Mini Review

人工神経ガイドチューブの腹腔内における
分解・吸収性に関する検討伊藤忠雄^{1,2)}, 中村達雄¹⁾, 高木 剛²⁾,
萩原明於²⁾, 山岸久一²⁾, 清水慶彦¹⁾¹⁾京都大学再生医科学研究所 臓器再建応用部門²⁾京都府立医科大学消化器外科*Assessment of biodegradability of artificial nerve conduits in the peritoneal cavity*

Biodegradability of new types of polyglycolic acid (PGA)-collagen composite tubes for nerve regeneration was evaluated in the peritoneal cavity. Hollow PGA mesh tubes were coated with atelocollagen solution, dried at room temperature, and then subjected to dehydrothermal treatment (hollow composite tubes). Hollow composite tubes filled with collagen sponge were also investigated in this study (sponge tubes). Tubes were fixed at the parietal peritoneum of BALB/c mice, and excised 0.5, 1, 2 and 3 months after the insertion. The inner areas of the excised tubes were measured microscopically. The rate of remained inner areas were calculated and analyzed statistically by one-way ANOVA and Fisher's PLSD test. 1 month after the insertion, the inner areas of the sponge tubes were well maintained, though they were not maintained in the hollow composite tubes. The rate of remained inner areas of the sponge tubes was significantly larger than that of the hollow composite tubes until 2 months after insertion. These results suggest that sponge tubes are more suitable than hollow composite tubes for nerve regeneration in the peritoneal cavity.

Rec.3/12/2003, Acc.5/30/2003, pp275-278

Tadao Ito^{1,2)}, Tatsuo Nakamura¹⁾, Tsuyoshi Takagi²⁾,
Akeo Hagiwara²⁾, Hisakazu Yamagishi²⁾, Yasuhiko Shimizu¹⁾¹⁾Department of Bioartificial Organs, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University²⁾Department of Digestive Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine**Key words** PGA-collagen composite tube, biodegradability, nerve regeneration

はじめに

交通事故による神経損傷や悪性腫瘍切除に伴う神経切除に対し、現在では直接吻合や自家神経移植による再建が行われている。しかし、直接吻合できる症例は限られており、自家神経移植にも移植片採取の限界や採取部位における神経機能の脱落などの問題点が存在する。これらの問題点を克服するためシリコン、ポリグリコール酸(PGA)、ポリ乳酸などの人工合成材料を用いた人工神経ガイドチューブが開発・検討されてきた¹⁻⁵⁾。中でも細胞毒性や免疫原性のない生体内分解吸収性人工材料は神経再生に適した環境・足場(scaffold)を提供し、再生後には完全に吸収されるため、人工神経ガイドチューブに最も適していると考えられる。現在までに我々の開発してきた生体内分

解吸収性材料による人工神経ガイドチューブを用いた検討では、人工神経ガイドチューブが自家神経移植片に変わってしまう可能性が示唆されている⁶⁻¹²⁾。

このような末梢神経再生に対する人工神経ガイドチューブの有用性は皮下もしくは筋組織間において証明されてきたが、腹腔内という異なる環境下における神経再生に対しての有用性は検討されていない。腹腔内においても自律神経系が直腸癌や前立腺癌のような悪性腫瘍に対する根治手術の際に合併切除され、術後に排尿障害や性機能障害を来すといったような神経障害に起因する後遺症が存在するが、これらを救済するための神経再建術はほとんど報告がみられない。本稿では我々の開発してきた人工神経ガイドチューブの分解・吸収速度や構造(内腔)保持期間を腹腔

内において検討し、腹腔内における神経再生に対する寄与の可能性について報告する。

人工神経ガイドチューブの作成

人工神経ガイドチューブとして中空のPGA コラーゲン複合チューブとその内腔にコラーゲンスポンジを充填したチューブを検討した。円筒状に編まれた直径2mmと4mmのPGA メッシュチューブの外表面に1%アテロコラーゲン溶液を塗布し室温にて乾燥させた。このアテロコラーゲンは豚真皮からペプシンを用いて酵素抽出したもので、70～80%の型コラーゲンと20～30%の型コラーゲンから成り、末梢のテロペプチドを取り除くことにより免疫原性を無くしている。塗布を繰り返すことによりPGA メッシュチューブ上に厚いコラーゲン層を形成し、次いでチューブを熱脱水架橋処理(140℃, 24時間)し完成させた(中空のPGA コラーゲン複合チューブ)。コラーゲンスポンジを充填するにはアテロコラーゲン溶液をホモジナイズして熱脱水架橋処理前の中空チューブ内腔に流し込み、-20℃で一旦凍結させてから凍結乾燥を3時間行い、その後上記と同条件で熱脱水架橋処理を加えた(内腔にコラーゲンスポンジを充填したPGA コラーゲン複合チューブ)。作成したチューブはすべてエチレンオキサイドガスにて滅菌してから用いた。

腹腔内における人工神経ガイドチューブの検討法

36匹のBALB/c マウス(5週齢)を挿入するチューブの種類により12匹ずつ3群に分けた。すなわち径2mmの中空PGA コラーゲン複合チューブ挿入群(2mm 中空チューブ群)、径4mmの中空PGA コラーゲン複合チューブ挿入群(4mm 中空チューブ群)、そして径2mmのコラーゲンスポンジを充填したPGA コラーゲン複合チューブ挿入群(スポンジチューブ群)である。開腹して長さ15mmのチューブを壁側腹膜に、皮膚切開線の両脇に1本ずつ(1匹につき2本ずつ)非吸収糸にて固定した。各群につき3匹ずつのマウスを0.5・1・2・3ヵ月後に犠牲死させチューブを摘出した(各群とも各観察期間につきチューブは6本ずつ摘出した)。摘出したチューブの両端および中央の3ヵ所から短軸方向の切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色にて光顕的に組織学的評価を行った。

チューブの内腔保持機能評価のため、切片上のチューブ内腔面積をコンピュータ上で計測した。3ヵ所の面積の平均値をチューブの摘出時内腔面積とし、各群6本ずつのチューブの摘出時内腔面積を平均値±標準誤差(mm²)で示した。

すべての種類のチューブを比較するため、摘出時内腔面積のチューブ本来の内腔面積に対する割合を計算した(遺残面積率)。挿入2週間後まではチューブ本来の形状および内腔が保持されていたので、挿入2週間後における摘出時内腔面積をチューブ個々の標準内腔面積とした。遺残面積率は摘出時内腔面積を標準内腔面積で割ったものと定義した。

$$\text{遺残面積率}(\%) = \frac{\text{摘出時内腔面積}}{\text{チューブ個々の標準内腔面積}} \times 100$$

遺残面積率はOne-way ANOVAおよびFisher's PLSD Testにて統計学的に検討し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

腹腔内挿入後の人工神経ガイドチューブの組織学的所見

挿入2週間後にはすべてのチューブが本来の形状および内腔面積を保持していた。チューブと腹腔内臓器との間に癒着は認められず、光顕的にも内腔に結合組織は認められなかった。挿入1ヵ月後にはスポンジチューブのみが肉眼的に本来の形状を保持していた。2mm および4mm 中空チューブも同定するのは容易であったが、チューブ本来の形状は保持されていなかった。光顕的にはPGA 繊維は残存していたが、チューブ内腔は保持されていなかった。数例において軽度の癒着が2mmおよび4mm中空チューブと腹腔内臓器との間に認められた。挿入2ヵ月後には、すべてのチューブが程度に差こそあれ吸収され始めており、挿入3ヵ月後には、チューブは細い糸状の遺残物としてのみ認められるか、完全に吸収されて同定できなかった。

腹腔内挿入後の人工神経ガイドチューブの内腔保持機能に関する検討

挿入1ヵ月後にはスポンジチューブは本来の内腔面積をほぼ保持していたが、2mm および4mm 中空チューブでは内腔面積は著明に縮小していた(図1, 2)。この両者間には口径差による内腔面積保持期間に明らかな差は認められなかった。遺残面積率によるスポンジチューブと中空チューブの比較・検討では、統計学的に有意な差を認めた(図3, 表)。挿入2ヵ月後にはスポンジチューブにおいても内腔面積縮小を認めたが、中空チューブと比べて有意に大きな内腔面積を保持していた。挿入3ヵ月後には前述の理由により内腔面積の計測は不可能であった。

腹腔内における人工神経ガイドチューブの神経再生に対する寄与に関する考察

PGA コラーゲン複合チューブは末梢神経に対する人工

図1 2mm 中空チューブと4mm 中空チューブの摘出時内腔面積の比較 (平均値 ± 標準誤差)

図2 2mm中空チューブとスポンジチューブの摘出時内腔面積の比較 (平均値 ± 標準誤差)

図3 遺残面積率の比較 (平均値 ± 標準誤差)

表 遺残面積率の統計学的検討

1) One-way ANOVA

1ヵ月後; $p < 0.0001^*$; 2ヵ月後; $p = 0.0008^*$

2) Fisher's PLSD Test

2mm 中空チューブ vs. 4mm 中空チューブ

1ヵ月後; $p = 0.0005^*$; 2ヵ月後; $p = 0.3922$

2mm 中空チューブ vs. スポンジチューブ

1ヵ月後; $p = 0.0282^*$; 2ヵ月後; $p = 0.0013^*$

4mm 中空チューブ vs. スポンジチューブ

1ヵ月後; $p < 0.0001^*$; 2ヵ月後; $p = 0.0003^*$

* $p < 0.05$ を有意差ありとした

神経ガイドチューブとして開発・評価されてきた。これらのチューブは皮下もしくは筋組織間での使用を念頭に開発されてきたものであり、チューブ材料としてのPGA繊維の選択や熱脱水架橋処理によるチューブの分解・吸収性の調節などの設計は、細胞接着や軸索伸長を含めた末梢神経再生における生物学的優位性をチューブに与える^{13,14)}と同時に、この環境下において有用であるようになされている。腹腔内では皮下や筋組織間に比べて温度が高く腹水のような水分がより多く存在しており、人工神経ガイドチューブにとってより分解が早い環境となっている。また、術後には炎症反応などにより腹水量が増加するため、さらにチューブの吸収は早まるものと考えられる。我々の組織再生のコンセプトは生体内に足場(scaffold)を置き、再生の場を十分な期間提供することによって組織を生体内で再生させる *in situ* tissue engineering と呼ばれる手法であり¹⁵⁾、チューブが期待するよりも早期に吸収されてしまう

ならば再生の場を十分な期間提供できない。このような観点から、これらのチューブが腹腔内という異なる環境下でどのような過程を経て吸収されるかを検討した。

スポンジチューブは挿入1ヵ月後までは内腔面積を標準内腔面積のまま保持しており、挿入2ヵ月後までは中空チューブより有意に大きな内腔面積を保っていた。充填されたコラーゲンのスポンジ構造は細胞接着や増殖の場を3次的に提供するだけでなく、中空チューブよりも長期にわたり神経再生の場を保持することに寄与していた。しかしながら、吸収の過程は我々が期待していたよりも早いものであった。

中空のPGAメッシュチューブにコラーゲンをコーティングし、150℃、24時間の熱脱水架橋処理を行ったガイドチューブを用いた検討では、ネコの坐骨神経25mmの神経欠損がこのガイドチューブで連結されることにより再生され連続性を回復した⁶⁾。このチューブをさらに改良し内腔

にコラーゲンを充填したガイドチューブを用いた検討では、神経のより長い欠損が再生された。イヌの総腓骨神経80mmの神経欠損は中空のガイドチューブ内腔にラミニンコーティングして熱脱水架橋処理を行ったコラーゲン系や、ラミニンを含浸させたコラーゲンスポンジを充填したガイドチューブで連結されることにより再生可能であることが示された⁹⁻¹²⁾。

我々のグループはイヌの総腓骨神経80mmの神経欠損を再生させることに成功したと報告しているが¹⁰⁾、この報告の中で電気生理学的反応のいくつかは挿入3ヵ月後にすでに認められており、80mmにわたる神経再生が完全ではないが部分的には達成されているものと考えられる。スポンジチューブは小さいにせよ、挿入2ヵ月後までは内腔面積を保持しており、このチューブを用いて腹腔内において神経再生を達成することは可能であると考えられる。

おわりに

コラーゲンスポンジ充填PGAコラーゲン複合チューブは中空PGAコラーゲン複合チューブよりも腹腔内において長期にわたり内腔を保持しており、中空チューブに比べてより神経再生に適していると考えられる。スポンジチューブは腹腔内において少なくとも挿入2ヵ月後までは内腔を保持することが可能であったが、より長い神経欠損の再生を達成するためには、チューブの設計をより緩徐に吸収されるものへと変更することが必要となると考えられる。

文 献

- 1) Heath CA, Rutkowski GE: The development of bioartificial nerve grafts for peripheral-nerve regeneration. *Trends Biotechnol*, 16: 163-168, 1998.
- 2) Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N: Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. *Exp Neurol*, 76: 361-375, 1982.
- 3) Bora FW, Bedner JM, Osterman AL: A resorbable tube as an alternative to autogenous nerve grafting. *J Hand Surg*, 12A: 685-692, 1987.
- 4) Evans GR, Brandt K, Widmer MS: In vivo evaluation of (L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 20: 1109-1115, 1999.
- 5) Mackinnon SE, Dellon AL: A study of nerve regeneration across synthetic (Maxon) and biologic (collagen) nerve conduits for nerve gaps up to 5 cm in the primate. *J Reconstr Microsurg*, 6: 117-121, 1990.
- 6) Kiyotani T, Teramachi M, Takimoto Y: Nerve regeneration across a 25-mm gap bridged by a polyglycolic acid collagen tube: a histological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res*, 740: 66-74, 1996.
- 7) Kitahara AK, Suzuki Y, Nishimura Y: Evaluation of collagen nerve guide in facial nerve regeneration. *J Art Organs*, 1: 22-27, 1998.
- 8) Suzuki Y, Tanihara M, Ohnishi K: Cat peripheral nerve regeneration across 50 mm gap repaired with a novel guide composed of freeze-dried alginate gel. *Neurosci Lett*, 259: 75-78, 1999.
- 9) Matsumoto K, Ohnishi K, Kiyotani T: 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, 2000.
- 10) Toba T, Nakamura T, Shimizu Y: Regeneration of canine peroneal nerve with the use of a polyglycolic acid-collagen tube filled with laminine-soaked collagen sponge: a comparative study of collagen sponge and collagen fibers as filling materials for nerve conduits. *J Biomed Mater Res*, 58: 622-630, 2001.
- 11) Toba T, Nakamura T, Lynn AK, et al: Evaluation of peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap using a polyglycolic acid (PGA)-collagen nerve conduit filled with laminin-soaked collagen sponge in dogs. *Int J Artif Organs*, 25: 230-237, 2002.
- 12) Toba T, Nakamura T, Shimizu Y: Peripheral nerve regeneration using a polyglycolic acid (PGA)-collagen nerve conduit filled with collagen sponge: experimental research and human application. *Connect Tissue*, 35: 45-51, 2003.
- 13) Mikos AG, Bao Y, Cima LG: Preparation of poly (glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. *J Biomed Mater Res*, 27: 183-189, 1993.
- 14) Weadock KS, Miller EJ, Keuffel EL: Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *J Biomed Mater Res*, 32: 221-226, 1996.
- 15) Hori Y, Nakamura T, Matsumoto K: Experimental study on tissue engineering of the small intestine by acellular collagen scaffold grafting. *Int J Art Org*, 24: 50-54, 2001.