

シンポジウム：侵襲制御を科学する

外科侵襲後の生体反応の特性

—免疫担当細胞に注目して—

小野 聡¹⁾, 池田寿昭¹⁾, 辻本広紀²⁾, 平木修一²⁾, 上野琢哉¹⁾

¹⁾ 東京医科大学八王子医療センター 特定集中治療部

²⁾ 防衛医科大学校 外科学講座

キーワード：重症敗血症, immunoparalysis, 制御性T細胞

連絡先：東京医科大学八王子医療センター 特定集中治療部 小野 聡

〒193-0944 東京都八王子市館町1163

Tel：042-665-5611

Fax：042-665-1796

E-mail：sono@tokyo-med.ac.jp

要 旨

外科侵襲後の生体反応について、SIRS(Systemic Inflammatory Response Syndrome)やCARS(Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome)の病態と炎症・免疫担当細胞のサイトカイン産生能やレセプター、表面抗原発現との関連に着目し概説した。具体的には、末梢血単核球でのサイトカイン(TNF- α やIFN- γ)産生能、単球の抗原提示機能(MHC-class II:HLA-DR), CD16 receptorの発現やCD4⁺T細胞, 制御性T細胞に注目し、過大手術侵襲患者や重症敗血症患者の臨床データを分析し解説した。

1. はじめに

生体は手術、外傷や感染などの侵襲を受けると、生体の内部環境を回復するために神経内分泌系、心血管系、代謝系、免疫系などの各臓器や系がお互いに関連をもちながら多彩な生理学的、生化学的変化が誘導される。これまで多くの生体反応は、神経・内分泌反応によって説明されてきたが、近年の各種分子生物学的解析方法の進歩により様々なメディエータが発見され、それらが様々な生体反応を惹起することが解ってきた。その中でも特に重要な役割を果たしているのが炎症・免疫担当細胞から産生されるサイトカインの役割である。サイトカインは細胞間を結ぶ情報伝達物質

として、細胞の分化、増殖から免疫応答、炎症、代謝反応を調節し各種生体反応を調節する極めて重要な液性因子である。また最近の研究により、神経内分泌反応と炎症担当細胞とは密接に関連していることが明らかになってきた。

そこで本稿では、外科侵襲後の生体反応を理解するうえで重要な免疫・炎症担当細胞に注目し、自験例での結果に文献的考察を加え概説する。

2. 外科侵襲とSIRS, CARSの病態

外科侵襲後の生体反応を理解する上で、SIRS(systemic inflammatory response syndrome)¹⁾とCARS(compensatory anti-inflammatory re-

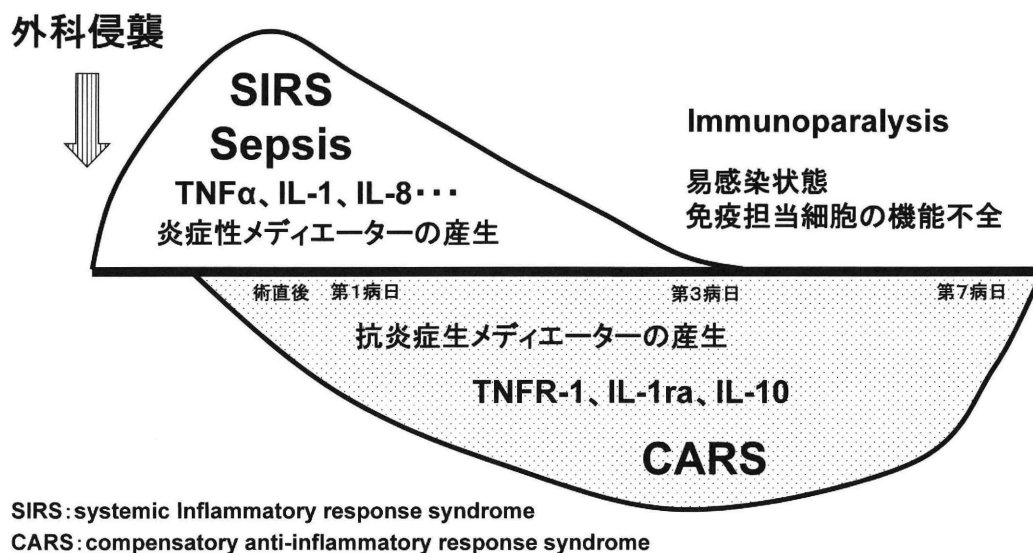


図1 外科侵襲後のSIRSとCARSの病態

sponse syndrome)^{2,3)}の病態を理解することは重要である。外科侵襲後には、侵襲局所において炎症担当細胞が活性化され、TNF α 、interleukin (IL)-1などの炎症性サイトカインが産生される。その際生体は、体温の上昇、脈拍数、呼吸数や白血球数の増加などを来し、臨床的にSIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) と呼ばれる状態になる。したがってSIRSの本態は炎症性サイトカイン (pro-inflammatory cytokine) の過剰産生により高サイトカイン血症 (hypercytokinemia) を来し、全身性に著明な炎症反応が惹起された状態である。

一方生体内では、このSIRSに対して抗炎症性サイトカインであるIL-10や内因性のサイトカイン拮抗物質であるIL-1receptor antagonist (IL-1ra)、TNF receptor I (TNFR-I)などを産生し、炎症反応を抑えようとする。これら抗炎症性メディエーターが持続的に過剰に産生された場合には、代償性抗炎症反応症候群とも言うべき状態で、全身的に抗炎症性サイトカイン (anti-inflammatory cytokine) が優位になったCARS (Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome) 状態になる。その際生体は免疫担当細胞が機能不全に陥り感染に対する生体防御機構が低下した、いわゆるimmunoparalysisと呼ばれる病態になる (図1)。しかし先述のSIRSには

臨床的評価が容易にできる明確な診断基準が存在するのに対し、CARSには存在しないため、いわば概念的病態ともいえる。しかしかつてSIRSの病態を提唱したBone⁴⁾やKox⁵⁾、Zedlerら⁶⁾はCARSの定義として単球の炎症性サイトカイン産生能消失、単球の抗原提示機能低下やCD8⁺T細胞優位な状態など、を提唱している。

3. 外科侵襲と免疫応答

外科侵襲後の臨床病態を把握する上で免疫機能を客観的に評価し、治療戦略を構築することは重要である。近年の研究成果により様々な免疫担当細胞の機能解析が可能になり臨床応用が期待されている。

1) 単球の免疫能

外科侵襲後の免疫応答において単球のMHC class II抗原 (HLA-DR) は、T細胞のレセプターを介して抗原提示を行いT細胞の活性化を引き起こす。特に外科侵襲下ではHLA-DRとCD4⁺T細胞との関係が重要な役割を果たしている (図2)。そこで我々は外科侵襲患者を対象にHLA-DR発現率と患者の重症度との関連を検討した。その結果、食道癌手術など侵襲の大きな手術では術後のHLA-DR発現率は著明に低下すること、また敗血症患者ではsepsisに比べseptic shockでは有意に低値で、APACHE II score (acute

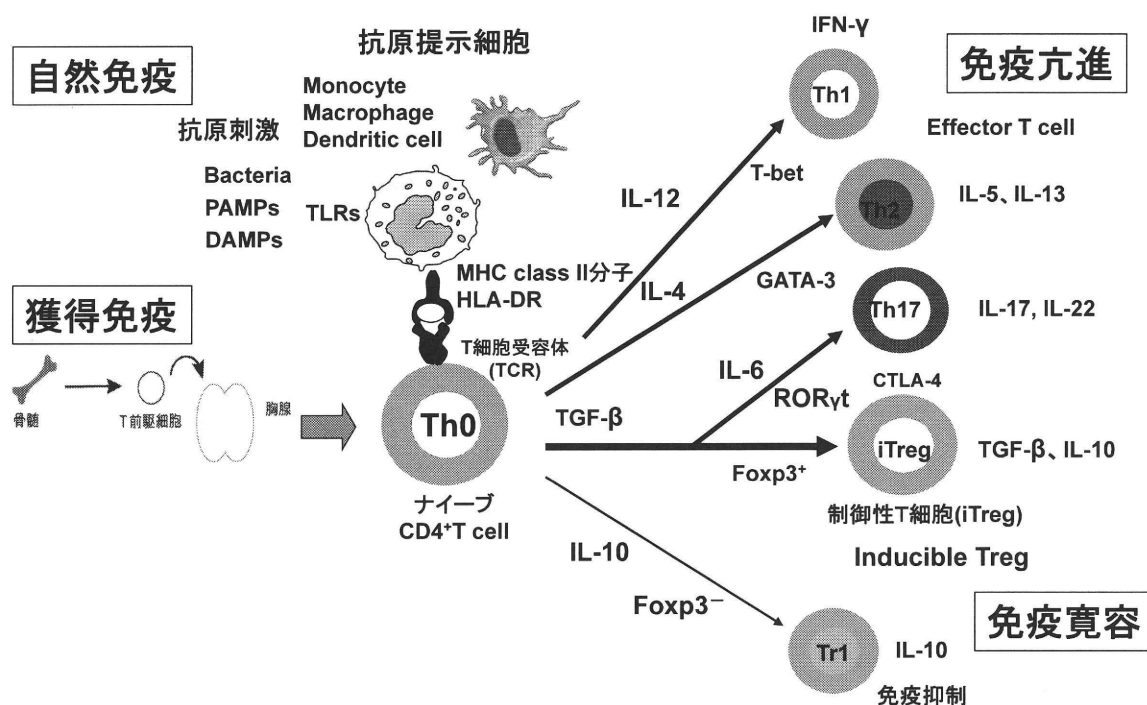


図2 外科侵襲と免疫応答

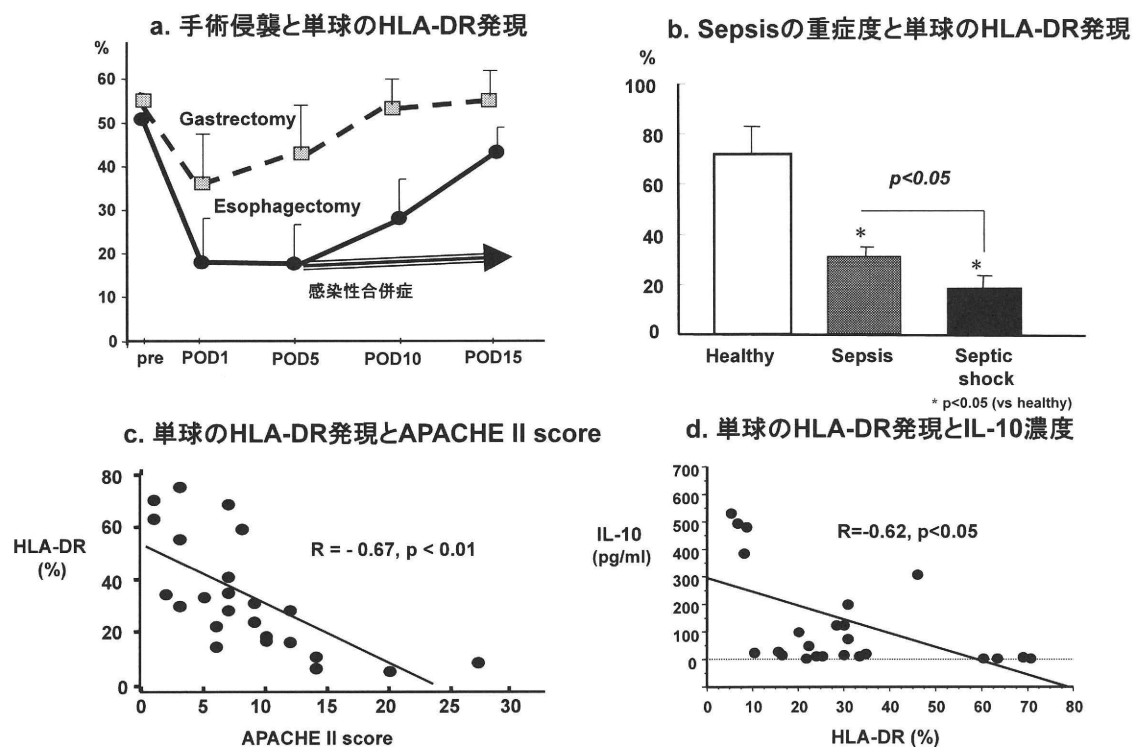


図3 末梢血単球の HLA-DR 発現率と手術侵襲，sepsis 重症度，血中 IL-10 濃度との関連

physiology and chronic health evaluation) と有意に負の相関関係を認めることから (図3)，敗血症患者の重症度を評価する上で極めて有用な免疫学的マーカーである^{7, 8, 9)}。先述の Bone らの CARS の定義では具体的な数値として，単球

の HLA-DR 発現が 30% 以下に低下した場合を CARS と定義しているが，単球の HLA-DR 発現率は炎症性サイトカインである IL-10 濃度と有意に負の相関関係を認めるため (図3)，敗血症時の単球の HLA-DR 発現低下と IL-10 には密接

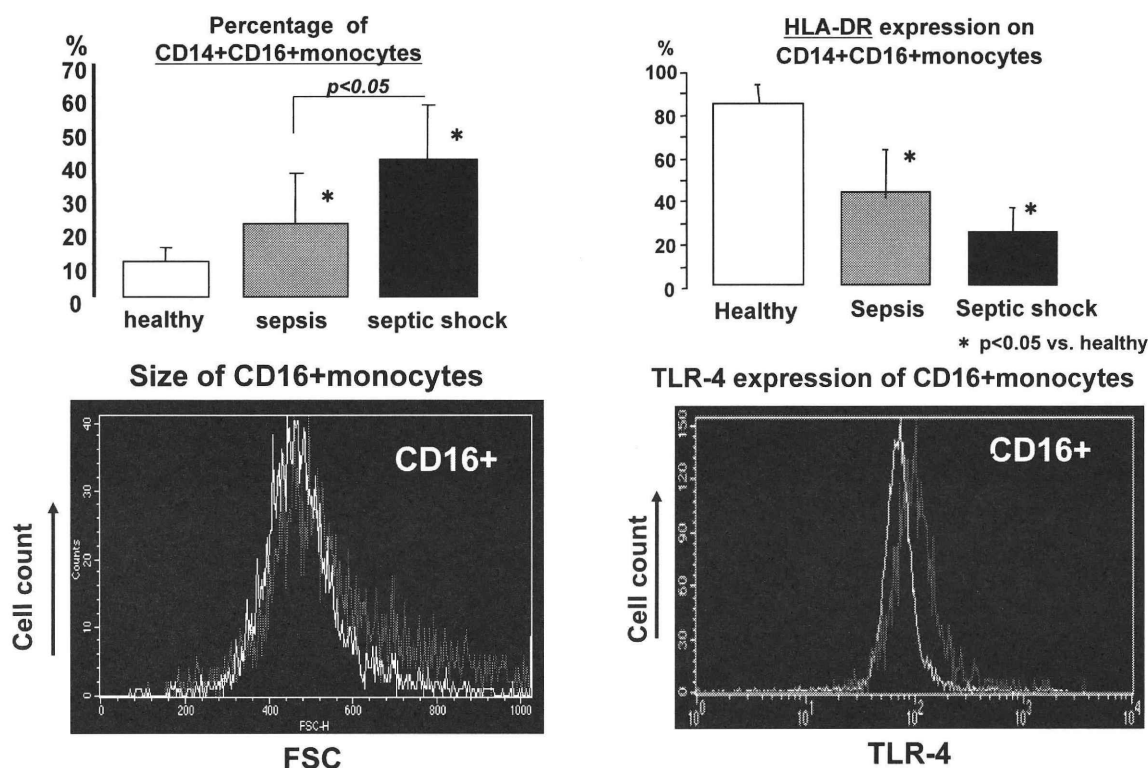


図4 敗血症時の末梢血 CD16 陽性単球の増加とその特徴

な関連があることが推察される。

また我々は敗血症患者では末梢血中に炎症性サイトカイン産生能や抗原提示機能が低下した単球集団、つまり CD16 陽性単球が著明に増加していることを報告してきた (図4)¹⁰⁾。敗血症患者での CD16 陽性単球は、HLA-DR 発現率が低下し、細胞径がやや大きく、TLR (Toll-like receptor)-4 が高発現している特徴がある (図4)¹¹⁾。近年、我々の結果と同様の結果が報告されているが^{12, 13)}、さらに CD16 陽性単球集団の中に IL-10 を特に産生する細胞集団が存在することも明らかになってきた。したがって、敗血症時の末梢血単球は抗原提示能や炎症性サイトカイン産生能が低下し、逆に IL-10 など免疫機能低下に関与しているサイトカインを多く産生する特徴を有している。したがって敗血症時の immunoparalysis の病態形成にこのような単球集団が深く関与していることが推察される。

2) CD4⁺T細胞, Th1, Th2 サイトカインと制御性T細胞

T細胞は骨髄で産生された後、胸腺で分化成熟し、発現する T細胞抗原受容体 (TCR) の種類

により $\alpha\beta$ 型 T細胞と $\gamma\delta$ 型 T細胞に分けられる。 $\alpha\beta$ 型 T細胞は末梢血 Tリンパ球の大部分を占め、発現する補助受容体の違いにより CD4⁺ (ヘルパー) T細胞と CD8⁺ (キラー/サプレッサー) T細胞に分けられる。T細胞の抗原認識機構は、細胞表面にある抗原レセプター (CD3 分子) に抗原が結合して活性化されるが、この場合抗原提示細胞上の MHC との組み合わせにより抗原認識がなされる。胸腺から移出した T細胞は、抗原刺激を未だ受けていないという意味でナイーブ T細胞 (naive T cell = 無知, 未経験) とよばれ、抗原によって活性化され増殖期に入った T細胞は、増殖を繰り返すなかで機能発現に向けた分化を開始する (図2)。さらに生体の免疫調節はこれら CD4⁺T細胞の産生するサイトカインのバランスによって成立している。つまりナイーブ CD4⁺T細胞は抗原提示細胞からの抗原刺激や IL-12, IL-4 などのサイトカイン刺激によって Th1 あるいは Th2 へと機能的に分化する。IFN- γ や IL-2 に代表される Th1 系サイトカインは細胞性免疫の中心的役割を、IL-5 や IL-13 に代表される Th2 系サイトカインは体液性免疫の調節に重要

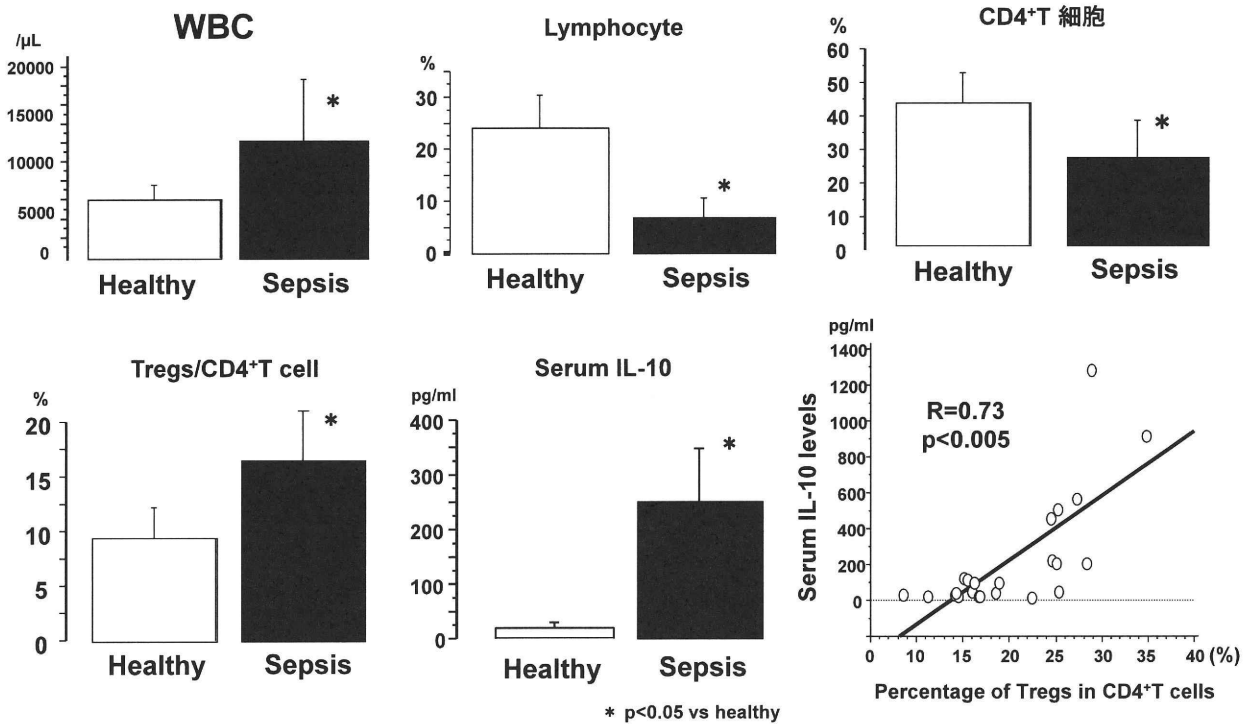


図5 敗血症での白血球数, リンパ球, CD4⁺T細胞とCD4⁺T細胞に占めるTregの割合, 血中IL-10濃度

な役割を果たし, それぞれのバランスによって免疫機能の恒常性が維持されている (図2). しかし侵襲生体では交感神経系が亢進するため, ノルアドレナリンの作用により Th1 細胞機能が抑制されること, 末梢血単核球で IFN- γ 産生能が低下していること¹⁴⁾, などにより相対的に Th2 優位へ shift している.

このような外科侵襲後の Th1, Th2 サイトカインバランスの失調には, 免疫反応を抑制的に調節する特異なリンパ球集団, つまり制御性 T 細胞 (Regulatory T cell: Treg) の関与が指摘されその役割が注目されている^{15, 16)}. Treg はもともと CD25 強陽性の CD4⁺T 細胞として認識されていたが, その機能発現のマスター制御分子が転写因子 Foxp-3 であることが明らかになり, Foxp-3 陽性 CD25⁺CD4⁺T 細胞として認識されている¹⁷⁾. また CD4⁺T 細胞は, 抗原刺激を受けるとさまざまな炎症性サイトカインを分泌する Th1, Th2, Th17 などの effector 細胞に分化するが, Treg は炎症性サイトカインを分泌せず, むしろ免疫応答を抑制する働きを有する. したがって Treg は CD4⁺T 細胞の中で免疫抑制に特化した細胞集

団であり外科侵襲の病態においては, Treg の増加により免疫機能が持続的に抑制されるため immunoparalysis になり, 致死的病態に陥ることが指摘されている^{18, 19)}. また Treg は単球の HLA-DR 発現を直接低下させ, 主に Th2 サイトカインを産生し Th1 サイトカインはほとんど産生しないため²⁰⁾, 外科侵襲時の Th2 優位な病態形成に関与していることが推察される. 図5に敗血症患者でのリンパ球の割合, CD4⁺T細胞の割合と CD4⁺T細胞に占める Treg の割合を示したが, 健常人に比しリンパ球, CD4⁺T細胞の割合は有意に低下しているが, CD4⁺T細胞に占める Treg 細胞の割合は逆に増加している. さらに, 血中 IL-10 濃度と Treg 細胞の割合は有意に正の相関関係を示している. したがって敗血症患者の CD4⁺T細胞の割合, Treg 細胞の割合や血中 IL-10 濃度を測定することは, immunoparalysis の指標として有用であろう.

4. Immunoparalysis 対策

待機手術などの周術期患者に対しては術前, 術後に immune modulating nutrition (IMN: 免疫

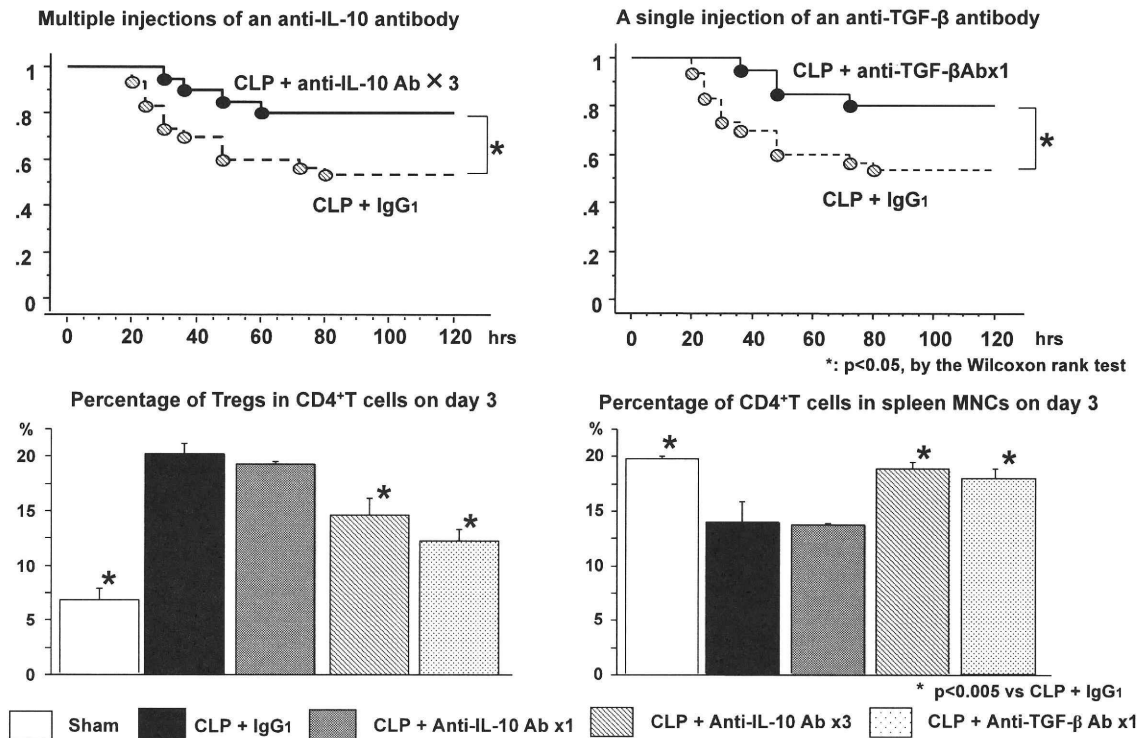


図6 敗血症マウスに対する抗 IL-10 抗体, 抗 TGF-β 抗体投与後の生存率, Treg 細胞の割合の変化

調整経腸栄養剤)を投与することによって術後感染性合併症の発生率が低下することが報告されている²¹⁾。一方,重症敗血症で immunoparalysis に陥った生体の免疫機能を回復させることは極めて難しい。最近, sepsis-associated immunosuppression 患者を対象に GM-CSF 投与の有効性に関する小規模の RCT が行われ, GM-CSF を投与することによって単球の HLA-DR 低下を回復させることは可能であることが報告されている²²⁾。また以前我々は腹膜炎 (cecal ligation and puncture: CLP) マウスを作成し, Th2 優位に傾いているサイトカインバランスに対し, Th1 サイトカインを誘導する IL-12 を投与することが有用であることを報告している²³⁾。さらに最近我々は CLP マウスを用いて Treg 細胞の変化やその制御について検討した。その結果, CLP マウスでは脾臓において Treg 細胞が有意に増加し, Treg 細胞の誘導に関与している TGF-β, および腹膜炎重症化に伴い著明に上昇する IL-10 濃度と強い正の相関関係を認めた。そこで sepsis に対する抗サイトカイン療法の可能性について検討するため, CLP モデル作成後に抗 IL-10 抗体あるいは

抗 TGF-β 抗体を投与し Treg 細胞の誘導が抑制されるかどうか, さらに予後改善効果について検討した。その結果, 抗 IL-10 抗体を6時間後に単回投与したモデルでは Treg 細胞の誘導抑制効果・生存率改善効果ともに認められなかったのに対し, 抗 TGF-β 抗体を6時間後に投与するか,あるいは抗 IL-10 抗体を6時間後に加え12時間ごとに3回投与することで有意に生存率が改善した(図6上段)。そしてこの有効性発現機序として, 血中 IL-10 濃度が有意に抑制されていること, Treg 細胞の CD4⁺T 細胞における割合が有意に低下し, 脾単核球細胞における CD4⁺T 細胞の割合が有意に改善していることが明らかになった(図6下段)²⁴⁾。したがって, 抗 TGF-β 抗体もしくは抗 IL-10 抗体複数回投与によって, Treg 細胞の誘導が抑制されるとともに T 細胞分化増殖能が改善し, 正常の機能を有する CD4⁺T 細胞の割合が上昇したことが関与していると推察される。

一方本邦においては septic shock の治療手段としてエンドトキシン吸着療法 (PMX: Polymyxin B-immobilized fibers: トレミキシン) が広く臨床の現場に浸透し, ショックからの早期

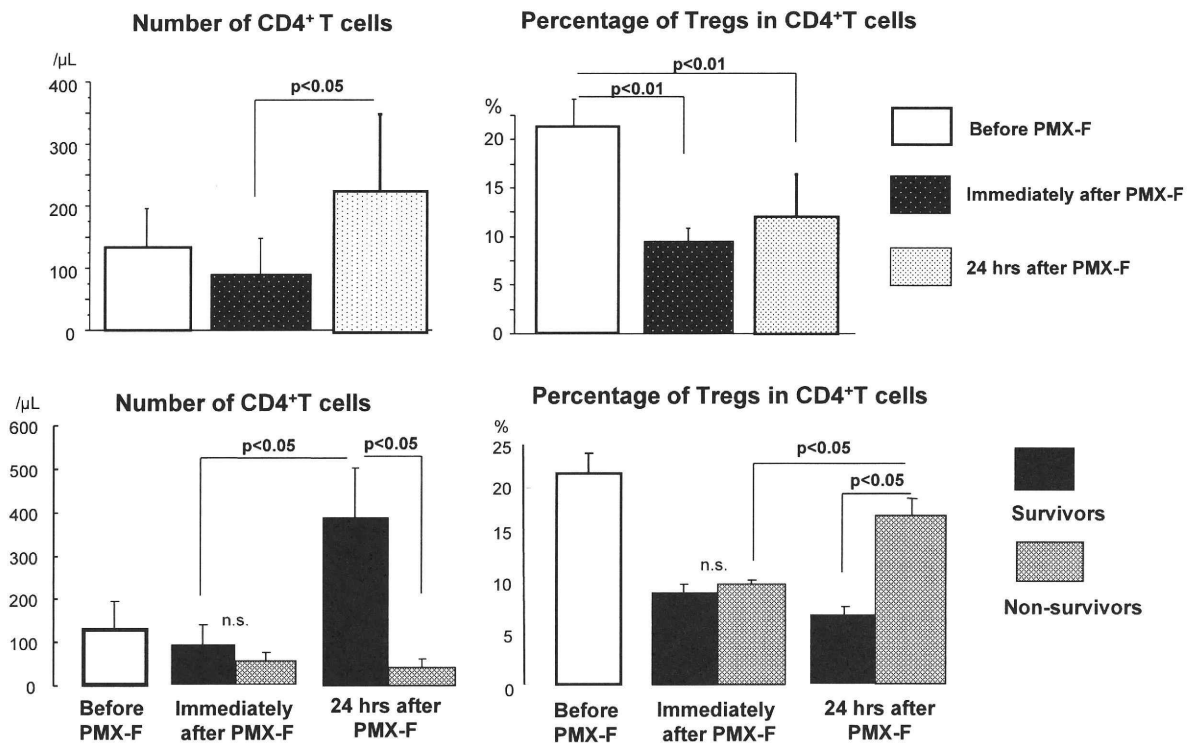


図7 敗血症性ショック症例に対するPMX治療前後でのCD4⁺T細胞, Treg細胞の変化

離脱や尿量回復などその臨床的有効性は高く評価されている。以前我々は septic shock 患者に対し PMX 治療を行うと免疫機能の回復, つまり PMX 治療終了後には免疫機能が低下した CD16 陽性単球が著明に減少し, 単球の HLA-DR 発現が回復することを報告した^{7, 10)}。また最近我々は Treg 細胞に対する PMX 治療の可能性について検討し, PMX 治療 2 時間後には Treg 細胞が有意に減少し正常の機能を有する CD4⁺T 細胞数が回復することを明らかにした (図 7 上段)。さらに PMX 治療 24 時間後の変化を生存例と死亡例で比較すると, 生存例では CD4⁺T 細胞に占める Treg 細胞の割合が低値のままで CD4⁺T 細胞数が有意に回復することが明らかになった (図 7 下段)²⁵⁾。したがって PMX 治療は重症敗血症時の immunoparalysis 対策として有用な手段になるであろう。

5. おわりに

外科侵襲, 特に重症敗血症においては, immunoparalysis の病態解明とその対策が重要であることを概説したが, 免疫機能評価方法の煩雑さか

ら immunoparalysis の病態を把握し治療に応用には難しい問題が存在するのも事実である。しかし近年の分子生物学的手法の進歩により immunoparalysis の病態解明が確実に進歩していることは間違いなく, 今後益々の発展が期待される研究領域である。

参考文献

- 1) American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992, 20(6): 864-874.
- 2) Bone RC: Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996, 24(7): 1125-1128.
- 3) Bone RC: Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med* 1996, 24(1): 163-172.

- 4) Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA: Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997, 112(1): 235-243.
- 5) Kox WJ, Bone RC, Krausch D, et al: Interferon gamma-1b in the treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome. A new approach: proof of principle. *Arch Intern Med* 1997, 157(4): 389-393.
- 6) Zedler S, Bone RC, Baue AE, et al.: T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit Care Med* 1999, 27(1): 66-72.
- 7) Ono S, Tsujimoto H, Matsumoto A, et al.: Modulation of human leukocyte antigen-DR on monocytes and CD16 on granulocytes in patients with septic shock using hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fiber. *Am J Surg* 2004, 188(2): 150-156.
- 8) Venet F, Tissot S, Debard AL, et al.: Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: Correlation with severity and secondary septic shock. *Crit Care Med* 2007, 35 (8) : 1910-1917.
- 9) Monneret G, Lepape A, Voirin N, et al.: Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 2006, 32 (8): 1175-1183.
- 10) Tsujimoto H, Ono S, Hiraki S, et al.: Hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fibers reduced the number of CD16⁺ CD14⁺ monocytes in patients with septic shock. *J Endotoxin Res* 2004, 10(4): 229-237.
- 11) Tsujimoto H, Ono S, Majima T, et al.: Differential toll-like receptor expression after ex vivo lipopolysaccharide exposure in patients with sepsis and following surgical stress. *Clinical Immunology* 119(2): 180-87, 2006.
- 12) Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, et al.: Peripheral blood CD14high CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scandinavian journal of immunology* 2008, 67 (2) : 152-159.
- 13) Azeredo EL, Neves-Souza PC, Alvarenga AR, Reis SR, Torrentes-Carvalho A, Zagne SM, Nogueira RM, Oliveira-Pinto LM, Kubelka CF: Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leukocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology* 2010, 130 (2): 202-216.
- 14) Hiraki S, Ono S, Kinoshita M, et al.: Interleukin-18 restores immune suppression in patients with nonseptic surgery, but not with sepsis. *Am J Surg* 2007, 193(6): 676-680.
- 15) Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T: Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 1985, 161 (1): 72-87.
- 16) Sakaguchi S: Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000, 101(5): 455-458.
- 17) Hori S, Nomura T, Sakaguchi S: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003, 299 (5609): 1057-1061.
- 18) Monneret G, Debard AL, Venet F, et al.: Marked elevation of human circulating CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med* 2003, 31(7): 2068-2071.
- 19) MacConmara MP, Maung AA, Fujimi S, et al.: Increased CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity. *Ann Surg* 2006, 244 (4): 514-523.

- 20) Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, et al. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104(49): 19446-19451.
- 21) Marimuthu K, Varadhan KK, Ljungqvist O, Lobo DN: A meta-analysis of the effect of combinations of immune modulating nutrients on outcome in patients undergoing major open gastrointestinal surgery. *Ann Surg* 2012, 255(6): 1060-1068.
- 22) Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, et al.: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2009, 180(7): 640-648.
- 23) Ono S, Ueno C, Aosasa S, et al.: Severe sepsis induces deficient interferon-gamma and interleukin-12 production, but interleukin-12 therapy improves survival in peritonitis. *Am J Surg* 2001, 182(5): 491-497.
- 24) Hiraki S, Ono S, Tsujimoto H, et al.: Neutralization of interleukin-10 or transforming growth factor-beta decreases the percentages of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in septic mice, thereby leading to an improved survival. *Surgery* 2012, 151 (2) : 313-322.
- 25) Ono S, Kimura A, Hiraki S, et al.: Removal of increased circulating CD4(+)CD25(+) Foxp3(+) regulatory T cells in patients with septic shock using hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fibers. *Surgery* 2013 : 153 : 262-71.