

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791950

研究課題名(和文) ナノ粒子化した神経栄養因子を用いた顔面神経再生の研究

研究課題名(英文) Research of the facial nerve reproduction using the nanoparticle-ized neurotrophic factor

研究代表者

三橋 亮太 (Mihashi, Ryouta)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：50461439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：末梢性顔面神経麻痺に対する新しい治療法の検討を行うために、モルモットを用いて顔面神経麻痺モデルの作成を行った。この麻痺モデルを用いて無治療群および神経栄養因子(:GDNF)の投与群とナノ粒子化した神経栄養因子の投与群に分けて治癒過程の評価を行うこととした。無治療群に比べて神経栄養因子投与群方が軸索および髄鞘の再生が良好な傾向が認められている。今後はナノ粒子化した栄養因子での治療群との比較を行ってゆく。

研究成果の概要(英文)：In order to examine the new cure to peripheral facial paralysis, the guinea pig was used and the facial-nerve-palsy model was created. We decided to divide into a treatment free group and the medication group of a neurotrophic factor (:GDNF), and the medication group of the nanoparticle-ized neurotrophic factor using this paralysis model, and to evaluate a recovery process. In neurotrophic factor medication group an axonal fiber and a myelin sheath has reproduced better than non treatment group. Comparison with the medical treatment group in the nanoparticle-ized nutrition factors is performed from now on.

研究分野：再生

科研費の分科・細目：顔面神経

キーワード：顔面神経再生

## 1. 研究開始当初の背景

末梢性顔面神経麻痺で最も頻度が高いのは Bell 麻痺と Hunt 症候群である。膝神経節での HSV および VZV の再活性化によるウイルス性神経炎による神経浮腫により絞扼・虚血をきたし、神経変性へと至るとされている。早期診断と保存的治療である程度は完治するが、高齢者・重症例・糖尿病などの合併症からステロイド早期投与不能な症例では予後不良である。難治例に対する新たな治療法の確立が望まれる。予後不良例に対する治療として様々な施設で顔面神経喧嘩術が行われている。顔面神経減荷術は神経管を開放し絞扼解除、循環改善により、麻痺の進行を予防することが目的であり、Waller 変性が完成した段階では再生を促す治療が必要である。実際には、晩期手術症例に関しては神経変性の予防は無意味であり、神経再生の阻害因子の確認と除去（神経虚血、神経ヘルニア、神経症腫）がその目的にとどまっている。現在繊維芽細胞増殖因子製剤（フィブラストプレー®）をゼラチンハイドロゲルにより徐放化し神経再生を促す方法が羽藤らにより行われて、この治療により従来の減荷術の柳原法 32 点以上への治癒率が 70.1%であったのに対し、87.5%にまで改善している。より効率的に神経再生を促す神経栄養因子を使用し、より組織移行を良好とする基剤を選択することで顔面神経の再生を促し、晩期手術例に対してもよりよい治療効果が得られるのではないかと考えた。最近の研究で GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) は非常に強力な神経栄養因子とされているためこれを使用することとした。神経組織への栄養因子の導入方法としてタンパク質をナノ粒子化し導入することを検討した。その中でも粒子の大きさの調整や徐放する期間、基剤の剤型が調整できる特徴を持つナノジェルに注目した。ナノジェルは架

橋された高分子鎖よりなる三次元網目構造を有するナノ微粒子である。内部が密なナノスフェアとは異なり含水率が高く、ナノネットワーク内にたんぱく質や核酸などを安定に閉じ込めることができる。網目構造の変化などにより内包物の徐放制御も可能とされる。

## 2. 研究の目的

当研究の目的は顔面神経の再生を促進する治療方法を確立することである。このために均一な麻痺モデルをモルモットを用いて、作成し顔面神経の局所解剖の確認及び麻痺モデルの作成方法について手術手技を確立する。この麻痺モデルに対して強力な神経栄養因子である GDNF をそしてタンパク導入のキャリアーとしてナノ粒子を用いることとする。

## 3. 研究の方法

### 実験動物の選択

麻痺モデルの作成には 400-500 g のハートレイ系モルモットを使用した。

### 麻痺モデル作成方法

ケタミン 35 mg / k g およびザイラジン 7 mg / k g を大腿部に筋注し全身麻酔を行う。15 番メスで皮膚、側頭骨上の筋組織および骨膜までを広く切開し骨表面を広く剥離する。開創器を装着し、乳様突起先端までを十分に明視下に置く。乳様突起先端付近で 15 番メスを回転させて側頭骨を削り鼓室へ入る。手術顕微鏡下に骨性鼓膜輪を確認し開窓部を拡大すると鼓膜輪の直上に顔面神経垂直部の骨が露出される。神経管をバーで削開し神経を茎乳突孔から水平部まで露出する骨片を鑷子で除去し、顔面神経をマイクロペアンで 10 分間圧迫する。創部を縫合し手術を終了する。術直後より手術側の完全麻痺をきたし、自然経過では 5 週間後より徐々に回復をすることが

わかっている。6 週間までの経過観察において麻痺が完全に回復した症例は認めなかった。

#### 治癒過程の評価方法

治癒過程の評価のために顔面麻痺のスコアリングを行った。麻痺モデルの作成後には週に一回、眼瞼、鼻、口唇の3項目について評価を行った。

眼瞼の評価にはシリンジで空気を顔面にかけて瞬目で評価を行った。鼻に関しては30秒のひげの動きを観察した。口唇に関しては30秒の口唇の動きを観察し評価を行った。全く動かないものは0点、動きが減弱しているものは1点、正常に回復しているものは2点とし、それぞれについて評価を行った後、合計スコアを算出し6満点で評価を行った。

#### 組織採取方法

ペントバルビタール50mg/kgを腹腔内投与し、10分後には深昏睡に陥る。

その後、断頭を行い手術顕微鏡下に解剖する。この際、削開した側頭骨は完全に骨増生により閉鎖しており、顔面神経周囲にも神経管の再生が認められた。

茎乳突孔から末梢へと耳下腺内に神経を剥離露出し茎乳突孔より5mmほどの長さを取り出す。採取した神経は10%ホルマリン溶液で固定を行った後、パラフィン包埋を行った。

#### グループ分類

上記の方法で作成した麻痺モデルを無治療群および神経栄養因子(GDNF)の投与群の2群に分けた。

無治療群は麻痺モデルの作製のみを行い、3週で神経採取を行うGroup aと6週で神経採取を行うGroup Aに分けた。

神経栄養因子投与群は麻痺モデルを作製時に神経栄養因子を投与し、

3週で神経採取を行うGroup bと6週で神経

採取を行うGroup Bとした。

各Groupは2匹ずつとし、合計8匹を使用した。

#### 神経栄養因子(GDNF)投与群の作成方法

GDNFはSIGMA-Aldrich社製ラット由来遺伝子組み換えGlial Cell Line-Derived Neurotrophic Factorを用いた。

GDNF製材をウシ由来アルブミンで溶解し、10 $\mu$ g/mlのGDNF溶液を作成する。麻痺モデル作成時に露出した神経周囲にゼラチンスポンジに浸透したGDNF溶液を留置することで栄養因子の導入を行った。

#### 結果

##### 顔面神経スコアについて

無治療群およびGDNF投与群では6週目までの時点では顔面神経スコアの改善に関して差は認めなかった。両群ともにスコアは0-2点であった。

##### 組織学的評価について

術後3週と6週目に組織採取を行い、組織学的評価を行った。

採取は深昏睡下に断頭し、顔面神経を垂直部から側頭骨外までを採取しホルマリン固定を行った。固定した標本はパラフィン包埋を行い、4 $\mu$ mの厚さで薄切しHE染色を行った。

#### 4. 研究成果

6週目までの期間では顔面神経スコアに関する差異は両群間には認めなかった。

組織学的評価では無治療群に比較してGDNF投与群において癒痕化が少なく髄鞘の再生が多く認められる印象があった。

これまでの、研究で麻痺モデルの作成方法および固定染色については手技が確立してきている。今後はいよいよナノジェルを用いた神経栄養因子の導入を行い、治療効果の検討を行っていく

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三橋 亮太 (Mihashi Ryouta)

久留米大学 医学部 助教

研究者番号 : 50461439