HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	新規敗血症モデルの開発に関する研究
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15205
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87666
Type	doctoral thesis
File Information	TSUCHIDA_Takumi.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

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）

２０２２年　９月

北　海　道　大　学

土　田　　拓　見

学　位　論　文

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）

２０２２年　９月

北　海　道　大　学

土　田　　拓　見

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 ‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　５頁

緒 言 ‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　６頁

緒 言 （序章）‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　８頁

方 法 （序章）‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　９頁

結 果 （序章）‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　１４頁

考 察 （序章）‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　２２頁

緒 言 （本章）‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　２５頁

方 法 （本章）‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　３１頁

結 果 （本章）‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　４０頁

考 察 （本章）‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　５１頁

結 論 ‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　５３頁

謝 辞 ‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　５５頁

利益相反‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　５５頁

引用文献 ‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥　５６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. Takumi Tsuchida, Takeshi Wada, Asumi Mizugaki, Yoshitaka Oda, Katsuhide Kayano, Kazuma Yamakawa, Shinya Tanaka

   Protocol for a Sepsis Model Utilizing Fecal Suspension in Mice: Fecal Suspension Intraperitoneal Injection Model.

   Frontiers in Medicine 9: 765805（2022）

2. Takumi Tsuchida, Takeshi Wada, Satoshi Gando

   Coagulopathy Induced by Veno-Arterial Extracorporeal Membrane Oxygenation Is Associated With a Poor Outcome in Patients With Out-of-Hospital Cardiac Arrest.

   Frontiers in Medicine 8: 651832（2021）

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Tsuchida T, Hayakawa M, Maekawa K, Wada T, Katabami K, Yoshida T, Saito T, Hayamizu M, Oyasu T, Honma Y, Mizukaki A, Kawahara S, Sadamoto Y, Takahashi Y, Takahashi M, Tahara S, Moriki K

   The effect of veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation for patients with out-of hospital cardiac arrest: A propensity score matched analysis

   ESICM 32nd Annual Congress Berlin (2019 年 9 月 30 日)

要 旨

【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。敗血症は、感染症に対する免疫反応をはじめとする生体反応が制御不能に陥ることで臓器不全を生じた状態と定義される。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、動物モデルで成功した治療薬がヒトの臨床試験で効果を示したものはない。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、敗血症研究の標準的な敗血症モデルは、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、漏れ出た糞便と壊死組織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を再現している。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、麻酔による免疫変化があること、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生理食塩水で溶解しフィルターで濾して、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、死亡率が同程度である 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、術後 20 時間後、すなわち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。生理学的評価は、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り行った。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り行った。

【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。FSI モデルの血液ガス分析では、ほとんどの項目で標準誤差が CLP モデルよりも小さかった。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 1ml あたり 10^3 Colony Forming Unit 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ることができる。FSI モデルでは、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、膿瘍形成を伴う CLP モデルを用いた実験で有効性が証明された薬剤が、臨床的な敗血症治療では効果がない場合がある。また、CLP モデルを用いた場合、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といった問題もあった。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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

APACHE II	acute physiology and chronic health evaluation II
AUC	area under the curve
CFU	colony forming unit
CLP	cecal ligation and puncture
CPC	cerebral performance category
DIC	disseminated intravascular coagulation
FDP	fibrin/fibrinogen degradation products
FSI	fecal suspension intraperitoneal injection
ICR	institute of cancer research
IL	interleukin
LPS	lipopolysaccharide
PCAS	post-cardiac arrest syndrome
PICS	persistent inflammation immunosuppression catabolism syndrome
PT	prothrombin time
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

ROC	receiver operating characteristic
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SOFA	sequential organ failure assessment
VA-ECMO	veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation

緒 言

1960 年代に緊急を要する病態の患者への医療ニーズの高まりから誕生した救急医療はその後急速に世界に広まり、専門分野としての救急医学の地位が確立されていった(Hughes, 2005; Williams, 2018)。救急医療システムが患者の転帰を改善することは数多くのレビューで示されており(Murray et al., 2020; Razzak and Kellermann, 2002; Thind et al., 2015)、本邦においては 1973 年に日本救急医学会が設立され、昨今の救急医療システムが構築されている(Hori, 2010)。

救急医療システムの発展とともに救急医学研究も盛んに行われるようになっていった。“医学は不確実性の科学であり確率の芸術である”(Bean, 1954)と言われているが、特に救急医学は不確実性による困難に頻繁に直面する(Platts-Mills et al., 2020)。この不確実性の問題だけでなく、高額な研究資金の必要性やインフォームドコンセント取得の難しさが救急医学研究の妨げになっているが(Kline, 2014; Limkakeng et al., 2014)、これらの壁を乗り越えて救急領域でも多くの素晴らしい臨床論文が発表されてきた(Heyworth and Mason, 2018)。

救急医療システムの構築や臨床研究からの知見により救急医学は発展してきた。しかし、先に述べた救急医学研究に立ちはだかる障壁とその歴史の浅さから、救急医学の進歩は他の医学領域に比較して遅いといっても過言ではない。基礎研究によって敗血症、外傷、虚血再灌流障害などの侵襲における生体内分子の挙動の一部が明らかとなっているが、その結果から創薬にまで至った例は驚くほど少ない。今日の救急患者の予後改善は、患者の適切な循環管理、体液量・輸液量管理、呼吸管理と、搬送システムの確立、専門病院・部門の設立といったシステム面改善の賜物である。これらのほとんどは臨床研究によって得られた成果である。救急医学領域において基礎研究の結果が患者の利益に結び付いていない、すなわち橋渡し研究が十分に進んでいない現状は大きな課題である。

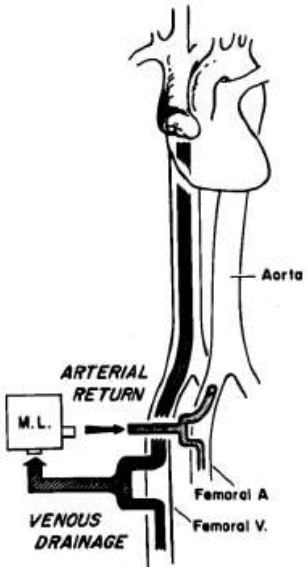
序 章

体外式膜型人工肺によって誘発される凝固障害と院外心停止患者の転帰の関連

緒 言

本研究は本論文の主題目である新規敗血症モデルの開発に関する研究を志す契機となった臨床研究で、私が大学院入学時より取り組んだ萌芽研究である。

静脈動脈体外式膜型人工肺（veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation: VA-ECMO）は、患者の静脈から血液を取り出し、人工肺で酸素化した血液を再度患者の動脈へ戻すポンプを用いた体外循環による生命維持装置である（右図）。

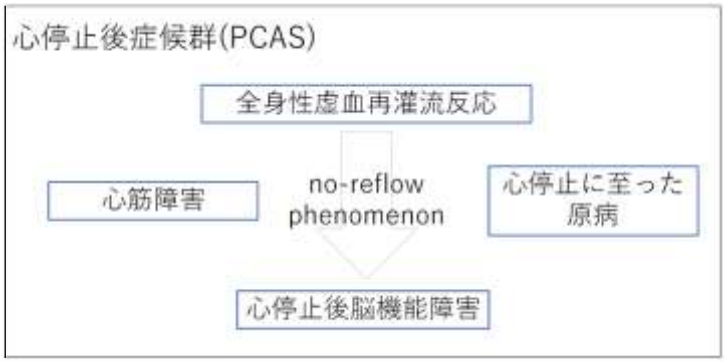


大腿動静脈アプローチによる VA-ECMO (Zapol et al., 1977)より

VA-ECMO が心停止患者に応用されたのは 1960 年頃であり(Kennedy, 1966)、それから新生児(Bartlett et al., 1976)、成人の呼吸不全(Zapol et al., 1977)へと本格的な臨床応用がなされた。今日においては重症呼吸不全や循環不全の治療選択肢としての地位が確立され、心停止患者においても従来の蘇生法に反応しない患者への適応がガイドラインで示されている(Panchal et al., 2020; Soar et al., 2015)。しかし、心停止患者に対する VA-ECMO が患者の予後を改善するかどうかは最近になっても結論が分かれている(Belohlavek et al., 2022; Scquizzato et al., 2022; Yannopoulos et al., 2020)。

また、心停止から蘇生された患者は、しばしば心停止後症候群（post-cardiac arrest syndrome：PCAS）を発症する。PCAS は、心停止後脳損傷、心停止後心筋機能障害、全身性虚血再灌流障害、および心停止の原病の複雑な組み合わせである(Neumar et al., 2008)。そして、全身性虚血再灌流障害の主な病態生理は全身性炎症反応症候群（systemic inflammatory response syndrome: SIRS）と凝固亢進であり、その結果として播種性血管内凝固症候群（disseminated intravascular coagulation: DIC）が引き起こされる(Wada, 2017; Wada et al., 2013)。 DIC は、組織因子依存性凝固カスケードの広範な活性化、血管内皮細胞の活性化と損傷による生

理学的抗凝固経路の破綻による凝固の不適切な制御、血管内のフィブリン形成、そして最終的には血管の血栓性閉塞によって生じる細胞と組織への酸素供給の低下を特徴とする(Levi and Ten Cate, 1999)。これらの変化は、微小血管系への損傷と臓器機能障害を引き起こす(Taylor et al., 2001)。特に、“no-reflow phenomenon”と呼ばれる DIC 誘発性の脳の微小血管血栓性閉塞は、安定した全身循環状態でも残存する脳機能障害を特徴とする(Ames et al., 1968)（右上図)。これらの所見は、PCAS 関連の凝固障害が心停止後の脳損傷の病態生理と密接に関連していることを示唆している(Wada et al., 2013)。



また、体外循環回路内の内皮化されていない表面への患者血液の曝露が、全身性炎症と凝固活性化を誘発することが示されている(Millar et al., 2016)。この結果は、心停止患者に対する VA-ECMO の導入が PCAS 関連の SIRS および DIC を悪化させ、ひいては VA-ECMO 導入患者の転帰を悪化させている可能性を示唆しているが、VA-ECMO により誘発された凝固障害が患者の予後に与える影響は不明なままである。本研究の目的は、VA-ECMO によって引き起こされた凝固線溶反応を評価し、患者の予後不良因子となっている要因を特定することである。

方 法

【倫理的声明】

本研究は、「ヘルシンキ宣言（2013 年 10 月修正)」及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」（平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号）を遵守して実施した。本研究は人体から採取した試料を用いないことから、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」（平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号）より、必ずしもインフォームドコンセントの取得を必要としないため、当該手続きを省略した。研究の目的を含む研究の実施についての情報を北海道大学病院ホームページに掲載することで研究対象者又は代理人（研究対象者の意思及び利益を代弁できると考えられる者）に拒否をする機会を与えた。研究プロトコルは、北海道大学病院内審査委員会によって承認され（承認番号：180831)、情報公開用文書は審査委員会で承認を

得たものを使用した。

【対象患者】

2010 年 1 月から 2017 年 12 月までに心原性院外心停止によって北海道大学病院に搬入され、蘇生後に同院集中治療室に入院した成人患者を対象とした。凝固線溶反応を詳細に評価するために本研究では次の除外基準を設けた。(1) 18 歳未満の患者、(2) 外傷、急性大動脈解離、大動脈瘤破裂による心停止患者、(3) 抗凝固療法中の患者、(4) 凝固線溶系障害の基礎疾患を有する患者。さらに、心停止時刻が不明な症例とデータが欠損している症例については正確な評価ができないため除外した。

【設定】

対象となった患者の電子医療記録を後方視的に収集し、年齢、性別、発症からの時間経過、目撃者による心肺蘇生の有無、救急隊接触時の心電図初期波形、アドレナリン総投与量、入院日数、入院 28 日後の状態などの患者の基礎情報と DIC 関連の評価項目ならびに検査結果項目を入手した。DIC 関連の評価項目ならびに検査結果項目は、Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II（APACHE II）スコア、Sequential Organ Failure Assessment（SOFA）スコア、日本救急医学会 DIC スコア、国際血栓止血学会 DIC スコア、血小板数、プロトロンビン時間（prothrombin time: PT）比、フィブリン/フィブリノゲン分解産物（fibrin/fibrinogen degradation products: FDP）、フィブリノゲン、アンチトロンビン活性、乳酸値である。これらの項目を取得するための血液検査は、到着時から入院 3 日目まで連日行われた。各項目は、(1) 救急外来到着時、(2) 救急外来到着から入院 24 時間後、(3) 入院 24～48 時間後、(4) 入院 48～72 時間後の 4 つの時点で測定した。また、各因子の予後に対する変化を評価するため、これら 4 時点の各因子の最大値と最小値を算出した。全症例を VA-ECMO を導入した VA-ECMO＋群と、導入しなかった VA-ECMO－群の 2 群に分けた。

VA-ECMO は、SAVE-J 試験の基準（右表）に従って導入した(Sakamoto et al., 2014)。VA-ECMO 中の抗凝固療法には未分画ヘパリンを使用した。未分画ヘパリンの投与量は、活性化凝固時間が 180～220 秒、または活性化部分トロンボプラスチン時間が基礎値の 1.5～2.5 倍を維持するように調整された。

(表) VA-ECMO の導入基準（Sakamoto et al., 2014)より

対象基準
初回心電図で心室細動または心室頻拍が確認された者
心肺蘇生を行っているのも関わらず、病院到着（医師診察）後、少なくとも 15 分間心停止が持続する者
通報または心停止発生から病院到着まで 45 分以内
除外基準
20 歳未満または 75 歳以上
心停止発症前の日常生活動作が不良の患者
患者の代理人から治療の許可を得られない患者

【定義と評価方法】

DIC は日本救急医学会 DIC スコア(Gando et al., 2008)、および国際血栓止血学会 DIC スコア(Taylor et al., 2001)に基づき診断した。臓器不全は SOFA スコア(Ferreira et al., 2001)を用いて評価した。患者の重症度は APACHE II スコアで評価した(Knaus et al., 1985)。転帰は入院 28 日目の病院死亡と cerebral performance category（CPC）スケール(Teasdale and Jennett, 1974)を用いて評価した。CPC 1 と 2 を神経学的予後良好、CPC 3～5 を神経学的予後不良と定義した。各スコアの評価項目を下に示す。

●日本救急医学会 DIC スコア（Gando et al., 2008）

	SIRS 項目数	血小板数(×10^4/μL)	PT 比	FDP (μg/ml)
0	0-2	＞12	＜1.2	＜10
1	≧3	≧8，＜12 または 24 時間以内に 30%以上の減少	≧1.2	≧10，＜25
2	-	-	-	-
3	-	＜8 または 24 時間以内に 50%以上の減少	-	≧25
4 点以上を DIC と定義する				

SIRS 診断基準

体温	36℃以下または 38℃以上
心拍数	90 回/min 以上
呼吸	呼吸数 20 回以上または動脈血二酸化炭素分圧 32mmHg 以下
白血球数	12000/mm^3 以上または 4000/mm^3 以下 または幼若球数 10%以上

●国際血栓止血学会 DIC スコア（Taylor et al., 2001）

	フィブリノゲン(mg/dl)	血小板数(×10^4/μL)	PT 秒	FDP
0	-	＞10	＜3	-
1	≦100	≧5，＜10	≧3，＜6	-
2	-	＜5	≧6	中等度増加
3	-		-	著明増加
5 点以上を DIC と定義する				

※本研究では FDP 10μg/ml 以上を中等度増加、25μg/ml 以上を著明増加と定義した。

●SOFA スコア（Ferreira et al., 2001）

	0	1	2	3	4
呼吸器 PaO2/FiO2 (mmHg)	＞400	≦400	≦300	≦200 ＋呼吸補助	≦100 ＋呼吸補助
凝固機能 血小板数（×10³/μL）	＞150	≦150	≦100	≦50	≦20
肝機能 ビリルビン値(mg/dL)	＜1.2	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	＞12.0
心機能	平均動脈圧 ≧70mmHg	平均動脈圧 ＜70mmHg	DOA≦5γ or DOB 投与 (投与量不問)	DOA＞5γ or NAD≦0.1γ or AD≦0.1γ	DOA＞15γ or NAD＞0.1γ or AD＞0.1γ
中枢神経系 Glasgow Coma Scale	15	13-14	10-12	6-9	＜6
腎機能 クレアチニン(mg/dL)	＜1.2	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9	≧5.0

PaO2: 動脈血酸素分圧，FiO2: 吸入中酸素濃度，薬剤投与単位：γ (μg/kg/min)
DOA: ドパミン，DOB: ドブタミン，NAD: ノルアドレナリン，AD: アドレナリン

Glasgow Coma Scale (Teasdale and Jennett, 1974)

観察項目	反応	スコア
E（開眼）	自発的に	4
	呼びかけにより	3
	痛み刺激により	2
	無反応	1
V（最良言語反応）	見当識あり	5
	混乱した会話	4
	不適切な単語	3
	意味不明の発声	2
	無反応	1
M（最良運動反応）	命令に従う	6
	疼痛部位認識（痛覚刺激部位に手が動く）	5
	逃避（正常屈曲反応）	4
	異常屈曲（除皮質肢位）	3
	伸展（除脳肢位）	2
	無反応	1

●APACHE II スコア（Knaus et al., 1985）

A：生理学的スコア	4	3	2	1	0	1	2	3	4
直腸温（℃）	≧41	39-40.9	-	38.5-38.9	36-38.4	34-35.9	32-33.9	30-31.9	≦29.9
平均血圧（mmHg）	≧160	130-159	110-129	-	70-109	-	50-69	-	≦49
心拍数（/min）	≧180	140-179	110-139	-	70-109	-	55-69	40-54	≦39
呼吸数（/min）	≧50	35-49	-	25-34	12-24	10-11	6-9	-	≦5
A-aDO2（FIO2>0.5）	≧500	350-499	200-349	-	＜200	-	-	-	-
PaO2（FIO2<0.5）	-	-	-	-	＞70	61-70	-	55-60	＜55
pH（動脈血）	≧7.7	7.6-7.69	-	7.5-7.59	7.33-7.49	-	7.25-7.32	7.15-7.24	＜7.15
血清 Na（mmol/L）	≧180	160-179	155-159	150-154	130-149	-	120-129	-	≦119
血清 K（mmol/L）	≧7	6.0-6.9	-	5.5-5.9	3.5-5.4	3-3.4	2.5-2.9	-	＜2.5
血清クレアチニン（mg/dL）	≧3.5	2.0-3.4	1.5-1.9	-	0.6-1.4	-	＜0.6	-	-
ヘマトクリット（%）	≧60	-	50-59.9	46-49.9	30-45.9	-	20-29.9	-	＜20
白血球数（×1000/μl）	≧40	-	20-39.9	15-19.9	3-14.9	-	1-2.9	-	＜1
血清 HCO3	≧52	41-51.9	-	32-40.9	22-31.9	-	18-21.9	15-17.9	＜15
Glasgow Coma Scale	Score=15-GCS								

A-aDO2: 肺胞気動脈血酸素分圧較差, FiO2: 吸入中酸素濃度, PaO2: 動脈血酸素分圧

B：年齢スコア

≦44 歳：0 点、45～54 歳：1 点、55～64 歳：3 点、65～74 歳：5 点、≧75 歳：6 点

C：慢性病態スコア

非手術または緊急手術後：5 点、定期手術後：2 点

APACHE II スコア＝生理学的スコア＋年齢スコア＋慢性病態スコア（A+B+C）

●CPC スケール(Teasdale and Jennett, 1974)

CPC		
1	機能良好	意識清明。普通の生活や労働が可能。
2	中等度障害	軽度の障害があるが、保護された状況下で労働可能。
3	高度障害	脳神経学的障害により日常生活に介助が必要。
4	昏睡、植物状態	脳死の基準を満たさない昏睡。周囲との意思疎通は不可能。
5	死亡、脳死	自発呼吸なし、脳幹反射消失、平坦脳波。

【統計学的手法】

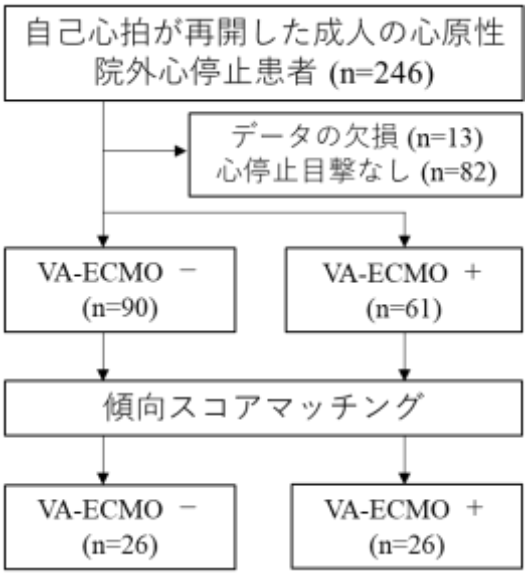
患者の特徴および転帰は、数値変数を Mann-Whitney U 検定、カテゴリー変数をカイ二乗検定または Fisher's の正確検定によって 2 群間で比較した。VA-ECMO＋群と VA-ECMO－群の間で、年齢、性別、発見から病院到着までの時間の 3 つの因子を用いて傾向スコアマッチングを行った。VA-ECMO＋群ではサブ解析も行った。サブ解析では、ロジスティック回帰分析（変数減少法［尤度比］）と受信者動作特性（Receiver Operating Characteristic: ROC）曲線の曲線下面積（Area Under the Curve: AUC）を用いて、各凝固線溶マーカーが予後に及ぼす影響を評価した。ROC 曲線の最適なカットオフ値は、Youden index を用いて算出した。単変量解析で 10%水準で統計的に有意とされた変数を多変量解析モデルに含めた。

連続変数のデータは中央値および四分位範囲（25-75 パーセンタイル）として表示した。カテゴリーデータは度数およびパーセンテージで示した。すべての解析は IBM SPSS ソフトウェア（version 25; IBM Japan、東京、日本）によって行われた。すべての P 値は両側であり、P 値が 0.05 以下の場合に統計学的有意差ありとみなした。

結 果

【患者の臨床的特徴】

自己心拍が再開した成人の心原性院外心停止患者 246 例から、心停止時の目撃者がいない症例とデータ欠損のある症例を除いた 151 例を解析した（図 1-1）。本研究の対象となった院外心停止患者 151 人の背景は（表 1-1）に示した。61 人の患者に VA-ECMO が導入され（VA-ECMO＋群）、90 人には導入されなかった（VA-ECMO－群）。VA-ECMO＋群では、男性の割合が有意に高かった。また、VA-ECMO＋群は VA-ECMO－群に比べ若年であった。通報から病院到着までの時間、現場（非医療者）の心肺蘇生、初期心電図波形などの病院前要因は、VA-ECMO＋群と VA-ECMO－群で有意差はなかった。しかし、VA-ECMO＋群では、通報から循環開始（自己心拍再開、または VA-ECMO 開始）まで



(図 1-1) 対象集団のフローチャート

の時間が VA-ECMO－群に比べ長かった。また、VA-ECMO＋群の APACHE II スコア、DIC スコア、SOFA スコアは VA-ECMO－群に比べ有意に高く、神経学的転帰および病院死亡は VA-ECMO＋群で VA-ECMO－群に比べ有意に不良であった。

表 1-1　解析の対象となった成人の心原性院外心停止患者の特徴

	VA-ECMO－ (n=90)	VA-ECMO＋ (n=61)	P 値
年齢	73.5 (61.0-80.0)	63.0 (52.0-68.0)	<0.001
性別；男性（%）	54 (60.0)	53 (88.3)	<0.001
通報から病院到着までの時間（分）	33.0 (27.0-38.0)	31.0 (27.0-44.0)	0.780
通報から循環再開までの時間（分）	25.0 (16.3-37.0)	51.0 (42.0-64.0)	<0.001
現場で心肺蘇生があった割合（%）	54 (60.0)	37 (60.7)	0.536
除細動可能な初期波形の割合（%）	43 (47.8)	40 (65.6)	0.072
アドレナリン総投与量（mg）	0.0 (0.0-1.0)	2.0 (1.0-3.0)	<0.001
APACHE II スコア	33.0 (28.0-36.0)	37.0 (34.0-41.0)	<0.001
日本救急医学会 DIC スコア（最大値）	3.0 (2.0-5.0)	7.0 (6.0-8.0)	<0.001
日本救急医学会 DIC スコア（最小値）	1.0 (0.0-1.8)	5.0 (3.0-6.0)	<0.001
国際血栓止血学会 DIC スコア（最大値）	3.0 (2.0-4.0)	6.0 (5.0-6.0)	<0.001
国際血栓止血学会 DIC スコア（最小値）	0.0 (0.0-2.0)	3.0 (1.0-4.0)	<0.001
SOFA スコア（最大値）	7.0 (6.0-10.0)	13.0 (12.0-15.0)	<0.001
SOFA スコア（最小値）	3.0 (1.3-5.0)	10.0 (7.0-12.0)	<0.001
入院日数（日）	13.5 (5.0-21.8)	12.0 (5.0-24.0)	0.824
神経学的予後不良（人数, %）	61 (67.8)	54 (88.5)	0.003
病院死亡（人数, %）	18 (20.0)	30 (49.2)	<0.001

中央値（25－75 パーセンタイル）で表示

【傾向スコアマッチング】

個々の患者のばらつきと病院到着前の重症度によるバイアスを減らすために、年齢、性別、および通報から循環再開までの時間の 3 つの要素について、2 つのグループ間で傾向スコアマッチングを実行した。傾向スコアモデルの c 統計量は 0.885 であり、これは 2 つの群間において良好な患者割り付けが行われたことを示している。傾向スコアマッチングによって、最終的に各群から 26 人ずつの患者が選択された（図 1-1）。表 1-2 にマッチング後の患者の特徴を示した。 2 つの群間で病院に到着する前の時間

的要因に有意差はなく、心停止から自己心拍再開までの時間に差はなかった。APACHE II スコアは、VA-ECMO＋群で高くなる傾向があったが、統計学的に有意ではなく、2 つの群に大きなばらつきはなかった。

表 1-2　傾向スコアマッチングにより割り付けられた患者の特徴

	VA-ECMO－ (n=26)	VA-ECMO＋ (n=26)	P 値
年齢	62.5 (55.3-76.0)	66.5 (58.5-72.8)	0.905
性別；男性（%）	21 (80.1)	22 (84.6)	0.500
通報から病院到着までの時間（分）	34.5 (27.3-39.3)	30.0 (27.0-38.3)	0.436
通報から循環再開までの時間（分）	34.0 (21.0-44.0)	42.0 (29.0-53.0)	0.245
現場で心肺蘇生があった割合（%）	15 (57.7)	16 (61.5)	0.500
除細動可能な初期波形の割合（%）	21 (80.8)	19 (73.1)	0.372
アドレナリン総投与量（mg）	0.0 (0.0-1.6)	2.0 (1.3-3.8)	<0.001
APACHE II スコア	34 (29.5-36.0)	37 (33.0-39.8)	0.060
日本救急医学会 DIC スコア（最大値）	3.5 (2.0-5.0)	7.0 (6.0-8.0)	<0.001
日本救急医学会 DIC スコア（最小値）	1.0 (1.0-1.0)	5.0 (3.3-6.0)	<0.001
国際血栓止血学会 DIC スコア（最大値）	3.0 (2.0-4.0)	5.5 (5.0-6.0)	<0.001
国際血栓止血学会 DIC スコア（最小値）	0.0 (0.0-1.8)	3.5 (1.3-4.0)	<0.001
SOFA スコア（最大値）	7.0 (5.3-8.0)	13.0 (11.3-14.8)	<0.001
SOFA スコア（最小値）	3.0 (2.0-4.8)	10.0 (6.0-12.0)	<0.001
入院日数（日）	16.5 (8.5-28.8)	11.0 (4.3-24.8)	0.216
神経学的予後不良（人数, %）	18 (69.2)	22 (84.6)	0.066
病院死亡（人数, %）	5 (19.2)	11 (42.3)	0.143

中央値（25－75 パーセンタイル）で表示

VA-ECMO＋群は、臓器不全と DIC の重症度を包括的に評価した各スコアでより悪い値を示した（表 1-1、表 1-2）。さらに、VA-ECMO＋群では重度の凝固障害が見られた（表 1-3）。 VA-ECMO＋群は、FDP、PT 比の有意な増加と血小板、フィブリノゲンの減少、およびアンチトロンビン活性の低下があった。 2 つの群間で病院死亡率の有意差はなかったが、VA-ECMO＋群ではより悪い転帰に向かう傾向があった（表 1-2）。傾向スコアマッチングによって入院前の要因を調整した後でも、VA-ECMO＋群は VA-ECMO－群よりも SOFA スコア、国際血栓止血学会 DIC スコア、および日本救急医学会 DIC スコアが高く凝固障害が重症であった（表 1-2）。

表 1-3　傾向スコアマッチングで割り付けられた患者の凝固線溶マーカーと乳酸値

	VA-ECMO－ (n=26)	VA-ECMO＋ (n=26)	P 値
血小板数（搬入時）(×10⁹/L)	169 (132-216)	75 (57-103)	<0.001
血小板数（最大値）(×10⁹/L)	169 (132-216)	88 (71-106)	<0.001
血小板数（最小値）(×10⁹/L)	12.5 (9.4-14.8)	5.5 (4.7-7.7)	<0.001
PT 比　（搬入時）	1.1 (1.0-1.3)	1.7 (1.4-2.2)	<0.001
PT 比　（最大値）	1.2 (1.1-1.4)	1.8 (1.4-2.3)	<0.001
PT 比　（最小値）	1.0 (1.0-1.1)	1.1 (1.0-1.3)	0.056
FDP（搬入時）(mg/L)	23.4 (11.2-48.4)	205.0 (82.1-412.0)	<0.001
FDP（最大値）(mg/L)	24.5 (11.7-48.4)	205.0 (86.3-412.0)	<0.001
FDP（最大値）(mg/L)	5.9 (3.8-9.1)	16.8 (8.7-47.6)	<0.001
フィブリノゲン（搬入時）(g/L)	2.58 (2.12-3.01)	2.13 (1.50-2.47)	<0.001
フィブリノゲン（最大値）(g/L)	4.87 (4.11-5.64)	3.97 (3.01-4.49)	0.001
フィブリノゲン（最小値）(g/L)	2.45 (2.12-3.01)	2.08 (1.48-2.40)	0.004
アンチトロンビン活性（搬入時）(%)	70.5 (61.0-85.3)	49.0 (42.0-63.8)	<0.001
アンチトロンビン活性（最大値）(%)	82.0 (69.0-90.5)	64.0 (53.0-70.8)	0.001
アンチトロンビン活性（最少値）(%)	68.0 (56.8-79.0)	44.0 (40.0-53.0)	<0.001
乳酸値（搬入時）(mmol/L)	10.0 (7.2-12.8)	15.0 (12.9-17.8)	<0.001
乳酸値（最大値）(mmol/L)	10.0 (7.2-12.8)	15.0 (12.9-17.8)	<0.001
乳酸値（最小値）(mmol/L)	1.0 (0.8-1.6)	1.7 (1.2-3.2)	0.001

中央値（25－75 パーセンタイル）で表示

【VA-ECMO＋群を対象としたサブ解析】

サブ解析は、VA-ECMO を受けた 61 人の患者に対して実施された。患者は、入院中の生存有無と入院後 28 日目の神経学的転帰に応じて 2 つの群に分けられた（表 1-4、表 1-5）。予後別による比較でも、2 つの群間で入院前の患者因子に有意差はなかったが、SOFA スコア（最大値）、PT 比（最小値）、およびアンチトロンビン活性（最大値）に有意差があった。生存者と非生存者の間の比較では、それらに加えて SOFA スコア（最小値）、FDP（最大値）、フィブリノゲン（最大値）、および乳酸値（最小値）にも有意差があった。

表 1-4　予後別に見た VA-ECMO+群の患者背景と重症度

	生存 (n=31)	死亡 (n=30)	P 値	予後良好 (n=7)	予後不良 (n=54)	P 値
年齢	63.0 (48.0-68.0)	62.5 (53.0-69.8)	0.644	66.0 (47.0-67.5)	62.5 (52.3-68.8)	0.851
性別；男性（%）	27 (87.1)	26 (86.7)	0.628	6 (85.7)	47 (87.0)	0.647
通報から病院到着までの時間（分）	30.0 (27.0-42.0)	32.5 (27.3-43.3)	0.634	28.0 (25.5-34.0)	32.0 (27.0-44.0)	0.279
通報から循環再開までの時間（分）	52.0 (44.0-66.5)	48.0 (38.0-61.8)	0.462	51.0 (48.5-56.5)	50.5 (39.8-64.0)	0.956
現場で心肺蘇生があった割合（%）	19 (61.3)	18 (60.0)	0.563	6 (85.7)	31 (57.4)	0.151
除細動可能な初期波形の割合（%）	22 (71.0)	18 (60.0)	0.206	6 (85.7)	34 (63.0)	0.247
アドレナリン総投与量（mg）	2.0 (0.0-3.0)	2.0 (1.3-3.0)	0.475	2.0 (1.5-2.5)	2.0 (1.0-3.0)	0.903
APACHE II スコア	37.0 (33.5-38.5)	38.0 (35.0-42.0)	0.107	36.0 (33.5-37.5)	38.0 (34.0-41.0)	0.428
日本救急医学会 DIC スコア（最大値）	8.0 (6.5-8.0)	7.0 (6.0-8.0)	0.160	7.0 (7.0-8.0)	7.5 (6.0-8.0)	0.682
日本救急医学会 DIC スコア（最小値）	4.0 (3.0-5.0)	5.0 (3.3-6.0)	0.725	4.0 (4.0-4.5)	5.0 (3.0-6.0)	0.634
国際血栓止血学会 DIC スコア（最大値）	6.0 (5.0-6.5)	6.0 (5.0-6.0)	0.638	6.0 (5.0-6.0)	6.0 (5.0-6.0)	0.974
国際血栓止血学会 DIC スコア（最小値）	3.0 (1.0-4.0)	4.0 (2.0-5.0)	0.098	2.0 (1.0-3.0)	4.0 (1.3-4.0)	0.161
SOFA スコア（最大値）	13.0 (12.0-14.0)	14.5 (12.0-17.0)	0.036	12.0 (10.5-12.5)	13.0 (12.0-15.0)	0.030
SOFA スコア（最小値）	9.0 (5.5-11.0)	11.0 (9.0-12.0)	0.015	8.0 (5.0-10.5)	10.0 (7.3-12.0)	0.250

中央値（25－75 パーセンタイル）で表示

表 1-5　予後別に見た VA-ECMO+群の凝固線溶マーカーと乳酸値の比較

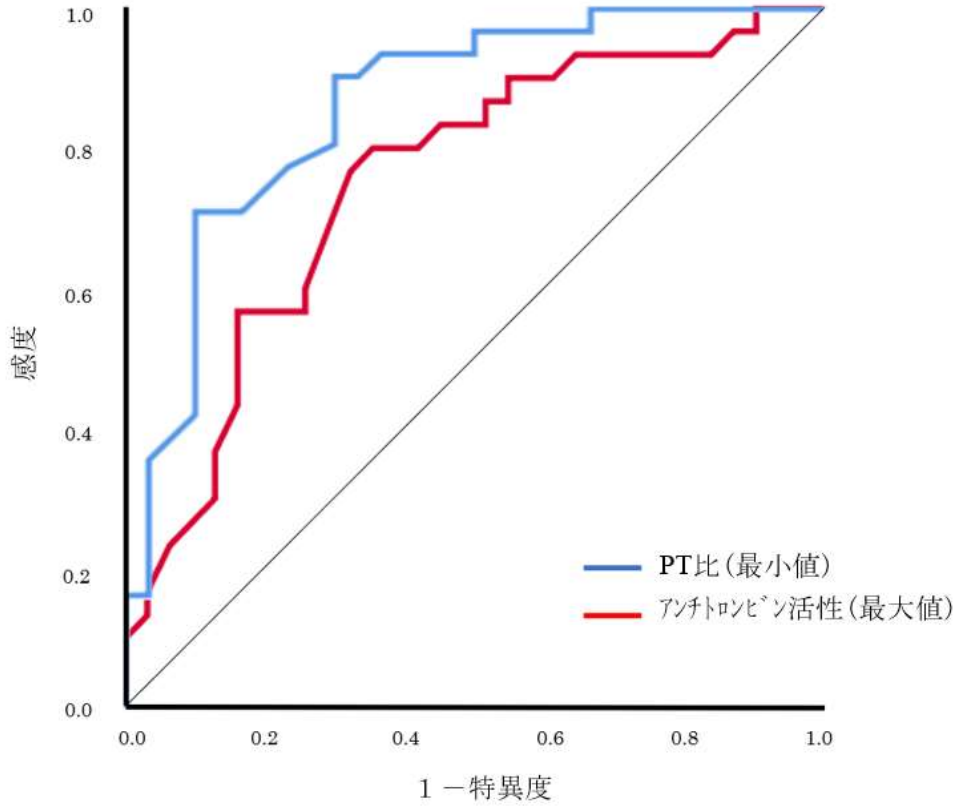
	生存 (n=31)	死亡 (n=30)	P 値	予後良好 (n=7)	予後不良 (n=54)	P 値
血小板数(最大値) (×10^9/L)	89 (73-115)	90 (65-112)	0.702	89 (82-102)	87 (67-114)	0.765
血小板数(最小値) (×10^9/L)	52 (40-62)	46 (32-93)	0.614	54 (44-59)	50 (35-65)	0.765
PT 比×10 (最大値)	1.8 (1.4-2.3)	1.8 (1.5-2.7)	0.480	1.8 (1.3-2.0)	1.8 (1.5-2.5)	0.310
PT 比×10 (最小値)	1.1 (1.0-1.1)	1.4 (1.1-1.8)	<0.001	1.0 (1.0-1.1)	1.1 (1.0-1.5)	0.025
FDP（最大値） (mg/L)	258.0 (163.0-448.0)	135.3 (73.9-363.0)	0.091	310.0 (218.8-396.5)	200.0 (83.7-436.0)	0.232
FDP（最小値） (mg/L)	13.6 (8.1-24.5)	24.1 (13.6-53.9)	0.020	9.7 (7.7-18.8)	17.3 (12.0-48.2)	0.088
フィブリノゲン（最大値）(g/L)	4.19 (3.71-4.72)	3.26 (2.48-4.77)	0.016	4.36 (3.96-4.48)	3.91 (2.96-4.79)	0.269
フィブリノゲン（最小値）(g/L)	2.02 (1.51-2.32)	1.78 (1.46-2.37)	0.634	1.85 (1.37-1.98)	1.92 (1.49-2.35)	0.417
アンチトロンビン（最大値）(%)	70.0 (63.0-81.5)	57.5 (50.3-64.0)	0.001	98.0 (69.0-104.0)	64.0 (52.0-72.8)	0.002
アンチトロンビン（最小値）(%)	48.0 (38.0-57.5)	45.0 (38.0-55.5)	0.415	48.0 (40.0-58.0)	46.0 (38.0-56.0)	0.666
乳酸値（最大値） (mmol/L)	15.0 (13.0-17.0)	16.5 (13.5-19.0)	0.193	15.0 (14.7-16.5)	15.5 (12.8-18.0)	0.715
乳酸値（最小値） (mmol/L)	1.6 (1.3-2.3)	3.9 (2.0-14.4)	<0.001	1.5 (1.4-1.9)	2.3 (1.5-6.2)	0.088

中央値（25－75 パーセンタイル）で表示

VA-ECMO＋群の患者の病院死亡に対する各要因の影響を評価するために行ったロジスティック回帰分析の結果、単変量解析では PT 比（最小値)、フィブリノゲン（最大値)、アンチトロンビン活性（最大値)、乳酸値（最小値）に有意差を認めた（表 1-6)。多重ロジスティック回帰分析では、PT 比（最小値）が病院死亡の独立した予測因子であり（オッズ比：1.714、95%信頼区間：1.147-2.562、P 値 = 0.009)、アンチトロンビン活性（最大値）が病院死亡の予測因子である可能性が示された（オッズ比：0.961、95%信頼区間：0.916-1.007、P 値 = 0.094）（表 1-6)。

表 1-6　VA-ECMO+群の病院死亡を予測するための単変量解析および多変量ロジスティック回帰分析の結果

	単変量解析			多変量解析		
変数	オッズ比	95%信頼区間	P 値	オッズ比	95%信頼区間	P 値
年齢	1.009	0.971-1.049	0.644			
性別	1.038	0.235-4.593	0.960			
血小板数（最大値）	0.988	0.864-1.131	0.865			
血小板数（最小値）	1.098	0.926-1.303	0.282			
PT 比（最大値）	1.025	0.975-1.076	0.333			
PT 比（最小値）	1.892	1.267-2.826	0.002	1.714	1.147-2.562	0.009
FDP（最大値）	0.998	0.996-1.001	0.168			
FDP（最小値）	1.013	0.997-1.030	0.121			
フィブリノゲン（最大値）	0.996	0.992-0.999	0.025			
フィブリノゲン（最小値）	0.996	0.998-1.005	0.393			
アンチトロンビン（最大値）	0.940	0.902-0.979	0.003	0.961	0.916-1.007	0.094
アンチトロンビン（最小値）	0.265	0.945-1.016	0.265			
乳酸値（最大値）	1.111	0.966-1.278	0.139			
乳酸値（最小値）	2.072	1.132-3.793	0.018			



	AUC	標準誤差	95%信頼区間	P値	最適カットオフ値	感度	特異度
PT比(最小値)	0.861	0.048	0.767-0.954	0.000	1.2	0.903	0.700
ｱﾝﾁﾄﾛﾝﾋﾞﾝ活性(最大値)	0.751	0.063	0.627-0.875	0.001	67	0.800	0.645

図 1-2　PT 比（最小値）とアンチトロンビン活性（最大値）の病院死亡に対する ROC 曲線分析

図 1-2 は、病院死亡を予測するために行った ROC 曲線分析の結果である。 PT 比（最小値）とアンチトロンビン活性（最大値）双方が病院死亡に対する優れた予測因子であることが明らかとなった（AUC はそれぞれ 0.861、0.751）。最適なカットオフ値は、アンチトロンビン活性（最大値）で 67（感度：80.0、特異度：64.5）、PT 比（最小値）で 1.2（感度：90.3、特異度：70.0）であった。さらに、独立変数として国際血栓止血学会 DIC スコアの項目を使用した多変量解析では、PT 比（最小値）（オッズ比：3.989、95%信頼区間：1.692-9.406、P 値 = 0.001）と PT 比（最大値）（オッズ比：0.768、95%信頼区間：0.644-0.916、P 値 = 0.005）のみが独立した予後因子として残っていることが示された。

考 察

本研究により、心肺蘇生のために VA-ECMO が導入された患者において VA-ECMO が導入されなかった患者よりも重度の凝固障害を呈することが明らかとなった。この結果は、VA-ECMO 自体が凝固障害を引き起こす可能性を示している。VA-ECMO が導入された患者の解析では、病院死亡と PT 比（最小値）、フィブリノゲン（最大値）、アンチトロンビン活性（最大値）、および乳酸値（最小値）の間に統計学的に有意な相関があった。特に PT 比（最小値）とアンチトロンビン活性（最大値）では強い相関があり、これらが VA-ECMO 導入患者における病院死亡の予測因子となり得る事が示された。PT 比（最小値）とアンチトロンビン活性（最大値）は、神経学的転帰とも相関していた。

VA-ECMO が導入された患者は、VA-ECMO が導入されなかった患者よりも有意に重度の凝固障害を生じた。しかし、VA-ECMO＋群では、通報から循環再開（自己心拍再開、または VA-ECMO 開始）までの時間が、VA-ECMO－群よりもはるかに長かった（表 1-1）。以前の研究は、心停止の発症から心肺蘇生（胸骨圧迫）開始時刻までの時間として定義される低酸素時間と心肺蘇生法が施されている時間が、PCAS に関連する凝固障害の重症度の重要な決定要因であることを示している(Schwameis et al., 2015; Wada, 2017; Wada et al., 2017)。本研究で VA-ECMO＋群の患者は、心停止時間を調整した後でも、VA-ECMO－群の患者よりも有意に重度の凝固障害を示した。これらの結果は、VA-ECMO 自体が PCAS に関連する凝固線溶反応の障害を引き起こし、ひいては PCAS 患者の転帰不良を引き起こす可能性を示唆している。

ロジスティック回帰分析では、PT 比（最小値）とアンチトロンビン活性（最大値）が VA-ECMO＋群の患者の転帰不良と強く相関していた（表 1-6 および図 1-2）。アンチトロンビンは、トロンビンと複合体を形成しトロンビンと活性化凝固第 X 因子を阻害する重要な抗凝固因子である。敗血症および敗血症性ショックの管理に関する本邦の診療ガイドラインでは、アンチトロンビン活性が 70%未満に低下した敗血症性 DIC の患者にアンチトロンビン補充療法が推奨されおり(Nishida et al., 2018)、本邦のアンチトロンビン補充療法の保険適応は 70%未満となっている。これは、本研究で得られた最適なカットオフ値 67%に近似している。以前の研究では、PCAS 患者、特に DIC を伴う PCAS 患者でアンチトロンビン活性の低下が確認されている(Adrie et al., 2004; Adrie et al., 2005; Wada et al., 2016)。さらに、アンチトロンビンは心筋虚血と再灌流障害に対する保護効果があることが示唆されている(Wang et al., 2013)。VA-ECMO が導入された心停止患者に対するアンチトロンビン補充療法の有益な効果を前向きに示した研究はないが(MacLaren and Monagle, 2016)、本研究で得られた最適なアンチトロンビンカットオフ値（図 1-2）は VA-ECMO が導入された

心停止患者において、アンチトロンビン活性 70%程度を目標にアンチトロンビンを投与する必要があることを示唆している。

DIC の主な病態生理は、組織因子－第 VII 因子経路の活性化によって引き起こされる大量のトロンビン生成である。この機序は外因性凝固経路として知られ、その活性は主に PT によって評価されてきた。本研究では、VA-ECMO＋群で PT の延長を伴う凝固障害が示された。DIC 患者では PT 比が 1.2 を超える場合、死亡率と多臓器不全の発生率が有意に高いことが示され(Gando et al., 2006)、日本救急医学会 DIC 基準では PT 比 1.2 以上が診断基準項目の一つとなっている(Gando et al., 2008)。本研究のサブ解析における、VA-ECMO＋群患者の病院死亡を予測するための PT 比の最適カットオフ値も 1.2 であり（図 1-2)、既存の研究結果から得られた結論と同一であった。

また、本研究では、日本救急医学会 DIC スコアおよび国際血栓止血学会 DIC スコアは VA-ECMO＋群における予後予測因子となり得なかった（表 1-4)。各 DIC スコアの診断基準項目に用いられる因子を使用して実行された多変量解析の結果は、PT が予後を最も正確に反映している可能性を示唆した。さまざまな要因の修飾を受ける血小板や FDP などの線溶マーカーを含む DIC スコアよりも PT 単体の方が正確に予後を反映する可能性があるといえる。

PCAS は、しばしば「sepsis-like syndrome」として扱われる。それは、高サイトカイン血症と凝固線溶異常、すなわち DIC を引き起こす病態として高い関連性があるからである(Adrie et al., 2002)。 DIC の発症は、その頻度と重症度の高さから敗血症の最も重大な臓器障害の一つとして認識されている。以前の研究では、DIC を伴う敗血症患者の死亡率は敗血症患者の敗血症全体の死亡率よりも有意に高かったことが示されている(Gando et al., 2013; Gando et al., 2019)。さらに、最近の研究では、敗血症における DIC の積極的なスクリーニングと診断が、患者の転帰改善に寄与することが示されている(Umemura et al., 2018)。

これらのエビデンスは、本研究の新知見を裏付けている。すなわち VA-ECMO の導入そのものが PCAS に関連する DIC の悪化を引き起こす可能性である。また、凝固関連のバイオマーカー、特に PT とアンチトロンビンの評価により、VA-ECMO が導入された PCAS 患者の転帰不良を予測することができる可能性がある。VA-ECMO によって誘発される凝固障害は、PCAS 患者の有望な治療標的となる可能性があり、その目標値はアンチトロンビン活性 70%以上、PT 比 1.2 以下であると推測される。

【制限事項】

本研究では、VA-ECMO が導入された 13 人の患者と VA-ECMO が導入されなかった 29 人の患者が入院 3 日目までに死亡し、生存バイアスが生じた。また、本研究は単一の施設で遡及的に実施されたため、登録された患者の数は比較的少なかった。さらに、未知の変数または測定されていない変数が原因で、選択バイアスや交絡因子を含んでいる可能性がある。この研究の対象患者はデータ収集期間中、血小板輸血、アンチトロンビン製剤、およびフィブリノゲン製剤を使用されなかったが、ヘパリン、新鮮凍結血漿、および凝固線溶反応に影響を与えるその他の薬物の使用は評価されていない。

本 章

新規マウス敗血症モデルの作成に関する研究

緒 言

序章の研究内容である“体外式膜型人工肺によって誘発される凝固障害と院外心停止患者の転帰の関連”に取り組む中で、冒頭の緒言で述べた救急医学研究の困難に直面した。序章の研究において一定の結果と結論を導くことができたものの、臨床研究において真実にたどり着くには極めて多くの交絡因子の処理が必要であり、そのための十分な症例数も必要である。救急搬送患者の症例数は限られ、その背景や経過も一定ではない。もちろん将来の治療につなげるための症例報告の蓄積や患者の予後を推定するような研究は臨床場面でのみ経験・成立しうるものであり、私はこれらの報告も大学院在籍中に積極的に行ってきた(Semba et al., 2022; Tsuchida and Mizuguchi, 2021; Tsuchida et al., 2021)。

私は救急医学領域の臨床研究で革新的な成果を挙げることは非常に困難であるということを序章の研究を通して理解したため、臨床経験を積み重ねながら基礎研究活動に重点を置くことを決意した。

救急医学における三大侵襲は、「虚血再灌流障害」「外傷」「敗血症」である。序章の研究では「虚血再灌流障害」を扱ったが、その中で「敗血症」との類似点が多いことを改めて認識した。救急医学研究では他の医学領域以上に患者（対象）の均一化が必要であると実感したため、対象の均一化が比較的容易な基礎実験によって患者数が多くかつ画期的な治療薬が存在しない「敗血症」をテーマとした研究を行うこととした。

【本論文の学術的背景】

敗血症は、感染症に対する宿主の免疫過剰および過少反応により生じるものであり、その結果として脳、肺、肝、腎などの主要臓器が臓器不全に至った病態である。敗血症は一般的な急性期疾患であり、現在世界の 5 人に 1 人は敗血症により死亡している(Rudd et al., 2020)。その死亡率は 28〜48%と非常に高く(Angus et al., 2001; Panacek et al., 2004; Vincent et al., 2014)、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。今日までの敗血症研究には、さまざまな敗血症モデルマウスが用いられてきた(Korneev, 2019)（表 2-1）。

表 2-1　現在までに開発されてきた敗血症モデルマウス（Korneev, 2019）

	長所	短所
病原物質の非観血的投与による敗血症の誘発		
リポポリサッカライド（ lipopolysaccharide: LPS）投与 (Copeland et al., 2005)	低侵襲性で、重症度の制御が可能。標準化済みで再現性あり。 グラム陰性桿菌の敗血症急性期が再現される。 LPS の量や活性により重症度のコントロール可能。	敗血症の血行動態や、免疫学的、代謝的特徴のモデル化が不十分。 多菌性敗血症が再現されない。 急激で短期間の免疫応答。 LPS に対して動物間に感受性の相違がある。
LPS と D-ガラクトサミン投与 (Silverstein, 2004)	LPS 投与と同様。 D-ガラクトサミンは LPS 感度を高めるため、LPS 必要量が少なくなる。	LPS 投与と同様。 敗血症性ショックは急速に進行し、早期死亡する。
病原菌の非観血的投与による敗血症の誘発		
菌体の体内投与 (Poli-de-Figueiredo et al., 2008)	低侵襲性で、再現性あり。 極端な臨床敗血症のモデル化。特定の細菌株に対する免疫応答の研究に適する。臨床的に関連のある病原菌株を使用可能。細菌の数と組成を変えることによって重症度のコントロール可能。	敗血症の血行動態や、免疫学的、代謝的特徴のモデル化が不十分。 細菌が大量に投与された場合にのみエンドトキシン血症を発症する。 ある種の細菌は、残留性が低く敗血症を誘発しない。 多菌性敗血症の再現が困難。
肺炎による敗血症 (Coopersmith et al., 2002)	シンプルで再現性がある。 敗血症は、細菌の組成や抗菌薬投与により制御可能。	敗血症に至らない場合もある。 敗血症の血行動態の評価が困難。 気管支内投与の場合、麻酔が必要。
糞便懸濁液腹腔内投与 (Cetinkaya et al., 2009; Starr et al., 2014)	シンプル、低侵襲で再現性がある。 多菌性敗血症を再現可能。 敗血症の重症度は、注入する	敗血症の代謝、血行動態、免疫学的特徴は必ずしも再現されない。 サンプル調製のばらつきに

	物質量により調節可能。 新生児マウスにも応用可能。	より、標準化が困難。 自身の腸内の微生物叢に耐性がある可能性がある。
病原菌の観血的投与による敗血症の誘発		
細菌感染したフィブリン塊の腹腔内移植 (Toky et al., 2003)	早期死亡が誘発されない。 敗血症の重症度は、細菌濃度と血栓密度により調節可能。	感染フィブリン塊の調製と手術手技の標準化が困難。 再現性に問題があり。 麻酔、手術侵襲あり。 多菌性敗血症の再現が困難。
内因性保護バリアの観血的な破壊による敗血症の誘発		
盲腸結紮穿刺（cecal ligation and puncture: CLP）モデル (Parker and Watkins, 2001; Wichterman et al., 1980)	組織の虚血を伴う多菌性腹膜炎の発症を模倣。 炎症性、抗炎症性の両方の免疫反応が活性化される。 敗血症の重症度は、穿刺径や結紮部位の長さにより調節可能。	標準化が困難なため、再現性が悪い。 手術による組織損傷がある。 穿刺部位の周囲に膿瘍が形成される。 全身的な炎症反応は弱い。 麻酔、手術侵襲あり。
大腸ステント腹膜炎（colon ascendens stent peritonitis: CASP）モデル (Maier et al., 2004)	CLP よりもよく多菌性汎発性腹膜炎を模倣できる。 敗血症の重症度は、ステント径やステントの抜去により調節可能。 CLP のように膿瘍を形成することはない。	最も複雑なモデル。 二相性免疫反応の再現性が低い。 麻酔、手術侵襲あり。

表 2-1 に示した敗血症モデルは、過去の研究者たちがヒトの臨床経過に近い、あるいは個体差の少ない理想のモデルを追い求めて作成してきたものである。しかし、現在の敗血症モデル動物にはそれぞれ固有の長所と短所があり、これまでのところ敗血症の創薬に最適なモデルは存在しない。今までの研究では、これらの動物モデルに効果のあった敗血症治療薬はヒトの臨床試験では悉く無効だった。現在の敗血症治療は抗菌薬投与を中心として酸素投与、昇圧薬投与などの支持療法が加わったシンプルなものであり、敗血症の病態、すなわち感染により生じた異常な免疫反応をターゲットとした治療薬、いわば “純粋な敗血症治療薬” は未だに開発されていない。敗血症治療は最近数十年間で大きな進歩がない状況である。

【本研究課題を取り巻く最近の研究動向と本論文の位置づけ】

敗血症研究の標準となっている動物モデルは、CLP（cecal ligation and puncture）モデルである(Parker and Watkins, 2001; Wichterman et al., 1980)。現在の敗血症基礎研究のほとんどは、CLP モデルを用いて行われている。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、漏れ出た糞便と壊死組織による腹膜炎を誘発するモデルである(Rittirsch et al., 2009)。このモデルはヒト敗血症の血行動態と代謝の段階が再現されていることが確認されており(Wichterman et al., 1980)、特定の細胞のアポトーシスと宿主の免疫反応もヒト敗血症の経過に似ていることも証明されている(Ayala and Chaudry, 1996; Hotchkiss et al., 2003)。一方で、CLP モデルの問題点も多数指摘されており、研究者によるばらつきが大きいこと(Wynn et al., 2007)、盲腸の形や大きさが異なる動物間での比較が難しいこと(Starr et al., 2014)、穿孔部位の被覆化により局所の膿瘍形成に留まり、腹膜炎に至らない場合があることなどがその問題点である(Buras et al., 2005)。

敗血症研究が停滞している原因としては、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。ヒトを対象とした場合、敗血症の感染部位、起因菌、重症度、患者の基礎疾患、免疫応答、使用薬剤など様々な修飾要因により、病態の解明が他の疾患に比して非常に困難である。したがって、敗血症研究では研究対象の条件を均一化できる基礎実験での結果が求められる。基礎実験の問題点としては、ヒトとマウスの免疫学的差異や敗血症動物モデルの問題が指摘されている(Dejager et al., 2011)。前者の改善は困難であるため、表 2-1 に示すようなモデル開発が盛んに行われてきた。本研究もその敗血症モデル開発研究の一編であり、新規プロトコルの確立を通して敗血症病態の解明を目指すものである。

【研究の動機と本論文の目的】

我々は敗血症の病態を解明するべく、ヒト敗血症と同等の重症度となる CLP モデルの作成に取り掛かった。しかし、表 2-2 に示すような要素により重症度の調整は非常に困難であった。CLP モデルを用いた過去の報告においても、その作成方法は一定しておらず(Dejager et al., 2011)、各研究施設で試行錯誤している様子がうかがわれた。我々も試行錯誤を繰り返した末に、求める重症度の CLP モデルの確立に成功した。CLP モデル確立のために行った我々の予備実験の結果を（図 2-1、図 2-2）に示すが、術者や手

表 2-2　CLP モデルを不均一化させる様々な要素

- 盲腸の大きさ
- 盲腸内に含まれる糞便の量
- 盲腸の結紮部位
- 穿刺する針の太さ
- 穿刺する部位・回数
- 作成過程で生じる便の漏れ
- 手術操作による出血量
- 脂肪組織除去の有無
- 術者による個人差

技の違いにより大きく生存率が異なる結果となることがわかる。安定した質の CLP モデルを供給できるようになるまでに我々は約 6 か月の期間を要した。

図 2-1　CLP モデル作成における術者の影響（予備実験結果）

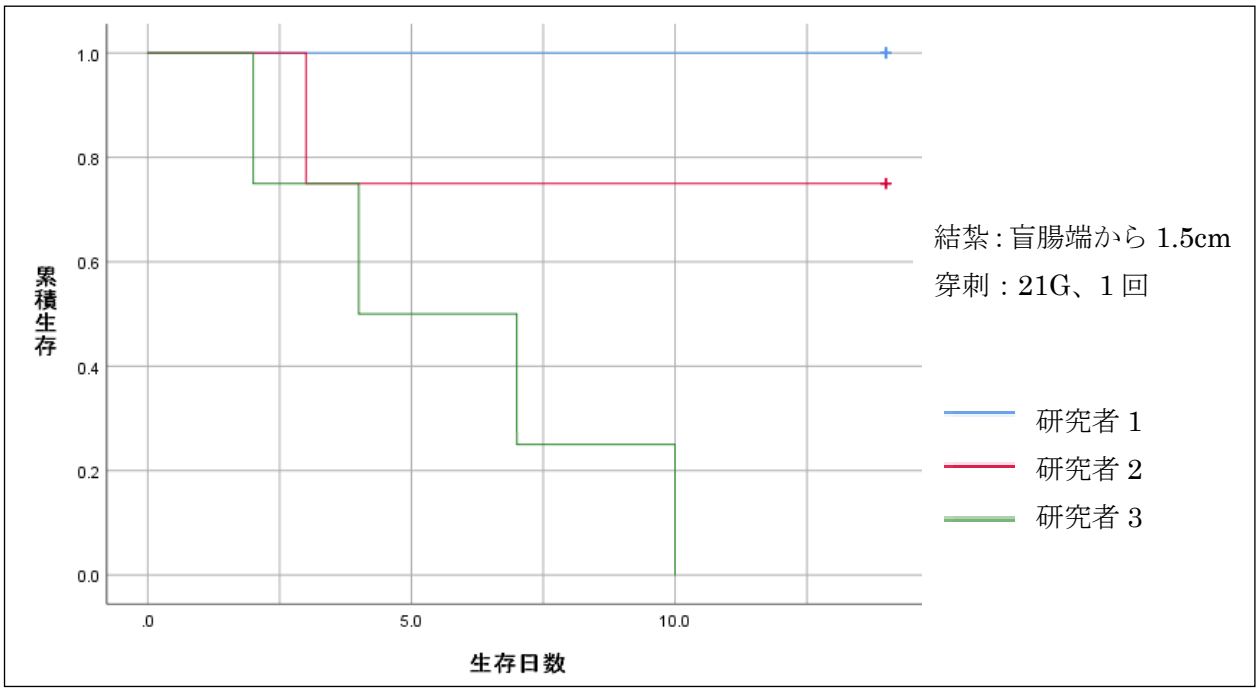
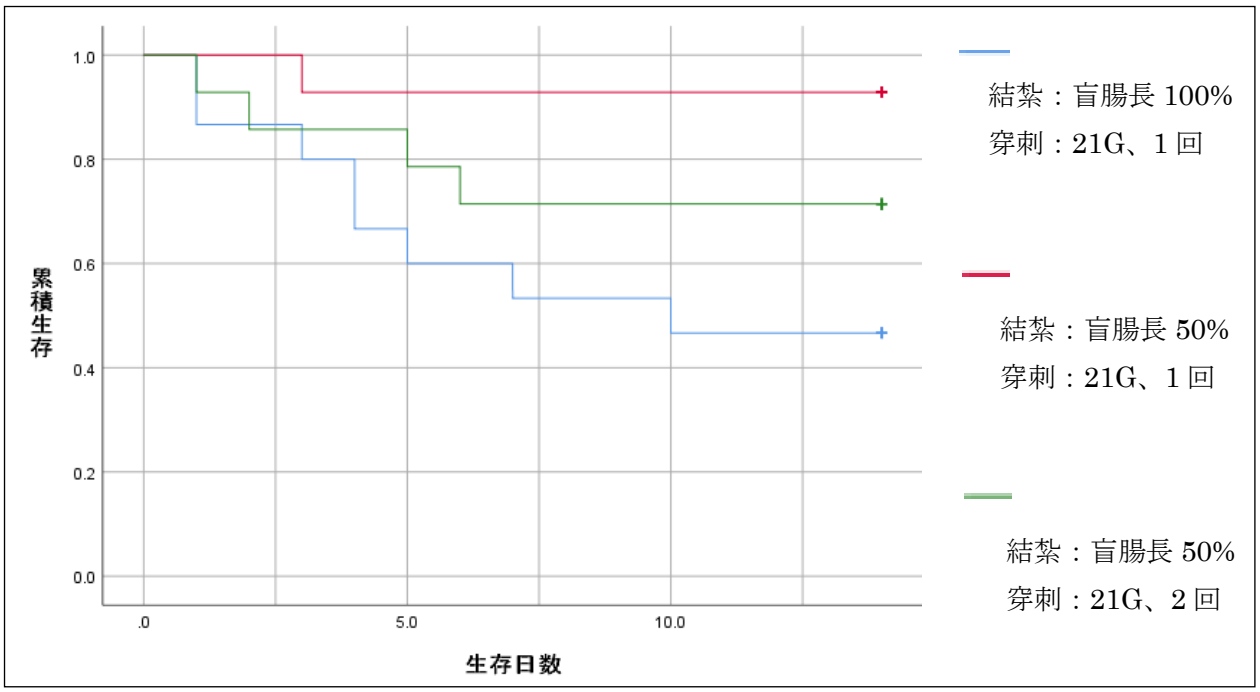


図 2-2　CLP モデル作成における作成手技の影響（予備実験結果）



我々は CLP モデル確立の過程で敗血症研究の問題点や課題についてゼロベースで再考し、敗血症モデルの問題に行き着いた。ヒトの敗血症が生じる際には、CLP モデル作成時に伴う手術、麻酔、出血などの侵襲が加わることは無い。したがって今までの CLP モデルを用いた敗血症基礎研究の結果は、これらの侵襲による修飾を受けたものであり、臨床像と大きく異なる。基礎研究において、モデルの精度は研究精度に直結する根幹的な部分であり、敗血症研究が数十年間ほとんど進んでいない原因の一端は敗血症モデルにあると考えた。以上の経緯から、我々は臨床病態との乖離がある CLP モデルの課題を克服するモデル作成から敗血症研究を開始することとした。

新規の敗血症モデルマウスの作成にあたり、私は糞便懸濁液を使用したモデルに注目した。同モデルについては既報があり(Starr et al., 2014)、ラット、ヒツジにも糞便懸濁液を使用したモデルの報告がある(Cetinkaya et al., 2009; Hosokawa et al., 2018; Orbegozo et al., 2018)。しかし、マウスの糞便懸濁液を使用したモデルでは作成のプロトコルがあるものの、糞便懸濁液の作成にはグリセロールリン酸緩衝液を使用した調製と凍結保存・解凍が必要であり、その手順は煩雑である(Starr et al., 2014)。ラット、ヒツジの報告に関しては詳細なプロトコルがあるとは言えない(Cetinkaya et al., 2009; Hosokawa et al., 2018; Orbegozo et al., 2018)。また、これらのモデルにおける、敗血症の代謝、血行動態、免疫学的特徴に関する十分な検証や考察が行われていない(Korneev, 2019)。このような現状から、多くのメリットがあると思われる糞便懸濁液を使用したモデルが敗血症研究において普及しているとは言い難い状況となっている。

本研究では、糞便懸濁液を用いた新しいプロトコルによる、動物の個体差の影響を最小限に抑えた作成が簡便な敗血症動物モデルを考案し、そのモデルの妥当性を CLP モデルと比較して評価した。CLP モデルとの比較は、細菌学的、病理学的、生理学的、免疫学的に多角的に行った。本論文の最終的な目的は、作成が簡便で個体差の少ない新規の敗血症モデルを通して、敗血症の免疫学的病態解明の礎となる新知見を生み出すことにある。

方 法

【倫理的声明】

我々は北海道大学が実施する研究倫理教育講座を受講して本研究に参画している。本論文中のすべての実験は、「研究機関等における動物実験に関する基本指針」（文部科学省　平成 18 年 6 月 1 日）、「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 年環境省告示）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）に準じて実施した。また、本実験の動物実験計画書は動物実験委員会に提出され、北海道大学の倫理審査委員会によって承認されている（承認番号：20-0163）。

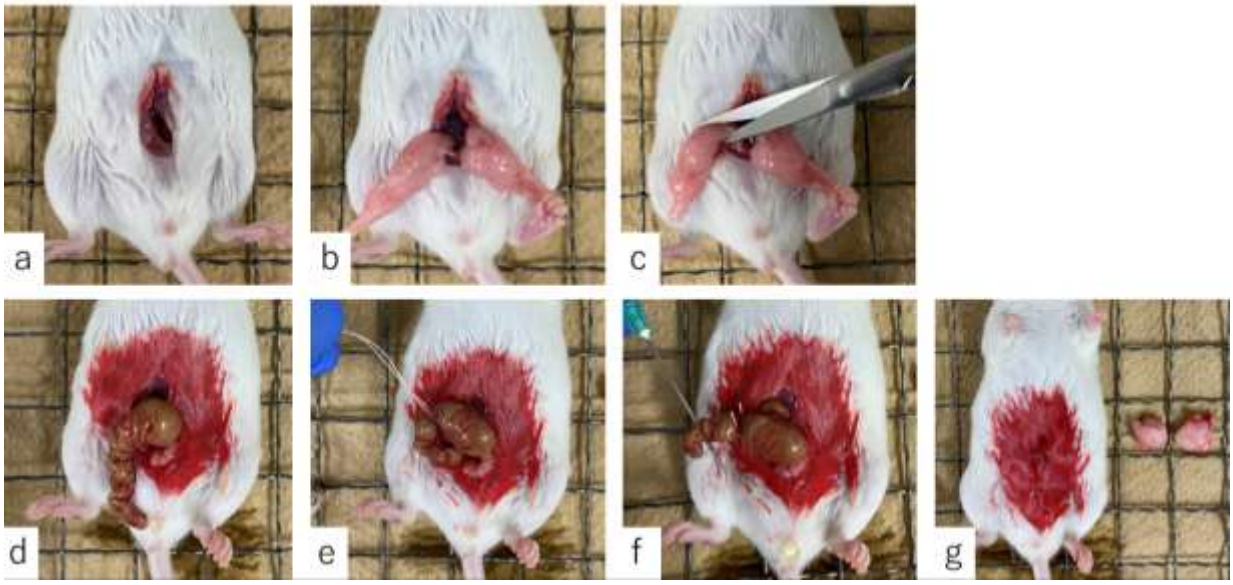
【実験動物】

全ての実験は、雄の 7 週齢の Institute of Cancer Research (ICR) マウスを用いた。ICR マウスは、日本エスエルシー株式会社（浜松、静岡）から入手した。マウスは specific pathogen free で、マウス固有の病原体による影響は除去されている。マウスの体重は 32～34g であった。マウスには実験室内の陰圧ラック内で最低 3 日間の順応期間を設け、その後実験に使用された。陰圧ラック内は、安定した室温と湿度（22～26°C、0%～20%）と定期的な明暗サイクル（午前 6 時から午後 6 時までの 12 時間の照明時間）が維持されていた。マウスには、飼料として日本農産工業株式会社（横浜、神奈川）の実験動物用飼料（固型飼料ラボ MR ストック®）が与えられ、水はケージの上に置かれたゴム栓式給水瓶から自由に摂取できる環境とした。ケージの底は、日本エスエルシー株式会社（浜松、静岡）から購入したペーパーマット（Paperclean®）を敷き、ケージを清潔に保つために数日ごとに交換した。各ケージ内のマウスの数は 5 匹以下に制限し、十分なスペースを確保してマウスにストレスがかからないように配慮した。

【実験手順（モデルマウスの作成）】

CLP モデルは、Rittirsch らの手順(Rittirsch et al., 2009)に脂肪組織除去の手順(Niiyama et al., 2016)を追加して作成した。すなわち、以下 （図 2-3）に示す手順である。ケタミン（125mg/kg）とキシラジン（10mg/kg）の腹腔内投与で麻酔し、ブプレノルフィン 0.05mg/kg の皮下投与で鎮痛した。本研究の CLP モデルの盲腸穿刺には 21 ゲージの針を使用し、結紮部位は盲腸の遠位極と基部の間の半分とした。手術後、輸液蘇生のために生理食塩水 1mL を皮下投与した。術後の創部感染を防ぐために、麻酔から覚醒するまでマウスをケージ内に仰臥位に置いた。手術後の低体温を防ぐために、ケージをヒーターで温めた。術後抗菌薬として、イミペネム/シラスタチン 25mg/kg を 1 日 2 回 3 日間使用した。初回の抗菌薬は、手術 2 時間後に投与した。

図 2-3　CLP モデル作成手順



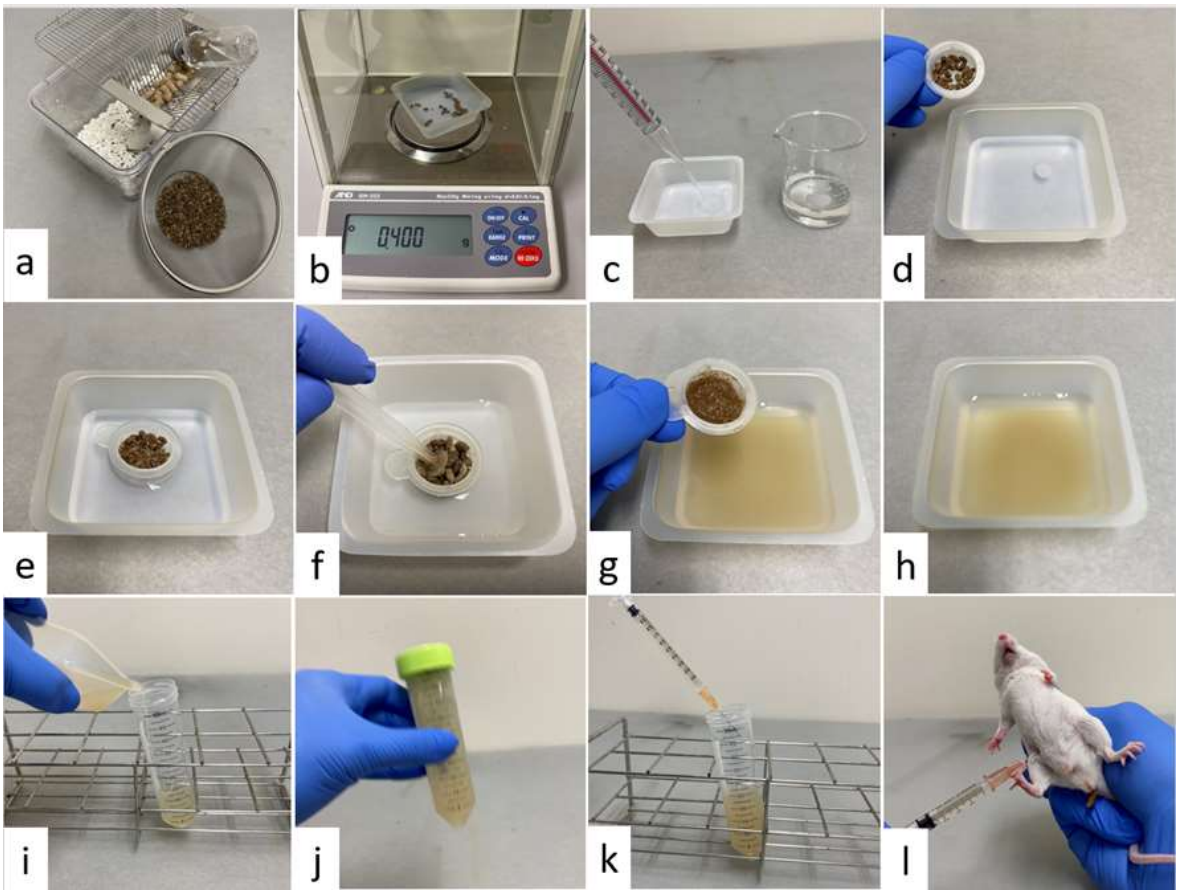
（a）麻酔したマウスの腹部表面を剃毛し、アルコールで消毒後に、腹部正中の皮膚・腹膜を約 1cm 切開する。
（b）腹腔内から両側の脂肪組織を同定する。
（c）同定した脂肪組織を両側ともに切除する。
（d）腹腔内から盲腸を同定する。
（e）盲腸の全長 50%の部分を 2-0 絹糸で結紮する。
（f）盲端から約 5mm の部分を 21G 注射針で対側まで貫通させる（2 穿刺）。
（g）4-0 ナイロン糸で結紮し閉創する。

糞便懸濁液を用いて作成する新規の敗血症モデルマウス（Fecal Suspension Intraperitoneal Injection Model：FSI モデル）は、図 2-4 および図 2-5 に示す手順で作成した。FSI モデルでは手術侵襲を伴わないため鎮静の必要が無く、鎮痛薬（ブプレノルフィン 0.05mg/kg）の投与のみを行った。糞便懸濁液は抗菌薬の使用有無に応じて薄い糞便懸濁液（10mg/ml～50mg/ml）と濃い糞便懸濁液（100mg/ml～296mg/ml）の 2 通りを作成した。濃い糞便懸濁液を用いた重症モデルには、CLP モデルと同様に術後の抗菌薬（イミペネム/シラスタチン 25mg/kg）を 1 日 2 回 3 日間投与した。初回の抗菌薬投与は、CLP モデルと同様に糞便懸濁液投与 2 時間後に行った。糞便懸濁液に十分な水分があるため、術後は CLP のように輸液蘇生を行わなかった。

古い便を取り除くために、FSI モデル作成予定時刻の 24 時間前にケージを交換した。糞便懸濁液の濾過には Falcon® 70 µm cell strainer（製品番号 352350、Corning、

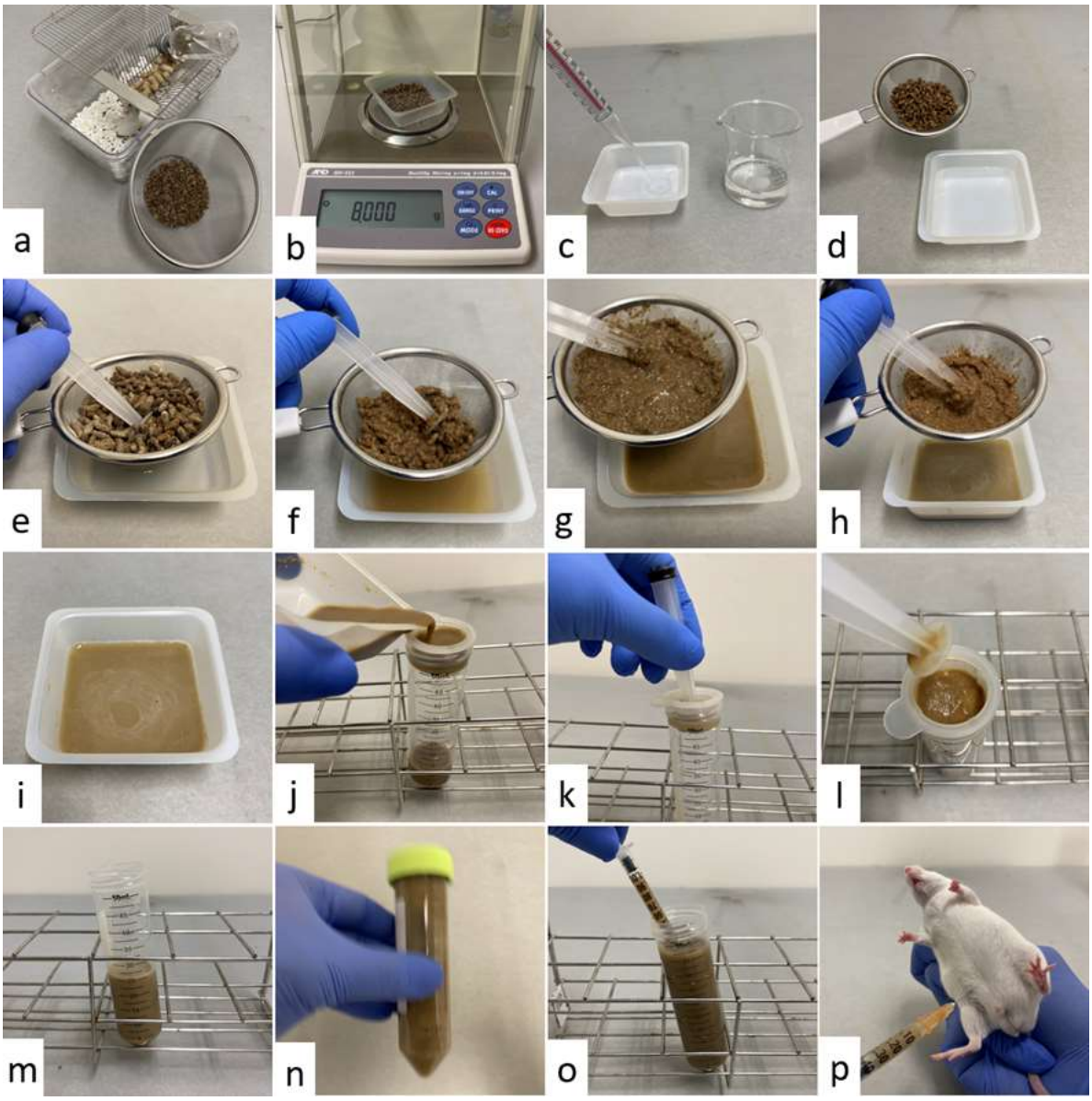
New York、USA）を使用したが、濃い糞便懸濁液の濾過には、市販されている茶漉し（製品番号 DH7086、Kai Industries Co. Ltd.、東京、日本）も併せて使用した。茶漉しのメッシュ数は 1cm/16 メッシュ(625μm/メッシュ)であった。

図 2-4　FSI モデル作成手順（薄い糞便懸濁液を用いた軽症モデル）



（a）ケージから必要な量の糞便を収集する。尿が糞便と混ざるのを防ぐために、ケージに予め十分なマットを敷き、糞便の採取時に給水瓶から水が滴らないようにする。（b）採取した糞便から 400 mg または 450 mg を秤量する。（c）調製する糞便懸濁液の濃度に応じて、40、20、10、15、8 mL の生理食塩水をトレイに秤量する。(d) Falcon® 70 μm cell strainer に糞便を載せる。（e）フィルターを通して糞便を生理食塩水に浸し、十分に浸軟させる。(f) 漉し棒を使用して糞便を濾過する（本研究では漉し棒として 10ml シリンジの押し子を使用）。(g) 糞便がペーストになるまで（糞便の形状が無くなるまで）糞便をよく擂り潰す。濾過後にペースト状の糞便から水をよく切る。(h) 得られた糞便懸濁液は不純物がなく、25 ゲージ針で抵抗なく吸引できる。（i）糞便懸濁液を攪拌可能な容器に移し替える。(j) 糞便懸濁液をよく振って十分に混合する。手順(j)は、手順(k) 1 回ごとに行う。(k) 手順(j)の直後に、1mL の糞便懸濁液を吸引する。（l）1mL の糞便懸濁液をマウスの腹腔内に投与する。

図 2-5　FSI モデル作成手順（濃い糞便懸濁液を用いた重症モデル）



（a）図 2-4 に同じ。（b）採取した糞便から 8000 mg を秤量する。（c）調製する糞便懸濁液の濃度に応じて、80、60、53、40、27mL の生理食塩水をトレイに秤量する。（d）茶漉しに糞便を載せる。（e）茶漉しを通して糞便を生理食塩水に浸し、十分に浸軟させる。（f）漉し棒を使用して糞便を濾過する。（g）糞便がペーストになるまで糞便をよく擂り潰す。（h）粗い濾過後にペースト状の糞便から水をよく切る。（i）得られた糞便懸濁液は不純物が多く、まだ 25 ゲージ針で吸引できない。（j）糞便懸濁液を 50 ml チューブの上に置いた Falcon® 70 µm cell strainer の上に注ぐ。（k）必要に応じて漉し棒を使用し濾過を促進する。（l）フィルターが目詰まりする場合は、必要に応じて残渣を除去する。（m）得られた糞便懸濁液は不純物がなく、25 ゲージ針で抵抗なく吸引できる。（n～p）図 2-4 の手順(j)～(l)に同じ。

【生存率の評価】

手術後 0〜24 時間を day 0 とし、術後 14 日目まで観察を続け、14 日間の生存率を評価した。CLP モデルと FSI モデルの比較実験［以下の実験（i）〜（iv)］は、マウスが死に始める前、すなわち術後 20 時間に行った。

【研究デザイン】

様々な重症度における FSI モデルの生存率を比較した。生存率の検証は、10 匹ずつのグループで行った。次に、CLP モデルと同等の死亡率を示す FSI モデル（133 mg/mL の FSI モデル）を用いて、（i）実質臓器の病理組織学的比較、（ii）腹水培養による細菌学的比較、（iii）呼吸数、体温、血液ガス分析による生理学的比較、（iv）Luminex® 100/200™（R&D Systems Inc.、Minneapolis、USA）の多重分析による免疫学的比較を行った。実験（i）は 3 匹ずつのグループ間で行った。実験（ii）〜（iv）は、それぞれ 5 匹ずつのグループ間で行った。対照群は、（i）は 3 匹ずつ、（iii）および（iv）は 5 匹からなる群である。

【実験グループへのマウスの割り付け】

生存率比較実験、CLP モデルと FSI モデルの比較実験［実験（i）〜（iv)］は、それぞれ別の日に独立に行った。使用するマウスの数を減らすため、実験（i）と（iii)、実験（ii）と（iv）には同じマウスを使用した。マウスは必要な数、群へと無作為に割り付けた。

【(i) 実質臓器の病理組織学的比較】

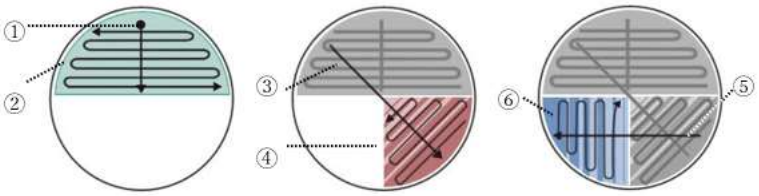
病理組織学的な比較は、腎臓、脾臓、肺、肝臓を用いて行った。臓器は CLP モデルと FSI モデルからそれぞれ 3 匹ずつ術後 20 時間後に採取し、10%ホルマリン中性緩衝液に入れた。臓器摘出前にケタミン 250mg/kg とキシラジン 20mg/kg を投与して安楽死させた。その後、ミクロトームを用いてこれらの臓器から組織切片を作製した。各臓器の組織切片に対しては、ヘマトキシリン・エオジン染色に加えてグラム染色を施した。さらに、腎臓の切片にはリンタングステン酸ヘマトキシリン染色を加えた。肝切片には Gitter 染色を行った。肺切片には Elastica-Masson 染色および Lader 染色を行った。

【(ii) 腹水培養による細菌学的比較】

細菌学的比較は、術後 20 時間の腹水培養により評価した。また、コントロールとして抗菌薬を投与していないマウスの糞便と、FSI モデル作成に用いた糞便懸濁液について、各 2 セットの培養を行った。マウスの腹水は、25 ゲージ針でマウスの腹腔

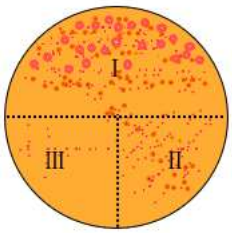
内に生理食塩水 5mL を注入し、マウスを振動させて腹腔内容物をよく撹拌した後に採取されたものである。腹水の採取手順は、細菌のコンタミネーションを防ぐために、剃毛・消毒後のマウスに対して常に清潔操作で行われた。使用した器具は全てアルコールで滅菌したものを用いた。複数回の洗浄を行うと誤差が大きくなるため、一度に 5mL の生理食塩水を注入した後、可能な限りの腹水を回収して細菌学的評価の検体材料とした。腹水採取の際には、麻酔としてケタミン 250mg/kg とキシラジン 20mg/kg をマウスの背中に皮下投与した。サンプルは、炭酸ガス培養にはニッスイプレート羊血寒天（日水製薬株式会社、東京）、DHL 寒天（ベクトン・ディッキンソンアンドカンパニー、東京）、嫌気培養にはウサギ血入りアネロコロンビア寒天、PEA/BBE 寒天（ベクトン・ディッキンソンアンドカンパニー、東京）で培養を行なった。24 時間の培養期間を経過させた後、コロニー数から菌数を半定量的に求めた（図 2-6）。菌種は MALDI Biotyper® （Bruker Japan K.K.、神奈川）を用いた質量分析により同定した。MALDI Biotyper®での同定はターゲットプレートに少量のコロニーを直接塗布後、HCCA portioned（Bruker Japan K.K.、神奈川）を 1μL 滴下し、乾燥後に測定した。解析にはソフトウェアとして flex control 3.4、MALDI Biotyper Compass 4.1 を用いた。

≪塗抹方法≫



①●部分に 1 白金耳量をつけ、培地の中心に向かってのばす。
②上 1/2 部分で往復を繰り返し、材料を希釈塗布する。
③図の角度で白金耳を引く
④培地の 1/4 部分で画線する。
⑤図の角度で白金耳を引く
⑥培地の 1/4 部分で画線する。

≪判定≫



発育範囲とコロニー数によって菌量を判定し入力。

菌量判定表

	範囲内コロニー数	
	10 個未満	10 個以上
I	10^3 以下	10^3
II	10^4	10^5
III	10^5 以上	

図 2-6
半定量培養法の手順

【(iii) 生理学的比較】

生理的評価として、FSI および CLP による敗血症誘導 20 時間後の呼吸数、体温を比較し、血液ガス分析を行った。呼吸数は目視で測定し、体温は高性能皮膚赤外線体温計（製品番号 CTD711，シチズン株式会社，東京）で剃毛した背部を 3 回測定し、その平均値で求めた。呼吸数と体温は麻酔していない状態で測定を行った。血液ガス分析を施行するにあたり、ケタミン 250mg/kg、キシラジン 20mg/kg の腹腔内投与で麻酔したマウスからヘパリンでコーティングされたシリンジを用いて心臓血を採取した。血液サンプルは採取後速やかに ABL800 FLEX® （Radiometer Medical ApS、Kobenhavn、Denmark）を用いて分析した。

【(iv) 免疫学的比較】

免疫学的評価は、Luminex® 100/200™ (R&D Systems Inc.、Minneapolis、USA) を用いたマルチプレックス解析により実施した。血液採取は（iii）生理学的比較と同様に心臓血を用いた。心臓血採取にあたり、ケタミン 250mg/kg、キシラジン 20mg/kg の腹腔内投与で麻酔し、採血にはヘパリンでコーティングされたシリンジを用いた。得られた血液を 2000G、10 分間遠心して血漿を分離した。血漿は MILLIPLEX® MAP キット（Merck Millipore Corporation、Darmstadt、Germany）を試薬として Luminex® 100/200™でマルチプレックス分析を実施した。Luminex® 100/200™の測定プロトコルは表 2-3 に示した。血漿検体は−80℃で保存し、使用時は 37℃のインキュベーターで融解後転倒混和し、沈殿物がないことを確認した。必要な試薬は 4℃保存後、使用時に室温に戻して使用した。

表 2-3　Luminex® 100/200™測定プロトコル

●測定手順
1. プレートの各ウェルに 200µL の Wash Buffer を加える。プレート振盪器にて室温（20～25℃）で 10 分間攪拌する
2. プレートを倒立させ、吸水性タオルの上で数回軽く叩き、全てのウェルから洗浄液を除去する
3. コントロールおよびスタンダード 25µL をそれぞれのウェルに添加する（アッセイバッファーにはバックグラウンドとして 0 pg/mL の標準品を使用する）
4. 検体ウェルに 25µL のアッセイバッファーを添加する
5. バックグラウンド、スタンダード、コントロールの各ウェルにキット添付の試薬（matrix solution）を 25 µL 添加する
6. CLP 血漿検体および FSI 血漿検体 25µL を検体ウェルに添加する
7. ミキシングボトルを混和し、25µL の混合ビーズを各ウェルに添加する
8. プレートシーラーでプレートを密封する。プレートをアルミホイルで包み、プレート振盪器で撹拌しながら 2～8℃で一晩静置する。
9. プレートの中身を静かに取り出し、「プレート洗浄」の手順に従い 2 回洗浄する
10. 検出抗体を各ウェルに 25µL 添加する
11. 封をしてホイルで覆いプレートシェーカーで撹拌しながら室温（20～25℃）で 1 時間インキュベートする
12. 検出抗体 25µL を含む各ウェルにストレプトアビジン-フィコエリトリン 25µL を添加する
13. 封をしてホイルで覆いプレート振盪器で撹拌しながら室温（20～25℃）で 30 分間インキュベートする
14. 静かにウェルの中身を取り出し、「プレート洗浄」の手順に従い 2 回洗浄する
15. Luminex で 150µL のシース液をすべてのウェルに添加する
16. プレートシェーカーで 5 分間ビーズを再懸濁する
17. Luminex 200™と xPONENT ソフトウェアでプレートを作動させる
18. 蛍光強度データを保存し、5 パラメータロジスティック曲線またはスプライン曲線フィッティング法を用いて、検体中のサイトカイン/ケモカイン濃度を算出し、解析する

（次頁に続く）

●プレート洗浄手順
1. プレートをマグネットの上で 60 秒間静止させ、磁気ビーズを完全に沈降させる
2. プレートを静かに移し、吸収パッドで軽く叩いて残留液体を除去する
3. マグネットからプレートをはずし、200μL の洗浄液で 30 秒間振盪してプレートを洗浄する
4. プレートをマグネットに再び取り付け、ビーズを 60 秒間沈降させ、洗浄後にウェルの内容物を除去する。

●洗浄液の調製
60 mL の 10X Wash Buffer を 540 mL の純水で希釈する

●Quality Control 試薬の調製
キット添付の Quality Control 1 と Quality Control 2 の入ったボトルに純水 250μL を加えて作成する

●スタンダードの調製
ヒトサイトカインスタンダードの入ったボトルに 250μL の純水を加えて作成する

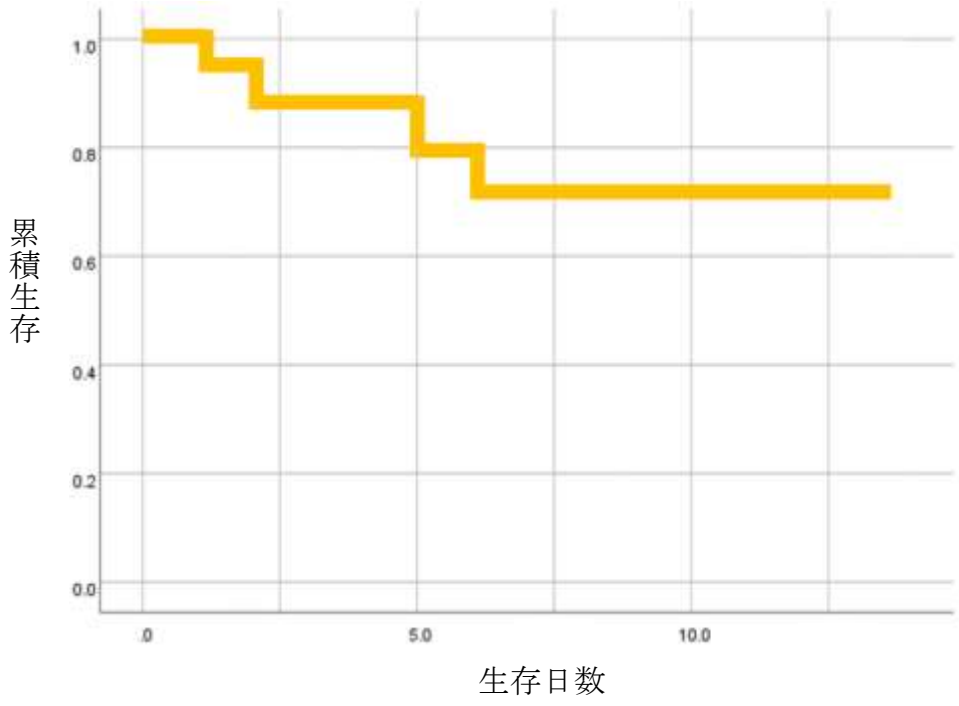
【統計解析】
すべてのデータは中央値および標準誤差（standard error: SE）で表した。データは IBM SPSS ソフトウェア（バージョン 25、日本 IBM、東京、日本）を用いて Mann-Whitney 検定で分析した。統計的な有意性は $P < 0.05$ とした。

結 果

【生存率の評価】

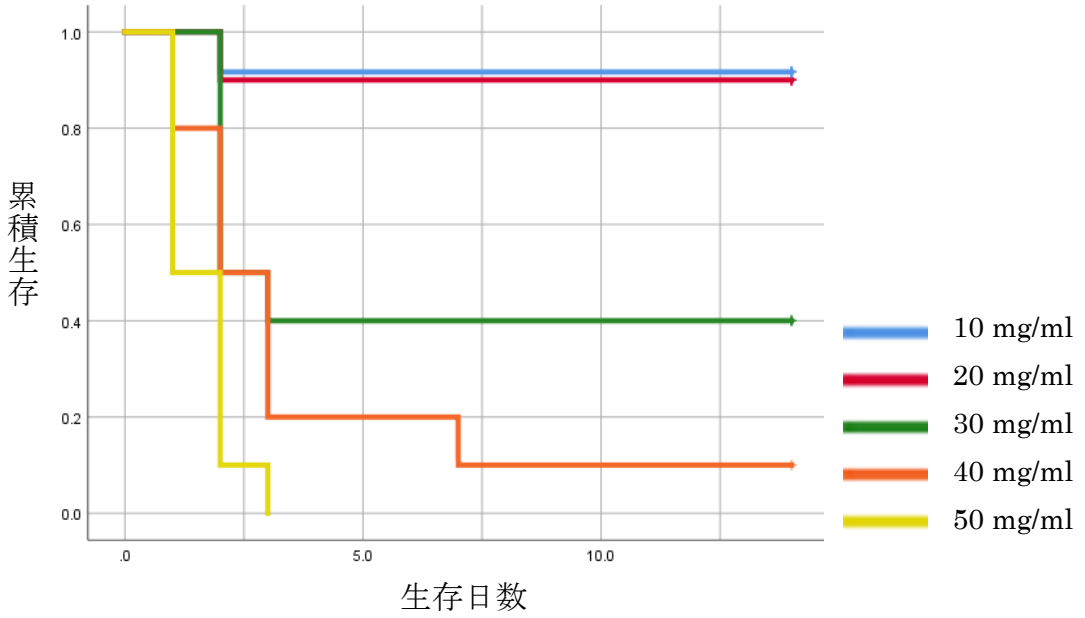
各モデルの生存曲線を（図 2-7、図 2-8、図 2-9）に示す。1 匹のマウスが麻酔のため死亡したため、15 匹のマウスを用いて 14 匹の CLP モデルを作成した。CLP モデルの 14 日後の生存率は 71.4%であった（図 2-7）。FSI モデルでは、糞便懸濁液の濃度に比例して死亡率が上昇した。抗菌薬を投与しない場合では、糞便懸濁液注入後早期にマウスが死亡することが多かった（図 2-8）。抗菌薬を投与した FSI モデルでは、100 mg/mL までの糞便懸濁液ではマウスは死亡しなかった。そのため、抗菌薬使用後の死亡率を検証するために、濃い糞便懸濁液（100～296 mg/mL）を作成する必要があった。濃い糞便懸濁液を用いたモデルの結果は、抗菌薬が死亡率を低下させ、生存期間を延長させることを示した（図 2-9）。

図 2-7　生存曲線（CLP モデル）



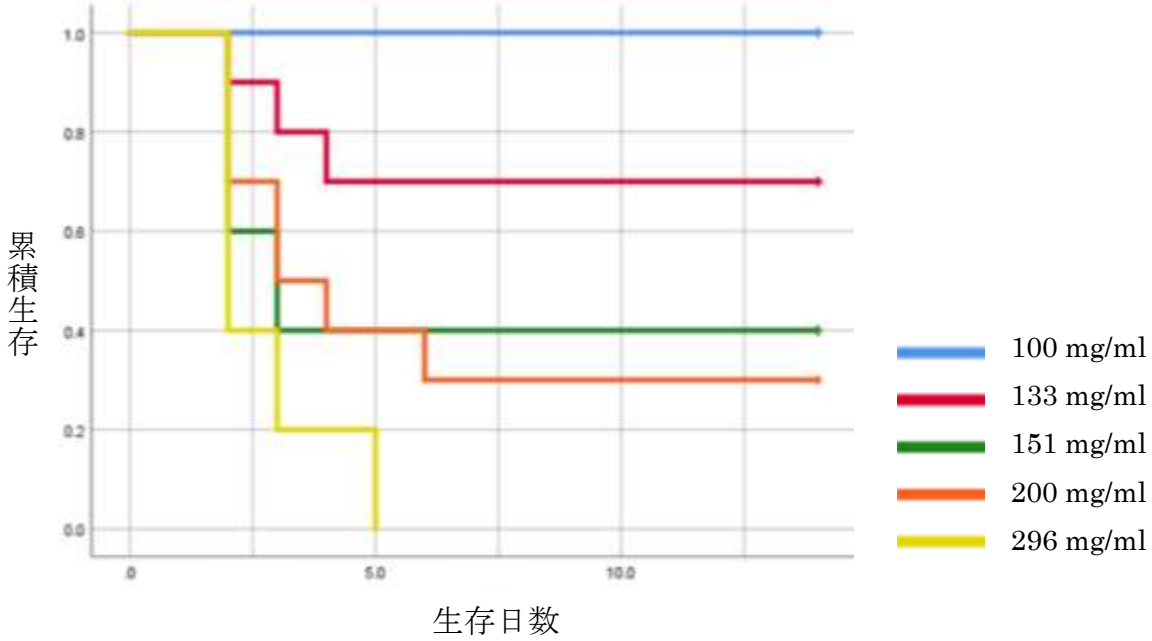
麻酔：ケタミン（125mg/kg）とキシラジン（10mg/kg）
鎮痛：ブプレノルフィン 0.05mg/kg
脂肪組織除去あり、結紮：盲腸全長の 50%、穿刺：21G 注射針で 2 回穿刺
術後抗菌薬：イミペネム／シラスタチン 25mg/kg（1 日 2 回 3 日間）

図 2-8　生存曲線（FSI モデル［薄い糞便懸濁液を用いた軽症モデル］）



鎮痛：ブプレノルフィン 0.05mg/kg
術後抗菌薬：イミペネム／シラスタチン 25mg/kg（1 日 2 回 3 日間）。

図 2-9　生存曲線（FSI モデル［濃い糞便懸濁液を用いた重症モデル］）



鎮痛：ブプレノルフィン 0.05mg/kg
術後抗菌薬：イミペネム／シラスタチン 25mg/kg（1 日 2 回 3 日間）。

【(i) 実質臓器の病理組織学的比較】

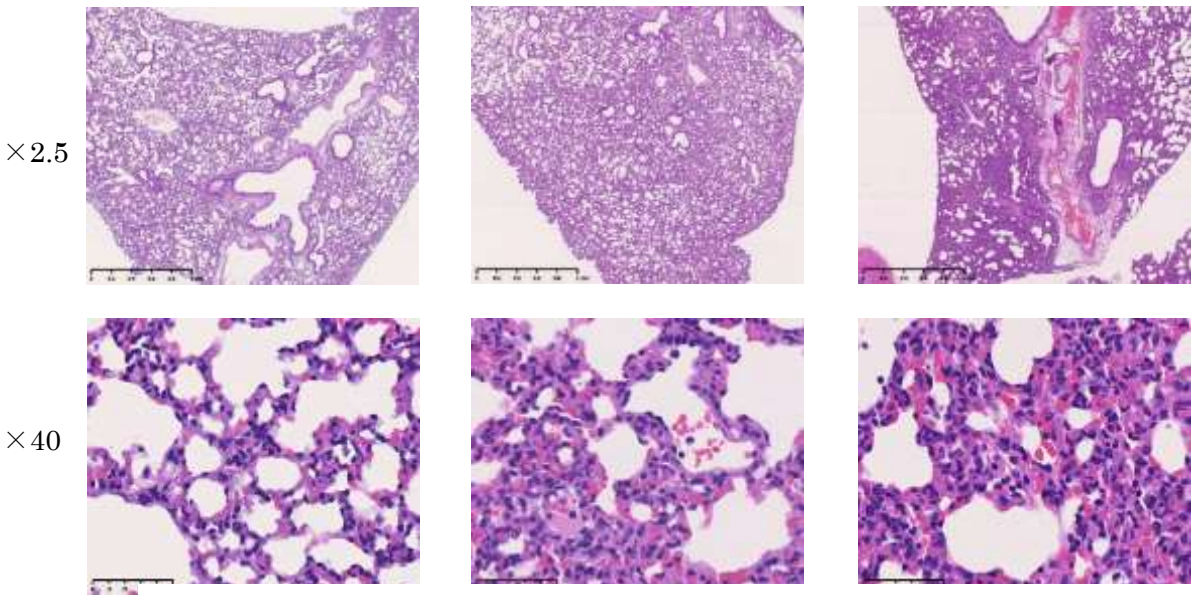
腹腔内の肉眼所見を（図 2-10）示す。FSI モデルでは腸の浮腫が顕著であり、CLP モデルでは腸の浮腫に加え、壊死が見られた。

図 2-10　各モデルの腹腔内の肉眼所見

コントロール　　CLP モデル　　FSI モデル

肺では、CLP、FSI 両群ともうっ血と好中球の浸潤が観察された。肺胞空間への好中球の浸潤はいずれの症例でも観察されず、肺炎の痕跡も認められなかった（図 2-11）。

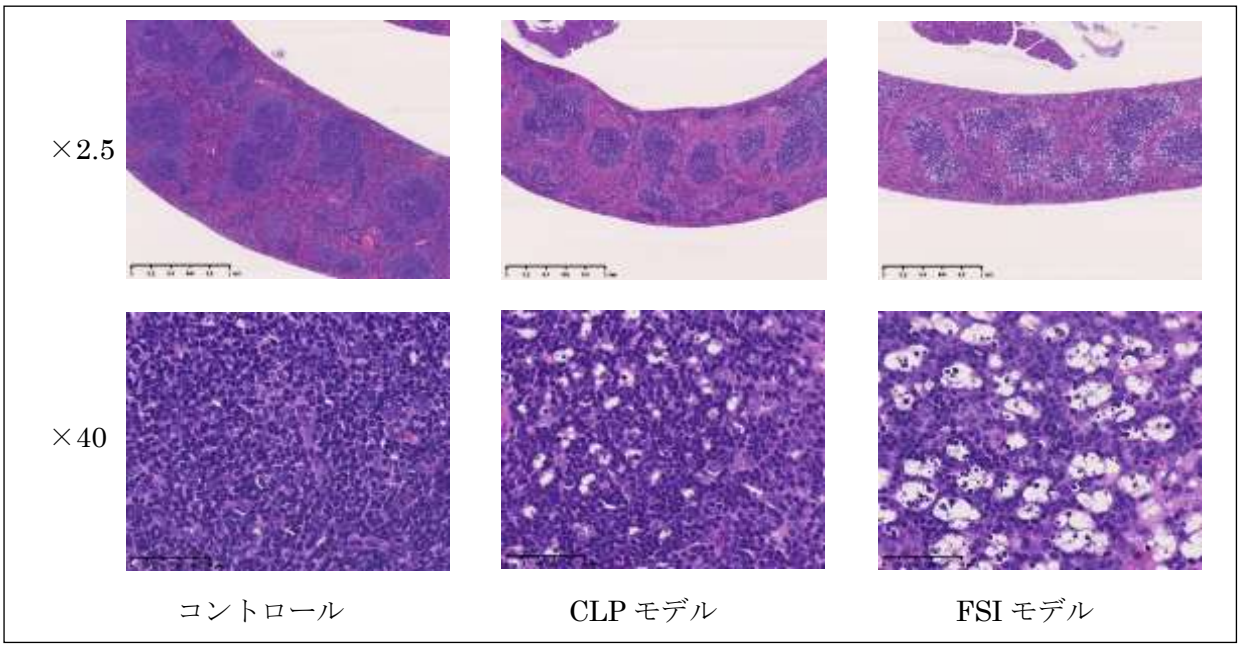
図 2-11　各モデルの病理学的所見（肺）



コントロール　　CLP モデル　　FSI モデル

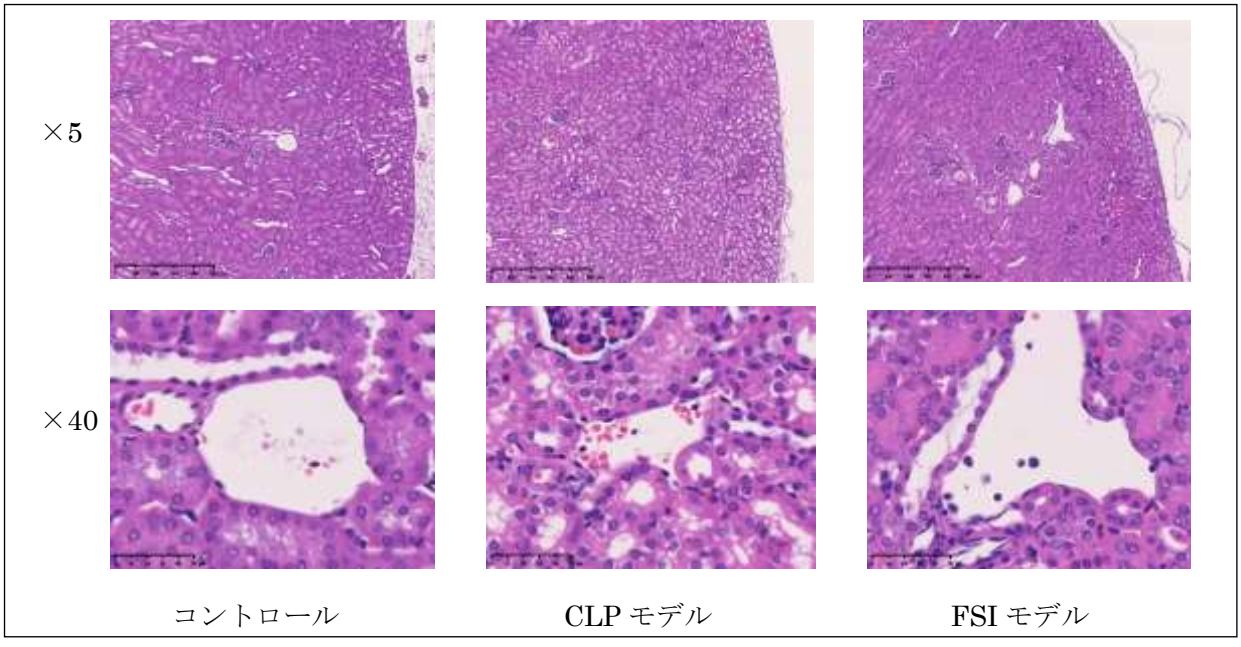
脾臓では、FSI と CLP モデル症例の両方で血球貪食が認められたが、コントロール群では認められなかった（図 2-12）。

図 2-12　各モデルの病理学的所見（脾臓）



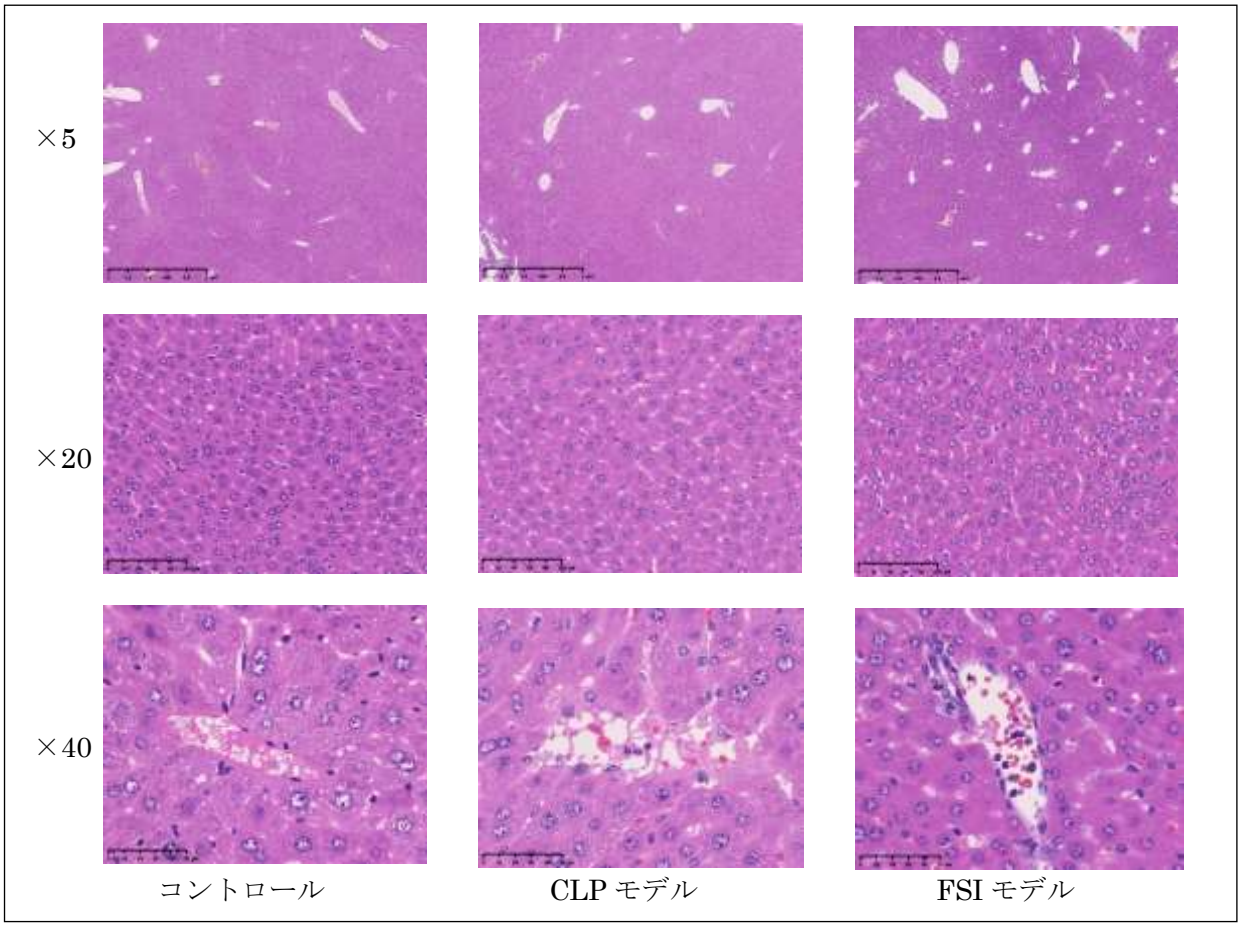
腎臓では顕著な形態学的変化は認められなかった（図 2-13）。FSI モデルでは腎小血管に好中球の浸潤がわずかに認められた。

図 2-13　各モデルの病理学的所見（腎臓）



肝臓の病理学的所見を（図 2-14）に示す。肝臓ではうっ血所見を反映し類洞が拡張していた。ショックを反映する肝細胞の遠心性変性はいずれの症例にも認められなかった。FSI モデルでは門脈と肝中心静脈に、CLP モデルでは肝中心静脈に好中球の浸潤がわずかに認められた。

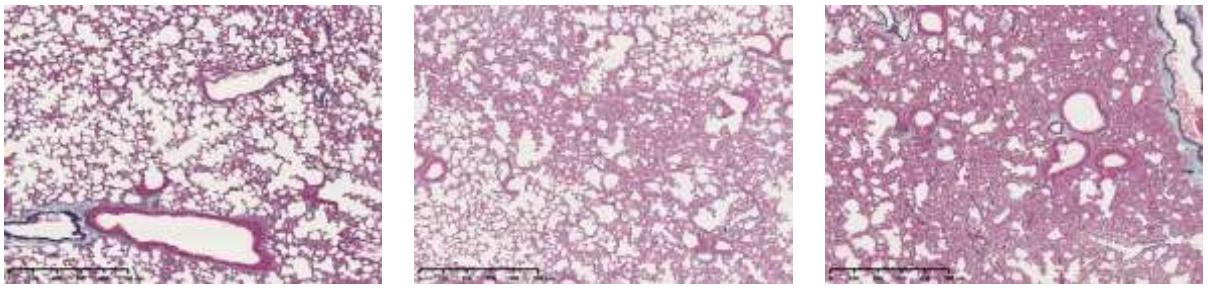
図 2-14　各モデルの病理学的所見（肝臓）



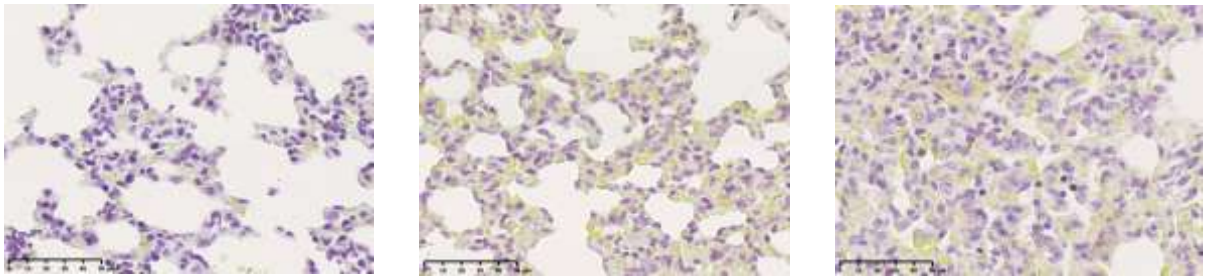
特殊染色の結果を（図 2-15）に示した。肺の E-Masson 染色で線維化はいずれも判然としなかった。Lader 染色では肺うっ血と好中球の浸潤が観察されたがヘマトキシリン・エオジン染色以上の情報は得られなかった。肝の Gitter 染色では細網線維がはっきりしなかったため、肝細胞の構築の評価は困難だった。中心静脈周囲の細胞脱落ははっきりせず、ショック状態を支持する所見はなかった。腎のリンタングステン酸ヘマトキシリン染色では明らかな糸球体血栓は指摘できず、播種性血管内凝固を支持する所見はなかった。いずれの臓器でも Gram 染色を行ったが、菌体の同定には至らなかった。

図 2-15　各臓器の特殊染色の結果

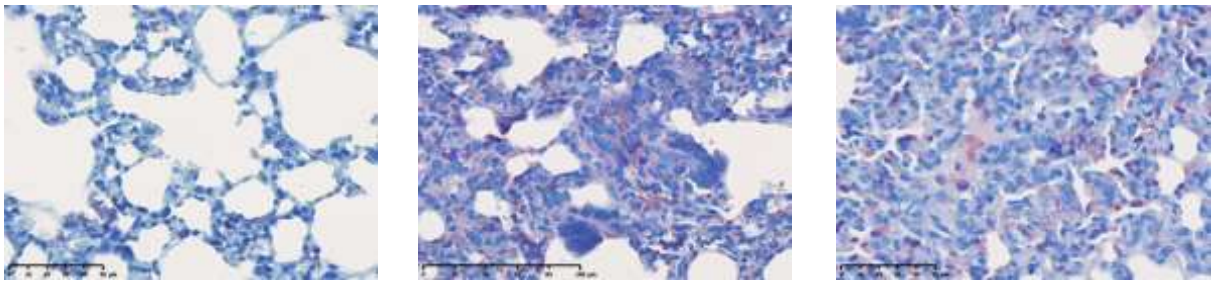
肺の E-Masson 染色（×5）



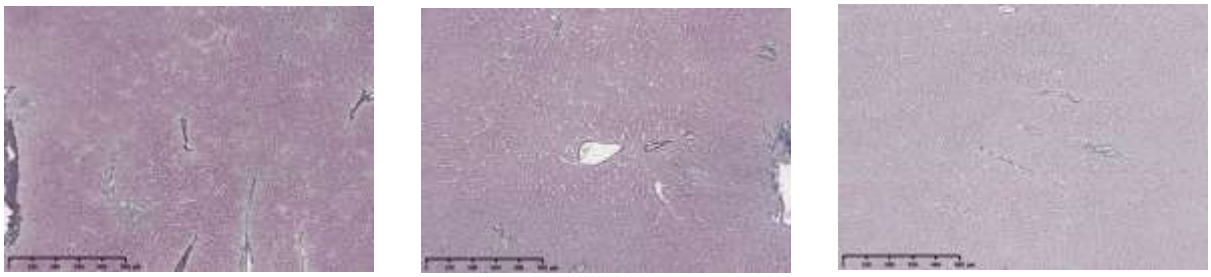
肺の Gram 染色（×40）



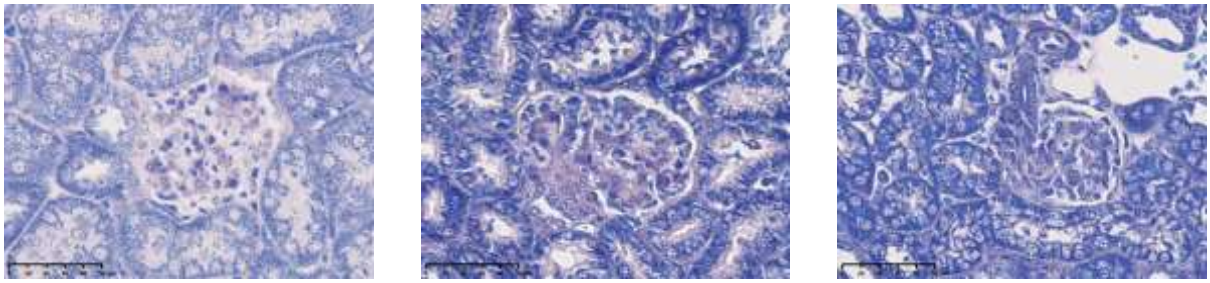
肺の Lader 染色（×40）



肝臓の Gitter 染色（×2.5）



腎臓のリンタングステン酸ヘマトキシリン染色（×40）



いずれも、（左）コントロール、（中）CLP モデル、（右）FSI モデル）

【(ii) 腹水培養による細菌学的比較】

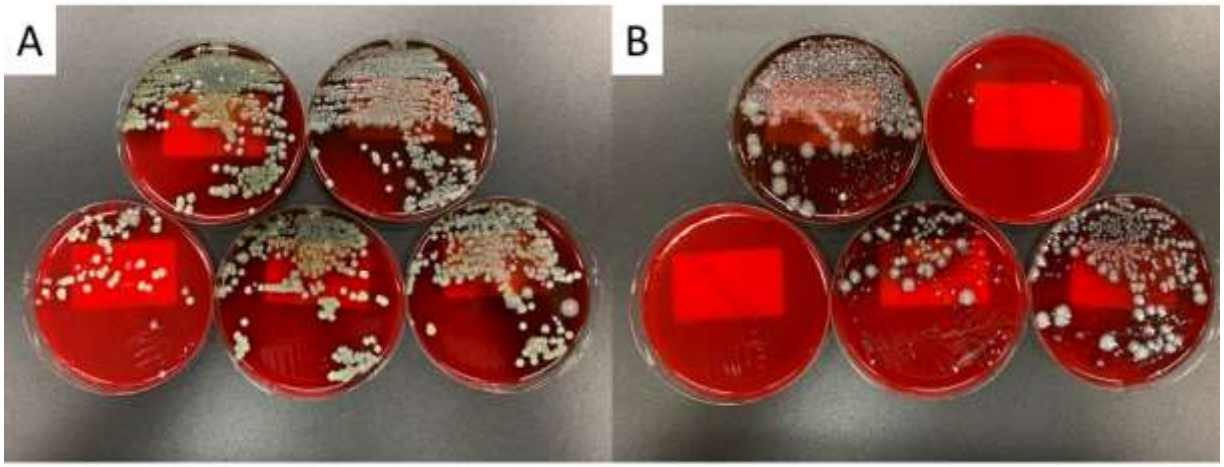
FSI モデルでは、全ての個体から 10^3 colony forming units (CFU)/mL 以上の複数種の細菌が培養された。しかし、CLP モデルでは、培養が陰性であったり、菌数が非常に少ない個体が存在し、個体差が大きかった（表 2-4、図 2-16）。盲腸内の便培養と糞便懸濁液の培養では菌種に若干の差があったが、その菌種の差は腹水培養の結果では消失していた（表 2-4）。Stenotrophomonas maltophilia は FSI モデルの腹水培養で同率に検出され、FSI モデルと CLP モデルの間で最も有意な差となった（表 2-4）。

表 2-4　腹水培養における細菌種の同定結果

	FSI モデル					CLP モデル					盲腸内糞便		糞便懸濁液	
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	1	2
Enterococcus gallinarum										◎	◎	◎	◎	
Enterococcus faecalis	○	◎	○		○	◎	○		◎		◎			
Lactobacillus species			○		○	◎	△		◎	◎	◎	◎		
Escherichia coli		○		○	○		△		○		◎	◎	◎	◎
Bacteroides vulgatus						◎	○		○	◎	◎	◎	◎	◎
Lactococcus garvieae			○										◎	◎
Proteus mirabilis		○			△	◎				△			◎	◎
Klebsiella oxytoca						○				◎				
Stenotrophomonas maltophilia	◎	◎	○	◎	◎									

腹水は腹膜炎発症から 20 時間後に採取したサンプルで評価した。FSI モデル 5 例、CLP モデル 5 例の腹水培養における細菌数および菌種の同定結果。細菌数は 1ml あたりの colony forming unit（CFU）で評価し、3 段階（◎：10^5 CFU/ml 以上、○：10^3 以上 10^5 CFU/ml 未満、△：10^3 CFU/ml 未満）で表示した。
CLP モデルのうち、1 個体では菌の増殖が見られなかった。また、抗菌薬を投与していない 2 匹のマウスの盲腸から採取した便と、FSI モデル作成に用いた糞便懸濁液（各 2 サンプル）について、細菌同定試験を実施した。

図 2-16　FSI モデルおよび CLP モデルの腹水培養結果



羊血寒天培地での炭酸ガス培養開始 24 時間後の結果
（A：FSI モデル、B：CLP モデル）

CLP モデル（B）では菌体の発育がみられない、もしくは発育が非常に少ないプレートが存在する。

【(iii) 生理学的比較】

FSI モデルと CLP モデルの術後 20 時間における呼吸数、体温、血液ガス分析結果を（表 2-5）に示す。FSI モデル、CLP モデルともに、頻呼吸、低体温、低血糖が認められた。また、両モデルとも高クロール血症が認められた。FSI モデルでは CLP モデルとは異なり、重度の代謝性アシドーシスが認められた。CLP モデルでは、対照群に比べ有意なアシドーシス所見は認められなかった。CLP モデルでは、ほとんどの変数で標準誤差が FSI モデルより大きかった。

表 2-5　術後 20 時間後の呼吸数、体温、血液ガス分析結果

	Control	FSI model	CLP model
呼吸数（/min）	136 ± 4.476	204 ± 11.123 *	160 ± 6.849 *
体温（℃）	37.0 ± 0.085	36.1 ± 0.044 *	36.0 ± 0.164 *
pH	7.241 ± 0.0034	6.974 ± 0.0110 *#	7.148 ± 0.0300
pCO2 (mmHg)	57.2 ± 2.276	82.4 ± 3.991 *	63.3 ± 3.523
pO2 (mmHg)	49.1 ± 4.161	30.6 ± 2.724	42.8 ± 2.705
K (mmol/L)	3.7 ± 0.061	4.6 ± 0.171 *	3.9 ± 0.203
Na (mmol/L)	148 ± 0.219	150 ± 0.456 #	154 ± 1.308 *
Cl (mmol/L)	118 ± 0.867	127 ± 0.780 *	125 ± 2.028 *
Hemoglobin (g/dL)	13.0 ± 0.461	14.3 ± 0.614	13.7 ± 1.141
Hematocrit (%)	39.9 ± 1.385	43.8 ± 1.846	42.1 ± 3.449
HCO3 (mmol/L)	23.4 ± 0.999	18.2 ± 1.089 *#	25.0 ± 1.592
Base excess (mmol/L)	-2.9 ± 0.946	-12.0 ± 1.102 *#	-2.8 ± 1.837
血糖値（mg/dL）	298 ± 8.112	125 ± 11.229 *	112 ± 17.035 *
乳酸値（mmol/L）	2.8 ± 0.118	3.2 ± 0.481	2.1 ± 0.275

データは中央値±標準誤差で表示

*コントロール群との統計学的有意差あり（P 値<0.05）

CLP 群との統計学的有意差あり（P 値<0.05）

【(iv) 免疫学的比較】

炎症関連サイトカインとケモカインの包括的な測定により、術後 20 時間の時点で、FSI モデルと CLP モデルの両方で高い炎症反応が見られた（表 2-6、図 2-17）。特に FSI モデルでは、強い炎症反応が観察された。IL-1β と RANTES は FSI モデルでのみ高く、IL-1α と IL-7 は CLP モデルでのみ高かった。IL-9 はどのモデルでも増加しなかった。測定パラメータによって若干異なるが、FSI モデルの標準誤差は全体的に小さかった。

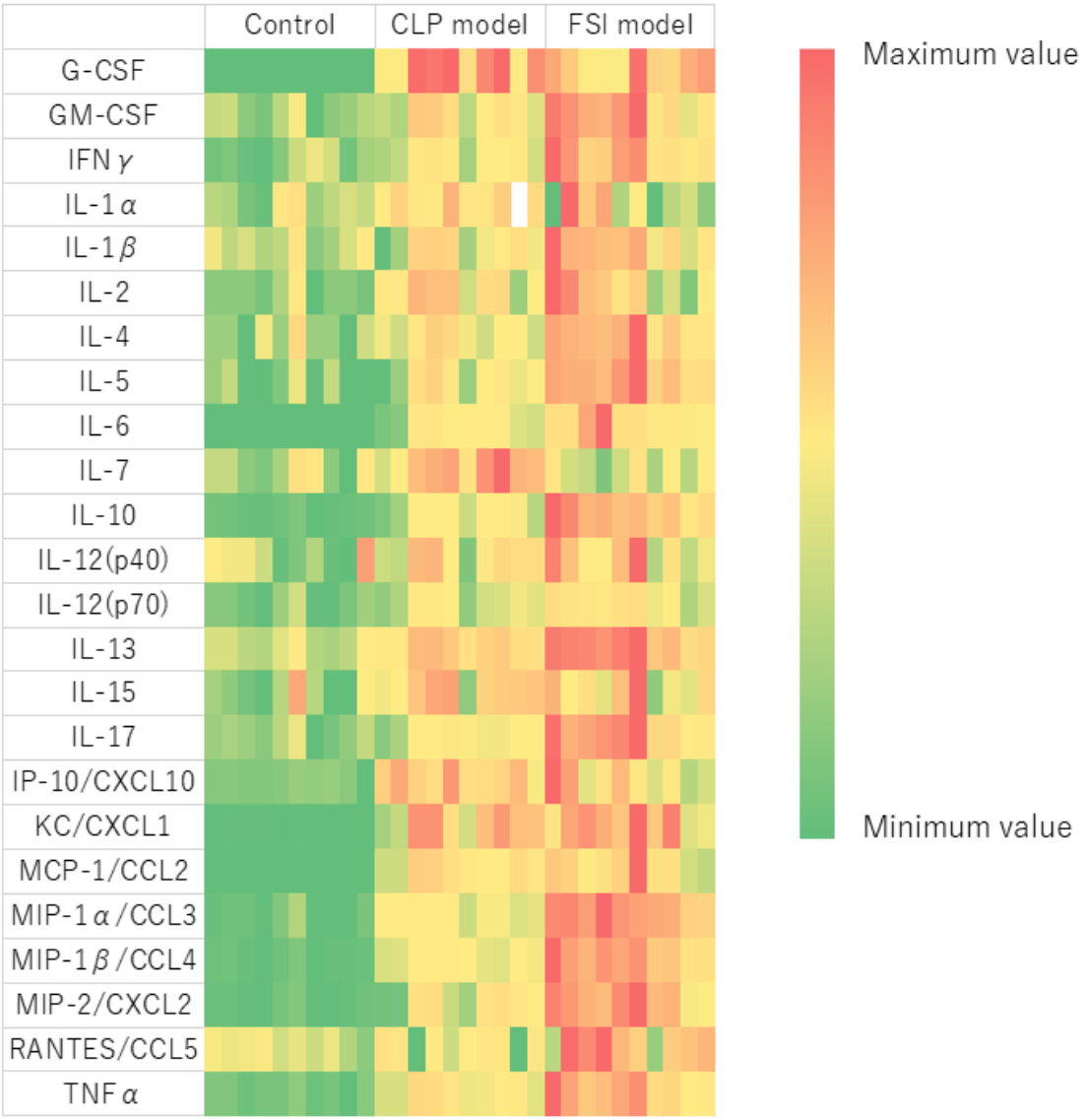
表 2-6　マルチプレックス分析によるサイトカインおよびケモカイン測定の結果

	Control	FSI model	CLP model
G-CSF	46.9 ± 5.0	89451.3 ± 734.2*	92031.9 ± 629.0*
GM-CSF	54.1 ± 7.3	196.7 ± 10.6*#	107.0 ± 23.4*
IFNγ	3.3 ± 1.0	37.6 ± 1.5*#	11.7 ± 13.1*
IL-1α	66.0 ± 13.5	73.3 ± 16.9	136.4 ± 51.3*
IL-1β	5.8 ± 0.6	17.9 ± 1.4*#	8.1 ± 2.7
IL-2	3.2 ± 0.8	12.9 ± 1.5*	11.4 ± 3.1*
IL-4	0.6 ± 0.1	3.0 ± 0.1*#	1.1 ± 0.4*
IL-5	1.9 ± 0.7	22.2 ± 1.2*#	8.4 ± 2.7*
IL-6	4.6 ± 0.7	17553.0 ± 1126.7*#	2720.4 ± 14972.8*
IL-7	4.9 ± 1.2	6.1 ± 4.6#	26.8 ± 0.9*
IL-9	151.7 ± 35.0	160.7 ± 141.9	93.4 ± 52.3
IL-10	10.4 ± 2.1	1594.9 ± 16.4*#	133.1 ± 347.4*
IL-12 (p40)	12.2 ± 4.0	21.8 ± 3.1*	23.4 ± 5.1*
IL-12 (p70)	12.7 ± 4.1	94.8 ± 6.9*#	48.5 ± 12.7*
IL-13	40.5 ± 5.3	560.8 ± 28.4*#	168.5 ± 67.0*
IL-15	47.1 ± 22.1	139.9 ± 18.1*	182.7 ± 24.0*
IL-17	3.0 ± 0.6	73.6 ± 1.1*#	8.2 ± 14.6*
IP-10/CXCL10	94.1 ± 11.7	408.4 ± 300.0*	484.7 ± 61.2*
KC/CXCL1	158.2 ± 25.0	18761.0 ± 2137.1*	17657.4 ± 2032.9*
MCP-1/CCL2	58.1 ± 4.5	6618.7 ± 468.3*	5992.5 ± 1182.5*
MIP-1α/CCL3	42.3 ± 4.9	599.1 ± 5.0*#	138.4 ± 58.5*
MIP-1β/CCL4	68.7 ± 5.8	4123.3 ± 26.7*#	424.8 ± 667.3*
MIP-2/CXCL2	32.0 ± 15.4	4732.8 ± 192.7*#	966.2 ± 871.9*
RANTES/CCL5	47.7 ± 3.7	185.0 ± 9.0*#	65.7 ± 42.0
TNFα	6.4 ± 1.0	113.5 ± 5.2*#	39.7 ± 23.2*

データは中央値±標準誤差で表示。単位は全て pg/ml。*コントロール群との統計学的有意差あり（P 値<0.05）。# CLP 群との統計学的有意差あり（P 値<0.05）。

CCL: C-C motif chemokine, CXCL: C-X-C motif chemokine ligand, G-CSF: Granulocyte-colony stimulating factor, GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, IFNγ Interferon gamma, IL: Interleukin, IP: Interferon gamma-induced protein, KC: Keratinocyte-derived chemokines, MCP: Monocyte chemotactic protein, MIP: Macrophage inflammatory protein, RANTES: Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted, TNF: tumor necrosis factor

図 2-17　マルチプレックス解析で行ったサイトカインおよびケモカイン測定値のヒートマップ



血液は腹膜炎発症から 20 時間後に採取したサンプルで評価した。サイトカイン・ケモカイン値の相対評価を示すヒートマップであり、各変数の最大値は赤、最小値は緑、中間値は赤から緑へのグラデーションスケールに相当する。

CCL: C-C motif chemokine, CXCL: C-X-C motif chemokine ligand, G-CSF: Granulocyte-colony stimulating factor, GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, IFNγ Interferon gamma, IL: Interleukin, IP: Interferon gamma-induced protein, KC: Keratinocyte-derived chemokines, MCP: Monocyte chemotactic protein, MIP: Macrophage inflammatory protein, RANTES: Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted, TNF: tumor necrosis factor

考 察

糞便懸濁液を用いて作成する新規の敗血症モデルマウス（Fecal Suspension Intraperitoneal Injection Model：FSI モデル）のプロトコルを確立した。FSI モデルと CLP モデルを生理学的、病理学的、細菌学的、免疫学的に比較した結果、FSI モデルは CLP モデルとほぼ同様の変化が確認された。また、FSI モデルは CLP モデルよりも個体差が少なかった。これらの結果は、FSI 敗血症モデルが従来のモデルよりも優れている可能性を示唆している。

マウスの CLP モデルは、低体温、頻脈、頻呼吸などの敗血症や敗血症性ショックの典型的な症状を呈することが知られており(Ayala and Chaudry, 1996)、また低血糖を伴うこともある(Ferreira et al., 2017)。したがって、今回の FSI モデルにおける生理学的評価の結果（表 2-5）は、敗血症で観察される結果と一致した。病理学的評価では、CLP モデル、FSI モデルともに実質臓器への好中球の浸潤が認められた（図 2-11、図 2-13、図 2-14）。臓器のグラム染色では菌が特定できず、菌血症を直接証明することはできなかったが（図 2-15）、細菌学的評価では、両モデルとも腹水培養で同様の菌が培養されていることが確認された（表 2-4）。これらの詳細な比較の結果は、FSI モデル、CLP モデルともに敗血症と一致するものと考えられた。Luminex®を用いた免疫学的評価では、FSI モデル、CLP モデルともに IL-7、RANTES、IL-9 を除くすべてのサイトカイン、ケモカインが上昇した（表 2-6、図 2-17）。特に、FSI モデルは CLP モデルよりも炎症レベルが高く、それに伴って IL-4 や IL-10 などの抗炎症サイトカインレベルも高いことがわかった。RANTES は敗血症で上昇し、肺への好中球の浸潤を促進する(Hwaiz et al., 2015)。本研究では、FSI モデルのみが RANTES レベルの上昇を示し、CLP モデルよりも FSI モデルの方が敗血症様の特性を持つことが示された。IL-7 は強力な抗アポトーシスサイトカインであり、リンパ球の生存と増殖に必須である(Fry and Mackall, 2005; Geiselhart et al., 2001)。本研究では、CLP モデルのみが有意に高い IL-7 値を示したが、血漿 IL-7 値と敗血症の重症度との間には相関はないと報告されている(Andreu-Ballester et al., 2014)。したがって、FSI モデルと CLP モデルの間には、時相の違いによる多少の差異はあるものの、免疫学的に敗血症と一致する結果が得られたといえる。

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、容易に多菌性腹膜炎の作成が可能なことと、敗血症の重症度をほぼ均一にできることである。生理学的、細菌学的、免疫学的評価により得られた結果は、FSI モデルにおける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の影響を最小限にし得る可能性を示した。以前の研究で、今回の FSI モデルと似たような糞便懸濁液調製プロトコルが報告されている(Starr et al., 2014)。このプロトコルでは、グリセロールリン酸緩衝液による糞

便懸濁液の調製、糞便懸濁液の-80℃での凍結、および解凍を必要とする(Starr et al., 2014)。同報告の糞便懸濁液の作製手順は、排泄された糞便から糞便懸濁液を作成するFSI に比べてかなり複雑である。また、腹水培養における細菌種の同定結果（表 2-4）では、排泄された便から誘発した腹膜炎と腸管内の便から誘発した腹膜炎でほぼ同様の菌種が同定されており、FSI に使用した糞便懸濁液の腹膜炎抗原としての妥当性も示されている。

また、糞便懸濁液を用いた他の動物モデルにおいても便を得るために外科的手術を必要とすることから(Hosokawa et al., 2018; Orbegozo et al., 2018)、作成の簡便さという点で FSI の方がより優位であるといえる。また、以前の糞便懸濁液を用いたマウスモデルにおいても、糞便懸濁液を得るためだけに複数のマウスを犠牲にする必要があった(Starr et al., 2014)。したがって、FSI モデルはその簡便性と均一性により、実験動物への負担を軽減することができたと考えられる。

本章の緒言に記載した通り、既存の敗血症モデル動物は、毒素の投与、病原体（生菌）の投与、動物の内在バリアの破壊の 3 つに分類される(Buras et al., 2005; Korneev, 2019)（表 2-1)。特定の毒素や病原体の注射のみでは、誤差の少ない正確な情報は得られるものの、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在バリアを破壊して敗血症を誘発するモデルは、個体差が大きく真の情報を得ることが難しいが、敗血症の臨床病態に最も近いといえる。FSI モデルは、特定の毒素や病原体を注射したモデルのように、複数の原因菌による腹膜炎を均質に発症させることが容易である。FSI モデルの腹水培養では、Stenotrophomonas maltophilia（S. maltophilia）の検出率が非常に高く、その濃度も高かった（表 2-4)。S. maltophilia は、多剤耐性の世界的な日和見病原体で(Brooke, 2012)、病原性は高くないが血流感染症の起因菌として重要な院内病原体である(Jang et al., 1992; Victor et al., 1994)。FSI モデルでは、腸管からの新たな糞便の流入がないため、抗菌薬の投与により S. maltophilia の占有率が上昇した可能性がある。

CLP モデルでは、盲腸穿孔部位からの糞便流出の程度、穿孔部位の被包化（局在化）の程度、あるいは遠位盲腸の壊死の程度によって重症度が大きく異なる(Buras et al., 2005; Dejager et al., 2011; Maier et al., 2004; Schabbauer, 2012)。さらに、CLP モデルの作成過程では、特に脂肪組織を除去する過程において少なくない出血が生じ、この出血も生体反応に影響を及ぼしている可能性がある（図 2-3)。本研究では、局所的な炎症を防ぐために脂肪組織を切除したが(Niiyama et al., 2016)、細菌学的評価では腹水培養が陰性で細菌の増殖が極めて少ない個体が存在した（図 2-16）したがって、CLP の手技に脂肪組織の切除を加えても局所的な膿瘍形成は完全に防げないという仮説が導かれる。膿瘍形成による腹膜炎の局在化は、CLP モデルを用いた実験で膿瘍形成に有効であることが証明された薬剤が、臨床の敗血症治療では効果がないことがあ

り、CLP モデルにおける大きな問題点であった(Buras et al., 2005)。FSI モデルは、CLP モデルに内在するこれらの問題点を克服することができる。

【制限事項】

本研究の実験結果は 1 つの施設で得られたものであり、FSI モデルのプロトコルや実験結果は他の施設でも検証する必要がある。施設、術者、便の状態、糞便懸濁液の濾過・撹拌の程度により、結果が異なる可能性がある。目的の重症度のマウスを作成するためには、施設によって糞便の投与量や濾過方法のアレンジを要する可能性がある。

生理学的評価については、血液ガス分析装置はヒトの血液を対象としているため、結果が不正確である可能性がある。また、免疫学的評価の結果は麻酔薬投与の影響を受けている可能性がある。細菌学的評価では、多くの細菌種が存在する試料があり、すべての細菌が同定されない可能性がある。FSI モデルは、一度に大量の病原体を腹腔内投与するため、CLP モデルよりも重症化が早い。したがって、同じ時間経過で同じ死亡率のモデル間の比較であっても、異なる病態を反映している可能性がある。

結 論

本研究より次の新知見が得られた。

●序章の研究内容より

・心肺蘇生に静脈動脈体外式膜型人工肺（veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation: VA-ECMO）が用いられた場合は、重度の凝固障害が生じる。

・プロトロンビン時間とアンチトロンビン活性は、心肺蘇生に VA-ECMO を用いた際の予後予測因子となる。

●本章の研究内容より

・低侵襲で均質な敗血症モデルである Fecal Suspension Intraperitoneal Injection Model（FSI モデル）のプロトコルを確立した。

・FSI モデルの敗血症モデルとしての臨床的妥当性が、従来の敗血症モデル（CLP モデル）との組織学的、生理学的、細菌学的、免疫学的比較により証明された。

・FSI モデルは CLP モデルに比し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の影響を最小限できる可能性がある。

【新知見の意義】

序章の研究結果より、VA-ECMO によって誘発される凝固障害が有望な治療標的となり得ることが示された。VA-ECMO を使用した心停止蘇生後の管理における凝固線溶マーカーの評価が患者の正確な予後予測や予後の向上につながる可能性がある。

本章の研究結果より、均質で作成が簡便な敗血症モデルとして提唱された FSI モデルが、今後の敗血症研究の基盤となる可能性が示された。従来存在しなかった誤差の少ない多菌性敗血症モデルの登場により、敗血症における生体反応の正確な評価が可能となる。

【新知見から今後の展開】

本章の緒言で述べた通り、救急医学における三大侵襲は、「虚血再灌流障害」「外傷」「敗血症」である。生体侵襲の機序は異なるが、その侵襲に対する病態は類似点も多く、一つの発見が他の生体侵襲に対する病態解明のヒントとなることも少なくない。

序章の研究結果により、プロトロンビンとアンチトロンビンが虚血再灌流障害や敗血症病態のカギとなる分子であると予想されたため、私は健常人の血漿検体を用いてトロンビン生成能をプロトロンビンとアンチトロンビンの濃度に応じてどのように変化するかを本研究と並行して調査した。その結果、臨床的に経験されていた事実を裏付ける結果が得られ、アンチトロンビン療法の適応に関するエビデンスとなる基礎実験結果を報告した(Tsuchida et al., 2022)（参考論文)。同じく、外傷領域においても外傷急性期に生じる凝固障害の詳細な機序を解明し(Hayakawa et al., 2021)（参考論文)、心停止後の虚血再灌流障害におけるヒストンと凝固線溶反応の関連も明らかにした（論文投稿中)。今後は本研究の成果である FSI モデルを用いて敗血症における詳細な免疫反応、凝固線溶反応の解明を行っていく予定である。

また、過去の敗血症罹患による免疫応答の変化も研究トピックスとなっており、亜急性期以降に生じる免疫機能不全あるいは免疫応答に伴う炎症反応の長期化、タンパク異化亢進と栄養障害など複数の病態が関与する症候群 ”Persistent Inflammation Immunosuppression Catabolism Syndrome (PICS)” も、近年注目されている概念である。このように救急・集中治療領域の研究領域が急性期だけでなく亜急性期の病態まで広がっているが、本研究の FSI モデルを用いれば、生存マウスを長期間飼育することで均質な PICS モデルを得ることができるため、PICS 病態に対しても本研究の成果が活かされる可能性がある。私は現在 FSI モデルを用いて敗血症急性期における免疫反応、凝固線溶反応の解明を目的とした研究だけでなく、PICS 病態の解明に関する研究も同時に進行させている。

【今後の課題】

多くの優秀な研究者たちが長年にわたって敗血症の研究を行ってきたが、敗血症治療薬は存在しない。本研究により均質な敗血症モデルのプロトコルが確立されたが、マウスとヒトとの免疫学的差異に係る問題が解決したわけではない。FSI モデルを用いてマウスにおける詳細な病態機序が解明されても、ヒト敗血症の治療薬の誕生までの道のりは困難の連続となる可能性がある。

救急医学はその特性から不確実性の影響を強く受け、橋渡し研究が十分に進んでいない領域である。その中でも、本研究や参考論文のように臨床研究と基礎研究の溝を埋める研究を継続することで、各生体侵襲の治療薬開発に結び付く研究成果が生まれると私は信じている。

謝 辞

本研究は、JSPS 科学研究費 20K0926 および K12C011174F の助成を受けたものである。

実験器具の管理やマウスの管理をしてくださった救急医学教室実験助手の柏原志保さん、腹水培養に協力していただいた北海道大学病院細菌検査室の早坂かすみさん、病理標本を準備してくださった株式会社モルフォテクノロジーさんに心から感謝いたします。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Adrie, C., Adib-Conquy, M., Laurent, I., Monchi, M., Vinsonneau, C., Fitting, C., Fraisse, F., Dinh-Xuan, A.T., Carli, P., Spaulding, C., et al. (2002). Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a "sepsis-like" syndrome. Circulation 106, 562-568.

Adrie, C., Laurent, I., Monchi, M., Cariou, A., Dhainaou, J.F., and Spaulding, C. (2004). Postresuscitation disease after cardiac arrest: a sepsis-like syndrome? Curr Opin Crit Care 10, 208-212.

Adrie, C., Monchi, M., Laurent, I., Um, S., Yan, S.B., Thuong, M., Cariou, A., Charpentier, J., and Dhainaut, J.F. (2005). Coagulopathy after successful cardiopulmonary resuscitation following cardiac arrest: implication of the protein C anticoagulant pathway. J Am Coll Cardiol 46, 21-28.

Ames, A., 3rd, Wright, R.L., Kowada, M., Thurston, J.M., and Majno, G. (1968). Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. Am J Pathol 52, 437-453.

Andreu-Ballester, J.C., Cuellar, C., Garcia-Ballesteros, C., Pérez-Griera, J., Amigó, V., Peiró-Gómez, A., Peñarroja-Otero, C., Ballester, F., Mayans, J., and Tormo-Calandín, C. (2014). Deficit of interleukin 7 in septic patients. Int Immunopharmacol 23, 73-76.

Angus, D.C., Linde-Zwirble, W.T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., and Pinsky, M.R. (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med 29, 1303-1310.

Ayala, A., and Chaudry, I.H. (1996). Immune dysfunction in murine polymicrobial sepsis: mediators, macrophages, lymphocytes and apoptosis. Shock 6 Suppl 1, S27-38.

Bartlett, R.H., Gazzaniga, A.B., Jefferies, M.R., Huxtable, R.F., Haiduc, N.J., and Fong, S.W. (1976). Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) cardiopulmonary support in infancy. Trans Am Soc Artif Intern Organs 22, 80-93.

Bean, W.B. (1954). Sir William Osler: aphorisms from his bedside teachings and writings. British Journal for the Philosophy of Science 5.

Belohlavek, J., Smalcova, J., Rob, D., Franek, O., Smid, O., Pokorna, M., Horák, J., Mrazek, V., Kovarnik, T., Zemanek, D., et al. (2022). Effect of Intra-arrest Transport, Extracorporeal Cardiopulmonary Resuscitation, and Immediate Invasive Assessment and Treatment on Functional Neurologic Outcome in Refractory Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Randomized Clinical Trial. Jama 327, 737-747.

Brooke, J.S. (2012). Stenotrophomonas maltophilia: an emerging global opportunistic pathogen. Clin Microbiol Rev 25, 2-41.

Buras, J.A., Holzmann, B., and Sitkovsky, M. (2005). Animal models of sepsis: setting the stage. Nat Rev Drug Discov 4, 854-865.

Cetinkaya, R.A., Görenek, L., Coşkun, O., Eyigün, C.P., Senses, Z., Ide, T., and Kiliç, S. (2009). The effect of methylprednisolone on treatment in rats with induced sepsis. Clin Exp Med 9, 45-50.

Coopersmith, C.M., Stromberg, P.E., Dunne, W.M., Davis, C.G., Amiot, D.M., 2nd, Buchman, T.G., Karl, I.E., and Hotchkiss, R.S. (2002). Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis. Jama 287, 1716-1721.

Copeland, S., Warren, H.S., Lowry, S.F., Calvano, S.E., and Remick, D. (2005). Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. Clin Diagn Lab Immunol 12, 60-67.

Dejager, L., Pinheiro, I., Dejonckheere, E., and Libert, C. (2011). Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? Trends Microbiol 19, 198-208.

Ferreira, F.B.D., Dos Santos, C., Bruxel, M.A., Nunes, E.A., Spiller, F., and Rafacho, A. (2017). Glucose homeostasis in two degrees of sepsis lethality induced by caecum ligation and puncture in mice. Int J Exp Pathol 98, 329-340.

Ferreira, F.L., Bota, D.P., Bross, A., Mélot, C., and Vincent, J.L. (2001). Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. Jama 286, 1754-1758.

Fry, T.J., and Mackall, C.L. (2005). The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. J Immunol 174, 6571-6576.

Gando, S., Iba, T., Eguchi, Y., Ohtomo, Y., Okamoto, K., Koseki, K., Mayumi, T., Murata, A., Ikeda, T., Ishikura, H., et al. (2006). A multicenter, prospective validation of disseminated intravascular coagulation diagnostic criteria for critically ill patients: comparing current criteria. Crit Care Med 34, 625-631.

Gando, S., Saitoh, D., Ogura, H., Fujishima, S., Mayumi, T., Araki, T., Ikeda, H., Kotani, J., Kushimoto, S., Miki, Y., et al. (2013). A multicenter, prospective validation study of the Japanese Association for Acute Medicine disseminated intravascular coagulation scoring system in patients with severe sepsis. Crit Care 17, R111.

Gando, S., Saitoh, D., Ogura, H., Mayumi, T., Koseki, K., Ikeda, T., Ishikura, H., Iba, T., Ueyama, M., Eguchi, Y., et al. (2008). Natural history of disseminated intravascular coagulation diagnosed based on the newly established diagnostic criteria for critically ill patients: results of a multicenter, prospective survey. Crit Care Med 36, 145-150.

Gando, S., Shiraishi, A., Yamakawa, K., Ogura, H., Saitoh, D., Fujishima, S., Mayumi, T., Kushimoto, S., Abe, T., Shiino, Y., et al. (2019). Role of disseminated intravascular coagulation in severe sepsis. Thromb Res 178, 182-188.

Geiselhart, L.A., Humphries, C.A., Gregorio, T.A., Mou, S., Subleski, J., and Komschlies, K.L. (2001). IL-7 administration alters the CD4:CD8 ratio, increases T cell numbers, and increases T cell function in the absence of activation. J Immunol 166, 3019-3027.

Hayakawa, M., Tsuchida, T., Honma, Y., Mizugaki, A., Ooyasu, T., Yoshida, T., Saito, T., Katabami, K., Wada, T., and Maekawa, K. (2021). Fibrinolytic system activation immediately following trauma was quickly and intensely suppressed in a rat model

of severe blunt trauma. Sci Rep 11, 20283.

Heyworth, J., and Mason, S.M. (2018). Emergency Medicine: great papers from the Summer of Love to 2017. Emerg Med J 35, 152-155. 10.1136/emermed-2017-207285.
Hori, S. (2010). Emergency medicine in Japan. Keio J Med 59, 131-139.

Hosokawa, K., Su, F., Taccone, F.S., Post, E.H., Creteur, J., and Vincent, J.L. (2018). Effects of acute ethanol intoxication in an ovine peritonitis model. BMC Anesthesiol 18, 70.

Hotchkiss, R.S., Tinsley, K.W., and Karl, I.E. (2003). Role of apoptotic cell death in sepsis. Scand J Infect Dis 35, 585-592.

Hughes, G. (2005). Professional issues in emergency medicine: UK perspective. Emerg Med Australas 17, 422-428.

Hwaiz, R., Rahman, M., Syk, I., Zhang, E., and Thorlacius, H. (2015). Rac1-dependent secretion of platelet-derived CCL5 regulates neutrophil recruitment via activation of alveolar macrophages in septic lung injury. J Leukoc Biol 97, 975-984.

Jang, T.N., Wang, F.D., Wang, L.S., Liu, C.Y., and Liu, I.M. (1992). Xanthomonas maltophilia bacteremia: an analysis of 32 cases. J Formos Med Assoc 91, 1170-1176.
Kennedy, J.H. (1966). The role of assisted circulation in cardiac resuscitation. Jama 197, 615-618.

Kline, J.A. (2014). Past, present and future of emergency care research. Emerg Med Australas 26, 8-13.

Knaus, W.A., Draper, E.A., Wagner, D.P., and Zimmerman, J.E. (1985). APACHE II: a severity of disease classification system. Crit Care Med 13, 818-829.

Korneev, K.V. (2019). Mouse Models of Sepsis and Septic Shock. Mol Biol (Mosk) 53, 799-814.

Levi, M., and Ten Cate, H. (1999). Disseminated intravascular coagulation. N Engl J Med 341, 586-592.

Limkakeng, A.T., Jr., de Oliveira, L.L., Moreira, T., Phadtare, A., Garcia Rodrigues, C., Hocker, M.B., McKinney, R., Voils, C.I., and Pietrobon, R. (2014). Systematic review and metasummary of attitudes toward research in emergency medical conditions. J Med Ethics 40, 401-408.

MacLaren, G., and Monagle, P. (2016). Antithrombin Administration in Extracorporeal Membrane Oxygenation Patients: Putting the Cart Before the Horse. Pediatr Crit Care Med 17, 1188-1189.

Maier, S., Traeger, T., Entleutner, M., Westerholt, A., Kleist, B., Hüser, N., Holzmann, B., Stier, A., Pfeffer, K., and Heidecke, C.D. (2004). Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. Shock 21, 505-511.

Millar, J.E., Fanning, J.P., McDonald, C.I., McAuley, D.F., and Fraser, J.F. (2016). The inflammatory response to extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): a review of the pathophysiology. Crit Care 20, 387.

Murray, C.J., Aravkin, A.Y., Zheng, P., Abbafati, C., Abbas, K.M., Abbasi-Kangevari, M., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Abdollahi, M., and Abdollahpour, I. (2020). Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. The Lancet 396, 1223-1249.
Neumar, R.W., Nolan, J.P., Adrie, C., Aibiki, M., Berg, R.A., Böttiger, B.W., Callaway, C., Clark, R.S., Geocadin, R.G., Jauch, E.C., et al. (2008). Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A consensus statement from the International Liaison Committee on Resuscitation (American Heart Association, Australian and New Zealand Council on Resuscitation, European Resuscitation Council, Heart and Stroke Foundation of Canada, InterAmerican Heart Foundation, Resuscitation Council of Asia, and the Resuscitation Council of Southern Africa); the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; and the Stroke Council. Circulation 118, 2452-2483.

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.

Nishida, O., Ogura, H., Egi, M., Fujishima, S., Hayashi, Y., Iba, T., Imaizumi, H., Inoue, S., Kakihana, Y., Kotani, J., et al. (2018). The Japanese Clinical Practice Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2016 (J-SSCG 2016). Acute Med Surg 5, 3-89.

Orbegozo, D., Su, F., Xie, K., Rahmania, L., Taccone, F.S., De Backer, D., Vincent, J.L., and Creteur, J. (2018). Peripheral Muscle Near-Infrared Spectroscopy Variables are Altered Early in Septic Shock. Shock 50, 87-95.

Panacek, E.A., Marshall, J.C., Albertson, T.E., Johnson, D.H., Johnson, S., MacArthur, R.D., Miller, M., Barchuk, W.T., Fischkoff, S., Kaul, M., et al. (2004). Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')2 fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. Crit Care Med 32, 2173-2182.

Panchal, A.R., Bartos, J.A., Cabañas, J.G., Donnino, M.W., Drennan, I.R., Hirsch, K.G., Kudenchuk, P.J., Kurz, M.C., Lavonas, E.J., Morley, P.T., et al. (2020). Part 3: Adult Basic and Advanced Life Support: 2020 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. Circulation 142, S366-s468.

Parker, S.J., and Watkins, P.E. (2001). Experimental models of gram-negative sepsis. Br J Surg 88, 22-30.

Platts-Mills, T.F., Nagurney, J.M., and Melnick, E.R. (2020). Tolerance of Uncertainty and the Practice of Emergency Medicine. Ann Emerg Med 75, 715-720.

Poli-de-Figueiredo, L.F., Garrido, A.G., Nakagawa, N., and Sannomiya, P. (2008). Experimental models of sepsis and their clinical relevance. Shock 30 Suppl 1, 53-59.

Razzak, J.A., and Kellermann, A.L. (2002). Emergency medical care in developing countries: is it worthwhile? Bull World Health Organ 80, 900-905.

Rittirsch, D., Huber-Lang, M.S., Flierl, M.A., and Ward, P.A. (2009). Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. Nat Protoc 4, 31-36.

Rudd, K.E., Johnson, S.C., Agesa, K.M., Shackelford, K.A., Tsoi, D., Kievlan, D.R., Colombara, D.V., Ikuta, K.S., Kissoon, N., Finfer, S., et al. (2020). Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. Lancet 395, 200-211.

Sakamoto, T., Morimura, N., Nagao, K., Asai, Y., Yokota, H., Nara, S., Hase, M., Tahara, Y., and Atsumi, T. (2014). Extracorporeal cardiopulmonary resuscitation versus conventional cardiopulmonary resuscitation in adults with out-of-hospital cardiac arrest: a prospective observational study. Resuscitation 85, 762-768.

Schabbauer, G. (2012). Polymicrobial sepsis models: CLP versus CASP. Drug Discovery Today: Disease Models 9, e17-e21.

Schwameis, M., Schober, A., Schörgenhofer, C., Sperr, W.R., Schöchl, H., Janata-Schwatczek, K., Kürkciyan, E.I., Sterz, F., and Jilma, B. (2015). Asphyxia by Drowning Induces Massive Bleeding Due To Hyperfibrinolytic Disseminated Intravascular Coagulation. Crit Care Med 43, 2394-2402.

Scquizzato, T., Bonaccorso, A., Consonni, M., Scandroglio, A.M., Swol, J., Landoni, G., and Zangrillo, A. (2022). Extracorporeal cardiopulmonary resuscitation for out-of-hospital cardiac arrest: A systematic review and meta-analysis of randomized and propensity score-matched studies. Artif Organs 46, 755-762.

Semba, A., Sato, T., and Tsuchida, T. (2022). The Moment of Left Ventricular Free-Wall Rupture. Internal Medicine advpub. 10.2169/internalmedicine.9206-21.

Silverstein, R. (2004). D-galactosamine lethality model: scope and limitations. J Endotoxin Res 10, 147-162.

Soar, J., Nolan, J.P., Böttiger, B.W., Perkins, G.D., Lott, C., Carli, P., Pellis, T., Sandroni, C., Skrifvars, M.B., Smith, G.B., et al. (2015). European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015: Section 3. Adult advanced life support. Resuscitation 95, 100-147.

Starr, M.E., Steele, A.M., Saito, M., Hacker, B.J., Evers, B.M., and Saito, H. (2014). A new cecal slurry preparation protocol with improved long-term reproducibility for animal models of sepsis. PLoS One 9, e115705.

Taylor, F.B., Jr., Toh, C.H., Hoots, W.K., Wada, H., and Levi, M. (2001). Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. Thromb Haemost 86, 1327-1330.

Teasdale, G., and Jennett, B. (1974). Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. Lancet 2, 81-84.

Thind, A., Hsia, R., Mabweijano, J., Hicks, E.R., Zakariah, A., and Mock, C.N. (2015). Prehospital and emergency care. Disease control priorities 1, 245-262.

Toky, V., Sharma, S., Arora, B.B., and Chhibber, S. (2003). Establishment of a sepsis model following implantation of Klebsiella pneumoniae-infected fibrin clot into the peritoneal cavity of mice. Folia Microbiol (Praha) 48, 665-669.

Tsuchida, T., Hayakawa, M., Kawahara, S., and Kumano, O. (2022). Thrombin generation capacity is enhanced by low antithrombin activity and depends on the activity of the related coagulation factors. Thromb J 20, 29.

Tsuchida, T., and Mizuguchi, Y. (2021). Pseudo-cardiac tamponade owing to a large hiatal hernia. Oxf Med Case Reports 2021, omab090.

Tsuchida, T., Ono, K., Maekawa, K., Wada, T., Katabami, K., Yoshida, T., and Hayakawa, M. (2021). Simultaneous external validation of various cardiac arrest prognostic scores: a single-center retrospective study. Scand J Trauma Resusc Emerg Med 29, 117.

Umemura, Y., Yamakawa, K., Hayakawa, M., Hamasaki, T., and Fujimi, S. (2018). Screening itself for disseminated intravascular coagulation may reduce mortality in sepsis: A nationwide multicenter registry in Japan. Thromb Res 161, 60-66.

Victor, M.A., Arpi, M., Bruun, B., Jønsson, V., and Hansen, M.M. (1994). Xanthomonas maltophilia bacteremia in immunocompromised hematological

patients. Scand J Infect Dis 26, 163-170.

Vincent, J.L., Marshall, J.C., Namendys-Silva, S.A., 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.

Wada, T. (2017). Coagulofibrinolytic Changes in Patients with Post-cardiac Arrest Syndrome. Front Med (Lausanne) 4, 156.

Wada, T., Gando, S., Mizugaki, A., Kodate, A., Sadamoto, Y., Murakami, H., Maekawa, K., Katabami, K., Ono, Y., Hayakawa, M., et al. (2017). Differences in coagulofibrinolytic changes between post-cardiac arrest syndrome of cardiac causes and hypoxic insults: a pilot study. Acute Med Surg 4, 371-372.

Wada, T., Gando, S., Mizugaki, A., Yanagida, Y., Jesmin, S., Yokota, H., and Ieko, M. (2013). Coagulofibrinolytic changes in patients with disseminated intravascular coagulation associated with post-cardiac arrest syndrome--fibrinolytic shutdown and insufficient activation of fibrinolysis lead to organ dysfunction. Thromb Res 132, e64-69.

Wada, T., Gando, S., Ono, Y., Maekawa, K., Katabami, K., Hayakawa, M., and Sawamura, A. (2016). Disseminated intravascular coagulation with the fibrinolytic phenotype predicts the outcome of patients with out-of-hospital cardiac arrest. Thromb J 14, 43.

Wang, J., Wang, Y., Wang, J., Gao, J., Tong, C., Manithody, C., Li, J., and Rezaie, A.R. (2013). Antithrombin is protective against myocardial ischemia and reperfusion injury. J Thromb Haemost 11, 1020-1028.

Wichterman, K.A., Baue, A.E., and Chaudry, I.H. (1980). Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. J Surg Res 29, 189-201.

Williams, D.J. (2018). Brief history of the specialty of emergency medicine. Emerg Med J 35, 139-141.

Wynn, J.L., Scumpia, P.O., Delano, M.J., O'Malley, K.A., Ungaro, R., Abouhamze, A., and Moldawer, L.L. (2007). Increased mortality and altered immunity in neonatal sepsis produced by generalized peritonitis. Shock 28, 675-683.

Yannopoulos, D., Bartos, J., Raveendran, G., Walser, E., Connett, J., Murray, T.A., Collins, G., Zhang, L., Kalra, R., Kosmopoulos, M., et al. (2020). Advanced reperfusion strategies for patients with out-of-hospital cardiac arrest and refractory ventricular fibrillation (ARREST): a phase 2, single centre, open-label, randomised controlled trial. Lancet 396, 1807-1816.

Zapol, W.M., Snider, M.T., and Schneider, R.C. (1977). Extracorporeal membrane oxygenation for acute respiratory failure. Anesthesiology 46, 272-285.