

学 位 論 文 要 旨

氏名 青佐 泰志

論 文 題 目

Pore alterations of the endothelial lining of rat fenestrated intestinal capillaries exposed to acute stress.

(急性ストレスに曝されたラットにおける腸管有窓性毛細血管の小孔の形態変化)

要 旨

【諸言】 ストレスの誘発による交感神経活性化は、門脈血中サイトカイン濃度を増加させ、炎症性に熱産生を行う。特に、持続照明ストレスは交感神経系を活性化させ、高血圧や代謝障害を惹起する可能性がある。一方、Lipopolysaccharide (LPS) などの炎症誘発物質は、腸管腔から Endocytosis を受けて腸絨毛粘膜固有層内に取り込まれて輸送されるが、ストレスの負荷によって、腸管粘膜固有層内への移行が亢進する。しかし、その門脈血中内への循環経路は未だ不明である。他方、腸絨毛粘膜固有層には、有窓性毛細血管が分布し、その形態は多くの小孔が存在し、血管内外の物質を修飾するとされている。以上のことから、ストレス負荷での門脈血中サイトカイン濃度の増加は、有窓性毛細血管の機能および構造の変化が関与すると考えた。本研究は、持続照明ストレスとアドレナリン作動性薬物によるカテコラミン応答に対する有窓毛細血管の内皮小孔の超微細構造の変化と門脈血中 Interleukin (IL) -6 濃度について検討した。

【材料と方法】 Wistar 系雄性ラット 300 g を恒温恒湿環境にて飼育した。すべての処置は、太分大学動物実験ガイドラインに則って施行した (M015004)。(1) 持続照明ストレス：通常照明群

(Light/Dark) または持続照明環境群 (Light/Light) に分け、さらに、プロプラノロール (2mg/kg) または飼育水を経口摂取させる 4 群に分けた (N = 8)。実験動物の血圧および直腸温、尿中カテコラミン濃度、血中 IL-6 濃度をそれぞれ定量した。さらに、回腸末端を摘出し、電子顕微鏡にて有窓性毛細血管の超微構造を観察した。(2) ノルアドレナリン静脈投与 (i.v.): プロプラノロール 2.0 mg/kg または同量の水 15 ml/kg を経口投与し、ノルアドレナリン 2.0 μ g/kg または、生理食塩水 100 μ g/kg を i.v. した 4 群に分けた (N = 8)。i.v. 120 分後、実験動物の血圧および直腸温、血中カテコラミン濃度、血中 IL-6 濃度をそれぞれ定量した。さらに、有窓性毛細血管の超微構造の観察は電子顕微鏡を用いた。

【結果】(1) 通常照明群と比較して、持続照明ストレスを負荷した群は、直腸温の上昇と収縮期および拡張期血圧の増加、尿中ノルアドレナリン、アドレナリン濃度の上昇をそれぞれ有意に認めた。さらに、有窓性毛細血管の小孔の径の開大および密度の増大が有意に認められ、門脈血中の IL-6 濃度は有意に上昇した。しかし、プロプラノロールの経口投与によって、これらの反応は有意な抑制を示した。(2) 対照群と比較して、2.0 μ g/kg のノルアドレナリンを i.v. した群は、血圧の上昇、直腸温の上昇、血中ノルアドレナリンとアドレナリン濃度の上昇がそれぞれ有意に認められた。さらに、門脈血中 IL-6 濃度の増加と有窓性毛細血管の小孔の径の開大がそれぞれ有意に認められた。しかし、前処置としてプロプラノロールの経口投与によって、直腸温の上昇抑制、有窓性毛細血管の小孔開大と数の増加の抑制、門脈血中 IL-6 濃度の増加を抑制することがそれぞれ有意に認められた。

【考察】本研究は、有窓性毛細血管の小孔の径の開大と密度の増加による形態変化が門脈血中 IL-6 濃度を有意に上昇させることを発見した。持続照明ストレスによって誘導されるこれらの反応は、プロプラノロールの経口投与によって有意に抑制したため、次に、ノルアドレナリンによる薬理効果を用いて、小孔と門脈血中 IL-6 濃度の関連について検討した。ノルアドレナリン i.v. とプロプラノロールの前投与における小孔の形態変化と門脈中の IL-6 濃度の増加は持続照明ストレスの生体応答に類似することを確認した。本研究は、ストレスに関連したカテコラミンの調整機構によって、腸管有窓性毛細血管の小孔が開大し、炎症物質が腸管腔から門脈へと移行した循環経路を示す知見である。

【結論】腸管から門脈への炎症性物質の透過修飾機能は、カテコラミン調節機構が関連した腸管有窓性毛細血管内の小孔における径の開大および密度の増大の関与が示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 (課)・論	第 561 号	氏名	青 佐 泰 志
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	北 野 敬 明	
	副査氏名	猪 股 雅 史	
	副査氏名	油 布 邦 夫	
論文題目 : Pore alterations of the endothelial lining of rat fenestrated intestinal capillaries exposed to acute stress. (急性ストレスに曝されたラットにおける腸管有窓性毛細血管の小孔の形態変化)			
論文掲載雑誌名 : Histology and Histopathology, 2016, in press.			
論文要旨			
<p>【目的】ストレスによる交感神経活性化は、門脈血中サイトカイン濃度を増加させ、炎症性に熱産生を行う。ストレスにより Lipopolysaccharide などの炎症誘発物質は、腸管腔から Endocytosis を受けて腸絨毛粘膜固有層内に取り込みが亢進する。持続照明ストレスは交感神経系を活性化させ、高血圧や代謝障害を惹起する可能性がある。腸絨毛粘膜固有層には、有窓性毛細血管が分布し、その形態は多くの小孔が存在し、血管内外の物質移動を修飾するとされている。本研究は、持続照明ストレスとアドレナリン(Ad)作動性薬物によるカテコラミン応答に対する有窓毛細血管の内皮小孔の超微細構造の変化と門脈血中 Interleukin (IL) -6 濃度について検討した。</p> <p>【対象・方法】Wistar 系雄性ラット 300 g を恒温恒湿環境にて飼育した。(1) 持続照明ストレス : 通常照明群 (Light/Dark) または持続照明環境群 (Light/Light) に分け、さらに、プロプラノロール (Pr) (2mg/kg) または飼育水を経口摂取させる 4 群に分けた (N = 8)。血圧および直腸温、尿中カテコラミン濃度、血中 IL-6 濃度を定量した。さらに、回腸末端を摘出し、電子顕微鏡にて有窓性毛細血管の超微構造を観察した。(2) ノルアドレナリン (NAd) 静脈投与 (i. v.) : Pr 2.0 mg/kg または同量の水 15 ml/kg を経口投与し、NAd 2.0 μg/kg または、生理食塩水 100 μg/kg を i. v. した 4 群に分けた (N = 8)。i. v. 120 分後、実験動物の血圧および直腸温、血中カテコラミン濃度、血中 IL-6 濃度を定量した。有窓性毛細血管の超微構造の観察は電子顕微鏡を用いた。</p> <p>【結果】(1) 通常照明群と比較して、持続照明ストレスを負荷した群は、直腸温の上昇と収縮期および拡張期血圧の増加、尿中 NAd、Ad 濃度の上昇をそれぞれ有意に認めた。さらに、有窓性毛細血管の小孔の径の開大および密度の増大が有意に認められ、門脈血中の IL-6 濃度は有意に上昇した。しかし、Pr の経口投与によって、これらの反応は有意な抑制を示した。(2) 対照群と比較して、2.0 μg/kg の NAd を i. v. した群は、血圧の上昇、直腸温の上昇、血中 NAd と Ad 濃度の上昇がそれぞれ有意に認められた。さらに、門脈血中 IL-6 濃度の増加と有窓性毛細血管の小孔径開大がそれぞれ有意に認められた。しかし、前処置として Pr の経口投与によって、直腸温の上昇抑制、有窓性毛細血管の小孔径開大と数の増加の抑制、門脈血中 IL-6 濃度の増加を有意に抑制することが認められた。</p> <p>【考察】本研究は持続照明ストレスによる有窓性毛細血管の小孔径開大と密度の増加が門脈血中 IL-6 濃度を有意に上昇させることを示し、炎症物質が腸管腔から門脈へと移行した循環経路を確認する新見である。</p> <p>本研究は腸管から門脈への炎症性物質の透過修飾機能は、カテコラミン調節機構が関連した腸管有窓性毛細血管内の小孔における径の開大および密度の増大の関与を明らかにした有益な研究であり、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 (課)・論	第561号	氏名	青佐泰志
審査委員会委員	主査氏名	北野敬明	
	副査氏名	猪股雅史	
	副査氏名	油布邦夫	
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、結果、考察について次の質疑を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 持続照明ストレスの投与方法とその期間、短期間(1日)投与方法とした理由を述べよ。 2. Propranololの投与方法の説明、持続照明ストレス群とノルアドレナリン投与方法でのPropranolol投与方法が異なる理由を述べよ。 3. 多重比較検定でScheffe法を使用した理由を述べよ。 4. 光刺激によって影響を受ける毛細血管の評価を回腸粘膜から採取する理由を述べよ。 5. 試料作成において、OsO₄に加えて、フェロシアン化カリを加えている理由は何か。 6. カルノフスキー液での還流固定において、固定手技(圧など)による影響はあるのか。 7. 光刺激によって生体の毛細血管の形態が影響を受けるという報告はこれまでにあるか。 8. 毛細血管のporeの大きさによって、通過しうる分子はその大きさによって規定されているのか。 9. 物質が毛細血管のporeを通過する際、トランスポーターなどの結合を必要とする機能は存在するのか。 10. 四肢の血管内皮は内分泌機能としてNOを放出して血管拡張や、逆に血管収縮物質を放出したりするが、同機能は腸管の毛細血管にもあるのか？ 11. ノルアドレナリン静注後の有窓性毛細血管のpore径の変化が2相性になる機序を述べよ。 12. 門脈血中でのIL-6上昇メカニズムに関与する機序と考察、その考察を明らかにするための今後の実験計画について。 13. カテコラミンを投与方法して体温の変化を検討するのはどういう意義があるのか？ 14. エンドトキシンに反応するサイトカインとしてTNFαやIL1ではなく、何故IL6を測定したのか？ 15. プロプラノロールの投与方法の変化によって多ければ多いほどストレス性変化を抑制する作用が強いのか？ 16. ノルアドレナリンは$\alpha_1\alpha_2$レセプター・β_1レセプターであるが、プロプラノロールも$\beta_1\beta_2$レセプターの働きによるがこのレセプターが今回の小孔の形態変化に直接関与しているのか？ 17. プロプラノロールはβ_1、β_2ともブロックするが選択性の強い薬剤は使えなかったか？ 18. 血圧の変化がかなり大きい、これによる血流のずり応力増加⇒内皮細胞がストレッチされて⇒血管内皮の変化ということはないのか？ 19. カテコラミンは炎症物質の取り込みを増やし生体にとって有害になる可能性があると言えるか？ また、βブロッカーを予防的に内服していると炎症物質が侵入しにくいと言えるか？ <p>これらの質疑に対し、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者であると認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。