

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790752

研究課題名（和文） 漢方薬によるマウス大腸炎の治療効果を評価できる ^{13}C 酪酸注腸呼気試験の確立研究課題名（英文） ^{13}C -butyrate breath-test is a new non-invasive method for assessing colitis in murine model

研究代表者

遠藤 真理 (ENDO MARI)

北里大学・東洋医学総合研究所・上級研究員

研究者番号：60296829

研究成果の概要（和文）：デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) の投与濃度依存的に炎症の程度が重くなり、 $^{13}\text{CO}_2$ 排出量が減少していることが示され、炎症程度と呼気試験結果との間に有意な相関を認めた。また、 ^{13}C 酪酸注腸呼気試験はトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘発マウス大腸炎も含めたマウスの大腸炎の炎症の有無を評価出来ることが示唆された。大腸炎に使用される漢方薬で DSS マウス大腸炎の炎症改善とともに $^{13}\text{CO}_2$ 排出も改善した。以上のことから、マウス大腸炎における ^{13}C 酪酸注腸呼気試験は、マウス大腸炎の病態や漢方薬を含めた治療薬の有効性を反映した実験方法であることが示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we showed for the first time that ^{13}C -butyrate breath-test is well correlated with parameters commonly used for assessing inflammatory phase of Dextran sodium sulphate (DSS)-induced murine colitis. Because excretion of $^{13}\text{CO}_2$ in trinitro benzene sulfonic acid (TNBS)-induced murine colitis was significantly lower than those of the normal mice, we confirmed that various types of murine colitis could be assessed by ^{13}C -butyrate breath-test. Moreover, we have demonstrated the recovery of $^{13}\text{CO}_2$ excretion after the administration of Kampo medicine. Our data suggest that ^{13}C -butyrate breath-test might reflect therapeutic efficacy of Kampo medicine in DSS-murine colitis. In conclusion, ^{13}C -butyrate breath-test is newly established, non-invasive method for assessing murine colitis. It may provide real-time information on colonic inflammation, so it may be a useful tool in research on experimental colitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学一般

キーワード：東洋医学、呼気試験、潰瘍性大腸炎、漢方薬、DSS マウス大腸炎、 ^{13}C 酪酸

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎患者において、 ^{13}C 酪酸の注腸後代謝され呼気中に排出される $^{13}\text{CO}_2$ の増減により病状の改善や炎症の程度を評価出来ることが報告されている。デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) マウス大腸炎の大腸細胞では、 ^{14}C 酪酸を用いた in vitro での実験系で、マウス大腸炎の病態と酪酸の分解の欠如が

関係していることが報告されている。しかし、 ^{13}C 酪酸注腸呼気試験による非侵襲的な方法での検討はされていない。

2. 研究の目的

DSS 大腸炎マウスに ^{13}C 酪酸を注腸して呼気試験による in vivo での酪酸代謝が炎症の程度と漢方薬による炎症の改善を反映する

のかどうかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 異なる濃度のDSSでマウスに大腸炎を惹起させ¹³C 酪酸を注腸して呼気試験を行い酪酸の代謝変化を評価した。

(2) 呼気試験後解剖し、炎症程度の違いを病理組織学的観察によるスコア、大腸全長、MPO活性を指標として評価した。

(1)、(2)の検討からDSSマウス大腸炎において炎症の程度が酪酸代謝と関連しているのかどうかを検討した。

(3) トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)マウス大腸炎においても酪酸代謝により炎症の評価が可能か否かを検討した。

(4) 大腸に炎症がおこっていないオイルマスタード(OM)マウス過敏性腸症候群では酪酸代謝に変化がないことを確認し、大腸炎特異的な評価方法であるのかどうかを検討した。

(5) DSSマウス大腸炎に有効な漢方薬と大腸炎を改善しない漢方薬をそれぞれ経口投与し、¹³C 酪酸を注腸して呼気試験を行い酪酸の代謝変化を評価した。

(6) 呼気試験後解剖し、漢方薬による炎症の改善を病理組織学的観察によるスコア、大腸全長、MPO活性を指標として評価した。

(5)、(6)の検討から¹³C 酪酸呼気試験が大腸炎治療薬に特異的な評価方法であるかを検討した。

4. 研究成果

(1) DSSによる大腸全長、MPO活性、病理所見の炎症に対する影響

正常群に比べ0.25、0.5、0.75%DSS投与群で大腸全長の有意な短縮(図1-A)、0.5、0.75%DSS投与群でMPO活性の有意な増加(図1-B)、DSSの投与で炎症細胞浸潤と腺窩の脱落範囲の有意な増加(図1-C)を認めた。

(2) DSSマウス大腸炎における¹³C 酪酸呼気試験による¹³CO₂排出の変化

¹³C 酪酸注腸呼気試験の結果、0.5、0.75%DSS投与群で、正常群に比べて¹³CO₂排出曲線(図1-D)、累計排出曲線(図1-E)が低下し、Cmax(図1-F)とAUC(図1-G)が有意に減少した。

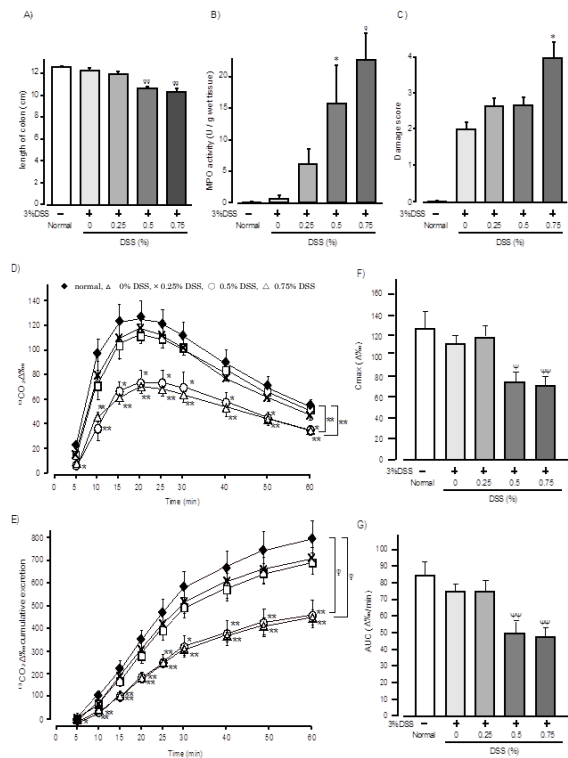


図1. DSS投与による大腸全長、MPO活性、ダメージスコアおよび¹³CO₂排出の変化

(3) ¹³C 酪酸呼気試験と炎症との相関

相関関係を図2に示した。Cmax(図2-A)又はAUC(図2-B)と大腸全長との間に有意な(P<0.001)強い相関を示した。Cmax(図2-C、E)又はAUC(図2-D、F)とMPO活性及び病理組織学的検討によるダメージスコアとの間に有意な(MPO活性; P<0.005, P<0.005、ダメージスコア; P<0.05, P<0.05)相関を示した。

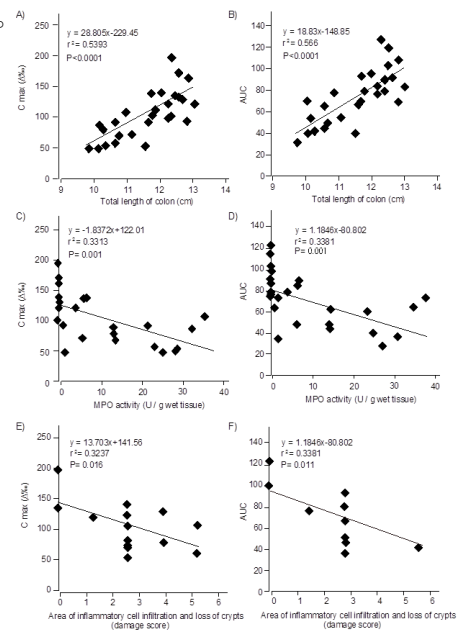


図2. 呼気試験と他の炎症パラメータとの相関

(4) TNBS 誘発マウス大腸炎における炎症所見と ^{13}C 酪酸呼気試験による $^{13}\text{CO}_2$ 排出の変化

TNBS マウス大腸炎では病理組織学的な炎症所見が観察された(図 3-A)。 ^{13}C 酪酸注腸後、TNBS マウス大腸炎では 5 分から 25 分の各時間で $^{13}\text{CO}_2$ 排出量、 $^{13}\text{CO}_2$ 排出曲線が Vehicle 群に比し有意に低下した(図 3-B)。累計 $^{13}\text{CO}_2$ 排出曲線においては変化を示さなかった(図 3-C)。また、TNBS マウス大腸炎で C max と AUC ともに Vehicle 群に比べて有意に低下していた(図 3-D, E)。

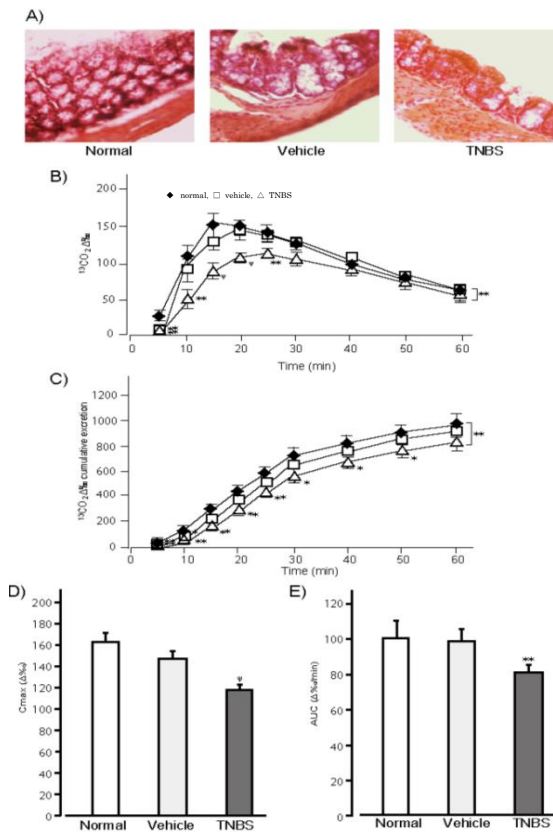


図 3. マウス TNBS 大腸炎における $^{13}\text{CO}_2$ 排出の変化

(5) オイルマスタードマウス過敏性腸症候群における ^{13}C 酪酸呼気試験による $^{13}\text{CO}_2$ 排出の変化

OM マウス過敏性腸症候群では炎症所見は認めなかった(図 4-A)。 ^{13}C 酪酸注腸後、OM マウス過敏性腸症候群では $^{13}\text{CO}_2$ 排出曲線、 $^{13}\text{CO}_2$ 累計排出曲線(図 4-B, C)、C max と AUC(図 4-D, E)ともに Vehicle 群に比べて変化を示さなかった。

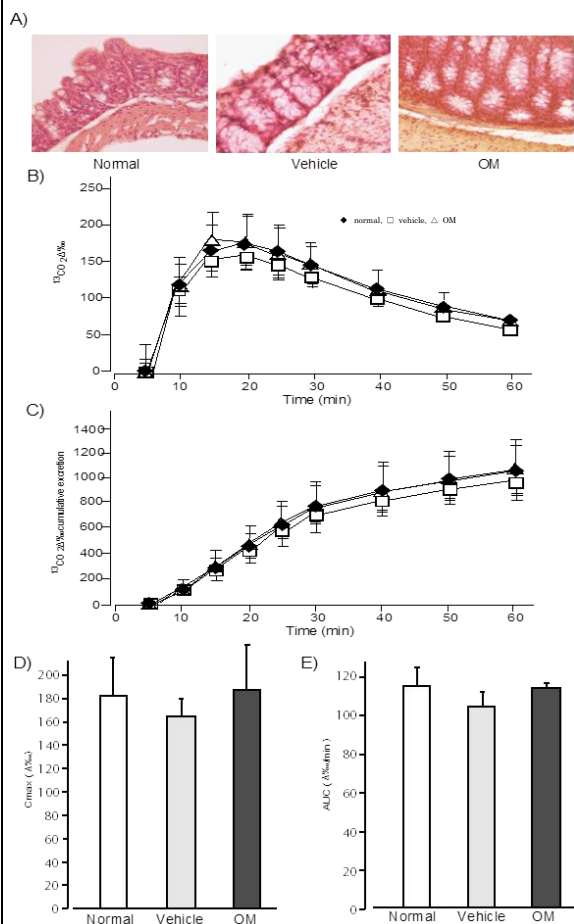


図 4. マウス OM マウス過敏性腸症候群における $^{13}\text{CO}_2$ 排出の変化

(6) DSS 誘発マウス大腸炎における漢方薬の ^{13}C 酪酸呼気試験による $^{13}\text{CO}_2$ 排出に対する影響

SASP を投与すると DSS による大腸全長の短縮、MPO 活性の上昇を有意に抑えて DSS 誘発マウス大腸炎が回復した(図 5-A)。また、SASP を投与すると DSS による $^{13}\text{CO}_2$ 排出曲線と $^{13}\text{CO}_2$ 累積排出曲線の低下がそれぞれ有意に回復した(図 5-B, C)。また、C max は DSS 群に比べて有意差は示さなかったが增加傾向、AUC においては有意に増加した(図 5-D, E)。

さらに、黄連解毒湯、柴苓湯を投与すると DSS による炎症が改善した(図 6-A)。また、黄連解毒湯、柴苓湯を投与すると DSS による $^{13}\text{CO}_2$ 排出曲線の低下が回復した(図 6-B)。

反対に、DSS マウス大腸炎には有効性を示さない香蘇散、半夏厚朴湯の投与では、 $^{13}\text{CO}_2$ 排出に対しても変化を示さなかった。

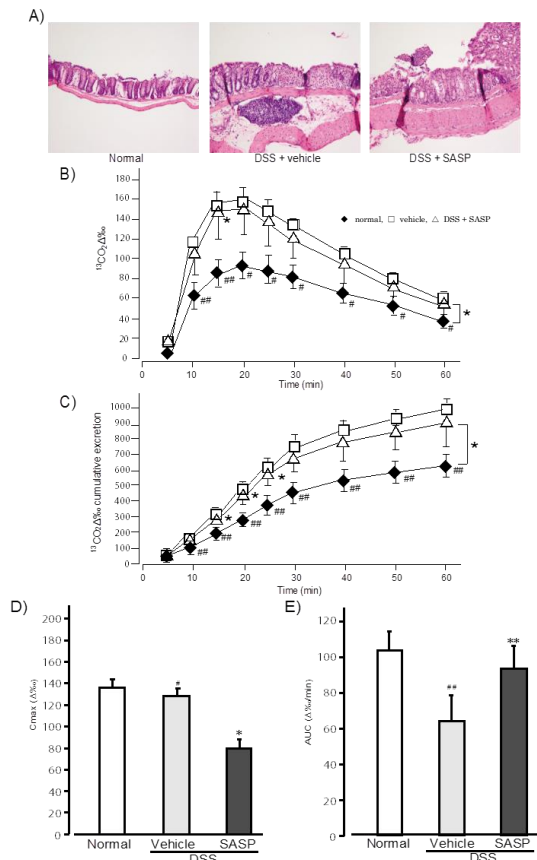


図5. DSS誘発マウス大腸炎におけるサラゾピリンの¹³C酪酸呼吸試験による¹³CO₂排出に対する影響

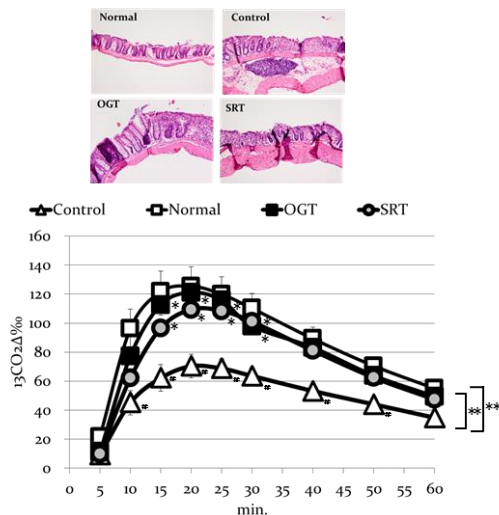


図6. DSS誘発マウス大腸炎における漢方薬の¹³C酪酸呼吸試験による¹³CO₂排出に対する影響

(7) 考察・まとめ

① マウス大腸炎の¹³C酪酸注腸呼吸試験は臨床の潰瘍性大腸炎の病状を反映した評価法であることが考えられた。

② ¹³C酪酸注腸呼吸試験はDSS誘発マウス大腸炎だけでなく、TNBS誘発マウス大腸炎も含めたマウス大腸炎の炎症の有無を評価出来ることが示唆された。

③ 呼吸試験がDSSマウス大腸炎に対する漢方薬を含んだ治療薬の有効性を反映することが示唆された。

以上のことよりDSS大腸炎マウスにおいて¹³C酪酸注腸呼吸試験によるin vivoでの酪酸代謝がヒトUC同様に、炎症の程度を反映することを初めて示した。さらに、¹³C酪酸注腸呼吸試験は炎症の程度を反映するだけでなく、DSS大腸炎マウス治療薬の有効性を評価できる手法であることを明らかとした。

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)

[学会発表] (計2件)

① 遠藤真理、星野卓之、及川哲郎、花輪壽彦:マウス大腸炎に対する漢方薬の有効性評価の為の非侵襲的方法の確立 ～¹³C酪酸注腸呼吸試験を用いた検討～, 第4回日本安定同位体・生体ガス医学応用学会大会, 2012.10.27, 東京

② 及川哲郎、遠藤真理、星野卓之、花輪壽彦:¹³C酪酸注腸呼吸試験を用いたマウス大腸炎の評価～漢方薬による治療効果を含めて～, 第99回日本消化器病学会総会, 2013.3.21-3.23, 鹿児島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 真理 (ENDO MARI)

北里大学・東洋医学総合研究所・上級研究員

研究者番号: 60296829