



Development of a novel method for decellularizing a nerve graft using a hypertonic sodium chloride solution

Ishida, Yasuhisa

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2015-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6514号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006514>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Development of a novel method for decellularizing a nerve graft using a hypertonic sodium chloride solution

高張塩化ナトリウム溶液を用いた新しい

脱細胞化神経グラフトの作成

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

形成外科学

(指導教員：寺師浩人教授)

石田 泰久

(目的) 外傷や悪性腫瘍切除後の神経欠損部において末梢神経再建の必要性が出てきた場合、臨床の現場においては現在自家神経移植がしばしば行われている。しかしこの方法はドナー部の犠牲が避けられず、レシピエント部に適切な太さの神経採取が難しいことがある。また代用神経チューブとしてシリコンチューブやコラーゲンチューブ、ポリグリコール酸などが用いられることがあるが、これらはシュワン細胞の侵入に必要な神経特有の3次元構造が無く、神経欠損範囲が大きい部位を架橋することには限界がある。これらの手法の欠点を補う脱細胞化神経グラフトは有用な末梢神経再建材料の一つであり、シュワン細胞のグラフト内への侵入と神経線維の伸展に必要な足場(scaffold)を提供する。脱細胞化を行うにはこれまで様々な方法が報告されているが、現在、凍結融解法と界面活性剤を用いた方法が多く報告されている。しかし凍結融解法では細胞除去が不完全であることが問題となり、界面活性剤を用いた方法ではscaffoldとして必要な細胞外基質が界面活性剤により破壊されることが界面活性剤残留の可能性が問題となる。今回われわれはこれらの問題を解決すべく、ラットにおいて高張塩化ナトリウム溶液を用いて脱細胞化神経グラフトを作成し、この同種移植を行い、移植前後の神経グラフトの評価を行ったので報告する。

(方法) ラットの坐骨神経を採取し、1Mの高張塩化ナトリウム溶液に入れ24時間振盪した。その後、リン酸緩衝生理食塩水に移し入れ7日間振盪しながら洗浄し、脱細胞化神経グラフトを作成した。この神経グラフトをH-E染色、免疫染色(抗ラミニ

ン抗体)、電子顕微鏡で評価した。また 1 cmの坐骨神経が欠損したラットを作成し、これに作成した神経グラフトを移植し、移植 2 か月後の状態を H-E 染色、免疫染色 (抗ニューロフィラメント抗体、抗 S-100 抗体)、順行性神経トレーサー (10% fluororuby)、電子顕微鏡で評価した。対照として、ラットの坐骨神経で凍結融解法により作成した脱細胞化神経グラフトと界面活性剤 (Triton X-100) を用いて作成した脱細胞化神経グラフトを用いて、われわれの方法で作成した脱細胞神経グラフトと同様に移植前、移植 2 か月後の状態を比較評価した。

(結果) われわれの方法で作成した神経グラフトは、移植前の状態では H-E 染色では細胞は認めず、細胞外基質の構造は保たれていた。また抗ラミニン抗体で行った免疫染色でも健常神経と同様に構造が保たれた状態で神経基底膜を確認できた。電子顕微鏡では SEM 像においてシュワン細胞やミエリン鞘を認めず神経基底膜が保たれていた。一方、凍結融解法で作成した神経グラフトでは H-E 染色や抗ラミニン抗体での免疫染色では細胞外基質、神経基底膜の構造は保たれているものの、H-E 染色において細胞の残存が認められた。電子顕微鏡でも同様に神経基底膜は保たれているものの、シュワン細胞やミエリン鞘が残存していた。また界面活性剤を用いて作成した神経グラフトでは H-E 染色において細胞は認めないが、免疫染色において神経基底膜の構造が破壊されていることが確認できた。電子顕微鏡でもシュワン細胞やミエリン鞘などの細胞成分は認めないものの、神経基底膜が破壊されていた。移植 2 か月後では、い

ずれの方法においても H-E 染色ではグラフト内に細胞が存在した。免疫染色においては神経線維の周囲に抗 S-100 抗体で染色されたシュワン細胞が存在していた。順行性神経トレーサーで確認したところ、いずれの方法でもグラフト内に神経線維が走行していることが確認できた。われわれの方法で作成したグラフトでは、グラフト遠位端の神経縫合部で神経線維がグラフト内から縫合部を乗り越えてレシピエントの神経内に入り込んでいく像が観察できた。

またわれわれの方法で作成した脱細胞化神経グラフトの移植後 8 ヶ月での状態を電子顕微鏡 (TEM 像) で確認したところ、グラフトは生体に吸収されずに存在し、シュワン細胞、ミエリン鞘に囲まれたアクソンを認めた。また神経内膜、神経周膜の形成も認め、ほぼ正常の末梢神経と同様の構造を確認した。

(考察) われわれの脱細胞化方法の原理としては、高張塩化ナトリウム溶液により細胞内脱水が生じ、洗浄により細胞を取り除くことが出来るのではないかと考えている。今回の実験では対照の手法においても移植後に神経線維の再生、シュワン細胞の存在を認めており、脱細胞化神経を用いての末梢神経再生において、どこまでの細胞の残存が許容できるか、シュワン細胞のグラフト内への侵入に細胞外基質をどの程度必要とするかは不明である。しかし、われわれの脱細胞化方法は、非常に簡単な手法でありながら、細胞を除去することができ、細胞外基質を温存し、生体組織に有害な物質を残すリスクが非常に低い。このことからこれまで報告されている脱細胞方法よりも

われわれの方法で作成した脱細胞化神経グラフトは末梢神経再建に有用ではないかと考える。今後の課題として、それぞれの脱細胞化方法でどの程度の差が生じるか見るため、移植後のグラフト内にそれぞれの方法で神経線維がどれくらい再生されるか調べていくことが必要と思われる。また更に大きな神経のギャップでも有用かどうか、あるいは大型の動物でも同様の結果を認めるか、他の生体組織の脱細胞化にも応用していけるかについても今後検討していきたい。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2532 号	氏 名	石田 泰久
論文題目 Title of Dissertation	Development of a novel method for decellularizing a nerve graft using a hypertonic sodium chloride solution (高張塩化ナトリウム溶液を用いた新しい脱細胞化神経グラフトの作成)		
審査委員 Examiner	主 査 青井 貴之 Chief Examiner 副 査 寺島 俊雄 Vice-examiner 副 査 黒 坂 昌 弘 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

(目的) 神経欠損部で末梢神経再建の必要性が生じた時、臨床では現在自家神経移植がしばしば行われるが、この方法はドナー部の犠牲が生じ、レシピエント部に適切な太さの神経採取が難しいことがある。また代用神経チューブが用いられることもあるが、これは神経特有の3次元構造が無く、欠損範囲が大きい部位を架橋するには限界がある。これらの欠点を補う脱細胞化神経 graft は末梢神経再建材料の一つであり神経線維の伸展に必要な足場を提供する。脱細胞化方法は様々な報告があるが、現在、凍結融解法と界面活性剤を用いた方法の報告が多い。しかし凍結融解法は細胞除去が不完全であることが、界面活性剤を用いた方法は界面活性剤による細胞外基質の破壊と界面活性剤残留の可能性が問題となる。これらの問題を解決すべく、申請者らは高張塩化ナトリウム溶液を用いて脱細胞化神経 graft を作成し、これの移植前後での graft 評価を行った。

(方法) ラットの坐骨神経を採取し高張塩化ナトリウム溶液に入れ24時間振盪した。その後、リン酸緩衝生理食塩水に移し入れ7日間振盪しながら洗浄し、脱細胞化神経 graft を作成した。この神経 graft をH-E染色、免疫染色、電子顕微鏡で評価した。また1cmの坐骨神経が欠損したラットに作成した神経 graft を移植し、移植より2か月後でH-E染色、免疫染色、神経トレーサー、電子顕微鏡で評価した。対照で、ラット坐骨神経で凍結融解法により作成した脱細胞化神経 graft と界面活性剤を用いて作成した脱細胞化神経 graft を用いて、申請者らの脱細胞神経グラフトと同様に移植前後の状態を比較評価した。

(結果) 申請者らの方法で作成した神経 graft では、移植前には、細胞を認めず、細胞外基質の構造は保たれているのを確認した。また抗ラミニン抗体での免疫染色でも健常神経と同様の神経基底膜を確認した。電子顕微鏡像ではシュワン細胞やミエリン鞘を認めず神経基底膜が保たれていた。一方、凍結融解法による神経 graft ではH-E染色や免疫染色では細胞外基質、神経基底膜は保たれているが、H-E染色で細胞の残存を認め、電子顕微鏡でも神経基底膜は保たれているが、シュワン細胞やミエリン鞘が残存していた。また界面活性剤を用いた神経 graft では、細胞は認めないが、免疫染色において神経基底膜の構造が破壊されていた。電子顕微鏡でもシュワン細胞やミエリン鞘などの細胞成分は認めないが神経基底膜が破壊されていた。移植2か月では、いずれの方法もグラフト内に細胞が存在し、神経線維の周囲にシュワン細胞が存在していた。神経トレーサーで確認したところ、いずれの方法も graft 内に神経線維が走行していた。申請者らの方法で作成した graft の移植後8ヶ月の状態を電子顕微鏡で確認したところ、graft 内にシュワン細胞、ミエリン鞘に囲まれたアクソンを認めた。また神経内膜、神経周膜の形成も認め、正常の末梢神経とほぼ同様の構造を確認した。

（考察）申請者らの脱細胞化方法は、高張塩化ナトリウム溶液により細胞内脱水が生じ、洗浄により細胞を取り除くことが出来るのではないかと考えられる。今回、対照の手法でも移植後に神経線維の再生、シュワン細胞の存在を認めており、脱細胞化神経を用いての末梢神経再生において、どこまでの細胞の残存が許容できるか、シュワン細胞の graft 内への侵入に細胞外基質をどの程度必要とするかは不明である。しかし、申請者らの脱細胞化方法は、非常に簡単な手法でありながら、細胞を除去することができ、細胞外基質を温存し、生体組織に有害な物質を残すリスクが非常に低い。このことからこれまで報告されている脱細胞方法よりも申請者らの方法で作成した脱細胞化神経グラフトは末梢神経再建に有用ではないかと考える。

本研究は、末梢神経再生に必要な足場となる脱細胞化神経の新しい作成方法について検討を行ったものであるが、脱細胞化神経の作成および末梢神経の再生について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。