



The recovery of blood-nerve barrier in crush nerve injury —A quantitative analysis utilizing immunohistochemistry—

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大村, 久美子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1269

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 4 1 6 号	学位授与年月日	平成 1 6 年 3 月 2 3 日
氏 名	大 村 久美子		
論文題目	The recovery of blood-nerve barrier in crush nerve injury - A quantitative analysis utilizing immunohistochemistry - (神経圧挫損傷における血液－神経関門の回復－免疫組織化学的手法を用いた定量分析－)		

論文題目

The recovery of blood-nerve barrier in crush nerve injury

— A quantitative analysis utilizing immunohistochemistry —

(神経圧挫損傷における血液 - 神経関門の回復 - 免疫組織化学的手法を用いた定量分析 -)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

末梢神経には血中物質の神経組織内への物質移行を制御し、神経内の環境の恒常性を維持する血液・神経関門が存在する。従来その評価は静脈内に投与したトレーサーの神経内膜内への漏出の有無により検討されてきた。しかしこの方法では定量的な評価は困難であり、詳細な血液・神経関門の機能動態の解明には検討の余地があった。本研究の目的は血液関門に特異的な抗血液関門抗体を用いた免疫組織化学的手法に着目し、この方法により神経再生に伴う血液・神経関門の破綻および再生を定量的に解析できるかを検討することである。

〔材料ならびに方法〕

200 - 250 g の雌 SD 系ラットを用い、麻酔下に左坐骨神経を圧挫し、有連続損傷モデルを作製した。圧挫には脳動脈瘤血管クリップを用い、圧挫力は 1.52N、圧挫時間は 5 分とした。損傷後 1、3、7、14、21、28、56 日に坐骨神経を圧挫部およびその中枢 10 mm から末梢 35 mm まで採取し、5 mm ごとに分け、凍結横断切片を作製した。コントロールには正常ラットの坐骨神経を用いた。

Evans blue albumin tracer による評価 : Evans blue albumin tracer を経静脈的投与し、蛍光顕微鏡で観察した。

免疫組織化学的评价 : 連続切片にて、血管内皮細胞マーカーとして抗 rat endothelial cell antigen-1(RECA-1) 抗体、血液関門因子マーカーとして抗 endothelial barrier antigen(EBA)抗体を使用し、免疫組織化学的染色を施行した。又、軸索の評価には抗 neurofilament 抗体を使用した。血液・神経関門の評価は全血管数に対する barrier 機能を持った血管の割合として数値化した。血管数および軸索数は解析ソフト Mac SCOPE、統計解析は ANOVA を使用した。

〔結果〕

Evans blue albumin tracer による評価 : 正常では Evans blue albumin は神経内膜内の血管に局限していた。圧挫後 1 日目に圧挫部より末梢全ての部分で一斉に Evans blue albumin の漏出像を認めた。21 日目に漏出像は正常まで減少し、56 日には神経内膜内の血管に局限していた。

免疫組織化学的评价 : RECA-1 は損傷後も正常と同様に抗原性は保たれ、神経内膜内の血管が陽性であった。一方 EBA は正常では神経内膜内の血管に陽性であったが、損傷後 3 日では中枢 5 mm から末梢 35 mm まで正常と比較し抗原性が低下し、7 日で最も低下した。14 日で損傷部より回復し始め、56 日にはほぼ正常にまで回復した。barrier 機能を持った

血管の割合は損傷後1日では正常と有意差を認めなかったが、損傷後3日および7日では中枢5 mm から末梢35 mm まで一様に有意に低下した。損傷後14日では末梢25 mm および35 mm のみ有意に低下していたが、中枢5 mm および末梢5 mm、15 mm では有意差を認めなかった。損傷後21日、28日、56日では圧挫部より徐々に陽性率が回復する傾向はみられ、いずれも正常と比較して有意差を認めなかった。56日には80%まで回復していた。一方、軸索は損傷後3日から変性が始まり、14日後に再生軸索がみられ、軸索数は21日、28日、56日では正常と比較して有意差を認めなかった。

〔考察〕

Waksman は初めてトレーサーを用いて血液・神経関門の存在を明らかにした。その後、正常の神経では静脈投与したトレーサーは神経内膜へ漏出しないが、神経が損傷するとトレーサーが漏出することを示した。すなわち正常の神経内膜の血管は barrier 機能を有しているが、神経損傷時には barrier 機能破綻により血管透過性が亢進し、その結果、静脈投与したトレーサーが神経内膜に漏出することが明らかとなった。その後多くの実験でトレーサーによる血液・神経関門の評価が行われてきた。しかし、定量的な評価は困難であり、詳細な血液・神経関門の機能動態の解明には検討の余地があった。

抗 EBA 抗体は Sternberger らにより、中枢神経系や末梢神経系で選択的透過性のある barrier 機能を持ったラット血管内皮細胞を認識する抗体として報告された。近年、中枢神経系では血液・脳関門の評価に使用されるようになったが、末梢神経では正常の坐骨神経で陰性または弱陽性とする報告のみで、血液・神経関門の評価に抗 EBA 抗体を用いた報告はなかった。今回我々は、ラットの全血管において抗原性を認識する抗 RECA-1 抗体とともに血液・神経関門の評価に免疫組織化学の手法を利用した。血液・神経関門の評価は連続切片を用いて全血管数に対する barrier 機能を持った血管の割合として数値化した。このことにより時間的および空間的变化を比較でき、特に回復の過程を詳細に検討することが可能であった。末梢神経が損傷すると最初に血液・神経関門が遠位部を中心に一斉に破綻し、神経再生への一連の過程の引き金となり、栄養因子や液性因子等が神経内膜内に流入することが推察された。血液・神経関門と神経再生との検討では、神経再生が生じると、それとともに血液・神経関門も損傷部より徐々に回復した。

〔結論〕

末梢神経に用いた免疫組織化学的手法は、血液・神経関門および末梢神経再生を定量的に解析する有用な方法である。末梢神経が損傷すると血液・神経関門が遠位部を中心に一斉に破綻し、神経再生が生じるとそれとともに血液・神経関門も損傷部より徐々に回復した。

論文審査の結果の要旨

末梢神経にも中枢神経に存在する血液・脳関門 (BBB) に相当する barrier があり (血液・神経関門、BNB)、血中より神経組織内への物質移行を御し神経内の環境の恒常性を維持する役割を果たしている。従来 BNB の評価は静脈内に投与したトレーサーの神経内膜内への漏出の有無により検討されてきたが、この方法では定量的な評価は困難であり、詳細な BNB の機能動態の解明には検討の余地があった。申請者らは神経の圧挫損傷とそこからの再生に伴う BNB の破綻および再構築の過程を、血液関門に特異的な抗血液関門抗体と

免疫組織化学的手法を用い定量的に解析した。

雌性 SD 系ラット(200-250 g) の左坐骨神経を麻酔下に脳動脈瘤血管クリップを用い圧挫力 1.52 N にて 5 分圧挫し、有連続損傷モデルを作製した。損傷後 1、3、7、14、21、28、56 日に坐骨神経を圧挫部およびその中枢 10 mm から末梢 35 mm まで採取し、5 mm ごとに凍結横断切片を作製した。血管内皮細胞マーカーとして抗 rat endothelial cell antigen-1(RECA-1) 抗体、血液関門因子マーカーとして抗 endothelial barrier antigen(EBA)抗体を用い免疫組織化学的染色を施行し、全血管数に対する barrier 機能を持った血管の割合(EBA/RECA-1)をもって BNB 機能を定量化した。従来方法である Evans blue albumin tracer の経静脈的投与法もあわせて行い比較した。軸索再生の評価には抗 neurofilament 抗体を使用した。

Evans blue albumin tracer よる評価では、正常神経における Evans blue albumin は神経内膜内の血管に限局していたが、圧挫後 1 日目には圧挫部より末梢全ての部分で一斉に漏出像を認め 14 日目まで続くが、21 日目には漏出像はほぼ正常まで減少した。RECA-1 免疫組織化学染色では損傷後も神経内膜内の血管で陽性であり、血管の数を反映していた。一方 EBA 免疫組織化学染色では正常神経内膜内の血管は陽性であるが、損傷後は様々に染色性が低下し BNB 機能を反映しているものと考えられた。EBA/RECA-1 の比率は損傷後 1 日目では正常と有意差を認めなかったが、損傷後 3 日目では中枢 5 mm から末梢 35 mm まで低下、7 日目で最も低下した。損傷後 14 日目では損傷部より回復し始め末梢 25 mm および 35 mm のみ有意に低下していた。損傷後 21 日、28 日、56 日目では圧挫部より徐々に陽性率が回復する傾向はみられ、いずれも正常と比較して有意差を認めなかった。Neurofilament 免疫組織化学染色による軸索の評価では、損傷後 3 日、7 日目で染色性が有意に低下していたが、14 日目以降正常と比較して有意差を認めなかった。

ラットの全血管において抗原性を認識する抗 RECA-1 抗体と BNB 機能を反映すると考えられる抗 EBA 抗体を用いた免疫組織化学染色の比 (EBA/RECA-1) を取ることにより、BNB 機能を定量的に評価するという方法は今後の BNB の研究に寄与するところが大であり、高く評価される。さらに、申請者らはこの評価系とラット坐骨神経圧挫損傷モデルを用い、末梢神経の損傷においては最初に BNB が破綻することにより栄養因子等が神経内膜内へ流入し神経修復が始まり、神経再生とともに BNB も徐々に回復してゆくことを明らかにした。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 圧挫による情報はどのように伝わるのか
- 2) 髄鞘はどの程度壊れるか、またそれが神経再生に及ぼす影響は
- 3) BNB の破綻は神経回復にとって合目的な現象か
- 4) EBA は BNB の何をあらわしているのか
- 5) EBA の発現はどのように調節されているのか
- 6) EBA の発現は発生の中のどの段階でおこるのか
- 7) EBA の機能的な意義はなにか
- 8) 圧挫により血管内皮が神経再生因子を出すことがないか
- 9) 神経再生に伴って神経機能も回復するのか
- 10) 脱髄疾患や炎症性疾患における BNB の役割は

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	難	波	宏	樹	
	副査	佐	藤	康	二	副査 宮 嶋 裕 明