

機関番号：14501

研究種目：基盤（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390456

研究課題名（和文） 脱細胞化神経をバイオスキャフォールドとする
新しいハイブリッド型人工神経の開発研究課題名（英文） Development of a novel hybrid-acellular nerve graft using hypertonic
sodium chloride solution

研究代表者 寺師 浩人（TERASHI HIROTO）

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：80217421

研究成果の概要（和文）：

我々は高張電解質溶液を用いた新しい脱細胞化方法を確立した。本方法を用いて神経を脱細胞化したものを組織学的に評価したところ、高い効率で脱細胞化が見られたが、細胞外マトリクスの破壊は軽度であった。これを実験動物に移植したのちに2ヶ月後に採取し、組織学的検討を行ったところ、シュワン細胞の浸潤をみとめ、また軸索の再生を認めた。再生軸索は有髄線維であった。本方法により確立された脱細胞化神経は有用な神経再生の足場となること明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We developed novel decellularizing method using hypertonic sodium chloride solution. The histological evaluation for acellularization was performed by HE staining, immunostaining and electron microscope images. The acellular nerve was also transplanted to rats and evaluated histologically. The cells were washed out completely and extracellular matrix was maintained. Two months after the transplantation, Schwann cells thrust into the graft and neurofilament was running through the graft. This acellular nerve presents a useful scaffold for peripheral nerve regeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：神経、再生、バイオマテリアル

1. 研究開始当初の背景

近年、自家神経移植による神経交叉を利用した神経再生・再構築の有用性が報告されており、末梢神経外科におけるブレイクスルーになり得るものとして期待されている。申請者らは、顔面神経と舌下神経の再生と再

構築の基礎的、臨床的研究を開始し、ラットモデルにおいて初めて順行性神経トレーサーによる神経回路解析に成功した。

古典的な神経移植による神経再建や神経交叉は自家神経を用いるため、採取される神経の機能喪失が宿命的な問題である。また、

すべての症例において理想的な口径と長さの神経を採取することは実際には困難である。これらの問題点を克服する目的で、30年以上にわたり人工神経の開発が行われてきた。最近の知見では、組織学的な互換性、吸収性、膜の透過性、細胞を保持できるマトリックスなどが効率的な神経再生に必須と考えられ、これらを兼ね備えた人工神経の開発が試みられているが、わずか数cmの欠損にしか用いることができない。その主因として、基底膜を始めとする本来生体が持つ3次元構造の欠如が考えられる。一方、同種神経を化学処理して無細胞化したものを代替神経とする試みもなされている。本法は抗原性を除去できるうえ、基底膜やマトリックスの3次元構造をある程度保持することができる。しかし界面活性剤を用いるため、材料内への化学物質の残存による細胞増殖への影響、基底膜やスキャフォールドを構成するタンパク質の変性と構造破壊が最大の欠点である。

脱細胞化の効率と細胞外マトリックスの温存とは相反するのが現状であった。このバランスの改善により、さらに高い神経再生効率が期待される。

2. 研究の目的

- ① 新しい組織脱細胞化法の確立
- ② 新規脱細胞化神経の評価
 1. 組織学的検討
 2. 動物モデルによる移植実験
- ③ 細胞導入型脱細胞化神経グラフトの開発

3. 研究の方法

- ① **実験動物**
wistar系ラット(メス BW=260g)を用いた。実験動物の麻酔にはペントバルビタールナトリウム塩を用いた。
- ② **神経採取および脱細胞化方法の開発**
実験動物を腹臥位とし、大腿背面に皮切をおき坐骨神経を出来る限り長く採取した。
採取された神経を1M NaCl水溶液に24時間、震盪下で浸漬した後、PBS中で震盪下で7日間、洗浄を行った。
- ③ **脱細胞化の評価**
脱細胞化処理を行った神経をホルマリンで固定後、凍結切片を作成し、HE染色を行った。また、別の組織はグルタルアルデヒドで固定を行った後、走査型電子顕微鏡写真および透過型電子顕微鏡写真の撮影を行った(撮影は外注によりおこなった)。
- ④ **脱細胞化神経の移植**
実験動物を腹臥位とし、坐骨神経を求め、約1cmの神経欠損を作成した。この欠損

部位に作成された脱細胞化神経(1cm)を顕微鏡下で縫合した。

⑤ 移植後神経の評価-その1 トレーサーによる軸索走行の確認

移植より2ヶ月の後、移植神経を求め、移植部位よりも中枢側に10% fluororuby 溶液を1 μ l、注入した。注入より1週間の生存期間をおいた後、正常神経部分を含めて移植神経を採取した。蛍光封入材に浸漬したのち、蛍光顕微鏡を用いて軸索走行の観察を行った。

⑥ 移植後神経の評価-その2 組織学的検討

移植より2ヶ月の後、移植神経を採取した。ホルマリン固定後に凍結切片を作成したのち、抗neurofilament抗体(軸索を標識)および抗S-100抗体(シュワン細胞を標識)を反応させた。抗neurofilament抗体に対してはAlexa488標識された二次抗体を、抗S-100抗体に対してはAlexa596標識された二次抗体をそれぞれ反応させ、DAPI溶液にて核染色を行った後に3重蛍光標識を行い、蛍光顕微鏡で観察を行った。また、グルタルアルデヒドで固定を行った後、走査型電子顕微鏡写真および透過型電子顕微鏡写真の撮影を行った(撮影は外注によりおこなった)。

⑦ 行動学的実験

移植翌日、2ヶ月、6ヶ月において実験動物を回転筒に導き、筒を回転させる事で後肢の運動機能についてビデオ撮影を行い、検討を行った。

⑧ ハイブリッド型人工神経の作成

ラットの培養シュワン細胞(購入したもの)を適正培養条件下で増殖させた。脱細胞化神経を培地中に導入し、同時に増殖させたシュワン細胞を混入させた。これを3日の間、回転培養をおこなったのち、培地を交換し、さらに3日の培養を継続した。その後、ホルマリン固定を行い、組織学的に細胞の定着の有無について検討を行った。

4. 研究成果

① 高張塩溶液を用いた脱細胞化方法の確立

本方法により神経組織を処理した結果、HE染色において、ヘマトキシリンに染色される核成分は検出されなかった。また、抗type IVコラーゲン抗体を用いた免疫染色では、染色を認め、基底膜の温存が確認された。
電子顕微鏡撮影においては、透過型電子顕微鏡撮影では脱細胞化と基底膜の温存が確認された。走査型電子顕微鏡撮影においても、チューブ型の細胞外マトリ

クスの温存が確認され、また、当処理による組織損傷は極めて軽度であった。

② **移植後神経の評価-その1 トレーサーによる軸索走行の確認**

トレーサー注入後に採取された移植神経を蛍光顕微鏡下に観察したところ、single fiber resolutionで軸索の走行が観察された。また、観察された軸索は中枢側の正常神経より移植神経に侵入し、さらに遠位側の正常神経へと流出していた。これは再生した軸索が移植神経内を通過した事を示す。

③ **移植後神経の評価-その2 組織学的検討**

移植後2ヶ月の神経では、抗 neurofilament 抗体および抗 S-100 抗体により染色され、その形態は正常神経に酷似していた。つまり、移植神経内を通過した神経軸索は無髄神経ではなく、有髄神経である事が示唆された。

次に採取された神経の横断面を透過型電子顕微鏡撮影を行ったところ、再生した軸索が確認された。またこれらの軸索はシュワン細胞に囲まれており、有髄線維である事が確認された。

④ **行動学的実験による神経再生の評価**

移植翌日は坐骨神経が損傷を受けているため、術側の下肢機能は廃絶していた。術後2ヶ月で下肢の運動機能の改善が認められたが、足関節の底屈および足趾の拘縮があり、また、kicking も不十分であった。6ヶ月になると、2ヶ月の時点で認められていた機能低下は著しく改善しており、十分な下肢運動機能の再獲得が得られた。

⑤ **ハイブリッド型人工神経確立の可能性**

購入した培養シュワン細胞を適正培地中で培養・増殖させた後に脱細胞化神経と回転下に共培養を行ったところ、培養シュワン細胞は affinity をもって脱細胞化神経へと定着した。また培養日数と相関を持って細胞の定着数は増加し、浸潤震度も増した。今後、定着したシュワン細胞は分裂・増殖しうるのか、また、定着後の NGF の分泌量の変化、さらにはシュワン細胞を導入した脱細胞化神経（ハイブリッド型人工神経）を個体に移植した際に神経再生は促進されるのか、を定量的に解析を行って行く予定である。

《図表》

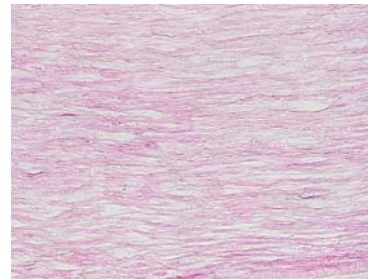


図1：脱細胞化神経の HE 染色像

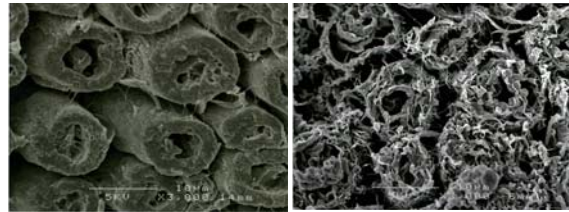


図2：走査型電子顕微鏡像

左：正常神経、右：脱細胞化神経

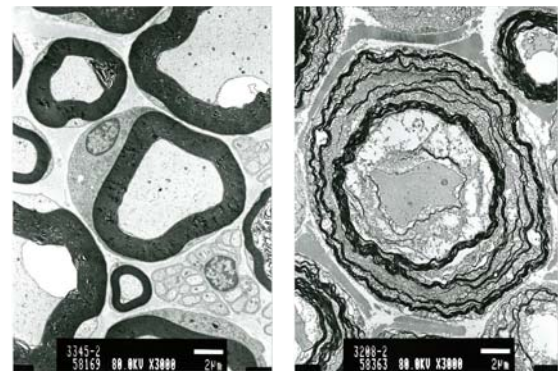


図3：透過型電子顕微鏡像

左：正常神経、右：脱細胞化神経

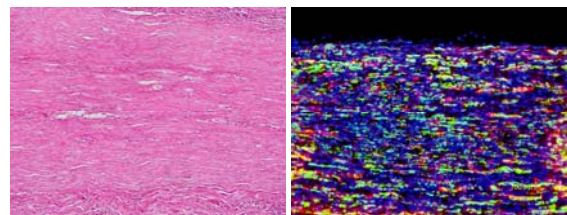


図4：移植2ヶ月後の神経グラフト

左：HE 染色、右：抗 neurofilament 抗体／抗 S-100 抗体／DAPI による 3 重蛍光染色

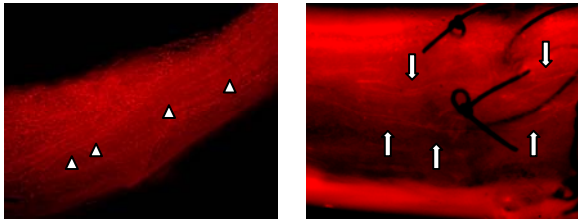


図5：移植2ヶ月後の神経グラフト
トレーサー法による解析



図6：移植後神経。髄鞘化が見られる。

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 件)

榊原俊介 他

順行性トレーサー法による舌下神経染色法

日本マイクロサージャリー学会会誌

2008; 21: 28-32

〔学会発表〕(計 件)

第35回日本マイクロサージャリー学会学術集会(2008.11.14-15)

神経トレーサーを用いる神経回路解析実験におけるわれわれの工夫

榊原俊介 他

第52回日本形成外科学会総会・学術集会(2009.4.22-24)

新しい脱細胞化技術を用いたバイオマテリアルの開発～その2 末梢神経スキャフォールド～

石田泰久 他

第36回日本マイクロサージャリー学会学術集会(2009.10.22-23)

新しい脱細胞化技術による代替小口径血

管・末梢神経の開発

榊原俊介 他

第18回日本形成外科学会基礎学術集会(2009.10.1-2)

新しい脱細胞化技術の開発 小口径血管・末梢神経への応用と臨床への展望

榊原俊介 他

第37回日本マイクロサージャリー学会学術集会(2010.11.18-19)

高張塩溶液脱細胞化法による脱細胞化神経とその評価

石田泰久、榊原俊介 他

第19回日本形成外科学会基礎学術集会(2010.9.16-17)

新しい脱細胞化人工神経の開発とその臨床応用を目指しての評価

石田泰久、榊原俊介 他

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称：高張電解質溶液による生体組織の脱細胞化処理方法

発明者：榊原俊介、橋川和信、石田泰久、寺師浩人、田原真也

権利者：神戸大学

種類：特許

番号：特願2010-30777

出願年月日：2010年2月16日

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺師 浩人 (TERASHI HIROTO)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80217421

(2)研究分担者

田原 真也 (TAHARA SHINYA)

神戸大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：60207206

寺島 俊雄 (TERASHIMA TOSHIO)
神戸大学・医学研究科・教授
研究者番号：20101892

藤里 俊哉 (FIJISATO TOSHIA)
大阪工業大学・工学研究科・教授
研究者番号：60270732

橋川 和信 (HASHIKAWA KAZUNOBU)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90403237

榊原 俊介 (SAKAKIBARA SHUNSUKE)
神戸大学・医学研究科・特命助教
研究者番号：50444592

馬原 淳 (MAHARA ATSUSHI)
国立循環器病センター・先進医工学センター・室員
研究者番号：80416221

(3) 連携研究者