

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18735

研究課題名（和文）坐骨神経損傷モデルにおける神経再生促進因子を添加した人工神経管の再生能の向上

研究課題名（英文）The effect of artificial nerve conduit with the factor promoting nerve regeneration in a mouse sciatic nerve injury model

研究代表者

中西 隆（Nakanishi, Takashi）

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：80772582

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ヒトの断端神経腫に含まれる神経再生促進因子を添加した人工神経管の神経修復機能の向上を進めていくことであり、中空の内腔構造の人工神経管の更なる機能開発と改善を目指すものである。今回、ヒトの舌神経損傷後に生じた断端神経腫内に多く含まれる神経再生促進因子を特定し、マウスの坐骨神経損傷モデルを用いて神経再生促進を添加した人工神経管で神経修復術を施行したが、実際に神経再生能の向上につなげることはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔領域の手術では舌神経損傷を引き起こすリスクがあり、重度の舌神経損傷が生じたとき、外科的療法が必要となる。それらの症例に対して人工神経管を用いた舌神経修復術を施行するが、予後には強いばらつきが生じる。

そこで、神経再生に関連したタンパク質を含んだ人工神経管を用いてマウスの末梢神経修復術を行うことにより、更なる神経再生機能を有した人工神経管の開発を目指す。その人工神経管の開発からヒトにおける末梢神経修復術の予後改善につなげていく。

研究成果の概要（英文）：This research is to analyze the proteins promoting nerve regeneration contained in human traumatic neuromas, and to promote the improvement of nerve repair function using artificial neural tubes containing these proteins. In other words, we aim to develop and improve the functions of a hollow nerve guidance conduit.

In this study, we identified the five proteins promoting nerve regeneration contained in human traumatic neuromas after lingual nerve injury. Additionally, we performed the nerve repair surgery for the artificial nerve conduit with these proteins in mice sciatic nerve injury model, but it was not possible to actually improve the nerve regeneration function.

研究分野：生体材料学関連

キーワード：舌神経損傷 断端神経腫 末梢神経再生 シュワン細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔領域の手術では舌神経損傷を引き起こすリスクがあり、重度の舌神経損傷が生じたとき、外科的療法が必要となる。それらの症例に対して、全身麻酔下で舌神経を明示したうえで断端神経腫を切除し人工神経管を用いた舌神経修復術を施行する。しかし舌神経修復術の予後改善には強いばらつきが生じるため、人工神経管の更なる機能改善を図り術後の回復を向上させていく必要がある。

損傷した末梢神経の特に中枢側の断端に、紡錘状の断端神経腫が生じ、中枢から乗じる神経再生に関連する因子を含有していることがある。しかし、神経再生の妨げる因子も含有されており、神経修復術の際は切除することが基本である。我々は、舌神経損傷に対して舌神経修復術を施行された患者から採取された断端神経腫の解析を行ってきた。予後の治療回復の良い症例の断端神経腫に着目し、cDNA マイクロアレイを用いて、舌神経修復術後に舌神経感覚の再生に影響を与える因子を解析した。解析の結果、5種類の神経再生に関連するタンパク質を同定することができた。

実際にこの予後回復の良い症例に生じた神経再生に関連する5種類のタンパク質を末梢神経修復術の際に使用する人工神経管に添加することにより、人工神経管内における神経再生機能を向上させ、神経再生修復術の予後回復の向上を目指す。

2. 研究の目的

末梢神経修復術後の神経機能の回復の向上を目指すため、神経修復術の際に用いられる人工神経管の機能改善を行うことが目的である。神経修復術後の予後回復の良い断端神経腫に多く含まれた5種類のタンパク質を人工神経管に添加し、マウスの坐骨神経損傷モデルを用いて坐骨神経の神経修復術を行う。その後、術後長期間経過した後の神経再生機能の向上を評価していくことが目的である。

3. 研究の方法

マウスに腹腔麻酔下で三種混合麻酔を行い、右側の坐骨神経を剖出し5mm切除した後に、両断端を神経再生誘導管で吻合し、14, 28, 42, 56, 70, 84 日後に治療予後を評価する。評価方法は針の太さが20段階に分かれた Semmes-Weinstein Monofilaments を用いて von Frey test とホットプレートを用いた温熱感覚試験を行い、足底の知覚の回復、温熱感覚の回復について解析する。84 日目の足底の知覚の回復を評価後にマウスをイソフルランで速やかに安楽死させ、人工神経管で吻合した部位の坐骨神経を摘出し、標本作成後、顕微鏡で解析する。神経再生誘導管は内径 10mm のリナーブ®(ニプロ株式会社)を 7 mm に切除して用いる。試験に用いる神経再生誘導管は、乾燥した状態で保管され、使用される 20 分前に生理食塩水で復元させる。復元に用いる生理食塩水に特定のタンパク質を添加することでタンパク質を添加した神経再生誘導管として用いる。使用するタンパク質は、cDNA マイクロアレイで同定した5種類タンパク質を用いて、1-5種類のタンパク質をかけ合わせて添加する。また使用するタンパク質は宿主が大腸菌のリコンビナントタンパク質を使用する。

(1), 研究に使用する道具、材料

- ・ マウス (C57BL/6J Kwi : 10 週齢、雄) を使用。
- ・ 同定したタンパク質を使用
- ・ 人工神経管 (リナーブ®): 内径 10mm
- ・ マイクロ用手術器具
 - 縫合糸 (10-0 ナイロン糸、マイクロ持針器、マイクロピンセット)
 - マイクロ持針器
 - マイクロ用ピンセット
- ・ 三種混合麻酔 (ドミトール、ミダゾラム、ベトルファール、生食)
- ・ 拮抗薬: アンチセダン
- ・ Semmes-Weinstein Monofilaments
- ・ 温熱刺激用装置

(2), 評価方法

- ・ von Frey テスト: 太さの違う針を足底部に刺して反応の検査を行う
- ・ Paw flick テスト: 薄いガラス状の板の裏から熱刺激を加え、逃避行動を行うまでの時間を計測する。
- ・ 坐骨神経切除: 12 週後の Anti-S100B, Anti-PGP9.5 抗体を用いて、免疫組織学的検査を行い、神経再生の程度を確認する

(3), 手術方法

マウスをゲージから取り出し、体重を測定する。

マウスに体重 10g あたり 0.1ml の三種混合麻酔を腹腔内投与する。

ゲージに戻して、麻酔が効くまで待つ。

麻酔が奏効していることを確認したらマウスを施術場に移動し、腹臥位に固定。

右臀部から大腿部にかけて除毛クリームを用いて、剃毛する。

右大腿部に 10mm 程度の切開を加え、筋層を剥離し坐骨神経を露出する。

露出した坐骨神経を 5mm 区間切断し、生理食塩水に浸していたリナーブ 7mm を末梢神経と中枢神経に縫合する。末梢・中枢側 2 系ずつ単純縫合する。

筋層と皮膚を縫合し、拮抗薬を注入し、マウスをゲージに戻す。



4 . 研究成果

Von Frey テストや Paw flick テストで術後の機能評価を行ったが、生食で復元した人工神経管とタンパク質を添加した群で有意な差は認められなかった。また、84 日経過したのちの末梢側の坐骨神経を免疫組織学的に染色し、軸索の数や大きさを評価したが、有意な差は認められなかった。今後の課題として、マウスの坐骨神経は補足、10 mm の人工神経管では神経再生過程において、肉芽組織が侵入し、神経再生を妨げることが考えられる。また、1 症例毎に手術が長時間になり、個体数を増やすことが困難であった。今後、ラット等の坐骨神経を用いて、対象を大きくし、再評価していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------