

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591861

研究課題名（和文） 鼓索神経再建後の味覚機能と再生茸状乳頭・再生味覚神経終末の超微細構造に関する研究

研究課題名（英文） Study on postoperative taste function and ultrastructure of regenerated fungiform papillae and nerve terminal after repair of chorda tympani nerve

研究代表者

齋藤 武久 (SAITOU TAKEHISA)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：10139769

研究成果の概要： 中耳手術中に鼓索神経が切断された症例の術後における味覚回復、茸状乳頭の再生に関して研究を行った。中耳手術前の電気味覚検査閾値が 8dB 以下の正常値を示し、術後2年以上検査が施行できた 87 例中 19 例(22%) において、最終閾値が正常値に回復した。正常値に回復した症例では茸状乳頭が再生し、内部には味蕾様構造と I 型, II 型, III 型細胞, 基底細胞の特徴を備える細胞の存在や、III 型細胞にシナプスを形成して終末する神経線維を透過型電子顕微鏡によって確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,600,000	0	2,600,000
2007年度	500,000	150,000	650,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	300,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：鼓索神経, 再生, 味覚, 茸状乳頭, 形態, 透過型電子顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 中耳手術中にやむを得ず鼓索神経を切断しなければならない場合は少なくない。鼓索神経は体内で唯一、鼓室という空間を走行する神経であるが、切断された神経が再生するかどうか、再生するとしたらどこをどのように再生するかについては、これまで全く解明されていなかった。過去に動物を使って鼓索神経の再生を検討した研究は多く存在するが、ヒトでは全く研究されていない。われ

われ耳科医は中耳手術中に鼓索神経の損傷をきたす可能性があることを患者に説明するが、神経を切断した後の神経再生や味覚機能の回復については、それに関するデータが全く存在しないため、漠然としか説明できない状態であった。われわれはこれまでに、真珠腫性中耳炎の再手術時に鼓索神経が再生していることを発見し、味覚機能が回復していることも確認した。

われわれ耳科医は、鼓索神経を切断したら術後に再生するのか、さらに味覚機能はどの

ように回復するのかを明らかにし、患者に説明できるようにする義務があると考え。さらに神経の再生を促進する方法が見つかれば、たとえ中耳手術中に鼓索神経を切断せざるを得なくなったとしても、患者にとっては福音になるであろう。

(2) われわれは平成 15～17 年度基盤研究 (C) によって鼓索神経切断後に適切な神経再建を行えば、約 30%の症例で神経が再生することを二次手術時に確認し、透過型電子顕微鏡を用いて再生鼓索神経内に有髄神経線維が存在することを証明した。さらに、再生鼓索神経が味覚機能を有していることを電気味覚検査と濾紙ディスク法によって確認した。これらの成果は国際誌に 4 編の論文として発表した。

## 2. 研究の目的

(1) 鼓索神経再建後の味覚機能がどこまで回復するのかを、舌の部位別に詳細に検討する。すなわち、鼓索神経固有領域の他に、舌尖部と舌後部を合わせた 3 ヲ所 で検討を行い、各部位の特徴を明確にする。

(2) 鼓索神経再生例における舌茸状乳頭の表面形態 (分布、サイズ、毛細血管分布) が、正常な茸状乳頭と比較してどのような差があるかをデジタル顕微鏡を用いて検討する。

(3) 鼓索神経固有領域において神経が再生した患者から採取した茸状乳頭の標本を透過型電子顕微鏡で観察し、再生した鼓索神経線維が茸状乳頭の中の味蕾細胞にシナプスを形成して終末しているかどうか、シナプスを形成しない舌神経はどの程度終末しているかを調べ、さらに正常側の茸状乳頭微細構造との差についても s 検討する。

(4) 舌尖部では対側からの鼓索神経が交叉支配しているという説がある (富田ら, 1973)。この説が妥当かどうか、鼓索神経切断後に明らかに神経が再生していない症例における舌尖部の電気味覚検査域値の長期経過と茸状乳頭の分布を対比することによって富田らの説を再検証する。

## 3. 研究の方法

(1) 鼓索神経切断後の舌 3 領域における味覚機能の検討

(研究分担：成田憲彦、齋藤武久)

鼓索神経切断症例に対しては、術後定期的

に電気味覚検査 (EGM) を行う。そして、EGM で域値の回復が認められ、それ以上域値が改善しなくなった時点で濾紙ディスク法による味覚検査を行う。その理由は、EGM 域値が回復しても濾紙ディスク法での回復がみられない限り、再生鼓索神経が味覚機能を有していると証明できないからである。

味覚機能の検討は、①鼓索神経固有領域 ②舌尖部 ③舌後部の 3 ヲ所で行う。その理由は、舌尖部では反対側から鼓索神経が交叉支配していると言われていたからであり、舌後部においては後方の舌咽神経が重複支配しているからである。したがって、鼓索神経固有領域はその名のとおり、鼓索神経のみによって支配されているので、この部位で EGM や濾紙ディスク法で明らかな回復がみられれば、鼓索神経が再生した結果であると推測することが可能と考えられる。一方、鼓索神経固有領域で EGM 域値が回復しない症例では、次のような点を検討することにした。すなわち、舌尖部においては、鼓索神経の交叉支配がどのくらいの率で存在するのか、また、舌後部では舌咽神経の二重支配がどのくらいの率で存在するのかを検討する。

これまでに得られた結果からは、鼓索神経固有領域における EGM 域値は、術後一旦スケールアウト (測定不能) になるが、早い症例では 1 年前後で域値の回復が始まる。しかし、症例によっては回復に 2 年近くを要することもあるので、この味覚機能の検討には、神経切断後 2 年以上が経過した症例のみを選ぶことにした。この基準に合致した症例は十分に確保できている。

(2) デジタル顕微鏡による茸状乳頭の観察 (研究分担：齋藤武久)

デジタル顕微鏡により、舌表面の乳頭を 30～100 倍で観察することが可能となる。低倍率では舌表面における茸状乳頭の分布密度を測定することが可能であり、高倍率では茸状乳頭一個ずつの形態、すなわち正確なサイズと乳頭に分布する毛細血管の状態を観察することが可能である。茸状乳頭の観察は、上記 (1) の項で検討する味覚機能と同様に舌の 3 ヲ所で行う。すなわち、鼓索神経固有領域で茸状乳頭が再生していれば、鼓索神経が再生したことを間接的に証明することになると考えている。また、舌尖部における茸状乳頭の残存は、鼓索神経の交叉支配がどのくらいの頻度であるかを検討する材料になる。

鼓索神経切断後、茸状乳頭の形態を定期的にデジタル顕微鏡で観察し、その映像をメモリーカードに記録する。味覚が回復した群と回復しなかった群の間で継時的に比較する。

### (3) 再生した茸状乳頭の採取および超微細構造の検討

(研究分担：伊藤哲史、齋藤武久)

鼓索神経が切断された症例では、鼓索神経固有領域の茸状乳頭が萎縮・消失するまでの期間は切断後約1年と報告されている。ところが、われわれのこれまでの観察では、茸状乳頭が萎縮・消失していく症例と、乳頭が再生する症例の2群に分かれることがわかってきた。鼓索神経が鼓室内で切断された場合、再生した神経が鼓室内から舌に到達し、味覚受容器である味蕾が存在する茸状乳頭に終末して味覚機能を再獲得するまでには、1年前後の期間が必要であるということが、味覚検査の経過から推測されている。つまり、茸状乳頭が再生する症例では、乳頭の肉眼的形態が萎縮・消失するまでの期間と、再生するまでの期間がほぼ等しいということになる。従って、茸状乳頭が消失せずに残存している場合は、乳頭が再生したという方が正しいのではないかと推測される。

これまでに、鼓索神経が切断され、二次手術時に再生神経が同定された症例は33例である。その中で、切断側の茸状乳頭が再生した症例、特に鼓索神経固有領域において茸状乳頭が再生し、正常側の茸状乳頭分布と差がほとんどない症例を選び、固有領域の舌組織を生検材料として採取することを計画している。正常な舌組織を採取する場合、本人の承諾はもちろん必要であるが、学内の倫理陰会に諮り、この計画を承認してもらわねばならない。これまでに、ボランティアとしてこの研究に協力してもらえる患者を得ているので、倫理委員会からの承認と、患者本人からの同意書を得た上で、舌標本を採取する。

標本は採取後ただちに固定液(2%パラホルムアルデヒド、0.15%グルタルアルデヒド、0.1%リン酸緩衝液)に入れて固定し、1%オスミウム酸で後固定する。その後、昇列アルコールで脱水し、エポン812に包埋する。その後、ウルトラミクロトームにて超薄切片を作製し、二重染色を施してから透過型電子顕微鏡で観察を行う。

まず検討しなければならないのは、茸状乳頭を構成する味蕾細胞に終末する再生鼓索神経線維の分布とその微細形態である。正常乳頭の場合、鼓索神経線維は味蕾細胞にシナプスを形成して終末しているとされる。また、茸状乳頭の形態を維持している神経には、鼓索神経の他に三叉神経の分枝である舌神経線維がある。この三叉神経線維は味蕾細胞にシナプスを形成せずに終末し、さらに味蕾の周囲の上皮細胞にもシナプスを形成せずに終末しているとされる。したがって、味蕾の超微細構造を観察することによって、再生鼓索神経がシナプスを形成しているかどうか

を検討することが非常に重要な課題となる。

### (4) 舌尖部における鼓索神経交叉支配説の再検証

(研究分担：齋藤武久)

1973年富田らによって、舌尖部には反対側から鼓索神経が交叉支配していると報告された。その報告によれば、鼓索神経切断後の舌尖部において、健側から神経切断側へ2cm以内の範囲で電気味覚反応が残る症例が85%存在するという。しかし、電気味覚検査域値がスケールアウトでないものを反応ありと判定しているので、すべての反応が本来の味覚なのかどうか疑わしい。事実、われわれの検討では、舌尖部の電気味覚検査域値がスケールアウトあるいは30dB以上の域値を示す症例が大部分を占めていた。

一方、鼓索神経固有領域で茸状乳頭が消失している症例の舌尖部における茸状乳頭の分布を観察すると、正中から1~2cmの範囲に茸状乳頭が残存していることがわかってきた。つまり、茸状乳頭が残存していても、味覚機能は不良ということになる。これは、茸状乳頭の形態を維持している神経が鼓索神経だけでなく、舌神経にも同様の働きがあるためではないかと考えられる。すなわち、反対側から交叉支配しているのは、鼓索神経と舌神経の両者であり、鼓索神経線維の分布がある程度多い場合には電気味覚検査域値が低くなるが、交叉する鼓索神経線維数が少ない場合には、舌神経を刺激するような高い電流でないと反応が出ないのではないかと推測される。

そこで、鼓索神経切断後から電気味覚検査域値を継時的に記録し、舌尖部の域値が一旦スケールアウトになるか、ならないか、さらに、その後域値が回復するか、しないかを詳細に検討する。そして、鼓索神経固有領域で茸状乳頭の再生がみられない症例(鼓索神経非再生例)を選び出し、舌尖部の域値変化を検討することによって、鼓索神経の交叉支配説を再検証する。

### (5) 舌尖部における茸状乳頭の形態維持に関与する神経についての検討

(研究分担：齋藤武久)

舌尖部において、茸状乳頭の形態を維持している神経が鼓索神経と舌神経のどちらが主であるかを検討するもう一つの方法として、舌尖部における茸状乳頭標本の超微細形態の観察が挙げられる。鼓索神経固有領域での鼓索神経非再生例から得られた舌尖部の茸状乳頭標本作製し、味細胞に終末する神経にシナプスが存在するかどうか、その比率はどうか検討する。その結果によって、舌尖部における再生茸状乳頭の形態維持が、鼓索

神経と舌神経のどちらが優位なのか、さらに舌神経単独でも茸状乳頭の形態維持が可能かどうかを推測できると予想される。

#### 4. 研究成果

##### (1) 鼓索神経切断後の舌3領域における味覚機能

鼓索神経切断後に舌全体の茸状乳頭が再生している群（A群）と、茸状乳頭が舌尖部のみ認められる群（B群）に分類した。それぞれの群において、①舌尖部 ②鼓索神経固有領域 ③舌後部（舌咽神経支配領域）の3領域における電気味覚検査（EGM）域値を測定したところ、以下のような結果になった。

A群の切断側(n=35)：①7.7±10.2 dB ②10.2±11.4 dB ③13.6±10.7 dB, A群の健側(n=29)：①-4.3±4.6 dB ②-2.9±4.6 dB ③-0.3±4.8 dB

B群の切断側(n=47)：①28.3±5.9 dB ②32.5±2.7 dB ③32.5±3.6 dB, B群の健側(n=39)：①-5.0±2.5 dB ②-3.1±4.2 dB ③-0.5±4.3 dB

以上の結果から、舌尖部における鼓索神経交叉支配を論ずる場合には、鼓索神経再生群（A群）を除外する必要があると思われた。また、舌尖部のみ茸状乳頭が残存する群では、電気味覚検査域値がスケールアウトあるいは30dB以上の高値を示す症例が多く、これらの症例ではEGMにおいて舌神経を刺激している可能性が高いと思われた。

##### (2) デジタル顕微鏡による茸状乳頭の観察

鼓索神経が切断された症例のうち、術前の電気味覚検査（EGM）域値が8dB以下の正常域値を示し、術後2年以上追跡できた症例を対象とした。最終検査時にデジタル顕微鏡で鼓索神経固有領域を撮影してメモリーカードに記録。画像はパソコン画面上で再生し、1cm<sup>2</sup>の範囲の正常茸状乳頭数をカウントした。EGMの結果から、①味覚回復群 ②非回復群 ③健側の3群に分類し、茸状乳頭数をカウントした。②の非回復群のうちでEGM域値がスケールアウトの22例の正常茸状乳頭数は、神経切断側では0個、健側で12.9±4.6個であった（図1）。一方、①の回復群のうちでEGM域値が8dB以下の正常値に回復した16例の正常茸状乳頭数は、神経切断側で8.4±5.5個、健側で12.8±4.9個であり、両群間に統計的有意差を認めたが、平均で66%の乳頭再生率を示した（図2）。このように、電気味覚域値が完全回復した症例は、舌の茸状乳頭も再生していることが明らかとなった。

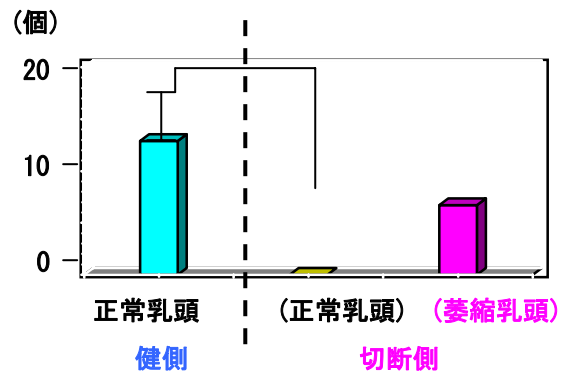


図1

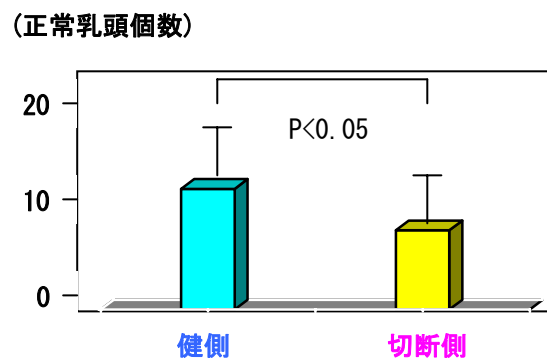


図2

##### (3) 再生した茸状乳頭の超微細構造

鼓索神経切断後に味覚機能（電気味覚検査および濾紙ディスク法）が回復していることを確認できた3症例を対象にして、局所麻酔下に鼓索神経固有領域の味覚検査部位に近い部分の舌を一部くさび型に切除した。切除標本内に含まれる3~5個の茸状乳頭を実体顕微鏡下に摘出して固定しエボン812に包埋した。そして、以下のような標本作製した。

###### ① 光学顕微鏡標本：

1μmの切片を作製し、トルイジン・ブルー染色を行って味蕾の同定を行った。その結果、検討された3症例すべてにおいて乳頭内に味蕾様構造が見つかった（図3の矢印）。合計では3症例の乳頭11個中7個に味蕾が見つかり、味蕾の存在率は64%であった。正常のヒト舌尖部茸状乳頭を光学顕微鏡で観察した過去の報告では、乳頭内に味蕾が存在する率は33~37%であるので、今回の対象症例における味蕾存在率はそれらを上回る結果であった。

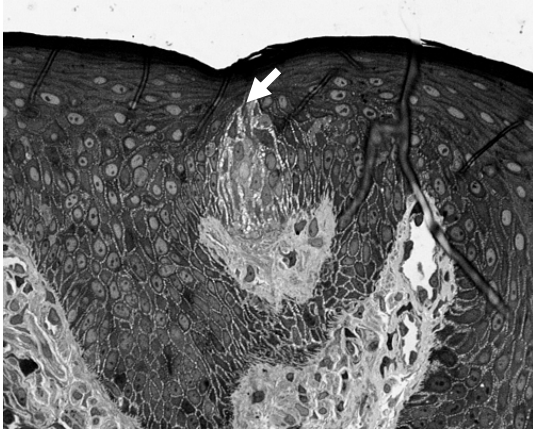


図 3

② 透過型電子顕微鏡標本：

光学顕微鏡切片で味蕾が同定できた時点で、同じブロックから超薄切片を作製し、酢酸ウランと Reynold 鉛溶液で電子染色を行って透過型電子顕微鏡で味蕾の微細構造を観察した。味蕾内には電子密度の異なる I 型、II 型、III 型細胞と基底細胞が同定された。さらに、核 (図 4 の Nu) を有する III 型細胞 (図 4 の III) に終末する神経終末 (図 4 の Nt) はシナプスを形成していた。これは鼓索神経線維の終末と考えられ、その内部にはミトコンドリア、小型淡明小胞 (small clear vesicle)、小型有芯小胞 (small dense-cored vesicle)、大型有芯小胞 (large dense-cored vesicle) が観察された。

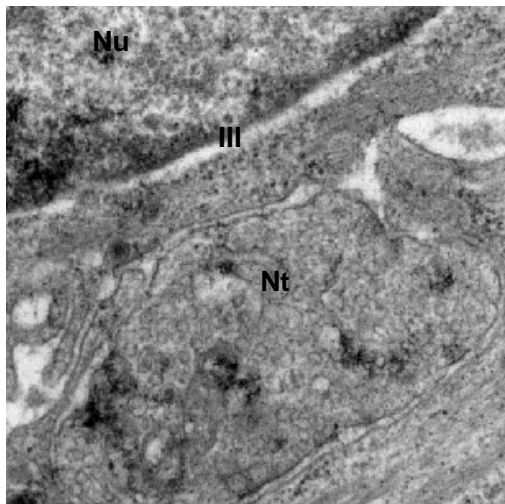


図 4

(4) 舌尖部における鼓索神経交叉支配説の再検証

Kinnman(1988) によれば、茸状乳頭の形態を維持している因子として、(1)味蕾細胞に終末する鼓索神経線維 (シナプス形成) (2) 味蕾細胞や周囲の上皮細胞に分布する舌神経線維 (CGRP や Substance P などの栄養因子を放出する神経線維) の 2 つが挙げられている。そして、これら 2 種類の神経は互いに modulate しており、鼓索神経が切断されても、早期に味蕾が萎縮・消失することはないとされる。特にヒトの場合には茸状乳頭が消失するまでに約 1 年を要するという報告がある (石井, 1979)。

そこで、舌尖部においては鼓索神経だけでなく舌神経も対側に交叉支配しているのではないかという仮説を立てた。つまり、健側から交叉支配している鼓索神経線維数が多ければ、電気味覚検査域値は低くなるであろう。さらに、健側から交叉支配している鼓索神経線維数が少ない場合には、電気味覚検査域値が高くなり、これは舌神経を刺激した結果であろうという仮説である。

富田ら(1973)の鼓索神経交叉支配説では、鼓索神経切断後に舌尖部で記録された電気味覚検査域値が高くても、反応があればすべて鼓索神経の交叉支配によると説明されている。

上記(1)の項の電気味覚検査結果では、鼓索神経切断後には電気味覚検査域値の高い症例が圧倒的に多かったことから、以下のように結論した。(1)舌尖部においては、鼓索神経だけでなく舌神経も交叉支配していると考え、鼓索神経切断後の電気味覚検査結果と茸状乳頭形態の関係を説明しやすい。(2)鼓索神経が舌尖部で交叉支配している割合は少なく、舌神経が交叉支配している割合の方が高い。

(5) 舌尖部における茸状乳頭の形態維持に関与する神経についての検討

舌尖部における再生茸状乳頭の形態維持に関して、鼓索神経と舌神経のどちらが優位なのか、さらに舌神経単独でも茸状乳頭の形態維持が可能かどうかについての検討は今後の課題として残った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計4件）

- ① 齋藤武久、味覚の再生 – 鼓索神経の再生、*医学のあゆみ*、226 (11), 996-1000, 2008. 査読なし
- ② 齋藤武久、味覚障害の原因となる薬剤の種類、調剤と情報、14 (11), 1266-1269, 2008. 査読なし
- ③ 齋藤武久、味覚障害の原因と治療、調剤と情報、14 (11), 1270-1273, 2008. 査読なし
- ④ 齋藤武久、中耳中術後の鼓索神経および茸状乳頭の再生、耳鼻咽喉科臨床、100 (11), 867-876, 2007. 査読なし

〔学会発表〕（計3件）

- ① 齋藤武久、山本健人、岡本昌之、呉 明美、鈴木 弟、徳永貴弘、藤枝重治、中耳手術で鼓索神経が切断された症例における味覚検査回復の有無と茸状乳頭形態の比較、第18回日本耳科学会総会、2008年10月18日
- ② 齋藤武久、伊藤哲史、山本健人、小嶋章弘、岡本昌之、徳永貴広、藤枝重治、鼓索神経切断後に再生したヒト茸状乳頭の微細構造、第17回日本耳科学会総会、2008年5月17日
- ③ 齋藤武久、徳力雅治、意元義政、藤枝重治、鈴木 弟、真鍋恭弘、舌尖部における鼓索神経交叉支配説の再検討、第107回日本耳鼻咽喉科学会総会、2006年5月11日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 武久 (SAITOU TAKEHISA)  
福井大学・医学部・准教授  
研究者番号：10139769

### (2) 研究分担者

山本 健人 (YAMAMOTO TAKEHITO)  
福井大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：80303379

伊藤 哲史 (ITOU TETUHUMI)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号：90334812