

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17900

研究課題名（和文）ラット敗血症モデルにおける筋力低下および認知機能障害に対するALAの効果

研究課題名（英文）The preventive effects of ALA to LPS-induced muscle weakness and cognitive dysfunction

研究代表者

立岩 浩規（Tateiwa, Hiroki）

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師

研究者番号：90614397

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：近年、敗血症を始めとした重症患者の生存率は大きく改善している。一方で治療後に残存する身体・精神的障害、すなわち集中治療後症候群（PICS）が問題となっている。PICSは筋力低下（ICU-AW）、認知機能障害、精神障害から成る。これに対して様々な予防・治療が検証されているが依然として確固たるものはない。本研究ではPICSに対して薬剤による介入が出来ないか、リポ酸（ALA）を用いて検証した。その結果、ALAがLPS投与に追隨する筋力低下を抑制し、認知機能障害に対してもその要因である脳内炎症を抑制する事が示された。これらの結果からALAがPICSの予防・治療として有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

集中治療の進歩によって、敗血症を始めとした重症患者の治療成績は大きく向上しているものの、その後の障害、PICSは大きな問題となっており、近年、集中治療領域で注目を集めている。早期リハビリテーションや栄養療法など効果があると考えられているものの依然として確固たる介入方法などは不明である。また実臨床において、こうした身体的介入は重症患者では困難な場面も多い。そこで本研究では薬剤投与によってPICSを予防・治療出来ないか検証し、その有効性を認めた。薬剤投与は重症患者でも容易に行える介入であり、PICSの介入として有用であると考えられる。今後、臨床を含めた更なる研究へ発展させる事が出来る可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Recently, survival rates for critically ill patients, including those with sepsis, have improved. On the other hand, post-intensive care syndrome (PICS), which consists of muscle weakness (ICU-AW), cognitive dysfunction, and mental disorder, has been raised as a problem. Although various prevention and treatment strategies have been tested, none has been proven to be effective. In this study, we investigated the possibility of drug intervention for PICS using alpha lipoic acid (ALA). The results showed that ALA suppressed muscle weakness induced by LPS administration, and also suppressed inflammation in the brain, which causes cognitive dysfunction. These results suggest that ALA should be effective in the prevention and treatment of PICS.

研究分野：集中治療

キーワード：PICS ICU-AW 敗血症関連認知機能障害 ALA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、集中治療の発展とともに敗血症を始めとした重症患者の治療成績は大きく向上し、生命予後も改善している。一方、これらの重症患者の治療後も続く身体的・精神的な障害は社会復帰や長期予後の障壁となっている。こうした重症疾患において ICU 治療後に生じる運動機能・認知機能・精神の障害に対して、集中治療後症候群 (Post Intensive Care Syndrome: PICS) という新たな概念が提唱され、その予防・治療が大きな課題となっている。

### 2. 研究の目的

本研究では PICS の中でも重大な運動機能障害 (ICU-AW: ICU-Acquired weakness) および認知機能障害を薬剤投与によって予防することが出来るかを、ラット敗血症モデルを用いて検討する事を目的としている。現在、早期リハビリテーションや積極的な栄養療法などが有用である可能性を示す報告はいくつか散見されるが、急性期からかなり積極的に負荷の高い介入を行うものが多く、実臨床でそのまま扱うというのは非常に難しい。そこで薬剤的にこうした合併症を予防する事が出来ないか考えた時に、抗炎症作用や抗酸化作用などを有する  $\alpha$  リポ酸 (ALA: Alpha Lipoic Acid) に注目し、その予防効果を検証した。

### 3. 研究の方法

本研究では 6-8 週齢の Wistar 系雄性ラットに LPS を投与することで敗血症モデルとして使用した。LPS は 3mg/kg 単回投与を行い (day0) 続いて ALA 100mg/日を 6 日間、連日投与 (day0-5) して介入した。LPS は PBS に、ALA は 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (H $\beta$ -CD) に溶解して投与した。その後 (day6)、握力測定による筋力評価、および新奇物体認識試験による認知機能評価を行った後、脳組織 (前頭前野および海馬) および筋肉組織 (腓腹筋) を摘出した。脳組織は炎症マーカーを ELISA 法を用いて測定し、脳内炎症の評価を行った。筋肉組織の一部は固定の後、HE 染色を行い筋線維の断面積を評価し、また一部は western blot によって、筋肉異化・同化マーカーの変化を評価した。

これらを vehicle (PBS)+vehicle (H $\beta$ -CD)、LPS+vehicle (H $\beta$ -CD)、LPS+ALA、vehicle (PBS)+ALA の 4 群で各群 n=5 として比較検討した。

統計解析は Prism (10.2.2) を用いて行った。群間差は one-way ANOVA に Tukey の post hoc を加えたもの、または Kruskal-Wallis に Dunn's 検定を加えたものを各パラメーターの特性に応じて用いた。有意差は、P 値が 0.05 未満と定めた。なお図表上でのエラーバーは SEM を示し、# は P < 0.05 vs control 群 (vehicle (PBS)+vehicle (H $\beta$ -CD))、\* は P < 0.05 vs LPS 群 (LPS+vehicle (H $\beta$ -CD)) を示す。

### 4. 研究成果

本研究では、LPS による敗血症モデルを用いたが、ALA の投与経路として腹腔内投与を選択したため、LPS は尾静脈投与する事とした。過去の報告では LPS 5-10mg/kg の静注の報告が散見されたため 5mg/kg の静脈投与を試みたが、死亡率が非常に高かった事から 3mg/kg の尾静脈投与を行った所、死亡率は高いものの生存個体で急性期の衰弱から 3-5 日目での体重回復が見られたことから、3mg/kg の投与設定を行った。また ALA については、生理食塩水や PBS に溶解して投与した報告があるが、これらに溶解する事は困難であり、様々な溶媒を試したところ、H $\beta$ -CD への溶解が有効である事が分かった。先行研究として、H $\beta$ -CD の投与および H $\beta$ -CD に溶解した ALA の投与をラットに行ったが、明らかな有害事象はなく、H $\beta$ -CD を溶媒として用いる事とした。

#### 【死亡率および体重変化】

LPS + vehicle (H $\beta$ -CD) 群および LPS+ALA 群の生存予後を比較ところ、統計学的な有意差は認めなかったものの、ALA 投与群の方が、死亡率が減少する傾向を認めた (Log Rank test, p=0.2274) (図 1a)。また、死亡個体については、両群ともにおよそ投与 2 日目までに死亡した。

図 1b および 1c にそれぞれ体重の経時変化および初日を基準とした最終日の体重変化率を示す。LPS 投与によって 2

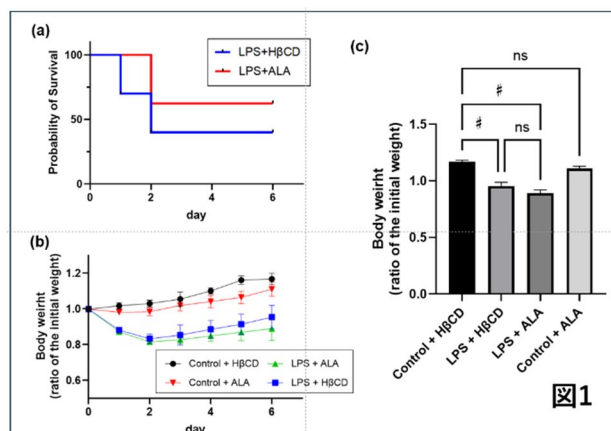


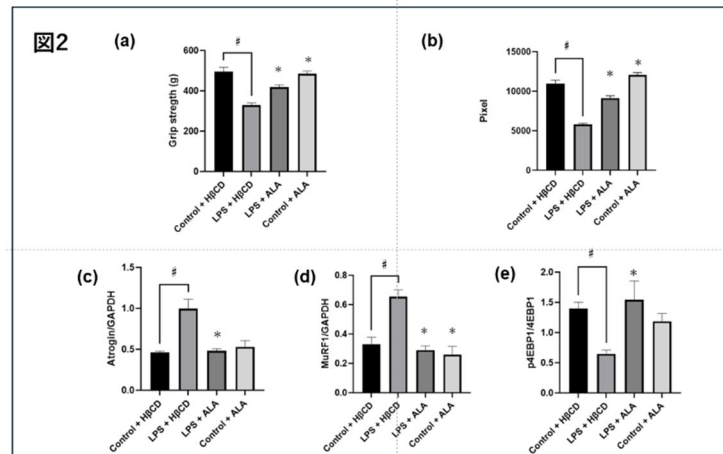
図 1

日目までにおよそ 20% 程度の体重低下を認め、その後徐々に増加傾向に転じた (図 1b)。ALA 投与による体重変化への影響は control 群および LPS 投与群ともに有意差は認めなかったがやや低下する傾向を認めた (図 1c)。これは ALA が肥満患者での体重減量効果や糖代謝改善などの報告もありそれに矛盾しない結果となった。

### 【筋肉評価】

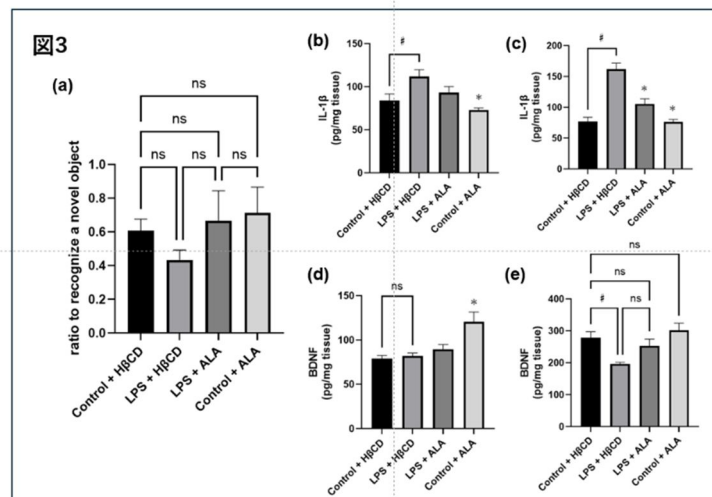
握力測定では、LPS 投与によって有意に握力の低下を認め、これに対して ALA 投与によって握力低下を改善する事が出来た (図 2a)。また、筋線維の断面積についても同様に、LPS によって有意に筋線維の萎縮を認めたが、ALA 投与によって、その影響を抑制する事が出来た (図 2b)。さらに、筋肉組織において、分解経路の一つであるユビキチン・プロテアソーム系タンパク質分解経路において、重要な MuRF1 (Muscle Ring Finger 1) と Atrogin 1 を異化のマーカーとして測定した (図 2c, d)。また同化の指標として p4EBP1/4EBP1 を測定した (図 2e)。

その結果、LPS によって筋肉異化亢進 (MuRF1 および Atrogin1 の増加) および同化抑制 (p4EBP1/4EBP1 の低下) を認めた。これに対して、ALA を投与する事で、これらの変化を抑制することが出来る事が示された。これらの結果から ALA が ICU-AW を抑制する可能性が示唆された。



### 【認知機能】

認知機能については、新奇物体認識試験を行い、LPS 投与によって新奇物体への探索率の低下傾向を認め、認知機能が低下している傾向を認め、また ALA 投与によって認知機能の低下が抑制される傾向を認めたが、統計的な有意差は認められなかった (図 3a)。過去の我々の研究グループの報告では、脳内炎症、特に海馬での炎症が認知機能低下と関係している事を報告しており、本研究でも炎症マーカーである IL-1 $\beta$  を前頭前野 (図 3b) および海馬 (図 3c) で測定した。その結果、いずれの部位も LPS によって IL-1 $\beta$  の有意な上昇を認めた。さらに海馬ではその上昇が ALA によって抑制される事が示された。また過去の報告からこれらの現象に脳内の神経保護因子である BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) が関連していると推測し測定した。その結果、LPS によって BDNF が低下し ALA でそれが抑制される事が海馬で示された。炎症に伴う認知機能障害は特に海馬で生じるとする過去の報告と矛盾しない結果となった。しかし、これらの関連についてはさらなる検証が必要と考えられた。行動実験では認知機能障害が示されなかったが、個体数が少ない事などが要因であると考えられた。



以上の結果より、ALA が敗血症に伴う ICU-AW を抑制する可能性が示唆された。認知機能障害についても、統計学的に有意ではなかったものの、改善する傾向を認め、またその要因として海馬での脳内炎症を抑制が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 立岩浩規
2. 発表標題 敗血症における筋力低下とその治療
3. 学会等名 第50回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------