

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 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：26201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21780291

研究課題名（和文） トリブチリン経口投与による腸管障害抑制効果

研究課題名（英文） Effect of oral tributyrin in intestinal injury

研究代表者 三好 真琴 (MIYOSHI MAKOTO)

香川県立保健医療大学・保健医療学部・助教

研究者番号：50433389

研究成果の概要（和文）：

酪酸のトリグリセライドで prodrug であるトリブチリンの経口投与による腸管への効果を明らかにした。エンドトキシン非投与下において、血中酪酸濃度の上昇、腸管 PPAR γ 発現の増加、アポトーシスの促進を生じた。またエンドトキシン投与による炎症性サイトカイン（TNF α 、IL-1 β ）増加、腸管出血などの腸管障害、高い致死率のいずれをもトリブチリンは抑制した。トリブチリンの経口投与は、新しい機能性食品として、血中酪酸濃度上昇を介した生理的効果とは異なる腸管への効果を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Oral tributyrin, prodrug of butyrate, increased plasma butyrate level in inferior vena cava and expression of PPAR γ and apoptosis in small and large intestine. And tributyrin attenuated intestinal injury associated with lipopolysaccharide injection. The increase in pro-inflammatory cytokine TNF- α /IL-1 β mRNA level, pathological changes including hemorrhage, and high mortality were improved by tributyrin. Oral tributyrin increased plasma butyrate level and attenuated intestinal injury in endotoxemic rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：酪酸、トリブチリン、腸管 integrity

1. 研究開始当初の背景

ヒトや齧歯類の下部消化管で腸内フローラにより形成される酪酸は主に大腸粘膜上皮細胞のエネルギー源となり、また、大腸粘膜上皮への直接作用を有している。他方、酪酸は食品成分であり、乳汁由来の酪酸を含有する自然食品流動食が日本で販売されている。経口摂取した酪酸は、上部小腸で吸収され門脈血中酪酸濃度を上昇させるため、腸内細菌による酪酸生成とは異なった動態と作用が考えられる。また、侵襲時の免疫反応への関与は、想定されてはいるものの、未だ報告は少ない。

本研究では、酪酸のトリグリセライドで prodrug であるトリブチリンをラットに経口投与し、全身、特に腸管障害抑制効果について検討した。1998年に Conley らが固形癌患者に対してトリブチリンを経口投与し血中酪酸濃度を測定する Phase I study 行ったが、これは酪酸の分化促進作用、抗腫瘍効果に注目したものであり、経口投与した酪酸の腸管への直接効果について着目した報告はない。我々はすでにエンドトキシン血症モデルへの経口トリブチリン前投与が肝門脈血中酪酸濃度を上昇させることにより直接的に肝障害を抑制することを明らかにしており、腸管障害への効果も期待できる。従って、トリブチリン経口投与による腸管への効果とエンドトキシン誘発腸管障害抑制効果を解析することは、食品成分である短鎖脂肪酸の新しい生理活性研究に発展するものであり、学術的な価値を有する。

2. 研究の目的

(1) トリブチリン投与による腸粘膜 integrity に及ぼす効果を明らかにする。

(2) トリブチリン投与後、エンドトキシンにより腸管障害を誘発し、血中サイトカイン濃度測定、病理組織学的解析等からこれら障害への抑制効果を明らかにする。

3. 研究の方法

いずれの実験系も Wistar 系雄性ラットを使用した。

(1) トリブチリン投与による腸粘膜 integrity に及ぼす効果

トリブチリン 1.0 g/kg を経口投与後 2.5 および 25 時間後に犠死せしめ、腸管（空腸、回腸、結腸）を摘出した。腸粘膜上皮細胞に発現し、細胞増殖抑制とアポトーシス促進に関与することが明らかにされている転写因子 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ の mRNA と蛋白発現を解析した。また採取した腸管から切片を作製

し TUNEL 染色によりアポトーシス数を算出した。腸粘膜 integrity の指標として diamine oxidase (DAO) 活性を測定した。

(2) エンドトキシン血症下でのトリブチリン投与効果

エンドトキシン血症の誘発はトリブチリン 5.2 g/kg 経口投与 1 時間後にエンドトキシン lipopolysaccharide (LPS) 20 mg/kg を腹腔内投与した。LPS 投与後 1.5 および 9 時間後に腸管を採取し、tumor necrosis factor- α (TNF α)、interleukin-1 β (IL-1 β) および LPS のレセプターである Toll-like receptor (TLR) 2, TLR4 を real-time PCR 法にて検出した。TNF α と IL-1 β は ELISA でも測定した。また HE 染色標本により腸管障害を観察し、LPS 投与後 24 時間までの生存率を調べた。

4. 研究成果

(1) トリブチリン投与による腸粘膜 integrity に及ぼす効果

トリブチリン経口投与により投与 1 時間後に門脈血中酪酸濃度が 2.43 ± 0.12 mM にまで増加していることはすでに明らかにしているが、門脈だけでなく、下大静脈血中酪酸濃度も投与 1 時間後に 153 ± 10 μ M、2.5 時間後に 101 ± 42 μ M と上昇することを明らかにした ($p < 0.01$)。

またトリブチリン経口投与により PPAR γ 発現増加とアポトーシス促進がいずれの部位でも認められたが、その効果は部位により異なっていた。トリブチリン投与 2.5 時間後において回腸では PPAR γ mRNA 発現が増加しており ($p < 0.01$)、結腸では増加傾向が認められた ($p = 0.06$, 図 1)。投与 25 時間後では mRNA は有意な変化は認められなかったが、蛋白発現はいずれも増加しており、空腸と結腸では有意であった (図 2)。またアポトーシス数はいずれの部位でも増加していたが、結腸における効果をもっとも著しかった (図 3)。DAO 活性は空腸、回腸いずれもトリブチリン投与によって増加していた。

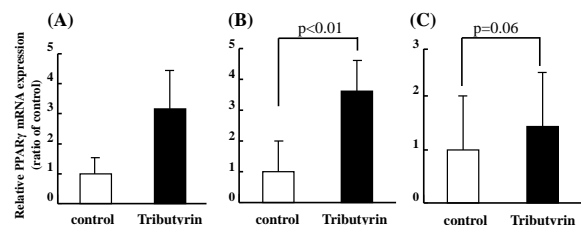


図1.投与2.5時間後のPPAR γ mRNA発現
A:空腸、B:回腸、C:結腸 (n=5~9)

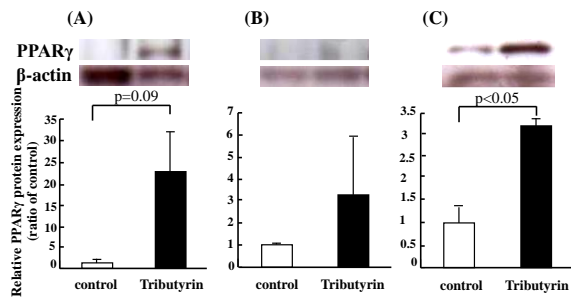


図2.投与25時間後のPPAR γ 蛋白発現
A:空腸、B:回腸、C:結腸 (n=3~5)

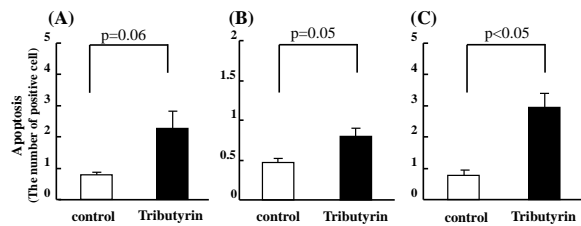


図3.投与25時間後のapoptosis (TUNEL陽性細胞数)
A:空腸、B:回腸、C:結腸 (n=2~3)
空腸・回腸は絨毛10本当り、結腸は腸粘膜上皮細胞
1000個当りの陽性細胞数を示す。

(2) エンドトキシン血症下でのトリブチリン投与効果

LPS 投与 1.5 時間後の空腸 TNF α 、IL-1 β mRNA 発現は LPS 群と比較してトリブチリン (TB) + LPS 群で発現増加が抑制されていた ($p < 0.05$, 図 4)。LPS 投与 1.5 時間後の TNF α 、IL-1 β 産生量も、mRNA の結果と同様に空腸における LPS 群での産生増加がトリブチリンによって抑制された。その他の部位と炎症性メディエーターなどの相互の関連については現在解析中である。また LPS のレセプターである TLR2, TLR4 mRNA 発現増加をトリブチリンは抑制する傾向を認めているが、現在詳細を解析中である。

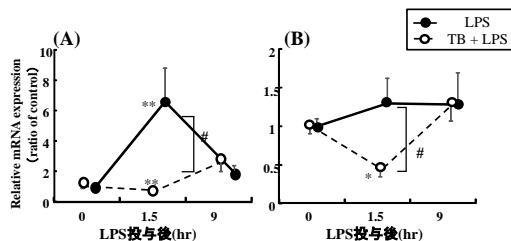


図4. LPS 投与後の空腸 TNF- α 、IL-1 β mRNA
A: TNF- α 、B: IL-1 β (n=8~18)
Mean \pm SEM. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ vs 0 hr, #; $p < 0.05$ vs LPS

LPS 投与 9 時間後の HE 染色標本より、LPS 群で多数認められた出血が TB + LPS 群では抑制されていた。

LPS 投与 24 時間では、LPS 群で 16.7% の生存率を TB + LPS 群では 83.3% と有意に改善した ($p < 0.01$, 図 5)。

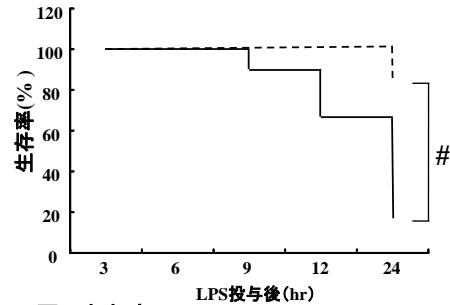


図5.生存率
実線:LPS群、点線:TB + LPS群 (n=6~16)
#: $p < 0.05$ vs LPS

以上より、トリブチリン経口投与は腸粘膜 integrity を増強し、侵襲下においては腸管障害軽減効果があり生存率を改善することが明らかになった。

通常、末梢血酪酸濃度はヒトで 1-4 μ M であるが、ラットは今回の結果では control 群で 20 μ M 前後であった。それに対してトリブチリン投与によって下大静脈血での酪酸濃度は 8 倍程度の有意な上昇が得られた。従って、トリブチリン経口投与による門脈血中酪酸濃度上昇を介した肝障害抑制効果と同様に、血中濃度上昇が今回の結果にも影響している可能性が考えられる。

腸粘膜上皮細胞において酪酸による PPAR γ 活性上昇を介したアポトーシス誘導が *in vitro* で報告されており、今回、この結果と一致してトリブチリンによって腸管 PPAR γ 発現とアポトーシス促進を明らかにした。トリブチリンによる PPAR γ 発現増加効果が部位によって異なっていたことに関して、経口投与したトリブチリンが血中に吸収され basolateral side から作用したために結腸では 25 時間後に 3.1 倍に蛋白発現が増加し、他方、腸管内の luminal side からのトリブチリンによって空腸では 22 倍に顕著に増加する効果が得られたと考えられる。

エンドトキシン血症ラットにおいて、トリブチリンが炎症性サイトカイン増加、腸管出血および致死率増加を抑制することを明らかにした。トリブチリンによるサイトカイン産生抑制を介して腸管出血が改善され、最終的に生存率改善に効果を及ぼした可能性が考えられる。現在 LPS のレセプターである

TLR2, TLR4 の発現について解析中であり、今後その機序を明らかにする予定である。

今回、エンドトキシン非投与下と投与下でトリブチリンを 1.0 g/kg、5.2 g/kg とそれぞれ異なる量を投与した。エンドトキシン非投与下の実験では、トリブチリンが低濃度でも腸管への効果が得られることを明らかにした。また肝障害の抑制効果を明らかにした LPS 10 mg/kg 腹腔内投与では腸管に著しい障害が認められなかったために、エンドトキシン投与実験ではトリブチリンと LPS の投与量を増加させた。トリブチリン 1.0 g/kg と LPS 10 mg/kg 投与では LPS 投与 24 時間後の生存率がいずれも 88%前後と差がなかったが、トリブチリンによる顕著な致死率改善効果は今回の投与量で初めて得られた。

食品成分であるトリブチリン投与による systemic な炎症抑制効果は、腸管の炎症が関与する多様な病態のコントロールに発展すると考えられる。今後、トリブチリン投与による腸管障害抑制効果の機序について詳細な検討を行う予定である。

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 3 件)

- (1) 三好真琴、高津美和、飯塚宣仁、他 6 名、Tributylin 経口投与によるラット腸粘膜 PPAR γ 発現および apoptosis への影響、機能性食品と薬理栄養、7、251-256、2012、査読有。
- (2) 坂木宏衣、三好真琴、飯塚宣仁、他 3 名、Tributylin 経口投与によるエンドトキシン誘発肝障害の抑制、機能性食品と薬理栄養、6、337-342、2011、査読有。
- (3) Miyoshi M, Sakaki H, Usami M, et al. Oral administration of tributyrin increases concentration of butyrate in the portal vein and prevents lipopolysaccharide-induced liver injury in rats. Clin Nutr 30, 252-258, 2011. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- (1) 三好真琴、Tributylin 経口投与によるエンドトキシン血症ラットの腸管 TNF α 産生抑制と生存率改善、第 10 回日本機能性食品医用学会、2012 年 12 月 16 日、東京

慈恵大学 (東京都)

- (2) 三好真琴、エンドトキシン血症下腸管障害におよぼす Tributyrin 経口投与の効果、第 7 回日本臨床検査学教育学会学術大会、2012 年 08 月 23 日、名古屋国際会議場(愛知県)
- (3) 三好真琴、Tributylin 経口投与によるエンドトキシン血症下の腸管障害抑制効果、第 49 回日本外科代謝栄養学会学術集会、2012 年 07 月 05 日、シェラトン・グランデ・トーキョーベイ・ホテル (千葉県)
- (4) 三好真琴、ラット腸粘膜 apoptosis および PPAR γ 発現におよぼす tributyrin 経口投与の効果、第 27 回日本静脈経腸栄養学会、2012 年 2 月 23 日、神戸ポートピアホテル (兵庫県)
- (5) 三好真琴、Tributylin 経口投与によるラット腸粘膜 apoptosis および PPAR γ 発現への影響、第 9 回日本機能性食品医用学会、2011 年 12 月 11 日、大阪大学コンベンションセンター (大阪府)
- (6) 三好真琴、Tributylin 経口投与のラット腸粘膜 apoptosis および PPAR γ 発現への効果、第 6 回日本臨床検査学教育学会学術集会、2011 年 8 月 18 日、新潟大学医学部保健学科 (新潟県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 真琴 (MIYOSHI MAKOTO)

香川県立保健医療大学・保健医療学部・助教

研究者番号：50433389