

論文の内容の要旨

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

氏名 東園 和哉

周術期の合併症を予防し、術後患者の早期回復を促進し、合併症を予防するために様々な包括的周術期プログラムが提唱されている。それらのプログラムで共通しているのは、術前の絶食期間を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、高度侵襲時に腸管バリアを超えて体内に侵入し、重篤な感染症や敗血症を引き起こすことが知られている (BT : Bacterial translocation)。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。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、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構造による物理的バリアが重要である。GALT リンパ球は全身循環を介して鼻腔や肺など全身粘膜を巡り、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。基礎・臨床研究で腸管の物理学的・免疫学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おり、術前早期回復プログラムで、絶食期間短縮と、栄養ルートとしての腸管の使用が推奨される所以はここにある。

近年、術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、筋力維持効果を持つことが報告され、術後早期回復プログラムの重要項目の一つとなっている。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、CHO 投与は腸管の免疫学的・物理的バリア改善効果も持つかもしれない。さらに、近年、術前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。外科周術期においては、術前の運動療法が筋肉量・筋力を強化・術後 ADL を維持して早期回復に寄与することが臨床的に報告されている。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。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だけではなく、マイオカインの修飾や炎症性メディエーターの制御、臓器障害の軽減を介して、腸管虚血再灌流傷害 (Gut I/R) を軽減する効果があるかもしれない。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や各種メディエーターの評価を行うことを目的とした。

第 3 章では、6 週齢雄性 ICR マウス (N=24) を①自由食事摂取(Control 群)、② 24 時間絶食(Fasted - water 群)、③ 24 時間飲水のみ(Fasted+water 群)の 3 群に分けた。24 時間の絶食期間後に全小腸を摘出し、免疫学的バリア評価として GALT リンパ球 (パイエル板 (PP) リンパ球、腸上皮間 (IE) リンパ球、粘膜固有層 (LP) リンパ球) の数を測定した。また、鼻腔、気管支・肺胞及び小腸洗浄液の免疫グロブリン A (IgA) レベルを ELISA 法で評価した。さらに物理学的バリア評価として空腸・回腸の絨毛高・陰窩深を測定した。その結果、IE リンパ球数、LP リンパ球数は絶食、絶食によって自由摂食群と比較して有意に減少し、絨毛高・陰窩深は萎縮した。このことから、24 時間絶食による GALT リンパ球の減少と絨毛の萎縮が腸管の免疫学的、物理的バリア機能の低下につながる可能性があること、腸管バリア機構の維持には水分だけではなく栄養素が必要である可能性が示された。

第 4 章では、6 週齢雄性 ICR マウス (N=60) を①Control、②12 時間絶食のみ (Fasting 群)、③12 時間絶食+犠死 2h 前 CHO 投与(2h 群)、④12 時間絶食+犠死 4h 前 CHO 投与(4h 群)⑤12 時間絶食+犠死 8h 前 CHO 投与(8h 群)の 5 群に分けた。12 時間の絶食期間後に犠死せしめ、全小腸を摘出し、検討 1 同様 GALT リンパ球数とそのフェノタイプ、粘膜 IgA レベル、絨毛高・陰窩深に加えて、腸管上皮細胞の細胞増殖率を Ki-67 免疫組織染色で、アポトーシスを TUNEL 法で評価した。その結果、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明らかになった。一方、犠死 2 時間前の CHO 経口投与は、IE、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軽減した。今回の結果によって、これまでの既存の CHO の効果に加えて、術前 CHO 投与による腸管の免疫学的・物理的バリア機構の維持という新たな意義が認識された。

第 5 章では、5 週齢の C57BL/6J マウスを用いて高度外科侵襲前の運動療法の有用性を検討した。高度外科侵襲として腸管虚血再灌流 (45 分間の上腸間膜動脈のクランプのち再灌流)、運動としてトレッドミル走行を用いた。はじめに、良好な運動完遂率を維持し、かつ腸管虚血再灌流後の生存を向上させる適切な強度、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 (速度: 20m/分) した上でトレッドミル走行を行い、異なる運動頻度・期間 (3 日/週・2 週間、5 日/週・2 週間、3 日/週・3 週間) 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。その結果、3 日/週隔日: 3 週間のプロトコルが最も生存率が高かった。しかし、すべてのプロトコルの運動完遂率が 60%と低く、運動速度が速すぎたことが原因と考え

られた。実験 2 では、実験 1 で得られた結果から運動頻度・期間を 3 日/週・3 週間に固定した上で、異なる運動速度（12m/分、15m/分、18m/分）のトレッドミル走行を負荷し、最適な速度を検索した。その結果、速度：12m/分が運動完遂率を 100% で、非運動群と比較して Gut I/R 後の生存を改善した。以上から高度外科侵襲前の適切な運動療法は、侵襲後の生存を改善すること、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。本検討では運動完遂率を維持しかつ Gut I/R 後の生存を改善する最適な運動プロトコールとして 12m/分・60 分/日・3 日/週・3 週間の運動プロトコールを適用した。

第 6 章では、運動プロトコール（12m/分・60 分/日・3 日/週・3 週間）が Gut I/R 後の生存を改善したメカニズムを解明することを目的として、運動療法が 1) Gut I/R 後の臓器障害を軽減すること、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こと、3) 筋肉から分泌されるマイオカインの運動による修飾が Gut I/R 後の炎症反応の制御の一因である、という仮説を立てて実験を行った。その結果、Gut I/R 前の運動によって、腸管のみならず、遠隔臓器（肺・肝）の障害が軽減することが明らかになった。また、運動群では Gut I/R 前後の腸管組織の 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が明らかになった。そして、血中の炎症性サイトカイン（IL-6, IFN- γ ）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が明らかになった。一方、マイオカインに関しては、Gut I/R 後の IL-6 を低下させ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す事、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。従って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。本検討で運動療法が 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、腸管そのものの組織障害の軽減が重要であることが示された。一方、運動がマイオカインの分泌に影響を与えることが示されたが、今回測定した筋肉中のマイオカインレベルは腸管組織や血液中と比較して非常に低値であり、生体反応の修飾に大きな影響を及ぼし得るのかは疑問である。

今回、術前の炭水化物水投与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、術前の運動療法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。