

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20379

研究課題名(和文)血管透過性亢進モデルマウスを用いた血管透過性亢進の抑制方法の検討

研究課題名(英文) Development of approaches to control vascular permeability using mouse models with increased vascular permeability

研究代表者

島居 傑 (SHIMAZUI, Takashi)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20598239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：血管透過性亢進は重症患者の予後を悪化させるため、動物実験などによる制御方法の探索が必要である。本研究は、従来動物を犠牲させる必要があった血管透過性評価の非侵襲的方法の開発と、その亢進の制御方法の探索を目的とした。評価方法の開発では、蛍光イメージング測定システムで非侵襲的に評価したマウスの足底蛍光度が、従来の肺血管透過性評価結果と同じ傾向を示し肺の蛍光度とも強く相関するため、非侵襲的肺血管透過性評価に有用であることを明らかにした。制御方法の探索では、エリスロポエチンが敗血症マウスの血管透過性亢進を制御しうる可能性を見出した。今後、さらなる薬剤や適切な使用方法の探索につき、検討を重ねていく。

研究成果の概要(英文)：Animal study is helpful to investigate therapeutic approaches to control increased vascular permeability, which worsens clinical outcomes in critically ill patients. However, conventional technique to quantify vascular permeability requires sacrifice of animals. We aimed to develop a non-invasive technique to quantify vascular permeability in mouse models, and then, investigated new therapeutic approaches to control vascular permeability. First, we found footpad fluorescent intensity assessed by an in vivo fluorescent imaging system had a strong correlation to lung fluorescent intensity, and had a same trend of severity of lung vascular permeability assessed by a conventional technique. Thus, the footpad fluorescent intensity assessment can be use to a non-invasive technique to quantify lung vascular permeability. Next, we found the erythropoietin may control vascular permeability in septic mouse. Further studies are warranted to establish ways to control vascular permeability.

研究分野：救急集中治療医学

キーワード：動物実験 血管透過性亢進 in vivo imaging 敗血症

## 1. 研究開始当初の背景

血管透過性は種々の侵襲により亢進する。過剰な血管透過性の亢進は輸液量の増加や浮腫の増大を来し、生命予後の悪化との関連も示唆される。よって、過剰な血管透過性の亢進の制御は、輸液量を減らし、生命予後の改善につながる可能性がある。

過去の研究では、複数の抗体や薬剤が、血管透過性亢進を制御しうる可能性が報告されている。しかしながら、未だ血管透過性亢進を制御する治療法は確立していない。また、血管透過性亢進を引き起こす侵襲は多様であるが、いずれの病態でも血管透過性亢進の制御が治療効果を発揮するかは明らかにされていない。

これらの問題を克服するためには研究が必要であり、動物実験はその一助となる。しかし、従来の動物実験の血管透過性の評価では、動物から摘出した臓器から、事前に投与した色素の漏出量を抽出する手法が用いられてきたが、これは動物を犠牲せしめる必要のある手法であるため、実験結果における個体差の影響を除外することはできず、侵襲や治療に対する経時的な変化を追うことも困難であった。しかし最近では、生存マウスにおいて、二光子顕微鏡で血管透過性を経時的に評価しえたとする報告も見られ、*in vivo* imaging を用いることにより、同一個体での変化を観察し、精度の高い実験結果を得られる可能性が報告されている。また最近、励起波長の長い新規の蛍光試薬が開発され、蛍光 imaging の進歩も見られる。これらの手法を用いることで、従来得られなかった精度の高い研究結果を得られる可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

今回、敗血症と出血性ショックという、血管透過性の亢進を呈する2種類のモデルマウスを用いて、血管透過性亢進を定量評価し、血管透過性を制御する方法を開発し、それぞれの病態において、血管透過性亢進の制御方法の有効性(治療対象・therapeutic window など)を評価することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 非侵襲的血管透過性評価方法の開発

- ・実験には、8-12週のC57BL/6Jマウスを用いた。
- ・血管透過性モデルとして、全身麻酔下に、盲腸結紮穿孔による敗血症マウスモデル(CLPモデル)と単開腹のみのsham、血管透過性を抑制しうる薬剤であるhydrocortisone(HC)を手術前に投与した、CLP+HCモデルを作成した。
- ・術後3時間後に動物に麻酔をかけ、従来用いられてきた血管透過性評価のための試薬であるEvans blue(EB)と、蛍光を評価するための近赤外線蛍光試薬の混合物を静注した。
- ・静注から2分後に、麻酔を維持したまま足底の蛍光イメージを撮影し、同部位の蛍光度についての定量評価を行った。また、一部のマウスでは採血を行い、その血液の蛍光イメージングと蛍光度の定量化を行った。血液は、100 $\mu$ Lを96 well plateに滴下することで、各マウスにおいて同量ずつの定量化を行った。
- ・試薬投与から60分後に再度麻酔を導入し、2回目の足底蛍光イメージングを行い、その後採血をし、血液蛍光イメージングを行った。
- ・さらに動物を犠牲せしめた後、肺の摘出と、蛍光イメージング、その蛍光度の評価を行った。
- ・摘出した肺は冷凍保存とし、後日Formamide内でhomogenizeし、EBの溶液中濃度を定量化した。
- ・上記実験により得られた、各モデルにおける足底・血液・肺の蛍光度と肺のEB漏出量とを比較することで、足底蛍光度評価の非侵襲的血管透過性評価への有用性につき検討した。

### 薬剤による、血管透過性亢進の抑制効果の検討

- ・血管透過性亢進モデルには、CLPマウスを用いた。
- ・で開発した、蛍光度測定による非侵襲的血管透過性評価方法を用いて、血管透過性を定量評価した。
- ・一部のマウスでは、足底蛍光度のみを血管透過性の指標とし、血管透過性の重症度と生命転帰との関係について評価した。その他のマウスでは2回目の血管透過性評価後に犠牲

せしめ、肺の血管透過性などについても評価を行った。

・血管透過性亢進の制御に関係する可能性があるが、その抑制効果が明らかではない物質(ヒスタミン阻害薬、カルバゾクロム、抗凝固薬、N-アセチルシステイン、エリスロポエチン、ビタミン類など)をマウスに投与し、その薬効について評価を行った。

・薬剤の投与タイミングは、CLP手術前、CLP手術時、CLP手術後とし、それぞれのタイミングでの薬効について評価した。

・薬剤を投与した CLP モデル と、コントロールとしての溶媒のみを投与した CLP モデルにおける、血管透過性の差について、比較検討した。

#### 4. 研究成果

##### 非侵襲的血管透過性評価方法の開発

・本実験では、CLP 群 10 匹、sham 群 11 匹、CLP + HC 群 8 匹のマウスを用いた。

・従来の血管透過性評価の指標である、肺の EB 漏出量は sham、CLP + HC 群と比べ、CLP 群で有意に高値であった (CLP vs. sham,  $P=0.0012$ ; CLP vs. CLP + HC,  $P=0.011$ )。

・肺と足底の蛍光度も同様に、他の群と比べ CLP 群で有意に高値であった (肺、CLP vs. sham,  $P<0.0001$ ; CLP vs. CLP + HC,  $P<0.0001$ ; 足底、CLP vs. sham,  $P<0.0001$ ; CLP vs. CLP + HC,  $P=0.0004$ )。

・肺と足底の蛍光度は、 $r=0.95$  と非常に良く関連した。

・これらの結果より、足底の蛍光度は従来の EB と同様に、血管透過性の重症度を評価可能であり、さらに、肺の蛍光度を非侵襲的に評価可能であると考えられた。

上記結果により、蛍光イメージングによる足底蛍光度評価は、非侵襲的肺血管透過性評価に有用と考えられた。

##### 薬剤による、血管透過性亢進の抑制効果の検討

・各種薬剤について検討した結果、CLP 手術 30 分前にエリスロポエチンを投与した CLP モデル ( $n=18$ ) と、生食を投与したモデル群 ( $n=18$ ) の間では、足底の蛍光度、60 分時に摘出した肺の蛍光度の両者において有意差を

認めた。

・しかし、その他の薬剤の血管透過性抑制への効果は明らかではなかった。

・CLP 手術時や CLP 手術後のタイミングにエリスロポエチンを投与した場合は、足底や肺の蛍光度に差は認めなかった。

今後、さらなる薬剤や、適切な投与タイミングの探索のため、研究を進めていく。また、敗血症モデルにおける血管透過性抑制方法の確立を行った後、出血性ショックモデルとの比較を行い、異なる病態における血管透過性亢進の制御の有効性(治療対象・therapeutic window など)を評価する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Shimazui T, Nakada TA, Fujimura L, Sakamoto A, Hatano M, Oda S, Development of Noninvasive In Vivo Approach to Assess Vascular Permeability in Inflammation Using Fluorescence Imaging. Shock, 査読有, Epub ahead of print.

DOI: 10.1097/SHK.0000000000001075.

[学会発表](計2件)

Shimazui T, Nakada TA, Fujimura L, Sakamoto A, Hatano M, Oda S, Noninvasive technique using fluorescence imaging to assess vascular permeability in sepsis, 38th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine, 2018年3月20日, Square - Brussels Meeting Center, Mont des Arts, Brussels, Brussels 1000, Belgium

島居 傑、中田 孝明、坂本明美、藤村 理沙、幡野 雅彦、織田 成人、マウスにおける近赤外線蛍光色素を用いた非侵襲的血管透過性評価方法の開発、第31回千葉集中治療研究会(第1352回千葉医学会例会)、2017年1月28日、千葉県千葉市千葉大学医学部附属病院。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

島居 傑 (SHIMAZUI, Takashi)  
千葉大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：20598239

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

中田 孝明 (NAKADA, Taka-aki)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師

幡野 雅彦 (HATANO, Masahiko)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授

藤村 理沙 (FUJIMURA, Lisa)  
千葉大学・バイオメディカル研究センター・助教