

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462843

研究課題名(和文) 衝撃波に起因するびまん性肺出血の病態解明と止血制御対策

研究課題名(英文) The Novel Hemostatic and Tissue Protective Treatment Elucidating the Pathophysiology of Blast Lung Injury

研究代表者

萩沢 康介 (HAGISAWA, KOHSUKE)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・助教)

研究者番号：50539244

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)：爆発等の衝撃波による外傷では致死性の肺出血を合併することが多い。今回、ヒトのBlast Lung Injuryの病像に近似した致死性肺出血マウスモデルを用いて、血小板代替物であるH12-ADP-liposome投与による救命効果について検討したところ、H12-ADP-liposomeは、衝撃波による致死性の肺出血の救命に有用である可能性が示唆され、その機序は止血効果とともに内封されたADPがアデノシンに代謝されて臓器保護効果を発揮することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Fibrinogen gamma-chain (HHLGGAKQAGDV, H12)-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes [H12-(ADP)-liposomes] can accumulate at bleeding sites where they release ADP that is rapidly metabolized to adenosine, which has tissue-protective effects. We investigated the efficacy of H12-(ADP)-liposomes to treat blast lung injury, with a focus on adenosine signaling. Pretreatment as well as post-treatment with H12-(ADP)-liposomes significantly increased mouse survivals and mitigated pulmonary tissue damage/hemorrhage and neutrophil accumulation after LISW exposure. Pretreatment with H12-(ADP)-liposomes reduced albumin and macrophage inflammatory protein-2 levels in bronchoalveolar lavage fluid. Although H12-(ADP)-liposome pretreatment did not affect blood coagulation activity in the injured mice, its beneficial effect on blast lung injury were significantly abrogated by adenosine receptor A2A or A2B antagonism, suggesting that adenosine signaling improved lung injury.

研究分野：生理学、循環器内科学

キーワード：Blast Lung Injury 止血凝固作用 アデノシン作用 レーザー誘起衝撃波 ドラッグデリバリシステム

1. 研究開始当初の背景

9.11 自爆テロ以降の世界各地の紛争・事件が示すように、軍事衝突はもちろん、市民生活の領域でも爆発物等による多発外傷への対処は喫緊の課題となっている。そのような多発外傷患者の管理で問題となるのは体腔内臓器出血である。出血部位によっては圧迫止血等の処置が困難であり、出血が遷延すると致命的になることも多い。一般的に胸部外傷では全体の35%に血胸を合併し、その手術所見から肺挫傷や横隔膜損傷が出血原因であると報告されている(1)。非開放性のBlunt Injuryでは手術例の30%弱に血胸を生じ、その10%が失血死したとの報告がある(2)。Blunt Injuryは非開放性で出血量の判定が容易でなく、緊急手術のタイミングが遅れがちになることが相対的に高い死亡率につながっているとされる。一方、Cohn SMらが報告(下図「PC」部位)しているようにBlunt Injury例ではびまん性肺出血を生じていることが多く、初期症状が軽く対処が遅れると数日で呼吸不全に陥ることもある(3)。

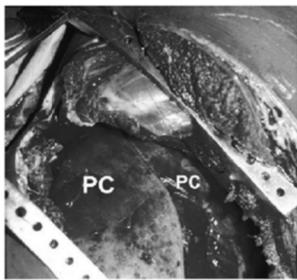


Fig. 1 Gross anatomic picture of left hemithorax during emergency thoracotomy. Pulmonary contusion (PC) noted involving multiple lobes of the lung.

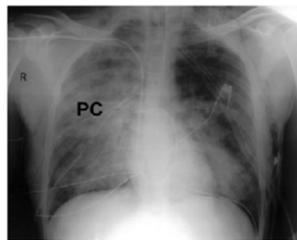
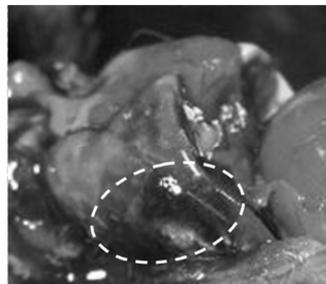
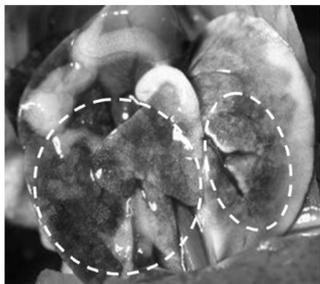


Fig. 2 Chest radiograph demonstrating large pulmonary contusion (PC) involving right lung.

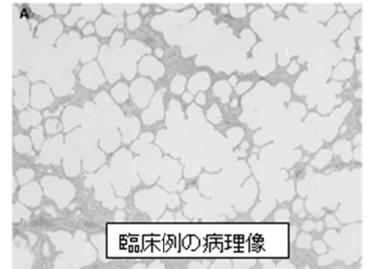
Stephen M. Cohn World J Surg (2010) 34:1959-1970

爆発により生じる衝撃波エネルギーは飛散する破片などの要素を取り除いたとしても、短時間に数十キロパスカルまで上昇し、管腔臓器を破壊(Blast Injury)することは容易に想像されるが、爆薬等で衝撃波を実験室で再現することは危険であり困難なため、正確な病態生理はこれまでのところ未解明であった。



これに対して申請者らは上写真円内で示されるようなびまん性の肺出血を呈するレーザー誘起衝撃波による肺損傷動物モデルを作成している(4)。本モデルの病理組織像(左図)は、Tsokos M

らが報告した爆発外傷の臨床例(5)(右図)と同様に肺胞が過伸展・破綻し、肺胞内に出血像を呈している点で相似している。また全身



管理をしないと数時間以内に死亡することから、本モデルはBlunt-Blast Injuryの重症例を再現していると考えられる。

本研究では、上記モデルを利用して、現在に至るまで特異的な治療法が確立していないBlast Lung Injuryに対して、病態生理に基づいた新しい治療のアプローチを考案した。

Blast Lung Injuryの病態生理は、いくつかの急性肺傷害の病態が複合している。肺胞壁の機械的過進展という点では、人工呼吸による肺損傷(VILI)に類似している。また低酸素症/低血圧の遷延に関しては、虚血再灌流傷害モデルに類似している。これらに共通するのは肺胞への出血と滲出液・炎症細胞の浸潤である。その病態制御に、内因性アデノシン産生とアデノシン受容体活性が重要であることがわかってきた。

我々は人工血小板としてH12-ADP-liposome(平均径210nm)を開発してきた。これは血小板が凝集するために不可欠な血小板膜糖タンパクのIIb/IIIa複合体をターゲットに、フィブリノゲン γ 鎖カルボキシル末端にある12個のペプチド(HHLGGAKQAGDV配列:H12)をリポソーム膜の表面に組み込むとともに、リポソーム内部にアデノシン5'-リン酸(ADP)を含有させている(6)。H12-ADP-liposomeは出血局所において血小板同士の凝集を補強するとともに内封していたADPを放出する。H12-ADP-liposome(20mg/kg)の投与で致死的な低血小板性凝固障害の止血凝固能を回復させ救命が可能になった(7)。このADPは、P2Y受容体を介した血小板凝集促進作用だけではなく、アデノシンに代謝され臓器保護に作用すると考えられる。そこでH12-ADP-liposome投与がBlast Lung Injuryの新しい治療法につながるものと考えた。

2. 研究の目的

本研究はヒトのBlast Lung Injuryの病像に近似した致死性マウス肺出血モデルを用いて、H12-ADP-liposomeによるBlast Lung Injuryの低減・救命効果を検証するとともに、そのメカニズム解明を目的とした。

3. 研究の方法

防衛医科大学校動物実験倫理委員会による承認を受け、

C57BL/6マウス(25 + 2g)を使用した。

レーザー誘起衝撃波 (LISW) 装置

波長694nmのQスイッチ・ルビーレーザーをターゲット (天然ゴム：厚さ0.5mm + アクリル板：直径12mm・厚さ1mm) に単発照射し、プラズマ現象による衝撃波を形成した(4)。

LISW強度によるBlast Lung Injuryの死亡閾値

マウスを剃毛後、腹臥位に固定した (図1)。レーザー装置をマウス右側背より密着させたうえでLISWを右肺全体に照射し、Blast Lung Injuryを作成した。6J、6.5J、7J、7.5J、8J、8.5J(n=3ずつ)、9J(n=2)のLISW照射後、気道閉塞による窒息死を防止する体位をとりながら、60分間呼吸状態等を観察し、回復後は飼育ケージに戻した。



H12-ADP-liposome投与による救命効果

〔 H12-ADP-liposome による予防効果の検討 〕

H12-ADP-liposome (n=14)、ADP-liposome (n=10)、PBS-liposome (n=10)、H12-PBS-liposome (n=13)を120μl尾静脈から投与した。その後、LISW 8Jを右肺に照射し、気道閉塞による窒息死を防止する体位をとりながら、60分間呼吸状態等を観察し、回復後は飼育ケージに戻した。

〔 H12-ADP-liposome による治療効果の検討 〕

LISW 8Jを右肺に照射し、直ちにH12-ADP-liposome (n=12)またはH12-PBS-liposome (n=12) を120μl尾静脈から投与した。気道閉塞による窒息死を防止する体位をとりながら、60分間呼吸状態等を観察し、回復後は飼育ケージに戻した。

H12-ADP-liposome投与による臓器保護のメカニズム解明

LISWの1時間前に、A2A受容体拮抗薬 (ZM241385) 10mg/kgをマウスに皮下注射した(n=6)。同様に A2B受容体拮抗薬 (PSB 1115) 10mg/kgをマウスの腹腔内に注入した(n=6)。その後、H12-ADP-liposome 120μlを尾静脈から投与し、LISW 8Jを右肺に照射した。気道閉塞による窒息死を防止する体位をとりながら、60分間呼吸状態等を観察し、回復後は飼育ケージに戻した。

Sonoclot®による血液凝固評価と血算測定

H12-ADP-liposome、ADP-liposome、PBS-liposome、H12-PBS-liposome 120μlを尾静脈から投与した(n=2ずつ)。その5分後に腹部大動脈から採血した。H12-ADP-liposome (n=6)、ADP-liposome (n=5)、PBS-liposome (n=5)、H12-PBS-liposome (n=6)を120μl、

尾静脈から投与した。5分後にLISW 8Jを照射して直ちに腹部大動脈から採血した。

いずれのサンプルも血算測定とともに、Sonoclot® (Sienco, CO) を使用し、凝集から凝固開始までの時間を反映する clotting time (CT)と凝固の完成を示す clotting rate (CR)を測定し、止血凝固能を総合的に評価した(7)。

病理組織学的検討

H12-ADP-liposome、H12-PBS-liposomeを120μl尾静脈から投与した(n=5ずつ)。5分後にLISW 8Jを照射。3時間後にマウスの肺、心臓、肝臓、脾臓および腎臓を病理学検査用に採取した。但しH12-PBS-liposome投与群は観察中死亡した場合、ただちに検体を採取。HE染色を行って、定量評価としてYelvertonsらのPathological injuryスコア(8)を修正して、使用した。

Pathological injuryスコア = (E + G + ST)*(SD) 64点満点

- Extent：肺の受傷面積として、いくつの肺葉に損傷が及んでいるか (1~7点)
- Grade：病変の重症度として、各肺葉の何割が受傷しているか (1~4点)
- Severity Type：出血や損傷の重症度として、損傷は散在性が融合性であるか (1~5点)
- Severity Depth/Disruption：深度として、損傷は胸膜・実質まで及んでいるか (1~4点)

電子顕微鏡による観察

H12-ADP-liposome、H12-PBS-liposomeを120μl尾静脈から投与した(n=2ずつ)。LISWの24時間後に採取した。但しH12-PBS-liposome投与群は観察中死亡した場合、その時点で検体を採取した。

気管支肺胞洗浄液 (BALF) 分析

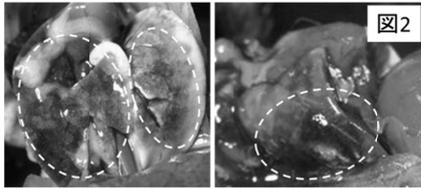
H12-ADP-liposome (n=6)、ADP-liposome (n=3)、PBS-liposome (n=3)、生理食塩水(n=4)、H12-ADP-liposome + ZM241385 (n=4)、H12-ADP-liposome + PSB 1115 (n=3)、前述のとおりそれぞれの薬物を投与してからLISW 8Jを右肺に照射し、3時間後にマウスからBALFを採取した。BALF中アルブミン濃度はBradford法 (Bio Rad)で測定した。BALF中のTNF-αおよびMIP-2濃度はELISA法(R&D Systems)で定量した。

統計解析

生存率はWilcoxon signed rank testによって比較した。2群間の統計はStudent's t testを使用した。他はANOVAを使用し、Bonferroni post-hoc testを行った。いずれもp<0.05を統計的有意とした。

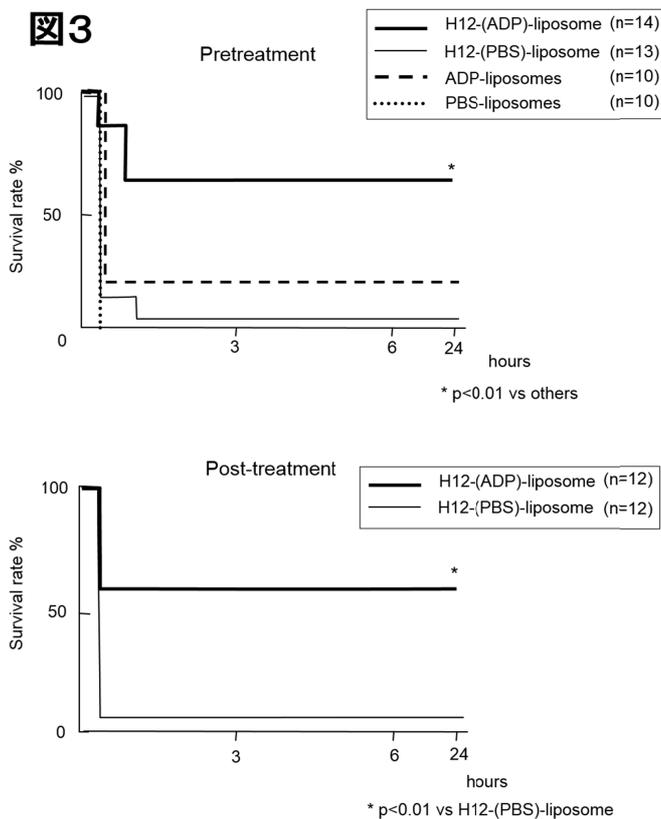
4. 研究成果

胸部X線はBlast Lung Injury 出血により右肺に浸潤影を示した。肉眼的にはびまん性の出血が右葉および左肺門部に生じた(図2 破線円内)。



融合性の出血が、右肺下葉に生じた。LISW 強度による死亡閾値の検討では、8J 以上で鼻出血(喀血)ありのものは全て1時間以内に死亡した。よって以後の生存率の検討では鼻出血(喀血)のない場合を除外した。

図3



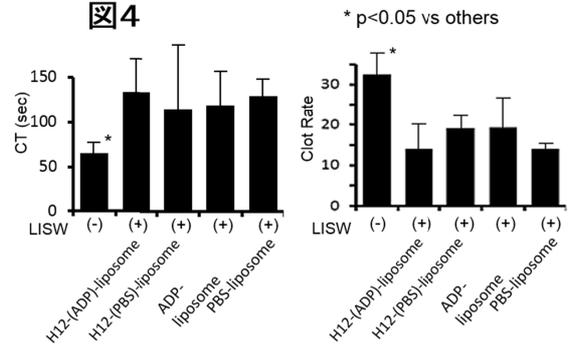
生存率比較

図3に示すように、24時間後の生存率は予防的にH12-ADP-liposomeを投与した群が他群に比して有意に生存率が高かった。H12-ADP-liposome (9/14)、ADP-liposome (2/10)、PBS-liposome (0/10)、H12-PBS-liposome (1/13)であった。またアデノシン受容体拮抗薬は、H12-ADP-liposomeによる救命効果を阻害した。(ZM241385: 0/6, PSB1115: 1/6) 治療的な後投与でもH12-ADP-liposome群がH12-PBS-liposome群に比して有意に生存率が高かった。

Sonoclot[®]による血液凝固評価と血算

LISW (-)すなわちBlast Lung Injuryなしでは、H12-ADP-liposome、ADP-liposome、PBS-liposome、H12-PBS-liposomeのいずれを投与した場合でもSonoclot[®]

図4

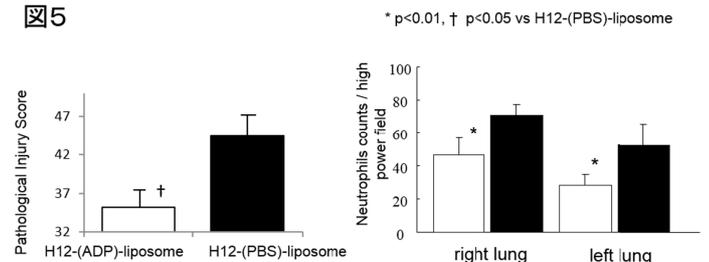


波形に相違はなく、CTやCRは対照群と変化なかった。LISWによるBlast Lung Injuryありでは、H12-ADP-liposome、ADP-liposome、PBS-liposome、H12-PBS-liposomeのいずれを投与した場合でも同様にCTが2倍に延長しCRは半減した(図4)。血小板数も半減した。

病理組織所見

肺以外の心臓、肝臓、脾臓および腎臓には血栓症等の異常所見はなかった。肉眼所見としては、どちらの群でも右肺には融合性の出血が生じた。左肺では、H12-PBS-liposome群で融合性出血が生じた一方で、H12-ADP-liposome投与群では、軽度の散在性出血が見られるに過ぎなかった。Pathological injuryスコアはH12-ADP-liposome投与群がH12-PBS-liposome群に対して有意に軽減していた(図5左)。さらに、肺胞における1視野あたりの好中球数についても、H12-ADP-liposome投与群がH12-PBS-liposome群に対して有意に軽減していた(図5右)。

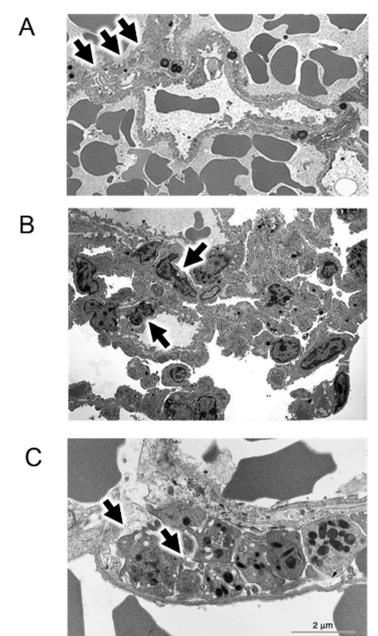
図5



電子顕微鏡所見

肺胞壁の毛細血管の変形・破断とともに肺胞内に赤血球が漏出していた(図6A)。好中球浸潤も認められた(図6B)。H12-ADP-liposome投与群では毛細血管内で血小板と結合するH12-ADP-liposome像が認められた(図6C)。

図6



BALF分析

LISW照射3時間後の

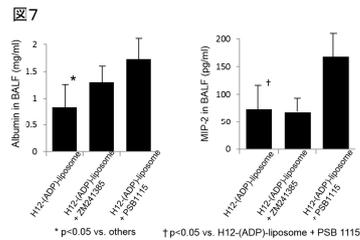
	LISW (-) (n=6)	Normal saline (n=4)	H12-ADP-liposomes (n=6)	ADP-liposomes (n=3)	PBS-liposomes (n=3)
BALF at 3 h					
Albumin (g/L)	not detectable	1.3 ± 0.3	0.8 ± 0.3 ‡	1.2 ± 0.5	1.3 ± 0.6
TNF-α (ng/mL)	not detectable	1.1 ± 0.3 †	0.3 ± 0.1 *	0.4 ± 0.2	0.7 ± 0.1
MIP-2 (pg/mL)	not detectable	355 ± 148 ‡ †	74 ± 34	124 ± 43	141 ± 52

To examine albumin, TNF and MIP-2 levels, BALF was obtained from mice 3 h after LISW exposure. Data are mean ± SD, ‡ p < 0.05 vs Normal saline, PBS-liposomes, * p < 0.05 vs PBS-liposomes, † p < 0.05 vs others, ** p < 0.01 vs others.

BALF中のアルブミン漏出はH12-ADP-liposome 投与群においてのみ有意に減少していた。さらにH12-ADP-liposome 投与は、BALF中のTNF-α

とMIP-2の過剰発現を有意に軽減した。(上表) いっぽうアデノシンA2A 受容体拮抗薬は、

H12-ADP-liposome 投与によるBALF中のTNF-α減少効果を有意に阻害し、アデノシンA2B受容体拮抗薬はH12-ADP-liposome 投与によるBALF中のMIP-2の減少効果を有意に阻害した(図7)。



このようにLISW衝撃波による致死性肺出血マウスにおいて、H12-ADP-liposomeは肺出血を軽減し、生存率を増加させた。その作用機序は以下のように説明しうる。

病理学的には肺胞壁の伸展と毛細血管の破壊に伴う肺胞出血の所見は、Tsokosらによって報告されたヒトのBlast Lung Injuryの病理所見(9)と合致した。YelvertonsらはPathological injuryスコア36点以上を重症肺傷害と定義している[8]が、今回H12-ADP-liposome投与により、36点以下に軽減できており、生命予後を改善したと合致している。LISW照射側の右肺はH12-ADP-liposome群でも生理食塩水投与群と同様に、融合性の出血が臓器の深部に亘り、所見に差異はない。むしろ非照射側である左肺の出血が限局されたことが予後の改善につながっていると推察される。これはLISWの衝撃波は経気道的に反対側の肺胞を傷害すると同時に、照射側肺の肺胞マクロファージから放出された炎症性サイトカインが反対側の肺胞上皮、毛細血管に作用することをH12-ADP-liposomeが抑制しているものと考えられた。すなわち、H12-ADP-liposomeは本来の止血作用とともに、局所で放出されるADPが病変部で代謝されアデノシン作用を示すものと考えられる。一般に、生理学的濃度でアデノシンはA1、A2AおよびA3受容体を活性化する。対照的に、アデノシンA2B受容体は高濃度のアデノシンで作用すると考えられている(10)。出血性ショックではアデノシンは病変局所で細胞外に放出される。特に低酸素病態を伴う場合にアデノシンA2B受容体作用が活性化することが報告されている(11)。

今回、アデノシン受容体拮抗薬を使った薬理的検討では、Blast Lung Injuryによる好中球誘導性ケモカインである

MIP-2放出亢進と好中球の遊走浸潤をH12-ADP-liposome 投与がA2B受容体を介して抑制し、急性期の予後の改善につながっていたことが示唆された。このBlast Lung Injury モデルでは急性肺傷害の病態が複合している。肺胞壁の機械的過進展に関しては、人工呼吸による肺外傷(VILI)に類似し、また低酸素症/低血圧の遷延に関しては、虚血再灌流傷害モデルに類似している。VILIに関しては、Eckleらが肺胞・毛細血管バリアの欠損が肺のA2B受容体を介して減じられると報告した(12)。さらに、A2B受容体作動薬はVILIによる毛細血管から肺胞へのvascular leakを軽減することに寄与し、ある種の「肺利尿」効果を示し、肺胞クリアランスが改善して臓器保護につながっていると述べている[12]。さらにEckleらは低酸素換気モデルで生じる肺胞への好中球の遊走浸潤がA2B受容体を介して抑制されることも報告している(11)。

Haskóらは、A2A受容体を介するアデノシンの外傷/出血性ショック軽減効果を報告している(13)。一般的にもA2A受容体を介したアデノシンの抗炎症効果の報告が多い。しかしながら、本研究におけるA2A受容体を介したアデノシンの役割は不明な点が残っている。血漿中のアデノシンの半減期が非常に短い(1-2秒)ことが、外因性に投与したアデノシンの実験結果の解釈を難しくしている。今後さらなる検討が必要である。

<引用文献>

1. Inter Cardiovasc Thorac Surg 2009 9:450-53.
2. Arch Surg 2001 136:513-18.
3. World J Surg. 2010 34:1959-70.
4. Lasers Surg Med. 2010 42:313-8.
5. Am J Respir Crit Care Med 2003;549-555.
6. J Thromb Haemost. 2009; 7: 470-7.
7. J Thromb Haemost. 2012;10:2137-48.
8. J Trauma. 1996 Mar;40(3 Suppl):S111-5.
9. Am J Respir Crit Care Med. 2003 Sep 1;168(5):549-55.
10. Cell Death Differ. 2007 14, 1315-1323.
11. Blood. 2008 Feb 15;111(4):2024-35.
12. J Clin Invest. 2008;118:3301-15.
13. Crit Care Med. 2006 Apr;34(4):1119-25.

5. 主な論文発表等

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Hagisawa K, Kinoshita M, Miyawaki H, Sato S, Miyazaki H, Takeoka S, Suzuki H, Iwaya K, Seki S, Shono S Saitoh.

D, Handa M. Fibrinogen γ -Chain Peptide-Coated Adenosine 5' Diphosphate-Encapsulated Liposomes Rescue Mice from Lethal Blast Lung Injury via Adenosine Signaling. *Critical Care Medicine* 2016 Apr 6. [Epub ahead of print] 査読有

- Miyawaki H, Saitoh D, Hagiwara K, Noguchi M, Sato S, Kinoshita M, Miyazaki H, Satoh Y, Harada N, Sakamoto T. Noradrenalin Effectively Rescues Mice from Blast Lung Injury Caused by Laser-induced Shock Waves. *Intensive Care Medicine Experimental*. 2015 Dec;3(1):32. doi: 10.1186/s40635-015-0069-7. 査読有
- Hagiwara K, Nishikawa K, Yanagawa R, Kinoshita M, Doi M, Suzuki H, Iwaya K, Saitoh D, Seki S, Takeoka S, Handa M, Nishida Y. Treatment with fibrinogen γ -chain peptide-coated, ADP-encapsulated liposomes as an infusible haemostatic agent against active liver bleeding in acute thrombocytopenic rabbits. *Transfusion*. 2015; 55(2):314-325. 査読有
- 萩沢康介、木下学、宮脇博基、佐藤俊一、鈴木英紀、土井麻美、武岡真司、小野聡、斎藤大蔵、西田育弘 「衝撃波による致死的肺出血マウスに対する人工血小板 (H12-ADP-liposome) の救命効果」 *Shock* (日本ショック学会雑誌) 2015;30: 1-8 査読有

[学会発表](計5件)

- 萩沢康介、木下学、宮脇博基、佐藤俊一、鈴木英紀、多喜川真人、武岡真司、斎藤大蔵、西田育弘 「レーザー衝撃波による肺出血に対する H12-ADP-liposome の救命効果」 第22回日本血液代替物学会シンポジウム・人工血小板の新しい展開に向けて 平成27年10月23日 熊本 人工血液 23巻1号 P30
- Hagiwara K, Kinoshita M, Miyawaki H, Miyazaki H. Fibrinogen γ -chain peptide-coated, Adenosine Diphosphate-encapsulated Liposomes Rescue Mice from Lethal Blast Lung Injury. 38th Annual Conference on Shock, 平成27年6月7日 Denver, CO *Shock* 2015; 130: A19
- Hagiwara K, Kinoshita M, Miyawaki H. Fibrinogen γ -chain peptide-coated, Adenosine Diphosphate-encapsulated Liposomes Rescue Lethal Blast Lung Injury Hemorrhage via Purinergic Signaling. American Heart Association 2014 Resuscitation Science Symposium, (Young Investigator Award 受賞) 平成26年11月16日

Chicago IL, final program p.40 *Circulation* 2014; 130:

A19

- 萩沢康介、木下学、宮脇博基、佐藤俊一、鈴木英紀、土井麻美、武岡真司、小野聡、斎藤大蔵、西田育弘 「衝撃波による致死的肺出血マウスに対する人工血小板 (H12-ADP-liposome) の救命効果」 第29回日本ショック学会 平成26年5月17日 松山 (学会長賞受賞)
- 萩沢康介、木下学、宮脇博基、佐藤俊一、鈴木英紀、土井麻美、武岡真司、斎藤大蔵、西田育弘 「H12-ADP-liposome の新たな適応: 衝撃波による肺出血マウスに対する H12-ADP-liposome の救命効果」 第20回日本血液代替物学会シンポジウム 人工血小板 / H12-(ADP)リポソームの前臨床 平成25年12月6日 奈良 人工血液 21巻1号 P25

6. 研究組織

(1)研究代表者

萩沢 康介 (HAGISAWA, Kohsuke)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・助教
研究者番号: 25462843

(2)研究分担者

木下 学 (KINOSHITA, Manabu)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授
研究者番号: 70531391
佐藤 俊一 (SATO, Shunichi)
防衛医科大学校・防衛医学研究センター・准教授
研究者番号: 90502906
鈴木 英紀 (SUZUKI, Hidenori)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 30158977

(3)連携研究者

武岡 真司 (TAKEOKA, Shinji)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号: 20222094
斎藤 大蔵 (SAITOH, Daizoh)
防衛医科大学校・防衛医学研究センター・教授
研究者番号: 90531632
半田 誠 (HANDA, Makoto)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 40129614