

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390453
 研究課題名（和文） ラット遊離筋弁移植モデルを用いた運動・知覚神経交差再生による筋萎縮予防効果の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism for “Sensory Protection” on rat free muscle transfer model
 研究代表者
 田原 真也（TAHARA SHINYA）
 神戸大学・医学部附属病院・教授
 研究者番号：60207206

研究成果の概要：

遊離筋皮弁などによる再建を行うにあたり、筋を支配する運動神経を切断したことに続発する筋の萎縮は思わぬ変形・機能喪失を来す場合がある。臨床ではこのような場合において如何に筋の萎縮を抑えることができるか、は重要な課題となる。本研究では動物実験モデルを利用して、いくつかの切断後の神経の修復方法とそれぞれの間での筋体萎縮予防効果に関して検討を行った。知覚神経あるいは端側神経縫合を介した他の運動神経による交叉支配により、脱神経後の筋体量を維持できることが示された。自家遊離移植後の筋体萎縮予防は臨床上、大きな課題となるが、手術手技の単純な工夫によって予防できる可能性が強く示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
平成 20 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
年度			
年度			
総計	9,600,000	2,880,000	12,480,000

研究分野：マイクロサージェリー学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：移植・再生医療、マイクロサージェリー、神経科学、再建外科学

1. 研究開始当初の背景

骨格筋を支配する運動神経と筋との連絡が外傷や手術などによって途絶した場合に、遠位断端を運動神経ではなく知覚神経と縫合する試み”motor-sensory nerve crossover”は古くから行われているが、その結果は好ましいものではなかった。現在では、再縫合あるいは神経間置移植により本来の支配神経との

連続性を回復することによってのみ筋機能の喪失を防げるとされており、末梢神経の臨床における大前提となっている。Motor-sensory nerve crossover は長らく神経科学界の興味から外れていたが、1990 年代になり、本来の機能を回復するには至らないものの脱神経による筋萎縮を相当程度予防することが明らかにされ、”sensory protection”という言葉

が適用されるようになった。Motor-sensory nerve crossover による筋体のsensory protectionという概念は、神経科学者のみならず末梢神経を扱う外科医にとっても極めて興味深いものであり、臨床応用へ向けた新しい試みが期待される。

われわれは、癌切除や外傷などにより生じた組織欠損を修復する再建外科学を専門としている。Free flapは高度な臨床技術を要するものの、得られる治療効果が極めて高いうえに、これまで手術適応外とされてきた症例をも治療対象とすることが可能である。欠損組織の量と種類は様々であり、適材適所のfree flapを再建材料として選択することになるが、死腔の充填あるいは術後機能を考慮してflapの量が必要な場合（頭蓋・頭蓋底領域、頭頸部領域など）、移植する組織の豊富な血行が求められる場合（放射線障害、骨髄炎など）などには、筋弁あるいは筋皮弁が選択される。しかし、症例の術後経過を詳細に観察すると、筋組織の脱神経による廃用性萎縮のため、移植された組織のボリュームが経時的に減少し、当初の治療目的を達成していない例が散見される。現行の手術手技では、free flapとして移植する筋組織の変性・萎縮を制御することは困難であり、臨床上の大きな問題となっている。

2. 研究の目的

移植筋の減量により生ずる問題を解決する手段として、われわれはsensory protectionに着目した。本研究では、臨床応用の前段階として、まずラット遊離筋弁モデルを用いてmotor-sensory nerve crossoverによるsensory protectionのメカニズムの解明を目指した。研究計画の最終目的は、実地臨床において筋組織をfree flapとして移植する際、移植筋の支配神経断端を移植部位の近傍にある知覚神経と縫合することにより、移植筋の減量を予防し、より優れた治療効果を得ることにある。

3. 研究の方法

<動物モデル>

Wistar系ラット39匹（メス、retired）を用いた。実験動物は全て神戸大学医学部動物実験施設において適正に飼育されたものを用いた。全ての実験は神戸大学動物実験倫理規定を遵守した。

<実験系>

ラットを無作為に次の4つのグループに分けた。①坐骨神経の分枝（筋支配神経）を切

断して再縫合しなかった群〔denervation〕（n=9）②坐骨神経分枝と伏在神経（知覚神経）を端端縫合した群〔sensory protection〕（n=10）③坐骨神経分枝を坐骨神経本幹に喘側縫合した群〔motor protection〕（n=11）④切断した坐骨神経分枝を即時に再縫合した群〔reinnervation〕（n=10）

各モデルともに反対側の半膜様筋は手術を行わずに対照群として用いた。

<手術手技>

ペントバルビツール系麻酔薬の腹腔内注入による全身麻酔を行ったのちにラットの大腿内側に皮切を置き、半膜様筋と薄筋の筋間中隔を剥離して半膜様筋および脛骨神経を同定した。①群においては顕微鏡視野下に坐骨神経分枝を鋭的に切断し、自発的な再開通を防ぐために末梢側を筋体付近まで追って切断し、中枢側を坐骨神経本幹からの分岐まで追って切除した。②群においては伏在神経を鋭的に切断して、その中枢側と切断した坐骨神経分枝の末梢側を顕微鏡下に10-0ナイロン糸で端端縫合した。③群においては坐骨神経の本幹を露出させて神経上膜を開窓しておき、そこに切断した坐骨神経分枝の末梢側断端を10-0ナイロン糸を用いて端側縫合した。④群においては直接の支配神経である坐骨神経の分枝を鋭的に切断しておいてから10-0ナイロン糸を用いて再縫合した。

<乾燥筋体重量測定>

全身麻酔下に前回の皮切から半膜様筋を露出させ、神経縫合部を露出し、各モデルが正確に作成されていることを顕微鏡視野下に確認したのちに両側の半膜様筋を摘出した。摘出した筋体を2日間風乾させたのちに重量を測定してコントロールとの重量比をパーセンテージで算出した。統計解析を行った。

<組織学的検討>

摘出した筋の一部をホルマリン固定し、6 μ mに薄切した凍結切片を作成したのち、通法に従いH-E染色を行った。

< α -Bungarotoxinを用いたNMJ染色>

10%緩衝ホルマリンにより2時間の固定の後、10 μ mの厚さのcryosectionを作製した。室温にて4%BSA、1%Triton in PBSにより30分のblockingをおこなったのち、Alexa Fluoro 488 conjugated α -Bungarotoxin (Invitrogen B13422)を1%BSA・0.1%triton in PBSにより1:500に希釈したものを1時間、反応させた。

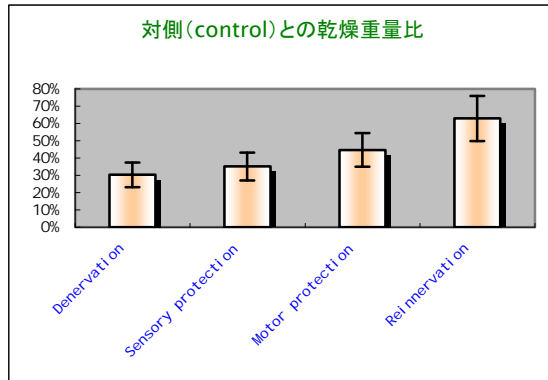
0.1%エバンスブルーに5分間浸漬したのち、十分に洗浄をおこない、封入し、蛍光顕微鏡（Keyence社製Biozero）により観察を行っ

た。

4. 研究成果

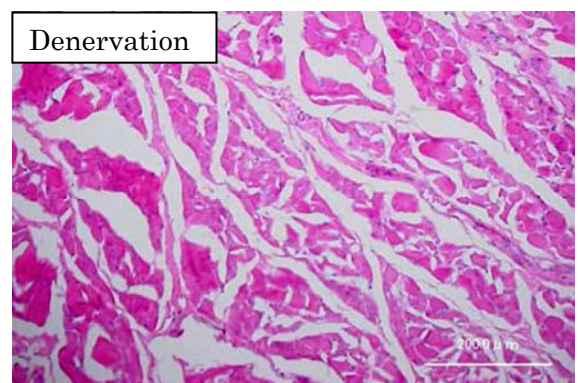
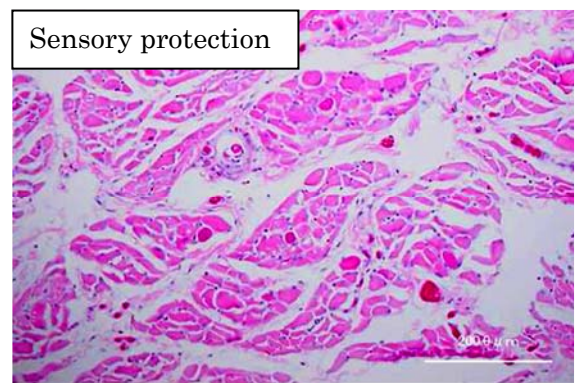
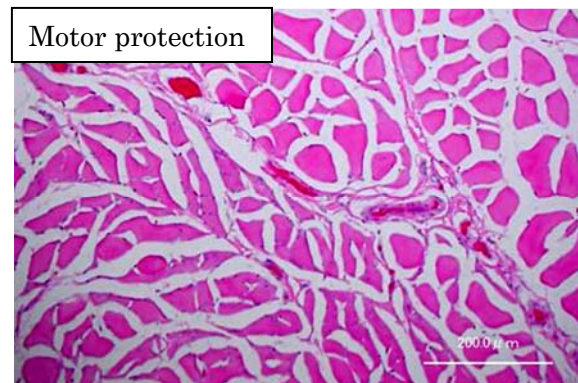
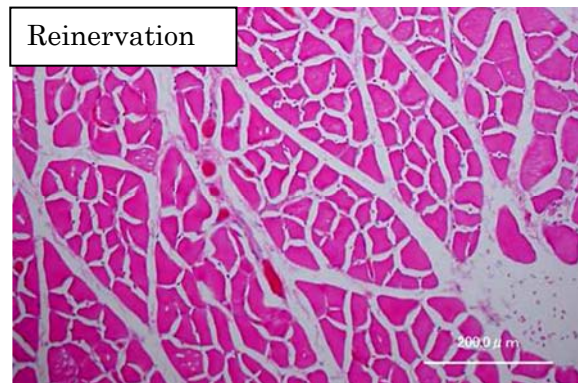
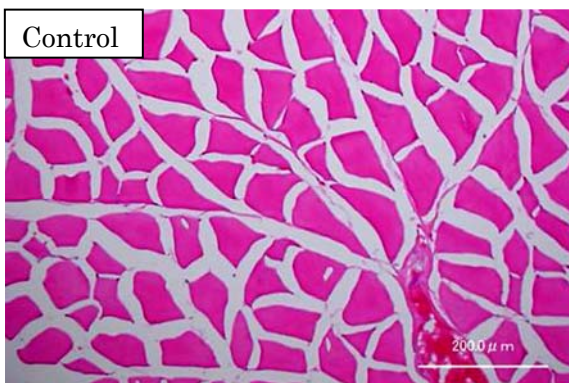
<筋重量>

各群の平均筋体重量のコントロールとの比は **denervation < sensory protection < motor protection < reinnervation** であった。統計学的有意差を **denervation** 群と **motor protection** 群の間に認めた。Denervation 群と **sensory protection** 群の間には統計学的有意差は認めなかった。



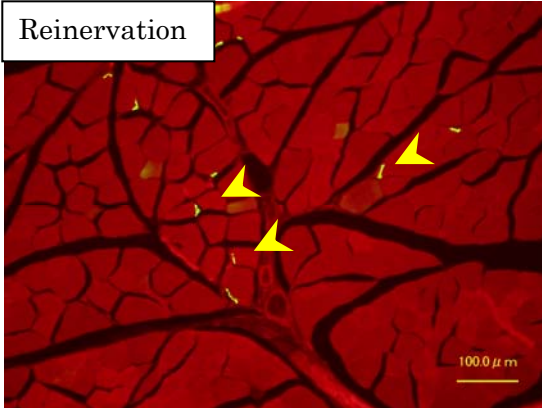
<組織学的検討>

Denervation 群においては著明な間質の増生、筋組織の形態の破壊が観察された。また筋線維の菲薄化が観察された。**Sensory protection** 群において筋線維はコントロールに比して菲薄化しているものの、筋組織の構造は比較的保たれていた。**Motor protection** 群においては **sensory protection** 群よりも筋線維の萎縮が少なかった。**reinnervation** 群は最もコントロールに近似しており間質の増生は認めなかったが、筋線維の萎縮は認められた。(下~右図)

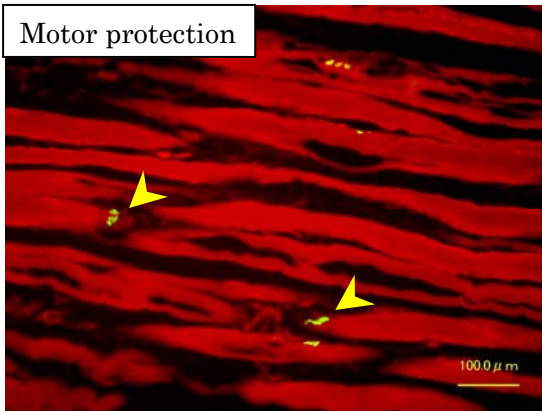


神経筋接合部の再形成はD群を除く全ての群で観察されたが、S群ではその数は少なかった（下図）。

Reinnervation



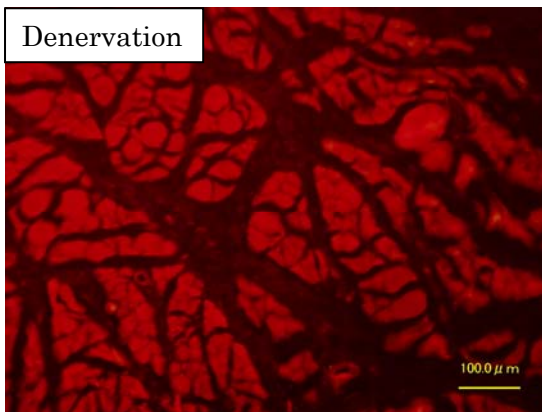
Motor protection



Sensory protection



Denervation



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 3件)

① Sakakibara S, Tahara S, Hashikawa K, Nibu K, Curious Complication after Oropharyngeal Reconstruction with Free Jejunal Flap: Intussusception-like Deformity of Transferred Jejunum, *J Reconstr Microsurg.* 24(2): 89-92, 2008 査読有

② Hashikawa K, Terashi H, Tahara H, Therapeutic strategy for the triad of acquired anophthalmic orbit, *Plast Reconstr Surg*, 119: 2182-2188, 2007 査読有

③ Fukii M, Terashi H, Hashikawa K, Tahara S, Functional reconstruction of large anogenital defects with bilateral V-Y advancement posterior thigh fasciocutaneous flaps, *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 20: 1208-1213, 2007 査読有

〔学会発表〕(計 4件)

① 榑原 俊介, “Neural Switching”とNMJの検討、第52回日本形成外科学会総会、2009.4.22-24、横浜

② 橋川 和信、移植床神経による筋(皮)弁の「再支配」-ラットモデルを用いた脱神経萎縮防止効果の検討-、第35回日本マイクロサージャリー学会学術集会、2008.11.14-15、新潟

③ 大守 誠、筋弁/筋皮弁の萎縮予防効果に関する実験的研究、第17回日本形成外科学会基礎学術集会、2008.10.2-3、東京

④ 橋川 和信、口腔内再建材料としての広頸筋皮弁の有用性について、第13回形成外科手術手技研究会、2008.2.9、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田原 真也 (Tahara Shinya)
神戸大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：60207206

(2) 研究分担者

寺島 俊雄 (TERASHIMA TOSHIO)
神戸大学・医学研究科・教授
研究者番号：20101892

橋川 和信 (HASHIKAWA KAZUNOBU)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90403237

(3)研究協力者

榊原 俊介 (SAKAKIBARA SHUNSUKE)
神戸大学・医学研究科・特命助教
研究者番号：50444592

大守 誠 (OOMORI MAKOTO)
神戸大学・医学研究科・大学院生

石田 泰久 (ISHIDA YASUHISA)
神戸大学・医学研究科・大学院生