慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	急性期重症患者擬似モデルにおける高血糖惹起性腸内細菌動態と対応策
Sub Title	Hyperglycemia-induced alterations of gut microflora and therapeutic strategy in a critically ill model
Author	森崎, 浩(Morisaki, Hiroshi) 藍, 公明(Ai, Kimiaki)
Publisher	
Publication year	2012
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2011.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究は、腸内細菌が体内(血液中)に侵入することを防ぐ腸管壁防御機能を高血糖が傷害する可能性を内毒素血症モデルで検証した。短時間の高血糖持続でも腸管壁透過性は亢進し、また高血糖が長時間(24時間)持続すると腸間膜リンパ節の炎症性サイトカインIL-1β、IL-6の発現増強を来たすことを見出した。同時に免疫担当細胞リンパ球ヘルパーT2型細胞、制御性T 細胞の発現が亢進した。本研究結果は、臨床でよく遭遇するレベルの高血糖が腸管壁防御機構ならびに腸管免疫機構に顕著な影響を及ぼすことを示している。
Notes	研究種目：基盤研究(B) 研究期間：2009～2011 課題番号：21390484 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21390484seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2009～2011
課題番号：21390484
研究課題名（和文）　急性期重症患者擬似モデルにおける高血糖惹起性腸内細菌動態と対応策

研究課題名（英文）　Hyperglycemia-induced alterations of gut microflora and therapeutic strategy in a critically ill model

研究代表者
森崎　浩（MORISAKI HIROSHI）
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：60182226

研究成果の概要（和文）：本研究は、腸内細菌が体内（血液中）に侵入することを防ぐ腸管壁防御機能を高血糖が傷害する可能性を内毒素血症モデルで検証した。短時間の高血糖持続でも腸管壁透過性は亢進し、また高血糖が長時間（24 時間）持続すると腸間膜リンパ節の炎症性サイトカイン IL-1β、IL-6 の発現増強を来たすことを見出した。同時に免疫担当細胞リンパ球ヘルパーT2 型細胞、制御性 T 細胞の発現が亢進した。本研究結果は、臨床でよく遭遇するレベルの高血糖が腸管壁防御機構ならびに腸管免疫機構に顕著な影響を及ぼすことを示している。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined if persistent hyperglycemia elicited alterations of gut barrier function in a critical ill model. Short-term hyperglycemia augmented gut mucosal permeability in an endotoxemic model, while long-term hyperglycemia for 24hr resulted in the up-regulation of inflammatory cytokines such as IL-1β and IL-6 in mesenteric lymph nodes, and of T lymphocyte subset such as helper T2 and regulatory T cells in gut. The present study shed light on the significant effects of clinically relevant level of persistent hyperglycemia on gut barrier function and immune system in critical ill.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総　計	8,700,000	2,610,000	11,310,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学
キーワード：高血糖・敗血症・腸管関連リンパ組織・炎症性サイトカイン・腸管壁防御機構・腸内細菌・リンパ球サブセット

１．研究開始当初の背景

厳密な血糖管理が集中治療室入室患者の予後を有意に改善するとの臨床試験結果の報告(N Engl J Med 2001;345:1359)以来、急性期重症患者における血糖制御の重要性が注目された。基礎研究では、高血糖が活性酸素を介して炎症性サイトカイン(TNF-α, IL-1β, IL-6)産生を増強することが明らかに

され(Circulation 2002;106:2067)、また当研究室では重症患者擬似モデルとして内毒素血症ラットを用い、高血糖が及ぼす影響について検討した結果、高度高血糖(400-500 mg/dl)は短時間(3 時間)であっても内毒素惹起性の全身性炎症反応を増強し、腸管壁防御機構が破綻すると共に、病原性細菌を含む腸内環境を変化させる可能性を見出している(Crit Care Med 2009;37:1024)。一方、敗血症等の重症病態では、炎症性メディエーターや微小循環障害により、腸管は構造的・機能的に傷害され、腸内病原性細菌の増殖等の腸内細菌叢異常や腸内環境の変化を来たす。そのため早期経腸栄養など腸管機能を保護する治療戦略が推奨されている。腸管壁防御機能の低下は、腸内細菌種が生体内循環に移行する bacterial translocation を惹起する誘因となる。さらに腸管機能の恒常性維持に重要な免疫機構である腸管関連リンパ組織(Gut-Associated Lymphoid Tissue, GALT)が急性期重症患者の炎症反応を賦活化・遷延化させる増幅装置として作用する可能性が示唆されている。しかし、高血糖が生体を侵襲から防御する免疫機構として重要な腸内環境及び腸管免疫機構に及ぼす影響について明らかとなっていない。

２．研究の目的

本研究計画では、臨床で頻繁に遭遇するレベルの中等度の高血糖(200-300 mg/dl)を長時間(24 時間)にわたり維持した急性期重症患者擬似ラットモデルを作成し、高血糖が腸管壁防御機構ならびに腸内環境を修飾する可能性について、以下の点に焦点を当てて探求した。

(1) 長時間持続する中等度高血糖が腸管壁防御機構に与える影響を探求するため、腸管壁透過性の評価ならびに bacterial translocation を評価する。同時に腸内細菌叢の変化ならびに有機酸等の腸内環境に及ぼす影響を検証する。

(2) 中等度高血糖が長時間持続した場合の腸管免疫機構に及ぼす影響を探求するため、各腸管組織における炎症性サイトカイン(TNF-α, IL-1β, IL-6 等)の発現状況を評価する。同時に腸管免疫の恒常性維持に必要不可欠なヘルパーT 細胞に注目し、そのサブセット(Th1, Th2, Th17, regulatory T cell 等)の分布を解析する。

(3) 上述の(1)(2)を明らかにした後、時間的猶予があれば、プロバイオティクス投与による腸内細菌叢の恒常性維持が高血糖による影響に対する治療的・予防的効果を探求し、同時に高血糖惹起敗血症モデルでの予防的効果を探求する。

３．研究の方法

本研究は、上記項目の達成を目標に 3 ヵ年計画で行った。

（１）初年度は、以前当研究室で確立した短時間高度高血糖敗血症モデル(Crit Care Med 2009;37:1024)を発展させ、段階的(正常血糖群：90－120mg/dl、中等度高血糖群：200－300mg/dl、高度高血糖群：400－500mg/dl)な血糖領域での腸管壁防御機能への修飾を壁透過性の点から評価する。同時に、ラットでは維持が困難であった 24 時間高血糖持続モデルを確立し、その後の炎症反応や腸内環境の評価に耐える安定したモデル作成を目指した。

① 短時間高血糖敗血症モデルの作成は以下の手順で行った。Wistar 系ラット(200－250g)を使用し、全身麻酔下に頸動静脈カテーテルを留置、回転式シーベルを装着の上、持続輸液を継続しながら飼育ゲージ内を自由に動けるモデルを作成した。その後、無作為に対照群および内毒素血症群(内毒素 4mg/kg を投与)の 2 群に分け、更に各々を正常血糖群(90-120 mg/dl)、中等度高血糖群(200-300 mg/dl)、高度高血糖群(400-500 mg/dl)の 3 群に無作為に割り付けた。各々の血糖領域を目標に正常血糖群には生理食塩水、中等度高血糖群には 20%ブドウ糖液、高度高血糖群には 40%ブドウ糖液を 10ml/kg/hr で持続投与した。実験終了 4 時間の時点で開腹後、回腸ループを作成し蛍光デキストラン(fluorescence-labeled dextran; FD4)を注入、一定時間後の血中への蛍光デキストラン漏出から腸管壁透過性を評価した。

② 次に、24 時間持続可能な高血糖内毒素血症モデルを作成した。目標血糖値は ICU 等で遭遇する臨床病態に近似させるために 200-300mg/dl とした。動静脈カテーテル挿入処置後、対照群ならびに内毒素血症群の 2 群に無作為に割り付け、さらに正常血糖群（生理食塩水投与）及び高血糖群（ブドウ糖投与）のサブグループに割り付けた（計 4 群）。24 時間を実験終了時間とし内毒素血症群には内毒素 1 mg/kgを投与、高血糖群には適宜血糖値を測定の上、20%-40%ブドウ糖液を調節し持続投与した(10 ml/kg/hr)。また、時間経過と共に動脈カテーテルより採血し、血糖値を測定、輸液内容を変更の上、適宜血糖値の調節を行った。

(2) 内毒素血症下における長時間高血糖負

荷モデルを用い、腸管免疫システムへの影響を探求するため、各腸管組織における炎症性サイトカイン(TNF-α、IL-1β、IL-6)の発現及びヘルパーT 細胞サブセット(Th1、Th2、Th17、regulatory T cell) の分布を解析する。(1)－①、②の方法で前処置及び無作為化後の 24 時間の時点で、小腸、大腸及び腸間膜リンパ節を採取した。その後、各組織より mRNA を抽出、real time PCR 法を用いて炎症性サイトカイン及びリンパ球サブセットの発現を解析した。リンパ球サブセットの発現解析では各々の転写因子 Th1:Tbx21、Th2:Gata3、Th17:Rorc、regulatory T cell:Foxp3 を標的とした。

(3) 最終年度は高血糖による腸内細菌叢及び腸内環境への修飾を検討する。また、時間的猶予があればプロバイオティクス経口投与等による腸内細菌叢の恒常性維持が、重症病態での高血糖に伴う影響に対し治療的あるいは予防的効果があるか否かを探求する。

① これまで同様、長時間高血糖敗血症モデルを用いて 4 群に無作為化する。対照群及び内毒素血症群において、24 時間の時点で小腸及び大腸内容物を採取した後、細菌の 16s ribosomal RNA を標的とした real-time PCR 法にて腸内細菌叢の構成を解析した。また腸管内容物の有機酸含有量、pH を測定し腸内環境への影響を同定する。同時に門脈血、動脈血及び腸間膜リンパ節を採取し、bacterial translocation の有無を real time PCR 法にて半定量解析した。

② プロバイオティクス投与による腸内細菌叢の恒常性維持効果を探求する。具体的には実験動物飼育中に、乳酸桿菌、ビフィズス菌凍結乾燥菌末を 3-7 日間、連日経口投与し腸内環境への菌の定着を図る。本研究では非プロバイオティクス群及びプロバイオティクス群の 2 群に割り付け、その後内毒素血症及び長時間高血糖負荷での予防的効果を探求するために、対照群及び内毒素血症群、さらにこの 2 群を正常血糖群と高血糖群の 2 群に無作為に割り付け、24 時間後の腸内細菌叢、腸内環境及び bacterial translocation への影響を(3)－①と同様の方法で評価する。

４．研究成果

(1) 短時間段階的高血糖モデルを目標としモデルの作成を行った。20-40%ブドウ糖液を頸静脈持続投与することにより、正常血糖群：90-120mg/dl、中等度高血糖群：200-300mg/dl、高度高血糖群：400-500mg/dl の高血糖モデルを作成した。モデル作成後、4 時間の時点で FD4 を用いた腸管壁透過性評価を行った結果、高血糖の負荷は短時間であっても FD4 の血中漏出を惹起し、内毒素血症では中等度高血糖（EMH 群）で対照群（CMH 群）と比較し腸管の透過性が亢進していることが明らかとなった（図 1)。

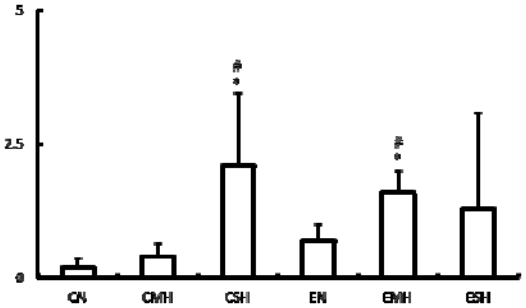

図 1. 短時間高血糖モデルにおける血中 FD4 濃度 *P<0.05 *versus* CN, #P<0.05 *versus* CMH. CN: Control with normoglycemia, CMH: Control with moderate hyperglycemia, CSH: Control with severe hyperglycemia, EN: Endotoxemia with normoglycemia, EMH: Endotoxemia with moderate hyperglycemia, ESH:Endotoxemia with sever hyperglycemia.

(2) 短時間高血糖が腸管壁透過性を亢進させることを確認後、臨床病態により近似した長時間維持可能な高血糖内毒素血症モデルの確立法を検討した。一定量の糖液負荷では高血糖状態を 24 時間安定して維持することが、げっ歯類では困難であった。そこで最終的に、20-40%ブドウ糖液を目標血糖値範囲内に合わせて適宜調節し、正常血糖群 90-120mg/dl、高血糖群 200-350mg/dl の 24 時間維持に成功した（図 2）。

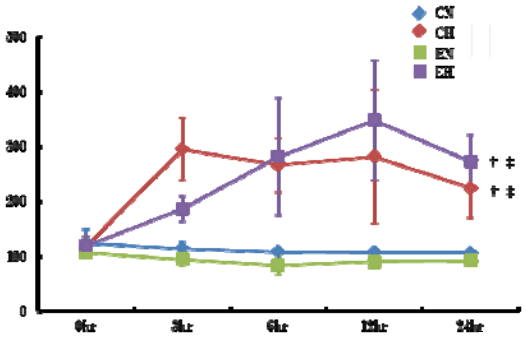

図 2. 長時間高血糖モデルにおける血糖値の推移. † P<0.01 *versus* CN, ‡ P<0.01 *versus* EN. CN: Control with normoglycemia, CH: Control with hyperglycemia, EN: Endotoxin with normoglycemia, EH: Endotoxin with hyperglycemia.

(3) 長時間高血糖持続モデルを用いて、GALT を中心とした腸管免疫システムにおける炎症反応への影響を探求するため、小腸、大腸及び腸間膜リンパ節(MLNs: mesenteric lymph nodes)における炎症性サイトカイン

TNF-α、IL-1β、IL-6 の mRNA 発現を real-time PCR 法にて検討した。その結果、小腸、大腸では、内毒素血症及び高血糖負荷にも関わらず有意な発現を認めなかったが、MLNs において高血糖内毒素血症群で IL-1β、IL-6 の有意な発現増加を認めた（図 3）。この結果から長時間の高血糖持続は内毒素血症病態において、MLN s での炎症反応を増悪させる因子であることが明らかとなった。

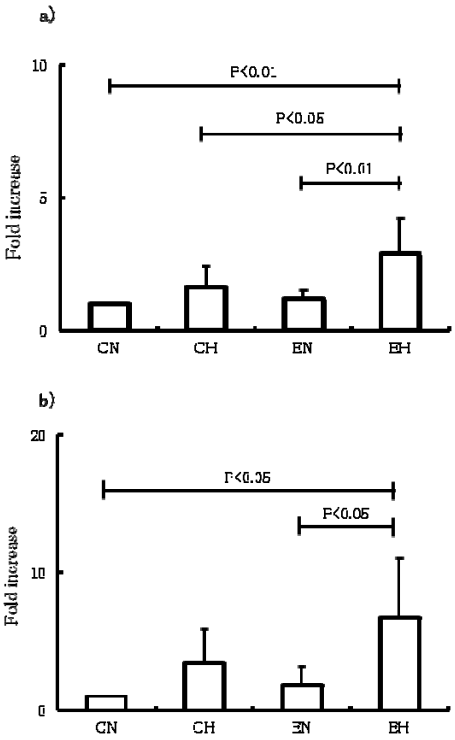

図 3.腸間膜リンパ節における炎症性サイトカイン mRNA の発現. a) The expression of IL-1 beta mRNA, b) The expression of IL-6 mRNA. CN: Control with normoglycemia, CH: Control with hyperglycemia, EN: Endotoxin with normoglycemia, EH: Endotoxin with hyperglycemia.

（4）次に、腸管関連リンパ組織 GALT におけるヘルパーT 細胞に焦点を当て、そのサブセット（Th1、Th2、Th17、regulatory T cell）の転写因子に着目し、それらの分布発現を解析した。その結果、Th1 細胞の転写因子である Tbx21、Th2 細胞の Gata3 及び regulatory T 細胞の Foxp3 は小腸、大腸組織と比較し MLNs で高値に発現していることを見出した。さらに、内毒素血症及び長時間高血糖による MLNs への効果を個別に発現解析したところ、Th2 細胞及び regulatory T 細胞が高血糖の単独投与で有意に発現が増加していた（図 4）。一方、Th17 細胞の発現に変化は認めず、Th1 は有意差はないものの、内毒素血症群で増加傾向にあった。本結果は持続する長時間高血糖が、内毒素血症そのものより腸管免疫系に多大な影響を与えていることを示唆している。

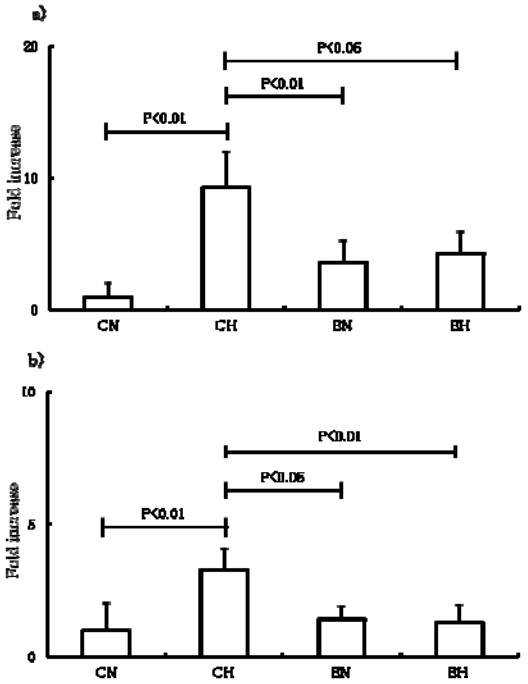

図 4.長時間高血糖内毒素血症モデルの腸間膜リンパ節における Th2、regulatory T 細胞転写因子の発現. a) The expression of Gata3 (Th2 cell), b) The expression of Foxp3 (regulatory T cell). CN: Control with normoglycemia, CH:Control with hyperglycemia, EN:Endotoxin with normoglycemia, EH:Endotoxin with hyperglycemia.

（5）高血糖の腸内細菌叢、腸内環境及び bacterial translocation への影響を検討した。これまでに確立してきた長時間持続高血糖内毒素血症モデルを使用し、現在、各測定系における全ての標本採取を終え解析を開始しているところである。本結果から、高血糖の腸内細菌叢及び腸内環境への修飾が明らかとなる。また、bacterial translocation の解析により高血糖と腸管壁防御機構破綻の関連が明らかになる見込みである。プロバイオティクスによる腸内細菌叢の恒常性維持効果の検討は、23 年度で交付期間が終了となったため、将来的な課題としたい。

本研究から、内毒素血症下における高血糖は 200-300mg/dl という臨床的に頻繁に遭遇する血糖領域でも、腸管透過性を亢進させることが明らかとなった。また 200-300mg/dl の血糖値が長時間持続する場合、内毒素血症下の GALT を中心とした腸管免疫組織では、高血糖が炎症性サイトカイン発現の増悪因子であることが判明し、同時に、GALT の中でも MLNs が中心的な役割を果たしていた。さ

らに、同部位ではヘルパーT 細胞の活発な発現変化が見られ、高血糖そのものが腸管免疫システムに強い影響を与えている可能性が示唆された。これらの知見から、持続する高血糖が腸管における炎症反応の賦活化並びに腸管壁防御機構を修飾し、同時に Th2 及び regulatory T 細胞を中心とした腸管免疫担当細胞の分化を促進している可能性が高く、高血糖の腸管における修飾を明らかにした点で、本研究の臨床的意義は高い。現在解析中の腸内細菌叢、腸内環境への効果の結果を含め、国際誌への論文投稿の準備を進めている。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計５件）

① 鈴木武志、芹田良平、森崎浩、敗血症における心機能障害～心筋保護と β 遮断薬の可能性～、日集中医誌、査読有、18 巻、2011、193-200
② Katsuya Mori, Hiroshi Morisaki, Satoshi Yajima Takeshi Suzuki, Akiko Ishikawa, Norihito Nakamura, Yasushi Innami, Junzo Takeda. Beta-1 blocker improves survival of septic rats through preservation of gut barrier function, Intensive Care Med, 査読有, Vol.37, 2011, 1849-1856
③ 森崎浩、硬膜外麻酔・鎮痛と消化管粘膜保護、日臨麻会誌、査読有、30 巻、2010、106-112
④ 長田大雅、森力哉、森崎浩、硬膜外麻酔の抗炎症作用、臨床麻酔、査読有、34 巻、2010、1856-1863
⑤ Yajima Satoshi, Morisaki Hiroshi, Serita, Ryohei, Suzuki Takeshi, Katori Nobuyuki, Asahara Takashi Nomoto Koji, Kobayashi Fujio, Ishizaka Akitoshi, Takeda Junzo, Tumor necrosis factor-α mediates hyperglycemia augmented gut barrier dysfunction in endotoxemia, Crit Care Med, 査読有, Vol.37, 2009, 1024-1030

〔学会発表〕（計４件）

① Katsuya Mori, Hiroshi Morisaki, Toru Igarashi, Junzo Takeda, Per sistent hyperglycemian up-regula tes inflammatory cytokines in me senteric lymoh nodes in endotoxe mic rats, American Society of An esthesiologists, 2011.10.15-19, USA
② Katsuya Mori, Hiroshi Morisaki, Takeshi Suzuki, Yasushi Innami, Junzo Takeda, Beta-blocker therapy minimizes gut mucosal injury and local inflammatory response in peritonitis -evoked septic rats, American Society of Anesthesiologists, 2010.10.16-20, USA
③ Katsuya Mori, Hiroshi Morisaki, Satoshi Yajima, Norihito Nakamura, Junzo Takeda, Hyperglycemia per se deteriorates gut barrier function in rats, American Society of Anesthesiologists, 2010. 10.16-20, USA
④ Hiroshi Morisaki, Katsuya Mori, Satoshi Yajima, Takeshi Suzuki, Junzo Takeda, Beta-blocker, esmolol, infusion improves survival of septic rats, American Society of Anesthesiologists, 2009.10.17-21, USA

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）
○取得状況（計０件）

〔その他〕
ホームページ等
なし

６．研究組織
(1)研究代表者
森崎　浩（MORISAKI HIROSHI）
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：60182226

(2)研究分担者
藍　公明（AI KIMIAKI）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：30265847

(3)連携研究者
なし