

# 学位論文

## Doctor's Thesis

論文題名

腕神経叢牽引負荷における神経軸索の細胞骨格に関する研究  
(Changes in the axonal cytoskeleton after mild stretching of the brachial plexus)

著者名 :

菊川憲志

Kenshi Kikukawa

指導教官名 :

整形外科学教授

高木克公

審査委員名

- |    |      |       |       |    |
|----|------|-------|-------|----|
| 1) | 神経内科 | 学担当教授 | 内野 誠  | 先生 |
| 2) | 薬理   | 学担当教授 | 西 勝英  | 先生 |
| 3) | 解剖   | 学担当教授 | 児玉 公道 | 先生 |
| 4) | 神経分化 | 学担当教授 | 田中 英明 | 先生 |

2002年3月

## Table of Contents (目次)

- 1) 要旨
- 2) 発表論文
- 3) 謝辞
- 4) 略語一覧
- 5) 研究の背景と目的
- 6) 実験方法・結果
- 7) 考察
- 8) 結語
- 9) 参考文献

## 1) 要旨

我々はこれまでラットを用いた上肢牽引モデルを作成し、牽引負荷に対する腕神経叢の易損性について研究を重ねてきた。今回同モデルで、軽微な牽引負荷に対するラット上肢の末梢神経の細胞骨格に関して、電子顕微鏡学的・神経生化学的に検討した。これまでの研究結果より軽微な牽引条件を2 N・1時間とした。電子顕微鏡学的検討では、牽引負荷にて腕神経叢で微小管の有意な減少がみられた。正中神経では微小管の変化はみられなかった。ニューロフィラメントは腕神経叢・正中神経とも変化はみられなかった。ウェスタンブロッティング解析では、腕神経叢でタウタンパクの有意な減少がみられた。神経根・正中神経ではこの変化はみられなかった。微小管の主要成分であるチューブリンはいずれの部位でも変化はみられず、またニューロフィラメントも同様であった。このタウタンパクの減少は牽引後12時間で回復した。これらの結果より、軽微な牽引負荷にて微小管は脱重合し、この脱重合はタウタンパクの減少によるものと推察された。上記の変化は腕神経叢でのみ起こり、牽引負荷に対する腕神経叢の易損性が示唆された。

## **Abstract**

We have developed an animal model to investigate acute changes in the axonal cytoskeleton caused by a mild stretching of the peripheral nerve in the upper limbs of rats. Rat forelimbs were continuously stretched at 2N for one hour. Thereafter, a part of the brachial plexus and median nerve were harvested and processed for electron microscopic analysis. The total number of microtubules in the brachial plexus decreased to 55% of that of the control animals without change in the number of neurofilaments. No significant changes in microtubules or neurofilaments were observed in the median nerve. By Western blotting analysis, the amount of tau protein in the stretch group significantly decreased in the brachial plexus but not in the median nerve. However, no significant changes in the amount of tubulin protein were observed in either the brachial plexus or median nerve. These results suggest that the microtubules were depolymerized by stretching of the brachial plexus and that the depolymerization was due to the decrease in the tau protein.

## 2) 発表論文

Acute changes in the axonal cytoskeleton after mild stretching of the rat brachial plexus

Kenshi kikukawa, Kohji Fukunaga, Teiji Kato, Makio

Yamaga, Eishichi Miyamoto and Katsumasa Takagi

Journal of Orthopaedic Research, in press

# JOURNAL OF ORTHOPAEDIC RESEARCH

Joseph A. Buckwalter, M.D.  
Dept. of Orthopaedic Surgery  
The University of Iowa Hospitals and Clinics  
200 Hawkins Drive, Iowa City, IA 52242-1088

Timothy M. Wright, Ph.D.  
Dept. of Biomechanics & Biomaterials  
The Hospital for Special Surgery  
535 E. 70<sup>th</sup> St., New York, New York 10021-4892

Deputy Editors  
Linda J. Sandell/St. Louis, MO & Stephen B. Trippel/Boston, MA

Deputy Editors  
Cyril B. Frank/Calgary, Canada & R. Bruce Martin/Sacramento, CA

Jeanette Marsh, Director of Publications  
(319) 356-2595 Fax: (319) 356-8999  
e-mail: jeanette-marsh@uiowa.edu

Martha Bacchus, Director of Publications  
(212) 606-1085 Fax: (212) 606-1490  
e-mail: bacchusm@hss.edu

August 2, 2002

Kenshi Kikukawa, M.D.  
Dept. of Orthopaedic Surgery  
School of Medicine, Kumamoto University  
1-1-1 Honjo  
Kumamoto, 860-8556, JAPAN

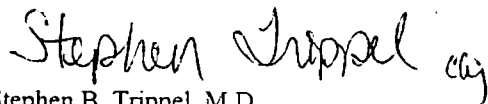
RE: MS#B01-164  
Authors: Kikukawa, et al.  
Title: Acute Changes in the Axonal Cytoskeleton After Mild Stretching of the Rat Brachial Plexus

Dear Dr. Kikukawa:

I would like to thank you and your co-authors for submitting your revised manuscript to the Journal of Orthopaedic Research. I am happy to inform you that the manuscript is acceptable for publication in the Journal of Orthopaedic Research.

Again, congratulations and thank you for considering the Journal for the publication of your work. We look forward to future submissions.

Sincerely yours,



Stephen B. Trippel, M.D.  
Deputy Editor

SBT/ckj

### 3) 謝辞

この論文を作成するにあたり、御指導いただきました高木克公先生、山鹿眞紀夫先生、加藤悌二先生に感謝申し上げます。共同実験という形で御指導いただきました第一薬理学教室宮本英七先生、福永浩司先生に感謝申し上げます。また電子顕微鏡実験を行う際、御教授いただいた鶴田潤二先生、窪田俊朗先生に感謝申し上げます。最後に、これまで私を支えてくれた両親にこの論文を捧げたいと思います。

#### 4) 略語一覽

BP : brachial plexus

MN : median nerve

SCa : slow component a

SCb : slow component b

HMW tau : high molecular weight tau

LMW tau : low molecular weight tau



## 5) 研究の背景と目的

### 1 臨床的背景

日常臨床において、頸・肩・上肢の痛みやしびれ、脱力といった神経症状を呈する症例は数多く、腰痛、膝痛と並んで多くみられる整形外科受診理由である。頸椎症や頸椎椎間板ヘルニア、あるいは肘部管症候群や手根管症候群など最近の診断技術の進歩により確定診断に至る場合も増えてきたが、尚、明らかな病因が確定できないケースも少なくない。このような患者には頸肩腕症候群という診断名がつけられるが、本症候群の概念は曖昧なものであり、病因・病態も多種多様である<sup>48,72</sup>。そのため有効な治療が行われず、長期にわたり適切な管理が行えないため症状が遷延化することもあり、慢性疼痛症候群として問題となっている。

頸肩腕症候群という名称は1955年飯野および河頓らによって提唱された。飯野がその論文の前書きで述べているように、当時は一般の病院・診療所では頸から肩・腕にかけての痛みを主訴として来院する患者に対し、神経痛、リウマチあるいは過労、時には年のせいということで漠然と治療されていた。そこでこのような症状に対し、解剖学的生理学的弱点を有する頸椎柱下部から腕部にかけて静動力学的要請が加わり脊椎・脊髄・神経・筋・血管系を通じて一貫した系列の共通の異常状態が把握されるとして、一般医家に対する啓蒙や本疾患の病態解明、疾患の細分化を意図してこの名称を導入したものと思われる。本症候群はその後の各種診断学の進歩・発達により詳細に検討され病態の解明が進んだ。しかし同時に、第一線の診療においては確定診断までの一時的保留名として重宝なため広く用いられるようになっている。

1960年代の高度経済成長時代に、キーパンチャー作業、電話交換業務などの単純繰り返し作業の大幅導入に伴って、頸・肩・腕を中心とする痛み、障害を訴える労働者が増加し社会問題となった。労働省はこの様な疾患に対し本症候群名を用いるようになり、業務上の認定をめぐる争いも発生した。その後、産業医学的立場から労働省通達（昭和50年2月5日基発第59号）にのっとり、業務起因性であることが必須で明らかな原因疾患を除いたものを対象とすることとし、従来の呼称である頸肩腕症候群と区別する必要性から、

「頸肩腕障害」とする概念が導入された。すなわち、従来の「頸肩腕症候群」は症候学的病理学的な疾患概念として捉えるのに対し、「頸肩腕障害」は病因のいかんに関わらず、業務に関連して発生した症状に対する行政上の問題としての原因論的社会的疾患概念とし

て定義づけられている。

頸肩腕痛・障害をきたす疾患は表1に示すものが挙げられるが、表2に示すように、研究者による範疇に含める疾患は様々である。狭義の頸肩腕症候群とは、種々の機序により後頭部・頸部・肩甲帯・上肢・前腕・手指のいずれかあるいは全体に「こり」「しびれ」「痛み」などの不快感をおぼえ、他覚的には当該部筋肉の圧痛および緊張もしくは硬結を認め、時には神経・血管系を介して頭部・頸部・背部・上肢における異常感、脱力、血行不全などの症状を伴うことのある症候群である（労働省通達、基発第59号）。さらにこの通達では、除外診断として外傷および先天性の異常による場合の他、以下の8疾患を挙げている。

- (1) 頸・背部の脊椎、脊髄あるいは周辺軟部の腫瘍
- (2) 頸・背部および上肢の炎症性疾病
- (3) 関節リウマチおよびその類似疾病
- (4) 頸・背部の脊椎、肩甲帯、および上肢の退行性変性による疾病
- (5) 胸郭出口症候群
- (6) 末梢の神経障害
- (7) 内臓疾病に起因する諸関連痛
- (8) 類似の症状を呈しうる精神医学的疾患

すなわち広義の頸肩腕症候群には、頸椎病変に伴うものや胸郭出口症候群のように頸部に原因を有するもの、肩関節疾患、末梢神経や交感神経の疾患、上肢の炎症性疾患などからPancoast腫瘍のような悪性腫瘍の転移や虚血性心疾患など生命に関わる重篤なものまでが含まれ、外来診察において注意を要する。しかしながら一方で種々の検査を行っても明らかな器質的変化の認められない、いわゆる不定愁訴と言わざるをえない症候群（狭義の頸肩腕症候群）が多数を占めているのが現状である。この狭義の頸肩腕症候群や頸椎捻挫難治例、キーパンチャー病のような労働に伴う頸肩腕障害と称されるものは心理的加重も多い。すなわち、狭義の頸肩腕症候群とは頸部から上肢にかけて種々の症状を訴える患者の中で原因が不詳と言わざるをえない一群をさすが、その診断には厳密な除外診断が不可欠となる。しかしこの様な障害の病態そのものは未だ不明であり、chronic neck-shoulder pain や cervico-brachial pain syndrome という black box の中におかれてきたため、治療に難渋する。

これまで当教室では、胸郭出口症候群（Thoracic outlet syndrome、TOS）の診

# 表 1 頸肩腕症候群の分類<sup>48</sup>

## 広義の頸肩腕症候群

### I 頸椎疾患

- 1.外傷（打撲、捻挫、骨折、脱臼、椎間板損傷、神経根損傷、脊髄損傷）
- 2.頸椎症 3.椎間板ヘルニア 4.脊柱靭帯骨化
- 5.炎症（化膿性・結核性骨髄炎、慢性関節リウマチ、軟部の炎症）
- 6.先天性疾患 7.頸椎の腫瘍 8.頸髄の腫瘍 9.脊髄空洞症
- 10.脊髄血管障害

### II 頸椎周辺部疾患

- 1.胸郭出口症候群（頸肋症候群、斜角筋症候群、肋鎖症候群、過外転症候群）
- 2.Pancoast 腫瘍

### III 肩関節周辺疾患

- 1.肩関節疾患(肩関節周囲炎、関節症)

### IV 肘・手関節疾患

- 1.関節症 2.上腕骨内・外顆炎 3.腱鞘炎

### V 末梢神経・交感神経疾患

- 1.絞扼性神経障害 2.肩手症候群 3.Barre-Lieou 症候群
- 4.Raynaud 症候群 5.神経痛性筋萎縮(neuralgic amyotrophy)

### VI 精神・心因性疾患

### VII その他

- 1.心疾患（狭心症、心筋梗塞） 2.代謝性・中毒性疾患
- 3.ウィルス感染（風邪、流行性耳下腺炎） 4.運動ニューロン疾患
- 5.多発性硬化症 6.視力調整障害による肩こり 7.咬合不全 8.頭蓋内病変
- 9.メニエル病

## 狭義の頸肩腕症候群

- 1.原因不明の頸肩腕痛
- 2.筋肉性疼痛(いわゆる肩こり)

## 表 2 頸肩腕症候群の範疇疾患 —各研究者間の相違—

小野村(1966)

主に変形性頸椎症や椎間板ヘルニアなど、頸椎退行性変性が対象

高岸(1966)

主に胸郭出口症候群や Pancoast 腫瘍などを中心とした

頸部周辺部疾患が対象

石田(1971)

この両者を合わせた上に、末梢神経、交感神経疾患を加える

都留(1966)

頸椎の外傷や腫瘍、運動ニューロン疾患も加える

平林(1974)

広い意味での頸肩腕症候群として五十肩、腱鞘炎、上腕骨外上顆炎  
や神経内科疾患、心身的疾患も含める

今釜(1978)、藤巻(1988)、酒匂(1989)

原因疾患がはっきりすればその病名を使用すべき

原因不明の頸肩腕痛のみを頸肩腕症候群とすべき

断・治療について報告してきた。胸郭出口症候群とは胸郭出口部における神経・血管障害による疾患である。頸肋症候群、斜角筋症候群、肋鎖症候群、過外転症候群などに分けられていたが、症状はいずれも似ているということから、1956年 Peet はこれらを統括する概念として胸郭出口症候群を提唱した。当科では胸郭出口症候群の病態として血管性よりも神経性が多いことを示してきた。また胸郭出口部の神経・血管への圧迫という病態以外に牽引という病態があることを提唱し、両者を区別して診断・治療に対応することが大切であるとしてきた<sup>27,75,76,77,78,79</sup>。また動物モデルにおいても、ラットを用いて上肢の牽引負荷により、末梢神経と比べ腕神経叢に最も障害が起こりやすいこと（易損性のあること）を確認している<sup>21,29,71</sup>。

二足歩行であるヒトでは上肢の重量により常に腕神経叢に対する牽引負荷がかかり、また上肢運動に伴い反復性蓄積性障害を来しやすいと考えられる。これまでの検討から、易損性のある腕神経叢にまず障害が起こり、それを基盤として本来は神経障害を来さない程度の軽微な圧迫力・牽引力が加わることにより、他の末梢神経障害を引き起こされるのが上肢の神経障害の特徴と考えられる。

以上のように、上肢の神経障害の一病態として腕神経叢牽引障害があげられる。今回我々は腕神経叢牽引障害の病態を明らかにすることを目的とし、ラット上肢牽引モデルを用いて、牽引負荷に対する上肢末梢神経の変化を電子顕微鏡学的・神経生化学的に検討した。

## 2 神経の解剖と機能

### 2-1 解剖<sup>34</sup>

神経線維は、神経線維束の中の神経内膜の結合組織内に密に詰められている。神経線維束はかなりの力学的張力に耐えうる層状の鞘である神経周膜に包まれている。神経線維束の内部である神経内膜の空間は神経周膜内の拡散関門（diffusion barrier）によって周囲の組織から化学的に分離されており、それゆえ特殊な内部環境を保持している。神経線維束は神経上膜に包まれており、この結合組織により支持保護されている。神経上膜には神経内血管系の主要供給路である神経上膜血管が存在する。

神経線維は有髄か無髄かである。どちらの神経線維においても軸索は縦に並んだ Schwann 細胞に包まれている。有髄線維では一本の軸索が各レベルで一つの Schwann 細胞とのみ関係しており、脂肪と蛋白質の交互の層からなる髄鞘を形作る Schwann の

膜が軸索を螺旋状に取り囲んでいる。無髄線維では一つの Schwann 細胞が多数の軸索を取り囲んでいる。

## 2-2 軸索輸送<sup>55,66</sup>

神経細胞の代謝機能の大半は細胞体に集中しており、そこでは軸索およびその末端を構造上・機能上、完全に維持するのに必要な物質の合成が行われている。神経細胞体とその軸索の末梢部分との間の距離を考慮すると、ニューロンの細胞内軸索輸送には非常に厳しい必要条件が課せられていることは明白である。これらの必要条件を満たすために、ニューロンは順行性および逆行性の細胞内輸送のための独特なシステムを有する<sup>20</sup>。順行性軸索輸送によって神経細胞体で生産された広く多様な物質が軸索に沿って異なった速度で運び出される。ニューロン内において機能的役割を有する物質もあり、例えば神経伝達物質、それらの前駆物質、あるいは合成酵素が軸索末端における化学的伝達に必要とされる。軸索輸送にはミトコンドリア (mitochondria) の様な小器官 (organelle) そのものや、微小管 (microtubule) ・ニューロフィラメント (neurofilament) およびマイクロフィラメント (microfilament) のような軸索の細胞骨格成分を構成したり、あるいは細胞膜中で結合したりする糖タンパクやタンパクも含まれている。

順行性軸索輸送の二つの主要成分が明らかにされている。すなわち一つは遅い軸索輸送 (slow axonal transport, 0.1~3mm/day) であり、微小管のサブユニットタンパク、ニューロフィラメントあるいはマイクロフィラメントなどの細胞骨格成分を含んでいる。速い軸索輸送より2桁も遅く、順行性に限られる。もう一方は速い軸索輸送 (fast axonal transport, 400mm/day) で、主として伝達物質貯蔵小胞、糖タンパクや脂質のような細胞膜成分および細胞膜合成酵素を運搬する。

遅い軸索輸送システムは、1948年に Weiss と Hiscoe によって最初に唱えられ、末梢神経周囲を帯状に絞扼すると、絞扼部より中枢の軸索は膨張するが、一方、絞扼部より末梢の軸索は細くなることが発見された。その後、放射性トレーサーの実験により軸索形質成分の順行性容積流 (bulk flow) の存在が証明された。遅い軸索輸送は軸索形質の細胞骨格成分に関連した物質を含み、この中でも微小管・ニューロフィラメントが重要である。これらの構造物は、繊細な架橋によって連結された非常に長い軸索形質の線維様成分を構成している。微小管は主としてチューブリン (tubulin) やそれに関連したタンパク (微小管関連タンパク、microtubule-associated proteins、MAPs、具体的には MAP1、MAP2 およびタウタンパク tau protein など) から成るが、これは速い軸索輸送

にとっては重要である。ニューロフィラメントは3種のタンパク（200kDa、160kDa、80kDa）が構造上の基礎を構成している。遅い軸索輸送は主としてラジオアイソトープを使って研究されてきた。Lasekらはこの方法にて遅い軸索輸送を2つの成分に分けている。輸送速度が1mm/day以下のSCa（slow component a）と、3mm/day程度のSCb（slow component b）である。主としてSCaで運ばれるのはチューブリンやニューロフィラメントであり、SCbで運ばれるのはアクチンである。

Lubinskaは実験動物の神経を異なった部位で結紮し、アセチルコリンエステラーゼ酵素の蓄積を研究することによって、前述の遅い軸索輸送よりも相当に速い速度で働く輸送メカニズムを発見した。これらの研究や、組織化学的および放射線化学的な放射性物質トレーサー技術を含むその他の研究から、1日に400mmもの速度で働く速い軸索輸送システムを定義することが可能となった。速い軸索輸送は新しい膜物質を細胞体より運ぶ。すなわち、その多くの部分は軸索膜を維持し置換するために軸索に沿って取り込まれる。一方、残りは神経末端にまで到達する。

順行性軸索輸送に対し、逆行性の軸索輸送も存在も明らかになっている。主としてライソゾームが運ばれている。末梢で生じた老廃物を細胞体で処理するという、輸送される物質の大部分が再循環物質と考えられている。また、軸索の状況や末端における微小環境についての情報を細胞体へ伝達することも含まれている。速度は順行性の半分ほどで、1日に200mm程度である。

### 2-3 微小管<sup>8</sup>

微小管は長く比較的堅い中空のタンパクでできた管で、ある場所で急速に分解したり（脱重合）、別の場所で再集合して管を再生したりする（重合）。構成単位はチューブリン tubulin 分子であり、チューブリンは2つのよく似た球状タンパク、 $\alpha$ チューブリンと $\beta$ チューブリンが非共有結合で固く結合した二量体よりなる。これが積み重なって中空な筒状の微小管の壁をつくる。微小管には極性があり、 $\beta$ チューブリンが出ている方の微小管末端をプラス端 plus end、 $\alpha$ チューブリンが出ている方の微小管末端をマイナス端 minus end と呼ぶ。

速い軸索輸送では微小管の重要性は次のような事実によって示されている。すなわち微小管の分離を引き起こすのに十分な濃度のコルヒチン（colchicine）・ビクリスチン（vincristine）・ビンブラスチン（vinblastine）およびメチル水銀により輸送は阻害されるというものである。細胞内物質が微小管に沿って行われる場合、モータータンパク

が重要な働きをしている。神経軸索内では2つのモータータンパクがわかっており、キネシン kinesin とダイニン dynein である<sup>55</sup>。キネシンは微小管のプラス端に向かって、ダイニンはマイナス端に向かって動く。

微小管はその細胞内で動的不安定性を示す。例えば、常に一方の端で重合すると同時に、他方の端では脱重合をしている、という具合である。よって神経軸索内では微小管として存在するチューブリンと遊離のチューブリンが存在することになる。

### 3 末梢神経絞扼性障害に関する研究

1つの部位で神経絞扼性障害がある患者で、同時期同肢の他の部位に症状が出現することは临床上よく経験する。これは1973年 Upton and McComas<sup>65</sup>が、連続した1本の神経のある部位に障害が生じると神経全体の易損性が高まり他部位での障害がより生じやすくなる神経重複障害 (Double crush syndrome) と報告し、以後単独では神経障害を来さないと言われてきた軽微な負荷でも、同時に複数の負荷がかかることによって神経障害をきたすことが示されてきた<sup>49,50,56,73</sup>。神経では、代謝機構、蛋白合成、脂質や他の必要な産物は神経細胞体で行われ、軸索の末梢部は生存のため、また正常の構造機能を維持するため軸索輸送に依存している。よって神経に何らかの負荷が加わった場合、末梢部では軸索膜と同様に軸索形質も傷害され、結果として易損性が高まることは容易に理解される。また Lundborg は1985年に reverse double crush syndrome の存在を唱え、Mackinnon は1988年に multiple crush syndrome という考えを示した。いずれも軸索輸送を基盤とした障害と指摘している。実際に、Narakas らによると30%に、Wood らによると44%に遠位部との合併損傷がみられると報告されている。上肢においては頸椎・胸郭出口・肘・手関節といった絞扼障害を併発しやすい箇所があり重複障害をきたしやすい。しかしながらこのような基礎的研究としては、これまで下肢坐骨神経に圧迫という負荷を加えたモデルが用いられてきた。また過去の文献では圧迫のみの神経障害<sup>1,11,23,34,36,37,53</sup>・牽引のみの神経障害<sup>7,10,31,67,68</sup>、しかも完全麻痺を来す高度障害に関する研究が主であった。本来臨床的に多くみられる障害はそのほとんどが上肢の神経障害である。かつ軽微な牽引負荷による神経障害の研究は皆無であり、我々はこれまで軽微な牽引力を定義し、上肢の末梢神経における腕神経叢の易損性を報告してきた<sup>21,29,71</sup>。

当科ではこれまで一連の研究で動物モデルとしてラットを用いてきた。人間においては腕神経叢の特徴として最大の可動域を持つ肩関節近傍を走行する。ラットの肩が人間の肩



に最も近く、またラットでは腕神経叢の解剖も報告されており<sup>4,58</sup>、人間とは若干の違いがある程度である。よってこれらをもとに実験動物としてラットを選択している。

牽引方向については、腕神経叢造影を用いて、ラット肩関節を80°外転位に牽引することで腕神経叢から末梢に向けて直線的に牽引されることを確認しており<sup>29</sup>、この方向に牽引した (Fig.1)。

牽引力・牽引時間については、Watanabe et al<sup>71</sup> が電気生理学的手法を用いて検討した。2 N・1時間の条件では複合神経活動電位 (compound nerve action potential, CNAP) が牽引中は有意に低下するものの、牽引解除後速やかに回復した。

1 N・1時間では CNAP の有意な低下はみられず、5 N・1時間では CNAP は有意に低下するものの牽引解除30分後でも回復しなかった。我々の研究は軽微な牽引条件を必要とする。よって今回の研究においても、牽引力 2 N・牽引時間 1 時間を神経障害をきたさない軽微な牽引条件として用いた。

## 6) 実験方法・結果

### 1 動物モデル

動物モデルは Kitamura et al<sup>21,29,71</sup>の方法に準じた。すなわち、Wistar 系雄ラット（体重280-300g）を pentobarbital (0.1ml/100g) 腹腔内麻酔し、ラット両側前肢の橈・尺骨遠位部に直径0.35mm鋼線を刺入、この鋼線を介してラット前肢を牽引することで、上肢末梢神経を間接的に牽引した (Fig.1-A)。

牽引方向は肩関節80° 外転位、牽引力は 2 N、牽引時間は 1 時間とした。

神経の摘出部位を Fig.1-B に示す。segment 1 は神経根、segment 2 は腕神経叢、segment 3 は正中神経近位部、segment 4 は正中神経の上腕遠位部である。実験 1 においては、腕神経叢（すなわち segment 2）、正中神経の上腕遠位部（すなわち segment 4）を試料とした。各 segment は約 8 mm である。

### 2 実験 1

#### 2-1 方法

2 N・1 時間牽引後、2.5%緩衝グルタルアルデヒド300mlで灌流固定を行った。緩衝液は0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いた。腕神経叢 (segment 2) と上腕遠位部の正中神経 (segment 4) を摘出、2%緩衝グルタルアルデヒドで浸漬固定を48時間行った。1%四酸化オスミウム酸で2時間の後固定後、酢酸ウランでブロック染色を12時間行った。50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%と低濃度から高濃度へとエタノール脱水を行った。脱水時間は合計で2時間とした。プロピレン置換 (10分×3回) した後、プロピレン+エポンで overnight し、エポンに包埋した。ガラスナイフにて1  $\mu$ mの横切片を作製し、トルイジンブルーで染色し光学顕微鏡で観察した。

続けて光顕で確認した箇所を超薄切片とした。干渉色は灰色～銀色を指標とした。酢酸ウラン・Reynolds液 (硝酸鉛) で電子染色を行った後、透過型顕微鏡 (TEM) で観察した。腕神経叢・正中神経の有髄神経を5万倍で撮影、1視野 (2.7  $\mu$ m<sup>2</sup>) あたりの微小管・ニューロフィラメントをカウントした。ラット1匹あたり腕神経叢・正中神経をそれぞれ20軸索ずつ撮影、正常群・牽引群とも n = 3 であり、合計240枚となった。

結果は mean  $\pm$  SE で示した。統計学的解析には two-way ANOVA を用いた。P values < 0.05 を有意差ありとした。

## 2-2 結果

光顕では腕神経叢・正中神経とも正常群・牽引群において組織学的変化は認めなかった (Fig.2)。すなわち、神経を圧迫・牽引した際、急性期にみられる神経内浮腫は両群とも認めなかった。

電顕像3000倍を示す (Fig.3-A, B)。腕神経叢・正中神経で正常群・牽引群において組織学的な差は認めなかった。

電顕5万倍を示す (Fig.3-C, D)。正常群の腕神経叢および正中神経では、1視野あたりの平均微小管数はそれぞれ $61.7 \pm 2.5$ 、 $65.7 \pm 2.1$ であった。一方、牽引群では $35.3 \pm 2.1$ 、 $57.7 \pm 5.0$ であり、微小管数は腕神経叢で有意に低下していた ( $P < 0.05$ )

(Fig.4)。これに対しニューロフィラメントは、正常群では $394.7 \pm 11.4$ 、 $379.0 \pm 8.3$ 、牽引群では $403.3 \pm 12.3$ 、 $369.3 \pm 7.8$ であり、腕神経叢・正中神経で正常群・牽引群で有意差を認めなかった (Fig.4)。

以上の結果から、2 N・1時間の軽微な牽引負荷により、腕神経叢で微小管の有意な減少を認めた。微小管は主としてチューブリンやそれに関与したタンパク (微小管関連タンパク、microtubule-associated proteins、MAPs) よりなる。よってタンパクレベルの変化をみるために、生化学的手法を用いて検討を行った。

## 3 実験2

### 3-1 一次抗体

monoclonal antibody :  $\alpha$ -tubulin (1:1000 dilution)

tau protein (TAU-2, 1:1000 dilution)

neurofilament (Neurofilament 200, 1:400 dilution)

polyclonal antibody : tau protein (1:800 dilution)

phosphorylated tau (199/202) (1:500 dilution)

### 3-2 方法

12匹のラットを用いた (正常群  $n=6$ 、牽引群  $n=6$ )。2 N・1時間牽引後、神経根から正中神経上腕遠位部まで摘出、 $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。摘出部位、各 segment は先述のとおりである。凍結組織を120  $\mu\text{l}$  of RIPA solution (50mM Tris-HCl (pH 7.5), 4mM EGTA, 10mM EDTA, 0.5% TritonX-100, 0.15M NaCl, 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 30mM

Na pyrophosphate, 50mM NaF, 1mM DTT and 100nM calyculin A) + protease inhibitors (50  $\mu$ g/ml leupeptin, 25  $\mu$ g/ml pepstatin A and 50  $\mu$ g/ml trypsin inhibitor at the final concentration) 内でホモジナイズ、Bradford et al の方法<sup>6</sup> に準じてタンパク定量を行った。この後、サンプルへ Laemmli's sample buffer<sup>32</sup>を加え、100°C で4分煮沸した。

タンパク定量後、各 segment で電気泳動 (10% sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis、SDS-PAGE) を行った。泳動後、70V で2時間 Western blotting (membrane transfer) を行った。2% bovine serum albumin (BSA) (Tris-buffered saline (TBS); 20mM Tris-HCl and 0.15M NaCl, pH 7.6) でブロッキング後、一次抗体反応 ( $\alpha$ -tubulin、TAU-2、Neurofilament 200、polyclonal tau、phosphorylated tau) を overnight で行った。メンブレンを TBS containing 0.1% Nonidet P-40 で5分、30分、15分、15分の計4回洗浄、二次抗体反応を1時間行った (horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody or anti-mouse antibody)。TBS containing 0.1% Nonidet P-40 で5分、15分、5分、5分計4回洗浄、ECLで発色させ、メンブレンを X AP-5 film に暴露した。得られたデータをコンピュータに取り込み、解析ソフト (Bio-Imaging Analyzer) で正常神経根を100%として定量化した。

結果は mean  $\pm$  SE で示した。統計学的解析には non-parametric Mann-Whitney test を用いた。P values < 0.05 を有意差ありとした。

### 3-3 結果

電顕像における微小管の減少がみられたことから、牽引負荷に対しタンパク分解を考え、微小管の major component であるチューブリンを免疫プロットで測定した。結果は、各 segment においてチューブリンは変化は認めなかった (Fig.5-A, B)。電顕では微小管の減少をきたしているのに対しチューブリンは変化していなかったことから、微小管の脱重合が考えられた。よって微小管関連タンパクの一つであるタウタンパクを免疫プロットで測定した。TAU-2 抗体では segment 2 で有意な低下を認めたが、segment 1、3、4では有意な低下は認めなかった (Fig.6-A, B)。これは、polyclonal tau でも同様であった (Fig.6-A)。

また脱重合の一つとしてタウタンパクのリン酸化も考え、タウタンパクの199/202のリン酸化を認識する抗体を用いた。タウタンパクが分解されていたことから、TAU-2 で

割った比を統計学的に解析した。これは各群とも上昇する傾向にあったが、有意な上昇はみられなかった (Fig.6-C, D)。よって微小管の減少はタウタンパクのリン酸化による脱重合ではなく、分解による脱重合と結論した。

ニューロフィラメントでは Neurofilament 200 抗体の変化はみられなかった (Fig.7-A, B)。これは Neurofilament 160 抗体でも同様であった (data not shown)。この結果は、牽引負荷によるニューロフィラメントは変化しないという電顕の結果と同様であった。

実験 1 で微小管が減少し、実験 2 で微小管の major protein であるチューブリンは低下しなかった。よって微小管の脱重合が考えられ、これを確認する目的で実験 3 を行った。

## 4 実験 3

### 4-1 一次抗体

Monoclonal antibody :  $\alpha$ -tubulin (1:1000 dilution)

### 4-2 方法

12匹のラットを用いた (正常群 n=6、牽引群 n=6)。方法は Xie et al<sup>74</sup> に準じて行った。2 N・1 時間牽引後、神経根から正中神経上腕遠位部まで摘出、-80°C に保存した。摘出部位、各 Segment は実験 2 と同様である。凍結組織を 80  $\mu$ l extraction buffer (80mM MES (pH 6.8), 5mM MgCl<sub>2</sub>、2mM EGTA, 0.1% TritonX-100, 100  $\mu$ M PMSF, 10mM benzamidine, 1mM GTP $\cdot$ 3Na, 1mM DTT and 100nM calyculin A) + protease inhibitors (50  $\mu$ g/ml leupeptin, 25  $\mu$ g/ml pepstatin A and 50  $\mu$ g/ml trypsin inhibitor at the final concentration) 内でホモジナイズ、Bradford et al の方法<sup>6</sup> に準じてタンパク定量を行った。サンプルへ 60% glycerol 80  $\mu$ l, 5mM GTP $\cdot$ 3Na 16  $\mu$ l を加え、37°C で 10 分 incubate した。50000 $\times$ g で 30 分遠心、上清・沈澱を別チューブとし、沈澱は extraction buffer (+glycerol) 120  $\mu$ l で満たした。この後 Laemmli's sample buffer<sup>32</sup> を上清 32  $\mu$ l、沈澱 24  $\mu$ l 加え、100°C で 4 分煮沸した。

各 segment で電気泳動 (10% sodium dodesyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis、SDS-PAGE) を行った。アプライ量は上清・沈澱とも segment 1,2 は 20  $\mu$ l、segment 3,4,5 は 60  $\mu$ l ずつとした。泳動後、70V で 2 時間 Western blotting (membrane transfer) を行った。2% bovine serum albumin (BSA)

(Tris-buffered saline (TBS) ; 20mM Tris-HCl and 0.15M NaCl, pH 7.6) でブロッッキング後、一次抗体反応を overnight で行った。メンブレンを TBS containing 0.1% Nonidet P-40 で5分、30分、15分、15分の計4回洗浄、二次抗体反応を1時間行った (horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibody) 。TBS containing 0.1% Nonidet P-40 で5分、15分、5分、5分計4回洗浄、ECLで発色させ、メンブレンを X AP-5 film に暴露した。得られたデータをコンピュータに取り込み、解析ソフト (Bio-Imaging Analyzer) で定量化した。データはタンパクの総量に補正し、上清 / (上清 + 沈澱) の比率を%で示した。

結果は mean  $\pm$  SE で示した。統計学的解析には non-parametric Mann-Whitney test を用いた。P values  $<$  0.05 を有意差ありとした。

#### 4-3 結果

正常群では腕神経叢 48.7  $\pm$  5.3 %、正中神経 51.3  $\pm$  5.7 %であった。牽引群では腕神経叢 59.8  $\pm$  5.4 %、正中神経 58.3  $\pm$  8.2 %であった。正常群に対し牽引群で上清にチュブリンが上昇する傾向がみられたが、明らかな有意差は得られなかった。これは腕神経叢・正中神経いずれも同様であった (Fig.8) 。実験1、2より、牽引負荷により微小管が脱重合したと予想し実験3を行ったが、この結果は必ずしも証明するには至らなかった。ではいずれの機序が関係しているのだろうか。実験4はその答えを求めて行った結果である。

## 5 実験4

### 5-1 一次抗体

Monoclonal antibody : nitrotyrosine 抗体 (1:1000 dilution)

### 5-2 方法

2 N  $\cdot$  1時間牽引後、神経根から正中神経上腕遠位部まで摘出、-80°Cに保存した。摘出部位は実験2と同様である。凍結組織を120  $\mu$ l of RIPA solution (50mM Tris-HCl (pH 7.5), 4mM EGTA, 10mM EDTA, 0.5% TritonX-100, 0.15M NaCl, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 30mM Na pyrophosphate, 50mM NaF, 1mM DTT and 100nM calyculin A) + protease inhibitors (50  $\mu$ g/ml leupeptin, 25  $\mu$ g/ml pepstatin A and 50  $\mu$ g/ml trypsin inhibitor at the final concentration) 内でホモジナイズ、Bradford et al

の方法<sup>6</sup>に準じてタンパク定量を行った。この後、サンプルへ Laemmli's sample buffer<sup>32</sup> を加え、100℃ で4分煮沸した。

タンパク定量後、各 segment で電気泳動 (10% sodium dodesyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis、SDS-PAGE) を行った。泳動後、70V で2時間 Western blotting (membrane transfer) を行った。5% skim milk (Tris-buffered saline (TBS); 20mM Tris-HCl and 0.15M NaCl, pH 7.6) でブロッキング後、一次抗体反応 (nitrotyrosine 抗体) を overnight で行った。メンブレンを TBS containing 0.1% Nonidet P-40 で5分、30分、15分、15分の計4回洗浄、二次抗体反応を1時間行った (horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibody)。TBS containing 0.1% Nonidet P-40 で5分、15分、5分、5分計4回洗浄、ECLで発色させ、メンブレンを X AP-5 film に暴露した。

### 5-3 結果

明らかな nitrotyrosine 抗体の上昇は認められなかった (Fig.9)。これ以外にも Ubiquitine 抗体を用いたがこれも変化はみられず (data not shown)、牽引負荷に対する微小管減少の機序は不明であった。

実験1、2で微小管の減少、タウタンパクの減少がみられたが、これは牽引直後という急性期の実験であった。回復がいつ頃起こるのか、あるいは起こらないのか、最終的にはどうなるのかが臨床的に興味があるところである。これをみるために、牽引負荷をかけ時間的経過をおって組織を作成し実験5を行った。

## 6 実験5

### 6-1 一次抗体

Monoclonal antibody :  $\alpha$ -tubulin (1:1000 dilution)

tau protein (TAU-2, 1:1000 dilution)

### 6-2 方法

33匹のラットを用いた (正常群 n=3、牽引群は各群 n=3)。2 N・1時間牽引した。牽引直後・2時間後・6時間後・12時間後・24時間後・72時間後・1週後・2週後・3週後および4週後に神経根から正中神経上腕遠位部まで摘出、-80℃に保存した。試料が全てそろったところで実験2と同様の方法にて SDS-PAGE、Western blotting

を行った。

結果は mean ± SE で示した。統計学的解析には non-parametric Mann-Whitney test を用いた。P values < 0.05 を有意差ありとした。

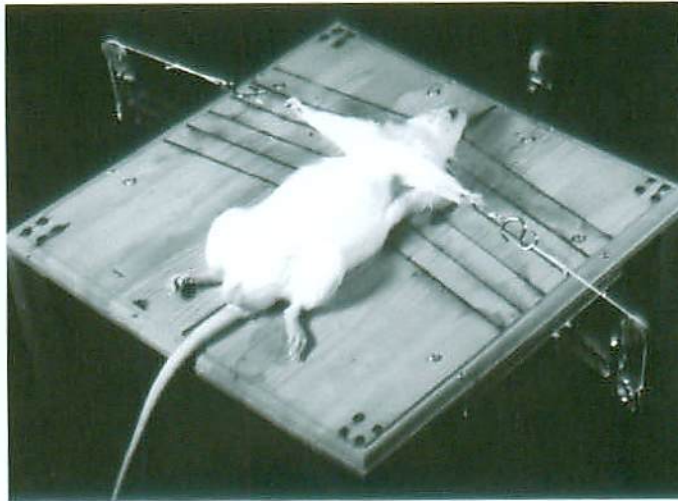
### 6-3 結果

腕神経叢では、TAU-2 抗体は牽引直後より低下し、12時間で回復した (Fig.10)。  
 $\alpha$ -tubulin 抗体は有意差なく変化がみられなかった (Fig.11)。正中神経では、TAU-2 抗体 (Fig.12)、 $\alpha$ -tubulin 抗体 (Fig.13) とも有意差なく変化がみられなかった。

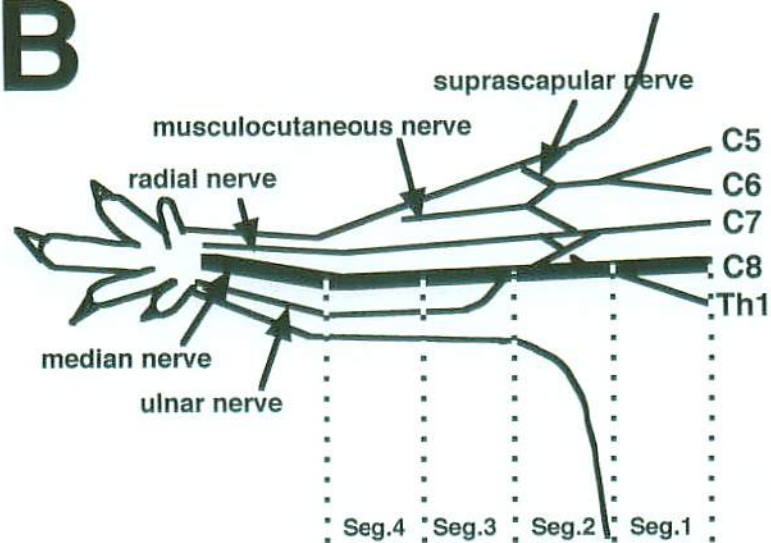


**Fig.1 : Photograph and Schematic drawing of the rat**

**A**



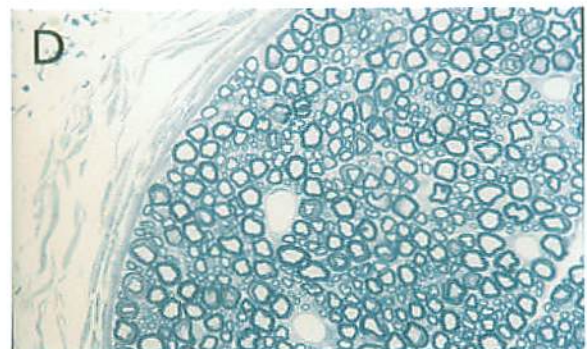
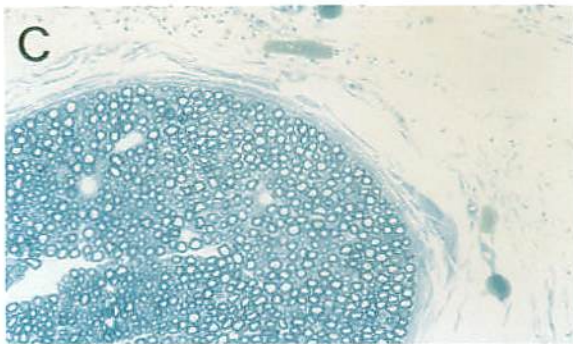
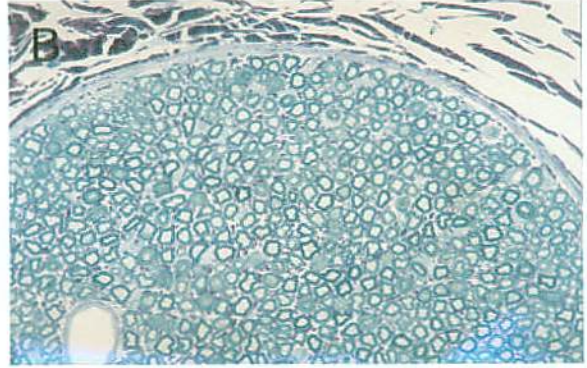
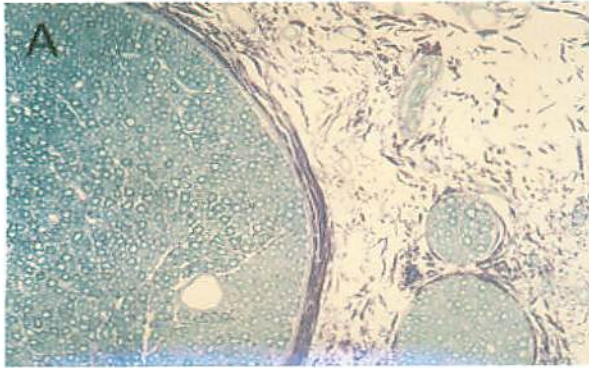
**B**



A : Photograph showing the procedure of stretching the upper limbs in the rat.

B : Schematic drawing of the peripheral nerves of the right upper limb in the rat. Segments 1-4 were obtained from the brachial plexus and median nerve originated from C8.

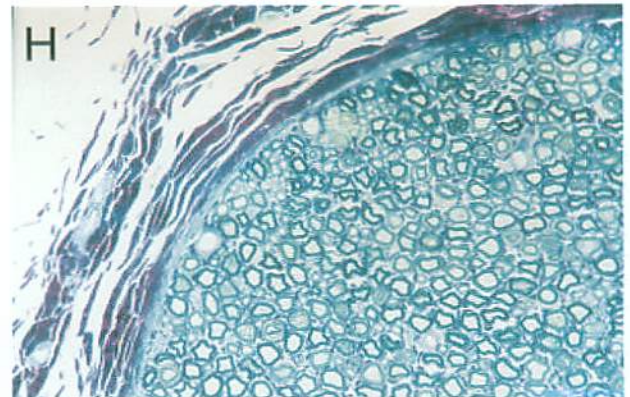
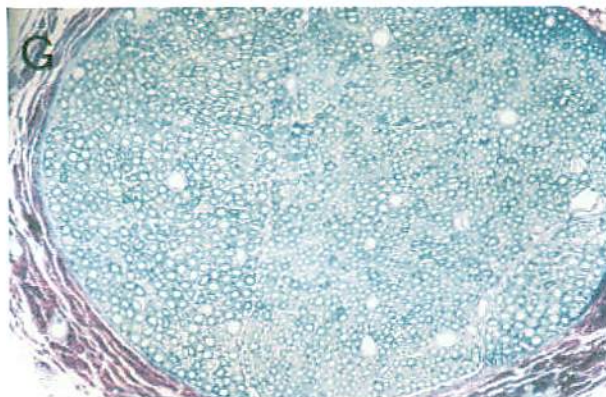
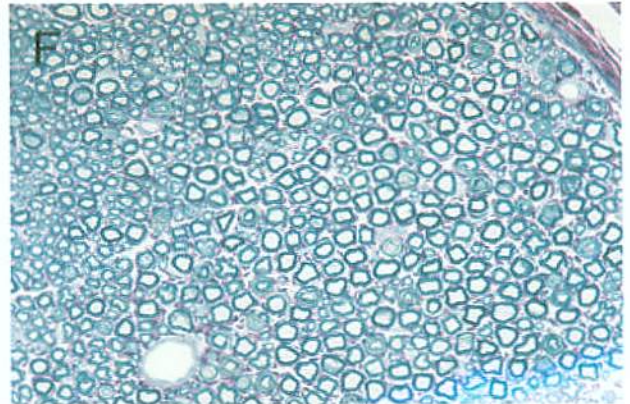
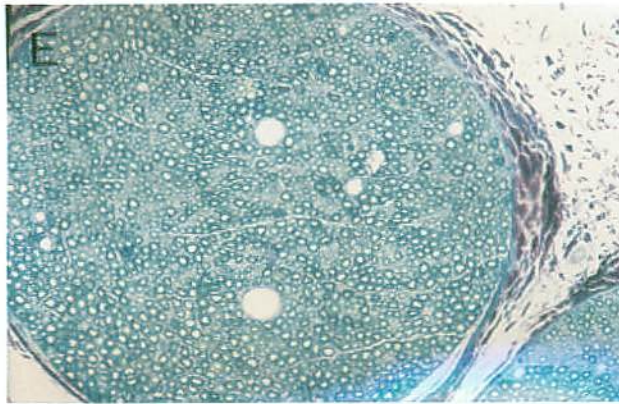
**Fig.2 : Photographs of light microscope**



**A transverse section of the brachial plexus in the control (A,B) and stretch (C,D) groups. Light microscopic examination revealed no significant difference between the control and stretch groups.**



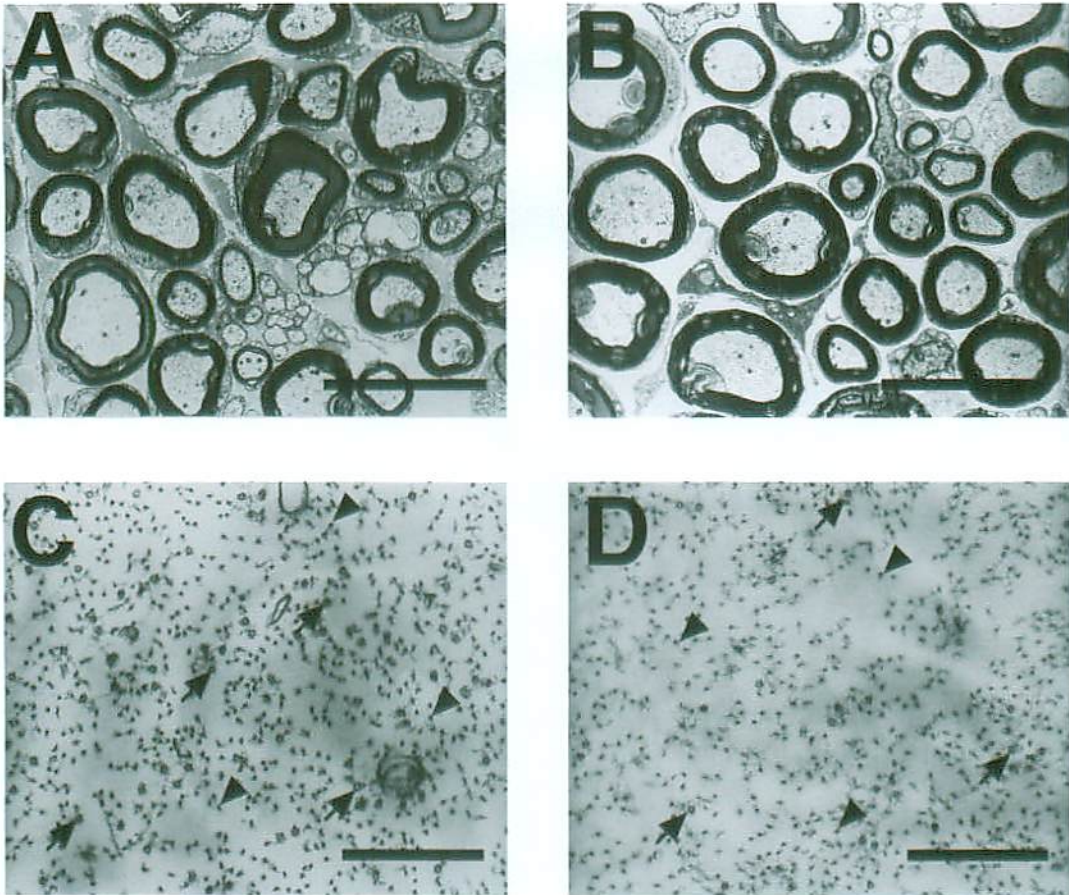
**Fig.2 : Photographs of light microscope**



**A transverse section of the median nerve in the control (E,F) and stretch (G,H) groups. Light microscopic examination revealed no significant difference between the control and stretch groups.**

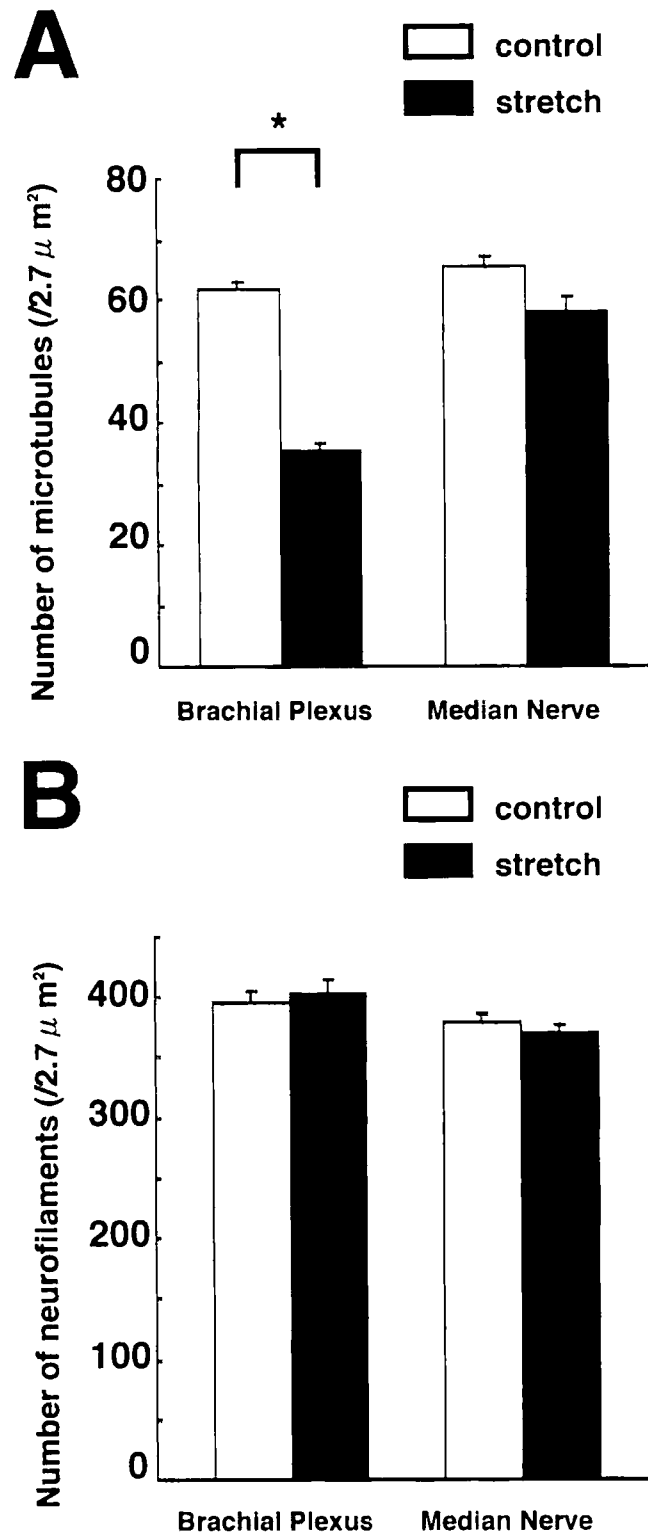


**Fig.3 : Photographs of electron microscope**



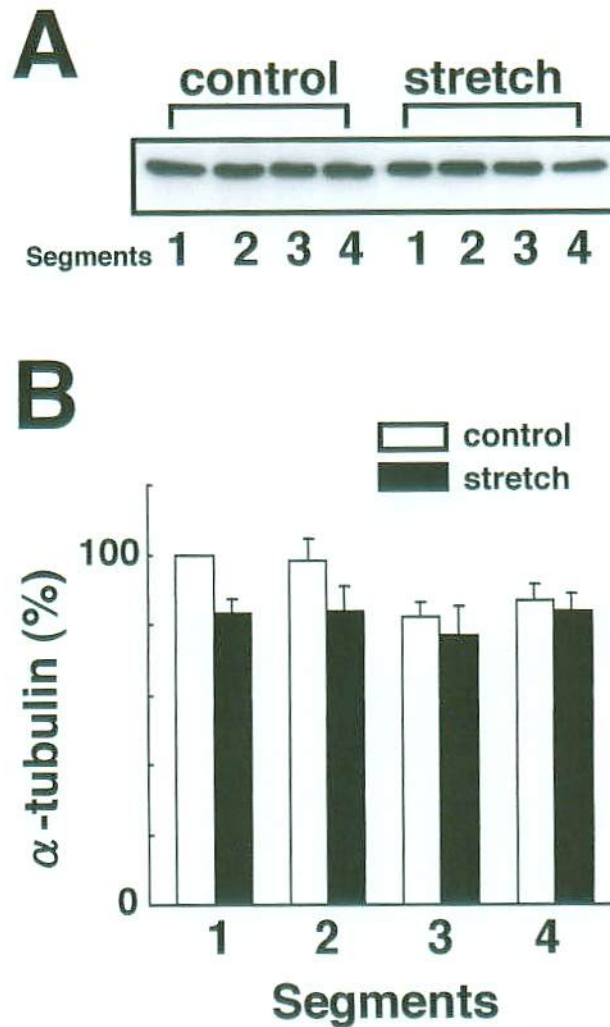
**Low magnification view ( $\times 3,000$ , Bar =  $10 \mu\text{m}$ ) of a transverse section of the brachial plexus in the control (A) and stretch (B) groups. Representative electron microscopic observation of a transverse thin section ( $\times 50,000$ , Bar =  $0.5 \mu\text{m}$ ) of a myelinated fiber in the brachial plexus from the control (C) and stretch (D) groups. The number of microtubules (shown by arrows) significantly decreased in the stretched rats compared to the controls. In contrast, the number of neurofilaments (shown by arrowheads) did not differ between the two specimens.**

Fig.4 : Quantitative analysis of the number of microtubules (A) and neurofilaments



Quantitative analysis of the number of microtubules (A) and neurofilaments (B) in the brachial plexus and median nerve obtained from the control (n=3) and stretch (n=3) groups. The number of microtubules in the brachial plexus from the stretch group significantly decreased to 55% of that in the control. ★  $p < 0.05$

**Fig.5 : Immunoblot analysis of tubulin**



Immunoblot analysis of tubulin using  $\alpha$ -tubulin monoclonal antibody. Segments 1-4 were obtained as described in Materials and Methods.

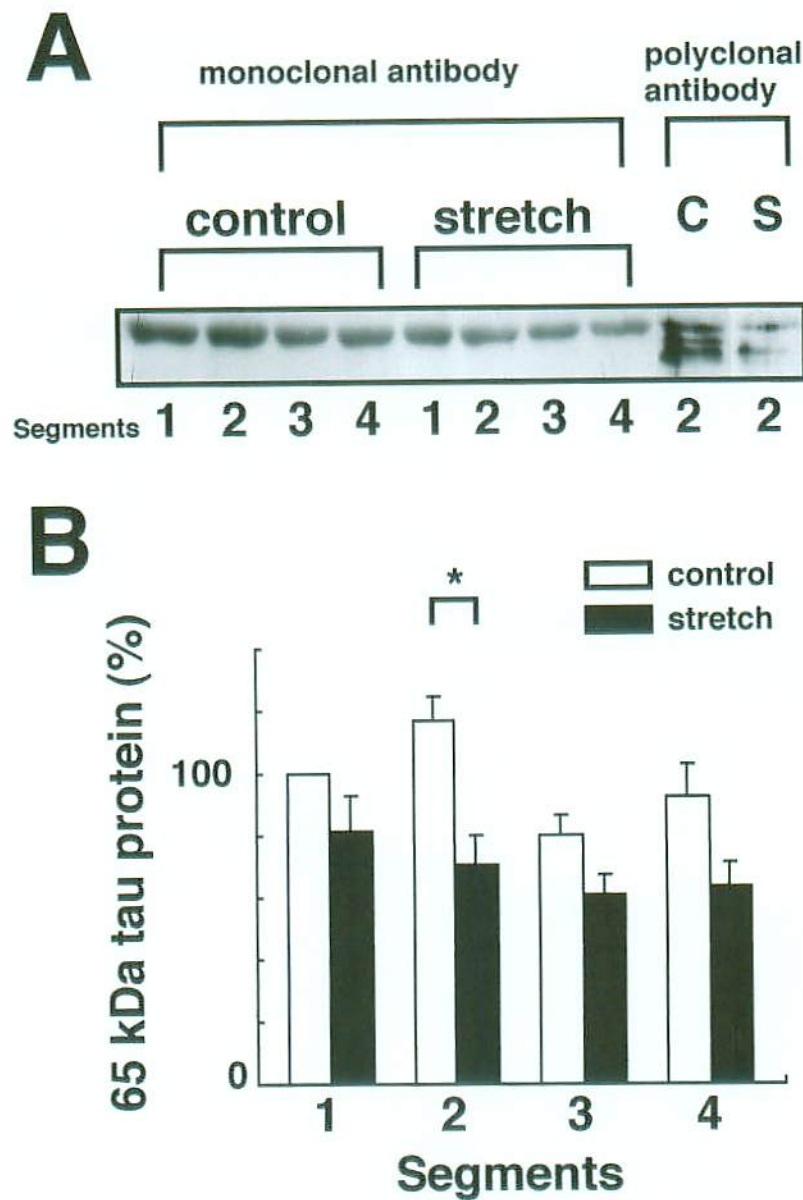
**A** : Representative autoradiograph showing immunoreactive tubulin

**B** : Quantitative analysis of the amount of tubulin

Immunoreactivities obtained in A were quantified by a Bio-Imaging analyzer. Values were expressed as a percentage of segments 1 from the controls (n=6). The amount of tubulin in all four segments did not differ significantly between the control and stretch groups.



**Fig.6 : Immunoblot analysis of tau protein**



Immunoblot analysis of tau protein using TAU-2 monoclonal antibody. Segments 1-4 were obtained as described in Materials and Methods.

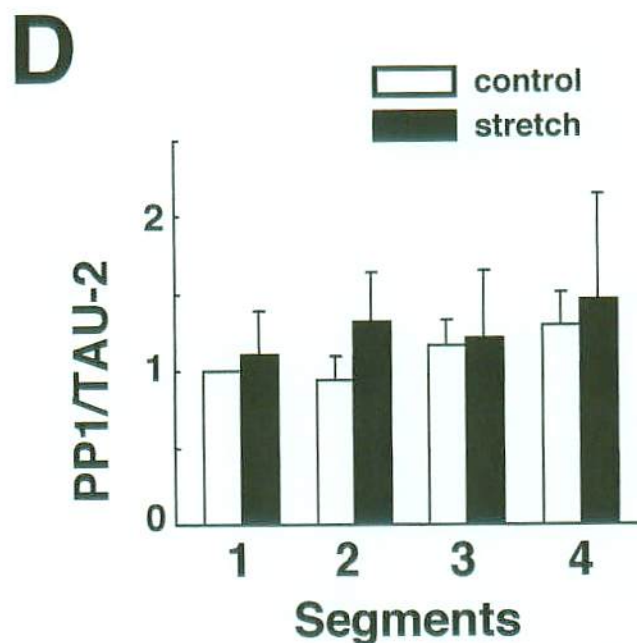
**A :** Representative autoradiograph showing immunoreactive tau protein

**B :** Quantitative analysis of the amount of tau protein

Immunoreactivities obtained in A were quantified by a Bio-Imaging analyzer. Values were expressed as a percentage of segments 1 from the controls (n=6). The amount of tau protein in the stretch group significantly decreased only in the brachial plexus (segment 2 ; 43% reduction compared to the controls) but not in the median nerve.

★ p<0.01

**Fig.6 : Immunoblot analysis of phosphorylated tau protein**



Immunoblot analysis of tau protein using PPI polyclonal antibody. Segments 1-4 were obtained as described in Materials and Methods.

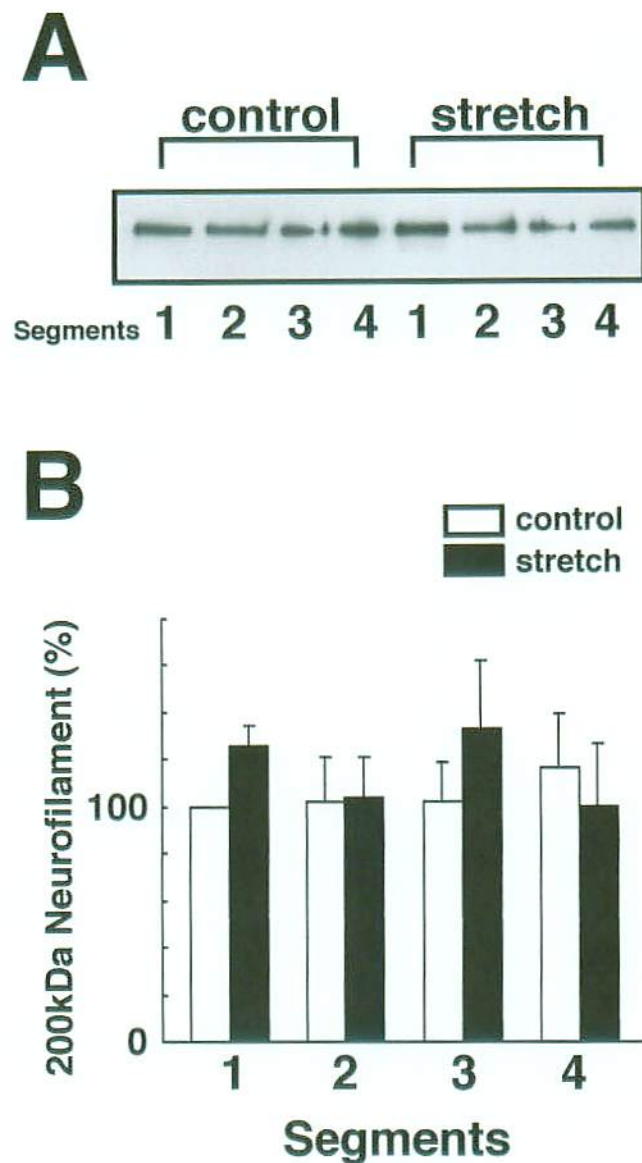
**C :** Representative autoradiograph showing immunoreactive phosphorylation of tau protein

**D :** Ratio of immunoreactivity against PP1 antibody to that against TAU-2 antibody (PP1/TAU-2) (n=6)

The immunoreactivities against PP1 antibody were divided by those against TAU-2 antibody shown in A. The ratio of the phosphorylation to the amount of protein was not significantly different between the control and stretch groups.



**Fig.7 : Immunoblot analysis of neurofilament**

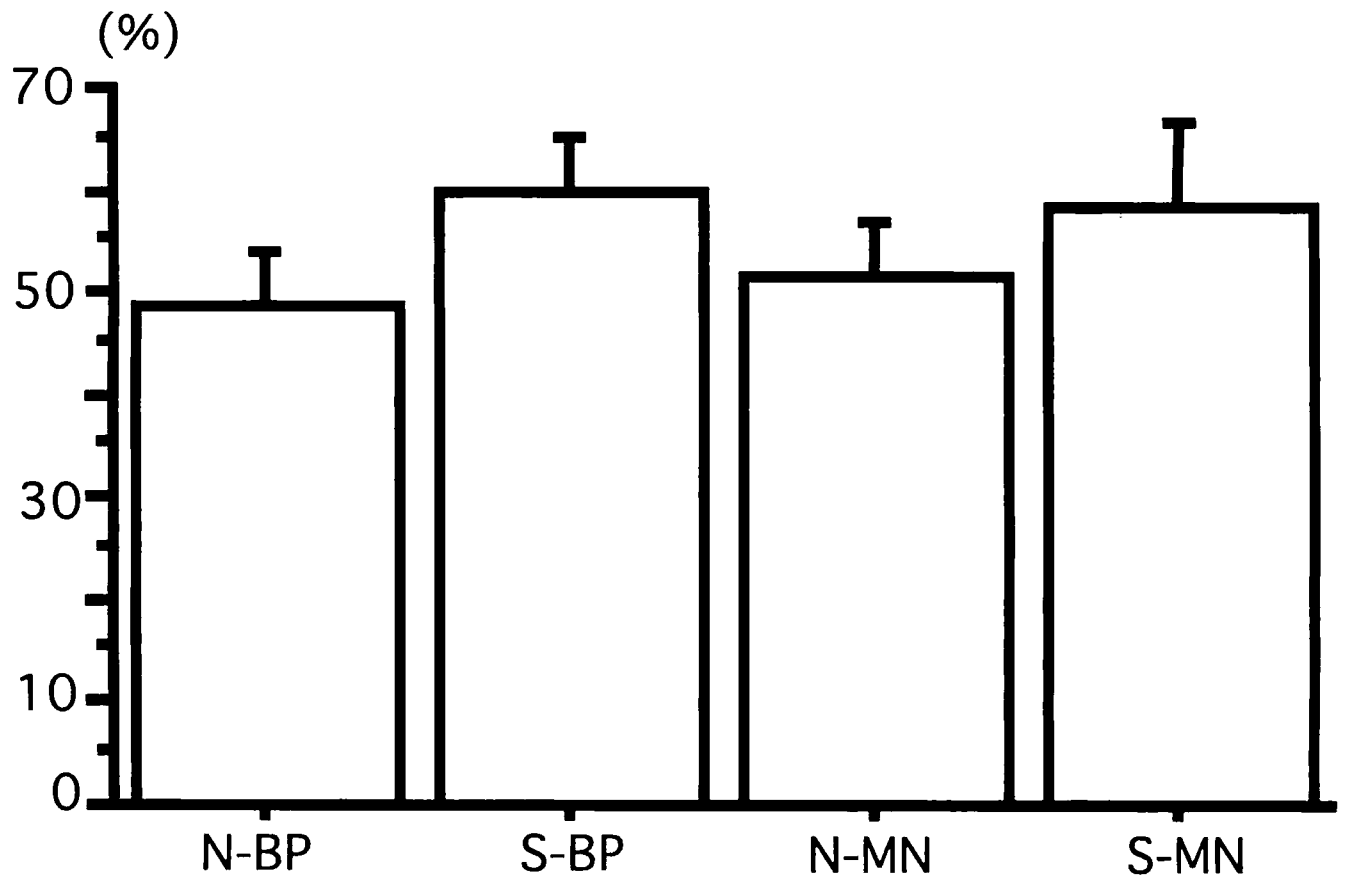


Immunoblot analysis of neurofilament using Neurofilament 200 monoclonal antibody. Segments 1-4 were obtained as described in Materials and Methods.

**A :** Representative autoradiograph showing immunoreactive neurofilament

**B :** Quantitative analysis of the amount of 200 kDa-neurofilament Immunoreactivities obtained in A were quantified by a Bio-Imaging analyzer. Values were expressed as a percentage of segments 1 from the controls (n=6) . The amount of neurofilament in all four segments did not differ significantly between the control and stretch groups.

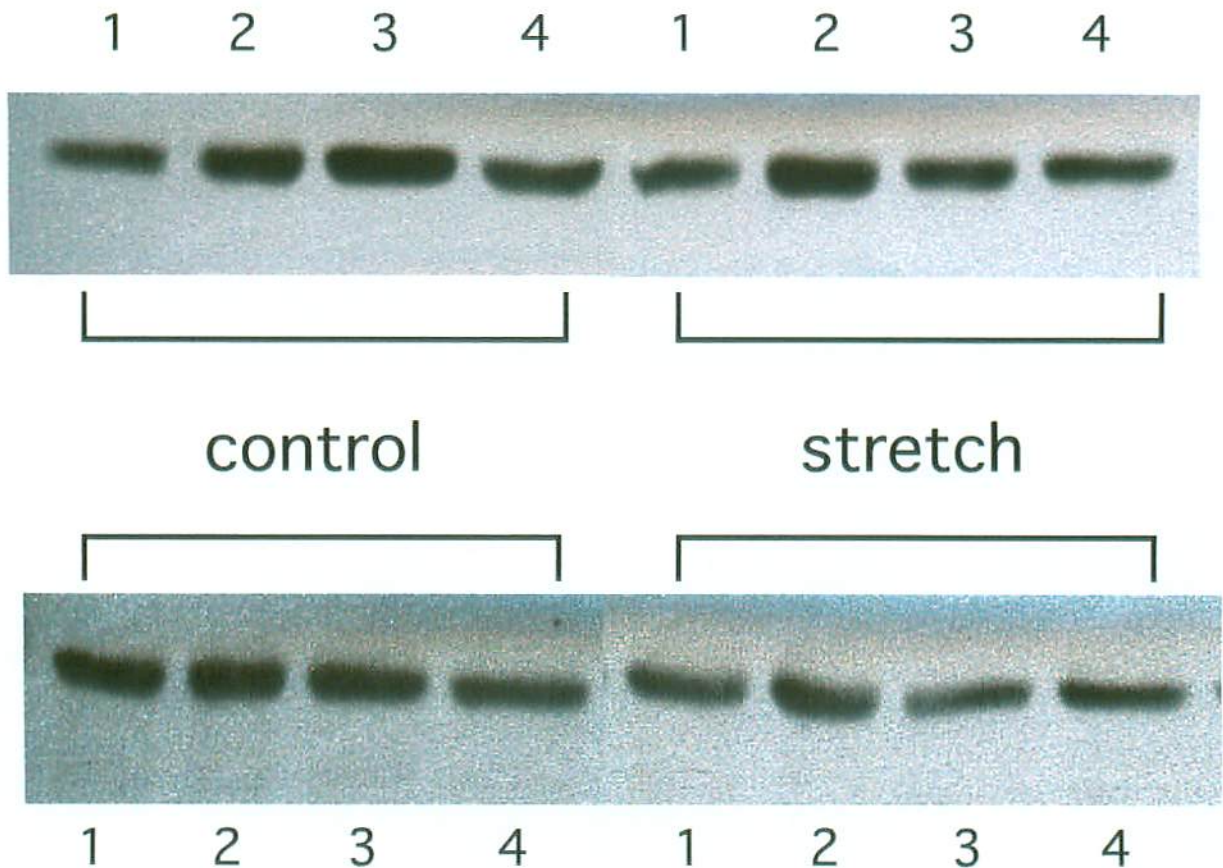
**Fig.8 : Immunoblot analysis of tubulin**



**Immunoblot analysis of tubulin using  $\alpha$ -tubulin**

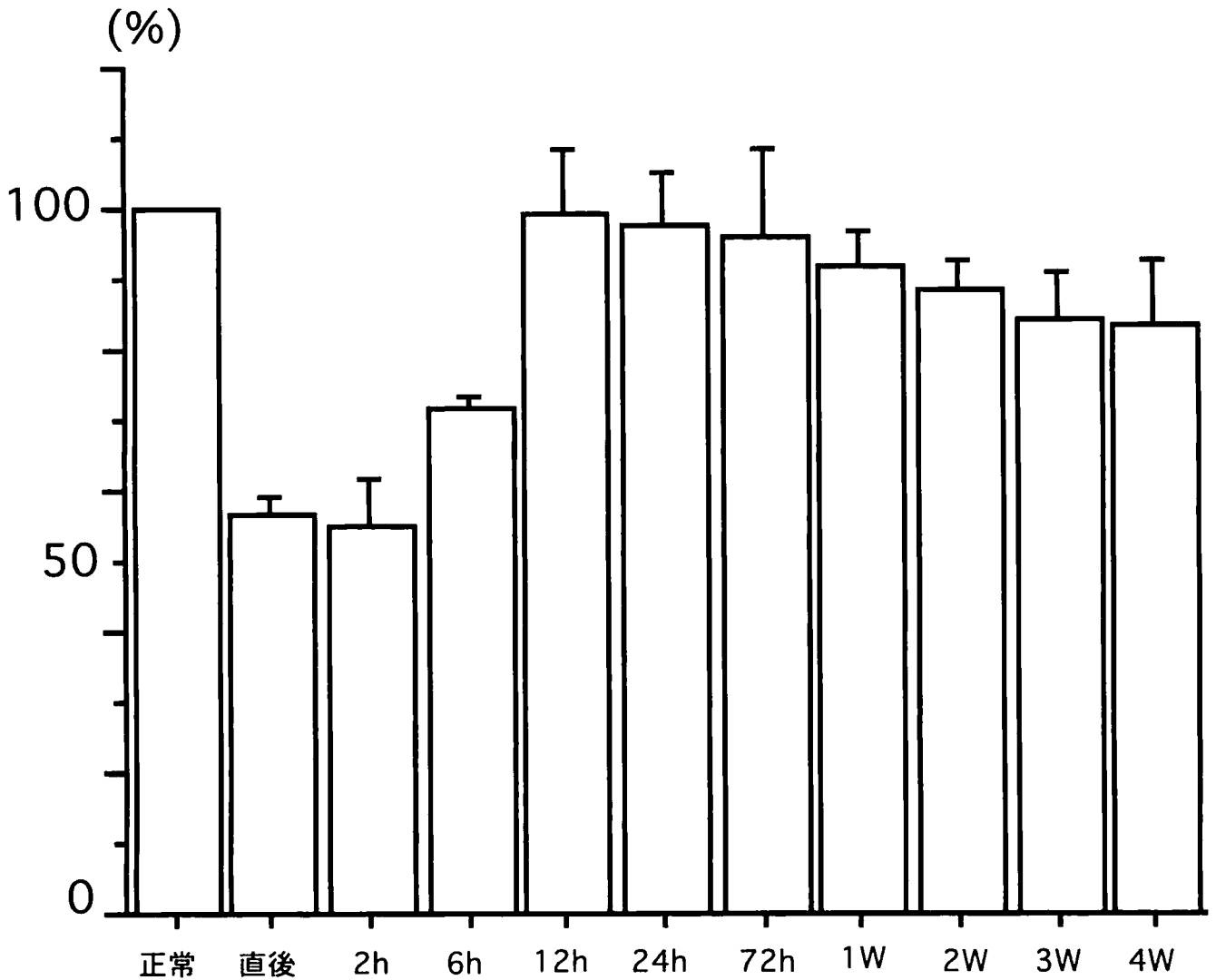
**monoclonal antibody. There were no significant changes in the ratio of tubulin (supernatant / supernatant + pellet) in the brachial plexus and median nerve between the control and stretch groups.**

**Fig.9 : Immunoblot analysis of nitrotyrosine**



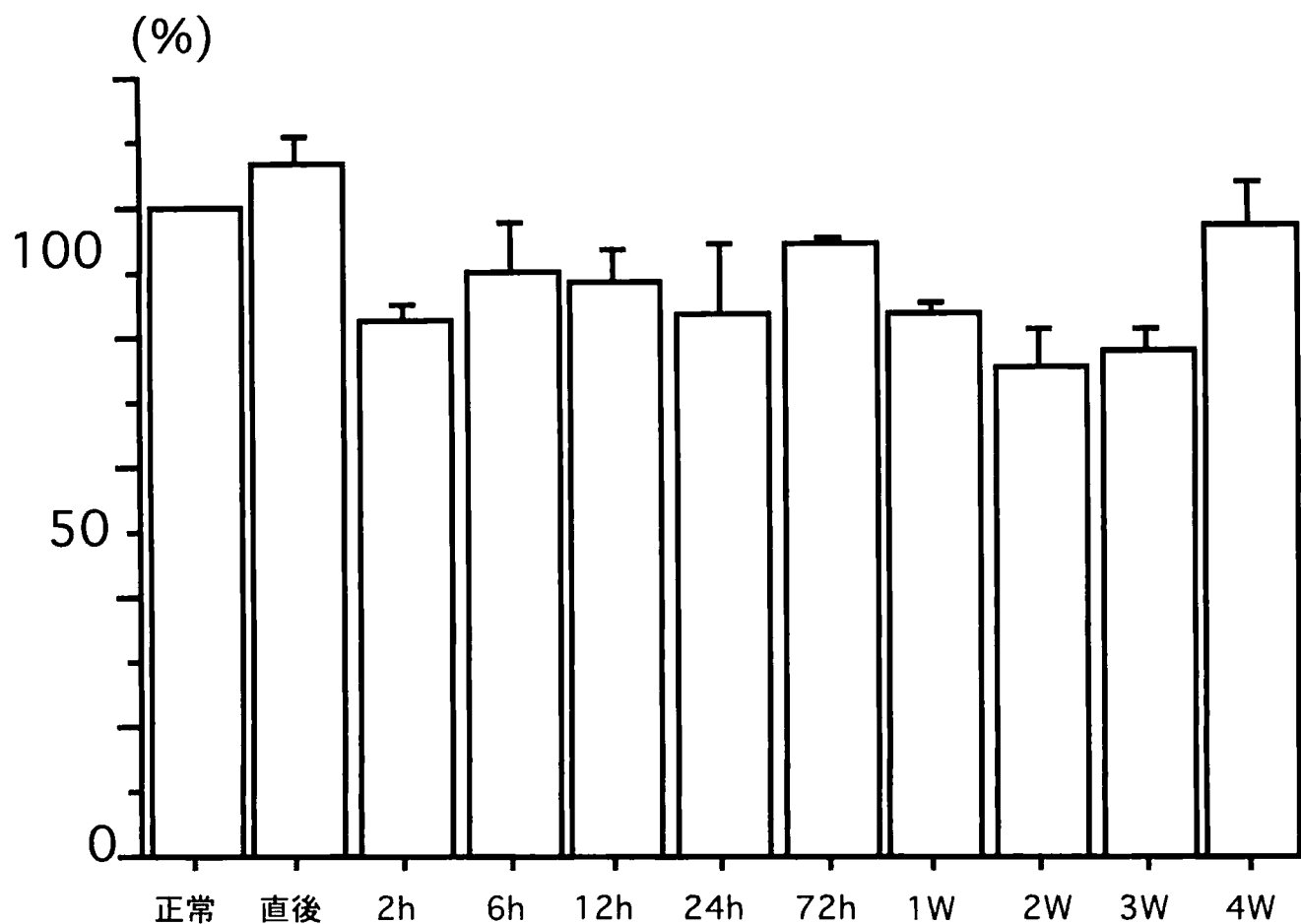
**Immunoblot analysis of nitrotyrosination using nitrotyrosine monoclonal antibody. Segments 1-4 were obtained as described in Materials and Methods. The amount of nitrotyrosine in all four segments did not differ significantly between the control and stretch groups.**

**Fig.10 : Immunoblot analysis of tau protein in the brachial plexus**



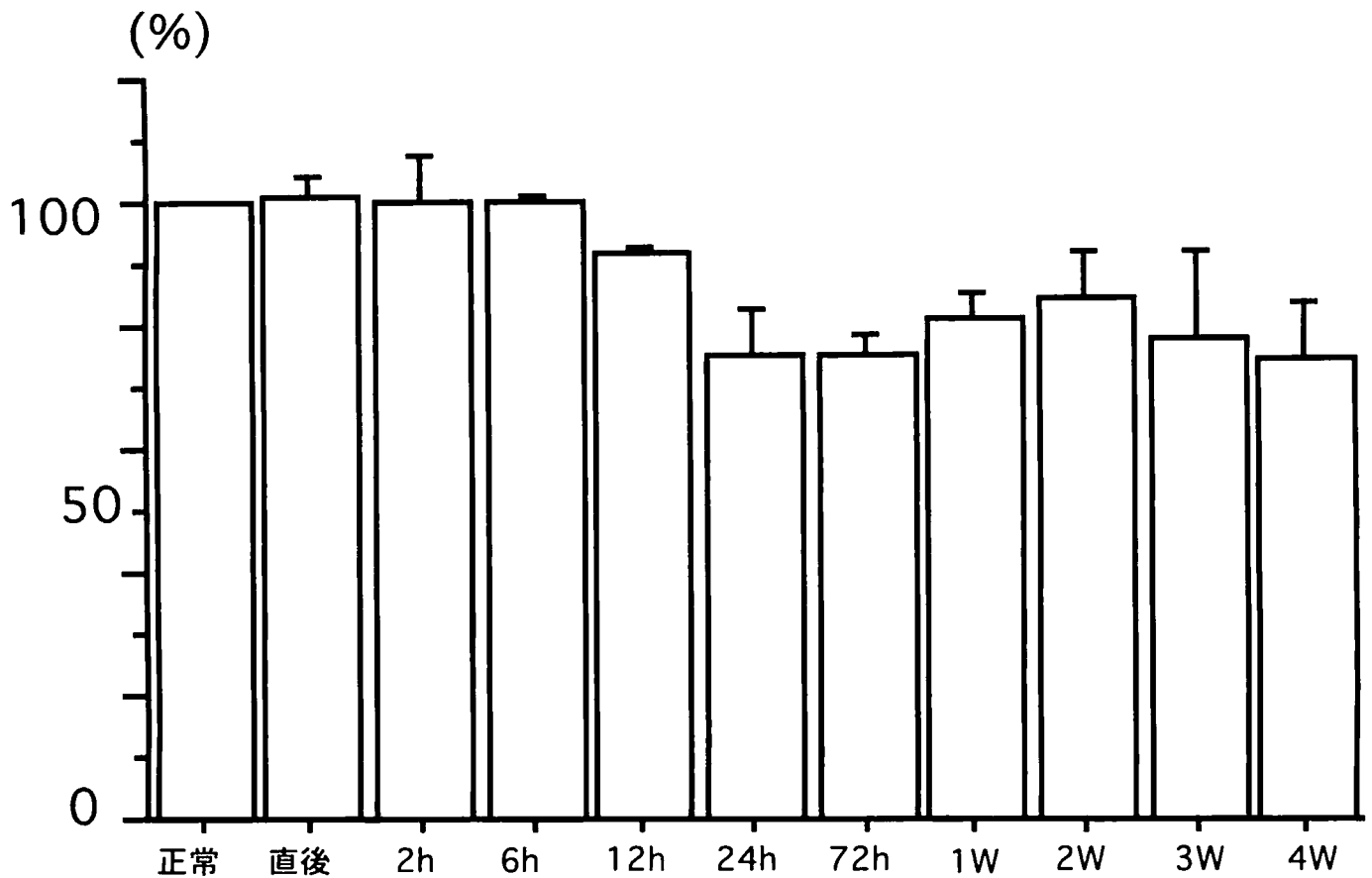
**Immunoblot analysis of tau protein using TAU-2 monoclonal antibody in the brachial plexus. Values were expressed as a percentage of segments 2 from the controls (n=3). The amount of tau protein significantly decreased rapidly following stretching in the brachial plexus, but recovered at 12 hours.**

**Fig.11 : Immunoblot analysis of tubulin in the brachial plexus**



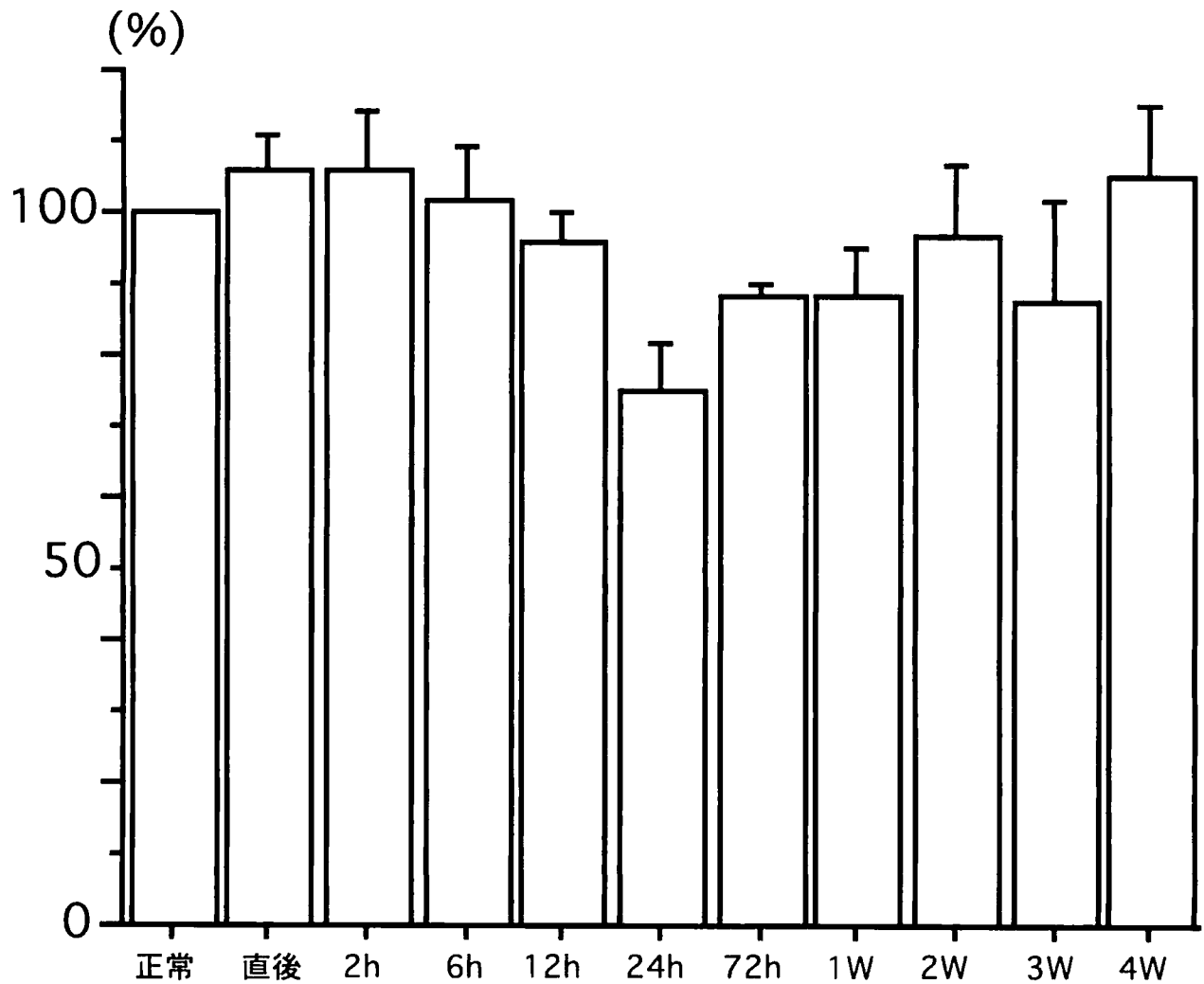
**Immunoblot analysis of tubulin using  $\alpha$ -tubulin monoclonal antibody in the brachial plexus. Values were expressed as a percentage of segments 2 from the controls (n=3). The amount of tubulin in the brachial plexus did not differ significantly between the control and all stretch groups.**

**Fig.12 : Immunoblot analysis of TAU-2 in the median nerve**



**Immunoblot analysis of tau protein using TAU-2 monoclonal antibody in the median nerve. Values were expressed as a percentage of segments 4 from the controls (n=3). The amount of tau protein in the median nerve did not differ significantly between the control and all stretch groups.**

**Fig.13 : Immunoblot analysis of tubulin in the median nerve**



**Immunoblot analysis of tubulin using  $\alpha$ -tubulin monoclonal antibody in the median nerve. Values were expressed as a percentage of segments 4 from the controls (n=3). The amount of tubulin in the median nerve did not differ significantly between the control and all stretch groups.**

## 7) 考察

### 1 軽微な牽引負荷が引き起こす細胞骨格の変化

微小管は神経軸索輸送に関与する細胞骨格の一つである。長く比較的固い中空でできた管で、ある場所で急速に分解したり別の場所で再集合して管を再生するという、いわゆる動的不安定性を示す細胞器官である。神経細胞の代謝機構の大半は細胞体に集中しており、そこでは軸索およびその末端を構造上・機能上完全に維持するのに必要な物質の合成が行われている。生成された物質を輸送する機構が軸索輸送であり、順行性あるいは逆行性に細胞体と軸索の間で物質の循環が行われている。このとき、物質は微小管に沿って輸送される<sup>55,66</sup>。

今回、牽引負荷により微小管が腕神経叢で有意に減少することが示された。モルモットの視神経を牽引した一連の実験<sup>17,26,42,43</sup>では、牽引負荷により軸索がポケット状に変形してこの部分に微小管が移動し、結果として正常軸索内では微小管数が減少すると結論づけた。同様に実験1で牽引負荷により微小管が減少したが、動的不安定性のある微小管が瞬時に移動するとは考えにくく、むしろ微小管が脱重合をおこしたと考える方が妥当と思われる。実験2からチューブリンに変化はみられなかったが、タウタンパクの減少がみられておりこの減少が微小管を脱重合させたと考えている。またニューロフィラメントは実験1では減少せず実験2でも同様の結果であった。前述のモルモット視神経牽引実験でもニューロフィラメントは減少しておらず、牽引負荷に対する反応としては本実験と同様であった。牽引負荷に対して微小管は脱重合し、ニューロフィラメントは変化みられなかったわけだが、同じ細胞骨格でも牽引負荷に対する耐性の違いが認められており、この機序は他の報告もなく不明である。

### 2 神経軸索輸送障害の可能性

Koike et al<sup>30</sup> はイカの巨大軸索を用い、神経牽引により速い軸索輸送が障害されたと報告した。また Tanoue et al<sup>61</sup> はラット坐骨神経を用い、11%の神経伸張が逆行性軸索輸送を障害すると報告した。このように神経牽引が軸索輸送障害を引き起こすことが示されているが、その機序に至る研究はみられていない。

これまでの報告とは違い、今回我々が用いた牽引力は神経に対し可逆性である<sup>21,29,71</sup>。この牽引条件下で腕神経叢有意に微小管の低下がみられた。軸索輸送は神経機能を正常に



保つ働きがある。コルヒチンやビンブラスチン、ピンクリスチンなどの植物性アルカロイドは微小管を脱重合させるとともに軸索輸送を完全に止めることは以前より報告されている。今回の研究で同様の変化が生じたとすれば、軽微な牽引負荷が軸索輸送を障害させる可能性がある。すなわち牽引負荷による軸索輸送障害の機序の一つではないかと考えている。

### 3 タンパクレベルにおける変化

タウタンパク tau protein は微小管関連タンパクの一つであり、チューブリンを重合させ微小管を安定化させる働きがある。末梢神経においては、タウタンパクは分子量115 KDa の、いわゆる high molecular weight (HMW) tau が報告されてきた<sup>18</sup>。今回の研究では 55-65 KDa の low molecular weight (LMW) tau が主体となっており、HMW tau はみられなかった。これまで末梢神経で LMW tau が報告されたのは狩猟しうる限りラット坐骨神経を用いた 1 文献<sup>59</sup>のみであり、やはり同様に分子量 60 KDa 前後であった。ラット上肢の末梢神経では、LMW tau 優位であった。

一過性脳虚血モデルでは、虚血によりタウタンパクのリン酸化・脱リン酸化が報告されている<sup>9,33,38,51,57</sup>。タウがリン酸化すると微小管は不安定となり脱重合をきたす。逆にタウの脱リン酸化では微小管は安定化し重合する方向に働く。実験 1 で微小管が減少していることから微小管の脱重合を考え、実験 2 でタウタンパクのリン酸化抗体

(phosphopeptide 1、PP1 抗体)を用いた。これをタウタンパク全体を認識する抗体 (TAU-2) で除し比率 (PP1/TAU-2) を求めたが、結果は腕神経叢優位に上昇傾向ではあったが、有意差のある上昇は認められなかった。よって実験 1 でみられた微小管の減少は、タウタンパクのリン酸化ではなく、タウタンパクの減少と結論づけた。

ではその機序はいかなるものであろうか。Kitamura et al は水素クリアランス法を用いて同モデルで 2 N の牽引負荷をかけると腕神経叢で 30% 程度血流が低下することを報告した<sup>29</sup>。このとき腕神経叢の神経束内血管と神経上膜下血管で血流の差がみられ、腕神経叢の血流に対する易損性を考察した。一過性脳虚血モデルではタウタンパクのリン酸化・脱リン酸化およびその減少に関して  $Ca^{2+}$  の存在を指摘している。脳が虚血となるとエネルギーが枯渇状態となり、細胞膜におけるイオンポンプの障害が生じる。カリウムイオンが細胞外へ漏出すると同時に、 $Ca^{2+}$  が  $Ca^{2+}$  チャネルおよび NMDA 受容体作動性チャネルから細胞内へ流入する。 $Ca^{2+}$  が流入することでカルモジュリンや CaM kinase、カルバ

インなどが活性化され、リン酸化やタンパク分解がおこるとされている。今回のモデルでは牽引負荷により腕神経叢で血流低下をきたすことで  $\text{Ca}^{2+}$  が流入し、カルパインやカテプシンDなどのタンパク分解酵素が働くことによってタウタンパクが分解されたと考えられる。 $\text{Ca}^{2+}$  の関与は先述のモルモット視神経牽引実験でも考察されており<sup>43</sup>、 $\text{Ca}^{2+}$  の流入が微小管に変化をきたすことを示唆している。本研究では詳細な機序までは明らかにできなかったが、タウタンパクの減少については上記機序が、特に $\text{Ca}^{2+}$  の関与が考えられた。

興味深いことに、実験2・5減少がみられたのはタウタンパクのみであり、微小管の主成分であるチューブリンおよびニューロフィラメントにはみられなかった。 $\text{Ca}^{2+}$  に対する反応性の違いがタンパクにも存在するのであろうか。今後の研究課題であろうと思われる。

#### 4 タウタンパクの回復

今回実験5にてタウの回復をみた場合、12時間で回復した。タウタンパクのような細胞骨格は遅い軸索輸送で運ばれ、定常状態では軸索輸送は1mm/日以下のいわゆる S<sub>Ca</sub> で運ばれる<sup>66</sup>。ただし神経に何らかの損傷がみられた場合、軸索輸送が速くなることはこれまで報告されている (S<sub>Ca</sub> が S<sub>Cb</sub> となる)<sup>44</sup>。神経再生という点で合目的反応であると思われる。ただし今回の実験で、牽引負荷にてタウタンパクが減少したという情報が神経細胞体へいき、タウタンパクを合成して S<sub>Cb</sub> (1~3mm/日) で輸送されたとしても、腕神経叢までは8~16mmまであり計算では早くても2~5日かかる見込みであり、12時間では回復時間としては早い。もしタウタンパクが速い順行性軸索輸送にて運ばれた場合はその速度は1日40cm程度であるためこの説明は可能ではあるが、タンパク輸送が速い軸索輸送で行われたという報告はない。ただし先述の神経再生における軸索輸送の研究は神経切断のような非可逆性における研究がほとんどであり、今回のような可逆性条件下における神経再生の報告はない。可逆性条件下ではタンパク輸送が速い軸索輸送となるのであろうか。いかなるメカニズムによりタンパクが再生するのか本研究では明らかにできなかったが、今回のような可逆性条件下における神経再生という点からは非常に興味深いところである。

#### 5 腕神経叢の牽引障害に対する易損性

1つの部位で神経絞扼障害がある患者で、同時期同肢の他の部位に症状が出現すること

は臨床上よく経験する。これは1973年の Upton and McComas により初めて重複障害 Double crush syndrome として報告され<sup>65</sup>、以後臨床的・基礎的研究が多数報告されている。神経では代謝機構・蛋白合成・脂質や他の必要な産物は神経細胞体で行われ、軸索の末梢部は生存のため、また正常の構造機能を維持するため軸索輸送に依存している<sup>55,66</sup>。よって神経に何らかの負荷が加わった場合、末梢部では軸索膜と同様に軸索形質も傷害され、結果、易損性が高まることは容易に理解される。上肢においては、頸椎・胸郭出口・肘・手関節といった絞扼障害を併発しやすい箇所があり重複障害をきたしやすい<sup>73</sup>。

今回の研究結果から、牽引負荷に対して腕神経叢は正中神経より易損性があることが判明した。ヒトの腕神経叢は人体の関節中最大の可動域を持つ肩関節の近傍を走行し、上肢の運動に伴い他の末梢神経よりも伸張・滑走される。臨床上・検査等に明らかな異常を認めず、頸肩腕症候群などとして診断・治療されている症例において、痛みやしびれ、脱力等の症状は一般に脊髄分節や末梢神経支配領域に合致せず、広範でかつその境界は不明瞭である。このような臨床症状・所見も腕神経叢の障害に基づくものと考えると理解しやすい。軽微な牽引負荷でも電顕レベル・タンパクレベルでも変化がみられこの変化が腕神経叢に生じやすいという今回の研究結果は、従来から chronic neck-shoulder pain、cervico-brachial pain syndrome あるいは頸肩腕症候群などとして取り扱われてきた疾患群の病態の一つである可能性が示唆された。

## 8) 結語

ラット上肢牽引モデルを用いた当科の一連の研究を発展させ、電子顕微鏡学的・神経生化学的手法を用いて研究を行った。牽引負荷により腕神経叢で微小管の減少がみられた。また同様にタウタンパクも減少したが、チューブリンやニューロフィラメントには変化がみられなかった。よって牽引負荷による微小管の減少は、タウタンパクが減少することで微小管が脱重合したと考えられた。微小管は軸索輸送に関与する細胞骨格である。牽引負荷により腕神経叢で軸索輸送障害が起こる可能性が示唆された。牽引障害に対する腕神経叢の易損性が示された。

## 9) 参考文献

- 1) 安藤義博 慢性絞扼神経障害の実験モデル 日整会誌 1990 ; 64 633-47
- 2) Badalamente MA, Hurst LC, Stracher A. Decreased axonal transport in rat nerve following acute and chronic exposure. J. Hand Surg. 1986; 11B 337-40
- 3) Bednarski E, Lynch G. Cytosolic proteolysis of  $\tau$  by cathepsin D in hippocampus following suppression of cathepsins B and L. J. Neurochem. 1996; 67 1846-55
- 4) Bertelli JA, Mira JC, Gilbert A, et al. Anatomical basis of rat brachial plexus reconstruction. Surg. Radiol. Anat. 1992; 14 85-6
- 5) Bi X, Haque TS, Zhou J, et al. Novel cathepsin D inhibitors block the formation of hyperphosphorylated tau fragments in hippocampus. J. Neurochem. 2000; 74 1469-77
- 6) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; 72 248-54
- 7) Brown R, Pedowitz R, Rydevik B, et al. Effects of acute graded strain on efferent conduction properties in the rabbit tibial nerve. Clin. Orthop. 1993; 296 288-94
- 8) Bruce A. et al. Essential 細胞生物学 南江堂 1999
- 9) Burkhart KK, Beard DC, Lehman RAW, Billingsley ML. Alterations in tau phosphorylation in rat and human neocortical brain slices following hypoxia and glucose deprivation. Exp. Neurol. 1998; 154 464-72

- 10) Clark WL, Trumble TE, Swiontkowski MF, et al. Nerve tension and blood flow in a rat model of immediate and delayed repairs. *J. Hand Surg.* 1992; 17A 677-87
- 11) Dahlin LB, Lundborg G. The neurone and its response to peripheral nerve compression. *J. Hand Surg.* 1990; 15B 5-10
- 12) Denoulet P, Filliatreau G, Nechaud B, et al. Differential axonal transport of isotubulins in the motor axons of the rat sciatic nerve. *J. Cell Biol.* 1989; 108 965-71
- 13) Eiserich JP, Estevez AG, Bamberg TV, et al. Microtubule dysfunction by posttranslational nitrotyrosination of  $\alpha$ -tubulin: A nitric oxide-dependent mechanism of cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96 6365-70
- 14) Fasulo L, Ugolini G, Visintin M, et al. The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. *J. Neurochem.* 2000; 75 624-33
- 15) Fukunaga K, Miyamoto E. A working model of CaM kinase II activity in hippocampal long-term potentiation and memory (review). *Neurosci. Res.* 2000; 38 3-17
- 16) Fukunaga K, Muller D, Ohmitsu M, et al. Decreased protein phosphatase 2A activity in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurochem.* 2000; 74 807-17
- 17) Gennarelli TA, Thibault LE, Tipperman R, et al. Axonal injury in the optic nerve: a model simulating diffuse axonal injury in the brain. *J. Neurosurg.* 1989; 71 244-53

- 18) Georgieff IS, Liem RKH, Mellado W, et al. High molecular weight tau: preferential localization in the peripheral nervous system. *J. Cell Sci.* 1991; 100 55-60
- 19) Gillen C, Gleichmann M, Spreyer P, et al. Differentially expressed genes after peripheral nerve injury. *J. Neurosci. Res.* 1995; 42 159-71
- 20) 後藤秀機 軸索輸送 神経生化 133-154
- 21) Hirai Y, Kitamura K, Yamaga M, et al. Brachial plexus stretching injuries: physiological conduction block caused by nerve stretching in rats. *Neuro-Orthopedics* 1999; 25 19-25
- 22) 平野寛, 宮澤七郎 よくわかる電子顕微鏡技術 朝倉書店 1997
- 23) 堀内行雄 末梢神経障害に関する実験的研究 -圧迫神経障害について- 日整会誌 1983 ; 57 789-803
- 24) Hu BR, Janelidze S, Ginsberg MD, et al. Protein aggregation after focal brain ischemia and reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2001; 21 865-75
- 25) Hu BR, Wieloch T. Tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase in the rat brain following transient cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 1994; 62 1357-67
- 26) Jafari SS, Maxwell WL, Neilson M, et al. Axonal cytoskeletal changes after non-disruptive axonal injury. 1997; 26 207-21
- 27) 片岡泰文 胸郭出口症候群の病態 -腕神経叢造影を用いて- 日整会誌 1994 ; 68 357-66

- 28) 河井秀夫ら 腕神経叢牽引の実験的研究 日手会誌 1990 ; 7(3) 327-9
- 29) Kitamura T, Takagi K, Yamaga M, Morisawa K. Brachial plexus stretching injuries: microcirculation of the brachial plexus. *J. Shoulder Elbow Surg.* 1995; 4 118-23
- 30) Koike H. The disturbance of the fast axonal transport of protein by passive stretching of an axon in aplasia. *J. Physiol.* 1987; 390 489-500
- 31) Kwan MK, Wall EJ, Massie J, Garfin SR. Strain, stress and stretch of peripheral nerve: rabbit experiments in vitro and in vivo. *Acta. Orthop. Scand.* 1992; 63 267-72
- 32) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 1972; 227 680-85
- 33) Litersky JM, Johnson GVW. Phosphorylation of  $\tau$  in situ: inhibition of calcium-dependent proteolysis. *J. Neurochem.* 1995; 65 903-11
- 34) Lundborg G. *Nerve Injury and Repair* Churchill Livingstone, London 1991
- 35) Lundborg G. Intraneural microcirculation. *Orthop. Clin. North Am.* 1988; 19(1) 1-12
- 36) Mackinnon SE, Dellon AL, Hudson AR, et al. Chronic nerve compression - an experimental model in the rat. *Ann. Plast. Surg.* 1984; 13(2) 112-120
- 37) Mackinnon SE. Double and multiple crush syndromes. *Hand Clinics* 1992; 8(2) 369-90



- 38) Mailliot C, Dimster VP, Rosenthal RE, et al. Rapid tau protein dephosphorylation and differential rephosphorylation during cardiac arrest-induced cerebral ischemia and reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2000; 20 543-49
- 39) Malbouisson AMB, Ghabriel MN, Allt G. Axonal degeneration in large and small nerve fibers -An electron-microscopic and morphometric study- *J. Neuro.Sci.* 1985; 67 307-18
- 40) Mandelkow E., Song YH, Schweers O, et al. On the structure of microtubules, tau, and paired helical filaments. 1995; 16(3) 347-54
- 41) Matloub HS, Yousif NJ. Peripheral nerve anatomy and innervation pattern. *Hand Clinics* 1992; 8(2) 201-14
- 42) Maxwell WL, Graham AI, Adams JH, et al. Focal axonal injury : the early axonal response to stretch. *J. Neurocytology* 1991; 20 157-64
- 43) Maxwell WL, Graham DI. Loss of axonal microtubules and neurofilaments after stretch-injury to guinea pig optic nerve fibers. *J. Neurotrauma* 1997; 14 603-14
- 44) McKerracher L, Hirscheimer A. Slow transport of the cytoskeleton after axonal injury. *J. Neurobiology* 1992; 23(5) 568-78
- 45) Mercken M, Grynspan F, Nixon RA. Differential sensitivity to proteolysis by brain calpain of adult human tau, fetal human tau and PHF-tau. *FEBS Lett.* 1995; 368 10-14
- 46) Miller KE, Joshi HC. Tubulin transport in neurons. *J. Cell Biol.* 1996; 133(6) 1355-66

- 47) Mullins FH, Hargreaves AJ, Li JY, et al. Tyrosination state of  $\alpha$ -tubulin in regenerating peripheral nerve. *J. Neurochem.* 1994; 62 227-34
- 48) 永田見生 頸肩腕症候群の診断 -狭義と広義の頸肩腕症候群- *MB Orthopaedics* 2000 ; 13(12) 1-9
- 49) Narakas AO. The role of thoracic outlet syndrome in the double crush syndrome. *Ann. Hand Surg.* 1990; 9(5) 331-40
- 50) 根本孝一 末梢神経障害に関する実験的研究 -重複圧迫による神経易損性の発現機序について- *日整会誌* 1983 ; 57 1773-86
- 51) Pettigrew LC, Holtz ML, Craddock SD, et al. Microtubular proteolysis in focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1996; 16 1189-1202
- 52) Poduslo JF, Curran GL, Berg CT. Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; 91 5705-9
- 53) Powell HC, Myers RR. Pathology of experimental nerve compression. *Laboratory Investigation* 1986; 55(1) 91-100
- 54) Reles A, Friede RL. Axonal cytoskeleton at the nodes of Ranvier. *J. Neurocytology* 1991; 20 450-8
- 55) Schroer TA, Sheetz MP. Functions of microtubule-based motors. *Ann. Rev. Physiol.* 1991; 53 629-52
- 56) Seiler WA, Schlegel R, Susan E, et al. Double crush syndrome : experimental model in the rat. *Surgical Forum* 34 596-8

- 57) Shackelford DA, Nelson KE. Changes in phosphorylation of  $\tau$  during ischemia and reperfusion in the rabbit spinal cord. *J. Neurochem.* 1996; 66 286-95
- 58) Sojitra NM, Fananapazir K, Drew SJ. Observations on the vasculature of the brachial plexus, using the rat as the mammalian model. *Neuro-Orthopedics* 1995; 19 1-15
- 59) Sun X, Tashiro T, Hirai S, et al. Preparation of tau from the peripheral nerve: presence of insoluble low molecular weight tau with high phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 210 338-44
- 60) Taleghany N, Oblinger MM. Regional distribution and biochemical characteristics of high molecular weight tau in the nervous system. *J. Neurosci. Res.* 1992; 33 257-65
- 61) Tanoue M, Yamaga M, Ide J, Takagi K. Acute stretching of peripheral nerves inhibits retrograde axonal transport. *J. Hand Surg.* 1996; 21B 358-63
- 62) Tashiro T, Sun X, Tsuda M, Komiya Y. Differential axonal transport of soluble and insoluble  $\tau$  in the rat sciatic nerve. *J. Neurochem.* 1996; 67 1566-74
- 63) Tomioka C, Nishioka K, Kogure K. Absence of early destructive changes of cytoskeletal proteins after transient ischemia in the rat. *Brain Res.* 1992; 586 352-7
- 64) Trausch JS, Grenfell SJ, Handley-Gearhart PM, et al. Immunofluorescent localization of the ubiquitin-activating enzyme, E1, to the nucleus and cytoskeleton. *American Physio. Society* 1993; C93-101

- 65) Upton ARM, McComas AJ. The double crush syndrome in nerve entrapment syndrome. *Lancet* 1973; 2 359-62
- 66) Vallee RB, Bloom GS. Mechanisms of fast and slow axonal transport. *Ann. Rev. Neurosci.* 1991; 14 59-92
- 67) Wall EJ, Kwan MK, et al. Stress relaxation of a peripheral nerve. *J. Hand Surg.* 1991; 16A 859-63
- 68) Wall EJ, Massie JB, Kwan MK, et al. Experimental stretch neuropathy. *J. Bone Joint Surg.* 1992; 74B 126-9
- 69) Wang GP, Khatoun S, Iqbal K, et al. Brain ubiquitin is markedly elevated in Alzheimer disease. *Brain Res.* 1991; 566 146-51
- 70) Wang X, An S, Wu JM. Specific processing of native and phosphorylated  $\tau$  protein by protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 219 591-7
- 71) Watanabe M, Yamaga M, Kato T, Ide J, Kitamura T, Takagi K. The implication of repeated versus continuous strain on nerve function in a rat forelimb model. *J. Hand Surg.* 2001; 26A 663-669
- 72) 渡辺雅彦 頸肩腕症候群 -原因疾患別の症状を中心に- *MB Orthopaedics* 2000 ; 13(12) 10-16
- 73) Wood VE, Biondi J. Double-crush nerve compression in thoracic-outlet syndrome. *J. Bone Joint Surg.* 1990; 72A 85-7
- 74) Xie HQ, Litersky JM, Hartigan JA, et al. The interrelationship between selective tau phosphorylation and microtubule association. *Brain Res.* 1998;

- 75) 山鹿眞紀夫 頸肩腕症候群の management ; 腕神経叢牽引型の診察と治療に関して  
別冊整形外科 1995 ; No.27 154-8
- 76) 山鹿眞紀夫 胸郭出口症候群の保存的治療 整形・災害外科 1994 ; 37  
1135-42
- 77) 山鹿眞紀夫 頸肩腕症候群・胸郭出口症候群 実践リハ処方別冊 1996 ; 204-8
- 78) 山鹿眞紀夫 外傷性頸部症候群 (むち打ち症) 実践リハ処方別冊 1996 ; 209-11
- 79) 山鹿眞紀夫 胸郭出口症候群の保存療法 MB Orthopaedics 1998 ; 11(7)  
43-50