

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	盛田 景介
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 844 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Dynamic changes in basal lamina fenestrations in rat intestinal villous epithelium under high-fat diet condition (高脂肪食によるラット小腸絨毛上皮基底膜の窓の動態変化)
論文審査委員	主査 教授 味岡 洋一 副査 准教授 三上 剛和 副査 教授 寺井 崇二

博士論文の要旨

背景と目的

小腸絨毛上皮の吸収上皮細胞は栄養の吸収において重要であり、各栄養素は細胞頂上部より細胞内へ取り込まれる。上皮細胞どうしの上部はタイト結合で閉じられているが、その下部にはすき間があり、取り込まれた栄養素はこの間隙に単糖、アミノ酸、カイロミクロンとして一度放出された後に、上皮の基底膜を通過して粘膜固有層に入り、単糖やアミノ酸は毛細血管へ、カイロミクロン (脂肪) は中心リンパ管へ回収される。したがって、この基底膜は、吸収された栄養素が上皮から粘膜固有層へ移行する際のバリアとして働くと考えられる。

一方、小腸絨毛では、粘膜固有層から上皮内へ自由細胞 (リンパ球、好酸球、マクロファージなど) が移動することから、絨毛上皮の基底膜に多数の孔 (窓) が生じることが知られている。また、カイロミクロンのサイズは比較的大きい (直径約 100 nm~1 μ m) ため、基底膜を通過する際に、これら基底膜の窓を通過することも報告されている。これまで申請者らは、絶食時および食後においてこの基底膜の窓が動的に変化し、その変化が栄養吸収、特に脂質吸収の調節に関連している可能性を示した。本研究は、この脂質吸収における窓の役割をさらに詳しく解析することを目的とした。

方法

本実験では 10~11 週齢の Wistar 系雄ラットを次の 4 群に分け、20 時間絶食後に普通食を 2 時間摂取 (A 群)、20 時間絶食後に高脂肪食を 2 時間摂取 (B 群)、20 時間絶食後に普通食を 2 日間摂取 (C 群)、20 時間絶食後に高脂肪食を 2 日間摂取 (D 群) とした。ラットは麻酔下で 4%パラホルムアルデヒドを用いて血管灌流固定を行い、上部空腸を採取し実験試料とした。小腸上皮の基本構造は光学顕微鏡を用いたエポン包埋切片の観察により、さらに微細な構造は走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた準超薄切片の観察や透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた超薄切片の観察により解析した。次に、基底膜の窓と通過中の自由細胞を直接可視化するため、試料にオスミウム浸軟処理と超音波処理を施して、上皮細胞を剥離させ基底膜を露出させ、乾燥・金属コーティング後に SEM の反射電子像を取得した。詳細に解析をおこなうためにこの像から絨毛の面積、基底膜の窓数および窓面積を、画像処理ソフトウェア ImageJ を用いて統計解析

を行った。解析には絨毛高さの中央 60%部分を用い、4 群を比較した。

結果

光学顕微鏡像では、高脂肪食群においてカイロミクロンや上皮細胞に吸収された脂肪滴の局在が明瞭で、とくにカイロミクロンは上皮細胞間隙や粘膜固有層に認められた。また切片の SEM 像および TEM 像により、カイロミクロンの分布や、上皮内の自由細胞（リンパ球や好酸球など）の解析が可能であった。

さらに、基底膜を露出させた試料の SEM 反射電子像を解析した結果、単位面積当たりの窓の平均数は、普通食群と高脂肪食群の間に有意差は認められなかった。絨毛単位面積に対する窓面積は、通常食と高脂肪食をそれぞれ 2 時間与えた群の間に有意差は認められなかったが、2 日間の食餌では高脂肪食群で有意に増加した。また、普通食をそれぞれ 2 時間と 2 日間与えた群の間に有意差は認められなかったが、高脂肪食をそれぞれ 2 時間と 2 日間与えた群では、2 日間与えた群で有意に窓面積が増加した。なお高脂肪食を 2 日間摂取した群では、約 4 μm^2 未満の小さな窓が減少し、6 μm^2 を超える大きな窓が増加した。窓を通過する自由細胞の数については、2 時間の時点で高脂肪食摂取群の方が普通食摂取群より有意に多かった。

考察

本研究では食餌条件の変化に伴う基底膜の窓面積、窓数の変化を明らかにするため、普通食もしくは高脂肪食を与えたラットの上部空腸基底膜を SEM で観察した。申請者らの以前の研究では、食餌によって遊走する自由細胞により基底膜の窓が形態変化することを示し、栄養吸収、特に脂質吸収の調節に関係している可能性を示唆した。またこれまでの研究で、普通食 2 時間後に上部空腸で自由細胞が増加することが示されたが、本研究では高脂肪食摂取により、さらに自由細胞が増加することを明らかにした。また高脂肪食 2 日後には窓の面積も増加したことから、高脂肪食摂取が自由細胞の遊走を誘導し、その結果として基底膜の窓面積が増加した可能性が示唆される。

また本研究では、切片像により、高脂肪食 2 時間後の時点で上皮細胞間隙にカイロミクロンが蓄積することが明らかとなった。これは基底膜が実際に上皮細胞間隙と粘膜固有層との間のバリアを形成することを示すもので、基底膜の窓がカイロミクロン等の大きな栄養素の通過に重要な役割を持つことが予想される。また、長期間の高脂肪食摂取により基底膜の窓が拡大することで、脂質吸収の効率が上がる可能性も示唆している。近年は高脂肪食が様々な病態生理学的変化を誘発し、肥満と炎症との関係性が明らかとなっていることから、本研究は、肥満における栄養吸収、特に脂質吸収の分野において新しい知見を与える可能性がある。

審査結果の要旨

小腸絨毛では、粘膜固有層から上皮内へ自由細胞（リンパ球、好酸球、マクロファージなど）が移動することから、絨毛上皮の基底膜に多数の孔（窓）が生じることが知られている。本研究は、この脂質吸収における窓の役割を解析することを目的とした。10~11 週齢の Wistar 系雄ラットを A 群：20 時間絶食後に普通食を 2 時間摂取、B 群：20 時間絶食後に高脂肪食を 2 時間摂取、C 群：20 時間絶食後に普通食を 2 日間摂取、D 群：20 時間絶食後に高脂肪食を 2 日間摂取（D 群）に分け、各群上部空腸の光学顕微鏡所見、走査型電子顕微鏡（SEM）および透過型電子顕微鏡（TEM）所見を解析した。絨毛の面積、基底膜の窓数および窓面積は、画像処理ソフトウェア ImageJ を用いて統計解析

を行った。光学顕微鏡像では、カイロミクロンは上皮細胞間隙や粘膜固有層に認められた。SEM 反射電子像の解析では、単位面積当たりの窓の平均数は、普通食群と高脂肪食群の間に有意差は認められなかった。絨毛単位面積に対する窓面積は、通常食と高脂肪食をそれぞれ 2 時間与えた群の間に有意差は認められなかったが、2 日間の食餌では高脂肪食群で有意に増加した。また、普通食をそれぞれ 2 時間と 2 日間与えた群の間に有意差は認められなかったが、高脂肪食をそれぞれ 2 時間と 2 日間与えた群では、2 日間与えた群で有意に窓面積が増加した。本研究から、高脂肪食摂取により、自由細胞が増加すること、高脂肪食摂取が自由細胞の遊走を誘導し、その結果として基底膜の窓面積が増加する可能性が示唆された。また、高脂肪食 2 時間後の時点で上皮細胞間隙にカイロミクロンが蓄積することが明らかとなった。

以上のことから本研究は、基底膜の窓がカイロミクロン等の大きな栄養素の通過に重要な役割を持つこと、長期間の高脂肪食摂取により基底膜の窓が拡大することで、脂質吸収の効率が上がる可能性を明らかにした点で学位論文としての価値を認める。