

# 博士学位論文

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

近畿大学大学院医学研究科  
医学系臓器病態制御外科学Ⅲ専攻


前 川 昌 平





同意書

平成25年10月30日


近畿大学大学院  
医学研究科長 殿


共著者 米倉ゆき 

共著者 八木 誠 

共著者 森下 祐次 

共著者 奥野 清隆 


共著者 木村 浩基 

共著者 \_\_\_\_\_ 

共著者 保木 昌徳 

共著者 \_\_\_\_\_ 

共著者 朴 雅美 

共著者 \_\_\_\_\_ 

論文題目 短腸ラットモデルにおける  
シロリン補充療法の有効性  
およびcitrulline-nitric oxide cycle  
の分子生物学的検討

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 前川 昌平
- 2. 専攻分野 医学系 臓器形態学Ⅱ 手術外科

# 博士學位論文

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

平成 25 年 11 月

近畿大学大学院医学研究科  
医学系臓器病態制御外科学Ⅲ専攻  
(指導: 光富 徹哉 教授)

前 川 昌 平



# 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

近畿大学医学部 外科学教室 小児外科部門<sup>1)</sup>

近畿大学医学部 外科学教室 下部消化管部門<sup>2)</sup>

近畿大学医学部奈良病院 小児外科<sup>3)</sup>

近畿大学医学部 生化学教室<sup>4)</sup>

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<sup>5)</sup>

前川昌平<sup>1)</sup>, 木村浩基<sup>1)</sup>, 米倉竹夫<sup>3)</sup>, 保木昌徳<sup>5)</sup>, 朴 雅美<sup>4)</sup>,

森下祐次<sup>3)</sup>, 八木 誠<sup>1)</sup>, 奥野清隆<sup>2)</sup>

(指導: 光富 徹哉 教授)

Citrulline-supplemented total parenteral nutrition induces mRNA expression  
in enzymes of the citrulline-NO cycle in rat model of short bowel syndrome.

Shohei Maekawa<sup>1)</sup>, Koki Kimura<sup>1)</sup>, Takeo Yonekura<sup>3)</sup>, Masanori Hoki<sup>5)</sup>, Ah-Mee Park<sup>4)</sup>,

Yuji Morishita<sup>3)</sup>, Makoto Yagi<sup>1)</sup>, Kiyotaka Okuno<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Division of Pediatric Surgery, Department of Surgery, Kinki University Faculty of Medicine

<sup>2)</sup> Department of Surgery, Kinki University Faculty of Medicine

<sup>3)</sup> Department of Pediatric Surgery, Nara Hospital, Kinki University Faculty of Medicine

<sup>4)</sup> Department of Biochemistry, Kinki University Faculty of Medicine

<sup>5)</sup> Division in Human Dietetics, Graduate School of Human Sciences, Osaka Shoin Women's University

(Director : Prof. Tetsuya Mitsudomi)

## 抄 録

**【目的】** シトルリンはアルギニンの前駆物質で、一酸化窒素 (NO) の産生に関与する。そこで中心静脈栄養 (TPN) に依存し低シトルリン血症を呈する短腸症候群へのシトルリン投与の有用性について citrulline-NO cycle を中心に検討した。

**【方法】** 80% 小腸切除ラットに、アラニン (Ala 群), シトルリン (Cit 群), アルギニン (Arg 群) をそれぞれ 2 g, 1 g, 1 g /kg/day 添加 TPN を 7 日間施行し、血漿アミノ酸、肝腎でのシトルリン代謝関連酵素の mRNA の発現を測定した。

**【結果】** Cit 群では血漿シトルリンは他の 2 群に比べ高値を示し、アルギニンとオルニチンは Ala 群に比べ高値を示した。Cit 群の肝におけるアルギニノコハク酸シンターゼ、アルギニノコハク酸リアーゼは他群と比べ、また eNOS は Arg 群と比べ mRNA の発現を有意に高く認めた。腎では差はなく、肝のアルギナーゼやオルニチントランスカルバミラーゼの発現も差はなかった。

**【結論】** シトルリンの補充は citrulline-NO cycle の関連酵素の発現をもたらし、NO 産生に有用と考えられた。

Key words : シトルリン, eNOS, 短腸症候群, citrulline-NO cycle, 中心静脈栄養

## はじめに

短腸症候群は先天性または後天性疾患により小腸広範囲切除（以下、短腸）の結果生じる吸収不良を主とする症候群である<sup>1)</sup>。短腸症候群の病態は腸管切除による消化吸収面積の減少、切除部位による特異的消化吸収不全、消化管運動調節機能の破綻、腸管安静に伴う腸管萎縮、栄養投与と吸収不全による浸透圧刺激、胆汁酸代謝異常などの複合的結果により生じる<sup>2), 3)</sup>。このため短腸後の腸管機能不全時には中心静脈栄養（total parenteral nutrition: TPN）による栄養管理を余儀なくされる。しかし長期 TPN 依存状態においては腸管不全合併症肝障害 (intestinal failure-associated liver disease: IFALD) やカテーテル関連血流感染症 (catheter-related blood stream infection: CRBSI) などの重篤な合併症を惹起する。これらの合併症の発生には短腸状態による長期にわたる消化吸収障害に伴う何らかの欠乏症の関与が考えられる<sup>3), 4)</sup>。

短腸症候群による長期 TPN 依存患者では、血漿シトルリン値が著明に低下する<sup>5)</sup>。また短腸症候群で長期 TPN 依存状態の症例での血漿シトルリン値は TPN からの離脱不能や小腸移植の予測因子となる<sup>6)</sup>。また血漿シトルリン値は小腸移植が行われた際の拒絶反応など腸管機能のマーカーとしても有用であると報告されている<sup>7)</sup>。シトルリンはアミノ酸の一種ではあるがコドンで指定されておらず、主に小腸において産生される。すなわち吸収されたグルタミンやアルギニンが腸管細胞内のミトコンドリア内で代謝され、遊離アミノ酸として血中に放出される<sup>8), 9)</sup>。シトルリンはアルギニンの前駆物質で、産生されたシトルリンの75%が腎臓でアルギニンに合成される<sup>10)</sup>。またアルギニンは nitric oxide synthase (NOS) により血管拡張、神経伝達、免疫賦活作用などを有する重要な生理活性物質である NO を産生する<sup>11)</sup>。この際、副産物として産生されたシトルリンは、citrulline-NO cycle（以下、Cit-NO cycle）においてアルギニノコハク酸シンターゼ (argininosuccinate synthase: ASS)、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合成され、NO 産生が維持されると報告されている<sup>8), 12), 13)</sup>。外因性のシトルリンも NO 産生細胞に取り込まれ、Cit-NO cycle を介し NO 産生を惹起し、血流の改善効果をもたらすことが期待できる。臨床報告としても、経口シトルリン投与により先天性心疾患術後の肺高血圧が改善したとの報告がある<sup>14)</sup>。

短腸症候群などでシトルリンの供給が低下することで惹起される低シトルリン血症では、Cit-NO cycle を介しての NO 産生が低下し、微小循環障害など何らかの病態が発生している可能性が考えられる。以前、われわれはラットの腸80%を切除したモデル（以下、短腸モデル）に TPN 投与を1週間施行することで、血漿中シトルリン、アルギニン、オルニチンなどの各種アミノ酸の低下を認めた短腸症候群モデルの作成に成功した<sup>15)</sup>。そこでこの短腸 TPN モデルを用い、低シトルリン血症に対するシトルリン補充療法の有用性について、Cit-NO cycle を中心にシトルリン代謝関連酵素の発現を検討した。

## 対象と方法

### 1. 試薬

シトルリン、アルギニンおよびアラニンは協和発酵バイオ（東京）より提供された L-シトルリン、L-アルギニンおよび L-アラニンを使用した。TPN に使用した糖・電解質・アミノ酸・総合ビタミン剤・微量元素の混合高カロリー輸液用トリプルバッグ製剤としては、大塚製薬工業（東京）より提供されたネオパレン1号（12%糖液）とネオパレン2号（17.5%糖液）を使用した。その他、試薬は市販されているものを使用した。

## 2. 短腸モデルの作成

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 7～8 週齢 (200～260 g，日本クレア：東京) 35 匹を，通常ケージ内で固形飼料 (CE-2，日本クレア)，水道水を自由摂取させ，10 日間の順化飼育を行った後に 12 時間絶食し実験に使用した。ペントバルビタール・ナトリウム (大日本製薬：大阪) 35 mg/kg の腹腔内投与による麻酔下に，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) の先端を上大静脈へ留置した。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レーシーベル (スギヤマゲン：東京) と接続した。ついで腹部正中切開 (2 cm) を加え，Treitz 靭帯より肛門側約 10 cm の空腸から回盲部口側約 10 cm の回腸までを切除し (小腸 80% 切除)，残存小腸を 6-0 ポリジオキサノン縫合糸 (6-0 PDS II，ETHICON: New Brunswick, NJ) を用いて一層で回腸空腸端々吻合し，腹部は 3-0 ポリグラチン縫合糸 (3-0 Vicryl, ETHICON) で二層縫合にて閉腹し，小腸 80% 切除モデル (以下，短腸モデル) を作成した<sup>15)</sup>。

## 3. 実験プロトコール

これら短腸モデルラットを以下の 3 群に分けた：① Ala 群 (短腸モデル + アラニン添加 TPN)，② Cit 群 (短腸モデル + シトルリン添加 TPN)，③ Arg 群 (短腸モデル + アルギニン添加 TPN)。ラットはすべて個別にケージに入れ，絶食で TPN を施行した。TPN に用いた糖・電解質・アミノ酸混合液は術後 1 日目まではネオパレン 1 号液を 300 ml/kg/day (169 kcal/kg/day) で投与した。術後 2 日目からネオパレン 2 号液に変更し，300 ml/kg/day (246 kcal/kg/day) で 6 日間施行した<sup>16)</sup>。なお Cit 群はネオパレン 2 号液の 1000 ml 中にシトルリンを 1 g/kg/day になるように混注し，Arg 群は Cit 群との違いを確認するためにアルギニンを 1 g/kg/day となるように TPN に混注した<sup>15)</sup>，<sup>17)</sup>。また Ala 群では，総窒素量を合わせるために urea cycle に関係しないアミノ酸であるアラニン 2 g/kg/day を TPN に混注した。アラニン，シトルリンおよびアルギニンを添加したネオパレン 2 号液による TPN を 6 日間行った。術後 7 日目まで生存したラットは，TPN を中止した 2 時間後に，ペントバルビタール・ナトリウム (大日本製薬) 35 mg/kg を腹腔内投与し，TPN 前後における体重の変化率 (以下， $\Delta$ BW) を測定し，その後，正中切開創で再開腹し，腹部大動脈より脱血犠死させた。

## 4. 血液分析

採取した血液を 3000 rpm，5 分間遠心分離して血清を採取した。総ビリルビン (T-Bil) を化学酸化法，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 (ALT)，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。血漿アミノ酸分析は血漿を 6% スルホサリチル酸 (ナカライテスク：京都) で除タンパクした後に，上清を  $-20^{\circ}\text{C}$  で一時保存し，高速液体クロマトグラフィーを用いて，シトルリン，アルギニン，オルニチン濃度を中心に検討した。



## 5. シトルリン代謝関連酵素の PCR による mRNA 発現量の測定

摘出した肝臓、腎臓は直ちに液体窒素で凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。これら小切片を RNeasy plus mini Kit (Qiagen: Hilden, Germany) を用いて、RNA を抽出した。RNA 濃度測定後、各サンプル 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 (表 1) に示した各遺伝子の特異的な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: Hercules, CA) を用い、肝臓における ASS, ASL, アルギナーゼ 1 (arginase1: ARG1), オルニチントランスカルバミラーゼ (ornithine transcarbamylase: OTC), eNOS, iNOS, 腎臓における ASS, ASL を、内部標準として 28s rRNA を使用し解析した。

表 1: プライマー配列

Primer		Sequence (5'-3')	Product size (bp)	Cycles
28s rRNA	Forward	CCATCACCATCTTCCAGGAGC	483	17
	Reverse	GGAAGGCCATGCCAGTGAGC		
ASS	Forward	TGGAGGATGCCCGAGTTTTAC	612	26
	Reverse	CTTTCCTTCCACCCGTTCTG		
ASL	Forward	GCGGAGTGTGAAGTCCTCTTC	600	27
	Reverse	TCCAGTGGCTACTTGGAGGAC		
eNOS	Forward	CGAGTAAAGAAGTGGGAAGTGG	424	32
	Reverse	TGTAGGTGAACATTTCTCTGTGC		
iNOS	Forward	CTCTTCAGAGTCAAATCCTACCAAG	436	36
	Reverse	CTTGAAGGAGCCATAATACTGGT		
ARG1	Forward	CTGAAAGGAAAGTTCACAGATGTA	494	30
	Reverse	GTCTCTGGCTTATGATTACCTTCC		
OTC	Forward	ATGAAAGTCTCACAGACACAGCTC	468	31
	Reverse	GCTTTTTCTTCTCATCCTCTTGTC		

ASS: argininosuccinate synthase, ASL: argininosuccinate lyase

eNOS: endothelial nitric oxide synthase, iNOS: inducible nitric oxide synthase

ARG1: arginase1, OTC: ornithine transcarbamylase

## 6. 小腸の組織学的検査

脱血犠死させた後、回腸を摘出し 10% ホルマリン溶液にて固定した。パラフィン包埋し  $4\mu\text{m}$  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 100 倍) で 1 検体につき無作為に 3 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) を用いて回腸の絨毛高を測定し、その平均値を算出した。免疫組織染色はヒストファインシンプルステインキット (ニチレイバイオサイエンス: 東京) を用い、phospho-eNOS (Abcam: Cambridge, United Kingdom) を一次抗体として、diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) にて発色させた後 hematoxylin にて核染色し、phospho-eNOS の発現を検討した<sup>18)</sup>。

## 7. 統計処理

アミノ酸分析結果, mRNA レベル, は平均値  $\pm$  標準偏差で表した. 3 群間の比較検討は統計処理ソフトウェア JMP10 (SAS: Cary, NC) を用いて分散分析を行ったのち, Steel-Dwass 検定にて多重比較した. 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.

## 結 果

### 1. 生存数および体重変化

実験 7 日目まで遂行できたのは, Ala 群は 11 匹中 10 匹, Cit 群は 13 匹中 12 匹, Arg 群は 12 匹中 9 匹であり 3 群間の生存率は Kaplan-Meier 解析において有意差は認めなかった (表 2). また実験最終日まで実験を遂行できたラットの体重増減について各群の比較検討を行ったが, 3 群間に有意差は認めなかった (表 2).

表 2: 各群の死亡率および  $\Delta$ BW

	Ala群	Cit群	Arg群
手術数	11	13	12
死亡数	1	1	3
生存数	10	12	9
$\Delta$ BW	$-0.04 \pm 2.70$	$-0.15 \pm 1.30$	$1.73 \pm 3.58$

$\Delta$ BW=(TPN後体重-TPN前体重)/TPN前体重

data=mean  $\pm$  SD

### 2. 血液生化学検査

血液生化学検査では血清 AST, ALT, T.Bil, BUN, Cr 値とも 3 群間に差は認めなかった (表 3).

表 3: 血液生化学検査結果

	Ala群	Cit群	Arg群
AST (IU/L)	$143.8 \pm 37.0$	$117.8 \pm 16.5$	$120.4 \pm 38.2$
ALT (IU/L)	$25.0 \pm 7.07$	$22.2 \pm 3.18$	$24.2 \pm 8.80$
ALP (IU/L)	$486.8 \pm 80.2$	$479.7 \pm 46.4$	$540.0 \pm 184.6$
T.Bil (mg/dL)	$0.15 \pm 0.05$	$0.16 \pm 0.04$	$0.21 \pm 0.07$
BUN (mg/dL)	$19.4 \pm 1.75$	$19.4 \pm 1.85$	$18.4 \pm 1.63$
Cr (mg/dL)	$0.18 \pm 0.02$	$0.15 \pm 0.02$	$0.16 \pm 0.02$

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase

ALP: alkaline phosphatase, T.Bil: total bilirubin

BUN: blood urea nitrogen, Cr: creatinine

data=mean  $\pm$  SD

### 3. 血漿アミノ酸値

血漿アミノ酸値のうち urea cycle を構成するシトルリン，アルギニン，オルニチン値をみると，シトルリン値は Cit 群では  $54.9 \pm 12.2$  nmol/ml で Ala 群の  $32.5 \pm 6.00$  nmol/ml および Arg 群の  $35.7 \pm 7.57$  nmol/ml と比べ有意に高値を示した．またアルギニン値でも，Cit 群は  $313.9 \pm 48.9$  nmol/ml で Ala 群の  $244.7 \pm 23.5$  nmol/ml と比べ有意に高値を示した．オルニチン値も同様に Cit 群は  $99.9 \pm 15.1$  nmol/ml で Ala 群の  $74.7 \pm 16.4$  nmol/ml と比べ有意に高かった．なおアラニン値は3群間に差は認めなかった（図1）．

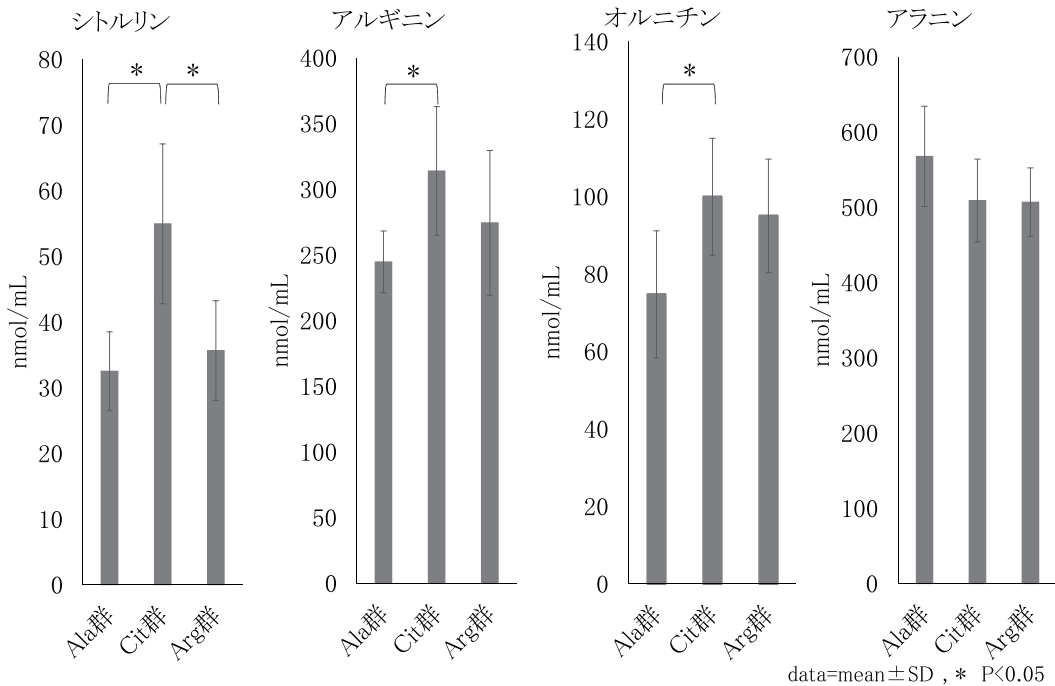


図1：血漿シトルリン，アルギニン，オルニチン，アラニン濃度  
シトルリン投与によりシトルリン，アルギニン，オルニチンの上昇を認め，アルギニン投与によりアルギニン，オルニチンの上昇を認めた．アラニンを添加してもその他のアミノ酸濃度には影響はなかった．

### 4. 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 Cit-NO cycle 関連酵素である ASS，ASL，eNOS の mRNA の発現をみたところ，Cit 群の ASS ( $1.27 \pm 0.14$ ) は Arg 群 ( $0.86 \pm 0.33$ ) と比較すると有意に高い mRNA の発現を認め，さらに Cit 群の ASL ( $1.53 \pm 0.14$ ) は Arg 群 ( $0.81 \pm 0.31$ ) や Ala 群 ( $1.00 \pm 0.13$ ) に比べても有意に高い mRNA の発現を認めた（図2）．一方，urea cycle に関与する酵素のうち ARG1，OTC の mRNA の発現は3群間に差は認めなかった（図3）．しかし eNOS の mRNA の発現は Cit 群 ( $1.13 \pm 0.08$ ) では Arg 群 ( $0.55 \pm 0.16$ ) と比較すると有意に高い mRNA の発現を認めたが，Ala 群 ( $1.00 \pm 0.20$ ) との間に差はなかった（図4）．なお肝臓における iNOS の mRNA の発現には各群間に差は認めなかった．また腎臓における ASS，ASL の mRNA の発現は3群間に差は認めなかった（図5）．

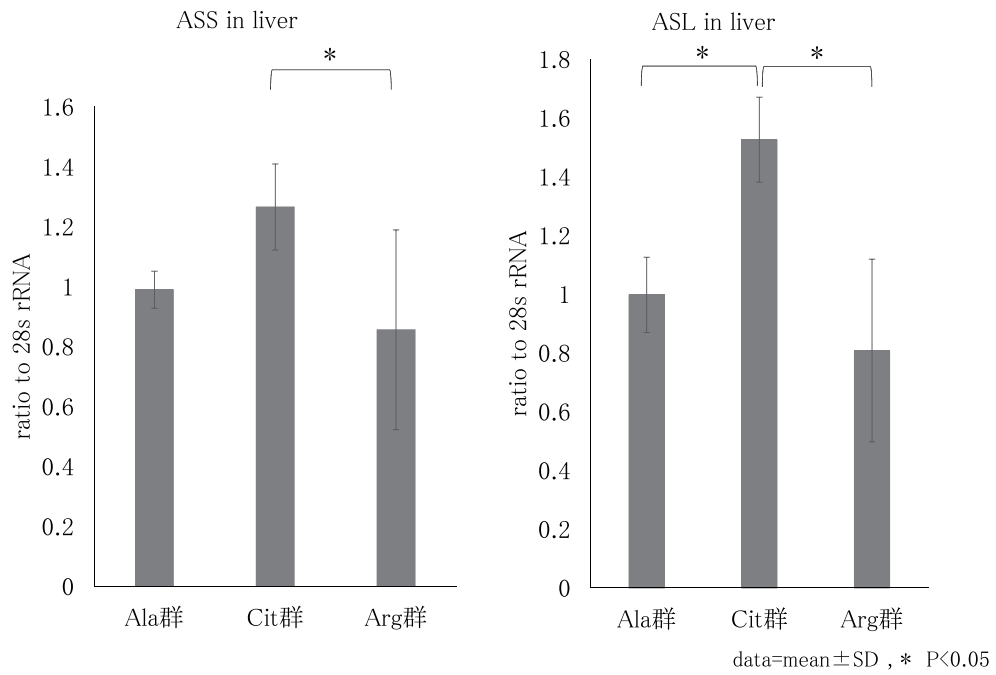


図2：肝臓における ASS と ASL の mRNA の発現  
Cit 群は他の 2 群と比較すると有意に肝臓における ASS, ASL の mRNA の発現を認めた.

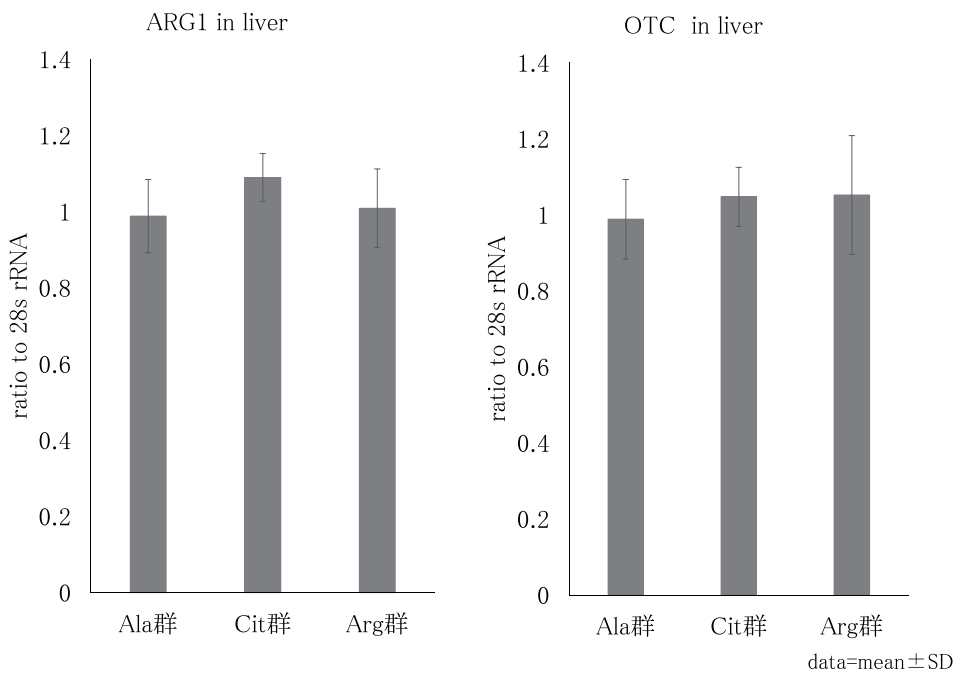


図3：肝臓における ARG-1 と OTC の mRNA の発現  
Urea cycleを構成する酵素の mRNA のレベルは各群間に差を認めなかった.

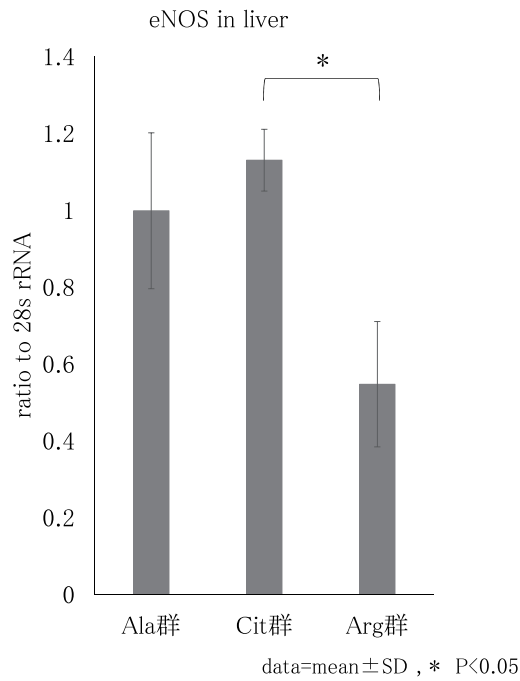


図4：肝臓における eNOS の mRNA の発現  
Cit 群は Arg 群と比較すると有意に高く eNOS の mRNA の発現を認めた。

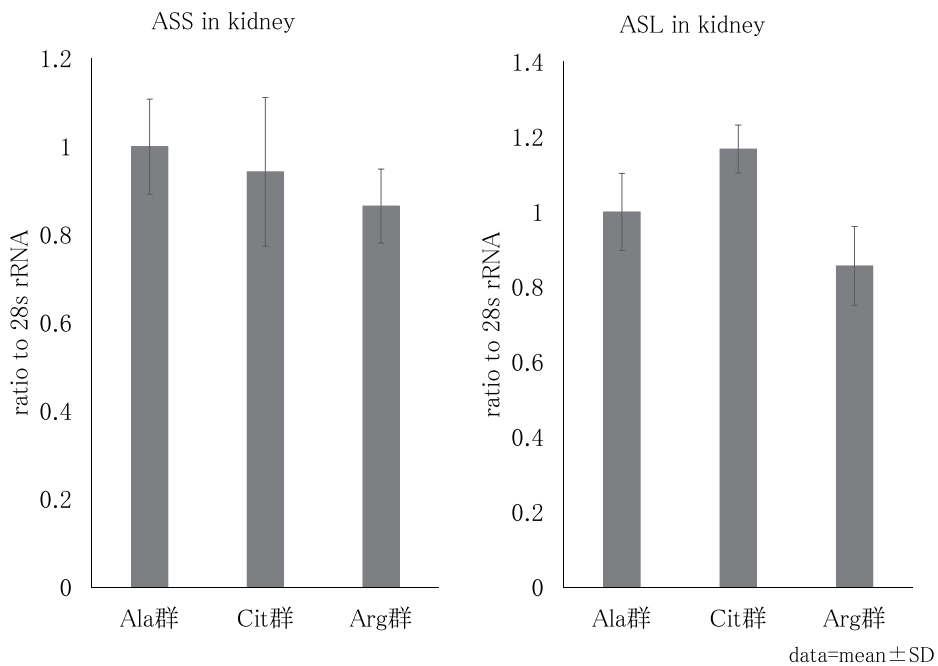


図5：腎臓における ASS と ASL の mRNA の発現  
腎臓における ASS, ASL の mRNA のレベルは3群間に差は認めなかった。

## 5. 小腸組織学検査

腸管粘膜の絨毛高は、Ala 群は  $491.6 \pm 47.9 \mu\text{m}$  で Cit 群の  $717.6 \pm 44.4 \mu\text{m}$  および Arg 群の  $649.7 \pm 47.3 \mu\text{m}$  と比較すると低く、腸管粘膜の絨毛の萎縮を認めた。Cit 群と Arg 群には統計学的な有意差は認めなかったが

Cit 群では Arg 群と比較すると絨毛の高さは高い傾向 (p=0.19) であった (図 6). 小腸における eNOS の活性型である phospho-eNOS の免疫染色では, Cit 群のみに粘膜固有層の血管に陽性細胞を認めた (図 7).

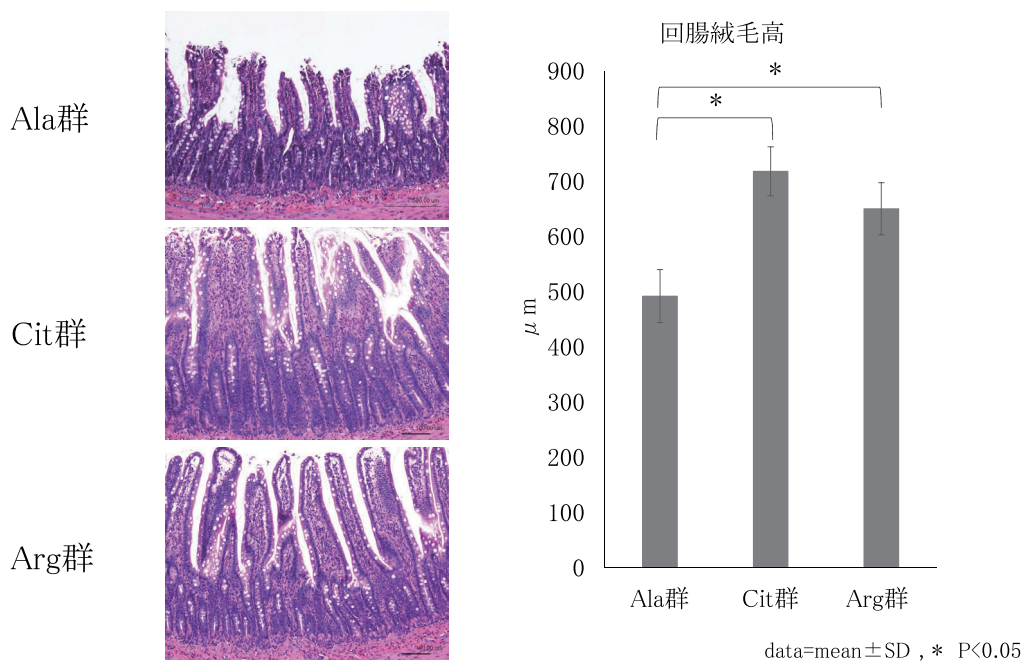


図 6 : 回腸 HE 染色所見 (×100) および回腸粘膜高の比較  
Cit 群, Arg 群で回腸粘膜高が高く, Ala 群では萎縮を認めた.

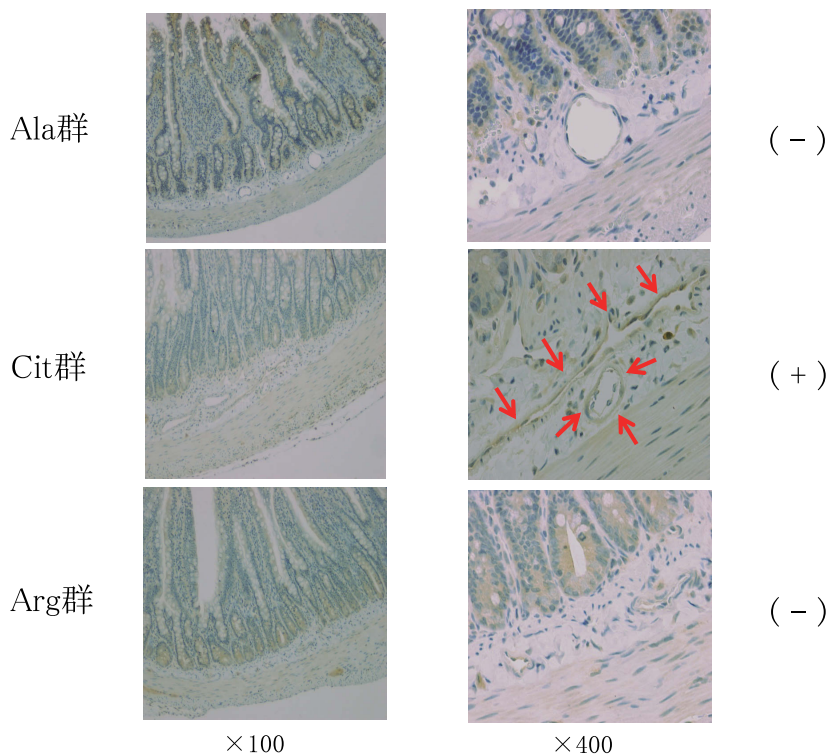


図 7 : 回腸 phospho-eNOS 染色所見  
Cit 群のみに phospho-eNOS 染色陽性細胞を小腸粘膜固有層の血管に認めた.

## 考 察

シトルリンはコドンでは指定されていないアミノ酸であり生体内でタンパク質を構成せず、遊離アミノ酸として血液中などに広く分布している<sup>8), 9)</sup>。シトルリンは小腸粘膜で吸収されたグルタミンから合成され、吸収されたグルタミンの11.5～27.6%がシトルリンに合成され、またその75%は腎臓においてアルギニンとなる<sup>8) - 10)</sup>。シトルリンは肝臓において urea cycle の構成アミノ酸としてアンモニアの解毒に関与するとともに(図8)、筋タンパク合成促進作用<sup>19)</sup> や hydroxyl radical に対する抗酸化作用を有する<sup>20)</sup>。中でもシトルリンは前駆物質として組織におけるアルギニン産生に重要な役割を持つ<sup>8) - 10)</sup>。一方、アルギニンはNO産生細胞にてNOSによりNOとシトルリンとなるが、産生されたシトルリンはCit-NO cycleのASS, ASLによりアルギニンに合成され、NO産生が維持される(図9)<sup>8), 12), 13)</sup>。NOは血管拡張、神経伝達、免疫賦活作用等を有する<sup>11)</sup> 生体内における重要な生理活性物質である。短腸症候群による長期TPN依存患者では血漿シトルリンが著明に低下する<sup>5), 6)</sup>。またラットの短腸モデルにおいても同様に血中シトルリンの低下を認めることが報告されている<sup>15), 17), 21)</sup>。このように腸管容量の減少などにより腸管からのシトルリンの供給が低下すると、Cit-NO cycleを介してのNO産生が低下することにより微小循環障害が惹起され、IFALDなどの病態発生に関与している可能性が考えられる。

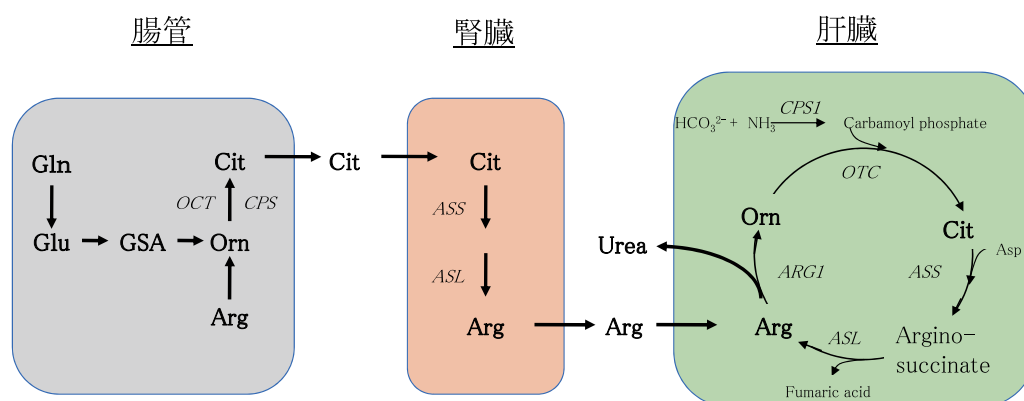


図8：シトルリン・合成代謝経路

小腸で吸収されたグルタミンからシトルリンが合成される。合成されたシトルリンは腎臓でアルギニンに代謝され、肝臓の urea cycle で代謝される。

Arg：アルギニン，Cit：シトルリン，Orn：オルニチン，Glu：グルタミン酸，Gln：グルタミン，NH<sub>3</sub>：アンモニア，NO：一酸化窒素，ARG1：アルギナーゼ1，ASL：アルギノコハク酸リアーゼ，ASS：アルギノコハク酸シンターゼ，NOS：ナイトリクオキシドシンターゼ，OTC：オルニチントランスカルバミラーゼ

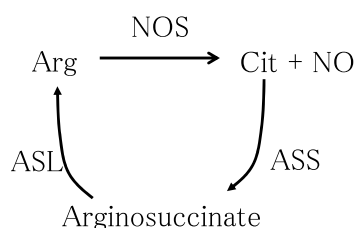


図9：Citrulline-NO cycle

アルギニンがNOSによりシトルリン，NOを産生する。シトルリンはASS, ASLの作用にてアルギノコハク酸を経てアルギニンに合成される。

われわれはこれまで短腸モデルラットに絶食下に TPN 投与を 1 週間施行したところ、血漿中シトルリン、アルギニン、オルニチンなどの各種アミノ酸の低下を報告してきた<sup>15), 21)</sup>。これは短腸ラットに対して絶食下に TPN を施行することにより、食事を介してのグルタミン供給がなくなるとともに、小腸自体の volume が減少することによりシトルリンの合成量が減少したためと考えられる。すなわちこの短腸 TPN モデルはシトルリン欠乏モデルとも考えられる。そこで今回、この短腸 TPN モデルに対するシトルリン補充療法の有用性について、肝臓や腎臓における Cit-NO cycle に関わる酵素の mRNA の発現を中心に検討した。比較としてシトルリン代謝に関連するアミノ酸としてアルギニンを添加した TPN 投与群、シトルリン代謝に直接関与しないアミノ酸としてアラニンを添加した TPN 投与群を作成した。これまでの報告<sup>15), 21)</sup>と同様に、本実験でも小腸 80% 切除により血漿シトルリン値の低下を認め、またシトルリン添加 TPN を施行することにより血漿シトルリン値の上昇、さらに urea cycle を構成するアルギニンやオルニチン値の上昇も認めた<sup>15), 17), 21)</sup>。アルギニンを投与しても血漿中のアルギニン値は上昇したが、シトルリン投与におけるアルギニン値の上昇よりもその値は低かった。これは血中のアルギニンは肝臓において活性が極めて高いアルギニン分解酵素であるアルギナーゼにより速やかにオルニチンに分解される<sup>22)</sup>のに対し、腸管で吸収および合成されたシトルリンや血中に投与されたシトルリンは用量依存的に腎臓や末梢細胞および組織にてアルギニンに代謝され<sup>10)</sup>、その後、肝臓で urea cycle に取り込まれてオルニチンに代謝されるためと考えられる<sup>15), 21)</sup>。本実験結果からも、短腸に対するアルギニン値の上昇にはアルギニンを使用するよりもシトルリンを使用した方が有効であると考えられる<sup>15), 17), 21), 23)</sup>。

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ある。ASS はシトルリンとアスパラギン酸からアルギニノコハク酸を合成するが、これは urea cycle における律速酵素である<sup>12)</sup>。さらに ASL はアルギニノコハク酸をアルギニンおよびフマル酸に分解する。ASS や ASL は肝臓における urea cycle 中に多く含まれる<sup>13), 24)</sup>。次いで ASS や ASL は腎臓に多く<sup>10), 25)</sup>、腎臓ではシトルリンはアルギニン合成に関わる<sup>13)</sup>。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<sup>13)</sup>。短腸モデルにおける Cit-NO cycle を中心とした ASS や ASL についての検討はこれまで報告されておらず、われわれの報告が初めてである。今回はこれら酵素を多く認める肝臓および腎臓での分析を行ったが、Cit 群では肝臓における ASS および ASL は他群と比較し有意に高い mRNA の発現を認めた。しかし肝臓における ARG1 と OTC は 3 群間ともに mRNA の発現に差は認めず、また腎臓でのシトルリンからアルギニン合成に関わる ASS や ASL の mRNA の発現も 3 群間に差は認めなかった。これは短腸によるシトルリン産生低下時には補充されたシトルリンは、肝臓では urea cycle ではなく、網内系を中心とした組織における Cit-NO cycle において利用されたものと考えられる。

NOS には血管内皮型 NOS (eNOS)、誘導型 NOS (iNOS)、神経型 NOS (nNOS) の 3 つのアイソフォームが存在する<sup>26)</sup>。血管内皮細胞には eNOS が、血管平滑筋には iNOS が発現し NO 産生を行っている。この中で eNOS により産生された NO は微小循環の維持に重要な役割をもつ。一方、iNOS による大量の NO 産生は NADPH oxidase による superoxide anion と反応して peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) などを産生し組織傷害や循環障害を引き起こす<sup>27)</sup>。本実験では eNOS および iNOS の肝臓における発現を検討した結果、シトルリン投与にて肝臓において有意に eNOS の mRNA の発現を認めたが、iNOS の mRNA の発現は各群に差は認めなかつ



た。また技術的な問題で腸管での PCR の検討はできなかったが、シトルリン投与群のみに腸管で eNOS の活性化型である phospho-eNOS が染色された。Wijnands ら<sup>28)</sup> は lipopolysaccharide (LPS) を投与したマウスに対するシトルリン投与により空腸において有意に eNOS が発現し、さらに iNOS の発現が抑制されるとともに、微小循環も改善したと報告している。本実験では LPS による敗血症のストレスと比較してストレスは少ないため iNOS の発現には至らなかったものの、Wijnands ら<sup>28)</sup> の結果と同様に、シトルリン投与により肝臓での eNOS の発現を認めた。

小腸組織における HE 染色ではアラニンを投与すると粘膜の萎縮を認めた。これは短腸に絶食状態下に TPN を行うことで、腸上皮細胞の栄養となるべき腸管内栄養素の欠如や、あるいは腸上皮細胞が栄養素を消化吸収しないための disuse atrophy の関与が考えられる<sup>29)</sup>。一方でシトルリンやアルギニンの添加では萎縮は認められなかった。アルギニンは成長ホルモン (growth hormone: GH) を介し、短腸後の小腸粘膜を増殖すると報告されている<sup>30)</sup>。またラット 75% 小腸切除モデルに GH を投与することで、残存小腸の粘膜絨毛高と粘膜 DNA 量を有意に増加させるとの報告もある<sup>31)</sup>。シトルリンはアルギニン産生を介し、またアルギニンではその直接的な作用から GH が残存小腸粘膜の増高に関与している可能性が考えられる。一方、TPN で出現する小腸粘膜の萎縮は GH 投与で改善しないがインスリン様成長因子-1 (insulin-like growth factor-1: IGF-1) の投与で粘膜増殖効果が得られるとの報告<sup>32)</sup> もあることから、GH の標的臓器である肝臓では IGF-1 が産生され空腸粘膜に IGF 結合タンパクの発現を誘導することにより腸粘膜上皮細胞が増殖した可能性も考えられる。さらに本実験ではシトルリンを投与することにより肝臓における eNOS の mRNA の発現や、小腸粘膜固有層の血管における eNOS の活性化型である phospho-eNOS の発現を多く認めた。すなわちシトルリン投与ではアルギニンを介しての GH や IGF-1 による作用とともに、Cit-NO cycle で生じる NO 産生の増加による血管拡張作用の結果、粘膜の増高が得られた可能性も考えられた。

さらにシトルリン投与によりアルギニンを投与するよりも有意に ASS, ASL, eNOS の mRNA の発現を認めた。種々のストレス時にはタンパク質のアルギニン残基が protein-arginine methyltransferases (PRMTs) によりメチル化され、内因性 NOS 阻害物質である asymmetric dimethylarginine (ADMA) が産生される<sup>33)</sup>。ADMA は NO 産生細胞膜の cationic amino acid transporters (CATs) 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<sup>34)</sup>。一方、シトルリンは system N transporter 1 (SN1) を介し NO 産生細胞内に取り込まれる (図 10)<sup>35)</sup>。すなわちこのようなストレス時にも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ることから、Cit-NO cycle を介しての NO 産生の維持に関与する可能性が高い。本実験でもアルギニンよりもシトルリン投与の有用性が示唆された。

今回の実験は7日間と短い実施期間のため肝機能異常や形態学的異常を生ずるまでには至らなかった。今後、短腸症候群症例における IFALD の機序を明らかにするうえで腸管大量切除後にエンドトキシンなどの何らかの負荷を加え肝障害などの臓器障害を合併したモデルを作成し研究する必要性があると考えられた。

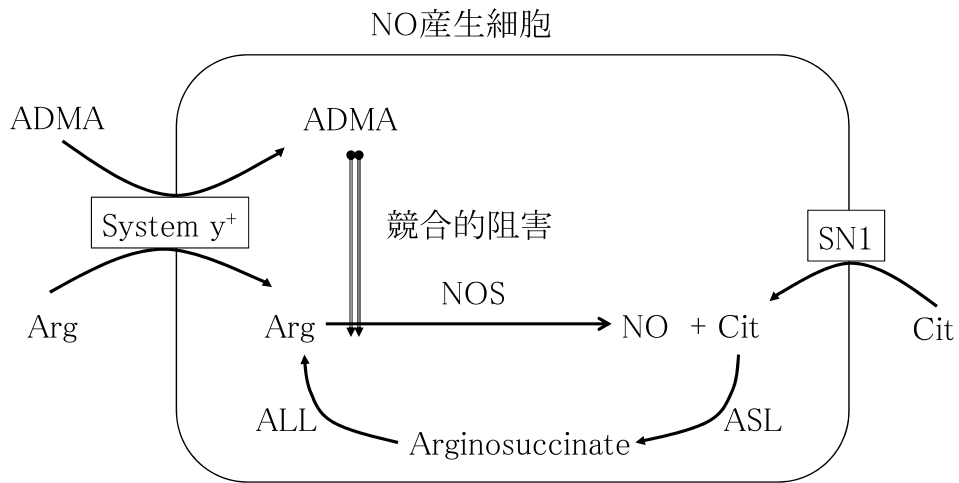


図10：NO 産生におけるシトルリン，アルギニンの関与

アルギニンは system y<sup>+</sup> を介して NO 産生細胞に取り込まれ，NOS により NO を産生するとともにシトルリンを産生する．ADMA はアルギニンと競合し NO 産生を阻害する．一方，シトルリンは SN1 を介して NO 産生細胞に取り込まれ，NO 産生に関与する。

## 謝 辞

稿を終えるに当たり，ご指導，ご校閲を頂きました近畿大学医学部 外科学教室 光富徹哉主任教授に深謝します。また本研究の施行に際し，動物実験で協力いただきました近畿大学ライフサイエンス研究所の山中重明氏，水口信行氏，渡辺信介氏，および試薬・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，鈴木貴視氏および大塚製薬株式会社の田中弘氏，さらに免疫組織学的解析についてご指導頂きました近畿大学医学部病理学教室 木村雅友先生ならびに筑後孝章先生には心より深謝いたします。

## 参考文献

1. 田附裕子, 窪田昭男: 短腸症候群の栄養療法. 臨床栄養 120:820-825, 2012
2. 鈴木完, 金森豊: 早期から“予防的プロバイオティクス療法”を行った短腸症患者の腸内細菌叢と血漿中シトルリン値の推移 小児外科 42:970-974, 2010
3. 吉田英生, 照井慶太, 佐藤嘉治ほか: 小児短腸症候群の栄養管理. 小児外科 43:344-350, 2011
4. 長谷川史郎, 福本弘二, 漆原直人ほか: 短腸症候群の病態栄養と問題点. 小児外科 43:338-343, 2011
5. Jianfeng G, Weiming Z, Ning L et al: Serum citrulline is a simple quantitative marker for small intestinal enterocytes mass and absorption function in short bowel patients. J Surg Res 127:177-182, 2005
6. Suzuki K, Kanamori Y, Sugiyama M et al: Plasma citrulline may be a good marker of intestinal function in intestinal dysfunction. Pediatr Int 54:899-904, 2012
7. David AI, Selvaggi G, Ruiz P, Vecino López R, et al: Plasma citrulline concentration as a biomarker of intestinal function in short bowel syndrome and intestinal transplant. Transplantation. 84:1077-1081, 2007
8. Curis E, Nicolis I, Moinard C et al: Almost all about citrulline in mammals. Amino Acids 29:177-205, 2005
9. 林登志雄: シトルリンの代謝と薬効. 化学と生物 7:460-464, 2008
10. Windmueller HG, Spaeth AE: Source and fate of circulating citrulline. Am J Physiol Endocrinol Metab 241:E473-E480, 1981
11. Rosselli M, Keller PJ, Dukey RK: Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. Hum Reprod Update 4:3-24, 1998
12. Haines RJ, Pendleton LC, Eichler DC: Argininosuccinate synthase: at the center of arginine metabolism. Int J Biochem Mol Biol 2:8-23, 2011
13. Husson A, Brasse-Lagnel C, Fairand A et al: Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. Eur J Biochem 270:1887-1899, 2003
14. Smith HA, Canter JA, Christian KG et al: Nitric oxide precursors and congenital heart surgery: a randomized controlled trial of oral citrulline. J Thorac Cardiovasc Surg 132:58-65, 2006
15. 森下祐次, 米倉竹夫, 山内勝治ほか: ラット短腸モデルにおけるシトルリン添加中心静脈栄養の有用性の検討. 近畿大医誌 35:83-90, 2010
16. 上田善継, 塩野豊久, 静間美江子ほか: アミノ酸加高カロリー輸液 (TAT-7180LおよびTAT-7180H) の栄養評価試験 (第2報) 開腹ラットを用いた栄養評価試験. 試薬理と治療 21:3953-3960, 1993
17. Osowska S, Moinard C, Neveux N et al: Citrulline increases arginine pools and restores nitrogen balance after massive intestinal resection. Gut 53:1781-1786, 2004

18. Miyauchi T, Miyata M, Ikeda Y et al: Waon Therapy Upregulates Hsp90 and Leads to Angiogenesis Through the Akt-Endothelial Nitric Oxide Synthase Pathway in Mouse Hindlimb Ischemia. *Circ J* 76:1712-1721, 2012
19. Osowska S, Duchemann T, Walrand S et al: Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:582-586, 2006
20. Akashi K, Miyake C, Yokota A: Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon levels, is an efficient hydroxyl radical scavenger. *FEBS Lett* 508:438-442, 2001
21. 森下祐次, 米倉竹夫, 大柳治正ほか: ラット腸管大量切除モデルにおけるシトルリン添加TPNの有用性の検討 (第四報). *外科と代謝* 44:333-338, 2010
22. 若林保良: アルギニン合成と消化管. *外科と代謝* 41:171-183, 2007
23. Osowska S, Neveux N, Nakib S et al: Impairment of arginine metabolism in rats after massive intestinal resection: effect of parenteral nutrition supplemented with citrulline compared with arginine. *Clin Sci* 115:159-166, 2008
24. Morris SM: Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr* 22:87-105, 2002
25. Brosnan ME, Brosnan JT: Renal arginine metabolism. *J Nutr* 134 (10 Suppl) : 2791S-2797S, 2004
26. Bredt DS: Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res* 31:577-596, 1999
27. 宮崎博喜, 藤乗嗣泰: 腎疾患における内皮機能障害: DDAH-ADMA-NOS系の役割. *Nephrol Fronti* 7:363-368, 2008
28. Wijnands KA, Vink H, Briedé JJ et al: Citrulline a more suitable substrate than arginine to restore NO production and the microcirculation during endotoxemia. *PLoS One* 7:1-11, 2012
29. Groos S, Hunefeld G, Luciano L: Parenteral versus enteral nutrition: morphological changes in human adult intestinal mucosa. *J Submicrosc Cytol Pathol* 28:61-74, 1996
30. Hebiguchi T, Kato T, Yoshino H et al: The effect of arginine supplementation on growth hormone release and intestinal mucosal growth after massive small bowel resection in growing rats. *J Pediatr Surg* 32:1149-1153, 1997
31. Shulman DI, Hu CS, Duckett G et al: Effects of short-term growth hormone therapy in rats undergoing 75% small intestinal resection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 14:3-11, 1992
32. Peterson CA, Gillingham MB, Mohapatra NK et al: Enterotrophic effect of insulin-like growth factor- I but not growth hormone and localized expression of insulin-like growth factor- I , insulin-like growth factor binding protein-3 and-5 mRNAs in jejunum of parenterally fed rats. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 24:288-295, 2000
33. Ueda S, Yamagishi S, Kaida Y et al: Asymmetric dimethylarginine may be a missing link between cardiovascular disease and chronic kidney disease. *Nephrology* 12:582-290, 2007

34. Teelink T, Luo Z, Palm F et al: Cellular ADMA: regulation and action. *Pharmacol Res* 60:448-460, 2009
35. Simon A, Plies L, Habermeier A et al: 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, 2003