

論文の内容の要旨

論文題目 頭頸部領域における G-CSF による筋および神経再生促進効果についての検討

氏名 藤巻 葉子

<背景>

顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor : 以下 G-CSF) には白血球増加作用、造血幹細胞の末梢への動員作用があり、血液疾患や抗がん剤投与後の白血球減少症に対して臨床で使用されている。近年、G-CSF には前述の血球系への作用の他に、心筋細胞増殖効果、血管内皮細胞の遊走、抗線維化作用などもあり、心筋梗塞の治療に有効であると報告されているが、心筋のみならず、骨格筋の細胞増殖効果の研究報告もある。さらには中枢神経保護作用も報告され、脳梗塞、脊髄損傷等、神経疾患への応用研究がなされている。しかし脳と脊髄を除く頭頸部領域の組織への応用はあまり検討されていない。そこで頭頸部領域の筋と神経における G-CSF の組織再生効果の有無を検証した。

<研究 1 : 喉頭筋 (声帯筋) 損傷後の G-CSF による再生促進効果>

【目的】 G-CSF による傷害声帯筋の再生促進効果の有無を検証する。

【方法】 Sprague Dawley (以下 SD) Rat にカルジオトキシン (Cardiotoxin 以下 CTX) を内視鏡下に声帯筋へ注入し、声帯筋傷害ラットを作成した。このモデルを使用して以下の三項目を検証した。

- (1) 声帯筋細胞再生の自然経過 : 筋傷害後、3、5、7、14 日に喉頭組織を採取し HE 染色後、再生筋細胞を観察した。
- (2) G-CSFR の発現 : 一次抗体として抗 G-CSFR 抗体を用いて免疫染色を行った。
- (3) G-CSF の傷害声帯筋細胞再生促進効果 : CTX で声帯筋傷害後、4、6 日目に生理食塩水 60 $\mu\text{l}/\text{kg}$ または G-CSF 製剤 (フィルグラスチム) 60 $\mu\text{l}/\text{kg}$ (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を投与した。以下 4 群、5 匹ずつを作成した。
 - ①生理食塩水を背部皮下注射
 - ②G-CSF 製剤を背部皮下注射
 - ③生理食塩水を内視鏡下に声帯筋注射
 - ④G-CSF 製剤を内視鏡下に声帯筋注射

筋傷害 7 日後に組織採取した。HE 染色後、再生筋細胞 10 個の面積を計測し、その平均値を比較した。4 群で一元配置分散分析を行い、ライアンの方法による多重比較により群間の有意差を判定した。

【結果】

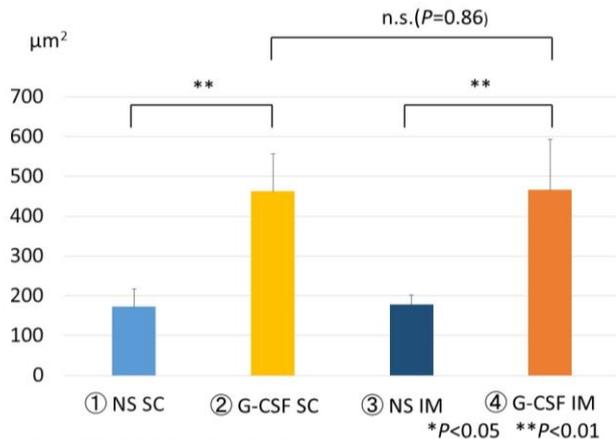


図1:再生筋細胞面積の比較

た ($P < 0.01$)。G-CSF 投与群では、背部皮下注射群②と声帯筋注射群④で再生筋細胞面積に有意差は認められなかった。

【考察】声帯筋の G-CSF による再生促進効果を証明した研究は本研究がはじめてである。今回の実験結果から、声帯筋においても筋細胞再生が認められ、免疫染色により G-CSFR 発現が確認できた。声帯筋傷害7日後の再生筋細胞の大きさは、G-CSF 投与群でコントロール群より有意に大きかった ($P < 0.01$)。以上から G-CSF による筋再生促進効果が示された。投与経路に関しては局所投与（声帯筋注射）では針刺入痕が著明であり、今回のラットを用いた実験では全身投与（背部皮下注射）の方が好ましい印象であった。

<研究2：顔面神経部分切除または切断縫合後の G-CSF による再生促進効果>

【目的】G-CSF による顔面神経再生促進効果の有無を検証する。

【方法】SD Rat を用い、G-CSF 製剤はレノグラスチムを使用した。G-CSF 製剤は半減期が短いため、ドラッグデリバリーシステムである生体内吸収性ゼラチンハイドロゲル (MedGel[®]) を使用した。これは約 2 週間にわたり G-CSF を徐放する。左顔面神経を側頭骨外本管で処置した。顔面神経部分切除群は本管切断部から末梢側を 10mm 切除し、顔面神経切断縫合群は切断直後に神経上膜を端々縫合し、16G プラスチックカニューレ型穿刺針の外筒 1.5mm 長を縦割して縫合部に 3/4 周被せた。5 匹ずつ下記の 6 群を作成した。生理食塩水 ($210 \mu\text{l}/\text{kg}$)、G-CSF ($150 \mu\text{g}/\text{kg} = 210 \mu\text{l}/\text{kg}$ に調整) はゼラチンハイドロゲルに含浸し、背部皮下投与した。

- ① 神経を部分切除し、2、4 週後に生理食塩水を投与
- ② 神経を部分切除し、2、4 週後に G-CSF を投与
- ③ 神経を切断縫合し、2、4 週後に生理食塩水を投与
- ④ 神経を切断縫合し、2、4 週後に G-CSF を投与
- ⑤ 神経を切断縫合し、直後と 2 週後に生理食塩水を投与
- ⑥ 神経を切断縫合し、直後と 2 週後に G-CSF を投与

2, 4, 8, 12 週後に顔の動きの撮影・記録と筋電図検査を施行し、12 週後で顔面組織を採取した。

以下を評価項目とした。

- (1) 顔面の動きの評価：眼瞼・鼻翼・口角・ひげの動き・安静時の対称性の5項目に対し、動かない：0点、左右差なし：3点として4段階評価し、合計の平均値を各群間で比較した。
- (2) 筋電図 振幅測定値：左耳前部を開創し、切除または切断部より中枢側（茎乳突孔付近）に刺激電極を当て、導出マイナス電極は上嘴唇で正中から左側2mmの箇所においた。刺激強度は最大刺激検査（MST）として一律2mAとし、1回の計測につき10回加算し、計5回計測した。振幅の平均値を求め、群間で比較した。
- (3) 筋電図 ENoG値：12週後の筋電図により得られた波形で左右の振幅値を求め、非切断側に対する切断側の振幅値の割合を%で表した数値をENoG値として各群間で比較した。
- (4) 組織学的評価：12週後の顔面神経末梢側（頬枝）の組織にKlüver-Barrera（以下KB）染色を施行し、髄鞘化軸索直径値を計測し、平均値を群間で比較した。また眼輪筋と口輪筋における12週後の筋萎縮回復の様子をHE染色により観察した。

実験から得られた結果は、6群で一元配置分散分析を行い、ライアンの方法による多重比較を行い、群間の有意差を判定した。さらにラットの左顔面神経本管を部分切除し、5日後の顔面神経核と14日後のワーラー変性後の末梢顔面神経におけるG-CSFR発現の有無を確認した。一次抗体として抗G-CSFR抗体を用いて蛍光染色を行った。

【結果】

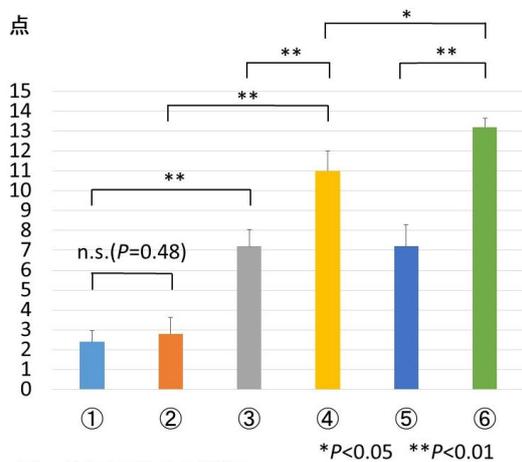


図2：顔面の動きの評価

(1) 顔面の動きの評価 (図2)：G-CSF投与の有無に関わらず、神経部分切除群①②に比べ神経切断縫合群③④で有意にスコア平均値が高かった ($P < 0.01$)。切断縫合群では生理食塩水投与群③⑤に比べG-CSF投与群④⑥で有意にスコア平均値が高かった ($P < 0.01$)。G-CSF投与の時期の比較では処置2週後から投与した群④に比し、処置直後から投与した群⑥で有意にスコア平均値が高かった ($P < 0.01$)。G-CSF投与は早期から開始した方が効果が高いという結果になった。部分切除2群(生理食塩水投与群①とG-CSF投与群②)間には有意差は認めなかった ($p=0.48$)。

(2) 筋電図 振幅測定値の推移 (図3)：12週後の振幅平均値で統計解析を行った。顔面の動きの評価と同様の傾向にあったが、部分切除群でも生理食塩水投与群①に比べG-CSF投与群②で振幅平均値が高く、有意差を認めた ($P < 0.01$)。

(3) 12週後のENoG値の比較 (図4)：部分切除2群(生理食塩水投与群①とG-CSF投与群②)間では有意差を認めなかった ($P = 0.14$) が、他の群間には振幅値と同様の有意差があった ($P < 0.01$)。

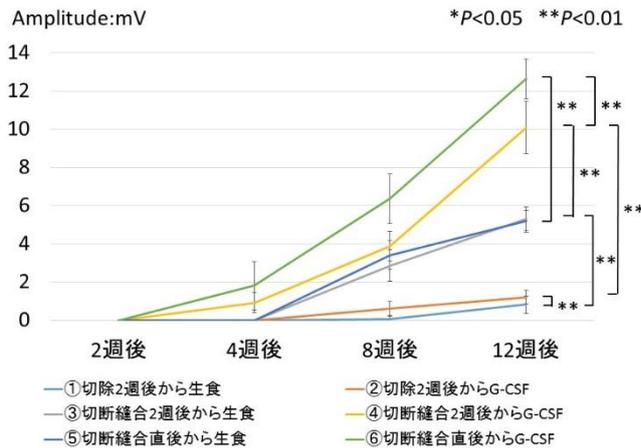


図3: 筋電図 振幅測定値の推移

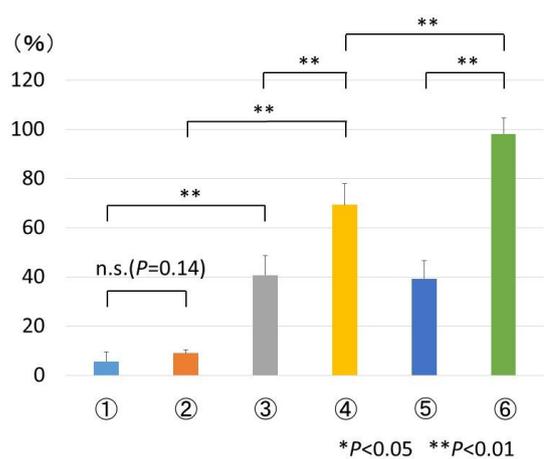


図4: ENoG値 (12週後)

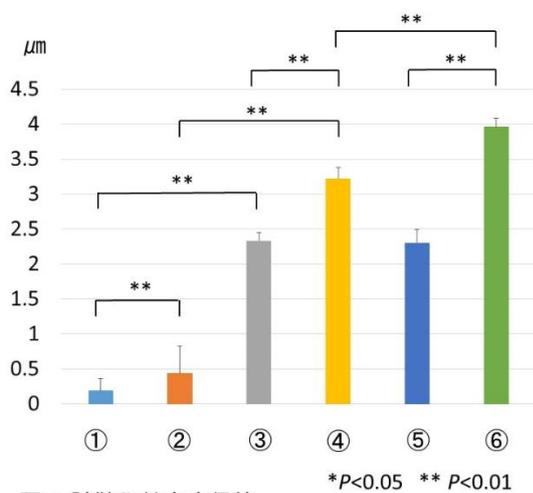


図5: 髄鞘化軸索直径値

(4) 組織学的評価 (図 5): 髄鞘化軸索直径値も振幅値と同様に各群間に有意差を認めた ($P < 0.01$)。各群 12 週後の眼輪筋と口輪筋での筋萎縮回復の程度を HE 染色で観察した結果、部分切除群①②では両筋が著明に萎縮していた。切断縫合群では部分切除群に比べ筋萎縮は軽度で、さらに G-CSF 投与群では、非切断側に近い筋量まで回復していた。左顔面神経本管を部分切除して 5 日後の顔面神経核と 14 日後の末梢顔面神経(頬枝)では、蛍光免疫染色で G-CSFR の発現が切除側において著明であった。

【考察】 顔面神経部分切除群と切断縫合群の比較では、切断縫合群で有意に評価項目における回復が早かった。理由は軸索再生芽の伸長方向が迷いなく決定されるためと推測される。切断縫合 4 群においては G-CSF 投与群がコントロール群に比べ、視診、筋電図、および組織による評価上、有意に回復が早かった。これにより、G-CSF には顔面神経再生促進効果があることが示された。神経機能の回復が早い群では筋肉の回復も早い傾向にあった。G-CSF 投与の時期については、神経切断縫合処置直後から G-CSF を投与した群⑥で最も回復が早かった。さらに 2 週間より投与した群④もコントロール群③に比して有意に回復が早く、投与が多少遅れても神経再生効果が期待できることがわかった。投与経路については、背部皮下注射で G-CSF の効果が確認できた。全身投与で効果が得られるので傷害部位を開創せずとも投与可能であり、発症より数日遅れてから、または追加投与が必要な場合でも同様に低侵襲で投与できる。また神経損傷後の顔面神経核および末梢神経で G-CSFR の発現を認め、顔面神経傷害に対して G-CSF が顔面神経核と末梢神経の双方に作用して効果を及ぼす可能性が示唆された。

本研究により、頭頸部領域において、G-CSF には声帯筋傷害における筋再生促進効果と顔面神経傷害における神経再生促進効果があることが示された。G-CSF はすでに血液疾患などに対し臨床で使用されており、安全性に関しては確認されている薬剤である。本研究で、その効果が示されたことにより、早期の臨床応用が期待できる。