

論文の内容の要旨

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-

氏名 李 基成

【背景】

迷走神経は胸腹部諸臓器に広く分布する第X脳神経である。近年、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動物侵襲モデルで示されている。そのメカニズムとして、各臓器に分布する迷走神経の終末で放出されるアセチルコリン(Ach)が、マクロファージなどの免疫細胞上の α -7ニコチンアセチルコリン受容体(alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor ; α 7nAChR)に作用し、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を調節すると報告されている。さらに最近では、迷走神経の抗炎症作用を調節する上で、脾臓も重要であると示唆されている。脾臓への迷走神経の分布はいまだ不明な点が多いが、交感神経を介してAchを産生するT細胞が活性化され、分泌されたAchが脾臓マクロファージ上の α 7nAChRに作用することで全身の抗炎症作用を及ぼすと考えられている。

一方、高度外科侵襲後に生じる炎症反応や臓器障害の機序の一つとして、腸管虚血再灌流(Gut ischemia-reperfusion ; Gut I/R)が注目されている。再灌流後の腸管では様々な炎症性メディエーターが惹起され、全身の高サイトカイン血症や多形核好中球の活性化が生じ、腸管自体の傷害と同時に肺や肝臓などの遠隔臓器障害が引き起こされる。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、その後改善する際にGut I/Rが生じる。

迷走神経切離(迷切)によって生体内の炎症性サイトカインの産生が亢進することが他の侵襲モデルにおいて示されているが、迷切がGut I/Rに及ぼす影響について既存の報告は少なく、腸管サイトカイン動態や小腸粘膜組織像への影響を検討したものはない。本研究では、まず迷切がGut I/R後の生体反応に及ぼす影響を調べた(検討1)。

一方、迷走神経は、抗炎症作用を及ぼす以外に、求心性経路として体重・摂食調節に関与していると言われている。複数の消化管ホルモンによって、迷走神経-大脳視床下部への神経伝達が調節されると示唆されているが、その全貌は明らかでない。迷走神経を電氣的にブロックすることで体重が減少することが知られており、米国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認可されている。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、体重減少効果をもたらされるのであれば、迷切という

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、迷切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。しかし、迷切が体重コントロールや摂食量に及ぼす影響について定まった見解は得られていない。そこで、迷切が体重および摂食量に及ぼす影響について動物実験を行った（検討2）。

【方法】

検討1では、迷切が Gut I/R 時の生体反応に及ぼす影響について実験1~5を行った。供試動物は6週齢の雄性 Institute of Cancer Research (ICR) マウスを用いた。

実験1. マウス(n=22)を、Sham手術に加え Gut I/Rを行う I/R群(n=11)と、迷切(Vagotomy)および Gut I/Rを行う Vago-I/R群(n=11)に無作為に分けた。迷切は開腹下に腹部食道レベルでの全幹切除、Gut I/Rは上腸間膜動脈を45分間遮断、その後解放した。術後48時間の生存を観察した。

実験2. マウス(n=55)を 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。Sham群はSham手術、Vago群は迷切のみを行い、I/R群、Vago-I/R群は実験1と同様の手技を施行した。虚血解除後、3時間(n=3/4/10/10)、6時間後(n=4/4/10/10)で犠死せしめ、血液、小腸を回収し、血漿および小腸（空腸および回腸）組織ホモジネート上清中のサイトカイン値(IL-6, MCP-1, TNF- α , IFN- γ , IL-10)を Cytometric Bead Array システムで測定した。また、小腸組織傷害の程度について評価した。

実験3. マウス(n=24)を Sham群(n=3)、Vago群(n=3)、I/R群(n=9)、Vago-I/R群(n=9)の4群に無作為に分けた。実験2と同様の手術を施行し、術後3時間で犠死せしめ、小腸を回収し、空腸・回腸切片を3時間培養した後に培養上清中のサイトカイン値を実験2と同様に測定した。

実験4. マウス(n=63)を Sham群(n=10)、Vago群(n=10)、I/R群(n=22)、Vago-I/R群(n=21)の4群に無作為に分けた。実験2と同様の手術を施行し、術後3時間(n=5/5/11/10)、6時間後(n=5/5/11/11)で犠死せしめ、脾臓を摘出。脾臓組織ホモジネート上清中のサイトカイン値を実験2と同様に測定した。

実験5. マウス(n=80)を Sham群(n=13)、Vago群(n=13)、I/R群(n=27)、Vago-I/R群(n=27)の4群に無作為に分けた。実験2と同様の手術を施行し、術後3時間(n=7/7/15/15)、6時間後(n=6/6/12/12)で犠死せしめ、脾臓を摘出。脾臓細胞を分離した後にフローサイトメトリーを用いて脾臓マクロファージの評価を行った。抗体は抗 F4/80 抗体（マクロファージ特有の表面マーカー）、抗 CD11b 抗体（活性化指標）を用いた。

検討2では、肥満症治療としての迷切の効果について実験6、7を行った。供試動物は6週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用いた。

実験6. マウス(n=38)を半数ずつに分け、それぞれ高脂肪食(HD)、通常食(ND)を8週間自由摂取させた。その後、高脂肪食摂取マウスを HD-Sham群 (n=10)、HD-Vago群 (n=9) の2群に、通常食摂取マウスを ND-Sham群 (n=10)、ND-Vago群 (n=9) の2群に分け、さらに1週間同様の食餌を投与した。その後、実験2と同じく Sham群は sham手術、Vago群は迷

切を施行し、術後 10 週まで体重・摂食量の推移を観察した。体重は各食餌開始後から、摂食量は食餌開始後 8 週以降より測定を開始し、いずれも 1 週毎に測定した。

実験 7. マウス(n=26)に HD を 8 週間自由摂取させ後、HD-Sham-ND 群 (n=13)、HD-Vago-ND 群 (n=13) の 2 群に分け、1 週間同様の食餌を投与した。その後、実験 7 と同様の手術を施行し、術後食餌を通常食に変更し、術後 10 週まで体重・摂食量の推移を観察した。体重・摂食量の測定方法も実験 7 と同様に行った。

【結果】

検討 1 :

実験 1. Gut I/R 後の生存は Vago-I/R 群が I/R 群に比べて有意に増悪した。

実験 2. Gut I/R 後 6 時間の血漿 IL-6、MCP-1 レベルは、Vago-I/R 群が I/R 群に比べて有意に高値であった。Gut I/R 後 6 時間の空腸 IFN- γ レベル、回腸 MCP-1 レベルは、Vago-I/R 群が I/R 群に比べて有意に高かった。術後 3 時間の血漿・小腸組織ホモジネート上清中のサイトカインレベルは、IL-6、MCP-1、TNF- α において正の相関関係を認めた。また、Gut I/R 後 6 時間の空腸粘膜傷害については、Vago-I/R 群が I/R 群に比べて有意に高度であった。

実験 3. Gut I/R 後 3 時間で摘出した空腸を *ex vivo* で 3 時間培養した上清中の MCP-1 レベルは、Vago-I/R 群が I/R 群に比べて有意に高値であった。

実験 4. Gut I/R 後の脾臓組織サイトカインレベルは、Vago-I/R 群と I/R 群の 2 群間に明らかな差を認めなかった。

実験 5. Gut I/R 後の脾臓マクロファージ細胞数、活性化は、Vago-I/R 群と I/R 群の 2 群間で明らかな差を認めなかった。

検討 2 :

実験 6. 体重変化率は、HD-Sham 群と HD-Vago 群の間で術後 1~5 週に、ND-Sham 群と ND-Vago 群間で術後 6~8 週において、Vago 群が Sham 群に比べて有意に低値であった。摂食量は、HD-Sham と HD-Vago 群の 2 群間、ND-Sham と ND-Vago 群の 2 群間において、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。

実験 7. HD-Sham-ND 群、HD-Vago-ND 群の 2 群間で、体重、摂食量はいずれも明らかな差を認めなかった。

【考察】

検討 1 では迷切が Gut I/R 後の生体反応に及ぼす影響を検討した。迷切は Gut I/R 後の血中および小腸ホモジネート上清中の炎症性サイトカインレベルを上昇させ、全身と局所の炎症反応の亢進が示された。また、炎症性サイトカインの血漿値、小腸組織ホモジネート上清値は正の相関を認め、局所と全身性の炎症反応は互いに関連していると考えられた。さらに、小腸組織培養上清の炎症性サイトカインレベルが迷切によって上昇した結果から、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。また、迷切による高度の小腸組織傷害は、こうした炎症性サイトカインプロファイルと呼応するものであった。迷切による小腸サイトカインプロファイル、小腸病理組織像、さらに

は、腸管起源のサイトカイン産生への影響についての検討はこれまでになく、本研究において初の報告となった。迷走神経は直腸を除くすべての腸管に分布し局在する免疫細胞の働きを調節していることから、迷切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、その結果として高サイトカイン血症を生じ、Gut I/R 後の生存が増悪したと考察された。特に MCP-1 は血漿、小腸ホモジネート上清、腸管培養上清のいずれにおいても迷切によって上昇しており、重要なメディエーターであった。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、マクロファージは迷走神経末端から放出される Ach の受容体($\alpha 7nAChR$)を有することから、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、この結果はきわめて合理的であると考えられる。一方、迷切が Gut I/R に及ぼす影響における脾臓の関与は、脾臓組織サイトカインレベル、脾臓マクロファージ細胞数・活性化という点では明らかでなかった。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た。

検討 2 では、迷切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、食事内容の改善を加えることでむしろ消失した。迷走神経の電氣的ブロックは、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で、迷切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示唆された。

【結語】

迷走神経は Gut I/R 時の炎症反応制御に重要であり、外科手術時の迷切の適否について一考が必要であろう。また、肥満症治療の一術式として迷切の効果は一時的である可能性が示された。