

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293362

研究課題名(和文)立体三次元構築法を用いた末梢神経交叉移行術後における可塑的神経再生経路の検討

研究課題名(英文) Study of nerve plasticity after nerve crossing using three dimensional imaging reconstruction

研究代表者

柴田 実 (Shibata, Minoru)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・研究員

研究者番号：50196432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経交叉術は本来、過誤支配をもたらす手技であり、有用な機能再生が促されるにはこれまで知られていないメカニズムが作用すると考えられる。マウス腕神経叢、上腕末梢神経は小さく、全体標本を使用して可塑的神経再生の観察に適する。高度の神経縫合技術を確立し、カルボシアニン蛍光色素染色でマウス末梢神経支配髄節はヒトと同様の支配レベルで筋皮神経と尺骨神経の支配髄節はほぼ、重ならない事を示し、尺骨神経を近位、筋皮神経を遠位に交叉すると、交叉部遠位からの逆行とレーザーで尺骨神経支配髄節とともに筋皮神経支配髄節の支配が加わっていることが判明した。電気生理学的にも交叉術後に有用な筋収縮が起こることを示した。

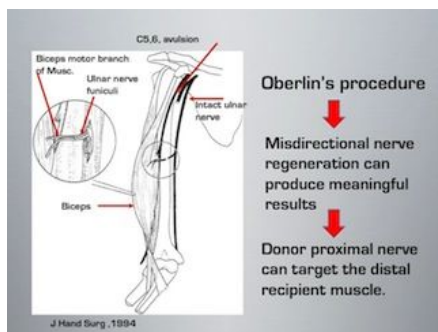
研究成果の概要(英文)：Nerve crossing recently become useful nerve repairing method, however, this procedure should theoretically invites unusefull misreinnervation. We anticipated unknown nerve purposeful neural plasticity worked after nerve crossing. We established nerve crossing technique in the extremely small peripheral nerve in the upper arm to allow hole mount brachial plexus observation. Retrograding tracing of ulnar and musculocutaneous nerve revealed spinal neuron innervation and there was almost no overlapping innervation between ulnar and musculocutaneous nerve. It was found that after crossing of proximal ulna and distal musculocutaneous nerve retrograde tracing from distal to the crossing site identified participation of musculocutaneous nerve innervating neuron tracing in addition to the ulnar innervating neurons. Electrophysiological study demonstrated useful reinnervation by this type of crossing procedure. Observation of whole mounting brachial plexus is proceeding.

研究分野：末梢神経

キーワード：神経交叉 神経可塑性 脊髄髄節 支配レベル 脊髄前根 脊髄後根

1. 研究開始当初の背景

修復不可能な顔面神経に対する舌下神経、三叉神経咬筋枝の端々および端側交叉術や腕神経叢麻痺における端々および端側神経交叉術による肘屈曲再建などで優れた成績が得られている(図1)。しかし、これらの神経交叉術は本来、過誤神経支配をもたらすはずであり、予想外に合目的な再支配が起こりうるメカニズムが解明されていない。



(図1)。

2. 研究の目的

研究者は、Adenovirus Vector を用いて、逆行性に再生神経全長トレーシングを行い、神経端側縫合や交叉縫合後に接続が絶たれた末梢ターゲットに本来の支配レベルから神経再生が起こり得ることを証明したが、その再生経路が明らかでない。

本研究では、ホールマウント標本で、この再生経路を新たな立体3次元構築法を用い、細胞からつながる再生経路を連続的に検討し、細胞から末梢神経まで可塑的再生ルート全体を解明する事を目的とする。

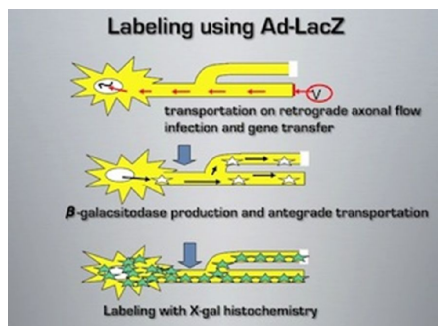
3. 研究の方法

(1) Adenovirus vector tracer によるトレース

末梢神経再生経路を検討するには逆行性に導入し、経路全長の可視化が望ましい。研究者は様々な神経トレーサーを試用したが Adenovirus vector tracer による再生神経トレーシングはユニークで優れた特性を有する。

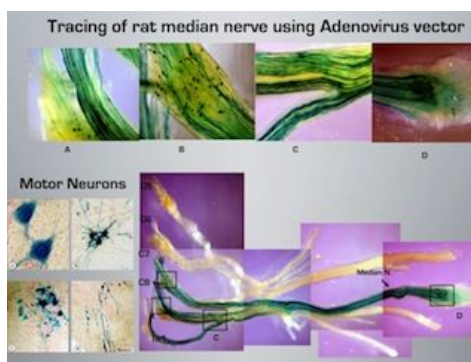
特性第1：逆行性の導入が可能である(再生神経のみのトレースが可能)

導入された virus は逆行性軸索流に乗って神経細胞体ニューロンに到達、感染し、細胞体に LacZ 遺伝子が組み込まれる(図2)。



(図2)。

特性第2：神経全長の標識が可能  
LacZ が組み込まれた細胞体で -galactosidase が産生され、これを x-gal histochemistry により、鮮やかな blue-green のラインとして神経軸索および神経細胞体の全長を標識できる。切断近位神経断端からの Adenovirus vector 導入による感染率は限定的であり、正常神経を切離した近位端からの感染導入率は 20~30% で、再生神経ではさらに低く、10~数%程度である。これは、再生軸索の総数計測には不向きな特性と考えられるが、逆に、再生神経の走行経路の詳細な軸索経路探索にとっては大きな利点となる(図3)。



(図3)。

特性第3：-galactosidase に対する抗体染色により、高感度蛍光染色が可能であり供焦点レーザー顕微鏡により3次元構築下の観察が可能である。以上のように、Adenovirus vector は極めてユニークで有用なトレーサーであるが、研究者らのグループは国内外で初めて末梢神経軸索探索の実用化に成功している。

(2) これまでに実験的に確認出来た結果とそれに基づく仮説：

ラット筋皮神経と尺骨神経の支配脊髄随節レベルを検討した結果、人間と同様に筋皮神経は C5,6,7 レベル、尺骨神経は少数の C7 支配を受けるが大部分は C8,Th1 レベル支配であり、殆ど支配レベルの重複がない(図4)。

Traced Nerve	Tracer	Spinal Levels
Musculocutaneous	Adenovirus (Inducted 16 wks after repair).	C5,6,7
	Nonvirus	C5,6,7
Ulnar	Adenovirus (Inducted 16 wks after repair)	C8,Th1
	Nonvirus	(C7),C8,Th1

(図4)。

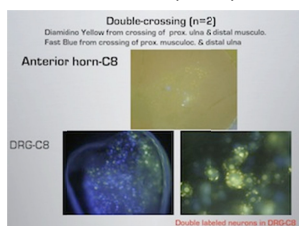
筋皮神経の近位断端に尺骨神経の遠位断端を交叉縫合し 24 週後に縫合部遠位から導入し LacZ adenovirus でトレースすると端側縫合モデルでは尺骨神経のレベルのみならず、支配を受けるルートのない筋皮神経

支配随節レベル C5,6, (7)から、また交叉縫合モデルでは C8,Th1 レベルからの支配を認めた(図5)。

Tracer Root Level		Type of crossing	Tracer Distribution
Inf-C8	Inf-C7		
2/2	2/2	Group A: Double (n=2)	Dist. to Crossing & Dist. MC
3/3		Group A: Single (n=3) Prox. Ulna & Dist. MC	Dist. to Crossing & Dist. MC & Dist. Ulna
	2/2	Group B: Double (n=2)	Dist. to Crossing & Dist. MC
	3/3	Group B: Single (n=3) Prox. MC & Dist. Ulna	Dist. Ulna

(図5)。

non-virus tracer である Diamidino Yellow、Fast Blue で支配随節を同定しても、同じ結果が得られた(図6)。



(図6)。

(3) 本研究で企画する新たな展開としての研究：

コントロール実験結果は正常ラット腕神経叢には筋皮神経と尺骨神経との間を交通する神経線維の神経細胞により、筋皮神経に C8, Th1 レベルの神経細胞からの神経線維は標識されないことを示す。しかし、筋皮神経と尺骨神経の交叉術後 24 週では明らかに交通する線維が新たに生じている。その、再生ルートを解明できれば、脊髄および末梢神経レベルで神経可塑性の作用するメカニズムを解き明かす。

神経端側縫合や交叉縫合後に合目的な末梢効果器官の再支配を目指すメカニズムが作用して、断絶した神経線維の、もとの支配神経細胞体からの再支配が誘発されると考えられる。その際、もとの支配神経細胞とどのレベルで新たな神経線維の発芽を促され、結果として効果器官に向けて再秩序化に向けての軸索再生が起きるのか解明することが本研究の目的である。

(4) 本研究で解明されるべきポイント

可塑性発現の事実を電気生理学的手法で証明・確認する

端側縫合または交叉縫合した末梢神経本幹を電気刺激し、C8,Th1 前・後枝あるいは前角・後根神経節において誘発電位を記録する。(これまで、全く行われていない)

可塑的に誘発される発芽のレベル  
仮説 1 . 神経細胞体およびその近辺

2 . 既存の神経線維の internodal space

発芽後の再生神経の伸展ルート

仮説 1 . 腕神経叢内に既存の plexus 構造を介して新しく形成されるルート

2 . 脊髄内を上行または下降するルート

(5) 可塑的に誘発される発芽レベルの検討

(仮説：1 . 神経細胞体 2 . 既存線維 internodal space)

-galactosidase を X-gal 染色し、引き続いて一次、および二次抗体をもちいた免疫染色で、まず神経交叉術後の標本で抗体染色された蛍光再生神経を供焦点顕微鏡三次元解析し、神経根系からガングリオン、さらに腕神経叢を走行する再生線維を一体三次元再構築し、発芽レベルを検討する。脊髄縦割標本で前角細胞と軸索経路の検討を行う。続いて透過光顕微鏡で x-gal 染色線維について標本をグリセリン溶液で透徹化し、倒立顕微鏡を用いて z 軸、xy 軸をスキャン、再構築する。

(6) 発芽後の再生神経の伸展ルート探索

上記のデータから、脊髄内、脊髄外(腕神経叢)の神経細胞と上肢末梢神経軸索全長を探索する。

4 . 研究成果

神経細胞体およびその近辺、腕神経叢、上肢末梢神経内の軸索走行そして腕神経叢内に既存の plexus 構造を介して新しく形成されるルート、脊髄内を上行または下降するルート。(シナプスを越えて追跡できるトレーサーが必要)さらに既存神経線維の internodal space 発芽後の再生神経の伸展ルートを詳細に観察する事が最終目標である。そのためには、ラットのモデルでは検索神経部位の全体標本での実施は困難であり、共同研究者とともに再度検討の結果、マウスモデルを使用することに変更した。

しかしながら、神経交叉モデルを作製する操作にはマウスの末梢神経はラットに比べ遙かに小さく、神経切離・縫合の操作が極めて困難であることが判明した。

臨床手術用の優れた高倍率顕微鏡を用い、拡大率を最大に設置し、神経剥離、切離そして縫合の操作器具としては超微小外科器具の使用が不可欠であることが確認された。実際のモデル作製には超微小外科手術の技量が必要であり縫合糸も臨床でもめったに使用しない 11-0 ナイロン糸を用いる必要がある。主たる研究者の直接指導の下に実験担当大学院生が末梢神経の剥離、神経切離、交叉縫合の練習を重ねたが安定して良好な交叉モデルの作製は困難との結論に至った。より、操作が簡便で安定性の高い交叉モデルが作製可能な方法として神経交差部の神経断端接着に臨床試用されているフィブリン糊を

用い、接合前に神経に通しておいた直径0.5mmの人工神経を用いて神経交叉接合部をチューピングする方法を検討した。

しかし、担当大学院生は11-0ナイロンで神経縫合を行う技術を習得し、適切に施行できることが確認できたので、神経接合は縫合法を用いることにした。

共同研究を行っている解剖学教室で各種神経トレーサーの特徴を学び、まずは手術していない新鮮マウスを用いて末梢神経支配髄節レベルの検討し、ラットおよびヒトの支配髄節レベルとの比較検討を行った。

手術未施行のマウス腕神経叢の支配髄節レベルの同定を行った。マウスの上腕で筋皮神経、尺骨神経をそれぞれ同定した。；神経上膜を開窓し、カルボシアニン蛍光色素の結晶を置き、逆行性に神経標識を行った。末梢神経線維から連続して、遠心性経路である前角細胞～軸索、求心性経路である軸索～後根神経節を連続的に観察することが可能であった。その結果、支配髄節については、筋皮神経はC5,6,7レベル(n=6)、尺骨神経は少数のC7支配を受けるが大部分はC8,Th1レベル(n=6)であり、ヒト、ラットと同様であることが判明した。

マウスモデルでもラットモデルと同様に神経交叉移行術後に支配髄節レベルの変化を来すことが判明した。すなわち、マウス筋皮神経近位-尺骨神経遠位(n=6)、尺骨神経近位-筋皮神経遠位(n=6)の交叉術を行うと交叉モデル前者の術後に縫合部遠位より脊髄支配髄節を追跡すると筋皮神経の支配髄節に加え、尺骨神経支配髄節支配が加わるが、後者の交叉モデルでは尺骨神経支配髄節のみが追跡される事が判明した。

以上から、マウスモデルでも神経交叉術後にラットモデルと同じ神経可塑性が発現することがわかり、より個体サイズの小さいマウスモデルで神経可塑性発現経路の三次元解析が可能であることがわかった。

マウス神経交叉モデルで透徹標本作製し可塑性発現経路の追跡を試みたが全体標本を通しての神経再生経路の検討は簡便にはできないことが判明した。その解決策として全体標本の連続切片を作製し、そのトレース結果を3次元解析ソフトウェア-、全体標本を連続的に一定量ずつ自動移動するstaging装置を使用し、三次元的解析を行う方がよいと判断された。しかし、この再構築には時間を要するため、まず短期間に施行できる神経交叉術後の神経再生の生理学的検討を行った。

筋皮神経神経を切離放置する群、一旦切離し縫合した群、および近位尺骨神経に遠位筋皮神経を交叉した群で神経切離部より近位で電気刺激し、上腕二頭筋の筋収縮電位を記録した。後二者の群では上腕二頭筋の収縮電位が記録された。すなわち、異種の神経交叉をしても上腕筋の再支配が起こることが判明した。さらに交叉部位より近位の下神経幹レ

ベルで電気刺激し、上腕二頭筋のM波を測定予定である。仮説として下神経幹の刺激で上腕二頭筋が収縮すると予想される。またコントロールの末手術マウスの下神経幹の電気刺激では二頭筋は収縮しないと予想される。

## 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 2 件)

若槻華子 渡辺啓介 千葉映奈 柴田 実 松田 健 佐藤 昇

マウス腕神経叢神経移行術モデルを用いた末梢神経再生経路の解析

第121回日本解剖学会総会・全国学術集会  
2016.3.23 ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

若槻華子 渡辺啓介 千葉映奈 柴田 実 松田 健 佐藤 昇

マウス腕神経叢神経移行術モデルを用いた末梢神経再生経路の解析

第122回日本解剖学会総会・全国学術集会  
2017.3.29 長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

柴田 実 (SHIBATA Minoru)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・研究員  
研究者番号：50196432

### (2)研究分担者

松田 健 (MATSUDA Ken)

新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：50423166

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

佐藤 昇 (SATO Noboru)

新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号 00254756

牛木 辰男 (USHIKI Tatsuo)

新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号 40184999

洪木 克栄 (SHIBUKI Katsuei)

新潟大学・脳研究所・教授  
研究者番号 40146163