

平成 23 年 2 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19592102
 研究課題名（和文）熱傷後に伴う遠隔臓器障害の発生機序の解明と治療戦略の構築

研究課題名（英文）The elucidation and the strategy for multiple organ dysfunction syndrome following severe burn injury.

研究代表者
 佐藤 格夫 (SATO NORIO)
 日本医科大学・医学部・助教
 研究者番号：30409205

研究成果の概要（和文）：

重症熱傷に続発する感染性は死亡の原因、入院期間の長期化に直接関与する。早期からの栄養投与が免疫機能を強化し易感染症の対策に重要であると注目されている。本研究は炎症に対する免疫調整栄養剤として臨床でも注目をされている栄養剤を用いて、侵襲下における特に脂肪酸代謝に注目して検討した。持続栄養における基礎的な実験をした後、熱傷後に栄養剤を持続投与し、LPS（緑膿菌由来）投与による代謝変化を¹H-NMRを用いた代謝物解析を行った。NMR測定におけるピークの違いが確認された。

研究成果の概要（英文）：

One of the major complications following severe burn is an infection. This causes increasing high mortality rate and prolonged hospital stay. Early enteral nutrition is an important to preserve immune function and decrease complications. This study focused metabolism of fatty acids under inflammation using immunomodulating diets which usually is used clinically. First we investigated the basal experiment related with a continuous enteral nutrition of rat. Second we tested to change of metabolites following LPS stimulation as second hit after burned rat using ¹H-NMR. We observed the different peak of metabolites between the groups.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：免疫調整栄養剤、脂肪酸代謝、腸管粘膜障害、腸上皮細胞、n-3系脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

熱傷に伴う細菌感染は重症患者ほど高頻度に続発するが、熱傷・敗血症から多臓器不全を呈すると致死の合併症につながる。しかしその発生機序は十分に解明されていない。我々は重症熱傷患者を対象に血清 IL-18 を測定した結果、IL-18 の上昇は熱傷面積や多臓器不全との相関を認めたため、病態の解明に IL-18 とその他の関連メディエーター (IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-10) の変動の把握は病態を理解する上でとても重要である。また、侵襲時における免疫増強栄養剤の効果が国際的に期待されているが、効果や詳細な代謝動態は確立していないのが現状である。本研究ではラットに熱傷を与え、その後に細菌感染を与えることを最終モデルとする。侵襲時における栄養剤の効果を検討するとともに、熱傷後に早期経腸栄養を投与し、細菌感染後におけるメディエーター産生また血漿への代謝物動態を検討する。栄養素の役割を解明し、実際の臨床現場への栄養投与確立へと結び付けることを目的とする。

2. 研究の目的

- (1) 持続栄養モデルにおいて血中脂肪酸変化を知る
- (2) 適した変化の時に腸管への虚血再灌漑障害を起し、代謝物変化を検討する
- (3) 熱傷に検討した栄養剤を持続投与し LPS 刺激を与えた際の代謝物変化を捉える。
- (4) その他、腸上皮細胞における侵襲として酸化ストレスを与え代謝変化を捉え今後の栄養研究に対する基礎的研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 持続栄養モデル

ラットは Sprague-Dawley ラット、雄、体重 280–380 g を用いた。ラットにペントバルビタール(50mg/kg)を腹腔内投与し、麻酔を施した。十分な麻酔効果を確認した後に、シリコンチューブ (信越ポリマー株式会社 内径 1mm、外径 1.5mm) を十二指腸内に挿入し、十二指腸へ固定した。経腸栄養チューブを腹腔外、皮膚下を通し、背面よりチューブ末端を出した。スプリ

ングワイヤー内にチューブを通過させ、ラット飼育箱の外へ誘導した。スプリングワイヤーはシーベルに固定し、持続栄養ポンプへ装着した。EPA,DHA γ リノレン酸を強化した脂肪成分を 55%程度含む栄養剤、もしくは EPA,DHA、 γ リノレン酸を添加しておらず、同様に脂肪成分 55%程度含む栄養剤を 2 ml/hr (72kcal/ 48ml) 経腸栄養にて投与した。ラットは自由に動けるようにし、水分摂取は自由な状態とした。0、1、3、5 日目に検体採取を行った。心臓より血液を採取し、直ちにヘパリン添加のスピッツに入れ、遠心させ、血漿、血球成分を採取した。遠心している間に、引き続き、腸管、腸間膜リンパ節の採取を行った。回盲部より 10cm のあたりから 3cm 程度、組織評価のために、10%ホルマリン固定を行った。さらに、20cm 程度の回腸を検体として採取した。採取の際に各組織は生理食塩水にて洗浄し、その後、液体窒素にて冷却。検体は測定まで-80°Cにて冷凍保存を行った。

- (2) 持続経腸栄養による腸管虚血再灌流障害適した日数の持続経腸栄養投与後、ラットを揮発性吸入麻酔薬にて麻酔を行った。十分な麻酔効果を確認した後、上腹部に腹部正中切開を行い、血管遮断クリップを用いて上腸間膜動脈遮断を 45 分間施工した。その後、クリップによる遮断を解除し、4-0 絹糸にて閉腹を行った。麻酔から覚醒させ、再灌流 4 時間後に再び、検体採取のために揮発性吸入麻酔を行った。十分な麻酔効果を確認した後に、検体採取を行った。心臓より血液を採取し、直ちにヘパリン添加のスピッツに入れ、遠心させ、血漿、血球成分を採取した。遠心している間に引き続き、腸管の採取を行った。回盲部より 10cm のあたりから 3cm 程度、組織評価のために 10%ホルマリン固定を行った。さらに 20cm 程度の回腸を検体として採取した。採取の際に腸管内を生理食塩水にて洗浄し、液体窒素にて冷却。検体は測定まで-80°Cにて冷凍保存を行った。また、腸管粘膜障害の評価として Chiu 分類を用いた。
- (3) 熱傷後早期経腸栄養モデルと LPS 刺激
ラットは Sprague-Dawley ラット、雄、体重 280–380 g を用いた。ラットにペントバルビタール(50mg/kg)を腹腔内投与し、麻酔を施した。十分な麻酔効果を確認した後に、沸騰した湯に 10 秒間背部を接

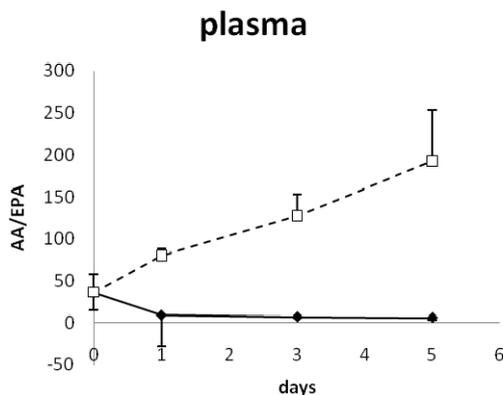
着させ、TBSA 20%の熱傷を負わせた。その後持続栄養を行い、(1)の結果より適した日数後にLPS 5mg/kgを腹腔内投与した。5時間後に血漿を採取し、血漿中の代謝パターンの変化を¹H-NMRを用いてスペクトルとして計測した。熱傷+(強化/非強化栄養剤)+(with/without LPS)において、各グループのスペクトルパターンを比較した。

(4) 腸上皮細胞に対する酸化ストレス

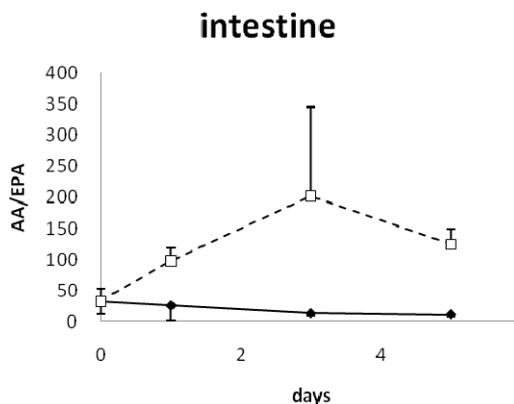
腸上皮細胞(IEC-6)をプレート上に継体培養を行った。十分に細胞が増殖が認められたところで酸化ストレスとして過酸化水素0.25mMまたは0.5mMを添加した。24時間後の細胞増殖の程度を顕微鏡にて写真で保存し経時的なMigrationを面積として計算し比較した。さらには¹H-NMRを用いてスペクトルとして計測した。その後、多変量解析ソフトを用いて主成分分析を用いて解析した。主成分分析から得られた物質群からCooman's plot法を用いて分類の有意度を検定した。

4. 研究成果

(1) 持続栄養モデル



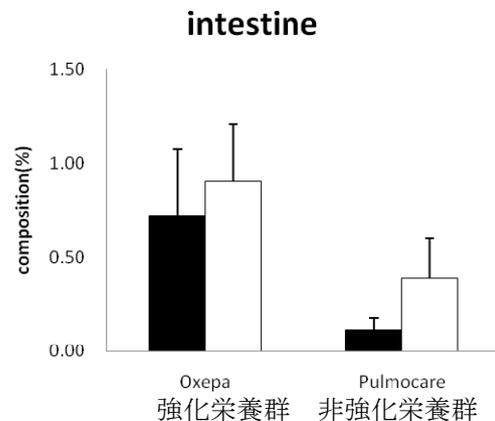
(図1) AA/EPA □栄養素強化栄養剤、●栄養素非強化栄養剤(血漿)



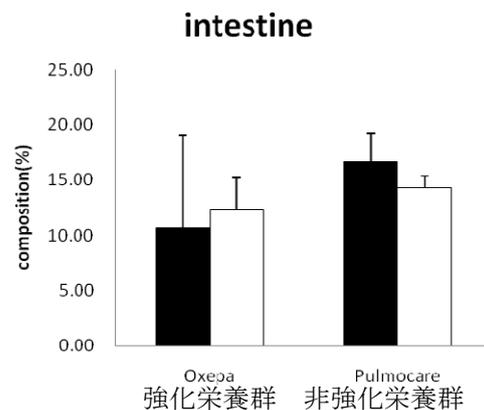
(図2) AA/EPA □栄養素強化栄養剤、●栄養素非強化栄養剤(腸管)

- EPA/AA比は血漿、腸管、腸間膜リンパ節、肝臓においても3日目には投与前に比較し有意に上昇した。また栄養剤の違いも顕著に現れた(図1、図2)。
- DHAに関しては血漿中ではそれほど変化が認められなかったが、腸管、腸間膜リンパ節において強化していない栄養剤群が3日目以降、有意に低下した。
- γリノレン酸の代謝物、ジホモγリノレン酸は腸管ではそれほど上昇が認められなかったが、それ以外の血漿、腸間膜リンパ節では強化していない栄養剤群と比較して3日目以降、有意に上昇した。

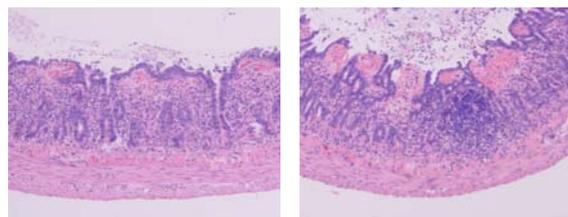
(2) 持続経腸栄養による腸管虚血再灌流障害



(図3) EPA ■sham □I/R(腸管)



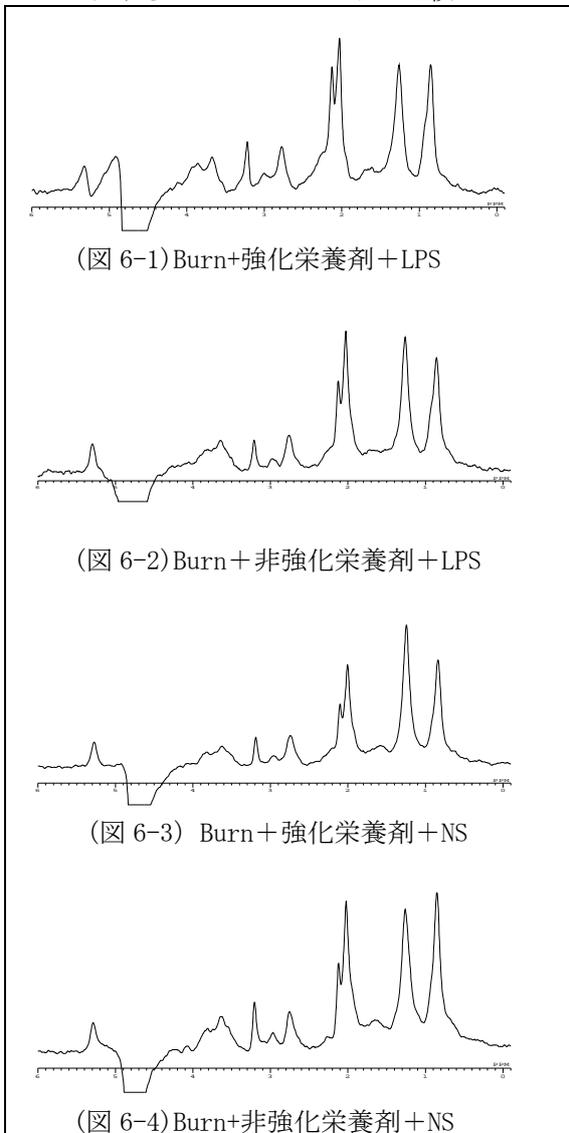
(図4) EPA ■sham □I/R(腸管)



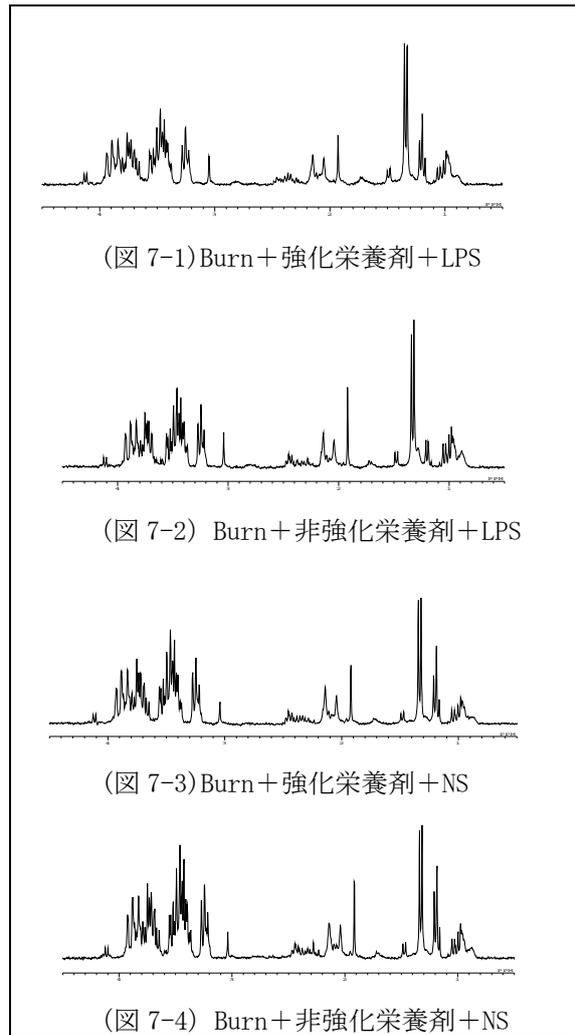
(図5) 非強化栄養群と強化栄養群のHE染色

- ① I/R により強化栄養群は腸管の EPA は有意な上昇は認められなかったが非強化栄養群は I/R により腸管 EPA の有意な上昇を認めた(図 3)。
- ② I/R により腸管の AA は有意な変化を認めなかった(図 4)。
- ③ I/R により強化栄養群は腸管の DHA は有意な上昇は認められなかったが、非強化栄養群は I/R により腸管 DHA の有意な上昇を認めた。
- ④ ジホモリノレン酸は I/R により大きな変動を腸管において認めなかった。
- ⑤ 非強化栄養群は I/R において粘膜障害の程度が多きく、強化栄養群は I/R において粘膜障害が軽減された(図 5)。

(3) 熱傷後早期経腸栄養モデルと LPS 刺激における ¹H-NMR スペクトル比較

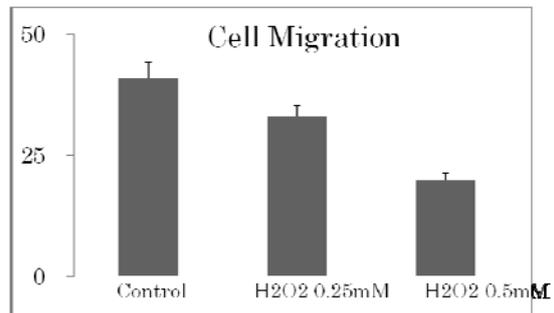


- ① Diffusion method により Peak Pattern が各グループ間で異なるのが観察された。(図 6-1, 2, 3, 4)



- ② CPMG method により Peak Pattern が各グループ間で異なるのが観察された。(図 7-1, 2, 3, 4)

(4) 腸上皮細胞に対する酸化ストレス



(図 8) 細胞 Migration

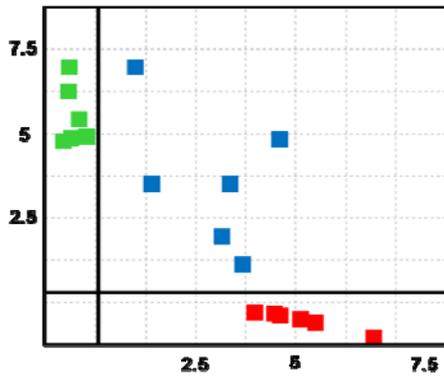


図9 Cooman' s plot analysis
 (青 : Control 緑 : H2O2 0.25mM
 赤 : H2O2 0.5mM)

- ① 腸管上皮細胞 IEC-6 を用いて酸化ストレスによる細胞障害度、細胞増殖度を 24 時間の時点で検討した。Control による細胞生存率は 96%、H2O2 0.25mM による細胞生存率は 85%、H2O2 0.5mM による細胞生存率は 70%であった。細胞増殖 (Migration) は Control 41 μ m、H2O2 0.25mM 33 μ m、H2O2 0.5mM 20 μ mであった (図 8)。
- ② 腸管上皮細胞 IEC-6 を用いて酸化ストレスによる代謝物解析を行い、主成分分析にて H2O2 0.25mM と H2O2 0.5mM とが分類可能であった。さらには Cooman' s plot analysis にて、Control と過酸化水素の濃度に応じて大きく分類がされた。
- ③ 今後、腸管上皮細胞への侵襲モデルとして色々な栄養素を通じての研究の足場となり得る。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① K Nakata, N Sato, T. Asakura, K.Hirakawa, R Zhu, T Masuno, S Shiraishi, Y Ohno, K Koike, H Yokota.
 1H-NMR based metabolomics study of the intestinal epithelial cell (IEC-6) under the oxidative stress.
 5th ASC(Academic Surgical Congress) 2010.Feburary. San Antonio, Texas USA

- ② K Nakara, N Sato, T Asakura, K Hirakawa, R Zhu, T Masuno, Y Ohno, K Koike, H Yokota. Pattern recognition using 1H-NMR of the intestinal epithelial cell (IEC-6) under oxidative stress. 33rd Shock Society. 2010 June. Portland Oregon USA.

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 格夫 (SATO NORIO)
 日本医科大学・医学部・助教
 研究者番号 : 30409205

(2)研究分担者

増野 智彦 (MASUNO TOMOHIKO)
 日本医科大学・医学部・助教
 研究者番号 : 00318528

横田 裕行 (YOKOTA HIROYUKI)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号 : 60182698

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

平川 慶子 (HIRAKAWA KEIKO)
 日本医科大学・医学部・助教
 研究者番号 : 30165162

小池 薫 (KOIKE KAORU)

京都大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号 : 10267164

小林 哲幸 (KOBAYASHI TETSUYUKI)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・教授
 研究者番号 : 50178323