

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：15401
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2010 ～ 2011
課題番号：22791283
研究課題名（和文） 消化管術後における IL-22 産生ナチュラルキラー細胞の機能解析と臨床的意義
研究課題名（英文） The clinical role and functional analyses of interleukin 22-producing NK cells in the peri-operative periods after gastrointestinal surgery.
研究代表者 徳本 憲昭（TOKUMOTO NORIAKI） 広島大学・病院・病院助教 研究者番号：90564980

研究成果の概要（和文）：

上部消化管吻合ラットモデルを作成し、吻合部bursting pressure、腹壁創skin wound breaking strengthを測定すると、著しい個体差を認めた。フローサイトメトリーでリンパ球解析を行ったところ、経口摂取不能なラットでは肝還流液中リンパ球数の著しい低下ならびにフェノタイプ変化を認め、個体差には免疫反応変化も関与していると思われた。絶食環境下（3日間）における免疫応答反応変化をマウスで検討した。絶食によりNKT細胞分画は増加、NK細胞では分画に変化は認めなかったがTRAILやCD69の活性化マーカー発現増加を認め、絶食により自然免疫反応増強が引き起こされることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Using our post-operative rat model, we performed anastomosis bursting pressure (ABP), skin wound breaking strength (SWBS). The results showed strong individual differences. The flow cytometric analyses of liver mononuclear cells (LMNC) showed sharp decrease and phenotype changes of lymphocyte cells in the rats those could not eat chows. We think the immune reactive changes in fasting status cause the individual differences of ABP and WSBS. Therefore we checked mice immune reactive changes from 3-days fasting by flow cytometer. In fasting status, the rate of NKT cells is increase. Although there is no change in the rate of NK cells, we find the up-regulation of TRAIL and CD69, these are activation markers of NK cells. These results show that fasting is able to activate the innate immune reaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胃十二指腸外科学、NK細胞、創傷治癒、免疫学、栄養管理、絶食

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

最近、消化管粘膜に内在する IL-22 産生 NK 細胞が炎症過程と抗炎症性過程の間で免疫系のバランスを維持することで、細胞増殖と創傷治癒を促進することが証明され、免疫学のトピックスとなった。当教室の外科免疫研究グループでは、消化管由来 IL-22 産生 NK 細胞の同定を行い、絶食マウスで IL-22 産生 NK 細胞が減少していることを確認した。本研究では、上部消化管術後ラットモデルを作成し、術後の経腸栄養が IL-22 産生 NK 細胞機能に与える影響を解析し、吻合部局所での創傷治癒と生体防御機構を改善し得る栄養管理法を検討することを目的とする。

外科手術の周術期栄養管理は EBM (evidence based medicine) により劇的に変化を遂げ、現在では消化管吻合を伴わない実質臓器に対する手術後は早期に経口摂取が開始される。消化管吻合術後症例に対しても経口摂取の開始は早期化され、特に下部消化管術後においては早期経口・経腸栄養の開始が吻合部の創傷治癒に好影響を与えることが判明した。しかし上部消化管術後に対しては、術後早期に吻合部へ直接物理的な刺激が加わることから縫合不全を惹起する可能性を懸念され、報告は非常に少ない。ラットに対し空腸吻合術を行い、高カロリー輸液を経中心静脈経路で投与した群と、胃瘻から経腸的に投与した群に振り分け、吻合部 bursting pressure、collagen 濃度を検討し、ともに経腸栄養群で良い結果であったとの報告がある。しかし経腸栄養による消化管治癒の改善のメカニズムは未だ解明されていない。

(2) 本研究の着想に至った経緯

創傷治癒には炎症細胞が関与していることが分かっている。消化管術後に縫合不全を起こした症例で、その後吻合部狭窄を起こす症例を経験する。過度の炎症反応により狭窄をきたしていることが予想された。また前述の当教室の研究結果より、生体防御・自己免疫に関わる消化管由来 IL-22 産生 NK 細胞が絶食マウスで減少していることが判明した。

以上のことから、術後の絶食期間や栄養管理法が吻合部創傷治癒遅延に関与するのではないかと考え本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

消化管粘膜に内在する IL-22 産生ナチュラルキラー (NK) 細胞が生体防御反応を制御するとともに抗炎症機構と創傷治癒にも関わっていることが明らかとなり、免疫学のトピックスとなっている。一方、消化管術後の栄養管理における早期経口摂取の開始が推奨されているものの、創傷治癒や生体防御機構にどのような影響を及ぼしているのか未だ解明されていない。特に、上部消化管術後に対する経口摂取開始時期の検討は、吻合部へ直接物理的な刺激が加わることから縫合不全を惹起する可能性が懸念され、未だ十分に行われていない。ごく最近我々は、摂食障害により消化管における IL-22 産生 NK 細胞の機能低下を来すことを確認した。本研究では、上部消化管術後ラットモデルを作成し、術後の経腸栄養が IL-22 産生 NK 細胞機能に与える影響を解析し、局所での創傷治癒と生体防御機構を改善し得る栄養管理法を検討する

(1) 何をどこまで明らかにするか

上部消化管術後に対する最良の周術期栄

養管理を解明し、IL-22 産生 NK 細胞の吻合部創傷治癒への関与を証明する。

上部消化管術後ラットモデルを作成し、中心静脈栄養群、経腸栄養群、更に両群を高カロリー群、低カロリー群の 4 群に振り分け、吻合部に与える影響を検討する。また同モデルの閉腹創で創傷治癒に関しても検討を行う。吻合部、腹壁を同じラットで解析することにより吻合部特有の創傷治癒機転を解明する。更に創傷治癒に至適な摂取カロリー量、投与経路を明らかにする。

引き続き L-アルギニン、グルタミンなど必須アミノ酸投与が創傷治癒を促進するとの報告もあり、本研究においても検討する。アミノ酸添加が創傷治癒に与える変化を解明する。更にアミノ酸添加は術後炎症反応低下させると報告され、免疫反応との関連を認める。本研究では、ラットの腸管・吻合部粘膜より IL-22 産生 NK 細胞数を測定し、創傷治癒・炎症反応との関連を解明する。

この研究により実臨床での消化管術後周術期管理を経験的管理からのみならず、そのメカニズムを解明した学術的管理へと変える。

(2) 研究の学術的な特色・独創的な点及び

予想される結果と意義

上部消化管術後の周術期栄養管理は外科医の感覚的・経験的主感により決定していた。本研究では至適摂取カロリー量、至適投与経路、ならびにアミノ酸添加の有無が創傷治癒に与える影響を解明し、周術期栄養管理を学術的に行うための研究である。

また消化管術後周術期栄養管理と、腸管免疫を司る腸管粘膜由来 IL-22 産生 NK 細胞との関連を調べる点で独創的である。

本研究から経腸栄養を早期に開始することの有効性が証明されることが予想され、術

後絶食期間が短縮されると思われる。結果入院期間も短縮され、医療経済学的にも有意義な研究になると信じている。

3. 研究の方法

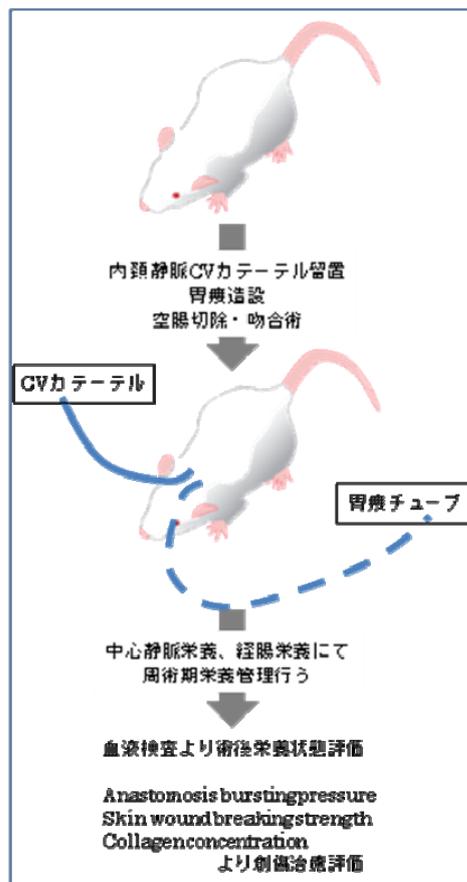
(1) 上部消化管切除・吻合モデルの確立

ならびに評価方法の確立

ラット(ex. Sprague-Dawley rats)を用い、全身麻酔下に内頸静脈にカテーテル留置、開腹下に胃瘻造設を行う。その後空腸切除・吻合術を施し、中心静脈カテーテル・胃瘻チューブを皮下トンネル作成し固定する。その後中心静脈栄養群、経腸栄養群に振り分け周術期管理を行う。術後1日目、3日目、5日目、7日目に犠牲死させ、下記に示す評価項目を測定する。

① 血液検査

周術期栄養状態を評価



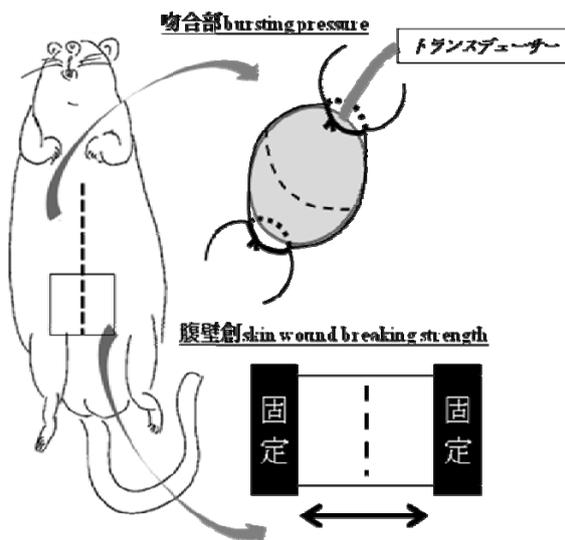
②吻合部 bursting pressure

吻合部周囲を剥離、周囲癒着組織を除去、バルーンカテーテルを腸管内挿入する。バルーンが吻合部にかかるように固定、生食をバルーンに注入し圧トランスデューサーで測定を行う。吻合部破裂直前の最高圧を bursting pressure とする。

③腹壁創 skin wound breaking strength

腹壁創を一部とり、創を開く力を加える。哆開直前の力を skin wound breaking strength とする。

④病理組織学的検討・フローサイトメトリー



吻合部・創部を病理組織学的に検討し、血管新生増加、炎症所見の程度、線維芽細胞の増生など創傷治癒に関与する因子を検討する。

更に正常・吻合部腸管粘膜をすり潰し、IL-22 産生 NK 細胞の検出を行い比較・解析を行い吻合部創傷治癒における IL-22 産生 NK 細胞の役割を解明する。

(2) 腸管吻合部の創傷治癒を促進させる 周術期栄養管理の検討

確立された上部消化管切除・吻合モデルで投与カロリー/経路を変更し、創傷治癒に与える影響を比較する。

①カロリーの摂取量、投与経路が吻合部

あるいは創傷治癒に与える影響の検討

経中心静脈/経腸、高/低カロリーの4群に振り分け検討する。

吻合部/腹壁創を同じ個体で検討することが可能であり、この検討により創傷治癒に最良の投与カロリーが明らかとなり、吻合部創傷治癒を促進する投与経路が明らかとなる。

②必須アミノ酸などの有用性

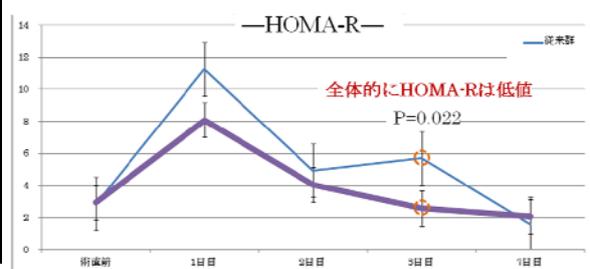
創傷治癒促進や免疫反応関与とされる L-アルギニンやグルタミンなど条件付き必須アミノ酸を添加し、創傷治癒に与える影響を検討する。

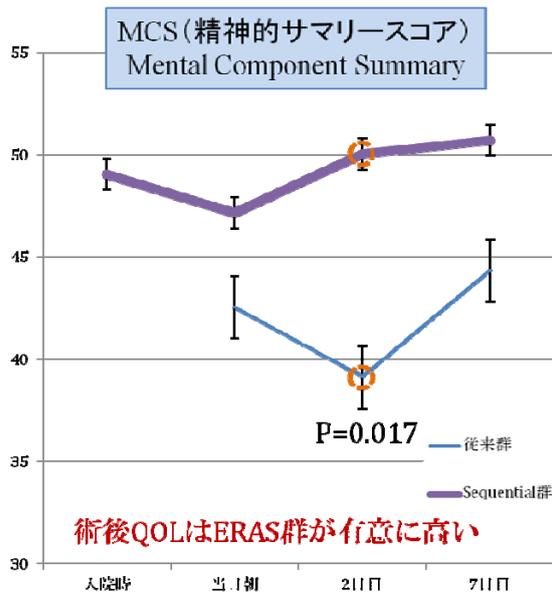
4. 研究成果

(1) 実臨床での検討

近年各消化器外科手術において確立された ERAS (Enhanced Recovery After Surgery) プログラムを、当科でも胃切除症例に対し導入しその有用性を検討した。

結果：早期経口摂取を再開することで周術期栄養指標に変化は認めなかったが、周術期インスリン抵抗性の改善や患者 QOL の改善に寄与した。





現在この結果をもとに、当科では ERAS プログラムの臨床試験を展開している。

(2) 上部消化管切除・吻合モデルの確立 ならびに評価方法の確立

2010 年の研究結果により吻合部 bursting pressure (ABP)、腹壁創 skin wound breaking strength (SWBS) の測定時期は術後 5 日目が最適と判明した。しかし予備実験を重ねていくに従い手術手技や標本摘出手技により著しく結果が異なることが明らかとなった。

	平均	min	max
ABP (mmHg)	123.4	54.3	203
SWBS (g)	313.4	158.5	600

フローサイトメトリーにより腸管粘膜中リンパ球を検出するとともに肝還流液中リンパ球の解析を行ったところ、経口摂取が不可能であったラットの肝還流液中のリンパ球数の著しい低下ならびにフェノタイプの変化を認めた。

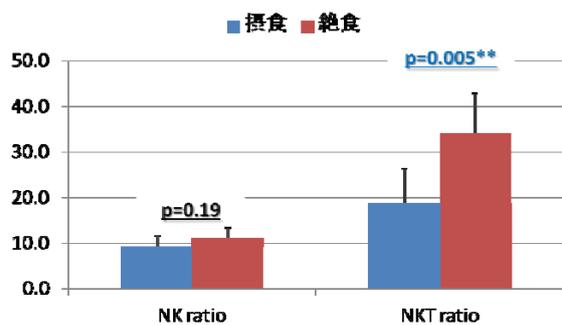
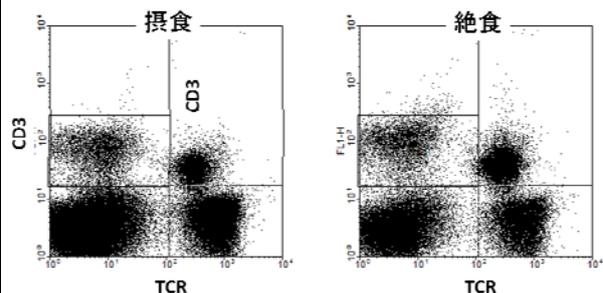
個体差が著しい理由が手技的問題のみが原因であるのではなく、経口摂取困難に伴う免疫反応変化が関与していると思われた。手技の安定化を図るとともに、絶食環境下におけ

る免疫応答反応の変化を検討する目的に、マウス (B6) を用い絶食下での肝還流液中 NK・NKT 細胞の発現変化を確認した。

(3) 絶食に伴う免疫反応変化の検討

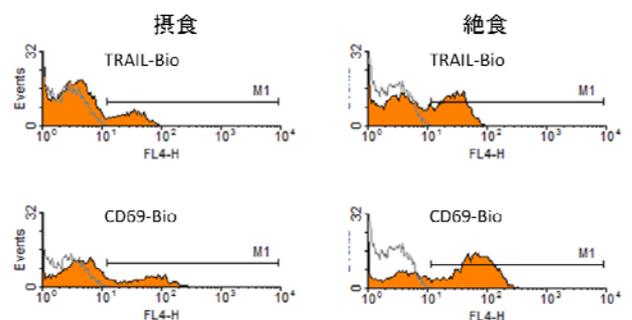
絶食 (3 日間) により NKT 細胞分画は増加、NK 細胞では分画に変化は認めなかった。

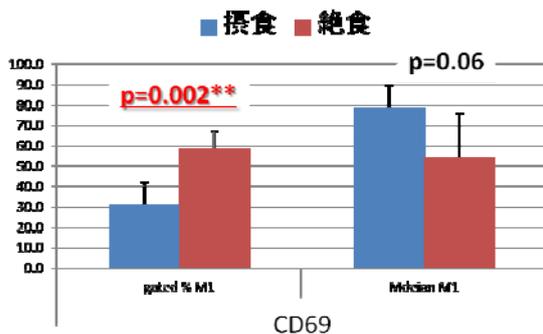
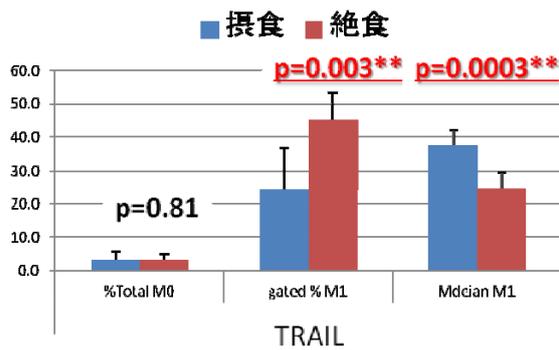
—絶食(3日間)により肝内リンパ球分画に変化が起こる—



NK 細胞分画に変化は認めなかったが、TRAIL や CD69 の活性化マーカー発現増加を認め、絶食により自然免疫反応増強が引き起こされることが明らかとなった。

—絶食(3日間)によりNK細胞活性化に変化が起こる—





今後はこの結果を踏まえ、絶食によるNK細胞の活性化が生体防御に必要な反応であるものなのか、非特異的炎症を起こす過剰免疫反応につながるのか検討を行うとともに、絶食とNK細胞活性化のメカニズムについても解明を行う。この活性化をコントロールすることにより周術期の免疫反応を制御することができる可能性が高いと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 徳本憲昭、胃切除症例に対するERASプロトコルの有用性、第66回日本消化器外科学会総会、2011年7月14日、名古屋
- (2) 徳本憲昭、当院における胃切除症例におけるERASプロトコルの導入、第13回広島食道専門疾患研究会、2011年1月25日、広島
- (3) 徳本憲昭、胃切除術後症例に対するERASプロトコル導入への取り組み、第83回胃癌学会総会、2011年3月4日、青森
- (4) 徳本憲昭、当科におけるERASプロトコルへの取り組み、第40回胃外科・術後障害研究会、2010年11月19日、東京
- (5) 徳本憲昭、胃切除症例におけるERASプロトコルの安全性・有用性の検討、第111回日本外科学会定期学術集会、2011年紙面発表

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
徳本 憲昭 (TOKUMOTO NORIAKI)
 広島大学・病院・病院助教
 研究者番号：90564980