



Title	外傷後敗血症病態に關与する好中球フェノタイプの研究
Author(s)	水柿, 明日美
Description	配架番号 : 2810
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15650号
Issue Date	2023-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15650
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90975
Type	doctoral thesis
File Information	MIZUGAKI_Asumi.pdf



学 位 論 文

外傷後敗血症病態に関与する好中球フェノタイプの研究
(Neutrophil phenotypes implicated in the pathophysiology of
post-traumatic sepsis)

2023年9月

北 海 道 大 学

水 柿 明 日 美

学 位 論 文

外傷後敗血症病態に關与する好中球フェノタイプの研究
(Neutrophil phenotypes implicated in the pathophysiology of
post-traumatic sepsis)

2023年9月

北 海 道 大 学

水 柿 明 日 美

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	4 頁
緒言	6 頁
方法	9 頁
結果	21 頁
考察	36 頁
結論	39 頁
謝辞	41 頁
利益相反	41 頁
引用文献	42 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Asumi Mizugaki, Takeshi Wada, Takumi Tsuchida, Yoshitaka Oda, Katsuhide Kayano, Kazuma Yamakawa, Shinya Tanaka
Neutrophil phenotypes implicated in the pathophysiology of post-traumatic sepsis, *Frontiers in medicine* 9. 982399, (2022)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 水柿明日美, 和田剛志, 土田拓見, 小田義崇, 茅野勝英, 山川一馬, 田中伸哉
外傷後二次性敗血症病態における好中球フェノタイプが関与する免疫応答の研究
第36回日本外傷学会総会・学術学会, 2022年6月30日・大阪国際会議場

要旨

【背景と目的】重症外傷による死亡は、受傷後からの時期によって3つに分けることができる。すなわち、治療介入の余地がない超急性期の死と、医学・医療の進歩によって死亡率が改善してきた急性期の死、そして現時点では支持的療法が中心で根本的治療方法が確立されていない亜急性期～慢性期の死である。救命率の比較的低い外傷急性期を乗り越えたにもかかわらずその後の亜急性期～慢性期に命を落とす原因としては、手術侵襲や二次性に発症する感染症・敗血症による臓器不全が考えられているが、その機序としては免疫恒常性の破綻が知られている。好中球は、自然免疫の中核を担い、感染症の最前線で病原体を排除する役割を持つことで広く知られてきた。しかし近年、炎症性好中球だけではなく、抗炎症作用を持つ好中球など様々な機能を有する好中球フェノタイプの存在が指摘されている。腫瘍性疾患や自己免疫性疾患、アレルギー性疾患を中心としてさまざまな病態に好中球フェノタイプが関与している可能性が示唆されている。外傷後敗血症病態にも好中球フェノタイプの偏在が関与していることが報告されているが、その全容は依然として明らかにされていない。外傷後敗血症病態における好中球フェノタイプの関与を明らかにし予後と関連する因子について検討する目的で本研究を行った。本研究では外傷後敗血症モデルマウスを用い、生存率や腹水生菌数の検討、病理組織学的解析を行った。さらに、同モデルマウスの血液および腹水中サイトカイン測定や好中球フェノタイプの解明を目的としたマスサイトメトリーによる免疫学的解析を行った。

【材料と方法】週齢7-8の雄のICRマウスを用いて外傷後敗血症マウスモデルを作製した。外傷として25%3度熱傷もしくはコントロールとしてShamを施し、受傷24時間後に盲腸結紮穿孔(cecal ligation and puncture: CLP)を行うことによって敗血症を引き起こし、熱傷を施したBurn/CLPモデルと、Shamを施したSham/CLPモデルを作製した。CLP後14日間生存率、CLP翌日の腹水生菌数、CLP翌日の脾臓、肝臓、腎臓、肺組織の病理組織学的所見を両群間で比較した。さらに両群の血清および腹水のサイトカイン測定と、血液中および腹水中の好中球、単球・マクロファージに的を絞ったマスサイトメトリーによって免疫学的解析を行った。

【結果】Burn/CLP群はSham/CLP群と比較し有意に生存率が低かった。腹水生菌数測定においてはBurn/CLP群とSham/CLP群の間に有意な差を見出すことができなかったが、病理組織学的検査ではSham/CLP群と比較してBurn/CLP群では脾臓組織中のマクロファージが少なく、肝臓、腎臓、肺の組織ではBurn/CLP群でSham/CLP群よりも進行した臓器障害が見られた。Burn/CLP群では、血清中のtransforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1)のレベルがSham/CLP群と比し

て高く、その他のサイトカインレベルは血清、腹水中ともに概して Burn/CLP 群で低下していた。血液、腹水それぞれについて行ったマスサイトメトリーでは、clusters of differentiation (CD) 11b と CD172a が血液、腹水中の好中球、単球・マクロファージいずれにおいても Burn/CLP 群で高い傾向にあり、sialic acid-binding Ig-like lectin-F (Siglec-F) 陽性好中球が Burn/CLP 群の腹水中で多く見られた。また、腹水中の CD68 陽性好中球群が Burn/CLP 群で著減していた。

【考察】本研究では、外傷後敗血症病態における好中球フェノタイプの関与を検討した。細胞死や細胞分化に関与しサイトカイン放出を抑制する働きも持つとされる TGF- β 1 が、Sham/CLP 群と比して Burn/CLP 群の血清中から高く検出されたが、これによって Burn/CLP 群では炎症性サイトカイン・抗炎症性サイトカインいずれの放出も抑制された可能性が考えられた。マスサイトメトリーでは、好中球の接着や遊走に関与するとされる CD11b と貪食細胞の貪食能に関与するとされる CD172a が、血液および腹水中の好中球、単球・マクロファージいずれにおいても Burn/CLP 群で高く発現する傾向にあり、炎症組織での組織修復に関与している可能性のある Siglec-F 陽性好中球が Burn/CLP 群の腹水中で多く見られた。これらの好中球フェノタイプの局在が Burn/CLP 群の免疫抑制状態に関与している可能性があるが、本研究では因果関係の証明には至っていない。また、Sham/CLP 群で認められた CD68 高発現好中球が Burn/CLP 群では欠損していることがわかった。CD68 高発現好中球は炎症性腸疾患患者の腸管組織から検出されたという報告はあるがその存在意義は明らかにされておらず、外傷後敗血症病態における CD68 高発現好中球の役割についても明らかにすることはできなかった。腹水生菌数は Burn/CLP 群と Sham/CLP 群で違いが指摘できなかったが、病理組織学的解析からは Burn/CLP 群において脾臓のマクロファージの減少が反映する免疫応答の抑制と肝臓・腎臓・肺の臓器虚血の進行が示された。マスサイトメトリーの結果 Burn/CLP 群において見られた好中球フェノタイプの偏在は血液中の TGF- β 1 をはじめとするサイトカインによって引き起こされ、免疫恒常性の破綻を招き、病理組織学的検査によって得られた臓器障害や生存率の低下に関与している可能性が考えられた。腹水生菌数に Burn/CLP 群と Sham/CLP 群の間で有意差がなかったことについては、腹水採取の時期などが原因として考えられた。

【結論】 Burn/CLP 群と Sham/CLP 群において、血清中 TGF- β 1 レベルの違いといくつかの好中球フェノタイプの偏在を認めた。これらの結果が、生存率の低下や病理組織学的検査で認められた臓器障害の進行など、Sham/CLP 群と比較した際の Burn/CLP 群の悪い予後に寄与している可能性が考えられた。ノックアウトマウスや抗体を用いたさらなる検討により、両群で違いが見られた因子が予後に寄与していることを証明することが今後の課題である。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome
CCR2	C-C chemokine receptor type 2
CD	clusters of differentiation
CLP	cecal ligation and puncture
CT	computed tomography
CX3CR1	C-X-3C chemokine receptor 1
CyTOF	cytometry by time-of-flight
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FCS	foetal calf serum
FlowSOM	Flow self-organizing map
FoxP3	forkhead box P3
FSI	fecal suspension intraperitoneal injection
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
H&E	hematoxylin and eosin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
ICR	Institute of Cancer Research
IFN γ	interferon-gamma
ILT3	immunoglobulin-like transcript 3
JATEC	Japan advanced trauma evaluation and care
JETEC	Japan expert trauma evaluation and care
JPTEC	Japan prehospital trauma evaluation and care
Ly6	lymphocyte antigen 6
MC	metacluster
MSR	macrophage scavenger receptor
NETs	neutrophil extracellular traps
NKG2D	natural killer group 2D
opt-SNE	optimized parameters for T-distributed stochastic neighbor embedding
PD-1	programmed cell death-1
PD-L1	programmed cell death-ligand 1
ROR γ T	retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t
Sca-1	stem cell antigen-1
Siglec-F	sialic acid-binding Ig-like lectin F

SIRP α	signal-regulatory protein alpha
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SR-AI	scavenger receptors AI
T-bet	T-box expressed in T cells
TCR $\gamma\delta$	T cell receptor gamma delta
TGF- β 1	transforming growth factor-beta 1
TLR	Toll-like receptor
VEGF_R1	vascular endothelial growth factor receptor 1

緒言

救急医が対応すべき代表的疾病の一つに重症外傷がある。外傷は世界的に見ても若年者の死因の上位に挙げられ (Centers of Disease Control and Prevention, 2021)、日本国内でも小児から 30 代までの死因上位に「不慮の事故」が挙がり、これには外傷が含まれる (Ministry of Health, Labour and Welfare, 2009)。外傷による死亡は社会的にも大きな損失であり、医学・医療の発展によってその救命率の向上が期待されてきた。輸血療法や外科的止血療法、血管内治療の普及、computed tomography (CT) スキャンや超音波検査診断装置などの導入は、外傷急性期の治療成績の改善に貢献してきたと言える。日本では 2002 年に外傷初期診療ガイドラインが作成され、“防ぎ得た外傷死”を減らすことを目標として、Japan prehospital trauma evaluation and care (JPTEC) コース・Japan advanced trauma evaluation and care (JATEC) コース・Japan expert trauma evaluation and care (JETEC) コースなどの off the job training の普及活動により外傷初期診療システムの構築が進められ、定期的に時代に沿った改良が重ねられている。

外傷による死亡は、その時期によって大きく 3 つに分けることができる：①超急性期死亡 (受傷後 0～1 時間)、②急性期死亡 (受傷後数時間～24 時間前後)、③亜急性期～慢性期死亡 (数日～数週間以降)。大血管損傷や高度脳損傷などによってほぼ即死状態となる超急性期の死亡は、ほとんどの場合で医療の介入の余地がないが、病院前・病院到着後に介入の可能性が残るいわゆる外傷急性期の死亡は、上記のような医療の発展により大幅に減少した (Jaunoo and Harji, 2009; Roberts et al, 2013; CRASH-3 trial collaborators, 2019)。しかし、命を落とす危険の高い外傷急性期を乗り越えた患者の中には、外傷後亜急性期～慢性期の時期に再び命の危機に直面し、実際に命を落とす者がいる (Guo et al, 2003; Shelley et al, 2003)。外傷亜急性期～慢性期の死亡原因の多くは手術侵襲や二次性感染症による臓器障害であると考えられているが、それらに対する治療は支持的療法がほとんどで根本的な治療方法が確立されていないのが現状である。

外傷後には自然免疫系による炎症反応とそれを代償する形で起こる獲得免疫系の抗炎症反応が起こるが、それらの不均衡が生じたときに、全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) あるいは代償性抗炎症反応症候群 (compensatory anti-inflammatory response syndrome: CARS) を来とし、ひいてはサイトカインストームや敗血症などによる臓器障害を引き起こすと考えられている (Shelley et al, 2003; Stoeklein et al, 2012)。この臓器障害を引き起こす「免疫恒常性の破綻」に介入することで外傷亜急性期～慢性期の患者予後

の改善につながる可能性があると考える。

自然免疫系は、主に好中球と単球・マクロファージなどが感染の初期段階で病原体の侵入を阻止し排除したりその後の獲得免疫を誘導したりするなど重要な役割を担っているが (Leliefeld et al, 2016; Park et al 2020; Janicova and Relja, 2021)、近年、好中球には機能が異なるいくつかのフェノタイプがあり、向炎症性のもものだけでなく抗炎症性の好中球も存在し、そのバランスが免疫恒常性の維持に大きな役割を果たしていることが知られるようになってきた (Tsuda et al, 2004; Silvestre-Roig, 2016; Silvestre-Roig et al, 2019; Yang et al, 2019)。抗炎症性の好中球は特に、CARS やそれに引き続いて起こる二次性感染症に関与していると考えられている (Janicova and Relja, 2021; Silvestre-Roig et al, 2016)。Th1/Th2 型サイトカインによって活性化される炎症性/抗炎症性マクロファージ (M1/M2) と同様に、好中球もサイトカインの誘導によって炎症性/抗炎症性好中球 (N1/N2) に極分化することがわかってきた (Fridlender et al, 2009)。悪性腫瘍領域では、細胞死や細胞分化に関与することが知られる transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) のシグナルを阻害することで、N1 好中球が増加することが示された (Fridlender et al, 2009)。また、循環器領域における Puhl らの研究では、N1 および N2 好中球のバランスが、心筋梗塞後の心筋の炎症における心室リモデリング過程に関与している可能性が示唆されている (Puhl and Steffens, 2019)。さらに、中枢神経領域における研究では、Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) 4 の欠損によって N2 好中球の割合が増え、脳卒中後の脳組織損傷修復に寄与することが示されている (Garcia-Culebras et al, 2019)。

外傷後の免疫不全については、様々な観点からすでに研究が進んでおり (O'Sullivan et al, 1995; Guo et al, 2003; Shelley et al, 2003; Ni Choileain et al, 2006; Hanschen et al, 2011; Stoecklein et al, 2012; Wanke-Jellinek et al, 2016; Seshadri et al, 2017; Yamakawa et al, 2021)、外傷後の免疫抑制状態に関わる好中球フェノタイプについての既報も散見されている。外傷症例の好中球の CD11b 高発現は予後不良に関連していることが示唆され (Botha et al, 1997)、外傷後の好中球の細胞マーカーの発現の違いが、好中球の生存期間や neutrophil extracellular traps (NETs) 形成、活性酸素産生などの能力に反映されている可能性も示唆されている (Hazeldine et al, 2014; Leliefeld et al, 2016; Mortaz et al, 2019)。しかし、いずれの報告も外傷後敗血症の病態形成における好中球の関与を明らかにするまでには至らず、外傷後敗血症病態への治療介入につなげるためにはさらなる研究の蓄積が必要である。

本研究では、外傷後敗血症病態への好中球の関与を調べるために、すでに多くの外傷後免疫不全の研究 (O'Sullivan et al, 1995; Guo et al, 2003; Shelley et al, 2003; Ni Choileain et al, 2006; Hanschen et al, 2011; Wanke-Jellinek et al, 2016;

Yamakawa et al, 2021) で使用されている熱傷モデルを外傷モデルとして研究を行った。熱傷モデルは、循環血液減少と組織損傷を引き起こし、また、特定の免疫反応を引き起こす頭部外傷 (Yang et al, 2014; Hsieh et al, 2016) を回避できるという利点がある。さらに、3 度熱傷であるがため他の外傷モデルとは異なり受傷後の痛みがなく、動物愛護の観点からも好ましいと言える。敗血症モデルには、標準的に使用されている盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture: CLP) モデルを採用した。外傷モデルと敗血症モデルを組み合わせることで外傷後敗血症モデルを作製し、生存率評価や腹水生菌数測定、組織学的検査、血清および腹水中のサイトカイン測定、マスサイトメトリー (cytometry by time-of-flight: CyTOF) を用いた免疫学的評価を行った。サイトカイン測定には、LUMINEX®100/200™システム (ルミネックス・ジャパン株式会社、東京都港区) を採用した。LUMINEX®は、ターゲットタンパク質に特異的に結合する抗体と結合した LUMINEX®ビーズを液相でターゲット抗原に反応させ測定を行うことで、わずか 25-50 μ l の検体量で最大 80 項目のサイトカインを同時検出する多項目同時測定プロファイリング技術である。CyTOF は金属同位体標識抗体を用いて細胞内外のタンパク質を検出する多次元サイトメトリー技術であり、蛍光標識抗体を用いる従来のフローサイトメトリーで問題となる色素の漏れ込みによる評価精度の低下が解決されていることから、40 種を超える抗体を同一細胞で同時に評価することが可能である。従来検出が困難であった希少な細胞集団の同定や細胞内外のタンパク質の解析が可能となるメリットがあり、研究室の先行研究ですでに使用経験もあったことから、大学内外の協力を得てこれらの技術を用い、外傷後敗血症患者の予後に影響を与えうる好中球フェノタイプについて検討した。

方法

1. 本研究の概要

本研究では day0 に外傷を施し、その 24 時間後 (day1) に敗血症を誘導することで外傷後敗血症マウスモデルを作製し、検体採取、各種解析を施行した (図 1)。

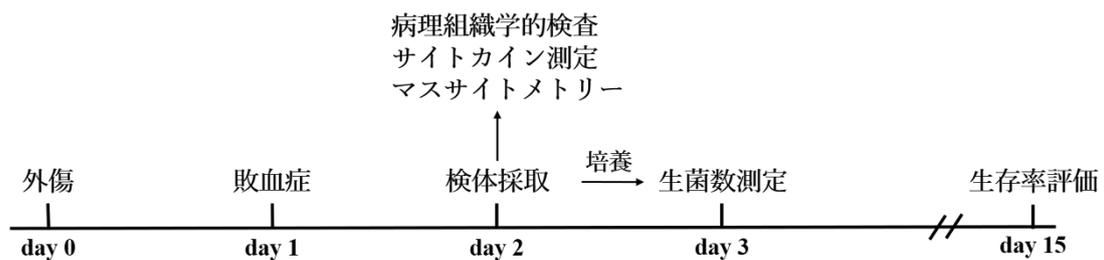


図 1. 外傷後敗血症モデル作製と評価項目の概要

2. 外傷後敗血症マウスモデルの作製

2.1. 実験動物

本研究に用いた実験動物は株式会社三協ラボサービス (東京都江戸川区) から購入した週齢 7~8・雄の Institute of Cancer Research (ICR) マウスである。マウスは適切な温度 (22~26°C) と湿度 (0~20%) に維持され、6 時から 18 時までを照明時間として 12 時間ごとに自動で明暗が切り替わるように設定された環境で飼育された。マウスケージの底はペーパーマット (Paperclean®、日本エスエルシー株式会社、静岡県浜松市) を敷き、数日ごとにケージは洗浄して交換し衛生状態を維持するように配慮した。マウスには実験動物用飼料 (固形飼料ラボ MR ストック®、日本農産工業株式会社、神奈川県横浜市) および水を自由に摂取させた。

2.2. 外傷モデルについて

外傷モデル作製にあたり、外傷の種類としては研究室の先行研究ですでに経験がありこれまでも多く報告されている熱傷モデルを採用した。モデルは、既報 (O'Sullivan et al, 1995; Ni Choileain et al 2006; Hanschen et al, 2011; Abdullahi et al, 2014; Wanke-Jellinek et al, 2016) を参考に次に示すように作製した。

まず、ケタミン 125 mg/kg・キシラジン 20 mg/kg の腹腔内投与によってマウスに麻酔を施し、鎮痛のためにブプレノルフィン 0.05 mg/kg を皮下投与した。背部を剃毛した後、体表面積の約 25%が露出するように設計された 50 ml シリンジ型 (図 2) に、露出部が背部となるようにマウスを収納しスポンジで固定

した。この際、背部と型に隙間が生まれないように確実にかつ愛護的に固定するように注意した。予め 90°C に設定しておいた恒温水槽に露出した背部を 9 秒間浸した。9 秒間浸した後は、熱傷範囲が広がることを防ぐために外表の熱湯を良くふき取った上で速やかに固定を外し、0.9%生理食塩水 1 ml の皮下投与によって蘇生し、覚醒が得られるまで伏臥位にしてケージに安置した。覚醒するまでの間の低体温を防ぐためにあらかじめ温めておいた KN-475 ヒーターマット（夏目製作所、東京都文京区）をケージの下に敷き保温に努めた。この手技（図 3）により 25%3 度熱傷モデルが作製された。作製された熱傷は、神経の深さまで損傷され痛みを感じることがない 3 度熱傷であるため、受傷後の定期的な鎮痛薬の投与は行っていない。Sham モデル作製の際には、恒温水槽を 24°C に設定したが、その他は熱傷モデル同様に作製した。既報（O'Sullivan et al, 1995; Ni Choileain et al 2006; Hanschen et al, 2011; Abdullahi et al, 2014; Wanke-Jellinek et al, 2016）ではこの工程で作成された 25%3 度熱傷マウスモデルの生存率は 95%以上であったが、当研究室の予備実験では、15 匹のマウスモデルで行った検討で生存率は 100%であった（図 4）。



図 2. Institute of Cancer Research マウス用の 25%熱傷作製プラスチック型

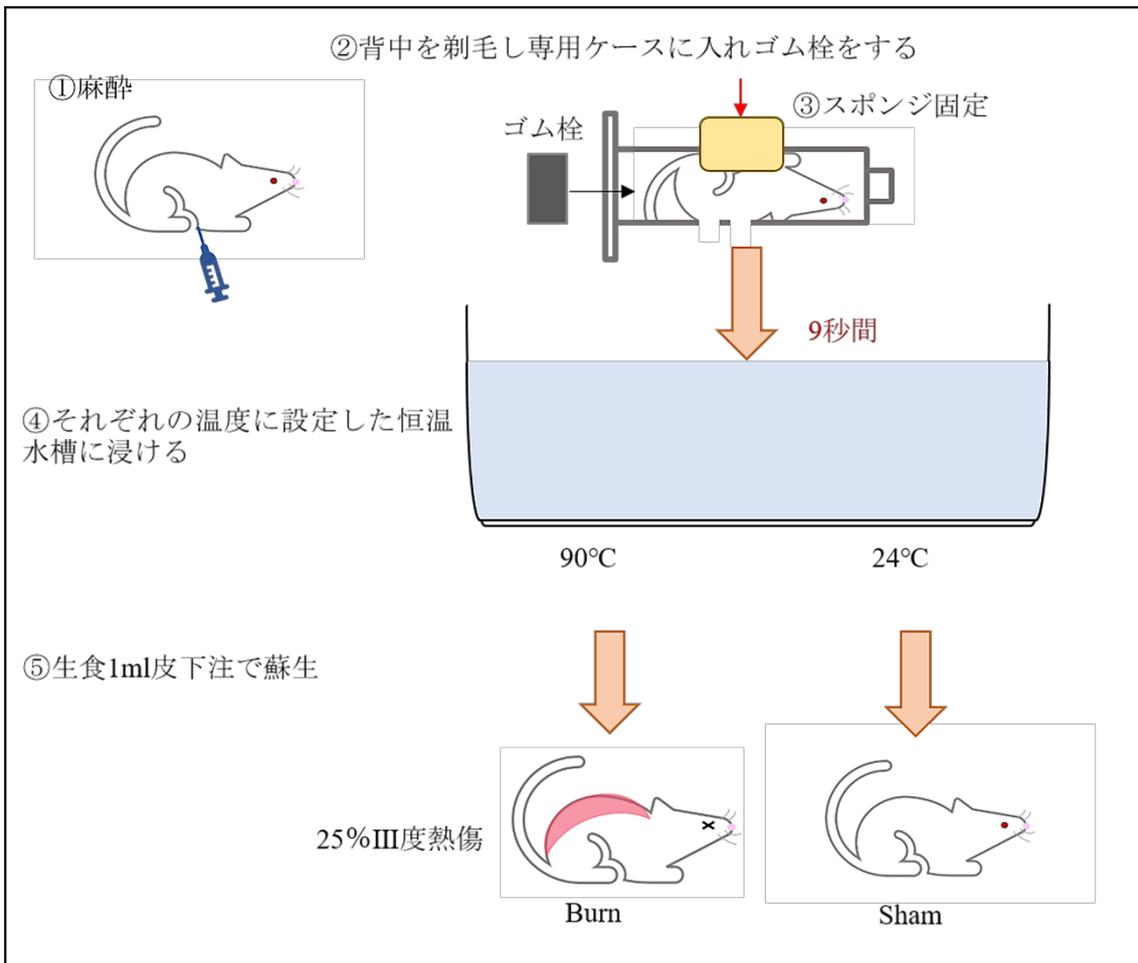


図 3. 25%III度熱傷マウスモデル作製手順

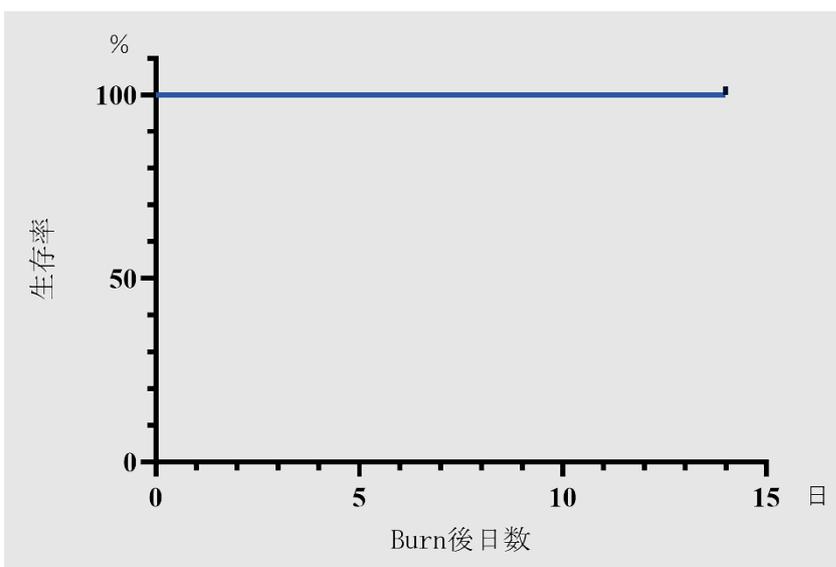


図 4. 25%III度熱傷マウスモデルの14日間生存率

2.3. 敗血症モデルについて

敗血症モデルには、CLP モデルを採用した。CLP モデルマウスの作製は、既報 (Wichterman et al, 1980; Hubbard et al, 2005; Rittirsch et al, 2009) を参考に行った。CLP は、敗血症モデルを作製するにあたって代表的な手法であるが、術者の手技の熟練度やマウスの個体差、結紮位置や穿刺針の太さなど様々な要因により結果にバラつきが出るのが指摘される。当研究室では、3 人の術者の手技の統一を図り安定させた上で、本研究に適切な生存率を生み出すモデルを探った。予備実験 (図 5) においてヒトの敗血症生存率 65-80% (Angus and van der Poll, 2013; Vincent et al, 2014; Cecconi et al, 2018) とほぼ同等の生存率を得た「50%結紮 2 回穿刺」CLP モデルを採用し本研究に用いることとした。

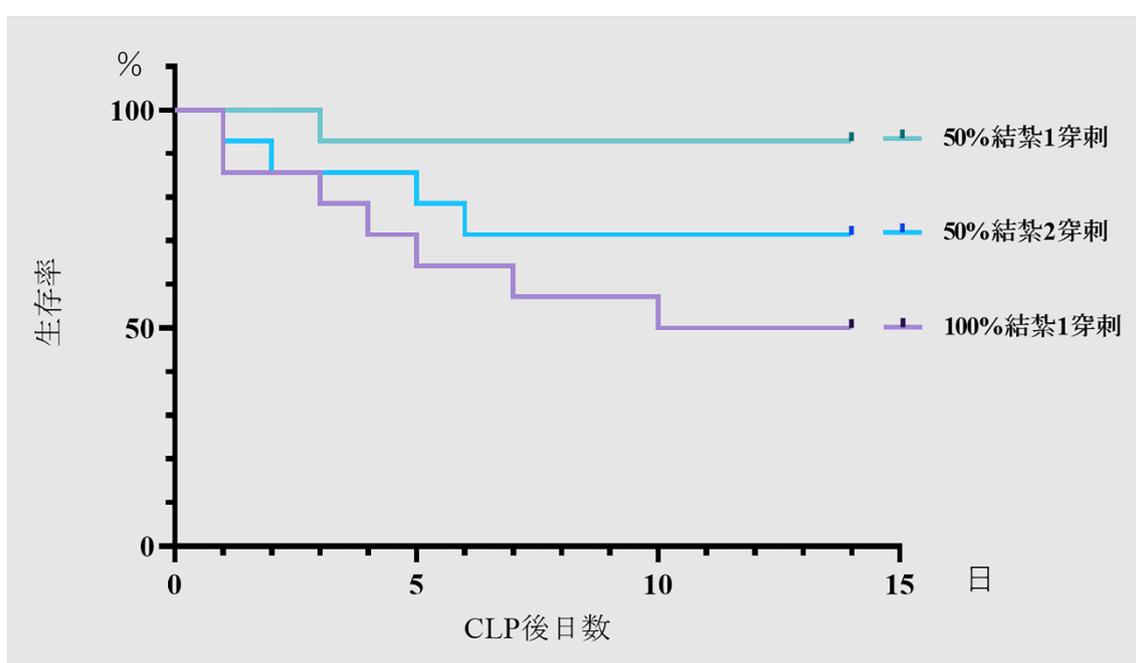


図 5. 結紮位置と穿刺回数による CLP マウスモデルの生存率の検討
CLP; cecal ligation and puncture.

当研究で用いた「50%結紮 2 回穿刺」CLP モデルの具体的作製方法を次に示す。ケタミン 125 mg/kg・キシラジン 20 mg/kg の腹腔内投与によってマウスに麻酔を施し、鎮痛のためにブプレノルフィン 0.05 mg/kg を皮下投与した。CLP 手技だけではなく翌日の検体摘出のために腹部を広範囲に注意深く剃毛し、腹部正中縦 1 cm の皮膚切開を行い、十分に皮下を剥離した後、腹部正中縦 1 cm の腹膜切開を行った。脂肪組織で被覆されることによって腹腔内の感染が局限してしまうことを防ぐ目的で Niiyama らの手順 (Niiyama et al, 2016) に従って両側の脂肪組織を切除した後、盲腸を露出させた。2-0 絹糸を用いて盲腸の全長の 50%の位置で結紮し、盲端から 5 mm の部位を 21 ゲージ針で穿刺・貫通さ

せることで 2 穿刺し、その後愛護的に盲腸を還納した。4-0 ナイロン糸を用いて腹膜 5 針、皮膚 3 針ずつ縫合して閉創した。蘇生のために 0.9%生理食塩水 1 ml を皮下投与し手術を終了した。術後創部感染の予防のため、麻酔から覚醒するまではマウスは仰臥位でケージ内に安置した。手術時および術後の低体温を防ぐために手術台とケージはあらかじめ温めておいた KN-475 ヒーターマット（夏目製作所、東京都文京区）の上に置き保温に努めた（Kirihara et al, 2013）。術後抗生剤として、イミペネム・シラスタチン 25 mg/kg を 1 日 2 回 3 日間（Iskander et al, 2016）投与した。初回抗生剤投与は術後 2 時間後に投与し以後 12 時間ごとに投与した。

2.4. 外傷後敗血症モデル

外傷後の免疫状態を検討する当研究の目的のために、外傷モデルと敗血症モデルを組み合わせることで外傷後敗血症モデルマウスを作製した。施した外傷によって、熱傷を施したものを Burn/CLP モデル、Sham を施したものを Sham/CLP モデルとした。

本研究におけるすべての動物実験は、動物実験計画書を作成の上、北海道大学動物実験委員会および北海道大学機関倫理審査委員会の承認を得た上で（承認番号：19-0167）、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」（平成 18 年 6 月 1 日、文部科学省告示第 71 号）および「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成 18 年 4 月 28 日、環境省告示第 88 号）を遵守し、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」（平成 19 年 4 月 1 日、海大達第 61 号）に則り行っている。

3. 評価項目と解析方法

3.1. 生存期間観察

各モデル 15 匹ずつマウスを使用し、CLP 施行後 14 日間生存率を検討した。外傷を施した 24 時間後に CLP により敗血症を誘発し、その後は 1 日 2 回の観察を行い、外観や行動に変化が確認された場合に人道的エンドポイントとして安楽死処置を行った。

3.2. 腹水生菌数測定

腹水生菌数測定のために各モデル 10 匹ずつマウスを使用した。生菌数測定のための寒天培地をシャーレに準備した。また、96 ウェルマイクロプレートの 10 列×6（60 個）のウェル（ 6A）に予めリン酸緩衝生理食塩水（gibco PBS pH 7.4（1×）, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）を 180 μl ずつ入れ準備した。CLP 施行 24 時間後に麻酔および安楽死の目的で外傷や CLP 施行前

に使用する量の2倍量に当たるケタミン 250 mg/kg・キシラジン 40 mg/kg を腹腔内投与し、麻酔の効果が表れたところで仰臥位にした。CLP の創部とは異なる腹部の皮膚に切開を加え、皮下を十分に剥離し露出した腹膜を穿刺し 0.9%生理食塩水 5 ml を腹腔内に注入した。腹部を愛護的に揺すり生理食塩水を腹腔内に十分に行きわたらせてから 5 mm ほどの腹膜切開を置き、2.5 ml シリンジを用いて腹水を採取した。採取した腹水を濾過して均一にした上でそのうち 20 μ l を採取し、上述の 96 ウェルマイクロプレートを用いて、 $10^1 \sim 10^6$ 倍希釈まで順に作製した。寒天培地は、マウス 1 匹当たりシャーレを 1 つ使用し、**図 6B** のように 6 区画に分け、各希釈率のウェルから 50 μ l ずつ取って寒天培地に蒔いた。寒天培地に蒔いた腹水が完全に乾いた後、シャーレに蓋をして上下反転し、37-40°C の培養容器に入れ培養した。24 時間後に生菌数測定を行った。

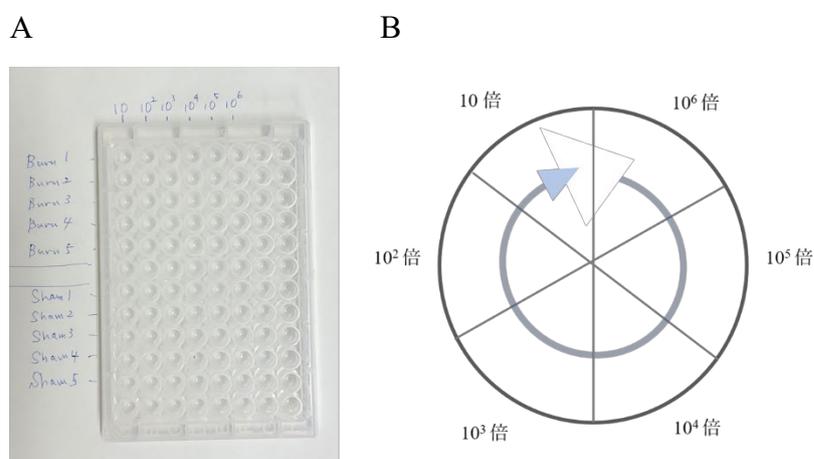


図 6. 腹水生菌数測定に使用した器具と準備

A: 96 ウェルマイクロプレート、B: シャーレ上の寒天培地（表から見た図、青い矢印の順番にそれぞれの希釈濃度の腹水検体を撒く）

3.3. 病理組織学的評価

病理組織学的評価では、Burn/CLP モデルと Sham/CLP モデルのほかに外傷も敗血症も施されていないマウスをコントロールモデルとし、各モデル 5 匹ずつ使用し検討した。Burn/CLP 群と Sham/CLP 群では、CLP 施行 24 時間後に、麻酔および安楽死の目的で生菌数測定の際と同様にケタミン 250 mg/kg・キシラジン 40 mg/kg を腹腔内投与し、麻酔の効果が表れたところで仰臥位にした。脾臓、肝臓、腎臓、および肺の 4 臓器摘出後に 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、モルフォテクノロジー株式会社（北海道札幌市）に依頼し切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン（Hematoxylin and eosin: H&E）染色を行った。各臓器の病理組織学的評価は北海道大学腫瘍病理学教室に依頼した。Burn/CLP・Sham/CLP 各群において脾臓、肝臓、腎臓、肺の組織に表れている変化をコン

トロール群と比較して評価した。脾臓については、CLP モデルと Fecal suspension injection model を比較した当研究室での先行研究 (Tsuchida et al, 2022) において、ヒトの敗血症の脾炎に見られるような脾臓への好中球浸潤は明らかでないものの、敗血症による炎症の強さに比例して脾臓への Tingible body macrophage (巨大マクロファージ) の出現が顕著になることが指摘されていた (図 7)。

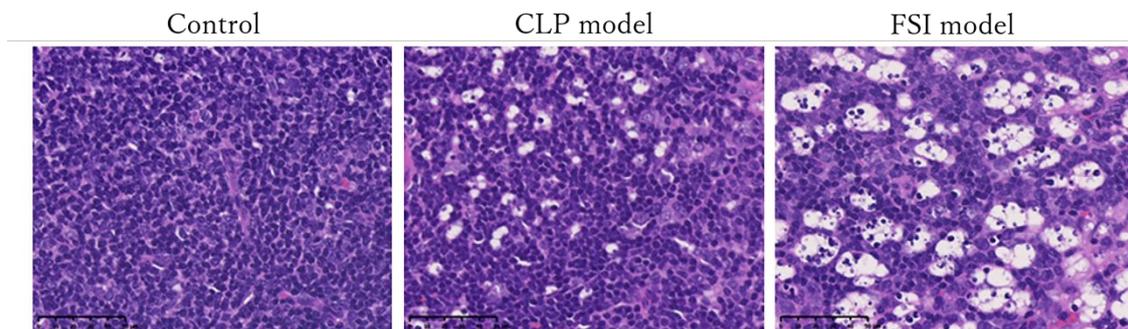


図 7. 敗血症モデルにおける脾臓の巨大マクロファージ (Tsuchida et al, 2022)
CLP: cecal ligation and puncture, FSI: fecal suspension intraperitoneal injection

このことから、敗血症モデルマウスでは脾臓のマクロファージが免疫応答を良好に反映していると考えられ、本研究での脾臓の評価には図 8 の表を用いた。マクロファージ・リンパ球比が 1%未満の場合はスコア 0、1%以上 5%未満の場合はスコア 1、5%以上 20%未満の場合はスコア 2、20%以上の場合はスコア 3 とした。また、マクロファージ・リンパ球比に関わらず巨大マクロファージが 20%以上の場合はスコア 3 とした。

		巨大マクロファージの割合	
			20%
マクロファージ /リンパ球	1%	スコア 0	
	5%	スコア 1	
	20%	スコア 2	
		スコア 3	

図 8. 脾臓組織中マクロファージのスコアリング方法

3.4. サイトカイン測定

血清中および腹水中のサイトカインの評価には、Burn/CLP モデル、Sham/CLP モデルともに 5 匹ずつ使用し、腹水と血液は CLP 施行 24 時間後に採取した。生菌数測定や病理組織学的評価の臓器摘出時と同様の要領で安楽死も兼ねて麻酔し、仰臥位で安置した。CLP の創部を避けて腹部の皮膚に切開を加え、露出した腹膜を穿刺し 0.9%生理食塩水 5 ml を腹腔内に注入した。腹部を愛護的に揺することで生理食塩水を腹腔内に十分に行きわたらせてから 5 mm ほどの腹膜切開を置き、2.5 ml シリンジを用いて腹水を採取した。採取された腹水は概ね 3-4 ml のうち 2 ml を予め 169 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0.5 ml を入れておいた遠心チューブに注入した。その後、心停止前に 169 mM EDTA 0.1 ml をあらかじめ充填した 1 ml シリンジで心窩部を穿刺することにより、心臓血を採取した。採取した腹水検体は 200×g、25°C、5 分間遠心分離し、血液検体は 700×g、25°C、20 分間遠心分離した。マウス一匹あたり腹水上澄み 250 μ l×4 本、血清 50 μ l ×4 本分の検体を回収し、-20°Cのフリーザーで保存した。

大阪医科薬科大学救急医学教室で、MILLIPLEX[®] MAP キット (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Germany) を用いて LUMINEX[®] 100/200[™] (ルミネックス・ジャパン株式会社、東京都港区) によるマルチプレックス解析を行った。

3.5. マスサイトメトリー

Burn/CLP モデルおよび Sham/CLP モデルをそれぞれ 5 匹ずつ使用し、サイトカイン測定のための検体採取と全く同様の手順で血液および腹水検体を採取した。採取した腹水と血液の検体処理には、RPMI 1640 培地、5%熱非動化ウシ胎児血清 (foetal calf serum: FCS)、1 mM グルタミン、10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)、2 mM 非必須アミノ酸、ペニシリン/ストレプトマイシン/ファンギゾン、 2.5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノールを含む培養液 (C5) を用いた。C5 培養液に含まれる上記の製品はすべて、Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA, USA) から購入した。血液検体は、15 ml 遠心チューブに入れ、ハーバード大学医学部の Lederer 研究室が開発した塩化アンモニウムベースの赤血球溶解緩衝液 (JL-buffer) (Wanke-Jellinek et al, 2016) 5 ml を添加し密閉後に転倒混和し 5 分静置して赤血球溶解処置が完了した後、C5 を 5ml 注入し 400×g、25°C、10 分間の遠心分離を行った。その後上澄みを破棄し残ったペレットに C5 を 5ml 注入し 100×g、25°C、5 分間の遠心分離を行った。上澄みを破棄し残ったペレットに再び C5 を 5ml 注入し 400×g、25°C、10 分、10 分間の遠心分離を行った。上澄みを破棄し、遠心チューブの底

にあるペレットを、0.5 ml の細胞凍結培地 CryoStor[®] (Biolife Solutions, Inc. Bothell, WA, USA) で回収し、保存用チューブに入れた。急速冷却を避けるため、CryoStor[®]と細胞が入ったチューブは、4°Cの冷蔵庫であらかじめ冷やしておいた Mr. Frosty[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) にセットし、はじめに 4°Cの冷蔵庫に 20 分間入れ、その後-80°C冷凍庫に一晚 (12~24 時間) 保管した後、チューブを Mr. Frosty[®]から取り出し、液体窒素タンク (-196°C) で保存した。腹水サンプルは、JL-buffer を用いた工程は行わずその後の洗浄と遠心分離の工程は血液サンプルと同様に行った。

CytoTOF の染色は大阪医科薬科大学で、測定は聖路加エスアールエル先端医療研究センターで行った。CyTOF による染色はすべて室温で行った。細胞はまずシスプラチン生存率染色試薬 (Fluidigm Sciences, South San Francisco, CA, USA) で 5 分間染色し、遠心分離で洗浄した。Fc ブロッキング剤を 10 分間添加した後、CyTOF 抗体染色カクテルを添加した。細胞を 30 分間染色した後に、CyTOF 染色バッファー (カルシウム/マグネシウムフリーリン酸緩衝生理食塩水、0.05%アジ化ナトリウム、0.2%ウシ血清アルブミン) で洗浄した。Maxpar[®] Fix I Buffer/Maxpar 10X Barcode Perm Buffer (Fluidigm Sciences) を用い、パラジウムベースのバーコード試薬と 30 分間インキュベートした。バーコード試薬を洗い落とした後、サンプルを 1 つのチューブにプールした。Maxpar Nuclear Antigen Staining Buffer Set (Fluidigm Sciences) を用いて細胞を固定・透化させ、細胞内抗体カクテルとインキュベートした。細胞内抗体カクテルを 30 分間添加した後、細胞を洗浄し、1.6%パラホルムアルデヒドで固定した。細胞とイリジウムインターカラーター溶液 (Max-Par Intercalator-Ir 500 mM; Fluidigm Sciences) を 20 分間一緒に添加し、その後最終洗浄を行った。EQ キャリブレーションビーズ (EQ Four Element Calibration Beads; Fluidigm Sciences) を含む 1×10^6 細胞/mL の濃度の MilliQ ろ過蒸留水 (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) と共に細胞を培養した。Nolan Lab (Stanford, Palo Alto, CA, USA) で開発された Normalizer and Single Cell Debarcoder ソフトウェアを用いて、プールしたシングルサンプルについて Helios mass cytometer (Fluidigm Sciences) で解析した。次にノーマライゼーションとデコンボリューションを行った。本研究で使用した CyTOF 染色パネルは、表 1 および表 2 に示す。マスサイトメトリー解析には OMIQ (Omiq, Inc., Santa Clara, CA, USA) を使用した。OMIQ では、次元圧縮アルゴリズムに optimized parameters for T-distributed stochastic neighbor embedding (opt-SNE)、クラスタリングと可視化アルゴリズムに Flow self-organizing maps (FlowSOM) の自動最適化パラメータを使用した。

表 1. CyTOF パネル (血液)

Marker	Clone	Isotope Label	Marker	Clone	Isotope Label
CD45	30-F11	⁸⁹ Y	CD206	C068C2	¹⁵⁹ Tb
CD4	RM4-5	¹¹⁵ In	Ly6A/E	E13-161.7	¹⁶⁰ Gd
CD44	IM7	¹⁴¹ Pr	CD83	Michel-19	¹⁶¹ Dy
CD8a	53-6.7	¹⁴² Nd	FoxP3	FJK-16s	¹⁶² Dy
CD49b	DX5	¹⁴³ Nd	NK1.1	PK136	¹⁶³ Dy
CD184	L276F12	¹⁴⁴ Nd	Ki-67	8D5	¹⁶⁴ Dy
NKG2D	REA1175	¹⁴⁵ Nd	CD115	REA827	¹⁶⁵ Ho
CD11c	N418	¹⁴⁶ Nd	CD86	GL-1	¹⁶⁶ Er
PU.1	phpu13	¹⁴⁷ Sm	CD25	3C7	¹⁶⁷ Er
Ly6G	1A8	¹⁴⁸ Nd	CD64	x54-5/7.1	¹⁶⁸ Er
CD19	6D5	¹⁴⁹ Sm	CD11b	M1/70	¹⁶⁹ Tm
TLR4	MTS510	¹⁵⁰ Nd	RORγt	REA278	¹⁷⁰ Er
Ly6C	HK1.4	¹⁵¹ Eu	CD279	29F.1A12	¹⁷¹ Yb
CD3e	145-2C11	¹⁵² Sm	TCRγδ	GL3	¹⁷² Yb
CD172a	P84	¹⁵³ Eu	CD69	310106	¹⁷³ Yb
CD274	10F.9G2	¹⁵⁴ Sm	CCR2	475301R	¹⁷⁴ Yb
CD68	FA-11	¹⁵⁵ Gd	F4/80	T45-2342	¹⁷⁵ Lu
CD14	Sa14-2	¹⁵⁶ Gd	TLR2	T2.5	¹⁷⁶ Yb
T-bet	4B10	¹⁵⁸ Gd	I-A/I-E	M5/114.15.2	²⁰⁹ Bi

CCR2: C-C chemokine receptor type 2; CD: clusters of differentiation, CyTOF: cytometry by time-of-flight, FoxP3: forkhead box P3, Ly6: lymphocyte antigen 6, NKG2D: natural killer group 2D, RORγT: retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t, T-bet: T-box expressed in T cells, TCRγδ: T cell receptor gamma delta, TLR4: Toll-like receptor 4.

表 2. CyTOF パネル (腹水)

Marker	Clone	Isotope Label	Marker	Clone	Isotope Label
CD45	30-F11	⁸⁹ Y	CD206	C068C2	¹⁵⁹ Tb
CD326	G8.8	¹¹³ In	Ly6A/E	E13-161.7	¹⁶⁰ Gd
CD4	RM4-5	¹¹⁵ In	Arginase I	Polyclonal	¹⁶¹ Dy
CD44	IM7	¹⁴¹ Pr	CD85k	H1.1	¹⁶² Dy
CD8a	53-6.7	¹⁴² Nd	NK1.1	PK136	¹⁶³ Dy
CD49b	DX5	¹⁴³ Nd	Ki-67	8D5	¹⁶⁴ Dy
VEGF R1	141522	¹⁴⁴ Nd	CD115	REA827	¹⁶⁵ Ho
NKG2D	REA1175	¹⁴⁵ Nd	CD103	2E7	¹⁶⁶ Er
CD11c	N418	¹⁴⁶ Nd	SR-AI	268318	¹⁶⁷ Er
PU.1	phpu13	¹⁴⁷ Sm	CD64	x54-5/7.1	¹⁶⁸ Er
Ly6G	1A8	¹⁴⁸ Nd	CD11b	M1/70	¹⁶⁹ Tm
CD19	6D5	¹⁴⁹ Sm	Siglec F	E50-2440	¹⁷⁰ Er
CX3CR1	SA011F11	¹⁵⁰ Nd	CD279	29F.1A12	¹⁷¹ Yb
Ly6C	HK1.4	¹⁵¹ Eu	TCRγδ	GL3	¹⁷² Yb
CD3e	145-2C11	¹⁵² Sm	CD69	310106	¹⁷³ Yb
CD172a	P84	¹⁵³ Eu	CCR2	475301R	¹⁷⁴ Yb
CD274	10F.9G2	¹⁵⁴ Sm	F4/80	T45-2342	¹⁷⁵ Lu
CD68	FA-11	¹⁵⁵ Gd	CD197	REA685	¹⁷⁶ Yb
CD14	Sa14-2	¹⁵⁶ Gd	I-A/I-E	M5/114.15.2	²⁰⁹ Bi
CD205	NLDC-145	¹⁵⁸ Tb			

CCR2: C-C chemokine receptor type 2, CD: clusters of differentiation, CyTOF: cytometry by time-of-flight, CX3CR1: C-X-3C chemokine receptor 1, Ly6: lymphocyte antigen 6, NKG2D: natural killer group 2D, RORγT: retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t, Siglec F: sialic acid-binding Ig-like lectin F, SR-AI: scavenger receptor-AI, T-bet: T-box expressed in T cells, TCRγδ: T cell receptor gamma delta, TLR4: Toll-like receptor 4, VEGF R1: vascular endothelial growth factor receptor 1.

3.6. 統計解析

統計解析は、GraphPad Prism for Windows version 9.3.1 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) を用いて行った。生存曲線は Kaplan-Meier 法で推定し、生存率の差は log-rank test で評価した。OMIQ の数値データをエクスポートし、有意性を評価するために、ノンパラメトリックの Mann-Whitney *U* テストを使ってグループ間で比較した。統計学的有意性は、 $p < 0.05$ とした。

結果

1. Burn/CLP 群における生存率の変化

Burn/CLP モデルおよび Sham/CLP モデル各 15 匹ずつ使用して算出した CLP 後 14 日間生存率は、Sham/CLP 群（66.7%、生存期間中央値 14 日 [3-14 日]）と比較して Burn/CLP 群（13.3%、生存期間中央値 6 日 [2-14 日]）で有意に低かった（図 9、log-rank、 $p=0.006$ ）。

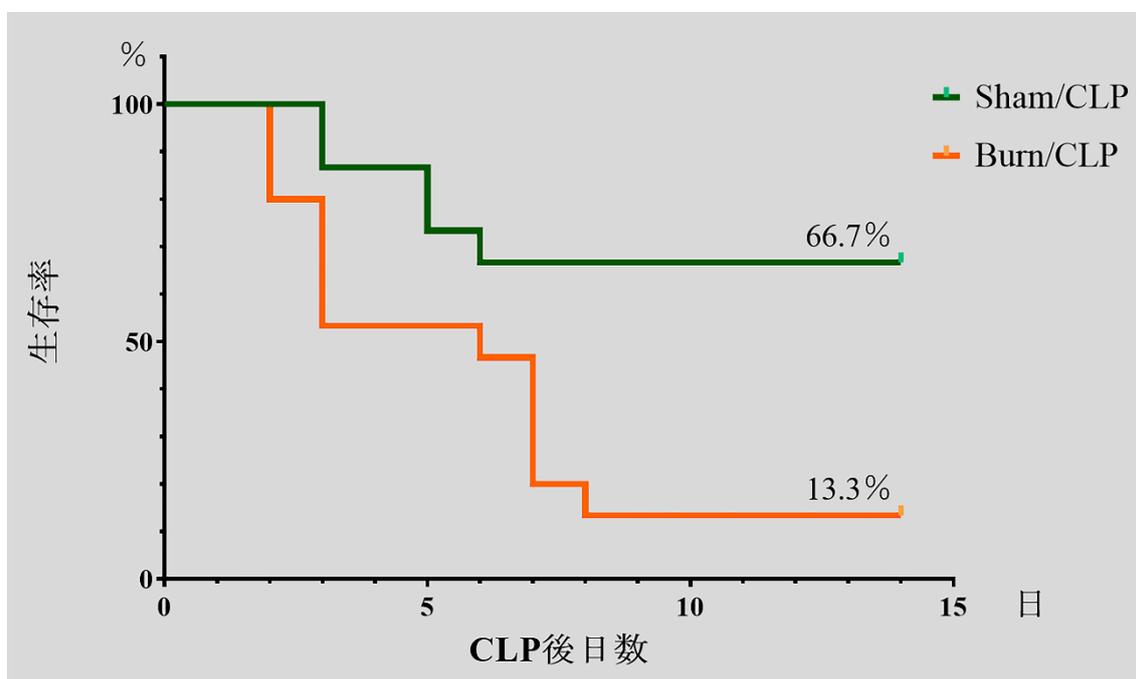


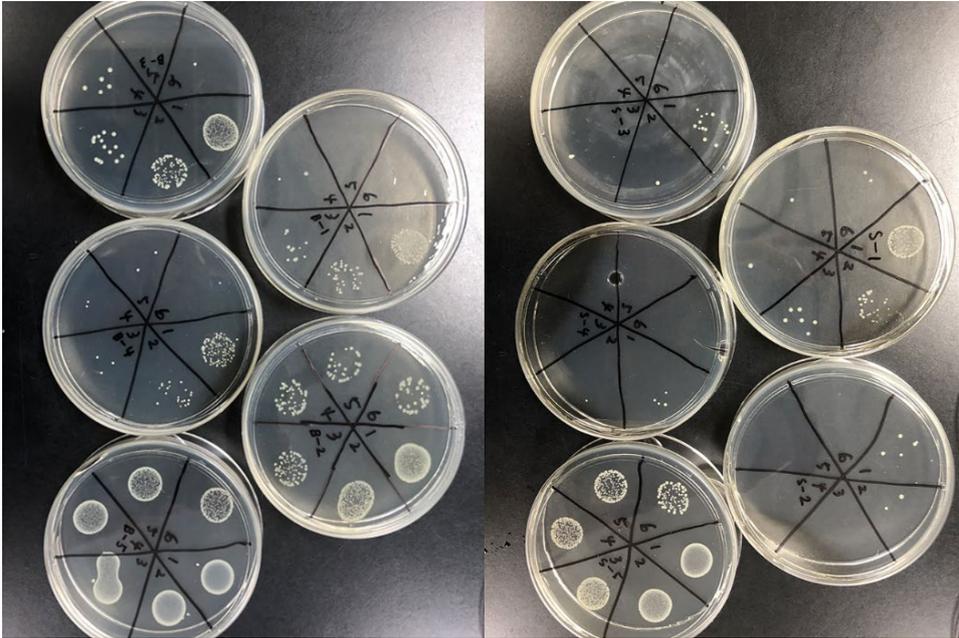
図 9. Burn/CLP 群と Sham/CLP 群の CLP 後生存率

CLP: cecal ligation and puncture.

2. Burn/CLP 群と Sham/CLP 群の腹水生菌数の検討

Sham/CLP 群および Burn/CLP 群から当初 5 匹ずつマウスを用いて生菌数を算出したが有意差は出ず、10 匹ずつに増やして検討したが、両群間に有意差は認められなかった（図 10A、B）。

A



B

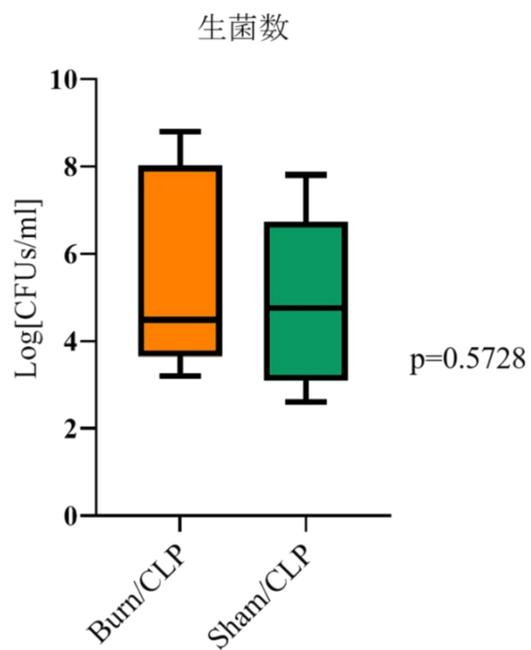


図 10. Burn/CLP 群と Sham/CLP 群の腹水生菌数

A: 24 時間後の培地 (左: Burn/CLP 群、右: Sham/CLP 群)

B: Burn/CLP 群と Sham/CLP 群の生菌数比較

CFU: colony forming unit, CLP: cecal ligation and puncture.

3. Burn/CLP 群における主要臓器の病理組織学的変化

脾臓、肝臓、腎臓、肺の組織の H&E 染色を用いて、病理組織学的評価を行った (図 11)。脾臓組織におけるマクロファージが、Sham/CLP 群ではコントロール群と比して多い一方で、Burn/CLP 群ではコントロールよりは多いものの Sham/CLP 群より少なかった。肝臓組織は、Sham/CLP 群では類洞の拡張が見られ、Burn/CLP 群で類洞の拡張に加えて中心静脈周囲の肝細胞の変性が見られた。腎臓組織は、Burn/CLP モデル 5 例中 3 例で被膜下の尿細管壊死が見られたが、Sham/CLP 群やコントロールでは 1 例もそのような変化は見られなかった。肺組織では、Sham/CLP 群やコントロール群と比較して Burn/CLP 群でうっ血の程度が強くと表れていた。脾臓組織のマクロファージ・リンパ球比を図 8 に示したスコアリング表を使用し点数化したところ、平均スコアは、コントロール群 0 点、Sham/CLP 群 1.4 点、Burn/CLP 群 0.4 点であった (図 12-14)。

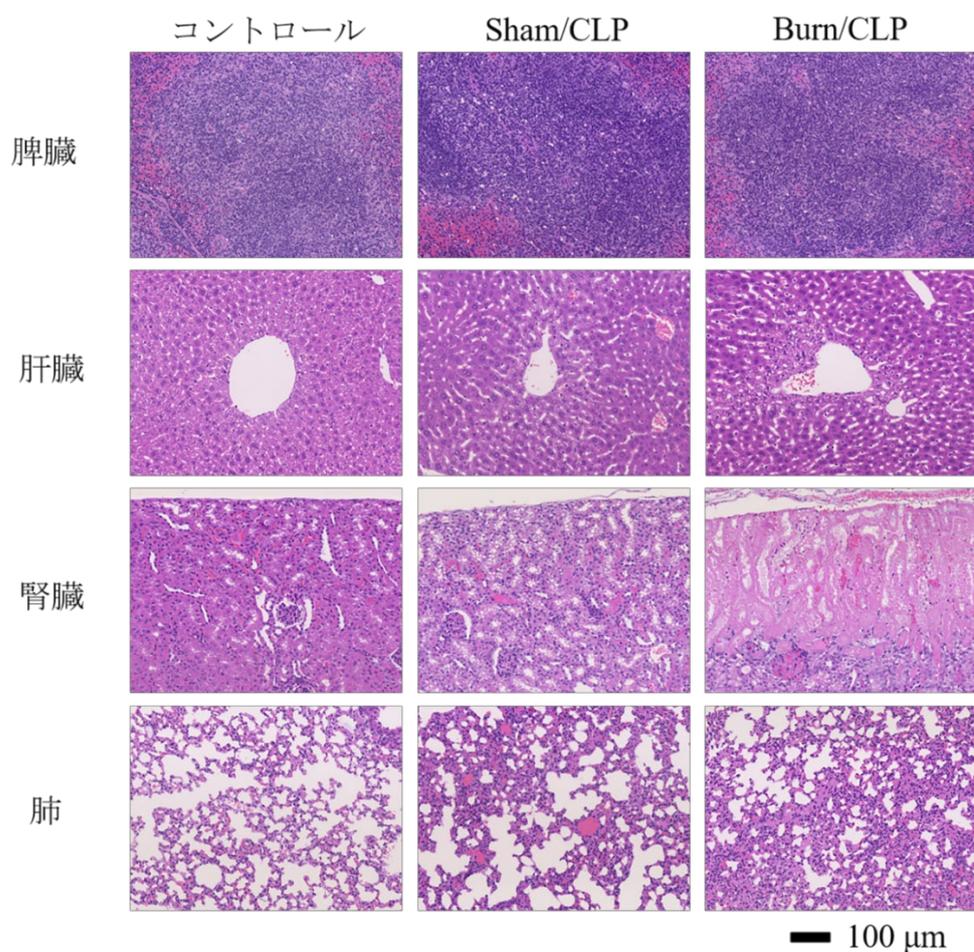


図 11. 脾臓・肝臓・腎臓・肺の各群の代表的な病理組織像
CLP: cecal ligation and puncture.

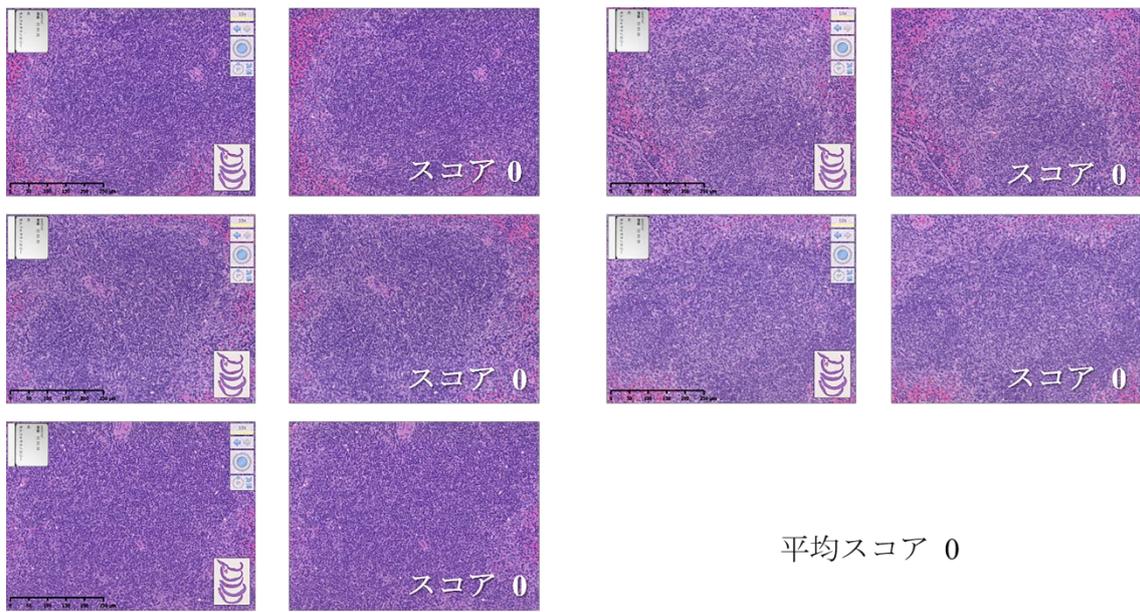


図 12. コントロール群の脾臓組織のマクロファージ

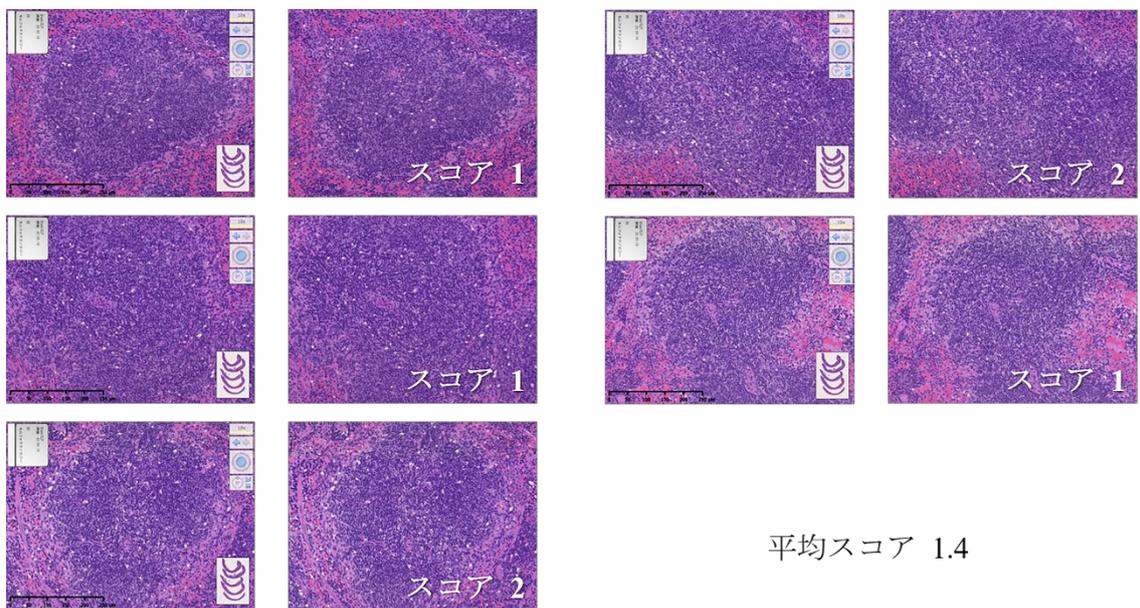


図 13. Sham/CLP 群の脾臓組織のマクロファージ
CLP: cecal ligation and puncture.

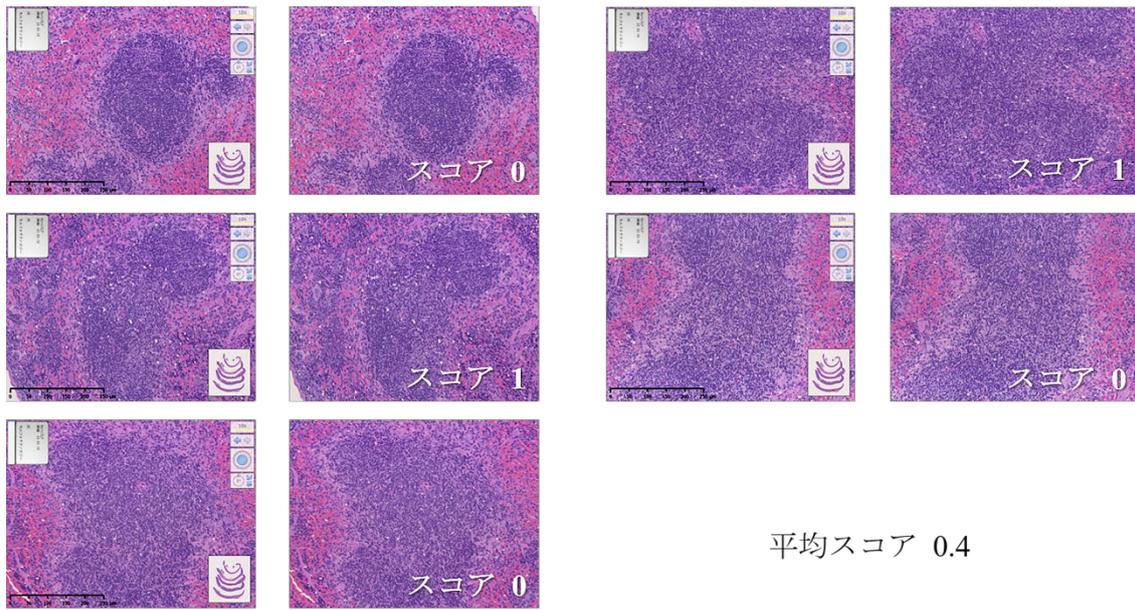


図 14. Burn/CLP 群の脾臓組織のマクロファージ
 CLP: cecal ligation and puncture.

4. Burn/CLP 群のサイトカイン濃度の変化

サイトカインごとに最も濃度が低い検体を 0、最も濃度が高いものを 100 として正規化したヒートマップを作成した (図 15)。Burn/CLP 群では TGF- β 1 以外の interferon-gamma (IFN γ) を含むサイトカイン濃度は、Sham/CLP 群と比較して低く、TGF- β 1 は Burn/CLP 群の血清中で Sham/CLP 群と比較して高値であった (図 16)。

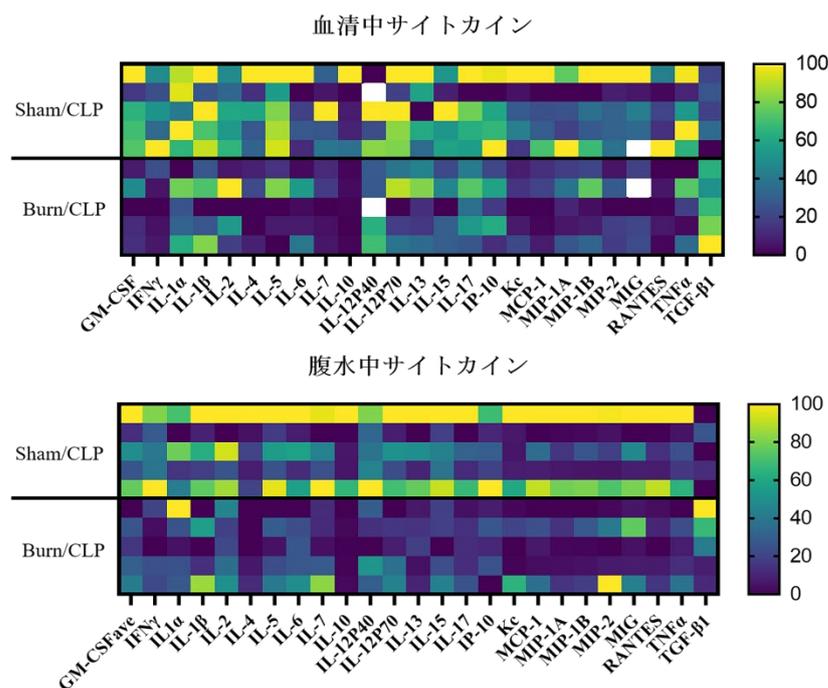


図 15. Burn/CLP 群と Sham/CLP 群の血清および腹水中サイトカイン濃度

CLP: cecal ligation and puncture, GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, IFN γ : interferon-gamma, IL: interleukin, IP: interferon gamma-induced protein, KC: keratinocyte-derived chemokines, MCP: monocyte chemotactic protein, MIG: monokine induced by interferon-gamma, MIP: macrophage inflammatory protein, RANTES: regulated on activation, normal T cell expressed and secreted, TNF: tumor necrosis factor, TGF- β 1: transforming growth factor-beta 1.

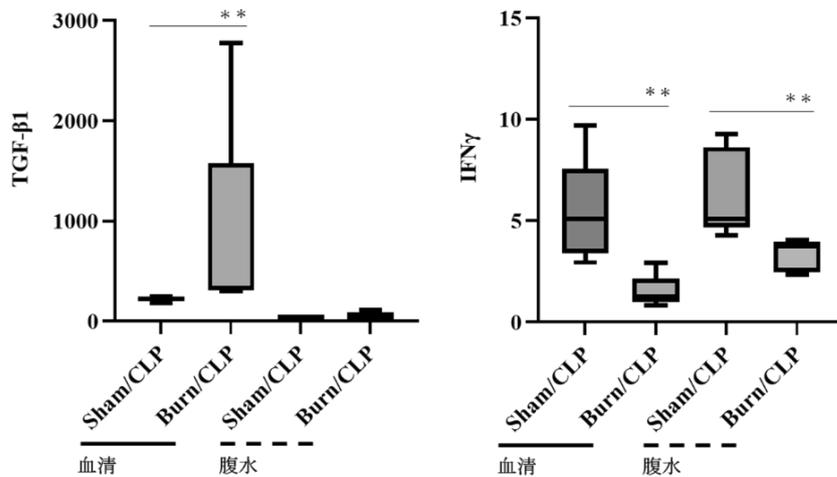


図 16. Burn/CLP 群と Sham/CLP 群の血清および腹水中の TGF-β1・IFN γ の濃度
 ** p<0.01. CLP: cecal ligation and puncture, IFN γ : interferon gamma, TGF-β1: transforming growth factor-beta 1.

5. マスサイトメトリーによる検討

5.1. 次元圧縮アルゴリズムによる好中球、単球・マクロファージの同定

OMIQ での解析を始めるにあたり、Burn/CLP 群と Sham/CLP 群の比較のため event 数を揃えるようにサブサンプリングを行い調整した。次に、次元圧縮アルゴリズム opt-SNE によって作成した散布図を用いて、好中球、単球・マクロファージの同定を試みた。好中球の同定には lymphocyte antigen 6 (Ly6) G を、単球・マクロファージの同定には clusters of differentiation (CD) 68 を用いた (図 17A)。次に、血液と腹水それぞれについて、Sham/CLP 群と Burn/CLP 群ごとにファイルを連結し、CD45 でフィルターをかけ、opt-SNE による等高線図を作成し比較した (図 17B)。CD45 陽性細胞の局在は血液および腹水のいずれにおいても両群間で異なっており、Burn/CLP 群では Sham/CLP 群と比較して単球・マクロファージの割合が増加し、相対的に好中球の割合が減少している傾向にあった。

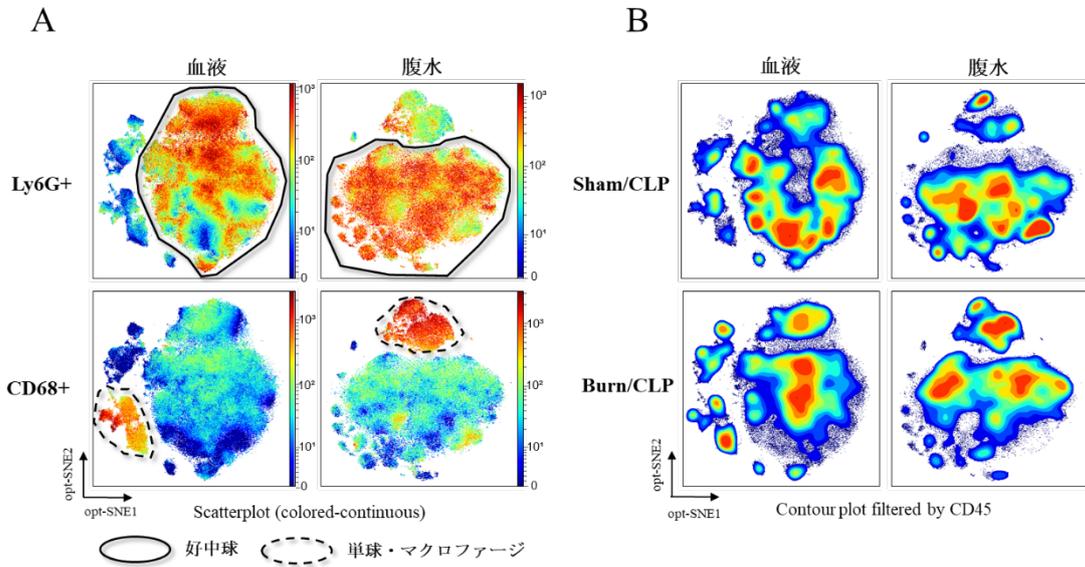


図 17. 好中球、単球・マクロファージの同定と両群間の CD45 陽性細胞の局在
 A. Ly6G を用いた好中球の同定と CD68 を用いた単球・マクロファージの同定
 B. Sham/CLP 群と Burn/CLP 群の CD45 陽性細胞の分布の違い

CD: clusters of differentiation, CLP: cecal ligation and puncture, Ly6: lymphocyte antigen 6, opt-SNE: optimized parameters for T-distributed stochastic neighbor embedding.

5.2. Burn/CLP 群の好中球上の CD11b、SIRP α 、Siglec-F の発現変化

次に、Burn/CLP モデルと Sham/CLP モデルにおける好中球や単球・マクロファージ上のマーカーの発現の違いを全体的に把握するために、血液と腹水それぞれでマーカーごとに最も発現の低い検体を 0、発現の高い検体を 100 として正規化したヒートマップを作成した (図 18・19)。そしてヒートマップにおいて両群で発現に差があるように見受けられたマーカーにチャンネルを合わせ、モデルごとにファイルを連結して作成した次元圧縮アルゴリズム opt-SNE の散布図で視覚的に両群を比較し、OMIQ データを外部の統計ソフトにエクスポートすることでボックスプロットを作成しさらに比較検討した。腹水中の好中球の CD11b 発現は Sham/CLP 群と比較して Burn/CLP 群で高く、血液中の好中球の CD11b 発現も Burn/CLP 群で高い傾向にあった (図 20A)。CD172a (signal-regulatory protein alpha: SIRP α) は、血液および腹水いずれにおいても Sham/CLP 群と比較して Burn/CLP 群の好中球での発現が高い傾向が観察された (図 20B)。好酸球の細胞表面マーカーとして知られる sialic acid-binding Ig-like lectin F (Siglec-F) が、腹水サンプル中の好中球の一部に発現が見られ、その発現は Burn/CLP 群で高く見られた (図 20C)。この Siglec-F 陽性好中球が、好酸球で

はなく好中球であることを証明するために、Siglec-F 陽性細胞について詳細を検討した。opt-SNE によって作成した散布図において、チャンネルを Siglec-F に設定すると、Siglec-F が高く発現する島が好中球やマクロファージの島とは距離を持つ部位に認められていることが確認され、これを好酸球と同定した (図 21A)。クラスタリングアルゴリズム FlowSOM を用いてクラスタリングを行い 図 21B のように metacluster (MC) を作成した。好酸球と同定した MC-I と、好中球上の Siglec-F 陽性となるメタクラスター MC-F と MC-T、Siglec-F 陰性の MC-C における Siglec-F の発現を比較した。好中球上の Siglec-F 陽性となるメタクラスター MC-F と MC-T は比較的距離が離れていたため、それぞれ別のメタクラスターとして区別した。opt-SNE の散布図では、MC-I の Siglec-F 発現が MC-F や MC-T より高いことが視覚的に予測されたが、ヒストグラムでも MC-I は MC-F や MC-T よりも Siglec-F の発現が高いことが示された (図 21C)。また、この4つのメタクラスターについて、Ly6G の発現をヒストグラムで検討したところ、MC-C, MC-F, MC-T の3つのメタクラスターでは同様の発現が見られた一方で、好酸球と同定したメタクラスター MC-I ではそれらに比べて Ly6G の発現が低いことが示された (図 21D)。ヒストグラムでの検討の際には、メタクラスターによって event 数が大きく異なることからヒストグラムの高さを揃えるように調整した上で比較している。なお、Siglec-F 陽性好中球は一般に炎症が起こっている局所で観察されることが知られており、末梢循環血液中の好中球では見られないことから、今回の血液パネルには含まれておらず、腹水パネルのみで検討した。

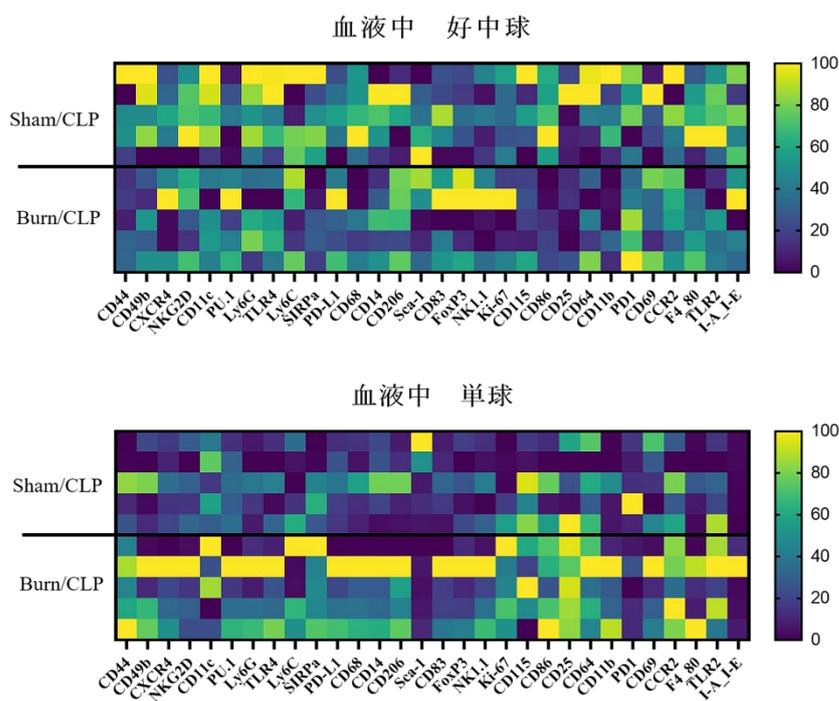


図 18. 血液中の好中球、単球のマーカー発現

CCR2: C-C chemokine receptor type 2, CD: clusters of differentiation, CLP: cecal ligation and puncture, CXCR4: C-X-C chemokine receptor type 4, FoxP3: forkhead box P3, Ly6: lymphocyte antigen 6, NKG2D: natural killer group 2D, PD-1: programmed cell death-1, PD-L1: programmed cell death-ligand 1, ROR γ T: retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t, Sca-1: stem cell antigen-1, SIRP α : signal-regulatory protein alpha, T-bet: T-box expressed in T cells, TCR $\gamma\delta$: T cell receptor gamma delta, TLR4: Toll-like receptor 4.

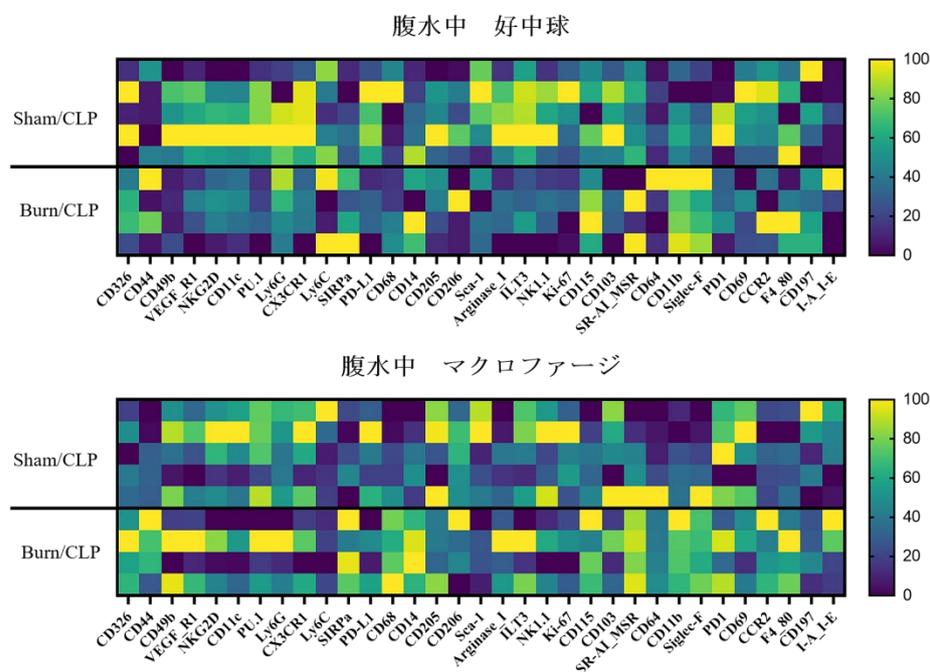


図 19. 腹水中の好中球、マクロファージのマーカー発現

CCR2: C-C chemokine receptor type 2, CD: clusters of differentiation, CLP: cecal ligation and puncture, CX3CR1: C-X-3C chemokine receptor type 1, FoxP3: forkhead box P3, ILT3: immunoglobulin-like transcript 3, Ly6: lymphocyte antigen 6, NKG2D: natural killer group 2D, PD-1: programmed cell death-1, PD-L1: programmed cell death-ligand 1, ROR γ T: retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t, Sca-1: stem cell antigen-1, Siglec-F: sialic acid-binding Ig-like lectin F, SIRP α : signal-regulatory protein alpha, SR-AI_MSR: scavenger receptors AI_macrophage scavenger receptor, T-bet: T-box expressed in T cells, TCR $\gamma\delta$: T cell receptor gamma delta, TLR4: Toll-like receptor 4, VEGF_R1: vascular endothelial growth factor receptor 1.

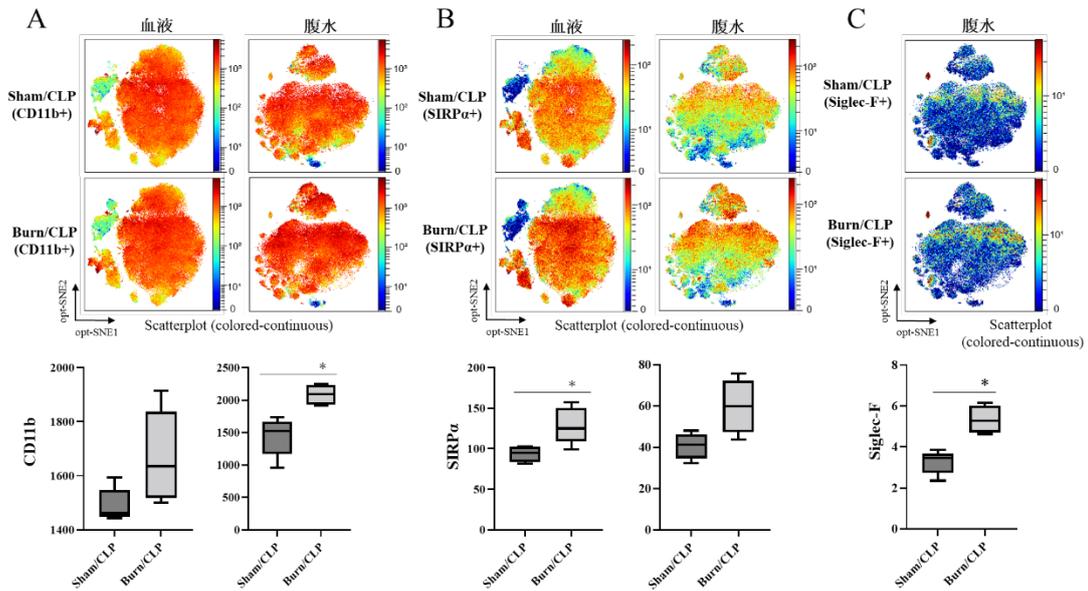
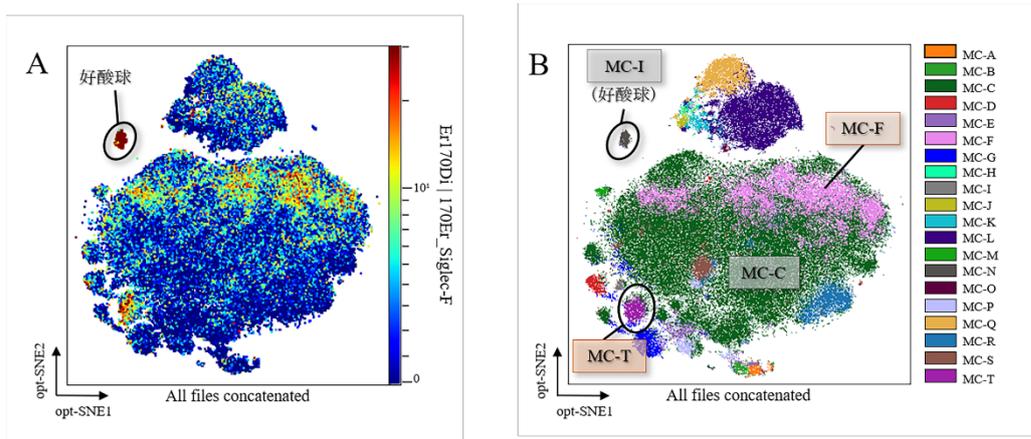


図 20. Burn/CLP 群と Sham/CLP 群における好中球上の CD11b、SIRP α 、Siglec-F 発現の違い

A: CD11b、B: SIRP α 、C: Siglec-F

* $p < 0.05$. CD: clusters of differentiation, CLP: cecal ligation and puncture, opt-SNE: optimized parameters for T-distributed stochastic neighbor embedding, Siglec-F: sialic acid-binding Ig-like lectin F, SIRP α : signal-regulatory protein alpha.



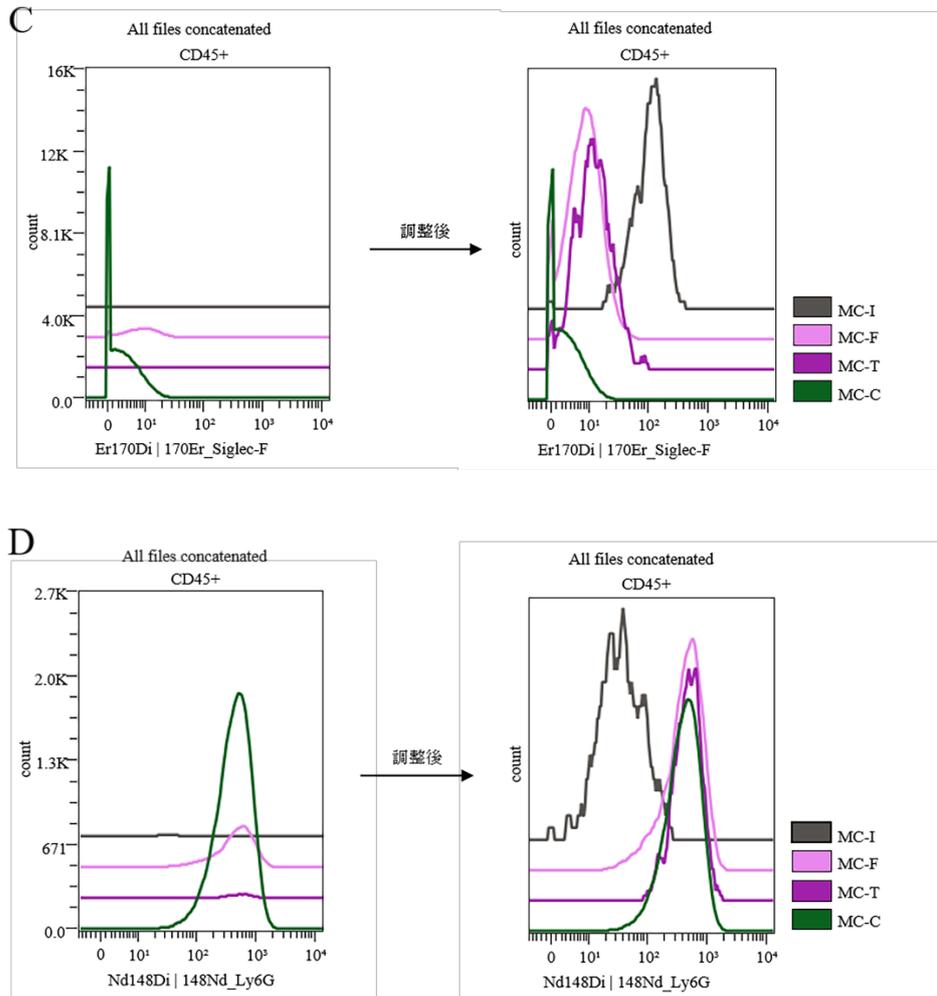


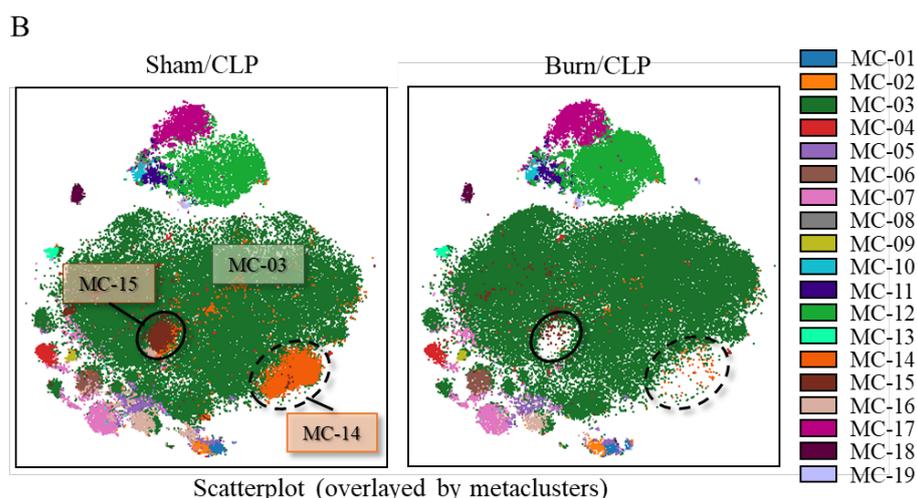
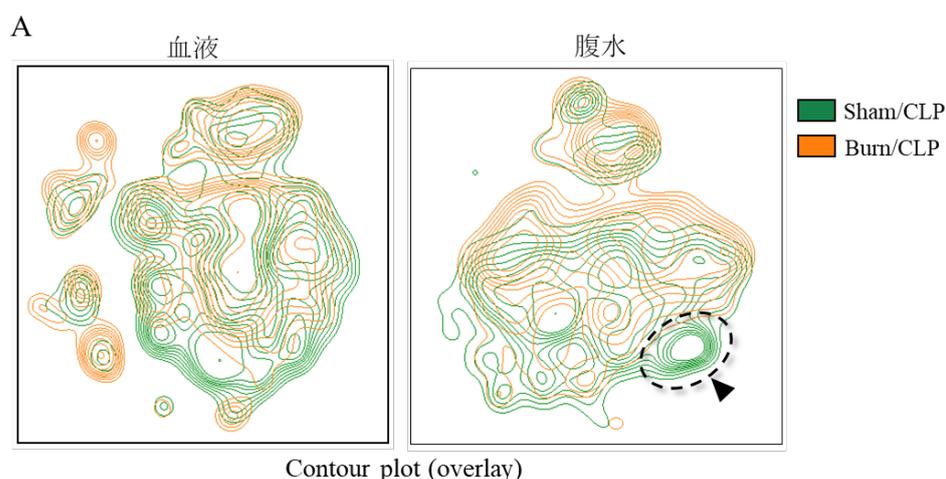
図 21. 好酸球と Siglec-F 陽性/陰性好中球の Siglec-F・Ly6G 発現の違い
 A: 好酸球の同定、B: Siglec-F 陽性細胞のメタクラスタリング、C: 各メタクラスタの Siglec-F 発現の違いを示すヒストグラム、D: 各メタクラスタの Ly6G 発現の違いを示すヒストグラム

CD: cluster of differentiation, Ly6: lymphocyte antigen 6, MC: metacluster, opt-SNE: optimized parameters for T-distributed stochastic neighbor embedding, Siglec-F: sialic acid-binding Ig-like lectin F.

5.3. Burn/CLP 群における CD68 高発現好中球の欠損

Burn/CLP モデルと Sham/CLP モデルのさらなる違いを見出すために、それぞれの群の等高線図を作成した上でそれらを重ね、重複しないところに 2 群間の違いがある可能性を考えた。血液検体では 2 群間に大きな違いを指摘することはできなかったが、腹水検体では好中球の島に 2 群間で重複しない部位が見られた (図 22A 矢印)。FlowSOM によってクラスタリングしたところ、等高線図

が重複しない部分である MC-14 は、Sham/CLP 群では認められるが Burn/CLP 群では欠損していた。さらに、MC-14 に加えて、もう一つ Sham/CLP 群では認められ Burn/CLP 群では欠損しているメタクラスター (MC-15) が存在することが判明した (図 22B)。この Burn/CLP で欠損するメタクラスターの性質を把握するために、好中球の島で最も面積の広いメタクラスターである MC-03 と MC-14, MC-15 についてヒストグラムを用いて検討したところ、MC-14 と MC-15 は MC-03 と比較して CD68 の発現が高く、逆に Ly6G や CD11b の発現がやや低いことがわかった。また MC-14 と MC-15 は次元圧縮マップで距離が取られているため、別の性質を持つメタクラスターと考え、その性質の違いを検討し、MC-15 は MC-14 と比較して C-X-3C chemokine receptor 1 (CX3CR1) , CD 205, Ly6A の発現がやや高いことがわかった (図 22C)。



C

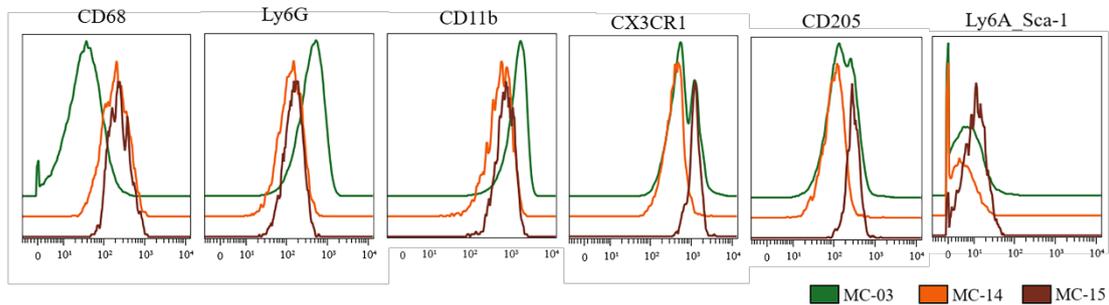


図 22. Burn/CLP 群における CD68 高発現好中球の欠損

A: 次元圧縮マップ opt-SNE の等高線図を重複させることによって明らかになった Burn/CLP 群と Sham/CLP 群の相違 (矢印で示された点線部が非重複部)

B: FlowSOM による Burn/CLP 群と Sham/CLP 群それぞれのクラスタリング

C: MC-03、MC-14、MC-15 のマーカー発現を示したヒストグラム (比較可能となるよう高さ調整後)

CD: clusters of differentiation, CLP: cecal ligation and puncture, CX3CR1: C-X-3C chemokine receptor 1, Ly6: lymphocyte antigen 6, MC: metacluster, Sca-1: stem cell antigen-1.

CD68 は通常はマクロファージや単球で陽性となるマーカーであり、CD68 高発現であった MC-14 や MC-15 がマクロファージではないことを証明するために CD68 の発現についてマクロファージ (MC-mac) と MC-14, MC-15, MC-03 の CD68 発現を比較したところ、図 23A のヒストグラムのようになり、MC-14, MC-15 の CD68 発現は、MC-mac ともことなることがわかった。macrophage scavenger receptor (MSR) の発現を検討したところ、MC-mac のみで発現が認められ、MC-14 や MC-15 は MC-03 と同様に MSR の発現が見られなかった (図 23B)。

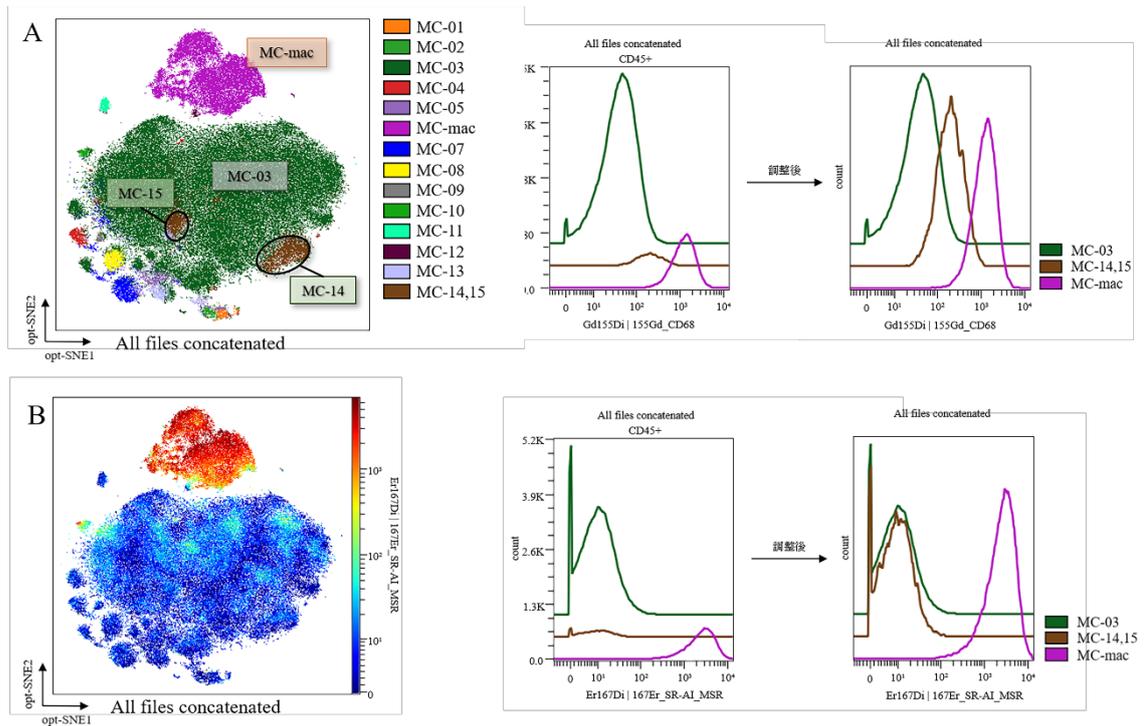


図 23. CD68 高発現 / 低発現好中球の CD68 ・ MSR 発現の違い

A. MC-03、MC-14,15、MC-mac の CD68 発現の違い

B. MC-03、MC-14,15、MC-mac の MSR 発現の違い

CD: clusters of differentiation, MC: metacluster, MSR: macrophage scavenger receptor, opt-SNE: optimized parameters for T-distributed stochastic neighbor embedding.

考察

本研究で我々は、外傷後敗血症病態における好中球フェノタイプの関与について検討した。

病理組織学的検査の結果、Burn/CLP 群の脾臓組織中のマクロファージが Sham/CLP 群と比較して減少していることから、Burn/CLP 群では免疫応答が減衰していることが示唆された。また Burn/CLP 群では、中心肝静脈周囲の肝細胞変性、腎臓の急性尿細管壊死、肺うっ血など、臓器虚血が Sham/CLP に比して進行し組織損傷がより強く表れていることが示されており、Burn/CLP 群と Sham/CLP 群の生存率の乖離と矛盾しない結果であった。

各群 5 匹ずつのモデルマウスを作製し検討した腹水生菌数は Burn/CLP 群と Sham/CLP 群の間に有意差が認められなかったため、各群 10 匹ずつ用いて再検討したが同様の結果であった。CLP 後 2 日目からは死亡する個体が見られたため、検体採取は CLP 後 24 時間の時点で行ったが、腹水生菌数に有意差が出なかった原因として、CLP 後 24 時間の腹水には Burn/CLP 群の免疫抑制状態が十分に反映されていなかった可能性を考えた。また、本研究では CLP によって敗血症を誘発しており、術者による手技のばらつきは最小限に抑えられていたとしても、盲腸の大きさや便の含有量には個体差があるため、腹水中の生菌数へのバラつきの影響が強く表れた可能性も考えられた。本研究では臨床的に有用なエビデンスを得るためアウトブリードマウスを使用しており、血液中、腹水中のサイトカインをヒートマップで示した図 14 にもバラつきが見られる通り、マウスの免疫応答の個体差があり、統計学的解析を行う段階でそれらの影響を受けた可能性も考えられる。

血清および腹水中のサイトカイン測定の結果、Sham/CLP 群と比較して唯一 Burn/CLP 群の血清中で高値を示した TGF- β 1 は、創傷治癒に貢献することが示されているが (Lichtman et al, 2016)、細胞増殖の抑制やサイトカイン放出の抑制によって免疫応答を制御する役割を持つことも知られている (Batlle and Massague, 2019)。Burn/CLP 群では IFN γ に代表される炎症性サイトカインおよび TGF- β 1 以外の抗炎症性サイトカインのいずれにおいても全体的に産生が抑制されていることが示されたが、外傷後敗血症モデルマウスである Burn/CLP 群では、外傷によって TGF- β 1 が過剰に産生されることで他のサイトカイン産生が抑制され、本来感染に対して起こるべき免疫応答が十分に発揮できていなかった可能性が考えられる。

本研究では、自然免疫を担う細胞の中でも特に血液中および腹水中の好中球、単球・マクロファージに絞りマウスサイトメトリーを行った。好中球は感染症の初期段階で動員され、貪食、活性酸素の生成、NETs の生成、アポトーシスな

どを通じて標的微生物を直接排除する (Janicova and Relja, 2021; Balamayooran et al, 2010)。さらに好中球は、サイトカインの産生を通じてその後の獲得免疫にも大きな影響を与えることが知られている (Hazeldine et al, 2014; Lelifeld et al, 2016)。本研究では、血液および腹水中の好中球上の CD11b 発現は Burn/CLP 群で高いことが示されたが、これは既報 (Janicova and Relja, 2021; Hazeldine et al, 2017) と同様の結果であった。CD11b は、CD18 とともにインテグリンを形成し、好中球の接着と遊走に重要な役割を果たしている (Janicova and Relja, 2021; Hazeldine et al, 2017; Anderson et al, 2000)。インテグリン作動薬によって CD11b/CD18 を活性化させると、好中球の接着を促進し、組織への好中球遊走を抑制することにより、炎症性腎炎が改善することが、Maiguel らによって報告されているが (Maiguel et al, 2011)、当研究で見られた Burn/CLP 群の好中球における CD11b 発現の増加の意義については明らかにすることができていない。

悪性腫瘍分野において新しい免疫チェックポイント阻害剤が次々に臨床応用され、次なる候補として注目されているターゲットのひとつに SIRP α があるが (Yanagita et al, 2017; Feng et al, 2019; Logtenberg et al, 2020; Zhang et al, 2020)、本研究では血液中、腹水中の好中球、単球・マクロファージいずれにおいてもこの SIRP α が Burn/CLP 群で高く発現していた。SIRP α は、貪食細胞の表面に発現する膜貫通型タンパク質で、貪食対象となる標的細胞上の CD47 が貪食細胞上の SIRP α と結合すると、“do not eat me signal” を発し、貪食細胞の貪食活性が抑制されると言われている (Zhang et al, 2020)。以上から本研究の Burn/CLP 群における SIRP α の高発現は、好中球やマクロファージなどの貪食能力の低下を示唆し、免疫反応の低下を反映している可能性がある。

一般に好酸球の鑑別マーカーとして使用される Siglec-F は、近年好中球の細胞表面にも発現されることが認識されているが、本研究の Burn/CLP 群の腹水中の好中球において Sham/CLP 群と比較して高く発現していることが示された。既報では、Siglec-F 陽性好中球は、アレルギー性鼻炎マウスモデルの鼻腔洗浄液や (Matsui et al, 2020)、急性心筋梗塞後の心筋組織 (Vafadrnejad et al, 2020) などの炎症局所の組織中で認められた他、肺腫瘍組織 (Engblom et al, 2017; Pfirschke et al, 2020) で検出され腫瘍形成促進に働くと考えられている (Engblom et al, 2017)。Siglec-F 陽性好中球は損傷した組織から放出される TGF- β 1 か顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (Granulocyte-macrophage colony stimulation factor: GM-CSF) もしくはその両方から影響を受けて Siglec-F 陰性好中球から生じると報告されている (Ryu et al, 2022)。また、Siglec-F 陽性好中球は、骨髄、脾臓、末梢血中ではほとんど検出されず、炎症組織中に存在することが多く、通常的好中球が数時間しか生存しない一方で Siglec-F 陽性好中球は数日間生存することができる過分葉好中球であるとの報告もある

(Pfirschke et al, 2020)。さらに、Siglec-F 陽性好中球は Siglec-F 陰性好中球と比較して活性酸素の産生能力や NETs 形成能力が高いことも示されている (Matsui et al, 2020; Ryu et al, 2022)。本研究で外傷後敗血症モデルである Burn/CLP 群の腹水中において Siglec-F 陽性好中球が多く見られた意義や予後との因果関係は明らかではないが、Burn/CLP 群の血液中被見られた TGF- β 1 がより多くの Siglec-F 陽性好中球を誘導した可能性が示唆される。

CD68 は単球やマクロファージの鑑別マーカーとして使用されるが、好中球など他の細胞にも CD68 が発現し得ることが報告されている (Chistiakov et al, 2017)。炎症性腸疾患患者の腸管粘膜組織に CD68 陽性好中球の浸潤が見られた報告があるものの (Amanzada et al, 2013)、CD68 陽性好中球についての既報は少ない。CD68 は炎症刺激によりマクロファージ上で高く発現することが報告され (Rabinowitz and Gordon, 1991)、マクロファージが貪食細胞であることから貪食に関わる因子である可能性も予想されたが、CD68 遺伝子をノックアウトしてもマクロファージの貪食能力は維持されることが報告されている (Song et al, 2011)。CD68 がマクロファージや単球の免疫機能において果たす役割の詳細は明らかにされておらず、CD68 陽性好中球についてはさらに未解明である。本研究の Burn/CLP 群において CD68 高発現好中球が Sham/CLP 群と比較した際に著しく減少していることを示したが、その意義は現時点ではわかっていない。

結論

【新知見】

本研究により下記の新知見が得られた。

- ・外傷後敗血症マウスモデルとして作製した Burn/CLP モデルは、コントロールの非外傷後敗血症マウスモデルとして作製した Sham/CLP モデルと比較して、14 日間生存率が低下し、脾臓のマクロファージの減少が反映する免疫応答の低下と、肝臓、腎臓、肺の臓器障害が進行していることが示された。
- ・Burn/CLP モデルでは Sham/CLP モデルと比較して、血清中の TGF- β 1 の上昇と他のサイトカインの全般的な産生低下が認められた。
- ・マスサイトメトリーの結果、Burn/CLP モデルの血液および腹水検体の好中球、単球・マクロファージの細胞表面上で CD11b および SIRP α が Sham/CLP モデルと比較して高く発現し、Burn/CLP モデルの腹水検体では Sham/CLP モデルと比較して Siglec-F 陽性好中球が多く見られた。
- ・CD68 高発現好中球が、Burn/CLP モデルの腹水中で著しく減少していることがわかった。

【新知見の意義】

Wanke-Jellinek らの研究では CpG-オリゴデオキシヌクレオチドの投与が、炎症性サイトカインの誘導やそれによる獲得免疫の調整にも寄与し、免疫恒常性が維持され外傷後二次性肺炎の予後が改善されることが示されている (Wanke-Jellinek et al, 2016)。当研究では外傷後敗血症モデルにおいて血清中の TGF- β 1 が上昇していたが、この TGF- β 1 の上昇に介入することでその後のサイトカイン放出や好中球フェノタイプの偏在にも影響を与え、外傷後の免疫不均衡が是正される可能性があると考えられる。

SIRP α -CD47 については、多剤との併用ではあるもののすでに悪性腫瘍領域で臨床試験が行われている (Zhang et al, 2020)。SIRP α が外傷後敗血症マウスモデルの好中球、単球・マクロファージにおいて発現が上昇していたことと、予後との因果関係が証明されれば、今後外傷後敗血症患者への適応拡大も検討される可能性がある。

CD11b、Siglec-F、CD68 陽性好中球の分布の違いについても、予後との因果関係を明かにすることで、外傷後免疫抑制状態への根本的介入の一助になる可能性がある。

【新知見から今後の展開】

外傷後敗血症の血中 TGF- β 1 の濃度や好中球フェノタイプの局在に介入することで、本来起こるべき免疫反応が回復し生存率や臓器損傷に改善が見られるかどうか、因果関係を明らかにすることが今後の研究課題である。

【今後の課題】

介入のタイミングを検討するため、本研究の外傷後敗血症モデルにおいて変化の見られた TGF- β 1 や細胞マーカー発現の経時的変化について把握し、TGF- β 1 や細胞マーカーの発現をノックアウトマウスや抗体を用いて検討する。

損傷組織から分泌されることが知られている TGF- β 1 は、今回外傷後敗血症モデルとして作製した Burn/CLP モデルの血液中で上昇していたが、本熱傷モデルでは体表面積 25%におよぶ組織損傷ができあがるため、TGF- β 1 の血中濃度の著しい上昇を招いた可能性が否定できない。そのため、熱傷モデル以外の外傷モデルでの血中濃度も測定する。

また、本研究はマウスモデルのみから得られた結果を元に解析、検討した研究であり、外傷患者の血液検体から同様の傾向が得られるか否か確認されていないため、臨床検体を使用した解析も意義があると考ええる。

謝辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費（18K16504 および 20K09260）の助成を受け行ったものです。

本研究の機会を与えていただきご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院・医学院 侵襲制御医学講座救急医学教室助教 和田剛志先生に深謝いたします。当実験にご協力・ご助言いただいた同教室医師 土田拓見先生、実験補助員 柏原志保様に御礼申し上げます。病理組織学的評価にあたり丁寧なご指導とご助言をいただきました北海道大学大学院医学研究院・医学院 病理学講座腫瘍病理学教室教授 田中伸哉先生、同教室助教 小田義崇先生に心より感謝申し上げます。また、免疫学的評価において多大なご協力・ご指導を賜りました大阪医科薬科大学救急医学教室准教授 山川一馬先生、同教室研究補助員 茅野勝英様に深く感謝致します。

利益相反

開示すべき利益相反状態はありません。

引用文献

【雑誌】

- Abdullahi A, Amini-Nik S, and Jeschke MG (2014) Animal models in burn research. *Cell Mol Life Sci* 71, 3241–3255.
- Adams JM, Hauser CJ, Livingston DH, Lavery RF, Fakete Z, and Deitch EA (2001) Early trauma polymorphonuclear neutrophil responses to chemokines are associated with development of sepsis, pneumonia, and organ failure. *J Trauma* 51, 452–456.
- Amanzada A, Malik IA, Blaschke M, Khan S, Rahman H, Ramadori G, and Moriconi F (2013) Identification of CD68⁺ neutrophil granulocytes in in vitro model of acute inflammation and inflammatory bowel disease. *Int J Clin Exp Pathol* 6, 561–570.
- Anderson SI, Hotchin NA, and Nash GB (2000) Role of the cytoskeleton in rapid activation of CD11b/CD18 function and its subsequent downregulation in neutrophils. *J Cell Sci* 113, 2737–2745.
- Angus DC and van der Poll T (2013) Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 369, 840–851.
- Batlle E and Massagué J (2019) Transforming growth factor- β signaling in immunity and cancer. *Immunity* 50, 924–940.
- Balamayooran G, Batra S, Fessler MB, Happel KI, and Jeyaseelan S (2010) Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs against bacteria. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43, 5–16.
- Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Peterson VM, and Goode AW (1997) Base deficit after major trauma directly relates to neutrophil CD11b expression: a proposed mechanism of shock-induced organ injury. *Intensive Care Med* 23, 504–509.
- Cecconi M, Evans L, Levy M, and Rhodes A (2018) Sepsis and septic shock. *Lancet* 392, 75–87.
- Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, and Bobryshev YV (2017) CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest* 97, 4–13.
- CRASH-3 trial collaborators (2019) Effects of tranexamic acid on death, disability, vascular occlusive events and other morbidities in patients with acute traumatic brain injury (CRASH-3): a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 394, 1713–1723.
- Engblom C, Pfirschke C, Zilionis R, Da Silva Martins J, Bos SA, Courties G, Rickelt S, Severe N, Baryawno N, Faget J, et al (2017) Osteoblasts remotely supply lung tumors with cancer-promoting SiglecF^{high} neutrophils. *Science* 358, eaal5081.
- Feng M, Jiang W, Kim BYS, Zhang CC, Fu YX, and Weissman IL (2019) Phagocytosis checkpoints as new targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 19, 568–586.

Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS, and Albelda SM (2009) Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* 16, 183–194.

García-Culebras A, Durán-Laforet V, Peña-Martínez C, Moraga A, Ballesteros I, Cuartero MI, de la Parra J, Palma-Tortosa S, Hidalgo A, Corbi AL et al (2019) Role of TLR4 (toll-like receptor 4) in N1/N2 neutrophil programming after stroke. *Stroke* 50, 2922–2932.

Guo Z, Kavanagh E, Zang Y, Dolan SM, Kriynovich SJ, Mannick JA, and Lederer JA (2003) Burn injury promotes antigen-driven Th2-type responses in vivo. *J Immunol* 171, 3983–3990.

Hanschen M, Tajima G, O’Leary F, Ikeda K, and Lederer JA (2011) Injury induces early activation of T cell receptor signaling pathways in CD4⁺ regulatory T cells. *Shock* 35, 252–257.

Hazeldine J, Hampson P, and Lord JM (2014) The impact of trauma on neutrophil function. *Injury* 45, 1824–1833.

Hazeldine J, Naumann DN, Toman E, Davies D, Bishop JRB, Su Z, Hampson P, Dinsdale RJ, Crombie N, Duggal NA, et al (2017) Prehospital immune responses and development of multiple organ dysfunction syndrome following traumatic injury: A prospective cohort study. *PLOS Med* 14, e1002338.

Hsieh T, Vaickus MH, Stein TD, Lussier BL, Kim J, Stepien DM, Duffy ER, Chiswich EL, and Remick DG (2016) The role of substance P in pulmonary clearance of bacteria in comparative injury models. *Am J Pathol* 186, 3236–3245.

Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, Bland KI, and Chaudry IH (2005) Cecal ligation and puncture. *Shock* 24 Suppl 1, 52–57.

Iskander KN, Vaickus M, Duffy ER, and Remick DG (2016) Shorter duration of post-operative antibiotics for cecal ligation and puncture does not increase inflammation or mortality. *PLOS ONE* 11, e0163005.

Janicova A and Relja B (2021) Neutrophil phenotypes and functions in trauma and trauma-related sepsis. *Shock* 56, 16–29.

Jaunoo SS and Harji DP (2009) Damage control surgery. *Int J Surg* 7, 110–113.

Kirihara Y, Takechi M, Kurosaki K, Kobayashi Y, and Kurosawa T (2013) Anesthetic effects of a mixture of medetomidine, midazolam and butorphanol in two strains of mice. *Exp Anim* 62, 173–180.

Leliefeld PH, Wessels CM, Leenen LP, Koenderman L, and Pillay J (2016) The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit Care* 20, 73.

Lichtman MK, Otero-Vinas M, and Falanga V (2016) Transforming growth factor beta

(TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis. *Wound Repair Regen* 24, 215–222.

Logtenberg MEW, Scheeren FA, and Schumacher TN (2020) The CD47-SIRP α immune checkpoint. *Immunity* 52, 742–752.

Maiguel D, Faridi MH, Wei C, Kuwano Y, Balla KM, Hernandez D, Barth CJ, Lugo G, Donnelly M, Nayer A, et al (2011) Small molecule-mediated activation of the integrin CD11b/CD18 reduces inflammatory disease. *Sci Signal* 4, ra57.

Matsui M, Nagakubo D, Satooka H, and Hirata T (2020) A novel Siglec-F⁺ neutrophil subset in the mouse nasal mucosa exhibits an activated phenotype and is increased in an allergic rhinitis model. *Biochem Biophys Res Commun* 526, 599–606.

Mortaz E, Zadian SS, Shahir M, Folkerts G, Garssen J, Mumby S, and Adcock IM (2019) Does neutrophil phenotype predict the survival of trauma patients? *Front Immunol* 10, 2122.

Ni Choileain N, MacConmara M, Zang Y, Murphy TJ, Mannick JA, and Lederer JA (2006) Enhanced regulatory T cell activity is an element of the host response to injury. *J Immunol* 176, 225–236.

Niiyama S, Takasu O, Sakamoto T, and Ushijima K (2016) Intraperitoneal adipose tissue is strongly related to survival rate in a mouse cecal ligation and puncture model. *Clin Transl Immunology* 5, e64.

O’Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, Chin DH, Mannick JA, and Rodrick ML (1995) Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann Surg* 222, 482–490.

Park MY, Kim HS, Lee HY, Zabel BA, and Bae YS (2020) Novel CD11b⁺ Gr-1⁺ Sca-1⁺ myeloid cells drive mortality in bacterial infection. *Sci Adv* 6, eaax8820.

Pfirschke C, Engblom C, Gungabeesoon J, Lin Y, Rickelt S, Zilionis R, Messemaker M, Siwicki M, Gerhard GM, Kohl A, et al (2020) Tumor-promoting Ly-6G⁺ SiglecF^{high} cells are mature and long-lived neutrophils. *Cell Rep* 32, 108164.

Puhl SL and Steffens S (2019) Neutrophils in post-myocardial Infarction Inflammation: damage vs. resolution? *Front Cardiovasc Med* 6, 25.

Rabinowitz SS and Gordon S (1991) Macrosialin, a macrophage-restricted membrane sialoprotein differentially glycosylated in response to inflammatory stimuli. *J Exp Med* 174, 827–836.

Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, and Ward PA (2009) Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* 4, 31–36.

Roberts I, Shakur H, Coats T, Hunt B, Balogun E, Barnettson L, Cook L, Kawahara T, Perel P, Prieto-Merino D, et al (2013) The CRASH-2 trial: a randomised controlled trial

and economic evaluation of the effects of tranexamic acid on death, vascular occlusive events and transfusion requirement in bleeding trauma patients. *Health Technol Assess* 17, 1–79.

Ryu S, Shin JW, Kwon S, Lee J, Kim YC, Bae YS, Bae YS, Kim DK, Kim YS, Yang SH, et al (2022) Siglec-F-expressing neutrophils are essential for creating a profibrotic microenvironment in the renal fibrosis. *J Clin Invest* 132, e156876.

Seshadri A, Brat GA, Yorkgitis BK, Keegan J, Dolan J, Salim A, Askari R, and Lederer JA (2017) Phenotyping the immune response to trauma: A multiparametric systems immunology approach. *Crit Care Med* 45, 1523–1530.

Shelley O, Murphy T, Paterson H, Mannick JA, and Lederer JA (2003) Interaction between the innate and adaptive immune systems is required to survive sepsis and control inflammation after injury. *Shock* 20, 123–129.

Silvestre-Roig C, Fridlender ZG, Glogauer M, and Scapini P (2019) Neutrophil diversity in health and disease. *Trends Immunol* 40, 565–583.

Silvestre-Roig C, Hidalgo A, and Soehnlein O (2016) Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood* 127, 2173–2181.

Song L, Lee C, and Schindler C (2011) Deletion of the murine scavenger receptor CD68. *J Lipid Res* 52, 1542–1550.

Stoecklein VM, Osuka A, and Lederer JA (2012) Trauma equals danger—damage control by the immune system. *J Leukoc Biol* 92, 539–551.

Tsuchida T, Wada T, Mizugaki A, Oda Y, Kayano K, Yamakawa K, and Tanaka S (2021) Protocol for a Sepsis Model Utilizing Fecal Suspension in Mice: Fecal Suspension Intraperitoneal Injection Model. *Frontiers in Medicine* 9, 765805.

Tsuda Y, Takahashi H, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN, and Suzuki F (2004) Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity* 21, 215–226.

Vafadarnejad E, Rizzo G, Krampert L, Arampatzi P, Arias-Loza AP, Nazzal Y, Rizakou A, Knochenhauer T, Bandi SR, Nugroho VA, et al (2020) Dynamics of cardiac neutrophil diversity in murine myocardial infarction. *Circ Res* 127, e232–249.

Vincent JL, Marshall JC, Namendys-Silva SA, François B, Martin-Loeches I, Lipman J, Reinhart K, Antonelli M, Pickkers P, Njimi H, et al (2014) Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med* 2, 380–386.

Wanke-Jellinek L, Keegan JW, Dolan JW, Guo F, Chen J, and Lederer JA (2016) Beneficial effects of CpG-oligodeoxynucleotide treatment on trauma and secondary lung infection. *J Immunol* 196, 767–777.

Wichterman KA, Baue AE, and Chaudry IH (1980) Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 29, 189–201.

Yamakawa K, Tajima G, Keegan JW, Nakahori Y, Guo F, Seshadri AJ, Cahill LA, and Lederer JA (2021) Trauma induces expansion and activation of a memory-like Treg population. *J Leukoc Biol* 109:645–656.

Yanagita T, Murata Y, Tanaka D, Motegi SI, Arai E, Daniwijaya EW, Hazama D, Washio K, Saito Y, Kotani T, et al (2017) Anti-SIRP α antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy. *JCI Insight* 2, e89140.

Yang P, Li Y, Xie Y, and Liu Y (2019) Different faces for different places: heterogeneity of neutrophil phenotype and function. *J Immunol Res* 2019, 8016254.

Yang S, Stepien D, Hanseman D, Robinson B, Goodman MD, Pritts TA, Caldwell CC, Remick DG, and Lentsch AB (2014) Substance P mediates reduced pneumonia rates after traumatic brain injury. *Crit Care Med* 42, 2092–2100.

Zhang W, Huang Q, Xiao W, Zhao Y, Pi J, Xu H, Zhao H, Xu J, Evans CE, and Jin H (2020) Advances in anti-tumor treatments targeting the CD47/SIRP α axis. *Front Immunol* 11, 18.

【Web サイト】

Centers for Disease Control and Prevention (2021) Injury prevention and control. Data and statistics. In CDC, https://www.cdc.gov/injury/wisqars/?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Finjury%2Fwisqars%2Foverview%2Fkey_data.html (2022年5月3日参照)

Ministry of Health, Labour and Welfare (2009) Statistics information and white paper. In Ministry of Health, Labour and Welfare, https://www.mhlw.go.jp/toukei_hakusho/index.html (2022年5月3日参照)