

博士學位論文

生分解性人工神経の神経再生における
塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）徐放化
システムの有用性

近畿大学大学院
医学研究科医学系専攻
福田 智 一

博士學位論文

生分解性人工神経の神経再生における
塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）徐放化
システムの有用性

平成 29 年 11 月

近畿大学大学院医学研究科
医学系専攻(指導:磯貝典孝 教授)

福 田 智 一

生分解性人工神経の神経再生における 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 徐放化システムの有用性

近畿大学医学部 形成外科学教室

福 田 智 一

(指導：磯貝 典孝 教授)

Effect of bFGF slow-release system in nerve regeneration using biodegradable nerve conduit

Tomokazu Fukuda

Department of Plastic Surgery,

Kindai University Faculty of Medicine

(Director : Prof. Noritaka Isogai)

抄 録

背景：生分解性素材による人工神経は、未だ自家神経の治療成績に及ばない。そこで、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 徐放化システムを人工神経の移植時に併用し、神経再生誘導を検討した。

方法：ELISA 法を用いて bFGF 徐放化システムの徐放特性について、bFGF 量の経時的变化を測定し検討した。次に、ラットの坐骨神経欠損モデルを作成し、人工神経を移植した後にチューブ周囲に bFGF 徐放化システムを併用した。人工神経のみを移植した群をコントロールとした。移植後 2 週、4 週、8 週、20 週にて標本摘出し、組織学的検索、免疫組織学的検索および透過型電子顕微鏡の画像解析を実施し、神経再生誘導能を検討した。

結果：bFGF 徐放化システムでは、観察期間 [2 週間] において一定量の bFGF が持続的に徐放されていた。人工神経に bFGF 徐放化システムを併用した場合、血管内皮細胞の遊走距離は伸長し、新生血管数は増加した。さらに、その後のシュワン細胞の遊走距離および軸索の成長距離はともに伸長した。軸索数及び軸索総面積の画像解析結果から経時的に神経成熟度も同時に高まることが判明した。

結論：bFGF 徐放化システムは人工神経の再生時に関与する血管内皮細胞およびシュワン細胞の両細胞群に対して促進的に作用し、人工神経の再生誘導能を向上させる上で有用であることが示唆された。

Key words：生分解性人工神経, bFGF, 徐放化システム, 神経再生

緒 言

末梢神経欠損の治療は、自家神経移植が第一選択である。この自家神経移植の供給源としては腓腹神経・前腕皮神経・後骨間神経終末枝などが用いられるが、これらの採取には少なからず犠牲を伴う。そのため近年では自家神経移植の代替として、人工神経や同種神経移植が臨床現場に導入されている¹⁻³⁾。

1979年 Lundborg らが報告したシリコンチューブを用いた神経再生が人工神経移植の最初の試みである⁴⁾。続いて、中空内部構造をもつ管腔状生分解性素材をベースにした人工神経が開発されてきた。近年では、神経再生誘導能を向上させるために、管腔内をコラーゲンで充填した人工神経が試作された。これらの生分解性素材による人工神経では神経採取に伴う犠牲はないものの、自家神経移植や同種神経移植に比較して神経再生誘導能が劣り⁵⁻⁷⁾、いまだ自家神経移植の治療成績には及ばない。

神経の再生誘導には移植神経周囲の血行が重要である⁸⁾。塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF: basic fibroblast growth factor) は血管新生を促すサイトカインであるため、これを生分解性人工神経に付与することで効率よく人工神経断端および周囲に血管新生を誘導し、神経再生誘導そのものを促進しうると推測される。ただし生体内での bFGF 半減期は極めて短く不安定であるため (血中半減期: $T_{1/2} = 1.5$ min), 田畑らはこの欠点を補うべく、ゼラチン微粒体に bFGF を組み合わせた bFGF 徐放化システムを作製し、持続的 bFGF 投与方法を開発した⁹⁾。

そこで今回我々は、この bFGF 徐放化システムを生分解性人工神経に併用し、人工神経の再生誘導能を促進しうるかを検討した。

方 法

1) bFGF 徐放化システムの作製

bFGF 徐放化システム作製は田畑らの手法を踏襲した⁹⁾。まず bFGF 担体となるゼラチン微粒子を以下のよう⁹⁾に作製した。10% ゼラチン水溶液 0.2 ml (等電点 5, 豚皮ゼラチン, 新田ゼラチン株式会社, 大阪) をオリーブオイル 5 ml に加え、40°C で 1 時間静置した。攪拌後 4°C で冷蔵して粒子化し、さらにゼラチン周囲に付着したオリーブオイルをアセトン 1.5 ml にて洗浄した。得られた溶液を 4°C, 5,000 rpm で 5 分間遠心分離し、再度 4°C のアセトンにて 3 回洗浄した。その後 4°C の冷蔵庫内で 1 週間乾燥させ、沈殿物であるゼラチン粒子を得た。次にゼラチン粒子の架橋を行うため、ゼラチン粒子 1 mg に対し 0.1% ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート 1 ml および 25% グルタルアルデヒド 5 L を加え、4°C にて 24 時間攪拌した。次にゼラチン粒子懸濁液を 5,000 rpm で 5 分間遠心分離し、沈査ゼラチン粒子にグリシン溶液を加え、さらに 1 時間常温で攪拌した。続いて蒸留水を用いた遠心分離による洗浄を 3 回行った。得られたゼラチン粒子に超純水を加え、ポアサイズ 70 μ m および 30 μ m のストレーナーを用いて粒子径を均一化した。直径 30 ~ 70 μ m のゼラチン粒子を回収し、液体窒素で凍結させた。凍結真空乾燥したゼラチン微粒子 (直径約 10 μ m) をエチレンオキサイドガス滅菌した。最後にゼラチン微粒子に bFGF を含浸させるため、bFGF 100 μ g (トラフェルミン, 科研製薬, 東京) を Ca/Mg 不含リン酸緩衝液 60 μ l (Dulbecco's phosphate-buffered saline/PBS, Gibco) に溶解し、ゼラチン微粒子 10 mg を加えて 4°C で 24 時間または 37°C で 1 時間静置した。

2) ELISA 法による bFGF 徐放量の測定

生分解性素材による人工神経として、ナーブリッジ[®] (直径 1.5 mm, 長さ 12 mm, 東洋紡株式会社, 大阪) を用いた。この人工神経はポリグリコール酸 (PGA) 線維束をらせん状に配列し、壁厚を 500 μ m に調整した管腔構造体である。管腔内部は I 型および III 型コラーゲンスポンジによって充填され、外表面は内腔と同様の組成を有するコラーゲンにて被覆されている。この生分解性人工神経上に、マイクロピペットを用いて bFGF 含浸ゼラチン微粒子を均等に塗布した。またこの bFGF 徐放化システムの徐放特性を調べるため、bFGF 含有ゼラチン微粒子を塗布した生分解性人工神経を PBS (pH 7.4, 37°C, 10 ml) に浸漬させ、浸漬後 1 時間, 2 日, 4 日, 6 日, 8 日, 10 日, 12 日, 14 日目に上清を 100 μ l ずつ回収した。上清中に含まれる bFGF 量を ELISA 法 (RayBio Human bFGF ELISA Kit) にて測定した。

3) 走査電顕を用いた生分解性人工神経の表面観察

走査電顕を用いて bFGF 徐放化システム投与後における生分解性人工神経の表面観察を行った。生分解性人工神経への bFGF 含浸ゼラチン微粒子の塗布は、上記と同様にマイクロピペットを用いて行った。bFGF 含浸ゼラチン微粒子の塗布後、生分解性人工神経には乾燥・金凝着の操作を加えた。ゼラチン微粒子と生分解性人工神経との接着状態の観察には走査型電子顕微鏡 (S-900, Hitachi, Japan) を用いた。

4) 生分解性人工神経の移植

本研究で行った動物実験はすべて近畿大学医学部動物実験委員会規定に基づいて実施された。実験動物は 14 週齢 SD ラット (平均体重 280-324 g, 雄, 102 匹, Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN, USA) を用いた。飼育は、クリーンラック内で室温 22°C, 湿度 50%, 12 時間明暗サイクルの条件下に行った。飼料は放射線滅菌 (3 mG) された固形飼料を与え、飼料用水は制限なく与えた。

ウレタンおよび α -クロラロースにて全身麻酔後、両大腿の坐骨神経を 10 mm 切断して神経欠損モデルを作成した。次に生分解性人工神経を坐骨神経の神経両断端に 1 mm ずつ引き込み、手術用顕微鏡下に 10-0 ナイロン糸を用いて水平マットレス縫合した。bFGF 徐放群 (実験群) およびコントロール群の 2 群を設定し、実験群では生分解性人工神経を移植した後に bFGF 含有ゼラチン微粒子を塗布した (n=48)。またコントロール群では生分解性人工神経の移植後、bFGF 含有ゼラチン微粒子は塗布しなかった (n=48)。移植後の評価期間は 2 週, 4 週, 8 週, 20 週とした (図 1)。

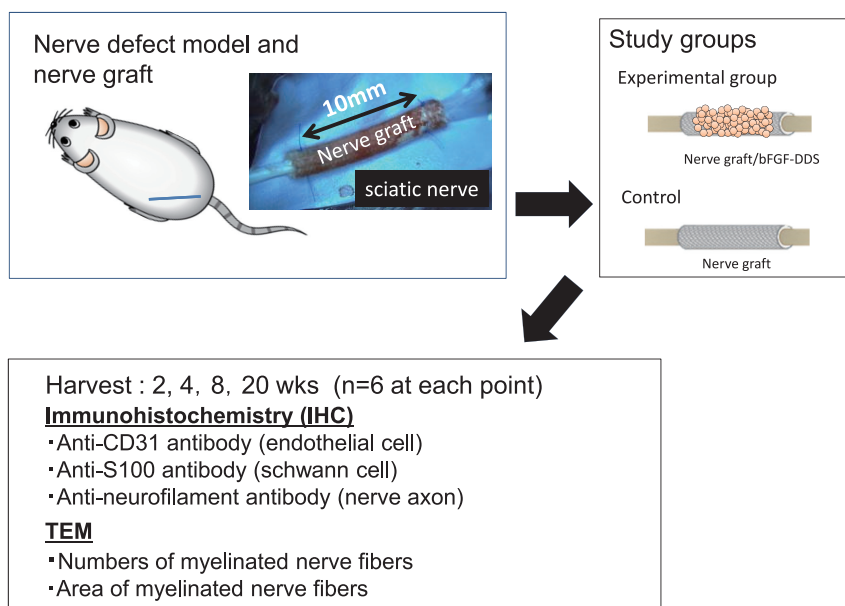


図1. 実験プロトコール.

5) 免疫組織学的手法を用いた神経成長速度の評価

移植後 2 週, 4 週, 8 週, 20 週目に生分解性人工神経を採取し, 組織を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて 3 日間浸漬・固定した. 次いでパラフィンブロックを作製し, ミトクローム (LEICA SM2000R) にて長軸方向に $5\mu\text{m}$ の薄切切片を作成した. 組織学的評価では, 血管内皮細胞の染色をするために抗 CD31 抗体 (anti-CD31 Rabbit polyclonal antibodies : Abcam, ab28364), シュワン細胞の染色では抗 S100 抗体 (anti-S100 Rabbit polyclonal antibodies : Dako, Z0311), 軸索の染色では抗 NF 抗体 (anti-neurofilament 68kDa Mouse monoclonal antibodies : Dako, M0762) を用いた.

免疫組織染色は以下の方法で行った. まず組織切片を脱パラフィン処理した. 次に抗 CD31 抗体用の切片は, アルカリ性 (pH 8.0) 下で加熱処理した. また, 抗 S100 抗体および抗 NF 抗体は, 酸性 (pH 6.0) 下で加熱処理して抗原の賦活化を行った. 抗原賦活化した切片をリン酸緩衝液 (0.01 M, pH 7.4) で洗浄後, 流水洗を行い, 3.0% H_2O_2 含有メタノール溶液で内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行った. 上記リン酸緩衝液で洗浄後, $0.4 \sim 0.8\mu\text{g/ml}$ (50 ~ 100 倍希釈) の抗 CD31 抗体, $0.1 \sim 0.2\mu\text{g/ml}$ (700 ~ 800 倍希釈) の抗 S100 抗体, $0.1 \sim 0.2\mu\text{g/ml}$ (700 ~ 800 倍希釈) の抗 NF 抗体を, 室温にて 30 ~ 60 分間反応させた. 1 次抗体反応後に上記リン酸緩衝液で洗浄し, 抗 CD31 抗体および抗 S100 抗体用の切片は Histostar mouse (Rb) で, 抗 NF 抗体の切片は Histostar rat (Ms+Rb) で室温にて 15 ~ 30 分間 2 次抗体反応させた. 再び上記リン酸緩衝液で洗浄後, DAB (ニチレイ) にて発色させて流水洗を行った後, マイヤーヘマトキシリンで核染色した. 作製した切片は脱水・透徹・封入した. CD31 抗体を用いた血管内皮細胞の染色では, 生分解性人工神経の中枢部 (中枢側断端より 2.5 mm 末梢側), 中央部, 末梢部 (末梢側断端より 2.5 mm 中枢側) の 3 領域における新生血管数を計測した. 次に S100 抗体を用いたシュワン細胞の染色では, 中枢側および末梢側から生分解性人工神経内へのシュワン細胞の遊走距離を測定した. さらに抗 NF 抗体を用いた軸索の染色では, 中枢側から生分解性人工神経内への軸索の伸長距離を測定した. シュワン細胞の遊走距離および軸索の伸長距離は, 画像解析ソフトウェア Image J (National Institutes of Health, MD, USA) にて測定した.

6) 透過型電子顕微鏡を用いた神経成熟度の評価

移植後 20 週目に採取した生分解性人工神経は、4% グルタルアルデヒドにて 3 日間浸漬・固定した。組織はウルトラミクロトーム (LEICA EM UC7) にて横切断方向に薄切 ($1.5\mu\text{m}$ 厚) 後、4% オスミウムで後固定した。アルコール系列で脱水し、ウラン染色の後、エポン包埋した。これを 700A 厚で超薄切し、ウランおよび酢酸鉛で染色後、透過型電子顕微鏡 (H-7700, Hitachi, Japan) で観察した。観察部位は生分解性人工神経の中枢部・中央部・末梢部とし、軸索を確認しうる最大スケールである $50\mu\text{m} \times 40\mu\text{m}$ ($= 2,000\mu\text{m}^2$) で軸索数と軸索面積を測定した。各群の神経断面中央付近の 3 視野を撮影し、単位面積 $2,000\mu\text{m}^2$ あたりの平均値を算出した。解析には画像解析ソフトウェア Image J を用いた。

7) 統計解析

すべての実験結果は平均 \pm 標準誤差 (SE) として表した。統計学的有意差は、2 グループ間比較に対しては Student t 検定、3 グループ以上に対しては一元配置分散分析 (one-way analysis of variance/one-way ANOVA) および Holm 後検定で判定した。データ解析処理には GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を使用し、 $P < 0.05$ で有意差ありと判定した。

結 果

1) 生分解性人工神経における bFGF 徐放量とゼラチン微粒子の局在

生分解性人工神経に併用した bFGF の経時的徐放動態を調べるため、ELISA 法にて bFGF 量を測定した (図 2)。その結果、bFGF は投与後一定の速度で徐放され、投与後 14 日間目において bFGF 全投与量の 64.9% が徐放された。またこの観察期間においては bFGF 濃度は約 $5\mu\text{g}/\text{日}$ に維持されていた。次に走査電顕を用いてゼラチン微粒子の投与後における人工神経の表面観察を行った (図 3)。その結果、ゼラチン微粒子は生分解性人工神経の側面に沿って局在していた。さらにゼラチン微粒子は隣接する周囲組織に漏出していった。

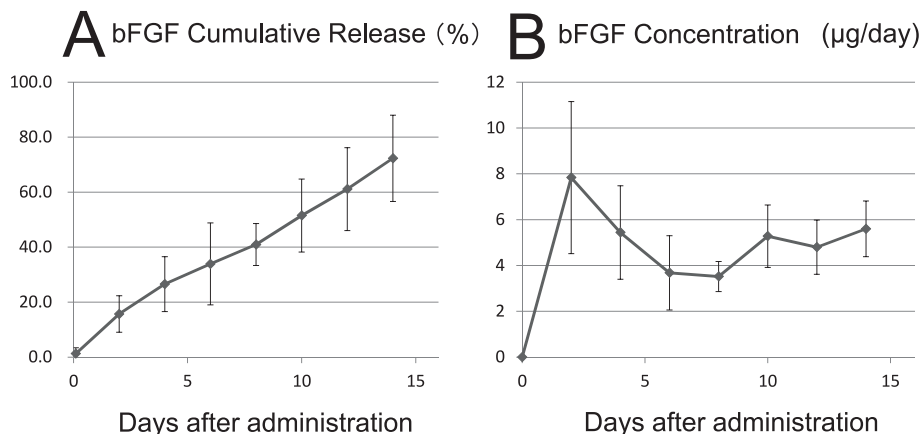
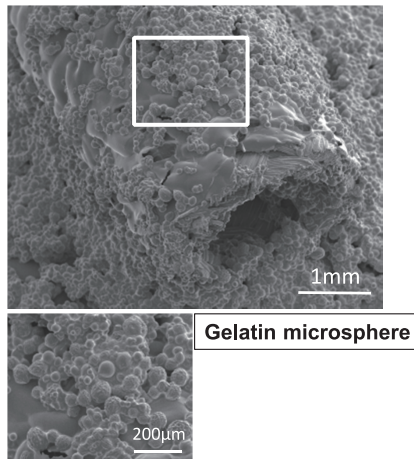


図 2. 生分解性人工神経に併用した bFGF 徐放化システムの徐放特性

生分解性人工神経に bFGF 徐放化システムを併用し、ELISA 法 (RayBio Human bFGF ELISA Kit) にて徐放される bFGF 濃度を経時的に測定した。A: 生分解性人工神経より徐放される経時的累積 bFGF 徐放量比率。B: 24 時間毎の bFGF 濃度。各群 $n = 6$, 平均値 \pm 標準誤差にて表記。

Experimental group



Control

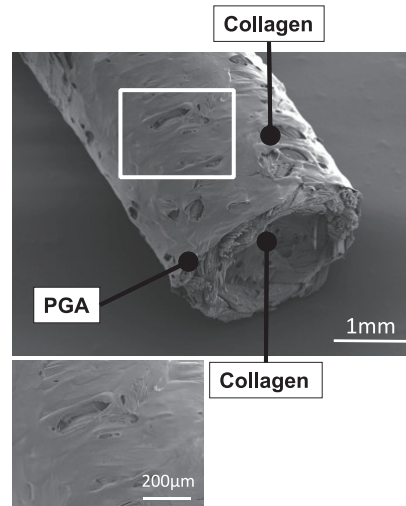


図3. bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経の走査電子顕微鏡所見
生分解性人工神経に bFGF 徐放化システムを併用した群（実験群：左）と、併用していない群（コントロール群：右）を走査電子顕微鏡にて観察した。各群 n=6, 代表的所見を提示。

2) 生分解性人工神経移植後の肉眼所見

移植後 2 週目の実験群では、生分解性人工神経は周囲組織によって被覆されていた（図 4）。移植経過に伴い、生分解性人工神経の周囲組織は厚く広く形成され、生分解性人工神経は周囲組織内に埋没していた。一方、コントロール群では生分解性人工神経は周囲組織に被覆されることなく、観察期間を通して神経の連続性が観察された。しかし、移植経過に伴い生分解性人工神経は細く変化し、移植後 20 週目において菲薄化していた。

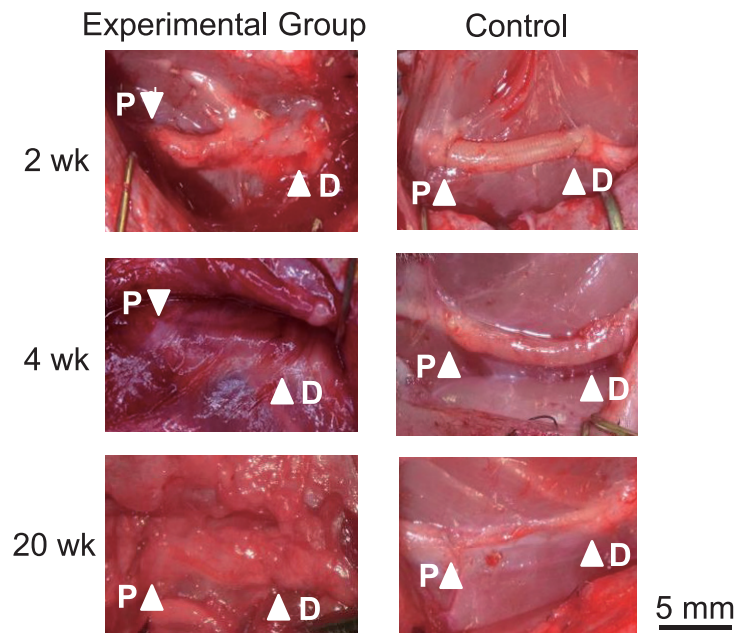


図4. 生分解性人工神経移植後の肉眼所見
坐骨神経を切除された SD ラットに bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経（左）および併用しない生分解性人工神経（右）を移植し、経時的肉眼的観察を行った。P：中枢部，D：末梢部。各群 n=3, 代表的所見を提示。

3) 免疫組織学的手法を用いた神経成長速度

生分解性人工神経の3部位（中枢部，中央部，末梢部）における新生血管数の経時的变化を検討した。その結果，移植後2週目の実験群において，数多くの新生血管が認められた。新生血管は，特に中枢部と中央部において有意に増加していた。移植後4週目では，実験群の末梢部において有意に新生血管数の増加が認められた（図5, 7）。中枢部と中央部では，両群間に有意差は認められなかった。移植後20週目では，両群において中枢部および中央部の新生血管数は減少した。一方，末梢部では，実験群に比較しコントロール群において有意に新生血管数の増加が認められた（図6, 7）。これらの結果より，実験群においては，新生血管数は移植後2週目から4週目において増加し，移植後20週目では減少することが判明した。一方，移植後20週目のコントロール群では，中枢部と中央部において実験群と同様の新生血管数の減少傾向が認められたが，末梢部においては有意に増加していた（図7）。

生分解性人工神経におけるシュワン細胞遊走距離の経時的变化を検討した結果，移植2週目の両群において，中枢側および末梢側の両端からシュワン細胞の遊走像が観察された（図8）。また末梢側と比較して，中枢側からの遊走距離がより長い傾向を認めた。移植2週目および4週目の実験群では，コントロール群に比較してシュワン細胞遊走距離が長い傾向が認められた。また移植後8週目では，両群ともに中枢側から末梢側まで連続したシュワン細胞が観察された（図9）。

軸索伸長距離の経時的变化を検討した結果，両群において生分解性人工神経の中枢側から軸索伸長が観察された（図10）。また移植20週目において軸索は末梢側に到達していることが確認された。移植期間を通じて実験群の軸索伸長は促進傾向を示したがコントロール群との間に統計学的有意差は認められなかった（図11）。

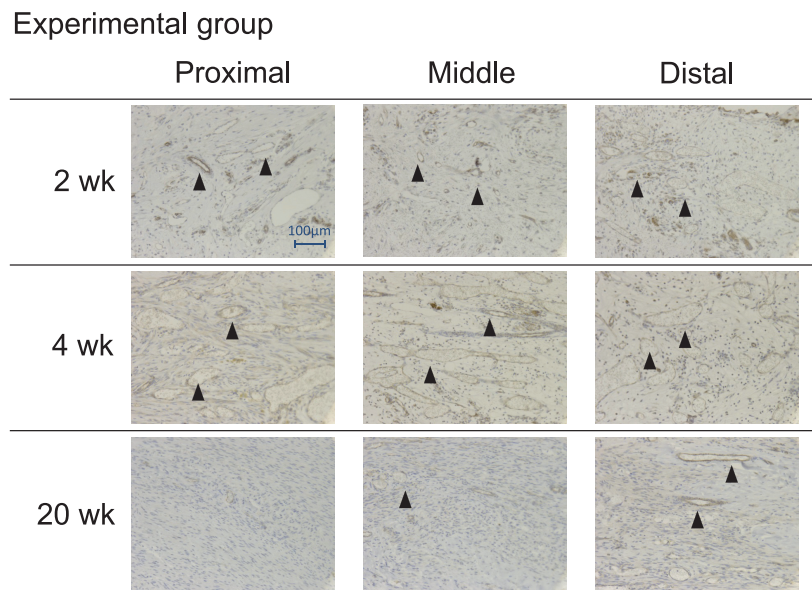


図5. bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経の組織学的評価

坐骨神経切除 SD ラットに移植された bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経（実験群）を経時的に採取し，中枢部（左），中央部（中）・末梢部（右）における新生血管を CD31 染色にて評価した。矢頭：新生血管による管腔形成。各群 n=6，代表的所見を提示。

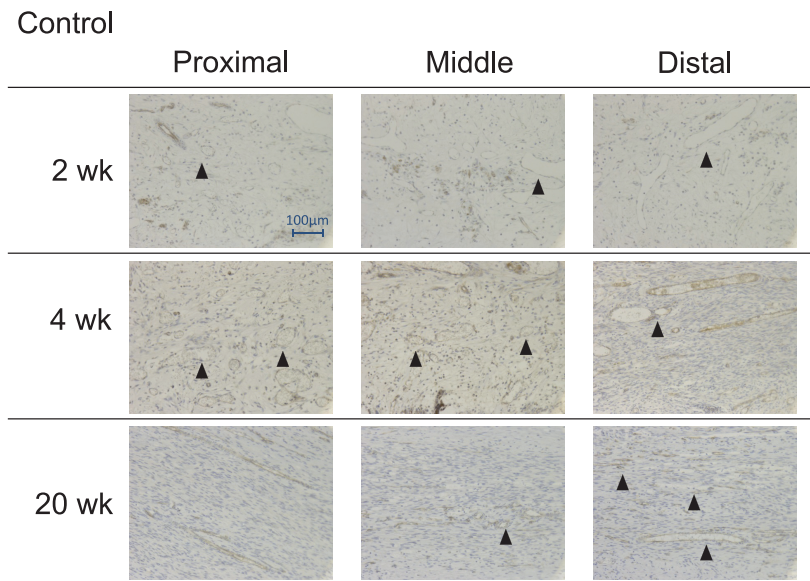


図6. bFGF 徐放化システム未使用時の生分解性人工神経の血管新生の組織学的評価
 坐骨神経切除 SD ラットに移植された bFGF 徐放化システム未使用の生分解性人工神経（コントロール群）を経時的に採取し，中枢部（左），中央部（中）・末梢部（右）における新生血管を CD31 染色にて評価した．矢頭：新生血管による管腔形成．各群 n=6，代表的所見を提示．

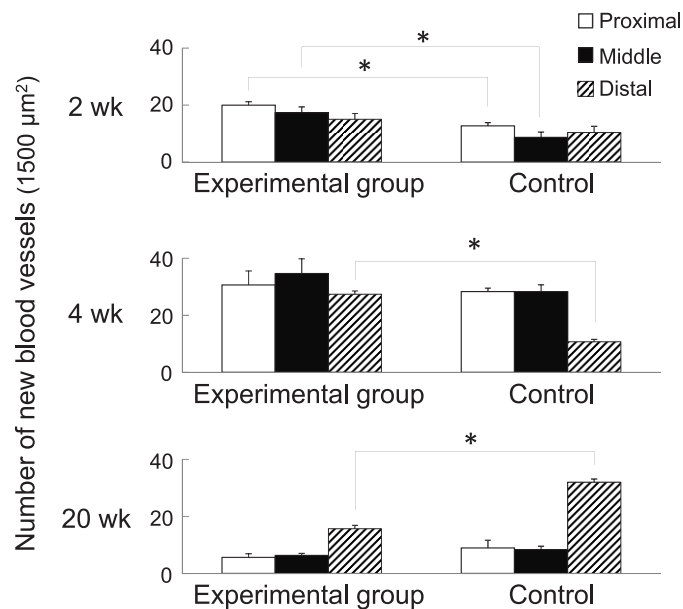


図7. bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経内での血管新生の定量的評価
 坐骨神経切除 SD ラットに移植された bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経（実験群）および bFGF 徐放化システム未使用の生分解性人工神経（コントロール群）における，人工神経内 $1,500 \mu m^2$ あたりの CD31 染色で示される血管新生数を比較した．各群 n=6，平均値 \pm 標準誤差にて表記．

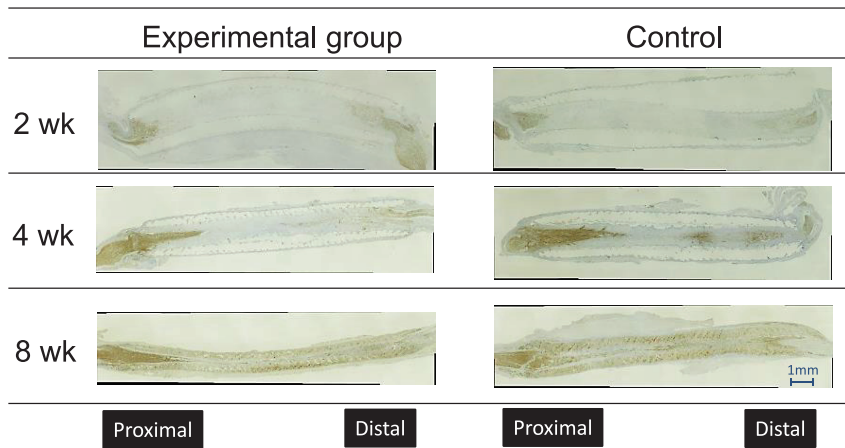


図8. bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経内でのシュワン細胞の組織学的評価
 坐骨神経切除 SD ラットに移植された bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経（実験群）および bFGF 徐放化システム未使用の生分解性人工神経（コントロール群）を経時的に採取し、中枢部（左）・末梢部（右）におけるシュワン細胞の分布を S100 染色にて評価した。各群 n=6, 代表的所見を提示。

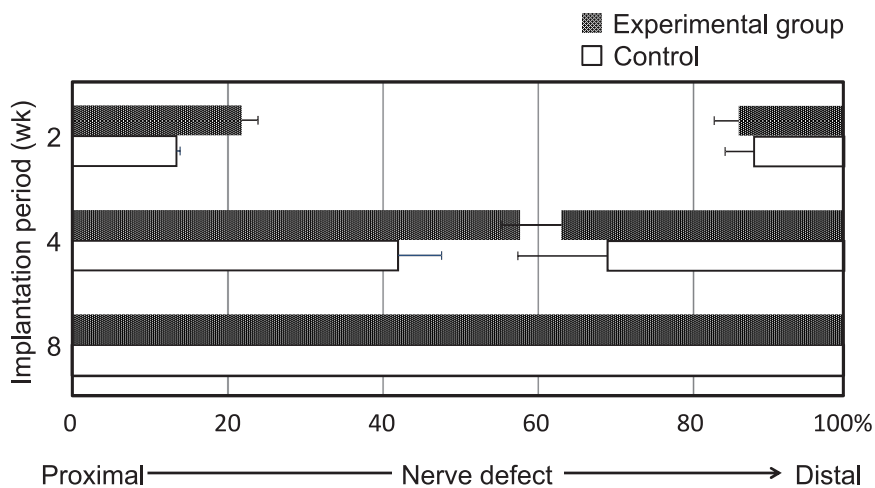


図9. bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経内でのシュワン細胞の定量的評価
 坐骨神経切除 SD ラットに移植された bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経（実験群）および bFGF 徐放化システム未使用の生分解性人工神経（コントロール群）における、S100 染色で示されるシュワン細胞伸長距離を比較した。各群 n=6, 平均値 ± 標準誤差にて表記。

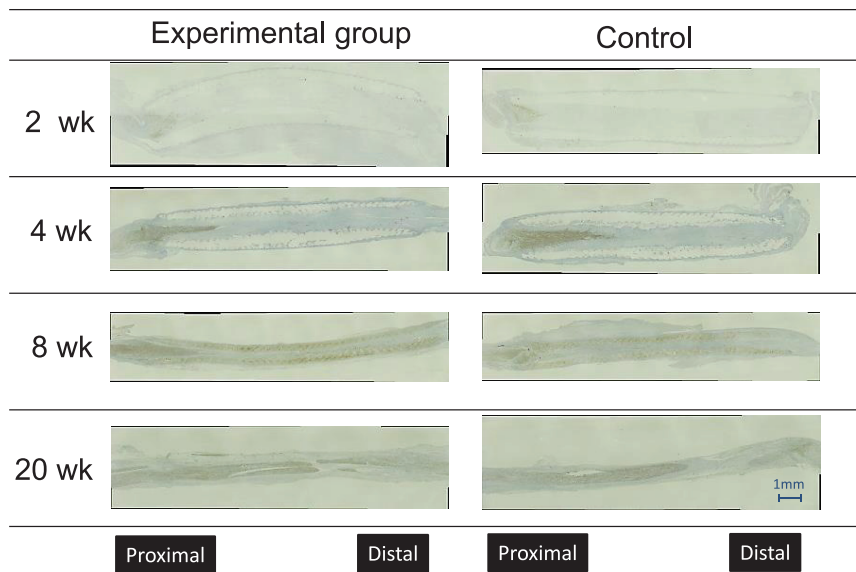


図10. bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経内での神経軸索再生の組織学的評価
坐骨神経切除 SD ラットに移植された bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経（実験群）および bFGF 徐放化システム未使用の生分解性人工神経（コントロール群）を経時的に採取し、中枢部からの神経軸索再生を NF 染色にて評価した。各群 n=6, 代表的所見を提示。

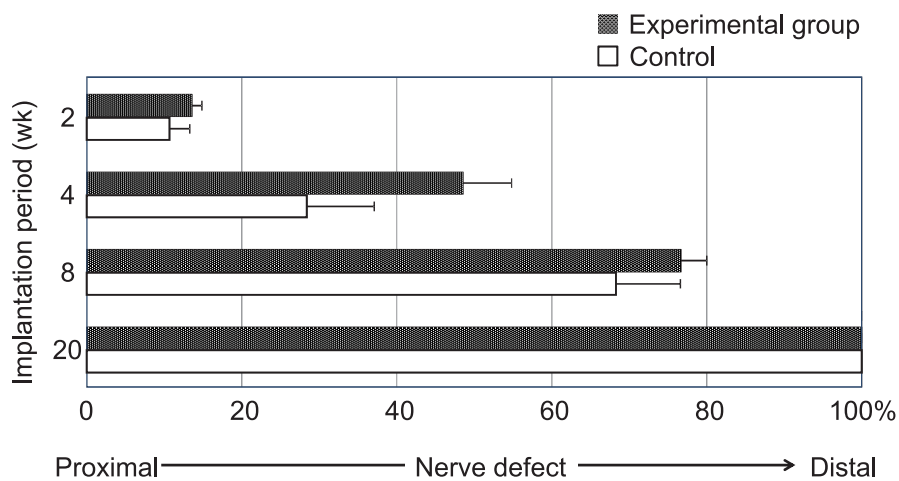


図11. bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経内での神経軸索再生の定量的評価
坐骨神経切除 SD ラットに移植された bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経（実験群）および bFGF 徐放化システム未使用の生分解性人工神経（コントロール群）における、NF 染色で示される神経軸索再生距離を比較した。各群 n=6, 平均値 ± 標準誤差にて表記。

生分解性人工神経における実験群とコントロールのシュワン細胞遊走距離と軸索伸長距離を比較評価した。その結果、徐放化システムの投与によって、移植 2 週目および 4 週目において、シュワン細胞の遊走距離および軸索伸長距離が 1.3 ~ 1.7 倍長くなる傾向が認められた (表 1)。

表 1. 生分解性人工神経における実験群とコントロールのシュワン細胞遊走距離と軸索伸長距離の比較検討

		Schwann cell (mm)	Axon (mm)
2 wk	Experimental	3.6	1.4
	Control	2.5	1.1
	Exp./Con. ratio	1.4	1.3
4 wk	Experimental	9.5	4.9
	Control	7.3	2.8
	Exp./Con. ratio	1.3	1.7
8 wk	Experimental	10.0	7.7
	Control	10.0	6.8
	Exp./Con. ratio	1.0	1.1
20 wk	Experimental	10.0	10.0
	Control	10.0	10.0
	Exp./Con. ratio	1.0	1.0

4) 透過型電子顕微鏡を用いた神経成熟度

生分解性人工神経断面の有髄神経をトルイジンブルー染色したところ、染色された有髄神経に明らかな偏位は認められなかった。そこで透過型電子顕微鏡を用いて詳細に解析することとした。まず正常坐骨神経における有髄神経の透過型電子顕微鏡画像と軸索面積の分布を確認した(図12)。正常坐骨神経の横断面中央部では、断面積が $2\mu\text{m}^2$ の軸索を頂点とする一峰性曲線の分布が観察された。次に移植後20週目の実験群(図13)およびコントロール群(図14)の中枢部、中央部、末梢部を採取し、それらの横断面中央部 $2,000\mu\text{m}^2$ における有髄神経軸索を透過型電子顕微鏡にて観察し、有髄神経軸索面積を比較検討した。その結果、実験群では断面積が $2\mu\text{m}^2$ の有髄神経数は正常坐骨神経とほぼ同等の値を示した(図13)。一方、コントロール群の有髄神経面積は低値であり、比較的細い軸索の有髄神経から構成されていた(図14)。この有髄神経軸索を各群間で比較したところ(図15)、実験群の単位面積あたりの軸索面積は正常坐骨神経に比して末梢部でのみ有意な低下を示したが、中枢部および末梢部においては有意差を認めず、ほぼ同等の分布であった。一方でコントロール群の単位面積あたりの軸索面積は、正常坐骨神経に比して中枢部、中央部、末梢部の全領域において有意な低下を示した。

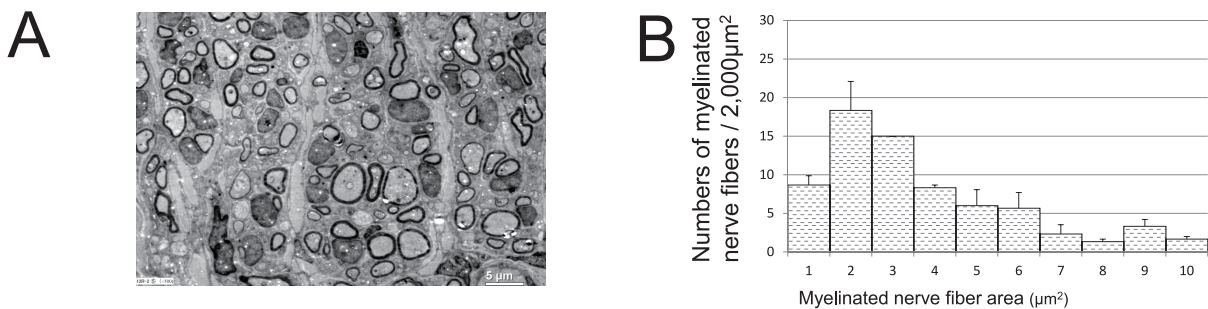


図12. 正常坐骨神経の透過型電子顕微鏡所見

上：SD ラットから切除された正常坐骨神経横断面中央部における有髄神経軸索を透過型電子顕微鏡で観察した。n=6, 代表的所見を提示。下：中央部 $2,000\mu\text{m}^2$ あたりの有髄神経軸索を面積別に定量的評価した。

Experimental group (20 wk)

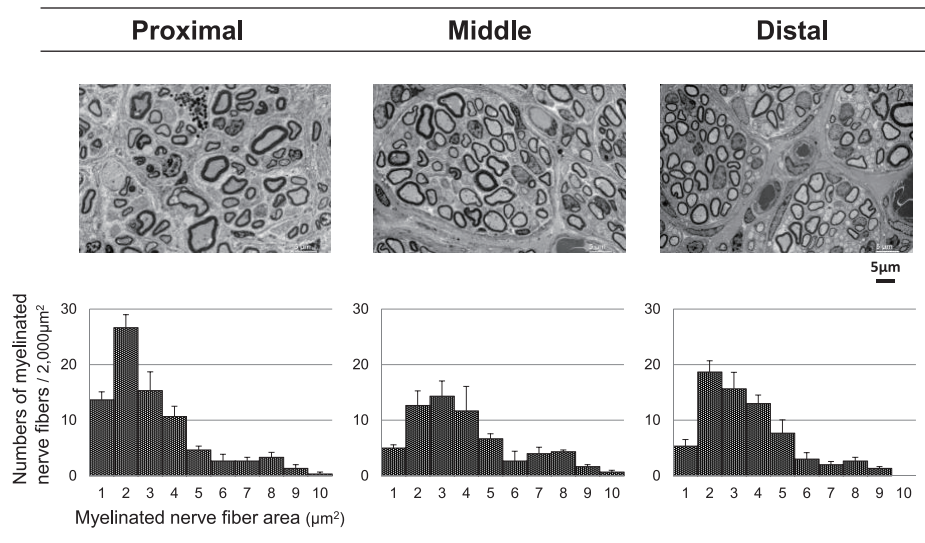


図13. bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経の移植後 20 週での透過型電子顕微鏡所見
 上：坐骨神経切除 SD ラットに移植された bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経 (コントロール群) を移植後 20 週目に採取し, 中枢部 (左), 中央部 (中)・末梢部 (右) の横断面中央部における有髓神経軸索を透過型電子顕微鏡で観察した. 下：中央部 $2,000 \mu\text{m}^2$ あたりの有髓神経軸索面積を面積別に定量的評価した. 各群 $n=6$, 平均値 \pm 標準誤差にて表記.

Control (20 wk)

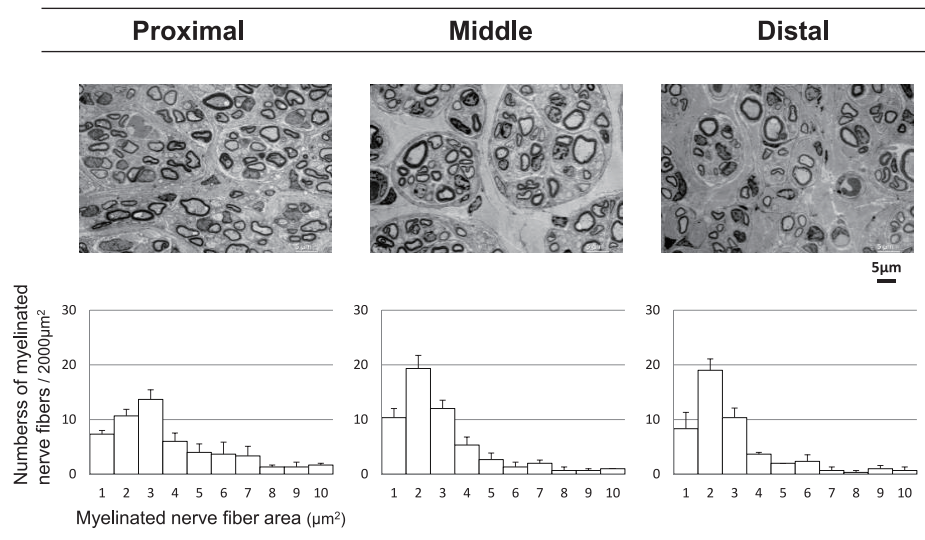


図14. bFGF 徐放化システム未使用時の生分解性人工神経の移植後 20 週での透過型電子顕微鏡所見
 上：坐骨神経切除 SD ラットに移植された bFGF 徐放化システム未使用の生分解性人工神経 (コントロール群) を移植後 20 週目に採取し, 中枢部 (左), 中央部 (中)・末梢部 (右) の横断面中央部における有髓神経軸索を透過型電子顕微鏡で観察した. 下：中央部 $2,000 \mu\text{m}^2$ あたりの有髓神経軸索面積を面積別に定量的評価した. 各群 $n=6$, 平均値 \pm 標準誤差にて表記.

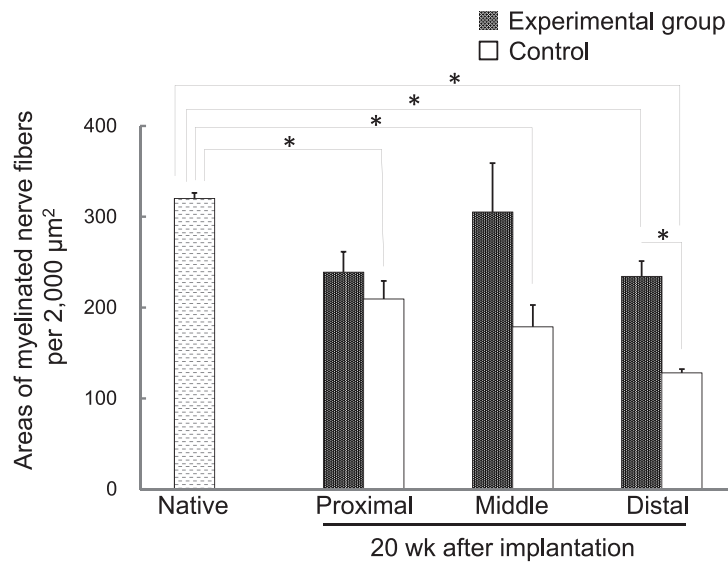


図15. 生分解性人工神経移植後 20 週目における有髄神経軸索面積の定量的評価
 坐骨神経切除 SD ラットに移植された bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経（実験群）および bFGF 徐放化システム未使用の生分解性人工神経（コントロール群）を移植後 20 週に採取し、中枢部（左）、中央部（中）・末梢部（右）の横断面中央部 $2,000 \mu\text{m}^2$ における有髄神経軸索面積を透過型電子顕微鏡で測定した。Native: 正常坐骨神経。各群 n=6, 平均値 \pm 標準誤差にて表記。

さらに移植 20 週目における神経横断面（中枢部、中央部、末梢部）中央部について、単位面積 $2,000 \mu\text{m}^2$ あたりの有髄神経数を比較検討した（図 16）。その結果、実験群の有髄神経数は正常坐骨神経に比して有意差を認めなかった。一方でコントロール群は、中枢部および末梢部において、正常坐骨神経および実験群と比較して有意に低下していた。

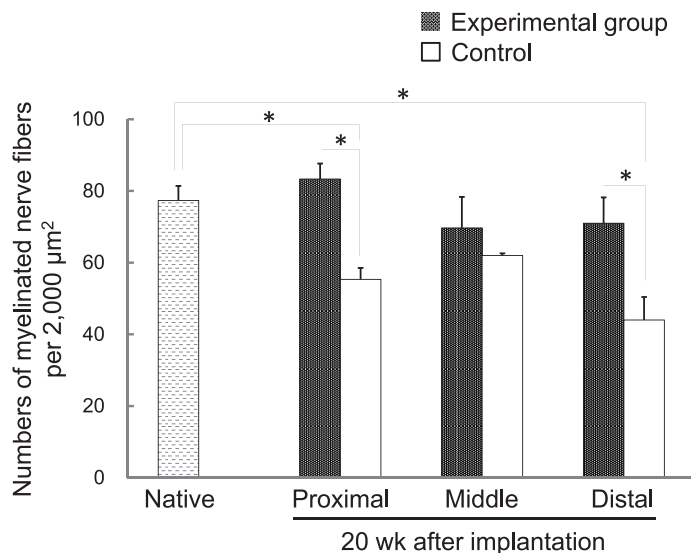


図16. 生分解性人工神経移植後 20 週目における有髄神経軸索数の定量的評価
 坐骨神経切除 SD ラットに移植された bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経（実験群）および bFGF 徐放化システム未使用の生分解性人工神経（コントロール群）を移植後 20 週に採取し、中枢部（左）、中央部（中）・末梢部（右）の横断面中央部 $2,000 \mu\text{m}^2$ における有髄神経軸索数を透過型電子顕微鏡で測定した。Native: 正常坐骨神経。各群 n=6, 平均値 \pm 標準誤差にて表記。

考 察

末梢神経欠損の治療において、中空構造体をした人工神経の適応は 2 cm 以内とされ、それ以上の神経欠損長に対しては同種神経移植や自家神経移植が適応されている^{1) 10)}。しかし、本邦において同種神経移植は法的に実施不可能であり、人工神経の改良が必須とされる状況が続いている。今回の実験に使用した人工神経は、管腔壁の厚さを約 500 μm に調整した PGA 線維束を管腔構造体に形成した生分解性素材である。また、従来の中空構造を持つ生分解性人工神経と異なり、内腔はコラーゲンスポンジで充填されている。内腔のコラーゲンスポンジは、神経再生に寄与する種々の細胞が遊走・増殖する際の足場となり、神経再生能が促進することが報告されている¹¹⁻¹⁷⁾。

末梢神経の再生については、以下のような 3 段階の再生機序が報告されている¹⁸⁾。まず神経損傷部は低酸素状態となり、マクロファージが遊走して血管内皮細胞増殖因子 A (VEGF-A) を分泌する。次に神経組織内に血管内皮細胞が遊走し、神経走行方向に柱状の血管形成が生じる。最後に、形成された血管に沿ってシュワン細胞が遊走し、軸索が再成長する。このため神経の再生誘導過程においては、神経再生に先行する血管新生が極めて重要と考えられている。その点で本研究は、生分解性人工神経による神経再生では上述の末梢神経と同様に神経組織内での新生血管が生ずることを示した。先行研究では、人工神経内腔に血管を誘導した場合、神経再生の臨界欠損とされる 10 mm の 2 倍以上長い 25 mm のラット坐骨神経欠損の神経再生が可能であることが報告されている¹⁹⁾。さらにアルブミンなどの低分子が人工神経壁を透過しうる人工神経を用いれば、人工神経の側面に血管を隣接させるのみで、組織学的評価や筋重量、電気生理学的の観点から人工神経単独よりも神経再生が優れていることが報告されている¹⁶⁾。そこで本研究では、アルブミン分子の管腔壁の透過性がすでに確認されている生分解性人工神経を用い、より多くの血管網を付与する目的から bFGF 徐放化システムを併用した。

bFGF は、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞に同時に働き、これらを増殖させ、さらに VEGF, HGF の両因子の発現を調整して血管新生を促進する重要な機能を持つ。また、その効果は VEGF や血小板由来成長因子 (PDGF) に比較してより高いことが報告されている²⁰⁻²³⁾。本邦では、皮膚創傷治癒を促進させる臨床結果に基づき、スプレー剤として皮膚潰瘍や開放創の治療に広く使用されている。これまでに bFGF が単独投与される場合は、血中半減期がおおよそ 90 秒と生物学的活性が非常に短い欠点指摘されている。一方、ゼラチン微粒子と組み合わせて bFGF 徐放化システムとして使用する場合、塩基性 bFGF と酸性ゼラチン微粒子は静電的に相互作用で吸着し固定化され、ゼラチンの分解速度に合わせて bFGF が徐放される。この結果、徐放化システムの導入により bFGF の薬理活性を長期間維持することが可能となった。この bFGF 徐放化システムはすでに様々な分野で臨床応用されはじめ、著しい治療効果が報告され、bFGF の組織濃度は約 2 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{日}$ と報告されている²⁴⁻²⁸⁾。

神経再生の領域においても、人工神経に bFGF を塗布することで、軸索の再生挙動や、活動電位、歩行解析結果などより自家神経移植や正常神経とほぼ同等の性能まで回復していることは、これまで報告されている²⁹⁻³⁶⁾。そこで本研究では生分解性素材で作製した人工神経に bFGF 徐放化システムを併用した実験モデルを作製し、人工神経内部に早期より血管新生が誘導され、その後の神経再生誘導が促進されるか否かを検討した。その結果、生分解性人工神経に bFGF 徐放化システムを併用した場合、神経の再生過程の早期 (2 ~ 4 週

目)において、血管内皮細胞の遊走距離および新生血管数が促進され、その後のシュワン細胞の遊走距離および軸索の成長距離は約 1.5 倍伸長して神経再生能が向上することが判明した。さらに透過型電子顕微鏡を用いた軸索数及び軸索総面積の画像解析結果から神経成熟度も同時に高まることが判明した。これらの理由として、生分解性人工神経の周囲に徐放された bFGF 局所濃度と作用時間が深く関与する機序が推測された。これまでに *in vitro* において細胞増殖を促進する bFGF 濃度は 10 ng/ml と報告されている^{37,38)}。一方、ゼラチン微粒子を用いた bFGF 徐放化システムでは、bFGF の初期濃度を 1 mg/ml とした時に *in vivo* で最も強い血管新生が認められることが報告されている³⁹⁾。本実験では、これまでの報告に基づき bFGF 初期濃度を 1 mg/ml に設定した。ELISA 法を用いて検討した結果、生分解性人工神経に併用された bFGF 徐放化システムでは、一定量の bFGF が持続的に徐放され、2 週間の観察期間における bFGF 濃度は約 5 μ g/日に維持されていることが確認され、これまでの報告と一致していた²⁸⁾。また徐放後 2 週目では、bFGF 全投与量の 35.1% が残存していた (図 3)。

また本研究では bFGF 徐放化システムを生分解性人工神経の外側に使用した。本手法の長所は、現在臨床で使用が試みられている各種人工神経でも用いうる点である。そのため、今回用いた生分解性人工神経のみならず、今後改良を施した場合にもシームレスに応用しうる。一方の短所は、bFGF の作用が人工神経の内部にまで作用しえない可能性がある点である。今回行った ELISA 法による bFGF 徐放量の測定では (図 3)、人工神経内の局在別徐放量の測定にまでは至らなかった。今後の研究では、bFGF 徐放化システム併用による人工神経内の局在別 bFGF 徐放量を測定するとともに、bFGF 充填型生分解性人工神経の開発も行っていく。

本実験では、実験群において、シュワン細胞および血管内皮細胞の両細胞群の遊走距離および軸索の成長距離が最も伸長した (図 7, 9, 11)。その時期は神経再生の早期 (移植後 2~4 週目) であり、bFGF 徐放により神経周囲に形成された血管網が神経再生に強く影響したことが示唆された。bFGF によって誘導される血管は通常の血管新生によって形成される血管に比較してさらに太く、比較的構造の整った血管であることが報告されている⁴⁰⁻⁴³⁾。今後組織学的検討を進め、生分解性人工神経を取り囲む血管網の形成状態について詳細な観察を予定している。また、bFGF 徐放化システムの導入により、太い有髄神経が数多く観察されたことから、運動神経が再生されている可能性があるが、今回、運動および知覚を区別する機能的評価は行っておらず今後の課題である。

bFGF の生理作用は血管新生を促進させる成長因子としてのみならず、近年では神経細胞に対する直接的作用が明らかとなりつつある。特に神経細胞に対する分化促進作用 (神経細胞保護作用、神経軸索伸長作用、神経幹細胞分化誘導作用等) を有する神経栄養因子として注目されている⁴⁴⁾。本研究では、徐放化システム併用による軸索直径の増加および軸索数の増加を認めた (図 15-16)。これらの所見は、bFGF が初期に人工神経内部での血管新生を促進させたのち、神経再生にも直接作用し、神経の成熟を促していたとも考えられる。本研究は人工神経内部における血管新生を評価したものであるが、今後の研究では人工神経を介した神経再生における bFGF の直接的作用を明かにしていく必要がある。

三次元組織の再生誘導技術 (Tissue engineering) では、(1) 細胞、(2) 足場、(3) サイトカインが 3 要素として提唱されている。bFGF 徐放化システムを併用した生分解性人工神経では、内腔のコラーゲンスポンジが細胞の足場となり、サイトカインである bFGF が加わることで神経再生能が向上した機序が推察される。今

後さらに脂肪幹細胞などの間葉系幹細胞を組み合わせることで^{45k)}、神経再生能のさらなる向上を図り、自家神経移植の代用材料として臨床応用できる技術開発が必要と考えられる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご指導・ご校閲を賜りました形成外科学教室・磯貝典孝教授ならびに微生物学教室・藤田貢准教授に深甚な謝意を捧げます。

文 献

1. Rbia N, Shin AY (2017) The Role of Nerve Graft Substitutes in Motor and Mixed Motor/Sensory Peripheral Nerve Injuries. *J Hand Surg Am* 42:367-377
2. Brooks DN, et al. (2012) Processed nerve allografts for peripheral nerve reconstruction:a multi-center study of utilization and outcomes in sensory, mixed, and motor nerve reconstructions. *Microsurgery* 32:1-14
3. Lin MY, Manzano G, Gupta R (2013) Nerve allografts and conduits in peripheral nerve repair. *Hand Clin* 29:331-348
4. Lundborg G, Hansson HA (1979) Regeneration of peripheral nerve through a performed tissue space:Preliminary observations on the reorganization of regenerating nerve fibres and perineurium. *Brain Reseach* 178:573-576
5. Hernández-Cortés P, Garrido J, Cámara M, Ravassa FO (2010) Failed digital nerve reconstruction by foreign body reaction to Neurolac nerve conduit. *Microsurgery* 30:414-416
6. Meek MF, Den Dunnen WF (2009) Porosity of the wall of a Neurolac nerve conduit hampers nerve regeneration. *Microsurgery* 29:473-478
7. Moore AM, et al. (2009) Limitations of conduits in peripheral nerve repairs. *Hand (NY)* 4:180-186
8. Koshima I, Harii K (1985) Experimental study of vascularized nerve grafts:multifactorial analyses of axonal regeneration of nerves transplanted into an acute burn wound. *J Hand Surg Am* 10:64-72
9. Tabata Y, Nagano A, Muniruzzaman M, Ikada Y (1998) In vitro sorption and desorption of basic fibroblast growth factor from biodegradable hydrogels. *Biomaterials* 19:1781-1789
10. Ducic I, Fu R, Iorio ML (2012) Innovative Treatment of Peripheral Nerve Injuries:Combined Reconstructive Concepts. *Ann Plast Surg* 68:180-187
11. Suzuki K, et al. (2009) Histologic and electrophysiological study of nerve regeneration using a polyglycolic acid-collagen nerve conduit filled with collagen sponge in canine model. *Urology* 74:958-963
12. Matsumoto K, et al. (2000) Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid [PGA] -collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers:a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain res* 868:315-328
13. Lee JY, et al. (2012) The effect of collagen nerve conduits filled with collagen-glycosaminoglycan matrix on peripheral motor nerve regeneration in a rat model. *J Bone Joint Surg Am* 94:2084-2091
14. Sahakyants T, Lee JY, Friedrich PF, Bishop AT, Shin AY (2013) Return of motor function after repair of a 3-cm gap in a rabbit peroneal nerve:a comparison of autograft, collagen conduit, and conduit filled with collagen-GAG matrix. *J Bone Joint Surg Am* 95:1952-1958
15. Suzuki H, et al. (2016) Value of a novel PGA-collagen tube on recurrent laryngeal nerve regeneration in a rat model. *The Laryngoscope* 126:233-239

16. Iijima Y, Ajiki T, Murayama A, Takeshita K (2016) Effect of Artificial Nerve Conduit Vascularization on Peripheral Nerve in a Necrotic Bed. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 4:e665
17. Matsui Y, Yamasaki T, Inoue T, Kamba T, Ogawa O (2015) Cavernous Nerve Graft Reconstruction with a Novel Artificial Conduit during Robot-Assisted Laparoscopic Radical Prostatectomy. *Open Journal of Urology* 5:118-122
18. Cattin AL, et al. (2015) Macrophage-Induced Blood Vessels Guide Schwann Cell-Mediated Regeneration of Peripheral Nerves. *Cell* 164:1127-1139
19. Kakinoki R, et al. (1997) Nerve regeneration over a 25 mm gap in rat sciatic nerves using tubes containing blood vessels: the possibility of clinical application. *Int Orthop* 21:332-336
20. Gospodarowicz D (1991) Biological activities of fibroblast growth factors. *Ann N Y Acad Sci* 638:1-8
21. Hayek A, et al. (1987) An in vivo model for study of the angiogenic effects of basic fibroblast growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 147:876-880
22. Tassi E, et al. (2001) Enhancement of fibroblast growth factor (FGF) activity by an FGF-binding protein. *J Biol Chem* 276:40247-40253
23. Tsuboi R, Rifkin DB (1990) Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice. *J Exp Med* 172:245-251
24. Kumagai M (2016) Safety and efficacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia. *Heart Vessels* 31:713-721
25. Kawanaka H, et al. (2009) Therapeutic angiogenesis by controlled-release fibroblast growth factor in a patient with Churg-Strauss syndrome complicated by an intractable ischemic leg ulcer. *Am J Med Sci* 338:341-342
26. Matsumoto S, et al. (2013) The effect of control-released basic fibroblast growth factor in wound healing: histological analyses and clinical application. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 1:e44
27. Takemoto S, et al. (2008) Preparation of collagen/gelatin sponge scaffold for sustained release of bFGF. *Tissue Eng Part A* 14:1629-1638
28. Kusahara H, Itani Y, Isogai N, Tabata Y (2011) Randomized controlled trial of the application of topical b-FGF-impregnated gelatin microspheres to improve tissue survival in subzone II fingertip amputations. *J Hand Surg Eur* 36:455-460
29. Fujimoto E, Mizoguchi A, Hanada K, Yahima M, Ide C (1997) Basic fibroblast growth factor promotes extension of regenerating axons of peripheral nerve: In vivo experiments using a Schwann cell basal lamina tube model. *J Neurocytol* 26:511-528
30. Ide C, et al. (1998) Long acellular nerve transplants for allogeneic grafting and the effects of basic fibroblast growth factor on the growth of regenerating axons in dogs: a preliminary report. *Exp Neurol* 154:99-112

31. Midha R, Munro CA, Dalton PD, Tator CH, Shoichet MS (2003) Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J Neurosurg* 99:555-565
32. Wang S, et al. (2003) Acceleration effect of basic fibroblast growth factor on the regeneration of peripheral nerve through a 15-mm gap. *J Biomed Mater Res A* 66:522-531
33. Ohta M, et al. (2004) Novel heparin/alginate gel combined with basic fibroblast growth factor promotes nerve regeneration in rat sciatic nerve. *J Biomed Mater Res A* 71:661-668
34. Ma F, et al. (2014) Linear ordered collagen scaffolds loaded with collagen-binding basic fibroblast growth factor facilitate recovery of sciatic nerve injury in rats. *Tissue Eng Part A* 20:1253-1262
35. Ikeda M, et al. (2014) Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system. *J Biomed Mater Res A* 102:1370-1378
36. Suzuki Y, Ishikawa N, Tanihara M, Saito S (2016) Nontubulation Repair of Peripheral Nerve Gap Using Heparin/Alginate Gel Combined with b-FGF. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 4:e600
37. Arévalo-Silva CA1, et al. (2000) A Influence of growth factors on tissue-engineered pediatric elastic cartilage. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126:1234-1238
38. Arévalo-Silva CA, et al. (2001) The effect of fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta on porcine chondrocytes and tissue-engineered autologous elastic cartilage. *Tissue Eng* 7:81-88
39. Tabata Y, Hijikat S, Ikada Y (1994) Enhanced vascularization and tissue granulation by basic fibroblast growth factor impregnated in gelatin hydrogels. *J Controlled Release* 31:189-199
40. Masaki I, et al. (2002) Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circ Res* 90:966-73
41. Onimaru M, et al. (2002) Fibroblast growth factor-2 gene transfer can stimulate hepatocyte growth factor expression irrespective of hypoxia-mediated downregulation in ischemic limbs. *Circ Res* 91:923-930
42. Yonemitsu Y, Sueyoshi K (2004) FGF-2 regulating multiple angiogenic factors in hierarchical mode of action. *J Jpn Coll Angiol* 44:151-156
43. Tabata Y, Nagano A, Ikada Y (1999) Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Eng* 5:127-138
44. Grothe C, Nikkhah G (2001) The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration. *Anat Embryol (Berl)* 204:171-177
45. Klein SM, et al. (2016) Peripheral motor and sensory nerve conduction following transplantation of undifferentiated autologous adipose tissue-derived stem cells in a biodegradable U.S. food and drug administration-approved nerve conduit. *Plast Reconstr Surg* 138:132-139