

機関番号：32620

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009 年～2011

課題番号：21592295

研究課題名 (和文) 短期的神経刺激による神経再生の促進と神経端側縫合への応用について

研究課題名 (英文) The effect of brief electrical stimulation for axonal regeneration and its application for end-to-side neurotaphy

研究代表者

林 礼人 (HAYASHI AYATO)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：10365645

研究成果の概要 (和文)：

圧挫損傷を加えたマウスの坐骨神経に短期的神経刺激を行いその再生を Thy1-YFP マウスなどを用い検討した。0 分・30 分刺激群に比べ 60 分刺激群では軸索の再生速度を促進させ、更にその再生した軸索のミエリンの厚さが優位に厚くなっていることが分かったが、再生軸索数には有意差を認めなかった。60 分の短期的神経刺激群は再生軸索数では無く、軸索の再生速度とミエリンの厚さを促進する因子として有用であると考え。

研究成果の概要 (英文)：

We evaluated the effect of brief electrical stimulation using the sciatic nerve crush injury model of the Thy1-YFP mice, which axons have fluorescent. Compared to 0 minutes or 30 minutes electrical stimulation, 60 minutes electrical stimulation model showed fast axonal regeneration and the thickness of myelin became thicker than the others. With respect to the number of regenerated axons, there was no difference between the groups. From these results, we thought that brief electrical stimulation can accelerate the speed of axonal elongation, however, it did not increase the number of axonal sprouting after crush injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：形成外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：神経再生 短期的神経刺激 トランスジェニックマウス 神経移植

Green fluorescent protein(GFP) 神経端側吻合 遺伝子改変動物

1. 研究開始当初の背景

現在、臨床において顔面神経の再建手術として顔面神経舌下神経交差神経移植が行われる。この手術により顔面神経麻痺は改善されるが、舌下神経を犠牲にするため、舌の運動障害を来すことがある。そこで舌の運動障害をより軽度にとどめる為に舌下神経への侵

襲が少ない手術を行う必要がある。端側神経吻合は 1992 年 Viterbo 等によりその有用性が報告されて以来様々な研究がなされ、特に前述の顔面神経麻痺の再建術などにおいては、再建の為に供与神経の障害を減ずる目的で、既に臨床応用され良好な結果が得られている。現在まで我々の研究では、神経端側吻

合において、知覚神経は供与神経を損傷しなくても神経発芽による神経再生を生じうると考えられ、運動神経については供与神経の損傷程度に応じて、再生を生じることが示唆された。臨床的に神経端側縫合を用いた場合、四肢の運動神経再生については特に結果が不安定で、運動神経と知覚神経の発芽形態の相違やその誘因について更に検討が必要である。より良い神経再生を得るには、どのような因子や手技が神経再生を増幅させるかが重要な研究課題で、特に臨床応用のしやすい手法について、検討する必要がある。

また、神経再生の評価を行うための基礎医学の大きな発展には軸索やシュワン細胞が生来 Green Fluorescent Protein (GFP) などにより蛍光発色するトランスジェニックマウスの開発が挙げられる。その技術を利用することで、今まで不可能であった *in vivo* 下での神経再生の経時的な観察や神経組織全体での再生軸索の観察を行うことができ、新しい評価法として注目を集めている。さらに、GFP の技術は他の動物にも広がりを見せ、トランスジェニック豚の開発も進められている。

2. 研究の目的

近年、神経縫合部位近位への縫合時の短期的な電気刺激が、運動・知覚神経の神経再生の促進やその過誤支配の予防に効果があることが報告され注目を集めている。特定のグループからの報告が主になっているので、まずその現象の整合性について検証する必要がある。我々は、神経軸索が蛍光発色するトランスジェニックマウスを使用し、神経再生が *in vivo* 下でどのような形で再生していくのかを同一マウスで観察する **Live imaging** の手法を用い、神経縫合部位近位への短期的な電気刺激が神経再生のスピードを促進させたり、運動・知覚のどちらの神経に優位に働くかについて検証を行う。

短期的電気刺激がどのような形で作用し有用かを検証出来た後には、その手法を神経端側縫合へ応用し、その有用性を検討するとともに、神経端側吻合で得られにくい運動神経再生の増幅や供与神経損傷との関連について研究を進め、より有効な神経端側縫合の使用法を検討する。

また、GFP 発色するトランスジェニック豚を使用する機会も得た為、GFP の局在や神経再生実験への有効性を検討することも行った。ブタの神経軸索が GFP 発色し、実験に使用出来れば、より人間に近いモデルとして臨床応用を踏まえたモデルが作成可能であるため、GFP の発色形態や神経移植モデルでの再生神経の観察の可否についても実験を行

った。

3. 研究の方法

まず、トランスジェニック豚について GFP の発色形態や神経移植モデルでの再生神経の観察の可否について、GFP を発色する TG 豚と Wild type 豚を使用し、実験を行なった。

A-1) ハンディタイプの UV ランプや蛍光実体顕微鏡を用い、皮膚、神経、筋肉について、GFP がどのような形で発色しているかを観察し、S100 や抗ニューロフィラメント抗体を使用して、GFP の局在を検討した。

A-2) 背部皮膚に様々な長さの矩形皮弁を作成するとともに、同種及び自家植皮術を行い、皮弁の血流や植皮の生着状況によって GFP の発現がどのように変化するかを経時的に観察した。

次に、軸索が蛍光発色するトランスジェニックマウスを用いて短期的電気刺激に関する実験を行ったが、実験には、全ての神経軸索が (Yellow fluorescent protein: YFP) 発色する Thy1-YFP16、運動神経の 10% 以下が YFP 発色する Thy1-YFPH、それぞれの神経軸索が約 100 色に発色する Thy1-Brainbow の 3 種類のトランスジェニックマウスを用いた。

神経再生を経時的に評価する為には、神経軸索が蛍光発色するトランスジェニックマウスの中に軸索が蛍光発色しない神経を作成して、蛍光発色する再生軸索が無蛍光な神経内をどの様に伸展していくかを観察する必要があり、前もって観察に使用する神経をワーラー変性させる操作を行う。

吸入麻酔下に腹臥位とし右臀部に切開を置き右坐骨神経を展開し、可能な限り長く坐骨神経を剥離・露出した。坐骨神経を脊椎への流入部より 3mm 末梢部で 5 番楔子を用い 5 秒間圧迫する (挫滅損傷)。すると、その遠位でワーラー変性が起こり無蛍光な神経となるため、術後 7 日後に再び 5 秒間圧迫して、その時点からの再生軸索を実体蛍光顕微鏡を用いて経時的に観察した。マウスは常温で飼育し通常の餌と水を与えるが、抗生剤を含め一切の薬剤の投与は行わなかった。

B-1) 短期的神経刺激の神経再生への影響を検証する目的に下記実験を行った。

実験モデルとして Thy1-YFP16 ・

Thy1-YHPH ・ Thy1-Brainbow 各マウスで 60 分刺激群. 30 分刺激群. 0 分刺激群の 3 つの群を作成した。60 分刺激群は圧挫部中枢に神経刺激装置を装着し刺激間隔 20Hz ・ 刺激時間 100 μ s ・ 刺激の強さ Supramaximal level で 60 分間刺激した。30 分刺激群は同様の設定で

30分刺激した。0分刺激群では坐骨神経の剥離露出は施行したが刺激は行わなかった。

神経再生の評価方法として術後7日毎に開創し蛍光実体顕微鏡下で再生神経の観察及び撮影を行った。撮影を暗室で行う事が出来ず周囲を遮光し、蛍光顕微鏡で観察しデジタルカメラで撮影を行った。撮影は開創し坐骨神経周囲の血液や組織を蛍光発色下で確認しながら完全に除去した。

B-2) 上記B-1)の実験結果を踏まえ実験内容の若干の修正を行いモデルを作成した。

上記無蛍光な神経を作成した後1週間後に、60分刺激群は圧挫部中枢に神経刺激装置を装着し刺激間隔20Hz 刺激時間100 μ s 刺激の強さSupramaximal levelで60分間刺激した。30分刺激群は同様の設定で30分刺激した後に30分間電源を入れない状態にした。0分刺激群は同様の状態で電源を入れず60分間そのままとした。神経刺激装置を装着の際は生理食塩水に浸したガーゼで創部を覆い神経の乾燥を防ぐようにした。

評価方法

7日毎に開創し坐骨神経を蛍光顕微鏡で観察し撮影する。(live imaging) 神経刺激4週間後に足背外側皮膚・長母趾伸筋・坐骨神経を採取した。

組織採取の際、下記手順で還流固定を行った。

還流固定：アパチンで腹腔麻酔を行い、仰臥位で固定し、腹部肋骨下縁に沿って開腹を行い、心臓を損傷しないように注意し横隔膜を切開し肋骨を両側胸部で切断し肋骨を反転し、心臓を露出させた。心臓を損傷しないように把持し左室を穿刺し50mlPBS+ヘパリン50単位を注入し右心耳より脱血後パラホルムアルデヒド50m1を注入し還流固定を行った。灌流固定後各組織を採取し、パラホルムアルデヒドに浸し遮光し4 $^{\circ}$ Cで保存した。神経の評価方法：圧迫部より中枢部・圧迫部より5mm末梢・筋への入る部位でそれぞれトルイジンブルー染色を行い光学顕微鏡(100倍)で一視野当たりの神経軸索数をカウントした。更に同部を電子顕微鏡で観察しミエリンの厚さを計測した。

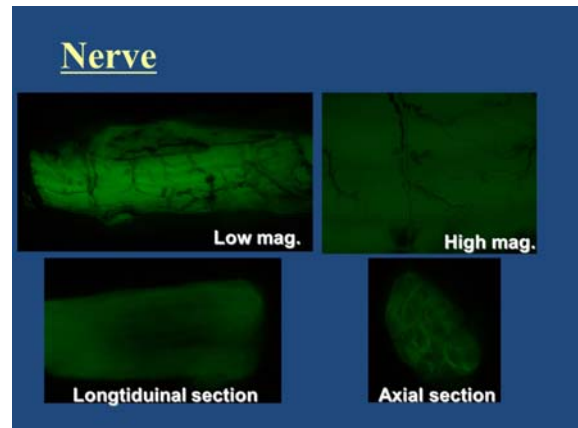
長母指伸筋の評価方法：長母指伸筋をPBS20mlに浸し4 $^{\circ}$ Cで1時間攪拌後に α -Bungarotoxin溶液4 $^{\circ}$ Cで30分浸し、その後PBS20mlに浸し4 $^{\circ}$ Cで30分攪拌を3回繰り返す、神経終末を染色した。これをWhole mountで蛍光顕微鏡下に観察した。

足背外側皮膚の評価方法：全層で採取した皮膚を裏面より観察し健側と比べ知覚神経の状態を蛍光顕微鏡で確認した。

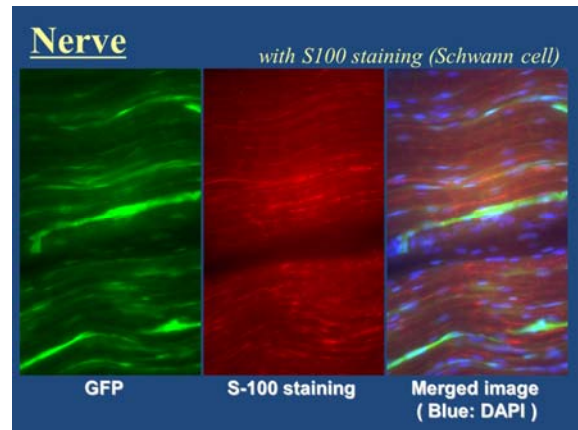
4. 研究成果

A-1) ブタの皮膚・神経・脂肪・筋肉組織にGFP発色を認め、神経については神経周膜、ミエリン鞘(シュワン細胞)にGFPが発色し

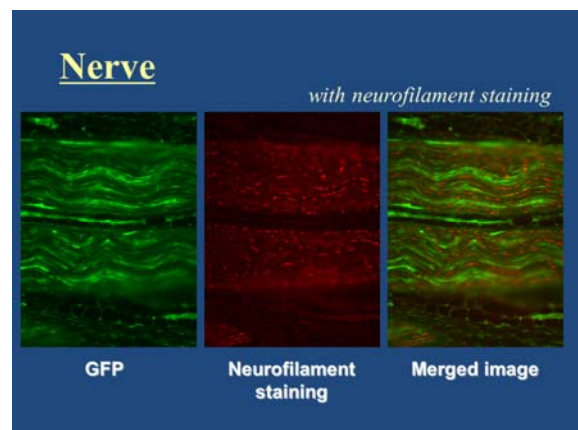
ているものと思われた。(図1、2)



(図1) 実体顕微鏡下末梢神経



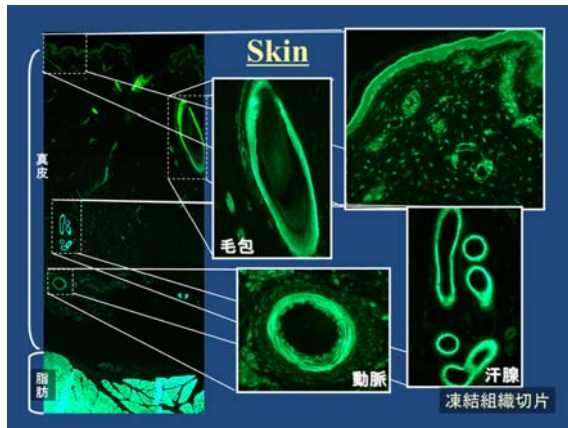
(図2) シュワン細胞の染色とGFPの局在
ただし、神経軸索への発色は抗ニューロフィラメント抗体での二重染色を生じないことから認められないと考えられ、GFPの発色そのものも弱かった。(図3)



(図3) 神経線維の染色とGFPとの関係

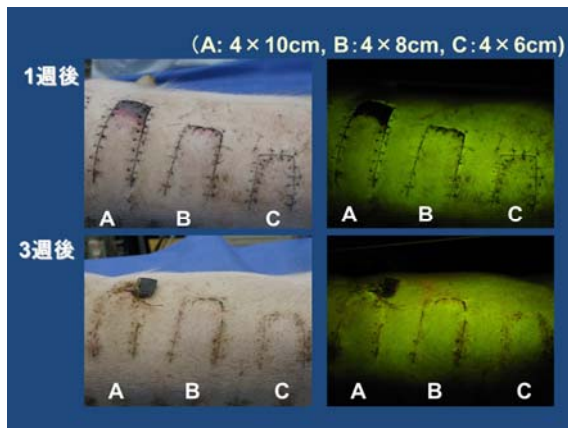
経時的観察に必要な同一部位への複数回の手術も強い癒着を生じる為、困難であった為、組織切片を作成しての観察は可能であるものの、トランスジェニック動物特有の生体内での経時的な再生過程の観察は困難と考えられた。

A-2) また、皮膚での GFP 発色は上皮や付属器、血管内皮に認めたものの、真皮成分については発色していなかった。(図 4)

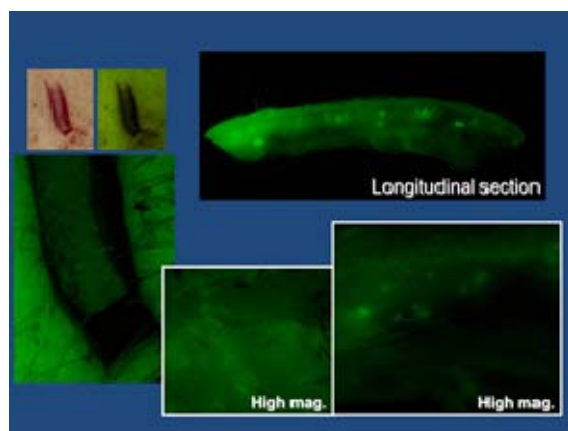


(図 4) 表皮から脂肪までの Whole mount imaging。真皮成分は発色していない

Live imaging については、表面的な上皮の経時的変化を観察することは可能と思われるが、皮弁の状態は視覚的な変化と差異が無く(図 5)、細胞の viability などの観察は困難であった。(図 6)



(図 5) 矩形皮弁下での GFP



(図 6) 鬱血した矩形皮弁下での GFP (細胞の Viability までは判断出来ず)

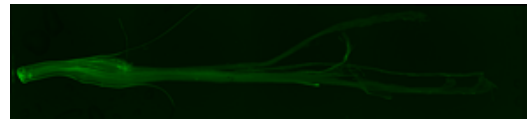
従って、使用可能な実験モデルとしては、潰瘍内への上皮の遊走を経時的に観察するなど、創傷治癒のモデルに有効である可能性が示唆されたものの神経再生の評価には適応しないと考えられた。

・トランスジェニックマウスを使用した短期的電気刺激実験の結果については

B-1) 3 種類のマウスでモデルを作成し、評価を行った。

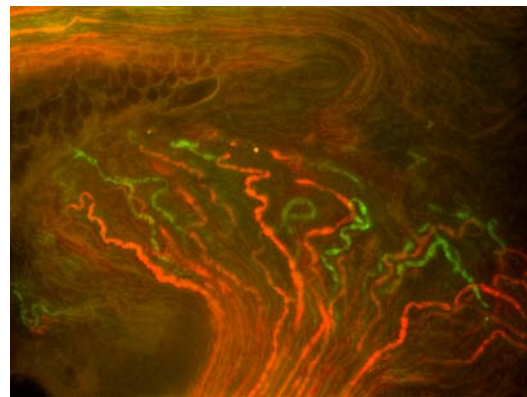
Thy1-YFP16 は知覚・運動神経とも良好に発色をしており様々な評価ができると考えられた。

Thy1-YFPH は運動神経の軸索を詳細に追跡することに有用であった。しかし、知覚神経の評価は行えず更に神経終末への神経支配を正確に確認することはできなかった。(図 7)



(図 7) Thy-1YHPH 蛍光顕微鏡撮影

Brainbow は蛍光発色の個体差が大きく、live imaging では多くの個体が蛍光発色を確認することができなかった。共焦点レーザー顕微鏡で蛍光発色を確認できたが、神経軸索を詳細に色分けできる予定であったが、最適な波長を確定するに至らなかった。(図 8)



(図 8) Brainbow 蛍光顕微鏡撮影

live imaging で評価を行った。0 分刺激群と比べ 60 分刺激で坐骨神経の再生が遅い傾向にあった。蛍光発色の強さは個々の発現系の違いや遮光の状態などにより異なる為評価は行わなかった。これは当初予測していた結果とは逆の結果であった。この原因として、60 分刺激群は 60 分間開創した状態であり、乾燥により神経が損傷を受けてしまい、0 分

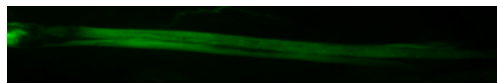
刺激群は神経圧迫後速やかに閉創したため神経が乾燥することなく余計な損傷を受けなかったことが神経再生に影響したものと考えた。

その為、B-2)の実験モデル作成の際はすべての群において60分開創した状態を保ち、感想による神経損傷を予防する為に創を生理食塩水で浸したガーゼで被覆し、刺激装置を装着した状態で電源を入れない時間を設ける事とした。

2)蛍光顕微鏡の撮影に用いていたデジタルカメラでは再生軸索を数値化することができず、新しく購入したCCDカメラ搭載の蛍光顕微鏡を用い蛍光顕微鏡での撮影をデジタルデータとして記録した。

これにより個々の発現の強さや周囲の状況によらず、発光の状態を統一することができ数値データとして評価することができた。今回の評価方法として用いた数値は蛍光発色をピクセルで数値化したものを用いた。これは神経圧迫部より中枢は非損傷部と考えここを基準(4000前後)として神経の中心に線を引きその部位のピクセルの相対値で表す方法である。

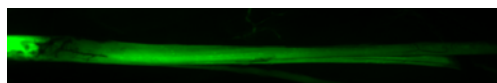
神経刺激後1週間でのlive imagingの結果は0分神経刺激群(図9.10)と60分刺激群(図11.12)の結果から60分刺激群で再生軸索の速度が増加している事が分かった。



(図9) 0分刺激 1週目 蛍光写真



(図10) 0分刺激 1週目 ピクセルグラフ



(図11) 60分刺激 1週目 蛍光写真



(図12) 60分刺激 1週目 ピクセルグラフ

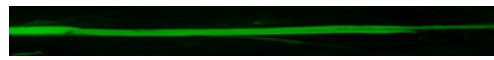
しかし神経刺激2週間後のlive imagingの結果では0分刺激群(図13.14)と60分刺激群(図15.16)では明らかな差は認めなかった。これは観察できる範囲内で全ての神経再生が行われた為と考える。



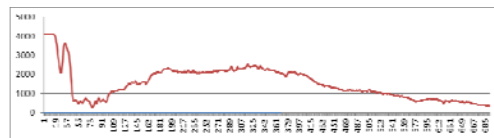
(図13) 0分刺激 2週目 蛍光写真



(図14) 0分刺激 2週目 ピクセルグラフ



(図15) 60分刺激 2週目 蛍光写真

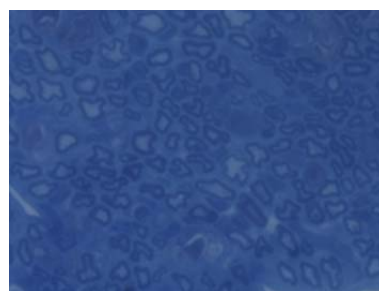


(図16) 60分刺激 2週目 ピクセルグラフ

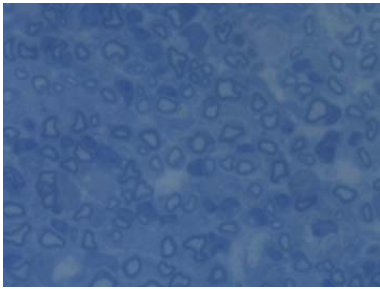
組織学的所見は、圧迫後4週の所見として圧迫部より5mmの部位での平均軸索数は0分刺激群では80個/視野(図17)、30分刺激群では133個/視野(図18)、60分刺激群では105個/視野(図19)であった。筋直前では0分刺激群では90個/視野(図20)、60分刺激群では128個/視野(図21)であった。両群間で統計学的有意差は認めなかったが、平均軸索数は0分刺激群より60分刺激群で多い傾向にあった。



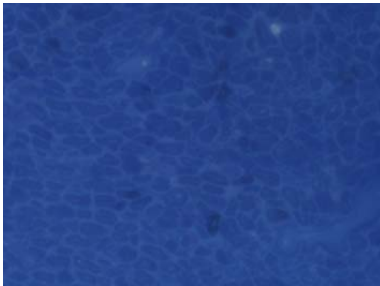
(図17) 0分刺激 5mm末梢



(図18) 30分刺激 5mm末梢



(図 19) 60 分刺激 5mm 末梢

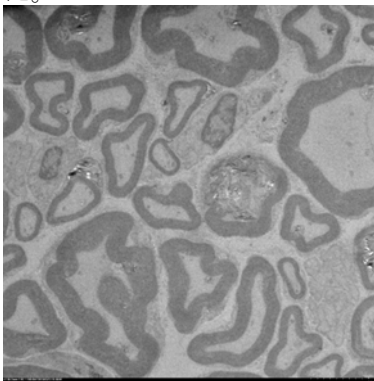


(図 20) 0 分刺激 筋直前

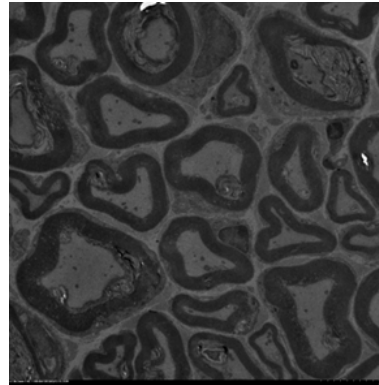


(図 21) 60 分刺激 筋直前

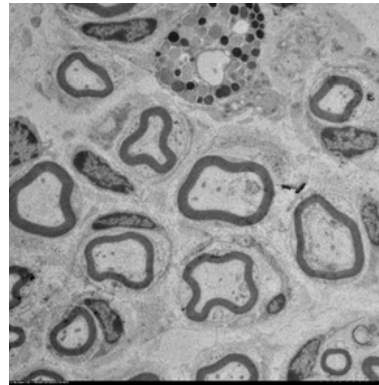
電子顕微鏡の所見では各部位でのミエリンの厚さを測定した。圧迫部中枢での平均ミエリン厚は0分刺激群では682nm(図22)、60分刺激群では792nm(図23)($P=0.011$)であった。圧迫部より5mm末梢での平均ミエリン厚は0分刺激群では587nm(図24)、60分刺激群では550nm(図25)($P=0.418$)筋直前での平均ミエリン厚は0分刺激群では471nm(図26)、60分刺激群では530nm(図27)($P=0.0092$)となった。60分刺激群では0分刺激群に比べ圧迫部中と筋直前で統計学的有意差を認められた。



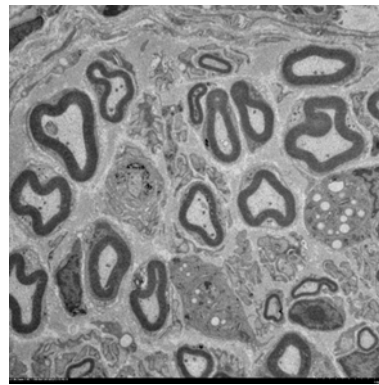
(図 22) 0 分刺激 中枢



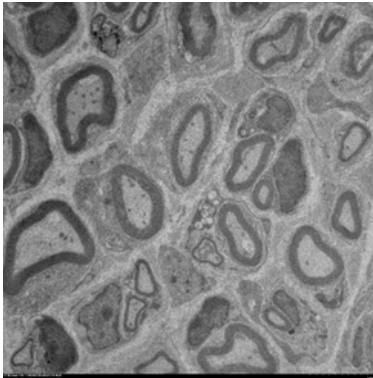
(図 23) 60 分刺激 中枢



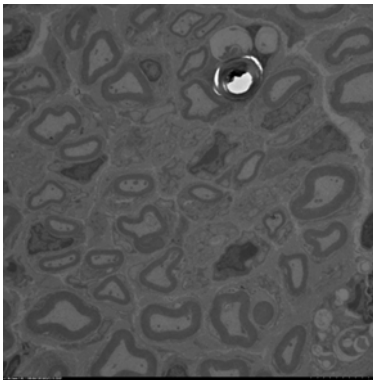
(図 24) 0 分刺激 5mm 末梢



(図 25) 60 分刺激 5mm 末梢



(図 26) 0 分刺激 筋直前



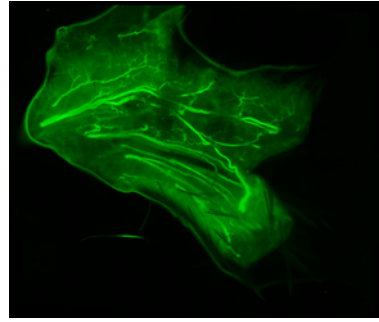
(図 27) 60 分刺激 筋直前

長母指伸筋の評価では神経終末の染色が一部不十分であったことから正確な評価が行えなかった。この原因としては還流固定から α -Bungarotoxin の染色までの期間が1ヶ月を超えてしまったものがあり、神経終末が変性を起こし染色が不十分となったと考える。
(図 28)

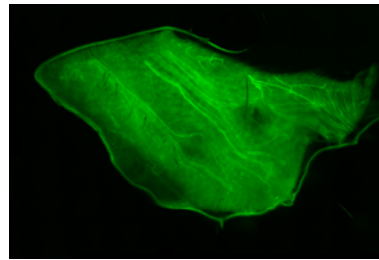


(図 28) 赤が神経筋接合部で緑が神経

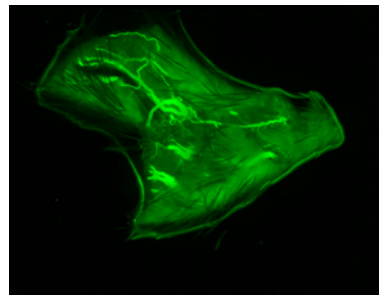
足背外側皮膚の知覚神経の評価は非圧迫側(左側)と圧迫側(右側)を比較し検討した。しかし両群間で明らかな差は認めなかった。
(図 29. 30. 31. 32)



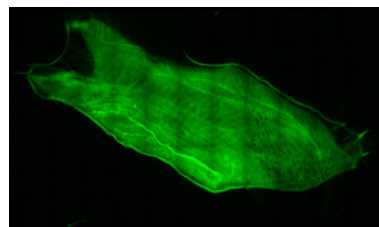
(図 29) 0 分刺激 非圧迫側



(図 30) 0 分刺激 圧迫側



(図 31) 60 分刺激 非圧迫側



(図 32) 60 分刺激 非圧迫側

短期的神経刺激は神経再生を促進するとされるが、その詳細についてはまだ解明されていないことが多い。今まで行われている報告ではラットを用いて形態学的な評価を行うに留まっていたり、脳由来神経栄養因子などでの作用増幅を試みた実験などについての報告がなされているのみで、どのような形で神経再生に寄与しているかについて、直接的には証明されていない。

今回我々はトランスジェニックマウスの特徴を用い、新たな解析方法を用い、その効果について直接的に評価することができた。

再生軸索の速度を計測する為に、軸索の蛍光発色を数値化し評価に使用したことで、今まで主観的にしか行えなかった蛍光発色を客観的に評価できる様にしたことは、今後の新たな定量的評価となり得る為、今回我々が新たに行ったこの方法をより正確に行う為にピクセルの数値と組織学的関係を解明していきたいと考えている。

今回はこの方法を用いることで短期的神経刺激の再生が軸索数ではなく、軸索の再生速度を早めるということを直接的に証明することが可能であった。このような結果は未だはっきりとしたエビデンスとして報告されておらず、今後の臨床応用も踏まえ非常に重要な結果であると思われた。

端側神経縫合の応用については、今回の期間内に結果を出すことが困難であったが、今後も研究を継続し、その有用性について検討していきたいと考えている。

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)

[学会発表] (計9件)

- ① 林礼人ほか 第 52 回日本手の外科学会学術集会、軸索特異性又は Schwann 細胞特異性に蛍光発色する様々なトランスジェニックマウスを用いた末梢神経基礎研究 2009 年 4 月 16 日 京王プラザホテル
- ② 林礼人ほか 第 52 回日本手の外科学会学術集会 逆行性神経トレーサーの有効な使用法とその問題点 2009 年 4 月 17 日 京王プラザホテル
- ③ 林礼人ほか 第 18 回日本形成外科学会基礎学術集会 神経同種移植におけるシュワン細胞の遊走形態について 2009 年 10 月 1 日 都市センターホテル
- ④ 林礼人ほか 第 18 回日本形成外科学会基礎学術集会 GFP トランスジェニック豚の使用経験とその可能性について 2009 年 10 月 2 日 都市センターホテル
- ⑤ 林礼人ほか 第 36 回日本マイクロサージャリー学術集会 神経同種移植におけるシュワン細胞の遊走形態について 2009 年 10 月 22 日 ホテルクレメント徳島
- ⑥ 林礼人ほか 第 53 回日本手の外科学会学術集会 神経同種移植におけるシュワン細胞の遊走形態について 2010 年 4 月 17 日 朱鷺メッセ
- ⑦ 林礼人ほか 第 19 回日本形成外科学会基礎学術集会 FK506 の神経再生に与える影響及びその実際についてトランスジェニックマウスを用いた多角的な検討を行ってー

2010 年 9 月 16 日 パシフィコ横浜

- ⑧ 林礼人ほか 第 37 回日本マイクロサージャリー学術集会 FK506 の神経再生に与える影響及びその実際についてトランスジェニックマウスを用いた多角的な検討を行ってー 2010 年 11 月 18 日 ウィンク愛知
- ⑨ 林礼人ほか 第 19 回日本形成外科学会基礎学術集会 神経再生についての研究を行う理由とは? 2011 年 10 月 7 日 ハイアットリージェンシー東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 礼人 (HAYASHI AYATO)
順天堂大学・医学部・前任准教授
研究者番号：10365645

(2) 研究分担者

小室裕造 (KOMURO YUZO)
順天堂大学・医学部・臨床教授
研究者番号：90306928