

博士論文

論文題目

敗血症に引き続く緑膿菌肺炎のマウスモデルに対する
インターフェロン β の治療的効果とそのメカニズム

氏名 比留間 孝広

目次

第1章 略語 p1

第2章 要旨 p4

第3章 序文 p5

第4章 目的 p19

第5章 方法 p20

第6章 結果 p37

第7章 考察 p55

第8章 結論 p64

参考文献 p65

謝辞

第1章 略語

AMP : adenosine monophosphate

ARDS : acute respiratory distress syndrome

BAL : bronchoalveolar lavage

BALF : bronchoalveolar lavage fluid

CARS : compensatory anti-inflammatory response syndrome

CD3 : cluster of differentiation 3

CD28 : cluster of differentiation 28

CD73 : cluster of differentiation 73

CD119 : cluster of differentiation 119

CFU : colony forming unit

CLP : cecal ligation and puncture

DAMPs : damage associated molecular pattern molecules

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA : enzyme linked immunosorbent assay

FACS : fluorescence activated cell sorting

HE : hematoxylin and eosin stain

IFN : interferon

IFN β : interferon β

IFN γ : interferon γ

IFN γ R : interferon γ receptor

IL-1 β : interleukin-1 β

IL-1RA : interleukin-1 receptor antagonist

IL-6 : interleukin-6

IL-8 : interleukin-8

IL-10 : interleukin-10

JAK : janus activated kinase

KC : keratinocyte derived chemokine

LIS : lung injury score

LPS : lipopolysaccharide

MARS : mixed antagonistic response syndrome

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1

MFI : mean fluorescent intensity

MPO : myeloperoxidase

MRSA : methicillin resistant staphylococcus aureus

MSSA : methicillin sensitive staphylococcus aureus

NF- κ B : nuclear factor-kappa B

NS : normal saline

NSIT : normal saline intratracheal instillation

PAIT : *pseudomonas aeruginosa* intratracheal instillation

PAMPs : pathogen associated molecular patterns

PBS : phosphate buffered saline

PEEP : positive end expiratory pressure

PRRs : pattern recognition receptors

RPMI : roswell park memorial institute medium

SIRS : systemic inflammatory response syndrome

SSCG : surviving sepsis campaign guideline

STAT : signal transducer and activator of transcription

TLR : toll like receptor

TNF α : tumor necrosis factor α

2H : two hit group

2H,IFN : two hit group treated with interferon β

2H,NS : two hit group treated with normal saline

第2章 要旨

免疫抑制による二次感染への脆弱化は重症化に関与する。本研究では臨床的二次感染を想定した、回盲部結紮穿孔後に緑膿菌肺炎を起こす2ヒットマウスモデルを作成し、その重症化メカニズムを検討した。2ヒットモデルは、肺炎単独よりも著明に生存率が低下した。腹膜炎を惹起することで、その後の肺炎に対するマクロファージ機能や炎症反応が抑制されており、肺炎の重症化に免疫抑制機構が影響していることが示唆された。急性呼吸窮迫症候群への治療適応が注目されているインターフェロン β を投与すると、生存率が改善すると共に肺内の炎症反応とマクロファージ機能が復活し、免疫賦活効果が生存率改善に寄与している可能性が示唆された。

第3章 序文

・敗血症

2004年敗血症診療のガイドラインとして、Surviving Sepsis Campaign Guideline (SSCG)¹が発表された。これは単なる感染症治療の記述にとどまらず、敗血症における初期蘇生方針に加え、循環管理、人工呼吸管理、鎮静法、その他様々な支持療法を含めた実践的なガイドラインであった。これに基づいた4年間の新たな知見を踏まえて2008年にSSCG2008が発表され、集中治療学における多くのevidenceが集約され、敗血症診療はさらに成熟した²。これらのガイドラインでは敗血症とは「systemic inflammatory response syndrome (SIRS) を伴う感染症」と定義され、我が国でもよく混同されがちな、血液中より感染病原菌が同定されることを意味する菌血症とは区別され、より早期の治療介入が求められた。SIRS³とは感染、外傷、熱傷、術後など様々な重篤な侵襲が加わった際に、全身に広がる炎症により引き起こされる病態をいい、①体温38℃以上または35℃以下、②脈拍90回/分以上、③呼吸数20回/分以上またはPaCO₂32mmHg以下、④白血球数12000/ml以上または4000/ml以下、のいずれか2項目をみたした状態と定義された。

2012年にはさらなる改定が行われ、SSCG2012⁴が発表され現在に至る。ここではSIRSがあまりに幅広く炎症状態を拾い上げることや、SIRSが炎症反応のみに焦点をあてたものであり、実際は過剰な抗炎症状態 (compensatory anti-inflammatory response syndrome; CARS)^{5,6}も大きく影響していることから、敗血症の定義が「全身症状を伴

う感染症あるいはその疑い」と変更になっている。また欧米人を対象とした臨床試験に基づいたエビデンスをもとにしたガイドラインをそのまま日本人に使用してよいのかとの疑問から、日本からも日本版敗血症診療ガイドライン⁷が日本集中治療医学会より公表された。日本独自の支持療法等の記載が追加されているものの、大筋はSSCG2012と類似している。このようなガイドラインの整備、集中治療の発展に伴い、敗血症死亡は以前よりは減少しているとの報告^{8,9}もあるが、敗血症は現在においてもいまだ急性期死亡の主要な原因である。Stevensonらは敗血症治療の14418例を対象としたメタ解析で、1993年から2009年の死亡率の推移を報告している。1991年から1995年の期間で46.9%だった28日死亡率は、2006年～2009年では29.2%には減少していたが、いまだその死亡率は高い¹⁰。また敗血症のガイドラインの普及に伴い、軽症敗血症を早期から多く診断するようになり、それによりみかけの死亡率が低下しているのではという議論もある¹¹。

SSCG2012⁴の中で敗血症治療として輸液や昇圧剤の使用、強心薬やステロイド製剤の使用、その他補助的治療の重要性について述べられているが、敗血症の根幹治療である感染源のコントロールと迅速な抗菌薬の投与は極めて重要な位置づけである。ガイドラインでは1時間以内の抗菌薬の開始が推奨されている。2731例の敗血症性ショックを対象に、適切に抗菌薬が投与された2154例の抗菌薬投与の投与時期と死亡率の関係を検討した結果、1時間以内に適切に抗菌薬治療が開始された場合の救命率は79.9%であるのに対して、投与が1時間遅れるごとに救命率が7.6%低下し、死亡のオッ

ズ比は1.12倍へ有意に増加した ($p < 0.01$)¹²。

敗血症において抗菌薬とともに極めて重要な論点としては、病原体感染によって生体内で起こる炎症と抗炎症の反応である。生体の自然免疫反応は最も重要な生体反応のひとつである。自然免疫システムは、感知センサーであるパターン認識受容体

(pattern recognition receptors; PRRs)¹³が、病原体に共通する病原体関連分子パターン (pathogen associated molecular patterns; PAMPs)¹⁴と呼ばれるシグナルを認識することで発動される。またこの PRRs の一部が、傷害された細胞・組織から放出される傷害関連分子パターン (damage associated molecular pattern molecules; DAMPs) も認識して炎症反応が惹起されることが明らかになった¹⁴。敗血症の炎症惹起のメカニズムは、感染や組織傷害により発生した PAMPs や DAMPs が、Toll like receptor (TLR) などの PRRs によって認識され、転写因子 NF- κ B などの活性化を介して、炎症反応が惹起される。その結果 TNF α 、IL-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカインや MCP-1 や IL-8 などのケモカインが誘導され、前述の SIRS の状態に至る。またすでに炎症状態が減弱している患者や敗血症後期では、抗炎症性サイトカインである IL-10、IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1RA) の増加によって特徴づけられる CARS の状態も併存することとなる。

以前は敗血症早期は SIRS の状態であり、後期に CARS の状態に至るという考えが主流であったが、最近の見解ではより早期から SIRS と CARS が併存している状況にあるとの報告があり、その混在状態は mixed antagonistic response syndrome (MARS) などと呼ばれることもある¹⁵。これら炎症と抗炎症、SIRS と CARS のバランスは重

要である。サイトカインストームともいわれる過剰炎症状態は、免疫細胞の過剰な活性化、播種性血管内凝固症候群、血管拡張や血管透過性の亢進などから、組織傷害を引き起こし、多臓器不全に至り、高い死亡率の原因の一つと考えられている。しかし炎症性サイトカインを抑制する臨床試験では、必ずしも死亡率の改善には繋がっていないのが現状である¹⁶。逆に過剰な抗炎症状態では免疫抑制状態 immunosuppression に陥り、二次感染へと進展し、敗血症が重症化する。敗血症をはじめとした重症患者においては、炎症と抗炎症のバランスが重要であると考えられている（図1）^{17,18}。

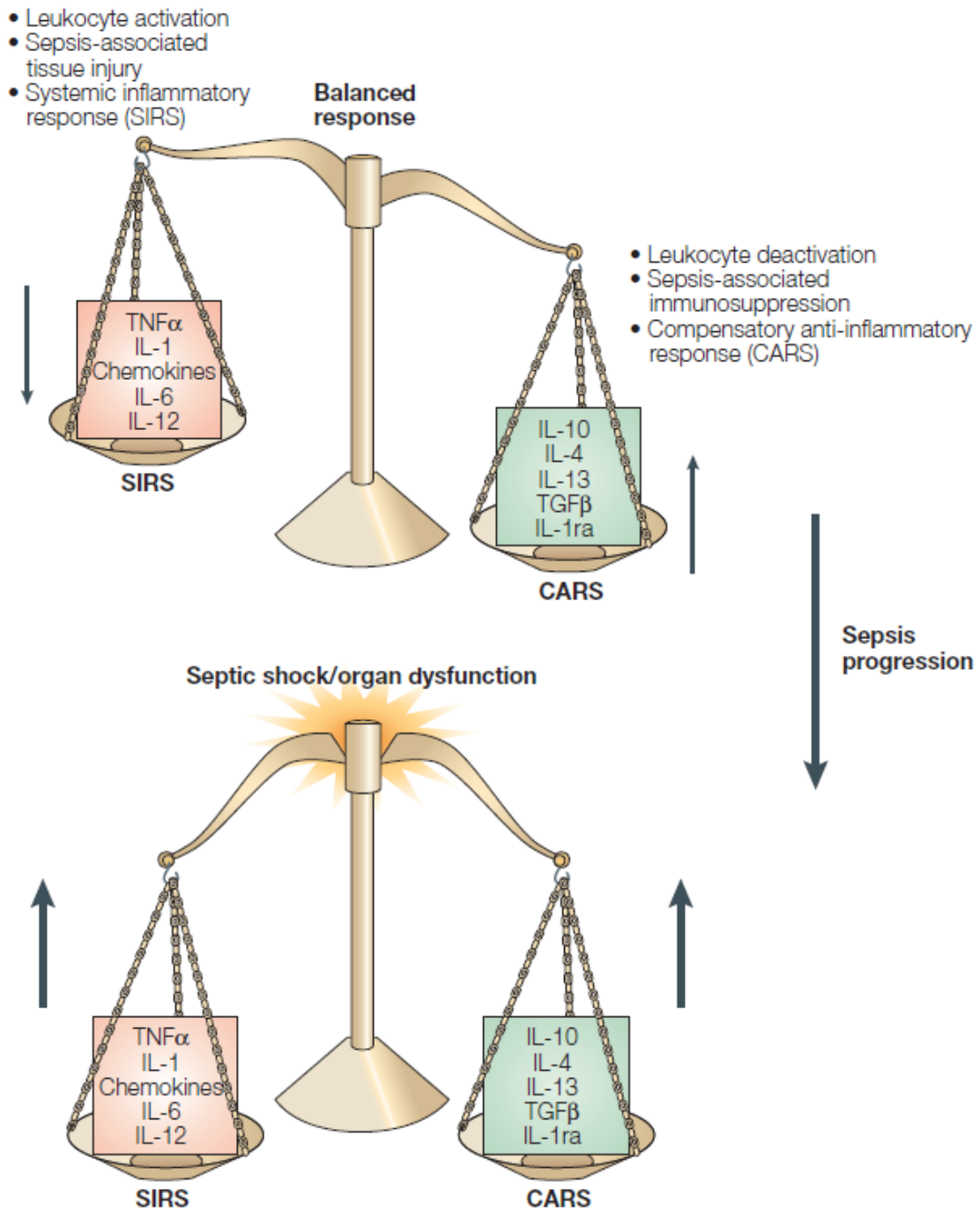


図 1 敗血症における炎症

過剰な炎症は多臓器障害、死亡の原因となり、過剰な抗炎症は免疫抑制を引き起こす。重症患者では炎症と抗炎症のバランスが極めて重要である。

M. F. Osuchowski *et al.*, *J. Immunol.* 177, 1967–1974 (2006).

・ Two hit theory

敗血症による過剰な炎症状態を乗り越えた患者も、その後に過剰な抗炎症状態から生じた immunosuppression から、肺炎、尿路感染症、カテーテル感染症などを代表とした院内感染症を発症することで、さらに救命は困難になる。集中治療室の感染症発生率の結果では呼吸器感染症が 63.5%、腹部感染症が 19.6%、腎泌尿器感染症が 14.3% と呼吸器感染症が最も敗血症の原因として多い⁹。集中治療室の滞在日数の増加に伴ってこれらの感染症はより発生しやすくなるが、長期化するとカテーテル感染症の頻度が上昇することも報告されている¹⁹。消化管穿孔、術後、外傷など、それだけでは軽症であったはずの患者が、こういった呼吸器感染症やカテーテル感染症、菌血症などを合併することにより、重症敗血症、多臓器不全で致命的病態にいたるといった状況が臨床においては実によく発生している（図 2）。免疫機能低下による二次感染への脆弱化が、その重症化に関わっていることが報告されており、Hotchkiss らはそのような機序を two hit theory と呼んでいる^{20,21}。そのような two hit theory に基づいた、様々な two hit mouse model が作成されている。Hotchkiss らは回盲部結紮穿孔刺（cecal ligation and puncture; CLP）による腹膜炎後の緑膿菌肺炎を引き起こす two hit model を検討しており、CLP4 日後に肺炎を起こすと生存率は 40% と著明に低下し、CLP7 日後に肺炎を起こすと生存率は 85% まで上昇し、免疫機能も 4 日後には著明に低下していたが、7 日後には回復していたとの報告がなされている²¹。

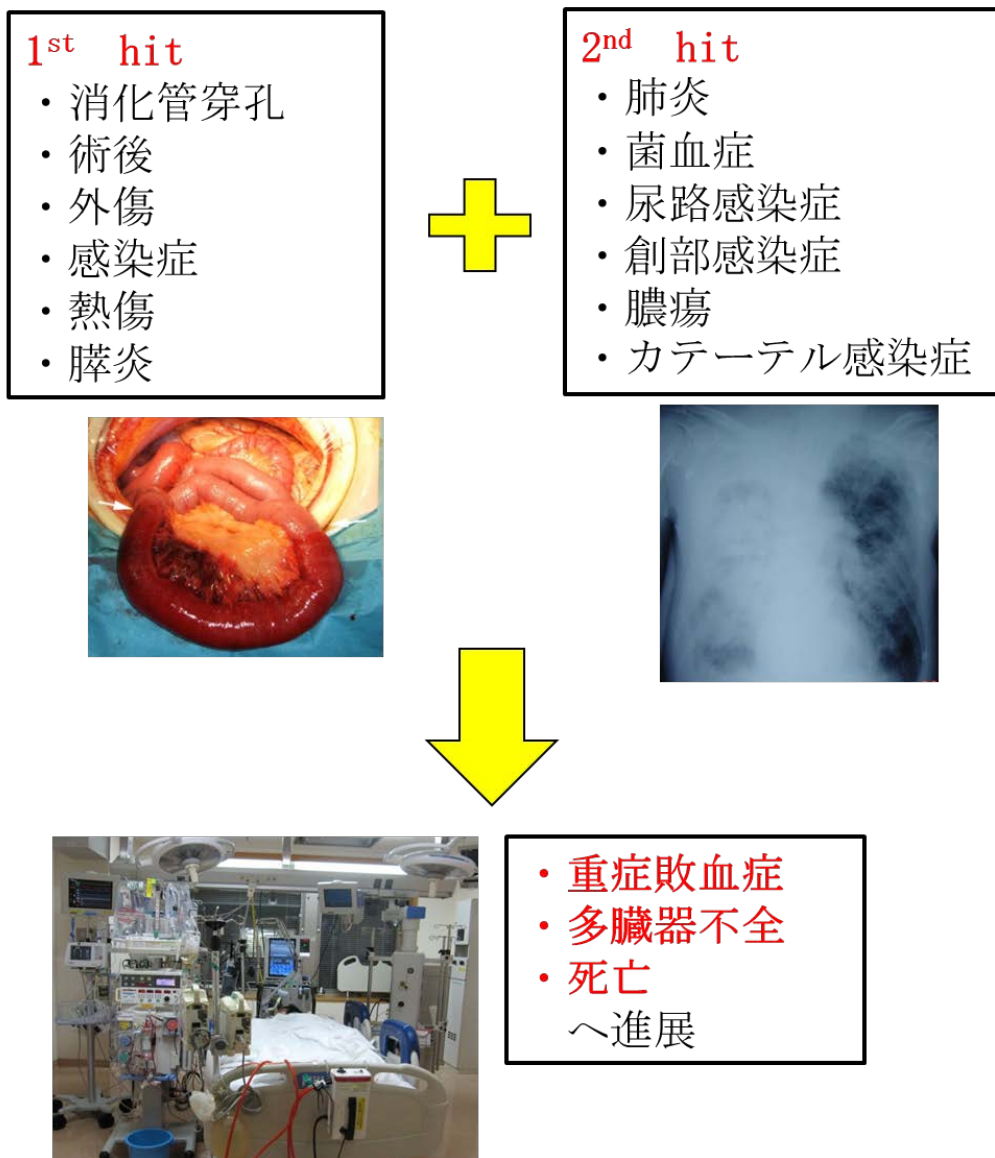


図2 Two hit theory

免疫機能低下による二次感染への脆弱化が重症化に関与している。

J. T. Muenzer *et al.*, *Infect. Immun.* 78, 1582–92 (2010).

そのような **two hit mouse model** に対して、様々な治療介入を施行した報告がなされている。サイトカインへの介入としては、肺内に **TNF** 遺伝子導入することで、肺内 **TNF** 産生が増加し生存率が改善したり²²、抗炎症性サイトカインである **IL-10** をブロックすることで生存率が改善するという報告がなされている²³。また前述した **PRRs** である **TLR** への介入としては、抗ウイルス経路で **focus** があてられている **TLR3 agonist** の使用により **two hit model** の生存率が上昇したり²⁴、**TLR2** 欠損マウスでは生存率が上昇するなどの報告がある²⁵。

本検討ではこれら過去の報告を踏まえて、腹膜炎による敗血症に引き続く、緑膿菌肺炎による **two hit model** を作成し、この重症化のプロセスを詳細に検討した。過去に報告されているデータも含め、さらにサイトカインの経時的な変化などのメカニズム解析を施行した。またこのような **two hit model** に対して、治療介入を試み、それによる生存率への影響やそのメカニズムの解析を試みた。

・インターフェロンβ (IFNβ)

今回作成したtwo hit modelを用いて、使用した薬剤はインターフェロンβ (IFNβ) である。IFNβはリンパ球、マクロファージ、線維芽細胞、骨芽細胞などで産生され、抗ウイルス効果、腫瘍増殖抑制作用があるといわれており、臨床的には現在多発性硬化症の治療に使用されている薬剤である。またマウスにおいて腸管虚血再灌流モデルでは著明な肺傷害が生じることが知られているが²⁶、Kissらが腸管虚血再灌流モデルで生じる肺傷害に対して、IFNβの投与が血管透過性の増加を予防し、肺傷害を軽減したとの報告している²⁷。CD73欠損マウスではこの効果は消失しており、CD73を介したIFNβの影響が示唆されている²⁷。

肺の血管透過性の亢進により非心原性肺水腫を引き起こす病態に急性呼吸促迫症候群 (acute respiratory distress syndrome; ARDS) がある。ARDSの発症機序は、高度の炎症に伴い肺内に集積した好中球から放出される活性酸素や蛋白分解酵素などにより、肺胞隔壁 (血管内皮・肺胞上皮) の透過性が亢進することで生じる非心原性肺水腫である²⁸。ARDSの発症原因となる病態は、直接損傷と間接損傷の2つに大別される^{29,30}。直接損傷のなかで重要なものは重症肺炎と狭義の誤嚥性肺炎である。一方、間接損傷として重要なものは敗血症であり、全体の約40%を占めており、ARDSの原因としてもっとも頻度が高く³¹、敗血症診療を進めるうえでARDSを念頭に置き診療を進めることは不可欠である。2012年にThe ARDS Definition Task Forceで新たな診断基準が提唱され³²、発表された地にちなんでベルリン定義 (The Berlin Definition) と

呼ばれている（表1）。①急性発症（1週間以内）、②肺の酸素化傷害、③胸部X線で両側性浸潤影、④左心不全徴候なし、などから成り立っているが、②に関してはPEEPの存在下で、 $\text{PaO}_2/\text{F}_1\text{O}_2$ （動脈血酸素分圧/ 吸気酸素分画）の値が201～300 mmHgであればmild ARDS、 $\text{PaO}_2/\text{F}_1\text{O}_2$ 値が101～200 mmHgであればmoderate ARDS、 $\text{PaO}_2/\text{F}_1\text{O}_2$ 値が100 mmHg以下であればsevere ARDSと重症度分類されている。さまざまな多施設コホート研究の報告によると、ARDSの死亡率は40～60%と高率であり、重篤な病態であるといえる³²。そのような重篤な病態に対して、NO吸入療法³³、ステロイド³⁴、タンパク分解酵素阻害薬³⁵、N acetylcysteine³⁶、サーファクタント補充療法³⁷など様々な薬剤の使用が試みられたが、ことごとく失敗におわり、今のところ薬剤投与に関してはevidenceの高いものは存在していないのが現状である。

表1 ARDS診断基準（The Berlin Definition）

	Mild	Moderate	Severe
経過	急性発症（1週間以内）		
胸部X線所見	両側性浸潤影		
左心不全症状	なし		
酸素化能 $\text{PaO}_2/\text{F}_1\text{O}_2$	PEEP \geq 5cmH ₂ O で201-300 mmHg	PEEP \geq 5cmH ₂ O で101-200 mmHg	PEEP \geq 10cmH ₂ O で100mmHg以下
死亡率	27%	32%	45%
人工呼吸器装着 日数（中央値）	5日	7日	9日

（文献32より引用改変）

そのような状況の中、近年 Bellingan らにより ARDS 患者において IFN β を投与することで生存率の改善を認めたとの報告がなされた³⁸。ARDS 患者に対して IFN β (IFN β -1a) 10 μ g/日を 6 日間投与することで、非投与群での死亡率 32%が、治療群では 8%まで改善した (Odds 比 0.19, 95% CI 0.03-0.72, p=0.01) (図 3)³⁸。機序としては IFN β が前述した CD73 という接着分子の発現を誘導し、それが AMP (adenosine monophosphate)、アデノシンを増幅させることで、血管透過性の亢進を抑制させたのではと考察されている。今後の ARDS の治療薬として期待されている薬剤である。

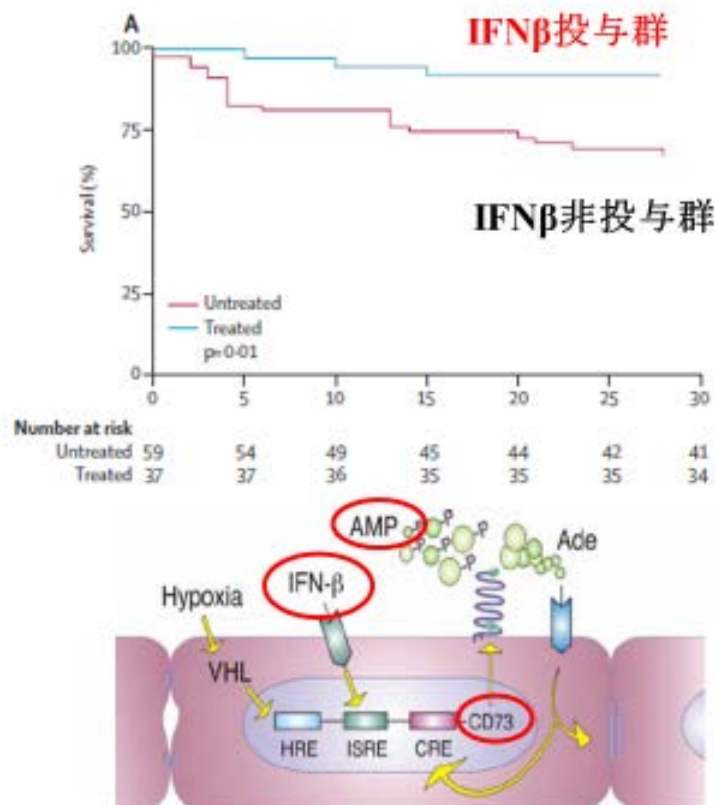


図 3 ARDS 患者における IFN β の効果

ARDS 患者で IFN β 投与群の 28 日死亡率が非投与群より低いことが示された。IFN β が CD73、AMP、アデノシンを増幅させ、肺の血管透過性の亢進を抑制させると考えられている。

G. Bellingan *et al.*, *Lancet. Respir. Med.* 2, 98–107 (2014).

IFN β は多発性硬化症ではマクロファージの機能を抑制することが知られているため、細菌のクリアランスの観点からは生体防御に有利かどうかは不明である。しかし谷口らの報告では、IFN β が非存在下での刺激には弱い反応しか起きないが、IFN β 存在下での刺激ではより強い反応がおき、このような IFN β の微量産生モデルを Revving-up モデルと呼んでおり、この考えは非常に興味深い (図 4)³⁹。Revving-up とは車やバイクでエンジンをふかすことを意味し、IFN β が存在することで刺激が来た際に速やかに反応が起こるのではといった理論である。

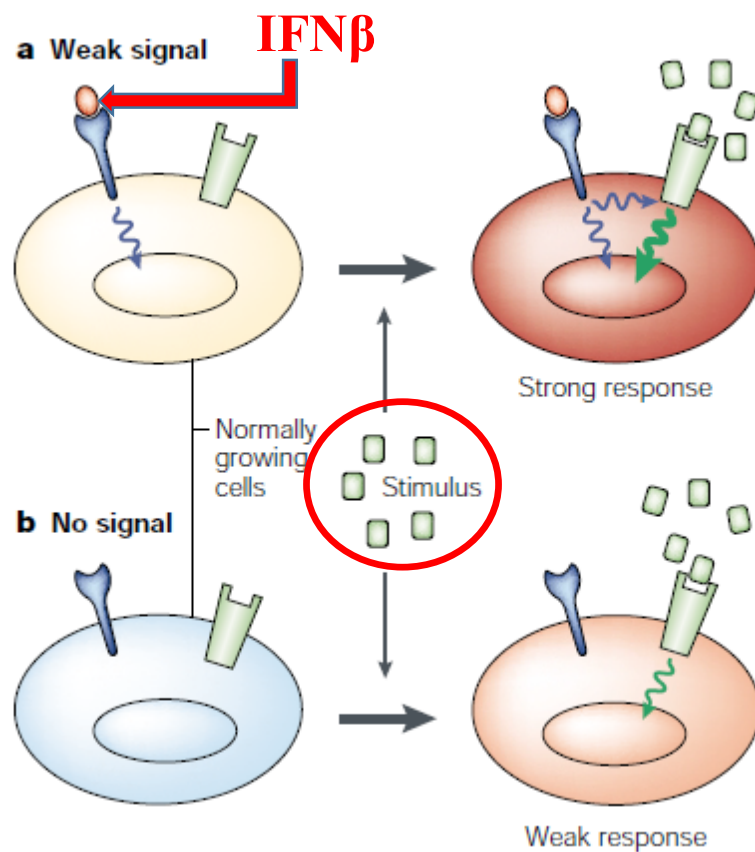


図 4 Revving-up model

IFN β 非存在下での刺激では弱い反応しか起きないが、IFN β 存在下での刺激ではより強い反応がおき、このような作用は Revving-up model と呼ばれている。

T. Taniguchi et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 378–86 (2001).

またインターフェロン（IFN）は IFN α/β は type 1、IFN γ は type2、IFN λ は type3 などと呼ばれ、それぞれ別の受容体、シグナル伝達を介してシグナルが伝達されるが、それぞれはインターアクションがあると報告されており、これらの影響により IFN β が炎症制御に関与しているとも考えられる（図 5）⁴⁰。ARDS における血管透過性への制御という側面は非常に興味深いが、本検討では IFN β がこのような炎症制御に関与しているのではないかという仮説に基づき、two hit model において検討した。

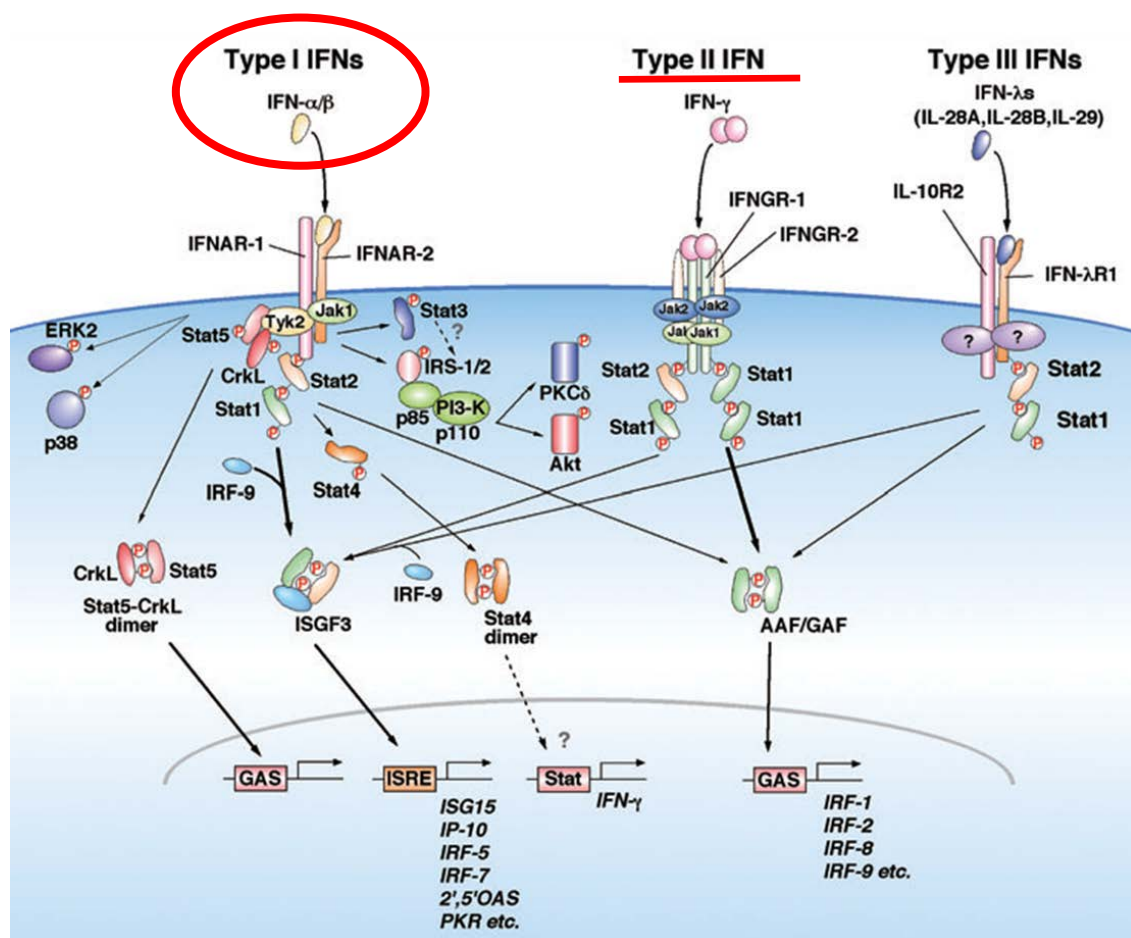


図 5 インターフェロンのシグナル伝達

各インターフェロンはそれぞれ別の受容体、シグナル伝達を介するが、それぞれは相互作用があると報告されている。

A. Takaoka et al., *Cell. Microbiol.* 8, 907–22 (2006).

本検討では上記のような背景を踏まえて、二次感染モデルとして、two hit model を作成し、どのような機序がその重症化に関わっているのかを検討した。またそのような重症化のプロセスに、IFN β を投与することによる生存率への影響、及びそのメカニズムの解析として生体防御能への影響を評価した。重症化のメカニズムが判明し、またそこに治療介入が可能であれば、実臨床にとっても非常に有意義なものになる研究と考えている。

第4章 目的

1. 腹腔内、肺内へ感染を起こす two hit model を作成し、その免疫機能の変化を検討する。
2. Two hit model における IFN β の治療的効果を検討する。
3. IFN β 投与における免疫機能の変化を解析し、IFN β の治療メカニズムを明らかにする。

第5章 方法

動物

8-10 週齢で体重 20-25g の C57/BL6 雄のマウスを使用した。マウスの飼育環境は 12 時間ごとの明/暗室のサイクルで、水分や食事は自由に摂取できる環境とした。動物実験は、東京大学医学部・大学院医学系研究科の倫理審査許可を得ており（倫理委員会承認番号：医 - P12-146）、動物実験に関する倫理規定に準拠して行われた。

実験 1 二次感染モデル(two hit model)の作成と、その免疫機能の検討

実験 1-1 Two hit model の生存率への影響

腹膜炎単独、肺炎単独ではそれぞれ軽症であるが、腹膜炎に two hit として肺炎が起ることにより重症化するという two hit model を作成した。First hit として回盲部結紮穿孔（cecal ligation and puncture; CLP）により腹膜炎モデルを作成した。Second hit としては二次感染症を想定し、緑膿菌による肺炎モデルを作成した（*Pseudomonas aeruginosa* intratracheal instillation; PAIT）。過去の報告を踏まえて、CLP を施行した 4 日後に肺炎を引き起こした^{21,24,41}。詳細を図 6 に示す。生存解析は以下の 5 群で比較した。①CLP 後に PAIT を施行した two hit 群（2H 群）、②CLP のコントロールとして sham 手術後に PAIT 施行した sham 群、③PAIT のコントロールとして CLP 後に生理食塩水を投与（normal saline intratracheal instillation; NSIT）した NSIT 群、single hit 群として④CLP のみを施行した CLP 単独群、⑤PAIT のみを施行した肺炎単独群の 5 群

で評価した。2H 群、sham 群、NSIT 群、肺炎単独群は肺炎後 7 日間、CLP 単独群は CLP 後 7 日間の生存率を評価した。

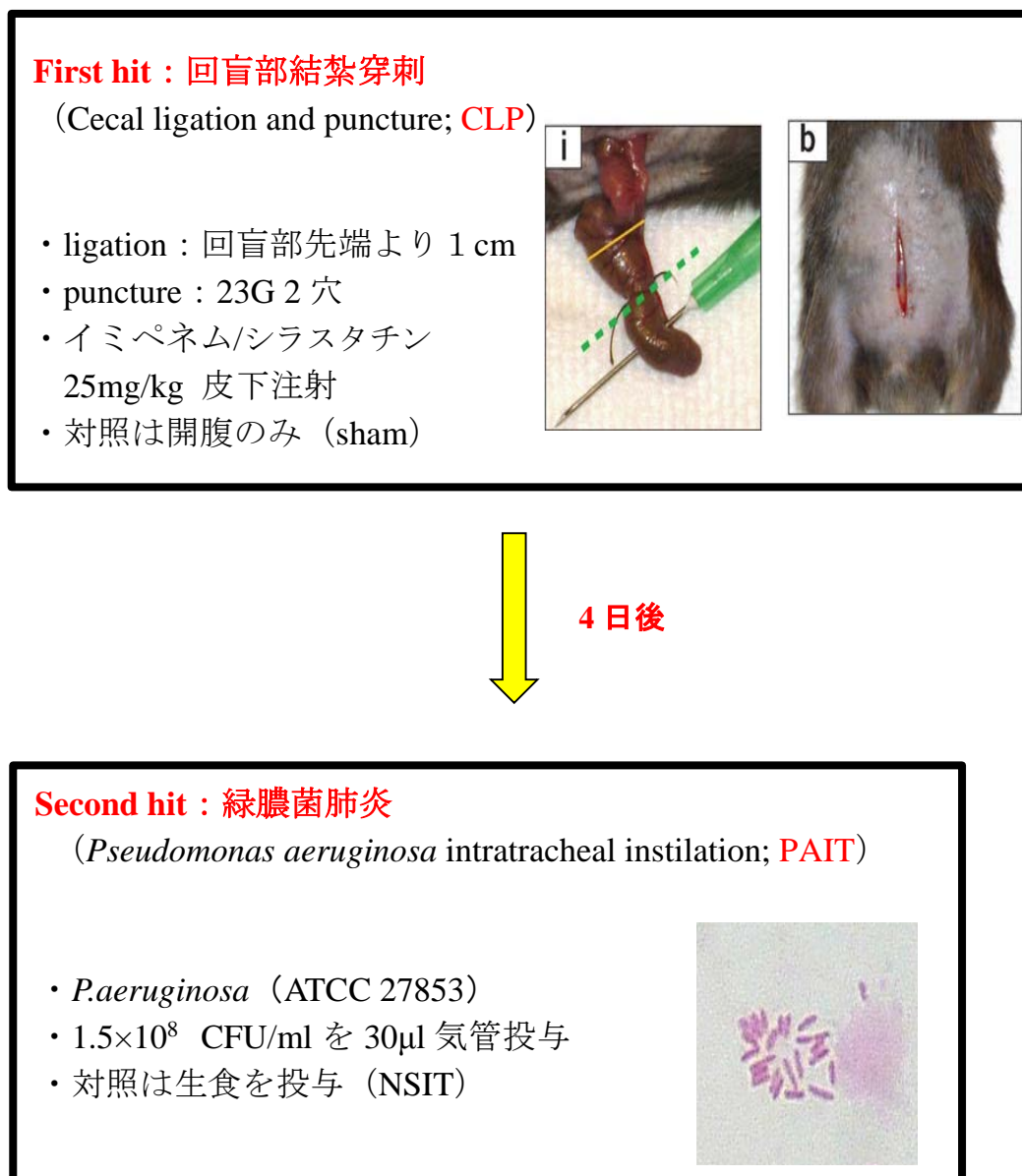


図 6 Two hit model の作成

First hit としては回盲部結紮穿刺 (CLP)、Second hit としては 4 日後に緑膿菌肺炎 (PAIT) を起こした。

・マウス腹膜炎モデルの作成⁴²

First hit として回盲部結紮穿刺 (CLP) により腹膜炎モデルを作成した。イソフルラン 3-4% の吸入麻酔にて麻酔を施行した。十分に麻酔が効いたことを確認し、手術を開始した。マウスの腹部正中に 1.5 cm 程度の皮膚切開後に、腹膜を正中切開した。回盲部を同定し、愛護的に腹腔外に挙上し、回盲部先端より 1 cm を 4-0 絹糸にて結紮した。その後結紮部位付近に 23 ゲージ針で穿刺した。1 回の穿刺で 2 穴を作成した。その後愛護的に回盲部を腹腔内に戻し、腹膜を 4-0 絹糸で閉腹、皮膚を 3-0 ナイロンで縫合した。術後には文献を参考に²¹、イミペネム/シラスタチン 25 mg/kg と生理食塩水 (normal saline; NS) 1ml を皮下注射した。

対照群として開腹のみを施行した sham (疑似手術) 群をおいた。こちらは皮膚切開と腹膜切開後、回盲部を同定し、愛護的に腹腔外に挙上し、結紮や穿孔することなくそのまま腹腔内に戻し、縫合し、処置を終えた。

・マウス肺炎モデルの作成^{20, 24}

Second hit としては二次感染症を想定し、緑膿菌による肺炎モデルを作成した (PAIT)。 *P.aeruginosa* (ATCC 27853) を液体培地にて振盪培養し、-80°C でストックした。肺炎作成時はストックから標準寒天培地に 10µl をまき、37°C、5%CO₂ のインキュベーターの環境で一晩菌を培養した。生育してきたコロニーから、マクファーランド比濁法を用いて 1.5×10^8 CFU/ml になるように緑膿菌を調整した。

マウスを塩酸ケタミン 30 mg/kg と塩酸キシラジン 8 mg/kg の腹腔内投与により麻酔した。十分に麻酔が効いたことを確認し、処置を行った。前頸部に 1 cm 程度の皮膚切開を行い、甲状腺や軟部組織をよけ気管を同定した。気管投与用のシリンジに溶液の後押し用に 30 μ l の空気を入れた後、用意した緑膿菌の溶液 (1.5×10^8 CFU/ml) を 30 μ l 入れた。マウスを 45 度で head up し、気管投与シリンジ針を気管に刺入し、上記溶液を 5 分間かけてゆっくりと注入した。その後皮膚を 3-0 ナイロンで縫合した。術後に生理食塩水 1ml を皮下注射した。

生存率の検討には、対照群として生理食塩水を気管内投与した生食投与群 (NSIT) をおいた。こちらは緑膿菌の代わりに、生理食塩水を同様の方法で注入した。

実験 1-2 Two hit model の生体防御能の変化

メカニズム解析としては CLP 後に PAIT を施行した two hit 群 (2H 群)、そのコントロールとして sham 後に PAIT を施行した sham 群の 2 群にて生体防御能の評価を施行した。詳細は図 7 に示すが、肺炎 18 時間後にマウスを犠死させ、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF)、または肺組織を採取し、BALF 中の好中球数や細菌数、肺の病理像・肺傷害スコア (lung injury score; LIS)、肺湿乾重量比、肺組織の MPO (Myeloperoxidase) 活性を測定した。犠死の時期に関しては、文献的に 12 時間から 24 時間が多く^{20, 25, 43}、本検討では 24 時間前後での死亡例が著増するため、18 時間での犠死とした。

BALF 中の細菌数に関しては 18 時間、24 時間、48 時間で、BALF 中のサイトカインは肺炎後 12 時間、18 時間、24 時間、48 時間と経時的な変化を測定した。

マウスは塩酸ケタミン 30 mg/kg と塩酸キシラジン 8 mg/kg の腹腔内投与により麻酔し、十分に麻酔が効いたことを確認したあと、採血及び放血により犠死とし、その後に処置を施行した。

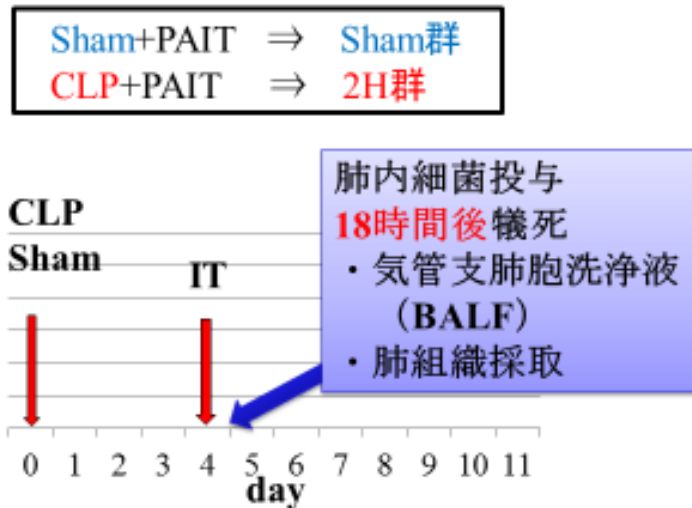


図7 気管支肺胞洗浄・肺組織の評価
Sham群、2H群で肺炎18時間後にBALF,肺組織を採取し、メカニズム解析を施行した。

・BALF中の細菌数、好中球数の測定

犠死後に前頸部に1 cm程度の皮膚切開を行い、甲状腺や軟部組織をよけ気管を同定した。22Gの金属針を気管に留置、固定し、0.5mlのPBS (phosphate buffered saline) で3回気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage; BAL) を施行し、回収液(BAL fluid; BALF)を得た。

細菌数に関してはBALF原液、10倍、100倍、1000倍希釈したものを準備し、50μlずつを標準寒天培地にまき、37°C、5%CO₂のインキュベーターで菌を培養し、24時間後にコロニー数をカウントすることで細菌数 (CFU/ml) を算出した。

BALFを遠心分離し(300G, 5分, 4°C)、上清は0.22μmのフィルターを通して、-80°Cに保存し、サイトカイン測定に使用した。遠心分離後のPelletに2mMEDTA入りの

PBS1ml を注入し、これを用いて細胞数のカウントを施行した。血算盤を用いて細胞数をカウントした。残液をサイトスピン（350rpm, 10分, 室温）で遠心し、塗沫標本を作製した。血球形態検査に汎用されるメイ・ギムザ染色の迅速簡易法である Diff Quick 染色（シスメックス株式会社, 兵庫県, 日本）を行い、光学顕微鏡で 400 個の細胞中の好中球数をカウントし、好中球分画を算出した。好中球数は細胞数に好中球分画を掛け合わせるにより算出した。

・サイトカイン測定.

BD™ Cytometric Bead Array (CBA) (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて各種サイトカインを測定した。これは Multiplex Bead Assay とも言われ、多様な粒子を用いて可溶性のタンパク質を補足し、定量するもので、ELISA とほぼ同様の結果を複数項目のサイトカインを測定できるものである。BALF 上清の検体で、フローサイトメーター(BD Accuri™ C6) (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて TNF α (tumor necrosis factor α)、IL-6 (interleukin-6)、MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)、IL-10 (interleukin-10)、KC (keratinocyte derived chemokine) を測定した。

・肺組織の組織学的検討・肺傷害スコア (lung injury score; LIS)

23 ゲージ針とシリンジを用いて気管より 10%緩衝ホルマリン溶液を注入し、肺組織を拡張後に肺組織を採取した。10%緩衝ホルマリン溶液により固定後にパラフィン包埋し、肺組織切片を 3 μ m に薄切しヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。

表 2 に示すように、肺傷害スコアを計測した⁴⁴。それぞれの標本はブラインドで選択し、選択した病理標本からランダムに抽出した 10 視野から各項目についてスコア化し、LIS (lung injury score) を算出した。

	Parameter	0	1	2
A	Neutrophils in the alveolar space	none	1-5	>5
B	Neutrophils in the interstitial space	none	1-5	>5
C	Hyaline membranes	none	1	>1
D	Proteinaceous debris filling the airspaces	none	1	>1
E	Alveolar septal thickening	<2x	2x-4x	>4x

lung injury score=

$$\frac{[(20 \times A) + (14 \times B) + (7 \times C) + (7 \times D) + (2 \times E)]}{(\text{number of fields} \times 100)}$$

表2 肺傷害スコア (lung injury score ; LIS)

ブラインドで選択した肺病理標本において、ランダムに抽出した10視野から各項目についてスコア化し、LIS (lung injury score) を算出した。

G. Matute-Bello *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44, 725-38 (2011).

・肺湿乾重量比 (lung wet/dry ratios) の測定

肺の肺湿乾重量比 (lung wet dry ratios) は肺内水分量の程度を評価するのに使用される方法である。測定は過去の報告と同様の方法で行った⁴⁵。両側の肺組織を採取したあと、気管や主気管支は除去し、肺湿重量を測定した。その後オーブンに肺組織をいれて、60°C、48 時間で乾燥させて、乾燥重量を測定した。肺湿重量/乾燥重量を算出し、それを肺の肺湿乾重量比 (lung wet dry ratios) とした。

・MPO 測定

肺組織 (右下葉の一部) をホモジナイズし、上清を抽出し、Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA) を用い、ELISA で 562nm の吸光度を測定し、タンパク量を定量化した。タンパク濃度を 100µg/ml に調整した上で、Myeloperoxidase fluorometric detection kit (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA) を用いて、MPO 活性を測定した。MPO 活性は肺組織タンパク量 1g あたりの MPO 活性 (Unit) で算出した。

実験 2 Two hit model に対するインターフェロン β の効果

実験 2-1 Two hit model におけるインターフェロン β の生存率への影響

次に two hit model における IFN β の治療介入を行い、その効果を検討した。CLP のコントロールとして sham 手術後に緑膿菌肺炎とした sham 群、CLP 後に緑膿菌肺炎とした two hit model に対して、治療として IFN β を投与した 2H,IFN 群、治療のコントロールで生理食塩水 (NS) を投与した 2H,NS 群の 3 群で比較した。Sham 群と 2H,NS 群の生存率は、実験 1 と同データである。

CLP、PAIT の方法は実験 1 と同様の方法で施行し、CLP4 日後に PAIT を施行した。IFN β の製剤には IFN β -1a と IFN β -1b があり、IFN β -1a は遺伝子組換え技術によりチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いて産生され、糖鎖がある製剤である。それに対して今回使用したのは IFN β -1b で、大腸菌を用いて産生された遺伝子組換え型であり、糖鎖はない製剤である。IFN β (PBL Assay Science, Piscataway, NJ, USA) を生理食塩水に溶解し、700,000unit/kg を 1 匹あたり 200 μ l の容量で皮下注射した²⁷。対照群には同量の生理食塩水 (NS) を投与した。実験プロトコールを図 8 に示した。CLP による免疫抑制状態に IFN β を投与することで免疫抑制が改善され、次にくる侵襲に耐えうるという仮説をもとに、IFN β は CLP 施行後 3 日目、肺炎の 24 時間前に投与した。生存率解析では PAIT 時を day0 とし、7 日間の生存率を解析した。

Sham+NS+PAIT	⇒ Sham群
CLP+NS+PAIT	⇒ 2H,NS群
CLP+IFN β +PAIT	⇒ 2H,IFN群

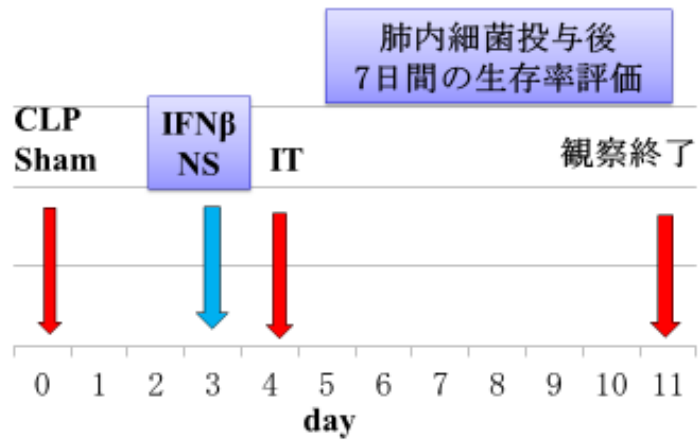


図8 Two hit modelにおけるIFN β の効果

CLP、sham手術施行後3日目にIFN β またはNSを投与し、CLP4日後に肺炎を施行した。肺炎後7日間の生存率を評価した。

実験 2-2 インターフェロン β による生存率改善のメカニズム解析

生存解析同様、sham 群、2H,NS 群、2H,IFN 群の 3 群で比較した。

詳細は図 9 に示すが、メカニズム解析では肺炎 18 時間後にマウスを犠死させ、BALF または肺組織を採取し、BALF 中の好中球数、細菌数、サイトカイン、また肺の病理像と LIS、肺湿乾重量比、肺組織の MPO 活性を測定した。BALF 中の細菌数に関しては 18 時間、24 時間、48 時間で経時的な変化を測定した。

マウスの麻酔方法、犠死の方法、BALF 中の好中球数、細菌数、サイトカイン、肺病理像・肺傷害スコア (LIS)、肺湿乾重量比、肺組織の MPO 活性の測定方法に関しては実験 1-2 と同様である。この測定項目のうち、sham 群と 2H,NS 群のデータの結果については、サイトカイン以外の測定項目は実験 1 の結果と同データである。

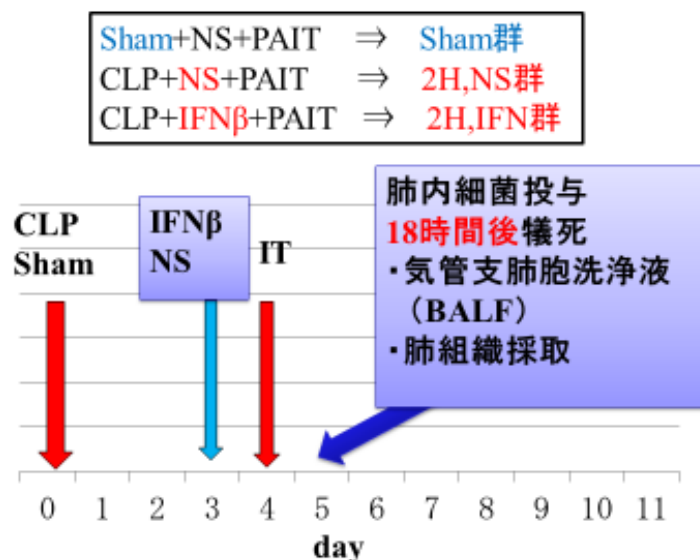


図9 気管支肺胞洗浄・肺組織の評価

Sham群、2H,NS群、2H,IFN群で肺炎18時間後にBALF、肺組織を採取し、メカニズム解析を施行した。

実験3 インターフェロンβによるマクロファージの機能変化

腹膜炎が肺胞および腹腔マクロファージの機能に与える影響と、IFNβのそれらに対する治療効果を検証するため、*ex vivo*の実験を行った。実験2と同様にCLP3日後にIFNβまたはNSを投与し、CLP4日後に肺胞・腹腔マクロファージを採取した。プロトコールを図10に示す。CLP4日後に麻酔下で放血犠死し、腹腔にRPMI (Roswell Park Memorial Institute medium)培地を5ml注入し、回収した。この操作を2回施行し、それらを合わせて腹腔洗浄液とした。またBALを2mMETDA入りのPBSを1mlで4回施行し、BALFを回収した。

実験3-1、3-2では腹腔洗浄液、BALFをそれぞれ4°C、300G、5分で遠心分離した後に上清を吸引除去し、RPMI 1mlに懸濁した。採取した腹腔・肺胞マクロファージ(各群6匹)はRPMI培地で 4×10^4 cell/300 μ l/wellとなるように48wellのプレートで培養した。

実験3-3ではBALFを4°C、300G、5分で遠心分離後に上清を吸引除去し、cell staining buffer (Biolegend, San Diego, CA, USA) 1mlに懸濁した。35 μ mセルストレーナー付きポリスチレンラウンドボトムチューブ (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)に通した後、4°C、300G、5分で遠心分離後に上清を吸引除去し、各サンプルをcell staining bufferを用いて 5×10^5 cell/50 μ l/本になるように調整した。

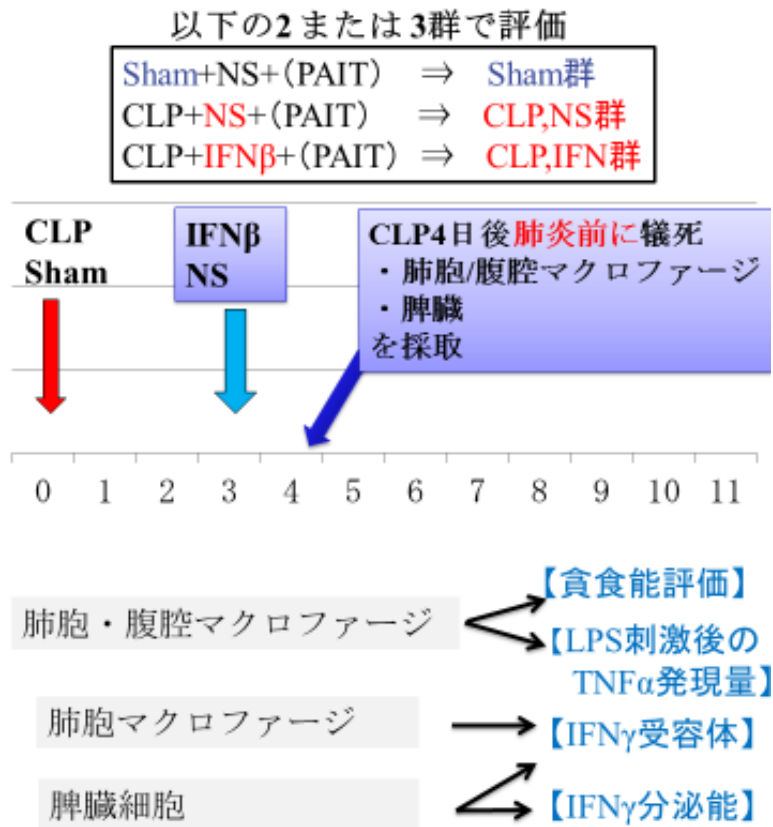


図10 マクロファージ、脾臓の機能評価
 肺炎直前に肺胞・腹腔マクロファージ、脾臓を採取し、その機能変化を検討した。

実験 3-1 マクロファージにおける食食能評価

マクロファージの食食能の評価には phagocytosis assay kit (Cayman chemical company, Ann Arbor, MI, USA)を用いて測定した。マクロファージをプレートに撒き、2 時間静置後に IgG でオプソニン化した latex beads を 30 μ l ずつ投与し、24 時間食食後にフローサイトメーターで食食量を定量化した。

実験 3-2 マクロファージを LPS 刺激後の TNF α 定量

培養液中のマクロファージの生体防御能の指標として、LPS 刺激による TNF α 発現量を検討した。マクロファージをプレートに撒き、2 時間静置後に RPMI 培地で 2 回洗浄し、37°C、5%CO₂ 下で overnight で培養した。その後上清を吸引し、270 μ l の RPMI 培地を注入し、LPS (E.coli 0111:B4 株由来, Sigma 社 O71M4065, St. Louis, MO, USA) を 30 μ l 加えた。最終の LPS 濃度は 10ng/ml である。

LPS 刺激 24 時間後の上清を回収し、TNF α 濃度を測定した。TNF α は mouse TNF α duo set (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)を用いて、ELISA 法で定量化した。96well プレートリーダーを用いて 450nm、540nm の吸光度にて測定した。

実験 3-3 肺胞マクロファージにおけるインターフェロン γ 受容体 (IFN γ R)

生体防御反応に関連する IFN γ の反応性を表すと考えられる IFN γ 受容体量をフローサイトメトリー法で定量した。ポリスチレンラウンドボトムチューブ中の細胞懸濁液に、1 次抗体として biotin anti-mouse CD119 (IFN γ R α chain) (Biolegend, San Diego, CA, USA) を投与して on ice、30 分反応させ、洗浄後、PE streptavidin (Biolegend, San Diego, CA, USA) と on ice、30 分反応させ、蛍光強度をフローサイトメーター (BD Accuri C6) で測定した。アイソタイプコントロールとして、biotin armenian hamster IgG isotype ctrl (Biolegend, San Diego, CA, USA)を用いた。1 次抗体、アイソタイプコントロール、2 次抗体の最終濃度はそれぞれ 10 μ g/ml、10 μ g/ml、2 μ g/ml となるようにした。

実験 4 インターフェロン β による脾臓細胞の変化

腹膜炎が脾臓細胞機能に与える影響と、IFN β のそれらに対する治療効果を検証するため、ex vivo の実験を行った。実験 3 と同様に CLP3 日後に IFN β または NS を投与し、CLP4 日後に脾臓を採取した（各群 5 匹）。プロトコールを図 10 に示す。採取した脾臓は破碎後 70 μ m セルストレーナーを通した後、300G、5 分、4°C で遠心分離した。上清を吸引除去し、BD Pharm lyse™ (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて血球成分を溶血させ、遠心分離後に上清を吸引除去し、RPMI 5ml で懸濁し、脾臓細胞を回収後、以下の実験を行った。

実験 4-1 脾臓細胞におけるインターフェロン γ 受容体 (IFN γ R) 発現量

回収した脾臓細胞を遠心分離し、上清を吸引除去後に cell staining buffer 3ml に懸濁し、各サンプルを 5×10^5 cell/50 μ l/本になるように調整した。実験 3-3 同様、1 次抗体として biotin anti-mouse CD119 (IFN γ R α chain) (Biolegend, San Diego, CA, USA) を投与して on ice、30 分反応させ、洗浄後、PE streptavidin (Biolegend, San Diego, CA, USA) と on ice、30 分反応させ、蛍光強度をフローサイトメーター(BD Accuri C6)で測定した。アイソタイプコントロールとして、biotin armenian hamster IgG isotype ctrl (Biolegend, San Diego, CA, USA)を用いた。1 次抗体、アイソタイプコントロール、2 次抗体の最終濃度はそれぞれ 20 μ g/ml、20 μ g/ml、2 μ g/ml となるようにした。

実験 4-2 脾臓細胞におけるインターフェロン γ 分泌能

脾臓細胞の CD3、CD28 刺激による IFN γ 分泌能を測定した。12well プレートを、脾臓細胞回収の前日に CD3 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) 10 μ g/1ml/well で overnight でコーティングした。プレートを洗浄後、脾臓細胞を 4 \times 10⁶cell/1ml/well 注入した。その後 CD28 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を 2 μ g/well ずつ注入した (最終濃度 2 μ g/ml)。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ のインキュベーターで overnight で培養し、24 時間後の上清を回収した。回収液を 10000G, 4 $^{\circ}$ C, 5 分で遠心分離し、その上清を -80 $^{\circ}$ C にて保存した。BD™ Cytometric Bead Array (CBA) を使用し、IFN γ を測定した。陰性コントロールとして脾臓細胞のみを撒いたプレートの培養上清を用いた。

統計解析

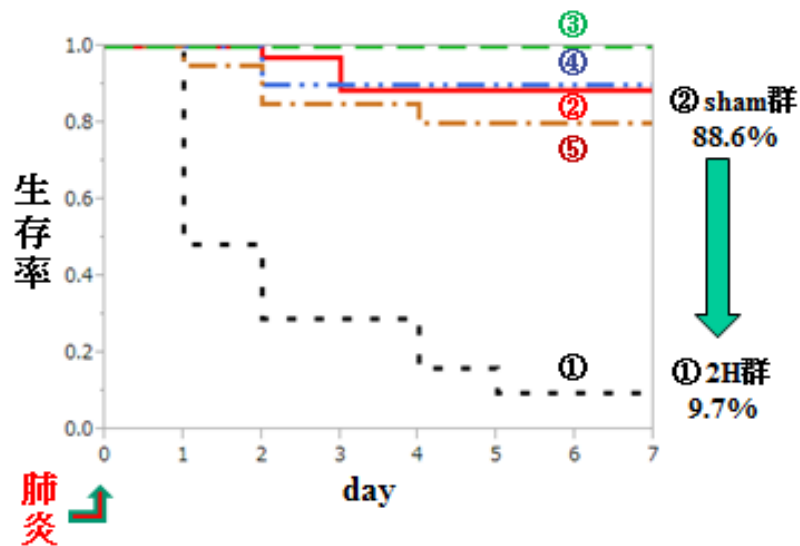
JMP11.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) および SigmaPlot software, version 12.5 (Systat Software, San Jose, CA) を用いて統計解析を行い、結果は全て平均 \pm 標準偏差にて記載した。生存率比較は Log Rank 解析、多群の比較には 1 元配置分散分析 (Holm-Sidak 法)、群間比較には Mann-Whitney の U 検定を用い、 $p < 0.05$ を統計学的有意と判断した。

第6章 結果

実験1 二次感染モデル(two hit model)の作成と、その免疫機能の検討

実験1-1 Two hit modelの生存率への影響

生存曲線を図11に示す。Single hit 群である CLP 単独群、PAIT 単独群の7日間生存率はそれぞれ90%、80%であり、CLP後にNSITを施行したNSIT群は100%、sham後にPAITを引き起こしたsham群では88.6%であり、生存率に有意差を認めなかった。Sham後にPAITを引き起こしたSham群と比較して、CLP後にPAITを起こしたtwo hit 群では生存率は9.7%と著明な低下をきたした(88.6 vs. 9.7%, $p < 0.001$)。



		群	n	生存率 (%)
①	CLP+PAIT (2H群)	31	9.7
②	————	Sham+PAIT (sham群)	35	88.6
③	- - - -	CLP+NSIT (NSIT群)	8	100
④	- . - .	CLP単独	10	90
⑤	- . - .	PAIT単独	20	80

図11 Two hit modelの生存率への影響

Sham群に比べ、two hit群は有意に生存率が低かった。(88.6 vs. 9.7%, $p < 0.001$)

実験 1-2 Two hit model の生体防御能の変化

Two hit model の生存率低下のメカニズム解析として、First hit の影響で two hit の侵襲に対する免疫応答への影響がどうなっているのかを検討した。sham 群と 2H 群において、肺炎 18 時間後に BALF 中の好中球数、細菌数(18-48 時間)、サイトカイン(12-48 時間)、肺病理と LIS、肺湿乾重量比、肺の MPO 活性を測定した。

BALF 中の細胞数はいずれの群も 96–99.5% は好中球であり、それぞれの好中球分画から好中球数を算出した。BALF 中の好中球数の結果を図 12 に示す。BALF 中の好中球数では Sham 群と比較し、two hit 群では有意に低下した。

BALF 中の細菌数の結果を図 13 に示す。BAL 中の好中球数の影響で BAL 中の細菌数にも変化が出ていることが予想されたが、two hit 群では死亡例も多く、バラツキも大きく、sham 群と two hit 群では 18 時間の時点で有意差は認めなかった。その後 24 時間、48 時間の細菌量も施行したが、両群で経時的に細菌量は減少したものの、両群で有意差を認めなかった。

Sham+PAIT	⇒	Sham群
CLP+PAIT	⇒	2H群

好中球数 (×10⁶/ml)

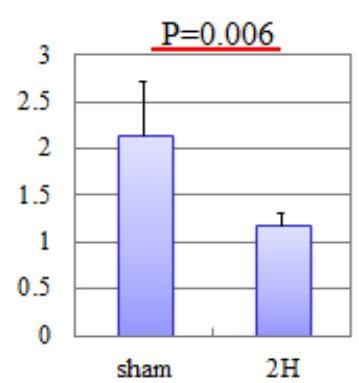


図12 BALF中の好中球数 (各群n=5)

Sham群と比較し、2H群ではBALF中の好中球数が有意に低下した。

Sham+PAIT	⇒	Sham群
CLP+PAIT	⇒	2H群

BALF中の細菌数 (CFU/ml)

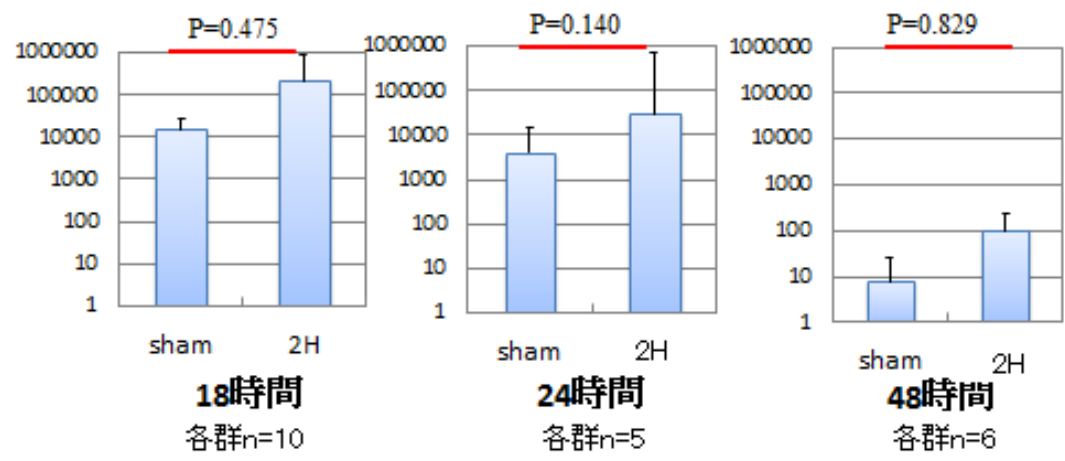


図13 BALF中の細菌数 (12時間、24時間、48時間)

細菌量は経時的に減少したものの、両群で有意差は認めなかった。

BALF 中のサイトカインの結果を図 14 に示す。BALF 中の IL-6, TNF α などの炎症性サイトカインは two hit 群では sham 群と比較して、半分以下に抑制された結果であり、12 時間、18 時間で有意差を認めた。また抗炎症性サイトカインである IL-10 は two hit 群では sham 群と比較して、早期からの上昇を認めていた。two hit 群では 12 時間、24 時間後では有意差をもって上昇しており、それ以外でも two hit 群で高値の傾向であった。好中球を遊走させる KC は sham 群では 12 時間後には有意に上昇を認め、これを受けて 18 時間後の細胞数が増加していると考えられた。また単球を遊走させる MCP-1 も、two hit 群では 12 時間後、24 時間後に有意に上昇を認めた。

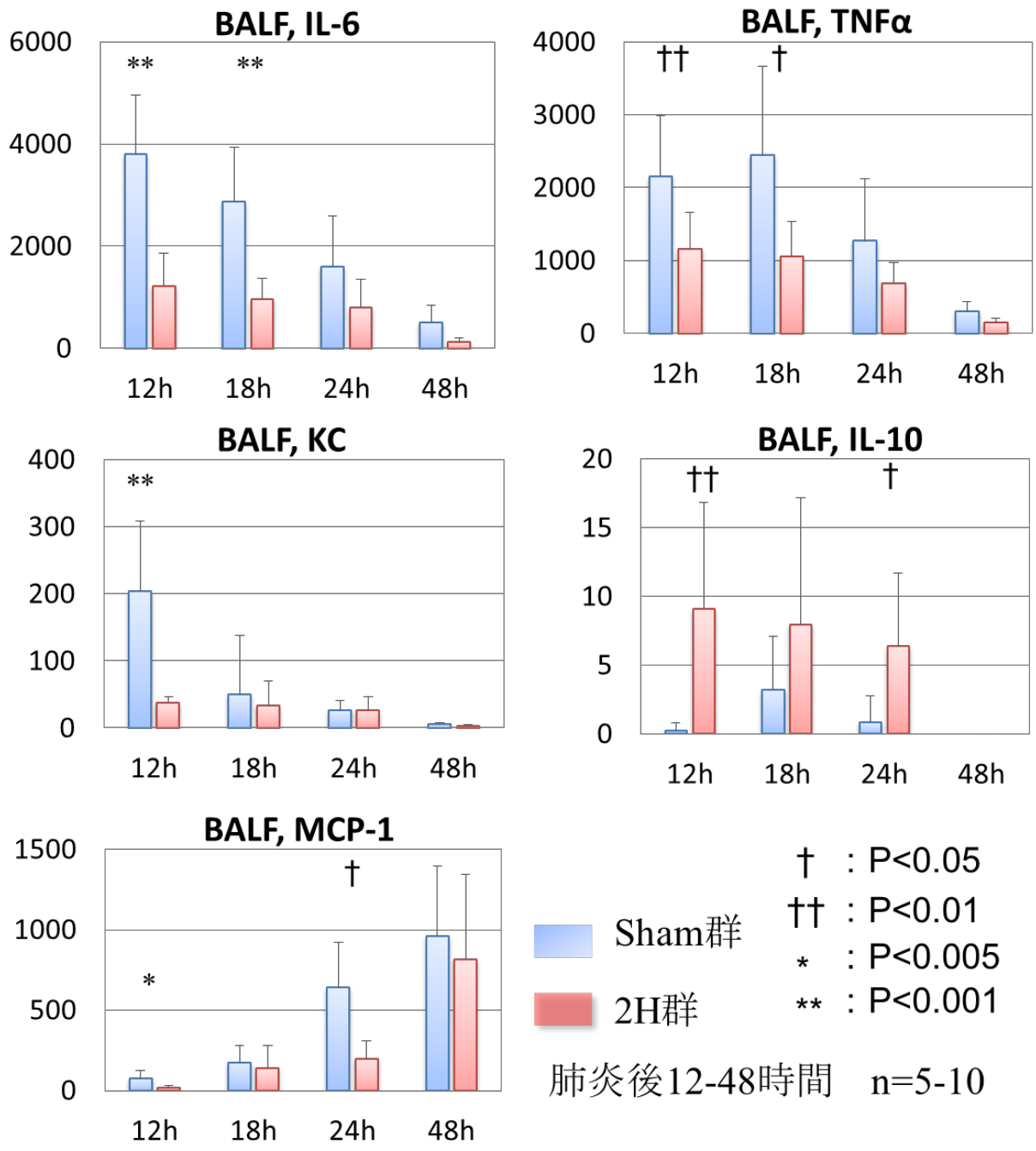


図 14 BALF 中のサイトカイン (pg/ml)

Sham 群と比較し、2H 群では炎症性サイトカインが抑制され、抗炎症性サイトカインが上昇していた。また sham 群では早期に KC の上昇がみられた。

肺病理では sham 群では肺胸腔内に細胞は認めているものの、肺胞構造は比較的 normally 保たれていた。Two hit 群では肺胞内に硝子化や、一部出血を認めており、すでに肺傷害が進行していた。また肺実質、肺間質への細胞浸潤は two hit 群では多く認められた (図 15)。肺傷害スコア (LIS) では sham 群と比較して、2H 群では有意に肺が傷害されていた (図 16)。

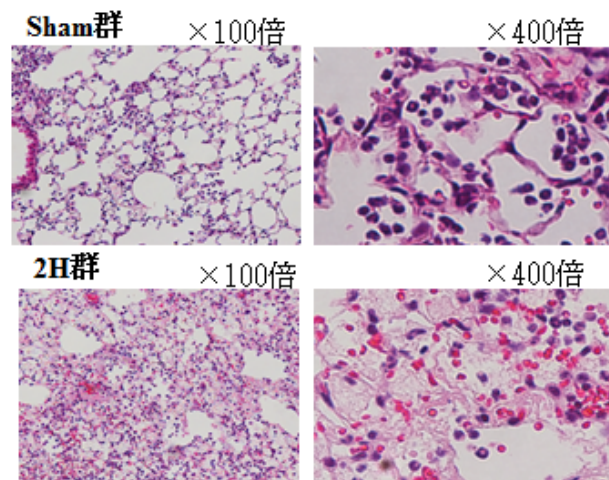


図15 肺のH-E染色

Sham群では肺胞内の細胞が多いにも関わらず、肺胞構造は保たれているのに対して、2H群では肺胞内に硝子化、肺傷害がおきており、一部出血を認めている。

LIS

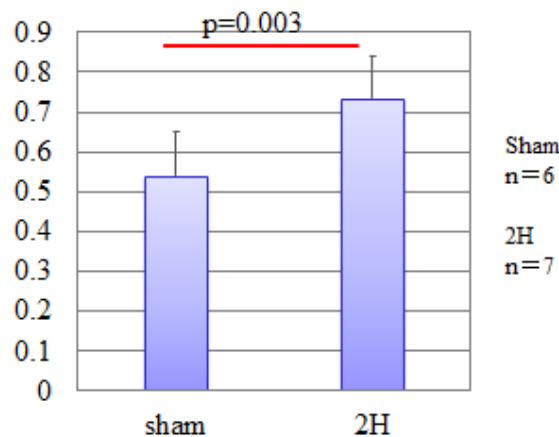


図16 肺傷害スコア (lung injury score:LIS)

肺傷害をスコア化したLISではsham群と比較して、2H群では有意に肺が傷害されていた。

肺内水分量を表す lung wet/dry ratios では 2H 群では sham と比べて有意に肺が wet な状態であった (図 17)。肺組織の MPO 活性では sham 群と比較して、2H 群で有意に高値を示した (図 18)

lung wet dry ratio = 肺湿重量/乾燥重量
 ・肺湿重量 (採取後の肺重量)
 ・乾燥重量 (60℃48時間乾燥後の肺重量)

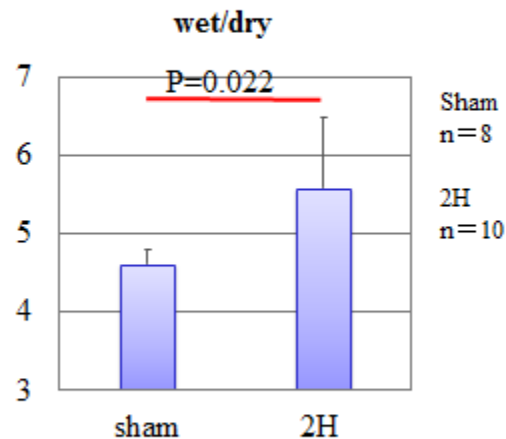


図17 肺の肺湿乾重量比 (lung wet/dry ratio)
 肺内水分量を表すlung wet/dry ratiosでは2H群ではshamと比べて、有意に肺がwetであった。

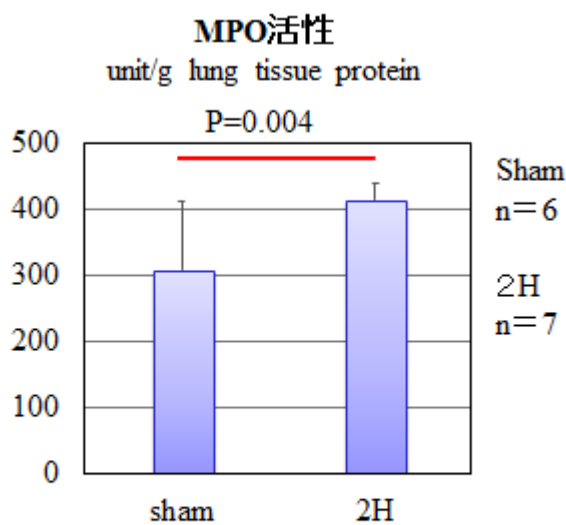


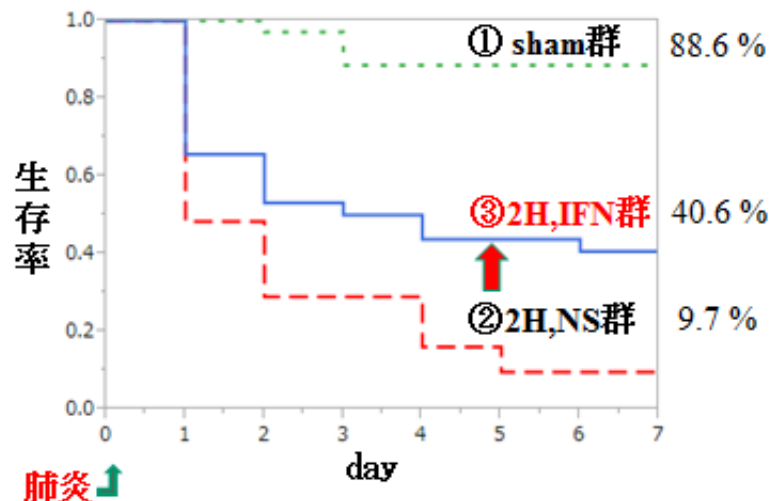
図18 肺のMPO活性
 肺組織のMPO活性ではsham群よりも2H群では高値を示した。

実験 2 Two hit model に対するインターフェロン β の効果

実験 2-1 Two hit model におけるインターフェロン β の生存率への影響 (図 19)

①sham 群、②2H,NS 群、③2H,IFN 群の 3 群で生存率を比較した。Sham 群と 2H,NS 群の生存率は、実験 1 の図 11 の結果と同データである。

実験 1 で述べたように sham 群に対して CLP 後に PAIT を起こした two hit 群では生存率 9.7%と著明な低下をきたした(88.6 vs. 9.7%, $p < 0.001$)。それに対して治療群である 2H,IFN 群は 2H,NS 群に比較して有意に生存率の上昇を認めた(9.7% vs. 40.6%, $P < 0.01$)。



		群	n	生存率 (%)
①	Sham+PAIT (sham群)	35	88.6
②	- - - -	CLP+NS+PAIT (2H,NS 群)	31	9.7
③	————	CLP+IFN β +PAIT (2H,IFN群)	32	40.6

図19 Two hit modelにおけるインターフェロン β の生存率への影響

2H,IFN群は2H,NS群に比較して有意に生存率が高かった。Sham群と2H,NS群は図11の結果と同データである。

実験 2-2 インターフェロン β による生存率改善のメカニズム解析

Two hit model における IFN β の生存率改善のメカニズム解析として、sham 群、2H,NS 群、2H,IFN 群の 3 群において、肺炎 18 時間後に BAL 中の好中球数、細菌数（18-48 時間）、サイトカイン、肺病理と LIS、肺湿乾重量比、肺の MPO 活性を測定した。この測定項目のうち、sham 群と 2H,NS 群のデータの結果については、サイトカイン以外の測定項目は実験 1 の結果と同データである。

BALF 中の好中球数は Sham 群と比較し、2H,NS 群では有意に低下し、治療群である 2H,IFN 群は 2H,NS 群と比較して好中球数が有意に改善した（図 20）。

BALF での細菌量はバラツキが大きく、18 時間の時点で 3 群で有意差は認めなかった（図 21）。その後 24 時間、48 時間の細菌量も施行したが、各群で経時的に細菌量は減少したものの、各群で有意差を認めなかった。

Sham+NS+PAIT	⇒	Sham群
CLP+NS+PAIT	⇒	2H,NS群
CLP+IFN β +PAIT	⇒	2H,IFN群

好中球数 ($\times 10^6/ml$)

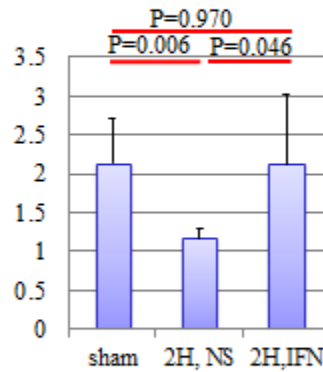


図20 BALF中の好中球数

2H,IFN群は2H,NS群と比較して好中球数が有意に高かった。Sham群と2H,NS群は図12の結果と同データである。

Sham+NS+PAIT	⇒	Sham群
CLP+NS+PAIT	⇒	2H,NS群
CLP+IFN β +PAIT	⇒	2H,IFN群

BALF中の細菌数 (CFU/ml)

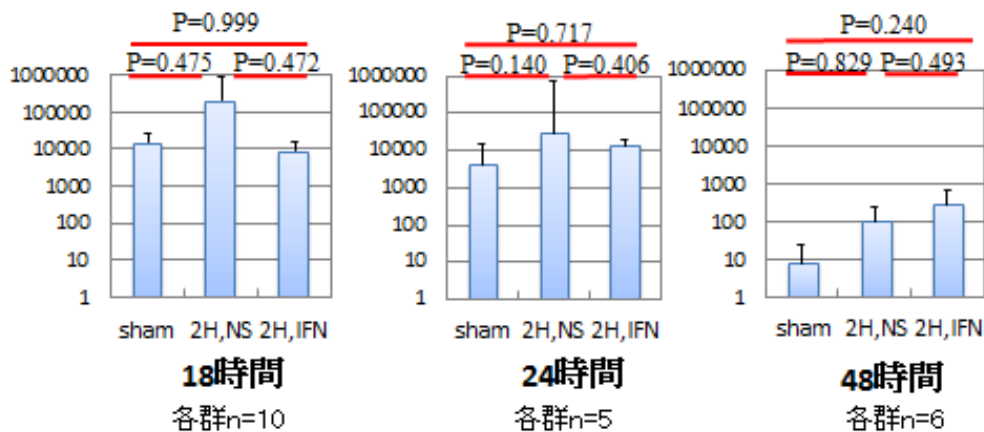


図21 BALF中の細菌数 (12時間、24時間、48時間)

細菌量は経時的に減少したものの、両群で有意差は認めなかった。Sham群と2H,NS群は図13の結果と同データである。

BALF中のサイトカイン解析の結果、2H,NS群ではSham群と比較してBALF中のTNF α 、IL-6が有意に低下した。2H,IFN群では2H,NS群と比較して、低下したTNF α が有意に上昇し、IL-6も上昇する傾向がみられた。2H,IFN群では2H,NS群と比較してKCは有意に高値であった(図22)。

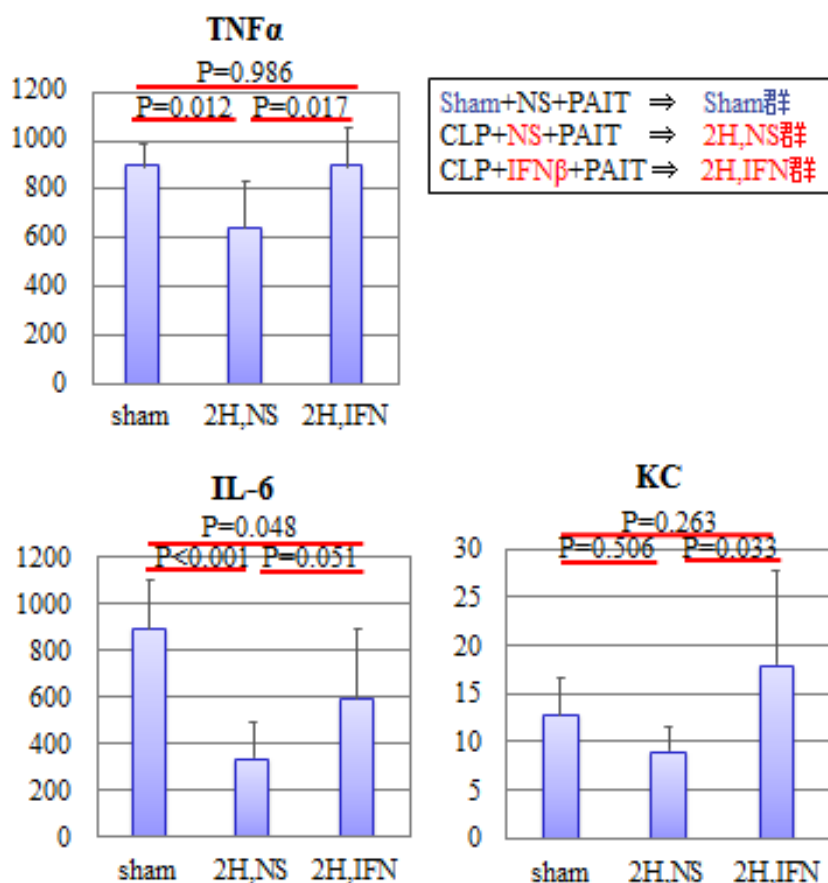


図22 BALF中のサイトカイン (pg/ml) (各群n=7)

2H,NS群ではSham群と比較してBALF中のTNF α 、IL-6が有意に低下した。2H,IFN群では2H,NS群と比較して、低下したTNF α が有意に上昇し、IL-6も上昇する傾向がみられた。2H,IFN群では2H,NS群と比較してKCは有意に高値であった。

肺病理では、2H,IFN 群では肺胞内細胞数は多いものの、肺胞内の硝子化、肺傷害は2H,NS 群と比較すると軽度であった。しかし実験1の sham 群 (図15) と比較すると、硝子化を一部で認めた (図23)。肺傷害をスコア化した LIS では2H,NS 群と比較して、2H,IFN 群では有意に肺の傷害が軽度であった (図24)。

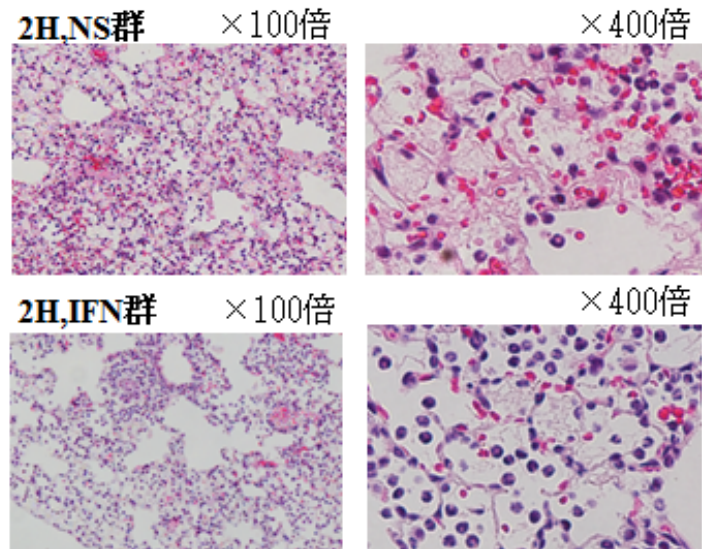


図23 肺のH-E染色

2H,IFN群では肺胞内細胞数は多いものの、肺胞内の硝子化、肺傷害は軽度であった。2H,NS群は図15の結果と同データである。

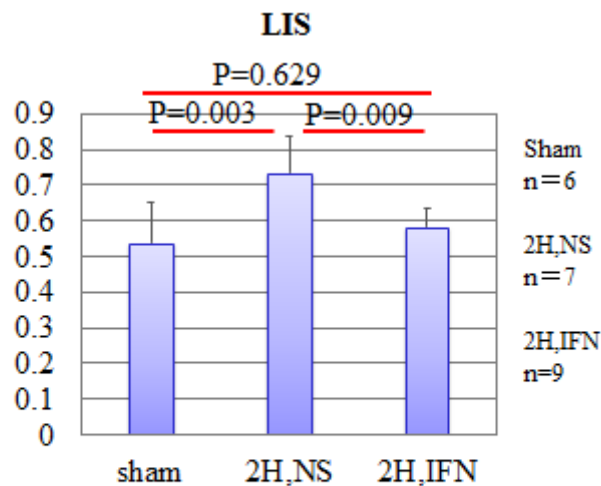


図24 肺傷害スコア (lung injury score:LIS)

2H,NS群と比較して、2H,IFN群では有意に肺の傷害は軽度であった。Sham群と2H,NS群は図16の結果と同データである。

肺内水分量を表す lung wet/dry ratios では sham 群と比べて、2H,IFN 群と 2H,NS 群は有意に肺が wet な状態であったが、2H,IFN 群と 2H,NS 群では有意差を認めなかった (図 25)。肺組織の MPO 活性では sham 群と比較して、2H,IFN 群と 2H,NS 群は有意に高値を示したが、2H,NS 群と 2H,IFN 群では差を認めなかった (図 26)。

lung wet dry ratio = 肺湿重量/乾燥重量
 ・肺湿重量 (採取後の肺重量)
 ・乾燥重量 (60°C48時間乾燥後の肺重量)

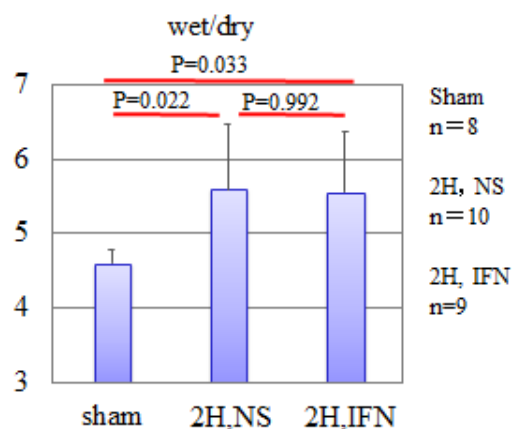


図25 肺の肺湿乾重量比 (lung wet/dry ratio)

肺内水分量を表すlung wet/dry ratiosでは2H,NS群と2H,IFN群で差は認めなかった。Sham群と2H,NS群は図17の結果と同データである。

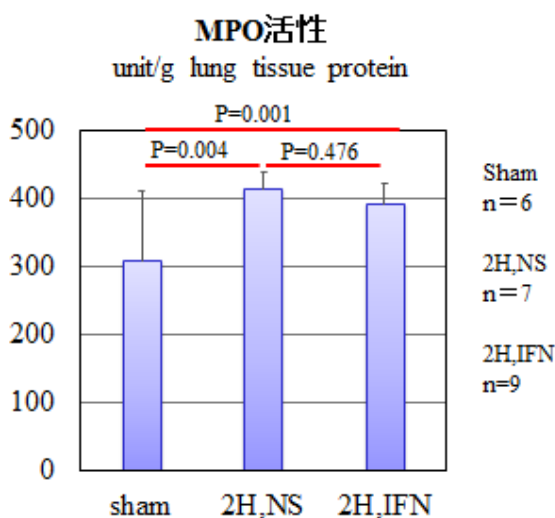


図26 肺のMPO活性

肺組織のMPO活性では2H,NS群と2H,IFN群では差を認めなかった。Sham群と2H,NS群は図18の結果と同データである。

実験3 インターフェロンβによるマクロファージの機能変化

実験3-1 マクロファージにおける食食能評価 (図27)

24時間後の肺胞マクロファージでの食食能は、CLP,NS群ではSham群と比較して食食能は有意に低下した。CLP,IFN群では、CLP,NS群と比較して食食能は有意に上昇した。同様に腹腔マクロファージでの食食能は、CLP,NS群ではSham群と比較して食食能は有意に低下し、CLP,IFN群では、CLP,NS群と比較して食食能は有意に上昇した。

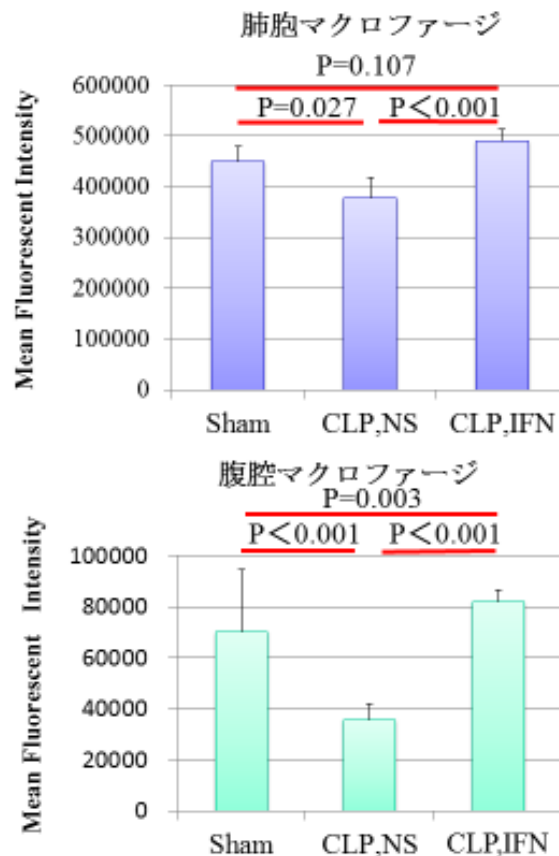


図27 マクロファージの食食能 (各群n=6)

肺胞・腹腔マクロファージはNS群ではSham群と比較して食食能は有意に低下した。IFN群では、NS群と比較して食食能は有意に上昇した。

実験 3-2 マクロファージを LPS 刺激後の TNF α 発現量 (図 28)

肺胞マクロファージにおける LPS 刺激の TNF α 発現量は、CLP,NS 群と比較して CLP,IFN 群では、有意に高値を示した。同様に腹腔マクロファージでも、TNF α 発現量は CLP,NS 群と比較して CLP,IFN 群では、有意に高値を示した。

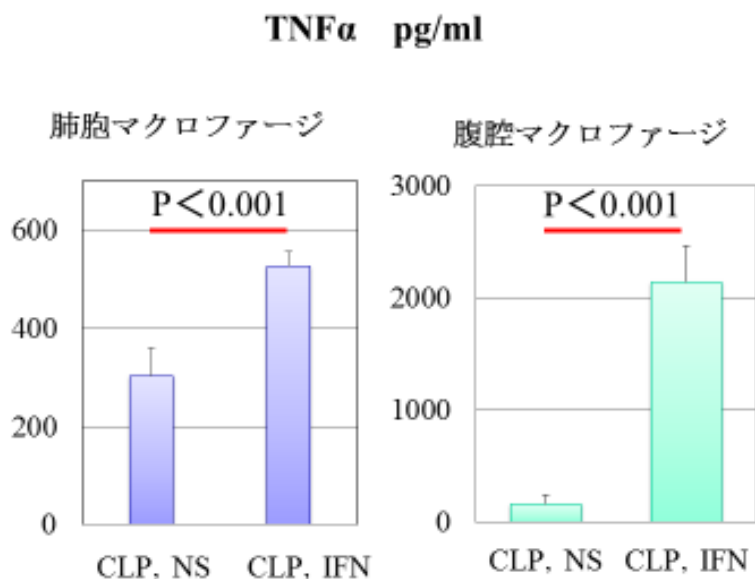


図28 マクロファージにおけるLPS刺激後(24時間後)のTNF α 発現量 (各群n=6)
肺胞・腹腔マクロファージLPS刺激後のTNF α 発現量は、NS群と比較してIFN群では有意に高値を示した。

実験 3-3 肺胞マクロファージにおけるインターフェロン γ 受容体 (IFN γ R) (図 29)

肺胞マクロファージでの IFN γ R は、sham 群と比較して、CLP,NS 群では有意に増加した。また IFN β を投与した CLP,IFN 群では、CLP,NS 群と比較して IFN γ R がさらに有意に上昇した。

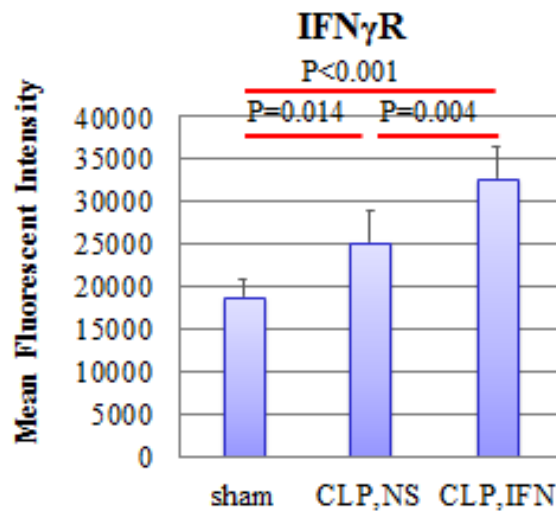


図29 肺胞マクロファージにおける
インターフェロン γ 受容体 (IFN γ R)
(各群n=5)

肺胞マクロファージにおけるIFN γ Rは、CLPにより増加し、IFN β を投与することでIFN γ Rはさらに有意に上昇した。

実験 4 インターフェロン β による脾臓細胞の変化

実験 4-1 脾臓細胞におけるインターフェロン γ 受容体 ($\text{IFN}\gamma\text{R}$) (図 30)

脾臓細胞の $\text{IFN}\gamma\text{R}$ は sham 群と比較して、CLP,NS 群、CLP,IFN 群では $\text{IFN}\gamma\text{R}$ が有意に上昇した。しかし CLP,NS 群、CLP,IFN 群では有意差は無かった。

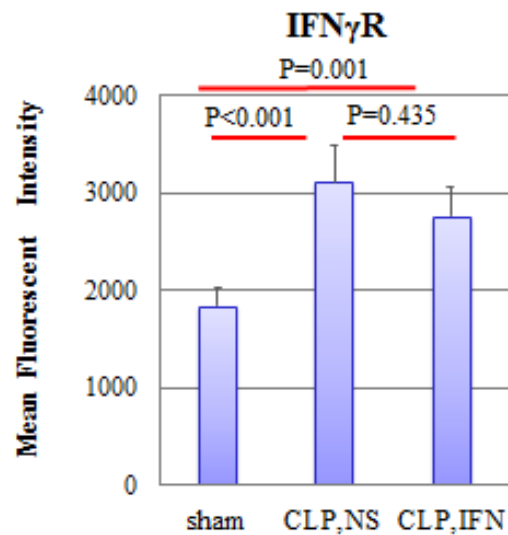


図30 脾臓細胞におけるインターフェロン γ 受容体 ($\text{IFN}\gamma\text{R}$) (各群 $n = 5$)

脾臓細胞の $\text{IFN}\gamma\text{R}$ は CLP により有意に増加した。CLP,NS 群と CLP,IFN 群では差を認めなかった。

実験 4-2 脾臓細胞におけるインターフェロン γ 分泌能 (図 31)

脾臓細胞における CD3・CD28 刺激後の IFN γ 分泌能は、sham 群と比較して、CLP,NS 群、CLP,IFN 群で IFN γ の分泌能は有意に低下した。CLP,NS 群、CLP,IFN 群での有意差は無かった。

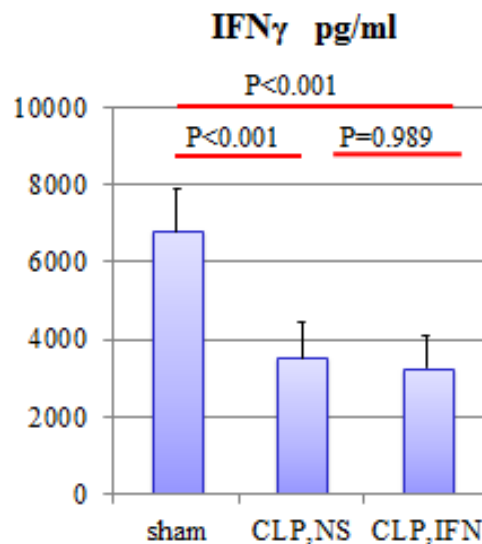


図31 脾臓細胞におけるインターフェロン γ 分泌能 (各群n=5)

脾臓細胞におけるIFN γ 分泌能は、sham群と比較して、CLP,NS群、CLP,IFN群で有意に低下した。CLP,NS群、CLP,IFN群での有意差は無かった。

第7章 考察

高齢化社会を迎えた現在、様々な基礎疾患を持つ人が増加し、また医療も高度化が進み、様々な合併症をもつ患者が手術や治療行為を受けるようになった。そのような背景の中、手術や感染、外傷などそれだけであれば軽微であったはずの患者が、感染症などを合併することにより重症化し、治療が遷延したり、救命が困難である事態に陥ることがある。そのような重症化にいたるプロセスを解明することは、救命救急、集中治療領域では不可欠であり、また重症化のプロセスに治療介入することで、さらなる治療成績の向上につながる。本研究では臨床での二次感染モデルとして、CLPによる腹膜炎後の緑膿菌肺炎による two hit mouse model を作成し、その解析から重症化には免疫抑制が関与していることが判明した。またインターフェロン β により two hit model の生存率は改善し、免疫抑制を改善する傾向があることが示唆された。

CLP に肺炎を組み合わせた two hit mouse model では、肺炎の菌種としては *P.aeruginosa*^{21,22,46}、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (*methicillin resistant staphylococcus aureus*; MRSA)⁴³、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (*methicillin sensitive staphylococcus aureus*; MSSA)⁴¹、*Listeria monocytogenes*⁴⁶ などが使用されている。肺炎は集中治療室における院内感染の 27 % を占め、院内肺炎の 86 % は人工呼吸器関連である⁴⁷。またその起因菌としては *P.aeruginosa*、*Staphylococcus aureus* が 1/4 ずつを占め、院内肺炎を想定して *P.aeruginosa* を使用することはより臨床に近い状況を反映できると思われる。

本検討では、腹膜炎に続く緑膿菌肺炎モデル (two hit model) が、過去の報告と一致して^{20,21}、CLP・肺炎の単独の侵襲と比較して生存率を下げることを示された。単独侵襲では80%以上の生存率が、2つ合併すると生存率が10%以下になるというのは臨床に重ねて考えると、二次感染の予防が生命予後を向上させる上で大変重要であることを示唆する。

このような two hit model による死亡率上昇のメカニズムは、肺内での炎症性サイトカインの発現量や、流入好中球数が、肺炎のみの sham 群と比較して有意に低下しており、本研究の結果では、免疫抑制が関わることを示唆する。two hit model では炎症性サイトカインである IL-6、TNF α が減少しているとともに、抗炎症性サイトカインである IL-10 が早期より上昇していることから免疫抑制が起きていると考えられる。また好中球を遊走させる KC が低値である two hit 群では、BALF 中の好中球数が低値であり、sham 群では早期から KC が上昇しており、これを受けて好中球が炎症部位により効率的に流入してきたと示唆される。好中球数の流入が多い sham 群では BALF 中の細菌量も低値であることを期待したが、本検討では細菌量で two hit 群と sham 群では差を認めなかった。two hit 群では早期より死亡例が多く、細菌量が多いと予想される重症群のサンプル採取が困難であること、またコロニーカウント法という細菌の計量法にばらつきが大きいことによって、有意差が検定出来なかった可能性もあると考えられる。

BALF 中の好中球数やサイトカインが高値であると、それによる肺傷害がおこるこ

とが懸念される。しかし肺病理からは sham 群での肺胞内細胞は多いものの、肺胞構造は比較的正常に保たれており、two hit 群ではすでに肺胞の硝子化、肺傷害が進行しており、肺胞内の細胞数は少ないが肺実質、間質への炎症細胞浸潤はむしろ増加していた。そのため肺胞中細胞数を表す BALF 中の流入好中球数では sham 群が多いのにもかかわらず、肺胞、肺実質全体の好中球数の指標としての MPO 活性ではむしろ two hit 群では有意に高値であり、two hit 群では肺実質、間質への細胞浸潤が多いことが示唆される。肺傷害の指標として今回 LIS を用いたが、この結果からも two hit 群では肺傷害の程度が強いことがわかる。また肺内水分量を表す lung wet/dry ratios でも two hit 群では sham 群と比べて、有意に肺が wet な状態であり、血管透過性が亢進している状況であり、two hit 群では肺傷害・肺水腫の程度がより強い状態であったといえる。これらの結果より、炎症性サイトカインの発現量が抑制されている two hit 群の方が、肺傷害が重症であることが確認された。適切な時期に、適切なレベルで炎症反応を惹起することが、結果的に肺傷害の程度を軽減し、生体防御に有効に働くことが示唆される結果であると考えられる。

このような免疫抑制を背景とした two hit model に対して、IFN β の投与は生存率を上昇させた。本検討の結果はヨーロッパでの ARDS 患者に対する臨床試験の結果と矛盾しない³⁸。Bellingan らの報告では、IFN β が肺血管透過性の亢進を抑制する機序が ARDS の予後改善のメカニズムとされている³⁸。しかし本検討では肺水分量は IFN β 投与の有無で有意な変化を生じず、生命予後の改善は別のメカニズムが考えられる。

肺内の生体防御能に着目したところ、今回の結果では、two hit 群で著明に低下した BALF 中の好中球数が IFN β 投与によって、sham 群と同様にまで回復した。細菌量は 3 群では差を認めなかったが、18 時間、24 時間の時点では IFN β 投与群で菌量は少ない傾向にはあった。肺内の炎症性サイトカインも、2H,NS 群と比較すると 2H,IFN 群では TNF α 、KC は有意に上昇しており、IL-6 も増加している傾向を示した。これらの結果から、IFN β は、CLP によって低下した生体防御能を復活させている可能性が推定される。

肺胞、肺実質全体の好中球数を示す MPO 活性では 2H,NS 群、2H,IFN 群両者に差がなかったが、肺胞内に流入した好中球数は IFN β 投与群で有意に上昇していた。IFN 群では、好中球がより多く肺胞内へ流入していた可能性が考えられる。この結果は BALF 中の KC 値が有意に高いことと符号する。肺病理像を見ても、IFN β 投与群の病理像は sham 群の病理像よりは硝子化、出血、肺傷害は認めるものの、two hit 群と比べるとその傷害度は軽度であり、2H,IFN 群は 2H,NS 群と比較して有意に LIS が低く、肺傷害が軽度であることが分かった。

これらの結果より、IFN β は、腹膜炎の後に起きている免疫抑制状態から、生体防御能を賦活する結果、肺傷害を低減することで、生存率を上げたと推論できると考える。

本研究では動物モデルが肺炎急性期の生存率を見るもので、IFN β も単回投与にとどめて反応を見たが、感染によらない肺傷害モデル、ARDS モデルなどで、より頻度

や投与量を増やした場合は、従来唱えられている、IFN β の血管透過性抑制効果が予後改善に関与する事象もあるかもしれない²⁷。

IFN β が免疫機能に与える影響をより詳細に検討するため、*ex vivo*の実験として、マクロファージに着目して、その機能変化を検討した。two hitによる影響、IFN β 投与による影響を考える上では、リンパ球の機能²¹、樹状細胞の機能⁴⁸、好中球の機能⁴¹なども重要であると考えており、これらの機能変化に関しては今後の課題である。まずマクロファージの機能変化に着目したのは、肺に細菌が流入した際にまず最初に接触するのはマクロファージであり、マクロファージが司令塔となり、好中球の誘導や、サイトカインの誘導がおきると考えたためである。本検討の結果では肺胞、腹腔マクロファージの貪食機能はCLP後に抑制され、IFN β の投与はこれを改善する結果であった。LPSに対する反応性はIFN β を投与することで上昇した。IFN β が貪食能を増加させたことは、生体防御能の改善による生存率上昇に寄与したと考えられる。

マクロファージ機能を修飾するメディエーターとして、インターフェロン γ は良く知られているが、同じインターフェロンファミリーとして、そのシグナルがどのように影響しているかは興味深い。過去の文献から、IFN β にはIFN γ との相互作用による効果があるといわれている⁴⁰。そこで肺胞マクロファージにおいてIFN β 投与によるIFN γ 受容体(IFN γ R)の変化をみた。またリンパ球が多い脾臓より採取した脾臓細胞を対象として、IFN β 投与によるIFN γ 受容体の変化、CD3・CD28刺激後のIFN γ 分泌能を評価した。肺胞マクロファージにおけるIFN γ 受容体はCLPにより増加し、IFN β

を投与することで IFN γ R はさらに有意に上昇した。脾臓細胞の IFN γ R は CLP により有意に増加したが、IFN β による効果は認めなかった。肺胞マクロファージと脾臓細胞における IFN γ R において、IFN β の効果に違いが出ていることは興味深い結果である。肺胞マクロファージにおける IFN γ R の変化は、次なる刺激である肺炎に対して影響した可能性を示唆する。また脾臓細胞における CD3・CD28 刺激後の IFN γ 分泌能は過去の文献でも報告されている方法であり、その結果は CLP4 日後の IFN γ 分泌能は低下しており、CLP による免疫抑制の影響であると考察されている²¹。本検討でも CD3・CD28 刺激後の IFN γ 分泌能は CLP により有意に低下しており、CLP による免疫抑制の影響が示唆された。

上記を踏まえると肺胞マクロファージにおける IFN β と IFN γ との相互作用が、本検討の結果に影響を与えた可能性はある。IFN β の投与により IFN γ が賦活され、免疫抑制状態から免疫賦活へと変化したのではないかと考えられる (図 32)。また IFN β による BAL 中 KC の上昇により、肺内好中球数が増加したことも、炎症をより賦活する結果となったことも考えられる。IFN β と IFN γ の関連性に関しては、JAK (janus activated kinase) /STAT (signal transducer and activator of transcription) をはじめとした、シグナル伝達の下流の転写因子などの影響も検討し、より詳細なシグナル伝達への影響を検討する必要があると考えている。

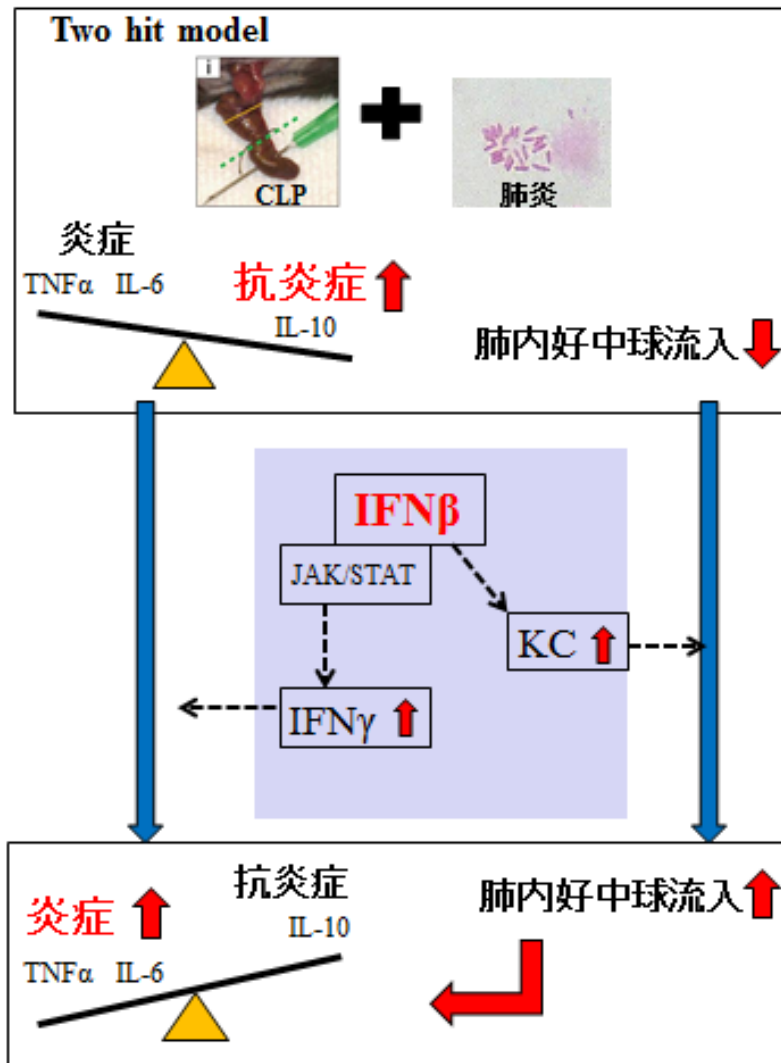


図 32 IFNβ の生体防御能における効果

Two hit model で低下した生体防御能を IFNβ は改善した。IFNβ の投与により IFNγ が賦活され、免疫抑制状態から免疫賦活へと変化した可能性が考えられる。また IFNβ による BAL 中の KC の上昇が、肺内好中球数の増加をもたらし、それがさらなる炎症を賦活する結果となった可能性も考えられる。

近年動物モデルにおける IFN β の影響について報告する研究が散見されるようになった。Dejager らの報告⁴⁹では、CLP または LPS モデルに対して、インターフェロンのシグナル阻害が生存率を改善すると報告している。IFN β の受容体の一つである IFNAR1 のノックアウトマウス、また IFNAR 1 の阻害抗体の使用により、流入好中球数の低下が改善したり、炎症性サイトカインの低下が抑制されたりするとの報告である。インターフェロンシグナルの生存率との関係と言う観点で、彼らの報告は本研究結果と相反する。動物モデルの違い、薬剤の投与時期などが影響した可能性がある。本研究では免疫抑制状態の two hit model であり、Dejager のモデルは LPS 投与、CLP という、いずれも single hit で炎症を惹起するモデルである。また Yoo らは、IFN β 投与が CLP や LPS 投与の single hit によるモデルにおいて生存率を改善したとの報告しており⁵⁰、我々の生存率の結果と同様であるが、その機序は免疫機能に抑制的に働くと推論されており、その点は本検討の結果と相反するが、彼らの報告も、動物モデルが異なり、また IFN β の投与量が 1000 U/body と本研究の 1/10 以下である。こうしたことを勘案しても、インターフェロン β を臨床応用することを考える際に注意しないと期待と全く逆の影響を呈することも考えられ、注意が必要である。本検討のモデルでは、CLP により発生した免疫抑制状態を IFN β が正常化することによる肺炎への耐性向上が、生存率を上げている可能性が考えられる。しかし、こうした病態以外では、IFN β を投与することが、有効な生体防御能を阻害する可能性を示唆するものであり、IFN β が有効な特定の病態や、それぞれにおける至適投与量、至適投与時期があると

考えられ、IFN β 投与が有効である病態を反映するバイオマーカーを検討する必要があると考えている。

また ARDS に関わる研究で行われているように、IFN β が CD73 を含めた肺胞構造に与える詳細な影響については本検討では行っていない。Bellingan らの報告では、人の肺組織中の気管支周囲血管壁での CD73 は増加しており、IFN β の濃度依存性に増加するとしている³⁸。様々な炎症制御の臨床試験が失敗に終わっていることから、IFN β が炎症制御のみで生存率を上げるというものであるとは考えにくい。炎症制御だけでなく、血管透過性の制御も行うことによって、全体として良好な治療成績に至ったのではないかと考えており、そういう意味では血管透過性の制御や肺への影響そのものについては、今後より深い検討が必要であると考えている。

本検討は回盲部結紮穿孔に引き続く緑膿菌肺炎で、単独侵襲に比較して著明に生存率が低下する two hit model を確立した。Two hit により高度に低下した生存率は、IFN β の全身投与により上昇した。Two hit model では、肺内の生体防御能が低下しており、IFN β はこれらを改善する傾向が認められた。免疫抑制を背景とした病態に対して、新たな治療法の創造は、今後の重症患者の集中治療において治療戦略の一つになる可能性が示唆された。

第8章 結論

回盲部結紮穿孔に引き続く緑膿菌肺炎で、単独侵襲に比較して著明に生存率が低下する two hit model を確立した。two hit により高度に低下した生存率は、IFN β の全身投与により上昇した。Two hit model では、肺内の生体防御能が低下しており、IFN β はこれらを改善する傾向が認められた。

参考文献

1. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent J-L, Levy MM: Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.* 32: 858–873, 2004
2. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut J-F, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent J-L: Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit. Care Med.* 36: 296–327, 2008
3. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent J-L, Ramsay G: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.* 31: 1250–6, 2003
4. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb SA, Beale RJ, Vincent J-L, Moreno R: Surviving sepsis campaign: international

- guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit. Care Med.* 41: 580–637, 2013
5. Gomez HG, Gonzalez SM, Londoño JM, Hoyos NA, Niño CD, Leon AL, Velilla PA, Rugeles MT, Jaimes FA: Immunological characterization of compensatory anti-inflammatory response syndrome in patients with severe sepsis: a longitudinal study*. *Crit. Care Med.* 42: 771–80, 2014
 6. Bone RC: Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit. Care Med.* 24: 1125–8, 1996
 7. 日本集中治療医学会 Sepsis Registry 委員会: 日本版敗血症診療ガイドライン. 1-109, 2013
 8. Tabah A, Koulenti D, Laupland K, Misset B, Valles J, Bruzzi de Carvalho F, Paiva JA, Cakar N, Ma X, Eggimann P, Antonelli M, Bonten MJM, Csomos A, Krueger WA, Mikstacki A, Lipman J, Depuydt P, Vesin A, Garrouste-Orgeas M, Zahar J-R, Blot S, Carlet J, Brun-Buisson C, Martin C, Rello J, Dimopoulos G, Timsit J-F: Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: the EUROBACT International Cohort Study. *Intensive Care Med.* 38: 1930–45, 2012

9. Vincent J, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K: International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 302: 2323–9, 2009
10. Stevenson EK, Rubenstein AR, Radin GT, Wiener RS, Walkey AJ: Two decades of mortality trends among patients with severe sepsis: a comparative meta-analysis*. *Crit. Care Med.* 42: 625–31, 2014
11. Rhee C, Gohil S, Klompas M: Regulatory Mandates for Sepsis Care—Reasons for Caution. *N. Engl. J. Med.* 370: 1673–6, 2014
12. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M: Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit. Care Med.* 34: 1589–96, 2006
13. Takeuchi O, Akira S: Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805–20, 2010
14. Bianchi ME: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* 81: 1–5, 2007

15. Osuchowski MF, Craciun F, Weixelbaumer KM, Duffy ER, Remick DG: Sepsis chronically in MARS: systemic cytokine responses are always mixed regardless of the outcome, magnitude, or phase of sepsis. *J. Immunol.* 189: 4648–56, 2012
16. Iskander KN, Osuchowski MF, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Stepien D, Valentine C, Remick DG: Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiol. Rev.* 93: 1247–88, 2013
17. Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG: Circulating Cytokine/Inhibitor Profiles Reshape the Understanding of the SIRS/CARS Continuum in Sepsis and Predict Mortality. *J. Immunol.* 177: 1967–1974, 2006
18. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M: Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4: 854–65, 2005
19. Zahar J-R, Timsit J-F, Garrouste-Orgeas M, Français A, Vesin A, Vesim A, Descorps-Declere A, Dubois Y, Souweine B, Haouache H, Goldgran-Toledano D, Allaouchiche B, Azoulay E, Adrie C: Outcomes in severe sepsis and patients with septic shock: pathogen species and infection sites are not associated with mortality. *Crit. Care Med.* 39: 1886–95, 2011

20. Muenzer JT, Davis CG, Dunne BS, Unsinger J, Dunne WM, Hotchkiss RS: Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant “two-hit” model of sepsis. *Shock* 26: 565–70, 2006
21. Muenzer JT, Davis CG, Chang K, Schmidt RE, Dunne WM, Coopersmith CM, Hotchkiss RS: Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis. *Infect. Immun.* 78: 1582–92, 2010
22. Chen GH, Reddy RC, Newstead MW, Tateda K, Kyasapura BL, Standiford TJ: Intrapulmonary TNF gene therapy reverses sepsis-induced suppression of lung antibacterial host defense. *J. Immunol.* 165: 6496–503, 2000
23. Steinhäuser ML, Hogaboam CM, Kunkel SL, Lukacs NW, Strieter RM, Standiford TJ: IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J. Immunol.* 162: 392–9, 1999
24. Davis CG, Chang K, Osborne D, Walton AH, Ghosh S, Dunne WM, Hotchkiss RS, Muenzer JT: TLR3 agonist improves survival to secondary pneumonia in a double injury model. *J. Surg. Res.* 182: 270–6, 2013
25. Pène F, Grimaldi D, Zuber B, Sauneuf B, Rousseau C, El Hachem C, Martin C, Belaïdouni N, Balloy V, Mira J-P, Chiche J-D: Toll-like receptor 2 deficiency

- increases resistance to *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in the setting of sepsis-induced immune dysfunction. *J. Infect. Dis.* 206: 932–42, 2012
26. An S, Hishikawa Y, Liu J, Koji T: Lung injury after ischemia-reperfusion of small intestine in rats involves apoptosis of type II alveolar epithelial cells mediated by TNF-alpha and activation of Bid pathway. *Apoptosis* 12: 1989–2001, 2007
 27. Kiss J, Yegutkin GG, Koskinen K, Savunen T, Jalkanen S, Salmi M: IFN-beta protects from vascular leakage via up-regulation of CD73. *Eur. J. Immunol.* 37: 3334–8, 2007
 28. Ware LB, Matthay MA: The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 342: 1334–49, 2000
 29. Doyle RL, Szaflarski N, Modin GW, Wiener-Kronish JP, Matthay M: Identification of patients with acute lung injury. Predictors of mortality. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152: 1818–24, 1995
 30. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ: Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151: 293–301, 1995
 31. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of

- innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee.
American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101:
1644–55, 1992
32. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E,
Camporota L, Slutsky AS: Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition.
JAMA 307: 2526–33, 2012
33. Taylor RW, Zimmerman JL, Dellinger RP, Straube RC, Criner GJ, Davis K, Kelly KM,
Smith TC, Small RJ: Low-dose inhaled nitric oxide in patients with acute lung injury: a
randomized controlled trial. *JAMA* 291: 1603–9, 2004
34. Calfee CS, Matthay MA: Nonventilatory treatments for acute lung injury and ARDS.
Chest 131: 913–20, 2007
35. Zeiher BG, Artigas A, Vincent J-L, Dmitrienko A, Jackson K, Thompson BT, Bernard
G: Neutrophil elastase inhibition in acute lung injury: Results of the STRIVE study.
Crit. Care Med. 32: 1695–1702, 2004
36. Bernard GR, Wheeler AP, Arons MM, Morris PE, Paz HL, Russell JA, Wright PE: A
trial of antioxidants N-acetylcysteine and procysteine in ARDS. The Antioxidant in
ARDS Study Group. *Chest* 112: 164–72, 1997

37. Spragg RG, Lewis JF, Walmrath H-D, Johannigman J, Bellingan G, Laterre P-F, Witte MC, Richards GA, Rippin G, Rathgeb F, Häfner D, Taut FJH, Seeger W: Effect of recombinant surfactant protein C-based surfactant on the acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 351: 884–92, 2004
38. Bellingan G, Maksimow M, Howell DC, Stotz M, Beale R, Beatty M, Walsh T, Binning A, Davidson A, Kuper M, Shah S, Cooper J, Waris M, Yegutkin GG, Jalkanen J, Salmi M, Piippo I, Jalkanen M, Montgomery H, Jalkanen S: The effect of intravenous interferon-beta-1a (FP-1201) on lung CD73 expression and on acute respiratory distress syndrome mortality: an open-label study. *lancet. Respir. Med.* 2: 98–107, 2014
39. Taniguchi T, Takaoka A: A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 378–86, 2001
40. Takaoka A, Yanai H: Interferon signalling network in innate defence. *Cell. Microbiol.* 8: 907–22, 2006
41. Robertson CM, Perrone EE, McConnell KW, Dunne WM, Boody B, Brahmhatt T, Diacovo MJ, Van Rooijen N, Hogue LA, Cannon CL, Buchman TG, Hotchkiss RS, Coopersmith CM: Neutrophil depletion causes a fatal defect in murine pulmonary *Staphylococcus aureus* clearance. *J. Surg. Res.* 150: 278–85, 2008

42. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA: Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat. Protoc.* 4: 31–6, 2009
43. Jung E, Perrone EE, Liang Z, Breed ER, Dominguez JA, Clark AT, Fox AC, Dunne WM, Burd EM, Farris AB, Hotchkiss RS, Coopersmith CM: Cecal ligation and puncture followed by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia increases mortality in mice and blunts production of local and systemic cytokines. *Shock* 37: 85–94, 2012
44. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, Kuebler WM: An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44: 725–38, 2011
45. Folz RJ, Abushamaa AM, Suliman HB: Extracellular superoxide dismutase in the airways of transgenic mice reduces inflammation and attenuates lung toxicity following hyperoxia. *J. Clin. Invest.* 103: 1055–66, 1999
46. Delano MJ, Thayer T, Gabrilovich S, Kelly-Scumpia KM, Winfield RD, Scumpia PO, Cuenca AG, Warner E, Wallet SM, Wallet MA, O'Malley KA, Ramphal R, Clare-Salzer M, Efron PA, Mathews CE, Moldawer LL: Sepsis induces early

- alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. *J. Immunol.* 186: 195–202, 2011
47. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP: Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit. Care Med.* 27: 887–92, 1999
48. Pène F, Zuber B, Courtine E, Rousseau C, Ouaz F, Toubiana J, Tazi A, Mira J, Chiche J: Dendritic cells modulate lung response to *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of sepsis-induced immune dysfunction. *J. Immunol.* 181: 8513–20, 2008
49. Dejager L, Vandevyver S, Ballegeer M, Van Wonterghem E, An L-L, Riggs J, Kolbeck R, Libert C: Pharmacological inhibition of type I interferon signaling protects mice against lethal sepsis. *J. Infect. Dis.* 209: 960–70, 2014
50. Yoo C-H, Yeom J-H, Heo J-J, Song E-K, Lee S-I, Han M-K: Interferon β protects against lethal endotoxic and septic shock through SIRT1 upregulation. *Sci. Rep.* 4: 4220, 2014

謝辞

本研究は東京大学医学系研究科麻酔科学において、内田 寛治 准教授、山田 芳嗣 教授、また東京大学医学系研究科救急医学において、矢作 直樹 教授、中島 勸准教授、土井 研人 講師のご指導のもとに行ったものである。

また本研究は丸石製薬株式会社中央研究所開発研究部の山村 睦朗 氏、東京大学血液浄化療法部の野入 英世 准教授との共同研究であり、心より感謝いたします。

研究の機会を与えていただきました救急部 矢作 直樹 教授、麻酔科 内田 寛治 准教授、山田 芳嗣 教授に深く感謝の意を表します。