

□ 会長奨励賞(平成17年度) □

## Bio-plex<sup>®</sup>を用いたALI/ARDS患者における 気管支肺胞洗浄液の各種サイトカインの測定

中野 泰<sup>1)</sup> 藤島 清太郎<sup>2)</sup> 宮庄 拓<sup>4)</sup> 北川 雄光<sup>3)</sup> 須田 康一<sup>3)</sup>  
西村 知泰<sup>1)</sup> 小川 裕子<sup>1)</sup> 栗原 亜子<sup>1)</sup> 斎藤 史武<sup>1)</sup> 清水 三恵<sup>1)</sup>  
山田 稚子<sup>1)</sup> 黄 英文<sup>1)</sup> 田坂 定智<sup>1)</sup> 中村 守男<sup>1)</sup>  
長谷川 直樹<sup>1)</sup> 横田 博<sup>4)</sup> 石坂 彰敏<sup>1)</sup>

### Abstract

Simultaneous measurement of multiple cytokines by a bead array method in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ALI/ARDS

Y. Nakano<sup>1)</sup>, S. Fujishima<sup>2)</sup>, T. Miyasho<sup>4)</sup>, Y. Kitagawa<sup>3)</sup>, K. Suda<sup>3)</sup>, T. Nishimura<sup>1)</sup>, Y. Ogawa<sup>1)</sup>, A. Kurihara<sup>1)</sup>, F. Saito<sup>1)</sup>, M. Shimizu<sup>1)</sup>, H. Koh<sup>1)</sup>, W. Yamada<sup>1)</sup>, M. Nakamura<sup>1)</sup>, S. Tasaka<sup>1)</sup>, N. Hasegawa<sup>1)</sup>, H. Yokota<sup>4)</sup>, A. Ishizaka<sup>1)</sup>

1) Department of Medicine,

2) Department of Emergency and Critical Care Medicine,

3) Division of general and gastrointestinal surgery, Keio University School of Medicine

4) Department of Veterinary Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University

【Background】 There have been many reports showing the increase in single or several lung cytokines of patients with ALI/ARDS. However, cytokines are composing complex networks by playing multiple unique or redundant roles, and it is not easy to clarify the pathophysiological roles just by measuring individual cytokine. Therefore, we preliminary determined a set of multiple cytokines by a novel technique in patients with ARDS. 【Methods】 Bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was obtained from normal volunteers (controls) and patients with ARDS, after obtaining informed consent. Diagnosis of ARDS was determined, following the American-European consensus conference. Totally 17 cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, G-CSF, MCP-1, MIP-1b, IL-7, IL-17) in the BAL fluid were measured by a Bio-plex<sup>®</sup> suspension array system. One way ANOVA was used for statistical analysis and significance was accepted at  $p < 0.05$ . 【Results】 We detected 16 cytokines, except GM-CSF, in ARDS patients and the levels were significantly higher than those in controls. 【Conclusion】 We could detect a significantly higher levels of 16 cytokines out of 17 in the BAL fluid of ARDS patients by a novel beads array method.

### 1. 序 文

急性肺損傷 (acute lung injury、ALI) / 急性呼吸促進症候群 (acute respiratory distress syndrome、ARDS) の本態は、肺微小血管透過性の亢進により発症する非心原

性肺水腫であるが、臨床診断には1994年のAmerican-European Consensus Conferenceによる簡便な定義が現在広く用いられており、それに伴ってALI/ARDS自身も広範かつ多様な病態を包括した概念へと変貌してきている<sup>1)</sup>。ALI/ARDSの病態解明も進み、発症にはTNF  $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8などの炎症性サイトカインが重要

慶応義塾大学医学部呼吸器内科<sup>1)</sup> 同救急医学<sup>2)</sup> 同一般消化器外科<sup>3)</sup>  
酪農学園大学 獣医生物化学教室<sup>4)</sup>

な役割を担っていることが明らかとなっている。しかしその他にも様々なサイトカインの関与が知られており、それらが複合的に病態に関与しているため、個別の測定では病態の全体像把握に限界があった。一方で近年、遺伝子発現や蛋白質の網羅的解析法が開発され、様々な分野において病態解析への応用がなされつつある。そこで今回我々は、ARDS患者における気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage: BAL) 液中サイトカインの網羅的解析を行うことで、その病態解析を試みたので報告する。

## 2. 対 象

健常ボランティア8名および診断確定を目的としてBALが施行されたARDS症例4名を対象とした。またARDSの診断はAmerican-European Consensus Conferenceによる定義に基づいて行った<sup>1)</sup>。

## 3. 方 法

健常ボランティア群、ARDS患者群、両群ともに気管支鏡下で通常の手技によりBALを施行し、BAL液を測定まで-80℃で凍結保存した。BAL液中の各種サイトカインをBio-plex<sup>®</sup> suspension array法により測定した。Bio-plex<sup>®</sup> suspension array法とは、蛍光ビーズを用いてラベルした検体をフローサイトメトリーの技術を利用して試料の解析を行う方法であり、微量の検体から多数の蛋白質を、同時に短時間に測定することが可能である。本システムを利用し、今回測定したサイトカインの種類はTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-2、IL-12、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、GM-CSF、G-CSF、MCP-1、MIP-1 $\beta$ 、IL-7、IL-17の17種類である。検出限界はいずれのサイトカインも1.0pg/ml以下であった。測定結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。統計解析は、one way ANOVA および Fisher PLSD により行い、 $p < 0.05$ をもって有意と判定した。

## 4. 結 果

健常群8人はすべて非喫煙男性であり(20歳~45歳)、ARDS患者は男性3人、女性1人(55歳~82歳)であった。原因疾患は4例とも肺炎であった。BAL施行時のARDS患者4名のP/F比(平均値 $\pm$ 標準誤差)は $108.6 \pm 14.1$ (範囲: 78.7~142.2)、Lung injury score (LIS)は $2.5 \pm 0.1$ (2.3~2.7)であった。またBAL液

の回収率は $39.5 \pm 9.3\%$ (28~60)、BAL液細胞分画中の好中球は $64.0 \pm 1.9\%$ (59.8~68.5%)であった。

検討した17種のサイトカインを5群に分けて、健常群と検討した。炎症性サイトカインについては、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8のいずれもARDS群において著明な高値を示した(図1)。

Th-1細胞関連サイトカインについて見ると、IL-2、IL-12、IFN- $\gamma$ いずれもARDS群において高値を示した(図2)。

一方、Th-2細胞関連サイトカインについても、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13のいずれも、ARDS群において有意に高値を示した(図3)。

次に、単球作用性サイトカインに関して比較すると、GM-CSFのみ他のサイトカインとは異なる挙動を示した(図4)。すなわち、GM-CSFがARDS群4人の全てにおいて測定感度以下であった。他のG-CSF、MCP-1、MIP-1 $\beta$ は、ARDS群において有意に高値を示した。最後に、上記の何れの群にも分類されないIL-7、IL-17についてであるが、両サイトカインとも、ARDS群において有意に高値を示していた(図5)。

以上をまとめると、健常群においては、IL-17を除く16種が検出され、一方ARDS群では、GM-CSFを除く16種が検出された。GM-CSFを除く16種のサイトカインが、健常群に比しARDS群で有意に高値を示した。

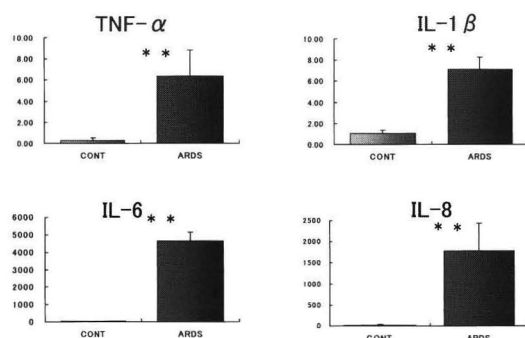


図1 BAL液中の炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8のいずれもARDS群において著明な高値を示した。単位はpg/ml、\*\*  $p < 0.01$

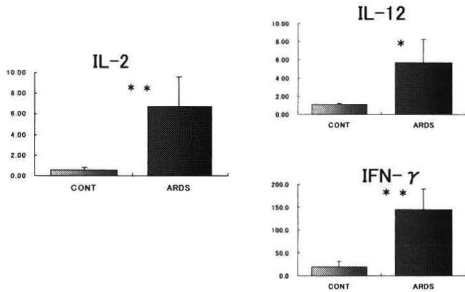


図2 BAL液中のTh-1細胞関連サイトカイン  
IL-2, IL-12, IFN-γいずれもARDS群において高値を示した。単位はpg/ml、\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$

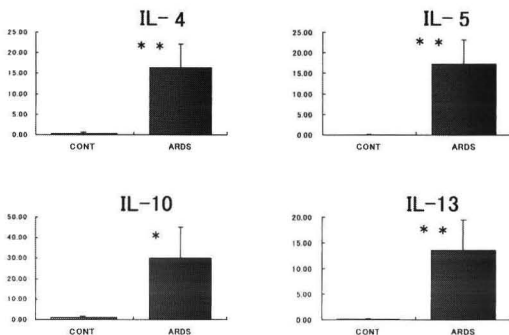


図3 BAL液中のTh-2細胞関連サイトカイン  
IL-4, IL-5, IL-10, IL-13のいずれも、ARDS群において高値を示した。  
単位はpg/ml、\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$

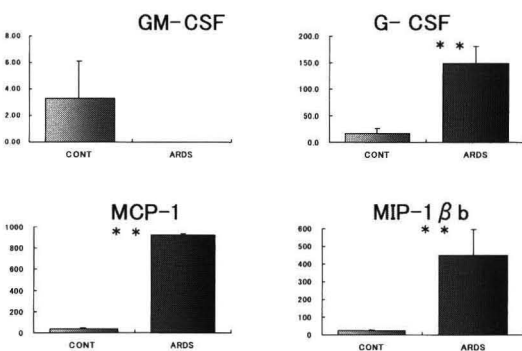


図4 BAL液中の単球作用性サイトカイン  
GM-CSFはARDS群で全て測定感度以下であった。G-CSF、MCP-1, MIP-1βは、ARDS群において有意に高値を示した。  
単位はpg/ml、\*\*  $p < 0.01$

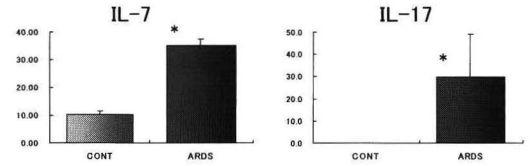


図5 BAL液中のIL-7, IL-17  
両サイトカインとも、ARDS群において有意に高値を示した。  
単位はpg/ml、\*  $p < 0.05$

## 5. 考 案

ALI/ARDSは広範かつ多様な病態を包括しており、原因疾患、関与因子は多岐にわたるが、病理学的には好中球を主体とした炎症細胞の肺腔内、肺壁への集積と種々の程度の肺組織傷害を呈し、肺微小血管透過性の亢進が主病態となる。これらの病態形成に大きく関わるのがサイトカインと理解されている。今回、ARDS患者および健康人のBAL液を採取し、そのサイトカインについて網羅的解析を行った。その結果、ARDS群においてGM-CSFを除く16種のサイトカインが有意差をもって高値を示した。ALI/ARDSにおける肺局所サイトカインが高値を示した機序として、肺泡マクロファージなどによる肺局所産生の亢進、及び血管透過性亢進に続発する血中からの移行と二つの可能性が考えられた。今回はBAL液のみの検討で血液の採取・測定は行っておらず、また測定した全てのサイトカインについて肺局所濃度の情報がこれまでに得られているわけではないため、一部のサイトカインが血中から移行した可能性を否定できない。しかし一般的にALI/ARDS病態下では過剰炎症が認められることから、今回特に高値を示したIL-6、IL-8、MCP-1に関しては肺泡マクロファージ、血管内皮細胞、肺胞上皮細胞などにより肺局所で過剰に産生された可能性が高いと考えた。また今回測定したBAL液中の好中球とサイトカイン濃度の間には有意な相関関係は認められなかった。この一因としてARDS患者の検体数が少なかったことが考えられ、今後症例数を増やし再検討を行う予定である。

サイトカインの中には、炎症反応を惹起するもの（炎症性サイトカイン）と、抑制するもの（抗炎症性サイトカイン）があり、通常の生理的、病理的環境下においては両サイトカインの産生が合目的的に制御されている。しかし過度の侵襲によって両者のバランス

が崩れる場合があり、炎症性サイトカインが過剰になることで引き起こされる状態が systemic inflammatory response syndrome(SIRS)、そして抗炎症性サイトカインが過剰になることで引き起こされる状態が compensatory anti-inflammatory response conference(CARS) と呼ばれている。炎症性サイトカインには IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 などが含まれ、抗炎症性サイトカインには TGF- $\beta$ 、IL-4、IL-10 などが含まれる。これらの中で今回測定したものは IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、IL-4、IL-10 であるが、そのいずれも健常者検体に比べて有意に高値を示した。ARDS 患者の BAL 液で、これらのサイトカインが高値を示すことはこれまでに報告されており (IL-1 $\beta$ <sup>2,3)</sup>、TNF- $\alpha$ <sup>3,4)</sup>、IL-6<sup>3)</sup>、IL-8<sup>3,5)</sup>、IL-4<sup>3)</sup>、IL-10<sup>6)</sup>、今回の我々の結果からも、ARDS 病態下において炎症性、抗炎症性サイトカインのいずれもが産生亢進していることが確認された。

炎症性/抗炎症性サイトカインバランスの評価指標としては、TNF- $\alpha$ /IL-10 比などが試用されており<sup>7,8)</sup>、今回の検討で同比を求めると、ARDS 群 0.018 $\pm$ 0.002、健常群 0.00 $\pm$ 0.00 と、ARDS 群で高い傾向を示しており、過剰炎症に傾いた病態であることが想像された。しかし TNF- $\alpha$ /IL-10 比は、標準的指標とまでは言い難く、また他の多くの炎症性、抗炎症性サイトカインを考慮していないため、その正確性は不明である。また今回は、BAL 液の採取が一回のみであることから、経時的变化を観察することができなかった。

次に、ヘルパー T 細胞は、そのサイトカイン産生パターンから Th-1 細胞と Th-2 細胞に二分され、Th-1 細胞は IL-2、IL-12、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$  を産生することにより、細胞傷害性 T 細胞、マクロファージを活性化する。今回測定した Th-1 サイトカインは IL-2、IL-12、IFN- $\gamma$  であり、これらすべてが ARDS 群において高値を示した。IL-2 は ARDS 発症早期、中でも sepsis に伴う ARDS において上昇するとされており<sup>9)</sup>、今回の結果とも合致した。IFN- $\gamma$  は高濃度酸素曝露下における肺損傷において重要な役割を果たしていることが示されており<sup>10)</sup>、また ARDS との関与も示されているが<sup>11)</sup>、ARDS 患者の BAL 液中 IFN- $\gamma$  についての報告はない。ARDS 患者の BAL 液好中球はアポトーシス抵抗性であり<sup>6)</sup>、その原因としてリポ多糖 (lipopolysaccharide)<sup>12,15)</sup>、補体 C5a<sup>12)</sup>、GM-CSF<sup>12,16)</sup>、G-CSF<sup>13,15,16)</sup>、IFN<sup>13,16)</sup>、IL-2<sup>17)</sup>、IL-6<sup>18,19)</sup> などの炎症性メディエーターが好中球のアポトーシス

を阻害することが知られている。従って今回高値を示した IL-2 と IFN- $\gamma$  が、好中球アポトーシスを阻害することで ARDS の発症や病態の遷延化に関与していた可能性も考えられた。同じく ARDS 患者 BAL 液の IL-12 に関する報告も認めないが、IL-12 は IFN- $\gamma$  産生を誘導し、細胞性免疫を賦活化することで炎症を遷延化させている可能性があった。

一方、Th-2 細胞は IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-13 などを産生し、これらは抗炎症性作用をもつものが多い。IL-4 は sepsis 誘発 ARDS の早期において高値を示すとの報告があり<sup>3)</sup>、IL-13 については VEGF の産生を誘導し、ARDS に保護的に作用している可能性が示唆されている<sup>20)</sup>。IL-5 については ARDS と関連を示す文献は認められなかった。今回の検討で、IL-4、IL-10、IL-13 などが高値を示していたことより、ARDS 病態下で Th2 細胞の活性化も示唆された。

Th-1/Th-2 バランスの指標として INF- $\gamma$ /IL-4 比が用いられることがある。今回は健常群において IL-4 の濃度が測定感度以下のものが多いため当てはめることができなかった。そこで IL4/IFN- $\gamma$  比を測定した場合、ARDS 群 0.093 $\pm$ 0.033、健常群 0.003 $\pm$ 0.003 と、ARDS 群で高い傾向を認め、Th-2 細胞の活性化が示唆された。しかし、炎症性/抗炎症性バランスと同様、本比は標準的ではなく、今後より多数のサイトカインを考慮した指標が必要と考えられた。

次に、単球作用性のサイトカインとしては、今回 GM-CSF、G-CSF、MCP-1、MIP-1 $\beta$  を測定し、GM-CSF を除くすべてが健常群と比べて有意に高値を示した。ALI/ARDS 患者の BAL 液において GM-CSF が検出されなかったことから、GM-CSF が ALI/ARDS の病態にあまり関与していない可能性があった。同可能性を示唆する他の根拠として、GM-CSF が好中球以外に好酸球に対してもコロニー刺激作用や抗アポトーシス作用を発揮するにもかかわらず<sup>21)</sup>、ALI/ARDS 患者の BAL 液の分画で好酸球の上昇が見られないことが挙げられる。一方、重症敗血症例に対する GM-CSF 療法により、肺酸素化能の改善を認めていることから<sup>22)</sup>、GM-CSF 低値が ALI/ARDS 病態の発症・増悪に関連している可能性も考えられた。その他、健常人では GM-CSF 濃度が極めて高値を示した一人を除けば最高値が 1.53pg/ml と、他のサイトカインに比べて極端に低く、GM-CSF の血中から肺腔への移行率が低い可能性も

考えられた。

CC ケモカインに属する MCP-1 や MIP も、ARDS 病態への関与が報告されている<sup>23)</sup>。MIP-1  $\beta$  は MCP-1 と比べて、より血管透過性を亢進させる点で ARDS の発症に強く関与していると報告される一方で<sup>23)</sup>、MCP-1 は ARDS 患者 BAL 液中で高値を示し、その値と呼吸不全の重症度との間に相関関係があると報告されている<sup>24)</sup>。今回 MCP-1、MIP-1  $\beta$  を測定した結果、いずれも ARDS 群において高値を示しており、上述した以前の報告結果を裏付けるものであった。

最後に IL-7、IL-17 に関しては、今回の検討で他のサイトカインと同様 ARDS 群で高値を認めたが、ARDS 病態への関与を示すこれまでの報告は見あたらなかった。しかし IL-7 は末梢 T 細胞の数的平衡調節機構の中心的役割を果たし<sup>25)</sup>、また IL-17 は気管支喘息などにおいて、気道炎症を惹起するなどの重要な役割を果たしていること<sup>26)</sup> から、両サイトカインの ARDS 病態への関与が疑われ、今後の検討が必要と思われた。

## 6. 結 語

今回、我々は preliminary な検討として、Bio-plex<sup>®</sup> suspension array 法を用いて ARDS 患者および健康者における BAL 液中のサイトカインを測定し、GM-CSF を除くサイトカインが ARDS 群で高値をとることを示した。同法による網羅的解析は、呼吸器疾患の病態解明に極めて有用であり、今後同法を臨床検体、動物実験に応用し、ALI/ARDS のより詳細な病態解明を行う予定である。

## 参考文献

- 1) Bernard, G.R., A. Artigas, K.L. Brigham, et al: The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med.* 149(3 Pt 1):818-824, 1994
- 2) Siler, T.M., J.E. Swierkosz, T.M. Hyers, et al: Immuno-reactive interleukin-1 in bronchoalveolar lavage fluid of high-risk patients and patients with the adult respiratory distress syndrome. *Exp Lung Res.* 15(6):881-894, 1989
- 3) Meduri, G.U., G. Kohler, S. Headley, et al: Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest.* 108(5):1303-1314, 1995
- 4) Millar, A.B., N.M. Foley, M. Singer, et al: Tumour necrosis factor in bronchopulmonary secretions of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet.* 2(8665): 712-714, 1989
- 5) Jorens, P.G., J. Van Damme, W. De Backer, et al: Interleukin 8 (IL-8) in the bronchoalveolar lavage fluid from patients with the adult respiratory distress syndrome (ARDS) and patients at risk for ARDS. *Cytokine.* 4(6): 592-597, 1992
- 6) Matute-Bello, G., W.C. Liles, F. Radella, 2nd, et al: Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 156(6):1969-1977, 1997
- 7) Armstrong, L. and A.B. Millar: Relative production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome. *Thorax.* 52(5):442-446, 1997
- 8) Park, W.Y., R.B. Goodman, K.P. Steinberg, et al: Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 164(10 Pt1):1896-1903, 2001
- 9) Lesur, O., A. Kokis, C. Hermans, et al: Interleukin-2 involvement in early acute respiratory distress syndrome: relationship with polymorphonuclear neutrophil apoptosis and patient survival. *Crit Care Med.* 28(12):3814-3822, 2000
- 10) Yamada, M., H. Kubo, S. Kobayashi, et al: Interferon- gamma: a key contributor to hyperoxia-induced lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 287(5):L1042-1047, 2004
- 11) Jacobs, R.F., D.R. Tabor, A.W. Burks, et al: Elevated interleukin-1 release by human alveolar macrophages during the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 140(6):1686-1692, 1989
- 12) Lee, A., M.K. Whyte, and C. Haslett: Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol.* 54(4):283-288, 1993
- 13) Colotta, F., F. Re, N. Polentarutti, et al: Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood.* 80(8):2012-2020, 1992
- 14) Hachiya, O., Y. Takeda, H. Miyata, et al: Inhibition by bacterial lipopolysaccharide of spontaneous and TNF-alpha-

- induced human neutrophil apoptosis in vitro. *Microbiol Immunol.* 39(9):715-723, 1995
- 15) Yamamoto, C., S. Yoshida, H. Taniguchi, et al: Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestion by guinea pig macrophages. *Infect Immun.* 61(5):1972-1979, 1993
- 16) Liles, W.C., P.A. Kiener, J.A. Ledbetter, et al: Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J Exp Med.* 184(2):429-440, 1996
- 17) Pericle, F., J.H. Liu, J.I. Diaz, et al: Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. *Eur J Immunol.* 24(2):440-444, 1994
- 18) Biffl, W.L., E.E. Moore, F.A. Moore, et al: Interleukin-6 suppression of neutrophil apoptosis is neutrophil concentration dependent. *J Leukoc Biol.* 58(5):582-584, 1995
- 19) Biffl, W.L., E.E. Moore, F.A. Moore, et al: Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis. *Arch Surg.* 131(1):24-29; discussion 29-30, 1996
- 20) Come, J., G. Chupp, C.G. Lee, et al: IL-13 stimulates vascular endothelial cell growth factor and protects against hyperoxic acute lung injury. *J Clin Invest.* 106(6):783-791, 2000
- 21) Lopez, A.F., D.J. Williamson, J.R. Gamble, et al: Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression, and survival. *J Clin Invest.* 78(5):1220-1228, 1986
- 22) Presneill, J.J., T. Harris, A.G. Stewart, et al: A randomized phase II trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy in severe sepsis with respiratory dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med.* 166(2):138-143, 2002
- 23) Bless, N.M., M. Huber-Lang, R.F. Guo, et al: Role of CC chemokines (macrophage inflammatory protein-1 beta, monocyte chemoattractant protein-1, RANTES) in acute lung injury in rats. *J Immunol.* 164(5):2650-2659, 2000
- 24) Rosseau, S., P. Hammerl, U. Maus, et al: Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279(1):L25-35, 2000
- 25) Fry, T.J., E. Connick, J. Falloon, et al: A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood.* 97(10):2983-2990, 2001
- 26) Linden, A. and M. Adachi: Neutrophilic airway inflammation and IL-17. *Allergy.* 57(9):769-775, 2002
-