

平成22年 4月 1日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20860063

研究課題名（和文） 生体と類似の構造を有する再生医療用人工末梢神経構築手法の開発

研究課題名（英文） Development of artificial peripheral nerve for regenerative medicine

研究代表者

武井 孝行 (TAKEI TAKAYUKI)

九州大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：90468059

研究成果の概要（和文）：Co-flowing stream 法を利用することで、様々な外径（100–800  $\mu\text{m}$ ）および内径（内径/外径=0.06–0.80）を有する中空アルギン酸ゲルファイバーを調製できた。また、延伸操作を追加することにより、外径数十 $\mu\text{m}$ の微少なゲルファイバーを連続的に調製することが可能となった。ゲルファイバー内にゼラチンを固定化することにより、中空部内表面およびゲル内部での線維芽細胞の接着・伸展・増殖を促進することができた。また、神経細胞株を用いた場合においてもほぼ同様の結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：Calcium-alginate hollow microfibers with various outer (100–800  $\mu\text{m}$ ) and inner diameters (inner diameter/outer diameter = 0.06–0.80) were successfully fabricated using a spinning system consisted of a triple extrusion head. Stretching the microfibers resulted in decrease in outer diameter of them (less than 100  $\mu\text{m}$ ). Immobilization of gelatin into the microfibers enhanced adhesion and proliferation of enclosed mammalian cells, such as neuronal cell and glial cell lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,480,000	444,000	1,924,000
2009年度	1,490,000	447,000	1,937,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,970,000	891,000	3,861,000

研究分野：医用化学工学

科研費の分科・細目：プロセス工学/生物機能・バイオプロセス

キーワード：末梢神経、生体組織工学、ヒドロゲル、中空ファイバー

## 1. 研究開始当初の背景

外傷や外科手術などにより末梢神経を切除せざるを得ない臨床例は年々増加している。このような症例の中でも神経切除部長さが約5 cmを超える場合の現行治療法は主に患者自身の末梢神経を移植する、いわゆる自

家移植が採用されている。しかし、移植に使用できる神経組織の数に限りがあること、さらには組織を取り出した部位に傷害が残ることが問題となっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、微少な中空ヒドロゲルファイバーを用いて移植用末梢神経を生体外において作製する手法の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 中空ヒドロゲルファイバーの調製

ゲルファイバーの作製には3重円筒管を用いた。円筒管の外筒(内径: 5.5 mm)に100 mM 塩化カルシウム ( $\text{CaCl}_2$ ) 水溶液を、中筒に1% (w/v) アルギン酸ナトリウム (Alg) 水溶液を、内筒(内径: 290  $\mu\text{m}$ )に10% (w/v) デキストラン (Dext) 水溶液をそれぞれ同一方向に流通させ、中空ゲルファイバーを作製した (Fig. 1 (a))。ゲルファイバーの外径および中空径の制御のため、中筒先端内径、 $\text{CaCl}_2$  水溶液流速、中筒先端から押し出す2つの水溶液 (Dext 水溶液および Alg 水溶液) の合計流量に対する Dext 水溶液の流量比 (Dext 水溶液流量/Dext+Alg 水溶液流量、以下“Dext 流量比”と記載) を変化させた。全ての実験において、中筒先端での Dext 水溶液流速および Alg 水溶液流速を 15 cm/s に固定した。位相差顕微鏡を用いて得られたゲルファイバーの外径および中空径を測定した。

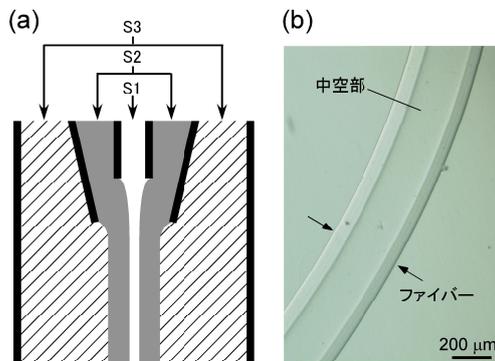


Fig. 1. (a) 3重円筒管を用いた中空ゲルファイバー作製法 (S1:Dext 水溶液, S2:Alg 水溶液, S3: $\text{CaCl}_2$  水溶液). (b) 中空ゲルファイバーの位相差顕微鏡写真.

#### (2) ヒドロゲルファイバー径のさらなる微少化に関する検討

上記ゲルファイバー調製プロセス中に、ファイバーをローラーで巻きとりながら延伸する操作を加えた。

#### (3) 中空ゲルファイバーへの細胞接着性タンパク質の付与

##### ① 酸化多糖の調製

天然多糖を純水に溶解させ、その中に過ヨウ素酸ナトリウム水溶液を加え6時間遮光条件下で攪拌することで、多糖を部分酸化し、その分子骨格内にアルデヒド基を付与した。続いて、透析を行った後、凍結・真空乾燥を行うことにより粉末状の酸化多糖を得た。

##### ② 酸化多糖を用いたゼラチンゲルの調製

上記“中空ヒドロゲルファイバーの調製”での中筒から押し出す溶液を1% (w/v) アルギン酸ナトリウム/5% (w/v) ゼラチン水溶液に変えることで、中空状のアルギン酸/ゼラチンヒドロゲルファイバーを作製した。また、別途平板状のアルギン酸/ゼラチンゲルも調製した。これらゲルを8% (w/v) 酸化多糖水溶液に浸すことでゼラチンを架橋した。

### 4. 研究成果

#### (1) 中空ヒドロゲルファイバーの調製

本中空ゲルファイバー作製法では、3重円筒管の内筒、中筒、外筒からそれぞれ、Dext 水溶液、Alg 水溶液、 $\text{CaCl}_2$  水溶液を押し出している。Alg 水溶液はその外側を流れる  $\text{CaCl}_2$  水溶液中の  $\text{Ca}^{2+}$  を取り込むことによりゲル化する。一方、Dext 水溶液では  $\text{Ca}^{2+}$  によるゲル化は起こらないため、中空状のゲルファイバーを作製することが可能であった (Fig. 1 (b))。

##### ① Dext 流量比のファイバー径への影響

本実験では、中筒先端内径および  $\text{CaCl}_2$  水溶液流速をそれぞれ、535  $\mu\text{m}$ 、25 cm/s に固定し、Dext 流量比を0.001 から0.424 まで変化させた。Fig. 2 (a) に Dext 流量比とファイバー径の関係を、(b) に Dext 流量比と外径に対する中空径の比 (中空径/外径) の関係を示す。中筒より押し出す Dext 水溶液および Alg 水溶液の合計流量を一定にしているため、Dext 流量比を変化させてもファイバー外径が大きく変化することはなかった。一方、Dext 流量比の増加とともに中空径および中空径/外径は増加した。これは、ファイバーのゲル部となる Alg 水溶液の流量に対して、中空部となる Dext 水溶液の流量が増加したためである。このように、Dext 流量比のみを変化させる場合、ファイバー外径はほとんど変化することなく、中空径のみが変化することが示された。

##### ② 内筒先端内径および $\text{CaCl}_2$ 水溶液流速のファイバー径への影響

本実験では Dext 流量比を0.001 または0.424 に固定し、内筒先端内径 (290, 535, 770  $\mu\text{m}$ ) および  $\text{CaCl}_2$  水溶液流速 (5, 25 cm/s) を変化させてファイバーを作製した。Fig. 3 (a), (c) に各内筒先端内径および  $\text{CaCl}_2$  水溶液流速に対するファイバー外径を、(b), (d) に中空系/外径を示す。内筒先端内径が増加するとともにファイバーの外径は増加した。また、 $\text{CaCl}_2$  水溶液流速の増加とともにファイバー外径は減少した。これは  $\text{CaCl}_2$  水溶液流速の増加に伴って、Alg 水溶液にかかる剪断応力が増し、それにより Alg 水溶液がより細く引き伸ばされたためであると考えられる。一方、中空径/外径は中筒先端内径および  $\text{CaCl}_2$  水溶液流速に依存せずほぼ一定の値を示した。以

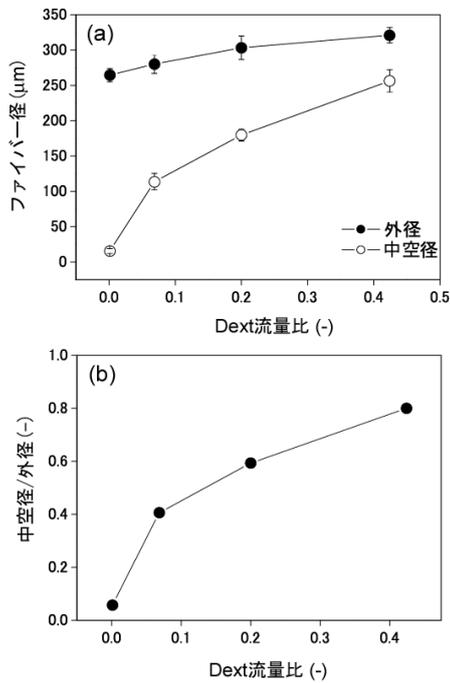


Fig. 2. Dext 流量比とファイバー径の関係. (b) Dext 流量比とファイバー外径に対する中空径の比(中空径/外径)の関係.

上をまとめると、ファイバーの外径は内筒先端内径および CaCl<sub>2</sub> 水溶液流速を変化させることにより制御可能であった。一方、中空径/外径は Dext 流量比のみに依存することが明らかとなった。

### ③動物細胞包括中空ゲルファイバーの作製

本研究では、生体末梢神経の基本単位構造を模倣したヒドロゲルファイバーを作製するべく、ファイバー中空部およびゲル部に異なる2種の細胞を配置可能であるか調査した。具体的には、中筒先端内径、CaCl<sub>2</sub> 水溶液流速、Dext 流量比をそれぞれ 770 μm、5 cm/s、0.015 に設定し、緑色蛍光 (Cell Tracker™ Green CMFDA) 標識マウス結合組織由来線維芽細胞 (L929 細胞) を懸濁させた Dext 水溶液 (7.2 × 10<sup>7</sup> cells/ml)、赤色蛍光 (Cell Tracker™ Red CMTPX) 標識 L929 細胞を懸濁させた Alg 水溶液 (1.7 × 10<sup>6</sup> cells/ml) を用いて中空ゲルファイバーを作製した。位相差顕微鏡を用いた観察により、ファイバー中心付近において細胞密度の高い部分を確認した (Fig. 4 (a))。蛍光顕微鏡観察によりこれらは緑色蛍光標識細胞、つまり Dext 水溶液中に懸濁した細胞であることを確認した。続いて、緑色蛍光標識細胞がファイバーの中空部内のみ存在しているのかを確認するため、ファイバーを数ミリに切断し、注射針 (30G) を用いて中空部内にリン酸緩衝液を流通させた。その結果、ファイバー中心付近に存在していた細胞はファイバー外に押し

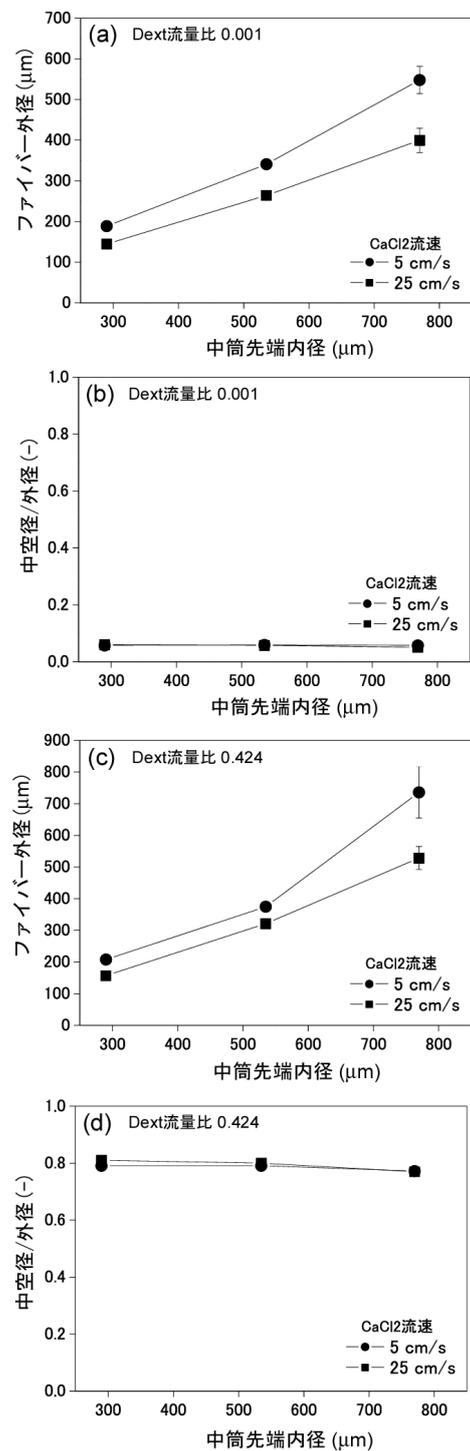


Fig. 3. 内筒先端内径および CaCl<sub>2</sub> 水溶液流速とファイバー外径(a, c)および中空径/外径(b, d)の関係.

流され (Fig. 4 (b))、ファイバー内には緑色蛍光標識細胞が残存しないことを蛍光顕微鏡により確認した。これより、Dext 水溶液に懸濁した細胞はファイバーのゲル内に取り込まれることなく、中空部内のみ配置できることが示された。また、中空部から押し出された細胞は、全て緑色蛍光標識細胞であり、

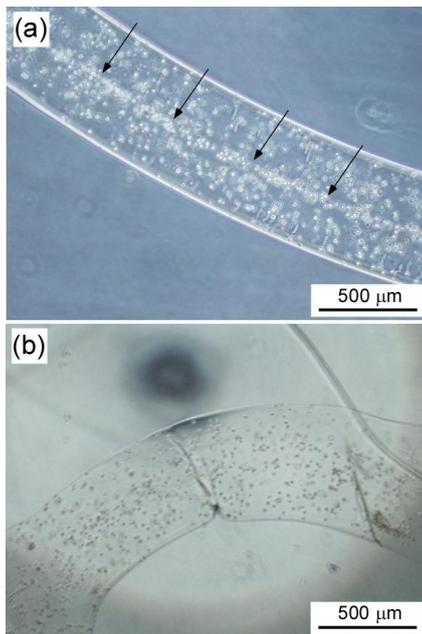


Fig. 4. (a) L929 細胞包括中空ゲルファイバー. 矢印は Dext 水溶液に懸濁した細胞を示す. (b) 中空部にリン酸緩衝液を流通させた後のファイバー.

Alg 水溶液中に懸濁した赤色蛍光標識細胞は観察されなかった。この結果より、Alg 水溶液中に懸濁した細胞は中空部に漏れ出すことなく、ゲル部にのみ配置できることが示された。以上をまとめると、本手法を用いることで2種の細胞を混ざり合わせることなくファイバーの中空部およびゲル部に正確に配置可能であることが示された。

動物細胞は剪断応力等のストレスにより容易に傷害を受ける。上述のように、本研究での細胞包括中空ゲルファイバー作製プロセスにおいては、各流体間の速度差に起因した剪断応力がファイバーの径を決定する重要な因子である。そこでファイバー作製プロセスが細胞に与える影響を調査した。具体的には中空部またはゲル部に L929 細胞を包括したゲルファイバーを作製し、それを 55 mM クエン酸三ナトリウム水溶液 (pH 7.4) 中に浸すことでゲルを溶解した後、細胞の生存率をトリパンブルー色素排除法により評価した。その結果、本ファイバー作製プロセスが包括細胞にほとんど傷害を与えないことが示された ((包括後の細胞の生存率/包括前の細胞の生存率) × 100 > 95%)。

#### (2) ヒドロゲルファイバー径のさらなる微小化に関する検討

これまでの手法では、生体末梢神経の基本単位構造と同等の断面直径を有するサイズ (数十μm) のゲルファイバーを連続的に調製することは困難であった。そこで、ファイバ

ーを延伸する操作を加えたところ、目的とした極めて微小な断面直径を有するゲルファイバーを調製することができた (Fig.5)。

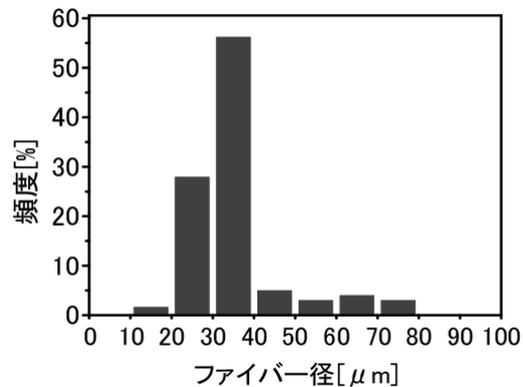


Fig. 5. 延伸操作を加えた際のゲルファイバーの直径.

#### (3) 中空ゲルファイバーへの細胞接着性タンパク質の付与

ファイバー内に包括した神経構成細胞の接着・増殖を達成するためには、ファイバーは細胞接着性を有していなければならない。しかし、これまでファイバー材料として使用してきたアルギン酸はその特性を有していない。そこで細胞接着性を有するゼラチンをファイバー内に付与することにした。ゼラチンは細胞培養に必要な 37°C の条件下において溶解してしまう。そこで、タンパク質架橋剤として酸化多糖を調製した。8% (w/v) 酸化多糖水溶液中にアルギン酸/ゼラチンゲルファイバーを浸したところ、約 6 時間程度でゼラチンは十分に架橋されることが示された (Fig. 6)。また、動物細胞 (LMAC01) を 8% (w/v) 酸化多糖水溶液中に 6 時間浸した後、その生

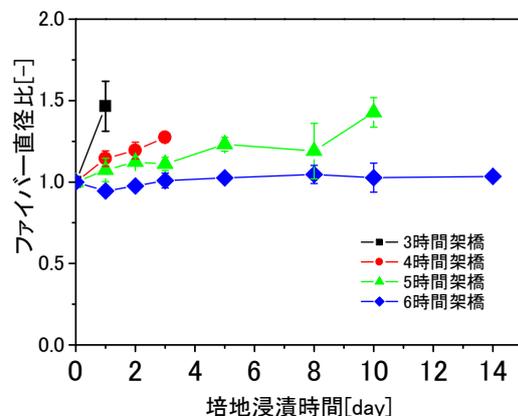


Fig. 6. ファイバー中のゼラチンの架橋時間とファイバー直径比との関係. ファイバー直径比 = (各培地浸漬時間でのファイバー径) / (架橋直後のファイバー径).

存率を調査したところ、調製した酸化多糖は極めて細胞毒性が低いことが明らかとなった。さらに、架橋処理を行ったゼラチンゲル表面および内部において細胞は接着・増殖が可能であった。以上より、調製した酸化多糖はゲルファイバーへのゼラチンの付与に適したタンパク質架橋剤であると考えられる。

最後に神経構成細胞を包括したゲルファイバーをラットに移植したところ、移植細胞はファイバー内で生存していることを示唆する結果を得た。

以上の結果より本手法は、移植用人工末梢神経構築法として有望であると考えられる。今後、神経組織としてのさらなる成熟化を図り、情報伝達性能等を評価する必要がある。

## 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 1 件)

① **Takayuki Takei**, Naoya Kishihara, Shinji Sakai, Koei Kawakami, “Novel technique to control inner and outer diameter of calcium-alginate hydrogel hollow microfibers, and immobilization of mammalian cells”, 査読有, *Biochemical Engineering Journal* **49**: 143-147 (2010).

[学会発表] (計 1 件)

① 武井 孝行, 境 慎司, “動物細胞包括中空アルギン酸ゲルファイバーの作製”, 第 11 回化学工学会 学生発表会, 2009 年 3 月 7 日, 岡山市.

[その他]

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003313/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

武井 孝行 (TAKEI TAKAYUKI)

九州大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：90468059