

経口ヌクレオシド / ヌクレオチド + ヌクレオプロタミン混合物サプリメント による放射線照射マウスの腸侵襲に及ぼす効果†

小野 香*1 酒井 徹*2 山本 茂*3 小越 章平*4
宇住 晃司*5 松永 政司*5

はじめに

核酸は、生体を構成する細胞内に含まれる成分であり、その供給は生体内において炭素、アミノ酸より de novo 経路にて合成される。また、食事由来の核酸についても、生体内で分解された後 salvage 経路にて再合成され、循環することが知られている。1960年代に高カロリー輸液が患者の栄養治療として開始されて後1984年に Ogoshi らによって初めて、核酸を栄養素として静脈内投与する試みがなされた¹⁻⁶⁾。70%肝切除ラットモデルでは核酸投与群において術後の窒素出納改善効果が認められた⁷⁾。その後、さまざまな病態モデルでの経静脈または経口核酸投与による早期回復効果が報告されている⁸⁻¹³⁾。一方、人工の乳児用ミルク摂取により乳児の免疫能低下が認められ、その原因は核酸欠乏によるものであることが報告された¹⁴⁾。生体が核酸欠乏、急激な核酸必要量増加による相対的欠乏状態に陥った場合、外来性のエネルギー節約型とされるサルベージ合成経路より核酸を供給し不足を補っている。これらのことから、核酸欠乏状態は生体の免疫能に影響を及ぼ

すことがわかり、病態時においては十分量の摂取により早期病態改善効果が期待され、条件付必須アミノ酸とされているグルタミン、アルギニンと並んで免疫栄養素と認識されている。

臨床では、癌患者に対し、化学療法や放射線療法が有効な治療法として行われているが、癌組織だけでなく正常組織も損傷を受けることから重篤な副作用として気管や腸管の粘膜炎症、潰瘍、出血、などが出現する¹⁵⁾。これにより食事摂取困難から容易に低栄養状態を来し、その結果治療継続困難となることがある¹⁶⁾。しかし現在のところ、それら副作用に対する有効な対処法は十分ではない。栄養療法についてはこれまで、グルタミンあるいはアルギニン強化による放射線照射動物モデルにおける腸粘膜侵襲軽減効果について¹⁷⁻¹⁹⁾、また臨床においても放射線および化学療法施行中の食道ガン患者への経口グルタミン投与による効果等が報告されており²⁰⁾、グルタミン投与が放射線療法の一助となる可能性が示唆されるが、核酸強化についてもその可能性が考えられる。しかし核酸の放射線による腸侵襲軽減効果についての報告はまだなされていないことから、本

† The effects of NS/NT and nucleoprotamine supplemented diets for intestinal injury on radiation-induced mice

*1 Kaori ONO: 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部

*2 Toru SAKAI: 大阪府立大学総合リハビリテーション学部

*3 Shigeru YAMAMOTO: お茶の水女子大学生生活科学部

*4 Shohei OGOSHI: 高知医科大学名誉教授

*5 Kouji UZUMI, Masaji MATSUNAGA: KYG 協会

研究において放射線損傷腸粘膜に及ぼす核酸の効果について検討することとした。

方法

動物

6週齢25~27gの雌性ICRマウス(日本エスエルシー)を1週間の予備飼育後に使用した。動物はいずれも徳島大学栄養学科動物実験室にて室温23±2℃,人工照明(8:00~20:00)の条件下で飼育した。予備飼育中は固形試料(日本農産)および飲料水を自由摂取させた。

栄養投与, X線照射

予備飼育後,動物をコントロール群(n=5),無核酸食群(n=5),(以下NFD群)核酸投与群(n=5),(以下OG-DNA)に分け,コントロール群およびNFD群には無核酸食を,OG-DNA群には無核酸食に加えて,ヌクレオシド/ヌクレオチド+ヌクレオプロタミン混合物を約1%重量投与した(表1)。栄養投与一週間後,NFD,およびOG-DNA群に対し,X線照射装置にて10GyのX線を照射した(図1)。実験期間中は定期的に体重測定を行った。

組織,細胞サンプリング

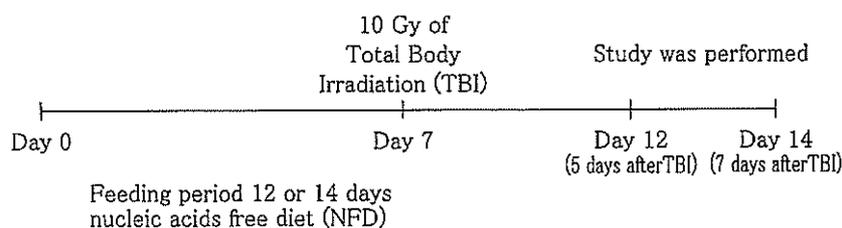
X線照射後5,7日目に,エーテル麻酔下に全血,回腸末端部,腸管洗浄液を採取した。また,腸間膜リンパ節を無菌的に採取した。腸管は回腸末端部を10%ホルマリン液に保存し,パイエル板を採取した後反転,4等分に切断し5%FCS

(GIBCO),抗生物質入りRPMI1640(SIGMA)を40ml入れたチューブ内に入れ,37℃恒温槽で45分間インキュベートし,腸上皮リンパ球を分離した。さらに腸管をコラゲナーゼ(SIGMA)40単位/ml,30mlのRPMI1640にて60分間インキュベートし,これを3回繰り返して腸管固有層リンパ球を分離した。パイエル板は細分しコラゲナーゼ40単位/ml,25mlのRPMIにて60分間インキュベートし,パイエル板リンパ球を分離した。それぞれのリンパ球分離には40%,および75% Percoll(Amersham pharmacia biotech)勾配を用いた。分離した腸管リンパ球数をそれぞれ測定した。

表1 無核酸食組成とOG-DNAの配合割合

	NFD	OG-DNA
	(w/w)	
Casein	24.5	24.5
Cornstarch	45.5	45.5
Granulated sugar	10.0	10.0
Corn oil	6.0	6.0
Crystal cellulose	3.0	3.0
Cellulose powder	2.0	2.0
α -Starch	1.0	1.0
Vitamin mixture	1.0	1.0
Mineral mixture	7.0	7.0
*Nucleosides ⁺	—	1.0
Nucleoprotamine		

*Nucleosides⁺ Nucleoprotamine; was added in drinking water Inosine, 13.5%; 5'-GMP·2Na, 20.5%; Cytidine, 12.3%; Uridine, 9.3%; Nucleoprotamine, 44.4%



1. Control group ; fed NFD and without irradiation
2. NFD group ; fed NFD
3. OG-DNA group ; fed NFD plus OG-DNA

図1 実験プロトコール

腸管内 IgA

採取した腸管腔内を20mlのPBSで洗浄し、その洗浄液を用いて腸管内IgAをELISA法(BETHYL laboratories, Inc)にて測定した。

IgA 陽性細胞数

分離したパイエル板リンパ球および粘膜固有層リンパ球中のIgA陽性細胞の割合を測定するため、フローサイトメトリー法を用いた。分離した細胞は0.5%サポニン入りFACSバッファー(0.5%BSA, 0.02%アジ化ナトリウム入りPBS)にて10分間室温に置き、ビオチン標識マウスIgA抗体(Becton Dickinson Co.)で30分間4°C保温後、ストレプトアビジン標識PE-Cy5(eBioscience)で30分間4°C保温にて染色し、FACSバッファーにて2回洗浄し、フローサイトメトリーにてIgA陽性細胞率を測定した。各々の細胞数にIgA陽性細胞率を乗じてIgA陽性細胞数を算出した。

血中 IL-6

採取した血液は遠心分離し血漿を-80°Cで保存した。血漿中IL-6をELISA法にて測定した。測定方法は製品のプロトコールに従った(eBioscience社)。

バクテリアルトランスロケーション

腸間膜リンパ節を無菌的に採取し、重量g当た

り4mlのブレイン-ハートインフュージョンブロス液中にてホモジネートした後、マッコンキーII寒天培地(BD社)に0.5ml添加し37°Cインキュベーター内で24時間培養した。コロニーが検出されたものを陽性とみなした。

統計手法

試験成績は平均値±標準誤差で表示し、有意差検定はF検定後、F値が0.05以上の場合にStudent's *t*-test, F値が0.05未満の場合にAspin-Welch's *t*-testを行った。危険率5%未満を有意差有りとして判定した(両側検定)。なお、統計処理ソフトはユックムスの「StatLight#3 2群間の比較」を使用した。

結果

体重変化

放射線照射前の各群における体重増加に差は見られなかった。放射線照射後は、コントロールに比べ放射線照射群は体重減少をきたし、照射後3日~4日後に最も顕著であった。放射線照射後7日目においてOG-NFD群ではNFD群よりもより回復傾向が認められた(3.12±0.80 vs. -0.08±0.63 vs. 0.66±0.54g)(図2)。

バクテリアルトランスロケーション

24時間の腸間膜リンパ節培養において、コントロール群では、陰性であったがNFD群、OG-NFD群では放射線照射後5日目に陽性を示す個

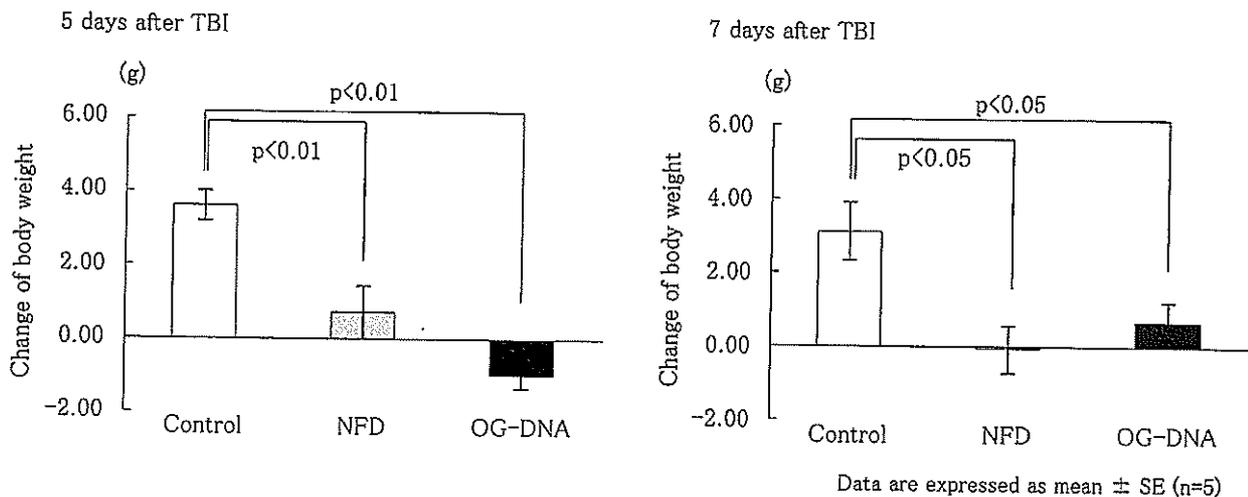


図2 放射線照射による体重変化

表2 放射線照射後の腸間膜リンパ節におけるBT陽性率

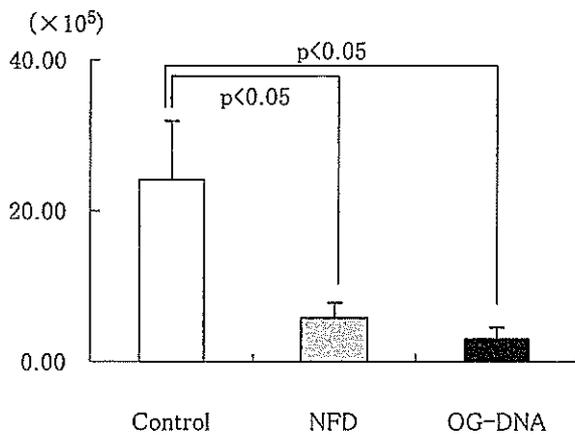
Group	Sampling point	Bacterial translocation to MLN
Control	Day 5	0 / 5
NFD		1 / 5
NFD+OG		3 / 5
Control	Day 7	0 / 5
NFD		0 / 5
NFD+OG		0 / 5

体が観察された。しかし照射後7日目では、全ての群で陰性であった。5日目のNFD群、OG-DNA群間の比較では有意差は認められなかった(表2)。

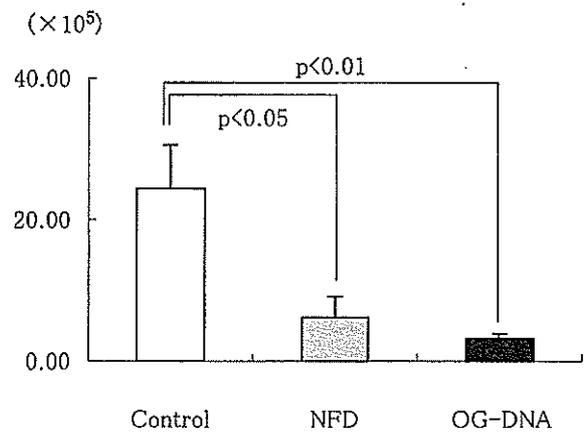
腸管リンパ球数

放射線照射後5, 7日目において, NFD群, OG-DNA群の腸上皮リンパ球数, パイエル板リンパ球数, 粘膜固有層リンパ球数は共にControl群に比べて有意に減少しており, リンパ球数の回復は認められなかった(図3, 4)。IgA陽性細胞数は, 7日目の粘膜固有層リンパ球におい

5 days after TBI

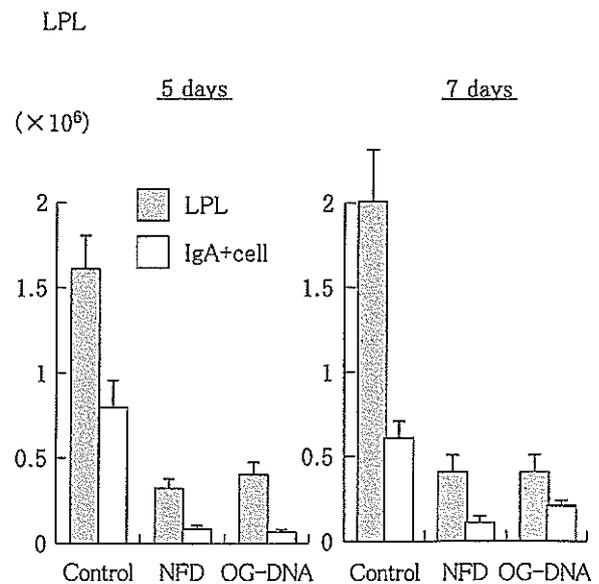
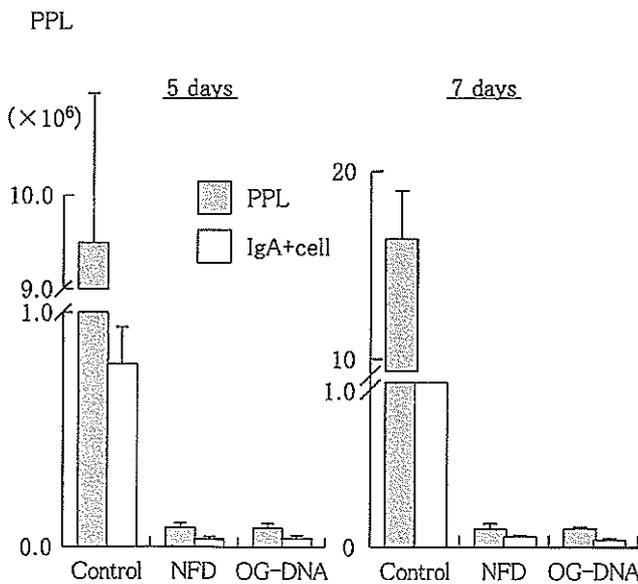


7 days after TBI



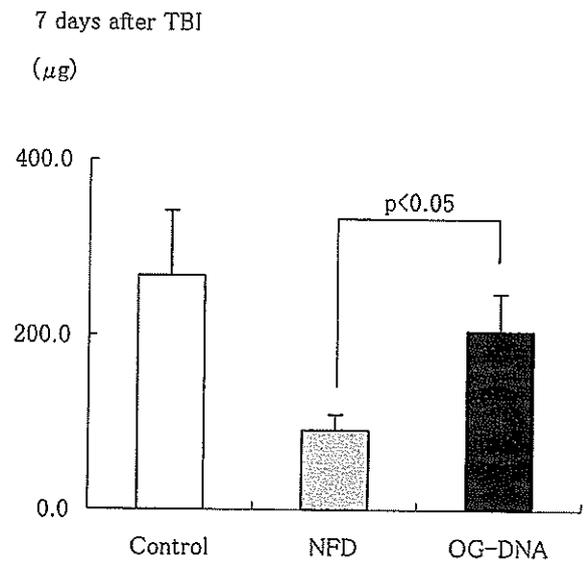
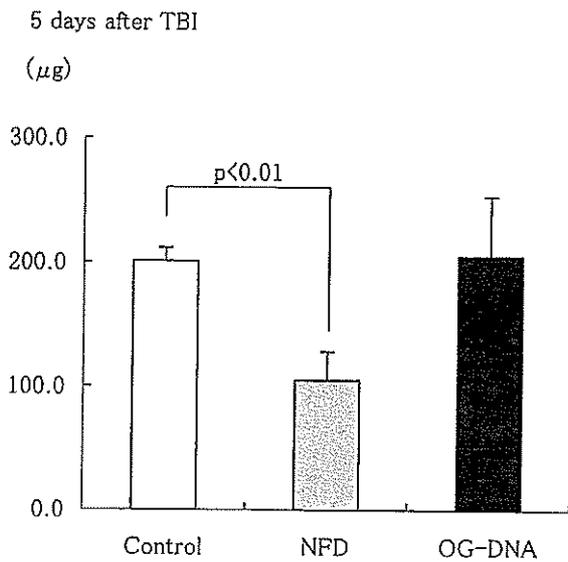
Data are expressed as mean ± SE (n=5)

図3 放射線照射後における腸上皮リンパ球数 (IEL)



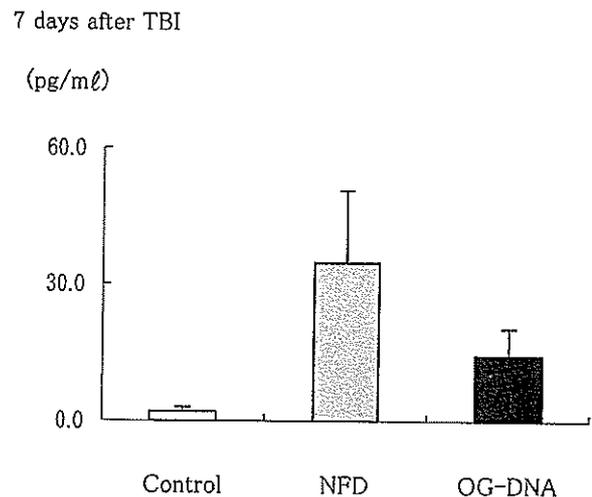
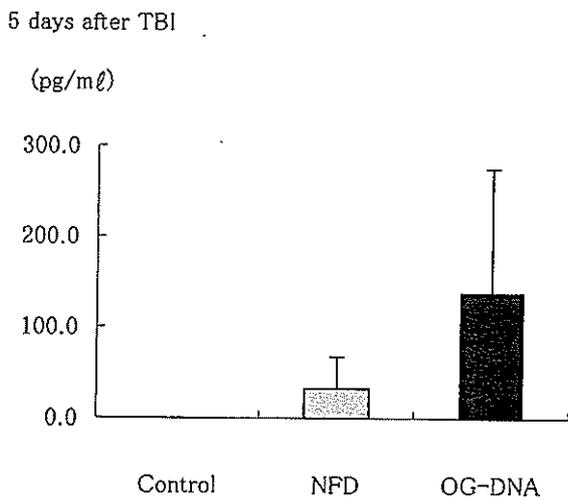
Data are expressed as mean ± SE (n=5)

図4 放射線照射後におけるパイエル板リンパ球 (PPL), 粘膜固有層リンパ球 (LPL), IgA陽性細胞数



Data are expressed as mean ± SE (n=5)

図5 放射線照射後における腸管 IgA 産生量



Data are expressed as mean ± SE (n=5)

図6 放射線照射後における血中 IL-6 産生量

て、OG-DNA 群は NFD 群よりも高い傾向が認められたものの有意差は認められなかった。

腸管 IgA

放射線照射 5 日後では、NFD 群において Control 群に比べて有意に IgA 産生が減少したが、OG-DNA 群における産生量はコントロール群と比べて差が認められなかった (200.7 ± 11.0 vs. 105.6 ± 22.5 vs. 206.3 ± 47.2 μg)。7 日後にはコントロール群と OG-DNA 群には差が認められないものの NFD 群に比べて有意に IgA 産生が増加した (267.7 ± 74.2 vs. 91.6 ± 17.3 vs. 206.3 ± 41.3 μg) (図 5)。

IL-6

放射線照射マウスでは、照射 5、7 日後で血中 IL-6 の上昇が認められた。5 日後は NFD 群に比べ、OG-DNA 群において高値を示したが 7 日後には OG-DNA 群はほぼ正常群に近い値に回復する傾向が認められた (1.8 ± 1.3 vs. 34.6 ± 15.9 vs. 14.5 ± 5.9 pg/ml)。いずれの値も、各群間で有意差は認められなかった (図 6)。

考察

腸管はウイルス、細菌などの侵入を防ぐバリア機構を担う粘膜で覆われており、腸粘膜内のリン

パ球は免疫グロブリンの一種である IgA を多量に産生している。また、腸上皮、粘膜固有層、パイエル板リンパ球は、免疫グロブリンと共に腸管からの病原体の侵入を阻止または排除する働きを担っているため、腸管は、脾臓に次いで第2の免疫組織とされている。従って腸管機能が破綻すると、容易にバクテリアルトランスロケーション (BT) を招き、敗血症や多臓器不全などを引き起こす一因となり得る²¹⁾。他方、中心静脈栄養 (Total Parenteral Nutrition: TPN) による栄養補給では、腸管を使用しないために腸管が萎縮し、BT を容易に起こし得るとされている²²⁻²³⁾。1993年、Iijima らによって TPN に核酸を付加することにより腸粘膜萎縮を抑制したことが報告されている²⁴⁾。それによると TPN 時に核酸を添加した群において、空腸および回腸の湿重量増加、回腸のタンパク量、空腸の DNA 量増加、などの結果が得られた。本実験では、多量の放射線を照射することにより、腸侵襲を惹起させたマウスに対して経口的に核酸を投与したが、腸間膜リンパ節における BT についての差は認められなかった。これは、経口投与による実験であったため、腸管の使用が維持されたことにより、BT の陽性率自体が低かったことが考えられるが、腸間膜リンパ節後の他臓器への影響についての検討も必要であると思われる。一方、IgA については、放射線照射により分泌量は減少しているが、核酸投与群において改善が認められ、放射線照射7日後においては無核酸群と核酸投与群間で有意差が認められたことより、核酸投与群で、腸侵襲後における IgA 分泌の回復、腸管侵襲の早期回復が示唆された。しかし、腸管リンパ球数に関しては照射7日後の

回復は NFD 群、OG-DNA 群共に認められなかったため、放射線照射による腸管リンパ球数の回復にはさらに時間を要することが明らかとなった。また、IgA 産生量の改善に対して、OG-DNA 群は NFD 群に比べて有意ではなかったものの腸管粘膜固有層リンパ球数の改善傾向が認められたため、この点についてさらなる検討が必要である。

放射線照射による炎症反応によって炎症性サイトカインが上昇することは一般的に知られている²⁵⁾。本結果からは炎症性サイトカイン IL-6 産生に有意差は認められなかったものの照射7日後において核酸投与群の方は産生量が低く、よりコントロール群に近い傾向が認められた。これより、核酸投与群において、放射線照射による炎症様症状が早期沈静されたことが示唆された。

放射線照射による腸侵襲時における核酸投与効果については、腸管リンパ球機能にいかなる影響を及ぼすか、特に免疫グロブリン IgA 産生への関与を含めて今後さらに追加研究を要する。

一方、核酸は物質の安定性も高く経口サプリメントとしても大変扱いやすいという特徴の下、多くの基礎研究によりその有用性について証明されているが、臨床における利用度は未だ低いといえる。しかし核酸は臨床において免疫栄養素としてさらに多くの病態に利用できる可能性が高く、今後もさまざまな基礎および臨床研究を進めることが必要である。

謝辞

本研究は、フォーデイズ株式会社 (和田佳子代表) の研究費により実施できたことに深謝する。

参 考 文 献

- 1) 小越章平, 他: 総合的核酸成分の輸液に関する研究 (I) - 正常ラットにおける配合比の検討. JJPEN, 6: 53-59, 1984
- 2) 小越章平, 他: 総合的核酸成分の輸液に関する研究 (II) - 肝切除ラットの高カロリー輸液に及ぼす影響. JJPEN, 6: 199-203, 1984
- 3) 岩佐正人, 他: 総合的核酸成分の輸液に関する研究 (III) - 肝切除犬の代謝に及ぼす影響を中心として. JJPEN, 6: 205-209, 1984
- 4) 岩佐正人, 他: 総合的核酸成分の輸液に関する研究 (IV) - 肝切除犬における至適濃度. JJPEN, 6: 319-323, 1984

- 5) 小越章平, 他: 総合的核酸成分の輸液に関する研究 (V) -ヌクレオチドとヌクレオシド輸液の比較. JJPEN, 6 : 1-6, 1985
- 6) 大森義信, 他: 総合的核酸成分の輸液に関する研究 (VI) -ガラクトサミン肝障害ラットに対する効果. JJPEN, 7 : 503-507, 1985
- 7) Ogoshi S, et al: Effect of Nucleoside and Nucleotide Mixture on Rats Given Total Parenteral Nutrition after 70% Hepatectomy. JPEN, 9 : 339-342
- 8) Fontana L, et al: Effects of dietary polyunsaturated fatty acids and nucleotides on tissue fatty acid profiles of rats with carbon tetrachloride-induced liver damage. Clin Nutr 18: 93-101, 1999
- 9) Veerabagu MP, et al: Intravenous nucleosides and a nucleotide promote healing of small bowel ulcers in experimental enterocolitis. Dig Dis Sci 41: 1452-1457, 1997
- 10) Adjei AA, et al: Dietary nucleosides and nucleotides reduce *Cryptosporidium parvum* infection in dexamethasone immunosuppressed adult mice. Exp Parasitol 92: 199-208, 1999
- 11) Kulkarni AD, et al: Effect of dietary nucleotides on response to bacterial infections. JPEN 10: 169-171, 1986
- 12) MC Nunez, et al: Effect of dietary nucleotides on intestinal repair in rats with experimental chronic diarrhea. JPEN 14: 598-604, 1990
- 13) Iijima S, et al: A total parenteral nutrition solution supplemented with a nucleoside and nucleotide mixture sustains intestinal integrity, but does not stimulate intestinal function after massive bowel resection in rats. J Nutr 126: 589-595, 1996
- 14) Carver JD, et al: Dietary nucleotide effects upon immune function in infants. Pediatrics 88: 359-363, 1991
- 15) Trier JS, et al: Morphologic response of the mucosa of human small intestine to x-ray exposure. J Clin Invest. 45: 194-204, 1966
- 16) Rivadeneira DE, et al: Nutritional support of the cancer patient. 48: 69-80, 1998
- 17) Klimberg VS, et al: Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. Cancer 66: 62-68, 1990
- 18) Chun H, et al: Effect of enteral glutamine on intestinal permeability and bacterial translocation after abdominal radiation injury in rats. J Gastroenterol 32: 189-195, 1997
- 19) Ersin S, et al: The prophylactic and therapeutic effects of glutamine- and arginine-enriched diets on radiation-induced enteritis in rats. J Surg Res 89: 121-125, 2000
- 20) Yoshida S, et al: Effects of glutamine supplements and radiochemotherapy on systemic immune and gut barrier function in patients with advanced esophageal cancer. Ann Surg 227: 485-491, 1998
- 21) Sheng ZY, et al: Bacterial translocation and multiple system organ failure in bowel ischemia and reperfusion. J Trauma 32: 148-153, 1992
- 22) Alverdy JC, et al: Total parenteral nutrition promotes bacterial translocation from the gut. Surgery. 104: 185-190, 1988
- 23) Illig KA, et al: Total parenteral nutrition-induced changes in gut mucosal function: atrophy alone is not the issue. Surgery. 112: 631-637, 1992
- 24) Iijima S, et al: Intravenous administration of nucleosides and a nucleotide mixture diminishes intestinal mucosal atrophy induced by total parenteral nutrition. JPEN 17: 265-270, 1993
- 25) Mouthon MA, et al: Inflammatory response to abdominal irradiation stimulates hemopoiesis. Int J Radiat Biol. 77: 95-103, 2001