

I 型コラーゲン充填シリコンチューブを用いた  
ラット反回神経再生モデルの確立（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程  
外科系耳鼻咽喉科学専攻

浅居 僚平

修了年 2019 年

指導教員 大島 猛史

## 【本研究の目的】

本邦では過去 40 年にわたり、甲状腺がんや、咽頭がん、喉頭がんの罹患率が上昇傾向にある[1]。これらの疾患の主要な治療は手術による切除であるが、術後の合併症として反回神経麻痺が大きな問題となっている。反回神経は喉頭運動を行う内喉頭筋を支配する神経であり、これが障害されると半永久的な嗄声や嚥下障害をきたし、QOL は著しく低下する。反回神経麻痺に対しては、これまでに神経吻合術[2]や甲状軟骨形成術[3]など、様々な治療法が考案されているが、いずれも喉頭運動の回復は得られず、確立した治療法はない。喉頭運動の回復が得られる新たな治療法が求められている。本実験ではラットの反回神経を切除した後、I型コラーゲンを充填したシリコンチューブで架橋することで反回神経再生ラットモデルの作出を試みた。

## 【方法】

8 週齢の SD ラット(n=28)を用いて動物実験を行った。左側の反回神経を切除し、I型コラーゲンを充填したシリコンチューブで架橋した。架橋した断端距離により 1mm 群、3mm 群、5mm 群の 3 群(各群 n=8)を作成した。また、コントロールとして同神経の切除のみを行った非架橋群(n=4)も作成した。喉頭運動評価のために喉頭内視鏡検査を処置直後、処置後 5 週、10 週、15 週に行った。また、再生神経の電気生理学的評価として誘発筋電図検査を処置後 15 週に行った。さらに、組織学的評価として、チューブ内再生組織と内喉頭筋を光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて観察した。

## 【結果】

喉頭運動の評価では、1mm 群で 6 頭、3mm 群で 3 頭、5mm 群で 2 頭に喉頭運動の回復が認められた。ただし、最終観察ポイントである術後 15 週において喉頭運動が確認されたものは各群 1 頭ずつのみであった。この結果により、切断した反回神経を 1 型コラーゲン充填シリコンチューブで架橋することにより、一過性でも喉頭運動の回復が得られることがわかった。また、断端間距離は短いほど回復しやすいことが示唆された。誘発筋電図検査では 1mm 群と 3mm 群において誘発電位が測定された。これにより電気生理学的にも反回神経が再生したことが示唆された。チューブ内再生組織の観察では、1mm 群、3mm 群、5mm 群の順で太く再生しており(図 1)、光学顕微鏡および電子顕微鏡による観察にて有髄神経および無髄神経の再生が認められた(図 2)。以上より組織学的にも再生していることが確認された。内喉頭筋の評価では、反回神経に支配される代表的な内喉頭筋である甲状披裂筋の萎縮について検討した。すべての群において処置側は正常側と比較して萎縮が認められたが、萎縮の程度は 1mm 群、3mm 群、5mm 群の順で萎縮の程度は少なかった。反回神経が再生しても喉頭に萎縮は起こるが、架橋する断端距離が短い方が萎縮は抑制されることが示唆された。ただし、組織学的にも、電気生理学的にも神経の再生が確認されたものの、喉頭運動の回復が一過性にとどまる個体が存在しており、原因として後輪状披裂筋の早期回復及びその後の拮抗筋回復や、チューブ素材の問題、内喉頭筋の萎縮の進行の関与が示唆された

## 【考察】

本研究では、I型コラーゲンを充填したシリコンチューブを用いて切断した反回神経を架橋し反回神経の再生を試みた。そして機能的、組織学的な検討を行った。

内視鏡を用いて行った喉頭運動の評価では、架橋群のすべての群において喉頭運動の回復が認められる個体が存在した。これまで、ラットにおいて切断した反回神経を異なるチューブ素材、充填物を用いた神経誘導管で架橋した実験はあるが[4-7]、喉頭運動の回復が認められた報告はない。本実験においてのみ喉頭運動の回復が認められた要因としては、チューブ素材と充填物の差異、評価のタイミングが考えられる。これまでの報告ではチューブ素材としてシリコンの他にPGAやコラーゲンが用いられており、充填物としては中空、または各種栄養因子や細胞、コラーゲンなどが用いられているが、本実験と同一の組み合わせはなかった。我々はI型コラーゲンを充填したシリコンチューブを用いたが、コラーゲンもゲル状の物を用い、使用直前まで37℃で保温するなど神経再生を極力阻害しないよう注意した。最近になり、末梢神経の再生においてコラーゲンが末梢神経の軸索再生を促進することが分子的に解明されており[8]、また使用したコラーゲンがゲル状であることが軸索の伸長において有利に働いたことが考えられる。また、評価のタイミングも本実験では経時的に4点で行ったが、これが一過性の回復を確認できた要因とも考えられる。

誘発筋電図検査では、1mm群と3mm群で活動電位が認められており電気生理学的に反回神経の再生が確認された。ただし、5mm群では活動電位は認められなかった。やはり断端間距離が長いほど神経再生には不利であり、機能的な回復が難しくなると考えられた。また、正常側との比較では、1mm群、3mm群ともに活動電位は小さく、

電位出現までの潜時は延長していた。再生神経では、有髄神経の未熟さもあり、正常側と比べると機能的に劣っていることが示唆された。

チューブ内再生組織の評価では、肉眼的に全ての個体において再生組織の接合が認められており、再生組織の太さは 1mm 群、3mm 群、5mm 群の順で太かった。組織学的な検討では、それぞれ内部に有髄神経および無髄神経が確認され、組織学的にも再生したことが確認された。有髄神経のミエリン鞘の厚さは断端距離が短いほど厚い傾向があった。この結果は、前述の誘発筋電図検査にて断端距離の短いものがより機能的な回復が得られていた結果を支持するものと言える。

内喉頭筋の評価では、反回神経の運動神経線維により支配されている内喉頭筋の状態を組織学的に検討した。反回神経に支配される筋肉術後 15 週における甲状披裂筋は検討した全個体において萎縮が認められていた。また、有意差はないものの 1mm 群、3mm 群、5mm 群の順に萎縮の程度は少ない傾向があった。反回神経切断後のラットにおける甲状披裂筋の萎縮については、kumai ら[9]は 2 週以降で有意に認められたと報告しており、miyamaru ら[10]は、58 週まで観察し、筋全体の断面積は切断 10 週間後には有意に減少したものの、その後は有意な減少は示さなかったとしている。これらの報告における甲状披裂筋の萎縮の程度は、本実験の結果と近似している。今回の結果で、I型コラーゲン充填シリコンチューブによる反回神経再生では甲状披裂筋の萎縮はあまり抑制されないことが分かった。この原因として、再生神経が標的とする甲状披裂筋に到達するまでの時間や、到達する神経繊維数が十分でないことが考えられた。内喉頭筋の萎縮を防ぐためには、より早く、十分な再生神経繊維が筋肉に到達する必要があると考えられた。

今回、喉頭運動を認めた個々の個体を調査した結果、組織学的および電気生理学

的に反回神経が再生されたにも関わらず、喉頭運動の回復が一過性である個体が存在し、特に 1mm 群において多いことが明らかになった。この結果については、以下の三つの要因が考えられる。一つ目は、後輪状披裂筋の早期回復及びその後の拮抗筋回復であり、二つ目がシリコンチューブによる阻血および絞扼、三つ目は内喉頭筋の萎縮の進行である。一つ目に関しては、外転筋である後輪状披裂筋は、内喉頭筋の中で反回神経から出る最初の分岐枝で支配されており [11]、その運動単位には、他の喉頭筋に比べてより多くの筋線維が含まれる [12]。Pitman ら [13] や Nishimoto ら [14] は切断した反回神経を端々吻合した実験において、内転筋である甲状披裂筋と外転筋である後輪状披裂筋の筋電図検査を行っており、甲状披裂筋よりも後輪状披裂筋の方が、早期に神経再支配が生じたことを報告している。そのため、早期の段階である 5 週や 10 週の段階では、後輪状披裂筋の早期神経再支配により喉頭運動が回復し、その後、内転筋群の神経支配が強まるとともに喉頭運動が再び消失した可能性が考えられた。二つ目のシリコンチューブによる阻血および絞扼については、シリコン性のチューブは強度が十分であり周囲からの肉芽の侵入を防ぐ上でメリットがあるが、非吸収性素材であることからチューブ外から血管の侵入が起こらず、チューブ外の電解質や栄養の交通路の確保が難しいとされる [15]。また、本実験において、内径 0.5mm のシリコンチューブを用いたが、1mm 群では 15 週におけるチューブ内再生組織の太さは最大 0.45mm まで成長しており、チューブ内腔がほぼ充満していた。このような状況のため、神経が成長することが逆に神経自身の絞扼という結果となり得ると考えられた。三つ目の内喉頭筋の萎縮の進行に関しては、前述したように 1mm 群、3mm 群、5mm 群の検討したすべての個体において術後 15 週後では甲状披裂筋が萎縮していた。再生した神経線維数が十分でない場合では、神

経再支配が起きても内喉頭筋の萎縮が進行することが示唆されており、早期の段階では喉頭運動が回復しても、その後萎縮が進むことで喉頭運動が困難となった可能性がある。

断裂した反回神経を再生させ、正常に近い喉頭運動の回復を回復させるためには、過誤再生のない反回神経再生、喉頭内筋の萎縮防止が必須である。そのためには、早期の回復を促す栄養因子や細胞、神経の再生を阻害しないチューブ素材、充填物に加えて、過誤再生を阻止する工夫が必要となる。今後の新たな治療法の確立にあたり、このモデルラットは新たな評価系として期待できる。

#### 【まとめ】

反回神経切断ラットに対して、I型コラーゲン充填シリコンチューブで架橋することで反回神経の再生を行い、欠損長1、3、5 mmの反回神経欠損を再生するラット反回神経再生モデルの作出に成功した。これまでに、神経誘導管を用いたラット反回神経再生実験において喉頭運動の回復が得られた報告はなく、本研究は、断端間に欠損距離のあるラットの反回神経において喉頭運動の回復をもたらした初めての報告である。今回、生体内で安定な神経誘導管であるシリコンチューブと、細胞培地としても用いられる I型コラーゲンを用いた実験において、1、3、5mmの断端間距離があっても神経の再生と喉頭運動の回復が得られたことは、今後、神経誘導管の工夫や細胞治療など、再生の新たな治療法を検証していく中で、新たな評価系として期待できる。

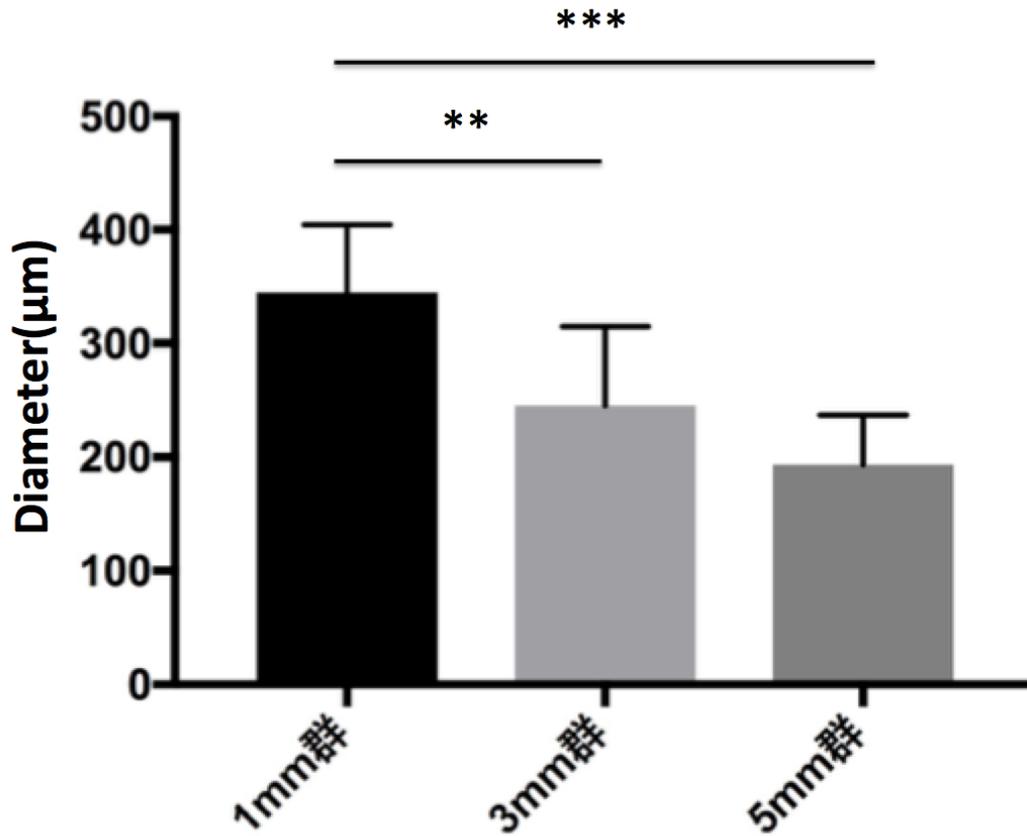


図1 各群のチューブ内再生組織直径の比較

処置後 15 週のチューブ内再生組織の直径を測定し群間比較した。1mm 群は 3mm 群、5mm 群に比べの有意に再生組織の直径が長かった。**\*\***  $p < 0.01$ , **\*\*\***  $p < 0.005$  (one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test)

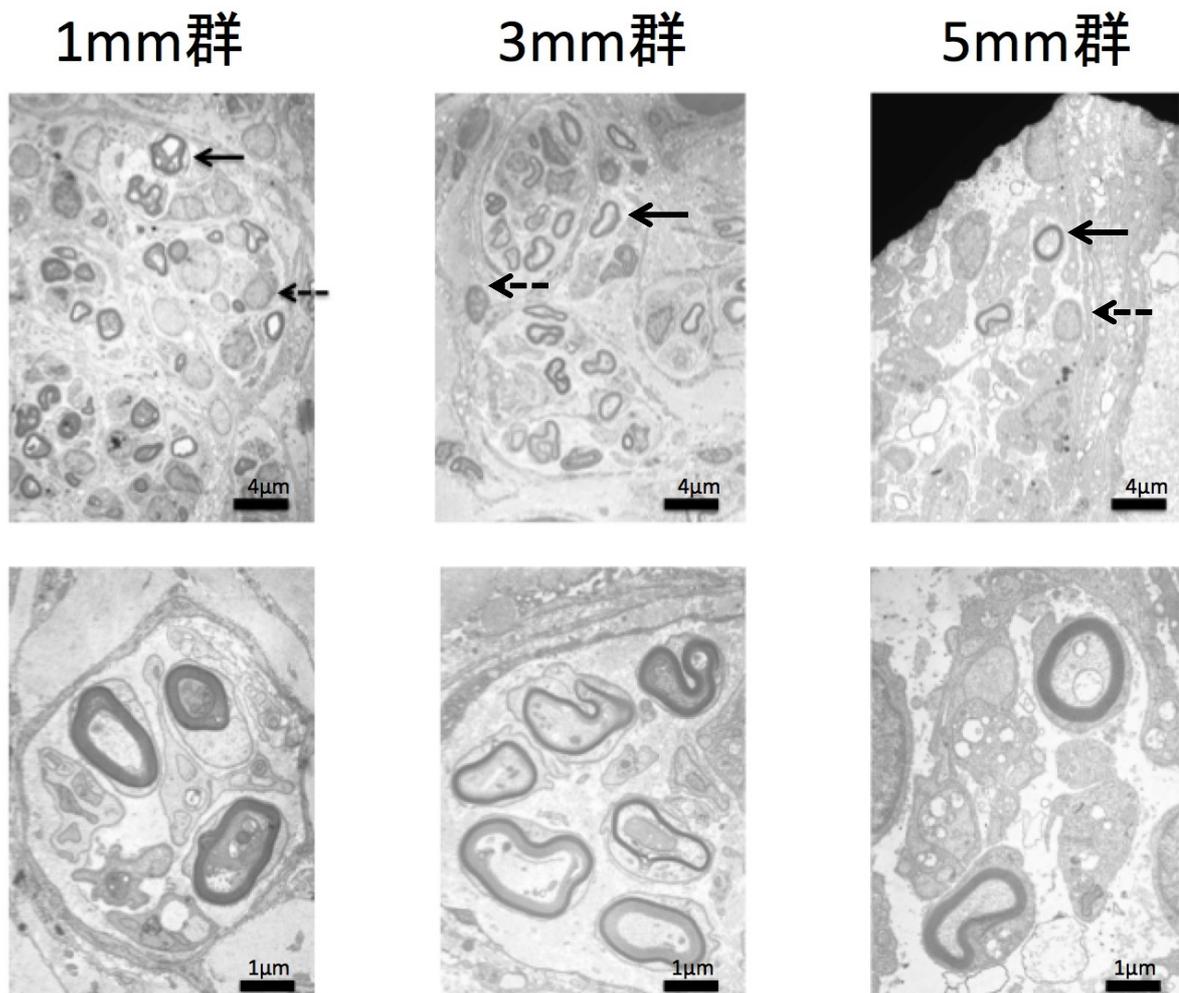


図 2 各群の代表的なチューブ内再生組織の電子顕微鏡像

処置後 15 週のチューブ内再生組織の切片標本を作成し電子顕微鏡で観察した。ミエリン鞘を伴う有髄神経（矢印）およびミエリン鞘を伴わない無髄神経（点線矢印）が確認された。

## 引用文献

1. 国立がん研究センター がん情報サービス 「がん登録・統計」  
[https://ganjoho.jp/reg\\_stat/index.html](https://ganjoho.jp/reg_stat/index.html)
2. Miyauchi A, Inoue H, Tomoda C, Fukushima M, Kihara M, Higashiyama T, Takamura Y, Ito Y, Kobayashi K, Miya A. Improvement in phonation after reconstruction of the recurrent laryngeal nerve in patients with thyroid cancer invading the nerve. *Surgery* 2009; 146: 1056–1062.
3. Isshiki N, Okamura H, Ishikawa T. Thyroplasty type I (lateral compression) for dysphonia due to vocal cord paralysis or atrophy. *Acta Otolaryngol* 1975; 80: 465-473.
4. 小森正博. 反回神経再生に対する神経栄養因子の効果, *耳鼻臨床* 1999; 92:677-686.
5. Kumai Y, Aoyama T, Nishimoto K, Sanuki T, Minoda R, Yumoto E. Recurrent laryngeal nerve regeneration through a silicone tube produces reinnervation without vocal fold mobility in rats. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2013;122:49–53.
6. Suzuki H, Araki K, Matsui T, Tomifuji M, Yamashita T, Kobayashi Y, Shiotani A. Value of a novel PGA-collagen tube on recurrent laryngeal nerve regeneration in a rat model. *The Laryngoscope* 2016, 126, E233–9.
7. Wang B, Yuan J, Chen X, Xu J, Li Y, Dong P. Functional regeneration of the transected recurrent laryngeal nerve using a collagen scaffold loaded with laminin and laminin-binding BDNF and GDNF. *Sci Rep* 2016; 6: 32292.
8. Hisamoto N, Nagamori Y, Shimizu T, Pastuhov S, Matsumoto K. The *c. elegans* discoidin domain receptor DDR-2 modulates the met-like RTK-JNK signaling pathway in axon regeneration. *PLoS Genet* 2016; 12: e1006475.

9. Kumai Y, Ito T, Matsukawa A, Yumoto E. Effects of denervation on neuromuscular junctions in the thyroarytenoid muscle. *Laryngoscope* 2005;115:1869–1872.
10. Miyamaru S, Kumai Y, Ito T, Sanuki T, Yumoto E. Nerve-muscle pedicle implantation facilitates re-innervation of long-term denervated thyroarytenoid muscle in rats. *Acta Otolaryngol*, 2009; 129: 1486-1492.
11. Eller RL, Miller M, Weinstein J, Sataloff RT. The innervation of the posterior cricoarytenoid muscle: exploring clinical possibilities. *J Voice* 2009; 23: 229–34.
12. Woodson GE. Configuration of the glottis in laryngeal paralysis. II: Animal experiments. *Laryngoscope* 1993; 103: 1235-41.
13. Pitman MJ, Weissbrod P, Roark R, Sharma S, Schaefer SD. Electromyographic and histologic evolution of the recurrent laryngeal nerve from transection and anastomosis to mature reinnervation. *Laryngoscope* 2011; 121: 325–31.
14. Nishimoto K, Kumai Y, Yumoto E. Paradoxical movement of rat vocal folds following recurrent laryngeal nerve injury. *Acta Otolaryngol* 2014; 134: 1164–1171.
15. 清水慶彦. 末梢神経の組織工学. 再生医学と組織工学. 一現状と今後の課題 (上田実編). 医歯薬出版 2002: PP.78-82.