

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792038

研究課題名（和文）マイクロサージャリー技術の脊髄再生医療における可能性の追求

研究課題名（英文）The Possibility of Microsurgical Vascularized Nerve Flap for Spinal Cord Repair

研究代表者

菊池 和希 (KIKUCHI KAZUKI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40508090

研究成果の概要（和文）：

血流をもった末梢神経の移植を脊髄切断部位に行うと、短期間で神経膠細胞の生着、線維性瘢痕の抑制に関して有意な効果を認められる。今回長期的な観察を行ったところ、血管付き神経移植のラットは全て体重を支えられるほど良好に後肢機能が回復したが、血行を持たない神経移植をしたラットでは同様な後肢機能の回復はみられなかった。それぞれの群の再生軸索の密度を測定したところ、両群に明らかな有意差が確認できた。

研究成果の概要（英文）：

Object: By making the “vascularized peripheral nerve flap for spinal cord injury” model, we assessed the hind limb function and the histological effect of this method.

Method: Six female Sprague-Dawley (SD) rats were divided into 2 groups, group A and B. Group A included “non-vascularized nerve flap” models. Group B consisted of “vascularized nerve flap” models. In each group, we transferred peripheral nerves (intercostal nerves) to fill the void made by surgical transection of the dorsal half of the spinal cord. Tissue sampling was done on postoperative day (POD) 90.

Results: In Group A, non-vascularized models, two out of three rats died in a few weeks and the survived one showed partial restoration of hind limb function, but it could not raise its lower back at all. In Group B, all rats survived and showed good restoration of hind limb function, they could raise their lower back absolutely. In the histological study, with neurofilament immunostaining, the density of the neurofilament in Group B was significantly higher than that in Group A. Therefore, in the vascularized cases, it was made clear that Schwann cells survived in vascularized models and that fibrotic scar formation was inhibited. This phenomenon facilitates axon guidance and results in good recovery in hind limb function.

Conclusion: Both histologically and functionally, significant differences between the vascularized and non-vascularized peripheral nerve transfer models were observed in 90 days. The fact that vascularized nerve flaps promotes axon guidance in spinal cord injury areas may result in the good functional recovery. Though a further histological study is necessary to clarify these results, but it was suggested that vascularized nerve flap become a breakthrough in spinal cord repair.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形成外科学

キーワード：マイクロサージャリー、脊髄損傷、血管柄付神経移植、中枢神経再生

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は現在日本での患者数がおおよそ 10 万人、毎年約 5 千人が新たに受傷していると言われている。破壊された脊髄を再生し、再び機能を取り戻すことは全世界の脊髄損傷患者共通の願いであるが、未だ根本的な治療法は確立されていない。また、脊髄損傷患者を診察する専門の科としては一般的に整形外科、脳外科などが認識されているが、現在の医学では急性期の神経原性ショックの管理や周辺骨組織の「脊椎」の整復固定、リハビリテーションや合併症管理などを行うこととなり、正確には「脊髄」そのものの治療を行うものではない。つまり、全世界における基本的な問題として、「脊髄」損傷を本当の意味で治療している臨床診療科は存在せず、治療に介入する安定した治療戦略も存在しないということがある。近年動物実験モデルにおいて、種々の組織・細胞移植により脊髄の再生、機能回復が得られたとする報告が相次ぎ脚光を浴びてきた。最近では脊髄損傷に対する骨髄間質細胞移植療法[Suzuki Y et al. *Exp Neurol* 2004;187:266-78] や iPS 細胞移植療法の可能性についても検討されている[Nakamura M et al. *Exp Neurol* 2001;169:407-15], [Nakamura M et al. *Exp Neurol* 2003;184:313-25]。しかし、脊髄内での移植細胞の動態解析が不十分な点も多く、細胞の生着・分化には多くの困難が存在している。iPS 細胞を神経幹細胞にあらかじめ分化させた上で移植しても、脊髄としての組織が再生されるには神経細胞やグリア細胞が立体的に正しく配置される必要があり、現在のところその技術が開発されていないという問題点が存在している。この問題点解決のためのブレイクスルーとして、我々は神経幹細胞を単に移植するものではなく、「超微小血管吻合技術」を用いて血行を持った生きた末梢神経移植を行い、更に神経幹細胞移植も併用して行うことで、安定した血行を持った移植組織が立体的に正しい神経幹細胞の分化・生着に寄与してくれる可能性に着目している。当科での以前の研

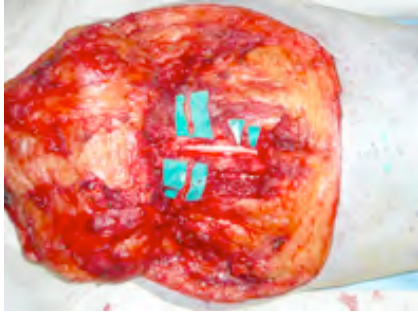
究で、末梢神経移植では血行を有する場合はシュワン細胞がほぼ 100%生着し、血行を有していない場合に比べて再生軸索の伸長速度が加速することを基礎実験において証明しており [Koshima et al. *J Reconstruct Microsurg* 20:357-361,2004], [Koshima et al. *Annals of Plastic Surgery* 14:235-243,1985]、我々は種々の末梢神経再建の臨床例に対して血管柄付き神経移植により非常に良好な結果を得てきた。この技術を脊損治療に生かせるのではないかというコンセプトのもと、これまでにいくつかの予備実験を行い、ラットを用いて既にその可能性を認めている。

2. 研究の目的

本研究は、形成外科医として我々が開発してきた「超微小血管吻合技術」を用いて、脊髄損傷動物モデルに対し、血流をもった末梢神経の自家移植を行うというまったく新しい方法をラットおよびブタ、サルなどの大動物で行い、マイクロサージャリー技術の脊髄損傷治療に対する可能性を追求する。さらに、神経幹細胞移植などとの併用療法も行うことによって再生医療が抱えていた脊髄損傷治療における問題の解決にいかに関与できるか、運動機能評価及び組織学的評価を通じて調べることを目的とする。

3. 研究の方法

過去にラットで肋間神経を束ねた形で切断部に移植し、軸索伸長と機能回復が認められたという報告が世界中で注目を浴びたが [Cheng, H., et al. *Science*, 273 : 510-513, 1996]、この報告を参照して実験モデルを作成した。350g のメスの SD 系ラットに対し、マイクロサージャリーにより血管柄付き末梢神経移植の実験モデルを作成した。脊髄を切断し、そこへ肋間神経移植を行い、血管柄付きの場合と血管柄付きでない場合とラットに対して組織学的評価および運動機能的評価を行った。今回は 6 匹で 3 ヶ月の長期フォローを行った。



#### 4. 研究成果

血管付き神経移植のラットは全て体重を支えられるほど良好に後肢機能が回復したが、血行を持たない神経移植をしたラットでは同様な後肢機能の回復はみられなかった。また、ニューロフィラメント染色においてそれぞれの群の再生軸索の密度を測定したところ、両群に明らかな有意差が確認できた。運動機能評価を BBBscore (Basso, Beattie, Bresnahan Locomotor Score) で観察 [Basso et al. Journal of Neurotrauma, 12:1-21, 1995]。術後 3 週間程で有意な差が現れた。術直後は両群とも後肢の完全麻痺と膀胱直腸障害が出現していたが、血管付き神経移植のラットは全て体重を支えられるほど良好に後肢機能が回復した [論文投稿中]。術後 90 日に採取した標本にニューロフィラメント染色を行い、それぞれの群の移植組織内の再生軸索の密度を画像解析ソフト Image J (version 1.45s)\* を用いて測定したところ、両群にはっきりと有意差が確認できた [論文投稿中]。

#### 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 1 件)

- ① **血管柄付き神経移植術による神経再建術と更なる可能性**  
脳神経外科速報第 22 巻 11 号 p283-289, 2013.  
(査読なし)  
菊池和希、三原誠、成島三長、飯田拓也、光嶋勲

[学会発表] (計 7 件)

- ①2011 年 4 月 14 日  
第 54 回日本形成外科学会総会・学術集会  
於 ホテルクレメント徳島
- ②2011 年 10 月 7 日  
第 20 回日本形成外科学会基礎学術集会  
於 ハイアットリージェンシー東京
- ③2011 年 11 月 11 日  
第 38 回日本マイクロサージャリー学会学術集会  
於 新潟コンベンションセンター
- ④2012 年 4 月 12 日  
第 55 回日本形成外科学会総会・学術集会  
於 ホテルニューオータニ
- ⑤2012 年 6 月 29 日  
the 3<sup>rd</sup> ACREP perforator flap course  
【the Best Paper Award 受賞】  
The University of Amiens, France
- ⑥2012 年 10 月 5 日  
第 21 回日本形成外科学会基礎学術集会  
於 ホテルリステル猪苗代
- ⑦2012 年 12 月 7 日  
第 39 回日本マイクロサージャリー学会学術集会  
於 北九州国際会議場

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菊池 和希 (KIKUCHI KAZUKI)  
東京大学 医学部附属病院 助教  
研究者番号：40508090

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：