

機関番号：24701
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008 ～ 2010
 課題番号：20591553
 研究課題名（和文） 肝硬変合併肝切除術後に効果的な熱量補給を可能にする新組成脂肪乳剤の有用性
 研究課題名（英文） Nutritional effects of the novel fat emulsion emulsified by phosphatidylglycerol after cirrhotic liver resection
 研究代表者 瀧藤 克也
 (TAKIFUJI KATSUNARI)
 和歌山県立医科大学・医学部・講師
 研究者番号：00254540

研究成果の概要（和文）：

われわれが長年研究を続けてきた phosphatidylglycerol (PG) で乳化し、中鎖脂肪酸トリグリセリド (medium chain triglyceride, MCT) を 50% 含有した全く新しい静注用脂肪乳剤を作成し、TAA 誘発硬変肝切除モデルに対し 120 分間持続投与し、その有用性を従来の脂肪乳剤と比較した。この新組成 PG 乳化 MCT/LCT 脂肪乳剤では、従来の脂肪乳剤のように血清中性脂肪の上昇はなく、血清遊離脂肪酸および血清リン脂質の上昇も抑制された。投与した脂肪乳剤は速やかに肝細胞内に取り込まれ、脂肪粒子はその代謝終末像とされるラメラ体および液胞となり、肝細胞内で十分代謝されることが判明した。肝組織内 ATP 量は従来の脂肪乳剤と差を認めなかったが、energy charge は新組成脂肪乳剤で高い傾向を示した。この新組成脂肪乳剤は肝硬変肝切除後でも投与後は速やかに代謝され、傷害肝においてもエネルギー源となり得ることが立証され、従来の脂肪乳剤が禁忌ないし慎重投与としてきた肝硬変患者に対する肝切除術後でも安全にエネルギーを供給できる新しい脂質栄養素材となり得ることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

We established a novel fat emulsion emulsified by phosphatidylglycerol (PG) and evaluated the efficacy on nutritional management after cirrhotic liver resection in thioacetamide-treated rats. PG emulsion inhibited not only the increases in serum triglyceride and free fatty acids, but also inhibited increases in serum levels of phospholipids for 2 hours after rapid infusion, even in hepatectomized rats with liver cirrhosis. Thus, temporary hyperlipidemia did not occur. Triglycerides from PG emulsion transferred into the hepatic cells much more rapidly than existing emulsions emulsified by phosphatidylcholine. The infusion of PG emulsion maintained a high level of energy charge of the liver even in hepatectomized rats with liver cirrhosis. On the electron microscopic findings, PG emulsion was rapidly taken into the hepatic cells and metabolized. From the results of this study, a novel PG emulsion produced rapid clearance from the blood stream, rapid transfer into the hepatic cells, and efficacy in energy production in the hepatic cells. Thus, we speculated that a novel PG emulsion might be available for cirrhotic liver resection in which commercial fat emulsions are not used.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：代謝栄養外科学

1. 研究開始当初の背景

現在増加傾向にある肝細胞癌のほとんどが肝炎ウイルスに起因する慢性肝炎や肝硬変を合併している。肝臓外科領域では手術手技の向上、医療機器の開発により安全に肝切除術が施行されるに至った。しかし、未だ術後肝不全の発症が生命予後に極めて重大な問題として残されている。また、肝硬変患者に対する肝切除術後には、耐糖能異常や蛋白代謝異常を伴うため、術直後の **surgical diabetes phase** が強く、多量の糖質の投与は高血糖や高インスリン血症、乳酸アシドーシスを引き起こす問題がある。また、この時期は動脈血中ケトン体比が 0.4~0.7 のいわゆるエネルギー危機の状態で、残存肝はエネルギー基質として糖質をうまく利用できなくなり、主に内因性脂肪酸のβ酸化によってエネルギーを産生している。まさにこの時期に適切なエネルギー器質の補給を行わなければ肝再生は期待できず肝不全に陥る危険性が非常に大きい。エネルギー基質として糖質の利用は抑制され、脂肪を補給することは極めて合理的であるので、肝切除後も残存肝の再生の促進や必須脂肪酸を補給する意味で脂肪乳剤を投与することが望まれる。しかし、現在の脂肪乳剤は、①血中リポ蛋白よりアポタンパクを受け取る速度が遅いので脂肪乳剤が血中に長く残存すること、②そのため肝への取り込みが抑制されること、③血中での消失速度が遅いため脂肪粒子そのものが長く血中に滞留し網内系機能を抑制すること、④乳化剤であるリン脂質も長く血中に残存し高脂血症を助長するなどの理由により、重篤な肝障害では禁忌ないし慎重投与とされており、折角投与した脂肪乳剤が肝細胞内で代謝されず、脂肪乳剤そのものの副作用が出現し、有効なエネルギー補給とはならないのが現状である。現在わが国において臨床使用されている脂肪乳剤は長鎖脂肪酸(LCT)の混合である大豆油を卵黄レシチン(phosphatidylcholine)で乳化しグリセリンで浸透圧を調整したもので、肝障害がなくても血中消失速度が遅く投与に長時間を要するなど、製剤学的には 1960 年以来全く改良がなされておらず、現時点では肝硬変肝機能障害時には有効に利用できない。

2. 研究の目的

肝硬変患者のいわゆるエネルギー危機の状態、残存肝はエネルギー基質として糖質をうまく利用できない時期に適切なエネルギー器質の補給を行うことを目的として、リ

ン脂質(乳化剤)として、われわれが長年研究を続けてきた **phosphatidylglycerol (PG)** で乳化した脂肪乳剤の高脂血症抑制効果に着目し、また中性脂肪に中鎖脂肪酸トリグリセリド (**medium chain triglyceride, MCT**) を用いて脂肪粒子中の脂肪そのものも肝代謝が迅速である素材とした全く新しい静注用脂肪乳剤を作成すれば、肝硬変肝切除後も投与した脂肪乳剤は速やかに代謝され、エネルギー源となることが期待される。この新組成脂肪乳剤が、従来の脂肪乳剤が禁忌ないし慎重投与としてきた肝硬変患者に対する肝切除術後も安全にエネルギーを供給できる新しい脂質栄養素材となる可能性を検討する。

3. 研究の方法

今回新しく作成した脂肪乳剤は、10%中性脂肪として MCT と長鎖脂肪酸トリグリセリド (long chain triglyceride, LCT) を等量混合し PG で乳化した PG 乳化 MCT/LCT 乳剤 (GML 乳剤) で、対照薬と同じ高圧ジェットホモジネート法で作製した。対照は、中性脂肪として MCT と LCT を等量混合し、従来の phosphatidylcholine (PC) で乳化した PC 乳化 MCT/LCT 乳剤 (CML 乳剤) と、LCT を PC で乳化した市販の 10% Intrafat[®] 乳剤 (CL 乳剤) の 2 種類を用いた。

(1) 脂肪乳剤持続静注後の血中および肝組織内脂質の変動

①正常肝ラットに対する PG 乳剤、単回静脈内投与後の血清および肝組織内脂質分析
Wistar 系 8 週齢雄性正常ラット (n=54) を、①新組成 PG 乳化 MCT/LCT 剤 (GML 乳剤)、② PC 乳化 MCT/LCT 剤 (CML 乳剤)、③従来の 10% イントラリピッド[®] 乳剤 (CL 乳剤) 投与の 3 群に分け、それぞれを単回静脈内投与し、5 分、60 分、120 分後の血清および肝組織を採取し、脂質、肝機能分析について各種測定キットを用いて行った。

②正常肝ラットに対する PG 乳剤持続静脈内投与後の血清および肝組織内脂質分析
Wistar 系 8 週齢雄性正常ラット (n=72) を、24 時間絶食後、エーテル麻酔下に右外頸静脈をカットダウンして 3 Fr IVH 用カテーテル (ファイコンチューブ[®]、富士システムズ社) を挿入し、先端を上大静脈内に留置し、皮下トンネルを作成して肩甲骨間より体外に誘導し、保護コイルを用いて固定した。①PG 乳化 MCT/LCT 剤、②PC 乳化 MCT/LCT 剤、③10%

イントラリピッド®乳剤投与の3群に分け、それぞれを輸液ポンプ（ニプロ・FP-1200）を用いて作成した中心静脈ルートから120分間持続静注し、投与終了直後、投与後5分、60分、120分後に血清および肝組織を採取し、脂質、肝機能分析を各種測定キットを用いて行った。

③硬変肝切除モデルに対するPG乳剤持続静脈内投与後の血清および肝組織内脂質分析

Wistar系4週齢雄性ラット（紀和実験動物）を1週間予備飼育の後に0.04% thioacetamide (TAA, 和光純薬) 溶液を6カ月間連続自由飲水させ、TAA誘発硬変肝ラットを作成した。続いて、Higgins-Anderson法に準じて70%肝切除を施行し、ラット硬変肝切除モデルとした。このようにして作成したTAA誘発硬変肝切除ラット（n=65、体重503.2±11.0g）と対照として正常肝ラット（n=72、体重287.6±2.6g）に対して、術直後より10%脂肪乳剤を硬変肝切除ラットの必要投与熱量である170 kcal/kg/day (0.6 g/kg/h) の速度で1日量の1/12(正常ラット; 平均3.4 ml、TAAラット; 平均6.0 ml) を120分間シリンジポンプ（SP-100型、日本メディカルサプライ社）を用いてBio-Cannula®(BC-101、バイオメディカ社) を経て持続静注した。投与終了直後、5分、60分、120分後にエーテル麻酔下に再開腹して腹部大動脈より採血し（約10 ml）、さらに下大静脈を切断して肝を完全に脱血した後、全肝を摘出した。

検討項目は、血清中性脂肪（遊離グリセロール消去法）、遊離脂肪酸（酵素法）、リン脂質（過マンガン酸塩灰化法、和光純薬）、HDLコレステロール（選択阻害法）、GOT（UV法）、GPT（UV法）および肝組織内中性脂肪濃度とした。なお、肝組織内中性脂肪濃度は肝湿重量1gよりBligh-Dyer法で全脂質を抽出後、アセチルアセトン法（和光純薬）にて測定した。

(2)硬変肝切除モデルにおける肝代謝過程の電子顕微鏡的観察

TAA誘発硬変肝切除ラット（n=12、体重509.1±8.1g）に対して、術直後より脂肪乳剤を0.6 g/kg/hの速度で1日量の1/12（平均6.1 ml）を120分間持続静注した。投与終了直後、60分、120分後にエーテル麻酔下に開胸開腹し、胸部大動脈から2%グルタルアルデヒド30ml（Polyscience社）で5分間灌流前固定後、摘出した肝組織を1mm角に細切し、0.1%イミダゾール緩衝四酸化オスミウム液で24時間後固定したものをを用いて電顕試料を作成した。各時間における脂肪乳剤の代謝像を透過電子顕微鏡（JEM-1220型、日本電子）で観察した。

測定値は平均値（mean）±標準誤差（SE）で示し、統計学的処理はMann-WhitneyのU

検定により、危険率5%以下で有意差ありと判定した。

(3)硬変肝切除後早期における新組成脂肪乳剤の肝エネルギー代謝に対する有用性の検討

TAA誘発硬変肝切除ラット（n=15、体重484.7±15.8g）に対して、術直後より脂肪乳剤を0.6 g/kg/hの速度で1日量の1/12（平均5.8 ml）を120分間持続静注した。投与終了120分後にエーテル麻酔下に肝組織をfreeze-clamp法で100mg採取し、肝組織内ATP、ADP、AMP量を高速液体クロマトグラフィー（LC9A、島津製作所）を用いて測定した。その測定値を用いて、Atkinsonの式： $Energy\ charge = (ATP + 0.5ADP) / (ATP + ADP + AMP)$ により、肝組織のenergy chargeを算出して、残肝エネルギー代謝の指標とした。

4. 研究成果

(1)脂肪乳剤持続静注後の血中および肝組織内脂質の変動

血清中性脂肪濃度は、硬変肝切除モデルでは、投与前の35±4 mg/dlから投与終了直後に、CML剤は612±86 mg/dl、CL剤は965±237 mg/dlと上昇したのに対し、GML剤は140±42 mg/dlと上昇が有意に抑制された（p<0.01）。また、GML剤では120分後に81±6 mg/dlまで減少したが、CML剤では495±51 mg/dl、CL剤では797±109 mg/dlと上昇したままであった（p<0.01）。

一方、正常肝ラットにおける血清中性脂肪濃度は、GML剤では60分後にすでに前値まで減少したが、他の2剤では120分後で初めて前値まで減少した（図1）。

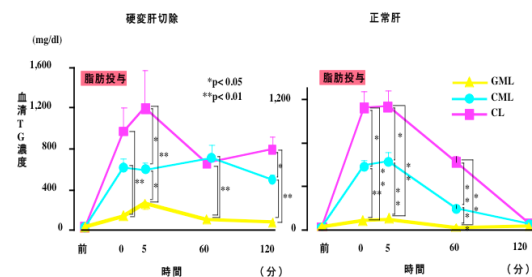


図1. 脂肪乳剤投与後の血清中性脂肪濃度

肝組織内中性脂肪濃度は、硬変肝切除モデルでは、正常肝ラットに対して約1/2の濃度にとどまったが、投与終了直後および5分後にはGML剤が他の2剤に比べて高い濃度に達していた（図2）。

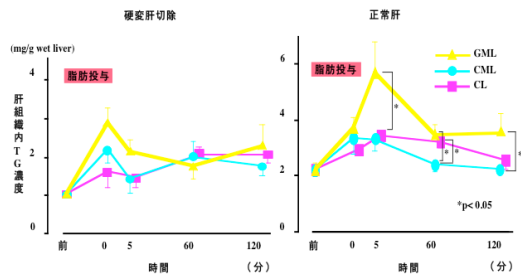


図2. 脂肪乳剤投与後の肝組織内中性脂肪濃度

血清遊離脂肪酸濃度は、硬変肝切除モデルでは CML 剤のみが有意に高値で推移した ($p<0.01$)。一方、GML 剤における上昇は硬変肝切除モデル、正常肝ラットともに軽度であった。

血清リン脂質濃度は、硬変肝切除モデルでは CML および CL 剤で著しく上昇を示したが、GML 剤ではその変動は僅少であった。

血清 HDL コレステロール濃度は、GML 剤で、投与終了 5 分後から有意に低値で推移した ($p<0.01$)。

GOT と GPT の変動は、正常肝ラットでは 3 剤間に差はなかったが、硬変肝切除モデルでは、脂肪乳剤投与終了 120 分後に、GML 剤が他の 2 剤に比べて上昇傾向を示したが、投与終了 240 分後には低下傾向を示した。

(2) 硬変肝切除モデルにおける脂肪乳剤の透過電子顕微鏡による肝代謝過程の観察

CL 剤は、投与終了直後に肝細胞内に多数の脂肪球を認め、さらに Kupffer 細胞内に貪食されている脂肪球も確認できた。60 分後では肝細胞内に多数の脂肪球の残存を認めたが、代謝終末像である液胞はわずかししか観察できなかった。また、120 分後には液胞は多数出現したが、脂肪球の残存も認めた。

CML 剤も、CL 剤と同様に、60 分後で肝細胞内に多数の脂肪球を認めたが、代謝終末像である液胞はわずかししか観察できず、120 分後には液胞は多数出現したが、脂肪球の残存も認めた。

GML 剤では、投与終了直後には肝細胞内に脂肪球を認めるとはいえ、代謝終末像である液胞も多数観察できた。さらに、投与終了 60 分後では、他の 2 剤と異なり、液胞を多数観察でき、脂肪球はかなり減少していた。

(3) 硬変肝切除早期における脂肪乳剤の残肝エネルギー代謝

肝組織内 ATP 量は 3 剤間で差を認めなかった。ATP、ADP、AMP の総和である TAN 量は、GML 剤で、他の 2 剤に比べて、低い傾向を示した。それに対して energy charge は、GML 剤で、他の 2 剤に比べて高い傾向を示した(図 3)。

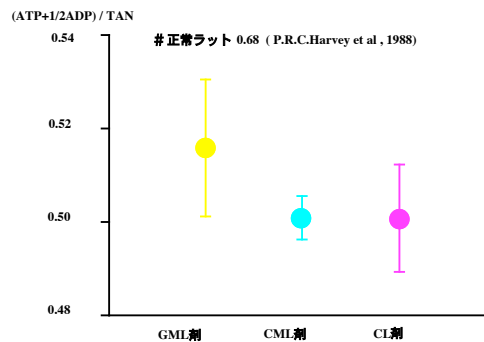


図3. 脂肪乳剤投与後の肝 energy charge

私達が考案した新組成脂肪乳剤は①硬変肝切除後でも血清中性脂肪や遊離脂肪酸のほか、リン脂質濃度の上昇を著しく抑制し、硬変残肝に危惧される一過性の高脂血症なかでも高リン脂質血症の発生を避けることができる。②肝に取り込まれる速度が迅速で、肝エネルギー代謝からも残肝が硬変肝であっても energy chargeが高いことより、硬変肝切除後でもエネルギー基質として有用である。以上より、従来の脂肪乳剤が禁忌ないし慎重投与としてきた肝硬変患者に対する肝切除術後でも安全にエネルギーを供給できる新しい脂質栄養素材となり得ることが判明した。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧藤 克也 (TAKIFUJI KATSUNARI)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：00254540

(2) 研究分担者

堀田 司 (HOTTA TSUKASA)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：50244744
中村 公紀 (NAKAMURA MASAKI)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：80364090
松田 健司 (MATSUDA KENJI)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：30398458
奥 喜全 (OKU YOSHIMASA)
和歌山県立医科大学・医学部・学内助教
研究者番号：10453185
山上 裕機 (YAMAUE HIROKI)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：20191190