研究論文

長期補助循環中の尿中トリプトファン代謝産物と炎症性ストレス反応の関係

伊藤康宏¹⁾・深尾英臣²⁾・海江田 章²⁾・石田沙織³⁾・藤原麻未³⁾・山本 賢³⁾
豊崎正人³⁾・山城知明³⁾・石川隆志³⁾・川井 薫¹⁾・渡邊 孝¹⁾・日比谷 信¹⁾

要 旨

補助循環中の症例から、連続する2週間に尿中に排泄された必須アミノ酸のトリプトファンの代謝産物のうち、キヌレニン経路からの代謝産物を測定した。比較対照として肝機能指標である総アルブミン、AST、肝臓で産生される腎機能指標 BUN および炎症性ストレス反応物質である CRP、プロカルシトニン、尿中コルチゾールを測定した。トリプトファン代謝は肝臓で行われるため、肝機能指標との関係が示された。また、トリプトファン代謝産物の経日的な動態から補助循環回路などに使われる可塑剤の影響が示唆された。更に、肝臓の重要な機能である栄養代謝のうち、エネルギー賦活源である NAD や解糖系への代謝障害が示唆され、栄養学的な観点からも重要な課題と考えられる。また、トリプトファン代謝産物と炎症性ストレス反応物質との間に高い相関係数が得られ、抗ストレス性、炎症反応との関連なども示された。

索引用語：補助循環、キヌレニン、キヌレン酸、可塑剤、炎症反応物質

Relationship between urinary tryptophan metabolites and longterm assisted circulation

Yasuhiro Ito¹⁾, Hideomi Fukao²⁾, Akira Kaieda²⁾, Saori Ishida³⁾, Asami Fujiwara³⁾, Masaru Yamamoto³⁾, Masahito Toyozaki³⁾, Tomoaki Yamashiro³⁾, Takashi Ishikawa³⁾, Kaoru Kawai¹⁾, Takashi Watanabe¹⁾, Makoto Hibiya¹⁾

Key words : assisted circulation, kynurenine, kynurenic acid, plasticizers, inflammatory mediators

I. 緒 言

必須アミノ酸であるトリプトファンにはアミノ基を代謝してメラトニンなどのアミンに代謝するセロトニン経路とインドール環を開裂するキヌレニン経路がある。キヌレニン経路は肝臓にあり、その代謝産物にはキヌレン酸のように中枢神経系作用を有するもの、キノリン酸のように免疫変調作用を有し酸化物の発生源になるもの、3-ヒドロキシキノレンのように酸化還元反応により免疫活性を調節するものなど多様な生理活性物質

がある。

我々はこれまでに、人工心肺中のこれらの生理活性物質の尿中濃度を測定し、体外循環がトリプトファン代謝系に及ぼす影響を考察してきた^{1, 2)}。体外循環を用いた開心術では、キヌレニン経路が強く活性化され、フリーラジカルの発生を抑制するアントラニル酸は増加、酸化還元作用をそれぞれ半々に持つ3-ヒドロキシアントラニル酸³⁾も増加し、体内の酸化還元反応の均衡を保つことを報告した。一方、長期補助循環では非生理的循環、非生理的呼吸状態によるストレスが臓器障害を生じさせるだけではなく、回路の材質中から溶出される可塑剤の量も多くなる⁴⁾。キヌレニン経路の中間代謝酵素であるキヌレニン3-モノヒドロキシラーゼは可塑剤に多く用いられるビスフェノール A によって阻害され、肝臓での糖新生の一部が障害を受ける⁵⁾。加えて、長期ストレス状態では副腎皮質が疲弊しコルチゾールなど炎症反応への抗ストレスホルモン産生が低下すると考えられる。

今回、長期補助循環中の尿中トリプトファンの代謝産物の動向から栄養学的知見も含めて生体への影響を

1) 藤田保健衛生大学 医療科学部 臨床工学科
伊藤康宏 (Yasuhiro Ito)
〒470-1192 愛知県豊田市杏掛町田楽ヶ窪 1-98
Department of Clinical Engineering, School of Health Sciences,
Fujita Health University
1-98, Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake, Aichi, 470-1192,
Japan
2) 一宮西病院 医療機器管理室
3) 藤田保健衛生大学病院 ME 管理室

[原稿受領日：2013 年 11 月 2 日 採択日：2013 年 12 月 25 日]

図1 トリプトファンのキヌレニン経路
太字は測定した代謝産物、斜字は結果に関与すると考えられる代謝酵素

表1 トリプトファン代謝産物の尿中濃度と14日間の経日変化

	Trp	Kyn	KA	XA	IAA	AA
平均値±標準偏差 (単位: $\mu\text{M}/\text{mg creatinin}$)	0.005±0.006	0.019±0.029	0.223±0.122	0.009±0.014	0.014±0.020	0.075±0.055
14日間の経日変化	$y=0.000003x+0.003$	$y=-0.001x+0.02$	$y=0.02x+0.12$	$y=-0.0006x+0.01$	$y=0.0007x+0.004$	$y=0.002x+0.06$

表2 他の指標の濃度、活性値と14日間の経日変化

	総ビリルビン	AST (GOT)	BUN	CRP	プロカルシトニン	尿中 cortisol
平均値±標準偏差 (基準値、単位)	0.8±0.3 0.3-1.2mg/dL	107±23 13-33U/L	39.6±17.7 8.0-22.0mg/dL	11.9±7.1 0.3mg/dL 未満	0.42±0.22 0.05ng/mL 以下	31.4±19.2 11.2-80.3 $\mu\text{g}/\text{day}$
14日間の経日変化	$y=0.06x+0.28$	$y=2.15x+87.7$	$y=4.12x+6.34$	$y=1.31x+1.47$	$y=-0.01x+0.46$	$y=-2.15x+44.12$

考察した。

II. 対象および方法

対象は肺塞栓症で補助循環 (Respiratory ECMO) を施行した2症例である。補助循環期間はそれぞれ2012年X月および2013年Y月の連続する2週間であった。補助循環回路にはテルモキャピオックスEBSを用いた。尿は1～2日に1回の採取が可能であった。

測定項目はトリプトファン (Trp)、キヌレニン (Kyn)、アントラニル酸 (AA)、キヌレン酸 (KA)、キサンツレン酸 (XA)、インドール酢酸 (IAA) であった。これらはいずれもアミノ酸であり、代謝経路の概略を図1に示した。測定は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法で行い、分析装置はNANO SUPASESI-2 3001 (資生堂) を、分析カラムにはセミマイクロカラム (CAPCELL PAKC18AQ; 資生堂) を使用した。移動層には50mM リン酸緩衝液 pH7.0 および50mM リン酸緩衝液 pH7.0 + アセトニトリル (95:5 混合) を用いた。尿サンプルは2.4M 過塩素酸で除タンパクし、その上清をHPLC検体とした。比較のために血中のC反応性タンパク (CRP:

ラテックス免疫比濁法)、総ビリルビン (化学酸化法)、血中尿素窒素 (BUN: ウレアーゼ UV 法) および尿中コルチゾール (urinary cortisol: RIA 固相法) を測定した。尿中の各指標は尿中クレアチニン (酵素法) で補正した。

それぞれの値は平均値±標準偏差で表した。また、各指標の比較にはPearsonの相関係数を用いた。

III. 結 果

尿中に排泄されたトリプトファン代謝産物の平均濃度は表1に示した。特にキヌレン酸の濃度が他の代謝産物などと比べて高値であり、逆にキサンツレン酸は低値であった。トリプトファン自体の排泄も認められたが、通常、健常者では排泄されないので体タンパクの異化亢進が推察される。経日変化では、キヌレニンは低下、キヌレン酸は増加、キサンツレン酸は低下傾向、アントラニル酸はやや増加傾向をそれぞれ示した (表1)。キヌレニンの低下の理由はキヌレン酸への代謝亢進であると考えられる。

他の指標の濃度あるいは活性値を表2に示した。血

表3 トリプトファン代謝産物と他の指標との相関係数

	総ビリルビン	AST (GOT)	BUN	CRP	プロカルシトニン	尿中 cortisol
Trp	r = 0.122 t = 0.492 p = 0.629	r = -0.524 * t = 2.464 p = 0.025	r = 0.149 t = 0.602 p = 0.556	r = 0.070 t = 0.279 p = 0.784	r = 0.734 * t = 4.322 p = 0.0005	r = 0.519 * t = 2.428 p = 0.027
Kyn	r = -0.771 * t = 4.849 p = 0.0002	r = -0.631 * t = 3.254 p = 0.005	r = -0.906 * t = 8.026 p = 0.0000	r = -0.065 t = 0.243 p = 0.812	r = 0.631 * t = 3.046 p = 0.009	r = 0.389 t = 1.580 p = 0.137
KA	r = 0.825 * t = 5.836 p = 0.00002	r = 0.497 * t = 2.290 p = 0.036	r = 0.763 * t = 4.414 p = 0.0006	r = 0.551 * t = 2.641 p = 0.018	r = -0.268 t = 1.111 p = 0.283	r = -0.593 * t = 2.753 p = 0.016
XA	r = 0.566 * t = 2.746 p = 0.014	r = -0.713 * t = 4.072 p = 0.001	r = -0.502 * t = 2.319 p = 0.034	r = 0.565 * t = 2.559 p = 0.023	r = 0.538 * t = 2.385 p = 0.032	r = 0.772 * t = 4.856 p = 0.0002
IAA	r = 0.375 t = 1.512 p = 0.153	r = 0.041 t = 0.154 p = 0.880	r = 0.494 * t = 2.126 p = 0.050	r = 0.657 * t = 3.258 p = 0.006	r = 0.495 * t = 2.134 p = 0.051	r = -0.196 t = 0.738 p = 0.473
AA	r = -0.033 t = 0.124 p = 0.903	r = 0.048 t = 0.182 p = 0.858	r = -0.271 t = 1.052 p = 0.311	r = 0.075 t = 0.280 p = 0.783	r = -0.274 t = 1.064 p = 0.305	r = -0.205 t = 0.783 p = 0.447

* : 有意な相関の得られたもの

中指標では、総ビリルビン以外は基準値より増加していた。また、尿中コルチゾールは経日的に減少した。

尿中トリプトファン代謝産物と血中、尿中指標の相関係数と検定値を表3に示した。特にプロカルシトニンとは6代謝産物中5代謝産物が有意な相関係数を得た。その他、総ビリルビン、CRP および尿中コルチゾールには3代謝産物に、AST およびBUNには4代謝産物に有意の相関係数が得られた。

Ⅳ. 考 察

補助循環中の尿中トリプトファン代謝産物を測定した。我々はトリプトファン代謝産物が人工心肺中に一過性に尿中への排泄が起こることを報告している¹⁾。しかしながら、長期間の補助循環での尿中濃度を測定した報告はこれまでに皆無である。栄養学的な観点からのトリプトファン代謝の研究は厚生労働省による日本人の食事摂取基準の作成などのために極めて多くなされている。したがって、代謝を律速する酵素や代謝障害と尿中代謝物の関係などについてもほぼ確定されているため、考察しやすい利点がある。今回の検討で確認できたことは、長期補助循環では回路から溶出される可塑剤の影響が避けられないことであった。可塑剤であるビスフェノール A はキヌレニンを3-ヒドロキシキヌレニンに代謝する酵素であるキヌレニン3-モノヒドロキシラーゼ (EC1. 14. 13. 9) を抑制することが知られている⁵⁾。ビスフェノール A による代謝状態の変化は動物実験から示されており⁵⁾、本報告の結果の一つである長期補助

循環尿中のインドール酢酸、アントラニル酸の増加とキサンツレン酸の減少は恐らく可塑剤による影響と考えられる。一方、キヌレニンが減少しキヌレニン酸が増加したことは栄養学的見地から重要であると考えられる。これはキヌレニンからキサンツレン酸への代謝抑制を生じたためにキヌレニンアミノトランスフェラーゼ (EC2. 6. 1. 7) の活性が亢進した結果と考えられた。この結論を得た根拠はキヌレニンとキサンツレン酸の相関係数であり、 $r = -0.914$ ($t = 6.352$, $p = 0.0002$) と著しく高い値となっていた。この状態はトリプトファンからNADが産生される経路およびトリプトファンから糖新生される経路の抑制を生じさせ (図1参照)、エネルギー賦活系の産生不足による身体の疲弊につながる。その理由は、日本人では1日に必要なNADはその全てを食物中のトリプトファンに依存しているためである⁶⁾。長期の補助循環では多臓器において障害を生じるが、この原因の一つに細胞のエネルギー賦活源であるNADの産生の低下による影響が示唆された。

尿中トリプトファン代謝産物と血中の各指標との関係を表3に示した。肝機能との関係が示唆されるが、トリプトファン代謝の多くが肝臓で行われるため肝機能に補助循環の影響を受けることはむしろ当然の結果と言える。BUNも肝臓で産生されるが、尿量は維持されているため、トリプトファン代謝産物との間の高い相関係数は腎機能ではなくASTや総ビリルビンと同様に肝機能との関係と考えられる。

炎症性ストレス関連物質として、抗ストレス反応・

免疫応答に関与するコルチゾール、急性相反応物質であるCRPおよび感染の指標となるプロカルシトニン⁷⁾とトリプトファン代謝産物との相関が認められることから免疫活性との関係が示唆されるが、事実、キヌレニンやキヌレン酸などへの代謝酵素は炎症反応⁸⁾、妊娠⁹⁾、癌¹⁰⁾、感染症¹¹⁾などにおいて免疫能を調節することが知られている。また、これらの免疫能を調節する初期の代謝酵素であるインドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO: EC1.13.11.52) は体外循環中に血中濃度が増加する IFN-gamma やフリーラジカルによって活性化され¹²⁾、マクロファージなど免疫細胞担当細胞の細胞障害性を抑制する。尿中の測定のみからでは IDO の総活性量の推測は困難であり、将来は長期補助循環中の血中のトリプトファン代謝産物の測定系も確立して補助循環の炎症性ストレスに対する免疫能の動向についても検討したい。

今後、我々は血中の NAD 量など生命活動に直結し治療に応用可能な指標を測定し検討する予定である。

結 語

長期補助循環中の尿中トリプトファン代謝産物から可塑剤の影響、栄養学的な代謝機能の障害、炎症性ストレス反応がそれぞれ示唆された。今後は生命活動に直結する指標を調査し、治療に応用できるかについて検討を予定している。

●参考文献

- 1) 杉森美幸, 伊藤康宏, 柴田克己, ほか: 人工心肺を用いた体外循環がトリプトファン代謝に及ぼす影響. 体外循環技術, 34 (1): 7-9, 2007.
- 2) 豊崎正人, 石川隆志, 伊藤康宏, ほか: 体外循環中のトリプトファン代謝系による酸化ストレスへの応答機序. 体外循環技術, 39 (1): 16-20, 2012.
- 3) 白沢栄一: ヒト赤血球における 3-ヒドロキシアントラニル酸の代謝とそれに共役したヘモグロビンの酸化還元反応. 金沢大学十全医学会雑誌, 96 (2): 338-348, 1987.
- 4) 海江田章, 石川隆志, 日比谷信, ほか: 体外循環における血中ビスフェノール A の検討. 体外循環技術, 31 (4): 405-407, 2004.
- 5) 福渡 努, 鳥落 舞, 柴田克己, ほか: 内分泌かく乱物質候補ビスフェノール A, スチレンモノマーによるトリプトファン-ニコチンアミド転換経路のかく乱作用. 食品衛生学雑誌, 45 (1): 1-7, 2004.
- 6) Fukuwatari T, Ohta M, Shibata K, et al.: Conversion ratio of tryptophan to niacin in Japanese women fed a purified diet conforming to the Japanese Dietary Reference Intakes. J Nutr Sci Vitaminol, 50 (6): 385-391, 2004.
- 7) Jaimes FA, De La Rosa GD, Henao AI, et al.: A latent class approach for sepsis diagnosis supports use of procalcitonin in the emergency room for diagnosis of severe sepsis. BMC Anesthesiol, 13 (1): 23, 2013.
- 8) Saito K, Nowak TS Jr, Heyes MP, et al.: Kynurenine pathway enzymes in brain: responses to ischemic brain injury versus systemic immune activation. J Neurochem, 61 (6): 2061-2070, 1993.
- 9) Munn DH, Zhou M, Mellor AL, et al.: Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. Science, 281 (5380): 1191-1193, 1998.
- 10) Flick HE, Lalonde JM, Muller AJ, et al.: The tumor-selective cytotoxic agent β -lapachone is a potent inhibitor of IDO1. Int J Tryptophan Res, 6: 35-45, 2013.
- 11) Fox JM, Sage LK, Tripp RA, et al.: Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase enhances the T-cell response to influenza virus infection. J Gen Virol, 94 (Pt 7): 1451-1461, 2013.
- 12) 伊藤康宏, 堀口敦史, 渡邊浩次, ほか: 免疫活性制御酵素 (IDO) による白血球除去フィルターの性能評価. 体外循環技術, 34 (1): 4-6, 2007.

[本論文の要旨は第 39 回日本体外循環技術医学会大会にて報告した]