

顔面—舌下神経間置移植下における 軸索再生および表情筋への影響

～動物モデルを用いた顔面神経不全麻痺に対する外科的治療の検証～

学位論文内容の要旨

【背景と目的】顔面神経不全麻痺に対する治療は主に対称性と自然な表情形成の回復を目的とする。これまでさまざまな外科的治療方法が考案されてきたが、そのひとつとして我々は神経端側縫合を用いた“neural supercharge”という概念を提唱し報告した。これは顔面神経と舌下神経に神経間置移植 interpositional nerve graft (IPNG) を行ない、新たな神経ネットワークを作成し、治療対象となる顔面表情筋への神経信号の増幅をはかるものである。この手術手技はすでに臨床で実践され、良好な成績をおさめている。本研究の目的は、について顔面神経不全麻痺をもつラットを作成し、それに対する顔面神経舌下神経間の IPNG による介入を行ない、軸索再生、神経再支配、そしてそれがもたらす表情筋への影響を明らかにすることである。

【対象と方法】20匹の Wistar オスのラットを使用した。ラットは4匹ずつ5つのグループに分けた。5つのグループは何も処置を施さないコントロール群 (Group A)、顔面神経不全麻痺の状態にした不全麻痺群(Group B)、顔面神経舌下神経間に神経間置移植を行なった群(Group C)、顔面神経不全麻痺の状態を作成し IPNG を行なった群 (Group D)、舌下神経不全麻痺の状態を作成し IPNG を行なった群(Group E)とした。手術の後、12週間にわたって表情筋の状態を1週間おきに評価した。評価の項目は眼瞼周囲の対称性、眼瞼周囲の運動、ひげの部分の安静時の対称性、ひげの動きの4項目で点数は8点満点で各項目に振り分けた。術後12週で0.1% FB 100 μ l を右側のひげのある部分の中央に、0.1% DiI 100 μ l を舌の右側の中央に注射した。注射後10日間の生存期間において後述の方法で灌流固定を行ない、脳幹と表情筋標本を採取した。採取した脳幹はクライオトームで冠状断の50 μ m 切片を作成した。作成した標本は蛍光顕微鏡の広範囲紫外線フィルターを用いて観察を行なった。また whisker pad を採取し、5 μ m の切片を作成し Masson's Trichrome 染色を行ない、光学顕微鏡で観察した。また追加実験として以下の群を作成した。Group Da は Group D と同様に顔面神経本幹をクリップで絞扼し、IPNG を同時に行った。Group Db は Group B のように顔面神経本幹をクリップ絞扼した状態にし、12週後に絞扼部より末梢に IPNG を行った。初回手術の24週後に神経トレーサーの濃度、注入部位は上述の研究と同様にして注射した。灌流固定の後、標識された神経細胞数の評価を行った。

【結果】顔面神経麻痺スコアに関しては Group B は重症の顔面神経不全麻痺の状態であった。Group C は一過性の顔面神経麻痺が認められたが 3 週目で完全に回復し、以後満点の評価を維持した。Group D は Group B 同様に顔面神経不全麻痺を認めた。しかし 12 週目のスコア Group B よりも統計学的有意差をもって高値であった。Group D は Group B と類似した顔面神経麻痺症状を呈したが、Group B と比較すると角膜刺激症状や鼻の偏位は軽症であった。各項目の比較では安静時の眼周囲の対称性のスコアにのみ統計学的有意差を認めた Group E は Group C 同様に術後早期において一過性の顔面神経麻痺と認めたが以後回復し満点のスコアで経過した。

Masson's Trichrome 染色での表情筋の組織学的評価については顔面神経を損傷した群の Groups B と Group D において表情筋筋線維の減少と線維化を認めた。しかし Group D では Group B に比較してより筋線維は残っており、変性も軽度であった。その他の顔面神経を損傷していない群の Group A、Group C、および Group E については筋線維に変性は認められず、群間の差はなかった。Group D のみ舌の運動と同期する表情筋の収縮が認められた。その他の群では舌と表情筋の運動の同期が認められなかった。標識された神経細胞の概略を示す。顔面神経核領域で FB により標識された神経細胞の数に関して Group A は統計学的有意差をもって他の群より多かった。また Group C と Group E は Group B と Group D よりも多かった。顔面神経核領域で DiI により標識された神経細胞は Group C と Group E のみに認められた。一方で舌下神経核領域の FB に標識された神経細胞は Group C と Group D にのみ認められた。舌下神経核領域で DiI により標識された神経細胞は数多く認めたが、舌に DiI を注射する際に正中線を越えて健側への混入が避けられず、そのため健側も標識される傾向があった。

追加実験については舌下神経核領域で FB により標識された神経細胞数は統計学的有意差をもって Group Da が多かった。顔面神経核領域において DiI により標識された神経細胞は Group Db のみに認められた。

【考察】ラットの顔面神経不全麻痺モデルの作成に成功した。これまで顔面神経不全麻痺を作成する方法としては鑷子による短時間の圧挫と脳動脈瘤クリップを用いた圧挫が報告されていたがその顔面神経麻痺は短期間で回復する傾向があった。一方で神経移植を含むような手術後の長期経過を観察するためにはより持続性のある顔面神経不全麻痺を作成する必要がある。結紮クリップを利用した我々の方法は長期にわたり不全麻痺が持続するため、上述のように神経を操作する手術に関する研究には非常に有用であると考えられる。

我々の研究では独自に作成したラットの顔面神経麻痺スコアによる評価を行なった。本研究では動的な評価を簡便にする一方で、安静時の対称性のスコアを新たに加味した。安静時の対称性の評価は神経操作を伴う手術の長期成績をみる上で非常に重要であると考えられる。実際に本研究では動的なスコアには有意差が認められなかったが、静的なスコアで手術の効果を確認することができた。

本研究で IPNG を介した軸索再生は神経損傷により影響を受けることが示唆された。IPNG を介した軸索再生はより健常な神経から損傷を受けている神経の方向へ向かうと考えられる。顔面神経、舌下神経とも損傷させていない状態で軸索再生が双方向になる原因は明らかではないが、手術の際に愛護的に操作しているつもりでも、実際は意図しない神経損傷が顔面神経や舌下神経を

露出する際や epineural window を作成する際に生じており、その損傷が上記の IPNG を介した双方向の軸索再生を発生させている可能性がある。

学位論文審査の要旨

主査	准教授	飛驒	一利
副査	教授	山本	有平
副査	教授	生駒	一憲
副査	教授	田中	真樹
副査	教授	鐘	邦芳

学位論文題名

顔面—舌下神経間置移植下における 軸索再生および表情筋への影響

～動物モデルを用いた顔面神経不全麻痺に対する外科的治療の検証～

申請者は以下の内容について発表した。

本研究の目的は顔面神経不全麻痺をもつラットを作成し、それに対する顔面神経舌下神経間のIPNGによる介入を行ない、軸索再生、神経再支配、さらにそれらがもたらす表情筋への影響を明らかにすることであった。

本研究でIPNGを介した軸索再生は神経損傷により影響を受けることが示唆された。またIPNGを介した軸索再生は健常な神経から損傷を受けている神経の方向へ向かうと考えられた。さらに本研究ではラットの顔面神経不全麻痺モデルの作成に成功した。これまで顔面神経不全麻痺を作成する方法としては鑷子による短時間の圧挫と脳動脈瘤クリップを用いた圧挫が報告されていたがその顔面神経麻痺は短期間で回復する傾向があったが、神経移植を含むような手術後の長期経過を観察するためには持続性のある顔面神経不全麻痺を作成する必要がある。結紮クリップを利用した申請者の方法は長期にわたり不全麻痺が持続するため、上述のように神経を操作する手術に関する研究には非常に有用であった。申請者の研究では独自に作成したラットの顔面神経麻痺スコアによる評価を行なった。本研究では動的な評価を簡便にする一方で、安静時の対称性のスコアを新たに加味した。安静時の対称性の評価は神経操作を伴う手術の長期成績をみる上で非常に重要であった。本研究では動的なスコアには有意差が認められなかったが、静的なスコアで手術の効果を確認することができた。

発表の後、以下の如く質疑応答がされた。

田中教授から「このIPNGにより形成された神経ネットワークには側枝形成が確認されたか、また静的スコアのみで改善が認められた結果だが、術後何週の時点でグループ間の差が発生するのか」という点について質問があった。それについて申請者は「今回の筋肉内注射による神経逆行性トレーサー法による観察では、Fastblue、DiIの両者に標識された神経細胞がなかったため側枝形成はなかった、あるいは極めて数が少ない可能性がある」

と回答した。またスコアについては本研究では顔面神経不全麻痺のある群では8週前後で表情筋の萎縮が明らかになってきており、静的スコアも8週経過した後から差がでてくることを説明した。

さらに田中教授から「顔面神経に支配された舌の表情筋収縮と同期した動きは確認できたか」との質問があったが、申請者は「理論的にはあってしかるべきだが、本研究内では明らかではなかった」と回答した。

鑑教授から「顔面神経麻痺のスコアの採点方法、また標識された神経細胞の観察において単一の研究者によりされており、研究がランダムイズドコントロールドスタディの見地からは再現性が低い」との指摘があった。それについて申請者は「主観をできるだけ回避すべく、スコアについてはあいまいな評価とならないような設定にしたこと、またトレーサーによる評価については一研究のなかで一つのスケールを設定し相対的評価を行なうことが主流であり、本研究もそれに則って行なった」と回答した。

次に飛騨准教授から臨床での実際とこの研究との乖離についてならびにリハビリの与える影響について質問があった。申請者は「顔面神経不全麻痺について介入時期はおよそ2年であり、完全に麻痺症状が固定している状態で行なっている」と回答し、また「人間では鏡を利用した表情形成と新たな力源である舌と連動させた高度なりハビリテーションが可能で実験動物と大きく異なり、それが本研究の結果にあるように動物では静的な表情の改善のみである大きな要因である」と回答した。

山本教授から今後の課題について質問があった。それについて申請者は「神経核から筋までより包括的な評価、また顔面神経麻痺の予後判定および神経支配の臨床で可能な定量方法について検討すべきである」と回答し、さらに今後はさらに高等な動物、あるいはリハビリを施したモデルを今後研究対象と考える旨、申請者が回答した。

生駒教授から神経トレーサーを用いた神経支配の検証についての特徴について質問がされた。それについて申請者は本研究で用いた筋肉内注射による逆行性トレーサーにより、個々の軸索レベルでの神経支配変化の確認ができたことと、他の方法との比較について回答した。

この論文は、これまで内容を発表した国内の学会および国際学会で高く評価され、今後の端側縫合を応用した神経再建手術の本質の追求、および顔面神経不全麻痺に対する神経再建手術の基礎および臨床研究結果に有用な新知見を付与するものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。