

大腸菌持続注入による腹膜炎ラットモデルにおける

アラニルグルタミン投与の評価

— 特に全身及び臓器蛋白代謝の検討を中心に —

仲 秀 司

大腸菌持続注入による腹膜炎ラットモデルにおける

アラニルグルタミン投与の評価

—特に全身及び臓器蛋白代謝の検討を中心に—

仲 秀司

【1】はじめに

外科侵襲では骨格筋や腸管、結合組織の蛋白崩壊で動員されたアミノ酸は、肝臓での急性相蛋白の合成、あるいは全身や創部の炎症反応または創傷治癒促進のために利用され、さらにエネルギー基質としても利用される(1,2,3,4)。これらのアミノ酸のうち、とくにグルタミンとアラニンは外科侵襲時の蛋白・アミノ酸代謝で極めて重要な役割を演じることが指摘されている。すなわち、グルタミンは線維芽細胞、リンパ球、マクロファージ、腸管細胞など分裂速度の速い細胞での主要なエネルギー基質となり(5)、またプリンやピリミジンの合成にも用いられる(6)他、骨格筋・腸・肝の臓器相互のアミノ酸代謝での窒素のキャリアーとなる。このグルタミンは通常では血漿や組織液中の遊離アミノ酸の60%も占め、しかも非必須アミノ酸とされているが、上述のようなグルタミン利用の亢進のために外科侵襲時(7)や敗血症時(8)にはグルタミンの筋肉内および血中濃度は低下し、必要量が増す(9,10)。事実、臨床的にもグルタミンのアミノ酸輸液剤への添加は、胆嚢摘除術など軽度の侵襲時の蛋白代謝改善に有効との報告(11)がある。

しかし、グルタミンは溶液中では不安定で、pyroglutamateやアンモニアなどの有害物質に変性しやすい(12)。このために現在市販されている輸液用アミノ酸製剤には含有されておらず、またその添加液の長期保存にも問題があることが指摘されている(13)。一方、グルタミンのdipeptideであるアラニルグルタミン(Ala-Gln)は溶液中でも安定で(14)、血液の中で速やかにグルタミンとアラニンに分解する(12)ため、中心静脈栄養液へのAla-Gln添加はグルタミンを投与するために好都合である。しかも、Ala-Glnによってグルタミンと同時に供給されるアラニンは、糖原性アミノ酸であり、外科侵襲時には肝臓での糖新生に用いられる(15,16)。このようにグルタミンの安定なdipeptideであるAla-Glnの投与は、重症外科侵襲生体の蛋白・アミノ酸代謝を円滑化することが考えられる。しかし、これまでのところ重症外科侵襲生体でのAla-Glnの経静脈的投与の効果を検

討した報告はほとんどない。

そこで本研究では、以下の検討を行った。

(1) 腹腔内に挿入した浸透圧ポンプからの持続的細菌注入によるラット腹膜炎モデルを作成した。

(2) このモデルを用い、重症外科侵襲時の Ala-Gln 添加アミノ酸製剤の全身及び各臓器の蛋白代謝への効果について、FAO/WHO 基準に基づいた従来のアミノ酸製剤と比較検討した。

(3) 同じモデルで、Ala-Gln 添加アミノ酸製剤の効果を、侵襲時に有用とされる高濃度 BCAA 含有アミノ酸製剤と比較検討した。

【2】方法と成績

1、実験1—ラット持続腹膜炎モデルの作成実験

1) 目的

本実験に用いるラット持続腹膜炎モデルでの腹腔内細菌注入量を決定するために以下の検討を行なった。

2) 対象と方法

A) 対象

ウィスター系雄性ラットを温度24℃、湿度60%の環境下で固形試料(MF、オリエンタル酵母工業(株)、東京)にて飼育し、1週間以上代謝ケージに入れ、環境馴化させた12週令(体重367gから407g)の発育順調なものを用いた。

B) 浸透圧ポンプとその腹腔内挿入法

浸透圧ポンプによる腹腔内持続細菌注入モデルは Alexander らの方法(17)に準じて作成した。すなわち、手術当日早朝より、絶飲食とし、pentobarbital sodium 50mg/kg 腹腔内投与による麻酔下に、上腹部正中切開で開腹、細菌注入用の浸透圧ポンプを腹腔内に挿入した。

浸透圧ポンプ (Alzet® Mini Osmotic Pump Type 2ML-1、Alza社製、Palo Alto、

California, U.S.A.) には腹腔内挿入直前に細菌溶液 2ml を注入した。なおこの浸透圧ポンプに内径 0.25 inch (=0.64mm)、長さ 1m のシリコンチューブ (Dow Corning Corporation, SILASTIC® Medical-Grading Tubing, 602-155, Midland, Michigan, U.S.A.) をシリコンボンド (Dow Corning Corporation, SILASTIC® Medical Adhesive Silicone Type A, Midland, Michigan, U.S.A.) で接続し、ポンプ挿入後は 36 時間後より細菌の腹腔内持続注入が始まり、1 日 24 μ l の細菌液が 4.5 日間持続的に注入されるように設定した。

C) 細菌の調整法

E.coli (American Type Culture Collection 25922 strain, Difco corporation, Detroit, Michigan, U.S.A.) を trypticase soy broth 液体培地 10ml で 37°C 一晚培養し、希釈法にて生存菌数を数え、必要な細菌濃度になるように生理食塩水で希釈した。

D) 実験群

浸透圧ポンプ腹腔内挿入ラットを *E.coli* の 24 時間注入量で 10^7 群 (n=5)、 10^6 群 (n=6)、 10^5 群 (n=6) の 3 群に分けた。さらに浸透圧ポンプ内に *E.coli* 溶液の代りに生理食塩水を入れたものを Control 群 (n=6) とした。4 群ともに手術後は代謝ケージ内に戻し、餌、水とも自由経口摂取とした。連日、体重、尿量、餌・水分摂取量を測定し、手術後 6 日間 (細菌注入開始後 4.5 日間) 生存したものは犠死とし剖検した。実験のプロトコールを図 1 に示した。

E) 腸粘膜高の測定法

幽門輪から 10cm 肛側の小腸、全小腸の中央、盲腸から 10cm 口側の小腸を各々近位小腸、中位小腸、遠位小腸としてホルマリン標本とした。腸粘膜の高さの測定には hematoxylin-eosin 標本を用い、画像解析装置 (digitalized morphometry SP500, オリパス光学、東京) で粘膜基底層までの面積と基底層の長さを測定し、その商を平均粘膜高とした。

F) 犠死時細菌培養法

犠死時に心臓血、腹腔内液の細菌培養を行なった。血液培養は、無菌的に

心臓採血した血液を直ちにBrain Heart Infusion 液体培地に入れ、36℃にて1～3日間培養した後、羊血液寒天培地（日水製薬、東京）、ドリガルスキー改良培地（栄研化学、東京）にてcolonyを分離し、colonyの肉眼的所見に応じ、グラム陰性桿菌の場合はEnterotube®（日本ロシユ、東京）にて同定を行い、

Staphylococcus aureus の確認にはStaphyslide-Test®（日本ビオメリューバイテック社、東京）を用いた。腹腔内培養は、犠死時に無菌的に開腹し、スワブにて腹腔内を拭い、腹水を採取し、羊血液寒天培地（日水製薬、東京）、ドリガルスキー改良培地（栄研化学、東京）に展開、培養し、血液培養と同様に分離、同定した。

G) 統計学的検討法

3群以上の比較には、分散分析により $p<0.05$ の場合を有意差ありとし、Scheffé's F-testにて群間の検定を行った。

2) 成績

A) 死亡率

Control群、 10^7 群、 10^8 群ではすべてのラットがポンプ挿入後6日間、すなわち細菌注入開始後4.5日間生存した。これに対し 10^9 群は術後2日目まで全ラットが死亡した。

B) 体重および食餌摂取量（表1）

浸透圧ポンプ挿入後6日間の体重変化はControl群、 10^7 群、 10^8 群の間に有意差はなかった。しかし、この間の食餌摂取量は術後1日目から4日目まで 10^9 群が最も少なかった。

C) 犠死時臓器重量（表2）

犠死時の脾臓重量は 10^9 群でControl群に比べ、また副腎重量は 10^7 群でControl群に比べ有意に増加していた（ $p<0.05$ ）。他の臓器重量は3群でいずれも有意差を認めなかった。

D) 犠死時細菌培養（表3）

犠死時の腹腔内細菌培養では 10^7 群および 10^8 群のラットすべてに*E.coli*が検

出された。しかしControl群の腹腔内培養は6匹すべてが陰性であった。また心臓採血血液培養では、 10^7 群で6匹中2匹に*E.coli*が検出されたが、 10^8 群およびControl群では細菌は検出されなかった。なお、腹腔内細菌培養、血液培養ともに*E.coli*以外の細菌は認められなかった。

E) 犠死時腸粘膜の組織所見と腸粘膜高 (表4)

腸管標本の組織像では、細菌投与群では非投与群に比べ、腸絨毛の萎縮、陰窩長の短縮、粘膜固有層へのリンパ球を中心とする炎症細胞浸潤の増加、管腔内へのフィブリン析出、粘膜糜爛などの所見が認められた (図2)。腸絨毛の萎縮は口側に著明であったが、陰窩長の短縮は腸絨毛の萎縮ほど明らかなではなかった。フィブリン析出は遠位小腸で著しく、粘膜固有層への細胞浸潤は小腸全体に認められた。腸粘膜高は細菌投与群ではControl群に比べ、近位・中位・遠位小腸とも低く、とくに近位小腸では 10^7 群が、中位小腸では 10^8 群が各々、Control群に比べ有意に低かった。

3) 小括

ラット持続腹膜炎モデルの腹腔内細菌注入量決定の検討を行なった。その結果、*E.coli* 10^8 投与群は全例2日以内に死亡し、長期の細菌腹腔内持続注入モデルとしては不適切と考えられた。 10^7 、 10^8 群のラットはすべて術後6日間生存したが、食餌摂取量、脾臓重量、犠死時細菌培養所見、小腸粘膜高などから 10^8 群は 10^7 群よりも強い侵襲を持続的に与えられると考えられた。そこで以後の実験では持続腹膜炎モデルでの*E.coli*注入量は 10^8 c.f.u./日を選択することにした。

2、実験 2—市販標準アミノ酸液とAla-Gln添加アミノ酸液の比較

1) 目的

持続腹膜炎におけるAla-Gln添加アミノ酸製剤の効果を、グルタミンを含有していない従来の市販標準アミノ酸製剤と比較した。

2) 方法

A) 持続腹膜炎作成、中心静脈カテーテル挿入

本実験には実験1で検討した持続腹膜炎実験モデルを用いた。すなわち、環境馴化させた12週令（体重383gから440g）のウイスター系雄性ラットを用い、pentobarbital sodium 50mg/kg 腹腔内投与の麻酔下に、上腹部正中切開で開腹、*E.coli* 10^8 c.f.u./mlを含む生理食塩水溶液2mlを注入した浸透圧ポンプを腹腔内に挿入した。このポンプ挿入で術後約36時間から*E.coli* 4×10^8 c.f.u./day が注入されることになる。

腹腔内浸透圧ポンプ挿入後、右頸静脈よりシリコンチューブ（SILASTIC® Medical-Grading Tubing, 602-155, Dow Corning Corporation, Midland, Michigan, U.S.A.）を上大静脈に挿入した。この中心静脈カテーテルを皮下経由で胸背部の固定スプリング内に通し、スィベルを介して栄養液の持続注入用のシリンジポンプ（SP-100, Japan Medical Supply 社製、東京）に接続した。なお、中心静脈カテーテルの位置は、すべてのラットで剖検時に確認した。術後はラット1匹ずつを代謝ケージ内に置き、絶飲食で完全経静脈栄養管理とした。

B) Ala-Gln投与の有無による実験群分け

手術終了後にラットを、従来のFAO/WHO基準準拠のアミノ酸輸液製剤を用いるCon群(n=16)と、このアミノ酸輸液製剤にAla-Glnを添加したAla-Gln群(n=7)の2群に分けた。両群ともにfull strengthの輸液量は200 ml/kg/day、投与カロリーは194 kcal/kg/day（ブドウ糖80%、アミノ酸20%）、NPC/N=88 kcal/g、投与窒素量は1.7 gN/kg/dayと、それぞれを同じにした。そして、術後5日間の完全静脈栄養実施期間のうち、投与水分量と窒素量は術直後よりfull strength、投与ブドウ糖量は術後1日目までは1/3 strength、2日目までは2/3 strength、2日

目より full strength とした。実験 2 のプロトコルを図 3 に示した。

投与栄養液は 50% ブドウ糖電解質液 (GE-3、大塚製薬 (株)、東京) および 10% アミノ酸製液 (モリブロン-F、森下製薬 (株)、東京)、20% Ala-Gln 液 (協和醗酵 (株)、東京)、蒸留水を用いて調整した。ビタミン製剤として MVI (エスエス製薬 (株)、東京) を加えた (表 5)。この処方で調整した各群の栄養液の組成を表 6 に挙げた。

とくに投与栄養液のアミノ酸濃度については、総アミノ酸濃度は Con 群が 5.0% W/V、Ala-Gln 群が 2.7% W/V とし、Ala-Gln 濃度は Con 群で 0%、Ala-Gln 群が 2.3% W/V とした。その結果、dipeptide である Ala-Gln が体内でアラニンとグルタミンに完全に分解したとすると、Con 群のアミノ酸組成でのグルタミンは 0%、アラニンは 7%、Ala-Gln 群ではグルタミンが 30%、アラニンが 20% となる。

C) 諸量の測定

(1) 体重および尿量測定

死亡あるいは犠死まで連日、体重および尿量を測定した。また酸性畜尿した全尿の一部を以下に述べる測定まで -40℃ で冷凍保存した。

(2) 蛋白代謝測定法

全身および臓器の蛋白代謝測定のため、犠死 24 時間前より 99% 重窒素標識グリシン (Cambridge Isotope Laboratories, USA、以下 ^{15}N グリシン) 80mg/日を持続静注した。なおラットでの経静脈経路で isotopic plateau を得るには、約 16 時間の ^{15}N グリシン注入時間が必要とされており (18)、今回の予備実験でも 15-20 時間の持続静注で尿での isotopic plateau 到達を確認した。

手術後 5 日目 (細菌注入開始後 3.5 日目) に、エーテル麻酔下に無菌的に心臓採血し犠死させた。犠死時にカラカス、肺、胸腺、肝、腎、副腎、脾臓、近位小腸、遠位小腸、大腸各々の重量を測定した。これら臓器の一部を組織 ^{15}N enrichment の測定まで -40℃ で凍結保存した。なお、近位小腸と遠位小腸は全小腸を長さで二分したものとし、大腸とともに各々 5mm の長さをホルマリン固定した。

(i) 試料中の ^{15}N enrichment 測定法(19,20)

凍結した尿は加温して液体試料とした。肺、胸腺、肝、腎、腓腹筋、近位小腸、遠位小腸、大腸は凍結臓器約1g (胸腺は量が少ないため、全量) に、10%トリクロル酢酸10mlを加えて、ホモジェナイズ後、遠沈して、上清のアミノ酸分画と、沈殿の蛋白分画に分けた。アミノ酸分画はSobelらの方法(21,22)により、アミノ基をニンヒドリン分解後、飽和過酸化カリウム溶液を加えてアンモニアとし、aeration法にて0.5規定塩酸溶液に吸収した。この塩酸溶液を遠心濃縮器にて、乾涸させ、塩化アンモニウム結晶とした後、蒸留水10mlに溶解、担体(Nitrogen free chromosorb-G、島津製作所、東京)に吸着させ、スズ製カプセルに挿入した。蛋白分画は、5%トリクロル酢酸で2回洗浄後、乾燥させ、200~300mgをスズ製カプセルに挿入した。これらの試料中の ^{15}N 含量を、全自動窒素質量分析計(ACNA-MS system, Europa Scientific 社、U. K.)で測定した。

(ii) 全身蛋白回転及び各臓器の蛋白合成率の算出法

全身蛋白代謝回転率(Q)、蛋白合成率(S)、蛋白崩壊率(B)などの全身蛋白代謝は以下の Picou, Taylor-Robertsら(23)の方法により求めた。

$$Q = \frac{d}{\text{Su}}$$

$$Q = I + B = E + S$$

d : infused dose of ^{15}N

Su : ^{15}N enrichment of urinary total nitrogen

I : nitrogen intake

E : nitrogen excretion

各臓器の蛋白合成率はGarlickら(24)の次式より求めた。

$$\frac{\text{Sb}}{\text{Si}} = \frac{R}{R-1} \times \frac{1 - e^{-RT}}{1 - e^{-RT}} - \frac{1}{R-1}$$

Sb : ^{15}N enrichment of cellular protein-bound mixed amino acids

Si : ^{15}N enrichment of cellular free amino acids

T : duration of ^{15}N infusion

K : fractional protein synthesis rate

R : ratio of nitrogen in protein to nitrogen in free amino acids

なお、 ^{15}N グリシンの持続注入時間が十分長ければ、Rの値の変化のK値に及ぼす変動は少なく(25,26,27)、ラットの概数値として $R=60$ を用いた。

(3) 尿生化学測定

連日採取した尿の総窒素値、3-メチルヒスチジン値、エピネフリンおよびノルエピネフリン値を以下の方法で測定した。尿中総窒素値は減圧化学発光法で測定した。尿中3-メチルヒスチジン測定は、ラットの尿3-メチルヒスチジンの90%がN-acetyl化されているため(28)、尿を6N HClで100℃、12時間加温し、N-acetyl基を加水分解した後、全自動高速アミノ酸分析装置(医理化機器、Model Σ -8700、東京)を用いて液体クロマトグラフ法にて測定した。尿中エピネフリンおよびノルエピネフリン値は尿 800 μl に 6% 過塩素酸 400 μl を加え、攪拌、遠沈後、上清をカテコラミン分析計(東ソー、HLC-8030、東京)で液体クロマトグラフ法にて測定した。

(4) 血液生化学測定

犠死時の血清でアミノグラム、アルブミン値、遊離脂肪酸値、血清中尿素窒素値を測定した。アミノ酸分析は血清0.5mlに4% sulfosalicylic acid 0.5mlを加え攪拌、遠沈後、上清50 μl を全自動高速アミノ酸分析装置を用い(医理化機器、Model Σ -8700、東京)、強酸性陽イオン交換樹脂を用いた stepwise gradient 溶出による分離法とニンヒドリン反応による検出法との組合せで行なった。血清アルブミンはブロムクレゾールグリーンを利用した比色法で、血清中遊離脂肪酸は酵素法で、血清中尿素窒素はUrease、NADPHを用いた酵素法による自動分析装置を用いて、それぞれ測定した。

なお、本実験に用いたのと同周齢のラットをラット通常食餌で1週間飼育し、開腹術および腹腔内細菌投与を行わずに犠死させ、正常ラット群とし、

これらの血清生化学検査も行ない比較検討に供した。

(5) 腸粘膜高の測定

実験1と同様の方法を用いた。

(6) 犠死時細菌培養

犠死時に心臓血、腹腔内液、経静脈カテーテルの細菌培養を行なった。心臓血および腹腔内液細菌培養法は実験1と同じ方法を用いた。経静脈カテーテル培養は犠死時に無菌的に頸静脈カテーテルを回収し、先端を羊血液寒天培地（日水製薬、東京）、ドリガルスキー改良培地（栄研化学、東京）に展開し、実験1と同様に培養、分離、同定した。

D) 統計学的検討法

Con群とAla-Gln群との2群の有意差の検定には、分散分析により正規分布とみなせるときにはStudent *t*-testを、みなせないときにはMann-Whitney testを用い、両側検定にて $p<0.05$ の場合を有意差ありとした。正常ラット食餌摂取で腹腔内細菌非投与のラットを含めた3群の比較には、分散分析により $p<0.05$ の場合を有意差ありとし、Scheffé's *F*-testにて群間の検定を行った。また、生存率の検定にはFisher's exact testを用い、 $p<0.05$ の場合を有意差ありとした。数値はMean \pm SEMで示した。

3) 成績

A) 生存率 (図4)

Ala-Gln群では7匹中1匹が術後5日目に死亡し、最終的な生存率は86%であった。これに対しCon群では16匹中術後第1日目に1匹、第2日目に1匹、第3日目に2匹、第4日目に4匹、第5日目に1匹の合計9匹が死亡し、最終生存率は44%で、Ala-Gln群での生存率が明かに良好であった ($P<0.05$)。

B) 体重および尿量

生存例のみでは、Con群の術後体重変化は術後2日目に術前の97%と最低値となり、術後5日目には100%まで回復した。またAla-Gln群の体重の推移も術後2日目に術前の96%と最低値となり、術後5日目には100%まで回復し、両

群間に有意差を認めなかった。術後5日目までの一日尿量も両群とも50~65mlで、有意差はなかった。

C) 尿中カテコラミン排泄量

生存例のみでは、Con群、Ala-Gln群における尿中エピネフリン排泄量、ノルエピネフリン排泄量、総カテコラミン（エピネフリン+ノルエピネフリン）排泄量には、有意差はなかった。

D) 犠死時剖検肉眼所見と臓器重量

犠死時剖検の肉眼所見ではCon群7匹中1匹に肺充血、3匹に膿性腹水の所見を認めた。またAla-Gln群では6匹中1匹で膿性腹水と肺充血を合併し、2例に膿性腹水を認めた。犠死時に測定したカラカス、肺、胸腺、肝、脾臓、腎臓、小腸、大腸、腓腹筋の各臓器重量には、両群間で有意差を認めなかった。

E) 蛋白代謝

i) 尿中窒素排泄量および3-メチルヒスチジン排泄量

生存例のみでは、Con群の術後5日間の累積尿中窒素排泄量は $6.6 \pm 0.2 \text{ g/kg/5days}$ 、Ala-Gln群のそれは $6.5 \pm 0.3 \text{ g/kg/5days}$ で差がなかった。また各日の尿中窒素排泄量も全経過を通じ両群間で差がなかった。さらに術後5日間の尿中3-メチルヒスチジン排泄量はCon群で $54.4 \pm 3.3 \mu \text{ mol/kg/5days}$ 、Ala-Gln群で $51.6 \pm 3.7 \mu \text{ mol/kg/5days}$ と、これも両群で有意差はなかった。

ii) 全身蛋白代謝および臓器蛋白合成率（表7）

^{15}N グリシン投与による術後5日目の全身蛋白回転率、全身蛋白合成率、全身蛋白崩壊率はいずれもAla-Gln群でCon群より大きい傾向を認めた。また ^{15}N グリシンによる臓器蛋白合成率のうち、肝のそれはCon群で $29.0 \pm 1.1\%/ \text{day}$ 、Ala-Gln群で $37.5 \pm 2.7\%/ \text{day}$ とAla-Gln群の方が大きかった（ $p=0.016$ ）。また腓腹筋の蛋白合成率もCon群で $1.6 \pm 0.1\%/ \text{day}$ 、Ala-Gln群で $2.0 \pm 0.1\%/ \text{day}$ で、Ala-Gln群で有意に大きかった（ $p=0.025$ ）。胸腺と脾臓の蛋白合成率もAla-Gln群で高値を示した（ $p=0.08$ ）。

F) 血液生化学測定値

i) 犠死時血清アミノグラム (表 8)

犠死時血清アミノグラムでは、Con群の方がAla-Gln群よりも有意に高値を示したのは、グリシン、スレオニン、フェニルアラニン、リジン、ヒスチジンであった。逆にAla-Gln群がCon群よりも有意な高値を示したのはグルタミンとアスパラギンのみであった。なお、正常ラット群の血清アミノ酸濃度と比べ、Con群、Ala-Gln群ともに有意な高値を示したのはフェニルアラニンとヒスチジンで、両群ともに有意な低値を示したのはアスパラギン、プロリンであった。また血清の総アミノ酸濃度、非必須アミノ酸濃度はCon群、Ala-Gln群、正常ラット群で差はなかったが、必須アミノ酸濃度はCon群はAla-Gln群および正常ラット群と比べて高値であった($p < 0.05$)。

更に、血清グルタミン濃度と肝の蛋白合成率、血清中グルタミン濃度と筋肉の蛋白合成率との間には正の相関を認めた (各々、 $r = 0.92, p = 0.0001$ 、 $r = 0.73, p = 0.012$ 、図 5)。

ii) その他の血清生化学測定値

犠死時の血清アルブミン値はCon群で $1.5 \pm 0.1 \text{ g/dl}$ 、Ala-Gln群で $1.4 \pm 0.1 \text{ g/dl}$ と両群間に差はなかったが、両群とも通常食摂取・細菌非投与の正常ラット群の $2.3 \pm 0.0 \text{ g/dl}$ よりも低値を示した($p < 0.05$)。BUNもCon群で $20.6 \pm 0.9 \text{ mg/dl}$ 、Ala-Gln群で $22.1 \pm 1.7 \text{ mg/dl}$ で両群間に差はなかったが、Ala-Gln群では正常ラット群の $17.2 \pm 0.8 \text{ mg/dl}$ よりも高値を示した($p < 0.05$)。血清遊離脂肪酸はCon群で $0.37 \pm 0.02 \text{ mEq/l}$ 、Ala-Gln群で $0.47 \pm 0.05 \text{ mEq/l}$ で両群間に差はなかったが、Con群では正常ラット群の $0.62 \pm 0.08 \text{ mEq/l}$ よりも低値を示した($p < 0.05$)。

G) 腸の組織学的所見および粘膜の高さ (図 2、表 9)

Con群では常食摂取・細菌非投与の正常ラットに比べ、絨毛高の低下、陰窩長の短縮、絨毛密度の減少、粘膜固有層の炎症細胞浸潤、管腔内へのフィブリン析出などの変化を認めた (図 2)。これらの所見はとくに遠位小腸で顕著であった。これに対し、Ala-Gln群ではCon群に比べ、絨毛高、陰窩長は著明に増加し、密度も増し、炎症細胞浸潤、フィブリン析出も明らかに少なかった。

また腸粘膜の高さを両群で比較したところ、近位小腸、中位小腸、遠位小腸、大腸いずれも Ala-Gln群に高い傾向を認め、とくに遠位小腸では Ala-Gln群の方が Con群より有意に高かった（表9）。

H) 犠死時細菌培養（表10）

犠死時の細菌培養をCon群5匹、Ala-Gln群5匹で施行した。腹腔内培養ではCon群、Ala-Gln群とも全例に *E.coli* が検出された。その他に両群1匹ずつで *Bacillus subtilis* が検出された。心臓採血血液培養ではCon群で5匹すべてが、Ala-Gln群では5匹中4匹で細菌培養陽性であった。中心静脈カテーテル先端培養では、Con群5匹中4匹、Ala-Gln群では5匹すべてで培養陽性であった。これらの内訳を表10にあげたが、いずれの群でも中心静脈カテーテル先端培養、血液培養ともに投与した *E.coli* 以外の細菌種が検出された。

4) 小括

持続腹膜炎におけるAla-Gln添加アミノ酸製剤の効果をグルタミンを含有していない従来の市販標準アミノ酸組成のアミノ酸製剤と比較した。その結果、Ala-Gln群ではCon群に比べて、生存率、肝および末梢骨格筋、胸腺、脾臓などの臓器蛋白合成率、小腸粘膜高が良好であった。また血清中グルタミン濃度は肝、筋肉の蛋白合成率との間に正の相関があった。

3、実験3—高BCAA含有アミノ酸液とAla-Gln添加アミノ酸液の比較

1) 目的

実験2において、Ala-Gln添加アミノ酸製剤はグルタミンを含有していない従来の標準酸組成のアミノ酸製剤にくらべて、ラット持続腹膜炎モデルでの効果が明らかとなった。そこでさらに高度外科的侵襲時に有効とされる高BCAA含有アミノ酸製剤とAla-Gln添加アミノ酸製剤の効果を比較した。

2) 対象と方法

A) 実験動物と持続腹膜炎作成、中心静脈カテーテル挿入

本検討には12週令（体重350から468 g）のラットを用い、実験2と同様の持続腹膜炎・完全経静脈栄養モデルを作成した。

B) Ala-Gln投与の有無による実験群分け

高BCAA含有アミノ酸製剤とAla-Gln添加アミノ酸液製剤投与の比較実験では手術後3日目に犠死させる3日群（n=23）と、手術後5日目に犠死させる5日群（n=17）との2つの実験を行った。3日群の実験では手術終了後のラットを、完全経静脈輸液に高BCAA含有アミノ酸輸液製剤を用いるBCAA-3群（n=13）と、この高BCAA含有アミノ酸輸液製剤にAla-Glnを添加したAla-Gln-3群（n=10）の2群に分けた。5日群では同様に高BCAA含有アミノ酸輸液製剤を用いるBCAA-5群（n=9）とAla-Glnを添加したAla-Gln-5群（n=8）に分けた。

各群ともにfull strengthの輸液量は200 ml/kg/day、投与カロリーは194 kcal/kg/day（ブドウ糖80%、アミノ酸20%）、NPC/N=88 kcal/g、投与窒素量は1.7 gN/kg/dayと、それぞれを同じにした。そして、完全静脈栄養実施期間のうち、投与水分量と窒素量は術直後よりfull strength、投与ブドウ糖量は術後1日目までは1/3 strength、2日目までは2/3 strength、2日目よりfull strengthとした。実験3のプロトコルを図7に示した。

BCAA群の投与栄養液は50%ブドウ糖電解質液（GE-3、大塚製薬（株）、東京）および総アミノ酸の30%のBCAAを含有した10%アミノ酸製剤（アミバレン、大塚製薬（株）、東京）、蒸留水を用いて調整した。またAla-Gln群の投

与輸液はこれらに20%Ala-Gln液(協和醗酵(株)、東京)を加えて調整した。ビタミン製剤としてMVI(エスエス製薬(株)、東京)を両群の投与輸液に加えた(表11)。この処方で調整した各群の栄養液の組成を表12に挙げた。

とくに投与栄養輸液のアミノ酸濃度については、総アミノ酸濃度はBCAA群が5.0%W/V、Ala-Gln群が2.7%W/Vとし、Ala-Gln濃度はBCAA群で0%、Ala-Gln群が2.3%W/Vとした。その結果、dipeptideであるAla-Glnが体内でアラニンとグルタミンに完全に分解したとすると、BCAA群のアミノ酸組成でのグルタミンは0%、アラニンは8.1%、Ala-Gln群ではグルタミンが30.0%、アラニンが19.9%となる。そしてBCAA濃度はBCAA群でアミノ酸全体の30.5%、Ala-Gln群で16.6%となる。

C) 諸量の測定

体重測定、尿量測定、 ^{15}N グリシンによる全身及び臓器蛋白代謝測定法、尿生化学測定、血液生化学測定、腸粘膜の組織学的検査、犠死時細菌培養は実験2と同じ方法で行なった。なお尿中カテコラミン測定、血清アミノ酸分析、血清アルブミン値、BUN、遊離脂肪酸値の測定はBCAA-5群とAla-Gln-5群のみに施行した。

D) 統計学的検討法

有意差の検定は実験2群と同じ手法により、また細菌培養の陽性率の比較には χ^2 検定を用いた。

3) 成績

A) 生存率

BCAA-3群では13匹中2匹が2日目に、1匹が3日目に死亡し、術後3日目までの生存率は77%であった。これに対し、Ala-Gln-3群では実験期間中死亡例はなく、生存率は100%であった。BCAA-5群、Ala-Gln-5群は両群とも実験期間中死亡例はなかった。

B) 体重および尿量

生存例のみでは、BCAA-3群の体重は術後2日目に術前値の95.2%と最低値

を示し、術後3日目には100%に回復した。またAla-Gln-3群の体重の推移もBCAA-3群と同様で、術後2日目には術前値の94.9%と最低値となり、術後3日目には98.2%に回復した。またBCAA-5群、Ala-Gln-5群でも同様に術後2日目にそれぞれ97.4%、95.0%と最低値をとり、以後回復に向かった。BCAA-3群とAla-Gln-3群、BCAA-5群とAla-Gln-5群の間の体重変化には有意差は認められなかった。またBCAA群、Ala-Gln群ともに犠死までの術後3日目、術後5日目までの一日尿量にも有意差はなかった。

C) 尿中カテコラミン排泄量

BCAA-5群、Ala-Gln-5群の生存例における尿中エビネフリン排泄量、ノルエビネフリン排泄量、総カテコラミン（エビネフリン＋ノルエビネフリン）排泄量には、有意差はなかった。

D) 犠死時剖検肉眼所見と臓器重量

術後3日目の犠死時所見はBCAA-3群11匹中で5匹に肺充血、1匹に胃粘膜糜爛を認めた。Ala-Gln-3群では11匹中9匹に肺充血を認め、そのうち1例では胃粘膜糜爛も合併していた。術後5日目の犠死時所見はBCAA-5群9匹中で3匹に肺充血を、Ala-Gln-5群では8匹中3匹に肺充血を認め、両群で犠死時所見に著明な差はなかった。

犠死時に測定したカラカス、肺、胸腺、肝、脾臓、腎臓、小腸、大腸、腓腹筋の各臓器重量には、術後3日目犠死、5日目犠死ともBCAA群とAla-Gln群の間に有意差を認めなかった。

E) 蛋白代謝

i) 尿中窒素排泄量および3-メチルヒスチジン排泄量

生存例のみでみると、BCAA-3群の術後3日間の累積尿中窒素排泄量は $4.8 \pm 0.1 \text{ gN/kg/3days}$ 、Ala-Gln-3群のそれは $5.1 \pm 0.1 \text{ gN/kg/3days}$ であった。またBCAA-5群の術後5日間の累積尿中窒素排泄量は $3.6 \pm 0.1 \text{ gN/kg/5days}$ 、Ala-Gln-5群のそれは $4.0 \pm 0.3 \text{ gN/kg/5days}$ であった。術後各日の尿中窒素排泄量も全経過を通じ両群間で差がなかった。

BCAA-3群の術後3日間の累積尿中3-メチルヒスチジン排泄量は $25.0 \pm 2.4 \mu\text{mol/kg/3days}$ 、Ala-Gln-3群では $27.6 \pm 2.1 \mu\text{mol/kg/3days}$ で有意差はなかった。BCAA-5群、Ala-Gln-5群の術後5日間の累積尿中3-メチルヒスチジン排泄量もそれぞれ $26.2 \pm 1.2 \mu\text{mol/kg/5days}$ 、 $28.5 \pm 2.9 \mu\text{mol/kg/5days}$ で有意差はなかった。

ii) 全身蛋白代謝および臓器蛋白合成率 (表13)

BCAA-3群とAla-Gln-3群での ^{15}N グリシン投与による術後3日目の全身蛋白代謝を比べると、全身蛋白回転率、全身蛋白合成率、全身蛋白崩壊率はいずれもAla-Gln-3群で有意に亢進していた (表13)。またBCAA-5群とAla-Gln-5群の術後5日目の全身蛋白代謝でも全身蛋白回転率は、Ala-Gln-5群で有意に亢進していた。

^{15}N グリシンにより測定した臓器蛋白合成率では、BCAA-3群の肝蛋白合成率は $19.7 \pm 0.8\%/ \text{day}$ 、Ala-Gln-3群では $23.7 \pm 1.7\%/ \text{day}$ で後者の方が有意に大きかった (表13)。犠死3日目のラットでの肝臓蛋白合成率は全身蛋白合成率と有意な正の相関を認めた ($r=0.68$, $p<0.01$)。しかし、3日目犠死群の肝以外の肺、胸腺、脾臓、小腸、大腸、腓腹筋などの臓器蛋白合成率はBCAA-3群とAla-Gln-3群で大きな差はみられなかった。

犠死5日目の臓器蛋白合成率では、BCAA-5群の遠位小腸の蛋白合成率は $39.6 \pm 1.0\%/ \text{day}$ 、Ala-Gln-5群のそれは $44.9 \pm 1.5\%/ \text{day}$ で、Ala-Gln-5群の方が明らかに大きかった。これ以外の臓器の蛋白合成率はBCAA-5群とAla-Gln-5群で有意差は認められなかった。

F) 血液生化学測定値

i) 犠死時血清アミノグラム (表14)

犠死時の血清アミノ酸濃度で、BCAA-5群の方がAla-Gln-5群よりも有意に高値を示したのは、バリン、ロイシン、リジン、さらに分岐鎖アミノ酸、必須アミノ酸であった。逆に、Ala-Gln-5群がBCAA-5群よりも有意な高値を示したのはグルタミンのみであった。

なお正常ラット群の血清アミノ酸値と比べ、両群がともに高値を示したの

はアラニン、ロイシン、イソロイシン、フェニールアラニン、ヒスチジンで、両群ともに低値であったアミノ酸はアスパラギン、プロリン、チロシン、トリプトファンであった。また血清の総アミノ酸濃度、非必須アミノ酸濃度は両群で差はなかった。必須アミノ酸濃度はBCAA-5群の方がAla-Gln-5群に比べ有意に高かったものの、Ala-Gln-5群の方が正常ラット群の血清必須アミノ酸濃度に近かった。また、5日目犠死群で血清中グルタミン濃度と肝の蛋白合成率、血清中グルタミン濃度と筋肉の蛋白合成率との間には正の相関を認めた（各々、 $r=0.45$ 、 $p=0.07$ 、 $r=0.54$ 、 $p=0.02$ 、図7）。

G)その他の血清生化学測定値

血清アルブミン値はBCAA-5群で $1.5 \pm 0.1 \text{ g/dl}$ 、Ala-Gln-5群で $1.6 \pm 0.1 \text{ g/dl}$ で両群間に差はなかったが、両群とも正常ラット群の $2.3 \pm 0.1 \text{ g/dl}$ よりも低値を示した($p<0.05$)。BUNはBCAA-5群で $20.4 \pm 1.2 \text{ mg/dl}$ 、Ala-Gln-5群で $25.4 \pm 2.2 \text{ mg/dl}$ で両群間に差はなかったが、Ala-Gln-5群では正常ラット群の $17.2 \pm 0.8 \text{ mg/dl}$ よりも高値を示した($p<0.05$)。血清遊離脂肪酸もBCAA-5群で $0.40 \pm 0.04 \text{ mEq/l}$ 、Ala-Gln群で $0.51 \pm 0.09 \text{ mEq/l}$ で両群間に差はなかったが、BCAA-5群で正常ラット群の $0.62 \pm 0.08 \text{ mEq/l}$ よりも低値を示した($p<0.05$)。

H)腸の組織学的所見および粘膜の高さ（図2、表15）

3日目犠死群のH.E.標本の腸所見では、BCAA-3群は、実験1のControl群に比べ、腸絨毛高の低下、絨毛密度の減少、陰窩長の短縮、粘膜固有層の炎症細胞浸潤の増加、管腔内へのフィブリン析出などの浸出性変化が認められ、絨毛高の萎縮、炎症細胞浸潤、浸出性変化とも遠位小腸で顕著であった。BCAA-3群に比べ、Ala-Gln-3群では腸絨毛高の低下・絨毛密度の減少の程度が共に少なかった（図2）。粘膜固有層の炎症細胞浸潤および管腔内へのフィブリン析出などの浸出性変化もAla-Gln-3群で軽度であった。BCAA-5群での遠位小腸の絨毛高の萎縮、炎症細胞浸潤、浸出性変化はBCAA-3群と変わらなかった。しかし、Ala-Gln-5群では長絨毛の萎縮は著明に抑制され、また粘膜固有層の細胞浸潤もBCAA-5群に比べ軽度であった。

腸粘膜の高さは、遠位小腸で Ala-Gln-3、5群ともにBCAA-3、5群より有意に高かった(表15)。

D) 犠死時細菌培養(表16)

犠死時細菌培養はBCAA-3群8匹、Ala-Gln-3群6匹、BCAA-5群3匹、Ala-Gln-5群4匹で施行した。腹腔内培養では4群のすべてのラットに*E. coli*が検出された。その他にBCAA-3群の3匹で*E. coli*とともに他のグラム陰性菌が検出された。Ala-Gln-3群では*E. coli*以外の細菌は検出されなかった。中心静脈カテーテルの培養では、BCAA-3群の8匹中7匹(88%)、Ala-Gln-3群の6匹中2匹(33%)が細菌培養陽性であった($p=0.07$)。血液培養ではBCAA-3群では8匹中7匹(88%)、Ala-Gln-3群で6匹中3匹(50%)で陽性であった。これらの内訳を表16にあげたが、いずれの群でも中心静脈カテーテル先端培養、血液培養ともに投与した*E. coli*以外の細菌種が検出された。

4) 小括

持続腹膜炎におけるAla-Gln添加アミノ酸製剤の効果を高BCAA含有アミノ酸製剤と比較した。その結果、Ala-Gln-3群ではBCAA-3群にくらべて、全身蛋白代謝回転率、全身蛋白合成率、全身蛋白崩壊率、肝蛋白合成率がそれぞれ充進していた。またAla-Gln-5群の遠位小腸の臓器蛋白合成率もBCAA-5群より大きく、腸粘膜高も高かった。またAla-Gln-5群の血清必須アミノ酸総濃度は正常ラットのそれに近かった。更に、血清中グルタミン濃度は肝、筋肉の蛋白合成率との間に正の相関があった。

【3】考察

グルタミンは侵襲時の蛋白・アミノ酸代謝で中心的役割を演じているアミノ酸であるが、薬剤配合上および保存上の問題のために従来の市販アミノ酸製剤には含まれていない(12)。しかし、最近になってアミノ酸輸液へのグルタミン添加が、侵襲時の蛋白代謝改善に有用との報告が増しつつある(11,29)。しかし、敗血症でのグルタミン投与効果はいまだ明らかでない。そこで本検討ではまず、重症外科敗血症モデルとして腹腔内細菌持続注入腹膜炎ラットを作成し、このモデルを用い、溶液中でも安定しているグルタミンのdipeptideであるAla-Glnを添加したアミノ酸輸液の効果について、とくに全身及び臓器蛋白代謝の改善効果に焦点をあてて、グルタミンを含有していない市販アミノ酸製剤や侵襲時に有用とされる高濃度BCAA含有アミノ酸製剤と比較検討した。

1) 持続腹膜炎モデル

本研究では重症外科侵襲モデルとして、その治療が困難で死亡率も高い腹膜炎モデルを選んだ。これまでラットでの腹膜炎モデルには、細菌の一回腹腔内投与や盲腸結紮・穿刺、などが考案されている(30,31,32)。しかし、これらのモデルでは、いずれも栄養・代謝研究に必要な長期にわたる腹膜炎の持続が難しく、しかも長期観察の場合には個体による炎症の程度のばらつきが大きいなどの問題点があった(33)。そこで本研究ではこのような欠点が少ない浸透圧ポンプによる持続細菌注入腹膜炎モデルを用いた。

しかし、浸透圧ポンプによる投与細菌の種類や腹腔内への投与量、投与速度によってラットの生体反応が異なると考えられるため、あらかじめ細菌の種類や投与量、その速度を決める必要がある。今回の検討では腹膜炎臨床例で検出頻度の高い*E.coli*を投与細菌として選び、実験1で*E.coli*の腹腔内投与量を 10^7 c.f.u.、 10^8 c.f.u.、 10^9 c.f.u./日で比較した。その結果、 10^9 c.f.u./日投与ではラットは3日以内に全て死亡し、この投与量は実験の目的に不適と考えられた。そ

して食餌摂取量、脾臓重量、犠死時細菌培養所見、小腸粘膜高などから 10^7 群よりも強い侵襲を持続的に与えられると考えられた 10^6 c.f.u./日を以後の検討に用いることにした。

尚、実験1では食事摂取量はポンプ挿入後4日目以降は食事摂取量はControl群と実験群で差は無く、腹膜炎の影響より脱したものと考えられる。この理由としては、まず、ポンプ内で生菌数が減じ、当初設定した1日当たりの細菌数が持続的に注入できなかったことが挙げられる。本実験に先立ち、予備実験として、ラット腹腔内に挿入したポンプ内細菌濃度の経時的測定を行った。その結果、 10^6 c.f.u.、 10^5 c.f.u.、 10^4 c.f.u./日群ともに1ml当りの細菌数は2日間で1/10量に減少した。そして、 10^5 c.f.u./日となってからは、この濃度で維持された。この結果より、細菌注入群と非注入群の間で、食餌摂取量などに次第に差がなくなった理由として、ポンプ内で次第に死菌が増え、細菌注入量が経時的に減少したことが一因と考えられる。もう一つの理由としては、注入細菌に対する生体防御機構が次第に働き始め、細菌が注入されても侵襲の程度が相対的に軽くなったことが考えられる。

2) 投与栄養量とその組成

ラットの経静脈栄養時の投与カロリーについて、今回用いたラットの体重350~400gでは214~221kcal/kgがすすめられており(34)、また実験1の術前・非侵襲下での平均食餌摂取量から換算したカロリーも平均217kcal/kg/日であることから、実験2と3ではfull strengthではこれらの値に近い194kcal/kg/日とした。

グルタミンの効果発揮必要量については、正常ラットでの高カロリー輸液では2w/v%以上で腸粘膜高や粘膜重量、DNA量に効果を認めたとの報告(35)、あるいは総アミノ酸投与量の20%をグルタミンとしても腸粘膜萎縮は完全には抑制できないとの報告(36)がある。そこで今回の実験ではグルタミンに換算して3w/v%、総アミノ酸投与量の30%となるようにAla-Glnを添加した。

今回の中心静脈栄養輸液処方で問題となるのは、アミノ酸製剤の組成にお

ける必須アミノ酸/非必須アミノ酸の比(E/N比)である。本検討でのAla-Gln添加アミノ酸液では非必須アミノ酸であるグルタミンの含量が多くなったために、実験2の標準アミノ酸組成製剤、実験3の高BCAA含有アミノ酸製剤でのE/N比はそれぞれ1.57、1.59である対し、Ala-Gln添加アミノ酸製剤のE/N比は各々0.45、0.43と低くなっている。非侵襲生体での結晶アミノ酸を用いた経口投与実験ではE/N比が1~1.85がよいとされている(37)。しかし、侵襲生体での至適E/N比はいまだ明らかでない。今回の実験2、3ともに、Ala-Gln添加アミノ酸製剤投与ラットでの血清非必須アミノ酸濃度および必須アミノ酸濃度はともに正常食餌摂取・細菌非投与ラットのパターンと類似していた。これに対し、標準組成アミノ酸製剤ないし高BCAA含有アミノ酸製剤投与ラットでの血清必須アミノ酸濃度は正常食餌摂取・細菌非投与ラットのそれぞれに1.27倍、1.30倍と明らかに高値であった。従って、本腹膜炎モデルでは血清アミノ酸濃度からみると、Ala-Gln添加液の低E/N比でもとくに問題はないものと思われる。

なお、Ala-Glnは一回静注では血中で速やかにアラニンとグルタミンに分解されることが知られている。本実験でも一回静注の際と同様、投与したAla-Glnは速やかにこれらのアミノ酸に分解されると仮定した。しかし、Ala-Glnの長期持続投与の際にはAla-Glnそのものの血中濃度も上昇している可能性がある。従って、本実験で得られた成績にはグルタミン及びアラニンの他にAla-Gln自体のdipeptideとしての作用も加味されている可能性があり、今後検討すべきであると考えられる。

3) Ala-Gln添加の効果

本検討では、持続腹膜炎モデルを用いて、まずAla-Gln添加アミノ酸輸液の効果をグルタミンを含有していない現在市販の標準アミノ酸組成のアミノ酸製剤と比較してみた。その結果、Ala-Gln添加によって腹膜炎ラットの生存率改善、小腸粘膜高や絨毛密度など腸管構造の維持、さらに肝と腓腹筋の蛋白合成率の増加などの優れた効果が認められた(表18)。

これまで、侵襲生体でグルタミンないしはAla-Glnの投与効果を従来のアミ

ノ酸製剤と比較検討した研究としては、動物実験での腸炎ラット(38,39,40,41)や腸切除ラット(42)、また臨床では胆嚢摘除術後患者(11,29,43)や骨髄移植患者(44,45)での報告がある。そして極く最近、ラット敗血症モデルや腹膜炎モデルでのグルタミン投与の効果がArdawiら(46)やYoshidaら(47)によって報告されている。これらのラットモデルでの成績は今回の実験成績と同様に、従来の標準組成アミノ酸製剤に比べてグルタミン添加アミノ酸製剤が敗血症や腹膜炎で効果があることを指摘している。ただし、Yoshidaらの実験モデルは*E.coli* 10¹⁰ 1回静注法、細菌投与5日前から高カロリー輸液施行、dipeptideとしてグリシルグルタミンの使用、細菌投与後1日という極く短期での蛋白代謝測定など、またArdawiらの実験モデルは盲腸結紮穿刺法であることやグルタミン非添加群に多量のグリシンが投与されていることなど、今回の実験方法と異なっている。さらにいずれの検討も腸あるいは骨格筋の代謝にのみ焦点をあてており、今回の検討のように全身蛋白代謝や肝をはじめとする各種の主要臓器の代謝を系統的に検討してはいない。

一方、高BCAA含有アミノ酸製剤とグルタミン添加アミノ酸製剤を比較した研究は、中心静脈カテーテル挿入という軽度の侵襲下での報告(48)があるのみで、敗血症のようなより大きな侵襲下での比較についての報告はいまだない。従って、今回の実験3では持続腹膜炎ラットモデルでAla-Gln添加製剤と高BCAA含有アミノ酸製剤の比較を術後3日目、5日目と詳細に行なった。その結果、Ala-Gln添加は高BCAAアミノ酸製剤よりも、全身蛋白代謝の亢進、小腸や肝臓の臓器蛋白合成率の亢進、小腸粘膜高の維持の点で優れていることが判明した(表17)。

4) Ala-Gln添加の腸への効果

従来から非侵襲下での中心静脈栄養では腸粘膜、とくに小腸粘膜が萎縮し、栄養成分にグルタミンを加えるとこの小腸粘膜萎縮が抑制されることが報告されている(38,48,49,50)。今回の実験2ではAla-Gln添加で遠位小腸の粘膜萎縮が

抑制された。グルタミンは小腸細胞の主なエネルギー基質であり、また核酸合成の基質でもあって(51)、これらの作用を介してグルタミンは中心静脈栄養の際の腸管粘膜の萎縮を防止するとされる。さらに実験3ではAla-Gln添加アミノ酸製剤は高BCAA含有アミノ酸製剤に比べて、投与3、5日目とも粘膜高を維持し、遠位小腸の臓器蛋白合成率も亢進させた。これに関し、中心静脈カテーテル挿入のみの侵襲ラットを用いたPlatellら(48)は、高BCAA含有アミノ酸製剤の6日間投与による小腸粘膜萎縮抑制作用は、グルタミン添加アミノ酸製剤と同程度という今回の成績とは異なる報告をしている。中心静脈栄養時のBCAA投与が腸粘膜に有利に作用する理由として、彼らは高BCAA含有アミノ酸製剤の投与によって筋肉内でのBCAAからグルタミンへの転化が亢進し、筋肉からのグルタミン放出が増加して、これが腸に摂取される可能性を挙げている。

しかし、彼らの検討での侵襲は中心静脈カテーテル挿入にかざられており、今回の細菌持続注入腹膜炎よりは軽度である。したがって、より侵襲の強い持続腹膜炎モデルでは高BCAA含有アミノ酸製剤を投与しても、筋肉内でのBCAAのグルタミンへの転化が十分に生じず、その結果グルタミンの筋肉からの放出も増加しないために、腸へのグルタミン供給が不十分となる可能性がある。このために本研究での高BCAA含有アミノ酸製剤は小腸の粘膜構造維持や臓器蛋白合成率亢進の点でAla-Gln添加アミノ酸製剤に劣ったと考えられる。

小腸細胞はグルタミンを摂取してエネルギーを産生し、このグルタミンをアンモニアやアラニンなどに変換し門脈中に放出する(51)。事実、Ardawirらの盲腸結紮穿刺ラットでは、グルタミン添加高カロリー輸液で腸のグルタミン摂取の増加とアラニンおよびアンモニア放出の増加が認められている。今回の検討では腸のアミノ酸摂取・放出量を測定していないので、Ala-Gln添加アミノ酸製剤の投与による腸でのアラニンやアンモニアの産生増加の詳細は明らかではない。しかし、敗血症などの代謝メジエータであるインターロイキン-1とAla-Glnを同時に投与した当教室の意識下犬での検討では、Ala-Gln投与では血中のアラニン濃度が増加し、全身血から肝へのアラニン供給が増加する一方、腸か

ら肝へのアラニン供給量の必要性が低下し、このために腸でのグルタミンからアラニンへの変換が減少し、もう一方のグルタミン代謝経路であるアンモニアの放出が増加する可能性が示唆されている。今回の検討でも実験2および3ともに、Ala-Gln添加でBUN上昇がみられており、Ala-Gln投与ではグルタミン投与と異なって小腸細胞でのグルタミンからアンモニア産生への経路が一層促進されることが推測される。

本検討ではAla-Gln投与による腸管への効果は、その部位によって相違がみられた。すなわち、実験2、3ともにAla-Gln投与の効果は遠位小腸に顕著であった。これまでの報告ではグルタミン投与は本成績と異なり、近位小腸に効果があるとするものが多い(52)。しかしtumor necrosis factor投与では遠位小腸のみにエネルギー不全の影響と考えられる腸管壊死がみられること(53)、またラット遠位小腸には近位小腸よりtransglutaminaseが多いこと(54)なども指摘されている。これらを考慮すると、本研究でのモデルでは遠位小腸の方がエネルギー源としてのグルタミンの影響を受けやすく、さらに蛋白合成基質としてのグルタミン投与の効果も出やすいものと考えられる。なお、実験2および3において大腸の粘膜高や蛋白合成率は、小腸のそれと違ってAla-Gln添加による明らかな効果は認められなかった。その主因は大腸のエネルギー源がグルタミンではなく、短鎖脂肪酸の占める割合が大きいためと考えられる(55)。

なお、実験2、3とも遠位小腸の粘膜の厚さがAla-Gln群で著明に増加しているにも関わらず、Ala-Gln群の遠位小腸での蛋白合成率は、BCAA 3日目群やConventional群とは差はなかった。このように、Ala-Gln添加により小腸粘膜厚が著明に増加したにも関わらず、小腸蛋白合成率が増加しなかった原因としては、1、蛋白合成率の測定が粘膜のみならず、筋層、結合織を含む小腸全層を対象に行われていること、2、腸粘膜厚の維持には、蛋白合成と分解の両方が関与すると考えられるが、今回は測定できなかった蛋白分解の影響が大きかった可能性などが推測される。

5) Ala-Glnの筋肉への効果

本検討ではAla-Gln添加アミノ酸製剤は標準組成アミノ酸製剤に比べて、末梢骨格筋の蛋白合成率を亢進させた。重症感染症では通常、筋肉内のグルタミン濃度は減少し(8)、末梢骨格筋の蛋白合成は低下、蛋白崩壊は亢進する(56)。この筋肉内グルタミン濃度の減少の主因は、放出増加と考えられている(57)。筋肉内グルタミン濃度は筋肉の蛋白合成率とは正の相関を、また筋蛋白崩壊率とは負の相関をすることが知られている(56,58,59,60)。今回の検討では筋肉内グルタミン濃度は測定し得なかったが、実験2では血清中グルタミン濃度と筋肉の蛋白合成率との間には正の相関があった。従って、Ala-Glnの投与によって筋肉内のグルタミン濃度が増し、これが標準組成アミノ酸製剤との比較で末梢骨格筋の蛋白合成の増加に寄与したと推測される。実際、Hammarqvistら(29)はヒトにおいて胆摘術後3日間の経静脈的Ala-Glnの投与による筋肉中のグルタミン濃度の維持と筋蛋白合成の促進をみている。

一方、高BCAA含有アミノ酸製剤とAla-Gln添加アミノ酸製剤の群間比較では、末梢骨格筋の蛋白合成率に有意差が認められなかった。しかし、実験3での全ラットでは、やはり血清中グルタミン濃度と筋肉の蛋白合成率の間には正の相関がみられた。一般に、異化期には末梢骨格筋でのBCAAの酸化が亢進し、これと同時にグルタミンとアラニンの産生も増加する。そして高濃度のBCAA投与によって筋肉内のBCAA濃度が増加するとこの酸化も増え、同時に筋肉内グルタミン濃度も増加すると推測される。これが高BCAA含有製剤とAla-Gln添加製剤の群間比較で差が出にくい理由と考えられる。ただし、ヒトの手術後にはBCAAをグルタミンに変換するのに必要な α -ketoglutarateが減少しており、BCAAの多量投与がグルタミン産生につながらない可能性が指摘されており(61)、将来的には腹膜炎など重症感染症でのグルタミン投与とBCAA投与の末梢骨格筋に対する効果を臨床例で比較する必要がある。

またグルタミン投与は筋肉での蛋白合成を亢進するとともに、その分解をも抑制するとされる(57,58)。本検討では筋線維蛋白の崩壊の指標として尿中3-

メチルヒスチジンメチルヒスチジン排泄量を測定したが、Ala-Gln添加アミノ酸製剤でのその排泄量は標準組成アミノ酸製剤、高BCAA含有製剤いずれとも有意差がなかった。しかし、もうひとつの筋肉崩壊の指標である血清フェニルアラニン値はAla-Gln添加アミノ酸製剤投与では標準組成アミノ酸製剤投与では低値であった。従って、今回の検討からはAla-Gln添加の末梢骨格筋崩壊抑制効果について明確な結論は出し得なかった。

6) Ala-Gln添加の肝への効果

本研究でみられた臓器蛋白代謝に関しての、もうひとつの興味ある成績はAla-Gln投与による肝の蛋白合成率の亢進である。Ala-Gln添加アミノ酸製剤での肝の蛋白合成率は、標準組成アミノ酸製剤、高BCAA含有アミノ酸製剤3日間および5日間投与のそれぞれ1.28倍、1.27倍、1.13倍にもなっていた。敗血症などの重症外科侵襲においては肝のアミノ酸摂取の増加と蛋白合成の亢進、とくに急性相蛋白や血液凝固因子、創傷治癒に必要な基質の合成亢進が生じ、しかもこの肝の蛋白合成亢進が侵襲からの回復にとって必須である(1,62,63)。今回検討したAla-Glnはこの点でも極めて有用と考えられる。

肝はグルタミン代謝においては他の臓器と異なって、ユニークな特徴を有している。すなわち肝にはグルタミンの分解酵素を有する肝細胞とこの合成酵素を有する肝細胞の両方が存在し、このために状況によって肝はグルタミン利用器官となったり、グルタミン放出器官となったりする(64)。正常ラットにグルタミン $16 \mu\text{mol/分/kg}$ を静注持続投与すると、肝は全グルタミン供給量のほぼ50%を摂取する。このさい、腸のグルタミン摂取が全供給量の26%に過ぎないことを考慮すると、正常ラットではグルタミン投与時の肝はグルタミン摂取の主要臓器といえる(65,66,67)。しかし、これまでのところ重症感染症ラットモデルで肝のグルタミン摂取や蛋白合成率を検討した報告はない。重症感染症のメジエータであるIL-1を投与したイヌでの検討では、Ala-Glnの $6 \mu\text{mol/kg/分}$ の持続静注で肝のグルタミン摂取量は2.4倍となっている。今回の持続腹膜炎モデルで

はグルタミンに換算して $14 \mu\text{mol/kg/分}$ を投与しており、肝のグルタミン摂取量は著明に増加したものと推測される。

肝に摂取されたグルタミンは、好氣的エネルギー源になる他に、糖新生、蛋白合成、尿素合成等に利用される(68)。本検討ではとくに肝の蛋白合成率に注目したが、Ala-Gln添加アミノ酸製剤投与は標準組成アミノ酸製剤や高BCAA含有アミノ酸製剤に比べて明らかに肝蛋白合成率を亢進させた。しかも、血中グルタミン濃度と肝蛋白合成率に正の相関が認められ(実験2: $r=0.92$, $p=0.0001$ 、実験3: $r=0.445$, $p=0.073$)、肝に到達するグルタミン量に比例してその蛋白合成率が増加することが示唆された。なお今回用いた ^{15}N グリシンの低速持続注入法は主に半減期1日前後の比較的代謝の遅い蛋白の合成を測定しており、急性相蛋白などの代謝回転の速い分泌蛋白の合成速度を正確に反映していない可能性がある。しかし、肝に摂取されたグルタミンは血漿蛋白合成に利用されるとされ、Ala-Gln投与による肝での蛋白合成の亢進は急性相蛋白合成増加につながっていると考えられる。一方、BUN値からみると、Ala-Gln添加でこれが上昇しており、肝での尿素合成をも亢進させたことが示唆される。

7) Ala-Gln添加の全身蛋白代謝への効果

今回の検討では実験2および3ともAla-Gln添加と非添加で窒素排泄量や窒素バランスに差は認められなかった。Ardawiの盲腸結紮腹膜炎ラット(9)ではグルタミン投与で窒素バランスの有意な改善が認められている。この成績の不一致の理由には、研究デザインの相違、特にArdawiらの対照群には今回の検討と違って多量のグリシンが投与されていることが挙げられる。

一方、グルタミン投与時の全身蛋白代謝評価法としての窒素バランスには問題があることが指摘されている(69)。すなわち、グルタミン投与では筋肉内遊離グルタミンプールが増加するので、蛋白合成が亢進しなくても見かけ上尿中窒素排泄量が減少し窒素バランスが改善される。このようにグルタミン投与のさいの窒素バランス改善は、必ずしも蛋白合成亢進と一致しない可能性がある。

る。そこで、本検討では全身蛋白代謝を一層詳細に評価するために、 ^{15}N グリシンによる全身蛋白回転率、蛋白合成率、崩壊率を測定した。その結果、Ala-Gln添加アミノ酸製剤投与は高BCAA含有アミノ酸製剤投与3日目との比較で、全身蛋白回転率、全身蛋白合成率、全身蛋白崩壊率いずれも有意に亢進させた。

さらに興味あることは術後3日目の方が術後5日目よりもAla-Gln添加の全身蛋白代謝亢進効果が顕著にみられたことである。すなわち、蛋白代謝亢進が生体の生存や創傷治癒などに最も要求される侵襲早期にこそ、Ala-Gln添加アミノ酸製剤の投与効果があらわる。このさい、全身蛋白合成率と肝蛋白合成率に有意な正の相関が認められた。正常ラットでは肝臓は全身蛋白合成の15%も占めるとされ(70)、今回のAla-Gln添加による蛋白代謝の亢進にも肝の蛋白代謝亢進が大きく寄与していると推測される。

8) Ala-Gln添加の脂質代謝への効果

今回の検討ではAla-Gln添加の影響は蛋白・アミノ酸代謝のみならず、脂質代謝にもみられた。実験2、3ともにAla-Gln添加での血清遊離脂肪酸濃度はそれぞれの比較群より高値を示し、正常ラットの値に近かった。一般に、重症感染症では脂肪組織からの遊離脂肪酸の放出抑制や肝での摂取・利用の亢進のため血中遊離脂肪酸は低下する(71)。一方、グルタミンやアラニン投与ではグルカゴン分泌が刺激され、このグルカゴンは肝からの遊離脂肪酸放出を促進する。さらにAla-Gln投与でのアラニンが糖新生に利用されブドウ糖の供給が増すために、エネルギー源としての遊離脂肪酸の末梢組織での利用が抑制されることも考えられる。本実験でのAla-Gln投与による血中遊離脂肪酸濃度上昇には、このような機序の関与が想定される。

9) Ala-Gln添加での生存率改善

実験2ではAla-Gln添加によって、持続腹膜炎ラットの生存率が改善された。現在市販されているアミノ酸製剤は確かに重症ストレス下での蛋白代謝をある

程度改善するが、その生存率までも向上させるほどのものでない。従って、本検討でAla-Gln添加が標準アミノ酸組成製剤での生存率44%を86%までも向上させたことは、このAla-Gln添加製剤の臨床への導入にあたって最も重要な成績といえる。

Ala-Gln添加が持続腹膜炎ラットの生存率を改善した大きな理由には、Ala-Glnによる全身および肝などの臓器の蛋白合成の亢進、およびAla-Glnによる免疫能の改善が挙げられる。すでに述べたように敗血症などの高度侵襲では、急性相蛋白や損傷組織修復のための蛋白の合成亢進が生存にとって必須で、Ala-Gln添加はこの蛋白合成促進という点でまず効果を発揮したと考えられる。

一方、グルタミンは免疫能にも密接に関与している。まずグルタミンは免疫系細胞、とくにリンパ球やマクロファージの主要なエネルギー基質である(6,72)。また、グルタミンはプリンやピリミジンなどの生合成の材料となり(6)、免疫細胞の分裂時に重要な基質となる。今回の実験2では、生存率の高かったAla-Gln投与群で胸腺と脾臓の蛋白合成率が亢進していた。この成績は、Ala-Gln投与が免疫と関連の深い胸腺や脾臓の蛋白合成を高めて免疫能を賦活化し、これが生存率の改善に役立ったことを示唆している。一方、実験3の高濃度BCAA含有アミノ酸液との比較では、Ala-Gln添加の生存率改善効果はみられなかった。その理由としては、BCAAのひとつであるロイシンはグルタミンと同程度にConcanavalin A刺激リンパ球に摂取されること(73)などが関係していると思われる。

グルタミン投与時の侵襲生体の生存率改善の理由としては、このほかにグルタミン投与による腸内細菌の全身への侵入(translocation)の抑制が指摘されている(39,40,74,75)。translocationの要因としては腸管粘膜構造の破綻、腸管免疫能の低下、腸管内細菌叢の変化などが挙げられている(76)が、グルタミンは腸管粘膜構造や腸管免疫の維持に有用とされる。今回の実験でも腹腔内、心臓血、中心静脈カテーテルの培養で、いずれも投与した*E. coli*以外の細菌、特に、*Enterobacter*や*Proteus*などの腸内細菌が検出され、腸管内細菌が腸管バリアーを

越えて侵入するtranslocationが起きていることが示唆された。そして、実験2の中心静脈カテーテル培養の細菌検出率はBCAA-3群で77%、Ala-Gln-3群で33%と後者で低く、この成績とAla-Gln添加による腸の構造や蛋白合成の維持を考え合わせると、Ala-Glnがある程度translocationを抑制することが示唆された。しかし、生存率で差を認めた標準アミノ酸製剤とAla-Gln添加アミノ酸製剤との比較では細菌培養所見に大差がないこと、さらには腹腔内投与細菌数が極めて多量であることなどから、translocationがこの腹腔内細菌持続注入ラットの生死を決定する要因である可能性はまずないと考えられる。

今回の実験1と実験2を比べると死亡率では細菌注入量が同じ108 cfu/dayでも実験1の自由経口摂取群では全例生存したのに対し、実験2の標準アミノ酸投与群では生存率が44%と低下している。この差異の原因としては、1、絶食、経静脈栄養と経口栄養摂取との栄養摂取ルートの違い、2、静脈カテーテルによる敗血症の発生などが考えられる。絶食、経静脈栄養が経腸栄養に比べ、感染による合併症の発生頻度が高いことは多くの研究者が指摘している(77,78)。その機序としては腸管内に栄養分が通ることが腸粘膜萎縮を防ぎ、腸管の細菌及びエンドトキシンに対するバリアー機能を保ち、更に侵襲時のストレス反応を抑制し、腸内細菌叢の正常化に役立つとされている。

この様に経腸栄養が経静脈栄養に比べ、侵襲に対する防御反応の点で優れていることが指摘されており、侵襲後早期からの経腸栄養の施行が勧められている。しかし、重症外科症例では腸管麻痺や吸収能低下のため、経腸栄養が施行し難い症例がありこのような場合には経静脈栄養を行わざるを得ない。今回の実験2、3ではこの状況を想定し、完全経静脈栄養を用いての比較実験を行った。その結果、Ala-Gln 添加完全経静脈栄養での、死亡率では経口栄養群とはほぼ同程度まで改善し、Ala-Gln 添加完全経静脈栄養は経口摂取不能場合ないし経腸栄養施行不能場合の次善策として有用であると考えられる。

尚、今回の実験は経静脈栄養の期間が最長5日間と比較的短期であり、それ以上長期のAla-Gln 投与の際の効果や安全性は明らかでない。すなわち、Ala-

Gln 長期大量投与により、グルタミンの血中濃度が著明に増加し、これによるアンモニア産生の増加などが危惧される。更に、Ala-Gln 長期大量投与により、他のアミノ酸投与量が減少し、アミノ酸代謝に影響が及ぶ可能性がある。本検討ではAla-Gln投与の効果が短期では有用なものと考えられるが、今後長期投与での安全性の確立が課題となると考えられる。

【4】総括

Al-Gln添加が腹膜炎侵襲時に全身及び諸臓器の蛋白代謝に及ぼす影響をラット持続細菌注入モデルを用いて検討した。

(1) ラット持続腹膜炎モデルとしては腹腔内細菌注入量は、食餌摂取量、脾臓重量、犠死時細菌培養所見、小腸粘膜高などから 10^6 c.f.u./日が適切であると考えられた。

(2) 持続腹膜炎におけるAla-Gln添加アミノ酸製剤の効果をグルタミンを含むしていない従来の市販標準アミノ酸組成のアミノ酸製剤と比較した。Ala-Gln添加により、市販標準アミノ酸投与に比べて、生存率、肝および末梢骨格筋、胸腺、脾臓などの臓器蛋白合成率、小腸粘膜高に改善をもたらした。

(3) 持続腹膜炎におけるAla-Gln添加アミノ酸製剤の効果を高BCAA含有アミノ酸製剤と比較した。Ala-Gln添加により、全身蛋白代謝回転率、全身蛋白合成率、全身蛋白崩壊率及び肝・小腸蛋白合成率、小腸粘膜高の改善をもたらした。

【4】結論

ラット腹膜炎モデルを用いて、Ala-Gln投与の効果を標準アミノ酸製剤及び侵襲時に有用とされる高BCAA含有アミノ酸製剤と比較検討した。Ala-Gln添加により、市販標準アミノ酸投与に比べて、生存率、肝および末梢骨格筋、胸腺、脾臓などの臓器蛋白合成率、小腸粘膜高に改善を認め、高BCAA含有アミノ酸

製剤との比較では、Ala-Gln添加により、全身蛋白代謝回転率、全身蛋白合成率、全身蛋白崩壊率及び肝・小腸蛋白合成率、小腸粘膜高の改善がみられた。以上から、Ala-Glnは侵襲時の栄養改善に有用であると考えられる。

1. Sargent WL, Boyd ML, Fisher CL, et al. The metabolic effects of nitrogenous products released in shock and sepsis. *Ann Surg* 1983;198:273-279.
2. Sargent WL, Boyd ML, Fisher CL, et al. Metabolism III. The impact of shock on nitrogenous product release. *Surgery* 1979;84:749-752.
3. Sargent WL. Metabolic effects of sepsis. *Prog Food Nutr Sci* 1980;4:123-133.
4. Juelich MP, Macdonald LA. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. *Metabolism* 1983;32:335-342.
5. Macdonald LA, Juelich MP, A'hearn JH. Glutamine metabolism in lymphocytes from the head-injured, physiological and shocked rat. *Quart J Med Physiol* 1984;78:417-425.
6. Vanders E, Bergman F, Furr R. Influence of the portocaval shunt on the nitrogenous product release in human shock states. *Ann Surg* 1975;182:553-56.
7. Anderson J, Furr R, Michelson CB, et al. Muscle and plasma amino acids after injury: hepatocellular plasma vs. arterial and venous. *Ann Surg* 1981;191:74-83.
8. Anderson ND. Effect of glutamine enriched fluid placement on nitrogenous product release. *Chir Sci* 1991;31(2):41-42.
9. Bergman F, Gnanou G, Walker MC, Macdonald LA. Long-term changes in amino acid release and levels after shock and abdominal surgery. *Br J Surg* 1992;79:312-316.
10. Bergman F, Furr R, Macdonald LA, et al. Vanders E. Addition of glutamine to fluid resuscitation after trauma: abdominal surgery opens free glutamine release, increases the rate of muscle protein synthesis, and improves nitrogen balance. *Ann Surg* 1989;209(4):437-44.
11. Furr R, Adams S, Smith P. Glutamine-containing peptides in parenteral nutrition. *Ann J Parenter Enteral Nutr* 1989;14(4):148-153.
12. Smith P, Kowale R, Eakin W, Furr R, Furr R. Synthesis and characterization of tyrosine and glutamine containing peptides. *J Appl Biochem* 1983;4:250-256.
13. Smith P, Eakin W, Furr R. Isopropylthiuronium synthesis of tyrosine containing L-alanine, glutamine, D-glucose for stability during long circulation. *J Pharmaceut* 1986;13(4):507-512.

【5】文献

1. Clowes GJ, Randall HT, Cha CJ. Amino acid and energy metabolism in septic and traumatized patients. *Jpn J Parenter Enteral Nutr* 1980;4(2):195-205.
2. Sganga G, Siegel JH, Brown G, et al. Reprioritization of hepatic plasma protein release in trauma and sepsis. *Arch Surg* 1985;120(2):187-99.
3. Cerra FB, Siegel JH, Border JR, Wiles J, McMenamy RR. The hepatic failure of sepsis: cellular versus substrate. *Surgery* 1979;86(3):409-22.
4. Beisel WR. Metabolic effects of infection. *Prog Food Nutr Sci* 1984;8(1-2):43-75.
5. Ardawi MS, Newsholme EA. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. *Biochem J* 1983;212(3):835-42.
6. Newsholme EA, Crabtree B, Ardawi MS. Glutamine metabolism in lymphocytes: its biochemical, physiological and clinical importance. *Q J Exp Physiol* 1985;70(4):473-89.
7. Vinnars E, Bergstrom J, Furst P. Influence of the postoperative state on the intracellular free amino acids in human muscle tissue. *Ann Surg* 1975;182(6):665-71.
8. Askanazi J, Furst P, Michelsen CB, et al. Muscle and plasma amino acids after injury: hypocaloric glucose vs. amino acid infusion. *Ann Surg* 1980;191(4):465-72.
9. Ardawi MS. Effect of glutamine-enriched total parenteral nutrition on septic rats. *Clin Sci* 1991;81(2):215-22.
10. Petersson B, Vinnars E, Waller SO, Wernerman J. Long-term changes in muscle free amino acid levels after elective abdominal surgery. *Br J Surg* 1992;79(3):212-6.
11. Hammarqvist F, Wernerman J, Ali R, von dDA, Vinnars E. Addition of glutamine to total parenteral nutrition after elective abdominal surgery spares free glutamine in muscle, counteracts the fall in muscle protein synthesis, and improves nitrogen balance. *Ann Surg* 1989;209(4):455-61.
12. Furst P, Albers S, Stehle P. Glutamine-containing dipeptides in parenteral nutrition. *Jpn J Parenter Enteral Nutr* 1990;14(4):118S-124S.
13. Stehle P, Kuehne B, Kubin W, Fuerst P, Pfaender P. Synthesis and characterization of tyrosine- and glutamine-containing peptides. *J. Appl. Biochem.* 1982;4:280-286.
14. Stehle P, Pfaender P, Fuerst P. Isotachophoretic analysis of synthetic dipeptide L-alanyl-L-glutamine: Evidence for stability during heat sterilization. *J.Chromatogr* 1984;294:507-512.

15. Funovics J, Roth E, Muhlbacher F, et al. [Alanine as a nitrogen sparing and gluconeogenic substrate in the postoperative state (author's transl)]. *Klin Wochenschr* 1981;59(14):797-802.
16. Pittiruti M, Siegel JH, Sganga G, Coleman B, Wiles C3, Placko R. Determinants of urea nitrogen production in sepsis. Muscle catabolism, total parenteral nutrition, and hepatic clearance of amino acids. *Arch Surg* 1989;124(3):362-72.
17. Alexander JW, Gonce SJ, Miskell PW, Peck MD, Sax H. A new model for studying nutrition in peritonitis. The adverse effect of overfeeding. *Ann Surg* 1989;209(3):334-40.
18. Stein TP, Leskiw MJ, Buzby GP, Giandomenico AL, Wallace HW, Mullen JL. Measurement of protein synthesis rates with [15N] glycine. *Am J Physiol* 1980;239:E294-E300.
19. Stein TP, Buzby GP, Gertner MH, Hargrove WC, Leskiw MJ, Mullen JL. Effect of parenteral nutrition on protein synthesis and liver fat metabolism in man. *Am J Physiol* 1980;239(4):G280-G287.
20. 熊沢 喜久雄. 醣酵分光分析法による重窒素の定量法. *ぶんせき* 1975;9:603-612.
21. Sobel A, Mayer A, Gottfried S. A convenient titrimetric ultramicro method for the estimation of urea and Kjeldahl nitrogen. *J. Biol. Chem.* 1944;156:355-363.
22. Sobel A, Hirschman A, Besman L. A convenient microtitration method for the estimation of amino acids. *J. Biol. Chem.* 1945;161:99-103.
23. Picou D, Taylor-Roberts T. The measurement of total protein synthesis and catabolism and nitrogen turnover in infants in different nutritional states and receiving different amounts of dietary protein. *Clin. Sci.* 1969;36:283-296.
24. Garlick PJ, Millward DJ, James WP. The diurnal response of muscle and liver protein synthesis in vivo in meal-fed rats. *Biochem J* 1973;136(4):935-45.
25. Stein TP, Hargrove W3, Miller EE, Wallace HW, Buzby GP, Mullen JL. Effect of nutritional status and 5-fluorouracil on protein synthesis in parenterally alimented LEW/Mai rats. *J Natl Cancer Inst* 1979;63(2):379-82.
26. Hasselgren PO, Pedersen P, Sax HC, Warner BW, Fischer JE. Methods for studying protein synthesis and degradation in liver and skeletal muscle. *J Surg Res* 1988;45(4):389-415.
27. Garlick PJ. An analysis of errors in estimation of the rate of protein synthesis by constant infusion of a labelled amino acid. *Biochem J* 1978;176(2):402-5.
28. Brenner U, Herbertz L, Thul P, et al. The contribution of small gut to the 3-methylhistidine metabolism in the adult rat. *Metabolism* 1987;36(5):416-8.

29. Hammarqvist F, Wernerman J, von dDA, Vinnars E. Alanine-glutamine counteracts the depletion of free glutamine and the postoperative decline in protein synthesis in skeletal muscle. *Ann Surg* 1990;212(5):637-44.
30. Bartlett JG, Onderdonk AB, Louie T, Kasper DL, Gorbach SL. A review. Lessons from an animal model of intra-abdominal sepsis. *Arch Surg* 1978;113(7):853-7.
31. Browne MK, Leslie GB. Animal models of peritonitis. *Surg Gynecol Obstet* 1976;143(5):738-40.
32. Fry DE, Garrison RN, Rink RD, Casey J, DeCamp MM, Richardson JD. An experimental model of intraabdominal abscess in the rat. *Adv Shock Res* 1982;7(7):7-11.
33. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 1990;49(2):186-96.
34. Tao C, Yoshimura N, Chinn I, Wolfe A. Determination of intravenous non-protein energy and nitrogen requirements in growing rats. *J Nutr* 1979;109:904-915.
35. O'Dwyer S, Scott T, Smith R, Wilmore D. 5-fluorouracil toxicity on small intestinal mucosa but not white blood cells is decreased by glutamine. *Clin. Research* 1987;35(3):369A.
36. Shizuka F, Vasupongsotorn S, Kido Y, Kishi K. Comparative effect of intravenously or intragastrically administered glutamine on small intestinal function of the rat. *Tokushima J Exp Med* 1990;37(1-2):49-57.
37. Heger J. Non-essential nitrogen and protein utilization in the growing rat. *Br J Nutr* 1990;64(3):653-61.
38. O'Dwyer ST, Smith RJ, Hwang TL, Wilmore DW. Maintenance of small bowel mucosa with glutamine-enriched parenteral nutrition. *Jpn J Parenter Enteral Nutr* 1989;13(6):579-85.
39. Klimberg VS, Souba WW, Dolson DJ, et al. Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. *Cancer* 1990;66(1):62-8.
40. Fox AD, Kripke SA, De PJ, Berman JM, Settle RG, Rombeau JL. Effect of a glutamine-supplemented enteral diet on methotrexate-induced enterocolitis. *Jpn J Parenter Enteral Nutr* 1988;12(4):325-31.
41. Souba WW, Klimberg VS, Copeland E3. Glutamine nutrition in the management of radiation enteritis. *Jpn J Parenter Enteral Nutr* 1990;14(4 Suppl):106S-108S.
42. Helton WS, Smith RJ, Rounds J, Wilmore DW. Glutamine prevents pancreatic atrophy and fatty liver during elemental feeding. *J Surg Res* 1990;48(4):297-303.

43. Vinnars E, Hammarqvist F, von dDA, Wernerman J. Role of glutamine and its analogs in posttraumatic muscle protein and amino acid metabolism. *Jpn J Parenter Enteral Nutr* 1990;14(4 suppl.):125S-129S.
44. Scheltinga MR, Young LS, Benfell K, et al. Glutamine-enriched intravenous feedings attenuate extracellular fluid expansion after a standard stress. *Ann Surg* 1991;214(4):385-93.
45. Ziegler TR, Young LS, Benfell K, et al. Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation. A randomized, double-blind, controlled study. *Ann Intern Med* 1992;116(10):821-8.
46. Ardawi M. Effect of glutamine-supplemented total parenteral nutrition on the small bowel of septic rats. *Clin. Nutr.* 1992;11:207-215.
47. Yoshida S, Leskiw MJ, Schluter MD, et al. Effect of total parenteral nutrition, systemic sepsis, and glutamine on gut mucosa in rats. *Am J Physiol* 1992;263:E368-E373.
48. Platell C, McCauley R, McCulloch R, Hall J. Influence of glutamine and branched chain amino acids on the jejunal atrophy associated with parenteral nutrition. *J Gastroenterol Hepatol* 1991;6(4):345-9.
49. Gouttebel MC, Astre C, Briand D, Saint AB, Girardot PM, Joyeux H. Influence of N-acetylglutamine or glutamine infusion on plasma amino acid concentrations during the early phase of small-bowel adaptation in the dog. *Jpn J Parenter Enteral Nutr* 1992;16(2):117-21.
50. Tamada H, Nezu R, Imamura I, et al. The dipeptide alanyl-glutamine prevents intestinal mucosal atrophy in parenterally fed rats. *Jpn J Parenter Enteral Nutr* 1992;16(2):110-6.
51. Windmueller HG. Glutamine utilization by the small intestine. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1982;53(201):201-37.
52. 堀地 義弘, 大熊 利忠, 岡村 健二, 宮内 好正. グルタミン加TPNの栄養的意義と腸管に及ぼす影響について. *JJPEN* 1992;14(6):909-914.
53. van Lanschot JJ, Mealy K, Wilmore DW. The effects of tumour necrosis factor on intestinal structure and metabolism. *Ann Surg* 1990;212:663-670.
54. D'Argenio G, Sorrentini I, Ciacci C, Mazzacca G. Transglutaminase activity along the rat small bowel and cellular location. *Enzyme* 1988;39(4):227-30.
55. Ardawi MS, Newsholme EA. Fuel utilization in colonocytes of the rat. *Biochem J* 1985;231(3):713-9.
56. Millward DJ, Jepson MM, Omer A. Muscle glutamine concentration and protein turnover in vivo in malnutrition and in endotoxemia. *Metabolism* 1989;38(8 suppl 1):6-13.

57. Jepson MM, Pell JM, Bates PC, Millward DJ. The effects of endotoxaemia on protein metabolism in skeletal muscle and liver of fed and fasted rats. *Biochem J* 1986;235(2):329-36.
58. MacLennan PA, Brown RA, Rennie MJ. A positive relationship between protein synthetic rate and intracellular glutamine concentration in perfused rat skeletal muscle. *Febs Lett* 1987;215(1):187-91.
59. MacLennan PA, Smith K, Weryk B, Watt PW, Rennie MJ. Inhibition of protein breakdown by glutamine in perfused rat skeletal muscle. *Febs Lett* 1988;237(1-2):133-6.
60. Jepson MM, Bates PC, Broadbent P, Pell JM, Millward DJ. Relationship between glutamine concentration and protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 1988;255(2 Pt 1):E166-72.
61. Cynober L. Ornithine alpha-ketoglutarate in nutritional support. *Nutrition* 1991;7(5):313-22.
62. Clowes GJ, Hirsch E, George BC, Bigatello LM, Mazuski JE, Villed CJ. Survival from sepsis. The significance of altered protein metabolism regulated by proteolysis inducing factor, the circulating cleavage product of interleukin-1. *Ann Surg* 1985;202(4):446-58.
63. 斎藤 英昭, 福島 亮治, 谷若 弘一, 平松 毅幸, 森岡 恭彦. 術後生体反応における肝アミノ酸・蛋白代謝の役割—とくに肝蛋白合成のreprioritizationを中心に—. *日外会誌* 1990;91(9):1182-1185.
64. Haussinger D. Liver glutamine metabolism. *Jpn J Parenter Enteral Nutr* 1990;14S:56S-62S.
65. Buttrose M, McKellar D, Welbourne TC. Gut-liver interaction in glutamine homeostasis: portal ammonia role in uptake and metabolism. *Am J Physiol* 1987;252:E456-463.
66. Welbourne TC, Phromphetcharat V, Givens G, Joshi S. Regulation of interorgan glutamine flow in metabolic acidosis. *Am J Physiol* 1986;250:E456-463.
67. Welbourne TC. Interorgan glutamine flow in metabolic acidosis. *Am J Physiol* 1987;253(6 Pt 2):F1069-76.
68. Austgen TR, Chen MK, Flynn TC, Souba WW. The effects of endotoxin on the splanchnic metabolism of glutamine and related substrates. *J Trauma* 1991;31(6):742-51.
69. Walser M. Misinterpretation of nitrogen balances when glutamine stores fall or are replenished [editorial]. *Am J Clin Nutr* 1991;53(6):1337-8.
70. Goldspink DF, Kelly FJ. Protein turnover and growth in the whole body,

liver and kidney of the rat from the foetus to senility. *Biochem J* 1984;217(2):507-16.

71. Beisel WR, Wannemacher RJ. Gluconeogenesis, ureagenesis, and ketogenesis during sepsis. *Jpn J Parenter Enteral Nutr* 1980;4(3):277-85.

72. Newsholme EA, Parry BM. Properties of glutamine release from muscle and its importance for the immune system. *Jpn J Parenter Enteral Nutr* 1990;14(4Supl.):63S-67S.

73. Koch B, Schroder MT, Schafer G, Schauder P. Comparison between transport and degradation of leucine and glutamine by peripheral human lymphocytes exposed to concanavalin A. *J Cell Physiol* 1990;143(1):94-9.

74. Burke DJ, Alverdy JC, Ayoys E, Moss GS. Glutamine-supplemented total parenteral nutrition improves gut immune function. *Arch Surg* 1989;124(12):1396-9.

75. Souba WW, Klimberg VS, Hautamaki RD, et al. Oral glutamine reduces bacterial translocation following abdominal radiation. *J Surg Res* 1990;48(1):1-5.

76. 井上 純雄, 石田 祐一, 内田 久則. 栄養管理法と Bacterial Translocation. *外科* 1991;53(7):710-718.

77. Kudsk KA, Croce MA, Fabian TC, et al. Enteral versus parenteral feeding. Effects on septic morbidity after blunt and penetrating abdominal trauma. *Ann Surg* 1992;215(5):503-11.

78. Moore FA, Feliciano DV, Andrassy RJ, et al. Early enteral feeding, compared with parenteral, reduces postoperative septic complications. The results of a meta-analysis. *Ann Surg* 1992;216(2):172-83.

表 1 体重及び食餌摂取量

		Control (n=6)	10 ⁷ (n=5)	10 ⁸ (n=6)	10 ⁹ (n=6)
Body Weight (g)	POD				
	Pre	388 ± 6	391 ± 5	388 ± 4	388 ± 5
	1	370 ± 6	381 ± 5	370 ± 4	375 ± 6
	2	363 ± 6	371 ± 6	359 ± 4	
	3	368 ± 7	370 ± 6	353 ± 3	
	4	372 ± 6	371 ± 5	354 ± 4	
	5	374 ± 5	374 ± 5	358 ± 4	
	6	380 ± 6	376 ± 5	361 ± 4	
Food Intake (g/day)	Pre	20.5 ± 0.8	19.6 ± 1.0	20.7 ± 0.6	21.8 ± 0.9
	1	3.5 ± 1.1	5.4 ± 0.8(a)	1.5 ± 0.7	2.5 ± 0.8
	2	5.8 ± 1.0	5.6 ± 1.0	4.8 ± 0.6	
	3	14.8 ± 1.8(a)	11.0 ± 1.7(a)	4.3 ± 0.8	
	4	18.8 ± 1.6(a)	15.4 ± 1.6	10.7 ± 1.4	
	5	18.8 ± 1.1	13.8 ± 1.1	13.7 ± 1.7	
	6	19.8 ± 1.4	17.0 ± 0.6	19.3 ± 4.6	

Values are means ± SE, (a): p<0.05 vs 10⁸

表 2 犠死時臓器重量(g)

Group	Control	10 ⁷	10 ⁸
No.	6	5	6
Lung	1.26 ± 0.06	1.29 ± 0.06	1.35 ± 0.12
Thymus	0.42 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.02
Liver	12.74 ± 0.22	12.79 ± 0.43	12.40 ± 0.32
Spleen	0.77 ± 0.03 (b)	0.88 ± 0.04	1.01 ± 0.05
Adrenal	0.076 ± 0.003 (a)	0.095 ± 0.005	0.089 ± 0.003
Kidney	2.28 ± 0.07	2.37 ± 0.05	2.17 ± 0.08
Intestine			
Proximal	3.33 ± 0.10	3.51 ± 0.17	3.22 ± 0.16
Distal	3.10 ± 0.10	3.54 ± 0.22	3.22 ± 0.18
Colon	1.48 ± 0.04	1.64 ± 0.10	1.40 ± 0.05
Gastro - cnemius	4.36 ± 0.07	4.32 ± 0.05	4.16 ± 0.11

Values are means ± SE, (a): p<0.05 vs 10⁷, (b): p<0.05 vs 10⁸

表 3 犠死時検出細菌

Group	No.	Peritoneal Cavity	Blood
Control	1	ND	ND
	2	ND	ND
	3	ND	ND
	4	ND	ND
	5	ND	ND
	6	ND	ND
10 ⁷	1	<i>E. coli</i>	ND
	2	<i>E. coli</i>	ND
	3	<i>E. coli</i>	ND
	4	<i>E. coli</i>	ND
	5	<i>E. coli</i>	ND
10 ⁸	1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
	2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
	3	<i>E. coli</i>	ND
	4	<i>E. coli</i>	ND
	5	<i>E. coli</i>	ND
	6	<i>E. coli</i>	ND

ND: Not Detected, *E. coli* : *Escherichia coli*

表 4 腸粘膜高

Group	Control		10 ⁷		10 ⁸	
No.	6		5		6	
Small Intestine						
Proxymal	476	± 37	327	± 33 (C)	357	± 20
Middle	421	± 18	376	± 35	274	± 26 (C)
Distal	315	± 12	309	± 40	276	± 27
Colon	259	± 11	263	± 16	258	± 13

Values are means ± SE, (c): p<0.05 vs Control

表5 栄養液の配合法(ml/l)

	Conventional	Ala-Gln
50%ブドウ糖・電解質液	444	444
標準アミノ酸液	553	275
20%Ala-Gln溶液	0	109
蒸留水	0	169
MVI	3	3

表6 栄養液の組成

		Conventional	Ala-Gln
Glucose	(g/dl)	18.5	18.5
Amino Acid	(g/dl)	5.0	2.7
Ala-Gln	(g/dl)	0	2.3
N.P.C.	(kcal/dl)	74.0	74.0
Amino Acid	(mmol/l)		
Ala		38.5	119.7
Gln		0	100.6
Glu		24.4	12.2
Val		21.3	10.6
Leu		52.7	26.2
Ile		23.6	11.7
Ser		11.6	5.8
Thr		30.2	15.0
Cysteine		4.6	2.3
Met		13.0	6.5
Pro		15.9	7.9
Phe		31.3	15.6
Tyr		1.1	0.5
Trp		3.5	1.8
Asp		15.8	7.9
Lys		46.9	23.3
Arg		25.1	12.5
His		21.4	10.6
Ala	(W/V%)	6.7	19.7
Gln	(W/V%)	0	30.0
BCAA	(W/V%)	24.3	13.1
Essential AA	(W/V%)	66.3	35.8

表 7 全身蛋白代謝及び臓器蛋白合成率
(Con vs Ala-Gln)

全身蛋白代謝(gN/kg/day)

Dynamics	Conventional (n=7)	Ala-Gln (n=6)	p
Turnover	3.43 ± 0.11	3.63 ± 0.10	0.26
Synthesis	1.57 ± 0.09	1.76 ± 0.06	0.15
Breakdown	1.75 ± 0.11	1.95 ± 0.10	0.26

Values are means ± SE.

臓器蛋白合成率(%/day)

Organ	Conventional (n=7)	Ala-Gln (n=6)	p
Lung	5.2 ± 0.3	5.7 ± 0.6	0.47
Thymus	19.8 ± 1.3	23.9 ± 1.5	0.08
Liver	29.0 ± 1.1	37.5 ± 2.7	0.016
Spleen	28.7 ± 0.8	31.2 ± 0.8	0.08
Kidney	13.9 ± 1.0	12.9 ± 0.3	0.38
Intestine			
Proxymal	40.8 ± 1.8	42.9 ± 3.1	0.58
Distal	40.2 ± 2.4	41.6 ± 2.2	0.7
Colon	18.0 ± 1.3	20.6 ± 1.0	0.18
Muscle	1.6 ± 0.1	2.0 ± 0.1	0.025

Values are means ± SE.

表 8 犠死時血清アミノグラム(Con vs Ala-Gln, $\mu\text{mol/l}$)

Amino Acid	Conventional (n=6)	Ala-Gln (n=5)	Control (n=6)
Gly	395.4 \pm 19.1 (G)	288.5 \pm 34.6	379.4 \pm 9.8
Ala	694.6 \pm 48.2	828.9 \pm 93.2	627.0 \pm 24.2
Val	299.2 \pm 13.7	230.2 \pm 25.6	242.3 \pm 7.1
Leu	309.0 \pm 12.0 (C)	249.5 \pm 22.3	209.4 \pm 8.7
Ile	163.4 \pm 3.8	136.4 \pm 1.7	138.7 \pm 4.3
Ser	268.0 \pm 13.6	208.9 \pm 16.8 (C)	291.2 \pm 10.7
Thr	348.0 \pm 20.1 (G)	225.4 \pm 17.8 (C)	331.0 \pm 6.2
Cystine	7.3 \pm 1.2	15.2 \pm 5.2	4.2 \pm 0.6
Met	77.5 \pm 4.9	63.0 \pm 9.0	66.7 \pm 3.8
Asn	18.4 \pm 7.4 (G),(C)	61.4 \pm 10.9 (C)	123.6 \pm 3.9
Gln	555.0 \pm 23.7 (G)	924.3 \pm 77.1 (C)	583.6 \pm 25.8
Pro	174.9 \pm 11.7 (C)	149.5 \pm 15.6 (C)	244.7 \pm 12.7
Phe	175.8 \pm 7.7 (G),(C)	132.8 \pm 10.3 (C)	84.6 \pm 3.7
Tyr	86.4 \pm 8.2	69.4 \pm 8.9 (C)	107.1 \pm 5.9
Trp	92.9 \pm 2.1	77.9 \pm 6.1 (C)	112.0 \pm 6.8
Asp	80.5 \pm 5.6	65.1 \pm 12.0	68.4 \pm 7.3
Glu	303.6 \pm 12.4	414.0 \pm 48.0	307.6 \pm 22.4
Lys	413.6 \pm 22.6 (G)	314.2 \pm 23.2	383.5 \pm 14.7
Arg	267.8 \pm 31.0	230.6 \pm 32.6	276.1 \pm 15.3
His	211.3 \pm 8.1 (G),(C)	156.7 \pm 10.9 (C)	74.0 \pm 1.9
BCAA	771.6 \pm 28.1 (C)	616.1 \pm 58.6	590.3 \pm 19.6
Aromatic	355.1 \pm 14.4 (G)	280.1 \pm 23.3	303.7 \pm 10.0
Essential	2090.8 \pm 70.0 (G),(C)	1586.0 \pm 125.2	1642.2 \pm 39.7
Non-Essen.	2894.4 \pm 116.4	3302.3 \pm 289.7	3090.2 \pm 84.3
Total	4985.1 \pm 174.7	4888.3 \pm 403.4	4732.4 \pm 122.2

Values are means \pm SE, (C): $p < 0.05$ vs Control, (G): $p < 0.05$ vs Ala-Gln

表 9 腸粘膜高(Con vs Ala-Gln, μm)

Locus	Conventional (n=5)	Ala-Gln (n=5)	p
Intestine			
Proximal	402 \pm 37	452 \pm 23	0.34
Middle	424 \pm 24	520 \pm 30	0.054
Distal	351 \pm 34	463 \pm 23	0.042
Colon	265 \pm 16	283 \pm 12	0.57

Values are means \pm SE.

表10 犠死時検出細菌

Group	Peritoneal Cavity	Blood	Catheter Tip
Conventional			
1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	ND
2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
3	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
4	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> + <i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i> + <i>K. ozaenae</i>
5	<i>E. coli</i> + <i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
Ala-Gln			
1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> + <i>B. subtilis</i>
2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> + <i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
3	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> + <i>B. subtilis</i>
4	<i>E. coli</i> + <i>B. subtilis</i>	ND	<i>Enterococcus</i>
5	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> + <i>P. mirabilis</i> + <i>Enterococcus</i>

ND: Not Detected, *E. coli* : *Escherichia coli*, *B. subtilis* : *Bacillus subtilis*, *S. aureus* : *Staphylococcus aureus*, *K. ozaenae* : *Klebsiella ozaenae*, *P. mirabilis* : *Proteus mirabilis*.

表11 栄養液の配合法(ml/l)

	BCAA	Ala-Gln
50%ブドウ糖・電解質液	452	452
標準アミノ酸液	545	276
20%Ala-Gln溶液	0	113
蒸留水	0	179
MVI	3	3

表12 栄養液の組成

		BCAA	Ala-Gln
Glucose	(g/dl)	18.5	19.2
Amino Acid	(g/dl)	5.7	2.7
Ala-Gln	(g/dl)	0	2.3
N.P.C.	(kcal/dl)	75.3	76.9
Amino Acid	(mmol/l)		
Ala		49.0	129.5
Gln		0	104.6
Val		37.2	18.9
Leu		58.2	29.5
Ile		33.2	16.9
Ser		15.6	7.9
Thr		26.1	13.3
Cysteine		4.5	2.3
Met		14.3	7.2
Pro		23.7	12.0
Phe		23.1	11.7
Tyr		1.5	0.8
Trp		5.3	2.7
Asp		4.1	2.1
Glu		3.7	1.9
Lys		55.2	28.0
Arg		32.9	16.7
His		17.6	8.9
Ala	(W/V%)	8.1	19.9
Gln	(W/V%)	0	30.0
BCAA	(W/V%)	30.5	16.6
Essential AA	(W/V%)	69.5	37.9

表13 全身蛋白代謝及び臓器蛋白合成率
(BCAA vs Ala-Gln)

全身蛋白代謝(gN/kg/day)

Group	Dynamics	BCAA	Ala-Gln
3POD		(n=10)	(n=10)
	Turnover	4.03 ± 0.06 (G)	4.62 ± 0.09
	Synthesis	2.41 ± 0.06 (G)	2.89 ± 0.11
	Breakdown	2.34 ± 0.06 (G)	2.94 ± 0.09
5POD		(n=9)	(n=8)
	Turnover	3.43 ± 0.06 (G)	3.85 ± 0.14
	Synthesis	2.66 ± 0.11	2.87 ± 0.27
	Breakdown	1.72 ± 0.06	2.10 ± 0.14

Values are means ± SE, (G): p<0.05 vs Ala-Gln

臓器蛋白合成率(%/day)

Organ	BCAA	Ala-Gln	p
3POD	(n=10)	(n=10)	
Lung	7.4 ± 0.8	7.4 ± 0.9	1.00
Thymus	22.9 ± 1.1	22.0 ± 0.9	0.54
Liver	19.7 ± 1.0 (G)	25.1 ± 1.1	0.02
Spleen	29.8 ± 1.2	28.5 ± 2.8	0.39
Kidney	15.6 ± 0.3	15.0 ± 0.6	0.34
Intestine			
Proxymal	39.4 ± 1.4	40.2 ± 3.0	0.64
Distal	38.6 ± 2.5	38.9 ± 1.6	0.92
Colon	19.5 ± 1.2	21.1 ± 0.8	0.28
Muscle	2.3 ± 0.2	2.1 ± 0.2	0.66
5POD	(n=9)	(n=8)	
Lung	5.5 ± 0.5	5.2 ± 0.4	0.65
Thymus	25.1 ± 1.0	25.4 ± 2.4	0.92
Liver	25.4 ± 1.0	28.6 ± 1.5	0.11
Spleen	35.7 ± 1.4	36.8 ± 0.9	0.59
Kidney	13.7 ± 0.6	14.0 ± 0.9	0.81
Intestine			
Proxymal	74.6 ± 10.8	73.2 ± 15.7	0.6
Distal	39.6 ± 1.0 (G)	44.9 ± 1.5	0.012
Colon	27.3 ± 3.4	23.1 ± 1.0	0.29
Muscle	2.2 ± 0.1	2.5 ± 0.2	0.25

Values are means ± SE, (G): p<0.05 vs Ala-Gln

表14 犠死時血清アミノグラム($\mu\text{mol/l}$)
(BCAA vs Ala-Gln, 5POD)

Amino Acid	BCAA (n=9)		Ala-Gln (n=8)		Control (n=6)	
Gly	329.4	± 11.1	296.5	± 29.1	379.4	± 9.8
Ala	907.7	± 46.8 (C)	1037.3	± 116.6 (C)	627.0	± 24.2
Val	402.0	± 13.7 (G),(C)	309.0	± 20.4	242.3	± 7.1
Leu	323.2	± 10.7 (G),(C)	270.2	± 12.7 (C)	209.4	± 8.7
Ile	199.8	± 7.2 (C)	183.6	± 11.8 (C)	138.7	± 4.3
Ser	269.3	± 7.7	250.1	± 12.3	291.2	± 10.7
Thr	319.6	± 5.9	270.5	± 20.2	331.0	± 6.2
Cystine	16.0	± 3.5	24.4	± 3.8 (C)	4.2	± 0.6
Met	74.7	± 3.1	68.4	± 4.9	66.7	± 3.8
Asn	37.3	± 7.7 (C)	61.8	± 6.0 (C)	123.6	± 3.9
Gln	473.3	± 18.1 (G)	857.9	± 76.6 (C)	583.6	± 25.8
Pro	196.1	± 8.9 (C)	168.4	± 10.8 (C)	244.7	± 12.7
Phe	131.9	± 7.7 (C)	123.1	± 11.8 (C)	84.6	± 3.7
Tyr	67.9	± 3.9 (C)	69.3	± 4.8 (C)	107.1	± 5.9
Trp	88.9	± 4.1 (C)	85.8	± 4.3 (C)	112.0	± 6.8
Asp	84.4	± 8.9	78.7	± 12.2	68.4	± 7.3
Glu	298.6	± 19.1	345.2	± 38.2	307.6	± 22.4
Lys	461.7	± 11.2 (G),(C)	371.0	± 12.4	383.5	± 14.7
Arg	284.8	± 22.8	207.7	± 23.6	276.1	± 15.3
His	128.2	± 6.1 (C)	118.6	± 12.0 (C)	74.0	± 1.9
BCAA	925.0	± 30.2 (G),(C)	762.8	± 41.8 (C)	590.3	± 19.6
Aromatic	288.6	± 10.4	278.2	± 11.1	303.7	± 10.0
Essential	2130.0	± 62.5 (G),(C)	1800.3	± 81.0	1642.2	± 39.7
Non-Essen	3028.2	± 80.3	3479.1	± 231.0	3090.2	± 84.3
Total	5158.2	± 127.1	5279.4	± 300.8	4732.4	± 122.2

Values are means \pm SE, (C): $p < 0.05$ vs Control, (G): $p < 0.05$ vs Ala-Gln

表15 腸粘膜高 (μmol)
(BCAA vs Ala-Gln)

3POD

Locus	BCAA (n=10)	Ala-Gln (n=10)	p
Intestine			
Proximal	416.0 \pm 27.9	440.2 \pm 28.6	0.55
Middle	382.1 \pm 18.8	404.7 \pm 30.1	0.53
Distal	306.6 \pm 15.5 (G)	463.3 \pm 33.8	0.005
Colon	273.9 \pm 10.1	314.6 \pm 23.5	0.13

Values are Means \pm SE, (G): $p < 0.05$ vs Ala-Gln

5POD

Locus	BCAA (n=8)	Ala-Gln (n=8)	p
Intestine			
Proximal	438.0 \pm 37.1	405.7 \pm 26.1	0.52
Middle	461.5 \pm 38.6	432.3 \pm 28.0	0.58
Distal	348.6 \pm 26.1 (G)	459.3 \pm 31.1	0.023
Colon	254.0 \pm 25.2	291.8 \pm 23.1	0.32

Values are Means \pm SE, (G): $p < 0.05$ vs Ala-Gln

表16 犠死時検出細菌

3POD

Group	Peritoneal Cavity	Blood	Catheter Tip
<u>BCAA</u>			
No.1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> + <i>B. subtilis</i>
No.2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
No.3	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> + <i>B. subtilis</i>
No.4	<i>E. coli</i> + <i>B. subtilis</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>
No.5	<i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>
No.6	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>
No.7	<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	<i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i>	<i>E. cloacae</i>
No.8	<i>E. coli</i>	ND	ND
<u>Ala-Gln</u>			
No.1	ND	ND	ND
No.2	ND	ND	ND
No.3	<i>E. coli</i>	ND	ND
No.4	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	ND
No.5	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>
No.6	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>

5POD

Group	Peritoneal Cavity	Blood	Catheter Tip
<u>BCAA</u>			
No.1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i>	<i>E. coli</i> + CNS
No.2	<i>E. coli</i>	ND	<i>E. cloacae</i>
No.3	<i>E. coli</i>	ND	<i>P. pneumoniae</i>
<u>Ala-Gln</u>			
No.1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
No.2	<i>E. coli</i>	CNS	CNS
No.3	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> + CNS
No.4	<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>

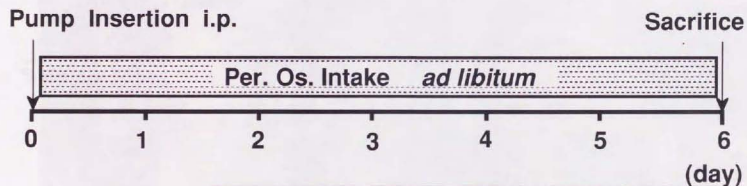
ND: Not Detected, *E. coli* : *Escherichia coli*, *B. subtilis* : *Bacillus subtilis*, *S. aureus* : *Staphylococcus aureus*,
E. cloacae : *Enterobacter cloacae*, *P. pneumoniae* : *pasteurella pneumoniae*

表17 アラニルグルタミン添加による
改善効果

	vs Conventional	vs BCAA
生存率	↑ ↑	～
全身蛋白代謝	～	↑ ↑
臓器蛋白合成率		
肝	↑	↑ ↑
筋肉	↑ ↑	～
胸腺	↑	～
脾臓	↑	～
小腸	～	↑ ↑
小腸粘膜高	↑ ↑	↑ ↑

↑ ↑：有効、↑：やや有効、～：不変

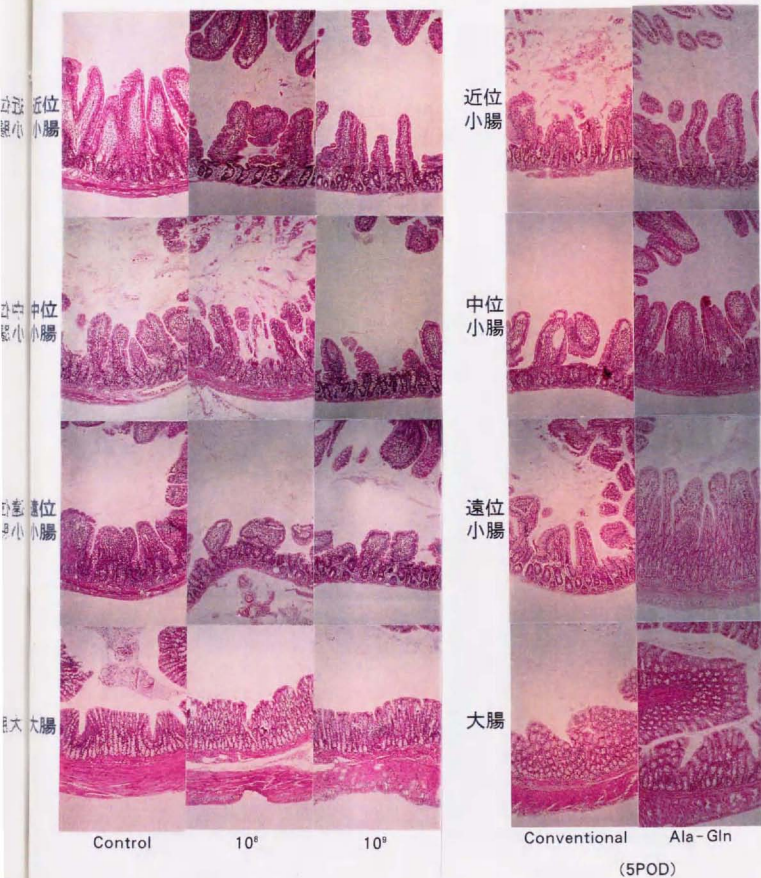
図1 注入細菌量決定実験のプロトコール



E. coli i.p. Infusion

$\left\{ \begin{array}{l} 10^7 \text{ cfu/day} \\ 10^8 \text{ cfu/day} \\ 10^9 \text{ cfu/day} \end{array} \right.$
or
Saline

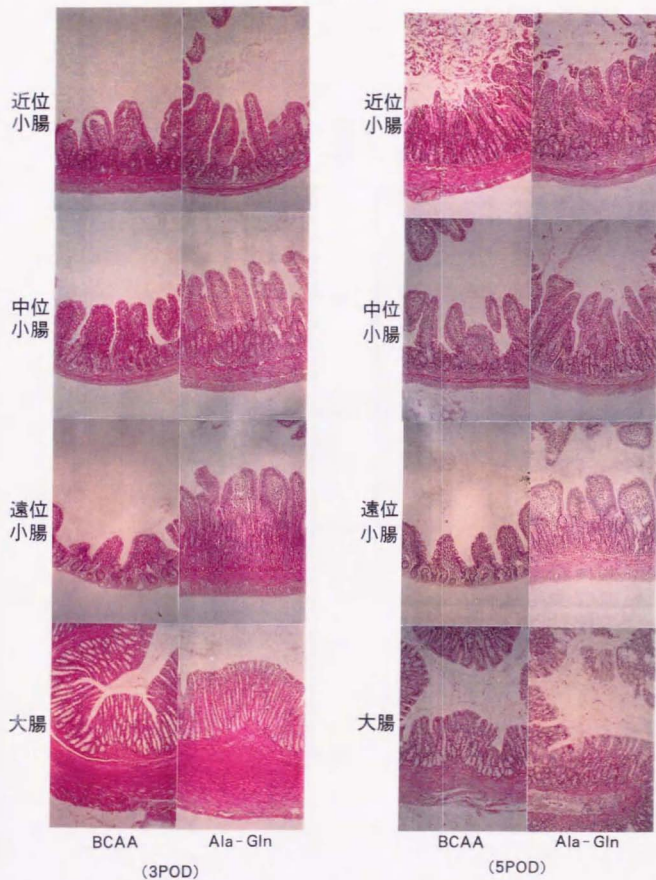
図2 腸管組織像（その1）



腸粘膜高は細菌投与群ではControl群に比べ、近位・中位・遠位小腸とも低く、とくに近位小腸では10⁸群が、中位小腸では10⁶群が各々、Control群に比べ有意に低かった。

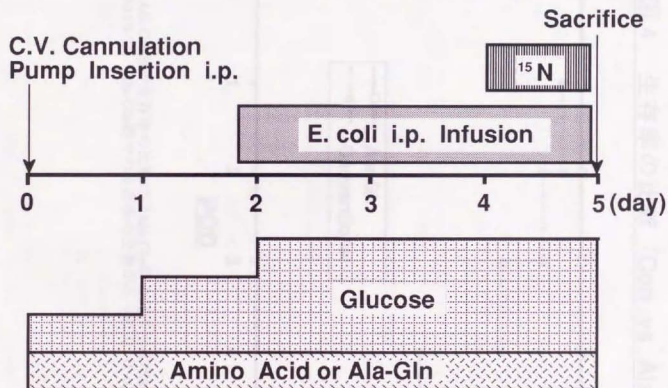
腸粘膜の高さは、遠位小腸ではAla-Gln群の方がCon群より有意に高かった

図 2 腸管組織像（その 2）



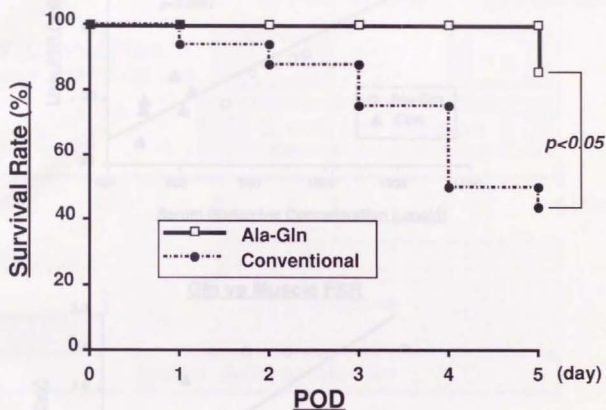
腸粘膜の高さは、Ala-Gln群とBCAA群との比較では、3日目、5日目とも、遠位小腸でAla-Gln群の方が有意に高かった

図3 標準アミノ酸とAla-Gln添加アミノ酸との比較実験の
プロトコール



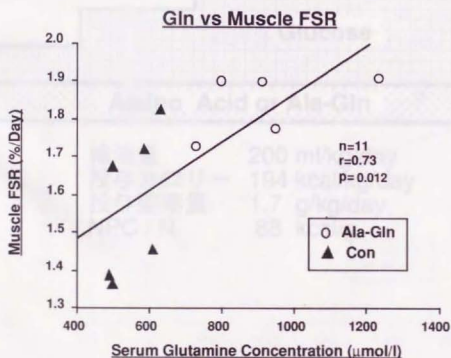
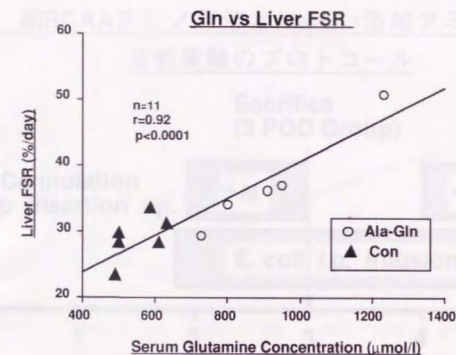
輸液量	200 ml/kg/day
投与カロリー	194 kcal/kg/day
投与窒素量	1.7 g/kg/day
NPC / N	88 kcal/g

図4 生存率の比較 (Con vs Ala-Gln)



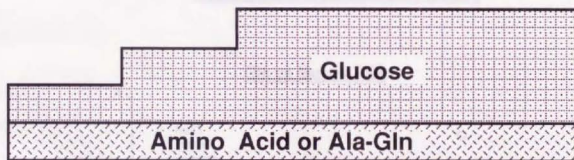
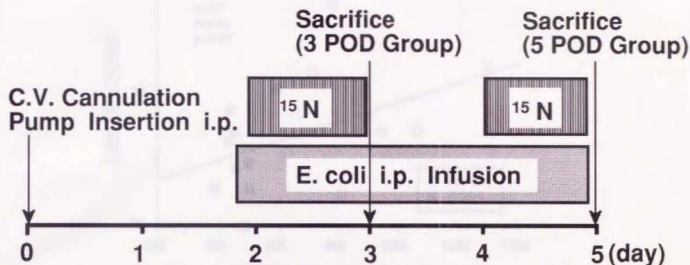
Con群とAla-Gln群の生存率の比較ではAla-Gln群の最終生存率86%に対し、Con群は最終生存率44%で、Ala-Gln群での生存率の改善がみられた ($P<0.05$)。

図5 血清グルタミン濃度の
肝及び腓腹筋蛋白合成率との相関



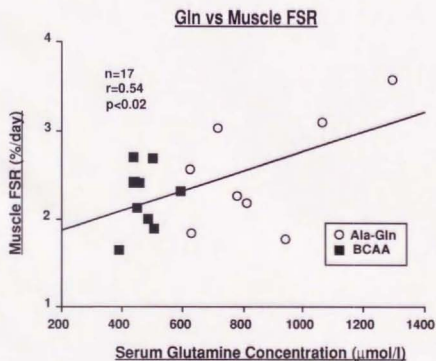
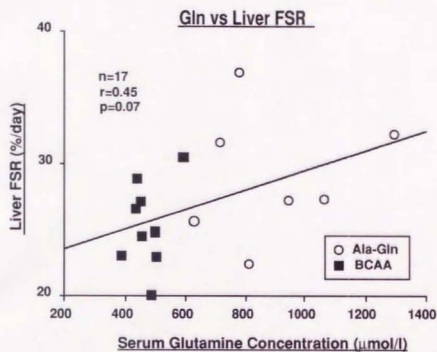
Con群とAla-Gln群との比較実験で、血清中グルタミン濃度と肝の蛋白合成率、
血清中グルタミン濃度と筋肉の蛋白合成率との間には正の相関を認めた。

図6 高BCAAアミノ酸液とAla-Gln添加アミノ酸液との
比較実験のプロトコール



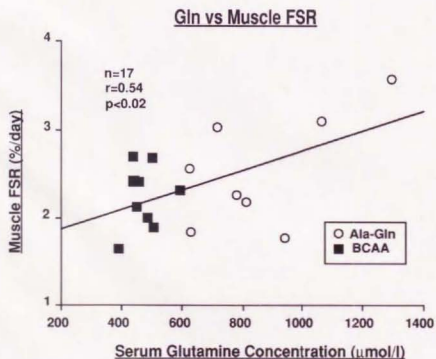
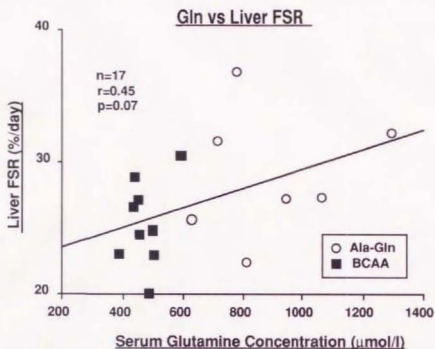
輸液量	200 ml/kg/day
投与カロリー	194 kcal/kg/day
投与窒素量	1.7 g/kg/day
NPC / N	88 kcal/g

図7 血清グルタミン濃度の肝及び腓腹筋蛋白合成率
との相関
(BCAA vs Ala-Gln, 5 POD)



BCAA-5群とAla-Gln-5群との比較実験で、血清中グルタミン濃度と肝の蛋白合成率、血清中グルタミン濃度と筋肉の蛋白合成率との間には正の相関を認めた。

図7 血清グルタミン濃度の肝及び腓腹筋蛋白合成率
との相関
(BCAA vs Ala-Gln, 5 POD)



BCAA-5群とAla-Gln-5群との比較実験で、血清中グルタミン濃度と肝の蛋白合成率、血清中グルタミン濃度と筋肉の蛋白合成率との間には正の相関を認めた。

