

レーザー誘起衝撃波の頭部照射による消化管
および腸内環境への影響についての研究

みぞぐち あきのり
溝口 明範

(消化器病学専攻)

防衛医科大学校

令和4年度

目次

第1章 緒言

第1節 軽度頭部爆傷	1
第2節 衝撃波	2
第3節 過敏性腸症候群	3
第4節 脳腸相関	5
第5節 Corticotropin-releasing hormone と消化管機能	5
第6節 過敏性腸症候群と粘膜透過性亢進	6
第7節 過敏性症候群と腸内細菌叢	7
第8節 本検討における仮説と目的	7

第2章 レーザー誘起衝撃波の頭部照射による直腸粘膜への影響の検討

第1節 目的	9
第2節 方法	9
第1項 動物	9
第2項 レーザー誘起衝撃波の頭部照射	10
第3項 直腸粘膜の評価	11
第4項 統計学的処理	12
第3節 結果	12
第4節 小括	12

第3章	レーザー誘起衝撃波の頭部照射による直腸過敏性への影響の検討	
第1節	目的	13
第2節	方法	13
第1項	動物	13
第2項	レーザー誘起衝撃波の頭部照射	13
第3項	直腸過敏性の評価	14
第4項	mRNAの抽出およびRT-PCR法	15
第5項	直腸過敏性の経時的評価	16
第6項	統計学的処理	16
第3節	結果	17
第1項	Colorectal Distention Test	17
第2項	直腸過敏性や直腸壁運動に関わる因子のmRNA発現	17
第3項	レーザー誘起衝撃波の頭部照射1, 2および4週後のColorectal Distention Test	18
第4節	小括	18
第4章	レーザー誘起衝撃波の頭部照射による直腸過敏性亢進の抑制や増悪への影響の検討	
第1節	目的	19
第2節	方法	19
第1項	動物	19

第2項	レーザー誘起衝撃波の頭部照射	20
第3項	直腸過敏性の評価	20
第4項	Corticotropin-releasing hormone の投与	20
第5項	CRHR antagonist astressin の投与	21
第6項	統計学的処理	21
第3節	結果	22
第1項	Corticotropin-releasing hormone の投与	22
第2項	astressin の投与	22
第4節	小括	23
第5章 レーザー誘起衝撃波の頭部照射による腸管透過性亢進への影響の検討		
第1節	目的	24
第2節	方法	25
第1項	動物	25
第2項	レーザー誘起衝撃波の頭部照射	25
第3項	腸管透過性亢進の評価	25
第4項	mRNA の抽出および RT-PCR 法	26
第5項	統計学的処理	26
第3節	結果	27
第1項	門脈血清中 fluorescein isothiocyanate dextran 4kDa 量	27
第2項	タイトジャンクション系タンパク質の mRNA 発現	27

第4節 小括	27
第6章 レーザー誘起衝撃波の頭部照射が腸内細菌叢に与える影響の検討	
第1節 目的	28
第2節 方法	28
第1項 動物	28
第2項 レーザー誘起衝撃波の頭部照射	28
第3項 糞便の採取	29
第4項 遺伝子学的な腸内細菌叢の解析	29
第5項 統計学的処理	29
第3節 結果	30
第1項 腸内細菌の多様性	30
第2項 腸内細菌の相対豊富度	31
第4節 小括	31
第7章 考察	32
第8章 結論	38
謝辞	39

略語一覽	40
附記	42
参考文献	43
図表	55

第1章 緒言

第1節 軽度頭部爆傷

テロリズムによる攻撃は、2014年をピークに2019年には世界で14,000人以上の犠牲者が発生している[1]。近年はテロリストによる即席爆発装置の使用が頻発しており、その結果、爆風による外傷性脳損傷 (blast-induced traumatic brain injury : bTBI) の割合が増加している[2,3]。イラク戦争における外傷性脳損傷の98%は爆風によるものであった[4]。低エネルギーの爆発装置もしくは爆発点より比較的距離をおいて受傷した患者のほとんどは、Computed Tomography (CT) 検査やMagnetic Resonance Imaging (MRI) 検査で急性期の異常所見がないことから軽症と診断される[5,6]。しかし頭痛、動悸、倦怠感の他、過敏性腸症候群 (Irritable bowel syndrome : IBS) の症状に類似した便秘や下痢などの持続的な消化器症状を呈する患者が意識消失を伴った軽度bTBIの患者が多かったという報告がある[2]。加えて心的外傷後ストレス障害、抑うつ、不安などの心理的变化がみられ[7-9]、外傷性脳損傷 (traumatic brain injury : TBI) と診断された退役米軍人の89%が精神科の診断を受けたとの報告があり[3]、これらの精神症状は社会的な問題となっている。

bTBIは複雑な効果が作用することで受傷することがわかっている。その受傷機転から1から4次爆傷に分類される。1次爆傷は爆風そのものに起因した衝撃波による直接的な損傷、2次爆傷は爆発物の飛散や爆発により推進された物体による損傷、3次爆傷は爆風により吹き飛ばされた受傷者が地面や物

体などに衝突することで生じる損傷，4次爆傷はその他であり熱傷，化学物質による損傷や被曝による損傷などを含む[10]．2，3および4次爆傷はbTBIに特異的なものではないためその病態生理は比較的報告があるものの，1次爆傷に関しては未だに解明されていないことが多い．

第2節 衝撃波

衝撃波とは，物理現象が起きた際に媒質の急激な圧力変化により流体中を伝播する変化のことであり，圧力波の一種である．爆傷においては，爆発により急激な空気圧変化が生じ，それが爆発点から離れた地点に到達することで生体に影響を与える[11]．爆発による衝撃波は，圧上昇が極めて速く，ピーク圧が高いという特徴を持つ[12]．衝撃波による頭部へのダメージの特徴は直撃損傷 (coup injury) や対側損傷 (contrecoup injury) ，回転性損傷がなくとも神経外傷を誘発することである[13]．

これまでにbTBI動物モデルとして微小な爆発を頭部付近で発生させたモデル[14]，Shock tube を用いたモデル[15]，Blast tube を用いたモデル[16]，エアージェンを用いたモデル[17]などが報告されているが，2，3および4次爆傷を完全に排除することや再現性高くエネルギーをターゲット臓器に伝播させることが困難であった．1次爆傷によるTBI，特に衝撃波による影響を観察するためには頭部にのみ衝撃波だけを伝播させることが重要である．近年，本校からレーザーにより衝撃波を誘起 (Laser-induced shock wave : LISW) したモデルが開発された[18]．このモデルは2，3および4次爆傷の影響を完全に排除す

ることができ、かつ頭部にのみ衝撃波を伝播させることができる。LISW による頭部爆傷の病態生理は、詳細は未だわかってはいないものの、全身の生理的パラメータに明確な変化が認められない条件下においても、脳波の抑制、低酸素血症状態やミトコンドリアのエネルギー障害を示す信号変化が観察されたと報告されている[12]。LISW を用いると軽症の bTBI モデルを再現性高く作製することができ、その病態生理解明に期待されている。

第3節 過敏性腸症候群

IBS とは少なくとも診断の 6 カ月以上前に症状が出現し、腹痛が最近 3 カ月で週に 1 日以上あり、① 排便に関連している、② 排便回数の変化に関連している、③ 便形状(外観)の変化に関連している、といった特徴を 2 項目以上認めるものと定義されている。加えてその原因が悪性腫瘍や炎症性腸疾患といった器質的疾患によるものではないものである[19]。本邦の有病率は 6.1～14.2%、女性の方が 1.2～1.7 倍多いとの報告がある[20-23]。IBS 患者の便形状は様々であり、その形状に応じて便秘型 (IBS-C)、下痢型 (IBS-D)、混合型 (IBS-M)、分類不能型 (IBS-U) の 4 型に分類される[19]。

IBS の病因は、これまでに、感染性腸炎[24]、腸内細菌[25]、心理学的異常[26]、遺伝[27]などが提唱されてきたが、ストレス[28]の関与が非常に重要であることがわかっている。特に近年は脳と消化管の機能を統合する双方向性の神経・内分泌性コミュニケーションシステムの障害により、症状が発現するという脳腸相関の関与が注目されている[29,30]。つまり、ストレスが脳腸

相関に影響を与え、消化管運動の異常や内臓知覚過敏、腸管透過性亢進や微小炎症に影響を与え、**IBS** としての症状が出現すると考えられ、上述した軽症の頭部外傷もその原因となっている可能性がある。

便通異常は排便回数や便の性状により評価可能であるが、内臓知覚過敏は自覚症状によるところが大きく、問診による聴取での評価が中心である。内臓知覚の異常を直接検出する方法としてバロスタット法が導入された[31]。これは被検者に経肛門的に大腸内にバルーンバッグを挿入し、それを加圧することで大腸に伸展刺激を加え、疼痛刺激が生じたバルーンバッグ径や内圧を測定する **Colorectal distension (CRD) test** により評価する方法である。**IBS** 患者は健常者と比較して大腸の感覚過敏があり、痛覚は低い閾値を示す[31]。バロスタット法はその後動物実験に応用され、ラットの大腸伸展刺激の評価が可能になった[32]。

IBS の病態モデルはこれまでにストレスにより惹起させるものと炎症により惹起させるものが報告されている。ストレスによるものは身体拘束モデル[33]や水回避モデル[34]、幼少期早期に母子分離させるモデル[35]などがある。炎症によるモデルは感染性腸炎後 **IBS** や炎症性腸疾患の寛解期にみられる **IBS** 症状残存のモデルとしては最適かもしれないが、それが全てではないため、近年はストレスによるモデルが使用されることが多い。

第4節 脳腸相関

IBS 患者の消化器症状はストレス曝露時に増悪する。ストレス曝露時には大腸運動の亢進が見られ、大腸平滑筋電図のスパイク状電位活動の亢進がみられた[36]。また IBS 患者の脳波の解析では power spectra において α power の減衰と β power の増強がみられ、中枢神経の感受性が亢進していた[37]。また functional MRI による機能的脳活動の評価では、IBS 患者では直腸の刺激で異常な脳活動が島皮質、前頭前野、視床、上側頭回、右下頭頂小葉で惹起されたと報告されている[38,39]。このように脳と消化管は機能的に深く関連しており、脳腸相関と呼ばれている。IBS の病態生理の重要部分を占めているのは脳腸相関であると考えられている[26]。

第5節 Corticotropin-releasing hormone と消化管機能

Corticotropin-releasing hormone (CRH) は 41 のアミノ酸からなるペプチドホルモンである。視床下部から分泌され、下垂体門脈を介して下垂体前葉に到達し、Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) の放出を促す。これにより副腎からの glucocorticoid の分泌が刺激され、ストレス反応を引き起こす。これは HPA 軸 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis) とよばれ、代謝や免疫に影響を及ぼすことがわかっている。CRH の受容体である CRH receptor (CRHR) は、下垂体前葉のみではなく腸管壁内神経叢をはじめ様々な細胞や臓器に発現している[40]。CRH を IBS 患者に投与すると健常者に比較して有意に大腸の壁運動

が亢進し、腹部症状が増悪する[41]。これはラットの IBS モデルでも再現されている[42,43]。

CRHR には type 1 (CRHR1) と type 2 (CRHR2) があり[44]，それを介して様々な生理作用を引き起こす。IBS モデルラットに CRHR1 の選択的 agonist を投与すると消化管運動が促進されるが，CRHR2 の選択的 agonist の投与では変化はなく，加えて，CRH と CRHR1 の選択的 antagonist をともに投与すると消化管運動促進は認めなかった。つまり CRHR1 はストレスに関連した大腸壁運動亢進や壁伸展の感覚の過敏性亢進に関与しているということがいくつかの研究で明らかになっている[45–47]。さらに大腸の壁運動において CRHR2 のシグナルは CRHR1 の作用を抑制し[48]，大腸の CRHR は IBS の症状の発現に重要な因子となっていると考えられている。

第 6 節 過敏性腸症候群と粘膜透過性亢進

腸は栄養成分や水分といった生命維持に必要な物質を吸収する。それと同時に管腔内の病原体や抗原に常に曝露されており，これらを適切に排除するためのバリア機構を有している。腸管バリア機能は物理的バリア，環境バリア，生物学的バリアの 3 つに大別される。その中でも物理的バリアのうちタイトジャンクションは不要な物質の排除とともに細胞外経路を介したイオンや分子，タンパク質や脂質の移動を司る最も重要な因子の一つである[49]。タイトジャンクションの構造は，膜貫通型タンパク質の細胞質ドメインが zonula occludens (ZO)-1 protein などの細胞内の裏打ちタンパク質に結合し

細胞骨格アクチンフィラメントに固定されている[50]. IBS 患者の盲腸では ZO-1 をはじめとする裏打ちタンパク質の messenger ribonucleic acid (mRNA) 発現が低下しており, 消化管粘膜透過性が亢進していることがわかっている [51].

第7節 過敏性症候群と腸内細菌叢

IBS では健常者と比較すると腸内細菌叢が異なることがわかっている. *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Bacteroides* が増加し, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* が減少していたという報告がある[52]. 特に *Bifidobacterium* はプロバイティクスとして用いられ, 奏効している[53]. しかし, IBS の病態は腸内細菌叢の変化だけで一元的に説明できるわけではなく, プロバイオティクスの投与が全ての IBS 患者に効果があるわけではない. 現在, 次世代シーケンサーによる解析がさかんに行われており, 新薬の開発や患者プロファイル等に期待されている.

第8節 本検討における仮説と目的

本研究では, bTBI を受けたヒトでは IBS に特徴的な下痢・腹痛・便秘といった消化器症状が出現することがあることに注目し, LISW による bTBI ラットモデルでも IBS と同様の病態生理が生じているのではないかという仮説を立てた. そのため, IBS の主要病態である内臓知覚過敏が本モデルにおいて生じているかを検討した. 加えて脳腸相関が病態に関与しているかを, CRH や, CRHR の antagonist が IBS の症状に関与していることに注目し, これら

を投与することで内臓知覚に影響するのかを検討した。さらに **IBS** では粘膜透過性亢進や腸内細菌叢の変化が生じていることに注目し、本モデルで同様の変化が生じているのかを検討した。

第2章 レーザー誘起衝撃波の頭部照射による直腸粘膜への影響の検討

第1節 目的

IBS は器質的疾患の除外が必要であることから、bTBI ラットモデルに IBS と同様の病態生理が生じていることを示すには、まず器質的疾患の除外が必要である。bTBI による消化管粘膜障害の誘発が消化器症状の原因となっている可能性も否定できないため、LISW による bTBI ラットモデルを用いて直腸に粘膜障害が生じていないことを確認することを目的とした。

第2節 方法

第1項 動物

9 週齢 (230~270 g) の Wistar 系雄系ラット (日本 SLC, 静岡) を用いた。プラスチックゲージに 3~4 頭ずつ飼育し、温度 21~23°C、湿度 55%、12 時間ごとの明暗サイクルの環境下で飼育した。実験は入荷後最低 4 日間の馴化期間を経た後に開始し、ラットの飼育は、防衛医科大学校実験動物に関するガイドラインに従い、標準実験食 (日本クレア, 東京) を与え、餌と水は自由に摂取させた。また全ての実験計画は防衛医科大学校の動物実験倫理委員会の承認を得て行った (No. 18011)。

第2項 レーザー誘起衝撃波の頭部照射

LISW の発生方法についての簡略図を図 1A に示す。レーザーを黒色天然ゴムに照射すると熱膨張し衝撃波が生じる。それを polyethylene terephthalate (PET) 樹脂でできたシートで蓋をすることで衝撃波を組織に伝えることができる。レーザーは Q-switched Nd: YAG レーザー (Brilliant B, Quantel, フランス共和国) により発生させた。条件はパルス幅 6 ns FWHM, 波長 532 nm とし, 1 回照射量は 2.4 J/cm^2 とした。直径 8 mm, 厚さ 0.5 mm の円形の天然ゴムを, 1 辺 1 cm, 厚さ 1 mm の正方形の PET 樹脂に接着したものをアタッチメントとして用いた。

ラットはイソフルラン吸入用麻酔 (和光純薬工業, 大阪) を用いて 4% の濃度で導入麻酔し, レーザー装置に固定した。その後維持麻酔は 2% の濃度で行い, 頭部を十分に剃毛した。両耳介を結ぶ線上に, 正中線から左右対称に間隔 5 mm, さらに各点から前方 5 mm の部位に, 脳全体をカバーするように 4 点のマーキングを行った (実際のマーキング写真を図 1B に, 模式図を図 1C として示した)。その後, ゼリー (超音波検査用プロゼリー, ジェクス, 大阪) を少量天然ゴム部に塗布し, 天然ゴムの円の中心にマーキングが来るように圧着させた。レーザーを天然ゴムの中央に照射し LISW を発生させ, これを各マーキングに 1 発ずつ, 合計 4 回繰り返した。これを LISW 群 ($n = 6$) とした。sham 操作として, 同様に導入麻酔, 剃毛とマーキングを行い, レーザーの照射は行わずにゲージに戻した。なお, sham 操作の維持麻酔時間は LISW 群の維持麻酔時間と整合性をとるために,

およそ 10 分とした。これを SHAM 群 (n = 6) として対照群とすることとした。

第 3 項 直腸粘膜の評価

LISW 照射もしくは sham 操作を行った 3 日後にラットをイソフルラン吸入により安楽死させ、直腸を摘出した。長軸方向に切開し、直ちに 10% 中性緩衝ホルマリン液 (pH 7.4, 和光純薬工業, 大阪) で固定を行い、パラフィン包埋し、切片を作成、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行った。炎症の程度は、MacPherson らが報告した大腸炎の評価法をもとに[54], grade 1: 正常粘膜, grade 2: 炎症性粘膜, 点状出血, 粘液の増加あり, grade 3: 直径 7 mm までの潰瘍性領域あり, 縦走ひだ基部のスリット状病変あり, grade 4: 直径 15~30 mm のびまん性潰瘍あり, 炎症性ポリープ様の粘膜残存あり, grade 5: 直径 45 mm までのびまん性の深い潰瘍あり, 潰瘍底は線維組織と顆粒状物質で覆われており, 新鮮出血なし, grade 6: 穿孔に近い深い潰瘍あり, と定義してスコアリングした。判定は検体を盲検化した上で, 2 名の実験者により行った。

また潰瘍形成には至らない軽微な炎症変化を評価することを目的に, Cameron らが報告した評価法をもとに[55], 光学顕微鏡 (BZ-X810, Keyence, 大阪) 200 倍で 1 検体につき, 5 カ所撮影し, 粘膜面積をトレースして計測し, 粘膜内の単核球数を測定し平均値を比較した。

第4項 統計学的処理

各データは平均値 ± 標準誤差で表した。各群間の比較分析では Levene の等分散性検定を用いて、データの同時性を調べた。等分散の群間では Student's t-test を用いた。スコアの比較には Wilcoxon rank-sum test を用いた。統計解析には JMP PRO software ver.15.2.0 (SAS Institute, アメリカ合衆国) を用い、p 値 0.05 未満を統計学的有意差ありとした。

第3節 結果

HE 染色を行った直腸組織像を図 2A に示す。SHAM 群、LISW 群ともに潰瘍形成、びらん、陰窩膿瘍、胚細胞の消失はなかった。大腸炎のスコア (図 2B) は SHAM 群が 1.17 ± 0.11 、LISW 群が 1.27 ± 0.13 であり有意差を認めなかった ($p = 0.53$)。粘膜内の単核球数 (図 2C) に関しては、SHAM 群が 1 mm^2 あたり 2003 ± 169 個、LISW 群が 1932 ± 151 個と有意差を認めなかった ($p = 0.76$)。

第4節 小括

LISW を照射した 3 日後のラットの直腸には粘膜障害は生じていなかった。また軽微な炎症を示唆するような粘膜内への単核球の浸潤は増加していなかった。

第3章 レーザー誘起衝撃波の頭部照射による直腸過敏性 への影響の検討

第1節 目的

軽症の bTBI 動物モデルにおいて消化管の内臓知覚過敏に与える影響をみた報告はこれまでにない。今回、LISW による bTBI ラットモデルを用いて直腸における内臓感覚に変化が生じているのかをバロスタット法を用いることで検討した。また大腸の CRHR は IBS の症状の発現に重要な因子となっていると考えられているため、本モデルでその変化が生じているかを確認するため直腸組織の CRHR の mRNA 発現を定量することで評価した。

第2節 方法

第1項 動物

使用動物および飼育環境や方法は、第2章 第2節 第1項と同様である。また全ての実験計画は防衛医科大学校の動物実験倫理委員会の承認を得て行った (No. 18011)。

第2項 レーザー誘起衝撃波の頭部照射

レーザーの条件や LISW の発生方法、ラットへの照射方法、sham 操作に関しては第2章 第2節 第2項と同様である。

第3項 直腸過敏性の評価

内臓感覚異常を定量する方法であるバロスタット法のうち、CRD test による評価を行った。イソフルラン吸入用麻酔を用いて 4%の濃度で麻酔し、腹壁が観察しやすいように剃毛を行った。透明アクリルケースに入れ、内視鏡用潤滑ゼリー (スループロゼリー, カイゲンファーマ, 東京)を塗布した直径 2 cm のバルーン付きカテーテルを愛護的に経肛門的に挿入し、バルーン中心がおよそ直腸に位置するように調整し、尾根部でテープ固定した。その後、イソフルランの麻酔効果が完全に消失するまで 15 分間静置した。バルーン付きカテーテルは Distender Series IIR (G & J Electronics, Ontario, カナダ) により制御し、0 mmHg から開始し、60 mmHg まで 1 mmHg/sec で加圧した。ラットの腹筋が疼痛刺激で収縮し始める圧 abdominal withdrawal reflex (AWR) を視覚的に測定した。加圧中は動画撮影し記録を行い、最低 5 回行った。また CRD test の間隔を 5 分以上空けた。AWR は、① 腹筋の収縮 (腹筋の単発の収縮)、② 腹部のつり上げ (腹壁がアーチ状になるような運動、波打つような周期的な腹筋運動)、③ 逃避行動 (体幹を反るような大きな運動、足を突っ張る、暴れる)を評価項目として定義し、動画は盲検化し 2 人の実験者により評価しその平均を算出した。LISW の照射を行ったラットを LISW 群 (n = 6)、sham 操作を行った群を SHAM 群 (n = 6) とした。LISW 照射もしくは sham 操作の前日 (pre) および 3 日後 (post) に CRD test により AWR を評価し、比較検討した。

第4項 mRNAの抽出およびRT-PCR法

直腸における mRNA の発現を reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて評価した。LISW 照射もしくは sham 操作後 5 日後にイソフルラン吸入により安楽死させ、肛門より 2 cm 口側の直腸を採取し、RNAlater (Thermo Fisher Scientific, MA, アメリカ合衆国) へ浸漬した後、 -20°C で保管した。組織のホモジナイズには MagNA Lyser (Roche, Basel, スイス連邦) を 6,500 rpm 50 秒の条件で使用した。ホモジナイズ後は RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, ドイツ連邦共和国) を用いて RNA 抽出し、分光光度計 (Gene Quant, GE Healthcare, IL, アメリカ合衆国) で濃度測定した後、そのうち 1.5 μg を DNase \cdot RNase free water (Thermo Fisher Scientific) で希釈して 14 μl の水溶液を作製し逆転写反応に使用した。逆転写反応は RNA 水溶液 14 μl , Random Primer 1.25 μl (タカラバイオ, 滋賀), SuperScript II Reverse Transcriptase 1 μl (Thermo Fisher Scientific), dNTP Mixture 0.625 μl (タカラバイオ), RNasin 0.625 μl (Promega, WI, アメリカ合衆国), DTT 2.5 μl (Thermo Fisher Scientific), First Strand Buffer 5 μl (Thermo Fisher Scientific) を混合した後, Gene Amp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を使用して行った。反応条件は 25°C 15 分, 42°C 15 分, 48°C 30 分, 20°C 15 分で行い, 終了後に complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) を得た。

cDNA を得た後, RT-PCR 法を行った。1 検体あたり cDNA 3 μl (9 ng), プローブ 2 μl , qPCR Mastermix (Eurogentec, Seraing, ベルギー王国) 5 μl

を混合して 384 well プレートに配置し，triplicate で評価した．housekeeping gene として ACTB (Rn00667869, Thermo Fisher Scientific) を設定し，primer probe として Crhr1 (Rn00578611, Thermo Fisher Scientific)，Crhr2 (Rn00575617, Thermo Fisher Scientific) を使用した．装置は Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System，SDS software version 2.4 (Thermo Fisher Scientific) を使用し，50°C 2 分，95°C 10 分，95°C 15 秒，60°C 1 分の条件のもと，40 サイクル繰り返す設定とした．結果の解析には RQ Manager 1.2.2 (Thermo Fisher Scientific) を使用し， $\Delta\Delta C_t$ 法によって評価した．LISW 照射後のラットから採取した検体を LISW 群 (n = 6)，sham 操作後のラットから採取した検体を SHAM 群 (n = 6) とし比較検討した．

第 5 項 直腸過敏性の経時的評価

CRD test を行い AWR の計測を行った 1 週後に LISW 照射を行った (n = 4)．その 1，2 および 4 週後にも CRD test を行い，AWR を計測した．

第 6 項 統計学的処理

各データは平均値 ± 標準誤差で表した．各群間の比較分析では Levene の等分散性検定を用いて，データの同時性を調べた．等分散の群間では Student's t-test を用いた．対応のあるデータについては paired Student's t-test を行った．p 値 0.05 未満を統計学的有意差ありとした．

第3節 結果

第1項 Colorectal Distention Test

各群の pre と post での個々の変化を図 3A に示す。腹筋の収縮は SHAM 群では pre は 30.5 ± 1.3 mmHg, post で 32.9 ± 0.9 mmHg に対し, LISW 群では pre は 31.3 ± 1.5 mmHg, post では 22.0 ± 2.1 mmHg であった。腹部のつり上げは SHAM 群では pre は 40.4 ± 1.1 mmHg, post で 44.0 ± 1.1 mmHg に対し, LISW 群では pre は 42.2 ± 1.7 mmHg, post では 30.4 ± 1.8 mmHg であった。逃避行動は SHAM 群では pre は 50.6 ± 1.0 mmHg, post で 53.3 ± 1.0 mmHg に対し, LISW 群では pre は 52.4 ± 1.0 mmHg, post では 40.3 ± 1.8 mmHg であった。これらの結果を post から pre を引いた変化量として図 3B に示した。腹筋の収縮は SHAM 群では 2.4 ± 0.6 mmHg であったのに対し, LISW 群では -9.4 ± 1.1 mmHg と有意に低下していた ($p < 0.01$)。腹部のつり上げは SHAM 群では 3.5 ± 1.1 mmHg であったのに対し, LISW 群では -11.8 ± 0.9 mmHg と有意に低下していた ($p < 0.01$)。逃避行動は SHAM 群では 2.7 ± 0.8 mmHg であったのに対し, LISW 群では -12.1 ± 1.3 mmHg と有意に低下していた ($p < 0.01$)。

第2項 直腸過敏性や直腸壁運動に関わる因子の mRNA 発現

SHAM 群と LISW 群の CRHR1 および CRHR2 の mRNA の発現量を図 3C に示す。CRHR1 の発現量は SHAM 群では 1.06 ± 0.31 であったのに対し, LISW 群では 2.31 ± 0.37 と有意に高かった ($p = 0.026$)。CRHR2 の発現量は

SHAM 群では 1.02 ± 0.09 であったのに対し、LISW 群では 0.75 ± 0.08 と有意に低かった ($p = 0.045$) .

第 3 項 レーザー誘起衝撃波の頭部照射 1, 2 および 4 週後の Colorectal Distention Test

腹筋の収縮, 腹部のつり上げ, 逃避行動の経時的変化を図 3D に示す. どの観察項目も LISW 照射 1 週後にみられた閾値の低下が 4 週間まで継続していた. 腹筋の収縮は pre が 33.6 ± 1.3 mmHg であったのに対し, 4 週間後では 24.3 ± 2.2 mmHg ($p = 0.011$), 腹部のつり上げは pre が 43.3 ± 2.4 mmHg であったのに対し, 4 週間後では 35.2 ± 2.1 mmHg ($p = 0.044$), 逃避行動は pre が 52.8 ± 1.2 mmHg であったのに対し, 4 週間後では 43.4 ± 1.1 mmHg ($p < 0.001$) と, どの観察項目においても閾値が有意に低下していた.

第 4 節 小括

LISW を頭部照射したラットは CRD test における AWR は閾値が低下していた. この効果は少なくとも 4 週間まで持続していた. またその直腸組織内における CRHR1 の mRNA 発現量は増加し, CRHR2 の mRNA 発現量は減少していた.

第4章 レーザー誘起衝撃波の頭部照射による直腸過敏性 亢進の抑制や増悪への影響の検討

第1節 目的

LISW を頭部照射すると直接粘膜障害は生じずに直腸の過敏性が亢進することがわかった。また、直腸組織の CRHR1 の mRNA の発現増加と CRHR2 の mRNA の発現減少がみられた。既報の他の IBS 動物モデルでは、CRH を投与すると大腸膨満刺激に対する腹痛反応が増強し、CRHR の antagonist を投与すると CRH 投与時の内臓知覚過敏が抑制される[43,56]。本モデルにおいても同様の反応がみられるのかを CRH (BACHEM, Bubendorf, スイス) と CRHR の antagonist である astressin (BACHEM) を用いて、CRD test での AWR を測定することで検討した。

第2節 方法

第1項 動物

使用動物および飼育環境や方法は、第2章 第2節 第1項と同様である。また全ての実験計画は防衛医科大学校の動物実験倫理委員会の承認を得て行った (No. 18011)。

第2項 レーザー誘起衝撃波の頭部照射

レーザーの条件や LISW の発生方法，ラットへの照射方法，sham 操作に関しては第2章 第2節 第2項と同様である。

第3項 直腸過敏性の評価

CRD test の方法は第3章 第2節 第3項と同様である。第2章より AWR の評価項目はどれも同じような傾向となることに加え，動物に必要な以上の苦痛を与えることを避けるため，本章では逃避反応として最初に出現する腹筋の収縮のみを観察項目とし，腹筋の収縮が十分に見られたらそれ以上の加圧を行わずに終了した。それ以外の AWR の測定方法は同様である。LISW 照射もしくは sham 操作の前日 (pre) および3日後 (post) に CRD test により AWR を評価し，比較検討した。

第4項 Corticotropin-releasing hormone の投与

CRH の投与方法および投与量については既報を参考に行った[46]。即ち CRH を生理食塩水で 10 µg/ml の濃度になるように溶解し，CRD test の30分前に 1 ml/kg 腹腔内投与した。CRH の対照として同量の生理食塩水のみを腹腔内投与した。これを LISW 頭部照射したラットと sham 操作したラットにそれぞれ行い (図 4A)，SHAM + VEHICLE 群 (sham 操作と生理食塩水のみを腹腔内投与した群，n = 4)，SHAM + CRH 群 (sham 操作と CRH 10 µg/kg を腹腔内投与した群，n = 4)，LISW + VEHICLE 群 (LISW 頭部照射と

生理食塩水のみを腹腔内投与した群, n = 6), LISW + CRH 群 (LISW 頭部照射と CRH 10 µg/kg を腹腔内投与した群, n = 6) の 4 群で比較検討した.

第 5 項 CRHR antagonist astressin の投与

astressin の投与方法および投与量については既報を参考に行った[46]. 即ち astressin を純水で 33 µg/ml の濃度になるように溶解し使用直前で pH 7.0 になるように調整した. LISW 頭部照射の 30 分前に 1 ml/kg 腹腔内投与した. 対照群には astressin の溶液である純水を同量腹腔内投与した. sham 操作を行うラットには純水を同量腹腔内投与した (図 4B). すなわち, SHAM + VEHICLE 群 (Sham 操作と純水を腹腔内投与した群, n = 7), LISW + VEHICLE 群 (LISW 頭部照射と純水を腹腔内投与した群, n = 7), LISW + ASTRESSIN 群 (LISW 頭部照射と astressin 33 µg/kg を腹腔内投与した群, n = 7) の 3 群で比較検討した.

第 6 項 統計学的処理

各データは平均値 ± 標準誤差で表した. 多群間の比較には Tukey's test を使用した. p 値 0.05 未満を統計学的有意差ありとした.

第3節 結果

第1項 Corticotropin-releasing hormone の投与

各群の pre と post での個々の変化を図 4C に示す. SHAM + VEHICLE 群では pre は 33.0 ± 1.8 mmHg, post で 31.1 ± 1.4 mmHg, SHAM + CRH 群では pre は 32.0 ± 1.3 mmHg, post で 23.1 ± 1.3 mmHg, SHAM + VEHICLE 群では pre は 33.0 ± 1.8 mmHg, post で 31.1 ± 1.4 mmHg, LISW + VEHICLE 群では pre は 32.8 ± 1.7 mmHg, post で 22.8 ± 0.8 mmHg, LISW + CRH 群では pre は 35.5 ± 2.8 mmHg, post で 12.9 ± 1.5 mmHg であった. これらの結果を post から pre を引いた変化量として図 4D に示した. SHAM + VEHICLE 群では -1.8 ± 1.3 mmHg であったの対し, SHAM + CRH 群では -8.9 ± 1.1 mmHg, LISW + VEHICLE 群では -10.0 ± 1.5 mmHg, LISW + CRH 群では -22.6 ± 2.9 mmHg であった. LISW + CRH 群は LISW + VEHICLE 群と比較して有意に閾値が低下していた ($p < 0.001$). SHAM + CRH 群と LISW + VEHICLE 群との比較では閾値の低下に有意差はなかった ($p = 0.97$).

第2項 astressin の投与

各群の pre と post での個々の変化を図 4E に示す. SHAM + VEHICLE 群では pre は 29.2 ± 1.3 mmHg, post で 32.0 ± 1.0 mmHg, LISW + VEHICLE 群では pre は 30.0 ± 1.7 mmHg, post で 20.9 ± 1.0 mmHg, LISW + ASTRESSIN 群では pre は 32.6 ± 2.1 mmHg, post で 33.3 ± 2.0 mmHg であった. これら

の結果を post から pre を引いた変化量として図 4F に示した。SHAM + VEHICLE 群では -2.7 ± 1.7 mmHg, LISW + VEHICLE 群では -9.1 ± 1.0 mmHg であったのに対し, LISW + ASTRESSIN 群では 0.7 ± 1.9 mmHg であった。LISW + ASTRESSIN 群は LISW + VEHICLE 群と比較して有意に閾値の低下を抑制していた ($p < 0.01$)。LISW + ASTRESSIN 群と SHAM + VEHICLE 群とで比較すると閾値の低下に有意差はなかった ($p = 0.64$)。

第4節 小括

LISW 頭部照射したラットに CRH を投与すると直腸過敏性がさらに増悪した。LISW 頭部照射と CRH 投与では直腸過敏性の亢進の程度に有意差を認めなかった。また astressin を LISW 頭部照射前に投与すると直腸過敏性亢進が抑制された。以上より, 本モデルにおける直腸過敏性の亢進は直腸の CRHR の関与が示唆された。

第5章 レーザー誘起衝撃波の頭部照射による腸管透過性 亢進への影響の検討

第1節 目的

LISW 頭部照射を行ったラットでは、CRH や CRHR の関与が示唆される直腸の過敏性亢進を認めることがわかった。これは IBS の病態生理と類似しており、LISW 頭部照射ラットは IBS モデルとして有用である可能性が示唆された。IBS 患者の盲腸では ZO-1, occludin をはじめとする裏打ちタンパク質の mRNA 発現が低下しており、消化管粘膜の透過性が亢進していることがわかっており[51]。また多くの場合、小腸の透過性亢進が大腸の粘膜透過性亢進に先行し[57]、また小腸透過性と IBS の重症度には正の相関がある[58]。

本モデルでも同様に消化管粘膜の透過性亢進がみられるのかを小腸バリア機能の細胞間隙透過性マーカーである fluorescein isothiocyanate dextran 4kDa (FITC-4kDa) を管腔内に投与し、門脈血の血清内の濃度を測定することで評価した。また回腸末端のタイトジャンクション系タンパク質の mRNA の発現量を測定することで評価し、検討した。

第2節 方法

第1項 動物

使用動物および飼育環境や方法は、第2章 第2節 第1項と同様である。また全ての実験計画は防衛医科大学校の動物実験倫理委員会の承認を得て行った (No. 18011)。

第2項 レーザー誘起衝撃波の頭部照射

レーザーの条件や LISW の発生方法，ラットへの照射方法，sham 操作に関しては第2章 第2節 第2項と同様である。

第3項 腸管透過性亢進の評価

小腸内への FITC-4kDa の投与量を安定させるため経胃・経十二指腸投与を行った。LISW 頭部照射もしくは sham 操作を行った5日後のラットに対し12時間絶食させた後，塩酸メドミジン 0.75 mg/kg，ミダゾラム 4 mg/kg，酒石酸ブトルファンール 5 mg/kg の3種混合薬で麻酔を行い，開腹して胃および十二指腸を露出させた。その後，前胃に小さな孔をあけ，カテーテルを挿入し，十二指腸まで先端をすすめた。逆流しないように先端より5 mm程度口側を4-0号絹糸で血管を避けるように注意しながら結紮固定した。その後0.1 mmol/lに調整した FITC-4kDa 10 mlをゆっくりと管腔内投与した。30分後に門脈から採血し，その血液を3,000 rpm 5分の条件で遠心し，血清を得た。これの蛍光検出量を SpectraMax Gemini EM

(Molecular Devices, CA, アメリカ合衆国) を用いて測定した。計測は 480 ~535 nm の波長で行い, スタンダードサンプルから検量線を作成し, FITC-4kDa 量を算出した。LISW を頭部照射したラットから採取した検体を LISW 群 (n = 4), sham 操作を行ったラットから採取した検体を SHAM 群 (n = 4) として比較検討した。

第 4 項 mRNA の抽出および RT-PCR 法

回腸末端における mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて評価した。LISW 照射もしくは sham 操作後 5 日後にイソフルラン吸入により安楽死させ, 回腸末端を採取した。検体の処理や cDNA の作成方法, RT-PCR 法の条件は第 3 章 第 2 節 第 4 項と同様である。primer probe として occludin (Rn00580064, Thermo Fisher Scientific), ZO-1 (Rn02116071, Thermo Fisher Scientific) を使用した。LISW 照射後のラットから採取した検体を LISW 群 (n = 7), sham 操作後のラットから採取した検体を SHAM 群 (n = 6) とし比較検討した。

第 5 項 統計学的処理

各データは平均値 ± 標準誤差で表した。各群間の比較分析では Levene の等分散性検定を用いて, データの同時性を調べた。等分散の群間では Student's t-test を用いた。分散が異なる群間では Welch's test を用いた。p 値 0.05 未満を統計学的有意差ありとした。

第3節 結果

第1項 門脈血清中 fluorescein isothiocyanate dextran 4kDa 量

門脈血清中の FITC-4kDa 濃度を測定したところ、SHAM 群では 258.0 ± 31.6 ng/ml であったが、LISW 群では 483.3 ± 24.3 ng/ml と有意に上昇していた ($p = 0.0013$) .

第2項 タイトジャンクション系タンパク質の mRNA 発現

回腸末端の occludin の mRNA の発現量は、SHAM 群は 1.16 ± 0.10 、LISW 群では 0.91 ± 0.07 であり、LISW 群の方が低い傾向にあった ($p = 0.051$) . ZO-1 では SHAM 群は 1.06 ± 0.04 、LISW 群では 0.86 ± 0.06 であり、LISW 群の方が有意に低かった ($p = 0.012$) .

第4節 小括

LISW 頭部照射したラットに対し、小腸に FITC-4kDa を投与すると門脈血清中の濃度が上昇しており、小腸粘膜細胞間隙からの FITC-4kDa の移動が亢進していた。また回腸末端でのタイトジャンクション系タンパク質の mRNA 発現が低下していた。以上より、本モデルでもヒト IBS と同様に小腸での腸管透過性亢進が生じていた。

第6章 レーザー誘起衝撃波の頭部照射が腸内細菌叢に与える影響の検討

第1節 目的

IBSの腸内細菌叢は健常者と異なり、IBS-C、IBS-D、IBS-Mによっても細菌叢構造が異なる[59]。細菌叢の多様性に関してはIBSの患者で減少しており[60,61]、またIBS患者に健常者の糞便を移植すると症状を改善したとの報告がある[62]。このように病態生理には腸内細菌叢が関わっているとされているが詳細は未だ解明されていない。本章ではLISW頭部照射したラットの糞便中の細菌叢の変化を検討した。

第2節 方法

第1項 動物

使用動物および飼育環境や方法は、第2章 第2節 第1項と同様である。また全ての実験計画は防衛医科大学校の動物実験倫理委員会の承認を得て行った(No. 18011)。

第2項 レーザー誘起衝撃波の頭部照射

レーザーの条件やLISWの発生方法、ラットへの照射方法、sham操作に関しては第2章 第2節 第2項と同様である。

第3項 糞便の採取

LISW 照射前日, 3 日後, 7 日後の新鮮な便を採取し, 速やかに -80°C で保存した. 前日に採取した便を PRE 群 ($n = 6$), LISW 頭部照射 3 日後に採取した便を 3 DAYS 群 ($n = 6$), LISW 頭部照射 7 日後に採取した便を 7 DAYS 群 ($n = 6$) として比較検討を行った.

第4項 遺伝子学的な腸内細菌叢の解析

解析は既報を参考に行った[63]. 糞便サンプルから protocol Q 法により DNA を抽出し, 16SrRNA 遺伝子の V3-V4 領域をターゲットとし, Nextera XT index kit v2 (Illumina, CA, アメリカ合衆国) を用いて PCR 法により増幅した. これを次世代シーケンサーMiSeq V3-600 (Illumina) を用いて解析した.

第5項 統計学的処理

結果は平均値 \pm 標準誤差で示した. 腸内細菌叢の多様性について Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 (QIIME2) を用いて解析したデータを基に評価を行った. Kruskal-Wallis test を行い, 事後検定として Steel-Dwass test もしくは, PRE 群を対照群に設定し Steel test を行った. β 多様性については Permutational analysis of variance (PERMANOVA) を使用し, PERMANOVA では第 1 種の過誤を補正した q 値を用い, q 値 0.05 未満を有意差ありとした.

第3節 結果

第1項 腸内細菌の多様性

PRE 群と 3 DAYS 群と 7 DAYS 群の 3 群間における腸内細菌叢の多様性の比較を行った。α 多様性の結果を図 6A に示す。Chao1 index を用いた比較では PRE 群を対照群とすると 3 DAYS 群は有意に低かった (PRE 群 : 456.6 ± 43.0 , 3 DAYS 群 : 318.7 ± 15.5 , $p = 0.038$, Steel test)。3 DAYS 群と 7 DAYS 群では 7 DAYS 群の方が高い傾向にあった (3 DAYS 群 : 318.7 ± 15.5 , 7 DAYS 群 : 410.0 ± 31.2 , $p = 0.078$, Steel-Dwass test)。しかし Shannon index を用いた比較では 3 群間において有意差は認めなかった。

また β 多様性の評価で Jaccard 距離を測定したところ、3 群はすべて異なる集団であった (表 1, $q = 0.007$: PRE 群 vs. 3 DAYS 群, $q = 0.007$: PRE 群 vs. 7 DAYS 群, $q = 0.007$: 3 DAYS 群 vs. 7 DAYS 群)。主座標分析 (Principal Coordinate Analysis : PCoA) では 3 群は異なる分布であることが示された (図 6B)。平均 UniFrac 距離に関して Unweighted 解析を用いて行ったところ、3 群はすべて有意に異なる集団であった (表 1, $q = 0.033$: PRE 群 vs. 3 DAYS 群, $q = 0.033$: PRE 群 vs. 7 DAYS 群, $q = 0.024$: 3 DAYS 群 vs. 7 DAYS 群)。PCoA では 3 群は異なる分布であることが示された (図 6C)。また、Weighted 解析を用いて行ったところ、PRE 群と 7 DAYS 群は異なる集団であった (表 1, $q = 0.033$)。PCoA では PRE 群と 3 DAYS 群、3 DAYS 群と 7 DAYS 群は重なりが大きいですが、PRE 群と 7 DAYS 群は異なる分布であることが示された (図 6D)。

第2項 腸内細菌の相対豊富さ

腸内細菌の門レベルの検討では相対豊富さは存在比率 1%以上の 6 門で 3 群間に大きな差異はなかった (図 6E) . 存在比率 1%以上の 32 属においての相対豊富さの結果を図 6F に示す . 占有率を加味した Weighted 解析で有意差があった PRE 群と 7 DAYS 群に注目し比較すると 7 DAYS 群で *Muribaculum*, *Prevotellaceae* UCG-001, [*Oscillospirales*], [*Oscillospiraceae*], [*Eubacterium*] *siraeum* group が有意に増加し, *Turicibacter*, [*Peptostreptococcaceae*] (■および■で示した両属) が有意に低下していた (角括弧で表記したものはその目もしくは科まで同定できたが属では所在不明であったことを意味する) . *Bifidobacterium* の占有率は PRE 群で $1.62 \pm 0.64\%$, 3 DAYS 群で $1.08 \pm 0.54\%$, 7 DAYS 群で $0.89 \pm 0.37\%$ であった . PRE 群と 7 DAYS 群に注目して比較したが有意差はなかった ($p = 0.203$) .

第4節 小括

LISW 頭部照射前後の便中の細菌叢は α 多様性, β 多様性ともに変化していた . 加えて 7 日後の糞便中には属レベルで数種類増減したものがみられた . これより LISW 頭部照射前後で腸内細菌叢が変化していることが示唆された .

第7章 考察

イラク戦争から帰還した米軍兵士において、意識消失を伴った軽症の外傷性脳損傷患者に、便秘、軟便、下痢などの IBS 様の腹部症状が他の損傷患者に比べ多く見られたことを基に、今回の研究では、その病態を明らかにする目的でラットに LISW 頭部照射を行い、消化管機能に及ぼす影響を観察し、さらにその病態解明を試みた。ラットの頭部 LISW 照射では内臓知覚が亢進することが観察された。また病態解析では、消化管に器質的な炎症性変化は誘発されず、腸管バリア機能異常を認め、腸内細菌叢への影響を認めたことから、IBS と非常に類似した病態が生じていることが推察された。

本研究では様々ある bTBI モデルの中でも LISW によるモデルを使用した。これまでの他のモデル[45–47]ではエネルギーが脳以外の臓器に波及することや、外傷ストレスとして直接消化管障害を来す可能性があり脳腸相関を観察するのは困難であった。LISW によるモデルは非常に再現性が高く[12]、安全かつ安易にエネルギーを目的臓器にのみ伝播させることができる。このモデルを用いることで、bTBI モデルと消化管との関係、特に脳腸相関や IBS 様症状との関連を観察することが可能となり、本研究はそれを初めて検討したものである。

本研究で用いたモデルは、レーザーの1回照射量は 2.4 J/cm^2 と強い熱量ではなく、大脳皮質に出血や挫滅は生じないと報告されている[12]。また、本研究と同条件で行った既報では、LISW 照射 2 日後に運動能力が低下するものの、3 日後には改善すること、照射後 7 日目には不安関連行動、うつ様行動を示すこ

とが報告されている[64]. また, うつ病性障害と不安障害が IBS 発症のリスク要因になると報告されている[65]. 以上の結果から, イラク戦争の軽度頭部外傷患者で認めた下痢などの消化器症状は消化器に直接爆傷が及んだ結果ではなく, 頭部爆傷による頭部の機能変化が脳腸相関を介して惹起されたものと考えられ, 脳腸相関を介しているという点において IBS と類似した病態を誘発している可能性が示唆された.

functional MRI による機能的脳活動の画像化が発展し, IBS 患者では直腸の刺激で異常な脳活動が島皮質, 前頭前野, 視床, 上側頭回, 右下頭頂小葉で惹起され[38,39], また IBS-C では右中帯状皮質が, IBS-D では左眼窩前頭皮質, 左鳥距溝, および両側紡錘状回が惹起され, 脳活動パターンに違いがあると報告されている[66]. LISW 頭部照射ラットでは照射 7 日後の帯状束と脳梁の軸索密度が低下したと報告されている[64]. 本モデルにおいて直腸刺激時の機能的脳活動の空間的評価はできていないが, LISW の頭部照射により脳腸相関に関わる神経回路の軸索密度に影響し, それが IBS 様の反応を来す脳活動を惹起した可能性が考えられる.

IBS の病態には CRHR1 と CRHR2 のバランスが密接に関与している. ストレスにより CRH が分泌され, 末梢の CRHR1 を刺激することで大腸壁運動亢進や壁伸展の感覚の過敏性亢進が生じる[45–47]. また CRHR2 のシグナルは CRHR1 抑制性に作用し, ブロックすることで IBS 症状は悪化する[48]. LISW 頭部照射ラットでは直腸の CRHR1 の mRNA 発現が増加し, CRHR2 の発現が低下していた. これは既報の IBS モデルと同様の結果であり, LISW 頭部照射ラットの内臓

知覚過敏が IBS の病態生理と類似していることを支持するものである。また既報では、IBS のモデルに対し astressin をはじめとする CRHR の antagonist を刺激前に投与すると IBS 特有の大腸壁運動亢進、内臓知覚過敏、便排泄量増加が抑制されたが[46,47,67]、本検討でも CRHR の antagonist である astressin の投与により内臓知覚過敏の亢進が抑制されたことも、LISW 頭部照射ラットで IBS と同様の機序が誘発されていることを支持している。

LISW 頭部照射で FITC-4kDa の小腸管腔から門脈への移動が有意に亢進していた。これは粘膜透過性が亢進し、上皮バリア機能の破綻、いわゆる leaky gut が生じていることを示唆する結果である。内臓知覚過敏や腹痛は、腸管透過性亢進と症状の増強とに関連があると報告されている[51]。また LISW 頭部照射後の回腸末端ではタイトジャンクション系タンパク質である ZO-1 の mRNA 発現が有意に低下し、Occludin は低下傾向にあった。これらのタンパク質が低下する機序についてはいくつか想定されているがすべてが解明しているわけではない。マスト細胞が粘膜の神経に近接した場合、分泌するトリプターゼやヒスタミンなどのメディエーターが上皮の透過性を亢進させると考えられている[68]。また既報では、水回避モデルでの IBS モデルでは HPA 軸の刺激が腸管透過性を亢進させていたと報告されている[69]。同様の機序が本モデルでも病態を形成していた可能性がある。すなわち LISW 頭部照射での中枢神経機能異常が、末梢の消化管に分布する神経の制御を攪乱し、神経ペプチドの産生によりマスト細胞を活性化させて粘膜透過性亢進を惹起した可能性が想定される。しかし、

本研究では末梢神経の検討や、HPA 軸の制御が腸管透過性を変化させるかの検討は行っておらず、今後検討の余地がある。

IBS と腸内細菌叢の関わりはこれまでに多数の論文で報告されている。*Bifidobacterium* は IBS 患者で減少しており、プロバイオティクスにより改善したとする報告や[53], *Lactobacillus* が有機酸を生成し腹痛や膨満感と関連しているといった報告があるが[70], これらの報告のメタアナリシスでは、72%がコントロールの選択もしくは人口統計学的なバイアスが懸念されるとの報告があり慎重な解釈が必要とされる[52]. それに加え、腸内細菌叢は食事の影響も大きいとされ、コントロール患者でも食生活の違いによるばらつきが大きいという問題点があり、ヒトでの病態解明が困難な理由の 1 つとされている。α 多様性は細菌叢の種数を反映し、β 多様性は細菌叢の分布の違いを反映する。種数を単純に比較する Chao1 index では LISW 頭部照射群の 3 日目で低下していたが、占有率を加味する shannon index では 3 群で有意差は見られなかった。また細菌叢の分布の違いを反映する β 多様性では、系統を加味しない Jaccard 距離では 3 群すべてが違う分布であることが示された。また系統を加味するが占有率を加味しない Unweighted Unifrac 解析でも同様に 3 群ともに違う分布であることがわかった。加えて、系統および占有率を加味する Weighted Unifrac 解析では PRE と 7 DAYS 群で異なる分布であることがわかった。これらの結果を総合すると、LISW 頭部照射により占有率を加味しないと有意差がいずれの時点でも認められた。占有率を加味すると、3 日目には占有率の低い細菌種の減少がみられ、それが 7 日目にはやや改善したものの照射前と 7 日目では占有率・系統を加味

しても大きく異なるものとなったことを意味する。以上から、LISW 頭部照射による腸内細菌叢の変化は照射後 3 日には起こりはじめ、少なくとも 7 日間には影響が持続していたこと、また変化は占有率の少ない少数派の菌に主に認められたと考えられた。また、LISW 頭部照射の内臓知覚過敏の影響は少なくとも 4 週後も持続していた。このタイミングで腸内細菌叢の変化を検討すると、腸内細菌叢の変化が IBS 症状の 2 次的な影響を受ける可能性を考えて、今回は病態解明の目的で LISW 照射後 7 日目までの照射後早期の変化を検討することとした。今回の腸内細菌叢の変化が病態に深く関わるものか、2 次的な変化であるかは断定できないが、今後 LISW を照射された動物の便を移植することで内臓知覚過敏が移入できるかどうかなどの検討が必要と考えられる。属レベルでの豊富度の検討では *Bifidobacterium* や *Lactobacillus* の様なヒトの既報で病態に関与していると想定されている菌の有意な変化は見られなかった。それ以外の今回増減していた菌種は、既報においては IBS で病態に関与しているものではなかった。しかし *Prevotellaceae* は、パーキンソン病の初発症状である便秘とその減少とに関連が深いと報告が相次いでおり、消化管の機能を制御する菌として注目されている[71]。今後さらなる検討で今回変化を認めた菌の中から新たなプロバイオティクスの候補が見つかる可能性も残されていると考えられる。

本研究では内臓知覚過敏の原因として CRH や CRHR の関与が大きいとの実験結果を得た。しかし IBS の病態生理は CRH や CRHR のみで一元的に病態を説明できるわけではなく、神経ペプチドである orexin[72], serotonin[73]なども病態に関与していることが報告されており、本研究ではこれらの検討は行って

いない。また実際の戦争時の爆傷の衝撃波では、頭部に衝撃を受ける前にすでに精神的なストレスを受けており、実際の頭部の衝撃以外の要素が腹部症状の感受性を高めている可能性もあり、今回の研究結果が全ての爆傷での消化器症状に関する病態生理を説明できるわけではなく、これらを解決するためにはさらなる検討が必要である。

第8章 結論

頭部爆傷モデルであるレーザー誘起衝撃波の頭部に限局した照射を行った動物モデルでは内臓知覚過敏が生じることがわかった。この機序には Corticotropin-releasing hormone や直腸の Corticotropin-releasing hormone receptor が関与しており、脳腸相関が関係していることが示唆された。また腸管透過性亢進、腸内細菌叢の変化がみられた。これらの変化は過敏性腸症候群と同様の病態である可能性が示唆され、軽度頭部爆傷後に生じる消化器症状に関して病態生理の一端を解明したと考える。また、レーザー誘起衝撃波の頭部照射モデルは再現性が高く内臓知覚過敏を惹起することから新たな過敏性腸症候群の動物モデルとなることが期待され、過敏性腸症候群の病態解明や新規治療方法の開発にも寄与できる可能性がある。

謝辞

本稿を終えるにあたり，御指導，校閲を賜りました防衛医科大学校内科学講座講師 東山正明博士および防衛医科大学校内科学講座教授 穂苅量太博士に衷心より感謝申し上げます．またレーザー誘起衝撃波に関して，貴重な御助言と御協力を賜りました防衛医科大学 防衛医学研究センター 生体情報・治療システム研究部門 教授 佐藤俊一博士，准教授 川内聡子博士に感謝申し上げます．本研究の遂行に際し，貴重な御助言と御協力を賜りました防衛医科大学校内科学講座の教室員諸先生に感謝申しあげます．また本研究の一部は，一般財団法人 防衛医科大学校振興会からの助成金により実施しました．この場を借りて深謝いたします．

略語一覽

ACTH : Adrenocorticotropic hormone

AWR : abdominal withdrawal reflex

bTBI : blast-induced traumatic brain injury

cDNA : complementary deoxyribonucleic acid

CRD : Colorectal distension

CRH : Corticotropin-releasing hormone

CRHR : Corticotropin-releasing hormone receptor

CRHR1 : Corticotropin-releasing hormone receptor type 1

CRHR2 : Corticotropin-releasing hormone receptor type 2

CT : Computed Tomography

FITC-4kDa : fluorescein isothiocyanate dextran 4kDa

HE : Hematoxylin-Eosin

HPA : hypothalamic-pituitary-adrenal

IBS : Irritable bowel syndrome

LISW : Laser-induced shock wave

MRI : Magnetic Resonance Imaging

mRNA : messenger ribonucleic acid

PCoA : Principal Coordinate Analysis

PERMANOVA : Permutational analysis of variance

PET : polyethylene terephthalate

QIIME2 : Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2

RT-PCR : reverse transcription - polymerase chain reaction

TBI : traumatic brain injury

ZO : zonula occludens

附記

本研究の主旨は下記の学会で発表した.

- (1) 米国消化器病週間 2020 (2020年5月, Web開催)
- (2) 第28回 日本消化器関連学会週間 (2020年11月, 神戸)
- (3) 第22回 日本神経消化器病学会 (2020年11月, 東京)
- (4) 第51回 日本消化吸収学会総会 (2020年11月, Web開催)
- (5) 米国消化器病週間 2021 (2021年5月, Web開催)
- (6) 第24回 日本神経消化器病学会 (2022年9月, 北海道)

参考文献

1. Miller Erin. Global Terrorism Overview: Terrorism in 2019. College Park, MD. July. Available from: https://www.start.umd.edu/pubs/START_GTD_GlobalTerrorismOverview2019_July2020.pdf
2. Hoge CW, McGurk D, Thomas JL, Cox AL, Engel CC, Castro CA. Mild traumatic brain injury in U.S. Soldiers returning from Iraq. *N Engl J Med.* 2008;358(5):453-463.
3. Newsome MR, Mayer AR, Lin X, Troyanskaya M, Jackson GR, Scheibel RS, Walder A, Sathiyaraj A, Wilde EA, Mukhi S, Taylor BA, Levin HS. Chronic Effects of Blast-Related TBI on Subcortical Functional Connectivity in Veterans. *J Int Neuropsychol Soc.* 2016;22(6):631-642.
4. MacGregor AJ, Dougherty AL, Galarneau MR. Injury-specific correlates of combat-related traumatic brain injury in Operation Iraqi Freedom. *J Head Trauma Rehabil.* 2011;26(4):312-318.
5. Mac Donald CL, Johnson AM, Cooper D, Nelson EC, Werner NJ, Shimony JS, Snyder AZ, Raichle ME, Witherow JR, Fang R, Flaherty SF, Brody DL. Detection of blast-related traumatic brain injury in U.S. military personnel. *N Engl J Med.* 2011;364(22):2091-2100.
6. Sharp DJ, Ham TE. Investigating white matter injury after mild traumatic brain injury. *Curr Opin Neurol.* 2011;24(6):558-563.

7. Arciniegas D, Adler L, Topkoff J, Cawthra E, Filley CM, Reite M. Attention and memory dysfunction after traumatic brain injury: cholinergic mechanisms, sensory gating, and a hypothesis for further investigation. *Brain Inj.* 1999;13(1):1-13.
8. Ling G, Bandak F, Armonda R, Grant G, Ecklund J. Explosive blast neurotrauma. *J Neurotrauma.* 2009;26(6):815-825.
9. Mac Donald CL, Barber J, Jordan M, Johnson AM, Dikmen S, Fann JR, Temkin N. Early Clinical Predictors of 5-Year Outcome After Concussive Blast Traumatic Brain Injury. *JAMA Neurol.* 2017;74(7):821-829.
10. Cernak I, Noble-Haeusslein LJ. Traumatic brain injury: an overview of pathobiology with emphasis on military populations. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30(2):255-266.
11. Chandra N, Ganpule S, Kleinschmit NN, Feng R, Holmberg AD, Sundaramurthy A, Selvan V, Alai A. Evolution of blast wave profiles in simulated air blasts: Experiment and computational modeling. *Shock Waves.* 2012 Sep;22(5):403–15.
12. Sato S, Kawauchi S, Okuda W, Nishidate I, Nawashiro H, Tsumatori G. Real-time optical diagnosis of the rat brain exposed to a laser-induced shock wave: observation of spreading depolarization, vasoconstriction and hypoxemia-oligemia. *PLoS One.* 2014;9(1):e82891. Published 2014 Jan 8.
13. Magnuson J, Leonessa F, Ling GS. Neuropathology of explosive blast traumatic brain injury. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2012;12(5):570-579.
14. Kato K, Fujimura M, Nakagawa A, Saito A, Ohki T, Takayama K, Tominaga T.

Pressure-dependent effect of shock waves on rat brain: induction of neuronal apoptosis mediated by a caspase-dependent pathway. *J Neurosurg.* 2007;106(4):667-676.

15. Cernak I, Wang Z, Jiang J, Bian X, Savic J. Ultrastructural and functional characteristics of blast injury-induced neurotrauma. *J Trauma.* 2001;50(4):695-706.
16. Bauman RA, Ling G, Tong L, Januszkiewicz A, Agoston D, Delanerolle N, Kim Y, Ritzel D, Bell R, Ecklund J, Armonda R, Bandak F, Parks S. An introductory characterization of a combat-casualty-care relevant swine model of closed head injury resulting from exposure to explosive blast. *J Neurotrauma.* 2009;26(6):841-860.
17. Jaffin JH, McKinney L, Kinney RC, Cunningham JA, Moritz DM, Kraimer JM, Graeber GM, Moe JB, Salander JM, Harmon JW. A laboratory model for studying blast overpressure injury. *J Trauma.* 1987;27(4):349-356.
18. Hatano B, Matsumoto Y, Otani N, Saitoh D, Tokuno S, Satoh Y, Nawashiro H, Matsushita Y, Sato S. Traumatic brain injury caused by laser-induced shock wave in rats: a novel laboratory model for studying blast-induced traumatic brain injury. In: *Optical Interactions with Tissue and Cells XXII.* SPIE; 2011. p. 78971V.
19. Lacy BE, Mearin F, Chang L, Chey WD, Lembo AJ, Simren M, Spiller R. Bowel disorders. *Gastroenterology.* 2016 May 1;150(6):1393-1407.e5.
20. Kanazawa M, Endo Y, Whitehead WE, Kano M, Hongo M, Fukudo S. Patients and nonconsulters with irritable bowel syndrome reporting a parental history of bowel

problems have more impaired psychological distress. *Dig Dis Sci.*

2004;49(6):1046-1053.

21. Miwa H. Prevalence of irritable bowel syndrome in Japan: Internet survey using Rome III criteria. *Patient Prefer Adherence.* 2008;2:143-147. Published 2008 Feb 2.
22. Kubo M, Fujiwara Y, Shiba M, Kohata Y, Yamagami H, Tanigawa T, Watanabe K, Watanabe T, Tominaga K, Arakawa T. Differences between risk factors among irritable bowel syndrome subtypes in Japanese adults. *Neurogastroenterol Motil.* 2011;23(3):249-254.
23. Kumano H, Kaiya H, Yoshiuchi K, Yamanaka G, Sasaki T, Kuboki T. Comorbidity of irritable bowel syndrome, panic disorder, and agoraphobia in a Japanese representative sample. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(2):370-376.
24. Halvorson HA, Schlett CD, Riddle MS. Postinfectious irritable bowel syndrome--a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(8):1894-1942.
25. Enck P, Aziz Q, Barbara G, Farmer AD, Fukudo S, Mayer EA, Niesler B, Quigley EM, Rajilić-Stojanović M, Schemann M, Schwille-Kiuntke J, Simren M, Zipfel S, Spiller RC. Irritable bowel syndrome. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16014. Published 2016 Mar 24.
26. Spiller R, Aziz Q, Creed F, Emmanuel A, Houghton L, Hungin P, Jones R, Kumar D, Rubin G, Trudgill N, Whorwell P. Guidelines on the irritable bowel syndrome: mechanisms and practical management. *Gut.* 2007;56(12):1770-1798.
27. Czogalla B, Schmitteckert S, Houghton LA, Sayuk GS, Camilleri M, Olivo-Diaz A,

- Spiller R, Wouters MM, Boeckxstaens G, Bermejo JL, Niesler B. A meta-analysis of immunogenetic Case-Control Association Studies in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2015;27(5):717-727.
28. Whitehead WE, Crowell MD, Robinson JC, Heller BR, Schuster MM. Effects of stressful life events on bowel symptoms: subjects with irritable bowel syndrome compared with subjects without bowel dysfunction. *Gut.* 1992;33(6):825-830.
29. Collins SM, Bercik P. The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology.* 2009;136(6):2003-2014.
30. Aziz Q, Thompson DG. Brain-gut axis in health and disease. *Gastroenterology.* 1998;114(3):559-578.
31. Ritchie J. Pain from distension of the pelvic colon by inflating a balloon in the irritable colon syndrome. *Gut.* 1973;14(2):125-132.
32. Ness TJ, Gebhart GF. Colorectal distension as a noxious visceral stimulus: physiologic and pharmacologic characterization of pseudodiffuse reflexes in the rat. *Brain Res.* 1988;450(1-2):153-169.
33. Williams CL, Villar RG, Peterson JM, Burks TF. Stress-induced changes in intestinal transit in the rat: a model for irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 1988;94(3):611-621.
34. Mönnikes H, Raybould HE, Schmidt B, Taché Y. CRF in the paraventricular nucleus of the hypothalamus stimulates colonic motor activity in fasted rats.

Peptides. 1993;14(4):743-747.

35. Coutinho SV, Plotsky PM, Sablad M, Miller JC, Zhou H, Bayati AI, McRoberts JA, Mayer EA. Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;282(2):G307-G316.
36. Welgan P, Meshkinpour H, Beeler M. Effect of anger on colon motor and myoelectric activity in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 1988;94(5 Pt 1):1150-1156.
37. Fukudo S, Nomura T, Muranaka M, Taguchi F. Brain-gut response to stress and cholinergic stimulation in irritable bowel syndrome. A preliminary study. *J Clin Gastroenterol.* 1993;17(2):133-141.
38. Yuan YZ, Tao RJ, Xu B, Sun J, Chen KM, Miao F, Zhang ZW, Xu JY. Functional brain imaging in irritable bowel syndrome with rectal balloon-distention by using fMRI. *World J Gastroenterol.* 2003;9(6):1356-1360.
39. Song GH, Venkatraman V, Ho KY, Chee MW, Yeoh KG, Wilder-Smith CH. Cortical effects of anticipation and endogenous modulation of visceral pain assessed by functional brain MRI in irritable bowel syndrome patients and healthy controls. *Pain.* 2006;126(1-3):79-90.
40. Larauche M, Kiank C, Tache Y. Corticotropin releasing factor signaling in colon and ileum: regulation by stress and pathophysiological implications. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60 Suppl 7(Suppl 7):33-46.

41. Fukudo S, Nomura T, Hongo M. Impact of corticotropin-releasing hormone on gastrointestinal motility and adrenocorticotrophic hormone in normal controls and patients with irritable bowel syndrome. *Gut*. 1998;42(6):845-849.
42. Taché Y, Million M, Nelson AG, Lamy C, Wang L. Role of corticotropin-releasing factor pathways in stress-related alterations of colonic motor function and viscerosensitivity in female rodents. *Gen Med*. 2005;2(3):146-154.
43. Taché Y, Martinez V, Million M, Maillot C. Role of corticotropin releasing factor receptor subtype 1 in stress-related functional colonic alterations: implications in irritable bowel syndrome. *Eur J Surg Suppl*. 2002;(587):16-22.
44. Perrin MH, Vale WW. Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;885:312-328.
45. Saito K, Kasai T, Nagura Y, Ito H, Kanazawa M, Fukudo S. Corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist blocks brain-gut activation induced by colonic distention in rats. *Gastroenterology*. 2005;129(5):1533-1543.
46. Maillot C, Million M, Wei JY, Gauthier A, Taché Y. Peripheral corticotropin-releasing factor and stress-stimulated colonic motor activity involve type 1 receptor in rats. *Gastroenterology*. 2000;119(6):1569-1579.
47. Taché Y, Martinez V, Wang L, Million M. CRF1 receptor signaling pathways are involved in stress-related alterations of colonic function and viscerosensitivity: implications for irritable bowel syndrome. *Br J Pharmacol*. 2004;141(8):1321-1330.
48. Nozu T, Takakusaki K, Okumura T. A balance theory of peripheral corticotropin-

- releasing factor receptor type 1 and type 2 signaling to induce colonic contractions and visceral hyperalgesia in rats. *Endocrinology*. 2014;155(12):4655-4664.
49. González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*. 2003;81(1):1-44.
50. Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol*. 1999;147(6):1351-1363.
51. Vivinus-Nébot M, Frin-Mathy G, Bziouche H, Dainese R, Bernard G, Anty R, Filippi J, Saint-Paul MC, Tulic MK, Verhasselt V, Hébuterne X, Piche T. Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut*. 2014;63(5):744-752.
52. Pittayanon R, Lau JT, Yuan Y, Leontiadis GI, Tse F, Surette M, Moayyedi P. Gut Microbiota in Patients With Irritable Bowel Syndrome-A Systematic Review. *Gastroenterology*. 2019;157(1):97-108.
53. O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, Hurley G, Luo F, Chen K, O'Sullivan GC, Kiely B, Collins JK, Shanahan F, Quigley EM. *Lactobacillus* and *bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*. 2005;128(3):541-551.
54. MacPherson BR, Pfeiffer CJ. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion*. 1978;17(2):135-150.
55. Cameron HL, Perdue MH. Stress impairs murine intestinal barrier function:

- improvement by glucagon-like peptide-2. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314(1):214-220.
56. Taché Y, Kiank C, Stengel A. A role for corticotropin-releasing factor in functional gastrointestinal disorders. *Curr Gastroenterol Rep.* 2009;11(4):270-277.
57. Camilleri M, Madsen K, Spiller R, Greenwood-Van Meerveld B, Verne GN. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil.* 2012;24(6):503-512.
58. Piche T, Barbara G, Aubert P, Bruley des Varannes S, Dainese R, Nano JL, Cremon C, Stanghellini V, De Giorgio R, Galimiche JP, Neunlist M. Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut.* 2009;58(2):196-201.
59. Kassinen A, Krogius-Kurikka L, Mäkivuokko H, Rinttilä T, Paulin L, Corander J, Malinen E, Apajalahti J, Palva A. The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology.* 2007;133(1):24-33.
60. Liu Y, Zhang L, Wang X, Wang Z, Zhang J, Jiang R, Wang X, Wang K, Liu Z, Xia Z, Xu Z, Nie Y, Lv X, Wu X, Zhu H, Duan L. Similar Fecal Microbiota Signatures in Patients With Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome and Patients With Depression. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016;14(11):1602-1611.e5.
61. Carroll IM, Ringel-Kulka T, Keku TO, Chang YH, Packey CD, Sartor RB, Ringel Y. Molecular analysis of the luminal- and mucosal-associated intestinal microbiota

in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301(5):G799-G807.

62. El-Salhy M, Hatlebakk JG, Gilja OH, Bråthen Kristoffersen A, Hausken T. Efficacy of faecal microbiota transplantation for patients with irritable bowel syndrome in a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Gut.* 2020;69(5):859-867.
63. Costea PI, Zeller G, Sunagawa S, Pelletier E, Alberti A, Levenez F, Tramontano M, Driessen M, Hercog R, Jung FE, Kultima JR, Hayward MR, Coelho LP, Allen-Vercoe E, Bertrand L, Blaut M, Brown JRM, Carton T, Cools-Portier S, Daigneault M, Derrien M, Druesne A, de Vos WM, Finlay BB, Flint HJ, Guarner F, Hattori M, Heilig H, Luna RA, van Hylckama Vlieg J, Junick J, Klymiuk I, Langella P, le Chatelier E, Mai V, Manichanh C, Martin JC, Mery C, Morita H, O'toole PW, Orvain C, Patil KR, Penders J, Persson S, Pons N, Popova M, Salonen A, Saulnier D, Scott KP, Singh B, Slezak K, Veiga P, Versalovic J, Zhao L, Zoetendal EG, Ehrlich SD, Dore J, Bork P. Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nat Biotechnol.* 2017;35(11):1069-1076.
64. Jitsu M, Niwa K, Suzuki G, Obara T, Iwama Y, Hagisawa K, Takahashi Y, Matsushita Y, Takeuchi S, Nawashiro H, Sato S, Kawauchi S. Behavioral and Histopathological Impairments Caused by Topical Exposure of the Rat Brain to Mild-Impulse Laser-Induced Shock Waves: Impulse Dependency. *Front Neurol.* 2021;12:621546. Published 2021 May 21.

65. Koloski NA, Jones M, Kalantar J, Weltman M, Zaguirre J, Talley NJ. The brain--gut pathway in functional gastrointestinal disorders is bidirectional: a 12-year prospective population-based study. *Gut*. 2012;61(9):1284-1290.
66. Guleria A, Karyampudi A, Singh R, Khetrpal CL, Verma A, Ghoshal UC, Kumar D. Mapping of Brain Activations to Rectal Balloon Distension Stimuli in Male Patients with Irritable Bowel Syndrome Using Functional Magnetic Resonance Imaging. *J Neurogastroenterol Motil*. 2017;23(3):415-427.
67. Taché Y, Perdue MH. Role of peripheral CRF signalling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function. *Neurogastroenterol Motil*. 2004;16 Suppl 1:137-142.
68. Balestra B, Vicini R, Cremon C, Zecchi L, Dothel G, Vasina V, De Giorgio R, Paccapelo A, Pastoris O, Stanghellini V, Corinaldesi R, De Ponti F, Tonini M, Barbara G. Colonic mucosal mediators from patients with irritable bowel syndrome excite enteric cholinergic motor neurons. *Neurogastroenterol Motil*. 2012;24(12):1118-e570.
69. Yoshikawa K, Kurihara C, Furuhashi H, Takajo T, Maruta K, Yasutake Y, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Higashiyama M, Watanabe C, Komoto S, Tomita K, Nagao S, Miura S, Tajiri H, Hokari R. Psychological stress exacerbates NSAID-induced small bowel injury by inducing changes in intestinal microbiota and permeability via glucocorticoid receptor signaling. *J Gastroenterol*. 2017;52(1):61-71.
70. Tana C, Umesaki Y, Imaoka A, Handa T, Kanazawa M, Fukudo S. Altered profiles

of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2010;22(5):512-e115.

71. Scheperjans F, Aho V, Pereira PAB, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, Haapaniemi E, Kaakkola S, Eerola-Rautio J, Pohja M, Kinnunen E, Murros K, Auvinen P. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord.* 2015;30(3):350-358.
72. Nozu T, Kumei S, Takakusaki K, Ataka K, Fujimiya M, Okumura T. Central orexin-A increases colonic motility in conscious rats. *Neurosci Lett.* 2011;498(2):143-146.
73. Kilkens TO, Honig A, van Nieuwenhoven MA, Riedel WJ, Brummer RJ. Acute tryptophan depletion affects brain-gut responses in irritable bowel syndrome patients and controls. *Gut.* 2004;53(12):1794-1800.

図 表

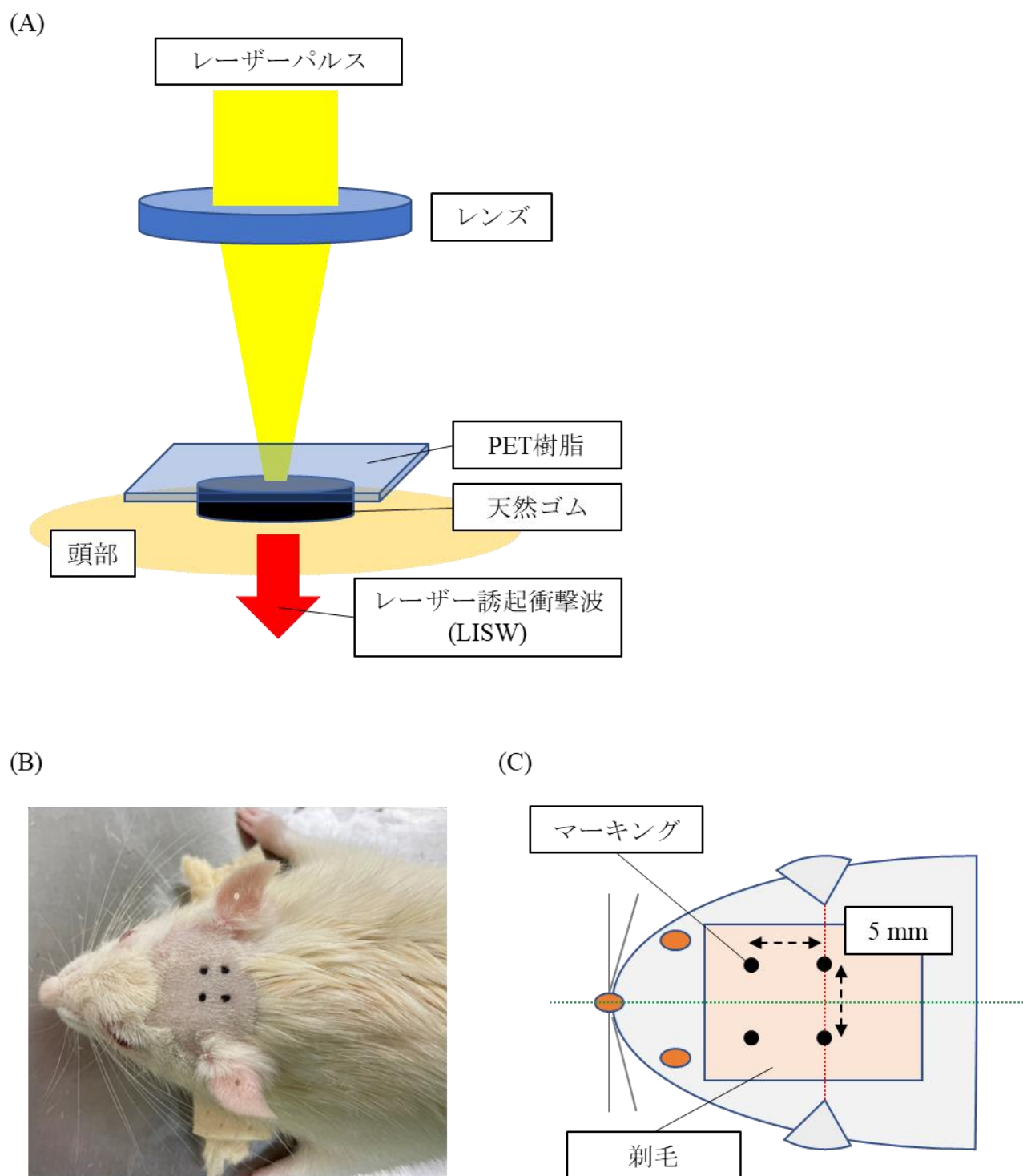


図1 LISW 頭部照射の方法

(A) LISW の発生方法の間略図

Q-switched Nd: YAG レーザーを使用し、パルス幅 6 ns FWHM, 波長 532 nm とし, 1 回照射量は 2.4 J/cm^2 の条件で行った. 直径 8 mm, 厚さ 0.5 mm の円形の天然ゴムを, 1 辺 1 cm, 厚さ 1 mm の正方形の polyethylene terephthalate 樹脂に接着したものをアタッチメントとし, 超音波検査用ゼリーを少量天然ゴム部に塗布し頭部のマーキングにその中心が来るように圧着させた. これを各マーキングに 1 発ずつ, 合計 4 回照射した.

(B) LISW 頭部照射前のマーキング写真

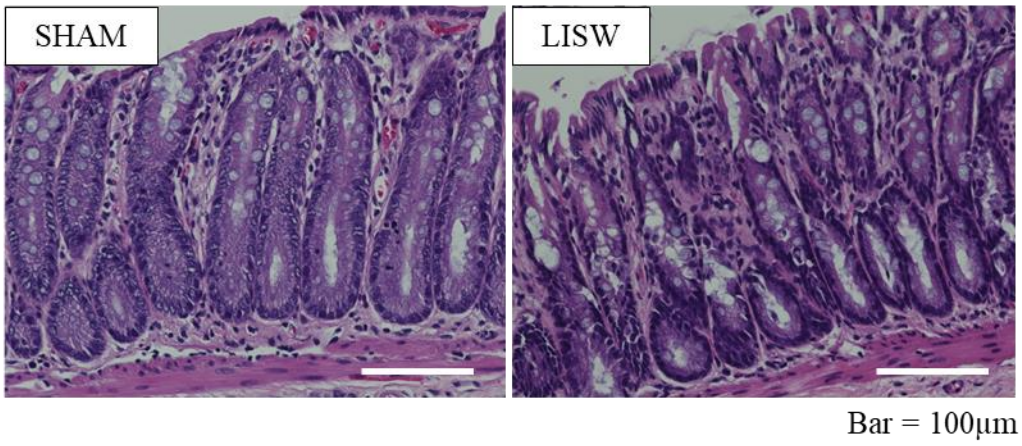
ラットを麻酔下で頭部を剃毛し, マーキングを行った.

(C) マーキング位置の模式図

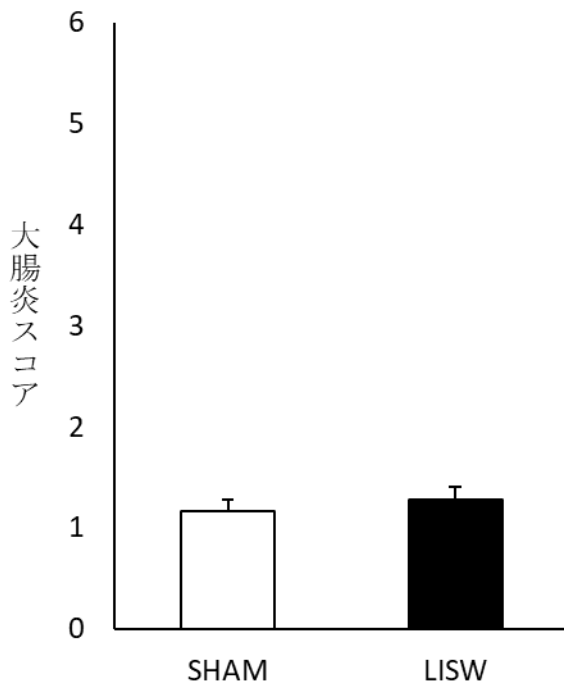
両耳介を結ぶ線上に, 正中線から左右対称に間隔 5 mm, さらに各点から前方 5 mm の部位に, 脳全体をカバーするように 4 点のマーキングを行った.

LISW : Laser-induced shock wave

(A)



(B)



(C)

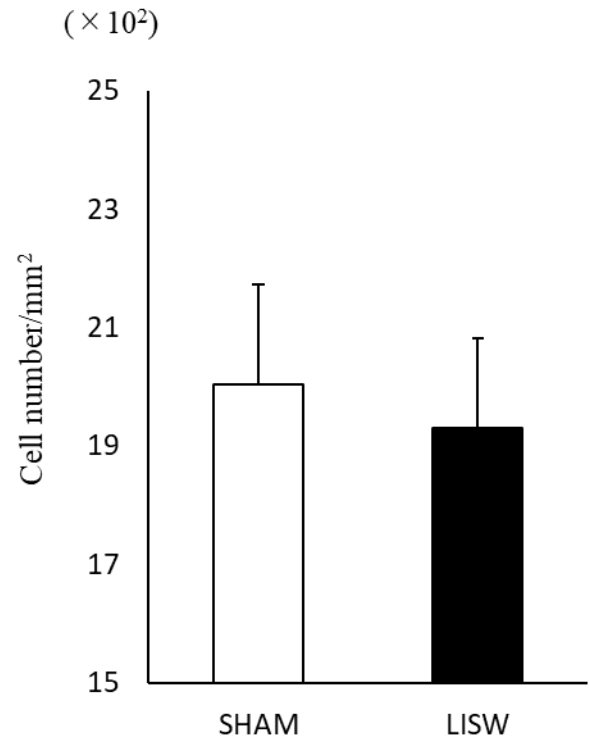


図2 直腸粘膜の評価

対照群を SHAM 群, LISW 頭部照射を行った群を LISW 群とした (各群 n = 6) .

(A) 直腸の代表的な HE 染色像

(B) 大腸炎スコア

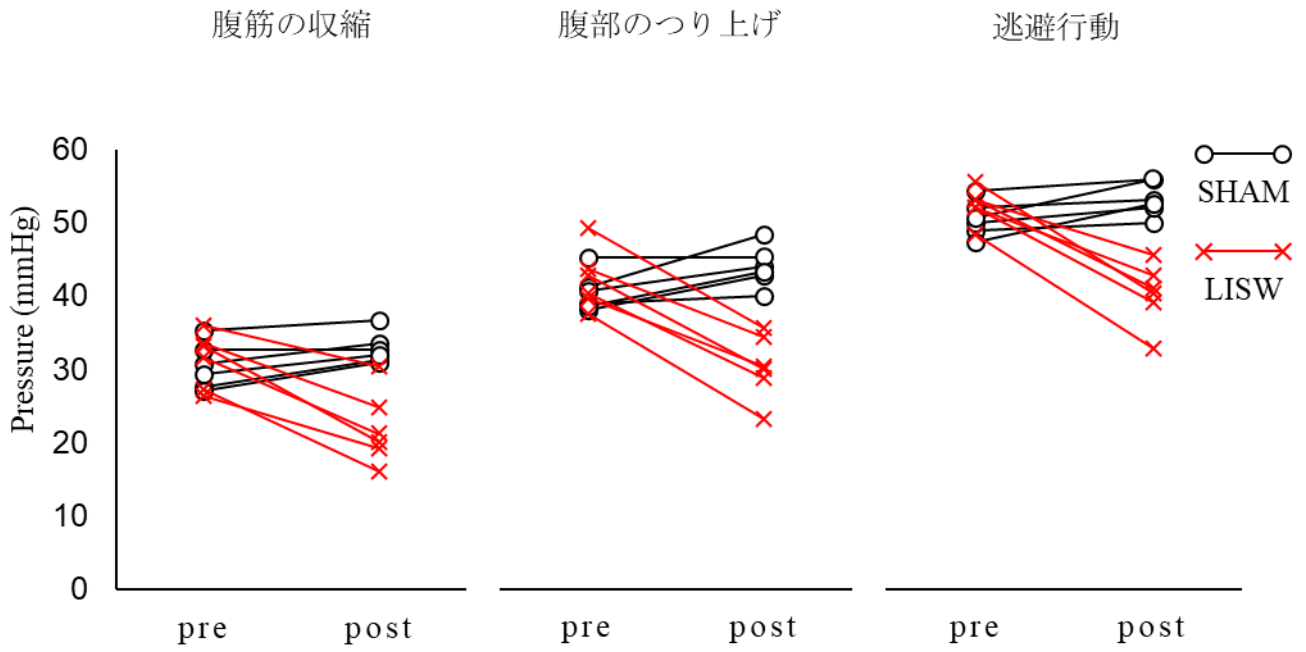
SHAM 群と LISW 群を比較したところ、有意差を認めなかった.

(C) 粘膜内の単核球数

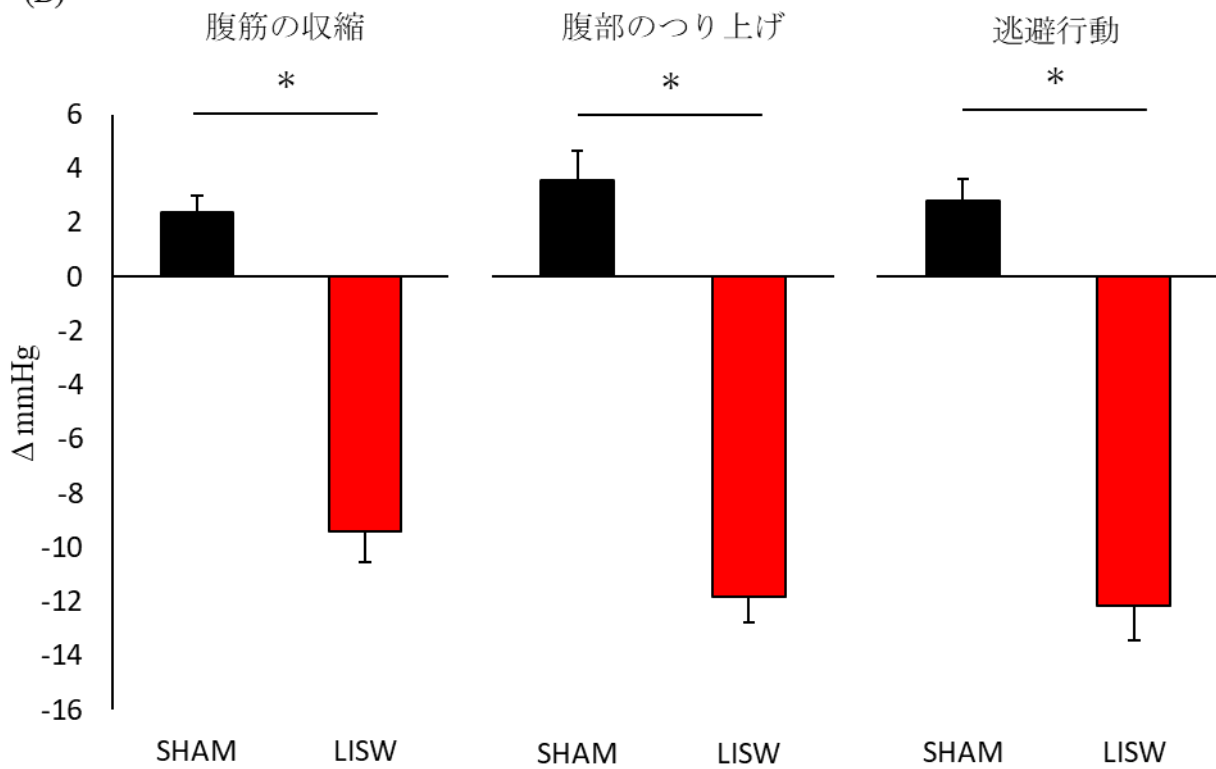
SHAM 群と LISW 群を比較したところ、有意差を認めなかった.

LISW : Laser-induced shock wave, HE : Hematoxylin-Eosin

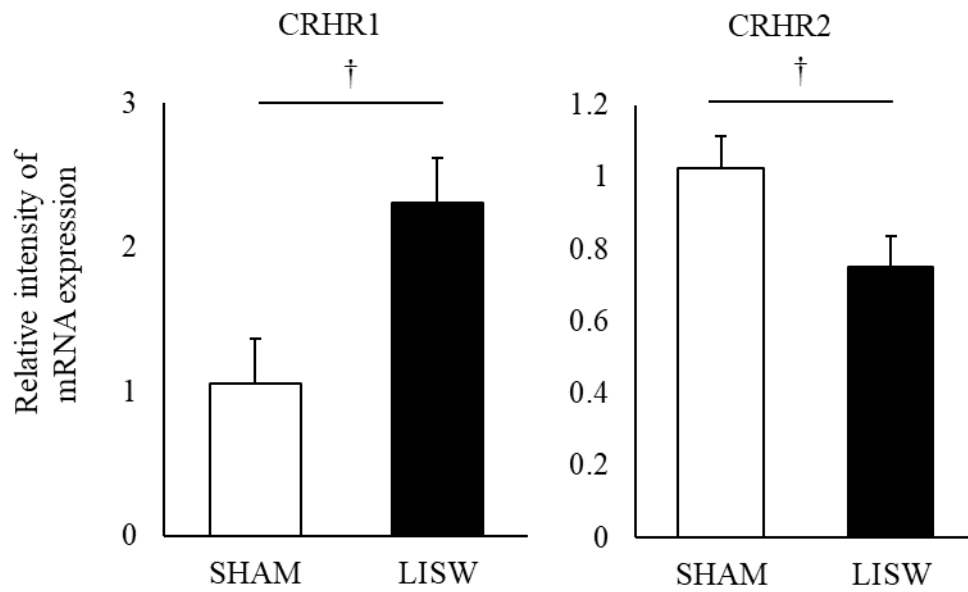
(A)



(B)



(C)



(D)

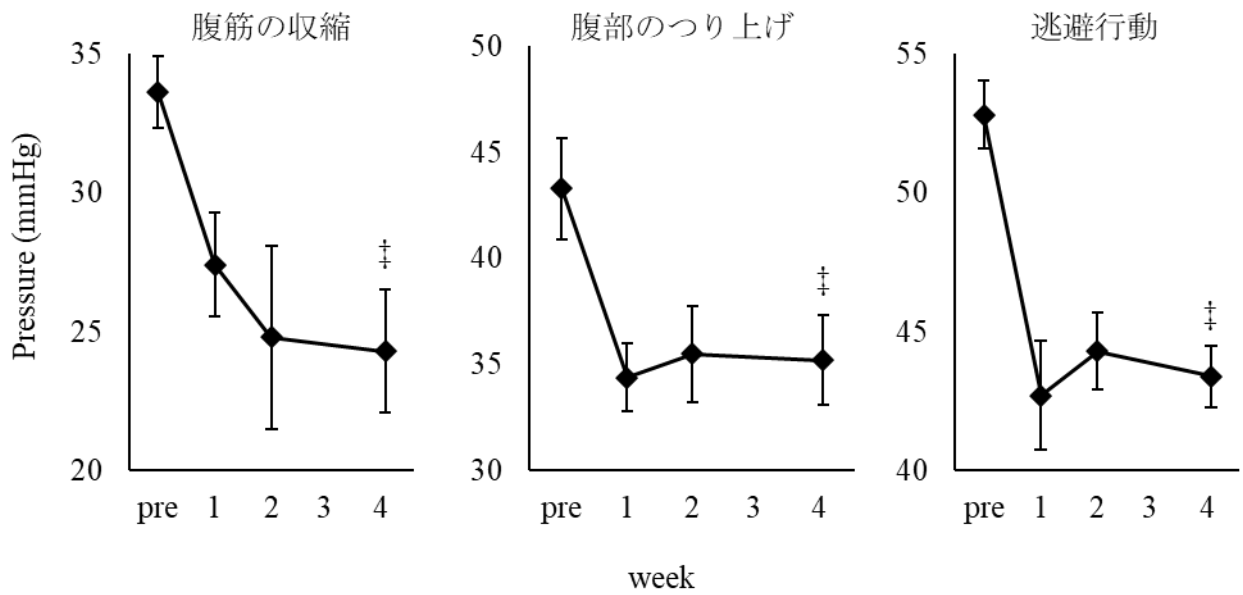


図3 LISW 頭部照射による直腸過敏性の比較

(A) AWR の pre と post での個々の変化

対照群を SHAM 群, LISW 頭部照射を行った群を LISW 群として, LISW 照射もしくは sham 操作の前日 (pre) および 3 日後 (post) に CRD test を行い, AWR を測定した (各群 $n = 6$). 腹筋の収縮 (腹筋の単発の収縮), 腹部のつり上げ (腹壁がアーチ状になるような運動, 波打つような周期的な腹筋運動), 逃避行動 (体幹を反るような大きな運動, 足を突っ張る, 暴れる) が見られた最低圧を記録した. ○を SHAM 群, ×を LISW 群で示し, 同一個体を線で結んで表示している.

(B) AWR の変化量

図 3A をもとに post から pre を引いた変化量として示す. SHAM 群と比較して LISW 群では腹筋の収縮, 腹部のつり上げ, 逃避行動に全ての観察項目において変化量は負の方向に有意に大きく, 閾値が低下していた. * $p < 0.01$

(C) CRHR1 および CRHR2 の mRNA の比較

CRHR1 の発現量は SHAM 群と比較して LISW 群では有意に多かった. CRHR2 の発現量は SHAM 群と比較して LISW 群では有意に少なかった. 各群 $n = 6$, † $p < 0.05$

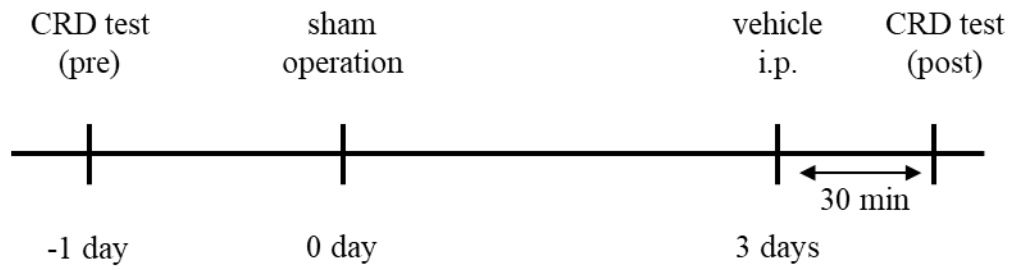
(D) AWR の経時的変化

LISW 群 ($n = 4$) に対し, pre, 1 週後, 2 週後および 4 週後に CRD test を行い, AWR を計測した. 4 週後の AWR は pre と比較して有意に低かった. ‡ $p < 0.05$ vs. pre

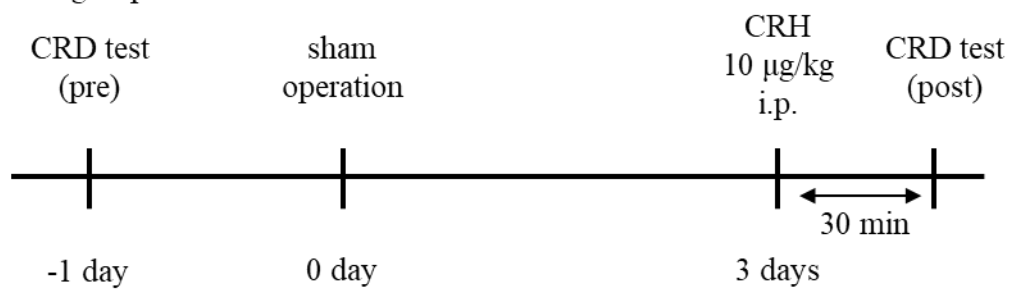
LISW : Laser-induced shock wave, CRD test : Colorectal distension test, AWR : abdominal withdrawal reflex, CRHR1 : Corticotropin-releasing hormone receptor type 1, CRHR2 : Corticotropin-releasing hormone receptor type 2

(A)

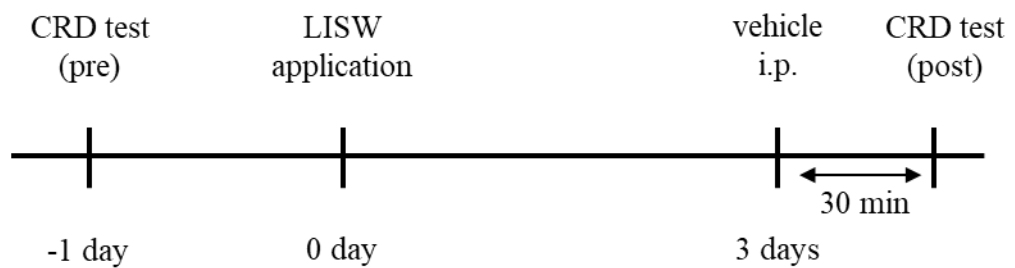
SHAM + VEHICLE group



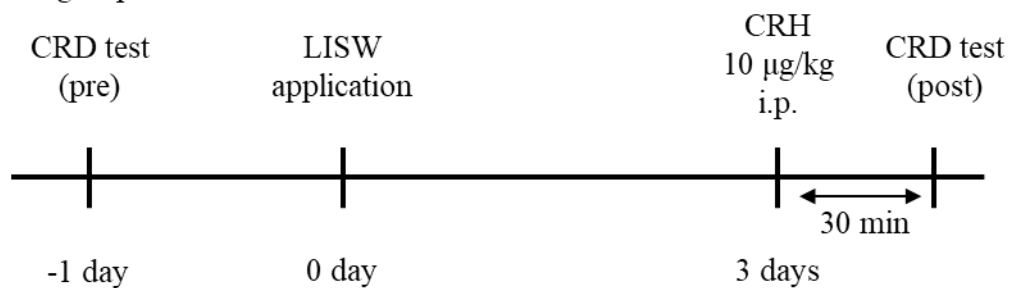
SHAM + CRH group



LISW + VEHICLE group

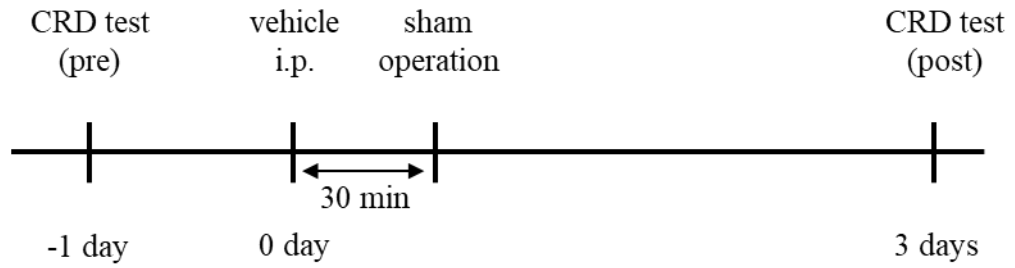


LISW + CRH group

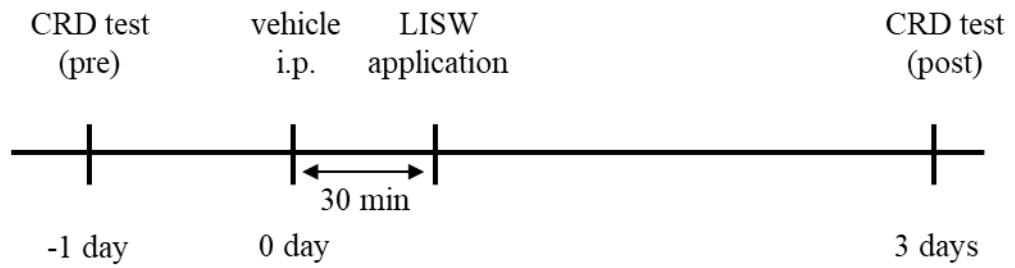


(B)

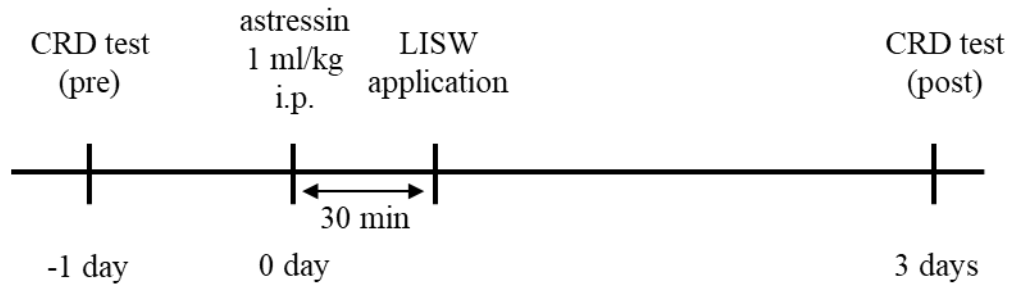
SHAM + VEHICLE group



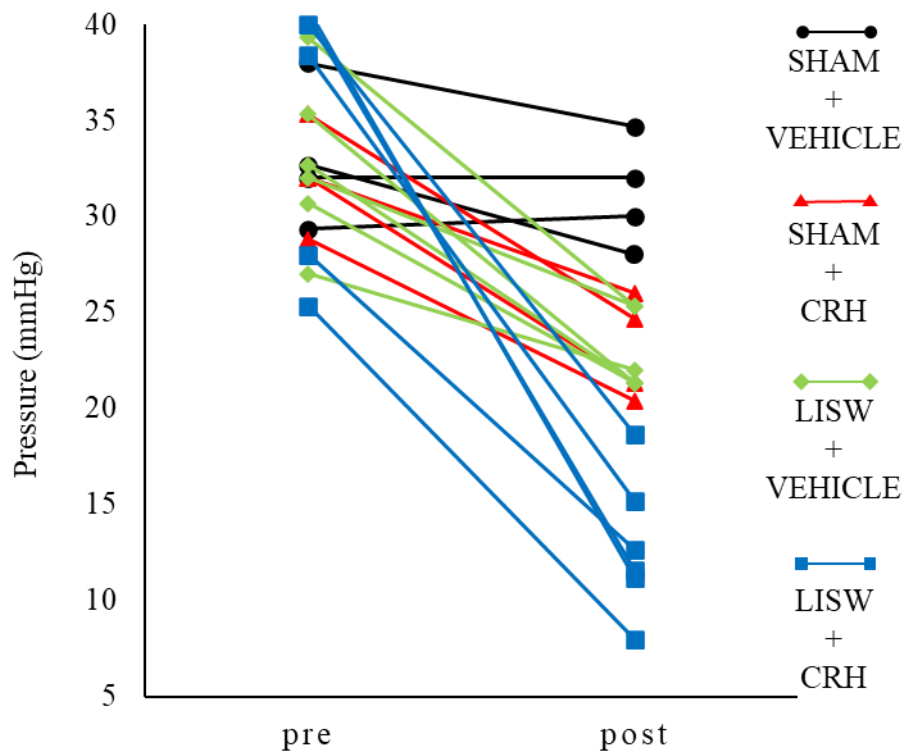
LISW + VEHICLE group



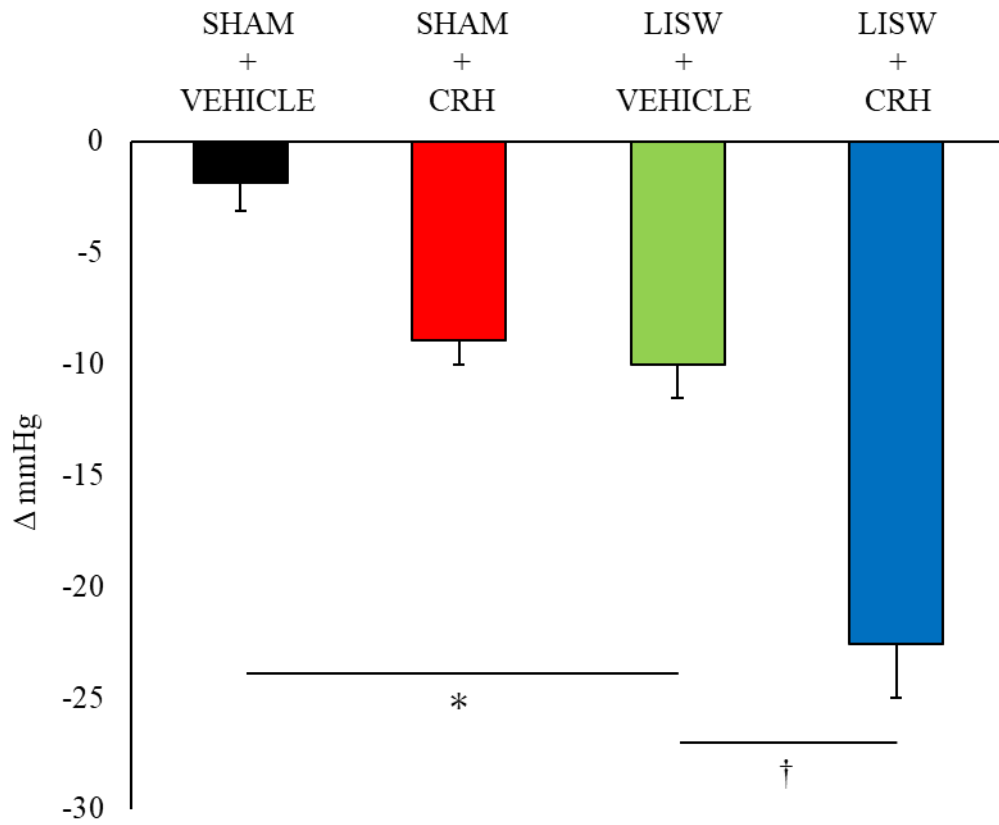
LISW+ ASTRESSIN group



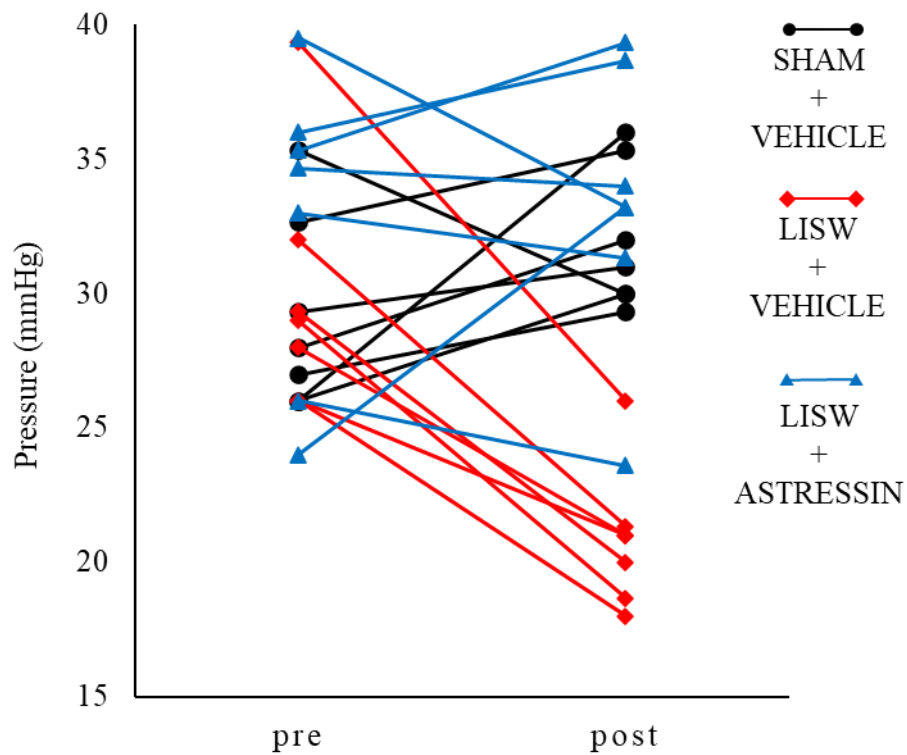
(C)



(D)



(E)



(F)

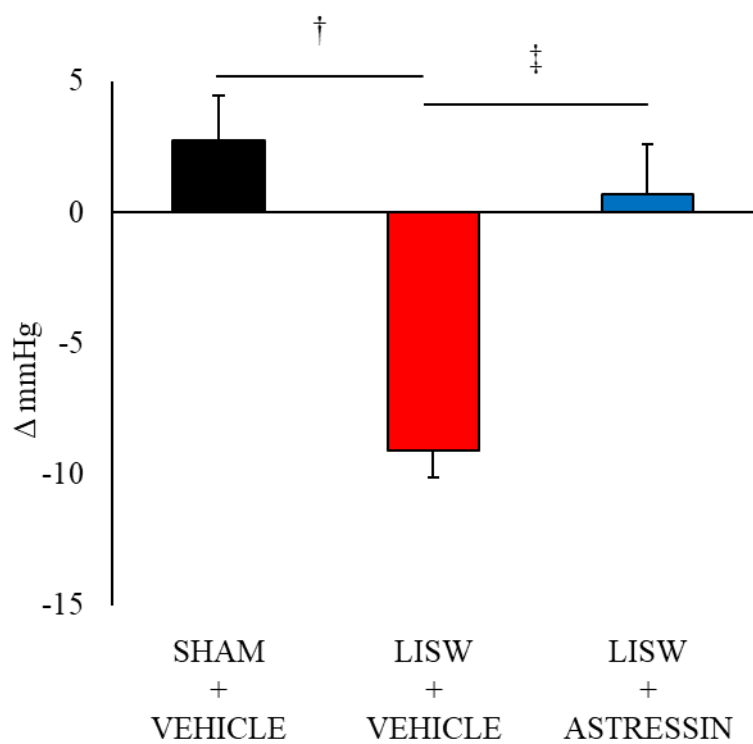


図 4 LISW 頭部照射による直腸過敏性亢進の抑制や増悪への影響

(A) CRH 投与のプロトコール

sham 操作と生理食塩水のみを腹腔内投与した群を SHAM + VEHICLE 群 (n = 4), sham 操作と CRH 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を腹腔内投与した群を SHAM + CRH 群 (n = 4), LISW 頭部照射と生理食塩水のみを腹腔内投与した群を LISW + VEHICLE 群 (n = 6), LISW 頭部照射と CRH 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を腹腔内投与した群を LISW + CRH 群 (n = 6) とした. LISW 照射もしくは sham 操作の前日 (pre) および 3 日後 (post) に CRD test により腹筋の収縮がみられた AWR を評価し, 比較検討した.

(B) astressin 投与のプロトコール

LISW 頭部照射と純水のみを腹腔内投与した群を LISW + VEHICLE 群 (n = 7), LISW 頭部照射と純水のみを腹腔内投与した群を LISW + VEHICLE 群 (n = 7), LISW 頭部照射と astressin 33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を腹腔内投与した群を LISW + ASTRESSIN 群 (n = 7) とした. LISW 照射もしくは sham 操作の前日 (pre) および 3 日後 (post) に CRD test により腹筋の収縮がみられた AWR を評価し, 比較検討した.

(C) CRH 投与の AWR の pre と post での個々の変化

腹筋の収縮 (腹筋の単発の収縮) がみられた最低圧を記録した. ●を SHAM + VEHICLE 群, ▲を SHAM + CRH 群, ◆を LISW + VEHICLE 群, ■を LISW + CRH 群で示し, 同一個体を線で結んで表示している.

(D) CRH 投与の AWR の変化量

post から pre を引いた変化量として示す。LISW + CRH 群は LISW + VEHICLE 群と比較して有意に閾値が低下していた。

* $p < 0.05$, † $p < 0.001$

(E) atressin 投与の AWR の pre と post での個々の変化

腹筋の収縮 (腹筋の単発の収縮) が見られた最低圧を記録した。●を SHAM + VEHICLE 群, ▲を LISW + ASTRESSIN 群, ◆を LISW + VEHICLE 群で示し, 同一個体を線で結んで表示している。

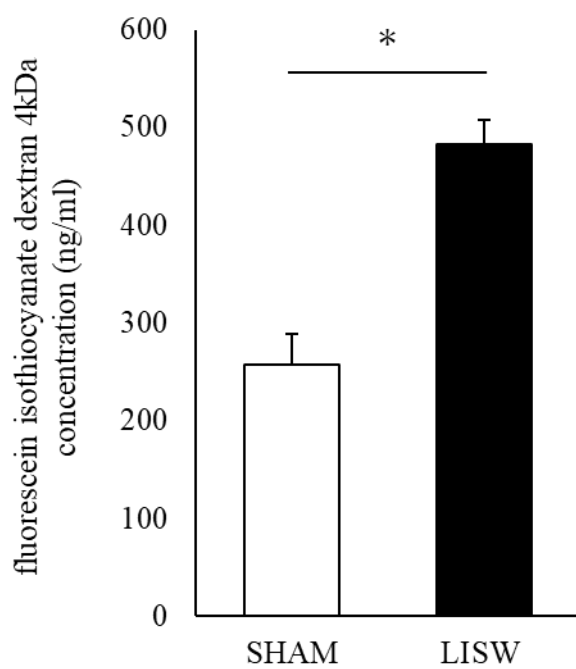
(F) astressin 投与の AWR の変化量

post から pre を引いた変化量として示す。LISW + ASTRESSIN 群は LISW + VEHICLE 群と比較して有意に閾値が低下を抑制していた。LISW + ASTRESSIN 群と SHAM + VEHICLE 群とで比較すると閾値の低下に有意差はなかった。

† $p < 0.001$, ‡ $p < 0.01$

LISW : Laser-induced shock wave, CRH : Corticotropin-releasing hormone, CRD test : Colorectal distension test, AWR : abdominal withdrawal reflex, i.p. : intraperitoneal injection

(A)



(B)

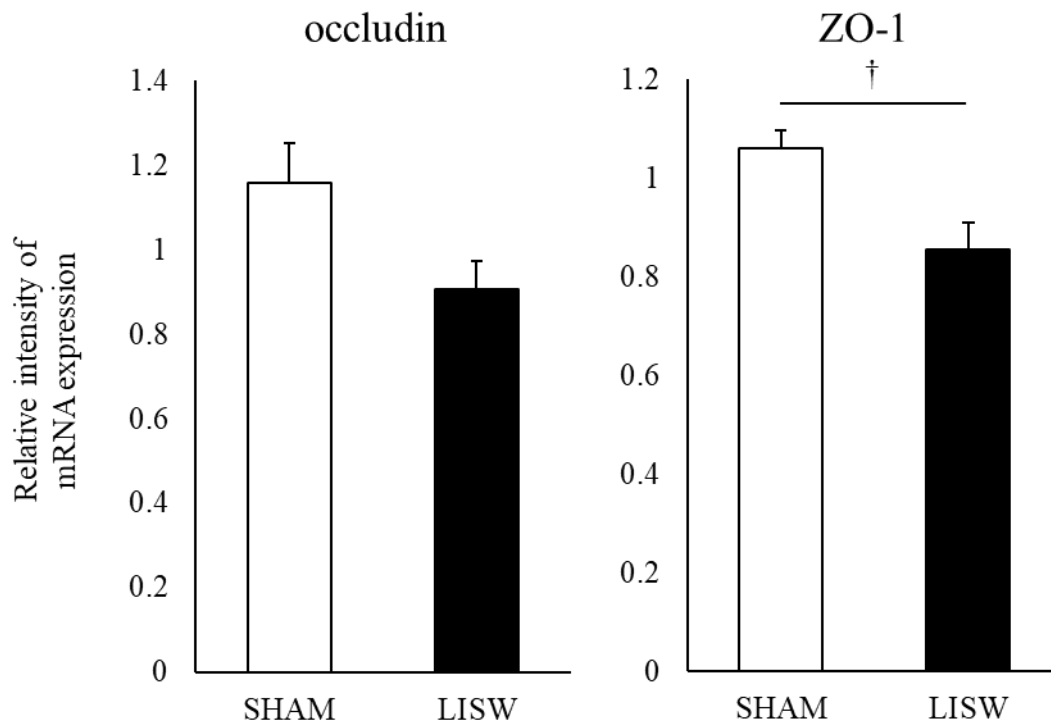


図5 腸管透過性の評価

(A) 門脈の血清中 FITC-4kDa 濃度の比較

対照群を SHAM 群 (n = 4) , LISW 頭部照射を行った群を LISW 群 (n = 4) とした. 経十二指腸的に FITC-4kDa を 0.1 mmol/l 10 ml 投与し, 30 分後に門脈から採血し血清を得た. 血清中の FITC-4kDa 濃度は LISW 群では SHAM 群と比較して有意に上昇していた.

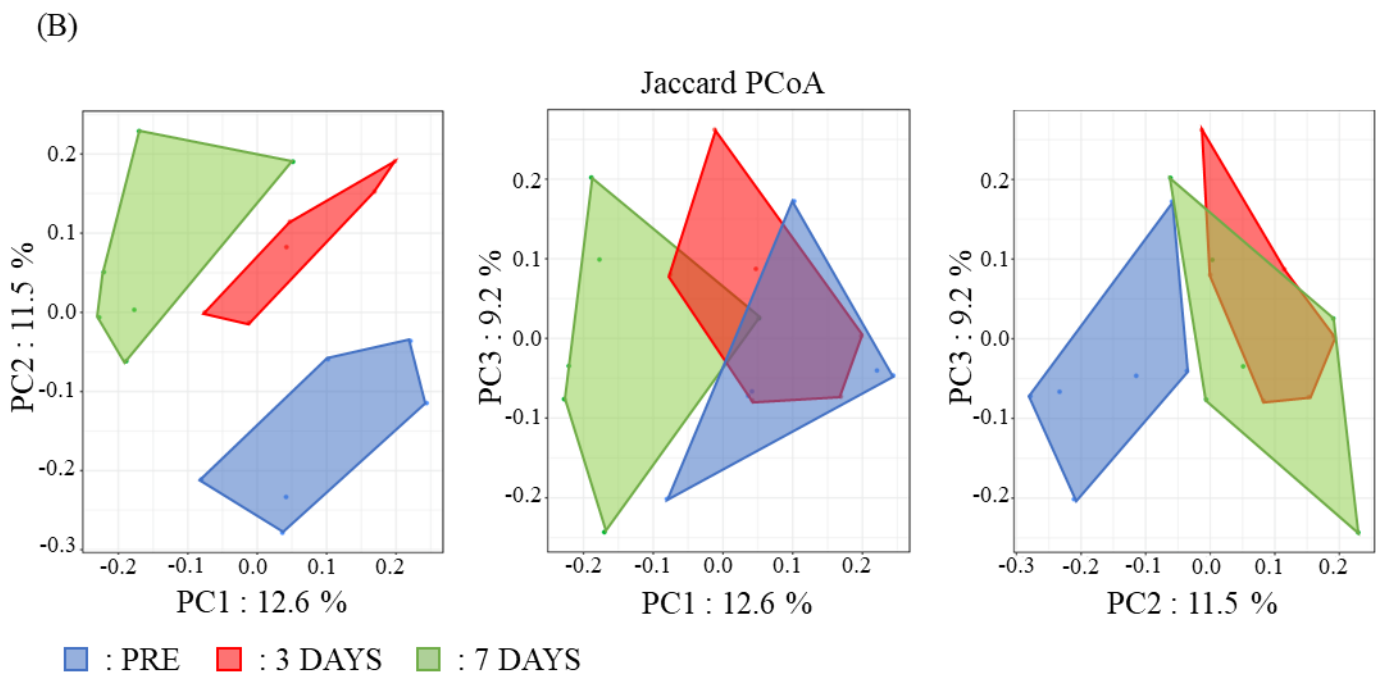
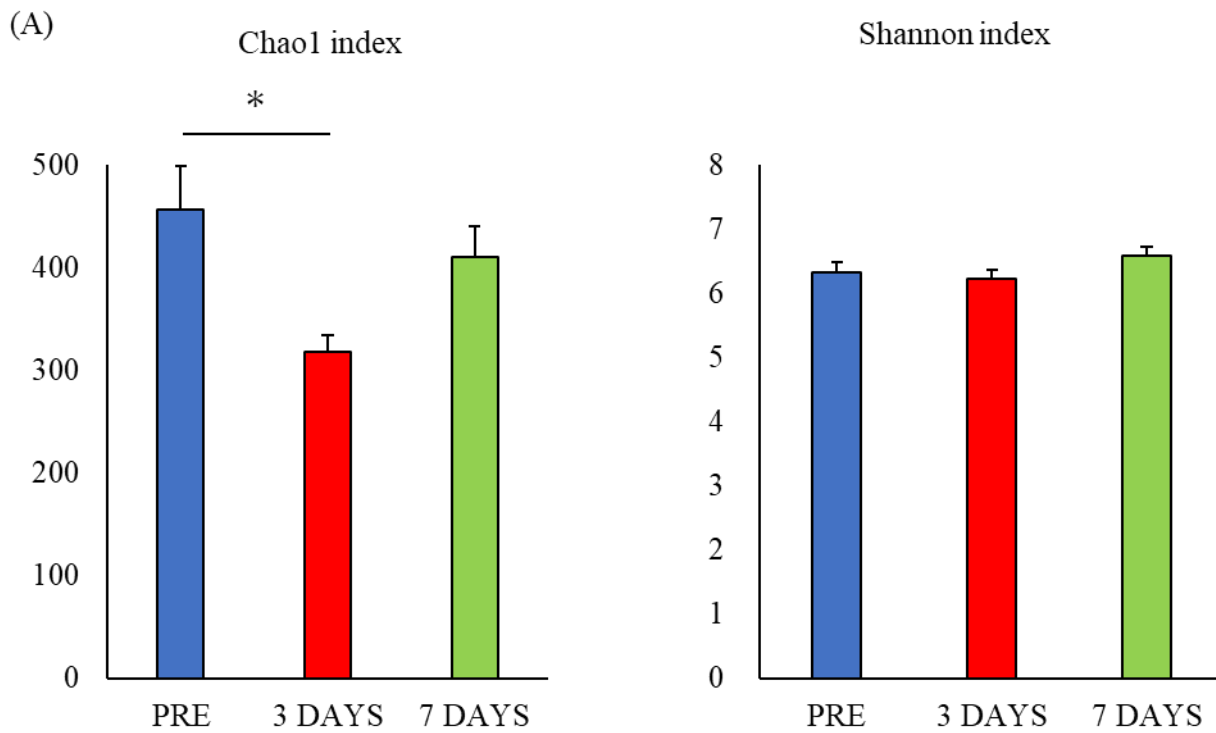
* p < 0.01

(B) タイトジャンクション系タンパク質の mRNA の比較

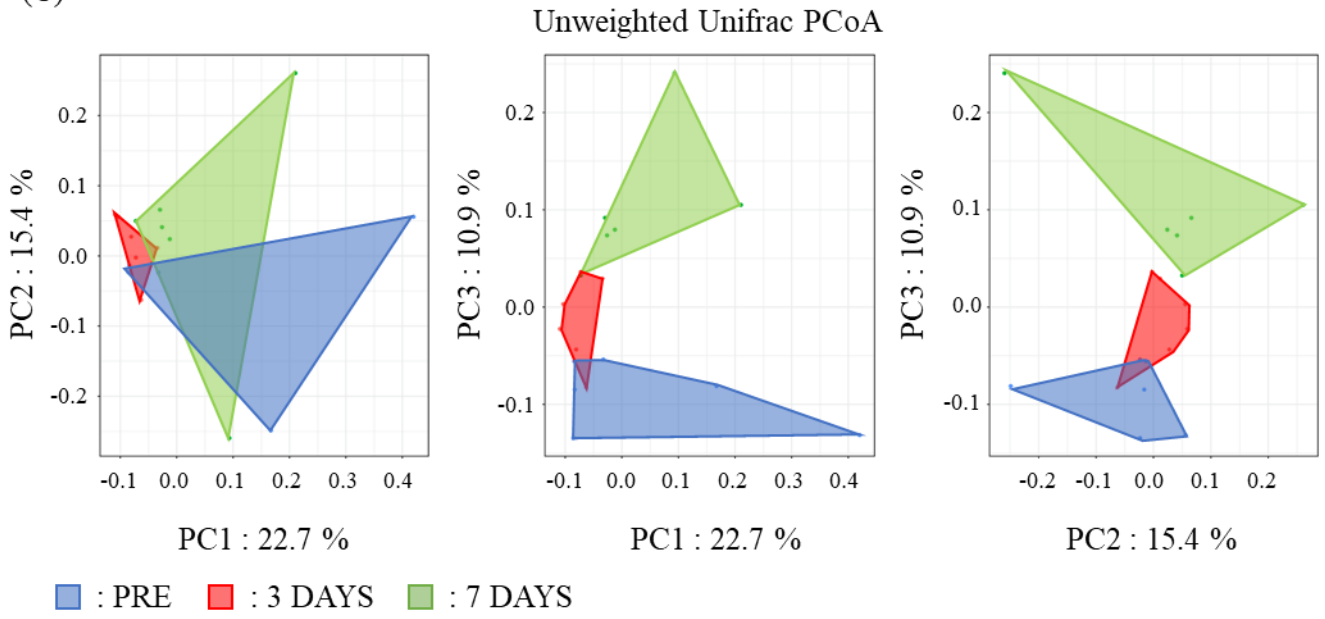
対照群を SHAM 群 (n = 6) , LISW 頭部照射を行った群を LISW 群 (n = 7) とした. LLISW 群の回腸末端での occludin の mRNA の発現量は, SHAM 群と比較して低い傾向にあった. ZO-1 の発現量は LLISW 群で有意に低かった.

† p < 0.05

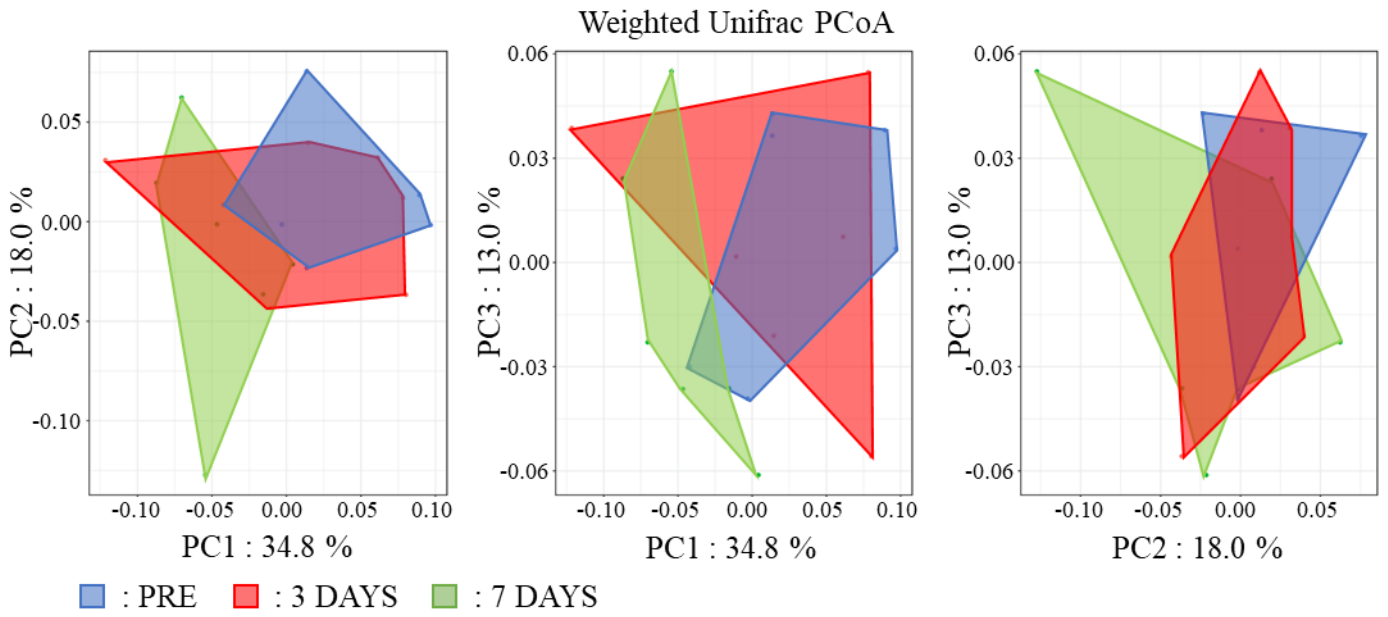
FITC-4kDa : fluorescein isothiocyanate dextran 4kDa, LISW : Laser-induced shock wave, ZO-1 : zonula occludens-1



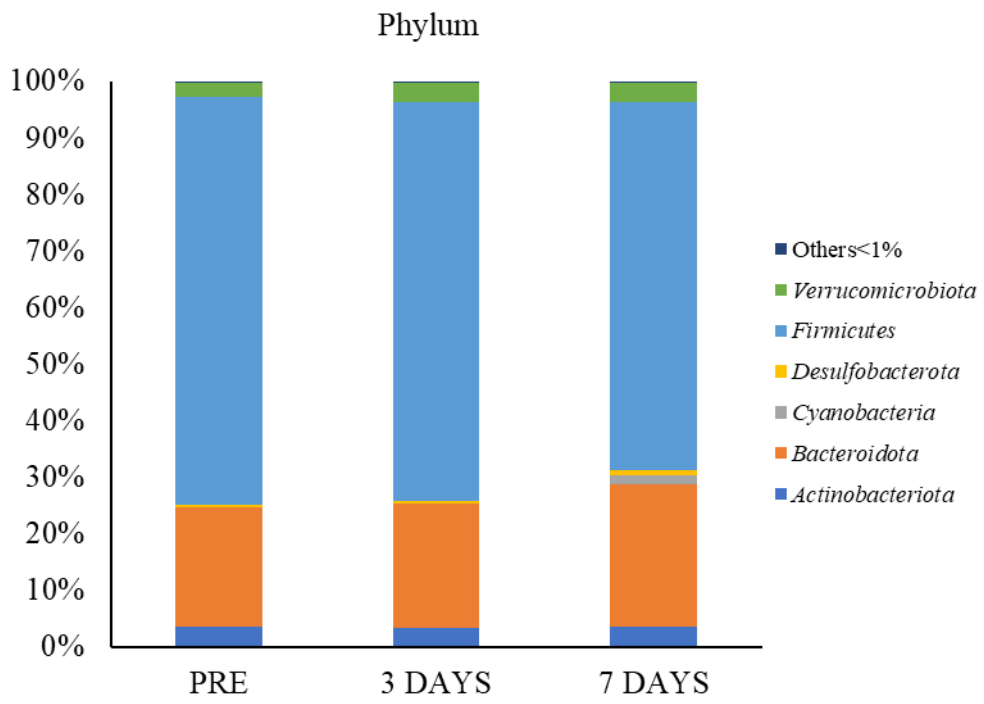
(C)



(D)



(E)



(F)

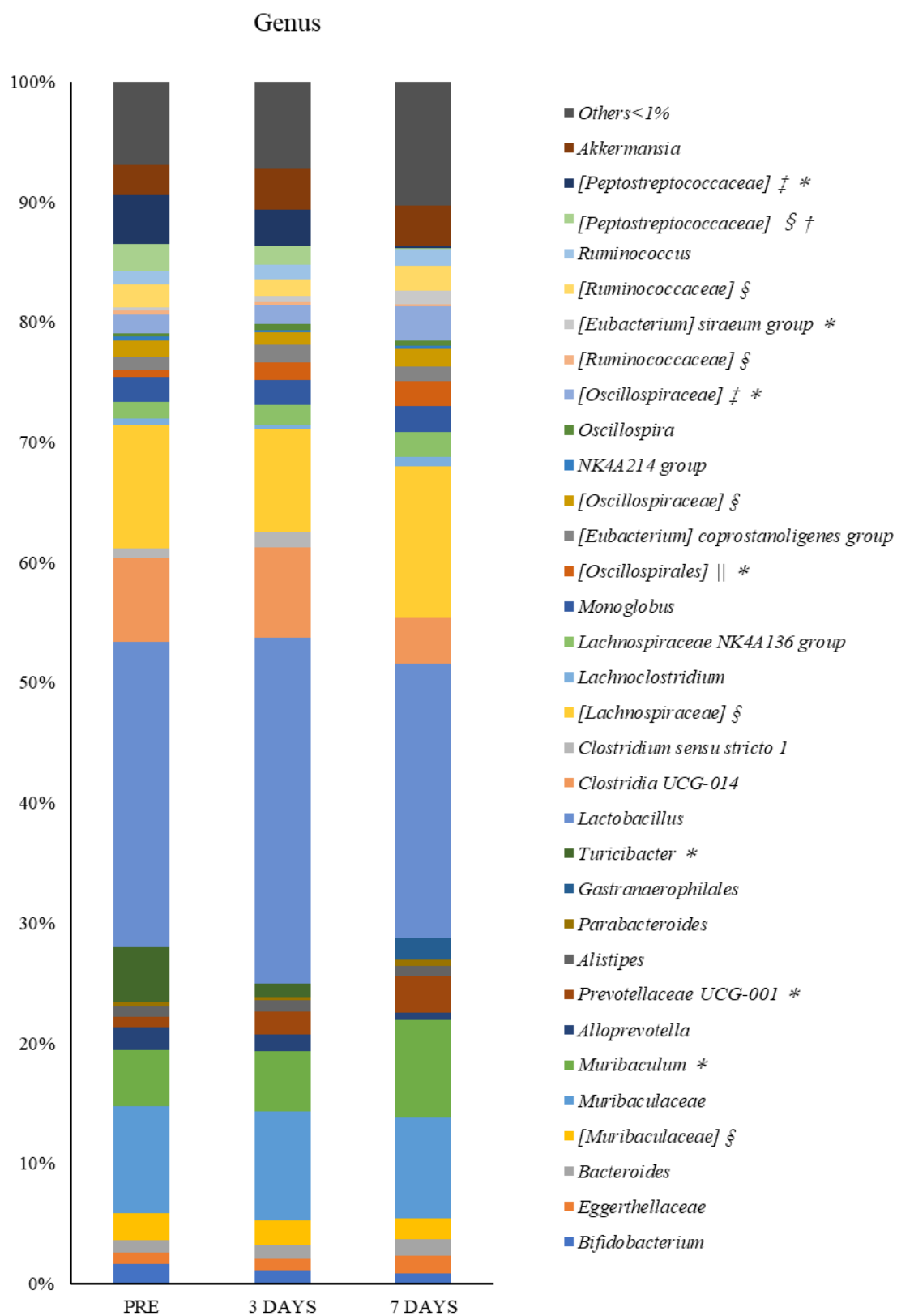


図 6 腸内細菌叢の検討

LISW の照射前 (PRE 群), 照射後 3 日 (3 DAYS 群), 照射後 7 日 (7 DAYS 群) の新鮮な便を採取し比較検討を行った (各 n = 6) .

(A) α 多様性の検討

Chao1 index (左図) では 3 DAYS 群は PRE 群と比較して有意に低かった. また shannon index (右図) では 3 群間において有意差は認めなかった.

* $p < 0.05$

(B) β 多様性の検討, Jaccard PCoA

各個体の座標を群別に囲って表示している. 3 群は異なる分布であることがわかる.

青色 : PRE 群の細菌叢分布, 赤色 : 3 DAYS 群の細菌叢分布, 緑色 : 7 DAYS 群の細菌叢分布

(C) β 多様性の検討, UniFrac 距離の Unweighted PCoA

各個体の座標を群別に囲って表示している. 3 群は異なる分布であることがわかる.

青色 : PRE 群の細菌叢分布, 赤色 : 3 DAYS 群の細菌叢分布, 緑色 : 7 DAYS 群の細菌叢分布

(D) β 多様性の検討, UniFrac 距離の Weighted PCoA

各個体の座標を群別に囲って表示している. PRE 群と 7 DAYS 群は異なる分布であることがわかる.

青色：PRE 群の細菌叢分布，赤色：3 DAYS 群の細菌叢分布，緑色：7 DAYS 群の細菌叢分布

(E) 便中細菌叢の門レベルでの相対豊富度

存在比率 1%以上の 6 門における相対豊富度を示す。3 群間で門レベルでの相対豊富度に有意な差は認めなかった。

(F) 便中細菌叢の属レベルでの相対豊富度

存在比率 1%以上の 32 属における相対豊富度を示す。PRE 群と 7 DAYS 群に注目し比較すると 7 DAYS 群で *Muribaculum*, *Prevotellaceae* UCG-001, [*Oscillospirales*], [*Oscillospiraceae*], [*Eubacterium*] *siraenum* group が有意に増加し, *Turicibacter*, [*Peptostreptococcaceae*] (■および■で示した両属) が有意に低下していた。

* $p < 0.05$, PRE vs. 7 DAYS

† $p < 0.01$, PRE vs. 7 DAYS

‡ 角括弧の科まで同定できたものの，培養されなかったもの

§ 角括弧の科まで同定できたものの，属での所属位置不明なもの

|| 角括弧の目まで同定できたものの，属での所属位置不明なもの

表 1 Jaccard 距離, Unweighted UniFrac 距離, Weighted UniFrac 距離解析

Group	jaccard			Unweighted UniFrac			Weighted UniFrac		
	pseudo-F	p-value	q-value	pseudo-F	p-value	q-value	pseudo-F	p-value	q-value
PRE vs. 3 DAYS	1.6603	0.005	0.007†	1.5523	0.033	0.033 *	0.4361	0.877	0.877
PRE vs. 7 DAYS	2.0819	0.004	0.007†	1.6600	0.028	0.033 *	2.6929	0.011	0.033 *
3 DAYS vs. 7 DAYS	1.4406	0.007	0.007†	1.4955	0.008	0.024 *	1.6575	0.137	0.206

系統を加味しない Jaccard 距離では各 3 群とも異なるすべて異なっていた。占有率を加味しない Unweighted UniFrac 距離でも同様に各 3 群とも異なるすべて異なっていた。占有率を加味する Weighted UniFrac 距離では PRE 群と 7 DAY 群は異なっていた。

* $q < 0.05$, † $q < 0.01$

PCoA : Principal Coordinate Analysis, LISW : Laser-induced shock wave