博士論文（要約）

経腸栄養の投与部位と栄養剤組成が腸管免疫におよぼす影響

柳川　将志

目次

第１章　緒言……　1

第２章　経腸栄養の投与部位が GALT リンパ球数と
粘膜 IgA 濃度におよぼす影響……　12
背景と目的……　13
方法……　15
結果……　22
考察……　25
図、表……　30

第３章　回腸瘻による栄養管理が GALT リンパ球数
および各種メディエーターにおよぼす影響……　40
背景と目的……　41
方法……　44
結果……　48
考察……　53
図、表……　57

第４章　新規栄養製剤が GALT リンパ球数
および粘膜 IgA 濃度におよぼす影響……　74
背景と目的……　75
方法……　77
結果……　80
考察……　84
図、表……　87

第５章　総括……　98

謝辞……　103

参考文献……　104

第１章

緒言

本章の内容は共著者の同意が得られていないため、公表できない。

第２章

経腸栄養の投与部位が GALT リンパ球数と粘膜 IgA 濃度におよぼす影響

背景と目的

経腸栄養は静脈栄養と比べ、腸管免疫能を始めとする感染防御能の維持に有利に働くことが示されており、臨床例においても感染性合併症の発生率が低下することが報告されている(Marik and Zaloga, 2001)。しかし、同じ経腸栄養であっても患者によってその投与部位は異なる。十分量の栄養が経口摂取できれば理想的であるが、術後患者や重症患者の多くは経管栄養に頼らざるを得ない。経管栄養の中で最も一般的なのは設置および管理が比較的容易な胃瘻であり、経鼻胃管、経食道あるいは経胃カテーテルを用いて胃内に直接栄養が投与される。しかし、患者の状態によっては胃瘻による栄養投与が実施しにくい、あるいはできない場合も少なくない。例えば重症患者では消化管運動が抑制されていることが多く(Adam and Batson, 1997) 、そのため投与した栄養剤が腸に流れず、栄養剤が吸収されないばかりでなく、胃内に貯留し、嘔吐を誘発する原因にもなりうる(Kuppinger et al., 2013; McClave et al., 2009)。このような場合、栄養チューブの先端を幽門より遠位の空腸まで進めることで栄養剤が胃に貯留せず嘔吐の発生を抑制でき、さらに栄養投与量も増やすことが可能になることが報告されている(Deane Adam et al., 2013)。その他、重症急性膵炎患者のように膵外分泌を抑制したい場合(Kaushik et al., 2005)には空腸から栄養が投与されることも多く、また空腸の大部分あるいは全部が切除された場合には回腸から栄養を投与せざるを得ない場合もある。

しかし栄養剤の投与部位の違いが腸管免疫にどのような影響をおよぼすのかについては

全く明らかにされていない。経管栄養の投与部位の違いが腸管免疫にも大きな影響を与えるのであれば、栄養投与法の選択にはこの影響も考慮する必要がある。

そこで本章では、マウスに経口摂取、および胃瘻、空腸瘻、回腸瘻を造設して栄養管理を行い GALT リンパ球、粘膜 IgA 濃度に関する検討を加えることで栄養剤の消化管への投与部位の違いが腸管免疫におよぼす影響について検討した。

方法

実験１　GALT リンパ球の解析

供試動物

実験には 6 週齢の雄性 ICR マウス（n=45）を用い、経口摂取群（ORAL: n=9）、胃瘻群（GAST: n=12）、空腸瘻群（JEJ: n=12）、回腸瘻群（ILEO: n=12）の 4 群に無作為に分けた。

動物の準備

実験に先立ち、ORAL 群および GAST 群には胃瘻チューブ、JEJ 群、ILEO 群には腸瘻チューブの設置を行った。チューブ設置はケタミン（100 mg/kg, SC）、キシラジン（10 mg/kg, SC）による全身麻酔下で行った。ORAL 群、GAST 群では麻酔下に上腹部正中切開を行い、胃体部に 7-0 GORE-TEX　Suture CV-7（W. L. Gore & Associates, Inc., Arizona, USA）で巾着縫合をかけ 23G 針を用いて小孔を作成し、同部からシリコンチューブ（内径 0.5 mm ×外径 1.0 mm、アズワン株式会社,大阪）を 1cm 胃内に挿入し、チューブの固定を行った。チューブは背部皮下を通し、尾部から体外に出した。

JEJ 群では同様に全身麻酔下で上腹部を切開し、幽門から肛門側 2.0 cm の部位に GORE-TEX　Suture CV-7 で巾着縫合をかけた。25G 注射針でチューブ挿入部位に小孔を作成し、シリコンチューブ（DETAKTA, Silikon-Kautschuk-Schlauch Type 00301（内径

0.3 mm×外径 0.4 mm、Detakta, Norderstedt, Germany,)）を 1 cm 挿入し固定した。シリコンチューブ挿入部位から約 3 mm 離れた部位の小腸に GORE-TEX　Suture CV-7 をかけチューブを固定した。GAST 群と同様にチューブは背部皮下を通し、尾部から体外に出した。

ILEO 群も JEJ 群と同様に全身麻酔下で上腹部を切開した。盲腸を確認し、口側に向かって約 25 cm の部位に JEJ と同様のシリコンチューブを設置した。チューブの設置は JEJ 群と同様に GORE-TEX　Suture CV-7 で巾着縫合をかけ、25G 注射針でチューブ挿入部位に小孔を作成し、シリコンチューブ（DETAKTA, Silikon-Kautschuk-Schlauch Type 00301）を 1 cm 挿入、固定した。

栄養剤の投与

手術終了後、代謝ケージにマウスの尾を固定し、直ちにシリコンチューブをテルフュージョン シリンジポンプ TE-331（テルモ株式会社、東京）にセットした注射器と接続した。2 日間は、胃瘻、空腸瘻、回腸瘻から生理食塩水を 0.2 ml/ hr で持続投与し、固形飼料 MF（オリエンタル酵母、東京）および水を自由摂取させた。GAST、JEJ、ILEO の 3 群は術後 3 日から 7 日の 5 日間、標準的な総合栄養流動食（MEIBALANCE, Meiji Co., Ltd ., Tokyo, Japan）をチューブから 0.8ml/hr（19.2 kcal/head/day）の速度で投与した。ORAL 群は、飲水ボトルに栄養剤を入れ自由摂取とし、胃瘻から生理食塩水を 0.2 ml/hr の速度で持続投

与した。

腸管関連リンパ装置（Gut Associated Lymphoid Tissue: GALT）リンパ球の分離

GALT リンパ球は、ケタミン（100 mg/kg, SC）、キシラジン（10 mg/kg, SC）による全身麻酔下で心臓穿刺による採血で安楽殺したマウス腸管のパイエル板、腸上皮間、粘膜固有層から採取した。リンパ球の分離は Li らの方法(Li et al., 1995)を改変して行った。

パイエル板（Payer's Paches: PP）リンパ球の採取

腸管洗浄液採取後の小腸の腸管漿膜面から確認できるパイエル板を鋏で切離、細切し 1% 抗生物質（penicillin, streptomycin）（GIBCO, Auckland, NZ）、1% グルタミン、5% FBS、コラゲナーゼ（Collagenase, from Clostridium histolyticum（Sigma, St. Louis, MO, USA））40U/ml を添加した RPMI1640 25ml に浮遊させ、37℃に設定したウォーターバスで振盪（150 rpm、60 min）した。振盪後 100μm ナイロンメッシュで試料を濾過した。濾過により得られた液を遠心分離（1500 rpm、5 min）し、上清を廃棄し得られた細胞を 1% 抗生物質、1%グルタミン、5% FBS 加 RPMI 5ml に懸濁した。懸濁試料をトリパンブルーで染色し、ビルゲルチュルク血球計算盤でリンパ球数を計数した。

腸上皮間（Intraepithelial Space: IE）リンパ球の採取

パイエル板切除後の腸管組織を翻転し、粘膜面を表に出した状態で四分割し、1 % 抗生物質、1 % グルタミン、5 % FBS を添加した RPMI1640 40 ml を加え、37 ℃に設定したウォーターバスで振盪培養（150 rpm、45 min）した。振盪培養後の試料をガラスウールカラムで濾過し、得られた試料を遠心分離（1500 rpm、10 min）後、上清を廃棄しペレットを回収した。ペレットを 40 %の Percoll PLUS（GE Healthcare, Uppsala, Sweden）に懸濁し、75 %の Percoll 上に重層し比重遠心（600 g、20 min、25 ℃）を行った。遠心分離後、境界面に存在するリンパ球を回収した。得られたリンパ球を 1 %抗生物質、1%グルタミン、5%FBS、を添加した RPMI1640 10 ml に懸濁し、遠心分離（1500 rpm、10 min）後、上清を廃棄し細胞を洗浄した。得られた細胞を 1 %抗生物質、1 %グルタミン、5 %FBS 加 RPMI に懸濁した後、懸濁試料をトリパンブルーで染色し、ビルゲルチュルク血球計算盤でリンパ球数を計数した。

粘膜固有層（Lamina Propria: LP）リンパ球の採取

前述の振盪培養後の腸管組織に抗生物質、グルタミン、FBS、コラゲナーゼを添加した RPMI1640 30 ml を加え、37 ℃に設定したウォーターバスで振盪（150 rpm、45 min）した。振盪後、上清を回収し氷上で保存した。残った腸管組織に、再度、抗生物質、グルタミン、FBS、コラゲナーゼを添加した RPMI1640 30 ml を加え同様の操作を二回繰り返し、それぞれ上清を回収した。回収した上清をまとめてガラスウールカラムで濾過し、遠心分

離（1500 rpm、10 min）後、上清を廃棄しペレットを回収した。ペレットを 40 %の Percoll に懸濁し、75%の Percoll 上に重層し比重遠心（600 g、20 min、25 ℃）を行った。遠心分離後、境界面のリンパ球を回収した。回収したリンパ球を 1%抗生物質、1%グルタミン、5%FBS、を添加した RPMI1640 10ml に懸濁し、遠心分離後（1500 rpm、10 min）上清を廃棄し細胞を洗浄した。得られた細胞を 1 %抗生物質、1 %グルタミン、5 %FBS 加 RPMI 5ml に懸濁した後、懸濁試料をトリパンブルーで染色し、ビルゲルチュルク血球計算盤でリンパ球数を計数した。

フローサイトメトリーによるリンパ球の解析

PP、IE、LP のリンパ球を RPMI1640 で希釈し fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-mouse γδTCR (clone GL3, Invitrogen, Camarillo, CA)でγδTCR 陽性 T 細胞を標識し 、phycoerythrin (PE) conjugated anti-mouse βTCR (clone H57-597, Pharmingen, San Diego, CA)でαβTCR 陽性 T 細胞を標識した。T 細胞サブセットを解析するために PE-anti-CD4 (clone RM4-5, Invitrogen) で CD4 陽性細胞、および FITC-anti-CD8α (clone 5H10, Invitrogen, Camarillo, CA)で CD8 陽性細胞を標識した。また FITC-anti-CD45R (B220) (clone RA3-6B2, Invitrogen) で B 細胞を標識した。各抗体は RPMI1640 で 1 μg/ml に希釈し、4 ℃ 30 分反応させた。RPMI1640 で各リンパ球を洗浄後、1% paraformaldehyde で固定し BD FACS Calibur（Becton Dickinson, San Jose, CA, USA）を用いて解析した。

実験２

鼻腔洗浄液の採取

実験１で安楽殺したマウスの頸部気管を露出し、喉頭に向かい 18G の留置針を留置した。留置針から、Phosphate-buffered saline 1 ml を注入し、鼻から洗浄液を回収した。採取した鼻腔洗浄液は-80℃で保存した。

肺胞洗浄液の採取

安楽殺したマウスの頚部気管から肺に向かい 18G 留置針を留置した。留置針から Phosphate-buffered saline 1ml を注入後、肺胞洗浄液を回収した。採取した肺胞洗浄液は-80℃で保存した。

腸管洗浄液の採取

安楽殺したマウスの十二指腸から回腸末端までの全小腸を採取し、腸間膜を切除した。1% penicillin, streptomycin（GIBCO, Auckland, NZ）を添加した Hank's balanced salt solution（HBSS: Sigma, St. Louis, MO, USA） 20ml で洗浄し、回収した洗浄液を遠心分離後（2000 rpm、10 min、4℃）、上清を分離して-80℃で保存した。

鼻腔洗浄液、肺胞洗浄液および腸管洗浄液中 IgA 測定

12 μg/ml の polyclonal goat anti-mouse IgA (Sigma, St. Louis, MO) を 96 穴マイクロプレートに 50μl ずつ加え固相化した（4 ℃, overnight）。各ウェルを洗浄後、1 % BSA, 0.05 % Tween20 添加 PBS 75 μl を加え、非特異反応のブロッキングを行った（37 ℃, 30 min）。標準曲線作成のための IgA 標準試薬として purified mouse IgA (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX)を用い 1000 ng、500 ng、250 ng、125 ng、62,5 ng、31,25 ng、15,635 ng に段階希釈した。各ウェルを洗浄後、IgA 標準液、鼻腔洗浄液、肺胞洗浄液、および 100 倍に希釈した腸管洗浄液を各ウェルに 50 μl 加えインキュベートした（37 ℃, 2 hr）。二次抗体（500 倍希釈の horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgA （Sigma, St. Louis, MO））を 50 μl 加えてインキュベートした（room temperature, 1hr）。各ウェルを洗浄後、SIGMAFAST™ OPD (Sigma, St. Louis, MO)を 100 μl 加え、2 分後に 2N H_2SO_4 を 50 μl 加え反応を停止させ、マイクロプレートリーダー（Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama）を用い 492nm で吸光度測定を行った。

統計解析

結果は Mean±SEM で示した。統計解析には ANOVA を用い、群間の比較には Fisher の PLSD を用い、有意水準を $p< 0.05$ とした。

結果

本項の内容は共著者の同意が得られていないため、公表できない。

考察

本項の内容は共著者の同意が得られていないため、公表できない。

第３章

回腸瘻による栄養管理が GALT リンパ球数および各種メディエーターにおよぼす影響

背景と目的

腸管内を栄養成分が通過することで消化酵素に加えて分泌される様々な消化管ホルモンは、栄養の消化、吸収に重要な役割を果たす。一方、消化管ホルモンは消化、吸収だけでなく代謝調節にも関わり、さらに一部のホルモンは免疫能にも影響を与える可能性が報告されている(Sirinek and O'Dorisio, 1991)。たとえば、コレシストキニン（CCK）の静脈内投与は TPN 管理時の GALT リンパ球数の減少を部分的に改善し、腸管免疫を修飾することがマウスモデルで報告されている(Keith Hanna et al., 2000)。また腸上皮の増殖を促進するホルモンである GLP-2 は、腸管の物理的バリアー機能、粘膜における物質透過性の調節、腸管血流の増加に関与しているが(Bremholm et al., 2009; Burrin et al., 2001; Cottrell et al., 2006; Lovshin and Drucker, 2000)、腸上皮細胞と腸管の免疫細胞は相互に影響をおよぼしていることから、GLP-2 の分泌の多寡により腸管免疫が変化する可能性が考えられる。一方で、小腸における腸管内分泌細胞の分布は、腸の部位によって異なることが知られている。小腸上部には脂質、タンパク質、アミノ酸等の消化を感知し、CCK を分泌する I 細胞が多く存在する（Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology, 12th Edition）。これに対して小腸下部には GLP-2 を産生する L 細胞が多く存在している。したがって経管栄養の投与部位の違いによってこれらの消化管ホルモンの血中や腸管組織中のレベルが異なり、腸管免疫にも違いが生じる可能性がある。

腸管上皮細胞や腸管の免疫細胞などから分泌されるサイトカインも、腸管免疫の調節に重要な役割を果たしていることが知られている。Yang らは静脈栄養を行うと腸上皮細胞における IL-7 発現が低下することを報告している(Yang et al., 2007)。腸上皮細胞から分泌される IL-7 は、GALT におけるリンパ球の増殖に重要であるため、静脈栄養管理時の腸管組織における IL-7 濃度低下が、GALT リンパ球数減少の重要な機序の一つと考えられている(Geiselhart et al., 2001)。実際 Fukatsu らは、静脈栄養施行時に IL-7 を経静脈的に投与したところ、GALT リンパ球数が維持できたと報告している(Fukatsu et al., 2005)。

さらに、腸管において Th1 系サイトカインである IFN-γは IgA の産生を抑制し、逆に Th2 系サイトカインである IL-4、IL-6、IL-10 は IgA 産生を高めることが報告されているが、マウス静脈栄養管理時には Th1/Th2 サイトカインバランスが Th1 優位となり、これが腸管 IgA 濃度の低下に関係していると報告されている(Wu et al., 1999)。このように、腸管におけるサイトカイン環境も GALT リンパ球数や IgA 産生能の維持に重要な働きを担っているものと考えられる。

第 2 章の結果からは、栄養投与部位の違いによって GALT リンパ球数の変化が生じ、回腸瘻からの栄養投与で IE、LP のリンパ球数が減少することが示された。このような違いが生じる機序として、空腸側の腸管内を栄養が通過しないことによる空腸側の GALT リンパ球数減少が生じること、さらに血中や腸管のホルモン、サイトカイン環境に変化が生じることが考えられた。そこで、本章ではこれらの点を明らかにするために、ILEO 群、および

対照群として 2 章において ORAL 群や GAST 群と比べ GALT リンパ球数減少を認めなかった JEJ 群の口側 1/2 小腸（空腸）と、肛門側 1/2 小腸（回腸）における GALT と各種メディエーターの比較を行った。同時に、腸管構造への影響を検討するために、腸重量と絨毛高、陰窩深の測定も行った。

方法

実験 1　GALT リンパ球の解析

供試動物および手術

6 週齢の雄性 ICR マウス（Nippon SLC, Hamamatsu, Japan）18 匹を JEJ 群（n=9）と ILEO 群（n=9）の 2 群に無作為に分け、第 2 章と同様にケタミン（100 mg/kg, SC）、キシラジン（10 mg/kg, SC）による全身麻酔下で経管栄養チューブを挿入・設置した。

手術終了後、マウスは代謝ケージに尾を固定し、術後 2 日間は生理食塩水を 0.2ml/hr で投与し、固形飼料 MF（オリエンタル酵母、東京）および水を自由摂取させた。術後 3 日から 7 日は人用半消化態流動食(MEIBALANCE; Meiji Co., Ltd., Tokyo, Japan)を 0.8ml/hr（19.2kcal/head/day）の速度で投与した。

腸管関連リンパ装置（Gut Associated Lymphoid Tissue: GALT）リンパ球の分離と解析

5 日間の栄養管理後、マウスを全身麻酔下の心臓採血により安楽殺し、全小腸を摘出後、口側 1/2（空腸）、肛門側 1/2（回腸）に分け、それぞれについて第 2 章と同様の方法で GALT リンパ球（PP、IE、LP）の分離を行った。それぞれの部位で GALT リンパ球を分離後、ビルゲルチュルク血球計算盤を用いてリンパ球数を計数し、フェノタイプの解析（αβTCR、γδTCR、CD4、CD8、B220）を行った。

実験 2　血中および腸管組織中サイトカインとホルモンの測定

供試動物および手術

実験 1 と同様に 6 週齢の雄性 ICR マウス（Nippon SLC, Hamamatsu, Japan）20 匹を JEJ 群（n=11）、ILEO 群（n=9）に無作為に分け、5 日間の栄養管理した後、ケタミン（100 mg/kg, SC）、キシラジン（10 mg/kg, SC）による全身麻酔下で採血し安楽殺を行った。血液はヘパリンナトリウムで抗凝固処理後、遠心分離（3000 rpm、10 min、4 ℃）して血漿を分離した。分離した血漿は-80℃で保存した。小腸を採取し内容物を HBSS で洗浄後、2 分割し空腸、回腸に分けてそれぞれの重量を測定した。空腸、回腸の中央部 1cm をホルマリン固定し、残りの小腸を液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。

腸管組織ホモジネート

-80℃で保存した空腸および回腸に重量の 20 倍の lysing buffer（0.75 % NH4Cl, 0.01 M Tris, 0.005 M EDTA, プロテアーゼインヒビター（complete protease inhibitor cocktail tablets: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany））を加え、30 秒間ホモジナイズを行った。ホモジナイズをした試料は遠心分離（14000 rpm, 45 min, 4 ℃）し上清を採取し-80℃で保存した。

ホルモンおよびサイトカイン濃度の測定

採取した血液および腸管ホモジネート中 CCK、GLP-2 濃度および IL-7、IL12-p70、TNF-α、IFN-γ、IL-6、IL-10 濃度測定した。CCK 濃度は、CCK（26-33）, Non-Sulfated, Human/ Mouse / Rat, EIA kit （Phoenix Pharmaceuticals, Inc. Burlingame, CA）を用いた。測定はマイクロプレートリーダー（Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama）を用いて 450nm の吸光度測定を行った。また GLP-2 濃度は YK142 Mouse GLP-2 EIA Kit（矢内原研究所、静岡）を用いた。測定はマイクロプレートリーダー（Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama）を用いて 492nm の吸光度測定を行った。

血液および腸管ホモジネート中 IL-7 濃度の測定には ab100714-IL-7 (Interleoukin-7) Mouse ELISA Kit（Abcam plc. Cambridge, UK）を用いた。測定はマイクロプレートリーダー（Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama）を用いて 450nm の吸光度測定を行った。IL12-p70、TNF-α、IFN-γ、IL-6、IL-10 濃度は BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit（BD Biosciences, San Diego,CA）を用い、フローサイトメーター（BD accuri C6, BD Biosciences, San Jose,CA）で測定した。データの解析には FCAP Array Software Version 3.0（BD Biosciences, San Jose,CA）を用いた。

病理組織学的検討

ホルマリン固定した空腸および回腸組織の HE 染色を行い、空腸、回腸の絨毛高および陰窩深を計測した。観察、計測には光学顕微鏡 BX43（オリンパス株式会社、東京）、DP-21-SAL

（オリンパス株式会社、東京）を用いた。絨毛がほぼ垂直に切れている部位で、それぞれを 5 から 8 個測定し、その平均値を求めた。

統計解析

結果は Mean±SEM で示した。群間の比較に Mann-Whitney U test、または unpaired t-test を用い、有意水準を $p < 0.05$ とした。

結果

本項の内容は共著者の同意が得られていないため、公表できない。

考察

本項の内容は共著者の同意が得られていないため、公表できない。

第４章

新規栄養製剤が GALT リンパ球数および粘膜 IgA 濃度におよぼす影響

第 3 章において、回腸からの半消化態栄養剤の投与により腸管組織のサイトカイン環境が炎症性に傾くことが示され、このサイトカイン環境の変化が GALT リンパ球数の減少に関与していることが示唆された。GALT 維持の観点からは、可能であればより口側からの栄養投与が望まれるが、患者の状態によっては回腸からの栄養投与を選択せざるを得ない場合もある。しかし使用する経腸栄養剤の組成を工夫することで、腸管のサイトカイン環境が炎症性に傾かないようにすることが可能であれば回腸瘻を用いた栄養管理であっても GALT の維持が期待できる。

静脈栄養に伴う GALT リンパ球数の減少、粘膜 IgA 濃度の低下に関しては、その成分を調整、工夫による GALT リンパ球数の減少や粘膜 IgA 濃度低下改善の試みがなされており、グルタミン、酪酸、IL-7、neuropeptide 等の静脈栄養剤中への添加は腸管免疫の改善効果を有することが示されている(Keith Hanna et al., 2000; Li et al., 1998; Li et al., 1997; Murakoshi et al., 2011)。一方、経腸栄養に関しては、経腸栄養剤の組成を工夫することで GALT リンパ球数、粘膜 IgA 濃度をさらに改善できるか否かについては十分な検討が行われていない。

牛乳中に含まれる生理活性ペプチドや、腸内細菌叢を調節する栄養成分の中には、抗炎症作用を有するものがあることが知られている(Chatterton et al., 2013)。近年これらの性質を利用し、ホエイペプチド、発酵乳、イソマルツロース、n-3 系多価不飽和脂肪酸、抗酸化物質等の immunonutrients や pharmaconutrients を強化した免疫調節栄養製剤が開発

された。この栄養剤は、CCl_4 、concanavalin-A による肝障害の軽減、腸管虚血再灌流モデルにおける炎症反応の軽減と生存改善効果を持つことが示されており(Kume et al., 2012; Nakamura et al., 2011)、回腸瘻からの栄養管理に利用すれば腸管のサイトカイン環境を調節し、GALT リンパ球数や IgA 産生をさらに改善できるものと期待される。

そこで、本章では経腸栄養剤の組成の工夫が腸管免疫におよぼす効果を明らかにするため、その基礎的検討として新規経腸栄養剤を経口的に摂取させたときの血液中、腸管粘膜におけるサイトカイン環境、GALT のリンパ球数、粘膜 IgA 濃度におよぼす影響について標準的な栄養剤投与と比較・検討した。

方法

実験１　栄養剤の違いがサイトカイン濃度に及ぼす影響

供試動物および栄養剤

6 週齢の雄性 ICR マウスを標準的半消化態栄養剤（MEIBALANCE, Meiji Co., Ltd ., Tokyo, Japan ; MBL 群：n=10.,と新規半消化態栄養剤（ MEIN®, Meiji Co., Ltd ., Tokyo, Japan ; MEIN 群：n=10）を与える群に無作為に分け、それぞれ 7 日間自由摂食させた。各栄養剤の組成の詳細を表 1 に示した。

血液および腸管組織中サイトカイン濃度の測定

7 日間の栄養管理後、ケタミン（100 mg/kg, SC）、キシラジン（10 mg/kg, SC）による全身麻酔下で採血を行い安楽殺した。採取した血液はヘパリンナトリウムで抗凝固処理後、遠心分離（3000rpm、10min、4℃）し、血漿を分離した。分離した血漿は-80℃で保存した。全小腸も採取し内容物を HBSS で洗浄後、空腸、回腸に 2 分割して水分を取り除いた。それぞれの重量を測定後、組織は液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。第 3 章と同様の方法で組織をホモジナイズし、腸管ホモジネートを回収した。

採取した血液および腸管ホモジネート中サイトカイン濃度を BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit を用いて　第 3 章と同様の方法で測定した。

実験２　栄養剤の違いが GALT リンパ球におよぼす影響

供試動物

6 週齢の雄性 ICR マウスを実験 1 と同様、通常食群（MBL: n=10）と免疫調節栄養群（MEIN: n=10）に無作為に分け、それぞれの栄養剤を凍結乾燥したものを自由摂食させて 7 日間栄養管理を行った。

腸管関連リンパ装置（Gut Associated Lymphoid Tissue: GALT）リンパ球の分離

7 日間の影響管理後、マウスをケタミン（100 mg/kg, SC）、キシラジン（10 mg/kg, SC）による全身麻酔下で安楽殺し、全小腸を摘出後、第２章と同様の方法で GALT リンパ球（PP、IE、LP）の分離を行った。それぞれの部位で GALT リンパ球を分離後、ビルゲルチュルク血球計算盤を用いてリンパ球数を計数し、フェノタイプの測定（αβTCR、γδTCR、CD4、CD8、B220）を行った。

実験３　粘膜洗浄液 IgA 濃度の測定

6 週齢の雄性 ICR マウスを通常食群（MBL：n=13）と免疫調節栄養群（MEIN：n=13）に無作為に分け、それぞれ 7 日間自由摂食させた。7 日間の栄養管理後、マウスをケタミン（100 mg/kg, SC）、キシラジン（10 mg/kg, SC）による全身麻酔下で採血安楽殺を行った。第 2 章と同様の方法で腸管洗浄液、鼻腔洗浄液、肺胞洗浄液を採取し、-80℃で保存した。

さらに第 2 章と同様の方法で鼻腔洗浄液、肺胞洗浄液および腸管洗浄液中 IgA 測定を行った。

統計解析

結果は Mean±SEM で示した。群間の比較に unpaired t-test を用い、有意水準を $p < 0.05$ とした。

結果

本項の内容は共著者の同意が得られていないため、公表できない。

考察

本項の内容は共著者の同意が得られていないため、公表できない。

第５章

総括

重症患者、手術患者は低栄養状態に陥りやすく、免疫能が低下しやすいため適切な栄養管理を行う必要がある。これらの患者に対する栄養管理法として経腸栄養の臨床的な有効性が示されており、人では近年、広く利用されるようになっている。経腸栄養は、静脈栄養に比べより生理的な栄養管理法であり、腸管免疫改善、腸管外の呼吸器などの粘膜免疫の改善、肝免疫の改善、腹腔内白血球機能改善効果を持つことが明らかにされている。一方で、経腸栄養管理を行う場合にも、その栄養投与部位により、経口摂取、経胃投与、経小腸(空腸、回腸)投与などの方法があるが、これらの違いが腸管免疫におよぼす影響についてはこれまで検討が行われていなかった。そこで、本研究ではまず経腸栄養の投与部位が腸管免疫におよぼす影響についてマウス栄養管理モデルを用いた基礎的検討を行い、さらに腸重量、腸絨毛を評価することで腸管組織構造におよぼす影響を検討し、最後により高い効果が期待できる栄養剤に関する検討を行った。

その結果、経口摂取および胃瘻による栄養管理と比較して空腸瘻では鼻腔洗浄液中の IgA 濃度に低下傾向が認められ、回腸瘻ではそれに加えて、GALT 実効器官である IE、LP におけるリンパ球数の減少が認められた。そのため経管栄養を行う場合、経口摂取または胃瘻からの栄養管理が望ましく、小腸からの栄養投与が余儀なくされる場合には、より口側の腸管からの栄養投与を行うことが腸管の免疫能維持の点で有利と考えられた。また、今回の検討では静脈栄養との比較は行っていないが、過去の静脈栄養管理による動物実験と比較すると、今回検討したどの部位からの経腸栄養投与であっても、静脈栄養に対して腸管

免疫維持効果が高いと考えられた。この結果から、免疫学的効果の点からはこれまで同様に腸管が利用できる場合には回腸瘻からのであっても、静脈栄養より経腸栄養を優先すべきと考えられた。

回腸瘻による栄養管理時の GALT リンパ球数減少は、栄養が内腔を通過しない空腸で減少するという当初の仮説とは異なり、リンパ球数の減少は回腸側の小腸で起こった。腸管のホルモンやサイトカインの検討によって、この機序として GALT リンパ球数減少が生じた回腸組織における炎症性変化が示唆された。過去の静脈栄養による GALT リンパ球数減少の機序として、リンパ球増殖にかかわる IL-7 の関与が報告されていた。一方で、今回の検討から経腸栄養の投与部位の違いによる GALT リンパ球数の変化に対しては、IL-7 による影響は小さく、腸管組織における炎症性変化の影響が大きいと考えられた。興味深いことに回腸瘻による栄養管理を行った場合、空腸では GALT リンパ球数の減少が起こっていないにも関わらず、腸絨毛の萎縮と腸管重量の低下し、腸管組織中の GLP-2 濃度との関連が認められた。回腸瘻からの栄養投与は腸管の物理的バリアー機能という点では空腸の防御能を低下させる可能性も示唆された。

腸管組織における炎症性変化が GALT リンパ球数の減少の一因であれば、抗炎症効果のある栄養剤を利用することで、標準的な栄養剤よりも GALT リンパ球の数と機能を高めることが可能と考えられる。次に栄養剤の成分を変更することで、これが可能であるか検討を加えた。その結果、抗炎症効果が期待できるホエイペプチド、発酵乳、イソマルツロー

ス、n-3 系多価不飽和脂肪酸、抗酸化物質を強化した新規栄養製剤の投与は、腸管組織における炎症性サイトカイン濃度を低下させ、GALT リンパ球数、および腸管洗浄液中の IgA 濃度を増加させることが示された。今回の検討では経口投与で本栄養剤の GALT 修飾効果について検討を行ったが、回腸瘻からの投与であっても腸管における炎症性変化を抑制することで腸管免疫能の改善が期待できると考えられる。

以上の結果から同じ腸管を利用した栄養管理であっても、経腸栄養の投与部位の違いが、腸管組織におけるサイトカイン環境に影響を与え、GALT リンパ球数を修飾する可能性が示唆された。そのため、腸瘻による栄養管理を行う場合、可能な限り口側からの栄養投与を行うことが腸管免疫を維持するために重要であること考えられる。また栄養成分の工夫により、腸管組織における炎症性変化を抑制し、GALT リンパ球数および腸管における IgA 濃度を増加できることが示された。この新規栄養製剤は、経腸栄養時の腸管免疫能を改善するために有用である可能性が示された。

栄養投与部位による GALT リンパ球数変化の機序については、リンパ球アポトーシス、細胞増殖、ホーミングの点からより詳細な検討が今後必要である。また新規抗炎症栄養剤の回腸瘻からの投与効果についても検討が必要と考えられる。新たに検討すべき項目が残っているが、本研究は経腸栄養を行った場合においても、栄養投与部位の工夫と栄養成分として immunonutrients や pharmaconutrients を応用することによって腸管免疫が大きく影響を受けることを明らかにした。経口摂取が行えない患者に対する経管栄養による栄

養管理のために貴重な所見が得られたと考えられる。

謝辞

本研究の遂行および本論文の執筆全般にわたり、懇切なる御指導をしていただいた、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻獣医外科学研究室の西村亮平教授、ならびに東京大学医学部付属病院手術部の深柄和彦准教授に謹んで御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、御指導、多大な御協力をいただいた東京大学医学部胃・食道外科の三ツ井崇司先生、東京大学医学部付属病院手術部研究部グループの皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、研究生活を送るにあたり、ご支援いただいた獣医外科学教室麻酔チームの皆様、獣医外科学教室および高度医療科学研究室の皆様、東京大学動物医療センター外科系診療科の皆様に感謝申し上げます。

参考文献

Adam, S., and S. Batson, 1997, A study of problems associated with the delivery of enteral feed in critically ill patients in five ICUs in the UK: Intensive Care Med, v. 23, p. 261-6.

Agarwal, E., M. Ferguson, M. Banks, M. Batterham, J. Bauer, S. Capra, and E. Isenring, 2013, Malnutrition and poor food intake are associated with prolonged hospital stay, frequent readmissions, and greater in-hospital mortality: results from the Nutrition Care Day Survey 2010: Clin Nutr, v. 32, p. 737-45.

Bilenker, M., A. I. Roberts, R. E. Brolin, and E. C. Ebert, 1995, Interleukin-7 activates intestinal lymphocytes: Dig Dis Sci, v. 40, p. 1744-9.

Bremholm, L., M. Hornum, B. M. Henriksen, S. Larsen, and J. J. Holst, 2009, Glucagon-like peptide-2 increases mesenteric blood flow in humans: Scand J Gastroenterol, v. 44, p. 314-9.

Brunetto, M. A., M. O. Gomes, M. R. Andre, E. Teshima, K. N. Gonçalves, G. T. Pereira, A. S. Ferraudo, and A. C. Carciofi, 2010, Effects of nutritional support on hospital outcome in dogs and cats: J Vet Emerg Crit Care (San Antonio), v. 20, p. 224-31.

Burrin, D. G., Y. Petersen, B. Stoll, and P. Sangild, 2001, Glucagon-like peptide 2: a nutrient-responsive gut growth factor: J Nutr, v. 131, p. 709-12.

Calder, P. C., 2007, Immunonutrition in surgical and critically ill patients: Br J Nutr, v. 98 Suppl 1, p. S133-9.

Campbell, I. T., 1999, Limitations of nutrient intake. The effect of stressors: trauma, sepsis and multiple organ failure: Eur J Clin Nutr, v. 53 Suppl 1, p. S143-7.

Campbell, S. A., and C. A. Daley, 2011, Endoscopically assisted nasojejunal feeding tube placement: technique and results in five dogs: J Am Anim Hosp Assoc, v. 47, p. e50-5.

Cangelosi, M. J., H. R. Auerbach, and J. T. Cohen, 2011, A clinical and economic evaluation of enteral nutrition: Curr Med Res Opin, v. 27, p. 413-22.

Chatterton, D. E., D. N. Nguyen, S. B. Bering, and P. T. Sangild, 2013, Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns: Int J Biochem Cell Biol, v. 45, p. 1730-47.

Chen, Y., K. Chou, E. Fuchs, W. L. Havran, and R. Boismenu, 2002, Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial γδ T cells: Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 99, p. 14338-14343.

Collison, A., P. S. Foster, and J. Mattes, 2009, Emerging role of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a key regulator of inflammatory responses: Clin Exp Pharmacol Physiol, v. 36, p. 1049-53.

Correia, M. I., and D. L. Waitzberg, 2003, The impact of malnutrition on morbidity, mortality,

length of hospital stay and costs evaluated through a multivariate model analysis: Clin Nutr, v. 22, p. 235-9.

Cottrell, J. J., B. Stoll, R. K. Buddington, J. E. Stephens, L. Cui, X. Chang, and D. G. Burrin, 2006, Glucagon-like peptide-2 protects against TPN-induced intestinal hexose malabsorption in enterally refed piglets: Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v. 290, p. G293-300.

Dahly, E. M., M. B. Gillingham, Z. Guo, S. G. Murali, D. W. Nelson, J. J. Holst, and D. M. Ney, 2003, Role of luminal nutrients and endogenous GLP-2 in intestinal adaptation to mid-small bowel resection: Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v. 284, p. G670-82.

Daley, J., S. F. Khuri, W. Henderson, K. Hur, J. O. Gibbs, G. Barbour, J. Demakis, G. Irvin, J. F. Stremple, F. Grover, G. McDonald, E. Passaro, P. J. Fabri, J. Spencer, K. Hammermeister, J. B. Aust, and C. Oprian, 1997, Risk adjustment of the postoperative morbidity rate for the comparative assessment of the quality of surgical care: results of the National Veterans Affairs Surgical Risk Study: J Am Coll Surg, v. 185, p. 328-40.

Deane Adam, M., D. Rupinder, G. Day Andrew, J. Ridley Emma, R. Davies Andrew, and K. Heyland Daren, 2013, Comparisons between intragastric and small intestinal delivery of enteral nutrition in the critically ill: a systematic review and meta-analysis: Crit Care, v. 17, p. R125.

Dempsey, D. T., J. L. Mullen, and G. P. Buzby, 1988, The link between nutritional status and clinical outcome: can nutritional intervention modify it?: Am J Clin Nutr, v. 47, p. 352-6.

Dudrick, S. J., 1970, Intravenous hyperalimentation: Surgery, v. 68, p. 726-7.

Dudrick, S. J., D. W. Wilmore, H. M. Vars, and J. E. Rhoads, 1968, Long-term total parenteral nutrition with growth, development, and positive nitrogen balance: Surgery, v. 64, p. 134-42.

Eastwood, G. L., 1977, Small bowel morphology and epithelial proliferation in intravenously alimented rabbits: Surgery, v. 82, p. 613-20.

FLETCHER, A. G., N. S. GIMBEL, and C. RIEGEL, 1950, Parenteral nutrition with human serum albumin as the source of protein in the early post-operative period: Surg Gynecol Obstet, v. 90, p. 151-4.

Fukatsu, K., T. Moriya, Y. Maeshima, J. Omata, Y. Yaguchi, F. Ikezawa, H. Mochizuki, and H. Hiraide, 2005, Exogenous interleukin 7 affects gut-associated lymphoid tissue in mice receiving total parenteral nutrition: Shock, v. 24, p. 541-6.

Geiselhart, L. A., C. A. Humphries, T. A. Gregorio, S. Mou, J. Subleski, and K. L. Komschlies, 2001, IL-7 administration alters the CD4:CD8 ratio, increases T cell numbers, and increases T cell function in the absence of activation: J Immunol, v. 166, p. 3019-27.

Gibbs, J., W. Cull, W. Henderson, J. Daley, K. Hur, and S. F. Khuri, 1999, Preoperative serum albumin level as a predictor of operative mortality and morbidity: results from the National VA Surgical Risk Study: Arch Surg, v. 134, p. 36-42.

Heyland, D. K., R. Dhaliwal, J. W. Drover, L. Gramlich, P. Dodek, and C. C. C. C. P. G. Committee, 2003, Canadian clinical practice guidelines for nutrition support in mechanically ventilated, critically ill adult patients: JPEN J Parenter Enteral Nutr, v. 27, p. 355-73.

Huang, N., F. Wang, Y. Wang, J. Hou, J. Li, and X. Deng, 2013, Ulinastatin improves survival of septic mice by suppressing inflammatory response and lymphocyte apoptosis: J Surg Res, v. 182, p. 296-302.

Inoue, S., T. Sato, K. Suzuki-Utsunomiya, Y. Komori, K. Hozumi, T. Chiba, T. Yahata, K. Nakai, and S. Inokuchi, 2013, Sepsis-induced hypercytokinemia and lymphocyte apoptosis in aging-accelerated Klotho knockout mice: Shock, v. 39, p. 311-6.

Johnson, C. D., K. A. Kudsk, K. Fukatsu, K. B. Renegar, and B. L. Zarzaur, 2003, Route of nutrition influences generation of antibody-forming cells and initial defense to an active viral infection in the upper respiratory tract: Ann Surg, v. 237, p. 565-73.

Johnson, L. R., E. M. Copeland, S. J. Dudrick, L. M. Lichtenberger, and G. A. Castro, 1975, Structural and hormonal alterations in the gastrointestinal tract of parenterally fed rats: Gastroenterology, v. 68, p. 1177-83.

Kaushik, N., M. Pietraszewski, J. J. Holst, and S. J. O'Keefe, 2005, Enteral feeding without pancreatic stimulation: Pancreas, v. 31, p. 353-9.

Keith Hanna, M., B. L. Zarzaur, K. Fukatsu, R. Chance DeWitt, K. B. Renegar, C. Sherrell, Y. Wu, and K. A. Kudsk, 2000, Individual neuropeptides regulate gut-associated lymphoid tissue integrity, intestinal immunoglobulin A levels, and respiratory antibacterial immunity: JPEN J Parenter Enteral Nutr, v. 24, p. 261-8; discussion 268-9.

King, B. K., K. A. Kudsk, J. Li, Y. Wu, and K. B. Renegar, 1999, Route and type of nutrition influence mucosal immunity to bacterial pneumonia: Ann Surg, v. 229, p. 272-8.

Kreymann, K. G., M. M. Berger, N. E. Deutz, M. Hiesmayr, P. Jolliet, G. Kazandjiev, G. Nitenberg, G. van den Berghe, J. Wernerman, C. Ebner, W. Hartl, C. Heymann, C. Spies, D. G. S. f. N. Medicine), and E. E. S. f. P. a. E. Nutrition), 2006, ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Intensive care: Clin Nutr, v. 25, p. 210-23.

Kudsk, K. A., 2006, Immunonutrition in surgery and critical care: Annu Rev Nutr, v. 26, p. 463-79.

Kudsk, K. A., M. A. Croce, T. C. Fabian, G. Minard, E. A. Tolley, H. A. Poret, M. R. Kuhl, and R. O. Brown, 1992, Enteral versus parenteral feeding. Effects on septic morbidity after blunt and penetrating abdominal trauma: Ann Surg, v. 215, p. 503-11; discussion 511-3.

Kume, H., K. Okazaki, T. Yamaji, and H. Sasaki, 2012, 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, v. 31, p. 283-9.

Kuppinger, D. D., P. Rittler, W. H. Hartl, and D. Rüttinger, 2013, Use of gastric residual volume to guide enteral nutrition in critically ill patients: a brief systematic review of clinical studies: Nutrition, v. 29, p. 1075-9.

Li, J., B. K. King, P. G. Janu, K. B. Renegar, and K. A. Kudsk, 1998, Glycyl-L-glutamine-enriched total parenteral nutrition maintains small intestine gut-associated lymphoid tissue and upper respiratory tract immunity: JPEN J Parenter Enteral Nutr, v. 22, p. 31-6.

Li, J., K. A. Kudsk, B. Gocinski, D. Dent, J. Glezer, and B. Langkamp-Henken, 1995, Effects of parenteral and enteral nutrition on gut-associated lymphoid tissue: J Trauma, v. 39, p. 44-51; discussion 51-2.

Li, J., K. A. Kudsk, P. Janu, and K. B. Renegar, 1997, Effect of glutamine-enriched total parenteral nutrition on small intestinal gut-associated lymphoid tissue and upper respiratory tract immunity: Surgery, v. 121, p. 542-9.

Lippert, A. C., R. B. Fulton, and A. M. Parr, 1993, A retrospective study of the use of total parenteral nutrition in dogs and cats: J Vet Intern Med, v. 7, p. 52-64.

Liu, D. T., D. C. Brown, and D. C. Silverstein, 2012, Early nutritional support is associated with decreased length of hospitalization in dogs with septic peritonitis: A retrospective study of 45 cases (2000-2009): J Vet Emerg Crit Care (San Antonio), v. 22, p. 453-9.

Lovshin, J., and D. J. Drucker, 2000, Synthesis, secretion and biological actions of the glucagon-like peptides: Pediatr Diabetes, v. 1, p. 49-57.

Machnicki, M., M. Zimecki, and T. Zagulski, 1993, Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 in vivo: Int J Exp Pathol, v. 74, p. 433-9.

Maldonado Galdeano, C., I. Novotny Núñez, A. de Moreno de LeBlanc, E. Carmuega, R. Weill, and G. Perdigón, 2011, Impact of a probiotic fermented milk in the gut ecosystem and in the systemic immunity using a non-severe protein-energy-malnutrition model in mice: BMC Gastroenterol, v. 11, p. 64.

Marik, P. E., and G. P. Zaloga, 2001, Early enteral nutrition in acutely ill patients: a systematic review: Crit Care Med, v. 29, p. 2264-70.

Matheson, P. J., R. T. Hurt, O. F. Mittel, M. A. Wilson, D. A. Spain, and R. N. Garrison, 2003, Immune-enhancing enteral diet increases blood flow and proinflammatory cytokines in the rat ileum: J Surg Res, v. 110, p. 360-70.

McClave, S. A., R. G. Martindale, V. W. Vanek, M. McCarthy, P. Roberts, B. Taylor, J. B.

Ochoa, L. Napolitano, G. Cresci, A. S. P. E. N. B. o. Directors, A. C. o. C. C. Medicine, and S. o. C. C. Medicine, 2009, Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Adult Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.): JPEN J Parenter Enteral Nutr, v. 33, p. 277-316.

Mizock, B. A., 2010, Immunonutrition and critical illness: an update: Nutrition, v. 26, p. 701-7.

Mongkolsapaya, J., A. E. Cowper, X. N. Xu, G. Morris, A. J. McMichael, J. I. Bell, and G. R. Screaton, 1998, Lymphocyte inhibitor of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand): a new receptor protecting lymphocytes from the death ligand TRAIL: J Immunol, v. 160, p. 3-6.

Monk, D. N., L. D. Plank, G. Franch-Arcas, P. J. Finn, S. J. Streat, and G. L. Hill, 1996, Sequential changes in the metabolic response in critically injured patients during the first 25 days after blunt trauma: Ann Surg, v. 223, p. 395-405.

Moore, F. A., D. V. Feliciano, R. J. Andrassy, A. H. McArdle, F. V. Booth, T. B. Morgenstein-Wagner, J. M. Kellum, R. E. Welling, and E. E. Moore, 1992, Early enteral feeding, compared with parenteral, reduces postoperative septic complications. The results of a meta-analysis: Ann Surg, v. 216, p. 172-83.

Murakoshi, S., K. Fukatsu, J. Omata, T. Moriya, M. Noguchi, D. Saitoh, and I. Koyama, 2011, Effects of adding butyric acid to PN on gut-associated lymphoid tissue and

mucosal immunoglobulin A levels: JPEN J Parenter Enteral Nutr, v. 35, p. 465-72.

Nakamura, K., S. Ogawa, K. Dairiki, K. Fukatsu, H. Sasaki, T. Kaneko, and T. Yamaji, 2011, A new immune-modulating diet enriched with whey-hydrolyzed peptide, fermented milk, and isomaltulose attenuates gut ischemia-reperfusion injury in mice: Clin Nutr, v. 30, p. 513-6.

Pierre, J. F., A. F. Heneghan, F. H. Tsao, Y. Sano, M. A. Jonker, J. Omata, J. Lan, and K. A. Kudsk, 2011, Route and type of nutrition and surgical stress influence secretory phospholipase A2 secretion of the murine small intestine: JPEN J Parenter Enteral Nutr, v. 35, p. 748-56.

Pontes-Arruda, A., L. F. Martins, S. M. de Lima, A. M. Isola, D. Toledo, E. Rezende, M. Maia, G. B. Magnan, and G. L. A. a. A. R. i. S. T. I. S. G. Investigating Nutritional Therapy with EPA, 2011, Enteral nutrition with eicosapentaenoic acid, γ-linolenic acid and antioxidants in the early treatment of sepsis: results from a multicenter, prospective, randomized, double-blinded, controlled study: the INTERSEPT study: Crit Care, v. 15, p. R144.

Sakkas, P., J. G. Houdijk, L. A. Jones, D. P. Knox, and I. Kyriazakis, 2011, Dietary protein and energy supplies differentially affect resistance to parasites in lactating mammals: Br J Nutr, v. 106, p. 1207-15.

Scott, R. B., D. Kirk, W. K. MacNaughton, and J. B. Meddings, 1998, GLP-2 augments the adaptive response to massive intestinal resection in rat: Am J Physiol, v. 275, p.

G911-21.

Screaton, G., and X. N. Xu, 2000, T cell life and death signalling via TNF-receptor family members: Curr Opin Immunol, v. 12, p. 316-22.

Sirinek, L. P., and M. S. O'Dorisio, 1991, Modulation of immune function by intestinal neuropeptides: Acta Oncol, v. 30, p. 509-17.

Suzuki, K., S. Kawamoto, M. Maruya, and S. Fagarasan, 2010, GALT: organization and dynamics leading to IgA synthesis: Adv Immunol, v. 107, p. 153-85.

TURNER, F. P., 1955, Hyperalimentation in the management of pyloric obstruction with comments on certain theoretical relationships between protein deficiency and peptic ulcer: Gastroenterology, v. 29, p. 1061-8.

van Wijk, F., and H. Cheroutre, 2009, Intestinal T cells: facing the mucosal immune dilemma with synergy and diversity: Semin Immunol, v. 21, p. 130-8.

Vantourout, P., and A. Hayday, 2013, Six-of-the-best: unique contributions of γδ T cells to immunology: Nat Rev Immunol, v. 13, p. 88-100.

Watanabe, M., Y. Ueno, T. Yajima, Y. Iwao, M. Tsuchiya, H. Ishikawa, S. Aiso, T. Hibi, and H. Ishii, 1995, Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes: J Clin Invest, v. 95, p. 2945-53.

Wu, Y., K. A. Kudsk, R. C. DeWitt, E. A. Tolley, and J. Li, 1999, Route and type of nutrition influence IgA-mediating intestinal cytokines: Ann Surg, v. 229, p. 662-7; discussion 667-8.

Yamaguchi, M., and M. Uchida, 2007, Alpha-lactalbumin suppresses interleukin-6 release after intestinal ischemia/reperfusion via nitric oxide in rats: Inflammopharmacology, v. 15, p. 43-7.

Yamamoto, T., M. Nakahigashi, S. Umegae, T. Kitagawa, and K. Matsumoto, 2005, Impact of elemental diet on mucosal inflammation in patients with active Crohn's disease: cytokine production and endoscopic and histological findings: Inflamm Bowel Dis, v. 11, p. 580-8.

Yang, H., X. Sun, E. Q. Haxhija, and D. H. Teitelbaum, 2007, Intestinal epithelial cell-derived interleukin-7: A mechanism for the alteration of intraepithelial lymphocytes in a mouse model of total parenteral nutrition: Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v. 292, p. G84-91.

Yang, H., B. Wildhaber, Y. Tazuke, and D. H. Teitelbaum, 2002, 2002 Harry M. Vars Research Award. Keratinocyte growth factor stimulates the recovery of epithelial structure and function in a mouse model of total parenteral nutrition: JPEN J Parenter Enteral Nutr, v. 26, p. 333-40; discussion 340-1.