

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	國崎 篤
学位授与の条件	学位規則第 4 条第① 2 項該当		
論文題目			
Carbon-nanotube yarns induce axonal regeneration in peripheral nerve defect (カーボンナノチューブ糸は末梢神経欠損の軸索再生を誘導する)			
論文審査担当者			
主査	教授	酒井 規雄	印
審査委員	教授	丸山 博文	
審査委員	准教授	吉田 隆行	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>損傷した末梢神経は神経縫合などにより再生が可能である。しかし、欠損や重度の損傷がある場合にはその再生能力は限られており、移植などの治療が必要となる。一般的には自家神経移植が標準治療であるが、正常神経を犠牲にするため、ドナー部位の感覚喪失や断端神経腫の可能性ならびに複数箇所をわたる手術部位といった欠点がある。代替方法として脱細胞化同種神経や様々な人工神経が開発されているが、現状では成功率は低く、その使用に関しても 4 mm までの直径や 3 cm までの欠損長、感覚神経のみといった臨床的制限が設けられている。そのためより強力な神経再生効果を持つ人工神経の開発が望まれている。</p> <p>本論文では神経再生の足場として、カーボンナノチューブ (CNT) に着目し、研究を行った。CNT は円筒形のナノ構造体であり、機械的強度をもち、柔軟で電気や熱を通すといった化学的特性を持ち、さらに生体適合性を有していることから再生医療や生体材料として着目される次世代素材である。神経再生においても CNT のもつ細胞接着性、蛋白質の吸着性ならびに導電性から <i>in vitro</i> 研究で神経突起の伸長を促すことが報告されている。しかし <i>in vivo</i> 研究は少なく、その微小なサイズのためリン酸ガラスマクロファイバーなどに結合させないと用いることができなかった。すなわち純粋な CNT の足場として研究モデルを作成することが困難であったことが 1 つの理由と考えられる。本研究では繊維状に加工可能となった CNT 糸を用いてシリコンチューブ内に様々な密度 (2%:CN2、5%:CN5、10%:CN10、35%:CN35) で長軸方向に整列するように充填し、15 mm の人工神経モデルを作成した。ラットの坐骨神経を 10 mm 切除して人工神経を移植した。ネガティブコントロールとして中空のシリコンチューブ (C0) を移植し 15 mm 欠損モデルとした。運動機能は移植後 4 週ごとに坐骨神経機能指数 (SFI) を計算し、移植後週、16 週で筋電図検査による評価を行った。安楽死後に腓腹筋と前脛骨筋を両側の後肢から切離し、実験側との健側比を測定した。さらに人工神経を坐骨神経とともに摘出し、組織学的評価を行った。免疫組織化学的染色として、軸索とシュワン細胞をそれぞれニューロフィラメント抗体と S100 抗体で、さらにマクロファージを CD68 抗体で染色した。8 週モデルの評価は、長軸断面の 4 領域 (P:近位端、P5:移植部の近位端から 5 mm、D5:遠位端から 5 mm、D:遠位端) で軸索とシュワン細胞の染色された領域の面積を測定しそれぞれを P 領域と比較した。16 週モデルでは、移植部中枢と末梢の神経短軸断面で単位面積あたりの軸索とシュワン細胞数を測定し、P5 領域でマクロファージ数を測定した。</p> <p>筋電図では活動電位を CN2, 5 で 85.7%に、CN10 で 42.9%に描出を確認できたが、C0 では描出されなかった。筋肉の健側と比べた患側の重量比率は C0 と比較し、CN2、5、10 で有意に大きかった。SFI は 4 週、8 週ではいずれとも有意差を認めなかったが、16 週では CN2 が C0 と比較し、優位に改善していた。組織の肉眼的所見では CN2、5、10 で中枢から末梢にかけて再生組織による架橋が確認された。架橋部の組織を免疫染色で評価すると、CNT に沿って伸長する軸索を確認できたが、C0、CN35 では再生を確認できなかった。16 週では遠位端</p>			

において再生した軸索とシュワン細胞が確認でき、その再生割合は C0 と比較し CN2 で有意に高かった。16 週での異物反応の評価では、CNT 周囲に集積する多数のマクロファージが確認された。

本研究では、CNT 系が神経再生の足場として機能し、末梢神経の再生を促進することが解剖学的及び機能的に確認できた。これは足場としてのナノスケールの表面形状が、神経栄養因子や細胞の移植を必要としない神経再生を可能にしたことを示している。さらに神経再生において 2% の CNT 密度が 0% と比較して有意な回復を認め、充填率においては最も効果的である傾向がみられた。これは、占有率が高いほど組織液の還流が妨げられ、35% では組織の再生が困難となったためであると示唆される。末梢神経の再生のメカニズムとして、形成されたフィブリンマトリックス内のマクロファージが血管内皮細胞増殖因子を分泌し、新生血管を誘導し、その血管を移動の足場としてシュワン細胞が整列して Büngner band を形成し、そのバンドを通して軸索が伸長することが考えられている。長軸方向に整列するように配列された繊維は、フィブリンマトリックスの誘導に有用と思われる。整列した線維方向への神経突起の伸長は、ランダムな配列と比較しても効率がよいと報告されており、CNT 系が神経突起伸長のための誘導足場として有利な物理的特性を持っている可能性を示している。また CNT 系は 10 nm の繊維がより合わさった直径 15 μm の線維であり、その細かい微小構造と広い表面積が細胞接着効果に優れていることも突起を伸長させた一因と考えられる。

以上の結果から、CNT 自体の特性に加え細い繊維・整列した線維といった表面形状の構造的特徴により、末梢神経再生の足場として CNT 系は臨床応用において有用な素材であることが示唆された。CNT による再生効果は自家神経移植と比較すると弱く、異物反応が残存するといった欠点はあるが、それらは CNT を修飾することで改善する可能性がある。このように、本研究において、末梢神経損傷における人工神経の限界を打破しうる素材として CNT の可能性を示したことは高く評価できる。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。