

## 学位論文審査結果の要旨

氏名	上甲 智規
審査委員	主査 松田 正司 副査 竹葉 淳 副査 高崎 康史 副査 永井 将弘 副査 三浦 史郎

論文名 冷却障害による難治性高度顔面神経麻痺モデル  
審査結果の要旨

ヒトの顔面神経麻痺は様々な原因によって引き起こされるが、一部では難治性の症例を経験する。これらの症例に対する新たな治療法が求められるが、それには適切な動物モデルを用いた基礎研究が不可欠である。過去の報告では切断モデルや圧迫モデルなどが用いられているが、いずれも自然に治癒するモデルであり、難治性顔面神経麻痺の研究には難治性の動物モデルが必要である。そこで、本研究では冷却障害により治癒率の低い高度顔面神経麻痺モデルを作製した。その結果、15週後でも70%の動物で麻痺が継続する動物モデル作成に成功した。

方法：8週齢のハートレイ系モルモットのメスを10匹用いた。ケタミンとキシラジンで麻酔後、左耳後部の骨包を開放し、スプレーフリーザーで顔面神経管を5秒冷却した。この時、顔面神経管は開放しなかった。冷却後から顔面運動の肉眼的評価を15週間行った。冷却1週後にSynacs（NEC社）にてENoG値を測定した。口輪筋の正中に記録電極を挿入し、側頭骨外の顔面神経を電極で刺激した。正常側との比率でENoG値を計算した。冷却1週後・15週後に組織学的評価を行った。2%グルタルアルデヒド、4%パラホルムアルデヒドで経心灌流固定し、四酸化オスミウムで後固定を行い、アルコール系列で脱水、エポン包埋した後にトルイジンブルー染色を行った。標本は1 $\mu$ mでスライスし、光学顕微鏡BZ9000（Keyence社）にて観察した。1匹のモルモットに対して温度変化を測定した。顔面神経管から顔面神経を抜去し、熱電対温度計（A&D社）のプロベの先端を茎乳突孔側から顔面神経管に挿入し、鼓室内からスプレーフリーザーで顔面神経管を5秒冷却し、その後5分間温度変化を測定した。この動物実験は、愛媛大学医学部の動物実験の倫理委員会によって承認されている。

氏名 上甲 智規

結果：全ての動物は冷却直後から完全麻痺を呈した。冷却後 3 週目から徐々に麻痺の回復を認め、15 週後でも 70%の動物では治癒していなかった。冷却 1 週後で測定した ENoG 値は全例で 0%だった。冷却 1 週後の組織標本では、冷却部において著明に脱髄している所見を認めた。冷却 15 週後では多くの神経で髄鞘化を認め、正常に比べると小さく、形状はいびつであった。冷却後の温度は-30℃まで急速に低下し、その後徐々に上昇していった。冷却 5 分後にはほぼ元の温度に戻っていた。

考察：これまで数々の顔面神経麻痺モデルの報告がある。ウイルス感染モデル、再活性化モデル、虚血モデルでは麻痺が軽度であり、またすぐに治癒していた。圧迫モデル、切断モデルでは高度麻痺は呈していたが、麻痺が長く続くものでも 13 週後には全例が治癒に至っていた。また、経鼓膜的に冷却したモデルもあったが、温度低下は-2~-8℃程度であり、5 週後には全例治癒していた。

冷却されると神経の内外では氷晶が生成され、神経軸索膜が障害される。髄鞘がマクロファージ等に貪食されると脱髄を起こし、ワーラー変性が進んでいく。冷却温度による障害の程度については過去の研究において、-20℃以下まで低下すると治癒までの期間が有意的に長くなると報告されている。本研究では-30℃まで低下しているため、過去の冷却モデルに比べ、麻痺の持続期間が長期間持続したと考えられる。

現在、様々な分野において、神経の再生治療が行われている。過去の報告では、顔面神経管切断後に、basic fibroblast growth factor (bFGF) をカテーテルから持続的に投与することにより期間限定的ではあるがコントロール群に比べて有意的に改善していたと報告している。ただし、用いられている切断モデルはそもそも自然に治癒するモデルである。今後難治性の顔面神経麻痺に対する新たな治療を開発していくうえで、自然に治癒しない難治性の冷却モデルを用いることは基礎研究において非常に有益であると考えられる。

結論：顔面神経管を冷却することにより、治癒率の低い高度顔面神経麻痺モデルを作製することができた。肉眼的評価、電気生理学的評価、組織学的評価では高度に障害されており、一定の回復傾向は認めるものの、15 週後においても 70%の動物において麻痺が継続していた。

公開審査会は、令和 2 年 1 月 6 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表した。審査員から、実験手技、本モデルと疾患との関係、病理所見、病的共同運動の有無、冷却剤の毒性、観察期間の正当性、顔面神経 3 枝の治癒速度の差、ヒトと本モデルの快復率の比較、盲検法、栄養血管の障害、運動スコア、完治個体と個体差、障害部位の範囲等について質問がなされ、申請者は明快に回答した。審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。