

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09803

研究課題名（和文）端側神経縫合法を用いたハイブリッド型人工神経の実践的応用の検討

研究課題名（英文）End-to-side neurorrhaphy as schwann cells provider for hybrid artificial nerve

研究代表者

林 礼人（HAYASHI, Ayato）

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：10365645

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：端側神経縫合法を用いてシュワン細胞を遊走させたハイブリッド型神経の実臨床への応用を目標として、ラット坐骨神経モデルにおいて本邦で臨床使用可能な既存の人工神経を用いて作成したハイブリッド型神経を移植し、神経および機能再生を検討する実験を行った。
既存の人工神経を用いて作成したハイブリッド型神経の移植により、ラット坐骨神経20mm欠損という巨大神経欠損においても良好な神経および機能的再生が得られることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により本邦で臨床使用可能な人工神経においても、端側神経縫合法を用いてシュワン細胞を遊走させたハイブリッド型神経を作成および移植する手技は有用であることが確認された。現在、本邦で使用されている人工神経は、運動神経での有用性が不安定であり、神経の有効な伸長距離にも限界があることから、積極的な適応は3cmまでの短い知覚神経の欠損に限られている。本手技はすぐにでも臨床応用可能であり、こうした人工神経の問題を解決し、適応範囲を大幅に拡大するとともに、自家神経移植に代わる手技としての発展、低侵襲な再建手技を実現できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： To explore the clinical application of hybrid nerves in which Schwann cells were mobilized using end-to-side neurorrhaphy, we conducted an experiment in a rat sciatic nerve model, transplanting hybrid nerves created using existing artificial nerves that are clinically available in Japan, to examine nerve and functional regeneration.

The transplantation of hybrid nerves created using existing artificial nerves demonstrated favorable neural and functional regeneration even in cases of large nerve defects, such as a 20mm deficit in the rat sciatic nerve.

研究分野：再建外科、末梢神経再生

キーワード：末梢神経再生 人工神経 端側神経縫合 神経移植 シュワン細胞遊走

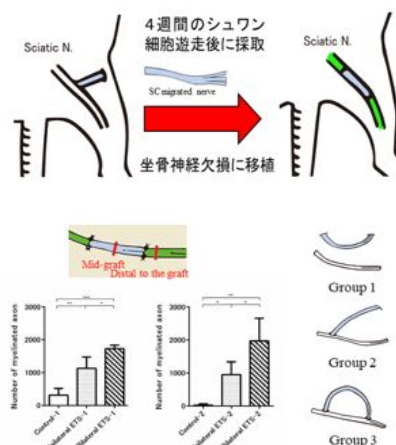
1. 研究開始当初の背景

末梢神経外科の領域で、人工神経や無細胞化した同種神経といった無細胞の移植材料が自家神経移植に代わる手法として注目を集め、コラーゲンのみで作成された日本独自の新たな人工神経が開発されるなど、本邦においてもその臨床応用が進められている。人工神経は神経欠損部を架橋し、再生軸索の足場を提供する無細胞な移植材料だが、移植神経内に軸索再生に不可欠なシュワン細胞が存在しないため、その有用性については、3cm までの短い知覚神経の欠損に限られる (Lundborg et al. 2000)。四肢の運動神経での有用性は知覚神経よりも不安定とされ、顔面神経再建に必要な長い運動神経欠損の架橋には、軸索栄養因子を供給するシュワン細胞の導入が必要不可欠となる (Lundborg et al. 2000)。培養シュワン細胞や幹細胞の移植といった試みが世界的に研究されているものの (Dai et al. 2013)、移植細胞の viability や倫理面などの問題で臨床応用にはまだまだ多くの課題が残り、その実現には長い時間を要するものと考えられる。

一方、端側神経縫合法は、特に顔面神経麻痺再建の領域で臨床応用され、舌下神経や咬筋神経といった顔面神経以外の運動神経を用いた神経移行術に新たな可能性を生み出している。

我々は端側神経縫合を無細胞化同種神経に対するシュワン細胞の供給法として応用出来ないかと考え、様々な検討を行い報告してきた (Hayashi et al. 2004, Hayashi et al. 2008)。その結果、無細胞化同種神経の両端を端側縫合したモデルで、豊富なシュワン細胞の神経内への遊走を確認でき、シュワン細胞を遊走させたハイブリッド型神経の移植で、極めて旺盛な軸索再生を確認出来た (Yoshizawa, Hayashi et al. 2016)。

本手技は、すぐにでも臨床応用が可能な手技であり、本邦で使用可能な人工神経を使用して本手技の有用性を確認出来れば、その適応範囲を大幅に拡大し得ると考え、遺伝子改変マウスを用いて検討を始めた。本邦で開発されコラーゲンのみで作成されたリナーブは、PGA で作成された他の人工神経に比べ高い柔軟性を有し、本手法の施行がマウスにおいても可能であった。ただし、既存の人工神経では最も細いサイズでもマウスの神経に対し非常に太く、マウスサイズに合わせた人工神経を独自に開発し、実験の遂行を行った。しかし、細い人工神経では、生体吸収が通常のものよりも早く、他材料でのラップ保護など様々な工夫を重ねたものの、実臨床での使用とは異なる手法になるため、既存の人工神経でモデル作成が可能なラットを用いた実験の遂行が必要と思われた。そのため、アジアでは保有している研究室の無い軸索が蛍光発色する遺伝子改変ラットを米国の研究室から譲渡頂き、ラットモデルを主体とした実験計画とすることで、本手技を利用したハイブリッド型人工神経の臨床応用の実現と発展を、さらに探求していきたいと考えた。



2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床現場で使用可能な人工神経を使用し、遺伝子改変ラットを用いて、より最適な実用手技の検討と再生過程の詳細について検討を重ね、本邦で使用可能となった人工神経の限られた適応を大幅に広げ、自家神経移植に代わる手技としての発展および低侵襲な再建手技の確立を推進することであった。

本研究の学術的な特色としては、我々が現在まで研究を重ねてきた端側神経縫合という手技を軸索再生の目的ではなく、シュワン細胞の供給という目的で使うことが大きな特徴となる。この様な手法は世界的にも類を見ず、非常に独創的で、すぐにでも臨床応用が可能という点で優れていると考えた。

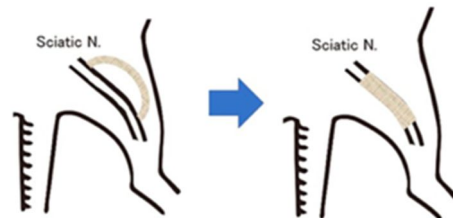
また、本邦で開発されたコラーゲン性人工神経は、柔らかな弾力性と均一な断端を有し、本手法を実現出来る唯一の人工神経である。本邦発の人工神経で新たな使用法を提言出来れば、その意義は世界的にも大きなものになり、再建手法そのものにも新たな考え方をもたらすことが可能と思われた。

3. 研究の方法

端側神経縫合法を用いて人工神経内にシュワン細胞を遊走させたモデルを作成し、シュワン細胞が充填された人工神経を 20mm の神経欠損ラットに移植した群をシュワン細胞充填型人工神経群 (ETS 群) とし、無細胞人工神経を 20mm 神経欠損ラットに移植した群 (コントロール群) とで比較実験を行い、その有用性を検討した。

両側端側神経縫合を行う際に使用するラットは、10~14 週齢オスの Sprague Dawley ラット坐骨神経を使用する。また、軸索が蛍光発色するトランスジェニックラット (Thy1-GFP ラット) をワシントン大学セントルイスの末梢神経外科ラボから譲って頂き、神経欠損作成後の端側神経縫合用のモデルで使用した。

ETS 群は、初回手術で Sprague-Dawley ラットの坐骨神経に上膜開創と部分軸索断裂を加え、1.0mm 幅 22mm 長のコラーゲン性人工神経 (Re Nerve: ニプロ社) を上膜開創部に 9-0 ナイロンを用いて両側端側神経縫合で移植し、4 週間観察後に 2 期手術としてシュワン細胞が遊走した人工神経を採取し縫合部両端を約 1.0mm ずつカットし 20mm 長の人工神経とした後、トランスジェニックラットの 20mm 坐骨神経欠損に採取した人工神経を 9-0 ナイロンを用いて端側神経縫合で移植した。



コントロール群は、トランスジェニックラットの坐骨神経に 20mm の神経欠損を作成し、コラーゲン性人工神経を 9-0 ナイロン端側神経縫合で移植した。

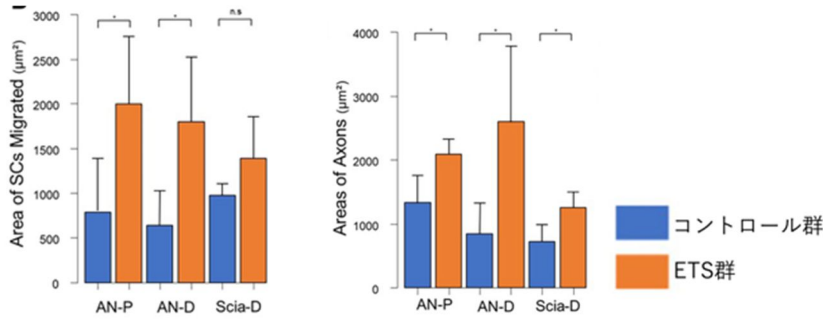
評価は移植後 4 週と 16 週で行った。組織学的評価法として人工神経の神経縫合部の近位断端から 3mm (AN-P)、遠位断端から 3mm (AN-D) および坐骨神経の遠位断端から 3mm (Scia-D) での横断切片を凍結切片で作成し、4 週時点ではシュワン細胞占有面積率 (抗 S-100 抗体による免疫染色を施行して、人工神経全面積に対する染色される領域の面積)、16 週時点では軸索数、軸索面積率 (抗 Neurofilament 抗体による免疫染色を施行して染色される領域の個数、面積) および有髄神経線維数、有髄神経繊維径、有髄神経軸索径、ミエリンの厚さ、g-ratio (トルイジンブルー染色を行い電子顕微鏡で観察、測定) を評価した。機能評価として 4 週、16 週時点で Von Frey filament test による感覚の評価および筋横断面積 (前脛骨筋の平均筋線維面積) の測定による筋再生の評価を行った。

長期経過での軸索伸長と、機能再生について検討するため、同様に 24 週のモデルを作成し、組織学的評価 (軸索数、軸索面積率) と機能評価 (筋横断面積) を追加で行った。

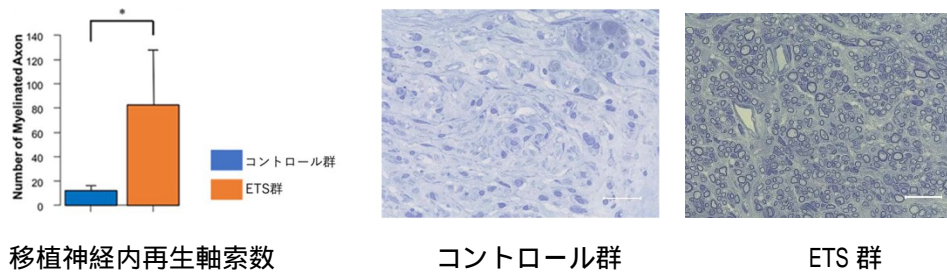
4. 研究成果

4 週時点のシュワン細胞占有面積は AN-P および AN-D の両セクションにおいて、ETS 群に比べコントロール群で有意に大きかった ($p < 0.001$)。Scia-D セクションでは 2 つのグループ間で統

計学的に有意な差は認めなかった。16週時点の軸索面積はAN-P、AN-D、Scia-Dいずれのセクションにおいてもコントロール群に比べETS群で有意に大きかった ($p < 0.001$)。



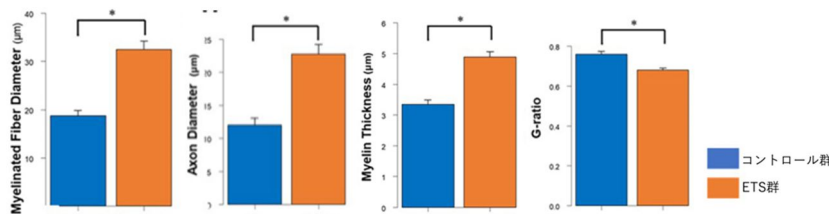
16週時点での有髄神経線維数、有髄神経繊維径、有髄神経軸索径、ミエリンの厚さはいずれもコントロール群に比べETS群で有意に大きかった ($p < 0.001$)。g-ratio はより小さい値がより大きな有髄化の指標となるが、コントロール群に比べETS群で有意に小さかった ($p < 0.001$)。



移植神経内再生軸索数

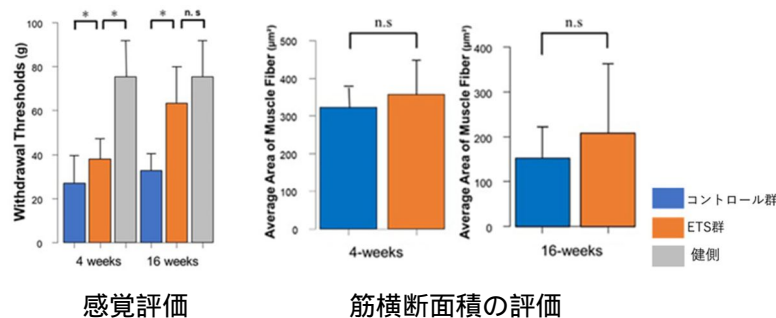
コントロール群

ETS群



電子顕微鏡による再生軸索評価

16週時点での機能評価では Von Frey filament test による感覚の評価は4週時点、16週時点ともにコントロール群に比べETS群で有意な改善を認めた ($p < 0.001$)。筋横断面積による近再生の評価は4週時点、16週時点で2群間に統計学的に有意な差を認めなかった。



感覚評価

筋横断面積の評価

長期経過では16週の経過と同様に24週の経過においてもコントロール群に比べ、ETS群で軸索面積率、軸索数が有意に優れている結果であった。また、16週の時点では改善を認めなかった筋横断面積についても24週時点ではコントロール群に比べETS群で増加を認めた。

本研究の結果からラットモデルにおいて、端側神経縫合法を用いて人工神経へシュワン細胞を遊走させたハイブリッド型神経の移植は、神経再生を改善し、ラット坐骨神経20mm欠損という巨大神経欠損においても神経再生および機能的再生が得られることが分かった。臨床使用可能な既存の人工神経においても本手技は有用であることを確認され、その適応範囲を拡大できる可能性が示唆された。

今回の実験で使用したコラーゲン性人工神経は3~4か月で分解が進み、コントロール群、ETS群ともに16週時点で人工神経がかなり狭小化してしまっていた。分解が遅い材料へ変更することにより良い結果を得られる可能性が考えられた。今後さらに実験を継続して、本手技の人工神経に対する有用性を検証していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki Masao, Ichihara Satoshi, Hayashi Ayato, Yamamoto Yasuhiro, Otani Satoshi, Ishii Sayaka, Hara Akira, Maruyama Yuichiro, Ishijima Muneaki	4. 巻 139
2. 論文標題 Potential of an artificial nerve graft containing Schwann cells for the treatment of a 20-mm nerve defect in rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1542 ~ 1551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/2023.3.JNS222419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 林 礼人	4. 巻 282
2. 論文標題 顔面神経麻痺の再建手術による治療	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ENTONI	6. 最初と最後の頁 67-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 林 礼人	4. 巻 66巻増刊
2. 論文標題 顔面神経麻痺再建の未来を語る	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 形成外科	6. 最初と最後の頁 S50-S53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi Ayato, Natori Yuhei, Suda Shunichi, Kamimori Tomoki, Nojiri Gaku, Uchiyama Mizuki, Labbe Daniel	4. 巻 33
2. 論文標題 Modified Lengthening Temporalis Myoplasty Using an Intraoral Approach	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Craniofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 926 ~ 930
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SCS.00000000000008207	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 林 礼人	4. 巻 172
2. 論文標題 臨床に役立つ神経再生・修復の基礎	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PAPERS	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Hayashi A
2. 発表標題 Using temporalis lengthening myoplasty to correct incomplete facial palsy and synkinesis.
3. 学会等名 2nd Instructional Course for Facial Paralysis Reconstruction (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hayashi A
2. 発表標題 Suitable Reanimation Technique for Incomplete Facial Paralysis
3. 学会等名 12th Congress of the World Society for Reconstructive microsurgery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林 礼人, 川端 智貴, 北山 晋也, 梅田 龍, 奥山 智輝, 大久保亜貴, 室田 悠美子, 澤井 祐美加, 中野 生順, 廣江 謙信
2. 発表標題 これからの末梢神経外科に向けて ~ 移植材料や医療機器の効果的な使用法を踏まえ ~
3. 学会等名 第50回日本マイクロサージャリー学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hayashi A, Kitayama S, Kokubo K, Yamamoto Y, Umeda R, Izuhara K, Okubo A, Ohashi M, Sawai Y, Ooi K
2. 発表標題 Lengthening Temporalis Myoplasty using an intraoral approach for incomplete facial paralysis
3. 学会等名 15th Japan-Korea Congress of Plastic and Reconstructive Surgery (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林 礼人
2. 発表標題 口腔内切開を用いたLengthening Temporalis Myoplasty法 ~ 施行におけるポイントと留意点について ~
3. 学会等名 第46回日本顔面神経学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林 礼人
2. 発表標題 Multiple nerve transfers for the acute to subacute facial paralysis - the detail description of our procedure -
3. 学会等名 第46回日本顔面神経学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林 礼人
2. 発表標題 末梢神経再建の基本と実践 - 顔面神経麻痺再建におけるクロソイド針の有用性 - 新時代にむけた新しい縫合針 - 血管吻合, 神経縫合の実際 -
3. 学会等名 第50回日本マイクロサージャリー学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hayashi A, Suzuki M, Yoshizawa H, Ichihara S:
2. 発表標題 End-to-side neuroorrhaphy as Schwann cells provider to acellular nerve graft or conduit
3. 学会等名 The 11th Congress of World Society for Reconstructive Microsurgery (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市原理司、鈴木雅生、林 礼人、石井紗矢佳、大谷 慧、山本康弘、原 章、石島旨章
2. 発表標題 人工神経の多様性を再考する
3. 学会等名 第65回日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木雅生、市原理司、林 礼人、山本康弘、大谷 慧、石井紗矢佳、内藤聖人、原 章、石島旨章
2. 発表標題 シュワン細胞充填型人工神経は神経再建の新たな選択肢となりうるか？(第2報)
3. 学会等名 第65回日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木雅生、林 礼人、市原理司、石井紗矢佳、内藤聖人、原 章、石島旨章
2. 発表標題 巨大神経欠損におけるシュワン細胞充填型人工神経の可能性
3. 学会等名 第33回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木雅生、市原理司、林 礼人、大谷 慧、石井紗矢佳、原 章、石島旨章
2. 発表標題 シュワン細胞充填型人工神経は神経再建の新たな選択肢となりうるか？
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 礼人
2. 発表標題 顔面神経麻痺 動的再建 我々のとりくみについて -
3. 学会等名 第64回日本形成外科学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市原理司、林礼人、鈴木雅生、原章、大谷慧、石島旨章
2. 発表標題 「コラーゲン製人工神経（リナーブ）との出会いから基礎研究に至るまで」
3. 学会等名 第38回中部日本手外科研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林礼人、市原理司、鈴木雅生、大谷慧、東名怜、内山美津希、野尻岳
2. 発表標題 顔面神経麻痺再建における基礎研究の融合と成果 再建法の発展とそのトランスレーショナルリサーチ
3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木雅生 市原理司 林礼人 原章 大谷慧 石井紗矢佳 石島旨章
2. 発表標題 シュワン細胞充填型人工神経は神経再建の新たなオプションとなりうるか
3. 学会等名 第48回日本マイクロサージャリー学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林礼人、市原理司、鈴木雅生、大谷慧、東名怜、野尻岳
2. 発表標題 顔面神経麻痺再建に対する人工神経活用の現状と基礎的検討の取り組み
3. 学会等名 第48回 日本マイクロサージャリー学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	野尻 岳 (NOJIRI GAKU) (20837231)	順天堂大学・医学部・助手 (32620)	
研究分担者	市原 理司 (ICHIHARA SATOSHI) (40599247)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	
研究分担者	内山 美津希 (UCHIYAMA MIZUKI) (60814506)	順天堂大学・医学部・助手 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------