

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

大竹啓太

論文題目

配向性コラーゲンチューブ移植によるラット坐骨神経切除後の神経再生の評価

緒言：

末梢神経の損傷は支配領域の神経組織、結合組織および筋組織の機能的、形態学的変化をもたらす。末梢神経障害の中でも、軸索の断裂を伴う損傷を受けた場合、自然回復は困難であり、神経支配領域における神経障害性疼痛の出現、感覚機能の麻痺および運動機能の低下などの有害事象により患者のQOLは著しく低下する。このような有害事象が生じた場合には、神経吻合術や自家神経移植といった従来の外科的治療法の適応となるが、これらの治療法には高度な技術や長い手術時間が必要であるといった問題点があげられる。

近年、従来の外科的治療法に加え、神経再生誘導チューブを用いた治療法が臨床応用されている。現在臨床応用されている神経再生誘導チューブはコラーゲンやポリグリコール酸といった吸収性材料などによって作製されている。また近年、コラーゲングルに引張力を作用させることによって配向性コラーゲンストリングスを容易に作製することができる技術が開発された。コラーゲン線維の配向は細胞の配列方向を規定することが明らかとなっている。これまでの *in vitro* の研究により軸索の伸長はシュワン細胞の配列に沿って行われることが明らかとなっている。また、シュワン細胞は標的器官を再生した神経が再支配する際に軸索を髄鞘化する働きを担っている。この事実より、シュワン細胞の配列を規定することが可能であれば、末梢神経の再生をより促進させることができると推測される。今回

われわれは、ラット坐骨神経切除モデルに配向性コラーゲン線維で作製した神経再生誘導管 (Oriented Collagen Tube : OCT) を移植することによる感覚機能の回復を評価することを目的に、von Frey test による知覚機能解析と、再生した坐骨神経の組織学的、免疫組織学的および透過型電子顕微鏡による微細構造学的解析をおこなった。

材料と方法 :

OCT の作製方法としては、まずブタタイプ I アテロコラーゲン (Nippi, Tokyo, Japan) に強い引張力を加え、配向性コラーゲンストリングスを作製した。この配向性コラーゲンストリングスを材料に、OCT (長径 14 mm, 内径 1.5 mm) を作製した。作製した OCT を左側坐骨神経を 10 mm 切除した 13 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラット (Chubu Kagaku Shizai Co., Ltd., Aichi, Japan) に移植し、OCT 内に切断した神経の両端 2 mm ずつ入れ込み、10-0 ナイロン糸で 2 糸ずつ縫合した (OCT 移植群、n = 8)。実験の対照群として、左側坐骨神経を 10 mm 切除したのみの群 (切除のみ群、n = 8)、および左側坐骨神経を剖出後、ただちに閉創をおこなった群 (sham 群、n = 8) を設定した。また、組織学的、免疫組織化学的、および微細構造学的解析の対照群として、無処置のラット坐骨神経を使用した (健側群、n = 8)。

知覚機能の回復の評価としてラットの患側足底部に対して von Frey test をおこない、up down 法で評価した。また、組織学的評価として OCT 移植後 2 週および 4 週でラットを安楽死させ、ヘマトキシリン&エオジン (H&E)

染色およびルクソールファストブルー (LFB) 染色をおこなった。免疫組織化学的解析として抗 Myelin basic protein (MBP) 抗体 (ab40390, 1:500; Abcam, Cambridge, UK)、抗 S-100B 抗体 (701340, 1:50; Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) および抗 CD34 抗体 (ab 81289, 1: 100; Abcam) を用いて免疫組織化学をおこない、再生した神経組織における髄鞘、シュワン細胞の分布および血管内皮細胞の分布を解析した。抗 MBP 抗体および抗 S-100B 抗体を用いた免疫組織化学では、OCT 移植後 2 週および 4 週で再生した坐骨神経の縦断切片を中枢側、中央部、末梢側の 3 部位に分け、各部位で標準化した領域 ($320 \mu\text{m} \times 240 \mu\text{m}$) を設定し、一領域あたりの抗体陽性面積を計測した。なお、対照群として健側の坐骨神経を使用した (各 $n = 5$ スライド)。抗 CD34 抗体を用いた免疫組織化学では、OCT 移植後 2 週および 4 週で再生した坐骨神経の神経中央部の横断像の切片を用い、CD34 に陽性反応を示す血管内皮細胞を有する血管の直径を計測した。なお、対照データとして健側の坐骨神経の内部を走行する血管の直径を測定した (各 $n = 40$)。最後に、再生した髄鞘につきより詳細に観察をおこなうことを目的に透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた微細構造学的解析をおこなった。評価の方法としては OCT 移植群の再生した坐骨神経および健側の坐骨神経の髄鞘の厚さをランダムに選択し、その厚さを計測し比較をおこなうこととした ($n = 10$)。

結果：

von Frey test による知覚機能評価では、OCT 移植後 15 日で sham 群と同程度まで知覚が回復することが明らかとなった。また、切除のみ群では術後 15 日までで知覚の回復を認めなかった。

組織学的解析では、H&E 染色において OCT 移植後 2 週で中枢側と末梢側の両神経断端の連続を認めた。再生した神経中央部の直径を計測して OCT 移植後 2 週と 4 週とで比較してみると、OCT 移植後 4 週の方が有意に直径が大きかった。また、高倍率での観察をおこなったところ、OCT 移植後 4 週では髄鞘様組織の存在を観察することができた。LFB 染色においては、OCT 移植後 2 週では再生神経の中枢側にのみ LFB 陽性反応を示す領域を認めたが、OCT 移植後 4 週になると再生神経の中枢側から末梢側にかけて LFB 陽性反応を示す領域が認められた。なお、OCT 移植群の再生神経と健側の坐骨神経の LFB 陽性領域の面積を計測して比較したところ、OCT 移植後 4 週では OCT 移植後 2 週と比較すると、再生神経の中枢側から末梢側のすべての領域で LFB 陽性領域の面積が有意に広がった。

抗 MBP 抗体を用いた免疫組織化学において OCT 移植後 2 週では再生神経の中枢側にのみに MBP 陽性反応を示す領域を認めたが、OCT 移植後 4 週になると再生神経の中枢側から末梢側にかけて MBP 陽性反応を示す領域を認めた。また、OCT 移植後 4 週では OCT 移植後 2 週と比較すると、再生神経の中枢側、中央部、および末梢側のすべての領域で MBP 陽性領域の面積が有意に広がった。抗 S-100 抗体を用いた免疫組織化学では、OCT 移植後 2 週では

再生神経の中枢側にのみに S-100B 陽性反応を示す領域を認めたが、OCT 移植後 4 週になると再生神経の中枢側から末梢側にかけて S-100B 陽性反応を示す領域を認めた。また、OCT 移植後 4 週では OCT 移植後 2 週と比較すると、再生神経の中央部および末梢側の領域で S-100B 陽性領域の面積が有意に広がった。しかし、OCT 移植後 2 週と 4 週の再生神経の中枢側の S-100B 陽性領域の面積には有意な差はなかった。抗 CD34 抗体を用いた免疫組織化学では、神経内部を走行する血管数は、健側の坐骨神経よりも OCT 移植群の再生神経の方が多く、OCT 移植群内で比較すると、OCT 移植後 4 週よりも OCT 移植後 2 週の方が多かった。なお、OCT 移植後 2 週と OCT 移植後 4 週での再生神経の中央部に存在する血管の直径を計測し、その平均値を求めたところ、両者で有意な差を認めなかった。

TEM を用いた微細構造学的解析では、OCT 移植後 2 週では再生神経の中央部には無髄軸索の存在を認めたが、髄鞘の存在は認めなかった。OCT 移植後 4 週になると再生神経に髄鞘の再生を確認できた。

考察：

von Frey test では、OCT 移植後 15 日で Sham 群と同程度まで知覚が回復した。切除のみ群では術後 15 日経過しても知覚が回復しなかったことから、知覚機能の回復は切除された神経の両断端を神経再生誘導管で架橋することによる有効性が示唆された。本実験では OCT 移植後 2 週の H&E 染色で、中枢側と末梢側の神経断端は連続していたことから神経が再生したことを

確認できた。

LFB 染色では OCT 移植後 2 週では中枢側にのみ陽性領域を確認できたが、OCT 移植後 4 週では中枢側から末梢側にかけて陽性領域が確認できた。この結果は抗 MBP 抗体を用いた免疫組織化学の結果とも一致していた。この結果から、神経の再生は中枢側から末梢側にかけて髄鞘が形成されることが明らかとなった。また、シュワン細胞の分布を確認するためにおこなった抗 S-100B 抗体による免疫組織化学では、OCT 移植後 2 週では中枢側にのみ陽性領域を確認できたが、OCT 移植後 4 週では中枢側から末梢側にかけて陽性領域が確認できた。この結果から、切除した坐骨神経の断端を OCT で架橋することは、OCT 内でシュワン細胞が配列・増殖し、軸索の伸長および髄鞘化にとって適切な環境を提供できることが示唆された。

TEM による微細構造学的解析では OCT 移植後 2 週の神経中央部には無髄軸索の存在は確認できたが、髄鞘の存在は確認できなかった。OCT 移植後 4 週になると、神経中央部に髄鞘の存在を確認できた。以上の結果から術後 15 日で Sham 群と同程度にまで知覚機能が回復したことは、無髄軸索の再生による効果であることが示唆された。

これまでの先行研究により、神経再生誘導チューブ内で再生した神経には多くの血管新生が観察され、血管数が増加することで軸索の伸長が促進し早期に神経が再生し、また新生血管により髄鞘の伸長に必要なシュワン細胞が誘導されることが報告されている。今回は血管新生を評価するために、

CD34 陽性領域を観察して再生神経内に存在する血管を解析した。血管数は、健側群と比較して、OCT 移植群の再生した坐骨神経は内部を走行する血管が有意に多かった。この結果より、OCT 移植は坐骨神経切除部位に血管新生に適切な環境を提供し、末梢神経の再生を促進させる効果があることが示唆された。

結論として OCT はチューブ内でのシュワン細胞の増殖を手助けし、軸索の伸長および有髄軸索の再生を促進させる働きがあることが示唆された。また OCT はチューブ内で再生した神経内の血管新生に適切な環境を提供することができ、OCT が持つコラーゲン線維の配向によって血管の新生を誘導することができる可能性が示唆された。