

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21037

研究課題名(和文) 腸間膜リンパ管の脂質吸収・免疫機能を測る新たな食品機能評価方法の検証

研究課題名(英文) Development of the method for evaluation of lipid absorption and gut immunology by using the mesenteric lymph cannulated rat model.

研究代表者

前島 大輔(MAEJIMA, Daisuke)

信州大学・医学部・特任講師

研究者番号：20715130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脂質の吸収経路であり腸管免疫担当細胞の輸送経路でもある腸間膜リンパ管にカニューレを留置し、食品(蒸留水あるいはココアバター)摂取後のリンパ液の採取を行い、食品摂取による腸管免疫機能を評価する動物実験系の確立を目指した。本研究により、蒸留水投与では投与後短時間のうちにリンパ液量が増加し、脂質投与では投与後3～4時間で液量の増加が見られた。リンパ球中のT細胞・B細胞比率には採取時間中大きな変動は見られなかった。リンパ液中のサイトカイン(IL-22)濃度を測定したところ、末梢血における濃度よりも10倍～20倍高いことが明らかとなったが、その意味と意義づけについては今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the food-intake dependent relationship between lipid absorption and gut immunology, we developed the mesenteric lymph cannulated rat model. The all experiment was carried out under continuous isoflurane anesthesia. The lymph was collected from one hour before the administration of food sample (distilled water or cocoa butter) to four hours later of the administration. The lymph flow was increased in a short period after the administration of distilled water, however in the case of cocoa butter, it was increased 3-4hr later of the administration. It was not observed a big change in the ratio of T cell and B cell of the collected lymph. Interestingly, the IL-22 concentration of the collected lymph was 10 to 20 times higher than that of serum plasma. To elucidate the significance of IL-22 concentration in the lymph, further experiment will be needed.

研究分野：リンパ動態学

キーワード：腸間膜リンパ管 カニューレーション 免疫機能

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会が急速に進行し、国民の健康維持増進は大きな課題となっている。食生活の重要性を啓発する方法の1つとして、食品機能表示制度のリニューアルがなされ、科学的根拠をもった機能性食品の利用促進に大きな期待が寄せられている。

本研究では、脂質吸収経路と腸管免疫細胞の輸送路であるリンパ管に焦点を当て、腸管ならびに腸間膜の脂質吸収と免疫機能を評価する食品機能評価法の実現を目指した。

### 2. 研究の目的

腸間膜リンパ管は食事で摂取した脂質の吸収・移動経路であり、同時に腸管免疫を主体とした免疫細胞の輸送路としての働きがある。そこで、実験動物の腸間膜リンパ管にカニューレを挿入し、リンパ液を経時的に採取することによって、食品摂取後の腸管における脂質吸収と免疫機能を評価する食品機能評価法を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

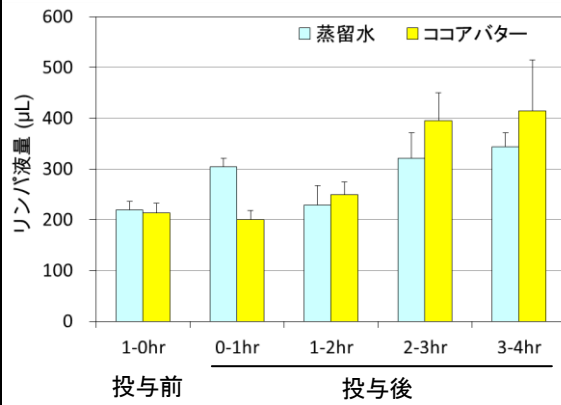
Wistar 系雄性ラットを用い、実験前日夕方より絶食・絶水させた。イソフルラン麻酔下で気管挿管し、人工呼吸器に接続後、麻酔下にて点滴導入および腸間膜リンパ管にカニューレを挿入し、麻酔条件下で実験を実施した。被験食品(蒸留水 1ml あるいはココアバター 0.3ml) 投与 1 時間前からリンパ液の回収を始め、被験食品の投与後 4 時間まで、1 時間ごとにリンパ液を回収した。実際の動物実験の様子を写真で示す(下図)。得られたリンパ液は液量、リンパ球数の計測のほかサイトカイン(IL-22)濃度の測定、フローサイトメトリーによるリンパ球解析、脂肪酸濃度の測定を実施し、蒸留水投与およびココアバター投与での比較検討を行った。



### 4. 研究成果

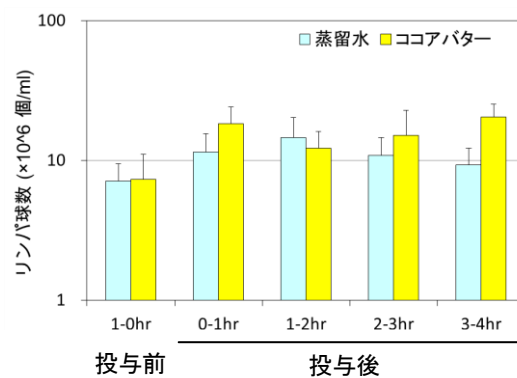
#### (1) リンパ液量の変動

蒸留水あるいはココアバターの投与前および投与後のリンパ液量の変動を次に示す。



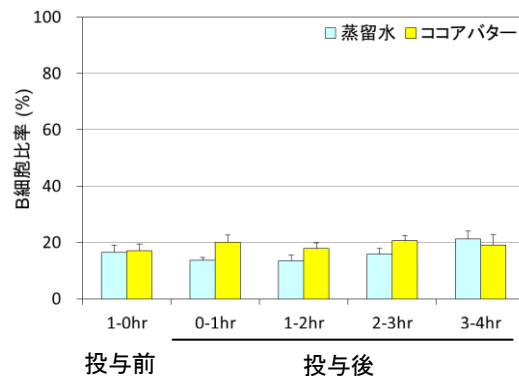
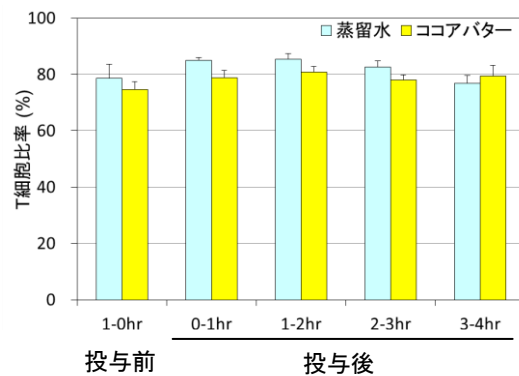
#### (2) リンパ球数の変動

蒸留水投与あるいはココアバター投与で若干のリンパ球数増加が見られた。

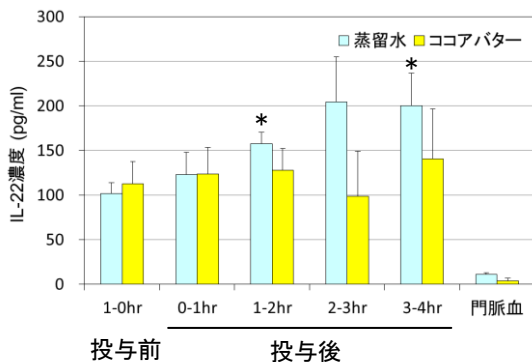


#### (3) フローサイトメトリーによるリンパ球解析

採取したリンパ液中の T 細胞・B 細胞比率を下記に示す。採取時間中のそれぞれの比率には大きな変動は見られなかった。

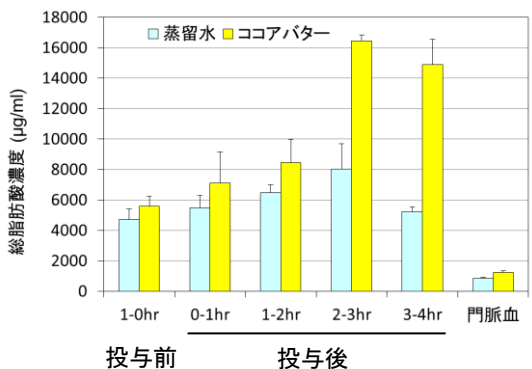


(4) リンパ液中の IL-22 濃度  
蒸留水投与後（2時間および4時間）で投与前に比べ有意に IL-22 濃度が上昇した。

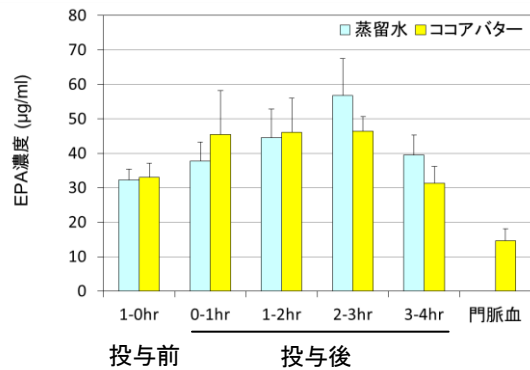
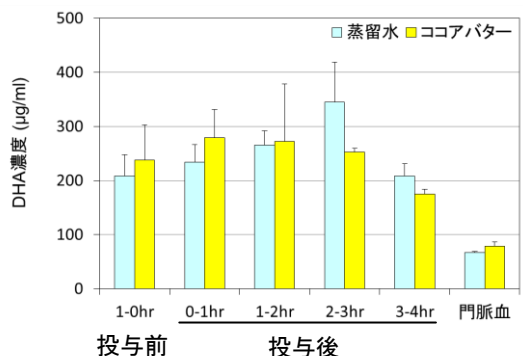


実験後の門脈血を採取し、同様に IL-22 濃度を測定したところ、リンパ液中の 1/10~1/20 の低濃度で、血液中とリンパ液中で大きな差があることが確認された。

(5) リンパ液中の脂肪酸濃度の測定  
採取したリンパ液および実験後の門脈血を採取し、リンパ液・血漿中の脂質分析をガスクロマトグラフィーで行った。蒸留水投与後3時間までは徐々に総脂肪酸濃度が上がって行く傾向が見られた。一方、ココアバター投与群では、投与後3時間と4時間で急激な濃度上昇が認められ、これは投与したココアバターが消化・吸収されたことにより、脂質がリンパ管に流れ込んだためと考えられる。



さらに、脂肪酸組成を詳細に調べたところ、蒸留水あるいはココアバター投与後に DHA や EPA 濃度が上昇する傾向が見られた。



これら DHA や EPA は蒸留水やココアバターには含まれておらず、ラット体内に蓄積されたものが蒸留水あるいはココアバターの消化・吸収による刺激で蓄積部位からリンパ管へ流れ込んできた可能性を示唆するものであり、非常に興味深い現象であると思われた。

今回の研究から、蒸留水摂取あるいはココアバター摂取により腸間膜リンパ液中のリンパ球数の増加が確認された。また、蒸留水の摂取でリンパ液中の IL-22 濃度が高まり、血中よりも高濃度で存在することを確認できたこと、蒸留水やココアバター投与でリンパ液中に DHA、EPA などの必須脂肪酸の濃度が投与前に比べて上昇傾向を示す結果を得ることができた。

しかしながら、当初予定していた免疫細胞に発現するような分子マーカーを付与した超音波造影剤の作製やその造影剤を用いた脂質吸収と腸管免疫活性を評価する実験系の構築まで到達することができず、今後の課題となった。

今回の実験結果で得られた成果をさらに発展させるためにも、IL-22 がリンパ液中に高濃度で存在する意味づけや蒸留水投与により IL-22 濃度の上昇が起こるメカニズムなどについて、今後明らかにしていきたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1) 大橋俊夫、河合佳子、前島大輔、腸と四肢のリンパ循環の違いに依存したリンパ機能特性. 実験医学, 35, 403-408, 2017, 査読無

2) Zolla V, Nizamutdinova IT, Scharf B, Clement CC, Maejima D, Akl T, Nagai T, Luciani P, Leroux JC, Halin C, Stukes S, Tiwari S, Casadevall A, Jacobs WR Jr, Entenberg D, Zawieja DC, Condeelis J, Fooksman DR, Gashev AA, Santambrogio L. Aging-related anatomical and biochemical

changes in lymphatic collectors impair lymph transport, fluid homeostasis, and pathogen clearance. Aging Cell 14: 582-594, 2015, 査読有

〔学会発表〕（計1件）

1) 前島大輔、勝又淳司、安嶋久美子、河合佳子、大橋俊夫. 脂質吸収と腸管免疫機能評価のためのラット実験方法の確立. 第93回日本生理学会大会, 2016年3月24日, 札幌コンベンションセンター (札幌)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前島 大輔 (MAEJIMA, Daisuke)

信州大学・医学部・特任講師

研究者番号：20715130