



ラット空腸腸絨毛における小型乳ビ球の毛細血管からの取り込みに関する超微形態学のおよび免疫組織化学的研究

高原, 英一郎

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2015-03-06

(Date of Publication)

2016-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3272号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003272>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博 士 論 文

ラット空腸腸絨毛における小型乳ビ球の毛細血管からの
取り込みに関する超微形態学的および
免疫組織化学的研究

平成 27 年 1 月

高原 英一郎

本論文の付図等は「社団法人日本獣医学会」に帰属する。

目 次

総 緒	1
第I章 ラット空腸腸絨毛における小型の乳ビ球の毛細血管からの 取り込みに関する超微形態学的研究	9
I-1. 小 緒	10
I-2. 材料および方法	12
1) 供試動物および飼育法	12
2) 材料採取および組織学的処理	12
3) 定量組織学的観察法	13
I-3. 結 果	15
1) 絨毛円柱上皮細胞内における脂肪滴について	15
2) 腸絨毛における乳ビ球の定性的分布について	15
3) 腸絨毛における乳ビ球の定量的分布について	16
I-4. 考 察	18
1) 絨毛円柱上皮細胞内における脂肪滴について	18
2) 腸絨毛の毛細血管による小型の乳ビ球の輸送について	18
3) 腸絨毛の毛細血管内皮における小型の乳ビ球の 通過に関わる受容体について	19
I-5. 小 括	21
第II章 ラット空腸腸絨毛の毛細血管における小型の乳ビ球の 輸送に関わる受容体に関する免疫組織化学的研究	22
II-1. 小 緒	23
II-2. 材料および方法	25
1) 供試動物および飼育法	25
2) 材料採取および組織学的処理	25
3) 免疫組織化学的染色法	26
4) 脂肪染色法	26
5) 定量組織学的観察法	27
6) 統計処理	27

II-3. 結果	28
1) 腸絨毛における脂肪滴および乳ビ球の分布について	28
2) 上皮直下の毛細血管内皮およびその他の組織構成要素 における受容体の発現について	28
II-4. 考察	30
1) 本実験における免疫組織化学的染色の特異性について	30
2) 毛細血管における小型の乳ビ球に対する受容体について	31
3) 毛細血管による小型の乳ビ球の輸送の意義について	31
II-5. 小括	34
総括	35
Abstract	38
謝辞	41
引用文献	42
付図および付図説明	55

総 緒

食餌中の脂質は主に長鎖脂肪酸からなる中性脂肪で構成される[Borgström, 1962; Hofmann and Borgström, 1962]。食餌中の脂質の消化は胃で唾液腺ないし胃腺から分泌されるリパーゼによって開始され、ラットの胃では投与されたコーン油に含まれるトリグリセリドの 29%が 20 分以内にグリセロールと遊離脂肪酸に加水分解されることが明らかにされている[DeNigris *et al.*, 1988; Hamosh and Scow, 1973]。また、哺乳期のラットでは摂取した母乳中のトリグリセリドの大部分が胃でジグリセリドと炭素数 12 以上の遊離脂肪酸に加水分解される[Helander and Olivecrona, 1970]。さらに、胃粘膜の上皮細胞内には脂肪滴がみとめられるが、上皮細胞間隙にはみられないことから、小腸の粘膜とは異なって乳ビ球を産生しないか、するとしても微量であると考えられている[Helander and Olivecrona, 1970]。

小腸では、脂肪に含まれるトリグリセリドやトリグリセリドの分解産物であるジグリセリドがコリパーゼの補助の下に腓リパーゼによって加水分解される[Borgström, 1975]。腓リパーゼは主にトリグリセリドの 1, -3 エステル結合を加水分解し、2-モノグリセリドと遊離脂肪酸を生じる[Mattson *et al.*, 1952; Mattson and Beck, 1956; Mattson and Volpenhein, 1968; Schønheyder and Volqvarts, 1952]。モノグリセリドと遊離脂肪酸は肝臓から小腸内に分泌される胆汁酸の働きによってミセル化されて親水性が向上し、これらの濃度勾配にしたがって腸管内腔を拡散することにより粘膜上皮細胞に達する。上皮細胞表面ではミセルから遊離脂肪酸が遊離し、受動拡散によって粘膜上皮細胞に吸収されるとされる[Hofmann, 1963; Hofmann and Borgström, 1964; Westergaard and Dietschy, 1976; Simmonds *et al.*, 1967]。一方、ラットの空腸を用いた *in vitro* での研究によると、食餌中の脂質濃度が高い状態では受動拡散によって上皮細胞に取り込まれるが、脂質が低濃度の状態では能動輸送によって取り込まれるとされる[Chow and Hollander, 1979]。また、ラットの空腸では、炭素数の少ない

脂肪酸で構成されたトリグリセリドは炭素数の多い脂肪酸で構成されたトリグリセリドに比べて加水分解される速度が速く、粘膜上皮に吸収される量も多いとされる [Greenberger *et al.*, 1966; Westergaard and Dietschy, 1976]。粘膜上皮細胞に吸収された遊離脂肪酸はそのまま上皮細胞外に放出されるか、または上皮細胞の小胞体でトリグリセリドに再合成されて脂肪滴になってから上皮細胞外に放出される。すなわち、炭素数が 7 個以下の脂肪酸は全て直接毛細血管から全身循環血に運ばれるが、炭素数が 8 から 10 個の脂肪酸の約 10%，炭素数が 12 個の脂肪酸の約 50%，および炭素数が 13 個以上の脂肪酸の 80 から 90%以上がトリグリセリドに再合成されて上皮細胞内で脂肪滴となることが報告されている [Bloom *et al.*, 1951; Greenberger *et al.*, 1966; van Greevenbroek and de Bruin, 1998]。この脂肪滴にはアポ A やアポ B48 などの各種アポリポタンパク質が結合した後、乳ビ球として上皮細胞間隙や粘膜固有層へ放出される。上皮細胞から放出された乳ビ球は粘膜固有層中の毛細血管からは吸収されず、中心リンパ管に取り込まれて輸送されるとされている [Bloom *et al.*, 1951; Friedman and Cardell, 1972; Glickman *et al.*, 1986; Johnston and Borgström, 1964; Mansbach II and Gorelick, 2007; Palay and Karlin, 1959; Westergaard and Dietschy, 1976]。

小腸に流入するコレステロールには主に食餌由来のものと胆汁由来のものがある [Grundy, 1978]。食餌由来の一部のコレステロールはエステル化して脂肪酸と結合しており、膵液に含まれるコレステロールエステラーゼによって加水分解される [Stern and Treadwell, 1958]。コレステロールの吸収も脂肪酸と同様に小腸でおこなわれ、コレステロールは胆汁酸の働きによってモノグリセリドや遊離脂肪酸とともにミセルを形成した後、粘膜上皮細胞の表面でミセルから遊離し、受動拡散によって粘膜上皮細胞に吸収される [Ashworth and Lawrence, 1966; Hofmann and Borgström, 1964; Westergaard and Dietschy, 1974, 1976]。コレステロールの吸収への胆汁酸の関与については、先天的に胆汁酸を合成できないヒトに胆汁酸を摂取させると、小腸におけるコレステロールの吸収率が約 55%も向上する事実からも分かる [Woollet, *et al.*,

2006]。

胆汁酸は肝臓でコレステロールから合成され、ビリルビン、コレステロールやアミノ酸などが加えられて胆汁として十二指腸へ分泌される[Boyer, 2013; Chiang, 2013]。胆汁酸の主な成分はコール酸とケノデオキシコール酸で、タウリンやグリシンと抱合されて胆汁として分泌される[Chiang, 2013]。肝臓で産生された胆汁酸は一次胆汁酸と呼ばれ、小腸内で常在細菌によって二次胆汁酸であるリトコール酸やデオキシコール酸に変えられた後[Chiang, 2013]、95%以上が回腸で再吸収され、肝門脈を介して肝臓に運ばれて再利用される（腸肝循環：Redinger, 2003）。

動物の血液やリンパを介する脂質の輸送はリポタンパク質によっておこなわれる。リポタンパク質は中性脂肪やコレステロールエステルによって構成されたコアが、アポリポタンパク質やリン脂質、コレステロールで構成された被膜によって包まれた球状を呈する。リポタンパク質は大型になるほど中性脂肪の割合が上昇して比重が低下するため、臨床的および生理学的には比重や直径を指標として乳ビ球（0.94 g/ml 未満の比重；75 nm より大きい直径）、超低比重リポタンパク質（Very low density lipoprotein; 以下 VLDL, 0.94 g/ml 以上 1.006 g/ml 未満の比重；28 nm より大きく、75 nm 以下の直径）、低比重リポタンパク質（Low density lipoprotein; 以下 LDL, 1.006 g/ml 以上 1.063 g/ml 未満の比重；21 nm より大きく、28 nm 以下の直径）および高比重リポタンパク質（High density lipoprotein; 以下 HDL, 1.063 g/ml 以上 1.210 g/ml 未満の比重；7 nm より大きく、21 nm 以下の直径）に分類される[Green and Glickman, 1981; Jonas, 2002]。一方、小腸で産生されるリポタンパク質の基本的な構造は前記のリポタンパク質の基本構造と同じであり[Green and Glickman, 1981; Mahley *et al.*, 1984; Tso *et al.*, 1983, 1984]、小腸で産生されたすべてのリポタンパク質が従来乳ビ球と呼ばれてきたことから、本論文では小腸で産生されたすべてのリポタンパク質を一括して乳ビ球と呼称する。

リポタンパク質の被膜に存在するアポリポタンパク質には、アポ A（A1, A2, A4, A5）、アポ B（B48, B100）、アポ C（C1, C2, C3）およびアポ E などがある[Green

and Glickman 1981; Jonas, 2002]。アポ A は小腸と肝臓で合成され、Lecitin-cholesterol acyltransferase (LCAT) を活性化する働きがある[Green and Glickman 1981; Jonas, 2002]。LCAT は肝臓で合成されて HDL の膜に結合した酵素であり、HDL の膜に存在する遊離コレステロールをエステル化してコアに移行させる働きがある[Ramasamy, 2014]。また、アポ A による LCAT の活性化は ATP 結合カセット輸送タンパク質 A1 (ATP binding cassette transporter A1; 以下 ABCA1) の働きの亢進によって組織からの遊離コレステロールの取り込みを促進させる[Green and Glickman, 1981; Jonas, 2002; Ramasamy, 2014]。アポ B は小腸と肝臓で合成される。アポ B はアポリポタンパク質の中で分子量が最も大きく、リポタンパク質の構造維持に関わるため、リポタンパク質の合成と分泌に必須とされる。アポ B にはアポ B48 とアポ B100 の 2 種類が存在しており、アポ B100 がアポ B 遺伝子の mRNA の全長が翻訳されたタンパク質であるのに対し、アポ B48 は転写後の修飾によって mRNA の全長の N 末端側の約 48% までしか翻訳されない短縮化されたタンパク質である。アポ B100 の C 末端側の領域には LDL 受容体に結合する部位があるため、アポ B100 は LDL 受容体と結合できるが、アポ B48 にはその領域がないために LDL 受容体とは結合できない[Jonas, 2002; Ramasamy, 2014]。一般にアポ B48 が小腸で合成され、アポ B100 が肝臓で合成されるとされるが、イヌ、ウマ、ラットやマウスでは肝臓でも転写後に修飾を受けて短縮化したアポ B の mRNA がみとめられるとともに、ラット肝臓由来の培養細胞はアポ B100 に加えてアポ B48 と考えられる小型のアポ B タンパク質も合成するとされる[Davis *et al.*, 1985; Greeve *et al.*, 1993]。一方、ヒト、サル、ブタ、ウシ、ヤギやネコの肝臓ではアポ B48 の合成が確認されておらず、ウサギやモルモットでも肝臓で合成されるアポ B のうち、99% 以上がアポ B100 であるとされる[Greeve *et al.*, 1993]。アポ C は肝臓と小腸の両方で合成され、肝臓の方が小腸より合成量が多いとされる。アポ C1 は細胞によるリポタンパク質の取り込みを阻害し、アポ C2 は Lipoprotein lipase (LPL) を活性化してリポタンパク質中のトリグリセリドの加水

分解を促進するとともに、アポ C3 は LPL の活性を抑制してトリグリセリドの加水分解を抑制するとされる[Green and Glickman 1981; Jonas, 2002; Ramasamy, 2014]。アポ E は主に肝臓で合成されるが、小腸由来のリポタンパク質もアポ E を保有するとされる。アポ E は LDL 受容体や VLDL 受容体のリガンドであり、リポタンパク質の細胞への取り込みを仲介するとされる[Green and Glickman 1981; Jonas, 2002; Ramasamy, 2014]。

一般的に血液中のリポタンパク質は LDL 受容体、VLDL 受容体やアポ B48 受容体にアポリポタンパク質が認識されて様々な細胞に取り込まれる[Gianturco *et al.*, 1988, 1994; Go and Mani, 2012]。細胞内に取り込まれたリポタンパク質はライソゾームに輸送されて加水分解を受け、脂質とタンパク質に分解されてから代謝されると考えられている[Go and Mani, 2012; Heeren *et al.*, 1999]。LDL 受容体はアポ E およびアポ B100 を認識し、主に LDL、VLDL 残渣や乳ビ球残渣に結合するとされる。全身の様々な組織中の細胞に LDL 受容体が発現しており、コレステロールの組織内の細胞への輸送に関わるとされる[Go and Mani, 2012]。VLDL 受容体はアポ E を認識するとされ、乳ビ球残渣、VLDL や VLDL 残渣を主に認識するが、LDL とは結合しないとされる。[Go and Mani, 2012; Niemeier *et al.*, 1996]。VLDL 受容体は心臓、脂肪組織、骨格筋や毛細血管の内皮細胞に幅広く発現する他、臍静脈の内皮細胞や平滑筋の細胞質にも発現するが、肝臓には発現しないとされる[Niemeier *et al.*, 1996; Mulhaupt *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 1992, 1995]。アポ B48 受容体はアポ B48 を認識し、血液の単球やマクロファージに発現するとされる。生理的条件下では細胞への脂質の供給に関わるが、高トリグリセリド血症の患者ではマクロファージの泡沫化や動脈硬化を引き起こす要因の一つと考えられている[Gianturco *et al.*, 1988, 1994, 1998]。

循環血中の乳ビ球では、脂肪組織の毛細血管などで発現する LPL によってコアに含まれるトリグリセリドが脂肪酸やグリセロールに徐々に加水分解され、放出される[Blanchette-Mackie and Scow, 1973]。乳ビ球から放出された脂肪酸やグリセロール

は毛細血管内皮を通過し、組織内に到達する[Blanchette-Mackie and Scow, 1971; Scow *et al.*, 1972]。一方、乳ビ球中のコレステロールは末梢組織へはほとんど輸送されないため、乳ビ球はコレステロールとタンパク質の割合が増加した小型の乳ビ球残渣へと変化し、最終的に LDL 受容体や乳ビ球残渣受容体を介して肝臓内で処理される[Kita *et al.*, 1982; Nestel *et al.*, 1962; Redgrave, 1970]。また、肝臓では乳ビ球よりもトリグリセリドの多くを失った乳ビ球残渣の方がより取り込まれやすい[Felts *et al.*, 1975; Redgrave, 1970]。そのため、乳ビ球に含まれるコレステロールのほとんどが肝臓に輸送されるのに対し[Nestel *et al.*, 1963; Stein *et al.*, 1969], 乳ビ球に含まれるトリグリセリドの多くが末梢組織へ輸送され、肝臓へ輸送される量は 3 分の 1 から 5 分の 1 程度とされる[Felts *et al.*, 1975; Nestel *et al.*, 1962; Redgrave, 1970]。

肝臓では、蓄えられた中性脂肪やコレステロールから VLDL が合成され、血中へ分泌される[Jonas, 2002; Kay and Entenman, 1961]。この肝臓性 VLDL も乳ビ球と同様に血液中で LPL によるトリグリセリドの分解を受けて小型化し、VLDL 残渣や LDL となった後、アポ B100 ないしはアポ E と LDL 受容体との結合を介して肝臓や様々な組織内の細胞に取り込まれる[Eisenberg, *et al.*, 1973; Felts *et al.*, 1975; Kompiang *et al.*, 1976]。また、VLDL や VLDL 残渣の一部は肝臓以外の末梢組織でアポ E を介して VLDL 受容体によって組織中の細胞に取り込まれる[Takahashi, 1992, 2004; Tiebel *et al.*, 1999]。小腸の上皮細胞でも小型の乳ビ球である VLDL が合成されており、小腸性 VLDL とも呼ばれる[Green and Glickman, 1981; Hayashi, *et al.*, 1990]。この小腸性 VLDL に関して、飢餓時にはより大型の乳ビ球の合成が低下するが、小腸性 VLDL の合成が低下しないため、より大型の乳ビ球とは上皮細胞内での合成経路が異なると考えられている。しかしながら、小型の乳ビ球である小腸性 VLDL のアポリポタンパク質の構成が大型の乳ビ球と同じであるが、肝臓性 VLDL とは異なることから、小腸性 VLDL の血液中での代謝過程は大型の乳ビ球と同様であると考えられる[Green and Glickman, 1981; Hayashi, *et al.*, 1990; Tso *et al.*, 1983, 1984]。

HDL は肝臓や小腸で産生されるとともに[Felker *et al.*, 1977; Green *et al.*, 1978; Haft *et al.*, 1962], 乳ビ球や VLDL が血漿中で LPL によってトリグリセリドを加水分解されることによっても産生される[Eisenberg *et al.*, 1973; Redgrave and Small., 1979]。産生された直後の HDL は円盤状であるが[Green *et al.*, 1978], 血液中で ABCA1 や LCAT の働きによって末梢組織からコレステロールを取り込んで球形の HDL へと変化し、最終的に肝臓で取り込まれるとされる。このように HDL は末梢組織中のコレステロールを肝臓へ輸送する働きがあると考えられている[Jonas, 2002; Lewis and Rader, 2005]。

一般的に小腸では、食餌由来の脂肪酸から腸絨毛の上皮細胞で合成された乳ビ球が中心リンパ管から吸収されて胸管を介して全身循環に合流するとされてきた[Dixon, 2010; Zilversmit *et al.*, 1967]。しかしながら、古くから小腸内腔の大型分子や粒子状物が全身循環血中に出現するパーソープションと呼ばれる現象が多数報告されており[Hillyer and Albrecht, 2001; Oesterlen, 1846; Volkheimer 1964, 1977, 1993; Volkheimer and Schulz., 1968; Volkheimer *et al.*, 1969], ラットでは小腸内の粒子状物が特異抗体と Fc 受容体を介して小腸腸絨毛先端のアポトーシス発現絨毛円柱上皮細胞から取り込まれ、毛細血管内に取り込まれて門脈を介して肝臓へ輸送されることが明らかにされている[Yuji *et al.*, 2007, 2012]。これらのことから、腸絨毛内の毛細血管は大型分子や粒子状物の取り込み能を有する特殊な毛細血管であると言える。また、絨毛円柱上皮細胞で形成される乳ビ球の直径は 10 数から 600 nm 程度で[Jonas, 2002], 従来報告されてきたパーソープションされた粒子状物の大きさの範囲内であることから、乳ビ球もまた腸絨毛の毛細血管から取り込まれる可能性が想定される。そこで、本研究では、絨毛円柱上皮細胞で産生された乳ビ球が上皮直下の毛細血管からも取り込まれることを証明するために、第 I 章では透過型電子顕微鏡下で超微形態学的にラットの空腸の腸絨毛を精査し、乳ビ球が毛細血管内皮を通過して内腔へ取り込まれるか否かについて定量組織学的に調べるとともに、第 II 章では乳ビ球の毛細血管内腔へ

の取り込みに関わる受容体を免疫組織化学的に調べた。この際、腸絨毛の最内腔側から腸陰窩開口部までを 3 等分し、それぞれ頂部、中部および基部とした。また、頂部の最内腔側の部位の先端部を先端と呼称して記載した。

第 I 章

ラット空腸腸絨毛における小型の乳ビ球の毛細血管からの
取り込みに関する超微形態学的研究

I-1. 小 緒

小腸では、食餌由来の脂肪は脂肪酸とグリセロールに分解され、脂肪酸のうち短鎖脂肪酸と中鎖脂肪酸の一部は絨毛円柱上皮細胞から取り込まれた後、脂肪酸の状態で上皮毛細血管から輸送されるが、残りの中鎖脂肪酸と長鎖脂肪酸は上皮細胞に取り込まれた後、上皮細胞内でトリグリセリドに再合成されて脂肪滴となり、乳ビ球として上皮細胞間隙や粘膜固有層へ放出される[Friedman and Nylund, 1980]。小腸絨毛の上皮細胞から粘膜固有層へ放出された乳ビ球は中心リンパ管のみから輸送され、上皮直下の毛細血管からは輸送されないとされてきた[Dobbins, 1969; Friedman and Nylund, 1980; Kvietys and Granger, 2010]。一方、腸管内腔の様々な物質が消化されることなく、直接全身循環血中に移行するパーソープションと呼ばれる現象がヒトや様々な動物で報告されてきた（ニジマス[McLean and Ash, 1987], ニワトリ[Volkheimer, 1977], マウス[Hillyer and Albrecht, 2001; Simon *et al.*, 1995], ラット[Jani *et al.*, 1990; Wells *et al.*, 1988], ウサギ[Udall *et al.*, 1981], イヌ[Herbst *et al.*, 1844; Volkheimer and Schulz, 1968; Volkheimer *et al.*, 1969], ヒト[Husby *et al.*, 1986; Volkheimer and Schulz, 1968]）。パーソープションされる物質については多種多様である（花粉と孢子[Volkheimer, 1964], デンプン粒子[Herbst *et al.*, 1844; Volkheimer, 1977], 木炭粒子[Oesterlen, 1846], 塩化ビニル粒子と鉄粒子[Volkheimer, 1977; Volkheimer *et al.*, 1969], 金粒子[Hillyer and Albrecht, 2001], ウシ血清アルブミン[Yuji *et al.*, 2006], ウシ血清アルブミン被覆ヒツジ赤血球[Yuji *et al.*, 2007]）。また、パーソープションされる物質の大きさについても血漿アルブミン[Yuji *et al.*, 2006]や西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）[McLean and Ash, 1987]などの分子から、直径 0.8 μm 程度のラテックス粒子[Wells *et al.*, 1988], 直径 1 μm 前後のポリスチレン粒子[Simon *et al.*, 1995]ならびに直径 7~22 μm のデンプン粒子[Volkheimer and Schulz, 1968]まで様々である。生体の組織中では、一般的に血管から漏出した血漿アルブミンなどの分子は毛細血管ではなく、リンパ管を介して全身循環血に戻されるが[Dixon, 2010; Friedman and Nylund, 1980; Mansbach II and Gorelick, 2007; Pepper and Skobe, 2003], 腸管内腔

から組織内にパーソープションされた粒子状物質が直接上皮直下の毛細血管に取り込まれ、門脈血から肝臓へ輸送されることが組織学的に明らかにされている[Yuji *et al.*, 2012]。このことから、小腸腸絨毛の上皮直下の毛細血管は大型の分子や粒子状物の血管外から内腔への取り込み能を有する特殊な血管であることが想定される。一方、小腸で合成される乳ビ球の直径は 10 数から 600 nm であり[Jonas, 2002]、パーソープションが報告されてきた粒子状物の大きさの範囲内であることから、乳ビ球もまた粒子状物と同様に中心リンパ管からのみならず、上皮直下の毛細血管から輸送される可能性が想定される。そこで、本章では乳ビ球が腸絨毛の毛細血管を通じて肝門脈血へ直接輸送されることを明らかにするために、ラットの空腸腸絨毛における乳ビ球の分布を透過型電子顕微鏡を用いて定量組織学的に精査した。

I-2. 材料および方法

1) 供試動物および飼育法

7 週齢の Wistar 系ラットの雄 4 匹（日本 SLC，浜松，日本）を用いた。供試動物の飼育および実験については「神戸大学動物実験実施規則」に基づいておこなった（許可番号：17-04-05）。主要な飼育条件については、 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，湿度を 50-60%，配合飼料（ラボ MR ストック，日本農産工業，横浜，日本）の自由摂食および自由飲水および午前 6 時から午後 6 時までの 12 時間照明とした。実験期間中，ラットには外見上の異常はみとめられず，健常であり，材料採取時における肉眼解剖学的所見および採取した臓器の組織学的所見においても異常はみとめられなかった。

2) 材料採取および組織学的処理

午前 0 時にペントバルビタールナトリウム（大日本住友製薬，大阪，日本）の腹腔投与による深麻酔下で心臓切開による放血によってラットを安楽死させた後，十二指腸空腸曲から尾部側へ 10 cm 離れた位置から 5 cm 分の空腸を採取し，速やかに 1 mm 幅の組織片に細切した。組織片を素早く 2.0% グルタルアルデヒド - 2.0% パラホルムアルデヒド 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) によって 4°C で 24 時間浸漬固定した。固定後，組織片を 1.0% 四酸化オスミウム - 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) に室温で 90 分間浸漬して後固定した。乳ビ球を同定するために，後固定後，Nakao ら (1992) の方法に従って一部のブロックを 1.0% イミダゾール - 1.0% パラフェニレンジアミン混合液に室温で 2 時間浸漬し，ブロック染色をおこなった。後固定あるいはブロック染色の終了後，エタノール上昇系列によって脱水し，QY-2 で透徹した後エポキシ系樹脂に包埋した。次いでウルトラミクロトーム (Sorvall MT-1; Dupont, Newton, CT, U.S.A.) を用いて 1 μm 厚の準超薄切片を作製し，0.05% トルイジンブルー染色液で染色して光学顕微鏡的観察をおこなった。また，同様にウルトラミクロトームを用いて 70 nm 厚の超薄切片を作製し，3% 酢酸ウラン溶液と 3% クエン酸鉛溶液で電子染

色をおこなった後，加速電圧 75 kV 設定の透過型電子顕微鏡（H-7100；日立，東京，日本）で観察した。

3) 定量組織学的観察法

透過型電子顕微鏡下で各動物から中心軸に沿って縦断された腸絨毛を無作為に 5 本選んだ。各腸絨毛ごとに，腸絨毛先端の上皮直下の毛細血管直上の上皮細胞間隙，その直下の毛細血管近傍の結合組織，上皮直下の毛細血管間の結合組織とその直上の上皮細胞間隙および中心リンパ管先端の内腔の 5 つの部位を選び，倍率 13,000 倍で各部位に含まれる乳ビ球 300 個の直径を計測した。また，腸絨毛基部に存在する細静脈と粘膜下組織に存在する細動脈の内腔の単位面積あたり ($6.0 \times 10^5 \text{ nm}^2$) の乳ビ球の数および直径を計測し，比較検討した（図 1）。なお，乳ビ球の直径については，乳ビ球の長径と短径を計測し，その平均を求めた。

乳ビ球の粒度分布については，直径 15 nm 毎の直径の範囲に含まれる乳ビ球の数を平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。細静脈と細動脈の内腔の単位面積当たりの乳ビ球の数の比較については Student の t 検定を用い，有意水準を 5%とした。

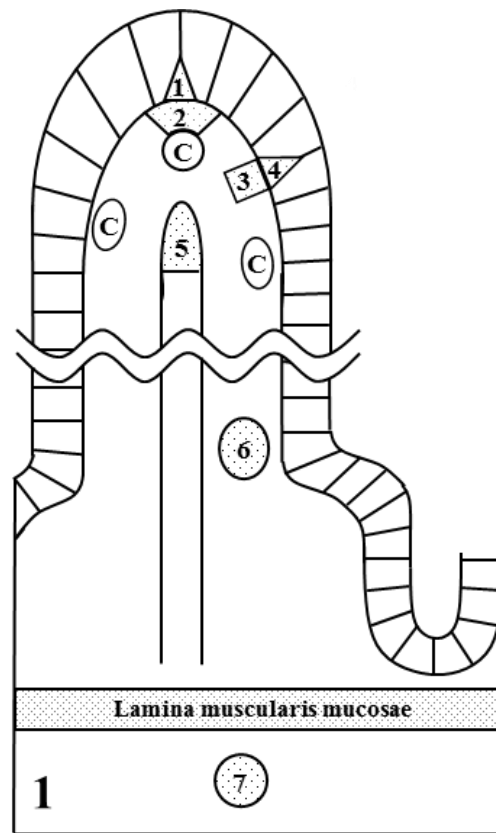


図 1 小腸粘膜における計測部位

1：腸絨毛先端の上皮下毛細血管直上の上皮細胞間隙

2：1 の直下の上皮下毛細血管近傍の結合組織

3：上皮直下の毛細血管間の結合組織

4：3 の直上の上皮細胞間隙

5：中心リンパ管先端の内腔

6：細静脈

7：細動脈

Lamina muscularis mucosae: 粘膜筋板

C: 毛細血管

I-3. 結果

1) 絨毛円柱上皮細胞内における脂肪滴について

腸絨毛頂部の絨毛円柱上皮細胞の細胞質には多数の脂肪滴がみとめられ、脂肪滴の量は腸絨毛先端に向うにつれて増加した（図 2）。腸絨毛頂部の上皮細胞にのみ脂肪滴がみとめられる場合と、腸絨毛中部の上皮細胞から脂肪滴がみとめられる場合があった。上皮細胞内の脂肪滴は円形ないしは楕円形で、その電子密度は高く、均一であった。脂肪滴の大きさは様々であり、微細なものから直径 600 nm 以上の大型の脂肪滴を多数有する上皮細胞もみとめられた（図 3）。腸絨毛の中部の上皮細胞では脂肪滴は微絨毛の直下の端網から基底側に出現し、直径 200 nm 以下の脂肪滴は主に上皮細胞の核から遊離縁側に多くみとめられたが、それ以上の大型の脂肪滴は核の周囲や基底側に多くみとめられた。一方、腸絨毛頂部でも同様に脂肪滴が微絨毛の直下の端網から基底側に出現したが、腸絨毛の中部の上皮細胞に比べて核の周囲から基底側にも小型の脂肪滴が多くみとめられた。また、腸絨毛頂部では、細胞質の全域に大型の脂肪滴が多数充満した上皮細胞がみとめられ、このような上皮細胞では大型の脂肪滴の隙間を埋めるように小型の脂肪滴が充満し、核が変形しているものもみとめられた。腸絨毛先端では直径 600 nm 以上の大型の脂肪滴を含む多数の脂肪滴を有した上皮細胞の脱落像がみとめられた（図 4）。

2) 腸絨毛における乳ビ球の定性的分布について

脂肪滴を有する絨毛円柱上皮細胞間には基底側の上皮細胞間隙に高密度に乳ビ球がみとめられた。乳ビ球の電子密度や均一性は脂肪滴とほぼ同じであった。腸絨毛の中部および先端以外の頂部では上皮細胞間隙は狭く、遊離縁側および基底膜側ともに乳ビ球が高密度でみとめられた。また、腸絨毛先端の上皮細胞間隙は拡張しており、この上皮細胞間隙の遊離縁側では基底側に比べて乳ビ球が少なかった（図 5, 6）。上皮細胞間隙には直径 200 nm を上回る乳ビ球はほとんどみとめられず、直径 600 nm 以上の乳ビ球は全くみとめられなか

った。粘膜固有層には脂肪滴を有する上皮細胞の基底板と結合組織との間に乳ビ球がみとめられたが、基底側の上皮細胞間隙に比べると乳ビ球の密度は低かった（図 7）。また、脂肪滴を有する上皮細胞直下の毛細血管の近傍には乳ビ球がみとめられ、その密度は上皮細胞間隙に比べると低かった。毛細血管内腔には小型の乳ビ球が低密度にみとめられた（図 8）。粘膜固有層内の深部にも乳ビ球がみとめられ、中心リンパ管の周囲および内腔で特に高密度に集積していた（図 9）。粘膜固有層の乳ビ球の形態は上皮細胞間隙の乳ビ球と同じで、直径 200 nm を上回る乳ビ球はほとんどみとめられず、直径 600 nm 以上の乳ビ球も全くみとめられなかった。細動脈と細静脈の内腔には小型の乳ビ球が少数みとめられた（図 10, 11）。

腸絨毛先端の上皮直下の毛細血管の内皮細胞内にはしばしば膜に包まれた小型の乳ビ球がみとめられた（図 12）。

3) 腸絨毛における乳ビ球の定量的分布について

全ての計測部位で直径 600 nm を上回る乳ビ球はみとめられず、ほぼ全ての乳ビ球の直径は 180 nm 未満であった。

腸絨毛先端の上皮直下の毛細血管近傍の結合組織とその直上の上皮細胞間隙に存在する乳ビ球の直径の粒度分布を比較すると、上皮細胞間隙では直径 45 nm 以上 60 nm 未満の乳ビ球が最も多かったのに対して、上皮直下の毛細血管近傍では直径 75 nm 以上 90 nm 未満の乳ビ球が最も多かった（図 13）。一方、腸絨毛先端の上皮直下の毛細血管間の結合組織とその直上の上皮細胞間隙の乳ビ球の粒度分布はほぼ一致しており、両者ともに直径 45 nm 以上 60 nm 未満の乳ビ球が最も多かった（図 14）。

上皮直下の毛細血管近傍の結合組織と上皮直下の毛細血管間の結合組織、さらに中心リンパ管の乳ビ球の粒度分布を比較すると、中心リンパ管で最も出現頻度の高い乳ビ球の直径は 60 nm 以上 75 nm 未満であり、両結合組織の最も出現頻度の高い乳ビ球の直径の中間の値であった（図 15）。

腸絨毛基部の細静脈と粘膜下組織の細動脈の内腔に存在する乳ビ球の個数を比較すると細静脈内腔の方が有意に多かった（図 16）。

I-4. 考察

1) 絨毛円柱上皮細胞内における脂肪滴について

一般に、小腸の腸管内腔から腸絨毛の絨毛円柱上皮細胞に吸収された脂肪酸とモノグリセリドは上皮細胞内でトリグリセリドに再合成されて脂肪滴となり、上皮細胞間隙へ乳ビ球として放出される。この脂質の吸収から放出までの過程は数分以内に起こるとされている[Cartwright *et al.*, 2000; Friedman and Cardell, 1972; Green and Riley, 1981]。胃にコーンオイルを投与したラットの空腸の上皮細胞間隙に存在した乳ビ球の大きさは直径約 120 から 480 nm であると報告されている[Sabesin and Frase, 1977]。また、飢餓状態のラットの腸管膜リンパ管内では直径 20 から 40 nm の乳ビ球が最も多くみられ、ほとんどの乳ビ球は直径 200 nm 以下であると報告されている[Hayashi, *et al.*, 1990]。さらに、生理的条件下のラットを用いた本章での研究においても直径 600 nm より大きい乳ビ球は空腸にはみられず、ほぼ全ての乳ビ球が直径 180 nm 以下であった。加えて、腸絨毛の絨毛円柱上皮細胞内には直径 600 nm よりも大きい脂肪滴が多数みとめられ、腸絨毛先端には細胞質内に大型の脂肪滴を多数有したまま脱落していく絨毛円柱上皮細胞もみとめられたことを考え合わせると、上皮細胞内の直径 600 nm 以上の脂肪滴は乳ビ球として細胞外へ放出されずに上皮細胞とともに腸管内腔へ脱落することが示唆された。

2) 腸絨毛の毛細血管による小型の乳ビ球の輸送について

水や小型の疎水性分子などの毛細血管内皮における透過性は毛細血管内腔と血管外の組織における静水圧と膠質浸透圧のバランスによって制御されており[Starling, 1896]、毛細血管から漏出したタンパク質などの大型分子は一般的に直接毛細血管へ取り込まれずに間質中の毛細リンパ管に取り込まれて最終的に全身循環血に戻るとされる[Pepper and Skobe, 2003]。一方、様々な動物種において大型の分子や粒子状物が消化されずに腸管内腔から全身循環血に移行するパーソープションと呼ばれる現象が報告されており[Volkheimer, 1993],

腸管内腔からパーソープションされた粒子状物は全身循環血中よりも門脈血中に有意に多く出現するとされている[Yuji *et al.*, 2007]。加えて、ラット空腸では粒子状物が腸絨毛の上皮直下の毛細血管内皮を直接通過することが実験的に明らかにされており[Yuji *et al.*, 2012]、腸絨毛の上皮直下の毛細血管は粒子状物の取り込み能を有することが示されている。本章の研究では、体循環血が流れる粘膜下組織の細動脈よりも肝門脈血が流れる腸絨毛基部の細静脈の方が有意に多くの乳ビ球を含んでいた。このことから、空腸の粘膜では体循環血から門脈血に移行する部位である腸絨毛の毛細血管で乳ビ球が加わったことが示唆されている。加えて、本章での観察結果から、上皮直下の毛細血管間の結合組織とその直上の上皮細胞間隙に存在する乳ビ球の直径毎の粒度分布が類似していたのに対して、腸絨毛先端の上皮直下の毛細血管近傍の結合組織とその直上の上皮細胞間隙に含まれる乳ビ球の粒度分布を比較すると、毛細血管近傍では直径 75 nm 未満の乳ビ球が少なかった。これらのことから、直径 75 nm 未満の乳ビ球の数が上皮直下の毛細血管近傍では減少していることが示唆された。加えて、中心リンパ管内腔に含まれる最多乳ビ球の直径は毛細血管間の結合組織と毛細血管近傍の結合組織の最多乳ビ球の直径の間であった。以上の所見を考え合わせると、生理的条件下のラット空腸では直径 75 nm 未満の小型の乳ビ球の一部が上皮直下の毛細血管内に取り込まれて肝門脈を通じて直接肝臓に輸送され、その残りが中心リンパ管を経て体循環血へ輸送されることが示唆された。以上の乳ビ球の輸送経路について図 17 にまとめた。

3) 腸絨毛の毛細血管内皮における小型の乳ビ球の通過に関わる受容体について

リポタンパク質の受容体介在性のトランスサイトosisに関して、ラットの肝臓ではVLDL残渣が洞様毛細血管内皮上の受容体を介してクラスリン被覆小胞に取り込まれ、トランスサイトosisされて肝細胞へ輸送されるとされる[Jones *et al.*, 1984]。今回の超微形態的観察によって直径75 nm未満の小型の乳ビ球が上皮直下の毛細血管の内皮細胞を小胞に包まれて輸送されることが示唆された。直径75 nm未

満の乳ビ球は、VLDL、LDLないしHDLが含まれる可能性があるとともに、15週齢のラットの
 の小腸にVLDL受容体が[García-Miranda, 2010], また、ヒト小腸にLDL受容体が発現すると
 いう報告があること[Rudling *et al.*, 1990], 加えてウサギのVLDL受容体は乳ビ球などのアポ
 Eを保有する乳ビ球などのリポタンパク質と結合し[Takahashi *et al.*, 1992], マウスのLDL受
 容体は乳ビ球残渣の代謝に重要な役割を果たすことから[Ishibashi *et al.*, 1996], ラット空腸
 の腸絨毛では、VLDL受容体ないしLDL受容体が小型の乳ビ球の毛細血管内皮の通過に関わ
 る可能性が考えられた。

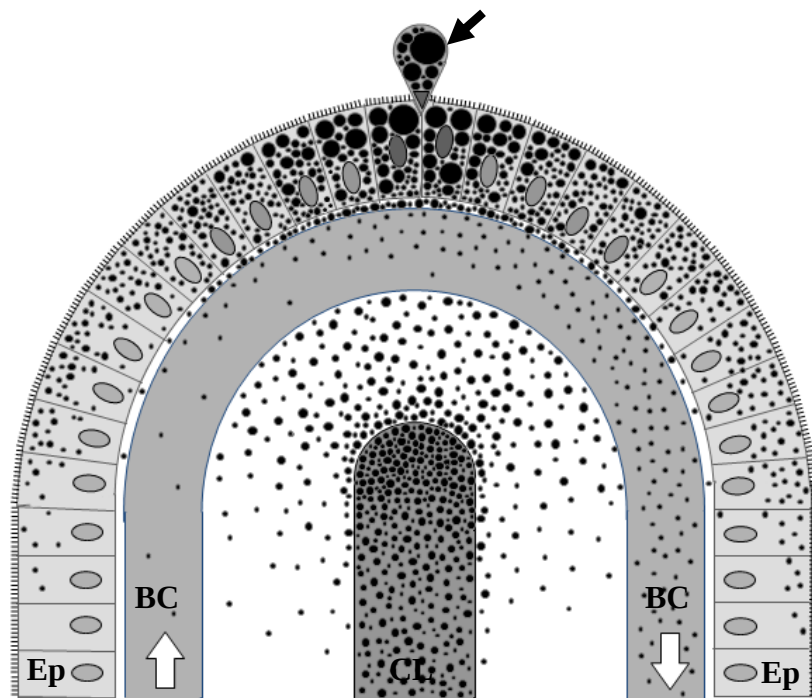


図 17 空腸腸絨毛の脂肪滴および乳ビ球の輸送経路の模式図

BC : 毛細血管

CL : 中心リンパ管

Ep : 絨毛円柱上皮細胞

➡ : 大型の脂肪滴を有したまま脱落する絨毛円柱上皮細胞

⇨ : 毛細血管内の血流の方向

● : 脂肪滴あるいは乳ビ球

I-5. 小 括

ラット空腸の粘膜および粘膜下組織を超微形態学的に精査し、これらの組織に含まれる乳ビ球の直径毎の粒度分布を計測して乳ビ球が毛細血管から輸送されるか否かについて検討した。

その結果、直径 600 nm 以上の大型の脂肪滴を有する絨毛円柱上皮細胞が多数みとめられたにも関わらず、直径 600 nm 以上の乳ビ球はみられず、加えて、腸絨毛先端では大型の脂肪滴を有したまま内腔へ脱落していく上皮細胞もみとめられたことから、直径 600 nm 以上の脂肪滴は乳ビ球としては放出されずに上皮細胞とともに小腸内腔へ脱落することが示唆された。また、上皮直下の毛細血管間の結合組織とその直上の上皮細胞間隙の乳ビ球の直径の粒度分布を比較すると、両部位ともに直径 45 nm 以上 75 nm 未満の乳ビ球が最も多かったのに対し、上皮直下の毛細血管近傍の結合組織では直径 75 nm 以上 90 nm 未満の乳ビ球が最も多かった。また、中心リンパ管内の最も多い乳ビ球の直径は 60 nm 以上 75 nm 未満で、毛細血管間の結合組織と毛細血管近傍の結合組織内の最も多い乳ビ球の直径の間であった。加えて、腸絨毛基部の細静脈と粘膜下組織内の細動脈の内腔の乳ビ球の数を比較すると細静脈内腔の乳ビ球数が多かった。これらの結果から、生理的条件下のラット空腸では直径 75 nm 未満の乳ビ球の一部は上皮直下の毛細血管から肝門脈へ輸送され、残りが中心リンパ管から全身循環血へ輸送されることが示唆された。加えて、小型の乳ビ球が上皮直下の毛細血管の内皮細胞の細胞質中を小胞に包まれて輸送されていたことから、小型の乳ビ球の毛細血管内皮の通過のメカニズムが受容体を介したトランスサイトーシスである可能性が考えられた。

第Ⅱ章

ラット空腸絨毛の毛細血管における小型の乳ビ球の輸送に関わる
受容体に関する免疫組織化学的研究

II-1. 小 緒

ヒトや動物の小腸の腸絨毛で産生される乳ビ球は、従来中心リンパ管からのみ輸送され、毛細血管から輸送されることはないと考えられてきた[Dixon, 2010; Friedman and Nylund, 1980; Mansbach II and Gorelick, 2007]。しかしながら、第 I 章で、直径 75 nm 未満の小型の乳ビ球の一部が腸絨毛先端の上皮直下の毛細血管内皮を通過し、直接門脈血に輸送されることが示唆されるとともに、毛細血管の内皮を通過する際には、小型の乳ビ球が細胞膜に包まれて内皮細胞の細胞質内を輸送されることが明らかになった。これらのことから、毛細血管内皮の乳ビ球の輸送には、内皮細胞膜上の受容体を介している可能性が想定された。

リポタンパク質は一般的に細胞膜上に発現する VLDL 受容体, LDL 受容体ないしアポ B48 受容体に認識されるとされる[Gianturco *et al.*, 1988, 1994; Go and Mani, 2012]。すなわち、アポ E を有するリポタンパク質は VLDL 受容体や LDL 受容体に認識されて細胞内に取り込まれるとされる[Go and Mani, 2012]。VLDL 受容体の細胞における発現については、そのタンパク質と mRNA がヒトの臍静脈の血管内皮細胞および平滑筋で *in situ* ハイブリダイゼーション法および免疫組織化学的に検出されるとともに[Multhaupt *et al.*, 1996]、ウシの骨格筋と脳の毛細血管および細動脈の内皮細胞で免疫組織化学的に検出されている[Wyne *et al.*, 1996]。また、LDL 受容体については、ウシの脳の毛細血管にドットブロット法によって発現がみとめられている[Méresse *et al.*, 1989]。一方、アポ B48 受容体については培養されたマクロファージと単球にのみ発現が確認されている[Gianturco *et al.*, 1988, 1994]。加えて、小腸で産生されたすべての乳ビ球はアポ A1, アポ A2, アポ A4, アポ B48, アポ C およびアポ E を有するとされることを併せ考えると[Green and Glickman, 1981; Mahley *et al.*, 1984; Tso *et al.*, 1984]、小腸由来の乳ビ球は前記のすべての受容体に認識される可能性があるが、アポ B48 受容体は遊走細胞のみに発現することから、腸絨毛の毛細血管内皮で乳ビ球の輸送に関わる受容体は VLDL 受容体ないし LDL 受容体であることが想定される。そこで、第 II 章ではラット空腸腸絨毛の上皮直下の毛細血管において小型の乳ビ球の輸送に参与する

受容体を明らかにするため，VLDL 受容体ないし LDL 受容体が上皮直下の毛細血管に発現するか否かについて免疫組織化学的に精査した。

II-2. 材料および方法

1) 供試動物および飼育法

7 週齢の Wistar 系ラットの雄 5 匹（日本 SLC）を用いた。供試動物の飼育および実験については「神戸大学動物実験実施規則」に基づいておこなった（許可番号：22-05-01）。主要な飼育条件については、 $23\pm1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50-60%，配合飼料（ラボ MR ストック，日本農産工業）の自由摂食および自由飲水および午前 6 時から午後 6 時までの 12 時間照明とした。実験期間中，ラットには外見上の異常はみとめられず，健常であり，材料採取時における肉眼解剖学的所見および採取した臓器の組織学的所見においても異常はみとめられなかった。

2) 材料採取および組織学的処理

ラットをペントバルビタールナトリウム（共立製薬，東京，日本）の腹腔投与による深麻酔下で心臓切開による放血によって安楽死させた。ついで胸郭の腹側を正中切開し，さらに心膜を切開して心臓を露出した後，左心室から 4%パラホルムアルデヒド（pH 7.4; 以下 PFA）固定液を灌流した。灌流固定後，すみやかに空腸の十二指腸空腸曲から 10 cm 尾部側の部位から 5 cm 採取して 4°C の 4%PFA で 6 時間浸漬固定した。浸漬固定後，Barthel と Raymond （1990）の方法に準拠して凍結切片を作製した。以下にその方法を簡潔に記載する。

浸漬後の組織片を 0.1M リン酸緩衝液（pH 7.4; 以下 PB）によって 20 分ずつ 3 回洗浄し，5%スクロース加 0.1M リン酸緩衝液（pH 7.4; 以下スクロース加 PB）に 20 分間ずつ 3 回，10%，12.5%，15%スクロース加 PB にそれぞれ 30 分，20%スクロース加 PB に 1 時間浸漬した後，20%スクロース加 PB と OCT コンパウンド（Sakura Finetek, California, U.S.A.）を 2：1 の割合で混合した混合液に 4°C で一晩浸漬した。浸漬後，浸漬液とともにアルミ箔製の容器に移し，その容器を液体窒素中の鉛塊に押し付けて急速凍結した。作製

した凍結ブロックについては薄切時まで -30°C で保存した。次いで、クリオスタット (HM505E 型; Carl Zeiss, Jena, Thüringen, Germany) を用いて $4\text{ }\mu\text{m}$ 厚の凍結切片を作製し、3'-aminopropyltriethoxysilane (信越化学工業, 東京, 日本) をコーティングしたスライドガラスに貼付して使用時まで冷凍保存 (-30°C) した。

3) 免疫組織化学的染色法

抗原の検出には連続切片を使用して酵素抗体法間接法をおこなった。その方法を簡潔に記す。冷凍保存した凍結切片を室温で 30 分風乾させた後、蒸留水に浸漬してアスピレーターを用いた陰圧条件下で切片に含まれる気泡を除去した後、0.05% Tween20 添加 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.4; 以下 TPBS) によって 10 分ずつ 3 回洗浄し、OCT コンパウンド混合液を除去した。洗浄後、切片を 100%メタノールと 0.5%過酸化水素水に室温で 30 分ずつ浸漬し、TPBS にて 3 回洗浄した。洗浄後、切片を Blocking One Histo (ナカライテスク, 京都, 日本) と室温で 1 時間攪拌しながら反応させた。その後、100 倍希釈した抗 VLDL 受容体ヤギ抗体 (sc-10107, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, U.S.A.) あるいは 200 倍希釈した抗 LDL 受容体ヤギ抗体 (sc-11824, Santa Cruz Biotechnology) と室温で 30 分間攪拌した後、 6°C で 18 時間静置して反応させた。反応後、TPBS で 3 回洗浄し、200 倍希釈した HRP 結合抗ヤギ IgG ニワトリ IgG (A200-116P-9, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, U.S.A.) と室温で 1 時間反応させた。反応後に切片を TPBS で 3 回洗浄し、最後にトリス緩衝液 (pH 7.6) で 1 回洗浄してから DAB 発色液と反応させ、メチルグリーンで対比染色をおこなった。

4) 脂肪染色法

免疫組織化学的染色をおこなった切片の連続切片を使用した。冷凍保存した凍結切片を室温にて 30 分風乾させた後、蒸留水に浸漬してアスピレーターを用いた陰圧条件下で切片に含まれる気泡を除去した。次いで蒸留水で 2 回洗浄した後、50%エタノールに 10 分間浸漬し、70%エタノール - 0.1%ズダンブラック B 染色液 (Chroma, Münster, Nordrhein-Westfalen,

Germany) で 1 時間染色した。染色後, 50%エタノールで 2 回, 蒸留水で 2 回洗浄し, スクレアファーストレッドで対比染色した。

5) 定量組織学的観察法

各ラットの空腸の切片上において中心軸に沿って縦断された腸絨毛の中から先端の粘膜固有層に乳ビ球が多数みられる腸絨毛と, 先端の粘膜固有層に乳ビ球がほとんどみられない腸絨毛をそれぞれ 20 本ずつ無作為に選んだ。次に 20 本の腸絨毛のうち, 腸絨毛先端の上皮直下の毛細血管に VLDL 受容体の陽性ないしは LDL 受容体の陽性がみとめられた腸絨毛の数を計測し, それぞれの平均値を 5 個体から算出して平均値±標準偏差で示した。

6) 統計処理

平均値間の有意性については, Student の t 検定を用いて統計処理をおこない, 有意水準を 5%とした。

II-3. 結果

1) 腸絨毛における脂肪滴および乳ビ球の分布について

細胞質内に多数の脂肪滴を有する絨毛円柱上皮細胞が腸絨毛の先端から中部に局限してみとめられ、このような腸絨毛は多数存在したが、脂肪滴を有さない腸絨毛も少数存在した。脂肪滴を有する腸絨毛の多くでは上皮細胞直下の粘膜固有層に多数の乳ビ球がみとめられた（図 18a）。しかしながら、上皮細胞内に多くの脂肪滴を有する一部の腸絨毛や少数の脂肪滴しかみられない腸絨毛の粘膜固有層には乳ビ球がほとんどみられなかった（図 18b）。

2) 上皮直下の毛細血管内皮およびその他の組織構成要素における受容体の発現について

上皮下の粘膜固有層に多数の乳ビ球を有する腸絨毛の先端では、高い割合で上皮直下の毛細血管内皮に VLDL 受容体の陽性がみとめられた（図 19a）。一方、LDL 受容体の陽性は全く検出されなかった（図 19b）。上皮直下の毛細血管における VLDL 受容体の陽性はほとんどの腸絨毛で先端に局限していたが、ごく少数の腸絨毛では先端から中部までみとめられた。また、上皮直下の毛細血管内皮における VLDL 受容体の陽性は遊離縁側と基底側の細胞膜および細胞質にみとめられ、細胞質の陽性は細胞膜の陽性に比べて弱かった（図 19c, d）。一方、上皮細胞内における脂肪滴の量に関わらず、粘膜固有層内に乳ビ球がほとんどみられない腸絨毛では、先端の上皮直下の毛細血管内皮に VLDL 受容体の陽性はほとんどみとめられず、LDL 受容体も全く検出されなかった（図 20a, b）。

多くの腸絨毛では上皮細胞の線条縁に VLDL 受容体の陽性はみとめられなかったが、一部の腸絨毛では主に先端の線条縁に局限してみとめられた（図 19a, 20a）。粘膜下組織の細動脈や細静脈の一部の内皮細胞や筋層の毛細血管の一部の内皮細胞にも VLDL 受容体のみとめられた（図 21a-c）。また、粘膜固有層の絨毛筋細胞や粘膜筋板および筋層の平滑筋細胞のほとんど全てに VLDL 受容体の陽性がみとめられ、その染色強度は細胞膜で強く、

細胞質では弱かった（図 21d-f）。また，一部の細動脈や細静脈の平滑筋細胞にも VLDL 受容体の弱陽性がみとめられ（図 21a, b），リンパ管の内皮細胞の一部にも VLDL 受容体の陽性がみとめられた（図 21g）。上記以外の組織構成要素には VLDL 受容体の陽性はみとめられなかった。

LDL 受容体の陽性は粘膜下組織の一部の細動脈と細静脈および筋層の毛細血管の内皮細胞，および細静脈の平滑筋にみとめられた（図 22a-d）。

この段落における VLDL 受容体および LDL 受容体の発現状況は，腸絨毛の脂肪滴や乳ビ球の量に関わらず同様であった。また，対照群には陽性反応はみとめられなかった。

上皮直下の毛細血管内皮に VLDL 受容体の陽性がみとめられる腸絨毛の出現頻度を計測した結果，粘膜固有層に多数の乳ビ球を有する腸絨毛のうち，約 68%の腸絨毛の上皮直下の毛細血管内皮に陽性がみとめられた。一方，粘膜固有層内に乳ビ球がほとんどみられない腸絨毛では，上皮細胞内の脂肪滴の量に関わらず，約 8%の腸絨毛にしか上皮直下の毛細血管内皮に陽性がみとめられず，両者には有意な差がみとめられた。また，粘膜固有層内の乳ビ球の量に関わらず，上皮直下の毛細血管に LDL 受容体が陽性を示す腸絨毛は 0%であった（図 23）。

II-4. 考察

1) 本実験における免疫組織化学的染色の特異性について

VLDL 受容体は、ヒトの細動脈や細静脈[Multhaupt *et al.*, 1996], ラット空腸の絨毛円柱上皮細胞[García-Miranda *et al.*, 2010]およびヒトの平滑筋細胞[Nakamura *et al.*, 2000]に免疫組織化学的に検出されている。本章における免疫組織化学的観察において、絨毛円柱上皮細胞の線条縁、絨毛筋細胞や筋層の平滑筋細胞、細動脈や細静脈の内皮細胞および平滑筋細胞に VLDL 受容体の陽性がみとめられたことは上記の報告と一致しており、本章で使用した抗 VLDL 受容体抗体の特異性の高さを示している。また、絨毛筋細胞および筋層や脈管系の平滑筋細胞における VLDL 受容体の陽性については、一般に骨格筋細胞と心筋細胞および大動脈の平滑筋細胞がエネルギー源として遊離脂肪酸を使用していることから[Coe *et al.*, 1968; Randle, 1964; Rasmussen and Wolfe, 1999], 平滑筋細胞のエネルギー源としての遊離脂肪酸の要求性の高さを示めしていると考えられた。

LDL 受容体はウェスタンブロット法[Méresse *et al.*, 1989]および免疫電子顕微鏡法[Ueno *et al.*, 2010]によってウシの脳の毛細血管内皮で発現することが報告されている。また、ウェスタンブロット法によってヒトの血管平滑筋細胞由来の培養細胞にも発現が報告されており[Ruan *et al.*, 2006], さらに、マウス空腸の絨毛円柱上皮細胞では LDL 受容体が発現しないとされている[Mutoh *et al.*, 2009]。本章における免疫組織化学的観察結果では、一部の血管内皮と血管平滑筋に LDL 受容体の陽性がみとめられたが、絨毛円柱上皮細胞を含む他の組織構成要素には陽性はみられなかった。これらのことから本章で使用した抗 LDL 受容体抗体の特異性の高さが確認された。また、LDL はコレステロールの末梢組織への輸送に関与するとされており[Jonas, 2002], 細静脈の血管内皮細胞と平滑筋細胞の LDL 受容体の陽性は小腸の脈管系の平滑筋におけるコレステロールの要求性の高さを示めしていると考えられた。

2) 毛細血管における小型の乳ビ球に対する受容体について

本章における免疫組織化学的観察から、VLDL 受容体が上皮直下の毛細血管の内皮細胞の細胞膜に発現していることが明らかになり、肝臓以外の組織では VLDL 受容体がアポ E を有するリポタンパク質の取り込みを仲介するとされること[Niemeier *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 1992, 1995], さらに乳ビ球がアポ E を有すること[Green and Glickman, 1981]を考え合わせると、VLDL 受容体が乳ビ球の上皮直下の毛細血管内への輸送を仲介している可能性が考えられた。加えて、本章での観察結果から、粘膜固有層に多数の乳ビ球が存在する腸絨毛では乳ビ球がほとんど存在しない腸絨毛に比べて有意に高頻度で先端の上皮直下の毛細血管に VLDL 受容体の発現がみとめられ、LDL 受容体はすべての腸絨毛の毛細血管にも発現はみとめられなかった。以上のことから、粘膜固有層に多数の乳ビ球が充満すると VLDL 受容体が上皮直下の毛細血管内皮に発現し、VLDL を含む小型の乳ビ球の血管外から血管内への輸送を仲介することが示唆された。

3) 毛細血管による小型の乳ビ球の輸送の意義について

一般に腸絨毛の中心リンパ管から輸送された乳ビ球に含まれるトリグリセリドは、全身循環血中でリポプロテインリパーゼによって徐々に加水分解されるとされる[Braun and Severson, 1992]。このような乳ビ球はトリグリセリドが分解されるにしたがって小型化し[Chappell and Medh, 1998; Mjøs *et al.*, 1975], 最終的に乳ビ球の残渣となって肝臓を通過する際に全身循環血から除去されるとされる[Braun and Severson, 1992; Chappell and Medh, 1998; Cooper, 1997; Friedman and Nylund, 1980]。また、肝臓では主に肝細胞によって血液中の VLDL を取り込むとされる[Cornetta and Zucker, 1983; Harkes *et al.*, 1989]。これらを併せ考えると肝臓では大型のリポタンパク質は取り込まずに小型のリポタンパク質を主に取り込むと考えられる。加えて、肝臓への主な遊離脂肪酸の供給源は、脂肪組織、血液中の乳ビ球残渣および小腸であるとされる[Ramasamy, 2014]。本章における免疫組織学的観察結果から、腸絨毛の上皮直下の毛細血管内皮における基底膜側の細胞膜に VLDL の取り込みに関与す

るとされる VLDL 受容体の発現をみとめたことを併せ考えると、小腸で産生された小型の乳ビ球が上皮直下の毛細血管の基底膜に発現した VLDL 受容体に認識されて毛細血管内皮細胞に取り込まれ、トランスサイトosisされて門脈血に入ることにより、肝臓へ直接輸送されて、肝臓への遊離脂肪酸の供給源になることが考えられた。

生理的条件下の動物の消化管には多種の常在細菌が定着し[Yamamoto *et al.*, 2009], グラム陰性細菌は小腸後位から大腸に進むにつれて増加する[Yokoo *et al.*, 2011]。また、グラム陰性細菌は内毒素としてリポポリサッカライド (LPS) を保有しており[Cabeen and Jacobs-Wagner, 2005], この LPS は Toll 様受容体-4 (TLR-4) によって認識される[Chow *et al.*, 1999]。また、ラットの消化管では分泌型 TLR-4 が腸陰窩や他の付属外分泌腺から分泌されており[Mantani *et al.*, 2012], 分泌型 TLR-4 陽性の小胞がラット十二指腸の腸絨毛先端の絨毛円柱上皮細胞内にみとめられ、この小胞が分泌型 TLR-4 と LPS の複合体であると考えられている[Mantani *et al.*, 2011]。同様にラットの肝臓の類洞周囲腔と肝細胞にも分泌型 TLR-4 陽性の小胞がみとめられている[Mantani *et al.*, 2012]。また、消化管に ³²P 標識大腸菌を投与されたウサギの肝臓に、標識された大腸菌由来の LPS がみとめられることが報告されている[Ravin *et al.*, 1960]。加えて、LPS は様々な疾病に罹患した患者の肝門脈血中にみとめられるが、肝臓に疾病がある場合を除いて全身循環血中にはみられなかったことから[Jacob *et al.*, 1977], 消化管内腔のグラム陰性細菌由来の LPS は腸管から肝門脈血中に流入し、肝臓で除去されるとされる[Jacob *et al.*, 1977; Ravin *et al.*, 1960]。実験的には、³H 標識 LPS ないしは蛍光標識 LPS をラットの門脈へ投与すると、星状大食細胞および肝細胞によって LPS が除去されることが報告されている[Bikhazi *et al.*, 2001; Mimura *et al.*, 1995]。また、肝臓の LPS 除去能力を超える量の LPS をイヌの肝門脈に投与すると全身性の内毒素血症が引き起こされるとされるが[Caruana *et al.*, 1984], LPS を静脈内投与する前に乳ビ球を静脈へ投与すると、ラットの死亡率が低下するとされており[Harris *et al.*, 1993], 加えて、乳ビ球あるいは VLDL と混合してインキュベートされた LPS は、インキュベートされていない LPS に比べてマウスに投与した場合の死亡率が有意に低いとされている[Harris *et al.*, 1990]。以上のことを併

せ考えると，肝門脈血に流入したグラム陰性菌由来の **LPS** は，小腸の上皮直下の毛細血管から肝門脈血に輸送された乳ビ球と合流して弱毒化されと考えられ，小腸性 **VLDL** を含む小型の乳ビ球の肝門脈への輸送は **LPS** に対する生体防御の一環として働いている可能性が推測された。

II-5. 小 括

従来動物の小腸で産生される乳ビ球は毛細血管からは輸送されず，中心リンパ管のみから輸送されると考えられてきた。しかしながら，第 1 章におけるラット空腸の超微形態学的研究から小型の乳ビ球の一部は腸絨毛の上皮下毛細血管からも輸送されることが示唆され，毛細血管内皮の乳ビ球の通過のメカニズムが受容体を介したトランスサイトーシスであることが想定された。そこで，ラット空腸の腸絨毛の上皮下毛細血管内皮において小型の乳ビ球の輸送に関わる可能性が考えられる VLDL 受容体と LDL 受容体の発現と腸絨毛における乳ビ球の産生状況との関連について免疫組織化学的および定量組織学的に精査した。

その結果，粘膜固有層に多数の乳ビ球が充満すると多くの腸絨毛の先端の上皮直下の毛細血管における内皮細胞の遊離縁側と基底側の細胞膜には VLDL 受容体の発現がみとめられたが，LDL 受容体の発現はみとめられなかった。加えて，上皮直下の毛細血管における VLDL 受容体の発現と腸絨毛の粘膜固有層における乳ビ球の量を定量組織学的に比較した結果，腸絨毛先端の粘膜固有層に乳ビ球が多数存在する腸絨毛の約 68%で毛細血管の内皮細胞に VLDL 受容体の発現がみとめられたのに対して，粘膜固有層に乳ビ球がほとんど存在しない腸絨毛では約 8%の腸絨毛にしか発現がみとめられず，両者の差は有意であった。以上の所見より，ラット空腸の腸絨毛の上皮直下の毛細血管における小型の乳ビ球の輸送には VLDL 受容体が関与しており，VLDL 受容体の発現は粘膜固有層に多数の乳ビ球が充満した時に起こることが示唆された。

総 括

一般に動物の小腸では、食餌中のタンパク質や多糖類などの栄養素は消化の過程でアミノ酸や単糖などの小型の分子まで分解されてから腸絨毛の絨毛円柱上皮細胞によって取り込まれ、毛細血管から輸送されるとされている。一方、脂肪は脂肪酸とグリセロールに分解された後、短鎖脂肪酸や中鎖脂肪酸の一部が受動拡散によって絨毛円柱上皮細胞に取り込まれ、直接上皮直下の毛細血管から輸送されるとされるが、中鎖脂肪酸の一部や長鎖脂肪酸は絨毛円柱上皮細胞に取り込まれて脂肪滴に再合成されてから乳ビ球として上皮細胞間隙や粘膜固有層に放出され、毛細血管からは輸送されずに中心リンパ管からのみ輸送されると考えられてきた。しかしながら、古くから腸管内腔の未消化の大型の分子や粒子状物が全身循環血中に出現するパーソーブションと呼ばれる現象がヒトや様々な動物種において報告されてきており、絨毛円柱上皮細胞に取り込まれた粒子状物が上皮直下の毛細血管に直接取り込まれることが明らかにされてきた。これらのことから、腸絨毛の上皮直下の毛細血管には大型の分子や粒子状物を取り込む能力を有することが推察され、乳ビ球もまた中心リンパ管のみならず上皮下毛細血管からも取り込まれて肝門脈へ直接輸送されることが想定された。そこで本学位論文では、ラットを実験モデルとして腸絨毛の上皮下毛細血管における乳ビ球の輸送の可能性およびその内皮の通過のメカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

第 I 章では透過型電子顕微鏡を用いて超微形態学的にラット空腸の腸絨毛を精査した。その結果、直径 600 nm 以上の乳ビ球がみられなかったにも関わらず、腸絨毛の先端には直径 600 nm 以上の大型の脂肪滴を有する絨毛円柱上皮細胞がみとめられ、大型の脂肪滴を保有したまま腸管内腔へ脱落していく上皮細胞がみとめられた。また、腸絨毛基部の細静脈と粘膜下組織の細動脈の内腔の乳ビ球の数を定量組織学的に比較すると、細静脈内腔の方で有意に多かった。加えて、上皮直下の毛細血管間の結合組織とその直上の上皮細胞間隙内の乳ビ球の直径毎の粒度分布が類似しており、直径が 45 から 60 nm の乳ビ球が最も多かつ

た。一方、上皮直下の毛細血管直上の上皮細胞間隙では直径 45 から 60 nm の乳ビ球が最も多かったのに対して、同間隙直下の毛細血管近傍の結合組織に直径 75 から 90 nm の乳ビ球が最も多く、直径 75 nm 未満の乳ビ球の割合が減少していた。加えて、中心リンパ管内腔では直径 60 から 75 nm の乳ビ球が最も多く、上皮直下の毛細血管間の結合組織中と上皮直下の毛細血管近傍の結合組織中のそれぞれの乳ビ球の最高頻度の中間の値であった。加えて、上皮直下の毛細血管内皮の細胞質中の小型の乳ビ球が膜に包まれて輸送されている超微形態学的所見も得られた。以上の所見から、直径 600 nm 以上の脂肪滴は乳ビ球としては粘膜固有層には放出されずに上皮細胞とともに脱落することが示唆された。また、直径 75 nm 未満の小型の乳ビ球の一部は中心リンパ管のみならず、上皮直下の毛細血管からも取り込まれて直接肝門脈血中へ輸送されることが示唆されるとともに、小型の乳ビ球が毛細血管内皮を通過するメカニズムは受容体を介したトランスサイトーシスであることが想定された。

第 II 章では、小腸腸絨毛の上皮直下の毛細血管における小型の乳ビ球の輸送のメカニズムの一端を明らかにするために、リポタンパク質の取り込みに関わるとされる VLDL 受容体と LDL 受容体に着目し、これらの受容体がラット空腸腸絨毛の上皮下毛細血管に発現しているか否かを免疫組織化学的および定量組織学的に精査するとともに、乳ビ球の分布と受容体の発現との関係を調べた。その結果、ラット空腸の一部の腸絨毛の上皮直下の毛細血管の内皮細胞に VLDL 受容体の陽性がみとめられたが、LDL 受容体の陽性は上皮直下の毛細血管にはみられなかった。上皮直下の毛細血管の内皮細胞における VLDL 受容体の陽性は遊離縁側の細胞膜と基底側の細胞膜の両方にみとめられた。さらに、上皮直下の毛細血管における VLDL 受容体の発現と粘膜固有層における乳ビ球の量との関係を調べた結果、粘膜固有層中に多数の乳ビ球が存在する腸絨毛の約 68%で毛細血管の内皮細胞に VLDL 受容体の陽性がみとめられたのに対して、粘膜固有層中に乳ビ球がほとんど存在しない腸絨毛では約 8%の腸絨毛にしか陽性がみとめられず、両者間には有意な差がみとめられた。これらの所見から、上皮直下の毛細血管内皮細胞における VLDL 受容体の発現は粘膜固有層

に多数の乳ビ球が充満した時に起こり、毛細血管内への小型の乳ビ球の輸送を仲介することが示唆された。

以上の所見を総合すると、本学位論文では、空腸腸絨毛の粘膜固有層に多数の乳ビ球が充満すると、腸絨毛の上皮下毛細血管内皮に VLDL 受容体が発現して小型の乳ビ球の毛細血管内皮の通過を仲介し、従来リンパ行性に体循環に運ばれるとされてきた乳ビ球のうち、直径 75 nm 未満の一部が粘膜固有層から直接門脈血へ輸送されることが明らかになった。

Abstract

Ultrastructural and Immunohistochemical Study on the Import of Minute Chylomicrons into Blood Capillaries in Rat Jejunal Villi

Ei-ichirou Takahara

In the small intestinal lumen, nutrients of proteins and polysaccharides are generally degraded into small molecules such as amino acids and monosaccharides in their digestion processes. After the degradation, amino acids and monosaccharides are absorbed by villous columnar epithelial cells and directly transported into the portal blood by subepithelial blood capillaries (sBCs). On the other hand, the other nutrient, fats are generally degraded into glycerol and short-, medium- and long-chain fatty acids. All short-chain and partial medium-chain fatty acids absorbed by villous columnar epithelial cells, are directly transported into the hepatic portal blood by sBCs, while the rest of medium-chain and all long-chain fatty acids are reconstructed into fat droplets in the villous columnar epithelial cells. Newly synthesized fat droplets are discharged from the villous columnar epithelial cells into the lamina propria as chylomicrons. Chylomicrons have been considered to be transported to the systemic circulation *via* central lymph vessels (CLV), but never *via* sBCs. On the other hand, a phenomenon known as “persorption”, by which various large molecules or particulates in the intestinal lumen are directly transported into the blood circulation without any digestion, has been reported in humans and various animal species. The direct entry of luminal particulates into the sBCs has been histologically demonstrated in the intestinal villi of rat jejunum. From these reports, the sBCs in the intestinal villi are considered to be special blood vessels which possess the ability of the absorption and transportation of macromolecules or particulates from the extravascular tissue. Therefore, it is assumed that sBCs can absorb and directly transport

chylomicrons into portal blood in intestinal villi in addition to CLV. Therefore, this doctoral thesis aims the demonstration of the import of chylomicrons into sBCs and the clarification of the import mechanism in rat jejunal villi.

In chapter I, the possibility of chylomicron absorption by the endothelium of sBCs was histoplanimetrically studied in the rat jejunum under a transmission electron microscope. As a result, there were no chylomicrons larger than 600 nm in diameter in the lamina propria, while many fat droplets larger than 600 nm were contained in the villous columnar epithelial cells in the apices of jejunal villi. Exfoliating villous columnar epithelial cells with fat droplets larger than 600 nm in diameter were often found in the apices of jejunal villi. There were significantly more chylomicrons in the venules of the intestinal villi than in the submucosal arterioles. From the histoplanimetry, the most frequent size (MFS) of chylomicrons was 75 to 90 nm in diameter in the areas adjacent to sBCs, while it was 45 to 60 nm in the epithelial intercellular spaces just above the sBCs. The MFS of chylomicrons was 45 to 60 nm in the intermediate areas between sBCs and in the epithelial intercellular spaces just above the intermediate areas. The MFS of chylomicrons in CLV was intermediate between that in the area adjacent to sBCs and that in the intermediate areas between sBCs. Chylomicrons were found in small vesicles in the endothelial cytoplasm of sBCs. These findings suggest that a part of the chylomicrons smaller than 75 nm, which probably contain intestinal very low-density lipoproteins (VLDL), are directly transported to the liver *via* sBCs in addition to *via* CLV, that the transportation mechanism is receptor-mediated transcytosis and that epithelial fat droplets larger than 600 nm are not discharged into the lamina propria in rat jejunum under a physiological condition.

In chapter II, to clarify the import mechanisms of minute chylomicrons into the sBCs, VLDL receptor and LDL receptor which are generally involved in the transportation of lipoproteins, were immunohistochemically and histoplanimetrically examined in the intestinal villi of rat jejunum. As a result, the immunopositivity for VLDL receptor was detected on the luminal and basal surfaces of

the endothelial cells of sBCs in approximately 68% of the apices of jejunal villi which possessed numerous chylomicrons in their lamina propria, while VLDL receptor was detected on the endothelial cells of sBCs in only approximately 8% of intestinal villi which possessed few or no chylomicrons in their lamina propria. This difference was significant. No immunopositivity for LDL receptor was detected in the sBCs of all intestinal villi. These findings suggest that VLDL receptor is expressed on the endothelial cells of the sBCs in conjunction with the filling of the lamina propria with chylomicrons produced by the villous columnar epithelial cells and that the VLDL receptor mediates the import of minute chylomicrons, maybe VLDL, into the hepatic portal blood from the extravascular tissue of rat jejunal villi.

In conclusion, this doctoral thesis clarifies that a part of minute chylomicrons, maybe VLDL, with less than 75 nm in diameter are absorbed by the sBCs in rat jejunal villi and directly transported to hepatic portal blood. Furthermore, this thesis suggests that VLDL receptor is expressed on the endothelial cells of the sBCs in conjunction with the filling of the lamina propria with many chylomicrons and that the VLDL receptor mediates the import of minute chylomicrons into the subepithelial portal blood in rat jejunal villi.

謝辞

本稿を終えるにあたり，本研究に終始御懇篤なる御指導および御助言賜りました，本学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座，北川 浩 教授に深謝致します。

また，本論文の御校閲を賜りました本学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座，河野 潤一 教授並びに星 信彦 教授に深謝致します。

さらに，本研究に御懇篤なる御助言を賜りました本学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座，横山 俊史 助教並びに万谷 洋平 特命助教に深謝致します。

最後になりましたが，本研究の遂行にあたり終始御協力くださいました組織生理学教育研究分野および分子形態学教育研究分野の各位に心より御礼申し上げます。

引用文献

- Ashworth C. T. and Lawrence J. F. 1966. Electron microscopic study of the role of lipid micelles in intestinal fat absorption. *J. Lipid Res.* **7**: 465-472.
- Barthel L. K. and Raymond P. A. 1990. Improved method for obtaining 3- μ m cryosections for immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **38**: 1383-1388.
- Bikhazi A. B., Jurjus A. R., Kamal M. T., Al-Housseini A. M., Saab R. N., Jaroudi W. A. and Bitar K. M. 2001. Kinetics of lipopolysaccharide clearance by Kupffer and parenchyma cells in perfused rat liver. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **129**: 339-348.
- Blanchette-Mackie E. J. and Scow R. O. 1971. Sites of lipoprotein lipase activity in adipose tissue perfused with chylomicrons. Electron microscope cytochemical study. *J. Cell Biol.* **51**: 1-25.
- Blanchette-Mackie E. J. and Scow R. O. 1973. Effects of lipoprotein lipase on the structure of chylomicrons. *J. Cell Biol.* **58**: 689-708.
- Bloom B., Chaikoff I. L. and Reinhardt W. O. 1951. Intestinal lymph as pathway for transport of absorbed fatty acids of different chain lengths. *Am. J. Physiol.* **166**: 451-455.
- Borgström B. 1962. Digestion and absorption of fat. *Gastroenterology* **43**: 216-219.
- Borgström B. 1975. On the interactions between pancreatic lipase and colipase and the substrate, and the importance of bile salts. *J. Lipid Res.* **16**: 411-417.
- Boyer J. L. 2013. Bile formation and secretion. *Compr. Physiol.* **3**: 1035-1078.
- Braun J. E. A. and Severson D. L. 1992. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem. J.* **287**: 337-347.
- Cabeen M. T. and Jacobs-Wagner C. 2005. Bacterial cell shape. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 601-610.
- Cartwright I. J., Plonné D. and Higgins J. A. 2000. Intracellular events in the assembly of chylomicrons in rabbit enterocytes. *J. Lipid Res.* **41**: 1728-1739.
- Caruana J. A., Camara D. S., Schneeberger G. J. and Nolan J. P. 1984. The clearance capacity of the

- canine liver for a portal vein endotoxin infusion. *J. Surg. Res.* **37**: 197-201.
- Chappell D. A. and Medh J. D. 1998. Receptor-mediated mechanisms of lipoprotein remnant catabolism. *Prog. Lipid Res.* **37**: 393-422.
- Chiang J. Y. L. 2013. Bile acid metabolism and signaling. *Compr. Physiol.* **3**: 1191-1212.
- Chow S.-L. and Hollander D. 1979. A dual concentration-dependent absorption mechanism of linoleic acid by rat jejunum in vitro. *J. Lipid Res.* **20**: 349-356.
- Chow J. C., Young D. W., Golenbock D. T., Christ W. J. and Gusovsky F. 1999. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* **274**: 10689-10692.
- Coe J., Detar R. and Bohr D. F. 1968. Substrates and vascular smooth muscle contraction. *Am. J. Physiol.* **214**: 245-250.
- Cooper A. D. 1997. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J. Lipid Res.* **38**: 2173-2192.
- Cornetta K. and Zucker S. 1983. Organ distribution of circulating very low density lipoproteins (VLDL): fate of hematopoietic growth inhibitory VLDL in the rat. *Exp. Hematol.* **11**: 275-283.
- Davis R. A., Boogaerts J. R., Borchardt R. A., Malone-McNeal M. and Archambault-Schexnayder J. 1985. Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **260**: 14137-14144.
- DeNigris S. J., Hamosh M., Kasbekar D. K., Lee T. C. and Hamosh P. 1988. Lingual and gastric lipases: species differences in the origin of prepancreatic digestive lipases and in the localization of gastric lipase. *Biochim. Biophys. Acta* **959**: 38-45.
- Dixon J. B. 2010. Mechanisms of chylomicron uptake into lacteals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1207**: 52-57.
- Dobbins W. O. 1969. Morphologic aspects of lipid absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* **22**: 257-265.
- Eisenberg S., Bilheimer D. W., Levy R. I. and Lindgren F. T. 1973. On the metabolic conversion of human plasma very low density lipoprotein to low density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* **326**: 361-377.

- Felker T. E., Fainaru M., Hamilton R. L. and Havel R. J. 1977. Secretion of the arginine-rich and A-I apolipoproteins by the isolated perfused rat liver. *J. Lipid Res.* **18**: 465-473.
- Felts J. M., Itakura H. and Crane R. T. 1975. The mechanism of assimilation of constituents of chylomicrons, very low density lipoproteins and remnants – a new theory. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**: 1467-1475.
- Friedman H. I. and Cardell R. R. Jr. 1972. Morphological evidence for the release of chylomicra from intestinal absorptive cells. *Exp. Cell Res.* **75**: 57-62.
- Friedman H. I. and Nylund B. 1980. Intestinal fat digestion, absorption, and transport. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**: 1108-1139.
- García-Miranda P., Peral M. J. and Ilundain A. A. 2010. Rat small intestine expresses the reelin-Disabled-1 signalling pathway. *Exp. Physiol.* **95**: 498-507.
- Gianturco S. H., Lin A. H.-Y., Hwang S.-L. C., Young J., Brown S. A., Via D. P. and Bradley W. A. 1988. Distinct murine macrophage receptor pathway for human triglyceride-rich lipoproteins. *J. Clin. Invest.* **82**: 1633-1643.
- Gianturco S. H., Ramprasad M. P., Lin A. H.-Y., Song R. and Bradley W. A. 1994. Cellular binding site and membrane binding proteins for triglyceride-rich lipoproteins in human monocyte-macrophages and THP-1 monocytic cells. *J. Lipid Res.* **35**: 1674-1687.
- Gianturco S. H., Ramprasad M. P., Song R., Li R., Brown M. L. and Bradley W. A. 1998. Apolipoprotein B-48 or its apolipoprotein B-100 equivalent mediates the binding of triglyceride-rich lipoproteins to their unique human monocyte-macrophage receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**: 968-976.
- Glickman R. M., Rogers M. and Glickman J. N. 1986. Apolipoprotein B synthesis by human liver and intestine *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 5296-5300.
- Go G.-W. and Mani A. 2012. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale J. Biol. Med.* **85**: 19-28.

- Green P. H. R. and Glickman R. M. 1981. Intestinal lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.* **22**: 1153-1173.
- Green P. H. R. and Riley J. W. 1981. Lipid absorption and intestinal lipoprotein formation. *Aust. N. Z. J. Med.* **11**: 84-90.
- Green P. H. R., Tall A. R. and Glickman R. M. 1978. Rat intestine secretes discoid high density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* **61**: 528-534.
- Greenberger N. J., Rodgers J. B. and Isselbacher K. J. 1966. Absorption of medium and long chain triglycerides: Factors influencing their hydrolysis and transport. *J. Clin. Invest.* **45**: 217-227.
- Greeve J., Altkemper I., Dieterich J.-H., Greten H. and Windler E. 1993. Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *J. Lipid Res.* **34**: 1367-1383.
- Grundy S. M. 1978. Cholesterol metabolism in man. *West. J. Med.* **128**: 13-25.
- Haft D. E., Roheim P. S., White A. and Eder H. A. 1962. Plasma lipoprotein metabolism in perfused rat livers. I. Protein synthesis and entry into the plasma. *J. Clin. Invest.* **41**: 842-849.
- Hamosh M. and Scow R. O. 1973. Lingual lipase and its role in the digestion of dietary lipid. *J. Clin. Invest.* **52**: 88-95.
- Harkes L., van Duijne A. and van Berkel T. J. C. 1989. Interaction of β -very-low-density lipoproteins with rat liver cells. *Eur. J. Biochem.* **180**: 241-248.
- Harris H. W., Grunfeld C., Feingold K. R. and Rapp J. H. 1990. Human very low density lipoproteins and chylomicrons can protect against endotoxin-induced death in mice. *J. Clin. Invest.* **86**: 696-702.
- Harris H. W., Grunfeld C., Feingold K. R., Read T. E., Kane J. P., Jones A. L., Eichbaum E. B., Bland G. F. and Rapp J. H. 1993. Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death. *J. Clin. Invest.* **91**: 1028-1034.
- Hayashi H., Fujimoto K., Cardelli J. A., Nutting D. F., Bergstedt S. and Tso P. 1990. Fat feeding

- increases size, but not number, of chylomicrons produced by small intestine. *Am. J. Physiol.* **259**: 709-719.
- Heeren J., Weber W. and Beisiegel U. 1999. Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. *J. Cell Sci.* **112**: 349-359.
- Helander H. F. and Olivecrona T. 1970. Lipolysis and lipid absorption in the stomach of the suckling rat. *Gastroenterology* **59**: 22-35.
- Herbst G. 1844. Das lymphgefäßsystem und seine verrichtung. pp. 333-337. *In*: Nach eigenen Untersuchungen Dargestellt. Verlag von Vandenhoeck und Ruprecht Göttingen.
- Hillyer J. F. and Albrecht R. M. 2001. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* **90**: 1927-1936.
- Hofmann A. F. 1963. The function of bile salts in fat absorption. The solvent properties of dilute micellar solutions of conjugated bile salts. *J. Biochem.* **89**: 57-68.
- Hofmann A. F. and Borgström B. 1962. Physico-chemical state of lipids in intestinal content during their digestion and absorption. *Fed. Proc.* **21**: 43-50.
- Hofmann A. F. and Borgström B. 1964. The intraluminal phase of fat digestion in man: The lipid content of the micellar and oil phases of intestinal content obtained during fat digestion and absorption. *J. Clin. Invest.* **43**: 247-257.
- Husby S., Jensenius J. C. and Svehag S.-E. 1986. Passage of undegraded dietary antigen into the blood of healthy adults. Further characterization of the kinetics of uptake and the size distribution of the antigen. *Scand. J. Immunol.* **24**: 447-455.
- Ishibashi S., Perrey S., Chen Z., Osuga J.-I., Shimada M., Ohashi K., Harada K., Yazaki Y. and Yamada N. 1996. Role of the low density lipoproteins (LDL) receptor pathway in the metabolism of chylomicron remnants: A quantitative study in knockout mice lacking the LDL receptor, apolipoprotein E, or Both. *J. Biol. Chem.* **271**: 22422-22427.

- Jacob A. I., Goldberg P. K., Bloom N., Degenshein G. A. and Kozinn P. J. 1977. Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* **72**: 1268-1270.
- Jani P., Halbert G. W., Langridge J. and Florence A. T. 1990. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J. Pharm. Pharmacol.* **42**: 821-826.
- Johnston J. M. and Borgström B. 1964. The intestinal absorption and metabolism of micellar solutions of lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **84**: 412-423.
- Jonas A. 2002. Lipoprotein structure. pp. 483-504. *In: Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 4th ed. (Vance D. E. and Vance J. E. eds.), Elsevier Science B. V., Amsterdam.
- Jones A. L., Hradek G. T., Hornick C., Renaud G., Windier E. E. T. and Havel R. J. 1984. Uptake and processing of remnants of chylomicrons and very low density lipoproteins by rats liver. *J. Lipid Res.* **25**: 1151-1158.
- Kay R. E. and Entenman C. 1961. The synthesis of "Chylomicron-like" bodies and maintenance of normal blood sugar levels by isolated, perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* **236**: 1006-1012.
- Kita T., Goldstein J. L., Brown M. S., Watanabe Y., Hornick C. A. and Havel R. J. 1982. Hepatic uptake of chylomicron remnants in WHHL rabbits: A mechanism genetically distinct from the low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 3623-3627.
- Kompiang I. P., Bensadoun A. and Yang M.-W. W. 1976. Effect of an anti-lipoprotein lipase serum on plasma triglyceride removal. *J. Lipid Res.* **17**: 498-505.
- Kvietys P. R. and Granger D. N. 2010. Role of intestinal lymphatics in interstitial volume regulation and transmucosal water transport. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1207**: 29-43.
- Lewis G. F. and Rader D. J. 2005. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ. Res.* **96**: 1221-1232.
- Mahley R. W., Innerarity T. L., Rall Jr. S. C. and Weisgraber K. H. 1984. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res.* **25**: 1277-1294.

- Mansbach II C. M. and Gorelick F. 2007. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **293**: 645-650.
- Mantani Y., Kamezaki A., Udayanga K. G. S., Takahara E.-I., Qi W.-M., Kawano J., Yokoyama T., Hoshi N. and Kitagawa H. 2011. Site differences of Toll-like receptor expression in the mucous epithelium of rat small intestine. *Histol. Histopathol.* **26**: 1295-1303.
- Mantani Y., Yokoo Y., Kamezaki A., Udayanga K. G. S., Takahara E.-I., Takeuchi T., Kawano J., Yokoyama T., Hoshi N. and Kitagawa H. 2012. Immunohistochemical detection of Toll-like receptor-2, -4 and -9 in exocrine glands associated with rat alimentary tract. *J. Vet. Med. Sci.* **74**: 1429-1438.
- Mattson F. H. and Beck L. W. 1956. The specificity of pancreatic lipase for the primary hydroxyl groups of glycerides. *J. Biol. Chem.* **219**: 735-740.
- Mattson F. H., Benedict J. H., Martin J. B. and Beck L. W. 1952. Intermediates formed during the digestion of triglycerides. *J. Nutr.* **48**: 335-344.
- Mattson F. H. and Volpenhein R. A. 1968. Hydrolysis of primary and secondary esters of glycerol by pancreatic juice. *J. Lipid Res.* **9**: 79-84.
- McLean E. and Ash R. 1987. The time-course of appearance and net accumulation of horseradish peroxidase (HRP) presented orally to rainbow trout *Salmo gairdneri* (Richardson). *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* **88**: 507-510.
- Méresse S., Delbart C., Fruchart J.-C. and Cecchelli R. 1989. Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries. *J. Neurochem.* **53**: 340-345.
- Mimura Y., Sakisaka S., Harada M., Sata M. and Tanikawa K. 1995. Role of hepatocytes in direct clearance of lipopolysaccharide in rats. *Gastroenterology* **109**: 1969-1976.
- Mjøs O. D., Faergeman O., Hamilton R. L. and Havel R. J. 1975. Characterization of remnants

- produced during the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins of blood plasma and intestinal lymph in the rat. *J. Clin. Invest.* **56**: 603-615.
- Multhaupt H. A. B., Gåfvels M. E., Kariko K., Jin H., Arenas-Elliott C., Goldman B. I., Strauss III J. F., Angelin B., Warhol M. J. and McCrae K. R. 1996. Expression of very low density lipoprotein receptor in the vascular wall. Analysis of human tissues by *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *Am. J. Pathol.* **148**: 1985-1997.
- Mutoh M., Komiya M., Teraoka N., Ueno T., Takahashi M., Kitahashi T., Sugimura T. and Wakabayashi K. 2009. Overexpression of low-density lipoprotein receptor and lipid accumulation in intestinal polyps in Min mice. *Int. J. Cancer* **125**: 2505-2510.
- Nakamura Y., Yamamoto M. and Kumamaru E. 2000. Very low-density lipoprotein receptor in fetal intestine and gastric adenocarcinoma cells. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **124**: 119-122.
- Nakao I., Okada H., Senzaki H., Nishimura R., Fujita N., Shikata N. and Mori S. 1992. A mixture of paraphenylenediamine and imidazole: its effect on the extraction of lipid droplets during electron microscopy staining. *Biotech. Histochem.* **67**: 219-223.
- Nestel P. J., Havel R. J. and Bezman A. 1962. Sites of initial removal of chylomicron triglyceride fatty acids from the blood. *J. Clin. Invest.* **41**: 1915-1921.
- Nestel P. J., Havel R. J. and Bezman A. 1963. Metabolism of constituent lipids of dog chylomicrons. *J. Clin. Invest.* **42**: 1313-1321.
- Niemeier A., Gåfvels M., Heeren J., Meyer N., Angelin B. and Beisiegel U. 1996. VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro. *J. Lipid Res.* **37**: 1733-1742.
- Oesterlen F. 1846. Ueber den Eintritt von Kohle und andern unlöslichen Stoffen vom Darmcanal aus in die Blutmasse. *Z. Rationelle Med.* **5**: 434-439.
- Palay S. L. and Karlin L. J. 1959. An electron microscopic study of the intestinal villus. II. The pathway of fat absorption. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**: 373-384.
- Pepper M. S. and Skobe M. 2003. Lymphatic endothelium: morphological, molecular and functional

- properties. *J. Cell Biol.* **163**: 209-213.
- Ramasamy I. 2014. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin. Chem. Lab. Med.* **52**: 1695-1727.
- Randle P. J. 1964. The interrelationships of hormones, fatty acid and glucose in the provision of energy. *Postgrad. Med. J.* **40**: 457-463.
- Rasmussen B. B. and Wolfe R. R. 1999. Regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Annu. Rev. Nutr.* **19**: 463-484.
- Ravin H. A., Rowley D., Jenkins C. and Fine J. 1960. On the absorption of bacterial endotoxin from the gastro-intestinal tract of the normal and shocked animal. *J. Exp. Med.* **112**: 783-792.
- Redgrave T. G. 1970. Formation of cholesteryl ester-rich particulate lipid during metabolism of chylomicrons. *J. Clin. Invest.* **49**: 465-471.
- Redgrave T. G. and Small D. M. 1979. Quantitation of the transfer of surface phospholipid of chylomicrons to the high density lipoprotein fraction during the catabolism of chylomicrons in the rat. *J. Clin. Invest.* **64**: 162-171.
- Redinger R. N. 2003. The coming of age of our understanding of enterohepatic circulation of bile salts. *Am. J. Surg.* **185**: 168-172.
- Ruan X. Z., Moorhead J. F., Tao J. L., Ma K. L., Wheeler D. C., Powis S. H. and Varghese Z. 2006. Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in vascular smooth muscle cells by inflammatory cytokines. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**: 1150-1155.
- Rudling M. J., Reihner E., Einarsson K., Ewerth S. and Angelin B. 1990. Low density lipoprotein receptor-binding activity in human tissues: Quantitative importance of hepatic receptors and evidence for regulation of their expression *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 3469-3473.
- Sabesin S. M. and Frase S. 1977. Electron microscopic studies of the assembly, intracellular transport, and secretion of chylomicrons by rat intestine. *J. Lipid Res.* **18**: 496-511.
- Schönheyder F. and Volqvarts K. 1952. Studies on the lipolytic enzyme action. III. Hydrolysis of

- tripropionyl glycerol. *Biochim. Biophys. Acta* **8**: 407-415.
- Scow R. O., Hamosh M., Blanchette-Mackie E. J. and Evans A. J. 1972. Uptake of blood triglyceride by various tissues. *Lipids* **7**: 497-505.
- Simmonds W. J., Hofmann A. F. and Theodor E. 1967. Absorption of cholesterol from a micellar solution: intestinal perfusion studies in man. *J. Clin. Invest.* **46**: 874-890.
- Simon L., Shine G. and Dayan A. D. 1995. Translocation of particulates across the gut wall -- a quantitative approach. *J. Drug Target.* **3**: 217-219.
- Starling E. H. 1896. On the absorption of fluids from the connective tissue spaces. *J. Physiol.* **19**: 312-326.
- Stein O., Stein Y., Goodman D. S. and Fidge N. H. 1969. The metabolism of chylomicron cholesteryl ester in rat liver. A combined radioautographic-electron microscopic and biochemical study. *J. Cell Biol.* **43**: 410-431.
- Stern H. S. and Treadwell C. R. 1958. Cholesterol esterases. VII. Hydrolysis of branched chain esters by pancreatic cholesterol esterase. *Exp. Biol. Med.* **97**:579-581.
- Takahashi S., Kawarabayasi Y., Nakai T., Sakai J. and Yamamoto T. 1992. Rabbit very low density lipoprotein receptor: A low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 9252-9256.
- Takahashi S., Sakai J., Fujino T., Hattori H., Znimaru Y., Suzuki J., Miyamori I. and Yamamoto T. 2004. The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. *J. Atheroscler. Thromb.* **11**: 200-208.
- Takahashi S., Suzuki J., Kohno M., Oida K., Tamai T., Miyabo S., Yamamoto T. and Nakai T. 1995. Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the very low density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* **270**: 15747-15754.
- Tiebel O., Oka K., Robinson K., Sullivan M., Martinez J., Nakamuta M., Ishimura-Oka K. and Chan L. 1999. Mouse very low-density lipoprotein receptor (VLDLR): gene structure,

- tissue-specific expression and dietary and developmental regulation. *Atherosclerosis* **145**: 239-251.
- Tso P., Drake D. S., Black D. D. and Sabesin S. M. 1984. Evidence for separate pathways of chylomicron and very low-density lipoprotein assembly and transport by rat small intestine. *Am. J. Physiol.* **247**: 599–610.
- Tso P., Ragland J. B. and Sabesin S. M. 1983. Isolation and characterization of lipoprotein of density < 1.006 g/ml from rat hepatic lymph. *J. Lipid Res.* **24**: 810-820.
- Udall J. N., Pang K., Fritze L., Kleinman R. and Walker W. A. 1981. Development of gastrointestinal mucosal barrier. I. The effect of age on intestinal permeability to macromolecules. *Pediatr. Res.* **15**: 241-244.
- Ueno M., Wu B., Nakagawa T., Nagai Y., Onodera M., Huang C.-L., Kusaka T., Kanenishi K. and Sakamoto H. 2010. The expression of LDL receptor in vessels with blood-brain barrier impairment in a stroke-prone hypertensive model. *Histochem. Cell Biol.* **133**: 669-676.
- van Greevenbroek M. M. J. and de Bruin T. W. A. 1998. Chylomicron synthesis by intestinal cells in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* **141**: 9-16.
- Volkheimer G. 1964. The passage of small, solid particles from the intestinal canal into the chyle and blood. *Wien. Med. Wochenschr.* **114**: 915-923.
- Volkheimer G. 1977. Persorption of particles: Physiology and pharmacology. *Adv. Pharmacol. Chemother.* **14**: 163-187.
- Volkheimer G. 1993. Persorption von Mikropartikeln. *Pathologe* **14**: 247-252.
- Volkheimer. G. and Schulz. F. H. 1968. The phenomenon of persorption. *Digestion* **1**: 213-218.
- Volkheimer G., Schulz F. H., Lindenau A. and Beitz U. 1969. Persorption of metallic iron particles. *Gut* **10**: 32-33.
- Wells C. L., Maddaus M. A., Erlandsen S. L. and Simmons R. L. 1988. Evidence for the phagocytic transport of intestinal particles in dogs and rats. *Infect. Immun.* **56**: 278-282.

- Westergaard H. and Dietschy J. M. 1974. Delineation of the dimensions and permeability characteristics of the two major diffusion barriers to passive mucosal uptake in the rabbit intestine. *J. Clin. Invest.* **54**:718-732.
- Westergaard H. and Dietschy J. M. 1976. The mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal cell. *J. Clin. Invest.* **58**: 97-108.
- Woollet L. A., Wang Y., Buckley D. D., Yao L., Chin S., Granholm N., Jones P. J. H., Setchell K. D. R., Tso P. and Heubi J. E. 2006. Micellar solubilisation of cholesterol is essential for absorption in humans. *Gut* **55**: 197-204.
- Wyne K. L., Pathak R. K., Seabra M. C. and Hobbs H. H. 1996. Expression of the VLDL receptor in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**: 407-415.
- Yamamoto K., Qi W.-M., Yokoo Y., Miyata H., Udayanga K. G. S., Kawano J., Yokoyama T., Hoshi N. and Kitagawa H. 2009. Histoplanimetric study on the spatial relationship of distribution of indigenous bacteria with mucosal lymphatic follicles in alimentary tract of rat. *J. Vet. Med. Sci.* **71**: 621-630.
- Yokoo Y., Miyata H., Udayanga K. G. S., Qi W.-M., Takahara E.-I., Mantani Y., Yokoyama T., Kawano J., Hoshi N. and Kitagawa H. 2011. Immunohistochemical and histoplanimetric study on the spatial relationship between the settlement of indigenous bacteria and the secretion of bactericidal peptides in rat alimentary tract. *J. Vet. Med. Sci.* **73**: 1043-1050.
- Yuji M., Fujimoto M., Miyata H., Inamoto T., Qi W.-M., Yamamoto K., Warita K., Yokoyama T., Hoshi N. and Kitagawa H. 2007. Persorption mechanisms of luminal antigenic particulates via apoptotic epithelial cells of intestinal villi into systemic blood circulation in orally immunized rats. *J. Vet. Med. Sci.* **69**: 339-346.
- Yuji M., Fujimoto M., Qi W.-M., Takahara E.-I., Mantani Y., Udayanga K. G. S., Takeuchi T., Warita K., Yokoyama T., Hoshi N. and Kitagawa H. 2012. Persorption of IgG-Fc-coated

particulates from intestinal lumen into portal blood via villous columnar epithelial cells in rat small intestine. *J. Vet. Med. Sci.* **74**: 1447-1452.

Yuji M., Tsubata M., Chin K., Onishi S., Inamoto T., Qi W.-M., Warita K., Yokoyama T., Hoshi N. and Kitagawa H. 2006. Persorption of luminal antigenic molecule and its specific antibody via apoptotic epithelial cells of intestinal villi and Peyer's patches into peripheral blood in rats. *J. Vet. Med. Sci.* **68**: 1297-1305.

Zilversmit D. B., Courtice F. C. and Fraser R. 1967. Cholesterol transport in thoracic duct lymph of the rabbit. *J. Atheroscler. Res.* **7**: 319-329.

付図および付図説明

図 2 上皮細胞内に脂肪滴を有する空腸腸絨毛

脂肪滴を有する上皮細胞が主に腸絨毛（IV）頂部にみられ，先端の上皮細胞に多くの脂肪滴がみられる（矢印）。

Imidazole と paraphenylenediamine による脂肪染色
トルイジンブルー対比染色 Bar = 50 μm

図 3 脂肪滴を有する上皮細胞の超微形態

上皮細胞（Ep）には大型の脂肪滴を含む大小様々な脂肪滴が含まれている（矢印）。

Imidazole と paraphenylenediamine による脂肪染色
酢酸ウランとクエン酸鉛による電子染色
Bar = 10 μm

図 4 腸絨毛先端の脱落過程にある上皮細胞

腸絨毛の先端に位置し，大型の脂肪滴を有する上皮細胞が脱落しつつある（矢印）。 矢頭：毛細血管，Ep：絨毛円柱上皮細胞

Imidazole と paraphenylenediamine による脂肪染色
酢酸ウランとクエン酸鉛による電子染色
Bar = 10 μm

図 5 腸絨毛先端の上皮における遊離縁側の上皮細胞間隙の乳ビ球

上皮細胞間隙（EI）が拡張しており，少数の乳ビ球（矢印）が散在している。 Ep：絨毛円柱上皮細胞

酢酸ウランとクエン酸鉛による電子染色
Bar = 1 μm

図 6 腸絨毛先端の基底側の上皮細胞間隙の乳ビ球

拡張した上皮細胞間隙（EI）には乳ビ球が高密度にみられる。
Ep：絨毛円柱上皮細胞 酢酸ウランとクエン酸鉛による電子染色
Bar = 1 μm

図 7 腸絨毛先端の上皮直下の粘膜固有層中の乳ビ球

上皮細胞（Ep）直下の粘膜固有層（LP）には乳ビ球（矢印）がみられるが，その密度は上皮細胞間隙に比べて低い。

酢酸ウランとクエン酸鉛による電子染色
Bar = 1 μm

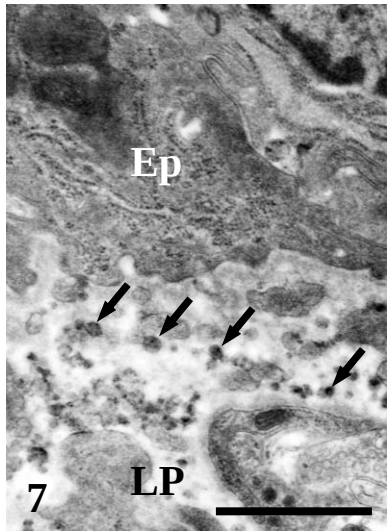
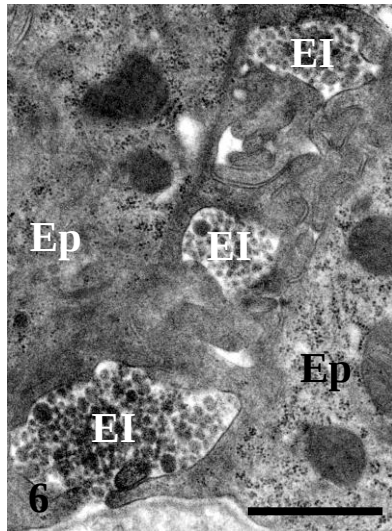
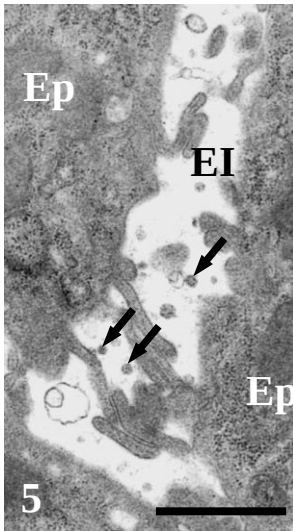
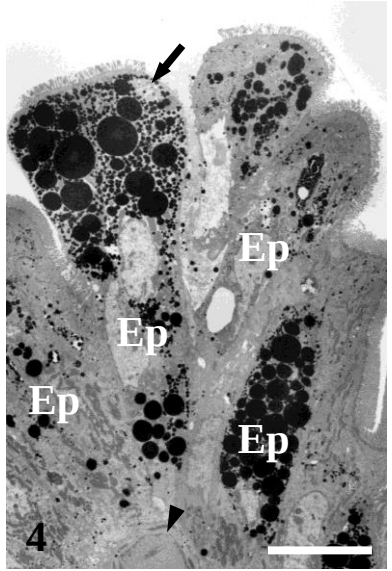
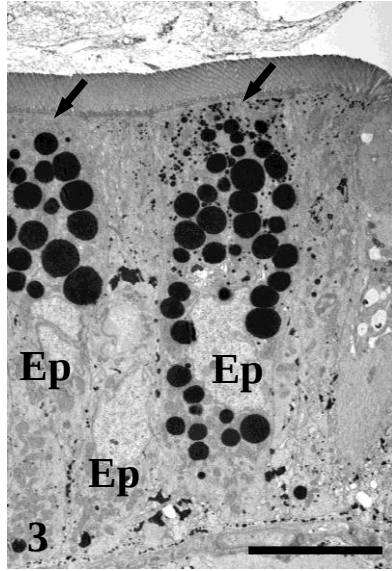
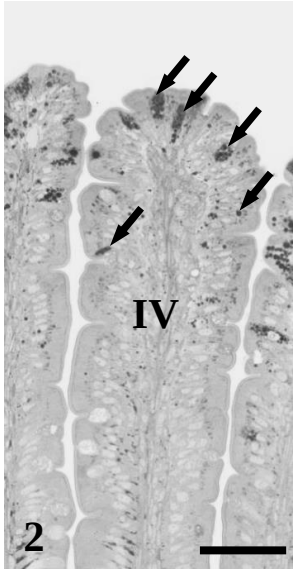


図 8 腸絨毛先端の上皮直下の毛細血管周囲の乳ビ球

毛細血管 (C) の周囲に大小様々な乳ビ球 (矢印) が多数存在するが、毛細血管内腔の乳ビ球 (矢頭) は全て小型である。

Ep : 絨毛円柱上皮細胞, Er : 赤血球

Imidazole と paraphenylenediamine による脂肪染色
酢酸ウランとクエン酸鉛による電子染色

Bar = 1 μ m

図 9 中心リンパ管内腔および中心リンパ管周囲の乳ビ球

中心リンパ管内腔 (L) およびその周囲の粘膜固有層 (LP) には大小様々な乳ビ球が高密度にみられる。 En : 内皮細胞

Imidazole と paraphenylenediamine による脂肪染色
酢酸ウランとクエン酸鉛による電子染色

Bar = 1 μ m

図 10 粘膜下組織の細動脈内腔の乳ビ球

粘膜下組織の細動脈の内腔 (L) には小型の乳ビ球が少数散在している (矢印)。 En : 内皮細胞, Er : 赤血球

酢酸ウランとクエン酸鉛による電子染色

Bar = 1 μ m

図 11 腸絨毛基部の細静脈内腔の乳ビ球

腸絨毛基部の細静脈の内腔 (L) には細動脈の内腔よりもやや高密度に小型の乳ビ球がみられる (矢印)。 En : 内皮細胞

酢酸ウランとクエン酸鉛による電子染色

Bar = 1 μ m

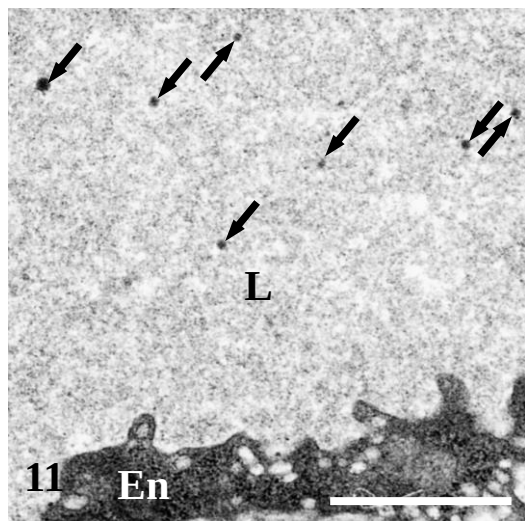
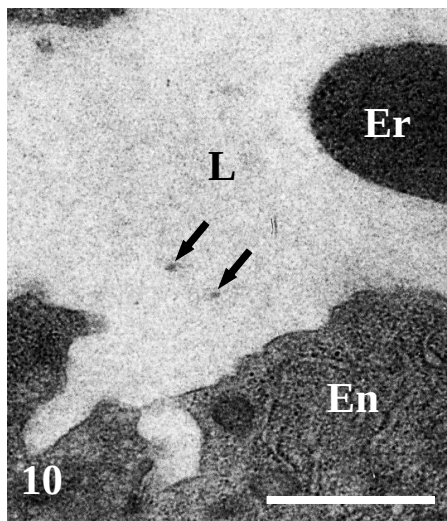
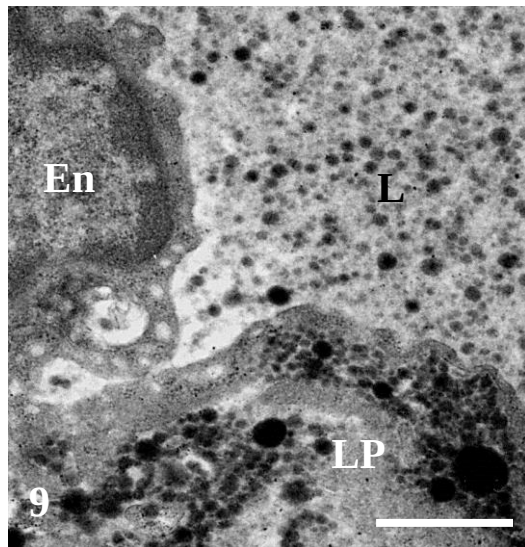
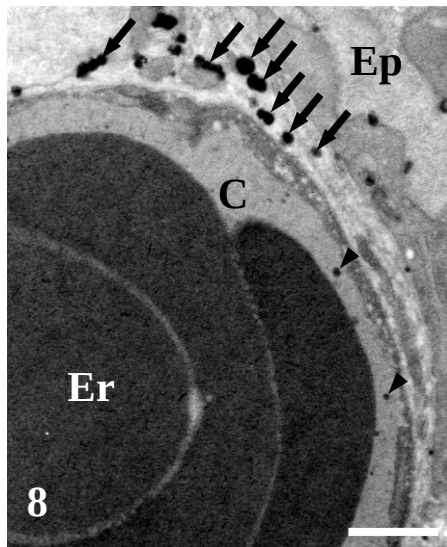


図 12 上皮直下の毛細血管の内皮細胞内に存在する乳ビ球

- a) 内皮細胞内に乳ビ球がみられる（矢印）。毛細血管（C）内腔の乳ビ球（矢頭）の方が毛細血管周囲の乳ビ球よりも小型である。 Ep：絨毛円柱上皮細胞，LP：粘膜固有層

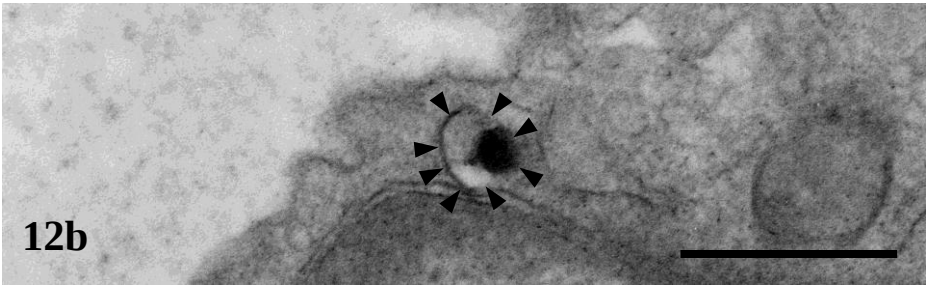
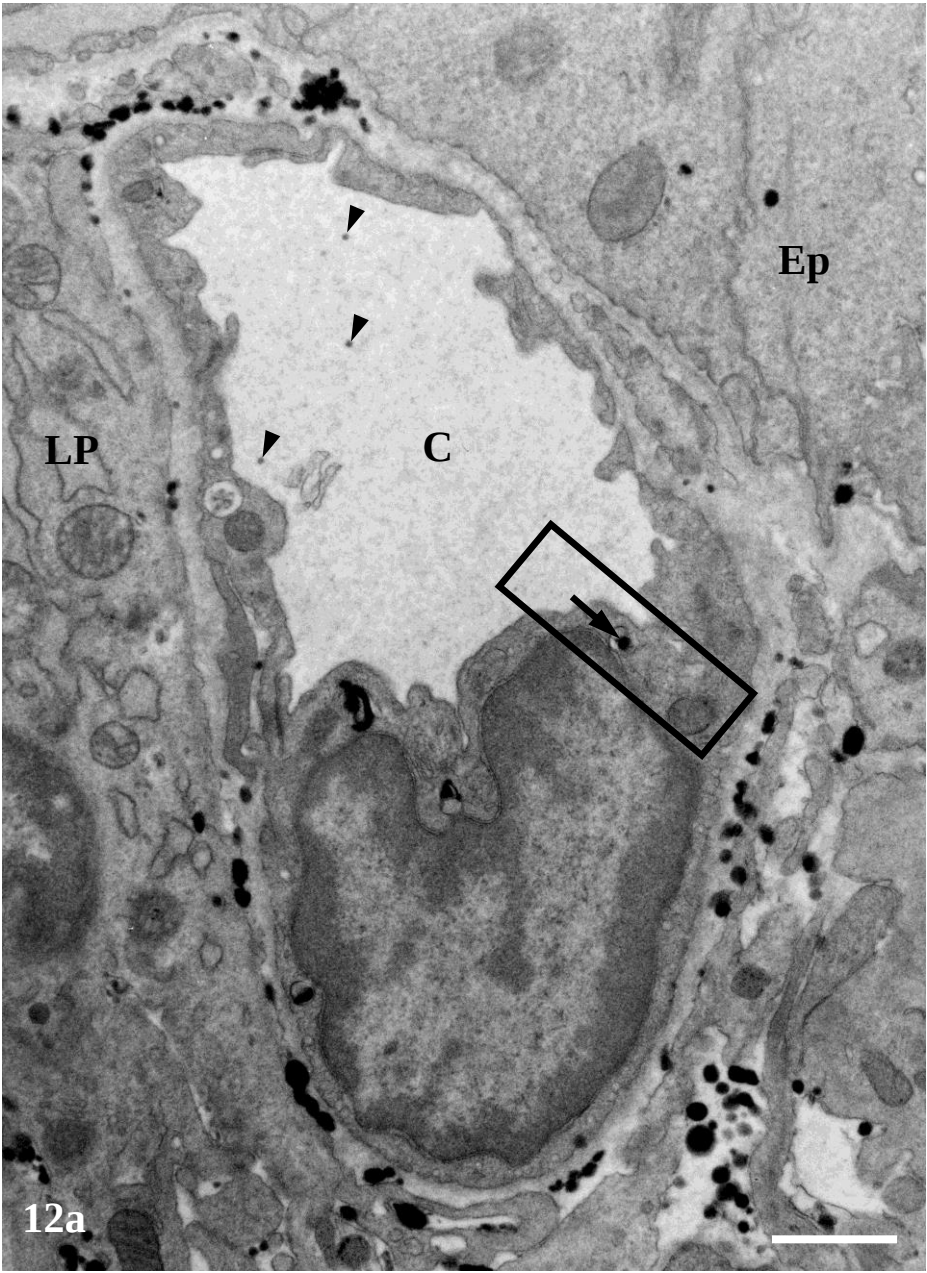
Imidazole と paraphenylenediamine による脂肪染色
酢酸ウランとクエン酸鉛による電子染色

Bar = 1 μ m

- b) 図 12a の四角で囲まれた部位の拡大像。乳ビ球が小胞（矢頭）内に存在する。

Imidazole と paraphenylenediamine による脂肪染色
酢酸ウランとクエン酸鉛による電子染色

Bar = 0.5 μ m



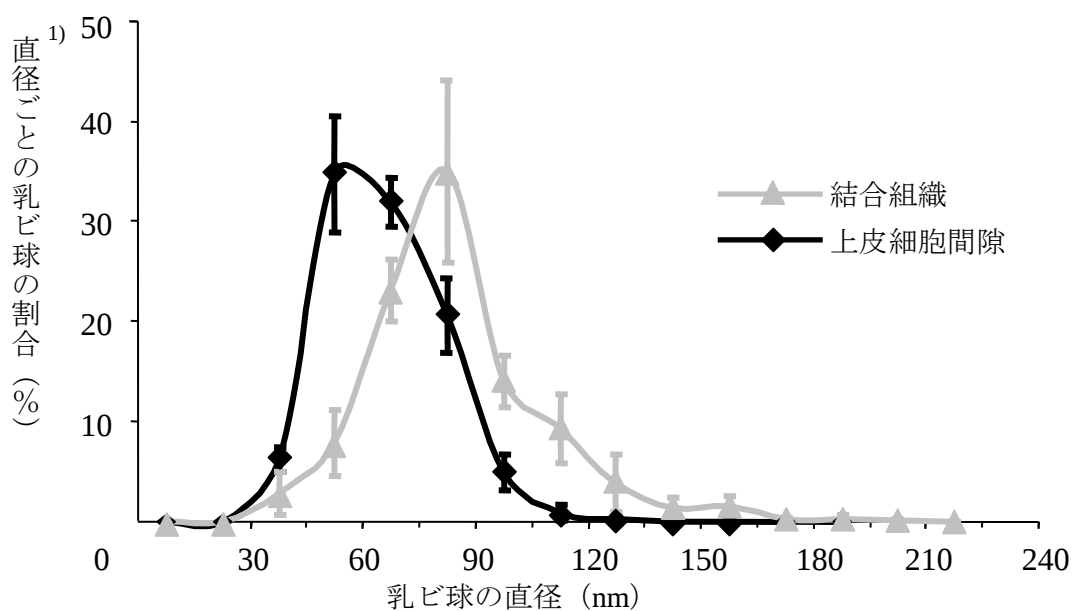


図13 腸絨毛先端部の上皮直下の毛細血管近傍の結合組織とその直上の上皮細胞間隙における乳ビ球の相対出現頻度

1) 計測した300個の乳ビ球における直径ごとの割合の平均値

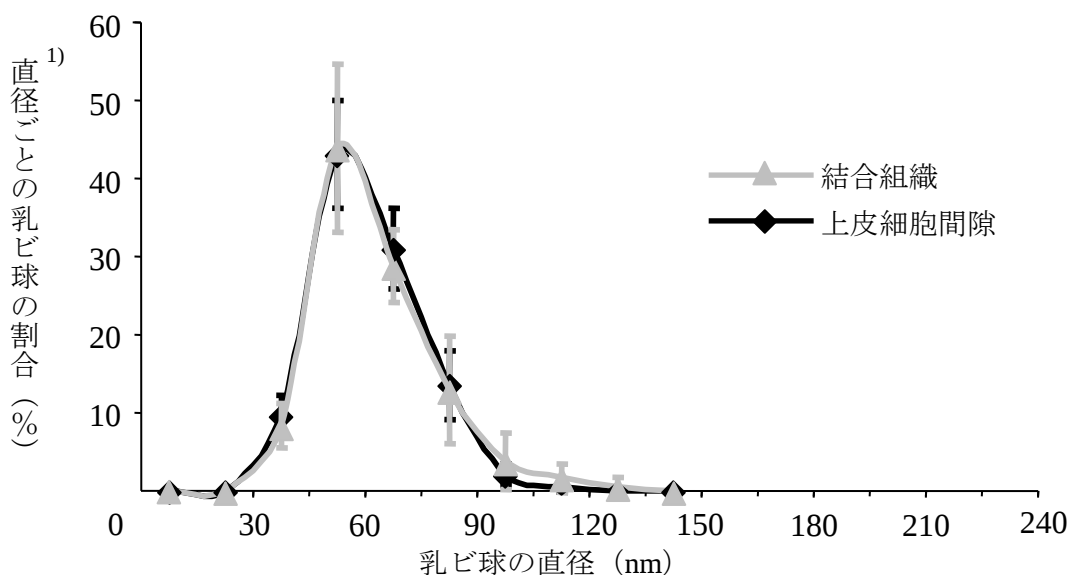


図14 腸絨毛先端部の上皮直下の毛細血管間の結合組織とその直上の上皮細胞間隙における乳ビ球の相対出現頻度

1) 計測した300個の乳ビ球における直径ごとの割合の平均値

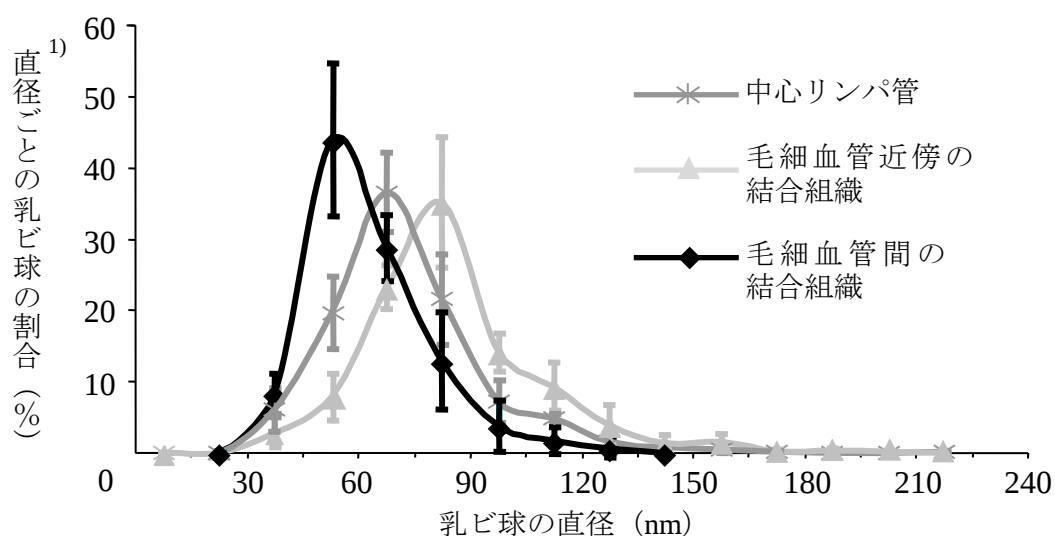


図15 中心リンパ管先端部の内腔と腸絨毛先端部の上皮直下の毛細血管近傍および毛細血管間の結合組織における乳ビ球の相対出現頻度

1) 計測した300個の乳ビ球における直径ごとの割合の平均値

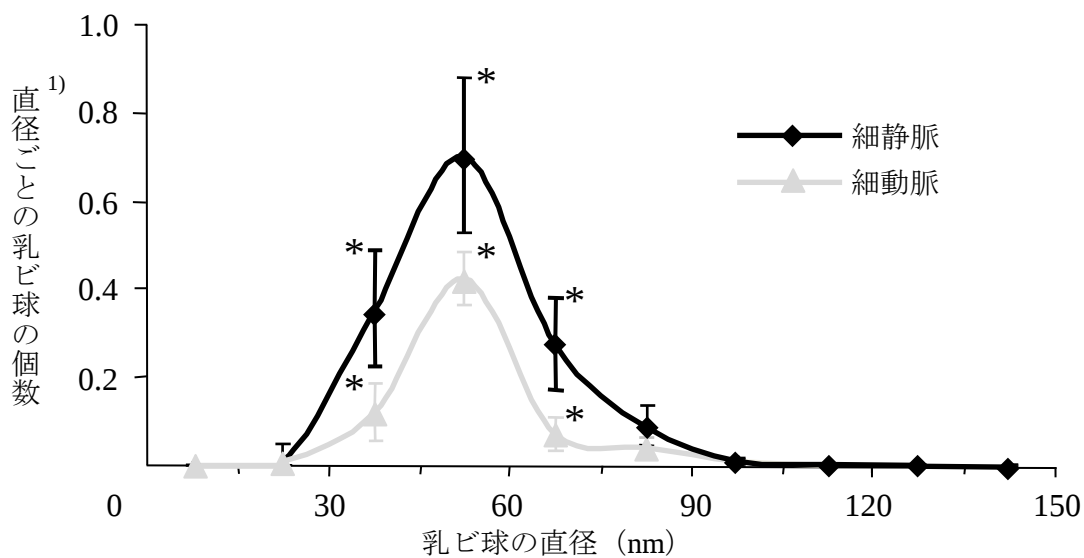


図16 腸絨毛基部の細静脈内腔と粘膜下組織の細動脈内腔の単位面積当たりの乳ビ球の出現頻度

1) 単位面積 $6.0 \times 10^5 \text{ mm}^2$ 当たりの直径ごとの乳ビ球の個数の平均値

※: $P < 0.05$

図 18 腸絨毛における脂肪滴および乳ビ球の分布

- a) 腸絨毛の上皮細胞 (Ep) 内に多数の脂肪滴が存在し, 毛細血管 (矢印) 周囲の粘膜固有層にも乳ビ球が多数みとめられる。
- b) 上皮細胞 (Ep) 内に脂肪滴が少ない腸絨毛の毛細血管 (矢印) 周囲の粘膜固有層には乳ビ球がほとんどみられない。

ズダンブラック B による脂肪染色

Bar = 10 μ m

図 19 乳ビ球を多数有する腸絨毛における VLDL および LDL 受容体の染色結果

- a) 図 18a の連続切片で, 粘膜固有層に乳ビ球を多数有する腸絨毛では, 先端の上皮直下の毛細血管内皮が VLDL 受容体陽性を示している (矢印)。また, 絨毛円柱上皮細胞 (Ep) の一部の線条縁に弱い陽性がみられる (矢頭)。
- b) 図 18a の連続切片で, 図 19a の腸絨毛先端にある毛細血管と同じ毛細血管 (矢印) が LDL 受容体陰性を示し, 絨毛円柱上皮細胞 (Ep) にも陽性がみとめられない。
- c) 図 19a の毛細血管の拡大像。内皮細胞の遊離縁側 (矢印) と基底側 (矢頭) に強い VLDL 受容体陽性が, また, 細胞質にはやや弱い陽性がみられる。 Ep: 絨毛円柱上皮細胞
- d) 乳ビ球を多数有する他の腸絨毛先端にある上皮直下の毛細血管にも図 19c と同様に内皮細胞の遊離縁側 (矢印) および基底側 (矢頭) に VLDL 受容体陽性が, また, 細胞質にやや弱い陽性がみられる。 Ep: 絨毛円柱上皮細胞

図 20 乳ビ球が少ない腸絨毛における VLDL および LDL 受容体の染色結果

- a) 図 18b の連続切片で, 粘膜固有層に乳ビ球がほとんど存在しない腸絨毛では, 先端の上皮直下の毛細血管内皮 (矢印) が VLDL 受容体陰性を示している。また, 絨毛円柱上皮細胞 (Ep) の線条縁 (矢頭) に弱い陽性がみられる。
- b) 図 18b の連続切片で, 図 20b の腸絨毛先端にある毛細血管と同じ毛細血管 (矢印) が LDL 受容体陰性を示し, 絨毛円柱上皮細胞 (Ep) にも陽性はみられない。

対比染色: メチルグリーン染色

Bar = 10 μ m

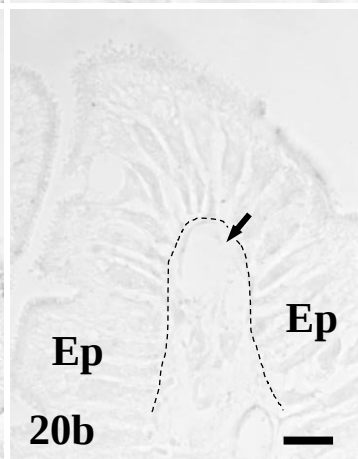
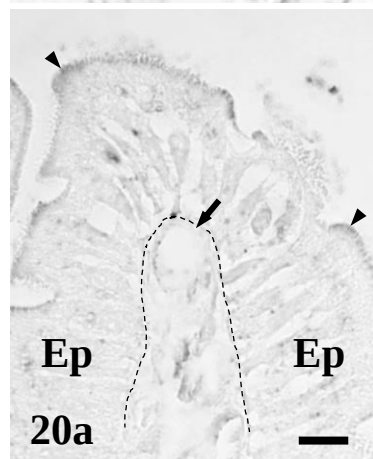
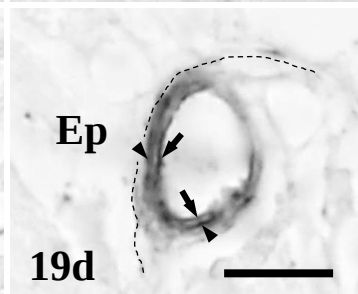
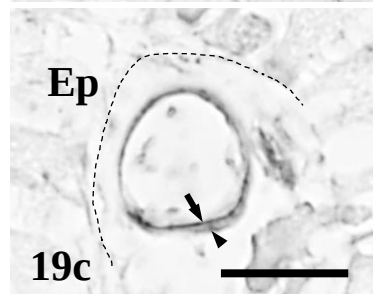
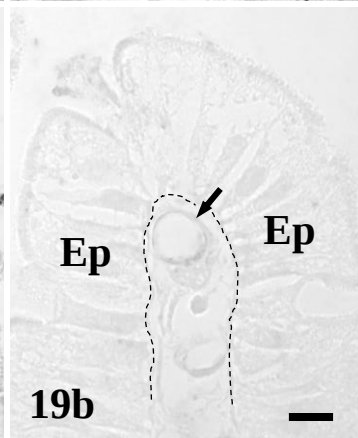
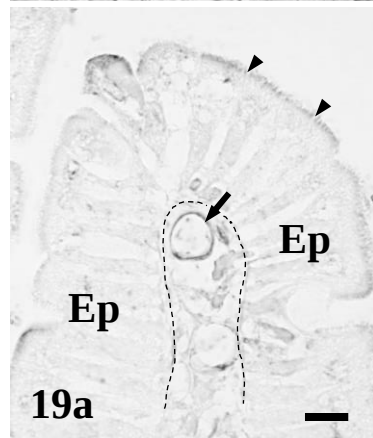
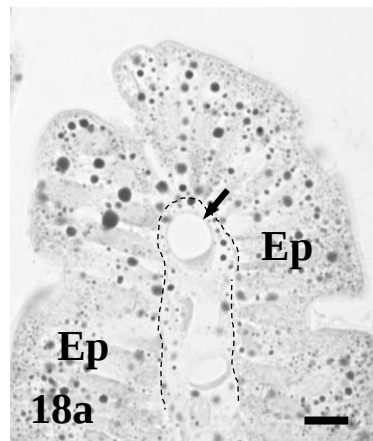


図 21 その他の組織構成要素における VLDL 受容体の発現について

- a) 粘膜下組織に存在する細動脈の内皮細胞（矢印）が強い VLDL 受容体陽性を示すとともに，平滑筋細胞（矢頭）が弱い陽性を示している。
- b) 腸絨毛基部に存在する細静脈の内皮細胞（矢印）が強い陽性を示し，平滑筋細胞（矢頭）が弱い陽性を示している。L:内腔
- c) 筋層内の毛細血管の内皮細胞（矢印）が陽性を示している。
- d) 腸絨毛中部の絨毛筋細胞の細胞膜が陽性を示すとともに，細胞質がやや強い陽性を示している（矢印）。

CL：中心リンパ管，Ep：絨毛円柱上皮細胞

- e) 腸陰窩（IC）の下部の粘膜筋板を構成する平滑筋細胞の細胞膜が陽性を示すとともに，細胞質がやや弱い陽性を示している（矢印）。
- f) 筋層の平滑筋細胞の細胞膜が陽性を示すとともに，細胞質がやや弱い陽性を示している（矢印）。
- g) 粘膜下組織内のリンパ管内皮の遊離縁（矢印）が陽性を示している。 L：内腔

対比染色：メチルグリーン染色

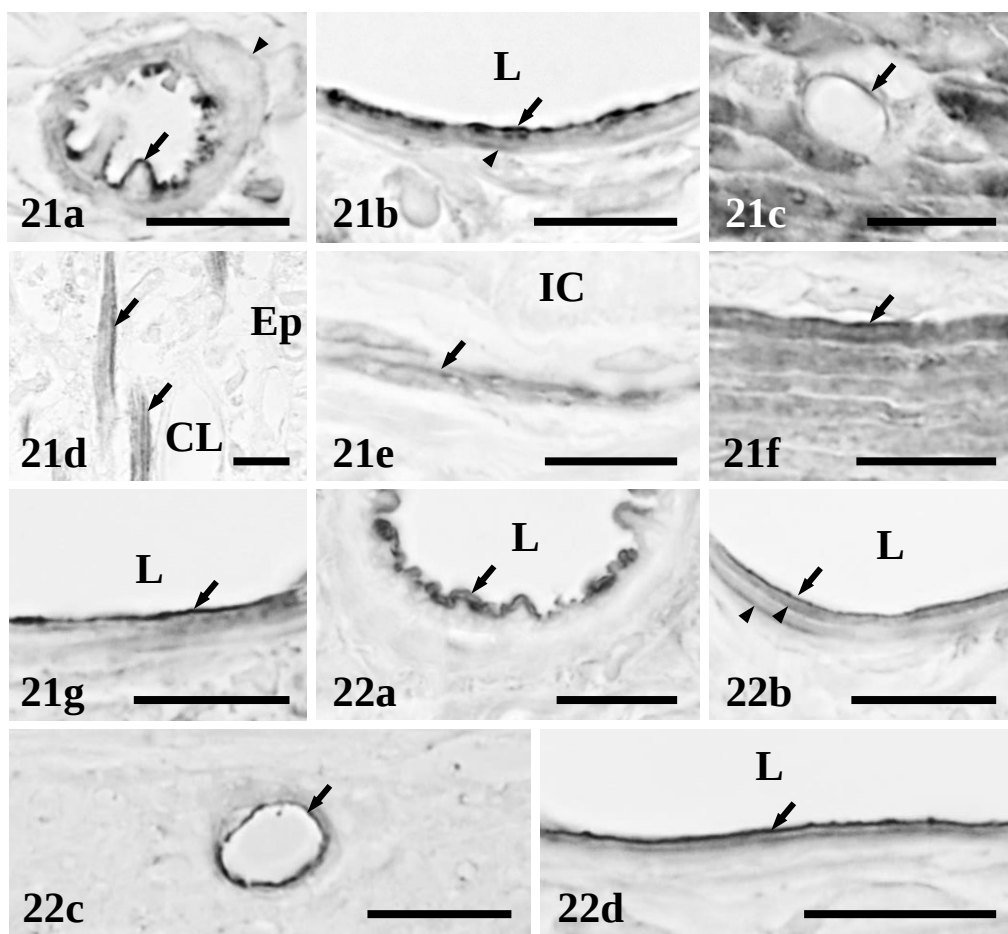
Bar = 10 μ m

図 22 その他の組織構成要素における LDL 受容体の発現について

- a) 粘膜下組織に存在する細動脈の内皮細胞の遊離縁側（矢印）が LDL 受容体陽性を示している。 L:内腔
- b) 腸絨毛基部に存在する細静脈の内皮細胞の遊離縁（矢印）および平滑筋細胞（矢頭）が陽性を示している。 L：内腔
- c) 筋層内の毛細血管の内皮細胞（矢印）が陽性を示している。
- d) 粘膜下組織内のリンパ管の内皮の遊離縁（矢印）が陽性を示している。 L：内腔

対比染色：メチルグリーン染色

Bar = 10 μ m



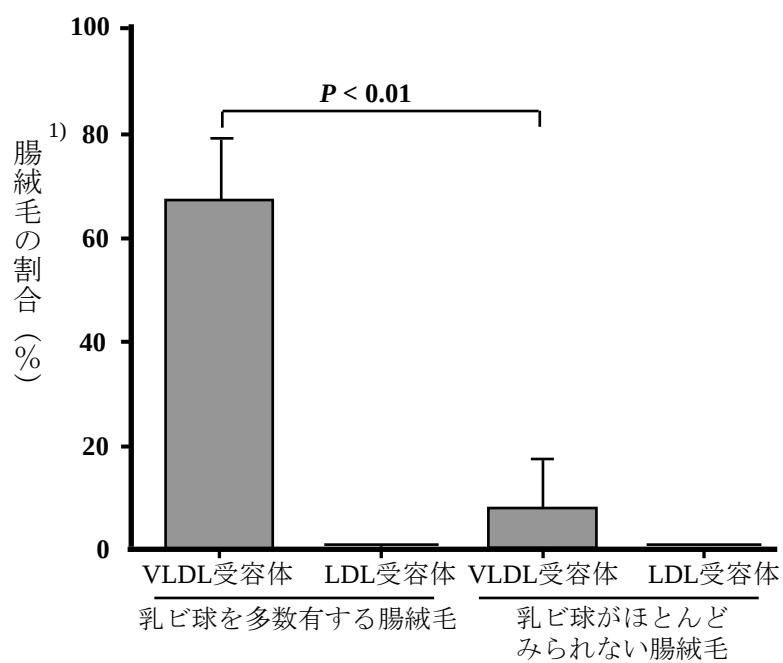


図23 上皮下毛細血管内皮にVLDL受容体およびLDL受容体の陽性を示す腸絨毛の出現頻度と粘膜固有層における乳ビ球の量の関係

1) 腸絨毛20本における先端の毛細血管が陽性を示した腸絨毛の出現頻度