

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592543

研究課題名(和文) 生体用共焦点レーザー顕微鏡によるヒト鼓索神経切断後の味蕾退縮・再生過程の解明

研究課題名(英文) Evaluation of degeneration and regeneration process of human fungiform taste buds after severing the chorda tympani nerve using confocal laser scanning microscopy in vivo

研究代表者

齋藤 武久 (Saito, Takehisa)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：10139769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：中耳真珠腫患者の鼓室形成手術中にやむを得ず鼓索神経を切断した7症例に対して、術前および術後定期的に電気味覚検査と生体用共焦点レーザー顕微鏡による茸状乳頭味蕾の観察を行った。その結果、神経切断後2～10週までに味蕾は消失し、7症例の平均では完全消失までに約50日を要することが判明した。この7症例を術後3ヵ月目から1年目までは毎月1回、その後2年目まで3～6ヵ月毎に検査を反復した。その結果、味蕾再生は7例中5例で神経切断の5～8ヵ月後に観察され、味蕾数の増加とともに味覚機能も術前値に回復した2例、味蕾の再生は見られるが、味覚機能が回復しない3例、味蕾の再生が全く見られない2例の3群に分かれた。

研究成果の概要(英文)：Subjects were seven patients with severed chorda tympani nerve during tympanoplasty for middle ear cholesteatoma. Electrogustometry (EGM) and confocal laser scanning microscopy in vivo were performed pre- and postoperatively to investigate taste function and morphology of fungiform taste buds (TB). TB was completely disappeared 2 to 10 weeks (50 days in average) after severing the nerve. Thereafter, these 7 patients were periodically followed for 1 to 2 years. Regeneration of the TB was firstly observed in 5 cases 5 to 8 months after surgery. In 2 cases, regenerated TB continued to increase and EGM threshold was recovered to preoperative value. In 3 cases, regenerated TB was detected but taste function never recovered. In other 2 cases, both regeneration of TB and recovery of EGM threshold could not be observed.

研究分野：医歯薬学

キーワード：鼓索神経 中耳手術 茸状乳頭 味蕾 退縮 再生

### 1. 研究開始当初の背景

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、さらに末梢の味覚受容器である茸状乳頭に到達した結果、果たして味蕾が再生するのかについては全く不明であった。過去に動物を用いた研究は数多く存在するが、ヒトでは全く研究されてこなかった。また、味蕾が再生するとしても、その証明には茸状乳頭を含んだ舌の一部を試料として採取し、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡で観察する必要があった。もし、「生体用共焦点レーザー顕微鏡」で「非侵襲的に」乳頭を観察できれば、患者の負担が大きく軽減される利点がある。さらに「継続的に」茸状乳頭を観察できるため、鼓索神経切断後の味蕾の退縮および再生の時期を正確に特定できると予想した。

### 2. 研究の目的

中耳手術中に鼓索神経を切断しても即時再建を行えば、神経は再生し味覚受容体である茸状乳頭味蕾も再生することを我々は報告してきた。しかし、味蕾の形態観察には茸状乳頭の採取が必要であり、患者の負担が大きいため、今後は非侵襲的に観察可能な方法の開発が求められる。そこで、角膜の表層を観察するために開発された「生体用共焦点レーザー顕微鏡」を利用することによって「継続的」かつ「非侵襲的に」鼓索神経切断後の茸状乳頭内部を観察することが可能になると考えた。この共焦点レーザー顕微鏡を利用することにより、これまで不明であったヒト鼓索神経切断後に味蕾が消失および再生するまでの正確な期間を解明することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

(1) 茸状乳頭生検と共焦点レーザー顕微鏡観察による再生味蕾数の比較



図1 共焦点レーザー顕微鏡の対物レンズに被験者の舌表面を接触させたところ

鼓索神経切断後に電気味覚検査域値が正常範囲に回復し、茸状乳頭が再生している患

者群、電気味覚検査域値が回復せず、茸状乳頭が萎縮した群、正常ボランティア群の3群を対象とした。「角膜観察用共焦点レーザー顕微鏡」を用い、茸状乳頭表面の味孔を指標として「正常味蕾」と「再生味蕾」の構造を表層から深部へ焦点を変えて観察し、デジタル画像に記録して上記3群を比較した。図1に共焦点レーザー顕微鏡の一部を示す。

舌尖から2cm後方で中心から外側へ2cm付近の「鼓索神経固有領域」に存在する茸状乳頭10個をメチレンブルー液でマーキングした(図2)。この対象者の舌尖をガーゼで前下方に引っ張った状態で共焦点レーザー顕微鏡の対物レンズに乳頭を接触させて乳頭内部を観察した(図1)。一方、茸状乳頭を生検して得られた標本を固定し、その連続切片を光学顕微鏡で観察して乳頭一個当たりの味蕾数をカウントし、共焦点レーザー顕微鏡によってカウントされた味蕾数との比較を行った。



図2 舌外側の茸状乳頭10個にメチレンブルーでマーキングする

(2) 鼓索神経切断後の茸状乳頭味蕾消失までの期間、および再生までの期間の検討

今回の研究期間中に施行した中耳手術中に鼓索神経が切断された7症例を対象とし、茸状乳頭味蕾が消失することが確認できるまで、1~7日毎に「角膜観察用共焦点レーザー顕微鏡」で鼓索神経固有領域の茸状乳頭内部を観察し、味蕾が退縮・消失するまでの平均期間を検討した。さらに、鼓索神経再生が期待できる症例ではその後も術後1年目までは毎月一回、その後は3~6ヵ月毎に観察を継続し、「再生味蕾」が出現する時期を検討した。また、電気味覚検査を定期的に施行し、味覚が回復する時期と味蕾再生の時期が一致するかについても比較検討した。

### 4. 研究成果

(1) 共焦点レーザー顕微鏡によって観察される茸状乳頭味蕾の形態

図3は茸状乳頭一個をその表面から味蕾内部、さらにその下部の上皮層まで共焦点レーザー顕微鏡を用いて動画撮影した中の4

枚を取り出したものである。味蕾 を例にとり、味蕾表面の味孔、味孔下部、味蕾の中心部、味蕾下部レベルの画像を呈示した。このように、乳頭を生検しなくても、共焦点レーザー顕微鏡によって味蕾全体の形態を非侵襲的に観察可能であることがわかる。

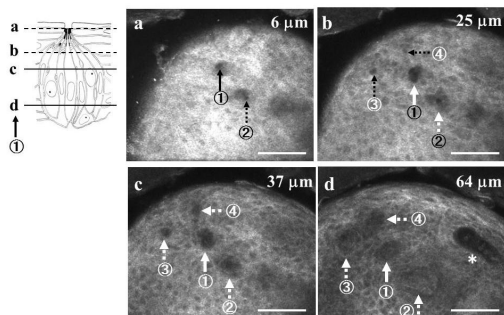


図3 共焦点レーザー顕微鏡で観察した茸状乳頭味蕾の断面. Bar=100 $\mu$ m

(2) 共焦点レーザー顕微鏡で得られた結果と茸状乳頭生検で得られた結果の比較

図4は正常ボランティア群 (Group 1)、鼓索神経切断後に味蕾が再生した群 (Group 2)、再生しなかった群 (Group 3) の3群間で乳頭一個当たりの味蕾数を比較したものである。Group 1 と2の間で統計学的に有意差を認めるものの、鼓索神経切断後のGroup 2では明らかに味蕾が再生していることがわかる。

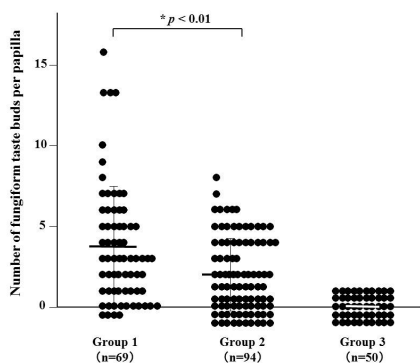


図4 共焦点レーザー顕微鏡で観察した茸状乳頭味蕾数の比較. Group 1; 正常ボランティア群. Group 2; 鼓索神経切断後に味蕾が再生した群. Group 3; 味蕾が再生しなかった群

図5は正常ボランティア群 (control group)と味蕾再生群 (regeneration group)において、乳頭生検(biopsy material)で味蕾数をカウントした場合と、共焦点レーザー顕微鏡 (*in vivo* imaging) でカウントした場合を比較したものである。いずれの群でも、生検と共焦点レーザー顕微鏡による結果に差はないことがわかる。すなわち、味蕾数をカウントするには、茸状乳頭を生検しなくても、共焦点レーザー顕微鏡で「非侵襲的に」観察するだけで良いことが判明した。

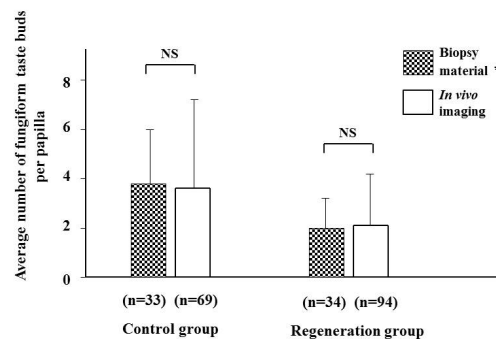


図5 茸状乳頭を生検した群と共焦点レーザー顕微鏡で観察した群における味蕾数の比較. Control group; 正常ボランティア群. Regeneration group; 味蕾再生群

(3) 鼓索神経切断から茸状乳頭味蕾消失までの日数

中耳真珠腫患者の術前には電気味覚検査、共焦点レーザー顕微鏡による茸状乳頭内部の観察を行い、静止画像と動画として保存した。中耳手術中にやむを得ず鼓索神経を切断した7症例に対して、手術の1~2日後に1回目、その後の2週間は1週間に2~3回、2~4週間後までは1週間に一回、4週目以後は味蕾が完全に消失するまで2~4週毎に検査を反復した。その結果、個人差が大きかったが、神経切断後2~10週間までの間に味蕾は完全に消失することが判明した。図6は鼓索神経切断群の一例において乳頭内に存在する6個の味蕾が消退していく過程を示している。味蕾は切断19日後に消失、味蕾は28日後に消失、味蕾は42日後に消失した。

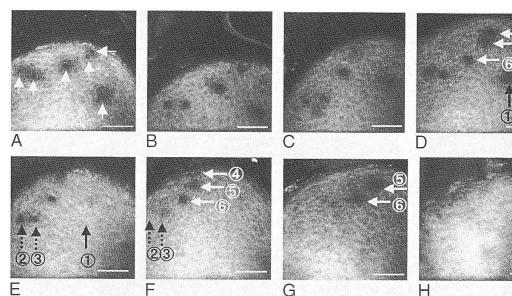


図6 鼓索神経切断後の茸状乳頭味蕾の消失過程. A; 術前. B; 術後5日目. C; 術後10日目. D; 13日目. E; 19日目. F; 28日目. G; 42日目. H; 71日目. Bar=100 $\mu$ m

図7は同じ症例における乳頭毎の味蕾数をプロットしたものである。これを図中の計算式に当てはめると、実線で表した「fitting curve」が得られる。そして、研究期間中に検討した7例すべての乳頭毎の味蕾数をプロットし、図8の計算式に当てはめると、実線のような「平均 fitting curve」が得られ、味蕾が完全消失するまでの平均日数を求めると、約50日であった。

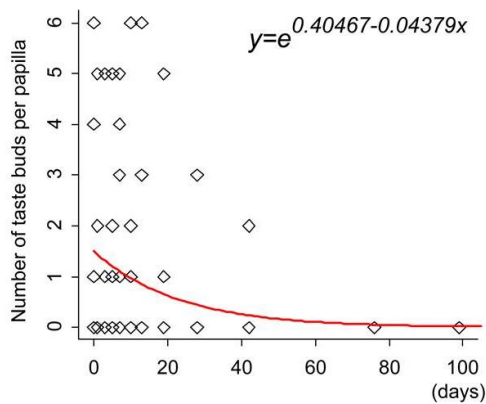


図7 味蕾消失過程の fitting curve の例

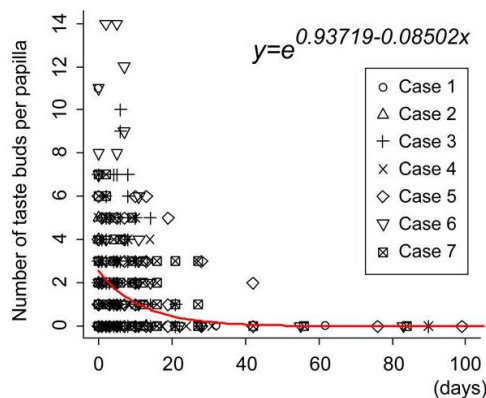


図8 7症例における味蕾消失過程の平均 fitting curve

(4) 鼓索神経切断から味蕾再生までの期間および電気味覚検査結果との比較

上記7人の鼓索神経切断患者を、術後3ヵ月目から1年目までは月に1回ずつ、その後2年目まで3~6ヵ月毎に検査を反復すると以下のような結果が得られた。まず、味蕾の再生は神経切断の5~8ヵ月後に始まり、徐々に味蕾数が増加していき、それとともに電気味覚検査域値が術前の値に完全回復するものが2例、味蕾の再生は見られるが、数の増加が頭打ちになり、電気味覚検査域値が回復しない3例、味蕾が全く再生しない2例の3群に分かれた。また、味蕾の再生は舌縁で最初に観察されたが、その後、舌背の乳頭内に再生する症例、舌縁のみでの再生で終わる症例に分かれた。また、電気味覚検査域値は神経切断後早期にスケールアウトになるが、味蕾の再生が始まって味蕾数が増加していくよりも、時間的に遅れて回復する傾向がみられた。

以上のように、ヒトの鼓索神経切断後に舌背の鼓索神経固有領域における茸状乳頭味蕾は約50日で完全消失することを世界で初めて報告した。さらに、味蕾が消失後、鼓索神経が再生して味蕾が再生するまでの期間は5~8ヵ月であることを解明した。この味蕾再生までの期間解明に関しても、ヒトでは

世界で初めての報告になる。以上の研究成果の一部は、2014年と2015年に2編の論文として英文誌に発表した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Saito T, Ito T, Ito Y, Kato Y, Manabe Y, Narita N. Degeneration process of fungiform taste buds after severing the human chorda tympani nerve - observation by confocal laser scanning microscopy. *Otol Neurotol* 36 (3): 539-544, 2015. 査読有 doi: 10.1097/MAO.0000000000000444

齋藤武久, 鼓索神経手術等での取扱い, *JOHNS* 30 (10): 1441-1445, 2014.10. 査読無

Saito T, Ito T, Kato Y, Yamada T, Manabe Y, Narita N. Observation of regenerated fungiform taste buds after severing the chorda tympani nerve using confocal laser scanning microscopy *in vivo*. *Otol Neurotol* 35 (3), e110-116, 2014. 査読有 doi: 10.1097/MAO.0000000000000223

齋藤武久, 鼓索神経切断後の茸状乳頭と再生味蕾の微細形態, *PCEM (Tohoku Univ. Med. School)* 31: 19-23, 2011-2012. 2013. 査読無

齋藤武久, 耳鼻咽喉科の手術と味覚障害, *JOHNS* 29(1): 101-105, 2013. 査読無

Saito T, Yamada T, Okamoto M, Narita N. Comparison of regeneration of the chorda tympani nerve and gustatory function recovery after severing the nerve between pediatric and adult patients. *Otol Neurotol* 33 (9): 1567-1572, 2012. 査読有 doi: 10.1097/MAO.0b013e3182713997

〔学会発表〕(計5件)

齋藤武久, 山田武千代, 岡本昌之, 等, 慢性中耳炎・真珠腫性中耳炎患者における茸状乳頭味蕾数 -生体用共焦点レーザー顕微鏡による比較検討- 第24回日本耳科学会総会, 新潟市 朱鷺メッセ, 2014年10月16日

齋藤武久, 伊藤有未, 成田憲彦, 等, ヒト茸状乳頭味蕾における生体用共焦点レーザー顕微鏡の有用性. 第27回日本口腔・咽頭科学会, 札幌市, ホテル ライフ オート札幌, 2014年9月12日

齋藤武久, 山田武千代, 岡本昌之, 等, 鼓索神経切断後に再生した茸状乳頭味蕾の生体用共焦点レーザー顕微鏡による観察. 齋藤武久, 山田武千代, 岡本昌之, 等, 第23回日本耳科学会総会, 宮崎市 シーガイヤコンベンションセンター, 2013年11月25日

齋藤武久, 伊藤有未, 成田憲彦, 等, 生体用共焦点レーザー顕微鏡によるヒト茸状乳頭味蕾の観察. 第 26 回日本口腔・咽頭科学会総会, 名古屋市, ANA クラウンプラザホテルグランコート名古屋, 2013 年 9 月 13 日

齋藤武久, 鼓索神経切断後の茸状乳頭と再生味蕾の微細形態. 第 63 回東北臨床超微形態懇話会, 仙台市, 東北大学・良陵会館, 2012 年 6 月 28 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 武久 (SAITO, Takehisa)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号: 10139769

### (2) 研究分担者

成田 憲彦 (NARITA, Norihiko)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 80345678

伊藤 哲史 (ITO, Tetsufumi)

福井大学・医学部・助教

研究者番号: 90334812