

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890151

研究課題名(和文) 黄疸肝におけるバクテリアル・トランスロケーションのメカニズム解明と制御

研究課題名(英文) Development of treatment for bacterial translocation in rat's biliary atresia model.

研究代表者

矢田 圭吾 (YADA, Keigo)

徳島大学・大学病院・医員

研究者番号：00633893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：胆道閉鎖症動物モデルとして、総胆管結紮ラットモデルを使用し、大建中湯(TU-100)による効果について検討した。大建中湯投与群では、総胆管結紮のみの群と比較して3日目のGPT値、14日目のヒアルロン酸値およびBT発生率が低値・小腸粘膜構造が保たれ・肝線維化および $\alpha$ -SMA発現も抑制された。さらに、総胆管結紮ラットから単離した星細胞を用いたin vitro実験では、大建中湯投与により有意に活性化抑制効果を認めた。以上より、胆道閉鎖症に伴う肝線維化の進行にはBTによるHSCの活性化が関与している可能性があり、大建中湯はその両者の抑制することで肝障害を改善することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Male Wistar rats were divided into the three groups: Group1, control; Group2, receiving BDL only; Group3, receiving BDL and oral administration of TU-100. In Gr.2 and Gr.3, rats were sacrificed at 3, 7 or 14 days after BDL. As a result: (1) Gr.3 had lower GPT on POD3 and lower serum HA on POD14 than Gr.1 and Gr.2, respectively ( $p < 0.05$ ). (2) BT was observed 0% in Gr.1 and 100% in Gr.2 on POD3, 7 and 14. In contrast, it was detected 100% on POD3, 20% on POD7, and 0% on POD14 in Gr.3. (3) Number and height of villus in Gr.3 were preserved compared to Gr.2, in time dependent manner (on POD 7, 14,  $p < 0.01$ ). (4) Area of liver fibrosis and positive  $\alpha$ -SMA area in Gr.3 were smaller than those in Gr.2 ( $p < 0.05$ ). (5) In vitro experiment using HSCs isolated from BDL rats showed less expression of  $\alpha$ -SMA, timp1 and coll alpha 1 in TU-100 administration group. In conclusion, TU-100 may improve liver fibrosis by suppressing the activated HSCs and maintaining intestinal integrity in patients with biliary atresia.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：閉塞性黄疸 胆道閉鎖症 バクテリアル・トランスロケーション 肝線維化 大建中湯

1. 研究開始当初の背景

(1) 胆道閉鎖症における胆管炎の発症

胆道閉鎖症は、乳児の閉塞性黄疸を来す小児外科領域では非常に重要な疾患の一つである。肝門部空腸吻合術(葛西手術)が行われるが、術後早期の胆管炎は胆汁排泄障害を来す最大の原因であり、肝の繊維化を進行させて患児の予後を大きく左右することから特に重要な合併症の一つである。

胆管炎の発生機序に関しては、肝門部吻合腸管脚からの腸内細菌の逆行性感染によるものと肝血流を介しての感染の2つが考えられている。我々は、肝血流を介する感染の原因として、閉塞性黄疸状態でのBTの発症が関与しているものと推測しているが、明確な結論は示されていない。

(2) TU-100によるBT予防効果

大建中湯(TU-100)は人参、山椒、乾姜よりなり、消化管運動亢進作用など様々な効果が報告されている(Am J Surg. 2006)。腸管粘膜バリアにおけるBT発症には多くの制御因子が関与しており、我々は絶食モデルラットに対して大建中湯(TU-100)を投与し炎症性サイトカインとの関係を検討し、IFN- $\gamma$ をはじめとしてTNF- $\alpha$ 、IL-6を有意に抑制することを明らかにしており、また腸粘膜の整合性を保持しアポトーシスを抑制し、結果的にBTを予防することを報告した(Dig Dis Sci 2008)。

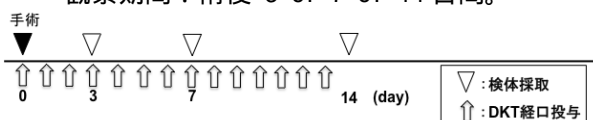
2. 研究の目的

胆道閉鎖症術後早期の胆管炎および肝線維化は、予後の悪化に繋がる特に重大な合併症の一つである。その発生機序に関しては、腸管粘膜バリア破綻によるbacterial translocation(BT)が大きく関与している。また、近年、マイクロビームが様々な疾患の発生と大きく関連していることが注目され、その変化を同定することで新たな治療のターゲットとなる可能性がある。本研究では、胆道閉鎖症モデル(閉塞性黄疸)におけるマイクロビーム(腸内)の変化を検討することによりBT発症の機序解明を目指し、さらに抗炎症作用を有する薬剤投与により病態制御が可能か否かを検討し、胆道閉鎖症における病態増悪の予防に繋げたい。

3. 研究の方法

(1) 胆道閉鎖症ラットモデルに対するTU-100の改善効果

Wister系雄性ラット(6週齢, BW:250~300g, n=5)を使用し、1) control群、2) BDL群、3) BDL+TU-100群  
胆管結紮モデル: 総胆管を結紮し、3 or 7 or 14日後にsacrificeする。  
投与方法 (BDL + TU-100群): TU-100 300mg/kg/dayを術当日から術後3 or 7 or 14日間、経口投与させる。  
観察期間: 術後3 or 7 or 14日間。

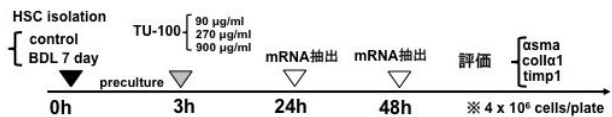


採取検体: 血液: 門脈血を採取後遠心分離し血漿を凍結保存。  
肝・脾・小腸・大腸組織: RNA later、ホルマリンに浸透させ保存。

検討項目  
・血液生化学検査(エンドトキシン、GOT、GPT、ALB、T-bil、ヒアルロン酸)  
・腸間膜リンパ節培養でバクテリアルトランスポレーションの評価  
・絨毛の数・高さ・小腸粘膜固有層への分葉核球浸潤 H.E.染色で評価する。  
・肝繊維化の程度をAZAN染色による染色域により定量的に評価する。  
・肝星細胞(HSC)活性について、SMAの免疫組織化学染色により評価する。  
・肝組織中のTLR4の発現についてPCRおよび免疫組織化学染色により評価する。

(2) rat HSC細胞株のisolation  
Wister系雄性ラット(6週齢, BW:250~300g)のquiescent HSC isolationを行ない、30mmディッシュに $4 \times 10^4$ 個/dishで培養を開始する。3時間後、24時間後、48時間後にmRNA抽出を行い、SMA・coll 1・timp1の発現について検討する。

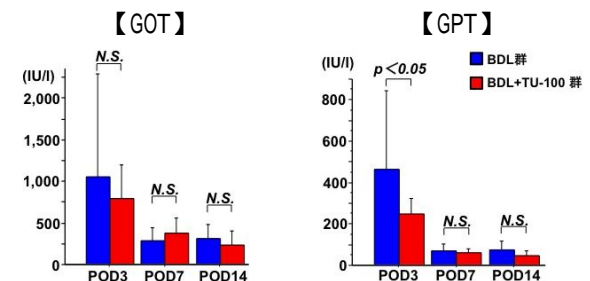
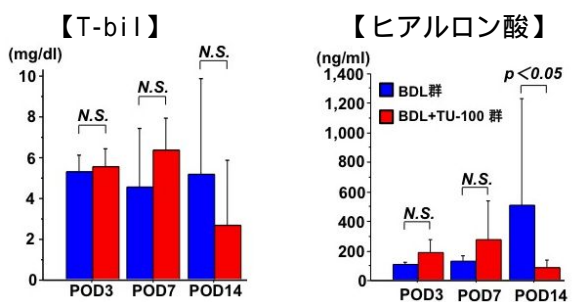
BDLを行った上記ラットからHSC isolationを行ない、3時間の前培養の後にTU-100を90, 270, 900  $\mu\text{g/ml}$ の濃度で投与し、24時間後、48時間後にmRNA抽出を行い、SMA・coll 1・timp1の発現について検討する。



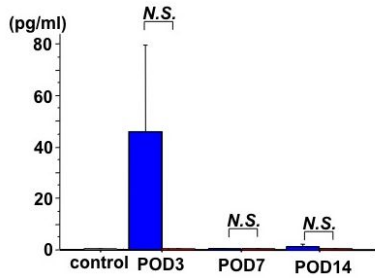
4. 研究成果

(1) 胆道閉鎖症ラットモデルに対するTU-100の改善効果

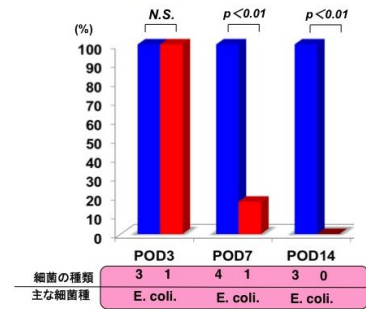
・血液生化学検査(エンドトキシン、GOT、GPT、ALB、T-bil、ヒアルロン酸)



【エンドトキシン】



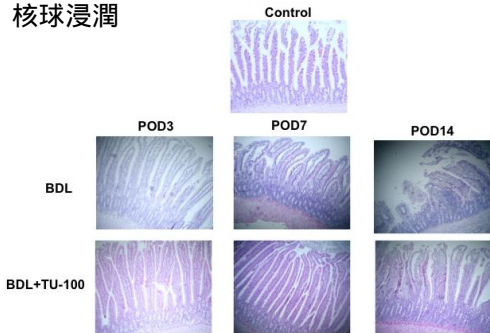
・腸間膜リンパ節培養でバクテリアルトランスロケーションの評価



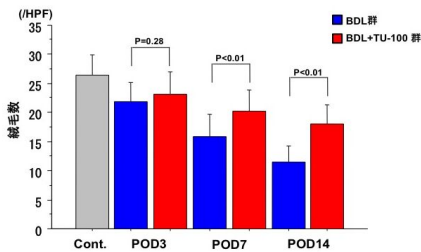
細菌の種類	POD3	POD7	POD14
主な細菌種	E. coli. 3	E. coli. 4	E. coli. 3

t-bil, GOT 値は術後 3, 7, 14 日後のいずれにおいても両群で有意差はなく、POD3 の GPT, POD14 のヒアルロン酸が DKT 投与群で有意に低値であった (GPT:  $463 \pm 189$  vs  $247 \pm 39$  U/l,  $p < 0.05$ ; ヒアルロン酸:  $510 \pm 415$  vs  $121 \pm 243$  ng/ml,  $p < 0.05$ )。エンドトキシン定量検査では、術後 3 日目の DKT 投与群で高値であった。BT 発生率は術後 7 日後、14 日後で TU-100 投与群において有意に抑制された。

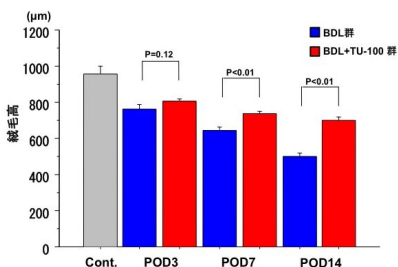
・絨毛の数・高さ・小腸粘膜固有層への分葉核球浸潤



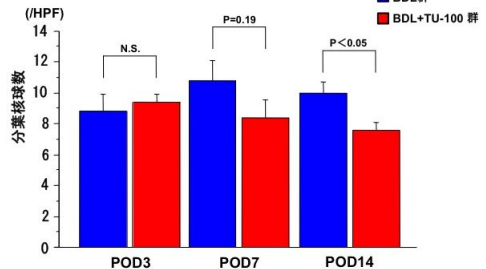
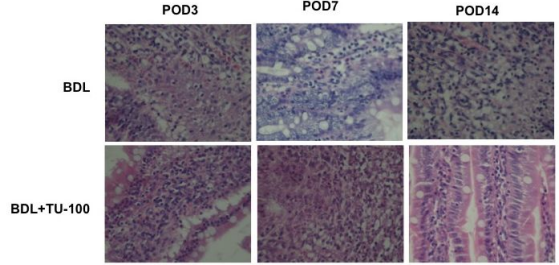
【絨毛数】



【絨毛高】



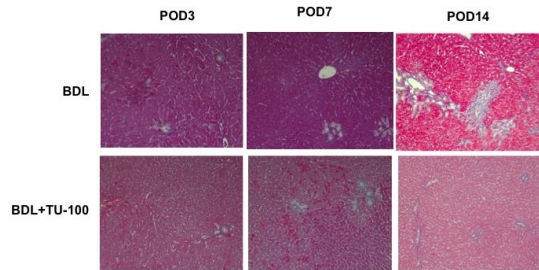
【小腸粘膜固有層への分葉核球浸潤】



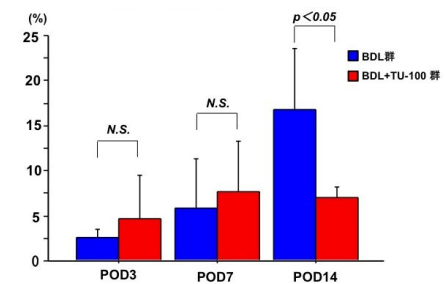
小腸絨毛の高さおよび数は、術後 7 日目および 14 日目において BDL 群と比較して BDL+TU-100 群において有意に保たれていた。

・肝繊維化の評価

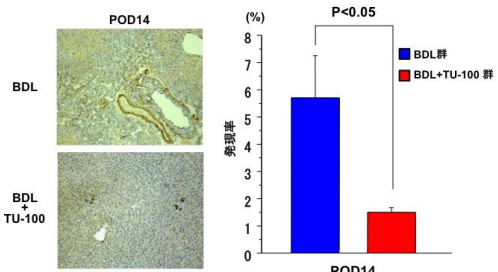
【AZAN 染色】



【Image J による定量評価 (AZAN 染色)】



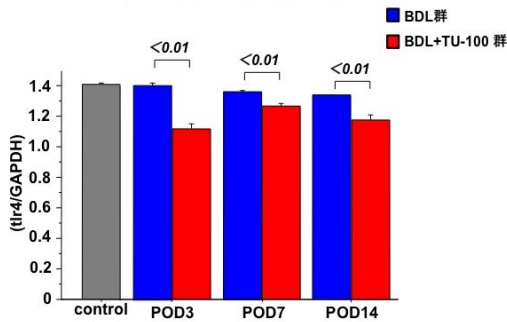
・SMA 染色による肝星細胞 (HSC) 活性についての評価



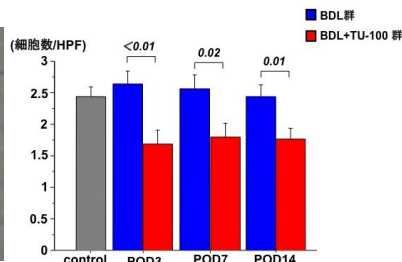
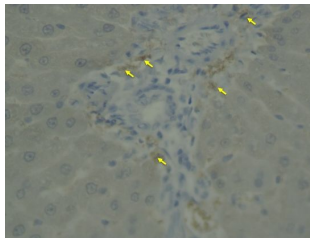
AZAN 染色では、術後 14 日目で、BDL 群と比較して BDL + TU-100 群で有意に線維化が抑制されていた。また、術後 14 日目の SMA 発現率についても有意に低値であった。

・肝組織中の TLR4 発現についての評価

【肝組織 tlr4 mRNA 発現】



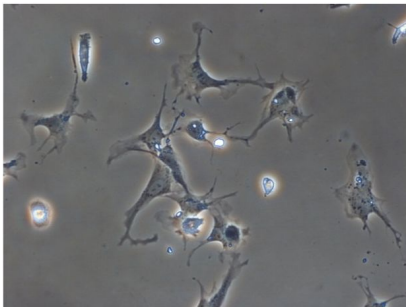
【肝組織 TLR4 免疫染色所見】



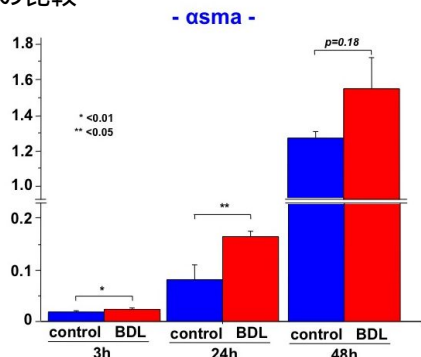
肝組織中の tlr4 mRNA は、術後 3, 7, 14 日後すべてで TU-100 投与群で有意に低発現であった。また、TLR4 免疫染色にて、Disse 腔に染色される細胞 (HSC または Kupffer 細胞) を確認でき、3, 7, 14 日後すべてで TU-100 投与群で有意に低発現であった。

(2) rat HSC 細胞株の isolation (in vitro)

【isolation 24h 後の HSC 所見】



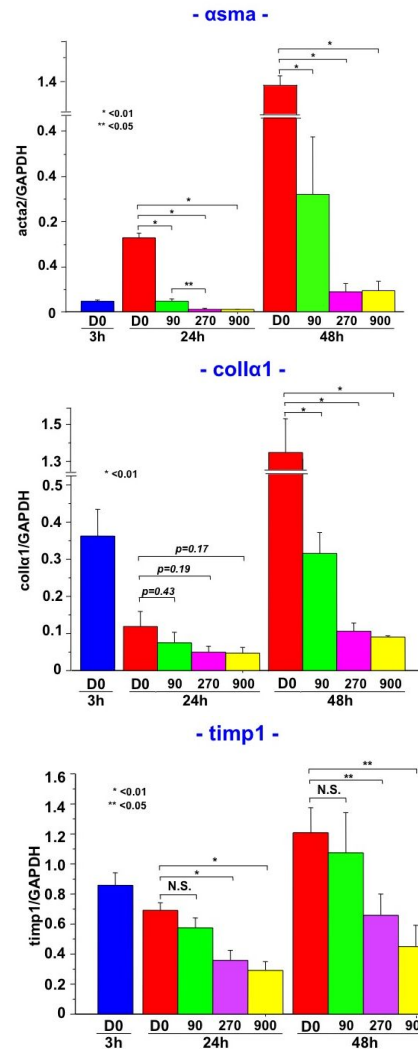
Normal rat と BDL rat HSC における SMA 発現の比較



BDL rat から単離した HSC は、Normal rat と比較して、3h 後、24h 後の SMA mRNA 発現が

有意に高く、48h 後では有意差はなかった。BDL rat 由来の HSC は、normal rat と比較して活性化が早い、48h 経つと差がなくなってくる可能性が考えられた。

BDL rat HSC への TU-100 投与による検討



BDL rat から単離した HSC に TU-100 を投与すると、sma・colla1、timp1 の mRNA 発現が濃度依存的に有意に抑制され、至適濃度は 270  $\mu\text{g/ml}$  であることが示唆された。

【今後の展望】

大建中湯の構成成分として知られる三種類の生薬である乾姜、人參、山椒のそれぞれを BDL rat より単離した HSC に投与し、いずれが肝星細胞活性化抑制に寄与するのか、さらなる検討を加える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

- 1) Ishibashi H, Oshio T, Sogami T, Nii A, Mori H, Yada K, Shimada M. Iliopsoas Abscess in an Infant. *J Med Invest.* 2014; 61: 213-216. (査読有)
- 2) Ishibashi H, Mori H, Yada K, Shimada M, Sogami T, Nii A. Dye-assisted lymphatic sparing laparoscopic Palomo varicocelectomy in children. *J Med Invest.*

2014; 61: 151-155. (査読有)

3) Mori H, Ishibashi H, Shimada M, Utsunomiya T, Asanoma M, Yamada S, Saito Y, Yada K, Iwahashi S, Ikemoto T, Imura S, Morine Y. Effects of Bevacizumab on liver damage after massive hepatectomy in rats. *Hepatogastroenterology*. 2014 (in press). (査読有)

4) Yada K, Ishibashi H, Mori H, Sato H, Shimada M. Laparoscopic resection of hepatoblastoma. Case report and literature review. *Asian Journal of Endoscopic Surgery*. 2014(in press) (査読有)

5) Yada K, Ishibashi H, Mori H, Sato H, Shimada M. Clinical features and outcomes of hepatoblastoma. *Hepatogastroenterology*. 2014(in press) (査読有)

6) 矢田圭吾, 石橋広樹, 森大樹, 島田光生 術後縦隔膿瘍を来たした横隔膜ヘルニアの1例. 日本小児外科学会雑誌 2014(in press) (査読有)

7) 石橋広樹, 島田光生, 森根裕二, 森大樹, 矢田圭吾 【膵・胆管合流異常アップデート】膵・胆管合流異常と胆道癌 *小児外科* 2013; 45(6): 661-664. (査読有)

8) 石橋広樹, 森大樹, 矢田圭吾, 島田光生 【小児腹部疾患における開腹手術と鏡視下手術の現状】鼠径ヘルニア *小児科* 2013; 54(4): 415-421. (査読有)

9) 石橋広樹, 森大樹, 矢田圭吾, 島田光生 【プロが見せる手術シリーズ(2): 難易度の高い消化管手術】胃食道分離術. *小児外科* 2013; 45(8): 813-817. (査読有)

10) 森大樹, 島田光生, 石橋広樹, 森根裕二, 矢田圭吾 【膵・胆管合流異常アップデート】膵・胆管合流異常の全国集計 成人の特徴 *小児外科* 2013; 45(6): 614-616. (査読有)

11) 矢田圭吾, 石橋広樹, 森大樹, 島田光生 若手小児外科医の ECFMG certificate 取得への挑戦 ~米国小児外科臨床留学を目指して~ *四国医学雑誌*. 2013; 69 (3,4): 187-192. (査読有)

〔学会発表〕(計 14 件)

1) Keigo Yada, Hiroki Mori, Hiroki Ishibashi, Mitsuo Shimada. Kampo medicine "Daikenchuto" prevents bacterial translocation and hepatic fibrosis in bile duct ligated rats. International Hepatopancreatobiliary association (IHPBA2014), 2014年3月22-27日 韓国(COEX)

2) 石橋広樹, 森大樹, 矢田圭吾, 佐藤宏彦, 島田光生, 極低出生体重児発症の鼠径ヘルニアに対する LPEC 法 第26回日本内視鏡外科学会総会 2013年11月28日-30日 福岡県(福

岡国際会議場)

3) 森大樹, 石橋広樹, 佐藤宏彦, 矢田圭吾, 島田光生, Finger assist を併用した腹腔鏡補助下高位鎖肛根治術 第26回日本内視鏡外科学会総会 2013年11月28日-30日 福岡県(福岡国際会議場)

4) 矢田圭吾, 石橋広樹, 森大樹, 佐藤宏彦, 島田光生 若手外科医の ECFMG 取得への挑戦: 初期・外科後期研修中に効率よく ECFMG を取得するためのコツとピットフォール 第75回日本臨床外科学会総会 2013年11月21日-23日 愛知県(名古屋国際会議場)

5) 石橋広樹, 森大樹, 矢田圭吾, 佐藤宏彦, 島田光生 小児鼠径部ヘルニア疾患に対する LPEC 法の現況と適応拡大 第75回日本臨床外科学会総会 2013年11月21日-23日 愛知県(名古屋国際会議場)

6) 森大樹, 石橋広樹, 佐藤宏彦, 矢田圭吾, 島田光生 重症心身障害児(者)の GERD に対する腹腔鏡下 Nissen 噴門形成術の検討 第75回日本臨床外科学会総会 2013年11月21日-23日 愛知県(名古屋国際会議場)

7) 石橋広樹, 森大樹, 矢田圭吾, 島田光生 胎児診断され先天性胆道拡張症との鑑別を要した胆道閉鎖症の1例 第40回 日本胆道閉鎖症研究会 2013年11月16日 茨城県(茨城県近代美術館)

8) Mori H, Ishibashi H, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Yada K, Shimada M. Risk of carcinogenesis in the biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction through both epigenetic and genetic regulation. International Surgical Week (ISW 2013) 2013年8月25日-29日 ヘルシンキ (Helsinki Exhibition and Convention Centre)

9) 森大樹, 石橋広樹, 矢田圭吾, 佐藤宏彦, 島田光生 胎生期発生の腹腔内停留精巣奇形腫の1例 第22回日本小児泌尿器科学会総会 2013年7月10日-12日 東京都(東京ビッグサイト TFT ホール)

10) 石橋広樹, 森大樹, 矢田圭吾 先天性尿道皮膚瘻の1例 第22回日本小児泌尿器科学会総会 2013年7月10日-12日 東京都(東京ビッグサイト TFT ホール)

11) 石橋広樹, 矢田圭吾, 森大樹, 佐藤宏彦, 島田光生 小児 abdominoscrotal hydrocoele(ASH)に対する腹腔鏡下手術 第50回日本小児外科学会学術集会 2013年5月30日-6月1日 東京都(京王プラザホテル)

12) Yada K, Shimada M, Ishibashi H, Satou H, Mori H, Utsunomiya T. Clinical features and outcomes of Hepatoblastoma. 第50回日本小児外科学会学術集会 2013年5月30日-6月1日 東京都(京王プラザホテル)

13) 森大樹, 石橋広樹, 佐藤宏彦, 矢田圭吾, 島田光生 ラットの膵・胆管合流異常症モデ

ルの意義と課題第 50 回日本小児外科学会学術集会 2013 年 5 月 30 日-6 月 1 日 東京都(京王プラザホテル)

14) 矢田圭吾, 島田光生, 石橋広樹, 佐藤宏彦, 森大樹 胆道閉鎖症ラットモデルにおけるバクテリアトランスロケーションと大建中湯による予防効果についての検討.

第 50 回日本小児外科学会学術集会 2013 年 5 月 30 日-6 月 1 日 東京都(京王プラザホテル)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢田 圭吾 (YADA, Keigo)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：00633893

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 研究協力者

島田 光生 (SHIMADA, Mitsuo)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・教授

研究者番号：10216070

石橋 広樹 (ISHIBASHI, Hiroki)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：20314867

森 大樹 (MORI, Hiroki)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：70448330