

平成30年6月26日現在

機関番号：30109

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15112

研究課題名(和文)ブタ敗血症モデルの構築と多角的検討

研究課題名(英文)Construction of a LPS-induced ARDS pig model and multiple assay of the model.

研究代表者

宮庄 拓 (Miyasho, Taku)

酪農学園大学・獣医学群・講師

研究者番号：50568996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ブタを用いてLPSによるARDSを呈するモデルの構築を行った。40 µg/mLのLPSを75分間160 µg/kg/hrで持続投与し、その後P/F比が継続して30分以上300を下回ることが確認されるまで80 µg/kg/hrで持続投与することで、およそ120分間でブタLPS誘発性ARDSモデルが作出することが出来た。非侵襲的なパルスオキシメーターで測定した灌流指標と侵襲的な循環動態モニターで測定した肺血管透過性係数が、一般的なショックの指標である血圧や心拍数よりも鋭敏に反応し、その予後にも反映していることが分かった。また、ARDS群の血中HMGB1濃度は死亡直前が最も高い値を示すことが分かった。

研究成果の概要(英文)：We attempted to construct a LPS-induced ARDS pig model. First, LPS was continuously administered at 160 µg/kg/hr for 75 minutes, and then LPS was continuously administered at 80 µg/kg/hr until it was confirmed that the P/F ratio < 300 continued for more than 30 minutes. As a result, a LPS-induced ARDS pig model was generated in about 120 minutes. Perfusion index measured with noninvasive pulse oximeter and pulmonary vascular permeability index measured by invasive hemodynamic monitor were reacted more sensitively than blood pressure and heart rate which are general indicators of shock, and it also were reflected its prognosis sharply. In all of the ARDS group, blood HMGB1 concentration was highest immediately before death.

研究分野：生化学

キーワード：動物モデル LPS 敗血症 肺障害 モデル構築 モニター メディエーター

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 我々はこれまで、人の救急救命治療の研究に用いることができるブタを用いた敗血症モデルの構築に取り組み、いくつかの敗血症治療デバイスや治療薬の効果を多角的に検証するために、

CT スキャンを用いた呼吸器障害に対する効果の画像的評価

循環動態モニターや呼吸器モニターを用いた循環動態や呼吸器状態の評価

サイトカインをはじめとする各種メディエーターの変動の評価

血液凝固能や血球状態などの血液学的評価

病理学的評価

などを行ってきた[J Nippon Med Sch. 2014. 81(3):130-138]。

それに至った理由は、現在、特に救急救命医療において、多くの敗血症治療デバイスや医薬品が使われているが、実際その効果は多義に渡ると考えられ、説明されていない効果も多くあると考えられており、その(副次的)効果を検討し、証明するためにこの研究が始まった。

(2) 検討を重ねる中で、様々な要因によりモデルの重症度や病態が変動することを経験してきた。最初はあくまでシンプルにと考え、その治療効果を検討するために、与える侵襲を LPS (lipopolysaccharide: エンドトキシン) の投与のみとし、循環改善のためのボラス輸液やステロイドの投与などの処置、呼吸器の保護のための PEEP (positive end expiratory pressure: 呼気終末陽圧) などの特別な麻酔管理などを極力行わずに施行してきた。しかし、確かにそれは LPS による生体反応を見るには間違いはないのであるが、肺に関しては敗血症による ARDS (acute respiratory distress syndrome: 急性呼吸窮迫症候群) だけでなく、長時間の同体位による肺への鬱血などによる物理的に与えられた肺障害が相乗している病態であることが分かった。例えば、その物理的に与えられた肺障害は PEEP をかけることにより、大きく病態は改善され、重症度も低くなったのであった。

実臨床ではボラス輸液やステロイド投与、PEEP による肺胞の保護等は当然実施されることであり、このモデルがある意味特殊な状態であることが分かった。しかし、そこで我々は『逆転の発想』に立ち、肺の状態を麻酔管理などでコントロールしながら、敗血症および敗血症性 ARDS を作出し、重症度をコントロールできる敗血症モデルを構築できないかと考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目標は、まず、重症度をコントロールできるブタ敗血症モデルを構築することであった。これまでも数多くブタを用い

た LPS 投与実験を繰り返し行ってきており、それらのデータと経験を十分に活かし、LPS の投与量や PEEP の割合などを調節し、その病態を様々な角度から多角的に検討することによって、重症度を細分化したモデルの構築に努めたいと考えた。

(2) さらにこれまでも、広く実臨床で用いられているエンドトキシン除去向け吸着型血液浄化用浄化器(トレミキシン: 東レ)などの敗血症治療デバイスや治療薬(AT (アンチトロンピン) など)を用いて、その効果を多角的に検討してきたので、それを重症度の違いにより効果の違いを検討し、病態改善機序の解明に努めたいと考えた。

## 3. 研究の方法

(1) 供試動物にブタ(三元豚、体重約 30kg、雌)を用いた。鎮静薬(メドミジン 40  $\mu$ g/kg + ミタゾラム 0.2mg/kg + プトルファノール 0.2mg/kg)を筋肉内注射して鎮静させ、左右耳介静脈に留置針を留置した。プロポフォル 6mg/kg を静脈内投与して麻酔導入し、挿管した。100%酸素およびセボフルラン(必要に応じて濃度調整)で麻酔維持し、輸液(生食)を 10mL/kg/hr で開始した。体動を抑えるためにベクロニウム 0.1mg/kg を静脈内投与した後、0.6mg/kg/hr で持続投与した(必要に応じてボラスまたは増量した)。人工呼吸は従量式(ペンロン)、PEEP なしで行った。右外頸静脈にダブルルーメン CV カテーテルを、右大腿動脈に PiCCO カテーテル設置し、実験開始前設定(呼気終末セボフルラン濃度 2.0%前後、動脈血二酸化炭素分圧 30~40mmHg、体温 37.0~39.0、呼吸回数 22~24 回/分、輸液量(生食 + ベクロニウム) 10mL/kg/hr)を調整した。

(2) 循環動態モニター(PiCCO<sub>2</sub>: PULSION)を用いて心拍数、体温、観血的動脈血圧、中心静脈圧、心臓拡張末期容量、心臓拡張末期容量係数、肺血管外水分量、肺血管外水分量係数、全駆出率、肺血管透過性係数、1 回拍出量、1 回拍出量変動率、脈圧変動率、体血管抵抗などを、パルス CO オキシメーター(Radical-7: MASIMO)を用いて灌流指標、脈波変動指標を、血液ガス分析装置(GEM プレミア 3500: アイ・エル・ジャパン)を用いて血液の pH、二酸化炭素分圧、酸素分圧、乳酸値などを、自動血球計数装置(pocH-100iV: SYSMEX)を用いて白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数などを経時的に測定した。

(3) LPS (*E.coli* 055:B5 (purified by ion-exchange chromatography, TLR ligand tested, Sigma-Aldrich) 40  $\mu$ g/mL を耳介静脈より、モデル構築のために量と時間を変更して投与した。

(4) 投与開始時および開始後から 30 分毎に、供試動物が死亡するか最大 420 分目まで、CT スキャン撮影や各種測定および血液採取を行った。

(5) 全測定終了後、ペントバルビタール (50mg/kg) を静脈内に投与して安楽殺し、病理解剖を行い、病理学的に検討した。

(6) 採取した血液を用いて血中の各種サイトカイン(IL-1、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40、IFN、IFN、TNF および HMGB1) 濃度を Bio-Plex (Bio-Rad) および ELISA キット(シノテスト)で測定した。

(7) これらの検討項目を総合的に評価し、LPS の投与量を決定し、モデルを構築した。決定した LPS 投与方法において、LPS 誘発性 ARDS モデル群(ARDS 群)と対照群(Cont 群)を各群 6 頭ずつ行い、上記のさまざまな項目の経時的变化を調べた。

(8) エンドトキシン除去向け吸着型血液浄化用浄化器(トレミキシン)や開発中の浄化器を用いて、本モデルに対する効果を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) これまでの経験とプレ実験として 6 頭の検討を行った結果、40  $\mu$ g/mL の LPS を最初の 75 分間 160  $\mu$ g/kg/hr で持続投与し、75 分以降、ベルリン定義 [JAMA. 2012; 307: 2526-2533]により ARDS であると定められる P/F 比( $\text{PaO}_2$ (動脈血酸素分圧)/ $\text{FI}\text{O}_2$ (吸入気酸素))が 300 を継続して 30 分間下回ることが確認されるまで 80  $\mu$ g/kg/hr で持続投与することで ARDS モデルを作出することが出来ることが分かった。

本モデルでは、LPS 投与開始後 90 分目までに P/F 比が 300 を切り、およそ 120 分間で LPS 誘発性 ARDS を呈することが確認された。

(2) LPS 誘発性 ARDS モデル群(ARDS 群)および対照群(Cont 群)(各 n=6)における種々の項目の経時的变化を以下に示す。

##### CT スキャン像

ARDS 群において、LPS 投与開始 60 分後から経時的に含気肺野領域が減少することが確認された。

##### バイタルの変化

ARDS 群において、心拍数は LPS 投与開始 90 分後から経時的に上昇し、血圧は LPS 投与開始 60 分後から経時的に低下し、体温は LPS 投与開始 30 分後から経時的に上昇することが確認された。Cont 群ではどの項目も変化は見られなかった。

##### 血球の変化

ARDS 群において、白血球数が LPS 投与開始 30 分で急激に減少し、その後も低値を示し、血小板数が投与開始 30 分後から経時的に減

少することが確認された。Cont 群ではどの項目も変化は見られなかった。

##### 循環動態

ARDS 群において、平均動脈圧が LPS 投与開始 60 分で急激に低下し、その後も低値を示し、心臓拡張末期容量が LPS 投与開始 30 分で低下し、一旦上昇するが 120 分後から経時的に低下し、肺血管外水分量係数が LPS 投与開始 120 分後から経時的に低下し、肺血管透過性係数が LPS 投与開始 30 分後から経時的に上昇することが確認された。また、灌流指標が LPS 投与開始 30 分で低下し、一旦上昇するが 60 分後から経時的に低下し、210 分後からは測定限界まで低下することが確認された。Cont 群ではどの項目も変化は見られなかった。

これらの中で非侵襲的なパルス CO オキシメーターで測定した灌流指標と侵襲的な循環動態モニターで測定した肺血管透過性係数が、一般的なショックの指標である血圧や心拍数よりも鋭敏に反応し、その予後をも鋭敏に反映していることが分かった。

##### 血中メディエーター濃度

ARDS 群において、血中の IL-1、IL-4、IL-6、IL-8 および HMGB1 濃度が LPS 投与開始 60 分後から経時的に上昇し、終了まで高い値を示し、IL-10、IL-12p40、IFN、IFN および TNF 濃度が投与開始 60 分後から経時的に上昇し、その後低下することが確認された。Cont 群ではどの項目も変化は見られなかった。

これらの中で血中 HMGB1 濃度はすべての ARDS 群で死亡直前が最も高い値を示すことが分かった。

##### 肺の病理学的検索

ARDS 群において、肺泡毛細血管の充血、好中球やマクロファージを主体とした多数の炎症細胞浸潤、それらに伴う肺泡中隔の肥厚、肺泡腔内に線維素の析出、肺泡上皮細胞の脱落が認められた。

(4) 上記のように Cont 群では何も変化が見られなかったことから、人工呼吸器管理による障害や外科的処置による侵襲などによる影響は極めて小さいことが分かった。また、肺の障害の程度は非観血的なモニターによる灌流指標で十分に把握出来る可能性があることが分かった。

(5) 本モデルを用いて、エンドトキシン除去向け吸着型血液浄化用浄化器(トレミキシン)と開発中の新しい血液浄化器を LPS 投与開始と同時に使用し、その効果を検討したところ、多くの項目で改善が見られたが、まだ頭数が少ないため、今後、さらに検討が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Endo Y, Kawase K, Miyasho T, Sano T,

Yamashita K, Muir WW. Plethysmography variability index for prediction of fluid responsiveness during graded haemorrhage and transfusion in sevoflurane-anaesthetized mechanically ventilated dogs. *Vet Anaesth Analg*. 2017; **44**(6): 1303-1312. DOI:10.1016/j.vaa.2017.07.007. 査読有り

〔学会発表〕(計3件)

Endo Y, Miyasho T, Imahase H, Sakamoto Y, Yamashita K. Evaluation of perfusion index as a hemodynamic monitoring in a sepsis pig model. American Society of Anesthesiology (ASA) 2017. 査読有り

Endo Y, Miyasho T, Sano T, Yamashita K. The change of perfusion index (PI) derived from pulse oximeter during the early stage of endotoxemia in pigs. International Veterinary Emergency and Critical Care Symposium (IVECCS) 2016. 査読有り

遠藤 雄介、宮庄 拓、今長谷 尚史、田村 純、阪本 雄一郎、山下 和人、ブタにおけるエンドトキシン投与時の末梢灌流指標 (Perfusion index) および血行動態の変動、日本麻酔科学会第63回学術集会 2016.

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

酪農学園大学 2016 年度 研究シーズ集  
<http://www.rakuno.ac.jp/education/research/materialseeds.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮庄 拓 (MIYASHO, Taku)  
酪農学園大学・獣医学群・講師  
研究者番号：50568996

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山下 和人 (YAMASHITA, Kazuto)  
酪農学園大学・獣医学群・教授  
研究者番号：60244844

阪本 雄一郎 (SAKAMOTO, Yuichiro)  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号：20366678

今長谷 尚史 (IMAHASE, Hisashi)  
佐賀大学・医学部・助教  
研究者番号：10724057

佐野 忠士 (SANO, Tadashi)  
酪農学園大学・獣医学群・准教授  
研究者番号：50365194

三好 健二郎 (MIYOSHI, Kenjiro)  
酪農学園大学・獣医学群・講師  
研究者番号：90588138

岡本 実 (OKAMOTO, Minoru)  
酪農学園大学・獣医学群・准教授  
研究者番号：60372877

(4) 研究協力者

なし