

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861702

研究課題名(和文)遊離筋肉移植における神経二重支配のメカニズムに関する研究

研究課題名(英文)Study of double innervation in neurovascular muscle transfer

研究代表者

清家 志円 (Shien, Seike)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：20644933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円

研究成果の概要(和文)：麻痺性疾患に対して行われる神経血管柄付き遊離筋肉移植は、近年では、より強力な筋収縮を獲得するために2系統の神経を縫合する試みがなされている。しかし、その基礎的裏付けは十分になされていない。われわれは神経二重支配の研究のための動物モデルを新しく開発した。ラットの広背筋を、神経および血管柄を付けた有茎筋弁として前頸部皮下に移行させ、胸背神経の近位側断端と遠位側断端をそれぞれ左右の顔面神経分枝に縫合して作成した。移植筋肉が神経二重支配を受けていることを確認するために、神経電気刺激および神経回路標識法を行った。これらのことから、移行した筋肉が両側の顔面神経によって二重支配を受けていることが確認できた。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of double innervation of muscle has not been elucidated well. To investigate the double innervation mechanism, we have contrived a new rat model in which a segment of the latissimus dorsi muscle is reinnervated by bilateral facial nerves through proximal and distal stump of dominant thoracodorsal nerve. Electrical nerve stimulation and fluorescent retrograde tracing study were undertaken to verify that the muscle segment was reinnervated through both of bilateral mandibular branches. First, muscle contraction was evoked by electrical nerve stimulation of both sides of mandibular branches. Second, retrograde tracing studies showed fluorescent labeling of both sides of facial nuclei.

This kind of model for double innervation study has not been described to date. This model is supposed to be useful for the future manifestation of the double innervation mechanisms of transferred muscle.

研究分野：移植筋肉における神経二重支配

キーワード：神経二重支配 筋肉移植 顔面神経 顔面神経麻痺 動物モデル 神経縫合 マイクロサージャリー

1. 研究開始当初の背景

陳旧性顔面神経麻痺に対する治療においては、マイクロサージャリー技術を用いた神経血管柄付き自家遊離筋肉移植によって、麻痺した表情筋の代替として表情を作り出すこと(reanimation)が可能になった。

従来の神経血管柄付き自家遊離筋肉移植においては、移植筋肉の1本の支配神経を移植床の1本の運動神経に縫合していた。対して、近年では、より強い筋収縮を得ることを期待して、移植筋体に2系統の運動神経を縫合することによって神経二重支配を付与する試みがなされている。いくつかの臨床報告が示すように、この治療法が実際に有用であることが分かれば、顔面神経麻痺を始めとする麻痺性疾患の治療にとって大きな利益になると考えられる。

しかし、一般的に、筋肉組織において、ひとつの運動終板は1本の運動神経繊維の支配を受けるものとされており、支配神経を2本に増やすことで、本当に筋収縮が増強されるのか、という疑問が生じる。他にも、運動終板の数的変化が起きるか、ひとつの運動終板に2つ以上の神経終末が接合し得るか、といった問題は、明らかにされていない。

移植筋肉に神経二重支配を付与するという概念は比較的新しいものであり、その基礎的知見は十分に得られていない。移植筋肉における神経二重支配の基礎的研究に取り掛かるためには、まず研究に適した動物モデルを開発する必要があった。

研究代表者の所属する施設では、ラットの広背筋を用いて、広背筋を支配する胸背神経の近位側を切断し、中枢側の神経断端を胸背神経の遠位側に縫合することで、広背筋への神経再支配が起こることを確認している。この知見を応用して、胸背神経の近位側断端および遠位側断端から神経再支配が同時に起こるのではないかと考え、動物モデルの発案に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、まず、移植筋肉における神経二重支配の基礎的研究に適した動物モデルを開発することである。

次に、作成した動物モデルを用いて、神経二重支配によって、単一神経支配の場合と比べてより強い筋収縮を得ることができるかどうか、神経二重支配を受けた移植筋肉に2系統の神経がどのように分布していくか、などについて、免疫組織学的解析や、順行性および逆行性神経トレーサによる神経回路標識法などを用いて解明する。

3. 研究の方法

本研究では、ラットの広背筋の支配神経である胸背神経の近位側断端と遠位側断端を左右の顔面神経分枝と縫合した、神経二重支配モデルを開発する。

神経二重支配モデルの開発に成功すれば、

それを応用して、近位側神経または遠位側神経のみを片側の顔面神経と縫合した単一神経支配群、神経縫合を行わない神経再支配欠如群を作成することが可能であり、筋収縮能、電気生理学的特性の比較検討を行うことができる。

さらに、免疫組織化学を用いた組織学的アプローチによって移植筋肉の形態学的解析や神経接合部の定量的評価を行い、群間の神経支配様式による影響の検証を予定した。また、順行性および逆行性神経トレーサを用いた神経回路標識法により、移植筋肉の支配神経回路の解析を予定した。

以下、動物モデル開発までの経緯とモデル作成の方法について、さらに作成したモデルにおいて実際に神経二重支配が起きていることを示す。

実験動物として、Wistar系ラットを用いた。右側胸部の皮切からラットの広背筋を剥離し、その支配神経である胸背神経の近位側断端および遠位側断端を確保した。遠位側断端は、広背筋の中を走行しているため、手術用顕微鏡を用いて丁寧に剥離する必要があった。広背筋の主たる栄養血管である胸背動静脈を同定して剥離し、これを上行して肩甲下動静脈、さらには腋窩動静脈の遠位側を焼灼切離することで、腋窩動静脈を血管茎とした広背筋弁を挙上した。広背筋は、神経および血管が筋体に入るところを含めた、1.5cm四方程度の筋弁とした。この有茎広背筋弁を、頸部正中切開から作成した前頸部皮下のスペースに筋弁を移動させた。腋窩動静脈を血管茎とすることで長い血管茎を確保することが可能であり、余裕をもって前頸部に筋弁を移動させることができた。移動の際には、右の大胸筋を切断しておくことで、血管柄が大胸筋に圧迫されることを回避できた。

さらに、同じ頸部正中切開から、左右の顔面神経分枝(下顎縁枝)が咬筋筋膜上を走行しているのを確認しこれを剥離して、できるだけ遠位において神経を切断し、翻転させて神経縫合に備えた。手術用顕微鏡下に右の顔面神経分枝と胸背神経の近位側断端、左の顔面神経分枝と遠位側断端を、それぞれ10-0ナイロン糸を用いて縫合した。この際も、顔面神経分枝と筋弁の血管茎を長く確保しておくことで、余裕を持って神経縫合することが可能であった。

当初は、遊離広背筋弁として頸部の血管(総頸動脈および外頸静脈あるいは内頸静脈)に吻合して移植する予定であったが、手術手技が煩雑でありかつ重要血管を使用することによってラットが周術期に死亡することにもしばしば遭遇した。しかし、血管柄を長く確保することで、有茎筋弁として移動させられることが分かり、有茎筋弁移植とすることで、手術時間の短縮とラットの生存率上昇は顕著であった。

続いて、前頸部に移植した広背筋が実際に神経二重支配を受けていることを確認するために、手術の1-2ヶ月後に、神経電気刺激および神経回路標識法を用いた。

神経電気刺激に関しては、左右の頸部皮下を走っている縫合した神経を同定し、それぞれの神経に対して誘発電位検査装置を用いて電気刺激を行い、いずれの電気刺激に対しても移植筋肉が収縮するかを確認した。また、その筋肉収縮の様子を録画した。誘発筋電図は、機械的な問題により得ることができなかった。

神経回路標識法に関しては、手術1-2ヶ月後に、神経トレーサである fluorogold を移植した筋肉に1ul 注入し、試薬が神経軸索を逆行性に移動して、顔面神経核へ移行したかを確認した。Fluorogold を注入して1週間後にラットを灌流固定して抜脳し、顔面神経核が存在する橋の切片標本(パラフィン包埋)を作成して蛍光観察に供し、左右の顔面神経核が fluorogold により蛍光標識されているかを確認した。

4. 研究成果

手術後1-2ヶ月に神経電気刺激および神経回路標識法で評価を行った。

右の顔面神経分枝は胸背神経近位側断端と縫合されており、これを電気刺激することで、移植筋肉の収縮を確認できた。左の顔面神経分枝は胸背神経遠位側断端と縫合されており、これを電気刺激することで、移植筋肉の収縮を確認できた。録画した筋肉収縮を比較すると、前者の筋収縮の方が、後者の筋収縮よりも強い印象を受けた。今後は、動画解析ソフトによる定量的な検討を重ねる予定である。

一方、神経回路標識法による評価では、橋の蛍光観察により、左右の顔面神経核および顔面神経軸索が蛍光標識されているのを確認できた。

以上2つの方法によって、本研究で作成した動物モデルの移植筋肉が実際に左右の顔面神経から二重支配を受けていることを確認できた。従って、神経二重支配を受ける移植筋肉の動物モデルの開発に成功した。

移植筋肉に神経二重支配を付与するという新しい治療方法に関しては、臨床分野での症例報告は散見されるものの、基礎的な検討はほとんどなされていなかった。本研究では、この新しい研究分野において有用と考えられる動物モデルを開発することに成功した。この動物モデルを用いた研究によって今後得られる基礎的知見は、それがたとえ治療にとって有用でないことを示すものであったとしても、治療方法を考える上で非常に重要であると考えられる。

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 3 件)

1. 清家志円、栗田昌和、Amr Khater、北幸紘、多久嶋亮彦、波利井清紀「移植筋体の神経二重支配の研究を目的とした新しい動物モデルの開発」第41回日本マイクロサージャリー学会総会、2014年12月5日
2. Shien Seike、Masakazu Kurita、Yukihiro Kita、Akihiko Takushima、Kiyonori Harii. "Development of a new rat model for the study of double innervation in neurovascular muscle transfer." World Society of Reconstructive Microsurgery, 19th March 2015.
3. 清家志円、栗田昌和、菅浩隆、大島直也、多久嶋亮彦、波利井清紀「移植筋体の神経二重支配の研究を目的とした新しい動物モデルの開発」第38回顔面神経学会、2015年6月11日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

清家志円(Shien Seike)
杏林大学医学部形成外科 助教
研究者番号：20644933

(2)研究分担者

栗田昌和(Masakazu Kurita)
Salk institute for biological studies

研究者番号： 2 0 4 2 4 1 1 1

菅浩隆 (Hiroataka Suga)
杏林大学医学部形成外科 助教
研究者番号： 6 0 6 3 3 9 4 2

(3)連携研究者