

氏名(本籍)	遠藤隆志(千葉県)					
学位の種類	医学博士					
学位記番号	博乙第545号					
学位授与年月日	平成元年10月31日					
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当					
審査研究科	医学研究科					
学位論文題目	神経細胞内骨格に関する検索 第1報: Waller変性における Tubulin, Neurofilament の免疫組織化学的観察 第2報: ワーラー変性におけるニューロフィラメント, チュープリンの免疫組織電顕的観察 第3報: 酵素抗体法の臨床応用: 術中迅速酵素抗体法による神経の変性および再生の評価 第4報: 神経再生モデルにおけるニューロフィラメント, チュープリン, S-100タンパクの免疫組織化学的観察					
主査	筑波大学教授	医学博士	中	西	孝	雄
副査	筑波大学教授	医学博士	草	刈		潤
副査	筑波大学教授	医学博士	杉	田	良	樹
副査	筑波大学教授	医学博士	安	羅	岡	一
副査	筑波大学教授		吉	川	靖	三

論文の要旨

〈目的〉

形成外科において形態の再建はほぼ完成された感があるが、一方、神経麻痺などの機能再建に関しては満足いく結果は得られておらず、これは神経、筋肉に関する基礎知識の未解決な部分が多いためと思われる。本研究は神経細胞の免疫組織化学的手法を応用し、細胞内骨格の構成要素である神経細線維、微小管そしてシュワン細胞に注目して、神経の変性および再生過程における経時的変化を観察する事を目的とした。また酵素抗体法の臨床応用として術中迅速酵素抗体法の可能性に関しても検討した。

〈実験材料と方法〉

実験にはウイスター系ラット雄33匹66検体の坐骨神経を使用。ワーラー変性の実験では大腿中部にて神経を結紮切離後、12, 24, 48, 72, 96時間後に神経を切断端遠位側(切断端より0.5cm遠位)と足関節部より経時的に採集、ニューロフィラメントおよびチュープリンに関して酵素抗体染色を施行した。迅速酵素抗体法の実験では、採取した神経をただちに30分、50分という異なる反応時間でニューロフィラメント染色し比較した。また反応温度についても室温および37度と条件を変え

ニューロフィラメント染色し、同様に比較検討した。一方、再生モデルにおける実験では、大腿中央部にて神経を切離後、顕微鏡下に再縫合、次いで1. 2. 3. 4. 5か月後に神経を経時的に切断端近位側（切断端より1 cm近位）および遠位側（切断端より1 cm遠位）より採取、ニューロフィラメント、チューブリンおよびS-100タンパクに関して酵素抗体染色を施行した。

#### 〈結果〉

神経変性時における細胞内骨格の変化に関しては、光顕的観察においてニューロフィラメント染色は、脱神経48時間頃より空軸索の出現する様になり変性が進行し、チューブリン染色でも同様に脱神経48時間から72時間で空軸索の数が増加した。また脱神経96時間ではニューロフィラメント、チューブリンともにほとんど染色性が認められなかった。一方電顕的観察においてもニューロフィラメント、チューブリン染色ともに脱神経48時間において突然モザイク状の局在を呈する様になり、やがて強い染色性を有する領域は時間の経過に従い染色性が低下していった。この様にニューロフィラメントの染色性が失われる時期とチューブリンの染色性が失われる時期はほぼ一致した。

神経再生時における細胞内骨格の変化に関しては、切断端近位側ではチューブリン、ニューロフィラメント染色ともに縫合後1-5か月の全期間を通して著明な変化は認められなかったが、一方切断端遠位側においてはその変化が顕著であった。ニューロフィラメント染色では縫合後1か月より多数の小径の再生軸索が出現し、縫合後2か月以降再生軸索は数が減少するものの、1つ1つの軸索は大径化していった。チューブリン染色では、縫合後1-3か月の遠位側は近位側と比較した場合、不明瞭な染色像を呈していたが、縫合後4か月以降明瞭となり近位側との染色性に差はなくなった。S-100タンパク染色では、縫合後1か月における切断端近位側においてやや不鮮明な生殖像を呈するものの、縫合後2か月以降では切断端近位側遠位側ともに良好に染色されていた。

一方、術中迅速酵素抗体法の可能性に関しては、反応時間を30分、50分と変えてもニューロフィラメントの特異的染色性に差が無く、また室温および37度の温度の違いによるニューロフィラメントの染色性の改善も認められず、どの条件でも染色像は良好であった。この様に条件を変えても差がなかったため、生理的溫度に近い37度、反応時間が短くて済む30分という条件にて2症例3検体の臨床例をニューロフィラメント染色し正確な染色像がえられた。

#### 〈考察〉

神経変性時における細胞内骨格の変化に関しては、神経細線維がカルシウム依存性プロテアーゼの働きにより分解され、微小管はカルシウムの直接作用である脱重合により分解されると言われており、その作用機序が異なるわけであるが、それにもかかわらず形態的に変性の時期が一致した事は興味深い結果であった。電顕的観察において脱神経48時間で突然出現したモザイク状の染色野が神経細線維や微小管の本体であるのか、または抗原性を有する代謝産物であるのかはこれらだけでは判断できないが、一般の電顕法でも形態的に抽出される事より神経細線維や微小管本体と考えて良い様である。しかしこのモザイク状の局在様式には特に規則性がなく、ミトコンドリアとの位置関係にも対応がなかったため、軸索流の位置に関しては上記の結果からでは確認できなかった。

神経再生時における細胞内骨格の変化に関して、縫合後1か月で認められた多数の小径軸索は近位側軸索より枝分かれした軸索であり、縫合後2か月以降それらは径の増大とともに数は減少していく。これはうまく終末にたどりつけた再生軸索の成熟化を意味すると思われる。またS-100タンパクであらわされるシュワン細胞は、縫合後1か月における遠位側において既に良好に染色されており活発なシュワン細胞の増殖が示唆され、シュワン細胞は再生軸索のガイドとして重要な働きをするものと思われる。

一方、迅速酵素抗体法の臨床応用として2症例2検体の臨床例をニューロフィラメントの染色した所、短時間にて神経細胞内骨格の正確な変性および再生の評価が可能であった。この方法が改良され一般化されれば、重要な術中診断手技による可能性がある。

#### 〈結 論〉

これまでの神経の変性および再生に関する報告では、機能と構造の変化を同時に観察する事は、それに適した良い検索法がなかったため不可能であった。しかし、近年開発された酵素抗体法は、この機能と構造を同時に観察する事が可能な新しい検索法として注目されている。

本研究では、この酵素抗体法を神経にもちいる事で、神経の変性および再生過程における細胞内骨格の機能および構造的変化を直接、同時に観察できる事が判明した。同様に酵素抗体法の臨床応用としての術中迅速診断法の可能性も示唆された。

### 審 査 の 要 旨

抹消神経は切断または挫滅されると変性するが、それを修復するためには変性と再生の過程を解明しておく必要がある。従ってこれ迄多くの学者により報告されているが、本研究は最近開発された酵素抗体法を用いて、細胞内骨格の神経細線維と微小管について、変性と再生過程を動物実験で検索し、研究成果をあげるとともに臨床的術中に迅速診断することが、酵素抗体法により可能であること示唆した。

このように抹消神経の変性と再生過程をけ形成外科面から意欲的に研究し成果をあげたことは高く評価できるといえる。

よって著者は医学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。