

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2020
課題番号：17K17043
研究課題名（和文）敗血症の重症化のメカニズム解析と治療的アプローチ

研究課題名（英文）Mechanism and treatment of severe sepsis

研究代表者
比留間 孝広（Hiruma, Takahiro）
東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40572277
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）： 腹膜炎後の院内肺炎による敗血症を想定し、回盲部結紮穿孔後の緑膿菌肺炎をおこすtwo hit動物モデルに対し、インターフェロン 投与の効果を検討した。腹膜炎により肺炎はより重症化し、インターフェロン は治療効果を示した。また肺炎直前の肺胞マクロファージの貪食能を評価し、腹膜炎により貪食能が低下し、インターフェロン は貪食能を回復させた。またショックや手術による虚血再還流を想定し、first hitとして腸管虚血再還流の動物モデルの生存率と多臓器障害を評価した。虚血時間の延長により重症化し、また腸管虚血再還流による多臓器障害が起こることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床では腹膜炎、肺炎などそれ自体であれば軽症であっても、それが組み合わさることで敗血症がより重症化することは多い。本検討ではそのような状況を想定したtwo hit動物モデルに対して、その重症化のメカニズムと治療薬としてインターフェロン の効果を検討することで、敗血症の病態把握につながる結果としての意義がある。また同様に虚血再還流による多臓器障害やその免疫機能に与える影響を検討することで、その後の侵襲による重症化に与える影響を検討することは同じく敗血症の重症化のメカニズム解析につながる。

研究成果の概要（英文）： Assuming sepsis due to nosocomial pneumonia after peritonitis, we investigated the effect of interferon administration on a two-hit animal model that causes Pseudomonas aeruginosa pneumonia after cecal ligation and puncture. Peritonitis made pneumonia more severe, and interferon showed a therapeutic effect. In addition, the phagocytic ability of alveolar macrophages before pneumonia was evaluated, and peritonitis reduced the phagocytic ability, and interferon restored the phagocytic ability. In addition, assuming ischemia-reperfusion due to shock or surgery, the survival rate and multi-organ damage of an animal model of intestinal ischemia-reperfusion injury were evaluated as the first hit. It was confirmed that the prolongation of the ischemic time made the disease more severe and that multiple organ damage was caused by intestinal ischemia-reperfusion.

研究分野： 集中治療医学

キーワード： 敗血症 免疫抑制 腹膜炎 虚血再灌流傷害 免疫調整

1. 研究開始当初の背景

Surviving Sepsis Campaign guidelines(SSCG) は敗血症におけるガイドラインで、敗血症に関する診断、治療を推奨している (Crit Care Med.2013;41:580-637)。SSCG や集中治療の発展に伴い、敗血症死亡は減少しているが、現在もその死亡率は 25%を超える。2016 年には敗血症の定義が変わり、診断基準に SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) スコアが導入された (JAMA.2016;315:801-10)。SOFA スコアは、臓器障害を簡便にスコア化するシステムであり (Intensive Care Med.1996;22:707-10)、敗血症の定義として「感染症が疑われ生命を脅かす臓器障害」を有することが条件とされ、臓器障害の有無が極めて重要となった。

敗血症による過剰炎症は組織障害から多臓器不全に至り、高い死亡率の原因となる。逆に過剰な抗炎症では免疫抑制による 2 次感染へと進展する。敗血症等の重症患者では、炎症と抗炎症のバランスが重要である。また消化管穿孔、腸管虚血、大侵襲手術後等それだけでは致死的な病態でなくても、その後に感染症を合併すると重症化し、多臓器不全に至る。初期の侵襲 (first hit) により生体防御能が低下し、臓器障害がおこることで、2 次感染 (second hit) への脆弱化が起きているためであるという報告があり、この概念は two hit theory と呼ばれている。

我々は first hit として腹膜炎を想定した回盲部結紮穿孔 (cecal ligation and puncture;CLP) を行い、second hit として緑膿菌肺炎 (Pseudomonas aeruginosa intratracheal instillation; PAIT) をおこす two hit 動物モデルの研究を行ってきた。CLP によって、次なる刺激である PAIT が起きた際に肺胞での免疫反応性は低下を示し、生存率は著明に低下した。今回腹膜炎とともに我々が着目した病態は、腸管虚血再還流障害 (Intestinal ischemia-reperfusion injury:I-IRI) である。腸管虚血再灌流傷害は手術、出血、ショックなどの腸管血流の一時的低下によって起こる現象である (Mol Med.2015;20:676-683)。感染を伴う腹膜炎とは異なり、予定手術やショックなどによる腸管虚血再還流を想定として、感染を伴わない腸管虚血再還流モデルを first hit として行う two hit 動物モデルにても、免疫機能の変化・遠隔臓器障害がどのような影響が起こるのかを検討した。

Two hit theory に関連する重症呼吸不全の病態に急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome; ARDS) があり死亡率の高い病態であるが、インターフェロン (IFN) によって予後改善の可能性を示唆する臨床試験結果が報告された (Lancet.Respir.Med.2014;2: 98-107)。ARDS 患者に IFN を投与すると、非投与群での死亡率 32% が治療群では 8% まで改善を示したとの報告であった。機序は IFN が CD73, AMP, アデノシンの発現を増加させ、血管透過性を減少させるためと考察されている。我々は CLP + PAIT による two hit model に IFN を投与する実験を行ってきた。Sham-PAIT の生存率 88.6% に対して、two hit 群 (2H, NS 群) である CLP-PAIT は 9.7% と低下し ($P < 0.001$)、CLP-PAIT に IFN を投与した 2H, IFN 群では、生存率は 40.6% に上昇した ($P < 0.01$)。IFN の投与により気管支肺胞洗浄液でのサイトカイン・細胞数に変化が起きており、immune modulation が予後改善に働く可能性が示唆された腸管虚血再還流に肺炎を起こす two hit model に対して IFN の効果を試みることは、感染を伴う first hit とは異なる影響を及ぼす可能性があり、異なった視点から重症化のメカニズムの解明に介入できるものと考えた。

腹腔内感染または腸管虚血再還流を first hit とし、その後肺炎をおこす two hit model を作成し、その免疫機能の変化・遠隔臓器障害を検討することで、敗血症にいたる重症化のメカニズムがより明白になる可能性があり、また ARDS の治療薬として期待されている IFN の治療的効果についての動物実験は、臨床では詳細に把握できない肺胞環境や遠隔臓器障害の検討を行うことで、臨床研究との知見をリンクさせることは双方の限界を補完し合うことになると考えた。

2. 研究の目的

- (1) 腹腔内感染または腸管虚血再還流を first hit とし、その後肺炎をおこす two hit model を作成し、その免疫機能の変化、遠隔臓器障害を検討する。
- (2) 急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome; ARDS) の治療として着目されているインターフェロン を用いて、これらの two hit model における治療的効果を検討する。
- (3) 重症化のメカニズムの解析とともに、インターフェロン 投与における自然免疫機能の変化を解析し、その治療メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

C57/BL6 マウスに対して、first hit として回盲部結紮穿孔 (cecal ligation and puncture; CLP) を行うことで腹膜炎モデルを、また上腸間膜動脈のクランプ・再還流により腸管虚血再還流モデル

ル (Intestinal ischemia-reperfusion injury: I-IRI) を作成した。前者では穿刺レベルの調整により、後者ではクランプ時間を調整することにより、様々な重症度の腹膜炎モデル、虚血再還流モデルを作成した。Second hit としては緑膿菌肺炎 (Pseudomonas aeruginosa intratracheal instillation; PAIT) を施行した。腹膜炎+肺炎の two hit model の検討は今まででの検討でおこなってきたが、その治療薬としてインターフェロン (以下 IFN) を使用してきた。IFN の治療効果のメカニズム解析の一貫として追加実験を行った。また腹膜炎とは異なる機序としての腸管虚血再還流+肺炎の two hit model の作成をめざし検討を行った。

(1) 腹膜炎+肺炎での two hit model での IFN の効果

CLP (腹膜炎) 後に PAIT (緑膿菌肺炎) を施行し、CLP3 日後に治療コントロールとして生食 (NS; normal saline) を投与した 2H, NS 群、コントロールとして開腹手術のみの sham 手術後に PAIT 施行した sham 群、2H 群に CLP3 日後に治療薬として IFN を投与した 2H, IFN 群の 3 群における解析を行った。今回肺炎後一定時間後 (6 時間、12 時間、18 時間、24 時間、48 時間後) に肺胞洗浄液を回収し、各群における肺内バクテリアの残存量を測定した。また上記 ~ の群において、肺炎直前の肺胞洗浄液を回収し、肺胞マクロファージを採取した。培養後の肺胞マクロファージに蛍光標識ラテックスビーズを貪食させ、それにより貪食能を評価した。

(2) データ解析と報告

腹膜炎+肺炎の two hit model、及び IFN による治療効果とそのメカニズム解析について、結果を解析・集計し、英文雑誌への投稿を行った

(3) 腸管虚血再還流+肺炎での two hit model の確立をめざし、first hit としての腸管虚血再還流モデルの作成とその影響を検討した。

first hit として腸管虚血再還流モデルの条件設定を行った。C57/BL6 マウスに対して、麻酔後に開腹し、上腸間膜動脈を同定し、クリップにより一定時間クランプし、デクランプすることで腸管の虚血再灌流モデルを作成した。コントロールとしては開腹のみを行う sham operation のマウスを使用する。虚血時間を 30 分、45 分、60 分などに調整することでその生存率を検討した。

各種条件における臓器障害の評価を施行した。腸管虚血再還流傷害が腸管だけでなく、肺、脾臓、肝臓、腎臓、凝固能などの遠隔臓器傷害をきたし、それにより two hit である肺炎への response の違いを引き起こす可能性を考え、まず腸管虚血再還流後、一定時間後に血液採取及び各種臓器を摘出し、その影響を評価した。血液生化学検査 (BUN, GPT, GOT) の測定、血算・凝固能の変化を測定した。また虚血再還流後の各種遠隔臓器 (肺、腎臓、脾臓、肝臓) の組織学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) 腹膜炎+肺炎の two hit model における IFN の治療効果のメカニズム解析

腹膜炎+肺炎での two hit model での IFN の効果を再検討した。CLP (腹膜炎) 後に PAIT (緑膿菌肺炎) を施行し、CLP3 日後に治療コントロールとして生食 (NS; normal saline) を投与した 2H, NS 群、開腹手術のみの sham 手術後に PAIT 施行した sham 群、2H 群に CLP3 日後に治療薬として IFN を投与した 2H, IFN 群の 3 群における解析を行ってきた。Sham 群と比較し、two hit により生存率は著明に低下し、IFN の投与はその生存率を有意に回復したが、メカニズムの解析として、肺炎後の肺組織中の緑膿菌のバクテリア菌量を測定し、コントロールの群と比較し、腹膜炎後に肺炎をおこしたの群では有意に肺内バクテリア量が増加し、治療として IFN を使用した群では群と比較して優位にバクテリア量が減少し、two hit model におけるバクテリア対応力の低下と、IFN によるその改善が認められることを示した。

上記の - のそれぞれの群の肺炎直前の肺胞マクロファージの貪食能を評価した。CLP (腹膜炎) 後の肺胞マクロファージの貪食能は、コントロールである sham 群と比較し著しく低下し、IFN ではその貪食能が有意に改善したことを示した。

今までの実験結果と今回の追加実験により、腹膜炎によりマウスの免疫機能が著しく低下し、IFN がその免疫機能を回復させ、次なる刺激である肺炎に対して治療効果をもたらすことがわかり、そのメカニズムも含めて American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology にその検討結果を論文発表した。

(2) 虚血再還流+肺炎の two hit model の確立のための腸管虚血再還流モデルの評価

First hit として感染を伴う腹膜炎を採用してきたが、別機序の first hit として虚血再還流の場合の two hit model の作成をめざした。腹膜炎+肺炎での実験結果から、First hit の臓器障害、免疫学的変化を先に検討することが重要であることがわかったため、まずは虚血再還流の条件設定、及びその影響を検討した。

まず First hit として、マウスにおいて腸管虚血再灌流 (I-IRI: intestinal ischemic reperfusion injury) モデルの確立と条件設定を行った。虚血時間の調整とそれによる重症度の設定を行い、今後 two hit model に適した条件設定を行った。クランプ時間は 60 分以上では致死的で、45 分では生存率は 20% 以下であった。30 分では生存率は 50% 程度であり、それでも重症度は中等症であり、腹膜炎と比較すると重症度が高い状況であった。腸管虚血再灌流が遠隔臓器に与える影響の検討として、クランプが 30 分での、臓器障害の評価を行った。虚血時間 30 分、再還流後 6 時間後の BUN は sham の 2.23 倍、GPT は sham の 6.3 倍、GOT は sham の 4.7 倍と臓器障害を認めた。また肺の H-E 染色では好中球の集簇及び肺胞内に滲出液を認めた。これらより虚血再還流障害に伴い、肺、肝、腎に少なくとも臓器障害を引き起こすモデルであることを確認した。

腸管虚血再還流モデルを first hit として、two hit として肺炎を伴う two hit model の重症度の確認、及び遠隔臓器臓器障害、IFN を含む治療薬の効果までは本検討では十分に行えなかったが、今後もここまでの研究結果を踏まえて、引き続き two hit における影響、first hit である腹膜炎もしくは虚血再還流による second hit に与える影響を検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiruma Takahiro, Tsuyuzaki Hitoshi, Uchida Kanji, Trapnell Bruce C, Yamamura Yoshiro, Kusakabe Yoshiomi, Totsu Tokie, Suzuki Takuji, Morita Shigeki, Doi Kent, Noiri Eisei, Nakamura Kensuke, Nakajima Susumu, Yahagi Naoki, Morimura Naoto, Chang Kyungho, Yamada Yoshitsugu	4. 巻 59
2. 論文標題 Interferon- Improves Sepsis-related Alveolar Macrophage Dysfunction and Post-septic ARDS-related Mortality	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 45-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1165/rcmb.2017-02610C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------