

氏名	熊谷 奈々
学位の種類	博士 (栄養科学)
学位記番号	博栄甲第 0010 号
学位授与の日付	平成 22 年 12 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 (課程博士)
研究科専攻	栄養科学研究科 栄養科学専攻
学位論文題目	Origin of the apical transcytic membrane system in jejunal absorptive cells of neonates (新生児空腸吸収上皮細胞における頂部トランスサイトosisに 関与する膜系の起源)
主論文公表雑誌	Medical Molecular Morphology
論文審査委員	(主査) 藤本 淳 (副査) 藤田 守 (副査) 森山 耕成 (副査) 向坂 彰太郎 (福岡大学) (副査) 沢 禎彦 (福岡歯科大学)

### 論文内容の要旨

ヒトをはじめ、哺乳動物の栄養形態は出生を境に胎盤栄養から母乳栄養へと移行し、これに伴って消化吸收機構も変化する。出生後の空腸吸収上皮細胞は母乳中の脂質吸収と母親の抗体のトランスサイトosisに関与することが知られている。しかし、出生直後(母乳摂取前)の吸収上皮細胞については報告が見られない。そこで本研究では、新生児空腸吸収上皮細胞における頂部膜領域からのトランスサイトosisに関与する膜系の起源について詳しく解明する目的で、超微形態学的・免疫組織化学的に検索を行った。

Wistar系新生仔ラットを①出生直後で母乳未摂取(出生直後群)、②出生直後から母乳摂取を開始させて2時間経過(母乳摂取群)または、③出生後、未授乳のまま2時間経過(未授乳群)の3群に分けた。各群より空腸を採取し、超微形態学的観察を行った。また、各群の小腸管腔内に horseradish peroxidase (HRP) を投与し、60分後に試料を採取して細胞化学的検索を行い、細胞全体に対する HRP を含む膜系の面積の割合を求め、Student の *t*-検定を用いて、3群間の統計解析を行った。結果は平均値±標準偏差で示し、 $P<0.05$  をもって有意と判定した。さらに、IgG のレセプターである neonatal Fc receptor (FcRn) に対する抗体を用いてウエスタンブロット解析および、抗 FcRn 抗体と抗 IgG 抗体を用いて免疫組織化学的検索を行った。

出生直後群①および未授乳群③の空腸吸収上皮細胞では、頂部に小胞および特殊な小管

状膜系構造が観察された。母乳摂取群②では、①、③より多くの小胞、小管状膜系構造、空胞が認められた。HRP を管腔内に投与した結果、①、③の吸収上皮細胞では、小胞内および小管状膜系構造内に反応産物が観察されたが、細胞間隙には見られなかった。②では発達したエンドサイトーシスに参与する膜系構造内および細胞間隙に反応産物が観察された。統計解析を行った結果、細胞全体に占めるエンドサイトーシスおよびトランスサイトーシスに参与する膜系の割合は、①が  $0.38 \pm 0.16$ 、③が  $0.38 \pm 0.14$  であったのに対し、②では  $4.16 \pm 1.84$  で、有意に高い値を示した ( $P < 0.001$ )。ウエスタンブロット解析の結果、空腸蛋白抽出液中に約 46kDa の FcRn が検出され、②で発現量が多かった。免疫組織化学的検索の結果、①、③では吸収上皮細胞の核周囲部に FcRn の免疫陽性反応が見られ、②では細胞全体、特に細胞頂部において FcRn 免疫陽性反応が観察された。①、③の空腸では粘膜固有層、粘膜上皮の細胞間隙に IgG 免疫陽性反応が見られ、②では管腔内、吸収上皮細胞内、細胞間隙、粘膜固有層に反応が認められた。

以上の結果から、母乳摂取または管腔内の IgG の存在によって、出生直後には空腸吸収上皮細胞の核周囲部に限局した FcRn が、小胞を介して頂部細胞膜領域へ輸送され始めることが示唆された。その後、管腔側からの IgG のエンドサイトーシスおよびトランスサイトーシスが開始と共に、構造的、機能的発達をもたらされ、免疫獲得に重要な役割を果たすことが考えられた。

#### 論文審査結果の要旨

本研究では、新生児空腸吸収上皮細胞における頂部膜領域からのトランスサイトーシスに参与する膜系の起源について詳しく解明する目的で、Wistar 系新生仔ラットを①出生直後で母乳未摂取（出産直後群）、②出生直後から母乳摂取を開始させて2時間経過（母乳摂取群）または、③出生後、未授乳のまま2時間経過（未授乳群）の3群に分け、各群より空腸を採取し、超微形態学的・免疫組織化学的に検索を行っている。

HRP を管腔内に投与した結果、①、③の吸収上皮細胞では、小胞内および小管状膜構造内に反応産物が観察されたが、細胞間隙には見られなかった。②では発達したエンドサイトーシスに参与する膜系構造内および細胞間隙に反応産物が観察された。ウエスタンブロット解析の結果、①、③では、空腸蛋白抽出液中に約 46kDa の FcRn が検出され、②で発現量が多かった。免疫組織化学的検索の結果、①、③では吸収上皮細胞の核周囲部に FcRn の免疫陽性反応が見られ、②では細胞全体、特に核上部において FcRn の免疫陽性反応が観察された。①、③の空腸では粘膜固有層、粘膜上皮の細胞間隙に IgG 免疫陽性反応が見られ、②では管腔内、吸収上皮細胞内、細胞間隙、粘膜固有層に反応が認められた。

以上の結果から、母乳摂取または管腔内の IgG の存在によって、出生直後には空腸吸収上皮細胞の核周囲部に限局した FcRn が、小胞を介して頂部細胞膜領域へ輸送され始めることが示唆された。その後、管腔側からの IgG のエンドサイトーシスおよびトランスサイトーシスが開始と共に、構造的、機能的発達をもたらされ、免疫獲得に重要な役割を果たすことが考えられた。

ーシスが開始と共に、構造的、機能的発達をもたらされ、免疫獲得に重要な役割を果たすという新しい知見が得られた。

公開審査会では、論文の内容を適切に呈示し、質疑応答においても的確に回答した。審査員合議のうえ、本学の学位論文として適格であると判断した。

### 最終試験結果の要旨

学位論文の内容に対して専門的見地から、以下のような質問を行った。

1. 母乳の IgA はどうなっているのか。
2. 今後、免疫電顕を行う予定はあるか。
3. 異なった蛍光トレーサを管腔側と血管側から投与したらどうか。
4. IgG に対するウェスタンブロット解析はどうなっているのか。
5. FcRn のリサイクルはどうか。
6. 総説的タイトルをもう少し工夫したらどうか。
7. FcRn の発現は、免疫的に他の分子による影響もあるのではないか。
8. IgG - FcRn の結合は何が運命づけているのか。
9. 出生直後の透過型電子顕微鏡写真で観察される 2 種類の吸収上皮細胞の違いは何か。
10. ウェスタンブロット解析において、バンドが 2 本に見られた理由は何か。
11. 統計解析は Student-t 検定ではなく、分散分析の方が良いのではないか。
12. 母乳摂取後に FcRn レセプターの量と場所が変化する理由として、母乳の何が原因と考えるか。
13. Bonneville の文献を参考にしたらどうか。

さらに、専門分野から質問を行った結果、的確な回答が得られたので、審査員合議の上、最終試験に合格したものと判定した。