

第 20 回

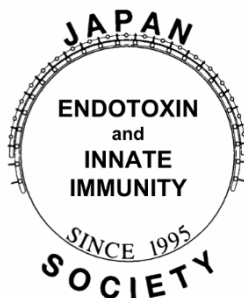
日本エンドトキシン・自然免疫研究会

プログラム・抄録集

会期：2014 年 12 月 5 日（金）・6 日（土）

会場：順天堂大学本郷・お茶の水キャンパス

センチュリータワー南 8 階教室



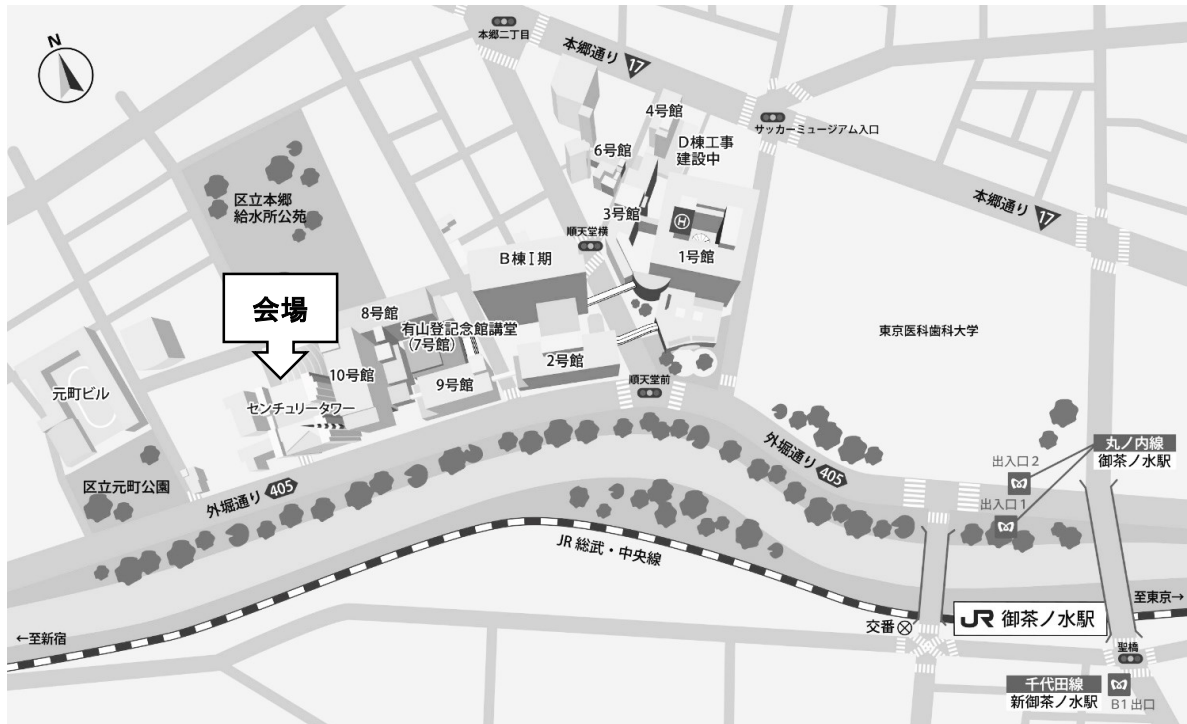
当番世話人 長岡 功

〒113-8421 文京区本郷 2-1-1
順天堂大学医学部生化学・生体防御学講座
TEL : 03-5802-1033/FAX : 03-3813-3157

【交通アクセスの御案内】

最寄り駅

- ・ JR 中央・総武線御茶ノ水駅 より徒歩約 8 分
- ・ 東京メトロ丸ノ内線御茶ノ水駅 より徒歩約 6 分
- ・ 東京メトロ千代田線新御茶ノ水駅 より徒歩約 10 分



【参加者へのご案内】

1. 参加登録会員ならびに未加入の方々へ

- 参加費（5,000 円）と引き換えに参加証をお受け取りの上、各自で所属・氏名をご記入下さい。期間中会場に入場する際には必ずお付け下さい。
（学生・研修医は無料です）
- 演者・共同演者は本会会員に限ります。研究会当日に事務局受付を設けておりますので、未入会の方はあらかじめ日本エンドトキシン・自然免疫研究会事務局にて入会手続きをとるか、研究会当日に入会手続きをお願いいたします（年会費 5,000 円）。

【研究会事務局】 〒520-2192 大津市瀬田月輪町
滋賀医科大学バイオメディカル・イノベーションセンター内
日本エンドトキシン・自然免疫研究会事務局
TEL : 077-548-2238 FAX : 077-548-2240

2. プログラム・講演抄録集

プログラム・講演抄録集は会場受付にて販売（1冊 1,000 円）いたします。研究会会員の方は、プログラム・講演抄録集を必ずご持参下さい。お忘れになられた方への無料配布はいたしませんのでご注意ください。

3. 関連行事

理事会	12月5日（金）15時00分～16時00分
代議員会（総会）	12月5日（金）16時10分～17時10分
イブニングセミナー	12月5日（金）17時20分～18時20分

会場：センチュリータワー南8階教室

懇親会 12月5日（金）18時30分～20時00分
会場：順天堂医院1号館 レストランヒルトップ

4. お問い合わせ先

第20回日本エンドトキシン・自然免疫研究会開催事務局
〒113-8421 文京区本郷2-1-1
順天堂大学医学部生化学・生体防御学講座内
TEL : 03-5802-1033/FAX : 03-3813-3157

【座長の皆様へ】

ご担当のセッションの進行・形式・分担を一任いたしますので、プログラム時間にご配慮いただき、進行くださいますよう宜しくお願いいたします。

【演者の皆様へ】

- 1) ご自身のセッションの開始時刻 30 分前までに、PC 受付にて発表データの受付をお済ませ下さい。
- 2) 発表は PC プレゼンテーションのみといたします。

シンポジウム	発表時間	17 分	質疑応答	3 分
ワークショップ	発表時間	12 分	質疑応答	3 分
一般演題	発表時間	7 分	質疑応答	3 分
優秀賞選考セッション	発表時間	7 分	質疑応答	3 分

座長者の指示に従って発表、討論を行って下さい。時間厳守でお願いします。
- 3) スクリーンは演台左右に 1 面ずつ、計 2 面です。
- 4) 演者は前演者口演開始までに次演者席について待機して下さい。
- 5) PC でのご発表について
 - 事務局で用意する PC の OS は Windows7、プレゼンテーションソフトは Powerpoint2007、2013 です。
 - データは USB メモリー、CD-R などで受付が可能です。
 - 前セッションが始まる前までに PC 受付において動作が正常であることを確認して下さい。
 - 使用フォントは特殊なものではなく、Powerpoint に設定されている標準フォントをご使用下さい。
 - Powerpoint 以外のアプリケーションおよび動画入りでのご発表など、不具合が生じる不安がある場合は、各自の PC によるご発表も可能です。その場合は、事前に PC 受付にその旨お伝え下さい。
 - PC 持ち込みの場合は、電源アダプター、モニタ変換コネクタ（必要な方のみ）もご持参下さい。PC からプロジェクター等につなぐコネクタは「D-Sub15 ピン」メスです。マッキントッシュ PC 等を使われる場合には D-Sub15 ピンへの変換コネクタを必ず持参して下さい。
 - 当日は演者自身で演台上の機材を操作して頂きます。
 - ファイル名は抄録掲載の「演題番号」と「氏名」を入力して下さい。（例）一般演題 1-1 鈴木一郎.ppt

研究会日程

12月5日（金）

会場：順天堂大学センチュリータワー南8階教室

15：00～16：00 理事会
16：10～17：10 代議員会（総会）
17：20～18：20 イブニングセミナー 座長：谷 徹
演者：射場敏明（順天堂大学医学部 救急・災害医学講座）

18：30～20：00 懇親会 会場：順天堂大学1号館レストランヒルトップ

12月6日（土）

会場：順天堂大学センチュリータワー南8階教室

開会の辞

08：40～09：30 一般演題1（優秀賞選考セッション） 座長：川原一芳
09：35～10：35 ワークショップ1（基礎） 座長：横田伸一
10：40～11：40 ワークショップ2（臨床） 座長：小野 聡
11：50～12：50 ランチョンセミナー 座長：田村弘志
13：00～13：50 特別講演 座長：横地高志
13：55～14：35 表彰式・受賞講演（最優秀賞） 座長：深瀬浩一
14：35～14：45 表彰式（優秀賞）
14：55～16：15 シンポジウム 座長：長岡 功
16：20～17：00 一般演題2 座長：高村（赤司）祥子

閉会の辞

12月5日（金）17：20～18：20

イブニングセミナー

会場：順天堂大学センチュリータワー南8階教室

座長：谷 徹（滋賀医科大学 バイオメディカル・イノベーションセンター）

射場 敏明

（順天堂大学医学部 救急・災害医学講座）

「敗血症性凝固異常における活性化好中球の関与」

12月6日(土) 8:40~9:30

一般演題1(優秀賞選考セッション)

座長: 川原一芳 (関東学院大学理工学部理工学科生命学系生命科学コース)

1. TLR4/MD-2 の新規リガンド創製を目指したイソプレノイド脂質の合成
○溝手啓介¹、藤本ゆかり^{1,2}、深瀬浩一¹
大阪大学大学院理学研究科¹
慶応大学大学院理工学研究科²
2. 腸内乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T のリポテイコ酸に認められた新奇構造と細胞表層における局在
○白石 宗、横田伸一
札幌医科大学 医学部 微生物学講座
3. カプトガニ体液凝固因子 factor C の LPS を介した factor B の活性
○小林雄毅¹、柴田俊生^{2,3}、池田駿典¹、小柴琢己²、水村 光⁴、
小田 俊男⁴、川畑俊一郎²
九大院・システム生命科学¹、九大院・理・生物科学²、九大院・高等研究³、
生化学工業⁴
4. Lipopolysaccharide downregulates the expression of p53 through activation of MDM2 and enhances activation of nuclear factor-kappa B
○Erdenezaya Odkhuu^{1,2}, Adilsaikhhan Mendjargal³, Naoki Koide¹,
Naoko Morita¹, Sachiko Akashi-Takamura¹ and Takashi Yokochi¹
5. 抗菌ペプチド LL-37 によるマクロファージのピロトーシス制御
○胡 忠双¹、村上泰介¹、鈴木 香¹、田村弘志²、長岡 功¹
順天堂大学医学研究科生化学・生体防御学¹、LPS コンサルティング事務所²

12月6日(土) 9:35~10:35

ワークショップ1(基礎)

座長: 横田伸一 (札幌医科大学 微生物学講座)

1. リピドAアシル基数減少がグラム陰性菌の病原性増強に果たす役割
—TLR4認識回避効果と食食抵抗性増強効果の誘導—
○松浦基博
京都大学大学院医学研究科 微生物感染症学
2. 透析液清浄化のためのエンドトキシン・微生物迅速検査の現状と
グローバルな展開
○ 檜村友隆^{1,2,3}
純真学園大学 保健医療学部医療工学科¹、Sen Sok International University²
(NGO) Ubiquitous Blood Purification International³
3. Low Endotoxin Recovery (LER)に関する欧米の状況と一考察
○土谷正和
Charles River, Endotoxin and Microbial Detection
4. 抗微生物材料としての銀ナノ粒子/キチン&キトサン複合体の細胞毒性と
自然免疫
○石原雅之、服部秀美、中村伸吾
防衛医科大学校・研究センター・医療工学研究部門

12月6日（土）10：40～11：40

ワークショップ2（臨床）

座長：小野 聡（東京医科大学八王子医療センター 特定集中治療部）

1. 腎臓内科医の観点からみた PMX-DHP 療法

○中村 司¹、佐藤英一¹、松村大輔¹、天羽繭子¹、野村まゆみ¹、村田一成¹、
上田善彦²

新松戸中央総合病院 腎臓内科¹ 獨協医大越谷病院 病理²

2. 重症患者におけるEAA（endotoxin activity assay）およびPCT

（Procalcitonin）測定の有用性

○池田寿昭、小野 聡、上野琢哉、須田慎吾

東京医科大学八王子医療センター 特定集中治療部

3. 四塩化炭素誘発急性肝障害ラットモデルにおける Bach1 mRNA の

発現とその意義

○高橋 徹

岡山県立大学保健福祉学部

4. SPECTRAL社のエンドトキシン活性レベルによる腸管透過性とエンドトキシン
感受性の検討

○近森正昭

近森病院臨床工学部

12月6日（土） 11：50～12：50

ランチョンセミナー

座長：田村弘志（LPSコンサルティング事務所）

講演 1

大内 和幸

（J.K.インターナショナル）

「フェージタンパク質とリコンビナント C 因子を用いた
エンドトキシン検出法」

講演 2

川畑 俊一郎

（九州大学大学院 理学研究院 生物科学部門）

「高機能組換え体を用いたカプトガニリポ多糖反応性カスケードの
インビトロ再構築」

12月6日（土）13：00～13：50

特別講演

座長：横地高志（愛知医科大学 感染・免疫学講座）

浜窪 隆雄

（東京大学先端科学技術研究センター 計量生物学）

「敗血症におけるペントラキシン3の血管内皮細胞保護効果について」

12月6日（土）13：55～14：35

受賞講演・表彰式（最優秀賞）

座長：深瀬浩一（大阪大学大学院 理学研究科 天然物有機化学研究室）

12月6日（土）14：35～14：45

表彰式（優秀賞）

12月6日(土) 14:55~16:15

シンポジウム –生体防御ペプチドの機能の多様性–

座長：長岡 功 (順天堂大学医学部 生化学・生体防御学講座)

1. 抗菌ペプチド α ディフェンシンによる腸内環境の恒常性制御と疾病
○綾部時芳、櫻木直也、中村公則
北海道大学大学院 先端生命科学研究院 細胞生物科学分野
2. Cathelicidin ファミリーの抗菌ペプチドによるエンドトキシン除去作用
○鈴木 香、村上泰介、胡 忠双、細田浩司、長岡 功
順天堂大学医学部 生化学・生体防御学
3. 昆虫抗微生物タンパク質の応用の試み
○石橋 純
(独) 農業生物資源研究所遺伝子組換え研究センター昆虫機能研究開発ユニット
4. 抗菌作用と創傷治癒促進作用を有する新規ペプチドの皮膚潰瘍治療への応用
○富岡英樹^{1, 3}、中神啓徳²、天満昭子²、齋藤佳巳³、加賀敏宏³、森下竜一¹
大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学¹
大阪大学大学院連合小児発達学研究科健康発達医学²
アンジェス MG 株式会社 彩都研究所 創薬研究部³

12月6日(土) 16:20~17:00

一般演題 2

座長：高村(赤司)祥子 (愛知医科大学 感染・免疫学講座)

1. グルコースのリン酸化体を用いた阻害物質による干渉作用の抑制法および血中エンドトキシン測定の新法の開発
○藤田 優、田中祥之
沢井製薬(株) 生物研究部
2. 好中球のケモタキシスにおいて GBF1 は ARF1 を介して Rac1 の局在に関与する
○真崎雄一
産業医科大学 医学部 生化学講座
3. *Porphyromonas gingivalis* ジンジパインは IL-33 誘導を介してヒト歯肉上皮細胞の CAP18/LL-37 産生をダウンレギュレーションする
○多田浩之¹、松下健二²、長岡 功³、高田春比古¹
東北大学大学院歯学研究科・口腔微生物学分野¹
国立長寿医療研究センター研究所・口腔疾患研究部²
順天堂大学大学院医学研究科・生化学・生体防御学³
4. エンドトキシン吸着療法を施行し異なる経過をたどった急性間質性肺炎の 2 症例
○松村大輔、佐藤英一、野村まゆみ、天羽繭子、中村 司
新松戸中央総合病院腎臓内科

イブニングセミナー

12月5日（金） 17：20～18：20

会場：センチュリータワー南8階教室

演者：射場敏明

（順天堂大学医学部 救急・災害医学講座）

座長：谷 徹

（滋賀医科大学 バイオメディカル・イノベーションセンター）

イブニングセミナー

敗血症性凝固異常における活性化好中球の関与

射場敏明（順天堂大学医学部 救急・災害医学講座）

敗血症に合併する凝固異常においては、血管内腔に存在する単球や内皮細胞が発現する **tissue factor** の役割が大きいと考えられてきた。しかし最近では、これらに加えて好中球の関与が注目されるようになってきている。すなわち、炎症性刺激によって活性化され血管内腔に接着した好中球は、やがてアポトーシスやネクローシスなどの細胞死をきたして **damage-associated molecular patterns(DAMPs)**を放出し、凝固を活性化する。それ以外にも 2004 年に **Brinkmann** らによってその存在が報告されて以来、好中球は **neutrophil extracellular patterns(NETs)**を放出する特殊な細胞死形態をとることによって凝固の活性化にかかわっていることが注目されるようになった。NETs の構成成分であるヒストンや顆粒タンパクは強力な凝固活性化作用を有し、敗血症性凝固異常の病態形成に深く関与している。敗血症における NETs の放出や凝固の活性化は、そもそも病原体の全身播種をくい止めるための自己防御反応の一環であるが、これが過剰となり、全身的の微小血管内に血栓形成をきたすようになると播種性血管内凝固(DIC)として重要臓器の機能障害を引き起こすことになる。今回のイブニングセミナーでは、特にバイオイメージングテクニックを用いて好中球細胞死や NETs の病態への関与を紹介する。

一般演題 1 優秀賞選考セッション

12月6日(土) 8:40~9:30

座長：川原一芳

(関東学院大学理工学部理工学科生命学系生命科学コース)

一般演題 1-1

TLR4/MD-2 の新規リガンド創製を目指したイソプレノイド脂質の合成

○溝手啓介¹、藤本ゆかり^{1,2}、深瀬浩一¹

大阪大学大学院理学研究科¹・慶応大学大学院理工学研究科²

自然免疫タンパク質の 1 つである TLR4 は、タンパク質 MD-2 と複合体を形成し、グラム陰性菌のリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS)、特に複合糖質である lipid A 部分を認識する事により、細胞内へシグナル伝達し、免疫系を活性化する。

最近、土壌菌 *Penicillium funiculosum* の二次代謝物であるイソプレノイド脂質によって TLR4/MD-2 を介した免疫誘導活性を示すことが明らかになった。これまでに当研究室において、HPLC により TLR4 活性化成分の単離および精製が行われ、各種 NMR 測定と高分解能質量分析を用いて解析することにより、活性成分である FNC-R-01 の化学構造を決定した。

本研究では、FNC-R-01 の詳細な免疫刺激活性および TLR4/MD-2 の機能解明と新しい免疫アジュバントとしての応用を目指し、その構造と活性についての検討を行った。まず、イソプレノイド脂質から FNC-R-01 への変換において接触還元の状態検討を行い、FNC-R-01 の効率的な合成法を確立した。また、分子力場計算により、イソプレノイド脂質及び FNC-R-01 の安定配座を計算し、lipid A/MD-2 複合体の X 線結晶構造解析の結果と比較することにより、TLR4/MD-2 による FNC-R-01 の分子認識について考察した。さらに、その知見をもとに TLR4/MD-2 の新規リガンドのデザインと合成を行い、生物活性試験を行った。

共同研究者：佐伯昭典¹、本田裕恵^{3,4}、岡本直樹^{3,5}、木村隆仁⁵、長井良憲³、高津聖志^{3,4}

(富山大学大学院医学薬学研究部(医学)³・富山県薬事研究所⁴・テイカ製薬株式会社⁵)

一般演題 1-2

腸内乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* JCM 1131^T のリポテイコ酸に認められた

新奇構造と細胞表層における局在

○ 白石 宗, 横田 伸一

札幌医科大学 医学部 微生物学講座

【背景と目的】

リポテイコ酸 (LTA) は, グラム陽性細菌の細胞表層を構成する分子の一つである. LTA は, 細菌の生理上重要な役割を持ち, 宿主細胞への定着, 免疫誘導など, 宿主との相互作用に關与する重要な表層分子とされている. しかし, これまでの LTA に関する知見は, ほとんどが病原細菌に関するもので, プロバイオティクスの LTA に関する情報は未だ不十分である. 本研究では, 代表的な腸内乳酸菌でプロバイオティクスとして利用される *Lactobacillus gasseri* の基準株 JCM 1131^T について LTA の構造と細胞表層における局在を検討した.

【方法】

LTA は菌体からのブタノール抽出と疎水クロマトグラフィーによって精製した. 構造は NMR スペクトル, および種々の化学処理によって得た部分分解物の MALDI-TOF MS やガスクロマトグラフィーにより決定した. 局在は免疫電子顕微鏡法を用いた. 対数期の細胞に抗 LTA モノクローナル抗体 clone 55 (Hycult Biotech) と金コロイド標識二次抗体を作用させ, 透過型電子顕微鏡によって観察した.

【結果と考察】

本菌株の LTA は, 多くのグラム陽性細菌に見られる一般的な構造であるグリセロールリン酸に D-アラニンが部分置換した主鎖構造を有しており, アンカー糖脂質部分には, 脂肪酸が 2 または 3 本結合していた. 3 本の脂肪酸は乳酸菌に特徴的に見られる構造である. アンカー糖部分は四糖 (ガラクトース:グルコース=3:1) であり, これは過去報告のない新奇構造であった. また LTA は, 対数期においては細胞壁内部に局在し, 細胞外には露出していないことが示唆された. 以上の結果は, プロバイオティクスと宿主との相互作用を考える上で重要な知見であると考えられる.

非会員共同研究者: 横田篤, 吹谷智 (北大), 森田直樹 (産総研), 富田理 (農研機構), 岡田早苗, 田中尚人 (東農大)

一般演題 1-3

カプトガニ体液凝固因子 factor C の LPS を介した factor B の活性化

○小林 雄毅¹、柴田 俊生^{2,3}、池田 駿典¹、小柴 琢己²、水村 光⁴、小田 俊男⁴、川畑俊一郎²

九大院・システム生命科学¹、九大院・理・生物科学²、九大院・高等研究³、生化学工業⁴

カプトガニの体液凝固因子であるセリンプロテアーゼ前駆体 factor B は、リポ多糖 (LPS) 感受性セリンプロテアーゼ前駆体である factor C によって活性化される。Factor C は、LPS 存在下における自己触媒的な活性化と factor B の活性化の際、それぞれ Phe-Ile および Ile-Ile 間を切断するキモトリプシン様活性を示す。一方で、合成ペプチド基質に対しては、Arg の C 末端側を切断するトリプシン様活性を示す。このため、factor C による factor B の詳細な活性化機構は不明である。本研究では、組換え体を用いて、その機能解析を行った。Factor C はキモトリプシンによって Phe-Ile 間を切断することで LPS 非依存的に活性化することができる。今回、factor B は、LPS 存在下で活性化された factor C (α -factor C) により活性化されるが、キモトリプシンにより活性化した factor C (β -factor C) によって活性化しないことが判明した。 β -factor C は、LPS 存在下においても factor B を活性化せず、キモトリプシンによる副次的な切断によって、LPS 結合活性を失っていることが判明した。さらに、表面プラズモン共鳴センサーによる LPS との相互作用解析から、factor B が LPS と相互作用していることが判明した ($K_D = 1.46 \times 10^{-9} \text{ M}$)。以上のことから、factor B の活性化には α -factor C が LPS 上で factor B と複合体を形成することが必須であると示唆された。また、今回 factor B が LPS 結合活性を有するセリンプロテアーゼ前駆体として新たに見いだされた。

一般演題 1-4

Lipopolysaccharide downregulates the expression of p53 through activation of MDM2 and enhances activation of nuclear factor-kappa B

○Erdenezaya Odkhuu^{1,2}, Adilsaikhan Mendjargal³, Naoki Koide¹, Naoko Morita¹, Sachiko Akashi-Takamura¹ and Takashi Yokochi¹

Department of Microbiology and Immunology, Aichi Medical University School of Medicine¹

Department of Anatomy² and Department of Oncology³, Mongolian National University of Medical Sciences

The effect of lipopolysaccharide (LPS) on the expression of p53 protein in RAW 264.7 macrophage cells was examined. LPS downregulated the expression of p53 protein 4-24 hr after the stimulation. LPS-induced p53 inhibition was restored with pharmacological inhibitors of c-jun N-terminal kinase (JNK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). It was also restored by inhibitors of MDM2 activation and proteasome. LPS-induced p53 inhibition corresponded to activation of MDM2. LPS-induced MDM2 activation was prevented by inhibitors of JNK and PI3K. The expression of p65 NF- κ B at a late stage after LPS stimulation was downregulated in the presence of a MDM2 inhibitor. Nutlin-3 as a MDM2 inhibitor reduced LPS-induced production of nitric oxide but not tumor necrosis factor- α . Administration of LPS into mice downregulated the in vivo expression of p53 in the livers. Taken together, LPS was suggested to downregulate the expression of p53 via activation of MDM2 and enhance the activation of NF- κ B at a late stage.

一般演題 1-5

抗菌ペプチド LL-37 によるマクロファージのピロトーシス制御

胡 忠双¹, 村上 泰介¹, 鈴木 香¹, 田村 弘志^{1,2}, 長岡 功¹

順天堂大学・医学研究科・生化学・生体防御学¹、LPS コンサルティング事務所²

背景・目的：近年、新たに見出された細胞死ピロトーシスは、caspase-1 依存的なプログラム細胞死であり、炎症性サイトカイン (IL-1 β など) の放出をともなうことから、敗血症治療の新たな標的として注目されている。我々はこれまでに、LL-37 が致死性エンドトキシンショックモデルマウスの生存率を改善させることを明らかにした。そこで本研究では、*in vitro* での LPS/ATP 刺激によるマクロファージ系細胞のピロトーシスと、*in vivo* での敗血症モデルにおける腹腔マクロファージのピロトーシスに対する LL-37 の効果について検討した。

方法：マウスマクロファージ系 J774 細胞を LL-37 の存在下あるいは非存在下において LPS/ATP で刺激した。その後、IL-1 β の放出、caspase-1 活性化、ピロトーシスを測定した。また、マウスの盲腸結紮穿孔敗血症モデルに LL-37 を投与し、腹腔マクロファージにおける caspase-1 活性化、ピロトーシス、および腹腔の IL-1 β を測定した。

結果・結論：J774 細胞を LPS/ATP 刺激することによって誘導された IL-1 β の放出、caspase-1 の活性化とピロトーシスが LL-37 によって抑制された。そして、LL-37 は LPS の細胞膜受容体への結合と、ATP 刺激による P2X₇ を介した caspase-1 の活性化を抑制することがわかった。従って、LL-37 は、LPS/ATP によるマクロファージのピロトーシスを抑制するが、その機序に、LL-37 による LPS の細胞膜受容体への結合抑制と ATP 刺激による P2X₇ の活性化抑制の二つが関与していることが考えられた。さらに、敗血症モデルに LL-37 を投与することにより、腹腔マクロファージにおける caspase-1 の活性化とピロトーシス、および腹腔の IL-1 β レベルが抑制され、マウスの生存率が改善された。以上の結果から、LL-37 はピロトーシスを抑制し、炎症反応を制御することにより、敗血症において、防御的に働くことが期待される。

ワークショップ 1 基礎

12月6日（土）9：35～10：35

座長：横田伸一

（札幌医科大学 微生物学講座）

ワークショップ 1-1

リポドAアシル基数減少がグラム陰性菌の病原性増強に果たす役割

—TLR4 認識回避効果と貪食抵抗性増強効果の誘導—

松浦基博

京都大学大学院医学研究科 微生物感染症学

LPS の活性中心であるリポドAは6個のアシル基を持つ構造が一般的で、この構造を宿主細胞の TLR4/MD-2 受容体が強く認識して感染防御機構活性化の格好の標的とする。ペスト菌の場合、宿主体温の 37°C 付近で生育するとそのリポドAはヒト TLR4 系に認識されない 4 アシル型が主になり、死菌体による反応でもこのリポドAの特徴が他の菌体成分の活性を凌駕して現れ、宿主自然免疫監視網をすり抜けて感染拡大を起こす病原因子として働く可能性を指摘して来た。

この様なリポドAアシル基数の減少効果が、生菌感染の場合でも反映されるのか、また、グラム陰性菌感染で一般的に見られる可能性があるのかについて検討を加えるために、ネズミチフス菌のリポドAアシル基数減少変異株を作成した。6 アシル型リポドAを主とする野生株に対して 5 アシル型リポドAを主とする変異株 3 株が得られた。野生株生菌感染で見られたヒト細胞 TLR4 系刺激活性は、5 アシル型変異株ではどの株にもほとんど認められなくなった。また、貪食効果を調べてみると、変異株は野生株に比べて貪食される菌数が明らかに少なくなっていたが、この現象への TLR4 系の関与は認められなかった。貪食実験では細胞に菌を感染させた後、非付着細菌を洗い流すが、この時点で既に細胞に捕えられている変異株の菌数が野生株に比べて少なく、その差が最終的な貪食菌数の差に反映されることを示唆する結果が得られた。

この様に、グラム陰性菌はリポドAアシル基数を減少させることにより、TLR4 シグナル系を介した自然免疫による感染防御機構を回避すると共に食細胞への付着性も低下させることで貪食抵抗性を増強させ、これら両作用が相俟って感染力を増強する可能性が考えられる。

ワークショップ 1-2

透析液清浄化のためのエンドトキシン・微生物迅速検査の現状と

グローバルな展開

○ 檜村友隆^{1,2,3}

純真学園大学 保健医療学部医療工学科¹、Sen Sok International University²
(NGO) Ubiquitous Blood Purification International³

本邦における人工透析患者数は 30 万人を越え、今後暫くの間は増加が続くと予想されている。人工透析治療では、透析膜を介して血液と透析液が触れ合い、さらには拡散・内部濾過現象によって透析液の一部が血液中に移行する。よって、透析液に汚染が生じた場合、エンドトキシン（以下、ET）を代表とする生理活性物質が血中に混入することで生体に炎症反応を引き起こし、各種透析関連合併症の発生母体となる。

1 回の治療で必要となる透析液は 120L にも及び、大量に製造する必要性から製造は各透析施設に委ねられ、局方の縛りは受けない。本邦では、透析関連学会が ET・微生物汚染に関する透析液水質管理基準を定め透析液清浄化に努めている。近年、さらなる安全性を確保するために、高感度エンドトキシン測定や微生物迅速検査の採用も検討されている。

一方、透析液清浄化は国際的にもその重要性が問われており、経済発展とともに透析患者の増加が顕著となってきた発展途上国においても例外ではない。しかしながら、現状のエンドトキシン検査では、人・物・予算不足で苦しむこれら発展途上国のニーズに応えることはできない。

今回、人工透析治療領域における透析液清浄化のためのエンドトキシン検査および微生物迅速検査の現状について報告する。

また、ASEAN 地域における発展途上国への透析液清浄化支援の現状について報告する。

ワークショップ 1-3

Low Endotoxin Recovery (LER)に関する欧米の状況と一考察

○土谷正和

Charles River, Endotoxin and Microbial Detection

カプトガニ血球抽出物を用いたリムルス試験は、医薬品や医療機器におけるエンドトキシン(ET)試験法として、広く使用されている。近年、米国食品医薬品局(FDA)は、発熱性物質及び ET 試験に関するガイダンス(2012年6月)で、測定試料の保存安定性に関して実際のデータに基づいた保存条件を確立するよう推奨しており、申請時にそのデータを要求する場合がある。2013年、Genentech社は、キレート剤と界面活性剤を含む製品で添加した ET が ET 試験法で回収できないと報告し、この現象を Low Endotoxin Recovery (LER)と命名した。その中の一製品では、ウサギ発熱性は検出されたにもかかわらず、リムルス試験では陰性であった。

演者らも LER に関して検討を行い、リムルス試験と他の生物活性との相関性が LER 条件下で認められるかどうかを調べた。その結果、LER による ET の活性の低下は、リムルス試験、ウサギ発熱性試験、全血によるサイトカイン産生試験で確認され、これらの生物活性が相関することを改めて確認した。また、グラム陰性菌の培養液から調製した天然の ET では LER が認められない場合もあった。キレート剤と界面活性剤による ET 活性の低下は、キレート剤によりリポ多糖(LPS)集合体を補強している 2 価イオンが除去され、弱くなった集合体から、界面活性剤が LPS を取り去ることにより起こると推定されている。LER は、添加した LPS 活性が試料により変化する現象であり、エンドトキシン試験法自体の問題ではない。しかし、試料をサンプリングした後の安定性をいかに示すべきか、現在も議論が行われている。

ワークショップ 1-4

抗微生物材料としての銀ナノ粒子/キチン&キトサン複合体の細胞毒性と自然免疫

○石原雅之, 服部秀美, 中村伸吾

防衛医科大学校 研究センター 医療工学研究部門

環境に優しい新規方法で粒径を制御した銀ナノ粒子溶液をナノ線維様或いはナノ多孔性表面構造を有するキチン&キトサン微粉末と混合すると、効率的に銀ナノ粒子がキチン&キトサン表面に吸着した強い抗微生物活性を有する銀ナノ粒子/キチン&キトサン複合体が生成し、安定な乾燥微粉末をキログラムスケールで製造することが可能になっている。本研究の目的は、この銀ナノ粒子/キチン&キトサン複合体を用いて有効な抗微生物（抗真菌、抗菌活性、抗ウィルス）活性を有する衛生材料としての最適である。キチン&キトサン微粉末は単独でも弱い抗微生物（抗ウィルス、抗菌及び抗真菌）活性を示し、その活性は構成キチン&キトサンの脱アセチル化度や分子量よりも粉末のナノ線維様或いはナノ多孔性表面構造を有した表面構造に依存することがわかった。また適量の銀ナノ粒子をキチン&キトサン微粉末に吸着させることによる有効な強い抗微生物活性を付与することが可能となる。

しかしながら銀ナノ粒子/キチン&キトサン複合体は、ヒト線維芽細胞に対する強力な細胞毒性及び好中球のホーミング等免疫反応惹起も観察されている。本口演では、銀ナノ粒子/キチン&キトサン複合体と抗微生物活性、及び細胞毒性と自然免疫反応について最新の知見を発表する。

ワークショップ 2 臨床

12月6日（土） 10：40～11：40

座長：小野 聡

（東京医科大学八王子医療センター特定集中治療部）

ワークショップ 2-1

腎臓内科医の観点からみた PMX-DHP 療法

○中村司¹、佐藤英一¹、松村大輔¹、天羽繭子¹、野村まゆみ¹、村田一成¹、
上田善彦²

新松戸中央総合病院 腎臓内科¹、獨協医大越谷病院 病理²

敗血症は、高度な炎症反応と循環不全に特徴付けられ、未だ予後不良の疾患である。1994年にPMX-DHP療法が保険適応されて以来20年以上が経過し日本全国の各施設で敗血症およびショックに施行され、有効かつ安全な治療法として確立されている。当療法の施行科は各施設により種々であるが当院では100%腎臓内科である。演者らは過去15年間に500名以上の敗血症およびショック患者に対して当該療法を施行し有効な治療法であることを報告している。敗血症の治療は発症早期における管理により臓器不全の重症度を軽減させることが重要である。ICUにおける急性腎障害(AKI)に対する疫学検討では敗血症性ショックが最大の原因であることはよく知られており、腎臓は臓器不全に陥りやすい代表臓器である。また、腎機能の低下は他臓器不全を惹起しやすく、重症病態における腎保護の重要性が強調されてきている。今回、septic AKIの病態、PMX-DHPの腎保護作用に関して演者らのこれまでの研究報告、世界の最近の知見、septic AKIにおける肝型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)の役割などに関して報告する。Septic AKIでは腎虚血により尿細管上皮細胞が脱落することは以前から報告されているが糸球体上皮細胞、集合管細胞も障害されることも示唆されている。上記細胞障害が当該療法により改善されデータを提示する。また、近位尿細管障害マーカーとしての尿中L-FABPが敗血症性ショックの予後と有意に相関することが報告されている。今回、シミックの菅谷健博士との共同研究によりICUにおける敗血症性ショック患者の重症度把握、当該療法の効果判定に迅速L-FABP測定キットが有効であった症例を提示する。

ワークショップ 2-2

重症患者におけるEAA (endotoxin activity assay) およびPCT

(Procalcitonin) 測定の有用性

○池田 寿昭、小野 聡、上野 琢哉、須田 慎吾
東京医科大学八王子医療センター 特定集中治療部

はじめに：PAMPs(pathogen-associated molecular patterns)の一つとされるエンドトキシンは、グラム陰性菌感染症における主要な病因物質であり様々な臨床症状を引き起こす。しかし、従来から広く用いられているエンドトキシン測定（比濁時間分析法）にも限界があるとされている。目的：ICUへ入室した重症患者を対象に、EAA (endotoxin activity assay) および PCT (Procalcitonin) を用いて、敗血症の背景を調査することを目的に本研究を行った。対象および方法：当施設の ICU へ入室し 24 時間以内に EAA 値が測定された症例を対象とした。EAA は化学発酵法 (Berthold Detection Systems, Germany) にて測定し、PCT は PCLIA 法 (BRAHMUS, Berlin, Germany) で行なわれた。求められた EAA 値と患者の客観的重症度 (APACHE II スコア) および転帰 (28 日死亡率) について検討した。更に、健康成人(日本人)ボランティア 61 名を対象にコントロール群とし比較検討を行った。結果は mean±SD で表記した。本研究は、東京医科大学医学研究倫理委員会において承認されたものである。結果：ICU 入室症例 (n=314 例、67±15 歳、男性：69.7%) の重症度は、APACHE II スコア 21.4±9.2、SOFA スコア 7.5±4.3 であった。EAA 値は 0.39±0.25 に対しコントロール群では 0.01±0.09 であった。以前に報告された MEDIC study で検討された結果と明らかに異なり、EAA 値は人種 (邦人と白人) による分布の違いがあると思われた。今回の EAA 値と重症度および 28 日後死亡率の間に有意な相関が認められた。また、EAA 値と PCT を同時測定した場合、1 個のマーカが測定された時よりも、重症度はより正確に評価されるものと考えられた。結語：EAA 値は、重症患者の重症度および転帰を予測する上で有用なマーカであると思われた。

ワークショップ 2-3

四塩化炭素誘発急性肝障害ラットモデルにおける Bach1 mRNA の発現

とその意義

高橋 徹

岡山県立大学保健福祉学部

【背景】急性肝障害において酸化ストレスはその病態に大きな役割を果たしている。私たちは四塩化炭素(CCl₄)誘発急性肝障害ラットモデルにおいてチトクローム P450 など肝のヘム蛋白から遊離したヘムが、脂溶性の鉄であることから酸化ストレスを増強し肝障害を悪化させることを明らかにした。Bach1 はヘム分解の律速酵素 Heme Oxygenase-1 (HO-1)の抑制性転写因子であり、遊離ヘムが増加するとヘム - Bach1 複合体が形成され核外に汲み出され、その結果 HO-1 が誘導される。これらの事実は CCl₄ 投与が Bach1 の遺伝子発現動態に影響を及ぼすことを示唆している。

【目的】 CCl₄ 誘発急性肝障害における Bach1 の発現動態とその意義についてヘム代謝と関連させて検討した。

【方法】雄性 SD ラットに CCl₄(0.1~2ml/kg)を腹腔内投与した。肝を経時的に採取し、Northern blot 法により肝 Bach1, HO-1 およびヘム合成の律速酵素 δ アミノレブリン酸合成酵素(ALAS1) mRNA の発現を測定した。肝障害を血清 ALT 値、肝マロンジアルデヒド(MDA)値、還元型グルタチオン(GSH)値により評価した。

【結果】 CCl₄ 投与後 HO-1 の発現増加と ALAS1 の発現低下が認められた。ヘムは HO-1 を誘導し ALAS1 の発現を抑制することから、肝遊離ヘム濃度の上昇が示唆された。肝 Bach1 mRNA 誘導は用量依存的に 6 時間後をピークとして誘導された。血清 ALT 値と肝 MDA 値は 24 時間後に有意に上昇し、肝 GSH 値は 3 時間後に著明に減少した。また、血清 ALT 値は Bach1 mRNA と正の相関関係を示した。

【考察・結論】 CCl₄ 投与により Bach1 が核外に運び出された結果、核内で枯渇した Bach1 蛋白を補うために Bach1 mRNA が誘導されると考えられた。Bach1 mRNA はヘム依存性酸化ストレス肝障害の指標となる可能性がある。

ワークショップ 2-4

SPECTRAL社のエンドトキシン活性レベルによる腸管透過性と

エンドトキシン感受性の検討

近森正昭

近森病院臨床工学部

初めに

FDAはICU重症度判定としてEAレベル測定装置を承認した。エンドトキシンはTLR4を介した最も強力な自然免疫活性物質である。

心大血管手術でEAレベルと臨床症状の相関を検討、腹水濃縮再静注療法では高EAレベル腹水への感受性低下が考えられ慢性腎不全患者で感受性を検討した。

対象と方法

CABG29例、うち弁手術合併8例、弁手術18例、人工血管置換術3例、平均年齢70.46歳の50例で術後EAレベルを測定した。

維持透析患者34例、非代償性慢性腎不全患者11例でEAレベルを測定した。

結果

術中赤血球輸血はEAレベル0.30以上で増加、 $P<0.05$ 、術後入院日数はEAレベル0.20以上で延長し、 $P<0.05$ の統計的な有意差があった。

透析患者34例でEAレベルは重症とされる0.40以上が10例、体重が減少した非代償期の患者は高値で、透析患者のEAレベルは連続的に分布していた。

考察

心大血管手術は侵襲で腸管透過性が高まりEAレベルが上昇する。女性はエストロゲンの作用で感受性が高く少量飲酒で肝障害を発症させる。非代償期腎不全患者は異化亢進で体重、performance statusが低下し生命予後は短いrefractory cachexiaだが自然免疫障害から透析導入時のEAレベルは高く、維持透析患者34名、平均年齢67.36歳のEAレベルは健常状態へ移行する連続的な散布図だった。

まとめ

心大血管手術でEAレベル高値の患者は術中赤血球輸血が多く入院日数が長い。透析患者は感受性低下があり健常状態まで連続的な散布図となる。

ランチョンセミナー

12月6日（土） 11：50～12：50

演者 1： 大内和幸

（株式会社 J.K.インターナショナル）

演者 2： 川畑俊一郎

（九州大学大学院 理学研究院 生物化学部門）

座長： 田村弘志

（LPS コンサルティング事務所）

ランチオンセミナー1

ファージタンパク質とリコンビナントC因子を用いたエンドトキシン

検出法

大内和幸

株式会社 J.K.インターナショナル

リムルス反応では試料中の成分によって LPS と C 因子の反応が干渉されることがある。この問題を解決するため、マイクロウェルに固定化したファージタンパク質に試料中の LPS を結合させて他の成分を洗い流してから C 因子を加えて反応させる系を開発した。

干渉による問題とは別に、LPS が試料中の成分によりマスキングされてしまい測定値が実際より低くなることがある (low endotoxin recovery: LER)。エンドトキシンのマスキングについてはタンパク質溶液、血液製剤で報告されているが、最近の研究で、生物学的製剤では製剤中の界面活性剤が引き金になりうることが示された。マスキングについての検討が進み、脱マスキングするキットも開発された。併せて紹介する。

ランチオンセミナー2

高機能組換え体を用いたカプトガニリポ多糖反応性カスケードの インビトロ再構築

川畑俊一郎

九州大学大学院・理学研究院・生物科学部門

リポ多糖 (LPS) で惹起されるカプトガニ凝固カスケードは、セリンプロテアーゼ前駆体である C 因子、B 因子、および凝固酵素前駆体から構成される。C 因子は、LPS により自己触媒的に活性型となり、B 因子を切断して活性化する。ついで活性型 B 因子が凝固酵素前駆体を活性化し、最終的には凝固酵素が凝固タンパク質のコアグジュロゲンをコアグジュリンに変換して不溶性のゲルを形成する。当研究室では、カプトガニ個体数の減少によるリムルス試験の原料不足に対応すべく、均一な N-型糖鎖 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ を付加する HEK293S 細胞の変異株を用いることで、構造的に安定化した高機能の組換え C 因子の調製に初めて成功した¹⁾。現在、B 因子や凝固酵素前駆体についても組換え体の調製を進めている。LPS を介した凝固カスケードのインビトロでの再構築の研究は、プロテアーゼ前駆体の自己触媒的活性化の分子機構を解明するための格好のモデル系であり、「近接効果」による前駆体活性化の分子基盤の解明に大きく貢献するはずである。

1) Kobayashi, Y., Shiga, T., Shibata, T., Sako, M., Maenaka, K., Koshiba, T., Mizumura, H., Oda, T., and Kawabata, S. (2014) *JBC*. **289**, 25987.

特別講演

12月6日（土）13：00~13：50

演者：浜窪隆雄

（東京大学先端科学技術研究センター 計量生物医学）

座長：横地高志

（愛知医科大学 感染・免疫学講座）

特別講演

敗血症におけるペントラキシン3の血管内皮細胞保護効果について

浜窪隆雄

東京大学先端科学技術研究センター 計量生物医学

ペントラキシン3 (PTX3) は、CRP や SAP などのペントラキシンファミリーに属する炎症の急性期蛋白として知られている。PTX3 は炎症部位において、好中球や単球から局所的に分泌されるため、肝臓から全身に分泌される CRP にくらべ血中濃度は低いのが特徴である。自然免疫において、PTX3 は液性のパターン認識受容体として捉えられており、補体系のタンパク質やウイルス・細菌、カビなど様々な病原体と結合しマクロファージに提示するオプソニン化蛋白として重要な役割が指摘されている。また、マトリックス蛋白との結合も知られており、創傷治癒における炎症反応等での役割が考えられる。

PTX3 は敗血症で血中濃度が上昇することから、我々は、特異抗体を用いて敗血症血中に存在する PTX3 結合タンパク質を高感度質量分析法により調べ、補体系やマトリックス蛋白のほかに、好中球細胞外トラップ (NETs) 蛋白群とヒストンを見出した。細胞外ヒストンは、血管内皮細胞の傷害や血小板凝集反応を起こし、敗血症において臓器不全の原因と考えられていることから、ヒストンと PTX3 の結合解析と敗血症における役割を調べた。

その結果、PTX3 とヒストンの結合は通常の蛋白相互作用ではなく、蛋白の構造が失われる凝集反応であり、すばやく不可逆的な凝集体を作る反応であることがわかった。PTX3 はヒストンによる培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の傷害を抑制し、さらに、敗血症モデルマウスにおいても PTX3 の投与により死亡率や炎症反応が劇的に改善することを見出した。

以上のことから、PTX3 は細胞外ヒストンを取り除くことにより、敗血症における血管内皮細胞傷害を保護し、臓器不全に対する治療薬として効果が期待される。

受賞講演・表彰式（最優秀賞）

12月6日（土）13：55～14：35

座長：深瀬浩一

（大阪大学大学院理学研究科天然物有機化学研究室）

表彰式（優秀賞）

12月6日（土）14：35～14：45

シンポジウム
—生体防御ペプチドの機能の多様性—

12月6日（土）14：55～16：15

座長：長岡 功

（順天堂大学医学部 生化学・生体防御学講座）

シンポジウム 1

抗菌ペプチド α ディフェンシンによる腸内環境の恒常性制御と疾病

○綾部時芳 櫻木直也 中村公則

北海道大学大学院 先端生命科学研究院 細胞生物科学分野

腸は、病原体をすばやく排除する自然免疫がはたらくと同時に、腸内細菌叢を構成している莫大な数の常在菌と共生して腸内環境の恒常性を維持している。小腸陰窩基底部のパネト細胞 (Paneth cell) は、細菌やコリン作働性刺激等に反応して抗菌ペプチド α ディフェンシン (α -defensin) を腸内腔に分泌して病原体を排除する。マウス α ディフェンシン cryptdin (Crp) は病原菌を強く殺菌するが常在菌にはほとんど殺菌活性を示さず、選択的殺菌活性によって腸内細菌叢を制御することが解った (Masuda K et al., *J Innate Immun* 2011)。一方、腸内細菌叢の組成異常 (dysbiosis) が炎症性腸疾患、生活習慣病、癌など様々な疾病に関与することが急速に知られてきたが、未だその機序はほとんど不明である。われわれは、 α ディフェンシンと dysbiosis さらには疾病との関係を解明するために、Crp sandwich ELISA を確立して分泌された Crp 定量をはじめて可能とした (Nakamura K et al., *Anal Biochem* 2013)。クローン病モデルマウスを用いて、経時的に糞便中の Crp を測定したところ Crp 分泌量の異常を認めた。移植片対宿主病モデルマウスでは、パネト細胞が傷害されて α ディフェンシンが消失し、dysbiosis を生じる (Eriguchi Y et al., *Blood* 2012)。メタゲノム解析でその本態は重篤な菌交代現象であった。さらに、高脂肪食摂取による肥満マウスでは Crp 分泌量が減少していた。これらより、 α ディフェンシンの減少や構造・機能異常をはじめとするパネト細胞の異常は dysbiosis を招き、腸内環境を破綻させて疾病に関与することが示された。

シンポジウム 2

Cathelicidin ファミリーの抗菌ペプチドによるエンドトキシン除去作用

○鈴木香、村上泰介、胡忠双、細田浩司、長岡功
順天堂大学医学部 生化学・生体防御学

Cathelicidin (カテリシジン) は多くの哺乳動物で保存されている抗菌ペプチドであり、グラム陽性・陰性細菌、真菌などに対する幅広い殺菌活性を示す。近年の研究から、cathelicidin は殺菌の他にも多彩なメカニズムで生体防御に関わると考えられるようになってきている。我々は、モルモット cathelicidin の CAP11 やヒト cathelicidin の LL-37 が、グラム陰性細菌の外膜から放出されるリポ多糖 (LPS) と直接結合することにより単球・マクロファージなどに発現する LPS 受容体 (CD14, TLR4) への LPS の結合を阻害して、致死性的エンドトキシンショックマウスの生存率を向上させることを明らかにしてきた。

一方、肝臓は血中に混入した LPS を取り除いて血液を清浄化する機能をもつ。肝臓の類洞を構成する類洞内皮細胞 (LSECs) や肝常在マクロファージのクッパー細胞は、自身を活性化することなく LPS を取り込んで細胞内消化する。我々は今回、LPS の除去に対する LL-37 の効果を検討したところ、LL-37 が LSECs による LPS の取り込みを促進することを見出した。このとき、LPS は LL-37 と結合して LSECs に速やかに取り込まれること、また、取り込まれた LPS は TLR4 下流のシグナル経路を活性化しないことがわかった。さらに、取り込まれた LPS はリソソームに運ばれて細胞内消化されることが示唆された。これらの結果から、LL-37 は肝臓の類洞内皮細胞を活性化せずに効率良く LPS を取り込ませることが明らかになった。したがって、抗菌ペプチド LL-37 はその LPS 結合能により、LPS 受容体への LPS の結合を阻害して炎症応答を抑制するのみならず、血中 LPS の除去を促進することで LPS の暴露から宿主を保護する可能性が示された。

シンポジウム 3

昆虫抗微生物タンパク質の応用の試み

石橋 純

(独) 農業生物資源研究所 遺伝子組換え研究センター 昆虫機能研究開発ユニット

昆虫は獲得性免疫を持たないにもかかわらず、全生物種の半数以上を占めるほどの多様性を持ち、幅広い環境に適応している。昆虫の繁栄を支えている一つの要因が、感染を克服する自然免疫である。昆虫の自然免疫において、抗微生物タンパク質が重要な役割を果たしている。抗微生物タンパク質の多くは塩基性に富み、細胞膜を標的としている。薬剤耐性細菌による感染症の問題が深刻化する中、抗微生物タンパク質は既存の抗生物質とは異なる作用機構を持つため、新たな抗生物質の候補として注目を浴びている。

本講演では、昆虫抗微生物ペプチドの応用を目指した研究について紹介する。特に、カブトムシより単離したディフェンシンの活性部位を同定し、改変することにより得られた低分子量の抗微生物ペプチドの幅広い活性と、本抗菌ペプチドを利用した抗菌性素材の開発について紹介する。

シンポジウム 4

抗菌作用と創傷治癒促進作用を有する新規ペプチドの皮膚潰瘍治療へ

の応用

○富岡英樹^{1, 3}、中神啓徳²、天満昭子²、齋藤佳巳³、加賀敏宏³、森下竜一¹

大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学¹

大阪大学大学院連合小児発達学研究科健康発達医学²

アンジェス MG 株式会社 彩都研究所 創薬研究部³

【背景】新規血管新生因子の探索プロジェクトから血管新生作用を有する 30 残基のアミノ酸からなるペプチドを同定し、AG (Angiogenic peptide) 30 と命名した。このペプチドは α ヘリックス構造を有し、hydrophobicなアミノ酸と positive chargeのアミノ酸がそれぞれ偏在する抗菌ペプチドに特徴的な構造を呈し、大腸菌、緑膿菌及び黄色ブドウ球菌とグラム陰性から陽性まで幅広い抗菌スペクトルを有し、またメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) や薬剤耐性緑膿菌などの薬剤耐性菌にも活性を有していた。AG30 をリード化合物とし、最適化を行い、製造コストを抑えた新規ペプチド (SR ペプチド) の創製に成功した。SR ペプチドを開発化合物とし、前臨床試験を行っている。

【方法・結果】SR ペプチドは構造上、アルファヘリックス構造を呈し (CD スペクトル解析)、緑膿菌・黄色ブドウ球菌・真菌に対する抗菌活性を有し、正常ヒトさい帯静脈血管内皮細胞と皮膚繊維芽細胞の共培養系モデルでの管腔構造形成を促進する作用を有していた。さらに、ヒト皮膚培養線維芽細胞の増殖活性を有し、その細胞内情報伝達系の解析では phosphoinositide 3-kinase/Akt/mTOR 経路が活性化されていることを見出した。薬効薬理試験においては、ストレプトゾトシン投与によるラット糖尿病モデルでの全層皮膚欠損モデルにおいて、SR ペプチド投与群では全層欠損作製直後に対照群で認められている全層欠損部位の増大は認められず、創面積は SR ペプチド投与群にて対照群と比較して有意に縮小した。また、ラットに黄色ブドウ球菌を感染させたモデルにおいて対照群と比較して、有意な創面積の縮小効果が確認された。

【考察】SR ペプチドは、抗菌活性に加えて、血管新生作用、繊維芽細胞の増殖促進作用を有していたことから、創傷治癒の増悪因子である菌をコントロールしながら、創傷治癒を促進できる化合物であると考えられた。既存の抗菌作用をもつ薬剤は創傷治癒を遅らせる作用があり、創傷に対して治癒の促進と感染の防御との間で最適環境を整えることは難しい課題である。そのため、創傷治癒も感染防御も妨げることのない薬剤の開発は、未だに誰も着手していない領域である。虚血性潰瘍などを対象とした SR ペプチドの医師主導治験を目標とし、非臨床試験を進めている。

一般演題 2

12月6日(土) 16:20~17:00

座長：高村(赤司) 祥子

(愛知医科大学 感染・免疫学講座)

一般演題 2-1

グルコースのリン酸化体を用いた阻害物質による干渉作用の抑制法および血中エンドトキシン測定改良法の開発

○藤田優、田中祥之
沢井製薬(株) 生物研究部

【目的】

我々はこれまでにエンドトキシン活性に対する硫酸鉄の阻害作用のメカニズム解析を行い、リピド A のリン酸基が硫酸鉄の阻害作用に重要であり、リン酸基由来の負電荷により鉄イオンが引き寄せられることが鍵となることを報告している。そこでリン酸基を介した干渉作用の抑制を目的に、リピド A のグルコサミン部位と構造的に類似したグルコースのリン酸化体を用いた干渉作用抑制方法を検討した。さらに、グルコースのリン酸化体を用いた血中エンドトキシン測定改良法について検討したので報告する。

【方法】

グルコース 1 リン酸 (G1P) およびグルコース 6 リン酸 (G6P) を用いて試料溶液を調製し、その干渉作用抑制効果を比濁法により確認した。また血中エンドトキシン測定では、希釈加熱法を基に注射用水の代わりに G1P または G6P 溶液で希釈する方法でエンドトキシン回収率を比較した。さらに、ラット盲腸穿刺結紮モデルにおける血中エンドトキシン濃度について従来法と比較した。

【結果および考察】

G1P および G6P は、様々な阻害物質による干渉作用を抑える結果となった。特に抗がん剤ではリン酸緩衝液と比較して抑制効果が高くなる傾向であった。また、血漿中エンドトキシン回収率では全ての動物種において、G6P 溶液で血漿を希釈することで回収率の改善が認められ、盲腸穿刺結紮モデルの血中エンドトキシン測定においても、G6P 溶液を用いることでより高い血漿中エンドトキシン濃度値となり、測定感度の上昇が認められた。

グルコースのリン酸化体は、阻害物質またはタンパク質のリピド A のリン酸基へのアクションを拮抗的に抑制し、その結果、干渉作用の抑制効果が生じていると推察される。

一般演題 2-2

好中球のケモタキシスにおいて GBF1 は ARF1 を介して Rac1 の局在 に關与する

○真崎雄一

産業医科大学 医学部 生化学講座

好中球は、ヒトの白血球の半数以上を占める自然免疫に関わる細胞であり、その主な役割は、体内に侵入してきた病原体へ向かい、病原体を貪食し、活性酸素によって殺菌し、体内から病原体を排除することである。細胞が運動する際には、シグナル伝達、細胞骨格の変化、細胞内物質の再編成など様々な変化が起こるが、細胞が正常に運動するためには、これら複数の変化が協調的に、そして統合的に起こることが重要だと考えられている。近年、我々は、細胞内輸送に関わる低分子量 G タンパク質 ARF (ADP-ribosylation factor)の GAP (GTPase-activating protein)の一つである GIT2 (G protein-coupled receptor kinase interactor 2)や ARF の活性化因子 GEF (Guanine nucleotide exchange factor)の一つである GBF1 (Golgi-specific BFA resistance factor 1)が、好中球のケモタキシスや活性酸素の産生に極めて重要な役割を果たしていることを明らかにした。

今回、GBF1 と細胞骨格の制御との関係を調べるために、好中球様細胞へ分化させた HL-60 細胞を用い、GBF1 と細胞骨格の制御に関わる低分子量 G タンパク質との関係を調べた。その結果、GBF1 が Rac1 の細胞内局在に関わっていること。さらに、その局在には、ARF1 を介している可能性が高いことが明らかになったので報告する。

一般演題 2-3

Porphyromonas gingivalis ジンジパインは IL-33 誘導を介してヒト歯肉上皮細胞の CAP18/LL-37 産生をダウンレギュレーションする

○多田浩之¹ 松下健二² 長岡功³ 高田春比古¹

東北大学大学院歯学研究科・口腔微生物学分野¹ 国立長寿医療研究センター研究所・口腔疾患研究部² 順天堂大学大学院医学研究科・生化学・生体防御学³

【緒言】 慢性歯周炎は歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* (以下、*P. g*) による感染症であり、同菌が産生するプロテアーゼであるジンジパインは主要なビルレンス因子と目されている。これまで我々は、ヒト歯肉上皮細胞に *P. g* を感染させるとジンジパイン依存的に interleukin-1 ファミリーサイトカインである IL-33 が誘導されることを報告した。本研究では、*P. g* によるヒト歯肉上皮細胞からの抗菌ペプチドの CAP18/LL-37 産生に対する IL-33 の影響について検討した。**【材料と方法】** ヒト歯肉扁平上皮癌細胞株の Ca9-22 細胞に *P. g* W83 および ATCC33277 野生型株ないしジンジパイン欠損株の KDP136 (長崎大学・中山浩次教授より恵与) を感染後、LL-37 mRNA 発現を定量性 RT-PCR 法にて測定した。また、LL-37 ならびに CAP18 発現をウェスタンブロット法にて、培養上清中の CAP18 産生を ELISA 法にて測定した。**【結果と考察】** 1) Ca9-22 細胞に *P. g* W83 および ATCC33277 野生型株を感染させると、LL-37 mRNA 発現ならびに CAP18 産生が亢進した。2) KDP136 は CAP18/LL-37 を更に強力に誘導した。3) *P. g* 野生型株による同細胞からの CAP18/LL-37 誘導は、RNAi 法で IL-33 をノックダウンすると増強された。4) ビタミン D₃ 誘導体の OCT により CAP18/LL-37 誘導は亢進され、同作用は *P. g* 野生型株感染により抑制された。**【結論】** ジンジパインによりヒト歯肉上皮細胞から誘導された IL-33 は、同細胞からの CAP18/LL-37 産生を負に制御することが示唆された。今後、ジンジパインによる IL-33 誘導を制御することで、ビタミン D 類による抗菌ペプチド産生を基軸とした歯周炎予防を目指したいと考えている。

一般演題 2-4

エンドトキシン吸着療法を施行し異なる経過をたどった急性間質性肺炎の2症例

○松村大輔 佐藤英一 野村まゆみ 天羽繭子 中村司
新松戸中央総合病院腎臓内科

【症例1】79歳男性。現病歴：近医にて好酸球肺炎が疑われ Prednisolone 内服開始となったが2週間の経過で呼吸不全が増悪，当院呼吸器内科紹介され転院。血液検査：WBC 18700/ μ L CRP 27.26mg/dL LDH 278 IU/L KL-6 666 U/mL 動脈血液ガス分析（リザーバー付酸素マスク 10L）：pH 7.480 pCO₂ 40.8 mmHg pO₂ 43.0 mmHg HCO₃⁻ 29.7 mmol/L。胸部単純CT：全肺野にびまん性にスリガラス状陰影を認めた。経過：急性間質性肺炎と診断，第1病日よりNPPVを開始，steroid pulse 療法を施行も奏功せず，第4病日よりIPPVを開始とともに当科紹介され2日間エンドトキシン吸着療法を施行したが効果は一時的で呼吸不全増悪，第22病日永眠。【症例2】66歳女性。現病歴：発熱，呼吸苦を主訴に当科外来受診。血液検査：WBC 12800/ μ L CRP 5.41 mg/dL LDH 650 IU/L KL-6 6372 U/ml 動脈血液ガス分析（room air）：pH 7.483 pCO₂ 26.2 mmHg pO₂ 35.4 mmHg HCO₃⁻ 19.2 mmol/L 胸部単純CT：全肺野にびまん性のスリガラス状陰影を認めた。経過：急性間質性肺炎と診断し当院呼吸器内科入院，steroid pulse 療法を施行も奏効せず第3病日当科紹介，2日間エンドトキシン吸着療法を施行したところ呼吸状態の改善を認めた（酸素 2L 鼻カヌラで SpO₂ 97-99 %）。第46病日に在宅酸素療法導入し退院。【考察】急性間質性肺炎に対するエンドトキシン吸着療法の効果、予後因子等について文献的考察を加え報告する。

日本エンドトキシン・自然免疫研究会

- 【1】 日本エンドトキシン・自然免疫研究会定款施行細則（日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞（最優秀賞・優秀賞）表彰規定）
- 【2】 役員名簿
- 【3】 研究会開催記録

一般社団法人 日本エンドトキシン・自然免疫研究会定款施行細則

第1章 代議員の選出および退任

第1条 代議員に立候補する正会員は、代議員選出委員会（以下「選出委員会」という）の代議員資格審査を経るものとする。

② 前項の選出委員会の審査を経た代議員候補者の中から正会員による選挙により代議員を選出する。

第2条 選出委員会の代議員資格審査は、代議員の任期満了1ヵ月前に行うものとする。

② 代議員に欠員および補充の必要性が生じたときは、理事長の要請により、補充の代議員の代議員資格審査を行うため選出委員会を開催するものとする。

第3条 選出委員会は、総ての正会員に対し、選出委員会の審査日の1ヵ月前に代議員資格審査を告示しなければならない。

第4条 代議員資格審査を申請する者（以下「申請者」という）は、次の第1号及び第2号の要件を充たし、かつ代議員選出委員会が別に定める所定の代議員審査申請書及びその他の書類を提出することが必要である。

(1) 正会員であり、かつ会費を完納していること。

(2) エンドトキシン研究に従事し貢献していること。

第5条 選出委員会は、全代議員候補者の各分野配分を考慮し代議員資格審査を行う。

第6条 選出委員会は、審査の結果を理事長に報告するとともに、すべての申請者に審査の結果を通知しなければならない。

第7条 理事長は、前条の審査の結果を受け、代議員の任期満了までに代議員候補者の中から代議員選挙を行わなければならない。

第8条 代議員は、理事会において、退任届けを提出することにより任期の途中でも職務を退くことができる。

第2章 代議員選出委員会

第8条 代議員選出委員（以下「選出委員」という。）は、監事1名と基礎系・臨床系の専門委員4名の合計5名で構成する。

- ② 監事が2名いる場合は、理事長が選出委員を指名する。
- ③ 基礎系・臨床系の専門委員は、理事会において選任し、社員総会の承認を得るものとする。

第9条 選出委員会の決議は、選出委員の過半数が出席し、その過半数をもって行う。

第10条 選出委員会の運営についての細則は、理事会において定める。

第2章 役員の選任

第11条 役員の選任に関する事務は、事務局が行う。

- ② 役員に立候補する代議員は、定められた期日までに、理事長が定めた所定の様式の書類を事務局に提出する。

第12条 役員は、前条の立候補者の中から定時社員総会において選任する。

第3章 日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞

第13条 本賞は「日本エンドトキシン・自然免疫研究会 最優秀賞」および「日本エンドトキシン・自然免疫研究会 優秀賞」と称する。

第14条 本賞は、日本エンドトキシン・自然免疫研究会（以下、本研究会）の賞とし、エンドトキシン・自然免疫研究に関する学術、及び技術の進歩について貢献をしたと認められる本研究会会員に授与するものとする。

第15条 本賞は、賞状ならびに副賞よりなる。

第16条 本賞は、本研究会において、理事長より授与されるものとする。受賞者は研究会での発表を原則とし、また表彰された研究内容を受賞者本人がとりまとめて本研究会刊行物に執筆するものとする。

第17条 本賞は、下記の要領により、原則として若干名選考される。

- (1) 「最優秀賞」の対象となる者は、研究会開催年の10月1日時点で50歳未満、「優秀賞」の対象となる者は、同じく40歳未満であることを原則とする。
- (2) 「日本エンドトキシン・自然免疫研究会 最優秀賞」の受賞は、エンドトキシン・自然免疫研究に関する受賞候補者の学術業績の評価によるものとする。本研究会

会員1名の推薦（他薦）または本人の申請（自薦）による。受賞候補推薦書は別に定める。なお、この申請書の提出期限は当該年度の8月31日（必着）とする。受賞者は候補推薦書をもとに選考委員会において選考し、定時社員総会の承認を得て決定される

- (3) 「日本エンドトキシン・自然免疫研究会 最優秀賞」の選考委員会の委員長の任には、理事長が当たるものとする。選考委員は理事長、その年度の当番世話人、および理事長、当番世話人がそれぞれ代議員の中から選出した各1名以上の委員の計4名以上によって構成される。ただし推薦された受賞候補者と直接的に利害関係者となる者は選考委員にならないものとする。
- (4) 「日本エンドトキシン・自然免疫研究会 優秀賞」受賞は、当該年度の受賞候補者の研究会での研究発表に対する評価によるものとする。演題申込時に対象者は「優秀賞」に応募し、応募演題の5題に1題程度の割合で選出する。選考委員および選考方法は、原則、当番世話人に一任されるが、選考委員と優秀賞セッション参加者による投票を総合して評価する。

第18条 本賞に関する事務局は、日本エンドトキシン・自然免疫研究会事務局とする。

第19条 本賞の募集、選考などに関する内規は別に定める。

第4章 会 費

第20条 設立時における会費の額は、次のとおりとする。

正会員 金5,000円/年

（ただし、学部学生および大学院生は割引適応し3,000円/年とする。）

賛助会員 金100,000円/年

第5章 定款施行細則の変更

第21条 本施行細則は、理事会並びに社員総会で、出席構成員の過半数の賛成によって変更することができる。

第6章 補 則

第22条 本法人設立時に任意団体日本エンドトキシン研究会の会員であった者は、本施行細則の施行日に本法人に入会したものとみなす。

附 則

1. 本法人は、平成6年11月5日に創立された日本エンドトキシン研究会が、平成22年10月17日に一般社団法人 日本エンドトキシン・自然免疫研究会として設立登記をして、法人格を取得したものである。
2. 本施行細則は、理事会及び社員総会の承認を得て、平成22年11月12日に施行された。

第二版：平成24年10月23日改訂

第三版：平成25年12月7日改訂

役員名簿

理事長

横地高志

名誉会員

加藤延夫
芝 哲夫
松浦基博
丸山征郎

楠本正一
中野昌康
上西紀夫
望月英隆

窪田達也
吉田昌男
熊沢義雄

小玉正智
嶋田 紘
高橋愛樹

理事

天野憲一
嶋田 紘
筒井ひろ子
深瀬浩一

安藤 朗
清水智治
長岡 功
福井 博

池田寿昭
隅田泰生
比企直樹
横地高志

木下 学
谷 徹
平田公一

代議員

(基礎系)

天野憲一
川原一芳
斎藤伸一郎
高村祥子
西島正弘
三宅健介

井上健一郎
木下 学
杉山剛志
竹田 潔
橋本雅仁
横田伸一

大野尚仁
切替照雄
隅田泰生
筒井ひろ子
深瀬浩一
横地高志

川畑俊一郎
小出直樹
高田春比古
長岡 功
松下健二

(臨床系)

安藤 朗
小谷穰治
嶋田 紘
高橋 徹
比企直樹
吉川敏一

池田寿昭
小林誠人
島津元秀
竹下誠一郎
平田公一

遠藤重厚
阪本雄一郎
清水智治
谷 徹
廣橋伸之

小野 聡
志賀英敏
瀬戸泰之
西田正人
福井 博

会計監事

吉川敏一 切替照雄

事務局長

谷 徹

研究会開催記録

第 1 回研究会	平成 7 年 (1995 年) 1 1 月 1 7 日	嶋 田 紘	横 浜
第 2 回研究会	平成 8 年 (1996 年) 1 0 月 2 2 日	横 地 高 志	名 古 屋
第 3 回研究会	平成 9 年 (1997 年) 9 月 5 日	近 藤 元 治	京 都
第 4 回研究会	平成 1 0 年 (1998 年) 9 月 2 5 日	恩 田 昌 彦	東 京
第 5 回研究会	平成 1 1 年 (1999 年) 1 1 月 2 7 日	山 本 俊 輔	大 分
第 6 回研究会	平成 1 2 年 (2000 年) 1 1 月 2 4 日	窪 田 達 也	栃 木
第 7 回研究会	平成 1 3 年 (2001 年) 1 1 月 2 4 日	望 月 英 隆	埼 玉
第 8 回研究会	平成 1 4 年 (2002 年) 1 1 月 3 0 日	楠 本 正 一	大 阪
第 9 回研究会	平成 1 5 年 (2003 年) 1 1 月 2 9 日	遠 藤 重 厚	岩 手
第 1 0 回研究会	平成 1 6 年 (2004 年) 1 1 月 1 5 日	吉 川 敏 一	京 都
第 1 1 回研究会	平成 1 7 年 (2005 年) 1 1 月 2 6 日	熊 沢 義 雄	東 京
第 1 2 回研究会	平成 1 8 年 (2006 年) 1 1 月 1 7 日	上 西 紀 夫	東 京
第 1 3 回研究会	平成 1 9 年 (2007 年) 1 1 月 2 0 日	丸 山 征 郎	鹿 児 島
第 1 4 回研究会	平成 2 0 年 (2008 年) 1 0 月 2 4 日	高 田 春 比 古	仙 台
第 1 5 回研究会	平成 2 1 年 (2009 年) 1 1 月 1 4 日	池 田 寿 昭	東 京
第 1 6 回研究会	平成 2 2 年 (2010 年) 1 1 月 1 3 日	福 井 博	奈 良
第 1 7 回研究会	平成 2 3 年 (2011 年) 1 2 月 1 0 日	筒 井 ひろ子	兵 庫
第 1 8 回研究会	平成 2 4 年 (2012 年) 1 0 月 2 3 日	三 宅 健 介	東 京
第 1 9 回研究会	平成 2 5 年 (2013 年) 1 2 月 6 日	谷 徹	滋 賀

謝 辞

本研究会の趣旨にご賛同とご理解を賜り、ご支援頂きました
共催企業の皆様に心から厚く御礼申し上げます。

[ランチョンセミナー・展示・広告]

生化学工業株式会社

株式会社 J.K.インターナショナル

[展示・広告]

東レ・メディカル株式会社

[広告]

大日本住友製薬株式会社

和光純薬株式会社

第 20 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会

当番世話人 長岡 功