

博士論文

術後早期回復と合併症予防のための新規治療法開発  
に関する基礎的研究

東園 和哉

論文題目；術後早期回復と合併症予防のための新規治療法開発に  
関する基礎的研究

所属；外科学専攻

指導教員名；瀬戸 泰之 教授

申請者名；東園 和哉

## 略語表

GALT: gut-associated lymphatic tissue

PP: Peyer's patches

IE: intraepithelial

LP: lamina propria

CHO: carbohydrate

DAB: 3,3'-diaminobenzidine, tetrahydrochloride

TUNEL: TdT-mediated dUTP nick end labeling

Gut I/R: Gut ischemia reperfusion

RLU: Relative Light Unit

8-OHdG: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

MPO: Myeloperoxidase

## 目次

1.	要旨	1
2.	序文	2
3.	24 時間の絶食がマウスの腸管免疫及び腸管組織に与える影響	3
3-1:	背景と目的	6
3-2:	対象と方法	7
3-2-1:	対象	7
3-2-1:	GALT (gut associated lymphoid tissue) リンパ球の抽出	9
3-2-2:	免疫グロブリン A レベルの測定	12
3-2-3:	小腸絨毛形態の組織学的検討	12
3-2-4:	統計学的検討法	13
3-3:	結果	15
3-3-1:	GALT リンパ球数	15
3-3-2:	鼻腔、気管支・肺胞及び腸管洗浄液中の免疫グロブリン A レベル	17
3-3-3:	空腸・回腸の絨毛高/陰窩深	19
3-4:	考察及び小括	22

4.	12 時間の絶食期間と炭水化物水投与がマウスの腸管免疫及び腸管組織 に与える影響	24
4-1	: 背景と目的	24
4-2	: 対象と方法	25
4-2-1	: 対象	25
4-2-2	: GALT リンパ球の抽出とフェノタイプの同定	27
4-2-3	: 免疫グロブリン A レベルの測定	27
4-2-4	: 小腸絨毛形態の組織学的検討	28
4-2-5	: 免疫組織染色による小腸絨毛上皮の細胞増殖とアポトーシスの 評価	28
4-2-6	: 統計学的検討法	29
4-3	: 結果	31
4-3-1	: GALT リンパ球数とフェノタイプ	31
4-3-2	: 鼻腔、気管支・肺胞及び腸管洗浄液中の免疫グロブリン A レ ベル	34
4-3-3	: 空腸・回腸における絨毛高/陰窩深	36
4-3-4	: 小腸絨毛上皮の細胞増殖能とアポトーシス	40
4-4	: 考察及び小括	46

5.	術前運動療法が腸管虚血再灌流傷害後の生存に及ぼす影響 (適切な運動強度の決定) . . . . .	51
5-1 :	背景と目的 . . . . .	51
5-2 :	対象と方法 . . . . .	52
5-2-1 :	トレッドミル運動プロトコールと運動完遂率の設定 . . . . .	52
5-2-2 :	腸管虚血再灌流傷害 . . . . .	52
5-2-3 :	運動期間・頻度の違いが運動完遂率と腸管虚血再灌流傷害後の生存に及ぼす影響 . . . . .	53
5-2-4 :	運動速度の違いが運動完遂率と腸管虚血再灌流障害後の生存に及ぼす影響 . . . . .	54
5-2-5 :	統計学的検討法 . . . . .	54
5-3 :	結果 . . . . .	55
5-3-1 :	異なる運動期間・頻度の運動プロトコールの運動完遂率と腸管虚血再灌流後の生存 . . . . .	55
5-3-2 :	異なる運動速度の運動プロトコールの運動完遂率と腸管虚血再灌流後の生存 . . . . .	57
5-4 :	考察及び小括 . . . . .	59

6.	術前の運動療法がマウス腸管虚血再灌流モデルの臓器障害及び 各種メディエーターに及ぼす影響	60
6-1	: 背景と目的	60
6-2	: 対象と方法	62
6-2-1	: 対象	62
6-2-2	: 各主要臓器の組織傷害度のスコアリング	64
6-2-3	: 腸管の各種メディエーター	66
	・ 腸管の ATP および ATP+ADP+AMP レベルの測定	
	・ 腸管の 8-OHdG レベルの測定	
	・ 腸管の各種サイトカインレベルの測定	
	・ 腸管のミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性の測定	
6-2-4	: 尿中・血中の各種メディエーター	69
	・ 尿中の 8-OHdG レベルの測定	
	・ 血中の各種サイトカインレベルの測定	
6-2-5	: 運動による体組成の変化と筋肉中の各種メディエーター	69
	・ 運動による体組成の変化	
	・ 筋肉中の ATP および ATP+ADP+AMP の測定	
	・ 筋肉中のマイオカインレベルの測定	

6-2-6 : 統計学的検討法 . . . . .	71
6-3 : 結果 . . . . .	72
6-3-1 : 各臓器の組織傷害とスコアリング . . . . .	72
・ 腸管の組織傷害と傷害度スコア	
・ 肺の組織傷害と傷害度スコア	
・ 肝臓の組織傷害と傷害度スコア	
・ 腓腹筋の組織傷害と傷害度スコア	
6-3-2 : 腸管の各種メディエーター . . . . .	80
・ 腸管の ATP および ATP+ADP+AMP レベル	
・ 腸管の 8-OHdG レベル	
・ 腸管の各種サイトカインレベル	
・ 腸管のミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性	
6-3-3 : 尿中・血中の各種メディエーター . . . . .	88
・ 尿中の 8-OHdG レベル	
・ 血中の各種サイトカインレベル	
6-3-4 : 運動による体組成の変化と筋肉中の各種メディエーター . 92	
・ 運動による体組成の変化	
・ 筋肉中の ATP および ATP+ADP+AMP	



・筋肉中のマイオカインレベル

6-4 : 考察及び小括	98
7. 総括	103
8. 謝辞	107
9. 引用文献	108

## 1. 要旨

術後の早期回復と合併症予防のために術前炭水化物含有液摂取とプレハビリテーションが注目されている。今回、前者が粘膜防御の要である腸管免疫と腸管構造の維持に有効であること、後者が筋力改善のみならず腸管虚血再灌流時の過剰な炎症反応の制御・臓器障害軽減・予後改善に有効であることを動物実験で明らかにした。両者はすでに臨床の現場で一部取り入れ始められているが、今回の研究でその新しい意義が示され、今後のよりよい周術期管理の発展につながると期待される。

## 2. 序文

周術期の合併症を予防し、患者の回復を促進することは外科領域において積年の課題であり、課題解決に向けた様々な包括的周術期プログラムが提唱されてきた。ERAS®(Enhanced recovery after surgery), Fast track surgery などの欧米のプログラムは、術後入院期間の短縮、合併症の予防や、入院期間短縮による費用の削減など様々な臨床成果を示している<sup>[1] [2] [3]</sup>。また最近では、日本外科代謝栄養学会が、術後回復意欲の促進を主眼とした ESSENSE というプログラムを提唱している。こうした術後早期回復プログラムで共通しているのは、術前の絶食期間を可能な限り短縮し術後早期に経口摂取を再開すること、すなわち腸管を栄養投与ルートとしてできる限り使用することを推奨している点である。その理由は、腸管が侵襲時の生体反応において中心的な役割を果たしていることが近年の研究で明らかとなったからである。

腸管内腔には大量の病原体や毒素が存在し、これらは高度侵襲時に腸管バリアを超えて体内に侵入し、全身性の炎症反応や重篤な感染症を引き起こすことが知られている<sup>[4]</sup>。この現象は **Bacterial Translocation (BT)** と呼ばれ、敗血症や多臓器不全の原因であると考えられている。さらに、大量出血やショックの際に重要臓器の血流を保つために腸管の血流が犠牲となり、その後の腸管血流の回復に伴って生じる腸管虚血再灌流 (**Gut I/R : Gut ischemia reperfusion**) が過

剰な炎症反応を惹起し、遠隔臓器の臓器障害を引き起こすことが知られている<sup>[5]</sup>  
<sup>[6]</sup>。従って、外科侵襲によって起こる腸管バリアの破綻を抑えること、及び腸管  
虚血再灌流傷害を軽減・予防することが周術期の合併症予防にとって重要であ  
ることが示唆される。

腸管のバリア機構としては、腸管リンパ装置（GALT : Gut associated  
lymphoid tissue）による免疫学的バリアと粘膜の構造による物理的バリアが重要  
である。腸管は全身の 60-70%の免疫細胞を有する人体最大の免疫器官であり、  
GALT はその免疫機構の要として機能している。GALT のパイエル板(PP : Peyer's  
patch)で感作されたリンパ球は胸管を経て体循環に戻り、一部は腸管上皮間

(IE : Intraepithelial) や粘膜固有層 (LP : Lamina propria) に、一部は腸管外の呼  
吸器や泌尿器系などの粘膜にホーミングする (CMIS : Common mucosal immune  
system) <sup>[7]</sup> <sup>[8]</sup>。それぞれの粘膜で、これらのリンパ球は免疫グロブリン A (IgA)  
や各種メディエーターを産生し、粘膜防御に貢献している<sup>[9]</sup>。基礎・臨床研究で  
腸管の免疫学的・物理的バリアの維持には腸管を使った栄養管理、すなわち、  
経口摂取、経腸栄養が静脈栄養よりも優れていることが報告されている<sup>[10]</sup> <sup>[11]</sup> <sup>[12]</sup>。  
術前早期回復プログラムで、絶食期間を短縮し、腸管内に栄養を可能な限り早  
期から投与することが推奨される所以はここにある。術後早期回復プログラ  
ムの重要項目の一つである、手術直前の炭水化物含有水 (CHO : Carbohydrate) 投

与はインスリン抵抗性の改善、筋力の維持効果がこれまで報告されている<sup>[13] [14]</sup>。  
しかし、術前絶食期間の短縮に寄与していることを考えれば、腸管の免疫学的・  
物理的バリア改善効果も持つかもしれない。

さらに、従来の術後早期回復プログラムでは検討されていなかったが、  
近年術前の運動療法も術後早期回復に寄与するものとして注目を集めている<sup>[15]</sup>  
<sup>[16]</sup>。運動療法は以前から心血管・神経・内分泌分野などで取り入れられており、  
心血管イベントの減少、認知機能の改善や、糖尿病患者におけるインスリン抵  
抗性の軽減など、その効果が多岐にわたって報告されてきた<sup>[17] [18] [19]</sup>。外科周術  
期においても、術前の運動療法が筋肉量・筋力を強化、サルコペニアを予防す  
ることで術後の ADL を改善し早期回復に寄与することが臨床的に報告されてい  
る<sup>[20]</sup>。しかし、近年の研究で、運動療法が様々な侵襲モデルにおいて、生体反  
応を調整することが明らかになっている<sup>[21] [22]</sup>。従って、術前運動療法には単な  
る筋肉の量や質を向上させるという直接作用だけではなく、例えばマイオカイ  
ンの分泌や、腸管虚血再灌流傷害に対する **Preconditioning** を介しての炎症反応・  
臓器障害を軽減する効果があるかもしれない<sup>[23] [24]</sup>。

そこで本研究ではマウスを用いて、まず、炭水化物含有水の効果検証の  
ために、1) 24 時間の絶飲食が腸管の物理的・免疫学的バリア機構に与える影響、  
次に 2) 12 時間の絶食期間と炭水化物水投与が腸管の物理的・免疫学的バリア機

構に及ぼす影響、を評価した。さらに、術前運動療法による生体反応調整効果  
検証のために、3) 腸管虚血再灌流傷害モデルにおける予後、臓器障害や各種メ  
ディエーターの評価を行うことを目的とした。

今回の研究における動物実験プロトコールは東京大学の倫理委員会で  
承認されたものであり、東京大学大学院医学系研究科・研究ガイドライン（実  
験系）（<http://www.m.u-tokyo.ac.jp/education/guideline.html>）に則り行われた。

### 3. 24時間の絶食期間がマウスの腸管免疫及び腸管組織に与える影響

#### 3-1：背景と目的

周術期回復プロトコールでは、可能な限り術前術後の絶食期間を短縮することを推奨している。しかしながら、依然として手術前に24時間、あるいはそれ以上の期間、栄養投与を受けていない患者がいることも少なくない。さらに、嘔気や下痢などの消化器症状を有する患者や、精密検査前の患者が絶食を指示されることも多く見受けられる<sup>[25]</sup>。もし、短時間の絶食であっても腸管バリア機構が障害されうるのであれば、臨床医は患者が絶食状態になることを回避するか、少なくとも最小限に抑える必要がある。そこで本検討では、24時間の絶飲食が腸管の免疫学的・物理的バリア機構に与える影響を明らかにするために以下の実験を行った。

## 3-2 : 対象と方法

### 3-2-1 : 対象

5 週齢の Institute of Cancer Research (ICR)マウス (雄性、n=24、27g - 30g)

(Charles River Laboratories Japan、INC. Japan) を購入した。搬入後、マウスを通常食餌 (MF、オリエンタル酵母工業株式会社 バイオ事業部) で飼育し、1 週間環境順応させた後に実験を開始した。マウスを、食餌 (MF) を自由摂取させる群 (Control 群、n=8)、24 時間の絶飲食群 (Fasted water (-)、n=8) 及び絶食のみ (Fasted water(+))群、n=8) の 3 群に無作為に割り付けた (図 1)。24 時間の絶食期間は AM08:00~翌 AM08:00 とした。ケタミン・100 mg/kg とキシラジン・10 mg/kg の混合溶液を皮下に注入し全身麻酔を行ったのちに、心腔採血にて脱血し犠死せしめた。



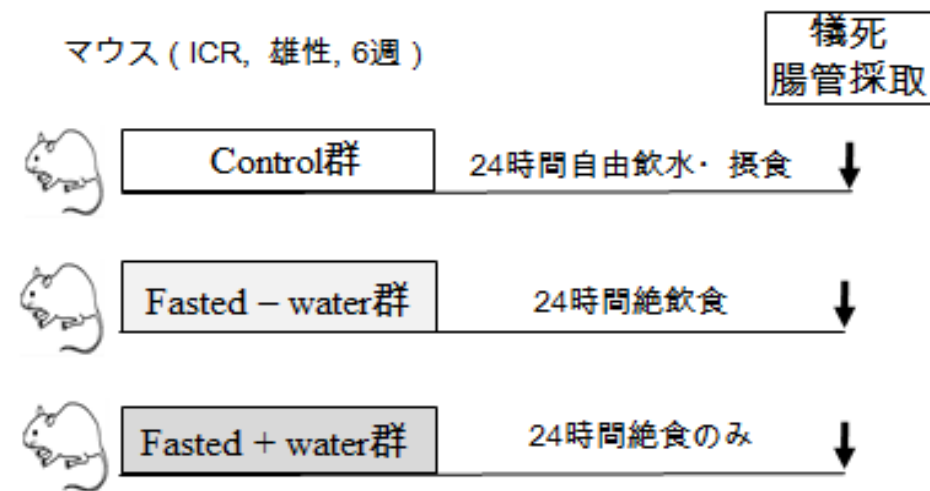


図1：実験プロトコール

マウスを、食餌 (MF) を自由摂取させる群 (Control 群、n=8)、24 時間の絶飲食群 (Fasted water(-)、n=8) 及び絶食のみ (Fasted water(+))群、n=8) の 3 群にわけ、実験開始 24 時間後に犠死せしめて腸管を採取した。

### 3-2-2 : GALT リンパ球の抽出

開腹後、腸間膜を外しながら全小腸を摘出した。腸管内腔を 20 ml の Hanks' balanced salt solution (HBSS)にて洗浄した。GALT リンパ球の分離は、Li らの方法に基づいた<sup>[26]</sup>。すなわち、まず、漿膜側よりパイエル板 (PP : Peyer's patch) を同定し、鉸にて丁寧に採取した。RPMI1640(Gibco Laboratories, Gaithersburg, MD)に、Collagenase (40U/ml; Sigma, St.Louis, MO)、5% fetal bovine serum(FBS)、1% glutamine、1% antibiotics (penicillin と streptomycin, Gibco, Auckland, New Zealand) を添加した溶液 25ml に切除後細切した PP を加え、持続振とうで培養した(37°C、60 分間、150rpm)。培養後の PP 組織を Nylon filter (100µm Cell Strainer, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) 上ですりつぶした後、その濾過液を氷上で保存した。すべての PP を切除した後の小腸は、表裏翻転したのちに 4 分割した。RPMI1640、5% FBS、1% glutamine、1% antibiotics (penicillin と streptomycin) の溶液の中に入れ、持続振とう (37°C、60 分間、150rpm) 小腸上皮層を小腸より分離し、上清中に浮遊させた。剥がれた上皮と IE リンパ球が入った上清は回収し、氷上で保存した。残りの腸管組織片は、RPMI1640 に collagenase (40U/ml)、5% FBS、1% glutamine、1% antibiotics を加えた混合溶液内で持続振とう (37°C、60 分間、150rpm) した。同様の操作を計 3 回繰り返し、LP リンパ球を含む上清を回収して氷上で保存した。上清をグラスウールカラム (10ml シリンジに 0.2

g のガラスウールを詰めて作製) にて濾過後に遠心分離 (4°C、5 分間、1500rpm) し、ペレットを 40% Percoll (2%FBS 含有の RPMI1640 と Percoll で調整したもの) にて再懸濁した。75% Percoll (2%FBS・RPMI1640 と Percoll で調整したもの) 上に積層し遠心分離 (25°C、20 分間、1700rpm) 後、40%・75% Percoll の境界の中間細胞層を回収した後、RPMI1640、5% FBS, 1% glutamine, 1% antibiotics の混合溶液にて 2 回洗浄し、LP リンパ球が入った上清を採取した。細胞数は、トリパンブルー染色によって生細胞数をカウントした (図 2)。

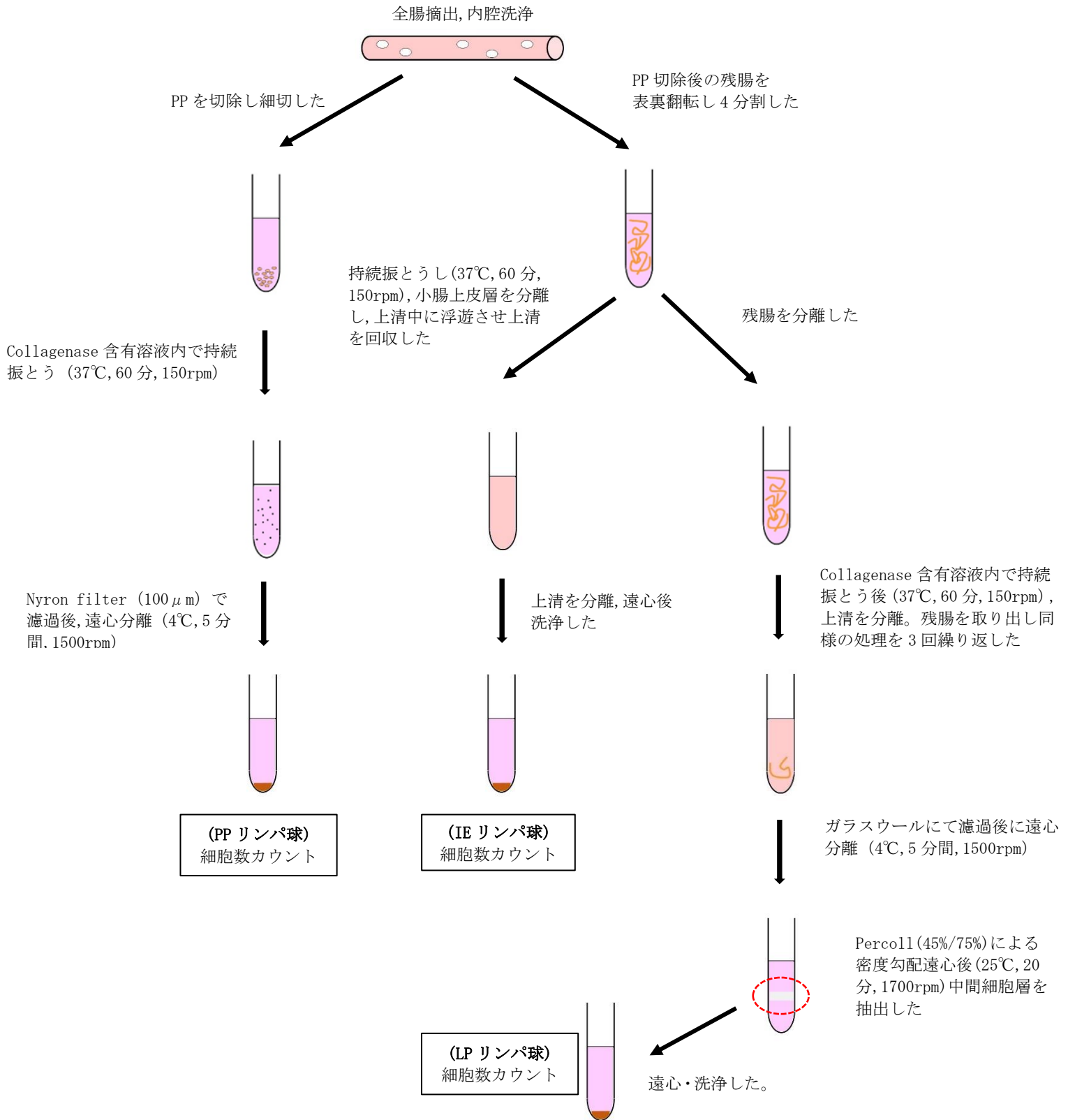


図 2 : GALT リンパ球抽出のフローチャート

### 3-2-3 : 免疫グロブリン A レベルの測定

犠死せしめたマウスの頸部気管を露出し、喉頭に向かい 18G の留置針を留置、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline; PBS) 1ml を注入して、洗浄液を回収した。次に、頸部気管から肺に向かい 18G 留置針を留置し、留置針から PBS 1ml を注入して肺胞洗浄液を回収した。さらに、マウスの十二指腸から回腸末端までの全小腸を採取し、腸間膜を切除した後、1% penicillin, streptomycin (GIBCO, Auckland, NZ) を添加した Hank's balanced salt solution (HBSS: Sigma, St. Louis, MO, USA) 20ml で洗浄した。回収した洗浄液を遠心分離後 (2000rpm、10min、4°C)、上清を回収した。鼻腔、気管支・肺胞および腸管洗浄液は -80°C で保存した。鼻腔、気管支・肺胞及び腸管の洗浄液中の IgA レベルは、ELISA 法 (sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) にて測定した (M8769-1MG kit; Anti-Mouse IgA ( $\alpha$ -chain specific) antibody produced in goat. Sigma-Aldrich japan)。一次抗体として Goat anti-mouse IgA (M8769-1MG kit; Sigma), スタンダードとして Purified mouse IgA (M8769-1MG kit; Sigma), 二次抗体として Peroxidase conjugated goat-antimouse IgA (M8769-1MG kit; Sigma) を使用した。

#### 3-2-4 : 小腸絨毛形態の組織学的検討

内腔を洗浄後、小腸の幽門輪から肛門側 2-3cm を空腸、回盲部から口側 2-3cm を回腸として切除、回収してホルマリン固定した。空腸および回腸組織は HE 染色を行ったのちに、それぞれの絨毛高および陰窩深を計測した。観察、計測には光学顕微鏡 BX43 (オリンパス株式会社、東京)、DP-21-SAL47 (オリンパス株式会社、東京) を用いた。絨毛が垂直に切れている部位で、絨毛、陰窩それぞれ 10 個無作為に測定し、その平均値を求めた。

### 3-2-5 : 統計学的検討法

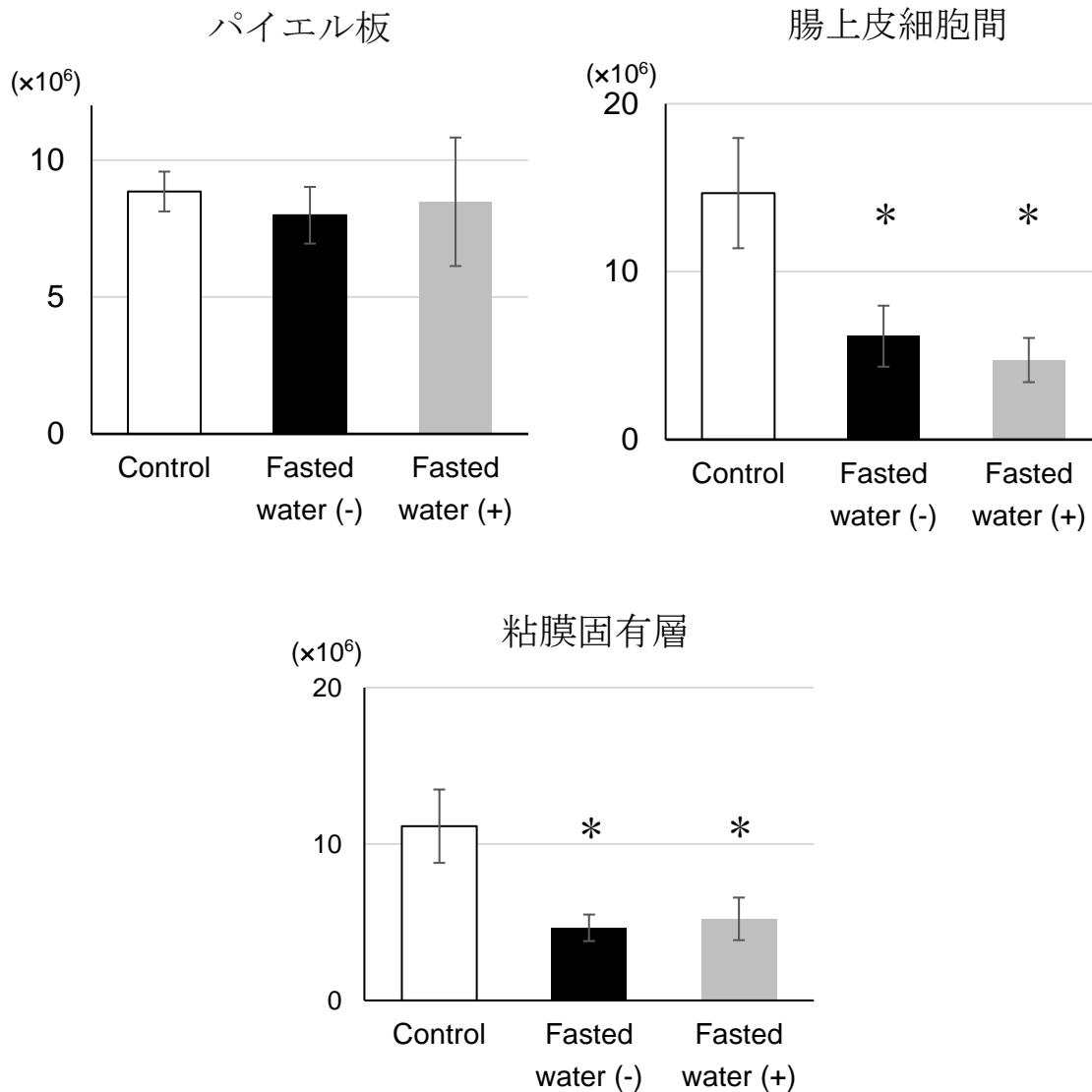
本実験での値は全て Means  $\pm$  SE で表し、統計ソフトは Windows 用の JMP Pro 12 (SAS Institute Japan Ltd, Japan)を使用した。P 値は 0.05 未満にて有意差があるとした。3 群間の比較は ANOVA 検定を用いて行った。

## 3-2 : 結果

### 3-3-1 : GALT リンパ球数

PP リンパ球数に 3 群間で有意差は認めなかった。しかし、IE リンパ球数、LP リンパ球数は Fasted water(-)群、Fasted water(+)群とも Control 群と比較して有意に減少した。一方、Fasted water(-)群と Fasted water(+)群の間に IE、LP リンパ球数の違いは見られなかった (図 3)。





**図 3 : 24 時間の絶食・絶飲食が腸管リンパ装置 (GALT) のリンパ球数に与える影響**  
 PP リンパ球数に絶食、絶飲食とも影響を及ぼさなかった。しかし、IE リンパ球数、LP リンパ球数は Control 群と比較して、絶食、絶飲食によって有意に減少した。  
 Control: 食餌・水とも自由摂取 Fasted water (-): 24 時間食餌・水投与なし、Fasted water(+): 24 時間食餌なし・自由飲水。平均±標準誤差、 \*P<0.05 vs. Control (ANOVA)

### 3-3-2 : 腸管及び呼吸器洗浄液中の粘膜 IgA レベル

鼻腔及び気管支・肺胞洗浄液中の IgA レベルに 3 群間で有意差を認めなかった。腸管洗浄液中の IgA レベルは Control 群と比較すると、Fasted water(-)群、Fasted water(+)群で減少する傾向がみられた (P=0.06、ANOVA)。Fasted water(-)群と Fasted water(+)群の IgA レベルに有意差を認めなかった (図 3)。

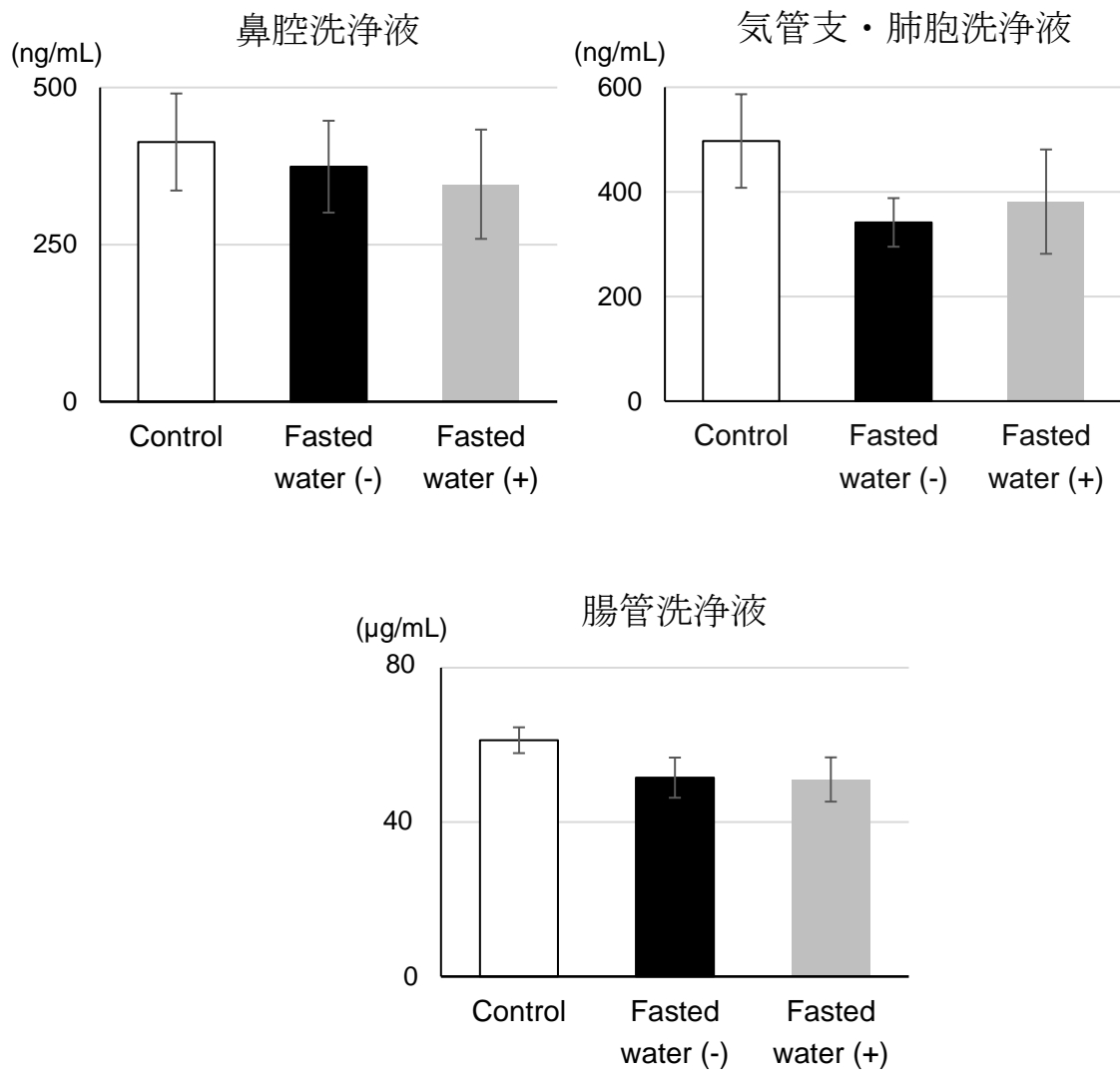


図 4 : 24 時間の絶食、絶飲食が鼻腔、気管支・肺胞及び腸管洗浄液中の IgA レベルに与える影響

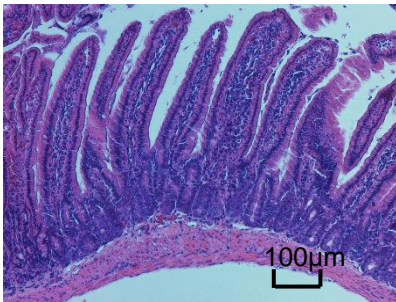
鼻腔、気管支・肺胞及び腸管洗浄液中の IgA レベルは、絶食・絶飲食によって有意な減少を示さなかった。腸管洗浄液中の IgA レベルは Control 群と比較すると、絶食、絶飲食で減少する傾向がみられた (P=0.06, ANOVA)。

### 3-3-3 : 小腸絨毛形態

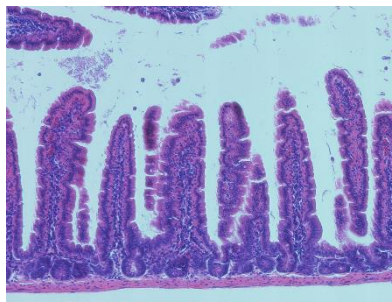
H&E 染色による組織観察上、Control 群と比較して Fasted water (-)群、Fasted water(+)群では絨毛の萎縮が示唆された (図 5A)。また、Control 群と比較すると、空腸・回腸ともに絨毛高と陰窩深は Fasted water(-)群、Fasted water(+)群で有意に萎縮した。Fasted water(-)群と Fasted water(+)群の間でこれらの萎縮に統計学的有意差は認めなかった (図 5B)。

### 【空腸】

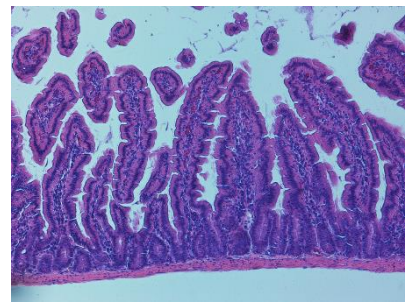
Control



Fasted water (-)

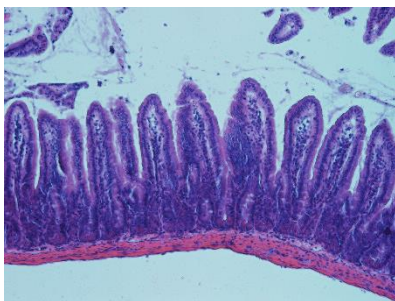


Fasted water (+)

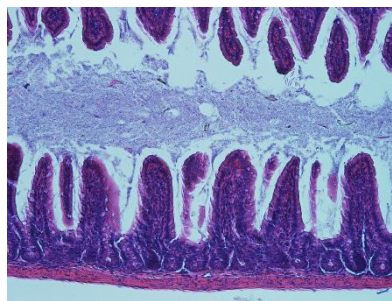


### 【回腸】

Control



Fasted water (-)



Fasted water (+)

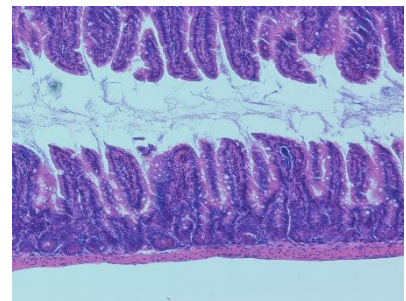
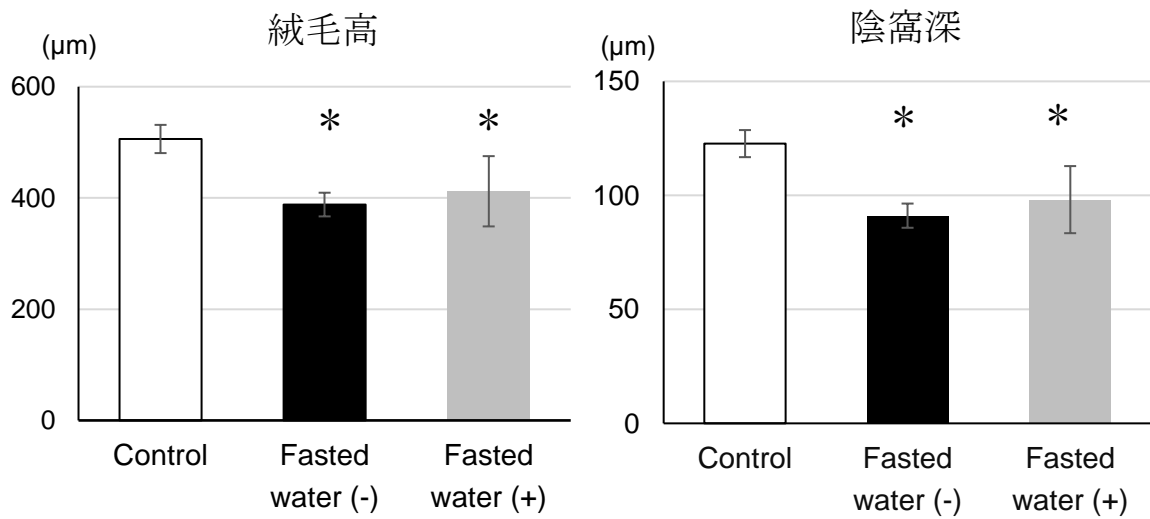


図 5A : 24 時間の絶食・絶飲食が絨毛構造に与える影響

24 時間の絶食、絶飲食によって、空腸、回腸とも絨毛の萎縮が観察された (光学顕微鏡, Original magnification:  $\times 100$ , H&E 染色)。

空腸



回腸

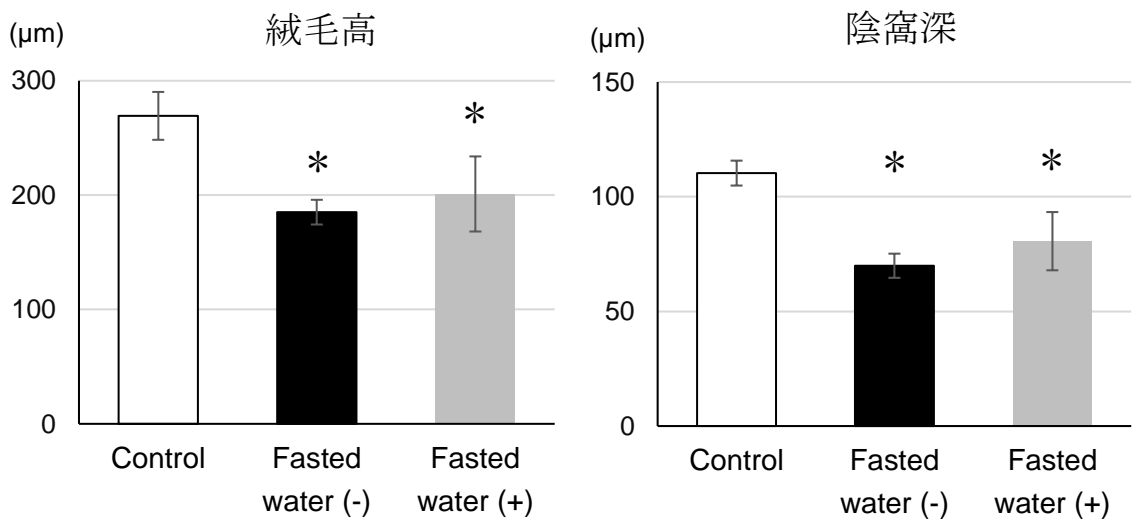


図 5B : 24 時間の絶食・絶飲食が絨毛高・陰窩深に与える影響

24 時間の絶食、絶飲食によって空腸・回腸ともに絨毛高と陰窩深は萎縮した。

平均±標準誤差、\*P<0.05 vs. Control (ANOVA)

### 3-4 : 考察

本検討で、マウスでは、飲水の有無にかかわらず 24 時間の絶食によって腸管絨毛は有意に萎縮し、腸管免疫の要である GALT のうち IE 及び LP リンパ球数が減少することが明らかになった。絨毛の萎縮は腸管の物理的バリア機構が脆弱となっていることを示している。LP や IE のリンパ球は実効細胞として腸管粘膜防御機構を担っているため、短期間絶食によるこれらリンパ球の減少は、腸管の免疫組学的バリア機能の低下につながる可能性がある<sup>[27] [28]</sup>。一方で、PP のリンパ球数は絶食による影響を受けなかった。パイエル板は全身免疫の誘導器官としての役割を担っており、抗原感作を受けていない（ナイーブ）リンパ球はパイエル板で感作を受けたのちに大循環系を巡ることを考えれば、24 時間の絶食はナイーブリンパ球の感作に対しては影響を与えない可能性が考えられる<sup>[29]</sup>。24 時間絶食が IE および LP リンパ球のみに影響を与え、PP リンパ球に変化が見られなかった明確な理由は明らかでないが、24 時間の絶食では PP に由来する全身循環中のナイーブリンパ球を減少させるに至るには短すぎたのかもしれない。あるいは、IE、LP リンパ球は腸管管腔内から直接エネルギーの供給を受けて活動するため、絶食の影響をより受けやすかったとも考えられる<sup>[30]</sup>。腸管内腔洗浄液の IgA レベルは通常食餌群と比較して絶食・絶飲食群で減少する傾向を示した（ $P=0.06$ 、ANOVA）。IgA は LP リンパ球のサブセットで

ある B リンパ球が形質細胞に分化・誘導されることで腸管内腔へ分泌されるため<sup>[31]</sup>、管内腔洗浄液の IgA レベルの低下は絶食による LP リンパ球の減少を反映したものだと考えられる。興味深いことに、気管支・肺胞洗浄液中の IgA レベルは絶食による影響を示さなかった。パイエル板で感作されたリンパ球が気管支・肺胞などの全身の粘膜免疫器官へホーミングすることを踏まえれば、PP リンパ球がわずか 24 時間の絶食では減少しなかったことが 1 つの理由であると考えられる。

マウスモデルでの 24 時間、あるいはより短時間の絶食による腸管絨毛形態の変化に関してはすでに多くの報告がある<sup>[32] [33]</sup>。我々の結果もこれらの報告に支持されるものである。García ら<sup>[34]</sup> は、栄養素を含有しない水分のみの経口摂取で腸管の吻合部の治癒を促進することをラットの研究で報告している。我々は飲水によって腸管の物理的・免疫学的バリア機構が維持される可能性も否定できなかったため、自由な水分摂取をする群を対照群に加えた。しかしながら、水分の自由摂取は腸管絨毛形態および GALT リンパ球数にほとんど影響を与えなかった。この結果から、たとえ腸管を経由して投与されたとしても、栄養素を含有しない水による物理的刺激だけでは絶食による腸管絨毛組織 /GALT の萎縮を抑制することはできない可能性も考えられた。



## 4. 12 時間の絶食期間と炭水化物水投与がマウスの腸管免疫及び腸管組織に与える影響

### 4-1 : 背景と目的

周術期回復プログラムの一つである ERAS プロトコールでは 12.5%の炭水化物液 (CHO : Carbohydrate) を手術前夜に 800mL、麻酔導入 2 時間前までに 400mL 摂取することを推奨している<sup>[1]</sup>。実際、術前の CHO は術後のインスリン耐性の強化、術後の筋力の維持、術前の不安や脱水・飢餓による不快感軽減、ひいては術後入院期間短縮効果を持つことが示されている<sup>[13][14]</sup>。しかしながら、術前の短期絶食期間や経口 CHO 負荷が腸管組織形態や腸管免疫に与える影響は知られていない。従って本章では、12 時間の絶食期間中に様々なタイミングで CHO を経口投与し、CHO が GALT リンパ球数、粘膜 IgA レベル、腸管絨毛形態に与える影響をマウスモデルで検討した。

## 4-2 : 対象と方法

### 4-2-1 : 対象

5 週齢の Institute of Cancer Research (ICR)マウス (雄性、n=60, 27g-30g) (Charles River Laboratories Japan, INC. Japan) を購入した。搬入後マウスを通常食餌 (MF、オリエンタル酵母工業株式会社 バイオ事業部) にて 1 週間環境順応させた後に実験を開始した。①自由摂取させる群 (Control 群, n=12)、②12 時間絶食のみ (Fasting 群, n=12)、③12 時間絶食+犠死 2h 前に CHO 経口投与 (2h 群, n=12)、④12 時間絶食+犠死 4h 前に CHO 経口投与(4h 群, n=12)、⑤12 時間絶食+犠死 8h 前に CHO 経口投与(8h 群, n=12)の 5 群に無作為に割り付けた。絶食時間は 12 時間 (18:00~翌 06:00、絶食期間中は自由に水分摂取) とした。CHO として 12.5%グルコース含有水を 0.3mL 経口投与した。ケタミン・100 mg/kg とキシラジン・10 mg/kg の混合溶液を皮下に注入し全身麻酔を行った後、心腔採血にて脱血し犠死せしめた。



マウス (ICR, 雄性, 6週)

CHO: 12.5%グルコース含有炭水化物水 (0.3ml/匹), 経口投与

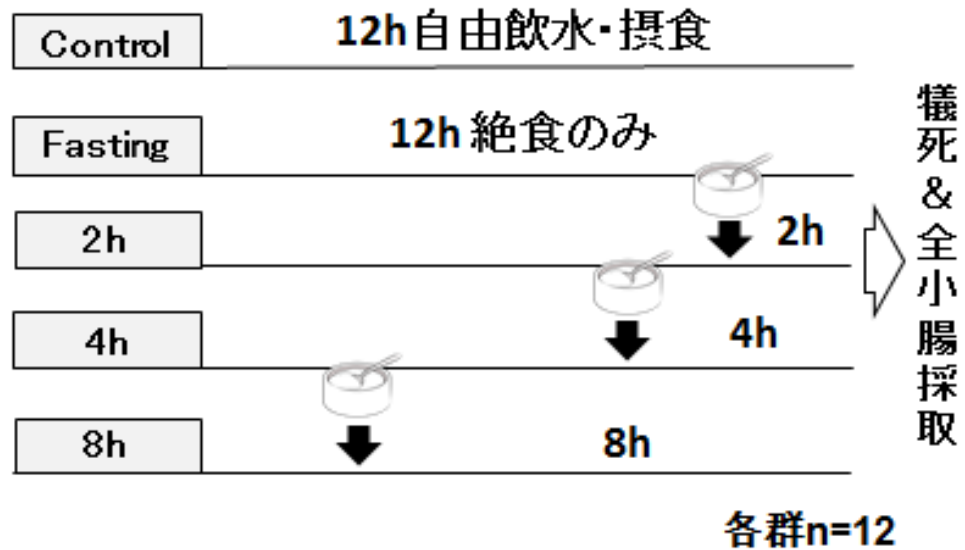


図6：実験プロトコール

マウスを、①自由摂取させる群 (Control 群, n=12)、②12時間絶食のみ (Fasting 群, n=12)、③12時間絶食+犠死2h前に CHO 経口投与 (2h 群, n=12)、④12時間絶食+犠死4h前に CHO 経口投与 (4h 群, n=12)、⑤12時間絶食+犠死8h前に CHO 経口投与 (8h 群, n=12)の5群に分け、犠死せしめた後に小腸を回収した。

#### 4-2-2 : GALT リンパ球の抽出とフェノタイプの同定

GALT リンパ球の分離は第 3 章の分離法に準じて行った。PP、IE、LP のリンパ球を分離した後、それぞれ HBSS で細胞数を  $1 \times 10^5$  に希釈・調整した。fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-mouse  $\gamma \delta$  TCR (clone GL3, Invitrogen, Camarillo, USA) で TCR 陽性 T 細胞を標識し、phycoerythrin (PE) conjugated anti-mouse  $\alpha \beta$  TCR (clone H57-597, Pharmingen, San Diego, USA) で  $\gamma \delta$  TCR 陽性 T 細胞を標識した。T 細胞サブセットの解析を目的に PE-anti-CD4 (clone CT-CD4; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で CD4 陽性細胞、および FITC-anti-CD8  $\alpha$  (clone CT-CD8  $\alpha$ ; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で CD8 陽性細胞を標識した。また FITC-anti-CD45R (B220) (clone RA3-6B2; Invitrogen, San Jose, CA, USA) で B 細胞を標識した。各抗体は 1% FBS 入り HBSS で  $1 \mu\text{g/ml}$  に希釈し、 $4^\circ\text{C}$  にて 30 分間反応させた。1% FBS 入り HBSS で各リンパ球を洗浄後、1% paraformaldehyde で固定、BD FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) を用いたフローサイトメトリーで解析した。

#### 4-2-3 : 免疫グロブリン A レベルの測定

第 3 章の方法に準じて実験を施行した。

#### 4-2-4：小腸絨毛形態の組織学的検討

第3章の方法に準じて実験を施行した。

#### 4-2-5：免疫組織染色による絨毛上皮の細胞増殖とアポトーシスの評価

細胞増殖の指標として抗 Ki67 ラビットポリクローナル IgG 抗体 (ab15580; Abcam, Cambridge, MA, USA; 1:1000 dilution)を用いた。ホルマリン固定パラフィン包埋切片をキシレンおよびアルコールにて脱パラフィンを行い、蒸留水で洗浄後に抗原賦活用緩衝液に浸してオートクレーブ用いて加熱による抗原賦活処理 (120 °C, 20 分間) を行った。蒸留水で 3 回洗浄後、過酸化水素加メタノールを 5 分間室温にて反応させ、内因性ペルオキシダーゼを除去した (ブロッキング)。リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS, pH7.4) にて 3 回洗浄後、発色までの操作は VECTASTAIN Elite ABC kit (Vector Laboratories, Inc. CA, USA) を用いて、添付のプロトコールに従って行った。その後、発色基質としてシンプルステイン DAB 溶液 (ニチレイ) を用いて 10 秒間反応させ暗褐色に発色させた。水道水で洗浄後にヘマトキシリンにて核染色を行い、アルコール、キシレンにて脱水処理後、包埋した。細胞増殖能は 2 名の観察者が盲目的、無作為に絨毛を選び、絨毛内の Ki67 陽性細胞をカウントすることで評価した。1 スライドあたり 20 絨毛を計測し、カウントされた数値の

中央値をその絨毛の”Ki67 細胞数”として記録した。細胞増殖能 (%) = Ki67 陽性細胞 / 陰窩上皮細胞数として数値化した。

アポトーシスの評価には TUNEL 染色法 (In Situ Cell Death Detection Kit (11684817910, POD; Roche, Japan) を用いた。試料を脱パラフィン後、オートクレーブによる抗原賦活処理を行った。過酸化水素加メタノールによるブロッキングの後に PBS で洗浄した。Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 溶液 100  $\mu$ l を試料に滴下し、37°C で 30 分間インキュベート、PBS で洗浄後、試料に horseradish-peroxidase (POD) 結合 TdT 抗体溶液を 100  $\mu$ l 滴下し、37°C で 10 分間インキュベートした。さらに試料を 10 分間 PBS 溶液に浸漬・洗浄した。そして、試料に 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 溶液を 100  $\mu$ l 滴下し、室温で 2 分間発色させたのち、ヘマトキシリンで対比染色を行い、顕微鏡下で観察した。TUNEL 法の評価は、細胞増殖能の評価時と同様に、2 名の観察者が盲目的、無作為に絨毛を選び、1 つの絨毛中の腸上皮細胞に対する TUNEL 陽性細胞数の割合で評価した。1 スライドあたり 20 絨毛を計測し、アポトーシス (%) = TUNEL 陽性細胞 / 絨毛上皮細胞数として数値化した。

#### 4-2-6: 統計学的検討法

本実験での値は全て means  $\pm$  SE で表し、統計ソフトは Windows 用の JMP

Pro 12 (SAS Institute Japan Ltd, Japan)を使用した。P 値は 0.05 未満にて有意差があるとした。5 群間の比較は ANOVA 検定を用いて行った。

## 4-3 : 結果

### 4-3-1 : GALT リンパ球数とフェノタイプ

PP リンパ球数に 5 群間で有意差は認めなかった。IE リンパ球数は Fasting 群、4h および 8h 群で Control 群と比較して有意に減少した。一方、2h 群では IE リンパ球数は絶食群と比較して有意に多く、Control 群のリンパ球数と同レベルまで維持された。LP リンパ球数は絶食群、8h 群で Control 群と比較して有意に減少したが、2h、4h 群のリンパ球数は Control 群のレベルまで保たれていた (図 7)。GALT リンパ球のフェノタイプ ( $\alpha\beta$ TCR+,  $\gamma\delta$ TCR+, CD4+, CD8+, or B220+) は、PP、IE また LP のどのリンパ球に関しても 5 群間に差を認めなかった (表 1)。



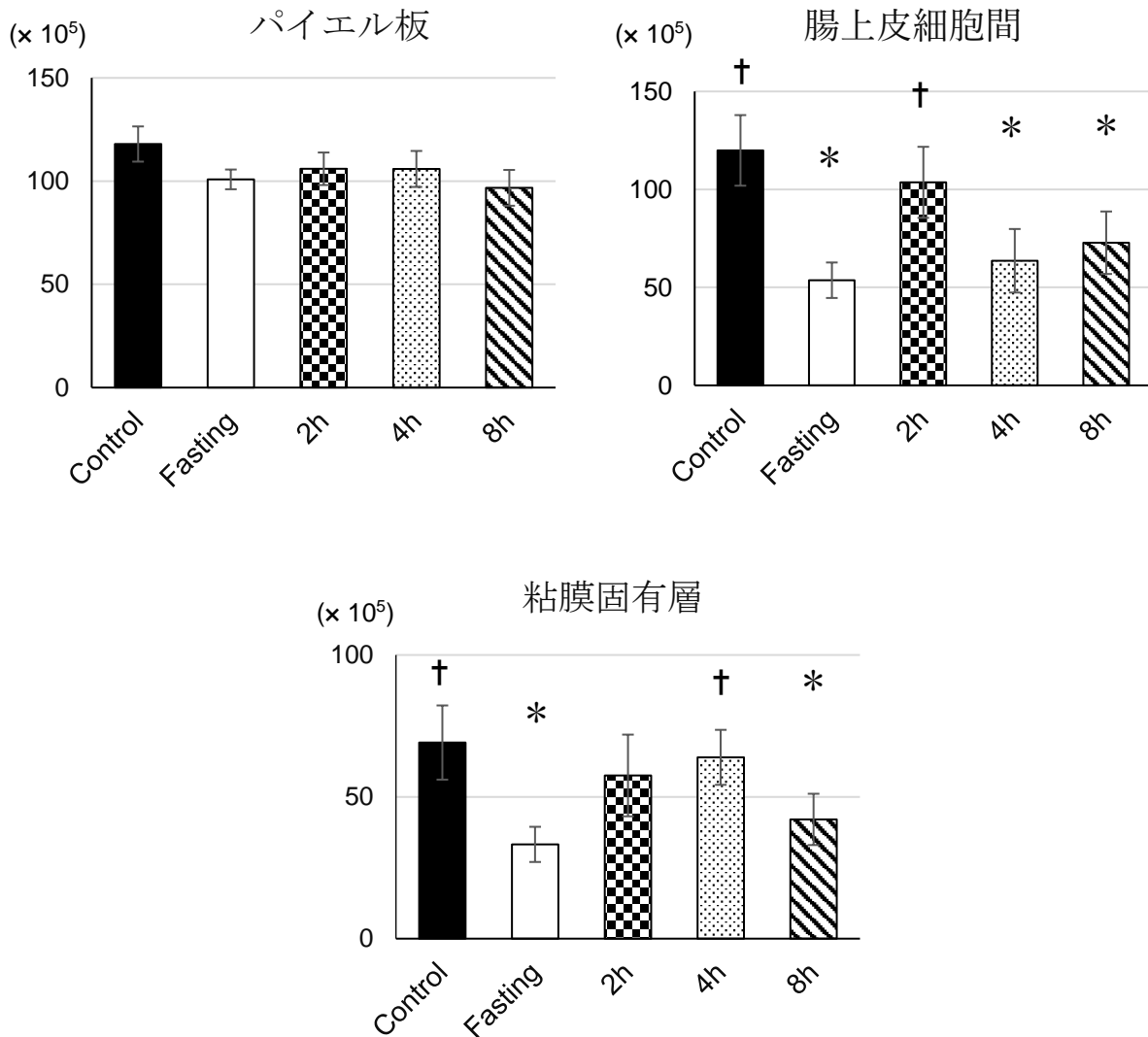


図7：12時間絶食とCHO投与がGALTリンパ球数に与える影響

PPリンパ球数に12時間絶食、CHO投与とも影響を及ぼさなかった。しかし、IEリンパ球数、LPリンパ球数はControl群と比較して、12時間絶食によって有意に減少した。IEリンパ球数は、犠死2h前にCHOを投与した場合Control群のリンパ球数と同じレベルまで維持された。LPリンパ球数は、犠死4h前にCHOを投与した場合Control群のリンパ球数と同じレベルまで維持した。平均±標準誤差、\* $P < 0.05$  vs. Control、† $P < 0.05$  vs. Fasting (ANOVA)。

GALT リンパ球	Groups	$\alpha\beta$ TCR+	$\gamma\delta$ TCR+	CD4+	CD8+	B220+
パイエル板	Control	21.2 $\pm$ 7.2	1.2 $\pm$ 0.2	20.0 $\pm$ 3.1	3.9 $\pm$ 1.3	54.2 $\pm$ 5.2
	Fasting	24.1 $\pm$ 5.1	1.8 $\pm$ 0.3	25.2 $\pm$ 5.5	4.5 $\pm$ 1.3	55.2 $\pm$ 3.9
	2h	25.3 $\pm$ 4.3	1.4 $\pm$ 0.6	23.3 $\pm$ 4.2	4.2 $\pm$ 1.0	55.2 $\pm$ 4.8
	4h	22.2 $\pm$ 3.9	1.7 $\pm$ 0.3	22.7 $\pm$ 5.0	5.2 $\pm$ 1.5	58.2 $\pm$ 5.6
	8h	25.9 $\pm$ 4.5	1.6 $\pm$ 0.5	22.9 $\pm$ 4.4	4.1 $\pm$ 1.6	56.2 $\pm$ 9.2
腸上皮細胞間	Control	27.2 $\pm$ 5.7	11.9 $\pm$ 1.4	11.0 $\pm$ 3.4	21.7 $\pm$ 4.1	11.2 $\pm$ 3.2
	Fasting	28.2 $\pm$ 4.2	8.5 $\pm$ 2.8	15.6 $\pm$ 1.5	22.9 $\pm$ 5.1	17.2 $\pm$ 1.9
	2h	29.0 $\pm$ 5.0	12.6 $\pm$ 2.3	14.6 $\pm$ 2.2	25.2 $\pm$ 2.9	15.2 $\pm$ 2.9
	4h	24.5 $\pm$ 6.8	10.4 $\pm$ 0.9	10.4 $\pm$ 2.5	28.2 $\pm$ 2.9	13.4 $\pm$ 1.6
	8h	32.3 $\pm$ 7.6	9.4 $\pm$ 1.3	12.5 $\pm$ 3.8	23.6 $\pm$ 3.3	16.2 $\pm$ 2.2
粘膜固有層	Control	23.1 $\pm$ 2.2	16.1 $\pm$ 2.6	12.0 $\pm$ 3.3	13.8 $\pm$ 2.5	7.2 $\pm$ 1.2
	Fasting	21.0 $\pm$ 4.7	11.5 $\pm$ 2.6	10.5 $\pm$ 2.9	13.2 $\pm$ 3.4	7.9 $\pm$ 1.5
	2h	20.2 $\pm$ 3.9	14.0 $\pm$ 3.6	13.1 $\pm$ 3.5	12.9 $\pm$ 1.9	9.1 $\pm$ 1.8
	4h	21.1 $\pm$ 4.5	12.3 $\pm$ 4.1	11.6 $\pm$ 4.2	15.2 $\pm$ 2.0	8.4 $\pm$ 2.3
	8h	23.7 $\pm$ 4.9	10.9 $\pm$ 3.2	9.9 $\pm$ 2.2	10.7 $\pm$ 2.8	10.2 $\pm$ 3.2

表 1 : 12 時間の絶食と CHO 投与が GALT リンパ球のフェノタイプ ( $\alpha\beta$ TCR+,  $\gamma\delta$ TCR+, CD4+, CD8+または B220+) に及ぼす影響

パイエル板、腸上皮細胞間、および粘膜下層のどのリンパ球に関しても 12 時間の絶食、炭水化物水の影響はなかった。

#### 4-3-2：鼻腔、気管支・肺胞及び腸管洗浄液中の免疫グロブリン A レベル

鼻腔、気管支・肺胞洗浄液中の IgA レベルに 5 群間で有意差は認めなかった。腸管洗浄液中の IgA レベルは Control 群と比較すると Fasting 群で減少傾向を認めた ( $P=0.07$ ) (図 8)。

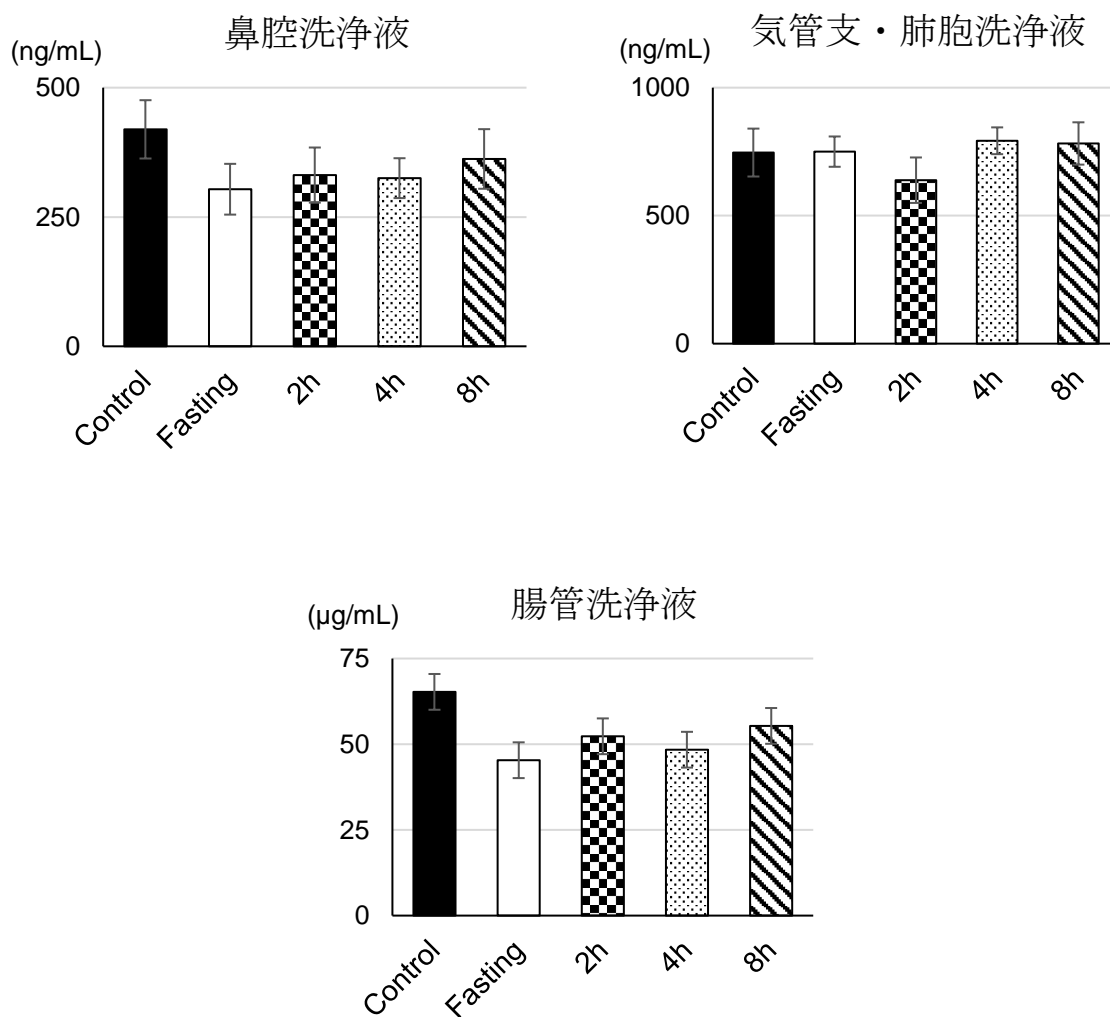


図 8 : 12 時間の絶食と CHO 投与が鼻腔、気管支・肺胞及び腸管洗浄液中の免疫グロブリン A レベルに与える影響

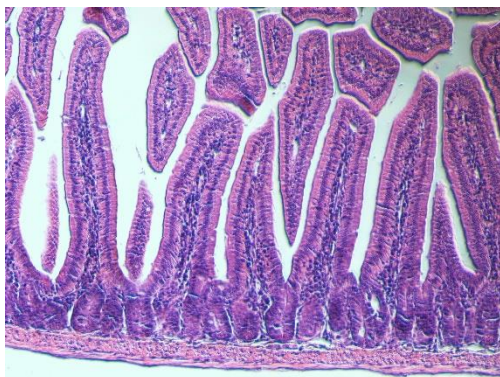
鼻腔及び気管支・肺胞洗浄液中の IgA レベルに 12 時間絶食、CHO 投与とも影響を与えなかった。腸管洗浄液中の IgA レベルは Control 群と比較すると Fasting 群で減少傾向を認めたが(P=0.07)、どのタイミングの CHO 投与群も Control 群と比較して統計学的有意差を示さなかった (図 8)。平均±標準誤差、\*P<0.05 vs. Control、(ANOVA)

#### 4-3-3 : 空腸・回腸における絨毛高/陰窩深の変化

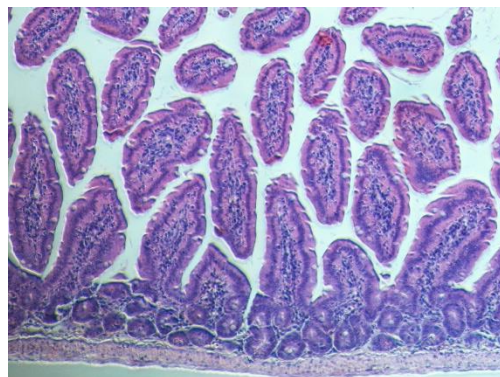
空腸では、絨毛高、陰窩深ともに Control 群と比較して Fasting 群で有意に萎縮を認めた。CHO 投与に関しては、2h 群では絨毛高・陰窩深ともに Control 群と同レベルまで維持されていたが、4h、8h は Fasting 群と同様に萎縮したままだった。一方で回腸では、絨毛高に 5 群間で有意差は認めなかった。Control 群と比較して陰窩深は 4h 群で有意に萎縮を示した (図 9AB,10)。

空腸

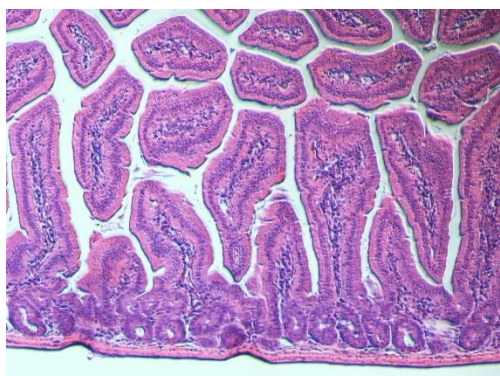
Control



Fasting



2h



4h



8h

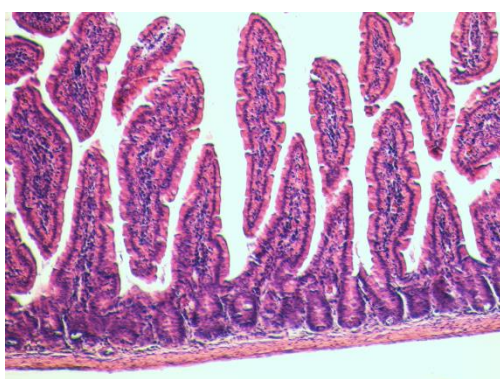


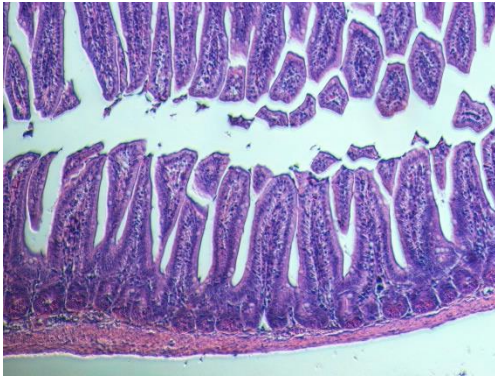
図9 (A) 12時間の絶食と炭水化物水投与が絨毛構造に与える影響

空腸の絨毛高・陰窩深はともに12時間の絶食によって萎縮し、犠死2h前のCHO投与によって絨毛高・陰窩深の萎縮軽減が観察された。

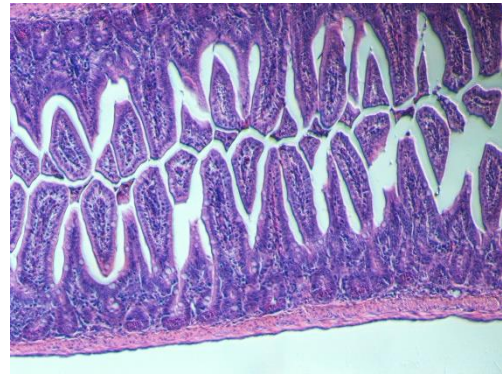


回腸

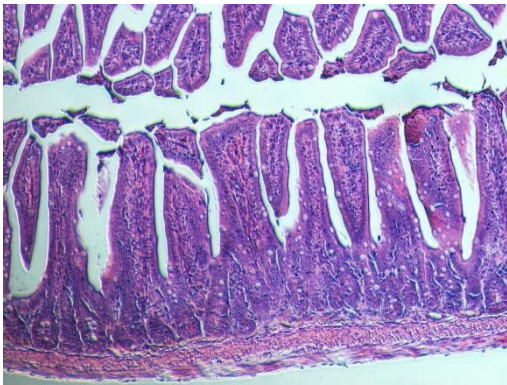
Control



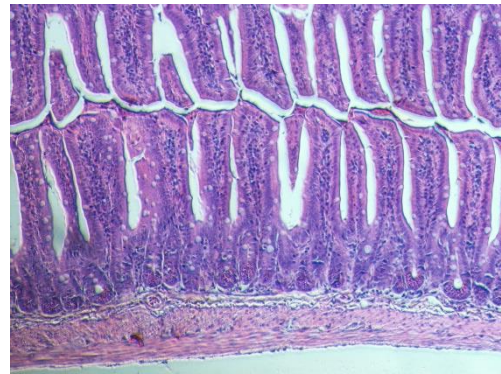
Fasting



2h



4h



8h

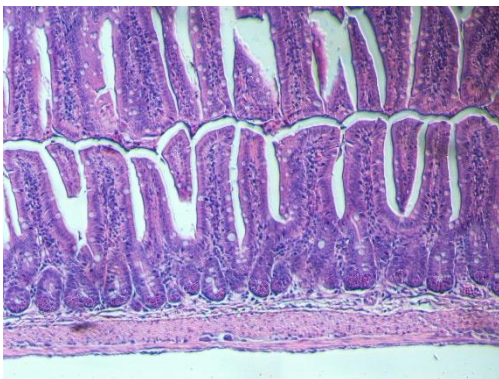
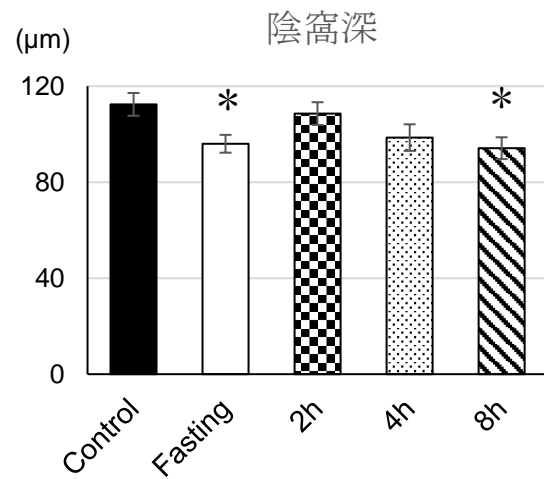
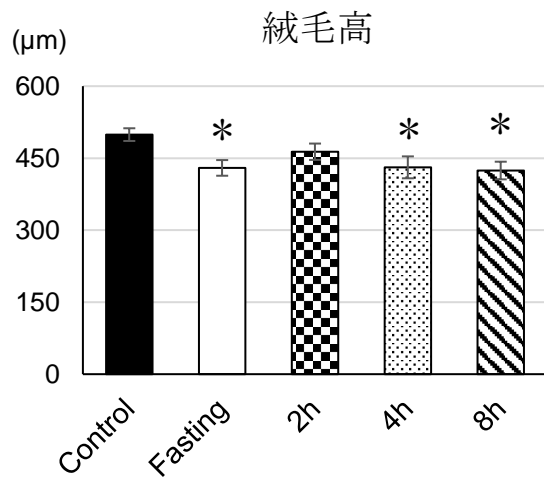


図 9. : 12 時間の絶食と炭水化物水投与が絨毛構造に与える影響

回腸の絨毛高・陰窩深はともに 12 時間の絶食によって萎縮したようにみえた (光学顕微鏡, Original magnification:  $\times 100$ , H&E 染色)。

## 空腸



## 回腸

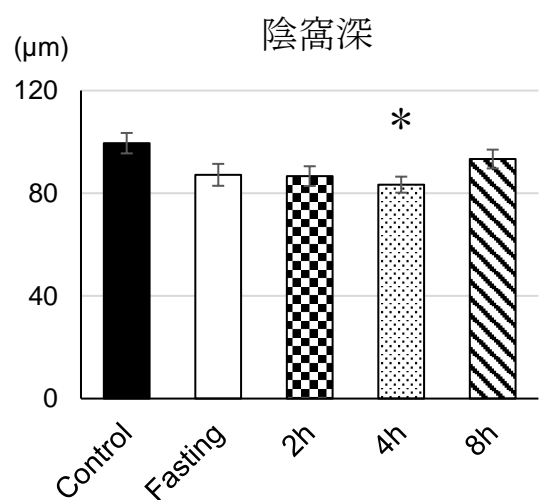
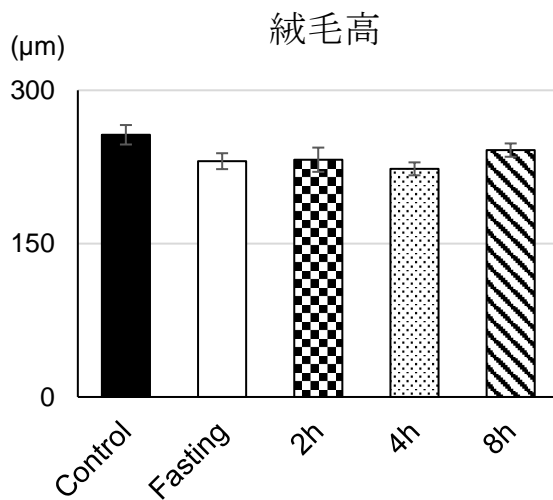


図 10 : 12 時間の絶食と CHO 投与が空腸・回腸の絨毛高/陰窩深に与える影響

空腸では、12 時間の絶食によって絨毛高、陰窩深とも萎縮した。犠死 2h 前の CHO 投与は絨毛高・陰窩深ともに通常食餌群と同レベルまで維持した。回腸では、絶食、CHO 投与とも絨毛高に影響を与えなかったが、犠死 4h 前 CHO 投与では絶食によって陰窩深が萎縮した。平均±標準誤差、\*P<0.05 vs. Control (ANOVA)



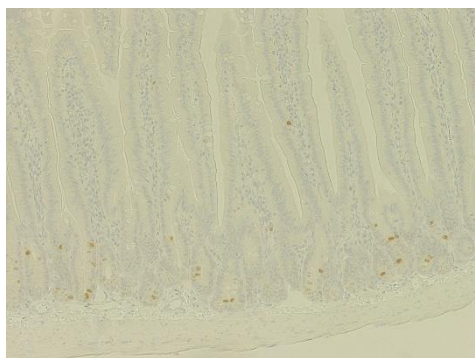
#### 4-3-4 : 小腸絨毛上皮の細胞増殖能とアポトーシス

Ki-67 陽性細胞数は空腸、回腸とも Control 群と比較して Fasting 群で有意に減少した。CHO 投与群に着目すると、空腸では、2h 群で Ki-67 陽性細胞は Control 群と同レベルまで増加していたが、4h 群、8h 群では CHO による影響を認めなかった。回腸では、どのタイミングの CHO 投与であっても Ki-67 の増殖能に影響を示さなかった (図 11A, 図 12A)。TUNEL 陽性細胞数は、空腸、回腸とも Fasting、2h、4h 及び 8h 群のいずれにおいても Control 群と比較して有意に増加した。Ki-67 とは異なり、2h、4h、8h 群のいずれの CHO 投与のタイミングでも TUNEL 陽性率に影響を与えなかった (図 11B, 図 12B)。

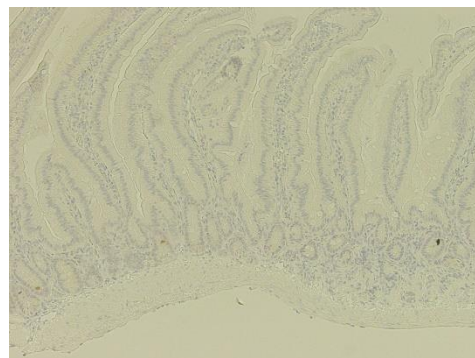
## A.細胞増殖能

空腸

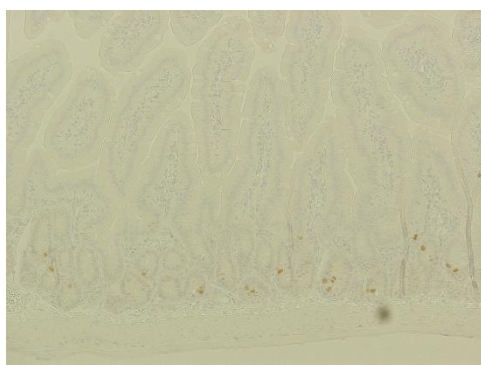
Control



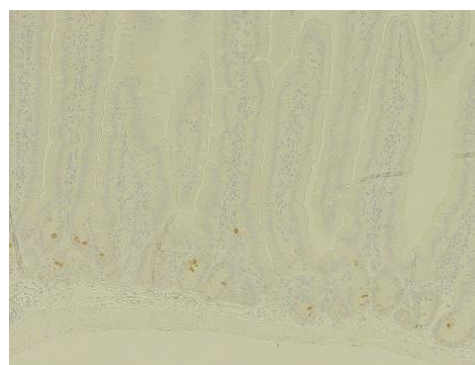
Fasting



2h



4h



8h

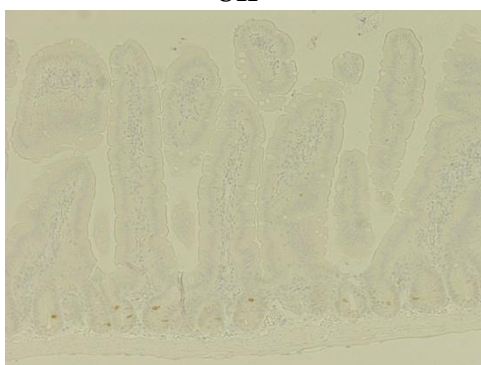


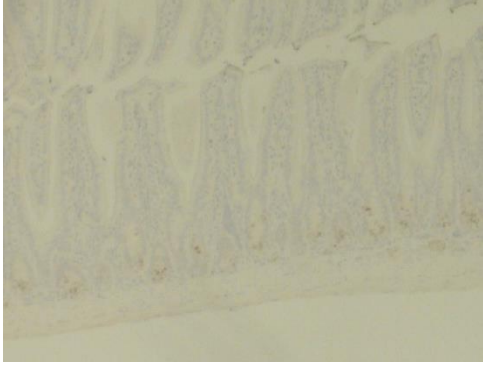
図 11 (A) : 12 時間の絶食と CHO 投与が空腸の細胞増殖に与える影響

Ki-67 陽性細胞数は 12 時間の絶食による減少、犠死 2h 前の CHO 投与による増加が観察された (光学顕微鏡, Original magnification:  $\times 100$ , 免疫染色)。

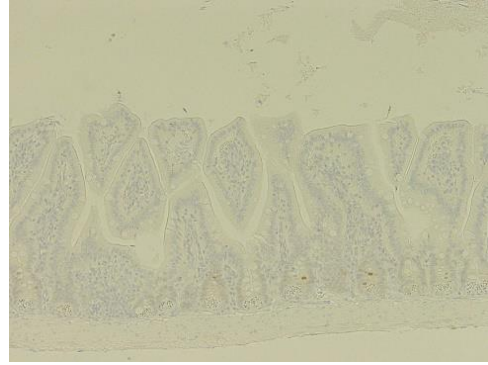
## A.細胞増殖能

回腸

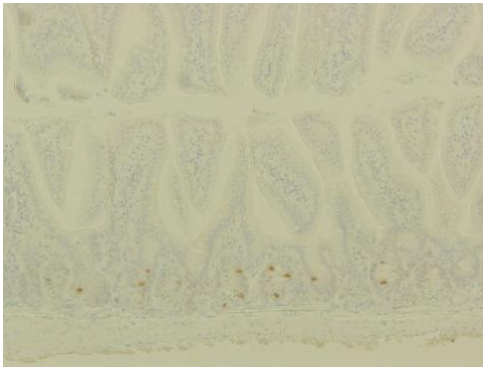
Control



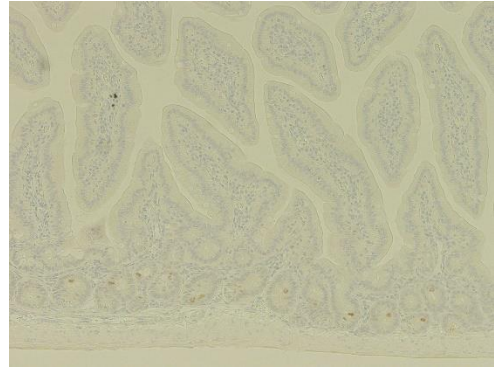
Fasting



2h



4h



8h

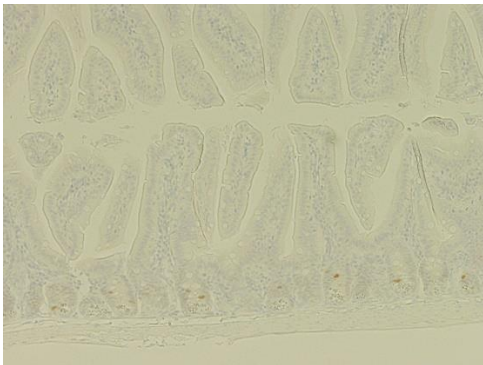


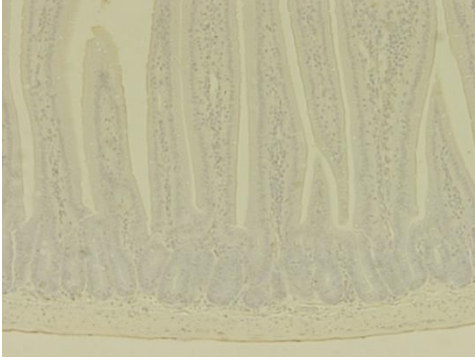
図 11 (A) : 12 時間の絶食と CHO 投与が回腸の細胞増殖に与える影響

Ki-67 陽性細数は 12 時間の絶食による減少が観察された (光学顕微鏡, Original magnification:  $\times 100$ , 免疫染色)。

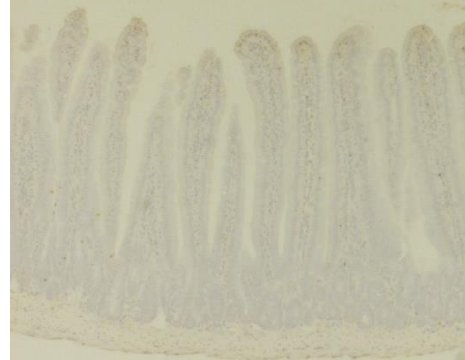
## B.アポトーシス

空腸

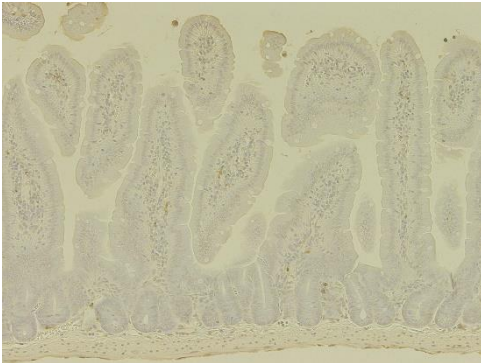
Control



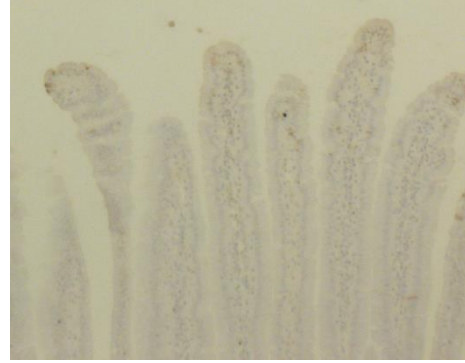
Fasting



2h



4h



8h

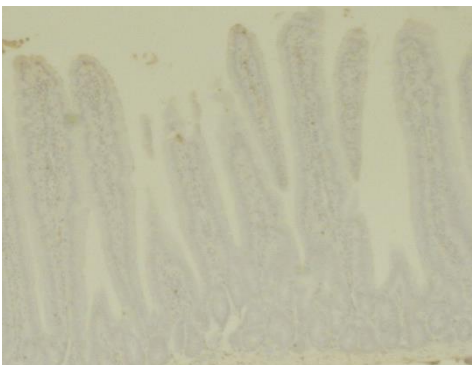


図 11 (B) : 12 時間の絶食と CHO 投与が空腸のアポトーシスに与える影響

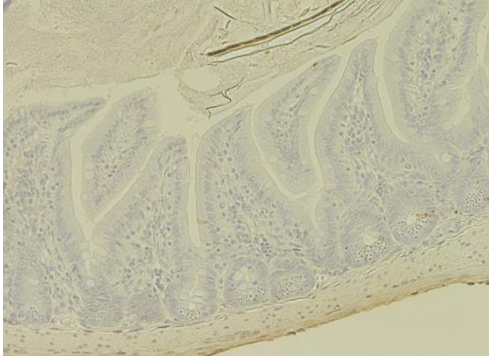
TUNEL 陽性細胞は 12 時間の絶食による増加が観察された。CHO 投与による変化は観察できなかった (光学顕微鏡, Original magnification:  $\times 100$ , 免疫染色)。



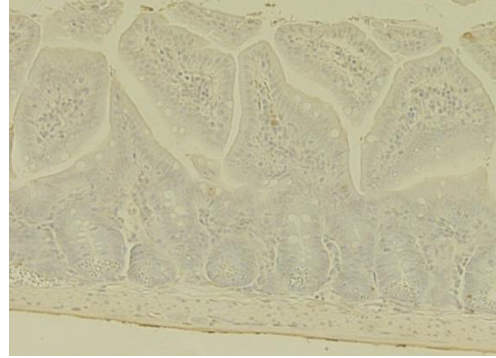
## B.アポトーシス

回腸

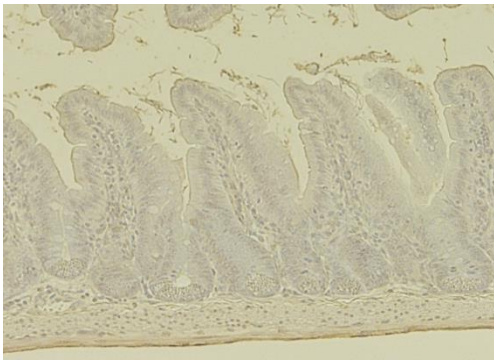
Control



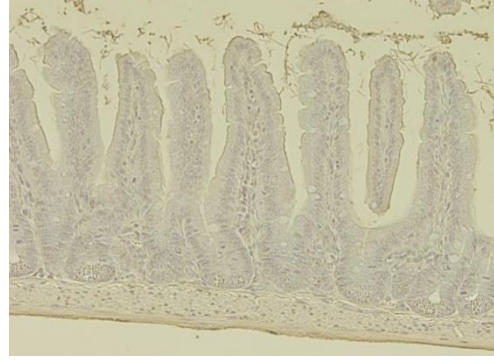
Fasting



2h



4h



8h

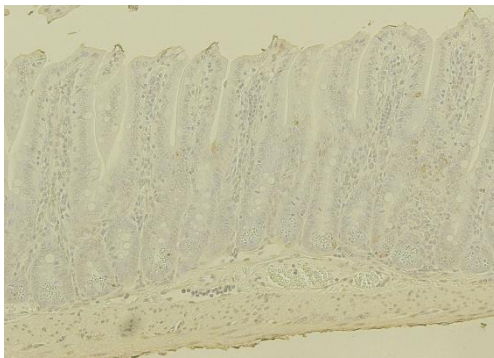
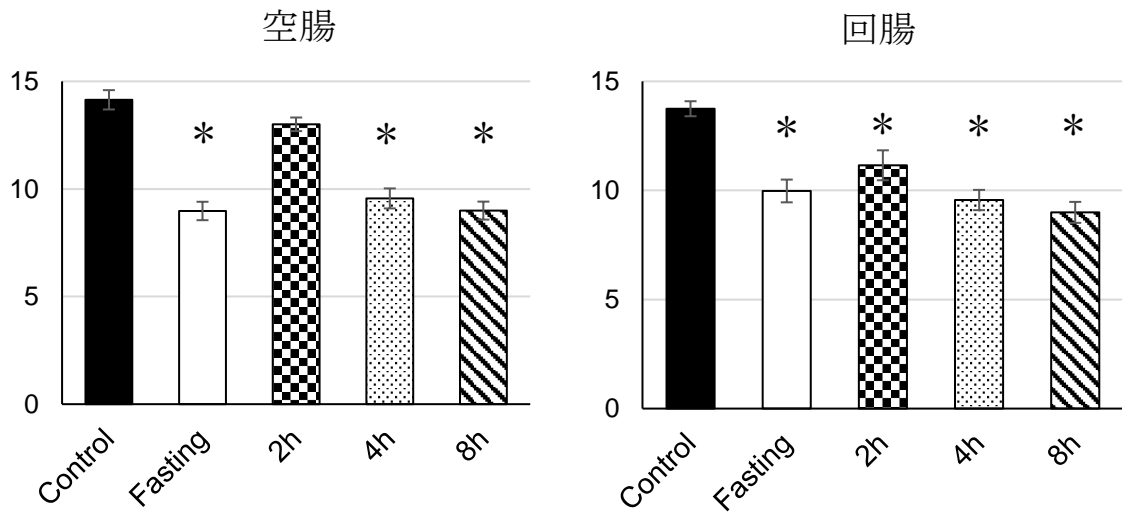


図 11 (B) : 12 時間の絶食と CHO 投与が回腸のアポトーシスに与える影響

TUNEL 陽性細胞は 12 時間の絶食による増加が観察された (光学顕微鏡, Original magnification:  $\times 100$ , 免疫染色)。

**A**



**B**

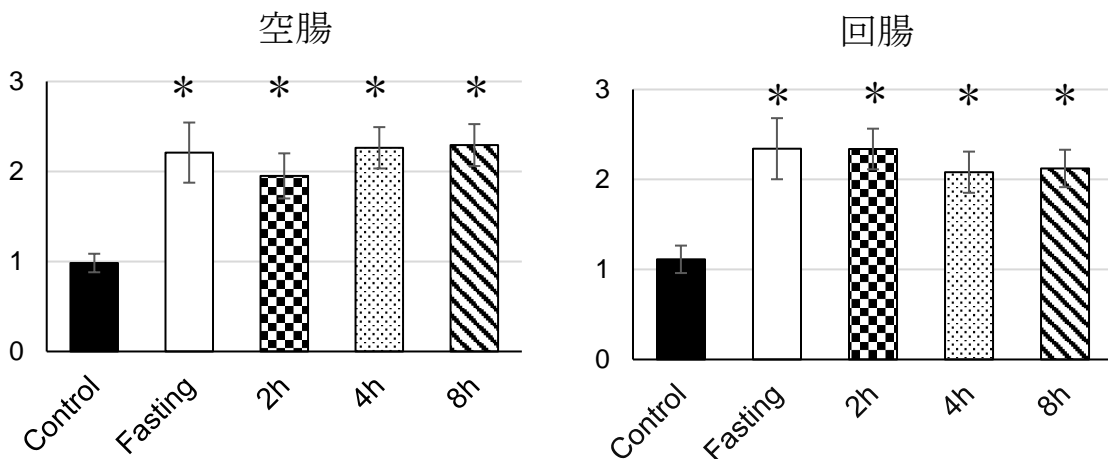


図 12(A) (B) : 12 時間の絶食と CHO 投与が空腸、回腸の (A) 細胞増殖と (B) アポトーシスに与える影響

(A) 空腸、回腸とも 12 時間絶食によって、Ki-67 陽性細胞数は Control 群と比較して有意に減少したが、犠死 2h 前の CHO 投与で Control 群のレベルまで増殖能は維持された。

(B) 空腸、回腸とも 12 時間絶食によって、TUNEL 陽性細胞数は Control 群と比較して有意に増加した。Ki-67 とは異なり、いずれの CHO 投与のタイミングでも TUNEL 陽性率は減少しなかった。平均±標準誤差、\*P<0.05 vs. Control (ANOVA)。

#### 4-4：考察及び小括

本検討で、マウスでは、わずか 12 時間の絶食でも IE リンパ球数および LP リンパ球数が減少し、さらに絨毛上皮のアポトーシスの増加と増殖能の減少を伴って腸管の物理的な萎縮を引き起こすことが示された。犠死 2 時間前の CHO 経口投与は、GALT の実効器官である IE および LP のリンパ球数を非絶食群と同レベルに維持し、さらに絨毛の萎縮も防いだ。今回の結果によって、これまで ERAS®で報告されてきた CHO による耐糖能改善や精神的な安定効果以上に、新たな意義が認識された (図 10)。

本研究では、CHO 投与のタイミングとして、犠死 4 時間前、8 時間前の検討も加えた。4 時間前投与では LP リンパ球数は維持されたものの IE リンパ球数は回復できず、腸管構造の萎縮を抑制することもできなかった。8 時間前投与に至っては GALT リンパ球数、絨毛構造のいずれも改善しなかった。マウスの実験結果をそのままヒトに当てはめることはできないが、ERAS®で推奨されている麻酔導入 2 時間前の CHO 投与の有用性と矛盾しない結果が得られた。第 3 章の 24 時間絶食モデルにおける検討で自由飲水しても GALT リンパ球数が全く改善しなかったことを合わせると、CHO が GALT リンパ球数を維持したメカニズムとして、水分補給よりもグルコース投与の意義が大きいであろう。グルコースは解糖系、クエン酸回路、電子伝達系を介して大量のエネルギーを生じ、

細胞の増殖、活性を高める<sup>[35][36]</sup>。リンパ球のエネルギー基質としてもグルコースは非常に重要であり<sup>[37]</sup>、外部からの栄養投与が遮断された状態でのグルコース投与が、IE、LP リンパ球の減少を抑制した可能性が高い。あるいは、GALT リンパ球の維持にも深くかかわっている腸内細菌叢がグルコース投与によって正常に保たれたのかもしれない<sup>[38][39]</sup>。8時間前の CHO 投与が GALT や絨毛構造に影響を与えなかったのは、グルコースが投与されても短時間で絨毛に吸収、消費されてしまい、結局 8 時間の絶食状態が生じてしまったことが原因だと推察される。

これまでに粘膜 IgA レベルと GALT リンパ球数は相関して変動することがマウス経静脈栄養 (TPN) モデルで示されている<sup>[40]</sup>。しかし今回の我々の検討では、12 時間の絶食と CHO 投与によって IE、LP リンパ球数が変動した一方、腸管内腔洗浄液中の IgA レベルは有意な変化を示さなかった。その理由は、今回の研究では明確にできない。しかしながら、短時間の変化を評価している今回の実験モデルの設定が関与している可能性がある。IgA の半減期は数日であるため<sup>[41]</sup>、GALT リンパ球数の減少によって生じると考えられる IgA 分泌量の低下が腸管内 IgA レベルの低下として短時間では反映されなかったのではなからうか。

腸管上皮の細胞増殖/アポトーシスに着目すると、検体採取 2 時間前に



CHO を経口投与した群で空腸の細胞増殖能の維持を認めたが、回腸では細胞増殖能は維持されなかった。アポトーシスは空腸、回腸両部位において絶食により増加し、いずれのタイミングでの CHO 投与によっても改善しなかった。岡田ら<sup>[32]</sup>は、36 時間の絶食で低下した小腸の細胞増殖能が再摂食 2 時間後には自由摂食群と同レベルまで回復したことを報告している。また、Zhou ら<sup>[42]</sup>は、グルコースの投与が絨毛陰窩の細胞増殖能を高めることを報告しており、これらは我々の結果を支持するものである。回腸の細胞増殖能が犠死 2 時間前の CHO 投与でも改善しなかった原因として、投与したグルコース量の少なさが考えられる。経口投与した CHO のグルコースは空腸上皮でほとんど吸収・消費され、回腸に到達しなかったからかもしれない。一方、CHO はどのタイミングで投与しても空腸/回腸とも絨毛上皮のアポトーシスの増加を抑制しなかった。アポトーシスを抑制するには、グルコース以外の栄養素も重要なかもしれない。

今回の我々の検討では、ERAS®プロトコールで待機手術の患者に手術 2 時間前に 12.5%グルコース含有水 400ml を摂取することが推奨されていることを踏まえて体重換算量がほぼ同等となるように、マウスにおける CHO 投与濃度/容量を設定した。しかし、ヒトとマウスでは、栄養素が最も効果を発揮する容量、濃度がそのまま体重換算で計算できるわけではない。CHO の投与量によってはさらなる改善効果が期待できるかもしれない、今後の研究課題といえよう。

グルコース以外にも免疫細胞や腸上皮に影響を及ぼす栄養素は数多く存在する。例えば、グルタミン、アルギニンやプロバイオティクスなどの成分は免疫栄養素として生体の免疫能を改善することが動物モデルや臨床の場で報告されている<sup>[43] [44] [45]</sup>。これらの栄養素をグルコースに加え、あるいは単独投与する検討も重要であろう。CHO は臨床において手術患者に投与されることを考えると、本研究でも実際に絶食群と CHO 群に手術侵襲を加え、その後の GALT や腸管構造の変化を検討すべきであるかもしれない。この点も今後明らかにすべきと考える。

今回の我々の研究では、わずか 12 時間の絶食期間が GALT および絨毛の萎縮を引き起こした。しかし、2 時間前の CHO 投与は GALT リンパ球数を維持し、さらに絨毛の萎縮も防いだ。今回の結果は、これまで ERAS® で報告されてきた CHO による耐糖能改善や筋力維持などの効果に、新たな意義を付加するものとする (図 13)。

## 術前炭水化物水負荷の新しい意義

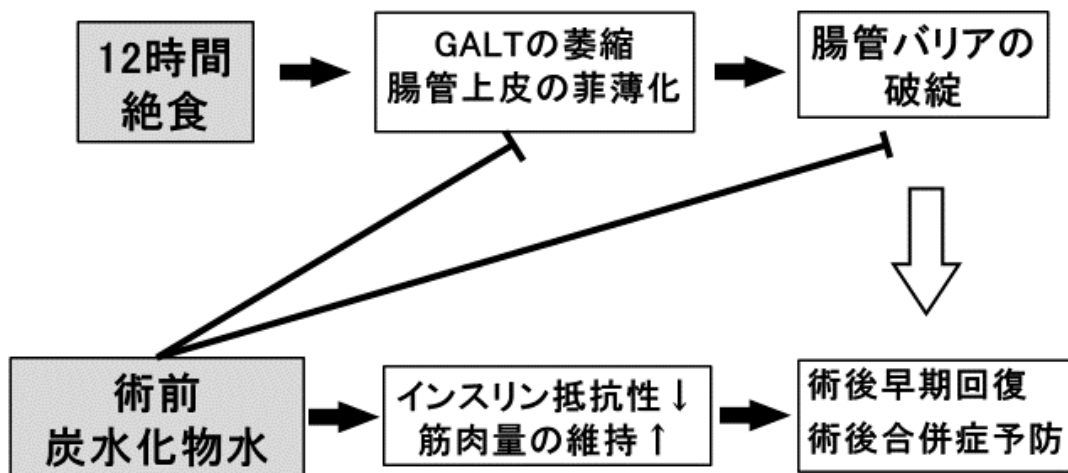


図 13 : 12 時間絶食と炭水化物水投与が腸管バリアに及ぼす影響

マウスでは、12 時間の絶食によって腸管バリア構造は萎縮する。術前炭水化物水の投与はインスリン抵抗性の改善や筋肉量を維持の以外に、腸管の物理的構造を維持し、GALT リンパ球数を維持することで物理的・免疫学的に腸管バリアを維持することが明らかになった。これらが相伴って術後の早期回復、合併症予防に役立っていることが示唆された。

## 5. 術前運動療法が腸管虚血再灌流傷害後の生存に及ぼす影響（適切な運動強度の決定）

### 5-1：背景と目的

運動療法は様々な分野でその有用性が報告されている。しかし、過度な運動は生体にとってストレスを誘発し、臓器障害や代謝不全など様々な弊害をもたらすことも報告されている<sup>[46] [47]</sup>。もし我々が術後の炎症反応の軽減効果を期待して運動療法を術前患者に適用するならば、安全に継続することができ、かつ術後経過の改善が最も期待できるプロトコルを設定する必要がある。

従って本検討では、良好な運動完遂率を維持し、かつ Gut I/R 後の生存を向上させるような適切な強度、頻度、期間の運動プロトコルを検索するために以下の2つの実験を行った。実験1では運動速度を固定した上でトレッドミル走行を行い、異なる運動頻度・期間のプロトコルを設定することで最適な頻度・期間のプロトコルを検索した。実験2では、実験1で得られた結果から運動頻度、期間を決定した上で、異なる運動速度のトレッドミル走行を負荷し、最適な速度を検索した。実験1、2で得られた結果から、最適な運動プロトコルを決定した。

## 5-2 : 対象と方法

### 5-2-1 : マウストレッドミル運動プロトコールと運動完遂率の設定

5 週齢の C57BL/6J マウス (雄性、18g - 21g) を購入、通常食 (AIN - 92M) を自由摂食・自由飲水下に 12 時間の明暗サイクルで 1 週間環境順応させた後に実験を開始した。運動群のマウスにはドレッドミル運動 (Treadmill system, メルクエスト, 富山, 日本) を施行した。トレッドミル機装置の後方には電気刺激グリッドが装着してあり (電気刺激 : 0.3mA)、マウスが走行中に 1 分間に 3 回以上ショックグリッドに接触するか、あるいは走行を持続することが困難となった場合、運動プロトコールを「脱落」と判断した。この運動脱落基準をもとに、運動プロトコールの完遂率を評価した。

### 5-2-2 : 腸管虚血再灌流傷害 (Gut I/R)

マウスの腹部正中縦軸方向にハサミで 2 cm 程度切開し、開創器にて術野を確保した。大腸、小腸を愛護的に左側に授動した後に、肝下面を展開し上腸間膜動脈 (superior mesenteric artery ; SMA) を同定、microvascular clip を用いて SMA を遮断し、直ちに仮閉腹を行った。45 分間の虚血後、再開腹して外科 clip を解放し虚血を解除した。その後直ちに、皮下に生理食塩水 1ml を投与した。層々に閉腹し、術後 48 時間までの生存を観察した。術後は自由摂食・自由飲水

とし、術後 12 時間までは 2 時間毎、術後 12～24 時間までは 6 時間毎、それ以降では 12 時間毎に生存確認を行った。

### 5-2-3 : 運動期間・頻度の違いが運動完遂率と腸管虚血再灌流傷害後の生存に及ぼす影響 (実験 1)

はじめに、全てのマウスに対してトレッドミル走行への馴化運動 (速度 : 12m/分、運動時間 : 15 分/日、期間 : 3 日間) を行った。次に適切な運動頻度、期間の運動プロトコールを決定することを目的として、速度 : 20m/分、60 分間/日の運動プログラムの設定下で、マウスを①5 日間/週 : 2 週間 (n=10)、②3 日間/週 : 2 週間 (n=9)、③3 日間/週 : 3 週間 (n=10) の 3 群に分けた。すべての運動プロトコールは 10 時から 18 時の間に行った。一方で非運動群は、運動群がトレッドミルで運動中、トレッドミル装置の付近においたゲージ内で飼育した。60 分の走行時間中、設定した運動脱落基準に従って、マウスが運動継続可能か否か観察し、運動プロトコール終了後に各群の運動完遂率を評価した。次に、運動プロトコールを完遂したすべてのマウス (n=16) に非運動群 (n=6) を加えた 4 群に対して Gut I/R を施行、再灌流後の生存を評価した。生存は再灌流後 48 時間まで観察し、術後 12 時間までは 2 時間毎、術後 12～24 時間までは 6 時間毎、それ以降では 12 時間毎に生存確認を行った。

#### 5-2-4: 運動速度の違いが運動完遂率と腸管虚血再灌流障害後の生存に及ぼす影響 (実験 2)

実験 1 の結果に従って、運動頻度・期間を 3 日間/週、3 週間と設定した。

一方、実験 1 の各群のマウスの運動完遂率は 60%前後と非常に低く、運動負荷が過度であった可能性が考えられた。走行中の観察で、脱落したマウスのほとんどが運動開始 15 分以内に脱落していたことから、運動時間ではなく速すぎる運動速度が今回の低い運動完遂率につながった可能性が疑われた。従って、実験 2 では、実験 1 同様、運動時間を 1 日 60 分と設定した上で異なる速度の運動プロトコールを設定した。すなわち、運動群では、全てのマウス (n=94) に対して馴化運動 (速度 : 10m/分、運動時間 : 15 分/日、期間 : 3 日間) を行った後、を無作為に速度 : ①12m/分 (n=31)、②15m/分 (n=31)、③18m/分 (n=32) の異なるプロトコールに分けて運動完遂率を評価した後に、実験 1 同様、非運動群 (n=25) を加えた 4 群に対して Gut I/R を施行、再灌流後の生存を評価した。

#### 5-2-5: 統計学的検討法

本実験での値は全て means ± SE で表し、統計ソフトは Windows 用の JMP Pro 12 (SAS Institute Japan Ltd, Japan) を使用した。P 値は 0.05 未満にて有意差があるとした。2 群間の生存時間は Log-rank test にて検定した。

## 5-3 : 結果

### 5-3-1 : 異なる運動期間・頻度の運動完遂率と腸管虚血再灌流障害後の生存

運動完遂率は各運動プロトコールとも約 60%だった。各群間の完遂率に有意差は認められなかった (図 14A)。また各プロトコールを完遂したマウスの Gut I/R 後の生存に統計学的有意差を認めなかったが、3 日/週隔日 : 3 週間のプロトコールが最も生存率が高かった (48 時間生存率 : 50%)。一方、5 日/週 : 2 週間のプロトコールは非運動マウスと比較して生存を改善しなかった (図 14B)。



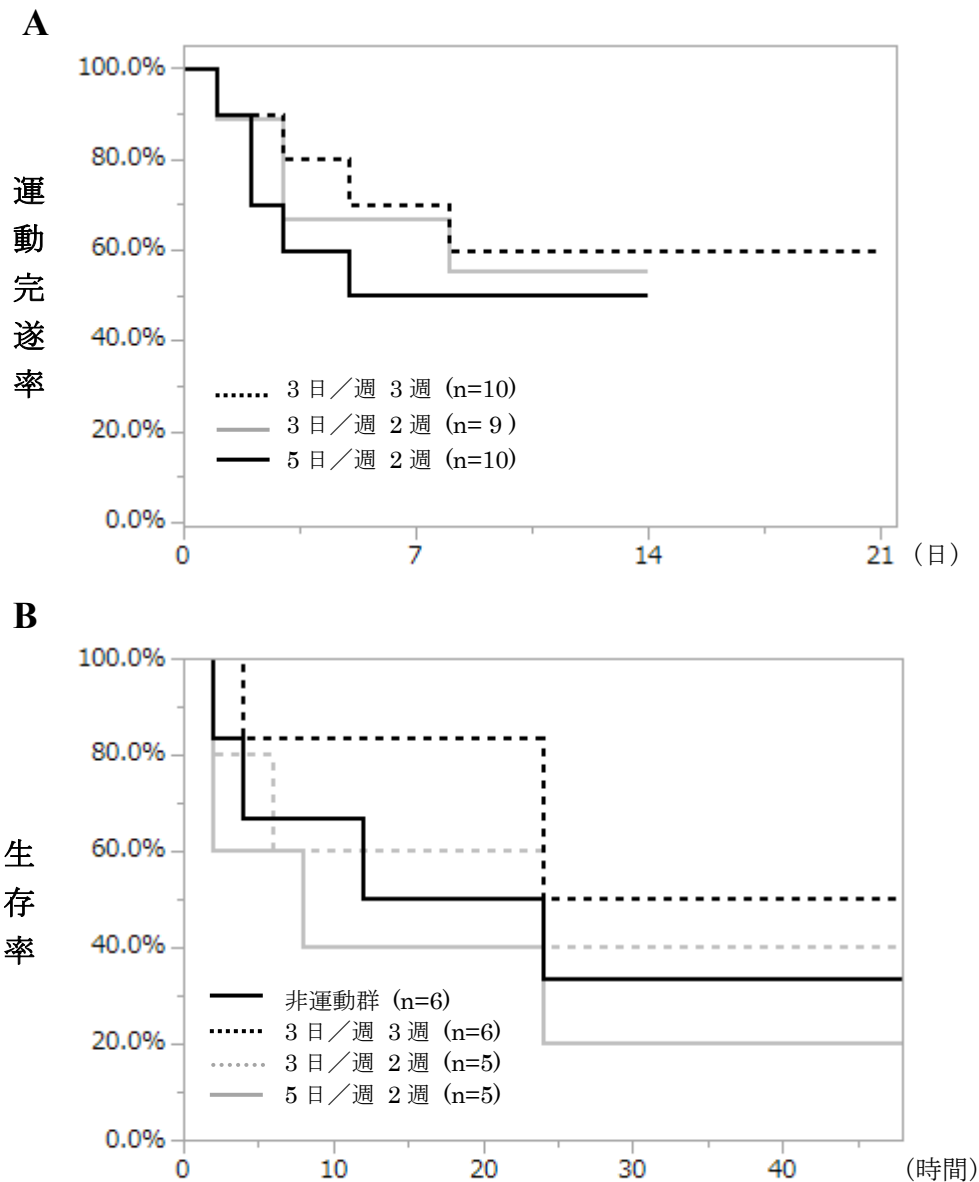


図 14 : 異なる運動期間・頻度が運動完遂率と Gut I/R 後の生存に及ぼす影響

(A) ①5日間/週：2週間、②3日間/週：2週間③3日間/週：3週間の3群の運動完遂率  
 プロトコル終了時の運動完遂率は3群とも約60%で、各群に有意差を認めなかった。

(B) ①5日間/週：2週間、②3日間/週：2週間、③3日間/週：3週間の3群の Gut I/R 後の生存

各群間で Gut I/R 後の生存に有意差を認めなかったが、3日/週隔日：3週間のプロトコルの生存が最も良好だった。5日/週：2週間のプロトコルは最も生存率が不良だった。

### 5-3-2 : 異なる運動速度の運動完遂率と腸管虚血再灌流障害後の生存

速度：12m/分のプロトコルを脱落したマウスはいなかった。速度：15、18m/分のプロトコル群のマウスはともに90%以上の運動完遂率だった（図15A）。非運動マウスと比較して、速度：12m/分と速度：15m/分の運動プロトコルは Gut I/R 後の生存を有意に改善した。また、速度：18m/分のマウスは有意差を得られなかったものの非運動マウスと比較して生存を改善する傾向を示した（図15B）。

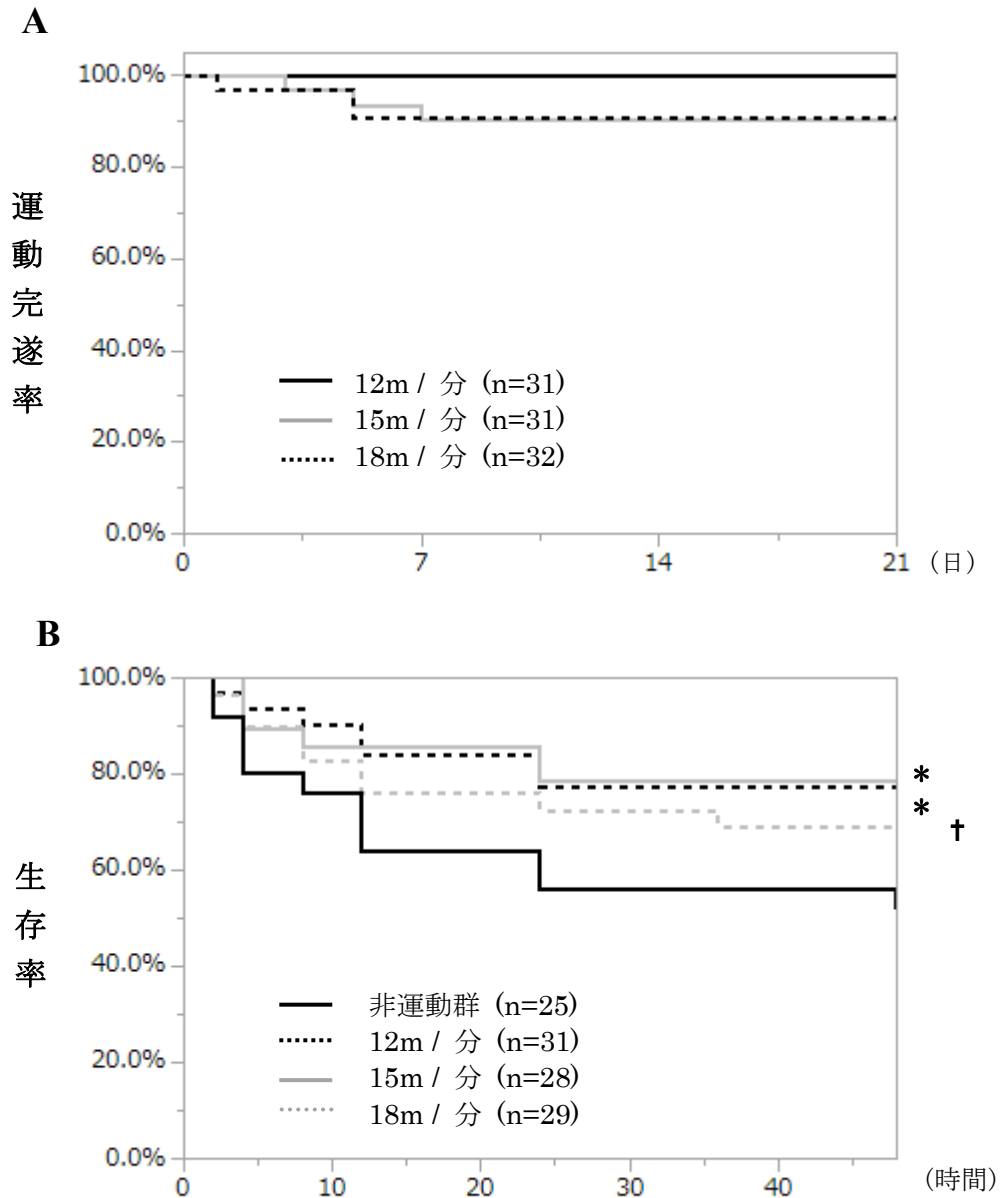


図 15 : 異なる運動速度が運動完遂率と Gut I/R 後の生存に与える影響

(A) 運動頻度・期間 : 3 日/週、3 日間のプロトコール下、速度①12m/分、②15m/分、③18m/分の 3 群の運動完遂率

速度 : 12m/分ではプロトコール終了時の運動完遂率は 100%だった。速度 : 15、18m/分でも 90%以上の運動完遂率だった。

(B) 運動頻度・期間 : 3 日/週、3 日間のプロトコール下、速度①12m/分、②15m/分、③18m/分の 3 群の Gut I/R 後の生存非運動マウスと比較して、速度 : 12m/分と 15m/分の運動プロトコールは Gut I/R 後の生存を有意に改善した。速度 : 18m/分でも非運動マウスと比較して生存を改善する傾向を示した。平均±標準誤差、\*P<0.05 vs. Sedentary, †P=0.08 vs. Sedentary (Log-rank test)

## 5-4 : 考察及び小括

本検討で、高度外科侵襲前の適切な運動療法は、以前から指摘されていた筋力の維持・改善を通して ADL の早期回復につながるという効果に加えて、侵襲後の生存を改善することが明らかになった。さらに、その運動療法として適切な運動プロトコールの選択が重要であることが示唆された。一方で、本検討では運動強度の強いプロトコールは運動完遂率も低いうえに、Gut I/R 後の生存を悪化させる可能性があった。臨床の場では、たとえ運動療法後に生体反応の改善効果が期待できたとしても、その運動プロトコールの完遂率・許容率が低ければ患者への適用は難しいだろう。我々は、運動療法を術前患者に施行するにあたっては慎重に運動プロトコールを選択する必要があると考えられる。

しかしながら、適切な運動プロトコールは、運動する患者の性別、年齢、運動習慣や、患者の受ける術式、侵襲強度によっても大きく変わると考えられる<sup>[48]</sup>。

従って、我々が最良の術後アウトカムを得るためには、患者背景を十分に加味した上で患者各々にテーラーメイドの運動プログラムを吟味、用意する必要があるかもしれない。

## 6. 術前の運動療法がマウス腸管虚血再灌流モデルの臓器障害及び各種炎症性メディエーターに及ぼす影響

### 6-1 : 背景と目的

第5章で、適切な強度の運動療法が Gut I/R 後の生存を改善することが明らかになった。本章では、Gut I/R 後の生存が改善したメカニズムを、侵襲が加わる局所である腸管と遠隔臓器に及ぼす影響を調べることに、次に腸管と全身の炎症性メディエーターを調べることで明らかにすることを目的とした。さらに、運動の影響が直接及ぶ骨格筋が分泌するマイオカインの関与も検討した。

虚血によって酸素の供給を遮断されると、ミトコンドリア機能が停止し ATP 産生が低下する一方で、ATP は ADP から AMP、を経てヒポキサンチン (hypoxanthine) へと分解される。そして、続いて起こる再灌流によって酸素が急激に供給されると、このヒポキサンチンが xanthine oxidase や NADPH oxidase の作用を受けて酸素と反応し、過剰な活性酸素種 (ROS : Reactive Oxygen Species) を生成する<sup>[49] [50]</sup>。活性酸素種による酸化ストレスは細胞そのものを傷害するとともに侵襲局所の腸管の TNF- $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を惹起する。この過剰な炎症性サイトカインによって、好中球は活性化、プライミングされて腸管へ集積するとともに、腸管そのものがプライミングベッドとして

働き、活性化した好中球が全身を循環してミエロペルオキシダーゼ（MPO : Myeloperoxidase）をはじめとする各種のプロテアーゼを分泌し、腸管および遠隔臓器障害を引き起こす<sup>[51] [52] [53]</sup>。以上の Gut I/R のメカニズムをふまえると、運動療法が侵襲局所である腸管の ATP レベルを保ち、酸化ストレスを軽減する結果、炎症性メディエーターを制御する。そして全身の炎症反応が抑えられ、臓器障害が軽減することで、生存が改善している可能性が考えられる。

また、近年運動が作用する主体である骨格筋そのものが、運動による刺激を受けて種々のマイオカインを分泌すること、マイオカインが骨格筋自身や、近傍または遠隔の組織に作用して、脂肪燃焼や発がん抑制効等様々な効果を持つことがわかってきた<sup>[54] [55]</sup>。運動療法によって修飾を受けたマイオカインが Gut I/R における生体反応の調節、臓器障害の軽減に関与しているかもしれない。

従って本検討では、運動療法が 1) Gut I/R 後の臓器障害を軽減する、2) Gut I/R 前後の腸管および全身の炎症性メディエーターを制御する、3) 筋肉から分泌されるマイオカインの分泌を修飾することで Gut I/R 後の炎症反応を制御する、という仮説を立て、以下の実験を行った。

## 6-2 : 対象と方法

### 6-2-1 : 対象

5 週齢の C57BL/6J マウス (雄性、18g - 21g) を購入、通常食 (AIN - 92M) を自由摂食・自由飲水下に 12 時間の明暗サイクルで 1 週間環境順応させた後に実験を開始した。マウス (n=92) を非運動群と運動群に分けた。運動群には、第 5 章で決定した運動プロトコール (トレッドミル走行 : 12m/分、1 日 60 分、3 日間/週、3 週間) を完遂したマウスを使用した。非運動、運動群に対して第 5 章と同様に Gut I/R を施行した。Gut I/R 後の臓器障害を評価するために、虚血前 (Pre)、再灌流直後 (0h)、再灌流 3 時間後 (3h)、6 時間後 (6h) 及び 24 時間後 (24h) に小腸、肺、肝臓及び左右腓腹筋を採取した。

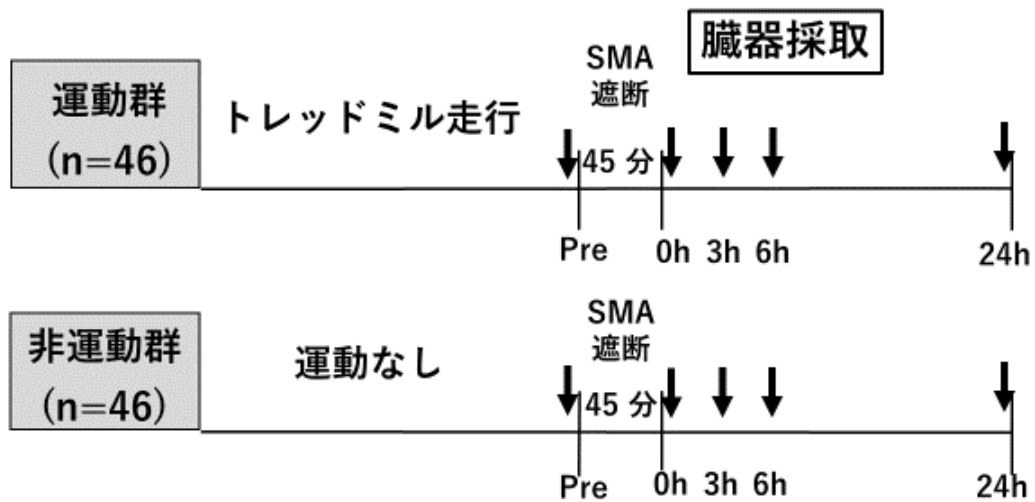


図 16 : 実験プロトコール

マウス (n=92) を非運動群と運動群に分けた。運動群にはトレッドミル走行 (12m/分、1日60分、3日間/週、3週間) を完遂したマウスを使用した。非運動、運動群に対して Gut I/R (虚血時間 : 45分) を施行した。虚血前 (Pre)、再灌流直後 (0h)、再灌流3時間後 (3h)、6時間後 (6h) 及び24時間後 (24h) に小腸、肺、肝臓及び左右腓腹筋を採取した。



## 6-2-2：各主要臓器の組織傷害度のスコアリング

腸管（腸管の口側半分の中央より 15mm 採取）、肺、肝臓の各臓器を 20%ホルマリン液で固定し組織標本を作製した。H&E 染色した後、腸管虚血再灌流による腸管局所の傷害及び遠隔臓器への傷害を評価するために組織傷害度を評価した。観察、計測には光学顕微鏡 BX43（オリンパス株式会社、東京）を用いた。

### ・小腸

腸管を切離、腸管内腔を 20 ml の Hanks' balanced salt solution (HBSS)にて洗浄して便塊を取り除いた。全小腸のおよそ中点で空腸と回腸にわけ、空腸の中点 15 mm切片を小腸組織像の評価のために採取した。残腸は本章以降の実験に使用するため水分を十分に取り除き、各々の重量を測定した後に-80℃にて凍結保存した。1 匹のマウスにつき盲目下無作為に 10 絨毛を選定、点数化を行い、その中央値を傷害度として記録した。スコアの詳細は Chiu<sup>[56]</sup>の報告した傷害度スコア、すなわち、0 点；正常粘膜、1 点；Gruenhagen 腔の軽度の開大（絨毛頂点に多く見られ、しばしば毛細血管の鬱血を伴う）2 点；粘膜固有層からの粘膜上皮の軽度隆起を伴った上皮直下の空胞の伸展、3 点；絨毛粘膜上皮の著明な隆起、4 点；粘膜固有層の露出と拡張した毛細血管の露出、粘膜固有層の細胞密度

の増加、5点；粘膜固有層の融解・崩壊（粘膜の潰瘍化と出血）、という分類に従った。

#### ・肺

マウスを心腔採血にて犠死せしめた後に気管切開し、18G サーフロー外套を肺側に向かって挿入してホルマリン緩衝液 0.5ml を肺内に肺胞組織を破壊しないよう緩徐に注入した。次に、腹腔内より横隔膜を切開、主気管支を切離、肺を回収し組織標本を作製・保存した。肺の組織傷害度は Zhu<sup>[57]</sup>の報告に従って A：滲出液・充血、B：鬱血・好中球浸潤・肺胞内出血、C：細胞破片・細胞過形成、の3項目に分けて評価した。1視野内に A～C の各項目が占拠する範囲を0点：0%、1点：0～25%、2点：26～50%、3点：51%～として点数化し、その中央値を記録、3項目の点数を合計し、そのマウスの傷害度スコアとした。観察視野から無作為に10視野を選定しその組織傷害度を評価した。

#### ・肝臓

犠死せしめたのちに肝臓を下大静脈から切離・回収しホルマリン固定して組織標本を作製した。肝臓の組織傷害度は鈴木ら<sup>[58]</sup>の傷害度スコアに従って、1：好中球浸潤、2：肝細胞空胞化、3、肝細胞壊死の3項目に分けて評価し、それぞれの項目が1視野内に占拠する範囲を0点：0%、1点：0～10%、2点：11～30%、3点：31～60%、4点：61%～として点数化した。肝傷害は3項目合計

を平均し、そのマウスの傷害度スコアとした。観察視野から無作為に 10 視野を選定しその組織傷害度を評価した。

#### ・筋肉

犠死せしめたのちに右腓腹筋を切離・回収して組織標本を作製した。腓腹筋の組織傷害度は Neto<sup>[59]</sup>らの傷害度スコアに従って、1：好中球浸潤、2：壊死、3、浮腫の3項目に分けて評価し、それぞれの項目が1視野内に占拠する範囲を0点：0～25%、1点：26～50%、2点：51～75%、3点：76%～として点数化した。上記3項目を合計し、そのマウスの傷害度スコアとした。観察視野から無作為に10視野を選定しその組織傷害度を評価した。

### 6-2-3：腸管メディエーターの評価

#### ・腸管組織中の ATP および ATP+ADP+AMP レベルの測定

6-2-2 で使用し凍結保存していた残りの腸を、蒸留水で10倍希釈した lysing buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、1 mM Na<sub>2</sub>EDTA) に Protease Inhibitor Cocktail (11697498001 Sigma-Aldrich)を加えた溶液中でホモジナイズした。得られた小腸ホモジネート液のうち 200 $\mu$ l を使用して、ルミノメーター(3 M<sup>TM</sup> Clean-Trace Water<sup>TM</sup> ATP system)を用いて ATP 量を、ルミテスター (Kikkoman) を用いて ATP+ADP+AMP 総量を測定した<sup>[60] [61]</sup>。これらの測定器はホモジナイ

ズされた組織から速やかに ATP および ATP+ADP+AMP 量を抽出し、ルシフェラーゼ発光法によって測定する。測定単位は RLU (Relative Light Unit : 相対発光量)として算出された。

#### ・腸管組織中の 8-OHdG レベルの測定

8-OHdG は DNA が酸化的損傷を受ける時に生じる副産物であり、酸化ストレスの指標として広く知られている<sup>[62]</sup>。得られた小腸ホモジネート液のうち 500 $\mu$ l を使用して、DNA エキストラクター TIS キット（和光純薬工業㈱）を用いて腸管から DNA を抽出した。得られた DNA は、8-OHdG 測定前処理試薬セット（和光純薬工業㈱）を用いて前処理した後に ELISA 法にて測定した。

8-OHdG の測定には New 8-OHdG Check ELISA キット（日本老化制御研究所，静岡県袋井市）を用いた。まず、8 - OHdG を固相化したマイクロプレートに 8 - OHdG 標準溶液または調整した検体と第一抗体（抗 8 - OHdG モノクローナル抗体）を加え、37 $^{\circ}$ C、1 時間反応後、反応液を除去した。洗浄後、第二抗体（酵素標識抗体）を分注し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ洗浄した。発色剤を加えて常温で 15 分反応させた後に反応停止液を加え、吸光度測定器で 450nm における吸光度を測定した。

#### ・腸管組織中の各種サイトカインレベルの測定

得られた小腸ホモジネート液 800 $\mu$ L を遠心分離 (14000 rpm, 45 min, 4  $^{\circ}$ C) し、その上清を採取して-80 $^{\circ}$ Cで保存、サイトカインを測定する直前に室温解凍して使用した。筋組織抽出液中の各サイトカインレベル (IL-6、MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-10) の測定には、CBA-detection kit (BD cytometric bead array mouse inflammation kit, Becton-Dickinson Bioscience, California, USA) を用い、フローサイトメトリー (BD accuri C6, Becton-Dickinson Bioscience, California, USA) で評価した。

#### ・腸管組織中のミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性の測定

得られた小腸ホモジネート液 800 $\mu$ L を遠心分離 (14000 rpm, 15 min, 4  $^{\circ}$ C) し、その上清を採取して-80 $^{\circ}$ Cで保存、測定する直前に室温解凍して使用した。測定方法はマニュアルに従った。すなわち、100  $\mu$  L の標準溶液または調整した検体をウェルに添加し室温で 1 時間反応させた。Washing buffer 200  $\mu$  L にて 4 回洗浄後、一次抗体を 100  $\mu$  L ウェルに添加し室温で 1 時間反応させた。洗浄後、各ウェルに二次抗体 (HRP : Horse Radish Peroxidase) を 100  $\mu$  L 添加し、室温で 1 時間反応させ洗浄後、各ウェルに 100  $\mu$  L の TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) を添加し暗所で 30 分間反応させた。各ウェル 100  $\mu$  L の反応停止液を添加し、吸光度測定器で 450nm における吸光度を測定した。

#### 6-2-4 : 尿中・血中のメディエーターの評価

##### ・尿中 8-OHdG レベルの測定

膀胱の直接穿刺によって得られた尿を遠心分離(3000 rpm、10 分、4℃)し、その上清を-80℃にて凍結保存、測定する直前に室温解凍して使用した。

8-OHdG の測定には New 8-OHdG Check ELISA キット (日本老化制御研究所, 静岡県袋井市) を用いた。測定方法は腸管組織中の 8-OHdG レベル測定と同様に、マニュアルに従って行った。

##### ・血中サイトカインレベルの測定

心腔穿刺によって得られたヘパリン全血検体を遠心分離(3000 rpm、10 分、4℃)し、その上清を-80℃にて凍結保存、サイトカインを測定する直前に室温解凍して使用した。各サイトカインレベル(IL-6、MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-10)の測定には、CBA-detection kit (BD cytometric bead array mouse inflammation kit, Becton-Dickinson Bioscience, California, USA)を用い、フローサイトメトリー (BD accuri C6, Becton-Dickinson Bioscience, California, USA)で評価した。

#### 6-2-5 : 運動による体組成への影響と筋肉中のメディエーターの評価

##### ・食餌摂取量、体重、四肢握力及び体組成

マウスのうち、非運動群、運動群からそれぞれ 10 匹ずつ無作為に選定し、設定した運動プロトコール中の食餌摂取量、体重、および四肢握力を経時的に測定した。マウスの四肢握力測定には、マウス用握力測定装置（GPM-101B メルクエスト、富山）を使用し、運動施行直前に 3 回測定し、その中央値を四肢握力として記録した。また、運動プロトコール終了後の腓腹筋・ヒラメ筋・肝臓および精巣上脂肪の重さを計測した。

#### ・筋肉中の ATP 及び ATP+ADP+AMP レベルの測定

6-2-1 で切離、-80°C で凍結保存していた左腓腹筋を剪刀で細切後、重量の 20 倍の lysing buffer (0.75 % NH<sub>4</sub>Cl, 0.01 M Tris, 0.005 M EDTA、プロテアーゼインヒビター (complete protease inhibitor cocktail tablets: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)) を加え、30 秒間ホモジナイズした。6-2-3 の方法に従って、ホモジナイズした組織液中の ATP 及び ATP+ADP+AMP レベルを測定した。

#### ・筋肉中のマイオカインレベルの測定

得られた筋肉ホモジュネート液の残液を遠心分離 (14000 rpm, 45 min, 4 °C) し、その上清を採取して-80°C で保存、サイトカインを測定する直前に室温解凍して使用した。筋組織抽出液中の各サイトカインレベル(IL-6、MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-10)の測定には、CBA-detection kit (BD cytometric bead array

mouse inflammation kit, Becton-Dickinson Bioscience, California, USA)を用い、フローサイトメトリー(BD accuri C6, Becton-Dickinson Bioscience, California, USA)で評価した。

#### 6-2-6：統計学的検討法

本実験での値は全て means±SE で表し、統計ソフトは Windows 用の JMP Pro 12 (SAS Institute Japan Ltd, Japan)を使用した。P 値は 0.05 未満にて有意差があるとした。2 群間の比較は t 検定で行った。



## 6-3 : 結果

### 6-3-1 : 各主要臓器の組織像と傷害度スコアリング

#### ・腸管の組織像と傷害度スコア

運動プロトコール終了後、Gut I/R 前の絨毛構造に非運動群・運動群間で違いは見られなかった。再灌流後、非運動群の小腸は傷害を受け、腸管構造をほとんど保っていなかった。一方、運動群では非運動群と比較すると腸管構造は保たれており、傷害が軽減されているように見えた (図 17A)。虚血再灌流 3 時間後の傷害度スコアは運動群が非運動群と比較して統計学的に有意に低かった (図 17B)。

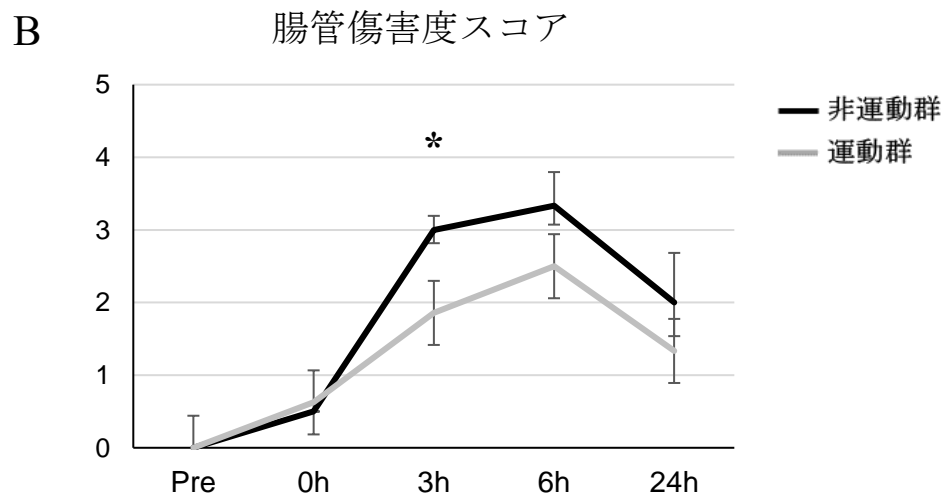
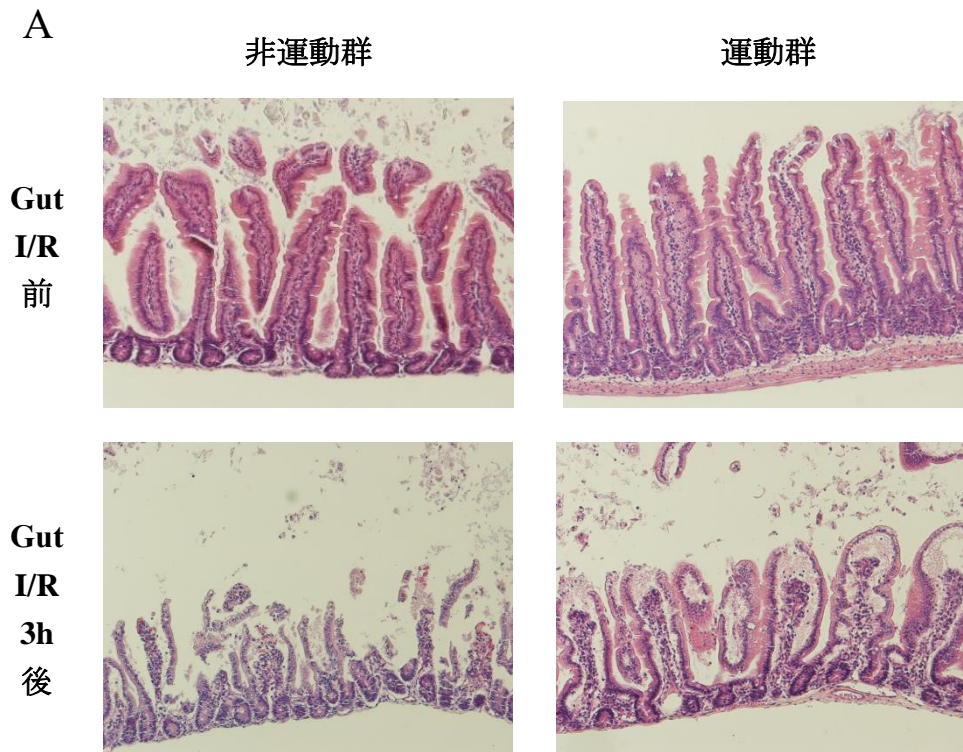


図 17A : 非運動群、運動群の Gut I/R 前後の (A) 腸管の組織像と、(B) 傷害度スコアリング

(A)再灌流後、非運動群では小腸の絨毛構造は破綻しているが、運動群では構造が保たれている。(B) 再灌流 3 時間後、運動群では非運動群と比較して腸管の傷害度スコアが有意に低下した。平均±標準誤差、n=(非運動群:4/8/7/5/6, 運動群: 4/8/7/8/6), \*P<0.05 vs. 非運動群, (Student t-test)

## ・肺の組織像と傷害度スコア

運動プロトコール終了後、Gut I/R 前の肺構造に非運動群・運動群間で違いは見られなかった。再灌流後、非運動群では好中球が肺胞組織に広範に浸潤し、肺胞内には浸出液や出血が著明に認められたが、運動群ではそれらが軽減しているように見えた（図 18A）。傷害度スコアにおいても、虚血再灌流 3 時間後の傷害度スコアは運動群が非運動群と比較して統計学的に有意に低かった（図 18B）

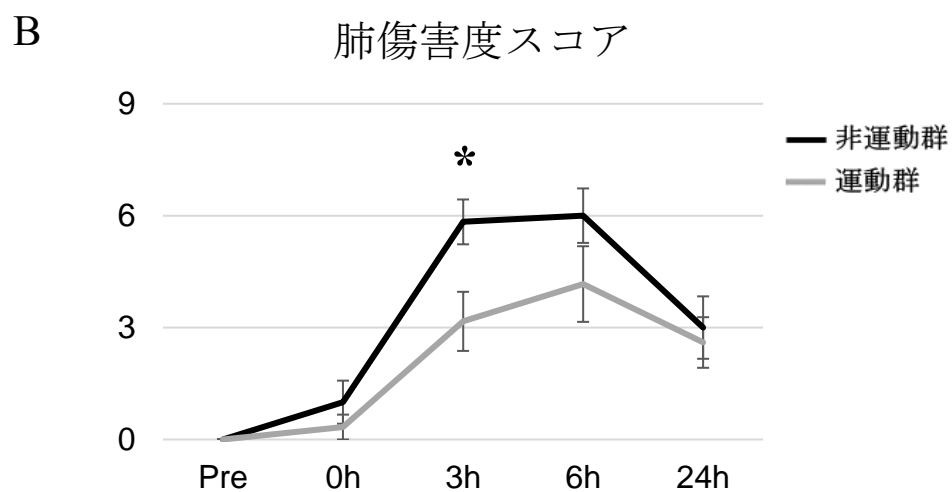
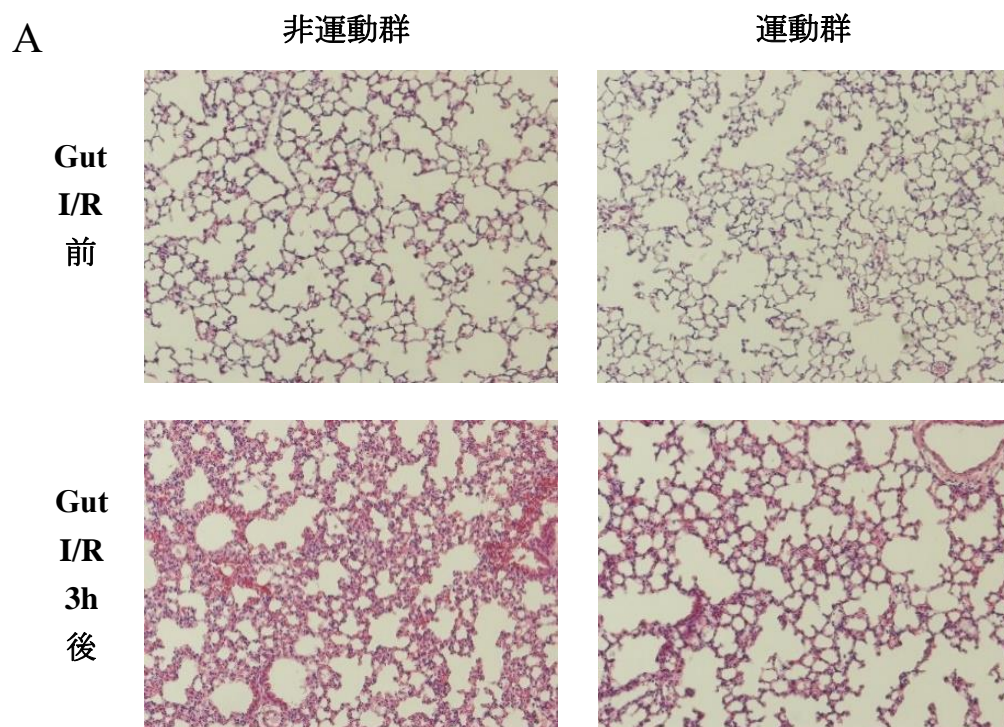


図 18A : 非運動群、運動群の Gut I/R 前後の (A) 肺の組織像と、(B) 肺傷害度スコアリング

(A) 再灌流後、非運動群では炎症細胞が広範に浸潤し、肺胞内に浸出液や血液が観察されるが、運動群ではそれらが軽減している。(B) 再灌流 3 時間後、運動群では非運動群と比較して肺の傷害度スコアが有意に低下した。平均±標準誤差、n=(非運動群: 3/3/6/6/5, 運動群: 3/3/6/6/5), \*P<0.05 vs. 非運動群, (Student t-test)

## ・肝臓の組織像と傷害度スコア

運動プロトコール終了後、Gut I/R 前の肝組織構造に、腸管、肺同様、非運動群・運動群間で違いは見られなかった。再灌流後、非運動群では肝細胞の空胞化、壊死が広範囲に観察されたが、運動群ではそれらが軽減しているように見えた（図 19A）。傷害度スコアにおいても、虚血再灌流 6 時間後の傷害度スコアは運動群が非運動群と比較して統計学的に有意に低かった（図 19B）。

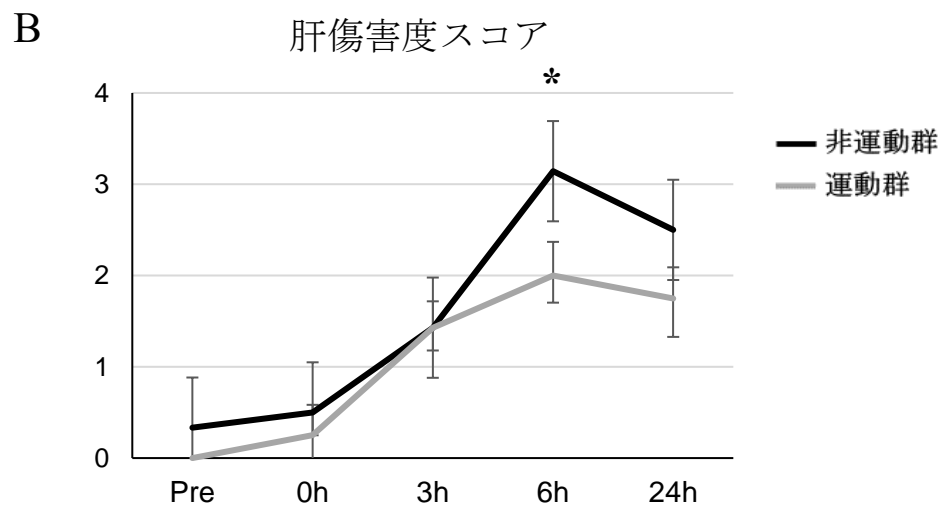
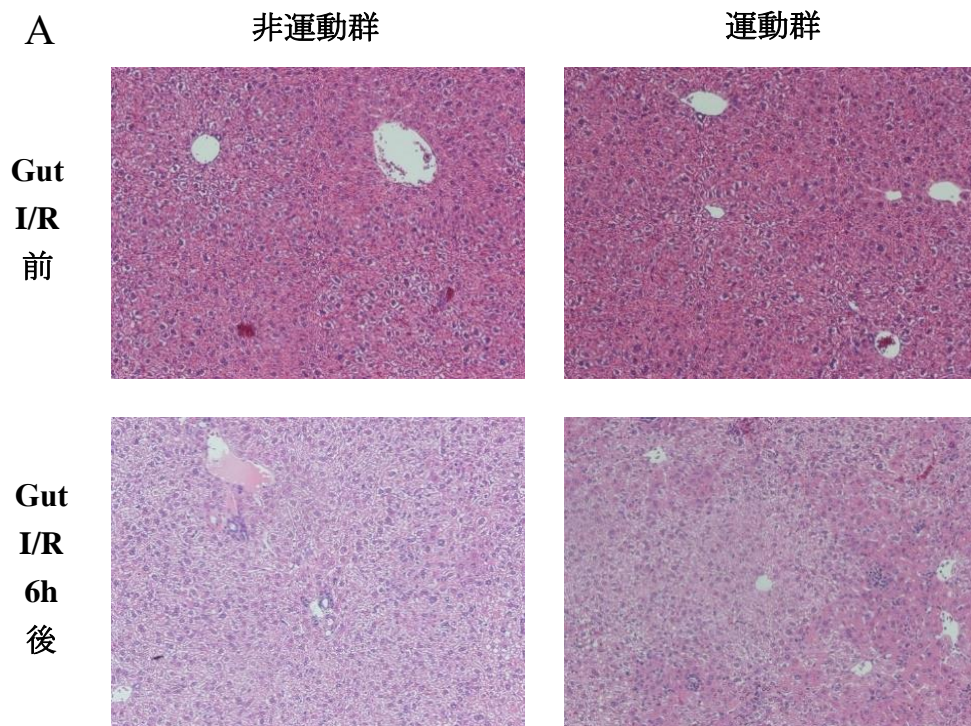


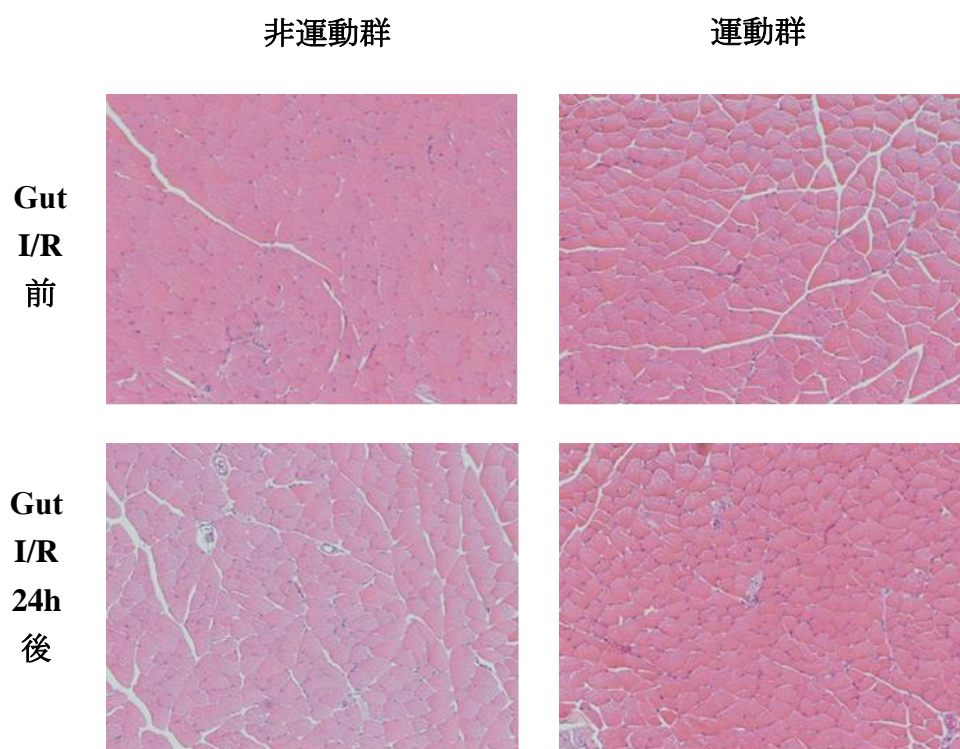
図 19 : 非運動群、運動群の Gut I/R 前後の (A) 肝臓の組織像と、(B) 肝傷害度スコアリング

(A)再灌流後、非運動群では肝細胞の空胞化、壊死が広範囲に観察されたが、運動群ではそれらが軽減している (B) 再灌流 6 時間後、運動群では非運動群と比較して肝の傷害度スコアが有意に低下した。平均±標準誤差、n=(非運動群:3/4/7/7/4, 運動群: 3/4/7/8/4),\*P<0.05 vs. 非運動群, (Student t-test)



## ・腓腹筋の組織像と傷害度スコア

運動プロトコール終了後、Gut I/R 前の筋組織構造に非運動群・運動群間で違いは見られなかった。再灌流後、腸管、肺や肝臓では組織の崩壊、好中球浸潤や壊死が認められたが、筋組織ではそれらの変化は見られなかった。Gut I/R 前の運動の有無によらず、組織像に大きな変化は認められなかった（図 20A）。傷害度スコアにおいても、Gut I/R による傷害は軽度であり、非運動群と運動群間で差は見られなかった（図 20B）。



筋傷害度スコア

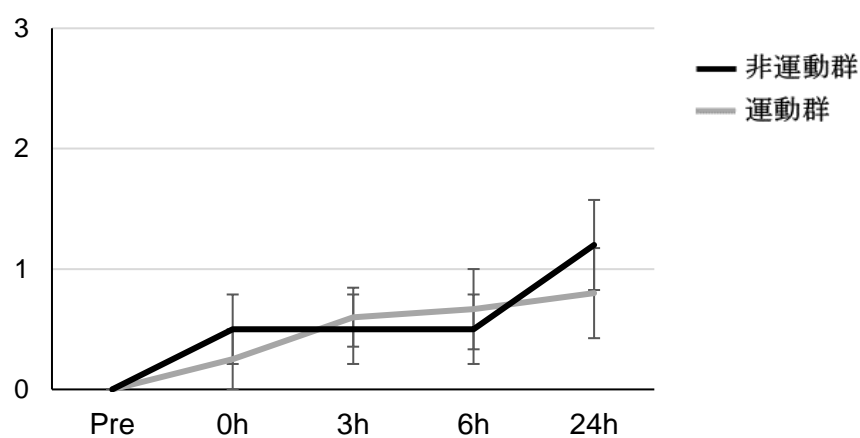


図 20 : 非運動群、運動群の Gut I/R 前後の (A) 腓腹筋の組織像と、(B) 筋傷害度スコアリング

(A) 運動プロトコル終了後 Gut I/R 前の筋組織構造に非運動群と運動群の間で違いは見られず、再灌流後も大きな組織傷害は観察されなかった。(B) 傷害度スコアは Gut I/R 後大きな変化はなく、両群間で差は見られなかった。

平均±標準誤差、n=(非運動群:3/4/5/6/5, 運動群: 3/4/4/4/5),\*P<0.05 vs. 非運動群, (Student t-test)



### 6-3-2 : 腸管メディエーターの評価

#### ・ 腸管組織中の ATP および ATP+ADP+AMP レベル

運動プロトコール終了後、Gut I/R 前の ATP 値は、非運動群と比較して、運動群で統計学的に有意に高かった。再灌流直後（0 h）に ATP 値は非運動群、運動群とも Gut I/R 前の値より低下し、両群の間で ATP 値に差はみられなくなつたが、再灌流（3 h）後には両群の ATP 値は再び上昇し、運動群で有意に ATP 値は高くなった。ATP+ADP+AMP 値は虚血前、再灌流後で両群に差を認めなかつた（図 21）。

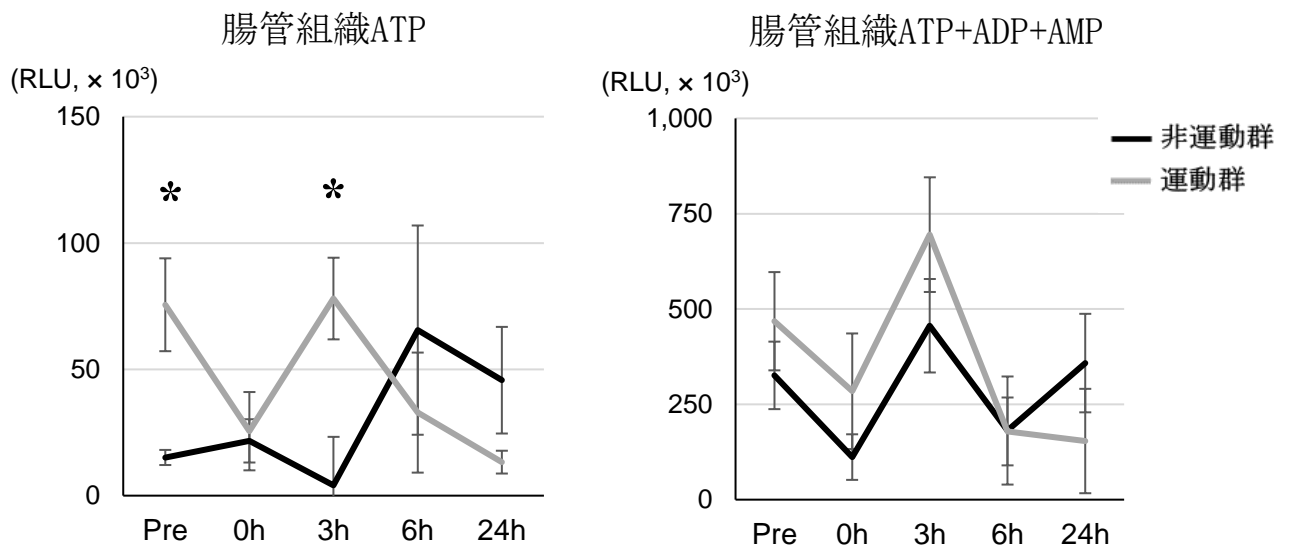


図 21 : 腸管組織中の ATP 及び ATP+ADP+AMP レベル

(A) 腸管組織中の ATP 値は虚血前、再灌流 3 時間後に非運動群と比較して、運動群で高かった。

(B) 腸管組織中の ATP+ADP+AMP 値は Gut I/R 前後で両群に差を認めなかった。

平均±標準誤差、n=(非運動群:6/6/6/6/6, 運動群: 6/6/5/6/6),\*P<0.05 vs. 非運動群, (Student t-test)

- ・腸管組織中の 8-OHdG レベル

腸管組織中の 8-OHdG レベルは Gut I/R 前後で大きな変化を示さなかった。また、非運動群と運動群の間に統計学的有意差を認めなかった (図 22)。

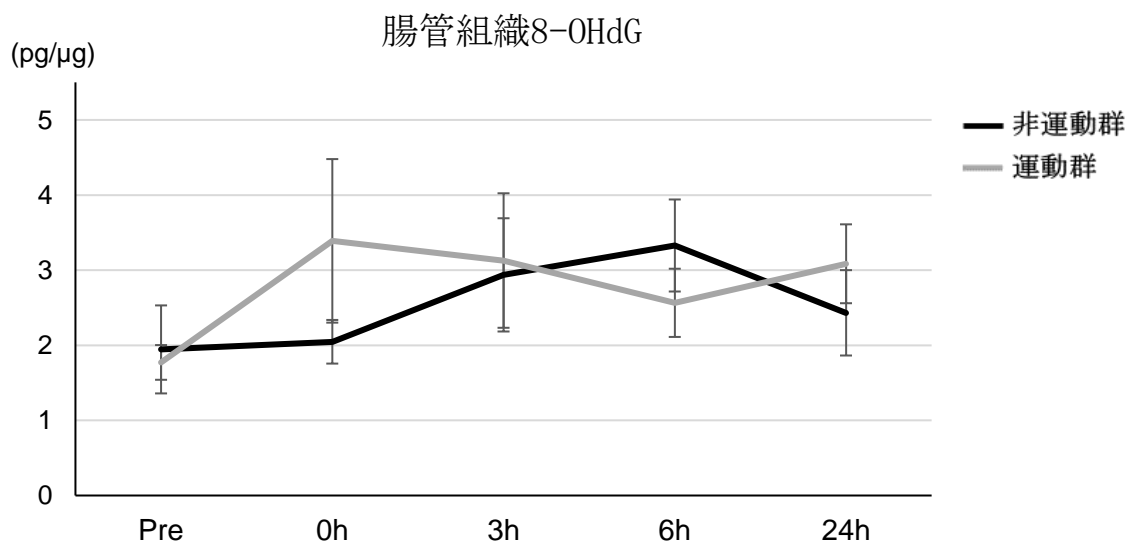


図 22 : 腸管組織中の 8-OHdG レベル

腸管組織中の 8-OHdG 値は非運動群、運動群の間で統計学的有意差を認めなかった。

n=(非運動群:6/6/6/6/5, 運動群: 6/6/5/6/6)

・腸管組織中のサイトカインレベル

虚血前、再灌流後のどのタイミングでも IL-12、IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  レベルに非運動群と運動群との間に統計学的有意差を認めなかった。非運動群と比較して運動群の MCP-1 と IL-6 レベルは再灌流 3 時間後に有意に低かった。IL-10 レベルは実験プロトコールを通して非運動群と比較して運動群で高かったが、虚血前、再灌流後のどのタイミングでも両群間で統計学的有意差を認めなかった (表 2)。

腸管サイトカイン	群	Pre	0h	3h	6h	24h
IL-6 (pg/mL)	非運動	28.6±14.6	7.93±3.39	394.2±91.6	87.3±16.2	114.4±38.9
	運動	15.7±4.46	18.0±10.3	150.4±58.7*	192.8±64.4	146.8±110.6
MCP-1 (pg/mL)	非運動	154.3±26.9	79.9±16.0	291.8±39.2	208.2±16.0	446.8±117.0
	運動	105.4±21.4	96.5±24.1	185.8±12.6*	280.5±43.0	565.6±338.3
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	非運動	46.8±12.6	18.0±3.75	21.9±0.99	25.3±0.69	31.2±11.7
	運動	36.6±7.70	21.0±0.87	22.2±1.13	23.2±4.54	22.1±6.56
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	非運動	1.08±0.25	0.71±0.15	0.72±0.02	0.79±0.02	0.77±0.24
	運動	0.82±0.01	0.73±0.04	0.69±0.02	0.72±0.04	0.51±0.03
IL-10 (pg/mL)	非運動	17.2±1.61	11.6±0.87	12.8±0.48	12.9±2.02	17.3±9.50
	運動	29.1±8.62	12.4±2.98	14.2±0.79	16.7±1.07	27.8±12.2
IL-12 (pg/mL)	非運動	449.1±101.1	256.4±29.5	1027±99.6	631.6±139.4	769.5±187.0
	運動	704.1±226.0	414.1±150.6	1083±131.0	841±96.6	611.9±127.8

表 2 : 腸管組織中のサイトカインレベル

非運動群と運動群との間に、虚血前、再灌流後のどのタイミングでも IL-12、IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  レベルに統計学的有意差を認めなかった。MCP-1 と IL-6 レベルは再灌流 3 時間後に運動群で有意に低下した。平均±標準誤差、n=(非運動群:6/6/6/6/6, 運動群: 6/6/6/6/6), \*P<0.05 vs. 非運動群, (Student t-test)

- ・腸管組織中の MPO 活性

虚血前と再灌流 6 時間後の MPO 活性は、非運動群と比較して運動群で統計学的に有意に低かった (図 23)。

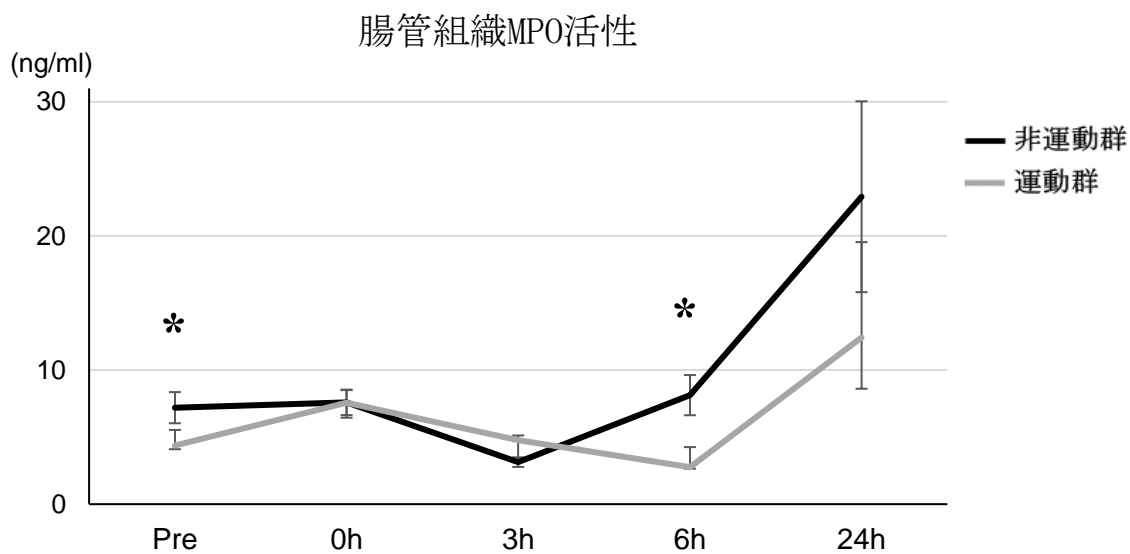


図 23 : 腸管組織中の MPO 活性

虚血前と再灌流 6 時間後の MPO 活性は、非運動群と比較して運動群で有意に低かった。

平均±標準誤差、n=(非運動群:6/6/6/6/6, 運動群: 6/6/5/6/6), \*P<0.05 vs. 非運動群, (Student t-test)



### 6-3-3 : 尿中・血中メディエーターの評価

#### ・尿中の 8-OHdG レベル

非運動群と運動群との間に、虚血前、再灌流 0 時間、3 時間、6 時間後の尿中の 8-OHdG レベルに統計学的有意差を認めなかった。しかし、再灌流 24 時間後の 8-OHdG レベルは非運動群と比較して運動群で有意に低下した (図 24)。

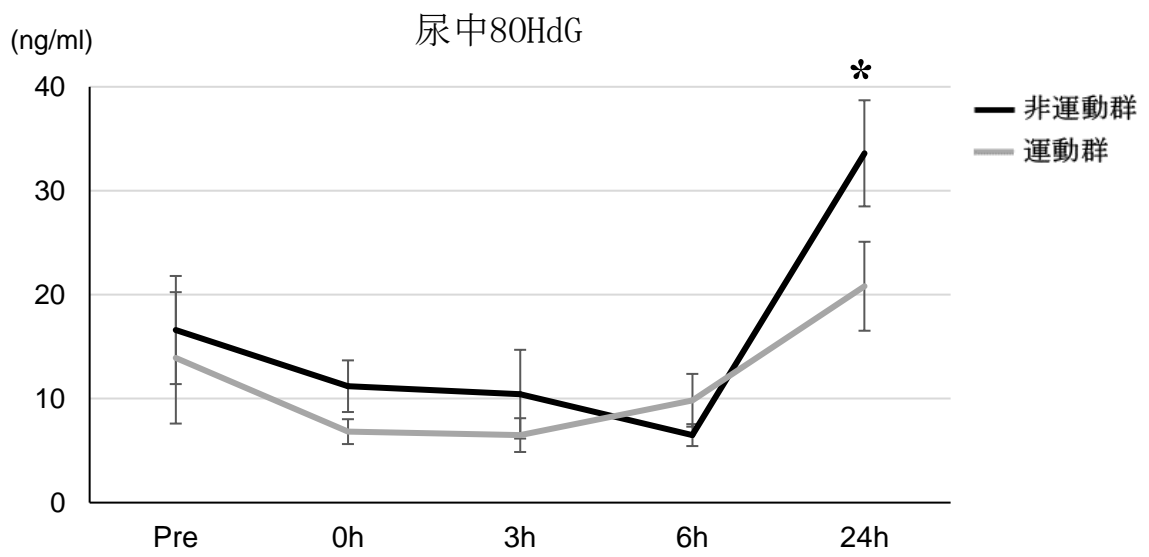


図 24 : 尿中の 8-OHdG レベル

再灌流 24 時間後の 8-OHdG レベルは非運動群と比較して運動群で有意に低かった。

平均±標準誤差、n=(非運動群:6/6/6/6/6, 運動群: 6/6/5/6/6), \*P<0.05 vs. 非運動群, (Student t-test)

#### ・血中のサイトカインレベル

虚血前、再灌流後のどのタイミングでも IL-12、MCP-1 および TNF- $\alpha$  レベルに非運動群と運動群との間に統計学的有意差を認めなかった。非運動群と比較して運動群の IFN- $\gamma$  と IL-6 レベルは再灌流 6 時間後に有意に低かった。一方、IL-10 レベルは非運動群と比較して再灌流 3 時間後に運動群で有意に高かった。

血中サイトカイン	群	Pre	0h	3h	6h	24h
IL-6 (pg/mL)	非運動	5.28±3.48	92.6±50.5	5420±1096	6615±1283	2297±1610
	運動	4.72±3.09	21.7±12.1	3142±925.4	933.9±416.7*	1724±434.8
MCP-1 (pg/mL)	非運動	21.3±7.08	63.5±14.6	103.8±25.1	115.2±34.7	117.6±10.7
	運動	18.9±6.35	37.9±8.38	64.8±18.8	49.0±17.4	213.7±45.8
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	非運動	8.29±0.48	6.55±2.34	83.9±12.8	18.5±5.69	2.78±1.17
	運動	5.67±2.05	5.28±0.67	58.3±14.1	30.9±19.1	9.45±3.60
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	非運動	3.32±0.42	4.55±1.62	2.66±0.26	3.17±0.40*	2.58±0.39
	運動	3.58±0.77	2.77±0.33	1.99±0.36	2.05±0.29	2.47±0.60
IL-10 (pg/mL)	非運動	1.71±1.10	8.69±7.74	10.9±3.98	4.50±2.11	1.12±0.76
	運動	0.53±0.34	7.03±6.32	27.4±7.27*	9.37±3.85	1.38±0.93
IL-12 (pg/mL)	非運動	2.58±1.45	9.76±5.19	0.59±0.59	2.84±1.86	1.81±1.33
	運動	1.66±1.22	7.13±4.69	2.38±1.91	2.84±1.99	5.49±3.52

表3：血中のサイトカインレベル

非運動群と比較して、運動群の IFN- $\gamma$  と IL-6 レベルは再灌流 6 時間後に有意に低下した。

一方、IL-10 レベルは再灌流 3 時間後に運動群で有意に高かった。

平均±標準誤差、n=(非運動群:6/6/6/6/6, 運動群: 6/6/6/6/6), \*P<0.05 vs. 非運動群, (Student t-test)

#### 6-3-4 : 運動による体組成への影響と筋肉中のメディエーターの評価

##### ・食餌摂取量、体重、四肢握力及び体組成

運動プロトコール中、非運動群と運動群の間で、食餌摂取量、体重に変化は認めなかった。四肢握力は 7 回目の運動前の測定で、非運動群と比較して運動群が強い傾向を示した。10 回目の運動前には運動群は統計学的に有意に握力が強くなっていた。運動プロトコール終了後の腓腹筋および肝臓の臓器重は、非運動群と運動群の間に差を認めなかったが、精巣上脂肪の重さが運動群で統計学的に有意に低かった (図 25、表 4)。

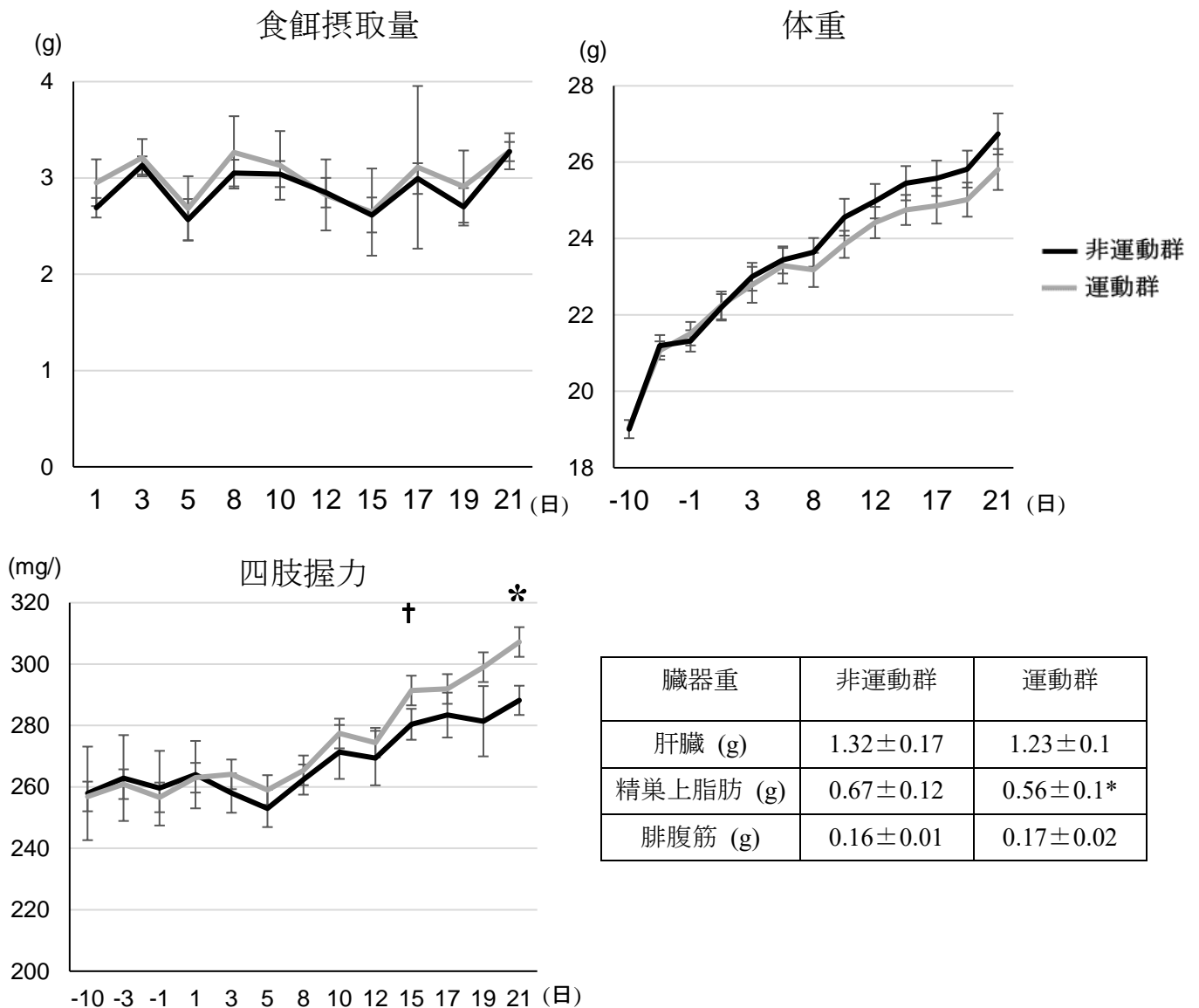


図 25・表 4：運動プロトコール中の非運動群、運動群の (A) 食餌摂取量変化 (B) 体重変化、(C) 四肢握力変化、(D) 運動プロトコール終了後の腓腹筋・肝臓および精巣上脂肪の重量

非運動群、運動群間でプロトコール中の食餌摂取量、体重に変化はなかった。プロトコール終了後、四肢握力は運動前と比較して上昇した。精巣上脂肪重は非運動群と比較して運動群で統計学的に有意に低かった。

平均±標準誤差、n=(非運動群:10, 運動群:10)\*P<0.05 vs. 非運動群, †P=0.07 vs. 非運動群, (Student t-test)

・筋肉中の ATP 及び ATP+ADP+AMP レベル

虚血前、再灌流後のどのタイミングの ATP 及び ATP+ADP+AMP レベルも非運動群、運動群の間に統計学的有意差を認めなかった (図 26)。

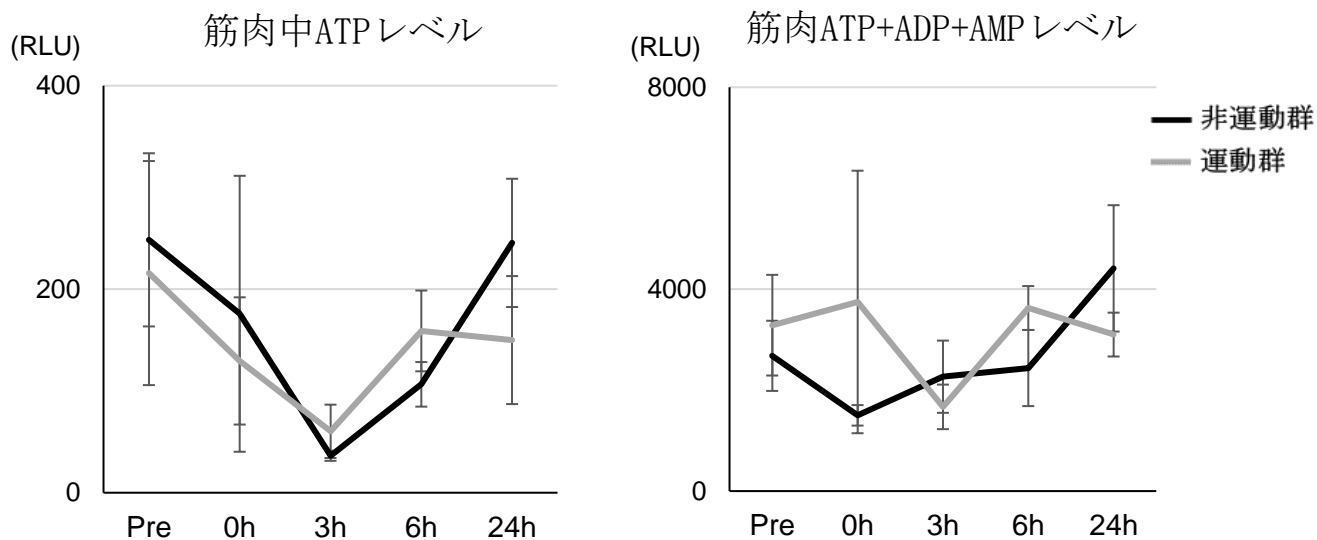


図 26 : 筋肉中の ATP 及び ATP+ADP+AMP レベル

非運動群、運動群の間で、虚血前、再灌流後のどのタイミングの ATP 及び ATP+ADP+AMP レベルも統計学的有意差を認めなかった。

平均±標準誤差、n=(非運動群:6/6/6/6/6, 運動群: 6/6/6/6/6), \*P<0.05 vs. 非運動群, (Student t-test)



・各種マイオカインレベル

運動プロトコール終了後、どのマイオカインの分泌量も非運動群、運動群の間で統計学的有意差を認めなかった。再灌流 6 時間後、非運動群と比較して、運動群の IL-6 が有意に低かった。それ以外のサイトカインは虚血前後のどのタイミングでも統計学的有意差を認めなかった (表 5)。

筋肉中マイオカイン	群	Pre	0h	3h	6h	24h
IL-6 (pg/mL)	非運動	8.40±1.34	7.27±1.58	10.7±1.91	6.13±0.84	3.79±0.93
	運動	9.55±1.09	7.53±4.14	8.69±1.50	3.42±0.66*	6.91±1.35
MCP-1 (pg/mL)	非運動	41.2±9.72	72.8±17.5	87.1±1.69	80.1±1.37	80.0±2.38
	運動	51.6±11.0	72.0±14.6	89.9±1.55	87.1±2.92	86.1±4.35
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	非運動	9.84±3.90	14.6±3.05	26.0±1.78	18.9±0.34	19.1±0.19
	運動	9.90±2.90	17.3±2.28	23.4±1.26	19.8±0.49	20.1±0.99
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	非運動	0.14±0.05	0.18±0.04	0.60±0.01	0.57±0.01	0.56±0.02
	運動	0.12±0.05	0.38±0.12	0.60±0.00	0.59±0.02	0.55±0.01
IL-10 (pg/mL)	非運動	7.36±2.56	5.04±1.74	19.2±1.43	12.6±0.78	13.4±1.15
	運動	7.22±3.07	8.58±3.40	16.6±1.33	15.0±1.21	14.3±1.30
IL-12 (pg/mL)	非運動	13.5±7.82	32.2±10.3	60.6±2.82	39.0±8.11	55.5±3.61
	運動	22.7±11.4	25.5±10.5	57.7±7.81	48.8±1.49	64.7±15.5

表 5：腓腹筋中のマイオカインレベル

再灌流 6 時間後、非運動群と比較して、運動群の IL-6 が有意に低かった。それ以外のマイオカインレベルは、どのタイミングでも群間に統計学的有意差を認めなかった。平均±標準誤差、n=(非運動群:6/6/6/6, 運動群: 6/6/6/6)\*P<0.05 vs. 非運動群, (Student t-test)

## 6-4 : 考察及び小括

本検討で、運動療法が Gut I/R 後の臓器障害を軽減すること、炎症性メディエーターを制御することが明らかになった。Gut I/R は遠隔重要臓器の重篤な障害を引き起こし、それが不良な予後につながるということが報告されていることから<sup>[5][6][49][50][51][52][53]</sup>、今回の運動療法による生存改善はこれら臓器の障害軽減によるものと推察される (図 27)。腸管、肺、肝臓では Gut I/R によって広範な組織傷害がみられた一方で、腓腹筋では明らかな組織傷害がみられなかった。Gut I/R では肺、肝、腎と比較して、腓腹筋などの骨格筋では血管内皮の接着分子の発現が低いことや<sup>[63]</sup>、単位重量当たりの血流量が少ないことが、腓腹筋が Gut I/R による障害臓器とならなかった理由かもしれない。従来の臨床研究では、術前運動療法による筋肉量の増加・筋力の強化が術後の ADL 早期回復を促進し、術後の合併症を予防することが示されてきた<sup>[20]</sup>。今回の結果は、筋肉の直接的な効果以外にも、運動療法が侵襲に対する生体反応を修飾し、術後の合併症を予防する効果を有することを示唆している。

非運動群と比較して運動群の Gut I/R 前後の腸管組織中の ATP レベルが高かったことは、運動によって腸管細胞のミトコンドリアによる ATP 産生が増加していたことを示していると考えられる。一方、再灌流直後の ATP レベルは非運動群、運動群とも同レベルまで低下していたが、運動群では、豊富な ATP

の蓄えによって虚血による組織傷害を軽減できた可能性がある。再灌流 3 時間後には非運動群と比較して運動群の ATP レベルが再び上昇していたことから、運動によってミトコンドリア機能自体が強化されており、運動群では再灌流後、急速に ATP 合成が回復したのかもしれない。ATP+ADP+AMP 値は運動によって大きな差を示さなかったことから、運動は ATP の消費、合成スピードを促進させるものの、アデノシン化合物の総量自体は増加させない可能性がある。腸管組織中の 8-OHdG レベルに両群間で差がなかったことは、同じ虚血時間を反映して、腸管に加わった酸化ストレス自体には差がなかったことを意味しているのだろう。MCP-1 と IL-6 といった炎症性サイトカインが Gut I/R 後に運動群で低かったことは、運動が腸管の過剰な炎症反応を制御していることを示唆している。また、炎症性サイトカインは局所の血管内皮における接着分子の発現を高めることで好中球の集積を増やし、集積した好中球のプライミング、活性化を促進する<sup>[51] [52] [53]</sup>。本検討で、好中球のマーカである MPO が運動群の腸管において低下したことは、再灌流後に血管床が生じる好中球の集積とプライミングが低下したことを示唆している。腸管組織の炎症性サイトカインの低下、好中球集積減少によって、活性化した好中球による遠隔臓器障害が軽減された可能性がある。

腸管に加わった酸化ストレスは運動群、非運動群とも同レベルであって

も、運動群では ATP レベルが高く、腸管の虚血再灌流傷害が軽減され、その結果、炎症性サイトカインの産生も低下することが、本研究から推察される。Gut I/R によって直接的に傷害される、全身性の炎症反応の源となる腸管の損傷が少なかったことで、腸管由来の炎症性メディエーターが減少し、血中の炎症性サイトカインの減少と、全身の酸化ストレス低下がみられたのであろう。実際、全身の酸化ストレスの指標である尿中 8-OHdG のレベルは運動群で低下している。尿中 8-OHdG の値に差が出たのが他のパラメーターに比べて遅れた理由として、1) 尿中 8-OHdG は累積した酸化的 DNA 損傷を示すマーカーであること<sup>[64]</sup>、2) Gut I/R によって循環動態が崩れ、再灌流後早期には十分な尿が生成されなかったこと<sup>[65]</sup>が挙げられる。

本検討では、運動療法が Gut I/R による各種炎症性メディエーターを制御した機序として、腸管障害の軽減が重要であることが示された。これに加えて我々は、近年注目されているマイオカインの影響にも着目した。実際、運動群の Gut I/R 後のマイオカインレベル (IL-6) が非運動群と比較して低下していた。運動療法がメディエーター産生臓器として筋肉の機能を修飾し、より侵襲に対する耐性を高めた可能性がある。しかし、今回測定した筋肉中のマイオカインレベルの値は腸管や血液中と比較して非常に低値であり、マイオカインが血中や全身の臓器に到達して、様々な生体反応の修飾に大きな影響を及ぼし得

るのか疑問である。また、今回の実験では全マウスを心臓穿刺による脱血によって犠死させているが、マイオカインの測定時、筋肉中に少量の血液が残存しており、その残存血液中のサイトカインがマイオカインの値に影響を与えた可能性も否定できない。運動療法による筋肉中の単位重量あたりの IL-6 レベル低下は統計学的に有意であってもその差は小さかったこと、筋肉重量も両群で変わらないことから、本モデルにおいては Gut I/R 時の炎症軽減にマイオカインは大きな影響を及ぼしていないかもしれない。なお、筋肉量が本運動プロトコルによって増加しなかった理由としては、運動強度の低さ、運動期間の短さが考えられる<sup>[66]</sup>。

運動が炎症性メディエーターを調節した別の機序として、運動によるプレコンディショニングが考えられる。プレコンディショニングとは、短時間の負荷の軽い虚血—再灌流を複数回繰り返すことで、その後の高侵襲の虚血再灌流に対して組織保護効果を高める操作である<sup>[67] [68] [69] [70]</sup>。Gut I/R 前に繰り返し運動を行うことで筋肉の血液が増加し、相対的に腸管の血流が減少する<sup>[71]</sup>。運動によるごく軽度の腸管虚血再灌流がプレコンディショニングとして作用した結果、虚血に対する耐性が腸管にできていたのかもしれない。今後、腸管プレコンディショニング効果についても検討の余地があると思われる。

## 術前運動療法の新しい意義

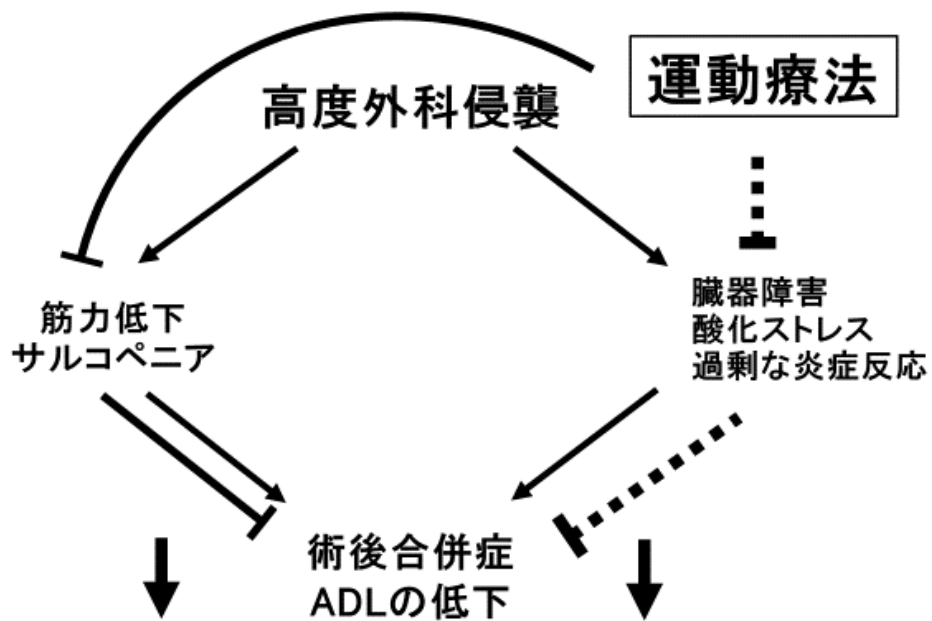


図 27: 術前運動療法が腸管虚血再灌流傷害後の生存に及ぼす影響 (適切な運動強度の決定)  
術前の運動療法には筋力の強化・サルコペニアの予防効果に加えて、高度外科侵襲が加わった時の生体反応を修飾することで臓器障害を軽減する。その結果、術後の合併症予防、早期回復に貢献することが示唆された。

## 7. 総括

本研究結果をまとめると、マウスモデルにおいて、

- 1) 24 時間絶食・絶飲食によって GALT リンパ球の IE リンパ球数と LP リンパ球数は減少し、絨毛高・陰窩深の萎縮がみられること。
- 2) 12 時間の絶食でも IE および LP リンパ球数が減少し、さらに絨毛上皮のアポトーシスの増加と増殖能の減少を伴って腸管の物理的な萎縮を引き起こすこと。
- 3) 犠死 2 時間前の CHO 経口投与は、IE および LP のリンパ球数を非絶食群と同レベルに維持し、さらに絨毛の萎縮も防いだこと。
- 4) Gut I/R 前の適切なプロトコールの運動療法は、Gut I/R 後の生存を改善すること。
- 5) Gut I/R 前の運動によって、腸管のみならず遠隔臓器の障害が軽減すること。
- 6) Gut I/R 前後の腸管組織では ATP レベルが維持され、炎症性サイトカイン (IL-6、MCP-1) の減少とともに過剰な好中球の集積が軽減すること。
- 7) また、血中の炎症性サイトカイン (IL-6、IFN- $\gamma$ ) の低下、抗炎症性サイトカイン (IL-10) の上昇とともに全身の酸化ストレスの指標である尿中 8-OHdG レベルが低下すること。

以上が明らかになった。すなわち、炭水化物水負荷には絶食期間に生じる GALT



萎縮と粘膜菲薄化の予防効果が、運動療法には腸管虚血再灌流傷害の軽減効果があることが明らかになった。本検討の結果は臨床における術前の炭水化物水負荷と運動療法の従来報告されてきた効果に加えて新たな可能性を示唆している。

経口的、経腸的な栄養摂取の欠如が、たとえ経静脈的に十分な栄養が投与されていたとしても、腸管粘膜の菲薄化、GALT の萎縮を引き起こすことが、動物モデルや大腸がん手術患者で示されてきた<sup>[11][12]</sup>。これらの研究では、最短で数日の経腸的な栄養投与欠如の影響が調べられてきたが、今回検討したように、術前にみられがちな一日、半日の絶飲食の影響については報告がなかった。マウスモデルであることを勘案しても、このような短期間で腸管の物理的・免疫学的バリアが損なわれてしまうことは、われわれ臨床家にとって非常に重要な知見であろう。可能な限り、腸管を使わない期間を短くすることが求められる。

驚くべきことに、犠牲死の2時間前に少量の炭水化物水を経口的に投与することで、絶食に伴う腸管構造・GALT の萎縮を防ぐことができた。この炭水化物水のブドウ糖濃度（12.5%）・投与量は、ヒトにおける欧州臨床代謝栄養学会が推奨する炭水化物水投与プロトコールを参照したものである<sup>[1]</sup>。わが国では、術当日朝の経口補水投与が多く施設で導入され、脱水の補正や患者満足

の向上効果が報告されているが、そこで用いられる経口補水液の糖質濃度は低く (2.5%) [72]むしろ水電解質の補充を主目的としている。そのため、本研究で示された腸管への効果は得られないかもしれない。実際、われわれの研究でも、犠死 2 時間前の投与で空腸の変化は防ぐことができたが、ブドウ糖が空腸で吸収されてしまい内腔に到達しなかった可能性のある回腸では明らかな効果を得ることができなかった。臨床において、術前の経口補水療法を行う場合は、その補水液の組成・種類によって、期待できる効果が異なることを認識すべきであろう。

腸管虚血再灌流は、近年、ショックや大出血、大動脈の手術、絞扼性イレウス手術などで生じる多臓器障害の重要な機序の一つとして注目されている [73] [74]。一般外科領域の低侵襲手術では腸管血流の著しい低下は認められないだろうが、腸管の把持や牽引を伴う消化器系の大手術では術中に著明な腸管血流低下が生じることが報告されている [75]。今回の研究結果から、待機手術であっても、このような大手術が予定されている場合は、術前の運動療法が術後の炎症反応制御、臓器障害軽減、予後改善に有効であることが示唆される。

しかし、今回の検討でも運動プロトコールの選択には細心の注意が必要であることが判明したように、多彩な背景因子をもつ個々の患者に対してどのような運動プロトコールを実践すればよいかテーラーメイドで判断することが

肝要であろう。特に高齢者、低栄養状態患者、ADL が障害されている患者では、無理な運動療法が逆に予後悪化につながる危険性もある。さらに、今回はマウスモデルの検討であったためトレッドミル走行を採用したが、ヒトの場合、有酸素運動、無酸素的な筋肉トレーニング、共に術前の運動療法として取り入れられつつある<sup>[76][77]</sup>。我々のトレッドミル走行では、筋力の向上はみられたものの、筋肉量の増加はなかった。適切な筋肉トレーニングを負荷することができれば、さらに筋肉の機能の修飾効果が高まり、今回は関与が小さいと考えられたマイオカインによる生体反応修飾効果が期待できるかもしれない。

このように、炭水化物水投与、運動療法いずれにおいても、今回の研究には、1) あくまでもマウスモデルでの検討である、2) 炭水化物水投与量・ブドウ糖濃度についてさまざまな設定は行っていない、3) 他の栄養素の効果は検証していない、4) いわゆる無酸素的な筋肉トレーニングの効果は検証していない、5) 外科侵襲として腸管虚血再灌流以外には調べていない、6) さまざまな併存疾患の影響は調べていない、などの問題点が存在する。しかし、外科手術後の合併症を可能な限り少なくして、早期の回復を目指すための術前管理法としての炭水化物水投与と運動療法の意義について非常に重要な知見を得られたと考えている。今後は、上記の諸問題にも取り組み、臨床効果も検証していくことで、よりよい周術期管理法を開発していく必要がある。

## 8. 謝辞

本研究を統括し、本研究の遂行および論文執筆にあたりご指導頂きました瀬戸泰之教授に謹んで御礼申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、貴重な研究の場を与えて頂きました手術部 安原洋教授に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究の遂行にあたり、ご指導・ご協力頂きました大学院生、手術部・材料管理部の関係各位の皆様に御礼申し上げます。最後に、研究の遂行、論文執筆などの本研究のすべてにおいて多大なるご指導・ご支援頂きました手術部 深柄和彦准教授に心より感謝申し上げます。

## 9. 引用文献

1. Sawyer J, Morningstar B, Chung F, Siddiqui N, McCluskey S, *Enhanced Recovery after Surgery Guideline, Perioperative Pain Management in Patients Having Elective Colorectal Surgery, A Quality Initiative of the Best Practice in General Surgery, Part of CAHO's ARTIC program*. Can Urol Assoc J, 1-22, 2013.
2. Adamina M, Kehlet H, Tomlinson G A, Senagore A J, Delaney C P, *Enhanced recovery pathways optimize health outcomes and resource utilization. A meta-analysis of randomized controlled trials in colorectal surgery*, 149: 830-40, 2011.
3. Melchior JC, Préaud E, Carles J, Brami M, Duru G, Fontaine E, Hébuterne X, Lukacs B, Zazzo JF, Panis Y, Nitenberg G, *Clinical and economic impact of malnutrition per se on the postoperative course of colorectal cancer patients: Clinical Nutrition*, 31: 896-902, 2012.
4. Koratzanis G, Giamarellos-Bourboulis EJ, Papalambros E, Giamarellou H, *Bacterial translocation following intrabdominal surgery. Any influence of antimicrobial prophylaxis?* Int J Antimicrob Agents, 20(6): 457-60, 2002.
5. Christopher BA, S Homer-Vanniasinkham, *Clinical implications of ischemia-reperfusion injury*. Pathophysiology, 9: 229-40, 2003.
6. Fukatsu K, Sakamoto S, Hara E, Ueno C, Maeshima Y, Matsumoto I, Mochizuki H, Hiraide H, *Gut ischemia-reperfusion affects gut mucosal immunity. A possible mechanism for infectious complications after severe surgical insults*. Critical Care Medicine, 34: 182-7, 2006.
7. Kelsall B, Strober W. *Gut-associated lymphoid tissue*. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J. R. McGhee (Eds.) Mucosal immunology. Academic Press, San Diego, 293-317, 1999.
8. Mowat AM, Agace WW, *Regional specialization within the intestinal immune system*. Nature Reviews Immunology, 14: 667-85, 2014.
9. Iijima H, Takahashi I, Kiyono H. *Mucosal immune network in the gut for the control of infectious diseases*. Rev Med Virol, 11(2): 117-33, 2011.
10. Kudsk KA, Li J, Renegar KB, *Loss of upper respiratory tract immunity with parenteral feeding*. Annals surgery, 223: 629-35, 1996.
11. Okamoto K, Fukatsu K, Hashiguchi Y, Ueno H, Shinto E, Moriya T, Saitoh D, Yamamoto J, Hase K, *Lack of preoperative enteral nutrition reduces gut-associated lymphoid cell numbers in colon cancer patients: a possible mechanism underlying increased postoperative infectious complications during parenteral nutrition*. Annals surgery, 258: 1059-64, 2013.
12. Okamoto K, Fukatsu K, Ueno C, Shinto E, Hashiguchi Y, Nagayoshi H, Hiraide H,

- Mochizuki H, *T lymphocyte numbers in human gut associated lymphoid tissue are reduced without enteral nutrition*. J Parenter Enteral Nutrition, 29: 56-8, 2005.
13. Soop M, Nygren J, Myrenfors P, Thorell A, Ljungqvist O, *Preoperative oral carbohydrate treatment attenuates immediate postoperative insulin resistance*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 280: 576-83, 2001.
  14. Henriksen MG, Hesso I, Dela F, Vind Hansen H, Haraldsted V, Rodt SA, *Effects of preoperative oral carbohydrates and peptides on postoperative endocrine response mobilization, nutrition and muscle function in abdominal surgery*. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 47: 191-9, 2003.
  15. Gillis C, Buhler K, Bresee L, Carli F, Gramlich L, Culos-Reed N, Sajobi TT, Fenton TR, *Effects of Nutritional Prehabilitation, With and Without Exercise, on Outcomes of Patients Who Undergo Colorectal Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis*. Gastroenterology, 155:391-410, 2018.
  16. Weimann A, Braga M, Carli F, Higashiguchi T, Hübner M, Klek S, Laviano A, Ljungqvist O, Lobo DN, Martindale R, Waitzberg DL, Bischoff SC, Singer P, *ESPEN guideline, Clinical nutrition in surgery*. Clinical Nutrition, 36: 623-50, 2017.
  17. Naderi R, Mohaddes G, Mohammadi M, Ghaznavi R, Ghyasi R, Vatankhah AM1., *Voluntary Exercise Protects Heart from Oxidative Stress in Diabetic Rats*. Adv Pharm Bull, 5: 231–236, 2015.
  18. Gomez-Pinilla F, Vaynman S, Ying Z, *Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition*. European Journal of Neuroscience, 28: 2278-87, 2008.
  19. Tyler EK, Robert HC, *Exercise Training and Insulin Resistance: A Current Review*. J Obes Weight Loss Ther, 5(5): 5-003, 2015.
  20. Fukuda Y, Yamamoto K, Hirao M, Nishikawa K, Nagatsuma Y, Nakayama T, Tanikawa S, Maeda S, Uemura M, Miyake M, Hama N, Miyamoto A, Ikeda M, Nakamori S, Sekimoto M, Fujitani K, Tsujinaka T, *Sarcopenia is associated with severe postoperative complications in elderly gastric cancer patients undergoing gastrectomy*. Gastric Cancer, 19: 986-93, 2016.
  21. De Araújo CC, Silva JD, Samary CS, Guimarães IH, Marques PS, Oliveira GP, do Carmo LG, Goldenberg RC, Bakker-Abreu I, Diaz BL, Rocha NN, Capelozzi VL, Pelosi P, Rocco PR. *Regular and moderate exercise before experimental sepsis reduces the risk of lung and distal organ injury*. J Appl Physiol, 112: 1206-14, 2012.
  22. Heidi L. Lujan, Stephen E. DiCarlo. *Cardiac output, at rest and during exercise, before and during myocardial ischemia, reperfusion, and infarction in conscious mice*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 15: 304(4), 2013.
  23. Schnyder S, Handschin C, *Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 $\alpha$* ,

- myokines and exercise*. Bone, 80: 115-25, 2015.
24. Zhang F, Wu Y, Jia J, *Exercise preconditioning and brain ischemic tolerance*. Neuroscience, 177: 170-6, 2011.
25. Seong HK, Jong JH. *Preparation and patient evaluation for safe gastrointestinal endoscopy*. Clin Endocrinol, 46: 212-8, 2013.
26. Li J, Kudsk KA, Gocinski B, Dent D, Glezer J, Langkamp-Henken B. *Effects of parenteral and enteral nutrition on gut-associated lymphoid tissue*. J Trauma, 39: 44-51, 1995.
27. Kiyono H, Kweon MN, Hiroi T, Takahashi I, *The mucosal immune system: from specialized immune defense to inflammation and allergy*. Acta Odontol Scand, 59(3): 145-53, 2011.
28. Komano H, Fujiura Y, Kawaguchi M, Matsumoto S, Hashimoto Y, Obana S, Mombaerts P, Tonegawa S, Yamamoto H, Itohara S, *Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 92: 6147-51, 1995.
29. Jung C, Hugot JP, Barreau F, *Peyer's patches: the immune sensors of the intestine*. Int J Inflamm 2010, 823710, 2010.
30. Schley PD, Field CJ. *The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics*. Br J Nutrition, 87: 221-30, 2002.
31. McIntyre TS, Ogra PL, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, editors. Mucosal immunology. San Diego, *Gut-associated lymphoid tissue regulation of IgA B-cell development*. Academic Press, 319-56, 1999.
32. Song J, Wolf SE, Wu XW, Finnerty CC, Herndon DN, Jeschke MG. *Proximal gut mucosal epithelial homeostasis in aged IL-1 type I receptor knockout mice after starvation*. Surg Res, 169(2): 209-13, 2011.
33. Okada T, Fukuda S, Hase K, Nishiumi S, Izumi Y, Yoshida M, Hagiwara T, Kawashima R, Yamazaki M, Oshio T, Otsubo T, Inagaki-Ohara K, Kakimoto K, Higuchi K, Kawamura YI, Ohno H, Dohi T, *Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice*. Nat Commun, 4:1654, 2013.
34. García-Olmo D, Paya J, García-Olmo DC, *Role of immediate postoperative feeding on colonic anastomoses resistance. An experimental study in a rat model*. Nutr Hosp 11: 279-85, 1996.
35. Rui L, *Energy metabolism in the liver*. Compr Physiol, 4(1): 177-97, 2014.
36. Kalyanaraman B, Cheng G, Hardy M, Ouari O, Lopez M, Joseph J, Zielonka J, Dwinell MB, *A review of the basics of mitochondrial bioenergetics, metabolism, and related signaling pathways in cancer cells: Therapeutic targeting of tumor mitochondria with lipophilic cationic compounds*. Redox Biol, 14: 316-327, 2018.



37. Donnelly RP, Finlay DK. Glucose, *glycolysis and lymphocyte responses*. Mol Immunol, 68: 513-19, 2015.
38. Chen H, Yang T, Zhu L, Zhao Y, *Cellular metabolism on T-cell development and function*. Int Rev Immunol, 34(1): 19-33, 2015.
39. Fushinobu S, *Unique sugar metabolic pathways of bifidobacteria*. Biosci Biotechnol Biochem, 74(12): 2374-84, 2010.
40. King BK, Li J, Kudsk KA, *A temporal study of TPN-induced changes in gut-associated lymphoid tissue and mucosal immunity*. Arch Surg, 132(12): 1303-9, 1997.
41. Hurley WL, Theil PK. *Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk*. Nutrients, 3(4): 442-74, 2011.
42. Zhou W, Clara R, Mansouri A, Langhans W, Dailey MJ, *Nutrient-induced metabolism dictates intestinal epithelial crypt proliferation*. FASEB J, 30: 695, 2016.
43. De Pablo MA, de Cienfuegos AG, *Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions*. Immunol Cell Biol, 78(1): 31-9, 2000.
44. Li P, Yin YL, Li D, Kim SW, Wu G, *Amino acids and immune function*. Br J Nutr, 98(2): 237-52, 2007.
45. Erickson KL, Medina EA, Hubbard NE, *Micronutrients and innate immunity*. J Infect Dis, 182: 5-10, 2000.
46. Svensson M, Rosvall P, Boza-Serrano A, Andersson E, Lexell J, Deierborg T. *Forced treadmill exercise can induce stress and increase neuronal damage in a mouse model of global cerebral ischemia*. Neurobiol Stress, 5: 8-18, 2016.
47. Lee S, Kim M, Lim W, Kim T, Kang C, *Strenuous exercise induces mitochondrial damage in skeletal muscle of old mice*. Biochem Biophys Res Commun, 461(2):354-60, 2015.
48. Carli F, Gillis C, Scheede-Bergdahl C, *Promoting a culture of prehabilitation for the surgical cancer patient*. Acta Oncol, 56(2): 128-33. 2017.
49. Collange O, Charles AL, Lavaux T, Noll E, Bouitbir J, Zoll J, Chakfe' N, Mertes M, Geny B, *Compartmentalization of inflammatory response following gut ischemia reperfusion*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 49(1): 60-5, 2015.
50. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, Li CY, Li CJ, *Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury*. Cell Physiol Biochem, 46(4): 1650-67, 2018.
51. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM, *Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury*. Dig Dis Sci, 49(9): 1359-77, 2004.
52. Moore EE, Moore FA, Franciose RJ, Kim FJ, Biffi WL, Banerjee A, *The postischemic gut serves as a priming bed for circulating neutrophils that provoke*



- multiple organ failure*. J Trauma, 37(6): 881-7, 1994.
53. Moore FA, *The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure*. Am J Surg, 178: 449-53, 1999.
54. Hoppeler H, Baum O, Lurman G, Mueller M, *Molecular mechanisms of muscle plasticity with exercise*. Comprehensive Physiology, 1: 1383-412, 2011.
55. Roy P, Chowdhury S, Roy HK, *Exercise-induced myokines as emerging therapeutic agents in colorectal cancer prevention and treatment*. Future Oncol, 14(4): 309-12. 2018.
56. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN, *Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal*. Arch Surg 101:478-83, 1970.
57. Zhu Q, He G, Wang J, Wang Y, Chen W, *Protective effects of fenofibrate against acute lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in mice*. Sci Rep, 6: 22044, 2016.
58. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D, *Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine*. Transplantation, 55: 1265-72, 1993.
59. Frias Neto CA, Koike MK, Saad KR, Saad PF, Montero EF, *Effects of ischemic preconditioning and cilostazol on muscle ischemia-reperfusion injury in rats*. Acta Cir Bras, 29 (3): 17-21. 2014.
60. Arroyo MG, Ferreira AM, Frota OP, Rigotti MA, de Andrade D, Brizzotti NS, Peresi JTM, Castilho EM, de Almeida MTG, *Effectiveness of ATP bioluminescence assay for presumptive identification of microorganisms in hospital water sources*. BMC Infectious Diseases, 17: 458, 2017.
61. Bakke M, Suzuki S, *Development of a Novel Hygiene Monitoring System Based on the Detection of Total Adenylate*. J Food Prot, 8: 729-37, 2018.
62. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C, *8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis*. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol, 27(2): 120-39. 2009.
63. D.Neil Granger, Senchenkova E, *Inflammation and the Microcirculation: Leukocyte-Endothelial Cell Adhesion. Chapter 7*, 2010.
64. Okezie I.Aruoma, Susan L.Cuppert, *Antioxidant Methodology: In Vivo and in Vitro Concepts*. The American Oil Chemists Society, 232-41, 1997.
65. Legrand M, Payen D, *Understanding urine output in critically ill patients*. Ann Intensive Care, 1: 13, 2011.
66. Hong AR, Hong SM, Shin YA, *Effects of Resistance Training on Muscle Strength, Endurance, and Motor Unit According to Ciliary Neurotrophic Factor Polymorphism in*

- Male College Students*. J Sports Sci Med, 13: 680-8, 2014.
67. Ding YH1, Young CN, Luan X, Li J, Rafols JA, Clark JC, McAllister JP 2nd, Ding Y, *Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion*. Acta Neuropathol, 109: 237-46, 2005.
68. Zhang F, Wu Y, Jia J, *Exercise preconditioning and brain ischemic tolerance*. Neuroscience, 177: 170-6, 2011.
69. Hung CH, Tzeng JI, Chang CN, Chen YW, Cho CY, Wang JJ, *Treadmill Exercise Preconditioning Attenuates Lung Damage Caused by Systemic Endotoxemia in Type 1 Diabetic Rats*. J Diabetes Res 2013, 527090, 2013.
70. Quindry JC, Hamilton KL, *Exercise and Cardiac Preconditioning Against Ischemia Reperfusion Injury*. Curr Cardiol Rev, 9: 220-9, 2013.
71. Costa RJS, Snipe RMJ, Kitic CM, Gibson PR, *Systematic review: exercise-induced gastrointestinal syndrome-implications for health and intestinal disease*. Aliment Pharmacol Ther, 46: 246-65, 2017.
72. Yatabe T, Tamura T, Kitagawa H, Namikawa T, Yamashita K, Hanazaki K, Yokoyama M, *Preoperative oral rehydration therapy with 2.5 % carbohydrate beverage alleviates insulin action in volunteers*. Journal of Artificial Organs, 16: 483-8, 2013.
73. Idrovo JP, Yang WL, Jacob A, Aziz M, Nicastro J, Coppa GF, Wang P, *AICAR attenuates organ injury and inflammatory response after intestinal ischemia and reperfusion*. Mol Med, 20: 676-83, 2015.
74. Ikezawa F, Fukatsu K, Moriya T, Maeshima Y, Okamoto K, Hara E, Hiraide H, Compher CW, *Albumin infusion after reperfusion prevents gut ischemia reperfusion induced gut associated lymphoid tissue atrophy*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 30: 380-6, 2006.
75. 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, 132: 805-14, 2002.
76. A.F.O'Doherty, M.West, S.Jack, M.P.W.Grocot, *Preoperative aerobic exercise training in elective intra-cavity surgery: a systematic review*. British Journal of Anesthesia, 110: 679-89, 2013.
77. Hoogeboom TJ, Dronkers JJ, Hulzebos EH, van Meeteren NL, *Merits of exercise therapy before and after major surgery*. Curr Opin Anaesthesiol, 27: 161-6, 2014.