

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K17046

研究課題名（和文）サイトカインプロファイリングによる敗血症評価；サイトカインバランス是正による戦略

研究課題名（英文）Evaluation of severity of sepsis by cytokine profiling and treatment strategy by correcting cytokine balance.

研究代表者

高三野 淳一（Takamino, Junichi）

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：70769281

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：敗血症による死亡や合併症は、過剰な炎症性サイトカインによる臓器障害と過剰な抗炎症性サイトカインによる免疫不全により引き起こされると考えられており、過剰となったサイトカインを血液浄化により調節しサイトカインのバランスを整えることで治療に役立つと考えた。本研究では、数日にわたり敗血症状態が遷延するラット敗血症モデルを構築することができた。罹患期間毎の複数のサイトカインの変動を確認している。敗血症状態を維持することにより組織学的に臓器障害が確認され、長期に遷延した敗血症をよく再現する新規のモデルであると考えた。このモデルを用いてサイトカインバランスの是正による治療効果を今後検討していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は現在医学でも致死率の高い疾患であるが、抗菌薬投与や感染巣のデブリードマン以外には根本的な治療がなく、治療の主体は全身管理である。過剰な炎症により臓器障害が引き起こされることに対し、炎症を強力に抑制する戦略がこれまで試みられたが臨床応用された治療法はない。感染に抵抗できる免疫力残しつつ臓器障害をきたさないサイトカインのバランスを保つという戦略が新たな敗血症治療になりうると考えている。今回構築した新たな敗血症動物モデルは長期の罹患期間に応じたサイトカインプロファイルを明らかにし、敗血症を原因とした臓器障害を再現するモデルである。敗血症の病態に基づく治療戦略開発の第一歩であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：It is widely believed that the pathogenesis of sepsis is caused by organ damage due to excessive inflammatory cytokines and immunodeficiency due to excessive anti-inflammatory cytokines. We hypothesized that blood purification would modulate the excessive cytokines and balance the cytokines, which would be useful for treatment. In this study, we were able to create a rat sepsis model in which the septic state persisted for several days. Several cytokine changes were identified by us for each period of illness. Histologically, organ damage was confirmed by maintaining the septic state, and we considered this model to be unprecedented in its reproducibility of long-term sepsis. As a next step, we plan to use this model to test the therapeutic effect of correcting cytokine balance by blood purification therapy.

研究分野：集中治療

キーワード：敗血症 サイトカイン 血液浄化

1. 研究開始当初の背景

敗血症は現在も致死率の高い疾病であるが、治療は感染源の制御と支持療法が主体であり、敗血症の病態生理に基づく根本的治療法は確立されていない。

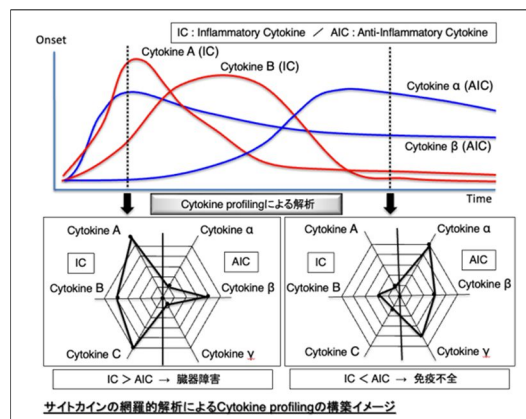
感染が重篤化した場合、過剰な炎症性メディエータは全身に波及し循環不全や血液凝固異常をきたす。また感染が長期に遷延した場合には、抗炎症性メディエータの発現により免疫麻痺状態を招く。敗血症の治療戦略として、感染源の制御に加え、これらメディエータを直接制御する方法が模索されているが、「過剰な」炎症性メディエータへの対策として Toll-like receptor 4 拮抗薬や Tumor Necrosis Factor 阻害薬、Interleukin-1 阻害薬などの「中和作用」による戦略 (Skrupsky LP et al.:Anesthesiology, 2011)は現在までに臨床応用には至っていない。炎症の強制的な抑制は感染に対する防御機構を障害し、また抗炎症性サイトカインの優位性は免疫不全の増悪を招いたためと考えられる。

現在の集中治療領域において血液浄化療法は単なる腎機能の代替療法に留まらず、メディエータ対策としての効果が議論されている。血液浄化における物質除去の機序として、透析・濾過・吸着があるが、「吸着」による対象物質の除去効率は血液浄化膜の素材毎に大きく異なり、また吸着の効率は血中濃度がより高い方が高効率になるという特徴がある。ある瞬間に過剰なサイトカインに対し十分な吸着効率を有する血液浄化器を用いることで、過剰なサイトカインを生理的範囲まで低下させることで臓器障害を抑制することが期待され、また過度にサイトカインを減じないことにより感染に対する防御機構を維持することができると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、敗血症による死亡や合併症は「過剰な」炎症性サイトカインによる臓器障害と「過剰な」抗炎症性サイトカインによる免疫不全にあるとの仮説に基づく、炎症性サイトカイン拮抗薬が有効性を否定されたことに対し、吸着の原理による血液浄化では「過剰な」サイトカインの補正が可能であり、単一のサイトカインを著減させるのではなく、各種サイトカインのバランス補正を行うことで敗血症の予後改善を企図している。

当施設ではラット敗血症モデルおよび超小型血液浄化器を使用したラット血液浄化モデルを既に構築している。今回の研究では、複数種類の炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインの出現の順番とピークを探求する。複数のサイトカインについて網羅的かつ経時的に測定し、これらのバランスの変動を数日単位で明らかにする。はじめに、長期間に敗血症状態が遷延した「敗血症集中治療モデルラット」を完成させ、このモデルによりサイトカインバランスの経時変化を明らかにする。サイトカインの変動のみならず、長期に敗血症に罹患したことにより実際に臓器障害を生じうるかを組織学的に評価する。サイトカインのピークに応じた血液浄化器の選択により生存率の改善及び臓器障害の抑制を図ることができると検討をする。



3. 研究の方法

(1) 敗血症治療モデルラットの作成

これまで当施設では、ラットに LPS を投与し擬似敗血症状態とし気管切開による呼吸器管理、内頸動脈からの動脈圧ラインモニター、ケタミンによる鎮痛とプロポフォールにて鎮静を行うことで敗血症モデルを構築し検討を行ってきた。最初に従来のモデルを用いてサイトカイン変動の確認を試み、想定する炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインの変動が得られる LPS 投与量及び観察期間を検討する。サイトカインは半定量アレイ等を用いて複数種類のサイトカインを網羅的に解析する。得られた各種サイトカインのバランスをレーダーチャートにより評価し、敗血症の罹患期間に応じ、相対的に優位となるサイトカインを選別する。数日の敗血症期間を経たラットは、観察終了後に剖検し臓器障害の有無を組織学的に評価する。

(2) 選択されたサイトカインに対する各種膜素材毎の吸着性能の評価

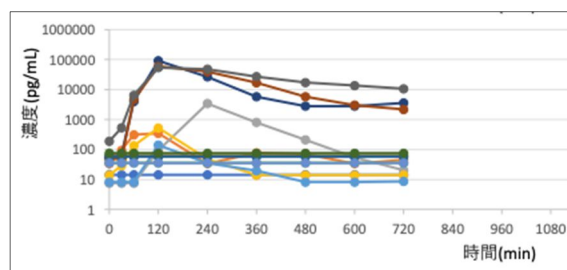
(1)の検討により判明したサイトカインプロファイルにおいて、敗血症の期間毎に相対的に優位となるサイトカインを選択し、各種血液浄化器の膜素材毎の吸着性能の違いを検討する。

(3) 任意のサイトカインを吸着することによる治療効果の判定

(1)により得られた敗血症の罹患期間毎のサイトカインバランスにおいて最も優位となるサイトカインを、(2)で検討した最も吸着性能の優れた血液浄化器を用いて血液浄化を行う。ラットの生存率並びに(1)で確認された臓器障害の抑制への有効性を検討する。

4. 研究成果

従来の敗血症モデルにLPSを単回投与後、120分までに各種サイトカインはピークを認めその後6時間までに低下傾向を認めた。炎症性および抗炎症性のサイトカインいずれも同様の時間経過にて上昇から低下を呈した。24時間以内の観察期間において、実験中の血圧低下をきたし複数匹の死が起こった。生存する個体の24時間時点でのサイトカインはごく一部のサイトカインが少量残存するのみであり、多くのサイトカインがすでに消失していることが確認された。鎮静にプロポフォールを使用した。十分な鎮静には投与量を増量せざるを得ず、血圧低下の増悪因子となった。また投与が長時間におよび、過剰な容量負荷および血清の白濁が確認された。生存例においては飲水をする形跡がなく脱水が懸念された。



以上の結果より、従来の敗血症モデルは、投与の数時間以内に循環不全による死がある程度の頻度で生ずる一方で、循環不全を脱した生存個体ではサイトカインの変動から見て敗血症状態からの回復することが判明した。このモデルは短期間に進行する敗血症性ショックの病態をより強く反映するものであり、本研究で求める長期の敗血症状態の遷延をモデル化するため以下の変更を行なった。

小型麻酔器を導入し鎮静の方法を propofol から sevoflurane に変更する
LPS 投与量を従来より大きく減量する
体重変化に応じた補液をする

により血圧の低下をきたさずに十分な鎮静を得ることができ、また補液量の調節が容易となった。サイトカイン変動について propofol と sevoflurane の麻酔方法の違いによる有意な違いは認めなかった。では従来の投与量より大幅に LPS 投与を減じてサイトカイン出現パターンを検討したが、投与より数時間での各種サイトカインの変動は LPS 投与量毎に大きな違いは認めず、少量の LPS でもサイトカインの放出刺激としては十分であると確認した。循環動態は少量 LPS 投与では変動が少なく、循環不全による死を回避しかつ長期間の敗血症状態を再現するため、少量の LPS を間欠的に持続投与とした。少量の LPS 投与であっても 24 時間毎の体重測定では 3-5% の体重減少が確認され、LPS 間欠的持続投与と合わせ体重減少分の補液 () を行なった。

上記の変更により 1 週間程度の敗血症状態での生存が可能となった。現在、再現性の確認のため敗血症の病日毎に数時間毎のサンプリングを行い、数日間でのサイトカインプロファイルの完成を試みている。循環動態は血圧並びに動脈血液ガス分析により評価しているが、致命的な循環不全を回避したまま敗血症状態が維持できていることが確認されている。組織学的な評価では臓器障害を示唆する所見が確認され、現行のモデルが長期間の敗血症状態をよく反映するものであると考えている。

実験系の安定に時間を要したが、サンプリングは順調であり、近日中に検討結果を報告できると考えている。ここで得られたプロファイルを元に血液浄化導入によるサイトカインバランスの是正を試みる。現行のモデルで既に臓器障害の合併が再現できており、血液浄化によるサイトカインバランスの是正により臓器障害の回避が証明できれば、敗血症治療における新規の治療戦略となりうると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------