

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	安住 里映
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 783 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	Dynamics of basal lamina fenestrations in the rat intestinal villous epithelium in response to dietary conditions (食餌によるラット小腸絨毛上皮基底膜の孔の動態変化)
論文審査委員	主査 教授 味岡 洋一 副査 准教授 横山 純二 副査 教授 寺井 崇二

博士論文の要旨

背景・目的：小腸の絨毛を被う上皮は単層円柱の上皮細胞とそれを支えるシート状の基底膜からなり、栄養の吸収や有害物質のバリアとして役立っている。とくに小腸上皮の主体をなす吸収上皮細胞は、細胞頂上部から栄養素を細胞内に取りこみ、細胞側面ないし基底側から放出しており、こののちに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ことになる。また、小腸上皮にはしばしば白血球 (リンパ球など) が迷入しており、これらの細胞が基底膜を貫く際に、基底膜に孔 (窓) ができることが知られている。本研究では、上皮に吸収された栄養素が毛細血管や中心リンパ管に吸収される際に基底膜を通過しなければならない点に着目し、この基底膜の窓が食餌と関係して変化する可能性があるかどうかについて明らかにすることを目的とした。そのために、オスミウム浸軟法と超音波処理法の併用により小腸の上皮細胞を剥離させ、基底膜の窓を走査電子顕微鏡 (SEM) で直接観察することを可能にし、食餌による基底膜の窓の変化を解析した。

方法：本実験では 8-10 週齢の Wistar 系雄ラットを用い、22 時間絶食処置を施した絶食群と、22 時間絶食処置を施した後に飼料を 2 時間摂食させた摂食群に分けた。ラットは麻酔処置を施し、生理食塩水を灌流した後に 4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行った。

初めに絨毛の基本構造を観察するためにパラフィン切片にヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡で観察した。さらに、基底膜の窓とそこを通過する自由細胞の関連性を観察するために透過電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察を行った。

つぎに基底膜の窓と通過中の自由細胞の観察には SEM を用いた。摘出した上部空腸、中部空腸、下部空腸、中部回腸のスライスに、オスミウム浸軟処理と超音波処理を施し、上皮細胞を剥離させ、基底膜を露出させた。その後導電染色、脱水、臨界点乾燥および金属コーティングを行い、各絨毛の基底膜の反射電子像を取得した。また、この像から、絨毛の面積、基底膜の窓数および窓面積について、画像処理ソフトウェア ImageJ を用いて統計解析を行った。その際、真円度 $0.4-1$ 、 $0.59 \mu\text{m}^2$ 以上を窓として自動抽出し、皺などにより自動抽出されなかった孔は画像処理ソフトウェアを用いて手動でマーキングを施した。さらに自由細胞の見える窓、窓を通過中の自由細胞を解析した。これらを小腸の各部位ごとに両群で比較し、絨毛の高さの中央 60%の部位

を用いて統計解析を行った。

結果：光学顕微鏡では、絨毛上皮に自由細胞が観察され、絶食群よりも摂食群において自由細胞の数が増加している傾向にあったが、光顕像による詳しい評価は難しかった。TEM では、上皮内の自由細胞が主にリンパ球や好酸球であり、これらが基底膜を通過している像も観察された。

SEM の反射電子像では、基底膜直下の毛細血管網も観察できることから、基底膜の窓が毛細血管の走行していない部位に見られることが明らかになった。また窓の大きさは直径0.5 ~ 6 μm で円形もしくは楕円形をしていた。また、基底膜の窓の平均面積は有意に下部空腸よりも上部空腸で大きく、これは絶食群でも摂食群でも同様であった。次に絶食群と摂食群間の基底膜の窓の平均面積を比較したが、有意な差は全部位において認められなかった。しかし、ヒストグラムから、食餌により上部・中部空腸において1.5 μm^2 以下の窓数が減少し、6.0 μm^2 以上の窓数が増加する傾向が認められた。さらに絨毛単位面積あたりで比較したところ、絶食群よりも摂食群において上部空腸で絨毛単位面積あたりの窓面積と基底膜を通過する自由細胞数が有意に増加していた。

考察：本研究では食餌による窓数、窓面積への影響を解析した。オスミウム浸軟法と超音波処理の併用は基底膜を露出させるのに有用であった。食餌により空腸、特に上部空腸において小腸上皮基底膜の窓数および窓面積が増大したのは、自由細胞の動きが活発になったことを示すもので、食餌と何らかの免疫応答との関与があることを示唆している。小腸上皮基底膜は上皮細胞間腔と粘膜固有層の間のバリアとして機能しており、そこに存在する窓はカイロミクロンなどの大きな栄養素の通路として役立っていると考えられる。このことから食餌により窓数および窓面積が増大することは、脂肪の吸収、すなわちカイロミクロンの中心リンパ管への回収において、この窓が調節的な役割を果たしている可能性を示唆するものである。

審査結果の要旨

小腸上皮には白血球（リンパ球など）の迷入により基底膜に孔（窓）ができることが知られている。他方、小腸上皮に吸収された栄養素が毛細血管や中心リンパ管に吸収される際には基底膜を通過しなければならないが、本研究は、基底膜の窓と食餌との関係について、光学顕微鏡および走査電子顕微鏡（SEM）を用いて検討した。8-10 週齢の Wistar 系雄ラットを 22 時間絶食させた絶食群と 22 時間絶食後に飼料を 2 時間摂食させた摂食群とに分け、各群で基底膜の窓とそこを通過する自由細胞とを観察した。自由細胞の数は、摂食群が絶食群に比べ増加傾向があった。上皮内自由細胞は主にリンパ球や好酸球であり、それらが基底膜を通過している像も観察された。基底膜の窓の平均面積は、絶食群、摂食群ともに上部空腸が下部空腸に比べ大きかった。また、上部空腸の絨毛単位面積あたりの窓面積と基底膜を通過する自由細胞数は、摂食群が絶食群に比べ有意に増加していた。これらのことから、食餌による空腸（特に上部空腸）の上皮基底膜の窓数・窓面積の増大は、自由細胞の動きが活発化したことを示すものであり、食餌と免疫応答との関与が示唆された。更に、食餌により窓数・窓面積が増大したことは、脂肪の吸収においてこの窓が調節的役割を果たしている可能性も示唆された。

以上より本研究は、リンパ球や好酸球が小腸吸収上皮基底膜の窓形成に関与しており、それが食餌摂取と関連していること、脂肪の吸収には基底膜の窓が調節的役割を果たしてい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。