

## 橋本 晋太郎 氏の学位論文審査の要旨

### 論文題目

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)

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、好中球が病態生理学的に重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しての報告は非常に少ない。本研究では、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するとともに、小腸の 3D イメージングも明らかにできるモデルの開発に成功した。

LysM-eGFP マウス (好中球を eGFP<sup>+</sup> に標識) を用いて、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、血液生化学的ならびに病理学的検討を行った。

マウスは生かしたまま、非侵襲的に小腸壁全層を観察可能であった。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。

以上のように、本研究では、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 2光子励起顕微鏡のメリットを生かし、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を可能にした。

本発表に対して、1) 虚血再灌流腸障害病態における好中球の意義、2) 腸虚血障害や腸移植における臨床応用への本研究の意義、3) 本研究法と既存の方法との相違点と優位性、4) 3D イメージングにおける呼吸の影響を抑える工夫、5) LysM-eGFP マウスでの macrophage と好中球の鑑別方法、6) 骨髄由来と組織に存在する陽性細胞の違い、7) macrophage と好中球の分布や動態の相違、8) 再灌流直後から血管壁に存在する陽性細胞の種類、9) 本研究法を応用した好中球の機能解析の実験、10) 本実験モデルでの細菌感染や脳腸相関の影響、などについての質疑がなされ、申請者は概ね的確に返答した。本研究では、マウス小腸障害時の好中球動態の生体内イメージング法を開発したが、本実験方法は、小腸の様々な疾患のメカニズム解明や治療薬開発への有意義な研究方法となる可能性があり、学位に相応しい研究と評価された。

審査委員長 機能病理学担当教授

伊藤隆明