

# 主 論 文 要 旨

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	藤 村 匠
<b>主 論 文 題 名</b> Fluorescence Visualization of the Enteric Nervous Network in a Chemically Induced Aganglionosis Model (蛍光タンパク質によって腸管神経回路を可視化した腸管無神経節症モデルマウスの作成)				
<b>(内容の要旨)</b> <p>神経堤に由来する腸管神経節細胞が欠損するヒルシュスプルング病をはじめとした腸管無神経節症は、手術可能であれば比較的良好な経過をたどるが、手術適応の困難な症例に対する新規治療法開発は課題が多い。近年、細胞移植療法が研究されているが腸管神経細胞可視化や腸管運動評価のモデルは十分とは言えない。ヒトの原因遺伝子を改変した動物モデルは複数存在するが、腎無形成などによる極端に短い生存期間やモデルの不均一性のために治療効果の経時的観察も困難であった。</p> <p>申請者は神経堤由来細胞を緑色蛍光蛋白質で標識したマウスを用いて薬剤（塩化ベンザルコニウム）による無神経節症モデルを作成し、神経節細胞の変化を蛍光により生体内で可視化することに成功した。蛍光標識のため手術直後の神経欠損領域の均一性確認が可能となった。また、薬剤性無神経節症モデルは長期生存が可能のため、同一個体で経時的な長期間の腸管運動機能評価にも有用であった。</p> <p>本モデルは麻酔下で腸管に薬剤を染み込ませたガーゼを巻いて神経を焼灼し、腸管神経の消失を手術前後で蛍光により確認した。術後1週間で再開腹し、生存下で腸管神経の様子を経時的に観察した。2～8週の各時点で腸管を摘出し、蛍光標識された神経堤細胞およびその他の細胞種への影響を評価した。具体的には緑色蛍光蛋白質抗体および神経・グリア・ペースメーカー細胞のマーカーを用いて多重免疫染色を行った。処置部中央では神経、グリア、ペースメーカー細胞は消失し、逆に血管内皮や平滑筋細胞には大きな変化がなく、術後8週目まで明らかな可逆性がないことも確認した。さらに薬剤による細胞傷害度を探るために処置から数時間後にアポトーシスの検出を行い神経細胞の存在した部位に強い陽性を認めたことから、アポトーシスによって神経細胞などが脱落していることが示された。</p> <p>薬剤処置部の腸管には狭窄が生じ、その口側には著しい糞便貯留を認めた。腸管運動の機能評価として術後2週で肛門からのビーズ排出時間を測定し、8週目まで体重、糞便排泄量、食事摂取量を毎週測定した。モデルではビーズ排泄時間は著明に遅延し、体重増加率、排便量、食事摂取量も一定期間後に有意差が認められた。術後8週目に摘出した腸管で腸管内残便量を測定したところ、モデル群では便貯留の明らかな増加を認めた。</p> <p>モデル腸管において神経節細胞の変化は蛍光顕微鏡により生体内でも経時的に長期の観察が可能となった。また腸管神経可視化されたために均一なモデルの作成が可能となり、腸管運動機能が一定の低下を示して長期生存できることから、将来の幹細胞移植治療による神経細胞の生着評価、腸管運動機能の長期評価が可能なモデルとして非常に有用である可能性が示された。</p>				