

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2013

課題番号：23792053

研究課題名（和文）脊髄ニューロンの定量的評価を用いた神経移行術の実験的研究

研究課題名（英文）experimental study of nerve transfer using quantitative evaluation of the spinal cord neuron

研究代表者

荻野 和仁 (OGINO KAZUHITO)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：80405787

研究成果の概要（和文）：神経移行術前後の脊髄ニューロンを比較することによって、機能回復に対する定量的評価を試みた。動物実験用 Rat を用い、神経移行術の donor として肋間神経を選択し、逆行性標識により脊髄前角ニューロンによる再支配が確認され、肋間神経-肩甲上神経移行術モデルを作成に成功した。

研究成果の概要（英文）：I tried a quantitative evaluation for the function recovery by comparing spinal cord neuron before and after nerve transfer. With Rat for animal experiment, I chose intercostal nerve as donor of nerve transfer. reinnervation due to the anterior horn of spinal cord neuron was confirmed by a retrograde mark and succeeded in making in an intercostal nerve - suprascapular nerve transfer model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1600000	480000	2080000

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：形成外科学 再生医学

キーワード：末梢神経再生 神経移行術 神経縫合 マイクロサージャリー 運動ニューロン

1. 研究開始当初の背景

末梢神経損傷に対する外科的治療の挑戦は、14 世紀に遡る。当時、様々な神経縫合の試みがなされたが、良好な結果が得られず、神経は再生できないものと長らく信じられていた。しかし、19 世紀末、神経縫合による臨床的に明らかな成功例が示され、今日の末梢神経外科の発展へとつながった。

20 世紀初頭、Balance らは神経移行術 (nerve transfer) の最初の臨床例を報告した。彼らは顔面神経麻痺に対して筋の tonus だけでも取り戻そうと、副神経あるいは舌下神経を麻痺した顔面神経に縫合した。しかし、結果は予想外であり、麻痺した表情筋の随意運動を可能にした²⁾。この神経移行術という手法は、現在でも顔面神経麻痺のみならず、幾つかの末梢神経障害の治療に応用されている。腕神経叢麻痺に対する神経移行術はその代表的

な治療法の一つであり、多くの成果をあげてきた。

臨床結果が先行した末梢神経外科領域ではあるが、神経再生のメカニズムについても、Cajal らに代表される研究者たちによって末梢神経断端から筋に至る軸索の再生機序に関する解析がなされてきた。

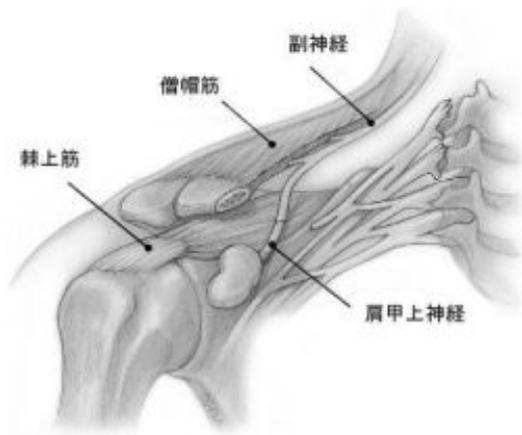
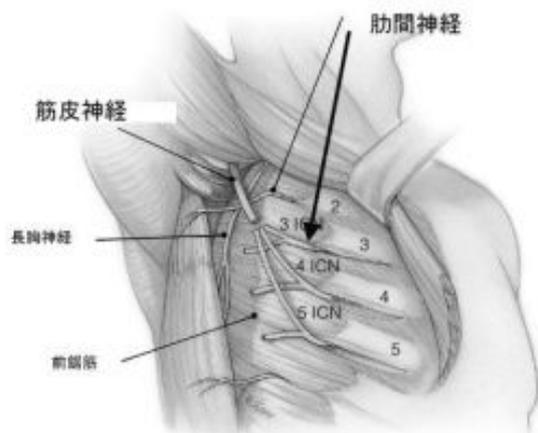
一方、神経縫合後、末梢神経再生軸索の起源である脊髄前角ニューロンの解析も Brushart らの研究者たちによって報告されてきた。しかし、損傷した肩甲上神経へ副神経僧帽筋枝を移行し、肩関節外転機能を再建させるというような現在臨床で一般的な治療法について、その質的評価、すなわち、神経の可塑性に対する形態学的評価はなされていない。特に、神経移行術では、筋を支配する末梢神経再生軸索の起源である脊髄前角ニューロンは変化すると推測されるが、移

行術前後の局在変化に関する報告は、実験例でもほとんど見られない。また、治療の質から考えた時、神経移行術後の機能には α ニューロンだけではなく、 γ ニューロンも重要な役割を担っていると考えられるが、両者を分けて解析した報告は未だなされていない。

Kristenssonらの報告以降、HRP法による研究が行われるようになり、報告がなされて来た。

しかし、HRPは出現する陽性細胞の数及び呈色濃度にばらつきが認められ、標識されたニューロンの信憑性に問題があるとされる。

fluorescent Dyeは、in vivo、in vitro、順行性にも逆行性にも標識が可能である長炭素鎖の脂溶性蛍光色素で、末梢神経のニューロンの標識に有用であることが証明されている。また標識後、二次抗体などによる処理を必要としない効率性の高い方法でもある。これは以前研究者が行った実験により方法は確立されている。そのデータに加えて新たなdonorによる結果を比較解析することにより新たな知見を得られると考えられた。



2. 研究の目的

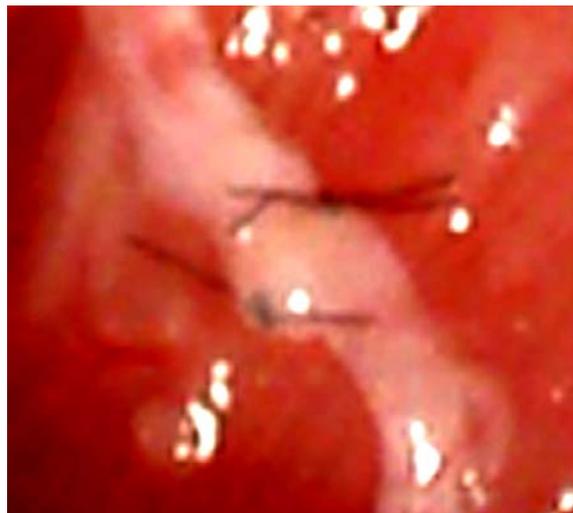
研究者は以前のラットの副神経僧帽筋枝-肩甲上神経移行術モデルより得られたデータに新たなdonor nerveの結果を比較することにより新たな知見を獲得出来ると考えた。本研究はfluorescent Dyeによる逆行性標識法で、中枢側の変化、すなわち、脊髄前角運動ニューロンの α と γ それぞれの数と前角内の局在変化を観察し、神経移行術後の神経の可塑性と筋の機能回復の関係を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

ラット(ウイスター、オス;9-18W)を用いた。実験は全て獨協医科大学動物実験規定に従った。麻酔はセボフルラン(Sevoflurane)吸入による導入後、ペントバルビタールナトリウム腹腔内注射による全身麻酔とした。

神経移行術

手術用顕微鏡下にラット(9W)の肋間神経(以下 Ic)と肩甲上神経(以下 Ss)を露出し、肋間神経-肩甲上神経縫合(Ic-Ss)を行った。



対照

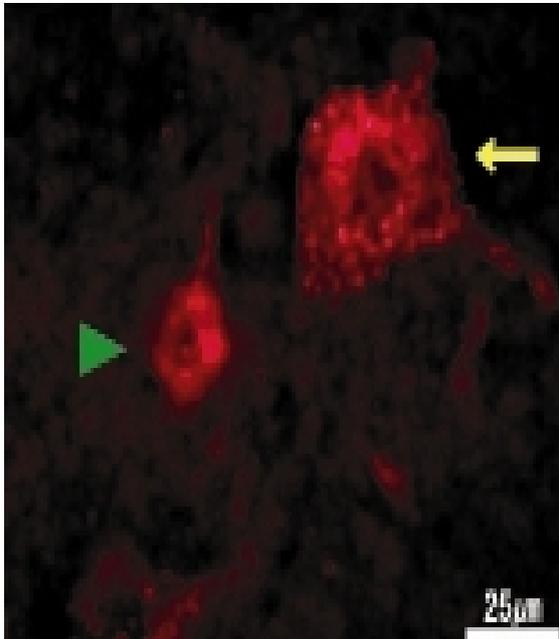
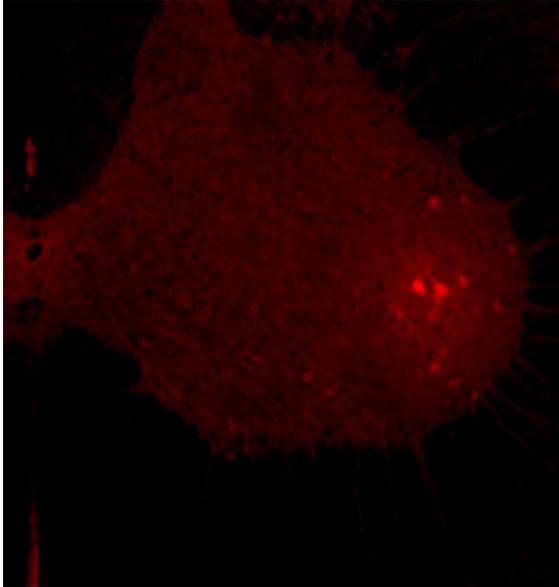
肋間神経、肩甲上神経をそれぞれ切断後、10-そのまま縫合し、対照例(以下 Ic-Ic 群、Ss-Ss 群)とした。

逆行性標識

未手術例の肋間神経と肩甲上神経(Ic-Ss 群は術後の棘上筋支配神経、Ic-Ic 群は肋間神経をそれぞれ切断し、それぞれの近位端から脂溶性蛍光色素 DiI による逆行性標識を行った。

標本の採取と固定

標識後、生存期間を経て、深麻酔下で生食及び4%ホルムアルデヒド・0.1Mリン酸緩衝液にて灌流固定後、脊髄のC1~Th5を摘出した。後固定後組織切片を作成分節ごとに連続横断切片(50 μ m)を作製し、蛍光顕微鏡にて観察した。



矢頭： γ ニューロン 矢印： α ニューロン

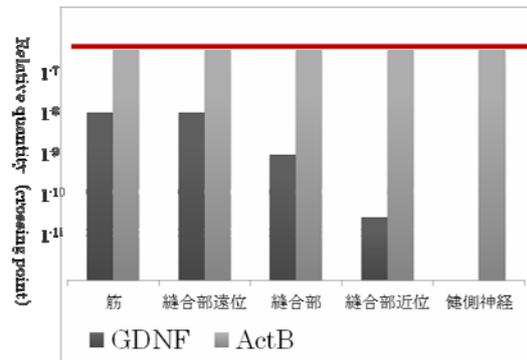
4. 研究成果

donorとして、当初は横隔神経も候補としていたが、術後モデルの生存が困難であり術後生存期間を維持できなかったため、横隔神経モデルは断念した。今後手術方法を再検討しモデル作製を試みる予定である。肋間神経モデルに関しては、現在までに神経移行術例Ic-Ss群(n=2)、対照例Ic-Ic群(n=2)の組織切片の獲得に至った。現時点での最適なアプローチ及び、神経縫合部の選択に至った。Ic-Ic群において脊髄前角の染色が確認され、ニューロンのカウントを行っている。

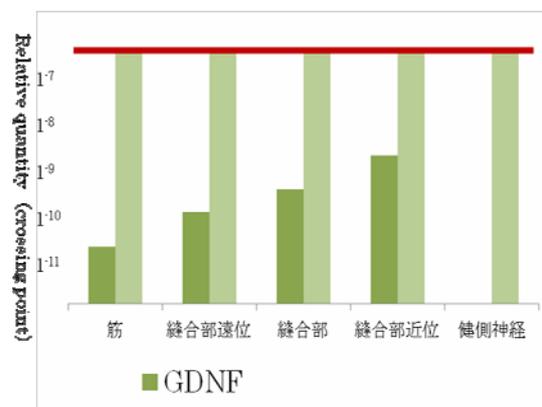
Ic-Ss群組織切片の観察により脊髄前角ニューロンがDiIにより逆行性に染色されていることが観察され、横隔神経による再支配が確認された。新たな実験モデルを確立することが出来た。

また、補足実験として神経移行術における神経成長因子glial cell line-derived neurotrophic factor(以下GDNF)の発現を、部位別の解析を試みた。術後1週と4週でRT-PCR法による分析を行った。

結果 術後1週



結果 術後4週



術後1－4週で部位別のGDNF発現に逆転が認められた。これは、GDNFが標的器官由来であることから妥当な結果である。しかし、以前の実験からはラットにおいて術後4週には神経の再支配は50%程度完成しているとの見方もできたが、GDNFの相対的発現量は半分までの変化は無く今後検討が必要であると考えている。

現在、上記結果に合わせ、移行術群、対照群の標識されたニューロンをカウントして得たデータを比較解析すると同時に、標本数を増やすための実験を継続中である。実験の今後については学会、論文にて報告を予定している。

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)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻野 和仁 (OGINO KAZUHITO)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：80405787