

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591661

研究課題名（和文）改良型キトサンナノ繊維管による胸腔内自律神経機能再生に関する実験的臨床的研究

研究課題名（英文）Experimental and Clinical studies of repair of intra-thoracic autonomic nerves using chitosan tubes

研究代表者

松本 勲 (Matsumoto Isao)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：80361989

研究成果の概要（和文）：

ナノテクノロジーを応用して作成したキトサンナノ繊維チューブ（C-tube）による胸腔内自律神経再生効果について検討した。ビーグル犬を使用し、交感神経および横隔神経を切断し、神経の断端をそれぞれ C-tube の両端に縫合した。いずれの犬も合併症なく生存した。術後 1 年で C-tube 内で神経が連結しており、神経障害症状が回復する犬もいた。C-tube は交感神経および横隔神経の形態的再生を促し、神経機能の一部を再生させることを確認した。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the safety and usefulness of chitosan nano/microfiber mesh tubes (C-tube) in regenerating damaged thoracic autonomic nerves. Animal experiments were performed using beagle dogs. The thoracic sympathetic nerve and phrenic nerve were resected and sutured with C-tubes. After surgery, all dogs survived without complication throughout the observational period. At 1 year after surgery, the nerves were connected in C-tube, and in some dogs the symptoms due to each damaged nerve were recovered. C-tubes can be safely used to facilitate the regeneration of damaged sympathetic and phrenic nerves and the restoration of their lost functions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	400,000	120,000	520,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、外科学一般

キーワード：キトサン、神経再生、横隔神経、迷走神経、交感神経

1. 研究開始当初の背景

胸腔内自律神経（交感神経、迷走神経、横隔神経）切除・損傷によって以下のような問題点を生じることが知られている。

【胸部交感神経】

手掌多汗症やレイノー病に対する胸部交感

神経節切除（ETS）は、切除する交感神経の支配領域での発汗抑制や血流増加には非常に有効であるものの、手術の副作用として腹部・大腿などに代償性発汗が生じる。このうち、20-30%の患者では代償性発汗の不快感が深刻で、患者自身の精神的苦痛が甚大であ

る。近年、胸腔鏡手術の導入により本邦でも飛躍的に ETS が行われるようになり、同時に起こる代償性発汗のため、医療訴訟が増加している[1]。この問題は手術数の増加とともに、今後さらに増加していくと考えられる。代償性発汗に対し Telaranta T.らは、腓骨神経を移植する交感神経再生術を行い有効であった症例を報告している[2]。しかしこの方法は、開胸手術であるうえに下肢の神経を摘出するため、新たな神経障害を引き起こすという問題がある。

【迷走神経】

肺癌や食道癌の手術などで迷走神経本幹を損傷すると、咳反射が起きなくなり肺炎の発生を助長するうえ、除脈や消化管運動異常もきたす。また、迷走神経の枝である反回神経の損傷は声帯麻痺を引き起こし、嘔声や誤嚥の原因となり患者の QOL を著しく低下する。現在のところ有効な迷走神経の再生法はなく、声帯固定術などの対処法があるが十分に機能を取り戻すことはできない。

【横隔神経】

心臓手術、呼吸器手術ともに、術中の横隔神経の切除・損傷は術後の呼吸機能を著しく低下させる大きな問題である。横隔膜縫縮などの対処法があるが、手術侵襲は大きくなる。

以上の点で、低侵襲な方法での新たな胸腔内自律神経再生法の開発が望まれている。

一方、キトサンは蟹の甲羅などから抽出され、生体親和性や保湿性が高く創傷被覆材や化粧品に用いられている。近年、ナノテクノロジーの発達によって、蟹から抽出したキトサンをエレクトロスピンング法で管状に構築することが可能となった。このキトサンで構築したナノ繊維管を用いて神経再生へ応用する基礎研究が始まっている[3]。しかし、その研究は坐骨神経などの体性神経で行われておらず、自律神経での検討は未だ成されていない。

(参考文献)

[1]Gossot D, et al.. Long-term results of endoscopic thoracic sympathectomy for upper limb hyperhidrosis. *Ann Thorac Surg.* 2003; 75: 1075-9.

[2]Telaranta T. Reversal surgery for reducing the side effects of ETS. A case report. *Ann Chir Gynaecol.* 2001; 90: 175-6.

[3]Wang W, et al.. Influences of Mechanical Properties and Permeability on Chitosan Nano/microfiber Mesh Tubes as a Scaffold for Nerve Regeneration. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 84: 557-66.

2. 研究の目的

本研究では、キトサンを神経の伸長方向に配向（整列）させた改良型キトサンナノ繊維管（C-tube）を作成し、C-tube を用いた胸腔

内自律神経（交感神経、迷走神経、横隔神経）機能再生に関して、その安全性、有用性を動物実験で確認し、臨床応用を行う。同方法が有用であることが確かめられれば、胸腔内自律神経の切除または損傷後合併症に苦しむ患者の苦痛を低侵襲に軽減することができるだけでなく、新たに自律神経再生メカニズムの解明につながる可能性がある。また、C-tube は食後に廃棄される蟹の甲羅からも作製が可能であり、環境保全にも貢献しうると考える。

3. 研究の方法

①平成 21 年度

(1) C-tube の作成

神経再生チューブとして、蟹から抽出したキトサンからエレクトロスピンング法を用いて、キトサンを神経の伸長方向に配向（整列）させた改良型である C-tube を作成する。

a) 脱アセチル化度 93%のキトサン（北海道曹達株式会社製）をトリフルオロ酢酸で溶解し、塩化メチレンを加え、ろ過してキトサントリフルオロ酢酸液を得る。

b) トリフルオロ酢酸液を噴出してエレクトロスピンング法（電界紡糸）による紡糸運転を行ない、2mm 径のステンレス棒上にキトサンナノ繊維管を得る。

c) この際、繊維管の支柱となるステンレス棒の長軸方向にも磁場をかけ、キトサンを神経の伸長方向に配向（整列）させる。以上の行程で長径 1.8cm、内径 2mm の C-tube を作成する。

(2) 胸部交感神経、迷走神経、横隔神経切除モデルの作成

a) 神経切除モデルの作成

動物はビーグル犬を用いる（n=6）。塩酸ケタミン 10mg/kg および硫酸アトロピン

0.02mg/kg の筋肉内注射により麻酔導入する。

気管内挿管下に臭化パンクロニウム 0.1mg/kg を静脈内注射し非動化した後、人工呼吸器を用いて調節呼吸を行う。維持麻酔としてセボフルランの吸入麻酔を行う。側臥位にて開胸し、胸部交感神経（上肢に線維を送る頸胸神経節）、迷走神経および横隔神経を約 1 cm 切除する。切断された胸部交感神経、迷走神経、横隔神経の頭尾側断端を長径 1.8cm、内径 2mm の C-tube の両側端にナイロン糸で縫合する。

b) C-tube を用いた神経再生術の施行

切断された胸部交感神経、迷走神経、横隔神経の頭尾側断端を長径 1.8cm、内径 2mm の C-tube の両側端にナイロン糸で縫合する。その後、抗生剤を投与し、閉胸後生存させる。

(3) 有茎心膜周囲脂肪織被覆の神経再生促進に対する有用性

神経再生促進法として、組織血流増加と生着促進目的に C-tube 周囲に有茎心膜周囲脂肪

織を被覆しその有用性を検討する。C-tube を有茎心膜周囲脂肪織で被覆する群(被覆群)を作成し、各神経の再生効果を神経の伸長および機能の両面で非被覆群と比較検討する (n=6)

(4) 交感神経、横隔神経再生の評価

● 交感神経の機能評価

代償性発汗は下腹部から大腿に多く、また皮膚の温度測定は交感神経切除の効果を表すと言われ

ており (Eisenach JH, 100:269-76, 2005)、犬の腹部、大腿、手掌の温度をサーモセンサーで測定する。また、ホルネル症候群の変化を観察する。

● 迷走神経の機能評価

咳反射の改善や脈拍数の測定を行う。

● 横隔神経の機能評価

横隔神経を切除すると横隔膜が麻痺し、横隔膜が挙上するため、胸部レントゲン写真で評価する。

以上を手術前、術後直後、術後3か月、術後6か月、術後1年で評価する。

<各神経に共通する神経再生の評価>

術後3か月、術後6か月、術後1年に犬を犠牲死させ、C-tube とその前後の神経を一塊に摘出する。神経伝導検査装置で取り出した神経の神経伝達速度を測定した後、病理学検査を施行する。病理学検査としては通常のH.E.染色だけでなく、神経特有のトルイジンブルー染色も行う。犠牲死の際、C-tube 移植による感染などの変化も観察する。

(5) 各神経再生の評価およびデータの統計解析

②平成22年度

(1) 各神経再生の評価およびデータの統計解析、成果報告

平成20年度と同様の方法で胸部交感神経、迷走神経、横隔神経切除モデルの作成を行い、C-tube による神経再生の評価を行う。動物実験成果の学会報告および論文作成を行う。

③平成23年度

(1) 臨床応用

動物実験の成果をもとに臨床応用を計画し、当院倫理委員会に審査提出する。倫理委員会の承認が得られた後、胸腔内自律神経の損傷に苦しむ患者または手術で胸腔内自律神経の合併切除を行った患者にC-tube を用いた神経再生手術を胸腔鏡手術またはロボット手術で行う。C-tube はオートクレーブ殺菌を行い、患者の同意を得た上で行う。神経再生の評価は動物実験と同様の検査を行い、患者に満足度調査を行う。患者情報は登録し、情報は厳重に管理する。

(2) データの統計解析および論文作成、学会報告

動物実験、臨床試験の成果を含め学会報告および論文作成を行う。

4. 研究成果

ナノテクノロジーを応用して作成したキトサンナノ繊維チューブ (C-tube) の交感神経および横隔神経再生効果について検討した。

【実験1】

【対象と方法】ビーグル犬6頭を使用(交感神経3頭、横隔神経3頭)。右開胸で交感神経および横隔神経を確認のうえ約1cm 切除し、神経の断端をそれぞれC-tube の両端に縫合。<評価法> [交感神経]: 手術前後、犠牲死の際にホルネル症候群を観察。手術前後にサーモメーターを用いて犬の上肢温を測定。[横隔神経]: 術直後と術後1年に、横隔膜の運動性を透視および胸部 Xp で評価。6頭とも犠牲死の際、C-tube と交感神経または横隔神経を一塊に摘出し神経再生や感染を病理学的に評価。【結果】6頭ともに犠牲死まで肺炎や創感染はなく生存。開胸時6頭ともC-tube 周囲に肉芽造生を認めるも、膿瘍形成はなし。[交感神経]: 犬3頭中2頭で、犠牲死の際ホルネル症候群が改善。犬3頭中2頭で、術後に右上肢が左上肢よりも1℃以上の温度上昇を認めたが、このうち1頭は3か月後に左右上肢の温度差がなくなった。術後3か月後に摘出したC-tube 内に索状物が増生し、術後1年ではC-tube 内で神経が連結していた。病理学的には索状物の多くは肉芽組織からなっていたが、その内部には交感神経断端から連続して増生した神経細胞が確認された。[横隔神経]: 右横隔膜は、術直後には3頭とも挙上し運動性はなかったが、1年後には3頭中2頭で呼吸に合わせて頭尾側に運動するようになった。横隔膜の運動性が戻った犬ではC-tube 内で横隔神経が索状物で連結されており、索状物は再生した神経細胞であった。

【実験2】横隔神経モデルで、A群:一重層C-tube (n=4)、B群:二重層C-tube (n=4)、C群:C-tube を用いず神経切断のみ (n=1) の3群に分け、横隔神経再生効果を術後1年で評価した。現在までにA群3頭とC群の評価を行った。C群では術後1年で、横隔膜は挙上し運動性はなく、神経は離断されたままであり、神経伝導検査装置による横隔神経の電気刺激で横隔膜は動かなかった。A群では、術後1年後には3頭ともに呼吸に合わせて横隔神経が頭尾側に、ある程度運動するようになった。C-tube 内の再生組織が太いほど、弱い横隔神経電気刺激で横隔膜が動き、この神経電位図を作成し、神経刺激—横隔膜運動の二相性電位を確認した。

【結語】C-tube は自律神経である交感神経および横隔神経の形態的再生を促し、横隔神経で神経機能の一部を再生させることを確認

した。

胸腔内自律神経として、交感神経、横隔神経、迷走神経を対象として実験を行ったが、迷走神経、交感神経再生の機能評価が動物実験では困難で、横隔神経の実験が主体となった。このため特に迷走神経再生の評価ができなかった。横隔神経、迷走神経の形態的再生については確認されており、すでに学会、論文で報告済みである。また、横隔神経機能再生の評価は病理、画像、神経伝導で行い、機能再生が認められているが、キトサンチューブの植え込みから摘出までを1年として評価したこと、キトサンチューブが一重層が良いか二重層が良いかも評価したことから、十分な症例数が足りていないため期間内に報告ができなかった。以上から、今現在のところ臨床応用に至っていない。

田村 昌也 (Tamura Masaya)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号：10397185
(H21-H22)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Repair of intra-thoracic autonomic nerves using chitosan tubes. Matsumoto I, Kaneko M, Oda M, Watanabe G. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2010; 10 (4): 498-501. (査読有)
DOI:10.1510/icvts.2009.227744

[学会発表] (計1件)

- ① ナノテクノロジーを応用したキトサンナノ繊維チューブによる横隔神経再生効果の検討. 松本 勲. 第110回日本外科学会定期学術集会. 平成22年4月10日. 名古屋市、名古屋国際会議場.

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 勲 (Matsumoto Isao)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号：80361989

(2)研究分担者

小田 誠 (Oda Makoto)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：50224241

渡邊 剛 (Watanabe Go)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：60242492