

グラム陽性菌敗血症に対する新しい血液浄化法 —スーパー抗原吸着カラム—

三 和 敬 史・柴 山 尚 子・河 邊 香 拓・大 関 岳 成

東レ株式会社 機能材料研究所 医療システム研究室

A Novel Blood Purification Therapy for the Treatment of Gram-Positive Bacterial Sepsis—Superantigen-adsorbing Device—

Keishi Miwa, Naoko Shibayama, Yoshihiro Kawabe and Takeshige Ohzeki

Medical Device Research Lab., Specialty Material Research Labs., Toray Industries, Inc.

Summary We developed a new superantigen-adsorbing device (CYT 860), and its characteristics and efficacy *in vitro* and in septic animals were evaluated. The CYT 860 was prepared by a chemical modification of polystyrene-based composite fiber reinforced with polypropylene. The superantigen-adsorption ability of CYT 860 was examined *in vitro* by incubating the CYT 860 with various superantigens (1 ng/ml) in serum. The adsorption rates were sufficiently high: 95%, 96% and 84% for staphylococcal enterotoxin A, B, and C, respectively, and 96% and 75% for toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) and streptococcal pyrogenic exotoxin A, respectively. Additionally, the CYT 860 showed some affinity for other molecules, such as streptococcal pyrogenic exotoxin B, lipoteichoic acid, β 2-microglobulin, myoglobin and vancomycin. Residual biological activities for leukocyte activation in human plasma containing TSST-1 after incubation with the CYT 860 were 125 pg/ml for tumor necrosis factor alpha (TNF α) production, and 359 pg/ml for interleukin-8 (IL-8) production (initial activities: 194 pg/ml for TNF α production and 1,029 pg/ml for IL-8 production).

When TSST-1/lipopolysaccharide-infused rabbits were subjected to direct hemoabsorption with a CYT 860 column, significant improvement of survival rate at 14 days after the infusion was observed (50% (CYT 860) vs. 0% (control), $p < 0.01$). In this review, we indicated the efficacy of CYT 860 in *in vitro* and *in vivo* studies, and discussed the possibility of clinical use of CYT 860 Gram-positive bacterial sepsis treatment.

Key words: superantigen, blood purification, Gram-positive bacteria, sepsis, adsorption

1. は じ め に

重症感染症の中でもグラム陽性菌による敗血症とグラム陰性菌による敗血症は起因菌の違いのみならず、病態の進行においても種々の違いがあることが報告され始めており^{1,2)}、治療法においてもグラム陰性菌とグラム陽性菌では異なった方法が用いられることが望まれている³⁾。これらの菌の違いの1つとしては、細菌由来の毒素が挙げられる。グラム陰性菌においては、細菌膜成分であるエンドトキシン (LPS) の病因物質としての研究が進められており、エンドトキシンを体外へ除去する血液浄化用カラムの有効性が報告されている^{4,5)}。一方で、グラム陽性菌由来の毒素に対する研究も近年になり多くの成果が上げられ、スーパー抗原と呼ばれる一群の毒素がエンドトキシンと同様に

免疫系を暴走させサイトカインの過剰産生を引き起こすことで敗血症などの病態を惹起すると考えられるようになった^{6,7)}。

スーパー抗原とは、黄色ブドウ球菌外毒素 A, B, C, G (SEA, SEB, SEC, SEG) やトキシックショック症候群毒素 1 (TSST-1) あるいは連鎖球菌発熱毒素 A (SPEA) に代表されるタンパク質性の分泌型毒素であり、現在までに 40 種類が同定されている⁸⁾。スーパー抗原は B 細胞などの抗原提示細胞の表面に存在する MHC クラス II タンパク質および T 細胞レセプターに、抗原提示細胞によるプロセッシングを受けることなく結合することで T 細胞を活性化する。T 細胞の活性化においては、スーパー抗原は T 細胞レセプター中の V β 領域のアミノ酸配列に対してのみ特異性を有しており、他の部位のアミノ酸配列には

影響されずに T 細胞を活性化する。(但し, SEH は $V\alpha$)^{8,9)}. 1 種類のスーパー抗原は複数の $V\beta$ 配列種に反応する. 例えば, 代表的なスーパー抗原である TSST-1 は, $V\beta$ 2 型を, SEA は $V\beta$ 1,5,6,7,9,23 型の 6 種の T 細胞レセプターを有する T 細胞全てを活性化させる能力を有している. ヒトでは 1 個体に存在する $V\beta$ の種類は 23 群 (47 種) あり, その中で 1~6 群, つまり全 T 細胞の約 5~25% が活性化される. 通常の生体防御としての免疫反応では厳密な抗原認識反応に制御されており, 全 T 細胞の 0.01% 以下しか活性化されないと考えられており, スーパー抗原は一般の抗原の 1,000 倍の T 細胞を活性化させることが出来る. このように, スーパー抗原は宿主免疫系の制御を受けずに過剰の T 細胞を活性化させることにより大量のサイトカインを誘導することで種々の病態を惹起すると考えられている¹⁰⁾.

トキシックショック症候群 (TSS) の原因毒素として同定されたスーパー抗原は¹¹⁾, その病因性に関しては, その後多くの動物実験で検証された^{12,13)}. 臨床研究においては, スーパー抗原の高感度検出方法が開発されることにより, TSS 患者や劇症連鎖球菌感染症患者の血液中にスーパー抗原が存在することが証明され^{14~17)}, また, グラム陽性菌感染症患者の重症度と患者血中からのスーパー抗原の検出率に正の相関があることも報告されている¹⁸⁾. その他にも, 新生児発疹症^{19,20)} や MRSA 関連糸球体腎炎²¹⁾ においてもスーパー抗原の病因性が証明されている.

このように, スーパー抗原は種々の患者の血液中に存在し, 病態の発症と深く関連していることを考慮すると, スーパー抗原を除去する血液浄化療法はグラム陽性菌感染症の病態の進展を防止する有効な治療法となりうると考えられた. Nagaki らは²²⁾, イオン交換樹脂により血漿中のスーパー抗原が吸着できることを *in vitro* 実験で示したが, 結合力や選択性は動物実験や臨床で使用するには不十分であった. われわれは, スーパー抗原への高吸着性・高選択性かつ高生体適合性を指標に数百種類の化合物から最適な吸着体化学構造を決定しスーパー抗原吸着カラム (CYT 860) を開発した²³⁾.

2. グラム陽性菌毒素吸着体

グラム陽性菌毒素吸着体は, エンドトキシン吸着カラム (トレミキシン[®]) と同様に, ポリスチレン-ポリプロピレン複合繊維の表面を化学修飾し, Fig. 1 に示

す有機構造を導入した繊維状吸着体である. 本構造は γ 線に対しても安定であり, 2.5 Mrad の γ 線照射により滅菌可能である.

2.1 タンパク吸着特性

Table 1 に示すように, 5 種類のスーパー抗原 (SEA, SEB, SEC, TSST-1, SPEA) に対してはそれぞれ 95, 96, 84, 96, 75% と高い吸着率を示した. また, 非スーパー抗原性毒素である連鎖球菌発熱毒素 B (SPEB), 黄色ブドウ球菌プロテイン A (StPA), 緑膿菌外毒素 A (ExA), エンドトキシン (LPS), リポタイコ酸 (LTA) およびペプチドグリカン (PepG) に対する吸着率は 85, 49, 10, 19, 94, 26% であり, 吸着選択性があることが示された. 血清タンパク質に対する吸着特性は, アルブミンやグロブリンに対しては吸着性はなく, β 2 ミクログロブリン (β 2 MG), ミオグロビンおよび総ビリルビンを選択的に吸着する. サイトカインに対しても高い吸着性を示したが腫瘍壊死因子 α (TNF α) は吸着しないことが示された. TNF α は 3 量体を形成しており他のサイトカインとは性質が異なることが示唆された.

2.2 薬剤吸着特性

抗生剤等の医薬品に対しても吸着選択性が認められ, バンコマイシン (VCM), セファクロル (CCL), ペニシリン G (PCG) 等に対して高い吸着性 (95%, 68%, 94%) を示し, アルベカシン (ABK) やクリンダマイシン (CLDM) に対しては吸着率は低かった (Table 1).

2.3 細菌の吸着

Fenwick らは²⁴⁾, CYT 860 と A 群連鎖球菌を接触させることにより培地中の菌数が減少することを報告している. この減少は, CYT 860 から抗菌性の溶出物が遊離するのではなく, 吸着体表面に菌体が吸着されるためであることが示された. CYT 860 が菌体の膜成分であるリポタイコ酸を吸着することにより菌全体をも吸着体表面に結合していると考えられる.

2.4 細胞活性評価試験

スーパー抗原のヒト白血球活性化を CYT 860 によ

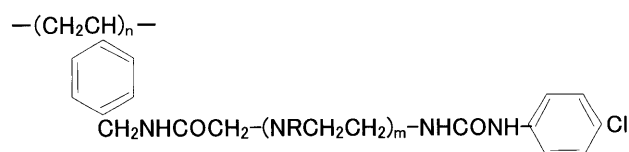


Fig. 1. Chemical structure of the superantigen-adsorbing device.

Table 1. Adsorption abilities of superantigen-adsorbing device (CYT 860).

Factors	Adsorption %	Initial Conc.	Solvent	Factors	Adsorption %	Initial Conc.	Solvent	Factors	Adsorption %	Initial Conc.	Solvent
Superantigens				Serum Components				Pharmaceuticals			
SEA	95	1 ng/ml	FBS	TP	<5	6.9 g/dl	HS	VCM	95	50 µg/ml	HS
SEB	96	1 ng/ml	FBS	Albumin	<5	4.4 g/dl	HS	ABK	10	10 µg/ml	H-HP
SEC	84	1 ng/ml	FBS	IgG	<5	0.78 g/dl	HS	AMK	4	20 µg/ml	HS
TSST-1	96	1 ng/ml	FBS	IgA	<5	239 mg/dl	HS	GM	6	10 µg/ml	HS
SPEA	75	1 ng/ml	FBS	IgM	<5	263 mg/dl	HS	CCL	68	10 µg/ml	H-HP
Other Bacterial Components				HDL	<5	70 mg/dl	HS	CTRX	39	250 µg/ml	H-HP
				LDL	<5	115 mg/dl	HS	PCG	94	50 µg/ml	HS
SPEB	85	1 ng/ml	FBS	C 3	<5	100 mg/dl	HS	CLDM	35	1 µg/ml	H-HP
StPA	49	10 ng/ml	FBS	C 4	<5	14 mg/dl	HS	AMPH	82	200 µg/ml	H-HP
ExA	10	10 ng/ml	FBS	C 5	<5	9 mg/dl	HS	MCZ	50	10 µg/ml	H-HP
LPS	19	10 ng/ml	FBS	β2 MG	84	1 mg/dl	HS	EPI	28	100 ng/ml	H-HP
LTA	94	100 ng/ml	FBS	Mioglobin	80	105 ng/ml	HS	NOR	21	100 ng/ml	H-HP
PepG	26	100 ng/ml	FBS	Total Bulirubin	75	25 mg/dl	HS	DOA	22	100 ng/ml	H-HP
Cytokines				Coagulation Factors				DOB	86	100 ng/ml	H-HP
				ATIII	7	103%	C-HP	Propranolol	87	150 ng/ml	HS
IL-1 b	97	1 ng/ml	FBS	Fibrinogen	11	209 mg/dl	C-HP	Nifedipine	94	100 ng/ml	HS
IL-2	99	1 ng/ml	FBS	TM	3.7	2.7 U/ml	C-HP	Cyclosporin	54	1 mg/ml	WB
IL-4	99	1 ng/ml	FBS	Protein C	20	134%	C-HP	Tacrolimus	14	80 ng/ml	WB
IL-6	92	1 ng/ml	FBS	Effects on Coagulation Time				Steroid (MPS)	9	1 µg/ml	H-HP
IL-8	99	1 ng/ml	FBS	APTT	4.6	38.2 sec	C-HP	Lidocaine	86	10 µg/ml	HS
IL-10	83	1 ng/ml	FBS	PT	1.8	11.2 sec	C-HP	Furosemide	83	20 µg/ml	HS
IFN-γ	98	1 ng/ml	FBS					Acetaminofen	58	300 µg/ml	HS
G-CSF	99	1 ng/ml	FBS					NM	92	5 mg/ml	Saline
aTGF-β	91	10 ng/ml	FBS					Heparin	26	2 U/ml	WB
TNF-α	20	1 ng/ml	FBS								
MCP-1	90	1 ng/ml	FBS								
PAI-1	18	1 ng/ml	FBS								

SEA, B, C : staphylococcal enterotoxin A, B, C, TSST-1 : toxic shock syndrome toxin-1, SPEA, B : streptococcal pyrogenic exotoxin A, B, ExA : Pseudomonas exotoxin A, StPA : staphylococcal protein A, PepG : peptidoglycan, LTA : lipoteichoic acid, LPS : lipopolysaccharide, IL : interleukin, IFN : interferon, G-CSF : granulocyte colony stimulating factor, aTGF-β : tissue growth factor β (active form), TNF : tumor necrosis factor, MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1, PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1, TP : total protein, IgG, A, M : immunoglobulin G, A, M, HDL : high density lipoprotein, LDL : low density lipoprotein, C 3,4,5 : complimental factor 3,4,5, β2 MG : β2 microglobulin, ATIII : anti-thrombin III, TM : thrombomodulin, APTT : activated partial thromboplastin time : PT : prothrombin time, VCM : vancomycin, ABK : arbekacin, AMK : amikacin, GM : gentamicin, CCL : cefaclor, CTRX : ceftriaxone, PCG : penicillin G, CLDM : clindamycin, AMPH : amphotericin B, MCZ : miconazole, EPI : epinephrine (adrenaline), NOR : nor-epinephrine (nor-adrenaline), DOA : dopamine, DOB : dobutamine, Steroid (MPS) : methylprednisolone succinate, NM : nafamostat mesilate, FBS : fetal bovine serum, HS : human serum, C-HP : citrated human plasma, H-HP : heparinized human plasma, WB : human whole blood.

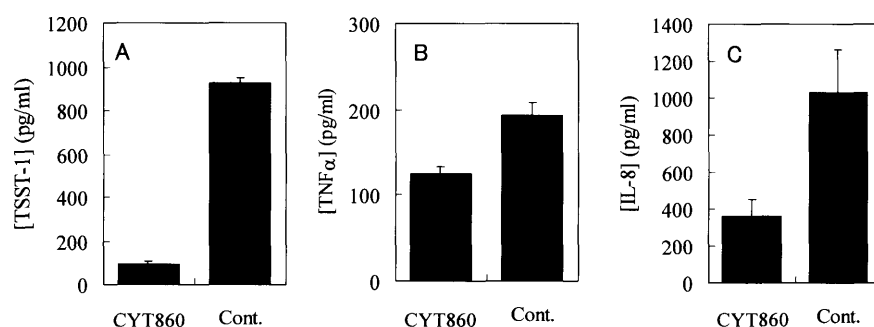


Fig. 2. Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) removal efficacy of superantigen adsorbing device (CYT 860) and the residual TSST-1 activity to induce cytokine production by human blood cells (A) residual TSST-1 concentration after incubating of TSST-1-containing plasma (1 ng/ml) with CYT 860 (0.065 g/ml), (B) tumor necrosis factor (TNF) α production by human blood cells stimulated with CYT 860-treated or untreated TSST-1-containing plasma, and (C) interleukin (IL) 8 production by human blood cells stimulated with CYT 860-treated or untreated TSST-1-containing plasma.

Error bars represent ±SD. *: Significantly different from the control by student *t*-test (*p*<0.001).

り減少させられるかを *in vitro* 試験で評価した。ヒト血漿中に TSST-1 を 1 ng/ml の濃度で添加した後、CYT 860 による TSST-1 吸着有りあるいは吸着無しの 2 検体をヒト末梢血単核球 (PBMC) と反応させたところ、培養上清に産生されるサイトカイン濃度は CYT 860 で処理することにより有意に低下した (Fig. 2)。これによりスーパー抗原の吸着除去は生物学的評価においても有効であることが示され、スーパー抗原除去による SIRS 抑制が可能であることが示唆された。

Fenwick らも²⁴⁾、A 群連鎖球菌の培養液を用いた実験により、CYT 860 が PBMC 活性化物質を吸着することを報告した。また、PBMC 活性化物質としてはスーパー抗原以外の物質の吸着も同時に起きている可能性を示している。

3. 敗血症モデルウサギを用いた評価

スーパー抗原 (TSST-1: 0.05 μ g/kg) を 1 時間投与し、その後 1 時間間隔を空けて LPS (0.27 μ g/kg) を 1 時間投与することでウサギ敗血症モデルを作製した²³⁾。スーパー抗原および LPS の投与量はそれぞれ単独では致死活性を示さない量であり、スーパー抗原との相乗作用²⁵⁾によってのみ動物が 3 日以内に死亡するモデルとした。

Fig. 3 に示す血液体外循環回路を用い、プライミング容量 10 ml のスーパー抗原吸着カラムを作製して回路に接続し治療を行った。ブラッドアクセスは大腿動

静脈シャントにより行い、抗凝固剤としてはヘパリンを使用した。体外循環は毒素投与と同時にを行い、3.5 時間の血液浄化を行った。その後に回路内血液を動物に返血し、血管および術部を縫合した後に 14 日間の生存率を観察した。

Fig. 4 に示すとおり、毒素投与後 14 日目の生存率は CYT 860 治療による血液浄化治療により有意に向上する (50% vs. 0%, $p < 0.01$, log-rank test)。また、カラムの入口と出口の TSST-1 濃度を体外循環開始 60 分後に測定した結果、入口濃度 135 ± 41 pg/ml,

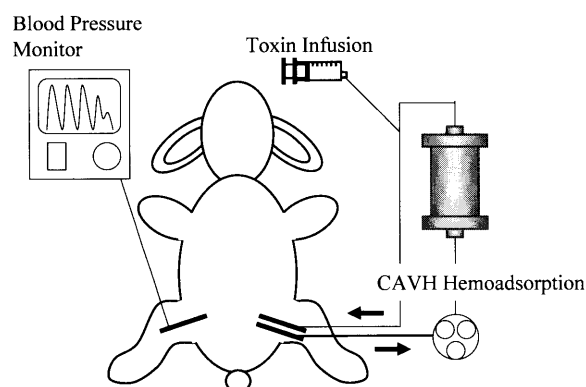


Fig. 3. Schematic representation of extracorporeal superantigen hemoabsorption by CYT 860 column in rabbit.

The extracorporeal volume in the system was approximately 17 ml (7 ml for the circuit, 10 ml for the CYT 860). Blood was introduced into the CYT 860 column from the left femoral artery and returned to left femoral vein, by 10 ml/min blood flow using heparin as anti-coagulant. Toxin was infused from the downstream of the extracorporeal circuit.

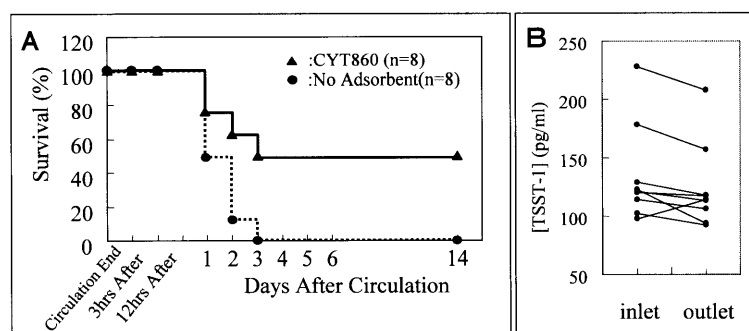


Fig. 4. Efficacy of superantigen-adsorbing device (CYT 860) in TSST-1/LPS-infused rabbits.

(A) Survival curves in rabbits treated with CYT 860 column ($n=8$) or blank column ($n=8$). The survival rate in the CYT 860 column-treated group was significantly higher than that in blank column-treated group (by Kaplan-Meier's method and log-rank test, $p < 0.01$). (B) TSST-1 concentrations in the circulating blood. In the rabbits treated with CYT 860 column, TSST-1 concentration in the circulating blood was significantly lower at the outlet than at the inlet at a timepoint of 60 min after the initiation of TSST-1 infusion (by paired t -test, $p=0.03$).

出口濃度 124 ± 37 pg/ml と統計的に有意な濃度低下が認められた ($p < 0.05$, paired t -test).

4. お わ り に

毒素に対する中和療法として、抗体やレセプターアナログペプチドによる活性阻害が試みられており^{26,27)}、われわれも特定の配列のペプチドにより TSST-1 と MHC クラス II タンパクの結合を阻害可能であることを確認している²⁸⁾。しかし、これらのタンパク・ペプチド医薬は、アナフィラキシー等の宿主に対する医薬の毒性や、投与時期、投与経路を考慮する必要がある、臨床応用されるまでには今後の検討課題が多い。一方で、体外循環による血液浄化療法が敗血症治療に有効であることが多数報告されている²⁹⁻³¹⁾。グラム陽性菌感染症においてもスーパー抗原除去療法が有効な治療になることを示唆する、多くの非臨床試験における実験結果を示した。

文 献

- 1) Sriskandan S, Cohen J: Gram-positive sepsis. Mechanisms and differences from Gram-negative sepsis. *Infect Dis Clin North Am* **13**: 397-412, 1999
- 2) Opal SM, Cohen J: Clinical Gram-positive sepsis: Does it fundamentally differ from Gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med* **27**: 1608-1616, 1999
- 3) Cohen J: Mechanism of tissue injury in sepsis: Contrasts between gram positive and Gram negative infection. *J Chemother* **13**: 153-158, 2001
- 4) Shoji H, Tani T, Hanasawa K, Kodama M: Extracorporeal endotoxin removal by polymyxin B immobilized fiber cartridge: Design and atienotoxin efficacy in the clinical application: *Ther Apher* **2**: 3-12, 1998
- 5) Reinhart K, Meier-Hellmann A, Beale R, et al: Open randomized phase II trial of an extracorporeal endotoxin adsorber in suspected Gram-negative sepsis. *Crit Care Med* **32**: 1662-1668, 2004
- 6) Llewelyn M, Cohen J: Superantigens: Microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infect Dis* **2**: 156-162, 2002
- 7) Holtfreter S, Bröker BM: Staphylococcal superantigens: Do they play a role in sepsis? *Arch Immunol Ther Exp* **53**: 13-27, 2005
- 8) Proft T, Fraser JD: Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol* **133**: 299-306, 2003
- 9) Li H, Llera A, Malchiodi EL, Mariuzza RA: The structural basis of T cell activation by superantigens. *Annu Rev Immunol* **17**: 435-466, 1999
- 10) Miethke T, Wahl C, Regele D, et al: Superantigen mediated shock: A cytokine release syndrome. *Immunobiology* **189**: 270-284, 1993
- 11) Todd JK: Toxic shock syndrome. *Clin Microbiol Rev* **1**: 432-446, 1988
- 12) de Azavedo JC: Animal models for toxic shock syndrome: Overview. *Rev Infect Dis* **11**: S 205-S 209, 1989
- 13) Parsonnet J, Gillis ZA, Richter AG, Pier GB: A rabbit model of toxic shock syndrome that uses a constant, subcutaneous infusion of toxic shock syndrome toxin 1. *Infect Immun* **55**: 1070-1076, 1987
- 14) Miwa K, Fukuyama M, Kunitomo T, Igarashi H: Rapid assay for detection of toxic shock syndrome toxin 1 from human sera. *J Clin Microbiol* **32**: 539-542, 1994
- 15) Wells DE, Reeves MW, McKinney RM, et al: Production and characterization of monoclonal antibodies to toxic shock syndrome toxin 1 and use of a monoclonal antibody in rapid, one-step enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of pictogram quantities of toxic shock syndrome toxin 1. *J Clin Microbiol* **25**: 516-521, 1987
- 16) Sriskandan S, Moyes D, Cohen J: Detection of circulating bacterial superantigen and lymphotoxin-alpha in patients with streptococcal toxic-shock syndrome. *Lancet* **348**: 1315-1316, 1996
- 17) 横田 徹, 小林知恵, 花澤一芳, 他: 重症感染症例における血中 toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) およびエンドトキシン濃度に関する検討. *日救急医学会誌* **9**: 53-59, 1998
- 18) Azuma K, Koike K, Kobayashi T, et al: Detection of circulating superantigens in an intensive care unit population. *Int J Infect Dis* **8**: 292-298, 2004
- 19) Takahashi N, Nishida H, Kato H, et al: Exanthematous disease induced by toxic shock syndrome toxin 1 in the early neonatal period. *Lancet* **351**: 1614-1619, 1998
- 20) 岡田隆滋, 北村明子, 古川正強, 他: MRSA による新生児発疹性疾患. *小児科* **41**: 591-601, 2000
- 21) Koyama A, Kobayashi M, Yamaguchi N, et al: Glomerulonephritis associated with MRSA infection: A possible role of bacterial superantigen. *Kidney Int* **47**: 207-216, 1995
- 22) Nagaki M, Hughes RD, Keane HM, et al: Clearance and tissue distribution of staphylococcal enterotoxin A in the rat and potential use of adsorbents for removal from plasma. *J Med Microbiol* **38**: 354-359, 1993
- 23) Miwa K, Fukuyama M, Ida N, et al: Preparation of superantigen-adsorbing device and its superantigen removal efficacies *in vitro* and *in vivo*. *Int J Infect Dis* **7**: 21-28, 2003
- 24) Fenwick P, Ryan C, Sriskandan S, Cohen J: Application of a rat model of streptococcal shock to evaluate on-line hemoperfusion and removal of circulating superantigens. *Crit Care Med* **31**: 171-178, 2003
- 25) Igarashi H, Fujikawa H, Usami H: Effect of drugs on the pyrogenicity of toxic shock syndrome toxin 1 and its capacity to enhance susceptibility to the lethal effects of endotoxic shock in rabbits. *Rev Infect Dis* **11**: S 210-S 213, 1989
- 26) McCloskey RV, Straube RC, Sanders C, et al: Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A. *Annu Intern Med* **121**: 1-5, 1994
- 27) Arad G, Levy R, Hillman D, Kaemper R: Superantigen antagonist protects against lethal shock and defines a new domain for T-cell activation. *Nature Med* **6**: 414-421, 2000
- 28) Sato A, Ida N, Fukuyama M, et al: Identification from

- a phage display library of peptides that bind to toxic shock syndrome toxin-1 and that inhibit its binding to major histocompatibility complex (MHC) Class II Molecules. *Biochemistry* **35**: 10441-10447, 1996
- 29) Hirasawa H, Sugai T, Ohtake Y, et al: Blood purification for prevention and treatment of multiple organ failure. *World J Surg* **20**: 482-486, 1996
- 30) Hoffmann JN, Faist E: Removal of mediators by continuous hemofiltration in septic patients. *World J Surg* **25**: 651-659, 2001
- 31) Jaber BL, Pereira BJG: Extracorporeal adsorbent-based strategies in sepsis. *Am J Kid Dis* **30**: S 44-S 56, 1997