

平成 31 年 3 月 31 日

日本音声言語医学会

理事長 大森孝一様

会員番号 5531

申請者氏名 岸本 曜 印

助成研究実績報告書

平成 29 年 5 月 8 日付で助成金交付決定を受けた研究が完了したので、次のとおりその実績を報告します。

記

- 1 研究課題名 3D プリンターを用いた反回神経再生技術開発
- 2 交付決定助成金額 500,000 円
- 3 添付書類
 - (1) 助成研究実績報告書(付表1)
 - (2) 助成研究収支計算書(付表2)
 - (3) その他参考資料

助成研究実績報告

申請者	岸本 曜
研究実施期間	平成 29 年 4 月～平成 31 年 3 月
研究課題名	3D プリンターを用いた反回神経再生技術開発
目的	本研究の目的は、分離した細胞が凝集する現象を利用して、細胞凝集塊を剣山に積層するバイオ 3D プリンターにより、細胞のみからなるバイオ三次元神経再生導管を作製し、その反回神経再生効果を検討することである。
方法	<p>① Normal Human Dermal Fibroblasts(NHDF)を2日おきに継代培養し、第5～6継代細胞を用いて96wellプレート上でスフェロイドを作製した。作製したスフェロイドを Regenova®にセットし、剣山上に積層し管腔状構造を3Dプリンティングし、バイオリアクターの中での熟成させることによりバイオ三次元神経再生導管を作製した。 図1：スフェロイドの作製</p> <div data-bbox="571 884 1332 1070" data-label="Image"> </div> <p>② ラット左反回神経を切除し(6 mm、1 mm)、作製した神経再生導管にて架橋した。8週間後に電気生理学的検査、喉頭内視鏡検査および組織学的検査を行い、神経再生効果を検討した。</p>
結果	<p>① 積層から約1週間でスフェロイドは結合し、神経再生導管が作製できた。神経欠損部を架橋するには十分な長さではなかったため、複数の構造体をサーフローに通して約2週間灌流培養することにより連結させることに成功した。 図2：灌流培養による神経再生導管の作製および連結</p> <div data-bbox="582 1496 1316 2004" data-label="Image"> </div> <p>② 6mmの欠損に関しては、神経再生導管を用いた再建では組織学的には6匹中2匹で中央までの神経再生を認めただが、複合筋活動電位を確認できた</p>

ものはなかった。シリコンチューブを用いた再建では3匹中2匹で組織学的な神経再生と、複合筋活動電位を認めた。

図3：神経欠損部の架橋

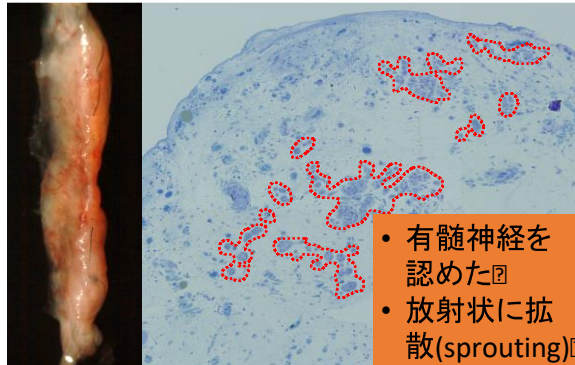


シリコンチューブによる架橋



神経再生導管による架橋

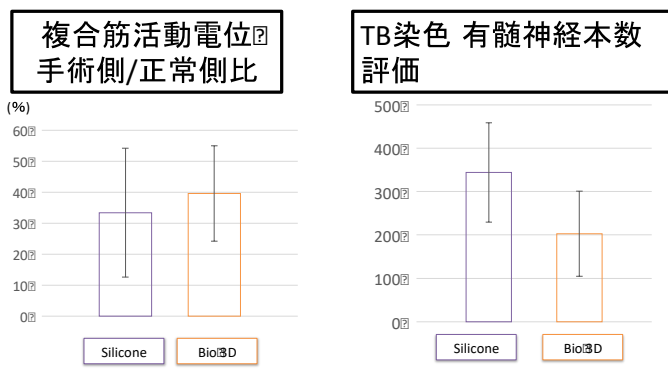
図4：再生神経



- 有髄神経を認めた
- 放射状に拡散(sprouting)

③ 1mmの欠損では神経再生導管およびシリコンチューブを用いた再建のいずれにおいても組織学的な神経再生、電気生理学的反応を認めた。複合筋活動電位、有髄神経の本数において両群に有意な差は認めなかった。前者においては1匹で声帯運動の回復も認めた。

図5：複合筋活動電位、有髄神経本数で有意な差は認めなかった。



倫理的配慮

京都大学動物実験施設での審査の後、部局長の承認を得た上で本実験を行った。

<p>考 察</p>	<p>甲状腺癌をはじめとした悪性腫瘍はしばしば反回神経に浸潤し、腫瘍切除の際に神経の合併切除を余儀なくされる。原因として最も多い甲状腺癌においては、15.1～19.4%の症例で反回神経浸潤を認めると報告されており、決して稀な病態ではない(1,2)。反回神経の合併切除を行うと、永久的な神経麻痺を生じ、声帯の運動障害や筋肉の萎縮をきたす。結果、声門閉鎖不全から嚔声および誤嚥を生じ、患者のQOLは著しく損なわれる。</p> <p>反回神経を合併切除した場合には通常、喉頭筋の萎縮予防および声帯の緊張維持を目的に神経即時再建が試みられる。可能であれば端々吻合が行われ、欠損部位が長く難しい場合には自家神経移植や頸神経ワナ・反回神経吻合が行われる。しかしながら、これらの方法では、健常な神経が犠牲にされるため、採取部の神経麻痺や異常知覚などの原因となること、採取神経と反回神経の口径が必ずしも一致しないこと、再建神経では神経腫が生じる可能性があることなどから理想的な再建方法とは言い難い。そのため、神経再生誘導チューブが開発され実用化されてきたが、なかなか自家神経移植と同等以上の治療成績は得られていない。また、チューブに加えて、成長因子や細胞の利用も試みられているが(3)、その効果は限定的であり、未だ理想的な神経再建方法の確立には至っていない。</p> <p>今回作製した線維芽細胞からなる神経再生導管は、合成高分子からなる足場が不要であること、神経伸長を促すサイトカインの持続的な産生が期待できるなどの利点があり、先行研究(4)では坐骨神経再生促進効果が示されている。しかしながら、反回神経においてはシリコンチューブに比べて優位性を確認することができなかった。理由としては①坐骨神経に比べ反回神経は細いため、導管の径を小さくした結果、導管の管腔構造の維持が困難になったことや、②坐骨神経は筋肉の間を走行しており血流が豊富であるのに対して、反回神経の内側は気管軟骨でありそれほど血流が期待できないことなどが考えられる。</p> <p>今後は管腔構造を維持するもしくは再建部位を血流の良い組織で被覆することなどにより、問題点の解消を図りたい。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 山田光一郎, 田中信三, 平塚康之, 渡邊佳紀. 甲状腺乳頭癌反回神経浸潤例における予後の検討. 日本内分泌・甲状腺外科学会雑誌. 2014;31(1):55-8. 2. Chiang F-Y, Wang L-F, Huang Y-F, Lee K-W, Kuo W-R. Recurrent laryngeal nerve palsy after thyroidectomy with routine identification of the recurrent laryngeal nerve. Surgery. 2005 Mar;137(3):342-7. 3. Konofaos P, Ver Halen JP. Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. J Reconstr Microsurg. 2013 Mar;29(3):149-64. 4. Yurie H, Ikeguchi R, Aoyama T, Kaizawa Y, Tajino J, Ito A, et al. The efficacy of a scaffold-free Bio 3D conduit developed from human fibroblasts on peripheral nerve regeneration in a rat sciatic nerve model. PloS One. 2017;12(2):e0171448.
<p>添付資料</p>	<p>なし</p>