

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 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791721

研究課題名（和文）

双方向の再生軸索を含む新しい神経移植法に関する研究

研究課題名（英文）

Research on the new method of nerve transplantation containing bidirectional regenerative axial fibers

研究代表者

谷川 知子（TANIGAWA TOMOKO）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00571407

研究成果の概要（和文）：

本研究は顔面神経欠損に対する新たな概念に基づいた術式の開発に向けての動物モデルを用いた研究である。臨床においては顔面神経と舌下神経のネットワークをより少ない移植神経で、より簡便に作成するのが目的である。本術式の特徴的な点は一本の移植神経内に双方向の軸索再生を期待する点である。マウスを用いたモデルを作成し、複数の神経源から一本の移植神経に双方向の軸索再生が起こるこの現象を証明できた。現在ラットの顔面神経モデルの研究を進めている途中である。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we used an animal model to develop surgical techniques based on new concepts for the treatment of facial nerve defects. In clinical settings, the purpose of the treatment is to create a network between the facial nerve and the hypoglossal nerve in a simpler manner, by using less nerve grafts. This surgical technique can be expected to allow for axonal regeneration in both directions, within a single nerve transplant. We created a model using mice, and were able to demonstrate the phenomenon of bidirectional axonal regeneration from a single nerve graft performed using multiple sources. We are currently conducting experiments on a rat model for the facial nerve.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系形成臨床医学・外科

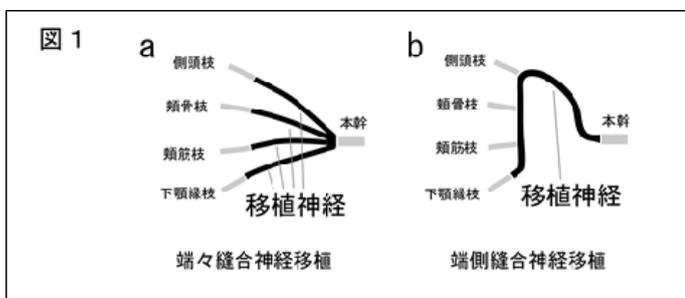
キーワード：神経移植・顔面神経再建・双方向の再生軸索

1. 研究開始当初の背景

耳下腺の悪性腫瘍の切除後の欠損は耳下腺内を走行する顔面神経の欠損を伴うことが殆どであり、それに伴う顔面神経麻痺を生ず

るといふ点で他部位とは異なった特別な配慮ならびに再建手技を要する。顔面神経麻痺の二期的な再建法として、静的再建としては筋膜等を用いる各種のつり上げ術、動的再建

としては側頭筋、咬筋の移行術、対側からの交叉神経移植術、神経血管柄付き遊離筋肉移植術、舌下神経—顔面神経縫合術などが一般的であるが、一次的な再建の場合は、欠損部の顔面神経を補うように神経移植を行うのが一般的である。顔面神経は一本の本幹が耳下腺内で多数の枝に分かれるという解剖学的特徴を有しているために、再建にあたり、複数の分枝を一本の本幹から再建する必要がある。従来これらの目的では数本の移植神経を束ねるようにして一本の本幹に縫着し、各々の末梢側に切断された各枝に端々吻合する再建法が用いられてきた。しかしながら、顔面神経の中枢側の断端は多くの場合深部に存在し、その周囲の骨の形状が入りくんでいることもあり、そこに数本の移植神経を束ねて縫着するのは手技的にかなり困難であり、神経縫合そのものが不確実となりやすい(図1-a)。これらを解消するために顔面神経本幹と再建すべき分枝の中で最も遠位にあるものとの間を一本の移植神経で端々縫合し、その移植神経の側面に他の再建すべき分枝を各々縫合するという術式が考案され(図1-b)、(Kakibuchi M et al. *Ann Plast Surg* 2004 53(5): 496-500.)、ラット坐骨神経を用いた2枝の再建モデル(Matsuda K et al. *J Reconstr Microsurg* 2005 21(8): 581-591.)やラット顔面神経を用いた4枝の再建モデル(Matsuda K et al. *J Plast Reconstr Aesthe Surg* 2008 61(11): 1357-1367.)を用いてこの術式の有用性が検証、証明されている。通常神経移植を行う際の移植片となる神経において神経縫合部位として用いられるのは移植神経の遠位端と近位端のみであり、移植神経そのものの側面は縫合部位としては用いられない。移植神経そのものの側面を神経縫合部位として積極的に活用する本法の新たな可能性として、複数の神経源からの再生軸索を複数の神経枝に効率的に分配するためにこの概念を用いることが可能なのではないかと考えた。



2. 研究の目的

本研究は顔面神経欠損に対する新たな概念に基づいた術式の開発に向けての動物モデルを用いた研究である。臨床においては顔面神経と舌下神経のネットワークをより少な

い移植神経で、より簡便に作成するのが目的である。本術式の特徴的な点は一本の移植神経内に双方方向の軸索再生を期待する点である。マウス、ラットを用いたモデルを用いて複数の神経源から一本の移植神経に双方方向の軸索再生が起こるこの現象を証明できれば移植神経をより効率的に利用することが可能となり、低侵襲、高効率の顔面神経再建術の開発に大きく寄与すると考えている。

3. 研究の方法

マウス坐骨神経モデルならびにラット顔面神経モデルを使用する。現在までに多く用いられている、軸索が蛍光顕微鏡下で可視化可能な特殊なトランスジェニックマウスを用いて一本の移植神経内での複数の神経源からの再生軸索の走行を観察する。定量評価に関してはラット顔面神経交叉モデルを用いて行う。

Thy-1 YFP マウス坐骨神経モデルによる検討。片側の坐骨神経の腓骨神経、脛骨神経分岐部より末梢を約5mmの長さで切除し、神経欠損を作成する(図2-a, b)。野生型マウスの尺骨神経を採取し一方の断端を腓骨神経に、もう一方の断端を脛骨神経に縫合する。移植された神経の側面に神経周膜までの開窓を二箇所行い、それぞれに腓骨神経、脛骨神経の遠位断端を縫合する(図2-c)。術後2週間、4週間、12週間で移植神経の近位ならびに遠位を含めて一塊に採取し、レーザー共焦点顕微鏡で観察し、中枢側からの再生軸索がどのように移植神経を通過し、遠位断端に向かうのかを記録する。この際に腓骨神経から脛骨神経へ、脛骨神経から腓骨神経へ向かう軸索が観察されれば移植神経が双方方向の再生軸索を含むことになる(図3)。

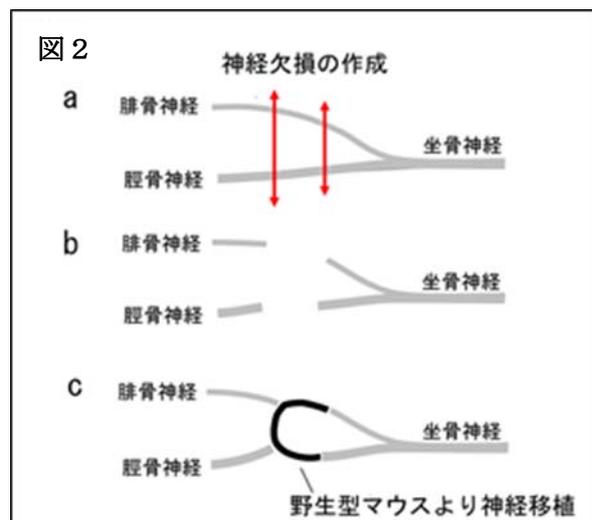
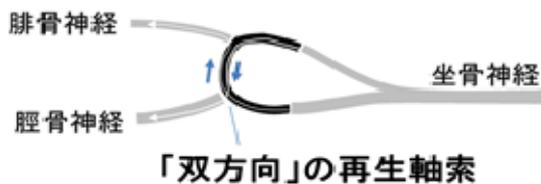


図 3



本実験では定性的な評価は行えるが、定量評価は行い難いのでこの後にラット顔面神経交叉移植モデルを用いて定性的な評価を行う。ラット顔面神経交叉移植モデルを用いて両側の顔面神経頬筋枝を両側の顔面神経とつなぐ形の顔面神経交叉移植モデルを作成し、これを用いて再生軸索の由来（同側もしくは対側）や、その比率、両側の顔面神経からの入力のない場合に比べてどのくらい再生の効率が上がっているか等を比較、検討する。

ラット両側耳前部の切開から両側の顔面神経を本幹まで剥離し、頬筋枝を温存しながらそれ以外の顔面神経枝を本幹近くから 1.5cm 切除する。頬筋枝を温存する理由は閉瞼障害による角膜潰瘍の予防である。移植神経は約 7cm 必要であり、坐骨神経を全長に渡り採取する必要がある。倫理上の問題から自家神経の採取は行わず、近交系ラットを用いた同種移植とする。つまり、一匹のドナー動物から二本のグラフトを採取し、二匹のモデルに用いる。神経は頭部の皮下トンネルを通して対側まで導く。両側の頬筋枝は片側顔面神経（図 4-a）もしくは両側顔面神経（図 4-b）から再支配される事になる。術後 12 週と 24 週で二群の評価、比較を行う。

(1) 運動機能評価

髭の毛根付近の筋肉 (whisker pad muscles) は頬筋枝により支配されており、髭の動きの評価を術後一週毎に目視で行い、大まかな頬筋枝の機能回復を評価する。

(2) 電気生理学的評価

顔面神経本幹の電気刺激を行い、対側の顔面表情筋への神経支配の有無を評価する。

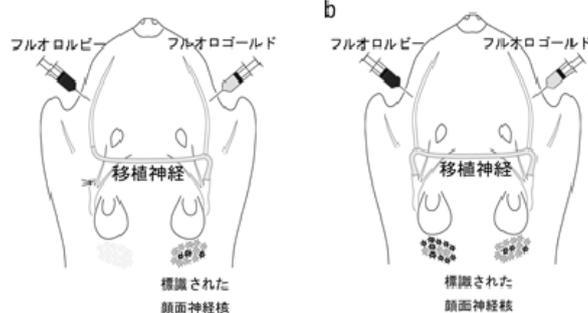
(3) 組織学的評価

両側顔面神経頬筋枝ならびに移植神経を採取、トルイジンブルー染色を施し、神経軸索数、密度、軸索の直径、ミエリンの厚さを計測する。また、必要に応じシュワン細胞並びに再生軸索に対する免疫染色（抗ニューロフィラメント抗体、抗 s-100 抗体、抗 gap-43 抗体など）を用いた評価も追加する。

(4) 逆行性トレーサーによる評価

術後 12 週と 24 週に神経トレーサーであるフルオロゴールド (FG)、フルオロルビー (FR) をそれぞれ左右の頬筋枝に注入し、逆行性に顔面神経核を標識する（同時二重標識法）。脳幹部の凍結切片を蛍光顕微鏡下で観察すると、2 種類のトレーサーにそれぞれ標識された細胞が観察される。左右の顔面神経核が共に二色のトレーサーで標識されれば双方向の再生軸索の存在が証明される。各々の標識された細胞数を比較、検討し神経機能回復の量的、質的評価を行う。

図 4



4. 研究成果

Thy-1 YFP マウスを用いて一本の移植神経内に複数の神経からの軸索再生が起こる様子を明らかにした。Thy-1 YFP トランスジェニックマウス (Feng G et al. Neuron 2000 28 (1) 41-51) では黄色の蛍光を発するタンパクが知覚、運動ニューロンの 3 ~ 10 % に特異的に発現しており、蛍光顕微鏡下で再生軸索が可視化されるため、蛍光タンパクを含まない野生型マウスからの同種神経移植を用いることで移植神経内へ伸長する軸索を直接観察することが出来る (Tomita K et al. Glia 2007 55 (14) 1498-1507)。

Thy-1 YFP マウス坐骨神経モデルによる検討した結果、腓骨神経から脛骨神経へ、脛骨神経から腓骨神経へ向かう軸索が観察された。つまり移植神経が双方向の再生軸索を含んでいることがわかった。

ラット顔面神経交叉移植モデルを用いての定性的な評価について逆行性トレーサーの評価に問題があり、術後 12 週、24 週の評価が出来なかったため、まず 48 週の評価を行っている。

(1) 運動機能評価

片側支配、両側支配ともに術前よりは弱いながらも whisker pad muscle の機能回復があった。

(2) 電気生理学的評価

現在記録中であり、まだすべての評価は終わ

っていないが、片側支配、両側支配共に潜時を経て、動いている様子が観察されている。現在更に詳しい評価を行っているところである。

(3) 組織学的評価

術後 48 週の検体を採取し、試料作製中である。

(4) 逆行性トレーサーによる評価

当初、逆行性トレーサーによる評価で使用する予定だったトレーサーのうちフルオロルビーが、手技の問題か、正常ラットに使用しても標識されなかった。現在はフルオロルビーを辞めて、True Blue で標識をしている。そのため術後評価が遅れ、長期のデータとして術後 48 週でフルオロゴールドと True Blue にて評価し直している。データ回収段階であり、その結果を踏まえ、術後 12 週のデータの取り直す予定である。術後 48 週のデータの分析と術後 12 週のデータの取り直しの結果とともに本年の 11 月の形成外科基礎学術集会で成果を発表したいと考えている。実験段階でいろいろな課題が浮上したが、現在はフルオロルビーから True Blue に変更し、再度検討段階である。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷川 知子 (TANIGAWA TOMOKO)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 00571407

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :