

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20086

研究課題名(和文) ラットHUSモデルにおける新たな治療法の検討

研究課題名(英文) Investigation of a new therapeutic approach in a rat HUS model

研究代表者

栗田 昭英 (Akihide, Kurita)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号：10507081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腸管出血性大腸菌0-157によって引き起こされる疾患としては、HUS(溶血性尿毒症症候群)が有名である。このHUSは、溶血性貧血、血小板減少、急性腎不全を伴う症候群で、小児や高齢者では致命的となりうる。その治療法は、対症療法のみで未だに有効な治療法がない。今回我々はこのHUSに対して様々な治療法を検討するために、ラットモデルを作成し、その妥当性を検討した。このHUSの病態には、ペロ毒素(STx2)が大きな役割を果たしていることがわかっており、このSTx2の腹腔内投与モデルを作成することができた。しかしこのモデルでは、急性腎不全は再現できたが、溶血性貧血や血小板減少の再現性が問題となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管出血性大腸菌0-157によって引き起こされるHUS(溶血性尿毒症症候群)は、小児や高齢者において致命的となることがあり、その治療法の開発が待ち望まれている。ラットHUSモデルを作成することで、様々な抗炎症作用薬剤の効果の検討や血液浄化療法まで含めた治療法の検討が可能になるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：HUS (hemolytic uremic toxin syndrome) is a well-known disease caused by enterohemorrhagic Escherichia coli 0-157. This HUS is a syndrome with hemolytic anemia, thrombocytopenia, and acute renal failure that can be fatal in children and the elderly. The only treatment for this disease is supportive care and there is still no effective treatment. In the present study, we developed a rat disease model to investigate various treatment options for HUS, and examined its validity. Verotoxin (STx2) has been found to play a major role in the pathogenesis of this HUS, and we were able to model the intraperitoneal administration of this STx2. In this model, however, acute renal failure was reproducible, but the reproducibility of hemolytic anemia and thrombocytopenia was problematic.

研究分野：麻酔科学

キーワード：腸管出血性大腸菌 溶血性尿毒症症候群 ペロ毒素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HUS (溶血性尿毒症症候群) は、EHEC (腸管出血性大腸菌) 感染によって産生された Vero toxin による微小血管障害が病態と考えられている。Vero toxin による微小血管障害は、微小血管障害そのものによる臓器障害だけでなく、血管内皮障害によって生じる高サイトカイン血症が病態をさらに悪化させている可能性がある。さらにそれを裏付けるデータとして、好中球による Vero toxin の認識が LPS (Lipopolysaccharide, エンドトキシン) と共通の TLR4 (Toll like receptor4) によるものであり、同パターンのサイトカインプロファイルであるとの報告がある (J Immunol. 2013 Sep 25. Epub)。現在の HUS に対する治療法は、対症療法がメインであるが、Vero toxin による好中球活性化の結果生じる高サイトカイン血症を是正することで、病態をより速く、より確実に治療することが出来る可能性がある。応募者は、これまで種々のショックにおける β 遮断薬の影響やスタチンの影響について、サイトカインなどの炎症性メディエーターの観点から研究してきた。また、敗血症ショック時における急性血液浄化法の有用性についても研究の一役を担ってきた。 β 遮断薬の研究では、各種ショックにおける β 遮断薬の有用性をサイトカインの観点から報告してきた (Anesth Analg. 2010; 111: 1207-10, Shock. 2009; 3: 272-275.)。また、エンドトキシンショックにおけるサイトカイン吸着カラムとエンドトキシン吸着カラムの比較についても研究してきた (Transfus Apher Sci. 2009; 40: 55-59)。これらの研究手法をもとに、Vero toxin によって生じる HUS の治療法の一つとして、抗炎症作用のある薬剤 (β 遮断薬, スタチン系脂質降下薬), サイトカイン吸着カラム, エンドトキシン吸着カラムについて検討することを目的に研究を開始した。

2. 研究の目的

これまで行ってきた研究手法 (サイトカイン測定, エンドトキシン吸着カラムなど) をもとに、Vero toxin によって生じる HUS の治療法の一つとして、抗炎症作用のある薬剤 (β 遮断薬, スタチン系脂質降下薬), サイトカイン吸着カラム, エンドトキシン吸着カラムについて検討することを目的に研究を開始した。

3. 研究の方法

まず、治療法の検討のために、HUS モデルの作成に取りかかった。

STX2 ip (腹腔内投与) モデル

これについて、HUS モデルとしての妥当性を検討した後に抗炎症作用薬剤の影響を検討していくこととした。

4. 研究成果

「ラット HUS モデルにおける内服カルベジロールの影響」…①

● 背景

非選択性 β 遮断薬であるカルベジロールは、近年高血圧治療や慢性心不全治療に広く使用されており、循環器分野では無くてはならない薬剤である。最近の研究によって、 β 遮断薬がエンドトキシン誘発性の高サイトカイン血症や心筋障害を軽減するといった抗炎症作用も示されている。

HUS (溶血性尿毒症症候群) は、腸管出血性大腸菌によって産生されるベロ毒素が病態形成に主要な役割を果たし、多様な炎症反応を引き起こす。今回我々は、HUS モデルラットを作成し、HUS 発症前の β 遮断薬内服が HUS ラットの生存率におよぼす影響を検討した。

● 方法

生存率

40匹の雄性SDラットを2群 (control群, carvedilol群) に無作為に割り付け、control群では通常の粉末給餌、carvedilol群では10 mg/kg/dayのカルベジロールを混合した粉末給餌でそれぞれ5日間飼育した。その後すべてのラットに1 μ g/kgのベロ毒素2 (from E. coli O-157, NAKARAI TESQUE, INC, Japan) を腹腔内投与し、5日間観察しKaplan-Meier法で生存率を算出した。

死亡後、ラットより腎臓を採取し、ホルマリンを用いて固定した。組織片をhematoxylin-eosin染色し、光学顕微鏡で観察した。

血算・血液生化学・血中サイトカイン

20匹の雄性SDラットを2群 (control群, carvedilol群) に無作為に割り付け、control群では通常の粉末給餌、carvedilol群では10 mg/kg/dayのカルベジロールを混合した粉末給餌でそれぞれ5日間飼育した。その後すべてのラットに1 μ g/kgのベロ毒素2 (from E. coli O-157, NAKARAI TESQUE, INC, Japan) を腹腔内投与した。ベロ毒素2投与48時間後に 40 mg/kgのペントバルビタールを腹腔内投与し麻酔を得た後に大腿動脈より血液サンプルを採取した。以下の項目を評価項目として検討した: leukocyte counts (WBC), Hb concentrations, platelet counts, BUN, creatinine, LDH, total bilirubin, indirect bilirubin, TNF- α , IL-1 β , IL-6。

統計解析

すべての連続変数はmean \pm SDで表し、unpaired t検定を用いて比較した。5日後の生存率はKaplan-Meier法にて算出し、log-rank検定にて比較した。P<0.05を有意差ありと判定した。

● 結果

死亡率

ベロ毒素の腹腔内投与後120時間の生存率は、control群で20%、carvedilol群で40%であった。(Fig. 1). 生存率は、carvedilol群で20%改善したが、統計学的有意差は認めなかった($P=0.21$).

腎組織の光学顕微鏡所見

腎の微小血管は、血栓によって閉塞していたが、炎症細胞浸潤や壊死、アポトーシスは認めなかった(Fig. 2).

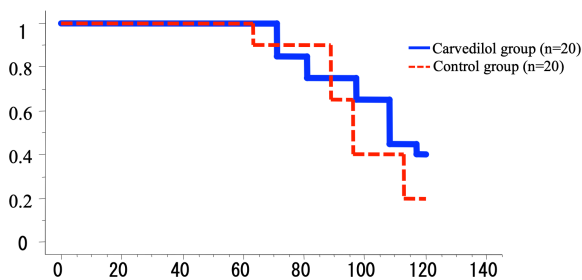


Fig. 1. Mortality curves on control group and Carvedilol group. there were no significant differences on mortality curves between groups ($P=0.21$)

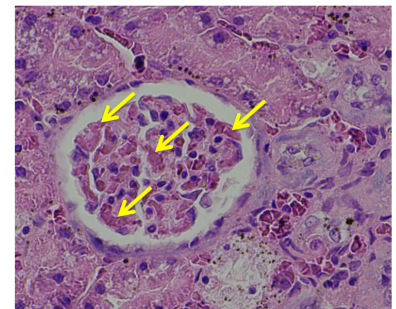


Fig. 2. Representative light microscopic photograph of renal tissue. Arrows show thrombotic occlusions of glomerular capillaries.

血算・生化学

血液サンプル採取時の麻酔によって1匹死亡したため、carvedilol群では9匹、control群10匹で解析した。血算においては、両群ともにWBCは減少し、Hb、血小板数は増加が見られた。BUN、Cr値、LDHは両群とも基準値に比べ上昇しているが、両群間で有意差はみられなかった。その他のパラメーターにおいても両群間で有意差は認められなかった (Table 1).

Table 1. Blood study and cytokine concentrations

	Control (n=10)	Carvedilol (n=9)	P value
WBC (μ L)	4320 \pm 1196	3433 \pm 1045	0.10
Hb (g/dL)	19.7 \pm 3.3	19.4 \pm 3.6	0.83
Plt (μ L)	92.9 \pm 22.6	95.8 \pm 22.5	0.78
BUN (mg/dL)	59.5 \pm 29.7	63.9 \pm 32.0	0.76
Cr (mg/dL)	0.79 \pm 0.46	0.72 \pm 0.50	0.77
LDH (IU/L)	3844 \pm 2033	3263 \pm 1522	0.49
GOT (IU/L)	189 \pm 77	149 \pm 50	0.2
GPT (IU/L)	28.6 \pm 5.0	27.0 \pm 5.6	0.52
T-bil (mg/dL)	0.020 \pm 0.012	0.013 \pm 0.014	0.27
I-Bil (mg/dL)	0.019 \pm 0.012	0.013 \pm 0.014	0.35
TNF- α (pg/mL)	0	10 \pm 27.7	0.27
IL-1 β (pg/mL)	3.7 \pm 11.6	0	0.36
IL-6 (pg/mL)	0	0	1.0

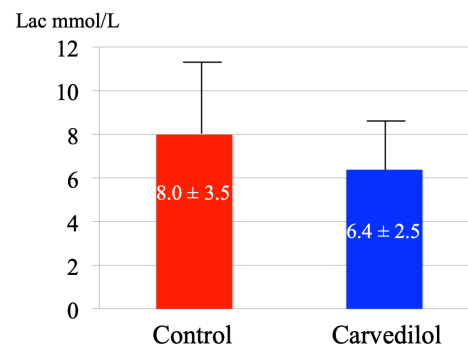


Fig. 3 Lactate level at 48hrs after intraperitoneal verotoxin2 injection. There were no differences between both groups ($P=0.26$).

ベロ毒素2の腹腔内投与後48時間の血中乳酸値はcontrol群で8.0 \pm 3.4 mmol/L、carvedilol群で6.4 \pm 2.5 mmol/Lと著明な循環障害を呈していたが、両群間で有意差は認められなかった(Fig. 3).

血中サイトカイン

本モデルにおいて、ベロ毒素2の腹腔内投与48時間の時点では、両群とも高サイトカイン血症を認めなかった(Table 1).

● 考察

今回我々は、ラットHUSモデルにおいてカルベジロールの効果を見出すことができなかった。この理由としては、2つの可能性が考えられる。1つ目としては、サンプルサイズと観察期間が不足していた可能性がある。5日目の生存率はcarvedilol群で20%生存率が良い結果ではあったが、統計学的有意差はみられなかった。もう一つの可能性として、今回われわれが作成したHUSモデルが、ヒトHUSとモデル的に異なっているのかもしれない。今回のモデルで、腎微小血管の血栓性閉塞、腎機能障害、LDHの著増は認められたが、ヒトHUSで認められる貧血、血小板減少はみられなかった。また、高サイトカイン血症を認めないモデルであったこともカルベジロールが効果を示さなかった原因かもしれない。

● 結語

我々は、ラットHUSモデルにおいて内服カルベジロールの生存率に与える影響を見いだせなかった。よりヒトHUSに近いモデルの作成も含めてさらなる検討が必要である。

「ラットを用いた溶血性尿毒症症候群モデル作成の試み」…②

● 背景と目的

溶血性尿毒症症候群(HUS)は腸管出血性大腸菌によって産生されたShiga toxin 2(Stx2)によって生じる、急性腎不全・血小板減少・溶血性貧血を三徴とする病態である。治療法は対症療法¹⁾であり、特異的な治療法は存在せず、救命率も高くないため早急な治療法の確立が望まれている。HUSの動物モデルを作成すれば、様々な治療法の検討が可能となる。今回オスのSDラットを用いてHUSモデルの作成を試みた。

● 方法

- ① 雄性SDラットに0.1, 0.2, 0.3, 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のStx2を3日ごとに計3回腹腔内投与し、各群の生存率とKaplan-Meier法を用いた生存曲線を求め、logrank trend検定で群間の有意差を比較した。
- ② 雄性SDラットを用いて①と同様に実験を行った。Stx2開始直前(0日目)と2回目のStx2投与24時間後(4日目)に採血を行い、Stx2投与前後でHUSに特有の血液生化学的変化の有無を検討した。ただし0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群は初回投与のみとした。2回目採血後には安楽死させ解剖し、組織を得た。

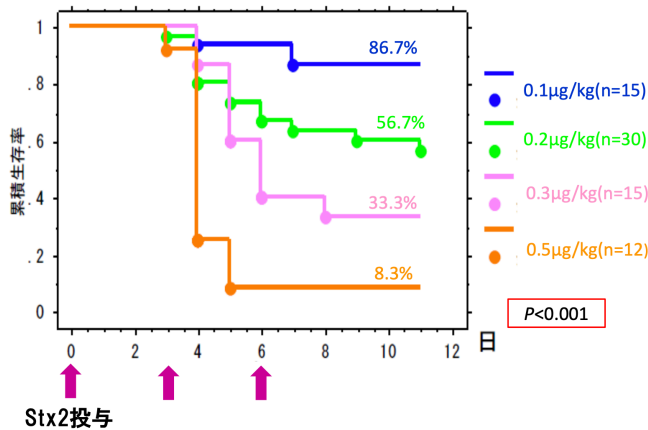
統計方法としてpaired t検定を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

● 結果

生存率比較(Fig. 1)

STx2の3回の腹腔内投与によって、用量依存性に死亡率が増加することが示された。

Fig. 1 生存曲線

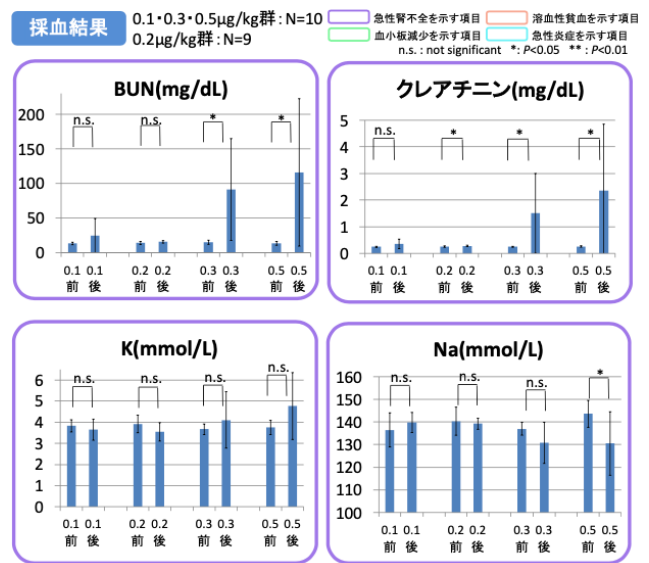


Stx2投与

血液生化学的変化の検討(Fig.2)

急性腎不全については、用量依存性に急性腎不全を示すBUN,クレアチニン値の上昇が見られた。しかし、溶血性貧血や血小板減少を認めることができず、微小血管内皮障害を反映していないのかもしれない。

Fig.2 血液生化学的変化の検討



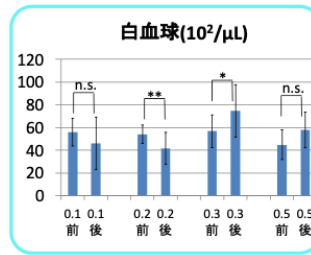
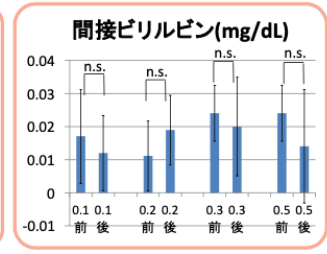
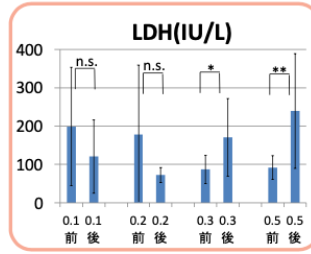
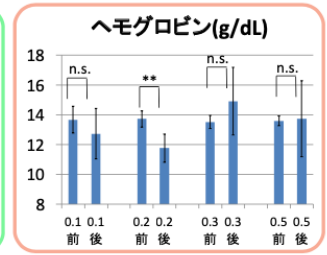
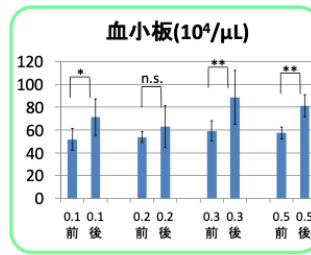
● 考察

ラットにStx2を3日ごと計3回投与することで死亡する個体が出現することが確認できた。また、生存率は用量依存性に低下した。

HUSの三徴のうち急性腎不全については、用量依存性に急性腎不全を示すBUN,クレアチニン値の上昇が見られた。しかし、溶血性貧血や血小板減少を認めることができず、微小血管内皮障害を反映していないのかもしれない。

主な発表論文等
[学会発表]

- ① 栗田昭英, 谷口 巧, 結城 緑, 山本剛史, 山本 健. ラット HUS モデルにおける内服カルベジロールの影響. 日本麻酔科学会第 61 回学術集会.
- ② 館英里佳, 栗田昭英, 谷口 巧. ラットを用いた溶血性尿毒症症候群モデル作成の試み. 日本麻酔科学会第 66 回学術集会



まとめ

	急性腎不全		血小板減少		溶血性貧血		急性炎症	
	BUN/Cr上昇	K上昇	Ha低下	Plt低下	Hb低下	LDH上昇	t-Bil上昇	WBC上昇
0.1	x	x	x	x	x	x	x	x
0.2	△	x	x	x	○	x	x	x
0.3	○	x	x	x	x	○	x	○
0.5	○	△	○	x	x	○	x	x
		傾向あり						

t-Bil:間接ビリルビン n.s.:not significant

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 館英里佳, 栗田昭英
2. 発表標題 ラットを用いた溶血性尿毒症候群モデル作成の試み
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第66会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----