

博士学位論文


ラット敗血症モデルにおける Citrulline-NO cycle と
シトルリン補充療法の有用性の検討

近畿大学大学院
医学研究科医学系専攻
木村浩基


同意書


平成26年12月16日

近畿大学大学院
医学研究科長 殿

共著者 前川 昌平 


共著者 八木 誠 


共著者 米倉 竹夫 


共著者 竹山 宜典 

共著者 保木 昌徳 

共著者 奥野 清隆 

共著者 朴 雅美 

共著者 _____ 

共著者 森下 祐次 

共著者 _____ 

論文題目

ラット敗血症モデルにおける Citrulline-NO cycle と L-アロイニン 補充療法の
有用性の検討

下記の学位論文提出者が、標記論文を貴学医学博士の学位論文（主論文）
として使用することに同意いたします。

また、標記論文を再び学位論文として使用しないことを誓約いたします。

記

1. 学位論文提出者氏名 木村 浩基

2. 専攻分野 医学研究科 医学系 臓器病態制御 外科 学Ⅱ

博士學位論文

ラット敗血症モデルにおける Citrulline-NO cycle と
シトルリン補充療法の有用性の検討

平成 25 年 12 月

近畿大学大学院医学研究科
医学系専攻(指導:竹山宜典 教授)

木 村 浩 基

ラット敗血症モデルにおける Citrulline-NO cycle と シトルリン補充療法の有用性の検討

¹ 近畿大学医学部外科学教室 (小児外科部門)

² 近畿大学医学部外科学教室 (下部消化管外科部門)

³ 近畿大学医学部外科学教室 (肝胆膵外科部門)

⁴ 近畿大学医学部奈良病院 小児外科

⁵ 近畿大学医学部 生化学教室

⁶ 大阪樟蔭女子大学大学院 人間科学研究科 人間栄養学専攻 病態栄養学研究室

木村浩基¹, 前川昌平¹, 米倉竹夫⁴, 保木昌徳⁶, 朴 雅美⁵,

森下祐次⁴, 八木 誠¹, 竹山宜典³, 奥野清隆²

(指導: 竹山 宜典 教授)

Citrulline supplementation improves NO production through Citrulline-NO cycle in a rat sepsis model

Koki Kimura¹, Shohei Maekawa¹, Takeo Yonekura⁴, Masanori Hoki⁶, Ah-Mee Park⁴

Yuji Morishita³, Makoto Yagi¹, Yoshifumi Takeyama³, Kiyotaka Okuno²

¹ Division of Pediatric Surgery, Department of Surgery, Kinki University School of Medicine

² Division of Colorectal Surgery, Department of Surgery, Kinki University School of Medicine

³ Division of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, Department of Surgery, Kinki University School of Medicine

⁴ Department of Pediatric Surgery, Nara Hospital, Kinki University School of Medicine

⁵ Department of Biochemistry Kinki University School of Medicine

⁶ Division of Human Dietetics, Graduate School of Human Science, Osaka Shoin Women's University

(Director : Prof. Yoshifumi Takeyama)

抄 録

【目的】一酸化窒素 (NO) は endothelial nitric oxide synthase (eNOS) を触媒としてアルギニンからシトルリンとともに産生され, 微小循環保持に関与する. シトルリンは Citrulline-NO cycle を経由して NO 産生に関与している. 敗血症時には臓器灌流障害が惹起されているが, その機序は明らかではない. そこで敗血症モデルラットにおける Citrulline-NO cycle の酵素発現を中心に, シトルリン補充療法の有用性を検討した.

【方法】敗血症モデルとして盲腸結紮穿孔 (Cecal ligation and puncture : CLP) ラットを用い, シトルリン (Cit 群), アルギニン (Arg 群), アラニン (Ala 群) を添加した維持輸液を行い, 実験 I では処置後 5 日間生存率を検討し, 実験 II では処置後 2 日目の肝, 腎, 回腸でのシトルリン代謝関連酵素の発現および組織学的検討を行った.

【結果】実験 I : Cit 群の生存率は他の 2 群に比して有意に高かった. 実験 II : 肝組織では Cit 群で eNOS の mRNA レベルが有意に高値を示し, アルギニノコハク酸シンターゼ (ASS) とアルギニノコハク酸リアーゼ (ASL) は増加傾向を示したが, 腎組織で 3 群に差はなかった. また Cit 群では回腸組織における phospho-eNOS は強く発現し, 一方 iNOS タンパク質合成やアポトーシスは抑制されていた.

【結論】CLP ラットモデルへのシトルリン投与は死亡率を低下させた. その一因として, Citrulline-NO cycle の酵素, 特に eNOS の活性化の関与が考えられた. 本研究の結果からシトルリンが敗血症の治療に有用であることが示唆された.

Keywords : シトルリン, 敗血症, 微小循環障害, Citrulline-NO cycle アポトーシス

緒 言

敗血症は、感染症を基盤とした全身性炎症反応症候群（systemic inflammatory response syndrome : SIRS）と定義され、敗血症の持続によりしばしば多臓器不全を引き起こす^{1,2,3}。多臓器不全は生命維持に必要な複数の臓器・系が傷害され機能不全に陥った病態^{1,2,3}である。重篤な敗血症性ショックでは、炎症により血管内皮が障害され臓器低灌流を伴う循環不全が生じ、多臓器不全へと進行する^{4,5}。現在も本邦の集中治療室における死因の第1位は臓器不全を合併した重症敗血症である。血管内皮を保護し、微小循環を保ち、臓器灌流を維持することが、敗血症における多臓器不全の進行に対する治療目標の一つとなる^{4,5}。

血管内皮の微小循環を保持する機構としては、内皮細胞から産生された一酸化窒素（NO）が重要である^{4,5}。NOは、生体内でアルギニンからNO Synthase（以下NOS）を触媒としてシトルリンに変換されるときに産生される。NOSには誘導型NOS（inducible NOS : iNOS）、血管内皮型NOS（endothelial NOS : eNOS）、神経型NOS（neuronal NOS : nNOS）の3つのアイソフォームが存在する。iNOSは炎症などの刺激によって、誘導されたマクロファージから産生され、生体防衛的に働くが、敗血症状態の時には、iNOSによる過剰のNO産生にて、組織障害や循環障害を惹起する^{5,6}。血管内皮細胞においては、eNOSを触媒として産生されたNOは血管拡張作用、血小板凝集抑制作用、血球の接着凝集抑制作用、血管平滑筋細胞の増殖抑制作用などを有する^{4,6,7}。

アルギニンはNO産生の基質となるが、またタンパク合成のために必要なアミノ酸である。特に敗血症のストレス状態においては必要不可欠で、尿素回路でアンモニアの解毒や、細胞の分化、創傷治癒、免疫に関与している⁸。しかしながら、敗血症患者に外因性アルギニンを投与しても、血中のアルギニン値は増加せず、NO産生が増加しないという矛盾が報告されている^{9,10}。その原因として肝臓におけるアルギナーゼ1で直ちに代謝されること¹¹や、タンパク異化の亢進や酸化ストレス等により内因性NOS阻害物質である非対称性ジメチルアルギニン（Asymmetric dimethylarginine : ADMA）の血中濃度が上昇によることなどが報告されている¹²。一方、シトルリンはNO産生の副産物であるが、コドンで指定されておらずタンパク質には含まれず、生体では主に腸管において産生される遊離アミノ酸である¹³。シトルリンはアルギニンの前駆物質として全身に供給され、産生されたシトルリンの75%は腎臓でアルギニンに合成される¹⁴。またシトルリンはNO産生細胞においてアルギニンからNOと共に産生されるが、NO産生細胞内ではアルギニノコハク酸シンターゼ（Argininosuccinate synthase : ASS）とアルギニノコハク酸リアーゼ（Argininosuccinate lyase : ASL）により再びアルギニンに再合成される。この経路はCitrulline-NO cycle（Cit-NO cycle）と呼ばれており、NO産生に関与している^{15,16}。

われわれは腸管大量切除により作成したシトルリン欠乏症ラットに対するシトルリン投与は、アルギニン投与よりも有意に血漿シトルリンやアルギニンが増加することを報告した¹⁷。敗血症においてもアルギニンよりもシトルリンの方が、肝において分解されず、またADMAの影響はなくNO産生細胞に取り込まれることから、Cit-NO cycleを経由してNO産生を促し、結果として微小循環障害の改善をもたらすのではないかと考えられた。そこで今回われわれはラットにCLPを行った敗血症モデルに外因性にシトルリンを投与し、その生存率改善効果及び、Cit-NO cycleを中心とした酵素の発現について検討した。

対象と方法

1. 試薬

実験に使用したL-シトルリン, L-アルギニン, L-アラニンは協和発酵バイオ(東京)より提供された製剤を使用した。維持輸液に用いたKN3号輸液は大塚製薬工業(東京)より提供された製剤を使用した。

2. 実験動物

本実験は動物の愛護および管理に関する法律, 基本指針に基づいて作成された近畿大学医学部動物実験規程に準じ, また近畿大学医学部実験動物倫理委員会の承認を受けて施行した。

雄性Sprague-Dawleyラット7週齢200-250g(日本クレア:東京)を使用した。ラットは通常ケージ内で1週間固形飼料(CLEA Rodent Diet CE-2;日本クレア)と水道水を自由摂取させ, 順化飼育を行った後, 一昼夜絶食し実験に使用した。ペントバルビタール(ソムノペンチル[®];共立製薬:東京)35 mg/kgの腹腔内投与麻酔下に, 右外頸静脈よりPolyethylene Tubing PE 50(内径0.58 mm, 外径0.97 mm;Becton-Dickinson:Franklin Lakes, NJ)を上大静脈へ留置し, 中心静脈カテーテルとした。カテーテルは頸部から皮下トンネルを作成し背側より導出し, カテーテル保護用のコイル内を通してカニューラシーベル(スギヤマゲン:東京)と接続した。敗血症モデルはCLPモデルを使用した。ラットに2 cmの腹部正中切開を加え盲腸を取り出し, 回盲動脈盲腸枝を6-0 PDS[®](Johnson & Johnson:New Brunswick, NJ)にて結紮し盲腸間膜を切離した。盲腸末端より2 cmのところまで3-0 バイクリル[®](Johnson & Johnson)にて盲腸結紮を行った。18ゲージ針にて盲腸間膜対側に1回穿刺を行ったあと腹腔内に還納した。腹部は3-0 バイクリルにて二層縫合にて閉腹した^{18,19}。

3. 実験プロトコール

CLPモデル作成後, 輸液に添加するアミノ酸により, ①Cit群(L-シトルリン添加維持輸液), ②Arg群(L-アルギニン添加維持輸液), ③Ala群(L-アラニン添加維持輸液)の3群に分けた。ラットはすべて個別に代謝ゲージにいて, 絶飲食とし中心静脈カテーテルを:し, 下記の輸液を持続投与した。

Cit群, Arg群には, 維持輸液(KN3号輸液)にそれぞれL-シトルリン, L-アルギニンを1 g/kg/日となるように添加した。また含有窒素量調節のため, Ala群には, Cit-NO cycleに関係しないL-アラニンを2 g/kg/日となるように添加し投与した。輸液量は各群とも300 ml/kg/日とし, 以下の実験を行った。

実験I:CLP後5日間を期限として3群における生存率を検討した。

実験II:CLP後48時間後に, ペントバルビタール(35 mg/kg)を腹腔内投与麻酔下に, 再開腹し腹部大動脈より採血を行い脱血犠死させた。生理食塩水200 mlにて左心房より灌流を行った後, 肝臓, 腎臓を取り出し-80℃凍結保存し, 一部は10%ホルマリン溶液で固定した。小腸は回盲部から口側に25 cm摘出し, 肛門側5 cmを全層10%ホルマリン固定, 残りの20 cmは, 粘膜を回収し-80℃にて凍結保存した。これら得られたサンプルに対し以下の検討を行った。

1) 血液分析

採血した血液はただちに3000 rpm, 5分間遠心分離したのち血清分離し, -20℃にて一旦保存した。後日

アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST), アラニンアミノ基転移酵素 (ASL), アルカリホスファターゼ (ALP) を JSCC 標準化対応法, クレアチニン (Cr) を酵素法, 尿素窒素 (BUN) をウレアーゼ・LED・UV 法にて測定した. C 反応性タンパク (CRP) は, Rat Serum CRP ELISA Kit (ALPHA DIAGNOSTIC INTERNATIONAL: San Antonio, TX) を使用し測定した. 血漿アミノ酸分析は血漿に 6% スルホサリチル酸を添加し 3000 rpm で 15 分遠心分離し上清を採取することで除タンパクを行い, -20°C にて一旦保存後, 日立高速アミノ酸分析計 L-8900 (日立ハイテクノロジーズ, 東京) を用いてシトルリン, アルギニン, オルニチン濃度を中心に測定した.

2) Reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR) 法による肝臓・腎臓におけるシトルリン代謝関連酵素の測定

-80°C 凍結した肝臓, 腎臓は RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen: Hilden, Germany) を用いて RNA を抽出した. RNA 濃度を測定し, 500 ng を High capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems: Foster City, CA) にて逆転写し cDNA サンプルを調整した. PCR 反応は Quick Taq HS Dye Mix (東洋紡, 大阪) と eNOS, ASS, ASL 各遺伝子の特異的プライマーを用いて増幅させた. PCR 産物は 1% アガロースゲルにて分離し, エチジウムブロマイド染色後 Chemi Doc XRS + および Image Lab Software (Bio Rad) を用いて解析した. 内部標準として 28s rRNA を使用した. プライマー配列を表に示した (表 1).

表 1. プライマー配列及び各臓器の PCR サイクル数

Primer		Sequence (5'-3')	Product size (bp)	Cycles	
				Liver	Kindefe
28s rRNA	Forward	CCATCACCATCTTCCAGGAGC	483	19	19
	Reserve	GGAAGGCCATGCCAGTGAGC			
ASS	Forward	TGGAGGATGCCCCGAGTTTTAC	612	27	26
	Reserve	CTTTCCTTCCACCCGTTTCCTG			
ASL	Forward	GCGGAGTGTGAAGTCCTCTTC	600	27	26
	Reserve	TCCAGTGGCTACTTGGAGGAC			
eNOS	Forward	CGAGTAAAGAACTGGGAAGTGG	424	32	32
	Reserve	TGTAGGTGAACATTTCTGTGC			

ASS: argininosuccinate synthase, ASL: argininosuccinate lyase, eNOS: endothelial nitric oxide synthase

3) ウェスタンブロット法による腸粘膜の iNOS の発現

腸粘膜ライセートは, 凍結保存させた組織を Complete Protease Inhibitor Cocktail (SANTA CRUZ: Santa Cruz, CA) を含む CelLytic MT (Sigma-Aldrich: St Louis, MO) にてホモジネートした後, 遠心分離することで回収した. タンパク定量は bovine serum albumin を standard として Bradford 法 (Bio Rad) にて行った.

腸粘膜ライセート 40 μ g を 2×Sample buffer (和光純薬, 大阪) と混和し, 95°C で 5 分間加熱処理したものを泳動用のサンプルとして用いた. サンプルはポリアクリルアミドゲル Super sep Ace 5-20% (和光純薬) にて電気泳動した後, PVDF 膜に転写した. 一次抗体として, 抗 iNOS モノクローナル抗体 (BD Biosciences : San Diego, CA) を, 二次抗体として horseradish peroxidase-conjugated-抗マウス抗体を使用した. 抗体の希釈には Can get signal (東洋紡) を使用した. また内部標準として抗 β -actin 抗体 (Sigma-Aldrich) を用いた. ECL prime Western Blotting Detection reagent (GE healthcare : Buckinghamshire, UK) を使用し, Chemi Doc XRS + にて発光を検出した.

4) 織学的分析

10% ホルマリン溶液にて固定した回腸をパラフィン包埋し 4 μ m 厚にスライスした後 hematoxylin and eosin 染色 (HE 染色) した. 光学顕微鏡下 (倍率 40 倍) で 1 検体につき無作為に 5 ヶ所選択し画像を取り込み, pixera software (ピクセラコーポレーション : 大阪) を用いて回腸の一検体 30 本の絨毛高を測定し, その平均値を算出した.

また回腸における eNOS の検討には, eNOS の活性型である phopho-eNOS の免疫組織染色を行い評価した. 抗-phospho-eNOS (Abcam : Cambridge, UK) 及びヒストファイニンシンプルスステインキット (ニチレイバイオサイエンス : 東京) を用い Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) を使用し発色させ, 核染色には hematoxylin を用いた.

さらに回腸組織のアポトーシス陽性細胞検出には, In situ Apoptosis Detection Kit (タカラバイオ : 滋賀) を使用し TUNEL 染色を行った. 染色後蛍光顕微鏡 (倍率 100 倍) で 1 検体につき無作為に 3 ヶ所選択し, Image J を使用し, 1 視野当たりのアポトーシス陽性細胞数を測定しその平均値を算出した.

4. 統計処理

統計学的処理は統計処理ソフトウェア JMP10 (SAS : Cary, NC) を使用した. 生存時間分析は Kaplan-Meier 法により比較し, 検定は各群間での一般化 Wilcoxon 検定を使用した. アミノ酸分析, PCR の 3 群間の比較検討は, Bartlett 検定にて等分散性が認められた場合は, Turkey-Kramer 検定を, 等分散性が認められない場合は Steel-Dwass 検定にて多重比較し, 統計学的有意差は危険率 5% 未満をもって有意差ありと判定した. 平均値 \pm 標準偏差で表した.

結 果

1. 実験 I

実験 I では Cit 群 17 例, Arg 群 13 例, Ala 群 10 例で 5 日間にわたる生存時間分析を行った (図 1). 実験最終日の 5 日目まで生存したラットは, Cit 群 5 例, Arg 群 2 例であり, Ala 群は 1 例も生存しなかった. 生存率は, Cit 群と Ala 群間では 3 日目以降, Cit 群と Arg 群間では 4 日目以降において有意差を認めた. なお Arg 群と Ala 群間では差は認められなかった.

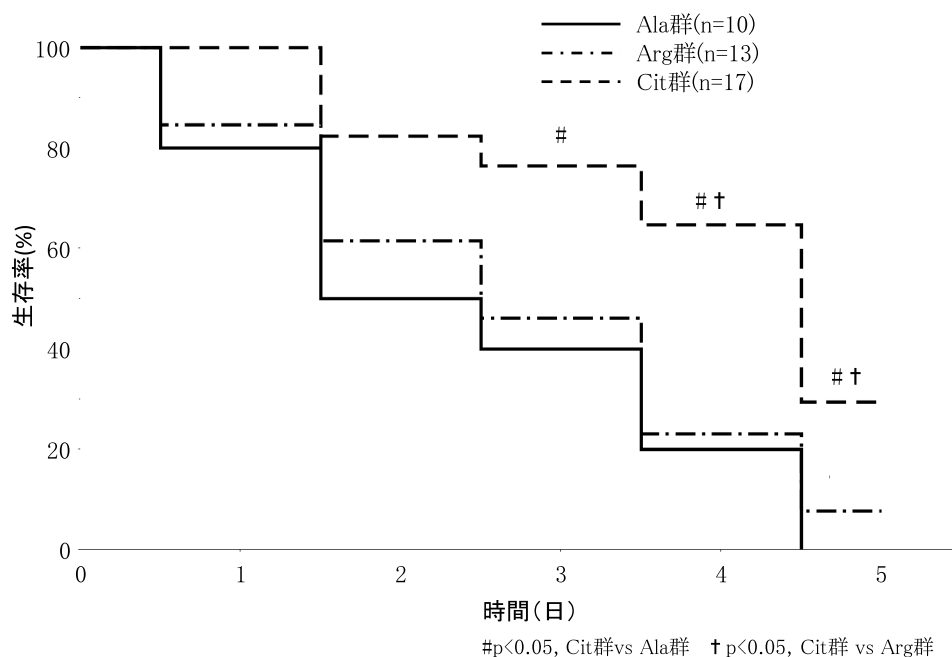


図1. 生存時間分析

Cit 群と Ala 群は処置後3日目から有意差を認めた (#).

Cit 群と Arg 群は処置後4日目から有意差を認めた (†).

2. 実験II

実験IIではCLP後48時間後に生存したCit群10例, Arg群8例, Ala群9例で下記の検討を行った.

1) 血液生化学検査

血液検査結果では血清AST, ALT, Cr, BUNは3群間に有意差を認めなかった. CRPも3群間に有意差は認められなかった. (表2)

表2. 血液生化学検査結果

	Ala群	Arg群	Cit群
AST (IU/L)	280.2±104.2	226.0±54.4	225.7±89.1
ALT (IU/L)	70.5±33.8	47.3±11.8	53.4±27.7
BUN (mg/dL)	21.27±4.74	20.32±4.25	19.36±8.10
Cr (mg/dL)	0.143±0.014	0.139±0.016	0.131±0.021
CRP (ng/ml)	37.8±14.3	52.8±14.1	43.3±24.7

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase,
ALP: alkaline phosphatase, BUN: blood urea nitrogen
Cr: creatinine, CRP: C-reactive protein

data=mean±SD

2) 血漿アミノ酸値

血漿シトルリン値は Arg 群, Ala 群に比べ Cit 群で有意に高値を呈した (図 2). 一方, 血漿アルギニン値とアラニン値は 3 群間に差を認めなかったが, Cit 群ではアルギニン値はやや高い傾向を示した.

3) 肝臓・腎臓におけるシトルリン代謝関連酵素の発現

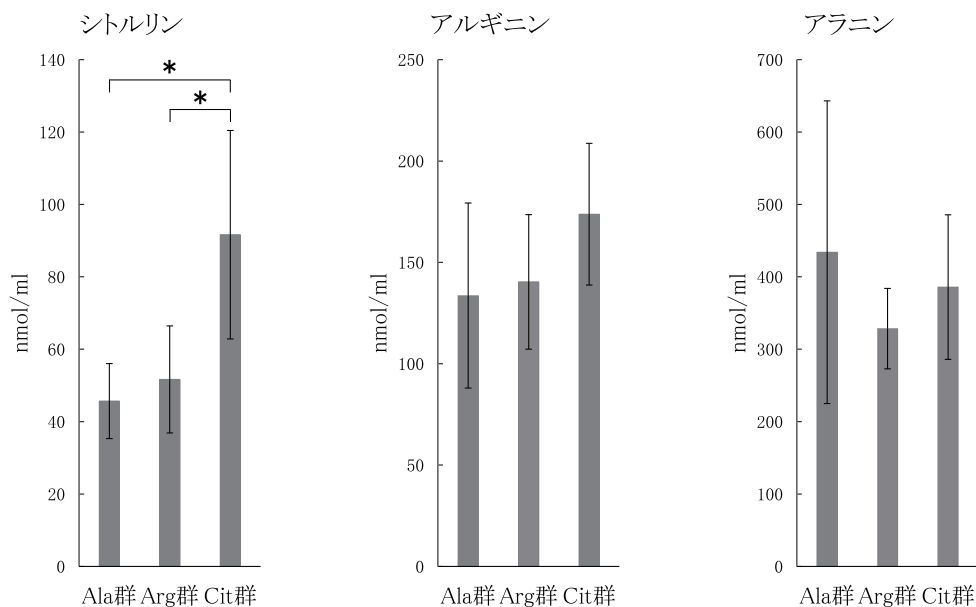
肝臓における ASS と ASL の mRNA の発現は 3 群間に有意差は認めなかったが, Cit 群に高い傾向を示した. 一方, 肝臓における eNOS の mRNA の発現は, Cit 群 (1.76 ± 0.54) は Ala 群 (1.00 ± 0.28) や Arg 群 (1.00 ± 0.22) に比べ有意に高い発現を認めた (図 3). 一方, 腎臓における ASS, ASL, および eNOS の mRNA の発現は 3 群間に差は認められなかった (図 4).

4) 腸粘膜における iNOS タンパク質の検出

ウェスタンブロット法により検討できた腸粘膜における iNOS タンパク質は, Ala 群では 8 検体中 4 検体に, Arg 群では 8 検体中 6 検体に検出していたのに対し, Cit 群で 8 検体中 2 検体のみと少なく, Cit 群では iNOS タンパク質の検出は少なかった (図 5).

5) 組織学的検討

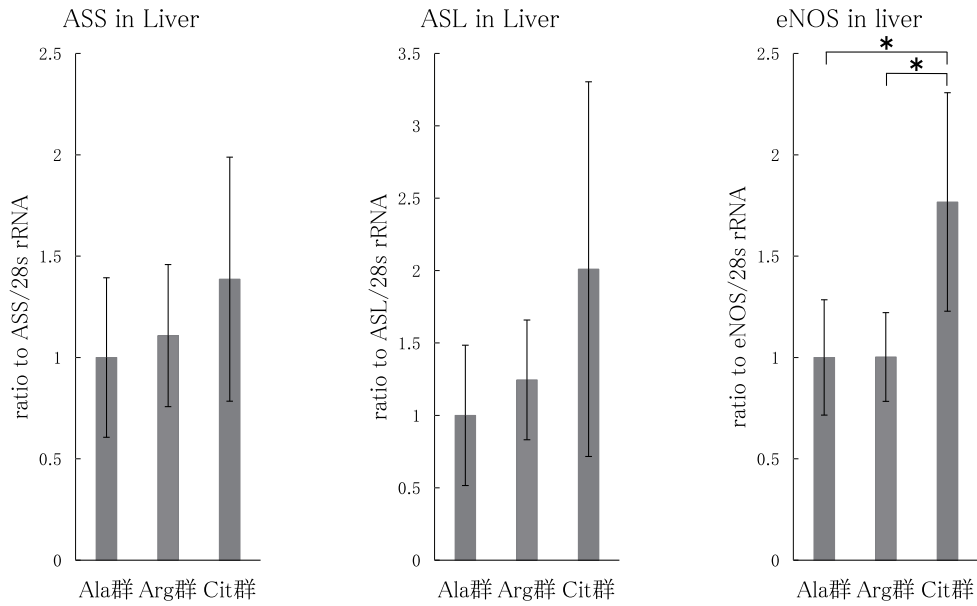
回腸における腸管絨毛高をみると 3 群間に有意差が認められなかったもの, Cit 群で高い傾向を示した (図 6). Phospho-eNOS 免疫染色にて陽性血管の出現は Ala 群で少なく, Arg 群と Cit 群は同等であった (図 7). さらに回腸で組織障害をみるために行った TUNEL 染色をみると (図 8), Ala 群では TUNEL 陽性細胞が多く出現し, Cit 群との間に有意差を認めた. Arg 群, Cit 群間では有意差は認めなかったものの, Arg 群で多い傾向であった ($p = 0.056$)



Ala群n=9 Arg群n=8 Cit群n=10 Mean±SD *P<0.05

図 2. CLP 後 2 日目の血漿アミノ酸濃度

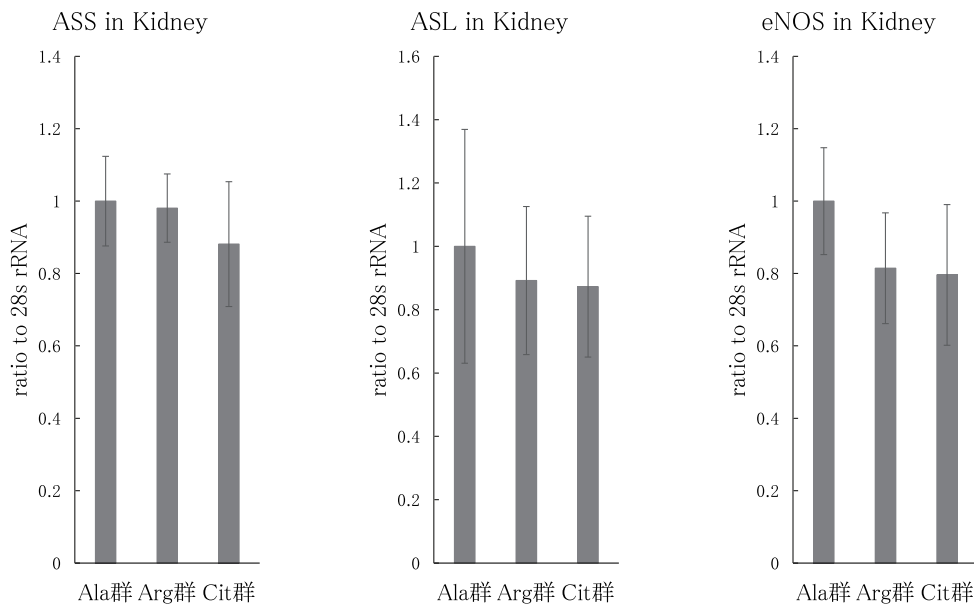
シトルリンを投与することで血漿シトルリン値の上昇を認めた. アルギニンを投与してもアルギニン濃度の上昇は見られなかった. アラニンを添加しても他のアミノ酸濃度に影響はなかった.



Ala群n=9 Arg群n=8 Cit群n=10 Mean±SD *P<0.05

図3. 肝臓における mRNA の発現

シトルリンを投与することで eNOS : endothelial nitric oxide synthase の mRNA の発現が高値を示した。ASS : argininosuccinate synthase, ASL : argininosuccinate lyase の mRNA の発現は 3 群間に有意差は認めなかった。



Ala群n=9 Arg群n=8 Cit群n=10 Mean±SD *P<0.05

図4. 腎臓における mRNA の発現

腎臓における ASS argininosuccinate synthase, ASL : argininosuccinate lyase, eNOS : endothelial nitric oxide synthase の mRNA の発現は 3 群間に有意差は認めなかった。

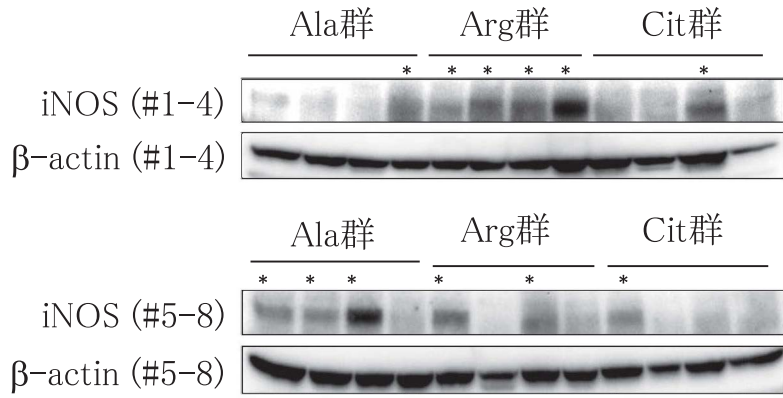


図5. 回腸粘膜における iNOS : inducible nitric oxide synthase タンパクの発現
iNOS タンパクの検出を (*) で示す.
Cit 群での iNOS タンパクの検出は少なかった.

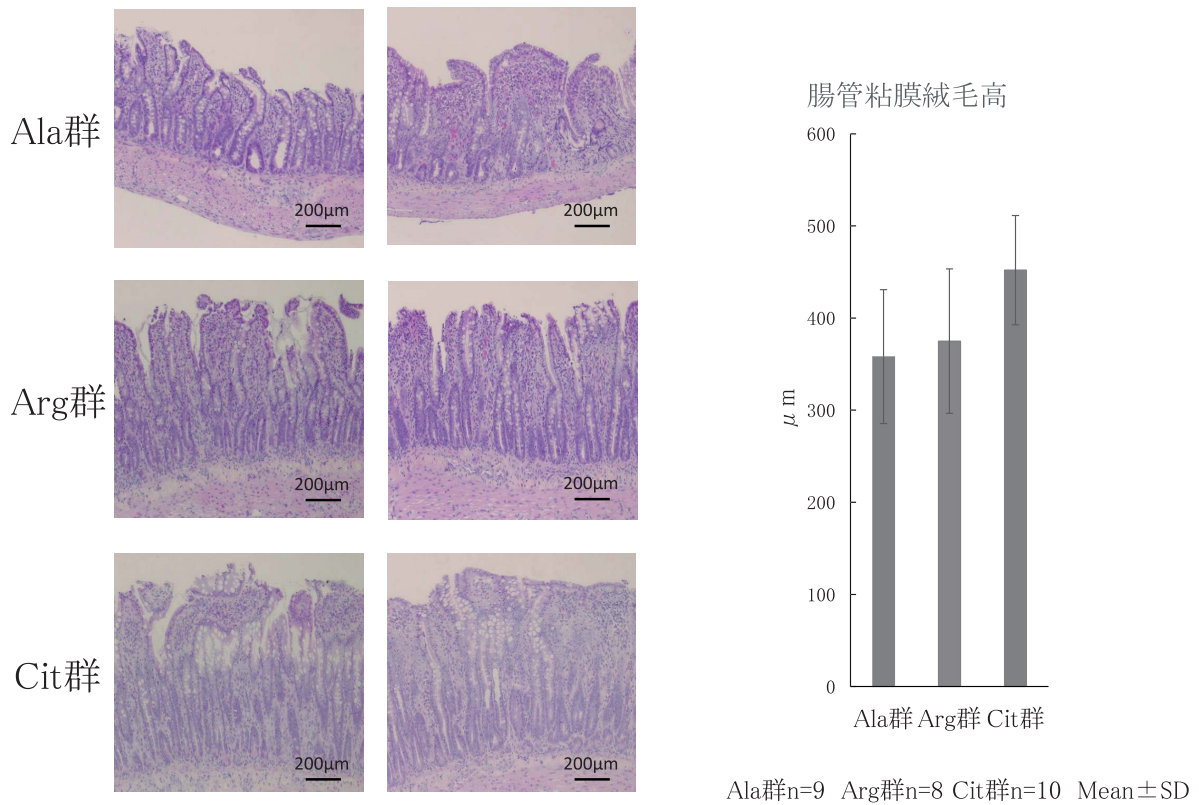


図6. 回腸 HE 染色像 (×100) 及び絨毛高の比較
回腸における腸管粘膜絨毛高は Cit 群で高い傾向を示したものの, 有意差は認められなかった.

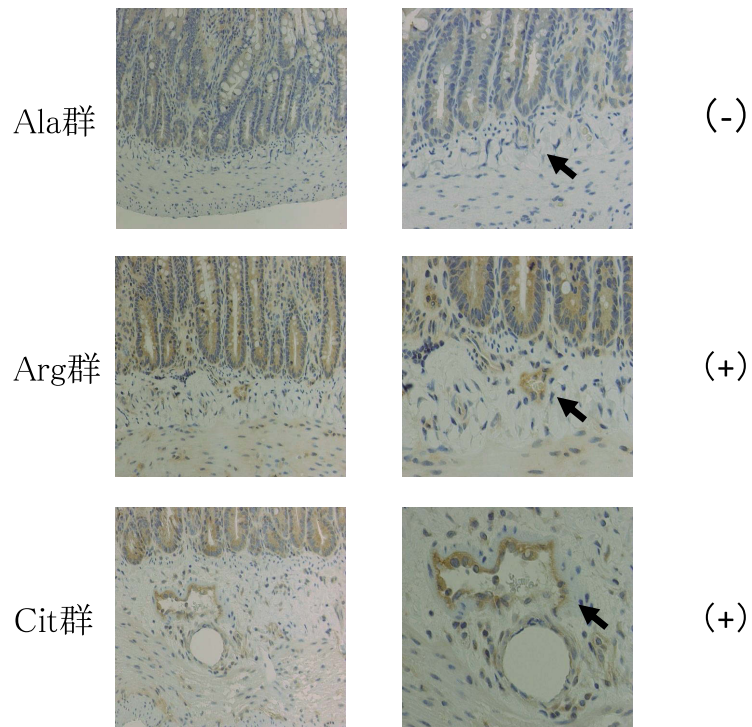
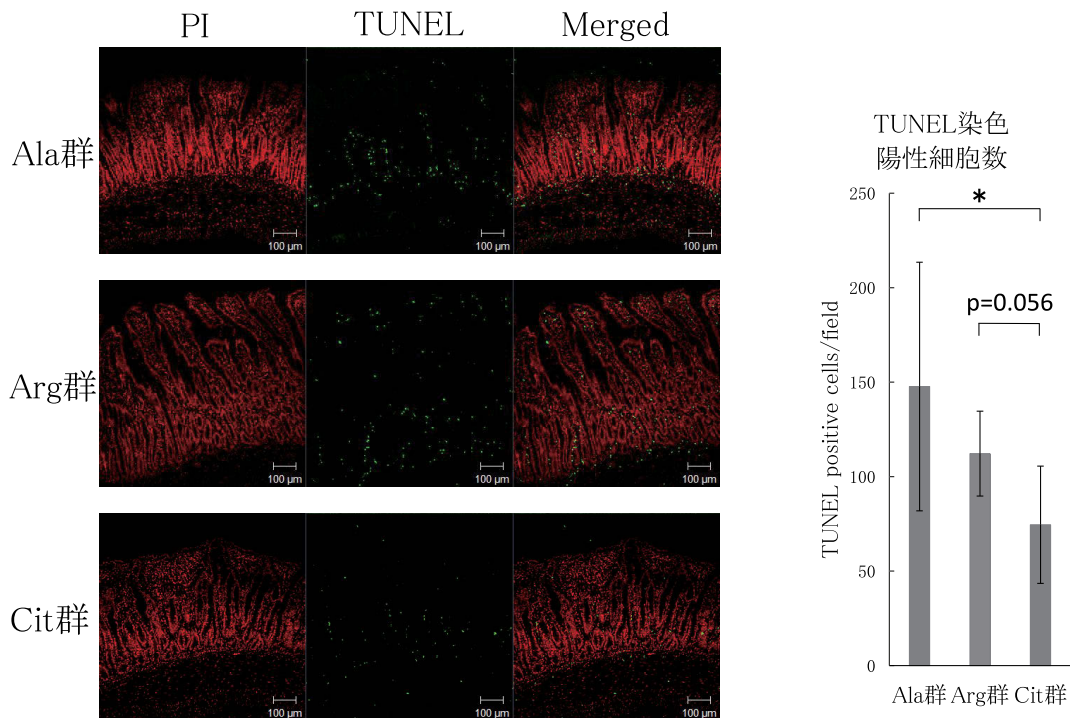


図7. 回腸 phospho-eNOS 染色像 (左 $\times 200$, 右 $\times 400$)
 染色陽性を (+), 染色陰性を (-) で示す. Ala 群では phospho-eNOS 陽性細胞少なく,
 Arg 群と Cit 群は同等であった (矢印).



Ala群n=9 Arg群n=8 Cit群n=10 Mean \pm SD *P<0.05

図8. 回腸 TUNEL 染色像 ($\times 100$)
 左: ヨウ化プロピジウム (PI) 中央: TUNEL 染色 右: 合成像
 3 視野における陽性細胞数の平均は Ala 群と Cit 群の間で有意差が見られた ($p < 0.01$).
 Arg 群と Cit 群の間では Arg 群で多い傾向であった ($p = 0.056$).

考 察

シトルリンはコドンで指定されていない遊離アミノ酸として血中や筋組織などに広く分布している^{13,20}。通常、シトルリンは小腸粘膜で吸収されたグルタミンの27.6%がシトルリンに合成され、またその75%が腎臓においてアルギニンとなり生体利用される^{14,21}。シトルリンはアルギニンと共に肝臓において尿素回路の構成アミノ酸としてアンモニアの解毒に関与し、筋タンパク質合成促進作用²²や抗酸化作用²³を有する。またアルギニンはNO産生細胞にてNOを遊離する。特に血管内皮細胞においてeNOSを触媒として産生されたNOは、血管拡張作用、血小板凝集抑制、血球の接着凝集抑制作用を有し、微小血管血流を保っている^{4,6,7}。一方、NOの副産物として産生されたシトルリンは、NO産生細胞のCit-NO cycleにおけるASS、ASLによりアルギニンに再合成され、NO産生が保たれてる^{15,16}。

そこで本研究では敗血症時におけるシトルリンの有用性を明らかとするために、CLPラットを用いCit-NO cycleを中心に酵素発現や組織障害を検討した。この際、経口摂取や中心静脈高カロリー輸液などの外因性のアミノ酸の影響を除外する為、CLP後は絶食下に通常のアミノ酸を含有しない維持液を用い、これにシトルリン、アルギニンまたはアラニンを添加した輸液を行った。維持輸液のみであったこともあり、CLPとしては18G針の1回穿刺であったが各群の死亡率は高く¹⁸、CLP後5日目にはアラニン群では全例、アルギニン群でも13匹中12匹が死亡した。しかしシトルリン群では17例中5例が生存し、5日間生存率は有意に高かった。

そこでこの生存率の改善の機序を解明するため、実験Ⅱとして各群とも50%以上の生存が得られたCLP術後48時間後におけるアミノ酸代謝、Cit-NO cycleの酵素発現や組織障害などを検討した。血漿アミノ酸値をみると、シトルリン群では他の2群に比べ血漿シトルリン値は高値を示したが、血漿アルギニン値やアラニン値は3群間に差はなかった。以前われわれは腸管大量切除により作成したシトルリン欠乏症ラットに対するシトルリン投与では、血漿シトルリンやアルギニンが増加することを報告した¹⁷。しかし今回の実験ではArg群もAla群も血漿シトルリン値はラットの正常範囲にあった。すなわちCLP後48時間では体タンパクの崩壊に伴い内因性のシトルリン供給が保たれ、アルギニン合成に利用されている可能性が考えられる。このためCit群ではアルギニン値は高値を示したが、3群間には差がでなかったものと考えられた。

ASSおよびASLはシトルリンからアルギニンを合成する酵素で、肝臓に多く含まれ²⁴、次いで腎臓に多い²⁵。さらにASS、ASLはNO産生細胞のCit-NO cycleにおいて、シトルリンからアルギニンへ変換する酵素として多くの組織中で発現している²⁶。最近われわれは腸管大量切除ラットにおいて、シトルリンを投与することにより肝臓におけるASSやASL、eNOSのmRNAを有意に発現するが、肝臓におけるアルギナーゼ1、オルニチントランスカルバミラーゼのmRNAと、腎臓でのASS、ASLのmRNAの発現には影響しないことを明らかとした²⁷。しかし今回の実験Ⅱは、敗血症作成後48時間後の状態のためArg群やAla群も血漿シトルリン値は低下していなかった。このため肝臓におけるASSやASLのmRNAの発現はCit群で強い傾向を示すものの3群間では差を認めなかったものと考えられる。しかしCit群ではeNOSのmRNAの発現が優位に認められたことから、外因性のシトルリン投与は微小循環を保持するのに有用であったものと考えられる。Wijnandsら²⁸もラットに対するlipopolysaccharide (LPS)持続投与モデルで、シトルリンは空腸でのphospho-eNOSタンパク質の合成は促進し、iNOSタンパク質の合成は抑制し、腸管の微小循環が保たれてい

たと報告している。今回の実験でも腸粘膜血管において eNOS の活性化型である phospho-eNOS はシトルリンやアルギニン投与の方がアラニン投与より優位に発現し、iNOS タンパク質の発現は Cit 群では低く、Arg 群では高かった。すなわちシトルリンはマクロファージなどの iNOS 系ではなく、血管内皮などの eNOS 系における Cit-NO cycle に作用することで、敗血症時の微小循環障害の改善をもたらした可能性が考えられる。一方、アルギニンを添加しても血漿アルギニン値は上昇せず、肝臓での eNOS 発現も増加せず、敗血症に対する改善作用を示さなかった。その要因としては、敗血症にともなうアルギナーゼの活性化の関与が考えられる¹¹。また敗血症のような全身に炎症が引き起こされ高サイトカインとなっている状態では全身のアルギニン需要の増大や、活性化マクロファージにおける iNOS 活性の増加などによりアルギニンが消費されたことも原因としてあげられる¹¹。また敗血症などのタンパク異化の亢進や酸化ストレス時には内因性 NOS 阻害物質である ADMA が産生される¹²。ADMA は NOS 産生細胞膜の cationic amino acid transporters においてアルギニンと競合することで NO 産生を抑制する^{12, 29}。一方、シトルリンは system N transporter 1 (SN1) を介し NOS 細胞内に取り込まれる³⁰。すなわちアルギニンに比較してシトルリンの有用性が高い理由としては、敗血症時にはシトルリンはアルギニンと異なり ADMA と競合せず細胞内に取り込まれ、Cit-NO cycle を経由して NO 産生が保たれている可能性が考えられた。

また今回の結果では、回腸のアポトーシスが Cit 群は他群よりも低下していた。敗血症における細胞死は、古くから侵襲による受動的細胞死であるネクローシスとして認識されてきたが、最近 アポトーシス、特にリンパ球と血管内皮細胞の関与が注目されている。重症敗血症剖検例のリンパ球にアポトーシスが著明に起きており、これが免疫不全状態を惹起し、感染の増悪により臓器不全へと進行するとの報告がある^{31, 32}。また敗血症モデル動物においても、胸腺や腸上皮に存在するリンパ球のアポトーシスが增加していることも報告されている^{33, 34}。一方で、CLP マウスにおいては CLP 処置後 24 時間で大動脈血管内皮細胞核に TUNEL 染色像が観察され、同部の caspase-8, caspase-3 の活性化、DNA の断片化を認めたとの報告がある³⁵。さらにアポトーシスを誘導する caspase-8, caspase-3 の発現を抑制する siRNA を CLP マウスに投与したところ死亡率が低下したことを報告している³⁶。Arg 群や Ala 群における回腸でのアポトーシスは主に粘膜固有層に起きており、また血管に沿って数珠状に観察されていることから、腸管粘膜における血管内皮細胞障害による微小循環障害の関与が考えられる。Cit 群では血管内皮において活性型 eNOS である phospho-eNOS の免疫染色で強く染色されている。このこともシトルリンが eNOS の発現を促進し、産生された NO が微小循環を改善し臓器や細胞の機能維持することでアポトーシスを抑制した可能性が考えられる。一方、NO そのものがアポトーシスを抑制している可能性も考えられる。Cekmez³⁷らは、新生児腸管壊死モデルラットに NO を吸入させることでアポトーシスが抑制されたことを報告している。シトルリンのアポトーシス抑制作用に関しては更なる研究が必要である。

臨床においても、敗血症の重症度と血漿シトルリン濃度の関係が報告されている。Puton ら³⁸は、敗血症患者の血漿シトルリン濃度に関して、24 時間以内に著明に血漿シトルリン濃度の低下が見られた患者は院内感染率と、28 日死亡率が上昇し、敗血症患者における予後因子の一つになりうると報告した。また、Ware ら³⁹は敗血症における呼吸窮迫症候群に陥った重症患者のシトルリンレベルが低いことを報告したうえで、シトルリン補充療法が敗血症における呼吸窮迫症候群への治療となりうる可能性を示唆した。本研究でシトルリン添

加輸液を行うことで、十分に血漿シトルリン値の上昇を認め、5日間生存率を高めたことは、彼らの仮説を裏付ける結果といえる。

本研究ではシトルリン投与により CLP 敗血症ラットの生存率が高まる事が明らかになったが、そのメカニズムは充分解明されたとはいえない。敗血症では、微小循環障害により多臓器不全での死亡のほか、急性期の高サイトカインによる血圧の低下や、ARDS による呼吸停止などさまざまな要因で死亡に至る。今回はラットの血圧測定や呼吸状態の把握がなされておらず、さらに死亡してから解剖に至るまでの間に持続点滴が続けられたため、各臓器の浮腫が著明であったケースも多くみられ、死亡原因の特定は困難であった。こういったモデルの問題点を改善することが出来れば、より詳細なシトルリンの作用メカニズムを明らかにすることが可能となるであろう。

結 語

本研究により、盲腸結紮穿刺敗血症モデルラットへのシトルリン投与は生存率を増加させることが明らかとなった。その一因として、Cit-NO cycle を経由して産生された NO による腸管の微小循環の改善と保護作用が考えられた。本結果からシトルリンの投与が敗血症の治療に有用であることが示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御協力を頂きました外科教室員各位に深謝いたします。また生化学教室員各位、近畿大学ライフサイエンス研究所 山中重明氏、渡辺信介氏、試薬・薬剤を提供頂いた協和発酵バイオ株式会社の熊谷弘太氏と鈴木貴視氏および大塚製薬株式会社の田中弘氏には格別の御指導、御協力を頂きましたことをここに深謝いたします。

文 献

1. Bone RC, et al. (1992) **Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis.** Chest 101:1644-55
2. Carrico CJ et al. (1986) Multiple-organ-failure syndrome. Arch Surg 121:196-208
3. Roger C, Bone MD (1996) Immunologic dissonance:a continuing evolution in our Understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS) . Ann Intern Med 125:680-687
4. Aird WC (2003) **The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome.** Blood 101:3765-3777
5. 射場敏明 (2005) ショックにおける血管内皮保護の重要性. ICUとCCU 29:1007-1013
6. Vallance P, Chan N (2001) Endothelial function and nitric oxide:clinical relevance. Blood. Heart 85:342-350
7. Bruckdorfer R (2005) The basics about nitric oxide. Mol Aspects Med 26:3-31
8. Luiking YC, Poeze M, Dejong CH, Ramsay G, Deutz NE (2004) Sepsis:An arginine deficiency. Crit Care Med 32:2135-2145
9. Barbul A, Uliyargolii A (2007) Use of exogenous arginine in multiple organ dysfunction syndrome and sepsis. Crit Care Med 35:S564-S567
10. Kalil AC, et al. (2006) Preclinical trial of L-arginine monotherapy alone or with N-acetylcysteine in septic shock. Crit Care Med 34:2719-2728
11. Jeyabalan G, et al. (2008) Arginase blockade protects against hepatic damage in warm ischemia-reperfusion. Nitric oxide 19:29-35
12. Boger RH (2003) The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. Cardiovasc Res 59:824-833
13. Curis E, et al. (2005) Almost all about citrulline in mammals. Amino Acids 29:177-205
14. Windmueller HG, Spaeth AE (1981) **Source and fate of circulating citrulline.** Am J Physiol Endocrinol Metab 241:E473-E480
15. Hecker M, Sessa WC, Harris HJ, Anggard EE, Vane JR (1990) The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor:cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. Proc Natl Acad Sci 87:8612-8616
16. Haines R, Pendleton LC, Eichler DC (2011) Argininosuccinate synthase:at the center of arginine metabolism. Int Biochem Mol Biol 2:8-23
17. 森下祐次ら (2010) ラット短腸症候群モデルにおけるシトルリン添加中心静脈栄養療法の有用性の検討, 近畿大医誌 35:83-90
18. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry JH (1980) Sepsis and septic shock:A review of laboratory models and a proposal. J Surg Res 29:189-201

19. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA (2009) Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nature protocols* 4:31-36
20. 林登志雄 (2008) シトルリンの代謝と薬効. *化学と生物* 7:460-464
21. 若林保良 (2007) アルギニン合成と消化管. *外科と代謝・栄養* 41:171-183
22. Osowska S, et al. (2006) Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E582-E586
23. Akashi K, Miyake C, Yokota A (2001) Citrulline a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. *FEBS Letters* 508:438-442
24. Morris SM (2002) Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr* 22:87-105
25. Brosnan ME, Brosnan JT (2004) Renal arginine metabolism. *J Nutr* 134:2791S-2797S
26. Husson A, Brasse-Lagnel C, Fairand A, Renouf S, Lavoigne A (2003) Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. *Eur J Biochem* 270:1887-1899
27. 前川昌平ら (印刷中) 短腸ラットモデルにおけるシトルリン補充療法の有用性およびcitrulline- nitric oxide cycleの分子生物学的検討. *外科と代謝・栄養*
28. Wijnands KA, et al. (2012) **Citrulline a more suitable substrate than arginine to restore NO production and the microcirculation during endotoxemia.** *PLoS ONE* 7, e37439
29. Teerlink T, Palm F, Wilcox CS (2009) Cellular ADMA:Regulation and action. *Pharmacol Res* 60:448-460
30. Simon A, et al. (2003) Role of neutral amino acid transport and protein breakdown for substrate supply of nitric oxide synthase in human endothelial cells. *Circ Res* 93:813-820
31. Hotchkiss RS, et al. (2001) Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 166, 6952-6963
32. 渡邊英三ら (2011) 敗血症における細胞死の様式. *ICUとCCU* 35:389-399
33. Clark JA, Clark AT, Hotchkiss RS, Buchman TG, Coopersmith CM (2008) Epidermal growth factor treatment decreases mortality and is associated with improved gut integrity in sepsis. *Shock* 30:36-42
34. Coopersmith CM, et al. (2002) Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis. *JAMA* 287:1716-1721
35. 松田直之, 山本誠二, 畠山登, 服部裕一 (2008) 敗血症性ショックにおける血管内皮細胞の機能異常. *日本薬理誌* 131:96-100
36. Matsuda N, et al. (2007) Silencing of caspase-8 and caspase-3 by RNA interference prevents vascular endothelial cell injury in mice with endotoxic shock. *Cardiovasc Res* 76:132-140
37. Cekmez, et al. (2012) Comparing beneficial effects of inhaled nitric oxide to L-arginine in necrotizing enterocolitis model in neonatal rats. *Pediatr Surg Int* 28:1219-1224

38. Puton G, et al. (2010) Plasma citrulline kinetics and prognostic value in critically ill patients. Intensive Care Med 36:702-706
39. Ware L, et al. (2013) Low plasma citrulline levels are associated with acute respiratory distress syndrome in patients with severe sepsis. Crit Care 17:R10