

## 静脈注入中性脂肪の代謝における腸内細菌叢の役割

近畿大学医学部第2外科学教室

久 山 健

〔原稿受付：昭和54年7月31日〕

### Role of Intestinal Flora on Metabolism of Intravenous Neutral Fat

TAKESHI KUYAMA

The Second Department of Surgery, School of Medicine, Kinki University

It was proved that any toxic reaction of overloading by intravenous fat never occurred in gnotobiotic animals, even if various dosis of lipid was injected repeatedly for long period. Recently in the other paper, the author reported that conventional rats suffered from splenomegaly and anemia in overloading by intravenous administration of neutral fat. On the other hand, in the gnotobiotic rats which do not have any intestinal flora, either enlargement of spleen or anemic hemogram was not recognized, even if the intravenous overloading of neutral fat, that was more than 6g per kilogram of body weight, continued during 4 weeks. Also, at that time, the deposit of Thompson's pigment in liver was never found, both microscopically and electron-microscopically. Therefore, it was concluded that all signs of overloading syndrome in venous injection of neutral fat were caused by bacteriological origin. Besides, only at the germfree environment, absolutely not at the conventional environment that is as same as our life, male rat of gnotobiotie have seemingly some metabolic defects in utilization of intravenous fat emulsion.

ノートルダム大学・ローバンド研究室の無菌マウス・無菌ラット飼育技術をそのまま用いて無菌ラットを繁殖させ次の様な実験を行う。10%大豆油静脈用脂肪を体重1Kgに6gの割に毎日注入を無菌ラットに行った。人体に換算し直すと1日300g 5400calを静脈

注入したことになる。臨床では1日1G/Kg用いている。発熱等の副作用は無菌の世界では全くない。これらは完全無菌操作では全く消失するものであることを証明し完全非経口栄養では消毒に注意すべきであることを強調するものである。次に腸内細菌がないとき脂

Key Words : Intravenous fat, Intestinal flora, Gnotobioties, Overloading syndrome, Splenomegaly.

索引語：静脈注入脂肪, 腸内細菌叢, 無菌動物, 重荷症候群, 脾腫

Present address : The Second Department of Surgery, School of Medicin, Kinki University, Sayama, Minami-kawachi, Osaka, 589, Japan.

肪利用は少々雄において劣るものであることを示唆する研究結果をえた。脾臓重量は大量の中性脂肪を連日負荷すると(臨床の6倍)脾腫が一過性にくることを著者は報告したが、無菌動物の場合、その程度が明らかに軽減されることは静脈注入脂肪の E.R.S. 処理は腸内細菌により抑制されることを示している。

### 緒 言

この半世紀の間、著者は外科領域における完全非経口栄養に関する研究計画に何らかの形にて参加して来た。特に日本とスエーデンの静脈注入脂肪の研究に興味を示して来た<sup>4)5)</sup>。Wretling の実験研究に引きつづいて中心静脈栄養の主役としてイントラリピッドを用いるために多くの研究がなされた<sup>6)</sup>。現在はこの栄養方法は消化器手術々後管理におけるルチンの技術となっている<sup>7)</sup>。完全絶食によって消化ホルモンの制御を抑制し脾液の分泌を極度に減少するため、この完全非経口栄養は急性脾炎の死亡率を極度に低下せしめている<sup>7)</sup>。他方著者は次の様な仮説を提唱している。これは完全非経口栄養と胆汁酸の肝・盲腸間循環サークルに関するものである。これを無菌生物を用い証明しようとするものである。

1958年以来、生物学、病理学、衛生学及び実験外科学において無菌生物学的研究は極めて重要なものであることを強調して来た。実験外科学を無菌タンク内において行う事は色々の急性腹部疾患における微生物の影響を解明するに極めて有意義と思う。免疫学や微生物学相方に関係して開腹後の胃腸癒着の病因、完全非経口栄養の利用率を解明するにも有用と考える<sup>9)</sup>。

非経口栄養は手術において非常に重要な技術の一つであるばかりでなく、この開発は新生児の疾患に対する栄養治療に関し重要である。無菌実験動物学は現在医用動物学において基本技術として洋の東西を問わず広く活用されている。

### 実験材料と実験方法

#### A. 動物

無菌動物として24匹のウイスター系のラット♂及び♀が用意された。そのラットはトレキシラー型ポリエチレン無菌タンクの中に飼育されたものである。この24匹のラットは一对の無菌ラットより無菌タンク内にて繁殖させたものである<sup>10)</sup>。

6♂ラットを無菌、7♂ラットをタンク外にて飼育した。5♀を無菌、6♀をタンク外にて飼育した。両者をそれぞれ実験群、対照群とした。オープンルームラットも無菌ラットもすべてプラスチックケージに1匹宛収容した。糞食を出来るだけ避けるため床は金属メッシュとした。その無菌性は写真に示す様にクックドミノブイオン糞便培養を週に1回行う。

飼料は表1に示した様な組成により作成した。これは金属罐にシールし2.5M. R. 6時間<sup>60</sup>C照射して滅菌用意された。無菌タンク内実験用具・給水瓶・瓶詰飲料水すべては無菌生物研究用消毒シリンダーにつめセロファン消毒シールにて密封した。130°C 1.2kg/cm<sup>2</sup> 1時間消毒した。無菌タンク内空間、消毒罐とタンクの接続空間すべて防毒マスクをつけた著者によって4%過酢酸スプレーによって消毒し30分後物品・動物を通した。

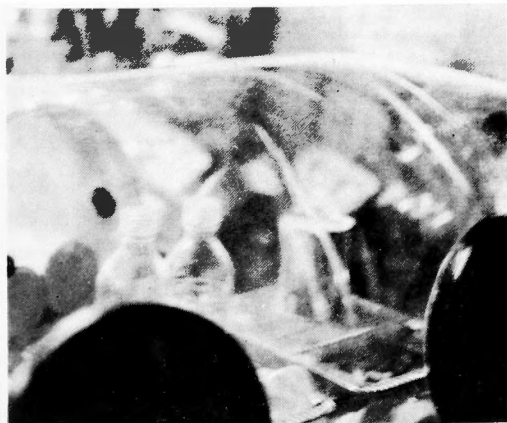


Photo 1 : Germfree isolator for experimental surgery

Table 1 : Standard diet of germfree mice in our laboratory

Composition	Weight (1 bs)
Casein	20
Corn oil	11
Rice flour	50
Fibre	5
Desiccated liver	2
Ascorbic acids	0.2
L-inositol	0.1
Panvitamine (Shionogi)	2
Salt Mixture	5
Vitamine B mix.	0.5
Vitamine A (200.000IU/g)	0.3
Vitamine D <sub>3</sub> (1500IU/g)	3.26
Sterilization 130°C	1.2 Kg/scm

### B. 特殊飼料と静脈注入脂肪

表2に示す様な注入脂肪量をさし引き特殊な飼料を用意した。一日の摂取飼料重量より算定しほとんど毎日 6g/kg の中性脂肪が飼料から静脈注射にうつした事になる。滅菌については中性脂肪10%乳剤 (スエーデン・Wretling の臨床用イントラリピッド溶液) ボトルの金属部分を除去しゴム栓のみとする。そして4%過酢酸を全表面にスプレーする。その後すべての物品同様無菌タンク二重トビラ物品搬入口を利用し、ルーチンの方法によりタンク内に持ち込んだ。注射はマントウ針とガラス製金属キャップ付 1cc 注射筒を用い、タンクについたゴム製グラブを用いタンク内において15~30分かかって尾静脈に注入した。タンク外の

注射は1匹宛殺菌灯の下において70%エタノールガーゼにより注射部位、瓶の蓋をそのたびに充分消毒した。この技術は1963年アルバートアインスタイン医科大学において習得するに6ヶ月を要したものである。又無菌動物注射用具はそのたびに蒸留水で充分洗滌した。注射する時間は毎日、5匹無菌ラットは9 a.m.~11 a.m.、他の5匹は1 a.m.~3 a.m.、残りは正午にタンク内で行われた。こゝで注意すべきは注射後尾静脈よりの出血である。充分圧迫して止血を確認しておく必要がある。タンク外の動物については5匹は9~12 a.m.、残りは3~6 p. m. において注射した。後述の種々の生物学的検査は60日にわたり定期的に行う。

### C. 肝血流遮断無菌ラットの作成

無菌ラット20週令の3匹を用意し、Nembutal 0.2 mg/kg を腹腔内に注入し麻醉す。図1の様にラットのA. coeliaca を結紮す。著者のデータによると (オープンルームラット)、肝への酸素供給は60%が門脈より40%が肝動脈と云う比率をえた。これはラット特有にて人・犬・モルモットはこの逆の数値を示す。ラットの場合、A. coeliaca をくくっても colon を結紮しないと腹腔臓器の壊死は生じない。しかし一般ラットのときは閉腹後30分以内に45%、24時間以内68%が死亡す。無菌ラットと大きな差がある。結局4匹の20週令のラットにおいて腹腔動脈結紮長期生存ラットをうることが出来た。

この両者に同量・1/2期間・同頻度のイントラリピッド尾静脈注入を行った所、無菌ラットは15回迄行い他は10回迄に全部死亡した。一般ラットを死亡後観察するとすべて Panporitonitis を認めるが腸の穿孔は発見出来ない。よってこの実験はイントラリピッドに関するものでない。血流障害と感染の問題であった。こゝで附記しておきたいのはイントラリピッド14日、注射無菌ラットも他のすべてのラットも肉眼的にも組織学的にも正常であった。猶オープンラットには毎日50mg/kg Keflodin が腹腔内注入された。病理所見としては結腸傍動脈が明らかに努張していた。即ち酸素供給源たる門脈血も腹腔動脈流減少とともに肝流入が低下するが A. colica media, A. mesenterica inferior et superior の代償により肝保全が出来る。しかし長期、しかも腸内細菌叢保有動物のときは門脈血流に血栓が散発し、これに反し無菌ラットはそう云う事はない。いづれにしても著者が計画した無菌肝血流遮断ラットは静脈性中性脂肪の研究には適さざるもの様であった。

Table 2 : Pancreatitogenic diet of Lambardi' 1975.

Comoposition	Weight (g)
Dextrine	400
Sucrose	800
Starch	20
Cellulose	30
Soya Triglyceride	70
Casein	60
Soya Protein	125
Vitamine E	0.2
Vitamine D <sub>3</sub>	22,500 IU
L(-) Cysteine	4.0
Salt Mixture	12.0
Vitamine K <sub>2</sub> (Keywan)	0.5
Panvitamine (Shionogi)	2.0
Water	400
D.L. Ethionine	0.5%
Sterilization 130°C	1.2 Kg/scm 3 Hrs.



Photo 2 : Cecal dilatation of germfree mice at feeding of standard diet

**D. 生物学的測定**

尾静脈の病変・特に炎症と壊死，食物摂取，体温—肛門温度・体重・活動性・下痢・肛門出血・脱毛・発汗・下肢の発汗・腹部膨満特に腹水徴候を毎日測定観察した。実験の最後にすべてのラットを屠殺した。その方法は次の様である。密封した大型ジャーの中に70%アルコールをした綿と共に無菌ラットを入れ3分後に麻酔されたラットを取り出す この操作は無菌ラットを無菌タンクより取り出して後に行う。ヘパリン化シリコンにてコーティングした注射器を用い心臓穿刺によって5mlの全血をとる。すぐコールドルームに保存す。最高2時間以内にコールドルーム内にて分3000回転の遠心分離を30分間行う。血漿は生化学的検査迄デープフリーザーに保存す。この時、全血の2、3滴はヘマトクリットと血小板の測定に用いられた。心穿刺直後コールドルームにもって行く前に全血漿蛋白を測定した。コールドルームにおいて遠心分離をする時に溶血をおこさざる様に注意し血漿乳糜白濁の有無をチェックする。

次に解剖に際し全血漿蛋白，体重，全消化管重量，全盲腸（内容含）重量，盲腸壁重量（内空含まず），脾重量，肝重量及びすべての異常所見，副腎の写真，重量及び直径が記録に残された。すべての内臓は中性ホルマリンに貯蔵され大腿骨は死体より剝離摘出された。すべての血液サンプル中の中性脂肪は生化学的に測定された。すべての中性ホルマリン固定標本はヘマトキシリン・エオシン染色により染色され検鏡に供された。

**実験結果及び考案**

a) 無菌環境下における静脈注入用脂肪尾静脈注入後の発熱テスト

静脈注入脂肪による発熱反応は過重負荷反応と細菌汚染にもとづくものとある。無菌動物に見るものは前者に限られこれは脂質代謝性のものと判断してよい。無菌生物タンクは Robound 研究室の方法によりその無菌性は常に確認されている。よって細菌汚染による発熱は有りえない。実験終了後の動物病理解剖でも如

**Table 3** Mortality of cecal perforation in germfree mice

Group	Mortality 5 minuts	Mortality 30 minuts
A1	100	100
A2	0	0
A3	100	100
B1	0	0
B2	0	0
B3	0	0

**Table4** : Toxicological test for sterilized cecal content

Material of peritoneal injection	Longest survival time
Cecum content of germfree mice	4 minuts
Cecum content of open room mice	115 minuts
Both cecum content was sterilized by <sup>60</sup> CO radiation	

**Table 5** : Mortality of metabolic acute pancreatitis of Lambardi

Group of mice	4 days after starting of Lambardi diet	6 days after starting of Lambardi diet
Germfree mice (16 male)	4 mice died 4 mice biliary peritonitis cecal perforation 8 no perforation (12 mice were sacrificed)	
Open room mice (20 male)	all survival	all survival 20 mice necrosis of pancreas, hepatic necrosis fatty liver (20 mice were sacrificed)

何なる炎症性病変も発見出来ないからこの発熱は代謝性以外には考え難い。しかしビールス感染については何も云う事は出来ない。表に示した通り無菌タンク内でノートバイオートに中性脂肪を注射した場合、発熱反応は全くなく、これは完全静脈脂肪による発熱はすべて感染と間接又は直接に関り合いがあることを示している。次の記載はあく迄著者の想像の域を出ないけれども、中性脂肪注入後に生じる発熱物質の全身散布の原因と感染に関するものとして想起されるものとして、Endotoxin (一種の Lipopolysaccharide) が脂溶性であることである。

b) 無菌環境下の静脈注入脂肪代謝

中性脂肪静脈注入 4 週目になると一般ラットは高熱を発する様になる。それ迄は雄無菌ラットは雄の一般ラットよりもずっと成長が悪くなる。一般ラット注射 4 週目の高熱期における極度の食物摂取減少を除くと両者の食物摂取量は全く同じである。これに反し全実験を通じ雌のラットに関しては無菌ラットの方がその体重増加は著明である。勿論その食物摂取は同じである。この問題を解明するために次の 3 つの可能性を考えた。即ち雌雄の体重曲線が無菌と一般動物により逆転している理由は次のいずれかである。1) 腸内細菌が産生する脂向性化学物質は性別と関連性がある。これはステロイドか、ステロイドの拮抗物質・ビタミン E の様な抗過酸化物質かいずれかである。2) この体重の変動は無菌動物の巨大盲腸重量増加にもとづく。3) 静脈注入開始時期には雄ラットの成長はつづき雌ラットの成長はすでに止まっている。しかし2)3)の点に

は更に検討を要するが著者の解剖データと無処置雌雄試獣の成長曲線を解析すると否定される。

雌ラットは腸内細菌叢を取り除いても脂質移動の機構が完全であるが、雄試獣の腸内細菌を除外すると脂質代謝機構は障害される。現在、腸内細菌叢が完全に消滅しているときには脂質異動の上に女性ホルモンの影響と云う問題に目を注ぐ必要を考えている。この問題は更に女性の皮下脂肪沈着にも関連するであろう。雌ラットは充分な男性ホルモンと女性ホルモンをもっているのに反し雄ラットは充分な男・女性両方のホルモンをもっていない。腸内細菌叢は女性ホルモン同様の脂質異動活性物質を産生し生体のそれを円滑にせしめている。

c) 体重 1 kg に対し 6 g の中性脂肪静脈注入を毎日 1 回 30 回行った後の無菌ラットに見られる脂血症

最後の静脈注射より 24 時間後高蛋白質血症は一般動物より無菌ラットにおいて著明である。この現象は雌無菌ラットよりも雄の方がより顕著である。何故に静脈注入脂肪の代謝において性別の差が生じると云う質問に明確に答えることは出来ない。更にこの場合も無菌ラットのすべてに脂血症を認めこれに反し♀の場合は 1 匹のみに本症を認めた。しかし一般のラットは本実験の終りに採血 (最後の注射後 24 時間) しても脂血症は認めなかった。結論として不明の化学物質が腸内細菌により産生され血中脂質クリアランスの作用を示す。多分それは女性ホルモン類似物質であろう。全実験期間を通じ各試獣に脱水はなかったので高蛋白質血症 (無菌ラット 6) は高リポ蛋白質血症によると考

Table 6 : Shock death of intraperitoneal injection of prostaglandins

Group of mice	E <sub>1</sub> 50mg/kg	E <sub>2</sub> 50mg/kg	E <sub>1</sub> 0.5mg/kg	E <sub>2</sub> 0.5mg/kg
Open room mice Standard diet	30%	20%	0%	0%
Open room mice Pancreatitogenic diet	45%	20%	0%	0%
germfree mice Pancreatitogenic diet	60%	40%	10%	10%

Table 7 Prophylactic effects of prostaglandins in metabolic acute pancreatitis of germfree mice

Injection	Germfree mice ♂	Germfree mice ♀
E <sub>1</sub> 50mg/kg	Acute pancreatitis (-)	Acute pancreatitis (-)
E <sub>1</sub> 0.5mg/kg	Acute pancreatitis (+)	Acute pancreatitis (+)
E <sub>2</sub> 0.5mg/kg	Acute pancreatitis (+)	Acute pancreatitis (+)

える。α-グロブリンはごく少量の中性脂肪を含む。燐脂質、コレステロールをβ-グロブリンは含んでいる。γ-グロブリンも中性脂肪を含んでいる。アルブミン-遊離脂酸結合体が増加し全血漿蛋白濃度が高い値を示す時には脂質結合蛋白が高値を示しても脂血症は生じることはない。この実験において無菌ラットに見る脂血症は血中脂質の絶対量が増加しているのか、或いは脂質蛋白の溶解性が減少しているのか不明である。無菌ラットの混濁した脂血症性血漿の血漿脂質総量を測定するとその測定値は極めて高い。著者は既に大量静脈脂肪負荷の生物反応について報告した。これは貧血と脾腫であって脾臓機能亢進症を思わせるものがある。無菌動物の大量静脈脂肪負荷の場合、この脾腫は有菌動物の1/2程度である。著者が主張する次の説が正しいならばこの説明はやさしい。脾臓のR.E.S.が血中脂質処理の中心的役割を果たすと云う事である。この説明の総括は腸内細菌叢と血中脂質の処理は密接な関係があって生体反応の影響をより簡単にするため腸内細菌叢の影響を除外してみると雌の方がより強い脂肪処理能をもつと云うことである。腸内細菌は男女の別なく血中脂肪処理を促進せしめる。そのため無菌動物では脾腫は軽度である。

## 結 論

外科臨床において完全静脈栄養（すべての経口栄養を停止し栄養をすべて静脈注入する人間改造論）はもっともメリットをもたらす技術として広く応用されている<sup>1)2)</sup>。この副作用も論議されている反面、死亡率の高い急性肝炎、上部消化管縫合不全に対する予防と治療救命にはこの方法をおいてない<sup>7)8)</sup>。本研究により次の様に結論す。(a)脂質静注の副作用はすべて感染によるものであって感染を全く除外すると副作用は消失する。(b)腸内細菌叢は脂質処理を促進す。長期にわ

たる完全非経口栄養はこの腸内細菌叢の消失による障害もありうる。(c)腸内細菌があると性別の差は出にくい、これを除外すると♀の方が処理能は高い。

## 文 献

- 1) Kuyama T : Clinical studies of the nutritional effects of intravenous administration of fat emulsion. Arch Jap Chir **27** : 64-90, 1958.
- 2) Meng HC, Kuyama T, et al Toxicity testing of fat emulsion, I. Tolerance study of long-term intravenous administration of intralipids in rats. Amer J Clin Nutr **16** : 29-35, 1965.
- 3) Hikasa Y, Kuyama T, et al Progress of fat emulsion research in Japan. Fette in der Medizin **5** : 121-122, 1966.
- 4) Hikasa Y, Shirotani H, et al : Parenteral administration of fats : III Qualitative investigation on nutritional effects of fat and recent studies on fat metabolism in vivo. Arch Jap Chir **28** : 835-854, 1959.
- 5) Meng HC, Kuyama T, et al : Studies of anemia following multiple intravenous infusion of fat emulsion. Fette in der Medizin **5** : 31-41, 1966.
- 6) Shiraha S, Kawai H, et al : Annual review of the intravenous hyperalimentation in the surgical patients. Med J Kinki Univ **2** : 15-26, 1977.
- 7) Sile n W : Pancreas, principle of surgery, edited by Schwartz. SI **2** : 1258-1259, 1974.
- 8) Tanami J, Sakurai N, et al Experimental studies on the effects of irritant gas and dust on the respiratory organs of gnotobiotics. J Hygiene **47** : 177-184, 1971.
- 9) Dudrich SJ, Groff DB, et al : Long term venous catheterization infants, Surgery, Gynecology and Obstetrics. **129** : 805-808, 1969.
- 10) Tanami J, Nomura T, et al : Polyvinyl isolator procedure. Bulletin of The Experimental Animals **12** : 8-12, 1963.