

# 学位論文抄録

Intravital imaging of neutrophil recruitment in intestinal ischemia-reperfusion injury  
(小腸虚血再灌流障害時における好中球動態の生体内イメージング)

橋本 晋太郎

指導教員

猪股 裕紀洋 前教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻小児外科学・移植外科学

紹介教授

日比 泰造 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻小児外科学・移植外科学

## Abstract of the Thesis

**Background :** Neutrophils are known to be key players in innate immunity. Activated neutrophils induce local inflammation, which results in pathophysiologic changes during intestinal ischemia-reperfusion injury (IRI). However, most studies have been based on static assessments, and few have examined real-time intravital neutrophil recruitment. We herein report a method for imaging and evaluating dynamic changes in the neutrophil recruitment in intestinal IRI using two-photon laser scanning microscopy (TPLSM).

**Methods:** LysM-eGFP mice were subjected to 45 min of warm intestinal ischemia followed by reperfusion. Mice received an intravenous injection of tetramethylrhodamine isothiocyanate-labeled albumin to visualize the microvasculature. Using a time-lapse TPLSM technique, we directly observed the behavior of neutrophils in intestinal IRI.

**Results:** We were able to image all layers of the intestine without invasive surgical stress. At low-magnification, the number of neutrophils per field of view continued to increase for 4 h after reperfusion. High-magnification images revealed the presence or absence of blood circulation. At 0-2 h after reperfusion, rolling and adhesive neutrophils increased along the vasculature. At 2-4 h after reperfusion, the irregularity of crypt architecture and transmigration of neutrophils were observed in the lamina propria. Furthermore, TPLSM imaging revealed the villus height, the diameters of the crypt, and the number of infiltrating neutrophils in the crypt. In the IRI group, the villus height 4 h after reperfusion was significantly shorter than in the control group.

**Conclusions:** TPLSM imaging revealed the real-time neutrophil recruitment in intestinal IRI. Z-stack imaging was useful for evaluating pathophysiological changes in the intestinal wall.

## 学位論文抄録

[ 目的 ] 小腸移植をはじめ、各種腹部手術における小腸虚血再灌流 (ischemia-reperfusion; I/R) 障害において、好中球が生理病理学的に主要な役割を果たすことは知られているものの、静的評価が主であり、生体内での動態に関する報告は非常に少ない。我々は、2光子励起顕微鏡 (two-photon laser scanning microscopy; TPLSM) を用いて、小腸虚血再灌流障害時における好中球動態のダイナミックな変化を観察した。

[ 方法 ] LysM-eGFP マウス (好中球は eGFP<sup>hi</sup> に標識) の/45 分の小腸 I/R モデルを作成、観察直前に TRITC-albumin を静注し血管を蛍光標識した。マウスは全身麻酔下に生かしたまま小腸を体外に露出し、腹壁に固定した。2光子励起観察には BX61 と FV1000MPE を用いた。低倍率と高倍率イメージングを用いて同部位を連続的に観察し、再灌流後 0、1、2、3、4 時間時点でそれぞれ 10 分の動画を撮影し、タイムラプスイメージングを行った。また、各時間帯で血清と小腸検体を採取し、血液生化学的検討ならびに病理学的検討を併せて行った。

[ 結果 ] マウスを生かしたまま非侵襲的に小腸全層が観察可能であった。低倍率イメージングでは、I/R 群における 1 視野辺りの平均好中球数はそれぞれ 357.1(0h)、838.2(1h)、705.8(2h)、758.2(3h)、802.2(4h)と増加傾向を示していた。高倍率イメージングでは小腸血流の有無が評価でき、再灌流後 0-2 時間では、血管壁に沿ってローリング、接着する好中球数の増加が捉えられ、再灌流後 2-4 時間では、血管内皮細胞間からの浸潤過程や、陰窩構造の不整を捉えることができた。また、絨毛高の変化、陰窩径、陰窩内の好中球数の変化も評価可能であった。さらに Z-stack イメージングを行うことで、絨毛高の変化や小腸の 3D イメージングも可能であった。

[ 考察 ] 2光子励起顕微鏡を用いた生体内イメージングは、生きた組織を高い分解能で、奥深く低侵襲に観察できるという非常に大きなメリットを持つ。今回この技術によりマウス小腸 I/R モデルでの好中球動態、小腸構造の変化を経時的にイメージングすることに成功した。こうした生体内現象の可視化技術は、小腸 I/R の新たなメカニズム解明や治療法開発に革新をもたらすであろうと考えられる。

[ 結論 ] 2光子励起顕微鏡は、マウス小腸虚血再灌流障害時の好中球動態の生体内イメージングに非常に有用であった。また Z-stack イメージングは、小腸壁構造変化の観察に適していた。