

図8. *in vitro*でのIAV-HAプロセッシング

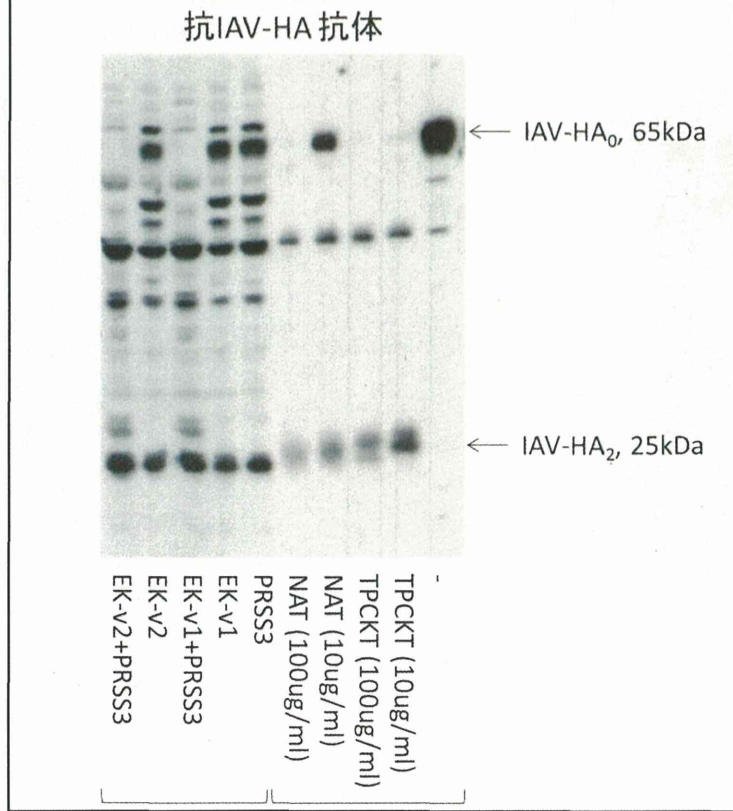
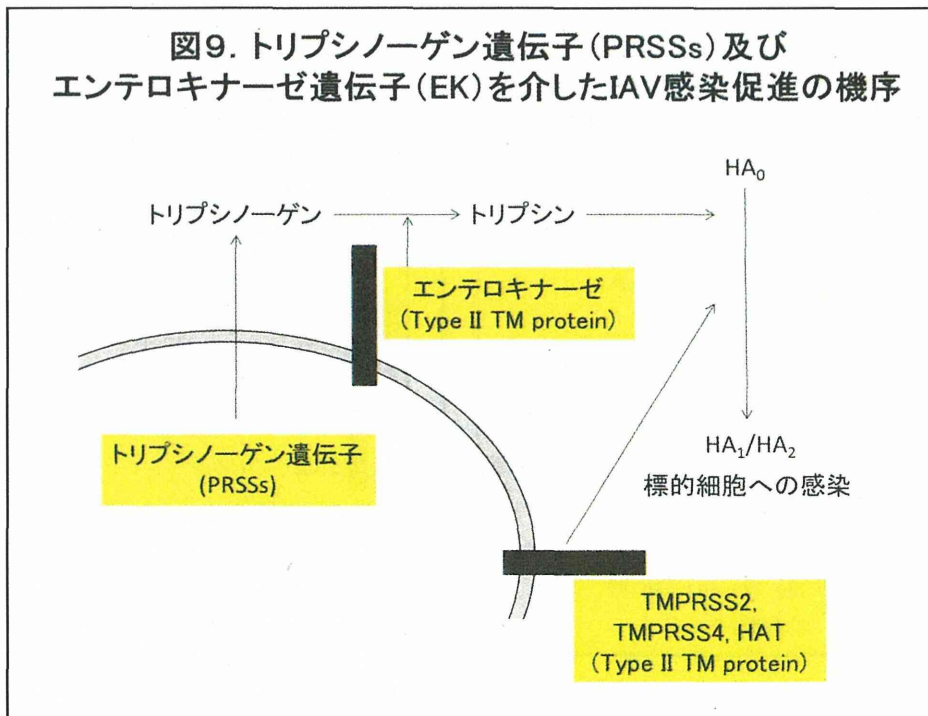


図9. トリプシノーゲン遺伝子 (PRSSs) 及び
エンテロキナーゼ遺伝子 (EK) を介したIAV感染促進の機序



平成26年度厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機序

研究分担者 高橋 悦久 (徳島大学疾患酵素学研究センター 特任助教)
研究協力者 Irene Lorinda Indalao (徳島大学疾患酵素学研究センター 大学院生)

研究要旨

インフルエンザウイルス肺炎およびインフルエンザ脳症が進行したことによる最終的な結果として血管透過性の亢進による多臓器不全が原因である。このことは高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染でも同様であると考えられる。しかし、インフルエンザウイルス感染により血管内皮細胞の透過性亢進を引き起こす正確な分子メカニズムは解明されていない。我々は、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)にインフルエンザウイルス (IAV) /Puerto Rico/8/34(PR8) (H1N1) を感染させて透過性亢進のメカニズムを調べた。血管内皮においてカドヘリンと β カテニンのレベルは細胞接着複合体を形成するための重要な分子であるが、IAV感染後にタンパクレベルで β カテニンの発現が減少することが明らかとなった。更に、透過性の評価の指標として transendo-thelial electrical resistance (TEER)を用いて測定したところ、血管透過性が亢進したことにより抵抗値の減少が認められた。次に、プロテアソーム阻害剤であるラクタシチンを添加すると β カテニンの分解が抑制された。プロテアソームによる分解の開始段階でGSK-3 β が示唆されたことから、我々は、HUVECにおいてGSK-3 β をノックダウンしたときの β カテニンの抑制の効果を調べた。その結果、IAV感染によって誘発される β カテニンの分解は、GSK-3 β -ノックダウン細胞で有意に抑制された。また、 β カテニンを細胞にトランスフェクションすることでIAV感染時の透過性亢進が抑制された。この結果は、IAV感染がアドヘレンスジャンクションにおけるGSK-3 β を介して β カテニンの分解を誘導し、血管の透過性亢進を誘導することを示唆している。更に、マウスをモデルとした動物実験においても同様で、IAV感染後0日目から6日目の肺を経時的に調べたところ β カテニンの分解とGSK-3 β の活性化が確認された。これらの知見から、アドヘレンスジャンクションにおいてGSK-3 β を介した β カテニン分解がインフルエンザ重症化を引き起こす血管透過性亢進の重要な機構の1つであることが示唆された。

A. 研究目的

これまでにインフルエンザ脳症、多臓器不全の病態解析から、重症化は血管

内皮と各臓器で誘発される“インフルエンザサイトカイン-プロテアーゼ”サイクルが主要原因で、このサイクルを介する血管内皮細胞障害が多臓器不全の根底にあることを明らかにしてきた(*J. Infect. Dis.* 202:991-1001, 2010、*Cardiovasc. Res.* 89:596-603, 2011)。IAV 感染により血管内皮細胞の透過性が亢進するが、相互作用のメカニズムについては解明されていない。本研究では、アドヘレンスジャンクションにおける細胞間接着分子である VE カドヘリンと β カテニンについて IAV 感染との関与を明らかとする。

B. 研究方法

感染：(1) ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に IAV (PR8) を MOI=1 で 1 時間感染させて、培地交換後 28 時間培養した。(2) C57BL/6CrSlc マウスに PR8 を 100 PFU で経鼻感染させて体重をモニターした。動物実験に関しては徳島大学の規定に基づき行った。

ウェスタンブロッティング：培養細胞及びマウス肺のホモジネートは RIPA バッファーで作製し、使用した。

RT-PCR：HUVEC より RNA を抽出し、One-Step RT-PCR Kit を用いて、それぞれの遺伝子発現を検出した。

C. 研究結果

(1) IAV 感染により、血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションにおいて β カテニンが有意に減少した
アドヘレンスジャンクションにおいて重要な分子である β カテニンと VE カドヘリンの発現をウェスタンブロッティングによって検出した。その結果、

β カテニンの発現は非感染コントロールと比べて 24% まで低下した (図 1A)。一方、VE カドヘリンの発現に有意な変化は認められなかった。また、遺伝子発現に関しては β カテニンの発現に有意な差は認められていない (図 1B) ことから、タンパク合成後にプロテアソームによる分解の可能性が示唆された。

(2) IAV 感染細胞においてプロテアソーム阻害剤により β カテニンの分解が抑制された

IAV に感染させた HUVEC 細胞にプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンを添加することで、 β カテニンの分解が抑制され、未処理と比べて 1.8 倍まで回復した (図 2)。この結果より、IAV 感染で、プロテアソームによる分解が増強されることが明らかとなった。

(3) IAV 感染により GSK-3 β が活性化される

β カテニンは、活性化した GSK-3 β によってリン酸化されることでユビキチン化されてプロテアソームの分解を受けるが、IAV に感染することで不活性化型である phospho-GSK-3 β の発現が有意に低下 (図 3) したが全体の GSK-3 β の発現には有意差は認められなかった。更に、GSK-3 β をノックダウンすると β カテニンの発現が回復した (図 4)。これらの結果から PR8 に感染した HUVEC において、アドヘレンスジャンクションでの VE カドヘリンと β カテニンの複合体形成の制御には GSK-3 β が関与していることが明らかとなった。

(4) IAV 感染マウスの肺における VE カドヘリンと β カテニン及び GSK-3 β の発現変化

マウスに PR8 を経鼻感染させた時、非感染コントロールと比べて 3 日目より体重の減少が認められた。また、NP 抗体で検出した肺のウイルス量は 2 日目から増加し始めて 3 日目にピークを迎えた (図 5-A)。肺における β カテニンは 2 日目から 6 日目まで減少が続き、それに伴い不活性型の phospho-GSK-3 β の減少が認められた (図 5-B)。

D. 考察

現在、一般的にノイラミニダーゼ阻害剤がインフルエンザ治療薬として使用されている。しかし、“インフルエンザウイルス-サイトカイン-プロテアーゼ (トリプシン、MMP-9)” サイクルを通して起こる循環不全、低酸素血症、内皮細胞における血管透過性の亢進による重症化の治療には適していない。そこで、重症化の新たな治療法のターゲットとして血管透過性亢進機序の解明を行った。血管内皮細胞では VE カドヘリンが発現しており、細胞間接着において β カテニンと複合体を形成することで重要な役割を果たしている。本研究では、IAV 感染により β カテニンの分解が亢進されることを明らかとし、その制御が GSK-3 β の活性化により起こることを証明した (図 6)。更に GSK-3 β ノックダウンにより β カテニンの分解が抑制されたことから GSK-3 β に対して新たな阻害剤を探索することがインフルエンザ重症化の治療につながると考えられる。

E. 結論

インフルエンザに感染させた HUVEC で VE カドヘリンと複合体を形成する β カ

テニンが減少することが明らかとなった。IAV 感染によって β カテニンのプロテアソームによる分解が亢進されたためであった。これらの結果から、VE カドヘリン- β カテニンの結合がインフルエンザ重症化発症機序の一つである可能性が示唆された。ユビキチン-プロテアソーム経路の GSK-3 β によって調節されることが明らかとなったことで、新たな創薬ターゲットになり得ると考えられる。

G. 研究発表 (平成 26 年度)

論文発表

- (1) Toshihiro Maekawa, Takashi Kimoto, Dai Mizuno, Yuichi Furukawa, Masayuki Ida, Etsuhisa Takahashi, Takayuki Izumo, Yoshiko Ono, Hiroshi Shibata, Hiroshi Kido; Oral Administration of Lactobacillus pentosus Strain S-PT84 Enhances Anti-Influenza Virus-Specific IgG Production in Plasma after Limited Doses of Influenza Virus Vaccination in Mice, *Journal of Vaccine & Immunotechnology*, Vol. 2, Issue 1. 2015. 1
- (2) Hiyoshi M, Indalao I.L, Yano M, Yamane K, Takahashi E, Kido H; Influenza A virus infection of vascular endothelial cells induces GSK-3 β -mediated β -catenin degradation in adherens junctions, with a resultant increase in membrane permeability, *Archives of Virology*, 10. 1007/s00705-014-2270-5. 2014. 11

図1 インフルエンザ感染によるアドヘレンスジャンクションのβカテニンの発現変化

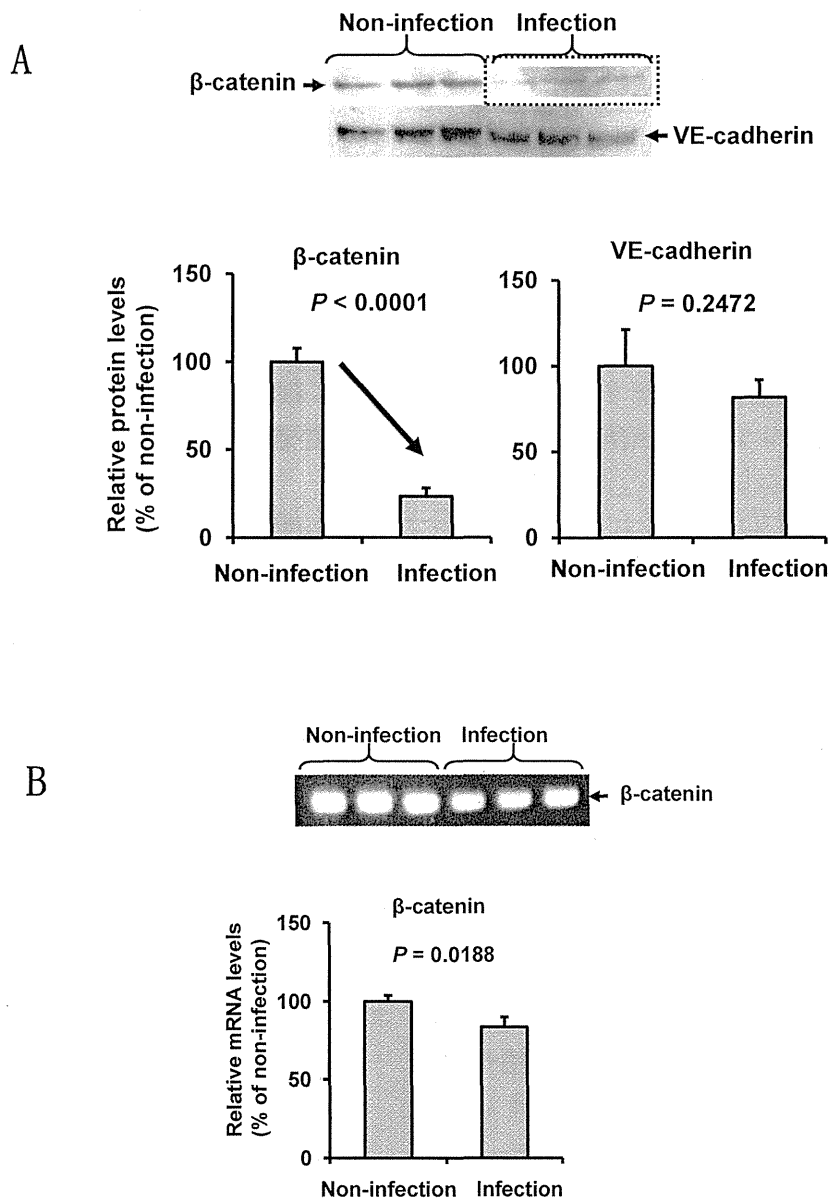


図2 プロテアソーム阻害剤によるβカテニンの分解抑制

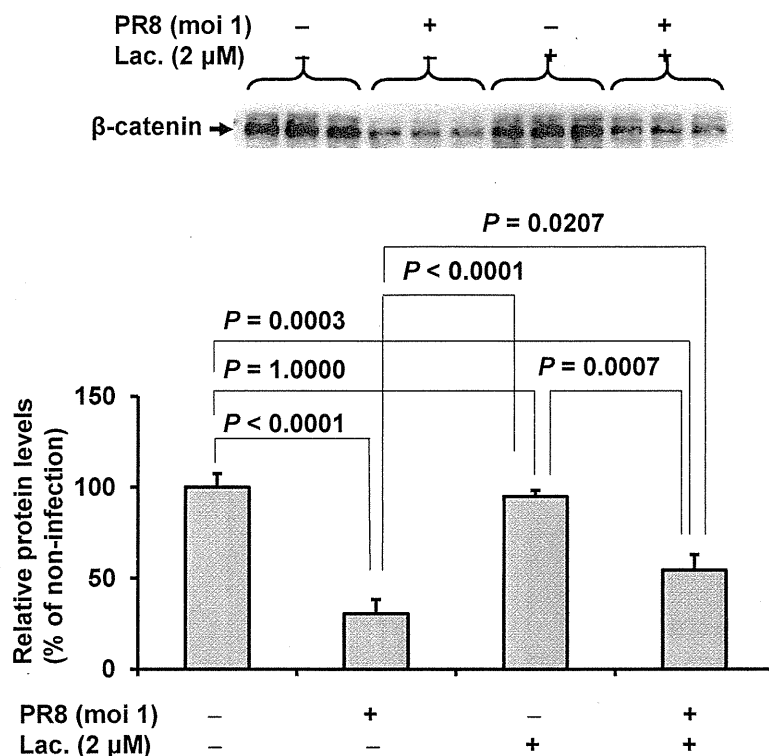


図3 インフルエンザ感染によるGSK-3βの活性化

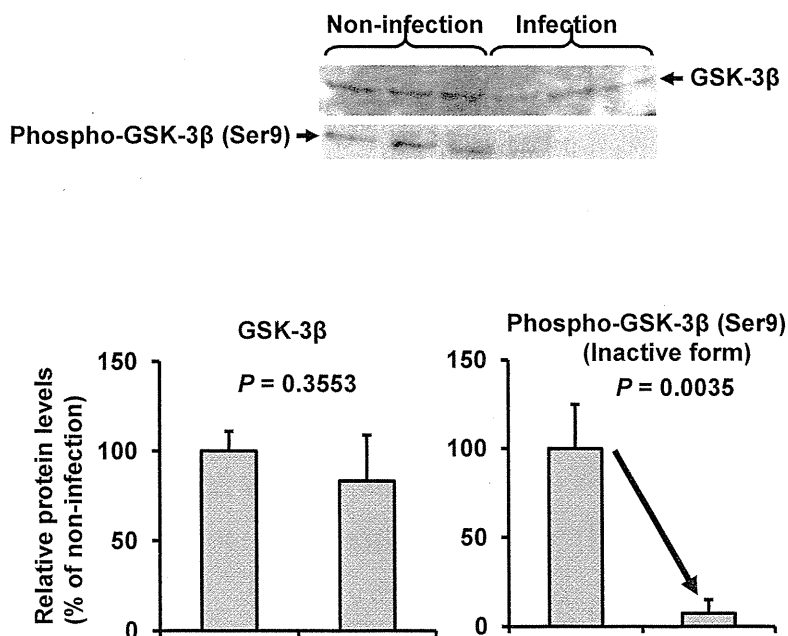


図4 GSK-3 β ノックダウンによる β カテニンの発現回復

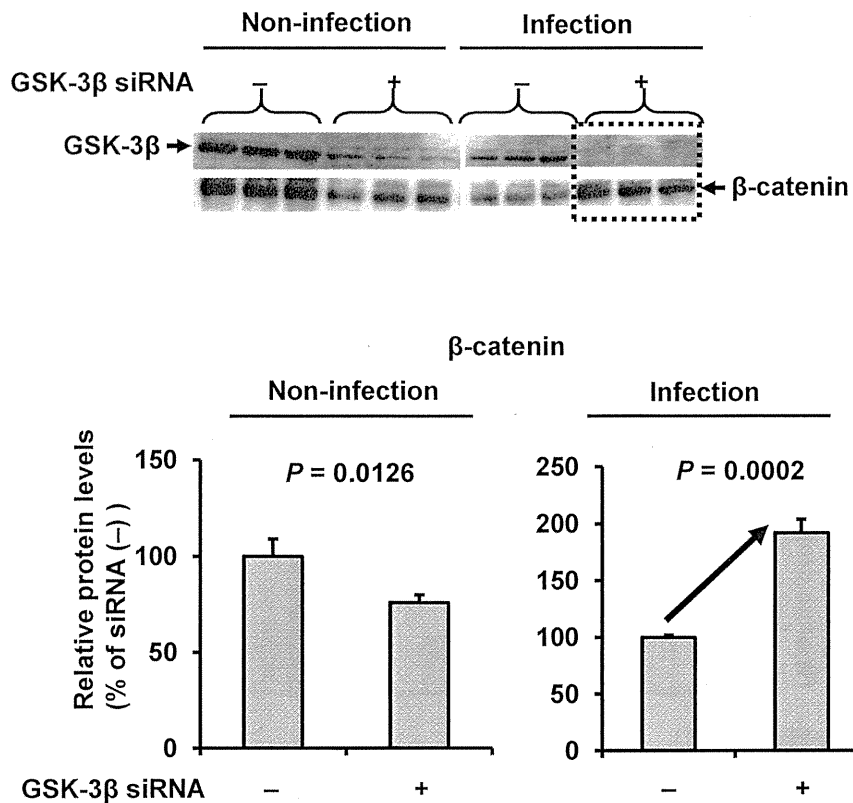
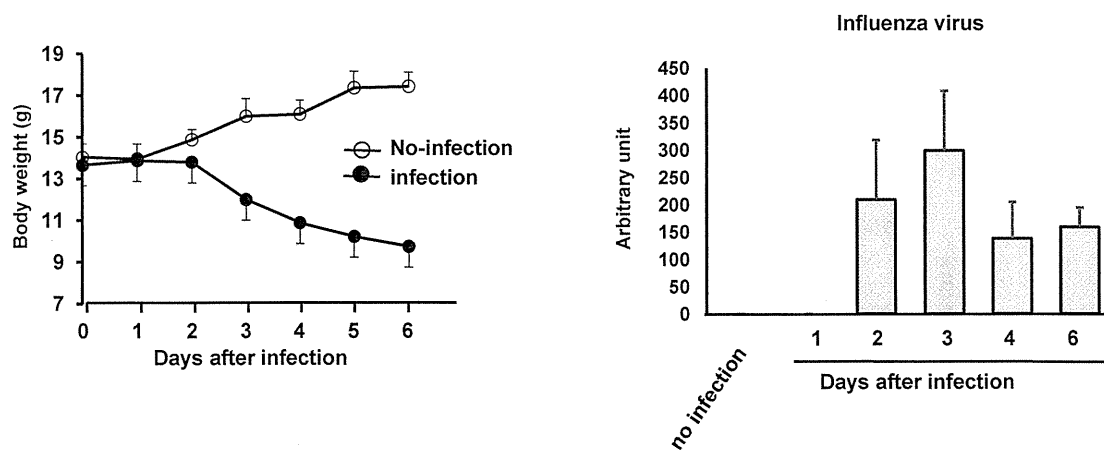


図5 インフルエンザ感染マウスの肺におけるVE-カドヘリンと β -カテニン及びGSK-3 β の発現変化

A



B

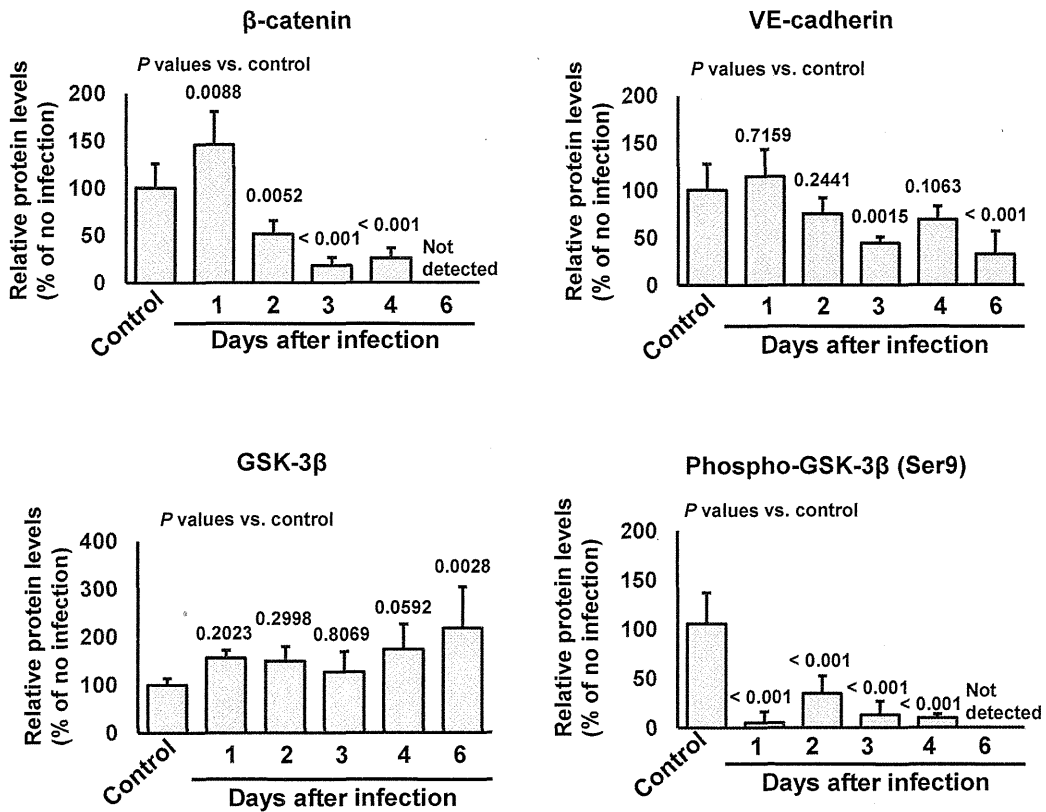
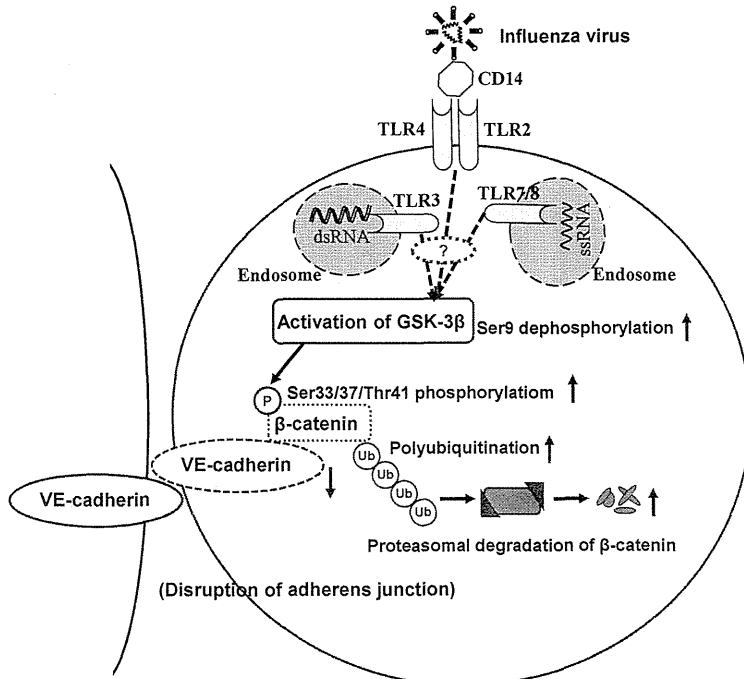


図6 急性脳症における血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの崩壊機序



分担研究報告書

平成26年度厚生労働科学研究費補助金「重症のインフルエンザによる肺炎・脳症診断・治療に関する研究：新規診断・治療に関する提案と検証」

分担研究報告書

急性脳症の病態：急性脳症とミトコンドリア病の急性期病態の類似性について

研究分担者 久保田雅也（国立成育医療研究センター 神経内科医長）

研究協力者 寺嶋宙（国立成育医療研究センター 神経内科医員）

柏井洋文（東京大学 大学院生）

研究要旨

インフルエンザ脳症の病態解明のため血中 ATP、乳酸、乳酸/ATP 比について急性脳症、熱性けいれん重積での解析を行い、病初期バイオマーカーとしての有用性の検討を行った。またミトコンドリア病における解析も行い急性脳症との病態の異同を検討した。乳酸/ATP 比は急性脳症急性期では高値、回復期で正常化するパターンが確認された。また急性脳症との鑑別が常に問題となる熱性けいれん重積と比較すると有意差を持って高値であり発症初期の病態の違いを反映している。乳酸/ATP 比が急性脳症急性期と種々のミトコンドリア病の患者での値と有意差がなかったことはミトコンドリアを場とする共通の energy failure が起こっている可能性を示唆する。

また通常の脳症治療に加えた早期3剤（VB1, VB6, L-カルニチン）投与により遅発性拡散低下をともなう急性脳症(AESD)の割合が減少し軽症タイプの脳症の数が増加した。AESD の予防および軽症化に有効である可能性が考えられた。今回の3剤はミトコンドリアレスキューにもなっており急性脳症とミトコンドリア病の急性期病態の類似性を示唆する。

A. 研究目的

急性脳症は我が国の小児に多く、各種のウイルス感染症を契機として急激に発症し、遷延する意識障害を特徴とする。その臨床像は多彩で重症の病型はしばしば難治で、予後も不良である。近年臨床像に加え MRI 所見を加味して細分類が進み、急性壊死性脳症（ANE）、遅発性拡散低下をともなう急性脳症（AESD）などの病態解析がなされつつある。病初期に熱性けいれん重積との鑑別が困難で感度の高いバイオマーカーの検索が重要な課題となっている。昨年に引き続き血中 ATP、乳酸、乳酸/ATP 比について急性脳症、熱性けい

れん重積での解析を行い病初期バイオマーカーとしての有用性の検討を行った。また各種ミトコンドリア病における解析も同様に行い急性脳症との病態の異同を検討した。

B. 研究方法

①血中乳酸/ATP 比について

血中 ATP 測定は急性脳症急性期 20 例、熱性けいれん重積急性期 16 例、各種ミトコンドリア病 13 例に対して既報告の方法により木戸研究室において測定が行われた。乳酸は ATP 検体採取時に最も近い時刻の値を解析に用いた。

②AESDに対する早期3剤（ビタミンB1, B6, およびLカルニチン）投与

国立成育医療研究センターにおいて2008年1月から2013年12月までに感染を契機とした急性脳症として入院加療を行った症例をリストアップしたところ6年間で合計82名を数えた（図2）。脳症の診断としては、インフルエンザ脳症ガイドラインを参考に、二相目も含め“初期症状発症24時間以降の意識障害の遷延を認めた”症例とした。基礎疾患がなく、有熱時けいれんで発症し、AESDの可能性が考慮されて発症早期より当院で対応し、結果的に急性脳症と診断された症例に限定すると(1)2008-2010年10名と

(2)2011-2013年11名が該当した。この21名に関して以下を比較した。

評価項目：早期ビタミンB1, B6, およびLカルニチン投与の有無（けいれん発症24時間以内から投与開始）、二相目のけいれんの有無、および画像変化(bright tree appearance, BTA)。投与量はビタミンB1 10mg/kg, ビタミンB6 20mg/kg, L-カルニチン 30-100mg/kgである。

（倫理面への配慮）

研究及び研究結果の発表にあたっては、患者のプライバシー保護に十分配慮した。

C. 研究結果

①乳酸/ATP比について

図1に各疾患の乳酸/ATP比を示す。急性脳症20例の急性期(5.65 ± 5.55)は熱性けいれん重積16例急性期(1.65 ± 1.01)よりも有意に乳酸/ATP比は高値であった。また急性脳症急性期の乳酸/ATP比はミトコンドリア病13例のそれ(5.65 ± 5.85)と比較し有意差は認めず。

②AESDに対する早期3剤（ビタミンB1, B6, およびLカルニチン）投与

2008-2013年を(1)2008-2010年と

(2)2011-2013年に分けて比較すると通常の脳症治療に加えた早期3剤（ビタミンB1, B6, およびLカルニチン）投与によりAESDの割合が減少し軽症タイプの脳症の数が増加していることがわかった。（表1、2、図3、4）つまりAESDの予防および軽症化に上記3剤投与が有効である可能性が考えられた。この2群に男女比や発症月齢に有意差はない。

D. 考察

乳酸/ATP比は急性脳症急性期では高値、回復期で正常化した。また急性脳症との鑑別が常に問題となる熱性けいれん重積と比較すると有意差を持って高値であり発症初期の病態の違いを反映している。その値は重症例の予後と相関した。

乳酸/ATP比が急性脳症急性期と種々のミトコンドリア病の患者での値と有意差がなかったことはミトコンドリアを場とする共通のenergy failureが起こっている可能性を示唆する。

AESDの発症の遺伝的素因として、*CPTII*や*ADORA2A*の遺伝子多型、*SCN1A*の遺伝子変異などが判明してきており、患者により発症の引き金となる病因が異なる可能性がある。今回の検討では一般的な抗けいれん薬に加えて、*CPTII*が関与する代謝障害に対する治療（ビタミンB1, Lカルニチン）、および*ADORA2A*に関連してはテオフィリンによりアデノシン受容体同様に抑制性の影響を受けるビタミンB6を、間接的な効果を期待して投与を行った。ビタミンB6に関しては、既にAESD予防効果として推奨されており、AESDの病態の一つとされる興奮毒性に関して、グルタミン酸脱炭酸酵素を介してのグルタミン酸減少効果も期待した。

AESDの早期治療介入に関しては、ビタミンB6投与、脳低温療法が報告されているが、現時点は早期診断が難しいことから、その介入効果の判断も難しい。通常の脳症治療に加えた早期3剤（VB1, VB6, L-カルニチン）投与によりAESD

の割合が減少し軽症タイプの脳症の数が増加した。AESDの予防および軽症化に有効である可能性が考えられた。今回の3剤はミトコンドリアレスキューにもなっており興味深い。脳の血管内皮(脳血管関門)のミトコンドリア密度は他の臓器よりも高く、小児期の体重あたりの血管内皮のミトコンドリア密度は成人よりも高い。そのため種々のenergy failureにより小児の脳血管内皮は機能低下に陥りやすい。急性脳症の最初の障害はニューロンではなく血管内皮に起こるとするのが我々の仮説である。ただし厚生労働科学研究・水口班の調査結果からは、2010年までの統計では急性脳症の中でAESDの頻度が最も高かったとされているが、それ以降の疫学は不明であり、今回の結果の解釈は注意を要すると思われる。

E. 結論

乳酸/ATP比は急性脳症急性期の有用なバイオマーカーの可能性はある。また急性脳症急性期の早期3剤(VB1, VB6, L-カルニチン)投与によりAESDの予防および軽症化に有効である可能性が考えられた。いずれも急性脳症の病態として特に脳血管内皮のミトコンドリア機能不全が病態と深く関連することを示唆すると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 論文発表

- (1) Shiihara T, Miyake T, Izumi S, Sugihara S, Watanabe M, Takanashi J, Kubota M, Kato M. Serum and CSF biomarkers in acute pediatric neurological disorders. *Brain Dev* 2014;36:489-95.
- (2) Nakashima M, Kashii H, Murakami Y, Kato M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kubota M, Kinoshita

T, Saitsu H, Matsumoto M. Novel compound heterozygous PIGT mutations caused multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome 3. *Neurogenetics* 2014 DOI 10.1007/s10048-014-0408-y

(3) Shimada S, Shimojima K, Okamoto N, Sangu N, Hirasawa K, Matsuo M, Ikeuchi M, Shimakawa S, Shimizu K, Mizuno S, Kubota M et al. Microarray analysis of 50 patients reveals the critical chromosomal regions responsible for 1p36 deletion syndrome-related complications. *Brain Dev* 2014 in press.

(4) Saitoh M, Shinohara M, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Shiomi M, Kawaguchi H, Kubota M et al. Clinical and genetic features of acute encephalopathy in children taking theophylline. *Brain Dev* 2014 in press.

(5) Tanuma N, Miyata R, Nakajima K, Okumura A, Kubota M, Hamano S, Hayashi M. Changes in Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Human Herpesvirus-6-Associated Acute Encephalopathy/Febrile Seizures. *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation* Volume 2014, Article ID 564091, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/564091>

(6) Hoshino H, Kubota M. Canavan disease: Clinical features and recent advances in research. *Pediatrics International* 2014;56:477-483.

(7) Haga N, Kubota M, Miwa Z. Hereditary sensory and autonomic neuropathy types IV and V in Japan. *Pediatrics International*. 2014 (in press)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

【特許取得】

なし

【特許出願】

なし

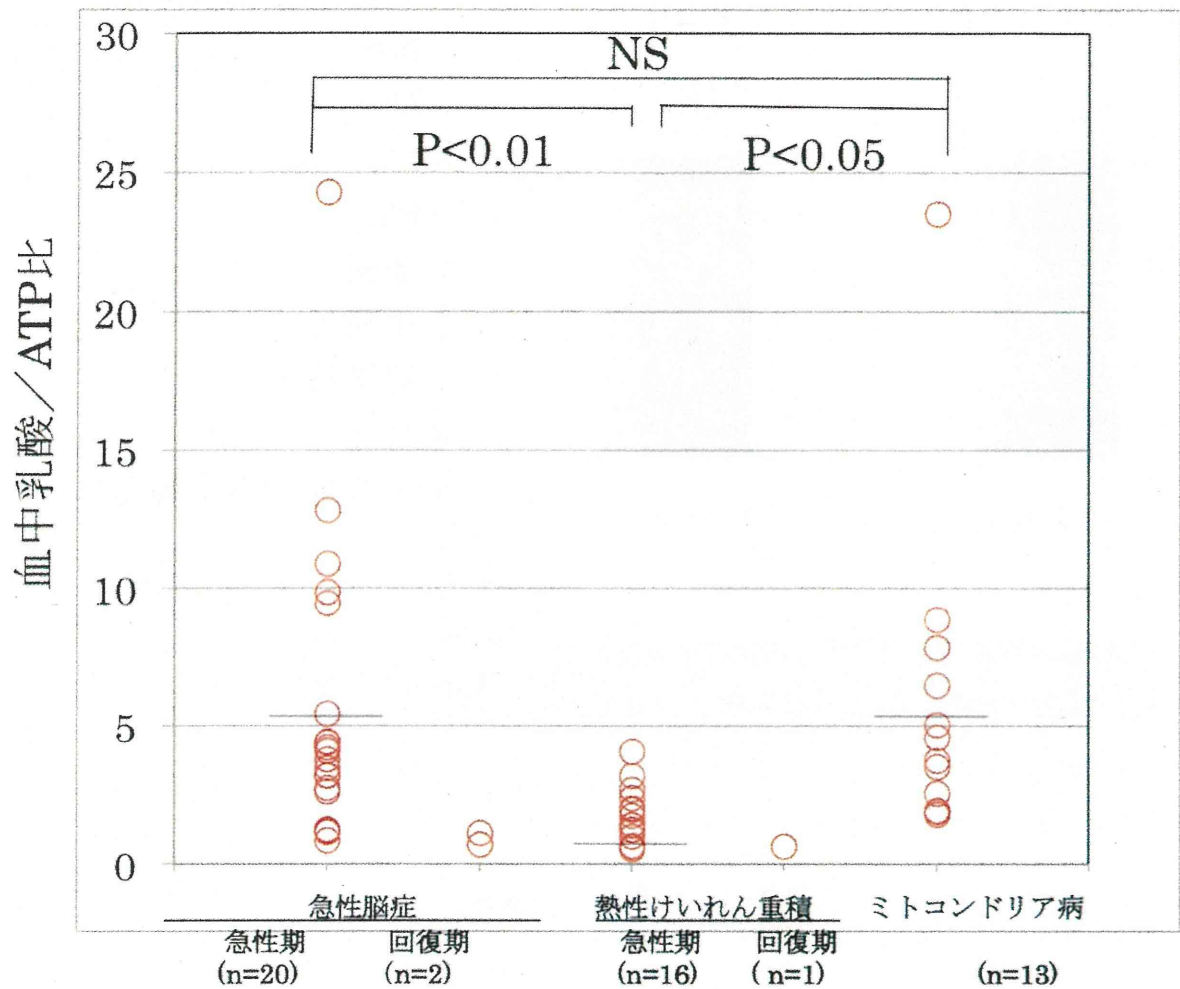


図1 各疾患の乳酸/ATP比

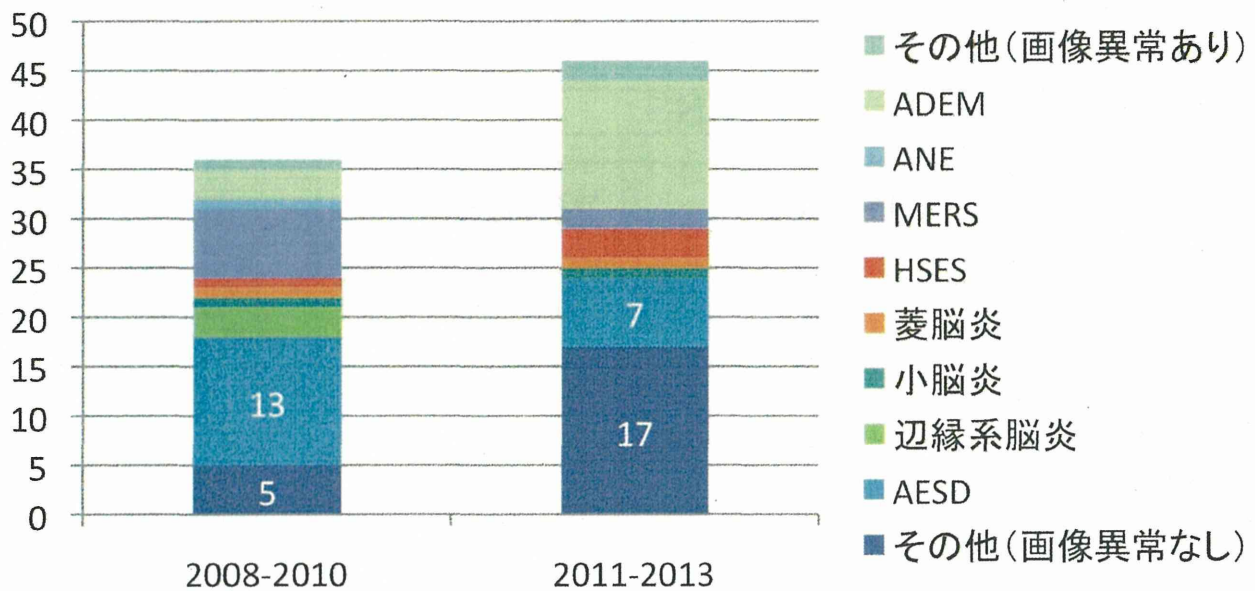


図2 成育医療研究センターにおける急性脳症・脳炎の患者数 6年間で合計82名

症例	性別	入院年	月齢(月)	感染源	けいれん	重積時間(分)	早期逸脱系 酵素上昇
1	男	2008	47	flu A	status		++
2	男	2009	12	ND	status	60	++
3	女	2009	15	ND	status	120	+++
4	女	2009	19	RSV	status	>120	-
5	女	2009	21	flu A	単発	数分	-
6	女	2009	33	ND	status	20	-
7	男	2009	48	RSV	status	60	+
8	男	2009	75	fluA	status	30	+++
9	男	2010	11	HHV-6	status	50	-
10	男	2010	20	ND	status	40	++
11	男	2011	23	ND	status		++
12	男	2011	25	VZV	status	60	++
13	男	2012	18	RSV	status	>120	-
14	男	2012	21	RSV	status	50	-
15	女	2012	35	HHV-7	status	60	-
16	男	2013	11	HHV-6	status	80	+
17	男	2013	12	ND	cluster		-
18	男	2013	13	HHV-6	cluster	3回	-
19	女	2013	18	flu A	status	50	-
20	男	2013	23	HHV-6	status	30	+
21	男	2013	25	RSV	cluster		-

表1 対象となった患者のプロファイル (2008-2013年)

基礎疾患がなく、有熱時けいれんで発症し、AESDの可能性が考慮されて発症早期より当院で対応し、結果的に急性脳症と診断された症例21例。青枠はAESDであった症例。

症例	挿管管理	ステロイドパルス	発症3日以内の治療			AEDs	二相目けいれん	二相目MRI	脳症タイプ	予後		
			Vit B6	Vit B1	Lカルニチン					運動障害	知能障害	てんかん
1	+	1~	-	-	-	PB	day7	左BTA	AESD/HHE	+	-	-
2	+	-	-	-	-	PB	day4	BTA	AESD	-	-	-
3	+	1~	-	-	-	PB	day4	BTA	AESD	+	+	+
4	+	2~	-	-	1~	PB	-	-	軽症	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	day5	BTA	AESD	-	+	-
6	+	1~	-	-	-	PHT/CBZ	day4	BTA	AESD	+	+	+
7	+	-	-	-	-	PHT/CBZ	-	-	軽症	+	-	-
8	+	1~	-	-	1~	PB	-	-	軽症	+	+	-
9	+	2~	-	-	1~	PHT/PB	-	-	軽症	一過性	-	-
10	+	1~	-	-	-	PHT/PB	day5	BTA	AESD	+	+	+
11	+	1~	-	1~	1~	PB	day4	BTA	AESD	+	+	+
12	+	1~	1~	1~	1~	PHT	-	-	軽症	一過性	一過性	-
13	+	1~	1~	1~	1~	PHT	-	-	軽症	-	一過性	-
14	+	1~	1~	1~	1~	PHT/PB	-	-	軽症	一過性	-	-
15	+	1~	1~	1~	1~	PHT/PB	-	-	軽症	-	-	-
16	-	3~	1~	1~	1~	FPHT	-	-	軽症	-	-	-
17	+	1~	1~	1~	1~	FPHT	-	-	軽症	-	-	-
18	-	-	-	-	-	FPHT	-	-	軽症	一過性	-	-
19	+	1~	1~	1~	1~	PHT	-	-	軽症	-	-	-
20	+	-	1~	1~	1~	FPHT	-	-	軽症	-	-	-
21	+	2~	1~	1~	1~	FPHT	-	-	軽症	-	-	-

症例1-10：2008-2010、症例11-21：2011-2013

投与量：ビタミンB1 10mg/kg、ビタミンB6 20mg/kg、L-カルニチン 30-100mg/kg

表2 けいれん重積型2相性脳症における早期のVB1、VB6、カルニチン投与による軽症化
BTA (bright tree appearance), PB (Phenobarbital), PHT (phenytoin), FPHT (fosphenytoin)

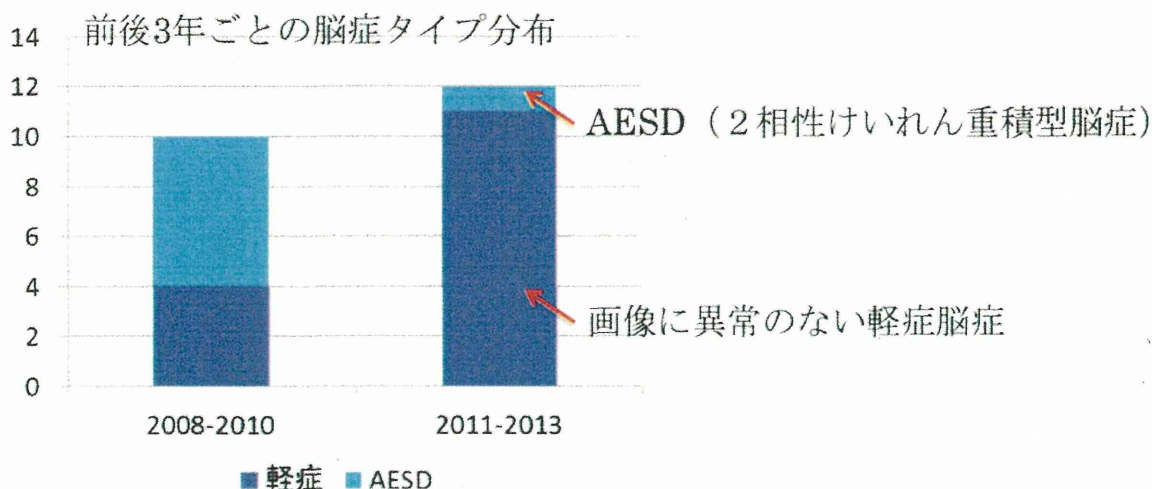


図3 2008-2010年および2011-2013年における脳症のタイプ別人数。早期3剤（VB1, VB6, L-カルニチン）投与を行った2011-2013年ではAESDが減少した。

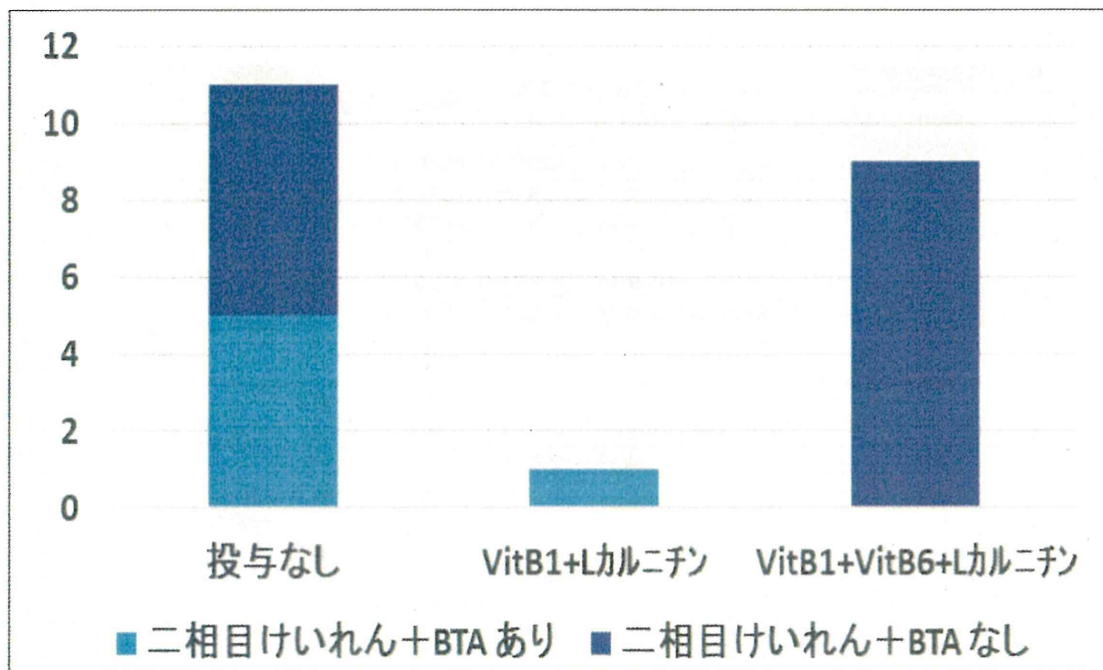


図4 薬剤投与別脳症タイプ分布。3剤投与ではAESD発症（2相目のけいれんとBTA(bright tree appearance)）を認めず。

ICU 入室患者における末梢血アデノシン三リン酸(ATP)と転帰との関係に関する研究

研究分担者 西村匡司 徳島大学大学院救急集中治療医学 教授

研究要旨

重症度スコアは必ずしも患者予後を反映しない。また、多くのスコアは経時的な変化をとらえることができない。簡便に重症患者の変化を経時的、客観的にとらえることが可能となれば、重症患者の治療効果を早期に把握することができ、予後改善にも役立つ可能性がある。本研究では ATP、A-LES (ATP-lactate energy risk score) を測定し、重症患者の予後および従来のスコアとの関連を検討した。特に予後の悪い敗血症患者についても検討した。ATP、A-LES は重症患者ではいずれも正常範囲を逸脱していた。特に感染症患者では予後との相関が高く、重症患者の予後予測因子として重要な役割を果たす可能性が示唆された。

研究協力者

・小野寺 睦雄

徳島大学大学院救急集中治療医学
講師

A. 研究目的

集中治療を必要とする患者では、重症度を評価するためさまざまな指標が用いられる。普及率の高いものに APACHE (acute physiology and chronic health evaluation) II スコアや SAPS (simplified acute physiology score) があり、集中治療室に入室した際の重症度評価は予後と良い相関を示す。これらのスコアと予後が相関しない症例も稀ではない。わが国では APACHE II スコアが一般的であるが、これは集中治療室 (ICU) 入室後 24 時間の検査値やバイタルサインから算出するものである。しかし、重症患者のバイタルサインは時々刻々変化していく。簡便、客観的かつ継時的に重症度を評価できる指標があれば、患者管理に有用である。重症患者では呼

吸・循環不全のため抹消組織への酸素供給が悪化することが多い。そのような病態では ATP 産生が低下している可能性がある。しかし、末梢血における ATP 濃度の意義は明らかでない。抹消循環不全、抹消での酸素利用の悪化の指標として乳酸値が良く用いられている。この二つを組み合わせることにより、重症患者の重症度評価がより正確になることが推測される。本研究では判定することが。本研究では末梢血 ATP 濃度、乳酸値、ATP/乳酸比 (ATP-lactate energy risk score : A-LES) が重症患者における重症度や予後予測の指標となり得るか検討した。

B. 研究方法

集中治療部に入室した重症患者から血液を経時的に採取し、血液ガス測定装置で pH, PaO₂, PaCO₂, ヘモグロビン値とともに乳酸値を測定した。同時に ATP 測定用の血液を EDTA 含有チューブで -20℃で保存した。重症度評

価としては集中治療部に入室 24 時間での APACHE II スコアを計算し用いた。(倫理面への配慮)

本研究は、徳島大学病院倫理委員会の承認を得た上で、対象者には研究内容を説明し、同意を得た上で実施した。

C. 研究結果

表-1 に対象となった患者の基本情報を示す。平均年齢、性別、基礎疾患には死亡患者と生存患者で差はなかった。死亡患者は生存患者と比較して有意に入室 24 時間での APACHE II スコアが高かった。

1. 入室時の ATP および A-LES

図 1 に示すように、入室時の ATP および A-LES は生存患者、死亡患者で統計学的に有意差を認めなかった。末梢血 ATP は赤血球内に存在すると考えられる。ICU に入室する患者ではヘモグロビン値が正常範囲にない場合が多い。ヘモグロビン値で ATP 値を補正することで標準化する方法をとった。ヘモグロビン 10g/dL あたりで補正した結果を図 2 に示す。入室時の ATP (ヘモグロビン補正後) および A-LES は生存患者、死亡患者で差を認めなかった (それぞれ 0.43 ± 0.13 vs. 0.40 ± 0.28 , 9.6 ± 8.6 vs. 16.8 ± 17.2)。

2. ATP 及び A-LES と APACHE II スコアの相関

図-3 に ATP 及び A-LES と従来利用されている APACHE II スコアの相関を示す。有意な相関を認めなかった。M 抗原間では、ルシフェラーゼ活性に変化は無く、プラトーに達していると判定した。

3. ATP 及び A-LES の経時的変化

ATP の特徴は経時的な変化を見る

ことができる点にある。時間経過を生存患者と死亡患者で検討した結果が表-2 である。入室翌日の値は ATP では差を認めなかったが、A-LES は死亡患者で悪化傾向にあった。

4. 感染症患者での解析

ICU 入室患者で予後が悪い代表疾患として敗血症がある。感染症に伴う多臓器不全を来す疾患である。基礎疾患として感染症を有する患者で生存患者 (17 人) と死亡患者 (4 人) を比較した (図-4)。敗血症患者と非敗血症患者での各パラメータの経時変化を図-5 に示す。敗血症患者では非敗血症患者より A-LES は低い値で経過した。

ATP は生存患者と死亡患者で差を認めなかったが、A-LES は死亡患者で有意に高値であった。感染症患者での予後判定予測を APACHE II スコア、ATP、A-LES で比較すると曲線下の面積は APACHE II 0.801、ATP (ヘモグロビン補正) 0.279、A-LES 0.941 で、A-LES で有意に良かった (図-6)。

D. 考察

インフルエンザ感染症では重症化機序に熱不安定性フェノタイプによる ATP 産生不全が関与していると報告されている。熱中症患者の重症化にも同様の機序の関与が示唆されている。これら以外の疾患でも重症化の機序に同様に ATP 産生不全が関与している可能性は十分にある。ICU に入室する患者は呼吸・循環動態が不安定なことが多い。肺での酸素取り込み、心不全による酸素供給の問題から、組織での酸素利用が障害される。一般的に末梢組織での酸素不足を見るには嫌気性代謝の産物である乳酸を測定す

る。しかし、理論的には乳酸よりも ATP は酸素供給に対し、より鋭敏な反応を示すはずである。

今回、ICU 入室患者の ATP および A-LES の予後判定効果を検討した。ATP、A-LES ともに対象患者全員では生存患者と死亡患者で差を認めなかった。基礎疾患により酸素供給、末梢組織での酸素利用が異なることが原因と考えられる。従来用いられている重症度評価スコアである。APACHE II スコアは死亡患者で高く、ICU 入室患者の予後判定としての APACHE II スコアの精度を示す結果となった。しかし、APACHE II スコアの計算には 24 時間を要するという欠点がある。ATP 及び A-LES の測定は入室時に可能であり、その後も経過を追って変化をとらえることができる。入室時と翌日の検査値の変化を評価した結果でも生存患者と死亡患者で有意差は認めなかったが、生存患者では ATP は増加傾向、A-LES は減少傾向、死亡患者では反対の傾向が認められた。患者数を増やすことで経時的変化の意義が明らかになると期待できる。

感染症患者を対象とすると A-LES の予後判定予測値は最も良好であっ

た。敗血症は集中治療室で管理する患者群の中では予後不良の疾患である。敗血症は細菌感染が原因で臓器不全が起きる病態である。抹消組織での酸素利用障害が病態生理の一つとして考えられている。敗血症患者で発症する多臓器不全に ATP 産生不全が関与しているか可能性は高い。これが感染症患者で A-LES の予後判定予測が良好であった理由の一つと考えられる。全ての患者に当てはまるわけではないが、A-LES は簡便に測定できるとともに、経時的变化を追うことができる点で優れている可能性がある。

E. 結論

重症患者で ATP、A-LES を測定した。重症患者ではいずれも正常範囲を逸脱していた。さらに感染症患者では予後との相関が高く、重症患者の予後予測因子として重要な役割を果たす可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

表-1 対象患者の基本情報

	Survivor (n=74)	Non-survivor (n=18)	P value
年齢	66.0±14.4	66.3±10.3	.918
性別 (男性:女性)	45:29	7:11	.115
APACHE II score	18.3±8.1	27.7±10.6	.000
基礎疾患			
感染症	17	4	
心原性肺水腫	10	0	
虚血性心疾患	8	1	
呼吸器疾患	6	2	
神経系疾患	8	0	
術後	22	1	
熱傷	0	3	
その他	3	7	

表-2 ATP と A-LES の入室日と翌日での比較

	ATP/Hb*10			A-LES/Hb*10		
	入室日	翌日	変化	入室時	翌日	変化
Survivor	0.43±0.13	0.47±0.15	0.05±0.14	9.6±8.6	4.6±3.3	-4.9±8.0
Non-Survivor	0.40±0.28	0.39±0.28	-0.01±0.16	16.8±17.2	23.8±35.6	7.0±20.2