

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08625

研究課題名(和文) 神経特異的発現蛍光物質を用いた術中自律神経同定法の開発

研究課題名(英文) Development of intraoperative identification of autonomic nerves through a myelin-binding fluorophore

研究代表者

河野 洋平 (Kouno, Yohei)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：90572008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、神経損傷を予防する腹腔鏡下術中自律神経同定法を開発し、臨床応用を目指す。走査型電子顕微鏡(SEM)による組織形態の確認を行い、神経細胞に特異的に発現しているS100蛋白を標的とした免疫組織化学染色によって、*ex vivo*において腸管壁内神経細胞叢の可視化に成功した。一方で、蛍光標識を必要としない方法として腸管の外側、内側からレーザー光を照射し、ラマン分光法などの光イメージング技術を駆使して、非侵襲的に腸管壁内の神経叢の可視化に成功した。直腸手術における骨盤内神経の可視化を目標とする本研究において、腸管の蠕動運動を司る自律神経を形態学的側面、細胞生物学的側面の両方から同定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌は世界で最も頻度が高い癌腫であり、なかでも多数を占める直腸癌の手術は世界中で広く行われている。臨床的に術中に容易に神経を同定し、温存できる方法はなく、容易に神経が可視化され同定できる技術が開発されれば、手術困難症例や、経験の浅い手術チームにおいても術中神経損傷による術後機能障害を減少させる可能性が高く、これまでにない新しい手術合併症対策が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop a laparoscopic intraoperative autonomic nerve identification method to prevent nerve injury, which is a frequent complication, by ensuring the identification of pelvic nerves in rectal surgery. First, we analyzed the tissue morphology with a scanning electron microscope (SEM) and successfully visualized the nerve plexus in the colon wall *ex vivo* by immunohistochemical staining targeting the S100 protein specifically expressed in nerve cells. On the other hand, we also tried to investigate a methodology without fluorescent labeling. We also captured the nerve plexus non-invasively in the colon wall by irradiation of laser light on the outside or inside of the colon wall and using optical imaging techniques such as Raman spectroscopy. In this study, we identified the autonomic nerves that control the peristaltic movements of the colon wall from both morphological and cell biological aspects.

研究分野：消化器外科

キーワード：神経同定 ニューロフィラメント 術中イメージング ラマン分光

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

術後の局所再発率が高い直腸癌に対しては、1970年代より側方郭清を初めとする拡大郭清術も行われ手術成績は向上したが、同時に術中の自律神経損傷に伴う多くの術後排尿障害あるいは性機能障害が認められるようになった。その後、1980年代には自律神経温存術式が提唱され腹腔鏡手術の拡大視効果の利点も生かされ、本術式は現在広く行われるようになった。しかしながら肥満症例、再手術例、高度進行癌症例など術中の自律神経同定困難例は多く経験され、直腸手術後の性機能、排尿障害の頻度は高く、勃起障害 79%、射精障害 72%、尿失禁 38%、中等度以上の残尿 30.6%と報告されている (Lange MM, et al: Eur J Cancer 2009, Lange MM, et al: Br J Surg 2008)。これらの手術合併症対策は早急に解決すべき課題である。これまで外科医が筋電図を用いて術中に運動神経を同定する方法は存在していたが、現在、術中に細い末梢神経を認識する技術は存在せず、容易に自律神経などを同定し、神経損傷を回避できる技術はいまだ確立されていない。

2. 研究の目的

本研究では、直腸手術における骨盤内神経の同定を確実にすることで同手術において頻度の高い合併症である神経損傷を予防し手術成績向上を視野に入れ、腹腔鏡下術中自律神経同定法を開発し、臨床応用を目指す。そのために、神経同定法として検討する手法に関して、in vivo にて有害事象を認めない投与量にて、神経の蛍光観察に有用な特定の波長や光量を明らかにする。また、神経を可視化するための光線照射機能を搭載した内視鏡の開発および臨床応用を見据え、可視化された骨盤神経の温存方法の確立および、手術時間の短縮を目指す。骨盤神経の術中可視化技術を基盤として、消化器外科領域や直腸癌だけでなく、頭頸部領域手術、乳癌手術における腋窩郭清など神経温存が必要なさまざまな手術への適応拡大を目指す。

3. 研究の方法

(1)動物を用いた in vivo 実験

術中の骨盤内自律神経同定法として、まずロイコメチレンブルーの酸化還元反応を用いた神経染色による同定法の検討を行った。これは他組織と比較し酸素需要の高い神経組織における酸化反応により、白色のロイコメチレンブルーが青色のメチレンブルーに変化する性質を利用した方法であり、ブタを用いて腹腔鏡手術下に神経の観察を試みた。

(2)SEM および免疫組織化学染色による同定法の検討

当科で行われた直腸癌手術時に切除され、10%ホルマリン固定されていた標本内の正常な腸管の一部を用いて、走査型電子顕微鏡 (SEM) による組織形態の確認、免疫組織化学染色を行った。

(3)無染色イメージングによる神経組織の同定

ラマン分光法による神経組織の同定方法を検討した。サンプルの前処置として、標本内の正常腸管より 1cm 角の切片を切り出して、漿膜側から平行に Microslicer を用いて 100 μ m ずつのスライス切片を作成。筋繊維の方向が変化した箇所(外縦筋と内輪筋の境界)でスライスを終了した。上記の方法で作成したスライス標本にレーザー光を照射し、ラマン顕微鏡による観察を行った。

4. 研究成果

当初期待していた骨盤内自律神経同定法である、ロイコメチレンブルーの酸化還元反応を用いた神経染色による同定法を検討した結果、他組織との十分なコントラストが得られ確実に術中に神経を同定できるレベルまで達することはできなかった。これらの結果を踏まえて、測定対象を動物からヒト検体へと切り替え、病理組織学的方法で神経組織の存在を確認できる上位体で、神経組織の同定方法を検討した。手術にて切除されたヒト大腸切除標本を用いて、神経細胞に特異的な抗 S100 抗体を用いた組織免疫染色を行い、腸管神経系を構成している腸管壁内の神経叢の可視化に成功した。腸管壁内に存在している神経ネットワークの構造を明らかにするため、結合組織の消化処理および薄切標本作成技術を駆使して、腸管壁内神経叢を露出させることに成功した。さらに、走査型電子顕微鏡 (SEM) による組織形態の確認を行い、神経細胞に特異的に発現している S100 蛋白を標的とした免疫組織化学染色によって、ex vivo において腸管壁内神経細胞叢の可視化に成功した。一方で、蛍光標識を必要としない方法論を検討してきた結果、腸管の外側、もしくは内側からレーザー光を照射し、ラマン散乱光などの光イメージング技術を駆使して、非侵襲的に腸管壁内の神経叢の可視化に成功した。直腸手術における骨盤内神経の可視化を最終目標とする本研究において、腸管の蠕動運動を司る自律神経を形態学的側面、細胞生物学的側面の両方から同定できた。

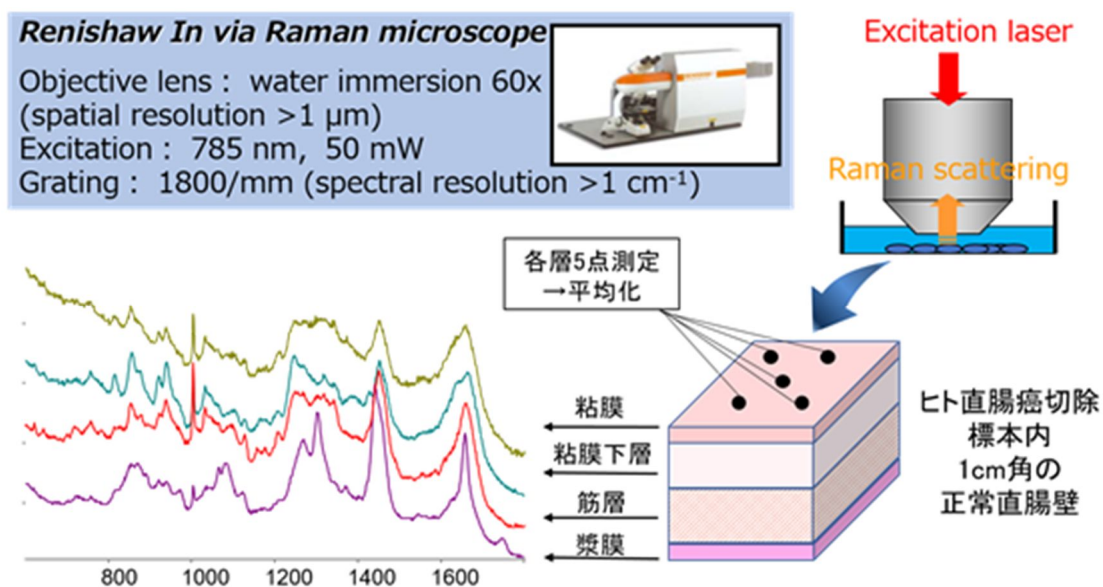
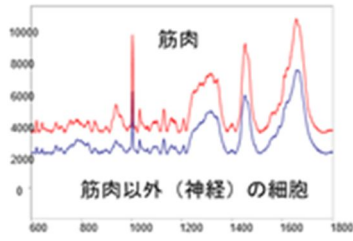


図1 ラマン分光法による腸管壁各層の同定

神経と筋肉を100%判別



PCA

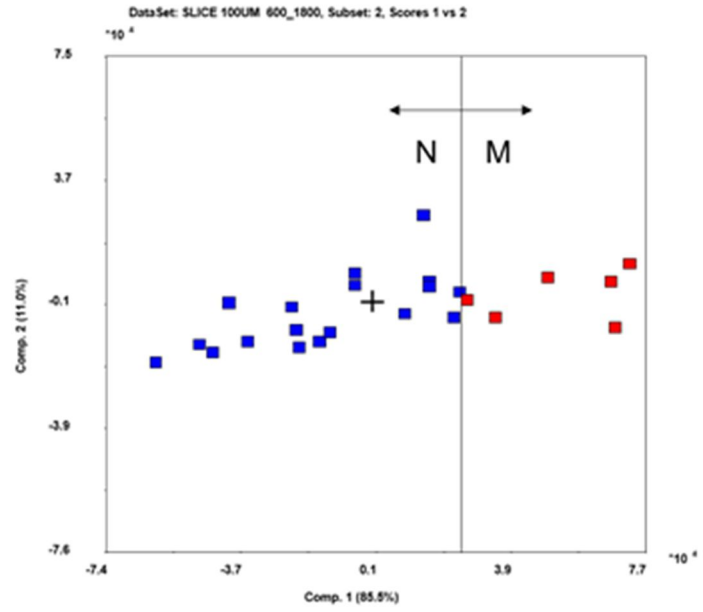


図2 ラマン分光法による腸管壁内神経叢の同定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川 雄大、大嶋 佑介、河野 洋平、平塚 孝宏、赤木 智徳、鈴木 浩輔、柴田 智隆、上田 貴威、當寺ヶ盛 学、白下 英史、衛藤 剛、白石 憲男、猪股 雅史
2. 発表標題 ラマン分光法を用いたヒルシユスブルグ病における無神経節腸管同定法の開発
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第40回年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	猪股 雅史 (Inomata Masafumi) (60315330)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	花田 礼子 (Hanada Reiko) (00343707)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	衛藤 剛 (Etoh Tsuyoshi) (00404369)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	
研究分担者	赤木 智徳 (Akagi Tomonori) (80572007)	大分大学・医学部・助教 (17501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	大嶋 佑介 (Oshima Yusuke) (10586639)	富山大学・学術研究部工学系・准教授 (13201)	
研究協力者	小川 雄大 (Ogawa Katsuhiro) (40733621)	大分大学・医学部・医員 (17501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関