

学位論文

「 Effects of neuropeptides and their local administration to
cutaneous wounds in sensory-impaired areas 」

(知覚障害領域の創傷に対する神経因子局所投与の影響)

指導教授名 内沼 栄樹

申請者氏名 石川 心介

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

<背景>

臨床の場合において糖尿病性足病変や脊髄損傷に伴う褥瘡など知覚障害部位の創傷を診察することが多いが、しばしば難治性であり治療に難渋する。現在では治癒が遅れる原因として神経終末から放出されるべきいくつかの神経因子の欠乏による影響が考えられている。本研究では脱神経部位での皮膚欠損において神経因子の一つである substance P (以下 SP) が創傷治癒に対しどのように影響を与えるか検討した。

<対象・方法>

Sprague-Dawley ラットを用いた。全身麻酔下に背部正中を切開し、片側の Th8~Th13 までの肋間神経を切離して背部皮膚に脱神経領域を作成した。脱神経後 7, 10, 14, 21 日目に背部知覚脱失部から麻酔下に皮膚を採取し、免疫染色により脱神経後 7 日目以降に組織中に SP が存在しないことを確認した。この結果を踏まえて SP が枯渇して作用しない状態での創傷治癒と SP の影響を観察した。

脱神経を行ったラットに対し脱神経後 7 日目に左側の知覚脱失部位に直径 15mm の皮膚全層欠損を作製した。それと対称になるように右側の健常部位にも直径 15mm の皮膚全層欠損創を作製した。

皮膚欠損を作製した翌日から 3 日間、創に生理食塩水を 3ml もしくは SP を 10^{-9} M 局所に投与した。皮膚欠損作製後 3、7、11、14 日に創の面積を計測した。創は知覚障害の有無と、SP 投与の有無で以下の 1 から 4 群に分けて検討した。

- 1 群；健常皮膚に作成した創傷に生理食塩水を投与した群
- 2 群；健常皮膚に作成した創傷に SP を投与した群
- 3 群；脱神経した領域に作成した創傷に生理食塩水を投与した群
- 4 群；脱神経した領域に作成した創傷に SP を投与した群

<結果>

皮膚欠損の治癒過程ではいずれの創も上皮化よりも収縮が著明だった。皮膚欠損作成後 3 日目の時点では、知覚障害のない 1 群と 2 群、及び知覚障害で SP を補充した 4 群は面積比にして約 60 から 70 % に縮小したが、知覚障害のある 3 群では 90 % 前後の面積であり、他に比べ有意差を持って創の収縮率が低い結果となった。

しかし術後 7 日目以降ではいずれの創も有意差無く、皮膚欠損作成後 14 日目にはすべて閉鎖した。

<考察>

神経因子とは、脊髄近傍の後根ガングリオンで産生される神経伝達物質の総称であり、末梢では炎症反応を加速させ創傷治癒に関わる。

本実験では知覚脱失部位に生理食塩水を投与した群は知覚脱失のない創に比べ術後3日目で統計的に有意差をもって創収縮が悪かった。神経因子の欠乏が一因と考えられる。しかし、知覚脱失部位の創にSPを投与した群では創収縮は健常群と同様であり、これは欠乏していたSPを外的に補充することにより炎症反応が惹起され、創傷治癒が回復したと考えられる。

<結論>

知覚障害部位ではSPによる炎症反応の惹起が阻害されるため創傷治癒が遷延する。これに対しSPの局所投与は治癒速度を回復させる。

目次

1.	序論	1
2.	方法	
2-1.	動物	1
2-2.	脱神経	1
2-3.	免疫染色	1
2-4.	皮膚欠損創作成および SP 投与	2
2-5.	統計	2
3.	結果	
3-1.	SP の局在および癒痕量	3
3-2.	創収縮	3
3-3.	癒痕の比較	3
4.	考察	
4-1.	神経因子と創傷治癒	3
4-2.	脱神経による SP 変化	4
4-3.	皮膚欠損創への SP 局所投与	4
5.	総括	5
6.	今後の課題	5
7.	謝辞	5
8.	引用文献	6
9.	業績目録	9
10.	図表	11

1.序論

臨床の場合において糖尿病性足病変や脊髄損傷などによる知覚障害部位は皮膚潰瘍や褥瘡を生じやすい。さらに、それらの創では収縮や上皮化が不良であり種々の治療に抵抗して慢性化する。同様の現象は実験的にも報告されており、我々も過去にラットの背部に作製した脱神経部位の創治癒遷延を報告している¹⁾。知覚障害部位で治癒が遅れる原因として、現在では神経終末から放出されるべき神経因子の欠乏が考えられている。神経因子では substance P (以下 SP), calcitonin gene-related peptide (以下 CGRP), neuropeptide Y(以下 NPY)が創傷の治癒過程に関係していると言われ、特に SP の重要性が報告されている²⁾³⁾。

今回我々は知覚脱失部位での SP の発現を組織学的に検討した。また、知覚脱失部位の皮膚欠損に対する SP の局所投与がどのように影響を及ぼすか実験を行った。

2.材料と方法

2-1.動物

24 匹の male Sprague-Dawley rat (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) を用いた。体重は 200~300g で、遺伝子高次機能解析センターで管理飼育した。手術と処置は全身麻酔下に行い、全行程について北里大学動物実験指針に基づいて実験を行った (No.2010-010)。

2-2.脱神経

ラットに対し midazolam (0.5ml/kg), butorphanol(0.5mg/kg), medetomidine(0.3mg/kg)混合薬を筋肉内に注射し全身麻酔を行った。脱神経の手技は過去の報告の如く¹⁾背部正中の皮膚および皮筋を切開し、左側の傍脊柱筋を剥離して Th8~Th12 まで肋骨を露出した。肋間を剥離し Th8~Th12 まで肋間神経を露出した後、鋭的に切離した (図 1a)。筋肉と皮膚はナイロンで層々縫合し閉創し、覚醒後 pin-prick で知覚脱失の範囲を確認した。

2-3.免疫染色

脱神経後 7, 10, 14 日目に 8 匹のラットの背部知覚脱失部から全身麻酔下に皮膚を採取した。採取した組織は 10%ホルマリン液で固定し、24 時

間後にパラフィン包埋した。それらを $4\mu\text{m}$ に薄切し、切片のうち数枚は形態確認のため HE 染色を行った。他の切片は SP の局在を確認するために peroxidase-labelled-dextranpolymer anti rabbit goat antiserum(Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan)で免疫染色を行った。一次抗体は rabbit polyclonal antibody to SP(1:8000, Enzo, NY, USA)を用いて過去の報告の如く行った⁴⁾⁵⁾。

2-4.創面積計算

16 匹のラットに対し脱神経後 7 日目に背部左側の知覚脱失部位に直径 15mm の皮膚全層欠損を作製した。それと対称になるように右側の健常部位にも直径 15mm の皮膚全層欠損創を作製した(図 1b)。皮膚欠損創は湿潤環境を保つためポリエチレンフィルム (Tegaderm, 3M, MN, USA) で被覆した。

皮膚欠損作製翌日から 3 日間, SP を 10^{-9}M もしくは生理食塩水を 1ml シリンジと 27G 注射針を用いてフィルムを穿刺して投与した。2 つの群はコントロールとして生理食塩水を 0.3ml 投与し (コントロール群), 別の 2 つの群は SP を 0.3ml の生理食塩水で溶解し投与した (SP 投与群)。

知覚の有無と SP の投与の有無により皮膚欠損を以下の 4 群にわけて面積を算定した。

- 1 群：健常知覚の創に生理食塩水投与
- 2 群：健常知覚の創に SP 投与
- 3 群：知覚脱失部の創に生理食塩水投与
- 4 群：知覚脱失部の創に SP 投与

皮膚欠損作成後 3, 7, 11, 14 日目に皮膚欠損創の写真を撮影した。創面積は解析ソフト (Adobe Photoshop CS4, Adobe System Inc., CA, USA) を用いて計測し, 経時的な総面積の変化を百分率で表した。

2-5.統計解析

データは平均値 \pm 標準偏差で表した。4 群の比較は Kruskal Wallis H-test を用い p 値 0.05 以下を有意差ありと判定した。

3.結果

3-1.SPの局在及び癒痕の厚さ

健常皮膚では真皮内および皮下組織内の神経線維中の SP が染まっていた(図 2a,b)。しかし脱神経後 7 日目以降, SP 陽性神経線維は認められなかった(図 2c,d,e)。HE 染色では健常部と脱神経部で皮膚及び皮下組織の構造に明らかな差異は認めなかった。皮膚欠損作成後 14 日目の癒痕の厚さは健常側では $1171.2 \pm 268.2 \mu\text{m}$ (n=6) で脱神経側では $1392.2 \pm 386.4 \mu\text{m}$ (n=6) であり有意差は認めなかった。

3-2.創閉鎖

いずれの創も肉眼的には大差なく, 上皮化よりも収縮が著明だった(図 3)。

皮膚欠損作成後 3 日目では 1, 2, 4 群の創面積は約 70% 以下に縮小していたが, 3 群では約 84.9% であり他群に比べ総面積は有意に大きかった (図 3, 表 1)。

術後 7 日目以降ではいずれの創面積も有意差無く, 皮膚欠損作成後 14 日目にはすべて閉鎖した。

3-3.癒痕の比較

HE 染色ではいずれの群も癒痕組織や皮下組織に差を認めなかった。

4.考察

4-1.神経因子と創傷治癒

知覚障害部位の創傷治癒はしばしば難治であり, 脊髓損傷患者や糖尿病患者などでの治癒遷延についてはこれまでも報告がされている⁶⁾⁷⁾。現在では知覚障害モデルを用いての収縮や上皮化, 抗張力の動物実験により, こうした治癒の遅れは神経因子の欠乏がひとつの原因と言われている¹⁾³⁾⁸⁻¹¹⁾。

神経因子とは, 脊髓近傍の後根ガングリオンで産生される神経伝達物質の総称であり末梢で感知した痛みを脊髓へ伝える他, 末梢での炎症惹起や細胞増殖にも関与している¹²⁾¹³⁾。通常, 神経終末に外傷などにより痛み刺激が加わると, 中枢へ痛みの信号が伝達されると同時に, 軸索反射によって神経終末から神経因子が組織中に放出される。放出された神経因子は肥満細胞に作用し, ヒスタミン遊離を促し, 末梢血管の拡張, 透過性亢進を介して炎症反

応を加速させ創傷治癒に関わる¹²⁾。しかし、末梢神経が障害されると神経因子の放出が起こらず、炎症反応が加速されない。このため創傷治癒に遅れが認められると考えられている。

4-2. 脱神経による SP の変化

これまで種々の神経因子が確認されているが、我々の中でも炎症惹起能力の高い SP に注目し、知覚障害部に補充することで創傷治癒が回復するか実験を行なった。SP は培養線維芽細胞での増殖促進能を有し¹⁴⁻¹⁶⁾、CGRP と共に血管透過性の亢進、血流増加作用をもつ¹⁷⁻¹⁹⁾。

神経切離以外にもカプサイシンを用いた化学的な脱神経も報告されている²⁰⁾が、我々は Camingdat ら²¹⁾の方法に倣い Th10 から Th12 の脊髄後根神経を切離することにより脊髄後根ガングリオンから末梢への SP の軸索輸送を阻害した。脱神経直後は末梢に貯蓄された SP が実験に影響する可能性を考え、免疫染色で SP が枯渇する時期を確認した。その結果脱神経してから 7 日目以降は末梢には SP は存在せず、以後少なくとも 21 日目までは周囲からの神経の再支配などで SP が出現しないことも確認した。

4-3. 皮膚欠損創への SP 局所投与

以上の結果をふまえ、ラットの背部片側に知覚脱失部位を作製し Fukai ら¹⁾の報告の如く左右対称に皮膚全層欠損創を作製し、SP の局所投与の影響を調べた。

SP は容量依存性に創傷治癒に影響するとされているが^{22, 23)}、我々が切除した皮膚は約 300mg であり、Scott らによると同量の組織中に含まれる SP は 509pg とされる²⁴⁾。また、Gibran らは、糖尿病において SP は 10^{-9} M の濃度で効果を表すと報告しており²²⁾、我々もそれに倣い同量の SP を局所投与した。

また、SP は炎症の初期に作用すると言われており^{22, 24)}、Chin らは皮膚のストレッチモデルで神経因子の増加を報告している³⁾。そのため我々も、皮膚欠損作成後 3 日間の SP 投与を行った。

その結果、知覚脱失部位に生理食塩水を投与したグループ 3 で創の収縮が遅れたがこの原因の一つは神経因子の欠損が考えられ、Dunnick¹⁰⁾や Lai¹¹⁾らの報告と一致する。また、知覚障害部位の創に SP を投与することにより

健常部位の創と同等の治癒を示したが、これは欠乏していた SP を補充することにより炎症反応が惹起され、創傷治癒が回復したと考えられる。

脱神経部位でも術後 7 日目には創の収縮と上皮化が進行し、他の群と創の面積が大差なくなった。これについては炎症期以降放出される様々な因子により創の収縮が促進された可能性がある。また、知覚健常部位の創に SP を投与しても創傷治癒は促進されなかった。これは SP には至適投与量があり、ある一定量を超えて投与しても治癒促進効果は望めないためとも考えられる。

5.総括

神経切離によって得られた知覚脱失部位では SP の放出が認められなかった。このため炎症反応が惹起されず、初期の創傷治癒が遷延した。しかし、SP の局所投与により健常と同等の治癒速度を示した。これらより、SP は創傷治癒の初期段階で治癒を促進する効果があると考えられる。

6.今後の課題

本実験では炎症の初期段階の 3 日間のみ SP を投与したが、それ以後の継続投与が与える影響および投与量の検討が必要と考えられる。

7.謝辞

本研究は文部省科学研究補助金基盤(C) (22592001)の助成を受けて行ったものである。

本研究には北里大学医学部病態・診療形 曾根由美子様の多大な貢献があった事を特記し心から感謝を申し上げます。

北里大学医学部形成外科・美容外科 内沼栄樹先生・武田啓先生のあたたかいご指導、同医局員の各先生方のご協力を賜って本研究が行えた事を深謝し心から感謝を申し上げます。

8.引用文献

- [1]Fukai T, Takeda A,Uchinuma E : Wound healing in denervated rat skin. *Wound Rep Reg* 2005; 13:175-80.
- [2] Tanabe T, Otani H, Bao L, Mikami Y, Yasukura T, Ninomiya T, et al : Intracellular signaling pathway of substance P-induced superoxide production in human neutrophils. *Eur J Pharmacol* 1996; 299: 187-95.
- [3]Chin MS, Lancerotto L, Helm DL, Dastouri P, Prsa MJ, Ottensmeyer M, et al : Analysis of neuropeptides in stretched skin. *Plast Reconstr Surg* 2009; 124: 102-13.
- [4]Akimoto M, Kameda Y, Arai Y, Miura M, Nishimaki T, Takeda A, et al : Hes1 is required for the development of craniofacial structures derived from ectomesenchymal neural crest cells. *J Craniofac Surg* 2010; 21: 1443-9.
- [5]Akimoto M, Nishimaki T, Arai Y, Uchinuma E, Yamauchi H, Kameda Y : Hes1 regulates formations of the hypophyseal pars tuberalis and the hypothalamus. *Cell Tissue Res* 2010; 340: 509-21.
- [6]Localio SA, Lowman WE, Gibson J : Wound healing in the paraplegic patient. *Surgery* 1958; 44: 625–6.
- [7]Basson MD, Burney RE : Defective wound healing in patients with paraplegia and quadriplegia. *Surg Gynecol Obstet* 1982; 155: 9–13.
- [8]Canimdat E, Demirkan F, Ayhan S : Delayed effect of denervation on wound contraction in rat skin. *Plast Reconstr Surg* 1995;98:1063–7.
- [9]Stelnicki EJ, Doolabh V, Lee S, Levis C, Baumann FG, Longaker MT, et al : Nerve dependency in scarless fetal wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2000;105: 140-7.
- [10]Dunnick CA, Gibran NS, Heimbach DM : Substance P has a role in neurogenic

mediation of human burn wound healing. J Burn Care Rehabil 1996; 17: 390–6.

[11]Lai X, Wang Z, Wei L, Wang L : Effect of substance P released from peripheral nerve ending on endogenous expression of epidermal growth factor and its receptor in wound healing. Chin J Traumatol 2002; 5: 176-9.

[12]Manxi L, Warn JD, Qin F, Smith PG : Relationships between nerves and myofibroblasts during cutaneous wound healing in the developing rat. Cell Tissue Res 1999; 297: 423-433.

[13]Chen J, Wang J, Zhuang H : Double-edged effects of neuropeptide substance P on repair of cutaneous trauma. Wound Repair Regen 2010; 18: 319-324.

[14]Schäffer M, Beiter T, Becker HD, Hunt TK.: Neuropeptides: mediators of inflammation and tissue repair? Arch Surg 1998; 133: 1107-16.

[15]Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Geppetti P, Alessandri G, Maggi CA : Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. Microvasc Res 1990; 40: 264-78.

[16]Nilsson J, von Euler AM, Dalsgaard CJ : Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. Nature 1985; 315: 61-3.

[17]Kahler CM, Reinisch N, Wiederman CJ : Interaction of SP with epidermal growth factor and fibroblast growth factor in cyclooxygenase-dependent proliferation of human skin fibroblasts. J Cell Physiol 1996; 166: 601-8.

[18]Brain SD, Williams TJ : Inflammatory edema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide and mediators of increased vascular permeability. Br J Pharmacol 1985; 86: 855-60.

[19]Gamse R, Saria A : Potentiation of tachykinin induced plasma protein extravasation by calcitonin gene-related peptide. Eur J Pharmacol 1985; 114: 61-66.

- [20]Green PG, Basbaum AI, Levine JD : Sensory neuropeptide interactions in the production of plasma extravasation in the rat. *Neuroscience* 1992; 50: 745-9,.
- [21]Wallengren J, Chen D, Sundler F : Neuropeptide-containing C-fibres and wound healing in rat skin. Neither capsaicin nor peripheral neurotomy affect the rate of healing *Br J Dermatol* 1999; 140:400-8.
- [22]Gibran NS, Jang YC, Isik FF, Greenhalgh DG, Muffley LA, Underwood RA, et al : Diminished neuropeptide levels contribute to the impaired cutaneous healing response associated with diabetes mellitus. *J Surg Res* 2002; 108: 122– 8.
- [23]Steyaert AE, Burssens PJ, Vercruysse CW, Vanderstraeten GG, Verbeeck RM : The effects of substance P on the biomechanic properties of ruptured Achilles's tendon. *Arch Phys Med Rehabil* 2006; 87: 254-8.
- [24]Scott JR, Tamura RN, Muangman P, Isik FF, Xie C, Gibran NS : Topical substance P increase inflammatory cell density in genetically diabetic murine wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 529-33.

9.業績目録

(I) 原 著

1. Ishikawa S., Takeda A., Akimoto M., Kounoike N., Uchinuma E., Uezono Y., :Effects of neuropeptides and their local administration to cutaneous wounds in sensory-impaired areas. J Plast Surg Hand Surg、(in press)
2. 柴田知義、武田啓、石川心介、秋本峰克、内沼栄樹：北里大学病院形成外科における35年間の乳房外 Paget 病の統計. 日本形成外科学会会誌、33(7):513-518、2013
3. 熊澤憲一、根本充、秋本峰克、石川心介、内沼栄樹：手指・手関節に発症したガングリオン摘出術後再発例の検討. 日本手外科学会雑誌、28(4):401-405、2012
4. 根本充、青柳和也、柏木慎也、秋本峰克、石川心介、熊澤憲一、内沼 栄樹：重度四肢開放骨折に対する free flap を用いた早期再建. 創傷 1(2):74-80、2010
5. 根本充、秋本峰克、石川心介、青柳和也、杉本孝之：上肢電撃傷の臨床的検討. 日本手の外科学会雑誌. 24(6):1191-1195、2008

(II) 著 書

な し

(III) 総説・講座

な し

(IV) 症例・臨床治験・その他

1. 石川心介、山田直人、柴田知義、内沼栄樹：神経線維腫内の大量出血に対し上腕動脈の結紮を要したレックリングハウゼン病の1例. 日本形成外科学会会誌、33(8):610-614、2013
2. 吉竹俊裕、根本充、永島和貴、新美裕太、氷見和巳、上原理恵、石川心介、内沼栄樹：皮膚筋炎に合併した肘部難治性皮膚潰瘍の1例. 形成外科、55(12):1375-1379、2012
3. 石黒匡史、松尾あおい、永島和貴、石川心介、武田啓、内沼栄樹：洗浄剤による足背部アルカリ損傷の1例. 産業医学ジャーナル、34(3):28-31、2011

4. 石川心介、根本充、秋本峰克、相馬一亥、内沼栄樹：持続する意識障害を伴った熱傷患者の 1 例. 熱傷、35(1)：38-42、2009

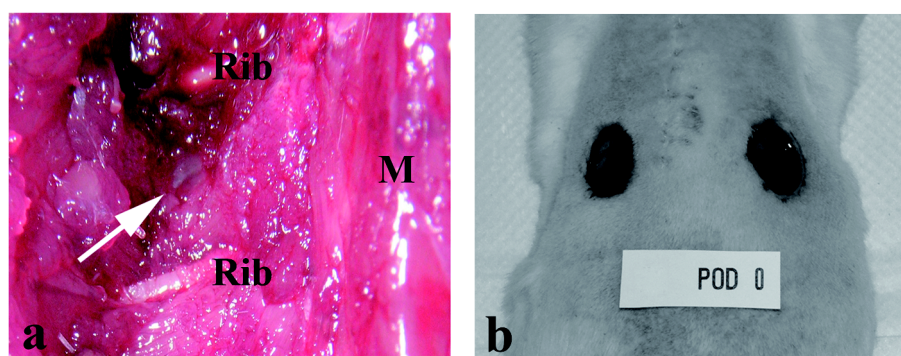


図 1 .

(a) 肋間神経の剖出 (M:某脊柱筋、矢印:肋間神経)

(b) ラット背部の知覚脱失部の皮膚全層欠損 (左側) および知覚健常部の皮膚全層欠損 (右側)

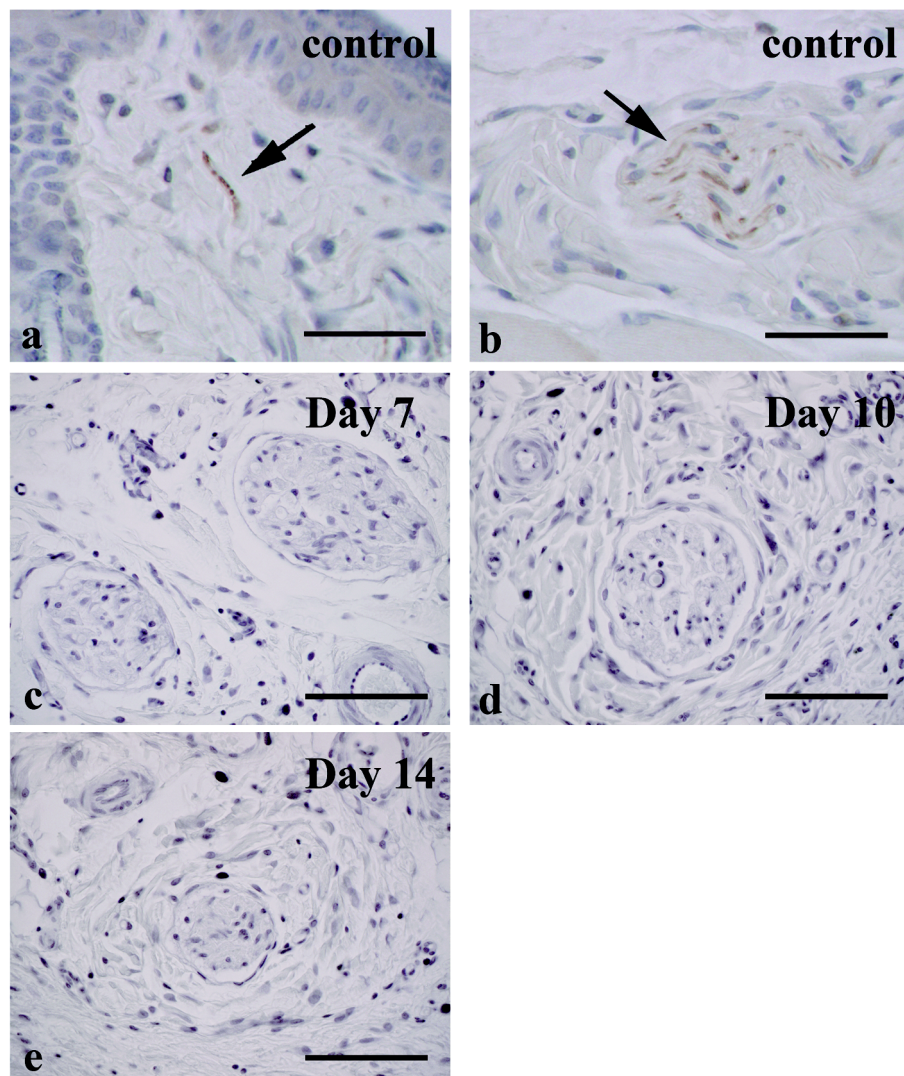


図2 SPの免疫染色

コントロールでは真皮内神経線維 (a, 矢印) および皮下の神経線維 (b, 矢印) の中の SP が染色されている。(bar=200 μ m)

知覚脱失部では7日目(c)、10日目(d)、14日目(e)のいずれも SP は染色されない。(bar=100 μ m)

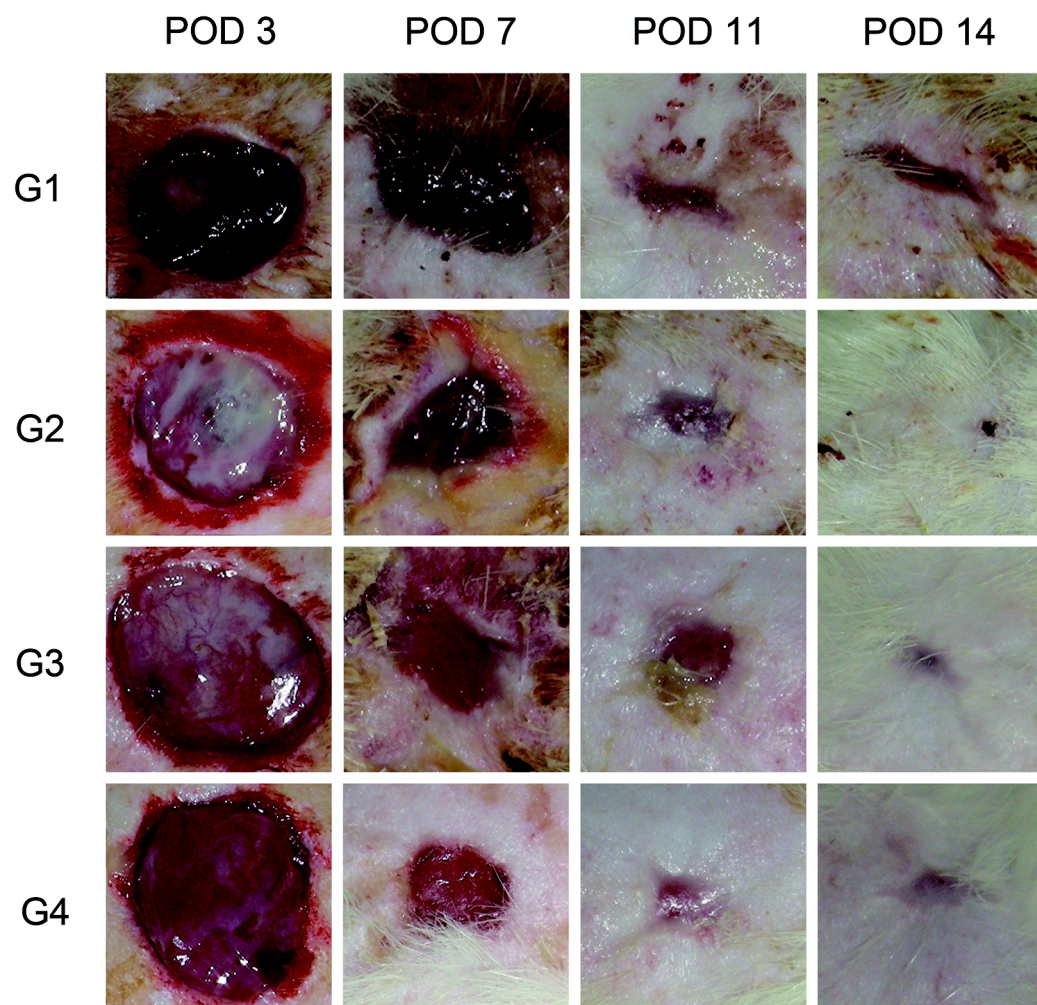


図3 皮膚全層欠損創の経時的変化

G1：健常知覚の創に生理食塩水投与

G2：健常知覚の創に SP 投与

G3：知覚脱失部の創に生理食塩水投与

G4：知覚脱失部の創に SP 投与

表 1 經時的創面積 (%)

Group	POD3	POD7	POD11
G1:健常知覚—生理食塩水	61.8 ± 6.6	23.1 ± 9.5	1.5 ± 2.7
G2: 健常知覚—SP	65.6 ± 9.6	24.9 ± 11.0	3.1 ± 3.7
G3: 知覚脱失—生理食塩水	84.9 ± 17.3 *	25.0 ± 10.7	4.2 ± 2.4
G4: 知覚脱失—SP	70.3 ± 9.2	24.6 ± 3.9	4.5 ± 2.6

The mean ± standard deviation of eight excisional wound surface area is shown.

* $p < 0.05$