HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	新規敗血症モデルの開発に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	土田, 拓見
Description	配架番号：2736
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15205号
Issue Date	2022-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87665
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	TSUCHIDA_Takumi_abstract.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　土田　拓見

学 位 論 文 題 名

新規敗血症モデルの開発に関する研究
(Research on the development of a new sepsis model)

【背景と目的】敗血症は一般的な疾患であり、現在世界の 5 人に 1 人は敗血症により死亡している。その死亡率は 28～48%と非常に高く、救急・集中治療医にとって挑戦的な疾患であるがゆえに数多くの研究者が敗血症の研究をしてきた。しかし、現在までに臨床で有効性が認められた敗血症治療薬は皆無であり、敗血症治療薬の開発は停滞している。敗血症の免疫反応をターゲットとした治療薬が生み出せない主要な原因として、感染に対する免疫応答が関与する敗血症の病態生理が十分に解明されていないことが挙げられる。今日までの敗血症研究には、さまざまな動物モデルが用いられてきた。しかし、動物モデルでは成功した治療薬もヒトの臨床試験ではほとんど有効ではなかった。新規治療薬を開発するための動物モデルは、ヒトの疾患の経過を模倣したものでなければならないが、現在の敗血症モデル動物にはそれぞれに特有の問題点があり、敗血症治療薬の開発に最適なモデルは存在しない。現在、敗血症研究のスタンダードとなっている敗血症モデルは、CLP（Cecal Ligation and Puncture）モデルである。CLP モデルは、結紮した盲腸の遠位部を穿刺して便が漏れるようにした後に閉腹し、漏れ出た糞便による腹膜炎を誘発するモデルである。このモデルは、主にヒトの敗血症の血行動態と代謝、および特定の細胞タイプのアポトーシスと宿主の免疫反応が再現されている。しかし、その限界として、研究者間のばらつきが大きいこと、盲腸の形や大きさが異なること、炎症の限局化により腹膜炎に至らない個体が存在することなどが挙げられている。本研究では、研究者間の技術的な影響や動物の個体差を最小限に抑えた簡便で利用しやすい敗血症動物モデルを考案した。新規に作成した敗血症モデルマウスを病理学的、生理学的、免疫学的、細菌学的に CLP モデルと比較し、敗血症モデルとしての妥当性を評価した。

【材料と方法】7 週齢の ICR マウス(雄)を用いて実験を行った。24 時間以内に排泄された新鮮な便をフィルターで濾しながら生理食塩水で溶解し、糞便懸濁液を作成した。よく攪拌した糞便懸濁液を腹腔内に投与することにより、新規の敗血症モデルマウス（Fecal Suspension Intraperitoneal Injection Model：FSI モデル）を作成した。適切な死亡率となるモデルを作成するために、濃度の異なる糞便懸濁液を調製し、各濃度の糞便懸濁液間で生存率を比較した。糞便懸濁液の投与後に抗菌薬を用いる場合には、イミペネム／シラスタチンを 25mg／kg の用量で 1 日 2 回、3 日間投与した。最初の抗菌薬投与は、糞便懸濁液を注入した 2 時間後に行った。生存率は、術後 0～24 時間を 0 日目とし，14 日目まで観察して評価した。敗血症モデルとしての FSI モデルの妥当性を評価するために、死亡率が同じである CLP モデルと FSI モデルを、コントロール群とともに病理学、生理学、免疫学、細菌学の観点から比較した。CLP モデルと FSI モデルの比較は、手術 20 時間後のマウスが死亡し始める前に行った。病理学的な比較は、実質臓器のヘマトキシリン・エオジン染色とグラム染色を中心とした組織学的評価で行った。生理的評価は、バイタルサイン（呼吸数、体温）と血液ガス分析を比較して行った。免疫学的評価は、Luminex®

100/200™を用いたマルチプレックス分析によって行われた。細菌学的な比較は、腹水の細菌培養、およびMALDI Biotyper®を用いた菌種同定検査によって行われた。

【結果】FSI モデルでは、糞便懸濁液の濃度に比例して死亡率が上昇した。糞便懸濁液の濃度により、敗血症の重症度を調整することができた。FSI モデルでは CLP モデルに比べて糞便懸濁液を注入してから早期にマウスが死亡することが多かった。抗菌薬の投与により死亡率の低下と生存期間の延長が認められた。CLP モデルと同程度の死亡率の FSI モデルを用いて行った各種比較実験では、FSI モデル、CLP モデルともに敗血症に矛盾しない所見であった。病理学的評価では、両モデルともに肺で鬱血と好中球浸潤が認められた。脾臓においても両モデルで血球貪食が認められ、全身性の炎症が引き起こされていることが裏付けられた。生理学的評価では、FSI モデル、CLP モデルともに、頻呼吸、低体温、低血糖を示し敗血症に矛盾しない所見がみられた。CLP モデルの血液ガス分析結果では、ほとんどの項目で標準誤差が FSI モデルよりも大きかった。細菌学的評価では、両群ともに腹水培養結果が陽性となった。CLP モデルでは、培養が陰性の個体や菌数が非常に少ない個体が存在し個体差も大きかったが、FSI モデルでは、すべての個体から 10^3 CFU/mL 以上の複数の細菌種が培養された。免疫学的評価として LUMINEX システムを用いて炎症関連のサイトカインとケモカインを総合的に測定した結果、両モデルで高い炎症反応が認められた。測定パラメータによって若干異なったが、FSI モデルの標準誤差は全体的に小さかった。

【考察】FSI モデルの大きな特徴は、麻酔や外科的処置を必要とせずに容易に作成可能であることと、敗血症の重症度が均一なマウスを作成できることである。CLP モデルでは、盲腸の穿孔部位からの糞便流出の程度、穿孔部位の局在化の程度、盲腸遠位部の壊死の程度などによって重症度が異なる。生理学的、細菌学的、免疫学的な評価で得られた結果から、FSI モデルでは個体間のばらつきが少なく、モデル作成時のマウスの個体差による影響を最小限に抑えることができると考えられた。既存の動物敗血症モデルは、毒素の外因的投与、生存病原体の外因的投与、動物の内因性防護壁の変化の 3 つに分けられる。リポポリサッカライドなどの毒素の注入や Escherichia coli などの特定病原体の投与は、誤差の少ない正確な情報が得られるものの、臨床病態とは異なるという問題がある。一方、CLP モデルに代表される動物の内因性防御壁を変化させることで敗血症を誘導するモデルは、個体差が大きいという問題があるが、複数の原因菌による腹膜炎を呈する臨床病態に最も近いモデルである。FSI モデルは、特定の毒素や病原体を注射するモデルのように、複数の原因菌による腹膜炎を均一に発症させながら、個体差に左右されない正確な免疫学的評価が可能である。また、細菌学的評価の結果、CLP モデルでは腹水培養が陰性で細菌の増殖が非常に低い個体があった。膿瘍形成による腹膜炎の局所化は、CLP モデルでは大きな問題であり、炎症の限局化を促進させる薬剤候補が誤って有効と判断されてしまう可能性がある。FSI モデルは、CLP モデルに内在するこれらの問題を克服することができる。

【結論】本研究では、作成が容易な新規の敗血症モデルマウスである FSI モデルを開発し、組織学的、生理学的、細菌学的、免疫学的手法により、敗血症モデルとしての臨床的妥当性を証明した。個体差を最小限に抑えることができる FSI モデルは、今後敗血症研究における新たな知見を生み出し、敗血症の臨床転帰の改善に貢献するものと考えられる。