

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591905

研究課題名(和文) 肝硬変肝機能障害およびその術後経過が好中球の機能および膜脂脂肪酸構成に及ぼす影響

研究課題名(英文) Composition of fatty acids in phospholipids and functions of neutrophils in patients with malnutrition induced by liver dysfunction after surgery

研究代表者

瀧藤 克也 (TAKIFUJI, KATSUNARI)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00254540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：肝機能障害による術前栄養不良例の術後好中球リン脂質脂肪酸構成を検討した結果、術後経過が良好であっても、栄養不良を有さない症例に比べて術前値への回復が明らかに不良であった。一方、好中球膜リン脂質中のEPAは栄養不良のない症例と同様に低値のままを推移した。好中球機能として、貪食能は術後1から4日目に上昇し、7日目から14日目に術前値に復する傾向があった。術後7日目の貪食能は好中球膜リン脂質中のアラキドン酸の低下が少ないほど貪食能は上昇した。肝機能障害による栄養不良例では、好中球膜リン脂質中のアラキドン酸が低下して好中球の貪食能が傷害されることが判明した。

研究成果の概要(英文)： The fatty acid composition of phospholipids in human neutrophils and functions of neutrophils was determined in surgical patients with malnutrition induced by liver dysfunction. The recovery of arachidonic acid(AA) in these neutrophil phospholipids with malnutrition was poorer than that of patients without malnutrition, even if these postoperative courses were safe. As neutrophil functions, the phagocytic activity increased gradually from the first day after an operation to the fourth day and tended to return to a preoperative value on the 14th day. On the seventh day, the decrease in the phagocytic activity was correlated with the decrease rate of AA in neutrophil phospholipids of patients with malnutrition induced by liver dysfunction.

These findings show that the malnutrition induced by liver dysfunction may affect the amount of arachidonic acid in the neutrophil phospholipids and the phagocytic activity of the neutrophil after surgery.

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：膜リン脂質脂肪酸構成 好中球機能 肝機能障害

1. 研究開始当初の背景

消化器外科、特に肝硬変・肝機能障害時の周術期管理に際しては、術後感染症の発症に伴い肝機能のさらなる悪化などから多臓器不全に陥り、その管理に難渋し、不幸な転機をとることも少なくない。術後感染症の治癒課程で大きく関与する好中球は、感染巣において細菌などの異物の貪食と殺菌を行う。一方、好中球は急性炎症病巣にも浸潤し、炎症の病態形成や遷延、さらには組織障害に関与し、その原因はエラスターゼを中心としたプロテアーゼ(蛋白分解酵素)や活性酸素を過剰産生・放出であることが解明された。さらに、好中球機能発現における細胞内情報伝達機構に関する研究が進み、特に、活性酸素産生には好中球のリン脂質やリン脂質由来の脂肪酸が深く関わっていることが明らかになってきた。好中球におけるリン脂質は、単に細胞膜の構成成分としてだけでなく、イノシトールリン酸による細胞内情報伝達やロイコトリエン、血小板活性化因子(PAF)などによる細胞間情報伝達などにおいても重要な役割を担っている。好中球の活性化いわゆるシグナル伝達機構は、活性酸素産生系を中心として、リン脂質から phospholipase D (PLD) の活性化によって生成された phosphatidic acid (PA) は還元ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸酸化酵素 (reduced nicotinamid adenine dinucleotide oxidase ; NADPH oxidase) を刺激し、活性酸素産生に関与することが明らかとなった。この PLD の活性化にはリン脂質から遊離したアラキドン酸、オレイン酸などの不飽和脂肪酸が関与する。ホスホリパーゼ A2 (phospholipase A2 ; PLA2) はリン脂質の 2 位の脂肪酸を遊離する酵素であるが、外科侵襲時を含めた炎症時には TNF- α 、IL-1 といった炎症性サイトカインによって誘導される s-PLA2-IIA が 1989 年クローニングされ、汎発性腹膜炎患者において、死亡例では生存例に比べて s-PLA2-IIA が高く、TNF- α 、IL-1、IL-8 などの炎症性サイトカインや Nox などの因子との間に相関関係を認めたと報告されている。また、in vitro では s-PLA2-IIA によるリン脂質代謝産物である LTB₄ と PAF は好中球機能の priming 効果に関与している。このように、リン脂質からの脂肪酸の遊離が侵襲時の好中球の活性化に深く関与していることは明白である。

実際に、我々が健常人の好中球リン脂質構成脂肪酸を調べた結果、オレイン酸が 35.5%、アラキドン酸が 16.4% と PLD を活性化する不飽和脂肪酸が血清総脂質脂肪酸に比べて多く含まれており、好中球では外界からの刺激に対して、リン脂質を供給源とした速やかな活性酸素産生活性化機構が備わっていることが判明した。次に、実際に消化器癌の手術を受けた患者での好中球のリン脂質構成脂肪酸の術後経過を検討した。術後経過が良好であった症例では、術後 1 日では好中球のリン脂質を構成する脂肪酸はすべて減少した。特に、アラキドン酸と EPA が他の脂肪酸に比べ、大きく減少したが、これには細胞質 PLA2 (cytosolic PLA2 : cPLA2) の関与が考えられた。さらに、術後経過良好例が経過の回復とともに、術前値に復する傾向を認めたのに対して、術後感染を

発症例では術後 7 日以降、さらに減少したが、一般に術後感染は術後 4 日前後に発症し、7 日前後に症状が顕著になることから、好中球リン脂質アラキドン酸の術後変動は術後経過に関連があることを見いだした。

好中球機能について、同時に測定した好中球リン脂質アラキドン酸との関連性をみると、術後 7 日では活性酸素産生能は負の相関、貪食能は正の相関を認めた。術後感染例では貪食能は減弱、活性酸素産生能は亢進し、臓器障害を招来する結果となり、同時に好中球リン脂質アラキドン酸が減少していることから、リン脂質からの脂肪酸の遊離が好中球機能に大きく関与している可能性がある。さらに、術前に脂肪乳剤を投与しておく、特に術後 7 日以降で、好中球リン脂質リノール酸が投与例で術前値に復する傾向を認めたのに対して、非投与例では低値のまま推移し、術前の適切な栄養補助により術後の好中球機能を良好に維持できる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト末梢血の好中球の膜リン脂質を構成する脂肪酸が好中球機能におよぼす影響に着目し、術後感染症の発症が術後経過に大きく関与する肝硬変肝機能障害時の周術期の好中球膜リン脂質脂肪酸構成を検討し、われわれが既に明らかにしている肝機能障害のない症例の術後経過と対比して、肝機能障害時の特徴を明らかにすると同時に、好中球の機能と術後経過におよぼす影響を検討する。

我々は既にリン脂質(乳化剤)として、phosphatidylglycerol (PG) を用いると、動物実験ではあるが、肝硬変肝切除後でも血中で速やかにアポ蛋白を受け取り、肝臓に取り込まれ代謝されることを証明した。肝硬変肝機能障害時の周術期の好中球の状態とその機能の変化を明らかにすることで、術前より好中球の状態を改善できる可能性が示唆され、肝機能障害時でも周術期に工夫して適切な脂肪酸を投与すれば、すなわち、特に術前に適切な栄養補助を行うことにより、好中球の機能を調節できる可能性があり、術後感染予防に対し有用な手段となり得ると推察した。

3. 研究の方法

肝機能障害例の周術期(術前、術後 4 日、7 日、14 日)のヒト末梢血好中球から細胞膜を構成するリン脂質を分離しリン脂質を構成する脂肪酸分析を行い、それぞれの脂肪酸をガスクロマトグラフィーで定量することで白血球の細胞膜脂肪酸構成を評価した。測定は、ヘパリン採血した末梢血に 2% デキストラン溶液を加え、その上清を Ficoll-Paque 液に重層し、上清および単球・リンパ球層を吸引除去して好中球を採取し、Bligh-Dyer 法を用いて総脂質を回収した。回収した総脂質から aminopropyl-NH₂ カラム法を用いてリン脂質を分取した。リン脂質構成脂肪酸のラベル化を行い、高速ガスクロマトグラフィーでマルガリン酸を内部標準として脂肪酸を分離定量した。

同時に、ヒト末梢血好中球の貪食能と殺菌能を測

定し、リン脂質を構成する脂肪酸の分析結果との関係を検討した。食食能の測定は血液に2.0 μ m FITC 標識ビーズを添加し、溶血処理後、Flow cytometryにて、無処理群を対照として、その陽性率(%)を算出した。活性酸素産生能は血液にDCFH-DAを添加し、Phorbol 12-myristate 13-acetateを加えFlow cytometryにて無処理群を対照として、{PMA 刺激検体の(陽性率) \times (平均蛍光強度)}- {PMA 刺激(-)検体の(陽性率) \times (平均蛍光強度)}で算出し、累積蛍光強度(cumulative fluorescence intensity, C.F.I)で表わした。

これらの結果から、肝機能障害時に術前の栄養状態として血清アルブミン、リンパ球数などの栄養指標が周術期の好中球のリン脂質脂肪酸と好中球機能に及ぼす影響を検討した。また、術前の脂肪乳剤の静脈内投与例で、血清総脂質脂肪酸および好中球のリン脂質脂肪酸および好中球機能に及ぼす影響も検討した。

4. 研究成果

(1)肝機能障害による血清アルブミンが3.5g/dl未満の術前栄養不良例は22例あった。このうち術後経過良好例は14例(63.6%)、術後に感染症を発生した症例は8例であった。以前に測定した肝機能に異常を認めなかった症例の結果と比較すると、好中球リン脂質脂肪酸構成では術後感染症を発生すると肝機能障害を認めなかった症例でも術後4日目以降で末梢血好中球のリン脂質脂肪酸、中でもアラキドン酸や多価不飽和脂肪酸/飽和脂肪酸(PUFA/SFA)比は術後14日目まで低値を推移し、この傾向は肝機能障害を有する場合でも同様で、肝機能障害の有無による経時的な差は全く認めなかった。一方、肝機能障害による術前栄養不良例では、たとえ術後経過が良好であっても、術後感染症発症例のように術後7日目以降も低値のまま推移はしなかったが栄養不良を有さない症例に比べて術前値への回復が明らかに不良であった(図1)。

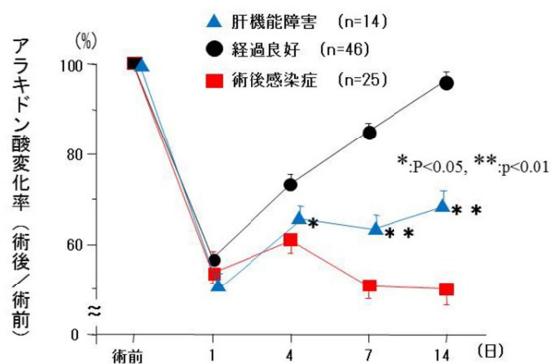


図1. 術後好中球リン脂質脂肪酸の変動

栄養不良例では血清総脂質脂肪酸のうち、アラキドン酸と、その生体内合成のもととなるリノール酸は周術期を通して低値であることを既に確認しているが、肝機能障害時でも同様に生体内のn-6系脂肪酸の貯蔵が減少しているため、術後の好中球リン脂質膜脂肪酸の中でもアラキドン酸の回復が術後14

日でも不良であった原因の1つと考えられた。

一方、好中球膜リン脂質中のEPAの術後変動を検討した結果、術後1日でアラキドン酸と同様に術前値の57%まで減少した。その後は、アラキドン酸は他の脂肪酸と同様に手術侵襲からの回復に伴い術前値に復する傾向を認めたが、EPAは栄養不良のない症例と同様に低値のままを推移した。

(2)好中球機能を測定しえた20例は、術後経過良好例が13例、術後感染発症例は7例であった。食食能は術後1から4日目に上昇し、7日目から14日目に術前値に復する傾向があった。一方、活性酸素産生能は術後1日目から4日目にかけて上昇し、術後14日目まで持続する傾向を認めた。肝機能障害時には術後7日目~14日目にかけて栄養不良のない症例に比し術前値への回復が明らかに不良であった。そこで、術後7日目における好中球のリン脂質アラキドン酸変化率と食食能および活性酸素産生能との相関を検討したところ、活性酸素産生能には明らかな相関は認めなかったが、食食能は好中球膜リン脂質中のアラキドン酸の低下が少ないほど食食能は上昇した($r=0.69$, $p<0.01$) (図2)。

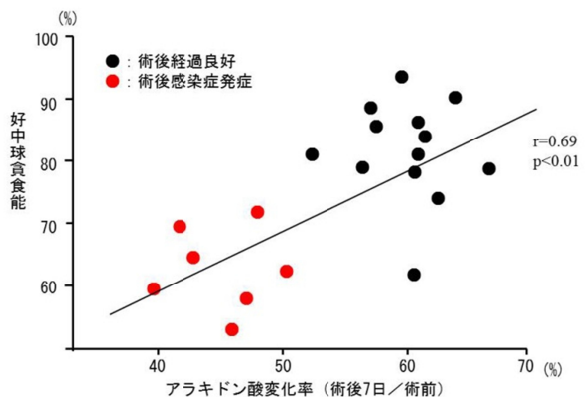


図2. 肝機能障害時の好中球リン脂質脂肪酸と好中球機能

肝機能障害による栄養不良例では、必須脂肪酸の体内貯蔵は枯渇傾向にあることが想定され、異化が促進する手術後にはさらに減少して、好中球の膜リン脂質脂肪酸構成に影響をおよぼす可能性が示唆された。好中球の膜リン脂質中のアラキドン酸が低下すると好中球の食食能が傷害され、感染免疫力の低下に繋がる。肝機能障害による栄養不良例では、手術前に十分な必須脂肪酸の供給が必要であると考えられるが、どの様にして供給するかは今後の課題である。

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)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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・准教授
研究者番号：00254540

(2) 研究分担者

松田 健司 (MATSUDA KENJI)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：30398458

堀田 司 (HOTTA TSUKASA)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50244744

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

(3) 連携研究者

なし
()
研究者番号：