

平成 23 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591742

研究課題名（和文） 犬でのポリフェノールを用いた同種神経移植の実験的研究

研究課題名（英文） Storage and allogeneic transplantation of peripheral nerve using a green tea polyphenol solution in a canine model

研究代表者

柿木 良介 (KAKINOKI RYOSUKE)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20314198

研究成果の概要（和文）：

ポリフェノール中で1ヶ月間保存した同種神経片は免疫抑制に有効量のFK506を投与することにより、自己神経移植とほぼ同等の神経再生を認めた。

FK506投与量とポリフェノール処理同種神経片内の神経再生には、再生神経軸索数、muscle evoked action potentialで正の強い相関が認められた。

結論として、高等動物であるイヌでも、ポリフェノールの抗虚血作用は神経片保存に有効であったが、抗免疫抑制作用に関しては、同種神経移植を抑制するほどの効果はなかった。

研究成果の概要（英文）：

Successful nerve regeneration was observed in the polyphenol-treated nerve allografts when transplanted in association with a therapeutic dose of FK506. The total myelinated axon numbers and amplitudes of the muscle action potentials correlated significantly with the blood FK506 concentration. The data indicate that polyphenols can protect nerve tissue from ischemic damage for one month; however, the effects of immune suppression seem insufficient to permit allogeneic transplantation of peripheral nerves in a canine model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：上肢外科、末梢神経外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：ポリフェノール、末梢神経保存、同種神経移植、神経再生、移植免疫

1. 研究開始当初の背景

我々は今までに、緑茶ポリフェノールの生物学的活性のうち、抗虚血作用及び免疫抑制作用に着目し、抗虚血作用に対しては末梢神経片がポリフェノール液中で長期間保存可能かどうか、また免疫抑制作用にたいしては、ポリフェノール処理した末梢神経は同種移植可能かを検討した。ポリフェノール液中(1mg/ml)で1ヶ月間保存したのち自己移植した神経の電気生理学的、組織形態学的検査結果は、新鮮坐骨神経移植群とほぼ同等であった。またポリフェノール液中で保存した移植神経内に残存する移植神経由来細胞は、PCR法により、新鮮神経移植内に残存する移植神経由来細胞の約半分であることがわかった。次にポリフェノール液中で1ヶ月間保存したのち major histocompatibility に mismatch のある同種移植した神経の電気生理学的、組織形態学的検査結果は、新鮮坐骨神経移植群とほぼ同等であった。ポリフェノール処理して同種移植した移植神経片内の移植神経由来細胞数は、新鮮自己神経移植した移植神経内の移植神経由来細胞の約 1/4 であることがわかった。

また少量の FK501 を投与下にポリフェノール処理することにより、末梢神経は1ヶ月間保存可能であり、さらに同種移植を行った場合、移植片内に残存する移植神経由来の細胞が増加し、電気生理的、組織形態学的には新鮮同系移植に遜色無いことがわかった。

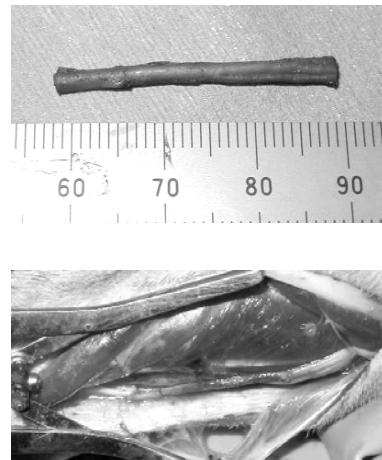
2. 研究の目的

高等動物である犬を用いて少量の FK506 を投与下でのポリフェノール液中に1ヶ月間保存した末梢神経の同種移植を行い、その保存効果と免疫抑制効果について、その有効性を検討した。

3. 研究の方法

雄1頭より採取した坐骨神経を直径1mm-1.4mmの funicles に分割し、ポリフェノール液中に摂氏4度で28日間保存し、DMEMに2日間浸漬させてポリフェノールを洗い流し、移植直前に長さ3cmに切断した。雌犬10頭の長さ3cmの右尺骨神経片を切除してできた神経欠損をポリフェノール処理した坐骨神経片 funicles 1-2本で架橋した(ポリフェノール同種神経移植モデル)(図1)。左尺骨神経も同様に3cm切除し、中枢端と末梢端を反転させ、縫合した(自家新鮮神経移植モデル)。

図1.



上：1ヶ月間1mg/mlのポリフェノール液中に浸漬させた直径1-1.4mmの坐骨神経束(2本)
下：イヌ右尺骨神経の3cm欠損を、上図のポリフェノール処理坐骨神経で架橋したところ。

その後手術当日よりFK506を毎日1回4頭に0.1mg/Kg、4頭に0.05mg/Kg、2日に1回2頭に0.05mg/Kg術後12週間筋注した。移植後12週で、右尺骨神経の神経伝導速度および短小指外転筋のM波振幅を測定した。さらに移植神経を遠位神経縫合部の1.5cm遠位の尺骨神経まで含めて採取した。左尺骨神経に作製した3cm自家新鮮神経移植モデルについても同様の電気生理学的検査と神経組織の採取を行った。また屠殺時に各犬の静脈血を採取し、FK506濃度を測定した。移植神経の遠位神経縫合部の1cm遠位の尺骨神経断面の組織形態学的検索を行った。移植神経は直ちに凍結保存して、分子生物学的検索用に保存した。電気生理学的検査および組織形態学的検査では、ポリフェノール同種神経移植モデル(右尺骨神経)の値は、自家新鮮神経移植モデル(左尺骨神経)の値のパーセントで表記した。

4. 研究成果

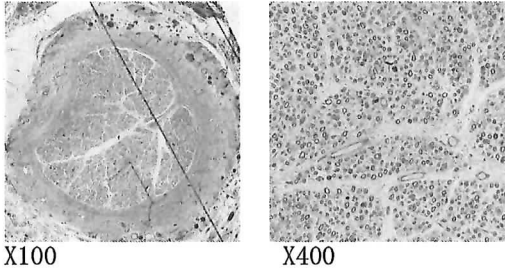
結果：ポリフェノール中で1ヶ月間保存した同種神経片は免疫抑制に有効量のFK506を投与することにより、自己神経移植とほぼ同等の神経再生を認めた(図2)。K506投与量とポリフェノール処理同種神経片内の神経再生には、再生神経軸索数(correlation coefficient = 0.91, $p < 0.001$)、muscle evoked action potential (correlation coefficient = 0.88, $p = 0.002$)で正の

強い相関が認められた (図 3)。また FK506 血中濃度の高い群で、移植神経片内に donor 由来細胞が多く残っている事が PCR にて判明した (図 4)。

図 2 遠位神経縫合部の 1.5cm 遠位での横断切片

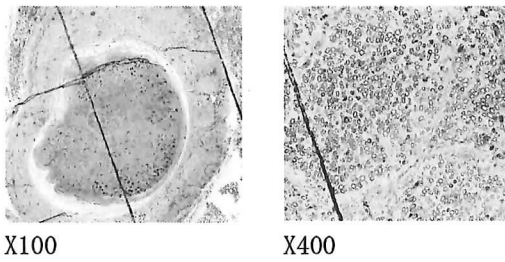
自家新鮮神経移植モデル

(FK506 0.1mg/Kg/day)



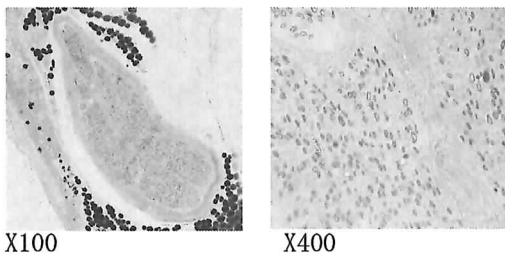
ポリフェノール同種神経移植モデル

(FK506 0.1mg/Kg/day)



ポリフェノール同種神経移植モデル

(FK506 0.05mg/Kg/day)



ポリフェノール同種神経移植モデル

(FK506 0.05mg/Kg/2day)

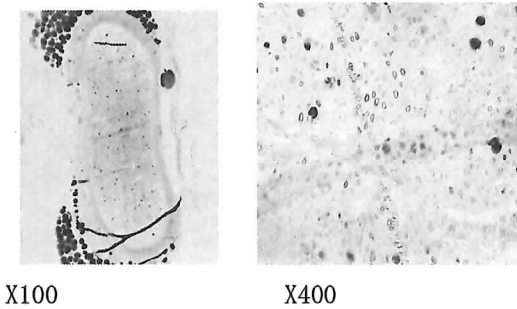
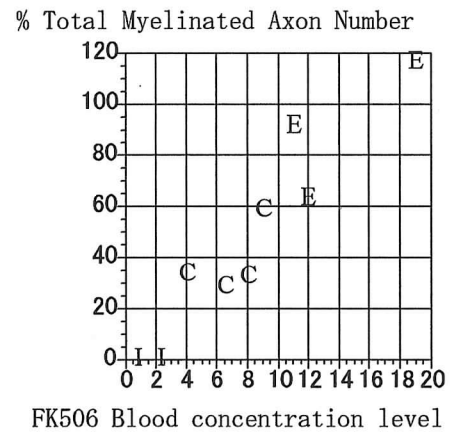
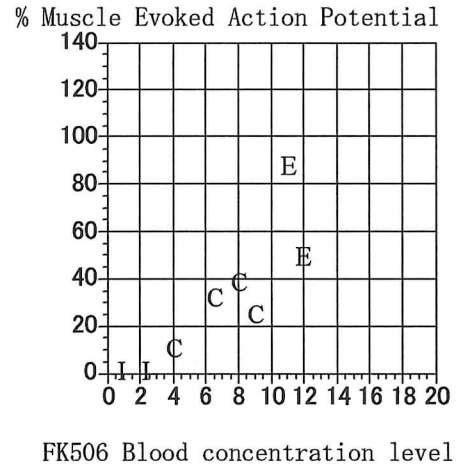
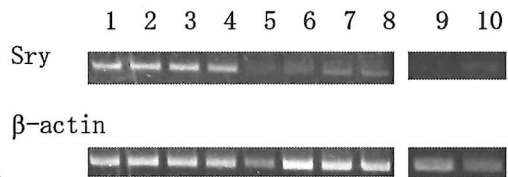


図 3



○:0.1mg/Kg/day 投与 △:0.05mg/Kg/day 投与 ×:0.05mg/Kg/every other day 投与

図 4



右尺骨神経 (ポリフェノール同種神経移植モデル) 中央部より採取した神経組織より genomic DNA を抽出し、Sry (Sex-determining region of Y-chromosome) と β-actin 特異的 PCR を行った。

1-4: FK506 0.1mg/Kg/day, 5-8: FK506 0.05mg/Kg/day, 9, 10: FK506 0.05mg/Kg/2day

FK506 の多く投与した群では、移植神経由来の雄細胞が多く残っていた。

結論：高等動物であるイヌでも、ポリフェノールの抗虚血作用は神経片保存に有効で、末梢神経片の1ヶ月間の保存が可能であったが、抗免疫抑制作用に関しては、同種神経移植を抑制するほどの効果はなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① Nakayama K, Kakinoki R, Ikeguchi R, Yamakawa T, Matsumoto T, Ohta S, Fujita S, Hyon SH, Nakamura T. Storage and allogeneric transplantation of peripheral nerve using a green tea polyphenol solution in a canine model. J Brachial Plex Peripher Nerve Inj. 2010; 28;5:17-25. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

- ① 柿木良介、中村孝志、池口良輔、他「ポリフェノールを用いた末梢神経保存と同種移植に関する研究」、第25回日本整形外科学会基礎学術集会 2010.10.15 京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿木 良介 (KAKINOKI RYOSUKE)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：20314198

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

池口 良輔 (IKEGUCHI RYOSUKE)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：80437201
中村 孝志 (NAKAMURA TAKASHI)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：10201675