

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18025

研究課題名(和文)悪性軟部腫瘍広範切除後の液体窒素処理自家神経移植術の確立

研究課題名(英文)A novel nerve reconstruction technique using liquid nitrogen-treated tumor-bearing nerve graft

研究代表者

米澤 宏隆 (Yonezawa, Hiroataka)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：20818942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経に近接する軟部肉腫では、神経の合併切除に伴う神経脱落症状が問題となる。近年は、温存した患肢の「機能」や「生活の質quality of life(QOL)」に注目が集まっている。本研究では、動物実験を行い、液体窒素処理自家神経は、自家神経と遜色ない患肢機能の回復を示した。また、担癌神経グラフトは、液体窒素処理において殺細胞化され、かつ神経再生能力を有していることを示した。本研究成果により将来的にヒトへこの技術が応用されれば、液体窒素処理担癌神経グラフトによる、軟部肉腫広範切除後のよりよい患肢再建術の一助となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋肉や神経、脂肪組織に発生した軟部肉腫の標準的な治療方法は手術であり、しかも軟部肉腫を正常組織で包み込むようにして切除(広範切除)することが必要となる。広範切除を行うにあたり、十分な切除縁を得るためには、ときに神経も合併切除する必要がある。本実験は、担癌神経グラフトを液体窒素処理し再利用する手術方法を考案した。この方法がヒトに応用できるようになれば、自家神経移植のように採取部の障害がなく、さらに切除した長さと同長の神経グラフトを得ることができ、軟部肉腫広範切除後の患肢再建の一助となることが予想される。

研究成果の概要(英文)：Although the liquid nitrogen treatment has been used for malignant bone tumor sterilization, its use in the preparation of nerve grafts has hitherto not been reported. Despite tumor involvement and freezing treatment, tumor-bearing frozen grafts demonstrated nerve regeneration activity, with no local recurrence observed at 48 weeks postoperatively in nude rats in this study. Our study revealed that the frozen nerve autograft has a similar regenerative potential as that of a nerve autograft. Though the findings in a rat model do not guarantee efficacy in humans, if they are substantiated by large-animal models, clinical trials will be needed for evaluating the efficacy of the tumor-bearing frozen nerve grafts in humans.

研究分野：整形外科

キーワード：骨軟部腫瘍 末梢神経 自家神経移植

1. 研究開始当初の背景

神経に近接する軟部肉腫では、神経の合併切除に伴う神経脱落症状が問題となる。軟部肉腫に対する広範切除後の一期的な神経再建については、腫瘍再発の可能性や、神経採取部の障害、手術時間の延長といった問題があり、その適応に明確な基準はない。現在、軟部肉腫においては患肢温存手術が主流となり、安定した治療成績が得られているが、近年は、温存した患肢の「機能」や「生活の質 quality of life (QOL)」に注目が集まっている。そして、腫瘍切除後の一期的な末梢神経再建の有用性が示されてきており、「運動機能、知覚機能の改善」のみならず、「神経痛・断端神経腫の予防」に寄与し、術後の患者満足度を大きく改善することが分かってきた。しかし、依然として神経再建のゴールドスタンダードは自家神経移植であることから、神経採取に伴う障害や、再建距離の限界といった問題がある。

2. 研究の目的

当教室では、液体窒素処理骨を用いた生物学的再建法を開発し、悪性骨腫瘍切除後の再建における有用性を報告してきた。この技術を用いて、担癌神経グラフトを液体窒素処理し再利用する手術方法を考案した。この方法では、自家神経移植のように採取部の障害がなく、さらに切除した長さと同長の神経グラフトを得ることができる。本研究の目的は、液体窒素処理担癌神経グラフトの有用性と安全性を *in vivo* で評価することにより、その実用性について検討することである。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルの作成

実験1. 神経移植法の比較: 雌 Wistar ラット (12 週齢, 250-300g, 日本チャールズ・リバー) の坐骨神経 10mm 欠損モデルに対し、自家神経を移植 (Auto 群)、自家神経を液体窒素処理して移植 (F-auto 群)、または 坐骨神経を 10mm 切除 (Resec 群) した。Auto 群, F-auto 群は、9-0 ナイロン糸で端々縫合し、Auto 群は近位、遠位を逆にして縫合した。術後 4, 12, 24, 48 週時点で各群 6 匹ずつモデルについて、神経生理学的、運動機能、組織学的評価を行った。F-auto 群における液体窒素処理は、5 分液体窒素処理、5 分室温解凍、5 分蒸留水解凍とした。

実験2. 液体窒素処理担癌神経の安全性・機能の評価: F344/NJcl-rnu/rnu ヌードラット (10 週齢, 100-150g, 日本クレア) の坐骨神経周囲に、ヒト線維肉腫 (HT1080) 株を 5×10^5 個/100 μL の濃度で移植した。移植後およそ 2 週間後に腫瘍径が 10mm になったところで、神経と腫瘍を一塊にして摘出した。実験1と同様に、神経を液体窒素処理および解凍を行い、同系ヌードラット坐骨神経 5mm 欠損モデルに移植した (F-tumor 群)。24 週, 48 週で各 6 匹ずつモデルを作成し、神経生理学的、運動機能、組織学的評価を行った。尚、担癌神経グラフト作成用のため、ヌードラット 3 匹分の両坐骨神経を用いた。

(2) 評価項目

神経の機能について、Sciatic functional index (SFI)、神経伝導速度 (潜時、振幅)、前脛骨筋湿重量、筋線維横断面積、S100 染色領域、Neurofilament (NF) 染色領域を評価した。画像解析には ImageJ (NIH) を使用した。筋線維横断面積は、前脛骨筋最大割面 (水平断) における、筋線維 1 本あたりの平均横断面積を算出した。S100 および NF 染色領域は単位面積あたりの染色面積の割合を計算した。実験1, 2 の 48 週モデルにおいては、術前 (0 週) から経時的に micro-CT (LaTheta, LTC-200, Hitachi Aloka Medical Ltd.) を撮影し、Synapse Vincent (Fujifilm Inc.) で画像解析を行い、下腿筋体積を算出した。

(3) 統計学的解析

Shapiro-Wilk の正規性検定の結果、本研究で算出した変数は正規性が認められなかった ($P < 0.05$) ため、変数は中央値及び四分位範囲で示した。多群間比較には one-way ANOVA を使用し、有意差が認められた場合には、Bonferroni/Dunn の多重比較検定を行った。S100 および NF 染色領域の比較は、Mann-Whitney 検定を行った。統計ソフトは IBM SPSS version 24.0 (日本 IBM) を使用し、 $P < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

(4) 研究倫理

尚、本実験は当院動物実験施設倫理委員会からの承認を得た上で行った (承認番号: AP-183912)。

4. 研究成果

実験 1: すべての群において, 4 週時点での下腿筋体積(患/健比)の減少を認めた(図 1A). Resec 群では 4 週以降も減少傾向を示したが, Auto 群, F-auto 群は 12 週から増加に転じ, 8 週以降より Resec 群と比較して有意差を認めた. Auto 群, F-auto 群では有意差を認めなかった. SFI は 24 週, 48 週で Resec 群と比較して, Auto 群において有意な改善を認めた(図 1B). 神経伝導速度(潜時)(患/健比)は 12 週以降で, Auto 群, F-auto 群ともに改善する傾向が認められた(図 1C). 振幅についても同様であり, Auto 群は 12 週以降で, F-auto 群は 12 週および 48 週で, それぞれ Resec 群に対して有意差を認めた(図 1D). 前脛骨筋の Masson's trichrome 染色では, Resec 群において筋萎縮を認めた. Image J を用いて解析すると, Auto 群, F-auto 群では, Resec 群と同様に, まず 4 週で一旦健側に比較して減少したが, その後増加傾向を示した. また, 前脛骨筋湿重量も同様の結果であった. S100 染色領域については, 12 週と 48 週で, Auto 群は, F-auto 群に比較して有意に増加していた(図 2A, B). 一方, NF 染色領域については, 経過で明らかな有意差は認めなかった(図 2C, D).

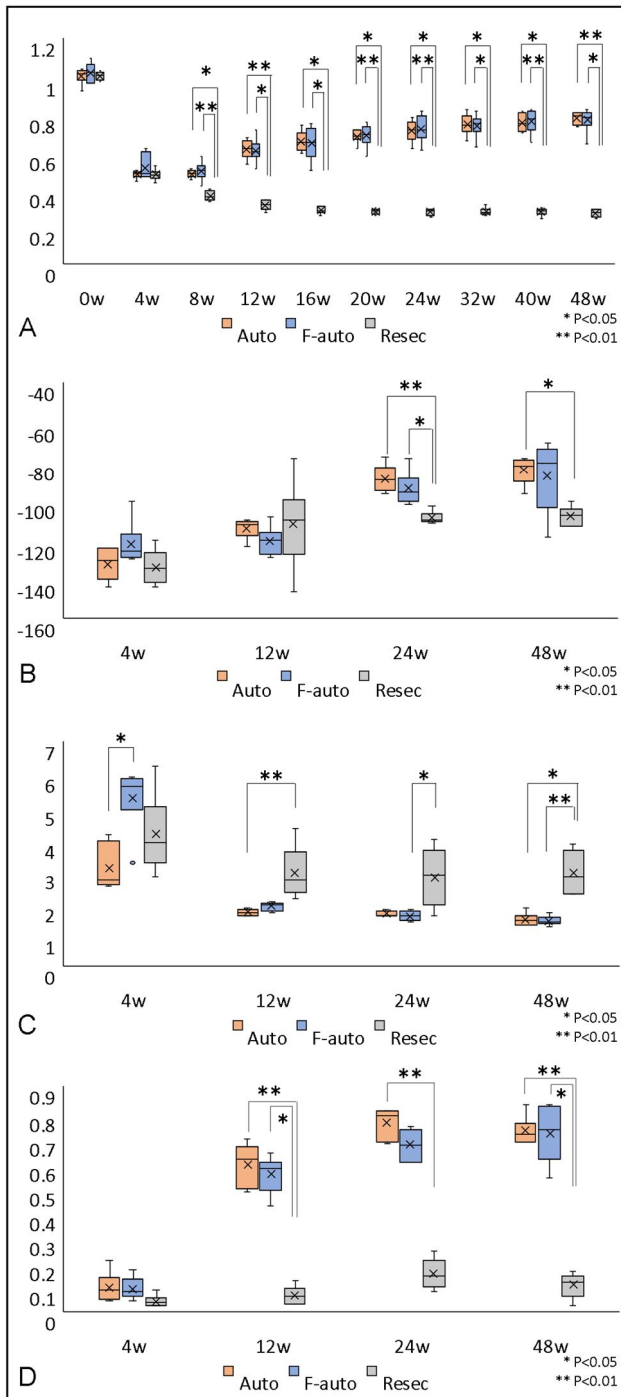


図 1 実験 1 の結果 (SFI 以外は患/健比)
 (A) 下腿筋体積, (B) SFI, (C) 潜時, (D) 振幅

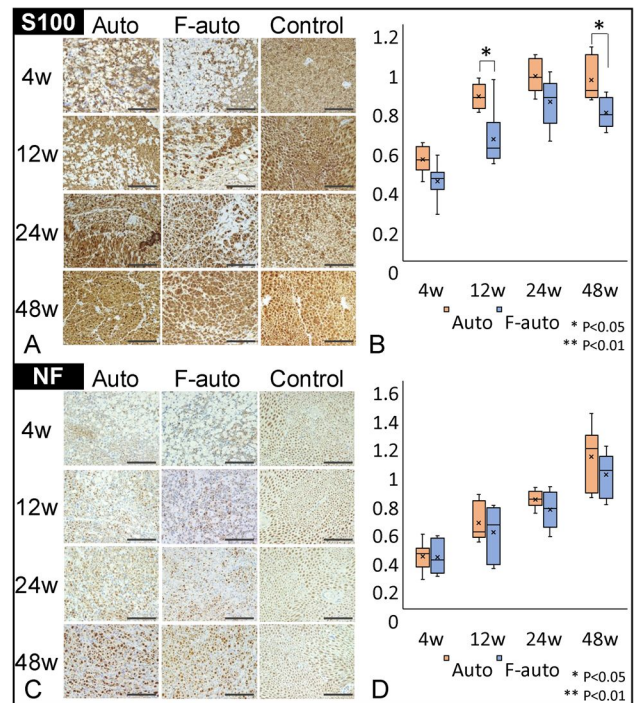


図 2 実験 1 の免疫染色結果 (Control は健側を示す)
 (A, B) S100 染色と染色領域 (患/健比) (Bar=100 μ m), (C, D) NF 染色と染色領域 (患/健比) (Bar=100 μ m)

実験 2 : CT による下腿筋体積 (患/健比) は術後 4 週で減少し, その後改善傾向を示した (図 3A). 潜時 (図 3B), 振幅 (図 3C), SFI (図 3D), 筋線維横断面積 (図 3E), S100 染色領域 (図 3F), NF 染色領域 (図 3G) を示す. SFI, 筋線維横断面積および S100 染色領域は有意な改善を認めたがそれ以外では明らかな有意差は認めなかった. 病理組織学的評価では, 神経再生所見が見られ, 48 週モデルにおいても腫瘍の再発は認めなかった.

【文献】

- 1) Saebye C, et al. Changes in functional outcome and quality of life in soft tissue sarcoma patients within the first year after surgery: A prospective observational study. *Cancers (Basel)* 12:463, 2020
- 2) Martin E, et al. A systematic review of functional outcomes after nerve reconstruction in extremity soft tissue sarcomas: A need for general implementation in the armamentarium. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 73:621-632, 2020
- 3) Tsuchiya H, et al. Reconstruction using an autograft containing tumour treated by liquid nitrogen. *J Bone Joint Surg Br* 87:218-225, 2005
- 4) Yamamoto N, et al. Effects of liquid nitrogen treatment on the proliferation of osteosarcoma and the biomechanical properties of normal bone. *J Orthop Sci* 8:374-380, 2003
- 5) Fuchs B, et al. Sciatic nerve resection in the thigh: a functional evaluation. *Clin Orthop Relat Res* (382):34-41, 2001
- 6) Hohenberger P, et al. Results of surgery and multimodal therapy for patients with soft tissue sarcoma invading to vascular structures. *Cancer* 85:396-408, 1999
- 7) Matsumoto S, et al. "In situ preparation": New surgical procedure indicated for soft-tissue sarcoma of a lower limb in close proximity to major neurovascular structures. *Int J Clin Oncol* 7:51-56, 2002
- 8) Sweiti H, et al. Limb-salvage surgery of soft tissue sarcoma with sciatic nerve involvement. *Sarcoma* 2018:6483579, 2018
- 9) Safa B, et al. Peripheral nerve repair throughout the body with processed nerve allografts: Results from a large multicenter study. *Microsurgery* 40:527-537, 2020
- 10) Hoffmann NE, et al. The cryobiology of cryosurgical injury. *Urology* 60:40-49, 2002

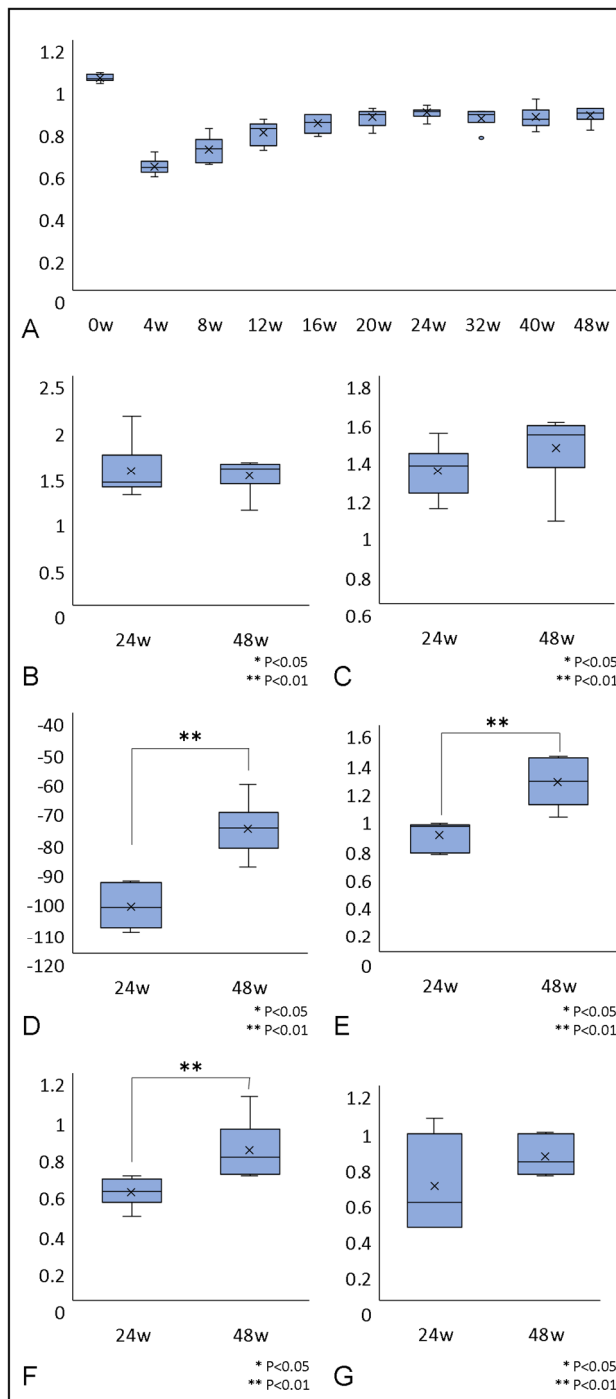


図 3 実験 2 の結果 (SFI 以外は患/健比)

(A) 下腿筋体積, (B) 潜時, (C) 振幅, (D) SFI, (E) 筋線維横断面積, (F) S100 染色領域, (G) NF 染色領域

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米澤宏隆
2. 発表標題 液体窒素処理担癌神経グラフトを用いた新しい末梢神経再建法
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米澤宏隆
2. 発表標題 A novel nerve reconstruction technique using liquid nitrogen-treated tumor-bearing nerve graft
3. 学会等名 第47回日本低温医学会総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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