

平成21年3月19日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007年～2008年
 課題番号：19591485
 研究課題名(和文)
 バクテリアルトランスロケーションのパラセルラールートの解析と重症度評価法の開発
 研究課題名(英文)
 Development of new methods to assess bacterial translocation evaluating paracellular route
 研究代表者
 栗田 信浩 (KURITA NOBUHIRO)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師
 研究者番号：30335814

研究成果の概要：

【目的】絶食・CPT-11投与にて惹起される Bacterial Translocation (BT) に対する臨床応用可能な新しいモニタリング法・予防法の開発と tight junction (TJ) の変化を解析する。

【方法】(1) Wistar 系雄性ラットを絶食コントロール群、DKT 投与群に分け、BT の発症、炎症性サイトカイン、病理組織変化、apoptosis に対する検討を行った。(2) Wistar 系雄性ラットをコントロール群、CPT-11 投与群、大建中湯(DKT)投与群に分け、病理組織変化、apoptosis、炎症性サイトカインに対する検討を行った。(3) Wistar 系雄性ラットをコントロール群、CPT-11 投与群に分け、下痢・体重変化、病理組織変化、炎症性サイトカイン、腸管電気抵抗、TJ タンパク (Claudin-1, Occludin, ZO-1)、TJ mRNA に対する検討をおこなった。

【結果】(1) 絶食により BT の発症、炎症性サイトカインの上昇、腸管粘膜障害、apoptosis をみとめ、DKT の投与による予防効果のみとめた。(2) CPT-11 投与群で、腸管粘膜障害、apoptosis、炎症性サイトカインの上昇を認め、DKT 投与群で予防効果を認めた。(3) CPT-11 投与群で、下痢・体重減少、腸管粘膜障害、炎症性サイトカインの上昇、小腸電気抵抗上昇、大腸電気抵抗低下、TJ タンパク発現減、Claudin-1 mRNA の上昇、Occludin mRNA の低下を認めた。

【結論】絶食により BT の発症、CPT-11 投与により腸管粘膜障害、炎症、電気抵抗の変化、TJ タンパク発現の減弱、mRNA の変化が確認され、DKT による BT、腸管粘膜障害、炎症、apoptosis の予防効果が確認された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：バクテリアルトランスロケーション、systemic inflammatory response syndrome (SIRS)、敗血症、タイトジャンクション、パラセルラールート

1. 研究開始当初の背景

Bacterial Translocation (BT)は腸管内の細菌、真菌やエンドトキシンなどが腸管のバリア機能の破綻や腸内細菌叢における病原細菌の異常増殖によって腸間膜リンパ節、肝臓、脾臓、全身の血中に移行する現象であり、systemic inflammatory response syndrome (SIRS)の原因となる。敗血症や多臓器不全への進行を予防する上でBTへの対策は重要である。我々は絶食にて惹起されたBTにおいて、電気抵抗の低下、上皮性ナトリウムチャンネルの上昇などの電気生理学的変化が新しいモニタリング法のなり得ることを報告してきた。

2. 研究の目的

絶食・CPT-11 投与にて惹起される Bacterial Translocation (BT)に対する臨床応用可能な新しいモニタリング法・予防法の開発と tight junction (TJ)の変化を解析する。

3. 研究の方法

(1) 絶食ラットモデルにおける DKT による BT 予防効果の検討：

Wistar 系雄性ラットに対し、6 日間絶食を行い、その間、生理食塩水 1ml/day のみ経口投与したコントロール群、DKT100mg/kg/day を経口投与した DKT100 群、DKT300mg/kg/day を経口投与した DKT300 群、DKT1000mg/kg/day を経口投与した DKT1000 群を作成した。①腸間膜リンパ節の培養による BT の確認、②RT-PCR による回腸の炎症性サイトカイン、HE 染色による腸管粘膜障害、TUNNEL 染色による apoptosis の検討を行った。

(2) CPT-11 (150mg/kg) 投与ラットモデルにおける DKT による腸管粘膜障害予防効果の検討：

Wistar 系雄性ラットに対し、0, 24 時間目に生理食塩水 1.5ml/kg/day 腹腔内投与を行うコントロール群、生理食塩水の代わりに CPT-11 150mg/kg/day 腹腔内投与を行う CPT-11 投与群、CPT-11 投与 3 日前から 5 日間、DKT 300mg/kg/day を経口投与する DKT 投与群を作成した。生理食塩水または CPT-11 初回投与 48 時間後に小腸を採取し、①HE 染色による病理学的変化、②TUNNEL 染色による apoptosis、③RT-PCR による炎症性サイトカインの検討を行った。

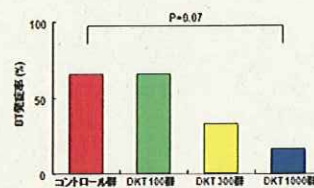
(3) CPT-11 (200mg/kg) 投与モデルにおける Tight Junction (TJ) の検討：Wistar 系雄性ラットに対し、0, 24 時間目に生理食塩水 2ml または CPT-11 200mg/kg 腹腔内投与を行うコントロール群、CPT-11 投与群を作成した。48 時間目に小腸、大腸を採取し、①下痢・体重

の変動、②HE 染色による病理学的変化、③ RT-PCR による炎症性サイトイン、④Ussing chamber 法による腸管電気抵抗、⑤蛍光染色による TJ タンパクの発現、⑥RT-PCR による TJ タンパク mRNA の検討を行った。

4. 研究成果

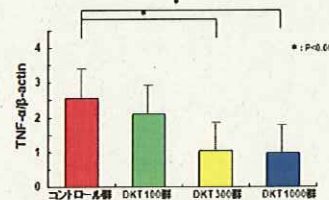
(1) ①腸間膜リンパ節培養：コントロール群の 66%に細菌が検出され、BT が発症することを確認した。DKT100 群においても、66%に細菌を検出したが、DKT300 群では 33%、DKT1000 群では 16%と、DKT による BT 予防効果を確認した。

BTの発症率

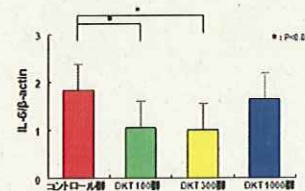


②炎症性サイトカイン：DKT 群では、コントロール群と比べ、TNF- α 、INF- γ 、IL-6 が有意に低下していた。

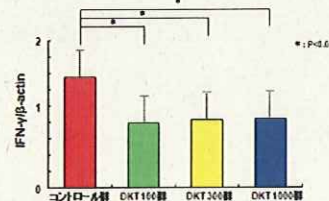
TNF- α



IL-6

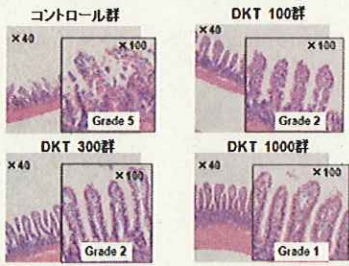


IFN- γ

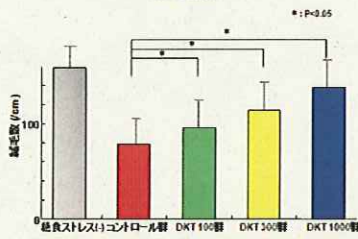


③HE染色：DKT群では、コントロール群と比較して、絨毛数、絨毛高が用量依存性に上昇していた。

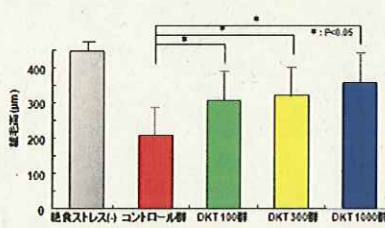
腸管粘膜傷害の検討



絨毛数

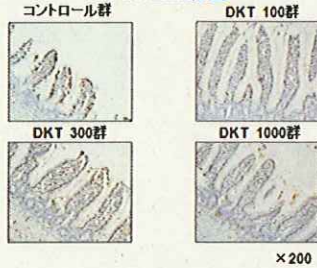


絨毛高

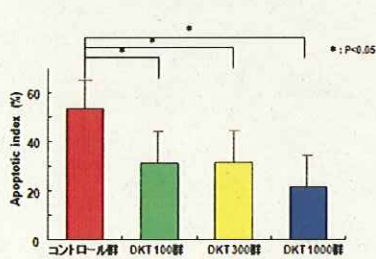


④TUNNEL染色：DKT群では、コントロール群と比べ、apoptosis細胞数が用量依存性に減少していた。

TUNEL染色

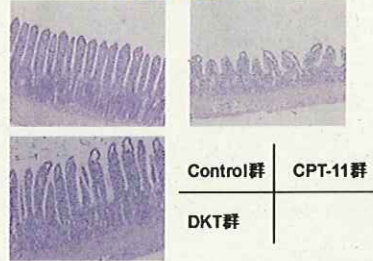


Apoptotic index

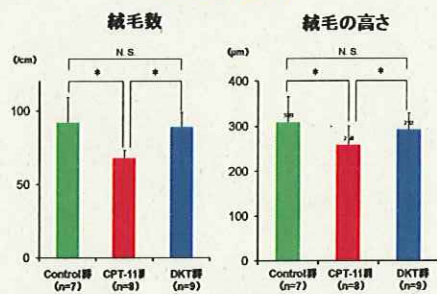


(2) ①HE染色：CPT-11投与群はコントロール群と比較して、有意に絨毛数の減少と絨毛高の低下を認めた。DKT投与群では絨毛数の減少、絨毛高の低下を認めなかった。以上から、CPT-11投与による腸管粘膜障害とDKTによる予防効果が確認された。

組織学的検討
(回腸のH.E.染色) (x100)

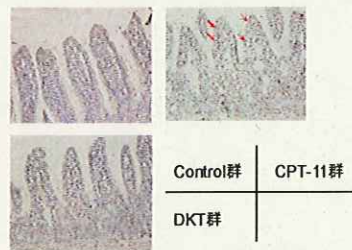


絨毛の変化

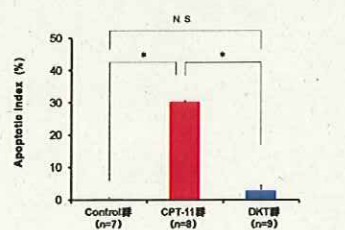


②TUNNEL：CPT-11投与群は、有意にアポトーシス細胞の増加を認め、DKT投与群では増加を認めなかった。以上から、CPT-11投与によるアポトーシスの誘導と、DKTによる予防効果が確認された。

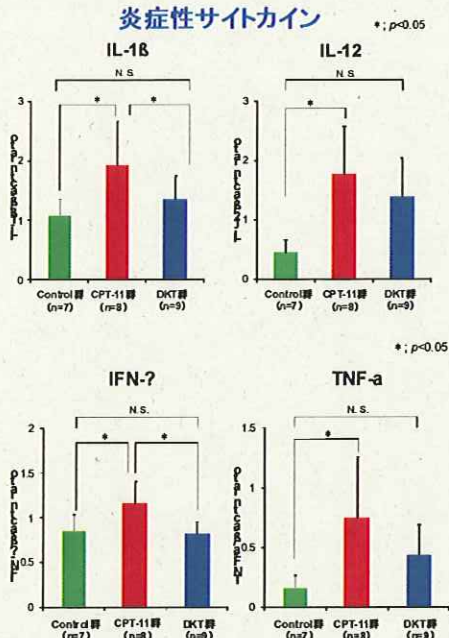
Apoptosis
(回腸のTUNEL染色) (x100)



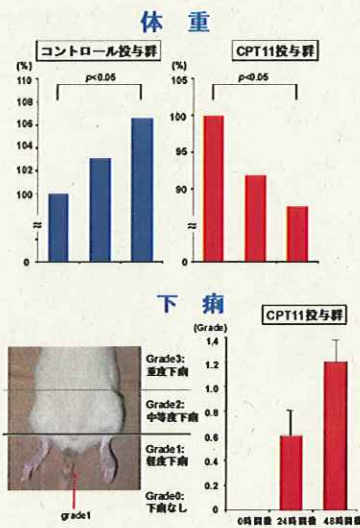
Apoptotic index



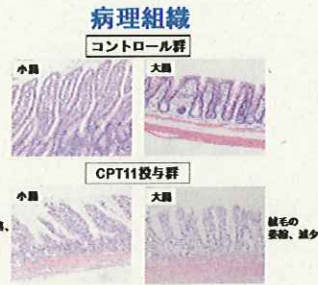
③炎症性サイトカインに対するRT-PCR：CPT-11投与群は、IL- β 1, IL-12, INF- γ , TNF- α の有意な上昇を認めたが、DKT投与群では認めなかった。以上から、CPT-11投与による炎症細胞の誘導と、DKTによる予防効果が確認された



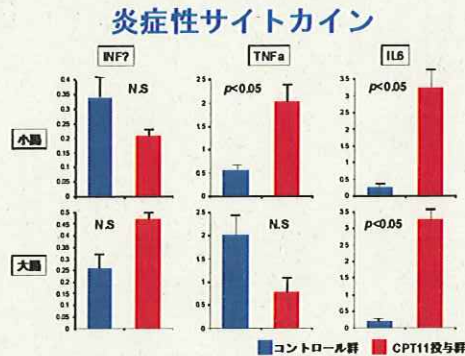
(3) ①下痢・体重：コントロール群では、下痢、体重減少を認めなかったが、CPT-11投与群では、有意な下痢スコアの上昇と体重減少を認めた。



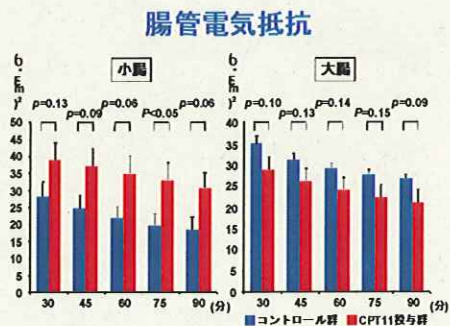
②HE染色：CPT-11投与群は小腸、大腸ともに絨毛数の減少と絨毛高の低下を認めた。以上より、CPT-11による腸管粘膜障害が確認された。



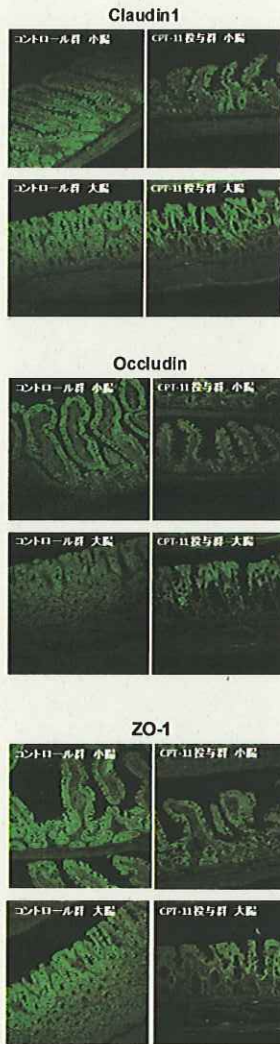
③炎症性サイトカインに対するRT-PCRの結果、CPT-11投与群小腸では、IL-6, TNF- α の有意な上昇、大腸では、IL-6の有意な上昇を認めた。以上より、CPT-11による炎症反応誘導が確認された。



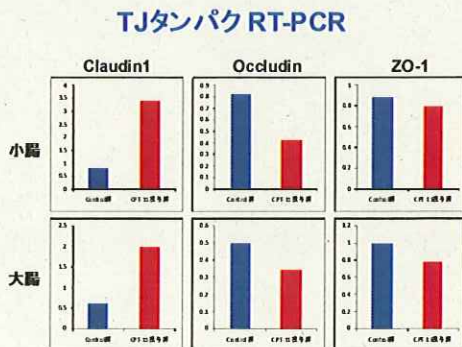
④Ussing chamber法：CPT-11投与群小腸で腸管電気抵抗の上昇、大腸で低下を認めた。腸炎ラットモデル等による実験では、一般的に小腸および大腸の透過性は亢進し、腸管電気抵抗が低下する。今回、大腸では、同様の反応が起こったと考えられる。腸管電気抵抗が上昇する報告は非常に少なく、小腸切除後に腸管電気抵抗が上昇したとの報告があり、その報告では、腸管の浮腫が電気抵抗上昇の一因であると述べており、今回の小腸における電気抵抗上昇も、炎症による浮腫が原因と考えられた。



⑤ TJタンパクに対する蛍光染色の結果、CPT-11投与群では、Claudin-1, Occludin, ZO-1タンパク発現の減弱を認めた。



⑥ TJタンパクmRNAに対するRT-PCR：CPT-11投与群小腸、大腸ともに、Claudin-1 mRNAの有意な上昇、Occludin mRNAの有意な低下を認め、ZO-1 mRNAでは有意な変化を認めなかった。



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)

[雑誌論文] (計 1 件)

Yoshikawa K, Kurita N, Higashijima J, Miyatani T, Miyamoto H, Nishioka M, Shimada M.

Kampo medicine "Dai-kenchu-to" prevents bacterial translocation in rats.

査読あり、53, 2008: 1824-1831

[学会発表] (計 4 件)

1) 近清素也、島田光生、小松正人、中尾寿宏、宮谷知彦、東島潤、吉川幸造、西岡将規、栗田信浩、岩田貴

CPT-11 による腸管粘膜障害と大建中湯の予防効果

第 46 回日本癌治療学会総会

2008 年 10 月 30 日 名古屋

2) 近清素也、島田光生、栗田信浩、岩田 貴、

西岡将規、吉川幸造、東島 潤、宮谷知彦

CPT-11 による腸管粘膜障害と大建中湯による予防効果に関する研究

第 50 回日本消化器病学会大会

2008 年 10 月 1 日 東京

3) 吉川幸造、島田光生、栗田信浩、岩田貴、

西岡将規、東島潤、宮谷知彦、近清素也

大建中湯の抗炎症効果の検討

第 33 回日本外科系連合学会

2008 年 6 月 12 日 浦安

4) 近清素也、宮谷知彦、東島潤、吉川幸造、

西岡将規、栗田信浩、島田光生

CPT-11 による腸管粘膜障害と Bacterial translocation 発症に関する研究

第 108 回日本外科学会定期学術集会

2008 年 5 月 15 日 長崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗田 信浩(KURITA NOBUHIRO)
徳島大学大学院ヘルスバ^イサイエンス研究部
講師
研究者番号：30335814

(2) 研究分担者

高橋 章(TAKAHASHI AKIRA)
徳島大学ヘルスバ^イサイエンス研究部
教授
研究者番号：90304047

島田 光生(SHIMADA MITSUO)
徳島大学ヘルスバ^イサイエンス研究部
教授
研究者番号：10216070

西岡 将規(NISHIOKA MASANORI)
徳島大学医学部・歯学部附属病院
助教
研究者番号：50398020

吉川 幸造(YOSHIKAWA KOZO)
徳島大学医学部・歯学部附属病院
医員
研究者番号：80448331