

経腸栄養剤の抗ラジカル活性および健常者並びに癌患者における 栄養剤経口摂取時の血中フリーラジカル消去作用

鈴木 彰人 橋口 誠子 渡邊 旬美 佐藤 圭創
白尾 一定* 本吉 佳世** 花牟禮 富美雄***

Antiradical activities of oral enteral nutrients and the effects of free radical scavenging ability
in healthy volunteers and cancer patients

Akito SUZUKI Seiko HASHIGUCHI Kumi WATANABE Keizo SATO
Kazusada SHIRAO* Kayo MOTOYOSHI** Fumio HANAMURE***

Abstract

Immunonutrition is thought to reduce the incidence of complications in surgical patients and is useful in preoperative nutritional management. However, choosing the appropriate immunonutrient for a patient can be difficult because of the many enteral nutrients available. This study searched an index for appropriate preoperative nutrient choices and selected four (ANOM[®], IMPACT[®], MEIN[®], RACOL[®]-NF) for comparison of their effects. The antiradical activity of each nutrient was measured in 10 healthy volunteers per group, and the effects of each nutrient on changes of free radicals in the blood were observed. Additionally, the effects of MEIN[®] on changes of free radicals and biochemical examination of blood in digestive system cancer patients were observed. Free radical scavenging ability was specific to each nutrient, and the obtained values showed antioxidant properties. The ascorbic acid content of each enteral nutrient could affect antiradical activity. Free radicals in the blood decreased after administration of the nutrients in healthy volunteers, and the free radical scavenging effects were maintained for 120 minutes with ANOM[®] or IMPACT[®] administration. In cancer patients, 7-day administration of MEIN[®] decreased free radicals in the blood. In conclusion, the antiradical activities and properties of free radicals in the blood are useful indices when choosing an appropriate nutrient.

Key words : enteral nutrient, immunonutrition, antiradical activity, free radicals, preoperative.

キーワード : 経腸栄養剤、免疫栄養法、抗ラジカル活性、フリーラジカル、術前

九州保健福祉大学 大学院 医療薬学研究科 〒882-8508 宮崎県延岡市吉野町 1714-1

* 社会保険宮崎江南病院 外科 〒880-8585 宮崎県宮崎市大坪西 1-2-1

** 社会保険宮崎江南病院 栄養管理部 〒880-8585 宮崎県宮崎市大坪西 1-2-1

*** 社会保険宮崎江南病院 検査部 〒880-8585 宮崎県宮崎市大坪西 1-2-1

Graduate School of Clinical Pharmacy, Kyushu University of Health and Welfare,
1714-1 Yoshino-machi, Nobeoka-shi, Miyazaki, 882-8508 Japan

*Department of Surgery, Social Insurance Miyazaki Konan Hospital
1-2-1 Otsubo-nishi, Miyazaki-shi, Miyazaki, 880-8585 Japan

**Department of Nutritional Management, Social Insurance Miyazaki Konan Hospital
1-2-1 Otsubo-nishi, Miyazaki-shi, Miyazaki, 880-8585 Japan

***Department of Clinical Laboratory, Social Insurance Miyazaki Konan Hospital
1-2-1 Otsubo-nishi, Miyazaki-shi, Miyazaki, 880-8585 Japan

緒言

栄養療法は、既に栄養障害に陥っている場合、食事摂取では栄養状態の維持が不可能な場合、あるいは栄養障害に陥るリスクが高い患者に対して適応となる¹⁾。米国静脈経腸栄養学会 (ASPEN) が 1993 年に発行したガイドラインでは、静脈栄養に対する経腸栄養の有用性が指摘され、腸管が機能している場合は経口摂取を優先するという指針が示された²⁾。

経腸栄養剤は五大栄養素の組成や、熱量、流動性を中心に開発され、さらに食物繊維も配合されるようになった。近年ではアルギニン、グルタミン、*n*-3 系脂肪酸、核酸などの特種栄養成分を複合配合して生体防御能や免疫能を増強させる免疫賦活経腸栄養剤を用いた多くの臨床試験が報告されている。免疫賦活経腸栄養剤の適応について、ASPEN は、栄養不良と術後合併症の発生リスクの高い消化器外科手術に限定していた³⁾。しかし、栄養リスクのない手術患者を対象として検討されたメタ解析において、免疫賦活経腸栄養剤による術後感染症発生の減少や在院日数が短縮されるなどの有用性が示され、欧州静脈経腸栄養学会 (ESPEN) は、栄養リスクに関係なく適用すべきであるとのガイドラインを示した⁴⁾。侵襲度の高い手術は、手術そのものが術後合併症のリスクを伴うことから、積極的に免疫賦活栄養法を試みる事が推奨されるようになった。また、アルギニンを配合せずに炎症調整成分を強化した免疫調整経腸栄養剤を用いた免疫調整栄養法も注目され、これらの 2 つの栄養法を組合せた免疫栄養法 (immunonutrition) が注目されている。

さらに、手術などの侵襲下において生体膜及び生体内分子に傷害を与える酸化ストレスに対して、抗酸化ビタミン、微量元素、ポリフェノールなどの抗酸化物質を配合した栄養剤も数多くみられる。これらの抗酸化成分は生体内分子の保護による臓器障害の軽減をもたらすことから、免疫賦活栄養法の一つと考えられている。

欧米では 1989 年にインパクト[®] が市販され、数多くの臨床試験に使用され、多くの無作為対照比較試験が報告されている⁵⁾。国内においては、2002 年にインパクト[®] が市販され、免疫賦活経腸栄養剤による栄養が行われるようになり、また 1999 年には *n*-3 系脂肪酸を強化し、*n*-6 系/*n*-3 系脂肪酸比を考慮したラコール[®] が医薬品として使用可能となった。最近ではポリフェノールを含有したアノム[®] が市販された。現在、各種病態に配慮した経腸栄養剤も数多く開発されて市

販されている。これらの栄養剤はそれぞれに特徴を有しているが、個体差の存在を考慮した場合、病態に最適な栄養剤を択一することは容易ではなく、また各栄養剤の有用性を評価した報告はみられない。

我々は術前の栄養管理において頻用されている栄養剤の栄養学的意義を検討し、栄養剤を選択する際の指標を探索することを目的に本研究を行った。栄養剤の特性を検討するため、各栄養剤の抗ラジカル活性を測定し、栄養剤間で比較した。また栄養剤の経口摂取による健常者および消化器癌患者の抗酸化特性並びに血液生化学検査に及ぼす効果について比較検討を行った。

方法

1. 経腸栄養剤の抗ラジカル活性の測定

臨床的に比較的使用頻度が高い栄養剤または配合組成に特徴を有する免疫賦活経腸栄養剤の中から、アノム[®] (株式会社大塚製薬工場)、インパクト[®] (味の素株式会社)、メイン[®] (株式会社明治)、ラコール[®]NF 配合経腸用液 (イーエヌ大塚製薬株式会社) を選択し、試験の対象とした。ラコール[®]NF 配合経腸用液 (以下、ラコール[®]NF と示す) は保険規制上は医薬品に分類されるが、それ以外の上記栄養剤は食品に分類される。これらの栄養剤について、スーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$) 及びヒドロキシルラジカル ($HO\cdot$) の抗ラジカル活性を測定し、栄養剤間で比較した。栄養剤の $O_2^{\cdot-}$ 及び $HO\cdot$ 活性測定時の標準物質として、それぞれスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 及びアスコルビン酸を用いた。標準物質添加後の各ラジカルに対する阻害曲線から、ラジカルの最大活性の 50% に相当する IC_{50} を算出し、抗ラジカル活性を求めた。

2. 健常者を対象とした経腸栄養剤による血中フリーラジカルの変化

被験者は、20 歳以上 30 歳以下の健常者とし、性別は不問とした。さらに 1) BMI (Body Mass Index) が 18.5 以上 25 未満であり、2) 文書による同意が得られた者であること、の各条件を満たす者とした。除外基準として、1) 疾患治療のために薬物療法 (内服、外用) を受けている、2) 医師により経過観察が必要と診断されている何らかの疾患がある、3) 何らかの外傷を負っている、4) 牛乳タンパクと大豆タンパクによるアレルギーの既往がある、5) 喫煙者、を設定した。

被験者には 4 種の栄養剤 (アノム[®]、インパクト[®]、メイン[®]、ラコール[®]NF) のいずれか 1 種類を無作為

に割り付け、200 mL を空腹時に経口投与した。採血は栄養剤投与前及び投与 15、30、60、90、120 分経過時に行い、それぞれの血中フリーラジカルを測定し、比較した。栄養剤投与前の採血は、試験前日夜の食事摂取以降、8 時間以上の絶食下に実施した。被験者に対しては試験前日の夜、食後から試験開始までの間は水の摂取のみ可とした。栄養剤投与後の採血は、投与終了時から経時的に実施した。採血は前腕静脈より 1 mL を採取し、遠心分離して得られた血漿を測定試料として用いた。

3. 消化器癌患者における栄養剤投与前後の血中フリーラジカル及び血液生化学検査値の変化

社会保険宮崎江南病院に手術目的に入院した消化器癌患者を対象とした。栄養剤の投与開始前及び栄養剤を 7 日間連日、経口投与した後の血中フリーラジカルをそれぞれ測定した。栄養剤は、当該施設において味覚や流動性の観点から日常診療で患者の摂取状況が良好なメイン[®]を選択して試験に用いた。メイン[®]は、ホエイペプチド、EPA を含有する免疫調整栄養剤であり⁶⁾、患者には通常の食事に加えてメイン[®]を投与した。採血は患者の前腕静脈より行い、血漿を試料とした。栄養剤投与後の採血は、7 日間連日投与した後、消化器癌切除術が施行される当日の朝に実施した。採血はいずれも 8 時間以上の絶食下で行った。

4. フリーラジカルの測定

栄養剤の抗ラジカル活性は、購入した栄養剤を試料として O₂^{·-}及び HO[·] を測定した。血中フリーラジカルは、経腸栄養剤を経口投与した後、採血により得られた血漿を試料として、血中脂質ペルオキシラジカル (*t*-BuOO ラジカル：*t*-BuOO[·]) を測定した。測定は電子スピン共鳴法 (JES-FR30EX：日本電子社) によって行い、スピントラップ剤として DMPO または DPPMPO を使用した^{7,8)}。

各群間のデータの比較は、Wilcoxon *t*-test または Mann-Whitney U test により検定した。解析には Excel 2010 (Microsoft) を用い、有意水準は *p* < 0.05 とした。

本研究は、九州保健福祉大学倫理審査委員会及び社会保険宮崎江南病院医療倫理委員会による承認を得て実施した。

結果

1. 栄養剤の抗ラジカル活性

栄養剤の O₂^{·-} 消去活性は、大きい順に、ラコール[®]NF、アノム[®] > メイン[®] > インパクト[®] であった。HO[·] 消去活性は、同様に、アノム[®] > ラコール[®]NF > メイン[®] > インパクト[®] であった。O₂^{·-} 及び HO[·] の最大活性の 50% (IC₅₀) に相当する各栄養剤の用量を図 1 に示した。また、各栄養剤の O₂^{·-} 及び HO[·] の消去活性の指標として、それぞれ SOD (1 U/mL) 及びアスコルビン酸 (100 μM) に相当する栄養剤の用量を表 1 に示した。

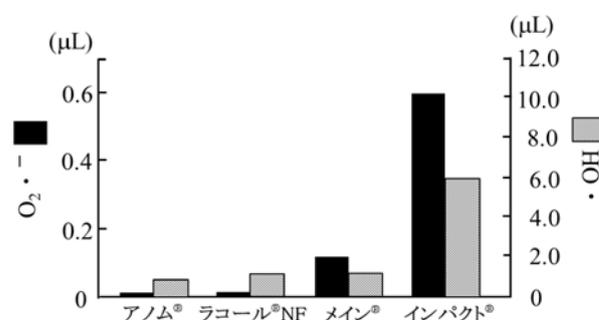


図 1 O₂^{·-} 及び HO[·] の最大活性の 50% (IC₅₀) に相当する各栄養剤の用量 (μL)

	SOD (1 U/mL)	アスコルビン酸 (100 μM)
アノム [®]	0.07	3.5
インパクト [®]	4.48	25.2
メイン [®]	0.88	8.3
ラコール [®] NF	0.07	4.8

表 1 SOD (1 U/mL) 及びアスコルビン酸 (100 μM) に相当する栄養剤の用量 (μL)

SOD：スーパーオキシドジスムターゼ

2. 健常者における栄養剤投与後の血中フリーラジカルの変化

各栄養剤について 10 名の健常者を対象に、栄養剤 200 mL を経口投与した。被験者のプロフィールを表 2 に示す。なお、各栄養剤は 1 mL = 1 kcal の熱量に相当する。BMI は、各群間で有意差はみられなかった。血中フリーラジカルは、栄養剤を投与した時点 (0 分) を 1.0 とし、投与 15、30、60、90、120 分経過時の値はその相対値として示した。血中フリーラジカルは経時的に変動がみられ、個体間でも変動がみられた (表 3)。メイン[®]は、投与後 60 分で有意に血中フリーラジカルを減少させた (*p* < 0.01)。このフリーラジカル消去効果は投与後 120 分においても、有意差はみられ

なかったが、持続して観察された。インパクト®及びアノム®は、投与後いずれも血中フリーラジカルを徐々に減少させ、投与後 90 分または 120 分において有意に減少させた。ラコール®NF は投与後、血中フリーラジカルの変化に有意な変化をもたらさなかった。

	アノム®	インパクト®	メイン®	ラコール®NF
n (男性/女性)	10 (4/6)	10 (5/5)	10 (5/5)	10 (6/4)
年齢(歳)	22.3±2.1	22.2±1.3	22.5±1.7	23.3±5.3
BMI	20.7±1.9	20.2±2.4	21.4±1.4	23.3±3.0

表 2 経腸栄養剤投与群における被験者(健常者)のプロファイル

年齢及び BMI の数値は平均 ± 標準偏差で示している。
BMI (body mass index): 体重 kg / (身長 m)²

栄養剤	栄養剤投与後の時間経過(分)				
	15	30	60	90	120
アノム®	0.99±0.05	0.97±0.05	0.96±0.06	0.94±0.07	0.94±0.05*
インパクト®	0.97±0.08	1.00±0.05	0.96±0.06	0.95±0.06*	0.93±0.06**
メイン®	0.99±0.05	1.01±0.12	0.92±0.05**	0.92±0.08*	0.93±0.08
ラコール®NF	0.99±0.08	1.00±0.09	0.97±0.10	0.97±0.08	0.98±0.11

表 3 経腸栄養剤の経口投与による血中フリーラジカルの経時の変化

数値は投与直前 (control : 0 分) の血中フリーラジカルを 1.0 としたときの相対値 (平均 ± 標準偏差) で示している (各栄養剤群 n=10)。

*p<0.05 vs control, **p<0.01 vs control

3. 患者症例における栄養剤投与後の血中フリーラジカル及び血液生化学検査値の変化

メイン®を経口投与した消化器癌の入院患者 10 名を対象とした。男性 9 名、女性 1 名であり、64 ~ 81 歳 (平均 70 歳) であった。血中フリーラジカルの測定を行った患者はこのうち 7 名であり、67 ~ 81 歳 (平均 72 歳、男性 6 名、女性 1 名)、胃癌、直腸癌、腭頭部癌の患者であった。この 7 名の患者について、1 日当たりの総投与熱量は約 1800 kcal であり、うち約 30% (23% ~ 38%) 相当量はメイン®によって投与された。7 名の患者に対してメイン®を 7 日間投与した結果、投与前と比較して血中フリーラジカルは平均で約 6.4% 減少したが、有意な減少ではなかった (図 2)。

10 名の患者に対してメイン®を 7 日間投与して観察された血液生化学検査値の変化において、白血球数は有意に増加を示した (表 4)。

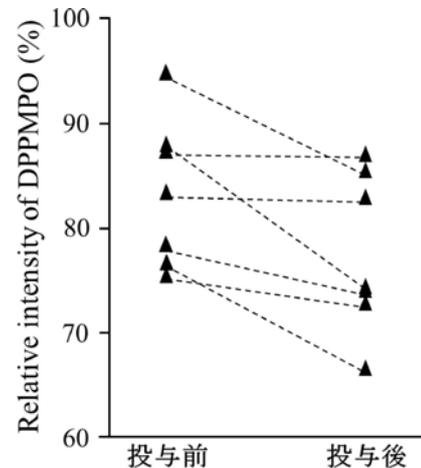


図 2 消化器癌患者におけるメイン®投与前後の血中フリーラジカルの変化

血液生化学検査値	投与前	投与後	有意差 p 値
トランスサイレチン (mg/dL)	27.2±6.2	26.5±6.7	0.407
アルブミン (g/dL)	4.3±0.4	4.0±0.5	0.145
リンパ球数 (10 ³ /mL)	16.1±3.0	18.4±3.8	0.083
白血球数 (10 ³ /mL)	54.2±11.4	61.7±10.2	0.007

表 4 消化器癌患者におけるメイン®投与前後の血液生化学検査値の変化

投与前及び投与後の数値は、平均 ± 標準偏差で示している。
有意差 : Wilcoxon t-test による検定 (n=10)

考察

経腸栄養剤は、静脈栄養に比較して生理的であり、カテーテル感染などの重篤な合併症が少ないことが利点である。また経腸栄養は腸粘膜の委縮を防止する効果もあることから、栄養療法において重要な位置づけとなっている。術前・術後に免疫賦活経腸栄養剤を用いた早期経腸栄養を行うと、術後感染症を 50% 減少させるとの報告が米国のメタ解析により示されている⁵⁾。日本国内でも同様の報告があり、さらに栄養障害のない症例においては、術前投与でも同等の効果が期待されている^{9, 10)}。しかし重篤な症例においては、アルギニン含有した免疫賦活経腸栄養剤は投与すべきでないとする見解もある¹¹⁾。このように、病態によって免疫賦活経腸栄養剤の使用基準や見解は異なる。さらに経腸栄養剤は、一般的な医薬品とは異なり、複合成分による製剤あるいは食品であるため、含有される各成分の薬理学的作用によって期待される効果を評価することが困難である。

本研究では経腸栄養剤を選択する際の指標を探索する目的で栄養剤の抗酸化活性を検討した。経腸栄養剤

の抗ラジカル活性の比較では、ラコール®NF及びアノム®は抗ラジカル活性が大きく、両者の抗酸化効果は同程度と考えられた。メイン®は、最も抗ラジカル活性の強かったアノム®と比較すると、 $O_2\cdot^-$ において約8%、 $HO\cdot$ において約42%に相当する抗ラジカル活性を示した。

栄養剤によって各成分の含有量や配合組成は異なるが、抗酸化成分に着目すると、各栄養剤に共通してビタミンC、ビタミンE、*n*-3系脂肪酸(EPA、DHA)、微量元素(鉄、亜鉛、銅、マンガン、セレン)が含まれている。アノム®においてはこれ以外にポリフェノール(カテキン、プロアントシアニン)が含まれているのが特徴である。その中でビタミンCの含有量は、アノム®:1 mg/mL、インパクト®:0.095 mg/mL、メイン®:0.5 mg/mL、ラコール®NF:0.28 mg/mLであり、ビタミンCの含有量は抗ラジカル活性を左右する一因子となっていることが推察された。

抗酸化成分は生体内でそれぞれ酸化還元反応に寄与し、血中フリーラジカルの個体内変動や個体間変動をもたらす原因になると考えられる。 $O_2\cdot^-$ は生体内で比較的多量に産生されるが酸化力は弱いと考えられている。特に核酸と反応することが知られているが、ラジカルとしての反応性は低いため、酸化的傷害において重要な寄与は少ないと考えられる。一方、 $HO\cdot$ の寿命は100万分の1秒と極めて短い、酸化力は強く、酵素タンパク質や細胞骨格タンパク質、脂質、糖質、核酸などと反応することが知られている。 $HO\cdot$ は、特に脂質に対して連鎖的過酸化反応を示す。このことから、栄養剤の抗酸化効果を反映する指標としては抗 $O_2\cdot^-$ 活性よりも抗 $HO\cdot$ 活性が優位にあると考えられる。

健常者に対する栄養剤の単回投与試験において、アノム®、インパクト®、メイン®は、投与後90分または120分まで、経時的に血中フリーラジカルを減少させたことから、病態治療において、栄養剤の繰り返し投与は血中フリーラジカルの消去能をさらに増大させることが推察される。また、*n*-3系脂肪酸は生体内での過剰な炎症反応や臓器傷害に対する抑制効果を有すると考えられるが、細胞膜への取り込みは緩徐であるため、投与後の短時間内での効果発現は期待できない。このことから、*n*-3系脂肪酸の効果を得るには本成分を含む栄養剤を連日投与することが必要と考えられ、術前からの繰り返し投与が有用と考えられる。

消化器癌の入院患者において、メイン®の連日(7日間)投与後のフリーラジカルは、投与前と比較すると減少したが(図2)、個体間変動が大きく、有意な減少

ではなかった。またメイン®の連日投与により、白血球数は有意に増加し($p < 0.007$)、リンパ球数は微小に増加したことから、メイン®はDNA損傷や組織損傷に対して防御的に作用して抗炎症効果を発現するとともに⁶⁾、免疫能を増強する効果があることが推察された。

結論

経腸栄養剤の抗 $O_2\cdot^-$ 活性及び抗 $HO\cdot$ 活性は、栄養剤によって異なり、これらの抗ラジカル活性は栄養剤固有の抗酸化特性を示した。また、経腸栄養剤に含有されているビタミンC含量は抗ラジカル活性に影響を及ぼすことが推察された。経腸栄養剤が示す抗ラジカル活性及び健常者における血中フリーラジカルの変化特性は、患者における抗酸化効果や臨床効果を直接的に反映しているものではないが、患者病態に適した栄養剤を選択する際の指標として有用と考えられた。

参考文献

- 1 Gallagher-Allred C.R., Voss A.C., Finn S.F., et al.: Malnutrition and clinical outcomes: the case for medical nutrition therapy. *J Am Diet Assoc.* 96: 361-366, 1996.
- 2 American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.) Board of directors: Guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adult and pediatric patients. *JPEN.* 17(suppl): 1SA-4SA, 1993.
- 3 ASPEN committee, Consensus recommendations from the U. S. summit on immune-enhancing enteral therapy. *JPEN.* 25: S61-S63, 2001.
- 4 Weimanna A., Bragab M., Harsanyic L., et al.: ESPEN guidelines on enteral nutrition: Surgery including organ transplantation. *Clinical Nutrition.* 25, 224-244, 2006.
- 5 Heyland D.K., Novak F., Drover J.W., et al.: Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence, *JAMA.* 286: 944-953, 2001.
- 6 Nakamura K., Ogawa S., Dairiki K., et al.: A new immune-modulating diet enriched with whey-hydrolyzed peptide, fermented milk, and isomaltulose attenuates gut ischemia-reperfusion

- injury in mice. *Clinical Nutrition*. 30, 513-516, 2011.
- 7 Miyamoto Y., Iwao Y., Tasaki Y., et al.: The uremic solute indoxyl sulfate acts as an antioxidant against superoxide anion radicals under normal-physiological conditions. *FEBS Lett.* 584, 2816-2820, 2010.
 - 8 Sato K., Tashiro Y., Chibana S., et al.: Role of lipid-derived free radical in Bleomycin-induced lung injury in mice: Availability for ESR spin trap method with organic phase extraction. *Biol. Pharm. Bull.* 31: 1855-1859, 2008.
 - 9 福島亮治, 齊藤英昭: 待機手術患者に対する術前 Immunonutrition の効果—我が国における成績の解析. *静脈経腸栄養*, 20 (増刊号) : 151, 2005.
 - 10 Gianotti L., Braga M., Nespoli L., et al.: A randomized controlled trial of preoperative oral supplementation with a specialized diet in patients with gastrointestinal cancer. *Gastroent.* 122: 1763-1770, 2002.
 - 11 Heyland D.K., Dhaliwal R., Drover J.W., et al.: Canadian clinical practice guidelines for nutrition support in mechanically ventilated, critically ill adult patients. *JPEN.* 27: 355-373, 2003.