

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月26日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592006

研究課題名（和文） 磁場及びアスコルビン酸と人工材料を用いた神経系組織損傷の再生治療法

研究課題名（英文） Development of the treatment for the injury of nervous system using magnetic stimulation, ascorbic acid and artificial materials

研究代表者

石川 奈美子（ISHIKAWA NAMIKO）

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第5研究部・主任研究員

研究者番号：00462276

研究成果の概要（和文）：

中枢及び末梢神経再生を磁場の大きさ、波形、周波数を変化させ検討した。術後7日目に免疫組織化学的に観察したところ、複数の磁場にてラットの軸索再生を認めた。また、末梢神経再生では、コントロールに比しc-AMP量は増加していた。

研究成果の概要（英文）：

We performed to change the wave pattern, frequency, electric current of magnetic fields. Young rats were injured sciatic nerve and spinal cord. Rats were acclimated to their magnetic fields for 7days and investigated immunohistochemically. Nerve regeneration was observed in several magnetic fields and c-AMP was increased.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

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：再生医学

1. 研究開始当初の背景

神経損傷により生じた神経の欠損部が大きい場合自家の知覚神経移植が広く行われてきた。しかし、採取された神経の支配領域の知覚の犠牲、採取できる神経の量に限界があるという欠点がある。これまでわれわれは人工材料や細胞移植を用いて中枢及び末梢神経の再生に関する研究を行ない良好な結果を得てきた。しかし、中枢及び末梢神経の再生の研究は多数報告されているが臨床応用されている研究は少ない。神経損傷部位に磁場を生じさせると、軸索再生を促進するとの

報告があり、パルス磁場を用いることにて再生神経のミエリン形成、行動機能観察などにおいて良好な結果をもたらすことが知られている。

一方、培養シュワン細胞を用いた実験にてc-AMPがシュワン細胞の増殖及び分化を調整するとのがある。磁場が、シュワン細胞やc-AMPに与える影響を考察し、臨床応用への第一歩となることを目的とし、磁場を応用した医療材料の開発につなげたい。磁場を利用する実験は低侵襲であり倫理上の問題や法令に触れる可能性はないと考え有効な磁場

の強さが発見できたら新たな再生治療に貢献できると考えられた。

2. 研究の目的

まず、細胞の磁場配向に注目し、再生神経の軸索及びその足場となるシュワン細胞が、静磁場内においてどのような影響を受けるのかを検討する。また、動磁場をかけ、軸索再生に有用な磁場の波形、振幅、時間及び日数に関する検討を行い、再生軸索の支配領域の廃用性萎縮を予防し、本来の支配組織に再生軸索が早期に到達することを期待する。

一定の静磁場及び動磁場をかけることによって、再生軸索の成長円錐の方向性及び、再生軸索伸長の足場となるシュワン細胞に与える影響を検討し、磁場を応用した医療材料の開発につなげたい。

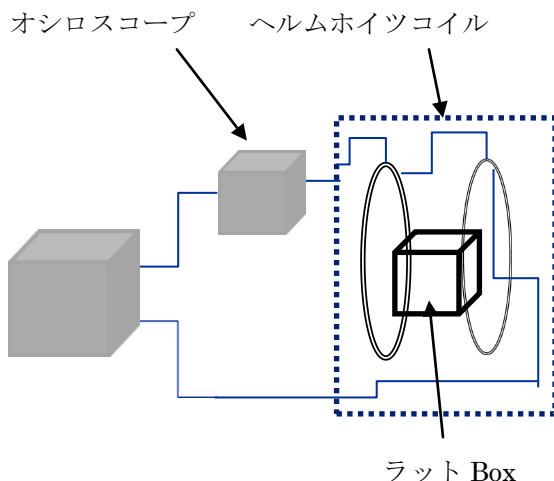
近年、アスコルビン酸が外傷に対して有効であることが報告されている。

高濃度のアスコルビン酸投与によって中枢及び末梢神経の再生が促進されることを示し機序を明らかにしたい。

3. 研究の方法

動磁場は、Fig.1 に示すような 0-120Hz 0.3-0.5mT の可変領域を持つヘルムホルツ型磁場発生装置を作成し1日4時間磁場をかけ、周波数、波形を変化させた。波形の検討は、sign 波、pulse 波、square 波にて検討した。

Fig.1 ヘルムホルツ型磁場発生装置



末梢神経の再生

モデル 1

Wister 系 4 週齢雄のラットの坐骨神経に 7mm の欠損部を作成し、b-FGF を架橋させたアルギン酸ゲルを scaffold として欠損部をサンドイッチ状に架橋し創部を閉鎖した。

- ① 1.5Tesla の静磁場を 1 日 4 時間かけた。
- ② 0-120Hz 0.3-0.5mT の可変領域を持つヘルムホルツ型磁場発生装置を作成し 1 日 4 時間磁場をかけ、周波数、波形を変化させた。波形の検討は、sign 波、pulse 波、square 波にて検討した。
- ③ アスコルビン酸 $1\mu\text{g/g}$ を 3 日に 1 回腹腔内に投与した。

モデル 2

Wister 系 4 週齢雄のラットの坐骨神経よりシュワン細胞を分離し培養。

中枢神経の再生

モデル 3

実体顕微鏡下に Wister 系 4 週齢雄のラットの脊髄を露出し hemi section を施行し創部を閉鎖。

モデル 4

Wister 系 1 日齢雄のラットの脊髄後根細胞を採取し培養。

評価方法

モデル 1

8mm の凍結切片を作成し病理組織学的及び免疫組織化学的に行なった。1 次抗体は β -tubulin、s-100 β を使用し、2 次抗体は AlexaFluoro 抗体を使用した。

2mm の坐骨神経を採取し C-AMP を測定した。

モデル 2

c-AMP が Schwann 細胞に与える影響を Real-Time PCR にて観察した。

モデル 3

8mm の凍結切片を作成し病理組織学的及び免疫組織化学的に行なった。1 次抗体は neurofilament、GFAP、O4 を使用し、2 次抗体は AlexaFluoro 抗体を使用した。

モデル 4

軸索の成長円錐に発現する細胞骨格 actin と軸索伸長の方向性を免疫組織科学的に観察。1 次抗体は actin、2 次抗体は AlexaFluoro 抗体を使用した。

4. 研究成果

モデル 1

- ① コントロールに比し有意な軸索伸長を認めなかった。
- ② 81Hz pulse 波、術後 7 日目の切片にて軸索伸長、シュワン細胞の増殖を認めたが詳細は検討中である。コントロールに比し C-AMP 量は増加していた。
- ③ 術後 14 日にて軸索は末梢側まで達し良

好な再生を提示した。

モデル 3

50Hz square 波 (Fig.2)、100Hz pulse 波 (Fig.3) 及び 50Hz pulse 波にて術後 7 日目の切片にて軸索伸長を認めた。

Fig.2 赤色： β -tubulin 緑色：GFAP 青色：DAPI

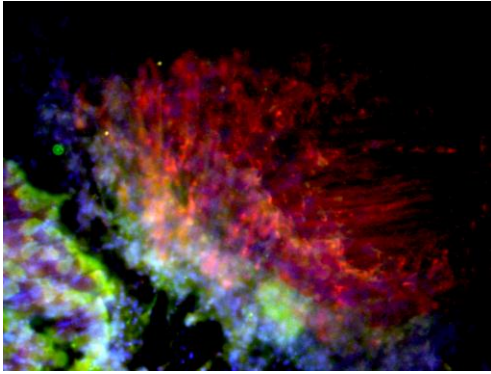
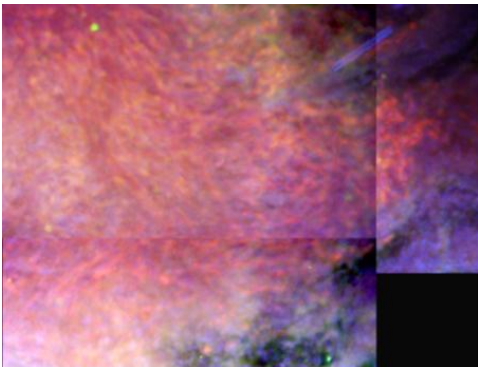


Fig.3 赤色： β -tubulin 緑色：GFAP 青色：DAPI



5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 奈美子 (ISHIKAWA NAMIKO)
公益財団法人田附興風会・医学研究所
第5研究部・主任研究員
研究者番号：00462276

(2) 研究分担者

鈴木 義久 (SUZUKI YOSHIHISA)
公益財団法人田附興風会・医学研究所
第5研究部・研究主幹
研究者番号：30243025