

氏 名	いけ ぐち りょう すけ 池 口 良 輔
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2821 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Successful storage of peripheral nerve prior to transplantation using green tea polyphenol: an experimental study in rats (ポリフェノールを用いた末梢神経保存に関する実験的研究)
論文調査委員	(主 査) 教授 大 森 治 紀      教授 戸 口 田 淳 也      教授 井 出 千 束

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### (緒言)

広範な末梢神経損傷の再建に際しては自家神経移植では採取神経の供給量に制限があるため、免疫抑制療法の発達とともに同種神経移植という概念が生まれてきた。同種神経移植を臨床応用するためには、末梢神経片をその神経誘導能力を維持した状態で長期間保存する方法が必要となる。ポリフェノール類は、酸化ストレスによって生じる反応を干渉できる物質として知られており、虚血性変化からの組織保護作用などが報告されている。本研究では、ポリフェノールの末梢神経保存液としての可能性について検討した。

#### (実験材料, 方法)

Lewis ラットの坐骨神経より 20mm 長の移植神経片を採取した。移植片採取直後に移植したものを F 群 (n=21), 7 日間 4 度でポリフェノール処理を行いその後 21 日間細胞培養液中で保存したものを P 群 (n=20), コントロールとして細胞培養液のみで 28 日間保存したものを M 群 (n=21) としそれぞれレシビエント Lewis ラットの坐骨神経を 15mm 切除して作成した神経欠損部に 10-0 ナイロン糸にて縫合架橋し移植した。移植前の神経移植片を calcein-AM/ethidium homodimer の二重染色にて cell viability を判定し、電顕による観察も行った。また、再生神経内のドナー由来細胞の存在を、オス Lewis ラットから採取し同様に処理した坐骨神経片をメス Lewis ラットに移植し、12 週後に移植神経から genomicDNA を抽出し、Sex-determining Region of the Y-chromosome (Sry) に特異的な PCR 法にて判定した。移植 12 週及び 24 週後に電気生理学的及び組織形態学的評価も行った。

#### (実験結果)

移植片に対する移植前評価では、P 群では移植片の cell viability が維持されており、再生神経内のドナー由来細胞の存在も確認できた。移植後の電気生理学的評価において、M 波の最大振幅に関しては、P 群では F 群とほぼ同等で、M 群より有意に改善していた。移植 24 週後の組織学的評価においては、総有髄神経軸索数、有髄神経軸索密度、及び有髄神経軸索直径ともに P 群は M 群より有意に高値であった。また P 群では F 群に比較して、両群間に統計学的有意差は認められなかった。

#### (考察)

シュワン細胞は末梢神経における主要な細胞成分であり、末梢神経移植において、神経栄養因子の合成、NGF receptor の表示、細胞接着因子の産生、細胞基底膜の合成など、重要な役割を担っている。そのため、保存末梢神経を用いた神経移植の成績を向上させるためには、シュワン細胞の viability をいかに保つかが重要と考えられる。本実験では、ポリフェノール処理した神経片を酵素化学的手法、組織形態学的手法及び分子生物学的手法の 3 通りの方法で、シュワン細胞の viability を確認した。したがって、P 群では保存神経片内のシュワン細胞の viability が保たれたことにより、F 群と同等の神経再生を示したものと考えられる。一方、M 群でシュワン細胞が保存されないにもかかわらず神経再生が認められたのは、

残存した一部の基底膜にそって両神経断端からレシピエントのシュワン細胞が移動し神経再生がおこったものと考えられる。

(結論)

ポリフェノールは有効な末梢神経保存液として応用できる可能性があると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

自家神経移植では採取可能な神経量に限りがあるため広範な末梢神経欠損の再建は不可能である。その欠陥を克服するため、近年免疫抑制療法の発達にともない同種神経移植という概念が生まれてきた。同種神経移植を臨床応用するためには、末梢神経片をその神経誘導能力を維持した状態で長期間保存する方法が必要となる。緑茶ポリフェノール類は、虚血性変化からの組織保護作用を有することが報告されており、今回、末梢神経保存液としての可能性について検討した。

Lewis ラットより 20mm の坐骨神経片を採取し、7日間摂氏4度でポリフェノール液中に浸漬し、その後21日間細胞培養液中で保存した。この4週間虚血状態においた末梢神経片内に生物活性を有するシュワン細胞が存在することを、酵素化学的手法、電子顕微鏡学的手法及びPCR法を用いた分子生物学的手法の3通りの方法で確認した。また、このように保存神経片をLewisラットの坐骨神経欠損部に移植したところ、摂氏4度の細胞培養液中で28日間保存した末梢神経片を移植したものより有意に良好な神経再生を示し、採取後直ちに移植した神経片内の神経再生とほぼ同等であったことを、組織形態学的、電気生理的に確認した。

以上の結果からポリフェノールは有効な末梢神経保存液として応用できる可能性があると考えられた。

以上の研究は末梢神経移植の進歩に貢献し、末梢神経損傷の治療に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成17年2月1日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。