

学 位 論 文 の 要 旨

学 位 の 種 類	博 士	氏 名	千 里 直 之
学 位 論 文 題 目			
<p>Impaired Nitric Oxide Production of the Myenteric Plexus in Colitis</p> <p>detected by a New Bioimaging System</p> <p>(新たに開発した生体画像システムによるラット大腸炎モデルにおける 筋層間神経叢の一酸化窒素産生動態に関する研究)</p>			
共 著 者 名			
<p>旭川医科大学 第二外科 河野 透、海老澤良昭、 浅間 俊之、菅原 睦、 葛西 眞一</p> <p>旭川医科大学 第三内科 綾部 時芳、高後 裕</p> <p>獨協医科大学 消化器科 米田 政志</p> <p>デューク大学 消化器外科 高橋 徳</p>			
掲載雑誌 Journal of Surgical Research 117,329~338 (2004)			
【研 究 目 的】			
<p>一酸化窒素(NO)は、消化管における non-adrenergic, non-cholinergic(NANC)神経系にかかわる主な抑制性神経伝達物質の一つである。この NANC 神経系は、大腸腸管運動調整の一つである NANC relaxation に重要な役割を果たしている。われわれは、この NANC relaxation が、NO 合成阻害剤によって抑制されることから、NO が大腸における NANC relaxation の重要な役割をはたしている事を報告してきた⁽¹⁾。さらに、潰瘍性大腸炎モデルである DSS 誘発(dextran sulfate sodium)腸炎ラットにおいて、NANC relaxation が遠位大腸において有意に減弱し、同部位での筋層間神経叢の神経型 NO 合成酵素 (nNOS) が有意に減少してい</p>			

ることを報告してきた⁽²⁾。しかしながら、これまで、神経で産生される NO は微量であるために NO 産生神経細胞の同定は NO 合成酵素の抗体を使用した免疫組織学的手法によってなされるのみで、微細な神経組織から直接的、非侵襲的に NO 産生細胞を同定し、NO 産生量を測定することは不可能であった。最近、われわれは 4,5-Diaminofluorescein-2 diacetate (DAF-2 DA) を使用した共焦点レーザー蛍光顕微鏡併用 NO 産生細胞同定法を開発し、分離肝細胞の NO 産生を同定、定量比較、可能なことを報告した⁽³⁾。本研究では、この新たな NO 産生細胞同定法を使用して腸管組織で初めて、NO 産生神経細胞を生きた状態で観察し、DSS 誘発腸炎モデルにおいて筋層間神経叢の NO 産生細胞を同定し、NO 産生量を測定、部位別に比較検討した。

【材 料 ・ 方 法】

動物は体重 220～240g の Sprague Dawley 系雄性ラットを使用した。

1. 潰瘍性大腸炎動物モデルの作成と組織作成方法

5 % DSS を飲料水として 7 日間摂取後犠牲死させ、回盲弁から 1cm 離して近位大腸として大腸を 2cm 切除および骨盤腹膜部から 2cm 離して遠位大腸として大腸を 2cm 切除した。切除腸管は筋層間神経叢を含有する縦走筋層で剥離した。

2. 神経型 NO 産生細胞の同定

剥離した組織を固定し、クレブス液に浸し、氷温にて DAF-2 DA を添加、その後、顕微鏡下でクレブス液を持続還流しながら筋層間神経叢に励起波長 495nm の蛍光を照射し、DAF 蛍光（緑色 515nm）を発する NO 産生細胞を生きた状態で観察し各種薬理学的解析を行った。その後、2 % パラフォルムアルデヒドで固定、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を使用し、各種免疫組織学的解析を行い、以下の項目について検討をおこなった。

- i) DAF-2 蛍光陽性細胞数と蛍光強度の定量的測定。
- ii) 筋層間神経叢の DAF-2 蛍光陽性細胞内における nNOS の存在。
- iii) DAF-2 蛍光陽性細胞内における神経組織特異的タンパクである PGP9.5 の存在。
- iv) NO 産生細胞の DAF-2 蛍光の非選択的 NO 合成阻害剤 N^G -nitro-L-argininmethyl ester(L-NAME)、選択的 nNOS 合成阻害剤である 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM) による NO 産生抑制。
- v) NO 産生細胞の DAF-2 蛍光の選択的神経型 Ca^{2+} channel blocker である omega-conotoxin GVIA または L 型 Ca^{2+} channel blocker である nifedipine による NO

産生抑制。

3. 統計学的検討

本実験で得られた全ての実験結果は、平均値±標準誤差で表記した。多群間の比較はANOVA、引き続き Duncan's contrast test により行なった。独立した2群間の比較はMann-Whitney test で検定した。危険率5%以下を統計学的有意差ありとした。

【成 績】

1) 正常ラットでの筋層間神経叢のNO発現

正常近位、遠位大腸の筋層間神経叢には DAF-2 の蛍光発色細胞が認められ、PGP9.5が存在することから神経細胞と考えられ、また nNOS 陽性であった。近位、遠位大腸で比べると、DAF-2 蛍光強度、発光細胞数共に、近位大腸の神経叢の方が優位に高かった。

正常近位大腸の筋層間神経叢を、DAF-2 励起前に非選択的 NOS 阻害物質、nNOS 選択的阻害剤、選択的神経型 Ca^{2+} channel blocker などでは処理すると、それぞれにおいて明らかに発光度が減少していることが生きた組織で直接的に観察できた。しかし、非神経型 Ca^{2+} channel blocker で前処置を施行した場合、差は認められなかった。

2) 潰瘍性大腸炎モデルラットでの筋層間神経叢のNO発現

DSS 誘発腸炎ラットでは、遠位大腸の Myeloperoxidase 活性が高く、炎症が強いことが分かった。筋層間神経叢からの DAF-2 蛍光は、炎症の強い遠位大腸で明らかに減少し、DAF 蛍光強度、発光細胞数の測定でも優位に減少していた。

【考 察】

最近、in vivo で NO 産生について直接的な証拠を得るために、NO に対する新しい高感度蛍光標識物質(検出限界 5nM)である DAF-2 法が開発された⁽³⁾。本実験では、筋層間神経叢から DAF 蛍光を発した NO 産生細胞には、すべて nNOS および神経組織特異性タンパクである PGP9.5 が存在することを免疫学的手法にて同定し、NO 神経細胞であることを明らかにした。本研究は、生きた筋層間神経叢から NO が産生されることを直接的な証明で示した初めての報告である。これまで、近位大腸の方が、NANC relaxation が遠位大腸より強く起こることが知られており、免疫組織学的手法によっても nNOS 陽性細胞数、nNOS mRNA 量が多いことが報告されてきた。しかしながら、NO 産生量の違いを同定すること

は不可能であった。本実験で初めて、近位大腸の方が DAF 蛍光強度、発光細胞数、つまり NO 産生量が実際に遠位大腸より高いことを生きた組織で明らかにし得た。さらに、本実験では大腸の筋層間神経叢の DAF 蛍光発光が、各種阻害剤を使用した薬理学的手法による実験結果から、腸管神経叢の DAF 蛍光を発した NO 産生細胞の NO は、N-type Ca 依存性であり、神経型 NO 合成酵素から合成されることを明らかにできた。これまで、腸管運動における炎症の影響の研究にさまざまな実験モデルが使用されてきたが、その中のひとつである DSS 誘発腸炎モデルは、ヒトの潰瘍性大腸炎と臨床的にも、形態学的にも極めて類似したモデルであるとされている。本実験から、DSS 誘発腸炎モデルでは、炎症の強い大腸の筋層間神経叢において、NO 産生細胞数、NO 産生量が有意に減少していることを明らかにした。しかしながら、DSS 誘発腸炎モデルにおける筋層間神経叢での nNOS の低下および NO の産生減少の機序として、抗炎症性サイトカイン (IL-1 β) の関与や、nNOS の発現にインターフェロン γ が関わっている可能性はあるが、未だ明らかではなく、今後のさらなる検討が必要である。

【結 論】

1. 筋層間神経叢において、DAF 蛍光を発した NO 産生細胞の NO は、N-type Ca 依存性であり神経型 NO 合成酵素で合成されることを薬理学的手法にて確認できた。
2. DAF 蛍光を発した NO 産生細胞は、すべて神経型 NO 合成酵素および神経組織特異性タンパクである PGP9.5 が存在することを免疫組織学的手法にて確認できた。
3. DSS 誘発腸炎モデルでは炎症の強い遠位大腸の筋層間神経叢の NO 産生細胞数、NO 産生量が有意に減少していることを新たに開発した共焦点レーザー蛍光顕微鏡併用 NO 産生細胞同定法にて明らかにした。
4. 共焦点レーザー蛍光顕微鏡併用 NO 産生細胞同定法は、微量な NO 産生組織である筋層間神経叢における NO 作動性神経を特異的に同定し、NO 産生細胞数および NO 産生量の検討に有用であることを明らかにした。

【引 用 文 献】

1. Takahashi, T., and Owyang, C. Regional differences in the nitrenergic innervation between the proximal and the distal colon in rats. *Gastroenterology* 115: 1504, 1998
2. Mizuta, Y., Isomoto, H., and Takahashi, T. Impaired nitrenergic innervation in rat colitis induced

by dextran sulfate sodium. *Gastroenterology* 118: 714, 2000

3. Ebisawa, Y., Kono, T., Chisato, N., Kasai, S. *et al.* Direct evidence that induced nitric oxide production in hepatocytes prevents liver damage during lipopolysaccharide tolerance in rats. *J Surg Res*, 118 : 183~189, 2004

【参 考 論 文】

1. Kono, T., Tomita, I., Chisato, N., Kasai, S., *et al.* Successful low-dose chemotherapy using vinblastine and methotrexate for the treatment of an ileoanal pouch mesenteric desmoid tumor: report of a case. *Dis colon Rectum* 47: 246~249, 2004
2. Ebisawa, Y., Kono, T., Chisato, N., Kasai, S. *et al.* Direct evidence that induced nitric oxide production in hepatocytes prevents liver damage during lipopolysaccharide tolerance in rats. *J Surg Res*, 118 : 183~189, 2004
3. 千里直之、河野 透、葛西眞一ら アセトアミノフェン肝障害モデルにおける誘導型 NO の細胞保護効果の検討。薬理と治療、31:63~65, 2003
4. Ohara, K., Kono, T., Chisato, N., Kasai, S *et al.* Acetic acid-derived prostaglandin-dependent colonic adaptive cytoprotection is preserved in chronic colitis: role of cyclo-oxygenase. *Int J Colorectal Dis* 18: 260~266, 2003
5. Kono, T., Yoneda, M., Chisato, N., Kasai, S., *et al.* Adaptive cytoprotection against acetic acid induced colonic injury in rats. *Int J Colorectal Dis* 16: 384~390, 2001

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	千里 直之
審査委員長 渡 部 剛 ㊞ 審査委員 葛 西 眞 一 ㊞ 審査委員 高 井 章 ㊞ 審査委員 奥 村 利 勝 ㊞			
学 位 論 文 題 目			
<p>Impaired Nitric Oxide Production of the Myenteric Plexus in Colitis Detected by a New Bioimaging System （新たに開発した生体画像システムによるラット大腸炎モデルにおける筋層間神経叢の一酸化窒素産生動態に関する研究）</p>			
<p>本論文提出者は、大腸の筋層間神経叢の神経細胞で産生される一酸化窒素（NO）を蛍光試薬 4,5-diaminofluorescein-2 diacetate (DAF-2 DA)を用いて直接的に検出する方法を開発し、潰瘍性大腸炎の動物モデルの一つである dextran sulfate sodium (DSS)誘発腸炎モデルラットの筋層間神経叢における NO 産生能の変化を検討した。その結果、(1) 大腸の筋層間神経叢の NO 産生は非神経型 Ca^{2+} channel blocker である nifedipine 前処理では影響を受けないが、選択的神経型 Ca^{2+} channel blocker である ω-conotoxin 処理によって強く抑制されることを見だし、さらに、(2) DSS 誘発腸炎モデルでは、炎症の強い部位ほど NO 産生が有意に減少しているという、潰瘍性大腸炎の病態の解明において興味深い知見を得た。</p> <p>これまで腸管の神経叢における一酸化窒素の動態を解析する方法としては、その合成酵素に対する免疫組織化学法など間接的方法しかなかったが、本研究によって示されたイメージング技術によって、より直接的にリアルタイムでその動態を追跡することが可能になった。この技術は今回解析された DSS 誘発腸炎モデルのみならず他の消化管疾患の病態モデルの解析にも応用可能であり、この分野の今後の発展に大きく寄与する研究であると思われる。</p> <p>以上の研究で用いた方法の妥当性は、適切な対照実験によって検証されており、論文の記述および図版の質・構成も得られた知見を説明するのに十分なものであると判断された。また、本論文の内容および関連領域に関して、論文提出者に試問を行ったところ、適切な応答が得られ十分な学力を有することが示された。</p> <p>以上の結果に基づき、審査委員会は本論文を学位論文として適切なものであると判定した。</p>			