

糞便懸濁液投与方法を用いた早産児マウス敗血症 モデルの作成と臨床課題への応用

藤岡 一路

神戸大学医学部附属病院総合周産期母子医療センター小児科

The current status of application of preterm sepsis mouse model to elucidate the clinical questions

Kazumichi Fujioka

Department of Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine

Abstract

Recently, a cecal slurry (CS) method was established by Wynn JL, in which a fecal suspension (CS) was prepared from contents of the appendix of adult mice and intraperitoneally administered to the subject mice. In addition, by creating and storing a large amount of CS preservation solution at once following the method reported by Starr ME, the experimental reproducibility of CS model has been improved.

We have applied these techniques to 4-day old newborn mice and created preterm sepsis mouse model. We believe that CS model is the best solution for modeling neonatal sepsis in the condition comparing between same-age newborn pups. In this paper, the current status of our application of this model to elucidate clinical questions will be outlined.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 16~21, 2020

Key words : 早産児, 敗血症, 新生児敗血症, モデルマウス, 敗血症モデル, Cecal Slurry (CS)

はじめに

新生児敗血症は、全身性の細菌感染と続発する多臓器不全を本態とする予後不良疾患である。その病態は、感染侵襲への免疫応答の破綻を主とし、生後に獲得する獲得免疫のみならず、先天的に備わった自然免疫まで未熟な早産児においては、高い致死率・後遺症発症率を認める。一方、新生児敗血症の治療としては、いまだ抗菌薬を中心とした支持療法が主体であり、この致命的感染症の新規治療法の開発は喫緊の課題である¹⁾。しかしながら、治療法開発に欠かせないモデル動物に関しては、生後早期の新生児マウスに対して盲腸結紮穿刺 (Cecal ligation puncture : CLP) モデルを応用することは侵襲性の観点から不可能であり、近年まで早産児敗血症の病態を模するマウスモデルは確立されていなかった²⁾。

著者は、2013~2016年にかけて新生児黄疸の新規治療法の開発を研究テーマとして、米国スタンフォード大学の David Stevenson 研究室に留学したが、その期間を通

じて日齢3~7の新生児マウスに対し、薬剤を腹腔内、皮下、胃内などさまざまな経路で投与する実験に従事した。当初の研究課題である「ヘムオキシゲナーゼ (HO) 制御を介したビリルビン産生抑制」に関しては、ZnPP-Lipid という薬剤が、内服可能な、副作用の乏しい、短時間作用型の HO 阻害薬であり、新生児黄疸治療薬として有望であることを明らかにすることができた³⁾。しかしながら、アフリカなど途上国と異なり、日本では新生児黄疸は通常の新生児集中治療および LED 機器を用いた光線療法により治療可能な疾患であり⁴⁾、臨床的有用性の観点からは当該研究の意義を見出しづらい状況であった。そのような最中の2014年末に、2007年に James Wynn らが発表した糞便懸濁液投与方法による敗血症モデルマウス作成に関する論文を偶然目にする機会があった。これは、成獣マウスから摘出した虫垂内容物から糞便懸濁液 (Cecal Slurry : CS) を作成し、腹腔内投与することで腹膜炎性敗血症を誘導するモデルであり、5~7日齢の新生児マウスにおける新生児敗血症モデルの作成

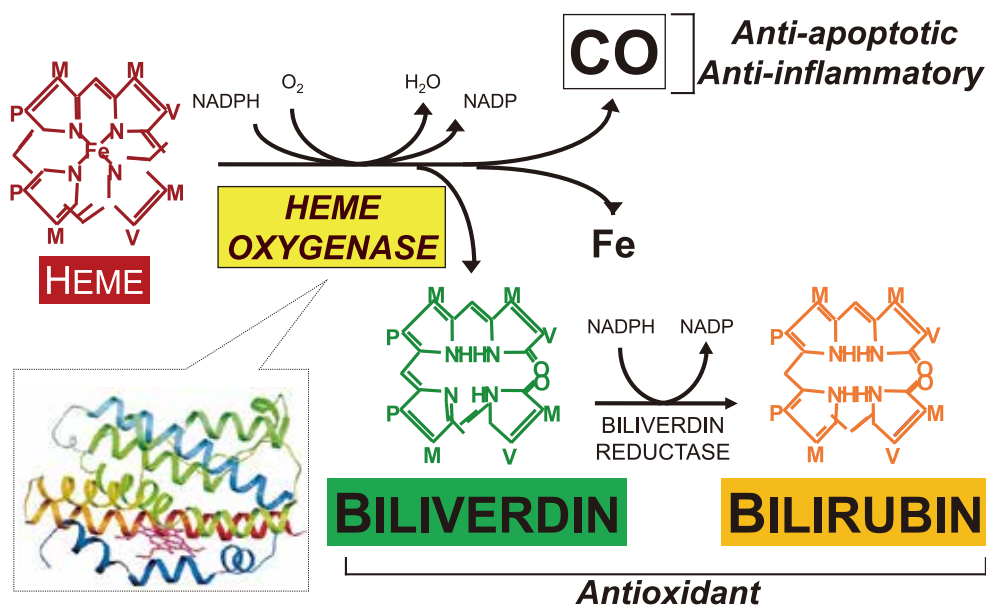


図1 Heme代謝経路とHeme Oxygenaseの働き

が報告されていた⁵⁾。そこで、本法に加えて自らの慣れ親しんだ新生仔マウスへの注射手技を応用すれば、より幼弱な早産児相当のマウス(日齢3~4)においても敗血症モデルが作成できるのではないかと考えた。さらに幸運なことに、ちょうど同時期の2014年12月に、Hiroshi Saitoらのグループによって新たなCS保存法が報告され、長期間(~6カ月)のCS冷凍保存が可能となった⁶⁾。以上の経緯により、CS法を用いた早産児マウス敗血症モデルの確立に至った。本モデルの作成方法に関しては、過去に複数の総説で解説済みであるため詳細は別稿に譲る^{7~9)}。

1. 早産児マウス敗血症モデルにおけるHeme Oxygenase-1誘導療法の保護効果

前述の新生児黄疸治療の開発研究において、3日齢の新生仔マウスにHemeを皮下投与して作成する新生児溶血性黄疸モデルマウスを用いていたが、Hemeによって誘導されるHeme代謝の律速段階酵素であるHOの誘導型アイソフォームであるHO-1は、ストレス応答蛋白であり、ストレス環境下において多様な組織保護作用を発揮することが知られていた(図1)¹⁰⁾。また、新生児慢性肺疾患、新生児壊死性腸炎などの動物モデルにおいては、HO-1の保護効果がすでに報告されていた¹¹⁾。一方、早産児敗血症におけるHO-1の働きに関する報告は認めなかったため、本敗血症モデルに対する薬物治療実験の手始めとして、Hemeを用いたHO-1誘導の敗血症保護効果を検討することにした。

方法は、HO-1誘導薬であるHeme(30 μmol/kg)またはVehicle(Veh)を、3日齢の野生型マウスに皮下投与し、24時間後(4日齢)にCS法により敗血症を誘導

し(H-CS群)、敗血症重症度を敗血症単独群(CS群)と比較検討した(図2)。結果として、Hemeによる薬物的HO-1誘導は、敗血症死亡率を改善させ(図3)、末梢血好中球を増加させ、体重増加率を改善させ、脾臓細菌数を有意に減少させることが明らかになった。また、薬物的HO-1誘導により、敗血症により誘導される炎症性サイトカインおよび免疫関連遺伝子発現を有意に抑制することができた^{9,12)}。またHO-1のヘテロノックアウトマウスを用いた実験を行い、恒常的にHO-1発現の低下している状態においては、敗血症死亡率が増加することも明らかにした¹³⁾。

一方で本研究課題の臨床応用に向けては、HO-1誘導薬として用いたHemeは、体内に過剰蓄積された場合Fenton反応を介してヒドロキシラジカルを産生するため、酸化ストレスの影響が危惧される点など、克服すべき課題が山積していた。

2. 早産児マウス敗血症モデルにおけるヒトリコンビナントトロンボモジュリン(rh-TM)の保護効果

そこで留学から帰国後は、実臨床で使用可能な薬剤や、臨床現場で日常的に経験する病態の研究を行うことを指向した。帰国後、治療候補薬剤の検討を行っていたところ、HO-1の敗血症保護効果にThrombomodulinの発現上昇が関与するとの論文に行き当たり¹⁴⁾、DIC治療薬として臨床応用されていたヒトリコンビナントトロンボモジュリン(rh-TM)を敗血症治療薬として用いるという計画を着想した。幸いなことに旭化成より原末提供の許諾が得られたため、rh-TMを用いた検討を開始することにした。

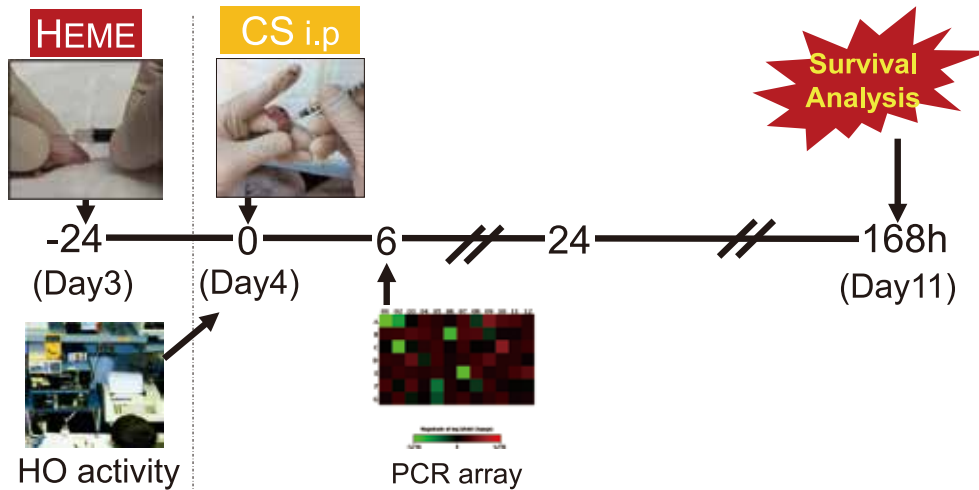


図 2 HO-1 誘導実験のプロトコール

3日齢マウスにHO-1誘導薬のHeme (30 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) を皮下投与した上で、24時間後(4日齢)に敗血症を作成する。

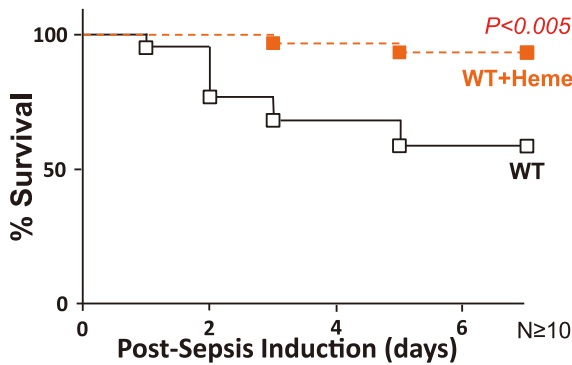


図 3 HO-1 誘導実験の生存曲線 (文献¹²⁾より引用改変)

rh-TM は、抗凝固・抗炎症作用を有し、敗血症治療薬として合目的な薬理作用を有することに加えて、実際に、DICを伴う成人敗血症患者において敗血症死亡率および呼吸機能障害を改善したとの報告がすでに存在した¹⁵⁾。また、成獣敗血症モデルマウスにおいて、rh-TMが炎症性サイトカインおよびHMGB-1産生を抑制し、敗血症死亡率を改善したとの報告もあった¹⁶⁾。そこで、以下の方法で本敗血症モデルに対するrh-TMの保護効果を検討した。

まず、rh-TMの投与経路・タイミングについて検討した。新生仔マウスにおいては静脈ルート確保が困難であることから、皮下投与を選択することとした。旭化成からrh-TMの血中動態シミュレーションデータの提供を受けて、皮下投与における至適投与量・タイミングを検討した結果、既報の動物モデルにおけるrh-TM静注投与と同等の血中濃度を得るためには、皮下投与では3倍量を敗血症誘導6時間前に投与する必要があることがわかった。そこで、4日齢マウスに対して敗血症誘導の6時間前にVehまたはrh-TM 3 mg/kgまたは10 mg/kg

を皮下投与し、CS法により敗血症を誘導し、生存率を比較検討することにした(図4)。結果は、Veh群(21%, $n=11$)と比較してrh-TM 3 mg/kg投与群(53%, $n=17$)では有意に生存率が改善した一方、rh-TM 10 mg/kg群(0%, $n=16$)では有意に生存率が低下した(図5)¹⁷⁾。rh-TM 10 mg/kgで生存率が低下した原因として、外表所見の観察からは死亡個体で多くの腹腔内出血を認め、凝固障害の併発が示唆された。

以上より、臨床的観点からは、rh-TMはヒト早産児の敗血症においても効果が期待されるが、使用にあたっては抗凝固作用への配慮が必要であると思われる。

3. 早産児マウス敗血症モデルにおけるストレス誘導性高血糖に対するインスリン療法

前述の実験において呼吸循環動態の評価目的に敗血症誘導後のマウスの血液ガス分析を行っていたところ、敗血症群において高い再現性をもって著明な高血糖を認めることに気づいた。そこで、本モデルにおいて経時的に血糖測定を行っていくと、敗血症誘導3時間後にピークをとる一過性の高血糖を呈することが明らかとなり、これはヒト敗血症患者におけるストレス誘導性高血糖を反映しているものと考えた(図6)。

ストレス誘導性高血糖は、一般に成人敗血症の合併症として広く認知されている一方¹⁸⁾、新生児とりわけ早産児の敗血症においても著明な高血糖がしばしば経験される¹⁹⁾。しかし、成人の敗血症ガイドラインにおいては高血糖の是正が推奨されているが²⁰⁾、新生児敗血症においてはエビデンスがなく、またヒト早産児に対する厳格な血糖コントロールは低血糖リスクを増加させるとの報告もあり²¹⁾、新生児敗血症に対するインスリン療法の是非は不明であった。そこで、本モデルを用いて早産児敗血

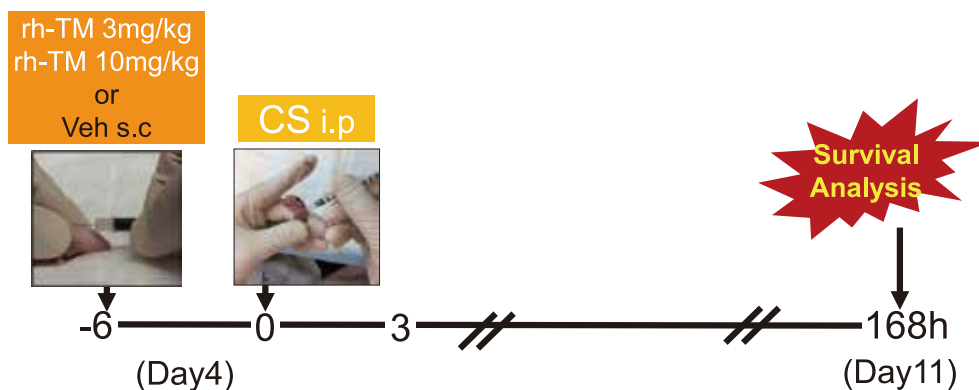


図 4 rh-TM 投与実験のプロトコール

4日齢マウスに rh-TM (3 or 10 mg/kg) または Vehicle を皮下投与した上で、6時間後に敗血症を作成する。

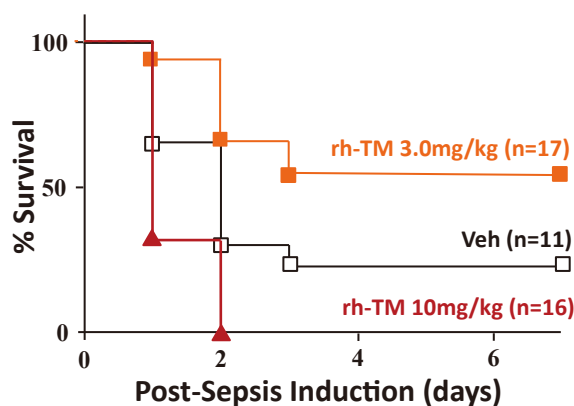


図 5 rh-TM 投与実験の生存曲線(文献¹⁷⁾より引用改変)

症におけるストレス誘導性高血糖に対するインスリン療法の保護効果について検討することを着想した。

まず、4日齢マウスにおいて敗血症誘導3時間後の高血糖を抑制するインスリン量を決定する目的で、超速効型インスリン製剤であるノボラピッドを1~20単位/kgの用量で、敗血症誘導と同時に皮下投与して、3時間後に血糖測定を行った。その結果、敗血症誘導3時間後の血糖値はインスリン投与量依存性に低下を認めた。ただし、インスリン10単位、20単位/kg投与群では明らかな低血糖を認めたため、以降の生存率評価はインスリン1単位、5単位/kgを用いて行うこととした(図7)。

生存率評価の結果は、敗血症単独群の61%と比較して、インスリン1単位/kg投与群では50%と改善なく、インスリン5単位/kg投与群では22%と有意な悪化を認めた(図8)²²⁾。また、インスリン投与後の各群における血糖値推移については、5単位/kg投与群において敗血症誘導6時間後以降に明らかな低血糖傾向を呈し、これが有意な生存率の悪化の原因となったと考察した(表1)。

以上の結果より、臨床的観点からは、早産児における敗血症時の高血糖は、免疫応答や脳活動のエネルギー源

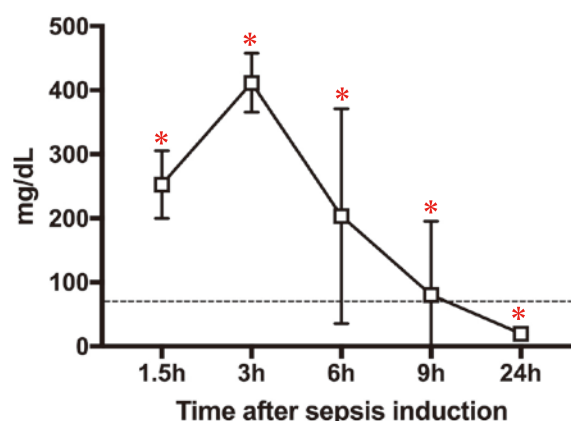


図 6 早産児マウス敗血症モデルの血糖推移(文献²²⁾より引用改変)

* ; P < 0.01, vs control.

として保護的に働いている可能性があり²³⁾、積極的なインスリン治療は不要なのではないかと考えた。

結 語

われわれの確立した早産児マウス敗血症モデルの臨床課題への応用につき、現在までの進捗状況につき概説した。今後も本モデルの活用により、早産児敗血症の病態解明および新規治療法開発の展開に貢献したい。

謝 辞

CS法を用いた敗血症モデルマウスの作成に関して貴重なご助言を頂いたUniversity of Florida, James L. Wynn先生、University of Kentucky, Hiroshi Saito先生、本研究の全般にわたり御指導頂いたStanford University School of Medicine, Ronald J. Wong先生、David K. Stevenson教授に深謝します。また、動物実験の実務を担ってくれた神戸大学小児科の芦名満理子助教、小児外科の宮内玄徳大学院生に感謝しています。

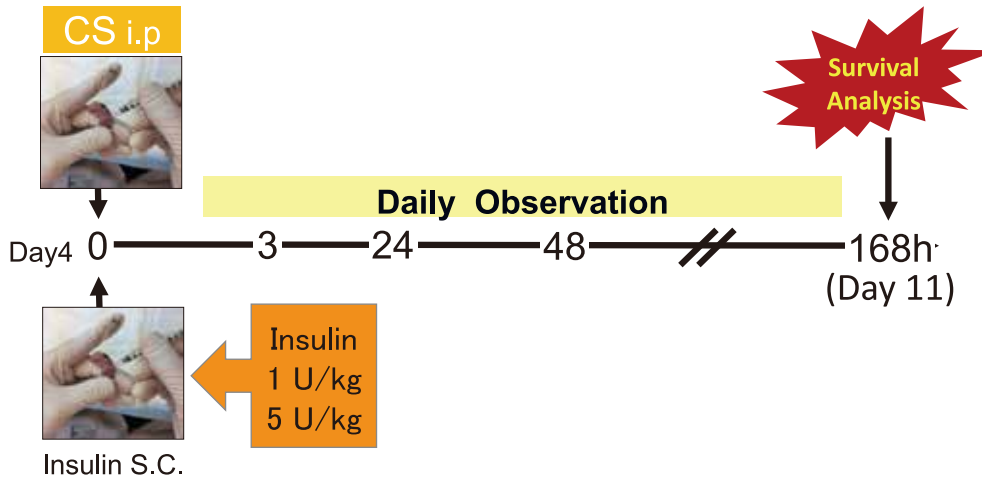


図 7 インスリン投与実験のプロトコール

4日齢マウスの敗血症誘導時に、インスリン (1 or 5 U/kg) を皮下投与し生存率を比較する。

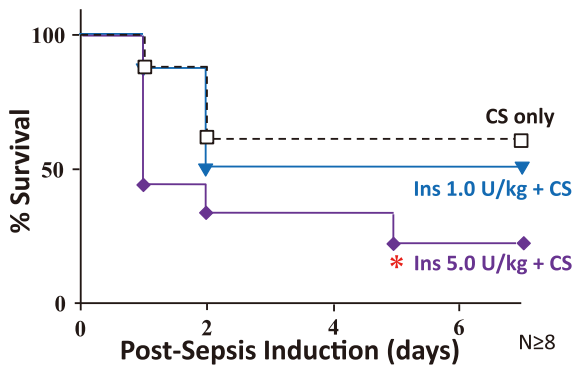


図 8 インスリン投与実験の生存曲線 (文献²²⁾より引用
改変)

* : P<0.05, vs CS 単独

本研究は、小児医学研究振興財団 日本イーライリリー海外留学フェローシップ、上原記念生命科学財団 リサーチフェローシップ、文部科学省科学研究費補助金、神緑会 研究助成金、母子健康協会 小児医学研究助成の助成を受けて行われた。

文 献

- 1) Wynn JL, Wong HR : Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. Clin Perinatol 37 : 439-479, 2010
- 2) Fujioka K, Kalish F, Zhao H, et al. : Induction of Heme Oxygenase-1 Attenuates the Severity of Sepsis in A Non-Surgical Preterm Mouse Model. Shock 47 : 242-250, 2017
- 3) Fujioka K, Kalish F, Wong RJ, et al. : Inhibition of heme oxygenase activity using a microparticle formulation of zinc protoporphyrin in an acute hemolytic newborn

表 1 インスリン投与実験の血糖推移

Group	1.5 h (mg/d)	3 h (mg/d)	6 h (mg/d)	9 h (mg/d)
Basal levels	72 ± 14 (13)			
CS-only	253 ± 53 * *	412 ± 46 * *	203 ± 168	80 ± 115 *
	(7)	(9)	(6)	(10)
CS+ Ins1	146 ± 37 * *, ##	277 ± 134 * *, #	279 ± 148	115 ± 154
	(7)	(5)	(13)	(10)
CS+ Ins5	115 ± 38 * *, ##	159 ± 24 * *, ##	84 ± 49	41 ± 25 * *
	(7)	(5)	(13)	(9)

CS-only : cecal slurry (CS) 3.0 mg/kg body weight (bw) treated group, CS+ Ins1 : CS 3.0 mg/kg bw + Insulin 1 U/kg bw treated group, CS+ Ins5 : CS 3.0 mg/kg bw + Insulin 5 U/kg bw treated group.

* p<0.05, * * p<0.01, vs basal levels.

##p<0.05, ###p<0.01 vs CS-only group at each timepoint.

- mouse model. *Pediatr Res* 79 : 251-257, 2016
- 4) 阿部真也, 森本紗代, 藤岡一路 : 【新生児医療 67 の臨床手技とケア タイミング, 流れ&コツ, 評価まで見える】 (第3章) 新生児ケアの手技 (6節) 検査, 治療時のケア 黄疸計の使い方と光線療法. with NEO (2019 秋季増刊) : 254-260, 2019
 - 5) Wynn JL, Scumpia PO, Delano MJ, et al. : Increased mortality and altered immunity in neonatal sepsis produced by generalized peritonitis. *Shock* 28 : 675-683, 2007
 - 6) Starr ME, Steele AM, Saito M, et al. : A new cecal slurry preparation protocol with improved long-term reproducibility for animal models of sepsis. *PLoS One* 9 : e115705, 2014
 - 7) 藤岡一路 : 早産児マウス敗血症モデルの作成. *Shock* 31 : 17-21, 2017
 - 8) 藤岡一路 : Cecal Slurry 法を用いた早産児マウス敗血症モデルの利点と課題. *Shock* 33 : 28-33, 2019
 - 9) 藤岡一路 : 早産児敗血症においてヘムオキシゲナーゼ-1 が果たす役割の解明. *神緑会誌* 33 : 61-64, 2017
 - 10) Maines MD : Heme oxygenase : function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 2 : 2557-2568, 1988
 - 11) Schulz S, Wong RJ, Jang KY, et al. : Heme oxygenase-1 deficiency promotes the development of necrotizing enterocolitis-like intestinal injury in a newborn mouse model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304 : G991-G1001, 2013
 - 12) Fujioka K, Kalish F, Zhao H, et al. : Induction of Heme Oxygenase-1 Attenuates the Severity of Sepsis in a Non-Surgical Preterm Mouse Model. *Shock* 47 : 242-250, 2017
 - 13) Fujioka K, Kalish F, Zhao H, et al. : Heme oxygenase-1 deficiency promotes severity of sepsis in a non-surgical preterm mouse model. *Pediatr Res* 84 : 139-145, 2018
 - 14) Kang K, Nan C, Fei D, et al. : Heme oxygenase 1 modulates thrombomodulin and endothelial protein C receptor levels to attenuate septic kidney injury. *Shock* 40 : 136-143, 2013
 - 15) Ogawa Y, Yamakawa K, Ogura H, et al. : Recombinant human soluble thrombomodulin improves mortality and respiratory dysfunction in patients with severe sepsis. *J Trauma Acute Care Surg* 72 : 1150-1157, 2012
 - 16) Nagato M, Okamoto K, Abe Y, et al. : Recombinant human soluble thrombomodulin decreases the plasma high-mobility group box-1 protein levels, whereas improving the acute liver injury and survival rates in experimental endotoxemia. *Crit Care Med* 37 : 2181-2186, 2009
 - 17) Ashina M, Fujioka K, Nishida K, et al. : Recombinant human thrombomodulin attenuated sepsis severity in a non-surgical preterm mouse model. *Sci Rep* 10 : 333, 2020
 - 18) Xiu F, Stanojic M, Diao L, et al. : Stress hyperglycemia, insulin treatment, and innate immune cells. *Int J Endocrinol* 2014 : 486403, 2014
 - 19) Ahmad S, Khalid R : Blood glucose levels in neonatal sepsis and probable sepsis and its association with mortality. *J Coll Physicians Surg Pak* 22 : 15-18, 2012
 - 20) Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. : Surviving Sepsis Campaign : International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock : 2016. *Crit Care Med* 45 : 486-552, 2017
 - 21) Alsweiler JM, Harding JE, Bloomfield FH : Tight glycaemic control with insulin in hyperglycemic preterm babies : a randomized controlled trial. *Pediatrics* 129 : 639-647, 2012
 - 22) Miyauchi H, Fujioka K, Okubo S, et al. : Insulin Therapy for Hyperglycemia in Neonatal Sepsis Using a Preterm Mouse Model. *Pediatr Int* 62 : 581-586, 2020
 - 23) Marik PE, Bellomo R : Stress hyperglycemia : an essential survival response! *Crit Care Med* 41 : e93-94, 2013