

氏名(本籍)	畑 和 憲(京都府)
学位の種類	博士(医学)
学位授与の要件	博士第411号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位論文題目	Sequential Changes in Luminal Microflora and Mucosal Cytokine Expression during Developing of Colitis in HLA-B27/ $\beta_2$ -Microglobulin Transgenic Rats (HLA-B27/ $\beta_2$ -マイクログロブリントランスジェニックラット大腸炎発症における腸内細菌叢と大腸粘膜内サイトカイン発現の変化)
	審査委員 主査 教授 小笠原 一 誠 副査 教授 瀬 戸 昭 副査 教授 上 原 正 巳

## 論文内容の要旨

### 【目的】

HLA-B27/ $\beta_2$ -マイクログロブリントランスジェニックラット(以下HLA-B27ラット)は、炎症性腸疾患(IBD)、特に潰瘍性大腸炎(UC)の動物モデルである。HLA-B27ラットは、一般環境下の飼育で自然発症的に大腸炎を生じるが、無菌状態では生じない。すなわち、大腸炎の発症に腸内細菌が影響していると考えられる。HLA-B27ラット大腸炎を用いて、潰瘍性大腸炎発症における腸内細菌叢と免疫調節機構の異常としての粘膜内サイトカイン発現の変化を検討し、その病因の一端を明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

1) 病原菌がない環境下でHLA-B27ラットを6週令より17週令まで飼育し、毎週、体重と便性状の観察、便潜血反応を調べた。2) 各週令で屠殺・解剖し、横行結腸を採取した。その後、HE染色を行い、組織学的に検討し、炎症をスコア化した。3) 各週令ラットの盲腸内容物を嫌気培養し、通性嫌気性菌と偏性嫌気性菌を同定し、また、コロニー数を比較検討した。4) 各週令ラットの残存大腸の粘膜を剥離し、AGPC法にてRNAを抽出し、1 $\mu$ gのRNAから各種サイトカインmRNA発現をRT-PCR法により検討した。5) コントロールとして15週令のフィッシャー344ラットを用いた。

### 【結果】

1) HLA-B27ラットは6週令ですべて軟便、下痢を生じており、8週令より便潜血反応が陽性化した。2) 横行結腸のHE染色組織像では、6週令より粘膜固有層への単核球浸潤が認め以後増強し、また粘膜の肥厚、陰窩の過形成、杯細胞の減少の進展を認めた。炎症をスコア化したところ、8週令より大腸炎を発症していた。3) 盲腸内細菌叢では、通性嫌気性菌に対する偏性嫌気性菌のコロニー数の比は週令を経るとともに増加した。6週令の時点で、バクテロイデス属とビフィドバクテリウム属のみが高いレベルで検出された。クロストリジウム属は6週令では認められず、その後漸増し15週令で他の嫌気性菌と同じレベルに達した。4) 大腸粘膜内では、炎症性サイトカインである、IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$ のmRNA発現が8週令より検出され、17週まで認められた。IL-7 mRNAの発現は全期間を通して強い発現を認めた。Th1系サイトカインのIFN- $\gamma$  mRNA発現が6週令以後認められた。Th2系サイトカインではIL-4 mRNAは6、8週令で弱く発現を認めるのみで、IL-10 mRNAは全期間認められなかった。TGF- $\beta$  mRNAは10週令で弱く認めたが、その他の時点では発現していなかった。コントロールラットでは、IL-7 mRNAの発現が弱く、TGF- $\beta$  mRNAは強く発現していたが、その他のサイトカインmRNAの発現は認められなかった。

## 【考 察】

HLA-B27ラット粘膜内において、炎症を惹起するサイトカインやTh1系サイトカインが優位で、Th2系サイトカインやTGF- $\beta$ の発現が非常に弱いことから、炎症を十分に抑制できないという免疫応答の破綻が慢性大腸炎の発症、進展に関与したと考えられる。また、偏性嫌気性菌であるバクテロイデス属に対する免疫応答の異常により慢性大腸炎が生じると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

潰瘍性大腸炎の病因に関しては、未だに不明な点が多い。本研究では潰瘍性大腸炎の動物モデルであるHLA-B27/ $\beta$ 2-microglobulin transgenic ratを用いて、潰瘍性大腸炎発症における遺伝的背景に基づく盲腸内細菌叢と免疫調節機構異常としての大腸粘膜内cytokine発現の変化を検討した。

以下の結果を得た。1) 大腸炎発症前より偏性嫌気性菌の*Bacteroides*属、*Bifidobacterium*属を高いレベルで検出した。また、*Bacteroides*属の中でも、ヒト潰瘍性大腸炎の病因への関与が疑われる*B. vulgatus*を高いレベルで検出した。2) 大腸粘膜では、6週令でIFN- $\gamma$ の発現を認め、8週令より他のpro-inflammatory cytokineやTh1系cytokineの発現が認められ、以後漸増していた。3) Th2系cytokineやTGF- $\beta$ は殆ど発現していなかった。

以上より、HLA-B27強制発現に基づく腸内細菌叢、特に*Bacteroides vulgatus*などの偏性嫌気性菌に対する免疫応答異常と免疫反応抑制異常が慢性大腸炎発症に関与する可能性を本研究は示したので、博士(医学)の学位論文に値すると考えられる。

なお、本学位授与申請者は平成14年2月19日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。