



Title	ラットを用いた顔面神経麻痺モデルにおける新たな評価法の確立に向けた研究- BASS : The Black Light Assisted Scoring System -
Author(s)	三浦, 隆洋
Description	配架番号 :
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14983号
Issue Date	2022-03-24
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14983">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14983</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/88816">https://hdl.handle.net/2115/88816</a>
Type	doctoral thesis
File Information	MIURA_Takahiro.pdf



# 学 位 論 文

ラットを用いた顔面神経麻痺モデルにおける

新たな評価法の確立に向けた研究

～**BASS: The Black light Assisted Scoring System**～

**(Studies on a novel method for the assessment of facial palsy in a  
rat model: the black light-assisted scoring system)**

2 0 2 2 年 3 月

北 海 道 大 学

三 浦 隆 洋

Takahiro MIURA



# 学 位 論 文

ラットを用いた顔面神経麻痺モデルにおける

新たな評価法の確立に向けた研究

～**BASS: The Black light Assisted Scoring System**～

**(Studies on a novel method for the assessment of facial palsy in a  
rat model: the black light-assisted scoring system)**

2 0 2 2 年 3 月

北 海 道 大 学

三 浦 隆 洋

Takahiro MIURA

## 目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
方法	11 頁
結果	19 頁
考察	38 頁
総括および結論	45 頁
謝辞	47 頁
利益相反	48 頁
引用文献	49 頁

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Takahiro Miura, Yuhei Yamamoto, Taku Maeda, Masayuki Osawa, Kosuke Ishikawa, Emi Funayama  
A novel method for the assessment of facial palsy in a rat model: the black light-assisted scoring system  
*Scientific Report* (2021 年投稿済)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 三浦隆洋、山本有平、前田 拓、石川耕資、大澤昌之、舟山恵美 顔面神経麻痺治療における人工神経の有用性およびその評価法について  
第 39 回北大形成外科アカデミー，2019 年 12 月 14 日・札幌
2. 三浦隆洋、山本有平、前田 拓、石川耕資、大澤昌之、舟山恵美 顔面神経麻痺のラットモデルによる新たな評価法確立とハイブリッド神経の開発に向けて  
第 40 回北大形成外科アカデミー，2020 年 11 月 28 日・札幌

## 要旨

### 【背景と目的】

これまでのラットを用いた顔面神経麻痺の評価法は、ビデオ撮影を行い、研究者がその動きを評価し、ラットのヒゲの動きや鼻の位置などを2～3段階で健側と比較するといった方法が用いられてきた。しかしこれらの方法は、定量化することができず、評価者の主観性が強いものだった。さらには通常のビデオ撮影は1秒に30フレーム撮影を行う30 frame per second (fps)が用いられるが、ラットのヒゲの動きが非常に速いため、通常のフレーム撮影ではフレーム間の動きが速さに対応できず、ブレのある映像となってしまう正確な評価は不可能であった。また生理学の分野で、ヒゲの機能に着目した研究の中でハイフレーム撮影と赤外線カメラでヒゲの動きを評価する方法が複数報告されている。しかし、これらの方法は、顔面神経麻痺のために考案されていないため、顔面神経麻痺研究では特定の位置のヒゲの動きを毎週経時的に評価する必要があるが、そのような評価は不可能であった。さらには、装置が煩雑かつ高価であるという問題もあった。

評価法がグローバルスタンダードとして普及するためには、再現性・客観性・簡便さ・低コストなどの条件を満たすことが求められる。つまり、顔面神経麻痺研究におけるラットのヒゲの動きの評価に対しては、毎回同じヒゲの動きを選択的にかつ繰り返し評価・定量化できること、選択したヒゲをカメラが識別するためのコントラストを付加できること、そして速い動きに対応するためハイフレーム撮影を行うことが重要であると考えた。これらの条件をクリアするために、紫外線ライトであるブラックライト、そしてハイフレーム撮影を行うためのツールとして広く普及しているiPhone、そしてビデオ分析のためのオープンソフトウェアであるKinovea、これらの3つのツールを用いることでスタンダードとなる評価法の確立が可能と考えた。この方法をBlack light-assisted scoring system (BASS)と名付け、このBASS法の確立と妥当性について検討を行った。

### 【材料と方法】

10週齢雄のWisterラットを用いて、BASS法確立に向けた評価する基準点並びに評価の指標における検討を行った。具体的には、どのヒゲの動きを評価し、どこを計測する基準とするのか、どのような計測を行うのかについて多角的に検討を行った。イソフルランを用いた浅麻酔下に、複数種類のヒゲおよび顔面における基準点をマーキングし、計測する基準点に関する評価検討を行った。マーキングはブラックライトに蛍光を示す専用塗料を用いた。ブラックライトをラットの前方から照射し、ラット

の頭上 30cm から撮影した。撮影は 3 分以上行った。撮影モードは 240 fps とした。1 秒間 240 fps で撮影した動画を 8 秒間 30 fps にコンバートし、Kinovea を用いた動画解析を行った。BASS スコアは、健側に対する患側の割合として算出した。この研究では顔面神経麻痺モデルとして顔面神経を 1 箇所切離し再縫合する Cut & Suture モデルを使用した。またラットの制御困難な体動の影響をより小さくするため、角度の変化ではなく、時間で微分する角速度の変化の方が望ましい可能性がある。そのため、この 2 つ指標についても検討した。

上記の検討によりより望ましいと考えら得た計測法や基準点の決定に基づいて、同じく 10 週齢雄の Wister ラット 6 匹を用いて、正常ラットおよび顔面神経麻痺ラットにおける BASS スコアの評価を行った。正常ラットは、左右差が存在せず、BASS スコアは 100% に近似した結果にならなくてはならない。この点についての評価検討を行った。また、顔面神経麻痺モデルのラットでも同様に BASS 法による評価を行った。顔面神経麻痺は、顔面神経に Crush Injury を加えた不全麻痺モデルを使用した。顔面神経麻痺の程度に差が少ない受傷後早期に BASS 法による評価を行い、結果にはばらつきが出ないかについて検討した。

## 【結果】

BASS 法確立にあたり、正中を規定する基準点としての両側内眼角の midpoint、そして評価点としての 2 段目 4 列目の毛根およびそのヒゲとし、その 3 点からなる角度の変化を計測することが望ましいと考えられた。また計測内容については、最初の段階では角度の変化による評価を検討していたが、角度の変化ではラットの首の動きを完全に制御することは難しいため、首の動きによる計測値、特に基線の変化への影響が大きかった。このため、時間を微分することでその時点での角度の変化率、つまり角速度を評価することでより正確かつ簡便な評価につながると考えられたため、角速度を選択することとした。角速度については、ヒゲを前に動かす Protraction の動きと後ろへ動かす Retraction の動きに分けてそれぞれの最大角速度を  $V_{pro}$ 、 $V_{re}$  と規定し、 $V_{pro}$  と  $V_{re}$  の大きい方を  $V_{max}$ 、 $V_{pro}$  と  $V_{re}$  の合計を  $V_{total}$  と規定して 4 つの指標による評価を行った。

BASS スコアは正常ラットの平均(± 標準誤差)は、 $V_{max} = 115.0 \pm 6.0\%$ 、 $V_{pro} = 97.2 \pm 9.5\%$ 、 $V_{re} = 106.1 \pm 10.4\%$ 、and  $V_{total} = 101.6 \pm 6.6\%$  だった。顔面神経麻痺モデルでは、 $V_{max} = 65.5 \pm 4.2\%$ 、 $V_{pro} = 72.5 \pm 5.3\%$ 、 $V_{re} = 65.5 \pm 4.2\%$ 、and  $V_{total} = 68.0 \pm 3.6\%$  だった。100% が予想された正常モデルでは  $V_{total}$  が最も 100% に近かった。また  $V_{pro}$ 、 $V_{re}$  は誤差が大きく、これは顔面神経麻痺モデルでも同様の傾向だった。また  $V_{total}$  は顔面神経麻痺モデルでは誤差が最も小さかった。

## 【考察】

BASS 法では、3つのツールが重要である。顔面神経麻痺研究では、経時的な回復の程度の評価が重要となる。したがって、常に同じポイントでの計測を毎週行える必要がある。これまで、特定のヒゲや毛根を選択して評価できた方法は存在しない。我々はブラックライトと蛍光塗料を用いることで、選択的に特定の毛根とそのヒゲを染色し、コントラストを高めることに成功した。

動画撮影においては、通常の 30fps（1秒に 30コマ）ではラットのヒゲの動きは速いため不十分である。したがってハイフレーム撮影が望まれる。民生用カメラや iPhone 以外のスマートフォンでは、ハイフレーム撮影に対応はしているものの数秒程度の撮影に限定されてしまう。数秒ではラットの動きを完全に制御することは不可能であり、必要なタイミングで撮影を行うのは困難である。一方、業務用の専用カメラは、よりハイフレームかつ長時間の記録が可能だが、非常に高価である。本研究では、近年技術進歩のめざましいスマートフォンの中でも iPhone を使用した。iPhone では、240fps の動画を 10分以上連続で撮影することが可能である。

Kinovea はフリーソフトウェアでありながら、動画の様々な動きや角度をトラッキングし経時的に計測可能な多機能性を持つ。しかし、ラットのヒゲは白く、背景や周囲とのコントラストがないため映像内で判別がつかず、そのままの状態では評価不能である。そこで、上記に示したブラックライトと蛍光塗料により映像内の特定の毛根とヒゲのコントラストを高めることで、トラッキングを可能にした。

## 【結論】

我々はブラックライト、iPhone、Kinovea を用いた新たな評価法（Black light-assisted scoring system : BASS）を開発した。BASS 法は、表情の変化による毛根の動きまでも反映可能だった。これは、表情の動きをより正確に反映し、更に選択したヒゲの動きの定量化と同部位の反復評価にも成功した初の方法である。BASS 法は、正確かつ客観性・再現性があり、低コストで導入可能な方法であるため、これからの顔面神経研究の評価法の一つとしてグローバルスタンダードとなりうると考えている。

## 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AR	Augmented Reality
ARRIVE	Animals in Research: Reporting <i>In Vivo</i> Experiments
BASS	the black light-assisted scoring system
fps	frame per second
IPNG	interpositional nerve graft
VR	Virtual Reality

## 緒言

### 【背景】

形成外科学分野では、臨床現場において顔面神経麻痺治療に携わっており、外傷後の神経損傷や悪性腫瘍切除後の神経欠損に対する神経縫合術や神経移植術、さらには陳旧性の顔面神経麻痺に対する皮弁移行術をはじめとする遊離組織移植術などのさまざまな外科的治療を行っている。特に耳下腺癌などの悪性腫瘍切除時の顔面神経合併切除が必要な症例では、広範な欠損が生じるため、直接神経縫合を行うことは不可能であり、神経移植術が必要となる。

神経移植術は、これまで腓腹神経や大耳介神経などをドナーとする自家神経移植術が一般的に広く行われてきた。しかし、自家神経移植はドナー部の犠牲があることから、同種神経移植術や人工神経である軸索再生誘導チューブをはじめとするドナーの犠牲のないさまざまな新たな素材を用いた神経移植が注目を集めるようになった。同種神経移植術は海外ではすでに臨床使用されているが、本邦では認可されておらず使用することができない。一方で人工神経はナーブリッジ(東洋紡株式会社, 大阪, 日本)およびリナーブ(ニプロ株式会社, 大阪, 日本)の2製品が国内でも認可・臨床応用されており、適応拡大が望まれている。

さらに近年では、幹細胞を用いたバイオ三次元神経再生導管 (Hu et al., 2016; Itoh et al., 2015; Yurie et al., 2017; Zhang et al., 2018) の出現など3Dバイオプリンティング技術や再生医療の発展による新たな研究も増加傾向にある。

このような新たな素材の出現に伴って、動物モデルを用いた顔面神経麻痺研究が行われるが、主にマウスやラットが用いられてきた。評価としては、電気生理学的評価や組織学的評価に加えて、臨床に即した評価法として実際の顔面の動きが用いられる。これまでは、眼や瞬き反射・ヒゲの動きなどが顔面神経麻痺の程度を反映した所見として、評価の一つとして使用されてきた(Byers et al., 1998; Mersa et al., 2000)。

我々も2012年にラットを用いた顔面神経麻痺モデルにおける顔面神経と舌下神経間を神経移植・縫合する interpositional nerve graft (IPNG) の研究で、顔面神経麻痺を作成したラットに対してビデオ撮影を行い、ヒゲの動きに加えて眼の動きや位置の左右差を評価する新たな評価法 (Facial Palsy Score) を報告した (Shichinohe et al., 2012)。この方法は、顔面神経本幹の損傷を想定しており、安静時の眼の左右対称性 (対称性なし: 0、あり: 1) と閉眼の程度 (動きなし: 0、筋収縮はあるが閉眼の動きなし: 1、不全閉眼: 2、正常: 3)、安静時のヒゲの対称性 (対称性なし: 0、あり: 1) とヒゲの動きの程度 (動きなし: 0、微細な動き: 1、対側に対して

劣るが有効な動き：2、正常：3）の4つの項目を用いており、顔面全体の評価を目的としていた。

しかし、先に述べたように近年様々な新たな神経移植術の研究が行われるようになった背景もあり、ラットなどを用いた顔面神経麻痺研究においても、これまでの顔面神経本幹を用いた研究ではなく、より臨床に即した顔面神経の分枝を用いた研究が積極的に行われるようになった。特に顔面神経の分枝の中でも解剖学的に神経長が確保しやすいことから **Marginal branch** および **Buccal branch** を使用した研究がよく施行されるようになった。それに伴って、この2本の分枝の支配領域である中顔面に特化した顔面神経麻痺評価が必要とされるようになった。そこで **Sasaki** らは、我々が報告した方法をより中顔面に特化したシステムとして、これまでの眼とヒゲを用いた評価法から、鼻とヒゲを評価する方法として改変し、研究における評価法の一つとして報告した(**Sasaki et al., 2014**)。この新たな方法は、一部の他の論文でも引用され使用されている(**Zhang et al., 2018**)。しかしながら、この方法も、同研究グループ以外で引用されたのはこの1編のみにとどまり、類似した評価法は他の研究でも使用されているものの、異なる指標や **Scoring** が用いられており、スタンダードな評価法には至っていない。

このようにラットを用いた顔面神経麻痺の評価法は、ラットのビデオ撮影を行い、研究者が動きを評価し、ラットのヒゲの動きや鼻の位置などを2～3段階で健側と比較するといった方法が用いられてきた(**Sasaki et al., 2014; Shichinohe et al., 2012; Zhang et al., 2018**)。しかしこれまでの方法では、通常の1秒に30フレーム撮影を行う **30 frame per second (fps)**でのビデオ撮影が行われており、ラットのヒゲの速い動きに対応できず、正確な評価は困難であった。また、特定のヒゲの動きを評価・定量化することができないだけでなく、計測基準についても評価者の主観が入りやすく、客観性・再現性について問題があった。

生理学の分野では、ヒゲの機能に着目した研究の中でヒゲの動きをハイフレーム撮影や赤外線カメラを用いて、ヒゲの動きを評価する方法が複数報告されている(**Deutsch et al., 2012; Knutsen et al., 2005; Mitchinson and Prescott, 2013; Towal and Hartmann, 2006, 2008**)。しかし、これらの方法は、ヒゲの機能に対する研究であることから、何度も同じ動きを評価することは難しく、また評価の尺度も何かしらの刺激に対する動きを用いているものが多かった。このように、顔面神経麻痺研究では特定のヒゲや毛根を経時的に繰り返し評価できることが望ましいが、顔面神経麻痺のために考案されていないため、顔面神経麻痺に対する研究で使用することはできなかった。また、装置が煩雑かつ高価だという問題も存在した。

臨床における顔面神経麻痺診療では、柳原法や **House-brackmann** 法、**Sunnybrook** 法などの世界的に普及したスタンダードとなる顔面の動きなどを用いた顔面神経麻痺の

評価法が確立されている。これらの評価法を用いることで、施設や主治医に関係なく各症例の麻痺の程度を把握することができるため、症例の比較検討が可能となる。これにより世界中の様々な報告された症例の比較が可能となるため、治療法などの発展にも大きく貢献しているものと考えられる。

一方で動物実験を用いた基礎研究分野において、そのようなグローバルスタンダードとなる方法が存在しない。これまでは神経片の組織学的評価などを通じての比較は可能であったが、組織学的評価と実際の臨床で求められる顔面の動きの程度は乖離している可能性があり、それぞれ別の指標として比較検討されることが望ましい。このように実際の臨床現場で求められる表情筋の動きについて、研究間での比較検討が不可能であることは、顔面神経治療全体の発展に対して不利益をもたらすものと考えられ、広く普及したスタンダードとなる評価法を確立することは、今後の動物を用いた顔面神経麻痺に関する研究において非常に重要な意義がある。

新たな評価法がグローバルスタンダードとして普及するためには、正確性・客観性・再現性があり、さらには低コストや煩雑さのないなどの導入の簡便さといった条件を満たすことが求められる。つまり、顔面神経麻痺研究における評価としては、繰り返し同部位の評価が必要であるため、毎回同じヒゲを選択的に評価可能であり、かつ主観性が入らずに定量化できることが必要である。その実現のためには、特定の選択したヒゲを映像内で識別するために、周囲のヒゲとコントラストを付加することができること、そしてヒゲの非常に速い動きに対応するため1秒間により多くのフレームを用いて撮影を行うハイフレーム撮影を使用すること、そしてそのヒゲの動きを主観性なく計測するために可能な限り自動的に定量化が可能であることが必要と考えられた。

さらには、顔面神経麻痺の評価において麻酔下では動きを計測できないため、覚醒下での観察となる。そのため、ラットの計測に不必要、または計測を妨げる様々な動きを完全に制御することは困難である。そこで、一定時間以上の録画を行い、評価に不適な時間を除外し、評価可能な時間を選択しなければならないため、ハイフレーム撮影を長時間可能である必要がある。しかしハイフレームカメラの中でも長時間撮影が可能な製品は、非常に高価である。そこで我々は、近年技術進歩の著明なスマートフォンに着目した。特に今回使用した iPhone (Apple Inc., Cupertino, CA, USA) は、他のスマートフォンや民生用カメラなどの多くの製品が不可能な長時間のハイフレーム撮影が可能となっており、かつ比較的安価に入手可能な製品である。

またラットのヒゲは非常に細く、動きも速いため、通常のフレーム撮影では特定のヒゲの識別は不可能である。そのため、特定のヒゲの動きを識別するためには、何かしらの染色などを用いたマーキングが必要となる。しかし、一般的な塗料による染色では、ヒゲは細く周囲のヒゲと区別できるに十分な効果を得るのは困難である。この

問題に対し、イベントや室内照明などで一般に使用されているブラックライトと蛍光塗料に注目した。特定のヒゲを蛍光塗料によって光らせることで周囲のヒゲとの区別をつける方法であれば、よりはっきりとヒゲの動きを判別できる可能性があると考えたためである。この方法により、特定のヒゲや計測点をマーキングすることが可能となれば、映像内にヒゲの動きのコントラストを付加することできるため、詳細な動きの分析が可能なのではないかと考えた。さらにこのコントラストによって、映像からヒゲの動きの解析を行うことが容易となる可能性がある。そこで我々はスポーツのフォーム解析などに使用実績のある **Kinovea** というオープンソフトウェアを用いることで、コストフリーでの解析実現を目指した。

我々は以上のことから、紫外線ライトであるブラックライトおよび蛍光塗料、そしてハイフレーム撮影を行うためのツールとして広く普及している **iPhone**、そしてビデオ分析のためのオープンソフトウェアである **Kinovea**、これらの3つのツールを用いることで客観性および再現性をもつ新たなスタンダードとなるラットなどの動物モデルを用いた顔面神経麻痺に対する新たな評価法の確立が可能であると考えた。この方法を **Black light-assisted scoring system (BASS)** と名付け、この方法の確立を目標とし検討を行った。

## 【目的】

### 1. BASS 法における計測点および計測法の確立

新たな評価法確立にあたり、上記で述べたコンセプトを活かした的確な計測点の設定並びに計測法の確立が肝となる。特に計測点は、これまでに複数の類似した方法が報告されているものの、報告によって異なる点がいられ、確立した方法は存在していない。さらには、今回のブラックライトと蛍光インクを用いることでこれまでに不可能だった計測点の設定も可能になる可能性がある。そこで、計測点が客観性を損なわず、かつ明確であること、そして正確な評価に直結する点であることが必要である。以上の事に配慮しながら様々な計測点について検討し、よりの確な計測点・計測法の設定を目的とする。

### 2. 正常ラットにおける BASS 法の検証

BASS 法が、ラットのヒゲの動きを正確かつ客観的に計測できる方法であるための一つの指標として、正常ラットで左右差が出てはならない。そこで、正常ラットを用いてここまで確立してきた BASS 法を用いて、ヒゲの動きの計測を行い、左右差がなく、また誤差が少ないことを検証する。

### 3. 顔面神経麻痺モデルにおける BASS 法の検証

正常ラットにおける BASS 法の検証に引き続き、顔面神経麻痺を作成したラットを用いて BASS 法でヒゲの動きを計測する。良い評価法は、より誤差の少ない結果になる必要があるため、その点を中心に検証を行う。

## 1.1 方法

### 1.1.1 動物実験計画

本研究は、「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和48年法律第105号)、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年文部科学省告示第71号)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成18年環境省告示第88号)、その他関係法令等に基づき、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」(平成19年4月1日海大達第61号)に従って、動物実験計画「HIF-PH阻害剤を用いた顔面神経麻痺治療」(承認番号19-0090)の一研究として行った。また、動物を用いた研究の報告のための *Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments* (ARRIVE) ガイドライン (Kilkenny et al., 2010) における20項目のチェックリストを参考にした。

### 1.1.2 動物実験施設

本研究は、北海道大学大学院医学研究院附属動物実験施設にて行った。ラットの飼育は、3階小動物飼育実験エリアの小動物飼育室にて12時間明暗サイクルの人工蛍光管理、固形飼料および自動給水用ノズルによる標準飲食管理下に行った。動物実験は、3階解析実験エリアの共同生体試料解析室2にて行った。

### 1.1.3 使用動物・機器・試薬

雄の Wister ラット(ブリーダー: Japan SLC, Inc., Hamamatsu, Shizuoka, Japan; 販売: Sankyo Labo Service Corporation, Inc., Sapporo, Japan) を8週齢(200~230g)で購入した。馴化のため入舎後2週間の予備飼育期間を設け、10週齢で実験に用いた。

全ての処置・手術は、実験動物麻酔装置(Laboratory Animal Anesthesia System; Shinano Manufacturing Co., Ltd., Tokyo, Japan; code SN-487)を用いて、イソフルラン(Forane<sup>®</sup> Inhalant Liquid; AbbVie Inc., Tokyo, Japan; code B506)2.5%吸入による全身麻酔下に行った。手術は、可搬型手術用顕微鏡(S100/OPMI<sup>®</sup> pico; Carl Zeiss Surgical GmbH, Oberkochen, Germany)を用いて、4倍もしくは10倍の視野にて行った。縫合糸は、6-0 ナイロン糸(Crownjun Nylon Suture, Polyamide Monofilament Non-absorbable; Kono Seisakusho Co., Ltd., Tokyo, Japan; code NA085)、10-0 ナイロン糸(Keisei Medical Industrial Co., Ltd., Tokyo, Japan; code 14V33-10N)を用いた。

写真は、デジタル一眼レフカメラ(EOS Kiss X2; Canon Inc., Tokyo, Japan)にマクロレンズ(EF 50 mm f/2.5 Compact Macro Lens, Canon Inc.)および接写専用ストロボ(Macro Ring Lite MR-14EX, Canon Inc.)を装着して撮影した。動画は、スマートフォン(iPhone X; Apple Inc., Cupertino, CA, USA)を用い、スローモードを用いたハイフレー

ム撮影を使用した。スローモードの設定は、画質：HD、フレームレート：240 fps とした。動画撮影はラットの頭上 30 cm の高さから行った(図1)。1回に1分以上(1～3分)の録画を行った。動画撮影時は、ラットの動きを抑制するため拘束衣 (LOMIR Biomedical Inc., Canada) を用いて、手足の動きを制限して行った。

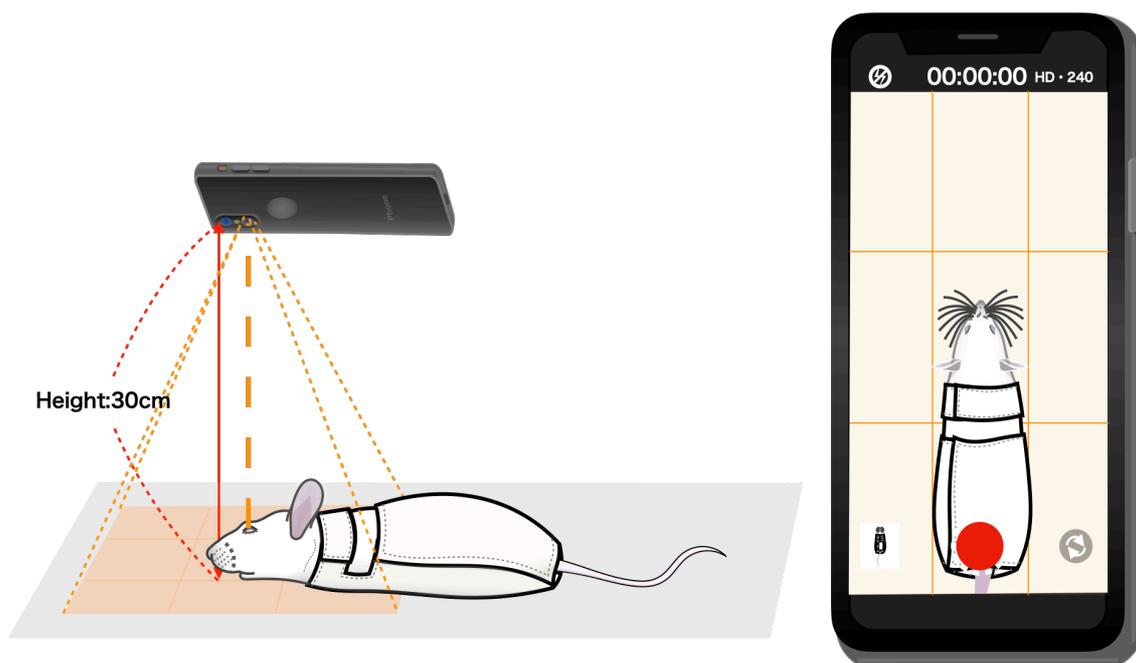


図1. BASS 法における撮影の実際

ラットに拘束衣を着用させ、頭上 30cm の高さより iPhone を用いてハイフレーム撮影を行った。ラットの内眼角の midpoint を映像の中心となるようにセットアップした。

ブラックライトは、一般に市販されている 3000 円前後の安価なものを使用した。本研究では波長 385～400 nm、10W 出力の UV Black light LED 10 W (Sgintek, China) を使用した。ブラックライトは、ラットの正面から照射した。ブラックライトに反応する蛍光塗料についても同様に一般に市販されている新・筆用ブラックライトインク 絵具緑色 (SO-KEN, Osaka, Japan) を使用した。

動画解析は、iMovie (Apple Inc., Cupertino, CA, USA) および Kinovea を用いて行った。まず iMovie を用いて、1分以上の 240 fps によるハイフレーム撮影動画から、拘束衣で抑制できない首の動きのより少ない 1 秒を選択した。ヒゲの動きをスローモーションでより正確に把握するため、選択した 1 秒間 240 fps の動画を 8 秒間 30 fps へコンバートした。

Kinovea を用いてその8秒間の動画からヒゲの角度の変化を解析した。上記のブラックライトおよび蛍光塗料によりマーキングを行った複数のポイントを用いて角度の計測地点をプロットした(図2)。Kinovea に搭載されている角度変化の計測機能を用いて解析を行い、結果はExcel (Microsoft Co., Ltd., Redmond, Washington, USA)への書き出しが可能となっているため、その機能を利用した。Excel データを用いて、顔面神経麻痺側の健側に対する動きの割合 (%) として評価を行った。

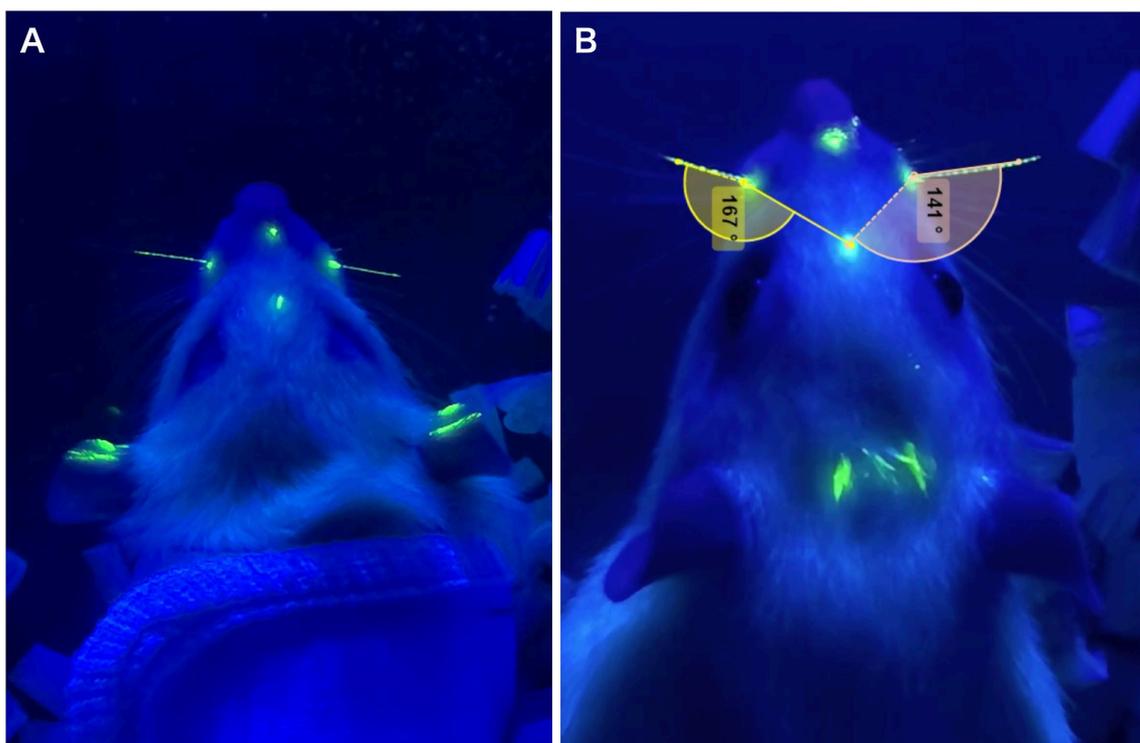


図2. Kinovea を用いたヒゲの動きのトラッキング

A : 撮影した動画からの切り出し画像。B : 撮影した動画から計測点を指定することで、自動的に動きを追尾しながら計測可能である。

なお、上記のデジタルデータは、パーソナルコンピュータ (MacBook Pro, Retina, 15-inch, Late 2016, Apple Inc., Cupertino, CA, USA) を用いて、ディスプレイ解像度を 2560×1600 ドットとして観察した。

## 1.1.4 パイロット実験

### 1.1.4.1 モデル作製手技

まず新たな評価法の対象となる顔面神経麻痺モデルの作成を行った。過去のラットの顔面神経麻痺モデルの報告の中でも近年報告の多い、**Buccal branch** および **Marginal branch** を用いて中顔面の麻痺を作成するモデルを参考にし、モデル作成することとした。麻酔は、過去の報告を参考にし(Sasaki et al., 2013)、セボフルランを用いた吸入麻酔 (2-3%) のみで実施する予定とした。

中顔面特にヒゲの動きは、この2本の顔面神経の分枝による二重支配であるとされ(Henstrom et al., 2012)、両者への損傷を加える必要がある(図3)。これまでの報告でも、どちらかの分枝を一定の長さで切除し、残りの一方の枝に損傷を加えるモデルが多く使用されている(Matsumine et al., 2014, 2016, 2017; Sasaki et al., 2014; Watanabe et al., 2017; Zhang et al., 2018)。

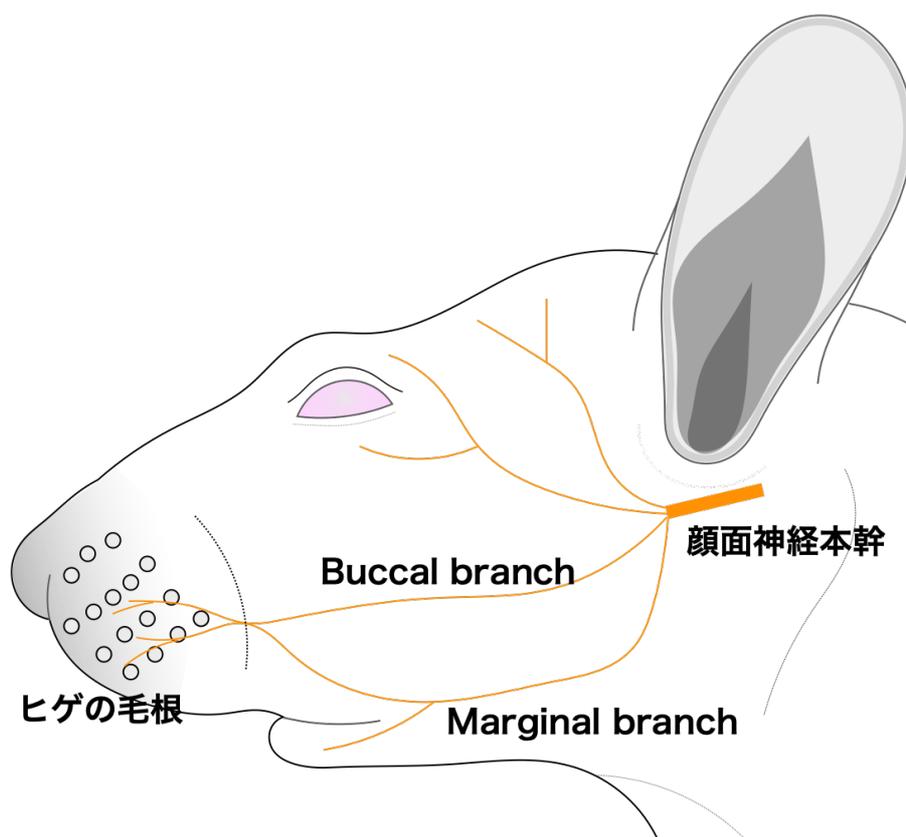


図3. ラットにおける顔面神経の解剖

**Buccal branch** と **Marginal branch** はヒゲの毛根より中枢側で合流し、ヒゲの動きは2つの顔面神経の枝の二重支配となっている。

本研究でも同様のモデルを使用し、**Marginal branch** の神経を切除し、**Buccal branch** に損傷などの介入を加えることで顔面神経麻痺を作成することとした。顔面神経麻痺作成における **Buccal branch** に対しての介入は、神経移植モデルが検討された。しかし、神経移植は2箇所神経縫合が必要となり1mm未満の神経に対する縫合箇所の増大は、結果に手技の影響が大きくなることが予想された。そのため、神経の1箇所を切断し、再度同部位を再縫合する **Cut & Suture** モデルを使用した。

再現性のあるモデル作製のため5匹のラットを用いて、以下の10項目につき、パイロット実験を行った。①皮膚切開の位置、②皮膚切開の長さ・方向、③皮下剥離の範囲、④**Buccal branch** 並びに **Marginal branch** の同定、⑤神経の剥離操作、⑥神経の切断および縫合の位置、⑦神経縫合法、⑧閉創の方法について検討した。

#### 1.1.4.2 計測する基準点およびヒゲの選択に関する検討

これまでもヒゲの角度を通常の動画撮影で測定したとする報告はあるが、基準点は報告により異なる(**Guntinas-Lichius et al., 2002; Uehara et al., 2019**)。まず計測の軸となる正中の基準点を決定する必要があるため、これについて検討した。また、これまでは特定のヒゲを映像内でコントラストを付加することが困難だったが、今回検討している **BASS** 法では特定のヒゲの選択的な評価が可能となりうるため、どのヒゲを評価すべきかについて検討する必要がある。そこで、どの位置のヒゲを測定するのかについても同時に検討を行った。

#### 1.1.4.3 角度の変化の評価において制御不可能である頭部の動きによる影響に関する検討

拘束衣を装着して動画撮影による評価を行うが、麻酔下では評価不能である。一方で、覚醒条件においては、頭部の動きの制御は困難である。従って頭部の動きのより少ない時間を選択して評価を行う。しかし一方で、ヒゲの角度の変化量ではなく、その変化率である角速度を評価すること、つまり時間で微分することでより頭部の動きによる測定の影響や計測の簡便さにつながる可能性が考えられた。そこで、角度の変化の大きさだけでなく、角速度についても同様に評価を行い、頭部の動きの影響について検討を行った。本研究で使用するソフトウェアである **Kinovea** には、動画内にプロットした点が形成する角度の変化だけでなく、角速度も同時に算出する機能が搭載されており、その機能を用いて、同様に **Excel** 形式での書き出しを行い、評価した。

## 1.1.5 本実験

### 1.1.5.1 実験計画

本実験では、正常ラットを用いた評価および顔面神経麻痺モデルを用いた評価の2つの評価を行い、BASS法の再現性や有効性を検証する計画とした。

パイロット実験において、ラットの顔面神経麻痺モデル作成手技のある程度の習熟を要すること、また神経縫合手技による顔面神経麻痺および回復の程度に差が生じてしまうことから、本実験で使用する顔面神経麻痺モデルでは、Buccal branchを用いた顔面神経麻痺のCut & Sutureモデルではなく、Crush injuryモデルに変更してモデルを作製した。

### 1.1.5.2 モデル作製手技

パイロット実験を参考に、顔面神経麻痺モデルを作成した。本実験では、顔面神経麻痺モデル作製にあたって手術手技による結果への影響を可能な限り減らすために、過去の報告を参考に(Bridge et al., 1994)、Marginal branchを切除してBuccal branchはペアンで一定期間把持して挫滅させるだけのCrush injuryモデルを使用した。吸入麻酔下にマウスを右側臥位とし、パイロット研究の結果に準じて左耳介前部から左下顎縁に沿って弧状切開を加えた。眼科用曲剪刀を用いて皮下をヒゲの生える位置より手前までの範囲で剥離を行い皮弁を挙上し、顔面神経のBuccal branchおよびMarginal branchを同定した。挙上した皮弁は牽引糸として6-0ナイロンをかけて、モスキートペアンで牽引し、術野を展開した。神経周囲の軟部組織および神経下の筋膜を15番メスおよびマイクロ剪刀を用いて神経から剥離した。この際に神経を挫滅しないように神経は鑷子で把持せず、周囲組織を把持することで剥離を行った。Marginal branchは耳下腺前縁から末梢側にかけて1 cm長で切除するため、その範囲の神経周囲を剥離、切除した。またBuccal branchに対しては、耳下腺前縁から7 mmの位置を損傷箇所を設定し、神経の1箇所をモスキートペアンで30秒把持して損傷させることでCrush injuryを加えた。損傷介入にあたり同部位周囲2mmずつを剥離した上で損傷を加えた。その後皮膚を6-0ナイロンで6針単純結紮縫合し閉創した。

### 1.1.5.3 角速度における複数の指標の評価を用いた正常ラットおよび顔面神経麻痺モデルでの検討

角速度については、ヒゲを前に動かすProtractionの動きと後ろへ動かすRetractionの動きに分けてそれぞれの最大角速度を $V_{pro}$ ・ $V_{re}$ 、 $V_{pro}$ と $V_{re}$ の大きい方を $V_{max}$ 、 $V_{pro}$ と $V_{re}$ の合計を $V_{total}$ として4つの指標を規定した(図4)。この4つの指標について、以下に示す正常ラットおよび顔面神経麻痺ラットを用いた2つの検討を用いて評価を行った。

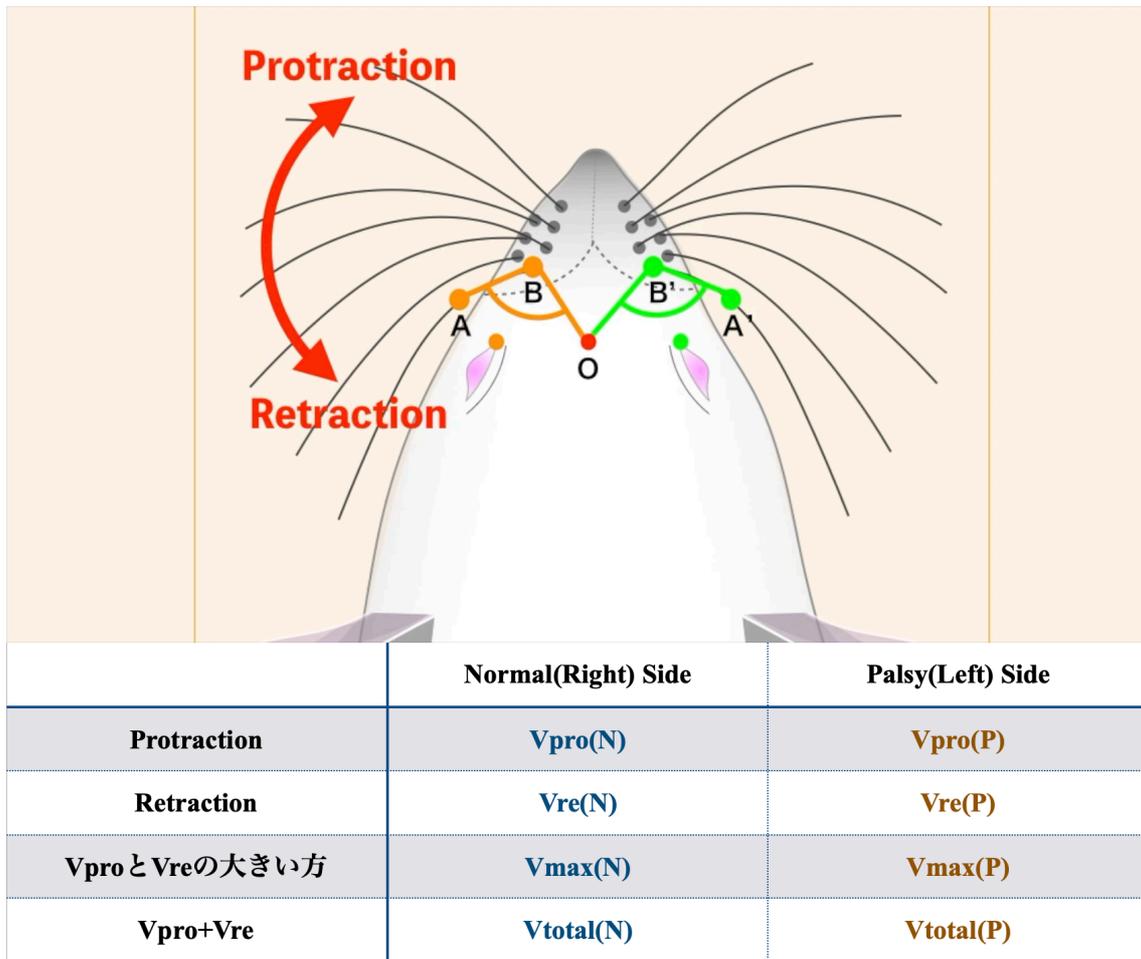


図4. BASS法の計測点と計測する角速度の4つの指標の分類

ヒゲを前に動かす Protraction と後ろへ動かす Retraction に分けてそれぞれの最大角速度を  $V_{pro}$ ・ $V_{re}$  と規定し、 $V_{pro}$  と  $V_{re}$  の大きい方を  $V_{max}$ 、 $V_{pro}$  と  $V_{re}$  の合計を  $V_{total}$  として評価した。計測点 A、B、O についてはパイロット研究の結果に応じて設定した。

#### 1.1.5.3.1 正常ラットを用いた評価法の妥当性に関する検討

##### 1.1.5.3.1.1 正常ラットを用いて BASS 法の実現性の検討 (各個体 1 回のみ評価)

顔面神経麻痺の評価法における 1 つ目の条件として、正常モデルでは麻痺は存在しないため左右差は存在しない。つまり BASS スコアが 100 に近似していなければならない。この検討では正常ラット 6 匹 (各個体 1 回) に対して、角速度の 4 つの指標を用いて BASS 法による評価を行い、どの指標が最も誤差が少なく、100 に近似するかについて検証を行った。

統計解析には、統計ソフトウェア JMP (version 16.0.0; SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いた。全群による比較には分散分析を用いた。各 2 群間の比較に Tukey-Kramer の検定を行った。両側  $P < 0.05$  を統計学的有意水準とした。

#### 1.1.5.3.1.2 正常ラットを用いて BASS 法の精度や妥当性の検討

前項で実現性の検討を行なった上で、その結果の傾向を踏まえて、詳細な検討を行った。6 匹のラットを用い、6 日間 1 日 1 回の BASS 法による測定 (計 6 回) を行った。

評価にあたり、BASS 法の結果から理想値である 100% との差を絶対値 ( $|\text{BASS score} - 100|$ ) として算出した。BASS 法の結果および理想値からの差の両者それぞれを用いて、4 つの角速度の指標に対して 3 種類の比較検討 (個体内・個体間・全体) での比較評価を行った (計 6 種類の検討)。

理想値との差を用いた個体間の評価においては、各個体において 100% との差の絶対値の 6 回の平均値をその個体の評価値とし、各 6 匹の平均値を用いて角速度の指標について統計学的解析を行った。

統計解析には、統計ソフトウェア JMP (version 16.0.0; SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いた。全群による比較には分散分析を用いた。BASS 法の結果を用いた各 2 群間の比較には、Steel-Dwass 検定による多重検定を行った。両側  $P < 0.05$  を統計学的有意水準とした。理想値との差を用いた評価では、各 2 群間の比較に Tukey-Kramer の検定を行った。同様に両側  $P < 0.05$  を統計学的有意水準とした。

#### 1.1.5.3.2 顔面神経麻痺モデルを用いた評価法の再現性に関する検討

外科的介入により顔面神経麻痺を生じさせたラットを用いて、この角速度の 4 つの指標の中でどの項目が最も結果の誤差が小さいかについて検討を行った。操作が簡便でかつ安定した成績が得られる Crush injury による顔面神経不全麻痺を作製し、顔面神経麻痺からの回復の程度のばらつきが少ないと考えられる受傷早期 (損傷後 2 週) の時点で BASS 法による評価を行った。

統計解析には、統計ソフトウェア JMP (version 16.0.0; SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いた。全群による比較には分散分析を用いた。各 2 群間の比較には、Steel-Dwass 検定による多重検定を行った。両側  $P < 0.05$  を統計学的有意水準とした。

## 1.2 結果

### 1.2.1 パイロット実験

#### 1.2.1.1 モデル作製手技

##### 1.2.1.1.1 皮膚切開と Buccal branch 並びに Marginal branch の同定

皮膚切開の位置は、過去の複数の報告(Matsumine et al., 2014, 2017; Watanabe et al., 2017; Yasui et al., 2016)に基づいて左耳前部から左下顎縁にかけて加えたが、ラットは皮膚の伸縮が大きく、メス刃での切開は困難だったため、眼科用曲剪刀を用いて切開にすることで手技は容易となった。また切開位置は、神経縫合の手技の容易さを優先して、直上切開も試みたが、耳介の前縁に沿って切開を行わないと顔面神経の分枝を皮下で損傷する危険性があり、当初の予定通り耳介の前縁から下顎縁に沿った切開を行った。また、耳介前縁から下顎角をわずかに越えるまでの切開での操作を行ったところ、Buccal branch と Marginal branch と判断した2本の神経は、その1本頭側にあたる Zygomatic branch と Buccal branch となるケースがあり(n=1)、かつ術野の展開も悪く、神経縫合も困難であった。Marginal branch の切除および Buccal branch の縫合部を確実に露出させるためには下顎縁に沿って下顎角を超えて弧状に回り込み、口側に概ね 10mm まで切開を行うことで展開・神経操作が容易であったため、この方法を用いることとした(図5)。

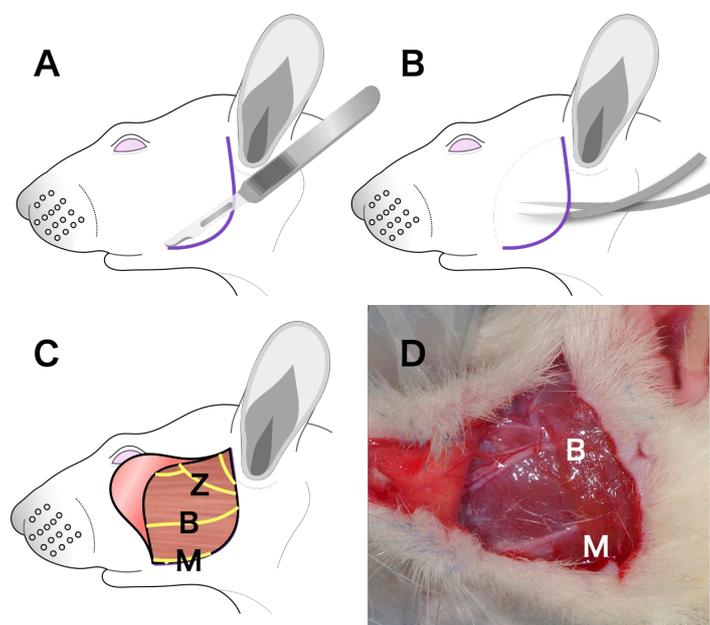


図5. 皮膚切開の位置と神経の同定

A. 耳前部から下顎縁に沿って皮膚切開、B. 眼科用曲剪刀で皮下剥離、C. 神経を同定  
Z : Zygomatic branch、B : Buccal branch、M : Marginal branch

#### 1.2.1.1.2 皮下剥離の範囲

剥離の範囲の設定については、10mm 長で **Marginal branch** を切除するため神経切除範囲を超えた剥離操作が必要である。体表面からの指標としてはヒゲが生えてくる皮膚の色調が淡赤色に変化する手前までを剥離範囲の目安とした。個体差はあるが、その位置周囲で **Buccal branch** と **Marginal branch** が合流していた。皮膚切開後、直視下に2つの神経を同定し、2つの神経合流位置の手前までを剥離範囲に設定した(図6)。

剥離により挙上した皮弁は、牽引糸として辺縁に6-0 ナイロンをかけて翻転することで、安定した術野確保が可能になった。

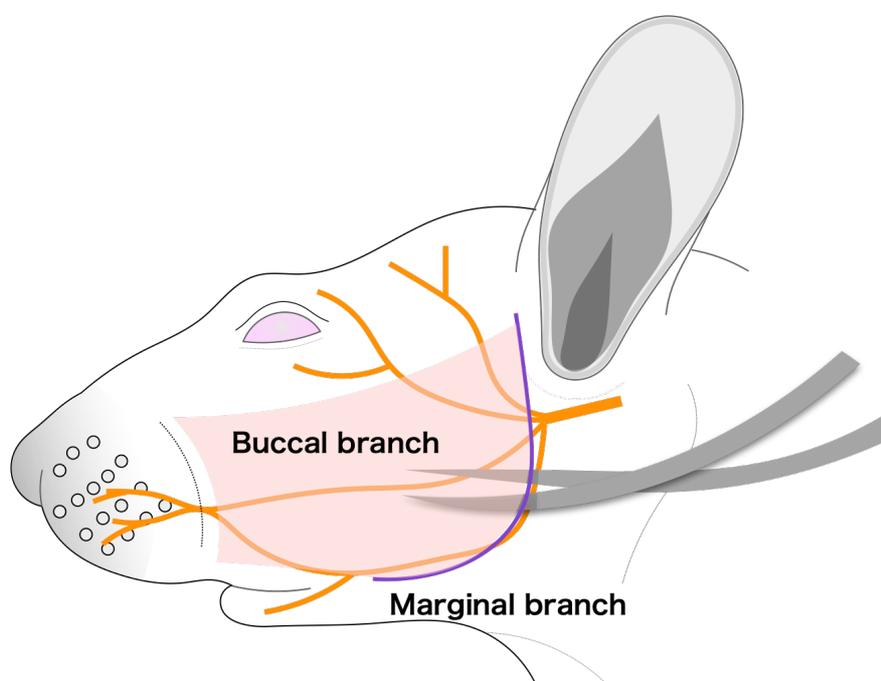


図6. 皮下剥離範囲の検討

**Buccal branch** と **Marginal branch** 合流部位の手前までを剥離範囲とした。

#### 1.2.1.1.3 神経の剥離操作、神経縫合法

同定した2つの神経の剥離操作は、マイクロ曲剪刀を用いて行った。神経周囲の膜様組織を切開し神経を剥離したが、神経辺縁にそって膜様組織を切開剥離すると、一部神経組織の挫滅を認めたため、数ミリのマージンを持って膜様組織を切開し、筋膜表面を剥離した。筋膜表面の剥離については、手術用顕微鏡の10倍視野において施行したが、筋膜側の挫滅が見られ、20倍視野を用いることで、より挫滅のない剥離が可能であった。

神経縫合についても同様に20倍視野を用いることで、神経断面解剖の正確な把握が可能であり、神経上膜縫合を用いた神経縫合を行った。単結紮縫合を6箇所行ったが、直径1mm未満の神経であり6針の結紮は不要と考えられ、4針の結紮へ変更した。

#### 1.2.1.1.4 閉創の方法

約20mmの皮膚切開部に対して、6-0ナイロン糸を7針で閉創した。顔面の動きに影響を与えないよう、弧状切開部が捩れを生じることなく閉鎖される必要があるが、伸縮性が著明のため困難を要した。そこで皮膚切開時に下顎角部に1mm未満の小さな切れ込みを入れてマーキングを行うことで、閉創の際の捻れやズレを防止することにした。

#### 1.2.1.2 計測する基準点およびヒゲの選択に関する検討

##### 1.2.1.2.1 計測する基準点の検討

これまでに報告のある鼻尖部および両側内眼角の midpoint を結ぶ線を正中の基準線とする方法の検討を行った(Guntinas-Lichius et al., 2002)。任意のヒゲの毛根から1cmの点—鼻尖—両側内眼角の midpoint (角度計測の基準点 Ver.1) が形成する角度による動画撮影・計測を行った(図7)。

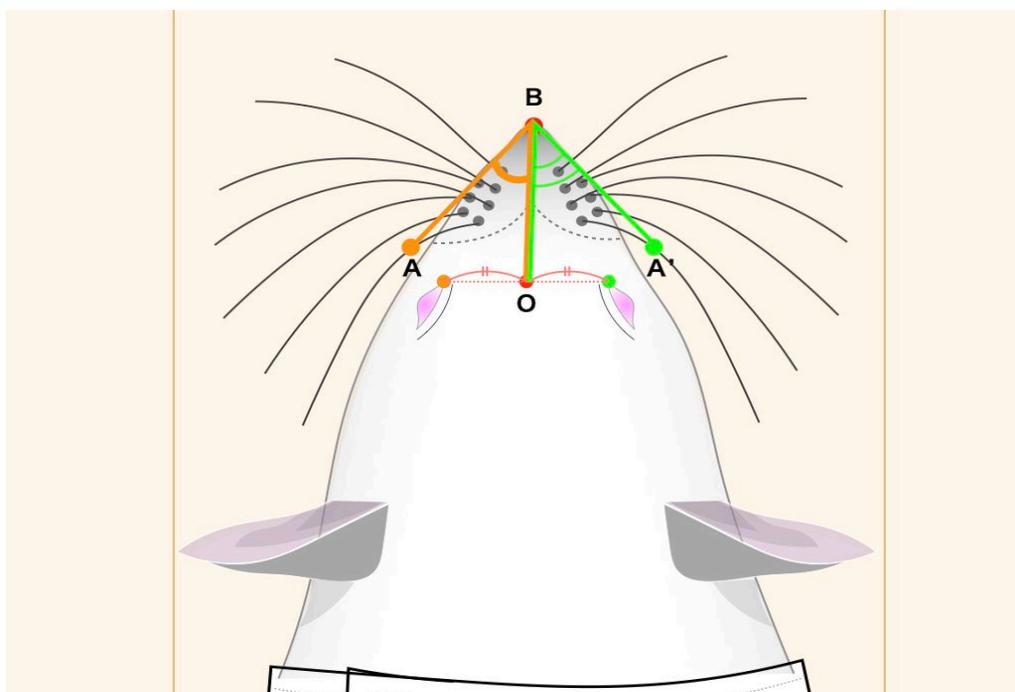


図7. 角度計測の基準点 Ver.1 に関するシェーマ

A : 任意のヒゲの毛根から1cmの点、B : 鼻尖、O : 両側内眼角の midpoint

顔面神経麻痺の程度により差はあるものの、麻痺により鼻は安静時に健側への偏位し(図8)、さらに顔面の動きで更なる健側への偏位の悪化を生じる。これにより、正中を規定する基準点として不適切であった。

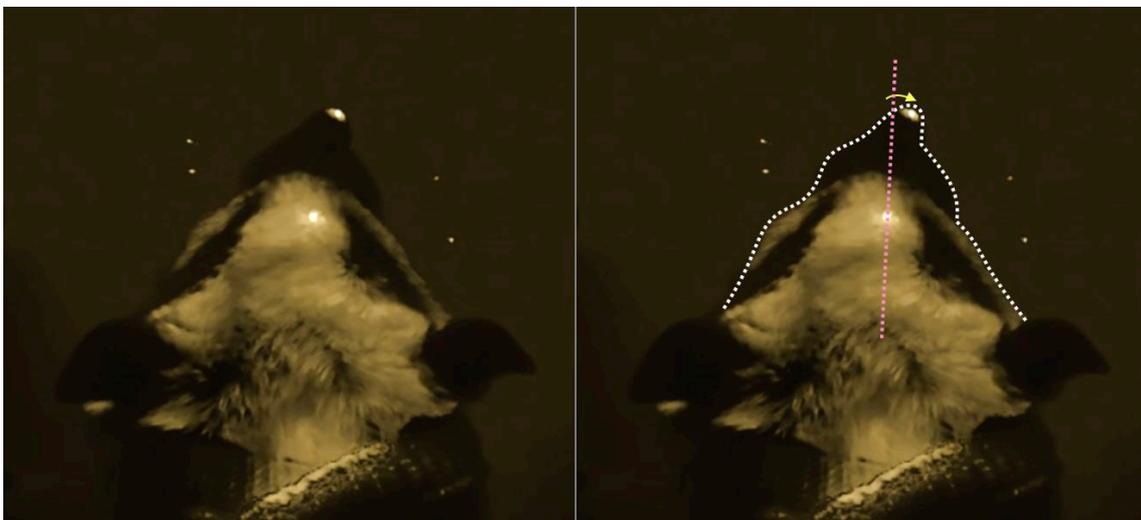


図8. 角度の変化を観察した実際の映像からの切り出し画像と、鼻尖の偏位  
鼻尖が、右方変異(健側)していることがわかる。

そこで次に鼻尖部に代わる正中の基準点として、頬部の皮膚の色調が白から淡赤色に変化する境界かつ正中に当たる点について検討した。正中の指標を極める基準点として色調の境界線がやや不明瞭であり、さらにその境界線上の正中に当たる点は明確な指標がないため感覚的に選択しなければならない問題があったが、この点を正中の指標の一つとして使用し、両側内眼角の midpoint と結ぶ線を正中の基準線として、ヒゲの動きの測定を試みた。任意のヒゲの毛根から1 cm の点—皮膚の色調が変わる境界で正中に当たる点—両側内眼角の midpoint (角度計測の基準点 Ver.2) が形成する角度による動画撮影・計測を行った(図9)。ヒゲは放射状に生えているが、ヒゲの動きに伴って表情筋が作用するため、毛根の位置も動く複雑な動きとなっていることがわかり、この方法による角度では、そもそも基準点の選択が曖昧であるだけでなく、ヒゲの放射状の動きに対して無関係な点であり、客観性・正確性に乏しい指標であると考えられた。

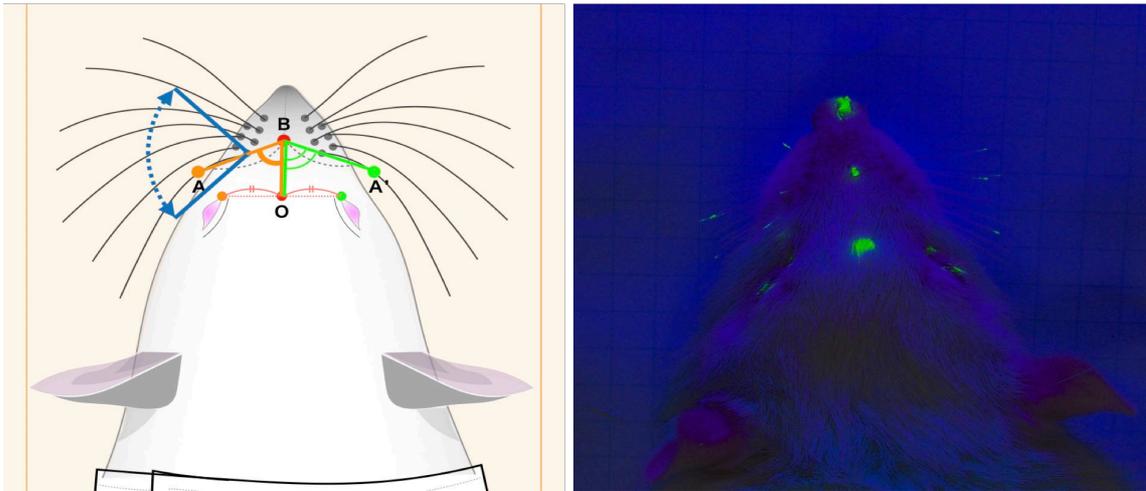


図9. 角度計測の基準点 Ver.2 に関するシエーマ

A : 任意のヒゲの毛根から 1 cm の点、B : 皮膚の色調が変わる境界で正中に当たる点、O : 両側内眼角の midpoint

そこで毛根自体を計測点とした角度の評価を可能とすべく、毛根への塗料の染色法について検討した。これまで爪楊枝を用いてマーキングを行っていたが、より細かい操作が必要となるため、26 G 針を用いた。4 倍の顕微鏡下での操作を行うことで、毛根とそのヒゲだけへの塗料の染色が可能となった。

これによりヒゲ—その毛根—両側内眼角の midpoint (角度計測の基準点 Ver.3) が形成する角度を計測することができ (図 10)、直接的なヒゲの動きの評価が可能となった。

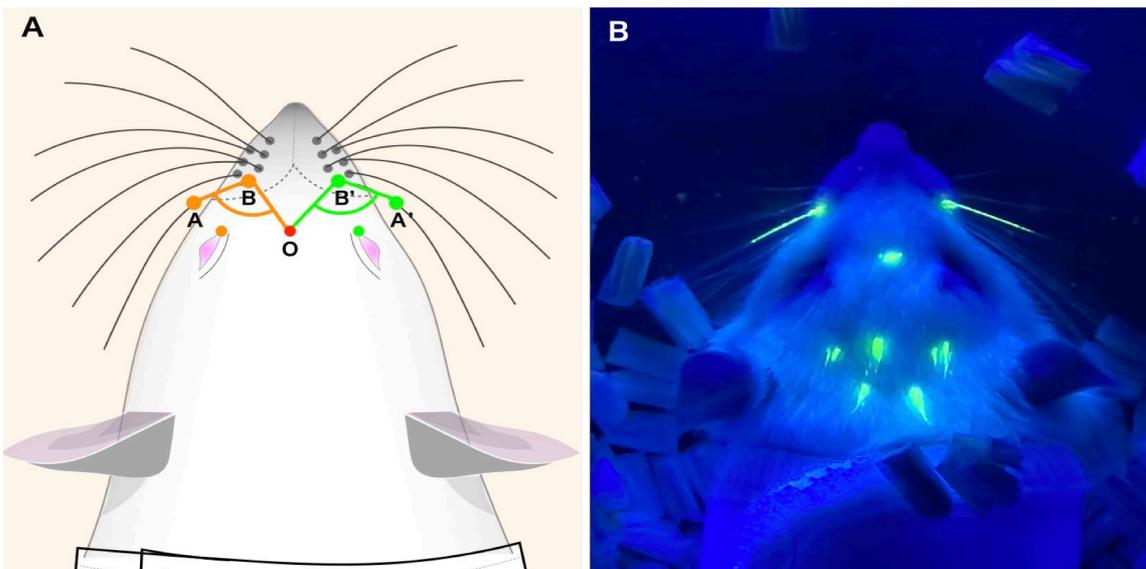


図 10. 角度計測の基準点 Ver.3 に関するシエーマと実際の映像より切り出し画像

A : 任意のヒゲの毛根から 1 cm の点、B : そのヒゲの毛根、O : 両側内眼角の midpoint

### 1.2.1.2.2 ヒゲとその毛根の選択に関する検討

ヒゲとその毛根の選択については、まず頭側から口側にかけて5~6段、そして各段に6列前後の毛根があるとされる(Towal et al., 2011)。ヒゲの選択において鼻側~尾側方向のヒゲの選択については、同一個体で2つの毛根からのヒゲの動きの評価を行ったところ、可能な限り尾側の方がヒゲの動きは大きい傾向にあり(図11)、顔面神経麻痺の回復の程度の評価に相応しいと考えられたが、6列目の毛根による評価では、動きが最大の際に体に触れてしまい、最大の動きを計測することが不可能であった。これにより4列目の毛根を選択することとした。

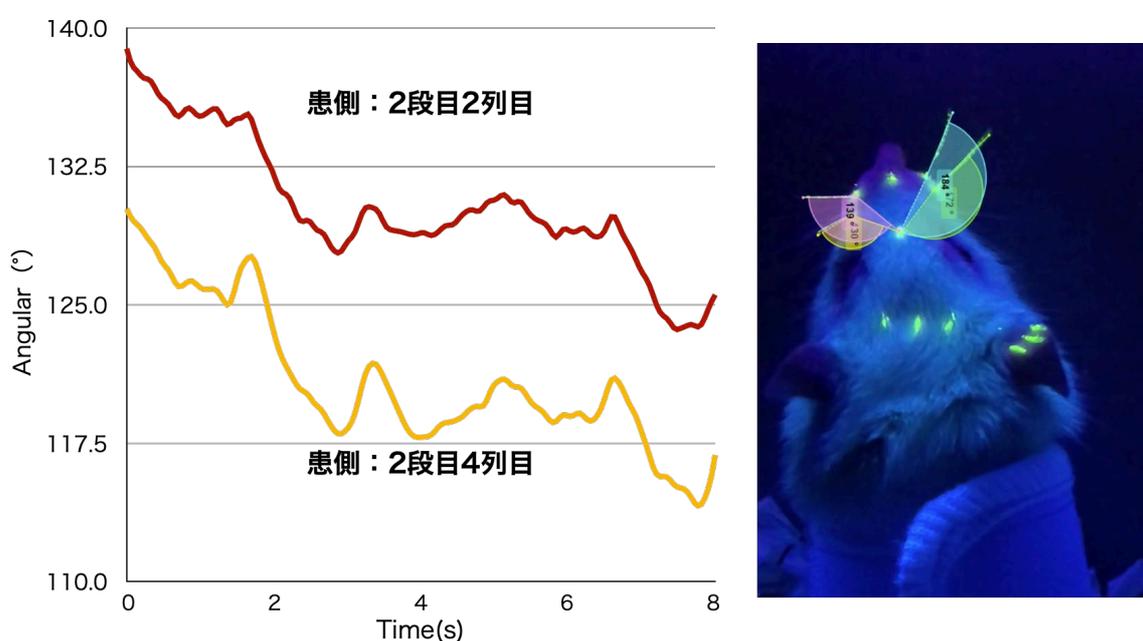


図11. 毛根の同段における2列目と4列目（鼻側と尾側）のヒゲの変化量の比較

また、毛根をマーキングし、計測点とするためには、頭上からの動画撮影において死角にならないことが条件となる。頭側~口側の段の選択において、より頭側では、ヒゲの動きが映像の角度に対して垂直な動きからかけ離れてしまうため、動きに対する評価として不適切である。また、撮影可能な範囲で死角に入るわずか手前の可能な限り口側の毛根を選択することは、ラットの首の動きで捻りの動きが生じた際に左右どちらかの毛根が死角に入ってしまうため、計測条件から自動的に除外することができる(図12)。これにより両側の毛根が両側動画で撮影できていることは、より首の動きが少ない条件での計測となりうる。このような条件を満たす毛根を検討すべく、評価を行ったが、2段目では両側の毛根が同時に撮影可能だが、3段目では両側の毛根が撮影不可能な個体が見られた。これにより2段目4列目の毛根からのヒゲを選択するという結論に至った。

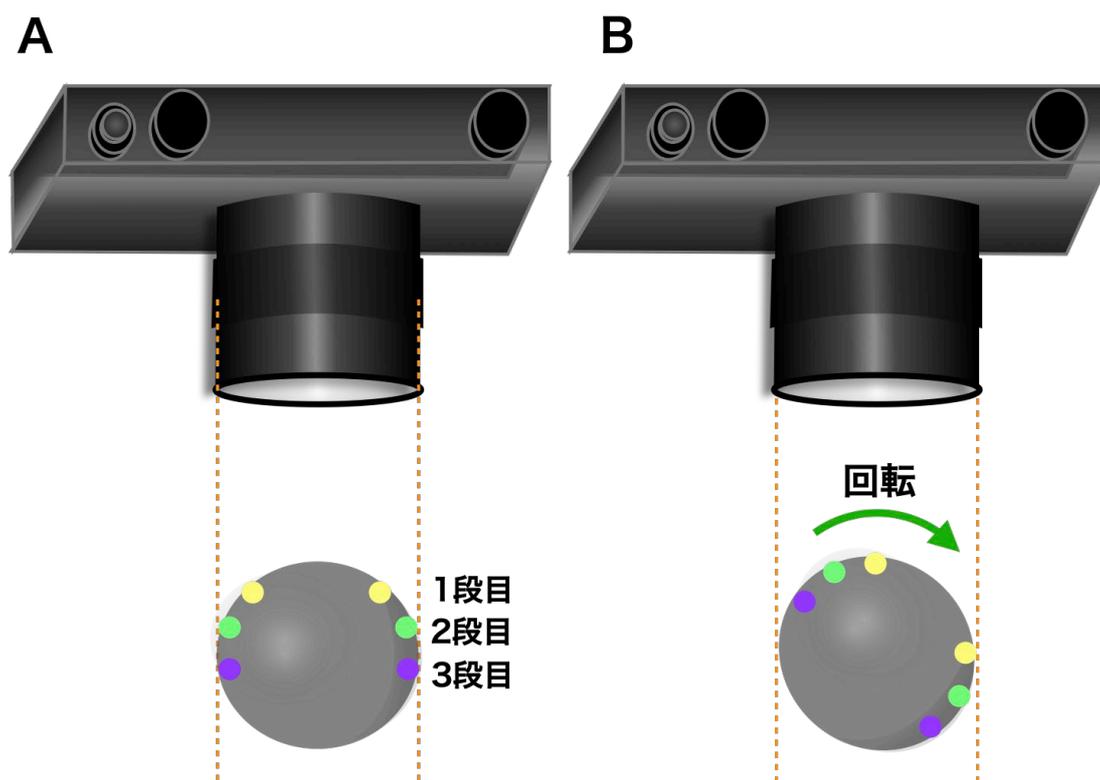


図 12. 毛根の段選択におけるカメラと死角の関係性

A：体の軸に対しての回転がなければ、2 段目は死角に入らない。

B：回転が生じると 2 段目の毛根は死角に入るため、評価不能となり自動的に評価から除外される。

### 1.2.1.3 評価において制御不可能である頭部の動きによる影響と角度および角速度の 2 つの指標の関係性に関する検討

当初の実験計画では、ヒゲの角度の変化量を測定する予定としていた。実際に計測を行ったところ、首のひねるような動きがわずかにでもあるとグラフのようにヒゲの動きの基線が変動してしまい、時間経過の中での角度の変化量の測定に影響が大きく、評価困難であった(図 13A)。

そこで、時間を限りなく短くした時の角度の変化量つまり時間を微分し、角速度による評価を行うことで、より容易にかつ動きの影響の少ない評価が可能になることが予想されるため、角速度による評価も同時に行った。これらの評価は、Kinovea による角度解析の結果を角度だけでなく角速度についても同時に算出する機能が備わっており、その機能を使って評価を行った。グラフに示すように角度の変化を用いた評価では、首の動きにより基線の変動が生じてしまい、どの動きを評価として計測するかの決定が困難だった。先に説明した毛根の選択によって首の動きの影響が最小限である撮影時間を選択できるようになったが、それでも動きによる影響を受けて、計測

が非常に煩雑となる。一方で首の動きの影響を完全に除外するのは困難だが、緩やかな首の動きであれば、ヒゲの動きは非常に速い動きであり、その点だけでも影響は極めて小さいと考えられる。さらに首の動きはヒゲの動きのベクトルとは異なる方向のベクトルの動きであるため、角速度を評価の指標にするにあたって、コントロール困難な小さな首の動きについては無視する事とした。

また角速度を用いた評価により、より単純な曲線としてグラフに示すことが可能となった。これにより規定時間内の最大の加速度を直感的に視覚的に認識可能であり、計測も容易となった(図 13B)。以上から、BASS 法における評価項目を角度ではなく角速度に変更を行うこととした。

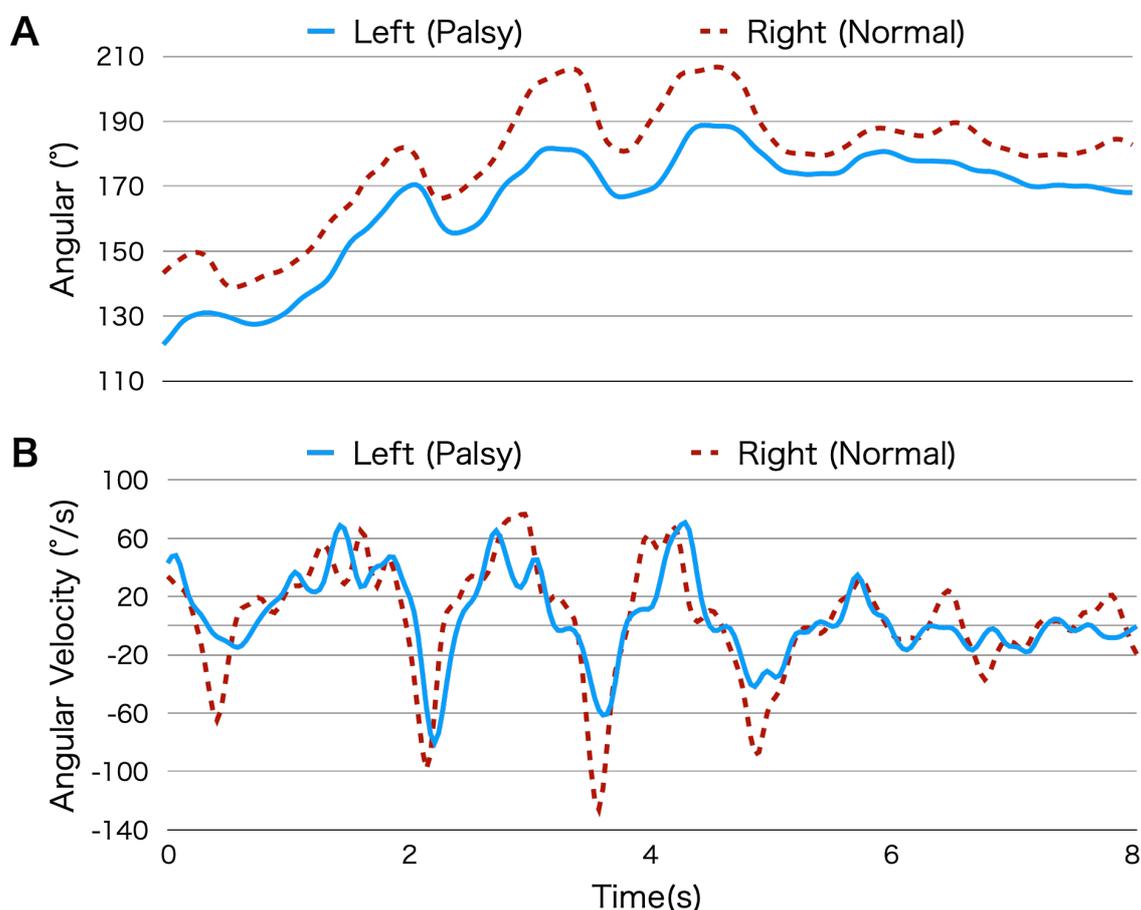


図 13. 角度変化および角速度変化を BASS 法によって計測した際の比較

A：角度を用いた評価、B：角速度を用いた評価

角度変化では緩やかな首の動きでも基線が変動してしまうため、ヒゲの変化量の測定ポイントの設定が難しくなる。一方で角速度では、0を基準とした正負の変化として図示可能であり、変化量を把握しやすいメリットがある。

## 1.2.2 本実験

### 1.2.2.1 モデル作製手技

パイロット実験の Cut & Suture モデルと比較し、Crush injury モデルでは神経縫合手技が不要であり、剥離と挫滅の手技のみとなるため、より手技が容易となった。術後2週の安楽死まで合併症なく生存しただけでなく、モデル作製にかかる手術時間も1人で行ってパイロット実験のモデル作成が1匹に約30分を要したところが、約10分に短縮することができた。

手術操作を加えた範囲に解剖学的変異は認めなかった。全例において Buccal branch と Marginal branch が存在し、それぞれ15~20mm程度の長さが確認できたため、10mmの神経切除および神経の挫滅による介入に十分であった。

### 1.2.2.2 角速度における複数の指標の評価を用いた正常ラットおよび顔面神経麻痺モデルでの検討

角速度については、方法の項で述べた  $V_{pro}$ 、 $V_{re}$ 、 $V_{max}$ 、 $V_{total}$  の4つの指標に分けて評価した。

#### 1.2.2.2.1 正常ラットを用いた評価法の妥当性に関する検討

##### 1.2.2.2.1.1 正常ラットを用いて BASS 法の実現性の検討（各個体1回のみ評価）

6匹のラットの正常モデルを用いた各1回の BASS 法の評価を行い、本方法の実現性の検討を行った(図14)。正常ラットにおける BASS スコアの平均(±標準誤差)は、 $V_{max} = 115.0 \pm 6.0\%$ 、 $V_{pro} = 97.2 \pm 9.5\%$ 、 $V_{re} = 106.1 \pm 10.4\%$ 、 $V_{total} = 101.6 \pm 6.6\%$ だった。分散分析において角速度の指標における個体間での有意差を認めなかった( $p=0.4891$ )。各2群間の比較でも全てにおいて有意差を認めなかった(図15)。

上記の結果から、有意差はないが、傾向として  $V_{total}$  が最も100%に近かった。また有意差は無いが、 $V_{pro}$ 、 $V_{re}$  は誤差が大きい傾向があった。この結果の傾向を検証すべく、次に示すような各個体につき6回の BASS 法による評価の結果を用いた検討を行った。

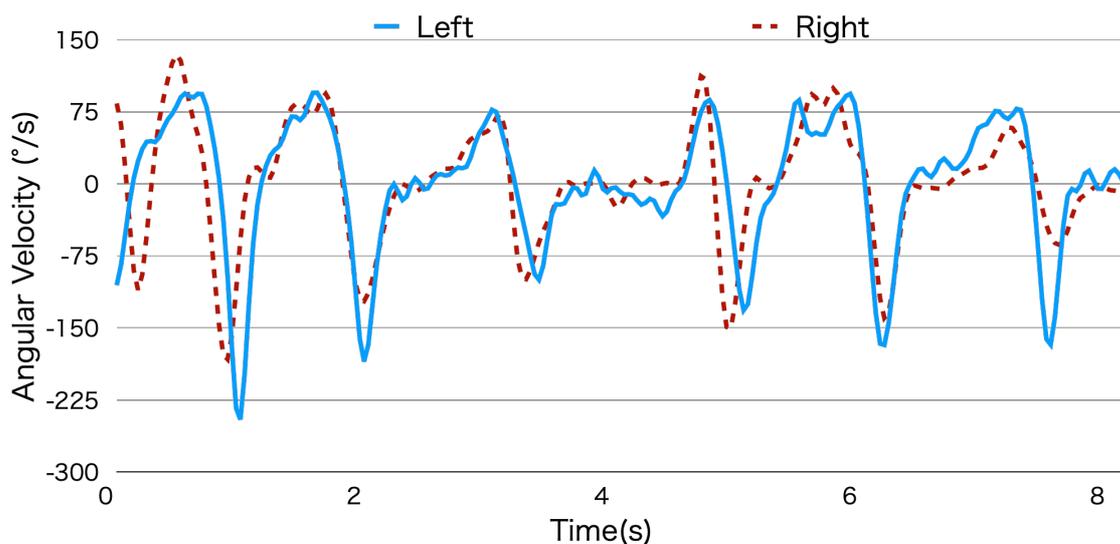
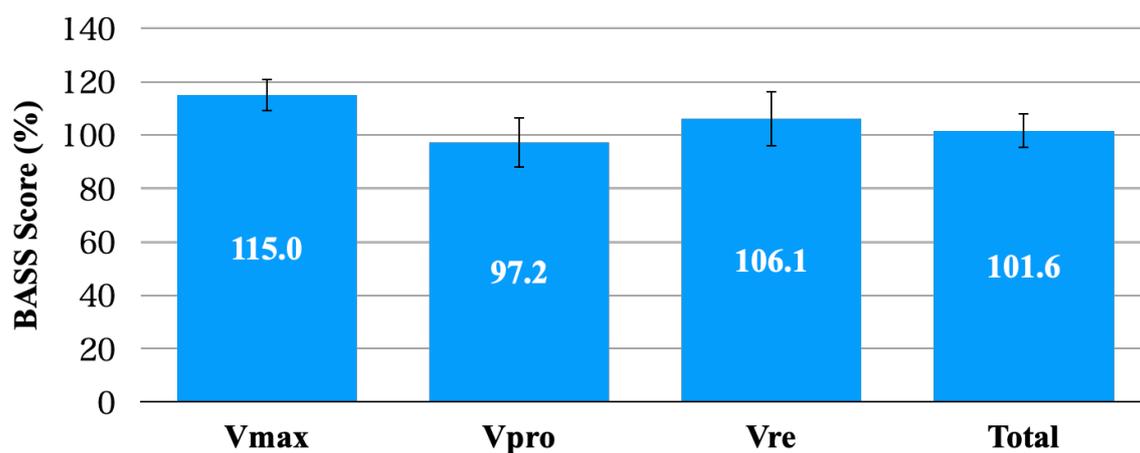


図 14. 正常ラットを用いた BASS 法による角速度の変化  
左右差は僅かに認めるが、ほぼ左右差のない結果となった。



	Vmax	Vpro	Vre	Vtotal
BASS Score	115.0	97.2	106.1	101.6
SE	6.0	9.5	10.4	6.6

図 15. 正常ラットを用いた BASS 法による角速度の指標と結果  
Vmax、Vpro、Vre、Vtotal の 4 つの指標による評価の中で、Vmax および Vtotal の標準誤差は小さく、Vtotal が 100% に最も近かった。

### 1.2.2.2.1.2 正常ラットを用いて BASS 法の精度や妥当性の検討

前項での結果およびその傾向を踏まえて、詳細な検討を行った。

各個体に対して6回の計測を行った。また、その精度や妥当性の評価を行った。評価にあたり、BASS法の結果から理想値である100%との差を絶対値(|BASS score-100|)として算出した。BASS法の結果および算出した理想値との差を表1に示した(表1)。BASS法の結果および理想値との差の絶対値(|BASS score-100|)を用いて個体内および個体間そして全体(計36回)でのBASS法の精度および角速度の指標による違いについて検討を行った。

表1 各個体の6回のBASS scoreとそこから算出した理想値との差の絶対値

Rat	Test	BASS Score				BASS score-100			
		Vmax	Vpro	Vre	Vtotal	Vmax	Vpro	Vre	Vtotal
A	T1	122.8	121.6	122.8	122.4	22.8	21.6	22.8	22.4
	T2	113.4	80.4	113.4	96.9	13.4	19.6	13.4	3.1
	T3	119.6	119.6	90.8	105.2	19.6	19.6	9.2	5.2
	T4	116.4	116.4	110.5	113.5	16.4	16.4	10.5	13.5
	T5	124.1	124.1	95.3	109.7	24.1	24.1	4.7	9.7
	T6	115.2	93.2	115.2	104.2	15.2	6.8	15.2	4.2
B	T1	90	83.3	90	88	10	16.7	10	12
	T2	96.2	81.4	96.3	88.9	3.8	18.6	3.7	11.1
	T3	106.9	96.6	106.9	101.8	6.9	3.4	6.9	1.8
	T4	115.3	76.9	115.3	96.1	15.3	23.1	15.3	3.9
	T5	125.4	79.7	125.4	102.6	25.4	20.3	25.4	2.6
	T6	131.1	131.1	83.3	107.2	31.1	31.1	16.7	7.2
C	T1	134.3	70.6	134.3	107.3	34.3	29.4	34.3	7.3
	T2	104.2	98.3	104.2	101.3	4.2	1.7	4.2	1.3
	T3	105.4	105.4	82.2	93.8	5.4	5.4	17.8	6.2
	T4	112.4	112.4	86.6	99.5	12.4	12.4	13.4	0.5
	T5	132.2	85.1	132.2	108.7	32.2	14.9	32.2	8.7
	T6	118.2	115.3	118.2	116.8	18.2	15.3	18.2	16.8
D	T1	116.1	115.1	116.1	115.7	16.1	15.1	16.1	15.7
	T2	121.4	121.1	101.4	111.3	21.4	21.1	1.4	11.3
	T3	89.5	89.5	85.2	87.4	10.5	10.5	14.8	12.6
	T4	108.2	103.3	108.2	105.8	8.2	3.3	8.2	5.8
	T5	112.2	112.2	97.3	104.8	12.2	12.2	2.7	4.8
	T6	118.3	84.4	118.3	101.4	18.3	15.6	18.3	1.4
E	T1	109.7	75.1	109.7	94.1	9.7	24.9	9.7	5.9
	T2	107.1	82.2	107.1	94.7	7.1	17.8	7.1	5.3
	T3	123.8	123.8	91.1	107.5	23.8	23.8	8.9	7.5
	T4	115.2	115.2	104.2	109.7	15.2	15.2	4.2	9.7
	T5	121.1	84.1	121.1	102.6	21.1	15.9	21.1	2.6
	T6	88.3	88.3	78.2	83.3	11.7	11.7	21.8	16.7
F	T1	117.2	117.2	63.5	81.8	17.2	17.2	36.5	18.2
	T2	102.4	82.1	102.4	92.3	2.4	17.9	2.4	7.7
	T3	134.2	134.2	98.1	116.2	34.2	34.2	1.9	16.2
	T4	114.2	114.2	103.2	108.7	14.2	14.2	3.2	8.7
	T5	122.2	96.3	122.2	109.3	22.2	3.7	22.2	9.3
	T6	89.2	89.2	84.1	86.7	10.8	10.8	15.9	13.3
合計		4093.4	3618.9	3734.3	3677.2	587	585.5	490.3	310.2
平均		113.7	100.5	103.7	102.1	16.3	16.3	13.6	8.6
SD		12.4	18.2	16.2	10.1	8.5	7.7	9.3	5.4

### 1.2.2.2.1.2.1 BASS 法の結果を用いた検討

BASS 法による角速度の指標と各個体での結果を表 2 に示した(表 2)。

角速度の指標による個体間での比較では、分散分析においてすべての角速度の指標における個体間での有意差を認めなかった ( $p=0.5355$ )。各個体 2 群間の比較でも全てにおいて有意差を認めなかった(図 16)。

個体内における検討においても、どの個体でも角速度の指標による有意差を認めなかった (A;  $p=0.3918$ , B;  $p=0.2164$ , C;  $p=0.2110$ , D;  $p=0.7292$ , E;  $p=0.3078$ , F;  $p=0.3440$ )。また 2 群間の比較でも有意差を認めなかった(図 17)。

個体 6 匹 (合計 36 回) の全測定値から角速度の指標による比較を行った(図 18)。4 つの角速度の指標において有意差が見られた ( $p=0.0007$ )。Steel-Dwass の検定で  $V_{max}$  と  $V_{pro}$  ( $p=0.0119$ )、 $V_{max}$  と  $V_{re}$  ( $p=0.0369$ )、 $V_{max}$  と  $V_{total}$  ( $p=0.0003$ ) の各組み合わせで有意差が見られた。

この結果から、 $V_{max}$  は、理想値である 100 から最も離れた結果であり、他の 3 つの角速度の指標よりも精度が低い可能性があり、BASS 法の計測の指標としては不適切である可能性が示唆された。

表 2 BASS 法による角速度の指標と各個体での結果

		BASS score						全体
		Rat A	Rat B	Rat C	Rat D	Rat E	Rat F	
<b>V<sub>max</sub></b>	平均	<b>118.6</b>	<b>110.8</b>	<b>117.8</b>	<b>111.0</b>	<b>110.9</b>	<b>113.2</b>	<b>113.7</b>
	SD	4.3	16.2	13.0	11.5	12.8	15.7	12.4
<b>V<sub>pro</sub></b>	平均	<b>109.2</b>	<b>91.5</b>	<b>97.9</b>	<b>104.3</b>	<b>94.8</b>	<b>105.5</b>	<b>100.5</b>
	SD	18.0	20.6	17.2	14.7	19.8	19.7	18.2
<b>V<sub>re</sub></b>	平均	<b>108.0</b>	<b>102.9</b>	<b>109.6</b>	<b>104.4</b>	<b>101.9</b>	<b>95.6</b>	<b>103.7</b>
	SD	12.4	15.9	22.4	12.4	15.1	19.9	16.2
<b>V<sub>total</sub></b>	平均	<b>108.7</b>	<b>97.4</b>	<b>104.6</b>	<b>104.4</b>	<b>98.7</b>	<b>99.2</b>	<b>102.1</b>
	SD	8.8	7.8	8.1	9.8	9.9	14.1	10.1

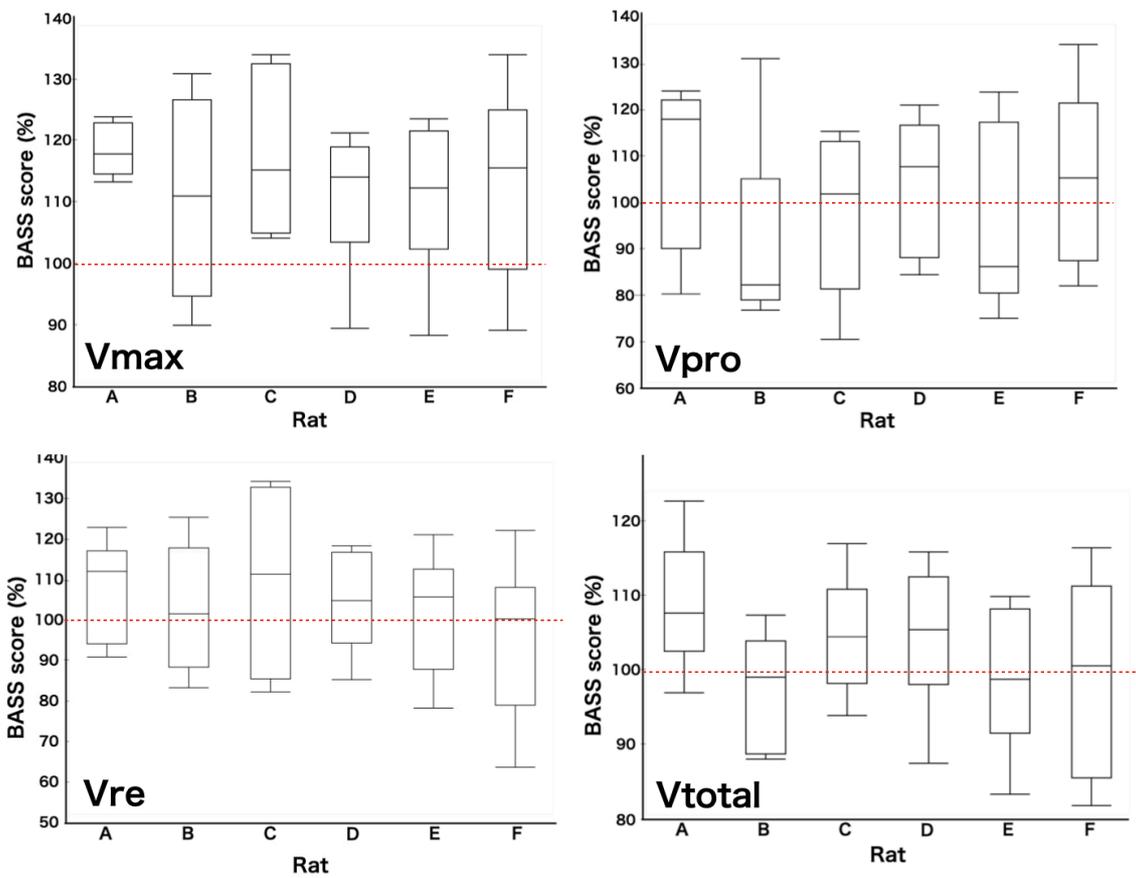


図 16 各個体における角速度の指標による比較（個体間評価）  
 角速度の指標における各個体間に有意差を認めなかった。

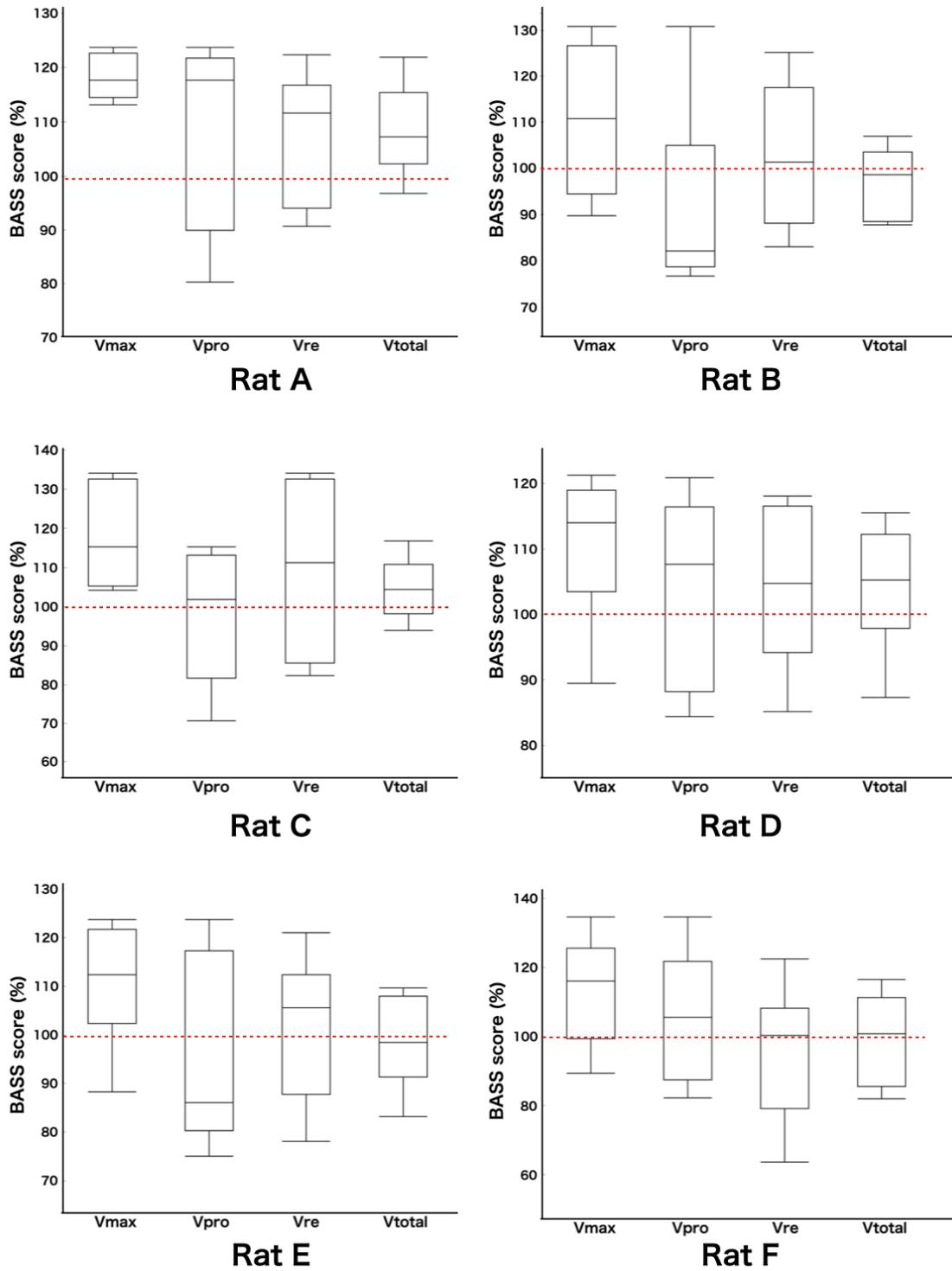


図 17 各個体における角速度の指標による比較（個体内評価）  
 各個体内での角速度の指標における比較で有意差を認めなかった。

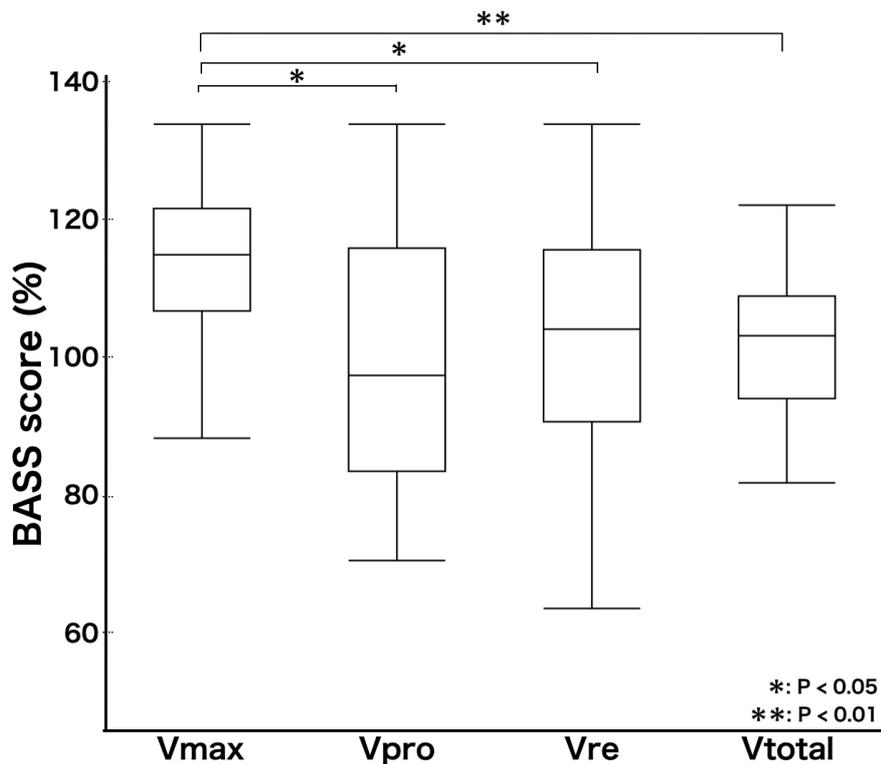


図 18 全ての結果における角速度の指標による比較

Vmax は他の 3 つの指標に比べて有意差を認め、理想値である 100 からも最も外れていた。

#### 1.2.2.2.1.2.1 理想値と結果の差を用いた検討

BASS の結果と同様に理想値からの差の絶対値を用いて検討を行った。

角速度の指標による個体間での比較では、分散分析ですべての角速度の指標における個体間での有意差を認めなかった ( $p=0.9557$ )。Tukey-Kramer の HSD 検定を用いた各個体 2 群間の比較でも全てにおいて有意差を認めなかった (図 19)。

個体内における検討においても、分散分析でどの個体でも角速度の指標による有意差を認めなかった (A;  $p=0.0538$ , B;  $p=0.1015$ , C;  $p=0.1604$ , D;  $p=0.3454$ , E;  $p=0.0541$ , F;  $p=0.8504$ )。また 2 群間の比較でも有意差を認めなかった (図 20)。

個体 6 匹 (合計 36 回) の全測定値から角速度の指標による比較を行った (図 21)。分散分析で 4 つの角速度の指標において有意差が見られた ( $p=0.0003$ )。2 群間の比較では、Vtotal と Vmax ( $p=0.0003$ )、Vtotal と Vpro ( $p=0.0010$ )、Vtotal と Vre ( $p=0.0250$ ) の各組み合わせで有意差を認めた。

この結果から、角速度の指標の中でも Vtotal が最も理想値に近い結果となるため、BASS 法における評価の指標として最も適切である可能性が示唆された。

表3 理想値からの差の絶対値による角速度の指標および各個体での結果

		BASS score-100						全体
		Rat A	Rat B	Rat C	Rat D	Rat E	Rat F	
<b>Vmax</b>	平均	<b>18.6</b>	<b>15.4</b>	<b>17.8</b>	<b>14.5</b>	<b>14.8</b>	<b>16.8</b>	<b>16.3</b>
	SD	4.3	10.8	13.0	8.5	6.6	10.8	8.5
<b>Vpro</b>	平均	<b>18.0</b>	<b>18.9</b>	<b>13.2</b>	<b>13.0</b>	<b>18.2</b>	<b>16.3</b>	<b>16.3</b>
	SD	6.1	18.8	9.6	7.7	5.2	10.2	7.7
<b>Vre</b>	平均	<b>12.6</b>	<b>13.0</b>	<b>20.0</b>	<b>10.3</b>	<b>12.1</b>	<b>13.7</b>	<b>13.6</b>
	SD	6.2	7.8	11.4	9.3	7.5	14.0	9.3
<b>Vtotal</b>	平均	<b>9.7</b>	<b>6.4</b>	<b>6.8</b>	<b>8.6</b>	<b>8.0</b>	<b>12.2</b>	<b>8.6</b>
	SD	7.3	4.4	5.9	5.4	4.9	4.3	5.4

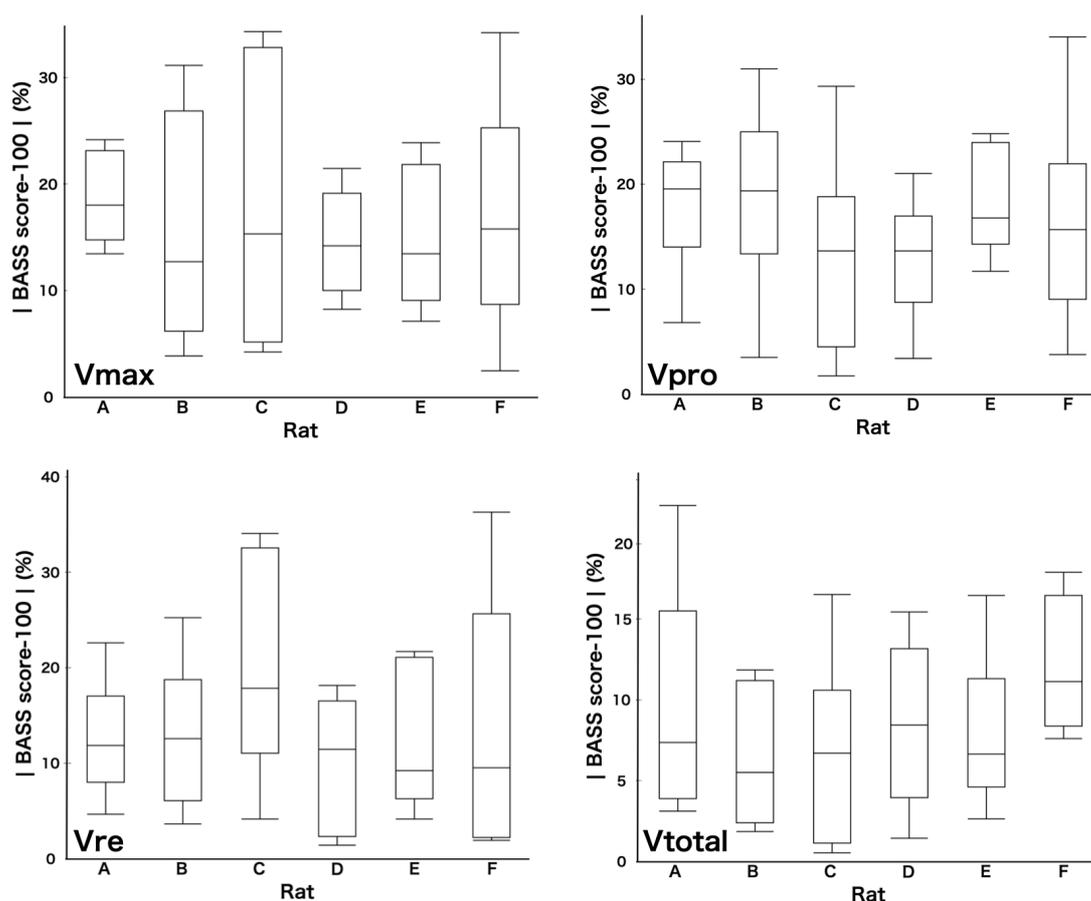


図19 理想値との差を用いた各個体における角速度の指標による比較  
角速度の指標における各個体間の結果において有意差を認めなかった。

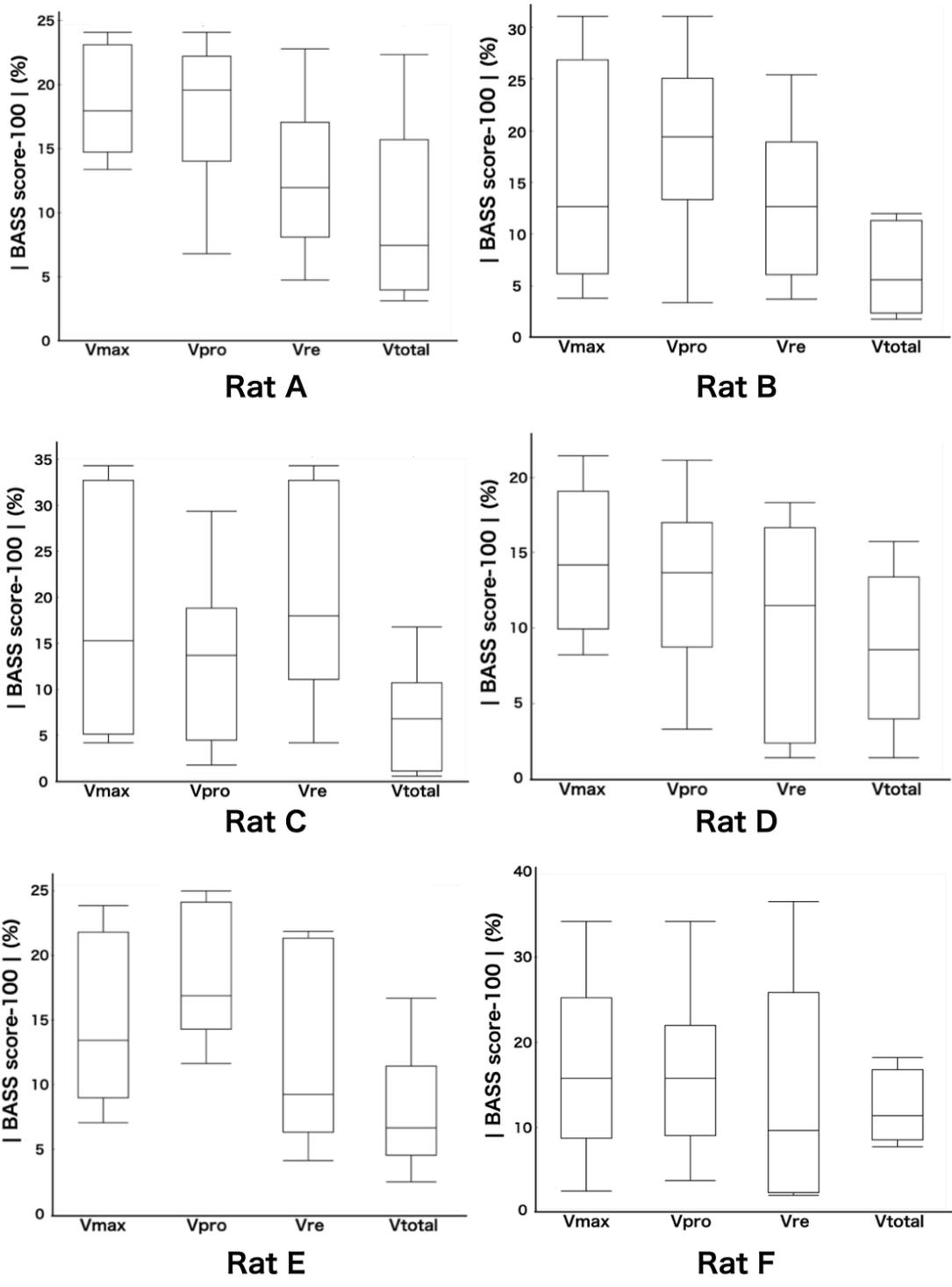


図 20 理想値との差を用いた各個体における角速度の指標による比較  
各個体内での角速度の指標における比較で有意差を認めなかった。

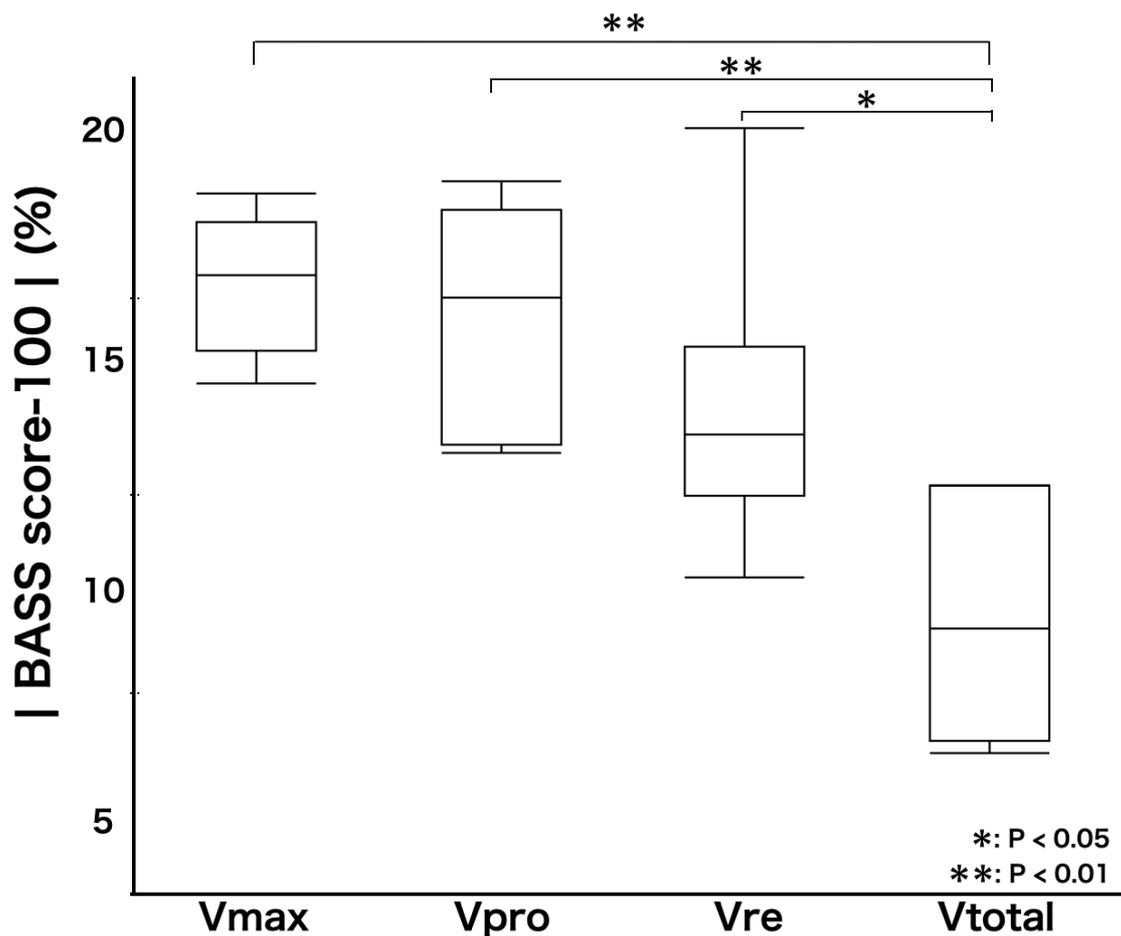


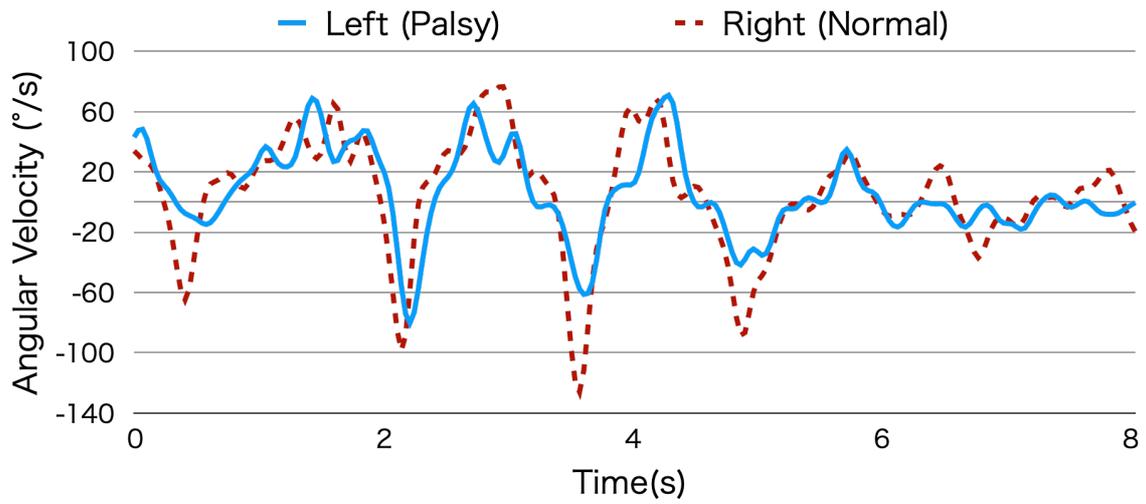
図 21 理想値との差を用いた全ての結果における角速度の指標による比較  
 Vtotal は他の 3 つの指標に比べて有意差を認め、理想値に最も近かった。

#### 1.2.2.2.2 顔面神経麻痺モデルを用いた評価法の再現性に関する検討

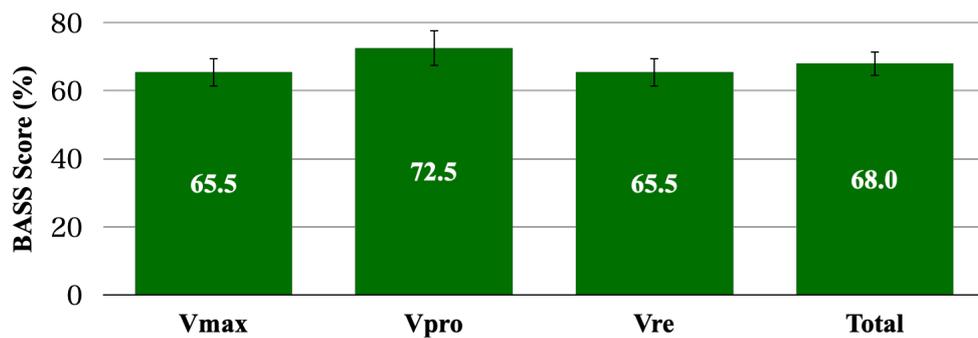
Crush injury を用いた顔面神経不全麻痺モデルを用いて、同様に BASS 法による評価を行った(図 22)。顔面神経麻痺モデルにおける BASS スコアの平均 ( $\pm$  標準誤差) は、 $V_{max} = 65.5 \pm 4.2\%$ 、 $V_{pro} = 72.5 \pm 5.3\%$ 、 $V_{re} = 65.5 \pm 4.2\%$ 、 $V_{total} = 68.0 \pm 3.6\%$  であった。統計的解析においても、分散分析において有意差は認めなかった

( $p=0.6405$ )。Steel-Dwass の検定を用いた各個体 2 群間の比較でも全てにおいて有意差を認めなかった。

しかし傾向として、角速度のどの指標も誤差は少ないものの、その中でも特に Vtotal の分散が小さかった(図 23)。



22. 顔面神経麻痺ラットを用いた BASS 法による角速度の変化



	Vmax	Vpro	Vre	Vtotal
<b>BASS Score</b>	65.5	72.5	65.5	68.0
<b>SE</b>	4.2	5.3	4.2	3.6

図 23. 顔面神経麻痺 (Crush injury) ラットを用いた BASS 法による評価  
Vmax、Vpro、Vre、Vtotal の 4 つの指標の中で、Vtotal の標準誤差が最も小さい。

## 1.3 考察

### 1.3.1 BASS 法考案に至る背景

我々は、臨床現場で顔面神経麻痺に対して外科的治療を中心に治療を行っており、術前後の麻痺およびその改善の程度を評価するにあたり、柳原法や House Brackmann 法、Sunnybrook 法などの広く使用されている方法を用いて、評価を行ってきた。柳原法は安静時の左右対称性と 9 項目の表情運動を 0-4 点で評価するものであり、非常に簡便であることから国内外でも特に広く使われている方法となっている。同様に House Brackmann 法では、安静時の対称性や額のしわ寄せ、閉眼の有無、口角の運動、共同運動、拘縮、痙攣などから総合的に判断して Grade I～VI で評価を行う。また Sunnybrook 法では、随意運動の回復、安静時非対称、病的共同運動などから総合点で評価する方法である。

これらの方法は、簡便でわかりやすい一方で、定量化ができず、判断も評価者側の主観によるものとなるため、客観性・再現性において不十分であることから、新たな方法の確立が望まれており、近年 3 次元カメラやビデオ撮影を用いた様々な方法が報告されてきた。

Sawyer らは、顔面に複数の指標となる点を設定し、3 次元画像から顔面の動きを評価する方法を報告している(Sawyer et al., 2009)。この方法は、評価内容が顔面に設定した基準点に関わる動きのみであるなど評価内容が限られていた。これに対して、3 次元画像の重ね合わせ画像を用いて、設定した指標にとらわれないダイナミックな変化を計測する方法も報告されている(Gibelli et al., 2017)。

このように臨床における評価法についても、近年新たな評価法確立に向けて様々な報告がある一方で、未だスタンダードとなる評価法は存在していない。この点については、原因として 2 次元および 3 次元映像を用いた評価法は、従来の方法に比べて客観性の点で非常に優れるものの、測定法が確立されていないため再現性の点で問題があり、さらには評価法導入に必要な機材のコストや複雑さなどの問題があるためではないかと考えられる。

このように現時点において古典的な評価法に代わるものは存在せず、結果として柳原法などの従来の古典的な方法を用いて評価を行っているのが現状である。

同様に動物を用いた顔面神経麻痺研究でも、顔面の動きが顔面神経麻痺の程度評価の 1 つとして使用されており、その評価法について様々な報告がなされてきた。しかし動物実験においても、これまでに確立されたスタンダードとなる評価法が存在しない。したがって、これまでは研究報告ごとに異なる方法・手技・指標が用いられており、研究間での比較検討を行うことができなかった。

動物実験では、臨床と異なり従命によって特定の動きを実行させるような評価は不可能である。そのため、結果として長時間の観察による肉眼的な評価または映像を用いた評価法が報告されてきた。我々もラットのビデオ撮影を行い、ヒゲの動きに加えて眼の動きや位置の左右差を評価する評価法 (Facial Palsy Score) を報告してきた (Shichinohe et al., 2012)。更に近年では、人工神経並びに幹細胞を使用した神経移植術の研究が活発となり、神経長を確保しやすいなどの解剖学的特性から中顔面に特化した顔面神経麻痺評価が必要とされるようになった。Sasaki らは、我々が報告した方法をより中顔面に特化したシステムとして改変し、報告した (Sasaki et al., 2014)。しかしながら、これらの方法を含め、現時点までに広く様々な研究で使用されるようなスタンダードとなる評価法は存在していない。

このような背景から我々は、将来的な臨床応用を見据えた、新たなラットを用いた顔面神経麻痺研究におけるスタンダードとなる評価法の確立が重要であると考えた。理想的には、今後様々な科学の発展によって技術的に可能となるならば、複数のカメラまたはレンズを用いた3次元映像からの精度の高い解析による評価が最も望ましい。しかし、そこに至るまでには膨大な技術革新が必要であり、実現性は極めて低いと言わざるをえず、さらにはコストの問題などもある。

そこで、新たな評価法確立に当たり、動きを正確に数値化することで客観性を持ち、かつ同じ部位を経時的に計測可能な再現性を備え、その中でも低コストかつ装置導入や測定が簡便な方法であることを条件とすべきであると考えた。

### 1.3.2 BASS 法におけるツールの選択とその利点

新たな評価法確立にあたり、特に顔面の動きを評価する上で臨床と動物実験で最も異なる点は、従命の可否である。つまり従命が不可能となる条件の中で、どのような工夫を用い、さらに計測法における仕組みを導入することで、より正確かつ再現性・客観性がある評価が可能となるのかについて十分な検討を行う必要があると考えられた。そこで、BASS 法の根幹である以下にあげる3つのツールを使用する新たなコンセプトを用いることによって、これまでに実現することが出来なかった客観性・再現性に優れ、かつ低コストなどの導入障壁の低い新たな評価法の確立が可能になるのではないかと考えた。

神経損傷が生じるとその部位から末梢側の神経がワーラー変性を生じる。神経縫合や移植を行った際にその神経そのものが生着し作用するのではなく、あくまでも足場として作用し、損傷部から再生していく過程を経る。そのため、顔面神経麻痺をはじめとする神経麻痺治療では、機能回復には時間を要してしまう。そのため、経時的に

麻痺の改善の程度を評価する必要があるため、動きの評価において毎回同じ部位の評価を選択的に繰り返し実現可能であるといった再現性が非常に重要である。

しかし、ラットの毛根は多数あり、本研究で行なった同一個体において異なる毛根からのヒゲの動きの程度の結果でも示したように、選択する毛根によって結果は異なってしまう。したがって同じ毛根およびヒゲを選択的に計測できなければ、再現性の担保は不可能である。つまり特定の毛根およびヒゲを選択した際に、その部位をマーキングし可視化する方法が必要である。そこで解決策として BASS 法の 1 つ目のツールである、ブラックライトとそれに対応する蛍光塗料を使用した。ブラックライトと蛍光塗料は、医療目的だけでなく、様々な照明や野外コンサートの入場確認、紙幣の偽造防止や異物・汚染のチェック目的など様々な分野で使用されており、安価で導入が容易なツールである。

ラットのヒゲは白色で非常に細く、通常の状態では肉眼で正確に動きを把握することは困難である。そこにブラックライト用の蛍光塗料をヒゲに塗布することで、ブラックライト照射下では、塗料の蛍光作用によって他のヒゲとははっきりとしたコントラストを持たせることが可能となるため、動きを容易に認識可能となる。さらに、この塗料を同じ特定の毛根およびヒゲに染色することによって、同一個体の同じ毛根とそのヒゲの動きを何度でも繰り返し評価が可能となるため、神経研究に必要な経時的な観察が可能となり、再現性に大きく寄与させることが出来たと考えられた。領域は異なるものの眼科における臨床での眼球表面の評価の際に、フルオロセインを用いた蛍光染色を行う方法が一般的に用いられている。この方法も、BASS 法における蛍光塗料による染色と類似したコンセプトであり、様々な領域で蛍光染色を用いた評価法が駆使されていると考えられる。

2 つ目のツールとして、BASS 法の根幹となるものがスマートフォンを用いたハイフレーム撮影である。ラットのヒゲの動きを撮影するにあたり、ヒゲの動きはかなり速く、通常の一般的な動画撮影に使われる 1 秒間の 30 フレームによる撮影 (30 fps) では、ヒゲの動きがブレのある映像となり、正確な評価は不可能である。したがって 1 秒間により多くのフレームで撮影を行うハイフレーム撮影が不可欠である。また、従命不可であるためにラットの頭部の動きの制御ができないことから、長時間撮影した後でより動きの少なく、評価に適したタイミングを選択し評価する必要があるため、数分以上の連続撮影が可能である必要がある。つまり長時間ハイフレーム撮影が可能カメラを使用しなければならない。近年スマートフォンの技術革新がめざましく、特にカメラ領域の発展は目を見張るものがあり、その点に着目した。

数多あるスマートフォンの中でも、本研究では iPhone X を使用した。iPhone X は HD 解像度 (1920×1080) による 240 fps の映像を数分以上にわたって連続的に撮影が可能となっている。また iPhone には多くのモデルが存在するが、それらの中でも最

新の製品である必要性はなく、iPhone 8以降であればHD画質でのハイフレーム撮影が可能であるため、安価に機材を入手可能であるだけでなく、世界中に広く流通した製品であるため入手も容易である。スポーツのフォームチェックや特殊撮影に用いられるような業務用のハイフレーム撮影専用カメラも存在するが、そのような製品は、さらにフレーム数が多くかつ長時間撮影可能であるが、非常に高価であり評価法の確立にあたって導入の障壁となる可能性が高いと考えられる。また最近では民生用カメラや他のスマートフォンでもハイフレーム撮影が可能な製品が販売されるようになってきたが、数秒までにとどまるものが多く、ラットの評価を行うには連続撮影時間が不十分と考えられた(表3)。ただしこの点については、技術進歩に伴い、長時間ハイフレーム撮影を可能とする製品が今後増加すると思われるため、撮影機材の選択肢が増える可能性は高いと考えている。

以上のような背景から、本研究ではiPhoneをカメラとして選択することで、結果としてより頭の動きの影響の少ない時間を選択し、かつハイフレーム撮影を行うことでクリアな映像として記録し、正確に評価することが可能となった。

表4. 主なカメラとハイフレーム撮影

モデル	iPhone X	スマートフォン	民生用カメラ	業務用カメラ
最大フレームレート	240 fps	240~960 fps	240~960 fps	1000 fps <
240 fpsでの最長撮影時間	> 10 分	< 10 秒	< 10 秒	> 1 時間
コスト	低	低	中	高

最後に3つ目のツールが動画解析ソフトウェアである。評価法の客観性を担保するためには、撮影した動画から可能な限り主観性が入ることなく自動的に解析が行われることが望ましい。近年では、様々なスポーツにおいてフォーム確認などの目的で映像から特定のマーキングした部位をトラッキングし、角度や速度を解析する方法が用いられている。このような方法においては、計測部位が映像内で周囲とコントラストがはっきりしているか、または映像内にマーキングなどがなされていることが必要である。したがって、1つ目のツールとして挙げた蛍光塗料で染色しブラックライト照射下で撮影を行うことで、測定したい部位のコントラストが明瞭となるため、ソフトウェア上でその部位を選択することで自動的にトラッキングが可能となる。しかしながら、このような機能をもつソフトウェアは、様々な研究で使われているものの、非常に高額であった。さらには多機能かつ複雑な解析にも対応可能であるが、一方で不要な機能も多かった。そこで本研究では、オープンソースのソフトウェアであるKinoveaを使用した。Kinoveaでは、計測に必要な計測点を指定するだけで、自動的

にその角度をトラッキングし、角度の変化を計測する機能を有し、角度のみならず角速度も同時に算出可能である。このソフトウェアを使用することで、コンピューターがあれば誰でも無償かつ簡単に解析が可能となる。

このように、BASS 法はブラックライトと蛍光塗料、iPhone を用いたハイフレーム撮影、そして Kinovea を用いた動画解析の3つを用いることで、非常に低コストでありながら、これまでの方法よりも正確かつ再現性・客観性を備えた評価法を構築することが可能となったと考えられた(図 18)。



図 24. Kinovea を用いたヒゲの動きのトラッキング

ブラックライトと蛍光塗料によってコントラストの付加された映像により、Kinovea による自動トラッキング機能を用いてヒゲの角度の評価が可能になった。

### 1.3.3 BASS 法における基準点並びに評価項目について

本研究で最も苦勞を要したのは、基準点と評価項目の設定にある。まず基準点については、これまでの類似した報告を参考に設定し、検討を行なった。しかし、これまでの方法は、あくまでも撮影した映像に後から基準点を設けて計測しており、さらに

はその撮影した映像で詳細なヒゲや毛根の認識・判別は困難であることなどから、計測点は映像内で判別可能な限られた選択肢の中から選ばざるを得ず、結果として正確な評価は不可能であったと考えられた。

今回の BASS 法のコンセプトにおいては、撮影してから選択するのではなく、設定した選択点を蛍光塗料で染色してから撮影するといった真逆の手順となるため、研究者側が意図した計測点の設定が可能となるなど根本的に異なる方法である。つまり、BASS 法ではこれまで不可能だった自在な評価・計測部位の選択が可能となる。

したがって、これまでは映像では判別が困難であったため、特定のヒゲおよび毛根レベルでの選択は不可能であった。しかし、注射針や涙管ブジーなどの繊細な先端を持つ器械を用いることで、あらかじめ塗料を用いてマーキングが行うこと可能となり、特定のヒゲを選択的かつ正確に評価することが可能となった。さらにこの評価を行うにあたり、毛根周囲の皮膚が表情筋の作用によって変動するため、それに伴って毛根の位置も変動することが確認できた。このようなりアルな動きに対しても BASS 法では、容易に自動的に追従し計測が可能であるため、本方法の正確さを高める一つの根拠となると考えられた。したがって、BASS 法は細かな表情筋の動きによる毛根の位置の変化にも対応したこれまでの評価法よりも正確な表情筋を含めた顔面神経麻痺評価であると考えられた。

またラットのヒゲの動きの評価は、麻酔下では評価不可能であり、覚醒時に評価する必要がある。そのため、覚醒時はヒゲの動きだけでなく、様々な体動が生じるため、その影響を限りなく小さくする工夫や仕組みが不可欠である。撮影した映像から体動の大きな時間を評価対象時間から除外するだけでは、三次元的な様々なラットの動きに対応するのは困難であり、同時に正確性の欠如につながる。そこで、計測する点の選択において様々な工夫および仕組みを導入することによって、体動が計測に与える影響の最小化を図った。

まず、計測基準点の設定の際に、両側の同じ毛根が死角に入らない点であり、かつ首のわずかな回転する動きでさえも、どちらか片側が死角に入るような撮影範囲にしろうじて含まれる毛根を選択した。これにより撮影時間の中で体軸に対して回転する方向の動きが生じているなどの不適切なタイミングを評価対象時間から自動的に除外可能であり、体動の影響の減少に寄与するものと考えた。

さらにこれだけでは、首を左右に振り向かせるような撮影面に対して平行な動きによる影響を受けてしまう。そこで評価項目を角度の変化ではなく、角度の変化率つまり角速度に変更することでこの影響を限りなく小さくできると考えた。撮影時間の中で首の動きが大きいタイミングは、簡単に判断して除外することができるが、緩やかなわずかな動きまでも除外するのは困難である。しかし、緩やかな動きであればヒゲの動きは非常に速く、かつヒゲと首では動きのベクトルが異なることから計測値へ

の影響は小さくなると考えられ、評価項目を角速度とすることで制御できない体動の影響の減少に貢献できるものと考えられた。角速度への評価項目の変更は、体動による影響の減少のみならず、計測した結果から算出する際のデータの抽出の簡便化にも寄与している。角度の変化では、僅かな動きであっても基線が緩やかに変動するため、どの数値からどの数値を変化量とするかの判断に主観が入ってしまう。しかし、角速度とすることで0を基準とした前方と後方への速度として算出されるため、最大角速度の把握が容易であり、よりわかりやすい指標ではないかと考えられた。

### 1.3.4 限界

BASS法は、これまでに報告されているどの方法よりも、客観性・再現性・簡便性を備えた方法であると同時に、限界点もある。やはりラットの頭部の撮影中の動きの制御が不可能である点である。これによりラットの頭部の動きの少ない時間を選択する必要があるため、そこにわずかながら主観性が入る余地が残されていると考えている。この点については、3方向からの同時録画を行い、標識を認識することで三次元的な動きを追跡することで評価可能となるが、現時点では技術的に難しく、とりわけ細かいヒゲのトラッキングは困難と考えられる。一方で、デジタルカメラ領域の発展はめざましく、モーショントラッキングの技術はAugmented Reality (AR)やVirtual Reality (VR)の技術に使用される新たなテクノロジーとして、発展途上にあるがものの、遠くない将来にはヒゲのような微細な物体に対しても自動でトラッキングが可能となりうる。将来的にそのような科学技術の進歩がもたらされれば、BASS法による映像にコントラストを付加するコンセプトと三次元的なモーショントラッキングを組み合わせることで、さらなる新たな時代の評価法を可能とする可能性がある。

また一方で臨床への応用については、動物実験とは異なり従命可能であるため短時間の録画で十分である。そのため、市販されている多くのスマートフォンやデジタルカメラを用いて対応可能であるため、すでに身の回りにあるもので可能となることから、より機材導入へのハードルが低くなることが考えられる。一方で本研究でもラットの計測する基準点の設定で様々な検討が必要であったように、臨床応用に向けてどのような測定点を設定するのかについて様々な検討が必要である。したがって、BASS法の基本コンセプトは非常に有効であると考えられるが、臨床応用に向けてさらなる検討が必要である。

## 2 総括および結論

### 2.1 本研究から得られた新知見

- ・ ラットを用いた顔面神経麻痺モデルにおける麻痺の新たな評価法を確立した。
- ・ ブラックライトおよび蛍光塗料は、特定の毛根を用いたヒゲの動きの評価に有効なツールであった。
- ・ ヒゲの動きは、非常に速いためハイフレーム撮影を行わないと評価不能だった。
- ・ 特定の毛根を選択・評価可能となったことで、表情筋による毛根の動きも反映することが可能となり、よりリアルな顔面神経麻痺の評価であった。

### 2.2 新知見の意義

本研究では、これまで不可能だった特定の毛根およびそのヒゲを評価可能とし、これまでもより正確な定量評価が可能となった。更には何度も繰り返して同部位を評価可能な再現性をも獲得することができた。今回の研究で導入したツールは、どれも安価に入手可能なもののみを使用しており、低コストでありながら、客観性・正確性・再現性を持った新たな評価法である。これまでは顔面神経麻痺研究において、報告により動きの評価の方法が異なっていたが、本研究で開発した **BASS** 法がスタンダードな評価として広く使用されれば、様々研究間の比較が可能となる有意義な知見である。

### 2.3 今後の展開

我々は、様々な顔面神経麻痺研究を行っており、各研究の評価項目の一つとして実施予定である。また、臨床分野においてもこれまで一般的に使われている顔面神経麻痺の動きの評価は、評価する医師の主観で何段階から選択するものであった。しかし、臨床でも本方法を応用し、特定の基準点を設定することで同一患者の経時的な変化を定量化することが可能である。むしろ、ラットのように頭部のコントロール困難な動きによる影響を受けないため、より臨床の現場に適した方法である可能性が高い。

本モデルを臨床応用することで、導入コストが低いことなどもあり、現在の評価法に変わる新たな方法となりうる。

### 2.4 今後の課題

ラットの頭部の動きの制御についての新たな工夫が必要と考えている。この点について考察でも述べた通り、カメラなどの電子技術の発展とその応用により解決法を模索すべきであるのか、それとも頭部の動きを制御する電子技術に頼らない別の新たな

方法が必要である。この2つのプロセスからの解決法を模索検討していきたいと考えている。

また現状では静止画像のみではあるが、3次元写真による立体の評価が乳房再建や顔面の美容形成分野などの一部の形成外科分野で使用されている。これは3方向から撮影することで立体画像を構築するもので、立体の評価としては非常に有効な方法である。しかし一方で処理に高度な演算処理が必要であり高性能なコンピューターを要するなど、課題の多い技術である。この技術が発展することで瞬時に3次元映像構築が可能になれば動画としての3次元映像が撮像可能となり、BASS法のコントラストを付加するコンセプトと組み合わせることで、新たな評価法の確立に寄与できる可能性が高い。

また臨床応用については、指示に従った動きの評価が可能のため、本研究で困難を要した頭部の動きなどの影響はないと考えられる。そのためラットなどの動物を用いた研究よりも容易であると考えられる。これまで計測点の設定が難しかった顔面のさまざまな動きの定量化が容易に可能になることから(図19)、我々形成外科分野に限らず、眼科や耳鼻科領域などさまざまな分野での応用が期待される。

臨床応用を可能にするためにも、基準点の設定がポイントとなると考えられるため、これらについて検討を行っていきたいと考えている。

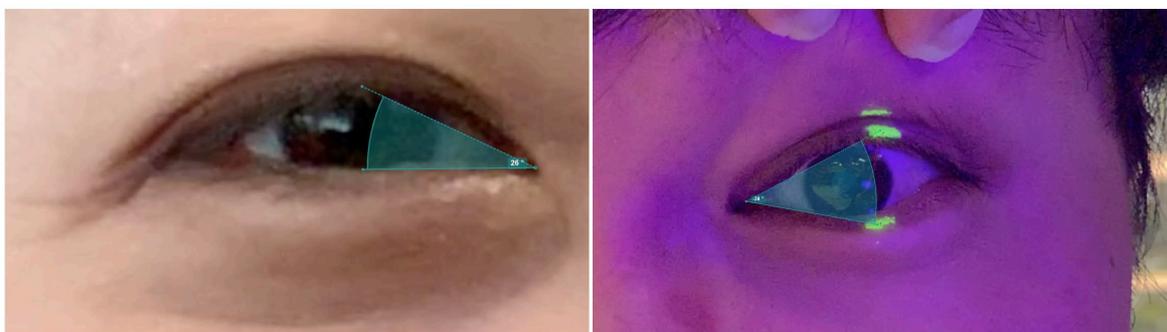


図25. BASS法の臨床応用の可能性

BASS法により眼瞼の開閉量など、これまで計測が難しかった顔面の様々な動きの定量化が可能となるため、形成外科をはじめ、眼科や耳鼻科領域などへの応用が期待される。

## 謝辞

本研究は、JSPS 科研費 19K18922 の助成を受けたものである。

本研究の全般において御指導、御助言をいただいた北海道大学 大学院医学研究院 機能再生医学分野 形成外科学教室・山本有平教授、舟山恵美准教授、大澤昌之講師、前田 拓助教、石川耕資助教ならびに同教室員の皆様に心より深謝申し上げます。

本研究期間中に北海道大学 大学院医学研究院 機能再生医学分野 形成外科学教室に在籍された愛知医科大学形成外科・古川洋志特任教授(兼 北海道大学病院客員臨床教授)ならびに旭川医科大学形成外科・林 利彦主任教授には、研究方法についての確な御助言をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

本研究の全般において温かい御支援をいただいた北海道大学 大学院医学研究院 機能再生医学分野 形成外科学教室・澤口恵美学術研究秘書ならびに早瀬さやか教室秘書に感謝申し上げます。

動物実験において施設の管理やラットの飼育を行っていただいた北海道大学 大学院医学研究院 附属動物実験施設・土佐紀子助教ならびに技術職員の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、これまで北海道大学 大学院医学研究院 機能再生医学分野 形成外科学教室において研究に携わってこられた全ての皆様の尽力の結果である研究環境がなければ、本研究は成り立ちませんでした。ここに心より感謝の意を表します。

(順不同)

## 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

## 引用文献

Bridge, P.M., Ball, D.J., Mackinnon, S.E., Nakao, Y., Brandt, K., Hunter, D.A., and Hertl, C. (1994). Nerve Crush Injuries—A Model for Axonotmesis. *Experimental Neurology* 127, 284–290.

Byers, J.M., Clark, K.F., and Thompson, G.C. (1998). Effect of Pulsed Electromagnetic Stimulation on Facial Nerve Regeneration. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* 124, 383–389.

Deutsch, D., Pietr, M., Knutsen, P.M., Ahissar, E., and Schneidman, E. (2012). Fast Feedback in Active Sensing: Touch-Induced Changes to Whisker-Object Interaction. *PLoS ONE* 7.

Gibelli, D., de Angelis, D., Poppa, P., Sforza, C., and Cattaneo, C. (2017). An Assessment of How Facial Mimicry Can Change Facial Morphology: Implications for Identification. *Journal of Forensic Sciences* 62, 405–410.

Guntinas-Lichius, O., Wewetzer, K., Tomov, T.L., Azzolin, N., Kazemi, S., Streppel, M., Neiss, W.F., and Angelov, D.N. (2002a). Transplantation of olfactory mucosa minimizes axonal branching and promotes the recovery of vibrissae motor performance after facial nerve repair in rats. *Journal of Neuroscience* 22, 7121–7131.

Guntinas-Lichius, O., Wewetzer, K., Tomov, T.L., Azzolin, N., Kazemi, S., Streppel, M., Neiss, W.F., and Angelov, D.N. (2002b). Transplantation of olfactory mucosa minimizes axonal branching and promotes the recovery of vibrissae motor performance after facial nerve repair in rats. *Journal of Neuroscience* 22, 7121–7131.

Henstrom, D., Hadlock, T., Lindsay, R., Knox, C.J., Malo, J., Vakharia, K.T., and Heaton, J.T. (2012). The convergence of facial nerve branches providing whisker pad motor supply in rats: Implications for facial reanimation study. *Muscle and Nerve* 45, 692–697.

Hu, Y., Wu, Y., Gou, Z., Tao, J., Zhang, J., Liu, Q., Kang, T., Jiang, S., Huang, S., He, J., et al. (2016). 3D-engineering of cellularized conduits for peripheral nerve regeneration. *Scientific Reports* 6.

Itoh, M., Nakayama, K., Noguchi, R., Kamohara, K., Furukawa, K., Uchihashi, K., Toda, S., Oyama, J.I., Node, K., and Morita, S. (2015). Scaffold-free tubular tissues created by a bio-3D printer undergo remodeling and endothelialization when implanted in rat aortae. *PLoS ONE* *10*.

Knutsen, P.M., Derdikman, D., and Ahissar, E. (2005). Tracking whisker and head movements in unrestrained behaving rodents. *Journal of Neurophysiology* *93*, 2294–2301.

Matsumine, H., Sasaki, R., Yamato, M., Okano, T., and Sakurai, H. (2014). A polylactic acid non-woven nerve conduit for facial nerve regeneration in rats. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* *8*, 454–462.

Matsumine, H., Sasaki, R., Tabata, Y., Matsui, M., Yamato, M., Okano, T., and Sakurai, H. (2016). Facial nerve regeneration using basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres in a rat model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* *10*, E559–E567.

Matsumine, H., Numakura, K., Klimov, M., Watanabe, Y., Giatsidis, G., and Orgill, D.P. (2017). Facial-nerve regeneration ability of a hybrid artificial nerve conduit containing uncultured adipose-derived stromal vascular fraction: An experimental study. *Microsurgery* *37*, 808–818.

Mersa, B., Tiangco, D.A., and Terzis, J.K. (2000). Efficacy of the “baby-sitter” procedure after prolonged denervation. *Journal of Reconstructive Microsurgery* *16*.

Mitchinson, B., and Prescott, T.J. (2013). Whisker Movements Reveal Spatial Attention: A Unified Computational Model of Active Sensing Control in the Rat. *PLoS Computational Biology* *9*.

Sasaki, R., Matsumine, H., Watanabe, Y., Yamato, M., and Ando, T. (2013). Anesthesia for research on reconstructive facial surgery in rats. *Journal of Reconstructive Microsurgery* *29*, 209–210.

Sasaki, R., Matsumine, H., Watanabe, Y., Takeuchi, Y., Yamato, M., Okano, T., Miyata, M., and Ando, T. (2014). Electrophysiologic and functional evaluations of regenerated facial nerve

defects with a tube containing dental pulp cells in rats. *Plastic and Reconstructive Surgery* 134, 970–978.

Sawyer, A.R., See, M., and Nduka, C. (2009). Assessment of the reproducibility of facial expressions with 3-D stereophotogrammetry. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 140, 76–81.

Shichinohe, R., Furukawa, H., Sekido, M., Saito, A., Hayashi, T., Funayama, E., Oyama, A., and Yamamoto, Y. (2012). 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. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* 65, 763–770.

Towal, R.B., and Hartmann, M.J. (2006). Right-left asymmetries in the whisking behavior of rats anticipate head movements. *Journal of Neuroscience* 26, 8838–8846.

Towal, R.B., and Hartmann, M.J.Z. (2008). Variability in velocity profiles during free-air whisking behavior of unrestrained rats. *Journal of Neurophysiology* 100, 740–752.

Towal, R.B., Quist, B.W., Gopal, V., Solomon, J.H., and Hartmann, M.J.Z. (2011). The morphology of the rat vibrissal array: A model for quantifying spatiotemporal patterns of whisker-object contact. *PLoS Computational Biology* 7.

Uehara, M., Wei Min, W., Satoh, M., and Shimizu, F. (2019). Fascicular turnover flap in the reconstruction of facial nerve defects: an experimental study in rats. *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery* 53, 155–160.

Watanabe, Y., Sasaki, R., Matsumine, H., Yamato, M., and Okano, T. (2017). Undifferentiated and differentiated adipose-derived stem cells improve nerve regeneration in a rat model of facial nerve defect. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 11, 362–374.

Yasui, G., Yamamoto, Y., Shichinohe, R., Funayama, E., Oyama, A., Hayashi, T., and Furukawa, H. (2016). Neuregulin-1 released by biodegradable gelatin hydrogels can accelerate facial nerve regeneration and functional recovery of traumatic facial nerve palsy. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*.

Yurie, H., Ikeguchi, R., Aoyama, T., Kaizawa, Y., Tajino, J., Ito, A., Ohta, S., Oda, H., Takeuchi, H., Akieda, S., et al. (2017). The efficacy of a scaffold-free bio 3D conduit developed from human fibroblasts on peripheral nerve regeneration in a rat sciatic nerve model. *PLoS ONE* 12.

Zhang, L.-Q., Zhang, W.-M., Deng, L., Xu, Z.-X., Lan, W.-B., and Lin, J.-H. (2018a). Transplantation of a Peripheral Nerve with Neural Stem Cells Plus Lithium Chloride Injection Promote the Recovery of Rat Spinal Cord Injury. *Cell Transplantation* 27, 096368971775294.

Zhang, Q., Nguyen, P.D., Shi, S., Burrell, J.C., Cullen, D.K., and Le, A.D. (2018b). 3D bio-printed scaffold-free nerve constructs with human gingiva-derived mesenchymal stem cells promote rat facial nerve regeneration. *Scientific Reports* 8.