

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 4 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590876

研究課題名（和文） 新規バイオポリマーを用いた急性膵炎の腸管環境制御

研究課題名（英文） Intestinal environmental control by using a newly-produced biopolymer during the progression of acute pancreatitis.

研究代表者

阪上 順一（SAKAGAMI JUNICHI）

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：30305578

研究成果の概要（和文）：

新規に開発されたバイオポリマーである Polyhydroxybutyrate（PHB）の急性膵炎モデルにおける重症化防止メカニズムの有無を腸管内外環境の変化を中心に解析した。PHB は急性膵炎モデルにおけるバクテリアルトランスロケーションに対して防衛的に作用した。PHB は糞便中有機酸組成に変動を与えることなく腸内細菌叢に影響を及ぼし、腸管内容物の滞留が減少し、腸管環境に影響することが示唆された。その仔細なメカニズムは更なる検討を要するが、急性膵炎の腸管侵襲に対して PHB の腸内発酵が新しい治療になりえることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated if Poly-(R)-3-hydroxybutyrate (PHB), a newly-developed biopolymer, had a preventive effect against the progression of acute pancreatitis with regard to intra- and extra- intestinal environment. PHB showed significant protective activity toward the bacterial translocation in rats with severe acute pancreatitis. PHB affected both bowel flora and bowel amount without altering fecal organic acid composition. The precise mechanism remains unknown, but the intestinal fermentation of oral PHB might become a novel treatment for invasive intestinal involvement in acute pancreatitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、消化器内科学

キーワード：急性膵炎、微生物、バイオテクノロジー、バイオポリマー、腸管内環境、バクテリアルトランスロケーション

1. 研究開始当初の背景

現在わが国の重点対策特定疾患である重症急性膵炎は、10年前には年間1500例の発症であったが、現在では年間5000例を突破するに至っている。1998年の厚生省急性膵炎全国調査での重症急性膵炎の致命率は22%であった。以後、急性膵炎の死亡率は2003年の厚生労働省重症急性膵炎実態調査では致命率は8.9%と低下傾向を示している。これは、主に重症化初期における循環不全死が減少したことによるものと想定されており、膵炎発症2週間以降の後期合併症であるsepsisやseptic MOFによる致命率は10年間でほとんど変わっていないと考えられている。重症急性膵炎におけるsepsisのルートは、腸管からのbacterial translocation (BT)と考えられており、現在BTへの対策が重症急性膵炎の救命率向上のための急務と考えられている。

われわれは、急性膵炎症例1145例の検討で選択的消化管殺菌selective digestive decontamination (SDD)を実施した場合には死亡オッズ比が旧基準・重症Iの症例でのみ低下するだけであったが、経腸栄養enteral nutrition (EN)は軽症・中等症・重症I・重症II・最重症のいずれの重症度においても死亡オッズ比を低下させること、ENを比較的長期間(約1ヵ月間)実施した症例での致命率が低いこと、sepsisやMOFを伴う症例で有用であることを示し、腸管内環境がいかに重症急性膵炎の後期死亡に関与するかを報告した(阪上順一;後向き解析からみた急性膵炎診療における経腸栄養、SDDの有用性と欠点。消化と吸収。2005)。

PHBは難消化性糖質であり、哺乳動物の消化酵素では分解されず、多段階に腸内発酵し最終少量生成物として(R)-3-ヒドロキシ酪酸となると予想される。(R)-3-ヒドロキシ酪酸はイオン輸送(能動輸送)により腸管上皮から吸収され、腸管のエネルギー源として働く。また、酪酸などの短鎖脂肪酸は酸性状態下で病原性細菌の感染防御に役立つことが知られており、酪酸類似物質の(R)-3-ヒドロキシ酪酸は官能基にOH基をもつために水溶性が増し酪酸よりもBT防止に関与することが期待される。PHBの予期される機能は多彩であるが、腸内フローラのバランス改善、腸管運動調節、抗炎症作用を予想している。

今回検討したPHBは新規発酵技術により精製された物質である。PHBは生物の細胞膜やミトコンドリア内に存在しており食物から摂取していることから、経口投与に対する安全性は高い。PHBは酪酸や酪酸誘導体

と異なり無味無臭で容易に経口摂取可能であり、消化酵素の分解を受けないため安全に腸内フローラに到達することも利点である。動物実験等で生体侵襲時の治療効果が確立されれば、ヒト臨床応用への可能性が高い。

2. 研究の目的

酪酸誘導体ポリマーである Polyhydroxybutyrate (PHB); ポリ((R)-3-ヒドロキシ酪酸)は1927年にパスツール研で原核生物のエネルギー・炭素貯蔵物質として発見され、多くの好気/嫌気性微生物が酵素分解することが知られている。

PHBは多くの新規生理作用が期待されているバイオポリマーであるが、ごく最近まで精製不能であったため腸内細菌による分解・生体内での利用は現在までほぼ未研究である。共同研究の新規発酵技術によりPHBの生成が可能となった。

今回われわれは、PHBが急性膵炎モデルの重症化防止メカニズムを腸管/腸管内環境の解析を中心として明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験

5%PHB自由摂取下のWistar系雄性ラットに既報のごとく4.5g/kg体重の滅菌1-アルギニン塩酸塩を腹腔内投与して急性膵炎を作成した(PHB群)。対照群には標準飼料IRF-1を粉末化し給餌した。膵炎進展期であるアルギニン投与後0, 0.25, 0.5, 1, 3日における解析を行った(各n=8~20)。血中エンドトキシンをLimulus Amebocyte Lysate反応による比色定量で測定した。血中IL-1 β , IL-6, TNF α はELISA法にて測定した。併せてラットCRP測定、腹水/腸間膜リンパ節の細菌培養を実施した。腸管透過性評価として、FITC-dextran 750mg/kg経口投与1時間後の門脈血FITC濃度を測定した。屠殺1時間前にBrdU 20mg/kg体重を静注した。組織学的評価にはHE染色とBrdU染色、TUNEL染色を用いた。

腸管内関連の検討項目は、腹腔内臓器湿重量、糞便中のH₂O, NH₃, コハク酸, 乳酸, ギ酸, 酢酸, イソ酪酸, プロピオン酸, 酪酸, 吉草酸, イソ吉草酸, 腸管内容物重量, 盲腸内pHとした。併せて、盲腸内容物の腸内フローラの遺伝子解析(T-RFLP法)を行った。さらに右頸部から中心静脈栄養(CVC); 時間当たりブドウ糖 0.16g, 塩化ナトリウム 2.65mg, 酢酸カリウム 1.96mg, 燐酸二水素カリウム 1mg, 硫酸マグネシウム 0.67mg, グルコン酸カリウム 1.62mg, 硫酸亜鉛 5.23mg, 嚙菌類

必須アミノ酸含有とし、8日間飼育した(図1)。PHB群はCVC1日後からホモゲン(三栄源エフ・エフ・アイ)にて分散・安定化させたPHB1.25g含有粉末懸濁液を1日2回経空腸投与した。コントロール群はホモゲン分散液のみ投与し検討を加えた。



図1. ラット CVC・空腸瘻飼育状況.

4. 研究成果

ラットアルギニン誘発急性膵炎における腹水量の検討では、膵炎誘発6時間後においてPHB投与群で有意に腹水量の低下が認められた(図2A)。血中エンドトキシンは、膵炎誘発12時間後まではPHB投与の影響はみられなかったが、膵炎発症1日以降に有意な低値をとった(図2B)。腹水と腸間膜リンパ節の細菌培養における大腸菌・腸球菌陽性率の検討では、PHB投与群で膵炎誘発1日目有意に低率であった(図2C, 2D)。

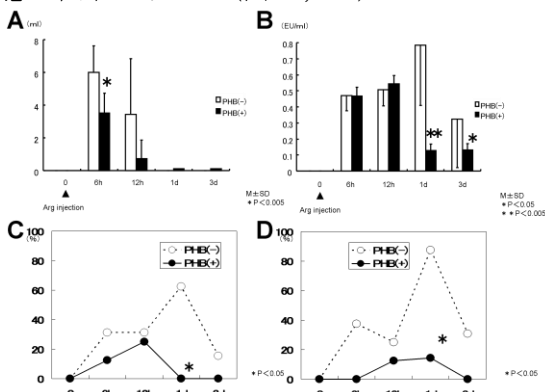


図2. バクテリアトランスロケーションに対するPHBの効果。A.腹水量 B.血漿エンドトキシン C. 腹水中大腸菌・腸球菌陽性率 D.腸間膜リンパ節中大腸菌・腸球菌陽性率

門脈血 FITC 濃度は膵炎発症12時間から1日後にかけて低下傾向を示した(図3A, 3B)。膵炎誘発12時間後における血中炎症性サイトカインの検討では、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6の低下傾向を認めるも、ラットCRP値の有意な変動はみられなかった(図3C, 3D, 3E, 3F)。

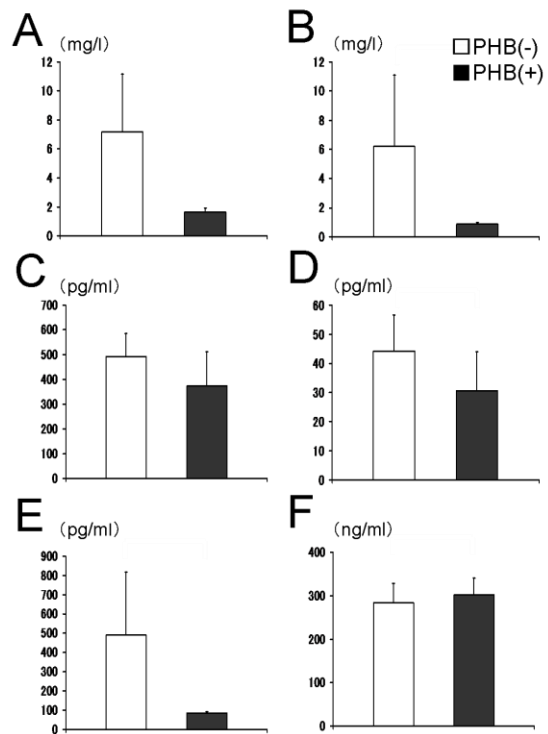


図3. アルギニン急性膵炎に対するPHBの効果
A: 膵炎誘発12時間後における門脈血FITC濃度
B: 膵炎誘発1日後における門脈血FITC濃度
C: 膵炎誘発12時間後における血中IL-1 β 値
D: 膵炎誘発12時間後における血中TNF- α 値
E: 膵炎誘発12時間後における血中IL-6値
F: 膵炎誘発12時間後における血中ラットCRP値

膵炎誘発6時間、12時間、1日後において小腸、大腸のHE染色とTUNEL染色による組織学的検討を実施した結果、6時間以降から小腸・大腸の萎縮がみられたが、PHB投与により、粘膜長短縮に防御効果があり、特に大腸粘膜上皮のアポトーシスが抑制されていた(図4)。増殖帯における小腸BrdU標識率に増加がみられたが有意ではなかった。

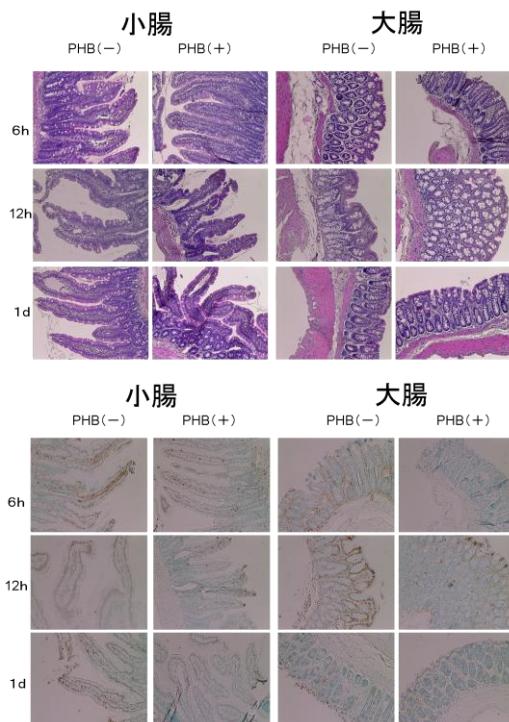


図4. ラットアルギニン急性膵炎後の腸管所見に対するPHBの影響 A.H&E染色 B. TUNEL染色
 糞便中H2O, NH3の減少, 盲腸内pH上昇, 胃滞留内容物の減少, 臓器湿重量減少(小腸, 腎臓)において有意差(p<0.05)がみられた. 糞便中有機酸組成には変動は与えなかった. T-RFLP法では, PHB投与により主にClostridium sp.の占拠割合の減少がみられた. より臨床例に即した環境であるCVC挿入下の急性膵炎モデルにおける生存分析において, PHBの致命率低減効果が示された(22% (PHB(-)) v. s. 4.2% (PHB(+))). CVC下であってもPHBは糞便中有機酸組成に変動を与えなかったが, T-RFLP法でClostridium sp.の占拠割合の減少が捉えられた.

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11件)

- ① 阪上順一、片岡慶正、保田宏明. 急性膵炎の重症度判定基準—2008改定を踏まえて. 日本医事新報、査読無、4436巻、2009、45-48、
- ② 阪上順一、桐原勇次郎、Jan Trna、他. 胆石性膵炎発症時における膵管径と病態との関係. 胆膵の病態生理、査読有、27(1)、2011、27-33、
- ③ 阪上順一. 抗菌薬(予防的投与)に関するpro/con. pro:重症化を想定したなら予防的投与を. INTENSIVIST 3(4)、2011、607-615、

[学会発表] (計8件)

- ① Suzuki N, Yasuda H, Sakagami J, Hasegawa H, Shinoda M, Sogame Y, Kataoka K, Yoshikawa T. Expression of the hedgehog pathway during exocrine pancreatic regeneration after arginine-induced acute necrotizing pancreatitis in rats. East Meets West : 40th anniversary meeting of the American pancreatic association and Japan pancreas society. 2009, Honolulu, USA.
- ② Sakagami J, Chari ST, et al. Relationship of visceral adiposity to severity in acute pancreatitis : A population-based study. International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society 2010. Fukuoka, Japan.
- ③ Sakagami J, Chari ST, et al. CT volumetric analysis of visceral organs in Autoimmune pancreatitis . International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society 2010. Fukuoka, Japan.

[図書] (計1件)

- ① 片岡慶正、阪上順一. 南江堂、慢性膵炎診療ガイドライン(日本消化器病学会編). 2009、195

[その他]

ホームページ等

京都府立医科大学 業績集特集

http://www.f.kpu-m.ac.jp/j/modules/pico/index.php?content_id=119

難病情報センター；難治性膵疾患に関する調査研究

<http://www.nanbyou.or.jp/entry/1468>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪上 順一 (SAKAGAMI JUNICHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号：30305578

(2) 研究分担者

保田 宏明 (YASUDA HIROAKI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号：40363973

片岡 慶正 (KATAOKA KEISHO)

京都府立医科大学・医学研究科・教授
 研究者番号：70185792