

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592155

研究課題名(和文) 陳旧性末梢神経損傷に対する末梢神経緩徐伸長法の適応に関する研究

研究課題名(英文) Simultaneous gradual lengthening of proximal and distal nerve stumps for repair of chronic peripheral nerve defect.

研究代表者

落合 直之(Ochiai, Naoyuki)

筑波大学・その他部局等・名誉教授

研究者番号：30134563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、15 mmの陳旧性末梢神経欠損モデルを確立し、これが末梢神経両断端緩徐伸長法により修復可能であることを示した。神経再生は電気生理学的、組織学的に陳旧性の端々縫合と同等であった。両断端は神経幹全体が伸長されたと考えられた。本研究の結果は末梢神経両断端緩徐伸長法が臨床応用可能であることを支持するものとする。末梢神経両断端緩徐伸長法は陳旧性末梢神経欠損に対する有用な治療法になると考えた。

研究成果の概要(英文)：We investigated nerve regeneration of rat sciatic nerves after chronic injury of 15 mm-defect by the gradual lengthening of proximal and distal nerve stumps. In the lengthened proximal stump, Schwann cells and axons existed along the whole nerve stump. In the lengthened distal stump, Schwann cells exist along the overall length. The whole nerve trunk was lengthened. The nerve regeneration was comparable with the delayed end-to-end suture without nerve defect. We showed the feasibility of direct gradual lengthening of proximal and distal nerve stumps for the treatment of chronic segmental nerve defect.

研究分野：整形外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 整形外科学

キーワード：再生医学 神経科学 末梢神経伸長 神経欠損治療

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。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コーゲンスポンジチューブを用いた犬の坐骨神経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。本法は従来より行われてきた創外固定による骨延長術に際して、骨延長に伴い周囲の筋や神経も過不足なく伸長されることを応用している。我々は神経断端を直接把持し牽引することのできる神経伸長器を考案した。これを用い、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カ所で行うため、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た。今回、この手法を実際に臨床の現場でより多く遭遇する末梢神経陳旧性損傷の治療に応用すべく本研究を計画した。

2. 研究の目的

- (1) 陳旧性の神経欠損間隙に対する末梢神経両断端緩徐伸長法の適応と限界を確認すること
- (2) 緩徐伸長された末梢神経断端に生じる神経再生メカニズムを明らかにすること

3. 研究の方法

(研究1) 陳旧性損傷時の治療法の確立

陳旧性神経欠損の両断端の神経伸長が可能か否か、伸長後機能的回復が得られるかどうかを確認する。

対象：Wistar系ラット9週齢雄，各群n=6

(研究1-1) 陳旧性神経欠損モデルの作製ラット坐骨神経を切断し30日経過後に両断端間の欠損距離が15mmになるようなモデルを作成するために、初期欠損長と待機期間中の神経両断端をどのようにすればよいかの検討を行う。

(研究1-2) 研究1-1で完成したモデルに対し、神経両断端緩徐伸長を行った際に神経の伸長が得られているかどうか、伸長後に端々縫合できるかどうかを確認する。

(研究1-3) 研究1-1, 1-2で決定した伸長終了日まで神経伸長を行った後、両断端を新鮮化し縫合する。対照群として陳旧性の端々縫合群を作成する。縫合後の神経再生能について電気生理学的評価(運動および知覚神経伝導速度検査)を経時的(縫合後4週, 8週, 12週)に観察し、評価する。腓腹筋の筋張力および湿重量を計測する。また再生神経の組織学的評価を縫合後12週に縫合部遠位の神経横断切片の有髄軸索数、径の計測により評価する。

(研究2) 神経伸長メカニズムの検討

伸長された神経の内部を観察し神経組織が伸長されているか確認するため、近位断端で抗neurofilament抗体染色、両断端で抗S-100抗体染色を行う。また、近位断端では抗PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) 抗体、抗GFAP (Glial fibrillary acidic protein) 抗体、核染色の三重染色を行い、近位でのSchwann細胞の増殖を検討する。この際隣接スライドで抗S100抗体、ヘマトキシリンの二重染色を行い、対比する。遠位断端ではSchwann細胞が増殖を伴って伸長しているかどうか検討するため、抗PCNA抗体、抗S-100抗体、核染色の三重染色を行う。また、遠位断端のSchwann細胞の表現型を確認するため、抗GFAP抗体染色を行う。

4. 研究成果

(研究1-1) ラット坐骨神経大腿中央部に5mmの神経欠損を作成し、両断端が退縮しないように周囲組織に縫着しておく。創を閉じて30日後に再び手術部を展開し、両断端を新鮮化することで15mmの神経欠損を作成できた。

(研究1-2) 完成した神経欠損の両断端に神経伸長器を装着し、1日1mmの伸長速度で神経伸長を試みた。15日後まで両断端は伸長可能でかつ端々縫合可能距離まで伸長できた。

(研究 1-3) 電気生理学的評価

神経縫合後 12 週において、MCV の健側比は神経伸長群で $42.6 \pm 6.7\%$ 、対照群で $41.1 \pm 6.2\%$ と有意差を認めなかった。CNP 振幅の健側比は神経伸長群で $3.4 \pm 2.8\%$ 、対照群 $5.1 \pm 4.1\%$ と両群間に有意差を認めなかった。腓腹筋の筋張力の健側比は神経伸長群で $37.2 \pm 21.5\%$ 、対照群で $28.3 \pm 8.8\%$ と有意差を認めなかった。腓腹筋の筋湿重量の健側比は神経伸長群で $35.3 \pm 6.0\%$ 、対照群で $33.4 \pm 5.9\%$ と両群間に有意差を認めなかった。神経縫合後 12 週において、有髄神経の総数は、神経伸長群で 7684 ± 1425 、対照群で 7767 ± 1036 であった。平均軸索径は神経伸長群で $1.84 \pm 0.07 \mu\text{m}$ 、対照群で $1.83 \pm 0.11 \mu\text{m}$ であり、いずれも両群間に有意差を認めなかった。軸索径の分布傾向にも有意差を認めなかった。近位断端軸索径はマーキングから遠位 2 mm の部位を境とし、遠位には小径線維が多く存在した。平均軸索径は近位で $2.00 \pm 0.05 \mu\text{m}$ 、遠位で $1.63 \pm 0.06 \mu\text{m}$ であり、近位、遠位間の軸索径に有意差を認めた ($p = 0.001$)。神経伸長法により、陳旧性の端々縫合と同等の良好な回復が得られることがわかった。

(研究 2)

15 日間伸長された近位断端縦断切片では、抗 neurofilament 抗体染色域がリングから 700 μm 以内に達していた。抗 S-100 抗体染色域は 420 μm 以内に達していた。遠位断端では、抗 S-100 抗体染色域はリングに達していた。遠位断端で、5, 10, 15 日伸長後の Schwann 細胞の表現型を検討した。いずれの時期にも GFAP 陽性細胞が存在した。

遠位断端で、5, 10, 15 日伸長後の Schwann 細胞の増殖を評価した。Schwann 細胞増殖率は、5 日後ではリング内部で神経伸長群 $0.85 \pm 0.54\%$ 、対照群 0%、リングの直近ではそれぞれ $0.39 \pm 0.47\%$ 、リングから 3 mm 部ではそれぞれ $0.40 \pm 0.69\%$ 、 $0.34 \pm 0.37\%$ であった。10 日後ではリング内部で神経伸長群 0%、対照群 $0.11 \pm 0.20\%$ 、リングの直近ではそれぞれ 0%、 $0.19 \pm 0.34\%$ 、リングから 3 mm 部ではそれぞれ 0%、 $0.40 \pm 0.69\%$ であった。15 日後ではリング内部で神経伸長群 $0.14 \pm 0.25\%$ 、対照群 $0.34 \pm 0.58\%$ 、リングの直近ではそれぞれ $0.24 \pm 0.21\%$ 、 $0.42 \pm 0.73\%$ 、リングから 3 mm 部ではそれぞれ $0.12 \pm 0.21\%$ 、 $0.1 \pm 0.17\%$ であった。5 日伸長後のリング内部のみ、神経伸長群で Schwann 細胞の増殖が多い傾向であった ($p = 0.053$) が、いずれも増殖率はわずかであった。

抗 PCNA 抗体染色では、近位断端で Schwann 細胞や他の細胞が旺盛に増殖する像が認められた。隣接スライドで行った抗 S100 抗体とヘマトキシリンの二重染色と対比して検討すると、増殖が旺盛な範囲はリングから 1 mm 以内の先端部分であった。15 日間伸長された陳旧性の近位断端でも、マーキングより遠位に小径の再生線維が観察された。本研究では近位断端の先端部が伸長される機序として、牽引とともに先端部で Schwann 細胞が増殖し、軸索を誘導している可能性があると考えられた。伸長された遠位断端では Schwann 細胞が全長にわたって存在し、GFAP 陽性細胞が観察された。Schwann 細胞はいわゆる immature / denervated state にあると考えられた。伸長された遠位断端は Schwann 細胞索としての役割を果たすことができ、軸索伸長に対する良い導管として働いていると考えた。また、縫合部より遠位で対照群に匹敵する数と径の有髄線維が観察されたことから、伸長により遠位断端の軸索を誘導し再髄鞘化する能力は損なわれていないと考えた。

【結論】

本研究では、15 mm の陳旧性末梢神経欠損モデルを確立し、これが末梢神経両断端緩徐伸長法により修復可能であることを示した。神経再生は電気生理学的、組織学的に陳旧性の端々縫合と同等であった。両断端は神経幹全体が伸長されたと考えられた。本研究の結果は末梢神経両断端緩徐伸長法が臨床応用可能であることを支持するものと考えた。末梢神経両断端緩徐伸長法は陳旧性末梢神経欠損に対する有用な治療法になると考えた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nakajima Y, Nishiura Y, Hara Y, Sharula, Ochiai N. Simultaneous gradual lengthening of proximal and distal nerve stumps for repair of chronic peripheral nerve defect in rats. Hand Surgery 17(1), 1-11, 2013. 査読有 (DOI: 10.1142/S0218810412500013)

〔学会発表〕(計 1 件)

中島佳子、西浦康正、原友紀、Sharula、落合直之 末梢神経両断端緩徐伸長法による陳旧性末梢神経欠損の修復. 第 56 回日本手外科学会学術集会 2013.4.11 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕 出願状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

落合 直之 (OCHIAI, NAOYUKI)
筑波大学・名誉教授
研究者番号：30134563

(2) 研究分担者

西浦 康正 (NISHIURA, YASUMASA)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：80208131

原 友紀 (HARA, YUKI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：30431688