

令和元年8月30日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10536

研究課題名(和文) エンドトキシンを軸とした潰瘍性大腸炎の新規治療の検討

研究課題名(英文) The investigation for new treatment of ulcerative colitis related to endotoxin

研究代表者

清水 智治 (Shimizu, Tomoharu)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70402708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎のモデルとして、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)投与ラットでの大腸粘膜障害モデルを用いた。大腸粘膜障害の強さと共に低濃度の血中エンドトキシン濃度の上昇を認め、粘膜障害によりエンドトキシントランスロケーションが起こっていることが確認された。このモデルにて、エンドトキシン吸着療法を施行することが可能であった。エンドトキシン吸着療法により末梢白血球が治療により低下することが確認され、潰瘍性大腸炎の治療法としてのエンドトキシン吸着療法可能性が確認された。さらなる基礎的・臨床的研究を進める一助となる成果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

UCの病態に、エンドトキシンが関連していることは古くから臨床的に検討されていたが、本研究にて軽微な大腸粘膜障害でもエンドトキシンが上昇することが本研究で確認された。実臨床におけるエンドトキシン吸着治療自体の安全性は確立されており、UCに対する治療効果とそのメカニズムが解明されることによりUC治療への臨床応用も速やかに行うことができる可能性が高い。本研究課題の結果から、エンドトキシン吸着療法により末梢白血球の減少を有意に認めたため、難治性疾患であるUCに対する新規血液浄化療法としての可能性が示唆され、さらなる研究を進める一助になる臨床的にも非常に意義のある研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We employed dextran sulfate sodium (DSS) administrated rat colorectal mucosal injury model as ulcerative colitis model. We observed the slight elevation in plasma endotoxin levels accompanied with the increase in colorectal mucosal injury. We confirmed that colorectal mucosal injury resulted endotoxin translocation. We could perform endotoxin adsorption therapy using this model. We observed that peripheral white blood cells decreased after endotoxin adsorption therapy in this model, suggesting the possibility the adaptation of this treatment for ulcerative colitis. We expected our findings will help future basic and clinical research of ulcerative colitis.

研究分野：消化器外科

キーワード：潰瘍性大腸炎 エンドトキシン エンドトキシン吸着療法 トレミキシン ポリミキシンB PMX

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎(UC)は原因不明の難治性疾患であるが、年々、患者数が増加しており、2013年には国内でも16万人の患者が特定疾患として登録されている。発症原因は不明であり、根本的な治療法は発見されていない。新しい治療法の開発は患者の予後改善に寄与すると考えられる。UCの病態には、微生物産物やマクロファージ、樹状細胞、Tリンパ球、好中球、サイトカインなどが複雑に関与している。

UCでは病状悪化すると大腸粘膜が炎症により荒廃し粘膜バリアーの機能が障害され、微生物産物が体内にトランスロケーションし免疫細胞を活性化させる。この微生物産物の中でグラム陰性菌の細胞壁成分の一つであるエンドトキシンは生物活性が強く、敗血症ではショックや多臓器不全の病態形成に重要な役割を果たすと考えられている。UCでも病状悪化によりエンドトキシントランスロケーションが生じると、さらに免疫細胞が活性化され、さらに悪循環に陥ることが考えられる。

Etの測定には1970年代よりリムルス試薬が用いられてきた。現在臨床で用いられている比濁時間分析法(従来法)は感度が低く、正確にエンドトキシンを評価できていない可能性が高い。リムルス試薬を応用した新しいエンドトキシン測定方法としてEndotoxin Scattering Photometry(ESP)が開発された(Anal Biochem 2008;373:281)。ESPでは、従来法で測定できなかった血中エンドトキシンを迅速・高感度に測定することが可能となった。我々は、ESPにて敗血症患者の重症度評価ができる可能性を明らかにした(Shock 2013;40:504-11)(基盤研究C 23591863:平成23~25年度)

我々が経験した外科治療を必要とするUC患者では、手術前にESPでのエンドトキシン値が高値であったが、術後には速やかに低下した。この値は従来法では測定感度以下であった(右図)このデータより重症のUC患者でエンドトキシンの影響が強い可能性が示唆される。

エンドトキシンに特異的に結合し中和するポリミキシンBは腎毒性と神経毒性のため治療薬として全身投与できない。我々の研究室では、ポリミキシンB固定化繊維と血液に接触させ血中Etを吸着することを治療原理とする血中エンドトキシン吸着器(トレミキシン®; PMX)を開発・上市した(Am J Surg 1994;167:412)。PMXは敗血症性ショック・エンドトキシン血症の血液浄化療法として本邦では既に20年以上臨床で使用されている。PMXはエンドトキシンの吸着以外にもHMGB1などのサイトカイン(Blood Purif 2011;32:310)、カンナビノイド(Ther Apher Dial. 2008;12:374)、好中球吸着(Lancet Infect Dis. 2011;11:65)や免疫細胞の機能調節(Surgery 2013;153:262, Am J Surg 2004;188:150)など様々な治療効果発現のメカニズムが明らかにされている。

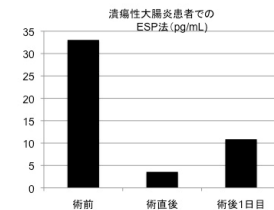
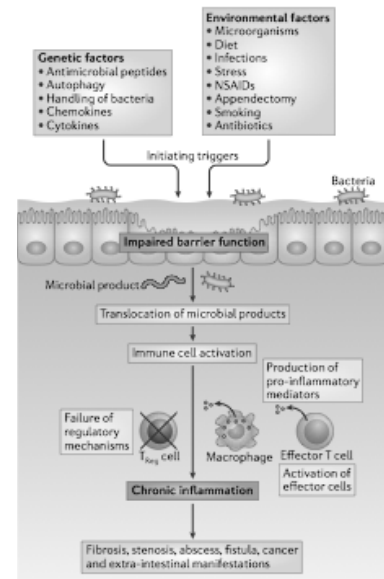
さらに、活動性UCの患者でPMX治療を用いたところUCの病状が改善したことが報告されている(ASAIO J 2005;51:471)。しかし、それ以降は、UCとPMX治療に関する詳細な検討は行われていない。

一方、UCの治療は薬物療法が中心となるが、血液浄化療法として白血球除去療法の臨床効果が認められており、世界各国でも広く普及している(Digestion 2015;92:39)。白血球除去療法の治療効果発現のメカニズムは、活性化好中球の末梢血からの除去が想定されている(World J Gastroenterol 2014;20:9699)。しかし、他の因子については吸着されている可能性は低いので、その効果には限界がある。PMX治療でも特異性肺線維症急性増悪の治療効果発現のメカニズムの一つとして活性化好中球吸着(Blood Purif 2010;29:321)が報告されており、UCにPMX治療を応用した際には、好中球とエンドトキシンの除去による治療効果が期待される。

本研究課題では、新しいエンドトキシン測定法であるESPを用いて、UCの病状進行に伴うエンドトキシントランスロケーションの状態について明らかにし、UCに対する新規血液浄化療法としてPMX治療が応用可能かどうか検討する。

## 2. 研究の目的

潰瘍性大腸炎(UC)は原因不明の難治性炎症性腸疾患であり、新しい治療法の開発は患者の予後改善に寄与する。UCでは強い粘膜荒廃によりエンドトキシントランスロケーションが生じて全身性炎症・免疫機能が活性化され、病態は悪循環に陥る。新しいエンドトキシン測定法であるEndotoxin Scattering Photometry(ESP)は高感度で測定可能であり、UC患者で従来では検出不能であったエンドトキシンが測定でき重症度に伴い上昇する可能性がある。一方、Et吸着療法(PMX)はエンドトキシン血症・敗血症性ショックの治療器具として既に臨床応用されている。本研究ではUCにおけるエンドトキシンの役割を明らかにし、新規治療法としてPMX治療の可能性を検討することを目的としている。



### 3. 研究の方法

#### 【実験1：UC 動物モデルでのエンドトキシンの役割の検討】

デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 投与ラットでの大腸粘膜障害と ESP 法による血中エンドトキシンの関連について検討する。エンドトキシンと大腸粘膜障害との関連を検討する。エンドトキシントランスロケーションと大腸粘膜障害の関与を明らかにするためにエンドトキシンを特異的に結合・中和するポリミキシン B を DSS 投与ラットに投与することにより検討する。

(方法)

- 健康コントロールラット (Control)
- 3% DSS 投与ラット (3%DSS)
- 4.5% DSS 投与ラット (4.5%DSS)
- 3% DSS + 経腸ポリミキシン B 投与ラット (PMB)

の 4 群により大腸粘膜の障害とエンドキシントランスロケーションについて検討を行う。評価項目：体重増加率、大腸腸管長、腸管組織学的所見、血中エンドトキシン、白血球数・白血球分画、ヘモグロビン、血小板数

#### 【実験2：UC 動物モデルでの PMX 治療の効果の検討】

DSS 投与ラットでの大腸粘膜障害と PMX 治療の介入による治療効果について検討する。

DSS 投与ラット大腸炎モデルで Et の推移が判明した後に、PMX 治療のモデルの検討を行う。

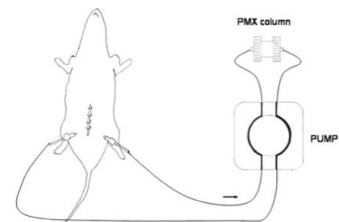
(方法)

- 健康ラット+シャムカラム (N-S),
- 健康ラット+PMX 治療 (N-P)
- 3% DSS 投与ラット+シャムカラム (D-S)
- 3% DSS 投与ラット+PMX 治療 (D-P)

の 4 群で検討を行った。

体外循環の方法：ラットを全身麻酔下に大腿動静脈にカニューレーションを行い、ミニ PMX カラムとシャムカラムを用いて 2mL/min にて体外循環を 2 時間行う。体外循環の抗凝固薬としてはヘパリンを用いた。体外循環治療の導入は、実験 1 の結果から DSS 投与開始後 7 日目に体外循環治療を行い、治療終了後 48 時間でラットを擬死させ、血液と組織を採取した。

【評価項目】腸管長、腸管組織学的所見組織 myeloperoxidase(MPO)活性、血中エンドキシントランスロケーション



ASAIO Journal 2009;55:246より引用



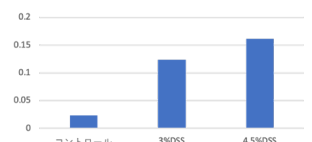
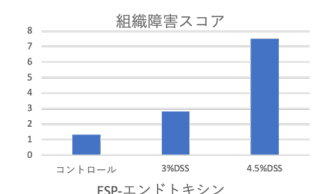
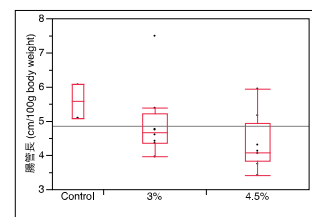
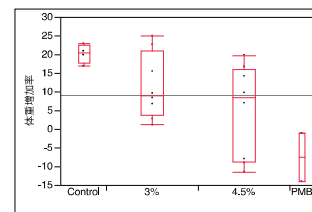
### 4. 研究成果

#### 【実験1：UC 動物モデルでのエンドトキシンの役割の検討】

Control と 3% DSS では、DSS 投与中に 10 日目までは死亡する症例はなかった。4.5% DSS では 9 日目で約 25%、PMB では 100% が 8 日目までに死亡するため 7 日目の体重増加率について検討した。PMB では、体重増加を投与 1 日目から認めず、Control と比較して有意な体重増加率の低下を認めた。3% DSS と 4.5% DSS では増加率はほぼ同等であり、Control と比較して有意差を認めなかった。

DSS 投与開始 10 日目では、大腸腸管長は 3% DSS と 4.5% DSS で Control より短縮していることが確認できた、大腸粘膜障害を組織障害スコアで検討したところ、DSS 濃度依存性に組織障害が強くなることが確認できた。この組織障害が観察された時点の血中エンドトキシン濃度を検討したところ、DSS 濃度依存性にエンドトキシン濃度が上昇することが確認された。

一方、大腸粘膜障害により血中に移行するエンドキシントランスロケーションの影響を考慮するためにポリミキシン B と DSS の共投与を行ったところ、体重増加を認めず、4.5% DSS よりむしろ死亡率の増加を認めたため、ポリミキシン B 投与によるエンドキシントランスロケーションの中和実験については中止した。PMB では、盲腸の肥大と内容の液状化を認めた。腸内細菌に含まれるエンドトキシンを中和してトランスロケーションの影響を減少させる効果より、腸内細菌叢を攪乱することにより悪影響がでたと考えられた。



以上より、4.5% DSS 投与ラットでは7日目に体外循環を行ったとしても、大腸粘膜障害が強すぎるために、大腸内への多く循環血液量の減少が想定され体外循環に堪えられない可能性が示唆された。したがって、実験2では、3% DSS 投与ラットを用いて DSS 投与開始7日目に体外循環治療を行い、治療48時間目に大腸粘膜障害の変化を観察することとした。

【実験2：UC 動物モデルでの PMX 治療の効果の検討】

- 健康ラット+シャムカラム (N-S),
- 健康ラット+PMX 治療 (N-P)
- 3% DSS 投与ラット+シャムカラム (D-S)
- 3% DSS 投与ラット+PMX 治療 (D-P)

の4群で検討を行った。

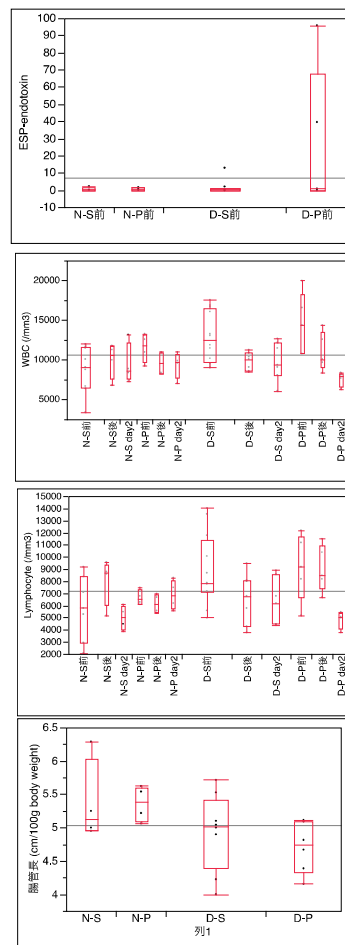
DSS 投与7日目の体外循環開始時の血中エンドトキシン濃度は右図のようになり、各4群で有意差を認めなかった。今回の実験モデルでは、エンドトキシンが上昇するほどの重篤なモデルではなかったため、軽微な上昇であり、ESP 法でも有意差が出なかったと判断される。

体外循環前(前)と体外循環直後(後)、体外循環後2日目(Day2)の白血球数(WBC)を検討したところ、DSS 投与ラット(D-S群とD-P群)では、健康ラット(N-S群とN-P群)と比較して有意に白血球数の増加を認めた。このWBCの増加は、D-P群でDay2に有意な低下を認めた。D-S群ではこの変化は認められていない。

このWBCはどの分画が減少しているかを検討したところ、D-P群でリンパ球分画が有意に低下していることがわかった。

Day2で擬死させた時点での腸管長を検討したところ、DSS 投与ラットD-P群とD-S群では、健康ラット群(N-S群とN-P群)と比較して腸管長の短縮を認めている。D-P群とD-S群の間には有意差を認めない。

大腸粘膜障害度と大腸組織のMPO活性を測定してPMX治療効果について評価を行い、論文投稿を行う予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 清水 智治, 三宅 亨, 北村 直美, 小幡 徹, 谷 眞至. 敗血症診断におけるエンドトキシンとプロカルシトニンの臨床的意義. 日本外科感染症学会雑誌 2017;42;101-110.
- Shimizu T, Miyake T, Tani M. History and current status of polymyxin B-immobilized fiber column for treatment of severe sepsis and septic shock. Ann Gastroenterol Surg 2017;2;105-113.
- 清水 智治, 小幡 徹, 三宅 亨, 谷 眞至. 潰瘍性大腸炎手術症例での ESP 法でのエンドトキシン推移の検討. エンドトキシン・自然免疫研究 第20巻 2017;20:22-24.
- 清水 智治, 小幡 徹, 園田 寛道, 三宅 亨, 植木 智之, 山口 剛, 飯田 洋也, 貝田 佐知子, 竹林 克士, 目片 英治, 遠藤 善裕, 谷 徹, 谷 眞至. 潰瘍性大腸炎における Endotoxin Activity Assay(EAA). エンドトキシン・自然免疫研究 第21巻 2018;21:26-29.

〔学会発表〕(計 7 件)

- Tomoharu Shimizu, Hiromichi Sonoda, Hiroyuki Ohta, Tohru Miyake, Tomoyuki Ueki, Hiroshi Yamamoto, Hiroya Akabori, Eiji Mekata, Yoshihiro Endo, Masaji Tani. The clinical significance of procalcitonin and microbial factors following gastrointestinal surgery. 第71回日本消化器外科学会総会, 2016
- Tomoharu Shimizu, Toru Obata, Hiromichi Sonoda, Toru Miyake, Hiroya Akabori, Takahisa Tabata, Yutaka Eguchi, Yoshihiro Endo, Tohru Tani, Masaji Tani. Diagnostic potential of novel endotoxin detection method for sepsis and septic shock. The 8th Congress of the International Federation of Shock Societies (国際学会), 2016.
- 清水智治, 園田寛道, 三宅 亨, 植木智之, 吉岡豊一, 北村直美, 他. 大腸穿孔症例での急性血液浄化療法の役割. 第27回日本急性血液浄化学会学術集会 2016
- 清水智治, 園田寛道, 三宅 亨, 植木智之, 山口剛, 貝田佐知子, 他. 大腸穿孔の治療における SOFA スコアの意義と治療戦略. 第29回日本外科感染症学会総会学術集会, 2016
- 清水智治, 園田寛道, 三宅 亨, 植木智之, 生田大二, 他. 潰瘍性大腸炎重症度の指標としての新しいエンドトキシン測定法の可能性. 第71回日本大腸肛門病学会学術集会, 2016
- 清水智治, 園田寛道, 三宅 亨, 植木智之, 北村直美, 他. 大腸穿孔症例における予後予測因子の検討. 第53回日本腹部救急医学会総会, 2016
- 清水智治. 潰瘍性大腸炎における Endotoxin Activity Assay (EAA)の推移. 第23回日本

〔図書〕(計 1 件)

Tomoharu Shimizu, Masaji Tani, Yoshihiro Endo, Tohru Tani. Endotoxin adsorption: Direct hemoperfusion with a polymyxin B-immobilized fibers column (Toraymyxin). World Scientific.2017

〔その他〕

ホームページ等 ; <http://www.shiga-med.ac.jp/~hqsurge1/pg216.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 谷 眞至

ローマ字氏名 : Tani Masaji

所属研究機関名 : 滋賀医科大学

部局名 : 医学部

職名 : 教授

研究者番号 (8桁) : 60236677

(2) 研究分担者

研究分担者氏名 : 三宅 亨

ローマ字氏名 : Miyake Toru

所属研究機関名 : 滋賀医科大学

部局名 : 医学部

職名 : 助教

研究者番号 (8桁) : 70581924

(3) 研究分担者

研究分担者氏名 : 太田 裕之

ローマ字氏名 : Ohta Hiroyuki

所属研究機関名 : 滋賀医科大学

部局名 : 医学部

職名 : 講師

研究者番号 (8桁) : 80710459

(4) 研究分担者

研究分担者氏名 : 今枝 広丞

ローマ字氏名 : Imaeda Hirotugu

所属研究機関名 : 滋賀医科大学

部局名 : 医学部

職名 : 非常勤講師

研究者番号 (8桁) : 20623317

(5) 研究分担者

研究分担者氏名 : 西田 淳史

ローマ字氏名 : Nishida Atsushi

所属研究機関名 : 滋賀医科大学

部局名 : 医学部

職名 : 助教

研究者番号 (8桁) : 90719915

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。