

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592232

研究課題名(和文) 腕神経叢引き抜き損傷に対する前処理自家神経を用いた神経根再埋め込み法の研究

研究課題名(英文) The pretreatment of nerve autograft used in the reimplantation surgery after nerve root avulsion injury

研究代表者

太田 壮一 (Souichi, Ohta)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70592484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：頸髄神経根引き抜き損傷後、引き抜かれた神経根を再埋め込みする手術で使用する移植神経の前処理法をラットで検討した。第6頸髄神経引き抜き損傷モデルをまず作成し、同時に移植神経を第5頸髄神経より採取した。再埋め込み手術までの1週間、移植神経をシュワン細胞培地で培養した。その後、引き抜かれた脊髄節と引き抜かれた神経根の間に前処理自家神経を橋渡し移植した。術後8週の組織学的評価では培地に1nMエリスロポエチン添加した群で再生軸索数や脊髄前角内の生存運動神経細胞数の有意な増加は見られなかった。100μM Resveratrol 添加群では検体数が足りないものの、再生軸索数の有意な増加を認めた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the pretreatment of the nerve autograft used in rat reimplantation surgery of the avulsed cervical nerve root. The nerve autograft was harvested from 5th cervical nerve root when 6th cervical nerve root was extravertebrally avulsed, and cultured in the commercially available Schwann cell medium for one week prior to the reimplantation surgery. Then, the cultured nerve was grafted to bridge between the avulsed spinal cord segment and the distal end of the avulsed nerve root one week after the first surgery. The histological examination at 8 weeks after second surgery showed that the addition of 1nM erythropoietin to the culture medium had no effects on axonal regeneration and survival of motor neurons in the lesioned side of the spinal cord segment. The addition of 100μM resveratrol to the culture medium showed marked increase of axonal regeneration in the 2mm distal to the distal coaptation site of the grafted nerve, although sample size was small.

研究分野：整形外科学

キーワード：神経根引き抜き損傷 治療 ラット 神経移植 Resveratrol

## 1. 研究開始当初の背景

腕神経叢の引き抜き損傷は、交通事故や労働災害時あるいは出生時に患肢を牽引されることにより生じる。脊髄腔内で脊髄の付着部から神経根が引き抜けているため、末梢神経損傷と異なり治療が非常に困難である。特に、全型損傷と呼ばれる頸神経根 5 本全ての損傷では患肢はほぼ廃用状態となる。この状態に対して、以前の欧米では上肢の切断および義肢装着で対応していたが、マイクロサージャリーの発展に伴い、神経移植、神経移行、筋肉移植、腱移行、関節固定などを駆使し、上位損傷型 (C5~C6 あるいは C5~C7) では筋力や可動域についてはいまだ不十分なことも多いが、肘や肩を多少自力で動かせる状態が期待できるようにはなった。しかし、依然として腕神経叢の全型損傷 (C5~T1) における手、手指の機能については惨憺たる現状である。

1995 年、Carlstedt らにより臨床例で引き抜かれた神経根を脊髄に再埋め込みし、上腕二頭筋への神経の再支配が得られたことが初めて報告された (T. Carlstedt et al. Lancet. 1995)。その後、数例 Carlstedt や Fournier らにより再埋め込み法が施行されたが、再埋め込みされた神経により上肢の一部の筋肉の再支配が行われるものの実用的とはいえるものではなかった (Carlstedt T et al. J Neurosurg. 2000, Fournier HD et al. Hand Clin. 2005)。

引き抜き損傷後、神経を引き抜かれた運動神経細胞は、脊髄内の前角におけるその細胞数が徐々に減少していくことがマウス、ラットなどの動物モデルにより報告されており、損傷後 1 ヶ月で生存細胞数が 50% 以下となること、我々の以前の研究でも確認されている (太田 日手会誌 2008)。この前角に残存した運動神経細胞から埋め込んだ移植神経内へと一部の軸索が伸長することは確認されているが、その再生軸索数は圧倒的に少ない。この対応策としては、引き抜き損傷後の運動神経細胞死を抑制すること、残存運動神経細胞より埋め込んだ移植神経への軸索再生を増加させることなどが考えられる。

我々の前研究では、ラット神経根引き抜き損傷モデルに対して、貧血の治療に広く使用されているエリスロポイエチン 5000unit/kg s.c. を損傷直後に単回投与し、4 週後に引き抜き損傷後の脊髄前角細胞 (運動神経細胞) に対するエリスロポイエチンの神経保護作用を確認した。

残存前角細胞数の患側/健側比は、コントロール群が 49.8% であったのに対して、エリスロポイエチン投与群では 89.3% と有意に改善しており、エリスロポイエチンの投与により運動神経細胞数の減少を抑制し、引き抜き神経根の再埋め込み術の成績向上につながる可能性があることを示した。

## 2. 研究の目的

再埋め込み術の成績向上をめざす別のアプローチは、残存運動神経細胞から再埋め込みされた移植神経へと再生する軸索数を増加させることである。実際の再埋め込み術では、脊髄と引きぬかれた神経根の間に移植神経を橋渡し移植する必要がある。そのため、橋渡し移植する移植神経に前処理を加え、引き抜かれた脊髄節の運動神経細胞から移植神経へと到達、伸長する軸索数を増加させることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

- (1) 我々が考案したラット頸髄神経根引き抜き損傷モデルを利用して、引き抜かれた神経根と脊髄間に移植神経を橋渡し移植するラットモデルをまず作成した。
- (2) 次に、非常に手間のかかるラットモデルの必要作成数の減少を期待し、移植神経に対する前処理方法の検討を *in vitro* で脊髄器官培養を利用して行う実験系の作成を試みた (参考文献; Vyas A et al. An *in vitro* model of adult mammalian nerve repair, *Exp Neurol*, 223:112-8, 2010)。8 日齢の幼若 SD ラットをジエチルエーテルで安楽死させた後、頸髄を摘出、350 $\mu$ m の横断切片を作成する。これをフィルター上で 50% minimal essential medium (Gibco), 25% Hanks Balanced salt solution (HBSS, Gibco, Grand Island, NY), 25% heat-inactivated horse serum (Hyclone, Logan UT), 25 mM HEPES, 35 mM D-glucose, 2mM glutamine and penicillin/ streptomycin の培地に浸し培養した。脊髄前角部の運動神経細胞より伸張する軸索を観察した。
- (3) 採取した移植神経を 1 週間 Schwann 細胞培地 (ScienCell Research Laboratories) のみ (N=7)、Schwann 細胞培地にエリスロポイエチン (1nM) を添加した培地 (N=8) の 2 種類で 1 週間培養し、その後引き抜き損傷後 1 週のラットに橋渡し移植を行った。移植 8 週後に安楽死させ、脊髄埋め込み移植部より 4mm の位置 (橋渡し移植した神経と神経根の縫合部の遠位側) の神経を採取した。採取した神経をエポン包埋後、準超薄切片を作成し、トルイジンブルー染色した。第 6 頸髄節も採取し、4% パラホルムアルデヒド固定および 20% スクロースで後固定後、40 $\mu$ m の凍結横断切片を作成した。その後、組織学的に検証した。
- (4) 実験 (3) と同様のプロトコールで Resveratrol 群とコントロール群で比較検証した。Resveratrol 群では、100 $\mu$ M Resveratrol を Schwann 細胞培地に添加した。

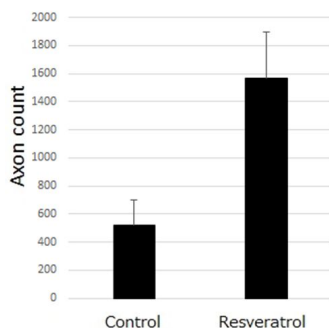
## 4. 研究成果

- (1) 計画当初では、左第 5~7 頸髄神経根を

引き抜き、同時に同ラットの下肢より腓腹神経を採取、採取した腓腹神経を1週間培地に浸した後、第6頸髄(C6)髄節と引き抜かれたC6神経根の間に橋渡し移植する予定であった。しかし、実際にラットモデルを作成すると、侵襲の大きさ、再現性、手間などの様々な問題が生じたため、最終的に計画当初より以下の点を変更した。変更点は、(1)採取する移植神経を、腓腹神経ではなく、より侵襲が小さく、簡便な隣接する第5頸髄神経へと変更、(2)基本的な評価時期を術後8週目とし、移植神経および脊髄の組織学的評価を中心に行うことの2点である。

- (2) 数匹分の脊髄横断切片を器官培養し、2~3週間観察したが、脊髄前角より伸張する軸索はほとんど見られなかった。そのため、脊髄器官培養を利用した運動神経細胞からの軸索伸張を *in vitro* で検証するモデルの作成は断念した。
- (3) 採取神経の横断面で軸索数(EP0;701.8 ± 45.3, Cont;521.3 ± 175.6)、神経線維直径(EP0;2.13 ± 0.05, Cont;2.27 ± 0.15)、軸索直径(EP0;1.17 ± 0.04, Cont;1.35 ± 0.11)、髄鞘厚(EP0;0.48 ± 0.02, Cont;0.46 ± 0.03)、G-ratio(EP0;0.54 ± 0.01, Cont;0.58 ± 0.01)を計測したが、エリスロポイエチン群とコントロール群間でいずれも有意差は認めなかった。また、患側の第6頸髄髄節前角内の運動神経細胞数を計測したが、2群間で有意差を認めなかった。
- (4) Resveratrol 群とコントロール群では、Resveratrol 群で再生軸索数が有意に増加していた(Res;1570.3 ± 329.8, Cont;521.3 ± 175.6, P<0.05)(Fig.1)。Resveratrol には、移植神経の再生軸索誘導能を著しく増加する効果があると思われるが、まだ検体数が少なく引き続き検討を要する。

Fig.1



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Noguchi T, Ohta S, Kakinoki R, Ikeguchi R, Kaizawa Y, Oda H, Matsuda S.  
The neuroprotective effect of erythropoietin

on spinal motor neurons after nerve root avulsion injury in rats. *Restor Neurol Neurosci.* 査読有り、in press. <http://content.iospress.com/journals/restorative-neurology-and-neuroscience/Preprint/Preprint>

Kaizawa Y, Kakinoki R, Ikeguchi R, Ohta S, Noguchi T, Oda H, Matsuda S.

Bridging a 30 mm defect in the canine ulnar nerve using vessel-containing conduits with implantation of bone marrow stromal cells. *Microsurgery.* 査読有り、2015 Mar 14. doi: 10.1002/micr.22391.

貝澤幸俊、柿木良介、池口良輔、太田壮二、野口貴志、織田宏基.血管茎を含むPLA/PCL 導管内に自家骨髄間葉系幹細胞を移植した人工神経の有用性の検討: イヌ尺骨神経 30mm 欠損モデル. *Peripheral Nerve (末梢神経).* 査読有り、2014; 25(2): 345.

野口貴志、太田壮二、貝澤幸俊、織田宏樹、柿木良介、松田秀一.ラット頸髄神経の節前損傷と節後損傷における組織学的所見の比較検討. *日本手外科学会誌*. 査読有り、2014; 31(4): 488-491. [https://www.jssh.jp/jssh\\_manager/CreateHTML.do?syscd=00001677&registcd=J-05000190](https://www.jssh.jp/jssh_manager/CreateHTML.do?syscd=00001677&registcd=J-05000190)

Kaizawa Y, Kakinoki R, Ohta S, Noguchi T, Matsuda S. Free functional muscle transplantation of an anomalous femoral adductor with a very large muscle belly: a case report. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj.* 査読有り、2013;8(1):11. doi: 10.1186/1749-7221-8-11

野口貴志、柿木良介、太田壮二、藤田俊史、貝澤幸俊、松田秀一.腕神経叢損傷の肘屈曲再建を目的とした部分尺骨神経移行術と肋間神経移行術の比較検討. *日本手外科学会雑誌*. 査読有り、2013;29(6):848-852. [https://www.jssh.jp/jssh\\_manager/mylist/MyListLogin.do?jsessionid=B5FBC568A084D4D8E8A736EEB9305BCE?syscd=00000962&registcd=J-03000139&pdf=&abst=Noguchi T, Ohta S, Kakinoki R, Kaizawa Y, Matsuda S.](https://www.jssh.jp/jssh_manager/mylist/MyListLogin.do?jsessionid=B5FBC568A084D4D8E8A736EEB9305BCE?syscd=00000962&registcd=J-03000139&pdf=&abst=Noguchi T, Ohta S, Kakinoki R, Kaizawa Y, Matsuda S.)

A new cervical nerve root avulsion model using a posterior extra-vertebral approach in rats. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj.* 査読有り、2013;8(1):8. doi: 10.1186/1749-7221-8-8.

[学会発表](計18件)

Kaizawa Y, Kakinoki R, Ikeguchi R, Ohta S, Noguchi T, Oda H, Matsuda S. Bridging A 20mm Rat Sciatic Nerve Gap Using An Undifferentiated Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell-laden Conduit Containing Vessels

And Decellularized Allogenic Basal Lamina. 61th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2015.3.28-3.31, Las Vegas, Nevada, USA

Noguchi T, Ohta S, Kaizawa Y, Ikeguchi R, Oda H, Kakinoki R, Matsuda S. Histological Comparison Between Pre-And Postganglionic Injuries of The Brachial Plexus in a rat model. 61th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2015.3.28-3.31, Las Vegas, Nevada, USA

貝澤幸俊、柿木良介、池口良輔、太田壮二、野口貴志、織田宏基、松田秀一. 脱細胞化同種神経基底膜を含む血管茎含有導管に未分化骨髄間葉系幹細胞を移植した人工神経における末梢神経再生 (第2報). 第29回日本整形外科学会基礎学術集会、2014.10.9、城山観光ホテル (鹿児島市)

貝澤幸俊、柿木良介、池口良輔、太田壮二、野口貴志、織田宏基. 血管茎を含むPLA/PCL導管内に自家骨髄間葉系幹細胞を移植した人工神経の有用性の検討: イヌ尺骨神経30mm欠損モデル. 第25回日本末梢神経学会学術集会、2014.8.25、ホテルルビノ京都堀川 (京都市)

野口貴志、太田壮一、柿木良介、貝澤幸俊、松田秀一. ラット頸髄神経の節前損傷と節後損傷における組織学的所見の比較検討. 第57回日本手外科学会学術集会、2014.4.17、沖縄コンベンションセンター (宜野湾市)

Noguchi T, Ohta S, Kaizawa Y, Kakinoki R, Matsuda S. The neuroprotective effect of erythropoietin on motor neurons in the spinal ventral horn after the nerve root avulsion injury in rats. 60th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2014.3.15-18, New Orleans, LA, USA

野口貴志、太田壮一、柿木良介、貝澤幸俊、松田秀一. ラット神経根引き抜き損傷におけるerythropoietinの投与開始時期と運動神経細胞死抑制効果についての検討. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会. 2013.10.18、幕張メッセ (千葉市)

貝澤幸俊、柿木良介、太田壮一、野口貴志、松田秀一. 同種無細胞化基底膜と自家骨髄由来間葉系細胞移植を行った血管含有チューブ内での末梢神経再生: ラット座骨神経20mm欠損モデル. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会. 2013.10.18、幕張メッセ (千葉市)

Noguchi T, Ohta S, Kaizawa Y, Kakinoki R, Matsuda S. Histological Comparison Between the Preganglionic and Postganglionic Injuries of Brachial

Plexus in a Rat Model. 68th ASSH, 2013.10.3-5, SanFrancisco, CA, USA

柿木良介、青山朋樹、新井隆三、桜井健世、太田壮一、佐藤晋. 腕神経叢損傷患者のDASHscoreを用いた上肢機能評価. 第50回日本リハビリテーション医学会. 2013.6.14、東京国際フォーラム (東京都)

太田壮一、柿木良介、野口貴志、貝澤幸俊、秋吉美貴、松田秀一. 我々の肋間神経筋皮神経移行術. 第30回中部日本手外科学会. 2013.2.2、奈良県新公会堂 (奈良市)

柿木良介、太田壮一、野口貴志、貝澤幸俊、秋吉美貴、松田秀一. 腕神経叢患者でのOberlin法を応用した部分神経移行術. 第30回中部日本手外科学会. 2013.2.2、奈良県新公会堂 (奈良市)

柿木良介、太田壮一、野口貴志、貝澤幸俊、秋吉美貴、上羽康夫、松田秀一. 腕神経叢損傷患者に対する筋肉移植による肘屈曲再建術後の肘屈曲力に関する研究. 第39回日本マイクロサーージャリー学会. 2012.12.7、北九州国際会議場 (小倉市)

太田壮一、柿木良介、野口貴志、貝澤幸俊、松田秀一. エリスロポイエチンによるラット神経根引き抜き損傷後の脊髄前角細胞死抑制効果. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会. 2012.10.26、名古屋国際会議場 (名古屋市)

Kakinoki R, Ohta S, Noguchi T, Kaizawa Y, Matsuda S. Change of activated area of the brain cortex after CC7 operations. Symposium 5, Brachial plexus. Inaugural Congress of Asia Pacific Federation of Societies for Reconstructive Microsurgery. 2012.10.8-9, Singapore.

Kakinoki R, Ohta S, Noguchi T, Kaizawa Y, Matsuda S. Change in the activated sites in the motor and sensory cortices after the contralateral cervical seventh nerve root (CC7) transfer in patients with brachial plexus injuries. The 3rd Sino-European meeting for Brachial Plexus Injuries, 2012.9.13-15, Milan, Italy.

Ohta S, Kakinoki R, Noguchi T, Kaizawa Y, Matsuda S. Erythropoietin Improves Motorneuron Death after Spinal Root Avulsion Injury in Rats. 67th ASSH annual meeting. 2012.9.6-8, Chicago, IL, USA

野口貴志、柿木良介、太田壮一、藤田俊史、貝澤幸俊. 上位型腕神経叢損傷における肘屈曲再建を目的とした部分尺骨神経移行術と肋間神経移行術の比較. 第55回日本手外科学会学術集会.

2012.4.20、パシフィコ横浜（横浜市）

〔図書〕（計 0 件）

6．研究組織

(1)研究代表者

太田 壮一（OHTA SOICHI）  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：7 0 5 9 2 4 8 4

(2)研究分担者

柿木 良介（KAKINOKI RYOSUKE）  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号：2 0 3 1 4 1 9 8

(3)連携研究者

なし