

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 05 月 25 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590178

研究課題名（和文）

末梢神経移植後の運動ニューロンの変化と末梢部の再生効果との相応関係

研究課題名（英文）

The corresponding relationship between the changes of the motor neurons after peripheral nerve transfer and the effects of peripheral nerve regeneration

研究代表者

燕 軍 (YAN JUN)

岩手医科大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20316350

研究成果の概要（和文）：

末梢神経移植の結果を考える際に、主観的な評価だけではなく、 $\alpha \cdot \gamma$ 運動ニューロン数、局在などのデータにより、客観てきな評価が得られる。それに、本研究の実施により臨床でよく利用されている神経移植治療法の問題点を明らかにし、各個ニューロンの軸索伸長の効果的な治療法を見い出せる基礎てきなデータを提供された。副神経僧帽筋枝-肩甲上神経吻合をラットで再現した結果、両神経の支配ニューロンは、前角の腹側と背外側にそれぞれ位置していることがわかった。それに、術後の運動ニューロンの総数が減って、 α 運動ニューロンの減少と比較して、 γ 運動ニューロンに有意な減少が認められた。この結果から γ 運動ニューロンは移植後の筋力回復に重要な役割を持つことを示唆された。再生された支配枝のニューロンは、コントロールグループの80%に対し、神経移植後の回復率は60%にとどまっている。しかも、筋電図で再生した神経枝に支配された棘上筋の筋力が、ニューロン数の回復率と一致し、60%であることを分かった。これは臨床の治療結果と一致している。

肩甲上神経の軸索は脊髄腹側から出るはずなのに、再生されたニューロンの軸索が副神経に合流し脊髄の背外側から出るようになった。この結果を考えると、脊髄内においてホメオボックス遺伝子が軸索伸長に影響しているのではないかと推測される。これを解明するために、成体ラットを両神経の吻合群と対照群のそれぞれニューロンの領域を確定し、抗-Islet-1と抗-Lhx-3抗体で免疫染色して、各ニューロングループの遺伝子特性を確認したが、満足できる結果はまだ得ていないが、追加実験を現在も実施している。

研究成果の概要（英文）：

For many years, nerve transfer has been commonly used as a treatment option following peripheral nerve injury, although the precise mechanism underlying successful nerve transfer is not yet clear. We developed an animal model to investigate the mechanism underlying nerve transfer between branches of the spinal accessory nerve (Ac) and suprascapular nerve (Ss) in rats, so that we could observe changes in the number of motor neurons, investigate the 3-dimensional localization of neurons in the anterior horn of the spinal cord, and perform an electromyogram (EMG) of the supraspinatus muscle before and after nerve transfer treatment. The present experiment showed a clear reduction in the number of γ motor neurons. The distributional portion of motor neurons following nerve transfer was mainly within the neuron column innervating the trapezius. Some neurons innervating the supraspinatus muscle also survived post-transfer. Compared with the non-operated group, the EMG restoration rate of the supraspinatus muscle following nerve transfer was 60% in the experimental group and 80% in a surgical control group. Following nerve transfer, there was a distinct reduction in the number of γ motor neurons. Therefore, γ motor neurons may have important effects on the recovery of muscular strength following nerve transfer. Moreover, because the neurons located in regions innervating either the trapezius or supraspinatus muscle were labeled after Ac transfer to Ss, we also suggest that indistinct axon regeneration mechanisms exist in the spinal cord following peripheral nerve transfer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：

Nerve Transfer Treatment, Fluorescent Dye Labeling, Electromyogram, Nerve Axonal Regeneration, Rat

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。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（3-7）。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いる。

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基礎的研究が進められ、1990年、井出らは電子顕微鏡下に、末梢神経の断端（ランビエの絞輪）から軸索の再生芽（growth cone）が形成され、末梢側の神経束を通り、筋を再支配する過程を観察した。以後、多くの研究者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 らを始めとする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。定量的データの蓄積が待たれるところである。

1970年代以前、脊髄研究では、神経標識法として逆行変性法などが主流であったが、Kristensenらの報告以降、HRP法による研究が行われるようになり、各骨格筋を支配する脊髄前角ニューロンの局在の同定が盛んに報告された。HRP法は標識時の操作が簡便であること、標識が完了するまでの期間が短くて済むことから、軸索損傷や神経縫合などの操作後の脊髄前角運動ニューロンの変化を評価する試みがなされた。

しかし、HRPは注入や塗付する場合、周囲組織に漏出することが多く、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。このことから、免疫染色、adenovirus vector、fluorescent dye 等による、新しい逆行性標識法が考案された。特に、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。

2. 研究の目的

本研究は、ラットの副神経僧帽筋枝-肩甲上神経移行術モデルを用い、信頼性の高い 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数と前角内の局在変化を観察するとともに、末梢側で筋力の回復を筋電図により評価し、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

(1): 実験モデルの作成

①神経移行術

手術用顕微鏡下にラット (9W) の副神経僧帽筋枝 (以下 Ac) と肩甲上神経 (以下 Ss) を露出し、縫合部への緊張を最小とするため、それぞれの筋移行部から中枢側分岐部まで慎重に剥離して切断、副神経僧帽筋枝-肩甲上神経縫合 (Ac-Ss) を行った (n=4)。術後観察期間は 9 週間とした。

②手術対照

9 週齢ラットの副神経僧帽筋枝、肩甲上神経をそれぞれ切断後、10-0 ナイロン糸 2 針で元の位置に縫合し、対照例 (以下 Ac-Ac 群、Ss-Ss 群) とした (それぞれ n=4)。移行術例と同じく術後生存期間は 9 週間とした。

(2): 複合筋電図による評価

神経再生の実質的機能を評価する目的に、未手術例は 18W 齢で、Ac-Ss 群と Ss-Ss 群は術後 9 週 (18W) で、それぞれの棘上筋支配神経を露出し、電極で直接刺激して複合筋電図を記録した。各個体で測定位置を変えて、合計 30 回の刺激を行い、得られた値の最高値より、各群の最高値の平均を算出した。

(3): 脊髄運動ニューロンの標識法と標本の作製

①脂溶性色素による逆行性標識

手術用顕微鏡下で未手術例 (18 週齢) の副神経僧帽筋枝 (n=4) と肩甲上神経 (n=4)、Ac-Ss 群は術後 9 週 (18 週齢) の棘上筋支配神経、Ac-Ac 群は副神経僧帽筋枝をそれぞれ切断し (移行術例と手術対照例は縫合部から末梢側約 5mm にて切断)、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。

②標本の採取と固定

標識後、生存期間 (14 日間前後) を経て、深麻酔下で生食及び 4%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液にて灌流固定後、脊髄の C1~Th2 を摘出した。

後固定は 4%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 24 時間、20%ショ糖リン酸緩衝液 12 時間、30%ショ糖リン酸緩衝液 24 時間とした。

③組織切片の作成

手術用顕微鏡下に脊髄を各分節で切断した後、Cryostat にて分節ごとに連続横断切片 (50 μ m) を作製し、蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus, 東京) にて観察・撮影 (DP72 DP2-BSW, Olympus, 東京) した。また、末梢神経再生の状況を確認するため、移行術後の末梢神経の神経縫合部から 5 mm の近位側と遠位側の末梢神経組織を採取した。ホルマリン固定後、パラフィン包埋し、神経の横断切片を Masson trichrome 染色により観察した。

(4): 運動ニューロンの計測

移行術後神経の形態学的評価を行うため、蛍光顕微鏡下に Ac-Ss 群、未手術例、Ac-Ac 群の全切片で標識された脊髄前角 α 運動ニ

ューロンおよび γ 運動ニューロンの分節ごとの総数を計測し、比較検討した。 α 運動ニューロンと γ 運動ニューロンの識別は、Brushart らの計測法に準じた。すなわち、核を確認できるニューロン体の最大径が 30 μ m 以上のものを α 運動ニューロン、25 μ m 以下のものは γ 運動ニューロンとした。

E: ニューロン局在の三次元再構築

未手術例及び Ac-Ss 群において、撮影した各分節の連続切片全ての画像を、三次元再構築ソフトウェアにより三次元再構築像を作成し、脊髄前角における各ニューロングループの局在分布を比較した。

4. 研究成果

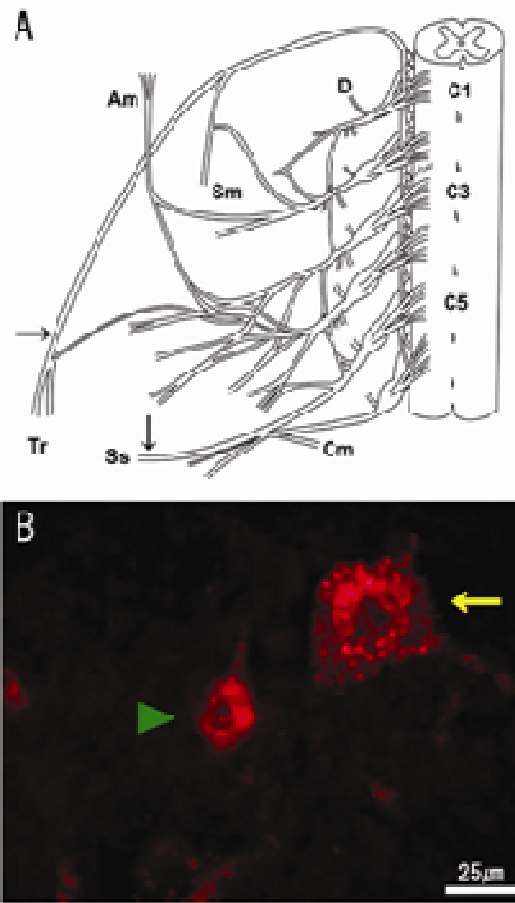


Figure 1. The form of Ac and cervical plexus (sketch) and α , γ motor neuron in anterior horn (photo). (a): The peripheral part of the Ac and cervical nerves of the rat (ventral view). The Ac has two main branches to innervate the ster-nocleidomastoideus and trapezius. C2, C3, and C4 send a branch directly to the Ac mainly. Black arrows: the dyed regions of the Ac and Ss; (b): The photo showing the α motor neuron (yellow arrow) and γ motor neuron (green arrowhead) in anterior

horn.

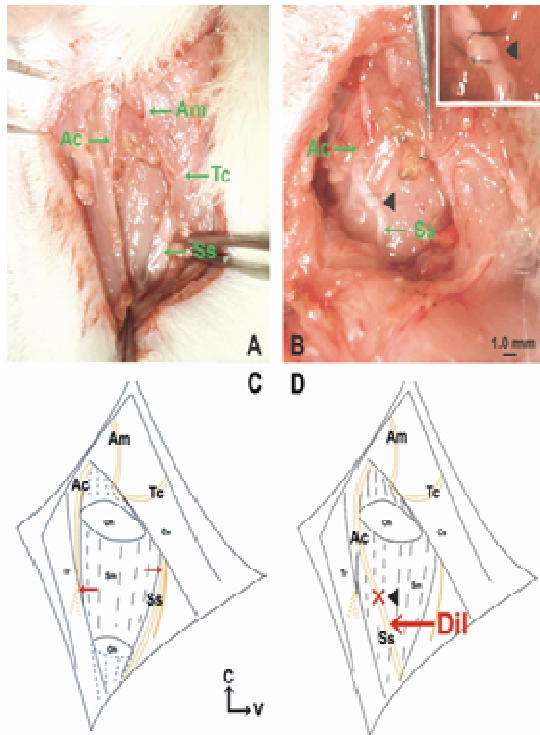


Figure 2. The photos and sketches showing the operation of the dye treatment and nerve transfer (Ac to Ss). (a): the Ac and Ss are in the upper and inferior edge of the omohyoideus muscle in rat. (b): the omohyoideus was amputated, the Ac and Ss has been transferred (black arrowhead). The right upper is the extended photo of the transferred nerve (Ac to Ss). (c): the red arrows are showing the dyed regions of the Ac and Ss, respectively. (d): the red-cross indicates the transferred point of two nerves, and the red arrow is showing the dyed point after nerve transfer (after operation 9 weeks).

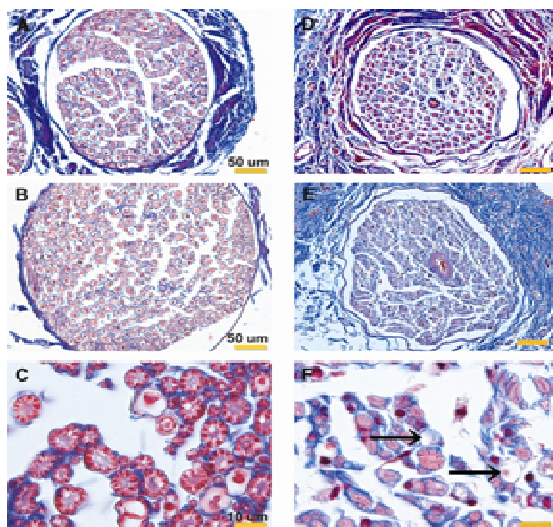


Figure 3. The section photos of peripheral nerves (un-operational and after nerve transfer). (a) (Ac) and (b) (Ss) are showing the peripheral nerve sections of un-operational cases. (d) and (e) are showing the sections which from the cranial and caudal part of the transferred nerve, respectively. It could be confirmed that the diameter of myelinated fibers was reduced, after compared with (a) and (b). (c) and (f) are the extended photos of (b) and (e). Note some of demyelination (black arrows) were observed and the number of fibers were decrease, the inflammatory cells were observed in (f).

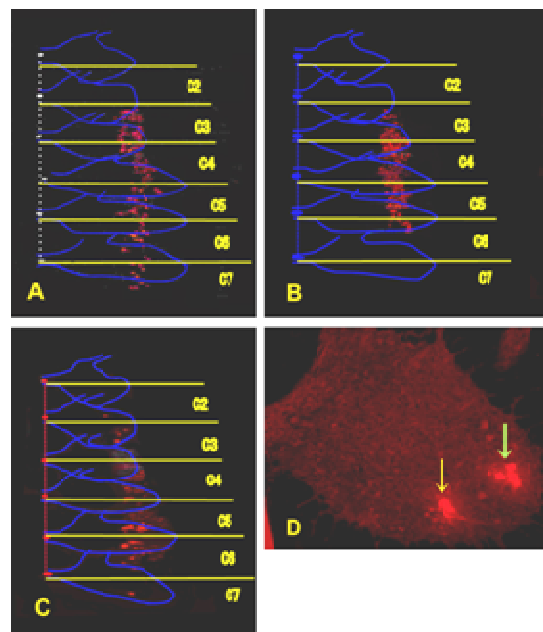


Figure 4. The neurons distribution of Ac, Ss and Ac to Ss. The neurons of Ac were located in the ventral portion of anterior horn and that of Ss were in the dorsal-lateral portion (yellow arrow: Ac; green arrow: Ss; in (d)). After 3-D reconstruction, the neuron column of Ac was showing in (a), that of Ss was in (b) and the column after nerve transfer was showing in (c). It was clear that the column after nerve transfer is similar with the Ac, although some dyed neurons were also observed (d).

まとめ：

(1) 末梢神経吻合術の動物モデルを作成した。移植後の治療効果を運動ニューロンの各変化で客観的な評価が得られた。

(2) 神経吻合をラットで再現した結果、

両神経の支配ニューロンは、前角の腹側と背外側にそれぞれ位置していることがわかった。

(3)、術後の運動ニューロンの総数が減って、 α 運動ニューロンの減少と比較して、 γ 運動ニューロンに有意な減少が認められた。この結果から γ 運動ニューロンは移植後の筋力回復に重要な役割を持つことを示唆された。

(4)、筋電図により、再生した神経枝に支配された棘上筋の筋力が、ニューロン数の回復率と一致していること、しかも、この結果は臨床の治療結果とも一致していることが分かった。

Tab. 1 The average number of the α and γ neurons

	α	γ	α/γ
Ac	233.0	39.0	5.9 / 1
Ss	222.0	45.0	4.8 / 1
Ac-Ac	199.0	33.0	6.0 / 1
Ac-Ss	183.0	25.0	7.3 / 1

Tab. 2 Restoration rate of the α and γ neurons (transfer and control)

	α	γ
Ac-Ss / Ac * 100%	79%	64%
Ac-Ac / Ac * 100%	85%	84%

Tab. 3 EMG (mv)

	Un-operational (Ss)	control (Ac-Ac)	transfer (Ac-Ss)
1	0.045	0.035	0.031
2	0.044	0.038	0.029
3	0.047	0.035	0.031
4	0.044	0.037	0.029
Aver	0.045	0.037	0.030

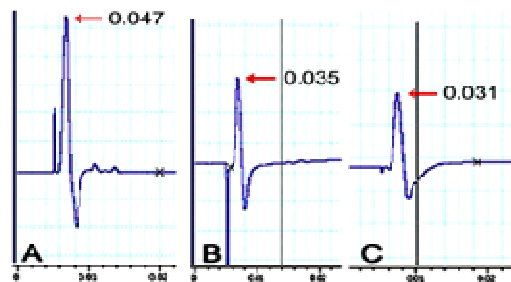


Table 1. The average number of the α and γ motor neurons. The average number of the α and γ motor neurons in Ac (un-operation), Ss (un-operation), Ac - Ac (control) and Ac - Ss (nerve transfer) were showing in the table. After nerve transfer, the numbers of the α and γ motor neurons were decreased clearly. After analysis by t-test, the significance difference between the two values were approved (in both α : Ac-Ac/Ac and γ : Ac-Ss/Ac, $p < 0.01$).

Table 2. The restoration rate of the α and

γ motor neurons. After nerve transfer, the restoration rate of the α and γ motor neuron were 79% and 64%, respectively. In the control, the rates of the two neuron group were 85% and 84%, respectively.

Table 3. The EMG of supraspinatus muscle in nerve transfer cases, control cases and un-operational cases. The graph is showing the un-operational (a), control (b) and transfer cases (c) of No.3 animal. The restoration rate of EMG in control cases (Ac to Ac) is 80% of the un-operational cases, and the rate of EMG in the nerve transfer (Ac to Ss) is 60% of the un-operational cases.

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2件)

① Jun Yan, Kazuhito Ogino, Jiro Hitomi (2011) Morphological and Electromyogram Analysis for the Spinal Accessory Nerve Transfer to the Suprascapular Nerve in Rats. Surgical Science, 2(5): 269-277 (査読有)

② 荻野和仁, 燕 軍 (2010) 脊髄前角ニューロンの形態学的解析と複合筋電図によるラット副神経僧帽筋枝一肩甲上神経移行術の評価、J Iwate Med Associa 62(3): 155-166 (査読有)

[学会発表] (計4件)

① 燕 軍 ラット胸鎖乳突筋・僧帽筋の二重神経支配の再検討、日本形態科学研究会、(2010/3/27) 盛岡市

② 燕 軍 脊髄前角における頸部体幹筋支配ニューロンの局在について、岩手医学会、(2010/1/29) 盛岡市

③ 荻野和仁, 燕 軍, 佐々木航, 人見次郎 副神経僧帽筋枝一肩甲上神経移行術における脊髄前角ニューロンの形態計測解析、解剖学学会東北北海道地方会 (2009/9/20) 仙台市

④ 荻野和仁, 燕 軍, 佐々木航, 人見次郎 僧帽筋支配枝と肩甲上神経に含まれる各ニューロンの数と局在の同定、日本解剖学学会、(2009/3/29) 岡山市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

燕 軍 (YAN JUN)

岩手医科大学医学研究科・講師

研究者番号：20316350

(2) 研究分担者

萩野 和仁 (OGINO KAZUHITO)

独協医科大学医学部・助教

研究者番号：80405787

(3) 連携研究者

人見 次郎 (HITOMI JIRO)

岩手医科大学医学研究科・教授

研究者番号：00218728