

視床下部腹内側核破壊動物の病態に関する研究
—アミノ酸センサーの機能 及び 胃・小腸の細胞増殖—

Study on pathophysiology of ventromedial hypothalamic lesioned animals
—The function of amino acid sensors,
and cell proliferation of stomach and small intestine—

2012年2月

石塚 典子

目次

序論	2
第1章	
VMH破壊ラットにおけるアミノ酸センサーの機能	14
第2章	
VMH破壊ラットにおける急性胃粘膜病変に対する消化管粘膜増殖の役割	27
第3章	
VMH破壊マウスにおける小腸組織内の細胞増殖	41
まとめ	53
謝辞	55

序 論

実験的肥満動物モデルには基本的には遺伝子肥満、視床下部性肥満、食餌性肥満モデルの3つのカテゴリーが存在する[1]。

HetheringtonとRanson[2]が1940年、視床下部腹内側核(ventromedial hypothalamic nucleus: VMH)を破壊して肥満が作製できることを指摘し、当初は視床下部性肥満とはVMH破壊によって発生する肥満のことを指していた。その後、VMHの他に室傍核(paraventricular nucleus: PVH)、弓状核(arcuate nucleus: ARH)破壊、VMHと外側核(lateral hypothalamus: LH)の間の切断などでも肥満が発生することが明らかになった[3]。VMH破壊動物は、両側のVMHが全域にわたって完全に破壊され、破壊直後から急激な体重増加を示し肥満を呈するモデル動物である。

Fig.1にラット脳の断面図を示した。第三脳室の両脇にVMHがあり、その外側にLHが位置している。VMHは満腹中枢と呼ばれる神経核で、刺激すると摂食が停止し、破壊すると過食になる。一方、LHは摂食中枢あるいは空腹中枢と呼ばれ、刺激すると摂食は亢進し、破壊すると摂食は停止する。

VMH破壊動物の作成

VMH破壊動物は脳アトラスに準じて、Inoueら[4]の方法に従い、以下の手順で作成する。

麻酔下にて、左右の外耳道と上顎の3点を脳固定装置に固定し、頭頂部皮膚を切開して電極挿入位置を確認する。電極挿入位置はラットではbregmaより2.8mm後方、midsagtal lineより0.6mm外側の2点、マウスではbregmaより1.6mm後方、midsagtal lineより0.5mm外側の2点とする (Fig.2)。電極挿入部の頭蓋骨を電動ドリルで穿孔し、硬膜を剥離した後、電極を挿入する。電極先端が頭蓋底よりラットでは0.4mm、マウスでは0.2mm上方となるように固定し電流を流す。電極挿入まで同様の操作を行い、電流を流さないことでsham VMH破壊動物を作成する。

実験終了後、脳切片を作成し組織学的にVMHが破壊されたかどうか確認し、完全にVMHを破壊されている個体のみを解析に使用する。

VMH破壊ラットにおける腹部臓器の細胞増殖

肥満においては脂肪の貯蔵庫である脂肪細胞は増殖、あるいは肥大して、脂肪貯蓄能力を高める。しかしながら、筋肉、内臓器官を中心とする活性組織(lean body mass)、あるいは除脂肪組織は増加せず、むしろ減少するものと認識されてきた。VMH破壊ラットはユニークな肥満動物モデルで、自律神経系緊張の異常をその肥満の主因とするが、VMH破壊による種々の病態にもこの変化が関係している。

その後の研究で、Kiba, Inoueら[5, 6]は、VMH破壊ラットにおいて、迷走神

経活動上昇により迷走神経が密に分布する腹部臓器（胃・小腸・大腸・肝臓・膵臓）の細胞増殖所見を見出した。VMH破壊後の胃と小腸のDNA含量とDNA合成の時間経過をみると、VMH破壊3日後より、DNA含量はSham VMH破壊ラットに比べて有意に増加し、7日まで増加し続けた。チミジン取り込みによるDNA合成をみると、DNA合成では、3日後にピークに達し、その後低下した（Fig.3）。また、VMH破壊ラットの腹部臓器における細胞増殖の指標であるPCNA（proliferating cell nuclear antigen）陽性細胞数は、いずれの臓器でも有意に増加しており、VMH破壊により腹部臓器の細胞増殖が惹起されていることが組織学的にも明らかにされた（Fig.4）。

VMH破壊によってさまざまな異常がもたらされるが、過食、高インスリン血症、迷走神経活動亢進の三点が細胞増殖の原因となりうると考えられる。先に述べたDNA含量とDNA合成の比較実験では、VMH破壊ラットを対照ラットと同量摂食にて飼育した群でも検討したが、VMH破壊自由摂食ラットとほぼ同様の成績であった（Fig.3）。したがって、過食はVMH破壊による胃腸組織の細胞増殖の原因とは考えられないことが明らかになった。また、インスリンは種々の細胞の成長因子であり、VMH破壊ラットではインスリン分泌は亢進し、高インスリン血症になるが、インスリンの細胞増殖への関与を検討するためにインスリン抗体過剰投与により高インスリン血症の作用を除去したときの影響を検討した結果、インスリン抗体投与によって胃、小腸、大腸ともDNA含量およびDNA合成に有意の変化を受けなかった[4, 7]。

横隔膜下迷走神経切断の影響をしてみると、VMH破壊を施すと胃、小腸のDNA含量とDNA合成はコントロールに比べて有意に上昇したが、VMH破壊に加えて迷走神経切断を施すと対照群と同様のレベルに戻った（Fig.5）。VMH破壊によって惹起されたDNA量とDNA合成の増加が、迷走神経の切断によって消失することから、VMH破壊によってもたらされる迷走神経活動上昇が胃と小腸での細胞増殖に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

肝門脈アミノ酸センサーと迷走神経の機能

膵ホルモンの分泌が神経性調節を受けていることは良く知られている。グルコースは膵β細胞への直接作用によりインスリン分泌を増加させることに加えて、門脈中のグルコース濃度上昇の刺激を受けて迷走神経求心路から脳幹の孤束核を通り迷走神経遠心路の反射路を介してインスリン分泌を促進する経路があり、この起点にグルコレセプターがあると言うことを、選択的迷走神経肝臓枝（求心路）切断と迷走神経膵臓枝切断実験によりRussekら[8]が報告している。

我々の研究グループのTanakaら[9]は1986年、迷走神経肝臓枝切断ラットと偽切断ラットを用い、アルギニン刺激後に膵臓から分泌されるインスリンとグルカゴンの分泌に対し、迷走神経肝臓枝における求心性の情報伝達について検討した（Fig.6）。アルギニンの腹腔内投与はインスリンおよびグルカゴン濃度をどちらも上昇させたが、迷走神経肝臓枝偽切断ラットよりも迷走神経肝臓枝切断ラットの方が有意な上昇となった。これらの結果から、アルギニン刺激によ

るインスリンとグルカゴンの分泌の抑制作用が、迷走神経肝臓枝を介して発揮されていることが示唆された。さらにこの実験では、迷走神経肝臓枝切断ラットではアルギニン腹腔内投与による血糖上昇が抑制されており、迷走神経肝臓枝切断によるアルギニン投与後のインスリン分泌過剰が、グルカゴン分泌増加による血糖上昇作用の影響を凌駕して起こるためと考えられた。以上、この結果は、アルギニンセンサーが肝臓に存在するということを示唆し、アルギニンセンサーから始まる肝迷走神経の求心路は、グルコレセプターとは逆に脳幹を介した膵臓の遠心性神経内分泌システムを抑制すると考えられた。

Tanakaら[10]はさらに1986年、アルギニン投与が肝迷走神経求心路、膵迷走神経遠心路および交換神経遠心路の電気活動に及ぼす影響を検討した。門脈へのアルギニン投与は迷走神経肝臓枝の電気活動を濃度依存的に増加させた (Fig.7a)。また、アルギニン門脈内投与は迷走神経膵臓枝 (迷走神経腹腔枝) の電気活動を低下させ、更にこの遠心路での電気的变化は肝臓枝を切断することにより阻害された (Fig.7b)。これらの結果から、門脈へのアルギニン投与は反射的に膵臓に分岐する迷走神経遠心路の活動を抑制することがわかった。

その後、臨床的に膵分泌能の検査に使用されているロイシンとアラニンについても検討を行い、ロイシンではインスリン分泌に対して抑制的に、アラニンではグルカゴン分泌に対して抑制的に、作用しているアミノ酸センサーを見出した。

肝アミノ酸センサーは食餌中蛋白質摂取により門脈から肝臓に入ってきたアミノ酸の刺激を受け迷走神経求心路を刺激し、中枢 (脳幹の孤束核) を介して反射的に迷走神経遠心路に抑制的に働き、アミノ酸による直接的な膵ホルモン分泌過剰を抑制することで、インスリンとグルカゴンの分泌を調整していると考えられている (Fig.8) [11]。

参考文献

1. Bray GA, York DA : Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: An autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev*, 59, 719-809 (1979)
2. Hetherington A, Ranson SW: Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec*, 78, 149-172 (1940)
3. Inoue S: Animal models of obesity: Hypothalamic lesions. Bjorntorp P, Brodoff BN eds. *Obesity*. Philadelphia: JB Lippincott Co., pp266-277 (1992)
4. Inoue S, Bray GA, Mullen YS: Effect of transplantation of pancreas on development of hypothalamic obesity. *Nature*, 266, 742-744 (1977)
5. Kiba T, Tanaka K, Inoue S, et al.: Comparison of DNA contents of visceral organs in rats with ventromedial hypothalamic lesions and fed a high fat diet. *Neurosci Lett*, 126, 127-130 (1991)
6. Kiba T, Tanaka K, Endo O, et al.: Ventromedial hypothalamic lesions increase gastrointestinal DNA synthesis through vagus nerve in rats. *Gastroenterology*, 104, G439-G444 (1993)

7. York DA, Bray GA: Dependence of hypothalamic obesity on insulin, the pituitary and the adrenal gland. *Endocrinology*, 90, 885-894 (1972)
8. Russek M: Hypothesis on the participation of hepatic glucoreceptors in the control of food intake. *Nature*, 197, 79-80 (1963)
9. Tanaka K, Inoue S, Fujii T, Takamura Y: Enhancement of insulin and glucagon secretion by arginine after hepatic vagotomy. *Neurosci Lett*, 72, 74-78 (1986)
10. Tanaka K, Inoue S, Takamura Y, Jiang ZY, Nijima A: Arginine sensors in the hepato-portal system and their reflex effects on pancreatic efferents in the rat. *Neurosci Lett*, 72, 69-73 (1986)
11. Tanaka K, Inoue S, Nagase H, Takamura Y.: Modulation of arginine-induced insulin and glucagon secretion by the hepatic vagus nerve in the rat: effects of celiac vagotomy and administration of atropine. *Endocrinology*, 127, 2017-2023 (1990)
12. Tanaka K, Inoue S, Nagase H, Takamura Y, Nijima A: Amino acid sensors sensitive to alanine and leucine exist in the hepato-portal system in the rat. *J Autonomic Nervous System*, 31, 41-46 (1990)

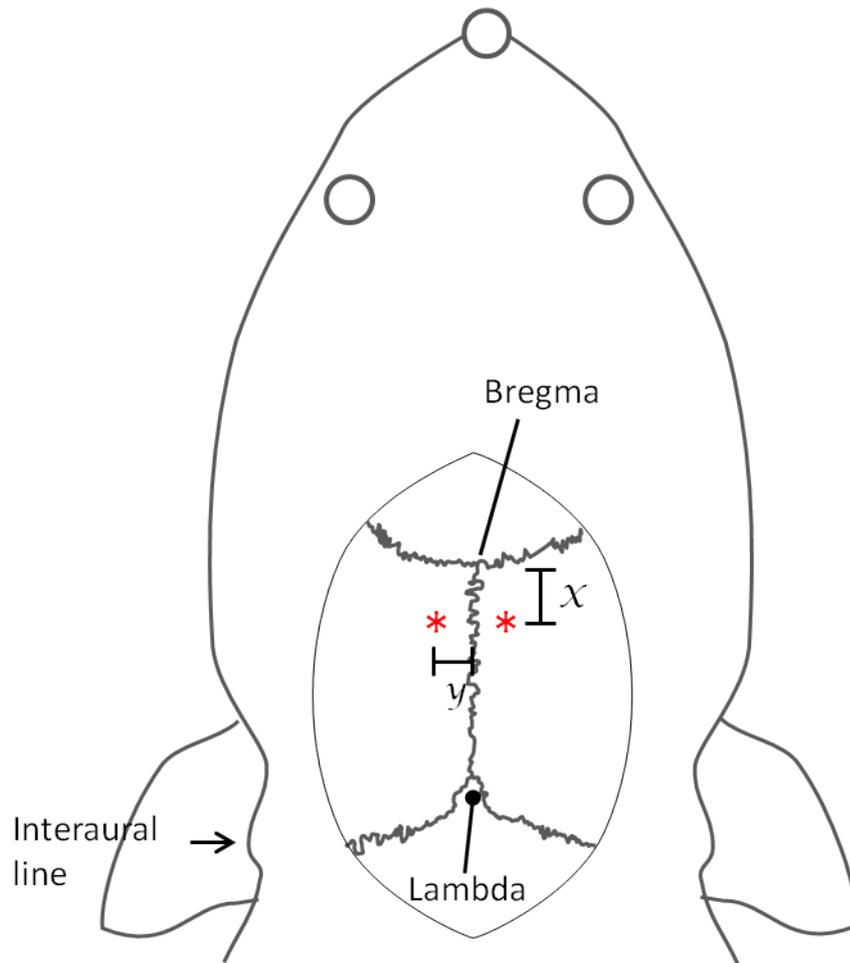


Fig.2 VMH破壊の脳座標

* : 電極挿入位置

ラット : X=2.8mm、y=0.6mm

マウス : X=1.6mm、y=0.5mm

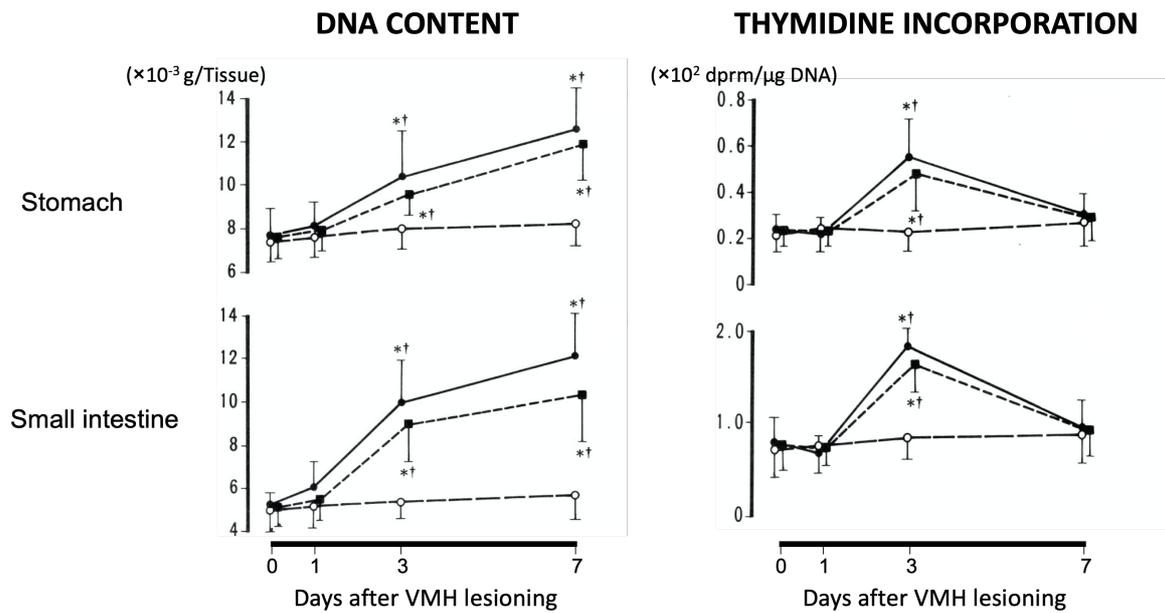


Fig.3 VMH 破壊後の組織 DNA 含量(左)とチミジン取り込みによる DNA 合成(右)の推移

● : VMH-lesioned rat

■ : Pair fed VMH-lesioned rat

○ : Sham VMH-lesioned rat

* $p < 0.05$ vs. Before VMH lesions † $p < 0.05$ vs. control

Modified from Gastroenterology 1993, 104 : G439-G444

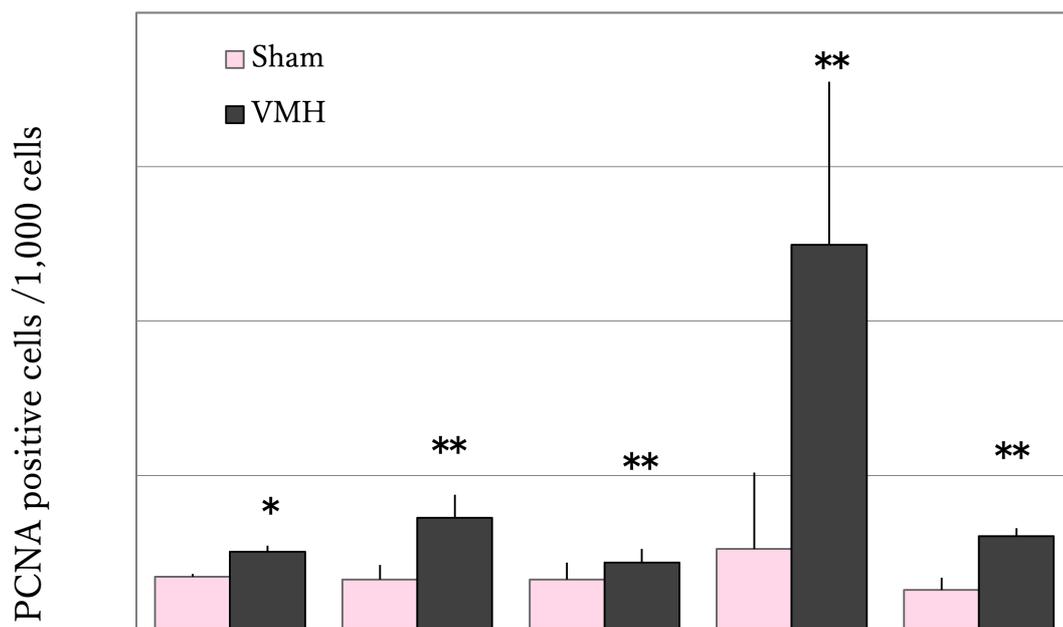


Fig.4 腹部臓器における PCNA 陽性細胞数の比較

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. sham.

Modified from J Mol Neurosci. 2009, 38 : 243-249

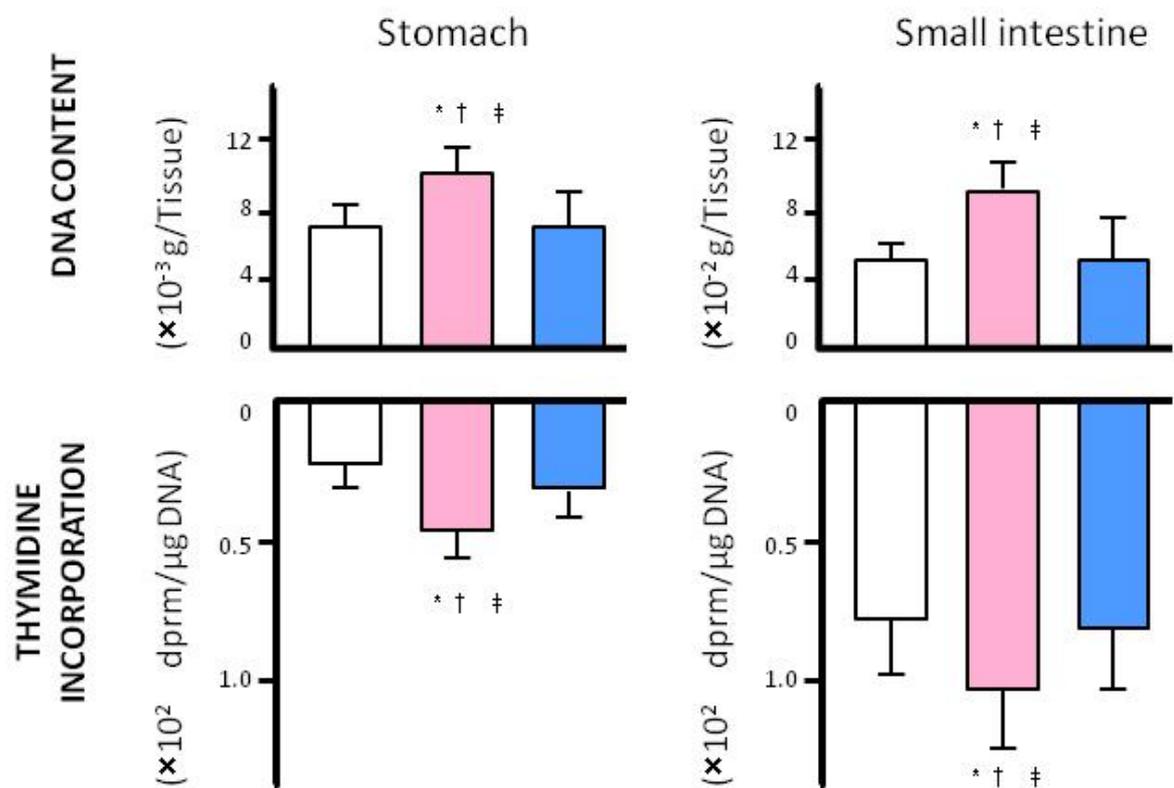


Fig.5 VMH破壊ラットの組織DNA含量とDNA合成に対する横隔膜下迷走神経切断(subdiaphragmatic vagotomy)の影響

□ : control

■ : Sham vagotomized + VMH lesioned

■ : vagotomized + VMH lesioned

* p < 0.05 vs. control

† p < 0.05 vs. vagotomized + sham VMH lesioned

‡ p < 0.05 vs. Sham vagotomized + VMH lesioned

Modified from Gastroenterology 1993, 104 : G439-G444

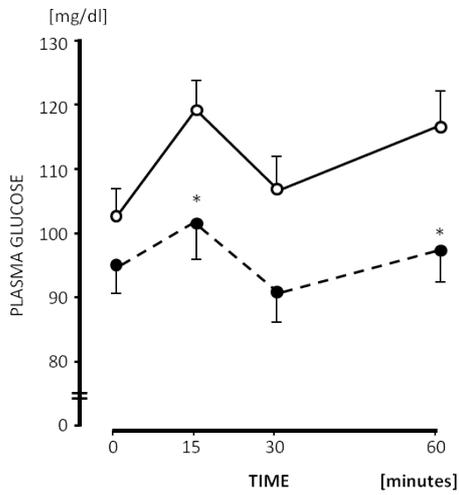
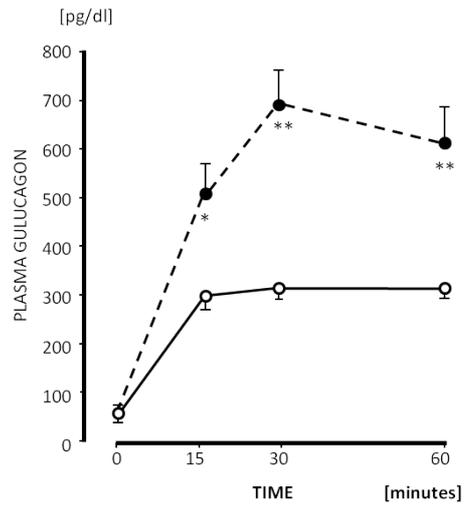
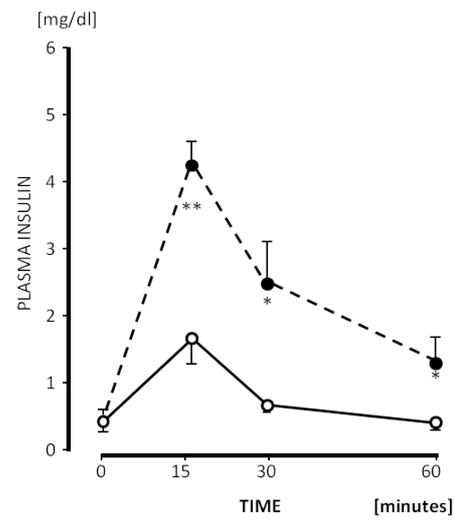


Fig.6 アルギニン腹腔内投与後のグルコース、インスリン、グルカゴンの血中濃度の推移

○ : Sham vagotomized rats

● : hepatic vagotomized rats

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. sham.

Modified from Neurosci Lett 1986, 72: 74-78

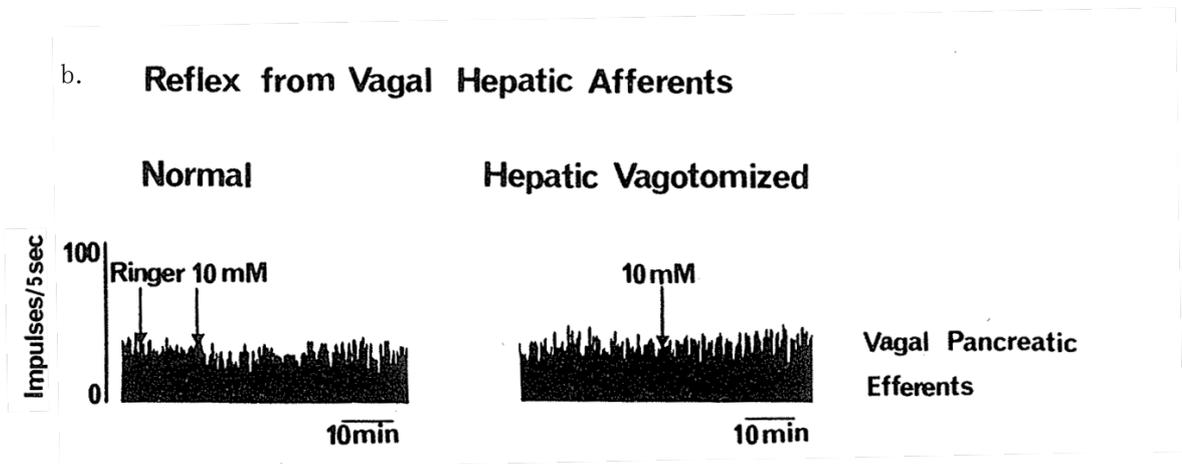
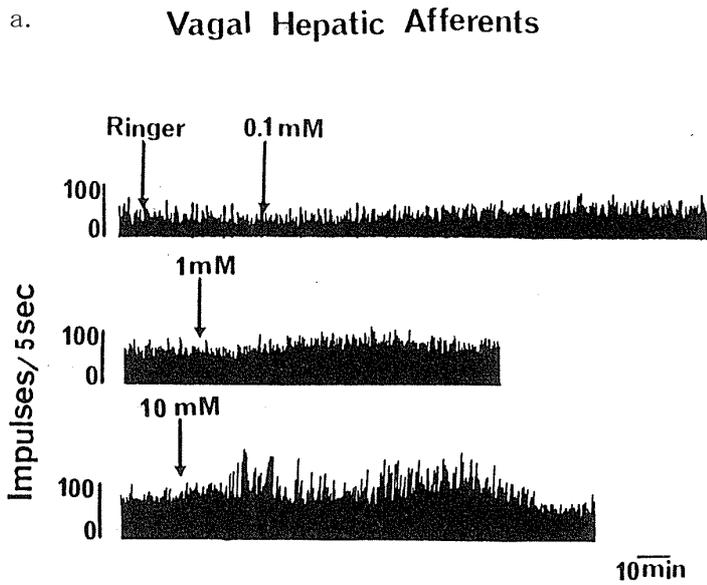


Fig.7 アルギニン腹腔内投与が電気活動に及ぼす影響

a. アルギニン投与が肝迷走神経求心路の電気活動に及ぼす影響

b. アルギニン投与が膈迷走神経遠心路の電気活動に及ぼす影響

Modified from Neurosci Lett 1986, 72: 69-73

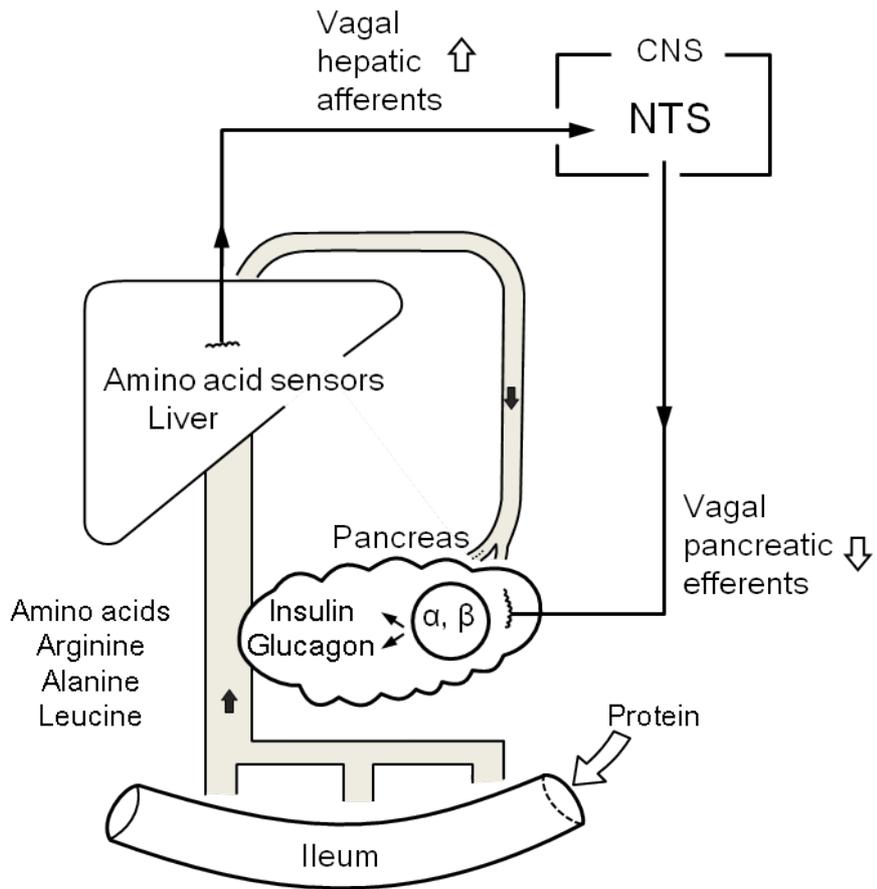


Fig.8 肝門脈アミノ酸センサーを介した神経調節の概略図

Modified from J Autonomic Nervous System 1990, 31: 41-46

緒言

膵ホルモン分泌が自律神経性調節を受けていることは良く知られている[1]。腹部横隔膜下に分布する迷走神経は遠心路と求心路に区別され、脳幹部から膵臓に向かう遠心路の機能に関する研究は多く認められ、遠心路は包括的に膵ホルモンの分泌促進に働いていると考えられている[2]。一方、肝臓から脳幹部に向かう求心路と膵ホルモンの分泌との関連についてはよく知られていない。

1963年Russek [3]は、肝に迷走神経肝臓枝を通じて中枢に摂食シグナルを送るグルコース受容体の存在を提唱し（これを“グルコレセプター”と呼ぶ）、血中のグルコースを感知したこの受容体から迷走神経肝臓枝を介して中枢神経にシグナルを伝達することを見出した。Nijima [4, 5]は電気生理学的手法でその存在を確認し、さらに門脈内にグルコースを投与すると迷走神経肝臓枝からの刺激により中枢神経を介して腹腔枝の電気活動が上昇することを見出した。1985年、LeeとMiller [6]はグルコース腹腔内投与によるインスリン分泌は迷走神経肝臓枝切断により低下することを報告し、また、Nagaseら[7]はこの効果は膵に分岐する迷走神経膵臓枝切断によって取り除かれることを報告した。これらの結果より、グルコースの直接的なインスリン分泌刺激に加えて、肝臓内のグルコレセプターからの刺激は迷走神経求心路-中枢-迷走神経遠心路を經由して、インスリン分泌を促進させグルコースの過剰による高血糖を是正して血糖調節のホメオスタシスの維持に寄与していると想定されている。

1986年、Tanakaら[8]は迷走神経肝臓枝切断ラットにおいてアルギニン腹腔内投与により血中インスリン及びグルカゴン濃度が有意に上昇することを発見した。また、迷走神経肝臓枝にアルギニンに反応する神経線維があり、アルギニンを門脈内に投与すると迷走神経肝臓枝を刺激し、それが中枢を介して迷走神経腹腔枝を抑制するという電気生理学の実験結果を報告した[9]。アルギニン投与によるこれらの影響は、迷走神経腹腔枝切断やアトロピン投与によっても阻止された[10]。その後、肝に迷走神経求心路を通じてアラニンとロイシンにアルギニンと同様に反応する神経線維の存在を示す電気生理学的根拠が示され[11]、さらに、迷走神経肝臓枝切断ラットでは偽切断ラットと比較して腹腔内アラニン投与によってグルカゴン分泌の有意な上昇を招き、ロイシンの腹腔内投与によって迷走神経肝臓枝切断ラットでは血漿インスリン濃度の著しい上昇が起きること、これらの効果は迷走神経腹腔枝切断によって元に戻ることが報告された[12]。

これらの結果から、肝の迷走神経肝臓枝にアミノ酸センサーが存在することが想定され、生理的状态においてアミノ酸センサーはアミノ酸の刺激を受け迷走神経求心性神経線維を刺激し、中枢を経て反射的に迷走神経遠心性神経線維を抑制して、アルギニンによるインスリン分泌およびグルカゴン分泌、ロイシ

ンによるインスリン分泌、アラニンによるグルカゴン分泌の全てに対し抑制的に作用していることが報告された[13, 14]。この結果は大量のアミノ酸を含む肉類などを過剰摂取した後のインスリンとグルカゴンの過度の分泌を防いで、血糖の恒常性の維持に寄与すると考えられた。以上の結果にもとづき、肝門脈にアミノ酸センサーが存在し、迷走神経求心性線維を刺激し、中枢神経を介して迷走神経遠心性線維に抑制のシグナルを送り、膵ホルモン分泌を調整するという説を提唱してきた[9-12]。このようなアミノ酸センサーが病的状態ではどのような作用を持つのかという問題は興味あることである。

視床下部腹内側核（VMH）を破壊した動物においては、迷走神経活動亢進と交感神経活動低下を起し自律神経の乱れが生じ[15-18]、結果として迷走神経遠心路と交感神経遠心路を通して高インスリン血症を招く事が知られている[20]。ラットにおいて、迷走神経肝臓枝は、大部分は求心性線維から成っており、主に肝臓と脳幹をつなぐ輸入経路として作用している[3, 4]。迷走神経腹腔枝は、膵臓へ分布する輸出経路として作用し、機能的に大部分は遠心性神経線維から成っている[3-5]。

本研究の目的は著明なインスリン分泌上昇を示すVMH破壊ラットにおいてインスリンおよびグルカゴン分泌に対する迷走神経の求心路と遠心路の機能を正常ラットと比較検討することである。

動物と方法

実験動物

体重260～290g前後の、14週齢雌性Sprague-Dawley (SD) 系ラット（日本チャールズ・リバー株式会社）を用い、恒温（23±5℃）、12時間明暗交替下にて、自由飲水にて飼育した。絶食時以外は自由摂食（固形飼料MF：オリエンタル酵母株式会社）とした。

実験手順

ラットを2群に分け、sham VMH破壊及びVMH破壊を行った。VMH破壊術後7日目に両群を2つのサブグループに分け、それぞれ偽迷走神経切断術（sham vagotomy）と迷走神経肝臓枝切断術（hepatic vagotomy）を行った。Vagotomy 施術と同時に頸静脈にカテーテルを留置した。更に3日後（VMH破壊10日後）に、一晚絶食後、3種類のアミノ酸を（アルギニン、ロイシンとアラニン）それぞれ腹膜内投与した。

VMH破壊ラットの作成

ラットをInoueら[21]の方法に準じてDe Groot[22]の脳座標に従い電気凝固法によるVMH破壊を施行した。対象群として、sham VMH破壊ラットを作成した。実験終了後、組織学的にVMH破壊部位の確認を行った。

迷走神経切断術および頸静脈カテーテル設置

Hepatic vagotomyはTanakaら[10]の方法に従って行った。ペントバルビタール(50mg/kg) 麻酔下、胃噴門部より2~3mm近位にある迷走神経前主幹から分岐する迷走神経肝臓枝を露出し、実体顕微鏡下で、近接迷走神経端部で前幹から走出する肝臓枝を完全に切断した(Fig.1)。Sham hepatic vagotomyは肝臓枝切断と同様な手術操作を行い、迷走神経の切断を行わないことにより作成した。

施術後、頸静脈よりポリエチレンカテーテル(Clay Adams Co, Parsippany, NJ, USA)を挿入し、その先端を右心房近くまで到達させ、その断端は皮下組織を通過して後頸部へ出し、固定した[23]。一日一回、頸静脈カテーテルをヘパリン添加生理食塩水で洗浄することによりアミノ酸負荷テストの日までカテーテル内の血栓形成による閉塞を予防した。

アミノ酸負荷試験

18時間絶食後、非麻酔および非拘束下において3種類のアミノ酸負荷試験を行った[23, 24]。それぞれ36-37°C度に温めたアルギニン溶液(10mM, 1g/kg)、ロイシン10%アラビアゴム浮遊液(0.3g/kg)およびアラニン溶液(0.5g/kg)を腹腔内投与した(各群:n=7)。投与前と5,10,15,30,60分後に0.9mlの血液を内頸静脈カテーテルからヘパリン塗布シリンジで採血して1000Uアプロチニン(バイエル薬品)添加冷却試験管に移した。遠心分離後の血清は測定時まで-80°Cで冷凍保存した。それぞれの血液採取後、血液減少の影響を最小限にするために頸静脈カテーテルを通じて等量のヘパリン添加血液を補充した[24]。

迷走神経肝臓枝切断の確認

迷走神経肝臓枝切断及び迷走神経腹腔枝切断の成功は、アミノ酸負荷後のラットをイソフルレン吸入麻酔下で開腹し、迷走神経切断部位の癒着組織を剥離し、実体顕微鏡下で確認した。

測定

血漿グルコース濃度はBeckmanグルコース分析器を用いてグルコースオキシダーゼ法によって測定した。血漿インスリンは免疫インスリン測定キット(Insulin assay kit, Amersham, Japan)によって測定した。標準曲線の作成にはラットインスリンを用いた。血漿グルカゴンはグルカゴン測定キット(Glucagon assay Kit, Daiichi Radioisotope Labs, Japan)により測定した。標準曲線の作成は豚グルカゴンを用いた。

統計分析

すべての結果は平均値±標準誤差で示した。得各群の体重推移の比較はDuncanの多重比較、群間の比較はT検定を用いて検討した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果

VMH破壊の確認

VMH破壊部位の確認は、当該部の組織切片を作成し、VMH全体が破壊されている場合をVMH破壊ラットとし、データの分析に用いた。Fig.2にVMH破壊後の典型的組織像を示す。両側VMH全域が破壊されている。

体重

Sham VMH破壊ラットにおいては、vagotomy施術前およびアミノ酸負荷試験前日の体重には2群の間に有意な差は認められなかった。VMH破壊ラットにおいては、VMH破壊1週後に著明な体重増加を示したが、アミノ酸負荷試験前日の体重は2群間に有意な差はみられなかった。

アミノ酸負荷試験

1) Sham VMH破壊ラット

(a) アルギニン負荷試験

アルギニンの腹腔内投与後、血漿グルコースは2群とも緩やかに上昇し10-15分間の間でピークに達し、30分まで緩やかに低下し、60分まで同一レベルを保った。2群間で有意差は見られなかった (Fig.3A)。血漿インスリンは全群で10分まで比較的急峻に上昇し、その後は30分までに急峻に低下し、60分まで同一レベルを保った。特にhepatic vagotomy群の上昇は急峻でsham vagotomy群と比較して5,10,15分で有意な高値を示した。血漿グルカゴンは5分まで急峻に上昇し、15分までほぼピーク値を示し、その後は低下した。特にhepatic vagotomy群の上昇は急峻でsham vagotomy群と比較して5,10,15,30分に有意の高値を示した。

(b) ロイシン負荷試験

ロイシンの腹腔内投与後、血漿グルコースはsham vagotomy群では緩やかな上昇を示した (Fig.3B)。Hepatic vagotomy群では一時的な低下を示し、5,10,15分ではsham vagotomy群と比較して有意な低値を示した。血漿インスリンは、hepatic vagotomy群では急峻な上昇を示し、sham vagotomy群と比較して5,10,15,30分で有意な高値を示した。血漿グルカゴンは2群間で有意差は見られなかった。

(c) アラニン負荷試験

アラニン負荷後の血漿グルコースは、2群ともに30分まで上昇を示し、あとは緩やかな低下もしくは同一レベルを示した (Fig.3C)。Hepatic vagotomy群の

上昇は急峻で、sham vagotomy群と比較して5,10,15,30分で有意な高値を示した。血漿インスリンは全群で30分まで緩やかに上昇しその後は低下したが、どの時点においても2群間に有意差は見られなかった。血漿グルカゴンはhepatic vagotomy群では上昇が急峻でsham vagotomy群と比較して5,10,15,30分で有意な高値を示した。

2) VMH破壊ラット

(a) アルギニン負荷試験

アルギニンの腹腔内投与後、血漿グルコースは2群とも比較的急峻に上昇し、5-15分の間でピークを示しその後は緩やかに低下した (Fig.4A)。血漿インスリンは両群ともに急峻な上昇を示した。血漿グルカゴンは両群ともに比較的急峻に上昇し、5-15分の間でピークに達し、その後は低下した。2群間にはいずれの時点でも有意差は見られなかった。

(b) ロイシン負荷試験

ロイシンの腹腔内投与後、血漿グルコースは2群ともに比較的急峻に上昇し10-15分の間でピークをつけ、その後は緩やかに低下した (Fig.4B)。血漿インスリンは両群ともに急峻に上昇し、10分にピークをつけその後は低下した。2群間に有意差は見られなかった。血漿グルカゴンは2群間で有意な差は見られなかった。

(c) アラニン負荷試験

アラニン投与後の血漿グルコースは2群とも緩やかに上昇し30分でピークをつけ、その後は同じレベルを維持した (Fig.4C)。血漿インスリンは両群ともにおだやかに上昇したが、2群の間に有意差は見られなかった。血漿グルカゴンは両群で急激に上昇したが、どの時点でも2群間に有意差は見られなかった。

考察

Sham VMH破壊ラット (コントロール) の成績では、迷走神経肝臓枝切断ラットにおいて迷走神経偽切断 (対照) ラットと比較してアルギニン腹腔内投与負荷によって、有意な血糖変動を伴わないインスリンおよびグルカゴン分泌の上昇、ロイシン腹腔内投与負荷では有意な血糖低下を伴うインスリン分泌の上昇、アラニン腹腔内投与負荷では有意な血糖上昇を伴うグルカゴン分泌の上昇を認めた。これらの研究結果は以前の報告と一致した[13, 15]。

アルギニン、ロイシン、アラニンは膵ホルモンであるインスリン、あるいはグルカゴンの強力な分泌刺激物質である事は良く知られており[25, 26]、このことだけを考えると、蛋白を過剰に摂取すると多くのアミノ酸が門脈を経て血中に入り、膵臓に達し、インスリン、あるいはグルカゴンを過剰に分泌させ、高

血糖や低血糖など血糖ホメオスタシスを阻害する可能性がある。アミノ酸センサーは門脈内のアミノ酸を感知し、それが過剰な場合は迷走神経求心性神経線維を刺激し、中枢を介して反射的に迷走神経遠心性神経線維を抑制することで、膵ホルモンの分泌を調節して血糖を正常域に保つ機能を有していると我々は考えている。また、我々は今回検討した3種類のアミノ酸以外にも、グリシン、グルタミン酸、イソロイシン、フェニルアラニンなどの他のアミノ酸についても同様の検討を行ったが、グリシン以外はアミノ酸センサーの機能を誘導しなかった[12, 27]。

本研究においてVMH破壊ラットでは、迷走神経肝臓枝切断ラットでは迷走神経偽切断VMH破壊ラットと比較してアルギニン、ロイシン、アラニンのいずれの腹腔内投与負荷によっても両群間に血糖の変動、インスリンおよびグルカゴン分泌に有意な差を認めなかった。この結果は、VMH破壊ラットにおいてはアミノ酸センサーを介した膵ホルモン分泌調整機能が働いていない可能性を示している。この理由について、VMH破壊ラットではインスリン分泌が著明に上昇すること[16, 28, 29]に加え、迷走神経腹腔枝切断術を用いた我々の過去の研究[30]と、交感神経性のアゴニスト及びアンタゴニスト投与実験[20]から迷走神経遠心路の活動上昇を伴う自律神経の乱れが更なるインスリン分泌を増加させていることによる可能性が考えられる。言い換えるとVMH破壊ラットでは著明な高インスリン血症のためにアミノ酸センサーの機能が遮蔽され、迷走神経肝臓枝切断がインスリン分泌への影響を与えなかったと考えられた。また、VMH破壊ラットでは迷走神経肝臓枝切断によっていずれのアミノ酸負荷によってもグルカゴン分泌に有意の変動が見られなかったのは、VMH破壊ラットのインスリン分泌過剰によってグルカゴン分泌が抑制されていたためと考えられた[31, 32]。これらはまた、グルカゴン分泌における神経性調節の関与が少ないことを支持する成績でもある[25, 31, 33]。

今回の研究ではVMH破壊ラットを用いて病的状態でのアミノ酸センサーの機能を検討したが、病的状態でのアミノ酸センサーの機能について検討した以前の研究においては、肝臓迷走神経切断後に四塩化炭素（CCl₄）によって肝硬変を誘発されたラットにおいて、アルギニンセンサーの機能は保持されていることが報告されている[34]。病的状態でのアミノ酸センサー機能については更なる検討が必要であると考えている。

結論として、正常ラットにおいては迷走神経肝臓枝切断によって、アルギニン腹腔内負荷により血糖変動を伴わないインスリンおよびグルカゴン分泌上昇、ロイシン腹腔内負荷により血糖低下を伴うインスリン分泌上昇、アラニン腹腔内負荷により血糖上昇を伴うグルカゴン分泌の上昇を示した。この現象は、肝門脈内にアミノ酸センサーが存在し、アミノ酸過剰摂取にもとづくアミノ酸による直接的な膵ホルモン分泌過剰を防ぐ役割を持っているものと説明できる。具体的には通常の食生活において、肉類の過剰摂取は血中に過度のアミノ酸を提供して、アミノ酸センサーの機能を破たんさせ、低血糖発作を起こすために注意しなければならないと考えている。VMH破壊ラットにおける迷走神経肝

臓枝切断によって、いずれのアミノ酸負荷によっても膵ホルモン分泌の有意な変動を示さなかった。このことはVMH破壊による神経性のインスリン過剰分泌のためアミノ酸センサー機能が遮蔽されたためと考えられた。

参考文献

1. Ahren B. Autonomic regulation of islet hormone secretion-implications for health and disease. *Diabetologia*, 43, 393-410 (2000)
2. Miller RE. Pancreatic neuroendocrinology: Peripheral neural mechanisms in the regulation of the islets of Langerhans. *Endocr Rev*, 2, 471-494 (1981)
3. Russek M. A hypothesis on the participation of hepatic glucoreceptors in the control of food intake. *Nature*, 197, 1089-1095 (1963)
4. Nijjima A: Afferent impulse discharges from glucoreceptors in the liver of the guinea pig. *Ann NY Acad Sci*, 157, 690-700 (1969)
5. Nijjima A. Nervous regulatory mechanism of blood glucose levels: In Food intake and chemical senses (ed by Y Katsuki et al., Scientific Societies Press, Tokyo, Japan, pp413-426 (1977)
6. Lee KC, Miller RE. The hepatic vagus nerve and the neural regulation of insulin secretion. *Endocrinology*, 117, 307-314 (1985)
7. Nagase, H., Inoue, S., Tanaka, K., Takamura, Y., Nijjima, A. Hepatic glucose-sensitive unit regulation of glucose-induced insulin secretion in rats. *Physiol. Behav*, 53, 139-143 (1993)
8. Tanaka K, Inoue S, Fujii T, Takamura Y. Enhancement of insulin and glucagon secretion by arginine after hepatic vagotomy. *Neurosci Lett*, 72, 74-78 (1986)
9. Tanaka K, Inoue S, Takamura Y, Jiang ZY, Nijjima A. Arginine sensors in the hepato-portal system and their reflex effects on pancreatic efferents in the rat. *Neurosci Lett*, 72, 69-73 (1986)
10. Tanaka K, Inoue S, Nagase H, Takamura Y. Modulation of arginine-induced insulin and glucagon secretion by the hepatic vagus nerve in the rat: effects of celiac vagotomy and administration of atropine. *Endocrinology*, 127, 2017-2023 (1990)
11. Tanaka K, Inoue S, Nagase H, Takamura Y, Nijjima A. Amino acid sensors sensitive to alanine and leucine exist in the hepato-portal system in the rat. *J Auton Nerv Syst*, 31, 41-46 (1990)
12. Tanaka K, Inoue S, Saito S, Nagase H, Takamura Y. Hepatic vagal amino acid sensors modulate amino acid induced insulin and glucagon secretion in the rat. *J Auton Nerv Syst*, 42, 225-232 (1993)
13. Adachi A, Nijjima A, Jacobs HL. An hepatic osmoreceptor mechanism in the electrophysiological and behavioral studies. *Am J Physiol*, 231, 1043-1049 (1976)

14. Magni F, Carobi C. The afferent and preganglionic parasympathetic innervation of the rat demonstrated by the retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Auton Nerv Syst*, 8, 237-260 (1983)
15. Inoue S, Bray G. The effects of subdiaphragmatic vagotomy in rat with ventromedial hypothalamic obesity. *Endocrinology*, 100, 108-114 (1977)
16. Inoue S, Bray GA, Mullen Y. Effect of transplantation of pancreas on development of hypothalamic obesity. *Nature*, 226, 742-744 (1977)
17. Yoshimatsu H, Nijijima A, Oomura Y, Yamabe K, Katafuchi T. Effects of hypothalamic lesion on pancreatic Autonomic nerve activity in the rat. *Brain Res*, 303, 147-152 (1984)

18. Bray GA, Nishizawa Y. Ventromedial hypothalamus modulates fat mobilisation during fasting. *Nature*, 274, 900-902 (1978)
19. Inoue S, Bray GA. An autonomic hypothesis for hypothalamic obesity. *Life Sci*, 25, 561-566 (1979)
20. Inoue S, Mullen Y, Bray GA. Hyperinsulinemia in rats with hypothalamic obesity: effects of autonomic drugs and glucose. *Am J Physiol*, 245, 372-378 (1983)
21. Inoue S, Camplifield LA, Bray GA. Comparison of metabolic alterations in hypothalamic and high fat diet induced obesity. *Am J Physiol*, 233, 162-168 (1977)
22. De Groot J. The rat forebrain in stereotaxic coordinates. N. V. Noord-Hollandsch Uitgevers Maatschappij, Amsterdam, (1959)
23. Shah J, Wongsurawat N, Aran P, Motto G, Bowser E. A method for studying acute insulin secretion and glucose tolerance in unanesthetized and unrestrained rats. *Diabetes*, 26, 1-6 (1977)
24. Berthoud H, Laughton W, Powley T. A method for large volume blood sampling and transfusion in rats. *Am J Physiol*, 250, 331-337 (1986)
25. Quesada I, Tudurí E, Ripoll C, Nadal A. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol*, 199, 5-19 (2008)
26. Floyds JC, Jr Fajans S, Conn JW, Knopf RF, Rull J. Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest*, 45, 1487-1502 (1966)
27. Saitou S, Tanaka K, Inoue S, Takamura Y, Nijijima A. Glycine sensor in the hepato-portal system and their reflex effects on pancreatic efferents in the rat. *Neurosci Lett*, 149, 12-14 (1993)
28. Bray GA, York DA. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev*, 59, 719-809 (1979)
29. King BM. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav*, 87, 221-244 (2006)

30. Inoue, S., Nagase, H., Satoh, S., Egawa, M., Tanaka, K., Takamura, Y.: Role of the efferent and afferent vagus nerve in the development of ventromedial hypothalamic (VMH) obesity. *Brain Res. Bull*, 27, 511-515 (1991)
31. MacDonald PE, Zhang Y, Ramracheta R, Salehi A, Ma X, Johnson PR, Cox R, Eliasson L, Rorsman P. A K ATP channel-dependent pathway within α cells regulates glucagon release from both rodent and human islets of Langerhans *Pros Biology*, 5, 1236-1247 (2007)
32. Bansal P, Wang Q. Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295, 751-761 (2008)
33. Gromada J, Franklin I, Wollheim CB. α -cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev*, 28, 84-116 (2007)
34. Okazaki H, Tanaka K, Nagase H, Inoue S. Modulation of insulin secretion by hepatic vagotomy in cirrhotic rats. *Physiol Behav*, 53, 521-525 (1993)

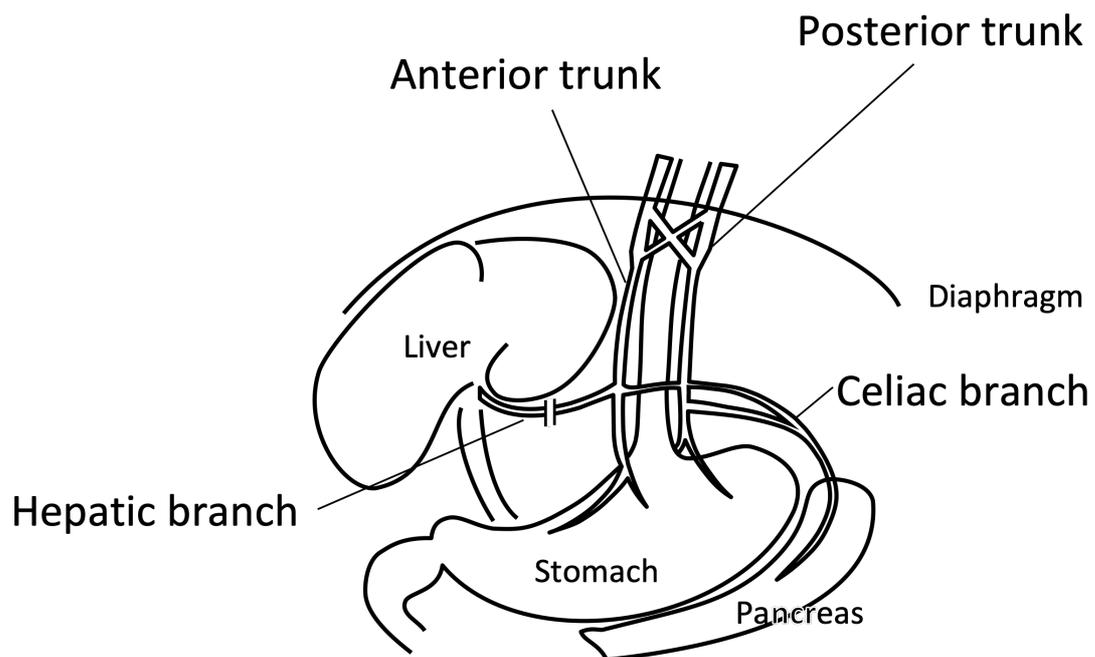


Fig.1 ラットにおける腹部横隔膜下迷走神経の模式図

迷走神経は食道に沿って2本の左右幹枝が下行し、一方は胃と肝に、他方は胃と膵に分枝している。主に肝臓枝は求心路として、膵臓枝は遠心路としての役割を担っている。

二重線で切断位置を示した。

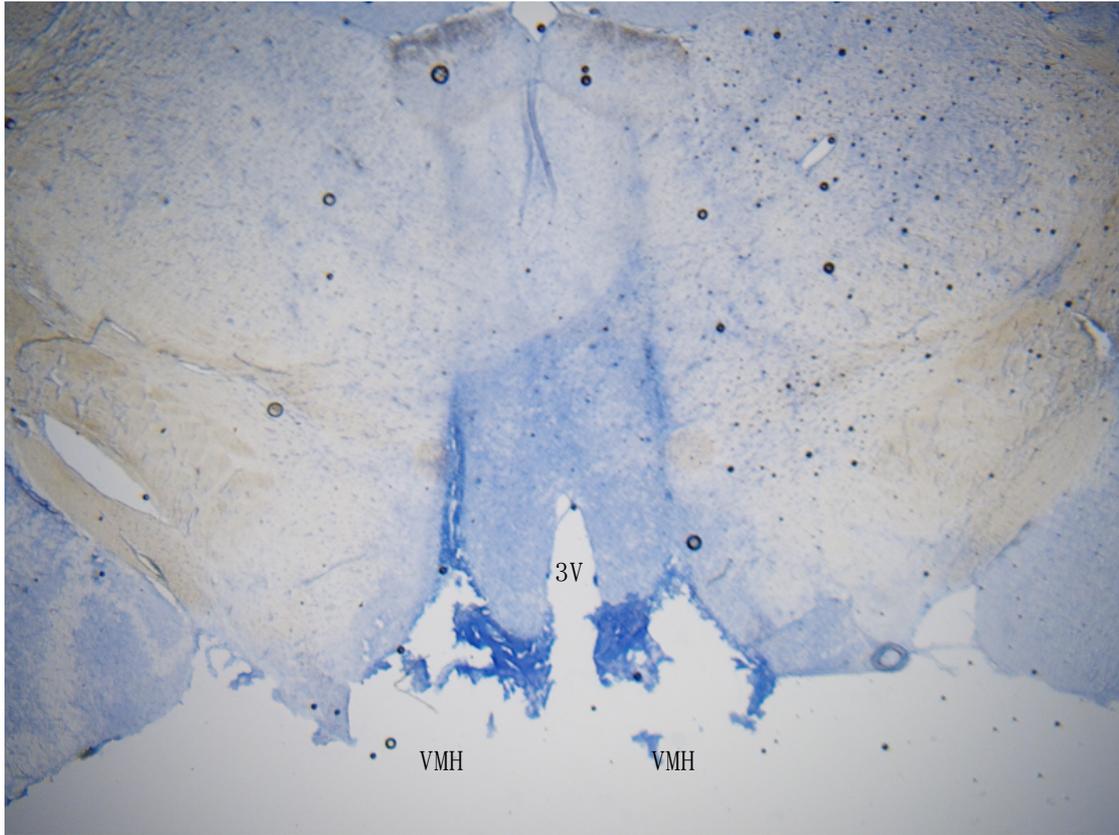


Fig.2 VMH破壊後の典型的なラット脳断面像

第三脳室（3V）の両脇にある腹内側核（VMH）が完全に破壊されていることが確認できる。

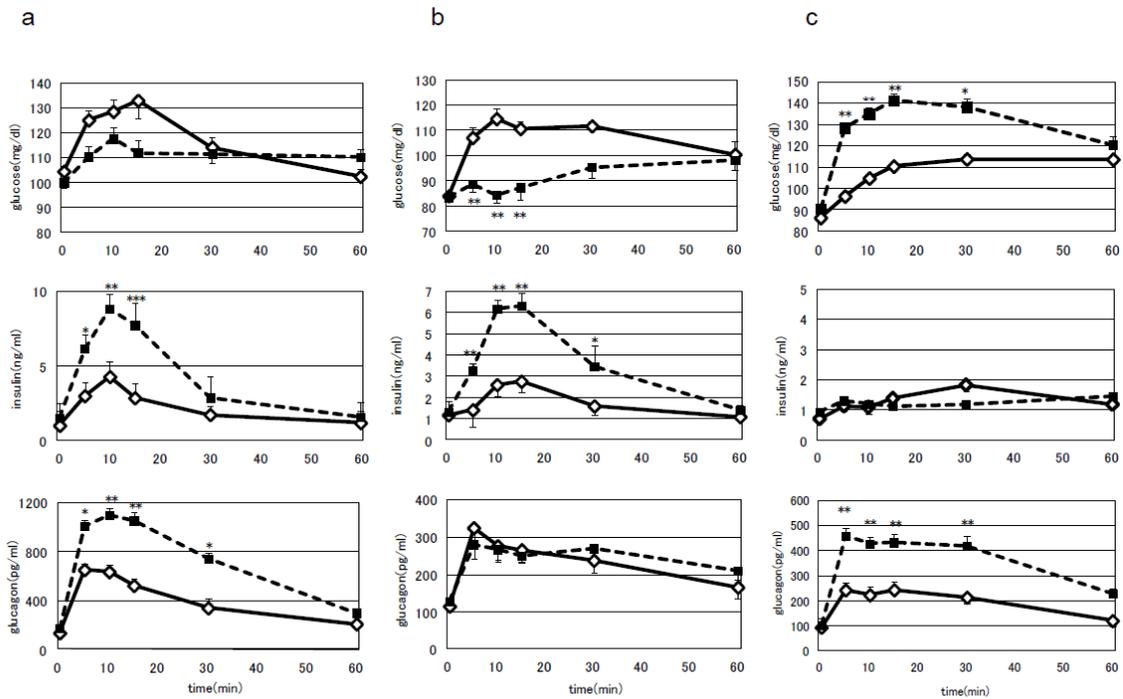


Fig.3 Sham VMH破壊ラットにおけるアルギニン(a)ロイシン(b)アラニン(c)腹腔内投与に対するグルコース、インスリン、グルカゴンの血中濃度の変動

◇ : sham-vagotomy、 ■ : hepatic-vagotomy

*P<0.05、**P<0.01 vs.sham-VMH-lesioned

Hepatic Vagotomyを施したラットではアルギニン負荷により血糖変動を伴わないインスリン及びグルカゴン分泌の上昇、ロイシン負荷により血糖低下を伴うインスリン分泌低下、アラニン負荷により血糖上昇を伴うグルカゴン分泌上昇を示した。

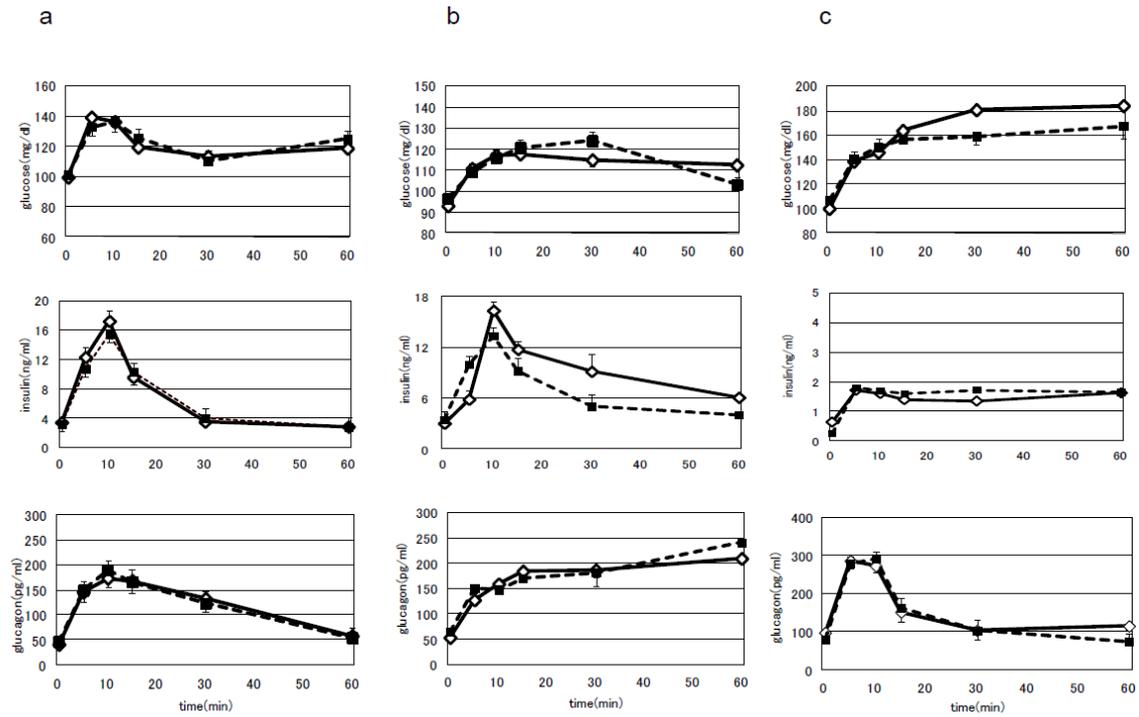


Fig.4 VMH破壊ラットにおけるアルギニン(a)ロイシン(b)アラニン(c)腹腔内投与に対するグルコース、インスリン、グルカゴンの血中濃度の変動

◇ : sham-vagotomy、■ : hepatic-vagotomy

高インスリン血症を示すVMH破壊ラットにおいては、アルギニン、ロイシン、アラニンのいずれのアミノ酸腹負荷によってもHepatic Vagotomyによって有意な分泌量の変動は示さなかった。

第2章 VMH破壊ラットにおける急性胃粘膜病変に対する 消化管粘膜増殖の役割

緒言

視床下部腹内側核 (VMH) 破壊ラットは視床下部性肥満モデルのひとつである[1, 2]。VMH破壊ラットでは、過食・体重増加・高インスリン血症・高レプチン血症などの病態が認められている[1, 3]。また、Kiba[4-6]らは迷走神経が密に分布する腹部臓器組織において、VMH破壊ラットで迷走神経活動上昇により細胞増殖をきたす事を報告している。さらにKintakaら[7]は既に、VMH破壊ラットにおける細胞増殖により胃粘膜が肥厚する所見を報告している。

急性胃粘膜病変 (acute gastric mucosal lesion: AGML) または急性胃病変 (acute gastric lesion: AGL) は、びらん、出血性胃炎、胃潰瘍を含む急性的に誘発される胃の病変と定義され、精神的あるいは身体的ストレス、薬剤 (NSAID、抗生物質、副腎皮質ステロイド、抗癌剤)、アルコール、火傷、外傷、手術、急性ヘリコバクターピロリ菌感染などに起因すると考えられている [8, 9]。臨床の場合において、胃腸出血の誘因としてAGMLは重要な因子であると認められている[9]。AGMLの成因については、ShayとSun [10]の提唱した「胃粘膜に対する攻撃因子と防御因子のアンバランス説」が広く受け入れられている。AGMLの多くは早期に回復するが、複数の攻撃因子が繰り返し発生し防御因子がその変化に対処できなかった場合には、慢性消化性潰瘍に発展することがある。ShayとSun [10]によって提案されるように、壁細胞量 (細胞増殖) や粘膜層 (粘膜分泌物) は主要な防御因子である。

本研究では、VMH破壊ラットにおいて胃粘膜細胞増殖による粘膜層の肥厚がAGML形成に抵抗性を示すかどうかを検討した。また、AGMLの発症機序を検討するために、VMH破壊ラットを用い主な攻撃因子と防御因子の変化を測定した。さらに防御因子としてのVMH破壊ラットにおける胃粘膜増殖細胞の組織内局在や形態学的特徴についても組織学的に詳細な検討を行った。

動物と方法

実験動物

体重約300gの、14週齢雌性Sprague-Dawley (SD) 系ラット (日本チャールズ・リバー株式会社) を用い、恒温 (23±5°C)、12時間明暗交替下にて、自由飲水にて飼育した。絶食時以外は自由摂食 (固形飼料MF: オリエンタル酵母株式会社) とした。

VMH破壊ラットの作成

ラットを脳アトラス[11]を参考にInoueら[12]の方法に準じて電気凝固法によるVMH破壊を施行した。対象群として、sham VMH破壊ラットを作成した。なおsham VMH破壊ラットはVMH破壊ラットと同様の操作を行い、通電を行わないことにより作成した。実験終了後、組織学的にVMH破壊部位の確認を行った。

急性胃粘膜病変（AGML）の誘発

1) 絶食負荷

VMH破壊10日後のVMH破壊（n=4）およびsham VMH破壊ラット（n=4）を用い、24時間絶食後、ペントバルビタール（50 mg/kg）麻酔下で解剖し、胃粘膜の観察を行った。

2) エタノール負荷

VMH破壊10日後のVMH破壊（n=14）およびsham VMH破壊ラット（n=12）を用い、24時間絶食後60%エタノール（3 ml/kg）を、胃ゾンデにて投与し90分後、ペントバルビタール（50 mg/kg）麻酔下で、胃を大弯にそって切開し、胃粘膜の観察を行った。急性胃粘膜病変発症率は肉眼で確認した急性病変の数で表し、さらに病変の広さは潰瘍係数として評価した。潰瘍係数はびらんや出血を1、胃粘膜欠損（急性潰瘍）は長径と短径の和とし、その総和で表した[13]。

胃粘膜攻撃因子の検討

1) 胃酸分泌量測定

VMH破壊10日後、VMH破壊（n=8）及びsham VMH破壊ラット（n=8）を用い、24時間絶食後にGhosh & Schild [14]の方法に準じて胃灌流を行い、胃液を採取した。ペントバルビタール麻酔下で腹部を正中切開し、灌流液注入用カテーテルは前胃より刺入し、幽門部に留置し、36°C生理食塩水を1 ml/minの速度で注入した。一方、灌流液採取用カテーテルは十二指腸より刺入し、前胃部に留置し、30分おきに胃液を採取した。灌流開始2~3時間後に基礎分泌測定用の採液を行ない、ついで、摂食刺激を想定したペンタガストリン（30 µg）腹腔内投与を行い、60分間（灌流開始3~4時間後）胃液を採取した。採液した灌流液は0.01 N NaOHによる中和滴定を行い、酸分泌総量を算出した。

2) 血中ガストリン量測定

VMH破壊10日後、VMH破壊（n=10）及びsham VMH破壊ラット（n=7）を用い、ペントバルビタール麻酔下にて心臓穿刺法にて採血し、それを検体としてガストリン濃度を測定した。ガストリンはRIA法（試薬：ガストリン・リアキットⅡ、アボットジャパン株式会社、機器名：γ-カウンター、型式：ARC 950、アロカ）にて測定した。

胃粘膜防御因子の検討

1) ヘキソサミン量測定

VMH破壊10日後、VMH破壊 (n=7) 及びsham VMH破壊ラット (n=7) を用い、24時間絶食後、胃体部粘膜をメスにて、削ぎ取り、湿重量を測定した後、Neuhaus & Letzring [17]の方法にもとづき、ヘキソサミンの測定を行った。

2) Thiobarbituric acid反応物質 (TBARS) 量測定

酸化ストレスは粘膜防御能を低下させるため、TBARSは防御因子の指標として用いられている[18]。TBARSは大川ら[19]の方法に準じて測定した。

3) 胃粘膜血流 (Gastric mucosal blood flow: GMBF) の測定

GMBFはPiqueら[20]の方法に準じて測定した。

4) 胃粘膜細胞増殖の組織学的検討

VMH破壊 (n=5) 及びsham VMH破壊ラット (n=5) を用い、VMH破壊10日後に解剖して胃を摘出し、大弯側に沿って切開し、10%ホルマリン液に浸漬固定後、パラフィン包埋し、薄切標本を作製した。ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色と免疫組織細胞化学染色法で細胞増殖のマーカーとなるproliferating cell nuclear antigen (PCNA) 染色 (ダコ・ジャパン株式会社) を行った。光学顕微鏡下でマイクロメーターにより胃粘膜高および胃粘膜増殖帯上部 (被蓋上皮細胞層) を測定した。また、細胞核1000個あたりのPCNA陽性細胞の割合をPCNA-labeling indexとして、細胞増殖の程度を評価した[21]。

統計解析

すべてのデータは、平均±標準誤差で示した。2群間 (VMHとsham) の有意差検定にはStudent t testを使用し、 $P < 0.05$ を統計的に有意であると判断した。

結果

AGMLの発生率

48時間絶食負荷ではsham VMH破壊ラット、VMH破壊ラット共にAGMLは観察されなかった。

60%エタノール負荷によるAGMLの発生率は2群間に有意な差は見られなかった (sham 80 % vs. VMH 72 % NS)。しかし、潰瘍係数はVMH群ではsham 群と比較して有意に低値を示した (Fig.1)。

攻撃因子の比較

胃酸分泌は、基礎分泌及びペンタガストリン刺激による追加分泌共にVMH群はsham群と比べて有意に高値を示した (Fig.2)。血清ガストリン濃度について

ても、VMH群はsham群と比べて有意に高値を示した (Fig.3)。

防御因子の比較

粘膜中ヘキソサミン濃度 (45.4 ± 2.6 vs. 46.3 ± 5.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ d.w., NS)、GMBF (71.8 ± 1.7 vs. 72.3 ± 16.5 ml/min/100g, NS)、胃粘膜TBARS (42.7 ± 16 vs. 49.6 ± 12.8 nmol/w.w., NS) はいずれも2群間に有意な差は見られなかった。

胃粘膜細胞層厚はSham群に比べてVMH群で有意な肥厚を示した (Fig.4、Table 1)。

さらに、PCNA染色で細胞増殖の状態を見てみると、胃では粘膜の上部三分の一の部分が増殖帯と言われているが、VMH破壊ラットでは増殖帯より上部の表層上皮層が特に肥厚していることが明らかになった (Fig.5 a, b、Table 1)。また、増殖帯におけるPCNA陽性細胞数は、sham VMH破壊ラットに比べてVMH破壊ラットで明らかに増加した (Fig.5c, d、Table 1)。

本研究において、48時間絶食負荷ではVMH群とsham群の両群においてAGMLの発生を確認できなかった。またエタノール負荷実験においては、潰瘍発症率には両群で差は見られなかったが、潰瘍係数を求めたところ、VMH破壊ラットにおいて有意な低値を示した。このことは、VMH破壊ラットはAGML誘発負荷に対して抵抗性を示したことを示唆している。

VMH破壊による迷走神経活動上昇によりAGMLの最も重要な攻撃因子である胃酸分泌が亢進していることは既に報告されているが[22, 23]、本研究においても、胃酸分泌は、基礎分泌及びペンタガストリン刺激による追加分泌のいずれでも、sham VMH破壊ラットと比較してVMH破壊ラットで約3倍の高値を示した。食後を想定したペンタガストリン刺激後のガストリン血中濃度はsham VMH破壊ラットと比較してVMH破壊ラットで高値であった。このVMH破壊ラットにおける食後のガストリン分泌の亢進は、胃酸分泌を促進させるために攻撃因子の増強と見なすことができるが、一方で、ガストリンによる細胞増殖促進作用[24]への関与も考えられる。実際に本研究において、VMH破壊ラットではガストリン分泌の亢進と胃粘膜層の肥厚が観察されていることから、ガストリンによる細胞増殖作用も胃粘膜増高に作用している可能性も十分に考えられる。したがって、我々はVMH破壊によるガストリン分泌の亢進は、短期的には攻撃因子としてAGML誘発に作用するが、長期的には防御因子としての粘膜肥厚に貢献するものと考えている。

以上、今回の成績にみられたようにVMH破壊ラットでは攻撃因子が増加したもののAGMLに対する抵抗性を示していたので、攻撃因子の影響よりも防御因子の影響が上まっていたと考えられた。そこで、防御因子に注目した。

防御因子については、胃粘膜の粘液分泌量の指標となるヘキソサミン量、胃粘膜血流量、酸化ストレスの指標であるTBA反応物質を測定したが、いずれもVMH破壊ラットとsham VMH破壊ラットで差は見られなかった。しかし、組織

学的検討でVMH破壊ラットでは胃粘膜層の肥厚がみられ、特に細胞増殖帯上部の表層上皮細胞の増加が認められ、さらに、細胞増殖帯のPCNA陽性細胞数が有意に増加していたことから、胃粘膜肥厚は胃粘膜細胞の増殖によるものであることが組織学的に証明された。これらの結果より、VMH破壊ラットでは胃粘膜層の肥厚、特に表層上皮細胞層の増加がAGML抵抗性を示す防御因子として重要な役割を果たしていることが示唆された。

エタノール誘発性AGMLの発症は、グレリン[25]または甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（TRH）[26]の中枢性投与によって阻害することができる事が判明しており、またSibiliaら[25]はグレリンがシクロオキシゲナーゼ-1（COX-1）由来のプロスタグランジン（PGE2）と一酸化窒素合成酵素の濃度を上昇させることによって、エタノール誘発性AGMLの発症を阻害できると報告している。さらに、Yonedaら[26]は本研究と同様の実験において、エタノール誘導性のAGMLがTRHアナログ投与により完全に防止されることを報告している。彼らは、その機序についてTRHの中枢性投与による迷走神経コリン作動性のPGE2分泌が胃粘膜再生を促進することに起因している可能性を述べている。その中で興味のあることは、TRHの低量中枢投与（1.5ng/rat）ではAGMLの完全な防止現象が認められたが、高量投与（6ng/rat）では、この現象は認められなかったことを指摘していることである。この理由はTRHには胃酸分泌刺激作用があるためTRH中枢高量投与は胃酸分泌の過促進をもたらす攻撃因子が防御因子を凌駕することによると考えられる。これは恐らく、TRH投与による迷走神経を介した胃粘膜増殖作用はVMH破壊による迷走神経を介した胃粘膜増殖作用よりも弱いのではないかと考えられる。本研究では胃粘膜層の肥厚がAGMLの発症を阻害することを示しており、更にVMH破壊により慢性的にも同様の機序によりAGML抵抗性を示すと考えているが、VMH破壊と長期的な胃粘膜保護作用との関連についてはさらなる検討が必要である。

粘膜細胞増殖による粘膜の肥厚は、消化性潰瘍（peptic ulcer disease: PUD）の予防や治癒にも寄与する可能性がある。ヘリコバクターピロリとアスピリンを含む非ステロイド性抗炎症剤（NSAID）はPUDの主な病原因子で、免疫系の減弱や直接接触によって防御因子を低下させている[27, 28]。PUDは最も重要な攻撃因子である胃酸の分泌を制御する抗潰瘍薬[29, 30]や、粘液の産生・分泌亢進により粘膜を保持する薬剤[31, 32]を使用して防御因子を増強させることで治療が期待できる。しかし、我々の知る限りでは、細胞増殖を通して防御機構を著明に増進して胃潰瘍やAGMLの治癒を強化しうる薬剤は報告されていない。H. pyloriの除菌治療によりPUD患者数は減少した[33, 34]。しかし、高齢患者の多くは慢性関節リウマチや各種の慢性痛に対しNSAIDを多用しており、NSAID関連のPUDは増加し続ける可能性がある。NSAIDで最も重要な副作用は、防御機構と修復機構が減弱することによる粘膜損傷、AGMLおよび消化性潰瘍の発症である[35]。その上、NSAIDは出血や穿孔などの重篤な粘膜障害にもつながることがある[36]。したがって、胃粘膜の防御・修復を増強する新薬開発の必要性が高まっている。この点に関し我々は、AGMLやPUDの治療のための新薬

を開発するために、胃と十二指腸で細胞増殖を介して粘膜の肥厚に寄与する因子を分子レベルで同定することが重要であると考えている。また、我々はVMH破壊による胃・十二指腸の粘膜細胞増殖はコリン作動性阻害薬であるアトロピンによって阻害されることを見出した。したがって、胃と小腸の細胞増殖に関与するムスカリンレセプターを同定することができれば、AGMLやPUDの別の治療法開発の根拠となりうることも考えられる。

結論として、VMH破壊ラットの胃粘膜は、エタノール誘発性AGMLに抵抗性を示した。VMHを破壊するとAGML形成に促進的に働く胃液分泌が増加したが、一方では細胞増殖による著明な粘膜増厚をもたらし、その結果、防御因子が攻撃因子を凌駕してAGMLに対する抵抗性を増すことにつながったと考えられた。

参考文献

1. Bray GA, York DA. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: An autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev*, 59, 719-809 (1979)
2. Inoue S. Animal model of obesity: hypothalamic lesions. In: Björntorp P, Brodoff BN, Obesity, 1st ed. Philadelphia: JB Lippincott, pp266-277 (1992)
3. Suga A, Hirano T, Kageyama H, Kashiba M, Oka J, Osaka T, Namba Y, Tsuji M, Miura M, Adachi M, Inoue S. Rapid increase in circulating leptin in ventromedial hypothalamus-lesioned rats: role of hyperinsulinemia and implication for upregulating mechanism. *Diabetes*, 48, 2034-2038 (1999)
4. Kiba T, Tanaka T, Endo O, Inoue S. Role of vagus nerve in increased DNA synthesis after hypothalamic ventromedial lesions in rat liver. *Am J Physiol*, 262, G483-G487 (1992)
5. Kiba T, Tanaka K, Endo O, Inoue S. Ventromedial hypothalamic lesions increase gastrointestinal DNA synthesis through vagus nerve in rats. *Gastroenterology*, 104, 475-484 (1993)
6. Kiba T, Tanaka K, Numata K, Hosino M, Misugi K, Inoue S. Ventromedial hypothalamic lesion-induced vagal hyperactivity stimulates rat pancreatic cell proliferation. *Gastroenterology*, 110, 885-893 (1996)
7. Kintaka Y, Osaka T, Suzuki Y, Hashiguchi T, Nijima A, Kageyama H, Fumiko T, Shioda S, Inoue S. Effects of gastric vagotomy on visceral cell proliferation induced by ventromedial hypothalamic lesions: role of vagal hyperactivity. *J Mol Neurosci*, 38, 243-249 (2009)
8. Floch MH. Erosive gastritis: acute gastric ulcers. In: Floch MH, Netter's Gastroenterology 2nd ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, pp142-143 (2010)
9. Yakabi K, Nakamura T. Acute gastroduodenal mucosal lesion. *Nihon Rinsho*, 56, 2336-2342 (1998)
10. Shay H, Sun DCH. Etiology and pathology of gastric and duodenal ulcer. In:

- Bockus HL, Gastroenterology. Saunders, pp420-465 (1953)
11. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd ed. New York: Academic Press, (1986)
 12. Inoue S, Campfield LA, Bray GA. Comparison of metabolic alterations in hypothalamic and high fat diet-induced obesity. *Am J Physiol*, 233, R162-R168 (1977)
 13. Ohta Y, Kobayashi T, Nishida K, Sasaki E, Ishiguro I. Preventive effect of Oren-gedoku-to (Huanglian-Jie-Du-Tang) extract on the development of stress-induced acute gastric mucosal lesions in rats. *J Ethnopharmacol*, 67, 377-384 (1999)
 14. Ghosh MN, Schild HO. Continuous recording of acid gastric secretion in the rat. *Brit J Pharmacol*, 13, 54-61 (1958)
 15. Joseph IM, Zavros Y, Merchant JL, Kirschner D.: A model for integrative study of human gastric acid secretion. *J Appl Physiol*, 94(4), 1602-1618 (2003)
 16. Yuzurihara M, Ikarashi Y, Kase Y, Torimaru Y, Ishige A, Maruyama Y.: Effect of Saiboku-to, an Oriental Herbal Medicine, on gastric lesion induced by restraint water-immersion stress or by ethanol treatment. *J Pharm Pharmacol*, 51(4), 483-490 (1999)
 17. Neuhaus OW, Letzring M. Determination of hexosamines in conjunction with electrophoresis on starch. *Analyt Chem*, 29, 1230-1233 (1957)
 18. Szelenyi I, Brune K.: Possible role of oxygen free radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Dig Dis Sci*, 33(7), 865-871 (1988)
 19. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. *J Lipid Res*, 19, 1053-1057 (1978)
 20. Pique JM, Leung FW, Tan HW, Livingston E, Scremin OU, Guth PH. Gastric mucosal blood flow response to stimulation and inhibition of gastric acid secretion. *Gastroenterology*, 95, 642-650 (1988)
 21. Saftoiu A, Ciurea T, Georgescu C, Banita M, Comanescu V, Rogoveanu I, Gorunescu F, Georgescu I. Immunohistochemical assessment of proliferating cell nuclear antigen in primary hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. *J Cell Med*, 7, 436-446 (2003)
 22. Ridley PT, Brooks FP. Alterations in gastric acid secretion following hypothalamic lesions producing hyperphagia. *Am J Physiol*, 209, 319-323 (1965)
 23. Tominaga S, Satoh S, Nagase H, Kazuaki T, Inoue S. Hypergastric acid secretion in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Physiol Behav*, 53, 1177-1182 (1993)
 24. Hong LI, Herbert HF. Hypergastrinemia increases proliferation of gastroduodenal epithelium during gastric ulcer healing in rats. *Digest Dis Sci*, 41, 40-48 (1996)
 25. Sibilio V, Pagani F, Rindi G, Lattuada N, Rapetti D, De Luca V, Campanini N, Bulgarelli I, Locatelli V, Guidobono F, Netti C. Central ghrelin gastroprotection involves nitric oxide/prostaglandin cross-talk. *Br J Pharmacol*, 154, 688-697

- (2008)
26. Yoneda M, Tache Y. Central thyrotropin-releasing factor analog prevents ethanol-induced gastric damage through prostaglandins in rats. *Gastroenterology*, 102, 1568-1574 (1992)
 27. Algood HM, Cover TL. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. *Clin Microbiol Rev*, 19, 597-613 (2006)
 28. Yeomans ND, Skeljo MV, Giraud AS. Gastric mucosal defensive factors: the therapeutic strategy. *J Gastroenterol Hepatol*, 9, S104-S108 (1994)
 29. Takagi T, Takeda M, Maeno H. Effect of new potent H2-blocker, 3-[[[2-[(diaminomethylene)amino]-4-thiazolyl]methyl]-thio]-N2-sulfamoylpropionamide (TM-11170) on gastric secretion induced by histamine and food in conscious dogs. *Arch Int Pharmacodyn*, 256, 48-58 (1982)
 30. Satoh H, Inatomi N, Nagaya H, Inada I, Nohara A, Nakamura N, Maki Y. Antisecretory and antiulcer activities of a novel proton pump inhibitor AG-1749 in dogs and rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 248, 806-815 (1989)
 31. Terano A, Hiraishi H, Ota S, Sugimoto T. Geranylgeranylacetone, a novel anti-ulcer drug, stimulates mucus synthesis and secretion in rat gastric cultured cells. *Digestion*, 33, 206-210 (1986)
 32. Yamasaki K, Kanbe T, Chijiwa T, Ishiyama H, Morita S. Gastric mucosal protection by OPC-12759, a novel antiulcer compound, in the rat. *Eur J Pharmacol*, 142, 23-29 (1987)
 33. Suzuki H, Hibi T, Marshall BJ.: *Helicobacter pylori*: present status and future prospects in Japan. *J Gastroenterol*, 42(1), 1-15 (2007)
 34. Ables AZ, Simon I, Melton ER.: Update on *Helicobacter pylori* treatment. *Am Fam Physician*, 75(3), 351-358 (2007)
 35. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T. Prostaglandins and ulcer healing. *J Physiol Pharmacol*, 56(Suppl 5), 5-31 (2005)
 36. Hawkey CJ, Langman MJ. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: overall risks and management. Complementary roles for COX-2 inhibitors and proton pump inhibitors. *Gut*, 52, 600-608 (2003)

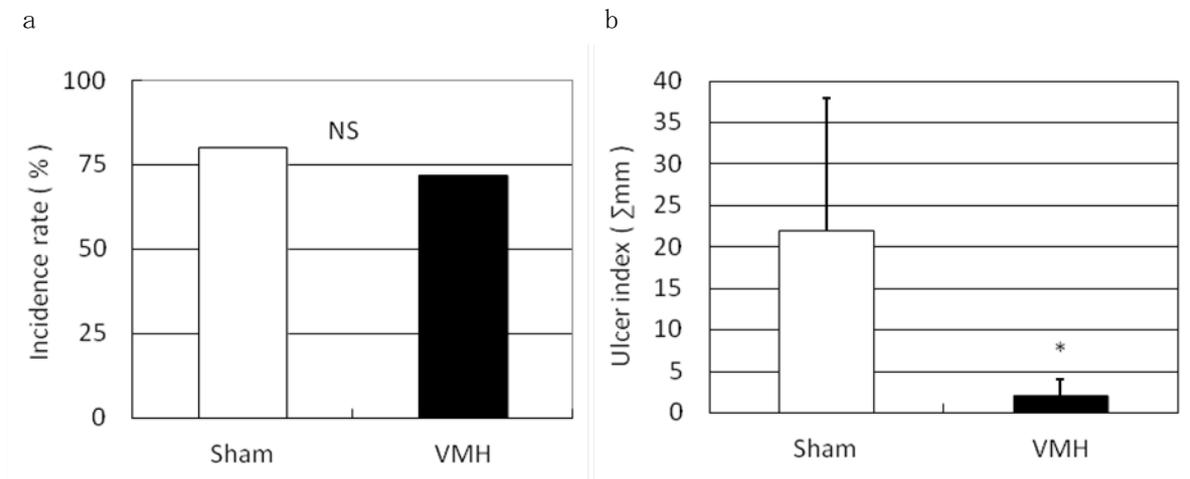
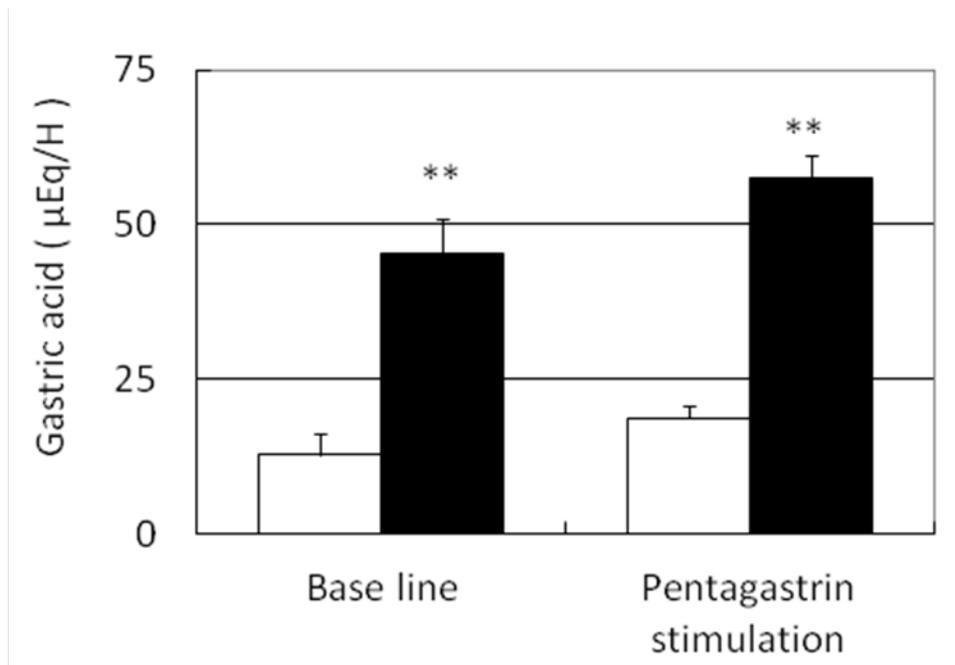


Fig.1 60%エタノール負荷による潰瘍発生率(a)と潰瘍係数(b)
* $p < 0.05$ vs. sham

60%エタノール負荷により誘発された潰瘍の発生率(a)には両群に差は見られなかったが、潰瘍の大きさを指標化した潰瘍係数(b)ではsham VMH破壊ラットに比べてVMH破壊ラットで有意に低値を示した。



□ : Sham VMH破壊ラット、■ : VMH破壊ラット

**p<0.001 vs. sham

空腹時を想定した基礎分泌と、摂食後を想定したペントガストリン刺激による追加分泌は、いずれもsham VMH破壊ラットに比べてVMH破壊ラットで有意に高値を示した。

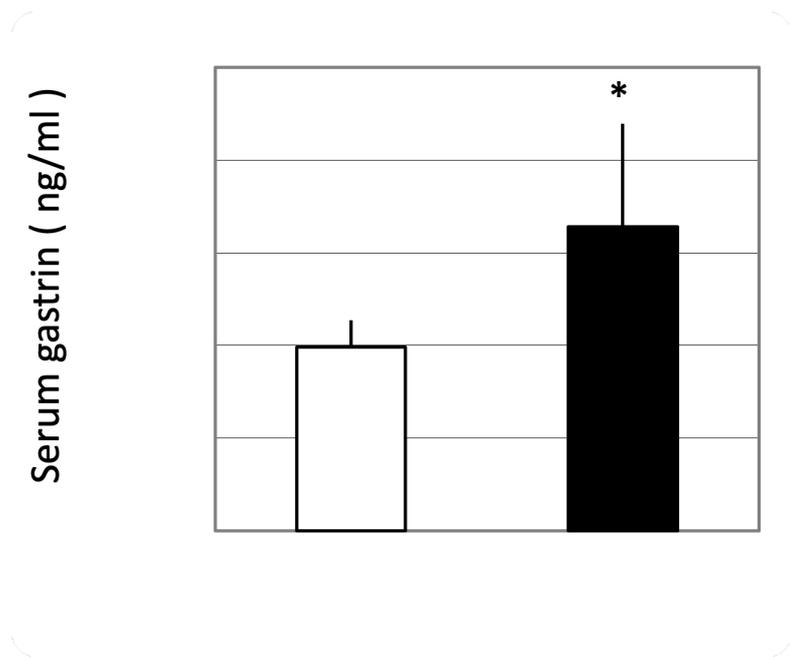
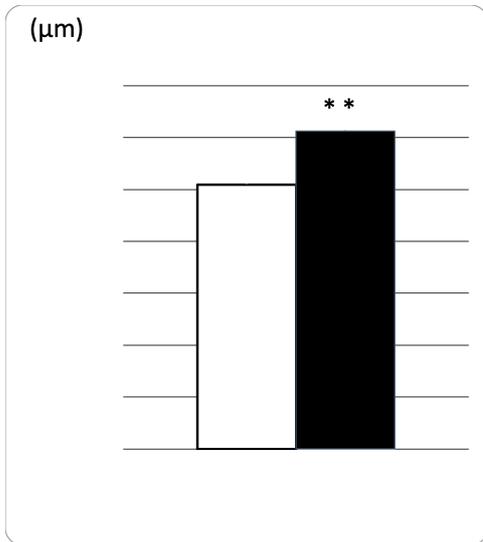


Fig.3 血中ガストリン濃度の比較

*p<0.05 vs. sham

食後のガストリン血中濃度はsham VMH破壊ラットに比べてVMH破壊ラットで有意に高値を示した。

a



b

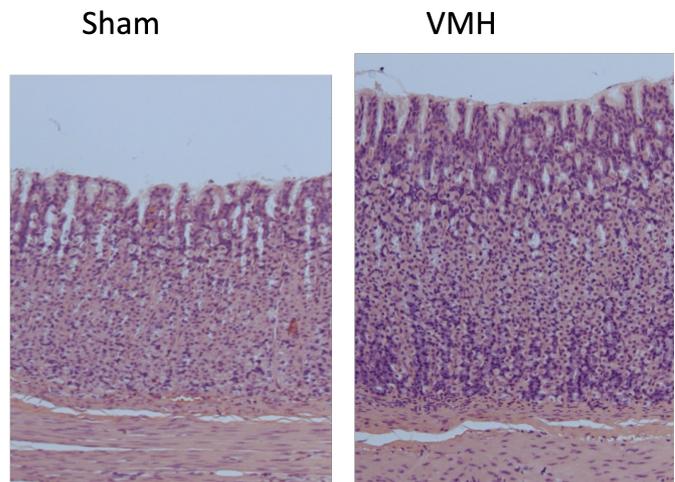


Fig.4 胃粘膜厚の比較(a)と典型的胃体部の組織像(b)

□ : sham VMH破壊ラット、■ : VMH破壊ラット

**p<0.001 vs. sham

胃粘膜厚はsham VMH破壊ラットに比べてVMH破壊ラットで有意に高値を示した。VMH破壊ラットにおける胃粘膜厚の増加は組織像 (HE染色) においても明瞭に観察される(b)。

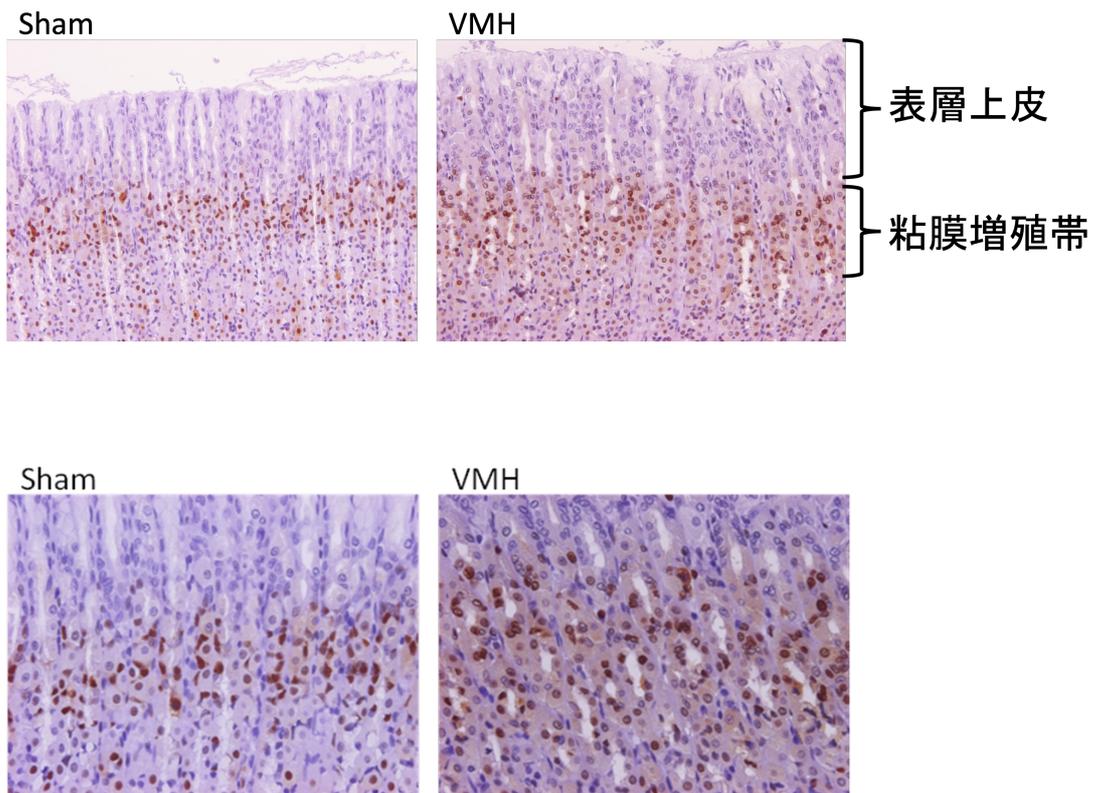


Fig.5 胃粘膜細胞増殖の比較

胃粘膜の増殖帯に相当する層に、核が茶褐色に染色されたPCNA陽性細胞が多数見られ、増殖帯より上部の表層上皮が著明に肥厚していることが観察される（上段）。増殖帯の強拡大像（下段）ではVMH破壊ラットにおいて、多数のPCNA陽性細胞が観察され、増殖帯の拡大も認められる。

Table 1 防御因子の比較

	Sham		VMH		
ヘキソサミン量 (μ g/mg d.w.)	45.4	\pm 2.6	46.3	\pm 5.7	NS
胃粘膜血流 (ml/min/100g)	71.8	\pm 1.7	72.3	\pm 16.5	NS
酸化ストレス (nmol/w.w.)	42.7	\pm 16.0	49.6	\pm 12.8	NS

防御因子の中で胃粘液分泌量の指標となるヘキソサミン量、胃粘膜血流、酸化ストレスの指標であるTBA反応物質を測定したが、いずれも両群に差は見られなかった。

第3章 VMH破壊マウスにおける小腸組織内の細胞増殖

緒言

視床下部腹内側核（VMH）破壊ラットは、神経緊張の変化を介した高インスリン血症を伴う視床下部性肥満をもたらすことが知られている[1-3]。VMH破壊ラットは、過食[3]、高レプチン血症[4, 5]、迷走神経活動亢進[6, 7]を呈することも報告されている。我々はこれまでに、VMH破壊により、ラット腹部臓器（小腸、胃、肝臓、膵臓）において、臓器重量とDNA含有量が増加することを見出した[8]。更に、³[H]チミジン取り込み法を用いて、VMH破壊後に迷走神経活動亢進を介した細胞増殖が小腸、胃、肝臓、膵臓などの腹部臓器で認められる事が報告された[9-11]。

VMH破壊動物の消化管における細胞増殖機序については、迷走神経活動上昇に起因する成長因子の局所的な分泌によって亢進している可能性が考えられる。しかし、VMH破壊動物の腹部臓器における増殖細胞の組織内局在や増殖方法などの詳細は知られていない。本研究では、将来、小腸の広範囲外科的切除の後に生ずる吸収障害や栄養不良を示す短腸症候群（SBS）の治療につながる可能性のある小腸の細胞増殖に関係する成長因子の同定を長期目標とし、VMH破壊マウスにおける細胞増殖の詳細を評価するため、小腸の組織学的変化を検討した[12]。

動物と方法

実験動物

ddyマウス（日本SLC）10週齢を用いた。飼育環境は室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 15\%$ 、明暗交代12時間のもと自由飲水・自由摂食（Lab MR Stock、日本農産工業）とした。マウスは2群に分け、sham VMH破壊群及びVMH破壊群とした（各群 $n=8$ ）。

VMH破壊7日後に解剖を行い、小腸は十二指腸起始部と回腸末端で切断し、摘出した小腸は管腔内を生理食塩水で洗浄し、重量と全長を測定した。組織学的検討に小腸の全長の中央部を空腸として用いた。

VMH破壊マウスの作成

我々のグループのSuzukiら[13]のマウスのVMH破壊法に従い電気凝固法により、イソフルレン（Forane;アボットジャパン）吸入麻酔下でVMHの両側を破壊した。また、電極挿入までを同様に行い通電しないことでsham VMH破壊とした。実験終了後、組織学的に破壊部位の確認を行った。

空腸の組織学的検討

摘出した空腸は10%ホルマリン液に浸漬固定後、パラフィン包埋し、薄切標本を作製した。ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色と免疫組織細胞化学染色法で細胞増殖のマーカーとなるproliferating cell nuclear antigen (PCNA) 染色 (ダコ・ジャパン株式会社) を行った[14]。粘膜厚及び筋層厚はHE染色標本を用いて光学顕微鏡下で測定した。PCNA染色による判定は、VMH破壊マウスとsham VMH破壊マウスの小腸陰窩部の細胞各1000個の核を数え、それらに対するPCNA抗体陽性細胞の割合 (PCNA-labeling index) を両群間で比較することで行った[15]。また、400倍50視野にて陰窩部での核分裂細胞数をカウントした。

統計解析

すべてのデータは、平均±標準誤差で示した。正規分布の分析にはShapiro-wilk testを用いた。また、2群間 (VMHとSham) のデータが等分散であるかどうかをBartlett testで、有意差検定をStudent t test、その他をMann-Whitney U-testによって分析した。すべての統計分析はJMP®バージョン8.0 (SAS研究所社、ケアリー、NC、USA) ソフトウェア・プログラムを使用し、 $P<0.05$ を統計的に有意であると判断した。

結果

実験終了後、脳を摘出し、組織学的に破壊部位の確認を行った。VMH破壊マウスの典型的な脳の断面図はFig.1に示した通りで、破壊部位は両側VMHを完全に含んでいることが確認された。

処置後7日目の摂食量と体重は、VMH破壊マウスではsham VMH破壊マウスと比較していずれも有意に増加した (8.33 ± 0.26 vs. 5.63 ± 0.18 g、 $P<0.001$ と 35.60 ± 0.41 vs. 31.47 ± 0.64 g、 $P<0.001$)。それぞれの増加率は48.0%及び13.1%となり、以前の報告[13]と同様の結果であった。

小腸重量及び全長はsham VMH破壊マウスと比較してVMH破壊マウスでいずれも有意に増加した (Fig.2)。

小腸粘膜厚及び筋層厚はsham VMH破壊マウスと比較してVMH破壊マウスでいずれも有意に増加した (Fig.3a, 4a)。増加率は粘膜厚12.7%、筋層厚12.5%であった。それぞれの典型的な組織像をFig.3b, 4bに示した。いずれも明らかな肥厚が観察された。

小腸陰窩部でのPCNA陽性細胞数はsham VMH破壊マウスと比較してVMH破壊マウスで31.9%増加した (Fig.5a)。VMH破壊マウスの小腸陰窩部にPCNA陽性細胞は高密度に存在したが、絨毛にほとんど存在しなかった (Fig.5b)。この結果は、小腸における増殖帯が陰窩部にあるという報告[16]と一致した。

小腸陰窩部での核分裂像数は、sham VMH破壊マウスと比較してVMH破壊マ

ウスで71.7%増加した (Fig.6a)。小腸陰窩部での典型的な組織像はFig.6bに示した通りで、VMH破壊マウスで多くの核分裂像が観察された。しかしながら小腸筋肉層ではPCNA陽性細胞数増加や核分裂像は認められなかった。

考察

本研究において、VMH破壊マウスではsham VMH破壊マウスと比較して小腸重量は11.6%、小腸全長は15.0%増加し、粘膜厚は12.7%、筋層厚は12.5%肥厚した。これらの結果からVMH破壊マウスでは小腸粘膜層および筋層における細胞増殖や細胞肥大が亢進し、それが小腸の延長及び重量の増大に寄与したことが示唆された。これらのマウスにおける粘膜の肥厚を伴う小腸重量の増大は、VMH破壊後に腹部臓器（小腸、胃、肝、膵）の重量とDNA含量が増加するという我々の以前の報告[8]から予想されていた通りである。これらの小腸粘膜における変化は、機能的な側面[9]や組織学的な側面[18]を検討した以前の研究結果に加え、今回の結果からも、腸管粘膜での細胞増殖の亢進によると考えられた。しかし、VMH破壊マウスにおける小腸全長が有意に延長することは予想外の発見であった。

我々はVMH破壊マウスでの小腸延長の原因を明らかにするために、粘膜厚および筋層厚が増加した根拠を検討した。PCNA陽性細胞数は粘膜層、特に小腸陰窩部で増加しており、これらのマウスにおいて粘膜層での細胞増殖が亢進していることが示唆された。しかし、筋層においては、PCNA陽性細胞は、VMH破壊マウス、sham VMH破壊マウスのいずれにおいてもほとんど存在しなかった。したがって、VMH破壊マウスにおける小腸全長の延長に重要な筋層の肥厚は、細胞増殖だけでなく細胞肥大も関わっていることが示唆された。VMH破壊マウスにおける筋層肥厚の機序を明らかにするためには今後更なる検討が必要である。

腸管上皮は、未分化細胞の増殖に次いで粘膜上部への移動、細胞死という過程をたどる細胞周期の回転率が高く、自己再生能力の強い組織である[19]。細胞周期はG0期（静止期）、G1期（DNA合成前期）、S期（DNA合成期）、G2期（DNA合成後期）及びM期（分裂期）に分類される。PCNA抗体はG1,S,G2,M期の細胞核内でDNAと結合するので[14]、PCNA染色は核分裂期の細胞は特定せずに増殖周期に入っている細胞を検出できる方法である。そこで、我々は小腸陰窩部においてPCNA染色に加え核分裂細胞数を計測した。その結果、VMH破壊マウスの小腸陰窩部でPCNA陽性細胞数とともに核分裂細胞数が増加することを見出し、VMH破壊マウスの粘膜層で細胞増殖が活発に増加していることが示された。さらに、小腸陰窩部での核分裂細胞とPCNA陽性細胞が増加したことは、VMH破壊マウスにおいて細胞の再生が生理的状态よりも速く起こることを示唆している。また、VMH破壊マウスの小腸陰窩部で核分裂細胞とPCNA陽性細胞が密に存在していることは陰窩部が小腸の増殖帯であることを

示した以前の成績[16]を支持するものである。しかし、小腸筋肉層では細胞増殖亢進を示すPCNA陽性細胞や核分裂像を認めなかったため筋肉層の肥厚は細胞増殖によるものと断定できなかった。これについては今後、更に検討する予定である。

本研究の結果は、VMH破壊マウスが小腸で細胞増殖に関係している成長因子またはそれに関係する遺伝子を特定する新しいツールとなり得る可能性を示唆している。短腸症候群（SBS）は、小腸の広範囲外科的切除の後に生ずる吸収障害や栄養不良を示す疾患である[12]。SBS患者は小腸表面積が極めて小さくなることに加え、小腸通過時間が短縮するため消化吸收不良となり、長期的な非経口栄養投与が必要となる[20]。

SBSに対しいくつかの治療法が試みられており[21-23]、近年、成長ホルモンやglucagon like peptide-2（GLP-2）などの成長因子がSBS治療に利用されているが、これらの因子は人間では小腸延長増大にはつながらないと報告されている[24, 25]。SBS患者の生存率とQOLの向上のためには、小腸が機能的にも解剖学的にも修復され、しかも再現性の高い方法が求められている。

我々はラットと比較してより多くの遺伝情報の利用が可能なマウスで、腹部臓器で細胞増殖を亢進する成長因子の同定を長期目標として、VMH破壊モデルを開発した[13]。本研究のVMH破壊マウスの小腸の組織学的検討は、我々の長期目標に対し有望な結果を示したと考えられる。VMH破壊動物において小腸の細胞増殖を誘発することができる成長因子を分子レベルでの同定することができれば、SBSで小腸の機能回復や小腸延長のための新薬の開発につながるかもしれない。あるいは小腸と同様に胃、肝臓、膵臓においても、VMH破壊に起因する迷走神経性活動上昇を介して細胞増殖が亢進することから、細胞増殖に関係する迷走神経構成要素を刺激する因子を発見できれば、薬剤開発の別な選択肢を提供する可能性も考えられる[9-11]。

今回の研究の結論として、VMH破壊マウスにおいて、細胞増殖あるいは細胞肥大の亢進により小腸重量と全長との増加を認めた。これらのマウスの小腸粘膜層においてPCNA陽性細胞数と核分裂細胞数の増加は、VMH破壊によって誘導される腸管粘膜で、細胞増殖が活発に亢進されている事を示した。このように、VMH破壊動物モデルは、小腸での細胞増殖に関係する成長因子を発見・同定するための新たなツールとなりうる可能性が示唆された。

参考文献

1. Inoue S, Bray GA, Mullen YS.: Effect of transplantation of pancreas on development of hypothalamic obesity. *Nature*, 266, 742-744 (1977)
2. Inoue S, Bray GA.: An autonomic hypothesis for hypothalamic obesity. *Life Sci*, 25, 561-566 (1979)
3. Bray GA, York DA.: Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals:

- An autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev*, 59, 719-809 (1979)
4. Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Tsuji T, Masuzaki H, Hiraoka J, Okazaki T, Tamaki M, Hayase M, Yoshimasa Y, Nishi S, Hosoda K, Nakao K. Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats: evidence for loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats. *Endocrinology*, 138, 947-954 (1997)
 5. Suga A, Hirano T, Kageyama H, Kashiba M, Oka J, Osaka T, Namba Y, Tsuji M, Miura M, Adachi M, Inoue S.: Rapid increase in circulating leptin in ventromedial hypothalamus-lesioned rats: role of hyperinsulinemia and implication for upregulating mechanism. *Diabetes*, 48, 2034-2038 (1999)
 6. Yoshimatsu H, Nijima A, Oomura Y, Yamabe K, Katafuchi T.: Effects of hypothalamic lesion on pancreatic autonomic nerve activity in the rat. *Brain Research*, 303, 147-152 (1984)
 7. Inoue S, Bray GA.: The effects of subdiaphragmatic vagotomy in rats with ventromedial hypothalamic obesity. *Endocrinology*, 100, 108-114 (1977)
 8. Kiba T, Tanaka K, Inoue S, Endo O, Takamura Y.: Comparison of DNA contents of visceral organs in rats with ventromedial hypothalamic lesions and fed a high fat diet. *Neurosci Lett*, 126, 127-130 (1991)
 9. Kiba T, Tanaka K, Endo O, Inoue S.: Ventromedial hypothalamic lesions increase gastrointestinal DNA synthesis through vagus nerve in rats. *Gastroenterology*, 104, 475-484 (1993)
 10. Kiba T, Tanaka K, Endo O, Inoue S.: Role of vagus nerve in increased DNA synthesis after hypothalamic ventromedial lesions in rat liver. *Am J Physiol*, 262, G483-G487 (1992)
 11. Kiba T, Tanaka K, Numata K, Hoshino M, Misugi K, Inoue S.: Ventromedial hypothalamic lesion-induced vagal hyperactivity stimulates rat pancreatic cell proliferation. *Gastroenterology*, 110, 885-893 (1996)
 12. Pereira PM, Bines JE.: New growth factor therapies aimed at improving intestinal adaptation in short bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol*, 21, 932-940 (2006)
 13. Suzuki Y, Inoue S, Shimizu H, Ishizuka N, Kasahara Y, Takahashi T, Arai K, Kobayashi Y, Kishi M, Imazeki N, Senoo A, Osaka T.: Cell proliferation in visceral organs induced by ventromedial hypothalamic (VMH) lesions: Development of electrical VMH lesions in mice and resulting pathophysiological profiles. *Endocr J*, 58, 247-256 (2011)
 14. Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, et al.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol*, 162, 285-294 (1990)
 15. Saftoiu A, Ciurea T, Georgescu C, Banita M, Comanescu V, Rogoveanu I,

- Gorunescu F, Georgescu I A.: Immunohistochemical assessment of proliferating cell nuclear antigen in primary hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. *J Cell Mol Med*, 7, 436-446 (2003)
16. Simons BD, Clevers H.: Stem cell self-renewal in intestinal crypt. *Exp Cell Res*, 317, 2719-2724 (2011)
 17. Haapasalo H, Pesonen E, Collan Y. Volume corrected mitotic index (M/V-INDEX). The standard of mitotic activity in neoplasms. *Pathol Res Pract*, 185, 551-554 (1989)
 18. Kintaka Y, Osaka T, Suzuki Y, Hashiguchi T, Nijima A, Kageyama H, Fumiko T, Shioda S, Inoue S.: Effects of gastric vagotomy on visceral cell proliferation induced by ventromedial hypothalamic lesions: role of vagal hyperactivity. *J Mol Neurosci*, 38, 243-249 (2009)
 19. Riccio O, van Gijn ME, Bezdek AC, Pellegrinet L, van Es JH, Zimmer-Strobl U, Strobl LJ, Honjo T, Clevers H, Radtke F.: Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO Rep*, 9, 377-383 (2008)
 20. Nightingale J, Woodward JM.: Guidelines for management of patients with a short bowel. *Gut*, 55, iv1-12 (2006)
 21. Ekema G, Milianti S, Boroni G. Total parenteral nutrition in patients with short bowel syndrome. *Minerva Pediatr*, 61, 283-291 (2009)
 22. DeLegge M, Alsolaiman MM, Barbour E, Bassas S, Siddiqi MF, Moore NM. Short bowel syndrome: parenteral nutrition versus intestinal transplantation. Where are we today? *Dig Dis Sci*, 52, 876-892 (2007)
 23. McMellen ME, Wakeman D, Longshore SW, McDuffie LA, Warner BW.: Growth factors: possible roles for clinical management of the short bowel syndrome. *Semin Pediatr Surg*, 19, 35-43 (2010)
 24. Wales PW, Nasr A, de Silva N, Yamada J.: Human growth hormone and glutamine for patients with short bowel syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*, 16, CD006321 (2010)
 25. Wallis K, Walters JR, Gabe S.: Short bowel syndrome: the role of GLP-2 on improving outcome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 5, 526-532 (2009)



Fig.1 VMH破壊後の典型的なマウス脳断面図
第三脳室（3V）の両脇にある腹内側核（VMH）が完全に破壊されている。

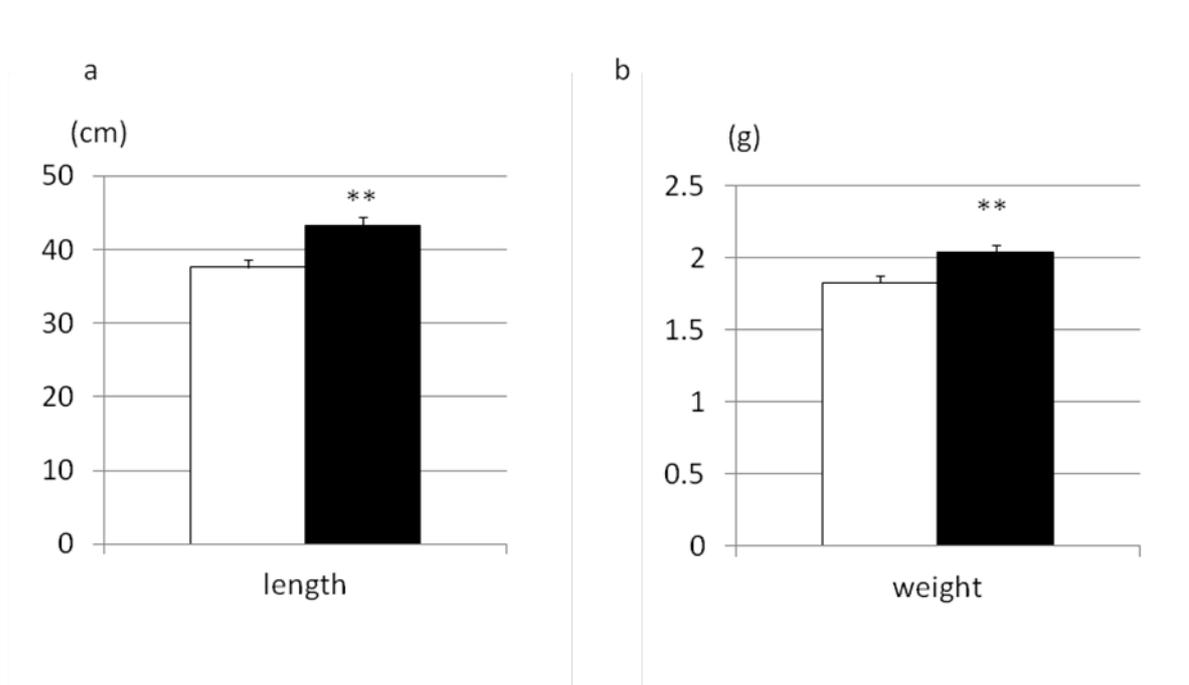


Fig.2 Sham VMH破壊とVMH破壊ラットの小腸全長(a)と重量(b)の比較

□ : Sham VMH破壊ラット、■ : VMH破壊ラット

* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ vs. sham

小腸全長、小腸重量共にSham VMH破壊ラットに比べてVMH破壊ラットで有意に高値を示した。

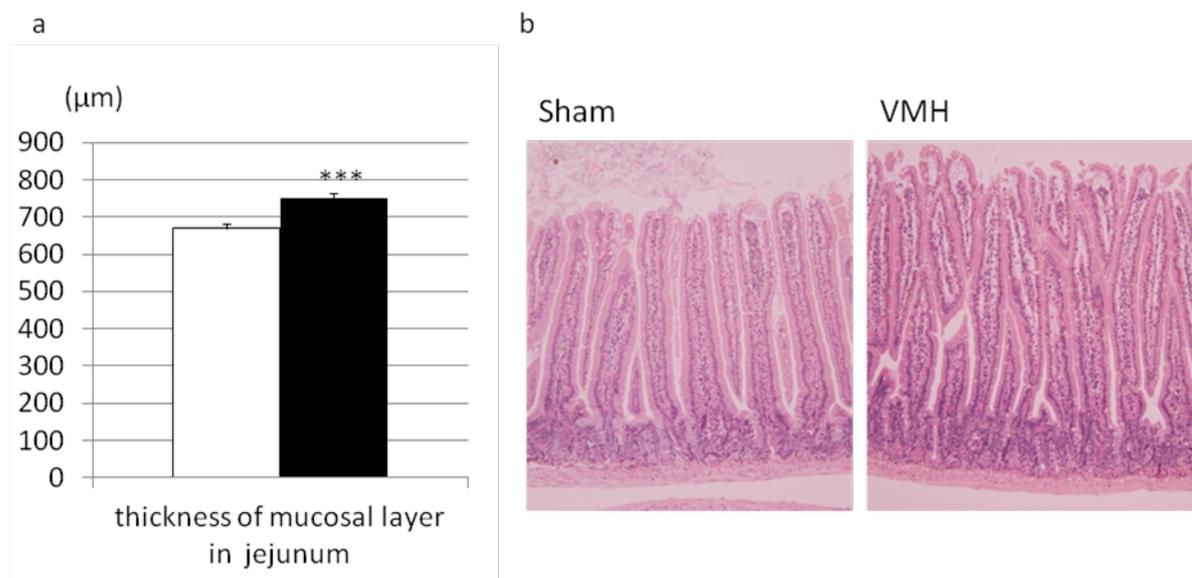


Fig.3 小腸粘膜厚の比較 (a) と典型的組織像 (b)
□ : Sham VMH破壊ラット、■ : VMH破壊ラット
***P<0.001 vs. sham

小腸粘膜厚はSham VMH破壊ラットに比べてVMH破壊ラットで有意に高値を示した。右に典型的な小腸粘膜の組織像 (HE染色) を示す。VMH破壊ラットで明らかな粘膜肥厚を認めた。

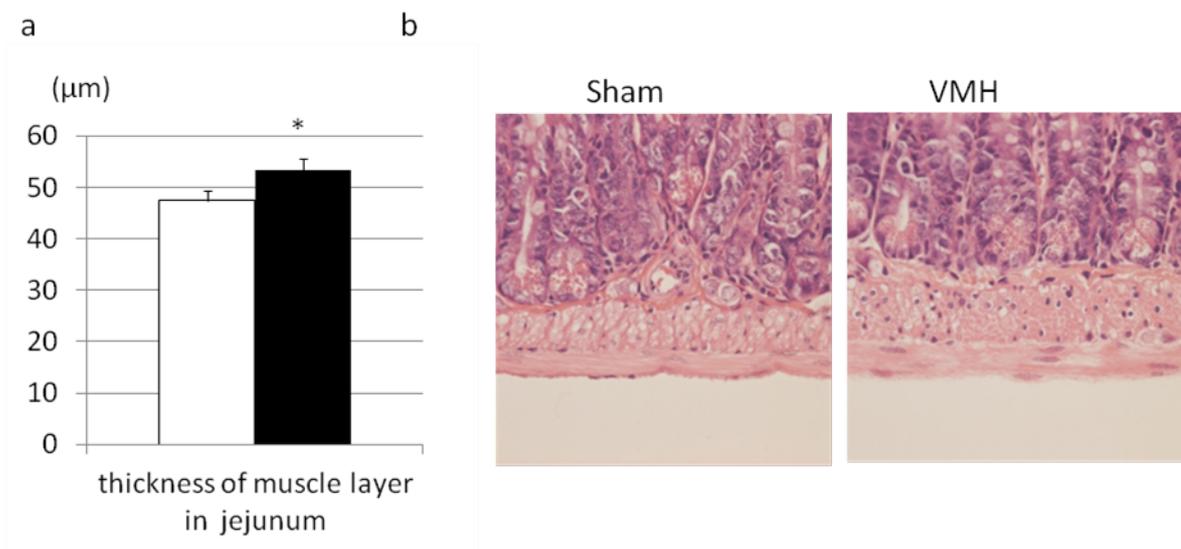


Fig.4 小腸筋層厚の比較 (a) と典型的組織像 (b)
□ : Sham VMH破壊ラット、■ : VMH破壊ラット
*P<0.05 vs. sham

筋層厚はSham VMH破壊ラットに比べてVMH破壊ラットで有意に高値を示した。右に典型的な筋層の組織像 (HE染色) を示す。VMH破壊ラットで明らかな筋層の肥厚が観察された。

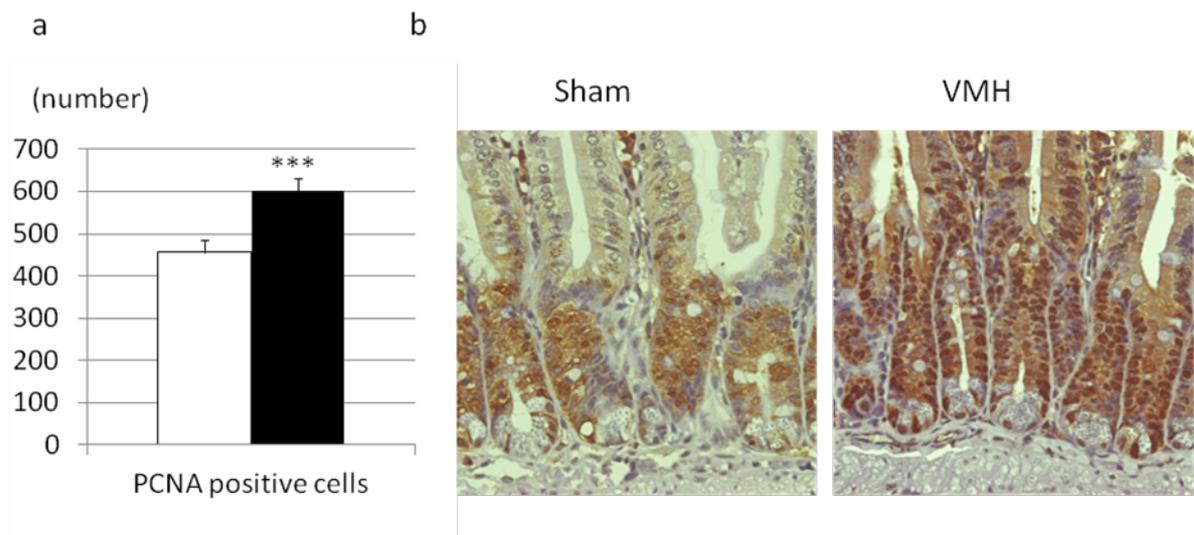


Fig.5 PCNA陽性細胞数の比較 (a) と典型的免疫染色像 (b)

□ : Sham VMH破壊ラット、■ : VMH破壊ラット

***P<0.001 vs. sham

小腸粘膜層におけるPCNA陽性細胞数はVMH破壊ラットで有意に高値を示した。右 (b) に細胞増殖帯である陰窩部でのPCNA染色の典型像を示す。VMH破壊ラットではSham破壊ラットに比べて多数のPCNA陽性細胞が観察された。

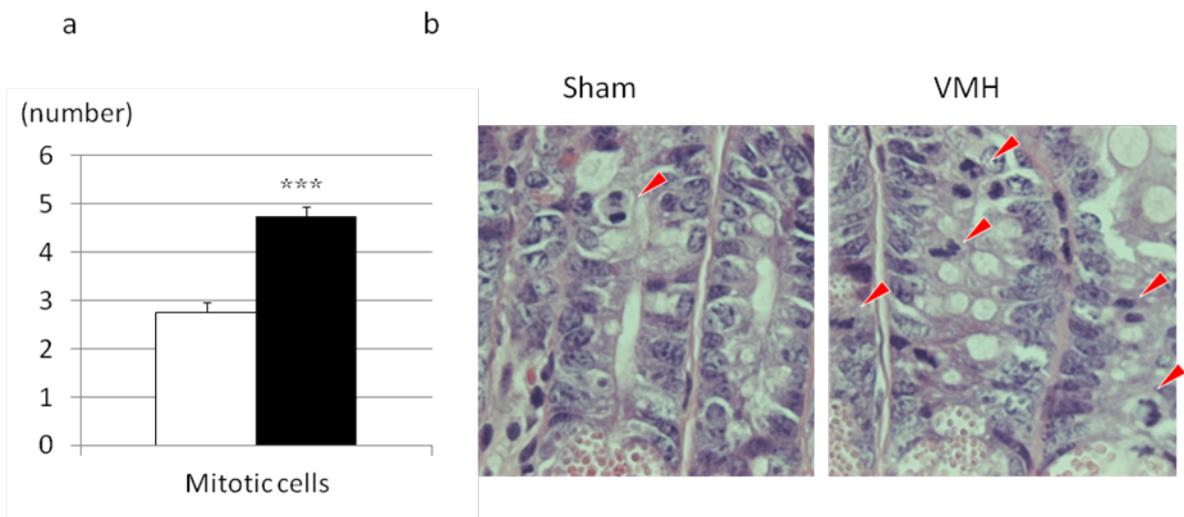


Fig.6 核分裂数の比較 (a) と典型的核分裂像 (b)
□ : Sham VMH破壊ラット、■ : VMH破壊ラット
***P<0.001 vs. sham

核分裂数はVMH破壊ラットで有意に高値を示した。右 (b) に典型的な陰窩部の核分裂像 (HE染色) を示す。矢印 (▲) で示すような核分裂中の細胞がVMH破壊ラットで多数観察された。

ま と め

本研究では、視床下部腹内側（VMH）破壊動物を用いて以下の3つの病態について検討した。

1. VMH破壊ラットにおけるアミノ酸センサーの機能

膵臓の内分泌神経支配において、迷走神経遠心路がインスリンとグルカゴンの分泌に関わることを示唆する多数の根拠が示されているが、迷走神経求心路の影響に関する情報は少ない。我々は著明な高インスリン血症を示すVMH破壊ラットで、迷走神経の求心性線維の機能を検討した。正常ラットにおける迷走神経肝臓枝切断によって、アルギニン腹腔内投与により血糖変動を伴わないインスリンおよびグルカゴン分泌上昇、ロイシン腹腔内投与により血糖低下を伴うインスリン分泌上昇、アラニン腹腔内投与により血糖上昇を伴うグルカゴン分泌の上昇を認めた。しかし、VMH破壊ラットにおける迷走神経肝臓枝切断によって、いずれのアミノ酸負荷によってもインスリンおよびグルカゴン分泌の有意な変動を示さなかった。正常ラットではアミノ酸センサーが、過剰なタンパク質摂取後に起こりうるアミノ酸の直接誘導による膵ホルモンの過剰な放出を抑制し、正常の血糖値を維持する作用を有するが、高インスリン血症を示すVMH破壊ラットにおいては著明な高インスリン血症により、アミノ酸センサー機能が遮蔽されたと推察された。

2. VMH破壊ラットにおける急性胃粘膜病変に対する消化管粘膜増殖の役割

VMH破壊ラットを用いて、急性胃粘膜病変（AGML）負荷に対する粘膜肥厚の役割を検討した。48時間絶食負荷及び24時間絶食後の60%エタノール負荷におけるAGMLs発生率と、攻撃因子（胃酸、血清ガストリン）及び防御因子〔ヘキソサミン、胃粘膜血流（GMBF）、チオバルビツール酸反応物質（TBARS）、胃粘膜厚〕についてVMH破壊ラットを用いて検討した。胃粘膜層における細胞増殖の効果は、HE染色と細胞増殖のマーカーであるproliferating cell nuclear antigen（PCNA）染色で評価した。Sham VMH破壊ラット、VMH破壊ラット共に48時間絶食後にAGMLは観察されなかった。24時間絶食後60%エタノール投与により、AGMLの発生数は両群で同程度を示したが、潰瘍の大きさと程度の指標である潰瘍係数はVMH破壊ラットではsham VMH破壊ラットと比較して低値を示した。VMH破壊ラットでは攻撃因子である胃酸分泌と血清ガストリン濃度は上昇し、防御因子の中でヘキソサミン、GMBF、TBARSは両群で差を認めなかったが、VMH破壊ラットでsham VMH破壊ラット

と比較して防御因子の一つである胃粘膜肥厚が明らかに認められた。組織学的検討において、VMH破壊ラットでは、胃粘膜、特に表面上皮細胞層の増厚が見られた。また、細胞増殖の指標であるPCNA陽性細胞は増殖帯で著しい増加がみられた。以上の結果からVMH破壊ラットでは防御因子である胃粘膜の細胞増殖亢進が攻撃因子の増強を凌駕し、AGML抵抗性を示したと考えられた。

3. VMH破壊マウスにおける小腸組織細胞の増殖

我々はこれまでに、ラットにおいてVMH破壊後に迷走神経活動上昇を介して腹部諸臓器において細胞増殖を亢進させることを見出し、報告してきた。本研究では、VMH破壊マウスを用いて小腸における細胞増殖の詳細について検討した。VMH破壊7日後のマウスを用い、小腸全長、重量、粘膜厚、筋層厚の測定、及びproliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性細胞数、核分裂細胞数の算出を行った。VMH破壊マウスではSham VMH破壊マウスに比べて小腸全長11.6%、重量15.0%、粘膜厚12.7%、筋層厚12.5%高値を示した。粘膜層におけるPCNA陽性細胞数と核分裂細胞数は、VMH破壊マウスではsham VMH破壊マウスに比べて、それぞれ31.9%と71.7%高値を示した。また筋層においては核分裂中の細胞を見出すことは出来なかった。これらの結果はマウス小腸においてVMH破壊が粘膜層での細胞増殖と筋層での細胞肥大または細胞増殖を亢進させ、それにより小腸全長と重量が増加することを示している。したがってVMH破壊マウスは細胞増殖を通して主に小腸の増大に関係する成長因子とそれに関連する遺伝子を特定するための新たなツールになり得ると考えられた。

今後の展望

1. VMH破壊以外の病的状態においてアミノ酸センサーがどのように機能するかが興味深いと考えている。
2. 本研究ではVMH破壊ラットの細胞増殖にもとづく粘膜肥厚に対してAGMLを誘発させた影響を観察したが、AGMLが形成された後にVMHを破壊した場合にAGMLの修復は促進されるのか検討していくことを考えている。
3. VMH破壊により小腸延長が惹起されることが判明したので、小腸部分切除による短腸症候群モデル動物にVMH破壊を施し、その治療効果を検討していきたいと考えている。

謝 辞

卒業研究に始まり、博士号取得までご懇篤な御指導・御鞭撻を賜りました静岡県立大学 生理学研究室 鈴木裕一先生、林久由先生に厚く御礼を申し上げます。また、本論文をご精読頂きご助言を頂きました横越英彦先生、合田敏尚先生、新井英一先生に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました桐生大学 医療保健学部 井上修二先生に深甚なる謝意を表します。

本実験遂行に際し、多大なる御助言を頂きました桐生大学 瀬野尾章先生、今関信夫先生、研究過程で様々なご協力を頂きました鈴木洋子さん、金高有里さん、櫻井純子さんに深く感謝申し上げます。

本研究のために犠牲になった動物達に感謝すると共に心よりご冥福をお祈り申し上げます。