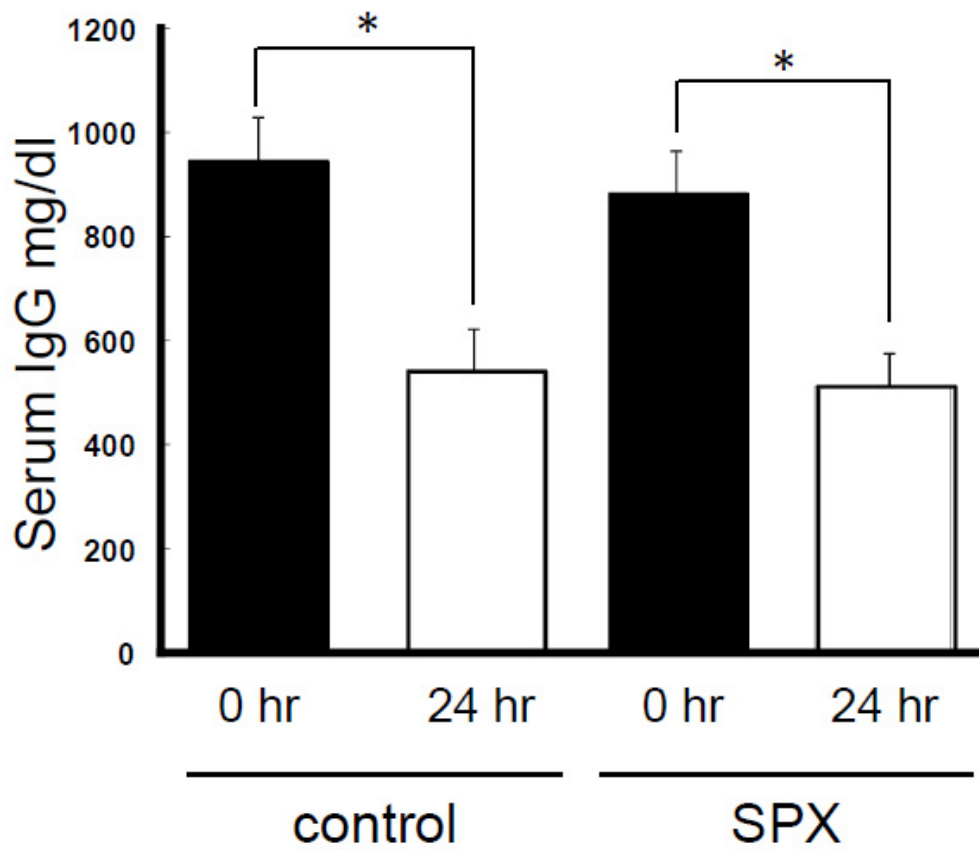


Figure 3 血清IgG値

感染前及び感染 24 時間後の血清 IgG 値を ELISA を用いて測定した。全群 $n=10$.
Data are presented as mean \pm SEM. *, $p<0.05$.

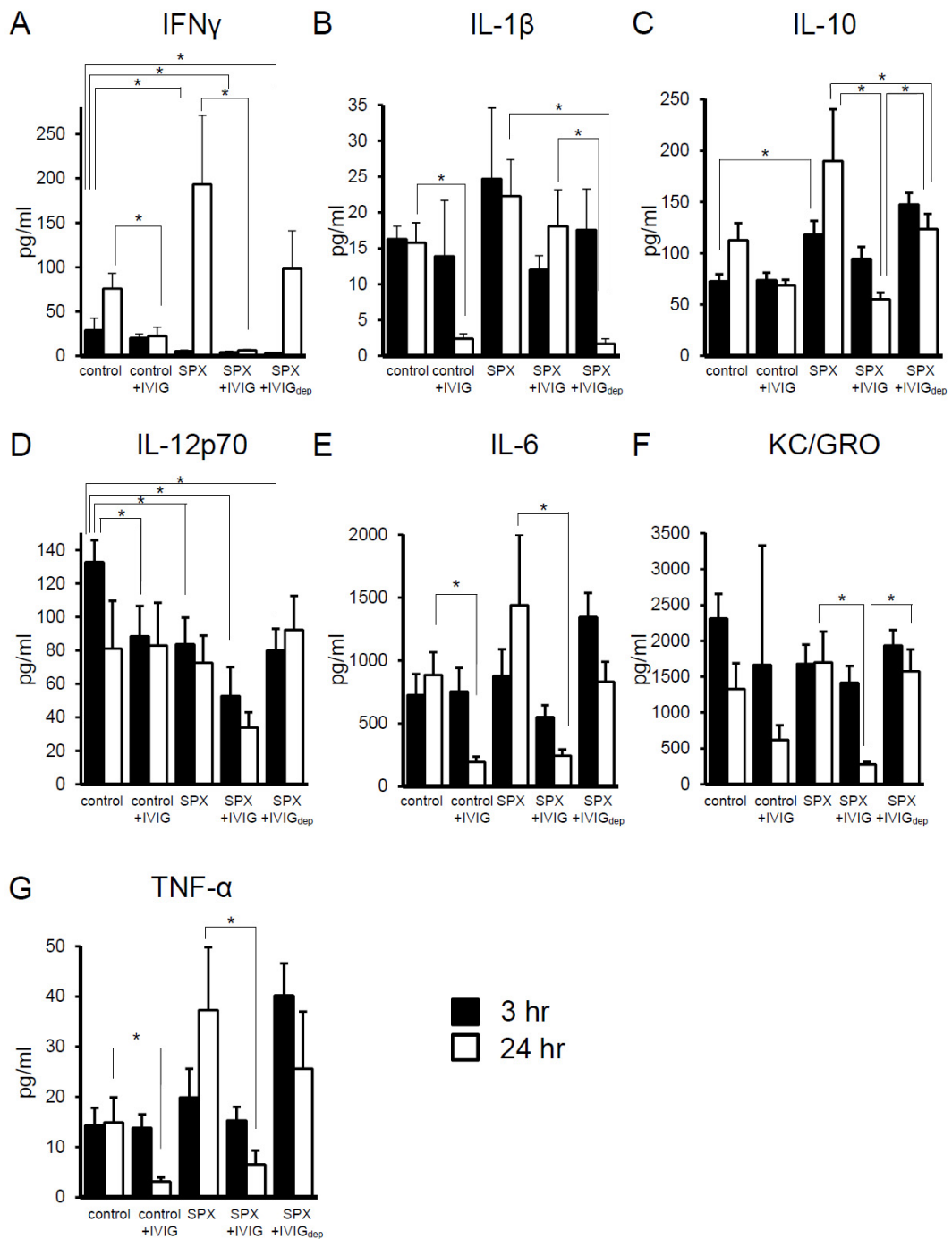


Figure 4 血清サイトカイン分析

感染後の末梢血のサイトカイン分析。全群 $n=16$ 。データは $\text{mean} \pm \text{SEM}$ で表示。黒は感染 3 時間後、白は 24 時間後のサイトカイン値を表している。: * $p < 0.05$; IFN γ , interferon gamma; IL, interleukin; KC/GRO, keratinocyte chemoattractant or growth-regulated oncogene- α ; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

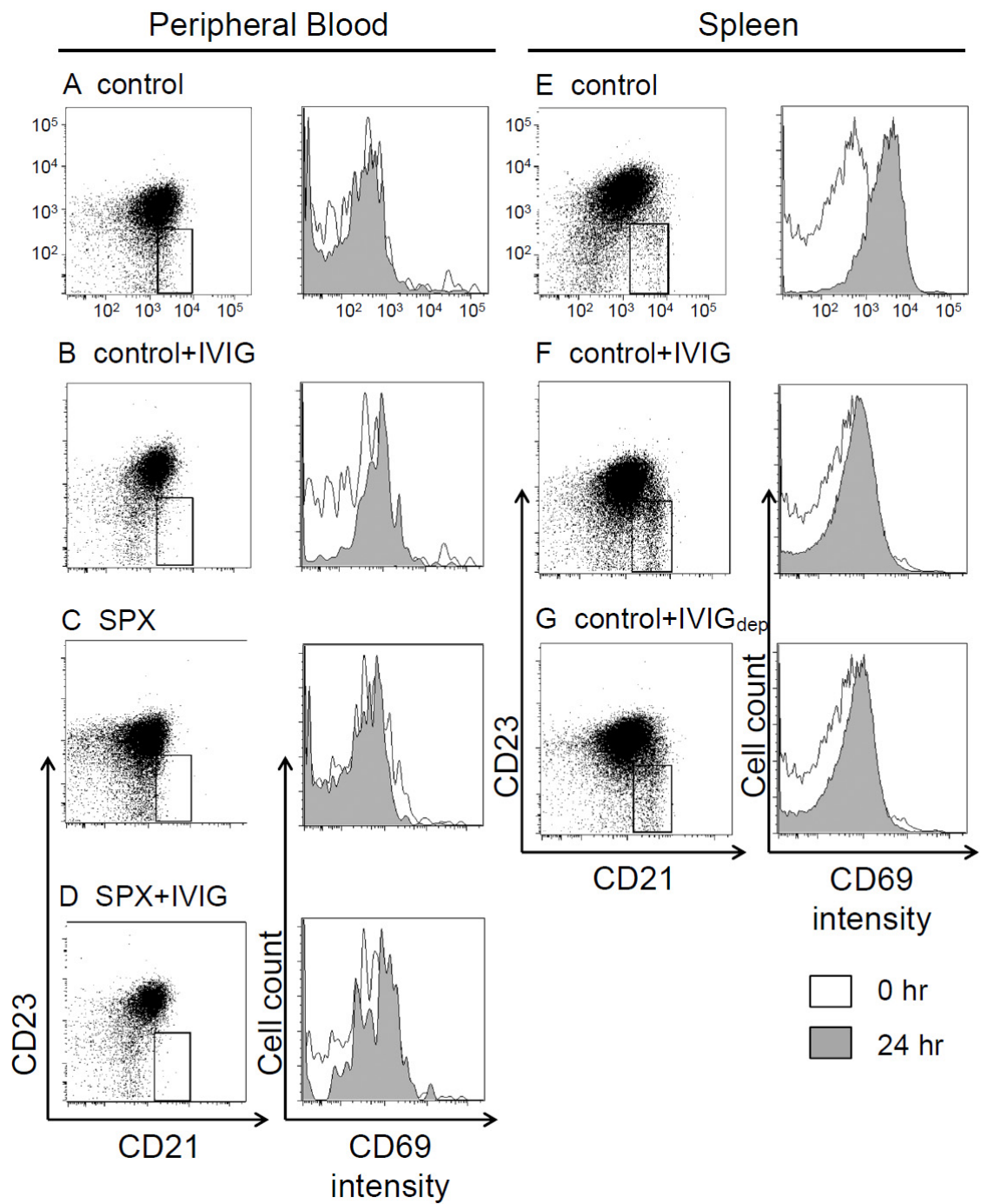


Figure 5 MZB 細胞分画と活性化

A-G. 感染 24 時間後の CD21^{high}CD23^{low} で同定した MZB 分画を左図に、MZB 分画の感染前（白）と感染 24 時間後（灰）の CD69 発現を右図に示した。IVIG 及び IVIG_{dep} 治療により脾臓における CD69 発現は著明に抑制された。

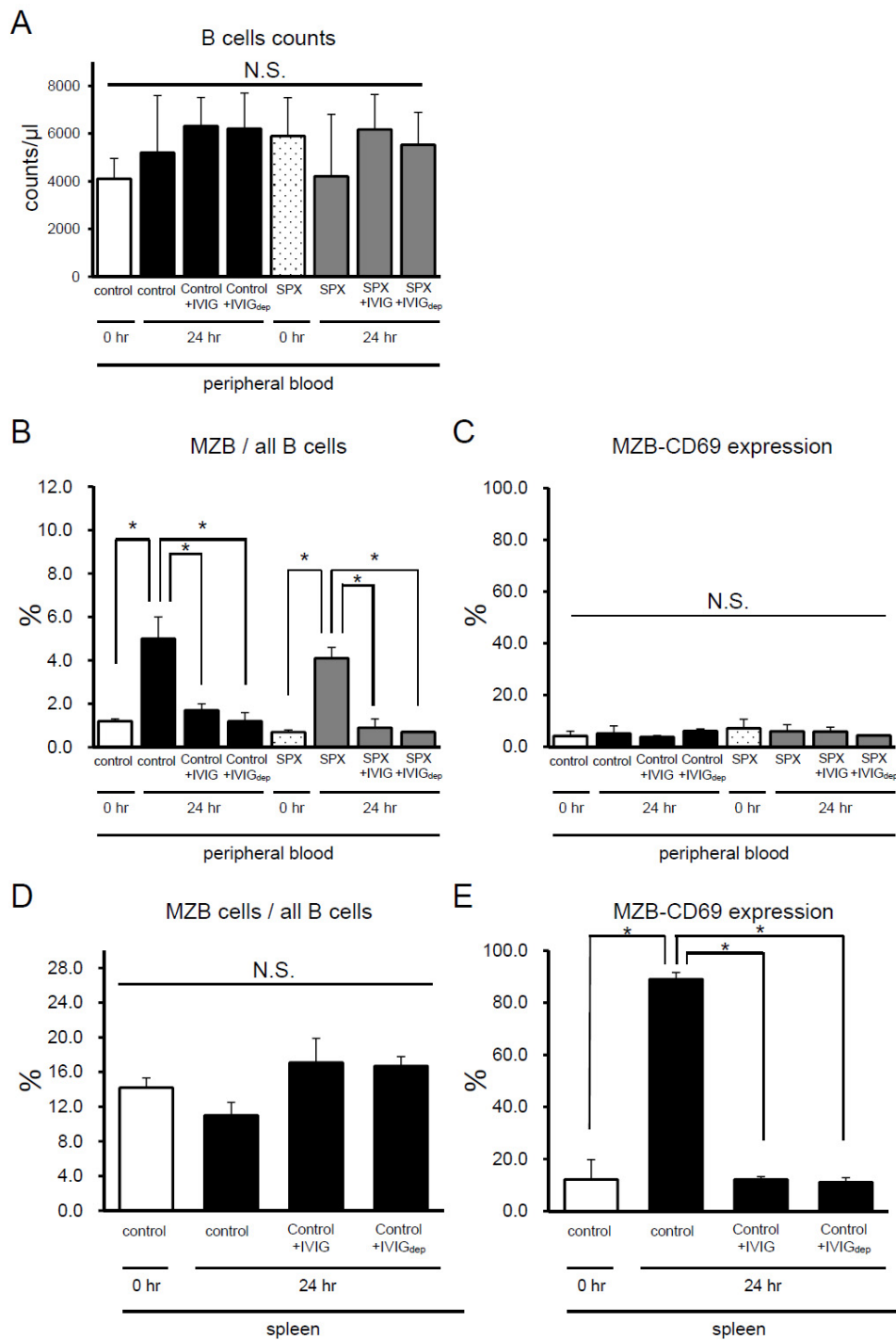


Figure 6 MZB 細胞活性化は IVIG 治療により抑制された

全群 $n=8$ 。データは mean \pm SEM で表示: MZB, marginal zone B cells; *, $p<0.05$; N.S., not significant.

A. 末梢血の全 B 細胞数

B, D. 末梢血及び脾臓の MZB 細胞分画

C, E. 末梢血及び脾臓の MZB 細胞の CD69 発現

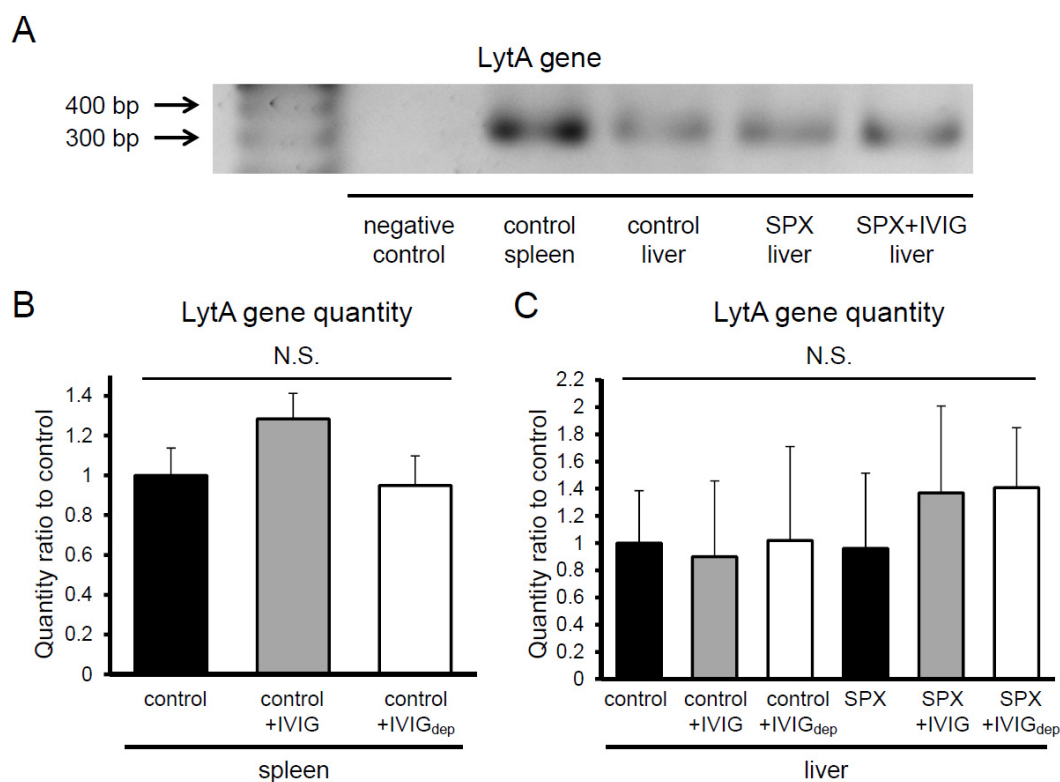


Figure 7 Real-time PCR による脾臓、肝臓の菌のトラップ率

A. 感染後の肝臓、脾臓から抽出し、PCR により増幅した LytA 遺伝子(319 bp).
 B, C. real-time PCR による各群の LytA 遺伝子の DNA 量。図は無治療 control の DNA 量を 1 として各群の DNA 量をそれに対する比で表した。全群 $n=8$. データは $\text{mean} \pm \text{SEM}$ で表示。 N.S., not significant.

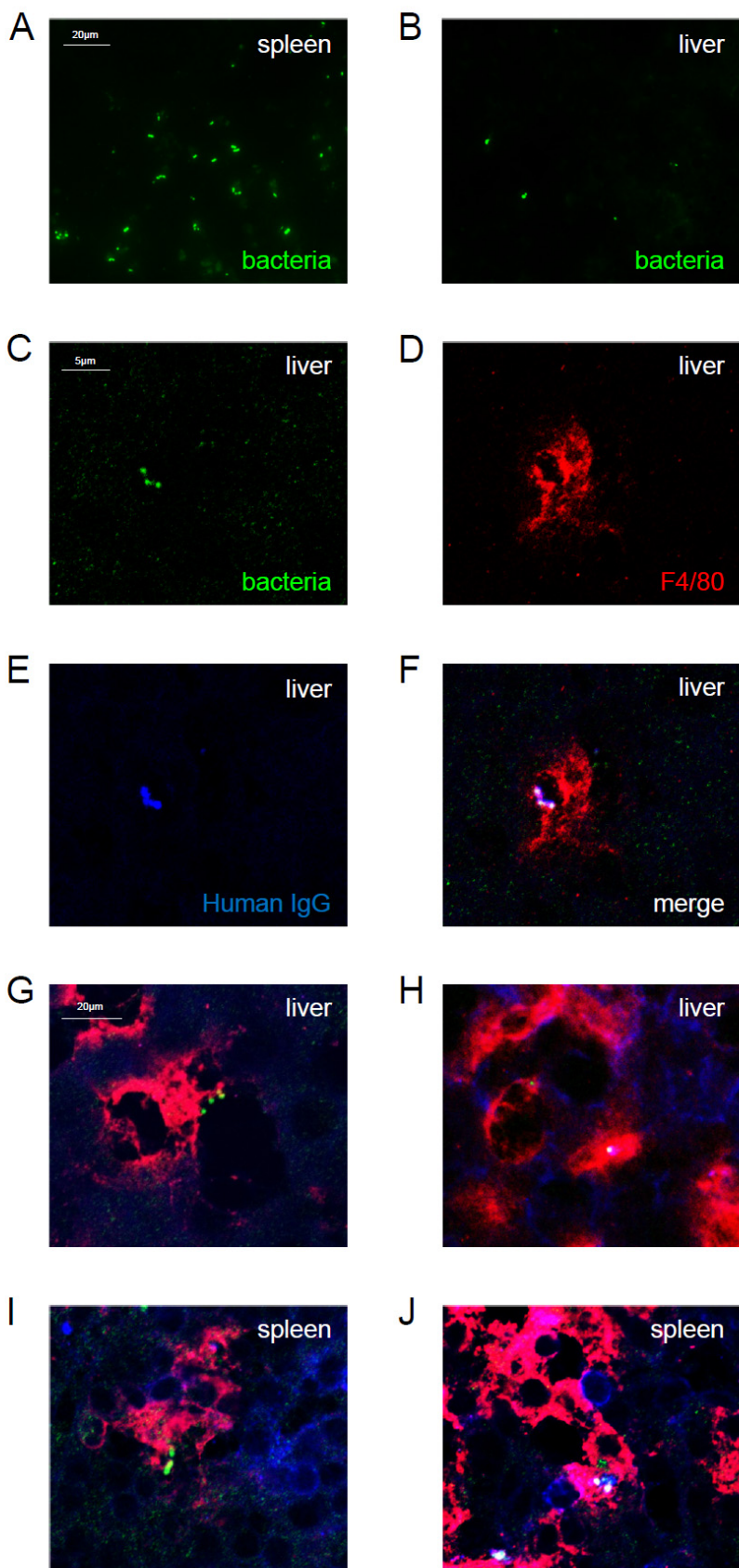


Figure 8 共焦点顕微鏡により、食食と投与された特異抗体の肺炎球菌への結合を可視化した

免疫蛍光染色、×1000 倍拡大。各臓器は FITC ベースの CFSE（緑）で標識された肺炎球菌の感染 1 時間後に摘出された。

A, B. CFSE 標識された細菌は control マウスの脾臓において多く検出され、肝臓よりも多かった。

C, D, E, F. マクロファージ及び投与されたヒト IgG に対する二重染色。マクロファージ/Kupffer 細胞は抗 F4/80 抗体により染色(赤) (D)。投与されたヒト IgG は抗ヒト IgG 抗体で染色(青) (E)。FITC 標識された細菌(緑)がヒト IgG と結合して食食されたものが検出される(白) (F)。

G. 無治療 SPX の肝臓。ヒト IgG は観察されず検出されている細菌は F4/80 と overlap(赤)しておらず、この細菌は食食下でないことを示している。

H. IVIG 治療 SPX の肝臓。細菌がヒト IgG 結合とともに食食されている(白)。

I. IVIG_{dep.}治療 control マウスの脾臓。ヒト IgG が非特異的に検出され、菌と一致していない。

J. IVIG 治療 control マウスの脾臓。細菌がヒト IgG 特異抗体と結合して食食されている(白)。ヒト IgG はマクロファージの一部にも重なって分布している。

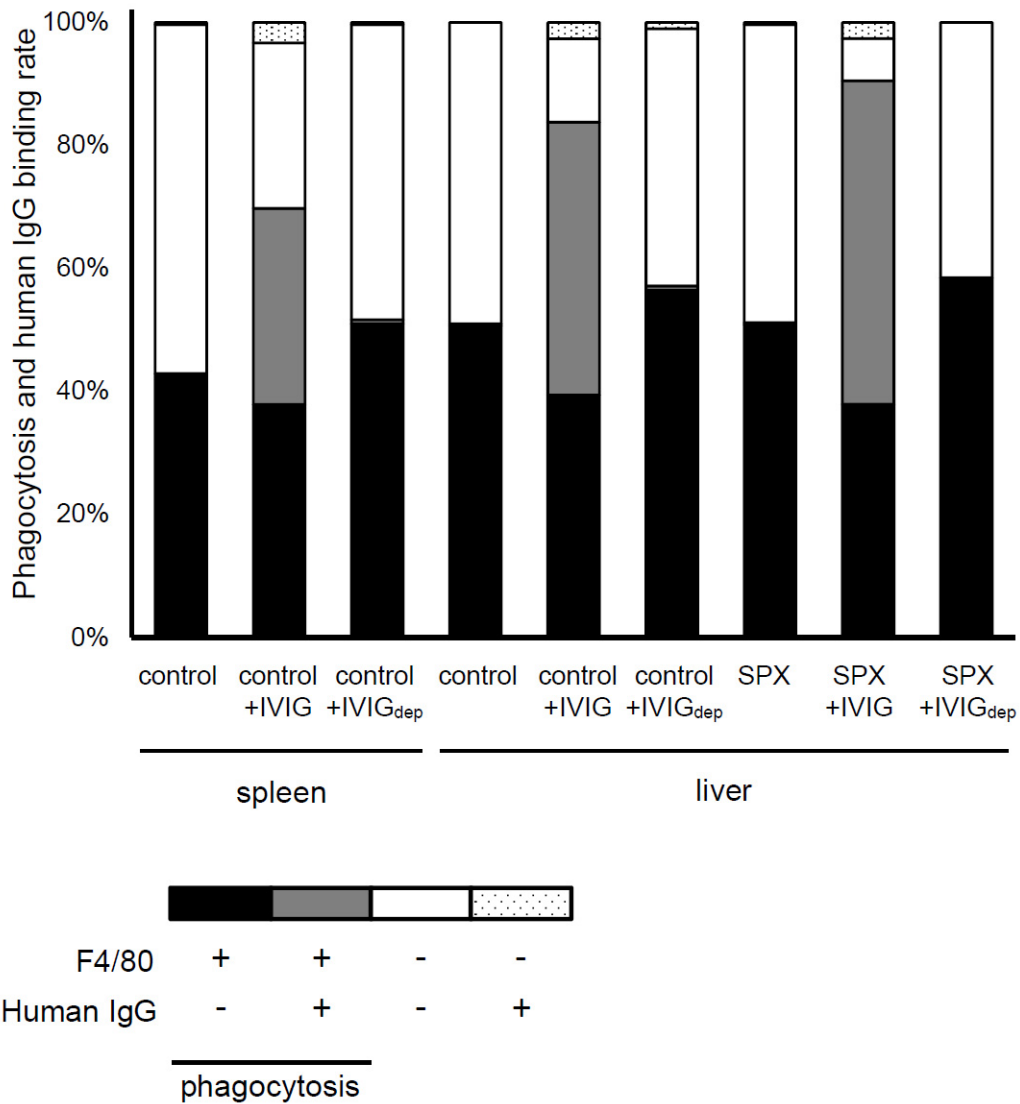


Figure 9 IVIG は特に肝臓において特異抗体を介して貪食を増加させた

免疫蛍光染色における貪食及び特異抗体結合率。各群 3 スライドで 100 個の CFSE 陽性細菌にて貪食と特異抗体結合の有無をカウントし、その平均を表した。総貪食率（黒と灰色の和）は IVIG 治療によって著明に増加しており、その増加は特異抗体結合（灰）によってもたらされている。

References

1. Styrts B: Infection associated with asplenia: risks, mechanisms, and prevention. *Am J Med* 1990; 88(5N):33N-42N
2. Holdsworth RJ, Irving AD, Cuschieri A: Postsplenectomy sepsis and its mortality rate: actual versus perceived risks. *Br J Surg* 1991; 78(9):1031-1038
3. Altamura M, Caradonna L, Amati L, et al: Splenectomy and sepsis: the role of the spleen in the immune-mediated bacterial clearance. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2001; 23(2):153-161
4. Zandvoort A, Timens W: The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. *Clin Exp Immunol* 2002; 130(1):4-11
5. Haas KM, Poe JC, Steeber DA, et al: B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 2005; 23(1):7-18
6. Weill JC, Weller S, Reynaud CA: Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:267-285
7. Weller S, Braun MC, Tan BK, et al: Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 2004; 104(12):3647-3654
8. Wardemann H, Boehm T, Dear N, et al: B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. *J Exp Med* 2002; 195(6):771-780
9. Offenbartl K, Christensen P, Gullstrand P, et al: Treatment of pneumococcal postsplenectomy sepsis in the rat with human gamma-globulin. *J Surg Res* 1986; 40(3):198-201
10. Camel JE, Kim KS, Tchejyan GH, et al: Efficacy of passive immunotherapy in experimental postsplenectomy sepsis due to *Haemophilus influenzae* type B. *J Pediatr Surg* 1993; 28(11):1441-1444; discussion 1444-1445
11. Mikolajczyk MG, Concepcion NF, Wang T, et al: Characterization of antibodies to capsular polysaccharide antigens of *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae* in human immune globulin intravenous preparations. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11(6):1158-1164
12. Darville T, Milligan LB, Laffoon KK: Intravenous immunoglobulin inhibits staphylococcal toxin-induced human mononuclear phagocyte tumor necrosis factor alpha production. *Infect Immun* 1997; 65(2):366-372

13. Yanagisawa C, Hanaki H, Natae T, et al: Neutralization of staphylococcal exotoxins in vitro by human-origin intravenous immunoglobulin. *J Infect Chemother* 2007; 13(6):368-372
14. Aukrust P, Müller F, Svenson M, et al: Administration of intravenous immunoglobulin (IVIg) in vivo down-regulatory effects on the IL-1 system. *Clin Exp Immunol* 1999; 115(1):136-143
15. Smith KG, Clatworthy MR: FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(5):328-343
16. Shankar-Hari M, Spencer J, Sewell WA, et al: Bench-to-bedside review: Immunoglobulin therapy for sepsis - biological plausibility from a critical care perspective. *Crit Care* 2012; 16(2):206
17. Vander Top EA, Perry GA, Gentry-Nielsen MJ: A novel flow cytometric assay for measurement of in vivo pulmonary neutrophil phagocytosis. *BMC Microbiol* 2006; 6:61
18. White KS, Covington D, Churchill P, et al: Patient awareness of health precautions after splenectomy. *Am J Infect Control* 1991; 19(1):36-41
19. Davies JM, Lewis MP, Wimperis J, et al: Review of guidelines for the prevention and treatment of infection in patients with an absent or dysfunctional spleen: prepared on behalf of the British Committee for Standards in Haematology by a working party of the Haemato-Oncology task force. *Br J Haematol* 2011; 155(3):308-317
20. Chu DZ, Nishioka K, el-Hagin T, et al: Effects of tuftsin on postsplenectomy sepsis. *Surgery* 1985; 97(6):701-706
21. Kubo S, Rodriguez T, Roh MS, et al: Stimulation of phagocytic activity of murine Kupffer cells by tuftsin. *Hepatology* 1994; 19(4):1044-1049
22. Mufson MA, Hao JB, Stanek RJ, et al: Clinical features of patients with recurrent invasive *Streptococcus pneumoniae* disease. *Am J Med Sci* 2012; 343(4):303-309
23. Pickering JW, Hoopes JD, Groll MC, et al: A 22-plex chemiluminescent microarray for pneumococcal antibodies. *Am J Clin Pathol* 2007; 128(1):23-31
24. Elberse KE, Tcherniaeva I, Berbers GA, et al: Optimization and application of a multiplex bead-based assay to quantify serotype-specific IgG against *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides: response to the booster vaccine after immunization with the pneumococcal 7-valent conjugate vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17(4):674-682
25. Huang ZY, Hunter S, Kim MK, et al: The effect of phosphatases SHP-1 and SHIP-1 on signaling by the ITIM- and ITAM-containing Fcγ receptors

- FcγRIIB and FcγRIIA. *J Leukoc Biol* 2003; 73(6):823-829
26. Blank U, Launay P, Benhamou M, et al: Inhibitory ITAMs as novel regulators of immunity. *Immunol Rev* 2009; 232(1):59-71
 27. Rhoades CJ, Williams MA, Kelsey SM, et al: Monocyte-macrophage system as targets for immunomodulation by intravenous immunoglobulin. *Blood Rev* 2000; 14(1):14-30
 28. Abe J, Jibiki T, Noma S, et al: Gene expression profiling of the effect of high-dose intravenous Ig in patients with Kawasaki disease. *J Immunol* 2005; 174(9):5837-5845
 29. Bruhns P, Samuelsson A, Pollard JW, et al: Colony-stimulating factor-1-dependent macrophages are responsible for IVIG protection in antibody-induced autoimmune disease. *Immunity* 2003; 18(4):573-581
 30. Nimmerjahn F, Ravetch JV: Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annu Rev Immunol* 2008; 26:513-533
 31. Tha-In T, Bayry J, Metselaar HJ, et al: Modulation of the cellular immune system by intravenous immunoglobulin. *Trends Immunol* 2008; 29(12):608-615
 32. Kotb M: Bacterial pyrogenic exotoxins as superantigens. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(3):411-426
 33. Norrby-Teglund A, Kotb M: Host-microbe interactions in the pathogenesis of invasive group A streptococcal infections. *J Med Microbiol* 2000; 49(10):849-852
 34. Darenberg J, Ihendyane N, Sjölin J, et al: Intravenous immunoglobulin G therapy in streptococcal toxic shock syndrome: a European randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis* 2003; 37(3):333-340
 35. Mosser DM, Edwards JP: Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(12):958-969
 36. Robinson CM, O'Dee D, Hamilton T, et al: Cytokines involved in interferon-gamma production by human macrophages. *J Innate Immun* 2010; 2(1):56-65
 37. Park-Min KH, Serbina NV, Yang W, et al: FcγRIII-dependent inhibition of interferon-gamma responses mediates suppressive effects of intravenous immune globulin. *Immunity* 2007; 26(1):67-78
 38. Kazatchkine MD, Kaveri SV: Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med* 2001; 345(10):747-755
 39. Toyoda M, Pao A, Petrosian A, et al: Pooled human gamma globulin modulates surface molecule expression and induces apoptosis in human B cells. *Am J Transplant* 2003; 3(2):156-166
 40. de Grandmont MJ, Racine C, Roy A, et al: Intravenous immunoglobulins

induce the in vitro differentiation of human B lymphocytes and the secretion of IgG. *Blood* 2003; 101(8):3065-3073

41. Bayry J, Fournier EM, Maddur MS, et al: Intravenous immunoglobulin induces proliferation and immunoglobulin synthesis from B cells of patients with common variable immunodeficiency: a mechanism underlying the beneficial effect of IVIg in primary immunodeficiencies. *J Autoimmun* 2011; 36(1):9-15

42. Lee JC, Park JS, Shepherd SE, et al: Protective efficacy of antibodies to the *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide in a modified model of endocarditis in rats. *Infect Immun* 1997; 65(10):4146-4151

43. Rupp ME, Holley HP, Lutz J, et al: Phase II, randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of a polyclonal anti-*Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide immune globulin in treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(12):4249-4254

44. Olliver, M., Hiew, J., Mellroth, P., Henriques-Normark, B., and Bergman, P. (2011). Human monocytes promote Th1 and Th17 responses to *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 79, 4210-4217.

45. Kuranaga, N., Kinoshita, M., Kawabata, T., Habu, Y., Shinomiya, N., and Seki, S. (2006). Interleukin-18 protects splenectomized mice from lethal *Streptococcus pneumoniae* sepsis independent of interferon-gamma by inducing IgM production. *J Infect Dis* 194, 993-1002.

46. Abe, J., Jibiki, T., Noma, S., Nakajima, T., Saito, H., and Terai, M. (2005). Gene expression profiling of the effect of high-dose intravenous Ig in patients with Kawasaki disease. *J Immunol* 174, 5837-5845.

47. Rhoades, C.J., Williams, M.A., Kelsey, S.M., and Newland, A.C. (2000). Monocyte-macrophage system as targets for immunomodulation by intravenous immunoglobulin. *Blood Rev* 14, 14-30.

48. Smith, K.G., and Clatworthy, M.R. (2010). FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nat Rev Immunol* 10, 328-343.