

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	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	

## I. 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。末梢神経損傷により生じる生体への障害は損傷の程度により異なる。軸索の断裂を伴わない損傷では自然回復が可能なケースもあるが、軸索の断裂を伴う損傷を受けた場合には、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、高度な技術や長い手術時間が必要である。さらに、自家神経移植においてはドナー部の知覚異常が生じるといった問題点が残されている。

末梢神経損傷の治療は軸索を再生させるだけでなく、再生した神経周囲の標的器官の機能的回復も考慮しなくてはならない。末梢神経再生においては、1) 損傷した神経の中枢側と末梢側の運動機能や感覚機能など様々な情報を伝達する軸索同士を適確に接合させる、2) 標的器官を支配するのに十分な数の軸索を再生させる、3) 再生した軸索が標的器官を支配するまでに、標的器官を動かすのに必要な筋肉の萎縮を最小限に抑える、といった3つの条件が重要とされている。現在、多くの研究者により軸索再生のみではなく、神経支配領域の標的器官の機能的回復を行える治療を開発するために様々な末梢神経再生のメカニズムに注目した研究がおこなわれている。

近年、従来の外科的治療法に加え、チューブ構造の断裂した神経の両断端を架橋する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。神経再生誘導チューブを用いた治療法は従来の手術方法と比較して、手術手技が簡便であり末梢神経障害への新たな治療法として注目されている。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

た吸収性材料やシリコンを材料に作製されているが、どの材料が最も効果的に末梢神経が再生するかについては未だに結論がでていないのが現状である。

これまでの研究によって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。しかしながら近年まで人工的に作製したコラーゲン線維に配向性を付与するには強力な磁場を利用する方法しかなく、この方法では臨床に使用することができるような適切なサイズや配向方向を有するコラーゲンチューブを作製するのは困難であった。近年、コラーゲンゲ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。このコラーゲンストリングスはサイズを好みの長さに調整でき、配向方向を規定することも可能である。

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。Fujimaki らは配向性コラーゲンストリングスを材料に作製した配向性コラーゲンチューブ (Oriented Collagen Tube; OCT) を神経再生誘導チューブとしてラット坐骨神経切除モデルに移植し、CatWalk XT を用いた歩行解析で運動機能の回復を評価し、坐骨神経を切除したのみのモデルと比較して有意に歩行機能が回復したことを報告している。しかしながら、現在までに OCT 移植による感覚機能の回復を評価した報告はされていない。今回われわれは、ラット坐骨神経切除モデルに 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。

## II. 材料および方法

### II-1. 配向性コラーゲンチューブの作製

配向性コラーゲンチューブの作製は株式会社アトリーに依頼した。作製方法は以前の研究にて報告されている方法に従った。ブタタイプ I アテロコラーゲン (Nippi, Tokyo, Japan) を 3 軸ロボットアーム (SM 300-3 A, Musashi Engineering, Tokyo, Japan) に取り付けられたシリンジに充填し、22G のソフトニードルより 0.1 MPa の圧力をかけてリン酸緩衝液 (PBS) 中に射出をおこない、配向性コラーゲンストリングスを作製した。この際、ロボットアームを射出方向とは逆方向に 550 mm/s の速度で移動をさせた。するとコラーゲンストリングスに強い引張力がかかり、コラーゲン線維へ配向性を付与することができる。この配向性コラーゲンストリングスでシートを作製し、シートを芯棒に 7 層巻きつけることによって OCT を作製した。完成した OCT の内面を走査型電子顕微鏡 (SEM) (JXA-8530FA; JEOL Ltd., Tokyo, Japan) で観察したところ、コラーゲン線維が一定方向に配向していることが確認できた。

### II-2. ラット坐骨神経切除モデルの作製

本研究は愛知学院大学歯学部動物実験委員会の承認 (AGUD 379 号) を得て実施し、実験動物の取り扱いと同委員会の指針に沿っておこなった。動物は 12 時間ごとの明暗サイクルで温度を一定に保った環境下におかれ、自由に飼料や水を摂取した。実験には 13 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラット (Chubu Kagaku Shizai Co., Ltd., Aichi, Japan) を用いた。手術方法は以前に報告されている方法に従った。ラットに吸入麻酔薬 (3.0% Isoflurane, Pfizer, Tokyo, Japan) で全身麻酔をかけ、左側の坐骨神経を剖出して 10 mm の欠損を作成した。そして、神経再生誘導チュー

ブとして欠損部へ留置するために、PBS で内部を満たした OCT (長径 14 mm, 内径 1.5 mm) を準備し、神経の両断端を 2 mm ずつ OCT 内に設置後 10-0 ナイロン糸で 2 糸ずつ縫合した (OCT 移植群、n = 8)。その後、筋層および皮膚を 4-0 絹糸で縫合して閉創した。また、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)。

#### II-3. von Frey test による知覚機能評価

ラットの患側足底部の知覚機能を調べるために von Frey test をおこない、up down 法で評価した。方法としては、ワイヤーメッシュを底部に貼ったプラスチックゲージ内に 1 時間順応させた後、荷重の異なる (8、10、15、26、60、100、180、300 g) von Frey filament (TACTILE TEST AESTHESIO Semmes-Weinstein Von Frey Aesthesiometer、Muromachi Kikai Co. Ltd, Tokyo, Japan) を使用して手術側である左側後肢の足底部に 90° の角度で刺激をおこなった。刺激は 60 g のフィラメントから行い、反応があれば低い荷重のフィラメント、反応がなければ高い荷重のフィラメントへと移行することとした。反応が変化してから 4 回の刺激を行い、50%反応閾値を求めた。なお、術後 3 日から 15 日まで、3 日毎に von Frey test を実施した。

#### II-4. 組織学的解析

OCT 移植後 2 週および 4 週で、ラットをペントバルビタール (Kyoritsuuseiyaku Corporation,

Tokyo, Japan) の腹腔内投与で安楽死させ、左側坐骨神経を摘出した。4%パラホルムアルデヒド中で12時間(4℃)固定を行い、通法に従い組織をパラフィン包埋した。マイクロトーム(LEICA RM 2125RT, Leica Biosystems, Nussloch, Germany)で5 μmの厚さに薄切したパラフィン切片を作製し、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。なお、観察および撮影はCCDカメラ(Nikon Digital Sight DS-Fi1; Nikon, Tokyo, Japan)を備えた光学顕微鏡(Eclipse E800M; Nikon)でおこなった。

はじめに、H&E染色による組織学的解析をおこなった。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用いて神経中央部の厚さをImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて計測した(各n = 5)。また、再生神経中央部の横断切片を用いて、走行する血管の数を計測した(各n = 40)。

次に、髄鞘の再生を評価するためにLFB染色をおこなった。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部位に分けた。そして、各部位で標準化した領域(320 μm×240 μm)を設定し、一領域あたりのLFB陽性面積をImageJ software (National Institutes of Health)で計測した。なお、対照群として健側群の坐骨神経を使用した(各n = 5スライド)。

## II-5. 免疫組織学的解析

II-4と同様の手法で厚さ5 μmのパラフィン切片を作製し、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

(学位論文の内容を要約したもの)

No. ....6.....

愛知学院大学

こない、それぞれ再生した髄鞘、シュワン細胞の分布および血管内皮細胞の存在を解析した。まず、パラフィン切片を脱パラフィンおよび上昇エタノール系列で脱水後に蒸留水で水洗した。そして、内因性ペルオキシダーゼ活性除去のために、メタノールで希釈した3%過酸化水素水に室温20分間反応させ、0.05% Tween20を含むトリス緩衝液(TBST)で5分間洗浄を2回おこなった。次いで、HistoVT one (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)で90℃、20分間抗原賦活化処理をおこなった。TBSTでの5分間の洗浄を3回おこなった後に、2.5%ウマ血清(Vector Laboratories, Burlingame, California, USA)で非特異的反応部位のブロッキングを1時間(室温)おこなった。そして、ブロッキング液で希釈した一次抗体を4℃、12時間で反応させた。TBSTで5分間の洗浄を3回おこなった後に、ImmPRESS Reagent, anti-rabbit IgGもしくはanti-mouse IgG (Vector Laboratories)で1時間(室温)反応させた。その後、陽性部の検出のためにImmPACT™ DAB(Vector Laboratories)にて発色させ、蒸留水で洗浄後、ヘマトキシリンによる核染色を施して封入した。なお、観察および撮影はCCDカメラ(Nikon Digital Sight DS-Fi1; Nikon)を備えた光学顕微鏡(Eclipse E800M, Nikon)で行った。抗MBP抗体および抗S-100β抗体を用いた免疫染色では、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 μm×240 μm)を設定し、一領域あたりの抗体陽性面積をImageJ software (National Institutes of Health)で計測した。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抗体を用いた免疫染色では、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ImageJ software (National Institutes of Health)で計測した。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  $n = 40$ )。

## II-6. 微細構造学的解析

ラットから摘出した坐骨神経を2%パラホルムアルデヒドと2.5%グルタルアルデヒドの混合液中で1時間固定をおこなった。その後、1%四酸化オスミウムで1時間の固定をし、50%~100%の上昇エタノール系列で脱水後 LR White (medium grade, London Resin Co., Ltd., Berkshire, England) で包埋をおこなった。神経中央部の超薄切片を作製し、酢酸ウラニールとクエン酸鉛で対比染色をおこなった。観察には JEM-1400 Plus system. (JEOL Ltd.) を用い、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った ( $n = 10$ )。

## II-7. 統計処理

データは平均値±標準偏差 (SD) で示した。統計解析にはエクセル統計 (Version 1.04; Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan) を使用した。H&E 染色における神経中央部の厚さの比較と、抗 CD34 抗体を用いた免疫染色における血管の直径の比較には Student' s *t*-test を用いた。また von Frey test による患側後肢足底部の知覚機能の回復の評価、LFB 染色、抗 MBP 染色および抗 S-100B 染色での各領域における陽性反応面積の比較、透過型電子顕微鏡による髄鞘の厚さの比較には Tukey 検定による一元配置分散分析を用いた。なお有意水準は5%とした。

## III. 結果

### III-1. von Frey test による知覚機能評価

実験に使用したすべてのラットに感染などの術後合併症は認めなかった。von Frey test による知覚機能評価で、OCT 移植群は術後 6 日から 9 日の間で 50%反応閾値の低下を認め、術後 15 日の 50%反応閾値は sham 群の 50%反応閾値と同程度の数値を示した。また、切除のみ群では術後 15 日までで 50%反応閾値の低下を認めなかった。

### III-2. 再生した坐骨神経の肉眼所見

OCT 移植後 2 週および 4 週で OCT は完全に吸収していなかったため、移植部位より除去して観察した。すでに OCT 移植後 2 週で、中枢側と末梢側の両神経断端が連続していることが確認できた。再生した坐骨神経の中枢側と末梢側よりも、神経中央部に充血を認めた。また再生神経の太さを OCT 移植後 2 週と 4 週と比較すると、OCT 移植後 4 週のほうで再生神経が太かった。切除のみ群のラットでは、術後 4 週が経過しても中枢側と末梢側の両神経断端の連続を認めなかった。

### III-3. 再生した坐骨神経における軸索と髄鞘の観察

H&E 染色標本を組織学的に観察すると、坐骨神経には炎症性細胞の浸潤を認めなかった。なお、肉眼所見と同じく、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。H&E 染色標本で再生した神経の中央部の太さを OCT 移植後 2 週と 4 週とで比較してみると、OCT 移植後 2 週よりも OCT 移植後 4 週の方が太かった。この所見から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 週の方が有意に大きかった。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ので、再

生神経での髄鞘の存在を観察するために、LFB 染色による組織学的解析、抗 MBP 抗体および抗 S-100B 抗体による免疫組織学的解析、TEM による微細構造学的解析をおこなった。LFB 染色において、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、神経中央部および末梢側にかけて 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。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 LFB 陽性領域の面積が有意に広がった。しかし、健側の坐骨神経と比較すると、OCT 移植後 4 週の再生神経では、すべての領域で LFB 陽性領域の面積が有意に狭かった。再生神経に存在する髄鞘において、髄鞘特異的タンパクである MBP を検出するために免疫組織化学をおこなった。OCT 移植後 2 週では再生神経の中枢側にのみ 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、神経中央部および末梢側にかけて MBP 陽性反応を示す領域を認めた。なお、OCT 移植群の再生神経と健側の坐骨神経の MBP 陽性領域の面積を計測して比較した。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。しかし、健側の坐骨神経と比較すると、OCT 移植後 4 週の再生神経では、すべての領域で MBP 陽性領域の面積が有意に狭かった。つぎに、再生神経におけるシュワン細胞の分布を観察するために、抗 S-100B 抗体を用いた免疫組織化学をおこなった。OCT 移植後 2 週では再生神経の中枢側にのみ 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、神経中央部および末梢側にかけて S-100B 陽性反応を示す領域を認めた。OCT 移植群の再生神経と健側の坐骨神経の S-100B 陽性領域の面積を計測して比較した。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。また、健側の坐骨神経と比較すると、OCT 移植後 4 週の再生神経では、すべての領域で S-100B 陽性領域の面積が有意に狭かった。また TEM による微細構造学的な観察をおこない、再生神経の中央部における髄鞘の存在を確認し、その厚みを計測した。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。再生した髄鞘の厚さを計測すると、OCT 移植後 4 週の再生神経および健側の坐骨神経での平均値はそれぞれ、 $0.423 \pm 0.107 \mu\text{m}$ 、および  $2.151 \pm 0.477 \mu\text{m}$  であった。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が、その厚みは健側の坐骨神経の髄鞘と比較すると有意に薄かった。

#### III-4. 再生した坐骨神経内を走行する血管の観察

再生神経の肉眼的所見において、OCT 移植後 2 週で再生神経の中央部に充血が観察されたため、H&E 染色および抗 CD34 抗体による免疫組織化学をおこなった。得られた組織像より、OCT 移植群の再生神経と健側の坐骨神経の中央部での血管の数を計測して比較した。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。

#### IV. 考察

これまでの研究で、ラット坐骨神経切除モデルに OCT を移植することにより運動機能の回復が促進させることは明らかとなっているが、感覚機能の回復は検討されていなかった。顎口腔外科領域では第三大臼歯の抜歯、外科的矯正手術、外傷および腫瘍による神経の損傷などで下歯槽神経や舌神経といった知覚神経に損傷を及ぼすことがある。したがって、運動機能のみならず知覚機能の回復を促進させる治療法の開発は重要な課題である。そこで、本研究では配向性を付与したコラーゲンチューブを神経再生誘導管として利用し、ラット坐骨神経切除モデルへ移植することにより感覚機能の回復の効果を検討した。

まず、坐骨神経切除部位に OCT を移植し、患側後肢足底部の感覚機能の回復を von Frey test で観察したところ、OCT 移植群の 50%反応閾値は移植後 6 日から 9 日の間で急激に低下し、15 日で Sham 群と同程度の値になった。切除のみ群では移植後 15 日経過しても 50%反応閾値に変化がみられなかったことから、知覚機能の回復は切除された神経の中枢側と末梢側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る。今回の実験では、OCT 移植後 2 週の肉眼所見および H&E 染色で、中枢側と末梢側の神経断端は連続していることから神経が再生したことを確認できた。また、OCT 移植後 2 週よりも、OCT 移植後 4 週で再生した神経は有意に太かった。

そこで、再生した神経組織中にある髄鞘の存在を明らかにするために、LFB 染色および抗 MBP 抗体による免疫組織化学をおこなった。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。これらの結果から、神経の再生は中枢側から末梢側にかけて時間の経過とともに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、抗 S-100B 抗体による免疫組織化学をおこなった。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、LFB 染色および抗 MBP 抗体による免疫組織化学のデータと一致していた。これらのことから、OCT 移植後 4 週では中枢側から末梢側にかけてシュワン細胞および髄鞘の存在を確認することができたことから、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。

さらに、髄鞘化された再生神経の微細構造学的解析をするために、TEM により再生神経の中央部を観察した。OCT 移植後 2 週の神経中央部にはシュワン細胞と無髄軸索によって構成される Remark bundles 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。この結果は、LFB 染色および抗 MBP 抗体による免疫組織化学の結果と一致していた。しかし健側群の坐骨神経と比較すると、再生神経中央部に形成された髄鞘は、その厚さが有意に薄かった。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、また髄鞘の伸長に必要なシュワン細胞を誘導するには血管新生が必要であることが報告されている。今回は、OCT 移植による血管新生を評価するために、血管内皮細胞マーカーである CD34 陽性領域を観察して再生神経内に存在する血管を観察した。結果として血管数は、健側群の坐骨神経と比較して、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。この結果を以前の研究の結果と合わせて考察すると、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。しかしながら、本研究では OCT が持つコラーゲン線維の配向性が血管新生の方向を誘導する効果を有しているかは検討していないため、今後の研究課題とする。

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。