

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659776

研究課題名(和文) 顔面神経麻痺再建における Active Axonal Guidance

研究課題名(英文) Active axonal guidance for reconstruction of facial palsy

研究代表者

齋藤 亮 (Saito, Akira)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：70507574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：9週齢のwistar male ratを用いた基礎実験において、顔面神経本幹を切断後に切断端同士を端々神経縫合を行った場合、術後4週において縫合部より軸索再生が起こり、顔面表情筋に達していることが確認できた。また同モデルで神経縫合部にbFGF含浸のMedGelを貼付してcontrol releaseすることにより、軸索再生が促進されることが示唆された。最終的な表情筋の運動もbFGFを作用させた方が改善することが示唆された。これにより、神経断裂後の顔面神経麻痺の治療において、徐放化bFGFが果たす役割が期待される。

研究成果の概要(英文)：In the basic experiment using nine-week-old wistar male rat, when the main trunk of the facial nerve was cut and anastomosed by epineural suture, the nerve regeneration already started from the sutured edge at four week past from the operation, and the nerve could reach to the mimetic muscles. Furthermore, when it was attached bFGF-impregnated MedGel on the point of epineural suture, the speed of nerve regeneration was faster than former group. And finally it also improve the movement of the mimetic muscles. This will enable us to expect a good role and capacity of the control released bFGF in the treatment of facial palsy after neurotmesis.

研究分野：形成外科

科研費の分科・細目：形成外科

キーワード：顔面神経麻痺 bFGF 神経再生

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床において、我々は顔面神経麻痺に対する表情筋運動の再建方法のひとつとして、顔面神経と舌下神経間に大耳介神経を神経端側縫合により自家移植する Interpositional Nerve Graft (以下 IPNG) を応用した Network 型再建を提唱し (Yamamoto Y et al. JPRAS.2007), 術後の Mirror Biofeedback によるリハビリテーションを併用することで、自然かつ力強い表情筋運動の獲得、異常共動運動の軽減といった効果を確認している。しかし顔面神経麻痺再建術は一般に術後経過観察期間が長期に渡ることに加え、実際の再建後における神経軸索再生の確認は困難であり、in vivo 環境での IPNG の証明は渉猟した限りでは、ラット等で少数行われているにすぎない。

(2) 一方、運動をはじめ五感、記憶、学習などをつかさどる脳神経系の中心として機能する神経回路は多数の神経細胞から伸びた神経突起が精巧に絡み合って構築される。この過程で成長円錐と呼ばれる神経突起の先端部が、その細胞外の環境に損じする標識を感受し、正しい方向へ移動する。

Rita Levi-Montalcini (米国1986年 Nobel 生理学・医学賞受賞) は成長円錐を引き寄せる標識として神経成長因子を発見し、成長円錐がこの因子の濃度差を検知して、濃度の高い方へ伸長することを確認した。この機能は軸索ガイダンス (Axonal guidance) と呼ばれ、軸索突起を正しい道筋に沿って伸長させる。更に近年、神経突起が伸びる方向を転換する分子メカニズムが明らかになってきており、損傷した神経回路の修復に向けて技術開発を可能にする成果として注目されている。

## 2. 研究の目的

(1) 神経軸索誘導因子の基礎的研究が進み、in vitro 環境下での神経軸索の側枝形成及び再生軸索の伸長を促進、更にはその道筋を能動的に操ることが可能となってきた。顔面神経麻痺への再建術のひとつである IPNG 後の移植神経に軸索誘導因子を作用させることで、再生軸索の側枝形成、伸長促進、及び標的臓器への再生軸索誘導 (Active Axonal Guidance) を可能にする為の基礎的研究を行い、顔面神経麻痺再建術後の術後経過観察期間の短縮及び手術成績を更に改善することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) まず実際に使用する神経軸索誘導因子を選定する。過去の類似論文の中から候補を挙げ、その中で入手が比較的容易なものを選択することとした。

(2) 実験1として、9週齢雄の Wistar rat を用い、顔面神経本幹を完全切断後、神経上

膜縫合を行い、完全麻痺 (neurotmesis) モデルを作成する。その縫合部に方法 (1) で選定した液性因子を MedGel® (徐放剤) に含浸させ control release することにより、神経軸索再生を促進するかを、液性因子を作用させない control 群と比較することにより評価する。評価法は tracer study と facial palsy scores (Shichinohe R et al. JPRAS. 2012) を用いる。tracer study では、脳幹内の顔面神経核領域で染色される核の数をカウントする。Facial palsy scores では、閉瞼の左右対称性や、ひげの動きなど、臨床的な所見から顔面神経麻痺の程度を評価するもので、0~8点で評価する (図1)。

facial palsy scores	
The score for rat facial palsy in this study.	
Symmetry of the eyes at rest	0 Asymmetry (Wide open or narrow)
	1 Normal
Eye-closure capability	0 No perceptible motion
	1 Muscle contraction but no perceptible motion
	2 Incomplete eye closure
	3 Complete eye closure
Symmetry of the vibrissae at rest	0 Asymmetrical position compared with the contralateral side (posterior or anterior position)
	1 Normal
Motion of vibrissae	0 No motion
	1 Minor trembling
	2 Effective movement inferior to contralateral side
	3 Effective movement undistinguishable from the contralateral side

図1 facial palsy scores

(3) 実験2として、同じく完全麻痺 (neurotmesis) モデルを作成する。今度は選定した液性因子を作用させる部位を顔面神経分枝 (側頭枝もしくは頬枝) とする。これを何も作用させない control 群と比較する。評価法は tracer study を用いる。

(4) 実験3として、IPNG モデルを作成する。すなわち、顔面神経本幹を完全切断した後、顔面神経末梢側と舌下神経間に大耳介神経を用いた遊離神経グラフトをそれぞれ端側縫合することで架橋する。そして端側縫合部に、選定した液性因子を作用させる。これを何も作用させない control 群と比較することにより評価する。評価法は tracer study と facial palsy scores を用いる。

## 4. 研究成果

(1) 神経軸索誘導因子の候補として Netrin や Ephrin ファミリー、Endothelin などが挙げられた。これらは単一神経細胞レベルで、軸索の伸長が認められた液性因子であるが、顔面神経のような末梢神経における神経再生に寄与するかの報告はなく、また Rat 由来のもの入手するのは困難な物質であった。そこで Axonotmesis (軸索断裂) の神経損傷において、神経軸索再生を促進すると報告のあり、比較的入手も容易な bFGF (塩基性線維芽細胞増殖因子) を用いることとした。bFGF

は当教室での臨床医療現場でも、創傷治癒目的によく用いられるものであり、今までに bFGF が神経軸索を誘導するとの報告はないが、それを検証する価値は大いにあったと考えた。

(2) 実験1の方法の如く、rat由来の bFGF を含浸の MedGel® を神経縫合部に貼付した(以下、bFGF 群)。これを10匹作成した。一方 control 群として MedGel® のみを貼付したのも10匹作成した。術後2,4,6,8,10週の時点で各群2匹ずつ、逆行性トレーサーである Fast Blue を whisker pad に注入した後にホルマリンで灌流固定を行い、tracer study を行った。これによりすべての時点において bFGF 群の方が control 群よりも脳幹内の顔面神経核領域で染まる核の数が多かった(図2)。また facial palsy scores は各群2匹ずつを術後0~10週で経時的に毎週評価を行った。これも bFGF 群のほうがスコアが高かった(図3)。

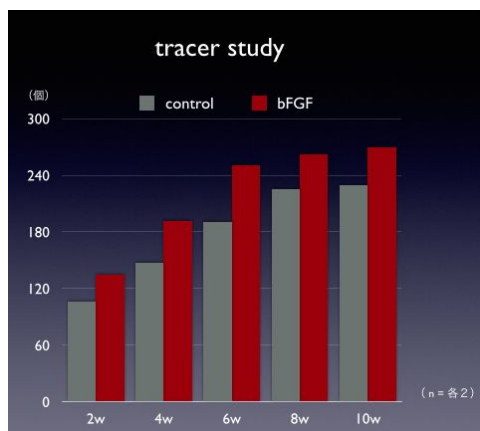


図2 tracer studyの結果

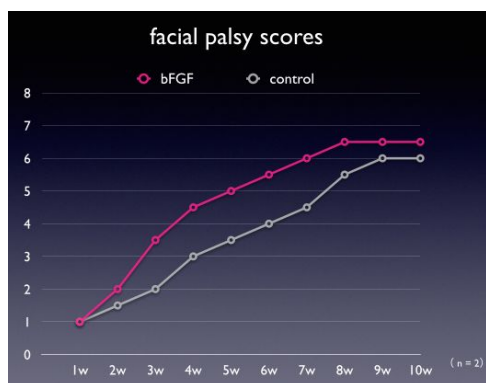


図3 facial palsy scoresの結果

これにより、Neurotmesis (神経断裂) の状態でも bFGF は神経軸索再生の促進に効果があることが示唆された。

(3) 実験2の方法に従い、(a) control 群として、顔面神経側頭枝、頬枝どちらにも bFGF 含浸の MedGel® を貼付しないものを、(b) 群として側頭枝のみに bFGF 含浸の MedGel® を貼付するものを、(c) 群として頬枝のみに bFGF 含浸の MedGel® を貼付するものを作成した。なお MedGel® を貼付する際は、もう一方の分枝または本幹に影響しないよう、皮切を3つに分けて行った(図3)。



図3 実験2における手術操作

この場合は、分枝間の比較となることから facial palsy scores での評価は行えない。そのため tracer study のみでの評価とした。(a)(b)(c) 群を各1匹ずつ作成し、術後4週の時点で tracer study による評価を行った。仮説通りの結果は得られなかったが、さらに実験手技の修練と n 数を増やすことにより新たな知見が得られると考えている。

平成26年5月10日の時点でここまですべて終了した。今後実験2の n 数を増やし、さらに本題である実験3も継続して行っていきたい。

#### 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2件)

塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の徐放化による顔面神経麻痺の治療, 安居 剛, 古川洋志, 齋藤 亮, 第87回日本形成外科学会北海道地方会(於札幌), 2014年2月8日

bFGF の徐放化による顔面神経麻痺の治療, 安居 剛, 第27回北大形成外科アカデミー(於札幌), 2013年12月14日

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 亮 (SAITOH, Akira)

北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：70507574

### (2) 研究分担者

山本 有平 (YAMAMOTO, Yuhei)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70271674

古川 洋志 (HURUKAWA, Hiroshi)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00399924

小山 明彦 (OYAMA, Akihiko)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：70374486

舟山 恵美 (FUNAYAMA, Emi)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：10533630

大澤 昌之 (OSAWA, Masayuki)

北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：70625029

### (3) 連携研究者

該当なし