

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670746

研究課題名(和文)側側縫合によるNetwork型再建～神経信号付加の更なる効率化～

研究課題名(英文)The efficiency of side-to-side neuroorrhaphy : the condition of donor nerve effects neural recovery.

研究代表者

大澤 昌之 (OSAWA, Masayuki)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：70625029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：顔面神経再建において、より効率のよい神経縫合の条件を探るべく動物モデルを作成しその効果の検証を行った。顔面神経頬枝の中枢側をクリップで持続的圧迫を加え、下顎縁枝を切断した頬部の不全麻痺モデルを作成しコントロール群とした。更に下顎縁枝をドナーとして、端側縫合群・縫合面の大きい側側縫合群・縫合面の小さい側側縫合群モデルを作成し、表情筋スケール・逆行性蛍光トレーサーによる顔面神経核での神経細胞数・縫合部より末梢部での神経軸索数・表情筋の萎縮の程度を観察した。結果は、神経縫合部の面積が同程度であれば端側縫合群が、側側縫合の2群間では面積の大きい群が良好な成績であった。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrated that the effect of neural reconstruction in rat models. In control group (group A), buccal branch was compressed by a ligature clip at peripheral to bifurcation of mandibular branch and mandibular branch was cut and ligated. In groups B, C and D, the nerve reconstruction was made in a different manner. The method of neuroorrhaphy were 'end-to-side' (group B), 'side-to-side (large window)' (group C) and 'side-to-side (small window)' (group D) technique. Facial palsy score was assessed every week. We measured the count of neural cells at the facial nucleus and axons at the distal point of neuroorrhaphy. The result showed that group B was equal to group C and group D was inferior to B and C, and group A was worst score in all groups.

研究分野：形成外科学

キーワード：再建外科学 顔面神経麻痺

1. 研究開始当初の背景

顔面神経再建において、神経端側縫合が様々な状況で行われている。多くの場合はドナー神経の側面からの軸索の萌芽に期待したものであり、その効果について報告されている。

末梢神経の構造は、シグナルを伝える神経細胞の樹状突起が延長した軸索とその周囲に存在する間質である内膜、軸索と内膜を包む被膜である周膜、さらにその外層を覆う外膜からなっている。端側神経縫合を行う際の周膜と外膜の処理についても報告があり、周膜・外膜に穴 (neural window) をあけて縫合するモデルとあけずに縫合するモデルの比較などが行われてきたが、そのサイズの違いによる比較の報告はない。また、断端と側面の接触ではなく神経の側面どうしの接触による神経軸索の移行が起きるかどうかにしてもこれまで報告はない。

神経再建の成績向上に向けてより効果的な手技が望まれている昨今、本研究では動物モデルを用いて条件を変えた縫合法についてその効果を検証する。

2. 研究の目的

以下の仮説の証明

(1) 神経縫合部の接触面積の大小により軸索再生に差がある

(2) 神経縫合部の軸索露出の大小により軸索再生に差がある

3. 研究の方法

10週齢 (220-250g) の wister rat を使用した。すべての実験は、北海道大学動物実験に関する規定にのっとり行った。ラット顔面神経不全麻痺モデルを作成し、神経付加縫合による神経再建を行う。その際、神経の縫合法として「端側縫合」「側側縫合」など縫合部条件の違う複数のモデルを作成し、12週間経過観察を行う。週一回、髭の動きを4段階に点数化した facial palsy score による評価と、12週後の逆行性神経トレーサーによる顔面神経核の神経細胞体数カウントおよびトルイジンブルー染色による神経軸索カウントにより、麻痺改善の評価を行う。また、whisker pad 部の表情筋組織を病理組織学的に観察する。

ラット顔面神経不全麻痺モデルは

Shichinohe らの報告 (引用文献) を改変し作成した。

< 実験モデル >

以下の手術操作はすべて手術用顕微鏡下で行った。

A group (control group)

顔面神経頬枝の中枢側をリガクリップで持続的に圧迫した。顔面神経下顎縁枝は切断し断端を結紮することにより頬枝領域の不全麻痺モデルを作成した。これをコントロール群とした。

B group (端側神経縫合 (1.5 mm window) group)

上述の不全麻痺モデルに対し、切断した下顎縁枝の中枢側を結紮せずに、頬枝の側面に作成した長径 1.5 mm の neural window へ端側神経縫合を行う。

C group (側側神経縫合 (5 mm window) group)

不全麻痺モデルに対し、切断し中枢側を結紮した下顎縁枝と頬枝の側面に、それぞれ長径 5 mm の neural window を作成し、側側神経縫合を行う。

D group (側側神経縫合 (1.5 mm window) group)

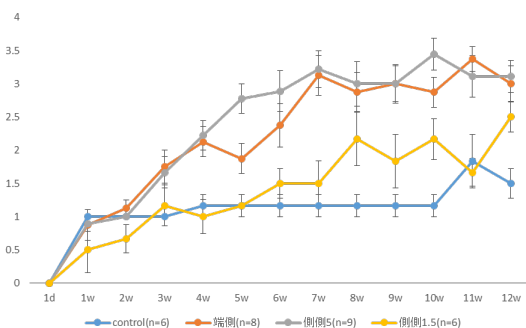
不全麻痺モデルに対し、切断し中枢側を結紮した下顎縁枝と頬枝の側面に、それぞれ長径 1.5 mm の neural window を作成し、側側神経縫合を行う。

4. 研究成果

Facial palsy score での 12 週間の回復状況は、 $C=B>D > A$ であった (図 1)。トレーサーによる顔面神経核の神経細胞数計測 (図 2) でも同様の結果であり、A と B、A と C、B と D の間に有意差を認めた。

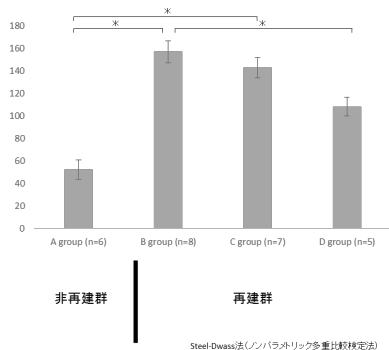
トルイジンブルー染色による軸索カウントは現在標本作成および計測中。whisker pad 部の組織標本の観察では、A group では筋組織が高度に萎縮し、腺組織の肥大を認めた。B、C、D group については A group よりは萎縮の程度は軽度だが、参考として採取した正常ラットの whisker pad 部の筋組織と比較すると明らかな萎縮を認め、その程度はほぼ同

程度であった。



(図1)

Number of labelled neurons in the facial nucleus



(図2)

今回作成した実験モデルは神経縫合部の条件の違いによる軸索再生の効果を比較するものであるが、そのポイントは縫合部のneural windowの大きさ、接触面の露出軸索数、の2点である。についてはneural window作成時の切開線の長さを変えることで調整し、については神経の断面と側面という条件の違いにより調整することとした。この実験モデル作成に先立ち、適切にneural windowを作成することができるかについて走査電子顕微鏡を用いて観察した。また走査電子顕微鏡所見より、神経断端とwindowを介した神経側面とではすべての軸索が露出する断端のほうが接触軸索数を多くすることも確認できた。

トレーサスタディの結果は、神経細胞の軸索の末梢端が存在する表情筋と細胞体との連続性を確認でき、軸索再生の評価法としては広く使用されている方法である。今回の実験ではそれぞれ差を認めることができたが、B groupとD group, C groupとD group

に差を認めたことは、それぞれ接触軸索数が多いほど、接触部のwindowが大きいほど多くの軸索の再生が起こったことを示している。B groupとC groupに差を認めずかつD groupより再生が良好であったのは、それぞれの優位性がほぼ同程度であったと考えられる。また、今回作成したsuper chargeモデルについては、super chargeはもともとある程度の軸索が残存していると考えられる神経の側面にwindowを作成し神経を縫合するものであるが、その際手術操作により既存の軸索を少なからず損傷してしまうことも十分に考えられる。しかし、A groupと比較し、他の3 groupすべてで細胞数が上回っていたことは、super chargeの有効性を示したことになる。

トルイジンブルー染色標本の計測は非常に時間がかかるためまだ作業中であるが、一部のデータを見ると、径の大小を無視すると比較のため観察している正常顔面神経類枝の軸索数より損傷を受けているはずのgroupの軸索の方が多く印象がある。これは軸索の再生時に、軸索断端から複数のgrowth cone(成長円錐:再生軸索の先端)が発芽していることを示していると考えている。これらの細く未成熟な軸索はfacial palsy scoreの結果に表れているように、実際には効果器である筋肉まで達しておらず、非機能的なものであると考えられる。これらのことについても計測を進める過程で考察していく。

現在までのデータでも、神経縫合部の条件により軸索再生の効果の違いは確認できている。これらのことをふまえて実際の臨床における神経再建時にも、より効率のよい神経再建を行っていきたいと考えている。

<引用文献>

Shichinohe, R. et al: Direction of innervation after interpositional nerve graft between facial and hypoglossal nerves in individuals with or without facial palsy: A rat model for treating incomplete facial palsy, J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2012, 65, 763-770

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)

{学会発表}(計 5件)

大野健太郎, 古川洋志, 七戸龍司, 山本有

平，側側神経縫合の有用性のラット顔面神経麻痺モデルを用いた検証，第 89 回北日本形成外科学会北海道地方会 2015 年 1 月 31 日，札幌医科大学国際医学交流センター（北海道札幌市）

大野健太郎，古川洋志，七戸龍司，山本有平，端側神経縫合における neural window 作成手技の電子顕微鏡を用いた検証，第 89 回北日本形成外科学会北海道地方会，2015 年 1 月 31 日，札幌医科大学国際医学交流センター（北海道札幌市）

大野健太郎，古川洋志，大澤昌之，七戸龍司，安居剛，山本有平，ラットモデルにおける端側神経縫合と側側神経縫合の比較，第 41 回日本マイクロサージャリー学会学術集会，2014 年 12 月 4 日～2014 年 12 月 5 日，京都テルサ（京都府京都市）

大野健太郎，古川洋志，大澤昌之，七戸龍司，安居剛，山本有平，顔面神経再建における側側神経縫合の基礎的研究第 2 報～側側神経縫合の有用性の検証～，第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会，2014 年 10 月 9 日～2014 年 10 月 10 日，キッセイ文化ホール（長野県松本市）

大野健太郎，古川洋志，大澤昌之，七戸龍司，安居剛，山本有平，顔面神経再建における側側神経縫合の基礎的研究第 1 報～neural window 作成手技の電子顕微鏡を用いた検証～，第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会，2014 年 10 月 9 日～2014 年 10 月 10 日，キッセイ文化ホール（長野県松本市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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（FURUKAWA, Hiroshi）
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
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・講師
研究者番号：10533630

林 利彦（HAYASHI, Toshihiko）
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：00432146

村尾 尚規（MURAO, Naoki）
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：90706558