

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18538

研究課題名（和文）脂肪由来幹細胞を用いた医原性神経根障害に対する新たな治療法の開発

研究課題名（英文）Novel treatment strategy for iatrogenic nerve root injury using adipose-derived stem cell

研究代表者

高橋 真治（Takahashi, Shinji）

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：80735605

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：脊椎手術において改善不良の一因として硬膜周囲の癒着や熱などによる神経損傷があげられる。本研究では動物を用いてそれぞれのモデルの作成、その予防対策を講じた。手術時の冷却やステロイド、脂肪由来幹細胞の局所投与を試行した。熱損傷モデルに関しては冷却水で神経損傷の予防効果がみられ、脂肪由来幹細胞で脱髄の予防効果を示唆する所見がみられた。硬膜周囲の癒着に関しては脂肪由来幹細胞の明らかな効果は認めなかった。本研究結果からは熱損傷に関しては有効な手段があげられたが、硬膜周囲の癒着に関しては更なる研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎手術では術後に症状が増悪する例や改善が乏しい例が散見される。その要因は多岐にわたるが一つとして熱損傷や神経周囲の癒着が考えられる。本研究ではその予防策を検討するために行われた。脂肪由来幹細胞は採取が容易で再生医療によく用いられる。本研究でも脂肪由来幹細胞による神経の脱髄予防が示唆された。しかし脂肪由来幹細胞は採取から培養まで1カ月以上要するため、今後は術後症状が増悪する例に対して使用可能かさらなる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：One of the causes of poor improvement in spine surgery is nerve damage due to adhesions around the dura mater or heat injury. In this study, we used animals to model each of these factors and took measures to prevent them. Cooling during surgery, steroids, and undifferentiated adipose stem cells (uADSCs) were tried. In the thermal injury model, cooling water and uADSCs were effective in preventing demyelination. There was no clear effect of uADSC on peridural adhesions. The results of this study suggest that uADSC is an effective treatment for thermal injury, but further study is needed for peri-dural adhesions.

研究分野：整形外科学

キーワード：脊椎 手術 脂肪由来幹細胞 熱損傷 癒着

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会をむかえ、本邦では腰椎手術の対象年齢が高齢化している。適切な手術的治療は、要介護、要支援者の減少につながり、介護費用の減額にも直結する。腰椎手術は内視鏡や顕微鏡を用いた低侵襲化により手術成績の向上が得られているが、依然として術後 1-8% に症状増悪がみられている①。申請者らは過去に、術中の過度な牽引②や熱損傷③がその一因であることを報告してきた。その予防に関してわれわれは、ハイスピードドリルの影響を観察した研究で、冷却した生食による効果を報告したが、医原性神経障害の治療に焦点を当てた研究は少ない。末梢神経分野において、多くの研究が脂肪由来幹細胞 (ADSC) 移植による神経再生促進効果を確認している④。しかし、医原性神経障害に対するその有効性は評価されていない。

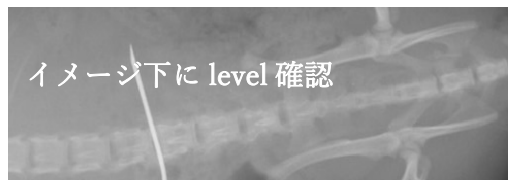
2. 研究の目的

本研究の目的は、「腰椎術後下肢症状の残存・再燃」の原因の一端である医原性神経障害の治療法を構築することである。これらが解明されれば、手術成績および安全性の向上により、健康寿命延伸に直結する。ハイスピードドリルによる骨切除やバイポーラー焼灼による止血、神経根 **Retract** は脊椎外科領域では一般的に用いられている手技であり、今回の動物実験で得られた神経障害の治療法(脂肪由来幹脂肪移植)の成果は早期に臨床応用へとつなげることが可能であり、本研究は学術的創造性を有している。末梢神経障害の研究では ADSC より分化誘導したシュワン様細胞が使用されることが多いが、分化させるためには培養時間やコスト、感染リスク増加等の問題が生じうる。一方、分化誘導の必要がない ADSC も神経再生に関わる神経栄養因子の産生・放出の役割を担うといわれ、パラクライン効果によりすでに宿主側に存在するシュワン細胞の本来の機能をサポートするかあるいは軸索伸長を直接促進させている可能性があり、医原性神経障害へも有用である可能性が高い。申請者らは過去に、神経根 **Retract**、ハイスピードドリルおよびバイポーラーの熱による神経根障害のメカニズムを報告しているが、その有効な予防・治療法に関する報告は乏しいため、本研究には新たな治療法を開発する独自性がある。

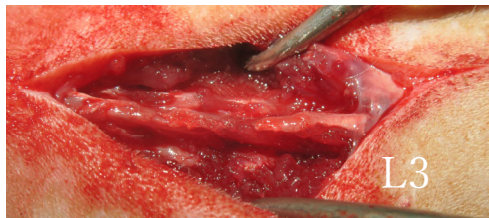
3. 研究の方法

< 1 >

- ◆ Rat を用いて、L2-3 椎弓を同定。ドリルを用いて椎弓を切除した。
- ◆ まず麻酔下に鼠径部より脂肪組織を採取し、酵素処理により分散し (37 度、2 時間、0.15%collagenase type I)、70um のフィルターに通し、Dulbecco's Modified Eagle Medium に加え、5 分後に間質細胞 pellet を 10%FBS および抗生剤を添加した MEM に 37 度で保存した。

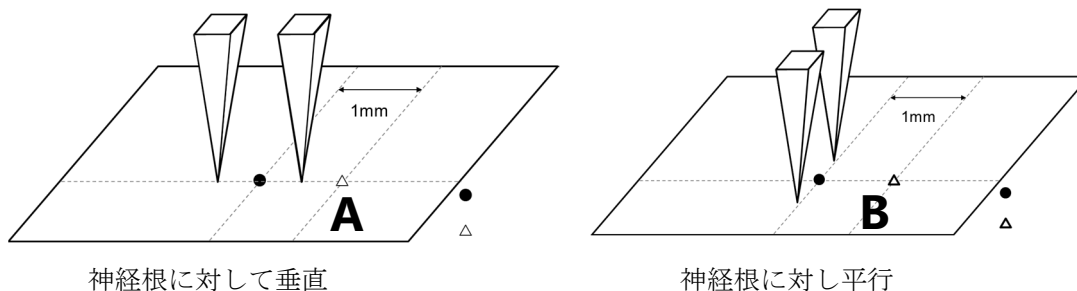


- ◆ ADSC であることを確定するため、CD29, CD44, CD90 といった間葉系幹細胞で発現する表面マーカーが陽性であることを RT-PCR、フローサイトメトリーおよび免疫組織染色で確認する。また骨髄単球系である CD-14 やリンパ管内皮細胞マーカー CD31、白血球共通抗原である CD45 が陰性であることを確認した。
- ◆ ADSC は、分化誘導せずに EDTA で洗浄の後、椎弓切除部の硬膜周囲に移植した。コントロール群としてシャム手術群、癒着に良いとされているセプラフィルム、4 週後に、犠牲死させた後に、周囲組織を含めて硬膜を採取する。
- ◆ HE 染色、クリューバー・バレラ染色にて脱髄の程度、血管障害を評価、Tunel 染色にて apoptosis の評価を行う。周囲の癒着については HE 染色とマッソントリクローム染色で評価した。癒痕の Grade は 0-3 で行った⑤。

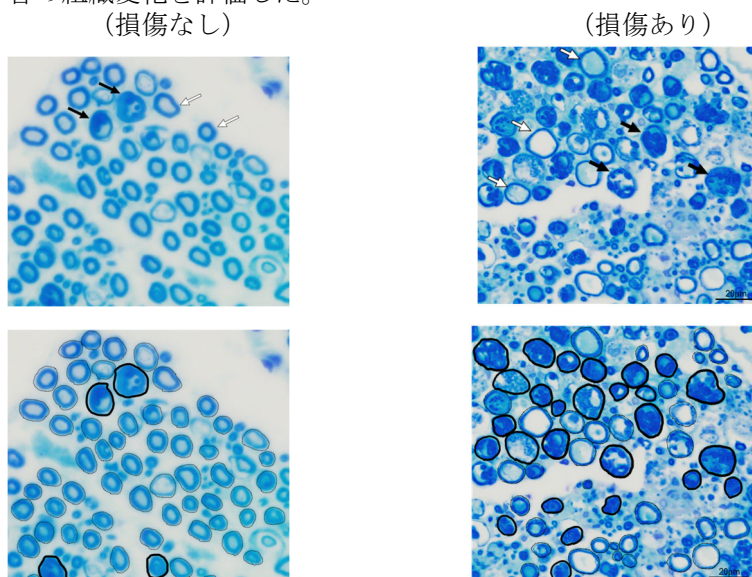


< 2 >

- ◆ 実験動物として、白色家兎を使用した、まずバイポーラ端子の方向性と端子から一定距離離れた位置での温度上昇を検討するため、家兎背筋筋膜上で、端子間距離 1mm、25W、4 秒間の条件下でバイポーラ焼灼を実施した際の温度評価を行った。温度測定位置は、神経根の走行に対しバイポーラ端子を垂直にして焼灼した場合 (垂直設置法) と、平行にして焼灼した場合 (平行設置法) を想定し、端子間中点からそれぞれ端子間線と平行に 1mm 離れた地点、端子間線から垂直に 1mm 離れた地点で行った。筋膜上で 25W 4 秒間のバイポーラ焼灼 (Stainless-Steel 端子) を行い、A 点、B 点における焼灼から 30 秒間の温度推移を比較した。(各 8 回)

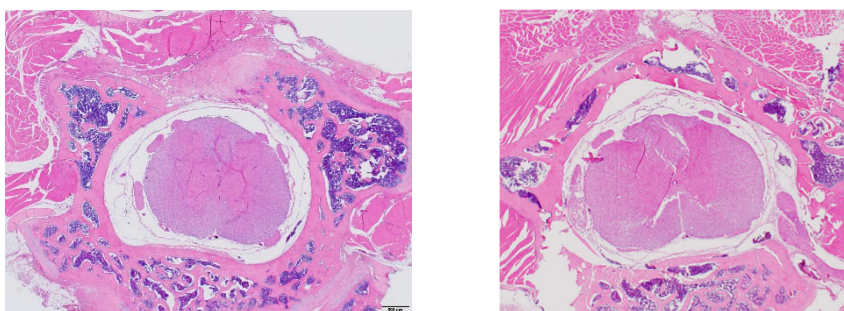


次に、L3-5 神経根由来の後枝を特定し、温度上昇が高かった平行設置法で各後枝から 1mm 離れた点でバイポーラ焼灼を行った。焼灼後、経時的に神経を採取し、Luxol Fast Blue 染色を用いて組織学的変化を評価した。また、予防法として焼灼の際に生理食塩水灌流を行った場合の温度変化および経時的組織変化を、加えて焼灼後にケナコルト ($20 \mu\text{g}/\text{kg}$) を神経周囲に注入した場合の組織変化を評価した。



4. 研究成果 < 1 >

	Scar Grade		
	1	2	3
Sham		3(38%)	5(62%)
Sheet		1(13%)	7(88%)
ADSC	2(20%)	5(50%)	3(30%)



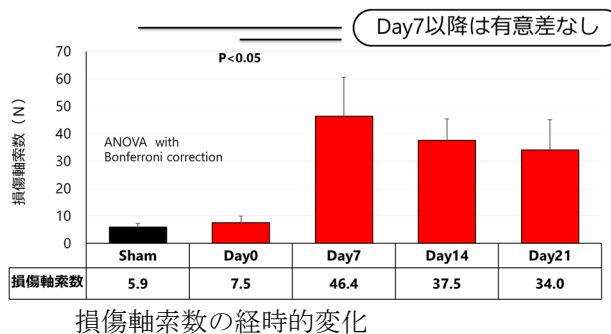
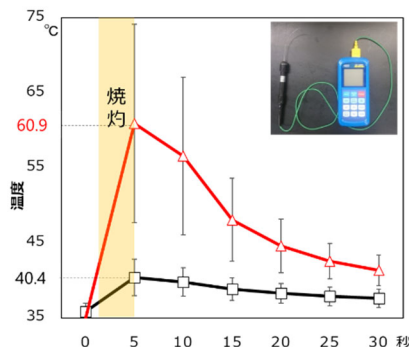
ADSC 移植に関して瘢痕形成に関しては明らかな有意差は認めなかった (χ^2 乗検定 $p=0.106$) が ADSC で瘢痕が軽度である傾向を示した。瘢痕予防で腹部外科等で使用される Sheet 群と 2 群比較すると瘢痕形成が軽度であり、その優位性 ($p<0.05$) を示すことができた (表)。

左図は Sham 群で癒痕形成がみられるが、右図 ADSC 群では癒痕形成はほとんど見られず椎弓の再生がみられた。

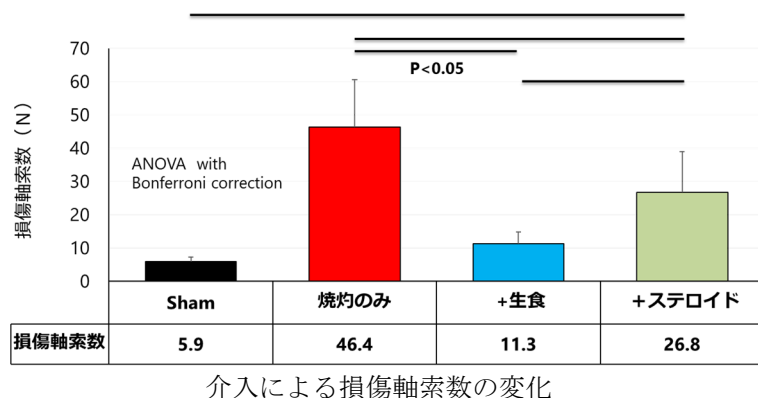
< 2 >

焼灼端子の垂直設置法では最大 $40.4^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ に留まった温度上昇は、水平設置法では最大 $60.9^{\circ}\text{C} \pm 13.2^{\circ}\text{C}$ に達した ($p < 0.01$)。その条件下では、焼灼後 1 週の時点で 47.8% に組織学的な神経損傷を認めた。生食灌流を用いると温度は最大 $42.7 \pm 4.6^{\circ}\text{C}$ に留まり、経時的な組織学的評価においても神経損傷は認めなかった。一方でケナコルト局注では、神経損傷は 25.0% までの軽減にとどまった。

以上の研究結果から、神経根近傍でのバイポーラ焼灼による温度上昇は、組織学的な神経損傷を惹起し得ることが明らかとなった。その予防のために、バイポーラ端子の向きは神経根に対し垂直とし、平行にせざるを得ない場合には、生食灌流を併用する事が望ましい。



バイポーラ焼灼による温度変化
(黒 = 平衡法、赤 = 垂直法)



< 引用文献 >

- ① Shardul Madhav Soman, Jayprakash Vrajlal Modi, Jimmy Chokshi. Feasibility of endoscopic discectomy by inter laminar approach at a high volume tertiary public hospital in a developing country. *J spine surg* 2017;3:38-43.)
- ② R Nagayama 1, H Nakamura, Y Yamano, et al. An experimental study of the effects of nerve root retraction on the posterior ramus. *Spine* 2000;25:418-24.
- ③ K Tamai, A Suzuki, S Takahashi, et al. *Bone Joint J*;99:554-560. 2017.
- ④ Hiroshi Mizuno, Morikuni Tobita, A Cagri Uysal. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem cells*, 2012;30:804-810
- ⑤ Surachai Sae-Jung, Kitti Jirattanaphochai, Chat Sumananont, et al. Interrater Reliability of the Postoperative Epidural Fibrosis Classification: A Histopathologic Study in the Rat Model. *Asian Spine J.* 2015 Aug;9(4):587-94.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 1.Takahashi S, Nonomiya Y, Terai H, Hoshino M, Ohyama S, Shintani A, Nakamura H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Artificial intelligence model to identify elderly patients with locomotive syndrome: A cross-section study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jos.2022.01.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 6.Takahashi S, Hoshino M, Takayama K, Sasaoka R, Tsujio T, Yasuda H, Kanematsu F, Kono H, Toyoda H, Ohyama S, Hori Y, Nakamura H.	4. 巻 31
2. 論文標題 The natural course of the paravertebral muscles after the onset of osteoporotic vertebral fracture.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Osteoporosis International	6. 最初と最後の頁 1089-1095
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00198-020-05338-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大山 翔一郎、高橋 真治、玉井 孝司、堀 悠介、平川 義弘、中村 博亮
2. 発表標題 神経根近傍でのパイポラ焼灼止血時に注意すべきポイント 家兔を用いた実験的研究の結果より
3. 学会等名 日本脊椎脊髄病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大山 翔一郎、高橋 真治、玉井 孝司、堀 悠介、平川 義弘、中村 博亮
2. 発表標題 パイポラ焼灼止血操作による神経根熱損傷と予防法の検証
3. 学会等名 中部日本整形外科災害外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 真治, 星野 雅俊, 辻尾 唯雄, 安田 宏之, 笹岡 隆一, 豊田 宏光, 河野 浩, 寺井 秀富, 玉井 孝司, 鈴木 亨暢, 高山 和士, 中村 博亮
2. 発表標題 骨粗鬆症性椎体骨折における傍脊柱筋の経時的変化と筋減少に関連する因子
3. 学会等名 日本整形外科学会
4. 発表年 2021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
研究協力者	藪 晋人 (Yabu Akito)	大阪市立大学・整形外科・大学院生 (24405)	
研究協力者	岡野 匡志 (Okano Tadashi)	大阪市立大学・整形外科・病院講師 (24405)	
研究協力者	大山 翔一郎 (Ohyama Shoichiro)	西宮渡辺病院・整形外科・医長	

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
---------	---------