

博士論文

迷走神経切離が生体に及ぼす影響についての実験的研究
-マウス腸管虚血再灌流モデルおよび肥満モデルを用いて-

李 基成

論文題目；迷走神経切離が生体に及ぼす影響についての実験的研究

-マウス腸管虚血再灌流モデルおよび肥満モデルを用いて-

所属；外科学専攻

指導教員名；瀬戸 泰之 教授

申請者名；李 基成

目次

1. 要旨	1
2. 序文	2
3. 検討1. 迷走神経切離が侵襲時生体反応に及ぼす影響について	8
3-1; 予備実験1. 迷走神経切離によるマウス腸管虚血再灌流後の生存評価における至適虚血時間の選定	9
3-1-1; 方法	9
3-1-2; 結果	12
3-2; 実験1. 迷走神経切離がマウス腸管虚血再灌流後の生存に及ぼす影響	14
3-2-1; 方法	14
3-2-2; 結果	17
3-2-3; 考察および小括	19
3-3; 予備実験2. 迷走神経切離によるマウス腸管虚血再灌流後の血中サイトカインレベル評価のタイミング決定	20
3-3-1; 方法	20
3-3-2; 結果	21
3-4; 実験2. 迷走神経切離がマウス腸管虚血再灌流後の血中・小	

腸組織中サイトカインレベルと小腸病理組織像に及ぼす影響	23
3-4-1 ; 方法	23
3-4-2 ; 結果	28
3-4-3 ; 考察および小括	36
3-5 ; 実験 3. 迷走神経切離がマウス腸管虚血再灌流後の小腸組織 培養上清中のサイトカインレベルに及ぼす影響	37
3-5-1 ; 方法	37
3-5-2 ; 結果	38
3-5-3 ; 考察および小括	40
3-6 ; 実験 4. 迷走神経切離がマウス腸管虚血再灌流後の脾臓組織 サイトカインレベルに及ぼす影響	41
3-6-1 ; 方法	41
3-6-2 ; 結果	42
3-6-3 ; 考察および小括	44
3-7 ; 実験 5. 迷走神経切離がマウス腸管虚血再灌流後の脾臓マク ロファージに及ぼす影響	45
3-7-1 ; 方法	45
3-7-2 ; 結果	47

3-7-3 ; 考察および小括	49
4. 検討2. 肥満症の治療としての迷走神経切離の効果について	50
4-1 ; 実験6. マウスモデルにおいて迷走神経切離が体重変化、摂食量に及ぼす影響-通常食及び高脂肪食摂取マウスモデルを用いて-	51
4-1-1 ; 方法	51
4-1-2 ; 結果	54
4-1-3 ; 考察および小括	59
4-2 ; 実験7. マウスモデルにおいて迷走神経切離が体重変化、摂食量に及ぼす影響-切離前の高脂肪食摂取、切離後の通常食摂取マウスモデルを用いて-	60
4-2-1 ; 方法	60
4-2-2 ; 結果	63
4-2-3 ; 考察および小括	66
5. 総括	67
6. 謝辞	73
7. 引用文献	74

1. 要旨

迷走神経は、抗炎症性経路として注目されると同時に、その電気刺激によるブロックが肥満症治療にも役立つと報告されている。今回、迷走神経切離が腸管虚血再灌流(Gut I/R)モデル及び肥満症の治療にどのような影響を及ぼすかについてマウスモデルにおいて検討した。迷走神経切離によって Gut I/R 後の短期生存は増悪し、その機序として血中・小腸組織・小腸組織培養上清中の炎症性サイトカインレベルの上昇、さらには高度の小腸粘膜傷害が明らかになった。

一方、肥満症治療としての迷走神経切離は一時的な体重増加抑制効果を認めるのみで、その長期的な効果は否定的であった。

2. 序文

迷走神経の抗炎症性経路

迷走神経は第X脳神経であり、下部延髄に起こり、頸部・胸腹部内臓に広く分布する。腹部まで分布する唯一の脳神経で主に副交感神経線維から成る。迷走神経の走行は頭蓋底を出た後に、頸部では左右頸動脈の外側を、胸腔では食道に沿って下行し、横隔膜レベルで前幹・後幹の二本の神経束になり腹腔に到達する。前幹は胃小弯前面の前胃神経叢を経て最終的に胃と肝臓に達し、後幹は腹腔神経叢となり骨盤内臓器以外の大部分の腹部臓器に分枝する[1,2]。このように迷走神経の末梢分布が非常に複雑であることが、「迷走」と名付けられた所以ともなっている。迷走神経の働きは、主に副交感神経として、骨盤臓器を除く胸腹部諸臓器の内臓平滑筋運動を制御し、心拍・ホルモン分泌・消化管蠕動や消化を調節する機能を有している[3]。さらには、胸腔・腹腔の内臓の感覚を伝達する求心性知覚神経や、咽喉頭の運動・感覚神経なども含まれる。

一方で、迷走神経は生体内のサイトカイン反応を調節し、抗炎症性経路として作用することが様々な動物侵襲モデルにおいて示されている[4-9]。そのメカニズムとしては、迷走神経の刺激が神経節でシナプスを介して節後神経に伝達され、その神経終末において神経伝達物質であるアセチルコリン (Ach) が放出される。Ach は各臓器に局在するマクロファージなどの免疫担当細胞の表面上に

発現している α -7 ニコチンアセチルコリン受容体 (α -7 nicotinic acetylcholine receptor ; α 7nAChR) に作用することで、炎症性サイトカインの分泌を抑制し、生体内免疫応答や炎症反応に影響を及ぼすことが明らかになっている[3,10,11]。例えば、腸管に分布する迷走神経は、筋層間神経叢において節前線維から節後線維へシナプス伝達され、腸管ニューロンの終末から放出された Ach が、腸管に局在するマクロファージに作用する[11-13]。最近では、脾臓も迷走神経の抗炎症作用を調節する上で重要な役割を担っていると言われている[14-17]。迷走神経の脾臓への直接的な神経支配はいまだ確認されておらず、迷走神経の信号は腹腔神経叢に存在する交感神経によって、シナプスを介さずに脾臓に投射されると推測されている[13,14]。この信号伝達は脾臓のみに認められる特徴的な経路である。そして、その交感神経が Ach を産生する T 細胞を活性化し、放出された Ach が脾臓のマクロファージ上の α 7nAChR に作用することで同様に全身の抗炎症作用を及ぼすと考えられている[10,13,18,19]。

高度侵襲モデルとしての腸管虚血再灌流の病態

高度の外科侵襲後にしばしば生じる炎症反応や臓器障害の機序として、腸管虚血再灌流(Gut ischemia-reperfusion ; Gut I/R)という病態が注目されている[20-24]。実臨床では、ショック、外傷、大手術などにおいて腸管の血流が大幅に低下し、その後の治療で改善する際に Gut I/R が生じることが知られている[25,26]。

Gut I/R は腸管自体の傷害と同時に肺や肝臓などの遠隔臓器障害も引き起こす [27,28]。高度の低灌流後に血流が回復した腸管では、ホスホリパーゼ A2 の過剰な活性化や、炎症性サイトカイン産生が生じ、腸管血管床を流れる血液中の多形核好中球のプライミングと活性化が生じる [21,29]。過度に活性化された好中球は体循環を介して遠隔臓器に至り重度の臓器障害を引き起こすことが示されている [28,29]。

大血管の手術や大量の出血を伴う手術では腸管の著しい低灌流を生じる [25,26]。また、一般的な腹部大手術でも腸管および腸間膜の把持、結紮、牽引などの手術操作によって腸管の一時的な低灌流とそれに続く血流の回復（再灌流）といった、Gut I/R に類似した状況が生じていると考えられる。実際に、大腸手術において終刀時の腸管血流が手術開始時に比べて約半分ほどに減少し、腸管の低灌流状態が生じているとの報告もされている [30]。

迷走神経切離と腸管虚血再灌流障害

これまでにも、他の侵襲モデルにおいて、迷走神経切離による生体内の炎症性サイトカイン産生亢進が報告されている [31-34]。よって、迷走神経切離が Gut I/R という侵襲に対しても悪影響を及ぼす可能性は十分に考えられる。しかし、迷走神経切離が Gut I/R に及ぼす影響についての既存の報告は少なく、迷走神経

切離が Gut I/R 時の腸管サイトカイン動態や小腸粘膜組織像に及ぼす影響についての検討はこれまでにない[35-37]。

本研究では、検討 1 として、迷走神経切離が Gut I/R 後の生体反応に及ぼす影響を動物実験で検討した。具体的には、迷走神経切離が Gut I/R 後の生存、血中・小腸組織中サイトカインレベル、小腸組織傷害度、小腸組織上清中サイトカインレベルに及ぼす影響、次に、脾臓組織中サイトカインレベル、脾臓マクロファージに及ぼす影響を検討した。これらによって、外科侵襲後の迷走神経の重要性が認識されるものと考えられる。

迷走神経による体重制御

迷走神経は遠心性経路として生体に抗炎症作用を及ぼす以外に、求心性経路として摂食調整や体重制御に関与していると言われている[38-41]。そのメカニズムの一部としていくつかの消化管ホルモンが関与する[38,39]。食事摂取によって胃から分泌されるグレリンは、迷走神経求心路の電気的活動を抑制し、その情報が延髄孤束核から視床下部まで伝達され摂食が促される[42-44]。また、小腸から分泌される GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) は血液脳関門や迷走神経求心路を介して同様な作用を生じると考えられている[45,46]。他にもコレシストキニンやペプチド YY 等の関与が数多く報告されている[38,47,48]。

一方で、迷走神経を電氣的にブロックすることによって体重増加が抑制されることが知られている[38,49]。特に最近では、肥満症に対する減量治療として腹腔内の迷走神経の電氣的刺激療法が米国の食品医薬品局によって認可された[50]。しかし、電氣的ブロックによる体重減少のメカニズムは、一部として前述の消化管ホルモンによる摂食調節が関与していると考えられているが、その全貌はいまだ解明されていない。

迷走神経の電氣的ブロックでその求心性経路が遮断されることで体重減少効果をもたらされるのであれば、迷走神経切離という物理的な神経の遮断も同様な効果を示す可能性がある。また、迷走神経切離は電氣的ブロックと比べて、手技・方法という点においては簡便で優れていると考えられるが、迷走神経切離が体重コントロールや摂食量に及ぼす影響については定まった見解は得られていない[51-54]。

そこで、検討2として迷走神経切離が体重制御および摂食量に及ぼす影響について動物実験にて検討した。通常食摂取マウスと高脂肪食摂取による肥満マウスを用いて、迷走神経切離が体重変化、摂食量に及ぼす影響について術後10週まで観察を行った。

今回の研究における動物実験プロトコールは東京大学の倫理委員会で承認されたものであり(動物認証番号；医 09-P-28, 29 および、医 P14-049)、東京大学

大学院医学系研究科・研究ガイドライン（実験系）

<http://www.m.u-tokyo.ac.jp/education/guideline.html> に則り行われた。

3. 検討1. 迷走神経切離が侵襲時生体反応に及ぼす影響について

検討1として、抗炎症作用を有する迷走神経を切離することによって、侵襲時生体反応にどのような影響が生じるかについて、マウスモデルを用いて検討した。侵襲モデルとしては、高度侵襲後の臓器障害の機序の一つとして注目され、かつ、大量出血を伴う大手術時にも生じることが示唆されている腸管虚血再灌流（Gut I/R）モデルを選択した。

3-1 ; 予備実験 1. 迷走神経切離によるマウス腸管虚血再灌流後の生存評価における至適虚血時間の選定

迷走神経切離がマウス Gut I/R 後の生存に及ぼす影響についての実験に先行し、本予備実験にて Gut I/R の虚血時間の長さとは術後生存率の関係を検討し、至適な虚血時間の選定を行った。

3-1-1 ; 方法

5 週齢の Institute of Cancer Research (ICR)マウス (雄性、n=37) (Charles River Laboratories Japan, INC. Japan) を購入、搬入後 1 週間環境順応させた後に実験を開始した。ICR マウス(n=37)を虚血時間が 45 分(n=14)、60 分(n=10)、75 分(n=13) の 3 群に無作為に分け、ケタミン 100 mg/kg とキシラジン 10 mg/kg の混合溶液を皮下に注入し全身麻酔下に Gut I/R を行い、術後 48 時間までの生存を観察した。術後 12 時間までは 2 時間毎、術後 12~24 時間までは 6 時間毎、それ以降では 12 時間毎に生存確認を行った。

腸管虚血再灌流(Gut I/R)手技

Gut I/R 手技の手順としては、開創器にて術野を確保したまま、大腸、小腸を愛護的に左側に授動した後に、肝下面を展開し上腸間膜動脈(superior mesenteric artery ; SMA)を同定、microvascular clip を用いて SMA 遮断した(図 1)。直ちに仮閉腹を行い、各時間 (45 分、60 分、75 分) の虚血を行った後に再開腹し、

microvascular clip を解放し虚血を解除した。その後直ちに、皮下に生理食塩水
1ml を投与し、層々に閉腹した。

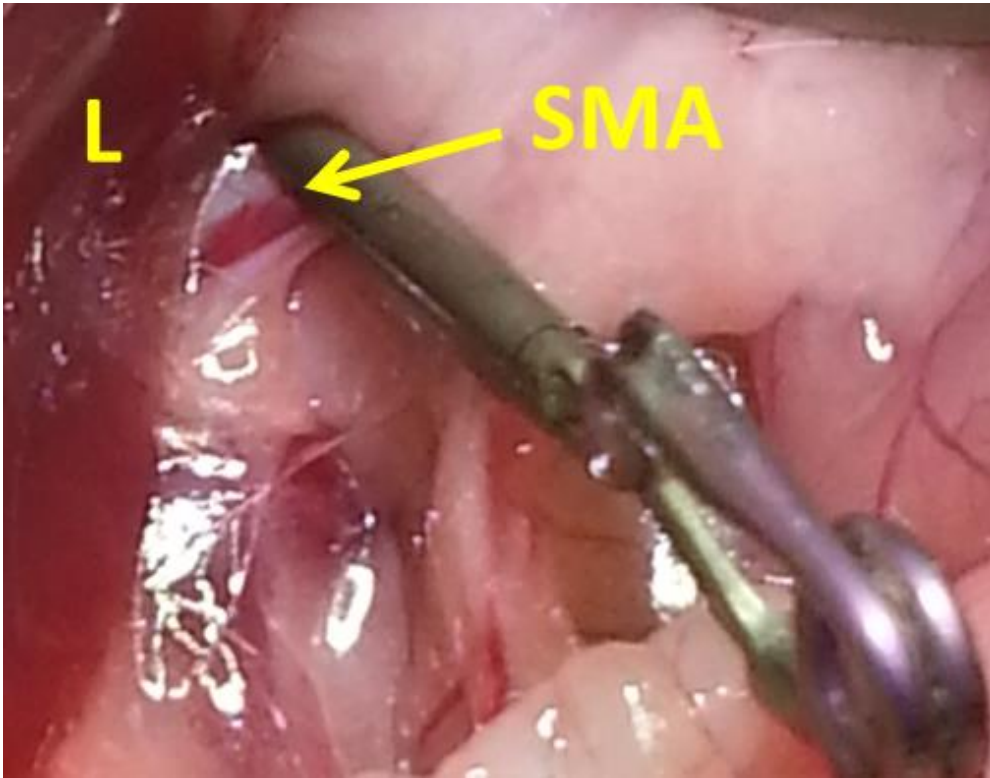


図 1 ; 腸管虚血再灌流手技シエーマ

SMA ; 上腸間膜動脈、L ; 肝臓

小腸・大腸を左側に授動した後に、肝下面を展開し SMA を同定。micro clip 用いて SMA を把持、遮断した。

3-1-2 ; 結果

各群において術後 48 時間までの生存を観察したところ、図 2 に示すように、虚血時間が長くなるとともに生存は増悪した。虚血時間 45 分では 24 時間生存が 80%、48 時間生存が 70%であったが、虚血時間が 60 分、75 分では 24 時間生存が 50%以下であった。本実験では Gut I/R に迷走神経切離を加えることで予後がさらに悪化するという仮説のもと、SMA の遮断時間は 45 分間が適当であると判断し、本実験に移った。

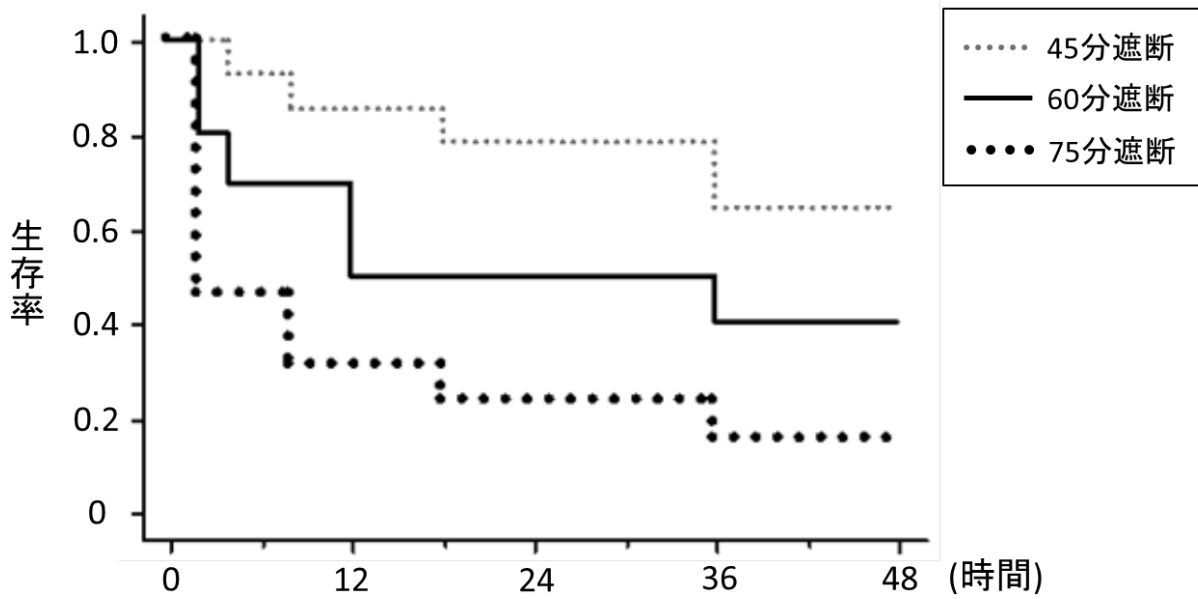


図 2 ; 腸管虚血再灌流後の生存曲線(予備実験)

上腸間膜動脈の遮断時間を長くするにつれて、術後生存率は増悪した。

遮断時間 45 分における術後生存率は 24 時間で 80%、48 時間で 70%であり、迷走神経切離手技が加わる本実験に適した遮断時間は 45 分間と判断した。

3-2 ; 実験 1 . 迷走神経切離がマウス腸管虚血再灌流後の生存に及ぼす影響

3-2-1 ; 方法

5 週齢の ICR マウス（雄性、n=22）を購入、搬入後 1 週間環境順応させた後に実験を開始した。ケタミン 100 mg/kg とキシラジン 10 mg/kg の混合溶液を皮下に注入し全身麻酔を行い、迷走神経切離(vagotomy)をせずに Gut I/R を行う I/R 群(n=11)と、迷走神経切離とそれに続く Gut I/R を行う Vago-I/R 群(n=11)の 2 群に無作為に分けた。

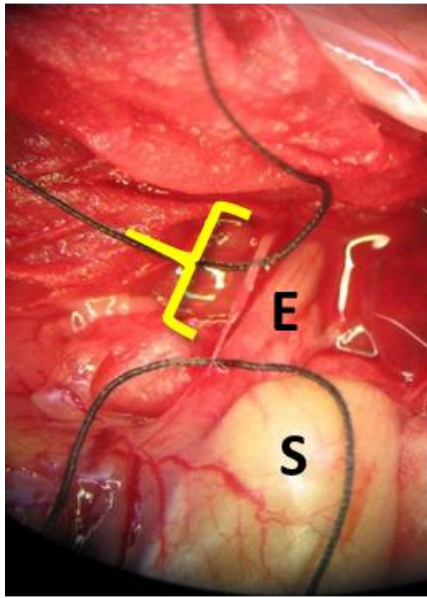
迷走神経切離手技

約 2cm の上腹部正中切開にて開腹、開創器にて開創し術野を確保した後、生理食塩水に浸したガーゼを用いて肝臓左葉を右上腹部に脱転し、腹部食道前面を露出した。その後、顕微鏡下で腹部食道の前面を通る迷走神経前幹を同定し、肝枝分岐部も含めて約 5mm 神経を切除した。次に、食道を左方に牽引し、迷走神経後幹を同定し同様に 5mm 神経を切除した（図 3）。迷走神経切離を行わない I/R 群では迷走神経の前幹・後幹の両方の露出・同定まで行った。

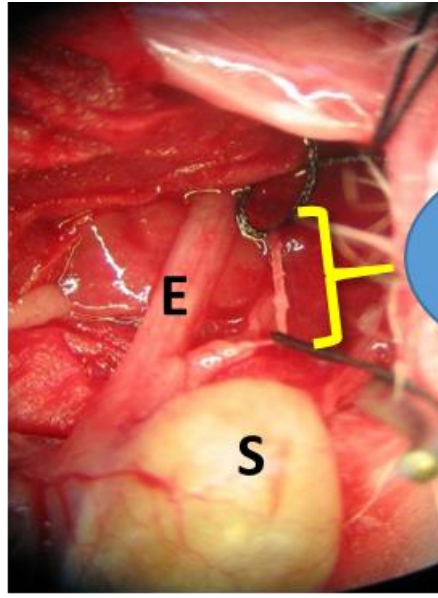
Gut I/R は予備実験 1 と同様に行い、SMA 遮断時間は 45 分とした。術後 48 時間までの生存を観察し、術後 12 時間までは 2 時間毎、術後 12~24 時間までは 6 時間毎、それ以降では 12 時間毎に生存確認を行った。

統計手法

本実験での値は全て $\text{means} \pm \text{SE}$ で表し、統計ソフトは Windows 用の JMP Pro 9 (SAS Institute Japan Ltd, Japan) を使用した。P 値は 0.05 未満にて有意差があるとした。2 群間の生存時間は Log-rank test、生存率は Fisher's exact test にて検定した。



前幹



後幹

切除
(5mm)

図 3 ; 迷走神経切離手技シエーマ

E ; 食道、S ; 胃

肝左葉を脱転し横隔膜下の食道を露出。同レベルで迷走神経の前幹・後幹を同定し、それぞれを 5mm に渡り切除した。

3-2-2 ; 結果

Vago-I/R 群は I/R 群に比べ、有意な生存時間の短縮を認めた(図 4)。術後 36 時間の生存率は Vago-I/R 群で 54.5%、I/R 群で 90.9%と Vago-I/R 群で有意に低かった($p=0.04$)。

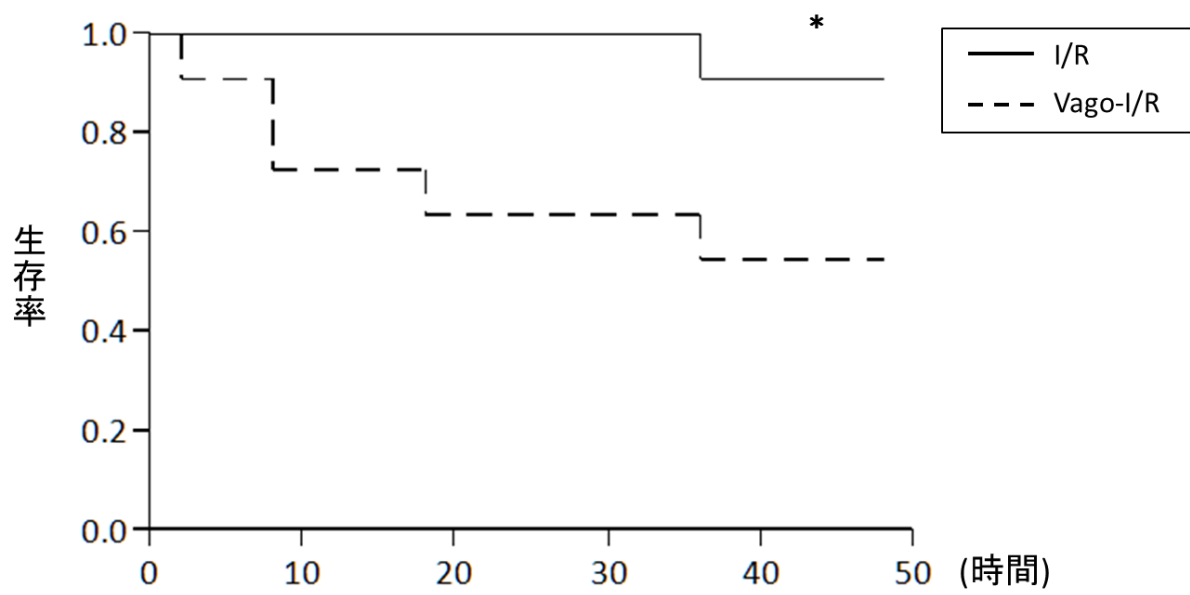


図 4 ; 腸管虚血再灌流後の生存曲線

I/R:n=11、Vago-I/R:n=11

Vago-I/R 群では I/R 群に比べて、有意な生存の増悪を認めた(*p<0.05)。

3-2-3 ; 考察および小括

迷走神経切離によって Gut I/R 後の生存は有意に増悪した。迷走神経は Gut I/R 後の生体反応調節にも深く関与していることが示された。次に、迷走神経切離によって Gut I/R 後の生存が増悪する機序を解明すべく、さらなる実験を追加した。

3-3 ; 予備実験 2. 迷走神経切離によるマウス腸管虚血再灌流後の血中サイトカインレベル評価のタイミング決定

迷走神経切離が Gut I/R 後の生体内サイトカインレベルに及ぼす影響についての実験に先行し、本予備実験にてサイトカイン測定の最適なタイミングを検討した。

3-3-1 ; 方法

5 週齢の雄性 ICR マウス(n=43)を購入、搬入後 1 週間環境順応させた後に実験を開始した。麻酔法は実験 1 と同様に行い、マウスを Sham 群(n=19)、I/R 群(n=20)、pre 群(n=4)の 3 群に分けた。Sham 群には単開腹、I/R 群には虚血時間 60 分の Gut I/R を施行し、術後 3 時間(n=4/5)、6 時間(n=8/8)、9 時間(n=7/7)で心腔穿刺にて犠死せしめた。また、pre 群では侵襲を加えないで同様に犠死せしめた。心腔穿刺によって得られたヘパリン全血検体を遠心分離(3,000 rpm、10 分、4°C)し、その上清を-80°Cにて凍結保存した。得られた血漿中のサイトカインレベル(IL-6、TNF- α)をマウス ELISA システム(IL-6 : Affymetrix, eBioscience, California, USA、TNF- α : R&D systems, Minnesota, USA)を用いて測定した。

3-3-2 ; 結果

いずれのサイトカインレベルも、I/R 群では 6 時間値が最も高値であり、また、9 時間値ではピークアウトしていた (図 5)。この結果より、術後 3 時間、6 時間での測定が適切と考えられ、次の本実験に移った。

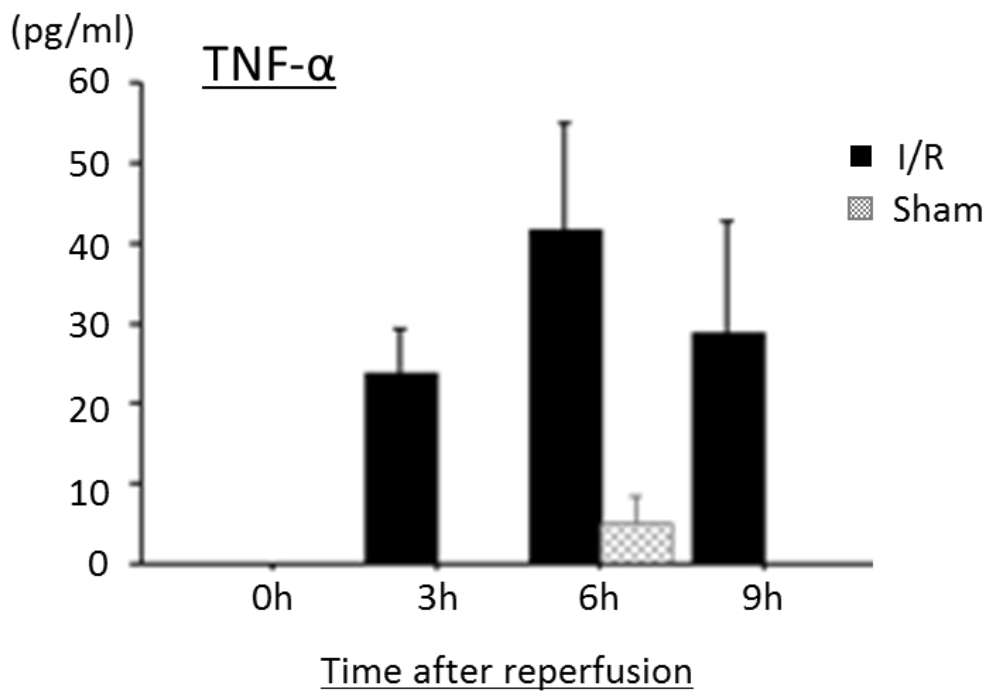
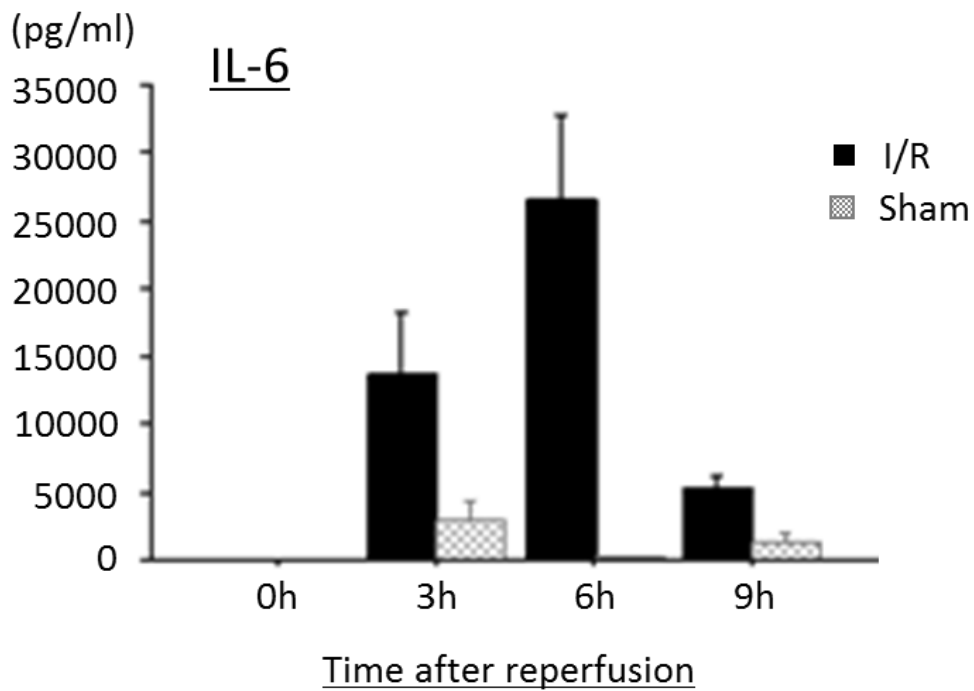


図 5 ; 血漿サイトカインレベル(予備実験)

IL-6、TNF- α レベルはいずれも術後 6 時間値が最も高く、術後 9 時間値ではピークアウトした。

3-4 ; 実験 2 . 迷走神経切離がマウス腸管虚血再灌流後の血中・小腸組織中サイトカインレベルと小腸病理組織像に及ぼす影響

実験 2 では、迷走神経切離が Gut I/R 後の生体内サイトカインレベルの動態に及ぼす影響を評価するために、血漿サイトカインレベル、小腸組織ホモジネート上清サイトカインレベルの測定を行った。また、Gut I/R は高度な小腸粘膜の組織傷害を生じさせることが知られており、迷走神経切離がその傷害の程度に及ぼす影響についても評価した。

3-4-1 ; 方法

5 週齢の雄性 ICR マウス(n=55)を購入、搬入後 1 週間環境順応させた後に実験を開始した。麻酔法は実験 1 と同様に行い、Sham 群(n=7)、Vago 群(n=8)、I/R 群(n=20)、Vago-I/R 群(n=20)の 4 群に無作為に分けた。I/R 群、Vago-I/R 群は実験 1 と同様の手技を施行、Vago 群は迷走神経切離、Sham 群は迷走神経の前幹・後幹の両方の露出・同定まで行った。術後 3 時間(n=3/4/10/10)、6 時間(n=4/4/10/10)で心腔穿刺にて犠死せしめた。

サイトカイン測定

血漿サイトカインレベルの測定では、心腔穿刺によって得られたヘパリン全血検体を遠心分離(3,000 rpm、10 分、4°C)し、その上清を-80°Cにて凍結保存した。

また、心腔穿刺による全血採取直後に全小腸を摘出し、小腸内腔を 20ml の calcium-magnesium-free Hanks' balanced salt solution (CMF-HBSS; Bio Whittaker Walkersville, MD)で洗浄後、全小腸のおよそ中点で口側小腸(空腸)と肛門側小腸(回腸)に離断した。その際、空腸・回腸それぞれの中点 10 mm切片を小腸組織像の評価のために採取した。残った腸管の水分を十分に取り除き、各々の重量を測定した後に-80℃にて凍結保存した。その後、各腸管組織を protease inhibitor mixtures (Complete; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)含有の 20 倍量の lysing buffer (0.75% NH₄Cl, 0.01 M Tris, 0.005 M EDTA) に入れ、ホモジナイズ(15,000 rpm、40 秒)した。得られた小腸ホモジネートを遠心分離(14,000 rpm、45 分、4℃)し、上清を-80℃にて凍結保存した。

得られた血漿、小腸(空腸・回腸)組織抽出液中の各サイトカインレベル(interleukin-6 ; IL-6、 monocyte chemoattractant protein-1 ; MCP-1、 tumor necrosis factor- α ; TNF- α 、 interferon- γ ; IFN- γ 、 interleukin-10 ; IL-10)を CBA-detection kit (BD cytometric bead array mouse inflammation kit, Becton-Dickinson Bioscience, California, USA)を用い、フローサイトメトリー(BD accuri C6, Becton-Dickinson Bioscience, California, USA)で測定した。

小腸組織傷害度の評価

小腸を摘出、内腔洗浄を行った後に、空腸・回腸の midpoint 10mm を採取し、20%ホルマリン液で固定し組織標本を作成した。なお、組織傷害評価のタイミングは、より時間が経過し侵襲が蓄積したと考えられる術後 6 時間を選択した。ホルマリン固定した空腸・回腸組織を Hematoxylin-Eosin 染色し、過去に報告されている Chiu らの傷害度スコアに従って、ブラインド下に 1 匹のマウスにつき 50 絨毛の点数化を行いその平均値を傷害度として評価した (図 6)。スコアの詳細は、0 点 ; 正常粘膜、1 点 ; 絨毛頂点の上皮下の空胞変性、2 点 ; 粘膜固有層からの粘膜上皮の軽度隆起を伴った上皮直下の空胞の伸展、3 点 ; 絨毛頂点から中央部までの空胞変性の拡大と粘膜上皮の著明なリフティング、4 点 ; 絨毛頂点から下部までの空胞変性と粘膜上皮のリフティング、5 点 ; 潰瘍化した粘膜と粘膜固有層の崩壊と定義され、数値の増加と共に傷害の程度が強くなった (図 6)。観察・計測には光学顕微鏡 BX43 (オリンパス株式会社、東京)、DP-21-SAL (オリンパス株式会社、東京)を用いた。

統計手法

本実験での値は全て means \pm SE で表し、統計ソフトは Windows 用の JMP Pro 9 (SAS Institute Japan Ltd, Japan)を使用した。P 値は 0.05 未満にて有意差があったとした。4 群間の比較は ANOVA 検定にて行い、血中と小腸組織中のサイトカイン

レベルの相関関係は単回帰モデルにて検討した。小腸組織傷害度の比較は I/R 群と Vago-I/R 群の 2 群間で行い、Student's t test にて検定した。

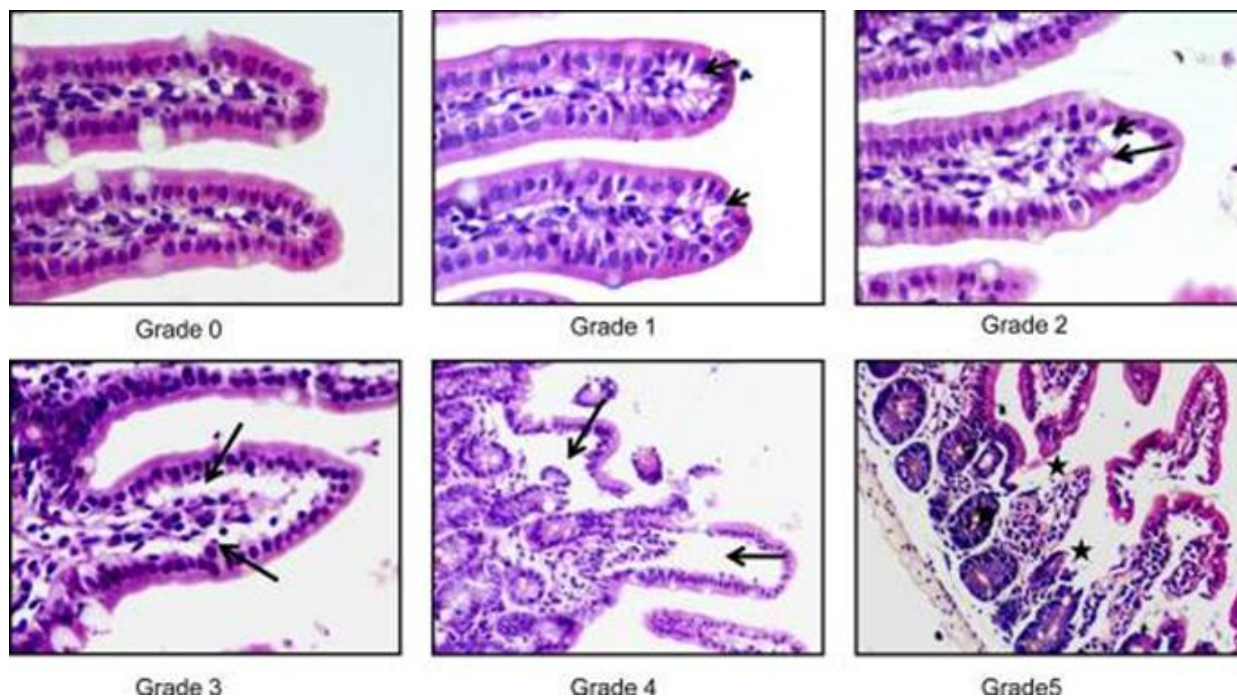


図 6 ; 小腸粘膜傷害度スコア

Feinman R. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010 より引用

スコアの詳細は、0点；正常粘膜、1点；絨毛頂点の上皮下の空胞変性、2点；粘膜固有層からの粘膜上皮の軽度隆起を伴った上皮直下の空胞の伸展、3点；絨毛頂点から中央部までの空胞変性の拡大と粘膜上皮の著明なリフティング、4点；絨毛頂点から下部までの空胞変性と粘膜上皮のリフティング、5点；潰瘍化した粘膜と粘膜固有層の崩壊と定義した。

3-4-2 ; 結果

血漿サイトカインレベル

術後 6 時間の血漿 IL-6 値、MCP-1 値は、Vago-I/R 群が他群に比べて有意に高値であった (図 7)。また、術後 3 時間の血漿 IL-10 値は、Vago-I/R 群が I/R 群に比べて低い傾向であった($p=0.07$)。

小腸組織ホモジネート上清サイトカインレベル

術後 6 時間の空腸 IFN- γ 、回腸 MCP-1 値は、Vago-I/R 群が他群に比べて有意に高値であった (表 1)。また、術後 6 時間の空腸 MCP-1 値および回腸 IL-6 値は、いずれも Vago-I/R 群が I/R 群に比べて高い傾向を示した。(空腸 MCP-1 ; $p=0.055$ 、回腸 IL-6 ; $p=0.07$)

血漿サイトカインと小腸組織ホモジネート上清サイトカインの関係

I/R 群、Vago-I/R 群の 2 群において、術後 3 時間の血漿サイトカイン値と小腸組織ホモジネート上清サイトカイン値の相関関係の有無について単回帰モデルを用いて検討した。なお、小腸組織ホモジネート上清サイトカイン値は空腸・回腸を重量補正した平均値とした。IFN- γ を除くすべての炎症性サイトカイン (IL-6、MCP-1、TNF- α) に正の相関関係を認めた (図 8)。一方で、抗炎症性サイトカインである IL-10 においては明らかな相関を認めなかった (図 9)。

小腸組織傷害度

各群の代表的な空腸粘膜の顕微鏡写真を図 10 に示した。I/R 群と Vago-I/R 群では空胞変性と粘膜固有層の崩壊を伴った重度の粘膜傷害が認められた。絨毛高や組織構造は I/R 群よりも Vago-I/R 群において悪化していた。実際に組織傷害度 score を計算したところ、空腸において Vago-I/R 群が I/R 群よりも有意に高得点であり、高度の粘膜傷害を認めた(図 11)。回腸においても同様な傾向が認められた($p=0.08$)。

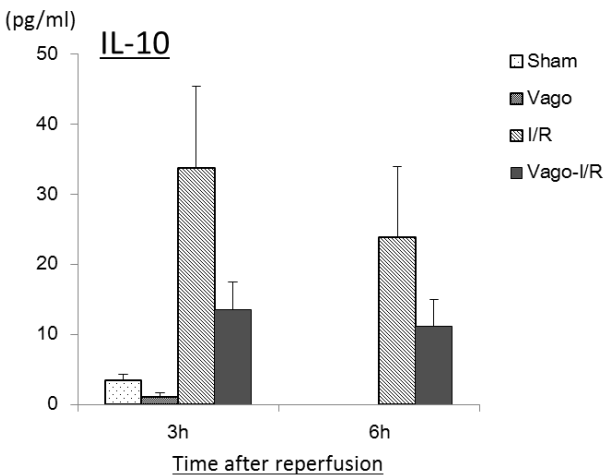
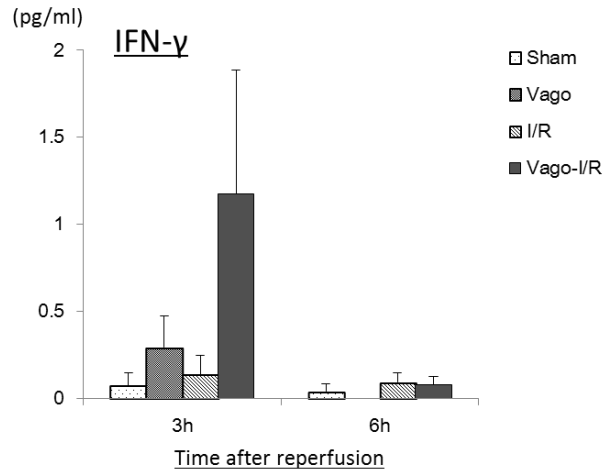
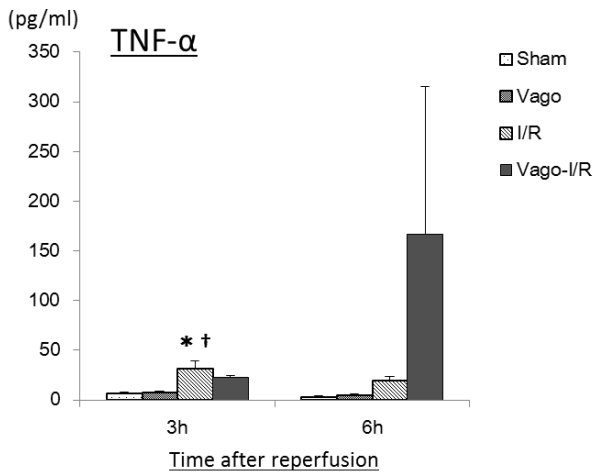
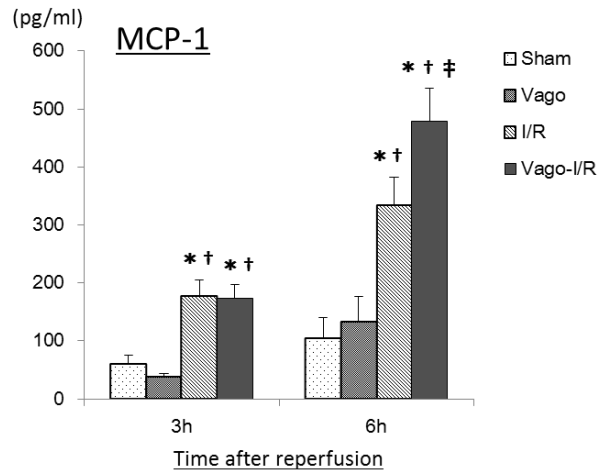
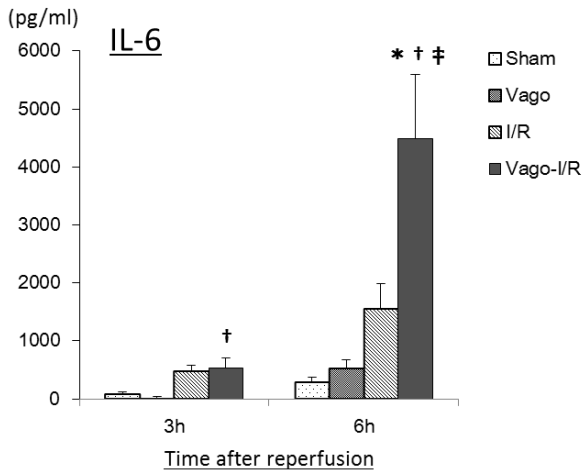


図7；血漿サイトカインレベル
 Sham、Vago、I/R、Vago-I/Rの順に、
 術後3時間 (n=3/4/10/10)
 術後6時間 (n=4/4/10/10)
 *p<0.05 vs. Sham群、†p<0.05 vs. Vago群、
 ‡p<0.05 vs. I/R群
 術後6時間のIL-6、MCP-1レベルは
 Vago-I/R群が他群よりも有意に高値で
 あった。また、術後3時間のIL-10レ
 ベルでは、Vago-I/R群がI/R群に比べて低
 い傾向であった(p=0.07)。

サイトカイン (pg/mL)	3h				6h			
	Sham	Vago	I/R	Vago-I/R	Sham	Vago	I/R	Vago-I/R
IL-6	2.34±4.20	1.59±4.20	9.85±2.30	8.44±2.30	2.53±6.00	4.43±6.00	13.7±3.79	12.8±3.79
MCP-1	11.5±25.4	10.1±25.4	78.3±13.9 ^{**†}	63.8±13.9	13.1±23.1	18.8±23.1	76.0±14.6 ^{**†}	117±14.6 ^{**†}
空腸 TNF- α	0.80±3.26	4.35±3.26	1.87±1.79	4.35±1.79	0.42±0.70	0.25±0.70	0.99±0.44	0.74±0.44
IFN- γ	0.80±0.57	0.24±0.57	0.38±0.31	0.71±0.31	0±0.04	0±0.04	0.02±0.02	0.12±0.02 ^{**‡}
IL-10	4.91±7.51	3.95±7.51	2.75±4.11	10.1±4.11	7.06±0.82	5.99±0.82	2.38±0.52 ^{**†}	3.39±0.52 ^{**†}
IL-6	2.48±20.9	2.31±20.9	50.5±11.4	35.5±11.4	3.60±29.1	7.90±29.1	79.7±18.4 ^{**†}	128±18.4 ^{**†}
MCP-1	13.8±6.98	17.3±9.68	152±250 [*]	119±21.1 ^{**†}	13.1±45.7	36.5±45.7	192±28.9 ^{**†}	306±28.9 ^{**‡}
回腸 TNF- α	5.11±3.04	4.47±3.04	8.70±1.66	6.43±1.66	2.21±1.91	1.79±1.91	4.63±1.21	5.32±1.21
IFN- γ	0.45±0.36	0.98±0.36	0.91±0.20	0.70±0.20	0.15±0.11	0.11±0.11	0.13±0.07	0.29±0.07
IL-10	2.53±1.48 [†]	9.51±1.48	3.27±0.81 [†]	3.59±0.81 [†]	2.20±0.72	1.06±0.72	2.46±0.45	2.53±0.45

表 1 ; 小腸組織ホモジネート上清サイトカインレベル

Sham、Vago、I/R、Vago-I/R の順に、

術後 3 時間 (n=3/4/10/10)、術後 6 時間 (n=4/4/10/10)

*p<0.05 vs. Sham 群、†p<0.05 vs. Vago 群、‡p<0.05 vs. I/R 群

術後 6 時間の空腸 IFN- γ 、回腸 MCP-1 値は、Vago-I/R 群が他群に比べて有意に高値であった。また、術後 6 時間の空腸 MCP-1 値、回腸 IL-6 値は、Vago-I/R 群が I/R 群に比べて高い傾向であった(空腸 MCP-1 ; p=0.055、回腸 IL-6 ; p=0.07)。

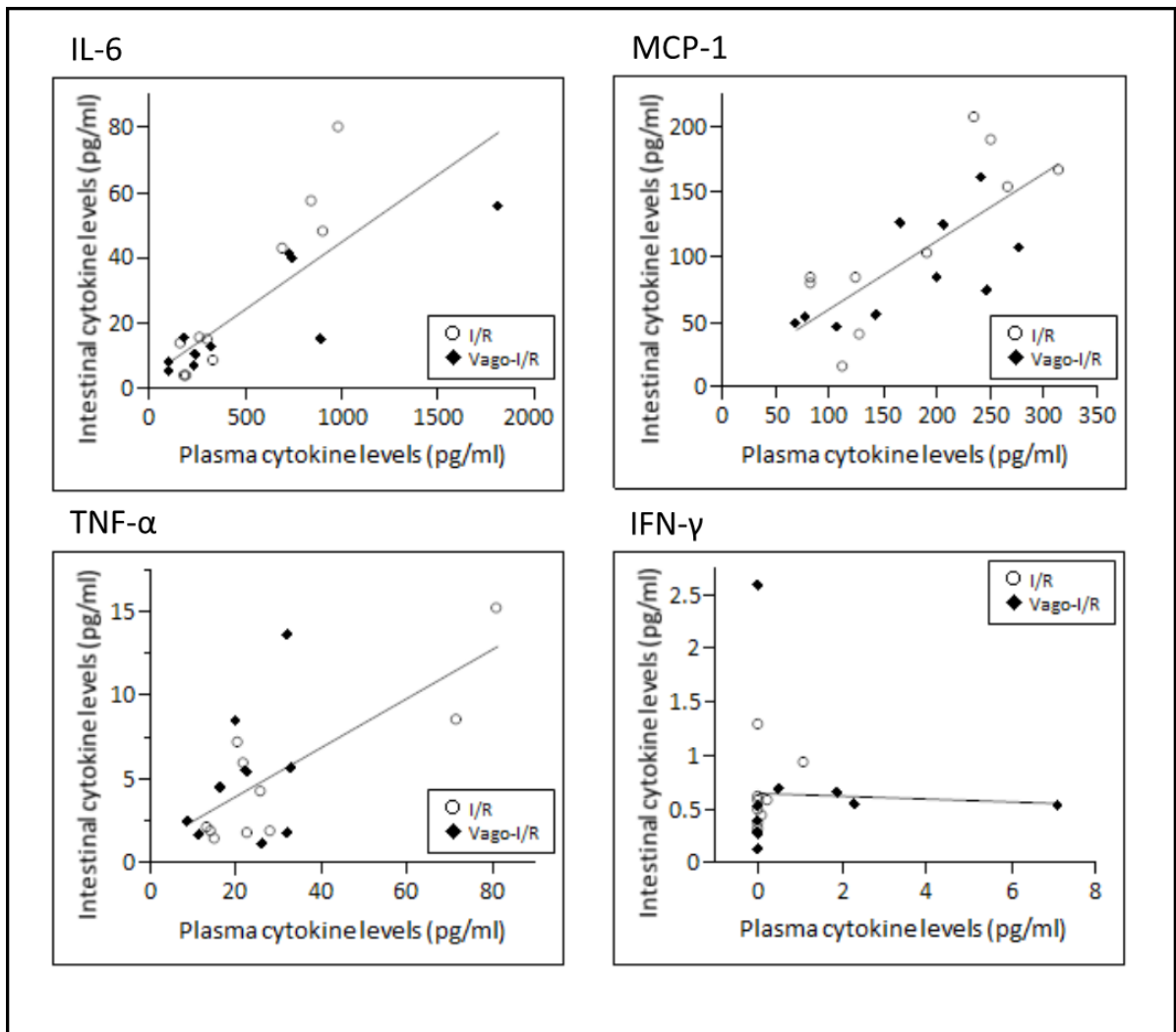


図 8 ; 血漿・小腸組織ホモジネート上清の炎症性サイトカイン相関図
 IL-6 ; n=20, $r^2=0.64$, $p<0.0001$ 、MCP-1 ; n=20, $r^2=0.55$, $p=0.0002$ 、TNF- α ; n=20, $r^2=0.44$, $p=0.0012$ 、IFN- γ ; n=20, $r^2=0.0018$, $p=0.85$
 血漿サイトカインと小腸組織ホモジネート上清サイトカインの IL-6、MCP-1、TNF- α レベルは正の相関を認めた。

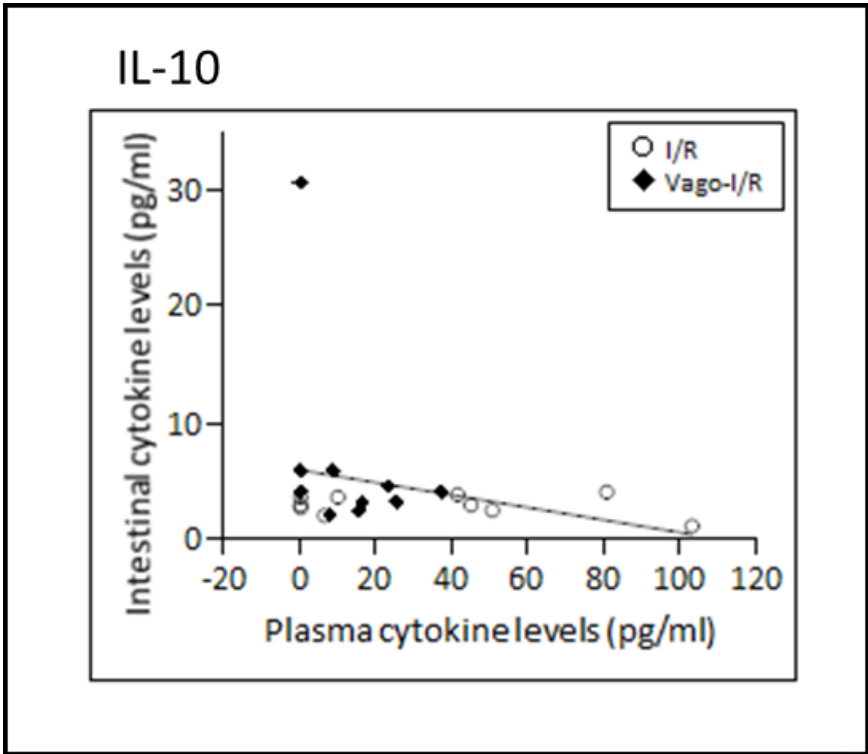


図 9 ; 血漿・小腸組織ホモジネート上清の抗炎症性サイトカイン相関図

IL-10 ; n=20, $r^2=0.06$, $p=0.29$

IL-10 の血漿値と小腸組織ホモジネート上清値は明らかな相関を認めなかった。

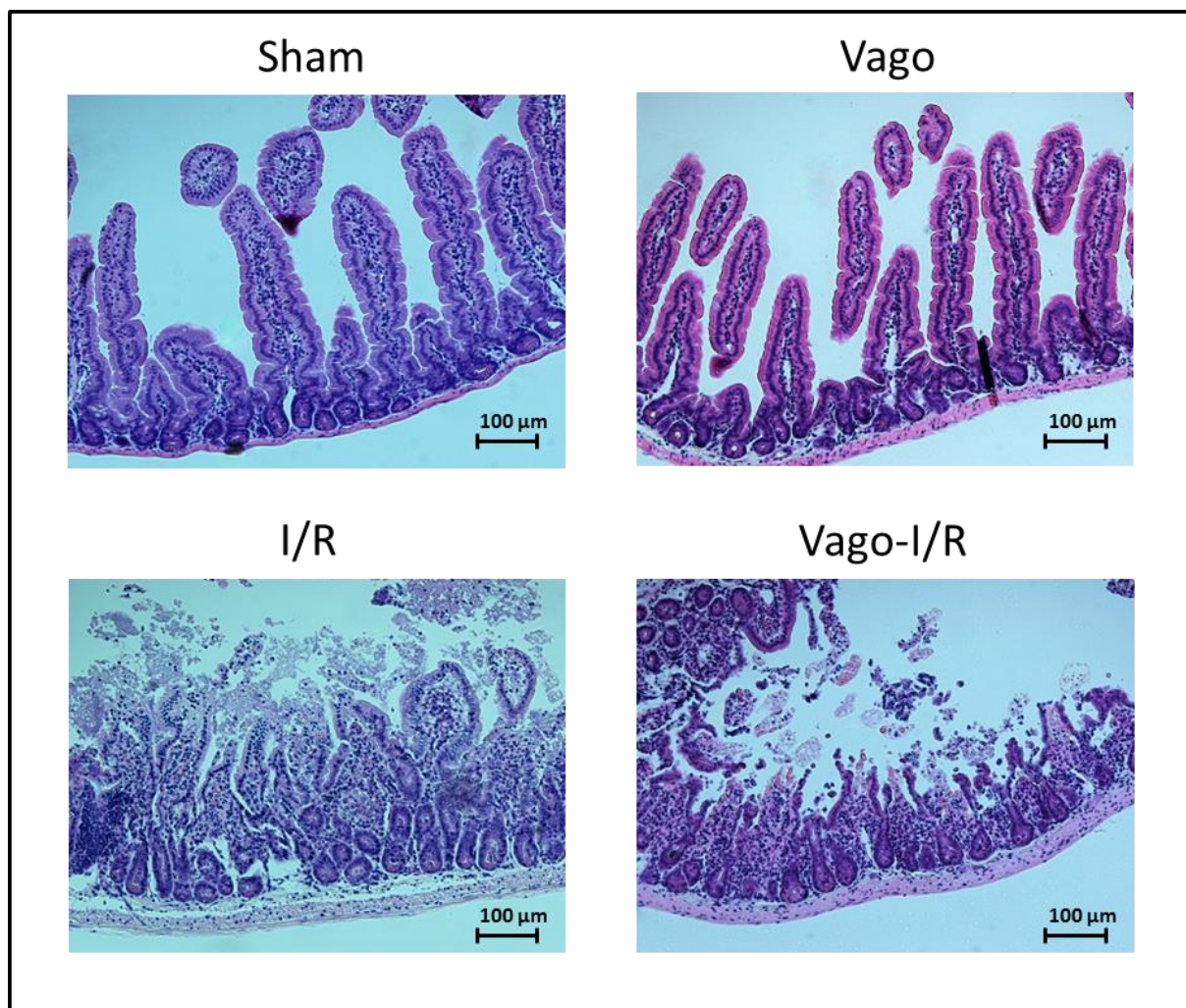


図 10 ; 空腸粘膜病理標本写真(H&E 染色、100 倍率)

Gut I/R を施行した I/R 群、Vago-I/R 群では明らかな粘膜構造の破壊を認めた。特に Vago-I/R 群での破壊は顕著であった。一方で、Sham 群、Vago 群では粘膜傷害はほとんど認められなかった。

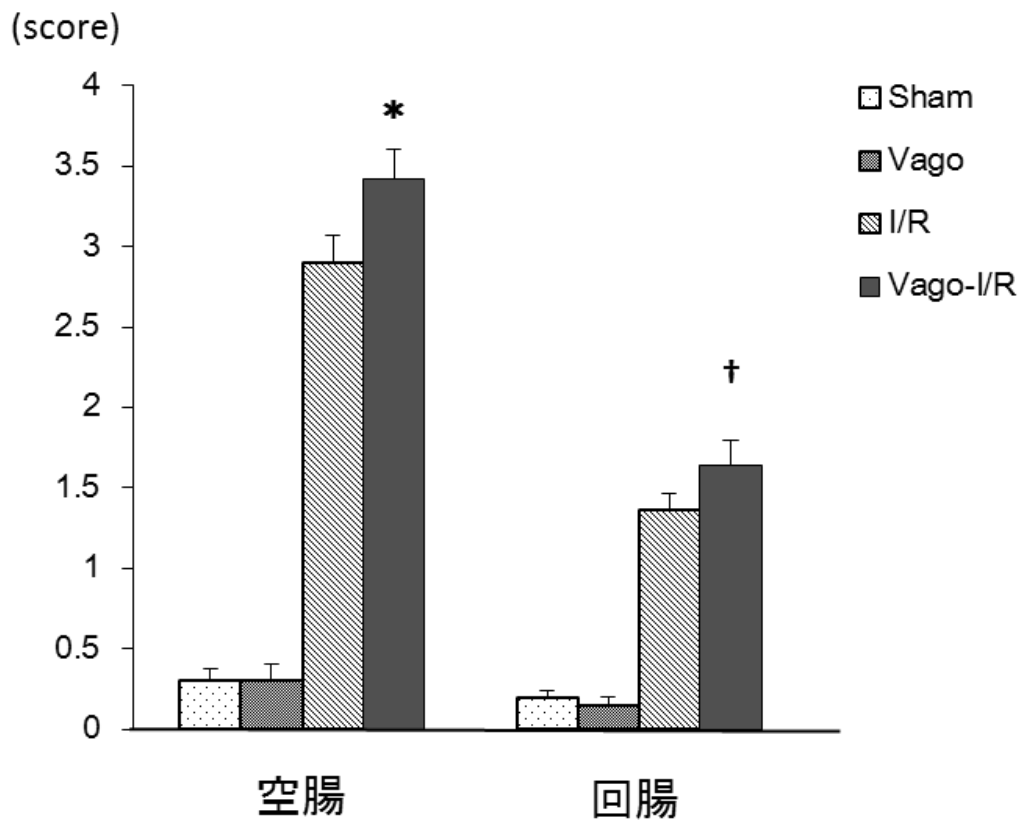


図 11 ; 小腸組織傷害度スコア

Sham、Vago、I/R、Vago-I/R の順に、n=4/4/10/10

*p<0.05 vs. I/R 群、†p=0.08 vs. I/R 群

空腸粘膜傷害度スコアは Vago-I/R 群が I/R 群に比べて有意に高値で、重度の粘膜傷害を呈した。

3-4-3 ; 考察および小括

迷走神経切離によって Gut I/R 後の腸管組織傷害がより顕著となり、それに関連して血漿・小腸組織ホモジネート上清中の炎症性サイトカインが上昇すると考えられた。また、血漿サイトカイン値、小腸組織ホモジネート上清サイトカイン値の間には、炎症性サイトカインである IL-6、MCP-1、TNF- α において正の相関を認め、血中の炎症性サイトカイン上昇のソースとして腸管が重要であることが示唆された。一方で、抗炎症性サイトカインである IL-10 については、血漿 IL-10 レベルが Vago-I/R 群において I/R 群よりも低くなる傾向を認めた。しかし、小腸組織 IL-10 レベルは有意な変化がなく、血漿・小腸組織の相関関係もみられなかった。小腸組織中の炎症性サイトカインレベルが、逆に血中レベルを反映して Vago-I/R 群で高値となっている可能性も否定できなかったため、次の実験を行った。

3-5 ; 実験3. 迷走神経切離がマウス腸管虚血再灌流後の小腸培養上清中のサイトカインレベルに及ぼす影響

実験3では、迷走神経切離によって Gut I/R 後の腸管からの炎症性サイトカイン産生が亢進するか否かを検討するために、小腸組織培養上清中のサイトカインレベルの測定を行った。

3-5-1 ; 方法

5週齢の雄性 ICR マウス(n=24)を購入、搬入後1週間環境順応させた後に実験を開始した。実験1と同様な麻酔法を行い、実験2と同様に Sham 群(n=3)、Vago 群(n=3)、I/R 群(n=9)、Vago-I/R 群(n=9)の4群に無作為に分け、同様の手術を施行した。術後3時間で心腔穿刺にて犠死せしめた。

小腸培養上清は Omata らの方法によって作成・採取された[55]。心腔穿刺の直後に全小腸を摘出し、小腸内腔を 20ml の calcium-magnesium-free Hanks' balanced salt solution で洗浄後、全小腸のおよそ中点で口側小腸(空腸)と肛門側小腸(回腸)に離断した。さらに、空腸・回腸それぞれの中点 20 mm を切片として回収した後、切片を長軸方向に切開し、1ml の CMF-HBSS を含んだ 24 ウェルプレートに置いた。その後、37°C で 3 時間培養した後に上清を速やかに回収し、遠心分離(3,000 rpm, 5 分, 4°C)して得られた上清を 0.22 μ m のフィルター(Millipore Corp., Bedford, MA)で濾過した後、-80°C にて凍結保存した。サイトカインの測定は実験2と同

様に Beads array kit を用いてフローサイトメトリーで行った。なお、術後小腸を摘出する時間と、培養時間の長さについては、それぞれ 1,2,3 時間後を設定(全部で 9 パターン)し、参考値としてサイトカインレベルを測定したところ、術後 3 時間での小腸摘出、培養時間 3 時間で測定した値が最も高値となったため、このタイミングで本実験を行った。

統計手法

本実験での値は全て means ± SE で表し、統計ソフトは Windows 用の JMP Pro 9 (SAS Institute Japan Ltd, Japan)を使用した。P 値は 0.05 未満にて有意差があるとした。4 群間の比較は ANOVA 検定を用いて行った。

3-5-2 ; 結果

小腸組織培養上清のサイトカインレベルは、空腸 MCP-1 において、Vago-I/R 群が他群に比べて有意に高値であった(表 2)。

サイトカイン (pg/mL)	3h				
	Sham	Vago	I/R	Vago-I/R	
空腸	IL-6	10.1±62.0	48.9±62.0	190±35.8*	224±35.8*†
	MCP-1	13.2±31.0	55.2±31.0	86.5±17.9	148±17.9*†‡
	TNF- α	0.84±1.27	1.26±1.27	5.52±0.73*†	6.87±0.73*†
	IFN- γ	0.07±0.08	0±0.08	0.14±0.04	0.12±0.04
	IL-10	1.44±4.63	0±4.63	8.68±2.67	4.38±2.67
回腸	IL-6	6.93±95.7	31.1±95.7	191±55.2	164±55.2
	MCP-1	9.02±50.6	34.3±50.6	110±29.2	113±29.2
	TNF- α	1.25±2.82	0±2.82	4.60±1.63	5.74±1.63
	IFN- γ	0.13±0.18	0.01±0.01	0.15±0.10	0.26±0.10
	IL-10	0±1.87†	0±1.87	0.41±1.08†	2.39±1.08†

表 2 ; 小腸組織培養上清サイトカインレベル

Sham、Vago、I/R、Vago-I/R の順に、n=4/3/9/9

*p<0.05 vs. Sham 群、†p<0.05 vs. Vago 群、‡p<0.05 vs. I/R 群

空腸培養上清中の MCP-1 レベルでは、Vago-I/R 群が他群に比べて有意に高値であった。

3-5-3 ; 考察および小括

本実験より、迷走神経切離時には小腸、特に空腸における炎症性サイトカインである MCP-1 の産生が高まることが判明した。血中の炎症性サイトカインレベル上昇の源としての小腸の意義がより明らかになった。

3-6 ; 実験4. 迷走神経切離がマウス腸管虚血再灌流後の脾臓組織サイトカインレベルに及ぼす影響

これまでの実験では、迷走神経切離が Gut I/R 時の小腸粘膜傷害を顕著にし、小腸組織における炎症性サイトカインの産生亢進、さらには血中の炎症性サイトカイン上昇をもたらすことが判明した。

その一方、近年では、迷走神経の抗炎症性作用において脾臓の存在も重要であると報告されている[14-17]。迷走神経の脾臓への信号伝達は、シナプスを介さず、交感神経が関与している点で、他臓器とは伝達様式が異なる[13,14]。交感神経は T 細胞からの Ach 産生を調節し、抗炎症作用を司ると考えられている[10,13,18,19]。そこで Gut I/R 時における、迷走神経の抗炎症経路としての脾臓の役割を検討すべく、迷走神経切離が Gut I/R 後の脾臓組織中サイトカインレベルに及ぼす影響について検討した。

3-6-1 ; 方法

5 週齢の雄性 ICR マウス(n=63)を購入、搬入後 1 週間環境順応させた後に実験を開始した。麻酔法は実験 1 と同様に行い、実験 2 と同様に Sham 群(n=10)、Vago 群(n=10)、I/R 群(n=22)、Vago-I/R 群(n=21)の 4 群に無作為に分け、同様の手術を施行した。術後 3 時間(n=5/5/11/10)、6 時間(n=5/5/11/11)で心腔穿刺にて犠死せしめ、脾臓を摘出した。

摘出した脾臓を 2ml の phosphate-buffered saline(PBS)に浸し、ステンレスメッシュに濾してホモジナイズした。その後、遠心分離(3,000 rpm、5 分、4°C)し得られた上清を 0.22 μ m のフィルター(Millipore Corp., Bedford, MA)で濾過した後、-80°Cにて凍結保存した。実験 2 と同様に Beads array kit を用いて各サイトカインレベル(IL-6、MCP-1、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10)の測定を行った。

統計手法

本実験での値は全て means \pm SE で表し、統計ソフトは Windows 用の JMP Pro 9 (SAS Institute Japan Ltd, Japan)を使用した。P 値は 0.05 未満にて有意差があるとした。4 群間の比較は ANOVA 検定を用いて行った。

3-6-2 ; 結果

脾臓組織ホモジネート上清サイトカインレベルは、多くの炎症性サイトカインにおいて、Gut I/R を行った群(I/R 群、Vago-I/R 群)がそうでない群(Sham 群、Vago 群)と比べて高かったが、I/R 群と Vago-I/R 群間での有意な差は認められなかった(図 12)。

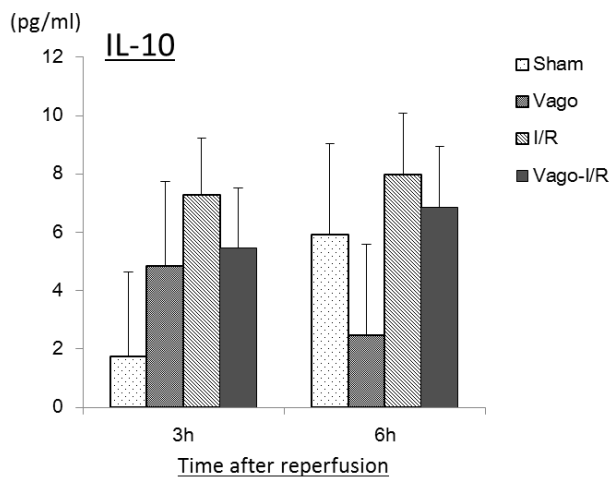
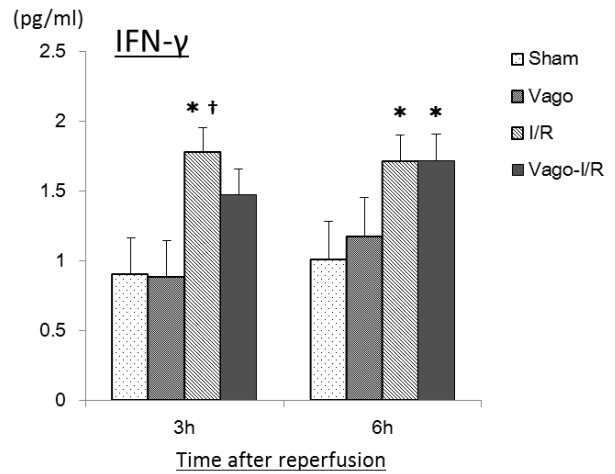
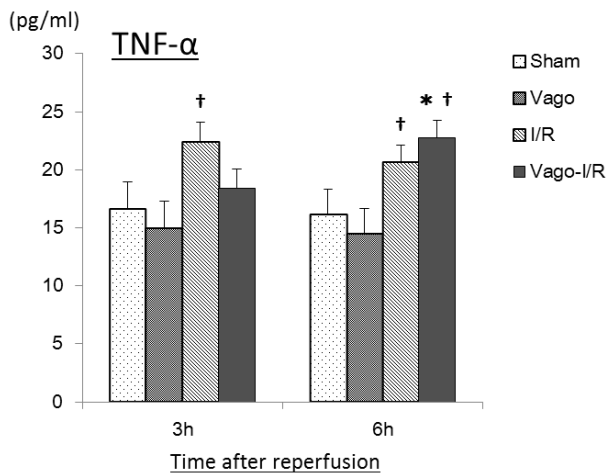
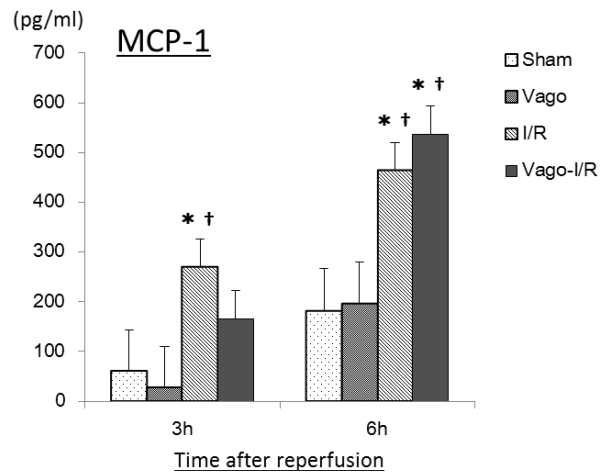
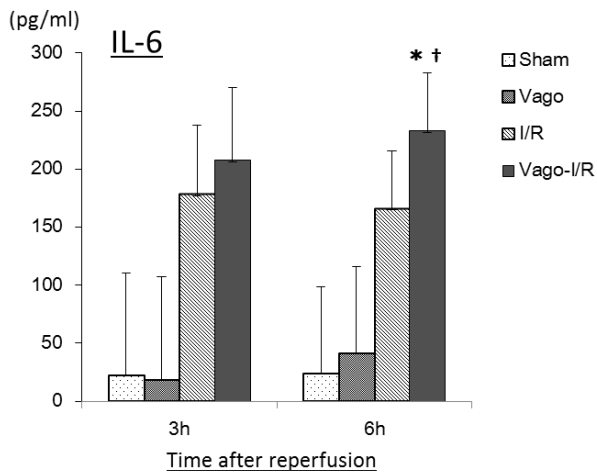


図 12 ; 脾臓組織ホモジネート上清サイトカインレベル

Sham、Vago、I/R、Vago-I/R の順に、

術後 3 時間 (n=5/5/11/10)

術後 6 時間 (n=5/5/11/11)

*p<0.05 vs. Sham 群、†p<0.05 vs. Vago 群

炎症性サイトカインの多くは Gut I/R を施行した I/R 群、Vago-I/R 群で高値となったが、I/R 群と Vago-I/R 群の 2 群間での明らかな差は認められなかった。

3-6-3 ; 考察および小括

Gut I/R 後の脾臓組織ホモジネート上清サイトカインレベルは迷走神経切離による明らかな影響を受けなかった。迷走神経切離による Gut I/R 後の生存増悪や血中・小腸組織中の炎症性サイトカイン上昇の機序として、脾臓内のサイトカイン動態の関与は否定的であると考えられた。

3-7 ; 実験 5. 迷走神経切離がマウス腸管虚血再灌流後の脾臓マクロファージに及ぼす影響

実験 4 では、迷走神経切離の有無による Gut I/R 後の脾臓組織中サイトカインレベルにおける明らかな差は認められなかった。そのため、脾臓が Gut I/R 後の血中サイトカイン上昇のソースとして働いている可能性は低いと考えられた。しかし、脾臓に存在するマクロファージの活性化に迷走神経切離が影響を及ぼし、サイトカイン以外の点で予後に影響を与えている可能性があり、次の実験を行った。

3-7-1 ; 方法

5 週齢の雄性 ICR マウス(n=80)を購入、搬入後 1 週間環境順応させた後に実験を開始した。麻酔法は実験 1 と同様に行い、実験 2 と同様に Sham 群(n=13)、Vago 群(n=13)、I/R 群(n=27)、Vago-I/R 群(n=27)の 4 群に無作為に分け、同様の手術を施行した。術後 3 時間(n=7/7/15/15)、6 時間(n=6/6/12/12)で心腔穿刺にて犠死せしめ、脾臓を摘出した。

脾臓細胞採取

摘出された脾臓の片端被膜を切った後に、その反対側端より 21G 穿刺針を刺し、2% fetal bovine serum (FBS)を添加した RPMI1640 (Gibco Laboratories, Gaithersburg, MD)にて脾実質をフラッシュし、得られた溶液をナイロンフィルタ

一(100 μ m Cell Strainer, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)で濾過した。その後、遠心分離(4°C、200G、5分)し、Lysing Buffer を加えて10分間静置した後に、同様の設定で遠心分離し上清を回収、実験2と同様の顕微鏡でトリパンブルー染色にて生細胞数をカウントした。この手技では、回収される全細胞の90%以上が生細胞であった。

抗 F4/80 抗体、抗 CD11b 抗体測定

脾細胞上清中の抗 F4/80 抗体、および抗 CD11b 抗体をフローサイトメトリーにて測定した。抗体測定は BD Biosciences Cell Analysis Protocol Elementare Vol.4 の方法に基づいた。抗マウス CD16/CD32 抗体(CD16/32, Becton-Dickinson Bioscience, California, USA)を用いて Fc レセプターのブロックを行い、一次抗体は、FITC で標識したマクロファージ特有の表面マーカーである抗 F4/80 抗体 (Anti-mouse F4/80 Antigen, Affymetrix Inc., California, USA)、PE で標識したマクロファージ活性化の指標となる抗 CD11b 抗体(CD11b, Becton-Dickinson Bioscience, California, USA)を用いた。また、アイソタイプ・コントロール抗体として Rat IgG2a κ Isotype Control FITC(Affymetrix Inc., California, USA)、Rat IgG2b κ (Becton-Dickinson Bioscience, California, USA)を使用した。また、カウントされた脾臓細胞数に F4/80 陽性の比率を乗じた結果が脾臓マクロファージ細胞数と定

義し、F4/80 陽性細胞における CD11b の蛍光強度をマクロファージ活性化の指標とした。

統計手法

本実験での値は全て means±SE で表し、統計ソフトは Windows 用の JMP Pro 9 (SAS Institute Japan Ltd, Japan)を使用した。P 値は 0.05 未満にて有意差があるとした。4 群間の比較は ANOVA 検定を用いて行った。

3-7-2 ; 結果

脾臓マクロファージの細胞数は I/R 群と Vago-I/R 群間で有意な差を認めなかった。また、脾マクロファージの活性化の指標である CD11b の発現に関しても、I/R 群と Vago-I/R 群間で明らかな差を認めなかった(図 13)。

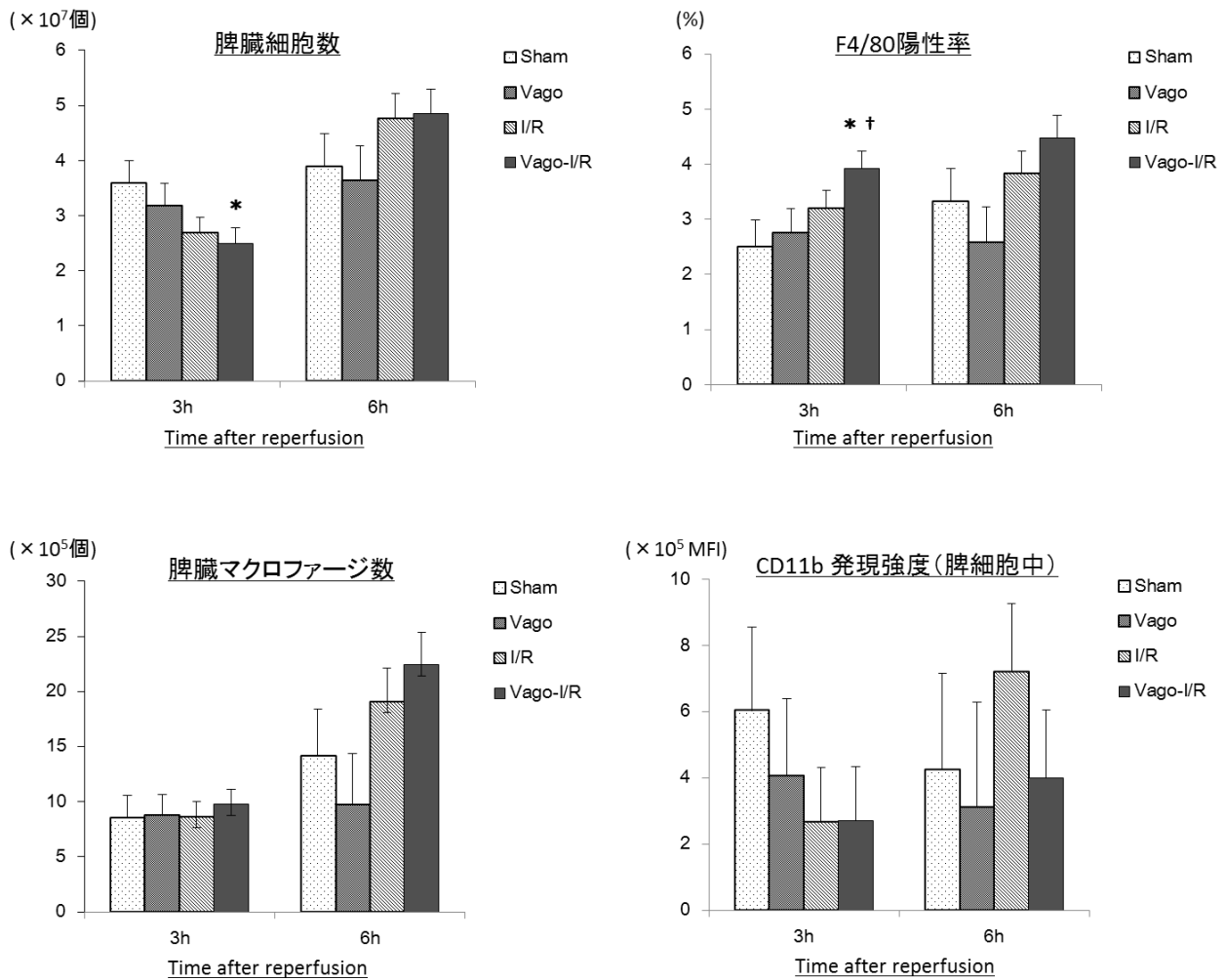


図 13 ; 脾臓マクロファージの細胞数と活性化

Sham、Vago、I/R、Vago-I/R の順に、

術後 3 時間 (n=7/7/15/15)、術後 6 時間 (n=6/6/12/12)

*p<0.05 vs. Sham 群、†p<0.05 vs. Vago 群

脾臓細胞数に F4/80 陽性率を乗じた数値を脾臓マクロファージ数と定義した。

脾臓マクロファージ数は群間における明らかな差を認めなかった。

脾臓マクロファージの活性化の指標である CD11b についても同様に各群の間に有意差はみられなかった。

3-7-3 ; 考察および小括

本実験では、迷走神経切離による Gut I/R 後の脾臓マクロファージの細胞数、活性化への影響は明らかでなかった。迷走神経の抗炎症性経路として脾臓免疫細胞の重要性が示唆されているが、本モデルにおいては、迷走神経切離が Gut I/R 後の生存、サイトカインプロファイルに影響を及ぼす機序として、脾臓マクロファージの関与は小さいと考えられた。

4. 検討2. 肥満症の治療としての迷走神経切離の効果について

迷走神経切離が外科領域でどのような意義を持つのかについて、検討1では外科侵襲モデルで明らかにしたが、本検討では肥満症の治療への応用の可否を模索した。

迷走神経の求心性経路は摂食行動やそれに伴う体重調節の機能を有すると言われている[38-41]。その作用経路の全貌はいまだ明らかにされていないが、延髄や視床下部へのシグナル伝達が関与していると考えられている[42-48]。近年、迷走神経の電氣的ブロックが肥満症に対する減量治療として米国で認可されたことも、迷走神経が体重制御において重要な役割を担っていることが伺える[50]。迷走神経切離も求心性経路の遮断により電氣的ブロックと同様の肥満症治療の効果をもつ可能性がある。そこで、検討2として迷走神経切離が術後の体重変化に及ぼす影響について通常食餌投与マウス及び高脂肪食投与による肥満マウスモデルを用いて検討した。

4-1 ; 実験6. マウスモデルにおいて迷走神経切離が体重変化、 摂食量に及ぼす影響-通常食及び高脂肪食摂取マウスモデルを用い て-

本研究では、検討2として迷走神経切離が体重制御に及ぼす影響について動物実験にて検討した。通常食摂取マウスと高脂肪食摂取による食餌起因性肥満マウスを用いて、迷走神経切離が体重変化および摂食量に及ぼす影響について術後10週まで観察を行った。

4-1-1 ; 方法

5週齢のC57BL/6Jマウス(雄性、n=38)(Charles River Laboratories Japan, INC. Japan)を購入、搬入後1週間環境順応させた後に実験を開始した。マウスに高脂肪食餌(HFD-60、オリエンタル酵母工業株式会社、東京)を摂取させる群と、通常食餌(MF、オリエンタル酵母工業株式会社、東京)を摂取させる群に半数ずつ無作為に割り当て、それぞれ8週間自由摂取させた。その後、高脂肪食摂取マウスをHigh fat diet-Sham群(HD-Sham, n=10)、High fat diet-Vagotomy群(HD-Vago, n=9)の2群に、通常食摂取マウスをNormal diet-Sham群(ND-Sham, n=10)、Normal diet-Vagotomy群(ND-Vago, n=9)の2群にさらに分け、1週間同様の食餌を投与した。この1週間の食餌摂取量を測定した。体重は各食餌開始後から1週毎に測定した(図14)。その後、実験1と同様な皮下全身麻酔下に、実

験 2 と同じく Vago 群は開腹下に迷走神経全幹切離、Sham 群は sham 手術を施行し、術後 10 週まで体重・摂食量の経過を観察した。なお、手術後も HD-Sham、HD-Vago 群には術前と同様の高脂肪食を、ND-Sham、ND-Vago 群には通常食を摂取させた。

統計手法

本実験での値は全て means ± SE で表し、統計ソフトは Windows 用の JMP Pro 9 (SAS Institute Japan Ltd, Japan) を使用した。P 値は 0.05 未満にて有意差があるとした。Vago 群と Sham 群の群間比較は Student's t test にて検定した。

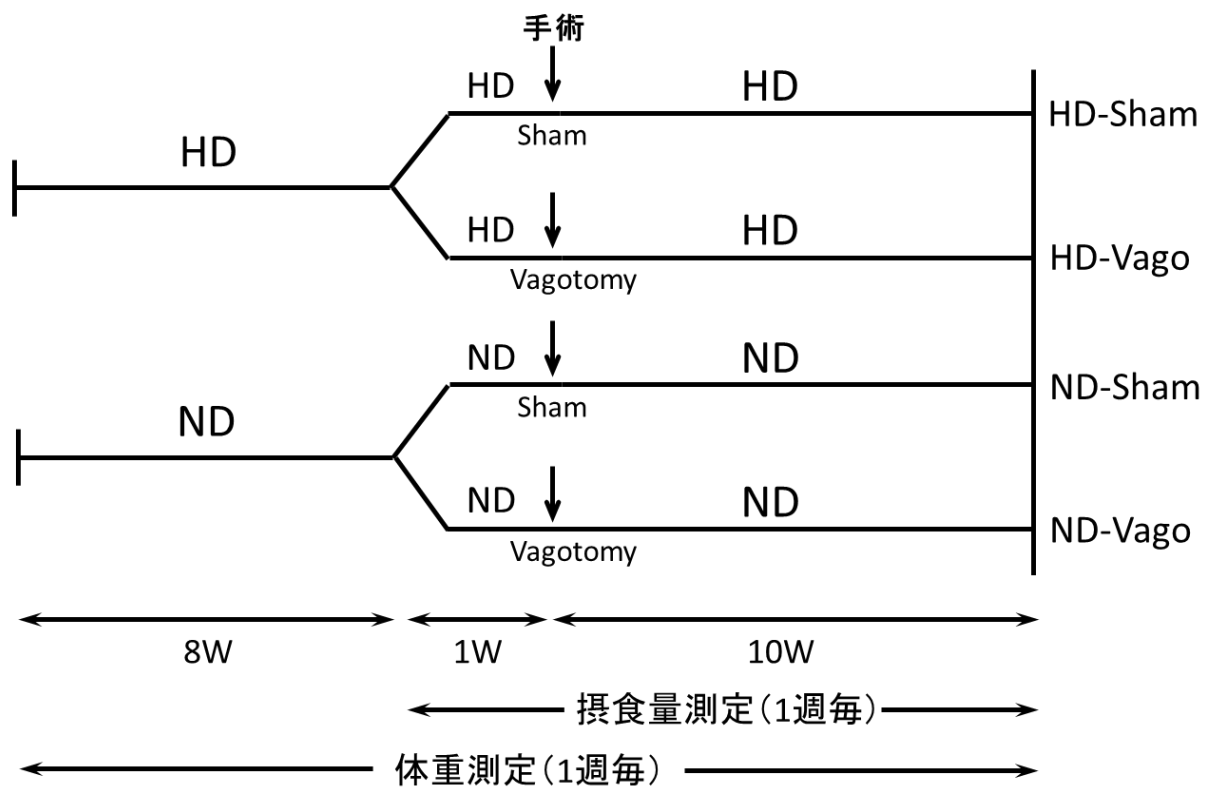


図 14 ; 実験 6 の概略

実験開始後 8 週間に渡り 2 種の食餌(高脂肪食 ; HD、通常食 ; ND)を給餌した。その後、HD 摂取マウスを HD-Sham と HD-Vago 群の 2 群、ND 摂取マウスを ND-Sham と ND-Vago 群の 2 群に分けた。さらに、1 週間同様の食餌を給餌した。術後も HD-Sham、HD-Vago 群には術前と同様の高脂肪食を、ND-Sham、ND-Vago 群には通常食を摂取させた。体重は各食餌開始後から 1 週毎、摂食量は食餌開始後 8 週以降より 1 週毎に測定した。

4-1-2 ; 結果

術前体重

通常食餌、高脂肪食餌のそれぞれのカロリー組成、1gあたりのカロリーを表3に示す。術前の体重推移は図15に示す通りで、高脂肪食摂取マウスは通常食摂取マウスと比べ、1週以降すべてのタイミングで有意に体重が高値であった。また、高脂肪食摂取マウスは手術直前には40g超となり、食餌起因性肥満マウスが作成されたと考えられた。

術後体重

次に、術後の体重推移を実体重(g)と手術時と比較した変化率(%)で示した(図16、17)。実体重(g)の推移は、高脂肪食摂取マウス、通常食摂取マウスのいずれにおいても、Sham群とVago群の2群間における有意な差は認められなかった。一方、体重変化率(%)は、高脂肪食摂取マウスでは術後1週から5週、通常食摂取マウスでは術後6週から8週において、Vago群がSham群に比べて有意に低値となった。

摂食量

術後0-1週における摂食量はすべての群において術前1週間に比べて低下したが、HD-ShamとHD-Vago群の2群間、ND-ShamとND-Vago群の2群間においてはいずれのタイミングにおいても明らかな差を認めなかった(図18)。

	炭水化物(%)	蛋白質(%)	脂質(%)	kcal/g
通常食(MF)	61.6	25.7	12.7	3.59
高脂肪食(HFD-60)	19.6	18.2	62.2	5.06

表 3 ; 各食餌のカロリー組成と単位重量あたりのカロリー
高脂肪食餌では脂質のカロリー比が高く、単重量あたりのエネルギーも通常食餌より大きい。

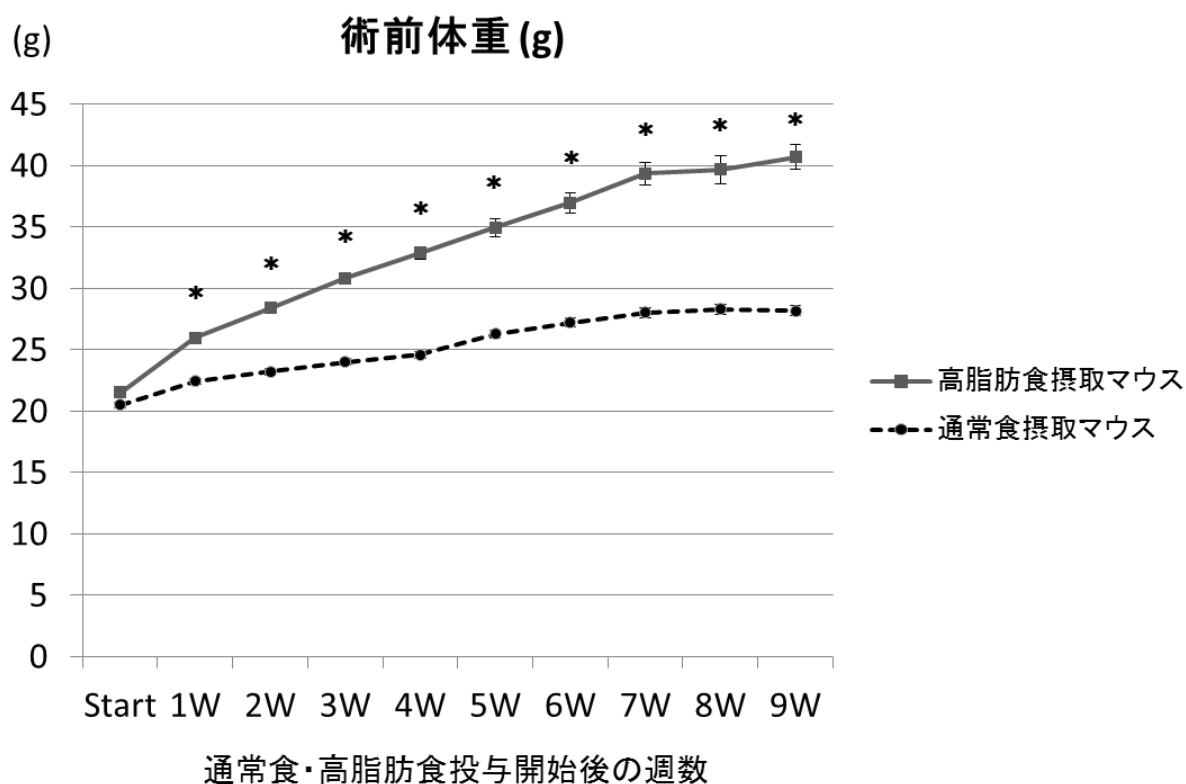


図 15 ; 術前の体重推移 (高脂肪食摂取マウス : n=19, 通常食摂取マウス : n=19)
*p<0.05 vs. 通常食摂取群
高脂肪食摂取マウスは実験開始 8 週後には 40g 超の肥満を呈した。

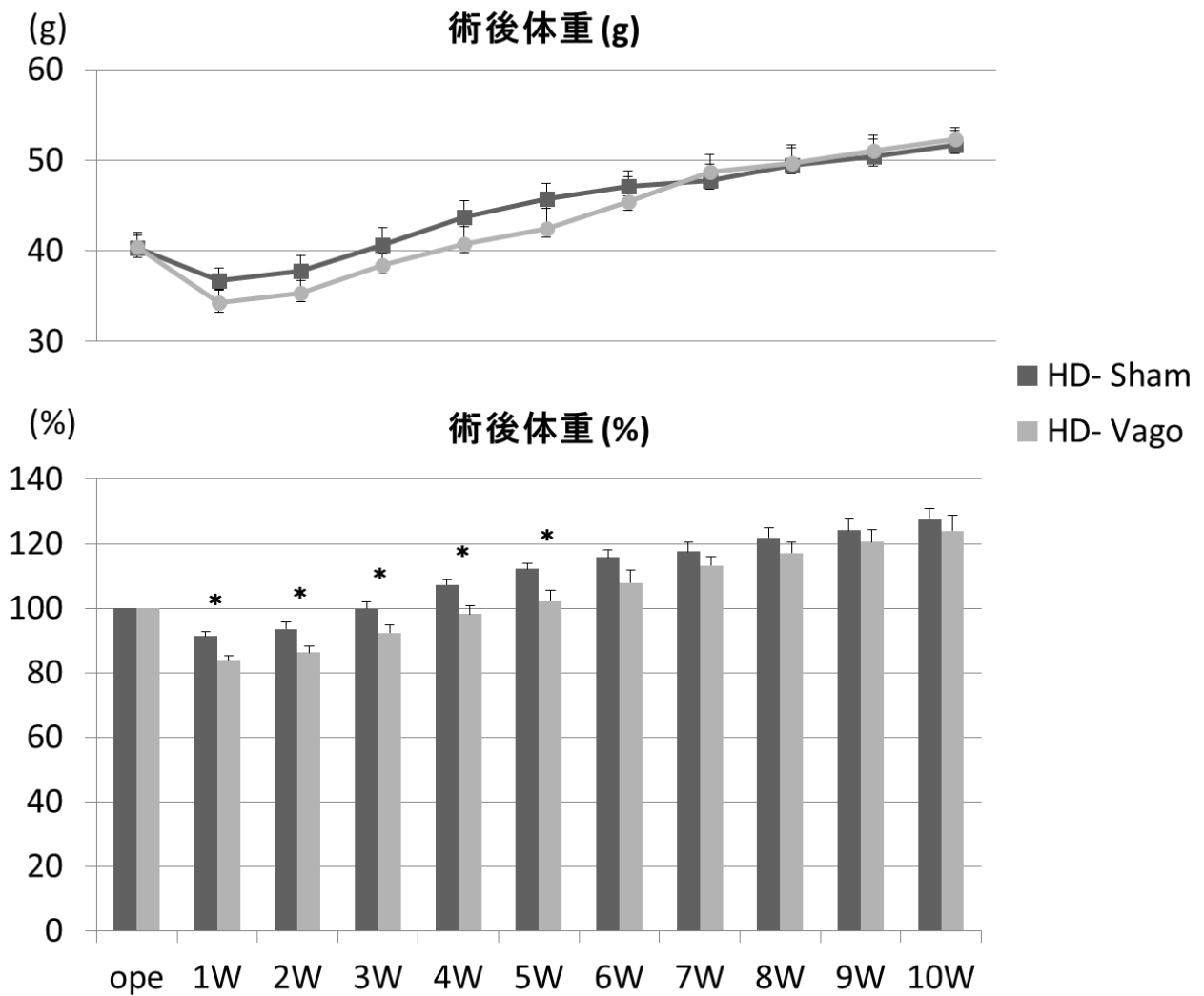


図 16 ; 高脂肪食摂取マウスの術後体重推移 (HD-Sham 群:n=10, HD-Vago 群:n=9)
 * $p < 0.05$ 、術後 1~5 週において HD-Vago 群の体重変化率(%)が有意に低値であった。

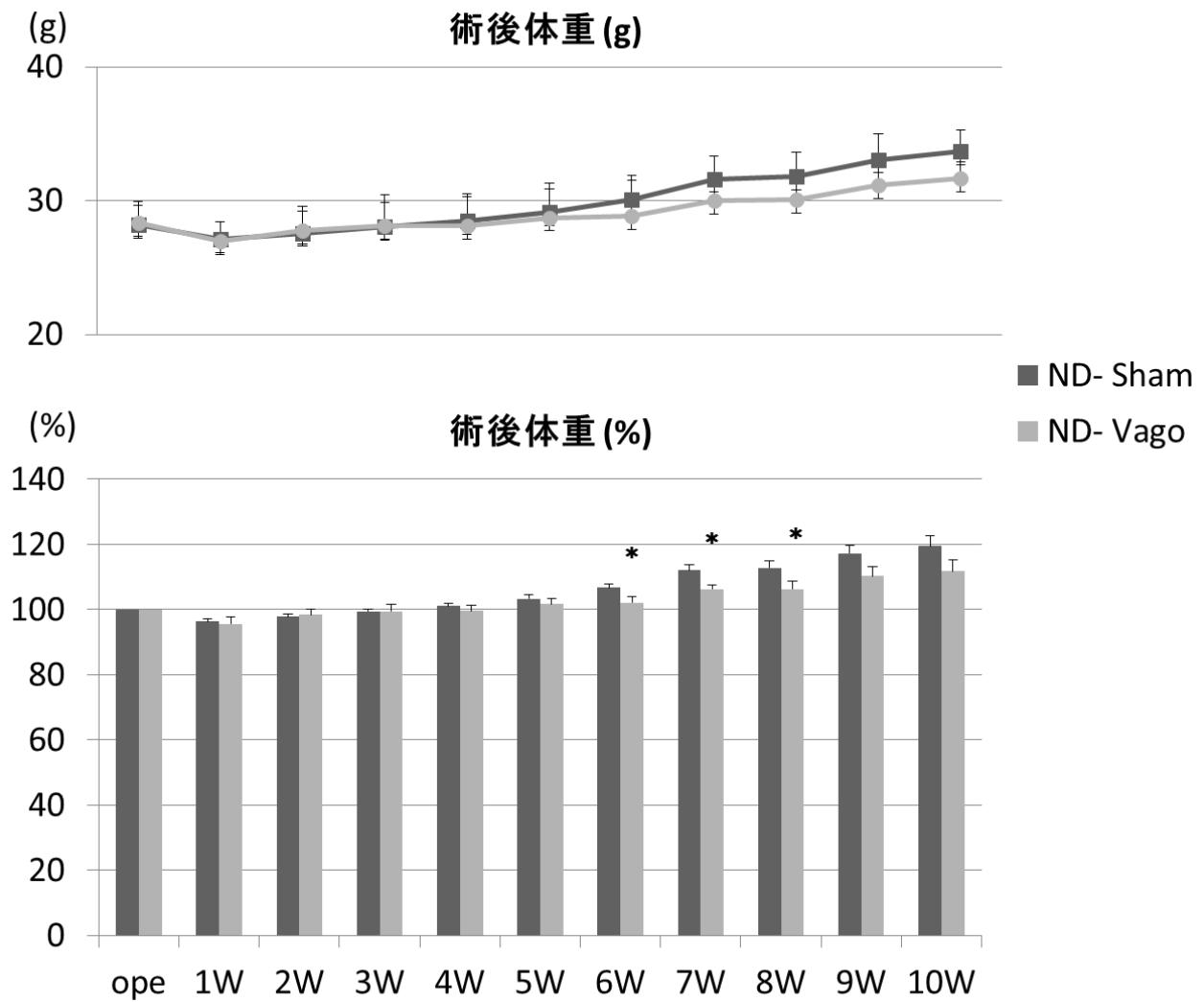


図 17 ; 通常食摂取マウスの術後体重推移 (ND-Sham 群:n=10, ND-Vago 群:n=9)
 * $p < 0.05$ 、術後 6~8 週において ND-Vago 群の体重変化率(%)が有意に低値であった。

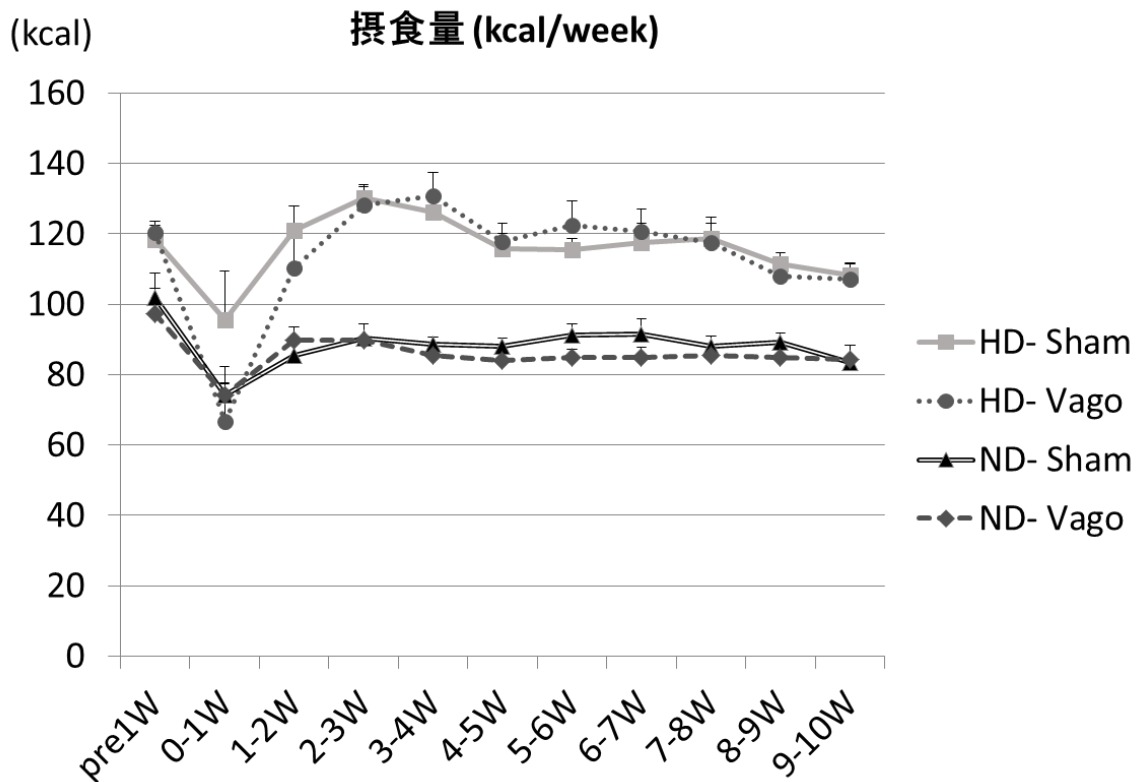


図 18 ; 周術期摂食量

(HD-Sham 群:n=10, HD-Vago 群:n=9, ND-Sham 群:n=10, ND-Vago 群:n=9)

術後 1 週間の摂食量はいずれの群においても減少した。

高脂肪食摂取マウス(HD-Sham、HD-Vago)は通常食摂取マウス(ND-Sham、ND-Vago)よりも摂取カロリーは高かったが、HD-Sham と HD-Vago 群の 2 群間、さらには ND-Sham と ND-Vago 群の 2 群間には有意差を認めなかった。

4-1-3 ; 考察および小括

迷走神経切離は、肥満マウスでは術後早期の、通常マウスでは術後中期の体重増加の抑制効果を示し、既報の迷走神経の電気刺激ブロックの効果が再現された。しかし、その効果は小さく一時的なものであった。したがって、迷走神経切離は肥満症に対する外科的治療として効果が乏しい可能性が推察される。

しかし、実臨床においては、肥満症治療は手術や薬物治療だけでなく、食事内容の改善も同時に行われる。次の実験では、高脂肪食給餌によって作成した肥満マウスに迷走神経切離を行い、術後に通常食を投与することで迷走神経切離の効果を再検討した。

4-2 ; 実験7. マウスモデルにおいて迷走神経切離が体重変化、 摂食量に及ぼす影響-切離前の高脂肪食摂取、切離後の通常食摂取マ ウスモデルを用いて-

本研究では、食餌起因性肥満マウスを用いて、迷走神経切離と術後の食餌内容の変更（高脂肪食→通常食）が体重変化・摂食量に及ぼす影響について術後10週まで観察を行った。

4-2-1 ; 方法

5週齢のC57BL/6Jマウス（雄性、n=26）を購入、搬入後1週間環境順応させた後に実験を開始した。マウスに高脂肪食餌（HFD-60、オリエンタル酵母工業）を8週間自由摂取させた後、High fat diet-Sham-Normal diet 群（HD-Sham-ND, n=13）、High fat diet-Vagotomy-Normal diet 群（HD-Vago-ND, n=13）の2群に分け、1週間同様の食餌を投与した。この1週間の食餌摂取量を測定した。体重は各食餌開始後から1週毎に測定した(図19)。その後、実験1と同様な皮下全身麻酔下に、実験2と同じくVago群は開腹下に迷走神経全幹切離、Sham群はsham手術を施行した。術後食餌を通常食に変更し、術後10週まで体重・摂食量の経過を観察した。

統計手法

本実験での値は全て means±SE で表し、統計ソフトは Windows 用の JMP Pro 9 (SAS Institute Japan Ltd, Japan)を使用した。P 値は 0.05 未満にて有意差があった。Vago 群と Sham 群の群間比較は Student's t test にて検定した。

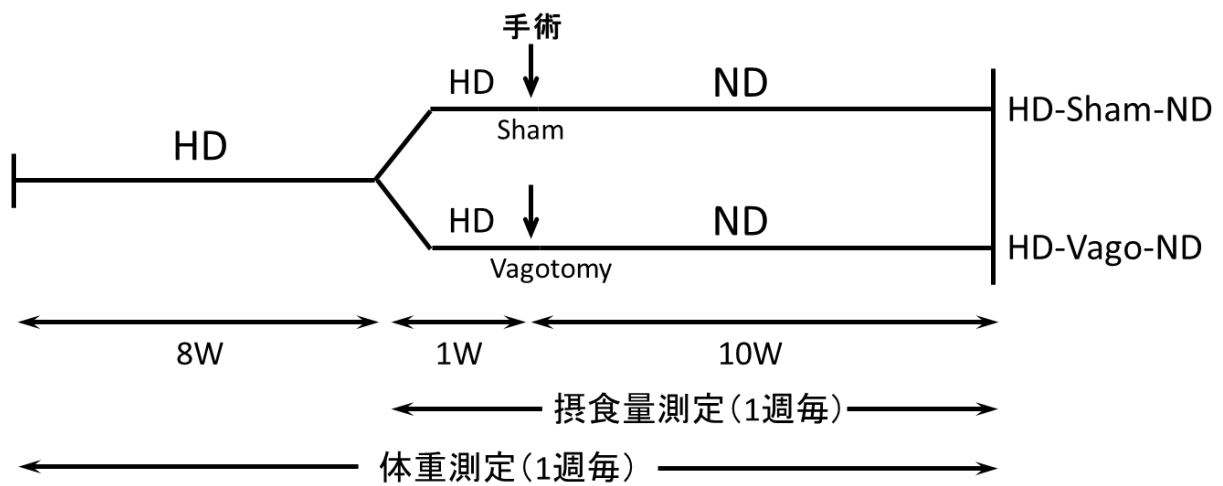


図 19 ; 実験 7 の概略

実験開始後 8 週間に渡り高脂肪食(HD)を給餌した。その後、HD-Sham-ND と HD-Vago-ND 群の 2 群に分け、さらに 1 週間同様の食餌を給餌した。術後はいずれの群においても、食餌を高脂肪食から通常食に変更した。体重は食餌開始後から 1 週毎、摂食量は食餌開始後 8 週以降より 1 週毎に測定した。

4-2-2 ; 結果

術後体重

術後の体重推移について、実験7と同様に実体重(g)は Sham 群と Vago 群に有意な差を認めなかった(図 20)。体重変化率(%)は術後1週で Vago 群が Sham 群に比べて有意に低値であったが、その後は2群間において明らかな差は認められなかった。

摂食量

2群間における摂食量の差は、いずれの測定のタイミングにおいても認められなかった(図 21)。特に、術後1週間では両群ともに摂食量はごく少量であった。

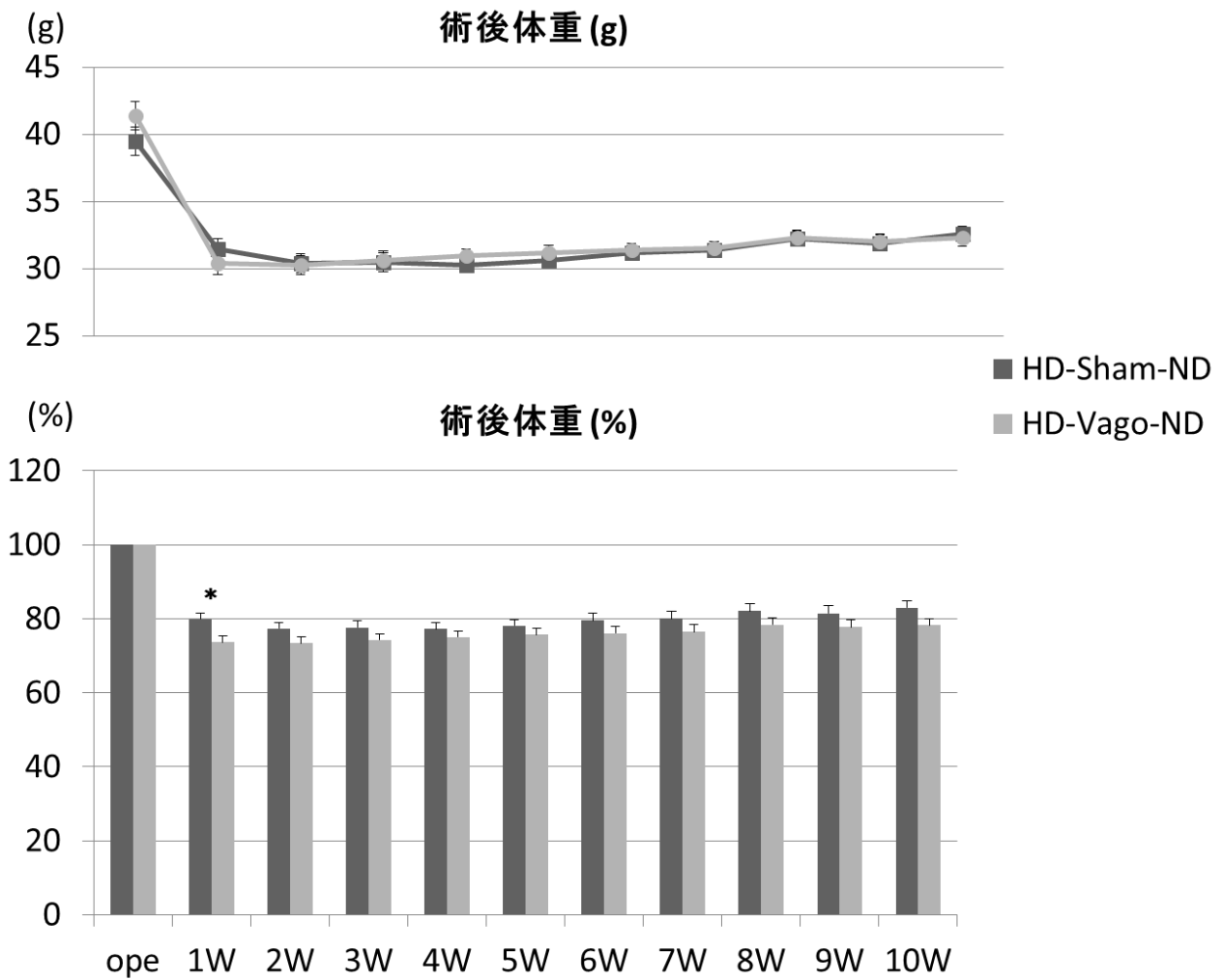


図 20 ; 術後体重推移 (HD-Sham-ND 群:n=13, HD-Vago-ND 群:n=13)、* $p<0.05$
 術後 1 週における体重は HD-Vago-ND で有意に低値であったが、その後は 2 群
 間における有意差を認めなかった。

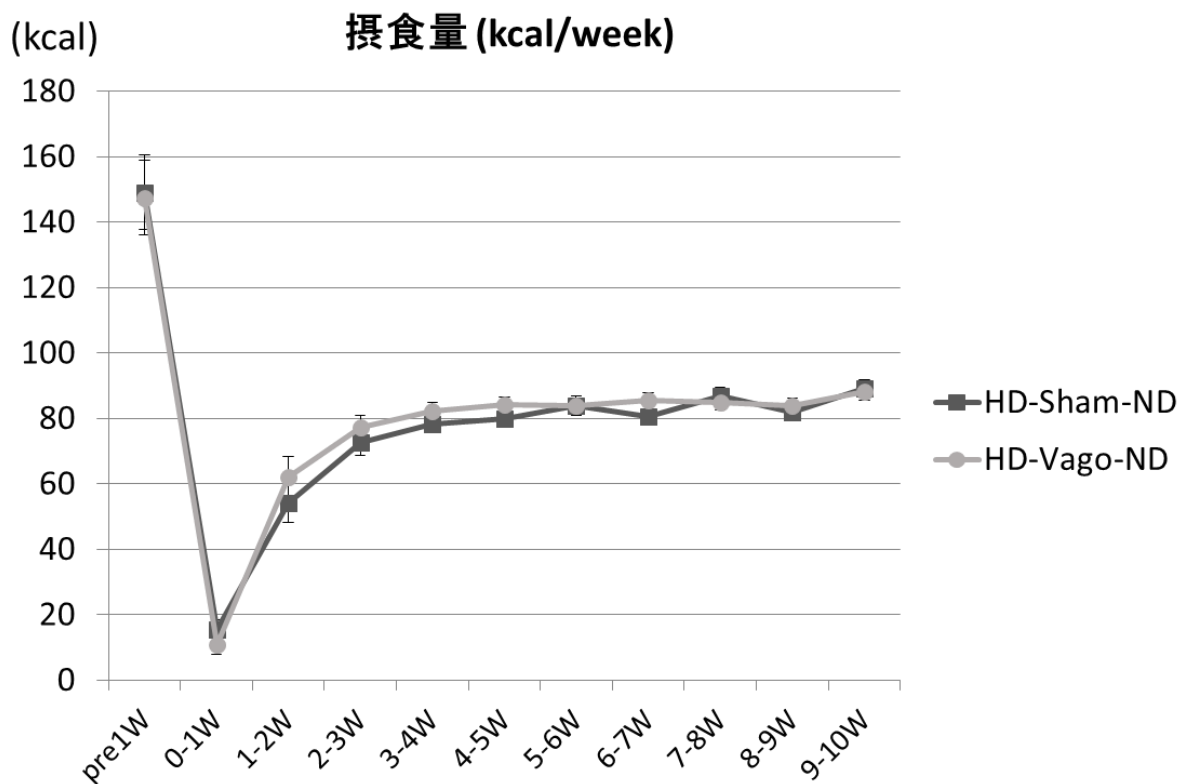


図 21 ; 周術期摂食量 (HD-Sham-ND 群:n=13, HD-Vago-ND 群:n=13)
 いずれの測定タイミングにおいても 2 群間の明らかな差は認められなかった。

4-2-3 ; 考察および小括

本実験では、食餌起因性肥満マウスに手術(Sham または Vagotomy)を施行し、術後食餌を通常食に変更した後に、体重・摂食量の経過を観察した。術後1週の Vago 群では Sham 群に比べ、有意に体重変化率(%)が低値となったが、その後は2群間の体重に有意差を認めなかった。摂食量に関しても2群間における明らかな差はなかった。術後の食事内容を改善しても、食餌起因性肥満マウスでは迷走神経切離による体重増加抑制効果が顕著になることはなかった。

5. 総括

検討1で得られた結果を表4にまとめた。既存の研究・検討では、様々な侵襲モデルにおける迷走神経の抗炎症性作用が報告されているが[4-9,31-34]、迷走神経切離が Gut I/R に及ぼす影響についての報告は数少ない[35-37]。さらに、そのいずれの報告においても血中のメディエーター評価に留まり、局所における小腸サイトカインプロファイルや小腸組織学的評価さらには、腸管起源のサイトカイン産生については検討されておらず、その点において本研究結果は初となるものである。

迷走神経切離による Gut I/R 後の血中炎症性サイトカインレベルの上昇は、これまでの報告と矛盾する結果ではない。小腸ホモジネート上清の炎症性サイトカインレベルの上昇によって、局所の炎症反応亢進も示された。また、血漿と小腸組織のサイトカインプロファイルからは局所と全身性の炎症反応は互いにリンクしているものと考えられた。さらに、腸管培養上清中のサイトカインレベルが迷走神経切離によって上昇した結果から、高サイトカイン血症のソースとしては小腸が重要であることが示唆された。迷走神経切離によって空腸粘膜傷害が顕著となったのもこれらの結果に呼応するものと考えられた。

これら一連のメカニズムを考察するに、迷走神経は直腸を除くすべての腸管に分布しコリン作動性のシグナルを介して局在する免疫細胞の働きを調節して

いることから[1,2]、迷走神経切離によって腸管局所の抗炎症機能が抑制され、それに続いて小腸粘膜傷害と腸管由来の炎症性サイトカイン産生が引き起こされ、高サイトカイン血症を生じたと考えられる。高サイトカイン血症は急性の循環不全、肺・肝・腎などの重要臓器障害をきたすことが知られている。今回、循環動態の評価、これら遠隔臓器の機能評価を行うに至らなかったが、直接的な死因としてはショックや多臓器不全が重要であったと推察される。

特に、MCP-1 レベルは、血漿、小腸ホモジネート上清、小腸組織培養上清のいずれにおいても迷走神経切離によって上昇した。さらに血漿と小腸組織サイトカインレベルが相関したことや、血漿・小腸組織・培養上清中のそれらの値が互いに近似していることから、MCP-1 は今回のモデルにおける炎症反応増悪・生存悪化の原因となる重要なメディエーターであると推察された。MCP-1 はマクロファージ等の単球細胞から分泌されるサイトカインであり[56]、迷走神経による抗炎症シグナルは、マクロファージ上の $\alpha 7nAChR$ を介して、その機能を調節すると報告されている。したがって、本検討で、血中や小腸組織中の MCP-1 が他の炎症性サイトカインに比べ、迷走神経切離により大きな影響を受けたことは、腸管に存在するマクロファージ活性化の修飾の点においてきわめて合理的であると考えられる。一方で、IL-6 の血漿・小腸組織サイトカインプロフィールは正の相関を認めたものの、血漿値の方がはるかに高値であった。

これは血漿中の IL-6 上昇が腸管由来だけでなく、他の臓器由来でもあったことを示唆している。

今後のさらなる検討事項としては、腸管マクロファージの機能、Gut I/R モデルにおいて重要な因子となる好中球の活性化や活性酸素産生などの評価が考えられる。本検討では小腸組織傷害度を絨毛の形態学的評価のみで行ったが、好中球の浸潤・活性化の評価をさらに加えることもその一助になるかもしれない。

一方、迷走神経切離が Gut I/R に及ぼす影響における脾臓の関与については、今回検討した脾臓組織サイトカインレベル、脾臓マクロファージ評価（細胞数・活性化）では明らかでなかった。この結果より、Gut I/R 時の生体反応修飾に迷走神経-脾臓の経路は大きな影響を及ぼしていないと考えられる。マウス腸閉塞モデルにおいても迷走神経切離が脾臓とは関係なく小腸粘膜の炎症性サイトカイン産生を亢進させるという報告もあり [57]、本研究と同様に迷走神経-脾臓の経路が必ずしも重要でないことを示している。

迷走神経切離が Gut I/R 後の局所・全身性の炎症反応を増悪するという今回の知見は、実臨床において、迷走神経切離を伴う上部消化管手術後に時に生じる合併症の機序解明の一助となるかもしれない。食道癌・胃癌手術の標準手技である迷走神経切離の是非については、従来、術後胆石症の発症や胃腸運動障害

の点から議論となってきた[58,59]。しかし、本検討によって術後早期の炎症反応や臓器障害の点からも迷走神経切離の意義を見直す必要があるかもしれない。

検討 2 では、迷走神経切離が体重コントロール・摂食量に及ぼす影響を検討したが、迷走神経切離による体重増加抑制効果は一時的なものであり、肥満症の治療として期待されるような恒常的な作用を有する可能性は少ないと考えられた。また、この一時的な体重増加抑制効果は、実臨床における肥満症の治療で実践される食事内容の改善を加えることでむしろ消失した。迷走神経の電気的ブロックは、間欠的な電気刺激を送り続けることで迷走神経を断続的にブロックする一方、迷走神経切離は迷走神経の経路を完全に遮断してしまうため、その機能を補うような代償性のメカニズムが働き、体重減少が一時的なものとなった可能性が考えられる。しかし、本検討はあくまでも迷走神経支配が必ずしもヒトと同一でないマウスを用いており、さらにヒトで有効性が明らかになっている迷走神経電気刺激の効果のマウスで確認していない。そのため、ヒト肥満症治療における迷走神経切離の是非についてはさらなる検討が必要であると考えられる。

今回、検討 1、検討 2 において迷走神経切離群、非迷走神経切離群の比較で、有意差は得られなかったがその傾向はみられた測定項目がいくつかあった。実験後の評価となるが、2 群間に大きな差(効果量 : $d=0.8$)があると仮定し、検出力

0.8、有意水準 5%のもとサンプルサイズを算出すると $n=26$ であった。よって本検討では、サンプル数がやや不足していたために本来の有意差を得るに至らなかった可能性が考えられる。

生存		I/R群	>	Vago-I/R群
血漿サイトカイン	IL-6	I/R群	<	Vago-I/R群
	MCP-1	I/R群	<	Vago-I/R群
	TNF- α	I/R群	=	Vago-I/R群
	IFN- γ	I/R群	=	Vago-I/R群
	IL-10	I/R群	=	Vago-I/R群
小腸組織サイトカイン	IL-6	I/R群	=	Vago-I/R群
	MCP-1	I/R群	<	Vago-I/R群
	TNF- α	I/R群	=	Vago-I/R群
	IFN- γ	I/R群	<	Vago-I/R群
	IL-10	I/R群	=	Vago-I/R群
小腸組織培養上清サイトカイン	IL-6	I/R群	=	Vago-I/R群
	MCP-1	I/R群	<	Vago-I/R群
	TNF- α	I/R群	=	Vago-I/R群
	IFN- γ	I/R群	=	Vago-I/R群
	IL-10	I/R群	=	Vago-I/R群
小腸組織傷害度		I/R群	<	Vago-I/R群
脾臓組織サイトカイン	IL-6	I/R群	=	Vago-I/R群
	MCP-1	I/R群	=	Vago-I/R群
	TNF- α	I/R群	=	Vago-I/R群
	IFN- γ	I/R群	=	Vago-I/R群
	IL-10	I/R群	=	Vago-I/R群
脾臓マクロファージ細胞数		I/R群	=	Vago-I/R群
脾臓マクロファージ活性化		I/R群	=	Vago-I/R群

表 4 ; 検討 1 のまとめ

ただし、血漿 IL-10 レベルは、術後 3 時間値において Vago-I/R 群が I/R 群に比べて低い傾向であった(p=0.07)。

また、小腸組織 IL-6 レベルは、術後 6 時間の回腸 IL-6 値において Vago-I/R 群が I/R 群に比べて高い傾向であった(p=0.055)。

6. 謝辞

本研究を統括し、本研究の遂行および論文執筆にあたりご指導頂きました瀬戸泰之教授に謹んで御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、貴重な研究の場を与えて頂きました手術部 安原洋教授に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究の遂行にあたり、ご指導・ご協力頂きました日本大学医学部 消化器外科 宮国泰己先生、手術部・材料管理部の関係各位の皆様に御礼申し上げます。

最後に、研究の遂行、論文執筆などの本研究のすべてにおいて多大なるご指導・ご支援頂きました手術部 深柄和彦准教授に心より感謝申し上げます。

7. 引用文献

1. Berthoud HR, Carlson NR, Powley TL.: Topography of efferent vagal innervation of the rat gastrointestinal tract. *Am J Physiol.* 260(1 Pt 2):R200-207,1991.
2. Altschuler SM, Escardo J, Lynn RB, Miselis RR.: The central organization of the vagus nerve innervating the colon of the rat. *Gastroenterology.* 104(2):502-509,1993.
3. Wang DW, Yin YM, Yao YM.: Vagal Modulation of the Inflammatory Response in Sepsis. *Int Rev Immunol.* 29:0,2016. [online published]
4. Jeremias IC, Victorino VJ, Barbeiro HV, Kubo SA, Prado CM, Lima TM, Soriano FG.: The Role of Acetylcholine in the Inflammatory Response in Animals Surviving Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture. *Mol Neurobiol.* 53(10):6635-6643,2016.
5. Zhao M, He X, Bi XY, Yu XJ, Gil Wier W, Zang WJ: Vagal stimulation triggers peripheral vascular protection through the cholinergic anti-inflammatory pathway in a rat model of myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 108(3):345,2013.
6. Tarras SL, Diebel LN, Liberati DM, Ginnebaugh K: Pharmacologic stimulation of the nicotinic anti-inflammatory pathway modulates gut and lung injury after hypoxia-reoxygenation injury. *Surgery.* 154(4):841-848,2013.
7. Yamakawa K, Matsumoto N, Imamura Y, Muroya T, Yamada T, Nakagawa

J, Shimazaki J, Ogura H, Kuwagata Y, Shimazu T: Electrical vagus nerve stimulation attenuates systemic inflammation and improves survival in a rat heatstroke model. *PLoS One*. 8(2):e56728,2013.

8. The F, Cailotto C, van der Vliet J, de Jonge WJ, Bennink RJ, Buijs RM, Boeckxstaens GE: Central activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway reduces surgical inflammation in experimental post-operative ileus. *Br J Pharmacol*. 163(5):1007-1016,2011.

9. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ.: Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 405(6785):458-462,2000.

10. Pavlov VA, Tracey KJ.: The vagus nerve and the inflammatory reflex--linking immunity and metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 8(12):743-754,2012.

11. Johnston GR, Webster NR: Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus nerve. *Br J Anaesth*. 102(4):453-462,2009.

12. Govere G, Stakenborg M, Matteoli G: The intestinal cholinergic anti-inflammatory pathway. *J Physiol*. 594(20):5771-5780,2016.

13. Costes LM, Boeckxstaens GE, de Jonge WJ, Cailotto C. Neural networks in intestinal immunoregulation. *Organogenesis*. 9(3):216-23,2013.

14. Martelli D, McKinley MJ, McAllen RM.: The cholinergic anti-inflammatory pathway: a critical review. *Auton Neurosci.* 182:65-69,2014.
15. Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR, Ochani K, Harris YT, Huston JM, Chavan S, Tracey KJ.: Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(31):11008-11013,2008.
16. Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, Liao H, Ochani K, Pavlov VA, Gallowitsch-Puerta M, Ashok M, Czura CJ, Foxwell B, Tracey KJ, Ulloa L: Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J Exp Med.* 203(7):1623-1628, 2006.
17. Inoue T, Abe C, Sung SS, Moscalu S, Jankowski J, Huang L, Ye H, Rosin DL, Guyenet PG, Okusa MD.: Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through $\alpha 7$ nAChR+ splenocytes. *J Clin Invest.* 126(5):1939-1952,2016.
18. Vida G, Peña G, Deitch EA, Ulloa L.: $\alpha 7$ -cholinergic receptor mediates vagal induction of splenic norepinephrine. *J Immunol.* 186(7):4340-4346,2011.
19. Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdés-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, Tusche MW, Pavlov VA, Andersson U, Chavan S, Mak TW, Tracey KJ.:

Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit.

Science. 334(6052):98-101,2011.

20. Fukatsu K, Sakamoto S, Hara E, Ueno C, Maeshima Y, Matsumoto I, Mochizuki

H, Hiraide H.: Gut ischemia-reperfusion affects gut mucosal immunity: a possible

mechanism for infectious complications after severe surgical insults. *Crit Care Med*.

34(1):182-7,2006.

21. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM.: Ischemia-reperfusion injury of the

intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci*. 49(9):1359-77,2004.

22. Moore FA: The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure.

Am J Surg. 178(6):449-453,1999.

23. Simpson R, Alon R, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB: Neutrophil and

nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg*.

218(4):444-54,1993.

24. Luo CC, Shih HH, Chiu CH, Lin JN.: Translocation of coagulase-negative bacterial

staphylococci in rats following intestinal ischemia-reperfusion injury. *Biol*

Neonate. 85(3):151-154,2004.

25. Idrovo JP, Yang WL, Jacob A, Aziz M, Nicastro J, Coppa GF, Wang P.: AICAR

attenuates organ injury and inflammatory response after intestinal ischemia and

reperfusion. *Mol Med.* 20:676-683,2015.

26. Ikezawa F, Fukatsu K, Moriya T, Maeshima Y, Okamoto K, Hara E, Hiraide H, Compher CW.: Albumin infusion after reperfusion prevents gut ischemia-reperfusion-induced gut-associated lymphoid tissue atrophy. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 30(5):380-387,2006.

27. Collange O, Charles AL, Lavaux T, Noll E, Bouitbir J, Zoll J, Chakfé N, Mertes M, Geny B: Compartmentalization of Inflammatory Response Following Gut Ischemia Reperfusion. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 49(1):60-65,2015.

28. Kostopanagiotou G, Avgerinos E, Costopanagiotou C, Arkadopoulos N, Andreadou I, Diamantopoulou K, Lekka M, Smyrniotis V, Nakos G: Acute lung injury in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion: the potential time depended role of phospholipases A(2). *J Surg Res.* 147(1):108-116,2008.

29. Moore EE, Moore FA, Franciose RJ, Kim FJ, Biffl WL, Banerjee A: The postischemic gut serves as a priming bed for circulating neutrophils that provoke multiple organ failure. *J Trauma.* 37(6):881-887,1994.

30. Braga M, Gianotti L, Vignali A, Carlo VD: Preoperative oral arginine and n-3 fatty acid supplementation improves the immunometabolic host response and outcome after colorectal resection for cancer. *Surgery.* 132(5):805-814,2002.

31. Sánchez-Alemán E, Quintanar-Stephano A, Escobedo G, Campos-Esparza Mdel R, Campos-Rodríguez R, Ventura-Juárez J.: Vagotomy induces deregulation of the inflammatory response during the development of amoebic liver abscess in hamsters. *Neuroimmunomodulation*. 22(3):166-180,2015.
32. Schulte A, Lichtenstern C, Henrich M, Weigand MA, Uhle F.: Loss of vagal tone aggravates systemic inflammation and cardiac impairment in endotoxemic rats. *J Surg Res*. 188(2):480-488,2014.
33. Kessler W, Traeger T, Westerholt A, Neher F, Mikulcak M, Müller A, Maier S, Heidecke CD.: The vagal nerve as a link between the nervous and immune system in the instance of polymicrobial sepsis. *Langenbecks Arch Surg*. 391(2):83-87,2006.
34. van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Daalhuisen J, Bruno MJ, de Vos AF, Tracey KJ, van der Poll T.: The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. *J Infect Dis*. 191(12):2138-2148,2005.
35. Langness S, Coimbra R, Eliceiri BP, Costantini TW: Vagus Nerve Mediates the Neural Stem Cell Response to Intestinal Injury. *J Am Coll Surg*. 221(4):871-879,2015.
36. Wu R, Dong W, Ji Y, Zhou M, Marini CP, Ravikumar TS, Wang P: Orexigenic hormone ghrelin attenuates local and remote organ injury after intestinal ischemia-reperfusion. *PLoS One*. 3(4):e2026,2008.

37. Pawlik MW, Obuchowicz R, Biernat J, Szczepanski W, Pajdo R, Kwiecień S, Brzozowski T, Konturek SJ, Pawlik WW: Effects of peripherally and centrally applied ghrelin in the pathogenesis of ischemia-reperfusion induced injury of the small intestine. *J Physiol Pharmacol.* 62(4):429-439,2011.
38. de Lartigue G: Role of the vagus nerve in the development and treatment of diet-induced obesity. *J Physiol.* 594(20):5791-5815,2016.
39. Pavlov VA, Tracey KJ.: The vagus nerve and the inflammatory reflex--linking immunity and metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 8(12):743-754,2012.
40. Cummings DE, Overduin J.: Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest.* 117(1):13-23,2007.
41. Schwartz GJ.: The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition.* 16(10):866-873,2000.
42. Bansal V, Ryu SY, Lopez N, Allexan S, Krzyzaniak M, Eliceiri B, Baird A, Coimbra R.: Vagal stimulation modulates inflammation through a ghrelin mediated mechanism in traumatic brain injury. *Inflammation.* 35(1):214-220,2012.
43. Smith RG, Cheng K, Schoen WR, Pong SS, Hickey G, Jacks T, Butler B, Chan WW, Chung LY, Judith F, et al.: A nonpeptidyl growth hormone secretagogue. *Science.* 260(5114):1640-1643,1993.

44. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Niijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M.: The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*. 123(4):1120-1128,2002.
45. Katsurada K, Maejima Y, Nakata M, Kodaira M, Suyama S, Iwasaki Y, Kario K, Yada T.: Endogenous GLP-1 acts on paraventricular nucleus to suppress feeding: projection from nucleustractus solitarius and activation of corticotropin-releasing hormone, nesfatin-1 and oxytocin neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 451(2):276-281,2014.
46. Candeias EM, Sebastião IC, Cardoso SM, Correia SC, Carvalho CI, Plácido AI, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI, Duarte AI. Gut-brain connection: The neuroprotective effects of the anti-diabetic drug liraglutide. *World J Diabetes*. 6(6):807-827,2015.
47. Roura E, Koopmans SJ, Lallès JP, Le Huerou-Luron I, de Jager N, Schuurman T, Val-Laillet D.: Critical review evaluating the pig as a model for human nutritional physiology. *Nutr Res Rev*. 29(1):60-90,2016.
48. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW.: Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 443(7109):289-295,2006.

49. Sarr MG, Billington CJ, Brancatisano R, Brancatisano A, Toouli J, Kow L, Nguyen NT, Blackstone R, Maher JW, Shikora S, Reeds DN, Eagon JC, Wolfe BM, O'Rourke RW, Fujioka K, Takata M, Swain JM, Morton JM, Ikramuddin S, Schweitzer M, Chand B, Rosenthal R; EMPOWER Study Group. The EMPOWER study: randomized, prospective, double-blind, multicenter trial of vagal blockade to induce weight loss in morbid obesity. *Obes Surg.* 22(11):1771-1782,2012.
50. Ikramuddin S, Blackstone RP, Brancatisano A, Toouli J, Shah SN, Wolfe BM, Fujioka K, Maher JW, Swain J, Que FG, Morton JM, Leslie DB, Brancatisano R, Kow L, O'Rourke RW, Deveney C, Takata M, Miller CJ, Knudson MB, Tweden KS, Shikora SA, Sarr MG, Billington CJ.: Effect of reversible intermittent intra-abdominal vagal nerve blockade on morbid obesity: the ReCharge randomized clinical trial. *JAMA.* 312(9):915-922,2014.
51. Barella LF, Miranda RA, Franco CC, Alves VS, Malta A, Ribeiro TA, Gravena C, Mathias PC, de Oliveira JC.: Vagus nerve contributes to metabolic syndrome in high-fat diet-fed young and adult rats. *Exp Physiol.* 100(1):57-68,2015.
52. Mravec B, Ondicova K, Tillinger A, Pecenak J.: Subdiaphragmatic vagotomy enhances stress-induced epinephrine release in rats. *Auton Neurosci.* 190:20-25,2015.
53. Lubaczeuski C, Balbo SL, Ribeiro RA, Vettorazzi JF, Santos-Silva JC, Carneiro

EM, Bonfleur ML. Vagotomy ameliorates islet morphofunction and body metabolic homeostasis in MSG-obese rats. *Braz J Med Biol Res.* 48(5):447-457,2015.

54. Stearns AT, Balakrishnan A, Radmanesh A, Ashley SW, Rhoads DB, Tavakkolizadeh A.: Relative contributions of afferent vagal fibers to resistance to diet-induced obesity. *Dig Dis Sci.* 57(5):1281-1290,2012.

55. Omata J, Pierre JF, Heneghan AF, Tsao FH, Sano Y, Jonker MA, Kudsk KA.: Parenteral nutrition suppresses the bactericidal response of the small intestine. *Surgery.* 153(1):17-24,2013.

56. Yadav A, Saini V, Arora S.: MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta.* 411(21-22):1570-1579,2010.

57. Costes LM, van der Vliet J, van Bree SH, Boeckxstaens GE, Cailotto C.: Endogenous vagal activation dampens intestinal inflammation independently of splenic innervation in postoperative ileus. *Auton Neurosci.* 185:76-82,2014.

58. Chen XJ, Li N, Huang YD, Ren S, Liu F, Chen L, Wang Y, Chen M.: Factors for postoperative gallstone occurrence in patients with gastric cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 15(2):877-881,2014.

59. Yamada H, Kojima K, Inokuchi M, Kawano T, Sugihara K.: Efficacy of celiac branch preservation in Roux-en-y reconstruction after laparoscopy-assisted distal

gastrectomy. *Surgery*. 149(1):22-28,2011.