



Title	顔面神経再建における神経縫合法の違いによる軸索再生効果についての基礎的研究
Author(s)	大野, 健太郎
Description	配架番号 : 2285
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12544号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12544
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65895
Type	doctoral thesis
File Information	Kentaro_Ono.pdf



学位論文

顔面神経再建における神経縫合法の
違いによる軸索再生効果についての基
礎的研究

(Study of the effect of
different neurorrhaphy on axonal
regeneration in facial nerve
reconstruction)

2017 年 3 月

北海道大学

大野 健太郎

学位論文

顔面神経再建における神経縫合法の
違いによる軸索再生効果についての基
礎的研究

(Study of the effect of
different neurorrhaphy on axonal
regeneration in facial nerve
reconstruction)

2017 年 3 月

北海道大学

大野 健太郎

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒 言	2 頁
略 語 表	4 頁
実験方法	5 頁
実験結果	21 頁
考 察	30 頁
総括および結論	34 頁
謝 辞	35 頁
引用文献	36 頁

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Kentaro Ono, Yuhei Yamamoto, Ryuji Shichinohe, Naoki Murao, Akihiko Oyama, Emi Funayama, Hiroshi Furukawa : Exploration of more effective neurorrhaphy in facial nerve reconstruction: A comparison focusing on the difference of neural window size and condition of the neurorrhaphy site.

J Plast Reconstr Aesthet Surg, volume 69, issue 8, Page 1072-1079, 2016

本研究の一部は以下の学会に発表した

1. 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. 10. 9-10 長野

2. 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. 10. 9-10 長野

3. 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. 12. 4-5 京都

4. 大野健太郎, 古川洋志, 七戸龍司, 大澤昌之, 山本有平: 神経縫合条件と軸索再生効果の関連性～ラット顔面神経再建モデルを用いた検証～ 第24回日本形成外科学会基礎学術集会 2015. 10. 8-9 岩手

5. 大野健太郎, 古川洋志, 七戸龍司, 大澤昌之, 山本有平: 神経縫合条件の違いによる機能回復についての軸索形態学的評価・表情筋臨床的評価の側面からの考察 第42回日本マイクロサージャリー学会学術集会 2015. 11. 26-27 埼玉

緒言

【背景】

顔面神経の再建においてより良い治療効果を目指すために、その神経の出力である donor をどこに求めるか、またその神経軸索をどのように効果器へ届かせるかなど、これまで多くの方法が試みられてきた。顔面神経の中枢端が利用できる場合はもちろんそれを利用し、いかに末梢断端への連絡を再建するかということを目指すわけであるが、中枢端が利用できない場合は他に神経の donor を求めることとなる。donor となる神経として代表的なものの一つが舌下神経であり、舌下神経の犠牲を減らしつつ顔面神経の再建を行うために神経の端側縫合が利用されるようになった¹。さらには端側縫合を用いて1本の神経移植で顔面神経の末梢側の枝への再建を行う方法なども報告されている^{2,3}。また、端側縫合を介して複数の神経をつなぎネットワークを形成することにより、顔面神経不全麻痺や回復の不足が予測される枝への軸索付加 (neural supercharge) の概念をもって我々の施設では顔面神経麻痺の治療を行いその有効性を報告してきた⁴。

しかしこれらネットワーク型再建における長期的な経過を振り返ると、かならずしも良好な麻痺の回復を得られていない症例があることが分かった。この原因として考えられる一つに、神経縫合部の条件というものを考えた。我々の施設での過去の報告や他の研究による報告における端側神経縫合には神経束の側面に neural window を開ける必要がある。マクロな意味での末梢神経は神経細胞の樹状突起の一つが長く伸びたものである軸索 (axon) の集合と、それを包む間質である内膜 (endoneurium)、それらを包む線維性の被膜である周膜 (perineurium)、さらにその周囲を覆う結合組織である外膜 (epineurium) から成っており⁵、神経生理学的なシグナルを伝えるための軸索の再生を十分に促すにはこれらの障壁を取り除く必要があるということである。端側神経縫合の報告の中でこれらのどの層で neural window を開けるのが良いかという報告はあるが⁶、その window の大きさ、つまり神経縫合部の接触量について十分に検討された報告はこれまでなかった。神経再建での軸索再生の量と縫合部での window の大きさについての関連がわかればネットワーク型再建におけるさらなる成績向上が期待できると考え、本研究を行うに至った。

【目的】

顔面神経不全麻痺ラットモデルを用いて端側神経縫合における縫合部の条件によって、神経再建後の軸索再生量および表情筋機能回復に差がでるかを調べることを目的とした。神経縫合部の条件の違いとは①neural windowの大きさの違い、②神経縫合部での接触軸索数の違い、の2点とした。

【結果】

条件①については neural window の大きいもの、条件②については接触軸索数が多いものがそれぞれ軸索再生や表情筋機能の改善に良い影響を与えることを示された。また、表情筋機能回復については軸索の量だけでなく軸索再生の速度、つまり効果器である筋肉の脱神経期間が短いほど表情筋機能回復が良いということが実験結果より示唆された。これらの結果はネットワーク型再建においては、一般に回復が悪いと言われている側頭枝や下顎縁枝への neural window を大きくするなどの工夫により、さらなる神経再建の成績向上を目指すための根拠となりうると考えられる。また、逆説的に考えると神経縫合部での通り道を狭くしないように、神経縫合時には周囲の結合組織などが縫合部に入らないよう限らない精密な操作が必要であるということの裏付けとも言える。

略語表

本文および図中で使用した略語は以下の通りである。

DMSO	dimethyl sulfoxide
PB	phosphate buffer
SE	standard error
SEM	scanning electron microscope

実験方法

<使用した動物>

24 匹の Wistar 系オスのラット (240 - 260 g) を使用した。この実験の前後でそれらの個体は北海道大学医学部附属動物実験施設内で管理され、12 時間間隔の人工蛍光管理、標準飲食管理が行われた。実験に際しての麻酔、手技は北海道大学医学動物実験に関する規定に則って行われた。

<予備実験>

実験を開始するにあたって、以下の予備実験を行った。

1. neural window について

まずこの実験の中核となる neural window についてであるが、過去に報告された論文においては端側神経縫合について epineural window を作成したとするもの、perineural window を作成したというもの、それらを比較したもの⁶など様々である。非常に微細な構造を持つ神経に対してたとえ顕微鏡下の操作とはいえ本当に考えているような window が我々の技術でできるのかということを考え、本実験に先立ち予定する顕微鏡下での手技により神経に neural window を作成できること、また epineural window, perineural window を作り分けることができるものかを scanning electron microscope (SEM) により確認することとした。

SEM 観察のための試料作成法

ペントバルビタール (50 mg/kg) の腹腔内投与により麻酔を行ったラットに対し、顔面神経頰枝を露出させ手術用顕微鏡下でマイクロ撮子・マイクロ剪刀を用いて perineural window, epineural window をそれぞれ作成した。それぞれの神経および neural window を開けていない神経とをそれぞれ採取し、7%スクロース (0.1M リン酸緩衝液 (phosphate buffer (PB))) で洗浄した後 2.5%グルタルアルデヒド (0.1 M PB) で固定し、さらに 1%オスミウム (0.1M PB) で後固定した。その後 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%のエタノールを用いて脱水し、98%酢酸イソペンチルに浸漬し、臨界点乾燥器 (HITACHI HCP-2 Critical Point Dryer) にて臨界点乾燥を行ってからイオンスパッタリング装置 (E-1030 Ion Sputter)

を用いて金属コーティングを行った。これらの試料を SEM(HITACHI S-4500) で観察した (図 1, 2, 3)。

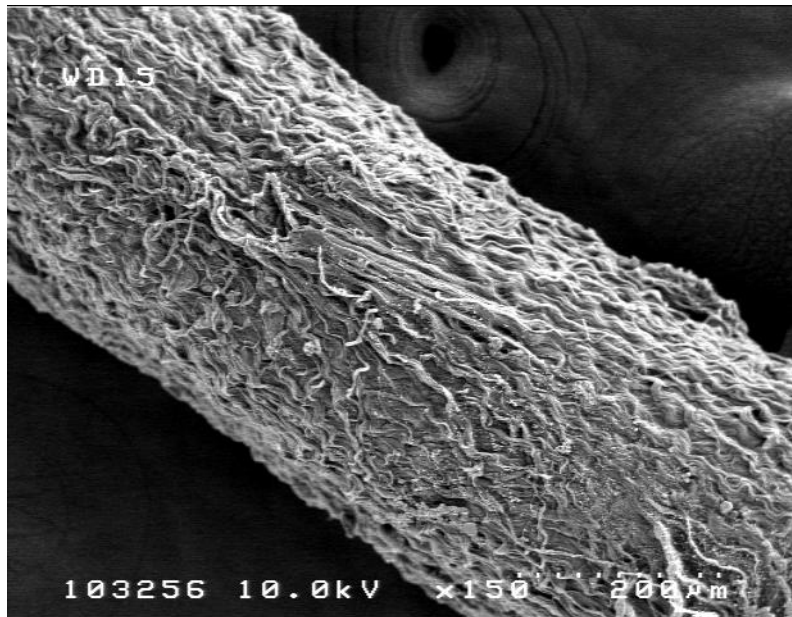


図 1 no window (結合組織である epineurium に覆われた神経)

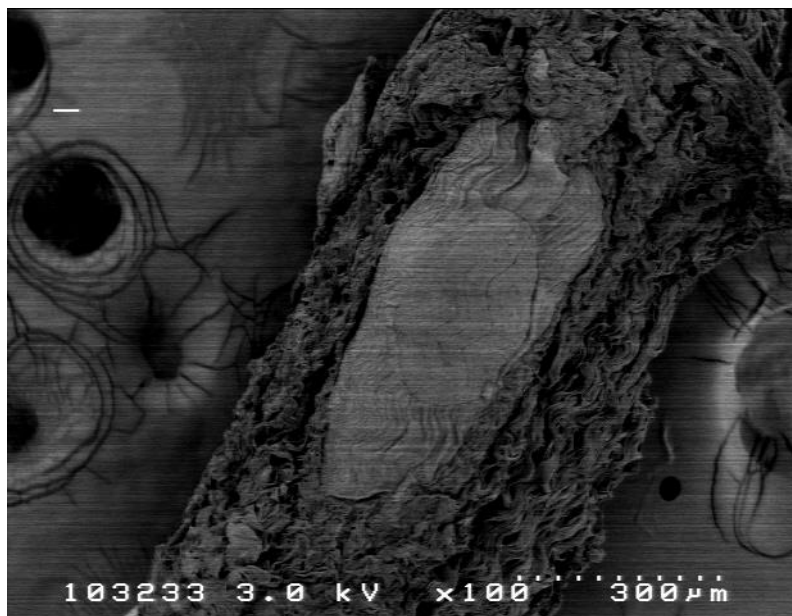


図 2 epineural window (window からは軸索は確認できない)

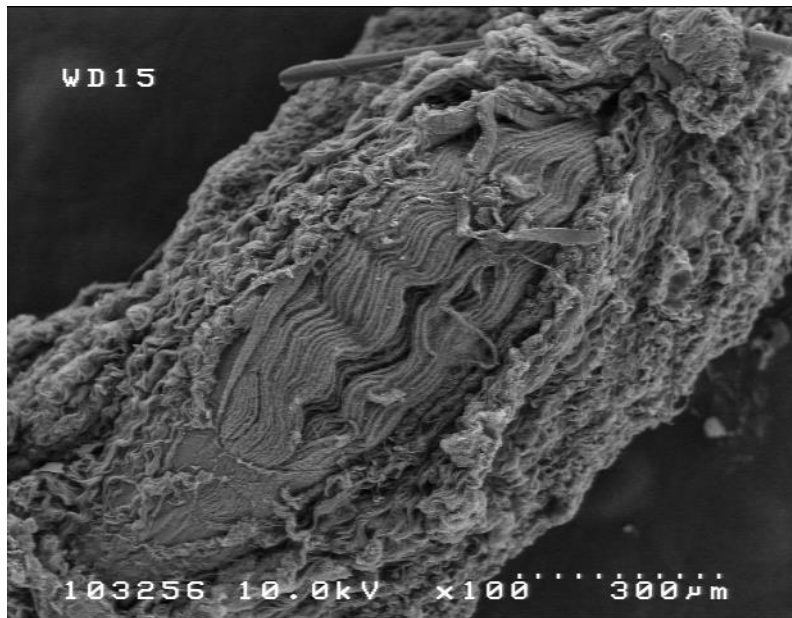


図3 perineural window (window から軸索が確認できる)

図2, 3に示したように、顕微鏡下での手技で今回の実験に必須の手技であるperineural windowの作成が可能であることを確認した。

2. 軸索再生の可視化の試み

次に異なる神経縫合法による軸索再生の差を比較するための評価法について検討した。評価法として候補に挙げたのは当教室で以前より行っている逆行性神経トレーサーを用いた顔面神経核における神経細胞の蛍光観察法⁷と神経軸索のトルイジンブルー染色法による観察であった。さらにこれとは別に、神経縫合部での軸索再生後の軸索構造について蛍光観察する方法を模索した。

脂溶性カルボシアニン色素 (DiI, DiO) による軸索観察

DiI やその誘導体などのカルボシアニン色素は細胞の生存性に顕著な影響を与ることなく細胞膜を標識し、長期研究に使用することができる。これらの色素は細胞膜における側方拡散により広がるという特徴があるため、しっかりと固定された標本であれば拡散能は落ちるが生体組織でなくても軸索を染めることができるという特徴を持つ⁸。Supercharge 型の端側神経縫合において、donor 側から recipient 側への軸索の流入を可視化するため、端側神経縫合部の組織を採取し Hayashi らの方法⁸に準じて脂溶性カルボシアニン色素を用いて軸索の染色を試みた。

9週齢のラットの右顔面神経の頬枝の側面に perineural window を作成し、そこへ切断した下顎縁枝の中枢端を端側神経縫合するモデルを作成（図 4）し、4週間後に図 4 のように緑の四角で囲った部位を検体として採取，4%ホルムアルデヒドで固定（over night）した後に頬枝中枢断端 DiI（Molecular Probes, Leiden, The Netherlands），下顎縁枝の断端に DiO（Molecular Probes, Leiden, The Netherlands）の結晶を接触させた状態として乾燥しないよう生食ガーゼで包んだ状態で 37℃，4 週間インキュベートした。

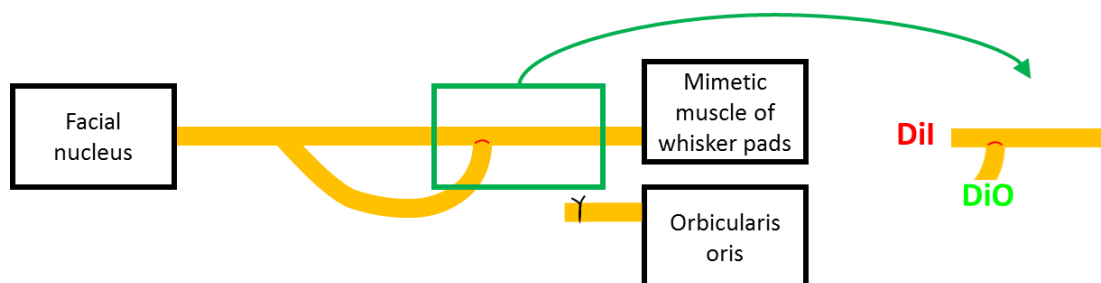


図 4 端側神経縫合の縫合部位観察のため作成したモデル

上記標本を蛍光顕微鏡（KEYENCE BIOREVO BZ-9000）で観察した（図 5）。

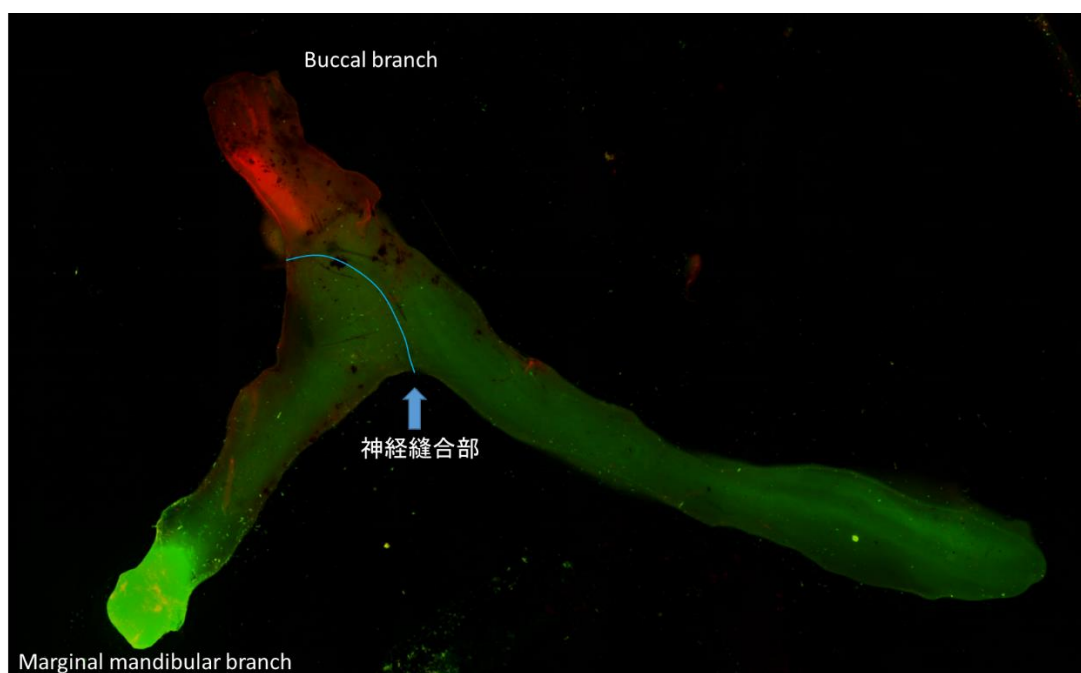


図 5 顔面神経頬枝と下顎縁枝の端側神経縫合部を DiI，DiO を用いて二重染色した標本の whole mount での観察像

結果は端側神経縫合部において, donor としての下顎縁枝神経断端から neural window を介して軸索が recipient としての頬枝へ神経軸索が侵入している所見が観察できた。これは我々が提唱してきた supercharge 現象と考えられた。しかし, 現象の確認はできたものの, 評価法としての定量性を備えた観察法とは言えないことや, 軸索の染まり具合が同一手法で行っても結果にばらつきがあるため本実験の評価法として用いることは断念した。

<<予備実験結果まとめ>>

●我々の行う手術操作において, 比較対象となる実験モデル作成に必須の perineural window を作成することができることを確認した。

●神経縫合の違いによる軸索再生効果の定量評価として順行性にカルボシアニン色素を用いた観察法を試みたが, 実用には至らなかった。よって, 過去 Shichinohe⁷ らの手順にならない逆行性にカルボシアニン色素を用いた評価法を用いることとした。

上記の結果を踏まえて以下のように実験を計画した。

<実験グループ>

ラットを 4 つのグループに分け, それぞれのグループは顔面神経下顎縁枝を切断・結紮し頬枝の中枢側を絞扼した不全麻痺の状態とした。これらのグループのうち, 神経再建を行わないグループを control 群 (group A, n = 6), 切断した下顎縁枝の中枢側断端を頬枝の絞扼部より末梢に長径 1.5 mm の perineural window を作成し端側神経縫合を行ったグループを end-to-side (1.5 mm window) 群 (group B, n = 6), 切断した下顎縁枝の中枢側側面と頬枝側面に長径 5 mm の perineural window を作成し側側神経縫合を行った side-to-side (5 mm window) 群 (group C, n = 6), 切断した下顎縁枝の中枢側側面と頬枝側面に長径 1.5 mm の perineural window を作成し側側神経縫合を行ったグループを side-to-side (1.5 mm window) 群 (group D, n = 6) とした (図 6)。

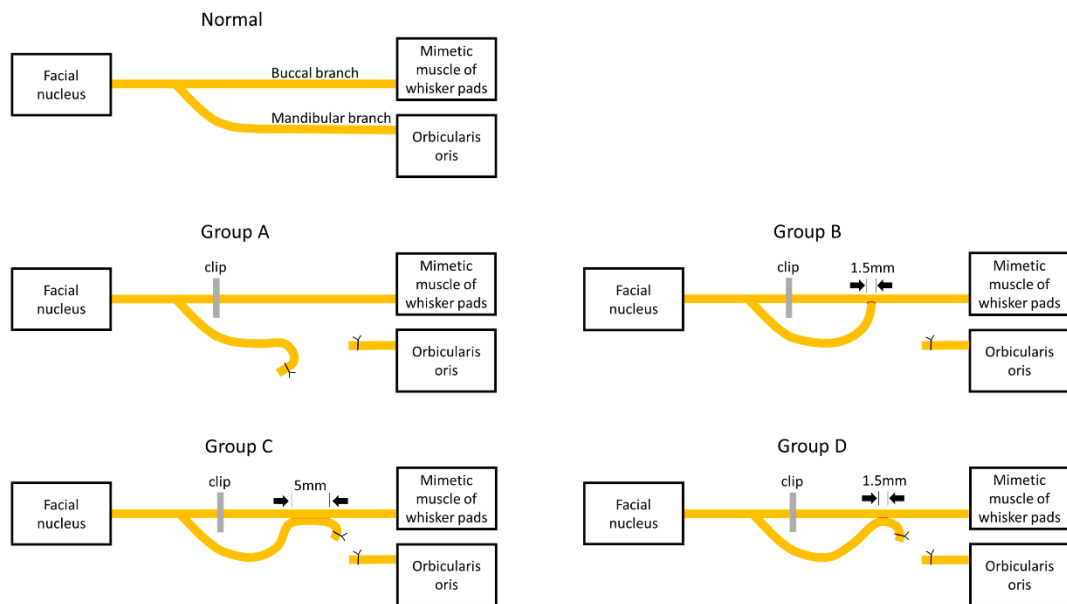


図 6 4つの実験グループ

<手術方法>

手術はすべて手術用顕微鏡下でラット右側の顔面神経に対し行った。ペントバルビタール (50mg/kg) を腹腔内投与し深麻酔を行い、ラット右頬部に皮切を加え顔面神経頬枝と下顎縁枝を露出させた (図 7)。頬枝の中枢側を Sichinohe らの方法⁷に習いリガクリップを用いて持続的な圧迫状態を作り不全麻痺状態とし、ついで下顎縁枝を耳下腺前縁から 10mm の部位で切断、その末梢端を 6-0 ナイロンで結紮した。Group A ではこの状態で神経再建を行わず、これを不全麻痺モデルの非再建群として control 群とした。Group B では下顎縁枝の中枢端をナイロンで結紮せずに、頬枝の側面に作成した長径 1.5mm の perineural window へ 10-0 ナイロンを用いて端側神経縫合した。Group C では下顎縁枝の中枢端を 6-0 ナイロンで結紮しその側面と頬枝の側面に長径 5mm の perineural window (図 8) を作成、その window を介し 10-0 ナイロンを用いて側側神経縫合を行った。Group D では Group C と同様に、下顎縁枝の中枢端を 6-0 ナイロンで結紮し

たうえて、その側面と頬枝の側面に長径 1.5mm の perineural window (図 9) を作成、その window を介して 10-0 ナイロンで側側神経縫合を行った。

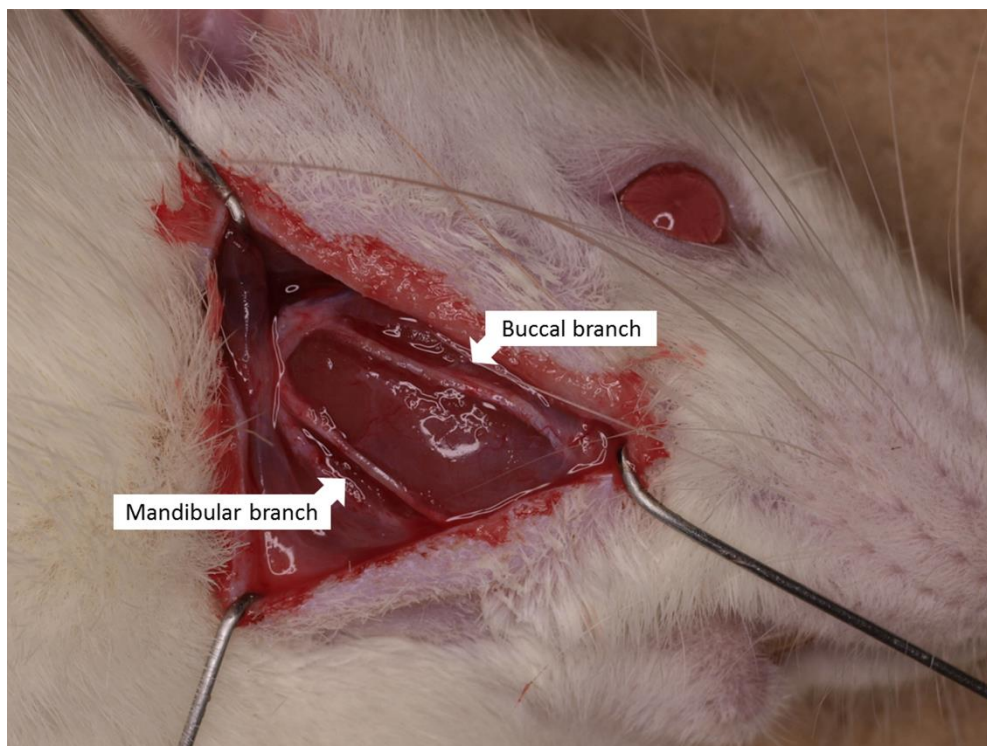


図 7 ラット顔面神経頬枝と下顎縁枝

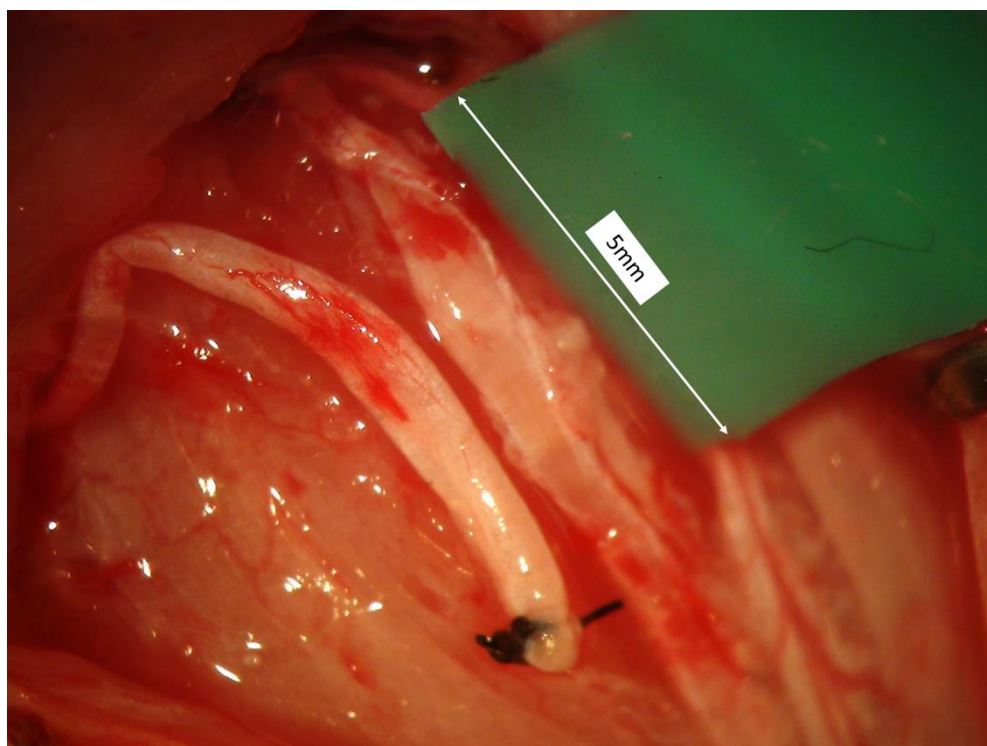


図 8 5mm perineural window (Group C)

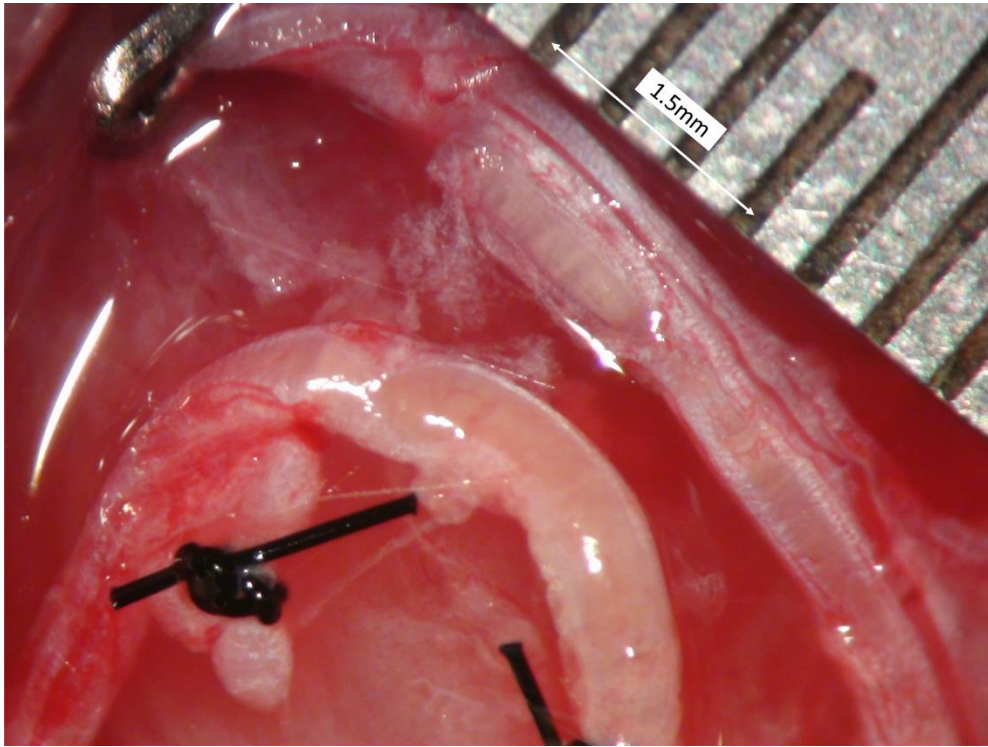


図9 1.5mm perineural window (Group D)

<評価方法>

1. ラット顔面神経麻痺表情筋スコア

我々の実験に先立ち，Shichinohe らによるラットによる顔面神経麻痺モデルを用いた報告に使用された方法⁷を今回のモデルにより適合するよう改変し使用した（表1）。それぞれの判定法の判断基準を図で示す（図10，11）

table		Score for rat facial palsy in this study	
Symmetry of the nose at rest	0	Asymmetrical position judging from mid-spinal line	
	1	Mostly normal	
Motion of vibrissae	0	No motion	
	1	Minor trembling	
	2	Effective movement in range posterior to the line perpendicular to mid-spinal line	
	3	Effective movement anterior above the line perpendicular to mid-spinal line	

表1 The score for rat facial palsy in this study. 文献7より改変して使用

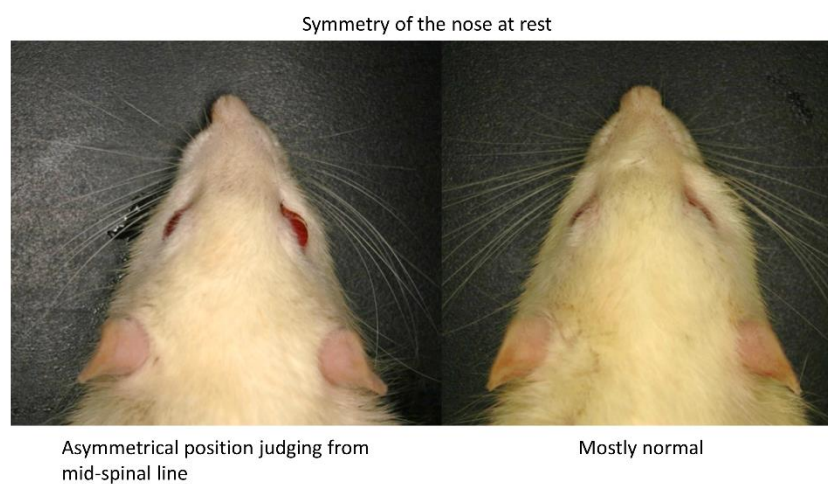


図10 Symmetry of the nose at rest

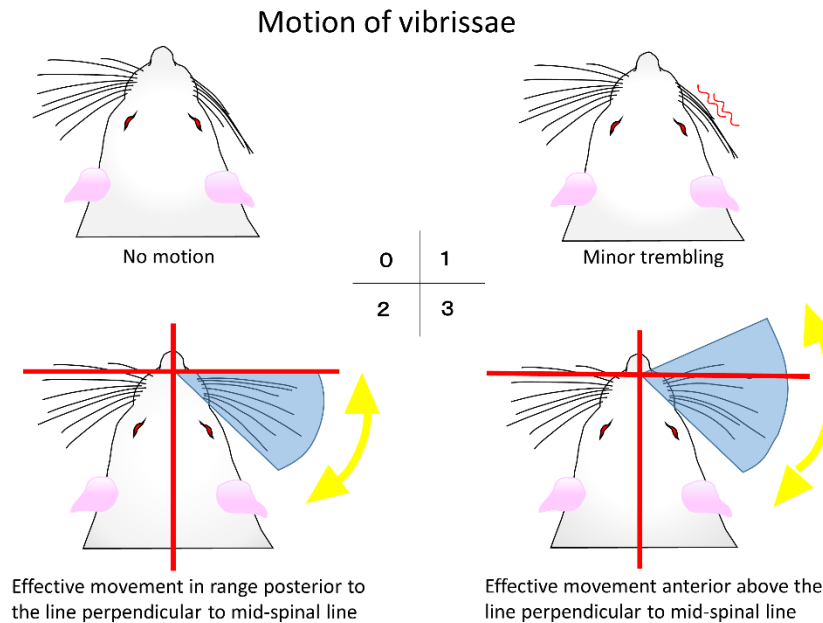


図 11 Motion of vibrissae

上記の判断基準により安静時の鼻の傾きを 2 段階（0 点，1 点），髭の動きを 4 段階（0 点～3 点）に点数化した。評価は術後から 1 週毎に行い 12 週間の観察を行った。

2. Neural tracer study

・標本準備

逆行性神経トレーサーとしてカルボシアニン系色素である DiI (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) を用いて蛍光染色された神経細胞体数を顔面神経核において計測した。前述の方法で手術を行った 12 週間後に各 group のラットをジエチルエーテル吸入により鎮静させ，右側 whisker pads（ラット頬部の髭の生えている範囲）中央部皮下に 1%DiI (in DMSO) 100 μ l を注入する。1 週間の生存期間の後，後述の方法で灌流固定を行い，脳幹を採取した。

採取した脳幹は 4%パラホルムアルデヒド (0.1M PB) に一晩浸漬した後，30%スクロースへ 3～5 日間浸漬し溶液に脳幹が沈んだ状態になってから cryotome (ZEISS HN500 Zeiss, Göttingen, Germany) を用いて 50 μ m 厚で切片を切り出した。切り出した切片の 3 枚に 1 枚を蛍光顕微鏡 (KEYENCE BIOREVO BZ-9000, Tokyo,

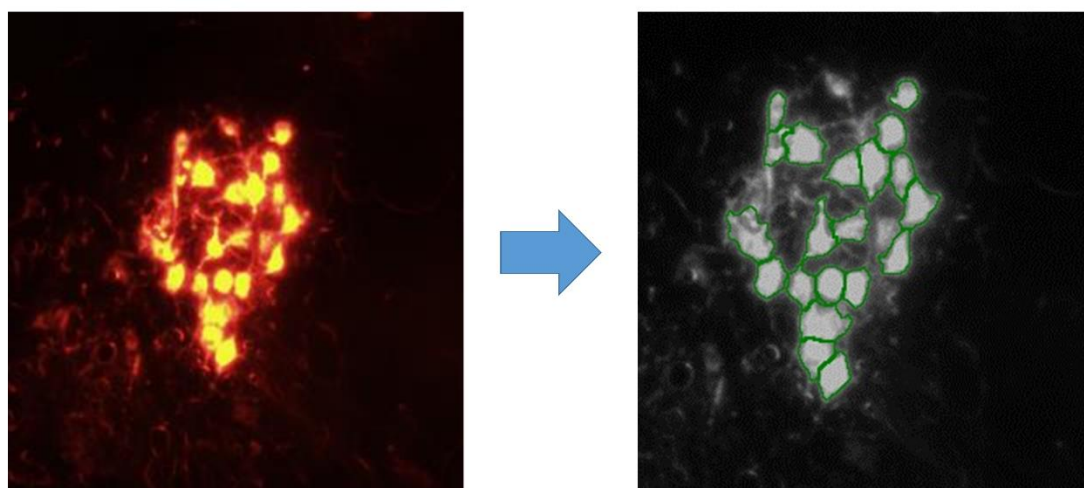
Japan)で TRITC filter (KEYENCE BIOREVO OP66837 BZ filter)を用いて観察・画像撮影した。

・灌流固定法

ラット腹腔内にペントバルビタール (75 mg/kg) を注入，開胸し左心室から 0.9% NaCl 溶液で灌流を行った後に 4%パラホルムアルデヒド (0.1M PB) で 20 分間灌流し固定した。

・標本の計測

撮影した蛍光観察画像を画像解析ソフト (Tissue Quest (TissueGnostics, Wien, Austria)を用いて神経細胞体の個数を計測した (図 12)。



8 bit変換し画像条件を整えソフトのアルゴリズムで自動計測

図 12 顔面神経核での神経細胞数の計測

3. 組織形態学的評価

・標本準備

逆行性神経トレーサーを注入した各 group のラットの脳幹採取時の灌流固定前に，ジエチルエーテル麻酔下で右顔面神経頰枝の神経縫合部から 3mm 末梢部を採取。採取した頰枝は 2.5%グルタルアルデヒド (0.1 M PB) で一晩以上浸漬固

定した後に 1% オスミウム (0.1 M PB) で後固定を行った。さらにアセトンを用いて段階的に脱水し、エポン包埋を行った。エポン包埋された頬枝から、超薄切片作成装置 (EM-UC7, Leica, Germany) を用いて 1 μm 厚の切片を切り出しトルイジンブルー染色し、顕微鏡 (KEYENCE BIOREVO BZ-9000, Tokyo, Japan) で観察、デジタル画像を撮影した (図 13 a, b, c, d, e)。

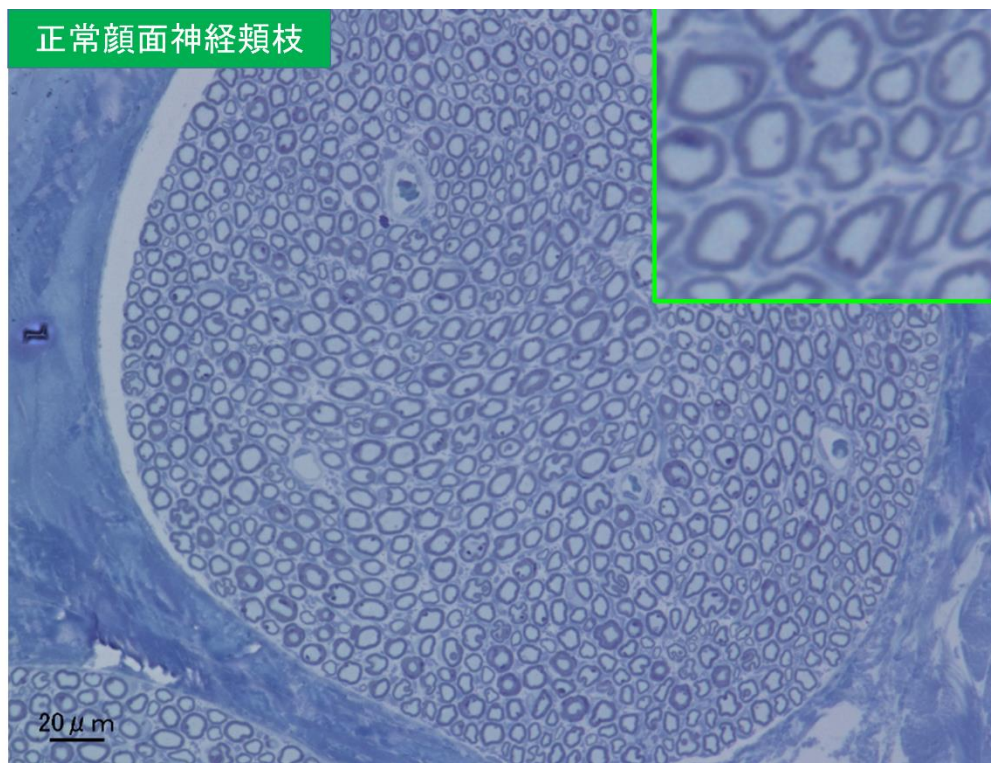


図 13 a 正常顔面神経頬枝のトルイジンブルー染色像

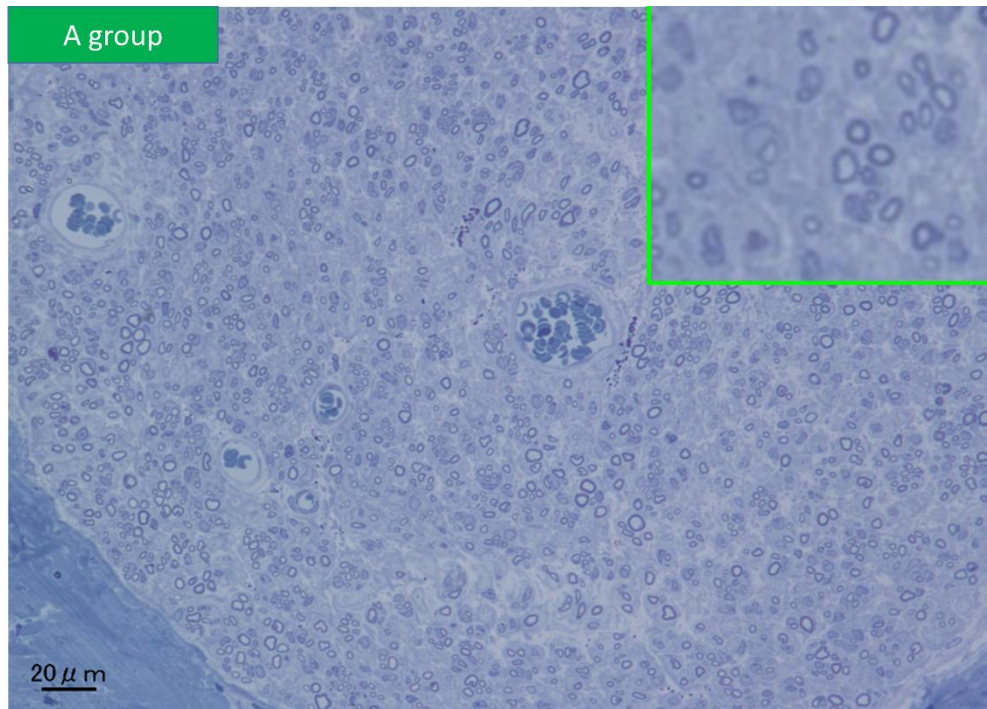


図 13 b group A の顔面神経頬枝のトルイジンブルー染色像

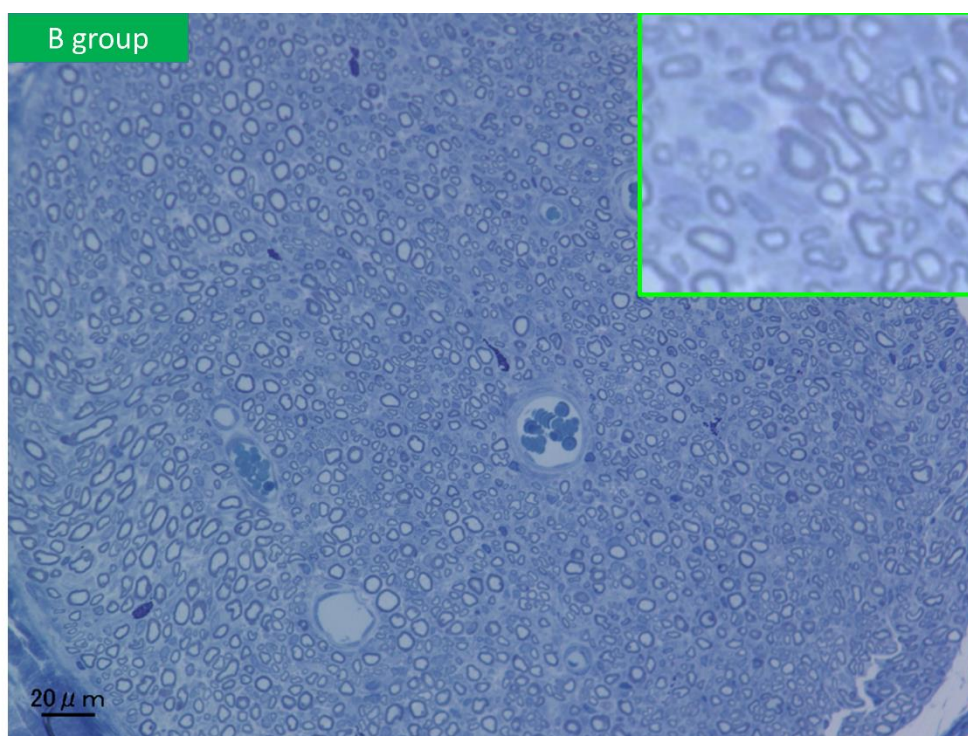


図 13 c group B の顔面神経頬枝のトルイジンブルー染色像

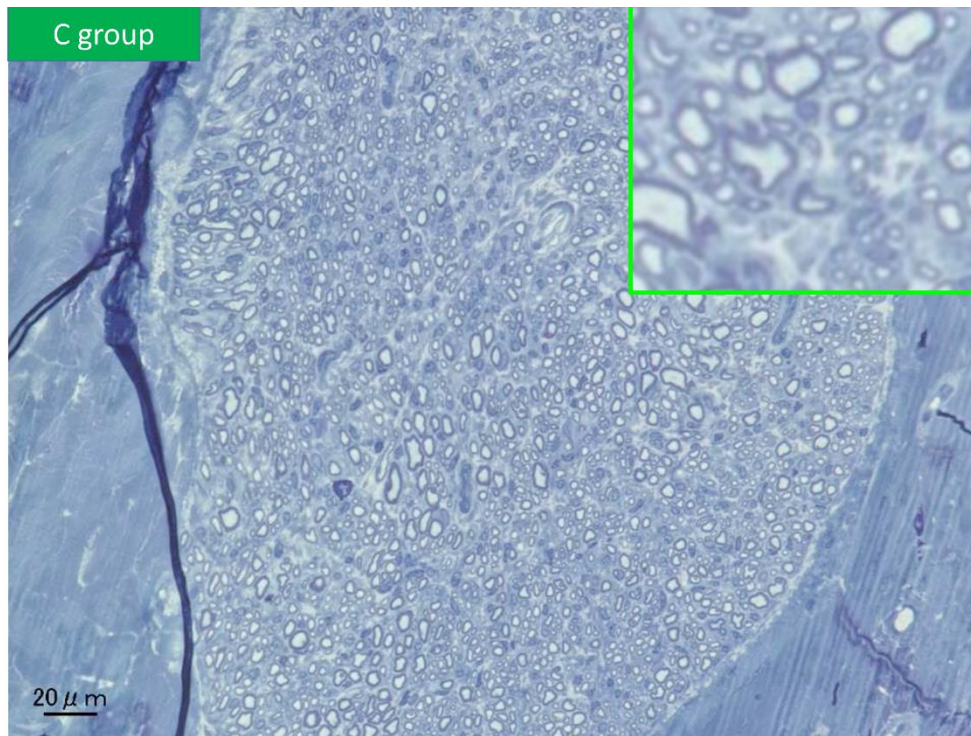


図 13 d group C の顔面神経頬枝のトルイジンブルー染色像

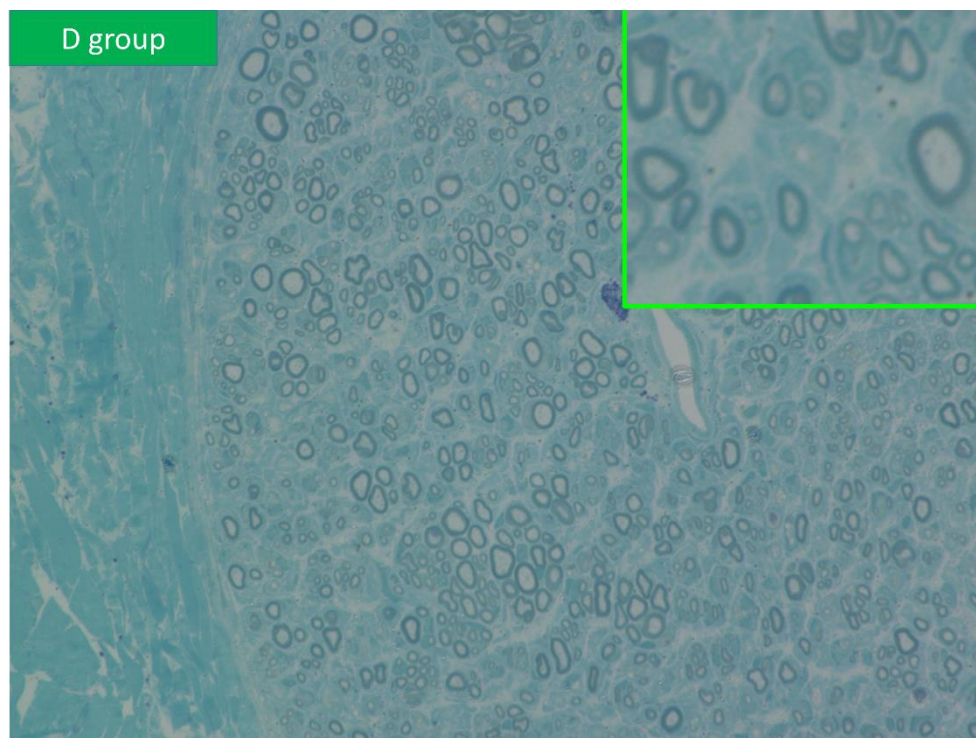


図 13 e group D の顔面神経頬枝のトルイジンブルー染色像

・標本の計測

過去の神経軸索再生についての報告を見てみると、軸索の回復具合を有髄軸索の数で評価している報告が多い^{6,9,10}が、そのカウント法について詳細に示しているものは少ない。Hunter ら¹¹は独自のアルゴリズムを用いた画像解析ソフトを用いた有髄軸索のカウント法を報告しているが、一般に普及しているものではなく我々の実験では用いることができなかった。本学で利用できる画像解析ソフト (Tissue Quest (TissueGnostics, Wien, Austria) や MetaMorph (Molecular Device, USA) では正常の軸索断面のトルイジンブルー染色標本であれば自動カウントが可能であったが、本実験では軸索変性後の再生軸索を評価しなければならないということもあり、実際の標本を同ソフトで解析してみても有髄軸索以外の組織のデブリスや核を有する細胞までカウントしてしまうという結果であった。そこで解析ソフトによる自動カウントは行わず、標本の拡大画像を画像解析ソフト image J とペンタブレット端末モニターを用いて有髄軸索の周囲をタッチペンでなぞりながら軸索カウントすることとした (図 14)。この方法では実線で囲まれた範囲をソフトにより最適楕円に変換することにより、長軸と短軸の径を計算することができるため、この疑似楕円の短軸長を軸索の直径の近似値として規定した。

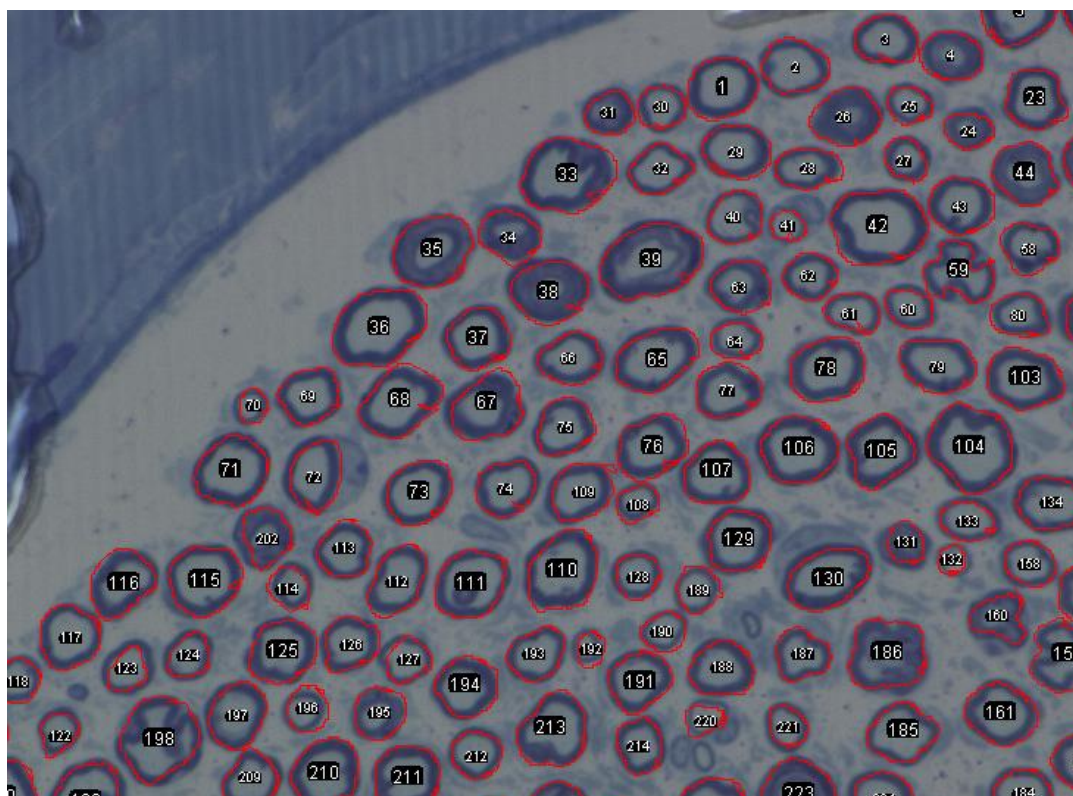


図 14 拡大した神経断面画像の有髄軸索をタッチペンも用いてカウント

この方法の問題点としては、ソフトを用いた自動カウントと比較し客観性や再現性に劣るということがあげられる。しかし現実実験環境において可能な方法のなかでは最良の手段と考え本方法で有髄軸索のカウントを行うこととした。

4. 表情筋の病理組織学的観察

各 group ラットの灌流固定後に右側 whiskar pads 部の組織を表情筋のサンプルとして採取し Masson' s trichrome 染色を行い観察した。

標本は whiskar pads の中央を通り、体軸に直行する方向で切片を作成して観察した。

5. 統計学的解析

それぞれのデータに対し、Tukey-Kramer multiple comparison test を用いて比較した (Excel 2013 (Microsoft, Redmond, WA, USA) を使用)。

実験結果

1. ラット顔面神経麻痺表情筋スコア

group A は処置後 1 週間の時点でやや回復したものの、その後はほぼ横ばいのスコアであり、12 週目では 1.33 ± 0.21 (mean $\pm$ SE) であった。すべてのラットで鼻は健側へ曲がっており、髭の動きも高度に制限されていた。group B と group C は観察期間前半において著明なスコアの上昇を認め、後半はほぼプラトーに達した。12 週間後のスコアはそれぞれ group B 2.83 ± 0.31 , group C 3.5 ± 0.34 であった。group D の回復経過は group B, C と比較し緩徐であったが 12 週目には 2.67 ± 0.21 となった。12 週目での各 group のスコアを比較すると group B と C は有意差をもって group A より高かった ($p < 0.01$)。11 週目では group B は有意差をもって group D より高かった ($p < 0.05$)。4, 5, 6, 11 週目では group C は有意差をもって group D より高かった ($p < 0.01$ (5 週目), $p < 0.05$ (4, 6, 11 週目)) (図 15)。

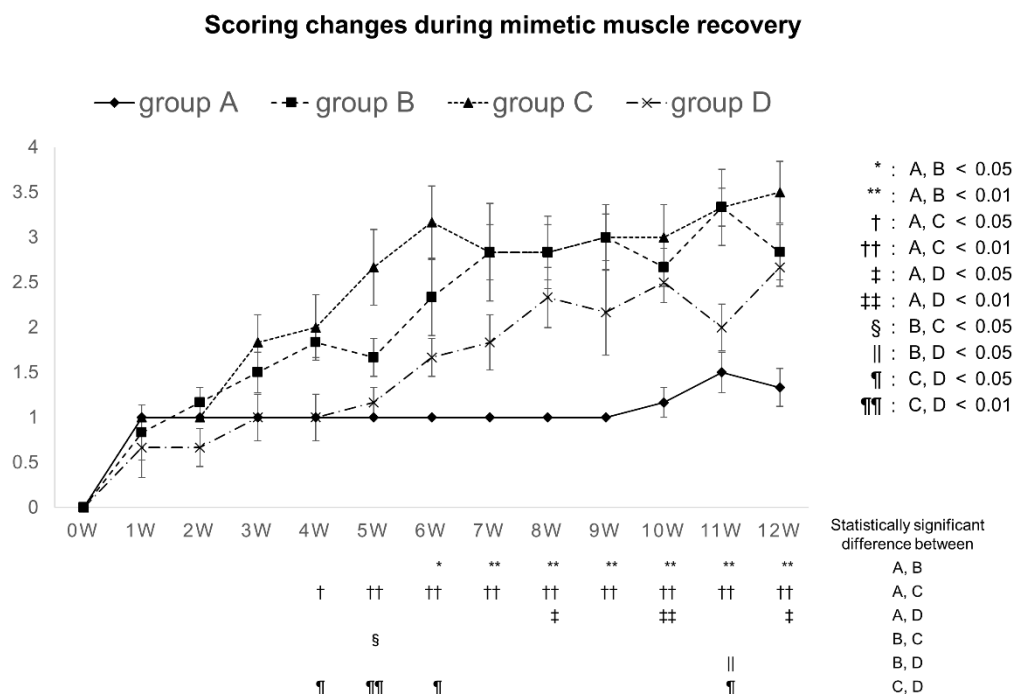


図 15 ラット顔面神経麻痺表情筋スコアの変化 (12 週間)

2. Neural tracer study

顔面神経核における蛍光色素で染色された神経細胞数は, group A が 52.5 ± 8.48 (mean $\pm$ SE), group B が 142.0 ± 2.27 , group C が 146.5 ± 9.48 , group D が 98.2 ± 6.60 であった (表 2, 図 16)。

group B, C, D はいずれも有意差をもって group A より多かった ($p < 0.01$)。また, group B, C は有意差をもって group D より多かった ($p < 0.01$)。group D は有意差をもって group A より多かった ($p < 0.01$)。group B と group C には有意差を認めなかった。

Table Number of labelled neurons in the facial nucleus

group A	52.5 ± 8.5^b
group B	$142 \pm 2.3^{a, b}$
group C	$138.8 \pm 9.9^{a, b}$
group D	98.2 ± 6.6^a

Data shown are mean $\pm$ SE

^a Significantly different from group A ($p < 0.01$)

^b Significantly different from group D ($p < 0.01$)

表 2 顔面神経核における標識された神経細胞数

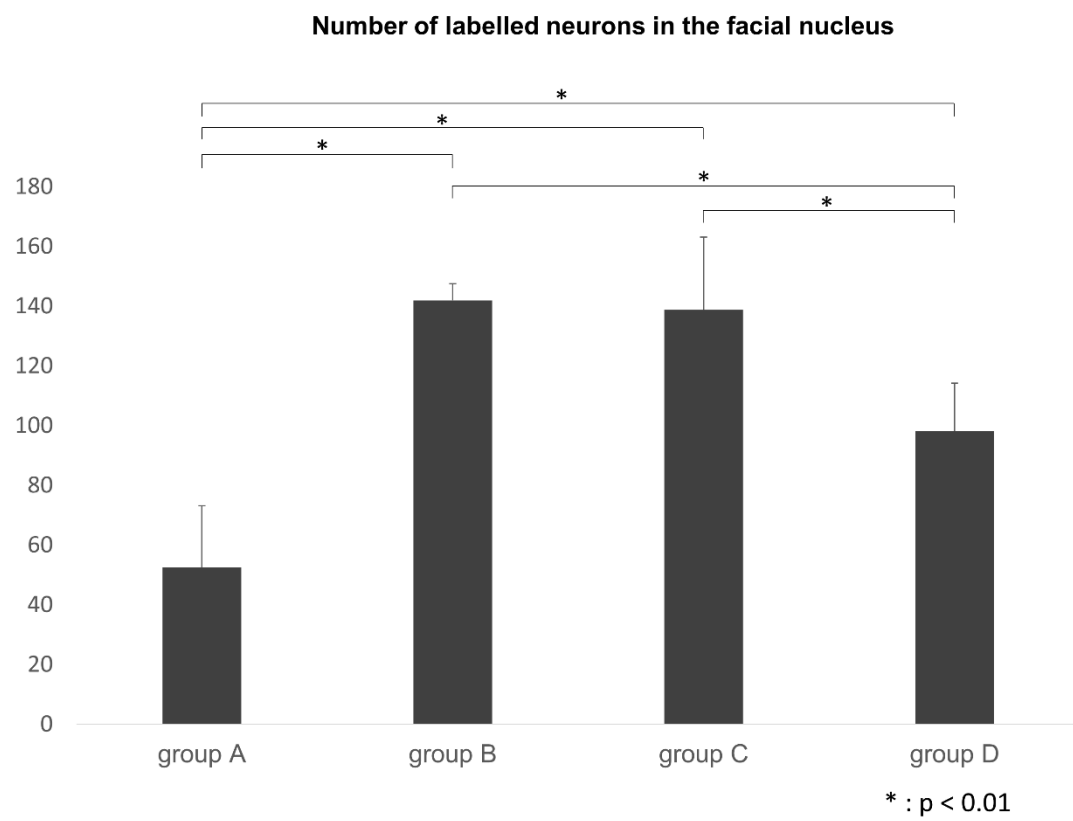


図 16 ラット顔面神経核における DiI で標識された神経細胞数

3. 組織形態学的評価による軸索数

自験例のデータによると、通常のラット顔面神経頰枝の平均軸索径は $6.15 \pm 0.019 \mu\text{m}$ ($n = 6$; mean $\pm$ SE) であり、軸索径別の軸索数のヒストグラムは正規分布を示した (図 17)。

正常ラット顔面神経頰枝と各 group の総有髄軸索数は正常群が 1090 ± 28.9 , (mean $\pm$ SE), group A が 830 ± 214 , group B が 3101 ± 249 , group C が 2807 ± 371.2 , group D が 2712 ± 143.5 であった。

手術操作を加えた group A, B, C, D についてはいずれも軸索径別の軸索数のヒストグラムは中央値が左へ、つまり軸索径が小さい方へ偏移しており全体的に軸索径が小さくなっていた。しかし総数としては正常のものより多くなっていた。そこで軸索数のカウントの方法を変更し、正常ラット顔面神経頰枝から割り出した軸索径の 95%信頼区間 ($3.11 - 9.59 \mu\text{m}$, 図 17 の網掛け部) にあたる軸索のみを有意な軸索と規定しカウントすることにより各群を比較することとした (図 18, 19)。

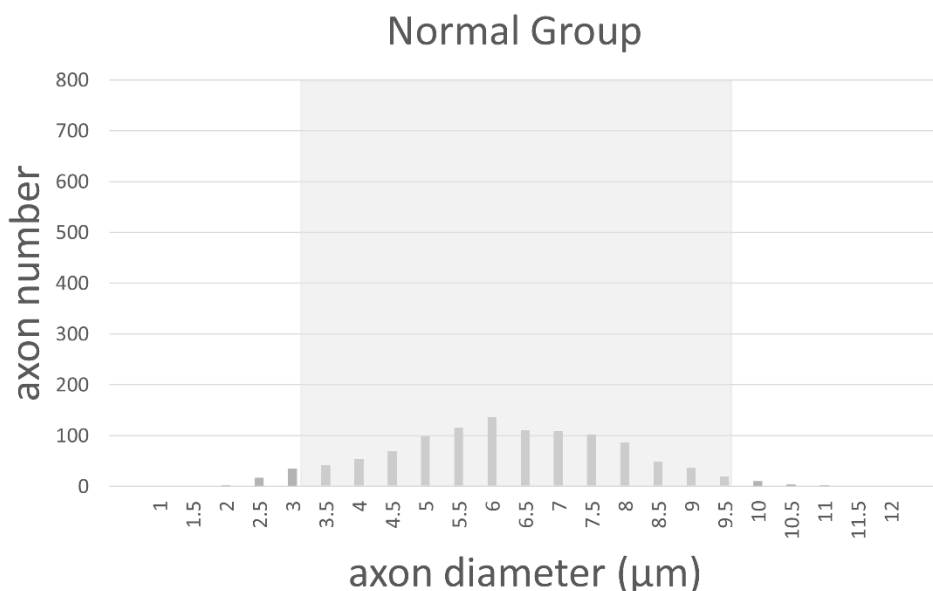


図 17 ラット正常顔面神経頰枝の軸索径別軸索数

●正常類枝軸索径 95%信頼区間 (3.11 - 9.59 μm) での軸索数

正常群 1050 ± 31.0 , group Aが 91.3 ± 42.6 , group Bが 866 ± 107.0 , group Cが 803.7 ± 161.8 , group Dが 658.1 ± 96.6 であった。

group B, C, D いずれも有意差をもって group A より軸索数は多かった ($p < 0.01$)。Group B, C, Dの間では group Dが少ない傾向はみられたがいずれの間にも有意差は認めなかった。

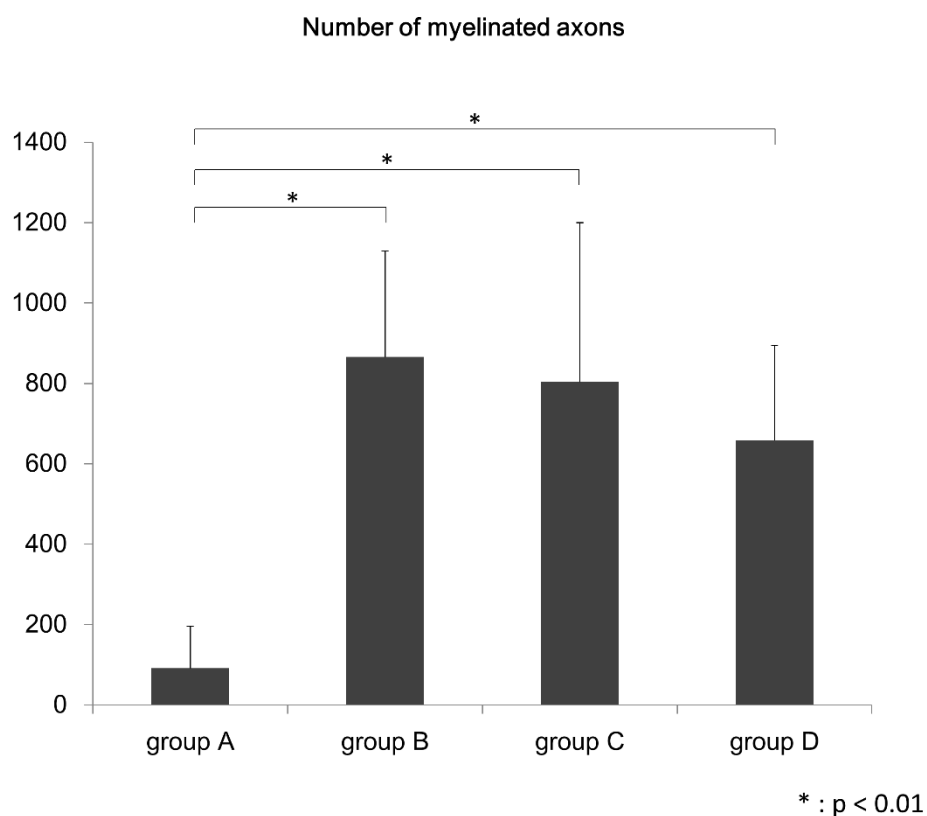


図 18 group A, B, C, D の軸索数

Histograms of the number of myelinated axons Example of each group

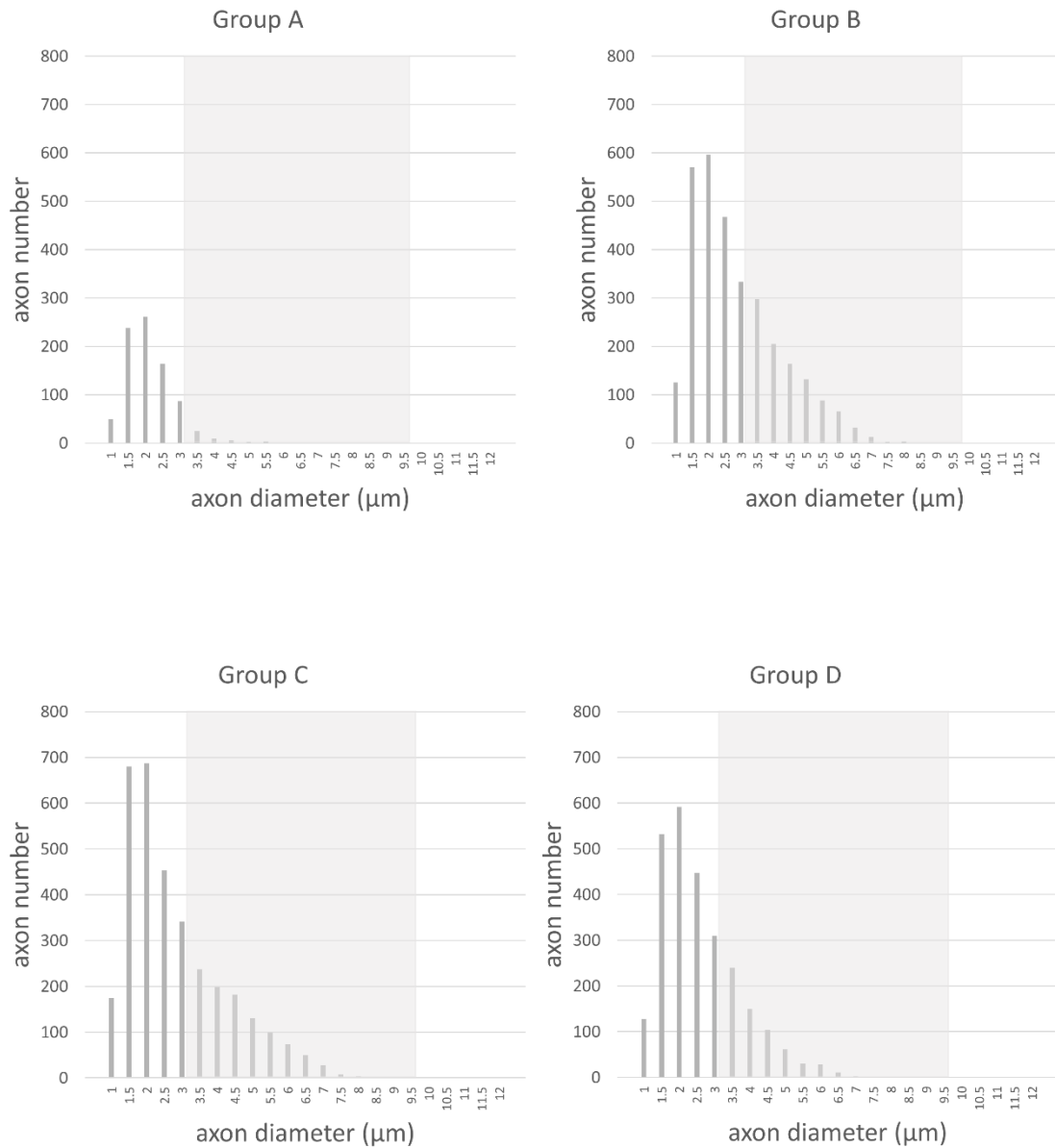


図 19 group A, B, C, D の軸索径別軸索数のヒストグラム

4. 表情筋の病理組織学的観察

各 group の whiskar pads 中央部の Masson' s trichrome 染色像を示す。正常にくらべてすべての group で筋線維の減少とコラーゲン線維の増加を認めた。特に group A ではほとんど筋線維が消失しており、相対的に腺組織が広い範囲を占めていた。本研究では筋線維の定量化は行っていないため統計的な比較はできないが、各 group, 各標本を通じて group B, C, D は group A と比較し筋線維の減少が少ない印象であった。また group B, C と比較し group D は筋線維の量が少ない印象であった (図 20 a, b, c, d, e)。

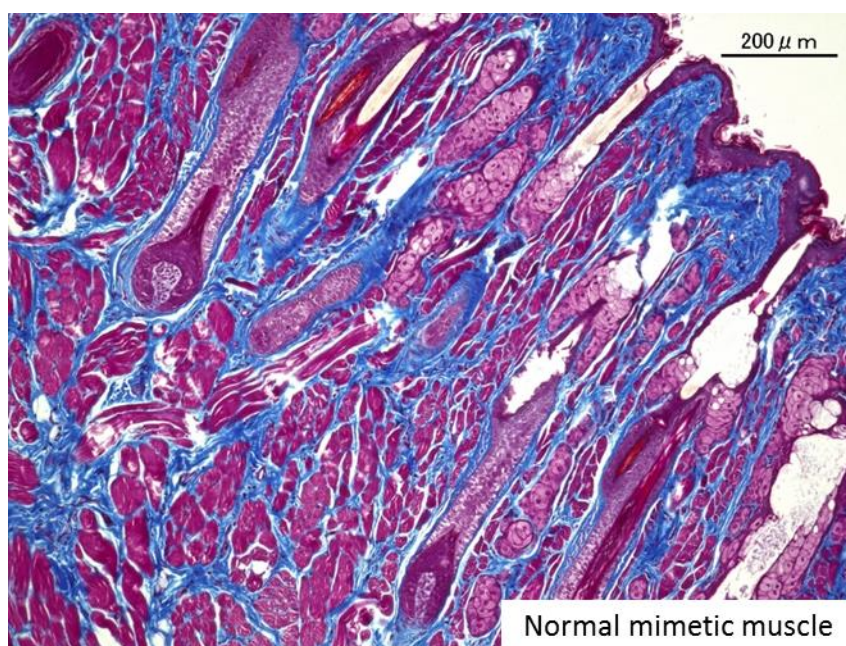


図 20 a 正常ラットの whiskar pads 部

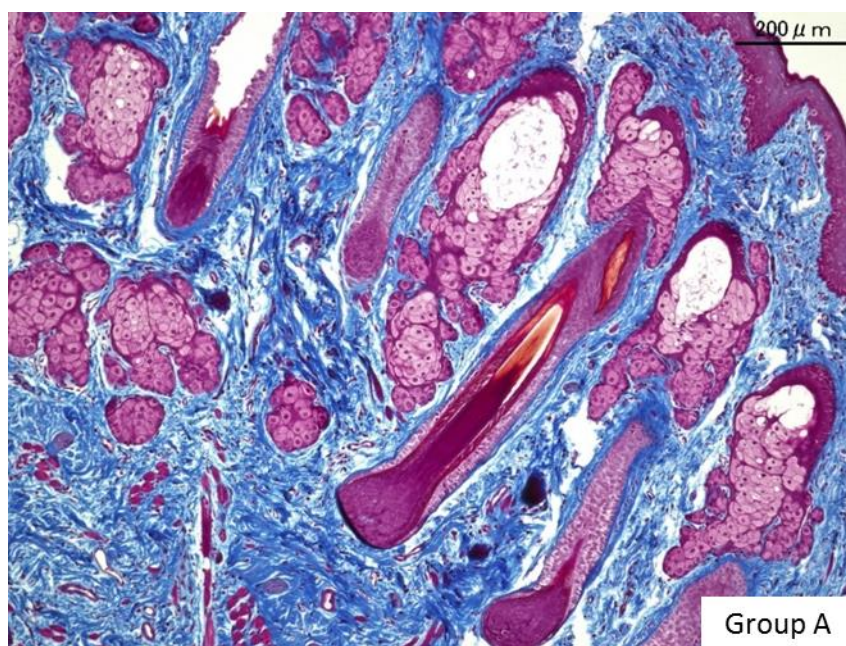


図 20 b group A の whisker pads 部

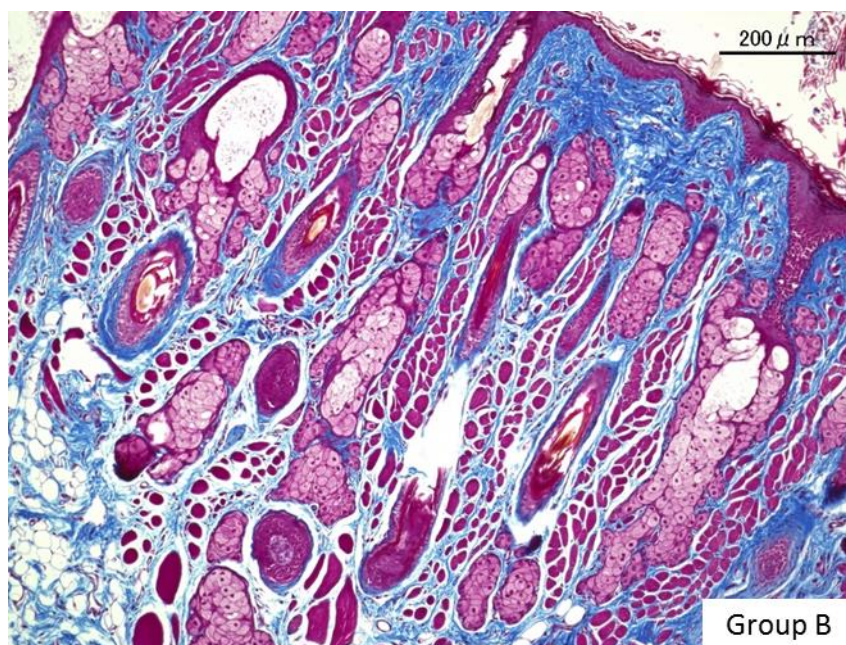


図 20 c group B の whisker pads 部

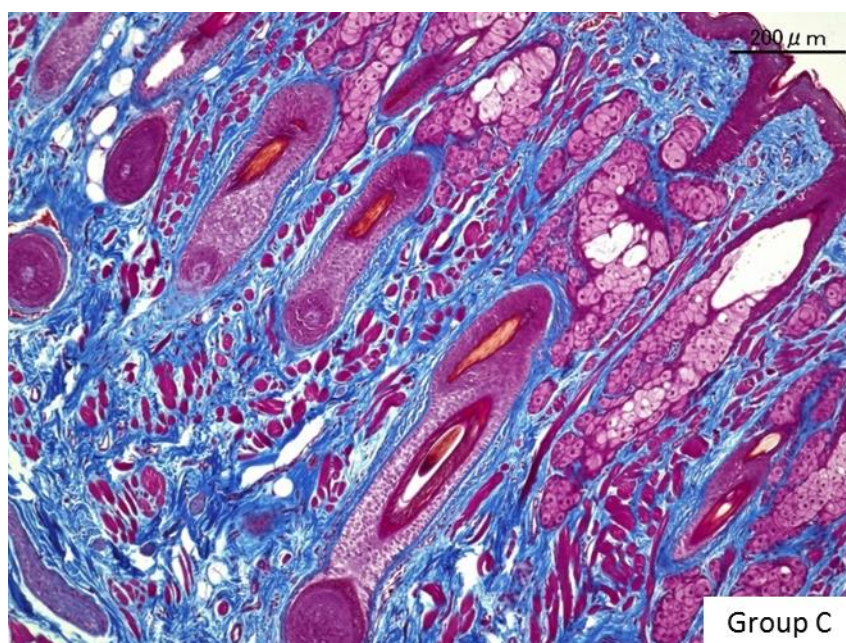


図 20 d group C の whisker pads 部

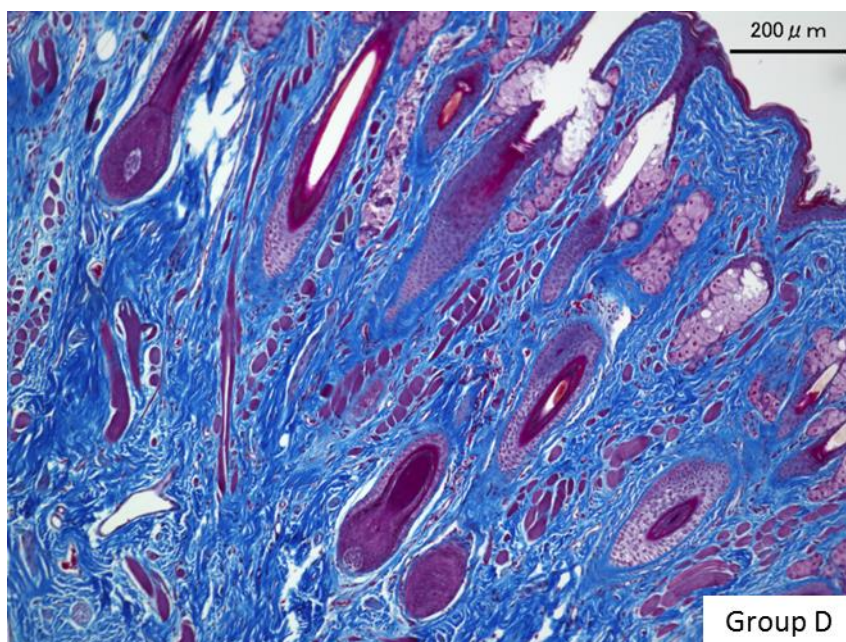


図 20 e group D の whisker pads 部

考察

我々は顔面神経不全麻痺に対して、neural supercharge というコンセプトのもとに臨床として⁴も基礎的に^{7,12}も過去に報告してきた。このコンセプトは力源となる神経から不全麻痺となっている神経へ神経シグナルを付加するというものである。このコンセプトの技術的なポイントは端側神経縫合であるが、過去の報告と異なる点は、力源となる神経ではなく神経シグナルを付加する側の神経側面に神経縫合部となる neural window を作成するところにある。先に述べたが我々はすでに臨床に用いている手段ではあるが、その長期経過を見ると必ずしも十分な効果をえられたとは言えない症例も散見される。そこで neural supercharge をより効果的にするための要素として、神経縫合部の条件に着目した。これまでの他の報告において、神経端側縫合における縫合部の neural window の作成法、つまり神経外膜のみを除去する epineural window, 神経周膜まで除去する perineural window, window を作成しないものの比較はされているが^{6,9,13,14}, その影響についての主張はそれぞれ異なっており一定の見解を得られていない。その原因としては手術手技の技術的な問題や評価法の問題などさまざまであると思われる。今回我々は、過去の報告とは視点を変えて neural window の大きさ、つまり神経縫合部の大きさの比較により軸索再生効果への影響を確認し、臨床に応用することができないかと考えたものである。

【neural window 作成についての技術的な裏付けについて】

最初にすべきこととして、過去の報告に述べられている epineural window, perineural window が技術的に安定して作成できているかという疑問の解消であった。顕微鏡下での手技ではあるが、1mm に満たないラット顔面神経頬枝の側面に、比較的構造的にしっかりしているとはいえ非常に薄い構造である神経周膜⁵に window をあけられるかどうか、その操作で神経軸索に大きな損傷を与えないだろうかという疑問があり、これを確認するために SEM を用いて確認することとした。結果は、我々の手技で perineural window を作成することができていることが確認できた。また SEM の観測において window 部から観察される軸索はある程度の物理的損傷を受けていることも確認され、残念ながら軸索への侵襲をゼロにすることはできないことも分かった。しかし複数の標本作製してみた結果各々わずかな軸索の損傷はあるものの形態的な状態としては各標本同等レベルであったため本実験における手技として妥当と判断した。

【評価法の妥当性と問題点】

本実験では神経縫合部の条件を分けて神経再建後のラット顔面神経麻痺の回復を比較したわけであるが、その評価法として①facial palsy score, ②neural tracer study, ③histomorphometric evaluation の3つの方法を用いた。いずれも過去に報告のある評価法であるが、本実験での優位点は3種類すべてを用いることによってそれぞれの評価法の相関性も確認することができた点である。また、①については最終的な回復結果だけでなく観察期間中の回復スピードについてもその傾向を捉えることができたというのも大きなメリットであったと考えている。②と③の結果を照らし合わせることで、tracer study は効果器から神経細胞までの連続性をもって軸索再生の結果がわかるというメリットがあるもののすべての軸索、神経細胞を観察しきれていないわけではないデメリットがあることや、histomorphometric evaluation における軸索観察では、単に軸索数が多ければ良いというわけではなく、ある程度の径をもつ軸索でなければ機能的に有意なものとしてはみなせないであろうということ、つまり神経束内には効果器（本実験では表情筋）まで到達していない軸索も多く存在しているであろうことが示唆された。この未成熟な軸索の剪定については過去の報告^{15, 16}でも述べられているが、それを裏付けた結果となった。

次にこれらの評価法の改善すべき点と限界についてであるが、①については判断の基準を明確にしたとはいえ、観察から主観を完全に取り除くことができないということがあげられる。これについての改善点としてはラットの頭位の固定法の検討と、定点カメラと動画解析ソフトを用いた方法の検討などがあり、それらについての報告もあるが¹⁷⁻¹⁹、現状の我々の研究環境では行うことができず、今後なんらかの代替法を検討していきたいところである。②については比較的広く使用されている方法ではあるが、問題点の一つは色素注入時に局所で色素が均等に組織内に拡散されるかということである。つまり用手的に筋創内に注入しているかぎり、色素の浸潤のばらつきは出てくるであろうということである。幸い本実験において各 group 内の個体では大きな外れ値となるようなデータは認めなかったが、この問題を解決するには実験個体数を増やすということが必要であると考ええる。③については当初は客観性を担保するため②の観察時に使用した画像解析ソフトや他のソフトを用いての軸索カウントを試みた。結果としては正常の神経束であれば染色された有髄軸索をしっかりと認識しソフトでのカウントが可能であったが、今回の実験群ではまず donor となる神経にリガクリップをかけて軸索に損傷をあたえ不全麻痺状態としていることもあり、神経束内には12週間後にも有髄軸索以外に、その間質（神経内膜）内に多くの組織（おそらく処理途中の髄鞘などのデブリス）が存在するため既定の軸索カウ

ントソフトでは正確に計測することができなかった。このため画像解析ソフトによる自動解析は断念し、本実験でのマニュアル式のカウント法を採用した。できるだけ正確に軸索辺縁をマーキングすることは心掛けたがマニュアル操作である以上限界はあると考えている。しかし、マーキングし終えたデータについては最適楕円をプログラムの的に算出し、その短径を軸索径とすることにより計測すべき軸索の閾値を設定することにより、他のデータとの相関性を確認することができた意義は大きいと考える。

【結果について】

facial palsy score では前述したように、主観的な評価法であるためやはりそのデータのばらつきがあり漸増のグラフとはならない部分もあった。それでも観察期間を通じて回復の経過をたどる group や、早くからプラトーとなる group などその差は見て取れた。結果からは2つの大きな情報が得られたと考えており、一つはもちろん12週目の結果として側側より端側、windowは小さい方より大きい方が良い結果であったということであるが、もう一つはwindowが大きい方が、軸索回復のスピードが速かったということである。これは継時的に観測できる facial palsy score だからわかったことである。この理由については本実験では縫合部の詳細は組織観察を行っていないため推測の域を出ないが、2つ理由を考えており、一つは単純に再生軸索の通り道となる neural window が広い方が障害なくスムーズに軸索が通れるということであり、二つ目は広い window を開けることにより縫合部軸索には物理的な影響がより大きく生じるわけであり、軸索の損傷まではいかないまでも髄鞘の脱分化、schwann 細胞活性化などを生じて軸索再生に要するさまざまなサイトカインの放出が活発となった可能性があるといったことである。後者については分子生物学的手法を用いて今後解明していく必要があると考えている。

neural tracer study においては問題点でも触れたが比較的安定したデータがとれたことは良かったと考えている。各 group 間での有意差がとれたのもこの評価法であり、神経再生の研究における神経細胞と効果器までの連続性を示せることも含め非常に有用な方法であることが改めて示された。

histomorphometric evaluation については group D と group B, group D と group C 間にそれぞれ有意差はみとめられなかったものの group B, C にくらべ group D が少ない傾向はあった。この結果についてはカウントする軸索径の閾値により結果は変わってくるものであり、今回定義した正常神経束における「95%信頼区間に含まれる軸索径の範囲」そのものの妥当性を再検討する必要もあるだろう。

表情筋の masson' s trichrom 染色については今回定量化ができなかったため各 group 間の比較はできなかったという大きな問題が残る。筋肉組織量の比較についてラット腓腹筋などの筋腹のしっかりした骨格筋であればその質量をもって比較することは容易であるが、表情筋のような薄く起始・停止部が明瞭でない組織の場合は筋肉を正確に全量採取することが困難であるため質量の比較は行えない。そのため組織の切り出しかたを設定し、その病理標本写真から画像解析ソフトを用いて筋肉の占有面積を数値化することにより定量化する方法の報告²⁰もあるため、我々もそれにならって画像解析を試みた。画像からの筋組織の面積測定だけであれば問題なく定量化することはできたが、問題点として各個体から安定して比較に耐えうる切断面の切片を作成することが困難であったため本実験では参考として各 group から比較が可能な代表的な画像の参照にとどめた。定量化はできなかったため統計的な検討はできないが、前述の 3 つの評価の結果を裏付ける結果であったと考えている。

【臨床への応用と顔面神経治療への課題】

本実験により、神経縫合部の条件により神経再建後の軸索再生、さらには効果器まで含めた機能的な再生も変化することを示すことができた。このことは、実際の臨床において単純に神経縫合の精度を上げることの重要性を直接示しているとも言える。つまり、実際の臨床の現場で行うことの多い端端神経縫合であったとしても、縫合部に結合組織が挟まる、縫合糸を締めすぎるなどで実際の軸索の通過するスペースが狭くなってしまうことがあると、軸索の再生に大きな障害となってしまうということを実験的に証明したことに他ならない。つまり、端側神経縫合に限定せずすべての神経縫合において通ずる結果であると言える。

また課題としては、今回のモデルは顔面神経不全麻痺モデルに対しての治療として考案したものだが、実際の臨床における顔面神経不全麻痺の問題は、筋力低下以外に、神経の過誤支配による病的共同運動によるものも多い。neural supercharge concept は主として、不足した神経信号を付加するという手段であり過誤支配の解決の手段とは成りえない。この問題を解決するために今後望まれることは、顔面神経のより上位での軸索毎の支配領域の分画 (topography) の詳細な解明と、それを軸索レベルで治療介入できる手段の開発の発展であると考えている。

総括および結論

【本研究全体から得られた新知見】

- ①顕微鏡下での外科手技において低侵襲に perineural window を作成することができることを、SEM を用いて視覚的に確認した。
- ②supercharge 型端側神経縫合において、付加した神経から donor 神経への軸索再生を、蛍光色素を用いて確認した。
- ③端側神経縫合において、neural window が同じ大きさであれば端側のほうが、縫合面の条件が同じであれば neural window が大きい方が軸索再生の効果は良好であった。

【新知見の意義】

①端側神経縫合については neural source として神経側面に neural window を開けて縫合する報告は過去にも複数あったが、作成した window 部の構造を視覚的に確認した報告はなく、また window 作成にあたっての軸索への損傷についても考察はされてきたが実験的な証明をした報告はなかった。本実験では形態学的な面のみとはいえ SEM を用いて neural window や軸索を視覚的に観察したことは有意義であった。

②端側神経縫合部の標本を、蛍光色素を用いて軸索の走行を見ることにより、neural supercharge の概念が実際に起こりうることの証拠の一つとして提示できたことは画期的であった。ただし、まだその観察精度については改善すべき点が多く、技術の改善を検討する必要がある。

③神経縫合部の条件について、neural window の大きさについての報告はほとんどない。縫合部の軸索露出の条件を考慮したうえでの対比実験により、臨床所見および組織学的所見の複数の視点から評価できたこと、ならびにそれら所見に相関があったという結果は興味深いものと考えられる。

謝辞

研究テーマの決定から研究環境の準備を含め、本研究の全体に渡り有形無形のご協力、ご援助をいただいた北海道大学大学院医学研究科機能再生医学講座形成外科学分野・山本有平教授ならびに同教室員の皆様に深謝します。

神経標本の採取，固定法・切片作成・評価法などについてご指導，ご助言をいただいた北海道大学腫瘍病理学分野，谷野美智恵講師，加藤容崇特任助教，佐藤真実技術員，北海道大学医歯学総合研究棟中央研究部門超微細形態学分野，中村秀樹助教に深謝します。

(順不同)

引用文献

- 1 May, M., Sobol, S. M. & Mester, S. J. Hypoglossal-facial nerve interpositional-jump graft for facial reanimation without tongue atrophy. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **104**, 818-825 (1991).
- 2 Kakibuchi, M. *et al.* End-to-side nerve graft for facial nerve reconstruction. *Ann. Plast. Surg.* **53**, 496-500 (2004).
- 3 Matsuda, K. *et al.* End-to-side nerve grafts: experimental study in rats. *J. Reconstr. Microsurg.* **21**, 581-591 (2005).
- 4 Yamamoto, Y. *et al.* Surgical rehabilitation of reversible facial palsy: facial--hypoglossal network system based on neural signal augmentation/neural supercharge concept. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **60**, 223-231 (2007).
- 5 Ushiki, T. & Ide, C. Three-dimensional organization of the collagen fibrils in the rat sciatic nerve as revealed by transmission- and scanning electron microscopy. *Cell Tissue Res.* **260**, 175-184 (1990).
- 6 Noah, E. M., Williams, A., Jorgenson, C., Skoulis, T. G. & Terzis, J. K. End-to-side neurorrhaphy: a histologic and morphometric study of axonal sprouting into an end-to-side nerve graft. *J. Reconstr. Microsurg.* **13**, 99-106 (1997).
- 7 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.* **65**, 763-770 (2012).
- 8 Hayashi, A. *et al.* Collateral Sprouting Occurs following End-to-Side Neurorrhaphy. *Plast. Reconstr. Surg.* **114**, 129-137 (2004).
- 9 Akeda, K. *et al.* Regenerating axons emerge far proximal to the coaptation site in end-to-side nerve coaptation without a perineurial window using a T-shaped chamber. *Plast. Reconstr. Surg.* **117**, 1194-1203; discussion 1204-1195 (2006).
- 10 Kokkalis, Z. T., Soucacos, P. N. & Terzis, J. K. Effect of donor nerve injury distal to an end-to-side neurorrhaphy model. *J. Reconstr. Microsurg.* **25**, 295-306 (2009).

- 11 Hunter, D. A. *et al.* Binary imaging analysis for comprehensive quantitative histomorphometry of peripheral nerve. *J. Neurosci. Methods* **166**, 116–124 (2007).
- 12 Furukawa, H. *et al.* Double innervation occurs in the facial mimetic muscles after facial-hypoglossal end-to-side neural repair: rat model for neural supercharge concept. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **61**, 257–264 (2008).
- 13 Matsumoto, M. *et al.* Schwann cells can induce collateral sprouting from intact axons: experimental study of end-to-side neurorrhaphy using a Y-chamber model. *J. Reconstr. Microsurg.* **15**, 281–286 (1999).
- 14 Oyamatsu, H., Koga, D., Igarashi, M., Shibata, M. & Ushiki, T. Morphological assessment of early axonal regeneration in end-to-side nerve coaptation models. *J. Plast. Surg. Hand Surg.* **46**, 299–307 (2012).
- 15 Zhang, Z. *et al.* Long-term evaluation of rat peripheral nerve repair with end-to-side neurorrhaphy. *J. Reconstr. Microsurg.* **16**, 303–311 (2000).
- 16 Zhang, F. & Fischer, K. A. End-to-side neurorrhaphy. *Microsurgery* **22**, 122–127 (2002).
- 17 Hadlock, T., Kowaleski, J., Mackinnon, S. & Heaton, J. T. A novel method of head fixation for the study of rodent facial function. *Exp. Neurol.* **205**, 279–282 (2007).
- 18 Bermejo, R., Szwed, M., Friedman, W., Ahissar, E. & Zeigler, H. P. One whisker whisking: unit recording during conditioned whisking in rats. *Somatosens. Mot. Res.* **21**, 183–187 (2004).
- 19 Heaton, J. T. *et al.* A system for studying facial nerve function in rats through simultaneous bilateral monitoring of eyelid and whisker movements. *J. Neurosci. Methods* **171**, 197–206 (2008).
- 20 Hadlock, T. A. *et al.* Quantitative analysis of muscle histologic method in rodent facial nerve injury. *JAMA Facial Plast Surg* **15**, 141–146 (2013).