

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592668

研究課題名(和文)核磁気共鳴法を応用した敗血症重症化早期診断の確立と新規治療ターゲットの開拓

研究課題名(英文)Early diagnosis of the possibility of severe sepsis using NMR

研究代表者

鈴木 崇生 (Suzuki, Takao)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40328810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：摘出した脳を抽出処理し、NMR測定を行った後、NMRデータの解析を行った。この解析によって、LPS(10 mg/kg、2 mg/kg)投与群と生食投与群の3群を投与6時間後において分離可能であった。また、この6時間で死亡したラットはいなかった。これは、この手法によって、敗血症早期の脳で敗血症やその重症度の識別が可能であることを示唆している。この知見はex vivoのものであるが、脳は動きも少なくin vivo MRS測定に非常に適した臓器であり、in vivo MRSによる敗血症重症化の早期診断につながる重要な知見が得られたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：After extracting the removed brains and performing NMR measurement of the extracts, NMR data were analyzed. We found that 3 groups of LPS (10 mg/kg/day and 2 mg/kg) and saline treated were isolated in 6 hours after administration. No rats died within 6 hours. This finding suggests the possibility of identification of sepsis and its severity in the brain of early sepsis by this method. Although this finding is from ex vivo experiment, we consider it is important knowledge leading to early diagnosis of the possibility of severe sepsis with in vivo MRS since brain has less movement and it is very suitable for in vivo MRS measurement.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学/救急医学

キーワード：集中治療医学

1. 研究開始当初の背景

敗血症の病態は感染によって引き起こされる全身性炎症反応症候群(SIRS)であり、それに続発する多臓器不全は集中治療領域における主要な死因の1つである。その死亡率を下げるべく国際的な取り組みがなされているが、未だ明解なエビデンスを伴った治療法は少なく、臨床の現場では手探りの状態が続いている。敗血症の治療が奏効し難い理由のひとつに、重症化して初めて本格的な治療が開始されるため、治療が後手に回ってしまうことが挙げられる。例えば国際的に有効性が認められている初期輸液療法である Early goal-directed therapy も、対象は重症化した敗血症であり、実施群でもまだ 30%を超える致死率となっている。重症化の徴候をショックや臓器不全を呈するより前に感知し治療介入を行うことが出来れば、敗血症の予後を劇的に改善できる可能性がある。しかし、現状では感染症の中から重症化してくるものを早期に判別するのは非常に困難である。

我々はこれまで、パターン認識を用いたスペクトル解析手法である NMR(Nuclear Magnetic Resonance)メタボロミクスを用いて病態解析の応用に取り組み、出血性ショックモデルを中心にリンパ液、腸管、肺などに関して研究成果を国際的に発表してきた。これは、尿・血液・リンパ液などの体液や脳・肝臓・腸管といった臓器試料の抽出物を検体とし、高分解能 NMR 測定を行うことによって得られる、スペクトルデータを解析することで、代謝像の違いが捉えられるという手法である。この解析で用いた NMR データ処理ソフトウェア「Alice2 for metabolome™」は、研究分担者である平川と小池の共同研究の中で編み出されたもので、世界でもオリジナリティーの高さが評価された(The 46th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference 2005)。

本研究ではこれまでの成果をさらに発展

させ、in vivo MRS(Magnetic resonance spectroscopy)技術を用いて、非侵襲的に各臓器の代謝像を可視化し、生体中の代謝変化を経時的に追跡するという画期的な手法によるものである。これにより、従来は感知不可能であった敗血症病態における重症化への分岐点を、代謝像の変化として捉えることが可能となり、臓器不全などが顕在化するよりも早い段階での重症化診断法へと結びつくと考えられる。この診断法を確立することが出来れば、近年開発が進んでいるポータブル MRI 装置を用いた臨床応用が十分に期待できる。

さらに本研究により、重症化への代謝像変化に深く関与する物質群を同定することも可能となり、これをターゲットとした治療法の開発へも繋げられる可能性を持っている。

2. 研究の目的

(目的1)「敗血症重症化分岐点の代謝変化検出」

ラットに LPS を投与し敗血症モデルを作成する。この敗血症モデルに対して 1H in vivo MRS 測定を経時的に行い、生存群と死亡群が分離できる最も早い時点とその代謝像を同定する。

(目的2)「敗血症重症化診断法の確立」

上記データを参考に、代謝像を用いた重症化診断基準を作成し、精度を検証することによって最適な診断法を確立する。

(目的3)「敗血症治療のターゲット物質の同定と治療法の開発」

分岐点において2群の代謝像を分ける主要な物質群を同定し、その物質を直接・間接的に増加または減少させうる手法を検索し、治療介入を行いその有効性を検討する。

3. 研究の方法

(目的1)「敗血症重症化分岐点の代謝変化検出」

敗血症モデルの作成

S-D ラットを用い、イソフルレン麻酔下で行う。静脈ライン、動脈ラインを確保し動脈圧、心拍数、体温をデータ収録・解析システム Power Lab に装着記録を開始する。LPS (E-coli, SIGMA) を 10-20 mg/kg 静脈内投与し敗血症病態を作成する。24 時間以内に半数が死亡する投与量を検討する。

実験用 MRI 装置による各種計測データの収集

(1) in vivo での MRI 撮像および MRS 測定
小動物用 MRI 装置 (7T、ボア内径 210mm、UNITY INOVA(バリアン社製)) を用いて、以下の測定を敗血症導入後 24 時間まで経時的に行う。動物が死亡した場合はその時点で中止する。我々の予備実験では死亡例は 5 時間以内に死亡する例が多かった。

1H MRI 撮像

T1 および T2 計算画像・拡散強調画像上の信号強度の変化を観察

1H in vivo MRS 測定

脳、心、肝、骨格筋の組織内代謝産物の測定

(2) ex vivo での NMR スペクトル解析

敗血症導入後、死亡例では死亡直後、生存例では 24 時間の時点で、脳、心、肝、骨格筋を摘出し、液体窒素にて直ちに凍結後 -80 にて保存する。後日凍結した試料から、これまで我々が行ってきた方法と同様に ex vivo での NMR スペクトル解析を行い、in vivo との相違の有無を確認する。

NMR スペクトル測定は試料ロック用の重水素溶媒・内部標準物質を添加後、分析用 FTNMR 装置 (ECX300、日本電子製) にて測定を行う。

(3) データ処理

データの数値化

平川、小池らが開発した「Alice2 for metabolome™」を用いて NMR データを加工、数値化する。

データ解析

The Unscrambler™ などの市販の多変量解析ソフトウェア等を用いて数値解析を行い、生存群と死亡群がどの時点で分離されるか、またその時点での代謝像を検討する。

(目的2)「敗血症重症化診断法の確立」

重症化診断基準の作成と検討

目的1のデータを基に、もっとも早期に生存群と死亡群が分かれる時点の代謝像を重症化診断基準とし、目的1と同様の測定を行い感度・特異度を検証する。もし十分な感度・特異度を得られなければ、もう少し後期で2群の分離がよりはっきりする時点の代謝像で診断基準を作成し、再度検証する。この手順を繰り返し、できるだけ早期に重症化を診断できる基準を確立する。さらに、どの臓器のデータが診断基準としてもっとも有用であるかも、ここで検討する。

(目的3)「敗血症治療のターゲット物質の同定と治療法の開発」

ターゲット物質の同定と治療介入法の検討

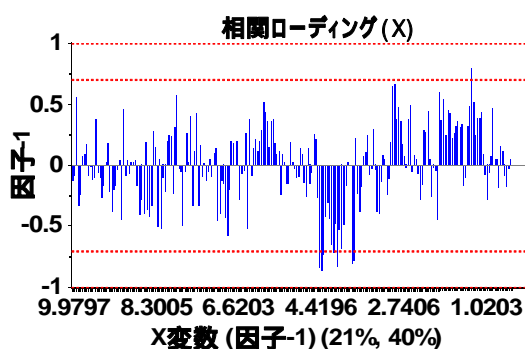
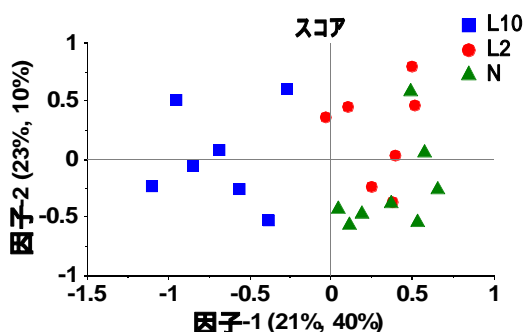
目的1のデータを基に、生存群と死亡群を分ける主要な生体内物質群を同定する。その代謝メカニズム等を検討し、阻害剤や刺激剤といった薬物や、あるタンパク質を標的とした siRNA などの投与といった、代謝像を生存群に近づける作用を持つ手法を考案する。

新規治療法の有効性の検討

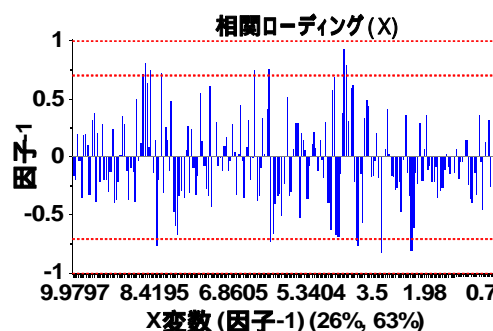
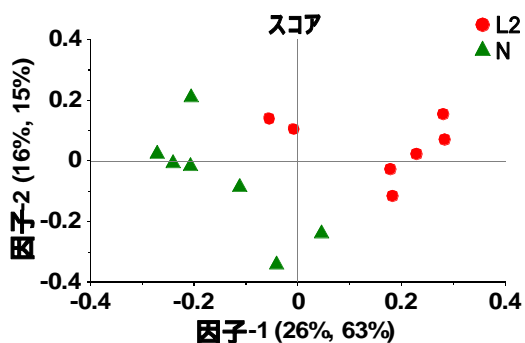
上記治療介入を目的2で確立した診断基準にて重症化診断した時点で開始し、その治療効果を生存率、代謝像、血圧などの各種パラメーターなどで評価する。

4. 研究成果

摘出した脳を抽出処理し、NMR測定を行った。「Alice2 for metabolome」や「The Unscrambler」といったソフトウェアを用いて、NMRデータの解析を行った。LPS (10 mg/kg、2 mg/kg) 投与群と生食投与群の3群の解析で、LPS 10 mg/kg 投与群が他の2群と良好に分離した。



LPS 2 mg/kg 投与群と生食投与群の2群の解析では、両群が分離する傾向を認めた。



このように、脳のNMRデータ解析によって、LPS (10 mg/kg、2 mg/kg) 投与群と生食投与群の3群を投与6時間後において分離可能であった。また、この6時間で死亡したラットはいなかった。これは、この手法によって、敗血症早期の脳で敗血症やその重症度の識別が可能であることを示唆している。この知見は ex vivo のものであるが、脳は動きも少なく in vivo MRS 測定に非常に適した臓器であり、in vivo MRS による敗血症重症化の早期診断につながる重要な知見が得られたと考えられる。

5. 主な発表論文等

特になし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 崇生 (SUZUKI, Takao)

京都大学大学院医学研究科・講師

研究者番号：40328810

(2) 研究分担者

小池 薫 (KOIKE, Kaoru)

京都大学大学院医学研究科・教授

研究者番号：10267164

平川 慶子 (HIRAKAWA, Keiko)

日本医科大学医学部・助教

研究者番号：30165162

佐藤 格夫 (SATO, Norio)

京都大学大学院医学研究科・講師

研究者番号：30409205