

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 6 月 1 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500800

研究課題名（和文）炎症性腸疾患に対する経口栄養食品の修飾作用

研究課題名（英文）Effects of oral nutritional product on inflammatory bowel disease

研究代表者

千原 猛（CHIHARA TAKESHI）

藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・講師

研究者番号：00217241

研究成果の概要（和文）：潰瘍性大腸炎とクローン病を代表とする難治性腸疾患は、近年増加の一途を辿り数年内には死因の第1位を占めることが予想されている大腸癌のリスクファクターである。それらの予防・病状改善は大腸発癌の予防につながると考えられる。そこで、マウス潰瘍性大腸炎モデルを用い、グルタミン、水溶性ファイバー、オリゴ糖の混合物（GFO混合物）、さらにそれに担がんマウスでの体重減少抑制が報告されている β -hydroxy- β -methylbutyrate（HMB）の添加物の経口摂取による影響を検討した。その結果、両者とも強くはないが発症抑制効果を示し、それはHMB添加の方がより有効であった。なお、その抑制効果は腸管粘膜保護による可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Intractable inflammatory bowel diseases such as ulcerative colitis and Crohn's disease are important risk factors for colon cancer, the frequency of which has increased progressively in recent years and is expected to become the leading cause of death in the next several years. Therefore, prevention and symptom improvement are key factors for decreasing colon cancer rates and improving the quality of life of these patients. We examined the effects of oral administration of a three-component mixture (GFO mixture) containing glutamine (G), soluble fiber (F) and oligosaccharide (O) on a dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis model in mice. Furthermore, we investigated the effects of simultaneous administration of the GFO mixture and β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB), which has been reported to prevent weight loss in tumor-bearing mice (GFO+HMB mixture). As a result, both the GFO mixture and GFO+HMB mixture demonstrated slight amelioration of DSS-induced experimental colitis. However, the GFO+HMB mixture was more effective than GFO mixture. One of the mechanisms of these ameliorative effects may involve a colonic mucosal protective effect.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：グルタミン・水溶性ファイバー・オリゴ糖・デキストラン硫酸ナトリウム・潰瘍性大腸炎・赤血球ポリアミン

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎とクローン病を代表とする難治性の炎症性腸疾患は下痢、粘血便を特徴的な症状とする疾患で、最近 20 年間でその有病率、罹患率が潰瘍性大腸炎で 5~6 倍、クローン病で約 10 倍増加している。この増加傾向は日本だけでなく隣国の韓国、中国でも同様にみられるという報告 (Yang ら, 2000) もあり、その発症病因の 1 つがライフスタイルの欧米化によると推測されている。炎症性腸疾患は、近年増加の一途を辿り数年内には死因の第 1 位を占めることが予想されている大腸癌のリスクファクターであるため、その予防・病状改善は大腸発癌の予防につながると考えられる。

炎症性腸疾患は原因不明であるが、Baggiolini ら (1995) は、異常亢進したマクロファージが産生する腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターロイキン (IL-1 β) などの炎症性サイトカインが腸管上皮細胞に作用し、腸管上皮細胞はそれらの刺激により好中球遊走に関与する IL-8 を分泌し、その結果腸管組織に好中球が浸潤、集積して細胞傷害をもたらす炎症症状が進展すると報告している。このように、炎症性腸疾患の病態には、腸管における免疫異常反応が関与すると考えられている (Hibi ら, 2006)。

炎症性腸疾患の治療としては、ステロイド系薬剤等により炎症をコントロールすることを目標とされているが、その副作用が懸念される。腸管は「コントロールされた炎症の場」と言われるほど (三浦ら, 2008) リンパ系細胞が豊富で、免疫防御機能と密接に関わっている。そのため、プロバイオティクスやプレバイオティクスに投与により腸内細菌を介して、あるいは漢方薬投与による消化吸收機能改善等の腸管機能による予防や治療の試みがなされている。

2. 研究の目的

連携研究者の東口らは栄養サポートチームを立ち上げ、侵襲期後の早期経口・経腸栄養療法 (GFO 療法、G: グルタミン 9 g/day、F: 水溶性ファイバー 15 g/day、O: オリゴ糖 7.5 g/day を水で溶解し 1 日 3 回に分けて経口あるいは経腸投与する) を実践し、腸管粘膜の萎縮を防止するとともに、腸管由来の免疫能を促進することを報告している (2004)。グルタミンは腸管細胞にある免疫担当細胞や腸管粘膜細胞のエネルギー基質となり、水

溶性ファイバーおよびオリゴ糖は、腸内細菌により加水分解され、その結果、有機酸、主として酢酸、プロピオン酸、酪酸などの揮発性脂肪酸が生成されて大腸粘膜細胞のエネルギー源となる。そこで、このグルタミン、水溶性ファイバー、オリゴ糖の混合物 (以下、GFO 混合物) が、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発マウス潰瘍性大腸炎モデルに対する修飾作用を検討した。また、本モデルは悪液質を伴うことも報告されているため (Sasaki ら, 2003)、Smith ら (2005) が担癌動物で 1 日 1 回の経口投与により体重減少が抑制されると報告している β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) を用い、その混合でも検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 方法：実験 1

GFO は市販されているが、今後それぞれの単品での検討やそれらの配合比率の変化の検討も考えられたため、グルタミン、水溶性ファイバーおよびオリゴ糖、それぞれの市販品を購入して市販 GFO と同割合で混合したもの (GFO 混合物) を実験に使用した。雄性 ICR マウス (5 週齢) を各群 5 匹の 1~4 群に分け、飲水として 1 群には水、2~4 群には 2.5% DSS 溶液を与え、潰瘍性大腸炎を誘発した。そして、飼料として 1 群と 2 群には基礎飼料、3 群と 4 群には 0.5% GFO 混合物混餌とし、さらに 4 群にのみ HMB を経口投与し他の群には HMB の溶媒である PBS を 1 日 1 回経口投与した。実験開始 10 日間後に全てのマウスを麻酔下で心臓採血にて犠牲剖検した後、主要臓器および大腸を摘出し次の測定を行った。

① 体重測定 (実験期間全日)

② 大腸炎症状のスコア化 実験開始 6 日目より、Kihara ら (2003) の報告に準じ、体重変化、便の性状および出血状態を観察してそれぞれスコアを付けた後に平均化する disease activity index (DAI) を算出した。

③ 大腸長 (回盲口~肛門) の測定

④ 臓器 (肝臓、腎臓、脾臓) 重量測定

⑤ 血液学的検査 白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (HB)、ヘマトクリット値 (HT) を多項目自動血球計数装置 K-4500 [シスメックス (株)] を用いて計測した。

⑥ 細胞増殖性マーカーの赤血球ポリアミン (Pu: プトレッシン、Spd: スペルミジン、Spm スペルミン) 測定 Gerbaut (1991) および Löser ら (1988) の方法を参照に赤血球除

タンパク液を作製した後に、HPLC-蛍光検出法にて分析を行った。

⑦大腸粘膜 TNF- α mRNA 発現レベル測定
採取した粘膜を用い、High Pure RNA Isolation キットを用いて RNA を抽出した後に、トランスクリプターユニバーサル cDNA マスター [ともにロシュ・ダイアグノスティクス(株)]にて cDNA を作製した。その cDNA を TaqMan プローブ法にて、リアルタイム PCR 反応により定量化し、 β -アクチンで標準化を行った。

(2) 方法：実験 2

実験 1 での軽度抑制機序の検討として、実験 1 と全て同じ実験群構成で、本モデルの炎症発症初期における検討として、実験期間を 4 日間に短縮した。そして、TNF- α 、IL-1 β および核内因子 k β (nuclear factor-k β ; NF-k β) の大腸粘膜 mRNA 発現レベルを測定した。

4. 研究成果

(1) 実験 1

①実験期間中の体重変化 (図 1)

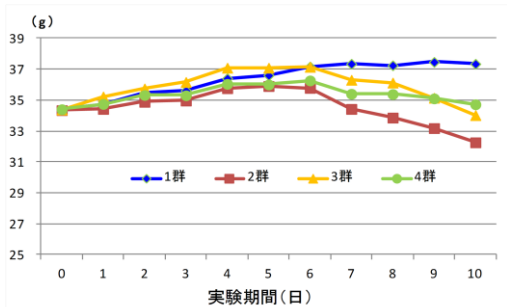


図1. 体重変化

体重変化については有意な変化は見られなかった。しかし、最終体重においては、2群が実験開始時に比べ 6%減少に対し、3群は 0.8%減少、4群は 0.8%増加していた。

②DAI スコア

実験開始 6 日目よりスコア化した。8 日目までは 2~4 群の 3 群間で差は認められなかった。しかし、9 日目、10 日目においては 4 群が 2 群に対して有意に ($p < 0.05$) 低スコアとなり、炎症抑制が示唆された。

③大腸長の比較 (図 2)

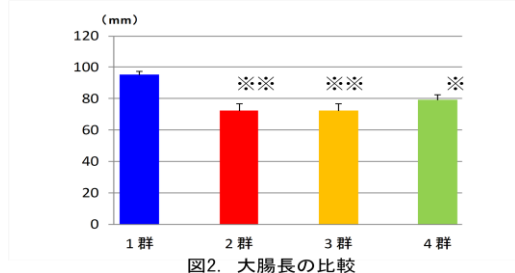


図2. 大腸長の比較

** $p < 0.05$, * $p < 0.01$ vs. 1群 (Dunn's Multiple comparisons test)

本モデルの特徴である大腸長の短縮について検討を行った。その結果、1 群に対し他の群はいずれも有意に短縮したが、 p 値については 2 群と 3 群で $p < 0.01$ であるのに対し、4 群は $p < 0.05$ であった。

④臓器重量

肝臓および腎臓の相対重量は各群で変化は見られなかった。しかし、脾臓においては 2 群に対しいずれの群もその増量を有意に (3 群 ; $p < 0.05$ 、1 群と 4 群 ; $p < 0.01$) 抑制していた。

⑤血液学的検査

WBC は、1 群に対して 2 群 ($p < 0.01$) と 3 群 ($p < 0.05$) は有意に増加したが、4 群では有意な増加は見られなかった。RBC は 1 群に対して 2 群のみが有意に低値であった。HB は 2 群に対して 1 群と 4 群は有意に ($p < 0.01$) 高値であった。HT は 1 群に対して 2 群のみが有意に ($p < 0.01$) 低値であった。RBC、HB および HT の結果より、3 群と 4 群の貧血抑制が示唆された。

⑥赤血球ポリアミン測定結果 (図 3)

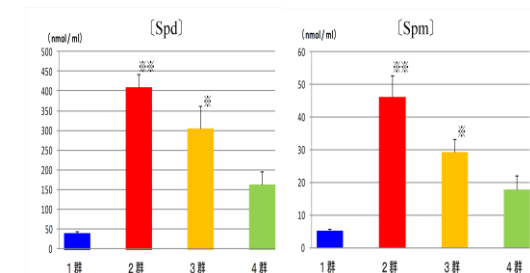


図3. 赤血球ポリアミン測定結果

** $p < 0.05$, * $p < 0.01$ vs. 1群 (Dunn's Multiple comparisons test)

赤血球ポリアミンの Pu, Spd, Spm とも 2 群は 1 群に対して有意に ($P < 0.01$) 増加した。3 群も 1 群に対しいずれも有意に増加したがその p 値は $p < 0.05$ であった。なお、4 群では有意な増加はみられなかった。

⑦大腸粘膜組織 TNF- α mRNA 発現レベル測定

TNF- α の mRNA 発現レベルは、1 群に対し他の 3 群はいずれも有意に ($p < 0.01$) 増量していた。

(2) 実験 2

①大腸粘膜組織 NF-k β mRNA 発現レベル測定

いずれの群でも有意な変化はみられなかった。

②TNF- α mRNA 発現レベル (図4)

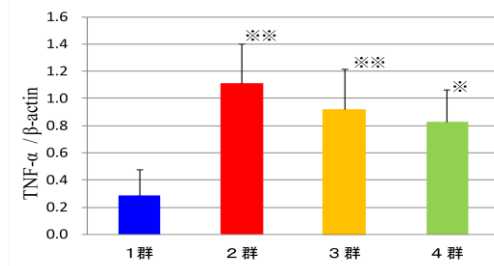


図4. TNF- α mRNA発現レベル(実験2)

※ p<0.05, ※※ p<0.01 vs. 1群
(Dunnett's Multiple comparisons test)

TNF- α mRNA 発現レベルは、1群に対し他の群はいずれも有意に増量した。しかしながら、p値については2群と3群でp<0.01であるのに対し、4群はp<0.05であった。

③IL-1 β mRNA 発現レベル (図5)

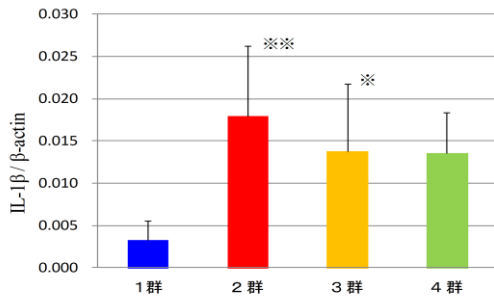


図5. IL-1 β mRNA発現レベル(実験2)

※ p<0.05, ※※ p<0.01 vs. 1群
(Dunnett's Multiple comparisons test)

IL-1 β mRNA 発現レベルは、1群に対し2群 (p<0.01)、3群 (p<0.05) は有意に増量したが、4群では有意な変化は見られなかった。

GFO 混合物および GFO 混合物+HMB 投与は、DSS 誘発マウス潰瘍性大腸炎の特徴である大腸長の短縮を明らかに抑制することはできなかったが、GFO 混合物+HMB 投与群(4群)の短縮は DSS 単独投与群(2群)よりも軽度で、DAI スコアも低値であった。また、体重、血液学的検査、赤血球ポリアミン測定では、GFO 混合物投与群(3群)と4群は、2群よりも良好な結果が得られた。また、その結果は3群よりも4群の方がより有効であった(実験1)。これらの有効性を確認するために、本モデルの発症初期と考えられる DSS 投与4日目における大腸粘膜の炎症性サイトカイン(TNF- α と IL-1 β)の mRNA 発現レベルを測定したところ、2群に対し3群、4群とも低値を示したが、この結果においても3群よりも4群の方が有効であった。4群が3群よりも有効であることより、これらの低値は HMB の NF- κ B の阻害作用が影響しているのかと予測されたが、今回の検討ではそれはみられなかった(実験2)。炎症性サイトカイン mRNA

発現レベルの低値、貧血抑制や赤血球ポリアミン値の抑制より、今回の抑制効果は、GFO 混合物、さらにそれに相加して HMB による腸管粘膜保護による可能性が示唆された。今後は GFO 混合物の配合比率の検討および HMB の濃度検討を実施していきたい。

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1件)

1. 千原 猛、東口高志、金児孝晃、伊藤彰博、二村昭彦、定本哲郎、村井美代、大原寛之、天野晃滋、篠邊篤志、柴田賢三、園田 茂、新保 寛、絶食下のラット小腸粘膜に対する GFO の修飾作用. 第26回日本静脈経腸栄養学会. 2011年2月18日. 名古屋(静脈経腸栄養 Vol.26, No.1, p384)

[その他]

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/FMIP/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

千原 猛 (CHIHARA TAKESHI)

藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所 講師

研究者番号：00217241

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

新保 寛 (SHIMPO HIROSHI)

藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所 教授

研究者番号：10142580

東口 高志 (HIGASHIGUCHI TAKASHI)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：40198974

伊藤 彰博 (ITO AKIHIRO)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：50273355