

博士論文

がん治療における免疫栄養療法に関する研究

中 村 健 太 郎

がん治療における免疫栄養療法に関する研究

目次

第 1 章	緒論	4
第 2 章	免疫調整流動食による栄養管理が 外科手術後の生体反応に及ぼす影響	1 6
第 3 章	がん悪液質に対する化学療法と免疫調整流動食を用いた 栄養管理の効果	4 6
第 4 章	免疫調整流動食が腸管および腸内環境に与える影響	6 8
第 5 章	抗がん剤の副作用に対する免疫調整流動食摂取の効果	9 1
第 6 章	総合討論	1 0 7
	参考文献	1 1 4
	論文の内容の要旨	1 3 4
	謝辞	1 3 8

略語一覽

5-FU	5-fluorouracil
ALT	alanine aminotransferase
AST	aspartate aminotransferase
BCAA	branched chain amino acid
BMI	body mass index
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome
CAWL	cancer-associated weight loss
CBA	cytometric bead array
CDE	choline-deficient ethionine-supplemented
CIWL	cancer-induced weight loss
COX	cyclooxygenase
ELISA	enzyme-linked immuno-sorbent assay
EPA	eicosapentaenoic acid
FCS	fetal calf serum
GALT	gut-associated lymphoid tissue
GLP-2	glucagon-like peptide-2
HE	hematoxylin eosin
I/R	ischemia-reperfusion
ICU	intensive care unit
IED	immune-enhancing diet
IFN- γ	interferon- γ
IgA	immunoglobulin A

IL	Interleukin
IMD	immune-modulating diet
LPS	lipopolysaccharide
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MCT	medium chain triglycerides
MOF	multiple organ failure
MuRF-1	muscle RING-finger protein-1
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NSAIDs	non-steroidal anti-inflammatory drugs
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PIF	proteolysis-inducing factor
PS	performance status
QOL	quality of life
RPMI	roswell park memorial institute
RE	retinol equivalent
SAP	severe acute pancreatitis
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SCFA	short chain fatty acid
SMA	superior mesenteric artery
Stat	signal transducer and activator of transcription
TNF- α	tumor necrosis factor- α
VEGF	vascular endothelial growth factor

第 1 章 緒論

がんとその治療

がんは、1981 年から日本人の死亡原因の第 1 位であり、2019 年のがん死亡者数は、約 37 万 6 千人に上る。日本では、がん対策基本法をもとに、がん対策が総合的かつ計画的に推進され、「がん予防」「がん医療の充実」「がんと共生」の三つを柱とした施策が進められている。長年に渡るがん研究の成果および医療技術の進歩と普及によって、がん患者の 5 年生存率は大きく改善した。現在は、がんを抱え、治療を続けながら、日常生活を送る期間が長くなっているため、がんの治療効果だけでなく、がん患者の生活の質（QOL; quality of life）も重要視されている。

がん患者の QOL を低下させる要因として、がんの存在、体重減少、栄養不良、手術や化学療法等のがん治療が挙げられており、また QOL 低下は身体活動性の低下だけでなく、生存率の低下にもつながることが報告されている (Table 1-1) [1]。現在、がん治療は、「手術療法（外科手術）」「化学療法（抗がん剤治療）」「放射線療法」の三大療法を中心に進められているが、三大療法を組み合わせるだけでなく、QOL を下げないような支持療法も組み合わせた集学的治療が進められている。先に挙げたように、がん患者の QOL には体重減少や栄養不良といった要因が大きいことから、「栄養療法」すなわち、がん患者の栄養不良を防ぐための適切な栄養管理が、QOL を下げないための支持療法として重要になる。

がん患者の栄養管理

以前より、各種栄養素の十分な摂取が、生体の機能を正常に作動させ、その構造を維持するのに重要であることが知られている。一方、重篤な疾患を有する患者で

は、栄養摂取が不十分であったり、疾患に伴いエネルギー消費が増加したりしており、栄養不良に陥る可能性が高い [2]。栄養不良状態が続くと、体内に貯蔵していた糖質だけでなく、タンパク質が失われ、免疫能低下、創傷治癒の遅延、臓器障害などが引き起こされる [3]。がんは栄養不良を生じる典型的な病態であり、体重減少は、がんの原発部位や進行度によって差があるものの、がん患者の 30～80%に見られると報告されている [4]。かつては、「がん治療施行中の栄養療法は、がんの増殖を促進する可能性がある」とする意見があったが、現在、これを積極的に支持する臨床的なエビデンスはない [3]。そのため、各種ガイドラインでも栄養管理の重要性が認識されており、本邦における静脈経腸栄養ガイドライン（第 3 版）では「がん治療施行中には定期的に栄養状態を評価し、十分な経口摂取ができない、もしくはできないと予想される場合には積極的に栄養療法を行う。」とされている [3]。

がん患者の体重減少は、がん関連体重減少（**CAWL; cancer associated weight loss**）と、がん誘発性体重減少（**CIWL; cancer induced weight loss**）に大別される [5]。**CAWL** は、「がんとその治療にともなう体重減少」であり、がんによる消化管の狭窄や閉塞、化学療法の副作用による食欲不振、がんの告知による精神的な食欲低下等が原因となる [5]。他方、**CIWL** は、「がん組織から誘発される代謝異常による体重減少」であり、がん細胞自身もしくは宿主の免疫反応によって引き起こされる代謝異常が原因となる [5]。この **CIWL** は単純な飢餓とは異なり代謝異常を伴うため、通常栄養管理では体重の維持・改善が困難であり、「がん悪液質（**cancer cachexia**）」に陥りやすい。がん悪液質は、「通常栄養サポートで改善することが困難で、進行性の機能障害をもたらし、（脂肪組織の減少の有無にかかわらず）骨格筋量の持続的な減少を特徴とする複合的な代謝症候群」として定義される [6]。

がん悪液質では、安静時のエネルギー消費量が亢進し、栄養摂取の減少と代謝異常によって骨格筋の合成と分解のバランスが負に傾く。がん悪液質は多くの進行がん患者に認められ、体重減少だけでなく、化学療法の副作用発現上昇や治療中断の増加を引き起こし、患者の生存率にも影響を及ぼす [6-8]。がんの進展に伴い、代謝異常は重症化し、通常の栄養管理が有用ではなくなるため、悪液質は、がんの進行と共に不可逆性の栄養不良に進展し、最終的に死に至る (Figure 1-1) [6]。そのため、全身状態が悪化する前の段階で、栄養介入を行い、悪液質を予防することが重要である。

また、がんの化学療法中には、抗がん剤の副作用によって **CAWL** が誘発される [5]。抗がん剤の投与は、味覚障害や悪心・嘔吐を誘発して食欲不振の原因になるだけでなく、口内炎や疼痛等の副作用から食事摂取量の減少、消化管粘膜障害や下痢による栄養吸収不良も引き起こす。そのため、化学療法中には、がんの代謝異常や悪液質を考慮した栄養管理に加えて、抗がん剤の副作用も考慮した栄養介入が必要になる。

以上より、がん患者の **QOL** や予後を改善するために、悪液質を予防できる適切な栄養管理方法の開発が望まれるが、がん悪液質を予防するための栄養介入方法はいまだに確立されていない。また、化学療法時における適切な栄養管理法についても明らかになっていない。

がんの外科手術時における栄養管理

一方、がん治療において外科手術を行う場合、術前～術後（周術期）における患者の栄養不良は、手術後の合併症発生リスクを高め、入院期間の延長や死亡率の上昇につながることを報告されている [9, 10]。特に消化器外科手術を受ける患者は、

食欲不振や消化管の通過障害などが存在し、術前から栄養不良に陥っている患者が少なくない [11]。食道がん切除手術や、すい臓がん手術（膵頭十二指腸切除手術）は、消化器外科手術の中でも侵襲が大きく、術後に経口摂取が不十分になる期間が長い。また術前から栄養不良に陥っている患者も多いため、周術期の栄養管理の重要度が高い。実際に、胃切除を行った胃がん患者の検討では、術前の体格指数（BMI; body mass index）が 25 未満の患者は、25 以上の患者に比べて、5 年生存率が有意に低いことが報告されている [12]。日本臨床栄養代謝学会の静脈経腸栄養ガイドラインでは、術前に中等度ないし高度の栄養障害に陥っている患者は術前栄養療法の対象であるとされている [3]。また、欧州臨床栄養代謝学会のガイドライン（ESPEN Guideline; Clinical nutrition in surgery）では、体重減少や BMI、血清アルブミン値等の栄養指標を元に、術前の栄養管理を適応すべき旨が記されている [13]。以上のように、がんの周術期において栄養状態を保つことは、患者の予後を保つ上で非常に重要であり、周術期に栄養状態を改善し、体重を維持する対策を講じることが重要である。

医療現場における栄養管理の方法は、「経腸栄養」と「経静脈栄養」の 2 種類がある（Figure 1-2） [11]。経腸栄養には、口から食事を食べる「経口栄養」と、経鼻胃管や胃ろう等から栄養剤を注入する「経管栄養」がある。経管栄養では一般的に、糖質や脂質、タンパク質、ミネラル、ビタミンなどの各栄養素をバランスよく配合した総合栄養食品である「流動食」が用いられる。一方、経静脈栄養は消化管を使用せず、直接血管に点滴を行う。栄養管理の基本としては、腸が機能しており、安全に使用可能であれば、経腸栄養を選択する。一番自然なのは経口栄養だが、消化器がん患者等、食事摂取のみでは栄養摂取が不十分なことが多い。その場合には通常の食事に加えて、経口補助栄養（oral nutritional supplement）として流動食を

経口摂取し、さらに経口で不十分な場合には、流動食を用いた経管栄養を実施することが推奨されている [3]。

近年、単純な熱量補給や栄養素の充足のための栄養摂取ではなく、摂取する栄養組成を一部変更したり、栄養素を追加したりすることにより、疾病や病態そのものを快方に導く「病態別栄養管理法」の研究が進んできた [14]。食道がん等の外科手術や多発外傷、感染症等の大きな侵襲を受けた患者では、生体への侵襲に対して身体の恒常性を保つための防御反応や過剰な炎症反応が生じており、生体の代謝系が通常とは異なる状況下にある。侵襲を受けた患者に対して適切な栄養管理を行うために、過剰な炎症反応を制御して患者の生体防御能や免疫能を増強、調整する作用を有する特殊な栄養成分の研究が進んでおり、これらの栄養素を免疫栄養素 (immunonutrients) と呼ぶ [2, 14]。Immunonutrients には、 ω -3 多価不飽和脂肪酸、抗酸化物質 (ビタミン A、C、E、亜鉛、セレン) 等の栄養素が挙げられる [15]。 ω -3 多価不飽和脂肪酸の投与は、リポ多糖 (LPS; lipopolysaccharide) 誘発敗血症モデルをはじめとした様々な動物モデルにおいて抗炎症作用が確認されている [16-18]。さらに敗血症患者を対象としたメタ解析の結果、 ω -3 多価不飽和脂肪酸の投与が敗血症患者の死亡率低減に寄与することが明らかになっている [19, 20]。抗酸化物質についても同様に周術期の動物モデルにおいて組織障害を低減することが報告されており、また ICU (intensive care unit) 患者の全身性炎症反応を減弱させ、死亡率の低下に寄与することが示されている [21-23]。これらの Immunonutrients を配合した流動食は、免疫増強流動食 (IED; immune-enhancing diet) ないしは免疫調整流動食 (IMD; immune-modulating diet) と呼ばれており、医療現場では感染性合併症や入院期間の減少を目的として、手術前後の栄養管理の際に使用され、その有用性が報告されている [24]。

免疫調整流動食に関する先行研究

食品および食品に含まれる栄養素は、栄養機能（一次機能）や、味や美味しさ等の感覚機能（二次機能）だけでなく、生体調節機能（三次機能）も有している [25]。牛乳や人乳等、乳に含まれるタンパク質についても生体調節機能を有することが明らかになっている。牛乳のタンパク質は、約 80%がカゼイン、約 20%がホエイという 2 種類のタンパク質に大別されるが、ホエイタンパク質、およびその画分である α -ラクトアルブミン、 β -ラクトグロブリン、ウシ血清アルブミン、免疫グロブリンは、免疫増強/調節作用を有することが報告されている [26, 27]。さらに我々の研究グループはこれまでに、ホエイタンパク質をトリプシンで加水分解したホエイペプチドが抗炎症作用を有することを明らかにしてきた [27, 28]。Kume らは、コンカナバリン A 誘発肝炎モデルおよび D-ガラクトサミン誘発肝炎モデルを用いた検討で、ホエイペプチドの投与が血漿中の肝酵素指標（アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)) の上昇および血漿中の炎症性サイトカイン濃度（腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、インターロイキン 6 (IL-6)) の上昇を、共に抑制することを報告している [29]。

そこで我々は、流動食の基本的な役割である一次機能（栄養機能）に加えて、三次機能を付与することを目的として、新しい免疫調整流動食を開発した (Table 1-2)。この免疫調整流動食には、 ω -3 多価不飽和脂肪酸、抗酸化物質（ビタミン A、C、E、亜鉛、セレン）といった Immunonutrients を強化しつつ、上記の研究成果を踏まえて、平均分子量 900~1100 のホエイペプチドを配合した。また、腸内環境の改善効果を期待して、*Lactobacillus burgaricus* (*L. burgaricus*) および *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) による乳酸菌発酵物も特徴的なタ

ンパク質源として配合した（ただし、流動食は殺菌処理を行うため、免疫調整流動食中の *L. burgaricus* および *S. thermophilus* は死菌となる）。また、周術期に生じる過剰な炎症反応によってインスリン抵抗性が惹起されることから、流動食投与時の血糖上昇を緩やかにするために、糖質の一部にイソマルツロースを配合した。これまでにイソマルツロース配合流動食は、投与時の血糖上昇が緩やかであることが明らかになっている [30]。開発した免疫調整流動食の効果については、先述のホエイペプチドの研究と同様に、コンカナバリン A 誘発肝炎モデルで抗炎症作用を確認された [31]。しかしながら、周術期（外科手術の前後）における有用性、すなわち、周術期に生じる過剰な炎症反応や手術の予後に与える影響については明らかになっていなかった。また、周術期以外への適用可能性について、どのような病態に適しているかの知見も取得できていなかった。

本研究の目的

以上をふまえて、本研究では種々のがん治療の際の適切な栄養管理方法を見出すことを目的とし、そのための基盤研究として「手術（外科治療）」および「化学療法（抗がん剤治療）」で問題となる、生体異常反応を制御する栄養管理方法とその作用機構を検討した。具体的には、より実践的な領域の研究として、医療現場で用いられる流動食に着目し、がん治療時の栄養管理に免疫調整流動食が有用であるか否かについて検討すると共に、その作用機構に関しても検討した。

Table 1-1. がん患者の QOL 決定因子 [1].

がんの存在	30%
体重減少	30%
栄養摂取量	20%
化学療法	10%
手術	6%
罹病期間	3%
がんのステージ	1%

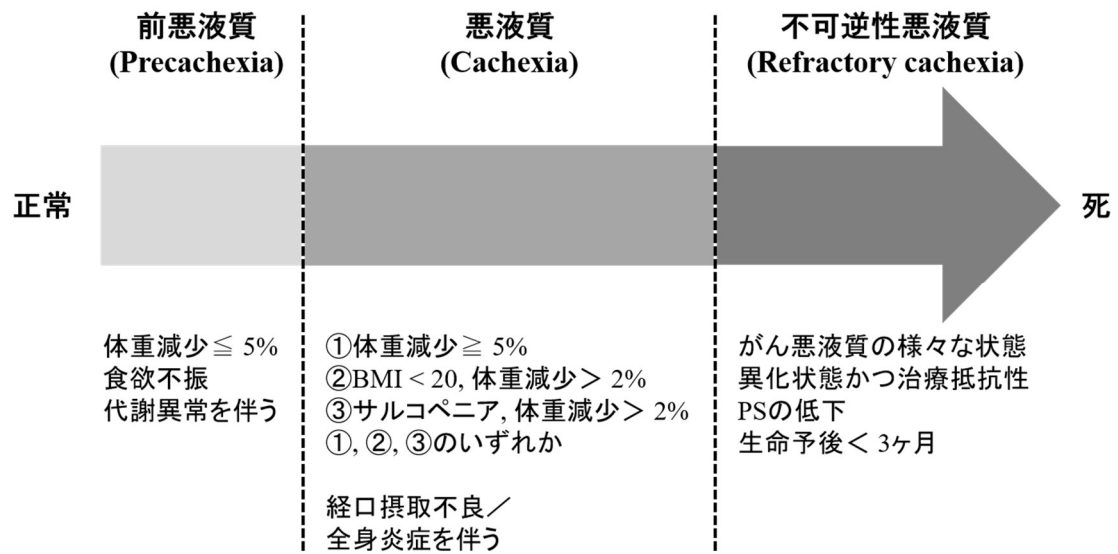


Figure 1-1. がん悪液質のステージ [6].

がん悪液質は全てのがん患者で進行するわけではない。現時点では、前悪液質 (Precachexia) の段階で、悪液質の進行を予見できるバイオマーカーはない。

不可逆性悪液質 (Refractory cachexia) は基本的に患者の臨床的特徴に基づいて定義される [6]。BMI: body mass index. PS: performance status.

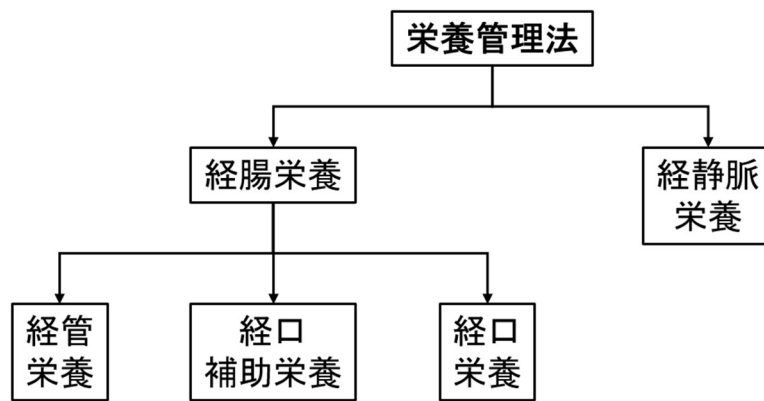


Figure 1-2. がん患者の栄養管理法

Table 1-2. 免疫調整流動食の栄養組成

100 kcalあたり	汎用流動食 (Meibalance 1.0)		免疫調整流動食 (IMD)	
三大栄養素のエネルギー比				
タンパク質 (% kcal)	16		20	
炭水化物 (% kcal)	59		55	
脂質 (% kcal)	25		25	
三大栄養素の配合量と種類				
タンパク質量 (g)	4.0		5.0	
タンパク質の種類	乳タンパク質、 カゼインタンパク質	4.0 g	ホエイペプチド 乳酸菌発酵物	2.0 g 3.0 g
炭水化物量 (g)	15.5		14.5	
炭水化物の種類	デキストリン スクロース 食物繊維	14.5 g 1.0 g	デキストリン イソマルツロース 食物繊維	6.3 g 7.0 g 1.2 g
脂質量 (g)	2.8		2.8	
脂質の種類	長鎖脂肪酸油脂	2.8 g	長鎖脂肪酸油脂 中鎖脂肪酸油脂 (MCT) EPA, DHA	2.2 g 0.6 g 0.06 g
その他の栄養素	各種ビタミン、ミネラル配合		各種ビタミン、ミネラル配合 (抗酸化ビタミン・ミネラル強化)	

(次ページに続く)

Table 1-2. 免疫調整流動食の栄養組成（続き）

100 kcalあたり	汎用流動食 (Meibalance 1.0)	免疫調整流動食 (IMD)
<i>Vitamins</i>		
Vitamin A (μg RE)	60	150
Vitamin D (μg)	0.5	0.75
Vitamin E (mg)	3	5
Vitamin K (μg)	3.1	3.4
Vitamin B1 (mg)	0.15	0.25
Vitamin B2 (mg)	0.2	0.3
Niacin (mg)	1.6	3
Vitamin B6 (mg)	0.3	0.3
Vitamin B12 (μg)	0.6	0.6
Folic acid (μg)	50	50
Biotin (μg)	15	7.5
Vitamin C (mg)	16	50
Choline (mg)	1.7	9.2
<i>Minerals</i>		
Sodium (mg)	110	70
Potassium (mg)	100	80
Calcium (mg)	60	80
Magnesium (mg)	20	20
Phosphorus (mg)	60	70
Iron (mg)	1	1
Zinc (mg)	0.8	1
Copper (mg)	0.08	0.05
Manganese (mg)	0.2	0.175
Chromium (μg)	3	2.96
Molybdenum (μg)	2.5	2.5
Selenium (μg)	3.5	5
Iodine (μg)	15	9.7
Chloride (mg)	140	80

第2章 免疫調整流動食による栄養管理が外科手術後の生体反応に及ぼす影響

第1節 緒言

食道がん等の生体への侵襲が大きい高度外科手術を行った際には、患者の機能障害のリスク上昇や術後の死亡率増加の原因となる「多臓器不全 (MOF; multiple organ failure)」の発生が問題となる [32]。術後の MOF は、生体への侵襲ストレスによって惹起される過剰な炎症反応の結果として生じる。炎症は、外来侵入から宿主を保護する上で不可欠な過程であることはよく知られている。しかし、MOF を引き起こすような炎症性サイトカインのコントロール不良かつ過剰な産生は、全身性炎症反応症候群 (SIRS; systemic inflammatory response syndrome) と呼ばれ、臨床上問題視されている (Figure 2-1) [15, 32]。また、炎症反応が生じた際には、抗炎症反応も同時に引き起こされるが、抗炎症反応が強すぎると免疫不全を引き起こし、術後の感染による臓器障害を引き起こす原因となる。この抗炎症反応は、代償性抗炎症反応 (CARS; compensatory anti-inflammatory response syndrome) として定義される [15, 32]。そして、SIRS を引き起こし、MOF 発症の重要な機序として、腸管虚血再灌流 (I/R; ischemia-reperfusion) が明らかになっている [32]。大手術や外傷等の侵襲が生体に加わると、循環動態が不安定になるが、その際、生体では生命維持のために腸管や皮膚等への血流が犠牲にされ、重要臓器への血流が優先される [33]。その後、治療に伴い、循環動態が改善されると腸管への血流が改善される。この一連の現象が腸管虚血再灌流に相当する。このストレスによって、酸化ストレスの増強や全身性炎症反応、好中球等の過剰な活性化、腸管機能低下が引き起こされ、臓器不全の引き金になることが報告されている [33]。

以上のように、生体恒常性を越える過剰な反応は身体にとって有害となることから、炎症反応・抗炎症反応を適切な範囲内にコントロールする事が重要となる。さらに、炎症反応は、生体のタンパク質異化の亢進や末梢組織への栄養の取り込み阻害を引き起こすことから、上記患者の栄養管理を行う上でも炎症のコントロールが重要となる。そしてこれまでに栄養管理、特に **Immunonutrients** を用いた栄養管理が、**SIRS** を調節する有望な方法として提唱されている [15]。

第 2 章では、周術期の侵襲ストレスによって生じる生体反応を予防、軽減できる術前の栄養管理方法を明らかにするために、マウスへの流動食投与の影響を検討した。より具体的には、我々の開発した免疫調整流動食を用いた栄養管理を行うことが、術後に生じる全身性の炎症反応を予防し、さらに予後（術後の生存）を改善できるかについて、マウス腸管虚血再灌流（I/R）モデルを用いて検討した。

また、術後に過剰な炎症反応が生じた後から、免疫調整流動食による栄養管理を行う有用性を明らかにするために、全身性の炎症反応が持続する動物モデルの構築を行い、炎症発症後からの免疫調整流動食投与の効果を検討した。検討に際して、既存の急性炎症モデルでは、全身性の炎症反応が持続することなく、数時間～24 時間程度で収束してしまうため、炎症発症後からの免疫調整流動食投与の効果を評価できない状況であった。そこで、全身性の炎症反応が数日間持続する動物モデルの探索を行い、種々の急性炎症モデルの中から、コリン欠乏エチオニン添加食（**CDE (choline-deficient ethionine-supplemented)** 食）誘発急性膵炎モデルを用いた検討を進めた。この **CDE** 食誘発急性膵炎モデルは、幼弱な雄性マウスに 24～36 時間絶食後、**CDE** 食を 24～72 時間経口投与することで、急性出血性壊死性膵炎を発症する [34]。**CDE** 食に含まれるエチオニンは、必須アミノ酸であるメチオニンのアナログであり、膵臓へのメチオニンの取り込みを拮抗的に阻害する。こ

れにより、膵房細胞における膵酵素分泌障害と膵酵素による膵房細胞の自己消化を引き起こすことで膵炎が惹起される。急性膵炎は致死となりうる疾患であり、一部の患者は予後不良で死亡率が高い重症急性膵炎（SAP; severe acute pancreatitis）に移行する [35]。また SAP における高い死亡率は、SIRS に関連する MOF にしばしば起因する。SAP の初期段階で放出される炎症性サイトカインは、SAP の関連病因のメディエーターであることが示されている [36-40]。

以上より、本研究では、上述の腸管虚血再灌流モデルを用いた検討に加えて、食事誘発急性膵炎モデルにおいて、膵炎発症後に炎症が持続し、それに伴って肝臓や脾臓などの臓器にも障害が起こることを明らかにした後、全身性炎症を引き起こされた後からの免疫調整流動食の投与によって、これらの合併症が改善されるかどうかについて検討を行った。

第 2 節 材料および方法

実験動物

実験動物は、5 週齢の雄性 ICR マウスまたは 3 週齢の雄性 C57BL/6 マウス（日本 SLC）を用いた。実験動物の飼育は、温度 $21.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55.0 \pm 15.0\%$ 、12 時間毎の明暗サイクル（明期：7-19 時）に設定された環境下にて実施した。実験期間中を通じて、飼料と飲料水は自由摂取とした。また、実験を開始する前に市販の非精製飼料の chow（CRF-1; オリエンタル酵母工業）にて 1 週間馴化させた。本研究における動物実験はすべて、株式会社 明治の動物実験倫理審査委員会の承認を受け、委員会の定める「動物実験における倫理規程」に則って行った。

腸管虚血再灌流モデル

1週間の馴化後にICRマウスを平均体重が等しくなるようにControl群(n = 58)とIMD群(n = 56)の2つの群に分けた。Control群には通常の汎用流動食(メイバランス®1.0、株式会社 明治)の凍結乾燥粉末を、IMD群には免疫調整流動食(メイイン®、株式会社 明治)の凍結乾燥粉末を自由摂取させた(Table 2-1)。なお、各流動食は、入手時点では液状で殺菌された状態であり、IMDに含まれる乳酸菌発酵物も加熱殺菌されている。実験前に、各流動食は凍結乾燥を行い粉末化した。粉末化した流動食は、腐敗および酸化を避けるために、酸素吸収剤および乾燥剤で真空パックし、実験動物への投与まで冷蔵保管した。

実験1 (Figure 2-2) (Control: n = 20、IMD: n = 19) では、各流動食を2週間摂取してから、腸管虚血再灌流手術を実施した。具体的には、イソフルラン麻酔下で2 cmの正中開腹を行い、上腸間膜動脈(SMA; superior mesenteric artery)を微小血管クリップで45分間閉塞した。SMAを閉塞した後、直ちに閉腹した。SMA閉塞による腸管虚血を45分間行った後、再度開腹し、クリップを抜去することで再灌流した。全てのマウスには再灌流直後に1 mLの生理食塩水を皮下注射し、再灌流してから3時間後に心臓穿刺による全採血を行った。採取した血液サンプルは、血漿中IL-6濃度と血漿中グルコース濃度の測定に供した。

実験2 (Figure 2-2) では、75匹のマウスを平均体重が等しくなるように2群(Control: n = 38、IMD: n = 37)に分け、実験1と同様に各流動食を2週間給餌した。マウスは60分間のSMA閉塞を実施した。腸管虚血再灌流後に、手術前と同様に汎用流動食の凍結乾燥粉末または免疫調整流動食の凍結乾燥粉末を与え、各マウスの生存を48時間観察した。

急性膵炎に伴う遠隔臓器障害モデル

マウスに重症急性膵炎を誘発するために、0.5%エチオニン添加コリン欠乏食（CDE食）を用いた。コリン欠乏食およびエチオニンはDyetsおよびSigma-Aldrichから購入した。C57BL/6 マウスは1週間の馴化後、12時間絶食させた（-24 hr）。次いで、これらのマウスに24時間CDE食を自由摂取させることで膵炎を発症させた（0 hr）。その後、飼料をCDE食から通常の汎用流動食（メイバランス®1.0、株式会社 明治）または免疫調整流動食（メイン®、株式会社 明治）に交換した。マウスは各時点で、腹部大静脈から全採血を行うことで安楽死させた後、組織を採取した。

実験3（予備検討；Figure 2-3）：マウスを5群に無作為に割り付け、12時間絶食させた後（-24 hr; n = 6）、CDE食を24時間与えた（0 hr; n = 6）。その後、CDE食から汎用流動食（メイバランス®1.0、株式会社 明治）の凍結乾燥粉末に変更し、24時間（24 hr）、48時間（48 hr）、72時間（72 hr）または96時間（96 hr）自由摂取させた（それぞれ n = 8、8、10、9）。各時点で剖検を行い、臓器重量および血液を採取した。採取した血液は血漿を分離し、血漿中アミラーゼ、AST、ALT、IL-6、TNF- α 、単球走化性因子（MCP-1）を測定した。

実験4（IMDの効果検討；Figure 2-3）：マウスを12時間絶食した後（-24 hr; n = 9）、CDE食を24時間与えた。これらのマウスを平均体重が等しくなるように、Control群（n = 18）とIMD群（n = 18）に分けた。Control群またはIMD群には各々、汎用流動食（メイバランス®1.0、株式会社 明治）の凍結乾燥粉末または免疫調整流動食（メイン®、株式会社 明治）の凍結乾燥粉末を72時間または96時間自由摂取させた。なお、摂餌量がCDE飼料給与時の半分以下であったマウスは除外した。各時点で臓器重量および血漿中アミラーゼ、AST、ALT、IL-6、TNF- α 、

MCP-1 を測定した。

血中の各指標の測定

血漿中の炎症性サイトカイン濃度は、マウス Cytometric Bead Array (CBA) inflammation kit (BD Biosciences) を用いて、488 nm レーザーを備えたフローサイトメーター (FACSCalibur ; BD Immunocytometry Systems) で、プロトコルに従って分析した。血漿中のグルコース、アミラーゼ、ALT、AST 濃度は、自動分析装置 (富士ドライケム 3500 ; 富士フイルム) を用いて酵素法により測定した。

統計処理

各試験における Control 群と IMD 群の比較は Mann-Whitney の U 検定を用いて行った。また、腸管虚血再灌流モデルでの検討において、生存期間の比較には Log-rank 検定を用いた。さらに χ^2 検定を用いて、再灌流 12 時間後と 30 時間後の生存率を比較した。

急性膵炎に伴う遠隔臓器障害モデルの検討において、-24 hr と他の時点を比較する際には、Bartlett の分散検定を用いて評価し、等分散データの場合は Dunnett の検定を、不等分散データの場合は Steel の検定を行った。また、血漿中炎症性サイトカイン濃度と血漿中 AST、ALT 濃度との関連性を Pearson の相関係数検定により検討した。差は $p < 0.05$ で有意とした。

第 3 節 結果

実験 1 : 腸管虚血再灌流後の生体反応に対する免疫調整流動食の効果検討

Control 群と IMD 群の間で実験前の体重に有意差はなかった。飼料の 2 週間投

与後の体重変化は、それぞれ 4.6 ± 0.6 g、 3.7 ± 0.5 g であり、Control 群と IMD 群の間に有意差はなかった（平均値 \pm 標準誤差）。

予備検討において、疑似手術を施したマウス（開腹手術のみで腸管の虚血再灌流は行わず）では、手術 3 時間後の血漿中 IL-6 濃度は 183.6 ± 33.0 pg/ml であった。腸管虚血再灌流 3 時間後の血漿中 IL-6 濃度は、Control 群と IMD 群の両者共に疑似手術マウスの値よりも高かったが、Control 群に対して IMD 群で有意に低かった（Control 群、 797.5 ± 156.3 pg/ml; IMD 群、 355.6 ± 47.3 pg/ml; $p = 0.013$ ）（Figure 2-4）。

術後は侵襲ストレスによる影響で、糖尿病の有無にかかわらず一過性に高血糖になる。術後高血糖は、創部感染などの合併症発生を上昇させ、予後にも影響することが明らかになっている。今回用いた腸管虚血再灌流モデルでも、血漿中グルコース濃度が再灌流後に上昇することが予備検討で明らかになっている。予備検討において、疑似手術を施したマウスでは、手術 3 時間後の血漿中グルコース濃度は 180.9 ± 3.3 mg/dl であった。腸管虚血再灌流 3 時間後の血漿中グルコース濃度は Control 群と IMD 群の両者共に疑似手術マウスの値よりも高かったが、IMD 群の血漿中グルコース濃度は、Control 群と比較して有意に抑制された（Control 群、 598.6 ± 50.5 mg/dl ; IMD 群、 388.0 ± 38.9 mg/dl; $p = 0.002$ ）（Figure 2-4）。

実験 2：腸管虚血再灌流後の生存に対する免疫調整流動食の効果検討

生存期間については、IMD 群が Control 群よりも長い傾向にあったが、両群間に有意差はなかった（ $p = 0.15$ 、Log-rank 検定）（Figure 2-5）。しかしながら、IMD 群では、術後早期の時点である再灌流後 12 時間および 30 時間における生存率が Control 群と比較して有意に高かった（再灌流後 12 時間における生存率: IMD 群

68% vs. Control 群 45%、30 時間における生存率: IMD 群 51% vs. Control 群 29%、 $p = 0.046$ および $p = 0.047$ 、 χ^2 検定)。

実験 3：炎症が持続する急性膵炎モデルの確立

CDE 食摂取終了後 24 時間 (24 hr) および 48 時間 (48 hr) で有意に体重が減少した。併せて、食餌摂取量も CDE 食摂取終了後 48 時間まで有意に減少し、72 時間後 (72 hr) と 96 時間後 (96 hr) に回復した (Table 2-2)。なお、それ以外の期間において、馴化期間中の Chow の摂取量や CDE 食の摂取量に差は認められなかった (Table 2-2)。

CDE 食の摂取により膵炎が誘発され、血漿中アミラーゼは CDE 食摂取終了後 24 時間 (24 hr) で有意に増加し、72 hr および 96 hr で有意に減少した (Table 2-3)。また、膵臓重量は 0 hr および 24 hr で有意に増加し、48 hr には減少した (Table 2-3)。IL-6、TNF- α 、MCP-1 などの炎症性メディエーターは、72 hr まで高い状態が維持された (Figure 2-6)。

また、CDE 食摂取終了後に、肝臓や脾臓の腫大および肝酵素上昇が確認され、遠隔臓器障害が生じた。肝臓重量は 96 hr まで有意に増加し、脾臓重量も有意ではないが肝臓と同様に増加した (Figure 2-7)。血漿中 AST および ALT 濃度は 0 hr および 24 hr で最も高く、96 hr まで高値を維持した (Figure 2-7C および 2-7D)。

血漿中の肝酵素指標と炎症性メディエーターの関連について、血漿中 AST、ALT 濃度と血漿中 MCP-1 濃度との間には、統計的に有意な強い正の相関が認められた ($p < 0.001$) (Figure 2-8A および 2-8C)。血漿中 IL-6 濃度も血漿中 AST、ALT 濃度と有意に相関したが、強くは相関しなかった。TNF- α は血漿中の肝酵素指標と相関しなかった。以上より、免疫調整流動食摂取の効果を検討する実験 4 では、

摂餌量が回復し、かつ炎症性メディエーターの上昇が維持されており、肝臓や脾臓に障害が惹起された、CDE 食摂取終了後 72 時間と 96 時間後の時点で検討した。

実験 4-1：急性膵炎に伴う臓器の腫大に対する免疫調整流動食の効果検討

Control 群と IMD 群の間で体重および摂餌量に有意差は認められなかった。また、Control 群と IMD 群の膵臓重量および血漿中アミラーゼ値については、72 hr でも 96 hr でも有意差は認められなかった (Table 2-4)。一方、肝臓および脾臓重量は、96 hr で Control 群よりも IMD 群で有意に低く、脾臓や肝臓の腫大が抑えられた (それぞれ $p = 0.032$ および 0.046) (Figure 2-9A および 2-9B)。

実験 4-2：急性膵炎に伴う血中の肝酵素指標および炎症性メディエーターの上昇に対する免疫調整流動食の効果検討

血漿中 AST、ALT 濃度は、両群共に 72 hr および 96 hr で有意に上昇した。しかし、IMD 群の血漿中 AST および ALT 濃度は、72 hr で Control 群よりも有意に低かった (それぞれ $p = 0.002$ および 0.002) (Figure 2-9C および 2-9D)。血漿中 MCP-1 濃度も両群共に 72 hr で有意に上昇したが、IMD 群が Control 群より有意に低かった (Figure 2-10C)。血漿中 TNF- α および IL-6 濃度は、いずれの群でも 72 hr および 96 hr の時点で有意な上昇は確認されなかった (Figure 2-10A および 2-10B)。Control 群では血漿中 MCP-1 濃度と血漿中 AST 濃度との間に有意な強い正の相関が認められたが ($r = 0.720$, $p < 0.005$)、IMD 群では認められなかった (Figure 2-11)。

第 4 節 考察

本章では、マウス腸管虚血再灌流モデルを用いて、免疫調整流動食が術後に生じる全身性炎症反応を予防し、それによって術後の生存を改善できるかどうかを検討した。その結果、術前に免疫調整流動食による栄養管理を行うことで、術後の血漿中 IL-6 濃度上昇と血漿中グルコース濃度上昇が有意に抑制されることを明らかにした。また、血漿中 IL-6、グルコース濃度の抑制と関連して、再灌流後の早期時点での生存率が改善された [41]。

さらに、マウス CDE 食誘発急性膵炎モデルを用いて、全身性炎症反応が誘発された後から免疫調整流動食を投与する有用性についても検討した。その結果、急性膵炎発症後から免疫調整流動食を摂取することでも、全身性炎症反応が抑制され、さらに炎症に関連する臓器障害が低減されることを明らかにした [42]。

マウス腸管虚血再灌流モデルやマウス CDE 食誘発急性膵炎モデルで確認された抗炎症作用は、過去の研究報告と一致した [31]。過去の我々の研究では、コンカナバリン A 誘発肝炎モデルにおいて、免疫調整流動食がコンカナバリン A 投与後の血漿中 ALT や AST、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 濃度の上昇を抑え、さらに肝臓の TNF- α と IFN- γ の発現、および脾臓の IL-6 と IFN- γ の発現を抑制したことを報告している [31]。ただし、周術期に生じる全身性炎症モデルでの検討はこれまでに実施しておらず、また全身性の炎症反応が誘発された後から免疫調整流動食を投与することの有用性についてもこれまでに報告がなかった。今回の研究で初めて、周術期における全身性の炎症反応に対する免疫調整流動食の有用性が明らかになった [42]。

我々の開発した免疫調整流動食は、 ω -3 多価不飽和脂肪酸、抗酸化ビタミンおよびミネラルといった Immunonutrients だけでなく、ホエイペプチドを含んでお

り、これらの成分の組み合わせにより免疫調整流動食の抗炎症作用が発揮されたと考えられる。ホエイペプチドは、コンカナバリン A 誘発性および D-ガラクトサミン誘発性の肝炎モデルにおいて、血漿中の ALT、AST の上昇抑制、および TNF- α 、IL-6 濃度の上昇を抑制することが示されている [28]。また、コンカナバリン A 誘発肝炎モデルを用いた検討で、肝臓における IL-1 β および TNF- α の mRNA 発現抑制ならびに NF- κ B や Stat 3 の活性化を抑制し、さらに脾臓における IL-6 の mRNA 発現を抑制することも報告されている [28]。また、ホエイペプチドを配合した他の流動食でも、LPS 誘発性の炎症反応が低減することも示されている [43]。 ω -3 多価不飽和脂肪酸、特にエイコサペンタエン酸 (EPA; eicosapentaenoic acid) は炎症を軽減することで抗異化作用を有することが明らかにされている [44]。酸化ビタミンおよびミネラルは、全身性炎症反応を減弱させ、ICU 患者の死亡率の低下に寄与することが示されている [23]。一方、免疫調整流動食と対照の汎用流動食では、それぞれに配合した糖質やタンパク質の種類だけでなく、量も異なっている。タンパク質や糖質の量の違いが、上記の抗炎症作用にどれくらい寄与したかは明らかになっておらず、今後の検討課題である。

また、CDE 食誘発急性膵炎モデルでの検討では、上述の抗炎症作用以外の因子も寄与している可能性が考えられた。汎用流動食で使用されるカゼインは、摂取後に膵酵素分泌を有意に増加させる一方で、ホエイペプチドは膵分泌にほとんど影響を及ぼさないことが示されている [45]。我々の開発した免疫調整流動食に配合されているタンパク質の一部はホエイペプチドであることから、対照の汎用流動食を摂取した場合よりも膵外分泌を刺激せず、膵臓への負荷が低減されることが考えられる。また、糖質源として、二糖であるイソマルツロースが配合されている。このイソマルツロースは、消化の過程で、完全に加水分解されてグルコースとフルク

トースになるが、ショ糖よりは消化が遅く、小腸で吸収される [46, 47]。イソマルツロースは摂取後に高血糖や高インスリン血症になることが少ないことが示されている。このことから、我々の開発した免疫調整流動食は汎用流動食よりも膵β細胞への負担を軽減した可能性が考えられた [46]。

また、腸内細菌叢の異常 (dysbiosis) が、腸管バリア機能障害、細菌の体内移行と全身性炎症反応を惹起・増悪することが報告されている [48]。そして dysbiosis が腸管虚血再灌流モデルで生じる臓器障害に関与していると考えられている [49]。腸管虚血再灌流を施したラットの大腸内容物では *Escherichia coli* や *Prevotella oralis* が増加し、*Lactobacillus* が減少した [50]。また、広スペクトル性抗生物質を投与したマウスでは腸管虚血再灌流障害が軽減された [49]。重度の SIRS 患者でも腸内細菌叢が変化していることが明らかにされており、この腸内細菌叢の異常が侵襲後に生じる全身性炎症反応に影響を及ぼすと考えられている [51, 52]。さらに、ヨーグルトなどの発酵乳や一部の乳酸菌には、腸内環境を改善するだけでなく、免疫反応を調節したり、抗炎症作用を示すことが報告されている [53, 54]。そのため、免疫調整流動食にタンパク質源として配合されている乳酸菌発酵物も、腸内環境の変化を通じて、抗炎症作用に関与している可能性がある。今後、免疫調整流動食が腸内環境に与える影響についてさらなる検討が必要と考えられたことから、第4章にて詳細な検討を進めることとした。

本章では膵臓の持続的炎症から遠隔臓器障害が誘発される動物モデルを構築した。これまでに、CDE食によって誘発される実験的膵炎モデルはすでに報告されている [55]。このモデルでは、全身性炎症反応を伴う急性壊死性膵炎が誘発される [56, 57]。しかし、ほとんどの先行研究ではマウスにCDE食摂取を継続しながら検討しており [55, 58]、CDE食の摂取を終了させた後に全身性炎症が持続し、

その後に遠隔臓器障害が発症したかどうかについてはほとんど報告されていなかった [37]。本章の実験 3 では、CDE 食によって誘発された膵炎に伴い、脾臓や肝臓の腫大、肝酵素の上昇などの遠隔臓器障害が引き起こされることを初めて明らかにした。

また、本研究では、MCP-1 といった炎症性メディエーターが CDE 食摂取終了後の数日間に渡り上昇し続けることが確認され、さらに血中肝酵素指標 (AST、ALT) が MCP-1 と強い相関を示すことが示された。急性膵炎の発症・進行には様々な炎症性メディエーターが重要な役割を果たしており [59]、ヒト急性膵炎における重症度の早期予測因子となりうることが報告されている [60, 61]。MCP-1 は C-C ケモカインのファミリーメンバーだが、急性膵炎の過程において重要な炎症性メディエーターであり、遠隔臓器障害の重症化に関与すると考えられている [59, 62]。臨床においても、急性膵炎を合併した患者では血中 MCP-1 が増加することが報告されており、MCP-1 が膵炎を伴う合併症の病態機序において中心的な役割を果たしていると考えられている [62, 63]。本研究の結果から、様々な炎症性メディエーターの中でも特に MCP-1 が遠隔臓器障害および重症膵炎の予測マーカーになりうることが示唆された。

以上の結果から、免疫調整流動食を用いた周術期の栄養管理は、術後に生じる全身性炎症反応を抑制することが示唆された。さらに、全身性炎症反応を抑えることで、遠隔臓器障害や術後の生存を改善する可能性も示された。また、免疫調整流動食は術後に生じる高血糖を予防することができたが、これは術後のインスリンの使用量を減らすことにもつながり、医療費の低減にも寄与すると考えられる。術後の高血糖を予防することで、血糖値を気にすることなく流動食を投与することが可能になるため、患者の管理の負担軽減にもつながると思われる。

ヒトでの効果を確認するためにはさらなる研究と臨床試験が必要であるが、本研究で得られた知見から、免疫調整流動食による栄養管理は、手術侵襲によって誘発される生体反応を予防し、周術期における新たな栄養療法となりうると考えられた。

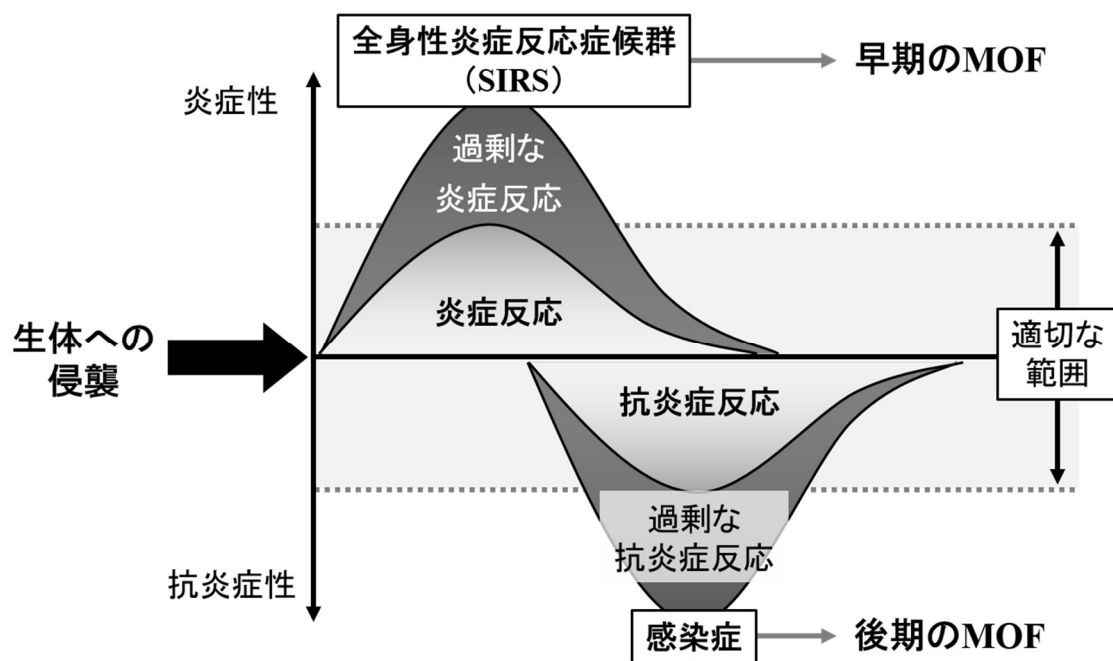


Figure 2-1. 術後に生じる多臓器不全 (MOF) に至る炎症反応 (イメージ図) [32].

SIRS: systemic inflammatory response syndrome, MOF: multiple organ failure.

Table 2-1. 飼料組成 (100 kcal あたり) .

	Control enteral diet	IMD
Proteins (g)	4	5
Protein (% kcal)	16	20
Protein Sources	Na caseinates, milk protein	whey-hydrolyzed peptide, fermented milk
Carbohydrates (g)	15.5	14.5
Carbohydrates (% kcal)	59	55
CHO Sources	dextrin	dextrin, isomaltulose
Lipids (g)	2.8	2.8
Lipids (% kcal)	25	25
MCT (g)	-	0.59
EPA, DHA (g)	-	0.06
n-6 / n-3	3.2	2
<i>Vitamins</i>		
Vitamin A (μg RE)	60	150
Vitamin D (μg)	0.5	0.75
Vitamin E (mg)	3	5
Vitamin K (μg)	3.1	3.4
Vitamin B1 (mg)	0.15	0.25
Vitamin B2 (mg)	0.2	0.3
Niacin (mg)	1.6	3
Vitamin B6 (mg)	0.3	0.3
Vitamin B12 (μg)	0.6	0.6
Folic acid (μg)	50	50
Biotin (μg)	15	7.5
Vitamin C (mg)	16	50
Choline (mg)	1.7	9.2

(次ページに続く)

Table 2-1. 飼料組成（100 kcal あたり）（続き）。

	Control enteral diet	IMD
<i>Minerals</i>		
Sodium (mg)	110	70
Potassium (mg)	100	80
Calcium (mg)	60	80
Magnesium (mg)	20	20
Phosphorus (mg)	60	70
Iron (mg)	1	1
Zinc (mg)	0.8	1
Copper (mg)	0.08	0.05
Manganese (mg)	0.2	0.175
Chromium (μg)	3	2.96
Molybdenum (μg)	2.5	2.5
Selenium (μg)	3.5	5
Iodine (μg)	15	9.7
Chloride (mg)	140	80

MCT: medium chain triglycerides, EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid, RE: retinol equivalent, -: no additives or unknown, CHO: carbohydrates.

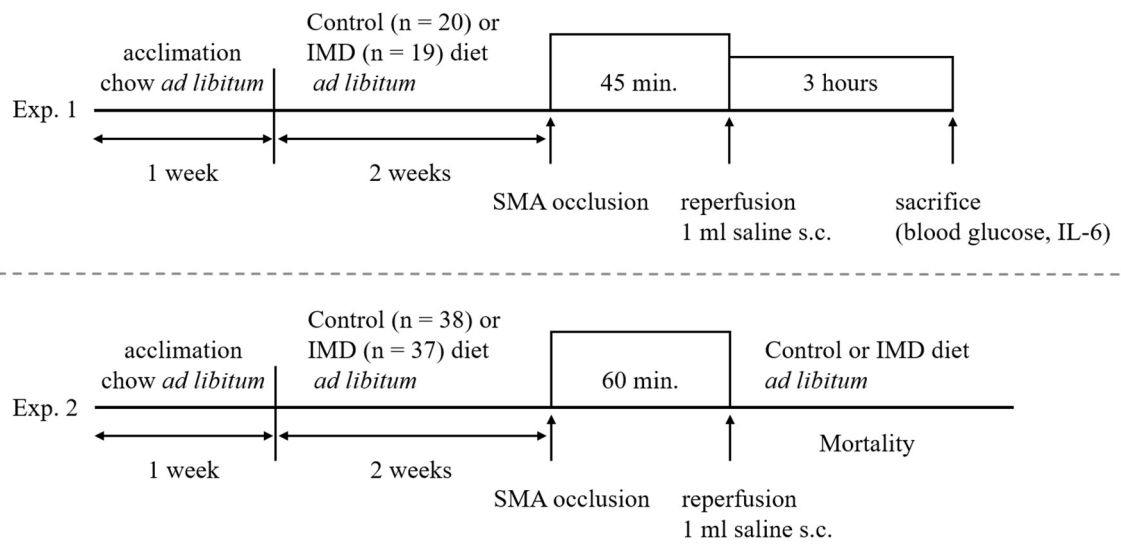


Figure 2-2. 実験 1 および実験 2 プロトコル.

IMD: immune-modulating diet, SMA: superior mesenteric artery.

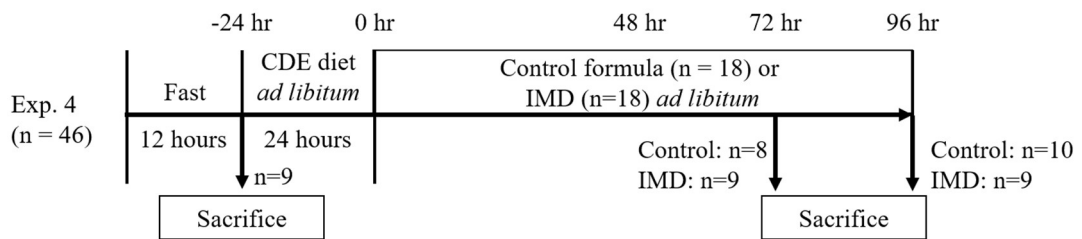
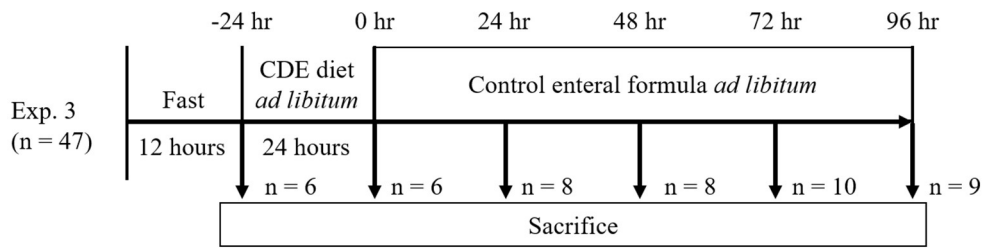


Figure 2-3. 実験 3 および実験 4 プロトコル.

IMD: immune-modulating diet.

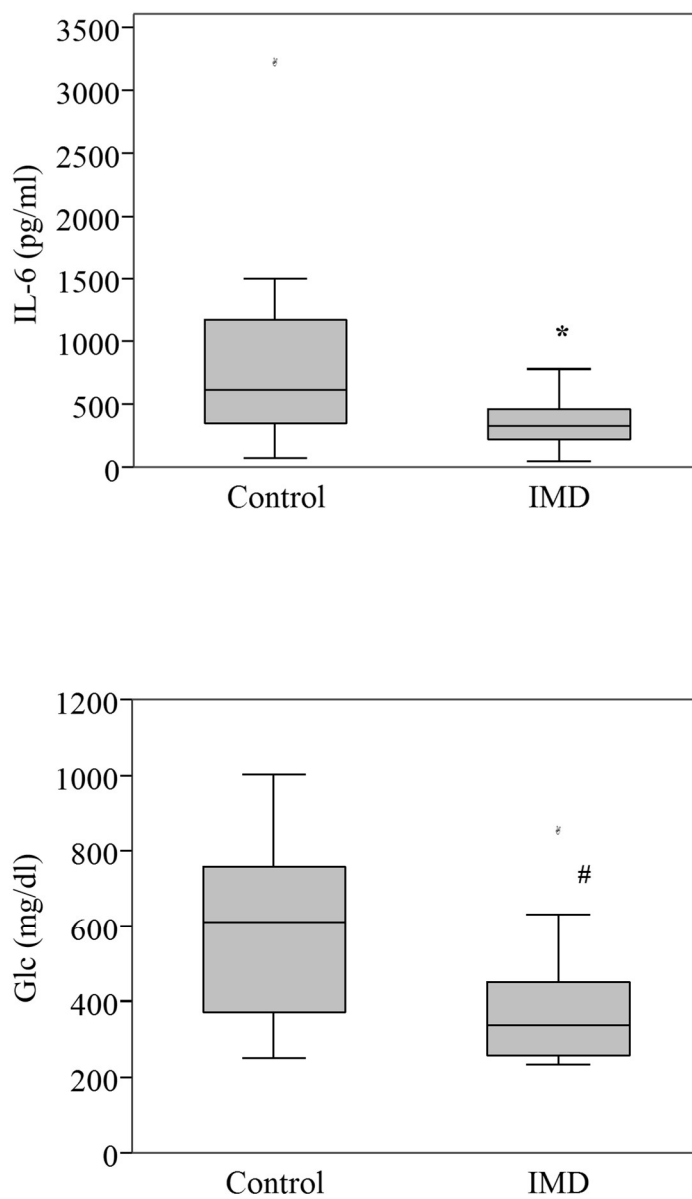


Figure 2-4. 腸管虚血再灌流 3 時間後の血漿中 IL-6 およびグルコース濃度.

Control 群および IMD 群は腸管虚血を 45 分間行った。再灌流 3 時間後に全採血を行った。* $p < 0.05$, # $p < 0.01$, vs. Control 群.

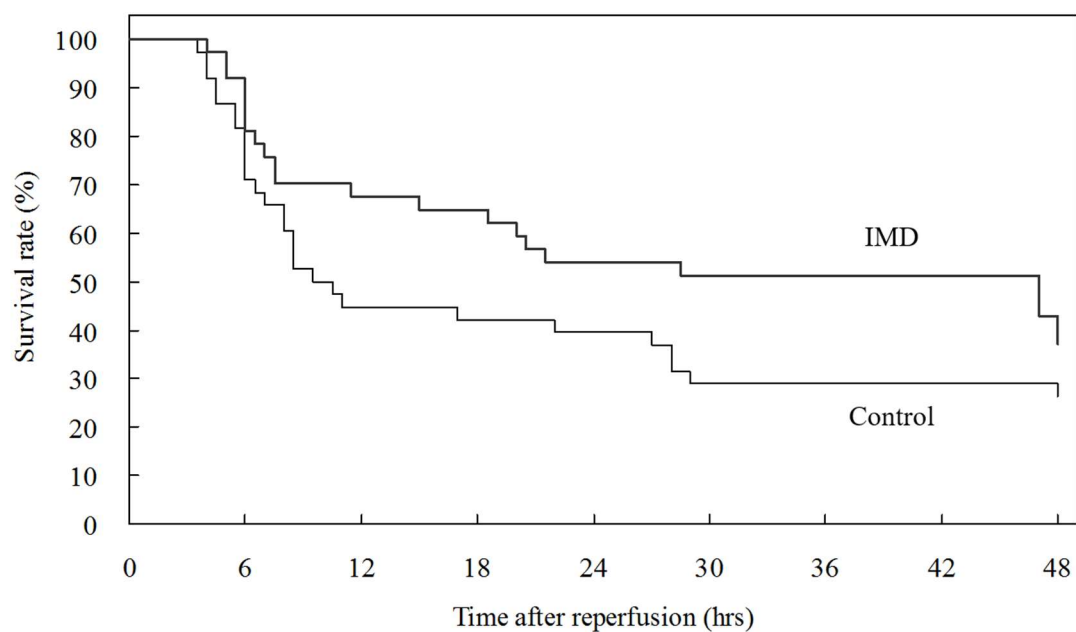


Figure 2-5. 60 分間の腸管虚血後の生存曲線.

生存期間については、IMD 群が Control 群よりも長い傾向にあったが、両群間に有意差はなかった (Log-rank 検定)。しかしながら、IMD 群では、再灌流後 12 時間および 30 時間における生存率が Control 群と比較して有意に高かった。

Table 2-2. 体重変化量および摂餌量（実験 3）.

Hour	Body weight (g)	Food intake (g)	Diet source
-24 hr	14.6 ± 1.0	2.7 ± 0.4	Chow
0 hr	14.4 ± 0.8	2.9 ± 0.4	CDE diet
24 hr	13.2 ± 0.8 ‡	0.2 ± 0.3 ‡	Control diet
48 hr	13.0 ± 1.2 ‡	1.2 ± 0.9 ‡	
72 hr	13.9 ± 1.5	2.4 ± 0.7	
96 hr	14.7 ± 1.4	2.9 ± 0.4	

表中の値は平均値 ± 標準偏差. ‡ p < 0.01, vs. -24 hr.

Table 2-3. 膵臓重量および血漿中アミラーゼ値（実験 3）.

Hour	Pancreas (g)	Amylase (U/l)
-24 hr	0.136 ± 0.025	2107 ± 510
0 hr	0.170 ± 0.017 ‡	2193 ± 1039
24 hr	0.163 ± 0.012 †	10927 ± 6946 ‡
48 hr	0.117 ± 0.012	12445 ± 24953
72 hr	0.123 ± 0.011	1561 ± 269
96 hr	0.122 ± 0.019	1456 ± 255 †

表中の値は平均値 ± 標準偏差. † p < 0.05, ‡ p < 0.01, vs. -24 hr.

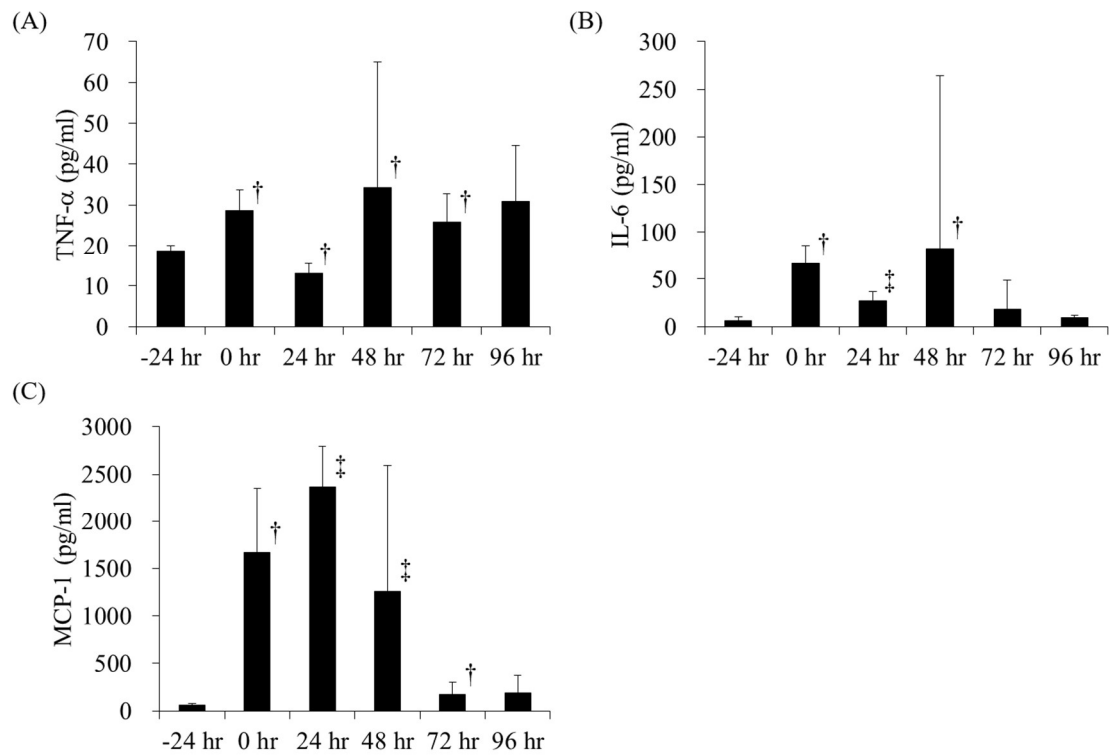


Figure 2-6. 血漿中炎症マーカーの値（実験3）。

(A) 血漿中 TNF- α 値、 (B) 血漿中 IL-6 値、 (C) 血漿中 MCP-1 値。

図中の値は平均値 \pm 標準偏差. † $p < 0.05$, ‡ $p < 0.01$, vs. -24 hr.

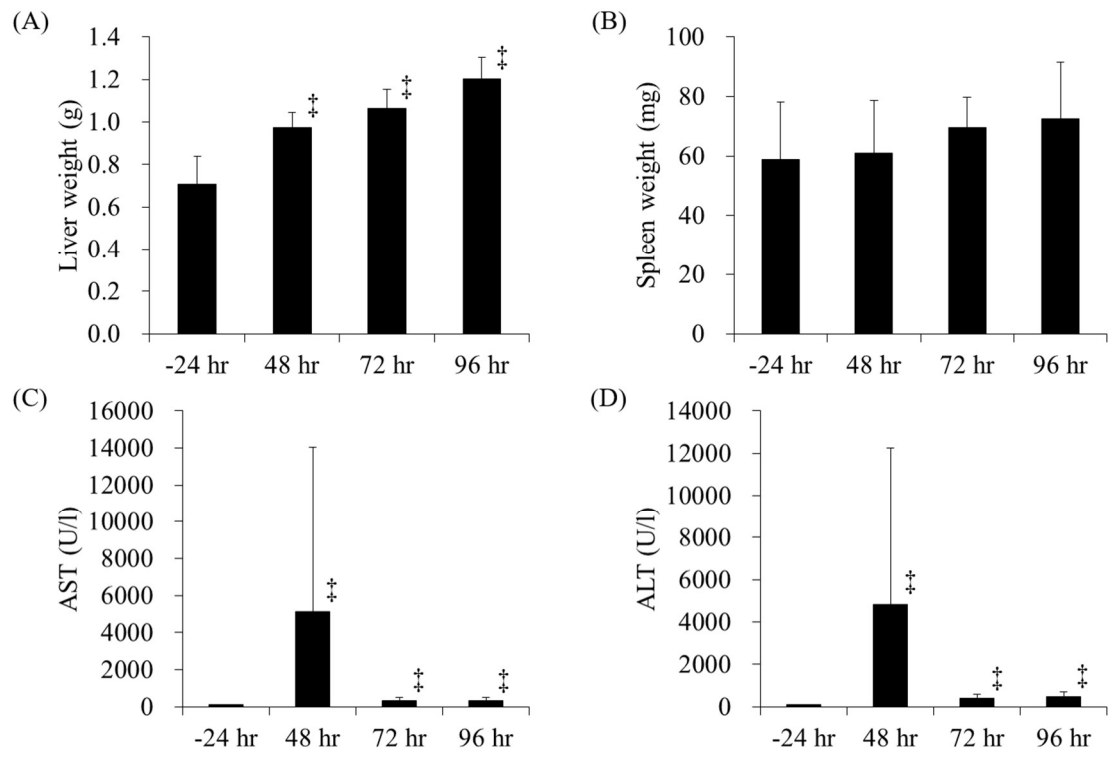


Figure 2-7. 遠隔臓器障害の発症（実験3）.

(A) 肝臓重量、(B) 脾臓重量、(C) 血漿中 AST 値、(D) 血漿中 ALT 値.

図中の値は平均値 ± 標準偏差. † p < 0.05, ‡ p < 0.01, vs. -24 hr.

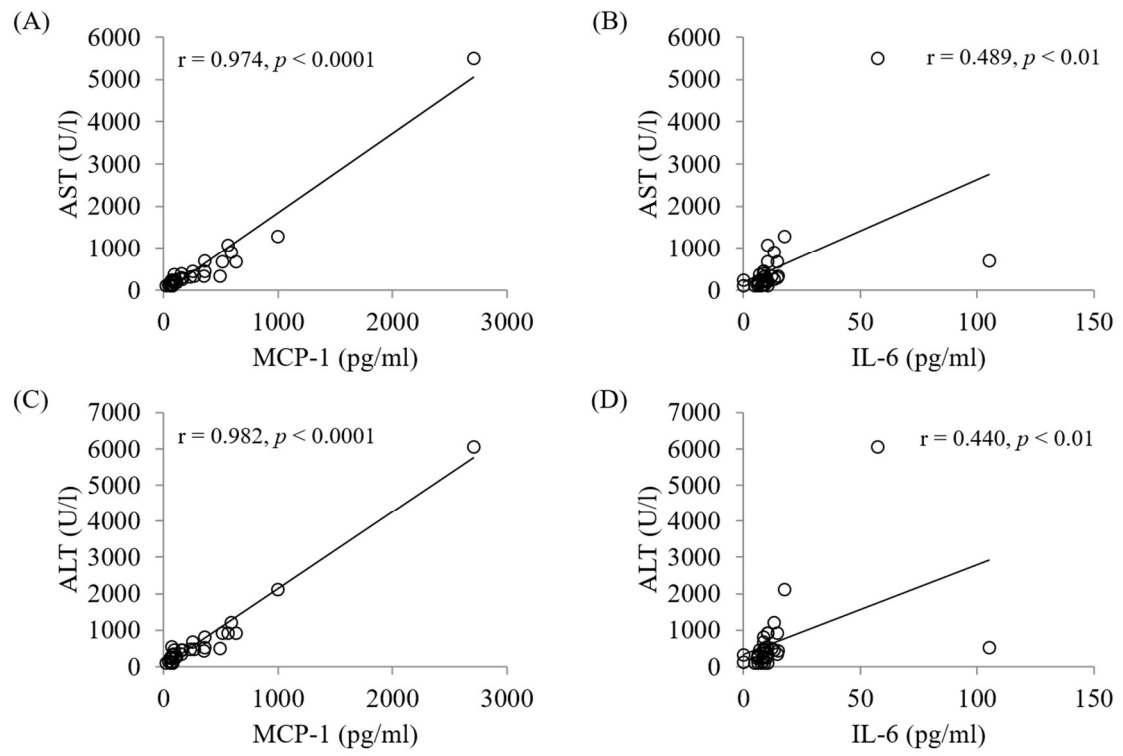


Figure 2-8. 血漿中 MCP-1 値、IL-6 値と血漿中 AST 値、ALT 値との相関 (実験 3) .

Table 2-4. 膵臓重量および血漿中アミラーゼ値（実験 4）.

Hour	Pancreas (g)		Amylase (U/l)	
	Control	IMD	Control	IMD
-24 hr	0.124 ± 0.024		2366 ± 954	
72 hr	0.115 ± 0.015	0.114 ± 0.013	1326 ± 247 ‡	1381 ± 371 †
96 hr	0.107 ± 0.022	0.113 ± 0.017	1542 ± 287 †	1566 ± 238 †

表中の値は平均値 ± 標準偏差. † p < 0.05, ‡ p < 0.01, vs. -24 hr.

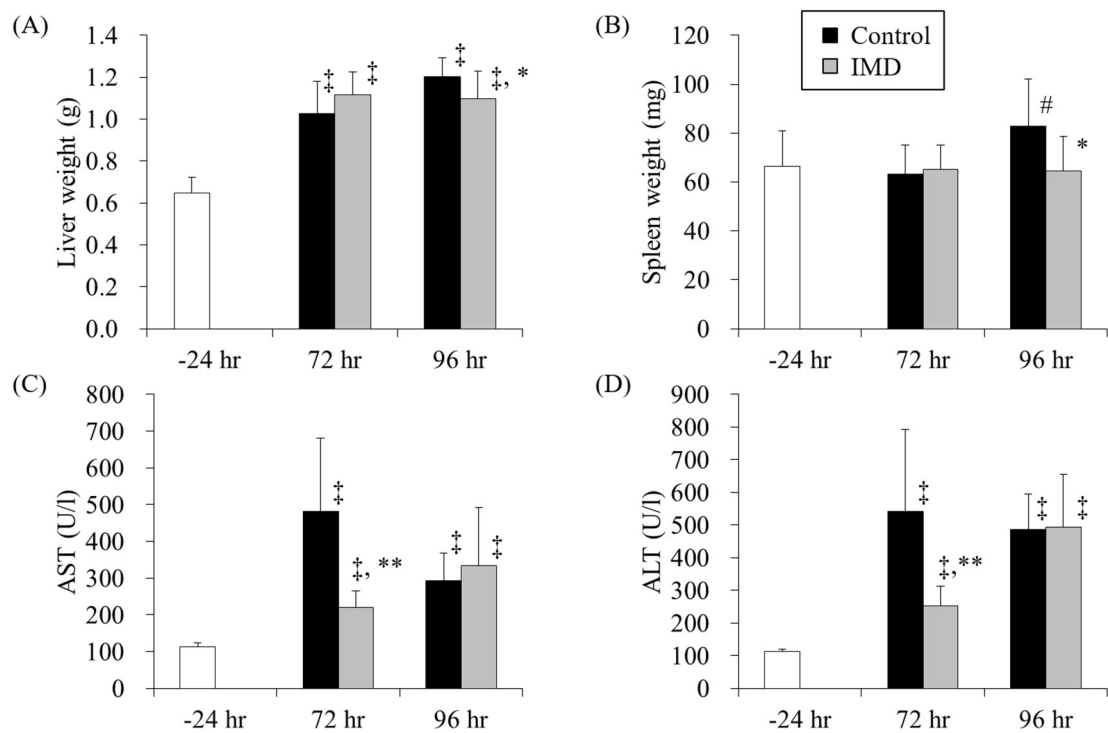


Figure 2-9. 遠隔臓器障害の発症（実験4）。

(A) 肝臓重量、(B) 脾臓重量、(C) 血漿中AST値、(D) 血漿中ALT値。

図中の値は平均値 ± 標準偏差。# $p < 0.1$, † $p < 0.05$, ‡ $p < 0.01$, vs. -24 hr. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. Control 群。

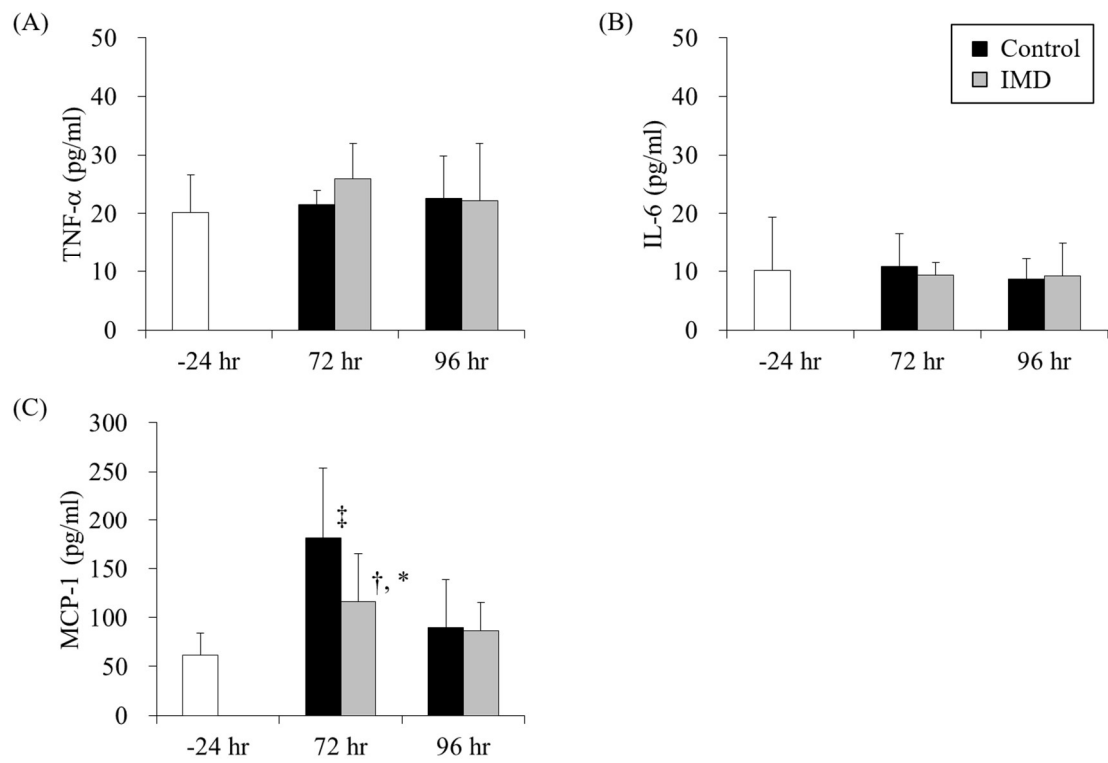


Figure 2-10. 血漿中炎症性メディエーターの値（実験 4）.

(A) 血漿中 TNF- α 値、 (B) 血漿中 IL-6 値、 (C) 血漿中 MCP-1 値.

図中の値は平均値 \pm 標準偏差. † $p < 0.05$, ‡ $p < 0.01$, vs. -24 hr. * $p < 0.05$, vs.

Control 群.

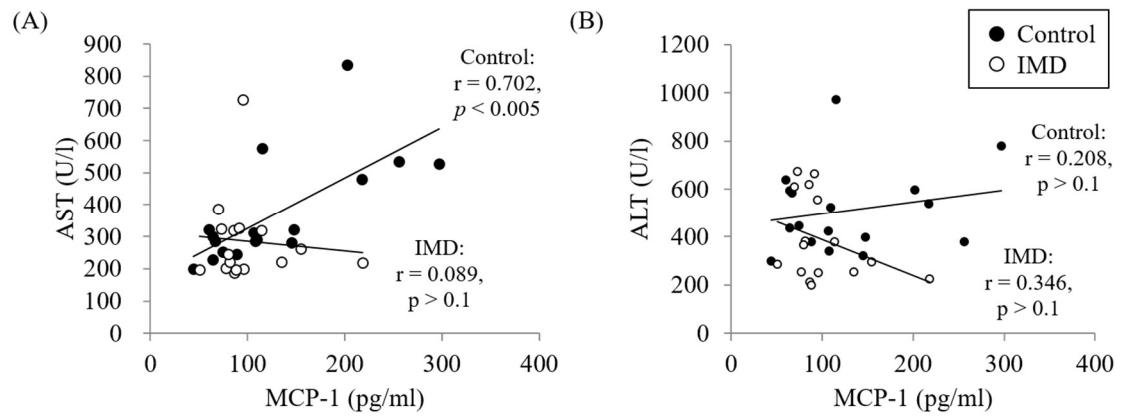


Figure 2-11. 血漿中 MCP-1 値と血漿中 AST 値、ALT 値の相関（実験 4）。

第3章 がん悪液質に対する化学療法と免疫調整流動食を用いた栄養管理の効果

第1節 緒言

がん悪液質は、体重および骨格筋量の進行性の減少を特徴とする多因子症候群である (Figure 1-1) [6]。筋肉量の減少は進行がん患者によくみられ、がん患者の死亡率や治療成績の悪化、化学療法の副作用発現上昇、疲労、QOL悪化と関連している [6, 8]。そのため、がん治療中の悪液質の発症や進行を防ぐことが重要である。

がん悪液質は代謝異常や食欲不振と関連しており、栄養介入による改善が試みられている。しかし、効果的な栄養介入方法は十分に確立されていない。前悪液質のがん患者に対しての栄養サポートは、がん患者の栄養状態の安定化に有効であることが明らかにされている [64, 65]。しかしながら、進行性の悪液質患者に対して、一般的な栄養サポートでは栄養状態を有意には改善できないと考えられている。というのも、これらの患者には全身性の炎症が存在しており、体タンパク質の同化が阻害されているからである [66, 67]。これまでに全身性炎症反応は、がん悪液質の発症に重要な役割を果たすことが示されている [67, 68]。がん患者では、IL-6 や TNF- α 、プロスタグランジン E₂ (PGE₂; prostaglandin E₂) といった、炎症性のサイトカインやエイコサノイドの血中濃度が高い [69-71]。

がんの進行が抑えられない限り、がん悪液質は悪化していくことから、悪液質を治す最善の方法は、がんを治すことである。近年、がん悪液質に対しては、抗がん治療に加えて、悪液質に対する薬物療法、栄養、非薬物治療等を組み合わせた集学的治療が検討されており、それぞれの単独療法よりも有効である可能性がある

[72]。しかし、がん悪液質患者を対象に、抗炎症薬や栄養補助食品、Immunonutrients を使用した様々な支持療法が検討されているが、これらの研究は確固たる結論には至っていない [73]。抗炎症薬を用いた薬物治療では、コルチコステロイド、インドメタシンなどの非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs; non-steroidal anti-inflammatory drugs）、シクロオキシゲナーゼ（COX; cyclooxygenase）-2 選択的阻害薬などが検討されている。しかしながら、これらの薬剤は消化管および心血管合併症などに対して重篤な副作用を有しており、臨床的な成績が安定していないため、長期使用に対する不安が依然として残っている。以上を踏まえると、がん治療中の早期時点で全身性炎症を調節する栄養療法を実施することで、がん悪液質を予防することが可能になると考えられた。

そこで第 3 章では、がん悪液質に対する免疫調整流動食を用いた栄養管理の有用性を明らかにするため、マウス結腸がん細胞株 Colon 26 移植担がんモデルにおいて、化学療法と免疫調整流動食の併用ががん悪液質を予防できるかどうかを検討した。さらに、免疫調整流動食が抗がん剤の抗腫瘍効果に悪影響を及ぼしうるか否かについても検討した。なお本研究では、抗がん剤として 5-フルオロウラシル（5-FU; 5-fluorouracil）を用いて検討を行った。5-FU は、DNA 合成に必要なウラシルに類似した分子構造を持ち、細胞増殖に必要な DNA 合成を阻害して抗腫瘍効果をあらわす代謝拮抗薬であり、大腸がんや食道がん、胃がん、乳がん等の化学療法で一般的に用いられる [74]。

第 2 節 材料および方法

試薬

5-FU およびカルボキシメチルセルロースナトリウムは、和光純薬工業株式会社

から購入した。

細胞

マウス結腸がん細胞株 Colon26 細胞 (BALB/c マウス由来) は、財団法人癌研究会より入手した。Colon 26 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FCS; fetal calf serum)、L-グルタミン添加 RPMI (roswell park memorial institute) 培地 (Invitrogen) で継代培養を数回行った後、細胞の移植に用いた。

動物

実験動物は、6 週齢の雄性 BALB/c マウス (日本 SLC) を用いた。実験動物の飼育は、温度 $21.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55.0 \pm 15.0\%$ 、12 時間毎の明暗サイクル (明期: 7-19 時) に設定された環境下にて実施した。実験期間中を通じて、飼料と飲料水は自由摂取とした。また、実験を開始する前にマウスは市販の非精製飼料の chow (CRF-1; オリエンタル酵母工業) にて 1 週間馴化させた。本研究における動物実験はすべて、株式会社 明治の動物実験倫理審査委員会の承認を受け、委員会の定める「動物実験における倫理規程」に則って行った。

実験スケジュール

馴化後、40 匹のマウスを担がん対照群 (TB)、低用量 5-FU・汎用流動食群 (LF/ST)、低用量 5-FU・免疫調整流動食群 (LF/IMD)、高用量 5-FU・汎用流動食群 (HF/ST) ならびに高用量 5-FU・免疫調整流動食群 (HF/IMD) の 5 群に無作為に割り付けた ($n = 8$) (Figure 3-1)。マウスには Colon 26 細胞を 5×10^5 個 (0.1 mL PBS に懸濁)、右側腹部に皮下移植した (day 0)。Day 1 から day 13 まで、LF および HF マ

ウスにはそれぞれ 5-FU を 30 mg/kg 体重（低用量）および 60 mg/kg 体重（高用量）の用量で週 3 回経口投与した。なお、5-FU は 0.5% カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液に溶解して投与した。ST 群には汎用流動食（以下、ST）（メイバランス®1.0、株式会社 明治）の凍結乾燥粉末を、IMD 群には免疫調整流動食（メイン®、株式会社 明治）の凍結乾燥粉末を 3 週間自由摂取させた。飼料組成を Table 3-1 に示す。TB 群には、溶媒（0.5% カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液）のみを経口投与し、ST を自由摂取させた。摂餌量および体重を週 2 回測定し、腫瘍の大きさ（長径および短径）を day 14 および day 21 に測定した。腫瘍体積は $ab^2/2$ の式を用いて推定した（a と b はそれぞれ腫瘍の長径と短径である）。マウスを day 21 に安楽死させ、血液および組織を採取した。なお、予備試験では、Colon 26 細胞（ 1.0×10^6 個）を担がんマウス（TB）の右側腹部に皮下移植した（day 0）。非担がん（NTB; n = 4）および TB（n = 10）マウスに ST を 21 日間自由摂取させた後、day 21 に安楽死させ、血液および組織を採取した（Figure 3-1）。

血漿中 PGE₂、サイトカイン、グルコースおよび血管内皮増殖因子 (VEGF; vascular endothelial growth factor) 濃度の測定

血漿中サイトカイン濃度は、マウス CBA inflammation kit（BD Biosciences）を用いて、488 nm レーザーを備えたフローサイトメーター（FACSCalibur ; BD Immunocytometry Systems）で、プロトコルに従って分析した。また血漿中 PGE₂ および VEGF 濃度は、市販の精製キットおよび enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) キット（Cayman Chemical および R&D Systems）を用いて ELISA 法により測定を行った。血漿中グルコース濃度は、自動分析装置（富士ドライケム

3500 ; 富士フィルム) を用いて酵素法により測定した。

統計

TB 群と他の群との差は、**Bartlett** の等分散性の検定を行い、等分散性が仮定できる場合は **Dunnett** 検定を、仮定できない場合は **Steel** 検定により検定した。また、5-FU 同用量の群間で比較を行う場合は、正規性について **Shapiro-Wilks** 検定、分散について **F** 検定を用いて行った後、正規分布している場合、等分散データについては **Student** の **t** 検定を、仮定できない場合は **Welch** の **t** 検定を用いた。正規分布しないデータには **Mann-Whitney** の **U** 検定を用いた。差は $p < 0.05$ で有意とした。

第 3 節 結果

体重、腫瘍重量および組織重量

予備試験では、TB マウスの最終体重は NTB マウスに比べて減少する傾向が認められた (Table 3-2)。NTB 群に比べて、TB 群では、最終体重、除腫瘍体重およびその変化量が有意に低かった。TB 群では、体重および除腫瘍体重に加えて、筋肉量および脂肪量も減少した。

本試験では、試験開始時の体重は 5 群間で有意差は認められなかった (Table 3-3)。TB 群の腫瘍は day 14 以降急速に増大し始めたが、5-FU 投与により腫瘍体積は用量依存的に減少した (Figure 3-2)。Day 21 における腫瘍体積は LF/ST 群以外の 3 群、すなわち HF/ST 群、HF/IMD 群、LF/IMD 群において TB 群に対して有意に小さかった。しかし、抗がん剤が同用量の群間、すなわち、LF/ST 群と LF/IMD 群の低 FU 群同士、または HF/ST 群と HF/IMD 群の高 FU 群同士で比較したとこ

ろ、汎用流動食を摂取した群と免疫調整流動食を摂取した群の腫瘍重量に有意な差はなかった (Figure 3-2 および Table 3-3)。

また TB 群の体重および除腫瘍体重は実験期間を通じて減少していった。Day21 の体重および除腫瘍体重は、抗がん剤高用量の 2 群 (HF/ST 群および HF/IMD 群) が TB 群と比較して有意に大きく、抗がん剤低用量でも免疫調整流動食を摂取させた LF/IMD 群で大きい傾向にあった (Table 3-3)。さらに、試験前後での体重および除腫瘍体重の変化量を解析したところ、高 FU の 2 群に加えて、LF/IMD 群においても、体重および除腫瘍体重の変化量が TB 群よりも有意に高かった (Figure 3-3)。なお、総摂取エネルギー量については群間で有意差は認められなかった (Table 3-3)。

骨格筋重量も、高 FU の 2 群と LF/IMD 群で有意に高かった (Figure 3-4A)。さらに、抗がん剤同用量の群間で比較したところ、骨格筋重量は汎用流動食を摂取した群よりも免疫調整流動食を摂取した群で有意に高かった (Figure 3-4A)。また脂肪重量は、HF/ST 群と HF/IMD 群で他の群より有意に高かった (Figure 3-4B)。

血漿中 PGE₂、サイトカイン、グルコースおよび VEGF 濃度

Colon 26 担がんマウスにおいて、血漿中 IL-6、PGE₂、VEGF 濃度が有意に上昇し、血漿中グルコース濃度が腫瘍の進行と関連して有意に低下することが、いくつかの研究で示されている [75-77]。また、予備試験においても、血漿中 IL-6、PGE₂、VEGF 濃度の上昇や、血漿中グルコース濃度の低下が確認された (Table 3-2)。

本試験の結果、血漿中 PGE₂ および IL-6 濃度は、HF/IMD 群が TB 群より低い傾向にあった (Figure 3-5)。さらに、抗がん剤同用量の群間で比較したところ、LF/IMD 群および HF/IMD 群の血漿 PGE₂ 濃度は、LF/ST 群および HF/ST 群よりも有意に

低かった (Figure 3-5A)。なお、TNF- α 、IFN- γ 、IL-12p70、IL-10 も測定したが、その濃度は非常に低く、群間に有意差は認められなかった (data not shown)。血漿中グルコース濃度は、HF/IMD 群のみが TB 群よりも有意に高かった (Figure 3-6A)。血漿中 VEGF 濃度は、HF/ST 群および HF/IMD 群に加えて LF/IMD 群において、TB 群よりも有意に低かった (Figure 3-6B)。血漿中 VEGF 濃度は、体重変化量、除腫瘍体重変化量、および骨格筋重量と有意に負の相関を示し (それぞれ $R = -0.550$ 、 -0.652 および -0.620 ; $p < 0.001$)、IL-6 も体重変化量および除腫瘍体重変化量と有意に負の相関を示し ($r = -0.465$ および -0.456 、 $p < 0.01$)、骨格筋重量とも弱く負の相関を示す傾向があった ($r = -0.286$ 、 $p = 0.09$)。血漿中 PGE₂ 濃度は骨格筋重量と有意に負の相関を示した ($r = -0.327$ 、 $p < 0.05$)。

第 4 節 考察

本試験では、5-FU 投与量依存的に除腫瘍体重および骨格筋重量を維持することができた。さらに、5-FU と免疫調整流動食を併用することで、5-FU の上記作用が増強され、血漿中の炎症メディエーター濃度も減少した。一方、免疫調整流動食による栄養管理は 5-FU の抗腫瘍効果を阻害しなかった。今回の結果から、がん悪液質の成因および進行を予防するには腫瘍の制御が不可欠であり、かつ、化学療法中に免疫調整流動食による特別な栄養療法を施すことで、がん悪液質をより効果的に予防できる可能性が *in vivo* で示された。本研究の長所の 1 つは、化学療法中の支持療法として、免疫栄養療法が有効であることを明らかにしたことである。これまでに検討されてきた栄養療法に関する研究のほとんどは、栄養療法単独での効果を論じるのみであり、化学療法や放射線治療といった一般的ながん治療との併用効果について検討されていなかった。

これまでの研究では、免疫調整流動食が急性炎症を抑制することが示されていたが [31, 41, 42]、本研究の結果、免疫調整流動食が、がん起因する慢性炎症を抑制することが初めて示された。抗がん剤と免疫調整流動食の併用が抗炎症作用を有することが示されたが、その一方で低用量の 5-FU と免疫調整流動食を併用しても PGE₂ と IL-6 は有意に低下しなかった。その理由の一つとして、低用量の 5-FU 投与では抗がん剤の抗腫瘍効果が不十分であり、血漿中 PGE₂ 濃度および IL-6 濃度について個体によるばらつきが大きかったことが考えられた。

がん誘発性慢性炎症の抑制に寄与した因子として、第 2 章の研究と同様に、免疫調整流動食に含まれている ω -3 多価不飽和脂肪酸、抗酸化ビタミンおよびミネラルといった Immunonutrients や、ホエイペプチドといった抗炎症性の成分の組み合わせが考えられた。先行研究では、 ω -3 多価不飽和脂肪酸、特にエイコサペンタエン酸 (EPA) は、がん患者の炎症反応を低減させることにより抗異化作用を有することが示されている [44]。まだ十分な知見が得られていないが、EPA にはがん患者の体重や除脂肪体重の増加に対しても有効であることも示唆されている [78, 79]。また、dysbiosis が、がん悪液質に影響することも報告されている [80, 81]。がん悪液質では *Lactobacillus* が減少し、*Enterobacteriaceae* や *Parabacteroides* が増えており、この dysbiosis によって全身性炎症や腸管バリア機能障害が惹起され、筋肉減少およびがん悪液質が誘発される [81]。免疫調整流動食には、タンパク質源としてホエイペプチドだけでなく、乳酸菌発酵物も配合されている。一方で、ヨーグルトなどの発酵乳や一部の乳酸菌には、腸内環境を改善するだけでなく、免疫反応を調節したり、抗炎症作用を示すことが報告されている [53, 54]。そのため、免疫調整流動食に配合されている乳酸菌発酵物も、腸内環境の変化を通じて、炎症反応を低減させ、抗異化作用を発揮している可能性が考えられた。

がん悪液質では、骨格筋におけるタンパク質合成の低下とタンパク質分解の増加により、筋萎縮が起こる [67]。タンパク質合成は、分岐鎖アミノ酸 (BCAA; branched chain amino acid) のような特殊な栄養素によって亢進される。BCAA の 1 つであるロイシンは、MAC16 細胞移植担がんマウスにおいて体重減少を減弱させる作用が強いことが報告されている [82]。しかし、本研究で使用した免疫調整流動食は、汎用流動食と同程度のロイシン含量であった (免疫調整流動食 : 0.44 g/100 kcal、汎用流動食 : 0.39 g/100 kcal)。したがって、免疫調整流動食による筋肉量維持について、配合されているロイシン含量の違いが寄与した可能性は低いと考えられた。一方で、免疫調整流動食にロイシンを添加するような改良を加えることでタンパク質合成を高め、より筋肉量を維持できるかについては、今後の検討課題である。また、免疫調整流動食と汎用流動食それぞれに、配合されたタンパク質量の違いが筋肉量維持に寄与した可能性も考えられた。しかしながらこの点については、免疫調整流動食と同じタンパク質量である別の汎用流動食を用いた検討も行っており、その結果、本研究と同様に免疫調整流動食の摂取によって体重や筋肉量が維持できることを確認した [83]。このことから、タンパク質量の違いが、今回の結果に寄与した度合は大きくないと考えられた。

骨格筋におけるタンパク質分解は、がん悪液質患者では炎症性メディエーターや、腫瘍から分泌される悪液質誘導因子 (タンパク質分解誘導因子 (PIF; proteolysis-inducing factor)) によって誘導される [67, 84]。これまでに、Colon 26 誘発悪液質モデルのみならず [76, 77, 85, 86]、臨床試験においても [69-71]、悪液質に伴って PGE₂ および IL-6 が上昇することが示され、PGE₂ と IL-6 ががん悪液質の発症に重要なメディエーターと考えられている。今回の動物実験モデルでは、Colon 26 細胞または炎症性マクロファージによって産生される PGE₂ が、悪液質

に関連する因子の1つであることが知られている [87]。また、COX-2 を介して誘導される PGE₂ は、臨床試験および動物実験において、筋タンパク分解に関与していることが示されている [87-90]。COX 阻害薬は、PGE₂ によって誘導されるタンパク質分解を低下させる作用が強く、がん患者ではプラセボ薬と比較して体重を増加させることが報告されている [91, 92]。さらに最近の研究では PGE₂ は、COX-2 と共に、がんの予後不良と相関するバイオマーカーとなることが明らかになった [93-95]。

炎症性サイトカイン IL-6 は、悪液質における筋肉分解にも関与していることがヒトと動物実験の両方で示唆されている [96]。IL-6 はまた、酸化およびリポ蛋白リパーゼ活性を介して脂質代謝にも影響を及ぼす。Colon 26 担がんマウスでは、筋肉の萎縮と共に血中 IL-6 が増加しており、IL-6 阻害によってユビキチン経路とリソソーム経路の両方の筋分解経路を低下させることができる。さらにこのがん悪液質モデルにおいて、IL-6 の増加は重度の体重減少や、低血糖、高カルシウム血症などの代謝異常と有意に相関していることが報告されている [85, 97]。本研究でもまた、高用量の 5-FU と免疫調整流動食の併用が低血糖を改善することを示した。

本研究では、VEGF は体重および除腫瘍重量、骨格筋重量の変化と有意に相関した。VEGF は血管新生促進因子であることが知られており、腫瘍の増殖と転移に関与している。近年、VEGF は悪液質の進行に関与し、結腸がん患者の体重減少の独立した予測因子であることが示されている [98]。VEGF の増加はまた、卵巣がん患者の栄養障害や炎症と相関することが明らかにされている [99]。VEGF の高値は、IL-6 および TNF- α と同様に、安静時エネルギー消費量の増加、体重減少および栄養摂取量の減少の主要な決定因子であることも報告されている [71]。

以上の知見を踏まえると、本研究において、化学療法と免疫調整流動食の併用が除脂肪体重および筋肉重量の減少を抑えた機序として、筋肉においてタンパク質合成刺激が惹起されたのではなく、PGE₂やIL-6、VEGFといった炎症性メディエーターの抑制を介してタンパク質分解反応を減弱させたことによるものであると仮説付けられた。

炎症性サイトカインは、ユビキチン-プロテアソーム経路を活性化することにより、筋タンパク質分解を増加させる。骨格筋の萎縮は、筋特異的なAtrogin-1 (MAFbxとも呼ばれる) および muscle RING finger protein 1 (MuRF-1) の誘導を介して起こる。これらは、ユビキチン-プロテアソーム経路を介して筋原線維および細胞内タンパク質を分解するため、筋萎縮の鋭敏なマーカーであることが知られている [100]。したがって、上述の仮説を確認するためには、免疫調整流動食が骨格筋における Atrogin-1 または MuRF-1 の上昇を低下させるかどうかをさらに検討する必要がある。

また、腫瘍から分泌され、体重減少と相関する悪液質誘導物質である PIF は、PGE₂の増加を介してタンパク質分解を刺激することが示されている [84, 90]。さらに、がん悪液質時の筋萎縮には NF-κB の活性化が重要であることが、実験的および臨床研究で確認されている [67, 101]。前述したように、我々の研究グループは肝炎モデルにおいて免疫調整流動食が NF-κB および Stat 3 の活性化を抑制することで抗炎症作用を有することを明らかにしている [28]。したがって、免疫調整流動食も PIF を抑制する可能性があるが、さらなる研究が必要である。

また今回、除脂肪体重および筋肉重量に差がついた原因として、食事摂取量の差が寄与した可能性は低いと考えられる。というのも、Colon 26 担がんマウスでは食欲不振は起こらないことが示されており、今回の試験でも総摂取エネルギー量

は群間で差が認められなかった [77]。一方で本研究では、5-FU を投与した 4 群の総摂取エネルギー量は、有意ではなかったが TB 群よりも低かった。この結果は、5-FU の食欲抑制効果が影響したと考えられた。本研究では、免疫調整流動食の効果が摂餌量の減少に影響されないように、摂餌量が減少しない悪液質モデルを選択したが、一方で食欲不振の治療はがん患者の生活の質 (QOL) に非常に重要であることから、食欲不振が誘発されるがん悪液質モデルにおける免疫調整流動食の効果についても、今後検討が必要と考えられる。

体重減少はがん患者の 30%~80%以上で起こり、その一部は診断時にはすでに重度 (10%超) であると報告されている [66]。さらに、体重減少はがん治療成績にも影響を及ぼし、患者の QOL の重要な決定因子である [1]。今回の実験では、化学療法と免疫調整流動食の併用によって体重と筋肉量が維持されたことから、これらの併用が、がん患者の治療コンプライアンスにも有益である可能性が示された。結論として、免疫調整流動食による栄養管理は、抗がん剤の効果を減弱することなく、がん悪液質を予防するために有用である可能性が示された。今後、この機序をさらに明らかにし、ヒトにおける効果を検証する臨床試験が必要であるが、本研究で得られた知見はがん悪液質に対する新しい栄養療法につながると考えられる。

Table 3-1. 飼料組成（100 kcal あたり）.

	Control enteral diet	IMD
Proteins (g)	4	5
Protein (% kcal)	16	20
Protein Sources	Na caseinates, milk protein	whey-hydrolyzed peptide, fermented milk
Carbohydrates (g)	15.5	14.5
Carbohydrates (% kcal)	59	55
CHO Sources	dextrin	dextrin, isomaltulose
Lipids (g)	2.8	2.8
Lipids (% kcal)	25	25
MCT (g)	-	0.59
EPA, DHA (g)	-	0.06
n-6 / n-3	3.2	2
<i>Vitamins</i>		
Vitamin A (μg RE)	60	150
Vitamin D (μg)	0.5	0.75
Vitamin E (mg)	3	5
Vitamin K (μg)	3.1	3.4
Vitamin B1 (mg)	0.15	0.25
Vitamin B2 (mg)	0.2	0.3
Niacin (mg)	1.6	3
Vitamin B6 (mg)	0.3	0.3
Vitamin B12 (μg)	0.6	0.6
Folic acid (μg)	50	50
Biotin (μg)	15	7.5
Vitamin C (mg)	16	50
Choline (mg)	1.7	9.2

(次ページに続く)

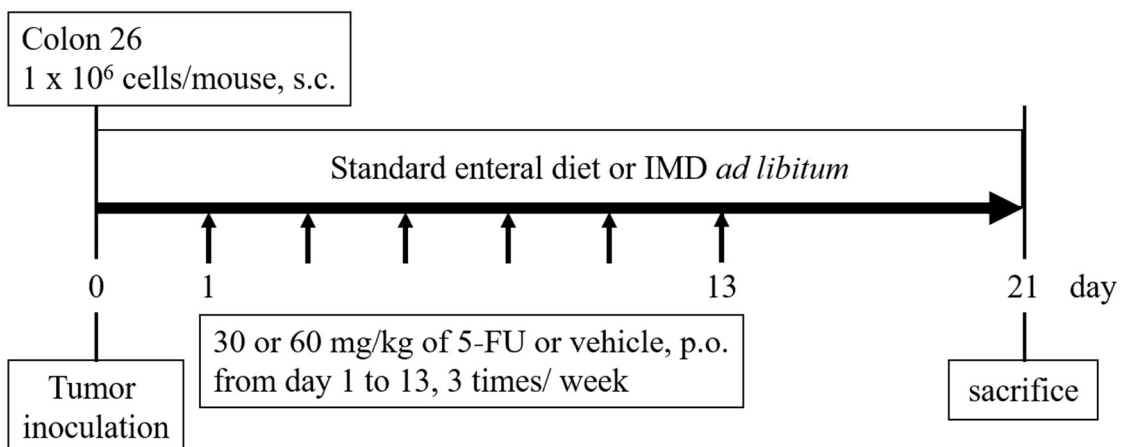
Table 3-1. 飼料組成（100 kcal あたり）（続き）。

	Control enteral diet	IMD
<i>Minerals</i>		
Sodium (mg)	110	70
Potassium (mg)	100	80
Calcium (mg)	60	80
Magnesium (mg)	20	20
Phosphorus (mg)	60	70
Iron (mg)	1	1
Zinc (mg)	0.8	1
Copper (mg)	0.08	0.05
Manganese (mg)	0.2	0.175
Chromium (μg)	3	2.96
Molybdenum (μg)	2.5	2.5
Selenium (μg)	3.5	5
Iodine (μg)	15	9.7
Chloride (mg)	140	80

MCT: medium chain triglycerides, EPA: eicosapentaenoic acid; DHA:

docosahexaenoic acid, RE: retinol equivalent, -: no additives or unknown, CHO:

carbohydrates.



1. Colon 26 + vehicle + standard diet (TB (control) group)
2. Colon 26 + Low dose of 5-FU (30 mg/kg) + standard diet (LF/ST group)
3. Colon 26 + Low dose of 5-FU (30 mg/kg) + IMD (LF/IMD group)
4. Colon 26 + High dose of 5-FU (60 mg/kg) + standard diet (HF/ST group)
5. Colon 26 + High dose of 5-FU (60 mg/kg) + IMD (HF/IMD group)

Figure 3-1. 実験プロトコル.

5-FU: 5-fluorouracil, IMD: Immune-modulating diet.

Table 3-2. 予備検討における体重、臓器重量、血漿中炎症マーカー.

	NTB (n = 4)	TB (n = 10)
Initial body weight (g)	20.5 ± 0.8	21.2 ± 1.4
Final body weight (g)	24.2 ± 0.9	21.2 ± 2.7 ^a
Tumor weight (g)	-	1.6 ± 0.4
Carcass weight (g)	24.2 ± 0.9	19.6 ± 2.9 ^{**}
Final body weight gain (g)	3.6 ± 2.0	0.0 ± 2.2 [*]
Carcass weight gain (g)	3.6 ± 2.0	-1.6 ± 2.3 ^{**}
Tibialis anterior muscle (mg)	45.5 ± 1.7	34.8 ± 4.6 ^{**}
Epididymal fat (mg)	254.3 ± 76.2	72.9 ± 80.4 ^{**}
Prostaglandin E ₂ (pg/ml)	227.3 ± 109.3	650.4 ± 398.7 ^b
Interleukin-6 (pg/ml)	0.0 ± 0.0	281.4 ± 384.3 [*]
Glucose (mg/dl)	219.8 ± 36.5	152.4 ± 44.7 [*]
Vascular endothelial growth factor (pg/ml)	64.6 ± 13.5	119.8 ± 18.1 ^{**}

表中の値は平均値 ± 標準偏差.

^a p = 0.059, ^b p = 0.063, * p < 0.05, ** p < 0.01, vs. NTB 群.

Table 3-3. 体重・臓器重量・総摂取エネルギー量.

	TB	LF/ST	LF/IMD	HF/ST	HF/IMD
Initial body weight (g)	20.6 ± 1.2	20.6 ± 1.2	20.6 ± 1.0	20.6 ± 0.9	20.6 ± 0.9
Final body weight (g)	20.4 ± 2.6	22.6 ± 2.4	23.2 ± 2.4 ^a	23.5 ± 2.0 [*]	23.5 ± 1.0 [*]
Tumor weight (g)	1.9 ± 0.2	1.9 ± 0.7	1.8 ± 0.4	1.0 ± 0.47 ^{**}	0.8 ± 0.19 ^{**}
Carcass weight (g)	18.4 ± 2.7	20.7 ± 2.8	21.5 ± 2.6 ^b	22.5 ± 2.3 ^{**}	22.7 ± 1.1 ^{**}
Total calorie intake (kcal)	212.2 ± 39.0	209.8 ± 13.3	209.8 ± 18.5	207.4 ± 22.0	205.0 ± 12.0

表値は平均値 ± 標準偏差. n = 7 or 8.

^a p = 0.051, ^b p = 0.059, * p < 0.05, ** p < 0.01, vs. TB 群.

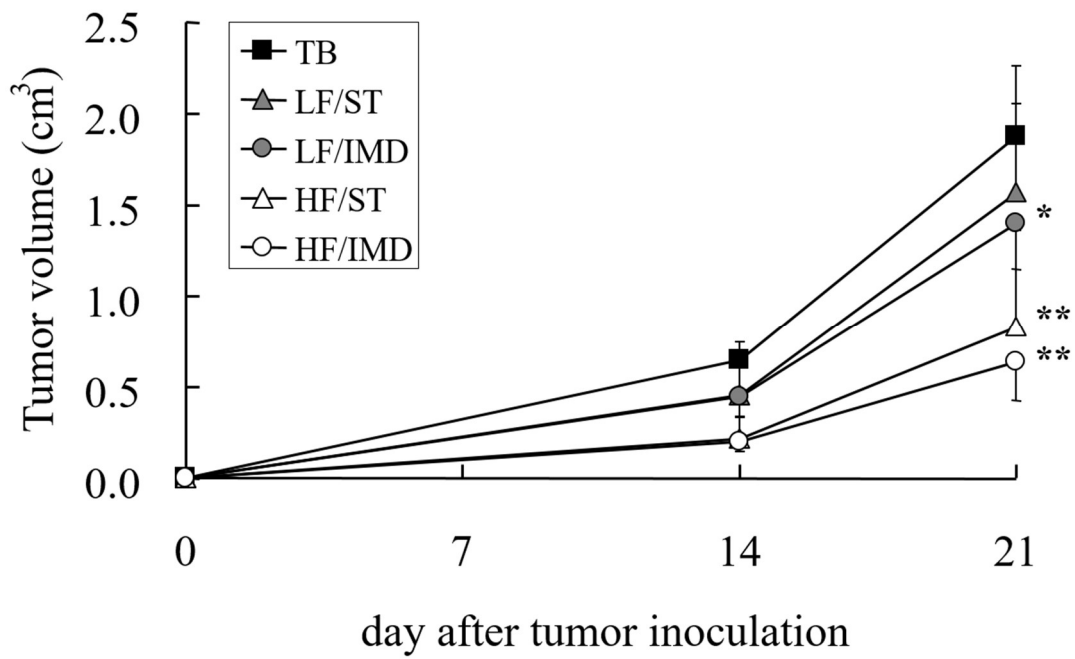
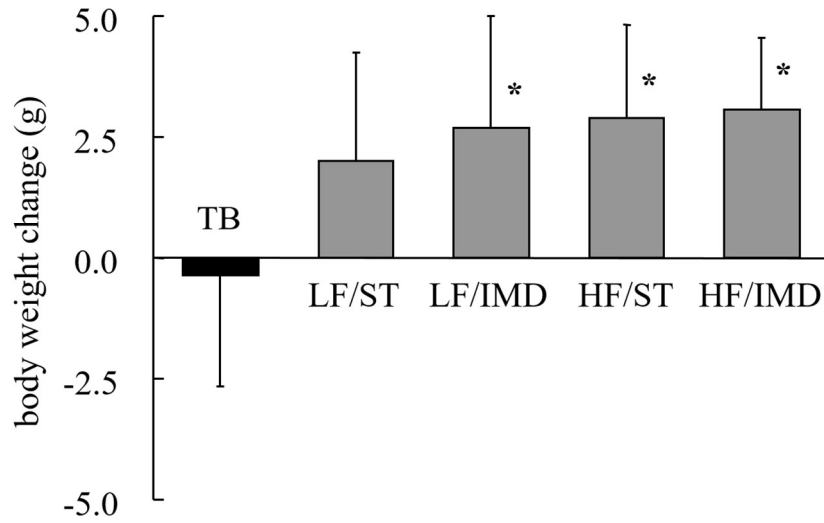


Figure 3-2. 腫瘍体積の推移.

表中の値は平均値 ± 標準偏差; n = 7-8. * p < 0.05, ** p < 0.01, vs. TB 群.

(A)



(B)

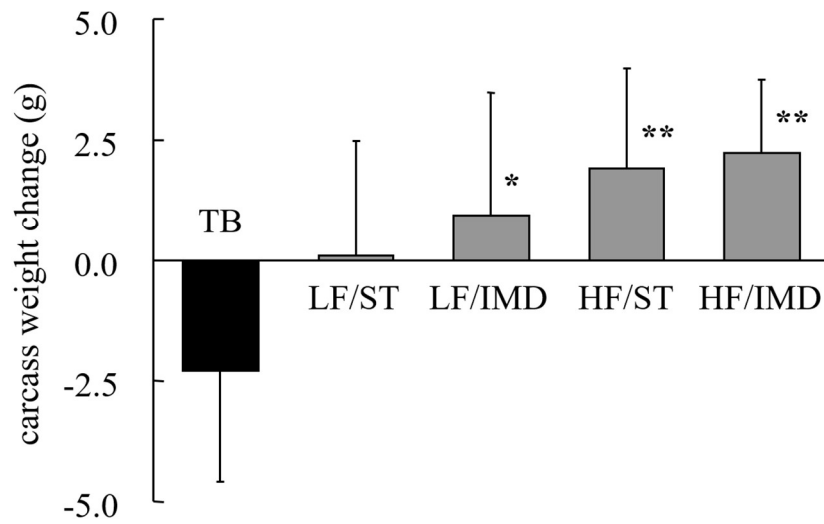
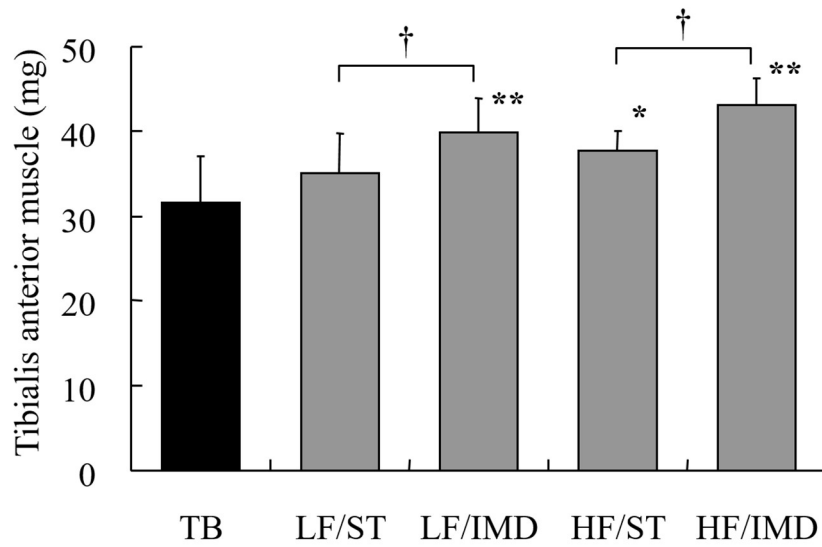


Figure 3-3. 剖検時における体重変化量 (A) および除腫瘍体重変化量 (B).

図中の値は平均値 ± 標準偏差; n = 7-8. * p < 0.05, ** p < 0.01, vs. TB 群.

(A)



(B)

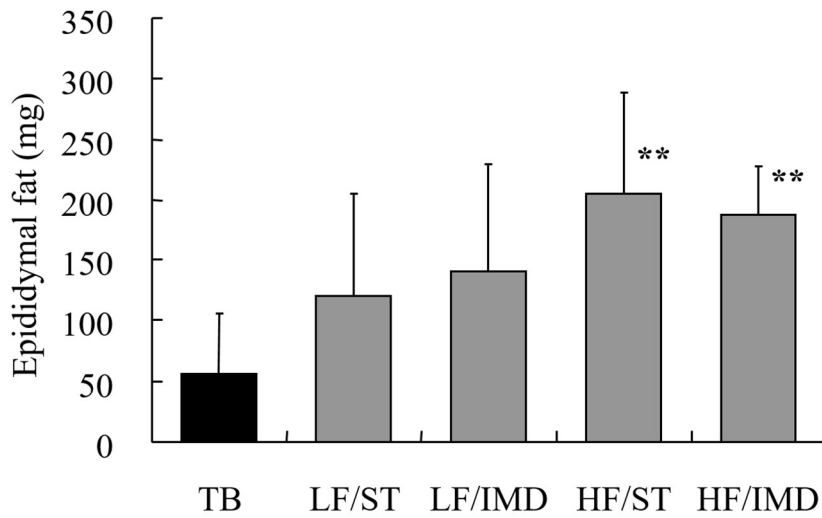


Figure 3-4. 剖検時における組織重量.

(A) 脛骨筋量、(B) 精巣周囲脂肪量.

図中の値は平均値 \pm 標準偏差; $n = 7-8$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. TB 群. † $p < 0.05$, vs. 同用量の 5-FU 投与群.

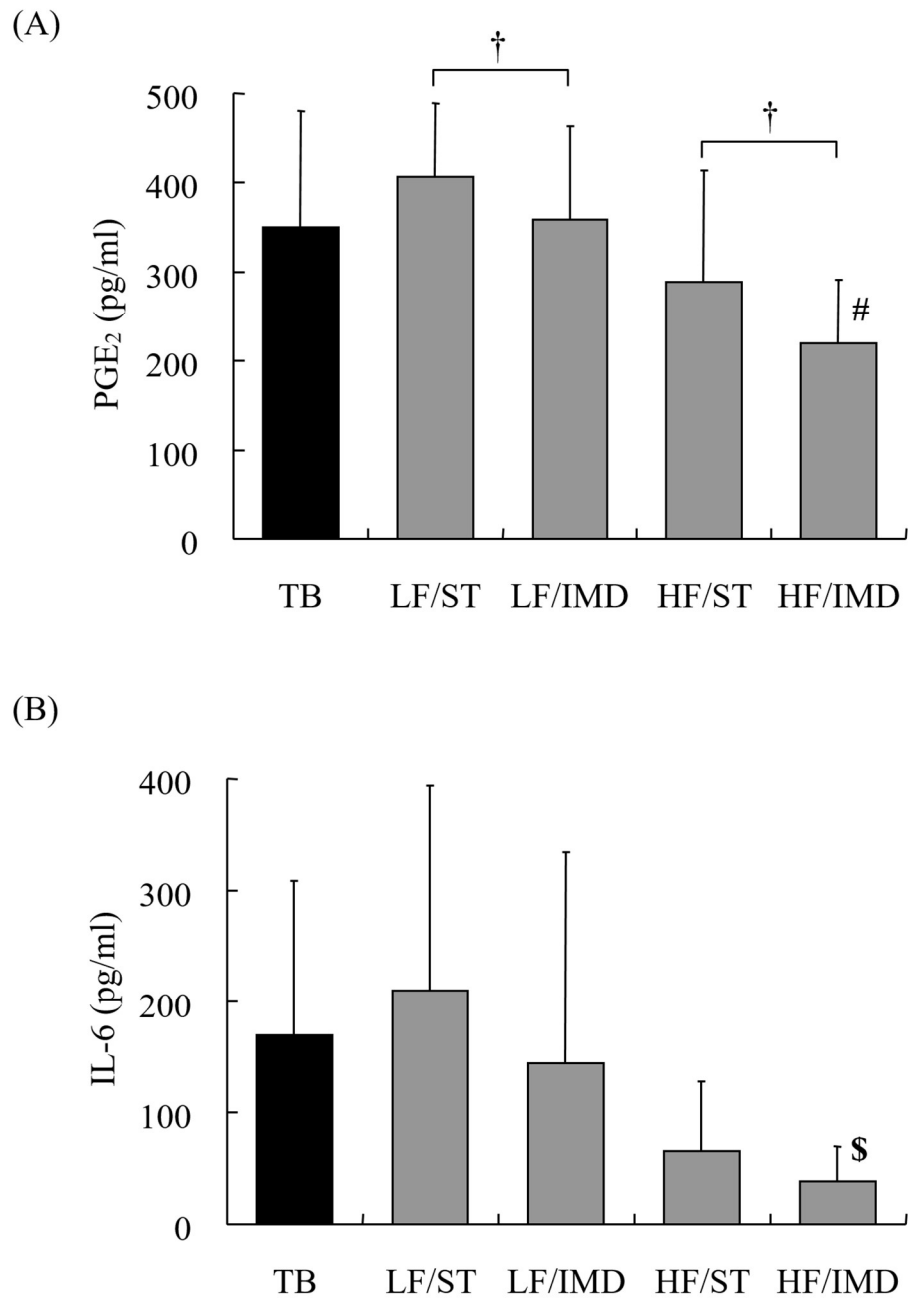
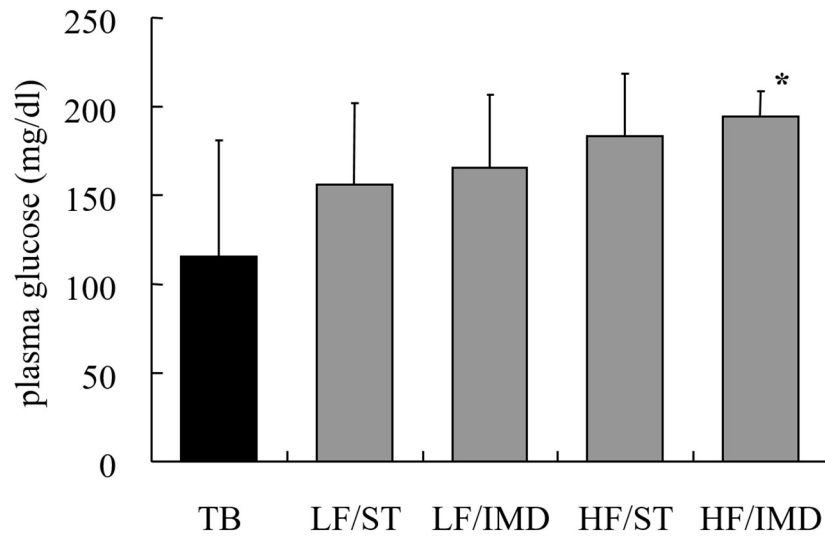


Figure 3-5. 剖検時における血漿中炎症性マーカーの値.

(A) 血漿中 PGE₂ 値、 (B) 血漿中 IL-6 値.

図中の値は平均値 ± 標準偏差; n = 5–8. # p = 0.068, \$ p = 0.099, * p < 0.05, ** p < 0.01, vs. TB 群. † p < 0.05, vs. 同用量の 5-FU 投与群.

(C)



(D)

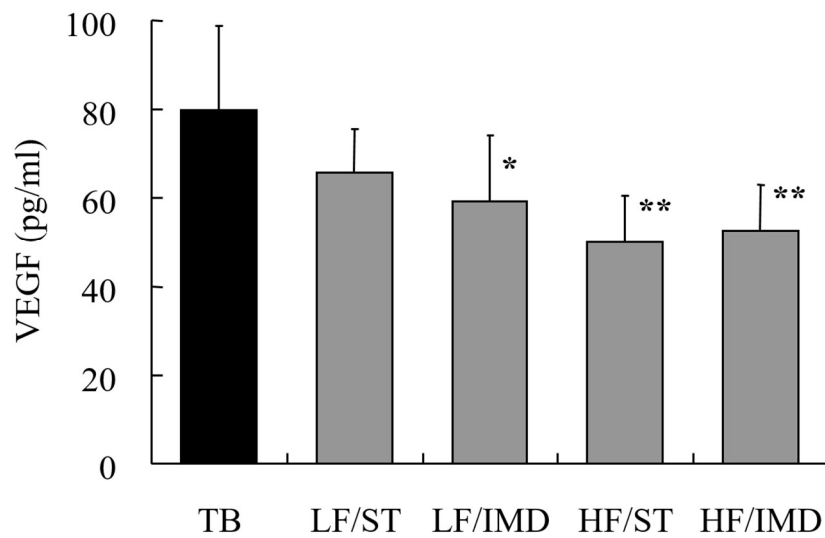


Figure 3-6. 剖検時における(A) 血漿中グルコース値および(B) 血漿中 VEGF 値.

図中の値は平均値 ± 標準偏差; n = 5-8. * p < 0.05, ** p < 0.01, vs. TB 群.

第 4 章 免疫調整流動食が腸管および腸内環境に与える影響

第 1 節 緒言

第 2 章の研究の結果、免疫調整流動食は術後に生じる全身性炎症反応を抑制することが示唆された。また、第 3 章では、免疫調整流動食が、がんに伴う全身性の炎症反応を減弱し、がん悪液質の発症を予防することが示唆された。これらの機序としては、免疫調整流動食に配合した様々な **Immunonutrients** による抗炎症作用が寄与したと考えられる。その一方で近年、これらの炎症反応の悪化や悪液質の進展に腸内細菌叢や腸管バリア機能維持が重要であることが示唆されている [51, 80, 81]。重度の SIRS 患者では腸内細菌叢が変化していることが明らかにされており、*Bifidobacterium* 属と *Lactobacillus* 属が健常人の 1/100~1/1000 程度に減少し、ブドウ球菌数が健常人の 100 倍程度に増加することや、腸内の短鎖脂肪酸の産生が減少し、腸管内 pH が上昇することが報告されている [52]。また、これらの SIRS 患者に対して *Bifidobacterium* と *Lactobacillus* によるプロバイオティクス製剤とプレバイオティクスのガラクトオリゴ糖を併用したシンバイオティクス療法によって、上記の腸内環境の変化を抑え、菌血症や腸炎などを減少させた [52]。このことから、大きな侵襲後に生じる全身性炎症反応に腸内細菌叢の異常が関与することが考えられる [51, 52]。免疫調整流動食を用いた臨床研究においても、生体肝移植手術の術後感染症の有意な減少も確認されており、免疫調整流動食の投与によって、腸管や腸内環境に何らかの影響を与えていることが推察される [102, 103]。また、がん悪液質にも腸管バリア機能低下や腸内細菌叢のインバランスが影響することが言われている [81]。がんの進展に伴う全身性の慢性炎症状態は、筋分解を誘導するだけでなく、*Lactobacillus* の減少や *Enterobacteriaceae* の増加と

いった腸内細菌叢の変化、および腸管バリア機能の低下を引き起こす [81]。腸管バリア機能の低下は、腸管からの病原性細菌やエンドトキシンの体内移行を増加させ、炎症の持続と筋分解を引き起こすと報告されている [81]。以上のことから、腸管バリア機能や腸内環境の維持が、術後の生存や遠隔臓器障害、悪液質の改善に寄与する要因の一つになると考えられる。

また、消化管は食物を消化するための酵素を分泌するのみならず、消化管ホルモンも分泌している。消化管ホルモンの一つである glucagon-like peptide-2 (GLP-2) は、33 のアミノ酸で構成されるプログルカゴン由来ペプチドの一種で、小腸粘膜の増殖や粘膜バリア機能の維持などの作用を有し、腸管機能の恒常性に寄与している [104]。また、他の消化管ホルモンであるグレリンは、成長ホルモン分泌促進作用や、NF- κ B を介して誘導される炎症性サイトカインを抑える抗炎症作用が報告されており、がん悪液質の改善作用が期待される [105-107]。

さらにがん治療における外科手術後には腸管機能低下（絨毛萎縮等の消化管障害）や腸内環境悪化をきたし、下痢や消化吸収不良が起きる。下痢の発生は栄養の吸収不良につながり、また流動食を必要量投与することが難しくなるため、外科手術時に腸管の維持は重要である。

免疫調整流動食には、タンパク質源としてホエイペプチドだけでなく、乳酸菌発酵物が配合されている。一方で、発酵乳や一部の乳酸菌には、腸内環境の改善作用や免疫調節作用を示すことが報告されている [53, 54]。そのため、免疫調整流動食は、腸内環境の変化を通じて、抗炎症作用や抗異化作用を発揮している可能性が考えられた。そこで第 4 章では、正常マウスおよび正常ラットを用いて、免疫調整流動食が腸管および腸内環境、消化管ホルモンに与える影響を検討した。

第2節 材料および方法

実験動物

実験動物は6週齢の雄性 C57BL/6 マウス(日本 SLC)または6週齢雄性 Sprague-Dawley 系ラット (日本 SLC) を用いた。動物の飼育は、温度 $21.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55.0 \pm 15.0\%$ 、12 時間の明暗サイクル (明期: 7-19 時) に設定された環境下で行った。実験期間中を通じて、飼料と飲料水は自由摂取とした。また、実験を開始する前に市販の非精製飼料の CRF-1 (オリエンタル酵母工業) にて 1 週間馴化させた。本研究における動物実験はすべて、株式会社 明治の動物実験倫理審査委員会の承認を受け、委員会の定める「動物実験における倫理規程」に則って行った。

正常マウスにおける免疫調整流動食投与による小腸への影響の解析

C57BL/6 マウスは平均体重が等しくなるように、Control 群 ($n = 8$) と IMD 群 ($n = 8$) の 2 つの群に分けた。Control 群には通常の汎用流動食 (メイバランス®1.0、株式会社 明治) の凍結乾燥粉末を、IMD 群には免疫調整流動食 (メイン®、株式会社 明治) の凍結乾燥粉末を 2 週間自由摂取させた。流動食の組成を Table 4-1 に示した。その後、糞便を採取し、イソフルラン麻酔下で腹部大静脈から血液を採取し、肝臓、脾臓、小腸の摘出を行った。

正常マウスにおける免疫調整流動食投与による血漿中グレリン値への影響の解析

C57BL/6 マウスは平均体重が等しくなるように、Control (h) 群 ($n = 8$) と IMD 群 ($n = 8$) の 2 つの群に分けた。IMD 群には免疫調整流動食 (メイン®、株式会社 明治) の凍結乾燥粉末を、Control (h) 群には、免疫調整流動食とタンパク質含量 (カロリー比) が等しい汎用流動食 (メイバランス®HP、株式会社 明治) の凍

結乾燥粉末を 2 週間自由摂取させた (Table 4-1)。その後、一晩絶食させた後、イソフルラン麻酔下で腹部大静脈から血液を採取した。

また、免疫調整流動食に含まれる中鎖脂肪酸油脂 (MCT; medium chain triglycerides) の影響を明らかにするために、マウスを平均体重が等しくなるように 2 つの群に分け、1 つの群 (AIN 群) には動物用精製飼料 (AIN-93G) を与え、もう 1 つの群 (AIN+MCT 群) には脂質を部分的に MCT に置き換えた飼料 (AIN-93G + MCT) を 2 週間自由摂取させた。マウスを一晩絶食させてから、イソフルラン麻酔下で腹部大静脈から血液を採取した。

正常ラットへの免疫調整流動食投与による小腸および盲腸内環境への影響の解析

Sprague-Dawley 系ラットは、平均体重が等しくなるように、Control (h) 群 (n = 6) と IMD 群 (n = 6) の 2 つの群に分けた。各群にはそれぞれ汎用流動食 (メイバランス®HP、株式会社 明治) の凍結乾燥粉末または、免疫調整流動食 (メイン®、株式会社 明治) の凍結乾燥粉末を 2 週間自由摂取させた (Table 4-1)。その後、イソフルラン麻酔下で解剖し、腹部大動脈からの全採血と肝臓、小腸および盲腸の摘出を行った。

血中の各指標の測定

血清または血漿中の GLP-2 およびアシルグレリン、デスアシルグレリン濃度は、市販の ELISA キット (矢内原研究所およびセティ) を用いて ELISA 法により測定を行った。血清中のアルブミン、AST、尿素窒素は自動分析装置 (富士ドライケム 3500 ; 富士フイルム) を用いて酵素法により測定した。

小腸の組織学的解析

空腸サンプルとして胃幽門より 15 cm の位置から 3 cm、回腸サンプルとして盲腸部より口側に 15 cm の位置から 3 cm を切り出し、10%ホルマリン溶液で固定後、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を行った。また、増殖期細胞を抗 Ki-67 抗体 (アジレント・テクノロジー) で免疫染色した。HE 染色標本は顕微鏡 (BZ-9000、キーエンス) を用いて撮影した。絨毛の長さ、筋層の厚さ、陰窩の深さは 1 個体につき 3 視野測定し、個体ごとの平均値を求めた。筋層の厚さは 1 視野あたり 5 か所、1 個体につき 3 視野測定し、個体ごとの平均値を求めた。また、Ki-67 陽性細胞数は同様の顕微鏡を用いて、500 倍で 1 視野を撮影し、陰窩中の染色細胞数を数え、個体ごとの陰窩あたりの平均の Ki-67 陽性細胞数を求めた。

盲腸内 pH および盲腸内短鎖脂肪酸量の測定

盲腸内容物の pH はラコムテスター pH 計 (アズワン) で測定後、短鎖脂肪酸を以下の方法で抽出した。盲腸内容物約 200 mg を 2 倍量の超純水で希釈しホモジナイズ後、4°C、10000 rpm、10 分で遠心分離した。その上清 200 mL に Carrez I 試薬 (53.5 g ZnSO₄·7H₂O/100 mL) 2.5 μL と Carrez II 試薬 (17.2 g K₄[Fe(CN)₆]·3H₂O/100 mL) 2.5 μL を加え、タンパク質を遠心により沈殿させて除き、その上清を 0.22 μm のフィルターに通してから分析に使用した [108]。短鎖脂肪酸分析方法は Niwa らの方法 [109]を改変した電気伝導度検出器 (CDD-10A、島津製作所) を用いたポストカラム pH 緩衝化電気伝導度検出法で測定した。有機酸分析用ポリマーカラム (ICSep-ORH-801 6.5 mm x 300 mm、東京化成工業) を 2 本連結して使い、カラム温度は 50°C、移動相は 5 mM p-トリニトロスルホン酸溶液、反応液

は 5 mM p-トリニトロスルホン酸溶液と 100 μ M EDTA \cdot 2Na を含む 20 mM Bis-Tris 水溶液を使用し、流速は 0.5 mL/分の条件で分析した。標準物質による検量線から各短鎖脂肪酸濃度を計算し、盲腸あたりの短鎖脂肪酸量を求めた。総短鎖脂肪酸量は酢酸、プロピオン酸および酪酸の合計量とした。

盲腸内細菌叢の測定

盲腸内容物から QIAamp DNA Stool mini kit (キアゲン) で抽出した total DNA を鋳型に、全細菌種共通のプライマーセットおよび *Bifidobacterium* 属または *Lactobacillus* 属に特異的なプライマーセット (Table 4-2) を用いて、Table 4-2 の条件で定量的リアルタイム PCR (7300 Real Time PCR Systems、Applied Biosystems) を行った。盲腸あたりの総細菌数および *Bifidobacterium* 属と *Lactobacillus* 属の各細菌数を調べた。

統計解析方法

各データについては、Shapiro-Wilks 検定にて正規分布していることを確認した後、分散について F 検定を用いて等分散性の検討を行い、Student の t 検定または Aspin-Welch の t 検定を行った。差は $p < 0.05$ で有意とした。

第 3 節 結果

正常マウスにおける免疫調整流動食投与による小腸への影響

各流動食投与 2 週間後の体重および肝臓重量、脾臓重量は、Control 群と IMD 群との間で有意差は無かった (Table 4-3)。一方、IMD 群の小腸重量は、Control 群に比べて有意に大きかった (Table 4-3)。また、消化管ホルモンの GLP-2 および

活性型グレリン(アシルグレリン)の血中濃度についても、Control 群に比べて IMD 群で有意に高かった (Figure 4-1)。

正常マウスにおける免疫調整流動食投与による血漿中グレリン値への影響

IMD 群は、Control (h)群よりも血中アシルグレリン濃度が高かったが、一方で不活性型のデスアシルグレリン濃度は両群で有意差は見られなかった (Figure 4-2A および 4-2B)。また、Control (h)群に比べて IMD 群では、アシル/デスアシルグレリン比 (A/D ratio) が有意に高くなった ($p < 0.01$) (Figure 4-2C)。免疫調整流動食に配合されている MCT は、グレリン分泌を促進すると報告されているため [110, 111]、免疫調整流動食に含まれる MCT の血漿中グレリン濃度への影響も調べた。その結果、血漿中アシルグレリン濃度およびデスアシルグレリン濃度共に、AIN 群と AIN+MCT 群の間で有意差は観察されなかった (Figure 4-3A および 4-3B)。一方で、AIN+MCT 群は、AIN 群よりも有意に高いアシル/デスアシルグレリン比を示した (Figure 4-3C)。

ラットへの免疫調整流動食投与による小腸組織への影響

各流動食投与 2 週間後の体重および肝臓重量は、マウスに給餌した場合と同様に、Control (h)群と IMD 群との間で有意差は無かった。また、ラットへの免疫調整流動食給餌の場合も同様に、体重あたりの小腸重量は IMD 群が Control (h)群に比べ有意に高値を示した (Table 4-4)。盲腸重量も小腸と同様、IMD 群が Control (h)群よりも有意に大きかった。血液中の栄養指標であるアルブミン値、肝機能の指標である AST 値、腎機能の指標である尿素窒素値には群間で有意差は認められなかった (Table 4-4)。一方、IMD 群は Control (h)群に比べ、血中の GLP-2 濃度

が有意に増加し、先のマウスでの検討と同様の結果が得られた (Figure 4-4)。さらに血中 GLP-2 濃度と小腸重量には極めて高い正の相関があることが示された (Figure 4-4)。

小腸の組織学的な解析の結果、空腸組織において、絨毛高、陰窩深および陰窩あたりの Ki-67 陽性細胞数は IMD 群で Control (h)群に比べ、有意に高値を示した (Figure 4-5A)。一方、筋層厚には群間で有意差は認められなかった。同様に、回腸組織においても空腸組織と同様の傾向を示した (Figure 4-5B)。

ラットへの免疫調整流動食投与による腸内環境への影響

盲腸内容物の pH は両群とも酸性域であったが、IMD 群は Control (h)群に比べて有意に低かった (Figure 4-6)。また、IMD 群の盲腸あたりの酢酸量と総短鎖脂肪酸量は、Control (h)群に比べ有意に多かった (Figure 4-6C)。

盲腸内容物中の総細菌数には 2 群間で有意差は認められなかったが、*Bifidobacterium* 属と *Lactobacillus* 属の細菌数は、Control (h)群に比べて IMD 群で有意に多かった (Figure 4-7)。

第 4 節 考察

本章では、免疫調整流動食の摂取が腸管組織構造や腸内環境に与える影響について検討を行った。

その結果、免疫調整流動食の摂取は、汎用流動食と比較して、小腸粘膜の陰窩で上皮細胞の増殖を促進し、腸管絨毛を伸長させることを見出した。また、免疫調整流動食の摂取により、消化管ホルモンである GLP-2 の血中濃度が高まり、さらに血中 GLP-2 濃度と小腸重量に高い正の相関が認められた。このことから、腸管の

絨毛を伸長させる要因として、**GLP-2** が関与している可能性が示唆された。**GLP-2** は、主に腸管内の栄養刺激によって、回腸を中心として腸管に幅広く分布する L 細胞から分泌される [104, 112]。**GLP-2** は腸管細胞上の受容体（クラス B - G タンパク質共役受容体（GPCR））に結合して、陰窩における上皮細胞の分化促進と絨毛細胞のアポトーシス抑制を促し、これによって絨毛が伸長し、腸管バリア機能を増強することが報告されている [104, 112]。そのため、免疫調整流動食の摂取によって **GLP-2** 産生が亢進されることで、腸管の絨毛の成長が促進されたと考えられる。

これまでに前田らは、イソマルツロースが L 細胞を刺激すると報告している [46]。また、ホエイタンパク質の一種である α -ラクトアルブミンの加水分解物にも **GLP-2** の分泌を促進する働きがあることが報告されている [113]。このことから、絨毛の伸長には、免疫調整流動食に配合されているイソマルツロースやホエイペプチドが一部寄与している可能性が考えられた。消化管ホルモンには、**GLP-2** と同様に L 細胞より分泌されるグルカゴン様ホルモンの **GLP-1** が存在する [114]。**GLP-1** と **GLP-2** は同じグルカゴン遺伝子にコードされていることから [114]、免疫調整流動食の摂取は **GLP-1** にも作用しうることが想定されたが、本研究では明らかになっていない。一方、先行研究では、 α -ラクトアルブミン分解物は **GLP-2** 分泌促進作用は示したが、**GLP-1** 分泌促進作用は確認されなかった [113]。そのため、免疫調整流動食摂取が **GLP-1** に与える影響については今後の検討課題である。

また、免疫調整流動食には有用菌である *Bifidobacterium* 属、および *Lactobacillus* 属の細菌数を増加させることにより腸内細菌叢を改善する働きがあることも明らかになった。さらに、盲腸内の短鎖脂肪酸、特に酢酸も免疫調整流動食の摂取により増加した。短鎖脂肪酸は、腸内細菌によって産生された後、腸管上皮細胞のエネルギー

ルギー源として利用されるとともに、大腸内の pH を低下させ善玉菌が成育しやすい環境を整える働きがある。このことから、免疫調整流動食の摂取は、腸管組織の伸長だけでなく、腸内環境も整えることが明らかになった。免疫調整流動食には、加熱殺菌された *L. bulgaricus* と *S. thermophilus* による発酵物が配合されているが、今回、免疫調整流動食摂取による盲腸内容物中の有用菌増加の原因として、免疫調整流動食に含まれている *Lactobacillus* が検出された可能性も考えられた。しかしながら本研究では、免疫調整流動食摂取によって乳酸菌発酵物には含まれていない *Bifidobacterium* 属も増加していることから、免疫調整流動食は上記に示した腸内環境の変化を通じて腸内細菌叢を改善すると考えられた。これまでに、加熱殺菌された乳酸菌発酵物も有用菌を増やすプレバイオティクス効果を有することが報告されていることから [115]、免疫調整流動食に配合された特徴的な原料が腸管絨毛の成長と腸内細菌叢の改善に寄与した可能性が考えられるが、今回の試験からはいずれの配合原料が結果に関与したかは明らかではなく、今後の検討課題である。

近年、腸管バリア機能障害、および *dysbiosis* によって、腸管からの病原性細菌やエンドトキシンの体内移行が増加し、炎症の持続と筋分解が惹起されることが報告されている [48, 81]。これまでに重度の *SIRS* 患者では *Bifidobacterium* 属と *Lactobacillus* 属が健常人の 1/100~1/1000 程度に減少し、ブドウ球菌数が健常人の 100 倍程度に増加することが明らかにされており、この腸内細菌叢の異常が大きな侵襲後に生じる全身性炎症反応に関与することが示唆されている [51, 52]。また、*dysbiosis* が全身性炎症や腸管バリア機能障害を惹起し、筋肉減少およびがん悪液質が誘発することも報告されている [80, 81]。免疫調整流動食によって腸管絨毛の伸長が促されることは、腸管組織を維持し、腸管バリア機能を高めること

につながる。したがって、第 2 章および第 3 章で示された、免疫調整流動食が全身性炎症反応を抑制し、予後を改善したり、悪液質を予防したりする機序の一つとして、**Immunonutrients** による直接的な抗炎症作用以外にも、腸管組織を維持する作用や腸内環境を整える作用が考えられた。

免疫調整流動食が腸管免疫機能に与える影響について、柳川らは非侵襲下のマウスを用いて検討し、免疫調整流動食が腸管関連リンパ組織 (**GALT**; **gut-associated lymphoid tissue**) のリンパ球数と腸管中の分泌型 **IgA** (**immunoglobulin A**) 量を通常の流動食よりも有意に増加させることを報告した [116]。今回明らかになった免疫調整流動食による腸管絨毛の伸長や、*Bifidobacterium* 属と *Lactobacillus* 属優位の腸内細菌叢の変化が、**GALT** の機能を高めることにも関与していた可能性が考えられた。一方、これまでに免疫調整流動食が、**T** 細胞や **B** 細胞に与える影響については明らかになっていない。しかしながら、ホエイタンパク質およびホエイペプチドには免疫調節作用が報告されていることから、**T** 細胞や **B** 細胞にも何らかの影響を与えていることが推察される。ホエイタンパク質の一部である α -ラクトアルブミンは、マウスの **B** 細胞および **T** 細胞の活性を調節することが報告されている [117]。以上のことから、免疫調整流動食の摂取は、腸管組織の成長を促し、腸内環境を整えるだけでなく、腸管免疫能を高めることで、生体の感染防御能を高めている可能性が考えられた。

本研究では、免疫調整流動食の摂取により消化管ホルモンの一つであるグレリンの産生が亢進することも明らかになった。グレリンは主に胃で産生されるペプチドホルモンで、成長ホルモン分泌促進作用をはじめ様々な生理活性を有している。また、グレリンは抗炎症作用を有し、**NF- κ B** を介して誘導される炎症性サイトカインを抑えることが報告されている [105, 107]。さらに、抗炎症作用以外にも

MuRF-1/MAFbx を介した筋タンパク質分解の抑制や IGF-1 を介した筋タンパク質合成の促進、エネルギー消費の低下などの作用が報告されており、グレリンにはがん悪液質の改善作用が期待されている [106]。このことから、免疫調整流動食摂取によるグレリン産生の亢進作用も、第 2 章や第 3 章で示された、全身性炎症反応の抑制やがん悪液質の発症予防の機序の一つとして考えられた。また、グレリンには摂食亢進作用が知られていることから [118]、化学療法等のがん治療時における食欲不振に効果を示すことも期待される。

本試験では、免疫調整流動食に配合されている MCT がグレリン産生亢進作用に寄与することを明らかにした。これまでにグレリンの活性にはオクタン酸（カプリル酸、炭素数 8 の中鎖脂肪酸）によるアシル化修飾が必須であることが報告されている [107, 119]。また先行研究で、オクタン酸の供給源となる MCT を経口摂取することでグレリンの活性化を促すことが判明している [110, 111]。臨床研究では慢性呼吸器疾患の患者に対して、MCT を配合した流動食（MCT 3 g/400 kcal）を 2 週間摂取することで、血中のアシルグレリン濃度が有意に上昇した [110]。今回の結果も先行研究を支持する結果であった。その一方で、汎用流動食や動物用精製飼料（AIN-93G）、AIN-93G+MCT よりも免疫調整流動食を摂取させた方が血中のアシルグレリン濃度が高かったことから、MCT 以外にもグレリン産生亢進に寄与する因子が存在する可能性が考えられた。

以上より、免疫調整流動食は消化管ホルモン分泌や腸管内の短鎖脂肪酸の産生亢進を介して、腸管組織構造や腸内細菌叢を変化させることが示唆された。免疫調整流動食を摂取することで得られるこれらの効果は、先に示されたがん患者における術後の生存や遠隔臓器障害の予防、がん悪液質の発症予防につながることが推察された。

Table 4-1. 飼料組成 (100 kcal あたり) .

	Control	Control (h)	IMD
Proteins (g)	4	5	5
Protein (% kcal)	16	20	20
Protein Sources	Na caseinates, milk protein	Na caseinates, milk protein	whey-hydrolyzed peptide, fermented milk
Carbohydrates (g)	15.5	15.3	14.5
Carbohydrates (% kcal)	59	57.5	55
CHO Sources	dextrin	dextrin	dextrin, isomaltulose
Lipids (g)	2.8	2.5	2.8
Lipids (% kcal)	25	22.5	25
MCT (g)	-	-	0.59
EPA, DHA (g)	-	-	0.06
n-6 / n-3	3.2	3.2	2

	AIN-93G	AIN-93G+MCT
Protein (% kcal)	20	20
Carbohydrates (% kcal)	64	64
Lipids (% kcal)	16	16
MCT (g)	-	0.59

MCT: medium chain triglycerides, EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid, -: no additives or unknown, CHO: carbohydrates.

Table 4-2. プライマーセット.

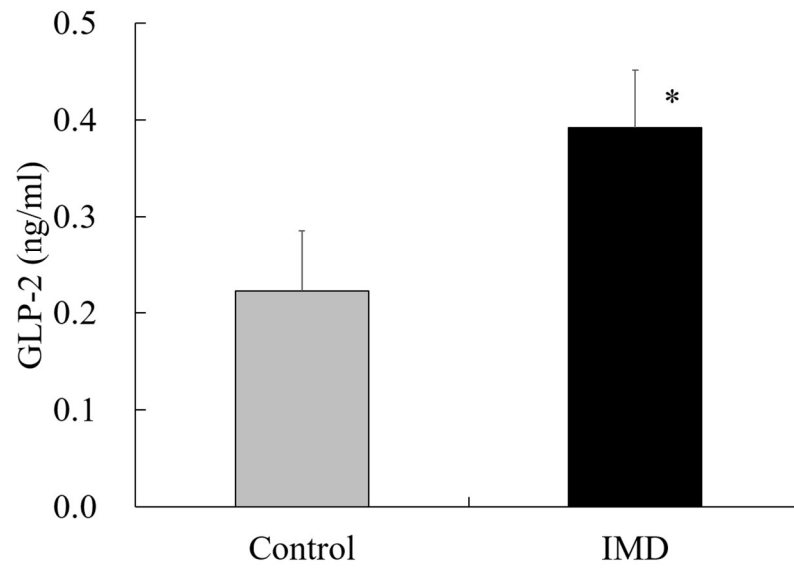
Target Organism		Sequence (5' to 3')	Annealing Temperature (°C)
<i>Bifidobacterium</i>	Forward	CTC CTG GAA ACG GGT GG	60
	Reverse	GGT GTT CTT CCC GAT ATC TAC A	
<i>Lactobacillus</i>	Forward	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA	57
	Reverse	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	
Total bacteria	Forward	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT	62
	Reverse	GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C	

Table 4-3. 汎用流動食および IMD を 2 週間摂取したマウスの体重および臓器重量.

	Control	IMD
Body weight (BW) (g)	25.0 ± 1.0	24.6 ± 0.6
Small intestine weight (g)	0.70 ± 0.09	1.13 ± 0.13 **
Liver weight (g)	1.21 ± 0.15	1.09 ± 0.16
Spleen weight (g)	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.02
Small intestine weight / BW (%)	2.80 ± 0.31	4.66 ± 0.51 **
Liver weight / BW (%)	4.82 ± 0.30	4.45 ± 0.64
Spleen weight / BW (%)	0.29 ± 0.03	0.35 ± 0.09

表中の値は平均値 ± 標準偏差; n = 8. ** p < 0.01, vs. Control 群.

(A)



(B)

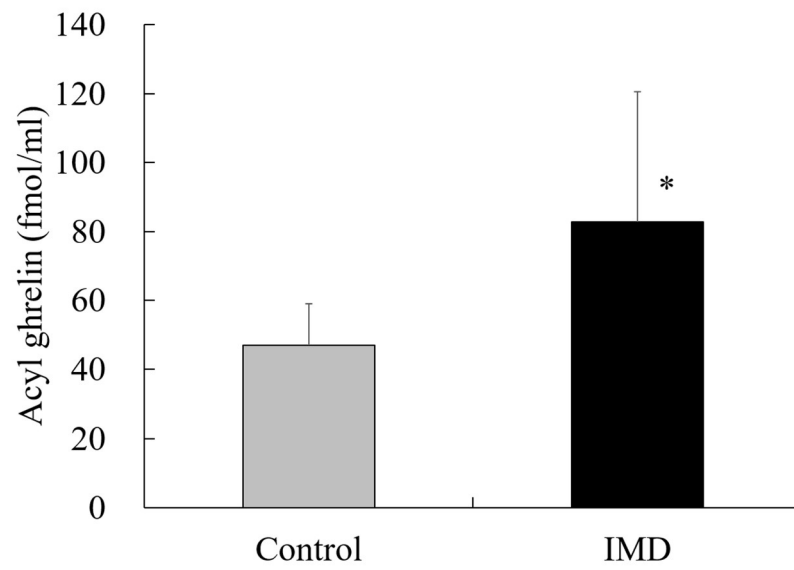


Figure 4-1. 汎用流動食および IMD を 2 週間摂取したマウスの血漿中消化管ホルモン濃度.

血漿中の (A) GLP-2 値、 (B) Ghrelin 値.

図中の値は平均値 \pm 標準偏差. * $p < 0.05$, vs. Control 群.

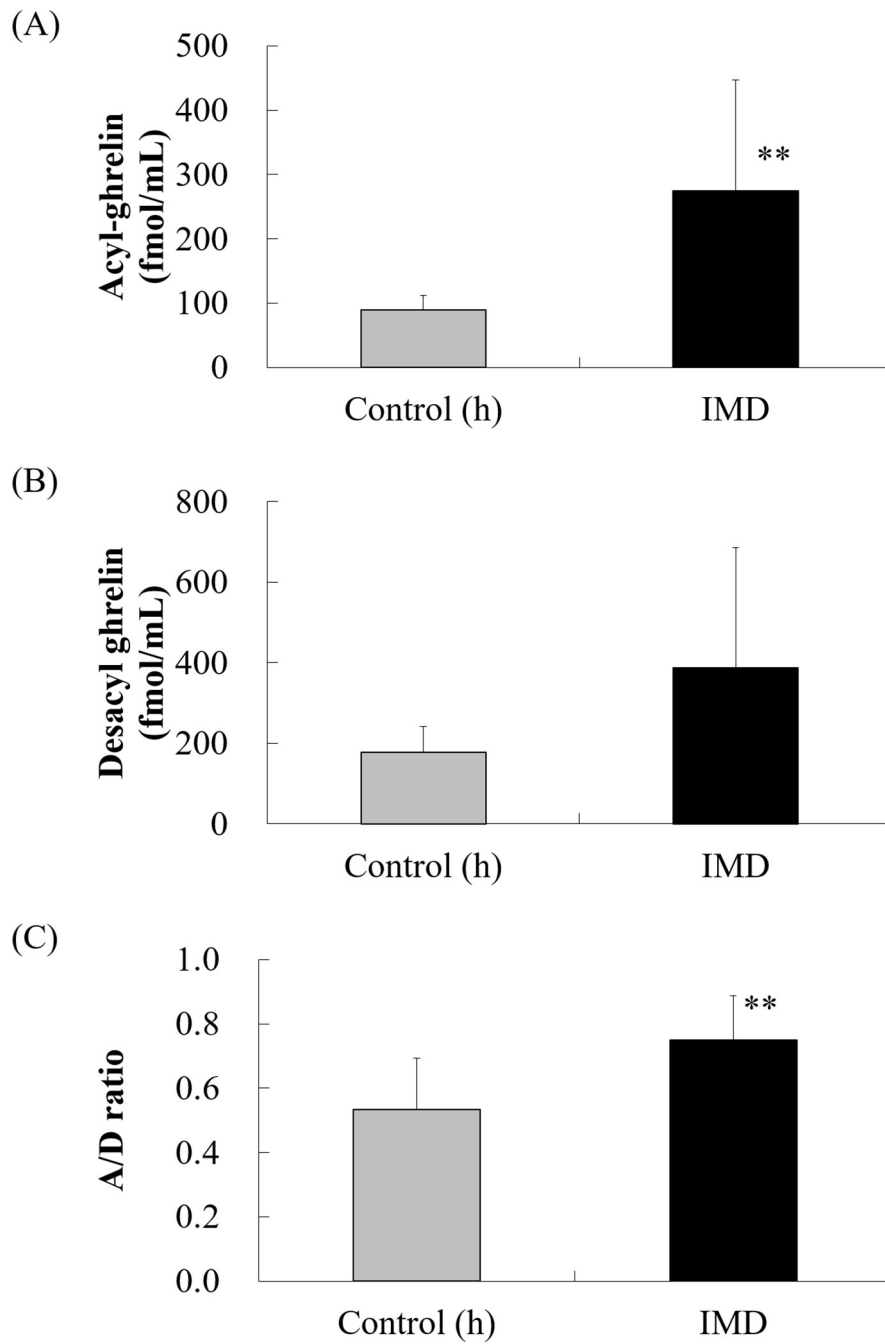


Figure 4-2. 汎用流動食および IMD を 2 週間摂取したマウスの血漿中アシルグレリン値およびデスアシルグレリン値.

血漿中の (A) アシルグレリン値、 (B) デスアシルグレリン値、 (C) アシルグレリン/デスアシルグレリン比 (A/D ratio).

図中の値は平均値 \pm 標準偏差. ** $p < 0.01$, vs. Control (h)群.

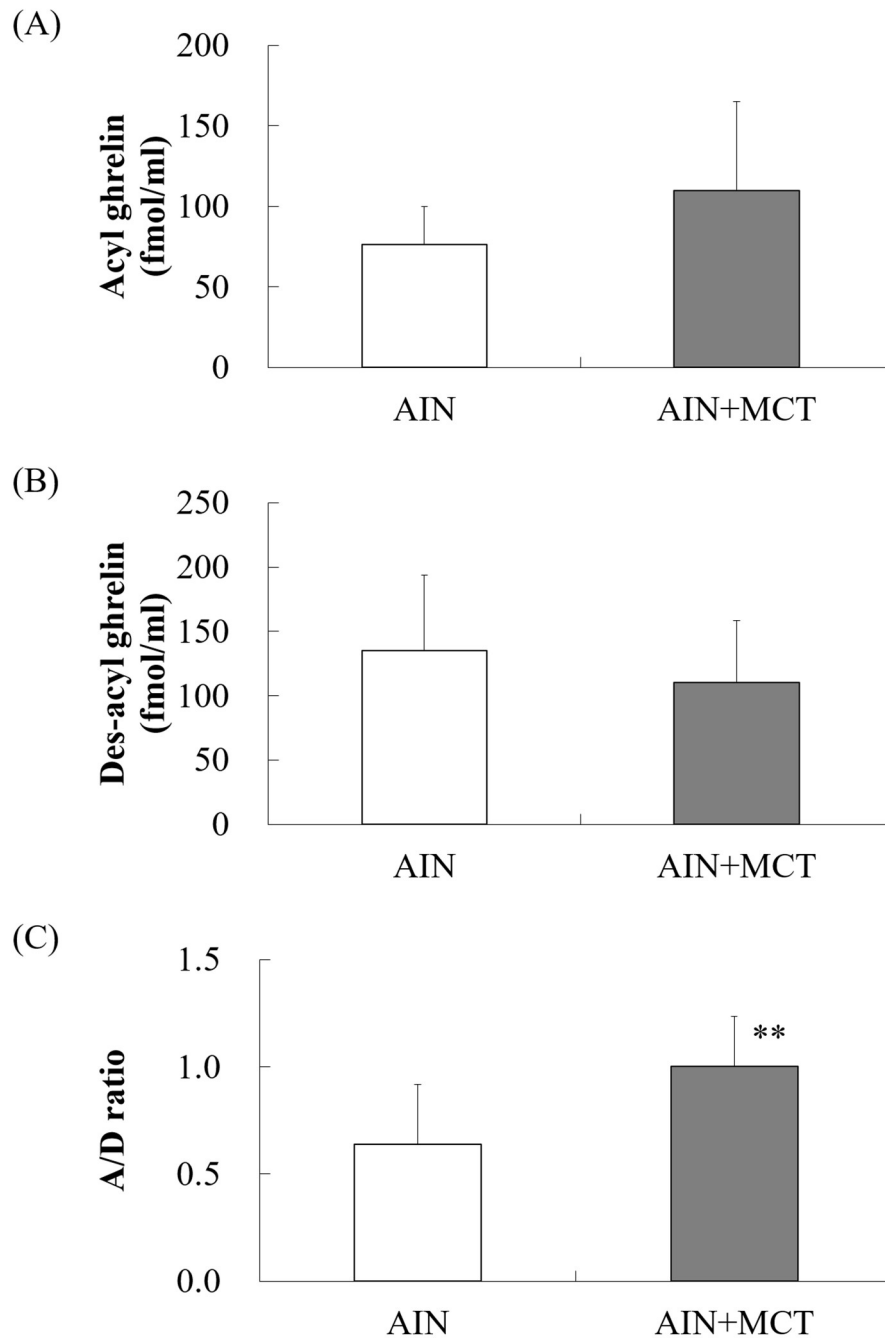


Figure 4-3. AIN-93G および AIN-93G+MCT 食を 2 週間摂取したマウスの血漿中アシルグレリン値およびデスアシルグレリン値.

血漿中の (A) アシルグレリン値、(B) デスアシルグレリン値、(C) アシルグレリン/デスアシルグレリン比 (A/D ratio).

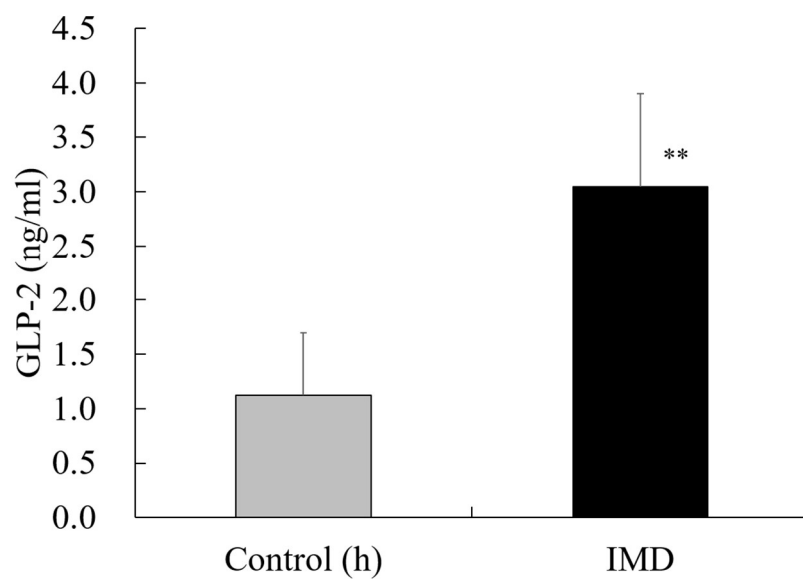
図中の値は平均値 \pm 標準偏差. ** $p < 0.01$, vs. AIN 群.

Table 4-4. 汎用流動食および IMD を 2 週間摂取したラットの体重、臓器重量、血中の各種栄養指標.

	Control (h)	IMD
Body weight (BW) (g)	320.4 ± 8.6	308.8 ± 10.4
Small intestine weight / BW (%)	1.30 ± 0.17	1.84 ± 0.10 **
Liver weight / BW (%)	3.67 ± 0.15	3.83 ± 0.05
Cecum weight / BW (%)	1.07 ± 0.30	2.92 ± 0.26 **
Albumin (mg/dL)	3.67 ± 0.08	3.70 ± 0.06
AST (U/L)	101.5 ± 23.1	98.7 ± 21.4
Urea nitrogen (mg/dL)	10.9 ± 1.9	10.7 ± 1.1

表中の値は平均値 ± 標準偏差; n = 6. ** p < 0.01, vs. Control (h)群.

(A)



(B)

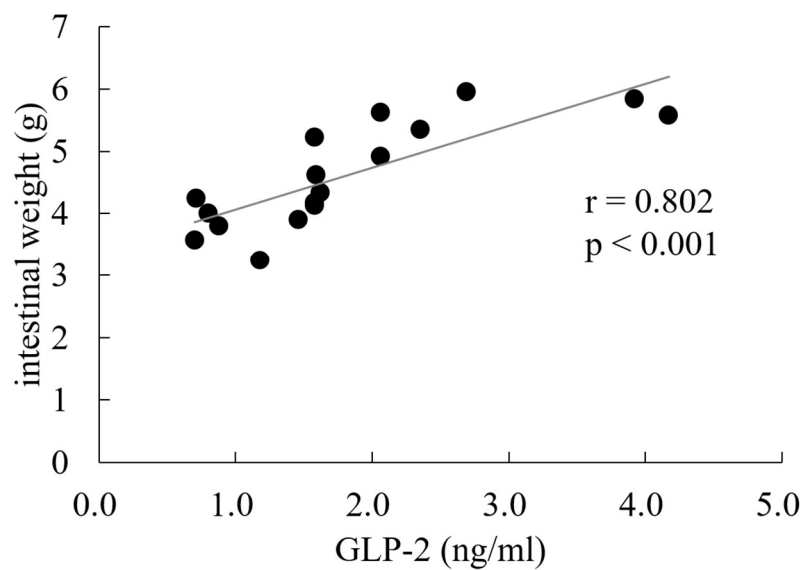


Figure 4-4. 汎用流動食および IMD を 2 週間摂取したラットの血漿中 GLP-2 濃度.

(A) 血漿中 GLP-2 濃度、 (B) 血漿中 GLP-2 濃度と小腸重量の相関.

表中の値は平均値 \pm 標準偏差; $n = 5-6$. ** $p < 0.01$, vs. Control (h)群.

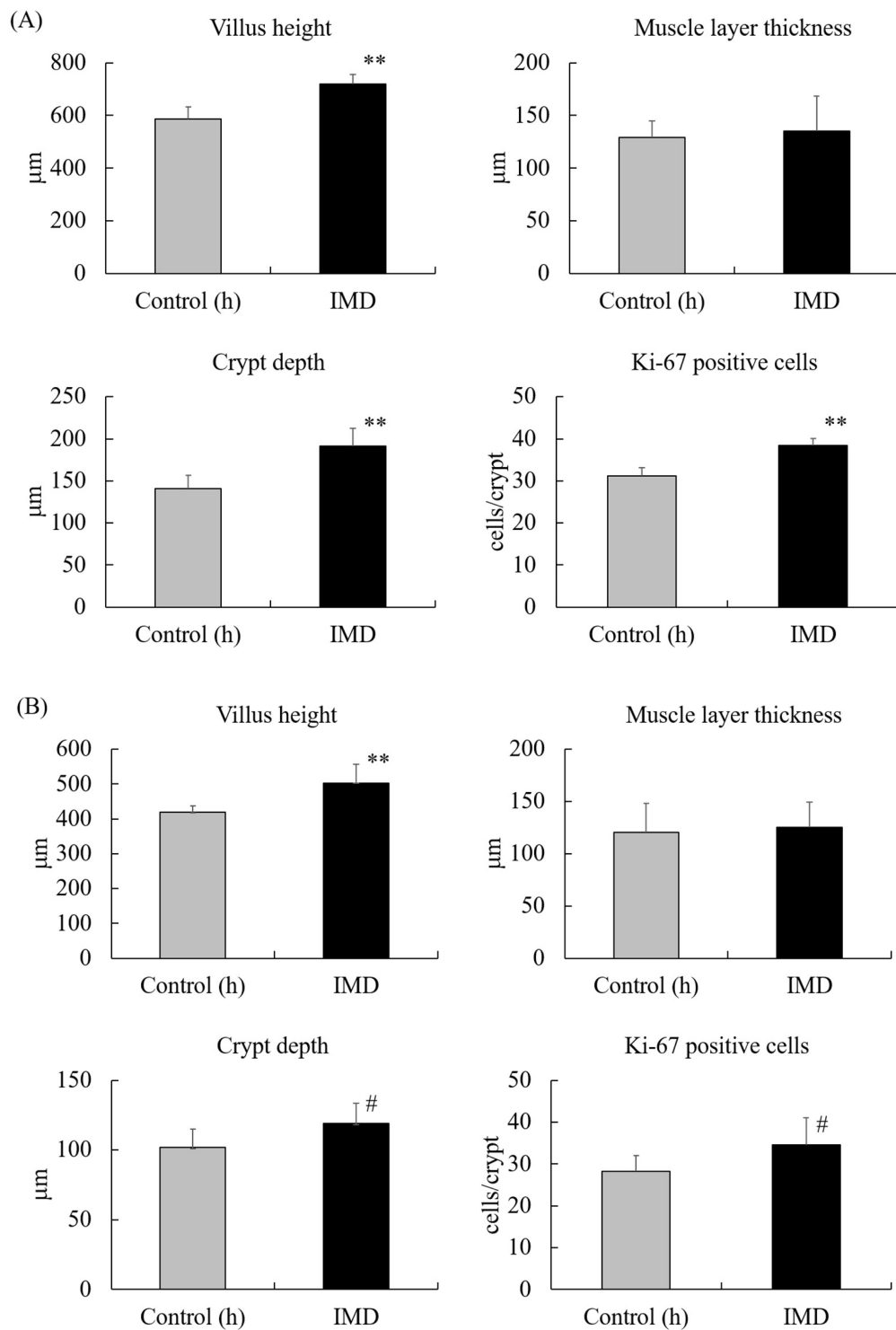


Figure 4-5. 汎用流動食および IMD を 2 週間摂取したラットの (A) 空腸および (B) 回腸の組織評価.

図中の値は平均値 ± 標準偏差; n = 6. ** p < 0.01, # p < 0.1, vs. Control (h)群.

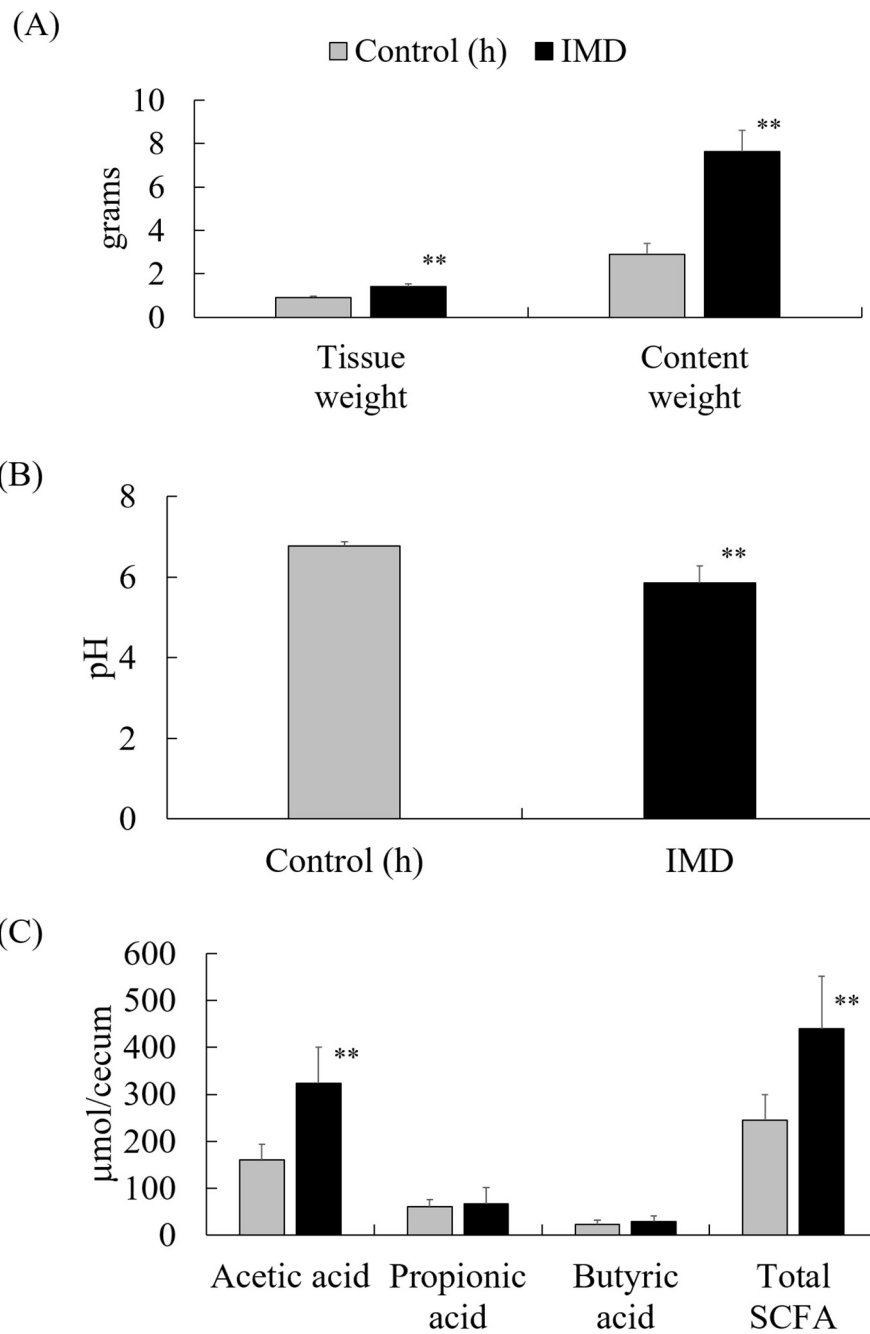


Figure 4-6. 汎用流動食および IMD を 2 週間摂取した際の腸内環境への影響 (ラット) .

盲腸の (A)組織重量および内容物重量、(B) pH、(C) 短鎖脂肪酸量.

図中の値は平均値 ± 標準偏差; n = 5–6. ** p < 0.01, vs. Control (h)群. SCFA: short chain fatty acid.

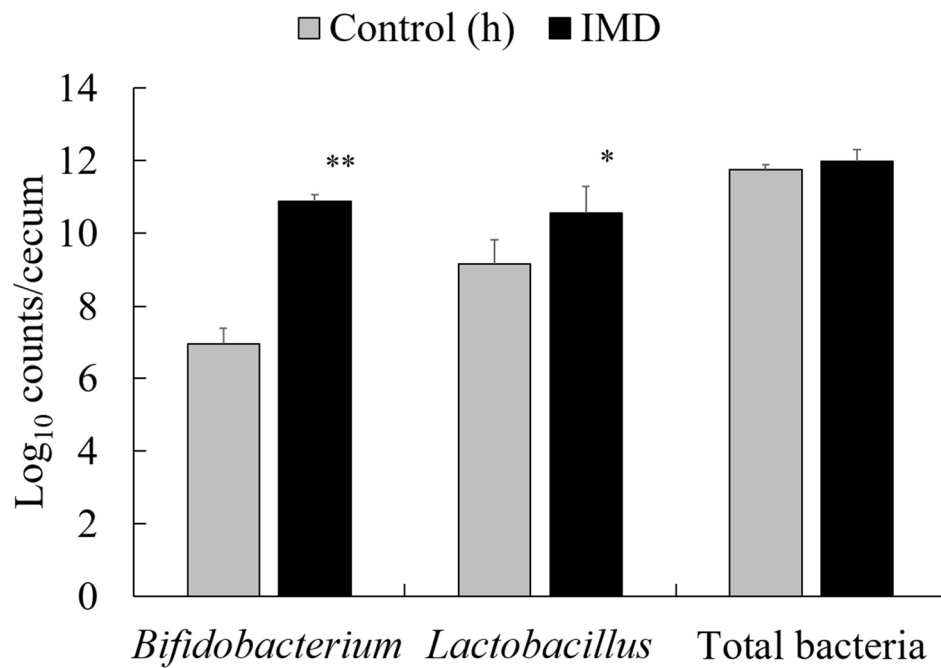


Figure 4-7. 汎用流動食および IMD を 2 週間摂取したラットにおける盲腸内容物中の各種細菌数.

図中の値は平均値 ± 標準偏差; n = 5-6. ** p < 0.01, * p < 0.05, vs. Control (h)群.

第 5 章 抗がん剤の副作用に対する免疫調整流動食摂取の効果

第 1 節 緒言

がんの化学療法に用いられる抗がん剤には、消化管毒性や白血球減少などの副作用が出現することが一般的であり、この副作用によって、薬の投与量を規定よりも下げることになったり、抗がん剤治療を中止したりすることになる。また抗がん剤の副作用は、患者の栄養不良も誘発する。がん患者の栄養不良は、治療成績、化学療法の毒性発生率および QOL を悪化させることが報告されている [1, 8]。そのため、化学療法を継続するには、副作用を発生させずに（もしくは上手く制御しながら）、患者の栄養状態を維持することが重要である。5-FU は、がん治療に多く使用されている抗がん剤の一つであるが [120]、他の抗がん剤と同様に、下痢や消化管粘膜炎、食欲不振、白血球減少、悪心などの様々な副作用をもたらす。5-FU 投与による消化管粘膜炎では、小腸において炎症誘発性サイトカインおよび NF- κ B 活性化が誘導されることが示されている [121, 122]。消炎鎮痛薬（5-アミノサリシル酸）は、5-FU 誘発性の消化管障害を改善し、NF- κ B 活性化と炎症性サイトカイン産生を抑制することが報告されている [121]。

抗がん剤の副作用は患者の QOL を低下させるが、支持療法によって患者の QOL を改善できることが報告されている [123]。また、化学療法中のがん患者に対して栄養成分による生体調節の有用性が報告されている [124]。これまでに第 2 章から第 4 章の検討の結果、我々の開発した免疫調整流動食には全身性の炎症反応を抑制し、さらに腸管組織構造や腸内細菌叢を変化させることが示唆された。

そこで本章では、化学療法中に免疫調整流動食による栄養補助を行う有用性を明らかにするために、免疫調整流動食が 5-FU により誘発される副作用を予防できるかどうかを検討した。検討に際しては、経日的な採血を行うことから、十分な血

液量を確保するためにラットを用いて検討した。また現在、化学療法に際しては入院せずに通院のみで実施することが増えている。そのため本研究では、免疫調整流動食が化学療法中の栄養補助として使用されることを想定し、ラットへの免疫調整流動食の投与は、摂取カロリーの半量となるように餌を調整して、検討を行った。

第 2 節 材料および方法

実験動物

実験動物は、6 週齢の雄性 Wistar ラット（日本 SLC）を用いた。実験動物の飼育は、温度 $21.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55.0 \pm 15.0\%$ 、12 時間毎の明暗サイクル（明期：7-19 時）に設定された環境下にて実施した。実験期間中を通じて、飼料と飲料水は自由摂取とした。また、実験を開始する前に市販の非精製飼料の CRF-1（オリエンタル酵母工業）にて 1 週間馴化させた。本研究における動物実験はすべて、株式会社 明治の動物実験倫理審査委員会の承認を受け、委員会の定める「動物実験における倫理規程」に則って行った。

試薬

5-FU は 5-FU 注射液（5 mL 溶液中 250 mg 5-FU 含有、協和発酵キリン株式会社）を用いた。

抗がん剤副作用モデル

40 匹のラットを対照群（CTR; $n = 20$ ）と IMD 群（ $n = 20$ ）に無作為に割り付けた。対照群には汎用流動食（メイバランス®HP、株式会社 明治）の凍結乾燥粉末

を自由摂取させ、IMD 群には対照の汎用流動食の 50%を免疫調整流動食（メイン
⑥、株式会社 明治）に置換した試験流動食の凍結乾燥粉末を自由摂取させた（Table
5-1）。

それぞれの試験食の摂取を開始してから 2 週間後、ラットの体重を測定し、5-
FU（300 mg/kg 体重）を腹腔内投与した（day 0）。

5-FU 投与（day 0）から day4 まで、体重および摂餌量を毎日記録し、また下痢
の状態を 1 日 2 回記録した。また、尾静脈により血液を毎日採取し、血液学検査
を実施した。実験終了後にイソフルランによる深部麻酔下で腹部大動脈からの出
血により全てのラットを安楽死させた。

血液学検査

血液サンプルは EDTA で処理した後、総白血球数および白血球分画、ならびに
リンパ球、好中球、および単球数を、自動血球計数装置（XT-1800i、シスメックス）
を用いて測定した。

下痢の評価

下痢の評価は、先行研究 [125, 126]を参考に、

0 (None) : 正常便、もしくは便無し

1 (Mild) : わずかに湿っている便、または柔らかい便

2 (Moderate) : 湿っており、形の崩れた便、肛門の周囲が汚れている

3 (Severe) : 水様便、肛門の周囲が非常に汚れている

として、1 日 2 回、day 4 までスコア化して記録した。

組織学的解析

対照群 (CTR; n = 20) と IMD 群 (n = 20) に対して、汎用流動食と試験流動食をそれぞれ 2 週間自由摂取させた。その後、5-FU を投与し、2 日後にイソフルラン麻酔下で腹部大動脈からの全採血により安楽死させた。各ラットから近位と遠位小腸 (それぞれ空腸と回腸) を採取し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。ホルマリン固定標本を作製し、パラフィンに包埋した。これらの標本から、3 μm の組織切片を薄切し、ヘマトキシリン-エオジン染色 (HE) を実施した。デジタル顕微鏡 (Keyence) を用いて小腸組織を撮影した。平均絨毛高と陰窩深度測定は、ラット 1 匹あたり 40 か所の絨毛と陰窩を評価することによって算出した。

統計解析

データは平均値 \pm 標準偏差で示した。正規性については Shapiro-Wilks 検定、分散については F 検定を用いて 2 群間の比較を行った後、正規分布しているデータについては、等分散の場合には Student の t 検定、不等分散の場合には Aspin-Welch の t 検定を行った。正規分布しないデータには Mann-Whitney の U 検定を用いた。差は $p < 0.05$ で有意とした。

第 3 節 結果

体重および摂餌量

5-FU 投与前の体重および摂餌量は、群間で有意差は認められなかった (Figure 5-1a および Table 5-2)。

両群共に 5-FU 投与によって体重および摂餌量が減少した。しかし day 1 におい

て、IMD 群は対照群よりも体重の減少が有意に抑えられ、摂餌量が有意に高かった (Figure 5-1b および Table 5-2)。また、IMD 群は対照群と比較して、day 2 および day 3 の体重減少が抑制される傾向にあった (Figure 5-1b)。

血液学的変化

総白血球数および好中球数、単球数は、5-FU 投与前 (day 0) において 2 群間で有意差はなかった (Figure 5-2a、5-2b および 5-2c)。一方、day 0 のリンパ球数は、対照群よりも IMD 群で有意に多かった (Figure 5-2b)。

5-FU 投与によって、総白血球およびリンパ球、単球数は減少し、好中球数は増加した。しかし、day 1 の総白血球数、リンパ球数、単球数は、対照群と比較して、IMD 群で有意に維持された (Figure 5-2a、2b および 2d)。好中球数は、day 1 において IMD 群が対照群よりも有意に多かった (Figure 5-2c)。

下痢スコアおよび組織学的解析

下痢スコアは 5-FU 投与後に両群で悪化したが、IMD 群の下痢スコアの平均値は実験期間を通して対照群よりも良好で、下痢の発症が遅延した (Figure 5-3a)。また、IMD 群では下痢スコアの悪い個体が少なかった (Figure 5-3b および 5-3c)。

これまでに、5-FU 投与が小腸の粘膜損傷を引き起こし、これが下痢の発生と関連することを確認している。day 2 における小腸の組織学的解析の結果、IMD 群は対照群に比べて、空腸の絨毛の高さと粘膜層の厚さが有意に大きかった (Table 5-3 および Figure 5-4)。

第 4 節 考察

本研究の結果、5-FU 投与後に誘発される体重や摂餌量、白血球数の減少が、免疫調整流動食によって抑制されることを、ラットを用いて明らかにした。また、免疫調整流動食の摂取は腸管の絨毛を維持すると共に下痢の発生を遅延させた。

本研究の長所の 1 つは、化学療法の副作用に対する支持療法として栄養療法の可能性を示したことである。体重減少はがん患者の 30～80%以上に起こり、一部の症例で重度（10%以上の体重減少）になる [66]。さらに、がん化学療法の副作用は、化学療法を受けている患者の栄養状態および体重に影響を及ぼす [127, 128]。体重減少は治療成績にも影響を及ぼし、患者の QOL を左右する重要な決定因子である [1]。今回、免疫調整流動食の摂取が 5-FU の副作用発現を遅らせる可能性があることが示された。このことから、化学療法中の免疫調整流動食の摂取は栄養不良の防止やがん患者の QOL 向上にもつながると考えられる。現在、抗がん剤の副作用対策としては、医薬品を用いた対症療法がしばしば行われている [129, 130]。免疫調整流動食を用いた栄養療法はこれらの対症療法に使用する医薬品の量を減らすことができ、これによって医療費の低減にも貢献すると期待される。

本研究では、免疫調整流動食は下痢の発生を遅らせ、腸管粘膜障害を軽減した。第 4 章の研究では、免疫調整流動食が腸粘膜の絨毛の成長を促進することが示されていることから [131]、免疫調整流動食による絨毛の促進が、腸管粘膜バリアの強化につながり、これによって 5-FU の腸管毒性に対する抵抗性が増し、下痢の発生を遅延させた可能性が考えられる。抗がん剤の副作用である下痢と白血球減少は、抗がん剤の使用量を制限し、化学療法が完遂できない要因となることから、免疫調整流動食の摂取は、化学療法の完遂に貢献できると考えられる。

本研究の限界の 1 つとして、免疫調整流動食の寄与因子が明らかにされていない

いことである。想定される機序の 1 つは、免疫調整流動食の抗炎症作用である。5-FU 投与は炎症性サイトカインおよび NF-κB 活性化を誘導することが示されている [121, 122]。消炎鎮痛薬（5-アミノサリシル酸）は、5-FU 誘発性腸障害を改善し、NF-κB 活性化と炎症性サイトカイン産生を抑制することが報告されている [121]。したがって、免疫調整流動食の抗炎症作用は抗がん剤の副作用の軽減に寄与する可能性がある。

また、腸内細菌叢は 5-FU 誘発性腸粘膜炎の病態に関与していることが示されている [132]。マウスを用いた先行研究では、5-FU の投与によって体重減少や下痢の発生、結腸の短縮、炎症性サイトカインの上昇が惹起され、さらに腸内細菌叢の変化（腸内細菌叢の多様性の減少、および *Firmicutes* の割合と *Firmicutes* / *Bacteroidetes* (F/B) 比の減少) が誘発された [132]。また、正常マウスの糞便移植を行うことで、5-Fu 投与による体重減少と結腸の短縮を防いだ [132]。さらに、一部のプロバイオティクスは抗がん剤の副作用を軽減することが示されている。*L. rhamnosus* GG の摂取は、5-FU を投与された大腸がん患者に対して、下痢や腹部不快感を軽減し、抗がん剤の投与量制限を減少させたことが報告されている [124, 133]。別の *Lactobacillus* は 5-FU により誘発される食欲不振と体重減少を減少させた [134]。また、*L. burgaricus* や *S. thermophilus* を含むヨーグルトは、加熱殺菌した場合でも、乳酸菌などの有用菌を増加させ、腸内細菌叢を調節することが報告されている [115]。免疫調整流動食は *L. burgaricus* および *S. thermophilus* による乳酸菌発酵物を含んでおり、また第 4 章の研究において、免疫調整流動食はラット盲腸内の *Bifidobacterium* および *Lactobacillus* の数を増加させるとともに、腸粘膜内の絨毛の成長を促進した [131]。このことから、免疫調整流動食に含まれる乳酸菌発酵物が 5-FU の副作用の予防に部分的に寄与していることが考えられる。

第 3 章の研究では、免疫調整流動食と化学療法の併用により、抗がん剤の抗腫瘍作用を抑制することなく、がん悪液質を軽減することを明らかにした [135]。本研究で得られた知見を統合すると、化学療法を行う際に免疫調整流動食を用いた栄養管理を行うことで、がん悪液質への進展を予防しつつ、抗がん剤の副作用を低減できる可能性が考えられた。これにより、免疫調整流動食は化学療法中のがん患者の QOL 維持に貢献すると考えられる。ただし、本研究では臨床における免疫調整流動食の有効性および有効用量は確認できていない。がん患者に対する免疫調整流動食の有効性と安全性を確立するには、さらなる研究が必要であるが、免疫調整流動食による栄養療法は、がん化学療法中の新たな支持療法になり得ると考えられる。

Table 5-1. 飼料組成（100 kcal あたり）.

	Control enteral diet	Test diet (50% of control/50% of IMD)
Proteins (g)	5	5
Protein (% kcal)	20	20
Protein Sources	Na caseinates, milk protein	whey-hydrolyzed peptide, fermented milk, Na caseinates, milk protein
Carbohydrates (g)	15.3	14.9
Carbohydrates (% kcal)	57.5	55
CHO Sources	dextrin	dextrin, isomaltulose
Lipids (g)	2.5	2.8
Lipids (% kcal)	22.5	25
CHO Sources	LCT	LCT, MCT, EPA, DHA
<i>Vitamins</i>		
Vitamin A (μg RE)	60	105
Vitamin D (μg)	0.5	0.63
Vitamin E (mg)	3	4
Vitamin K (μg)	3.1	3.3
Vitamin B1 (mg)	0.15	0.2
Vitamin B2 (mg)	0.2	0.25
Niacin (mg)	1.6	2.3
Vitamin B6 (mg)	0.3	0.3
Vitamin B12 (μg)	0.6	0.6
Folic acid (μg)	50	50
Biotin (μg)	15	11.3
Vitamin C (mg)	16	33
Choline (mg)	1.7	5.5

(次ページに続く)

Table 5-1. 飼料組成（100 kcal あたり）（続き）。

	Control enteral diet	Test diet (50% of control/50% of IMD)
<i>Minerals</i>		
Sodium (mg)	110	90
Potassium (mg)	100	90
Calcium (mg)	60	70
Magnesium (mg)	20	20
Phosphorus (mg)	60	65
Iron (mg)	1	1
Zinc (mg)	0.8	0.9
Copper (mg)	0.08	0.065
Manganese (mg)	0.2	0.19
Chromium (μg)	3	3
Molybdenum (μg)	2.5	2.5
Selenium (μg)	3.5	4.3
Iodine (μg)	15	12.4
Chloride (mg)	140	110

MCT: medium chain triglycerides, EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid, RE: retinol equivalent, -: no additives or unknown, CHO: carbohydrates.

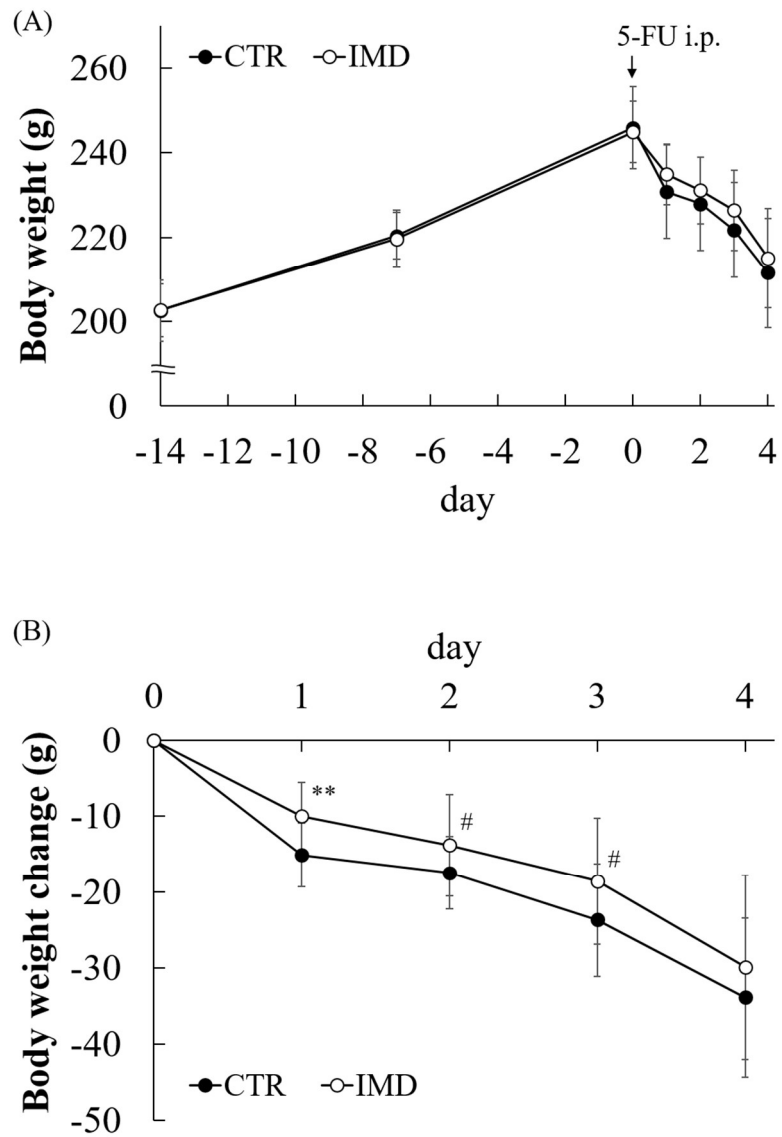


Figure 5-1. 試験期間中の体重推移.

(a) 体重、 (b) day 0 からの体重変化量.

図中の値は平均値 \pm 標準偏差. # $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, vs. CTR 群.

Table 5-2. 5-FU 投与後の摂餌量.

Day	CTR (g/day)	IMD (g/day)
~ Day 0	13.6 ± 0.8	13.8 ± 0.8
Day 0 ~ Day 1	3.2 ± 1.1	4.6 ± 2.0 **
Day 1 ~ Day 2	7.2 ± 2.7	7.7 ± 2.1
Day 2 ~ Day 3	4.5 ± 4.9	5.2 ± 2.7
Day 3 ~ Day 4	2.8 ± 4.7	2.6 ± 3.6

表中の値は平均値 ± 標準偏差.

** p < 0.01, vs. CTR 群.

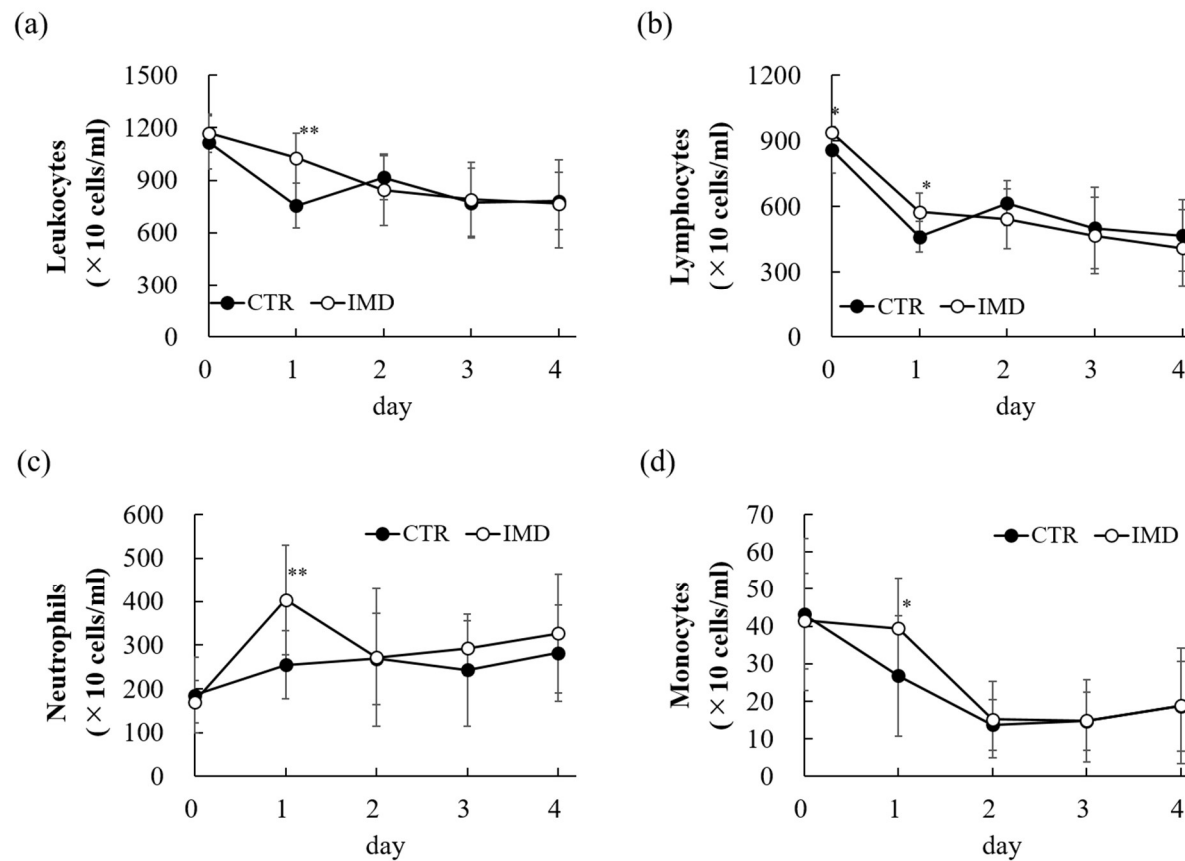


Figure 5-2. 5-FU 投与後の白血球数、リンパ球数、好中球数、単球数の推移.

(a) 総白血球数、(b) リンパ球数、(c) 好中球数、(d) 単球数.

図中の値は平均値 \pm 標準偏差. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. CTR 群.

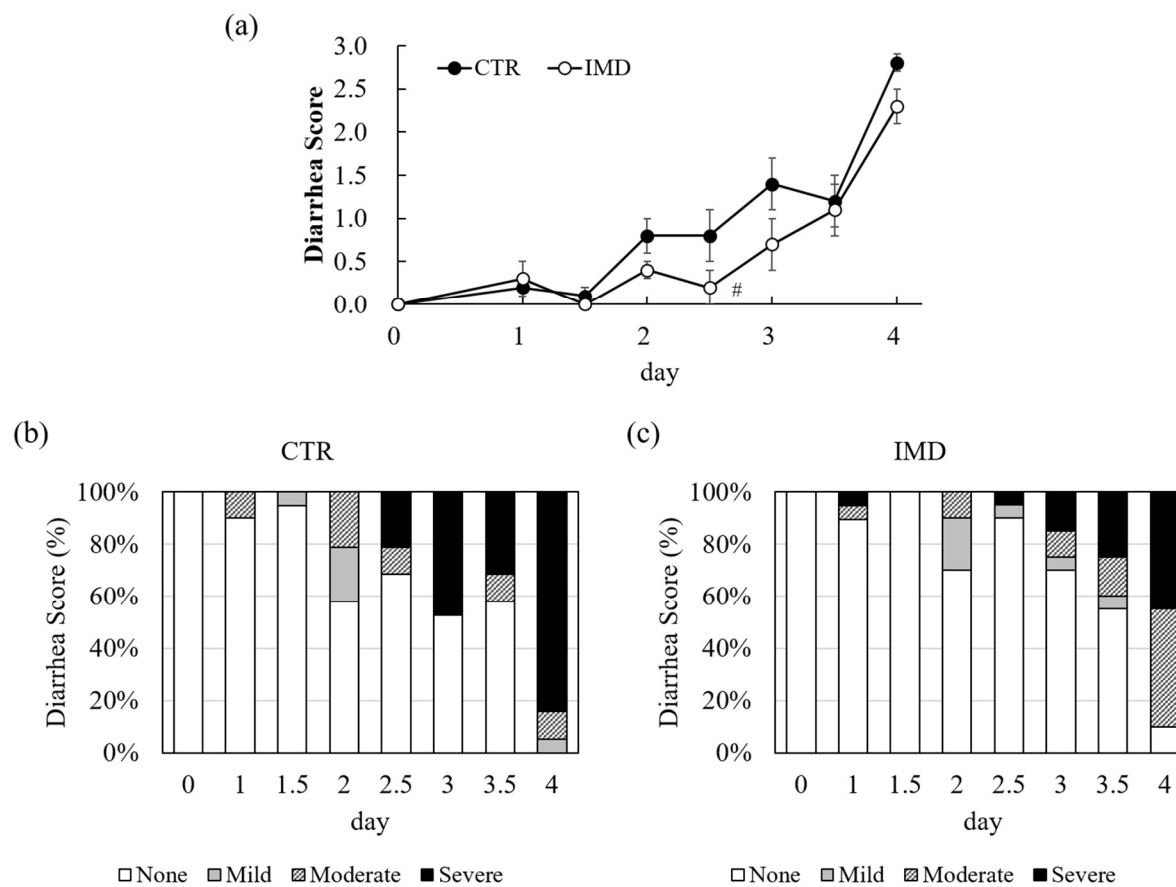


Figure 5-3. 試験期間中の平均下痢スコアおよび各群の下痢発生率.

(a) 平均下痢スコア、(b) CTR 群および (c) IMF 群における 5-FU 投与後の下痢発生率.

図中の値は平均値 ± 標準偏差. # $p < 0.1$, vs. CTR 群.

Table 5-3. 小腸の組織学的解析.

	CTR	IMD
Villus height (μm)	353.2 \pm 50.6	394.0 \pm 37.2 **
Crypt depth (μm)	114.8 \pm 22.7	118.5 \pm 16.6
Lamina muscularis mucosa (μm)	32.7 \pm 4.4	31.2 \pm 3.7
mucosal layer thickness (μm)	500.7 \pm 60.1	543.7 \pm 48.4 *
Muscle layer thickness (μm)	103.8 \pm 17.3	109.8 \pm 14.2

表中の値は平均値 \pm 標準偏差. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. CTR 群.

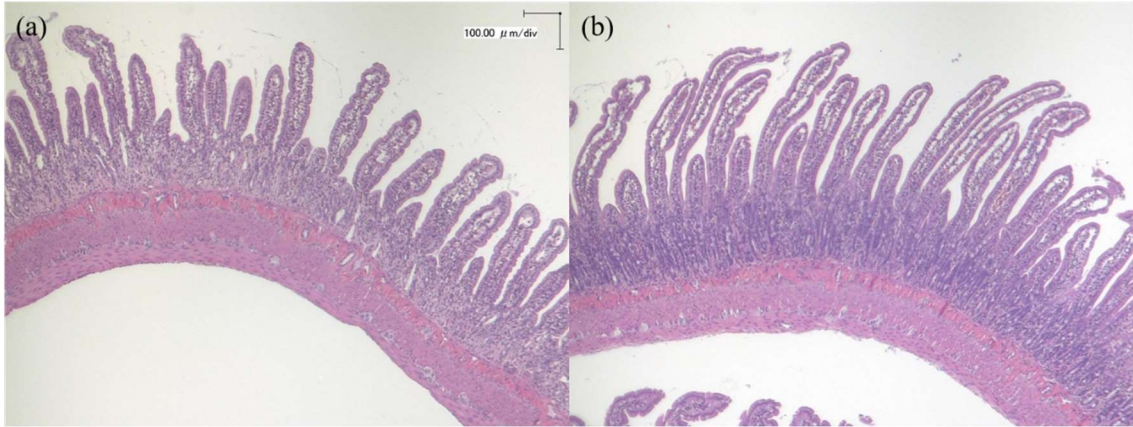


Figure 5-4. 各群の小腸組織画像（代表例）。

(a) CTR 群、 (b) IMF 群。

第 6 章 総合討論

本研究では、種々のがん治療の際の適切な栄養管理方法を見出すことを目的とし、そのための基盤研究として、「手術（外科治療）」および「薬物療法（抗がん剤治療）」で問題となる生体異常反応を制御する栄養管理方法とその作用機構を検討した。本検討に際しては、より実践的な領域の研究として、医療現場で栄養管理の際に使用される流動食を用いて研究を行った。具体的には、流動食の基本的役割である一次機能を満たすだけでなく、三次機能の付与を期待して栄養組成を工夫した免疫調整流動食を用いて、がん治療時の栄養管理に対する評価とその作用機構を検討した。

本研究ではまず、がんの手術時における適切な栄養管理について検討を行った。がんの周術期には、生体への侵襲ストレスによって過剰な炎症反応が生じ、それにより多臓器不全等の問題が生じる。第 2 章では、免疫調整流動食を用いた栄養管理によって手術に伴う生体の異常反応を予防、軽減できるかどうかを明らかにするために、腸管虚血再灌流モデルおよび食事誘発性急性膵炎モデルを用いて検討した。腸管虚血再灌流モデルを用いた検討の結果、腸管虚血再灌流手術前に免疫調整流動食による栄養管理を行うことで、術後の血漿中 IL-6 上昇と術後の高血糖を抑制し、再灌流後の早期時点での生存率を改善した (Figure 2-4、2-5)。また、急性膵炎モデルでの検討の結果、全身性炎症反応が誘発された後から免疫調整流動食を摂取することでも、全身性炎症反応を低下させ、さらに炎症に関連する遠隔臓器障害を改善することを明らかにした (Figure 2-9、2-10)。このことから、がんの周術期に免疫調整流動食を用いて栄養管理を行うことで、術後に生じる全身性炎症反応を抑制し、さらに遠隔臓器障害や術後の生存を改善する可能性が示された。また、手術後の高血糖を予防することで、手術後のインスリン使用量を低減し、血

糖値を気にすることなく流動食投与が可能になることから、患者の管理の負担軽減にもつながることが考えられた。

がん患者は、がん起因する代謝異常を伴うため、通常の栄養管理では体重や筋肉の維持・改善が困難な「がん悪液質」に陥りやすい。そのため化学療法中には、がんの代謝異常や悪液質を考慮した栄養管理が必要になる。第 3 章では、がん悪液質に対する免疫調整流動食を用いた栄養管理の有用性を明らかにすることを試みた。マウス結腸がん細胞株 **Colon 26** 移植担がんモデルを用いて、抗がん剤の **5-FU** の投与と免疫調整流動食の併用が、がん悪液質を予防できるかどうかを検討した。その結果、**5-FU** と免疫調整流動食の併用は、がんの進展に伴う全身性炎症反応の亢進を抑制し、さらに体重や除腫瘍体重、筋肉の減少を抑制した (**Figure 3-3** ~ **3-5**)。また、腫瘍重量は汎用流動食と免疫調整流動食で差はなかった (**Table 3-3**)。このことから、化学療法中に免疫調整流動食による栄養管理を行うことで、抗がん剤の抗腫瘍効果を減弱することなく、がん悪液質を予防できることが示唆された。

術後の全身性炎症反応の悪化や悪液質の進展に腸内細菌叢や腸管バリア機能維持が重要であることが示唆されている。また、腸管の機能低下や腸内環境の悪化は下痢や栄養素の消化吸収不良を引き起こすことから、栄養管理の際に腸管の維持は重要である。第 4 章では、免疫調整流動食の投与が腸管組織構造や腸内環境に与える影響について検討を行った。その結果、免疫調整流動食は、消化管ホルモン **GLP-2** の分泌亢進や腸管内の短鎖脂肪酸の産生亢進を介して、腸管の絨毛伸長を促したり、*Bifidobacterium* 属や *Lactobacillus* 属の細菌数を増やして腸内細菌叢を改善させたりすることが示唆された (**Table 4-3**、**4-4**、**Figure 4-1**、**4-4**~**4-7**)。また免疫調整流動食の摂取によって、抗炎症作用や悪液質改善作用が報告されてい

るグレリンの産生が亢進することも明らかになった (Figure 4-2)。免疫調整流動食によって得られたこれらの効果は、先に示されたがん患者における術後の生存改善や遠隔臓器障害の予防、がん悪液質の発症予防の機序の一つと考えられた。

がんの化学療法中には、抗がん剤の副作用によって、薬剤の使用量を制限したり、患者の栄養不良と QOL 低下につながる。そのため、化学療法中には、がん悪液質を考慮した栄養管理に加えて、抗がん剤の副作用も考慮した栄養介入が必要になる。第 5 章では、免疫調整流動食が抗がん剤の 5-FU により誘発される副作用を予防できるかどうかを検討した。結果、免疫調整流動食は、5-FU 投与後に誘発される体重、摂餌量、および白血球数の減少を予防することを明らかにした (Figure 5-1、5-2、Table 5-2)。また、免疫調整流動食の摂取は腸管の絨毛を維持すると共に下痢の発生を遅延させた (Figure 5-3、Table 5-3)。第 3 章と第 5 章で得られた知見を統合すると、化学療法の際に免疫調整流動食による栄養管理を行うことで、がん悪液質への進展を予防しつつ、抗がん剤の副作用を低減できる可能性が考えられた。

本研究の結果、手術や担がん状態によって誘発される全身性炎症反応に対して、免疫調整流動食が抗炎症作用を示すことが明らかになった。免疫調整流動食には、 ω -3 多価不飽和脂肪酸、抗酸化ビタミンおよびミネラルといった Immunonutrients だけでなく、抗炎症作用が明らかになっているホエイペプチドを含んでおり、これらの成分の組み合わせにより免疫調整流動食の抗炎症作用が発揮されたと考えられる。さらに、本研究によって、免疫調整流動食の摂取は、GLP-2 分泌や腸管内の短鎖脂肪酸の産生亢進を介して、腸管組織構造や腸内細菌叢を変化させることが明らかになった。全身性の炎症反応には腸内細菌叢の異常が関与することから、免疫調整流動食による腸内細菌叢の変化が、抗炎症作用に一部寄与しうることが

推察された。また、腸管絨毛の伸長を促進することは、腸管バリアの増強を促すことから、免疫調整流動食の摂取は抗がん剤の副作用を予防するだけでなく、生体の感染防御能を高める効果につながると考えられた。さらに、免疫調整流動食の摂取によりアシルグレリンの産生が亢進することが明らかになり、このことも全身性炎症反応の抑制やがん悪液質の発症予防の機序の一つとして考えられた。

一方で、本研究の限界として以下の三点が挙げられる。一つ目として、免疫調整流動食に配合された原料のどの成分が、どの程度結果に関与したかは明らかにされていないことが挙げられる。各成分の寄与度を明らかにすることは今後の検討課題である。また、本研究では、実験動物への免疫調整流動食の投与を、液状のまま経腸栄養投与を行っておらず、凍結乾燥粉末にして経口的に自由摂取させた。臨床の現場、特に手術時での使用の際は、経腸栄養で投与することが多い。流動食の物性や投与ルートの違いがどのように影響するかが明らかにはなっておらず、この点についても今後の検討課題である。最後に、ヒトにおいて免疫調整流動食がどのような患者に対して有効なのか、またその有効用量がどれくらいかについての検証できなかった点が挙げられる。一方、本研究で使用した免疫調整流動食は、すでに上市されており、臨床現場において周術期を中心に利用されている。これまでにこの免疫調整流動食を使用した臨床研究がいくつか報告されている。食道切除手術を施行する食道がん患者に対して、術前に免疫調整流動食を摂取することで、汎用流動食を摂取した群よりも術後の TNF- α 産生が抑制された [136]。また、肝細胞がんや肝硬変等によって生体肝移植手術を行う患者に対して、術後に免疫調整流動食を用いた早期経腸栄養を行った研究では、術後の空腹時血糖値が有意に低下し、菌血症の発生率および在院日数の有意な減少が見られた [102, 103, 137]。悪性リンパ腫患者を対象とした症例研究では、化学療法の際に免疫調整流動

食を食事に取り入れることで、血中のアシルグレリン／デスアシルグレリン比の上昇と総摂取カロリー量の向上が見られた [83]。また、がん患者以外を対象とした臨床研究も報告されている。脳卒中急性期重症患者に対して免疫調整流動食を用いた早期経腸栄養を実施することで、感染性合併症発症や抗菌薬の使用量の有意な減少が確認された [138]。慢性閉塞性肺疾患患者に対して低強度運動療法を行う際に、免疫調整流動食による栄養補助を行うことで、CRP、IL-6、IL-8、TNF- α といった血中の炎症マーカーが低減し、身体組成、運動耐容能、QOL が改善した [139]。今後、臨床研究での知見を積み重ねていくことで、免疫調整流動食がどのような患者に対して有効なのか、その有効用量がどれくらいかが明らかになると考えられる。

以上より、本研究では、がんの周術期やがん悪液質、抗がん剤の副作用に対して免疫調整流動食を用いた栄養管理の有用性が示された。この機序についての仮説を Figure 6-1 に示した。今回の研究で得られた知見は、栄養療法ががんの支持療法として重要になることを示す結果であり、栄養療法を工夫することで、担がん状態およびがん治療時における代謝異常や副作用の改善が可能になることを示唆している (Figure 6-2)。今後、がんの病態に対する各種栄養成分の作用およびその機序に関する研究やヒトにおける検証を進めることで、がん治療の際の適切な栄養管理方法がさらに明らかになることが期待される。

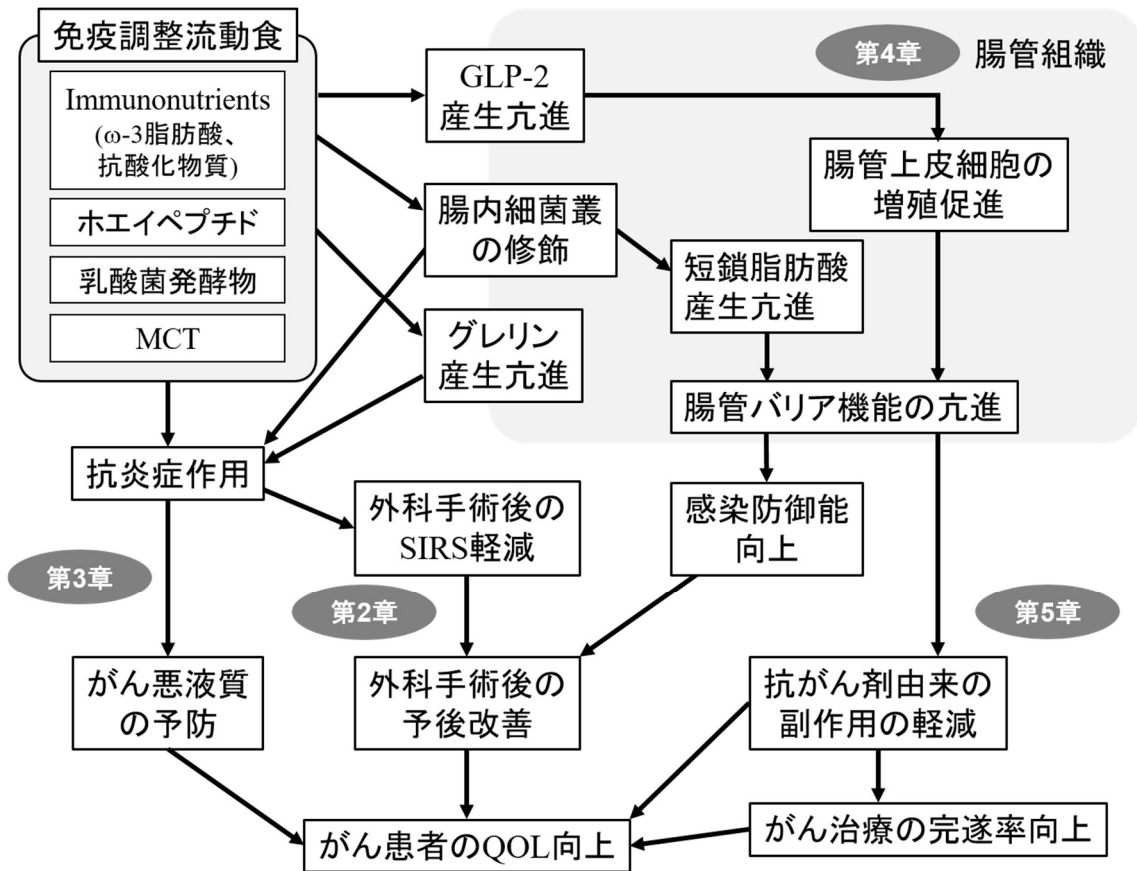


Figure 6-1. がん患者の QOL 改善に IMD が寄与する仮説.

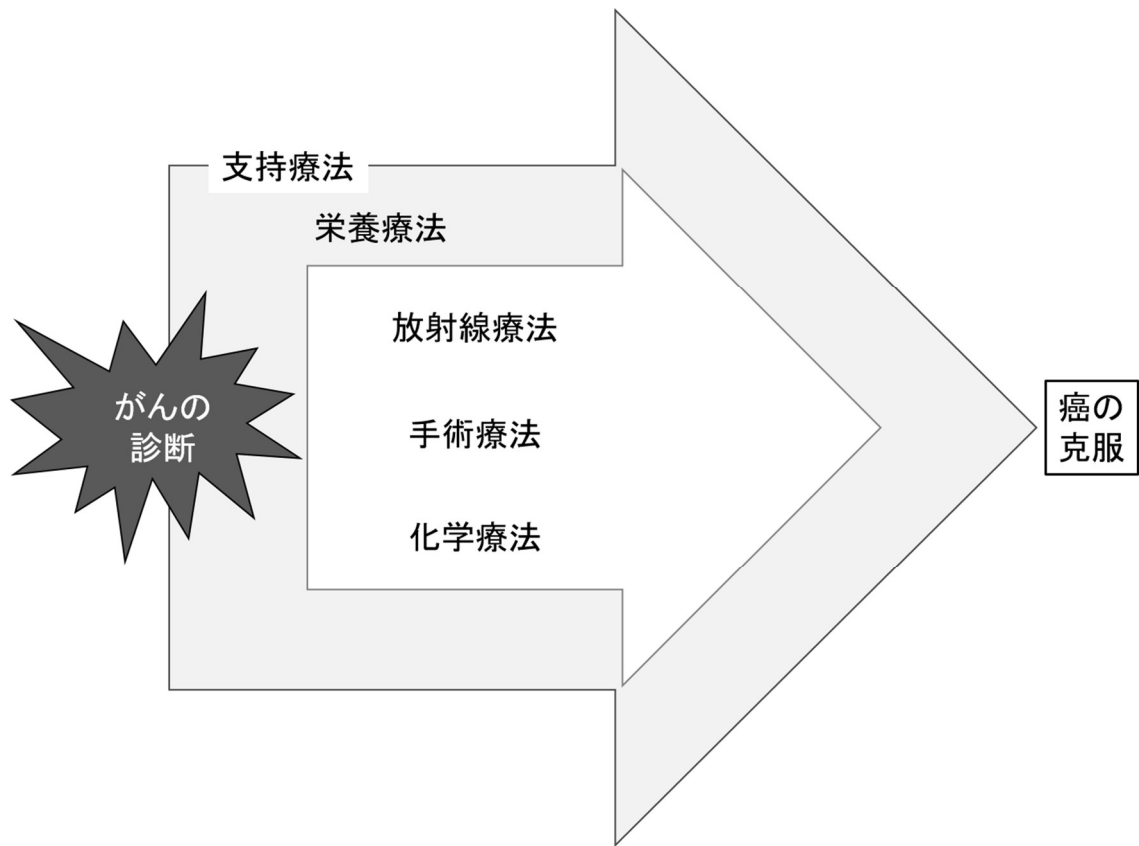


Figure 6-2. がん治療時における支持療法としての栄養療法の重要性.

参考文献

1. Ravasco P, Monteiro-Grillo I, Vidal PM, Camilo ME. Cancer: disease and nutrition are key determinants of patients' quality of life. *Support Care Cancer*. 2004; 12(4): 246-252. Epub 2004/03/05. doi: 10.1007/s00520-003-0568-z.
2. 深柄 和彦. Immunonutrients の作用機序. *静脈経腸栄養*. 2007; 22(3): 277-281. doi: 10.11244/jjsspen.22.277.
3. 静脈経腸栄養ガイドライン 第3版: 照林社; 2013.
4. Dewys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, Bertino JR, et al. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Med*. 1980; 69(4): 491-497. Epub 1980/10/01. doi: 10.1016/s0149-2918(05)80001-3.
5. 今村 博司, 岸本 朋乃, 川端 良平, 福永 睦, 大里 浩樹. がん化学療法による体重変化のしくみと対応策. *臨床栄養*. 2012; 120(7): 857-862.
6. Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol* 2011; 12(5): 489-495.
7. Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14(11): 754-762. Epub 2014/10/08. doi: 10.1038/nrc3829.
8. Prado CM, Lieffers JR, McCargar LJ, Reiman T, Sawyer MB, Martin L, et al. Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study. *Lancet Oncol*. 2008; 9(7): 629-635. Epub 2008/06/10. doi: 10.1016/s1470-

2045(08)70153-0.

9. Von Meyenfeldt MF, Meijerink WJ, Rouflart MM, Builmaassen MT, Soeters PB. Perioperative nutritional support: a randomised clinical trial. *Clin Nutr.* 1992; 11(4): 180-186. Epub 1992/08/01. doi: 10.1016/0261-5614(92)90026-m.
10. 櫻井 洋一. 外科疾患の静脈経腸栄養ガイドライン. *静脈経腸栄養.* 2013; 28(6): 1231-1238. doi: 10.11244/jjспен.28.1231.
11. キーワードでわかる臨床栄養 改訂版: 羊土社; 2011.
12. Tokunaga M, Hiki N, Fukunaga T, Ohyama S, Yamaguchi T, Nakajima T. Better 5-year survival rate following curative gastrectomy in overweight patients. *Ann Surg Oncol.* 2009; 16(12): 3245-3251. Epub 2009/07/29. doi: 10.1245/s10434-009-0645-8.
13. Weimann A, Braga M, Carli F, Higashiguchi T, Hübner M, Klek S, et al. ESPEN guideline: Clinical nutrition in surgery. *Clin Nutr.* 2017; 36(3): 623-650. Epub 2017/04/08. doi: 10.1016/j.clnu.2017.02.013.
14. 鍋谷 圭宏. Immunonutrition の実際. *静脈経腸栄養.* 2007; 22(3): 289-296. doi: 10.11244/jjспен.22.289.
15. Calder PC. Immunonutrition in surgical and critically ill patients. *British Journal of Nutrition.* 2007; 98(SupplementS1): S133-S139. doi: 10.1017/S0007114507832909.
16. Arisue A, Shimojima N, Tomiya M, Shimizu T, Harada D, Nakayama M, et al. Effect of an omega-3 lipid emulsion in reducing oxidative stress in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury. *Pediatr Surg Int.* 2012; 28(9): 913-918. Epub 2012/08/22. doi: 10.1007/s00383-012-3144-0.

17. Liu YH, Li XY, Chen CY, Zhang HM, Kang JX. Omega-3 fatty acid intervention suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation and weight loss in mice. *Mar Drugs*. 2015; 13(2): 1026-1036. Epub 2015/02/18. doi: 10.3390/md13021026.
18. Zhang R, He GZ, Wang YK, Zhou KG, Ma EL. Omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit the increase in cytokines and chemotactic factors induced in vitro by lymph fluid from an intestinal ischemia-reperfusion injury model. *Nutrition*. 2015; 31(3): 508-514. Epub 2015/02/24. doi: 10.1016/j.nut.2014.10.015.
19. Lu C, Sharma S, McIntyre L, Rhodes A, Evans L, Almenawer S, et al. Omega-3 supplementation in patients with sepsis: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Ann Intensive Care*. 2017; 7(1): 58. Epub 2017/06/07. doi: 10.1186/s13613-017-0282-5.
20. Wang C, Han D, Feng X, Wu J. Omega-3 fatty acid supplementation is associated with favorable outcomes in patients with sepsis: an updated meta-analysis. *J Int Med Res*. 2020; 48(12): 300060520953684. Epub 2020/12/30. doi: 10.1177/0300060520953684.
21. Köhler HF, DeLucca IM, Sbragia Neto L. Enteral antioxidants in ischemia/reperfusion injuries in rats. *Rev Col Bras Cir*. 2011; 38(6): 422-428. Epub 2012/01/24. doi: 10.1590/s0100-69912011000600010.
22. Manzanares W, Dhaliwal R, Jiang X, Murch L, Heyland DK. Antioxidant micronutrients in the critically ill: a systematic review and meta-analysis. *Critical Care*. 2012; 16(2): R66. doi: 10.1186/cc11316.
23. Heyland D, Dhaliwal R, Suchner U, Berger M. Antioxidant nutrients: a

systematic review of trace elements and vitamins in the critically ill patient.

Intensive Care Med. 2005; 31(3): 327-337.

24. Pontes-Arruda A, Demichele S, Seth A, Singer P. The use of an inflammation-modulating diet in patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis of outcome data. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2008; 32(6): 596-605. Epub 2008/11/01. doi: 10.1177/0148607108324203.

25. 矢野 俊正. 2. 「食品機能の系統的解析と展開」について. *化学と生物.* 1987; 25(2): 110-113. doi: 10.1271/kagakutoseibutsu1962.25.110.

26. Beaulieu J, Dupont C, Lemieux P. Whey proteins and peptides: beneficial effects on immune health. *Therapy.* 2006; 3(1): 69-78. doi: doi:10.2217/14750708.3.1.69.

27. Nakamura K, Yamaji T. Immune-Modulating Effects of Whey Proteins and Peptides. In: Benitez. RM, Ortero. GM, editors. *Whey: Types, Composition and Health Implications.* New York: Nova; 2012. p. 137-152.

28. Yamaji T, Kume H. Hepatoprotective Effects of Whey Protein and Whey Peptides on Hepatitis. *Milk Sci.* 2008; 56(3): 115-118.

29. Kume H, Okazaki K, Sasaki H. Hepatoprotective effects of whey protein on D-galactosamine-induced hepatitis and liver fibrosis in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70(5): 1281-1285.

30. Egi M, Toda Y, Katayama H, Yokoyama M, Morita K, Arai H, et al. Safer glycemic control using isomaltulose-based enteral formula: a pilot randomized crossover trial. *J Crit Care.* 2010; 25(1): 90-96. Epub 2009/09/29. doi: 10.1016/j.jcrc.2009.07.006.

31. Kume H, Okazaki K, Yamaji T, Sasaki H. A newly designed enteral formula containing whey peptides and fermented milk product protects mice against concanavalin A-induced hepatitis by suppressing overproduction of inflammatory cytokines. *Clin Nutr.* 2012; 31(2): 283-289. Epub 2011/11/29. doi: 10.1016/j.clnu.2011.10.012.
32. Hassoun HT, Kone BC, Mercer DW, Moody FG, Weisbrodt NW, Moore FA. Post-Injury Multiple Organ Failure: the Role of the Gut. *Shock.* 2001; 15(1): 1-10.
33. 深柄 和彦, 望月 英隆. 腸管虚血再灌流傷害 その機序と予防法・治療法 外科と代謝・栄養. 2007; 41(1): 1-15.
34. 正宗 淳. 急性膵炎・慢性膵炎の実験モデル 2006.
35. Dimagno MJ, Wamsteker EJ, Debenedet AT. Advances in managing acute pancreatitis. *F1000 Med Rep.* 2009; 1: 59.
36. Foitzik T, Eibl G, Schneider P, Wenger FA, Jacobi CA, Buhr HJ. Omega-3 fatty acid supplementation increases anti-inflammatory cytokines and attenuates systemic disease sequelae in experimental pancreatitis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2002; 26(6): 351-356.
37. Gray KD, Simovic MO, Blackwell TS, Christman JW, May AK, Parman KS, et al. Activation of nuclear factor kappa B and severe hepatic necrosis may mediate systemic inflammation in choline-deficient/ethionine-supplemented diet-induced pancreatitis. *Pancreas* 2006; 33(3): 260-267.
38. Grewal HP, Kotb M, el Din AM, Ohman M, Salem A, Gaber L, et al. Induction of tumor necrosis factor in severe acute pancreatitis and its subsequent reduction after hepatic passage. *Surgery* 1994; 115(2): 213-221.

39. Guice KS, Oldham KT, Remick DG, Kunkel SL, Ward PA. Anti-tumor necrosis factor antibody augments edema formation in caerulein-induced acute pancreatitis. *J Surg Res.* 1991; 51(6): 495-499.
40. Oláh A, Belágyi T, Pótó L, Romics LJ, Bengmark S. Synbiotic control of inflammation and infection in severe acute pancreatitis: a prospective, randomized, double blind study. *Hepatogastroenterology* 2007; 54(74): 590-594.
41. Nakamura K, Ogawa S, Dairiki K, Fukatsu K, Sasaki H, Kaneko T, 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(4): 513-516. Epub 2011/02/02. doi: 10.1016/j.clnu.2011.01.002.
42. Nakamura K, Fukatsu K, Sasayama A, Yamaji T. An immune-modulating formula comprising whey peptides and fermented milk improves inflammation-related remote organ injuries in diet-induced acute pancreatitis in mice. *Biosci Microbiota Food Health.* 2018; 37(1): 1-8. Epub 2018/02/02. doi: 10.12938/bmfh.17-011.
43. Oz H, Chen T, Neuman M. Nutrition intervention: a strategy against systemic inflammatory syndrome. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2009; 33(4): 380-389.
44. Colomer R, Moreno-Nogueira J, García-Luna P, García-Peris P, García-de-Lorenzo A, Zarazaga A, et al. N-3 fatty acids, cancer and cachexia: a systematic review of the literature. *Br J Nutr.* 2007; 97(5): 823-831.
45. Kinouchi T, Koyama S, Harada E, Yajima T. Large molecule protein feeding during the suckling period is required for the development of pancreatic digestive

functions in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012; 303(12): R1268-1276. Epub 2012/10/27. doi: 10.1152/ajpregu.00064.2012.

46. Maeda A, Miyagawa J, Miuchi M, Nagai E, Konishi K, Matsuo T, et al. Effects of the naturally-occurring disaccharides, palatinose and sucrose, on incretin secretion in healthy non-obese subjects. *J Diabetes Investig*. 2013; 4(3): 281-286. Epub 2014/05/21. doi: 10.1111/jdi.12045.

47. Tonouchi H, Yamaji T, Uchida M, Koganei M, Sasayama A, Kaneko T, et al. Studies on absorption and metabolism of palatinose (isomaltulose) in rats. *Br J Nutr*. 2011; 105(1): 10-14. Epub 2010/09/03. doi: 10.1017/s0007114510003193.

48. Al Bander Z, Nitert MD, Mousa A, Naderpoor N. The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17(20). Epub 2020/10/23. doi: 10.3390/ijerph17207618.

49. Nadatani Y, Watanabe T, Shimada S, Otani K, Tanigawa T, Fujiwara Y. Microbiome and intestinal ischemia/reperfusion injury. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2018; advpub. doi: 10.3164/jcbtn.17-137.

50. Wang F, Li Q, Wang C, Tang C, Li J. Dynamic alteration of the colonic microbiota in intestinal ischemia-reperfusion injury. *PLoS One*. 2012; 7(7): e42027. Epub 2012/08/01. doi: 10.1371/journal.pone.0042027.

51. Alverdy JC, Chang EB. The re-emerging role of the intestinal microflora in critical illness and inflammation: why the gut hypothesis of sepsis syndrome will not go away. *J Leukoc Biol*. 2008; 83(3): 461-466. doi: 10.1189/jlb.0607372.

52. Shimizu K, Ogura H, Goto M, Asahara T, Nomoto K, Morotomi M, et al. Altered Gut Flora and Environment in Patients with Severe SIRS. *The Journal of*

Trauma. 2006; 60(1): 126-133.

53. Lee JM, Hwang KT, Jun WJ, Park CS, Lee MY. Antiinflammatory effect of lactic acid bacteria: inhibition of cyclooxygenase-2 by suppressing nuclear factor-kappaB in Raw264.7 macrophage cells. *J Microbiol Biotechnol.* 2008; 18(10): 1683-1688. Epub 2008/10/29.

54. Ménard S, Candalh C, Bambou JC, Terpend K, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut.* 2004; 53(6): 821-828. Epub 2004/05/13. doi: 10.1136/gut.2003.026252.

55. Su KH, Cuthbertson C, Christophi C. Review of experimental animal models of acute pancreatitis. *HPB (Oxford).* 2006; 8(4): 264-286. Epub 2008/03/12. doi: 10.1080/13651820500467358.

56. Niederau C, Luthen R, Niederau MC, Grendell JH, Ferrell LD. Acute experimental hemorrhagic-necrotizing pancreatitis induced by feeding a choline-deficient, ethionine-supplemented diet. Methodology and standards. *Eur Surg Res.* 1992; 24 Suppl 1: 40-54. Epub 1992/01/01.

57. Yamaguchi I, Hamada K, Yoshida M, Isayama H, Kanazashi S, Takeuchi K. Risperidone attenuates local and systemic inflammatory responses to ameliorate diet-induced severe necrotic pancreatitis in mice: it may provide a new therapy for acute pancreatitis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 328(1): 256-262. Epub 2008/10/04. doi: 10.1124/jpet.108.141895.

58. Lundberg AH, Granger DN, Russell J, Sabek O, Henry J, Gaber L, et al. Quantitative measurement of P- and E-selectin adhesion molecules in acute

pancreatitis: correlation with distant organ injury. *Ann Surg.* 2000; 231(2): 213-222. Epub 2000/02/16.

59. Ishibashi T, Zhao H, Kawabe K, Oono T, Egashira K, Suzuki K, et al. Blocking of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) activity attenuates the severity of acute pancreatitis in rats. *J Gastroenterol.* 2008; 43(1): 79-85. Epub 2008/02/26. doi: 10.1007/s00535-007-2126-9.

60. Viedma J, Pérez-Mateo M, Agulló J, Domínguez J, Carballo F. Inflammatory response in the early prediction of severity in human acute pancreatitis. *Gut.* 1994; 35(6): 822-827.

61. Chen QP. Enteral nutrition and acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2001; 7(2): 185-192. Epub 2002/01/31. doi: 10.3748/wjg.v7.i2.185.

62. Rau B, Baumgart K, Krüger CM, Schilling M, Beger HG. CC-chemokine activation in acute pancreatitis: enhanced release of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with local and systemic complications. *Intensive Care Medicine.* 2003; 29(4): 622-629. doi: 10.1007/s00134-003-1668-4.

63. Yang Y-Z, Xiang Y, Chen M, Xian L-N, Deng X-Y. Clinical significance of dynamic detection for serum levels of MCP-1, TNF- α and IL-8 in patients with acute pancreatitis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 2016; 9(11): 1111-1114. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.09.001>.

64. Isenring EA, Capra S, Bauer JD. Nutrition intervention is beneficial in oncology outpatients receiving radiotherapy to the gastrointestinal or head and neck area. *Br J Cancer.* 2004; 91(3): 447-452.

65. Ravasco P, Monteiro-Grillo I, Marques Vidal P, Camilo ME. Impact of

nutrition on outcome: A prospective randomized controlled trial in patients with head and neck cancer undergoing radiotherapy. *Head & Neck*. 2005; 27(8): 659-668. doi: 10.1002/hed.20221.

66. Arends J, Bodoky G, Bozzetti F, Fearon K, Muscaritoli M, Selga G, et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Non-surgical oncology. *Clin Nutr*. 2006; 25(2): 245-259. Epub 2006/05/16. doi: 10.1016/j.clnu.2006.01.020.

67. Tisdale MJ. Mechanisms of Cancer Cachexia. *Physiol Rev*. 2009; 89(2): 381-410. doi: 10.1152/physrev.00016.2008.

68. Deans C, Wigmore SJ. Systemic inflammation, cachexia and prognosis in patients with cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2005; 8(3): 265-269.

69. Hambek M, Baghi M, Wagenblast J, Schmitt J, Baumann H, Knecht R. Inverse correlation between serum PGE2 and T classification in head and neck cancer. *Head & Neck*. 2007; 29(3): 244-248. doi: 10.1002/hed.20503.

70. Martín F, Santolaria F, Batista N, Milena A, González-Reimers E, Brito M, et al. Cytokine levels (IL-6 and IFN- γ), acute phase response and nutritional status as prognostic factors in lung cancer. *Cytokine*. 1999; 11(1): 80-86.

71. Ravasco P, Monteiro-Grillo I, Camilo M. How Relevant Are Cytokines in Colorectal Cancer Wasting? *Cancer J*. 2007; 13(6): 392-398.

72. Fearon K. Cancer cachexia: developing multimodal therapy for a multidimensional problem. *Eur J Cancer*. 2008; 44(8): 1124-1132.

73. Baldwin C. Nutritional support for malnourished patients with cancer. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2011; 5(1): 29-36.

74. 遠藤 良夫, 佐々木 琢磨. ヌクレオシド系核酸代謝拮抗剤の作用機序と耐

性化. 金沢大学十全医学会雑誌第. 2006; 115(1): 51-55.

75. Dong J, Yang J, Chen M, Wang X, Wu Z, Chen Y, et al. A comparative study of gene vaccines encoding different extracellular domains of the vascular endothelial growth factor receptor 2 in the mouse model of colon adenocarcinoma CT-26. *Cancer Biol Ther.* 2008; 7(4): 502-509.

76. Strassmann G, Fong M, Kenney J, Jacob C. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *J Clin Invest.* 1992; 89(5): 1681-1684.

77. Tanaka Y, Eda H, Tanaka T, Udagawa T, Ishikawa T, Horii I, et al. Experimental cancer cachexia induced by transplantable colon 26 adenocarcinoma in mice. *Cancer Res.* 1990; 50(8): 2290-2295.

78. Argilés J, Busquets S, López-Soriano F. Anti-inflammatory therapies in cancer cachexia. *Eur J Pharmacol* 2011; 668, Supplement 1(0): S81-S86.

79. Fearon KCH, von Meyenfeldt MF, Moses AGW, van Geenen R, Roy A, Gouma DJ, et al. Effect of a protein and energy dense n-3 fatty acid enriched oral supplement on loss of weight and lean tissue in cancer cachexia: a randomised double blind trial. *Gut.* 2003; 52(10): 1479-1486. doi: 10.1136/gut.52.10.1479.

80. Genton L, Mareschal J, Charretier Y, Lazarevic V, Bindels LB, Schrenzel J. Targeting the Gut Microbiota to Treat Cachexia. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019; 9: 305. Epub 2019/10/02. doi: 10.3389/fcimb.2019.00305.

81. Herremans KM, Riner AN, Cameron ME, Trevino JG. The Microbiota and Cancer Cachexia. *International journal of molecular sciences.* 2019; 20(24): 6267. doi: 10.3390/ijms20246267.

82. Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ. Effect of branched-chain amino acids on muscle atrophy in cancer cachexia. *Biochem J.* 2007; 407(1): 113-120. Epub 2007/07/12. doi: 10.1042/bj20070651.
83. Nakaya N, Nakamura K, Tonouchi H, Senpuku Y, Muramatsu M, Takemasa Y, et al. An Immune-modulating Diet Maintains Food Intake during Cancer Chemotherapy. *Med Clin Res.* 2020; 5(9): 239-244.
84. Cariuk P, Lorite MJ, Todorov PT, Field WN, Wigmore SJ, Tisdale MJ. Induction of cachexia in mice by a product isolated from the urine of cachectic cancer patients. *Br J Cancer.* 1997; 76(5): 606-613. Epub 1997/01/01. doi: 10.1038/bjc.1997.433.
85. Nukatsuka M, Fujioka A, Saito H, Uchida J, Takeda S, Unemi N. Prolongation of survival and antitumor activity of antitumor drugs in murine cancer cachexia model. *Jpn J Cancer Chemother.* 1996; 23(7): 887-892.
86. Tanaka Y, Tanaka T, Ishitsuka H. Antitumor activity of indomethacin in mice bearing advanced colon 26 carcinoma compared with those with early transplants. *Cancer Res.* 1989; 49(21): 5935-5939.
87. Lorite MJ, Cariuk P, Tisdale MJ. Induction of muscle protein degradation by a tumour factor. *Br J Cancer.* 1997; 76(8): 1035-1040. Epub 1997/01/01. doi: 10.1038/bjc.1997.504.
88. Trappe TA, Carroll CC, Dickinson JM, LeMoine JK, Haus JM, Sullivan BE, et al. Influence of acetaminophen and ibuprofen on skeletal muscle adaptations to resistance exercise in older adults. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011; 300(3): R655-662. Epub 2010/12/17. doi: 10.1152/ajpregu.00611.2010.

89. Trappe TA, Standley RA, Jemiolo B, Carroll CC, Trappe SW. Prostaglandin and myokine involvement in the cyclooxygenase-inhibiting drug enhancement of skeletal muscle adaptations to resistance exercise in older adults. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013; 304(3): R198-205. Epub 2012/12/12. doi: 10.1152/ajpregu.00245.2012.
90. Smith KL, Tisdale MJ. Mechanism of muscle protein degradation in cancer cachexia. *Br J Cancer*. 1993; 68(2): 314-318. Epub 1993/08/01. doi: 10.1038/bjc.1993.334.
91. Lai V, George J, Richey L, Kim HJ, Cannon T, Shores C, et al. Results of a pilot study of the effects of celecoxib on cancer cachexia in patients with cancer of the head, neck, and gastrointestinal tract. *Head Neck*. 2008; 30(1): 67-74. Epub 2007/07/07. doi: 10.1002/hed.20662.
92. McMillan DC, Wigmore SJ, Fearon KC, O'Gorman P, Wright CE, McArdle CS. A prospective randomized study of megestrol acetate and ibuprofen in gastrointestinal cancer patients with weight loss. *Br J Cancer*. 1999; 79(3-4): 495-500. Epub 1999/02/23. doi: 10.1038/sj.bjc.6690077.
93. Achiwa H, Yatabe Y, Hida T, Kuroishi T, Kozaki K, Nakamura S, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in primary, resected lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 1999; 5(5): 1001-1005. Epub 1999/06/03.
94. Swami S, Krishnan AV, Moreno J, Bhattacharyya RB, Peehl DM, Feldman D. Calcitriol and genistein actions to inhibit the prostaglandin pathway: potential combination therapy to treat prostate cancer. *J Nutr*. 2007; 137(1 Suppl): 205s-

210s. Epub 2006/12/22. doi: 10.1093/jn/137.1.205S.

95. Ranger GS, Thomas V, Jewell A, Mokbel K. Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with distant metastases in breast cancer. *Anticancer Res.* 2004; 24(4): 2349-2351. Epub 2004/08/28.

96. Carson JA, Baltgalvis KA. Interleukin 6 as a key regulator of muscle mass during cachexia. *Exerc Sport Sci Rev.* 2010; 38(4): 168-176. Epub 2010/09/28. doi: 10.1097/JES.0b013e3181f44f11.

97. Ishikawa D, Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, et al. Whey protein isolate, MEIN (R), can reduce liver damage early after living donor liver transplantation. *Transplant International.* 2011; 24: 311.

98. Kemik O, Sumer A, Kemik AS, Hasirci I, Purisa S, Dulger AC, et al. The relationship among acute-phase response proteins, cytokines and hormones in cachectic patients with colon cancer. *World J Surg Oncol.* 2010; 8: 85. Epub 2010/10/06. doi: 10.1186/1477-7819-8-85.

99. Watanabe T, Shibata M, Nishiyama H, Soeda S, Furukawa S, Gonda K, et al. Serum levels of rapid turnover proteins are decreased and related to systemic inflammation in patients with ovarian cancer. *Oncol Lett.* 2014; 7(2): 373-377. Epub 2014/01/08. doi: 10.3892/ol.2013.1735.

100. Glass DJ. Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010; 13(3): 225-229. Epub 2010/04/20. doi: 10.1097/mco.0b013e32833862df.

101. Wyke SM, Russell ST, Tisdale MJ. Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF-kappaB activation. *Br J Cancer.*

2004; 91(9): 1742-1750. Epub 2004/10/13. doi: 10.1038/sj.bjc.6602165.

102. Kaido T, Mori A, Ogura Y, Hata K, Yoshizawa A, Iida T, et al. Impact of enteral nutrition using a new immuno-modulating diet after liver transplantation. *Hepatogastroenterology*. 2010; 57(104): 1522-1525.

103. Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Hata K, Yoshizawa A, Yagi S, et al. Effects of post-transplant enteral nutrition with an immunomodulating diet containing hydrolyzed whey peptide after liver transplantation. *World J Surg*. 2012; 36(7): 1666-1671.

104. 佐藤 伸悟, 三浦 総一郎. Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) と小腸の消化・吸収 . 日本消化器病学会雑誌 . 2011; 108(4): 564-574. doi: 10.11405/nisshoshi.108.564.

105. Li WG, Gavrilu D, Liu X, Wang L, Gunnlaugsson S, Stoll LL, et al. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells. *Circulation*. 2004; 109(18): 2221-2226. Epub 2004/05/01. doi: 10.1161/01.cir.0000127956.43874.f2.

106. Molino A, Formiconi A, Rossi Fanelli F, Muscaritoli M. Ghrelin: from discovery to cancer cachexia therapy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2014; 17(5): 471-476. Epub 2014/06/07. doi: 10.1097/mco.0000000000000075.

107. Prodam F, Filigheddu N. Ghrelin Gene Products in Acute and Chronic Inflammation. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2014; 62(5): 369-384. doi: 10.1007/s00005-014-0287-9.

108. Kaneko T, Mori H, Iwata M, Meguro S. Growth Stimulator for Bifidobacteria Produced by *Propionibacterium freudenreichii* and Several Intestinal Bacteria.

Journal of Dairy Science. 1994; 77(2): 393-404. doi:

[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)76965-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)76965-4).

109. Niwa T, Nakao M, Hoshi S, Yamada K, Inagaki K, Nishida M, et al. Effect of Dietary Fiber on Morphine-induced Constipation in Rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2002; 66(6): 1233-1240. doi: 10.1271/bbb.66.1233.

110. Ashitani J, Matsumoto N, Nakazato M. Effect of octanoic acid-rich formula on plasma ghrelin levels in cachectic patients with chronic respiratory disease. *Nutr J*. 2009; 8: 25. Epub 2009/06/17. doi: 10.1186/1475-2891-8-25.

111. Nishi Y, Hiejima H, Hosoda H, Kaiya H, Mori K, Fukue Y, et al. Ingested Medium-Chain Fatty Acids Are Directly Utilized for the Acyl Modification of Ghrelin. *Endocrinology*. 2005; 146(5): 2255-2264. doi: 10.1210/en.2004-0695.

112. Burrin DG, Petersen Y, Stoll B, Sangild P. Glucagon-like peptide 2: a nutrient-responsive gut growth factor. *J Nutr*. 2001; 131(3): 709-712. Epub 2001/03/10. doi: 10.1093/jn/131.3.709.

113. Izumi H, Ishizuka S, Inafune A, Hira T, Ozawa K, Shimizu T, et al. alpha-Lactalbumin hydrolysate stimulates glucagon-like peptide-2 secretion and small intestinal growth in suckling rats. *J Nutr*. 2009; 139(7): 1322-1327. Epub 2009/06/06. doi: 10.3945/jn.109.106401.

114. 稲垣 暢也. 4. 膵・腸管内分泌機能と糖尿病. *日本内科学会雑誌*. 2019; 108(9): 1713-1722. doi: 10.2169/naika.108.1713.

115. Garcia-Albiach R, Pozuelo de Felipe MJ, Angulo S, Morosini MI, Bravo D, Baquero F, et al. Molecular analysis of yogurt containing *Lactobacillus delbrueckii*

- subsp. bulgaricus and *Streptococcus thermophilus* in human intestinal microbiota. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87(1): 91-96. Epub 2008/01/08. doi: 10.1093/ajcn/87.1.91.
116. Yanagawa M, Fukatsu K, Mitsui T, Murakoshi S, Yasuhara H, Nishimura R. Effects of a new immune-modulating diet enriched with whey-hydrolyzed peptide, fermented milk, and isomaltulose on gut associated lymphoid tissue in mice. *e-SPEN Journal.* 2013; 8(6): e241-e245. doi: <https://doi.org/10.1016/j.clnme.2013.08.003>.
117. Bounous G, Kongshavn PA. Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T-cell immune responses in mice. *J Nutr.* 1985; 115(11): 1403-1408. Epub 1985/11/01. doi: 10.1093/jn/115.11.1403.
118. Stasi C, Milani S. Functions of Ghrelin in Brain, Gut and Liver. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2016; 15(8): 956-963. Epub 2016/07/12. doi: 10.2174/1871527315666160709203525.
119. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999; 402(6762): 656-660. Epub 1999/12/22. doi: 10.1038/45230.
120. Stringer AM, Gibson RJ, Logan RM, Bowen JM, Yeoh AS, Hamilton J, et al. Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-Fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2009; 234(4): 430-441. Epub 2009/01/30. doi: 10.3181/0810-rm-301.
121. Chang CT, Ho TY, Lin H, Liang JA, Huang HC, Li CC, et al. 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor-kappaB activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. *PLoS One.* 2012; 7(3): e31808.

Epub 2012/03/14. doi: 10.1371/journal.pone.0031808.

122. Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, Gibson RJ, Sonis ST, Keefe DM. Serum levels of NFkappaB and pro-inflammatory cytokines following administration of mucotoxic drugs. *Cancer Biol Ther.* 2008; 7(7): 1139-1145. Epub 2008/06/07.

123. Masuda Y, Inoue M, Miyata A, Mizuno S, Nanba H. Maitake beta-glucan enhances therapeutic effect and reduces myelosuppression and nephrotoxicity of cisplatin in mice. *Int Immunopharmacol.* 2009; 9(5): 620-626. Epub 2009/03/03. doi: 10.1016/j.intimp.2009.02.005.

124. Xue H, Sawyer MB, Wischmeyer PE, Baracos VE. Nutrition modulation of gastrointestinal toxicity related to cancer chemotherapy: from preclinical findings to clinical strategy. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2011; 35(1): 74-90. Epub 2011/01/13. doi: 10.1177/0148607110377338.

125. Trifan OC, Durham WF, Salazar VS, Horton J, Levine BD, Zweifel BS, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib enhances antitumor efficacy and reduces diarrhea side effect of CPT-11. *Cancer Res.* 2002; 62(20): 5778-5784. Epub 2002/10/18.

126. Xue H, Sawyer MB, Field CJ, Dieleman LA, Baracos VE. Nutritional modulation of antitumor efficacy and diarrhea toxicity related to irinotecan chemotherapy in rats bearing the ward colon tumor. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(23): 7146-7154. Epub 2007/12/07. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-07-0823.

127. Lee H-O, Lee J-J. Nutritional intervention using nutrition care process in a malnourished patient with chemotherapy side effects. *Clin Nutr Res.* 2015; 4(1): 63-67. Epub 12/08. doi: 10.7762/cnr.2015.4.1.63.

128. Yang YH, Lee DS. The relationship of anorexia, nausea, vomiting, oral intake and nutritional status in patients receiving chemotherapy. *J Korean Acad Nurs.* 2000; 30(3): 720-730.
129. Cinausero M, Aprile G, Ermacora P, Basile D, Vitale MG, Fanotto V, et al. New frontiers in the pathobiology and treatment of cancer regimen-related mucosal injury. *Front Pharmacol.* 2017; 8(354). doi: 10.3389/fphar.2017.00354.
130. Nurgali K, Jagoe RT, Abalo R. Editorial: adverse effects of cancer chemotherapy: Anything new to improve tolerance and reduce sequelae? *Front Pharmacol.* 2018; 9: 245-245. doi: 10.3389/fphar.2018.00245.
131. Kume H, Nakamura K, Okazaki K, Matsuura M, Yamaji T, Ashida K. Influence of nutritional management using an enteral formula MHN-02 on intestinal tissue structure in rats. *Milk Sci.* 2018; 67(1): 30-33. doi: 10.11465/milk.67.30.
132. Li H-L, Lu L, Wang X-S, Qin L-Y, Wang P, Qiu S-P, et al. Alteration of gut microbiota and inflammatory cytokine/chemokine profiles in 5-fluorouracil induced intestinal mucositis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7(455). doi: 10.3389/fcimb.2017.00455.
133. Osterlund P, Ruotsalainen T, Korpela R, Saxelin M, Ollus A, Valta P, et al. Lactobacillus supplementation for diarrhoea related to chemotherapy of colorectal cancer: a randomised study. *Br J Cancer.* 2007; 97(8): 1028-1034. Epub 2007/09/27. doi: 10.1038/sj.bjc.6603990.
134. Von Bultzingslowen I, Adlerberth I, Wold AE, Dahlen G, Jontell M. Oral and intestinal microflora in 5-fluorouracil treated rats, translocation to cervical and mesenteric lymph nodes and effects of probiotic bacteria. *Oral Microbiol Immunol.*

2003; 18(5): 278-284. Epub 2003/08/22.

135. Nakamura K, Sasayama A, Takahashi T, Yamaji T. An immune-modulating diet in combination with chemotherapy prevents cancer cachexia by attenuating systemic inflammation in colon 26 tumor-bearing mice. *Nutr Cancer*. 2015; 67(6): 912-920. Epub 2015/07/03. doi: 10.1080/01635581.2015.1053495.

136. Kitagawa H, Namikawa T, Yatabe T, Munekage M, Yamasaki F, Kobayashi M, et al. Effects of a preoperative immune-modulating diet in patients with esophageal cancer: a prospective parallel group randomized study. *Langenbecks Arch Surg*. 2017; 402(3): 531-538. Epub 2017/03/12. doi: 10.1007/s00423-016-1538-5.

137. Kamo N, Kaido T, Hamaguchi Y, Uozumi R, Okumura S, Kobayashi A, et al. Impact of Enteral Nutrition with an Immunomodulating Diet Enriched with Hydrolyzed Whey Peptide on Infection After Liver Transplantation. *World Journal of Surgery*. 2018; 42(11): 3715-3725. doi: 10.1007/s00268-018-4680-0.

138. 一ツ松 勤, 一ツ松 薫, 田中 俊也, 石堂 克哉, 理. 伊. 脳卒中急性期重症患者に対する早期経腸免疫栄養の効果 : 当施設での検討. *脳卒中*. 2017; 39(3): 177-183. doi: 10.3995/jstroke.10434.

139. Sugawara K, Takahashi H, Kashiwagura T, Yamada K, Yanagida S, Homma M, et al. Effect of anti-inflammatory supplementation with whey peptide and exercise therapy in patients with COPD. *Respiratory Medicine*. 2012; 106(11): 1526-1534. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2012.07.001>.

論文の内容の要旨

論文題目 がん治療における免疫栄養療法に関する研究

氏 名 中村 健太郎

がんは、1981年から日本人の死亡原因の第1位であり、2019年のがん死亡者数は、約37万6千人に上る。一方で、長年に渡るがん研究の成果および医療技術の進歩と普及によって、がん患者の5年生存率は大きく改善した。現在は、がんの治療を続けながら、日常生活を送る期間が長くなっているため、がんの治療効果だけでなく、がん患者の生活の質（QOL）も重要視されている。

がんの治療は、手術療法・化学療法・放射線療法の三大療法を中心に進められているが、三大療法を組み合わせるだけでなく、QOLを下げないための支持療法も組み合わせた集学的治療が進められている。これまでに、がん患者のQOL低下には、患者の体重減少や栄養不良といった要因が大きいことが明らかになっている。そのため、がん患者の治療に際しては、栄養不良を防ぐために適切な栄養管理が重要になる。ただし、がん患者では通常とは異なる代謝や生体反応が生じている。特に、がんの存在やがん治療に伴う生体へのストレスによって、異常な免疫反応が引き起こされ、栄養不良の原因となっている。免疫反応は外来侵入から生体を保護する上で不可欠な過程であるが、一方で異常な免疫反応は生体に悪影響を及ぼす。そのため、がん患者に対しては、これらを考慮した栄養管理が必要になる。

そこで本研究では、種々のがん治療の際の適切な栄養管理方法を見出すことを目的とし、そのための基盤研究として、「手術（外科治療）」および「薬物療法（抗がん剤治療）」で問題となる生体異常反応を制御する栄養管理方法とその作用機構を検討した。本検討に際しては、より実践的な領域の研究として、医療現場で栄養管理を行う際に使用される流動食を用いて研究を行った。具体的には、流動食の基本的役割である一次機能を満たすだけでなく、三次機能を付与するために栄養組成を工夫した免疫調整流動食（IMD）を用いて、がん治療時の栄養管理に対する評価とその作用機構を検討した。

本研究ではまず、がんの手術時における適切な栄養管理について検討を行った。

第 2 章では、IMD を利用した栄養管理を行うことで、周術期の侵襲ストレスによって生じる異常な生体反応を予防、軽減できるかどうかを明らかにするために、腸管虚血再灌流 (I/R) による全身性炎症反応モデルおよび食事誘発性急性膵炎による遠隔臓器障害モデルを用いて IMD の効果を検討した。食道がん等の生体への侵襲が大きい高度外科手術を行った際には、生体への侵襲ストレスによって過剰な炎症反応が惹起され、それにより多臓器不全が生じ、術後の生存が悪化することが問題となる。これらの生体反応の機序として I/R が考えられており、その動物モデルを用いて IMD の効果を検討した。通常の栄養管理で使われる一般的な組成の流動食 (汎用流動食) または IMD をマウスに 2 週間投与した後に I/R 手術を実施した。手術後の生存を確認したところ、IMD 投与により術後早期の生存率が改善した。また、手術後の血中 IL-6 濃度および血糖値の上昇が、IMD 投与によって抑制された。本研究により IMD を術前に投与することでがん手術後の生存が改善される可能性が示唆された。また、過剰な炎症反応が生じた後に IMD による栄養管理を行う有用性を明らかにするために、マウスを用いて遠隔臓器障害モデルの構築を行い、炎症発症後からの IMD 投与の効果を評価した。コリン欠乏エチオニン添加食誘発性急性膵炎による遠隔臓器障害モデルを用いて、炎症発症後から IMD を投与したところ、汎用流動食と比較して脾臓や肝臓の腫大、および血中の肝酵素指標の上昇が有意に改善された。また、血中 MCP-1 濃度の上昇が IMD 投与によって有意に抑制された。これらの結果から、炎症が発症した後でも IMD による栄養管理を行うことで、遠隔臓器障害が軽減されることが示唆された。

IMD には、免疫能を増強、調整する作用が報告されている、 ω -3 多価不飽和脂肪酸や抗酸化ビタミン、ミネラルといった栄養素が配合されている。さらに、抗炎症作用を有するホエイペプチドや、腸内環境を改善する効果が期待される乳酸菌発酵物が配合されている。今回、これらの成分の組み合わせにより IMD の抗炎症作用が発揮されたと考えられた。以上の結果から、IMD による栄養管理は、がん手術後の過剰な炎症反応を抑え、がん患者の予後を改善する可能性が考えられた。

がん患者では代謝異常を伴うため、通常の栄養管理では体重や筋肉の維持・改善が困難な「がん悪液質」に陥りやすい。そのため、がんの治療中には、がんの代謝異常や悪液質を考慮した栄養管理が必要になる。第 3 章では、がん悪液質に対する化学療法と IMD を用いた栄養管理の効果を検討した。マウス結腸がん細胞株

Colon26 細胞を皮下移植したマウスに、抗がん剤 5-フルオロウラシル (5-FU) を投与しながら、汎用流動食または IMD を 3 週間摂取させた。その結果、5-FU と IMD の併用によって、体重および筋肉量が維持された。また、IMD と 5-FU を併用したマウスでは、汎用流動食を摂取させた場合と比べて、血漿中の PGE₂ 濃度が有意に低下しており、血漿中 IL-6 濃度および VEGF 濃度も同様に低下が認められた。腫瘍重量は汎用流動食と IMD で差はなく、IMD が 5-FU の抗腫瘍効果を減弱させることはなかった。以上より、抗がん剤と IMD の併用は、がんの進展に伴う体重や除腫瘍体重、筋肉の減少を抑制することが明らかになり、その機序としてがんによる全身性炎症反応の抑制が示唆された。IMD による栄養管理を化学療法中に行うことで、抗がん剤の効果を維持しつつ、がん悪液質を予防できる可能性が考えられた。

外科手術後には絨毛萎縮等の腸管機能低下や腸内環境悪化をきたし、下痢や消化吸収不良が起きる。下痢の発生は栄養の吸収不良につながり、また必要量の流動食の投与が難しくなるため、外科手術時に腸管の維持は重要である。さらに、腸管バリア機能や腸内環境の維持は、術後の生存や遠隔臓器障害の改善に寄与する要因の一つと考えられている。第 4 章では、IMD が腸管および腸内環境に与える影響を明らかにすることを目的として、正常マウスおよび正常ラットへの IMD 投与の影響を検討した。マウスに IMD を 2 週間投与することで、汎用流動食に比べて小腸組織重量、および盲腸内短鎖脂肪酸量、血漿中 GLP-2 濃度、血漿中グレリン濃度が有意に増加した。また、IMD を 2 週間摂取したラットの小腸組織では汎用流動食に比べ、絨毛が有意に長く、陰窩が深く、陰窩中の分裂細胞数が増加した。これら腸管組織の変化に加え、IMD を摂取したラット盲腸中では、*Bifidobacterium* 属と *Lactobacillus* 属の細菌数の増加が認められた。また、これらの効果は、IMD に配合した乳酸菌発酵物やイソマルツロース、ホエイペプチド、中鎖脂肪酸油脂が寄与したと考えられた。以上の結果より、IMD は腸内細菌叢を改善し、腸管内の短鎖脂肪酸の増加や、GLP-2、グレリンといった消化管ホルモンの産生亢進を誘導することが明らかになった。さらに、これらの作用が腸管の絨毛伸長を促し、また、IMD 摂取による全身性炎症反応の抑制やがん悪液質の発症予防の機序の一つとして考えられた。

がんの化学療法中には、抗がん剤の副作用によって、抗がん剤の使用量制限や、

患者の栄養不良、QOL 低下につながる。そのため、化学療法中には、がん悪液質を考慮した栄養管理に加えて、抗がん剤の副作用も考慮した栄養介入が必要になる。第 5 章では、IMD が抗がん剤 5-FU により誘発される副作用を予防できるかどうかを検討した。汎用流動食または IMD をラットに 2 週間摂取させた後に 5-FU を投与し、その後の副作用発現を観察した。その結果、IMD は 5-FU 投与後に誘発される体重や摂餌量、白血球数の減少を抑制した。また、IMD の摂取は 5-FU 投与後の腸管絨毛の萎縮を予防し、下痢の発生を遅延させた。第 3 章と第 5 章で得られた知見を統合すると、化学療法の際に IMD による栄養管理を行うことで、がん悪液質への進展を予防しつつ、抗がん剤の副作用を低減できる可能性が考えられた。

以上のように、本研究では様々ながん治療における適切な栄養管理方法を見出すことを目的とし、そのための基盤研究として、動物モデルを用いて IMD の投与が周術期や化学療法時に与える影響を検討した。併せて、IMD 投与が腸管および腸内環境に与える影響とその作用機構の解明を試みた。結果として、がん治療における手術や化学療法の際に IMD を用いた栄養管理の有用性を提案することができ、また、その機序を明らかにすることができた。本研究では、これら食品の生体調節機能の作用機構についての情報を取得したことから、それぞれの作用機構の違いを踏まえた上で、これらの食品成分を組み合わせるなど、今後、がん患者向け食品への活用が期待される。

謝辞

本論文の執筆にあたり、多大なる御指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科の八村敏志准教授に深く感謝の意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、ご指導賜りました東京大学医学部附属病院手術部の深柄和彦教授、ならびに上尾中央総合病院腫瘍内科の中島日出夫博士、中谷直喜博士に深く感謝申し上げます。

さらに本研究を進めるにあたり、多大なる御協力と御助言をいただきました、山地健人博士、芦田欣也博士、松浦基博士、大力一雄博士、糸久枝博士、高橋毅博士、金子哲夫博士、佐々木一博士、殿内秀和氏をはじめとする株式会社 明治の関係者の皆様に心から感謝いたします。また、技術的な面から本研究の遂行を支えてくださった岡崎恵子氏、笹山秋菜氏、今野沙織氏に感謝いたします。学位取得に向けて、親身になって相談に乗っていただいた中村吉孝博士に深く感謝申し上げます。

最後に本論文の執筆を進めるにあたり、陰ながら温かく応援してくれた家族に感謝いたします。