

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17912

研究課題名（和文）高齢者重症患者に対する漢方を併用した経腸栄養療法：骨格筋維持を目指す基礎研究

研究課題名（英文）Enteral Nutritional Therapy with Herbal Medicine for Elderly Critically Ill Patients: Basic Research for Skeletal Muscle Maintenance

研究代表者

藤井 研介（Huzii, Kensuke）

大阪医科薬科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：50846904

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：重症侵襲モデルに対する人参栄養湯の効果を検証するため、Lathela LCT-200による下肢骨格筋の体積測定、グリップテストによる筋力測定を施行した。盲腸結紮穿刺を施した腹膜炎モデルマウス（治療群:18 vs 対象群:18）、体表面積30%に一度熱傷を施した重症熱傷モデルマウス（治療群:6 vs 対象群:6）において検討を行い、両群間で体重、下肢骨格筋体積および重量、生存率に差は認めなかった。腹膜炎モデルで施行した筋組織解析では、蛋白合成・分解に関与する4E-BP1, Atrogin-1に有意差は認めなかった。腹膜炎モデルで、28日目に人参栄養湯群で上肢握力の改善を認めた(P値:0.03)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「筋肉量の低下に筋力または身体機能の低下を伴う状態」と定義されるサルコペニアは、救急治療の領域でもその重要性が明らかになっており、重症患者の骨格筋量が高いほど長期予後が改善する可能性があるが、薬剤による栄養療法の介入を行った効果を検証した研究は殆どなく、本研究ではこれまで慢性疾患や担癌患者に対して、骨格筋萎縮の予防に使用されている人参栄養湯を、特に集中治療後の身体機能障害に長期間悩まされる重症高齢患者に対して応用できるかを検討した。本研究の結果では骨格筋量の改善は認めなかったが、短期間で上肢握力の改善を認めており、骨格筋の質に関してさらなる研究が必要である。

研究成果の概要（英文）：To examine the effect of Ninjin'yoeito on the severe invasion model mouse, we performed volumetric measurements of skeletal muscles of the lower limbs using the Lathela LCT-200 and muscle strength measurements using the grip test. In a peritonitis model mouse with cecal ligation and puncture (treatment group: 18 vs. control group: 18) and a severe burn model mouse with a third-degree burn on 30% of the body surface area (treatment group: 6 vs. control group: 6), no differences were observed in body weight, lower limb skeletal muscle volume and weight, or survival rate between the two groups. Muscle tissue analysis in the peritonitis model showed no significant differences in 4E-BP1 and Atrogin-1, which are associated with protein synthesis and degradation. In a peritonitis model mouse, upper limb grip strength was improved in the Ninjin'yoeito treatment group on day 28 (P value: 0.03).

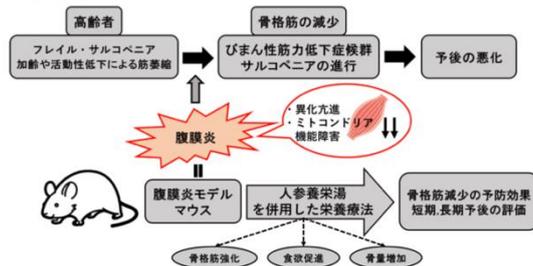
研究分野：一般消化器外科、救急診療科

キーワード：人参栄養湯 サルコペニア 筋萎縮 腹膜炎 熱傷

1. 研究開始当初の背景

救急・集中治療領域において、ICU 在室中あるいは退室後に生じるびまん性の筋力低下症候群 (ICU-acquired weakness: ICU-AW) は死亡率を上昇させることが報告されている。重症患者において骨格筋は著明に減少するため、骨格筋量を維持しながら集中管理を行うことが、ICU-AW への対策として重要視されている。しかし、侵襲期に骨格筋を維持することは難しく、もともと骨格筋量が少なく、虚弱状態、サルコペニア・フレイルを呈することの多い高齢者患者にとっては、非常に困難な課題である。サルコペニア・フレイル対策と同様に、ICU 患者の高齢化も進む本邦において、“骨格筋減少を予防する” 対策が急務であるが、コンセンサスのある“骨格筋減少を予防する栄養療法” は存在しないのが現状である。

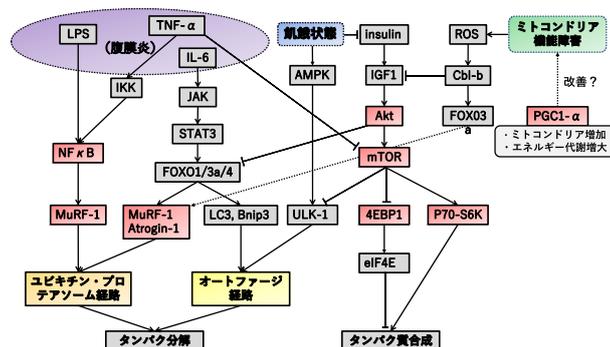
研究概要



・本研究は、骨格筋減少を防ぐことで予後改善を目的とした、漢方(人參養榮湯)を併用する日本独自の栄養療法を構築することを目標として計画した。

2. 研究の目的

本研究では、これまで慢性疾患や担癌患者に対して、骨格筋萎縮の予防に使用されている人參養榮湯を、集中治療における重症患者の骨格筋萎縮予防に対して応用できるかを動物実験で検討した。重症侵襲(腹膜炎・重度熱傷)モデルマウスを用いて、人參養榮湯(餌中濃度: 3%, 5%)の経口投与(自由摂取)による骨格筋減少の予防効果を検証し、予後に与える影響を評価した。人參養榮湯は、代謝や熱産生に関わる多くの遺伝子発現の制御する PGC-1 α を活性化し、骨格筋でのミトコンドリアの生合成の促進や、遅筋の成分である I 型 Myosin heavy chain の増加を誘導することが知られている。本研究では、マウスの下肢骨格筋に対し Western Blotting 法を用いて、タンパク質分解関連因子 (Atrogin-1, MURF-1, NF- κ B 等) と、その合成関連因子 (Akt, mTOR, p70S6K 等) の発現変化を評価し、筋タンパク質の関連シグナルを解析した。また、人參養榮湯は、代謝や熱産生に関わる多くの遺伝子発現の制御する PGC-1 α を活性化し、骨格筋でのミトコンドリアの生合成の促進や、遅筋の成分である I 型 Myosin heavy chain の増加を誘導することが知られており、マウスの筋力測定による骨格筋の質の評価を行った。



3. 研究の方法

実験スケジュールを左図に示す。8 週齢の雄マウスを購入して、1 週間順応させた後、人參養榮湯 (以下 NYT) 投与群では NYT を混合した餌 (餌中濃度: 3% or 5%) を 3 週間にわたって自由摂取させた後、12 週齢のマウスに侵襲処置を施し、その後隔週で体重測定、CT 撮像 (Lathela LCT-200)、グリップテストによる握力測定 (GPM-101BV) を施行した。対照群となる標準飼料 (MF) 投与群でも、上記と同じ実験スケジュールで観察を施行した。

① 腹膜炎モデルマウス

人參養榮湯を混合した飼料 (餌中濃度: 3%) を 3 週間にわたって自由摂取させた後、盲腸結紮穿刺 (cecal ligation and puncture: CLP) による腹膜炎モデルを作製した。セボフルラン吸入麻酔下に開腹して、腹腔内から盲腸を取り出し、盲腸の末端から 1.5cm の部位を縫合糸 (6-0 prolene) にて結紮し、20 ゲージ注射針を用いて盲腸壁全層にわたり穿刺し、少量の糞便を搾り出した後、盲腸を腹腔内に戻して閉腹。処置後に、蘇生輸液として生理食塩水 1ml を皮下注入した。

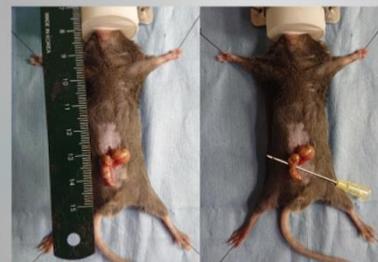
1 コースで、標準飼料を投与した MF 群 (CLP+/NYT-) : 6 匹と NYT 投与群 (CLP+/NYT+) : 6 匹を作製して、4 週間観察を施行。合計 3 コースを施行した。

実験スケジュール

week	1st	2nd	3-5th	6th	7th	8th	9th	10th [~]
計画	マウス購入 (8週齢)	順応期間	CT	CT	CT	CT	CT	CT
処置	人參養榮湯 (NYT) 混入飼料 (3% or 5%)	盲腸結紮穿刺: CLP	NYT 飼料前投与	NYT 飼料投与継続				
動物実験群			NYT 投与群: 生存~	Control 群: 生存~	1. 骨格筋量, 筋力の評価 2. 筋組織, シグナル因子の解析 3. 生存期間の解析			

*CLP: cecal ligation and puncture

盲腸結紮穿刺 (cecal ligation and puncture: CLP)



・開腹して盲腸を末端より 1.5cm の所で結紮。
・盲腸を 20Gy 針で穿刺し、少量の糞を絞り出して、腹腔内に戻す。

② 熱傷モデルマウス

人参養栄湯を混合した飼料(餌中濃度:5%)を3週間にわたって自由摂取させた後、重症熱傷モデルを作製した。マウスを麻酔下(3種混合麻酔、ドミトール+ドルミカム+ベトルフェール)に背部を剃毛し、高温浴槽(FSGPD28)を用いて9秒間94°Cの熱湯で熱傷(痛覚の消失するⅢ度熱傷、熱傷範囲は全体表面積の30%)を加えた。処置後、蘇生輸液として生理食塩水1mlを皮下注入した。

1 コースで、通常飼料を投与した MF 群(Burn+/NYT-):6 匹と NYT 投与群(Burn+/NYT+):6 匹を作製して、12 週間観察を施行した。本研究では治療効果として、Ⅰ:生存率 Ⅱ:下腿筋肉量(隔週で CT による下肢骨格筋の体積測定/観察期間終了時に下肢骨格筋を採取) Ⅲ:握力(隔週でグリップテストによる上肢または四肢の握力測定)、また Ⅳ:下腿筋の分子学的評価(筋萎縮に関連する発現タンパクの解析)を施行した。

熱傷モデル

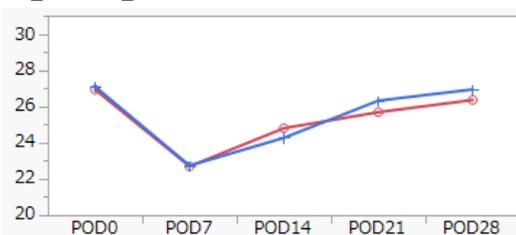
処置前 1週後



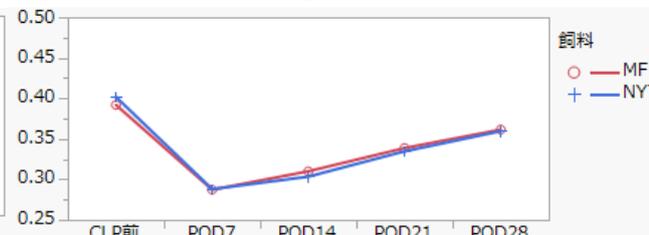
4. 研究成果

腹膜炎モデルマウス(盲腸結紮穿孔:CLP)を作成し、NYT 投与群(18 匹)と MF 群(18 匹)との治療効果を比較した。動物用 CT(Lathela LCT-200)により下肢骨格筋の体積を測定、またグリップテストによる筋力測定を行い、4 週間観察を施行した。生存率は NYT 投与群(12/18 匹)、MF 群(8/18 匹)で有意差は認めなかった(P 値:0.33)。体重(P 値:0.81)、下肢骨格筋体積(P 値:0.97)で有意差を認めなかった。

【体重】

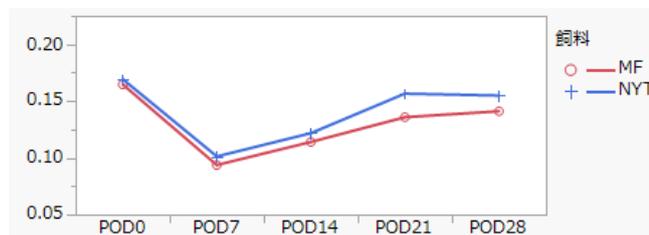


【下肢骨格筋体積】



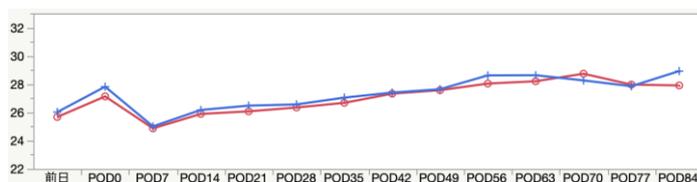
NYT 投与群では、水平方向の上肢握力で改善傾向を認めた(P 値:0.03)。採取した下肢骨格筋をコンパートメントごとに評価を行い、正の傾向を認めた前脛骨筋(P 値:0.09)と腓腹筋(P 値:0.20)において Western Blotting を施行。蛋白合成に関係する 4E-BP1, また蛋白分解に関係する Atrogin-1 に変化は認めなかった。

【握力-水平】

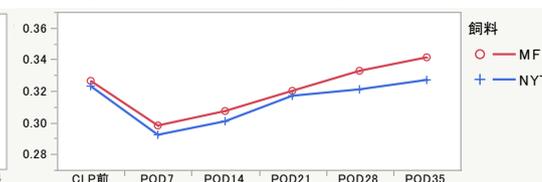


重症熱傷マウスモデル(Ⅲ度熱傷, 体表面積 30%)に対して、NYT 投与群(6 匹)と MF 群(6 匹)との治療効果を比較、腹膜炎モデルと同様に隔週で下肢骨格筋体積と筋力測定を施行して12 週間観察を施行した。生存率は NYT 群(6/6 匹)、MF 群(5/6 匹)で有意差は認めなかった。体重(P 値:0.80)、下肢骨格筋体積(P 値:0.57)、下肢骨格筋体積/体重(P 値:0.26)、下肢骨格筋体積/脛骨長²(P 値:0.64)で改善は認めなかった。全期間中に両群間で、上肢握力(P 値:0.88)また四肢握力(P 値:0.60)に有意差は認めず、4 週間の時点でも上肢握力に差は認めなかった(P 値:0.25)。

【体重】

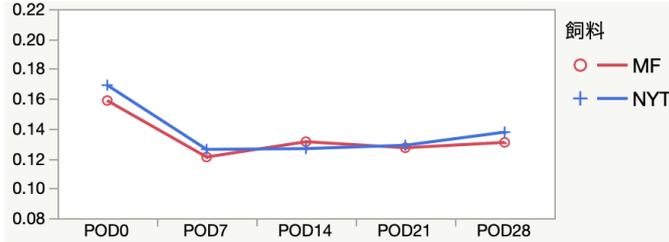


【下肢骨格筋体積】

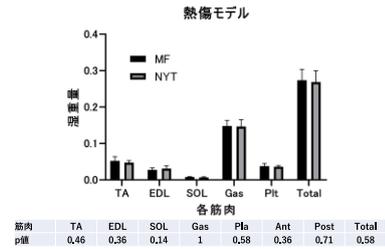


観察終了時に採取した下肢骨格筋の質重量(前脛骨筋 P 値:0.46, 長趾伸筋 P 値:0.36, ヒラメ筋 P 値:0.14, 腓腹筋 P 値:1.00, 足底筋 P 値:0.58)に有意差は認めなかった。

【握力-水平】



【下肢湿重量(12週後)】



本研究では、腹膜炎マウスに対する人参養栄湯の骨格筋萎縮予防効果を示すことは出来なかった。腹膜炎マウスでは、侵襲後に極端な食餌摂取量の低下を認めるため、人参養栄湯が十分に摂取できておらず、このため治療効果に差が出なかった可能性が考えられた。このため、侵襲により体重が著明に減少するが、侵襲後も食餌が比較的安定して摂取できる重症熱傷モデルマウスに着目した。先行研究を元に、重症熱傷モデルを作成し人参養栄湯の効果を検証したが、体重および骨格筋量に差は認めなかった。腹膜炎モデルマウスにおいて、NYT 群では侵襲後 4 週間の時点で上肢握力の改善を認めた。人参養栄湯は、代謝や熱産生に関わる多くの遺伝子発現の制御する PGC-1 α を活性化し、骨格筋でのミトコンドリアの生合成の促進や、遅筋の成分である I 型 Myosin heavy chain の増加を誘導することが知られている。本研究では PGC-1 α の発現については評価できなかったが、侵襲後早期での骨格筋の質を改善する可能性が示唆された。骨格筋萎縮に対して、薬剤による栄養療法の介入を行った効果を検証した研究は殆どなく、救急治療の領域で今後ますます重要となるサルコペニアに対する栄養療法を用いた治療介入の基盤研究が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

特記事項なし

<p>特記事項なし</p>

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
研究協力者	山川 一馬 (Yamakawa Kazuma)	大阪医科薬科大学・救急救命科・准教授 (34401)	

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
---------	---------