

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791789

研究課題名(和文)臨床に即した喉頭麻痺モデル動物の作成と内喉頭筋の二重神経支配に関する研究

研究課題名(英文) Effects of nerve-muscle pedicle on immobile rat vocal folds in the presence of partial innervation.

研究代表者

青山 猛 (Aoyama, Takashi)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70600170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：反回神経傷害後、部分的神経支配が存在する甲状披裂筋に対し神経筋弁移植術を行う場合、残存する反回神経と移植した頸神経が各々拮抗し新たな神経再支配の確立が妨げられる可能性がある。反回神経脱神経後部分的再生を認める甲状披裂筋モデル動物を作成し、このモデル動物を用い甲状披裂筋に神経筋弁移植術を行うことで、反回神経と頸神経ワナの二重神経支配がおこるかどうかを検討することを目的とした。結果は反回神経脱神経後部分的再生を認める甲状披裂筋に対しても神経筋弁移植術は有効であることが確認された。

研究成果の概要(英文)：OBJECTIVES: We investigated whether implantation of an ansa cervicalis nerve (ACN)-muscle pedicle into the thyroarytenoid (TA) muscle is efficacious in the presence of partial recurrent laryngeal nerve (RLN) innervation. METHODS: We studied a total of 36 rats. Twelve of the rats served as positive and negative control animals. In the remaining 24 rats, the left RLN was transected, a 1-mm piece of nerve was removed, and the stumps were abutted in silicone tubes (STs), inducing partial RLN regeneration. Twelve of the ST-treated rats underwent this procedure alone, and the other 12 rats had a nerve-muscle pedicle (NMP) implanted into the left TA muscle 5 weeks after ST treatment. At 15 weeks, reinnervation was assessed by histologic evaluation of the TA muscle and by electromyography with stimulation of the RLNs and ACNs. CONCLUSIONS: In rats, NMP implantation is efficacious for reducing atrophic changes in the TA muscle in the presence of partial RLN innervation.

研究分野：Laryngology

キーワード：ansa cervicalis nerve dual reinnervation nerve-muscle pedicle

### 1. 研究開始当初の背景

甲状腺腫瘍・食道癌・縦隔腫瘍・肺腫瘍・大動脈疾患などの手術後に発症する医原性反回神経麻痺が相対的に増加しており、今後も増加することが予想される。反回神経損傷はその傷害の程度により、完全に脱神経に陥る場合から、ある程度の神経線維の再生がみられ、内喉頭筋の過誤支配を伴う場合など様々である。ただ、いずれの場合も、声帯の可動性が回復することはなく、内転、外転運動が妨げられるため声帯は固定したままとなる。一側反回神経麻痺の患者に対する音声改善手術として一般的には甲状軟骨形成術型、披裂軟骨内転術などが行われるが、術後長期経過すると、麻痺側甲状披裂筋の筋萎縮が進行する場合もあり、全例が正常に近い音声まで改善するわけではない。この麻痺側甲状披裂筋の筋萎縮を予防あるいは回復するために、神経筋弁移植術が考案され臨床的に有効であると報告された。しかし、他の研究者の追試では同様な結果が得られず、神経筋弁の有効性には疑問が残されたままであった。熊井らは、ラットを用いて、完全に脱神経が成立した甲状披裂筋に対して頸神経ワナを用いた神経筋弁移植を行い、甲状披裂筋の断面積と神経筋接合部の組織学的変化を評価し、神経筋弁移植術の有効性を実証した。また内喉頭筋以外の領域でも、神経筋弁移植術は完全に脱神経された筋肉に新たな神経再支配を生じるとの報告がある。一方、喉頭領域以外では、部分的に神経支配が存在し機能的に問題のない筋線維は、他の神経支配を受け入れないとされている。もしそうならば、臨床的に反回神経が傷害された後、再生過程を経て部分的に神経支配の存在する甲状披裂筋に対して神経筋弁移植術を行っても、すでに再生した反回神経と移植した頸神経が拮抗し頸神経を経た新たな神経再支配の確立が妨げられる可能性が

ある。部分的に反回神経支配を有する内喉頭筋に対して、頸神経を介した神経筋弁移植術による神経再支配が起こるかどうかについては動物実験による基礎的検討がまったくなされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1) いったん完全脱神経に陥った後、ある程度の反回神経再生が起こる動物モデルを作成し、次に(2) その部分的再生動物モデルに頸神経ワナを用いた神経筋弁移植術を行って、頸神経ワナを介した甲状披裂筋の神経再支配が起こるかどうかを検討した。甲状披裂筋が神経支配を受けているかどうかを検討するために、

- ( ) 筋全体および単一筋線維の断面積、
  - ( ) 神経筋接合部(神経終末とアセチルコリン受容体)の数、
  - ( ) 生理学的評価として誘発筋電図検査を行い、誘発電位の有無、
- を指標とした。

### 3. 研究の方法

#### 1. 実験動物

実験にはウィスター系ラットメス8週齢(180~200g)を用いた。実験に関して動物の取り扱いには熊本大学動物実験指針に定められた方法を用い、また熊本大学動物資源開発研究センター使用心得に従った。

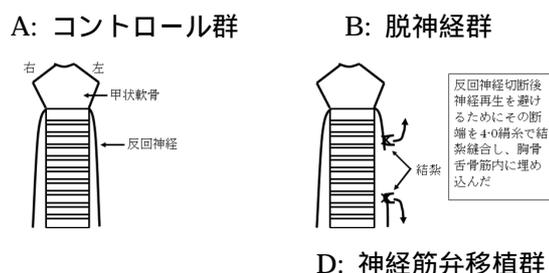
#### 2. 動物モデルの作成

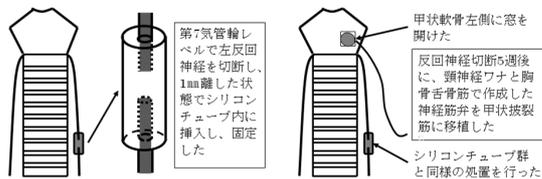
コントロール群(図1A)

脱神経群(図1B)

シリコンチューブ群(図1C)

図1 動物モデル





A: コントロール群は無処置の正常ラットとした。B: 脱神経群は左の反回神経を切断し、神経再生を避ける処置を行った。C: シリコンチューブ群は左の反回神経を切断後、断端間を 1 mm 離れた状態でシリコンチューブ内に挿入した。D: 神経筋弁移植群はシリコンチューブ群と同様の処置を行い、5 週後に頸神経ワナと胸骨舌骨筋で作成した神経筋弁を甲状披裂筋に移植した。

### 3. 評価時期

反回神経切断 15 週後、すなわち神経筋弁移植群では神経筋弁移植 10 週後に評価を行い、シリコンチューブ群と神経筋弁移植群の結果を比較することで頸神経ワナを用いた神経筋弁移植術の効果を検討した。

### 4. 評価項目

声帯運動の評価

誘発筋電図検査

冠状断連続凍結切片の作成

甲状披裂筋の筋全体および単一筋線維の断面積の解析

中心核を有する筋線維細胞数の割合

神経筋接合部

### 5. 統計学的検討

全てのデータは平均 ± 標準偏差で表記し、unpaired Student's T-test を用いて統計学的検討を行った。p<0.05 を統計学的に有意差があるとみなした。

## 4. 研究成果

### 1. 声帯の可動性の評価

コントロール群以外の 3 群全てのラット

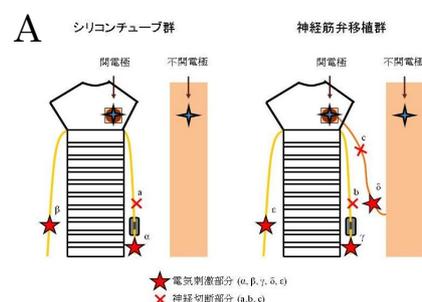
において、反回神経切断 15 週後では、処置側である左声帯の自発的運動は認められなかった。

### 2. 誘発筋電図検査 (図 2)

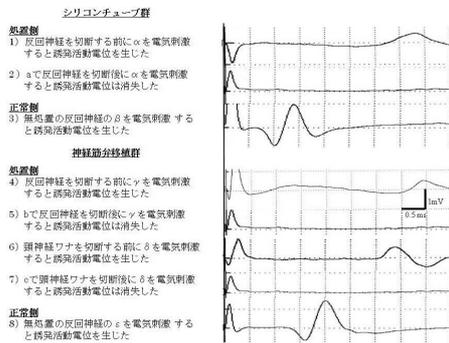
シリコンチューブ群において、反回神経切断部の中枢側である " " を電気刺激すると甲状披裂筋に誘発活動電位を認めた (図 2B, 1)。次に末梢側である " a " で切断し、再度 " " を電気刺激すると誘発活動電位は消失した (図 2B, 2)。正常側では、" " を電気刺激すると甲状披裂筋に誘発活動電位を認めた (図 2B, 3)。

神経筋弁移植群において、反回神経切断部の中枢側である " " を電気刺激すると甲状披裂筋に誘発活動電位を認めた (図 2B, 4)。次に末梢側である " b " で切断し、再度 " " を電気刺激すると誘発活動電位は消失した (図 2B, 5)。一方移植した頸神経ワナでは、" " で電気刺激すると甲状披裂筋に誘発活動電位を認めたが (図 2B, 6) 末梢側である " c " で切断すると誘発活動電位は消失した (図 2B, 7)。正常側では、" " を電気刺激すると甲状披裂筋に誘発活動電位を認めた (図 2B, 8)。さらに反回神経と頸神経ワナの末梢側を電気刺激することで甲状披裂筋に誘発活動電位を認めた。このことから、部分的に反回神経支配の存在する甲状披裂筋においても、もともとの反回神経と移植した頸神経ワナからの二重神経支配の生じたことが明らかとなった。

図 2 誘発筋電図検査



B



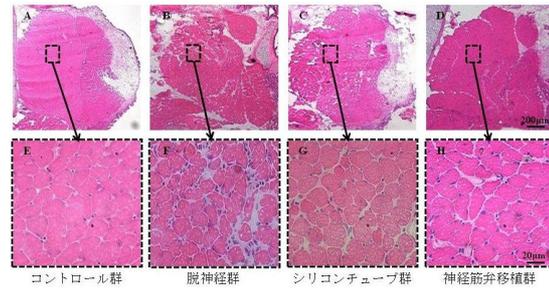
### 3. 甲状披裂筋の筋全体および単一筋線維の断面積の解析

シリコンチューブ群 (図 3C,G) の甲状披裂筋の筋全体および強拡大像における単一筋線維の断面積は、脱神経群 (図 3B,F) よりも大きかった。一方、神経筋弁移植群の甲状披裂筋の筋全体の断面積 (図 3D) は、コントロール群 (図 3A) より小さかったが、脱神経群やシリコンチューブ群より大きかった (図 3B,C)。強拡大像における単一筋線維の断面積においても同様に、神経筋弁移植群の単一筋線維の断面積 (図 3H) は、コントロール群 (図 3E) より小さかったが、脱神経群やシリコンチューブ群より大きかった (図 3E,F,G)。シリコンチューブ群では太い筋線維と細い筋線維が混在し、神経筋弁移植群では大部分が太い筋線維であった。

定量的に検討すると、シリコンチューブ群の筋全体の断面積は、有意差はなかったが脱神経群より大きく ( $p=0.298$ ; 図 4A)、単一筋線維のそれは有意に大きかった ( $p<0.01$ ; 図 4B)。一方、神経筋弁移植群の筋全体の断面積は、シリコンチューブ群より有意に大きかった ( $p<0.01$ ; 図 4A)。単一筋線維のそれは統計学的には有意差がなかったが、神経筋弁移植術がシリコンチューブ群より大きかった ( $p=0.051$ ; 図 4B)。以上の結果からシリコンチューブ群と神経筋弁移植群はともに筋萎縮が抑制されるが、神経筋弁移植群がシリコンチューブ群に比べて、より筋萎縮が抑制されたことが明らかになった。

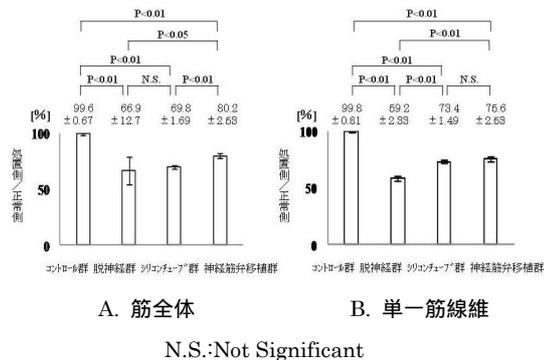
かになった。

図 3 甲状披裂筋の HE 染色



シリコンチューブ群 (図 3C,G) の筋全体および単一筋線維の断面積は、脱神経群 (図 3B,F) よりも大きかった。神経筋弁移植群の甲状披裂筋の筋全体の断面積は (図 3D)、コントロール群 (図 3A) と比較して小さかったが、脱神経群やシリコンチューブ群よりは大きかった (図 3B,C)。強拡大像における単一筋線維の断面積 (図 3H) においても同様だった (図 3E,F,G)。

図 4 甲状披裂筋の断面積の定量的検討



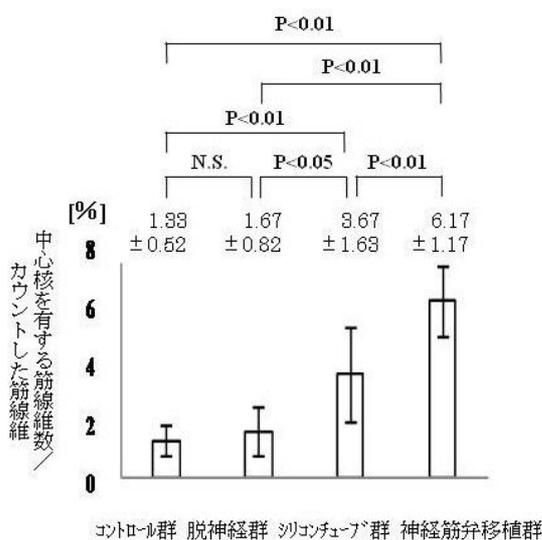
(図 4 の説明)

シリコンチューブ群の筋全体の断面積は、有意差はなかったが脱神経群より大きく ( $p=0.298$ ; 図 4A)、単一筋線維のそれは有意に大きかった ( $p<0.01$ ; 図 4B)。一方、神経筋弁移植群の筋全体の断面積は、シリコンチューブ群より有意に大きかった ( $p<0.01$ ; 図 4A)。単一筋線維のそれは統計学的には有意差がなかったが、神経筋弁移植群はシリコンチューブ群より大きかった ( $p=0.051$ ; 図 4B)。

### 4. 中心核を有する筋線維細胞数の割合

シリコンチューブ群における甲状披裂筋では、中心核を有する筋線維の占める割合は、脱神経群と比較すると、有意に多かった ( $p < 0.05$ ; 図 5)。神経筋弁移植群におけるそれは、コントロール群、脱神経群、シリコンチューブ群いずれと比較しても有意に多かった ( $p < 0.01$ ; 図 5)。この結果から、神経筋弁移植群の甲状披裂筋では再生過程にある筋線維の割合が他の 3 群よりも有意に多いといえる。

図 5 中心核を有する筋線維細胞数



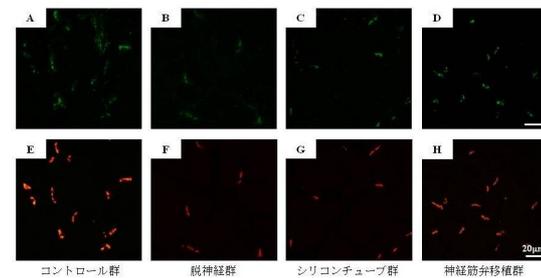
シリコンチューブ群における甲状披裂筋の筋線維で、中心核を有する筋線維の占める割合は、脱神経群と比較すると有意に多かった ( $p < 0.05$ )。神経筋弁移植群におけるそれは、コントロール群、脱神経群、シリコンチューブ群いずれと比較しても有意に多かった ( $p < 0.01$ )。

#### 5. 神経筋接合部 (神経終末およびアセチルコリン受容体) の変化

全ての群において、シナプトフィジン陽性の神経終末 (図 6A-D) と  $\alpha$ -BTX 陽性のアセチルコリン受容体 (図 6E-H) を認められた。シリコンチューブ群の神経終末数 (図 6C) とアセチルコリン受容体数 (図 6G)

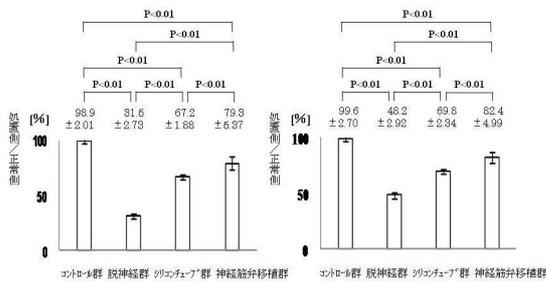
は、脱神経群 (図 6B,F) よりも多かった。神経筋弁移植群の神経終末数 (図 6D) とアセチルコリン受容体数 (図 6H) は、コントロール群 (図 6A,E) と比較して少なかったが、脱神経群 (図 6B,F) やシリコンチューブ群 (図 6C,G) よりも多かった。神経終末数とアセチルコリン受容体数の T/U 比は、シリコンチューブ群は脱神経群より有意な増加を認め ( $p < 0.01$ ; 図 7A,B)、神経筋弁移植群はシリコンチューブ群より有意な増加を認めた ( $p < 0.01$ ; 図 7A,B)。また、処置側のアセチルコリン受容体数に対する神経終末数の割合もシリコンチューブ群は脱神経群より有意に大きく ( $p < 0.01$ ; 図 7C)、神経筋弁移植群はシリコンチューブ群より有意に大きかった。 ( $p < 0.01$ ; 図 7C)。

図 6 神経筋接合部の蛍光二重染色

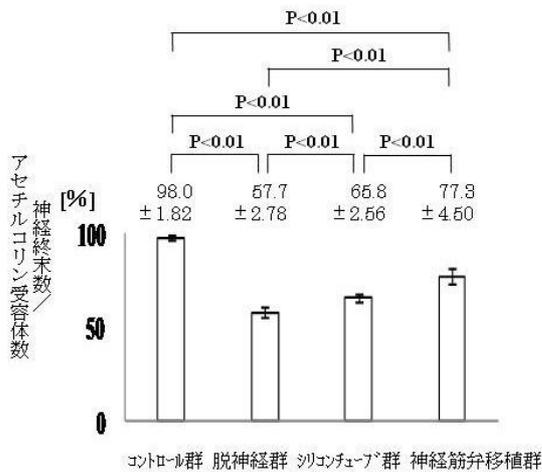


全ての群の神経筋接合部において、処置側の synaptophysin 陽性の神経終末 (図 6A-D) と  $\alpha$ -BTX 陽性のアセチルコリン受容体 (図 6E-H) を認められた。シリコンチューブ群の神経終末数 (図 6C) とアセチルコリン受容体数 (図 6G) は、脱神経群 (図 6B,F) よりも多かった。神経筋弁移植群の神経終末数 (図 6D) とアセチルコリン受容体数 (図 6H) は、コントロール群 (図 6A,E) と比較して少なかったが、脱神経群 (図 6B,F) やシリコンチューブ群 (図 6C,G) よりも多かった。

図 7 神経筋接合部の定量的検討



A. 神経終末 B. アセチルコリン受容体



C. 神経終末数/アセチルコリン受容体数

神経終末数とアセチルコリン受容体数の正常側に対する処置側の割合は、シリコンチューブ群と脱神経群を比較すると、それぞれにおいてシリコンチューブ群は脱神経群より有意に多かった ( $p < 0.01$ ; 図 7A,B)。神経筋弁移植群におけるそれは、コントロール群、脱神経群、シリコンチューブ群いずれと比較しても有意に多かった ( $p < 0.01$ ; 図 7A,B)。また、処置側のアセチルコリン受容体数に対する神経終末数の割合は、シリコンチューブ群は脱神経群より有意に大きく ( $p < 0.01$ ; 図 7C)。神経筋弁移植群はシリコンチューブ群より有意に大きかった ( $p < 0.01$ ; 図 7C)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kumai Y, Aoyama T, Nishimoto K, Sanuki T, Minoda R, Yumoto E  
 Recurrent Laryngeal Nerve Regeneration  
 Through a Silicone Tube Produces Reinnervation

Without Vocal Fold Mobility in Rats, Ann Otol

Rhinolaryngo 1122(1)49-53;2013

〔学会発表〕(計 10 件)

青山猛、讃岐徹治、湯本英二

高気圧酸素治療により喉頭を温存できた放射線治療後遅発性喉頭壊死の 1 例、

第 26 回日本喉頭科学会総会・学術講演会

2014.3.6-7 沖縄(那覇)

青山猛、熊井良彦、鮫島靖浩、湯本英二

喉頭粘表皮癌の 1 症例、第 25 回日本喉頭科学会総会・学術講演会、2013.3.7-8 横浜

青山猛、熊井良彦、鮫島靖浩、湯本英二、急速に進行した耳下腺血管肉腫例

第 25 回日本口腔・咽喉科学会総会・学術講演会、2012.9.13-14、熊本

青山猛、湯本英二

下咽頭・喉頭脂肪腫の 1 症例、第 22 回日本頭頸部外科学会総会・学術講演会、

2012.1.26-27 福島

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青山 猛 (AOYAMA TAKASHI)

70600170

研究者番号:

### (2) 研究分担者

研究者番号:

### (3) 連携研究者

研究者番号: