

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462351

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞を用いたショックへの新しい治療戦略

研究課題名(英文) The effects of Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in rats with shock

研究代表者

谷口 巧 (Taniguchi, Takumi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：30301196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：麻酔・集中治療医学領域において、敗血症や出血などによるショック状態で、治療に困窮する場合が少なくなく、確立した治療法がない現状である。本研究は、骨髄間葉系幹細胞を用いて様々なショックに対する新しい治療法を開発することを目的とした。その結果、敗血症性ショック、出血性ショック、窒息による低酸素血症のモデルは完成したが、骨髄間葉系幹細胞分離デバイスの大量入手が難しく、敗血症性ショックに至るモデルにおいて検討するだけになった。敗血症性ショックモデルにおいて骨髄間葉系幹細胞移植を行うと生存率は改善することが示唆されたが、その機序に関しては不明であった。今後さらなる検討が必要であった。

研究成果の概要(英文)：In the field of anesthesia and intensive care medicine, it is very difficult to treat in critical patients with shock caused by sepsis and bleeding because of no established treatments. Therefore, the aim of the present study is to evaluate the effects of bone marrow mesenchymal stem cell (BMSC) transplantation in shock states.

In the results, 1) The present study created models of septic shock, hemorrhagic shock, and asphyxia. 2) Because it was very hard to get the separation devices of BMSC, the present study was forced to evaluate the effects of BMSC transplantation in septic shock only. 3) The present study showed that BMSC transplantation improved survival in rats with septic shock, but the mechanism of the effects was unknown. The present study suggests that further investigations were needed.

研究分野：麻酔科学、集中治療医学

キーワード：敗血症性ショック 出血性ショック 心肺停止 低酸素血症 幹細胞移植 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

集中治療医学領域において、敗血症および出血によるショック状態に陥り、治療に困窮する 경우가少なくない。ショックという状態は様々な原因により病態は大きく変わり、治療法も多種多様存在する。ショック状態になり、改善しない場合はもちろん、治療に反応して一旦ショック状態から離脱しても、その後多臓器不全に陥る場合を臨床ではよく見かける。いろいろな治療法が試みられているが、依然として確固たる治療法は見いだせていない。

具体的には、敗血症の場合、近年エンドトキシン吸着カラムやサイトカイン吸着カラムを用いた血液浄化療法や、Toll like receptor と拮抗する目的の薬剤が開発され、臨床応用への研究が行われている。研究代表者もサイトカイン吸着カラムを用いて新しい敗血症の治療法を開発し、国内外で発表してきた (**Crit Care Med**, 2006; 34: 800-806、**Blood Purif** 2006; 24: 460-464、**Intensive Care Med** 2007; 33: 539-544)。しかしながら、当研究もその他の研究いずれの治療法も、現在、臨床での著明な効果を発揮していない。また、出血性ショックにおいても、ショック離脱後の虚血再灌流障害により多臓器不全が引き起こされる。この多臓器不全は、様々な治療に抵抗を示す場合も認めており、有効な治療法が求められている。

そこで、研究代表者は、骨髄間葉系幹細胞に注目した。骨髄間葉系幹細胞に関する研究は、近年脳虚血に対して骨髄間葉系幹細胞移植が効果を示したり (Stroke 2001; 32(4): 1005-11)、心筋虚血に対して、骨髄間葉系幹細胞移植が心筋虚血部位を減少されることが出来たとの報告 (Vascul Pharmacol. 2012; 57(1): 48-55) が散見される。これらの報告から、骨髄間葉系幹細胞移植が様々なショック状態に

対しても有用性が見出せるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨髄間葉系幹細胞を用いて、様々なショックに対する新しい治療法を開発することとした。

3. 研究の方法

本研究において目的遂行のため、以下の研究を行うこととした。

- 1) ショックモデルの確立と、これらのモデルを用いた薬物によるショック状態への影響
 - 1.1 敗血症性ショックモデルの確立と β 遮断薬における敗血症性ショックへの影響
 - 1.2 出血性ショックモデルの確立と各種薬剤における出血性ショックへの影響
 - 1.2.1 鈣質コルチコイド受容体拮抗薬の影響
 - 1.2.2 プロポフォールへの影響
 - 1.3 低酸素性ショックモデルの確立とプロポフォールにおける低酸素性ショックへの影響
- 2) 敗血症性ショックモデルにおける骨髄間葉系幹細胞移植の有用性に関する検討

4. 研究成果

- 1) ショックモデルの確立と、これらのモデルを用いた薬物によるショック状態への影響
 - 1.1 敗血症性ショックモデルの確立と β 遮断薬における敗血症性ショックへの影響
- 体重 350-450g の SD ラットを用い、ペントバルビタ

ールの腹腔内投与により麻酔を施行したのちに開腹し、盲腸を 18G の針を用いて2箇所穿孔させたのちに閉腹して5日間経過観察した。その結果、5日間で生存率25%の敗血症性ショックモデルを完成させた。

この敗血症性ショックモデルを用いて、 β 遮断薬であるカルベジロールの敗血症性ショックへの影響を検討した。

方法として、オスの SD ラット69匹を用いて無作為に High-Dose 群(カルベジロール 10 mg/kg/day)、Low-Dose 群(カルベジロール 2 mg/kg/day)、対照群(投与なし)の 3 群に分けた。High-Dose 群、Low-Dose 群にはカルベジロールを5日間投与した。投与後、ペントバルビタールの腹腔内投与により麻酔を施行したのちに開腹し、盲腸を 18G の針を用いて2箇所穿孔させたのちに閉腹して5日間経過観察した。

結果として、盲腸穿孔後 5 日目の生存率は、High-Dose 群が 18%、Low-dose 群が 21%、対照群が 24%と 3 群間で有意差を認めなかった。そのほか、アシドーシス、乳酸値、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の変動にも有意差を認めなかった。

結語として、投与量、投与期間にさらなる検討課題があるが、 β 遮断薬であるカルベジロールの前投与は敗血症性ショックモデルにおいて影響を及ぼすことがないことが判明した。

1.2 出血性ショックモデルの確立と各種薬剤における出血性ショックへの影響

1.2.1 鈣質コルチコイド受容体拮抗薬の影響

体重 350–450g の SD ラットを用い、ペントバルビタールの腹腔内投与により麻酔を施行したのちに気

管切開、動静脈カテーテル挿入を行い、人工呼吸管理とした。その後動脈カテーテルから脱血させて、収縮期血圧 40 mmHg 未満を40分間維持させ、出血性ショックモデルを作成した。このモデルはその後脱血量の半分量の血液と半分量の乳酸リンゲル液を返血し、8 時間後生存率 50–60%のモデルであることを確認した。

このモデルを用いて、鈣質コルチコイド受容体拮抗薬であるスピロラクトン (SPL) とエプレレノン (EP) の出血性ショックへの影響を検討した。

方法として、オスの SD ラット 51 匹を用いて無作為に SPL 群 (SPL を 10 mg/kg/day 投与)、EP 群 (EP を 100 mg/kg/day 投与)、対照群 (投与なし) の 3 群に分けた。SPL 群、EP 群には薬剤を5日間投与した。投与後、出血性ショック状態を作成し、8 時間経過観察した。

結果として、ショック後 8 時間の生存率は、SPL 群 94%、EP 群 82%、対照群 71%で、3 群間に有意差を認めなかった。ショック後の血圧の変動、アシドーシスの変化、サイトカインの変化に関しても 3 群間で有意差を認めなかった。

結語として、投与量、投与期間にさらなる検討課題があるが、鈣質コルチコイド受容体拮抗薬であるスピロラクトン (SPL) とエプレレノン (EP) は出血性ショックへの影響を及ぼすことがないことが判明した。

1.2.2 プロポフォールへの影響

出血性ショックモデルの状況をより厳しい状況下で検討することにした。

静脈麻酔薬であるプロポフォールの出血性ショックモデルにおける影響に関して検討した。

方法として、オスの SD ラット 26 匹を用いて、ペントバルビタールの腹腔内投与により麻酔施行後、気管

切開と動静脈カテーテル挿入を行なった。この時点でプロポフォール群(10 mg/kg/hr 投与)と対照群(投与なし)の2群に無作為に分け、動脈カテーテルから脱血し、収縮期血圧 30 mmHg 以下を20分間維持することにより出血性ショックを作成した。その後、脱血量の半分量の血液と半分量の乳酸リンゲル液を返血し、8時間後の生存率、血行動態、血液ガス分析を比較検討した。

結果として、8時間後の生存率はプロポフォール群で有意に高かった(54% vs 15%, $p=0.03$)。乳酸値やアシドーシスの変化には有意差を認めなかった。

結語として、投与量、ショック作成にさらなる検討課題があるが、プロポフォールは、出血性ショック蘇生後の生存率を改善させる可能性がある。

1.3 低酸素性ショックモデルの確立とプロポフォールにおける低酸素性ショックへの影響

体重 350–450g の SD ラットを用い、ペントバルビタールの腹腔内投与により麻酔を施行したのちに気管切開、動静脈カテーテル挿入を行い、人工呼吸管理とした。その後気管切開チューブを閉塞させることにより、気道閉塞による心停止状態を作成した。心停止後3分から胸骨圧迫、人工呼吸を開始し、自己心拍再開を得られたのち経過観察するモデルを確立させた。このモデルにより、心拍再開 8 時間での生存率は 40–50%であった。

このモデルを用いて、静脈麻酔薬であるプロポフォールの影響について検討した。

方法としては、体重 350–450g の SD ラット 30 匹を用い、ペントバルビタールの腹腔内投与により麻酔を施行したのちに気管切開、動静脈カテーテル挿入を行い、人工呼吸管理とした。その時点で、プロポフォール群(10 mg/kg/hr 投与)と対照群(投与な

し)の2群に無作為に分け、気管切開チューブを閉塞させることにより心停止状態にし、心停止後3分から胸骨圧迫、人工呼吸を開始し、自己心拍再開を得られたのち経過観察した。心拍再開後8時間での生存率、心拍再開率、心拍再開に要した時間、血中乳酸値の変化を評価項目とした。

結果として、心拍再開後の生存率には両群間で有意差を認めなかった。そのほかの項目についても有意差を認めなかった。

結語として、投与量、ショック作成にさらなる検討課題があるが、プロポフォールは、窒息による低酸素性ショックには影響を及ぼさないことが判明した。

2) 敗血症性ショックモデルにおける骨髄間葉系幹細胞移植の有用性に関する検討

今回の検討で確立した、SD ラットを用いた盲腸穿孔による敗血症ショックモデルにおいて、骨髄間葉系幹細胞移植の有用性に関する検討を行った。

方法として、オスの SD ラット 80 匹を用いて、まず 40 匹を用いて、両側大腿骨から骨髄を取り出し、骨髄間葉系幹細胞分離デバイスを用いて、骨髄間葉系幹細胞を分離した。次に、40 匹を用いてペントバルビタールの腹腔内投与により麻酔を施行したのちに開腹し、盲腸を 18G の針を用いて2箇所穿孔させたのちに閉腹した。その時点で、無作為に投与群(大腿骨4本から採取した骨髄間葉系幹細胞を静脈内投与した群)と対照群(投与なし)の2群に分けた(各群 20 匹)。その後7日間経過観察した。Primary outcome は7日間のラットの生存率、Secondary outcome は各主要臓器の組織学的評価とした。

結果として、投与群の生存率は対照群と比べ有意に改善した(70% vs 35%, $p<0.05$)。組織学的評価に関しては、死亡した際に採取した臓器ばかりであり、

両群とも評価できない臓器ばかりであった。また、そのほかの血液学的検査も今回は測定できなかった。

結語として、今回の検討で、骨髄間葉系幹細胞移植が敗血症性ショックに生存率を有意に改善し、有用でありそうであるが、依然としてその機序は不明であり、今後の検討課題となった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文]

現在投稿中

[学会発表] (計8件)

- ① 小池康志、谷口 巧、ラットを用いた窒息モデルにおけるプロポフォールPropofolの有用性の検討、第64回日本麻酔科学会学術集会、神戸ポートピアホテル、神戸、2017.6 (発表予定)
- ② 南部優介、谷口 巧、ラットの出血性ショックモデルにおけるプロポフォールPropofolの影響、第64回日本麻酔科学会学術集会、神戸ポートピアホテル、神戸、2017.6 (発表予定)
- ③ T Taniguchi: The changes of procalcitonin levels in critical patients with abdominal septic shock during blood purification Crit Care 2016; 20 (Suppl 1) p 9, Brussels, Belgium
- ④ 山本剛史、谷口 巧、アムロジピンAmlogipinが出血性ショック後の生存率に及ぼす影響の検討、第43回日本集中治療医学会総会学術集会、神戸ポートピアホテル、神戸、2016.2.12
- ⑤ T Taniguchi, K Sato, M Okajima: Effects of administration of dexmedetomidine on

inflammatory responses and severity in severe septic patients. Crit Care 2015; 19 (suppl 1): p487, Brussels, Belgium

- ⑥ 山本剛史、谷口 巧、ラットの出血性ショックモデルにおけるアムロジピン内服の影響、第61回日本麻酔科学会総会学術集会、パシフィコ横浜、横浜、2014.5.17
- ⑦ 谷口 巧、山本剛史、栗田昭英、ラットの低体温モデルにおける感染に対してのプロポフォールPropofolとケタミンKetamineの比較検討、第61回日本麻酔科学会総会学術集会、パシフィコ横浜、横浜、2014.5.16
- ⑧ 結城 緑、谷口 巧、ラット盲腸結紮穿孔敗血症モデルにおける内服カルベジロールCarvedilolの影響、第61回日本麻酔科学会総会学術集会、パシフィコ横浜、横浜、2014.5.16

6. 研究組織

研究代表者

谷口 巧 (TANIGUCHI Takumi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号:30301196