

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14923

研究課題名(和文) ビタミンC大量投与の敗血症における救命効果と抗炎症作用の検証

研究課題名(英文) Dietary intake of vitamin C attenuates lipopolysaccharide-induced sepsis and septic inflammation in ODS rats.

研究代表者

堀尾 文彦 (Horio, Fumihiko)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20165591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンC(VC)生合成不能のODSラットにVC無添加飼料を8日間与えた時期には欠乏症状は全く発症していないが、LPS誘発性敗血症を引き起こすと5.5%という極めて低い生存率であった。それに対して、最小必要量のVCの摂取は生存率を39%にまで上昇させ、ビタミンC摂取が敗血症防御効果のあることを初めて示した。さらに特筆すべきことは、最小必要量の10倍の高用量のビタミンC摂取は生存率を61%にまで改善させ、高用量VC摂取が敗血症に対して有効な防御手段であることを示した。このVCの作用は、LPSによる血中単核球でのTNF およびIL-1 の産生上昇の抑制によることを示唆する結果も得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VC欠乏時には肝臓を中心として炎症様変化が起こることを我々は以前から見出しており、VCの新たな機能として国際誌原著論文として社会に発進してきた。この成果から、VCが抗炎症作用を発揮することが推定されたが、それを証明した例は殆どなかった。本研究成果は、敗血症という炎症性疾患に対して高用量VC摂取が極めて有効な生存率改善効果と臓器障害抑制効果を有していることを初めて示すことができた。本研究の成果は、有効な改善薬の存在しない敗血症の発症時においてVC投与は安全な症状改善手段となる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to verify the protective effects of vitamin C (VC) against LPS-induced sepsis. The study was conducted using ODS rats, which are unable to synthesize VC. ODS rats were fed either an AsA-free diet (VC0 group), a diet supplemented with 300 mg/kg VC (VC300 group), or a diet supplemented with 3,000 mg/kg VC (VC3,000 group) for 8 days. On day 8, all the rats were intraperitoneally injected with LPS (15 mg/kg BW). Forty-eight hours after the injection, the survival rates of the rats in the VC300 (39%) and VC3,000 (61%) groups were significantly higher than that in the VC0 group (5.5%). Next, we measured several inflammatory parameters during 10 h after administering LPS. At 6 h, elevated serum levels of markers for hepatic injuries were suppressed in rats fed VC. The elevated serum concentrations of TNF and IL-1 by LPS in the VC0 group decreased in groups fed VC.

研究分野：栄養生化学

キーワード：ビタミンC 大量投与 敗血症 救命効果 抗炎症

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1970年代に米国のライナス・ポーリングにより風邪予防と癌治療に大量(1日10g以上)のVCを経口摂取させるメガドース療法が提唱され(PNAS, 71, 4442(1974))、現在でも注目されている。近年も、末期癌の患者に大量(20~50g)のVCを静脈内投与して極めて高い血漿VC濃度を維持することによる癌治療が国内外で行われている。しかし、このVCの作用機構が解明されてこなかったことから、VC大量投与の疾患防御への有効性については、国外においても、我が国のビタミンC研究委員会においても一定の見解には至っていない。一方、応募者はODSラットにおいてVC摂取が血中の炎症性サイトカイン濃度を抑えることにより肝臓での炎症関連タンパク質発現を抑制することを見出し(Nutrition, 31, 373(2015))、VC摂取の炎症性疾患防御作用の機構の糸口を明らかにした。これらの背景から、VC大量投与の炎症性疾患防御作用の証明に挑戦することを着想した。

2. 研究の目的

応募者は、ビタミンC(VC)合成不能のODSラットを用いてVC欠乏時には肝臓を中心に炎症状態が惹起されることを見出しており、これはVCの抗炎症作用を強く示唆している。一方、ヒトでVCの通常要求量の100倍以上(10g以上)のVCを投与して極めて高い血漿VC濃度を創出して疾患を治療するVC大量投与療法が提唱されているが、その基礎的データは乏しい。本研究では、炎症性疾患を対象にして通常要求量の50~100倍量の大量のVC投与による疾患防御作用を検討することを目的とする。具体的には、ODSラットでエンドトキシン(LPS)誘発性敗血症に対するVC大量投与の救命効果と炎症性障害抑制作用の証明に挑戦し、VC研究に新たな突破口の創出を目指す。

3. 研究の方法

(1) VC無添加飼料、最小要求量VC添加(300ppm)飼料および高用量VC添加(3,000ppm)飼料を摂取させた群にLPS投与して、経口のVC大量摂取の敗血症改善効果を検証する。

【実験1】VC無添加飼料(VC0群)、最小要求量VC添加(300ppm=ODSラットの最小要求量)飼料(VC300群)あるいは高用量VC添加(3,000ppm)飼料(VC3,000群)を摂取させる3群(各群18匹)を8日間飼育後に、LPS(15mg/kg body wt.)を腹腔内注射する。その後、各群の48時間までの生存率を経時的に調べた。

【実験2】実験3と全く同様の3種の飼料群(各群18匹)を設ける。LPSを投与して2、6および10時間後に各群6匹ずつを解剖する。解剖の各時点の血中の炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1 β)濃度と組織障害マーカー(AST、ALTの活性)のレベルを測定した。

(2) VC無添加飼料、最小要求量VC添加飼料および大量VC添加飼料を摂取させたODSラットの3群の血液から末梢血単核球(PBMC)を分離して培養し、培地へのLPS添加による炎症性サイトカイン(TNF-)産生上昇に対するVC大量摂取の抑制作用を検討する。

(1)項と同様のODSラットの3群の飼料群を8日間飼育の後、各ラットからヘパリンで凝固阻止した血液を採取した。この血液を遠心用チューブにてFicoll-Paqueの上に重層し、600xgで40分遠心したものからPBMC層を採取した。PBMCを5%FBS-RPMI1640培地にて 1×10^6 cells/mLに調整して1時間培養(0.6mL/ウェル、37、5%CO₂)後にLPSを培地に添加(0.1 μ g/mL)した。その後、2、4、8、12、16時間後に培地を採取して、そのTNF-濃度をELISAにて測定した。

(3) ODSラットのVC無添加飼料群から得たPBMCにin vitroでVCを添加して、LPS添加による炎症性サイトカイン産生上昇に対する抑制作用を検証する。

ODSラットにVC無添加飼料を与えて8日間飼育し、血液を採取してPBMCを 1×10^6 cells/mLに調整して、培地中にVCを100、250もしくは500 μ M添加して1時間培養した。その後、培地にLPS添加(1 μ g/mL)して、2、4、8、12、16時間後に培地を採取して、そのTNF-濃度をELISA測定した。

4. 研究成果

(1) 最小必要量および高用量VC添加飼料摂取のLPS誘発性敗血症改善効果

【実験1】

LPS投与後48時間の生存率の変化を図1に示した。48時間後の時点での生存率は、VC無添加飼料群(VC0群)で5.5%、最小必要量VC添加群(VC300群)で39%、高用量VC添加群(VC3,000群)で61%と、3群間で有意な差が得られた。

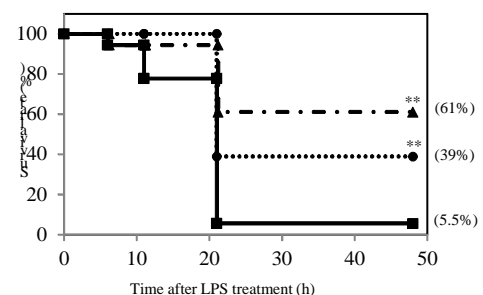


図1 LPS投与後48時間の生存率

— VC0群、..... VC300群、- . - VC3,000群

【実験 2】

LPS 投与後 2, 6 および 10 時間後において、血中の IL-1 と TNF- 濃度の上昇は VC0 群に比べて VC300 群と VC3,000 群において抑制された (図 2)。さらに、LPS 投与後 6 時間において血清 AST と ALT 活性は VC0 群で顕著に上昇し、その値に対して VC300 および VC3,000 群で有意に低下した (図 3)。

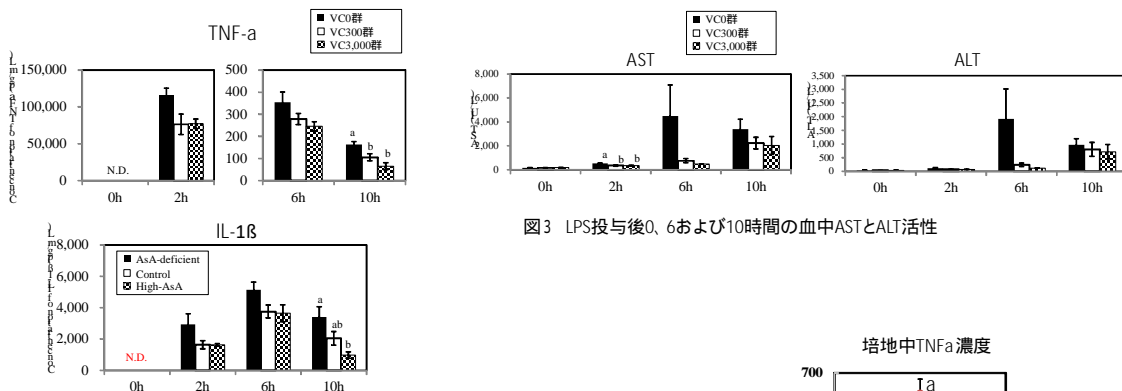


図2 LPS投与後0, 6および10時間の血中TNF-aおよびIL-1β

図3 LPS投与後0, 6および10時間の血中ASTとALT活性

(2) VC0 群、VC300 群、VC3,000 群から採取した PBMC での LPS 誘発性 TNF 産生上昇の比較

VC0 群と VC300 群の間では LPS 添加によって同様に TNF の産生は上昇したが、VC3,000 群では有意に TNF の産生が有意に抑制された (図 4)。

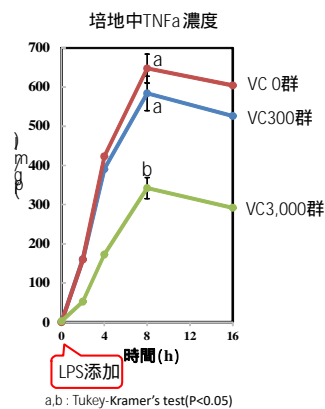


図4 VC0, VC300, VC3,000群のPBMCnoTNFα産生

(3) VC0 群から得た PBMC への in vitro でのビタミン C 添加の LPS 誘発性 TNF 産生上昇に対する抑制効果の検証

培地中への 100 μM のビタミン C の添加は、TNF 産生上昇を有意に抑制した。さらに、250 μM の添加は強い抑制作用を示した (図 5)。

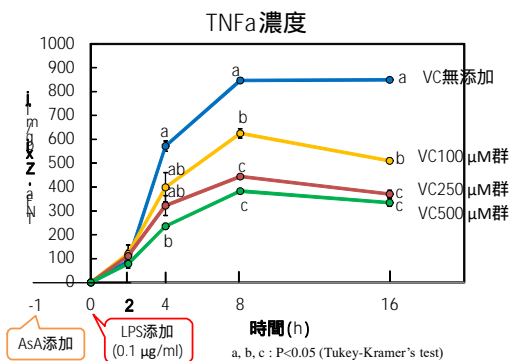


図5 VC0群のPBMCへのin vitroでのビタミンCの添加のTNFα産生に対する効果

(4) 総括

ODS ラットにビタミン C 無添加飼料を 8 日間与えた時期においてはなんら欠乏症状は発症していないが、LPS 誘発性敗血症により 5.5% という極め低い生存率であった。それに対して、最小必要量のビタミン C の飼料からの摂取は生存率を 39% にまで有意に上昇させ、敗血症防御効果のあることを初めて示すことができた。さらに本研究の成果で特筆すべきことは、最小必要量の 10 倍の高用量のビタミン C 摂取は生存率を 61% にまで改善させ、高用量ビタミン C 摂取が敗血症に対して有効な防御手段であることを初めて示すことができた。このビタミン C の作用は、LPS による TNF および IL-1 の産生上昇の抑制によることを示唆する結果も得た。これらの成果は原著論文 (*J.Nutr.Sci. Vitaminol.*, 64, 404(2018)) として発表した。

VC0, VC300, VC3,000 群から得た PBMC では、ビタミン摂取量の増加に伴って TNF 産生の上昇が抑えられることが明らかとなった。さらに PBMC への in vitro でのビタミン C 添加も TNF 産生を抑制することも示した。これらのことは、高用量のビタミン C の摂取は、TNF 産生の抑制を介して敗血症の防御効果を発揮することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Kawade, N., Tokuda, Y., Tsujino, S., Aoyama, H., Kobayashi, M., Murai, A. and Horio, H.:
Dietary Intake of Ascorbic Acid Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Sepsis and Septic Inflammation in ODS Rat. J.Nutr.Sci.Vitaminol.,64:404-411(2018) (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 川出野絵、鈴木若奈、大谷祥也、小林美里、村井篤嗣、堀尾文彦
アスコルビン酸欠乏時の肝臓での STAT3 活性化と腸管でのサイトカイン発現の上昇
日本ビタミン学会第 70 回大会(高槻市)2018.6.22
2. 川出野絵、鈴木若奈、大谷祥也、小林美里、村井篤嗣、堀尾文彦
アスコルビン酸欠乏および不足による肝臓と腸管での炎症関連因子の発現誘導の解析
第 72 回日本栄養・食糧学会大会(岡山)2018.5.13
3. 大谷祥也、川出野絵、鈴木若奈、辻野祥伍、小林美里、松田幹、村井篤嗣、堀尾文彦
ビタミン C の末梢血単核球における LPS 誘発性 TNF- 産生抑制効果
第 72 回日本栄養・食糧学会大会(岡山)2018.5.13
4. 川出野絵、鈴木若奈、大谷祥也、村井篤嗣、小林美里、堀尾文彦
アスコルビン酸による肝臓と腸管での炎症関連因子の発現変動
日本農芸化学会 2018 年度大会(名古屋)2018.3.16
5. 大谷祥也、辻野祥伍、小林美里、松田幹、村井篤嗣、堀尾文彦
アスコルビン酸の末梢血単核球での LPS による TNF- 産生の抑制作用
日本ビタミン学会第 69 回大会(横浜)2017.6.10
6. 大谷祥也、辻野祥伍、小林美里、松田幹、村井篤嗣、堀尾文彦
アスコルビン酸の末梢血単核球における LPS 誘発性 TNF 産生抑制効果の解析
日本ビタミン学会第 68 回大会(富山)2016.6.18
7. 辻野祥吾、川出野絵、徳田優希、小林美里、松田幹、村井篤嗣、堀尾文彦
アスコルビン酸の LPS 誘発性炎症防御作用の機構解析
第 70 回日本栄養・食糧学会大会(兵庫)2016.5.15

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~anutr/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名：村井篤嗣

ローマ字氏名：Murai Atsushi

研究協力者氏名：小林美里

ローマ字氏名：Kobayashi Misato