

氏名・(本籍)	辻川知之(滋賀県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第66号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与年月日	平成2年3月24日
学位論文題目	The trophic effect of epidermal growth factor (EGF) on the morphological changes and polyamine metabolism in the small intestine of rats (上皮成長因子のラット小腸増殖作用における形態変化とポリアミン代謝に関する研究)

審査委員	主査 教授	小玉 正 智
	副査 教授	細田 四 郎
	副査 教授	服部 隆 則

論文内容要旨

〔目的〕

経腸栄養剤は消化を受けずに小腸から速やかに吸収され、消化管に与える刺激が少ないため、消化管手術前後の栄養管理やクローン病などの炎症性腸疾患の栄養治療として広く臨床的に使用されている。しかしながら、長期の経腸栄養剤使用は消化管粘膜とくに小腸粘膜の萎縮をきたすことも報告されている。上皮成長因子(EGF)はCohenらによってマウス顎下腺より分離されて以来、上皮系の細胞や器官の増殖促進作用、分化誘導作用が報告されている。しかし小腸粘膜上皮については、幼若なラットあるいはマウスでEGFが小腸の分化を促進することは認められているが、成熟ラットの小腸ではEGFの増殖効果は疑問視されていた。著者らは経腸栄養剤4週間投与後の萎縮した成熟ラット小腸に対して、EGFが過形成や栄養効果にどのような作用を及ぼすかを主にポリアミン代謝の面から検討した。

〔方法〕

4週齢Wistar系雄ラットを経腸栄養剤(エレンタール:ED)のみで4週間飼育した。EDは1Kcal/mlの水溶液として給水瓶を用いて自由摂取させた。4週間後ラットをEGF群とコントロール群に分け、EGF(10 μ g/kg)あるいは生理食塩水を8時間おきに皮下注射した。EGF投与中もEDは自由摂取させた。またすべてのラットは屠殺1時間前に3H-thymidine

18.5 KBq/g body weight) を腹腔内投与した。EGF または生食の初回投与から 12、24、48 時間後にラットを pentobarbital 麻酔後断頭屠殺した。取り出した小腸は内腔を洗浄し、空腸としてトライツ靱帯から 2 cm 遠位より 10 cm、回腸として回盲弁から 2 cm 近位より 10 cm segment の粘膜をスライドガラスではぎとった。得られた粘膜は pyridoxal-5'-phosphate を含む buffer 10 ml でホモジェナイズした。一方 EGF 1 週間投与は Miniosmotic pump (Model 20 01, Alza corp.,) を用いた。すなわち、pump に EGF を 50 μ g 注入し、これを腹腔内に挿入した。1 週間後上述と同様に検体を作製した。ただし、1 週間投与ラットは vincristine (1.0 mg /kg body weight) を腹腔内投与し、Wright らの方法に従って crypt cell production rate (CCPR) を測定した。ホモジェネートより ornithine decarboxylase (ODC) は Luk の方法で 14 C-ornithine HCl を基質として、その反応生成物質 14 CO₂ の放射能活性を測定した。他に DNA は diphenyl amine 法、RNA は orcinol 法、蛋白は Lowry 法、ポリアミンは HPLC で測定した。なお 1 週間投与群のラット小腸のみ一部をホルマリ固定し、HE 染色を行って絨毛と陰窩を観察した。

〔結果〕

ED で 4 週間飼育したラットは固形食飼育ラットに比べて、栄養状態も体重増加率に差はなかった。しかし、小腸の長さは短縮し、単位長さあたりの粘膜湿重量は空腸で 70%、回腸で 60% に減少した。この ED で 4 週間飼育したラットを用い、萎縮した小腸粘膜に及ぼす EGF の影響について以下の検討を行った。

空腸の ODC 活性は 12 時間後の EGF 群でコントロールと比較して有意に ($p < 0.05$) 増加しており、24 時間後に 144.14 ± 24.11 (pmols/h/mg protein) とピークを示したが、48 時間後は低下し、コントロールとの間に差はなかった。回腸においては 12 時間後の EGF 群で 91.17 ± 7.24 とコントロール 33.90 ± 4.83 に比し有意な増加を認めしたが、24、48 時間後では両群に差を認めなかった。EGF 群の DNA specific activity は空腸の 48 時間後、回腸の 24 時間後に高い傾向を示した。DNA content は 48 時間までで両群に差はなかった。空腸のポリアミンは 12、48 時間とも EGF 群の putrescine, spermidine, spermine はコントロールと比較してすべて増加しており、回腸も同様の結果を示した。次に、EGF の 1 週間投与では空腸、回腸ともコントロールに比べて粘膜湿重量、蛋白、DNA が有意に増加しており、この傾向は回腸でより強く認められた。RNA は両群で差を認めなかった。CCPR は空腸、回腸とも EGF 群で高い傾向を認めた。組織学的検討でも EGF 群の絨毛高、陰窩深は増加しており、とくに回腸で有意であった。

〔考察〕

ED により小腸が萎縮をきたすのは、消化液中に含まれる Gut hormone の減少やペクチンを初めとする食物繊維の欠如などが考えられる。成熟ラット小腸に対する EGF の影響は、絶食モデルを用いて ODC の増加と共に腸粘膜の増殖を認めた報告はあるものの、通常固形食摂取ラッ

トでは効果は認め難いとされていた。われわれは ED 摂取ラットにおいて EGF 長期投与は小腸の増殖を認め、その作用は早期にポリアミン代謝が関与していることを初めて報告した。小腸の EGF レセプターは刷子縁膜に存在するが、皮下や腹腔内投与でも効果を認めている。これは EGF が血中から消化液に分泌されてレセプターに作用したもの、あるいは漿膜側から作用したものと考えられる。ODC 活性と putrescine の時間的ずれや、空腸と回腸で EGF の反応がやや異なったのは食餌摂取の影響や EGF を 8 時間おきに間欠投与したことなどが考えられた。

〔結 論〕

EGF は離乳期の発育過程の小腸粘膜ばかりでなく、成熟ラット小腸粘膜に対しても、ED 4 週間投与により萎縮した小腸粘膜には増殖作用を示し、その機序にはポリアミン代謝が関与することが明かとなった。

学位論文審査の結果の要旨

本論文は、経腸栄養剤飼育によって萎縮したラット小腸に対して、Epidermal Growth Factor (EGF) の増殖作用および、その増殖のメカニズムをポリアミン代謝の面から検討したものである。経腸栄養剤のみで 4 週間ラットを飼育し、小腸粘膜の萎縮を確認した後、EGF (50 $\mu\text{g}/\text{rat}$) を mini osmotic pump で 1 週間連続腹腔内投与し、小腸粘膜の各種パラメーターを測定した。その結果、空腸、回腸とも粘膜湿重量、蛋白量、DNA 量が増加し、また絨毛高や陰窩深の増加、Crypt Cell Production Rate の増加が認められた。また EGF (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}/8$ hours) を 6 回皮下投与した実験では、EGF 初回投与 24 時間以内にオルニチン脱炭酸酵素やプロレスシンの増加することが明かとなった。

以上の実験結果をもとに、EGF はポリアミン合成を介して、経腸栄養剤により萎縮した小腸の粘膜増殖を促し、小腸の hyperplasia が生じたことが明らかにされた。

EGF によるポリアミン合成とそれに続く粘膜増殖を、in vivo の小腸で同時に示した研究は初めてのもので、EGF の効果を認め難いとされていた成熟ラットの腸においても、経腸栄養剤摂取下では EGF が増殖を促進するという新しい事実を見いだしたものである。また、EGF が臨床的にも経腸栄養剤や中心静脈栄養長期使用による消化管、特に小腸粘膜の萎縮を防止するものとして、臨床的に非常に興味深い研究である。以上により、本研究は、学位論文として価値あるものと認める。