

修士論文・特別課題研究論文
論文要旨

研究テーマ：超音波照射が末梢神経圧挫後の神経再生におよぼす影響

学籍番号 0870055

氏名 豊田 慎一

研究指導教員 唐沢延幸 教授

概要

【背景と目的】

臨床経験で末梢神経損傷による軸索損傷患者に関わる機会があり、この疾患に対する超音波 (US) 療法による末梢神経組織修復への作用機序に関しては、療法の温熱効果によるとする報告が多く、物理的特性による効果に付いての報告は少なく、特に形態学的研究は非常に少ない。本研究は、ラットを用い坐骨神経圧挫による損傷モデルを作成し、US 療法 (パルス照射) を熱刺激を除いた条件下で行い、US の物理的特性による神経修復効果について、形態学的観点から解析を行い、臨床の場での応用の手がかりを探ることを目的とした。

【材料と方法】

1. 実験動物：実験動物は 8 週齢の Wister 系ラット 30 匹 (雌雄各 15 匹) を無作為に実験群 (20 匹) と対照群 (10 匹) に分けた。
2. 坐骨神経圧挫モデル作成：ペントバルビタール腹腔内投与 (60 mg/kg) による深麻酔下に、殿筋部を切開し坐骨神経を露出、先端部が平滑なペアンで、徒手的に最大限の圧迫力で 30 秒間圧挫損傷を加えた後、閉創する手術を行った。
3. US 治療群：手術を施行したラットを無作為に 10 匹選択し、1 日 1 回、週 5 回の頻度で、照射時間率 20% (1:5)、周波数 1MHz、強度 1.0W/cm²、治療時間 10 分の条件で 14 日間 (14-t)、28 日間 (28-t) の US 療法 (US-750: 伊藤超短波社) を各 5 匹ずつ実施した。
4. US 非治療群：手術実施後のラットを無作為に 10 匹選択、麻酔による成長不良などの影響を考慮し、14 日間 (14-nt)、28 日間 (28-nt) 麻酔のみを各 5 匹ずつ実施した。
5. 対照群：14 日間 (14-c)、28 日間 (28-c) 同頻度で麻酔のみを各 5 匹ずつ行った。
6. 組織学的検索：US 治療群、US 非治療群とも深麻酔下に圧挫部位を含む坐骨神経を切り出し、4%ホルムアルデヒド液で 1 時間浸漬固定後、2%四酸化オスミウム酸で 12 時間後固定を行い、アルコール系列で脱水、パラフィン包埋した。その後、ユング型マイクロトームを用いて 4 μ m 厚の横断切片 (挫圧部位から 5mm 遠位部) を作成、脱パラフィンし永久標本とし、画像解析により有髄線維数、有髄線維直径を計測した。
7. 免疫組織化学的検索：摘出した坐骨神経を 4%ホルムアルデヒド液で 12 時間固定した後、蔗糖-食塩加リン酸緩衝液で洗浄し、アルコール系列で脱水後、パラフィン包埋し、

マイクロトームを用いて 4 μ m 厚の横断切片（挫圧部位から 5mm 遠位部）を作成，シュワン Schwann 細胞のマーカーである s-100 蛋白抗体（1:500; LSL）で染色，画像解析により Schwann 細胞数を計測した。

8. 統計学的解析：US 治療群、US 非治療群および対照群間で有髄線維数，有髄線維直径，Schwann 細胞数に有意差が有るか否かを Kruskal-Wallis 検定により判定し，有意差を認めた場合，Bonferroni による多重比較検定を行った。なお，すべて有意水準は 5%未満とした。なお，本研究は星城大学研究倫理専門委員会の承認を受けて実施した（承認番号：2008D0001，2009D0001）。

【結果】

1. 有髄線維数

表 1)

14-t	6,314.8 \pm 192.2	28-t	13,005 \pm 676.0**
14-nt	5,060.3 \pm 213.2**	28-nt	7,524.7 \pm 150.0
14-c	6,578.5 \pm 248.1	28-c	7,285.2 \pm 273.6

14-nt 群は、14-t, 14-c 両群と比較し有意に低値を示したが，14-t と 14-c 群間の有意差は認めなかった。一方，28-t 群は，28-nt, 28-c 群と比較し約 57%の増加率と有意差は大きかったが，28-nt と 28-c 群間に有意差は認めなかった。（**：p<0.01）

2. 有髄線維直径（ μ m）

表 2)

14-t	5.1 \pm 1.3**	28-t	5.1 \pm 2.3**
14-nt	4.8 \pm 1.3**	28-nt	5.7 \pm 1.9**
14-c	8.5 \pm 3.5**	28-c	9.6 \pm 3.8**

14 日間, 28 日間とも，US 治療群，非治療群ともに対照群に比べ有意に減少し，治療群と非治療群間の有意差も認めた。（**：p<0.01）

3. Schwann 細胞数

表 3)

14-t	5,881.5 \pm 173.1	28-t	3,922 \pm 124.9**
14-nt	5,830.0 \pm 215.7	28-nt	5,627.5 \pm 526.6
14-c	5,176.3 \pm 556.6	28-c	6,217.0 \pm 176.1

14 日間では，14-t, 14-nt, 14-c すべての群間において有意差を認めなかった。28-t 群では 28-nt, 28-c 両群と比較し，有意に細胞数の減少を認めた。（**：p<0.01）

【考察】

手根管症候群をはじめとする絞扼障害に対する末梢神経障害の治療法として，US 療法は一般的とはいえず，ヒトに対する知見では握力，ピンチ力，潜時，伝導速度などに対する治療効果が報告されているが（Ebenbichler GR. Et al. BMJ. 7316,1998），これ等は温熱効果を含めた結果であり，US 療法の物理的刺激による効果に関しては報告が少ない。本研究は，末梢神経の軸索損傷に対する US 療法で熱刺激を除いた条件下で，物理

的刺激が神経再生におよぼす影響について組織形態学的に解析を行った。有髄線維数は 28-t と 28-nt 群間では大きな有意差が認められ、正常対照群 28-c との間にも大きな差が見られた (表 1)。Raso 等は坐骨神経挫滅後の有髄線維の定量解析で、US 照射群で挫滅部より遠位における神経修復促進や、神経線維密度が増加することを報告しており (J.Neurosci. Metho. 142)、本研究の結果とも一致する。有髄線維数の変化は、線維の直径と連動して考察する必要があるが、本研究で治療群、非治療群とも正常対照に比べ有髄線維の直径が有意に減少していることは (表 2)、大径有髄線維の損傷後の神経再生として小径有髄線維が増加したことを示唆している。今回の坐骨神経圧挫損傷モデルは軸索損傷を主体とした第 2 度障害 axonotomesis 状態で、治療群、非治療群ともに認められる小径神経線維は、Waller 変性後、中枢損傷部より発芽した再生神経と考えられる。神経再生機構については、マクロファージ活動と脈管形成の増加により、神経損傷部の浮腫の軽減を促進し、特定の細胞性および分子応答を調整し、Schwann 細胞による軸索およびミエリン再生を加速するもの (Mourad et al.; Neurosurg. 48, Raso et al. J.Neurosci. Metho. 142) や、US 照射が、新成血管形成を増加させて、損傷部の栄養を改善し、軸索輸送などによる媒体移動を促進し、軸索形質産生を刺激した結果とするもの (Raso et al. J.Neurosci. Metho.142) などが報告されている。神経再生は、Schwann 細胞による髓鞘形成に始まるので坐骨神経圧挫後、US 治療の有無、治療期間による Schwann 細胞の動態を解析した結果 (表 3)、28-t 群では Schwann 細胞数が大きく減数しており 28-nt (および 28-c) との間に大きな有意差が認められた。Crisci 等は電子顕微鏡レベルの超微形態学的研究では、修復軸索形質でミトコンドリアや小胞体が増加することなどを報告している。また、US 治療による刺激で Schwann 細胞の髓鞘形成活動が促進されるが、この活動は髓鞘回復の前に起こることも報告している (Ultrasou. Med. Biol. 28)。本研究の結果は、US 治療により Schwann 細胞による髓鞘形成が 14 日から 28 日迄の間で特に活発になり 28 日では髓鞘形成が一段落し、Schwann 細胞数が減少していることを示唆している。Chang 等によると、超音波から生じる Micro Wave は、乳酸脱水素酵素の蓄積を低下させることで酵素活性を増加させ細胞代謝を修正すると報告している。また、US は Schwann 細胞膜の透過性と選択性の促進と物質移動を亢進させ、栄養元素の吸収を増加させるとも報告している (J. Biomed. Mater Res. 75)。また、Raso 等によると神経管復元に働く細胞は Schwann 細胞であり、US 療法によって活性化されるとも報告している (J.Neurosci. Metho.142)。これらの報告も踏まえ、US 療法では Schwann 細胞が活性化され、神経再生に重要な働きをしていることは疑う余地がない。

【おわりに】

本研究を健康支援 (理学療法の観点) の視点から考察すると、急性の第 2 度障害 axonotomesis を伴う軸索損傷に対し、熱刺激を除いた Micro Wave のみによる物理作用を主体とした US 治療が、神経再生を促進することを強く示唆することを形態学的に立証できたことである。具体的には、28 日間の US 療法の効果が、14 日間の治療に比べて飛躍的に大きくなるのが推測され、ヒトでの治療期間決定の指標となり得ると考える。