

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20890195  
 研究課題名（和文） 完全静脈栄養管理下の短腸症候群における敗血症及び肝不全予防療法の開発  
 研究課題名（英文） Development of prophylactic therapy against sepsis and hepatic failure in rat short bowel models managed with total parenteral nutrition  
 研究代表者  
 古川 泰三（FURUKAWA TAIZO）  
 京都府立医科大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：20515291

## 研究成果の概要（和文）：

ラットの腸管を大量切除し、腸管を極端に短くしたモデルを作成した。さらに絶食かつ点滴管理とし、腸管と肝臓へのダメージがボンベシンという物質を投与することによって改善するかについて調べた。研究中、ラットに点滴を入れ長期間管理することが非常に難しかった。結果はボンベシンを投与することにより腸管から細菌が侵入するのが抑えられた。また肝臓に胆汁が溜まって肝機能が低下してしまうのをある程度予防できた。

## 研究成果の概要（英文）：

The rat short bowel model was established by massive intestinal resection. The animals were managed with total parenteral nutrition and were investigated whether administration of neuropeptide, bombesin, had favorable effect against cholestatic liver dysfunction induced by total parenteral nutrition. During this investigation, technical difficulty was encountered for the maintenance of long-term total parenteral nutrition.

As a result, bombesin could suppress bacterial translocation from intestinal mucosa and ameliorate the extent of cholestatic liver dysfunction.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

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：①短腸症候群、②完全静脈栄養、③神経ペプチド、④サイトカイン、⑤ボンベシン

### 1. 研究開始当初の背景

生後まもなく小腸大量切除を余儀なくされ短腸症候群（SBS）となった新生児あるいは乳児を救命するためには、完全静脈栄養（TPN）を中心とした栄養管理が必須となる。TPN を行う腸管粘膜が萎縮し腸内細菌の overgrowth、そしてそれによる bacterial translocation (BT) による敗血症を引き起こす。頻回の BT による敗血症から胆汁鬱滞による肝硬変、肝不全を引き起こし、救命困難となる。肝小腸同時移植が唯一の治療手段であるが、未だ技術的にも医療制度の面においても確立された治療ではない。故に、SBS の小児を救命するためには、残存小腸の粘膜を健全に維持し、BT をいかに予防するかが key factor となる。

### 2. 研究の目的

これまで申請者らはラット異型異所性小腸移植モデルにおいて、神経ペプチドであるボンベシン（BBS）が持つ免疫抑制剤投与下での粘膜再生維持作用、粘膜固有層のリンパ組織の維持作用、虚血再還流障害時の腸管粘膜維持作用を証明してきた。またボンベシンは成熟T細胞の成長を促進させたり、分泌型IgAの分泌を刺激する作用があるとも報告されている。これらの研究成果や報告をもとに、今回、BBS の移植腸管に対する作用を短腸症候群における残存小腸にも応用できるのではないかと考えるに至った。本研究ではこれまで大量小腸切除後、TPN 管理下の短腸症候群モデルにおいてボンベシンが BT を抑制する作用があるか、およびその作用が肝障害の程度を軽減させる効果を持つかについて以下の2つのモデルについて研究期間内に明らかにしたい。

### 3. 研究の方法

実験 1 TPN ラット短腸症候群モデルを用いた神経ペプチドの腸管免疫に与える影響  
雄性 inbred Lewis rat を用いて小腸 80%大量切除した短腸症候群モデルを作成し同時に頸静脈より中心静脈カテーテルを挿入し術後より絶飲食とし TPN 管理とする。BBS 投与群、非投与群に分ける、また control 群として腸管切除なしの TPN ラットモデルを作成し BBS 投与、非投与群に分け、短腸症候群モデルと比較検討する。BBS の投与方法は浸透圧ミニポンプを皮下に挿入し持続投与とする。

Group1 (n=10) TPN 腸管切除なし。

Group2 (n=10) 腸管切除なし

+bombesin (10  $\mu$ g/kg/day、皮下持続、14 日間)。

Group3 (n=10) 小腸 80%切除のみ。

Group4 (n=10) 小腸 80%切除

+bombesin (10  $\mu$ g/kg/day、皮下持続、14 日間)

全ての群において手術時に頸静脈より中心静脈カテーテルを挿入し術後絶飲食管理とする。術後 14 日目にラットを犠牲死させ静脈血、門脈血、肝、腸間膜リンパ節を採取しパラホルムアルデヒドによる還流固定の後、小腸を採取する。

各グループにおいて採取したサンプルを以下の手法により検索する。

#### 1) 組織学的（形態学的）検討評価

凍結標本及び whole mount 標本を作成し、免疫組織染色にて腸管粘膜上皮の cell proliferation 及び apoptosis を評価する。

#### 2) サイトカイン発現の検討評価

手術後 14 日目に採取した血液サンプルを用いて mRNA を抽出し、RT-PCR 法により cDNA を作成増幅し、TNF- $\alpha$ 、IL-6 を定量する。

### 3) bacterial translocation の検討評価

手術後 14 日目に採取した血液サンプルを用いて血液培養を行ない、腸間膜リンパ節、肝は組織採取後ホモジナイズし、細菌培養を行ないグラム陰性桿菌の存在を検討評価する。

実験 2. 術後長期にわたる BBS の BT 予防効果判定および胆汁鬱滞性肝障害に対する予防効果の判定

実験 1 と同様に雄性 inbred Lewis rat を用いて以下に示す 4 group のモデルを作成する。

Group 1 (Sham BBS(-), n=10)

腸管切除なし、単開腹+生理食塩水入り浸透圧ミニポンプの皮下留置を sham op として施行

Group 2 (Sham BBS(+), n=10)

腸管切除なし、単開腹

+bombesin(10  $\mu$ g/kg/day 皮下持続、6 か月間)

Group 3 (SBS BBS(-), n=10) 小腸 80%切除 +生理食塩水入り Osmotic mini Pump 皮下留置

Group 4 (SBS BBS(+), n=10) 小腸 80%切除 +bombesin(10  $\mu$ g/kg/day 皮下持続、6 か月間)

術後、定期的に体重増加を測定、BT の検索として術後より 2 週間毎に採血を行ない血中のエンドトキシン、サイトカインを定期的に定量する。また、実験 1 での 1)、2)、3) を同様に検索することに加え SBS の問題である晚期胆汁鬱滞性肝機能障害の評価目的に肝実質の組織学的検索を行なう。

## 4. 研究成果

### 実験 1

まず、術後管理に難渋した。小腸切除後に頸静脈へカテーテルを挿入固定したが、術後管理中に抜去あるいは閉塞をきたし、14 日間静

脈カテーテルを問題なく管理できたラットが極めて少なかった。

### 1. 組織学的評価

免疫組織染色にて腸管粘膜の cell proliferation を検索した。Group4 の方が Group3 よりも cell proliferation が維持できている印象があったが、14 日間問題なく経過したラットの数が少なく Group3 と Group 4 で有意差を出せなかった。

### 2. サイトカイン発現の検討評価

血清中の TNF- $\alpha$ 、IL-6 を測定した。Group3 よりも Group4 の方が高値を示したが有意差は認められなかった。測定値がどれも低かったが mRNA を抽出した RT-PCR 法を行う必要があった。

### 3. bacterial translocation の検討評価

血液培養と腸間膜リンパ節から細菌培養を行ないグラム陰性桿菌の存在を調べた。ともに E. coli が検出された。Group1 と Group3 で有意差を認めたが、Group3 と Group4 では明らかな有意差までは認められなかった。

### 実験 2

ラットの TPN 管理に難渋し、当初予定していた 6 ヶ月間の TPN 管理は不可能であった。最長でも 1 ヶ月であり、肝実質の組織学的検索を施行したが、軽度胆汁鬱滞を認めるのみでグループ間に有意差は出なかった。

本研究において静脈カテーテルの管理に最も難渋した。また細菌培養にて contamination をきたしている可能性もあり、実験手技の習熟にさらなる期間が必要であった。手技上の問題がなければ Group3 と Group4 に有意差が出るのが予測された。

### 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 2 件)

①Kimura O, Ono S, Furukawa T, Higuchi K,  
Management strategies for infants with  
total intestinal aganglionosis,  
Journal of Pediatric Surgery, 査読有、  
44 巻、2009、1564-1567

②Higuchi K, Kimura O, Furukawa T,  
Bombesin can minimize impairments of  
intestinal cells of Cajal induced by FK506  
in small bowel transplantation  
Journal of Pediatric Surgery, 査読有、  
44 巻、2009、541-545

[学会発表] (計 2 件)

① 古川 泰三、木村 修、  
小腸機能不全症例における中心静脈カテー  
テル管理の工夫、  
第 22 回日本小腸移植研究会、  
平成 22 年 3 月 6 日、東京、慶応義塾大学

② 古川 泰三、木村 修、  
Total intestinal aganglionosis 症例の救命  
一肝不全を予防する治療戦略について  
第 21 回日本小腸移植研究会、  
平成 21 年 3 月 7 日、仙台、良陵会館

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古川 泰三 (FURUKAWA TAIZO)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：20515291

### (2) 研究協力者

木村 修 (KIMURA OSAMU)  
京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：10315963