

氏名(本(国)籍)	今 岡 尚 子(東京都)
推 薦 教 員	岐阜大学 教授 柳 井 徳 磨
学 位 の 種 類	博士(獣医)
学 位 記 番 号	獣医博乙第118号
学位授与年月日	平成25年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学 位 論 文 題 目	Sprague-Dawley系ラット脾臓における自然発生性出血および線維化病変の病理発生に関する研究
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 柳 井 徳 磨 副査 帯広畜産大学 教 授 古 林 与志安 副査 岩 手 大 学 教 授 古 濱 和 久 副査 東京農工大学 教 授 渋谷 淳 副査 岐 阜 大 学 教 授 海 野 年 弘

論 文 の 内 容 の 要 旨

Sprague-Dawley (SD) 系ラットは各種実験に汎用されている系統であり、その自然発生性変化については多くの報告がある。このうち、脾臓には加齢性にヘモジデリン沈着および線維化の発生することが知られているが、その初期変化や進展過程に関する報告は殆ど見当たらない。本研究では、脾臓の自然発生性病変、特に出血、炎症ならびに線維化について詳細に検討し、出血の原因および線維化の進展に関わる因子について以下4章にわたり、病理学的に考察を加えた。

第一章では、8, 12, 18 および 26 週齢の雌雄 SD 系ラットの脾臓を組織学的に検査し、脾臓病変の特徴について調べた。その結果、雌雄ともに 12 週齢から脾臓の微小出血とヘモジデリン沈着が認められた。18 および 26 週齢では上記の病変に加え線維化が特徴的に観察され、脾臓は線維性隔壁により分割されて領域が拡大していた。また、炎症性細胞浸潤を伴う大型の出血も観察された。18 週齢以降に出血と線維化が同じ脾臓で発現する傾向があったことから、微小出血に対する軽微な炎症と修復の繰り返しによって脾臓病変が進展する可能性が示唆された。しかし、超微形態学的には出血を呈する脾臓の内皮細胞には変化は認められず、出血の原因は不明であった。26 週齢の雄における血清エストラジオール濃度は、脾臓出血の認められた動物群に比較して出血のない動物群で有意に高かった。なお、ヘモジデリン沈着を呈する脾臓の発現頻度が雌雄ともほぼ同等の増加率をもって加齢性に増加したことから、微小な出血が初期変化として存在し、これには雌雄差がないこと

が示唆されたが、出血に呼応した二次的变化と考えられる線維化については雌よりも雄で増加率が高く、炎症性細胞浸潤についても雌ではほとんど認められなかった。このことから、膵島における一連の病変形成過程には、特に病変の進展に対する性差があると考えられ、その一因としてエストロゲンの関与が推測された。

第二章では、出血発生の雌雄差に対する性ホルモン、特にエストロゲンの関与の有無をSD系ラットを用いて検討した。雌雄ラットならびに卵巢摘出術(OVX)を施した雌ラットに7週齢から β -estrogen 3-benzoate (EB)を週1回皮下投与し、12、18および26週齢で、組織学的な膵島病変の発生時期と頻度を比較した。OVX対照群およびEB投与群における膵島出血は雄の無処置群と同じ12週齢から認められ、発生頻度にも差がなかった。このことから、エストロゲンは膵島出血そのものの発生には関与しないと考えられた。一方、雌雄ともEB投与群では26週齢で炎症および線維化の抑制が有意に認められたことから、エストロゲンが膵島に何らかのメカニズムで抗炎症・抗線維化作用を及ぼし、病変進展の抑制を惹起したことが示唆された。Estrogen receptor (ER) α および β の免疫染色では、いずれも膵島の核および細胞質に弱い陽性反応が認められたが、無処置群とEB投与群の間に染色性の差は認められなかった。

第三章では、第2章で得られた雄26週齢の無処置ならびにEB投与群と、39、52、78、および102週齢の無処置雄SDラットの膵組織ブロックを用いて、26週齢以降の膵島線維化の進展メカニズムおよびEBによる抑制メカニズムの解明を試みた。まず、膵島線維化の発生頻度ならびに重篤度を組織学的に調べるとともに、 α -smooth muscle actin (α -SMA)およびplatelet-derived growth factor receptor α (PDGFR α)の免疫染色を施した。また、ER α についても、第2章で用いたものとはクローンの異なる抗体による免疫染色を実施した。膵島の線維化は26週齢では全膵島の約10%に認められ、39週齢以降は30~40%の割合で推移したが、同時に線維化の進展によると考えられる膵島の萎縮も認められ、その頻度は52週齢以降に増加した。 α -SMAおよびPDGFR α の免疫染色はいずれも、線維化を呈した膵島ならびに炎症性膵島の間質に陽性を示した。線維化膵島における α -SMAの陽性反応は26週齢で最も強く、39週齢以降は加齢により減弱した。また、炎症性の膵島では α -SMAおよびPDGFR α の陽性反応が週齢に関わらず強く認められ、その陽性部位は互いに一致していた。ER α の免疫染色では膵島 β 細胞の一部の核が陽性を示したが、その陽性率は26から102週齢のいずれにおいてもほぼ同等であった。また、EB投与群ではER α の陽性率が無処置群に比べて高かったが、線維化の有無による陽性率の差はみられなかった。一方で、EB投与群の α -SMA陽性反応は無処置群に比べて低下しており、PDGFR α の陽性像も認められなかった。以上より、膵島の線維化は加齢に伴い進展し、その一部は52週齢以降萎縮することが示された。また、膵島の線維化プロセスには α -SMA陽性の筋線維芽細胞

が関与していることが明らかとなった。 α -SMA と同部位における PDGFR α の高発現より、筋線維芽細胞が PDGF の影響を受けて活性化し、細胞外基質を産生するものと推察された。一方、EB 投与による脾島の線維化および炎症の抑制には脾島細胞の核内 ER α は関与しないと考えられ、抑制メカニズムの一つとして、EB による筋線維芽細胞の出現阻害が推測された。

第四章では、脾島病変の初期変化である微小出血に着目し、Dahl-Iwai salt sensitive (DIS) ラットを用いて、高血圧が脾島出血の原因因子となり得るかを検討した。高ナトリウム食を与えて 7 週齢から高血圧を惹起した DIS ラットの脾島を観察するとともに血漿 nitric oxide (NO) および von Willebrand factor (vWF) 濃度を測定した。DIS ラットでは 12 週齢で血漿 NO の減少、vWF 濃度の増加とともに腎糸球体の硬化が認められ、全身性の内皮細胞の障害が示唆された。しかし、組織学的な脾島出血の発生時期は 12 週齢であり、SD 系ラットとの間で発生頻度に差はみられなかった。したがって、ともに有窓内皮細胞で構成されている糸球体および脾島の毛細血管の間に、高血圧性の内皮細胞障害に対する感受性差がある反面、全身の血圧上昇は脾島出血のリスク因子とはならない可能性が示唆された。

以上、本研究では、SD 系ラットに発生する脾島出血ならびに線維化の組織学的詳細とその経過を病理学的に解明し、特に脾島の線維化については、そのメカニズムの一部を明らかにした。また、高血圧性の内皮細胞障害には臓器による感受性差があり、少なくとも高血圧が脾島出血発現の原因因子ではないことを示した。

これらの研究は SD ラット脾臓の背景病変の病理発生に関する基礎的なデータであり、化合物の安全性評価における質的向上に貢献するものと思われる。

審 査 結 果 の 要 旨

Sprague-Dawley (SD) 系ラットの脾島における加齢性ヘモジデリン沈着および線維化の病理発生に関しては、ほとんど報告されていないことから、申請者は同ラット脾島の自然発生性病変、特にヘモジデリン沈着および線維化に着目し、その初期変化および進展過程を含む病理発生を解析した。

第一章では、SD 系ラット雌雄につき脾島病変の発生頻度とその特徴について調べたところ、雌雄とも 12 週齢から脾島に微小出血とヘモジデリン沈着が認められ、18 および 26 週齢では線維化が加わり、脾島の線維性隔壁による分割と領域拡大、さらに、炎症性細胞浸潤を伴う大型の出血も観察された。脾島の一連の病変形成には、特に病変の進展において性差があると考えられ、その一因としてエストロゲンの関与が推測された。

第二章では、脾島出血の発現への性ホルモン、特にエストロゲンの関与を明らかにするために、雌雄ラットならびに卵巣摘出術 (OVX) を施した雌ラットに 7 週齢から β -estrogen 3-benzoate (EB) を週 1 回皮下投与し、12、18 および 26 週齢の各週齢における脾島病変の発生状況を調べたところ、OVX 対照群および EB 投与群における脾島出血は雄の無処置群と同じ 12 週齢から認められ、発生頻度にも差がなかったことから、エストロゲンは脾島出血の発生には直接関与しないと考えられた。一方、雌雄とも EB 投与群では 26 週齢で炎症および線維化の有意な抑制が認められたことから、エストロゲンが脾島に何らかのメカニ

ズムで抗炎症・抗線維化作用を及ぼし、病変の進展を抑制した可能性がある。

第三章では、第2章で得られた無処置雄SDラットの膵組織を用いて、26週齢以降の膵島線維化の進展メカニズムおよびEBによる抑制メカニズムの解明を試みた。 α -SMA および PDGFR α の免疫染色はいずれも、線維化を呈した膵島ならびに炎症性膵島の間質に陽性を示した。線維化膵島における α -SMA の陽性反応は26週齢で最も強く、39週齢以降は加齢に伴い減弱した。また、炎症を示す膵島では α -SMA および PDGFR α の陽性反応が週齢に関わらず強く認められ、その陽性部位は互いに一致していた。ER α の免疫染色では膵島 β 細胞の一部の核が陽性を示したが、その陽性率は26から102週齢のいずれにおいてもほぼ同等であったことから、膵島の線維化は加齢に伴い進展し、その一部は52週齢以降萎縮することが示された。 α -SMA と同部位における PDGFR α の高発現より、筋線維芽細胞が PDGF の影響を受けて活性化し、細胞外基質を産生するものと推察された。一方、EB 投与による膵島の線維化および炎症の抑制には膵島細胞の核内 ER α は関与しないと考えられ、抑制メカニズムの一つとして、EB による筋線維芽細胞の出現阻害が推測された。

第四章では、膵島病変の初期変化である微小出血に着目し、Dahl-Iwai salt sensitive (DIS) ラットを用いて、高血圧が膵島出血の原因因子となり得るかを検討した。高ナトリウム食を与えて7週齢から高血圧を惹起した DIS ラットの膵島を観察するとともに血漿 nitric oxide (NO) および von Willebrand factor (vWF) 濃度を測定したところ、DIS ラットでは12週齢で血漿 NO の減少、vWF 濃度の増加とともに腎糸球体の硬化が認められ、全身性の内皮細胞の障害が示唆された。しかし、組織学的な膵島出血の発生時期は12週齢であり、SD系ラットとの間で発生頻度に差はみられなかったことから、全身性血圧上昇は膵島出血のリスク因子とはならないと考えられた。

これらの研究はSDラット膵臓の背景病変の病理発生に関する基礎的なデータであり、化合物の安全性評価の質的向上に貢献するものと思われる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Age- and sex-related differences in spontaneous hemorrhage and fibrosis of the pancreatic islets in Sprague-Dawley rats
著 者 名 : Imaoka, M., Satoh, H. and Furuhashi, K.
学術雑誌名 : Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : 35(3):388-394, 2007
- 2) 題 目 : Effects of estradiol treatment and/or ovariectomy on spontaneous hemorrhagic lesions in the pancreatic islets of Sprague-Dawley rats
著 者 名 : Imaoka, M., Kato, M., Tago, S., Gotoh, M., Satoh, H. and Manabe, S.
学術雑誌名 : Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : 37(2):218-226, 2009
- 3) 題 目 : Effect of hypertension on the occurrence of micro-hemorrhage in the pancreatic islet of Dahl salt-sensitive rats
著 者 名 : Imaoka, M., Sayama, A., Suzuki, T., Jindo, T. and Sanbuissho, A.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : 25(2):155-161, 2012

4) 題 目 : The process and development mechanism of age-related fibrosis in the pancreatic islet of Sprague-Dawley rats: Immunohistochemical detection of myofibroblasts and suppression effect by estrogen treatment

著 者 名 : Imaoka, M., Jindo, T. and Takasaki, W.

学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology

巻・号・頁・発行年 : in press

既発表学術論文

1) 題 目 : Tumor promoting effect of phenolphthalein on development of lung tumors induced by *N*-ethyl-*N*-nitrosourea in transgenic mice carrying human prototype c-Ha-ras gene

著 者 名 : Imaoka, M., Kashida, Y., Watanabe, T., Ueda, M., Onodera, H., Hirose, M. and Mitsumori, K.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 64(6):489-493, 2002

2) 題 目 : Spontaneous ectopic sebaceous glands (Fordyce's granules) in the oral mucosa of Sprague-Dawley rats

著 者 名 : Imaoka, M., Satoh, H., Kai, K., Kajimura, T. and Furuhashi, K.

学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology

巻・号・頁・発行年 : 16(4):253-257, 2003

3) 題 目 : Lack of carcinogenicity of reserpine in transgenic mice carrying a human prototype c-Ha-ras gene (*RasH2* Mice)

著 者 名 : Imaoka, M., Satoh, H. and Furuhashi, K.

学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology

巻・号・頁・発行年 : 17(2):95-103, 2004

4) 題 目 : Aggravation of galactosamine hepatotoxicity by albumin in rats

著 者 名 : Imaoka, M., Kato, M., Tamanaka, M., Hattori, H. and Manabe, S.

学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology

巻・号・頁・発行年 : 21(3):175-183, 2008

5) 題 目 : Mixed germ cell tumor with embryonal carcinoma, choriocarcinoma, and epithelioid trophoblastic tumor in the ovary of a cynomolgus monkey

著 者 名 : Yokouchi, Y., Imaoka, M., Sayama, A. and Sanbuissho, A.

学術雑誌名 : Toxicologic Pathology

巻・号・頁・発行年 : 39(3):553-558, 2011

- 6) 題 目 : Indole-3-carbinol enhances oxidative stress responses resulting in the induction of preneoplastic liver cell lesions in partially hepatectomized rats initiated with diethylnitrosamine
- 著 者 名 : Shimamoto, K., Dewa, Y., Ishii, Y., Kemmochi, S., Taniai, E., Hayashi, H., Imaoka, M., Morita, R., Kuwata, K., Suzuki, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
- 学術雑誌名 : Toxicology
- 巻・号・頁・発行年 : 283(2-3):109-117, 2011
- 7) 題 目 : Neuroendocrine carcinoma of the apocrine glands of the anal sac in a dog
- 著 者 名 : Ogawa, B., Taniai, E., Hayashi, H., Imaoka, M., Machida, N., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
- 学術雑誌名 : Journal of Veterinary Diagnostic Investigation
- 巻・号・頁・発行年 : 23(4):852-856, 2011
- 8) 題 目 : Spermatocytic seminoma with neuroectodermal differentiation and sertoli cell tumor in a dog
- 著 者 名 : Saegusa, Y., Hayashi, H., Taniai, E., Imaoka, M., Ohishi, T., Wang, L., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
- 学術雑誌名 : Veterinary Pathology
- 巻・号・頁・発行年 : 48(5):1024-1028, 2011
- 9) 題 目 : Relationship between CYP1A induction by indole-3-carbinol or flutamide and liver tumor-promoting potential in rats
- 著 者 名 : Shimamoto, K., Dewa, Y., Kemmochi, S., Taniai, E., Hayashi, H., Imaoka, M., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
- 学術雑誌名 : Archives of Toxicology
- 巻・号・頁・発行年 : 85(9):1159-1166, 2011
- 10) 題 目 : Suppressive effect of enzymatically modified isoquercitrin on phenobarbital-induced liver tumor promotion in rats
- 著 者 名 : Morita, R., Shimamoto, K., Ishii, Y., Kuwata, K., Ogawa, B., Imaoka, M., Hayashi, SM., Suzuki, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
- 学術雑誌名 : Archives of Toxicology
- 巻・号・頁・発行年 : 85(11):1475-1484, 2011
- 11) 題 目 : Antioxidant *N*-acetyl-*L*-cysteine (NAC) supplementation reduces reactive oxygen species (ROS)-mediated hepatocellular tumor promotion of indole-3-carbinol (I3C) in rats
- 著 者 名 : Shimamoto, K., Hayashi, H., Taniai, E., Morita, R., Imaoka, M., Ishii, Y., Suzuki, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
- 学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
- 巻・号・頁・発行年 : 36(6):775-786, 2011

- 12) 題 目 : Low-grade myofibroblastic sarcoma of the maxillary region
in a dog
著 者 名 : Tsuchiya, T., Suzuki, K., Hojo, Y., Shiraki, A., Imaoka,
M., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学 術 雜 誌 名 : Journal of Comparative Pathology
卷・号・頁・発行年 : 147(1):42-45, 2012
- 13) 題 目 : Inflammatory fibroid polyp in the duodenum of a common
marmoset (*callithrix jacchus*)
著 者 名 : Yokouchi, Y., Imaoka, M., Sayama, A., Jindo, T. and
Sanbuissho, A.
学 術 雜 誌 名 : Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年 : in press