

Title	BRIDGING A 30 MM DEFECT IN THE CANINE ULNAR NERVE USING VESSEL-CONTAINING CONDUITS WITH IMPLANTATION OF BONE MARROW STROMAL CELLS(Abstract_要旨)
Author(s)	Kaizawa, Yukitoshi
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2016-01-25
URL	http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k19398
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士 (医 学)	氏 名	貝 澤 幸 俊
論文題目	BRIDGING A 30 MM DEFECT IN THE CANINE ULNAR NERVE USING VESSEL-CONTAINING CONDUITS WITH IMPLANTATION OF BONE MARROW STROMAL CELLS (骨髄間葉系細胞移植を行った血管含有神経導管によるイヌ尺骨神経 30mm 欠損の再建)		
(論文内容の要旨)			
<p>【背景】ラットを用いた先行研究では、血管含有神経導管に移植した骨髄間葉系細胞はその一部がシュワン細胞様細胞に分化し、神経再生を促進した。本研究では、高等動物においても同様の有用性が確認できるかを検証する目的で、イヌを用いて実験を行った。【対象・方法】ビーグル犬 8 匹(1 歳、雌、体重 10-13kg)を用いた。両側前肢の尺骨神経に 30mm の欠損を作成した。一側では、乳酸とカプロラクトンの重合体からなる生体内分解性導管に、尺骨動脈を含めた血管含有チューブで欠損部を架橋し、ここに腸骨の骨髄穿刺液から作成し、継代・増殖させた自家骨髄間葉系細胞(第 2 継代, 3×10^7 個/本)を移植した(人工神経移植群、以下 C 群、n=8)。対側では、30mm の尺骨神経を切除した後、翻転して縫合した(自家神経移植群、以下 A 群、n=7)。C 群の内の 1 匹には、移植直前に CM-DiI で標識した骨髄間葉系細胞を移植し、術後 8 週で導管内中央部再生神経の横断凍結切片を作成し、S100,GFAP に対する免疫組織染色を行った。1 切片につき 6 視野以上を 10 切片で蛍光顕微鏡下に観察し、CM-DiI 陽性細胞数に対する S-100、GFAP 陽性細胞数の割合を算出した。残りの 7 匹は、術後 12 週で電気生理学的検査を行い、術後 24 週では電気生理学的検査、小指球筋の湿重量測定、組織形態学的評価を行った。電気生理学的検査では、小指球筋で検出した複合筋活動電位の振幅と運動神経の伝導速度を評価した。形態学的評価では、遠位縫合部から 1.5cm 遠位部の再生神経横断面の準超薄切片のトルイジンブルー染色標本から有髄軸索総数と有髄軸索直径を計測した。【結果】術後 8 週の導管内再生神経組織中に CM-DiI 陽性細胞は観察され、そのうち $34 \pm 18\%$ が GFAP 陽性で、$35 \pm 14\%$ は S100 陽性であった。術後 12 週の C 群における振幅と伝導速度は、それぞれ $0.4 \pm 0.4 \text{mV}$ と $18.9 \pm 14.3 \text{m/s}$ で、これらはいずれも A 群($3.2 \pm 2.5 \text{mV}$ と $34.9 \pm 12.1 \text{m/s}$)に対して有意差をもって小さい値であった(いずれも $p < 0.05$)が、術後 24 週では、C 群の振幅と伝導速度($10.9 \pm 7.3 \text{mV}$ と $23.5 \pm 8.7 \text{m/s}$)は A 群($25.3 \pm 20.1 \text{mV}$ と $31.6 \pm 20.0 \text{m/s}$)に及ばない傾向にあったものの、両群間に有意差はなかった(それぞれ $p=0.11$、$p=0.35$)。術後 24 週の C 群と A 群の小指球筋の湿重量はそれぞれ $1.02 \pm 0.40 \text{g}$ と $1.19 \pm 0.26 \text{g}$($p=0.36$)、有髄軸索数はそれぞれ 7032 ± 4188 と 7165 ± 1814($p=0.94$)、軸索直径はそれぞれ $1.73 \pm 0.31 \mu\text{m}$ と $2.09 \pm 0.39 \mu\text{m}$($p=0.09$)であり、これらの再生神経評価パラメータについても C 群は A 群に及ばない傾向があったが、両群間に有意差はなかった。【考察】末梢神経欠損に対する治療は自家神経移植術が一般的であるが、採取部の問題や、採取可能な量に限界があることなどから、代替療法が望まれている。血管茎と骨髄間葉系細胞を含む人工神経移植術は、自家神経移植術には及ばなかったが、高等ほ</p>			

乳動物の 30mm という長距離欠損に対して用いても、良好な神経再生が得られることが分かった。組織再生には、細胞、成長因子、足場の 3 要素が重要だが、血流も神経再生に重要な要素である。導管内に含めた血管茎は、管内の血管新生を促すだけでなく細胞接着や軸索伸長の足場としても機能すると考えられる。骨髄間葉系細胞は神経栄養因子を産出し、シュワン細胞様細胞への分化能を有するとされるが、今回導管内に移植した骨髄間葉系細胞も術後 8 週で約 35%がシュワン細胞様細胞へと分化しており、神経再生に有利に作用したと考えた。本法は、成長因子や足場のさらなる追加により、神経再生がさらに促進される可能性もあり、今後の人工神経開発の足がかりとなるものと考えている。【結論】血管茎を含む生体内分解性導管内に自家骨髄間葉系細胞を移植した人工神経の有用性を高等動物で検証した。本法は自家神経移植術には及ばないが、人工神経開発における有用な基本戦略の一つとなり得ると考えた。

(論文審査の結果の要旨)

本研究では、乳酸とカプロラクトンの重合体からなる中空構造の生体内分解性神経導管内に、血管茎と骨髄間葉系細胞を移植した人工神経導管の臨床応用を考え、その神経再生能を、イヌ尺骨神経 30mm 欠損モデルを用いて、現在の標準治療である自家神経移植術と比較して評価した。人工神経導管で欠損を架橋したところ、術後 24 週で、人工神経導管よりも 15mm 遠位部の組織中に、良好に髄鞘化された有髄軸索神経を多数認めた。一旦萎縮した小指球筋に重量回復が見られ、良好な M 波も同定され、再生した尺骨神経による同筋への神経再支配が生じていることが示唆された。以上より、本人工神経導管は高等哺乳類の混合神経の 30mm 欠損を架橋しても神経再生が得られることが分かった。自家神経移植術との比較においては、電気生理学的評価(複合筋活動電位の振幅、運動神経伝導速度)、組織形態学的評価(有髄軸索神経数、有髄軸索直径)、小指球筋湿重量のいずれの評価パラメータも、人工神経導管で架橋した群は自家神経移植術を行った群には及ばなかったが、両群間に有意差はなかった。また、術後 8 週で、移植した骨髄間葉系細胞の一部はグリア細胞マーカーが陽性であり、人工神経導管内でシュワン細胞様細胞へ分化したことが示唆された。

以上の研究は、血管茎と骨髄間葉系細胞移植を行った人工神経導管の高等動物における神経再生能を解明し、今後の整形外科分野における人工神経導管開発に大きく寄与するものである。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 27 年 11 月 17 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降