

論 文 要 旨

The Administration of Ghrelin Improved Hepatocellular Injury Following Parenteral Feeding in A Rat Model of Short Bowel Syndrome

グレリンの経静脈投与は
大量腸管切除+完全静脈栄養モデルラットにおける肝障害を抑制する

大西 峻

【序論及び目的】

短腸症候群(SBS)とは、大量腸管切除後に起こる吸収不全を主とした病態である。SBS 患児は長期における絶食および完全静脈栄養(TPN: Total parenteral nutrition)から、重篤な肝障害へと進展し、腸管不全関連肝障害(IFALD: Intestinal failure-associated liver disease)と呼ばれている。IFALD は新生児、乳児期では胆汁うっ滞から肝硬変へと進行し、その原因として大豆由来の ω -6系脂肪乳剤の関与が示唆されることから、治療として魚油由来 ω -3系脂肪乳剤の有用性が報告されている。一方、成人では脂肪肝から肝線維化、肝炎へと進行する非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease) が多いとされている。IFALD はその発症時期にかかわらず、生命予後に大きな影響を与える合併症であるため、IFALD 発症の予防、治療は極めて重要な課題である。

一方、グレリンは、胃から分泌される消化管ホルモンであり、我々は、グレリンの組織修復、成長を促進する作用に注目し、絶食、静脈栄養管理ラットモデルにおいて、グレリン投与が小腸粘膜の萎縮を軽減することを報告した。さらに、グレリンが急性・慢性肝炎モデル動物の肝細胞障害、肝線維化の減弱作用を有することも報告されている。

我々は、静脈栄養管理中の SBS 患者で観察される IFALD の予防・治療として、グレリン投与が有用ではないかと考えた。本研究では、大量腸管切除+TPN モデルラットを使用し、大量腸管切除後の長期静脈栄養が引き起こす肝障害に対するグレリンの効果を検討することを目的とする。

【材料及び方法】

8 週齢 SD rat に右頸静脈から中心静脈カテーテルを挿入した。90%大量腸管切除モデル (treiz 靱帯から 5cm 肛門側空腸～回盲弁から 5cm 口側の回腸を切除) を作成し、グレリン投与群 (n=9, SBS/TPN/Ghrelin, グレリン 10 μ g/kg/day の持続投与)、グレリン非投与群 (n=9, SBS/TPN) の 2 群に分けた。さらに Sham 群 (カテーテル挿入および腸管切離・吻合) を作成した。SBS/TPN/Ghrelin 群および SBS/TPN 群は完全静脈栄養(水分 200ml/kg/day、栄養 254kcal/kg/day)、Sham 群は生食静注および経口摂取とし 13 日目に犠死せしめた。

評価項目

<血液生化学検査> 犠死時の血清から、aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH), total bilirubin (T-Bil), total cholesterol (T-CHO), triglyceride (TG)を測定した。

<組織学的評価> 肝組織について HE 染色標本を作製した。また組織学的所見を脂肪滴沈着 (Steatosis score)、炎症細胞浸潤 (Inflammation score)、肝細胞の ballooning (Ballooning score) の各項目をスコアリングし、その合計を NAFLD score とした。

<肝組織内脂質含有量> 肝組織中の triglyceride (TG), free fatty acid (FFA) および cholesteryl ester (CE) を定量した。

【結 果】

<血液生化学検査> SBS/TPN 群の AST および LDH は sham 群より有意に高値を示した。SBS/TPN/Ghrelin 群の ALT および LDH は SBS/TPN 群より有意に低値を示した。SBS/TPN 群および SBS/TPN/Ghrelin 群の TG および T-CHO は sham 群より有意に高値を示した。T-Bil は各群で有意差を認めなかった(表 1)。

表 1 血液生化学所見

	Sham	SBS/TPN	SBS/TPN/Ghrelin
AST (IU/L)	90.57 ± 15.75	162 ± 84.32 [†]	95.29 ± 9.78*
ALT (IU/L)	26.86 ± 1.77	21.14 ± 8.55	12.00 ± 3.61* ^{††}
LDH (IU/L)	467.25 ± 190.21	889.75 ± 450.77 [†]	407.88 ± 88.58**
T-BIL (mg/dL)	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.03	0.02 ± 0.04
TG (mg/dL)	19.22 ± 13.47	82.44 ± 42.54 ^{††}	69.78 ± 22.02 ^{††}
T-CHO (mg/dL)	61.57 ± 7.35	84.43 ± 14.49 ^{††}	101.43 ± 11.34* ^{††}

The values are presented as the mean ± SD

AST aspartate aminotransferase, ALT alanine aminotransferase, LDH lactate dehydrogenase, T-Bil total bilirubin, TG triglyceride, T-CHO total cholesterol

* $p < 0.05$ vs. SBS/TPN, ** $p < 0.01$ vs. SBS/TPN, [†] $p < 0.05$ vs. Sham, ^{††} $p < 0.01$ vs. Sham

<組織学的評価>

HE 染色において、SBS/TPN 群では明らかな脂肪滴の沈着が認められ、SBS/TPN/Ghrelin 群では認めなかった。脂肪滴の定量的評価では、SBS/TPN 群の Steatosis score、Inflammation score は Sham 群より有意に上昇していたが、Ballooning score は有意差を認めなかった。NAFLD score (total score) においても SBS/TPN 群は sham 群、SBS/TPN/Ghrelin 群より有意に上昇していた。SBS/TPN/Ghrelin 群の Steatosis score、Inflammation score および NAFLD score (total score) は、有意に SBS/TPN 群より低値で、Sham 群と同等であった (表 2)。

<肝細胞内脂質含有量>

SBS/TPN 群の肝内 TG、FFA、CE は、Sham 群および SBS/TPN/Ghrelin 群より有意に上昇していた。グレリンの投与により脂質の沈着が予防されたと考えられるが、SBS/TPN/Ghrelin 群の TG だけは Sham 群より上昇していた (表 3)。

【結論及び考察】

本研究より以下の結果が導かれた。

- (1) 90%大量腸管切除+13 日間の TPN 管理により、肝臓に胆汁うっ滞のない脂肪変性を生じた。
- (2) グレリン投与により肝臓における炎症細胞浸潤および脂質沈着を防ぐことができた。
- (3) グレリン投与により血清 AST および LDH の上昇を防ぐことができた。また血清 T-CHO 値が上昇した。

本実験に用いた大量腸管切除+完全静脈栄養ラットモデルでは、血清 AST および LDH の上昇は認められたが、血清 T-Bil は上昇しなかった。また、肝組織中の脂肪変性を認めたが、胆汁うっ滞や線維化は見られなかった。臨床における IFALD では、新生児、乳児では胆汁うっ滞や線維化、成人では脂肪変性が多くみられる事が報告されている。本研究モデルは、8 週齢の成獣ラットを用いたことから、成人に見られる NAFLD 様の脂肪変性が観察されたと考えられる。

既報では、ラットに過剰なカロリーの輸液を 6 日間投与することで脂肪肝を引き起こすモデルが報告されている。以前、我々は腸管切除をしないラットに適正カロリーの静脈栄養を 6 日間投与する実験において、肝障害は認められないことを確認しており、肝障害予防には適切な栄養管理が重要であると考えられる。また、大量腸管切除モデルを用いて、肝障害を検討した報告はないことから、本研究に用いたモデルは今後の脂肪沈着型の IFALD の研究にも有用であると考えられる。

本研究において、グレリン投与により血清 AST および LDH の上昇が抑えられたことから、グレリンは大量腸管切除+完全静脈栄養によって観察される肝障害を抑える働きがあると考えられる。

本研究で用いた脂肪乳剤は、大豆由来の ω -6 系脂肪乳剤であり、小児の IFALD との関連が報告されている。近年、臨床では魚油由来の ω -3 系脂肪酸が小児の IFALD 治療として注目されている。 ω -3 系脂肪酸が高脂肪食によって引き起こされる脂肪肝を改善する効果が報告されており、本動物モデルで見られた脂肪変性に対しても ω -3 系脂肪酸の効果が期待される。

NAFLD の発症および進行における“two-hit” theory によると、肝臓における脂肪変性は first hit であり、そこに second hit として酸化ストレスや炎症が加わることにより NASH へと進行することが報告されている。本研究では、大量腸管切除および TPN が first hit であり、bacterial translocation やカテール関連血流感染症の炎症、更なる手術などが second hit の可能性がある。グレリン投与がアポトーシスや酸化ストレスを軽減したという既報があることから、本研究におけるグレリンの肝障害抑制効果のメカニズムの一端である可能性が考えられる。

本研究によって、グレリンは短腸症候群患者における新たな術後栄養管理方法の一助となり得ることが示された。グレリン投与による肝障害の抑制のメカニズムについては、更なる研究が待たれる。

(Pediatric Surgery International. 2016 Dec;32(12):1165-1171 掲載)

表2 NAFLD score

	Sham	SBS/TPN	SBS/TPN/Ghrelin
Steatosis score	0.00 ± 0.00	1.44 ± 0.88 ^{††}	0.56 ± 0.53*
Inflammation score	0.56 ± 0.5	1.22 ± 0.44 [†]	0.44 ± 0.53**
Ballooning score	0.00 ± 0.00	0.33 ± 0.50	0.00 ± 0.00
NAFLD score	0.56 ± 0.53	3.00 ± 1.12 ^{††}	1.00 ± 0.87**

The values represent the mean ± SD

The NAFLD score was calculated as the total of the steatosis score, the inflammation score, and the ballooning score

* $p < 0.05$ vs. SBS/TPN, ** $p < 0.01$ vs. SBS/TPN, [†] $p < 0.05$ vs. Sham, ^{††} $p < 0.01$ vs. Sham

表3 肝細胞内脂質含有量

	Sham	SBS/TPN	SBS/TPN/Ghrelin
Hepatic TG (mg/g)	133.87 ± 13.73	1401.78 ± 636.3 ^{††}	822.48 ± 204.48* ^{††}
Hepatic FFA (mg/g)	99.67 ± 20.84	394.27 ± 259.20 ^{††}	181.60 ± 72.43*
Hepatic CE (mg/g)	76.16 ± 9.30	124.21 ± 36.54 ^{††}	89.30 ± 13.70*

The values represent the mean ± SD

TG triglyceride, FFA free fatty acid, CE cholesteryl ester

* $p < 0.05$ vs. SBS/TPN, ^{††} $p < 0.01$ vs. Sham