

平成21年 5月19日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591512

研究課題名（和文）亜鉛代謝からみた膵広範切除後脂肪肝発生機序の解明と治療

研究課題名（英文）Pathogenesis and treatment of fatty liver after major pancreatectomy with special attention to zinc metabolism

研究代表者 伊佐地 秀司 (ISAJI SHUJI)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70176121

研究成果の概要：

我々は実験的・臨床的研究から、膵広範切除(膵頭十二指腸切除)後には、非アルコール性脂肪肝(NAFLD)が高率に発生し、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)に移行するものもあり、その機序として膵機能低下と亜鉛代謝異常が関与していることを明らかにした。我々が考案した NAFLD 予測スコアは、発生予測に有用で、スコア 6 点以上では、膵酵素補充療法と亜鉛を含む微量元素の補充、経腸栄養などの積極的栄養管理が重要で、これにより NAFLD の予防と治療が可能であることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	600,000	180,000	780,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵広範切除、膵頭十二指腸切除、脂肪肝、非アルコール性脂肪肝、非アルコール性脂肪肝炎、亜鉛代謝、膵酵素補充療法

1. 研究開始当初の背景

膵広範切除後に脂肪肝が発生することは、1980年台のCTの普及と、膵頭部領域癌に対する膵頭十二指腸切除や膵全摘が多くの施設で行われるようになり、注目されるようになった。しかし、脂肪肝がなぜ膵広範切除では30～40%と高頻度にみられ、かつ術後1カ月の早期から発生するのに対して、他のmajor surgeryではほとんど発生しないのかについては、全く不明である。これまで臨床的に脂肪肝により高度の肝障害を来すこと

が知れておらず、また適切な治療もなかったために、膵広範切除後の脂肪肝の病態について研究した報告はほとんどない。わずかに我々がこの問題に取り組み、膵内外分泌機能の低下と栄養障害が関与していることを示唆する報告を過去に行っているにすぎない。

一方、脂肪肝については、最近、アルコール性脂肪肝(AFLD)と非アルコール性脂肪肝(NAFLD)に分けて病態が研究されているが、なかでも非アルコール性脂肪肝炎(NASH)が注目されるようになり、これまで脂肪肝

(NAFLD)として放置されていた症例のなかには NASH に移行して、肝の線維化から肝硬変を併発することが明らかにされた。これにより脂肪肝が注目されるようになり、アルコール性脂肪肝でも脂肪肝炎を併発して肝硬変に移行する機序が明らかにされつつあり、その機序としてアルコールによる腸管透過性亢進が原因でエンドトキシン血症をきたし肝 Kupffer 細胞が活性化されて肝障害を来すことが明らかにされている。さらに腸管透過性亢進の阻止に亜鉛経口投与の有効性が実験的に示されている。

亜鉛は微量元素であるが、多くの金属酵素 (metalloenzymes) の機能的構成成分であり、糖質や蛋白、脂質代謝に関与し、また DNA ポリメラーゼなどの構成成分として細胞増殖にも関与しており、生体の発育や発達に不可欠の元素である。膵臓は亜鉛代謝の中心的臓器であることが知られている。すなわち、亜鉛は膵ランゲルハンス島 B 細胞に主に存在し、インスリンの合成、貯蔵、分泌および安定性に関与し、また膵酵素の合成にも関与している。さらに亜鉛は膵液中に存在する亜鉛結合蛋白と結合して上部空腸から吸収され、またインスリンは亜鉛の腸管内から腸管上皮への移行を促進している。従って膵内外分泌機能の低下は膵における亜鉛代謝を障害し、亜鉛欠乏状態 (marginal zinc deficiency) を招来する。我々は膵広範切除後には血中亜鉛のみならず膵組織中亜鉛含有量が著明に低下し、その結果インスリン分泌や膵酵素分泌がさらに障害されることを明らかにし、かかる状況下に高亜鉛食を投与すると残存膵の再生を促して膵内外分泌機能が有意に改善することを明らかにしている。

膵広範切除の脂肪肝 (NAFLD) でも放置すれば脂肪肝炎に移行する可能性は否定でない (本研究を開始後、膵広範切除後に肝生検で NASH と診断された症例を 2 例経験し、さらに Tanaka らは高度の膵外分泌機能低下例で NASH が発生した症例を報告している: Pancreatic exocrine insufficiency: a rare cause of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:245-6). さらに、最近、膵癌に効果のある新規抗ガン剤 (ジェムザール) が登場し、膵癌根治術後の補助療法としてジェムザール投与が有効であることが明らかにされているが、術後に高度の脂肪肝を発生した場合には抗ガン剤投与を控える必要があり、膵広範切除後脂肪肝の予防が急務といえる。

2. 研究の目的

本研究は、亜鉛代謝を中心に膵広範切除後の早期から発生する脂肪肝 (NAFLD) の病態生理を明らかにし、かつ (NAFLD) の発生予防と治療法の開発をめざすことを目的とす

るものである。

膵広範切除後には亜鉛欠乏状態となり、これにより腸管粘膜の防御能が低下し腸管透過性 (intestinal permeability) が亢進し、腸管からエンドトキシンが肝臓へ移行し Kupffer 細胞が活性化されて肝に脂肪が沈着して NAFLD が発生する機序を想定しており、これをイヌ膵広範切除モデルを用いて確認する。さらに臨床的には、膵頭十二指腸切除 (PD) 症例を対象に、術後 NAFLD および NASH を来す危険因子を明らかにする目的で、術前・術中・術後の様々な因子を分析して NAFLD 予測スコアを作成すると共に、術後亜鉛を含む積極的栄養療法群と、通常栄養療法群に分けて NAFLD の改善効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験的研究

体重 10-15kg の雑種成犬 (三重大学医学部動物研究施設にて管理) を用いて、24 時間絶食の後、ペントバルビタール静脈麻酔下に 80% 尾側膵切除を施行。術後 3 日間は乳酸化リンゲル液の静注にて管理し、3 日以降より食事 (diet) を開始する。食事の種類により以下の 3 群を作成する。

A 群: 標準食 (亜鉛含有量 4.4 mg/100g: CD-1 食, Clea, Japan, Inc)

B 群: 標準食+膵酵素剤投与 (パンクレアチン 1g/日)

C 群: 高亜鉛食 (亜鉛含有量 44 mg/100g: 硫酸亜鉛添加 CD-1 食)

D 群: 高亜鉛食+膵酵素剤投与 (パンクレアチン 1g/日)

術後 1 週目、4 週目、12 週目に犠牲剖検して以下の検索を行った。血清、および膵、肝組織中の亜鉛濃度を測定 (colorimetric analysis: RM 172-K kit, Iatron)。肝の HE 染色による組織学的検索と、肝組織の中性脂肪含有量を測定。

(2) 臨床的研究

<対象症例>

2007 年 4 月から 2008 年 10 月までに当科にて施行した PD 54 例を対象とした。男性 38 例、女性 16 例で、平均年齢は 66.9±12.3 歳である。原疾患は、膵癌 27 例、IPMN (膵管内乳頭粘液性腫瘍) 13 例、胆管癌 7 例、その他 7 例である。手術術式は、通常の PD3 例、幽門輪温存膵頭十二指腸切除 (PPPD) 18 例、亜全胃温存膵頭十二指腸切除 (SSPPD) 33 例である。合併切除臓器は、門脈が 24 例、肝動脈など 6 例、上行結腸 7 例である。消化管再建は、すべて Child 変法で行い、術後経腸栄養の目的で空腸瘻を全例に造設した。

術後早期の血糖コントロールはインスリンを用い、経口摂取開始後は必要に応じて経口糖尿病薬を投与した。経口摂取開始後は全

例に膵酵素剤の補充を行った。

< 検討方法 >

① 術後 NAFLD 発生因子の解析

術前後の CT 値を比較し、術後 CT 値が 40HU 以下となった症例を手術に関連した NAFLD (術後 NAFLD) と定義した。なお、術後肝機能異常を示した症例では、経皮的肝生検を施行して NASH の有無を検索した。

NAFLD 発生危険因子を術前、術中、術後因子に分けて検討した。術前因子としては、年齢、性別、術前 BMI、糖尿病、ヘモグロビン値、悪性疾患、膵管癌、膵管原発腫瘍、術前肝機能障害とした。術中因子は、幽門輪温存、門脈合併切除、他の大血管切除、他臓器切除、膵切除線 (膵切除量)、膵線維化の程度とした。術後因子は、経口摂取不良、血糖コントロール、下痢、術後感染、術後 1 カ月目のアルブミン値とヘモグロビン値とした。

これらの因子を術後 NAFLD 発生例と非発生例で比較し、単変量解析および多変量解析し、NAFLD 発生危険因子を同定した。さらに、多解析の結果から、術後 NAFLD の発生を予測することを目的として NAFLD 予測スコアを策定した。このスコアと CT 値減少率 (%) : (術前 CT 値 - 術後 CT 値) / 術前 CT 値 × 100 との相関関係を検討した。

2 群間の検定には t 検定もしくは X^2 検定、関連 2 群間の相関関係は相関係数の検定を用い、 $p < 0.05$ で有意差ありと判定した。なお、NAFLD 発生予測スコアの策定に際しては、それぞれの因子のカットオフ値を正診率と ROC 曲線から求めた。

② 積極的栄養療法の効果

術後 NAFLD 発生例においては、膵酵素剤大量補充療法 (パンクレアチン 9~12g/日) に腸管粘膜保護剤 (亜鉛製剤、グルタミン製剤) や補助栄養剤 (アルギニン製剤) などを追加した治療が行われた積極的栄養療法群と、通常栄養療法群に分けて、治療後の CT 値を比較し、その効果を検討した。

4. 研究成果

【結果】

(1) 実験的研究

血清亜鉛は A (標準食) 群, B (標準食+膵酵素剤投与) 群では術前値より低下したのに対し, C (高亜鉛食) 群, D (高亜鉛食+膵酵素投与) 群では術前値より高値を示し, D 群では A 群に比べて有意に高値を示した。肝組織中亜鉛濃度も血清と同様の所見を示し, かつ肝組織中性脂肪含有量は A 群で最も高く, ついで B, C, D 群の順に低値で, 特に D 群では A 群に比べて有意に低値を示した。膵酵素および亜鉛の投与により, 脂肪肝の発生が阻止できる可能性が示された。

(2) 臨床的研究

① 術後 NAFLD 発生因子の解析

術前に NAFLD を認めた症例はなかった。術後 NAFLD の発生率は 37.0% (20/54) と高率であった。NAFLD の 20 例の原疾患は、膵癌 15 例、IPMN 4 例、その他 1 例であった。

術前後の CT 値 (HU) を比較すると、術前は 63.6 ± 7.4 であったのに対し、術後は 43.5 ± 21.4 と有意に低下していた ($p < 0.001$)。

極度に CT 値が減少し、かつ肝機能異常 ($AST \geq 100IU$ 、 $ALT \geq 100IU$) を認めた 4 症例に肝生検が施行され、2 例が Brunt 分類でステージ 2 の NASH と診断された。

単変量解析による検討から、NAFLD 発生の危険因子として 11 因子が同定された。すなわち、膵癌、膵管由来の腫瘍、門脈合併切除、膵切除線 (膵切除量)、膵線維化の程度、経口摂取不良、血糖コントロール、下痢、術後感染、術後ヘモグロビン値、術後アルブミン値である。多変量解析からは、膵癌、膵切除線 (膵切除量)、下痢の 3 因子が有意の危険因子であった。

多変量解析の結果から、術後 NAFLD 発生の有意の危険因子である膵癌、膵切除線、下痢の 3 因子に、回帰係数が 1.5 以上を示した 2 因子 (膵線維化の程度、経口摂取不良) を加えた 5 因子を用いて、NAFLD 予測スコアを作成した。それぞれの因子を 0, 1, 2 点と重みづけして、その合計点を予測スコアとした。

NAFLD 予測スコアと CT 値減少率は有意の正の相関 ($r = 0.829$, $p < 0.001$) を示した。/ NAFLD 予測スコアと NAFLD 発生率との関係を見ると、スコア 0~3 点では 0% (0/22)、スコア 4~6 点では 35.2% (6/17)、スコア 7~10 点では 93.3% (14/15) であった。

② 積極的栄養療法の効果

NAFLD 発生例の栄養療法に関しては、積極的栄養療法群 ($n = 12$) では 91.7% で CT 値が改善されたが、通常栄養療法群 ($n = 8$) では 12.5% しか改善しなかった ($p < 0.01$)。

【考察】

戦後の日本の食生活の変化にともない、糖尿病や高脂血症などの生活習慣病が急増しているが、脂肪肝の増加も報告されている。NASH は 1980 年に Ludwig らが提唱した概念で、非飲酒者にもかかわらず、アルコール性肝炎に類似した病理所見を認め、進行性に肝硬変から肝不全に至ることもであるとされている。また欧米では肝障害を有する非飲酒の脂肪肝症例に対して、侵襲的検査である肝生検を敢えて施行せずに NAFLD という臨床診断を下すことがあり、日本でもその疾患概念は定着しつつある。

このように NAFLD 及び NASH の疾患概念は近年、注目を集めているが、膵機能低下と NAFLD および NASH の発生機序に関する報告及び研究はほとんどなされていないのが現状

である。我々は以前より膵広範切除後に、膵内外分泌機能が低下することが原因で、術後早期から晩期にわたって30%前後の割合で脂肪肝が発生することを明らかにしてきた。Tanakaらもごく最近、膵外分泌機能不全が原因で発症したNASHの1例を報告している。

しかし、膵切除後膵機能低下に伴うNAFLDおよびNASHの発生機序は未だ不明であり、一度発症すると確立された治療法もないのが現状である。またNAFLDの中でも進行性のNASHを発症した場合は極めて重なる経過観察・治療が必要であると考えられる。したがって、膵切除後NAFLD及びNASHの危険因子を同定し発症を予測することが不可欠であると考え、我々は本研究を開始した。

まず、実験的検討からは、膵広範切除後の膵外分泌機能低下とそれに伴う亜鉛欠乏状態が、NAFLD発生に関与している可能性が示唆され、この状態に膵酵素剤と亜鉛を投与することにより、NAFLDの発生が予防できた。

さらに臨床的研究からは、術後NAFLDの危険因子として、膵癌、膵切離線(膵切除量)、下痢の3因子に加えて、膵線維化の程度、経口摂取不良の2因子の計5因子が判明した。

原疾患に関しては、膵癌は病変が膵管を閉塞させることにより慢性膵炎を引き起こし、膵内外分泌能を低下させることが危険因子となると考えられる。さらに膵癌は膵管に沿って病変が進展するから、広範膵切除が必要となり、膵切除量の増加につながり、術後の膵機能低下が著明となる。

術後栄養状態に関しては、PD後は複雑な消化管再建が加わり、胃排泄遅延などが発症する頻度も他の消化管手術に比べて高いことが知られている。したがって術後経口摂食障害が遷延し、低栄養状態、低蛋白血症が継続するとクワシオルコールと同様の食事性脂肪肝炎を発症するものと考えられる。

術後下痢に関しては、術後抗生剤投与に伴う偽膜性腸炎、膵周囲神経叢郭清に伴う神経性下痢が要因であり、これらが持続すると腸粘膜の萎縮が起りbacterial translocationが誘発される危険性が高まると考えられる。これに伴い、経門脈的にエンドトキシンが肝に流入しKupffer細胞が活性化され、肝への脂肪の取り込みの増大につながり、NAFLDが発生すると考えられる。

これらの危険因子が複雑に重なり合うことで膵広範切除、特に膵頭十二指腸切除が、他の消化管手術に比して高率に術後NAFLDを発生させている原因と考えられた。

これらの危険因子を総合的に評価し術後NAFLDの発生を予測もしくは予防する目的で、我々はNAFLD予測スコアを考案した。スコアとCT値減少率の関係をみると、これらは極めて強い正の相関関係を示すことが分かった。さらにスコアのカットオフ値を6点とす

ると、感度90%、特異度95.8%、正診率94.1%であり、術後NAFLDの発生を予測するにうえて極めて有用なスコアと考えられた。

膵癌もしくはIPMNに対して大量膵切除(SMA左側で膵切離)を行い、術後経口摂取不良、下痢が続くような症例では術後高率にNAFLDもしくはNASHを発生する可能性があるため、積極的な膵内外分泌補充療法が必要であると考えられる。術後NAFLDの治療に関しては確立されたプロトコルはないものの、術後早期よりインスリン補充療法を行うことで脂肪肝の発生率を低下させるという報告や、経腸栄養を経静脈栄養と併施して栄養管理を行ったほうが脂肪肝の発生を抑制できたという報告も認めるため、このような栄養管理は積極的に行うべきである。さらに我々は膵広範切除には膵内外分泌機能の低下により亜鉛欠乏状態となり、これがまた膵内外分泌能の低下を増強させるという悪循環を構成することを明らかにしており、術後早期より経口的に亜鉛補充を行って膵機能の改善に努めるべきであると考えている。

そこで、術後NAFLD発生例20例を、膵酵素剤大量補充療法(パンクレアチン9~12g/日)に腸管粘膜保護剤(亜鉛製剤、グルタミン製剤)や補助栄養剤(アルギニン製剤)などを追加した治療が行われた積極的栄養療法群12例と、通常栄養療法群8例に分けて比較検討した結果、積極的栄養療法群では91.7%でCT値が改善されたが、通常栄養療法群では12.5%しかCT値が改善されず、亜鉛と大量膵酵素補充療法の有効性が確認できた。

【結論】

膵広範切除後、特にPD後には、NAFLDが高率に発生しNASHへと移行する症例もあり、その機序として膵機能低下と亜鉛代謝異常が関与しているものと考えられた。我々が考案したNAFLD予測スコアは、術後NAFLD発生予測に有用であり、スコアが6点以上の症例では、積極的な膵内外分泌補充療法と亜鉛を含む微量元素の補充、経静脈栄養に加えて経腸栄養の併施が重要であると考えられた。

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6件)

① Kuriyama N, Isaji S, et al: Activated protein C prevents hepatic ischaemia-reperfusion injury in rats. Liver Int 2009; 29: 299-307

② 伊佐地秀司: 膵炎をどう治療するか 急性膵炎のマネジメントのポイントは? 蛋白分解酵素阻害薬, 抗菌薬の使い方は? 注意すべき点は? 2009; 46: 424-427.

③ 伊佐地秀司：動脈・静脈・神経の切離と温存 肝胆膵領域の手術. 手術 2008; 62: 1801-1807.

④ Nakamura, I, Isaji, S, et al: Timing of ischaemia/reperfusion before hepatectomy without inflow occlusion determines liver damage in rats: role of heat shock protein 70. Liver Int 2007; 27: 1323-1332.

⑤ Isaji S, et al: JPN Guidelines for the management of acute pancreatitis: surgical management. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2006;13: 148-155.

⑥ 伊佐地秀司：「術後遠隔期の栄養障害と対策」 膵切除術後(膵頭十二指腸切除と膵全摘術) 医師サイドから. 栄養-評価と治療 2006; 23: 338-342.

〔学会発表〕(計2件)

① 堯天一亨, 加藤宏之, 伊佐地秀司, ほか：膵頭十二指腸切除後早期に肝生検にてNASHと診断された1例. 第20回日本肝胆膵外科学会学術集会(2008.5.30. 山形市).

② Kato H, Usui M, Kobayashi M, Osawa I, Kishiwada M, Sakurai H, Tabata M, Isaji S: Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) confirmed by liver biopsy in the early

postoperative period of pancreaticoduodenectomy: report of a case. International Pancreatic Research Forum 2008. (2008.3.22 in Tokyo).

〔図書〕(計2件)

① 伊佐地秀司, 加藤宏之, ほか：膵機能低下とNAFLDおよびNASHの発生機序に関する研究. 難治性膵疾患に関する調査研究班平成20年度総括・分担研究報告書. 2009, p175-179.

② 伊佐地秀司(分担)：肝胆膵疾患の診断と治療トピックス2006. 膵癌外科治療の現状と取扱い規約の問題点について. 株式会社アークメディア 2006, p99-109.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊佐地 秀司 (SHUJI ISAJI)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70176121

(2) 研究分担者

櫻井 洋至 (SAKURAI HIROYUKI)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80378364

(3) 連携研究者