

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25504004

研究課題名(和文) 出血性ショックモデルラットを用いた魚油脂肪乳剤投与の抗炎症作用の解析

研究課題名(英文) Anti-inflammatory effects of fish-oil containing lipid emulsion in a rat model of hemorrhagic shock

研究代表者

小林 哲幸 (Kobayashi, Tetsuyuki)

お茶の水女子大学・基幹研究院・教授

研究者番号：50178323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： ω -3脂肪酸は種々の炎症病態において抗炎症作用を示すが、出血性ショックなどの救急救命医療における ω -3脂肪酸の臨床栄養学的意義については検討が不十分であった。本研究では、出血性ショックモデルラットを用いて、 ω -3脂肪酸を強化した魚油脂肪乳剤を臨床に近い条件下で投与し、その抗炎症効果を解析した。その結果、短時間の ω -3脂肪酸投与によって肺や腸管の障害が有意に抑制されるとともに、ショック時の循環動態改善効果が認められた。また、EPA由来の各種代謝物の有意な増加も観察され、これら脂質代謝物が循環動態改善や抗炎症作用に関与していることが示された。

研究成果の概要(英文)：Omega-3 polyunsaturated fatty acids show an anti-inflammatory effects on various inflammatory diseases, while its nutritional significance for emergency therapy was not yet clear. In this study, a lipid emulsion containing fish oil was administered intraarterially 90 min before hemorrhagic shock of rat to assess the anti-inflammatory effect of Omega-3 fatty acids. It was shown that the short-term pre-administration of fish oil-containing lipid emulsion palliated hypotension and hypoxia in hemorrhagic shock, together with moderation of the severe pulmonary and intestinal disorders. Lipid metabolome analysis using liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry showed the significant changes of some Omega-3 fatty acid metabolites, which may be involved in its anti-inflammatory effects on hemorrhagic shock.

研究分野：脂質生化学

キーワード：救急救命医療 脂質栄養 出血性ショック 脂質メディエーター 質量分析 オメガ3脂肪酸 脂肪乳剤 魚油

1. 研究開始当初の背景

外傷に伴う多量出血により虚血状態となり代謝が損なわれる症状を出血性ショックと呼ぶ。これに対する救命救急措置として輸血が行われると、急激な血液再灌流による酸化ストレスから炎症性メディエーターが産生され全身を循環し、急性肺障害や多臓器不全症候群等の重篤な症状を引き起こす。これらの出血性ショックに続発する遠隔臓器障害は最悪の場合死に至ることもあり、救急医療の現場で深刻な問題となっている。

3 脂肪酸は魚油に豊富に含まれており、外傷や炎症に対する効果で近年多くの報告がなされている。炎症性サイトカインや活性酸素種等の産生を減少させて炎症反応を抑制する効果や、虚血再灌流における炎症性メディエーター産生を減少させることで炎症反応を緩和させる効果のあることが報告されている。出血性ショックモデルラットを用いた我々の先行研究では、3 脂肪酸の血管内投与が血行動態を安定させ、腸管障害を軽減する可能性が示唆されている。

このように、出血性ショックとその続発性遠隔臓器障害において、3 脂肪酸は虚血再灌流後の炎症抑制と循環動態安定化の両面に効果があることが示唆されているが、詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、出血性ショックモデルラットを用いて、3 脂肪酸を強化した魚油脂肪乳剤を救命救急医療の臨床に近い条件下で投与し、6 脂肪酸を主成分とする脂肪乳剤の効果とを比較しながら、その出血性ショック病態（炎症や循環動態）に対する効果を多面的に解析し評価するとともに、リポミクス解析を行うことによって出血性ショック病態に関わる脂質メディエーターを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

雄性 Sprague-Dawley ラット(体重 300 - 350 g)に吸入麻酔(2% Isoflurane)を施し、正中開腹にて外傷を与えると同時に左内頸動脈・大腿動脈・右外頸静脈にカニューレシオンした。左内頸動脈カテーテルより心拍出量を測定した。大腿動脈カテーテルより、ラット 24 匹を NS 群・3 群・6 群の 3 つの群に分けてそれぞれ生理食塩水・3 強化魚油脂肪乳剤(Omegaven)・6 脂肪乳剤(Intralipos)を各 0.5g/kg 投与した。各群の半分は 90 分後に臓器サンプルと血液を採取し、shock-群とした。各群の残り半分は、投与 90 分後から右外頸静脈からの脱血を開始し 5 分間で血液量の 25%を脱血後、さらに 60 分間かけて総量 63%を脱血し、shock+群とした。shock+群は脱血完了直後に臓器サンプルと血液を採取した。また、出血性ショックモデルラット循環動態を観察するため、脱血開始からショック終了時までの平均動脈

血圧・心拍数、ショック終了時の乳酸値、ショック前・ショック終了時心拍出量、ショック前・ショック終了時抹消血管抵抗を測定した。一方で、観察期終了時においてエバンスブルー色素の浸潤を指標に腸管障害を測定した。

上記外傷出血性ショックモデルラットから採取した臓器サンプルより酸性 Bligh & Dyer 法により総脂質を抽出し、LC/ESI-MS/MS (QTRAP5500, ABSciex) ホスファチジルコリン (PC)、リゾホスファチジルコリン(LPC)、遊離脂肪酸について MRM モードにて測定し、Analyst software (ABSciex)によるリポミクス定量解析を行った。

4. 研究成果

(1) 3 脂肪酸あるいは 6 脂肪酸強化輸液投与による循環動態の変化

本研究の先行研究における出血性ショックラットモデルでは、平均動脈圧を一定の血圧に低下させて一定時間保つ定圧式ショックが行われていたが、3 脂肪酸を投与したラットに定圧式ショックを行うとコントロール群との脱血量に有意差が生じたため、ショックの強度や循環動態への効果を考える上で課題が残った。このため、本研究の出血性ショックラットモデルでは、脱血率を一定にする定量式ショックを用いた。種々の脱血率で検討した結果、安定した生存率を確保でき炎症病態も惹起される条件として、全血液量の 63%を脱血することとした。

実験の結果、ショック期間中平均動脈圧は、3 群は NS 群・6 群に比べて降下を有意に抑えた。また、ショック期間中の心拍数は NS 群・6 群で上昇を続けたが、3 群ではほぼ一定に保たれ心拍数の上昇を抑制した。ショック終了時の乳酸値は、3 群は NS 群・6 群に比べ有意に低く抑えられた。ショック前の心拍出量には 3 群間の有意差はみられなかった。ショック終了時心拍出量はショック前に比べ 3 群とも低下したが、3 群のみ有意に低下を小さく抑えた。抹消血管抵抗はショック開始前・終了時ともに有意差はみられなかった。

すなわち、3 脂肪酸投与により平均動脈圧・心拍数・乳酸値・心拍出量が有意に改善された。以上の結果より、3 脂肪酸の短時間投与は出血性ショック状態において循環動態改善効果があることが示された。

(2) 3 脂肪酸あるいは 6 脂肪酸強化輸液投与による臓器障害の変化

腸管障害は、NS/shock-群と比較し NS/shock+群・6/shock+群では有意に上昇がみられたが、3/shock+群では NS/shock-群との有意差がみられなかった。また、肺障害においても、NS/shock-群と比較し NS/shock+群・6/shock+群では有意に上昇がみられたが、3/shock+群では NS/shock-

群との有意差がみられなかった。

以上より、臓器の障害は 3 脂肪酸投与によって有意に抑制され、3 脂肪酸の抗炎症効果が示された。ただし、前項(1)で述べたように、3 脂肪酸は循環動態を改善する効果もあることから、障害に対する効果を評価するにあたっては、腸管での虚血状態そのものがある程度軽減化されていることも考慮する必要がある。

(3) 質量分析装置を用いたリピドミクス解析

各種臓器・組織での遊離脂肪酸 (アラキドン酸 ; AA, C20:4 6、ドコサヘキサエン酸 ; DHA, C22:6 3、ドコサペンタエン酸 ; DPA, C22:5 3、エイコサペンタエン酸 ; EPA, C20:5 3)の変動

心臓の DHA・EPA において、3 shock-群は NS shock-群に対して有意に高く、また 3 shock+群は shock-群に対し有意に低かった。DPA においても同様の傾向がみられた。AA においては NS 群・3 群ともに shock-群に対して shock+群が有意に低かったが、6 群では shock-/+群間に有意差はみられなかった。肺では 3 shock-群が他の 5 群に比べ有意に高かった。肝臓でも同様の傾向がみられ、血漿ではその傾向が非常に顕著であった。腸管では、4 種のどの脂肪酸種においても有意差は認められなかった。

心臓において、NS・3 群で shock+で低下がみられたのは脱血の影響と考えられる。一方、6 群においては shock-/+間で有意差が認められなかったことから、何らかの炎症性反応によって AA が増加したことが考えられる。

肺・肝臓は、血漿の影響を受けて類似した動態を示したと考えられる。また、血漿においてはどの脂肪酸種も 3 shock-群で蓄積され、shock+群で顕著に低下していた。この興味深い変動の機構については、今後の検討を要する。

各種臓器・組織でのリゾホスファチジルコリン (LPC)の変動

心臓において、全ての分子種で NS shock-群に比べて shock+群で増加する傾向があり、このうち LPC20:4、22:5、22:6 では有意差が認められた。また、3・6 群では shock-/+群間での有意差はみられなかったが、3 shock-/+群では NS shock-群との有意差はなく、6 shock-/+群では NS shock-群との有意差が生じ NS shock+群と同程度の値であった。ショック前後で 3 群では低い値で保たれ 6 群では高い値で保たれる傾向が見られた。

肺では、3 shock-群に比べて shock+群では低くなる傾向があり、このうち LPC18:2、20:4 では有意差がみられた。この傾向については血漿でも同様であった。また、肺ではほぼ全ての分子種で 6 shock-/+群は NS

shock-群に比べて有意に低くなる傾向がみられた。

血漿ではほぼ全ての分子種で 6 shock-/+群が NS shock-群に比べ有意に高くなる傾向がみられ、肝臓も同様の傾向を示した。また、腸管においてはどの分子種においても有意差が認められなかった。

心臓において 3 shock-/+群間で有意差が生じなかったことは、NS shock-/+群間でみられる shock+による LPC 上昇を抑制する機構の存在を示唆している。

血漿 3 系列及び 6 系列酸化脂肪酸の変動

NS または 3 投与から 90 分後のラット血漿を採取し、質量分析装置を用いて酸化脂肪酸の変動を解析した。

3 群の血漿中では、NS 群よりも 3 系脂肪酸由来の酸化脂肪酸が増加した。具体的には、EPA 由来のヒドロキシエイコサペンタエン酸 (HEPE)、ReE₃、diHEPE、DHA 由来のヒドロキシドコサヘキサエン酸 (HDoHE)、ジヒドロキシドコサヘキサエン酸 (diHDoHE) が 3 群において有意に増加した。これら代謝物の中には、生理活性を示すのに十分な濃度の分子種もあり、今後の研究により出血性ショック病態に関わる脂質メディエーターを特定できることが期待される。

一方、ラット血漿中には 6 系列の AA 代謝物も多数検出されたが、ショック依存的な増加が認められたのは PGE₂ のみであった。NS 群ラットの血漿では、AA 代謝物である PGE₂ の濃度が脱血後に有意に上昇したのに対し、3 群においては、PGE₂ 濃度の上昇が抑制された。

以上から、3 系脂肪酸投与は、それ自身の代謝物による生理活性と AA カスケード抑制の両面でショック病態緩和効果を示していると考えられた。

本研究により、出血性ショックの 90 分前という短時間に 3 脂肪酸を強化した魚油脂肪乳剤を動脈内投与することにより、循環動態が改善するとともに腸管や肺における臓器障害も軽減化することが示された。これは実際の救命救急医療の臨床に近い条件下であり、世界的に見ても報告のない新しい知見である。また、その際の脂質メディエーターの変動についてもその一部を明らかにできた。

3 強化脂肪乳剤は近年、欧米を中心に使用され始めたが、日本国内では処方製剤がなく、3 強化脂肪乳剤の有効性が示されている小児短腸症候群等の疾患治療では個人輸入に頼っている現状がある。我が国において適切な栄養療法を確立するために、本研究を初めとする 3 強化脂肪乳剤の外科領域への適用研究の成果が今後さらに蓄積されることが期待される。

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2件)

Saori Mikami, Junichi Aiboshi, Tetsuyuki Kobayashi, Mitsuaki Kojima, Koji Mirishita, and Yasuhiro Otomo. Discrete Roles of Intracellular Phospholipase A₂ in Human Neutrophil Cytotoxicity. J. Trauma and Acute Care Surgery, 79 (2): 238-246, 2015. (査読有り)

Mitsuaki Kojima, Junichi Aiboshi, Masahiro Shibata, Tetsuyuki Kobayashi, and Yasuhiro Otomo. Novel role of group VIB Ca²⁺-dependent phospholipase A₂ in leukocyte - endothelial cell interaction in acute inflammation: an intravital microscopic study in rat mesentery. J. Trauma and Acute Care Surgery, 79 (5): 782-789, 2015. (査読有り)

〔学会発表〕(計2件)

小林哲幸、鬼澤慶子、竹田宏美、三上さおり、相星淳一、「ヒト好中球活性化におけるアラキドン酸遊離とホスホリパーゼ A2 の役割」、第39回日本医用マスメクトル学会年会、三井ガーデンホテル千葉(千葉市) 2014年10月16-17日

篠美和、相星淳一「出血性ショックに対する-3脂肪酸投与の有効性の検討」、第44回日本救急医学会総会、グランドプリンス新高輪(東京・品川) 2016年11月17日-19日

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 哲幸 (KOBAYASHI Tetsuyuki)
お茶の水女子大学・基幹研究院・教授
研究者番号：50178323

(2)研究分担者

相星 淳一 (AIBOSHI Junichi)
東京医科歯科大学・医学部・講師
研究者番号：50256913

(3)研究協力者

篠 美和 (SHINO Miwa)
鬼澤 慶子 (ONISAWA Keiko)
佐藤 真知 (SATO Machi)
竹田 宏美 (TAKEDA Hiromi)
板垣 舞 (ITAGAKI Mai)