

平成22年5月14日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390387

研究課題名（和文） 末梢神経緩徐伸長による神経欠損間隙修復法の開発

研究課題名（英文） Repair of peripheral nerve gap by direct lengthening of both stumps

研究代表者

落合 直之 (OCHIAI NAOYUKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：30134563

研究成果の概要（和文）：末梢神経欠損間隙の新しい治療法として末梢神経両断端緩徐伸長法を開発した。ヒトに近い種であるカニクイザルを用いた研究で本法の有用性と安全性を確認したのち、臨床研究として実際の患者様にも本法を行った。両研究とも有害事象なく良好な神経再生が得られた。従来、末梢神経の欠損の治療は体の他の部分から健康な神経を採取していたが本法はその必要がなくかつ従来法より神経再生が優れた治療法である。

研究成果の概要（英文）：We have developed the new treatment for repair of a segmental nerve gap that simultaneous direct lengthening of both stumps. To determine the applicability of this method to humans, we carried out an experiment on primates. Good results have obtained the primate experiment, we have applied this method clinical setting. This method does not require the sacrifice of other healthy nerves and nerve regeneration is superior to the present method. We will be able to repair peripheral nerve gap not by nerve grafting but by lengthening the injured nerve itself.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2008年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：整形外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：神経科学・再生医学・末梢神経伸長・整形外科・カニクイザル

1. 研究開始当初の背景

現在まで一次修復不可能な末梢神経損傷に対する治療は、一般的に遊離神経移植が行われている。しかしこの方法には採取部の感覚障害残存、有痛性断端神経腫、移植神経の数・長さの限界など問題点がある。たとえ短い距離でも断裂神経の両断端が直接縫合できなければ他の神経を犠牲とせざるを得ない。また長い距離を架橋した場合の治療成績は十分

でなく、必ずしも最善の治療ではない。末梢神経欠損間隙の治療はこうした問題を抱えながらも四半世紀に渡り新しい治療の導入がなされなかった。新しい治療の試みとして、近年、Tissue engineeringの概念の導入に伴い、種々の生体材料で欠損部を架橋する神経修復法が国内外で多く研究されているが、長い欠損を修復し良好な神経再生を得ることは依然として困難である。国内では清水らのグルー

プが2002年にPGAコラーゲンスポンジチューブを用い犬の坐骨神経8cmを架橋し良好な神経再生を得たと発表し、その後臨床研究が行われている。しかしウシ由来のコラーゲンを用いる点において感染の危険性が問題となる。

そこで我々は新しい神経修復法として、欠損部両断端緩徐伸長による欠損間隙修復法の開発を着想した。本法は我々の考案した神経断端を把持し牽引することのできる神経伸長器を用い、損傷神経両断端を1日1mmなどの緩徐なスピードで縫合可能な距離まで近づけ、端々縫合することにより神経欠損間隙を修復する方法である。ドナー神経の採取は不要であり、従来法で問題となる神経採取による後遺症を患者に与えないことは最大の利点である。また、神経修復時の縫合は1カ所が良いため、修復後のmisdirectionは少なくより良好な神経再生が期待できる。我々は先行研究でラット坐骨神経15mm欠損モデルにおいて神経両断端を1mm/日の速度で伸長し、修復することに成功した。縫合後の再生能は遊離神経移植群より優っており、本法が末梢神経の新しい画期的な治療法に成り得ると確信している。我々は先行研究で神経の伸長は単に粘弾性によるものでなく組織の新生により生じていることを明らかにした。伸長された近位神経束ではsproutした再生軸索により構成され、遠位神経束ではシュワン細胞が増殖していた。本法は生体内で自己修復能力により自己の組織を選択的に増殖させる“生体内培養”を実現した革新的な医療技術である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトに使用可能な神経伸長器で動物実験（成熟サル）を行い、霊長類における末梢神経緩徐伸長による神経欠損間隙修復法の適応を確認したのち、実際の神経損傷患者において臨床治験を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

動物実験は独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター（茨城県つくば市八幡台）で行った。本研究ではサルへの外科的処置が必須となることから、動物福祉または動物実験倫理の問題に対し配慮した。個体レベルの動物実験にあたっては、法律第105号「動物の愛護及び管理に関する法律」、文部科学省通知「大学等における動物実験について」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」、および医薬基盤研究所「動物実験指針」「サルを用いる実験指針」の原則を遵守した。研究計画は年度毎に筑波大学および医薬基盤研究所の審査を受け承認を得た。

研究1：末梢神経両断端緩徐伸長によるサル

前腕正中神経欠損 20 および 30mm 欠損の修復研究1-1) 新鮮損傷時の治療法の確立

4~10歳齢のセンター産カニクイザル雌で手指の欠損のない個体を選定し、計9頭を用いた。

術前評価として両前腕の正中神経伝導速度検査、SSEP検査、筋電図検査により神経機能障害がないことを確認した。また神経伸長器およびモンキーチェア、つまみ動作テストの馴化を十分に行ったのち手術日を設定した。

霊長類センター職員による全身麻酔下、呼吸循環管理のもと、前腕部正中神経に手関節クリーゼの15mm近位から35mm近位までの20mm欠損（n=6:20mm群）と45mmまでの30mm欠損（n=3:30mm群）を作成した。両神経断端に牽引用糸を取り付けた神経把持リングを縫着し、自家開発の神経伸長器を橈骨骨幹部にピンで固定し、牽引用糸を取り付けた。神経伸長器を図1に示した。創外固定器の破損・脱落を防ぐために前腕部をプラスチックギプスで覆った。20mm群では本法の有用性を従来法と比較するために対象群として従来法である遊離神経移植法を3頭に行った。その術式は20mm欠損に対し同側下腿から腓腹神経を採取し、2束のケーブルグラフトとして移植した。30mm群は本法の限界を調査するためのもので欠損長30mmでも神経伸長が可能か、また縫合後に神経再生が得られるかを評価することを目的とし、遊離神経移植群との比較は行わなかった。

神経伸長は神経伸長速度を20mm群では各断端に対し1日1mm、30mm群では近位断端は1日1mm、遠位断端は0.5mmに設定し、翌日より1日1回毎日行った。霊長類センター担当職員がサルをモンキーチェアに保定、実験者が伸長器端にあるネジを回転させた。伸長日数は両断端が縫合可能距離に到達するまでとした。伸長の終了は神経把持リングにX線マーカーをあらかじめ埋め込みこれを1週間毎にX線写真で確認することにより決定した。伸長中の評価として神経伸長時の疼痛行動の有無、合併症の有無を観察した。伸長終了後、神経伸長を行った6頭（20mm群3頭、30mm群3頭）は神経両断端縫合術を行った。全身麻酔下に創部を展開し、神経両断端を同定、新鮮化して縫合した。

評価：神経再生の評価として、神経縫合後1か月毎に(a)短母指外転筋筋電図、(b)つまみ動作テストを最終観察時までに行った。つまみ動作テストは図2のような装置を用い、10mmの溝の中に7mm角のリングを置き、これをケージの外に取り付けケージ扉の小窓から手を出してリングをつまませるテストである。つまむときの母指の外転の様子とケージから手が出てリングをつまみケージ内に引っ込むまでの時間の計測を行った。20mm群では初回手術後16週、30mm群では初回手術後24週を最終観察時とした。神経再生の評価は、初回手術後

16週目に両側の(c)正中神経MCV, NCV, CNAP振幅と(d)母指外転筋の筋張力および筋湿重量を測定し、健側比率を算出した。また組織評価として正中神経母指外転筋入口部10mm近位の横断切片における(e)再生軸索総数および平均軸索径を算出した。

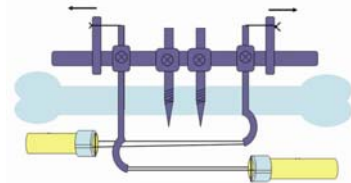
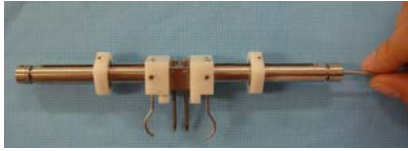


図1：神経伸長器と伸長の仕組み

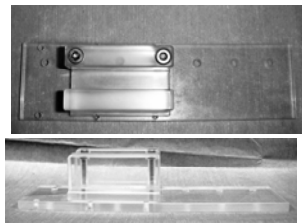


図2：つまみ動作テストの装置

研究2：臨床研究

筑波大学附属病院倫理委員会で臨床研究の承認を得たのち患者の募集を行った。研究機関内に1名の治療を行った。

臨床研究の方法は、パンフレットによる対象者の募集を行い、該当者に研究に関する説明を行った。同意が得られた場合、治療を行った。神経伸長器はヒト用に生体内使用が認可されている材質を用いて新たに作成した。主要評価項目は治療に伴う有害事象の有無のチェックと神経再生の評価として徒手筋力検査(MMT)、知覚機能検査(二点識別覚、Semmes-Weinstein monofilament test)、Tinel徴候、筋電図検査を行った。

4. 研究成果

研究1

【伸長中の評価】

神経伸長日数：20mm群は3頭とも両断端1日1mmで伸長可能で20日間の伸長で縫合可能距離に到達した。30mm群は2頭を近位断端1mm/日、遠位断端を0.5mm/日で伸長し、34および41日目に伸長が終了した。3頭目は近位断端も0.5mm/日で伸長し48日で伸長を終了した。伸長時の疼痛関連行動：神経伸長時に手をひっこめたり声をあげて威嚇するなどの疼痛関連行動があるか観察したが9頭とも疼

痛関連行動はなかった。また疼痛に起因する自傷行動による手指の欠損や潰瘍形成も認められなかった。20mm欠損の遊離神経移植群でも疼痛行動は認められなかった。

【神経再生評価】

(a) 筋電図による神経再生時期の評価

20mm群では初回手術後12週に6頭すべての再支配電位が確認できた。30mm群では3頭とも術後16週で再支配電位が確認できた。

(b) つまみ動作について

術前は9頭全てで母指を外転させ母指と示指でつまむ動作が確認できた。20mmでは神経伸長群が術後16週目に3頭とも母指外転機能が回復していたが、遊離神経移植群の3頭では1頭の回復が不良であった。30mm群は術後24週で3頭とも母指外転機能が回復していた(図3)

20mm群のつまみ動作の所要時間の評価を図4に示す。試技10回の平均をデータとした。術前の値を1として術後8週と16週後にこれの何倍の時間を要するかを換算した。8週で伸長群3.6倍、神経移植群3.2倍、16週で伸長群1.4倍、神経移植群1.9倍であり、統計学的有意差はなかったが伸長群で回復がよい傾向であった。(図4-a) 30mm群の結果は術前および術後の実測値を図4-bに示した。

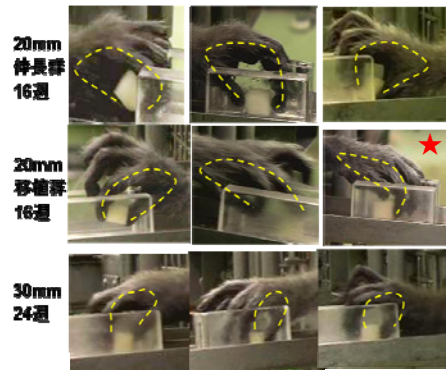


図3：つまみ動作の評価 ★印は母指の外転機能の回復が不十分

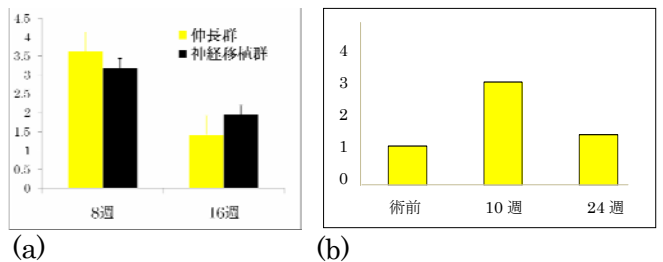


図4：つまみ動作所要時間の評価 (a)20mm群(y軸単位は倍), (b)30mm群(y軸単位は秒)

(c) 電気生理学的評価

20mm 群は 16 週時の NCV, CNAP 振幅を健側の測定値に対する百分率を求め伸長群と遊離神経移植群で比較した。伸長群で 47.7%、遊離神経移植群で 30.6%と t 検定で両群に有意差を認め、伸長群で伝導速度の回復が優れていた。CNAP 振幅は有意差はなかったがすべて伸長群で高い傾向を認め、個々のデータを比較した際、伸長群で遊離神経移植群を下回る値となったものはなかった。30mm 群については術前と術後 24 週目の MCV, SCV の値を比較し、回復率を検討した。MCV は対側比 48%, SCV は 54%回復していた。(図 5 a-d)

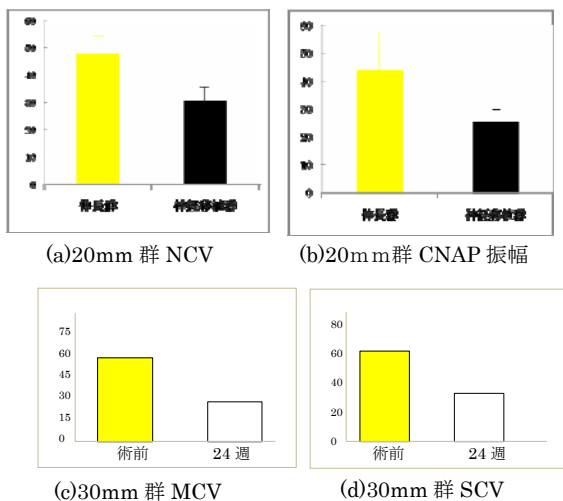
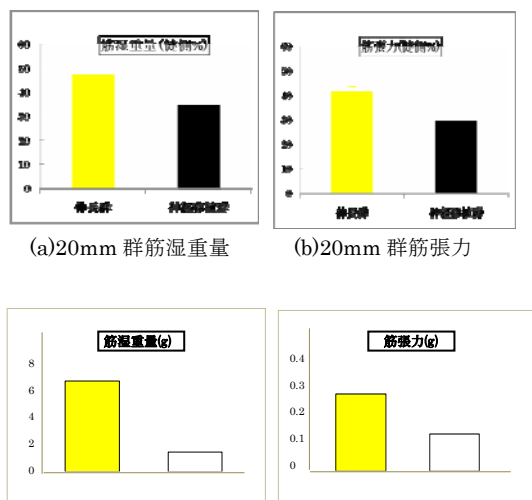


図 5 : 電気生理検査の結果

(d) 母指外転筋の筋張力および筋湿重量

20mm 群は 16 週時の健側の測定値に対する百分率を求め伸長群と遊離神経移植群で比較した。統計学的有意差はなかったがすべて伸長群で高い傾向を認め、個々のデータを比較した際、伸長群で遊離神経移植群を下回る値となったものはなかった。30mm 群では反対側と比較し回復率を評価した。筋張力は対側比 21%, 筋湿重量は 48%であった。(図 6 a-d)



術前 24 週 術前 24 週

(c)30mm 群筋湿重量 (d)30mm 群筋張力

図 6 : 筋湿重量と筋張力の結果

(e) 再生軸索総数および平均軸索径

20mm 群では各 3 頭の平均値を算出し、神経伸長群と遊離神経移植群で比較しグラフに示したが、平均軸索径は両群で差がなかったが軸索数は伸長群で多い傾向であった。30mm 群は反対側との比較を行ったが軸索径は 52%, 軸索数は 86%まで回復していた(図 7 a, b)

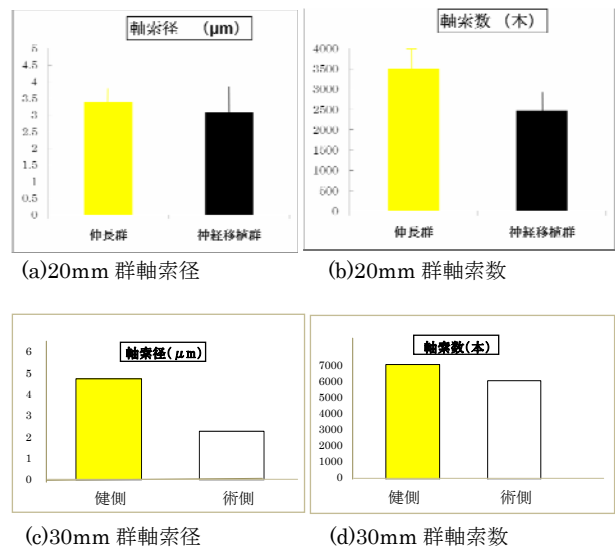


図 7 : 再生神経組織定量結果

研究 2 臨床研究

前腕部外側近位の挫減創により後骨間神経に 13mm の欠損が生じた患者に対し、本法を行った。受傷後 3 週に手術を行った。断裂した神経の近位断端のみの伸長とし、1 日 1mm を 4 回に分けて伸長した。X 線マーカーで伸長距離をモニターし、伸長距離を確認した。32 日の伸長で縫合可能距離まで到達し、神経縫合術を行った。合併症・有害事象の発生はなかった。神経縫合後 2 ヶ月で筋電図上再支配電位を認め、4 ヶ月で短母指伸筋および長母指伸筋は MMT [4]、固有示指伸筋 [2] に回復した。

総括：末梢神経欠損間隙の新しい治療法として末梢神経両断端緩徐伸長法を開発した。臨床応用の前に最終の動物実験としてヒトに種の近いカニクイザルを用い、本法の有用性と安全性を確認した。前腕部正中神経 30mm までの欠損を本法で修復し、良好な神経再生が得られることを確認した。このデータをもとに臨床研究を計画し、研究期間内に 1 例

の治療を行った。有害事象なく、神経再生が確認でき、ヒトにおいても本法の有用性と安全性が証明されつつある。

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)

[学会発表] (計 8 件)

(1) 西浦康正、原 友紀、Sharula, Saijilafu、中島佳子、落合直之：創外固定器を用いた神経断端直接緩徐伸長による末梢神経欠損部修復法、第 23 回日本創外固定・骨延長学会、2010. 1. 15 東京

(2) Sharula, Hara Y, Nishiura Y, Nakajima Y, Ochiai N: Repair of 30mm Median nerve Gap by direct lengthening of both nerve stumps in primates. 8th APFSSH, Kaohsiung(Taiwan) 2009. 11. 13.

(3) Ochiai N, Hara Y, Sharula, Saijilafu, Abe I, Nishiura Y. A new method for peripheral nerve gap repair without nerve grafting-Gradual elongation of both nerve stumps in Macaca fascicularis. 8th APFSSH, Kaohsiung(Taiwan) 2009. 11. 14.

(4) 原友紀、西浦康正、Sharula、中島佳子、落合直之：末梢神経緩徐伸長法による神経欠損間隙修復 霊長類における正中神経 20mm 欠損の治療成績、第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会、2009. 11. 6 神奈川

(5) 原友紀、西浦康正、Sharula、中島佳子、落合直之：末梢神経緩徐伸長法による神経欠損間隙修復：実験霊長類における治療成績、第82回日本整形外科学会学術集会、2009. 5. 13 福岡

(6) 原 友紀、西浦康正、Sharula、中島佳子、落合直之：末梢神経緩徐伸長法による神経欠損間隙修復：実験霊長類における治療成績、第 52 回日本手の外科学会学術集会、2009. 4. 17 東京

(7) 西浦康正、賽吉拉夫、原 友紀、莎茹拉、落合直之：末梢神経再生の基礎と臨床応用 神経断端直接緩徐伸長による末梢神経欠損部修復法の研究、第 52 回日本手の外科学会学術集会、2009. 4. 16 東京

(8) Y. Hara, Y. Nishiura, Saijilafu, Sharula, N. Nakajima, Y. Mishima, H. Ono, N. Ochiai: Repair of peripheral nerve gap

by direct lengthening of both stumps in primates. 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2009. 2. 22 Las Vegas (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

落合 直之 (OCHIAI NAOYUKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：30134563

(2) 研究分担者

西浦 康正 (NISHIURA YASUMASA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：80208131

原 友紀 (HARA YUKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：30431688