

# ラット腹腔内膿瘍モデルにおける ピルビン酸脱水素酵素活性の変化

帝京大学救急センター

中 谷 寿 男

## はじめに

重症感染症における輸液と栄養の研究に臨床症例を解析することは極めて重要であるが、感染症では病態、重症度が一定せず、controlled studyは難しいのが現状である<sup>1)</sup>。そこで、実験動物を用いての研究が多く行われてきたが、動物実験においても、病態を一定にそろえることは困難である。重症感染症の病態生理を動物実験モデルで研究するためには、病態が安定し、かつ常に同一のモデルが作成されること、すなわち、再現性の高いモデル作りが必要である。

島崎ら<sup>2)</sup>は sepsis の動物実験モデルに関する総説において、敗血症および敗血症性ショックの動物実験モデルを、軟部組織膿瘍モデル、菌血症モデル、腹膜炎モデル、エンドトキシン血症モデル、グラム陰性菌以外のモデル、humoral mediator モデルの6種類に分類することが出来たが、それぞれに欠点があり、未だに満足の行くモデルは完成されていないと述べている。広く用いられている腹膜炎モデルの cecal ligation + puncture は改良が加えられたものの、やはり再現性、一定の重症度という点では問題が残る<sup>2-4)</sup>。

著者<sup>5)</sup>は、かつて、再現性の高い慢性敗血症モデルの作成に取組み、ラットを用いて、腹膜炎の時期を乗り越えれば、全てのラットに単一、球形、ほぼ同じ大きさで、かつ起炎菌が既知で、たとえば大腸菌のみの monoclonal abscess、大腸菌と嫌気性菌 *B. fragilis* のみの biclonal abscess、あるいは無菌の abscess などの動物実験モデルを作った。今回はこのモデルを通じて得られた糖代謝と脂肪酸酸化の key enzyme の変化について報告し、重症感染症における輸液管理の指針の一端となる

実験事実を紹介する。

## 方 法

### 1. 動物実験モデル

#### (1) fecal pellet 作成方法

既報<sup>5)</sup>のごとく寒天と水と乾燥ラット糞を鋳型に、オートクレーブにて加熱滅菌する。無菌となった材料が菌が死滅しない温度であるおおよそ 50°C にまで冷え、かつ寒天が固まるまでの間に、無菌的操作によって細菌浮遊液を混入する。この細菌浮遊液は既知の clone の細菌、好気性菌では virulence の強い *E. coli* O-18 を、嫌気性菌は *B. fragilis* の ATCC23745、を別途培養し、洗浄し、吸光度測定にて生菌数を調整したものである<sup>6)</sup>。この操作によって一定の大きさで、所定の clone の一定の菌数を含んだ fecal pellet を作成した。表 1 に今回の実験に用いたグループの fecal pellet の大きさと菌種、菌数を示した。

#### (2) 動物のグループ分けと操作

実験動物としては体重 250~280 g の雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。術前 1 週間を定時点灯、温度一定の環境下で飼育した後、術前夜より絶食とした。術当日は午前中の一定時間帯にエーテル麻酔下に腹壁を十分消毒した後、腹腔内に上述の方法で作成した fecal pellet を無菌操作にて入れ、膿瘍を形成させた。術後、自由に飲水、摂食させたが輸液は行わなかった。ラットは試験開腹だけの control 群、無菌膿瘍を形成させた sterile inflammation 群、小さな pellet を植えた small abscess 群、大きな pellet を植えた large abscess 群の 4 つのグループに分けた。死亡率をみるためにいずれの群も実験頭数は 35 以上とし、そのうちの一部に対して以下の生化学的検討を加えた。

これらを術後5日目に再びエーテル麻酔下に開腹し、フリーズクランプにて、肝、筋肉(大腿四頭筋)を採取したのち大動脈より採取し犠死せしめた。膿瘍は小腸などを分離して摘出し、膿汁を培養して所定の菌のみの膿瘍が形成されたことを確認した。

2. アッセイ

凍結した肝および筋肉組織は液体窒素中で粉碎した。ピルビン酸脱水素酵素(PDH)の活性型と非活性型酵素活性の測定のために、200mgの組織をホモジナイズし、溶質を抽出液中に抽出した。抽出液はCatersonら<sup>7)</sup>の方法に従い、100mM potassium phosphate buffer とし、10mM sodium pyruvate, 2mM dithiothreitol と5mM EDTA を含みpH7に調整した。PDH活性はCooreらの方法<sup>8)</sup>に従い、ピルビン酸からアセチルCoAが形成される過程でカップリングするp-(p-aminophenylazo) benzene-sulphonic acid の acetylation を分光光度計によってとらえた。全PDH活性は抽出液を牛の心臓のPDH phosphatase, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 4mM CaCl<sub>2</sub>とともに30°Cで15分間イ

ンキュベートしたのちに測定した<sup>9)</sup>。30°Cで1分当たりに1μmolのピルビン酸をアセチルCoAに変換しうるPDH活性を1単位とした。凍結採取した組織の一部は6%過塩素酸溶液に抽出し、KOHで中和したのち、Corkeyら<sup>10)</sup>の方法に従ってHPLCにてmalonyl-CoAを測定した。

アデニンヌクレオチドの測定<sup>11,12)</sup>, energy charge の計算<sup>13)</sup>, ケトン体の測定<sup>14)</sup>はすべて既報の方法に従った。

結果は平均±標準誤差で示した。統計の検定は分散分析による。

結 果

各グループの死亡率を表2に示した。control群では死亡率は0, small abscess グループではperitonitis stage に約半数が死亡したが, abscess stage には死亡しなかった。large abscess では, E. coli の数を減らしたために, 初期のperitonitis stage の死亡率は少ないものの, 慢性期のabscess stage にも死亡するものが出ていた。

体重変化はcontrol及びsterile abscessでは順

表1 グループの fecal pellet の大きさと菌種, 菌数

群	クローン数	サイズ (ml)	E. coli	B. fragilis (cfu*/pellet)
Control	0	0	0	0
Sterile Inflammation	0	0.8	0	0
Small abscess	2	0.8	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>
Large abscess	2	1.5	10 <sup>2</sup>	10 <sup>8</sup>

\* cfu, colony forming unit

表2 死亡率

群	n数	24時間	48時間	7日	膿瘍期 (48h-7日)
Control	44	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0/44 (0%)
Sterile Inflammation	37	1(3%)	1(3%)	0(0%)	0/36 (0%)
Small abscess	35	18(51%) <sup>a</sup>	20(57%) <sup>a</sup>	20(57%) <sup>a</sup>	0/15 (0%)
Large abscess	55	15(27%) <sup>a,b</sup>	30(55%) <sup>a</sup>	34(62%) <sup>a</sup>	4/25 <sup>a</sup> (16%)

Chi-square test.

a : p<0.01 vs Control and Sterile Inflammation groups.

b : p<0.05 vs Small abscess group.

調な増加を示し、control 群では一週間で33 g 増加した。small abscess では術直後に減少し、その後順調に回復したものの、一週間の増加は10 g であった。large abscess では体重増加速度は鈍くなっており、とくに abscess の重量を差し引けば、わずかの体重増加しか認めなかった。

5日目の肝 energy charge を比較すると、図1に示したごとく、感染が重症化するに従って低下し、abscess 群では感染のない群に比べて有意に低下していた。

図2左に肝組織中のケトン体濃度を示す。感染

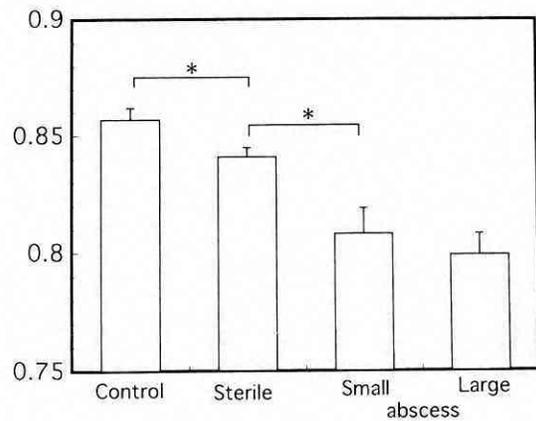


図1 5日目の肝 Energy Charge  
Y軸の数値は肝エネルギーチャージ(= (ATP+0.5ADP)/(ATP+ADP+AMP)) を示す。

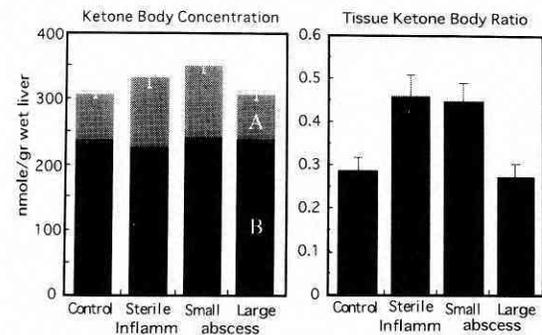


図2 肝組織ケトン体濃度と肝組織ケトン体比  
左図において灰色Aがアセト酢酸、黒Bがβ-ヒドロキシ酪酸濃度を示す。

が重症化するとケトン体濃度、とくにアセト酢酸が減少した。図2右には hepatic tissue ketone body ratio を示した。無菌感染や small abscess 群では hepatic tissue ketone body ratio は上昇したが、large abscess 群では低下した。

Pyruvate dehydrogenase 活性は、肝臓では図3左の如く sterile, small abscess 群では活性が高まり、large abscess では低下した。筋肉では図3右に示した如く PDH 活性は sterile 群で保たれたものの、sepsis ではこれらの1/3に低下した。

PDH 全体に占める active PDH の比率も図4に示したごとく、PDH 活性と同様に、肝臓においては sterile と small abscess 群では上昇するが、large abscess 群では低下した。また筋肉では sterile 群では control 群と同程度に保たれたが細菌感染がおきると1/3に低下した。

図5は肝臓における malonyl-CoA の濃度を示した。感染が重症化するに連れて malonyl-CoA 濃度は増加し、large abscess 群で small abscess 群よりも有意に上昇していた。

### 考 案

今回紹介した敗血症モデル<sup>5)</sup>では、モデルの作成に当って一定の菌を培養し続けなければならないこと、一定量の生菌を含む細菌浮遊液を作成する

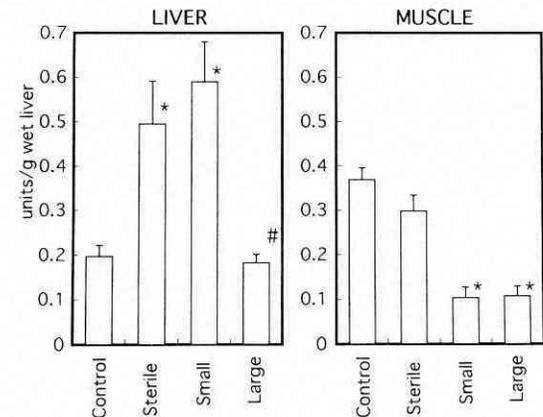


図3 pyruvate dehydrogenase 活性  
\*はControl 群に対する有意差を、#はsmall abscess 群ならびに sterile inflammation 群に対する有意差を示す。

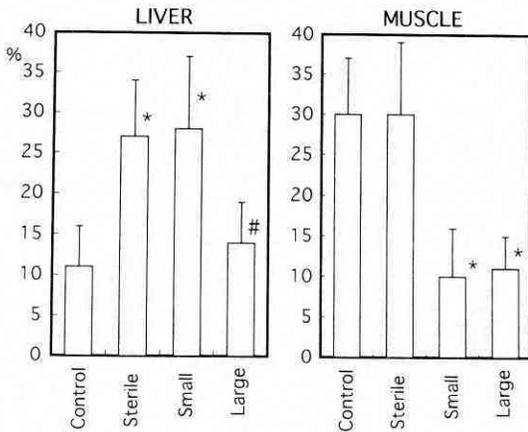


図4 pyruvate dehydrogenase complex 全体に占める active PDH の比率  
\*はControl 群に対する有意差を、#はsmall abscess 群ならびに sterile inflammation 群に対する有意差を示す。

ことに若干の細菌学的テクニックと手間を要することが難点ではあるものの、常に単一、同大、既知クローンの膿瘍を作成できる点、すなわち、再現性の高いことが最大の特色である。

Cecal ligation + puncture の如き multiclonal peritonitis/abscess model に比べると侵襲度は低い慢性期における体重増加の停止、肝 energy charge の低下、hepatic tissue ketone body ratio の軽度感染症群での上昇と重症感染症群での低下、*B. fragilis* 菌血症<sup>5)</sup>、死亡が認められた。Hepatic tissue ketone body ratio の軽度感染症群での上昇と重症感染症群での低下は、臨床症例における AKBR の軽度感染症群での上昇と重症感染症群での低下に一致する。

Sepsis model の重要な要件の一つとして hypermetabolic, hyperdynamic であるべきであるが<sup>11)</sup>、このモデルにおいて心拍出量を transpulmonary thermodilution<sup>15,16)</sup>で測定したところ、既報のごとく cardiac index で130%、total peripheral resistance で74%の hyperdynamic 状態となっていることが示された<sup>17)</sup>。

このモデルを用いて糖代謝の要の反応と考えられる pyruvate から acetyl-CoA への反応を司る酵素 pyruvate dehydrogenase complex の活性

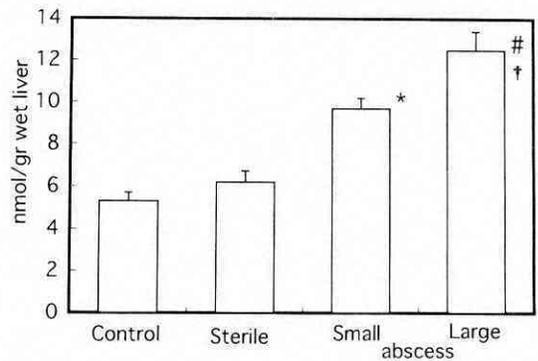


図5 肝臓における Malonyl-CoA の濃度  
\*はControl, Sterile Inflammation の両群に対し  $P < 0.05$  で有意差あり  
# : Control, Sterile Inflammation の両群に対し  $P < 0.01$  で有意差あり。  
† : Small abscess 群に対し  $P < 0.05$  で有意差あり。

と、肝臓において長鎖脂肪酸を細胞質から、その酸化の場であるミトコンドリアへ取り込ませ、脂肪酸代謝の要である酵素 carnitine acyltransferase の活性を抑制する malonyl-CoA の濃度を測定した。

腹腔内膿瘍モデルの結果をまとめると、筋肉と肝臓では感染の重篤化に伴う糖代謝が異なり、肝臓では当初、PDH 活性が高まり糖代謝が亢進するが、筋肉では感染が軽度のうちから PDH 活性が低下し糖代謝が阻害されることが示された。また、肝臓では sepsis の増悪と共に malonyl-CoA が増加して、これが脂肪酸酸化を抑制するであろうこと、また、敗血症でのケトン体濃度の低下を説明するものと考えられた。

以上の実験結果からは、末期に至らない hypermetabolic stage では肝臓での glucose の利用が可能であることが示唆された。肝ミトコンドリアの redox status が酸化に傾いて、糖の利用が可能な状況下では、肝臓は glucose のみならず、アミノ酸、脂肪酸と利用可能である<sup>18,19)</sup>。しかし、筋肉においては、感染の早期から glucose の利用が抑制されるために、糖を主体とした輸液では筋肉自体のエネルギー源に乏しく、筋肉崩壊、autocannibalism が進行し、蛋白崩壊によって得られたアミノ酸のうち芳香族アミノ酸が血中に蓄積して<sup>19)</sup>

Fisher 比が低下して意識障害をきたしたり<sup>20)</sup>、肝臓への代謝負荷が増大する。そこで、筋肉自体の栄養源となりうる BCAA を投与することによって筋肉崩壊を防ぎ、Fisher 比の低下の防止と肝臓への代謝負荷の軽減に努めるべきと考えられた<sup>21)</sup>。

今回の検討からは外れるものの、侵襲時に選択すべき輸液として中鎖脂肪酸<sup>22)</sup>、ケトン体輸液<sup>23)</sup>を始めとして種々の輸液が提唱され、今後に期待されている。

### ま と め

ラットに再現性の高い腹腔内膿瘍の慢性敗血症モデルを作成した。このモデルを用いて、解糖系の key enzyme である pyruvate dehydrogenase complex の活性を肝臓と筋肉で測定した。肝臓では pyruvate dehydrogenase 活性は感染早期から hypermetabolic stage では亢進するが、末期では低下すること、筋肉では感染早期から活性が低下し、糖の利用が抑制されていることが示された。また、脂肪酸酸化の key enzyme である carnitine acyltransferase 活性を抑制する malonyl-CoA が肝臓において感染の増悪と共に増加することから、脂肪酸の利用が次第に抑制される事が示唆された。これらの事実より、重症感染症においては肝臓、筋肉における基質利用を考慮しつつ輸液を選択すべきことと考えられた。

### 文 献

- 1) 島崎修次, 三島史郎: 敗血症および敗血症性ショックの動物実験モデル. 日本救急医学会雑誌 5 : 1, 1994.
- 2) Chaudry IH, Hirasawa H, Baue AE: Effect of adenosine triphosphate-glucose administration following sepsis. J Surg Res 29 : 348, 1980.
- 3) Chaudry IH, Schleck S, Clemens MG, et al. Altered hepatocellular active transport. an early change in peritonitis. Arch Surg 117 : 151, 1982.
- 4) Wichterman KA, Chaudry IH, Baue AE: Studies of peripheral glucose uptake during sepsis. Arch Surg 114 : 740, 1979.
- 5) Nakatani T, Sato T, Marzella L, et al: Hepatic and systemic responses to aerobic and anaerobic intraabdominal abscesses in a highly reproducible chronic rat model. Circ Shock 13 : 271, 1984.
- 6) Nakatani T, Tanaka J, Sato T, et al. The pathophysiology of septic shock: studies of reticuloendothelial system function and liver high-energy metabolism in rats following sublethal and lethal Escherichia coli injection. Adv Shock Res 7 : 147, 1982.
- 7) Caterson ID, Fuller SF, Randle PJ: Effect of fatty acid inhibitor 2-tetradecylglycidic acid on pyruvate dehydrogenase complex activity in starved and alloxan-diabetic rats. Biochem J 208 : 53, 1982.
- 8) Coore HG, Denton RM, Martin BR, et al: Regulation of adipose tissue pyruvate dehydrogenase by insulin and other hormones. Biochem J 125 : 115, 1971.
- 9) Vary TC, Randle PJ: The effect of ischemia on the activity of pyruvate dehydrogenase complex activity in rat heart. J Mol Cell Cardiol 16 : 723, 1984.
- 10) Corkey BE, Brandt MB, Williams RJ, et al: Assay of short-chain acyl coenzyme A intermediates in tissue extracts by high pressure liquid chromatography. Anal Biochem 118 : 30, 1981.
- 11) Lamprecht W, Trautschold I: Adenosine-5'-triphosphate: Determination with hexokinase in glucose-6-phosphate dehydrogenase. Bergmeyer HU, ed. Methods of enzymatic analysis. Academic Press Inc, New York 1974, P. 2101.
- 12) Jaworek D, Gruber W, Bergmeyer HU: Adenosine-5'-diphosphate and adenosine-5'-monophosphate. Bergmeyer HU, ed. Methods of enzymatic analysis. Academic Press Inc, New York 1974, P. 2127.
- 13) Atkinson DE: Enzymes as control elements in metabolic regulation. Boyer PD, ed. The

- Enzymes. Academic Press Inc, New York 1970, P. 461.
- 14) 中谷寿男, 動脈血中ケトン体比. 救急医学 17 : 1531, 1993.
  - 15) Sato T, Nakatani T, Hirai F, et al: The effects of splenectomy on an experimental rat intra-abdominal abscess model. Fed Proc 43 : 326, 1984.
  - 16) Sato T, Hirai F, Nakatani T, et al: Direct measurement of hepatic blood flow in rats using the thirmodilution method. Circ Shock 13 : 103, 1984.
  - 17) Sato T: New method for measurement of hepatic blood flow in the rat using thirmodilution method. Circ Shock 21 : 31, 1987.
  - 18) 中谷寿男, 小澤和恵, 戸部隆吉: MOF と肝 energy crisis. 最新医学 39 : 2480, 1984.
  - 19) 小澤和恵, 寫原康行, 中谷寿男, 他: 多臓器障害. Shock 1 : 62, 1986.
  - 20) Fischer JE, Rosen HM, Ebeid AM, et al: The effect of normalization of plasma amino acids on hepatic encephalopathy in man. Surgery 80 : 77, 1976.
  - 21) Freund H, Hoover HC, Atamian S, et al: Infusion of the branched chain amino acids in postoperative patients. anticatabolic properties. Ann Surg 190 : 18, 1979.
  - 22) 宇佐美真, 笠原 宏, 孫 凱, 他: 中鎖脂肪 (MCT). 救急医学 17 : 1510, 1993.
  - 23) Hiraide A, Katayama M, Sugimoto H, et al: Effect of 3-hydroxybutyrate on posttraumatic metabolism in man. Surgery 109 : 176, 1991.