

腸管虚血再灌流傷害増悪因子としての
腸内容停滞に関する基礎的検討（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系消化器外科学専攻

宮国 泰己

2016 年

指導教員 高山 忠利

近年、侵襲時の生体反応を考えるうえで、腸管虚血再灌流（I/R: ischemia-reperfusion）傷害やバクテリアル・トランスロケーション（BT: bacterial translocation）の重要性が明らかになり、腸管の意義が注目されている[1-8]。腸管虚血再灌流傷害は、大手術、大出血、ショックなど腸管血流の一時的低下を引き起こす侵襲で生じる現象である[9-11]。実際の臨床においても、通常の大腸手術時に腸管の血流が、開始時に比べて、手術終了時に、50%近く減少しているとの報告もあり[12]、手術後には局所での低灌流状態と共に、腸管虚血再灌流傷害が生じていると考えられる。侵襲からの回復過程において、全身循環の改善とともに腸管の低灌流は改善していく。積極的な蘇生は、その改善過程を早める。しかし、腸管の低灌流の程度が高度で、その継続時間が長きにわたった場合は、回復過程に必須な、治療の結果生じる腸管血流の改善が、逆に酸化ストレス、炎症性メディエーター産生の増大を引き起こし、好中球の過剰活性化とあいまって、腸管傷害・遠隔臓器障害を招いてしまう[1, 2, 11, 13, 14]。それゆえに、腸管虚血再灌流傷害は、深刻な多臓器不全（MOF）の重要なメカニズムの一つと考えられ[3]、その予防策・治療法の確立が急務である。実際、腸管虚血再灌流傷害を軽減、予防するための様々な治療が考案され臨床の現場で利用されてきたが[15-18]、確立したものは無く、明らかな成果が得られていないのが現状である。

近年の基礎研究・臨床研究で腸内環境の変化が腸管の免疫系に大きな影響をおよぼすことが、明らかになりつつある[19, 20]。動物の腸管虚血再灌流モデルでは、腸管の拡張と腸内容の停滞が認められる。腸管虚血再灌流を生じるような重症患者においても、しばしば同様の腸管の拡張と腸管内容停滞が観察される。これら腸管内容の停滞が、腸内環境の変化とあいまって、その後の全身性の炎症反応増悪・臓器障害・予後悪化を招く重要な機序になっていると考えた。

そこで、本研究では、腸管虚血再灌流に回腸末端の結紮（Lig: Ligation）を加え、腸管内容の停滞をさらに増悪させ、病態が悪化するか否か、マウスを用いた動物実験で検討した。また、腸管虚血再灌流傷害で生じた腸管内容の停滞を早期に解消することが、重症患者の予後改善の新しい治療法に成り得るかの検討も行った。今回、これらの検証のために、生存実験を行うとともに、全身性および腸管における炎症反応の評価、組織傷害の評価を行った。すべての実験に 6 週齢の雄性 Institute of Cancer Research (ICR)マウスを用いた。

最初に、回腸末端結紮の有無（Lig-I/R 群, I/R 群）による腸管虚血再灌流後の生存の比較を行った。腸管虚血再灌流マウスの回腸末端を結紮して、腸管内容を停滞させること(Lig-I/R 群)が、生存を悪化させることが明らかになった。

次に、この炎症の程度を評価するために、マウスを Lig-I/R 群, I/R 群, Lig 群(結紮のみを行った)に分け、腸管虚血再灌流後の血漿と小腸組織ホモジネイト上清のサイトカイン値 (interleukin 6 (IL-6), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin 10 (IL-10)) を測定した。Lig-I/R 群では、血漿および小腸組織中の炎症性サイトカイン(IL-6, MCP-1)の値が、I/R 群や Lig 群に比べて、高値を示していた。また、Lig-I/R 群では、抗炎症性サイトカインである IL-10 の血中レベルが、I/R 群に比べて有意に低下していた。これらの結果は、腸管内容の停滞が全身性に炎症性の反応を増悪させていたと言えるであろう。腸管で産生されたサイトカインが腸管内腔に分泌され、腸管内腔の炎症性サイトカインレベルが高まり、これが全身性の生体反応を悪化させている可能性を考えた。実際、炎症が生じた生体では腸管内腔の炎症性サイトカインレベルが高まっているとの報告があり [21-23]、腸管内容の質的变化の可能性を調べるために、本研究は腸管内容液中のサイトカインレベル (IL-6, TNF α , IL-10) を測定したが、今回の検討では、I/R 群と Lig-I/R 群の間に明らかな差を認めなかった。侵襲による腸管内のサイトカイン環境の変化は、今回の測定では示されなかった。今回測定したサイトカイン以外のメディエーターが腸管内腔で高まっていた可能性も考えられ、これらの因子の評価が今後の課題である。

腸管の透過性の亢進についての検討も行った。腸管内容の停滞により、腸管内腔に存在する病原菌や毒素の腸管壁通過が容易になり、炎症を助長している可能性がある。腸管バリアーを通常は通過しないと報告されている蛍光ラベルした Fluorescein-isothiocyanate (FITC) –dextran [24]をマウスに経口投与した後、侵襲後の血中レベルを測定することで、腸管の透過性を測定した[24-27]。その結果、腸管虚血再灌流に回腸結紮を加えた場合、結紮を加えない場合に比べ腸管透過性が亢進することが明らかになった。

今回、回腸末端結紮に伴う腸管内容停滞が引き起こす傷害の程度を調べるため、サイトカインに加えて高度侵襲時に発現する炎症性メディエーターとして、近年注目されている high mobility group box chromosomal protein1 (HMGB-1)[28, 29]の血漿中の値を測定した。HMGB-1 は、細胞が壊れた際に分泌される蛋白質であり、外科的侵襲でも血中の HMGB-1 濃度が上昇することが報告されている[30, 31]。血漿 HMGB-1 値は、Lig-I/R 群が、I/R 群や Lig 群に比べて、有意に高値を示しており、Lig-I/R 群で、細胞傷害が強く生じていたことがわかる。これは、腸管内容停滞によって、侵襲が助長され、傷害が強かったことを示している。また、今回、組織の傷害度の評価として、病理組織学的な評価も行っており、腸管組織の組織学的傷害度も Lig-I/R 群では、I/R 群に比べて高かった。腸

を結紮することによって、腸管壁を通して大腸から回腸に供給されていた血流が遮断され、腸管虚血の程度が悪化した可能性も否定できない。しかし、回腸末端の結紮にもかかわらず、空腸での組織学的傷害度において、Lig-I/R 群と I/R 群との間に有意な差を認めた。これは、空腸の方が、SMA クリップによる虚血の影響が出たからかもしれない。腸管内容の停滞が、侵襲局所である小腸、特に空腸の傷害を増悪させ、全身性の炎症反応を増強し、病態悪化に繋がっていることがこれらより明らかになった。

腸管虚血再灌流後に生じる腸管内容停滞を解消することが、病態改善につながる可能性を考え、空腸内容ドレナージ実験を行った。その結果、drainage 群が、non-drainage 群に比べて生存時間改善を示した。このことから、臨床においても、重症患者の空腸内腔に大量の貯留液が存在する場合、それをドレナージすることで、病態を改善できるかもしれないと考えた。炎症反応の評価のために測定した、血漿中の炎症性サイトカインレベル (IL-6, MCP-1, TNF α) は、drainage 群が non-drainage 群に比較して低値であった。ドレナージすることで、血漿中の炎症性サイトカイン値の上昇を抑制できたことから、腸管内容停滞の解消が、全身性炎症反応の改善に繋がると言えるであろう。また、再灌流後の血漿 HMGB-1 値は、non-drainage 群が、drainage 群に比べて有意な高値を示した。これもまた、腸管内容停滞

の解消が、全身性の炎症を改善させていたと考えられた。小腸の病理学的な組織傷害レベルでも、**drainage** 群が **non-drainage** 群よりも軽度であった。ドレナージは、腸管組織自体の傷害を軽減することが主体であり、腸管の透過性亢進に伴う全身性の炎症を軽減して、病態悪化を改善していることが考えられる。

今回の研究から、重篤な腸管低灌流に陥った患者では早期の腸管内容のドレナージが、予後改善に有効であると推察され、重症患者の新しい治療法として期待できる。早期腸管内容ドレナージを選択することで、予後の改善が期待できる患者をどのように選別するか、その判断基準を設けることが重要であろう。さらには、ドレナージから早期経腸栄養に切り替える適切なタイミングを求めることが必要となる。

以上より、腸管虚血再灌流後の腸管内容停滞が予後を悪化させること、早期腸管内容ドレナージが生存を改善することが明らかになり、腸管傷害と全身性炎症反応の変化がそのメカニズムとして重要であることが示唆された。空腸内容ドレナージは腸管血流の低下を伴う重症患者の新しい治療法として期待できる。

引用文献：

[1] Hassoun HT, Kone BC, Mercer DW, et al. Post-injury multiple organ failure: the role of the gut.

Shock. 2001;15:1-10.

[2] Fukatsu K, Sakamoto S, Hara E, et al. Gut ischemia-reperfusion affects gut mucosal immunity: a

possible mechanism for infectious complications after severe surgical insults. *Crit Care Med*.

2006;34:182-187.

[3] Mallick IH, Yang W, Winslet MC, et al. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective

strategies against injury. *Dig Dis Sci*. 2004;49:1359-1377.

[4] Lemaire LC, van Lanschot JJ, Stoutenbeek CP, et al. Bacterial translocation in multiple organ

failure: cause or epiphenomenon still unproven. *Br J Surg*. 1997;84:1340-1350.

[5] SCHWEINBURG FB, SELIGMAN AM, FINE J. Transmural migration of intestinal bacteria; a

study based on the use of radioactive *Escherichia coli*. *N Engl J Med*. 1950;242:747-751.

[6] Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal

tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun*.

1979;23:403-411.

- [7] Luo CC, Shih HH, Chiu CH, et al. Translocation of coagulase-negative bacterial staphylococci in rats following intestinal ischemia-reperfusion injury. *Biol Neonate*. 2004;85:151-154.
- [8] Simpson R, Alon R, Kobzik L, et al. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg*. 1993;218:444-453.
- [9] Idrovo JP, Yang WL, Jacob A, et al. AICAR Attenuates Organ Injury and Inflammatory Response after Intestinal Ischemia and Reperfusion. *Mol Med*. 2015;20:676-683.
- [10] Marshall JC, Christou NV, Meakins JL. The gastrointestinal tract. The "undrained abscess" of multiple organ failure. *Ann Surg*. 1993;218:111-119.
- [11] Ikezawa F, Fukatsu K, Moriya T, et al. Albumin infusion after reperfusion prevents gut ischemia-reperfusion-induced gut-associated lymphoid tissue atrophy. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2006;30:380-386.
- [12] Braga M, Gianotti L, Vignali A, Carlo VD. Preoperative oral arginine and n-3 fatty acid supplementation improves the immunometabolic host response and outcome after colorectal resection for cancer. *Surgery*. 2002 Nov;132(5):805-14.

[13] Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation.

Am J Physiol. 1986 ;250:G749-753.

[14] Moore EE, Moore FA, Franciose RJ, et al. The postischemic gut serves as a priming bed for circulating neutrophils that provoke multiple organ failure. *J Trauma.* 1994 ;37:881-887.

[15] Nakamura K, Ogawa S, Dairiki K, et al. A new immune-modulating diet enriched with whey-hydrolyzed peptide, fermented milk, and isomaltulose attenuates gut ischemia-reperfusion injury in mice. *Clin Nutr.* 2011;30:513-516.

[16] Zhang T, Wang Y, Ban R, et al. Oral administration of lactoferrin attenuates intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Eur Surg Res.* 2012;49:99-106.

[17] Matsuo S, Yang WL, Aziz M, et al. Cyclic arginine-glycine-aspartate attenuates acute lung injury in mice after intestinal ischemia/reperfusion. *Crit Care.* 2013;17:R19.

[18] Zobot GP, Carvalhal GF, Marroni NP, et al. Glutamine prevents oxidative stress in a model of mesenteric ischemia and reperfusion. *World J Gastroenterol.* 2014 ;20:11406-11414.

[19] Fagarasan S, Muramatsu M, Suzuki K, et al. Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science.* 2002;298:1424-1427.

- [20] Reikvam DH, Erofeev A, Sandvik A, et al. Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS One*. 2011;6:e17996.
- [21] Sonnier DI, Bailey SR, Schuster RM, et al. TNF- α induces vectorial secretion of IL-8 in Caco-2 cells. *J Gastrointest Surg*. 2010;14:1592-1599.
- [22] Sonnier DI, Makley AT, Friend LA, et al. Hemorrhagic shock induces a proinflammatory milieu in the gut lumen. *J Surg Res*. 2011;170:272-279.
- [23] Sonnier DI, Bailey SR, Schuster RM, et al. Proinflammatory chemokines in the intestinal lumen contribute to intestinal dysfunction during endotoxemia. *Shock*. 2012;37:63-69.
- [24] Chen LW, Hsu CM, Cha MC, et al. Changes in gut mucosal nitric oxide synthase (NOS) activity after thermal injury and its relation with barrier failure. *Shock*. 1999;11:104-110.
- [25] Jésus P, Ouelaa W, François M, et al. Alteration of intestinal barrier function during activity-based anorexia in mice. *Clin Nutr*. 2014;33:1046-1053.
- [26] Haque SM, Chen K, Usui N, et al. Alanyl-glutamine dipeptide-supplemented parenteral nutrition improves intestinal metabolism and prevents increased permeability in rats. *Ann Surg*. 1996;223:334-341.

- [27] Williams JM, Duckworth CA, Watson AJ, et al. A mouse model of pathological small intestinal epithelial cell apoptosis and shedding induced by systemic administration of lipopolysaccharide. *Dis Model Mech.* 2013;6:1388-1399.
- [28] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice, *Science.* 1999 Jul 9;285(5425):248-51.
- [29] Levy RM, Mollen KP, Prince JM, et al. Systemic inflammation and remote organ injury following trauma require HMGB1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007 Oct;293(4):R1538-44.
- [30] Suda K, Kitagawa Y, Ozawa S, et al. Serum concentrations of high-mobility group box chromosomal protein 1 before and after exposure to the surgical stress of thoracic esophagectomy: a predictor of clinical course after surgery?. *Dis Esophagus.* 2006;19(1):5-9.
- [31] Hatada T, Wada H, Nobori T, et al. Plasma concentrations and importance of High Mobility Group Box protein in the prognosis of organ failure in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost.* 2005 Nov;94(5):975-9.