

第 19 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

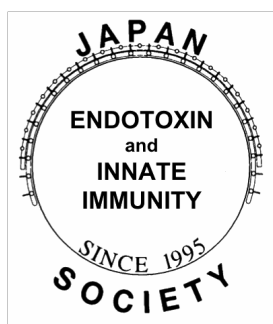
会期：2013 年 12 月 6 日（金）・7 日（土）

会場：ロイヤルオークホテル スパ&ガーデンズ

〒520-2143 滋賀県大津市萱野浦23番1号
TEL 077-543-0111

当番世話人 谷 徹

（滋賀医科大学 外科学講座）



開催事務局

〒520-2192 大津市瀬田月輪町

滋賀医科大学 外科学講座

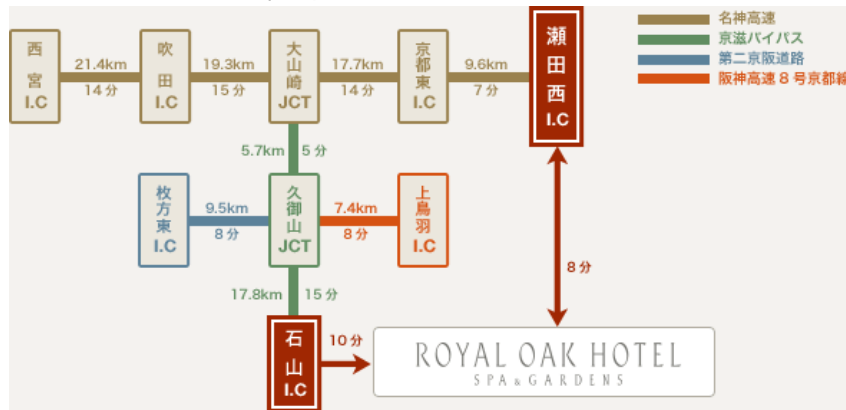
TEL : 077-548-2238 / FAX : 077-548-2240

【交通の御案内】

お車でお越しの方

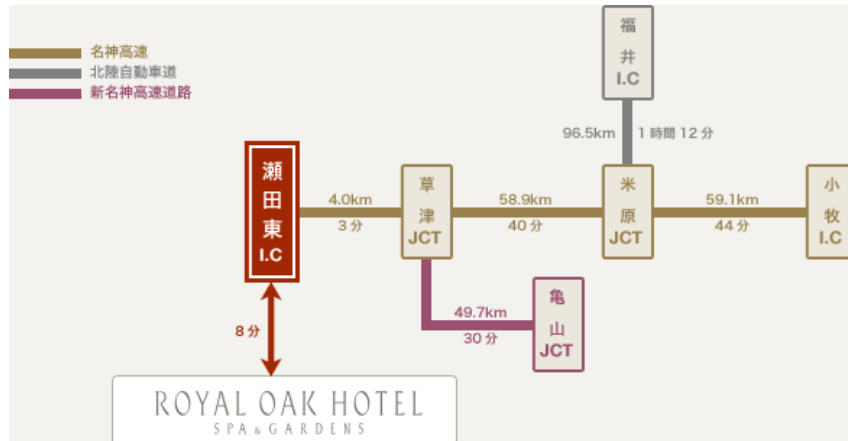
大阪・京都方面から

- ・ 名神瀬田西I.Cから車で約8分 京滋バイパス石山I.Cから車で約10分
- ・ 駐車場のご案内：300台駐車可能、駐車料金無料。地下駐車場と屋外駐車場に別れており、24時間入出庫可能。



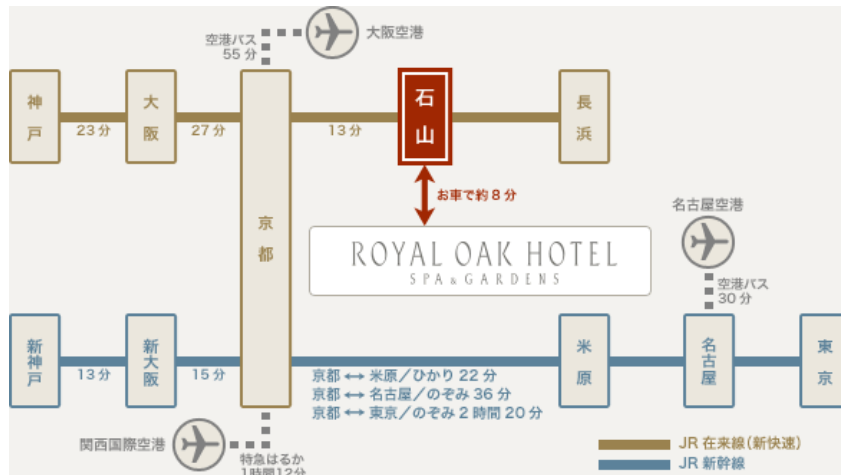
名古屋・東京方面から

名神瀬田東I.Cから車で約8分



電車でお越しの方

- ・ JR京都駅～JR石山駅：約13分（シャトルバスがございました。次項をご参照ください。）



シャトルバスのご案内

JR石山駅北口～ロイヤルオークホテルスパ&ガーデンズ（無料・所要時間10分～20分）

石山駅前（北口）

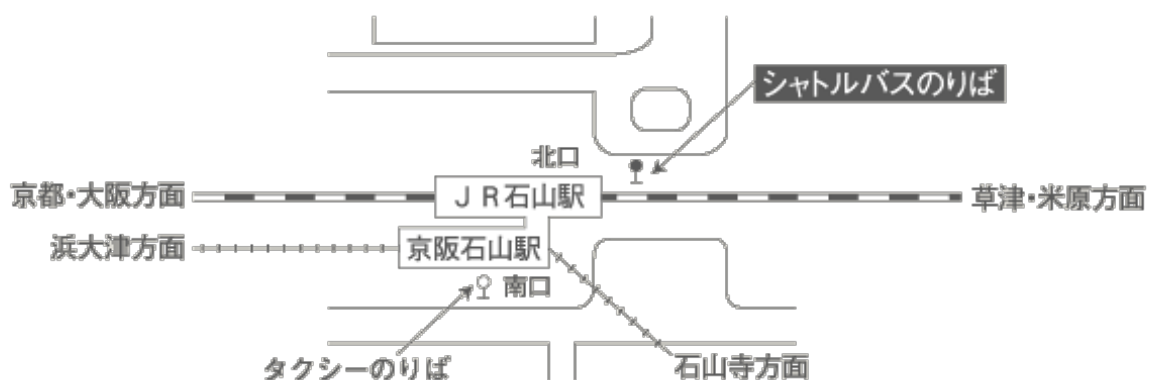
ホテル玄関前

| | JR石山駅北口発 | ホテル正面玄関発 |
|-----|----------|----------|
| 8時 | - | ※20分 |
| 9時 | ▲30分 | ▲00分 |
| 10時 | 30分 | 00分 |
| 11時 | 30分 | 00分 |
| 12時 | - | 30分 |
| 13時 | 00分 | 30分 |
| 14時 | 00分 | 30分 |
| 15時 | 00分 | 30分 |
| 16時 | 00分 | 30分 |
| 17時 | 00分 | 30分 |
| 18時 | 00分 | ▲30分 |
| 19時 | ▲00分 | ▲30分 |

▲印：土曜・日曜・祝日のみ運行 ※印：大型連休等の季節運行（運行日はお問い合わせください。）

シャトルバス乗り場

- ・ 停車場所は改札を出て左手側が北口です。また停車場所の表示はございません。
- ・ 交通事情により定刻に発車出来ない場合がございます。あらかじめご了承ください。



【会場案内】

【受付】 B1 ホワイエ

【理事会】 1F ラベンダー

【代議員会】 1F ライラック

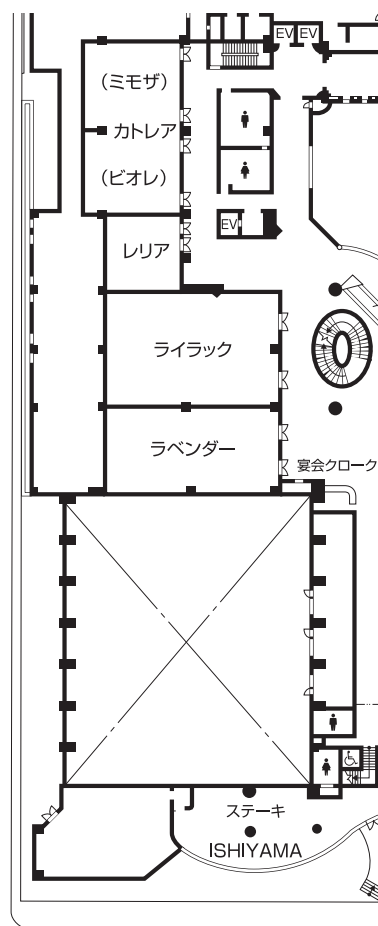
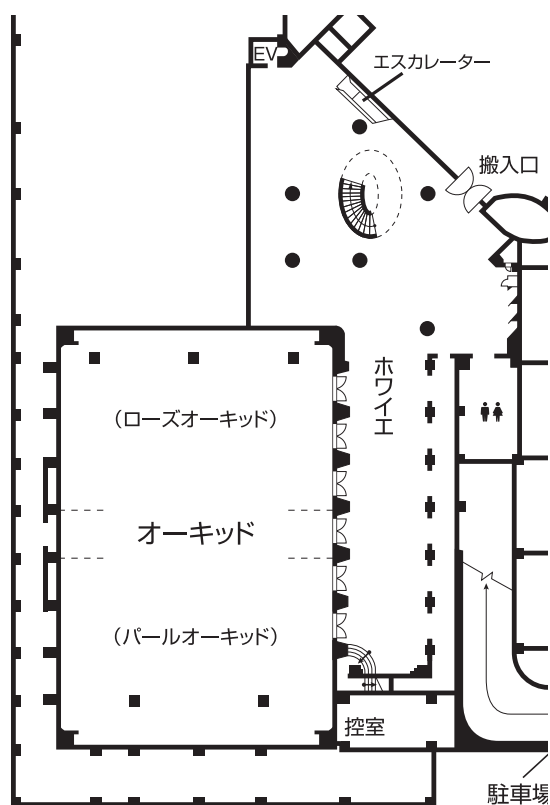
【イブニングセミナー・シンポジウム・ワークショップ・一般演題】

B1F パールオーキッド

【会員懇親会】 B1F ローズオーキッド

【地下1階】

【1階】



【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には必ずお付け下さい（学生・研修医は無料になります）。
- 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 外科学講座内
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6日（金）15時00分～16時00分 1F ラベンダー

代議員会（総会）

12月6日（金）16時00分～17時00分 1F ライラック

イブニングセミナー

12月6日（金）18時00分～19時00分 B1F パールオーキッド
会員懇親会

12月6日（金）19時00分～20時30分 B1F ローズオーキッド

4. お問い合わせ先

第19回日本エンドトキシン・自然免疫研究会事務局
〒520-2192 大津市瀬田月輪町
滋賀医科大学 外科学講座
TEL : 077-548-2238 FAX : 077-548-2240

【司会の皆様へ】

- 1) ご担当セッション開始時刻 15 分前には、次司会席にご着席下さい。
- 2) 各セッションの進行・形式・分担を一任いたしますので、時間厳守でお願いいたします。

【演者の皆様へ】

- 1) セッション開始時刻 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 | 12 分 | 質疑応答 | 3 分 |
| ワークショップ | 発表時間 | 8 分 | 質疑応答 | 3 分 |
| 一般演題 | 発表時間 | 5 分 | 質疑応答 | 3 分 |
| 優秀賞セッション | 発表時間 | 7 分 | 質疑応答 | 3 分 |

発表は司会者の指示に従って発表、討論を行って下さい。時間厳守でお願いいたします。
- 3) 口演はすべて PC で行って頂きます。
- 4) プロジェクターは正面 1 台とします。
- 5) 演者は前演者口演開始までに次演者席について下さい。
- 6) PC でのご発表について
 - 事務局で用意する PC の OS は Windows7 で、プレゼンテーションソフトは Powerpoint2003、2007 です。
 - 上記要領で作成されたデータであればデータ受付 (USB メモリー、CD-R など) で受付いたします。
 - 各自、前セッションが始まる前までにデータ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は、不具合が生じる可能性がありますので、各自の PC 持ち込みのみの受付となります。
 - 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__肝臓太郎.ppt

研究会日程

12月6日（金）

- 15:00～16:00 理事会（1F ラベンダー）
16:00～17:00 代議員会（総会）（1F ライラック）
18:00～19:00 イブニングセミナー（B1F パールオーキッド）
司会：江口 豊

演者：志馬伸朗

（京都医療センター救命救急センター/救命救急科）

- 19:00～20:30 会員懇親会（B1F ローズオーキッド）

12月7日（土）

- 08:45～08:50 開会の辞 日本エンドトキシン・自然免疫研究会
当番世話人：谷 徹
08:50～09:56 ワークショップ1：W1-1～W1-6
「敗血症の診断と現状」
司会：土谷正和・阪本雄一郎
10:00～11:00 優秀賞選考セッション
司会：天野憲一、木下 学、
筒井ひろ子
11:00～11:55 ワークショップ2：W2-1～W2-5
「最新の自然免疫研究」
司会：横田伸一・松下健二
12:00～13:00 ランチョンセミナー
「トレミキシン開発の歴史」
司会：谷 徹

演者1：池田寿昭

（東京医科大学八王子医療センター 特定集中治療部）

演者2：小路 久敬

（東レ・メディカル株式会社 国際部門）

- 13:00～13:10 休憩
13:10～13:50 一般演題：1～5 司会：川原一芳・志賀英敏
13:50～15:20 シンポジウム：S1～S7
「エンドトキシン吸着療法の20年と今後」
司会：小野 聡・小谷穰治
15:20～15:25 表彰式（優秀賞）
15:25～15:30 閉会の辞 当番世話人：谷 徹

12月6日(金) 18:00 ~ 19:00 (B1F パールオーキッド)

イブニングセミナー

司会：江口 豊 (滋賀医科大学 救急集中治療医学講座)

志馬 伸朗

(京都医療センター救命救急センター/救命救急科)

「敗血症診療のポイント～ガイドライン以上、PMX 未満？」

12月7日(土) 8:50 ~ 9:56 (B1F パールオーキッド)

ワークショップ1 : W1-1~W1-6 「敗血症の診断と現状」

司会 : 土谷 正和 (Charles River, Charleston, SC, USA)

阪本雄一郎 (佐賀大学医学部 救急医学講座)

W1-1. 血中エンドトキシン測定における前提条件の再確認

○土谷 正和

Charles River, Charleston, SC, USA

W1-2. リムルス試薬のこれからの展開

ーカプトガニリコンビナント C 因子 PyroGene™rFC

○益田 多満喜

ロンザジャパン株式会社 バイオサイエンス事業部

W1-3. リムルス試薬を用いた電気化学検出型の小型エンドトキシン検査装置の開発

○井上 (安田) 久美^{1,2}、高野真一朗²、高橋 里子²、石田 洋祐³、川端 莊平⁴、水村 光⁵、小田 俊男⁵、小川 健一⁶、坪井 達也⁶、伊野 浩介^{2,3}、珠玖 仁^{2,3,7}、末永 智一^{1,2,3,7}

東北大学マイクロシステム融合研究開発センター (μSIC)¹

東北大学大学院環境科学研究科²、東北大学工学部³、

株式会社アイ・ティ・リサーチ⁴、生化学工業株式会社⁵、

大日本印刷株式会社⁶、

東北大学原子分子材料科学高等研究機構 (WPI-AIMR)⁷

W1-4. 高感度エンドトキシン測定・エンドトキシン散乱測光法 (ESP 法) から見たリムルス反応の特殊性について

○小幡 徹、清水智治、谷 徹

滋賀医科大学 外科学講座

W1-5. 敗血症における EAA の新たな展望

○木口 雄之、藤見 聡

大阪府立急性期総合医療センター 高度救命救急センター

W1-6. プロカルシトニン (PCT) の現状と展望

○三田村 真

サーモフッシャーサイエンティフィック株式会社

クリニカルダイアグノスティックスディヴィジョン

12月7日(土) 10:00 ~ 11:00

優秀賞選考セッション

司会：天野 憲一 (秋田大学バイオサイエンス教育・研究センター)
木下 学 (防衛医科大学校 免疫微生物学講座)
筒井ひろ子 (兵庫医科大学 病原微生物学)

1. LPS/ATPで誘導されるピロトーシスに対する抗菌ペプチドLL-37の効果と作用機構

○胡 忠双、村上 泰介、鈴木 香、田村 弘志、長岡 功
順天堂大学大学院医学研究科 生化学・生体防御学

2. エンドトキシン投与豚モデルにおける重症予測因子の解析

○小網 博之¹、阪本雄一郎¹、宮庄 拓²、山下 和人³
佐賀大学医学部 救急医学講座¹
酪農学園大学獣医学群獣医保健看護学類動物栄養学²
酪農学園大学獣医学群獣医学類伴侶動物医療学分野附属動物病院麻酔科³

3. 腸内細菌 *Faecalibacterium prausnitzii* とクローン病活動性との関連について

○藤本 剛英¹、今枝 広丞²、高橋憲一郎¹、伴 宏充²、塩谷 淳²、
馬場 重樹²、佐々木雅也³、藤山 佳秀²、安藤 朗¹
滋賀医科大学大学院 感染応答・免疫調節部門(消化器免疫)¹
滋賀医科大学 消化器内科²
滋賀医科大学 栄養治療部³

4. 甘草成分は TLR4 及び NLRP3 インフラマソーム活性化を阻害する

○本田 裕恵^{1,2}、長井 良憲^{2,3}、高村(赤司) 祥子⁴、齋藤 伸一郎⁴、
三宅 健介⁴、高津 聖志^{1,2}
富山県薬事研究所¹
富山大学大学院医学薬学研究部 免疫バイオ・創薬探索講座²
(独) 科学技術振興機構・さきがけ³
東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 感染遺伝学分野⁴

5. TLR4/MD-2 リガンド認識における Lipopolysaccharide binding protein (LBP) と CD14 の要求性の相違と炎症性決定の分子基盤

○谷村奈津子^{1,2}、齋藤伸一郎¹、大戸 梅治³、松本文¹、高村(赤司)祥子¹、
藤本ゆかり⁴、深瀬 浩一⁴、清水 敏之³、三宅 健介¹
東京大学医科学研究所 感染遺伝学¹
日本学術振興会²
東京大学大学院 薬学研究科³
大阪大学大学院 理学系研究科⁴

6. A TOLL-LIKE RECEPTOR 2 LIGAND, PAM3CSK4, AUGMENTS INTERFERON-GAMMA-INDUCED NITRIC OXIDE PRODUCTION VIA A PHYSICAL ASSOCIATION BETWEEN MYD88 AND IFN-GAMMA RECEPTOR IN VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS

○Bilegtsaikhan Tsolmongyn, Naoki Koide, Takashi Yokochi
Department of Microbiology and Immunology, Aichi Medical University
School of Medicine

12月7日(土) 11:00 ~ 11:55

ワークショップ2 : W2-1~W2-5 「最新の自然免疫研究」

司会 : 横田 伸一 (札幌医科大学医学部 微生物学講座)

松下 健二 (独立行政法人国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部)

W2-1. 黒酢中に含まれる自然免疫活性化リガンドの分離

○橋本 雅仁¹、小原 恭子¹、大藪 まみ¹、古屋舗舞子¹、池田 剛¹、

隅田 泰生¹、深瀬 浩一²、藤本ゆかり²、重久 浩³

鹿児島大学大学院理工学研究科¹

大阪大学大学院理学研究科²、福山物産³

W2-2. HepG2 細胞での鉄存在下アデノウイルスベクターを用いた薬物代謝酵素 CYP2E1 過剰発現の構築とその組み換え過剰発現系を利用した TNF- α の cytotoxicity

○坂口 修平

東北薬大 環境衛生

W2-3. S1P1 IS REQUIRED FOR B CELL RECEPTOR- AND TOLL-LIKE RECEPTOR-MEDIATED B CELL ACTIVATIONS

○Sachiko Akashi-Takamura¹、Natsuko Yamakawa²、Natsuko

Tanimura¹、Takuma Shibata¹、Takeaki Amiya^{3,4}、Yosuke

Kurashima^{3,4}、Jun Kunisawa³、Hiroshi Kiyono⁴、Kazuhiro Suzuki⁵、

Junichi Kikuta⁶、Masaru Ishii⁶、Richard L. Proia⁷、Yasuo Okamoto⁸、

Yoh Takuwa⁸、Kensuke Miyake¹

Div. of Infectious Genetics, Univ. of Tokyo¹

Innovative Science and Technology, Univ. of Tokai²

Lab. of Vaccine Materials, National Inst. of Biomedical Innovation³

Div. of Mucosal Immunology, Univ. of Tokyo⁴

Lab. of Immune Response Dynamics, IFReC, Univ. of Osaka⁵

Lab. of Cellular Dynamics, IFReC, Univ. of Osaka⁶

The Genetics of Development and Disease Branch, NIDDK, National Institutes of Health⁷

Department of physiology, Kanazawa University School of Medicine⁸

W2-4. THE ARF-LIKE GTPASE ARL8B DRIVES TLR7 INTO TYPE I INTERFERON-MEDIATED INFLAMMATION

○Shin-Ichiroh Saitoh¹、Kensuke Miyake^{1,2}

Division of Innate Immunity, Department of Microbiology and Immunology¹

Laboratory of Innate Immunity, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo²

W2-5. 微細藻類由来多糖による Toll 様受容体シグナル活性化

○杉山 剛志

岐阜薬科大学 感染制御学研究室

12月7日(土) 12:00 ~ 13:00

ランチョンセミナー 「トレミキシン開発の歴史」

司会：谷 徹 (滋賀医科大学 外科学講座)

講演1

池田 寿昭

(東京医科大学八王子医療センター)

「トレミキシン臨床研究の歴史」

講演2

小路 久敬

(東レ・メディカル株式会社 国際部門)

「血中エンドトキシン吸着カラムによる敗血症治療
へのアプローチ update」

12月7日(土) 13:10 ~ 13:50

一般演題 1~5

司会：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）
志賀 英敏（帝京大学ちば総合医療センター 救急集中治療センター）

1. カンジダ由来 β -グルカンによる免疫修飾作用
○田中 満崇¹、井上健一郎¹、安達 禎之²、石橋 健一²、大野 尚仁²、
高野 裕久³
国際医療福祉大¹
東京薬科大・医療衛生薬学科²
京都大・工学研究科³
2. ビリベルジン投与がもたらす出血性ショック誘発急性肺傷害の改善
○高橋 徹
岡山県立大学 保健福祉学部
3. マウス敗血症モデルで抗炎症性脂質メディエーター リポキシン A4 は
生存率を改善する。
○上田 朝美¹、福永 興孝²、宮田 純²、別役 智子²、武田 純三¹
慶應義塾大学医学部 麻酔科¹、慶應義塾大学医学部 呼吸器内科²
4. エンドトキシン血症発症後の精巣生殖細胞アポトーシスへの内因性 IL-18
の役割
○井上 岳人^{1,2}、石川 倫子^{1,3}、西野 哲¹、笹野 真希¹、岡 伸樹¹、
山下 勇人¹、鴨志田伸吾¹、中尾 篤典³、宇佐美 眞¹、小谷 穰治³
神戸大学大学院保健学研究科 病態解析学領域¹
医療法人社団誠心会 小野レディースクリニック²
兵庫医科大学 救急・災害医学講座³
5. Endotoxin Scattering Photometry (ESP 法) でのエンドトキシン測定
○清水 智治¹、小幡 徹¹、園田 寛道¹、太田 裕之¹、山口 剛¹、
赤堀 浩也¹、遠藤 善裕²、田畑 貴久³、江口 豊³、谷 徹¹
滋賀医科大学 外科学講座¹
滋賀医科大学 臨床看護学講座²

12月7日(土) 13:50 ~ 15:20

シンポジウム S1~S6

「エンドトキシン吸着療法の20年と今後」

司会：小野 聡（防衛医科大学校 防衛医学研究センター 外傷研究部門）
小谷穰治（兵庫医科大学 救急・災害医学講座）

S1. PMX-F 療法における種々のマーカーの変動と作用機序

○中村 司¹、佐藤 英一¹、天羽 繭子¹、野村まゆみ¹、松村 大輔¹、
上田 善彦²
新松戸中央総合病院 腎臓内科¹
獨協医科大学越谷病院 病理²

S2. エンドトキシン吸着療法（PMX）のブレークスルーをさぐる

—PMX と免疫担当細胞機能—

○木村 暁史¹、小野 聡²、木下 学³、辻本 広紀¹、平木 修一¹、
高畑 りさ¹、青笹 季文¹、初瀬 一夫¹、齋藤 大蔵²、長谷 和生¹、
山本 順司¹
防衛医科大学校 外科学¹
防衛医科大学研究センター 外傷研究部門²
防衛医科大学 免疫微生物学³

S3. エンドトキシン吸着療法 ~ experience と evidence の狭間で

○廣橋 伸之、板井 純治、山賀 聡之、Ho Minh Van、谷川 攻一
広島大学救急医学、広島大学病院高度救命救急センター・集中治療部

S4. 重症感染症に対する sustained PMX-DHP

○山下 千鶴、西田 修
藤田保健衛生大学医学部 麻酔・侵襲制御医学講座

S5. エンドトキシン吸着療法の20年と今後 ~ PMX-01R

○和田 尚弘
静岡県立こども病院 腎臓内科

S6. びまん性肺胞障害(DAD)に対するPMX療法の有効性

○阿部 信二
東京都立広尾病院 呼吸器科

イブニングセミナー

12月6日(金) 18:00～19:00

B1F パールオーキッド

演者：志馬 伸朗

(京都医療センター救命救急センター/救命救急科)

司会：江口 豊

(滋賀医科大学 救急集中治療医学講座)

イブニングセミナー

敗血症診療のポイント～ガイドライン以上、PMX未満？

志馬伸朗（京都医療センター救命救急センター/救命救急科）

本日はエンドトキシン研究会にお招き頂き、ありがとうございました。

特別講演を、というご依頼を頂戴いたしましたが、エンドトキシンについては素人の人間が専門家の先生方を前にお話しできることはそう多くないようなと思います。

悩みましたが、エンドトキシン/PMX未満、の話ならできるかもしれないと思い、内容を考えてみました。

2013年には、国際的敗血症診療ガイドラインである **surviving sepsis campaign guidelines 2012** と、日本版敗血症診療ガイドラインが相次いで公表されました。また、**global sepsis alliance(GSA)**による世界的な敗血症救命キャンペーンも始まっています。

いずれにおいても、推奨内容は多岐にわたるわけですが、本公演の時間制限もあり、すべてを取りあげ解説することは、適切ではありません。そこで、最も基礎的かつ重要な点に絞り、お話しすることにします。「初期蘇生」と、「抗菌療法」です。

この2項目は、いずれのガイドラインにおいても推奨度が高く、また、敗血症治療の根幹をなすものです。この2つが適切に対処されていなければ、それ以降の、いわゆる支持療法、の効果が発揮されないと思われま

す。ガイドラインを参照するだけでは理解しがたい背景を含め、解説させていただきたいと思います。

ワークショップ 1 「敗血症の診断と現状」

12月7日（土） 8：50 ～ 9：56

司会：土谷 正和
(Charles River, Charleston, SC, USA)
阪本雄一郎
(佐賀大学医学部 救急医学講座)

ワークショップ 1 - 1

血中エンドトキシン測定における前提条件の再確認

○土谷正和

Charles River, Charleston, SC, USA

カプトガニ血球抽出物(Limulus Amebocyte Lysate, LAL)を用いたエンドトキシン測定法は、医薬品及び医療機器の安全性試験として広く使用されている。この方法の血中エンドトキシンの測定への応用は、すでに 1970 年に米国で始まっており、その後、測定手法や試薬の改良が行われてきた。近年国内外において、種々の分野で血中エンドトキシンの測定が報告されているが、その中には測定法に問題があるものも見受けられる。

エンドトキシン測定法における前提条件として、下記の条件が挙げられる。

- (1) エンドトキシンは、単一の物質ではなく、種々の比活性を持つことができる。
- (2) エンドトキシンの活性は変りやすい。
- (3) 国際エンドトキシン標準品を標準として測定を行う。
- (4) リムルス試薬は、製造者の指定した条件でのみ、性能が保証されている。
- (5) エンドトキシンは、環境中に普遍的に存在し、汚染の機会が多い。

血中エンドトキシン測定の前記条件では、さらに下記の条件が追加される。

- (1) 血中には測定に対する影響因子があるため、前処理によって影響を除く。
- (2) 測定しようとする血中エンドトキシン濃度が低いことから、器具や操作中の汚染、試薬の感度、測定中のノイズなどの影響を受けやすい。
- (3) 試料中への β -グルカンの混入が予想されるため、エンドトキシンに特異的な試薬を使用する必要がある。

これらの前提を考慮し、試料採取から前処理・測定における使用器具の選択、前処理条件の選択、使用する測定法における干渉因子の予測と対策を行った上で、測定を行う必要がある。本発表では、エンドトキシン測定法における前提条件を再確認すると共に、測定の実施や論文を読む上で確認すべき点を考える。

ワークショップ 1-2

リムルス試薬のこれからの展開

ーカブトガニリコンビナント C 因子 PyroGene™rFC

○益田 多満喜

ロンザジャパン株式会社 バイオサイエンス事業部

はじめに

エンドトキシン測定は、カブトガニの血球凝固系反応を利用した測定系である。カブトガニは現在 4 種が確認されているだけの希少生物である。1964 年にカブトガニ血球がエンドトキシンによって凝固反応(ゲル化)する事が確認されゲル化法が開発され、次に光学的定量法(比濁法、比色法)が開発されてきた。50 年経過した現在もエンドトキシン反応試薬はカブトガニの血液に依存している状況は変わってはいない。近年、地球環境の変化にともない、カブトガニが生息している地域においてその生息環境に影響が出はじめている。カブトガニを原料としている我々リムルス試薬製造メーカーとしても、カブトガニの保護等に努めてきた。そこで Lonza 社はカブトガニに依存しないカブトガニリコンビナント C 因子 PyroGene™ rFC (以下、rFC 法という)を開発した。

測定原理

rFC 法は、マルオカブトガニ (*Carcinoscorpius rotundicauda*) からクローニングしたリコンビナント C 因子を使用。リコンビナント C 因子はアッセイ混合液中の蛍光性基質に作用して、検体中のエンドキシン濃度に比例する量の蛍光シグナルを発生させ、そのシグナルを測定するエンドポイントアッセイ法である。

特長

- rFC 法には、グルカンに反応する G 因子が存在しないため、エンドトキシン特異的なリムルス試薬。
- 0.005~5.0EU/mL と広範囲の測定が可能。優れた直線性。
- リコンビナントのため、ロット間差が少なく再現性が高い。
- 各種エンドトキシンに対する選択性、各種薬剤に対しても良好な精度・正確性を確認。

rFC 法は、これらの特長を確認するとともに、USP の公定書操作のバリデーション (1225) に記載されている、特異性、精度、真度、直線性、範囲および定量限界に対する要求事項を満たしている。

操作法

- ステップ 1 : 蛍光リーダーの感度設定
- ステップ 2 : 標準品/検体の準備 : (測定範囲 : 0.005~5.0EU/mL)
- ステップ 3 : 10 分プレインキュベーション
- ステップ 4 : rFC 酵素溶液+蛍光基質の添加 60 分加温
- ステップ 5 : 蛍光測定・結果判定

ワークショップ 1-3

リムルス試薬を用いた電気化学検出型の小型エンドトキシン検査装置の開発

○井上 (安田) 久美^{1,2}、高野真一郎²、高橋 里子²、石田 洋祐³、川端 莊平⁴、水村 光⁵、小田 俊男⁵、小川 健一⁶、坪井 達也⁶、伊野 浩介^{2,3}、珠玖 仁^{2,3,7}、末永 智一^{1,2,3,7}

東北大学マイクロシステム融合研究開発センター (μ SIC) ¹

東北大学大学院環境科学研究科²、東北大学工学部³

株式会社アイ・ティ・リサーチ⁴、生化学工業株式会社⁵、大日本印刷株式会社⁶

東北大学原子分子材料科学高等研究機構 (WPI-AIMR) ⁷

簡易かつ安価なエンドトキシンセンサの実現は、医療の安全安心を担保する技術として大きなニーズがある。我々は、自己血糖測定など簡易検査で広く使われている電気化学センシング法に着目して、小型かつ安価なエンドトキシン検査装置を実用化するための開発を進めている。これまでに LAL 法に基づく 2 種類の電気化学検出法を開発した。ひとつは、LAL 試薬の発色基質 Boc-Leu-Gly-Arg-パラニトロアニリン (LGR-pNA) から遊離する pNA を微分パルスボルタンメトリ法で検出する方法であり¹、もうひとつは、新規に電気化学検出用の基質として開発した LGR-パラアミノフェノール (LGR-pAP) を用いる方法である²。pAP はアンペロメトリ法と呼ばれる簡易な方法で高感度検出できるため、LGR-pAP を用いる方法は実用センサ向きの方法である。検出限界は 30, 60, 120 分の反応時間でそれぞれ 0.1, 0.001, 0.0005 EU/mL であった。さらに、スクリーン印刷で作製した使い捨てチップセンサを用いて、0.01-1 EU/mL のエンドトキシンを 60 分以内に検出することに成功した。現在、実用化に向けた開発を進めている。

References

1. K. Y. Inoue, et al., *Innate Immun.* 18 (2012) 343.
2. K. Y. Inoue, et al. *Analyst*, DOI:10.1039/C3AN01202F.

ワークショップ 1-4

高感度エンドトキシン測定・エンドトキシン散乱測光法 (ESP 法) から見たリムルス反応の特殊性について

○小幡 徹、清水 智治、谷 徹
滋賀医科大学 外科学講座

エンドトキシン測定は、長い積み上げてきた開発の歴史を持ち、日本薬局方にもその方法が記載されているように、確立した技術であるように思われている。また臨床検査としてもその測定法のうちで比濁時間法は、頻繁に使われている。

しかし、臨床の現場では、敗血症といった感染を主要因とする重篤な疾患の治療の目安として、有効な方法では無いとして使われていないのが実状である。

なぜなのか？ 曰く「測定結果が出ない（多くは検出限界以下）」、曰く「得られた測定結果で症状が説明できない、あるいは血液培養の結果などと合わない」、曰く「結果が出るのに時間が掛かり過ぎる」と言った具合で、全く求められる要求に応えられないという状況に思える。

実際、臨床検体で結果を得られるのは1/3位ではないだろうか？ また感染創が目の前に見えても、血中にはエンドトキシンが測定できないなどということが普通に観察され、臨床の医師たちは、その測定結果（またはその測定自身）を当てにしていけないという事実がある。

なぜなのか？という疑問を考える前に、生化学的の常識を持ってエンドトキシン測定法（特に）比濁時間法）を見てみると、実におかしな反応系であることがわかる。もともと比濁時間法の由来は、リムルス試薬のエンドトキシン特異的なゲル化反応を利用したゲル化法という、“ゲル化するかしらないか”を目安としたその試料の希釈濃度から推定するという半定量的な測定法から始まっている。その方法から出発したために、ゲル化という不明な途中経過を、濁度という方法で定量化しようと試みた比濁時間法は、大きな誤りを犯してしまったように思える。

それはコアギュリンというリムルスカスケードの最終産物の凝集という現象を観察する上で、静かに溶液を置いて（静置して）ゲル化させ、観察したことにある。ゲル化の有無を見るだけなら、一種のブラックボックスとして測定対象に置けるが、その過程を見る場合、この方法には疑問を持たざるを得ない。

なぜなら因子類・凝集酵素類は言うまでもなく、コアギュローゲンも可溶性の蛋白質なのに対して、凝集酵素の最終産物コアギュリンは不溶性蛋白質であるからである。この大きな物理化学的変動を、静置の状態を観察して、均一に行われると保証できるだろうか？ あるいは、ゲル化という過程は複雑で、溶液全体が固まるのは最終段階に至ったとき。その途中は容器の底やら側壁から凝集が進行することは、寒天培地を作る時にでも容易に観測されるゲル化過程の基本的な事実である。

この条件下で、ゲル化法を踏襲する必要から静置という条件を受け入れた段階で、比濁時間法は、問題を抱えてしまったといえる。

今回は、比濁時間法の抱える問題点の検討から出発して、同じリムルス試薬の反応を利用したエンドトキシン散乱測光法 (ESP 法) の開発の中から明らかになったリムルス試薬のゲル化調節について話題を提供したい。

ワークショップ 1-5

敗血症における EAA の新たな展望

○木口 雄之、藤見 聡

大阪府立急性期総合医療センター 高度救命救急センター

敗血症は致死的な緊急病態であり、早期に診断し、治療を開始することが何よりも大切である。敗血症のバイオマーカーについてはこれまで様々な指標が報告されている。我々はその中の一つである **Endotoxin Activity Assay(EAA)** に注目し、これまで研究してきた。

EAA は新しいエンドトキシン測定法としてカナダで開発され、2003 年にはアメリカ FDA の承認も受けた測定法である。測定には患者の全血を使用し、リアルタイムに測定が可能で、30 分程度で測定ができる。測定原理は抗 LPS モノクローナル抗体を用いて、好中球の活性酸素産生反応を介したエンドトキシン測定法である。2004 年に Marshall らは欧米の 10 施設で実施した **MEDIC study** において重度敗血症のリスクは EA level の上昇とともに増大し、また、APACHE II、SOFA といった重症度スコアとも相関すると報告している。

当院においても 2009 年から敗血症症例を中心に EAA を測定してきた。我々の施設では研究当初からエンドトキシンの定量的評価だけでなく、重症度の指標として使用できないかという側面で研究を開始した。Marshall らが報告しているように当院のデータでも APACHE II スコアや SOFA スコアといった重症度の指標とはある程度の相関が認められた。しかし、重症症例の中に重症であるにもかかわらず、EA level の低い症例を認め、詳しく解析した結果化学発光値が低値であることに気付いた。そこで我々は化学発光値に着目しその値を中心に研究を進めた。今回はその結果も踏まえ、EAA の敗血症における新しい可能性について報告する。

ワークショップ 1-6

プロカルシトニン (PCT) の現状と展望

○三田村 真

サーモフッッシュャーサイエンティフィック株式会社
クリニカルダイアグノスティックスディヴィジョン

プロカルシトニン(以下 PCT)は、近年臨床応用が広がっている細菌感染症鑑別のためのバイオマーカーであり、カルシトニンの前駆体として甲状腺 C 細胞において生成される 116 個のアミノ酸より成る分子量 13kDa のタンパクである。

PCT は 2006 年より保険収載され、「細菌性敗血症の鑑別診断およびその重症度判定」として算定できる。

欧州を中心に広まった PCT は、多くの後向き、前向き、無作為比較試験のエビデンスが確立され、現在 2,500 以上の文献が存在し、結果 Surviving Sepsis Campaign Guidelines 2012(SSCG2012)に掲載されるなど、諸外国で CAP・VAP、抗菌薬コントロールのガイドラインにも掲載されている。

国内では、現在 3 本の GL に記述されており、日本版敗血症診療ガイドライン (日本集中治療学会)、急性膵炎診療ガイドライン (日本膵臓学会)、発熱性好中球減少症 (FN) 診療ガイドライン (日本臨床腫瘍学会) に臨床的有用性のコメントがされている。

ヨーロッパでは入院時だけでなく外来診療でも PCT 検査が行われ、迅速簡便な試験項目として幅広く認知されている。経時的測定により抗菌薬の中止判断指標となると考えられており、SSI など術後感染症にも有用との報告もある。

本邦では未だ敗血症診療以外の分野でのエビデンスが少なく、ER,ICU 以外の領域での臨床応用が期待されている。

PCT は細菌感染症の鑑別とその重症度判定において従来のパラメータ、CRP や WBC より鋭敏に反応し、真菌・ウイルス感染での上昇が限定的である事が報告されている。また免疫抑制剤やステロイド投与症例においても影響を受けにくく CRP よりも細菌感染症の重症度判定に優れていると報告されている。

本邦では各分野での研究、エビデンスの確立が計画されており、PCT は他の臨床所見と組み合わせることにより迅速かつ、診断の精度を向上させ、また経時的測定による抗菌薬中止指標としての活用も期待できる。

こうした特徴を鑑み、PCT は臨床現場における細菌感染症の鑑別に必須なバイオマーカーとして欠くことのできない検査項目になりうると考えられる。

我々は企業の立場として、PCT の更なる普及と国内のエビデンスの確立にまい進していきたいと考えている。

優秀賞選考セッション 1～6

12月7日（土） 10：00～11：00

司会：天野 憲一

（秋田大学バイオセンター）

木下 学

（防衛医科大学校 免疫微生物学講座）

筒井ひろ子

（兵庫医科大学 病原微生物学）

優秀賞選考セッション 1

LPS/ATPで誘導されるピロトーシスに対する抗菌ペプチドLL-37の効果と作用機構

○胡 忠双、村上 泰介、鈴木 香、田村 弘志、長岡 功

順天堂大学大学院医学研究科 生化学・生体防御学

目的:敗血症は、感染によって惹起される全身性炎症反応症候群である。敗血症では、宿主細胞の細胞死が病態の形成に関わっているが、近年、新たに見出された細胞死ピロトーシスは炎症反応を惹起・増強させることから、敗血症治療の新たな標的として注目されている。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。今までに、LPS や ATP などの物質が IL-1 β の放出と細胞死を誘導することが知られている。我々は既に LL-37 が LPS の作用を中和することを発表しているが、一方で ATP 刺激を制御することも報告されている。そこで本研究では、LPS と ATP による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で、LPS で処理した後に ATP で刺激した。その後、IL-1 β の放出、caspase-1 活性化、inflammasome の形成、LDH の放出 (細胞死の指標として) を測定した。さらに、LPS の細胞への結合、および ATP 刺激によるヌクレオチド受容体 P2X7 の活性化に及ぼす LL-37 の効果をフローサイトメトリーで測定した。

結果・結論: J774 細胞を LPS で前処理し、ATP で刺激することにより、inflammasome の形成、caspase-1 活性化、IL-1 β の放出、細胞死をともなうピロトーシスが起こった。さらに、LL-37 存在下で細胞を LPS/ATP 刺激すると inflammasome の形成、caspase-1 活性化、IL-1 β の放出、細胞死が抑制された。そして、LL-37 は LPS の細胞への結合と、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。以上の結果から、LL-37 は、LPS/ATP によるマクロファージ系細胞のピロトーシスを抑制するが、その機序に LL-37 による、LPS の標的細胞への結合抑制と 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。

優秀賞選考セッション 2

エンドトキシン投与豚モデルにおける重症予測因子の解析

○小網 博之¹、阪本雄一郎¹、宮庄 拓²、山下 和人³

佐賀大学医学部 救急医学講座¹

酪農学園大学獣医学群獣医保健看護学類動物栄養学²

酪農学園大学獣医学群獣医学類伴侶動物医療学分野附属動物病院麻酔科³

【目的】近年、さまざまな生理学的モニタリングデバイスの普及により、敗血症の管理においても使用することが増えてきている。今回我々は、エンドトキシン投与豚モデルを作成し、連続心拍出量測定装置 Pulse index Contour Cardiac Output system (以下 PiCCO) ならびに動脈血心拍出量計 FloTrac/Vigileo モニター (以下 Vigileo) を用いて、特に超急性期の各種因子の推移を解析した。

【方法】エンドトキシン投与豚モデルを7頭作成した。静脈麻酔下で人工呼吸管理を行った後、PiCCO ならびに Vigileo を装着した。エンドトキシンは、観察開始30分後に投与し、その後3時間30分間、モニタリングを行った。それぞれのモニターにおける各種パラメータや血液検査所見、動脈血液ガス分析、胸部 CT は投与開始30分前ならびに投与直後に測定した。

【結果】観察期間中に2頭が死亡した。この死亡した2頭(死亡群)と生存した5頭(生存群)で各データを比較検討した。死亡群ではエンドトキシン投与前の時点で、末梢血管抵抗(SVR, SVRI)が低値で、平均動脈圧(MAP)が低値、一回拍出量(SV, SVI)や心拍出量(CO, PCCO)が上昇しており hyper dynamic state となっていた。さらに、エンドトキシン投与直後より、肺血管透過性(PVPI)が亢進ならびに肺血管外水分量(EVLW)が増加し、酸素化障害が認められた。乳酸値やEAA(endotoxin activity assay)には転帰とは関連を認めず、胸部CT検査では、時間経過とともに肺水腫の増悪を4例認めたが、時間経過や死亡例との相関は認めなかった。

【結論】本モデルにおいて、予後不良であった個体は、エンドトキシン投与前の生理学的指標が異常値を示しており、エンドトキシン投与直後の反応も生存例のものとは異なっていたことから、エンドトキシンに対する反応は、各個体の全身状態に依存する可能性が考えられた。Vigileo や PiCCO はこれらのモニタリングとして有用であった。

優秀賞選考セッション 3

腸内細菌 *Faecalibacterium prausnitzii* とクローン病活動性との関連について

- 藤本 剛英¹、今枝 広丞²、高橋憲一郎¹、伴 宏充²、塩谷 淳²、馬場 重樹²、佐々木雅也³、藤山 佳秀²、安藤 朗¹
滋賀医科大学大学院 感染応答・免疫調節部門(消化器免疫)¹
滋賀医科大学 消化器内科²
滋賀医科大学 栄養治療部³

【背景】*Clostridium cluster IV* に属する *Faecalibacterium (F) prausnitzii* が術後クローン病の再燃に対して抑制的に作用することが報告されている。今回、クローン病の便中 *F. prausnitzii* 量を定量 PCR 法により測定するとともに、臨床パラメーターとの関連を検討した。

【方法】2012年1月から6月まで当院にて診療されたクローン病患者47名を対象とした。便中DNAを採取し、16S rRNA universal primer および *F. prausnitzii* specific primer を用いて定量 PCR を施行した。便中 *F. prausnitzii* 量を 16S rRNA 量で標準化し、CDAI、CRP、赤沈、血清アルブミン値、ヘモグロビン値との関連について検討した。腸内細菌叢の構成を T-RFLP (Nagashima 法)にて比較した。

【結果】便中 *F. prausnitzii* 量は、健常人と比較してクローン病患者では有意に低値をしめした(p=0.004)。クローン病患者を2群に分けると、*F. prausnitzii* 高値の群で有意に CDAI, CRP, ESR, アルブミン値の改善を認めた。T-RFLP 法による解析では、健常人とクローン病は異なる腸内細菌叢の構成を示し、*Clostridium cluster IV*、*Bacteroides* の低下、*Bifidobacterium* の増加を認めた。

【結語】*F. prausnitzii* は、健常人と比較しクローン病腸内細菌叢で有意な減少を認めた。また、*F. prausnitzii* の減少は、クローン病の病勢の悪化と関連する。

優秀賞選考セッション 4

甘草成分は TLR4 及び NLRP3 インフラマソーム活性化を阻害する

- 本田 裕恵^{1,2}、長井 良憲^{2,3}、高村 (赤司) 祥子⁴、齋藤 伸一郎⁴、
三宅 健介⁴、高津 聖志^{1,2}
富山県薬事研究所¹
富山大学大学院医学薬学研究部 免疫バイオ・創薬探索講座²
(独) 科学技術振興機構・さきがけ³
東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 感染遺伝学分野⁴

甘草は古くから良く知られた天然の甘味料であり、抗炎症作用、抗ウイルス作用など様々な免疫抑制効果を有することが多数報告されている。我々は自然免疫系に対する甘草の免疫抑制効果を調べるために、甘草に含有される成分が TLR4 やインフラマソームの活性化を抑制するかどうか検討を行った。その結果、以下の効果を見出したので報告する。

(1)TLR4/MD-2 シグナル抑制作用

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を用いて、甘草に含まれる複数のサポニン及びイソフラバノン/カルコンが lipid A 刺激による IL-6 産生を抑制することを見出した。また代表的なサポニンである GL 及び代表的なカルコンである ILG が lipid A 刺激による NF- κ B 及び MAP kinase の活性化を抑制することを明らかにした。さらに GL は LPS と TLR4/MD-2 との結合を阻害し、LPS による TLR4/MD-2 の二量体形成を阻害した。一方、ILG は、LPS と TLR4/MD-2 との結合を抑制しないが、LPS による TLR4/MD-2 の二量体形成を阻害した。以上から甘草には TLR4/MD-2 シグナルをレセプターレベルで且つ異なる機序で阻害する複数の成分が含まれることを見出した。

(2)NLRP3 インフラマソーム活性化抑制作用

次に慢性炎症性疾患の発症や病態に重要な役割を果たす IL-1 β の産生に対する甘草成分の効果について検討を行った。IL-1 β の産生には pro-IL-1 β の産生と、caspase-1 による pro-IL-1 β から成熟 IL-1 β への変換が不可欠である。Pro-IL-1 β の発現には TLR や TNF- α 等の炎症性シグナルが必要であり、caspase-1 の発現には ATP や尿酸結晶、アミロイド蛋白等の様々な刺激によるインフラマソームの活性化が必要である。そこでマウス骨髄由来マクロファージを LPS 及びインフラマソーム活性化剤で刺激し誘導される caspase-1 と IL-1 β の発現を指標に、甘草成分がインフラマソーム活性化を阻害するかどうか検討した。その結果、GL と ILG が ATP や尿酸結晶による NLRP3 インフラマソーム活性化を阻害することを見出した。ILG は既存の NLRP3 阻害剤である parthenolide よりも強力に且つ低濃度で NLRP3 インフラマソームの活性化を阻害した。さらに ILG は 2 型糖尿病の膵ラ氏島に沈着しインスリン分泌を阻害する islet amyloid polypeptide による NLRP3 インフラマソーム活性化も強力に阻害した。以上から、甘草成分、特に ILG は NLRP3 インフラマソームが関与する様々な慢性炎症性疾患の予防・治療に有用な創薬シーズになりうると思われる。現在、肥満・2 型糖尿病モデルマウスを用いた動物レベルでの ILG の有用性評価を実施中である。

参考文献

Honda H, Nagai Y, Matsunaga T, Saitoh S, Akashi-Takamura S, Hayashi H, Fujii I, Miyake K, Muraguchi A, Takatsu K. Glycyrrhizin and isoliquiritigenin suppress the LPS sensor toll-like receptor 4/MD-2 complex signaling in a different manner. *J Leukoc Biol.*, 91(6):967-76, 2012.

優秀賞選考セッション 5

TLR4/MD-2 リガンド認識における Lipopolysaccharide binding protein (LBP)と CD14 の要求性の相違と炎症性決定の分子基盤

○谷村奈津子^{1,2}、斉藤伸一郎¹、大戸 梅治³、松本文¹、高村(赤司)祥子¹、
藤本ゆかり⁴、深瀬 浩一⁴、清水 敏之³、三宅 健介¹
東京大学医科学研究所 感染遺伝学¹
日本学術振興会²
東京大学大学院 薬学研究科³
大阪大学大学院 理学系研究科⁴

病原体糖脂質を認識する TLR4/MD-2 は、これまで「場所特異的」に 2 つの異なったシグナル伝達経路を活性化されることが示されてきており、形質膜上で MyD88 依存性のシグナル伝達を、CD14 媒介性に誘導された受容体の細胞内移行によってエンドソーム内で TRIF 依存性経路を活性化するとされてきた。一方、モノリン酸化リピッド A は人工的に 1 位のリン酸基を欠いたリピッド A の派生物で、その低炎症の特性から臨床において免疫賦活化剤としても利用されている。しかし近年、過度の炎症によると考えられる多くの副反応も報告されており、その利用が慎重視されている。これまでに MPL の低炎症性の分子基盤としてリピッド A に比べて MyD88 依存性経路が減弱しており TRIF 依存性経路側に偏ったシグナルを伝達していることが報告されている。しかしながら、なぜそのようなシグナル伝達の偏向がおき、低炎症性となるのかについて、その詳細は不明であった。今回、我々は MPL がとても独特な経路、LBP 媒介性 CD14 非媒介性に TLR4/MD-2 に認識されることを見出した。それに呼応して CD14 依存的な TLR4/MD-2 の 2 量体化が著しく減弱していることも明らかとなった。このことから、CD14 非媒介性 TLR4/MD-2 活性化による 2 量体化不全が TNF α など炎症性サイトカイン産生に影響を及ぼし低炎症性の表現型として現れることが明らかとなった。加えて、TRIF 依存性経路によって誘導される共刺激分子 CD86 の細胞表面発現の上昇に注目した。CD86 の発現上昇は別の TRIF 依存性応答の IFN β とは異なり、CD14 非依存性かつ受容体の細胞内移行を阻害にも抵抗性の応答であった。つまり、TRIF 依存性経路の活性化の「場」は必ずしもエンドソームではなく、形質膜上でも活性化され、その結果 CD86 の細胞表面発現上昇を誘導することが分かった。以上のことから、MPL の低炎症性の分子基盤として、これまでに提唱されていた MyD88 依存性応答の減少というより CD14 媒介性応答の欠落の結果であること捉えなおすことが適当であると考えることができる。

A TOLL-LIKE RECEPTOR 2 LIGAND, PAM3CSK4, AUGMENTS INTERFERON-GAMMA-INDUCED NITRIC OXIDE PRODUCTION VIA A PHYSICAL ASSOCIATION BETWEEN MYD88 AND IFN-GAMMA RECEPTOR IN VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS

○Bilegtsaikhan Tsolmongyn、Naoki Koide、Takashi Yokochi

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

The effect of Pam3CSK4, a toll-like receptor (TLR) 2 ligand, on interferon (IFN)- γ -induced nitric oxide (NO) production in mouse vascular endothelial END-D cells was studied. Pretreatment or post-treatment with Pam3CSK4 augmented IFN- γ -induced NO production via enhanced expression of an inducible NO synthase (iNOS) protein and mRNA. Pam3CSK4 augmented phosphorylation of Janus kinase (JAK) 1 and 2, followed by enhanced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 at tyrosine 701. Subsequently, the enhanced STAT1 activation augmented IFN- γ -induced interferon-regulatory factor (IRF) 1 expression leading to the iNOS expression. Pam3CSK4 also induced the activation of p38 and subsequent phosphorylation of STAT1 at serine 727. A pharmacological p38 inhibitor abolished the augmentation of IFN- γ -induced NO production by Pam3CSK4. Surprisingly, Pam3CSK4 enhanced a physical association of MyD88 and IFN- γ receptor (IFN- γ R). Taken together, Pam3CSK4 was suggested to upregulate IFN- γ signaling in vascular endothelial cells via the physical association between MyD88 and IFN- γ R α , and p38-dependent serine 727 STAT1 phosphorylation.

ワークショップ 2

「最新の自然免疫研究」

12月7日（土） 11:00 ~ 11:55

司会：横田 伸一

(札幌医科大学医学部 微生物学講座)

松下 健二

(独立行政法人国立長寿医療研究センター
口腔疾患研究部)

ワークショップ 2-1

黒酢中に含まれる自然免疫活性化リガンドの分離

○橋本 雅仁¹、小原 恭子¹、大菌 まみ¹、古屋舗舞子¹、池田 剛¹、
隅田 泰生¹、深瀬 浩一²、藤本ゆかり²、重久 浩³
鹿児島大学大学院理工学研究科¹
大阪大学大学院理学研究科²、福山物産³

黒酢は鹿児島県特産の醸造酢であり、経験的に血液の循環不良による病気の改善、コレステロールや中性脂肪の減少、アトピーやアレルギーの改善に有効であると考えられている。黒酢の科学的な研究は一部で進行中であり、黒酢および抽出成分が抗酸化作用、血圧低下、抗がん作用等を示すことが報告されている。しかし、自然免疫に関する研究は報告されていない。黒酢は、糖化、アルコール発酵、酢酸発酵を一度におこなうため、細菌由来成分が豊富に含まれると予想される。本研究では、TLR や NLR の活性化を指標として、黒酢に含まれる成分を抽出し、その免疫調整作用について検討した。

黒酢の乾燥物はマウス腹腔細胞および脾臓細胞に対して TNF- α を誘導することが分かった。また、強制発現細胞を用いた実験の結果、黒酢は TLR2、NOD1、NOD2 を刺激することも分かった。そこでこれらの成分の分離を試みた。まず TLR2 活性化成分について検討した。黒酢を、OctylSephrose による疎水性クロマトグラフィーまたはトリトン X-114 二層分配により分離した結果、疎水性の画分に TLR2 の活性化能が濃縮されることが分かった。この疎水性画分は弱いながらも TLR4 も活性化することが分かった。SDS-PAGE でラダー状の成分が可視化されることから、リポ多糖様の成分も含むことが示唆された。また、この画分が脾臓細胞に対して TNF- α を誘導することも分かった。次いで、NOD1 活性化成分について検討した。黒酢を OSD をもちいた疎水性クロマトグラフィーで分離したところ、非吸着画分に NOD1 活性化能が溶出することがわかった。そこで、非吸着画分を逆相 HPLC でさらに分離したところ、わずかに疎水性を示す領域に NOD1 活性化能が溶出することが分かり、塩と分離することができた。

以上の結果から、黒酢は TLR2、4 および NOD1 を活性化する成分を含むこと、またこれらの成分が自然免疫を活性化しうることが分かった。

ワークショップ 2-2

HepG2 細胞での鉄存在下アデノウイルスベクターを用いた薬物代謝酵素 CYP2E1 過剰発現の構築とその組み換え過剰発現系を利用した TNF- α の cytotoxicity

○坂口 修平

東北薬大 環境衛生

重要疾患である敗血症は多臓器不全の中でも、特に肝障害の発症の原因として酸化ストレスの関与が重要であり、その要因として、我々は活性酸素の産生とその消去機構の障害、細胞内 Ca^{2+} の増大、Zn の低下などにより ROS が生成・調節されていることを報告している。一方、CYP2E1 の増大は酸化ストレスを導く。組み換えアデノウイルスベクターは、ほぼ全ての細胞に遺伝子の導入が可能である。今回、HepG2 培養細胞におけるアデノウイルスベクターシステムを用い CYP2E1 過剰発現系を構築した後、酸化ストレス誘発剤 Fe-NTA を添加し、*in vitro* での TNF- α による肝細胞障害性を検討した。さらに、酸化ストレスの面から敗血症の病態論に CYP2E1 の関与を考察した。

CYP2E1 の過剰発現系にアデノウイルス(Ad-CYP2E1)を HepG2 細胞に感染させ、CYP2E1 を過剰発現させた。Ad-CYP2E1 を multiplicity infection (MOI) で感染させた時の mRNA 発現量を PT-PCR, real-time PCR で測定した。ウイルス量に依存的に mRNA が上昇し、10 MOI で発現量がピークに達し、以後変化がなかった。この 10 MOI では western blot 法で Ad-CYP2E1 を感染させた細胞では CYP2E1 タンパクの発現が認められた。一方、非感染細胞(Ad-LacZ) では CYP2E1 mRNA およびタンパクは発現しない。これらからアデノウイルスベクターを利用した CYP2E1 過剰発現系が構築でき、ウイルス感染を 10 MOI とし、以後の検討を行った。一般に鉄イオン単独では細胞内導入率が低いので、導入効率の良い Fe-NTA complex(Fe^{2+}) を使用した。通常の HepG2 細胞に Fe^{2+} を曝露させた時の細胞毒性は 120~150 μM の濃度で細胞毒性が現れてくる。本実験では細胞障害性が現れない Fe^{2+} の最大値 90 μM を使用した。

これらの構築した CYP2E1 過剰発現系を用いて敗血症での酸化ストレス下の CYP2E1 の関与を 24h で検討した。対照として Ad-LacZ では TNF- α (10 ng/ml) に Fe^{2+} (90 μM) の添加では細胞障害性は変化見られない。しかし、過剰発現系である Ad-CYP2E1 では Ad-LacZ と比較して Fe^{2+} 添加時での TNF- α の有意差 ($p < 0.05$) が認められた。TNF- α で誘導される肝細胞障害は敗血症において内因性の鉄イオン濃度と CYP2E1 の発現増加が一部関与しており、鉄イオン存在下 CYP2E1 による ROS の産生が一つの要因になりえる。

(本会員以外の研究者；鈴木祐之、高橋昌吾、永田 清)

S1P1 IS REQUIRED FOR B CELL RECEPTOR- AND TOLL-LIKE RECEPTOR-MEDIATED B CELL ACTIVATIONS

- Sachiko Akashi-Takamura¹、Natsuko Yamakawa²、Natsuko Tanimura¹、Takuma Shibata¹、Takeaki Amiya^{3,4}、Yosuke Kurashima^{3,4}、Jun Kunisawa³、Hiroshi Kiyono⁴、Kazuhiro Suzuki⁵、Junichi Kikuta⁶、Masaru Ishii⁶、Richard L. Proia⁷、Yasuo Okamoto⁸、Yoh Takuwa⁸、Kensuke Miyake¹
Div. of Infectious Genetics, Univ. of Tokyo¹
Innovative Science and Technology, Univ. of Tokai²
Lab. of Vaccine Materials, National Inst. of Biomedical Innovation³
Div. of Mucosal Immunology, Univ. of Tokyo⁴
Lab. of Immune Response Dynamics, IFRc, Univ. of Osaka⁵
Lab. of Cellular Dynamics, IFRc, Univ. of Osaka⁶
The Genetics of Development and Disease Branch, NIDDK, National Institutes of Health⁷
Department of physiology, Kanazawa University School of Medicine⁸

Mouse and human B cells directly respond to microbial nucleic acids by using TLR7 and TLR9. Mutant B cells impaired in the B cell receptor (BCR) signaling show impaired TLR responses, and synergistic relationship between BCR and TLR7/9 signals is reported. These results suggest a functional link between BCR and TLR7/9. Little is known, however, about how these receptors are orchestrated in B cells.

S1P (Sphingosine 1-phosphate) is a lysophospholipid that controls B cell trafficking. S1P acts on the G protein-coupled receptor sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1). S1P1 is required for T and B cell egress from lymphoid organs, but its role in B cell responses has not been clarified. By using S1P1^{-/-} B cells derived from fetal liver chimeric mice, we found that B cell proliferation to a variety of TLR ligands were impaired. Moreover, B cell responses upon BCR ligation were also impaired. FACS analyses of S1P1^{-/-} chimeric mice revealed that S1P1^{-/-} B cells in the spleen were decreased. To exclude a possibility that altered maturation of S1P1^{-/-} B cell leads to impaired B cell responses, wild type B cells were treated with S1P1 antagonist FTY720. FTY720 inhibited B cell responses to TLR ligands or anti-IgM. S1P1 is required for B cell activation by TLR or BCR. S1P may have a role in linking BCR and TLR7/9. Underlying molecular mechanisms are currently studied.

THE ARF-LIKE GTPASE ARL8B DRIVES TLR7 INTO TYPE I INTERFERON-MEDIATED INFLAMMATION

○Shin-Ichiroh Saitoh¹, Kensuke Miyake^{1,2}

Division of Innate Immunity, Department of Microbiology and Immunology¹
Laboratory of Innate Immunity, The Institute of Medical Science,
The University of Tokyo²

Toll-like receptor 7 (TLR7) and 9, innate immune sensors for microbial RNA or DNA, erroneously respond to self RNA/DNA. RNA-sensing TLR7 exacerbates systemic lupus erythematosus (SLE), a systemic autoimmune disease mediated by type I interferon (IFN-I), whereas DNA-sensing TLR9 regulates disease progression. We here show that TLR7-unique risk of IFN-I-mediated autoimmunity is due to its link with Arl8b, the GTPase required for lysosomal trafficking. Arl8b is associated with Unc93B1, which transports TLR7/9 to DNA/RNA-sensing endolysosomes. TLR7 constitutively formed a complex with Unc93B1 and Arl8b in plasmacytoid dendritic cells (pDCs). Arl8b was required for TLR7-dependent IFN-I production by pDCs. *Arl8b*^{-/-} mice were impaired in TLR7-, and IFN-I-dependent inflammatory responses. Arl8b reveals a link between TLR7 and type I interferon.

ワークショップ 2-5

微細藻類由来多糖による Toll 様受容体シグナル活性化

○杉山 剛志

岐阜薬科大学 感染制御学研究室

【目的】クロレラに代表される微細藻類は海水・淡水に広く生息する緑藻類の一種であり、増殖能力が高く、アミノ酸、多糖、ビタミンなどの豊富な栄養素を含むため、健康食品として用いられている。また、いくつかの微細藻類の多糖成分は、Toll 様受容体 (TLR) を刺激して自然免疫系を活性化することが報告されている。本研究では、微細藻類のうちクロレラおよびココミクサの産生する多糖成分の自然免疫系への影響を明らかにする目的で、マウス由来マクロファージ細胞株 RAW264 の一酸化窒素 (NO) および炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。さらに微細藻類由来多糖の TLR リガンド活性について検討を行った。

【方法】クロレラ *Chlorella pyrenoidosa* Nikken strain およびココミクサ *Coccomyxa gloeobtrydiformis* Nikken strain の乾燥藻体を熱水抽出およびフェノール抽出し、透析して中性多糖画分 (NPS) を得た。また、熱水抽出残渣をアルカリ条件下で加熱抽出後、フェノール抽出し、透析して酸性多糖画分 (APS) を得た。RAW264 を各多糖成分で刺激し、Griess 法により培養上清中の NO_2^- を定量して NO 産生を評価した。また、上清中のサイトカイン、IL-6 を ELISA 法により測定した。TLR2、3、4 および 7 を発現する HEK293 細胞に NF- κ B のルシフェラーゼレポーター遺伝子をトランスフェクションし、各ココミクサ多糖成分で刺激してルシフェラーゼ活性を測定することにより NF- κ B 活性化を評価した。

【結果および考察】いずれの多糖画分も濃度依存的に NO 産生を誘導した。その活性はクロレラ APS が最も高く、クロレラでは $\text{APS} > \text{NPS}$ 、ココミクサでは $\text{NPS} > \text{APS}$ であった。また、サイトカイン産生誘導能も同様の結果であった。TLR リガンド活性については、いずれの多糖画分も TLR4 を介して NF- κ B を活性化し、加えてクロレラ APS およびココミクサ NPS は TLR2 を介しても NF- κ B を活性化した。本研究により、クロレラおよびココミクサ由来多糖画分が TLR2 または TLR4 を介してマクロファージを活性化し、NO や IL-6 の産生を誘導することが示され、微細藻類由来多糖の自然免疫活性化作用メカニズムの一端が明らかとなった。

非会員共同研究者：名古屋大学 木藤伸夫、愛知医科大学 小松孝行、岐阜薬科大学 高橋圭太 後藤麻美 野田拓史 佐原優太

ランチオンセミナー 「トレミキシン開発の歴史」

12月7日（土） 12：00 ～ 13：00

演者1：池田 寿昭

（東京医科大学八王子医療センター）

演者2：小路 久敬

（東レ・メディカル株式会社 国際部門）

司 会：谷 徹

（滋賀医科大学 外科学講座）

ランチョンセミナー「トレミキシン開発の歴史」

講演1：トレミキシン臨床研究の歴史

○池田 寿昭

東京医科大学八王子医療センター

1994年、トレミキシンは敗血症の原因となる毒素（エンドトキシン）を吸着除去する医療機器として発売された。それ以前から現在に至るまで敗血症治療を目的とした多くの薬剤、医療機器の開発が試みられ失敗してきたが、トレミキシンはその歴史のなかでの唯一ともいえる開発成功事例である。

敗血症は複雑な病態であり、その解明に向けて現在でも世界中で盛んに研究が行われている。トレミキシンの臨床研究もまた時代と共に大きく進展しており、臨床効果については当初より報告をされてきた血圧上昇だけでなく肺酸素化能や免疫機能の改善が報告され、その作用機序についてもエンドトキシンの減少だけでなくサイトカインや活性化白血球（好中球）の減少が報告されている。我々の施設でもこの20年の間に多くの臨床研究に取り組み、その成果を内外の学会にて報告してきた。トレミキシン使用についての初期の研究ではTNF- α 、IL-6やIL-10の変化を検討し、現在では感染マーカー（プロカルシトニン）やエンドトキシン活性（EAA）についても検討を行っている。

本日は自施設での検討データや他の施設からの報告データを用いて、トレミキシン臨床研究の歴史につき紹介していきたい。

ランチョンセミナー 「トレミキシン開発の歴史」

講演 2 : 血中エンドトキシン吸着カラムによる敗血症治療へのアプローチ update

○小路 久敬

東レ・メディカル株式会社 国際部門

敗血症は、感染に伴う全身性の炎症反応症候群と理解されており、この全身性反応の引き金として、数多くの PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) や DAMPs (danger-associated molecular pattern) が知られている。エンドトキシン (LPS: lipopolysaccharide) は、この PAMPs の一つではあるが、その強力な生物活性のために、とりわけ重要な敗血症の病因関連物質とされて来た。血液中へは、感染巣から、あるいは重症疾患における腸管粘膜のバリア機能の破綻によるバクテリアやエンドトキシンのトランスロケーションによって流入し、広範な生体反応を引き起こすと考えられている。

エンドトキシンを敗血症治療の標的とした試みとして、医薬品では、HA-1A (Centcore, USA)、E5 (Xoma, USA) などの抗エンドトキシンモノクローナル抗体薬や、最近の新たなアプローチとして、LPS の受容体 TLR4 を介したシグナル伝達のインヒビターである TAK-242 (Takeda, Japan) や、受容体 MD2: toll-like receptor 4 (TLR4) のアンタゴニスト E5564 (Eisai, USA) の開発が挙げられる。しかし、これらの治療薬は、大規模臨床試験において、いずれも対照群に比して有意な生存率の改善効果を示すことができず、本格的な臨床応用には至らなかった。

一方で、人工臓器的な手法による敗血症治療の試みも提案され、血液循環によって、エンドトキシンを体外へ除去するための吸着カラムが提案され、動物実験や臨床で評価されて来た。現在、血中エンドトキシン吸着カラムを標榜し、臨床使用されているカラムとしては、トレミキシン® (東レ(株), 東京) と Alteco® LPS Adsorber (Alteco Medical, Lund, Sweden) の 2 種類が存在するのみである。

本セミナーでは、従来検討されて来た幾つかのエンドトキシン吸着カラムの設計と性能について紹介し、とりわけ、国内で開発され、1994 年以来国内で広く臨床使用され、海外での臨床使用も始まっている“トレミキシン®”について、最近の研究も含め、詳しく説明する。

一般演題 1 ～ 5

12月7日（土） 13：10 ～ 13：50

司会：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）

志賀 英敏

（帝京大学ちば総合医療センター
救急集中治療センター）

一般演題 1

カンジダ由来 β -グルカンによる免疫修飾作用

- 田中 満崇¹、井上健一郎¹、安達 禎之²、石橋 健一²、大野 尚仁²、
高野 裕久³
国際医療福祉大¹
東京薬科大・医療衛生薬学科²
京都大・工学研究科³

[背景]細菌構成成分であるエンドトキシン（LPS）が自然免疫賦活化等の生物学的活性を有するのに対し、真菌細胞壁成分の生理活性や免疫修飾に関する知見は少ない。一方で真菌は、特に室内におけるアレルギーをはじめとする健康障害の一因と考えられているがその科学的根拠は不十分である。本研究で我々は、独自に抽出精製したカンジダ由来可溶性 β グルカン（CSBG）の生理活性に関して、肺での催炎症性、免疫原性作用を中心に検討を行った。

[方法] *in vivo* では、ICR マウスを 4 群に分け、vehicle、CSBG (25 μ g/個体; DMSO 溶解)、抗原 (ovalbumin: OVA; 2 μ g/個体)、CSBG + OVA を複数回気管内投与し、その後血清、気管支肺胞洗浄液、肺を採取・摘出し、種々のパラメーターを解析した。*in vitro* では、マウス由来脾細胞、樹状細胞に CSBG を添加して培養した際の性質変化を検討した。

[結果] *in vivo* の結果として、CSBG の複数回気管内投与で好中球性気道炎症が顕著に認められたのに対し、CSBG + OVA 群では好酸球浸潤の有意な悪化が確認された。また、肺での Th2、Th17 サイトカインのタンパク発現も CSBG + OVA の投与で増強していた。*in vitro* 実験では、CSBG により樹状細胞表面の CD80、CD86、DEC205 等、抗原提示に係る分子の発現増強や抗原特異的 T 細胞増殖の亢進が確認された。

[結語] CSBG が他の抗原性物質との慢性共曝露によって、アレルギー性炎症反応を助長し、その作用において樹状細胞等の免疫細胞が重要な働きを担っていることが示された。

一般演題 2

ビリベルジン投与がもたらす出血性ショック誘発急性肺傷害の改善

○高橋 徹

岡山県立大学 保健福祉学部

【背景】出血性ショックに陥ると蘇生に成功しても全身性炎症反応が惹起され急性肺傷害が発症する。急性肺傷害においては肺の炎症反応に起因する酸化ストレスがその病態に大きな役割を果たしている。しかし、酸化ストレスから肺を保護する薬物治療は未だ確立されていない。ビリベルジン(BV)はストレス蛋白 Heme Oxygenase-1 のヘム分解反応産物であり BV 還元酵素によって直ちにビリルビンに変換される。ビリルビンは活性酸素種(ROS)を捕捉すると同時に BV に再変換される。BV はこのビリルビン/BV 酸化還元サイクルを利用して抗酸化作用を示すことが報告されている。

【目的】BV をラット出血性ショックモデルに投与して蘇生後肺傷害に及ぼす影響を検討する。

【方法】雄性 SD ラットを脱血により平均血圧 30mmHg に 60 分間維持し、その後返血によって蘇生し出血性ショック蘇生(HSR)モデルを作成した。HSR ラットはビリベルジンを投与した BV/HSR 群、Vehicle を投与した Vehicle/HSR 群に分けた。尚、対象としては Sham ope ラット(BV/Sham 群、Vehicle/Sham 群)を用いた。BV または Vehicle は HSR 開始 1 時間前に尾静脈より 35 mg/kg 投与した。蘇生後の肺サンプルを用いて肺の組織傷害度スコア、好中球浸潤、肺重量 (Wet/dry 比)、炎症性メディエータ (TNF- α , iNOS) の発現、DNA 酸化損傷マーカー (8-OHdG) を測定した。

【結果】Vehicle/HSR 群では、肺の組織傷害度スコア、好中球浸潤、肺重量 (Wet/dry 比)、炎症性メディエータ (TNF- α , iNOS) の発現、DNA 酸化損傷マーカー (8-OHdG) 発現の全てのマーカーが Vehicle/Sham 群に比べて著明に上昇した。これに対して、BV/HSR 群では、上記いずれの値も有意な低下が見られた。さらに出血性ショック蘇生後に BV 投与を行っても肺傷害に対する保護作用を示すことを確認した。尚、BV/Sham 群では何ら異常所見は認められなかった。

【結語】ラットへの BV (35 mg/kg)投与は副作用を来すことなく、出血性ショック蘇生後急性肺傷害を改善し、その機序として BV の抗炎症および抗酸化作用が考えられた。

一般演題 3

マウス敗血症モデルで抗炎症性脂質メディエーター リポキシン A4 は生存率を改善する。

○上田 朝美¹、福永 興壺²、宮田 純²、別役 智子²、武田 純三¹

慶應義塾大学医学部 麻酔科¹

慶應義塾大学医学部 呼吸器内科²

重症感染症などによって惹起される敗血症は感染症と炎症の抑制を同時に行わなければならないことからその治療はしばし難渋することがある。近年アラキドン酸由来の代謝産物のひとつであるリポキシン A4 は抗炎症性作用を有し、炎症を能動的に収束させる作用を持つ脂質メディエーターとして着目されている。今回我々は感染症および炎症の両方の制御を必要とするマウス敗血症モデルでリポキシン A4 の有用性を検討した。リポキシン A4 投与群において腹腔内炎症細胞および好中球の集積が抑制され、また血清および腹腔内の大腸菌増殖の抑制・血中エンドトキシン濃度の減少を認めた。さらに血清中炎症性メディエーターの著明な減少を認めた。大腸菌投与後の生存率についても抗生剤およびリポキシン投与群において有意に改善した。これらのことより、細菌性敗血症においてリポキシン A4 が有用である可能性が示唆された。

一般演題 4

エンドトキシン血症発症後の精巣生殖細胞アポトーシスへの内因性 IL-18 の役割

○井上 岳人^{1,2}、石川 倫子^{1,3}、西野 哲¹、笹野 真希¹、岡 伸樹¹、
山下 勇人¹、鴨志田伸吾¹、中尾 篤典³、宇佐美 眞¹、小谷 穰治³
神戸大学大学院保健学研究科 病態解析学領域¹
医療法人社団誠心会 小野レディースクリニック²
兵庫医科大学 救急・災害医学講座³

背景：急性炎症下の精巣炎では生殖細胞のアポトーシスが精子形成障害の原因となる。IL-18 は精巣生殖細胞の成熟に関与するが、炎症下での役割は明らかではない。そこで急性炎症の急性期と回復期での精巣細胞アポトーシスへの IL-18 の働きを検討した。

方法：C57BL/6J (WT) 及び B6.129P2-IL-18^{tm1Aki}/J (KO) マウスに 20、40 mg/kg の lipopolysaccharide (LPS) または PBS を腹腔内投与した。マウスの行動で急性期、回復期を判断した。投与 12、48 時間後に精巣の TNF- α 、TNFR1、Fas、FADD mRNA をリアルタイム PCR で、Bax、Mcl-1、Bid、tBid を western blot で、cleaved-caspase (CC) 3、8、9 の発現を免疫組織学染色で解析した。

結果：生存率は PBS 群は 100%、LPS 群は WT で 50%、KO で 75%であった。LPS 群は投与 12-18 時間で行動低下が顕著となり、24 時間以降徐々に回復し、48 時間後精巣中の TNF- α は WT、KO 共に PBS 群と差はなく炎症の沈静化が示された。12 時間後、Fas/FasL、TNF/TNFR1、FADD、Bax、Mcl-1、tBid の発現、および CC8/CC3 陽性、CC9/CC3 陽性細胞は WT LPS 群に比べて KO LPS 群で有意に低く、内因性 IL-18 がデスレセプターおよびミトコンドリア経路を介してアポトーシスを促進している可能性が示唆された。一方で、48 時間後、Fas/FasL、TNF/TNFR1、FADD および CC8/CC3 陽性細胞は WT LPS 群に比べて KO LPS 群で有意に高く、内因性 IL-18 がデスレセプター経路を介してアポトーシスを抑制している可能性が示唆された。

結語：急性炎症下での IL-18 の働きは炎症のステージによって異なる可能性がある。

一般演題 5

Endotoxin Scattering Photometry (ESP 法) でのエンドトキシン測定

- 清水 智治¹、小幡 徹¹、園田 寛道¹、太田 裕之¹、山口 剛¹、赤堀 浩也¹、
遠藤 善裕²、田畑 貴久³、江口 豊³、谷 徹¹
滋賀医科大学 外科学講座¹
滋賀医科大学 臨床看護学講座²
滋賀医科大学 救急集中治療医学講座³

トレミキシンによる直接血液灌流 (PMX) 治療は、1994 年に本邦で保険適応を受けて以来 20 年を経過した。これまで多数の国内ならびに海外での臨床研究で臨床効果としては良好なデータが示されている。これまでに様々な作用機序が報告されているが、開発のコンセプトであったエンドトキシン吸着という意味では、ヒト血漿でのエンドトキシン測定法に関する課題もあり、「吸着していないのではないか？」との疑問まで持ち上がった。

リムルス試薬を応用した Endotoxin Scattering Photometry (ESP 法) の臨床での可能性について報告してきた。腹腔内感染が示唆される腹部緊急手術症例での ESP 法と比濁時間分析法 (従来法) によるエンドトキシン値の比較では、敗血症重症度にともない ESP 法ではエンドトキシン値が高値となり、Sepsis、Septic shock の診断能としては ESP 法が優位であることが判明した。さらに、PMX を長時間施行した 2 症例では、従来法ではエンドトキシンは検出できなかったが、PMX による患者の循環動態改善に伴い ESP 法ではエンドトキシンの低下を認めた。長時間の使用にもかかわらずカラム前後でのエンドトキシンの吸着能も保たれていた。

これまでのデータからは ESP 法を用いて敗血症患者状態の評価でき、PMX 治療が必要な症例の選択や病態評価に利用できる可能性が示唆された。汎用性測定機の開発が終了後には、多施設にて臨床検討を行うことを予定している。

シンポジウム

「エンドトキシン吸着療法の 20 年と今後」

12 月 7 日（土） 13 : 50 ~ 15 : 20

司会：小野 聡

(防衛医科大学校 防衛医学研究センター
外傷研究部門)

小谷穰治

(兵庫医科大学 救急・災害医学講座)

シンポジウム 1

PMX-F 療法における種々のマーカーの変動と作用機序

○中村 司¹、佐藤 英一¹、天羽 繭子¹、野村まゆみ¹、松村 大輔¹、上田 善彦²
新松戸中央総合病院 腎臓内科¹
獨協医科大学越谷病院 病理²

目的：1994年にPMX療法が保険認可され20年が経過したが、演者らは1996年からPMX療法に関する臨床研究を開始した。まず、種々のマーカーを測定することからPMXの作用機序解明への舵取りをきることにした。

方法：エンドトキシンおよびその他の細菌由来物質は好中球、単球、血管内皮細胞などに作用し細胞を活性化しサイトカインなどを分泌することにより敗血症、多臓器不全をきたす。演者らはPMX療法の作用機序解明のため以下のマーカーの変動を検索した。1. 単核球および血管内皮活性 (ET-1, MMP-9, RAGE, apelin) 2. 炎症マーカー(neopterin, IL-2R, IL-6, IL-18)、3. 血小板活性 (vWF, TM, P-selectin, PF4)、4. 心機能障害 (troponin T, ANP, BNP)、5. 脳障害 (amino acid ratio) 6. 骨障害 (NOx, PYD, DPD) 7. 腎障害 (podocyte, L-FABP)

結果：敗血症性ショック状態では単核球、血管内皮、血小板が活性化され、各種炎症マーカーが上昇しPMX療法により減少した。敗血症性ショック臓器障害の代表として心、腎、脳、骨障害マーカーは異常調整されPMX療法により是正された。特に最近はAKIが注目され腎臓組織変化とバイオマーカー変動が注目されているので動物実験を含めた報告を紹介する。

結論：敗血症性ショックには多数の因子が関与し複雑な機序を介して病変が進行し多臓器不全に移行する。PMX療法は異常調整された各種マーカーを是正し病態を改善する。今後は、種々のマーカーを組み合わせ敗血症ショックの重症度を早期に把握しPMX療法を施行すべきである。

シンポジウム 2

エンドトキシン吸着療法 (PMX) のブレークスルーをさぐる-PMX と免疫担当細胞機能-

○木村 暁史¹、小野 聡²、木下 学³、辻本 広紀¹、平木 修一¹、高畑 りさ¹、
青笹 季文¹、初瀬 一夫¹、齋藤 大蔵²、長谷 和生¹、山本 順司¹
防衛医科大学 外科学¹、防衛医科大学研究センター 外傷研究部門²
防衛医科大学 免疫微生物学³

【背景】重症敗血症患者では免疫機能不全状態、つまり自然免疫、獲得免疫いずれもが低下していることが指摘されているが、その対策こそが重症敗血症患者の予後を改善させるうえで極めて重要である。我々は以前から重症敗血症時のエンドトキシン吸着療法 (PMX) 療法の有効性に関して免疫担当細胞の機能解析に注目し、PMX は敗血症性免疫不全対策として臨床的に有効であることを報告してきた。

【目的】敗血症性患者の末梢血単核球、特に単球、natural killer(NK)細胞、T細胞などの免疫担当細胞に注目し、これら免疫担当細胞に対する PMX の効果について基礎的に検証する。

【対象と方法】臨床検討: PMX を施行した敗血症性ショック症例を対象に、①PMX 施行前後の平均血圧、P/F ratio、catecholamine index、血中 TNF- α 、IL-10、IL-6、IFN- γ 濃度を検討した。②末梢血単核球(PBMC)を採取し単球の抗原提示機能、各種レセプター (toll-like receptor、CD14、CD16) 発現、炎症性サイトカイン産生能と CD4+T 細胞、特に制御性 T 細胞の数、割合に着目し検討した。基礎検討: ①敗血症症例から全血を採取し、小動物用 PMX ミニカラムの膜を細切し 2 時間攪拌した PMX 膜群、ポリミキシン B (PLB) 50 μ g/mL のみを添加し 2 時間振盪した PLB 群、2 時間振盪のみをした sepsis 群と健常人の 4 群で PBMC を採取し、anti-CD3 あるいは IL-2+IL-12 で 24 時間刺激した際の IFN- γ 、TNF- α 産生能を比較した。②ラットへ大腸菌投与による敗血症モデルを作成し、小動物用 PMX ミニカラムで血液浄化を行った際の PMX カラム膜に吸着された免疫担当細胞を解析した。

【結果】臨床検討: ①PMX 施行後の平均血圧、P/F ratio は有意に改善し、catecholamine index は有意に低下した。血中 IL-10、IL-6 濃度は有意に低下し、IFN- γ は有意に上昇した。TNF- α は改善傾向を認めた。②末梢血単球の抗原提示機能(HLA-DR)やサイトカイン産生能 (TNF α 、IL-1 β 、IFN- γ) の低下を PMX 治療により有意に改善した。このような病態改善には PMX ファイバー繊維へ単球(CD14+CD16+HLA-DR 発現低下)や CD4+T 細胞 (CD25+Foxp3+) 集団を吸着することが関与していると推察された。基礎検討: ① Sepsis 群では健常人に比べ有意に IFN- γ 産生能の低下を認めたが、PMX 膜群、PLB 群いずれも sepsis 群に比べ有意に改善した。②PMX 膜の走査電子顕微鏡解析により主に単球集団の吸着が観察され現在のその特徴について解析中である。

【結論】敗血症性ショック症例を対象とした PMX 治療により単球の抗原提示機能や単核球での炎症性サイトカイン産生能は有意に改善したが、その機序として PMX 膜繊維への免疫機能の低下した単球、CD4+T 細胞集団の吸着と固定化されているポリミキシン B による NK 細胞への直接作用が重要であることが示唆された。

シンポジウム 3

エンドトキシン吸着療法 ～ experience と evidence の狭間で

○廣橋 伸之、板井 純治、山賀 聡之、Ho Minh Van、谷川 攻一
広島大学救急医学、広島大学病院高度救命救急センター・集中治療部

救命救急センターで勤務を再開した 1995 年以来、敗血症性ショックに対する急性血液浄化法の一つであるエンドトキシン吸着療法 (PMX-DHP) を使用してきた。その当初の目的はその名の通り血中のエンドトキシンを除去することであり、それ以降に起こりうるエンドトキシンによる自然免疫の活性化を抑制し、全身状態を安定化することであった。症例を経験して行くうち、施行開始早期から昇圧効果のあるものや、施行後徐々に昇圧するもの、全く効果のないもの、施行中に増悪するものなどがあり、PMX-DHP の効果メカニズムに対する疑問が湧いて来た。1995 年以来様々なサイトカインをその時代に注目されていたものを中心に DHP カラム前後で自ら測定 (IL-6,IL-18,MIF,TF,HMGB1, Adiponectin など) するもほとんど除去効果はなく、その他のメカニズムの解明 (活性化細胞除去など) が期待されている。PMX-DHP 施行開始時期については早期施行の効果が高いことは疑いなく、今後は重症患者の SIRS 抑制後の Imunoparalysis における PMX-DHP の再考が望まれる。近年、施行導入のマーカーとして患者の好中球、血漿成分を用いた EAA が導入されたが、ステロイド使用患者など評価困難例もあり注意を要する。一方、PMX-DHP は敗血症性ショック以外にも適応が広がりつつあり、当センターにおいても重症呼吸不全に対する 3 者併用療法 (PMX-DHP,ECMO,ステロイド) の症例を蓄積し、効果を得ている。この 20 年弱の自らの experiences と、世界で展開している EUPHAS 以降の study (ABDO-MIX や EUPHRATESS) による evidences の狭間で PMX-DHP の今後を考えて行きたい。

シンポジウム 4

重症感染症に対する sustained PMX-DHP

○山下 千鶴、西田 修

藤田保健衛生大学医学部 麻酔・侵襲制御医学講座

重症感染症において最も重要であるのは、早期の適切な抗菌薬投与および外科的手術などによる感染源制御であることは疑う余地もない。しかしながら、適切な感染源制御および初期治療にも関わらず、炎症と凝固のクロストークが制御不能となり、多臓器不全へと陥ることも少なくない。それに対して本邦では、mediator modulation として積極的に急性血液浄化療法を用いて良好な成績を得ているが、PMX-DHP は CHDF と並んでその中心的役割を果たしてきた。

PMX はエンドトキシンを吸着するカラムとして本邦で開発され、グラム陰性桿菌感染症による septic shock に対し、循環動態改善効果を期待して 2 時間を目安に施行されてきた。しかし、効果が不十分あるいは無効である症例も存在した。一方、発売後に、PMX カラムへの内因性カンナビノイドの吸着や活性化白血球の吸着などの新しい作用機序が発見され、カラムの能力や臨床効果がさらに広がる可能性も示唆されるようになった。そのような状況で、PMX カラムは 2 時間で本当に飽和するのか？の疑問を持ち、前任施設において、2 時間の PMX-DHP 施行で効果不十分な症例に対して施行時間を延長する「PMX-DHP 長時間施行」を進めてきた。

2 時間より長く PMX-DHP を施行した自験例 37 例は、APACHE II 28.2 ± 8.1 、SOFA score 11.9 ± 3.0 、平均施行時間は 15.8 ± 7.9 時間であった。開始 2 時間でショックから離脱したのは 8 例であったが、1 本目のカラム施行終了時には 25 例がショックから離脱し得た。また、ARDS 合併例 17 例において、 $\text{PaO}_2/\text{F}_i\text{O}_2$ ratio が 200 を超えて ARDS から離脱したのは 2 時間後では 1 例、終了時では 8 例であり、長時間施行の有効性が示唆された。PMX-DHP 施行時には血小板が減少することが報告されているが、長時間施行においても開始時の血小板数 $9.5 \pm 7.9 \times 10^4/\mu\text{L}$ に対し、終了時は $5.7 \pm 4.5 \times 10^4/\mu\text{L}$ であった。効果発現時期は、循環動態と肺酸素化能改善効果の間でも違いがみられたが、そのほか、炎症コントロール状況や個々の患者の病態、重症度などにより異なっていた。したがって、PMX-DHP 施行時間は、「時間」によって規定するのはなく、個々の患者で「期待する臨床効果が発現するまで」継続する「sustained PMX-DHP」法が望ましいと考える。本法によって、超重症例の救命率向上に寄与できる可能性を持つのみでなく、医療資源の有効活用にも繋がると考えられる。

現在、海外での臨床応用も拡大してきているが、有効性に関するエビデンスは未だ証明されていない。また、効果発現機序も全容が解明されているとはいえない。今後、PMX-DHP 至適施行時間を検証するためにも、効果発現機序の解明や 1 本のカラムの限界の評価などが望まれる。

シンポジウム 5

エンドトキシン吸着療法の 20 年と今後 ～ PMX-01R

○和田 尚弘

静岡県立こども病院 腎臓内科

PMX-20R は容量が大きいことから、容量 40ml の PMX-05R が発売されたが、体重 3kg 以下、循環血液量が 300ml にも満たないような新生児・低出生体重児では、容量だけで循環血液量の 10%を超えてしまう。新生児特に低出生体重児は、乳幼児よりも容易に敗血症性ショックに陥り急速に全身状態の悪化するため、エンドトキシン吸着療法も治療の選択肢としてあげられるが、体外循環量が大きくなってしまうことも一因で実施が困難であった。しかし、生後間もない児の救命治療として昨年容量 8ml の PMX-01R が発売された。また、新生児領域において吸着療法・血液浄化療法はリスクの高い治療と考えられていることから、日本未熟児新生児学会では 2010 年「小児・新生児におけるエンドトキシン除去療法ガイドライン」を学会誌掲載し、小児・新生児 SIRS 基準と施行方法を示した。さらに新生児医療において、PMX に限らず急性血液浄化療法全般の安全施行と有効性の検討を目的に「体外循環を用いた新生児急性血液浄化療法ガイドライン」を 2012 年公表した。また新生児血液浄化療法セミナーも定期的開催されている。PMX 01R 使用認可取得後、当初は以前より新生児血液浄化療法を積極的に行っている数施設で効果・安全性などを検討した。多くが体重 1000 g 前後の低出生体重児の敗血症性ショック症例を中心に施行され、有効かつ安全に施行されることが確認された。その後全国の施設で少しずつ使用され始め、現在まで 30 例近くの症例に使用されている。今回使用実態の一部を提示するとともに、施行上の問題点など、新生児領域でのエンドトキシン吸着療法の現状を報告する。

シンポジウム 6

びまん性肺胞障害(DAD)に対するPMX療法の有効性

○阿部 信二

東京都立広尾病院 呼吸器科

急性肺障害における基本病態はびまん性肺胞障害 (diffuse alveolar damage, DAD)である。2012年のBerlin定義において急性呼吸促迫症候群 (ARDS)はP/F比からmild、moderate、severe群に分類されているが、重症な群ほどDADを呈することが報告されている。DADは発症からの経過で浸出期、器質化期、線維化に分けられるが、器質化期以降では不可逆的な変化となってくる。肺胞障害により肺血管透過性が亢進し、変性した肺胞腔内には好中球の浸出を認めることから、DADにおいては好中球が重要な役割を果たすと考えられている。このDAD病態に対してコルチコステロイド、好中球エラスターゼ阻害薬、活性化プロテインCなど様々な薬物治療が試みられてきたが十分な治療成績は得られていない。近年、PMX (ポリミキシンカラムによるエンドトキシン吸着)療法が特発性間質性肺炎や膠原病肺の急性増悪あるいは薬剤性肺障害などのDAD病態を呈する疾患に対しての有効性が報告されている。しかしながらPMX療法の施行時間や施行回数、導入時期さらにその作用機序などについては未だなお課題が残っている。本研究会では極めて難治であるDAD病態に対するPMX療法の有効性について、これまでの報告を整理して総括する。

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・自然免疫研究会奨励賞（最優秀賞・優秀賞）
表彰規程

- 【2】 役員名簿

- 【3】 研究会開催記録

日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞表彰規程

第 1 条

本賞は「日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞・最優秀賞および優秀賞」と称する。

第 2 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 3 条

本賞は、賞状ならびに副賞よりなる。

第 4 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 5 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. 受賞の対象となる者は、研究会開催年の 10 月 1 日時点で 40 歳未満のものであることを原則とする。

2. 「日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞・最優秀賞」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・自然免疫研究会奨励賞・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 名の委員の計 4 名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・自然免疫研究会奨励賞・優秀賞」受賞は、当該年度の研究会での受賞候補者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6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7条

本賞の募集、選考などに関する内規は別に定める。

付 則 この規程は平成18年4月1日より施行する。

※：現在改定予定

平成18年5月16日 「表彰規程」決定

平成24年10月23日改訂

役員名簿

【理事長】

横地 高志 愛知医科大学 医学部 微生物・免疫学

【会計監事】

切替 照雄 国立国際医療センター研究所 感染症制御研究部

吉川 敏一 京都府立医科大学

【理事】

天野 憲一 秋田大学バイオセンター

安藤 朗 滋賀医科大学大学院 感染応答免疫調節部門（消化器免疫）

池田 寿昭 東京医科大学八王子医療センター 特定集中治療部

木下 学 防衛医科大学校 免疫微生物学講座

切替 照雄 国立国際医療センター研究所 感染症制御研究部

嶋田 紘 独立行政法人 労働者健康福祉機構

清水 智治 滋賀医科大学 外科学講座

隅田 泰生 鹿児島大学大学院理工学研究科 ナノ構造先端材料工学専攻

谷 徹 滋賀医科大学 外科学講座

筒井 ひろ子 兵庫医科大学 病原微生物学

長岡 功 順天堂大学医学部 生化学・生体防御学

比企 直樹 癌研有明病院 消化器外科

平田 公一 札幌医科大学 第一外科

深瀬 浩一 大阪大学大学院理学研究科

福井 博 奈良県立医科大学 第三内科

横地 高志 愛知医科大学 医学部 微生物・免疫学

吉川 敏一 京都府立医科大学

【代議員（基礎）】

天野 憲一 秋田大学バイオセンター

井上 健一郎 国際医療福祉大学 大田原キャンパス

大野 尚仁 東京薬科大学薬学部 第一微生物学

川畑 俊一郎 九州大学大学院理学研究院 生物科学部門

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

木下 学 防衛医科大学校 免疫微生物学講座

切替 照雄 国立国際医療センター研究所 感染症制御研究部

小出 直樹 愛知医科大学医学部 微生物・免疫学教室

齋藤 伸一郎 東京大学医科学研究所 感染遺伝学

| | | |
|----|-----|-----------------------------|
| 杉山 | 剛志 | 岐阜薬科大学 感染制御学研究室 |
| 隅田 | 泰生 | 鹿児島大学大学院理工学研究科 ナノ構造先端材料工学専攻 |
| 高田 | 春比古 | 東北大学大学院歯学研究科 口腔微生物学 |
| 高村 | 祥子 | 東京大学医科学研究所 感染遺伝学 |
| 竹田 | 潔 | 大阪大学大学院医学系研究科 (C6) 免疫制御学教室 |
| 筒井 | ひろ子 | 兵庫医科大学 病原微生物学 |
| 長岡 | 功 | 順天堂大学医学部 生化学・生体防御学 |
| 西島 | 正弘 | 昭和薬科大学 |
| 橋本 | 雅仁 | 鹿児島大学 大学院理工学研究科 化学生命・化学工学専攻 |
| 深瀬 | 浩一 | 大阪大学大学院理学研究科 |
| 松下 | 健二 | 独立行政法人国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部 |
| 牟田 | 達史 | 東北大学 大学院生命科学研究科 細胞認識応答分野 |
| 横田 | 伸一 | 札幌医科大学・医学部 微生物学講座 |
| 横地 | 高志 | 愛知医科大学 医学部 微生物・免疫学 |

【代議員（臨床）】

| | | |
|----|-----|-----------------------------|
| 安藤 | 朗 | 滋賀医科大学大学院 感染応答免疫調節部門（消化器免疫） |
| 池田 | 寿昭 | 東京医科大学八王子医療センター 特定集中治療部 |
| 遠藤 | 重厚 | 岩手医科大学 救急医学講座 |
| 小野 | 聡 | 防衛医科大学校 防衛医学研究センター外傷研究部門 |
| 小谷 | 穰治 | 兵庫医科大学 救急・災害医学講座 |
| 小林 | 誠人 | 公立豊岡病院 但馬救命救急センター |
| 阪本 | 雄一郎 | 佐賀大学医学部 救急医学講座 |
| 志賀 | 英敏 | 帝京大学ちば総合医療センター 救急集中治療センター |
| 嶋田 | 紘 | 独立行政法人 労働者健康福祉機構 特任研究ディレクター |
| 島津 | 元秀 | 東京医科大学八王子医療センター 消化器外科・移植外科 |
| 清水 | 智治 | 滋賀医科大学 外科学講座 |
| 瀬戸 | 泰之 | 東京大学大学院医学系研究科 消化管外科学 |
| 高橋 | 徹 | 岡山県立大学 保健福祉学部 |
| 竹下 | 誠一郎 | 神奈川県立保健福祉大学 |
| 谷 | 徹 | 滋賀医科大学 外科学講座 |
| 西田 | 正人 | 東京大学医学部医学系研究科 胃食道外科学 |
| 比企 | 直樹 | 癌研有明病院 消化器外科 |
| 平田 | 公一 | 札幌医科大学 第一外科 |
| 廣橋 | 伸之 | 広島大学病院高度救命救急センター 救急医学 |
| 福井 | 博 | 奈良県立医科大学 第三内科 |
| 吉川 | 敏一 | 京都府立医科大学 |

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 |