

## アカデミア主導の臨床開発の拠点とネットワーク

Coordinating centers and networks for clinical development of drugs and medical devices by investigators



荒川 義弘

Yoshihiro ARAKAWA

東京大学医学部附属病院臨床研究支援センター

◎アカデミア主導の臨床開発の環境の整備が日本でもはじまった。東大病院をはじめ大学病院を中心に、多施設共同試験のコーディネーティングセンター機能を有した拠点が整備されてきており、それら拠点のネットワークも形成されつつある。一方、研究者の育成や疾患別ネットワークの形成はまだ十分とはいえ、神経変性領域では筋ジストロフィーネットワークや Alzheimer 病の縦断研究(J-ADNI)のネットワークなど、まだ限られている。今後、ネットワークを中心に疾患の自然歴の調査とともにその解明を行い、バイオマーカーや各疾患に適した臨床評価指標を開発し、新薬の臨床評価を行う基盤とすることが期待される。

**Key word** : トランスレーショナルリサーチ(TR), 臨床開発, 医師主導の治験, ネットワーク,  
: コーディネーティングセンター

難病や希少疾患に対する創薬研究の産官学における環境が変わりつつある。

国は、“健康・医療戦略”や“日本版 NIH”など、基礎研究から創薬研究に至るシームレスな研究開発体制をオールジャパンで構築し、健康長寿と医薬品・医療機器産業の育成をめざしている<sup>1)</sup>。2014 年度概算要求には、大型予算に“脳とこころ”“難病”“ゲノム医療”など神経変性疾患にかかわる領域の研究開発が盛り込まれている<sup>2)</sup>。また、アカデミアを対象とした医薬品医療機器総合機構(PMDA)による薬事戦略相談などの施策はすでに開始されている。

一方、大手製薬会社においては生活習慣病の治療薬などブロックバスターといわれる大型製品の開発が難しくなり、難病や希少疾患など治療満足度の低い疾患に目が向けられている。また、大手製薬会社の医薬品のルーツはもともとアカデミア発のものが多くという現実から、アカデミアとのオープンイノベーションに注目が集まりつつある。

もうひとつのセクターであるアカデミアでは、トランスレーショナルリサーチ(translational research: TR)拠点、早期・探索的臨床試験拠点、

臨床研究中核病院など、拠点を中心とした支援組織の整備がはじまっている。しかし、アカデミアによる早期の臨床試験を産業界による後期臨床開発につないでいくためには拠点の整備だけでは進めることはできず、調整医師などの研究者の育成や臨床試験のためのネットワークが必要になるが、まだ十分とはいえない状況である。

本稿では、研究開発において研究者がおもに担うべき事項と、アカデミア側の開発拠点の整備と連携体制、および疾患領域別ネットワークについて概説する。

### 研究開発において

#### 研究者がおもに担うべき事項

基礎研究の成果を日常臨床に導入するまでには、①候補化合物の創成、②知財、③試験物の製造・品質管理、④非臨床試験、⑤安全性を中心とした早期臨床試験(第Ⅰ相試験)、⑥少数の患者で行う探索的臨床試験(第Ⅱ相試験)、⑦機能評価を主要指標とした検証的試験(第Ⅲ相試験)、⑧承認申請、⑨薬価収載、と多くの専門家が長い年月と資源をかけて段階的に進めていくことになる。と

くに、PMDA の意見を聴きつつ、産学で連携して進めることが不可欠である。産学連携ではたがいのもてる技術を補完して研究開発を進めることになるが、一般的にアカデミアの研究者が中心に進めるべき事項としては以下の事項があげられる。

- ① 疾患解析による標的分子の特定
- ② *In vitro* および *in vivo* の非臨床薬効薬理試験方法の策定
- ③ 臨床評価指標の設定(バイオマーカー、イメージング、機能評価スケール)
- ④ 被験者リクルート
- ⑤ 臨床試験における安全性評価
- ⑥ 対象疾患の疫学的事項の調査、自然歴の収集、レジストリー

①および②は創薬における探索研究の段階のものである。③～⑤は臨床試験のデザインおよび実施にかかわること、⑥は疾患の理解と試験成績の比較対象としての利用にかかわることである。

臨床導入にあたっての大きな壁は、GMP 基準を満たす試験薬の調達、GLP 基準に則った安全性試験などの実施、さらには臨床評価の試験デザインである。とくに新規疾患や新規機序の治療薬の場合は開発戦略や臨床試験デザインで苦慮することが多く、それゆえ、PMDA との対話のなかで進めていく必要がある。たとえば、リクルート可能な患者数が限られていること、新規臨床評価指標の策定、自然歴の欠如、対照群の設定の困難性、試験期間の長期化と患者の脱落など多くの困難があり、粘り強く段階を踏んで解決していくことが重要である。

### 開発拠点の整備と連携体制

文部科学省の TR 拠点<sup>3)</sup>、厚生労働省の早期・探索的臨床試験拠点<sup>4)</sup>、および臨床研究中核病院<sup>5)</sup>およびグローバル臨床研究拠点<sup>6)</sup>などの開発拠点では、国の支援を受けて多施設共同試験の支援組織の整備が進んでいる。また、これ以外にも独自に整備を進めている大学もある。

このような拠点の支援を受けた試験は日米 EU で合意した“医薬品の臨床試験の実施に関する基準”(ICH-GCP)に準拠した品質管理により、治験以外の臨床研究であっても製造販売承認申請の資

料として使用可能な方向で検討が進んでいる。ICH-GCP と“臨床研究に関する倫理指針”のもっとも大きな違いは、品質管理・品質保証の規定や、安全管理に関する国の審査が倫理指針にはないことである。拠点ではプロジェクトマネージャー、薬事の専門家、データ管理の専門家、生物統計家、モニタリング担当者、安全性情報の担当者などを整備し、ICH-GCP 準拠の実施体制を構築することが求められている。治験受託機関(contract research organization: CRO)のアカデミア版のような機能であるが、拠点として研究者や支援スタッフの教育・研修も担当し、また、自ら研究を実施することもある。

欧米ではこのような組織はコーディネーティングセンター(coordinating center)などと呼ばれ、大学などに付属し多くの領域の研究を支援するものと、疾患ネットワークに特化したものがある。疾患領域に特化した拠点については次項の疾患ネットワークで記載する。

アメリカの Clinical and Translational Research Award(CTSA)の医療機関は NIH のファンドを受けた全米約60の拠点施設であり、コンソーシアムを形成している<sup>7)</sup>。NIH グラントの支援を受けていた General Clinical Research Center の後継とされ、多くの施設は臨床試験専用の病床や外来を備えた臨床研究ユニットを有している。EU 各国でも地域ごとに拠点をおき、ネットワークを形成している。たとえば、ドイツには Coordinating center for Clinical Studies(KKS)のネットワークがある<sup>8)</sup>。

アメリカ・デューク大学の Duke Clinical Research Institute(DCRI)は世界でもっとも大きなコーディネーティングセンターで、自らを academic research organization(ARO)と称している。220人以上の教員を含む1,200人あまりのスタッフを擁し、循環器領域を中心に幅広く支援をしている<sup>9)</sup>。アメリカだけでなく、世界中の拠点と連携し、企業主導の治験も含め、グローバルに臨床試験を展開している。オックスフォード大学にも Clinical Trial Service Unit and Epidemiological Studies Unit(CTSU)という250人以上のスタッフを擁するコーディネーティングセンター

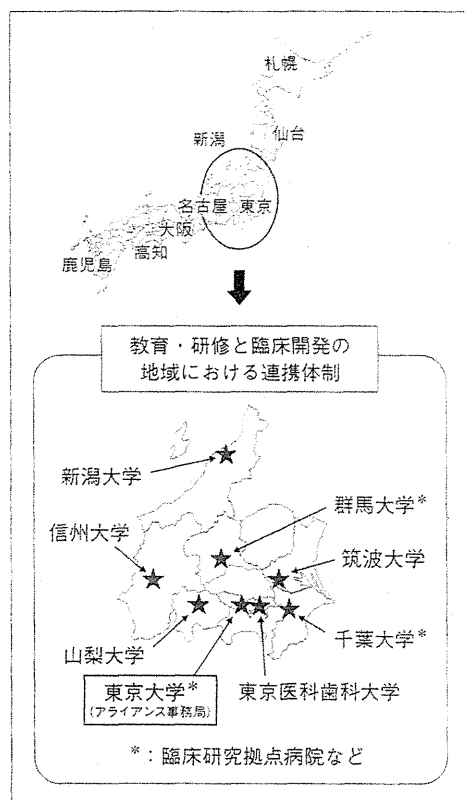


表 1 大学病院臨床試験アライアンスの特色と趣旨

1. 関東甲信越の8国立大学病院より構成
2. 臨床研究の支援部門の有志で設立
3. 先駆的な地域臨床研究ネットワークとして以下の事業を連携して推進
  - ・研究者と専門スタッフの養成
  - ・治療満足度の低い疾患に対するアカデミア発の新規治療法の大学間連携による開発
  - ・日本の医療環境におけるエビデンスの形成

図 1 大学病院臨床試験アライアンス

大学病院臨床試験アライアンスは2013年、山梨大学の加盟により関東甲信越の8国立大学のアライアンスとなった。加盟大学には文部科学省のトランスレーショナルリサーチ拠点(東京大学)、厚生労働省の早期・探索的臨床試験拠点(東大病院)、および臨床研究中核病院(千葉大学病院、群馬大学病院)が含まれ、また、筑波大学病院では独自にコーディネーティングセンターを整備している。各大学がタスクを分担し整備を行うスタイルは従来どおりであるが、2013年度アカデミア主導の臨床開発での連携に大きくシフトさせた。2011年にはISO9001を取得し、毎月のテレビ会議により進捗を管理している。事務局は東大病院にある。

があり、やはり循環器領域を中心にアウトカム研究などの試験をグローバルに展開している。

日本でも支援組織の連携の枠組みが形成されつつある。関東甲信越地区の8つの国立大学病院の支援組織からなる“大学病院臨床試験アライアンス”は2006年に有志で設立され、国際共同治験に耐えうる環境の整備を連携して行ってきた(図1)。治験コーディネーターなどのスタッフの国際化対応の実務研修も行っている。2013年からは臨床研究に大きく舵を取り、研究者やデータ管理者など専門家の育成をはかるとともに、大学間でリソースを有効活用して臨床研究を推進する枠組みの構築に取りかかった(表1)<sup>10)</sup>。この枠組みは臨床試験を実施する段階での被験者リクルートにも応用が利き、患者紹介により地域の拠点に被験者を集積することができる。これ以外にも、TR拠点のネットワーク、九州や東北の大学病院のネットワークなどがある。

また、国立大学附属病院全45病院からなる“国立大学附属病院臨床研究推進会議”(以下、推進会

議)を2012年10月に立ち上げた(図2)。臨床研究にかかわるさまざまな活動の大きなプラットフォームとし、その上で情報共有と連携をはかっていくことをめざしている。事務局は東大病院においている。推進会議には5つのトピックグループ(サイト管理、ネットワーク、ARO/データセンター、教育・研修、人材育成とサステナビリティ)を設け、活動を開始したところである。

### 疾患領域別ネットワークと拠点

#### 1. アメリカの疾患領域別ネットワーク

アメリカには疾患領域別ネットワークと一体になってコーディネーティングセンターを設置しているものが少なくない。たとえば、Alzheimer病に特化したAlzheimer's Disease Cooperative Study(ADCS)<sup>11)</sup>やNIHのNational Institute of Neurological Disorders and Stroke(NINDS)の臨床試験ネットワークNetwork for Excellence in Neuroscience Clinical Trials(NeuroNEXT)<sup>12)</sup>などがある。

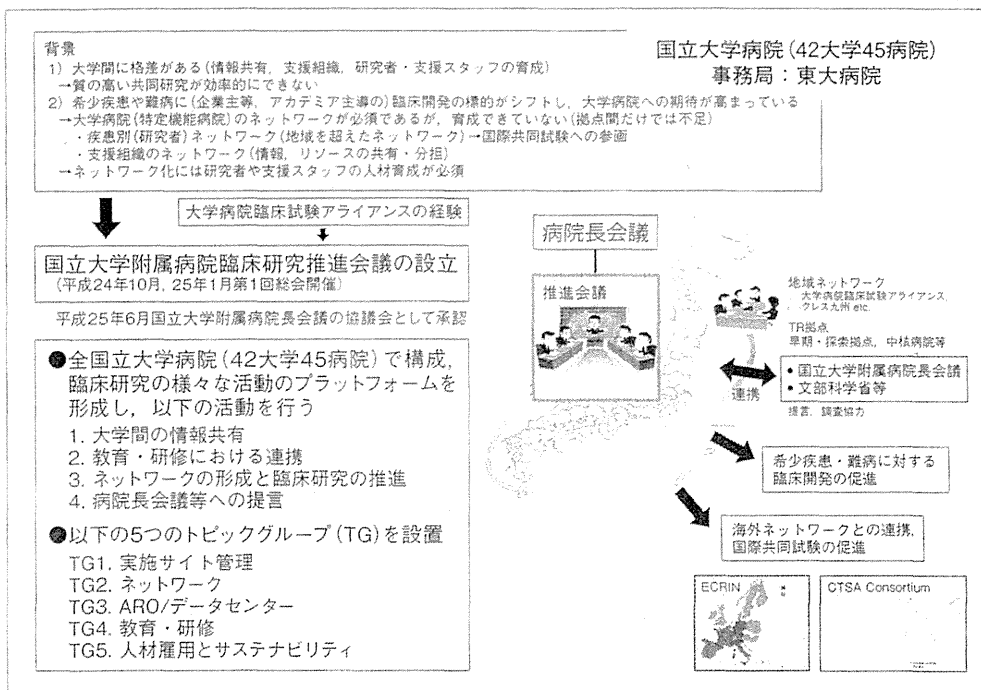


図 2 国立大学附属病院臨床研究推進会議

2012年10月国立大学附属病院の臨床研究の支援組織の協議会として設立された。拠点などのさまざまな活動の大きなプラットフォームとして機能し、大学間の情報共有と標準化・連携をはかりアカデミア発のシーズの臨床開発やエビデンス形成を促進することを目標としている。5つのトピックグループをおき、具体的課題を検討する。2013年6月、推進会議は国立大学附属病院長会議の傘下に入り、病院長会議との連携の下で活動を開始した。事務局は東大病院にある。

ECRIN: European Clinical Research Infrastructure Network (国別ネットワークのネットワーク),  
 CTSA: (USA) Clinical and Translational Science Award (NIH ファンドを受けた地域拠点)。

ADCS は、カリフォルニア州立大学サンディエゴ校 (UCSD) と National Institute of Aging (NIA) が 1991 年に設立した組織であり、連邦政府の Alzheimer 病に関する臨床研究を推進している。ADCS が中心となって進めた軽度認知症患者、早期 Alzheimer 病患者および健康高齢者の縦断観察研究 Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) は、さまざまなバイオマーカー、MRI や PET などの画像、認知機能評価などにより、Alzheimer 病の進行の理解と疾患修飾薬 (疾患の進行を抑制する医薬品) の開発の基盤として貢献している。現在、さらに早期の段階のアミロイド PET 陽性の軽度認知症および認知機能正常高齢者を対象とする研究 (ADNI2) が進行している。日本でもこれらに対応し、J-ADNI がすでにエントリーを終了し、J-ADNI2 も開始されたところである (後述)。アメリカではこれ以外にも Alzheimer

病に対して、DIAN 研究 (ワシントン大学) や A4 研究 (ハーバードメディカルスクール) など NIH のファンドと企業の協力も得て治療薬開発を進めている研究グループがあり、たがいに情報共有している。

NINDS の NeuroNEXT は神経疾患に共通の臨床試験ネットワークであり、ファンドの機会も用意されている。データコーディネーティングセンターはアイオワ大学が担当し、臨床コーディネーティングセンターはマサチューセッツ総合病院の Neurological Clinical Research Institute が担当している。

2. 日本の疾患領域別ネットワーク

日本でもがん研究の臨床試験グループではすでに多くの活動の歴史がある。国立がん研究センターに拠点を置く日本臨床腫瘍研究グループ (JCOG) はとくに有名である。このほか、婦人科

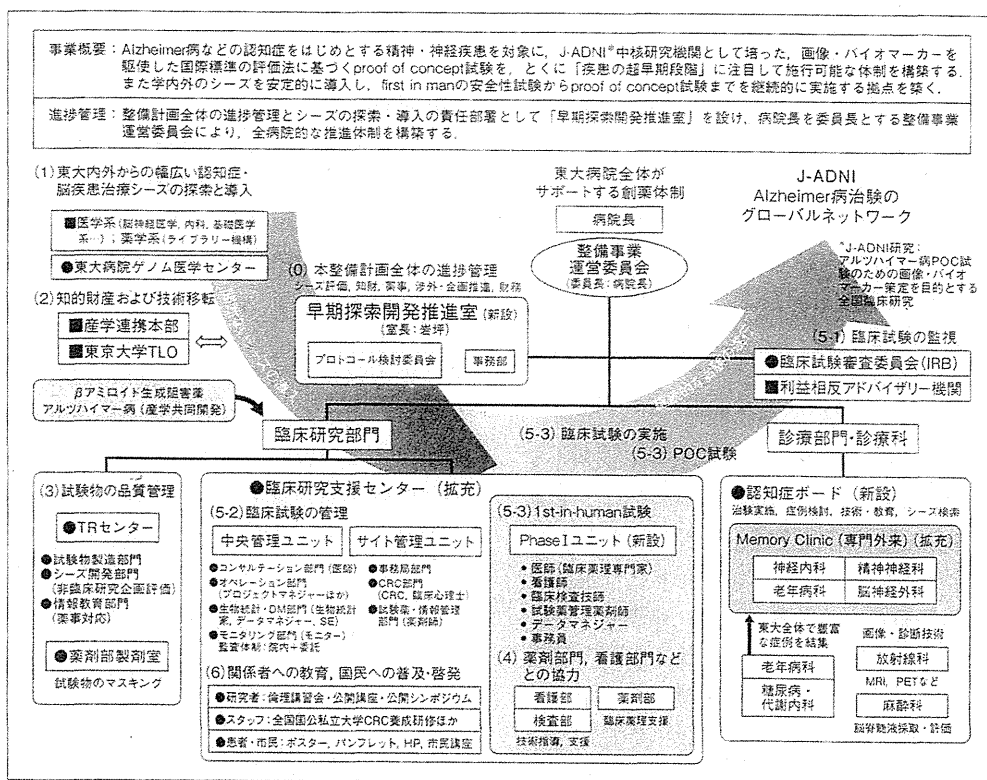


図 3 精神・神経領域の医薬品開発の拠点(早期・探索的臨床試験拠点)としての東大病院の体制整備<sup>16)</sup>

東大病院は2011年7月厚生労働省の早期・探索的臨床試験拠点(精神・神経領域の医薬品開発の拠点)に選定され、phase I unit (P1 ユニット)や臨床研究用のPET, MRIなどを設置し、臨床評価機能の強化をはかった。P1 ユニットはハード・ソフトの整備を終え、2012年10月に臨床薬理試験を開始した。現在はAlzheimer病の疾患修飾薬のFirst-in-humanの第I相試験を実施している。早期・開発推進室や臨床研究支援センター中央管理ユニットには企業で臨床開発を担当していた専門家を多数迎え入れ、幅広く支援を行っている。

悪性腫瘍研究機構(JGOG)や日本成人白血病治療共同研究グループ(JALSG)などがあり、それぞれ研究事務局やデータセンターをおいている。

精神・神経領域ではまだネットワークは限られている。筋ジストロフィー臨床試験ネットワークは国立精神・神経医療研究センターに拠点を置き、活動を開始している<sup>13)</sup>。国立病院機構の病院および大学病院などからなり、医師だけでなく、ケアにかかわるさまざまな職種の人々が参加している。2013年5月のネットワークの調査では28施設での診療患者数は約5,700人にのぼり、Duchenne型が30%を占めている。すでに、アカデミア発の新薬の臨床試験が計画されており、今後の発展が期待される。

厚生労働省難治性疾患等克服研究事業「運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究班」は、

21の研究施設や医療機関で、多系統萎縮症(MSA)の疾患の自然歴の調査や疾患感受性遺伝子のゲノム解析を行う多施設共同研究体Japan Multiple System Atrophy research consortium (JAMSAC)を組織している<sup>14)</sup>。今後、新薬開発の基盤にもなることが期待される。

Alzheimer病縦断研究 Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI)の日本版J-ADNIが東京大学医学部神経病理・岩坪 威教授を代表に全国レベルで展開されている。疾患早期の経過を臨床評価、画像、バイオマーカーを駆使して解析するとともに、Alzheimer病の進行を抑制する疾患修飾薬の開発の基盤となることをめざしている。現在、さらに疾患の早期の段階を対象とする縦断研究J-ADNI2が開始されたところである。事務局は東大病院臨床研究支援センター中

央管理ユニットが担当している。

東大病院の臨床研究支援センターは2010年にコーディネーティングセンター機能を有する中央管理ユニットを整備し、GCP対応の医師主導の治験や再生医療、遺伝子治療、先進医療Bなど、品質管理の必要な多施設共同試験などの支援をしている。2011年7月には厚生労働省の早期・探索的臨床試験拠点(精神・新鋭領域の医薬品開発)に選定され、早期開発の拠点としてphase I unit(P1ユニット)の整備を行った<sup>15)</sup>(図3)。P1ユニットは13床を有する独立棟(臨床試験棟)で、入院棟に隣接している。2016年度竣工予定の新入院棟(入院棟II期)では12階フロア全体が30床からなる治験病棟となり、臨床評価機能と研究参加者のアメニティのさらなる向上がはかれる予定である。P1ユニットは病院の1病棟として、看護部、検査部、循環器内科、救急部など、院内の全面的な支援を受けている。2012年3月に建屋が竣工し、その後手順書の整備や研修を積み、同年10月には最初の臨床薬理試験を健常人ボランティアを対象に実施した。さらに、企業主導の治験を経て、2013年3月にはAlzheimer病疾患修飾薬TAK-070の医師主導のfirst-in-human第I相治験を開始した。TAK-070は2012年に武田薬品工業より知財を承継し、東大病院が自らGMP対応の製剤発注から開発を行っているものである。医薬品の開発には多大な人材と資金、期間を要し、国からの絶大な支援が必要である。

このほか、特定の臨床試験のために国内の施設の連携で実施したものは多いと思われる。球脊髄性筋萎縮症(SBMA)に対するリュープロレリン酢酸塩のプラセボ対照の医師主導の治験では、名古屋大学医学部神経内科・祖父江元教授を中心に全国ネットで199人の患者に試験薬が投与された。主要評価項目の嚥下機能の評価では全体では有意差がつかなかったものの、発症10年未満の早期のSBMA患者を対象としたサブ解析では有効

との示唆が得られている。

## おわりに

神経変性疾患の医薬品開発には標的分子の特定から臨床開発まで多くの課題があり、産官学に患者団体も含め、取り組んでいく必要がある。日本はアカデミアの開発拠点の整備が東大病院をはじめようやくはじまったところであり、疾患ネットワークもまだまだ整備されていない。バイオマーカーなど最新の知見を取り入れた疾患の自然歴を構築し、科学的に解析し、医薬品開発に結びつけていくことが重要である。また、国に対しては試験薬の調達や非臨床試験の実施も含めた臨床試験の実施のための公的資金の充実を望むところである。

## 文献/URL

- 1) <http://www.kantei.go.jp/jp/singi/kenkouiryousu/suisin/kettei/taisei.pdf>
- 2) <http://www.kantei.go.jp/jp/singi/kenkouiryousu/suisin/dai2/siryoul.pdf>
- 3) <http://www.tr.mext.go.jp>
- 4) <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r985200001jym4.html>
- 5) <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r98520000304vd.html>
- 6) <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/isei/chiken/dl/120615-01.pdf>
- 7) <https://www.ctscentral.org/about-us/ctsa>
- 8) <http://www.kks-netzwerk.de/en/homepage.html>
- 9) <https://www.dcri.org>
- 10) <http://plaza.umin.ac.jp/~UHCTA/cgi-bin/information.cgi?mode=viewandtgtmon=2013-05and-pvc=130524100807>
- 11) <http://www.adcs.org/Default.aspx>
- 12) <http://www.neuronext.org>
- 13) <http://www.mdctn.jp>
- 14) Ichikawa, Y. : Japan Multiple System Atrophy Research Consortium (JAMSAC). 臨床神経, 50 : 927, 2010.
- 15) 荒川義弘, 山崎 努 : 東京大学医学部附属病院臨床研究支援センター. 医学のあゆみ, 244 : 1154-1160, 2013.
- 16) <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r985200001xhgb-art/2r9852000001xhli.pdf#search='早期・探索的臨床試験拠点'>

\* \* \*



## **Laser-Perforated Porous Nonwoven Chitosan Nerve Conduit\***

Petros RODOTHEOU\*\*, Wei WANG\*\*\*, Soichiro ITOH\*\*\*,  
Mutsumi OKAZAKI\*\* and Kazuo TAKAKUDA\*\*

\*\*Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Tokyo Medical and Dental University,  
1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan  
E-mail: wang.mech@tmd.ac.jp

\*\*\*Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University,  
2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda, Tokyo 101-0062, Japan

### **Abstract**

Chitosan nonwoven mesh conduit was introduced with perforating pores on the wall by laser-drilling process. The pore size was set at 200  $\mu\text{m}$  and the pore interval at 1mm. Twelve mm long grafts of following 4 groups (N=5, respectively) were implanted to rat sciatic nerve defects: non-pore, 2 lines of pores, 4 lines of pores and isograft. After 12 weeks standard nerve function evaluations were performed including functional test, electro conductivity test and histological analysis. It was found that revascularization of the conduit contents was improved with pores drilled, but accompanied nerve regenerative improvements were only shown as maturation of fasciculi, not with the general parameters of axon diameter and density.

**Key words:** Nerve Regeneration, Chitosan Conduit, Laser Perforating, Nano Scaffold

### **1. Introduction**

Bridging of large gaps between the cut ends after peripheral nerve injury and restoration with sufficient functional recovery has always been a clinical challenge. Autografts have been used as first line therapy and were the gold standard choice for peripheral nerve grafts, but they had the drawback of sacrificing healthy functioning nerves. Recent developments of biocompatible and degradable materials made the use of artificial guide conduits in repairing these injuries more and more a promising alternative solution. Various natural and synthetic biomaterials have been investigated as scaffolds for peripheral nerve regeneration such as collagen, gelatin, chitosan, fibroin, poly lactic acid (PLA), Poly glycolic acid (PGA), and Poly lactic acid caprolactone (PLAC) (1-6).

Chitosan is a partially de-acetylated derivative of chitin, extracted from crustacean shells. The metabolic products of chitosan are saccharides and glucosamines, which are constituents of normal metabolites in mammals. Chitosan is proved to have mild foreign body reaction, wound healing effect and antibacterial function (7). Also with its easy fabrication and appropriate mechanical property, chitosan is widely-applied for biomedical applications (8). A Three dimensional fibrous porous chitosan scaffold was obtained by electro spinning of chitosan solution and conduits fabricated from it showed excellent peripheral nerve regenerative function even comparable to isografts in rats (9-11).

Rapid and sufficient reconstruction of vascular network is always considered playing a crucial role in tissue regeneration (12-13). Porous biomaterials with interconnected channels aiming fast vascular ingrowth were developed through various



9fabricating methods (14). By applying laser processing technology, precise fabrication of object configurations could be easily achieved (15-16). Accurate porous structure with precise pore diameter and interval could be obtained by laser drilling which has a potential to introduce capillary vessels formation into its volume.

In this study, we have developed a pierced porous tube of nonwoven chitosan mesh by electro spinning and laser drilling processes. We evaluated its efficacy as peripheral nerve bridging conduit by implanting it to rat's sciatic nerve defect. The correlation of pore density and revascularization extent as well as the influence of revascularization level to peripheral nerve regeneration was investigated.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Conduit fabrication**

#### **a) Fabrication of nonwoven chitosan conduit:**

The nonwoven chitosan mesh tube at the size of 12mm in length, 1.2 mm in inner diameter and 0.3~0.5 mm in wall thickness was prepared by electro spinning method (17-18). Chitosan solution was prepared by adding 0.8 g of chitosan powder (HOKKAIDO SODA Co., Japan) with the deacetylation rate at 90% to 10 mL of trifluoroacetic acid (TFA) (0.5mol/L, TCI, Japan) and incubating at 50°C overnight. 2.5 mL of methylene chloride (MC) (DOJINDO, Japan) was then added to this mixture and glass filtered (6.4 w/v % chitosan). For electro spinning, the chitosan-TFA-MC solution was filled in a plastic syringe fitted with a 17-mm-long needle with an inner diameter of 0.5 mm. A high voltage power supply provided a potential of 20–30 kV at a distance of 10–20 cm between the needle tip (anode) and the collector (cathode), a 100 mm thick rotating stainless drum with the linear rate at 0.52 m/s (100 rpm). A positive-charged jet ejected from the syringe at a rate of 2–8 mL/h was sprayed onto the negative-charged collector (Fig.1). Nonwoven Chitosan mesh constituted by numerous randomly crossed nano/micro fibers was formed on the drum surface, the peak (>50%) of the distribution of fiber diameters was between 200 to 600 nm (10). Obtained mesh with a thickness of 0.02 mm was carefully unrolled from the drum, reeled on a stainless bar with the diameter of 1.2 mm and immersed in 28% aqueous ammonia at room temperature overnight to neutralize the chitosan-TFA-MC. After being washed with distilled water at room temperature for 2 h, it was dipped into 100 v/v% ethanol for 3 min. As a result of slight shrinkage of the chitosan fiber, slim but sufficient clearance occurred between the bar and the tube; thus, the chitosan mesh tube was easily removed from the bar. The completed chitosan mesh tube had an inner diameter of 1.2 mm; an outer diameter of 2.0 mm and a length of 12 mm. Twenty-seven samples in total were made for further evaluations.

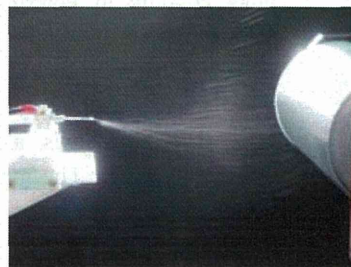


Fig. 1: Fabrication of nonwoven chitosan mesh by electrospinning. A positive-charged jet of chitosan solution ejected from the syringe distributed onto the negative-charged drum collector. Nonwoven Chitosan mesh constituted by numerous randomly crossed nano/micro fibers was formed on the drum surface.

#### **b) Laser drilling:**

An YVO4 SHG green Laser Marker with the working wavelength of 532nm



(MD-S9900A Series, KEYENCE, Tokyo, Japan) was employed to perforate holes on the nonwoven chitosan tube wall precisely. After several tests of different settings (LE:0~100%, IT: 50~300ms), Laser Energy (LE) set at 50% and Impact Time (IT) at 150 ms were found proper for achieving stable penetrating pores. 10 pores at the size of 200  $\mu\text{m}$  were punched linearly with the interval of 1mm to each other along the tube axis. Eleven samples were processed 2 lines of pores oppositely, 11 samples were processed 4 lines of pores centrosymmetricly. All samples were sterilized before animal implantation by immersion in 70% alcohol for 24 hours followed by PBS rinse.

### 2.2 Scanning electron microscopy

Laser drilled nonwoven chitosan conduits were dried in a critical point drying apparatus (hcp-2, Hitachi, Tokyo, Japan) with liquid  $\text{CO}_2$ , coated with platinum in an ion-sputter coater (E-1045, Hitachi, Tokyo, Japan) and observed by scanning electron microscopy (SEM) (Model S-4500, Hitachi, Tokyo, Japan). The average pore size was calculated on SEM images taken from different samples in each group,  $N=3$  respectively.

### 2.3 Animal implantation

Following experiments were carefully conducted in accordance with the Guidelines for Animal Experimentation (Tokyo Medical and Dental University) as well as the National Institutes of Health (NIH) guide for the care and use of laboratory animals (Eighth Edition).

Female Wistar rats weighed 180–200 g were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg body weight). The right sciatic nerve was exposed and a 10 mm long section was excised at the center of the thigh. Experimental grafts at the length of 12 mm were implanted by end to end suturing with two sutures (8-0 monofilament nylon) at each junction (Fig. 2). Following groups were set: 1) Nonwoven chitosan conduit, 2) Nonwoven chitosan conduit with 2 lines of micro pores, 3) Nonwoven chitosan conduit with 4 lines of micro pores, 4) Isograft which is harvested from isogenic rat and considered having the nearest function of human autograft. Sample number (N) was 8 in the 2 groups with pore drilled and 5 in the left 2 control groups. Muscle and skin incision was closed with sutures of 4-0 monofilament nylon. The whole procedure was conducted under a surgical microscope (OME-9000, Olympus, Tokyo, Japan) and strictly following the standards of surgical aseptic manipulation.

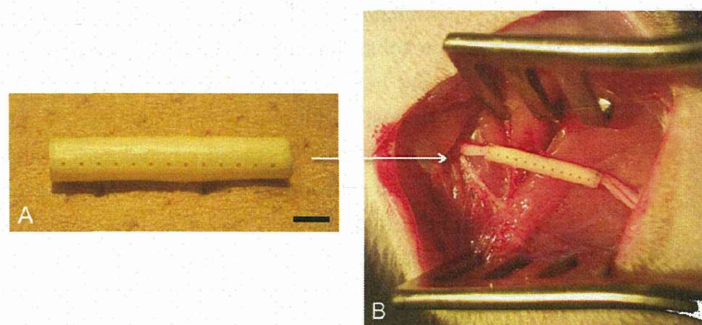


Fig. 2: A close (A) and intraoperative view (B) of the laser drilled nonwoven chitosan conduit. The conduit is 12 mm long and has 0, 2 or 4 lines of pores; every line contains 10 pores with the interval of 1mm (A). It is implanted by end to end suturing with two sutures of 8-0 monofilament nylon at each junction (B). Scale bar: 2mm

### 2.4 Functional test

Frey hair test (19) was applied for evaluating the final nerve function recovery before nerve harvest 12 weeks after operation ( $N=5$  in each group). Experimental rats were



placed on a wire mesh plate and allowed to calm down. A series of Nylon monofilaments (Touch-Test Sensory Evaluator, North Coast Medical, CA) were used to stimulate the sole of the hind feet from below. The size of the monofilament was recorded when a paw withdrawal or lick reaction was repeatedly observed. Stimulating load was from No. 3.84 to 5.07, and stimulating time was 5 seconds per operation. Both sides were tested and the results were calculated using the following formula:

(Result of experimental side - Result of the normal side) / Result of the normal side

### **2.5 Electrophysiological evaluation**

Electrophysiological evaluation was performed before animal sacrifice at 12 weeks post implantation (N=5 in each group). Under anesthesia with ketamine (80 mg/kg, intraperitoneal injection), the right sciatic nerve interposed by implant was carefully re-exposed and detached from surrounding tissues. Two recording needle electrodes were placed in the anterior tibialis muscle and the sciatic nerve was stimulated by two hook wire electrodes connected with DC electrical stimulator (Neuropack S1 MEB-9100, Nihon Kohden Co., Japan). Stimulation was set at 1 Hz in rate, 1.8 mA in intensity and 0.2 ms in duration. An earth electrode was also placed in surrounding muscle tissue to remove interference signals from surrounding tissue conduction. The stimulation was repeated for 20 times and accumulated compound action potentials (CAPs) were recorded, from which the evoking latency and the peak amplitude were measured and calculated as following formula:

| Result of experimental side - Result of the normal side | / Result of the normal side

### **2.6 Histological evaluation**

To verify the ingrowth of neo blood vessels through the opening pores of the conduit wall, 3 rats in both laser drilled groups were euthanized by intraperitoneal injection of overdosed sodium pentobarbital at 4 weeks after implantation. The implanted conduits were carefully harvested and the pores were observed under a surgical microscope. The conduits were then fixed in 10% formalin neutral buffer, dehydrated and embedded in paraffin, sliced longitudinally through the pores to 4  $\mu$ m thick sections, followed by staining with Hematoxylin-eosin (HE). These slices were examined under a light microscope (BX51, Olympus Co., Tokyo, Japan).

For histological analysis of regenerated nerve and vessel tissue, 12 weeks after implantation 20 rats (5 from each group) were sacrificed by administering overdosed pentobarbital intraperitoneally. Implanted samples and 5 healthy nerves from opposite side were harvested and fixed in 2.5 vol. % glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, followed by post-fixation of 1% OsO<sub>4</sub> in 0.1 M phosphate buffer. Then they were rinsed and dehydrated in a graded ethanol series, and embedded in Epon 812 resin. The mid-portions of the specimens were cut into thin cross-sections of 1  $\mu$ m thickness with an ultra-microtome (EM UC6, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), stained with 0.5 % toluidine blue, and observed by light microscopy.

Images of the transverse sections of the implanted conduits, isografts and normal nerves were captured for the measurements of regenerated nerves by following parameters; axon diameter (minimum), density (number/mm<sup>2</sup>) as well as vessel diameter (minimum) and density (number/mm<sup>2</sup>). The image analyzing software, Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc. MD, USA) was employed for the task.

### **2.7 Statistical analysis**

An ANOVA, Turkey-Kramer Post-hoc test, was applied to calculate the significance of differences between mean values for each parameter. A p value less than 0.05 was considered statistically significant (20).