

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592024

研究課題名（和文）

敗血症病態における画像を用いた生体内熱エネルギー動態と生体内代謝動態の可視化

研究課題名（英文） Visualization of the thermal energy change and the metabolism change in the body during sepsis

研究代表者

佐藤 格夫（SATO NORIO）

京都大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30409205

研究成果の概要（和文）：敗血症は感染によって引き起こされた全身性炎症性反応症候群（SIRS）であり、エネルギー代謝は著しく亢進し、蛋白代謝は異化に傾き筋蛋白の崩壊が起きるとされる。熱産生に関わる肝臓や骨格筋における代謝像変化は重要であり、栄養投与による代謝像変化とその有効性に期待がかかる。免疫調整栄養剤投与下における敗血症病態下での肝臓、筋肉に対して核磁気共鳴法を用いることで、全体の代謝像変化を捉えることに成功した。

研究成果の概要（英文）：Sepsis is systemic inflammatory response syndrome (SIRS) caused by infection. Energy metabolism is remarkably aggravated and hyper catabolism resulted in protein breakdown. It is important to understand metabolic change in liver and muscle which are mainly related heat production. Nutrition is expected to suppress inflammatory reaction and improve metabolic changes. We successfully demonstrated metabolic changes between immune-modulating diet and control diet under septic insult using nuclear magnetic resonance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,330,000	990,000	4,320,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：敗血症、代謝動態、免疫調整栄養剤、ホエイプロテイン、n-3 系脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症は感染によって引き起こされた全身性炎症性反応症候群（SIRS）であり、敗血症の病態には感染に対する自己防御機構が大きく関与する。自己防御機構として、神経

内分泌系反応や免疫炎症反応の賦活が関与し、その結果代謝動態に大きな変化が認められる。一般にエネルギー代謝は著しく亢進し、蛋白代謝は異化に傾き筋蛋白の崩壊が起きるとされる。体内で生成される熱エネルギー

は個々の細胞レベルでエネルギー産生に関与しているが、主には肝、脳、骨格筋など深部器官であると考えられている。筋線維の最も重要な収縮タンパク質であるミオシンは ATP を分解してアデノシン二リン酸 (ADP) を生成する酵素として作用し収縮を引き起こすのに必要なエネルギーの遊離が行われる。筋収縮が起きていない時は少量の ATP が分解されている。過剰量の ATP が細胞内で利用できる時、そのエネルギーの多くはホスホクレアチン合成に使用され、エネルギーの蓄積をしている。すなわち、ホスホクレアチンが十分にあれば、ADP から ATP を産生し、ATP 濃度の恒常性を可能な限り維持しようとする。敗血症の重症患者から筋肉生検をすると、生存群はアデノシン三リン酸 (ATP) が維持、上昇するが死亡群では ATP が減少しているとの報告がある。また、敗血症患者では、グルタチオン、アスコルビン酸の血中濃度が低下するとの報告が多く、さらに筋肉でのグルタチオン濃度は敗血症の重症度と相関関係があるとの報告がある。敗血症に伴う筋肉や肝臓などでの熱産生像変化、代謝像全体の変化など不詳である。

(2) 重症敗血症患者は強い侵襲から過度な炎症反応状態や免疫機能低下状態が引き起こされ、高頻度に多臓器障害を呈し、時に致死合併症につながる。臨床的な治療としては、感染源のコントロールと抗菌薬投与、組織灌流を維持するための輸液や適切な血圧を維持するための昇圧剤、呼吸不全に陥った際の人工呼吸管理、腎機能障害に対する透析が挙げられる。また、一方で敗血症の治療の一端として早期からの栄養投与が重要と考えられている。1990年代から2000年代前半まで免疫賦活栄養剤の重要性が注目されたが、最近の一つ一つの栄養素の役割に注目が

集まっている。例えば、アルギニンは重症敗血症状態時には投与を控えること、重症敗血症時にはグルタミンやタウリンの血中濃度が低下すること、グルタミン投与に関してはヨーロッパを中心に経腸投与よりも静脈投与に効果が期待できること、また n-3 系脂肪酸が抗炎症作用を示すことなど期待されているものの、それぞれの代謝動態は混沌としているのが現状である。免疫賦活栄養剤、免疫調整栄養剤などの使用における、敗血症状態における肝臓や筋肉など臓器での全体的な代謝像変化というのは不詳である。

2. 研究の目的

熱産生、代謝動態に大きく関与する肝臓、筋肉に関して、敗血症 Lipopolysaccharoid LPS 投与モデルを用いて体温変化、代謝像変化に関して検討をする。

3. 研究の方法

(1) S-D ラットをイソフルレンにて麻酔導入を行う。静脈ライン、動脈ラインを確保し動脈圧、心拍数、体温をデータ収録・解析システム Power Lab に装着記録を開始する。体温測定は温度センサープローブを肝臓、筋肉へ留置し、持続的測定が可能な状態とする。LPS (E-coli, SIGMA) を 10 mg/kg 静脈内投与し敗血症病態を作成し、計測が終了するまでイソフルレンにて維持麻酔を行う。

(2) 免疫調整栄養剤とコントロール栄養剤の自然傾口摂取投与を7日間行い、適宜体重計測を行う。体重増加に栄養剤間に差が無い事を確認後に LPS 10mg/kg の腹腔内投与を行う。LPS 投与6時間後に肝臓、筋肉を速やかに採取し、採取直後に液体窒素にて凍結を

行う。その後-80度で検体測定準備まで凍結保存を行う。

NMR(nuclear magnetic resonance、核磁気共鳴)測定試料の調整

Yoshiokaらの方法 (Magn Reson Med Sci. 1(1): 7-13, 2002) に従い、クロロフォルム・メタノール・水等の混合溶媒を用いて、エマルジョンを起こさずに短時間で抽出が可能な生体試料溶媒抽出器 (Centractor™、ユニフローズ製) によって遠心抽出し、二層に分離する。上層 (水・メタノール層) と下層 (クロロフォルム・メタノール層) をそれぞれ分取、溶媒を除去後、上層は内部ロック用重水 (D₂O) 540 μL に溶解後およびケミカルシフト確認用内部標準物質3-(トリメチルシリル)-2,2',3,3'-テトラジユウテロプロピオン酸 (TMSP-d₄) 溶液60 μLを加える。下層 (クロロフォルム・メタノール層) は重クロロフォルム (CDC13) 600 μLに溶解させ、ケミカルシフト確認用内部標準物質テトラメチルシラン (TMS) を適量加える。それぞれの溶液をガラス性NMR試料管に入れる。

b) NMR測定

i) NMR装置

7 テスラ (300MHz) FT-NMR装置 (JEOL製、日本医科大学 NMR研究施設に既設) を使用する。

ii) NMRデータの処理・解析

測定核種はプロトン (¹H) について行う。標準的な一次元スペクトル測定のほか、水信号消去 1次元測定、CPMGシーケンスによる T₂ フィルタ測定スペクトル測定などを行って生データを収集する。

収集した NMR 生データは、Alice2 for Metabolome™ (JEOL) を用いて処理し、(統計的) パターン認識による解析を行う。データを可視化 (マッピング) を検討する。

4. 研究成果

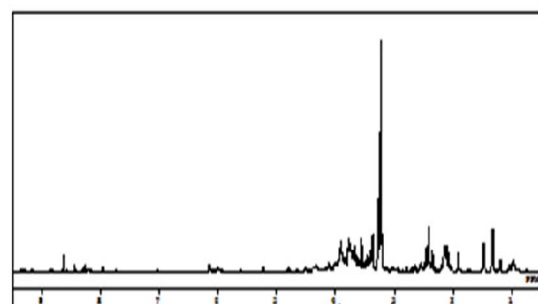
(1)

体温測定に関しては、持続麻酔下において体温低下の減少傾向を認めると共に、一定の見解を得ることが困難であった。エネルギー産生などを見るに当たり、臓器の持続的モニタリングは体温センサーなどを腹腔内などに埋め込み、体温変化をみることの改善点などが必要と考えられた。但し、体温変化を持続的に in vivo MRI 画像で捉えるには、持続麻酔が必要であり、当初の in vivo MRI での検討は、一時断念をすることとした。

(2)

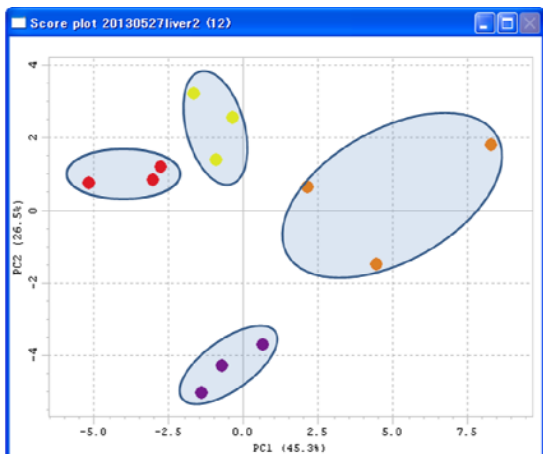
ホエイプロテイン、n-3 系脂肪酸を添加した免疫調整栄養剤とコントロールとして似た組成だが、カゼイン、n-6 系脂肪酸を添加した栄養剤を比較検討した。7 日間の栄養投与にて体重増加は同程度であり、群間に差は認めなかった。LPS10 mg/kg もしくは生理食塩水の腹腔内投与を行い、6 時間後に肝臓、筋肉の検体を採取した。

肝臓における ¹H-NMR スペクトル画像を下に示す



¹H-NMR spectra of Liver

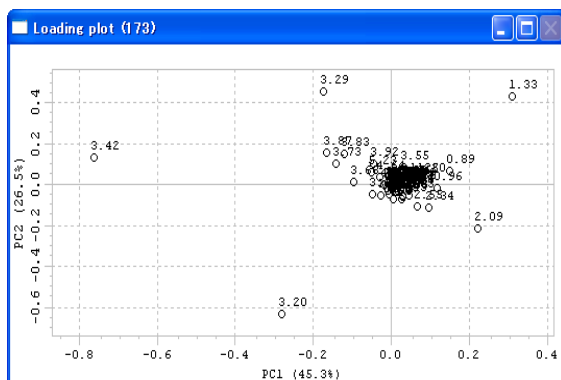
肝臓における代謝像変化のクラスター化を下図に示す。



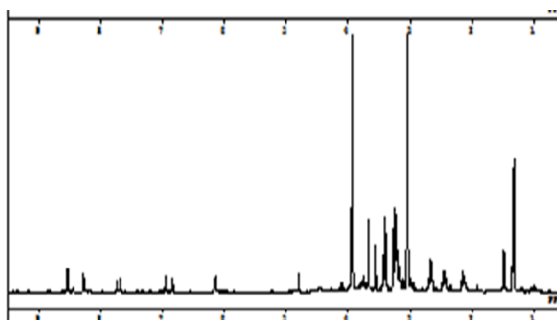
- Immunomodulating diets (Wheyprotein, n-3 fatty acid) + 生理食塩水
- Standard diets (casein, without n-3 fatty acid) + 生理食塩水
- Immunomodulating diets (Wheyprotein, n-3 fatty acid) + LPS 10 mg/kg
- Standard diets (casein, without n-3 fatty acid) + LPS 10 mg/kg

免疫調整栄養剤とコントロール栄養剤投与後に生理食塩水を投与した群は比較的類似した場所に位置するが、明らかに肝臓での代謝像に違いが認められた。また、LPS 投与することで、大きく代謝像に変化が生じた。免疫調整栄養剤 LPS 投与群とコントロール栄養剤 LPS 投与群では大きな異なる代謝像変化を認めた。

Loading plot を下図にしめす。

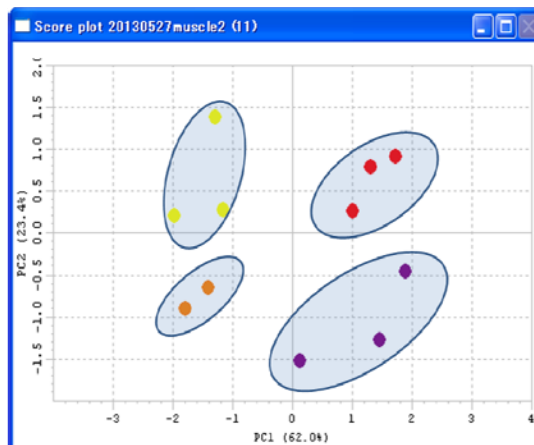


筋肉における 1H-NMR スペクトル画像を下に示す。



1H-NMR spectra of quadriceps femoris muscle

肝臓における代謝像変化のクラスター化を下図に示す。

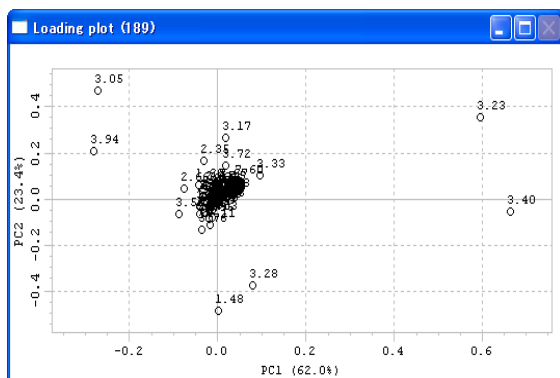


- Immunomodulating diets (Wheyprotein, n-3 fatty acid) + 生理食塩水
- Standard diets (casein, without n-3 fatty acid) + 生理食塩水
- Immunomodulating diets (Wheyprotein, n-3 fatty acid) + LPS 10 mg/kg
- Standard diets (casein, without n-3 fatty acid) + LPS 10 mg/kg

免疫調整栄養剤とコントロール栄養剤投与後に生理食塩水を投与した群は比較的類似した場所に位置するが、明らかに筋肉での代謝像に違いが認められた。また、LPS 投与することで、大きく代謝像に変化が生じた。免疫調整栄養剤 LPS 投与群とコントロール栄養

剤 LPS 投与群では大きな異なる代謝像変化を認めた。

Loading plot を下図に示す。



敗血症における肝臓、筋肉の代謝動態が大きく変化しており、しかもホエイプロテイン、n-3 系脂肪酸を強化した免疫調整栄養剤の使用により代謝動態が大きく変化することを核磁気共鳴法により示すことが可能である。今後、一つ一つの代謝動態に加えてと全体的な代謝変化の理解が病態把握に有用であると考える。

5. 主な発表論文等

現在、NMR 計測後の詳細な解析データ分析に取り組んでおり、間もなく終了予定である。その後学会発表、論文発表などを作成予定である。

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 格夫 (SATO NORIO)

京都大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30409205

(2) 研究分担者

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

鈴木崇生 (Suzuki Takao)

京都大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：40328810