

消化管への尿酸分泌が腸管炎症に及ぼす
影響についての研究

わだ あきのり
和田 晃典

(消化器病学専攻)

防衛医科大学校

令和3年度

目 次

第1章 緒言	
第1節 尿酸の抗酸化作用	1
第2節 尿酸の代謝	1
第3節 尿酸と疾病	3
第4節 腸内細菌と腸管炎症	4
第5節 本検討における仮説と目的	5
第2章 血中尿酸値および腸管への尿酸分泌量の検討	
第1節 目的	7
第2節 方法	7
第1項 動物	7
第2項 高尿酸モデルマウスの作製と血液採取	7
第3項 腸管分泌液の回収	8
第4項 尿酸の定量	9
第5項 統計学的処理	10
第3節 結果	10
第1項 血中尿酸値の経時的変化	10
第2項 腸管への尿酸分泌量	10
第4節 小括	11
第3章 尿酸による血中および腸管内の抗酸化度の変化に関する検討	
第1節 目的	12
第2節 方法	12

第1項	動物	12
第2項	高尿酸モデルマウスの作製と血液採取	12
第3項	腸管分泌液の回収	13
第4項	抗酸化度の測定	13
第5項	統計学的処理	14
第3節	結果	14
第1項	血中の抗酸化度	14
第2項	腸管分泌液の抗酸化度	14
第4節	小括	15
第4章 尿酸がインドメタシン腸炎に与える影響の検討		
第1節	目的	16
第2節	方法	16
第1項	動物	16
第2項	モデルマウスの作製と検体採取	16
第3項	肉眼的検討	17
第4項	組織学的検討	17
第5項	mRNA の抽出および RT-PCR 法	18
第6項	統計学的処理	19
第3節	結果	19
第1項	肉眼的所見	19
第2項	組織学的所見	20
第3項	炎症性サイトカインおよびインフラマソーム	21
第4節	小括	21

第5章 尿酸が腸管内の活性酸素種に与える影響の検討	
第1節 目的	22
第2節 方法	22
第1項 動物	22
第2項 小腸内の活性酸素種の測定	22
第3項 統計学的処理	23
第3節 結果	23
第4節 小括	23
第6章 尿酸が腸内細菌叢に与える影響の検討	
第1節 目的	25
第2節 方法	25
第1項 動物	25
第2項 高尿酸モデルマウスの作製と盲腸便の採取	25
第3項 遺伝子学的な腸内細菌叢の解析	26
第4項 統計学的処理	26
第3節 結果	26
第1項 腸内細菌の多様性	26
第2項 腸内細菌の相対豊富度	27
第4節 小括	28
第7章 尿酸による腸内細菌叢の変化がインドメタシン腸炎に与える影響の 検討	
第1節 目的	29
第2節 方法	29

第1項	動物	29
第2項	盲腸便の採取と処理	29
第3項	糞便微生物移植	30
第4項	腸炎の評価	30
第5項	糞便希釈液中の尿酸の測定	30
第6項	統計学的処理	31
第3節	結果	31
第1項	糞便希釈液中の尿酸含有量	31
第2項	糞便微生物移植による腸炎の変化	31
第4節	小括	32
第8章	尿酸により変化した腸内細菌叢と便中の短鎖脂肪酸濃度の検討	
第1節	目的	33
第2節	方法	33
第1項	動物	33
第2項	ガスクロマトグラフィーによる便中短鎖脂肪酸の測定	33
第3項	統計学的処理	34
第3節	結果	34
第4節	小括	35
第9章	考察	36
第10章	結論	41
謝辞		42

略語一覽	43
附記	44
参考文献	45
図表	57

第1章 緒言

第1節 尿酸の抗酸化作用

尿酸 (IUPAC 名 : 7,9-dihydro-1H-purine-2,6,8(3H)-trione) は, 分子式 $C_5H_4N_4O_3$, 分子量 168.11, 弱酸性の有機化合物である. 尿酸は内因性の抗酸化物質であり, 一重項酸素やペルオキシナイトライトなどの活性酸素種を消去する働きがある [1-3]. また, 尿酸は鉄イオンと複合体を形成し, 遊離鉄による脂質過酸化やアスコルビン酸の酸化を抑制するという報告もある [4]. ヒトの血中に最も高濃度で存在する抗酸化物質は尿酸であり, ヒト血清中の抗酸化物質全体の約半分を占めるとされている [5]. その一方で, 尿酸には酸化促進作用もあると言われており, 尿酸と活性酸素種の反応によって生成したアロキサンがペルオキシナイトライトと反応して, アミノカルボニルラジカルを生じ, 脂質過酸化を引き起こす可能性や [6], nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) オキシダーゼを活性化し, 活性酸素種の産生に寄与するとの報告もある [7]. 尿酸は抗酸化作用と酸化促進作用の両義的な働きをもつ存在であることが, その生理的意義の解釈を難しくしている.

第2節 尿酸の代謝

尿酸は食事から摂取されたプリン体や体内で合成されたプリン体の代謝産物である. 食事摂取や体内で合成されたプリン体はキサンチンオキシダーゼによりヒポキサンチン, キサンチンを介して尿酸へと代謝される (図 1). ほとんどの哺乳類では, 尿酸分解酵素であるウリカーゼによってアラントインへと代謝されるが, ヒトを含む一部の霊長類では進化の過程でウリカーゼを喪失しており, 尿酸がプリン体の最終代謝産物である [8].

健康なヒトにおいて生体内には約 1200 mg の尿酸プールが存在し, 1 日に約

700 mg の尿酸が合成されて排泄されている。排泄経路としては 500 mg が尿から、残りの 200 mg が腸管や汗から排泄される[9]。ヒトの血液中の尿酸の基準値は男性で 2.1mg/dl~8.5mg/dl, 女性で 2.0 mg/dl~7.0 mg/dl とされているのに対し、ウリカーゼを有しているマウスの血液中の尿酸は 0.5 mg/dl から 0.8 mg/dl 程度である。

体外に排泄される尿酸の約 3 分の 1 を消化管が担っているにもかかわらず、消化管におけるプリン体の吸収と尿酸分泌機構に関する研究はほとんど進展しなかった。この原因として、多くの物質の血中濃度が腎臓におけるトランスポーターの制御により一定に保たれていること、高尿酸血症の多くが腎臓の尿酸排泄能の低下によると考えられていたことなどが挙げられる。これまで、高尿酸血症の原因としては、尿酸産生量の増加（尿酸産生過剰型）、尿中尿酸排泄能の低下（尿酸排泄低下型）および両者の混在した混合型に大別されてきた。しかしながら、近年、薬物排出トランスポーターの 1 つである ATP-binding cassette transporter sub-family G member 2（ABCG2）が高容量性の尿酸トランスポーターであること[10]、ABCG2 が腸管にも発現しており、その機能低下により高尿酸血症となる腎外排泄低下型も存在していることが報告され[11]（図 2）、消化管における尿酸分泌の重要性が認識され始めた。ABCG2 の他には 5 型ナトリウムリン酸共輸送体（NPT5/SLC17A4）が消化管における尿酸の排泄に関与しているとされており、小腸と大腸の上皮細胞の管腔側、肝臓、膵臓に発現し、尿酸を含む有機アニオン系化合物の排泄を行っている[12]。腸管における尿酸排泄のトランスポーターが発見される一方で、ヒトにおける腸管の尿酸の吸収に関するトランスポーターの報告はない。また、従来は胆汁排泄の経路も考えられていたが、腎排泄や腸管排泄に比してほとんどないことも報告されている[13]。

腸管内では尿酸が腸内細菌によって代謝されてしまうため糞便中では検出されないことは以前より知られており[14]、嫌気性菌では *Clostridium* 属の一部が

[15], 好気性菌では *Pseudomonas* 属や *Bacillus* 属の一部が[16], 尿酸を分解していることが報告されている. ヒトはウリカーゼを持たないため尿酸を分解できないが, 腸管内へ尿酸を分泌することで腸内細菌叢を調節する機能のひとつとなっている可能性も考えられる.

第3節 尿酸と疾病

尿酸は種々の疾病との関連が指摘されている. 痛風はその関連がよく知られており, 析出した尿酸結晶が関節内に沈着して炎症を起こす疾患である[17]. これは, 関節内に析出した尿酸が NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) インフラマソームを活性化して, Interleukin 1 β (IL-1 β) の産生を誘導するためとされている[18]. また, 高尿酸血症では痛風のみならず, 高血圧や動脈硬化といった心血管疾患のリスクファクターとなることが, 多くの疫学調査で指摘されている[19–21]. その機序については, 主要血管に尿酸塩が直接沈着することによる直接傷害, 血管内皮中の一酸化窒素の産生低下, NADPH オキシダーゼの活性化を介してミトコンドリアの機能障害と活性酸素種の生成を誘導するなどの説が提唱されている[22]. その一方で, 高尿酸血症だけではなく低尿酸血症でも心血管イベントのリスクが増加するとするとの報告もあり[23,24], 一定の尿酸は体内に必要とも考えられている.

中枢神経疾患領域においては尿酸の有用性が示唆されており, パーキンソン病では高尿酸血症が病気の進行を遅らせるという効果が報告されている[25,26]. また, 多発性硬化症では血中の尿酸値が低い患者の方がより疾患活動性が高くなるとの報告があり[27], その動物モデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎マウスにおいて血清尿酸値の上昇が症状を軽減すると報告されている[28,29]. その他, アルツハイマー病や血管性認知症[30], 筋萎縮側索硬化症[31]などでも血清尿酸値の低下が指摘されており, 尿酸はその抗酸化作用により神経細胞に対し

保護的に働くことが示唆されている。

これまで尿酸が消化管で排泄されているとの知見に乏しかったため、消化管に対する尿酸の効果に関する報告は少ない。消化管は尿酸に曝露されているため、多大な影響を受けている可能性はあると考えられる。以前、本校からもマウスを用いた実験でインドメタシン（indomethacin：IND）腸炎に対して尿酸が保護的に働くことが報告されているが[32]，その機序については未だ解明できていない部分が多い。

第4節 腸内細菌と腸管炎症

近年、次世代シーケンサーを中心とした分子生物学的手法が急速に進歩し、腸内細菌叢の網羅的解析が進んでおり、腸内細菌が多彩な菌から構成される複雑な生態系であることを示している[33,34]。

腸内細菌は、食物繊維などの難消化性多糖の分解、胆汁酸の変換・抱合による脂肪吸収の促進、ビタミンやアミノ酸などの産生を介し、宿主の栄養環境をサポートするのに加え、短鎖脂肪酸やアミノ酸などを合成することで宿主の腸管上皮細胞や免疫細胞に働きかけ、宿主消化管の恒常性を制御している。そのため、腸内細菌叢のバランスの乱れ（dysbiosis）は種々の疾患のリスクとなる。

非ステロイド性抗炎症薬（non-steroidal anti-inflammatory drugs：NSAIDs）は、鎮痛解熱目的で使用される一般的な薬剤であるが、胃十二指腸のみならず小腸傷害もかなりの頻度で発生させることが明らかにされている[35,36]。NSAIDsによる小腸傷害の原因として、薬剤による直接的粘膜傷害、腸管透過性の亢進[37,38]，酸化ストレス傷害[39]，腸内細菌が産生するリポ多糖（lipopolysaccharide：LPS）の刺激[40]などが関与しているとされる。酸分泌抑制薬であるプロトンポンプ阻害薬（proton pump inhibitor：PPI）は、胃十二指腸潰瘍の予防としてNSAIDsにしばしば併用されるが、本来であれば殺菌されるべき口腔内・食物内細菌が殺

菌されず小腸へ到達し *dysbiosis* の原因となる。Wallace らは動物実験において PPI 投与が小腸内細菌叢を変化させ、NSAIDs 腸炎を増悪させると報告している [41]。その他にも、近位小腸に過剰な細菌増殖をきたす小腸細菌異常増殖症において、NSAIDs 腸炎が増悪する [42] との報告もあり、*dysbiosis* が NSAIDs 腸炎の形成に深く関与していることが示唆される。

また、炎症性腸疾患で認められる *dysbiosis* が炎症の結果なのか原因なのかは長年不明であったが、近年小腸に炎症のない大腸型クローン病患者においても小腸で *dysbiosis* が起こっていることや [43]、炎症性腸疾患の患者の便を無菌マウスに移植したところ、患者由来の便の定着が炎症性免疫反応を誘導し、腸管炎症に関与することが報告され [44]、*dysbiosis* が炎症性腸疾患の発症・増悪に関与していることがわかってきた。

dysbiosis をきたす要因として、食事、生活習慣、薬物、加齢などがあげられるが、酸化ストレスはそれらの要因に関わっている [45]。腸管内の酸素濃度は低く保たれており、宿主にとって有益な偏性嫌気性菌が存在しやすい環境となっているが、酸化ストレスが加わることにより、それらの偏性嫌気性菌が減少し *dysbiosis* が誘発される [46]。炎症を起こした腸内では周囲の酸素濃度が上昇し、潰瘍などの重度の組織損傷によって侵入性の酸素耐性菌が容易に侵入できることを考えると、嫌気的な環境を維持することは炎症によって誘発される *dysbiosis* を防ぎうると考えられる。

腸管には多量の尿酸が分泌されており、腸内細菌は抗酸化物質である尿酸に暴露されていることから何らかの影響を受けている可能性が高いと考えられるが、尿酸と腸内細菌叢の関連について報告した論文はほとんどない。

第5節 本検討における仮説と目的

前述の通り、尿酸は腸管に多量に排泄されているにもかかわらず注目されて

いなかったことや、抗酸化作用をもつ一方で酸化促進作用をもつこともあり、その消化管における作用については未だ明らかになっていない。

尿酸には抗酸化作用があることから、腸管保護作用を期待でき、酸化ストレスを軽減することで腸内細菌叢の多様性を保つ可能性があるのではないかと考えられる一方、尿酸は酸化促進作用もあることから、高濃度になると腸管傷害の原因になる可能性や、腸内細菌叢の多様性の低下を招く原因になる可能性も否定できない。そこで、尿酸が腸管炎症に与える影響に関して、NSAIDs 腸炎モデルである IND 腸炎マウスを用いて、特にヒトにおいて高尿酸血症にあたる濃度の尿酸が腸管に対し保護的に働くのか、あるいは腸管傷害を促進するのかを検討した。また、尿酸による腸内細菌叢の変化を解析することで、NSAIDs 腸炎などの腸管疾患の病態に関わる腸内細菌を解明する一助となると考えた。

第2章 血中尿酸値および腸管への尿酸分泌量の検討

第1節 目的

食物中に含まれる尿酸は微量であり，ヒトにおいて消化管に存在する尿酸は血液中の尿酸が腸管上皮に発現している ABCG2 などを通じて管腔へ排泄されたものに由来すると考えられる．また，尿酸は水に難溶であり多量の投与ができないこと，腹腔内の直接投与は結晶化すると腹膜炎を起こす可能性があることから，前駆体を投与して血液中の尿酸濃度を上昇させ腸管内への排泄を図るモデルがより生理的と考えられる．マウスは尿酸分解酵素であるウリカーゼを有していることから，高尿酸モデルマウスを作製するにあたり，前駆体であるイノシン酸に加え，ウリカーゼ阻害薬であるオキソン酸を投与するモデルが用いられている[32,47]．しかしながら，その血中尿酸値の継時的な変化についてはほとんど報告がない．また，動物モデルにおける血中尿酸値と腸管内への分泌量の報告もほとんどない．そこで，イノシン酸およびオキソン酸の投与による血中尿酸値の変化と腸管への尿酸の分泌量について検討した．

第2節 方法

第1項 動物

動物は8週齢の雄性 C57BL/6J マウス（日本クレア，東京，日本）を使用した．実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 17078）．マウスの飼育は，防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い，通常のマウス飼料および自由飲水で行った．

第2項 高尿酸モデルマウスの作製と血液採取

血中尿酸値を上昇させるため，inosine 5' - monophosphate disodium salt

hydrate : IMP (Sigma-Aldrich Co. LLC, St Louis, MO, USA) を各群に 0 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg 腹腔内投与した。また, 合成された尿酸を分解してしまいうリカーゼを阻害するために potassium oxonate : KOX (Sigma-Aldrich) をいずれの群にも 250 mg/kg 腹腔内投与した。投与前, 投与後 15 分, 30 分, 1 時間, 2 時間, 4 時間, 8 時間にそれぞれ尾静脈より 10 μ l ずつ採血を行った。採取した血液を 40 μ l の 0.05 M の EDTA 溶液 (ニッポンジーン, 富山, 日本) に攪拌した後, 1000 g で 10 分間遠心して上清を回収し, -80°C で保管した。KOX を単独投与した群を KOX 群 (n=6), KOX と IMP 500 mg/kg を投与した群を M (moderate)-IMP 群 (n=6), KOX と IMP 1000 mg/kg を投与した群を H (high)-IMP 群 (n=6) とした。

第3項 腸管分泌液の回収

マウスに塩酸メデトミジン (日本全薬工業, 福島, 日本) 0.75 mg/kg, ミダゾラム (サンド, 東京, 日本) 4 mg/kg, 酒石酸ブトルファノール (Meiji Seika ファルマ, 東京, 日本) 5 mg/kg の3種混合薬で麻酔を行った上で, 腹部正中を 1 cm から 2 cm 開腹して腸管を露出した。近位回腸に小切開をおき, 外径 2.3 mm, 内径 1.5 mm のエクステンションチューブ JR50 (八光, 東京, 日本) を切って挿入し, そこから約 10cm 離れた遠位回腸にも同様にチューブを挿入した。ペリスタポンプ SJ-1211III-L (アトー, 東京, 日本) を用いて口側より回腸内に生理食塩水を 5 ml/h で流し, 肛門側のチューブから液体を回収した。最初に 1 時間生理食塩水を流した後, 各群に IMP 0 mg/kg, 500 mg/kg, 1000 mg/kg および KOX 250 mg/kg を腹腔内に, 対照群にはリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate-buffered saline : PBS) を腹腔内に投与し, さらに 1 時間液体を回収した。回収した液体は遠心した後 -80°C で保存した。PBS を投与した群を control 群とし, KOX を単独投与した群を KOX 群 (n=6), KOX と IMP 500

mg/kg を投与した群を M-IMP 群 (n = 6), KOX と IMP 1000 mg/kg を投与した群を H-IMP 群 (n = 6) として比較検討を行った.

第4項 尿酸の定量

マウスはその体内に尿酸分解酵素であるウリカーゼを有していることから、ヒトと同様のウリカーゼ比色法では正確に血中の尿酸濃度を定量できない可能性が考えられた. そこで高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography : HPLC) を用いて尿酸を定量することとした. 検体の前処理および測定については既報を参考にして行った[48,49].

採取した血漿希釈液 40 μ l ないし腸管灌流液 100 μ l に 0.3 M 過塩素酸溶液 (富士フィルム和光純薬, 東京, 日本) を 400 μ l 加えてボルテックスで混和後, 30 分間氷上で静置した. 再度ボルテックスで混和した後, 1000 g で 10 分間遠心し, 300 μ l の上清を採取した. さらに 1000 g で 10 分間遠心し, 上清 200 μ l を回収した後, 0.2 M リン酸水素 2 ナトリウム溶液 (富士フィルム和光純薬) を 200 μ l と混和し, 0.45 μ m のフィルターであるクロマトディスク (ジーエルサイエンス, 東京, 日本) で濾過したものを解析サンプルとした.

HPLC 装置はフォトダイオードアレイ検出器 (MD-4015) とオートサンプラー (AS-4050) を備えた Jasco Extrema LC-4000 システム (日本分光, 東京, 日本) を, カラムは Inertsil ODS-4 (250 \times 4.6 mm, 粒子径 5 μ m, ジーエルサイエンス) を, 定量解析は JASCO ChromNAV version 2.02.05 (日本分光) を用いて行った. サンプルの注入量は, 血漿希釈液は 20 μ l, 腸管灌流液は 50 μ l とし, 溶媒にはリン酸水素 2 ナトリウムとリン酸 (富士フィルム和光純薬) をそれぞれ 0.014 M, 0.06 M となるよう混合し pH 2.2 に調整したリン酸塩緩衝液とメタノールの混合液 (98 : 2, v/v) を用い, 流量は 1 ml/min とした. 尿酸の波長は 292 nm で検出した.

第5項 統計学的処理

各データは平均値 ± 標準誤差で表した。多群間の比較には Tukey's test を、相関には Spearman の順位相関係数を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

第3節 結果

第1項 血中尿酸値の経時的変化

血中尿酸値の推移は KOX 群において、投与前は 0.68 ± 0.04 mg/dl、15 分後は 1.01 ± 0.11 mg/dl、30 分後は 1.35 ± 0.26 mg/dl、1 時間後は 1.38 ± 0.38 mg/dl、2 時間後は 0.64 ± 0.09 mg/dl、4 時間後は 0.73 ± 0.06 mg/dl、8 時間後は 0.64 ± 0.04 mg/dl であった。M-IMP 群において、投与前は 0.74 ± 0.04 mg/dl、15 分後は 3.42 ± 0.85 mg/dl、30 分後は 4.56 ± 0.30 mg/dl、1 時間後は 4.75 ± 0.12 mg/dl、2 時間後は 1.93 ± 0.24 mg/dl、4 時間後は 1.04 ± 0.10 mg/dl、8 時間後は 0.70 ± 0.06 mg/dl であった。H-IMP 群において、投与前は 0.75 ± 0.04 mg/dl、15 分後は 5.48 ± 0.64 mg/dl、30 分後は 8.52 ± 0.66 mg/dl、1 時間後は 9.63 ± 0.68 mg/dl、2 時間後は 2.42 ± 0.19 mg/dl、4 時間後は 1.05 ± 0.06 mg/dl、8 時間後は 0.93 ± 0.04 mg/dl であった (図 3A)。

第2項 腸管への尿酸分泌量

腸管への尿酸分泌量は、control 群で 10.69 ± 1.39 μ g/h、KOX 群で 11.94 ± 1.41 μ g/h ($p = 0.94$, vs control 群)、M-IMP 群で 50.73 ± 1.90 μ g/h ($p < 0.001$, vs KOX 群)、H-IMP 群で 94.57 ± 5.80 μ g/h ($p < 0.001$, vs KOX 群, $p < 0.001$, vs M-IMP 群) であり、KOX 単独投与では増加しなかったが、IMP の投与を加えることで有意に増加した (図 3B)。腸管への尿酸分泌量は IMP の投与量と正の相関を認めた ($R_s = 0.9443$, $p < 0.001$, Spearman)。

第4節 小括

KOX の単独投与では血中尿酸値はわずかにしか上昇せず，IMP を合わせて投与することにより，血中尿酸値が有意に上昇することが確認された．また，血中尿酸値の上昇に伴って，腸管への尿酸分泌量も増加することが確認された．KOX と IMP の投与で高尿酸モデルマウスを作製できると考えられた．

第3章 尿酸による血中および腸管内の抗酸化度の変化に関する検討

第1節 目的

尿酸は内因性の抗酸化物質である一方で、酸化促進作用も併せもつ物質である。KOX および IMP の投与により血中尿酸値および腸管への尿酸排泄量が増加することが確認されたことから、血中および腸管内の抗酸化度が上昇しているかどうかを検討した。

第2節 方法

第1項 動物

動物は8週齢の雄性 C57BL/6J マウスを使用した。実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 17078）。マウスの飼育は、防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い、通常のマウス飼料および自由飲水で行った。

第2項 高尿酸モデルマウスの作製と血液採取

血中尿酸値を上昇させるため、IMP 500 mg/kg ないし 1000 mg/kg と KOX 250 mg/kg を腹腔内投与した。1時間後に塩酸メデトミジン 0.75 mg/kg、ミダゾラム 4 mg/kg、酒石酸ブトルファノール 5 mg/kg の3種混合薬で麻酔を行い、開腹して下大静脈より採血を行った。対照群には PBS のみを投与したマウスから採血した。採取した血液を 1000 g で 10 分間遠心し、血清を回収し-80°C で保管した。PBS を投与した群を control 群 (n=6) とし、KOX と IMP 500 mg/kg を投与した群を moderate uric acid : MUA 群 (n=6)、KOX と IMP 1000 mg/kg を投与した群を high uric acid : HUA 群 (n=6) として比較検討を行った。

第3項 腸管分泌物の回収

第2章第2項と同様に腸管灌流液を回収し、測定までの間 -80°C で保存した。PBSを投与した群をcontrol群 ($n=6$) とし、KOXとIMP 500 mg/kgを投与した群をMUA群 ($n=6$)、KOXとIMP 1000 mg/kgを投与した群をHUA群 ($n=6$) として比較検討を行った。

第4項 抗酸化度の測定

血清および腸管分泌物の抗酸化度の測定に関しては、フリーラジカル解析装置 FREE CARRIO DUO (Diacron International srl, Grosseto, Italy) を使用し、酸化ストレスマーカーである diacron reactive oxygen metabolites (d-ROMs) と抗酸化マーカーである biological antioxidant potential (BAP) の測定を行った[50,51]。

d-ROMs の測定は d-ROMs テストキット (Diacron International srl) を使用し次の通り行った。20 μl のサンプルを pH 4.8 の緩衝液が入った専用容器に入れ、その後容器ごと反転させて十分に混合した。この操作により、サンプル中の過酸化水素が、アルコキシラジカルとペルオキシラジカルに分解される。次に、20 μl の発色剤 (N,N-ジエチル-パラフェニレンジアミン) を入れ、発色剤がフリーラジカルによって酸化され、ラジカルカチオンが赤色に発色する。容器の反転により十分に混合した後、フリーラジカル解析装置の分光光度計に入れて 505 nm でラジカルカチオンを測定した。測定の単位は U.CARR で表され、1 U.CARR は 0.08 mg/dl の H_2O_2 に相当する。

BAP の測定は BAP テストキット (Diacron International srl) を使用し次の通り行った。BAP 用の発色試薬である無色のチオシアン酸塩 50 μl を、 FeCl_3 を含んだ試薬の入った専用容器に入れて、容器ごと反転させて内容物を混合し、三価鉄イオンの赤色発色をフリーラジカル解析装置の分光光度計で測定した。続いて 10 μl のサンプルを加えて混合し、容器を恒温槽に入れ 5 分間混合物を

反応させた. この反応によりサンプル中の抗酸化物質の作用で赤色の三価鉄イオンは二価鉄イオンに還元され脱色される. その後, フリーラジカル解析装置の分光光度計に入れ 505 nm で測定し, その発色の変化から鉄イオンの還元量を定量した. 測定結果は $\mu\text{mol/l}$ で表した.

第5項 統計学的処理

各データは平均値 \pm 標準誤差で表した. 多群間の比較には Tukey's test を使用し, p 値 0.05 未満を有意差ありとした.

第3節 結果

第1項 血中の抗酸化度

血清の d-ROMs は control 群で 65.8 ± 9.1 U.CARR, MUA 群で 51.8 ± 10.9 U.CARR, HUA 群で 48.8 ± 4.3 U.CARR であり, control 群に対し MUA 群および HUA 群で有意に低かった (control 群 vs MUA 群, $p = 0.038$, control 群 vs HUA 群 $p = 0.0089$) が, MUA 群と HUA 群間では有意差を認めなかった (MUA 群 vs HUA 群, $p = 0.56$). BAP は control 群で 2574.5 ± 165.4 $\mu\text{mol/l}$, MUA 群で 4278.0 ± 597.5 $\mu\text{mol/l}$, HUA 群で 5143.2 ± 613.4 $\mu\text{mol/l}$ であり, control 群に対し MUA 群および HUA 群で有意に高く (control 群 vs MUA 群, $p < 0.001$, control 群 vs HUA 群 $p < 0.001$), MUA 群に対し HUA 群で有意に高かった (MUA 群 vs HUA 群, $p = 0.031$) (図 4A).

第2項 腸管分泌液の抗酸化度

腸管灌流液の d-ROMs は control 群で 22.2 ± 1.7 U.CARR, MUA 群で 22.6 ± 2.16 U.CARR, HUA 群で 21.0 ± 1.79 U.CARR であり, いずれの群間でも有意差を認めなかった (control 群 vs MUA 群, $p = 0.89$, control 群 vs HUA 群 $p =$

0.55, MUA 群 vs HUA 群, $p = 0.31$). BAP は control 群で $438.8 \pm 38.6 \mu\text{mol/l}$, MUA 群で $507.0 \pm 32.3 \mu\text{mol/l}$, HUA 群で $512.5 \pm 46.7 \mu\text{mol/l}$ であり, control 群に対し MUA 群および HUA 群で有意に高かった (control 群 vs MUA 群, $p = 0.024$, control 群 vs HUA 群 $p = 0.015$) が, MUA 群と HUA 群では有意差を認めなかった (MUA 群 vs HUA 群, $p = 0.97$) (図 4B).

第 4 節 小括

血中尿酸値の上昇に伴い, 血清の d-ROMs の低下, BAP の上昇を認め, 抗酸化度が上昇していることが確認された. また, 腸管分泌液も BAP の上昇を認め抗酸化度が上昇していることが確認された. 尿酸は血中および腸管内で抗酸化物質として作用していると考えられた.

第4章 尿酸がインドメタシン腸炎に与える影響の検討

第1節 目的

2017年に本校から、マウスの実験においてIND腸炎が尿酸によって改善することが報告されているが[32], その際の血中濃度はヒトにおける正常範囲内での検討であった. 高濃度の尿酸は炎症促進作用をもつ可能性もあることから, 血中濃度をヒトにおける高尿酸血症レベルまで上昇させた場合に, 抗炎症作用が維持されるかどうかについてマウスによる実験的腸炎モデルを用いて検討した.

第2節 方法

第1項 動物

動物は8週齢の雄性C57BL/6Jマウスを使用した. 実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った(承認番号17078). マウスの飼育は, 防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い, 通常のマウス飼料および自由飲水で行った.

第2項 モデルマウスの作製と検体採取

NSAIDs腸炎モデルの作製のために, マウス腹腔内にIND(富士フィルム和光純薬)20 mg/kgを腹腔内投与した. 高尿酸モデルマウスはKOX 250 mg/kgとIMP 500 mg/kgないしKOX 250 mg/kgとIMP 1000 mg/kgをIND投与の30分前, 12時間後, 24時間後, 36時間後に投与した. IND投与後の48時間後に安楽死させて全小腸を採取し, 潰瘍面積, 腸管長の測定を行った後, 組織学的評価のための検体作成を行った. また, 小腸におけるtumor necrosis factor α (TNF- α), interferon γ (IFN- γ), IL-1 β などの炎症性サイトカインやNLRP3インフラマソームの messenger ribonucleic acid (mRNA) の発現に関しては, IND

投与後の 6~12 時間でピークとなるとの報告があることから[52], 別に実験を行い, IND 投与の 12 時間後に安楽死させて回腸より検体を採取し, reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で評価を行った.

第3項 肉眼的検討

安楽死を行う 30 分前に, 1%エバンスブルー (富士フィルム和光純薬) を 200 μ l 静注し, 摘出した全小腸の腸間膜対側を切開して展開し, 粘膜面に漏出したエバンスブルーによる青斑を, IND により生じた潰瘍の面積として計測することで評価した[53,54]. また, 炎症による腸管の短縮を評価するため, 摘出した全小腸の長さを測定した. 薬物を投与していない control 群 (n=6), IND および PBS を投与した IND 群 (n=6), IND と KOX と IMP 500 mg/kg を投与した IND-MUA 群 (n=6), IND と KOX と IMP 1000 mg/kg を投与した IND-HUA 群 (n=6) の 4 群で比較検討を行った.

第4項 組織学的検討

回腸末端より約 10 cm 口側の回腸を 10%ホルマリン中性緩衝液 (富士フィルム和光純薬) で固定した後パラフィンに包埋し, 切片を作製した後ヘマトキシリン・エオジン染色した. 小腸の炎症の評価として, 陰窩 (crypt) と絨毛 (villous) の高さを測定し, 小腸絨毛の萎縮を陰窩絨毛比 (crypt villous ratio) として計測した. また, 組織学的スコアは既報を参考に, grade 0 : 正常の粘膜および絨毛構造, grade 1 : 絨毛先端の上皮下の組織が脱落し, 空間の出現を認める, grade 2 : 上皮下の空間が拡大するが, 絨毛の長さや幅は変化しない, grade 3 : 少数の絨毛が短縮し, 先端の構造が破壊された絨毛が出現する, grade 4 : 多くの絨毛が短縮し, 陰窩の過形成を認める, grade 5 : 全ての絨毛が鈍化し, 陰窩が伸長する, の 6 段階で評価し, 腸管 1 mm あたりの平均 grade を算出し

た[53,55]. 病理学的評価は2名の研究者で行った. 前項と同様に control 群 (n = 6), IND 群 (n = 6), IND-MUA 群 (n = 6), IND-HUA 群 (n = 6) の4群で比較検討を行った.

第5項 mRNA の抽出および RT-PCR 法

小腸における mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて評価した. 回腸末端より 10 cm 口側の小腸組織を採取し, RNeasy Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) へ浸漬した後, -20°C で保管した. 組織のホモジナイズには MagNA Lyser (Roche, Basel, Switzerland) を 6,500 rpm \cdot 50 秒の条件で使用した. ホモジナイズ後は RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて RNA を抽出し, 分光光度計 (Gene Quant; GE Healthcare, Chicago, IL, USA) で濃度を測定した後, そのうち 1.5 μg を DNase \cdot RNase free water (Thermo Fisher Scientific) で希釈して 14 μl の水溶液を作製し逆転写反応に使用した. 逆転写反応は RNA 水溶液 14 μl , Random Primer 1.25 μl (タカラバイオ, 滋賀, 日本), SuperScript II Reverse Transcriptase 1 μl (Thermo Fisher Scientific), dNTP Mixture 0.625 μl (タカラバイオ), RNasin 0.625 μl (Promega, Madison, WI, USA), DTT 2.5 μl (Thermo Fisher Scientific), First Strand Buffer 5 μl (Thermo Fisher Scientific) を混合した後, Gene Amp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を使用して行った. 反応条件は 25°C 15 分, 42°C 15 分, 48°C 30 分, 20°C 15 分とし, 終了後に complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) を得た.

cDNA を得た後, RT-PCR 法を行った. 1 検体あたり cDNA 3 μl (9 ng), プローブ 2 μl , qPCR Mastermix (Eurogentec, Seraing, Belgium) 5 μl を混合して 384 well プレートに配置し, triplicate とした. プローブは内在性コントロールとして mouse Gapdh (Mm4331182 : Thermo Fisher Scientific) を設定し, mouse TNF- α (Mm00443258 : Thermo Fisher Scientific), mouse IFN- γ (Mm00801778 : Thermo

Fisher Scientific), mouse Il-1 β (Mm01336189 : Thermo Fisher Scientific), mouse NLRP3 (Mm00840904 : Thermo Fisher Scientific) を使用した. 装置は Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System, SDS software version 2.4 (Thermo Fisher Scientific) を使用し, 条件は 50°C 2 分, 95°C 10 分の後, 95°C 15 秒, 60°C 1 分を 40 サイクル繰り返す設定とした. 結果の解析には RQ Manager 1.2.2 (Thermo Fisher Scientific) を使用し, $\Delta\Delta C_t$ 法によって評価した. 第 3 項と同様に control 群 (n = 6), IND 群 (n = 6), IND-MUA 群 (n = 6), IND-HUA 群 (n = 6) の 4 群で比較検討を行った.

第 6 項 統計学的処理

各データは平均値 \pm 標準誤差で表した. 多群間の比較には Tukey's test を使用し, p 値 0.05 未満を有意差ありとした.

第 3 節 結果

第 1 項 肉眼的所見

潰瘍面積の結果を図 5A に示す. control 群では $0.0 \pm 0.0 \text{ mm}^2$, IND 群では $9.3 \pm 3.4 \text{ mm}^2$, IND-MUA 群では $2.0 \pm 1.2 \text{ mm}^2$, IND-HUA 群では $0.2 \pm 0.2 \text{ mm}^2$ であり, control 群に比して IND 群で有意に潰瘍面積は大きかったが (control 群 vs IND 群, $p = 0.0085$), IND-MUA 群および IND-HUA 群では IND 群と比較し有意に小さかった (IND 群 vs IND-MUA 群, $p = 0.045$, IND 群 vs IND-HUA 群, $p = 0.0098$). また, IND-MUA 群と IND-HUA 群間で有意差を認めなかった (IND-MUA 群 vs IND-HUA 群, $p = 0.52$).

腸管長の結果を図 5B に示す. control 群では $36.3 \pm 0.4 \text{ mm}$, IND 群では $23.3 \pm 3.4 \text{ mm}$, IND-MUA 群では $31.4 \pm 1.0 \text{ mm}$, IND-HUA 群では $33.2 \pm 1.1 \text{ mm}$ であり, control 群に比して IND 群で有意に短かったが (control 群 vs

IND 群, $p < 0.001$), IND-MUA 群および IND-HUA 群では IND 群と比較し有意に長かった (IND 群 vs IND-MUA 群, $p < 0.001$, IND 群 vs IND-HUA 群, $p < 0.001$). また, IND-MUA 群と IND-HUA 群間で有意差を認めなかった (IND-MUA 群 vs IND-HUA 群, $p = 0.64$).

第2項 組織学的所見

各群の代表的な組織標本を図 5C に示す. control 群と比較し, IND 群では陰窩の肥厚, 絨毛の短縮や脱落が著明であった. また, IND-MUA 群および IND-HUA 群では, IND 群と比較して陰窩の肥厚や絨毛の短縮, 絨毛先端の破壊が抑制されていた.

炎症に伴う絨毛の萎縮を crypt villous ratio で評価したところ (図 5D), control 群では 0.43 ± 0.04 , IND 群では 0.93 ± 0.11 , IND-MUA 群では 0.41 ± 0.04 , IND-HUA 群では 0.45 ± 0.06 であった. control 群と比較し IND 群で有意に大きく (control 群 vs IND 群, $p < 0.001$), IND-MUA 群および IND-HUA 群では IND 群と比較し有意に小さかった (IND 群 vs IND-MUA 群, $p < 0.001$, IND 群 vs IND-HUA 群, $p < 0.001$). また, IND-MUA 群と IND-HUA 群間で有意差を認めなかった (IND-MUA 群 vs IND-HUA 群, $p = 0.70$).

組織学的スコアによる評価では (図 5E), control 群では 0.33 ± 0.16 , IND 群では 4.00 ± 0.26 , IND-MUA 群では 2.52 ± 0.84 , IND-HUA 群では 2.71 ± 0.23 であり, control 群と比較し IND 群で有意にスコアが高く (control 群 vs IND 群, $p < 0.001$), IND-MUA 群および IND-HUA 群では IND 群と比較し有意にスコアは低かった (IND 群 vs IND-MUA 群, $p = 0.0039$, IND 群 vs IND-HUA 群, $p = 0.012$). また, IND-MUA 群と IND-HUA 群間で有意差を認めなかった (IND-MUA 群 vs IND-HUA 群, $p = 0.96$).

第3項 炎症性サイトカインおよびインフラマソーム

各群における炎症性サイトカインとインフラマソームの mRNA の発現量を図 5F に示す.

TNF- α の発現量は IND 群で有意に多く (control 群 vs IND 群, $p = 0.0078$), IND-MUA 群と IND-HUA 群で有意に少なかった (IND 群 vs IND-MUA 群, $p = 0.018$, IND 群 vs IND-HUA 群, $p = 0.013$). また, IND-MUA 群と IND-HUA 群間で有意差を認めなかった (IND-MUA 群 vs IND-HUA 群, $p = 1.00$).

IFN- γ の発現量は各群間で有意な差は認めなかった (control 群 vs IND 群, $p = 0.062$, IND 群 vs IND-MUA 群, $p = 0.088$, IND 群 vs IND-HUA 群, $p = 0.066$, IND-MUA 群 vs IND-HUA 群, $p = 0.95$).

NLRP3 の発現量は IND 群で有意に多く (control 群 vs IND 群, $p < 0.001$), IND-MUA 群と IND-HUA 群で有意に少なかった (IND 群 vs IND-MUA 群, $p = 0.0054$, IND 群 vs IND-HUA 群, $p = 0.0098$). また, IND-MUA 群と IND-HUA 群間で有意差を認めなかった (IND-MUA 群 vs IND-HUA 群, $p = 0.57$).

IL-1 β の発現量も IND 群で有意に多く (control 群 vs IND 群, $p < 0.001$), IND-MUA 群と IND-HUA 群で有意に少なかった (IND 群 vs IND-MUA 群, $p < 0.001$, IND 群 vs IND-HUA 群, $p < 0.001$). また, IND-MUA 群と IND-HUA 群間で有意差を認めなかった (IND-MUA 群 vs IND-HUA 群, $p = 0.96$).

第4節 小括

高尿酸モデルマウスで IND による小腸の粘膜傷害が改善し, その効果は高濃度でも維持された. また, IND 腸炎ではインフラマソームを介した炎症が発生しており, 尿酸によって抑制されていると考えられた. 腸管において, 高濃度の尿酸も抗炎症効果があると考えられた.

第5章 尿酸が腸管内の活性酸素種に与える影響の検討

第1節 目的

NSAIDsによる消化管粘膜傷害や潰瘍形成においては、酸化ストレス傷害が関与していることが報告されている[39]. 尿酸は抗酸化物質であり、活性酸素種を除去するとされていることから、IND 腸炎における腸内の活性酸素種が尿酸によりどのように変化するかを検討した.

第2節 方法

第1項 動物

動物は8週齢の雄性 C57BL/6J マウスを使用した. 実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 17078). マウスの飼育は、防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い、通常のマウス飼料および自由飲水で行った.

第2項 小腸内の活性酸素種の測定

マウスの腹腔内に IND 20 mg/kg を腹腔内投与した. 高尿酸モデルマウスには KOX 250 mg/kg と IMP 500 mg/kg ないし KOX 250 mg/kg と IMP 1000 mg/kg を IND 投与の30分前に投与した. 活性酸素種の可視化分析は、既報を参考にして行った[56]. IND 投与の12時間後にマウスに塩酸メデトミジン 0.75 mg/kg, ミダゾラム 4 mg/kg, 酒石酸ブトルファノール 5 mg/kg の3種混合の麻酔をかけ、腹膜正中を小さく切開して回腸を取り出した. 回腸の粘膜を可視化するために、腸間膜附着部の対側に電気メスで長さ 1~2 cm の切り込みを入れて回腸を展開した. 腸管腔内の内容物を慎重に取り除いた後、少量の生理食塩水で粘膜面を軽く洗浄し、残存した生理食塩水を濾紙で吸引した後、蛍光性活性酸素

検出試薬であるアミノフェニルフルオレセイン (aminophenyl fluorescein : APF, 五稜郭, 北海道, 日本) を生理食塩水で $50 \mu\text{mol/l}$ に希釈し, $20 \mu\text{l}$ を粘膜に滴下した. 滴下から 15 分後に共焦点レーザー顕微鏡である A1R+ (ニコン, 東京, 日本) を用いて, APF の蛍光画像を撮影した. マウス 1 匹に対し 6 枚の画像を撮影し, その平均を 1 匹あたりの蛍光強度とした. 画像の蛍光強度は, NIS Elements version 4.50 (ニコン) を用いて, 視野 (約 0.3 mm^2) ごとに測定した. 第 4 章と同様に control 群 ($n=6$), IND 群 ($n=6$), IND-MUA 群 ($n=6$), IND-HUA 群 ($n=6$) の 4 群で比較検討を行った.

第 3 項 統計学的解析

各データは平均値 \pm 標準誤差で表した. 多群間の比較には Tukey's test を使用し, p 値 0.05 未満を有意差ありとした.

第 3 節 結果

APF による小腸粘膜の蛍光顕微鏡所見を図 6A に示す. IND 群ではより明瞭に蛍光しており, IND-MUA 群と IND-HUA 群では蛍光が弱くなっていた. 蛍光強度を定量化したところ (図 6B), control 群で 534.1 ± 13.4 , IND 群で 916.1 ± 22.9 , IND-MUA 群で 717.9 ± 25.1 , IND-HUA 群で 735.5 ± 38.4 であった. control 群に対し IND 群で有意に高く (control 群 vs IND 群, $p < 0.001$), IND 群と比較して IND-MUA 群と IND-HUA 群で有意に低かった (IND 群 vs IND-MUA 群, $p < 0.001$, IND 群 vs IND-HUA 群, $p < 0.001$). また, IND-MUA 群と IND-HUA 群間で有意差を認めなかった (IND-MUA 群 vs IND-HUA 群, $p = 0.64$).

第 4 節 小括

IND 腸炎において腸管内の活性酸素種が増加すること, また, 高尿酸モデルマ

ウスにおいて IND により増加した活性酸素種が減少することが確認された。尿酸が炎症に伴って増加する腸管内の活性酸素種を減少させていることが示唆された。

第6章 尿酸が腸内細菌叢に与える影響の検討

第1節 目的

腸内細菌のバランスを変化させる要因の一つに酸化ストレスがあげられる。通常腸管内の酸素濃度は低く保たれており、偏性嫌気性菌が存在できる環境となっているが、酸化ストレスが加わると偏性嫌気性菌が減少するため、*dysbiosis* が誘発される[57]。尿酸は腸管内に分泌される抗酸化物質であり、腸管炎症に対して防護的に働くことを示したが、その抗酸化作用は腸内細菌叢にも影響を与えている可能性が考えられた。そこで本章では動物実験モデルを用いて、尿酸による腸内細菌叢の変化について検討した。

第2節 方法

第1項 動物

動物は8週齢の雄性 C57BL/6J マウスを使用した。実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 17078）。マウスの飼育は、防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い、通常のマウス飼料および自由飲水で行った。

第2項 高尿酸モデルマウスの作製と盲腸便の採取

高尿酸モデルマウスの作製には IMP 1000 mg/kg と KOX 250 mg/kg の腹腔内投与を12時間毎に計7日間実施した。対照群には PBS を腹腔内投与した。最終腹腔内投与の12時間後にマウスを安楽死させ、腸内細菌の遺伝子解析用に新鮮な盲腸便を採取し解析までの間 -80°C で保存した。

第3項 遺伝子学的な腸内細菌叢の解析

既報を参考に処理を行った[58–60]. -80°C で保存した盲腸便から QIAamp stool mini kit (Qiagen) を用いて腸内細菌の DNA を抽出した. 16S rRNA 遺伝子の可変領域 V4 を標的とし, プライマー (Forward : 515F, Reverse: 806rcbc33~52) と TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ, 大阪) を用いて 16S rRNA 遺伝子領域を PCR 法により増幅した. QIAquick PCR purification kit (Qiagen) により PCR 産物を精製した. 次世代シーケンサー MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) を用いて解析した. 対照群 (control 群) ($n=5$) と高尿酸群 (HUA 群) ($n=5$) で比較検討を行った.

第4項 統計学的処理

結果は平均値 \pm 標準誤差で示した. 腸内細菌叢の多様性については Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) を用いて解析したデータを基に評価を行った. 腸内細菌の相対豊富さおよび α 多様性については Student's *t* test を, β 多様性については Steel-Dwass 法を使用し, p 値 0.05 未満を有意差ありとした.

第3節 結果

第1項 腸内細菌の多様性

control 群, HUA 群の二群間における腸内細菌叢の多様性の比較を行った. α 多様性の結果を図 7A に示す. Chao1 を用いた比較では, HUA 群は control 群と比較して有意に高かった (control : 572.0 ± 29.5 , HUA 群 : 948.0 ± 31.4 , $p < 0.001$). また, Phylogenetic Diversity (PD) whole tree による比較でも HUA 群で有意に高かった (control 群 : 22.6 ± 0.6 , HUA 群 : 26.5 ± 0.6 , $p = 0.0013$). また, β 多様性の評価で平均 UniFrac 距離解析を行ったところ (図 7B), control

群内の距離は 0.46 ± 0.01 であったのに対し, control 群と HUA 群間の距離は 0.67 ± 0.01 と control 群と HUA 群間で有意に高かった ($p < 0.001$). HUA 群内の距離は 0.49 ± 0.01 であり, control 群内の距離と有意差を認めなかった ($p = 0.32$). また, 主座標分析 (Principal Coordinate Analysis: PCoA) を行ったところ (図 7C), HUA 群は control 群と異なる分布を示した. これらの結果より, 両群の細菌叢構造が異なると考えられた.

第2項 腸内細菌の相対豊富さ

腸内細菌の相対豊富さの比較を行ったところ, 門レベルの解析では (図 8A, 8B), Firmicutes が control 群では $60.1 \pm 1.9\%$ であったのに対し, HUA 群では $69.3 \pm 3.9\%$ と高い傾向にあった ($p = 0.070$). また, Proteobacteria は control 群が $4.0 \pm 0.5\%$ であったのに対し, HUA 群では $2.9 \pm 0.3\%$ と低い傾向を認めた ($p = 0.070$). Bacteroides は control 群が $33.5 \pm 2.4\%$, HUA 群で $26.1 \pm 3.7\%$ と差は認めなかった ($p = 0.13$). Actinobacteria も control 群が $0.6 \pm 0.3\%$, HUA 群で $0.3 \pm 0.1\%$ と差は認めなかった ($p = 0.35$).

存在比率 0.1%以上の上位 21 科の解析では (図 9A, 9B), S24-7 (control 群: $26.0 \pm 2.0\%$, HUA 群: $16.7 \pm 2.6\%$, $p = 0.023$), Verrucomicrobiaceae (control 群: $0.9 \pm 0.3\%$, HUA 群: $0.0 \pm 0.0\%$, $p = 0.0079$), Alcaligenaceae (control 群: $0.3 \pm 0.1\%$, HUA 群: $0.1 \pm 0.0\%$, $p = 0.0057$) は HUA 群において相対豊富さは有意に低値であった. 一方, Ruminococcaceae (control 群: $10.4 \pm 0.7\%$, HUA 群: $14.2 \pm 0.8\%$, $p = 0.0063$), [Paraprevotellaceae] (control 群: $2.9 \pm 0.2\%$, HUA 群: $4.4 \pm 0.4\%$, $p = 0.017$), Lactobacillaceae (control 群: $2.7 \pm 0.5\%$, HUA 群: $6.4 \pm 0.0\%$, $p = 0.024$) は HUA 群で有意に高値であった.

存在比率 0.1%以上の上位 31 属の解析では (図 10A, 10B), S24-7 *incertae sedis* (control 群: $26.0 \pm 2.0\%$, HUA 群: $16.7 \pm 2.6\%$, $p = 0.023$), *Akkermansia* (control

群 : $1.0 \pm 0.3\%$, HUA 群 : $0.0 \pm 0.0\%$, $p = 0.0080$), *Sutterella* (control 群 : $0.3 \pm 0.1\%$, HUA 群 : $0.1 \pm 0.0\%$, $p = 0.0057$) が, HUA 群において相対豊富度は低値であった. 一方で, [*Prevotella*] (control 群 : $2.9 \pm 0.2\%$, HUA 群 : $4.4 \pm 0.4\%$, $p = 0.017$), *Lactobacillus* (control 群 : $2.6 \pm 0.5\%$, HUA 群 : $6.4 \pm 1.2\%$, $p = 0.024$), *Ruminococcus* (control 群 : $2.1 \pm 0.2\%$, HUA 群 : $4.8 \pm 0.4\%$, $p < 0.001$), *Ruminococcaceae incertae sedis* (control 群 : $0.7 \pm 0.1\%$, HUA 群 : $1.2 \pm 0.2\%$, $p = 0.044$), *Dorea* (control 群 : $0.2 \pm 0.0\%$, HUA 群 : $0.4 \pm 0.1\%$, $p = 0.0050$), *Dehalobacterium* (control 群 : $0.1 \pm 0.0\%$, HUA 群 : $0.2 \pm 0.0\%$, $p = 0.0045$) は HUA 群において相対豊富度が有意に高値であった. また, 有意差はなかったものの, *Desulfovibrio* (control 群 : $2.9 \pm 0.3\%$, HUA 群 : $2.0 \pm 0.4\%$, $p = 0.079$), *Butyricoccus* (control 群 : $0.6 \pm 0.1\%$, HUA 群 : $0.3 \pm 0.1\%$, $p = 0.096$) は HUA 群で低値の, *Rikenellaceae incertae sedis* (control 群 : $0.8 \pm 0.3\%$, HUA 群 : $1.7 \pm 0.2\%$, $p = 0.054$), *Ruminococcaceae Clostridium* (control 群 : $0.3 \pm 0.1\%$, HUA 群 : $0.6 \pm 0.1\%$, $p = 0.059$), *RF39 incertae sedis* (control 群 : $0.2 \pm 0.1\%$, HUA 群 : $0.6 \pm 0.2\%$, $p = 0.064$), は HUA 群で高値の傾向にあった.

第4節 小括

盲腸便中の腸内細菌を次世代シーケンサーによる遺伝子学的な解析をした結果, 高尿酸モデルマウスにおいて腸内細菌の多様性が上昇すること, また, その腸内細菌叢が通常のマウスと異なることが確認された. 腸管内に分泌された尿酸により腸内細菌叢が変化したと考えられた.

第7章 尿酸による腸内細菌叢の変化がインドメタシン腸炎に与える影響の検討

第1節 目的

腸内細菌はその多くが大腸に存在しており、大腸の腸内細菌が様々な疾患と関連があることが報告されている[61]。また、小腸の腸内細菌は大腸と比べると数は少ないものの、クローン病や NSAIDs 腸炎において小腸の腸内細菌が炎症と関連し、病態に関与するとの報告もある[40,62,63]。尿酸により腸内細菌の多様性が上昇し、通常のマウスと異なる腸内細菌叢になることが確認されたことから、尿酸で変化した腸内細菌が小腸の炎症に対し防護的に働く可能性を考え、動物実験モデルを用いて糞便微生物移植（fecal microbiota transplantation : FMT）による検討を行った。

第2節 方法

第1項 動物

動物は4週齢から8週齢の雄性 C57BL/6J マウスを使用した。実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 17078）。マウスの飼育は、防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い、通常のマウス飼料および自由飲水で行った。

第2項 盲腸便の採取と処理

前章と同様に8週齢の雄性 C57BL/6J マウスに IMP 1000 mg/kg と KOX 250 mg/kg を12時間ごとに計7日間腹腔内投与し、安楽死させた後に盲腸便を採取した。また、対照群に投与する便は PBS を12時間ごとに計7日間腹腔内投与したマウスから採取した。盲腸便の処理は既報を参考に[64]、採取した

盲腸便 200 mg あたり 1500 μ l の PBS で希釈した。粗大な沈殿物を除去した後、投与までの間 -80°C で保存した。

第3項 糞便微生物移植

腸内細菌を除去するため既報を参考にして[38,65], 4週齢の雄性 C57BL/6J マウスに, アンピシリン (富士フィルム和光純薬) を 1 g/l, バンコマイシン (富士フィルム和光純薬) を 0.5 g/l, ネオマイシン (LKT Labs., St. Paul, MN, USA) を 1 g/l, メトロニダゾール (富士フィルム和光純薬) を 1 g/l となるように 4 種の抗菌薬を混合した水溶液を作製し, 自由飲水で 4 週間投与した。投与終了後は通常の水に変更した。抗菌薬の投与終了の翌日より, 前項で作製した糞便希釈液を, 1 日 1 回 200 μ l ずつ計 5 日間ゾンデを用いて強制的に経口投与して FMT を行った。糞便希釈液最終投与の翌日に 10 mg/kg の IND を腹腔内投与した。IND 投与の 24 時間後にマウスを安楽死させて, 検体を採取した。IMP と KOX を腹腔内投与した高尿酸モデルマウスの便を FMT した群を HUA 群 (n = 6), 対照群として PBS を腹腔内投与したマウスの便を FMT した群を control 群 (n = 6) とした。

第4項 腸炎の評価

第4章第2節と同様に小腸の炎症について, 潰瘍面積および腸管長, 組織学的所見を crypt villous ratio と組織学的スコアで評価し, 炎症性サイトカインおよびインフラマソームに関する mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて control 群と HUA 群で比較した。

第5項 糞便希釈液中の尿酸の測定

糞便希釈液中の尿酸により左右される可能性があるため, 投与した糞便希釈

液中の尿酸含有量を第2章第2節と同様に HPLC を用いて測定した。control 群 (n = 5), HUA 群で (n = 5) で比較した。

第6項 統計学的処理

各データは平均値 ± 標準誤差で表した。2 群間の比較には Student's t test を使用し、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

第3節 結果

第1項 糞便希釈液中の尿酸含有量

control 群に投与した糞便希釈液 200 μ l 中の尿酸は 69.5 ± 7.0 ng, HUA 群に投与した糞便希釈液 200 μ l 中の尿酸は 80.9 ± 6.8 ng であり、糞便中の尿酸含有量に有意差を認めなかった ($p = 0.28$)。

第2項 糞便微生物移植による腸炎の変化

潰瘍面積は control 群で 7.1 ± 1.5 mm² であったのに対し、HUA 群では 3.8 ± 0.4 mm² であり、HUA 群で有意に小さかった ($p = 0.015$) (図 11A)。

腸管長は control 群で 26.9 ± 1.3 mm であったのに対し、HUA 群では 31.5 ± 0.7 mm であり、HUA 群で有意に長かった ($p = 0.012$) (図 11B)。

両群の代表的な組織標本を図 11C に示す。両群において、絨毛先端の細胞の脱落や絨毛の短縮を認めた。

crypt villous ratio は control 群で 0.64 ± 0.02 であったのに対し、HUA 群では 0.58 ± 0.02 であり、HUA 群で低い傾向にあったが、有意差は認めなかった ($p = 0.056$) (図 11D)。

組織学的スコアは control 群で 4.0 ± 0.2 であったのに対し、HUA 群では 3.1 ± 0.4 であり、HUA 群で低い傾向にあったが、有意差は認めなかった ($p = 0.085$)

(図 11E).

小腸における TNF- α , IFN- γ , NLRP3, IL-1 β の mRNA の発現は, いずれも HUA 群で有意に少なかった (TNF- α : $p = 0.0058$, IFN- γ : $p = 0.0015$, NLRP3 : $p = 0.0082$, IL-1 β : $p < 0.001$) (図 11F).

組織学的には有意な炎症の改善はなかったものの, 潰瘍面積や腸管長, 炎症性サイトカインおよびインフラマソームの mRNA の発現は HUA 群で有意に抑制されており, HUA 群で腸管炎症が改善したと考えられた.

第 4 節 小括

FMT に用いた盲腸便中の尿酸値に差がなく, 高尿酸モデルマウスの盲腸便を移植したマウスは通常のマウスの盲腸便を移植したマウスに比べて, IND 腸炎が軽減されたことから, 尿酸そのものの影響ではなく, 変化した腸内細菌叢が IND 腸炎に対し防護的に働いていると考えられた.

第8章 尿酸により変化した腸内細菌叢と便中の短鎖脂肪酸濃度の検討

第1節 目的

尿酸により変化した腸内細菌叢が IND 腸炎を改善させたが、そのメカニズムは明らかにはなっていない。高尿酸モデルマウスの腸内細菌叢において *Lactobacillus* 属や *Ruminococcus* 属が増加していたが、これらの細菌の中には、腸管免疫を制御する短鎖脂肪酸を産生するものが含まれており、尿酸によって変化した腸内細菌が短鎖脂肪酸の産生を介して腸管炎症を抑制しているのではないかと考えられた。そこで、高尿酸モデルマウスの盲腸便中の短鎖脂肪酸が増加しているかどうかについて検討した。

第2節 方法

第1項 動物

動物は8週齢の雄性 C57BL/6J マウスを使用した。実験は防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 17078）。マウスの飼育は、防衛医科大学校実験動物使用に関するガイドラインに従い、通常のマウス飼料および自由飲水で行った。

第2項 ガスクロマトグラフィーによる便中短鎖脂肪酸の測定

便中の短鎖脂肪酸分析は既報を参考にして行った[66]。糞便の採取は第6章第1節第1項と同様に実施した。採取した盲腸便（100～150 mg）に 10%イソブタノール（富士フィルム和光純薬）1 ml を加え、MagNA Lyser (Roche) を 6,000 rpm・20 秒の条件でホモジナイズした。21000 g で 5 分間遠心した後、上清 675 μ l を別のチューブにうつし、125 μ l の 20 mM NaOH（米山化学工業、大

阪, 日本) と, 内部標準として 1 μl の 3-メチル吉草酸 (富士フィルム和光純薬) を加えボルテックスで攪拌した後, 21000 g で 2 分間遠心した. 上清 470 μl を採取し, 80 μl のイソブタノールと 100 μl のピリジン (関東化学, 東京, 日本) を加え 650 μl に調整した後, 誘導体化のため 50 μl のクロロ蟻酸イソブチル (富士フィルム和光純薬) を加え 1 分間静置した後ボルテックスで攪拌した. 150 μl のヘキサン (関東化学) を加えて十分に混合した後, 21000 g で 2 分間遠心し, その上清を分析するサンプルとした.

ガスクロマトグラフィーの装置はイオン検出器を備えた GC-2014 (島津製作所, 京都, 日本) を, キャピラリーカラムは DB-1 (30 m \times 0.25 mm, フィルム圧 0.25 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を使用した. サンプルの注入量は 1 μl とし, GCsolution version 2.44 (島津製作所) を用いて酢酸, プロピオン酸, 酪酸の定量を行った. 結果は 1 mg の糞便に含まれる短鎖脂肪酸の mol 量 (nmol/mg) で表し, 対照群 (control 群) (n=7) と高尿酸群 (HUA 群) (n=7) で比較した.

第 3 項 統計学的処理

各データは平均値 \pm 標準誤差で表した. 2 群間の比較には Student's t test を使用し, p 値 0.05 未満を有意差ありとした.

第 3 節 結果

各群における糞便中の短鎖脂肪酸濃度を図 12 に示す. 酢酸の濃度は control 群で 21.04 ± 2.19 nmol/mg, HUA 群で 25.92 ± 2.42 nmol/mg (p=0.16), プロピオン酸の濃度は control 群で 2.89 ± 0.24 nmol/mg, HUA 群で 3.02 ± 0.21 nmol/mg (p=0.69), 酪酸の濃度は control 群で 6.98 ± 1.01 nmol/mg, HUA 群で 7.43 ± 0.63 nmol/mg (p=0.71) といずれも有意差は認めなかった. 短鎖脂肪酸の総濃

度は control 群で 30.92 ± 3.18 nmol/mg, HUA 群で 36.38 ± 3.20 nmol/mg であり有意な差は認めなかった ($p = 0.24$).

第4節 小括

高尿酸モデルマウスの糞便中の酢酸, プロピオン酸, 酪酸の濃度は通常のマウスと比較して増加していなかった. また, 短鎖脂肪酸の総量も両群で差を認めなかった.

第9章 考察

今回の研究では、1) 前駆体である IMP の投与により間接的に血中尿酸を増加させることで、腸管内への尿酸分泌量が増加すること、2) 尿酸が増加することで血中および腸管内の抗酸化度が上昇すること、3) 高尿酸モデルマウスで IND 腸炎が改善することを明らかにし、腸炎改善の機序として4) 管腔内に分泌された尿酸による活性酸素種の除去と、5) 尿酸による腸内細菌叢の変化・多様性の増加の関与が示唆された (図 13)。

尿酸は体内における抗酸化物質の一つであるが、ヒトにおいては抗酸化物質であるアスコルビン酸の血中濃度が約 $50 \mu\text{M}$ であるのに対し、尿酸は $120\sim 450 \mu\text{M}$ と生体内における抗酸化物質で最も多いとされる[5]。本研究では、d-ROMs の動きよりも BAP の動きの方がより鋭敏な印象であった。マウスはヒトと異なり尿酸分解酵素であるウリカーゼを有しており、血中の尿酸濃度は 0.5 mg/dl から 0.8 mg/dl とヒトと比較して極めて低い。マウスにおいては、尿酸を有意に上昇させ得たので抗酸化度の上昇を明らかにできたが、今回の検討は生理的条件下で行っており、そもそも酸化物が少ないため酸化物質の低下作用が弱かったのではないかと考えられる。腸管分泌液の検討において、抗酸化度の上昇のみ確認でき、酸化物の減少は確認できなかったことに関しても、同様の原因ではないかと考えられる。また、腸管分泌液の回収には生理食塩水を使用し、高度に希釈されていたことも、生理的状況下で測定感度下限付近であった d-ROMs の変化を確認できなかった原因の可能性もある。尿酸には抗酸化作用と酸化促進作用の両義的な働きがあるとされており、高濃度では酸化促進作用を惹起する可能性があったが、今回の検討では高濃度であっても血中や腸管分泌液中で酸化度が上昇していないことや、高度に希釈してもその抗酸化作用が確認できたことから、血液中および腸管において尿酸は強力な抗酸化物質として働いているこ

とが示唆される。

尿酸には強力な抗酸化作用がある一方で、酸化促進作用を持ち、特に細胞内では酸化促進物質として働くことが報告されている[67]。飽和限界を超える高尿酸血症では尿酸ナトリウム結晶が析出し、析出した尿酸ナトリウム結晶はインフラマソーム経路の活性化を介して炎症反応を引き起こすとされる。特に痛風における炎症は、NLRP3 インフラマソーム経路によって引き起こされるが[18]、IND による腸管傷害の病態生理にも、NLRP3 インフラマソームを介した IL-1 β シグナルが関与しているとされている[52,68]。したがって、高濃度の尿酸は同様の NLRP3 インフラマソーム経路を介して腸管炎症を悪化させるのではないかと懸念された。しかし、本実験においては多量の尿酸に暴露されたマウスにおいても、NLRP3 を含む炎症メディエーターの mRNA の発現は抑制されており、高尿酸血症においても腸管炎症を悪化させないことが確認された。

尿酸が疫学的に疾患に対し防護的に作用することが示唆された疾患としてはパーキンソン病[26]や多発性硬化症[27]などがあるが、これまで尿酸の抗炎症作用について実験的に示されたものは少なく、多発性硬化症のモデルであるアレルギー性脳脊髄炎モデルマウスに対する尿酸投与がその症状を改善したとの報告と[28]、尿酸の前駆体であるイノシン酸投与も症状を改善するが脳組織中でイノシン酸上昇では症状を改善せず、尿酸の脳組織内での上昇が必要であったとの報告がある[47]。このアレルギー性脳脊髄炎では活性酸素種の一つであるペルオキシナイトライトの上昇がその成因に関与しているとされ[28]、尿酸のペルオキシナイトライトの除去作用をその効果の一因であると推論している。今回実験で用いた IND 腸炎においても、活性酸素種が腸管傷害の発症に重要な役割を果たしている[69,70]。本研究においても、生体内において尿酸が腸管内での活性酸素種の産生を減少させることが示された。フリーラジカルの影響は、それが生成された場所に限定され、血中の活性酸素種は血管内皮の損傷を

引き起こすのに対し、IND 腸炎では腸管粘膜に遊走する好中球が発生する活性酸素種が粘膜傷害を引き起こすことから、腸管炎症に関しては、血中の尿酸よりも腸管内の尿酸の方がより重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。以前本校で行われた検討でも、尿酸の経口投与で血中の尿酸濃度は上昇しなかったものの IND 腸炎が改善したという結果であり[32]、この考察を支持するものとする。今回の検討において、NLRP3 の mRNA 発現が低下していることは確認できたが、NLRP3 インフラマソーム経路における尿酸の作用部位は特定できていない。NLRP3 インフラマソームはプライミングであるシグナル 1 と活性化のシグナル 2 に大別され、シグナル 1 は種々の刺激により NLRP3 が産生される経路であり、シグナル 2 は種々の刺激から NLRP3 複合体を形成して Caspase-1 を活性化し IL-1 β の活性を惹起する経路である。活性酸素種のひとつである過酸化水素で Caco-2 を刺激すると、IkB α の分解と NF κ B の核への移動が起こり、シグナル 1 を介して NLRP3 インフラマソームのプライミングが起こることが報告されており[71,72]、尿酸は腸管腔内の活性酸素種を除去することで、シグナル 1 を抑制すると考えられる。ただその実証についてはさらなる研究が必要である。

腸管内に分泌された尿酸が抗酸化物質として働くと考えられたため、尿酸が腸内細菌叢に影響している可能性についても検討を行い、腸内細菌叢の α 多様性の指標である Chao1 および PD whole tree は、通常のマウスと比較して高尿酸モデルマウスで有意に高く腸内細菌の種類がより豊富であること、また、 β 多様性を表す UniFrac 距離解析において、高尿酸モデルマウスと通常のマウスでは腸内細菌叢が異なることが示された。偏性嫌気性菌は、酸素存在下で生成される活性酸素種を代謝するのに必要な酵素を自身で産生できないため、酸素下では生存できない。腸管内に分泌された尿酸により活性酸素種が除去されることで、腸内の嫌気環境の改善につながり、偏性嫌気性菌が増加する結果になったのでは

ないかと考えられる。本検討において、Firmicutes 門に属する菌種の数、高尿酸モデルマウスにおいて有意に多かったが、これは、腸管内の尿酸が増加したことにより、検出可能な Firmicutes 門の偏性嫌気性細菌が増加し、他の門の相対的な割合が減少したことを示唆している。炎症性腸疾患患者は健常者と比較して Firmicutes が減少するという報告もあり[73]、Firmicutes 門の増加は炎症に対して防護的に働く可能性が考えられる。また、嫌気性菌である *Lactobacillus* 属や *Ruminococcus* 属の細菌が高尿酸モデルマウスで増加を認めており、その中には腸管免疫に有益であるとされる酪酸を産生することも報告されている[74,75]。また、硫酸還元菌の 1 種である *Desulfovibrio* 属が減少する傾向にあった。硫酸還元菌は、腸管粘液中のジスルフィド結合を減少させて粘液層を破壊する硫化水素を産生する菌であり、潰瘍性大腸炎患者で増加することが報告されている[76]。しかしながら、*Desulfovibrio* 属も偏性嫌気性菌であることから、腸内細菌の変化については、尿酸の抗酸化作用のみではなく他の作用もあると考えられる。

高尿酸モデルマウスで腸内細菌叢が変化した結果を踏まえ、FMT を行ったところ、通常のマウスからの FMT と比較して高尿酸モデルマウスからの FMT では IND 腸炎を抑制するという結果を得られた。糞便中の尿酸濃度には差がなかったことから、尿酸により変化した腸内細菌が IND 腸炎に対し防護的に働いたと考えられる。ただ、変化した腸内細菌がどのような機序で腸管炎症を改善したかを解明するのは、要因が多岐にわたるため非常に難しい。前述のとおり、*Lactobacillus* 属や *Ruminococcus* 属には短鎖脂肪酸の一種である酪酸を産生する細菌があり、酪酸は腸管免疫に有用とされる短鎖脂肪酸のひとつである。このことから、短鎖脂肪酸の産生が増加しているのではないかと推測したが、今回の検討では有意な差は認めなかった。前述したとおり、*Desulfovibrio* 属も腸管傷害の原因となりうるため、その減少が腸管傷害の改善にも関与している可能性も考えられる。また、高尿酸モデルマウスからの FMT が IND 腸炎におけるインフラ

マソームを有意に抑制していることが本検討において確認された。IND が腸管粘膜に傷害を起こす機序として、腸管壁に侵入した腸内細菌が産生する LPS がマクロファージの Toll like receptor 4 (TLR4) を刺激することで各種サイトカインが産生され炎症が惹起されると報告されている[40]。尿酸により変化した腸内細菌叢では LPS 産生が減少し、TLR4 への刺激が減弱して炎症が改善した可能性も考えられる。

本研究の **limitation** は腸管炎症との関連において腸管上皮内の尿酸と腸管内の尿酸を完全に分離して検討できていない点があげられる。血中の尿酸は腸管粘膜を介して腸管内に分泌されるが、尿酸が細胞内へ移行することで効果が発揮されるのか、管腔に分泌されることで作用が発揮されるかを分離して考えるのは困難である。尿酸を腸管へ分泌するトランスポーターである ABCG2 を抑制する薬剤は存在するものの、それ以外にも腸管分泌を行うトランスポーターが存在するため、ABCG2 阻害剤を用いても腸管への尿酸分泌がどの程度抑制できるかは不明である。また、今回はマウスを用いて実験を行っており、血中尿酸値と腸管への尿酸分泌量は相関していたが、ヒトにおける高尿酸血症の原因には、一般的に知られている尿酸の産生過剰と尿中への排泄低下に加え、腸管からの排泄能の低下もあることから[11]、血中尿酸値と腸管への尿酸分泌量が相関しないと考えられる。そのため腸管への尿酸分泌量の測定が必要になるが、その測定は容易ではないことから、ヒトにおける尿酸に関してはさらなる検討を要すると考えられる。

第10章 結論

尿酸は腸管炎症に対して防護的に作用し、高濃度の状態においてもその作用が維持されること、また、尿酸により腸内細菌叢の変化が惹起され、その変化した腸内細菌叢は腸管炎症に対して防護的に働くことも明らかになった。尿酸の抗酸化作用は腸管において重要な要素となっていることが示唆された。尿酸の生理的意義の一端を解明したと考える。

謝辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました防衛医科大学校内科学講座講師 東山正明博士および防衛医科大学校内科学講座教授 穂苅量太博士に衷心より感謝申し上げます。

腸内細菌の解析に関して、貴重な御助言と御協力を賜りました株式会社明治研究本部乳酸菌研究所基盤微生物研究部マイクロバイオー姆グループ 土橋英恵様に感謝申し上げます。また、尿酸および短鎖脂肪酸の解析に関して、貴重な御助言と御協力を賜りました防衛医科大学校化学講座准教授 武井史恵博士、航空自衛隊航空医学実験隊 秋山美沙紀技官に感謝申し上げます。本研究の遂行に際し、貴重な御助言と御協力を賜りました防衛医科大学校内科学講座助教 栗原千枝博士をはじめ、同内科学講座の教室員諸先生に感謝申しあげます。

また本研究の一部は、一般財団法人 防衛医科大学校振興会からの助成金により実施しました。この場を借りて深謝いたします。

略語一覽

ABCG2 : ATP-binding cassette transporter sub-family G member 2

APF : aminophenyl fluorescein

BAP : biological antioxidant potential

cDNA : complementary deoxyribonucleic acid

d-ROMs : diacron reactive oxygen metabolites

FMT : fecal microbiota transplantation

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IFN : interferon

IL : interleukin

IMP : inosine 5' - monophosphate disodium salt hydrate

IND : indomethacin

KOX : potassium oxonate

LPS : lipopolysaccharide

mRNA : messenger ribonucleic acid

NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NLRP3 : NOD-like receptor family pyrin domain containing 3

NSAIDs : non-steroidal anti-inflammatory drugs

PBS : phosphate-buffered saline

PPI : proton pump inhibitor

RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction

TLR : Toll like receptor

TNF : tumor necrosis factor

附記

本研究の一部は以下の論文で発表した。

Akinori Wada, Masaaki Higashiyama, Chie Kurihara, Suguru Ito, Rina Tanemoto, Akinori Mizoguchi, Shin Nishii, Kenichi Inaba, Nao Sugihara, Yoshinori Hanawa, Kazuki Horiuchi, Naoki Shibuya, Misaki Akiyama, Yoshikiyo Okada, Chikako Watanabe, Shunsuke Komoto, Kengo Tomita, Fumie Takei, Ryota Hokari
Protective Effect of Luminal Uric Acid against Indomethacin-Induced Enteropathy: Role of Antioxidant Effect and Gut Microbiota. Digestive Diseases and Sciences. 2021 Feb 11. doi: 10.1007/s10620-021-06848-z. Epub ahead of print.

本研究の主旨は下記の学会で発表した。

- (1) 米国消化器病週間 2019 (2019年5月, サンディエゴ)
- (2) 第50回 日本消化吸収学会総会 (2019年10月, 東京)
- (3) 第57回 日本小腸学会学術集会 (2019年11月, 大阪)
- (4) 第27回 日本消化器関連学会週間 (2019年11月, 神戸)
- (5) 米国消化器病週間 2020 (2020年5月, シカゴ)

参考文献

1. Muraoka S, Miura T. Inhibition by Uric Acid of Free Radicals that Damage Biological Molecules. *Pharmacology and Toxicology*. 2003;93(6):284–9.
2. Whiteman M, Ketsawatsakul U, Halliwell B. A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;962:242–59.
3. Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid: The oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008;27(6–7):608–19.
4. Davies KJA, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P. Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochemical Journal*. 1986;235(3):747–54.
5. B N Ames, R Cathcart, E Schwiers PH. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78(11):6858–62.
6. Gersch C, Pali SP, Imaram W, Kim KM, Ananth S, Angerhofer A, Johnson RJ, Henderson GN. Reactions of peroxynitrite with uric acid: formation of reactive intermediates, alkylated products and triuret, and in vivo production of triuret under conditions of oxidative stress. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2009;28(2):118–49.
7. Sautin YY, Nakagawa T, Zharikov S, Johnson RJ. Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2007;293(2):584–96.

8. Oda M, Satta Y, Takenaka O, Takahata N. Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. *Molecular Biology and Evolution*. 2002;19(5):640–53.
9. Hediger MA, Johnson RJ, Miyazaki H, Endou H. Molecular physiology of urate transport. *Physiology*. 2005;20(2):125–33.
10. Matsuo H, Takada T, Ichida K, Nakamura T, Nakayama A, Ikebuchi Y, Ito K, Kusanagi Y, Chiba T, Tadokoro S, Takada Y, Oikawa Y, Inoue H, Suzuki K, Okada R, Nishiyama J, Domoto H, Watanabe S, Fujita M, Morimoto Y, Naito M, Nishio K, Hishida A, Wakai K, Asai Y, Niwa K, Kamakura K, Nonoyama S, Sakurai Y, Hosoya T, Kanai Y, Suzuki H, Hamajima N, Shinomiya N. Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: A function-based genetic analysis in a Japanese population. *Science Translational Medicine*. 2009;1(5):1–8.
11. Ichida K, Matsuo H, Takada T, Nakayama A, Murakami K, Shimizu T, Yamanashi Y, Kasuga H, Nakashima H, Nakamura T, Takada Y, Kawamura Y, Inoue H, Okada C, Utsumi Y, Ikebuchi Y, Ito K, Nakamura M, Shinohara Y, Hosoyamada M, Sakurai Y, Shinomiya N, Hosoya T, Suzuki H. Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia. *Nature Communications*. 2012;3:764.
12. Togawa N, Miyaji T, Izawa S, Omote H, Moriyama Y. A Na⁺-phosphate cotransporter homologue (SLC17A4 protein) is an intestinal organic anion exporter. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2012;302(11):C1652–60.
13. Hosomi A, Nakanishi T, Fujita T, Tamai I. Extra-renal elimination of uric acid via intestinal efflux transporter BCRP/ABCG2. *PLoS One*. 2012;7(2):2–9.

14. Sorensen LB. Role of the intestinal tract in the elimination of uric acid. *Arthritis & Rheumatism*. 1965;8(4):694–706.
15. Barker HA, Beck J V. *Clostridium aciduri* and *Clostridium cylindrosporium*, Organisms Fermenting Uric Acid and Some Other Purines. *Journal of Bacteriology*. 1942;43(3):291–304.
16. Rouf MA, Lomphey RF. Degradation of Uric Acid by Certain Aerobic Bacteria. *Journal of Bacteriology*. 1968;96(3):617–22.
17. Perez-Ruiz F, Dalbeth N, Bardin T. A Review of Uric Acid, Crystal Deposition Disease, and Gout. *Advances in Therapy*. 2015;32(1):31–41.
18. So A, Thorens B. Uric acid transport and disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(6):1791–9.
19. Feig DI, Kang D-H, Johnson RJ. Uric Acid and Cardiovascular Risk. *The New England Journal of Medicine*. 2008;359(17):1811–21.
20. Neogi T, Ellison RC, Hunt S, Terkeltaub R, Felson DT. Serum Uric Acid Is Associated with Carotid Plaques : The National Heart , Lung , and Blood Institute Family Heart Study. *The Journal of Rheumatology*. 2009;36(2):378–84.
21. Kuwabara M, Niwa K, Nishi Y, Mizuno A, Asano T, Masuda K, Komatsu I, Yamazoe M, Takahashi O, Hisatome I. Relationship between serum uric acid levels and hypertension among Japanese individuals not treated for hyperuricemia and hypertension. *Hypertension Research*. 2014;37(8):785–9.
22. Lanaspá MA, Masanari AA. Uric acid and hypertension. *Hypertension Research*. 2020;832–4.
23. Verdecchia P, Schillaci G, Reboldi GP, Santeusanio F, Porcellati C, Brunetti P. Relation between serum uric acid and risk of cardiovascular disease in essential hypertension: The PIUMA study. *Hypertension*. 2000;36(6):1072–8.

24. Mazza A, Zamboni S, Rizzato E, Pessina AC, Tikhonoff V, Schiavon L, Casiglia E. Serum uric acid shows a J-shaped trend with coronary mortality in non-insulin-dependent diabetic elderly people. The Cardiovascular Study in the Elderly (CASTEL). *Acta Diabetologica*. 2007;44(3):99–105.
25. Matsuo H, Tomiyama H, Satake W, Chiba T, Onoue H, Kawamura Y, Nakayama A, Shimizu S, Sakiyama M, Funayama M, Nishioka K, Shimizu T, Kaida K, Kamakura K, Toda T, Hattori N, Shinomiya N. ABCG2 variant has opposing effects on onset ages of Parkinson's disease and gout. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2015;2(3):302–6.
26. Ascherio A, Lewitt PA, Xu K, Ph D, Eberly S, Watts A, Matson WR, Ph D, Marras C, Kieburtz K, Rudolph A, Ph D, Bogdanov MB, Schwid SR, Tennis M, Tanner CM, Ph D, Beal MF, Lang AE, Oakes D, Ph D, Fahn S, Shoulson I, Schwarzschild MA, Ph D. Urate as a predictor of the rate of clinical decline in Parkinson disease. *Archives of Neurology*. 2009;66(12):1460–8.
27. Toncev G, Milicic B, Toncev S, Samardzic G. Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients correlate with activity of disease and blood-brain barrier dysfunction. *European Journal of Neurology*. 2002;9(3):221–6.
28. Hooper DC, Scott GS, Zborek A, Mikheeva T, Kean RB, Koprowski H, Spitsin S V. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood–CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *The FASEB Journal*. 2000;14(5):691–8.
29. Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, Champion JM, Dickson GM, Chaudhry I, Koprowski H. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(2):675–80.

30. Scheepers LEJM, Jacobsson LTH, Kern S, Johansson L, Dehlin M, Skoog I. Urate and risk of Alzheimer's disease and vascular dementia: A population-based study. *Alzheimer's and Dementia*. 2019;15(6):754–63.
31. Keizman D, Ish-shalom M, Berliner S, Maimon N, Vered Y, Artamonov I, Tseheri J, Nefussy B, Droy VE. Low uric acid levels in serum of patients with ALS: further evidence for oxidative stress? *Journal of the Neurological Sciences*. 2009;285(1–2):95–9.
32. Yasutake Y, Tomita K, Higashiyama M, Furuhashi H, Shirakabe K, Takajo T, Maruta K, Sato H, Narimatsu K, Yoshikawa K, Okada Y, Kurihara C, Watanabe C, Komoto S, Nagao S, Matsuo H, Miura S, Hokari R. Uric acid ameliorates indomethacin-induced enteropathy in mice through its antioxidant activity. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2017;32(11):1839–45.
33. Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H, Atsushi Toyoda, Takami H, Morita H, Sharma VK, Srivastava TP, Taylor TD, Noguchi H, Mori H, Ogura Y, Ehrlich DS, Itoh K, Takagi T, Sakaki Y, Hayashi T, Hattori M. Comparative Metagenomics Revealed Commonly Enriched Gene Sets in Human Gut Microbiomes. *DNA RESEARCH*. 2007;14(4):169–81.
34. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Peter J, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006;312(5778):1355–9.
35. Goldstein JAYL, Eisen GM, Lewis B, Gralnek IANM, Zlotnick S, JOHN G. FORT. Video Capsule Endoscopy to Prospectively Assess Small Bowel Injury With Celecoxib, Naproxen Plus Omeprazole, and Placebo. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2005;3(2):133–41.
36. Maiden L. Capsule endoscopic diagnosis of nonsteroidal antiinflammatory drug-

- induced enteropathy. *Journal of Gastroenterology*. 2009;44(Suppl19):64–71.
37. Reuter BK, Davies NM, Wallace JL. Nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy in rats: role of permeability, bacteria, and enterohepatic circulation. *Gastroenterology*. 1997;112(1):109–17.
38. Yoshikawa K, Kurihara C, Furuhashi H, Takajo T, Maruta K, Yasutake Y, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Higashiyama M, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Nagao S, Miura S, Tajiri H, Hokari R. Psychological stress exacerbates NSAID-induced small bowel injury by inducing changes in intestinal microbiota and permeability via glucocorticoid receptor signaling. *Journal of Gastroenterology*. 2017;52(1):61–71.
39. Maity P, Bindu S, Dey S, Goyal M, Alam A, Pal C, Mitra K, Bandyopadhyay U. Indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug, develops gastropathy by inducing reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathology and associated apoptosis in gastric mucosa: A novel role of mitochondrial aconitase oxidation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(5):3058–68.
40. Watanabe T, Higuchi K, Kobata A, Nishio H, Tanigawa T, Shiba M, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Asahara T, Nomoto K, Takeuchi K, Arakawa T. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent. *Gut*. 2008;57(2):181–7.
41. Wallace JL, Syer S, Denou E, Palma GDE, Vong L, Mcknight W, Jury J, Bolla M, Bercik P, Collins SM, Verdu E, Ongini E. Proton Pump Inhibitors Exacerbate NSAID-Induced Small Intestinal Injury by Inducing Dysbiosis. *Gastroenterology*. 2011;141(4):1314–22.
42. Muraki M, Fujiwara Y, Machida H, Okazaki H, Sogawa M, Yamagami H, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe K, Tominaga K, Watanabe T, Arakawa T. Role

- of small intestinal bacterial overgrowth in severe small intestinal damage in chronic non-steroidal anti-inflammatory drug users. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2014;49(3):267–73.
43. Haberman Y, Tickle TL, Dexheimer PJ, Kim M, Tang D, Karns R, Baldassano RN, Noe JD, Rosh J, Markowitz J, Heyman MB, Griffiths AM, Crandall W V, Mack DR, Baker SS, Huttenhower C, Keljo DJ, Hyams JS, Kugathasan S, Walters TD, Aronow B, Xavier RJ, Gevers D, Denson LA. Pediatric Crohn disease patients exhibit specific ileal transcriptome and microbiome signature. *The Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(8):3617–33.
44. Nagao-kitamoto H, Shreiner AB, Iii MGG, Kitamoto S, Ishii C, Hirayama A, Kuffa P, El-zaatari M, Grasberger H, Seekatz AM, Higgins PDR, Young VB, Fukuda S, Kao JY, Nobuhiko K. Functional Characterization of Inflammatory Bowel Disease-Associated Gut Dysbiosis in Gnotobiotic Mice. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2016;2(4):468–81.
45. Weiss GA, Hennet T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017;74(16):2959–77.
46. Wong T. Smog induces oxidative stress and microbiota disruption. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2017;25(2):235–44.
47. Scott GS, Spitsin S V., Kean RB, Mikheeva T, Koprowski H, Hooper DC. Therapeutic intervention in experimental allergic encephalomyelitis by administration of uric acid precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(25):16303–8.
48. 日本臨床化学会, 試薬専門委員会. HPLCを用いる尿酸測定勧告法. *臨床化学*. 1993;22(4):300–7.
49. Tanaka R, Miyata Y, Sakazaki F. An Improved, Highly Sensitive HPLC-based

- Method for Determining Uric Acid Levels in Microliter Plasma Volumes. *Gout and Nucleic Acid Metabolism*. 2013;37(2):117–25.
50. Morimoto M, Hashimoto T, Taisuke K, Kyotani S. Impact of Oxidative Stress and Newer Antiepileptic Drugs on the Albumin and Cortisol Value in Severe Motor and Intellectual Disabilities With Epilepsy. *Journal of the Chinese Medical Association*. 2018;10(2):137–45.
51. Sone R, Matsuba K, Tahara R, Eda N, Kosaki K, Jesmin S, Miyakawa S, Watanabe K. Assessment of Salivary Nitric Oxide Levels in Elite University Athletes in Japan: Findings From a Cross Sectional Study Design. *Journal of Clinical Medicine Research*. 2019;11(2):114–20.
52. Higashimori A, Watanabe T, Nadatani Y, Takeda S, Otani K, Tanigawa T, Yamagami H, Shiba M, Tominaga K, Fujiwara Y, Arakawa T. Mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its role in NSAID-induced enteropathy. *Mucosal Immunology*. 2016;9(3):659–68.
53. Higashiyama M, Hokari R, Kurihara C, Ueda T, Watanabe C, Tomita K, Komoto S, Okada Y, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Indomethacin-induced small intestinal injury is ameliorated by cilostazol, a specific PDE-3 inhibitor. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2012;47(8–9):993–1002.
54. Narimatsu K, Higashiyama M, Kurihara C, Takajo T, Maruta K, Yasutake Y, Sato H, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Nagao S, Miura S, Hokari R. Toll-like receptor (TLR) 2 agonists ameliorate indomethacin-induced murine ileitis by suppressing the TLR4 signaling. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2015;30(11):1610–7.
55. Wu C, Lu Y, Wu L, Yu LC. Role of myosin light chain kinase in intestinal epithelial barrier defects in a rat model of bowel obstruction. *BMC*

- Gastroenterology. 2010;10(39).
56. Tomita T, Sadakata H, Tamura M, Matsui H. Indomethacin-induced generation of reactive oxygen species leads to epithelial cell injury before the formation of intestinal lesions in mice. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2014;65(3):435–40.
 57. Balfour Sartor R, Wu GD. Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology*. 2017;152(2):327–39.
 58. Jinno S, Toshimitsu T, Nakamura Y, Kubota T, Igoshi Y, Ozawa N, Suzuki S, Nakano T, Morita Y, Arima T, Yamaide F, Kohno Y, Masuda K, Shimojo N. Maternal Prebiotic Ingestion Increased the Number of Fecal Bifidobacteria in Pregnant Women but Not in. *Nutrients*. 2017;9(3):196.
 59. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gormley N, Gilbert JA, Smith G, Knight R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*. 2012;6(8):1621–4.
 60. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich K, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Jeremy E, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*. *Nature methods*. 2010;7(5):335–6.
 61. Vos WM De, Vos EAJ De. Role of the intestinal microbiome in health and disease : from correlation to causation. *Nutrition reviews*. 2012;70(Suppl 1):S45–56.

62. Shen Z, Zhu C, Quan Y, Yuan W, Wu S, Yang Z. Update on intestinal microbiota in Crohn ' s disease 2017 : Mechanisms , clinical application , adverse reactions , and outlook. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2017;32(11):1804–12.
63. Kent TH, Cardelli RM, Stamler FW. Small intestinal ulcers and intestinal flora in rats given indomethacin. *American Journal of Pathology*. 1969;54(2):237–49.
64. Gregory JC, Buffa JA, Org E, Wang Z, Levison BS, Zhu W, Wagner MA, Bennett BJ, Li L, Didonato JA, Lusic AJ, Hazen SL. Transmission of Atherosclerosis Susceptibility with Gut Microbial Transplantation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(9):5647–60.
65. Collins SM. Stress and the gastrointestinal tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: Basic mechanisms and clinical relevance. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2001;280(3):G315–8.
66. Furuhashi T, Sugitate K, Nakai T, Jikumaru Y, Ishihara G. Rapid profiling method for mammalian feces short chain fatty acids by GC- MS. *Anal Biochem*. 2018;543:51–4.
67. Roumeliotis S, Roumeliotis A, Dounousi E, Eleftheriadis T, Liakopoulos V. Dietary Antioxidant Supplements and Uric Acid in Chronic Kidney Disease : A Review. *Nutrients*. 2019;11(8).
68. Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T, Akira S. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nature Immunology*. 2013;14(5):454–60.
69. Higuchi K, Umegaki E, Watanabe T, Yoda Y, Morita E, Murano M, Tokioka S, Arakawa T. Present status and strategy of NSAIDs-induced small bowel injury.

- Journal of Gastroenterology. 2009;44(9):879–88.
70. Kim YJ, Kim EH, Hahm KB. Oxidative stress in inflammation-based gastrointestinal tract diseases: Challenges and opportunities. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2012;27(6):1004–10.
 71. Shin HS, Satsu H, Bae M-J, Totsuka M, Shimizu M. Catechol Groups Enable Reactive Oxygen Species Scavenging-Mediated Suppression of PKD-NFkappaB-IL-8 Signaling Pathway by Chlorogenic and Caffeic Acids in Human Intestinal Cells. *Nutrients*. 2017;9(2):165.
 72. Hiramatsu Y, Satho T, Irie K, Shiimura S, Okuno T, Sharmin T, Uyeda S, Fukumitsu Y, Nakashima Y, Miake F, Kashige N. Differences in TLR9-dependent inhibitory effects of H₂O₂-induced IL-8 secretion and NF-kappa B / I kappa B-alpha system activation by genomic DNA from five *Lactobacillus* species. *Microbes and Infection*. 2013;15(2):96–104.
 73. Frank DN, Amand ALS, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(34):13780–5.
 74. Heeney DD, Gareau MG, Marco ML. Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? *Current Opinion in Biotechnology*. 2018;49:140–7.
 75. Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G, Johnstone AM, Flint HJ, Lobley GE, Al DET, Icrobiol APPLNM. Reduced Dietary Intake of Carbohydrates by Obese Subjects Results in Decreased Concentrations of Butyrate and Butyrate-Producing Bacteria in Feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(4):1073–8.

76. Ijssennagger N, Meer R Van Der, Mil SWC Van. Sulfide as a Mucus Barrier-Breaker in Inflammatory Bowel Disease? Trends in Molecular Medicine. 2016;22(3):190–9.

図 表

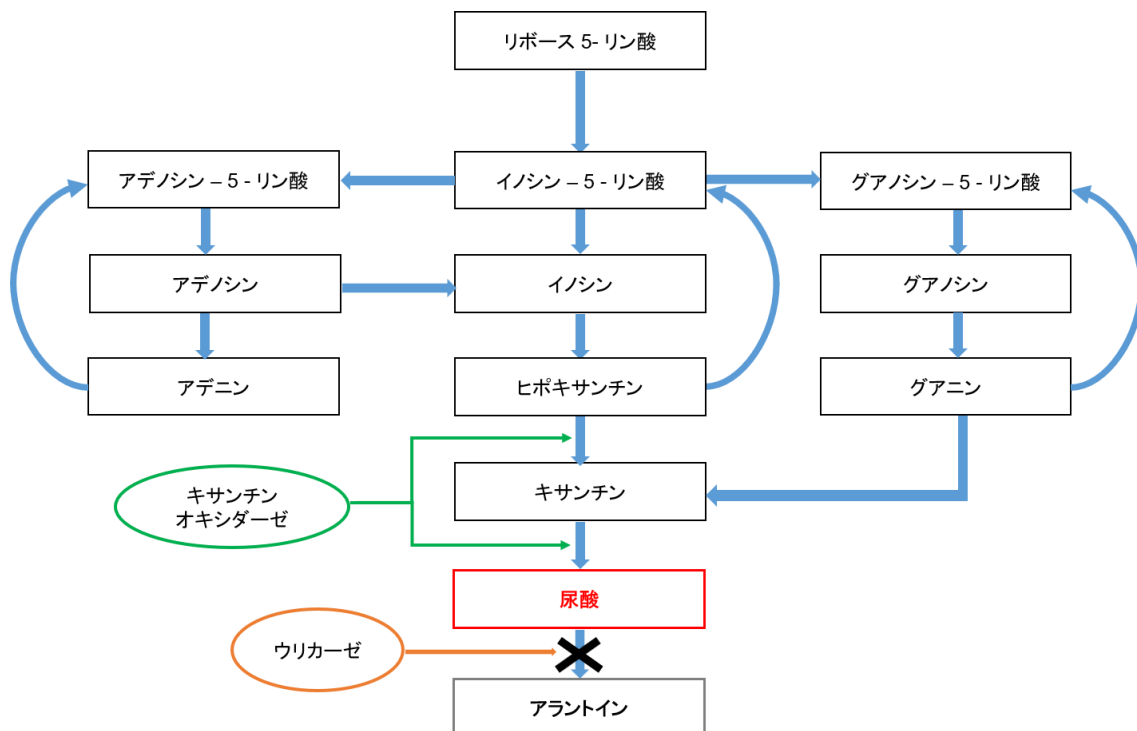


図1 ヒトにおける尿酸の代謝経路

食事摂取や体内で合成されたプリン体はキサンチンオキシダーゼによりヒポキサンチン、キサンチンを介して尿酸へと代謝される。ほとんどの哺乳類はウリカーゼによりさらにアラントインに代謝されるが、ヒトは進化の過程でウリカーゼを喪失しており、尿酸を代謝できなくなった。

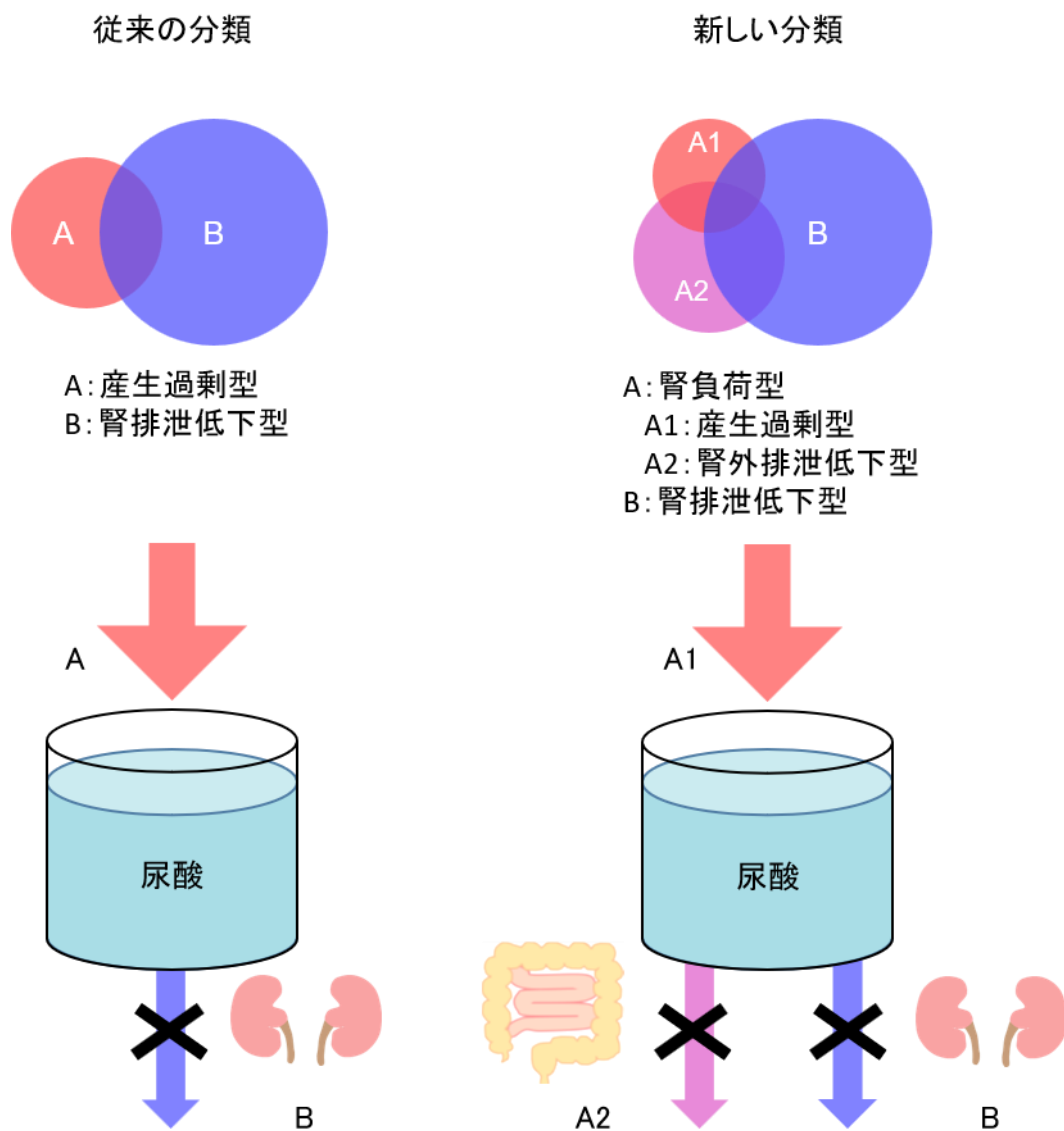


図2 ABCG2 の機能低下による高尿酸血症の成因分類

従来高尿酸血症の成因は産生過剰型（A）と腎排泄低下型（B）に分類されていたが ABCG2 の機能低下型の存在により従来産生過剰型と考えられていた病型には真の産生過剰型（A1）と腎外排泄低下型（A2）が存在することが明らかとなった。（文献 11 を改変）

ABCG2 : ATP-binding cassette transporter sub-family G member 2

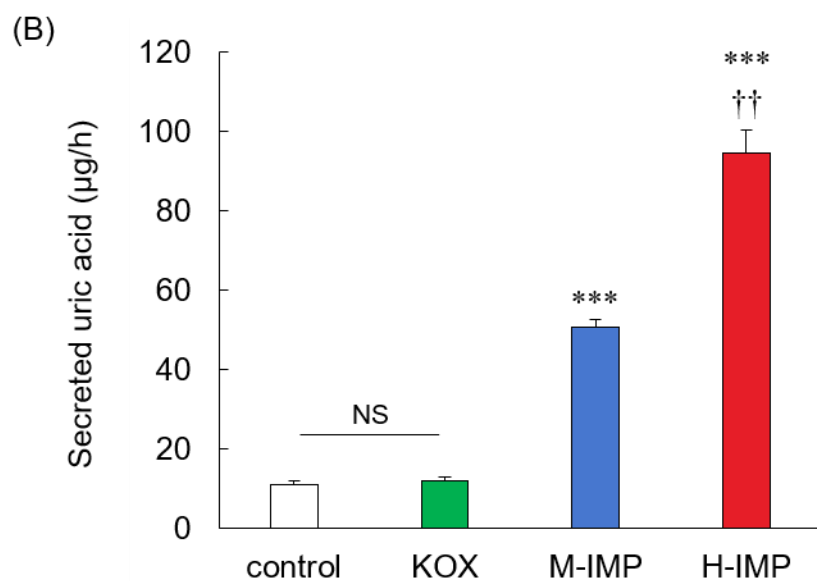
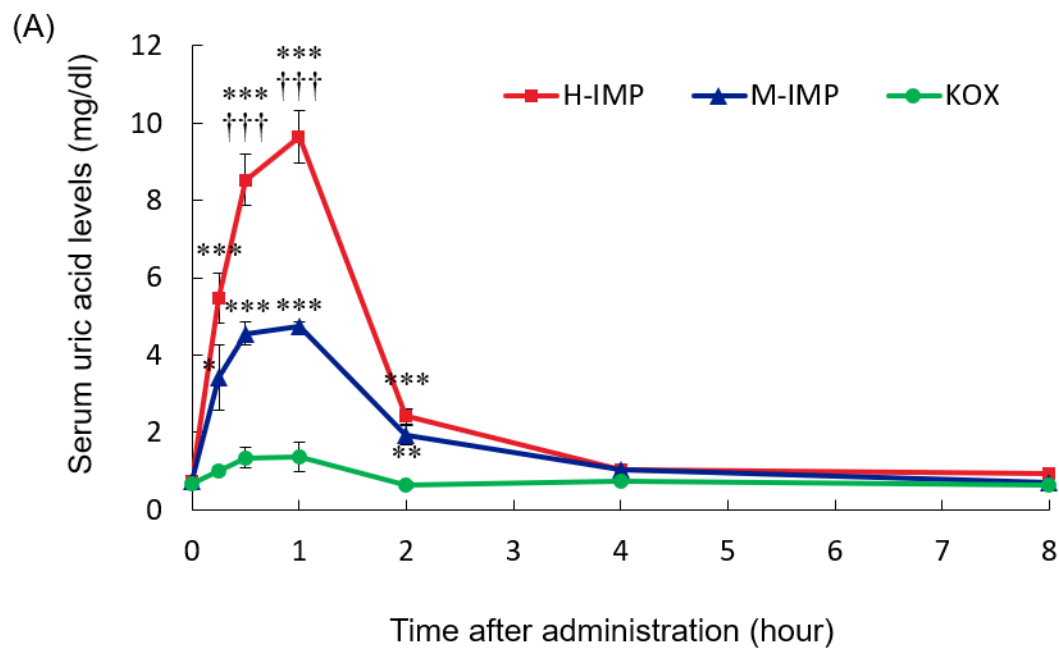


図3 血中尿酸値と腸管内への尿酸分泌量

KOX 250 mg/kg を単独投与した群を KOX 群, KOX 250 mg/kg と IMP 500 mg/kg を投与した群を M-IMP 群, KOX 250 mg/kg と IMP 1000 mg/kg を投与した群を H-IMP 群とした (各群 n = 6). vs KOX 群 : * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, vs M-IMP 群 : †† p < 0.01, ††† p < 0.001.

(A) 血中尿酸値の推移

KOX 群では血中尿酸値の上昇は軽度であったが、M-IMP 群および H-IMP 群では血中尿酸値は著明に上昇した。M-IMP 群および H-IMP 群では投与から 1 時間後がピークとなり、4 時間後にはほぼ投与前と同程度の値になった。

(B) 腸管内への尿酸分泌量

KOX 群では腸管内への尿酸分泌は変化しなかったが、M-IMP 群と H-IMP 群では著明に増加した。また、M-IMP 群に比して H-IMP 群の分泌量が有意に多かった。

NS : not significant, KOX : potassium oxonate, IMP : Inosine 5' - monophosphate disodium salt hydrate

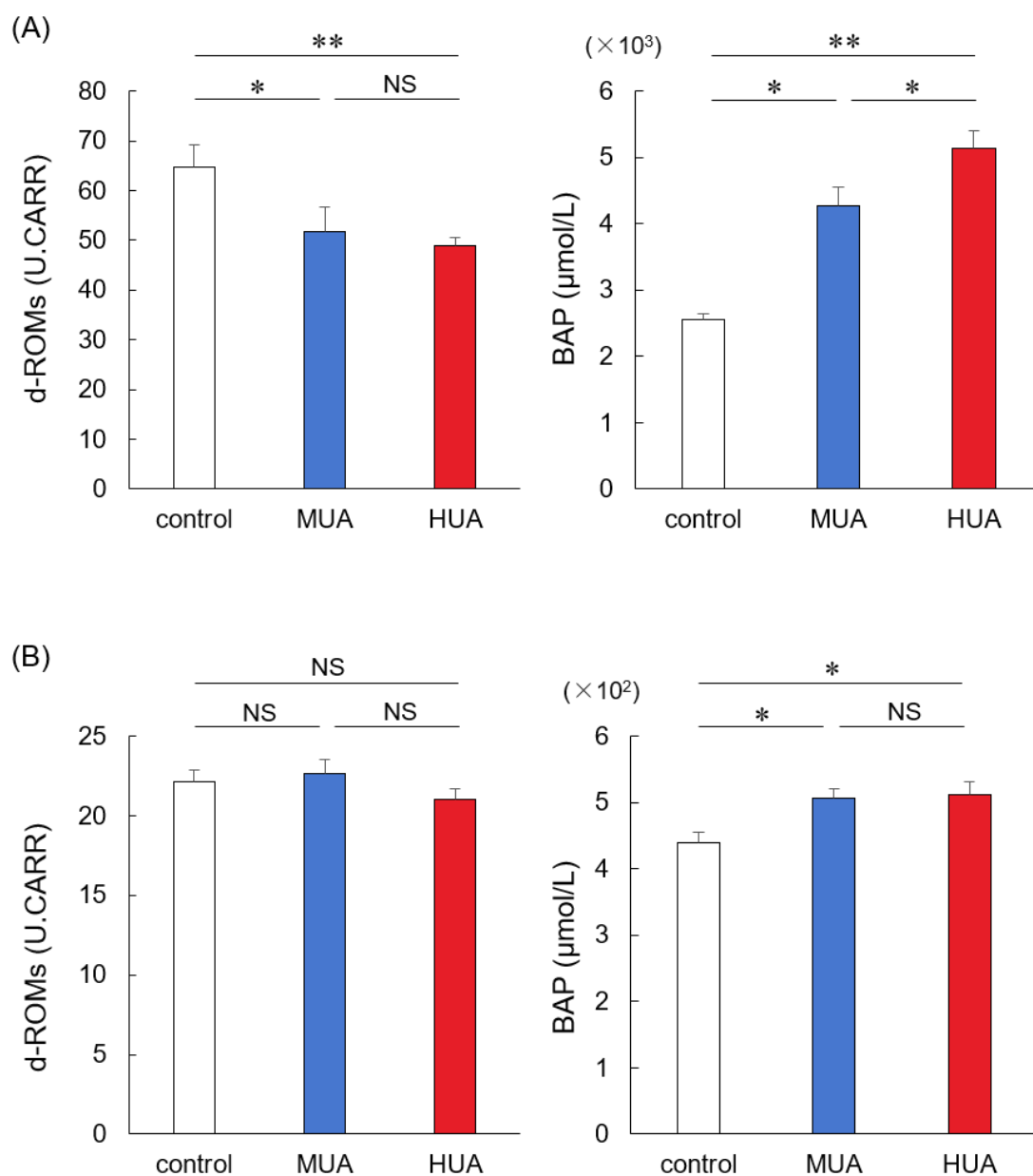


図4 血中および腸管内の抗酸化度

対照群を control 群, KOX 250 mg/kg と IMP 500 mg/kg を投与した群を MUA 群, KOX 250 mg/kg と IMP 1000 mg/kg を投与した群を HUA 群とした (各群 n = 6). *p < 0.05, **p < 0.01.

(A) 血中抗酸化度の比較

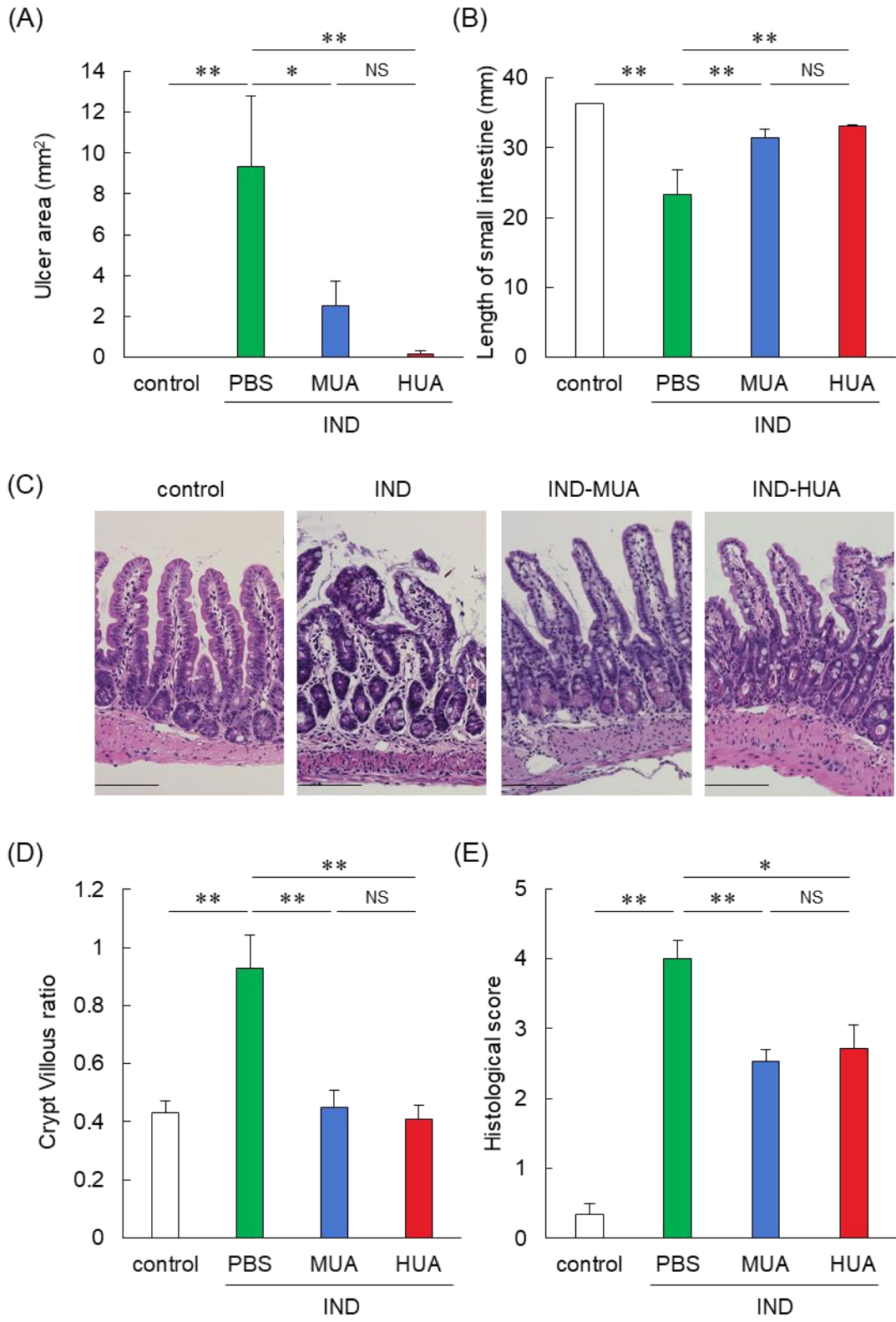
酸化ストレスマーカーである d-ROMs は control 群に対し MUA 群および HUA 群で有意に低かったが, MUA 群と HUA 群間では有意差を認めなかつ

た。抗酸化マーカーである BAP は control 群に対し MUA 群および HUA 群で有意に高く，また MUA 群に対し HUA 群で有意に高かった。

(B) 腸管灌流液の抗酸化度の比較

d-ROMs はいずれの群間でも有意差を認めなかった。BAP は control 群に対し MUA 群および HUA 群で有意に高かったが，MUA 群と HUA 群では有意差を認めなかった。

NS : not significant, KOX : potassium oxonate, IMP : Inosine 5' - monophosphate disodium salt hydrate, d-ROMs : diacron reactive oxygen metabolites, BAP : biological antioxidant potential



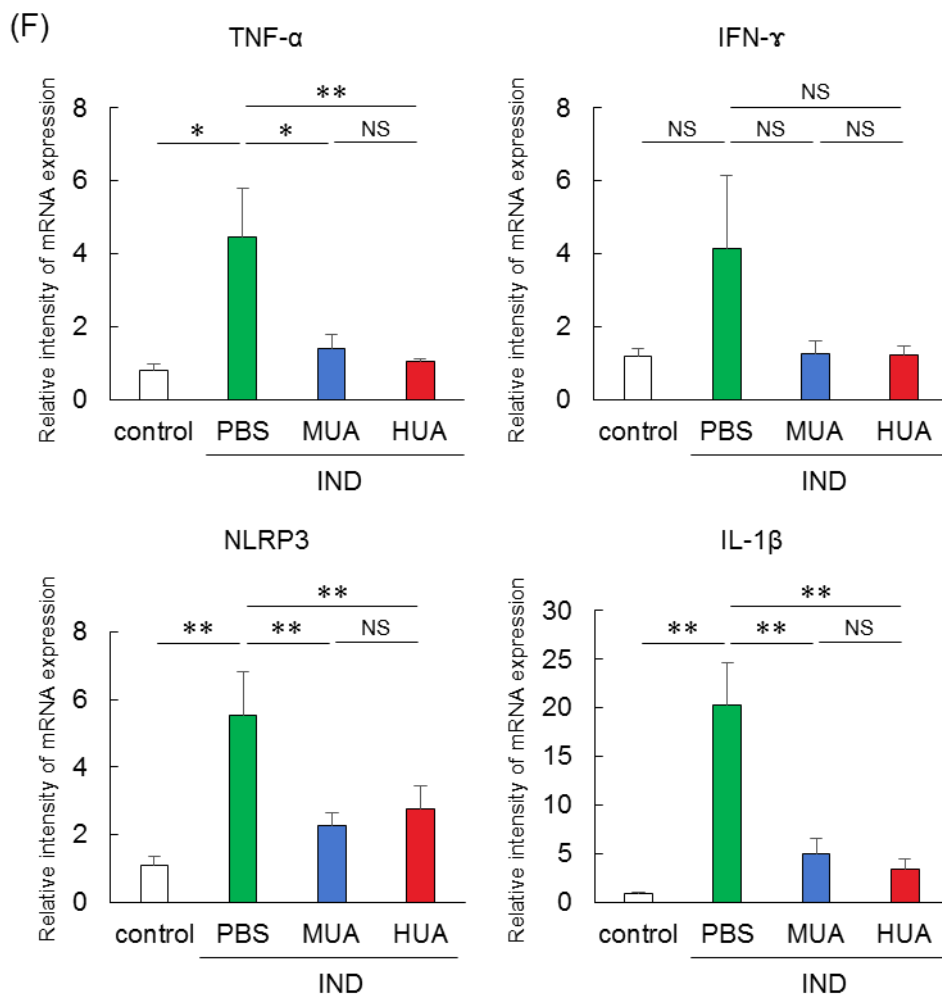


図5 尿酸がIND腸炎に与える影響

対照群をcontrol群, INDおよびPBSを投与した群をIND群, INDおよびKOX 250 mg/kg, IMP 500 mg/kgを投与した群をIND-MUA群, INDおよびKOX 250 mg/kg, IMP 1000 mg/kgを投与した群をIND-HUA群とした(各群 n = 6). *p < 0.05, **p < 0.01.

(A) 潰瘍面積の比較

潰瘍面積はcontrol群に比してIND群で有意に大きく, IND-MUA群およびIND-HUA群ではIND群と比較し有意に小さかった. また, IND-MUA群とIND-HUA群間で有意差を認めなかった.

(B) 腸管長の比較

腸管長は control 群に比して IND 群で有意に短く, IND-MUA 群および IND-HUA 群では IND 群と比較し有意に長かった. また, IND-MUA 群と IND-HUA 群間で有意差を認めなかった.

(C) 回腸のヘマトキシリン・エオジン染色像

左から順に control 群, IND 群, IND-MUA 群, IND-HUA 群である.

(bar = 100 μ m).

(D) crypt villous ratio の比較

crypt villous ratio は control 群と比較し IND 群で有意に高く, IND-MUA 群および IND-HUA 群では IND 群と比較し有意に低かった. また, IND-MUA 群と IND-HUA 群間で有意差を認めなかった.

(E) 組織学的スコアの比較

組織学的スコアは control 群と比較し IND 群で有意に高く, IND-MUA 群および IND-HUA 群では IND 群と比較し有意に低かった. また, IND-MUA 群と IND-HUA 群間で有意差を認めなかった.

(F) 炎症性サイトカインおよびインフラマソームの mRNA の比較

TNF- α , NLRP3, IL-1 β の発現量は IND 群で有意に多く, IND 群と比較して IND-MUA 群と IND-HUA 群では有意に少なかった. また, IND-MUA 群と IND-HUA 群間で有意差を認めなかった. IFN- γ の発現量は各群間で有意差を認めなかった.

NS : not significant, PBS : phosphate-buffered saline, IND : indomethacin, IFN-

γ : interferon γ , NLRP3 : NLR family pyrin domain containing 3, IL-1 β :

Interleukin 1 β , mRNA : messenger ribonucleic acid

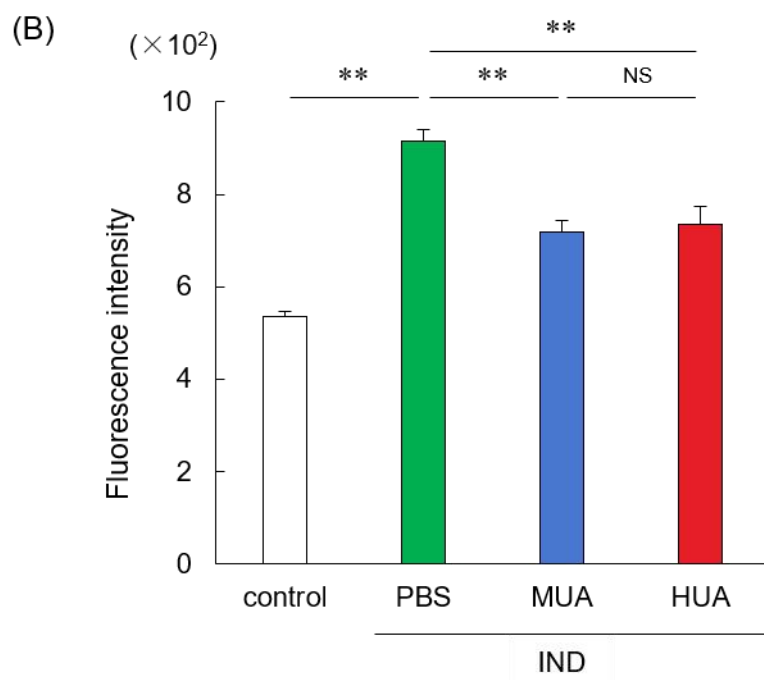
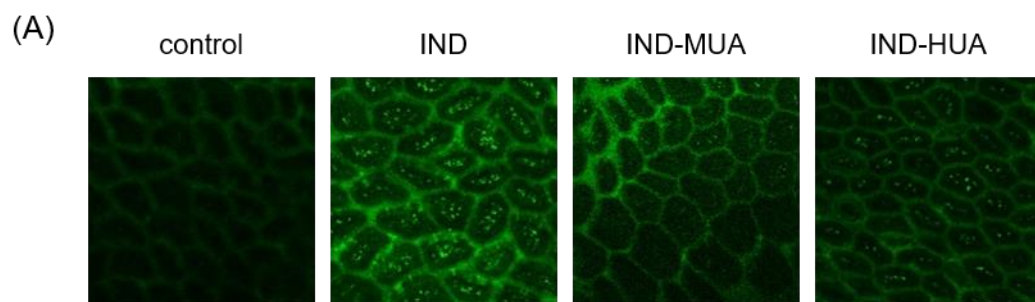


図6 IND腸炎における回腸の活性酸素種の比較

対照群を control 群, IND および PBS を投与した群を IND 群, IND および KOX 250 mg/kg, IMP 500 mg/kg を投与した群を IND-MUA 群, IND および KOX 250 mg/kg, IMP 1000 mg/kg を投与した群を IND-HUA 群とした (各群 $n = 6$). ** $p < 0.01$.

(A) 蛍光顕微鏡画像

APF を用いた回腸の蛍光顕微鏡画像を示す. 左から順に control 群, IND 群, IND-MUA 群, IND-HUA 群である. (約 0.3 mm^2 /視野).

(B) 蛍光強度による活性酸素種産生量の比較

APF の蛍光強度（活性酸素種の産生量）を定量化したところ、control 群に対し IND 群で有意に高かった。また、IND 群と比較して IND-MUA 群と IND-HUA 群で有意に低かった。IND-MUA 群と IND-HUA 群間で有意差を認めなかった。

NS : not significant, IND : indomethacin, PBS : Phosphate-buffered saline,

KOX : potassium oxonate, IMP : Inosine 5' - monophosphate disodium salt hydrate,

APF : Aminophenyl fluorescein.

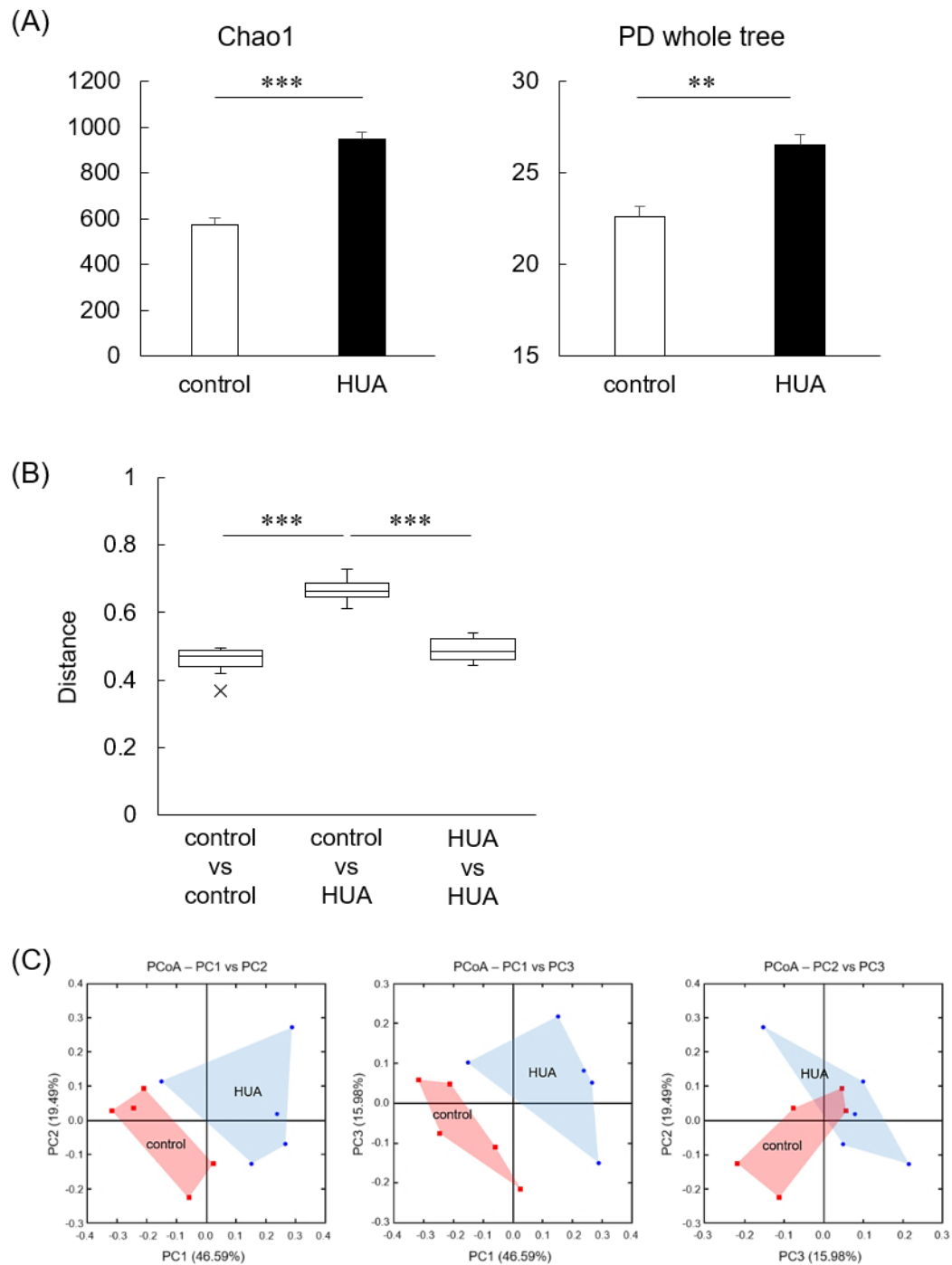


図7 腸内細菌叢の多様性の比較

KOX 250 mg/kg と IMP 1000 mg/kg の腹腔内投与を 12 時間毎に計 7 日間実施した高尿酸群を HUA 群, PBS を投与した対照群を control 群とした (各群 n = 5). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

(A) Chao1 および PD whole tree を用いた α 多様性の比較

Chao1 および PD whole tree のいずれにおいても, control 群に比して HUA 群が有意に高かった.

(B) UniFrac 距離の比較による β 多様性の評価

control 群と HUA 群間の距離が control 群内および HUA 群内の距離に比して有意に高かった.

(C) 主座標分析

各サンプルにおいて UniFrac 距離解析を行った際の主座標分析の結果を示す. control 群は■, HUA 群は●でプロットしている.

PD whole tree : phylogenetic diversity whole tree, PCoA : principal coordinate analysis, KOX : potassium oxonate, IMP : Inosine 5' - monophosphate disodium salt hydrate, PBS : Phosphate-buffered saline

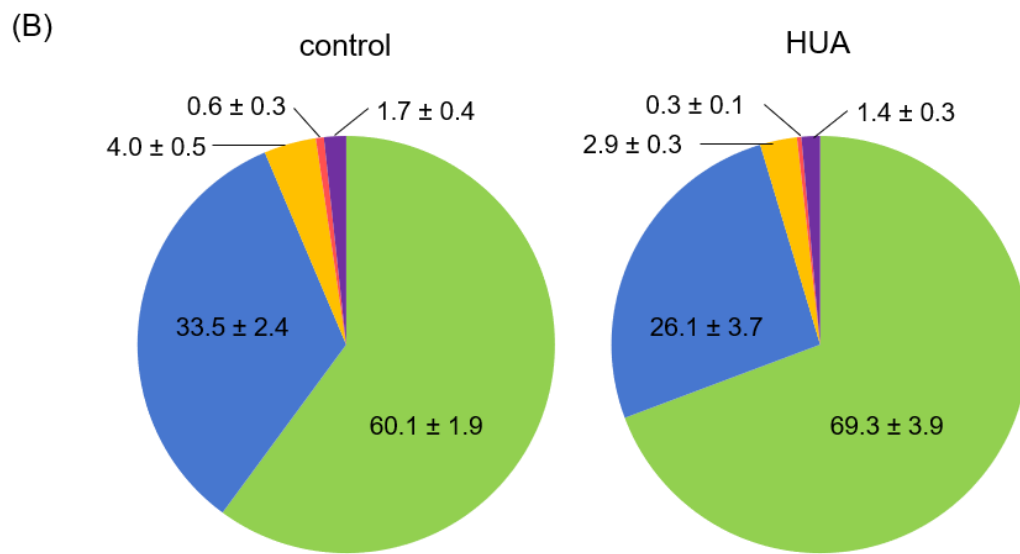
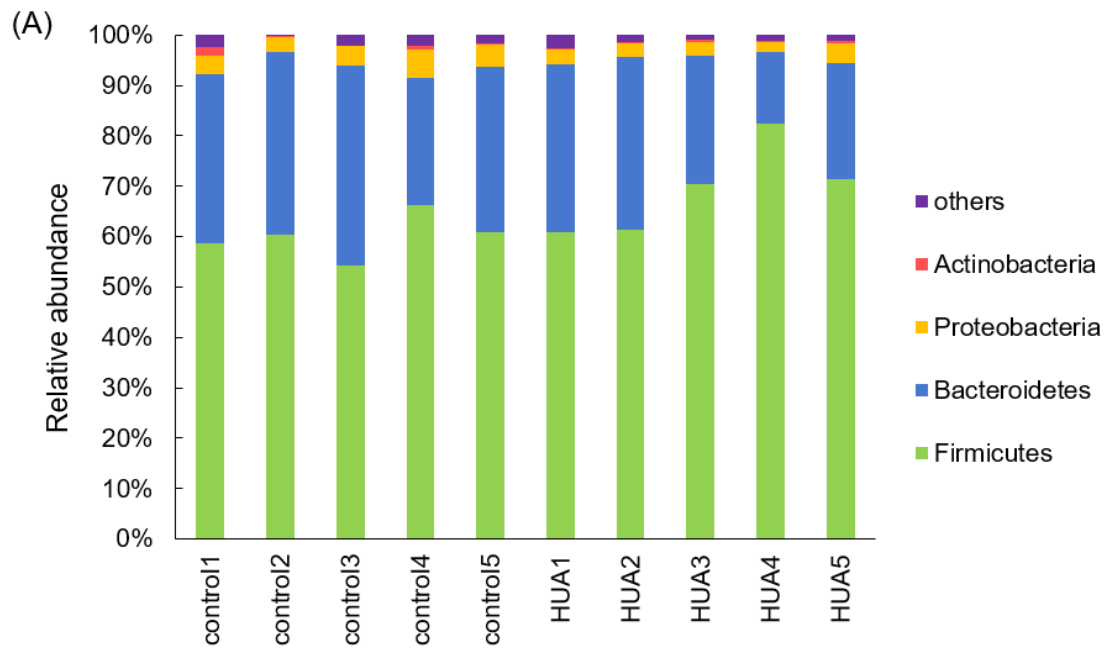


図 8 腸内細菌叢の門レベルでの相対豊富

(A) 各個体における門レベルの相対豊富

(B) 各群における門レベルの相対豊富の比較

両群間で門レベルの相対豊富に有意な差は認めなかった。

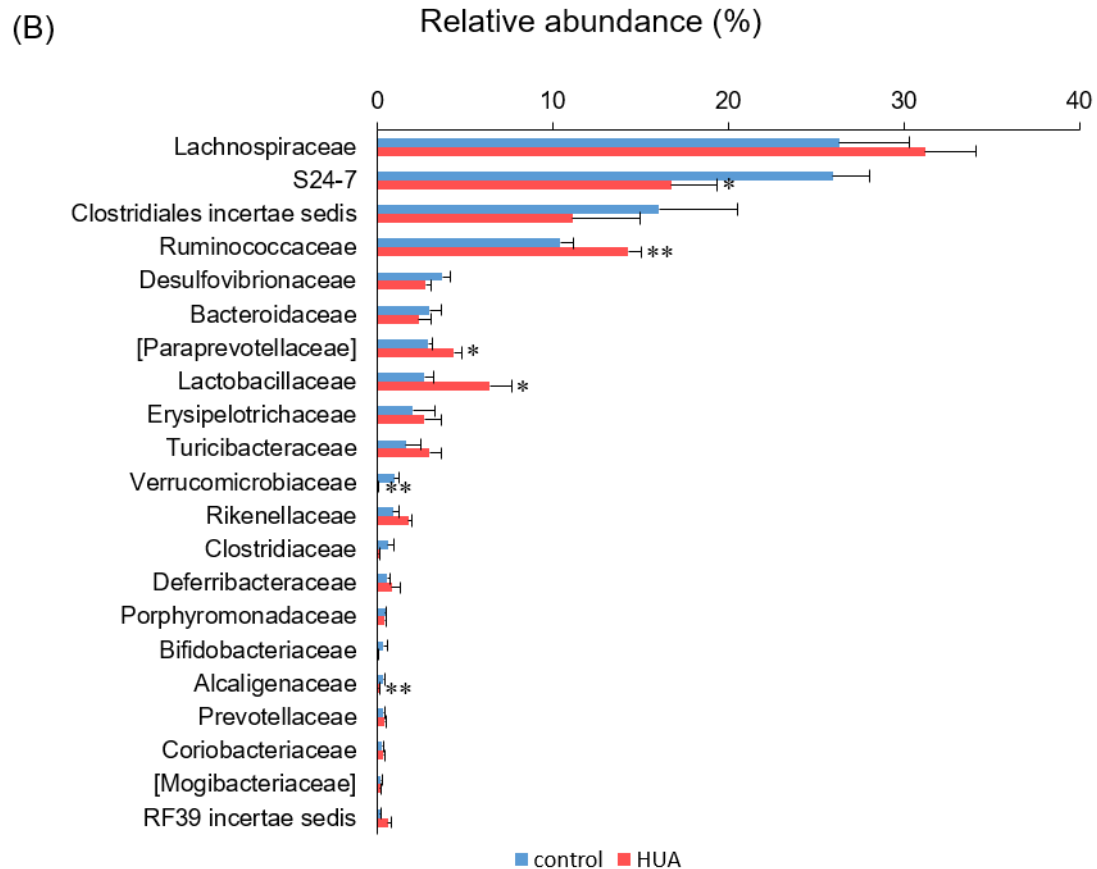
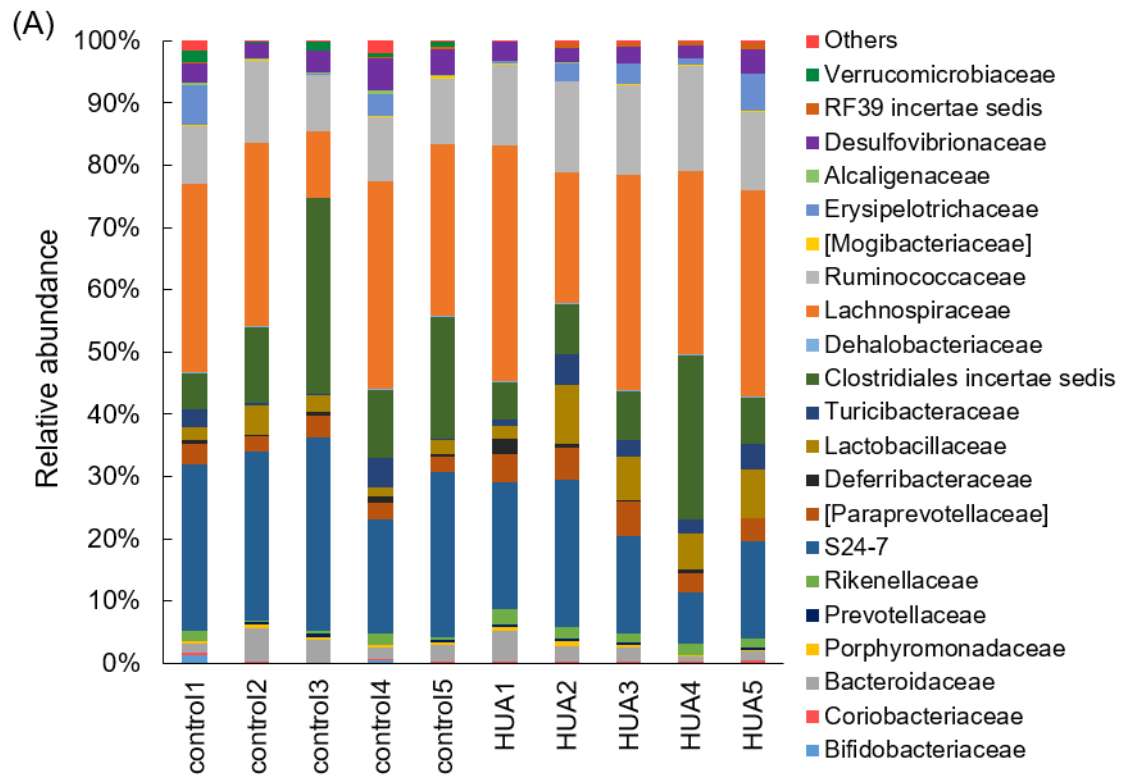


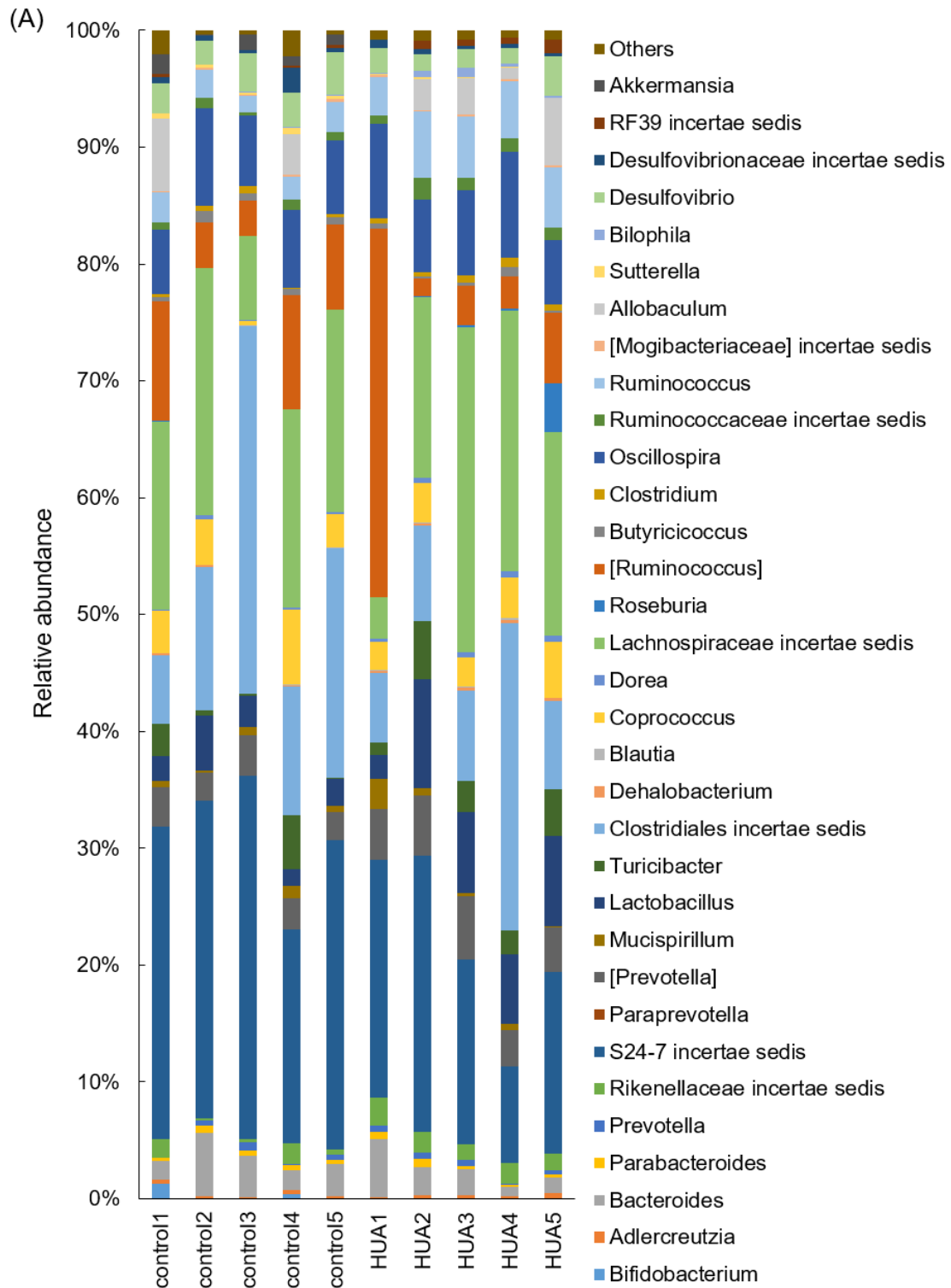
図9 腸内細菌叢の科レベルでの相対豊富

(A) 各個体における科レベルの相対豊富

(B) 各群における科レベルの相対豊富の比較

存在比率 0.1%以上の上位 21 科では, S24-7, *Verrucomicrobiaceae*,
Alcaligenaceae は, HUA 群において相対豊富が有意に低値であった. 一
方, *Ruminococcaceae*, †[*Paraprevotellaceae*], *Lactobacillaceae* は HUA 群で有
意に高値であった. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

†: QIIME 解析時, Greengenes database で Bacteroidales 目 *Paraprevotellaceae*
科として分類, 所属位置不明.



(B)

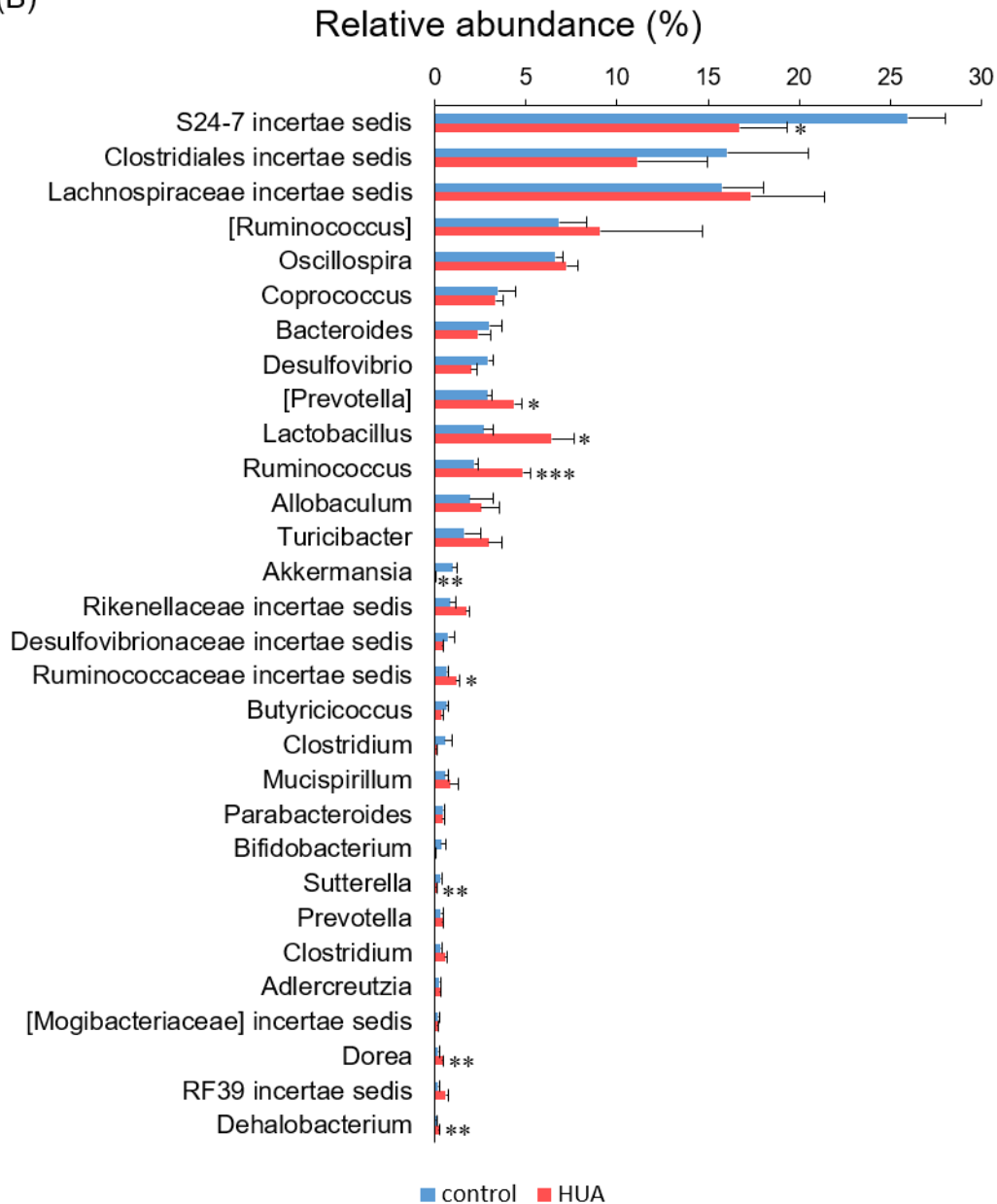


図 10 腸内細菌叢の属レベルでの相対豊富さ

(A) 各個体における属レベルの相対豊富さ

(B) 各群における属レベルの相対豊富さの比較

存在比率0.1%以上の上位31属の解析では, *S24-7 incertae sedis*, *Akkermansia*, *Sutterella* は, HUA 群において相対豊富さが有意に低値であった. 一方で, ††[*Prevotella*], *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Ruminococcaceae incertae sedis*,

Dorea, *Dehalobacterium* は HUA 群において有意に高値であった. * $p < 0.05$,

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

†† : QIIME 解析時, Greengenes database により Bacteroidales 目

Paraprevotellaceae 科 *Prevotella* 属として分類, 所属位置不明.

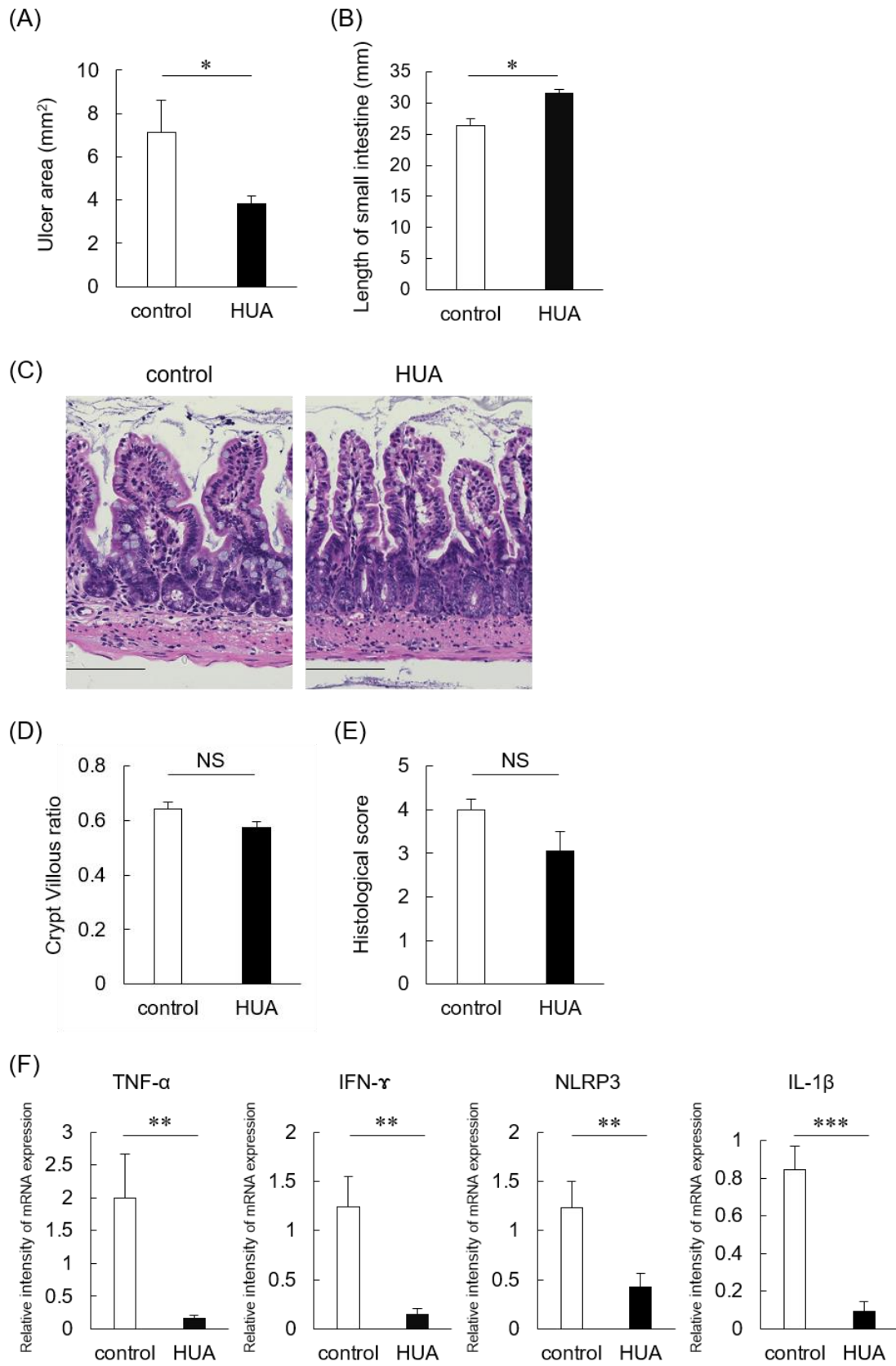


図 11 腸内細菌叢が IND 腸炎に与える影響

PBS を投与したマウスから FMT した群を control 群, 高尿酸モデルマウスから FMT した群を HUA 群とした (各群 n = 6). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

(A) 潰瘍面積の比較

潰瘍面積は HUA 群で有意に小さかった.

(B) 腸管長の比較

腸管長は HUA 群で有意に長かった.

(C) 回腸のヘマトキシリン・エオジン染色像

左から順に control 群, HUA 群である. (bar = 100 μ m).

(D) crypt villous ratio の比較

crypt villous ratio は HUA 群でやや低かったが, 両群間で有意差を認めなかった (p = 0.056).

(E) 組織学的スコアの比較

組織学的スコアは HUA 群でやや低かったが, 両群間で有意差を認めなかった (p = 0.085).

(F) 炎症性サイトカインおよびインフラマソーム

小腸における TNF- α , IFN- γ , NLRP3, IL-1 β の mRNA の発現は HUA 群で有意に低かった.

NS : not significant, PBS : Phosphate-buffered saline, FMT : fecal microbiota transplantation, TNF- α : tumor necrosis factor α , IFN- γ : interferon γ , NLRP3 : NLR family pyrin domain containing 3, IL-1 β : Interleukin 1 β , mRNA : messenger ribonucleic acid

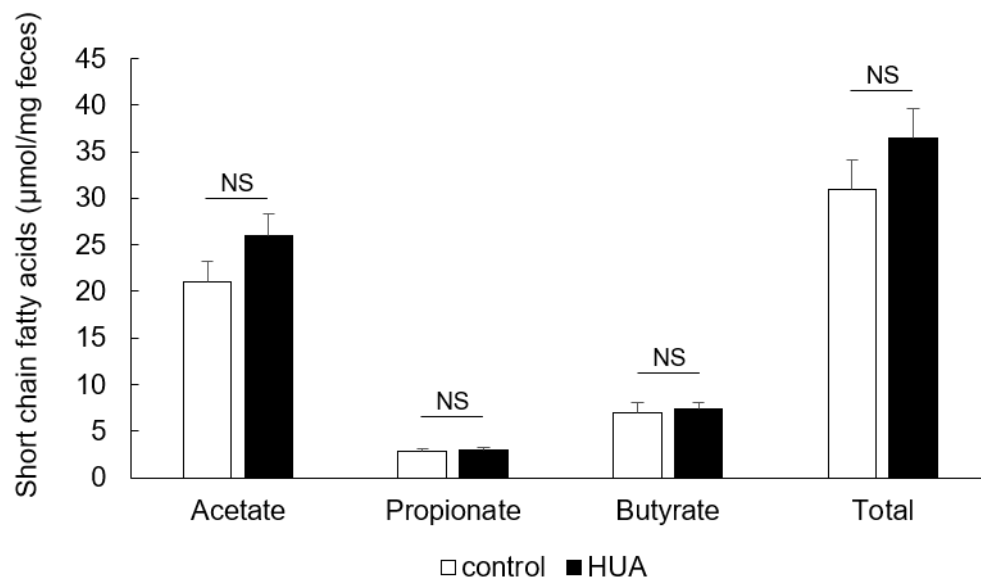


図 12 盲腸便中の短鎖脂肪酸濃度

KOX 250 mg/kg と IMP 1000 mg/kg の腹腔内投与を 12 時間毎に計 7 日間実施した高尿酸群を HUA 群, PBS を投与した対照群を control 群とした (各群 n = 7). 盲腸便中の短鎖脂肪酸 (酢酸, プロピオン酸, 酪酸) の含有量は, control 群と HUA 群間で差を認めなかった.

NS : not significant, KOX : potassium oxonate, IMP : Inosine 5' - monophosphate disodium salt hydrate

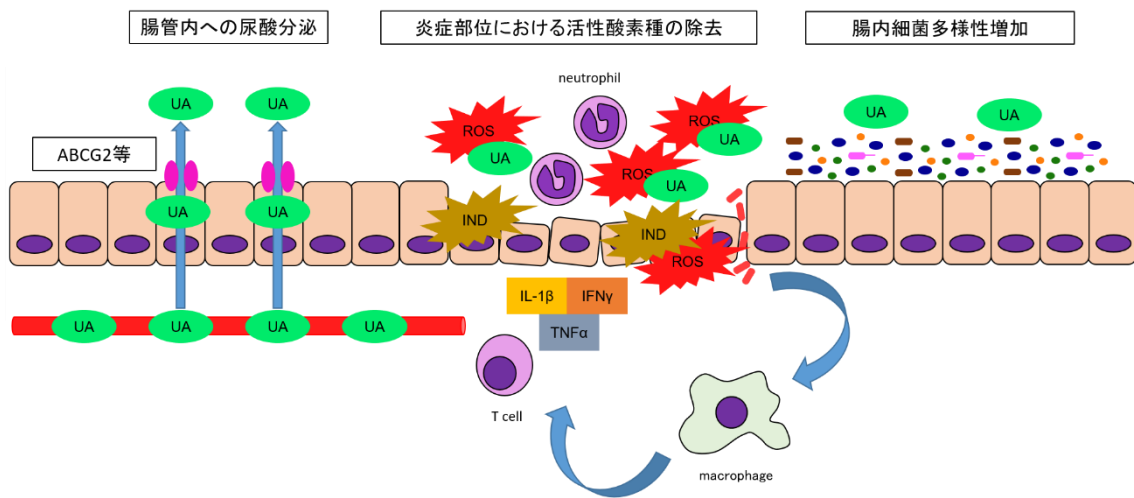


図 13 想定される尿酸の腸管への影響

血中から腸管上皮を介して腸管内へ分泌された尿酸が、炎症によって放出された活性酸素種を除去することで、腸管の活性酸素種による直接的な炎症を防ぎ、また、活性酸素種による腸内細菌叢への影響を減弱することで、dysbiosisを防ぐと考えられる。

UA : uric acid, ABCG2 : ATP-binding cassette transporter sub-family G member 2, IND : indomethacin, ROS : reactive oxygen species, TNF- α : tumor necrosis factor α , IFN- γ : interferon γ , NLRP3 : NLR family pyrin domain containing 3, IL-1 β : Interleukin 1 β