

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2010～2012

課題番号：22591993

研究課題名（和文） 顔面神経—舌下神経クロスリンク型神経移植術における神経回路再構築の機序を探る

研究課題名（英文） Analysis of newly formed neural circuit after cross-link operation for facial nerve palsy -with decellularized nerve graft-

研究代表者

橋川 和信 (HASHIKAWA KAZUNOBU)

神戸大学・医学部附属病院・特命講師

研究者番号：90403237

研究成果の概要（和文）：

顔面神経麻痺への外科的治療の一つとして、クロスリンク手術が挙げられる。われわれは本手術での軸索挙動を解析する為に体細胞が GFP 標識された実験動物を利用し、拒絶反応を起こさずに非標識のグラフトを移植するモデルの作成を目標に置いた。このため、神経グラフトの脱細胞化の評価、比較を行った。ラットより採取された坐骨神経を高張塩溶液法、界面活性剤法、凍結融解法によりそれぞれ脱細胞化を行った。これらを組織学的に評価した所、モデル動物において口径 1mm 程度の神経グラフトを要するクロスリンク手術では、高張塩溶液法による脱細胞化神経は免疫学のおよび強度的に適していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Cross-link operation is the one of the clinical operation for facial nerve palsy. We planned to administrate the acellular nerve graft for rat cross-link model and compare the three method for decellularization, hyper osmotic method, detergent method, and freeze and thaw method. In our result, hyper osmotic method is the one of the option for cross-link nerve graft for rat model.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2012年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：マイクロサージェリー学・神経再生・神経グラフト

### 1. 研究開始当初の背景

末梢神経の再生能力を利用し、損傷された神経束を手術的に修復する試みは古くから行われてきた。形成外科学分野においても、これまで Bell 麻痺や Hunt 症候群を始めとする末梢性顔面神経麻痺に対して手術的な治療戦略を試みてきた。顔面神経—舌下神経端端

吻合および喘側吻合術、神経付筋弁による動的再建術などである。しかしながらこれらの方法では一方ないしは双方の神経を切断するなど、手術的侵襲・犠牲が大きく、舌萎縮・嚥下障害などの合併症も報告されている。近年、大耳介神経や腓腹神経などの感覚神経を用いて顔面神経および舌下神経をバイパ

スする方法が臨床面で開発され、一定の成果を挙げ始めている。この手術法はこれまでの方法に比べ、手術操作による神経損傷のリスクが低く、殆ど傷害を残さないという点で画期的な方法である。また、100%の回復とは行かないまでも概ね良好な筋トーンが得られたとの報告がある。ところが临床上、経験的に効果のある神経伝達の線維乗り換え現象がいかなるメカニズムで起こるかについては殆ど解明されていなかった。われわれは本手術手技を cross-link 型神経移植術と位置づけ、ラットモデルに神経トレーサー法を導入し、神経回路解析を行ってきた。一連の研究により次の事が解明された

1. 順行性トレーサー法により舌下神経核より発生した軸索は移植神経を介して顔面神経束へと導入される。
2. 逆行性トレーサー解析により、顔面神経核より発生した軸索は舌下神経束へと導入される。
3. Cross-link された神経を介して神経縫合部では collateral sprouting が行われている。

臨床面では、cross-link 手術後に表情筋の運動機能の増大のみならず異常共同運動の改善を認めた例もあり、われわれがこれまでに得た基礎的データと併せると、依然、cross-link 手術により再構築された神経ネットワークに関しては多くの疑問が残る。

## 2. 研究の目的

形成外科学の分野に神経科学的なアプローチで臨む点が特色であるのは当然であるが、基礎研究と共に臨床研究を積み重ねており、双方からデータが得られる点が我々の研究チームの大きな特色である。現在、われわれは顔面神経麻痺の治療に焦点を当てているが、cross-link 型神経移植術は四肢の末梢神経ネットワークに対しても十分に応用できる画期的な神経再建法であり、われわれが本研究を通して得た知見は神経科学的に大きな意義を持つ。

臨床所見上、多くの患者において手術成績は良好であり、一定以上の表情筋機能の再獲得が認められた。ところが、われわれがこれまで行った実験結果より、当初、仮説として掲げた舌下神経の軸索が顔面神経束へと導かれることが明らかとなったが、顔面神経線維も舌下神経束へと導かれており、補強したい神経束からの神経軸索の流出も示唆された。また、臨床面では異常共同運動の改善も認められた。

これらの知見は当初の仮説から逸脱しており、更なる実験を重ねたうえで cross-link 型神経移植術の神経科学的意義を異なる角度から考察する必要がある、われわれは GFP ラットをモデル動物として、その個体の軸索

を蛍光観察出来る環境において蛍光を發さないグラフト（他の個体から採取されたグラフト）を移植する事で軸索の再生の挙動を観察するモデルの作成を行う事とした。この時他の個体からのグラフトは拒絶反応に繋がるため、脱細胞化組織を用いる事とし、適切な脱細胞化組織の探索より研究を開始した。また、前課題申請時から今日に至るまで、実験的データが得られたことは当然ながら、臨床データも多く蓄積している。われわれはこれらをもとに、基礎研究と臨床研究との知見を相互に評価するトランスレーショナルリサーチを行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

① ラットを利用した神経移植モデルの作成

### ①-1 脱細胞化神経の作成

Wistar ラットより坐骨神経を採取した。これを、われわれが開発した高張塩溶液を用いた脱細胞化法、界面活性剤法、凍結融解法により、それぞれ脱細胞化を行った。

### ①-2 脱細胞化神経の組織学的評価

高張塩溶液法、界面活性剤法、凍結融解法により脱細胞化処理を行った神経をそれぞれ、20% Sucrose PB に浸漬した。OCT コンパウンドに包埋し、凍結切片を作成した。

これら組織を一次抗体に抗 MHC-class 1 抗体を用いた免疫組織化学法により染色・評価を行った。

### ①-3 脱細胞化神経の抗原性評価

①-1 で作成された脱細胞化組織をそれぞれ可溶性バッファーで超音波破砕器を用いて溶解した。これらを SDS ゲルを用いて電気泳動を行った。ナイロンメンブレンに転写したのち、抗 MHC-1 抗体を用いてウェスタンブロットティングを行った。

### ①-4 脱細胞化神経への細胞付着の検討

ラットシュワン細胞を購入し、特化された培養液中で増殖させた。コンフルエントになった時点でスクラッチし、細胞を回収した。さらにこれらを培養液中に戻し、高張塩溶液法により脱細胞化された神経断端を導入し、回転培養を行った。

### ①-5 ラットへの移植

①-1 のそれぞれの方法により脱細胞化された神経を、Wistar ラットに移植した。移植より3ヶ月の後に採取し、一部は HE 染色により、一部はトルイジンブルー染色により軸索の伸展、拒絶反応などの評価を行った。

## ② 臨床研究

顔面神経麻痺症例において、術前・術後で筋電図を測定し、これらの経過を比較した。刺激強度は最大とし、口輪筋部で波形を測定した。刺激部位は耳垂後部および頸部の移植神経上とした。

#### 4. 研究成果

##### ① ラット脱細胞化神経グラフトの評価

###### A: 移植前組織の組織学的評価

高張塩溶液法、界面活性剤法、凍結融解法のいずれも、HE 組織上は一定の脱細胞化を認めた。界面活性剤法では、細胞の除去度が高く、ほぼ ECM のみとなった。一方で、高張塩溶液法ではある程度の細胞質の残存が推定されたが、およそ ECM は保たれていた。凍結融解法では、高張塩溶液法に比して、さらに細胞質の残存が認められた。

抗 MHC-1 抗体を用いた免疫組織化学法では、通常の免疫組織化学法では界面活性剤法により処理を行った場合、非特異的吸着により極めてバックグラウンドが高くなったため、十分にブロッキングを行う必要があった。

十分にブロッキングが行われた組織により評価を行った所、界面活性剤法 < 高張塩溶液法 < 凍結融解法 となった。

###### B: ウェスタンブロッティングによる MHC-1 の残存の評価

高張塩溶液法、界面活性剤法、凍結融解法のそれぞれにより抗 MHC-1 抗体を用いて残存抗原の評価を行った。その結果、残存抗原は界面活性剤法 < 凍結融解法 ≤ 高張塩溶液法となった。ただし、可溶化後のタンパク量を分光器で定量し、これをもとにサンプルをロードしたため、もともとの組織量としては一定していない為、評価の見直しが必要である。

###### C: 脱細胞化神経へのシュワン細胞の定着

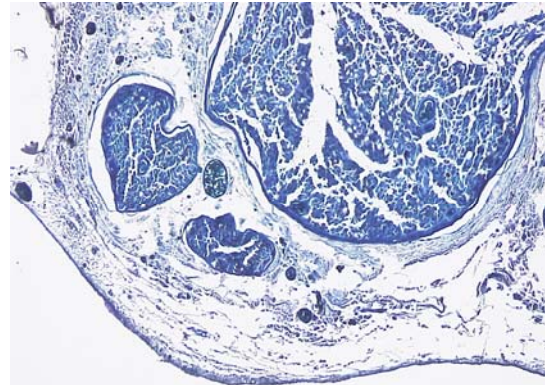
高張塩溶液法により脱細胞化を行った神経スキャフォールドとシュワン細胞とを同時に回転培養を行った結果、7 日目において細胞の定着、浸潤を認めた。したがって、高張塩溶液法により温存された ECM はシュワン細胞の定着に適切な足場を提供している事が示唆された。

###### D: 動物への移植実験とその評価

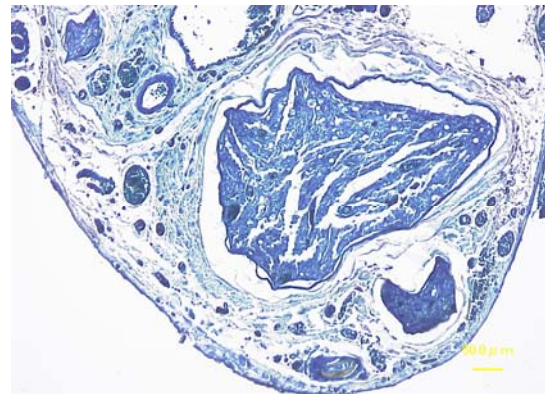
高張塩溶液法、界面活性剤法、凍結融解法によりそれぞれ作成した脱細胞化神経グラフトをラットへ移植後、3ヶ月の時点で取り出した。これを HE 染色により観察した所、高張塩溶液法、界面活性剤法ではリンパ球と考えられる細胞の浸潤は認めなかったが、凍結融解法では多くのリンパ球浸潤を認めた。また、組織は一部、融解していた。次に、トルイジンブルー染色を行った所、移植神経よりも遠位では、軸索の残存（再生）は、高張塩溶液法 ≥ 界面活性剤法 >> 凍結融解法という結果であった。

以上より、脱細胞化神経を用いてクロスリンクモデルを作成するにあたり、高張塩溶液法ないしは界面活性剤法により作成された神経グラフトが適切だと考えられた。また、クロスリンクに用いる神経グラフトは口径約 1 mm 程度であるため、吸収率を考慮する

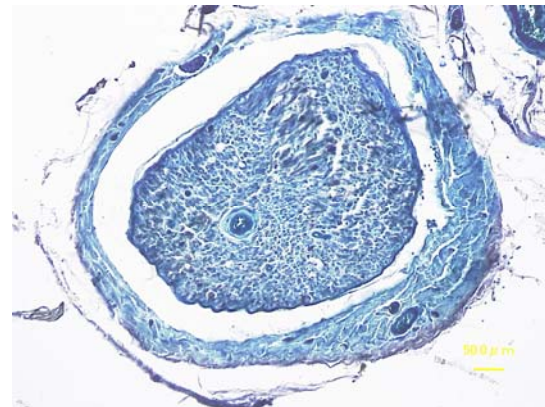
と、界面活性剤法ではその多くが吸収されてしまう可能性が考えられた。



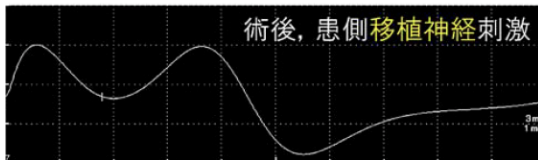
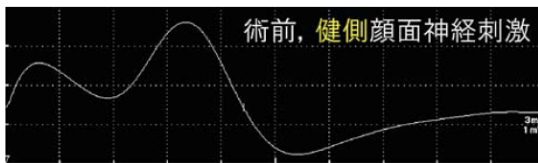
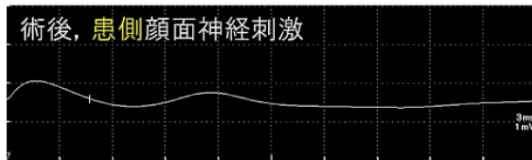
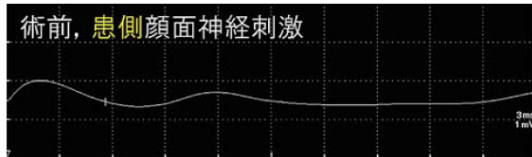
高張塩溶液法。グラフト末梢のトルイジンブルー染色像。



高張塩溶液法。グラフト末梢のトルイジンブルー染色像。



凍結融解法。グラフト末梢のトルイジンブルー染色像。末梢では神経が萎縮しており、軸索の伸展は殆ど認めない。



②cross-link 手術前後での筋電図変化

Hunt 症候群による顔面神経麻痺症例の誘発筋電図。刺激強度は最大とし、口輪筋部で波形を測定した。クロスリンク手術より1年6ヶ月経過した時点で、頸部で移植神経を刺激した所、振幅の大きな2相性の波形が得られた。これらの所見から、同手術より表情筋へ舌下神経が流入して機能的な神経筋単位が形成されている事が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

①Kazunobu Hashikawa  
Classification and Terminology of Reanimation Techniques for the Paralyzed Face: “Jump Graft” and “Cross-link”  
Facial N Res Jpn 32:38-40, 2012 (査読有)

②Kazunobu Hashikawa, Shunsuke Sakakibara  
Immediate Facial Nerve Reconstruction with End-to-side Neurotomy following Tumor Resection: Ten Consecutive Cases of End-to-side Loop Graft  
Facial N Res Jpn 32:26-28, 2012 (査読有)

③Omori M, Sakakibara S, Hashikawa K, Terashi H, Tahara S, Sugiyama D.  
Comparison of reinnervation for preservation of denervated muscle volume with motor and sensory nerve: an experimental study  
J Plast Reconstr Aesthet Surg. 65:943-949 2012 (査読有)

④橋川和信、榊原俊介、田原真也  
顔面神経麻痺に対する顔面-舌下神経クロスリンク手術と術後リハビリテーション  
日本マイクロサージャリー学会誌 24 巻 3号 Page267-274, 2011. (査読有)

⑤Kazunobu Hashikawa, Shunsuke Sakakibara

Brow Lift via an Infrabrow Approach for Facial Palsy

Facial N Res Jpn 31: 136-138, 2011 (査読有)

⑥Kazunobu Hashikawa

Therapeutic Tactics for Facial Palsy Around the Eye

Facial N Res Jpn 30: 7-9, 2010 (査読有)

[学会発表] (計5件)

①橋川 和信

顔面神経麻痺に対する眉毛下アプローチ眉毛挙上術

第29回日本頭蓋顎顔面外科学会学術集会

2011. 11. 24-25 東京

②橋川 和信

陳旧性顔面神経麻痺に対する顔面神経-舌下神経クロスリンク手術: 長期観察例の検討

第38回日本マイクロサージャリー学会学術集会

2011. 11. 10-11 新潟

③橋川 和信

顔面神経麻痺に対する眉毛下切開・眉毛挙上術

第34回日本顔面神経研究会

2011. 6. 2-3 東京

④橋川 和信

顔面神経麻痺に対する形成外科手術

平成23年度日本形成外科学会秋季学術講習会

2011. 10. 5 東京

⑤橋川 和信

顔面神経麻痺の目もとに対する治療タクティクス

第33回日本顔面神経研究会

5/27-28, 2010 福岡

[図書] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋川 和信 (HASHIKAWA KAZUNOBU)

神戸大学・医学部附属病院・特命講師

研究者番号: 90403237

(2) 研究分担者

榊原 俊介 (SAKAKIBARA SHUNSUKE)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号: 50444592