



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

藤岡, 一路

(Citation)

Shock : 日本Shock学会雑誌, 33(2):28-33

(Issue Date)

2019-02

(Resource Type)

journal article

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/90006136>



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

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

藤岡 一路

要旨

近年、成獣マウスの虫垂内容物から糞便懸濁液 (Cecal slurry: CS) を作成し、対象マウスに腹腔内投与する CS 法が確立された。また、一度に大量の CS 保存液を作成・保存し、全実験を通じて同一起源の CS を用いることで実験再現性が向上することが報告された。今回、第 33 回日本 Shock 学会総会において、CS 法を用いてわれわれが作成した早産児マウス敗血症モデル (*Shock* 2017; 47: 242-50.) の利点と課題について発表する機会を得た。CS 法の利点は、標準的敗血症モデルである盲腸結紮穿刺法と比して著しく低侵襲で、新生仔マウスへも応用可能な点、手技が単純で熟練を要さない点、および CS 用量依存性に死亡率増加を認めるため重症度調節が容易な点がある。CS 法の課題としては、第一に起源が異なる CS 間では誘導する敗血症重症度に差があること、第二に CS 保存液培養で得られる細菌数 (CFU) と投与後誘導される敗血症の重症度が必ずしも相関しないことがある。また第三の課題として、体重あたり用量 (mg/g 体重) に基づき CS を投与した場合、CS 総投与量 (mg) が多いほど死亡率が高い結果となることがあり、日・週齢の異なるマウス間での死亡率比較が困難な点がある。本稿では、これらの課題に対してわれわれが行っている工夫および考察について詳述する。

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)

1. 新生児敗血症マウスモデル作成の歴史

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し、とくに宿主防御機構が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¹⁾。しかし、至適な動物モデルがないため早産児敗血症の病態解析は困難であった²⁾。一般的な敗血症動物モデルとしては、手術的に虫垂を同定・結紮し、穿刺後に腹腔内に戻すことで腹膜炎性敗血症を誘導する Cecal Ligation Puncture (CLP) モデルがあり、敗血症研究のゴールドスタンダードとされている^{3,4)}。

かつては CLP 法を新生児動物に応用することで新生児敗血症モデル動物の作成が試みられてきた経緯があり、2004 年に Kato らは新生仔豚に CLP 法を応用し、新生仔豚敗血症モデルを報告した^{5,6)}。しかし、大型動物の飼育可能施設が限られること、SPF 動物および遺伝子改変動物入手が難しいことから普及しなかった。これらの観点から、新生仔マウス敗血症モデルの作成が理想と考えられてきたが、CLP 法は高侵襲なため新生仔マウスには応用不可能であった。

CLP 法以外の、敗血症マウスモデル作成法の一つとして LPS 投与法がある。Comim らは 2 日齢の新生児マウスに対して、LPS を皮下投与して敗血症を誘導するモデルを報告した⁷⁾。しかし、LPS を用いた場合、敗血症誘導直後に hypodynamic state を来す点で、生理的な敗血症病態を反映しているとはいえない。同様に、一定量の細菌を直接血中に直接投与する方法もあり、Kronforst らは、出生直後のマウスに表皮ブドウ球菌を静注することで敗血症を誘導する新生児敗血症マウスモデルを報告した⁸⁾。しかし、本モデルは CLP で認めるような細菌叢の多様性を反映していない点で生理的とはいえない。つまり、理想的な新生児敗血症モデルマウスとは、腹腔内糞便漏出に続発する polymicrobial infection のような、生理的な敗血症病態を反映する CLP に準じるモデルである。

CLP に準じるモデルとして近年 Cecal Slurry (CS) 法が注目されつつある。その原法として、1994

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

年に Kazarian らが Fecal Inoculum Model を報告している。彼らは、成獣豚から採取した糞便から懸濁液を作成し、自家移植として腹腔内投与することで敗血症が誘導できることを報告した⁹⁾。ついで 2007 年に、Wynn らが、成獣マウスから摘出した虫垂内容物から糞便懸濁液 (CS) を作成し、対象マウスに腹腔内投与することで敗血症を誘導する CS モデルを作成し、新生仔マウスにも応用可能であることを報告した²⁾。しかし、Wynn らの方法では実験毎に成獣マウスを安楽死する必要があるため、実験再現性にも限界があった。加えて、彼らは週齢 7~10 週の雌マウスを安楽死して CS を作成し、2 時間以内に使用することと記載しているが、CS 作成用の成獣マウスの性別・週齢を揃えることは利便性・経済性の観点からも容易ではない。著者は、留学中に同僚が実験で安楽死したマウスの虫垂をもらい CS 実験を行っていたが、死亡率が実験ごとに異なりうまくいかないことを経験した。

Wynn らの CS モデルの問題点を解決する方法として、2014 年に Saito らが複数の成獣マウスから摘出した虫垂内容物を glycerol-PBS に溶解することで、長期保存可能な CS 保存液作成法を報告した¹⁰⁾、われわれも本法を用いることで敗血症重症度の再現性が改善した。ただし、彼らの論文に記載されている Brain Heart Infusion (BHI) 培地の作成法に関しては、「3.7% BHI+0.15% アガロース」で作成すると記載されているところが、実際には「3.7% BHI+1.5% アガロース」で作成するとの誤植であり、注意が必要である。

以上の経緯により、われわれは Wynn および Saito の方法に基づき、CS モデルを免疫学的にヒト早産児相当である 4 日齢の新生仔マウスに応用し、早産児マウス敗血症モデルを作成し¹¹⁾、作成方法に関しては 2017 年度の日本ショック学会雑誌に詳述した¹²⁾。また本モデルの病態に関しては他誌に詳述しているが、本モデルは CS 用量依存性の死亡率増加、全身臓器への細菌定着、体重減少、重症例における肝腎機能障害、血液学的異常、肝臓炎症性サイトカイン発現増加を認めることを示した¹³⁾。以上より、本モデルはヒト早産児敗血症の病態をよく反映し、その病態解析に有用であると考えている。

2. CS 法を用いた本モデルの利点について

本モデルの最大の利点は簡便性であり、図に「Cecal Slurry」を含む PubMed 発表論文の推移を示すが、2007 年の Wynn の論文²⁾、2014 年の Saito の論文¹⁰⁾以降、われわれの論文¹¹⁾を含め発表数が急増しているのがわかる (図 1)。手術手技を要し熟練が必要なため術者間誤差の可能性が排除できない CLP モデルと比較しても、CS モデルは単純な注射手技のみであり、常に一定の細菌量を投与可能である。また、米国では CS モデルの受託解析を行う会社がすでに存在する (<https://noblelifesci.com/wp-content/uploads/2018/03/Sepsis-Model-10-30-13.pdf>)。著者は 2016 年に神戸大学に着任後、2017 年度には年間 800 個体を超える CS モデルマウスを作成しており、軌道に乗れば月あたり n=100 も可能であると考え (図 2)。本法を応用することで、[1] 治療候補薬剤のスクリーニングが簡便に行える。われわれは、Heme を用いた Heme Oxygenase-1 (HO-1) 誘導が敗血症重症度の改善に加え、炎症性サイトカイン発現を抑制することを報告した¹¹⁾。また [2] 敗血症重症化に関与する遺伝子の探索にも有用である。われわれは、HO-1 誘導不全を呈する HO-1 ヘテロ欠損マウスは早産児マウス敗血症モデルを重症化させることを報告した¹⁴⁾。

また、本モデルのその他の利点として迅速性があり、臨床業務との兼業が比較的容易な点がある。例えば、著者は NICU で臨床医として勤務しているが、朝の回診 (8:00) と、病棟カンファレンス (9:15) の間にマウスの体重測定や生存確認を行っている。また、敗血症誘導や薬剤投与などの実験もカンファレンスと昼食 (11:30) の間に終了することが可能であり、継続性の観点からも有用なモデルであると考えている。

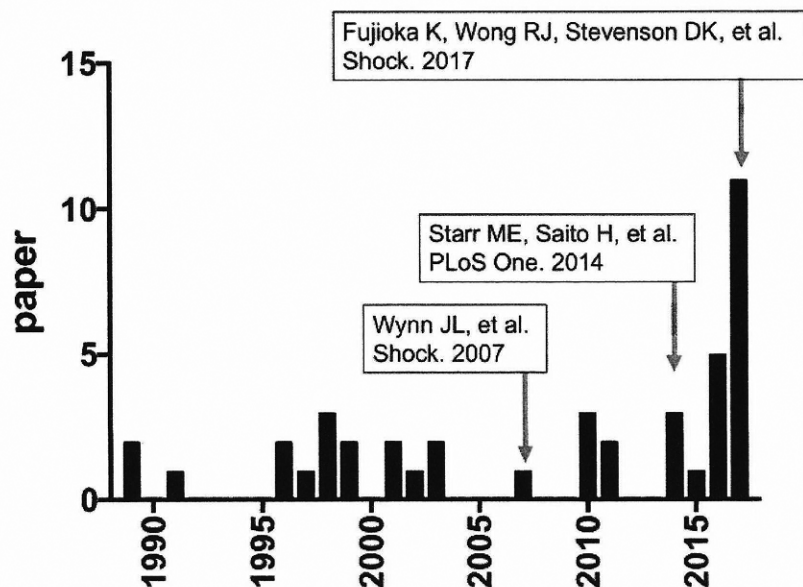


図1 「Cecal Slurry」を含むPubMed 発表論文の推移
Saito らのCS 保存液作成法の論文が発表された2014年以降、論文発表数が増加してきている。

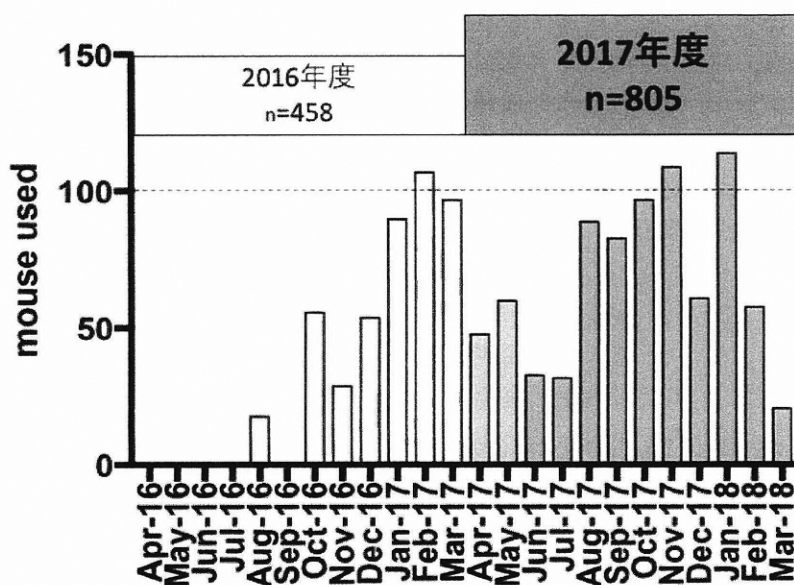


図2 動物実験個体数の推移
2016年度の帰国直後と比較すると、2017年度は実験が軌道に乗り始め実験個体数の増加を認めている。

3. CS 法を用いた本モデルの課題について

一方、本モデルの課題としてはCSソースが異なれば含有細菌量・投与時の死亡率が異なることがあり、同一実験で使用していたCS保存液がなくなると以降実験が再現できなくなることが大きな問題であった。しかし、われわれのグループではCS保存液作成時の試行錯誤を重ねるにつれ、細菌回収量の増加が得られるようになってきた（スタンフォード大学留学時代のCSストック平均含有細菌

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

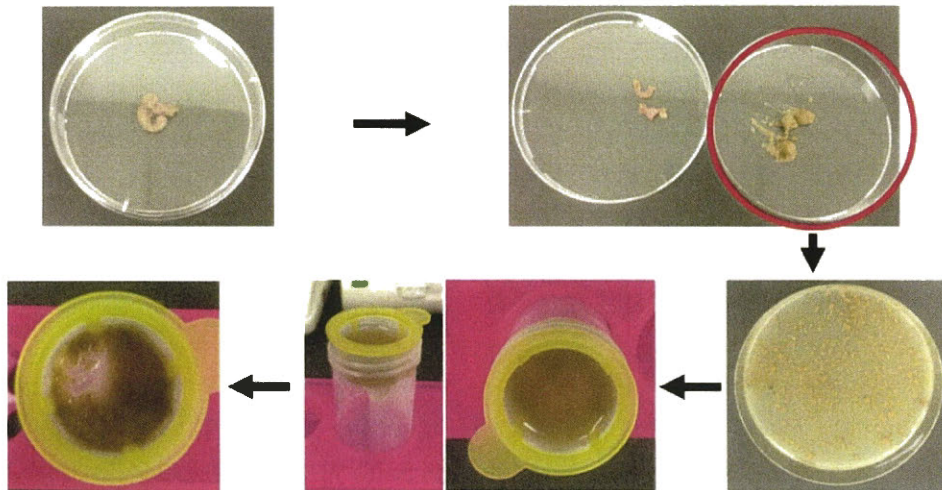


図3 CS 作製手順

腸管組織を除去後に腸管内容物（糞便）をフィルターでろ過する。

量 $1.0 \pm 1.1 \times 10^3$ CFU vs 神戸大学における CS ストック平均含有細菌量 $1.5 \pm 1.6 \times 10^5$ CFU)。同じく、用量毎の死亡率に関しても、以前の CS ソースと比べて一定の用量依存性死亡が得られるようになってきており、最近はおおむね CS 1.5 mg/g（生存率約 40%）を用いて実験を行っている。

現在われわれが行っている CS 保存液作成法の工夫を示す。1 点目は、水分喪失の防止に注意を払うことである。とくに、摘出した虫垂の計量時にシャーレに蓋をせずに計量すると、継時的に水分が蒸発し、重量が減少し糞便が濃縮されていくことがわかった（いつか定常状態に達するのではないかと秤の前で待っているとどんどん水分が蒸発して重量が下がっていく）。そのため、採取後速やかに上蓋を装着して密閉し迅速に計量することが重要である。2 点目の工夫として、採取した虫垂から内容物を抽出し、フィルターでろ過する過程において、図3に示すように丁寧に腸管組織を除去しておくことで残渣を可能な限り少なくしている（腸管組織が残存したままフィルターろ過を行うと、糞便成分の多くが腸管組織と一塊となりろ過膜を通過しにくくなり回収率が低下する）（図3）。

本モデルの次の課題として、異なる日・週齢間での比較の問題がある。前述の Wynn らは、7 日齢マウスと成獣マウスの比較を行い、新生仔マウスで死亡率が高いことを報告した。そこでわれわれも予備実験として、4 日齢、7 日齢、成獣マウスの比較を行い、追試を試みた。結果は、4 日齢マウスの生存率 42% の用量の CS 1.5 mg/g を投与したところ、7 日齢マウスでは 0%、成獣では 62% の生存率であった（未発表データ）。つまり、同一起源の CS を同用量用いた検討において、早産児相当の 4 日齢マウスは成獣マウスより敗血症死亡率が高い一方、予想に反して正期産児相当の 7 日齢マウスは 4 日齢マウスより敗血症死亡率が高いという結果であった。本結果からは、早産児の死亡率が正期産児より高いヒト新生児敗血症の病態を模倣できていなかった。この点に関しては、新生児敗血症モデルとして適切とはいえない。一方、本モデルは体重に比例した量の細菌に暴露されるという仮説に基づくモデルであり、体重の大きい正期産児は、体重の小さい早産児より多くの細菌に暴露されるというコンセプトである。ただし、早産児に対しても正期産児に対しても使用する点滴留置針のサイズは同じであり、実臨床においては早産児でも正期産児でも「敗血症初期に体内に侵入する細菌量」は一定なのではないかと考察している。本仮説に基づくと、体重に比例した CS 投与量以外の投与基準が必要になってくると思われる。

まとめ

CS 法による早産児マウス敗血症モデルの利点は、簡便であるため、治療候補薬剤のスクリーニングやノックアウトマウスを用いた解析が容易であること、迅速であるため、臨床業務と並行可能であることがある。一方、本モデルの課題としては、CS ソース毎の含有細菌量の相違があり、これに関しては、水分喪失の防止、糞便回収効率の改善をはかることで克服できつつある。また、日齢の異なるマウス間で同量の CS (mg/g) を投与した場合の死亡率の評価が困難な点に関しては、新生仔マウスにおいては用量の再検討が必要ではないかと考えており、現時点で日齢の異なるマウスに本法を応用した場合の敗血症重症度の比較には注意が必要である。

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先生、大久保沙紀先生、西田浩輔先生、小児外科の宮内玄德先生に感謝しています。

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 研究活動スタート支援、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) 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
- 3) Fink MP: Animal models of sepsis. Virulence 5: 143-153, 2014
- 4) Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M: Animal models of sepsis: setting the stage. Nat Rev Drug Discov 4: 854-865, 2005
- 5) Kato T, Hussein MH, Sugiura T, et al: Development and characterization of a novel porcine model of neonatal sepsis. Shock 21: 329-335, 2004
- 6) Kato S, Hussein MH, Kakita H, et al: Edaravone, a novel free radical scavenger, reduces high-mobility group box 1 and prolongs survival in a neonatal sepsis model. Shock 32: 586-592, 2009
- 7) Comim CM, Bussmann RM, Simão SR, et al: Experimental Neonatal Sepsis Causes Long-Term Cognitive Impairment. Mol Neurobiol 53: 5928-5934, 2016
- 8) Kronforst KD, Mancuso CJ, Pettengill M, et al: A neonatal model of intravenous Staphylococcus epidermidis infection in mice <24 h old enables characterization of early innate immune responses. PLoS One 7: e43897, 2012
- 9) Kazarian KK, Perdue PW, Lynch W, et al: Porcine peritoneal sepsis: modeling for clinical relevance. Shock 1: 201-212, 1994
- 10) 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

- 11) 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
- 12) 藤岡一路: 早産児マウス敗血症モデルの作成. Shock 31: 17-21, 2017
- 13) 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
- 14) 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