

学位論文

Doctoral Thesis

脱神経後部分的再生の認められる甲状披裂筋に対する神経筋弁移植術の効果

(Effects of nerve-muscle pedicle on immobile rat vocal folds with residual recurrent laryngeal nerve innervation)

青山 猛

Takashi Aoyama

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻頭頸部感覚病態学

指導教員

湯本 英二 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻頭頸部感覚病態学

伊藤 隆明 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻機能病理学

2011年3月

学位論文

Doctoral Thesis

論文題名： 脱神経後部分的再生の認められる甲状披裂筋に対する神経筋弁移植術の効果

(Effects of nerve-muscle pedicle on immobile rat vocal folds with residual recurrent laryngeal nerve innervation)

著者名： 青山 猛
Takashi Aoyama

指導教員名： 熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻頭頸部感覚病態学
湯本 英二 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻機能病理学
伊藤 隆明 教授

審査委員名： 神経内科学担当教授 内野 誠 教授
視機能病態学担当教授 谷原 秀信 教授
知覚生理学担当教授 宋 文杰 教授
顎口腔病態学担当教授 篠原 正徳 教授

2011年3月

目次

1. 要旨
2. 発表論文リスト
3. 謝辞
4. 略語一覧
5. 研究の背景と目的
6. 実験方法
7. 実験結果
8. 考察
9. 結語
10. 参考文献

1. 要旨

反回神経の傷害による一側声帯麻痺において、神経再支配の確立を目指した神経筋弁移植術が臨床的に有効かどうかについては一致した見解がない。以前我々はラットを用いて、完全に脱神経した甲状披裂筋に対して、頸神経ワナを用いた神経筋弁を甲状披裂筋に移植することで筋の萎縮が予防できることを実証した。それゆえ、神経筋弁移植術は完全に脱神経した筋においては神経再支配を確立できるといえる。一方、一般的に、神経支配が存在する筋線維は、他の神経支配を受け入れないとされている。もしそれが内喉頭筋についても成立するならば、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、新たな神経支配は起こらない可能性がある。そこで本研究では、脱神経後部分的に神経再支配の認められる甲状披裂筋に対しても、神経筋弁移植術が有効であるかを検討した。

目的：完全脱神経に陥っていない甲状披裂筋に対して、頸神経ワナを用いた神経筋弁移植術が有効であるかを検討する。

方法：ウィスター系ラットを用いた。正常なラットを無処置群とし、左反回神経を切断し完全に脱神経させた動物モデルを脱神経群とした。また、左反回神経を一旦切断後、断端間を1mm離れた状態でシリコンチューブ内に挿入したモデルをシリコンチューブ群とし、上記処置の5週後に甲状披裂筋に神経筋弁移植術を行ったものを神経筋弁移植群とした。この2群のラットを用いて、反回神経切断処置15週後に甲状披裂筋の筋断面積、神経筋接合部の免疫組織学的な検討を行うと同時に、反回神経と頸神経ワナを電気刺激して誘発筋電図検査を行い、電気生理学的に神経再生の程度を評価した。

結果：神経筋弁移植群の1) 甲状披裂筋の筋断面積と2) 神経終末数およびアセチルコリン受容体数3) アセチルコリン受容体数に対する神経終末数の割合は、すべてシリコンチューブ群より有意に大きかった。また、シリコンチューブ群と神経筋弁移植群の反回神経切断部の中枢側と神経筋弁移植群の頸神経ワナの電気刺激により、全ての動物モデルで甲状披裂筋に誘発筋活動電位を認めた。

結論：神経筋弁移植術を行うことによって、部分的に反回神経支配が存在する甲状披裂筋においても頸神経ワナを介した神経支配を確立できることが証明された。

Summary

Unlike the complete loss of recurrent laryngeal nerve (RLN) innervation, which leads to marked thyroarytenoid (TA) muscle atrophy, many RLN injuries cause partial denervation and reinnervation with various degrees of vocal fold motion impairment, accompanied by weakness, synkinesis, and partial atrophy. Successful clinical application of the nerve-muscle pedicle (NMP) implantation method for patients with unilateral vocal fold paralysis has been reported. Previously, we demonstrated that ansa cervicalis nerve (ACN)-NMP flap implantation into the TA muscle prevented the denervation and atrophy associated with complete RLN denervation in rats. Therefore, the NMP procedure can enable effective motor innervation following complete denervation. In other non-laryngeal muscles, implanted foreign nerves will partially reinnervate denervated muscles.

Nevertheless, it is possible that innervated, functionally active muscle fibers will not accept further innervation. If so, the effect of the NMP procedure on partially innervated TA muscle is questionable due to synkinetic RLN reinnervation, which is common clinically. Therefore, it is necessary to determine whether an NMP can innervate a TA muscle that is partially innervated by the RLN.

Objectives: We investigated whether ansa cervicalis nerve (ACN)-muscle pedicle (NMP) implantation into the thyroarytenoid (TA) muscle is efficacious in the presence of partial recurrent laryngeal nerve (RLN) innervation.

Methods: We studied by using the rats and also served as positive and negative control animal models. We served that untreated rats were as Control group and never degeneration rats after the left RLN was transected were as Denervation group. On the other hand the left RLN was transected, a 1-mm piece of nerve was removed, and the stumps were abutted in silicon tubes, inducing partial RLN regeneration. The silicon tube-treated rats underwent this procedure alone was as ST group, while the other rats had an NMP implanted into the left TA muscle 5 weeks after ST treatment as NMP group. At 15 weeks, reinnervation was assessed by histological evaluation of the TA muscle and electromyography with stimulation of the RLN and ACN nerves.

Results: In the NMP group, the muscle area, number of nerve terminals (NTs), number of acetylcholine receptors (AChRs), and NT/AChR ratio were significantly greater ($p < 0.05$) in the NMP group than in the ST group. Electromyography elicited TA compound action potentials upon stimulation of the RLN and ACN nerves.

Conclusion: NMP implantation is efficacious for reducing atrophic changes in the TA muscle in the presence of partial RLN innervation.

2. 発表論文リスト

参考論文

① 関連論文

1 編 1 冊

1. Aoyama T, Kumai Y, Yumoto E, Ito T, Miyamaru S. Effects of Nerve-Muscle Pedicle on Immobile Rat Vocal Folds in the Presence of Partial Innervation. *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*. 2010; 119; 823-829.

② その他の論文

2 編 2 冊

1. 青山猛、岡香澄、木下澄仁、湯本英二. 茎状突起過長症の 1 症例. *耳鼻咽喉科・頭頸部外科*. 2007; 79; 159-163.
2. 青山猛、讃岐徹治、増田聖子、湯本英二. 披裂軟骨脱臼の 2 症例. *音声言語医学*. 2010; 51; 149-155.

3. 謝辞

本研究は熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻頭頸部感覚病態学湯本英二教授、同機能病理学伊藤隆明教授の御指導の下に行いました。両教授ならびに両教室の皆様に深く感謝致します。

4. 略語一覽

TA: Thyroarytenoid

NMP: Nerve Muscle Pedicle

NMJ: Neuromuscular Junction

ST: Silicon tube

FITC: Fluorescein Isothiocyanate

AchR: Acetylcholine Receptor

α -BTX: α -Bungarotoxin

EMG: Electromyography

5. 研究の背景と目的

1) 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¹。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²。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Ⅰ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³。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⁴。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⁵。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⁶。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) 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、

- (i) 筋全体および単一筋線維の断面積、
- (ii) 神経筋接合部(神経終末とアセチルコリン受容体)の数、
- (iii) 生理学的評価として誘発筋電図検査^{7,8}を行い、誘発電位の有無、を指標とした。

6. 実験方法

6-1. 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。

6-2. 動物モデルの作成

① コントロール群 (図 1A)

無処置の正常ラット 6 匹をコントロール群とした。

② 脱神経群 (図 1B)

ケタミン (50mg/kg) とキシラジン (10mg/kg) の腹腔内投与にて全身麻酔を行った。頸部正中切開にて胸骨舌骨筋を左右に牽引して甲状軟骨、気管を露出した。手術用顕微鏡 (SN-MD2;永嶋医療機器) 下に左反回神経を露出し、第 7 気管輪レベルで、10 mmの長さの反回神経を切除した。切除断端はいずれも 4-0 絹糸で結紮し、中枢側は翻転し胸骨舌骨筋内に埋没固定して神経の再生を防止した。処置後内視鏡 (ES02700S;Nisco 社) にて左声帯が固定していることを確認した。以上の操作を 6 匹に行い、脱神経群とした。

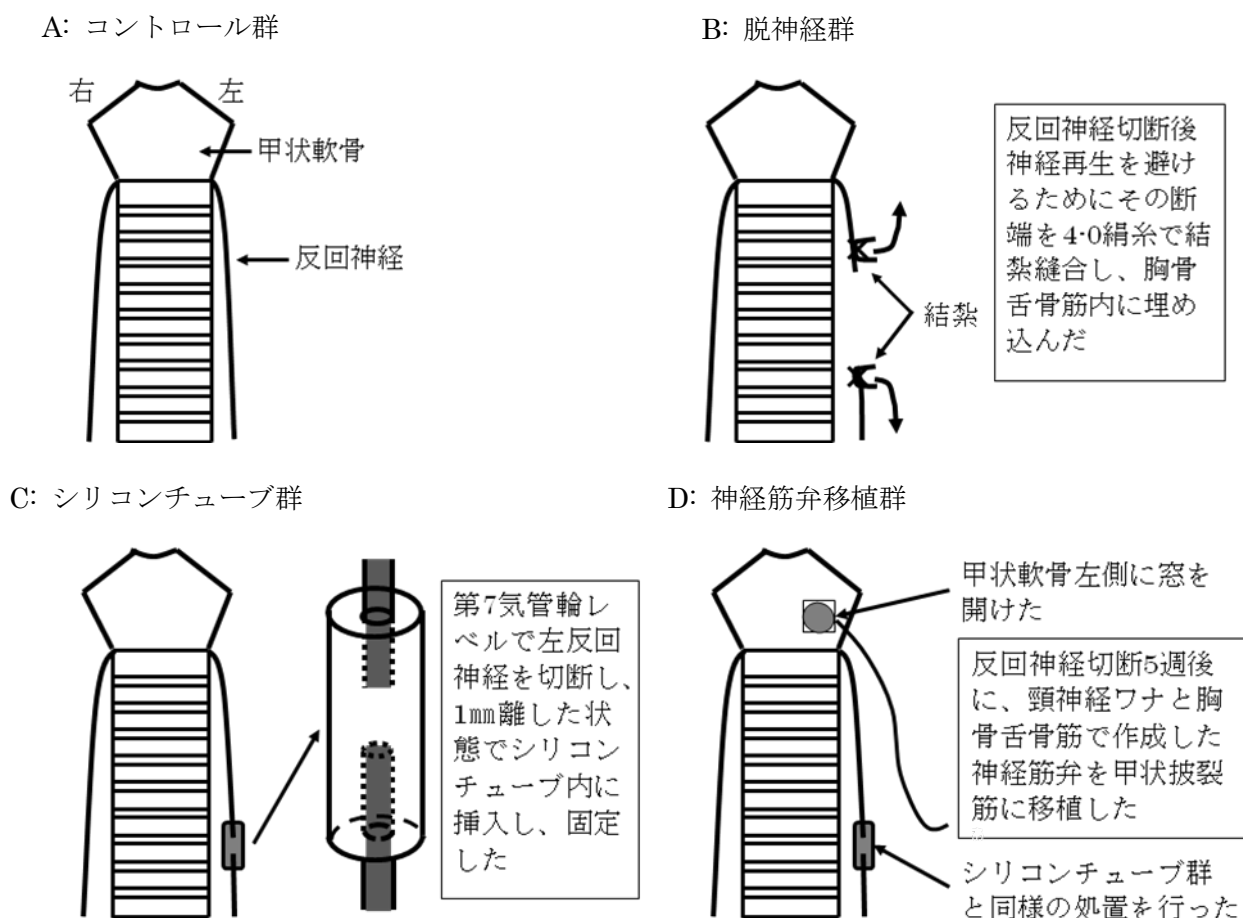
③ シリコンチューブ群 (図 1C)

上記のようにして左反回神経を露出した後、第 7 気管輪のレベルで 1 mmの長さを切除し、切断した神経の両断端を長さ 3 mmのシリコンチューブ内に入れ 1 mm離れた状態にして 9-0 ナイロン糸でシリコンチューブに固定した。処置後、内視鏡で左声帯が固定していることを確認した。以上の操作を 12 匹に行い、シリコンチューブ群とした。シリコンチューブ群ラットは、反回神経断端間 1 mmを経てある程度の神経再生が起こることが期待される。(声帯固定があるものの甲状披裂筋に部分的に反回神経支配が存在する動物モデル)

④ 神経筋弁移植群 (図 1D)

シリコンチューブ群の動物と同じ処置を施し 5 週経過したラットを用いた。左胸骨舌骨筋内を走行する頸神経ワナを顕微鏡下に同定し、電気刺激装置 (SEN-3301;日本光電) を用いて同神経を刺激し左胸骨舌骨筋の支配神経であることを確認した後、神経が筋線維を進入する箇所できさ約 0.5×0.5 mmの筋弁を採取し神経筋弁を作成した。次に甲状軟骨左側に、約 1 mm×1 mmの大きさの窓を作成し、作成した神経筋弁が甲状披裂筋に接する様に挿入し 9-0 ナイロン糸で甲状軟骨に固定した。以上の操作を 12 匹に行い神経筋弁移植群とした。なお、シリコンチューブ群と神経筋弁移植群はそれぞれ、組織学的評価用 6 匹と筋電図計測用 6 匹に分けた。

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1mm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。

6-3. 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。

6-4. 評価項目

①声帯運動の評価

脱神経群、シリコンチューブ群、神経筋弁移植群の全ての動物モデルにおいて、ケタミ

ン (50mg/kg) とキシラジン (10mg/kg) の腹腔内投与にて全身麻酔を行い、内視鏡下に (ES02700S;Nisco 社) 喉頭を観察しビデオに録画し、両側声帯運動の有無を確認した。

②誘発筋電図検査

シリコンチューブ群と神経筋弁移植群の各 6 匹ずつを用いた。ケタミン (50mg/kg) とキシラジン (10mg/kg) の腹腔内投与にて全身麻酔を施した後、誘発筋電図検査を行った。筋電位の記録に直径 0.08 mm のシリコンコーティング単極白金線 (UK-7005;ユニークメディカル社) を用いた。関電極は甲状軟骨に左右 1 つずつ作成した窓を通して左右の甲状披裂筋内に留置した。処置側については、新たに窓を作成することが困難な場合は、神経筋弁を移植する際に作成した窓を利用した。検査後全てのモデルで、喉頭の冠状断連続薄切切片を作成し HE 染色を施して、電極の先端が確実に甲状披裂筋内に刺入されていたことを顕微鏡下に確認した。不関電極は胸骨舌骨筋内に留置した。記録はニューロパック

(MEB-9100、日本光電) にて行い、電気刺激装置 (SEN-3301;日本光電) を用いて刺激時間 100 μ s で最大上刺激を行い、シリコンチューブ群では、左反回神経 (シリコンチューブの中枢側と末梢側)、右反回神経を刺激し、神経筋弁移植群では、さらに移植した頸神経ワナを刺激した。頸神経ワナと左反回神経では、それぞれの神経の切断前後で甲状披裂筋の誘発活動電位を調べた。

③冠状断連続凍結切片の作成

コントロール群、脱神経群、シリコンチューブ群、神経筋弁移植群の各群 6 匹ずつを組織学的検討に用いた。極量のペントバルビタールを腹腔内に投与して安楽死させた後、喉頭を摘出し、OCT コンパウンドに包理し、液体窒素で凍結した。その後、クライオスタット (CM1850;Leica 社) で 7 μ m 厚の冠状断連続切片を作成した。

④甲状披裂筋の筋全体および単一筋線維の断面積の解析

甲状披裂筋の筋萎縮性変化を検証する上で、各群の筋全体と単一筋線維の断面積を求めた^{4,7}。甲状披裂筋全体の断面積を評価するために、HE 染色を施し、顕微鏡にて 25 倍に拡大した像をイメージアナライザーシステム (Axio Vision 3.1; CarlZeiss 社) にて取り込んだ。披裂軟骨の形状を指標にして両側の甲状披裂筋の位置を合わせ、ラット一匹当たり 4 枚の切片をもとに甲状披裂筋全体の断面積を測定した。甲状披裂筋の単一筋線維の断面積を評価する際には、上記と同様の方法で位置を合わせた切片の中心部分を 200 倍に拡大して画像を取り込んだ。これらの中から、ラット一匹当たり 30 本の筋線維の断面積を測定した。測定に当たっては、画像解析ソフトウェア NIHimage を用いて定量的に算出した。甲状披裂筋の断面積は筋全体あるいは筋線維の萎縮の程度を反映しており、いずれも同一切片上の正常側 (Untreated side;U) に対する処置側 (Treated side;T) の割合である T/U 値を算出し評価の対象とした。無処置群も同様の方法で右側に対する左側の割合を算出し評

価した。

⑤中心核を有する筋線維細胞数の割合

神経再支配が起こると、筋線維が再生することを期待できる。再生した筋線維は成熟するまでの過程で、中心核を有するとされている。そこで、中心核を有する筋線維数を各群で計測し比較した。1匹当たり100本の筋線維に含まれる中心核を有する筋線維の比率を求め、各群における平均値を計算した。

⑥神経筋接合部

神経筋接合部は、神経終末とアセチルコリン受容体を蛍光二重染色することにより各々の局在を明らかにした。作成した喉頭冠状断薄切切片を4%パラホルムアルデヒドにて5分間固定し、PBSで3回洗浄した後、100倍に希釈したラビット抗ヒト synaptophysin 抗体 (Dako 社) とビオチン化抗ラビット IgG 抗体 (Dako 社) に2時間反応させた。PBSで3回洗浄した後、100倍希釈した Fluorescein Isothiocyanate (FITC) の streptoavidin (Sigma 社) および rhodamin 標識の α -Bungarotoxin (α -BTX) (Sigma 社) を2時間反応させた。評価は、筋の断面積と同様の方法で両側の位置を合わせた切片を選択した。これらの位置は神経筋接合部が最も豊富に存在する筋腹中央に相当する。画像解析装置の付属した蛍光顕微鏡 (BX51;Olympus 社) にて画像をパソコンに取り込み、同一切片上の正常側および処置側の甲状披裂筋における synaptophysin 陽性の神経終末数および α -BTX 陽性のアセチルコリン受容体数を調べ、正常側に対する処置側の割合を求めた。また、処置側の α -BTX 陽性のアセチルコリン受容体数に対する synaptophysin 陽性の神経終末数の割合を、神経筋接合部の再生の指標とし⁹、各群6匹ずつの計測数を平均して評価した。

6-5. 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。

7. 実験結果

7-1. 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。

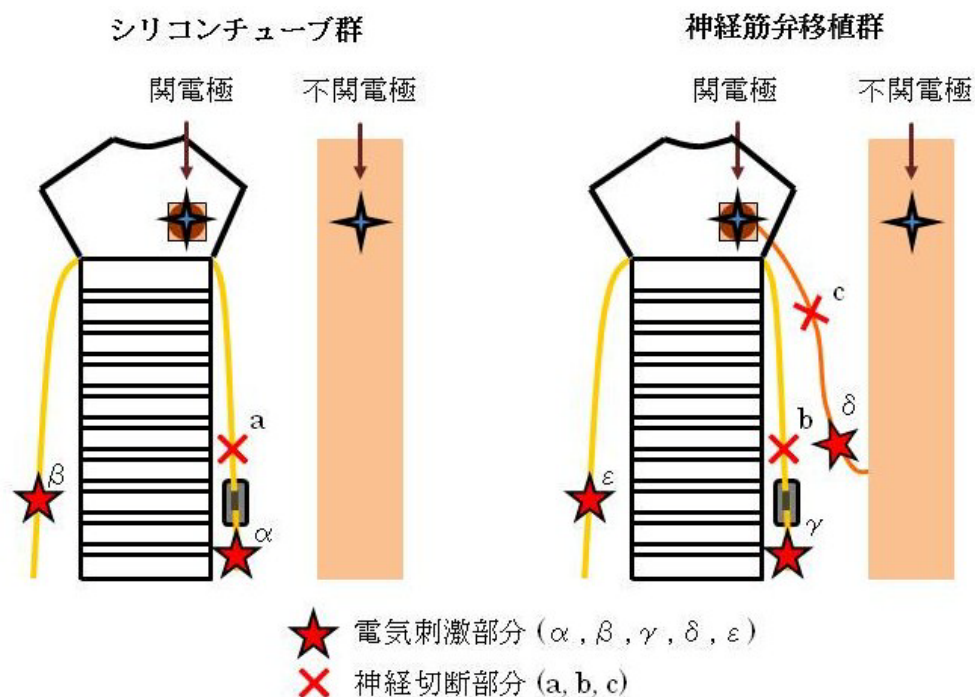
7-2. 誘発筋電図検査 (図2)

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” α ”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” α ”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、” β ”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” γ ”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” γ ”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、” δ ”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、” ϵ ”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を生じたことが明らかとなった。

図2 誘発筋電図検査

A



B

シリコンチューブ群

処置側

- 1) 反回神経を切断する前に α を電気刺激すると誘発活動電位を生じた
- 2) aで反回神経を切断後に α を電気刺激すると誘発活動電位は消失した

正常側

- 3) 無処置の反回神経の β を電気刺激すると誘発活動電位を生じた

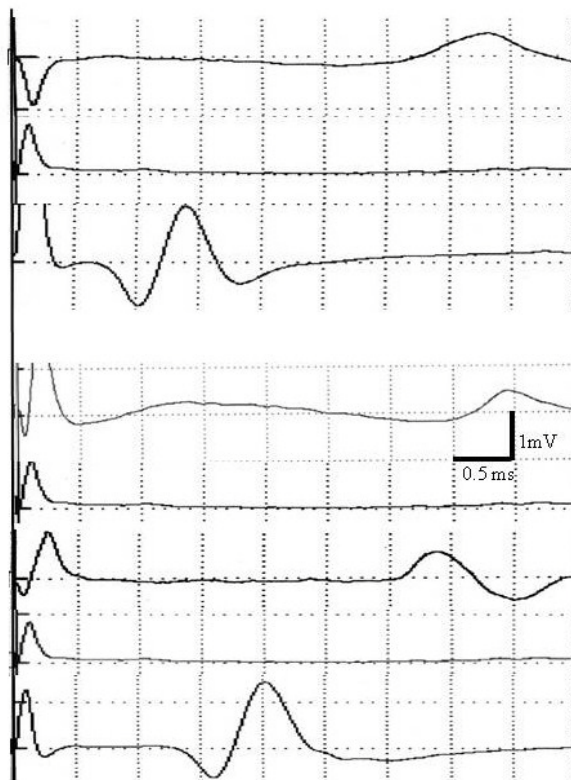
神経筋弁移植群

処置側

- 4) 反回神経を切断する前に γ を電気刺激すると誘発活動電位を生じた
- 5) bで反回神経を切断後に γ を電気刺激すると誘発活動電位は消失した
- 6) 頸神経ワナを切断する前に δ を電気刺激すると誘発活動電位を生じた
- 7) cで頸神経ワナを切断後に δ を電気刺激すると誘発活動電位は消失した

正常側

- 8) 無処置の反回神経の ε を電気刺激すると誘発活動電位を生じた

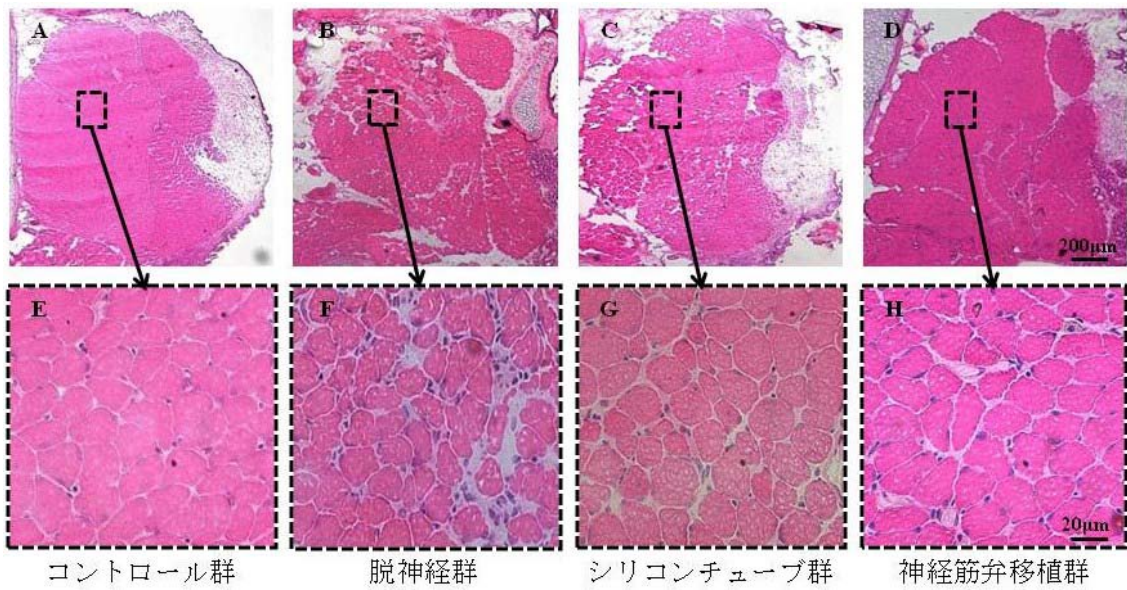


7-3. 甲状披裂筋の筋全体および単一筋線維の断面積の解析

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 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。

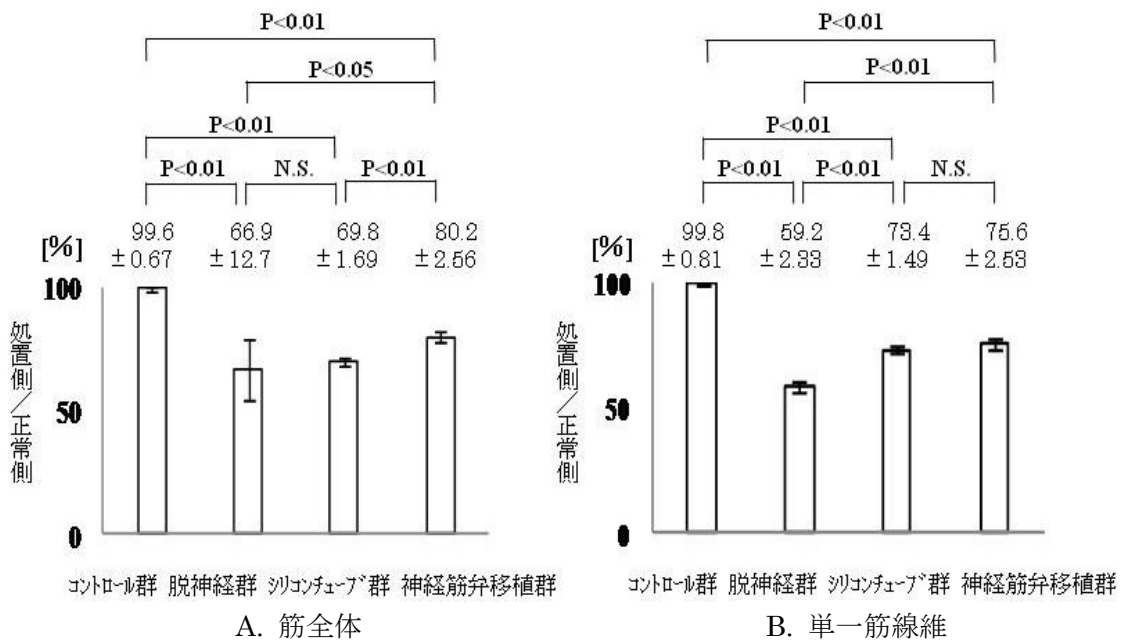
定量的に検討すると、シリコンチューブ群の筋全体の断面積は、有意差はなかったが脱神経群より大きく（ $p=0.298$; 図 4A）、単一筋線維のそれは有意に大きかった（ $p<0.01$; 図 4B）。一方、神経筋弁移植群の筋全体の断面積は、シリコンチューブ群より有意に大きかった（ $p<0.01$; 図 4A）。単一筋線維のそれは統計学的には有意差がなかったが、神経筋弁移植群がシリコンチューブ群より大きかった（ $p=0.051$; 図 4B）。以上の結果からシリコンチューブ群と神経筋弁移植群はともに筋萎縮が抑制されるが、神経筋弁移植群がシリコンチューブ群に比して、より筋萎縮が抑制されたこと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

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



N.S.: Not Significant

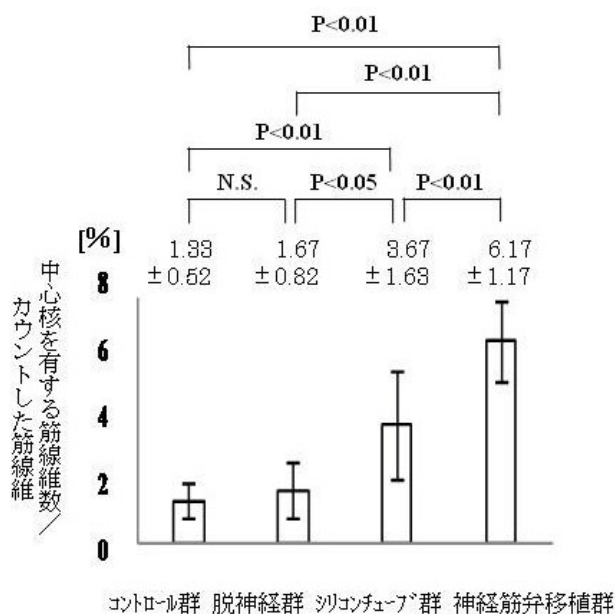
(図 4 の説明)

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)。

7-4. 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

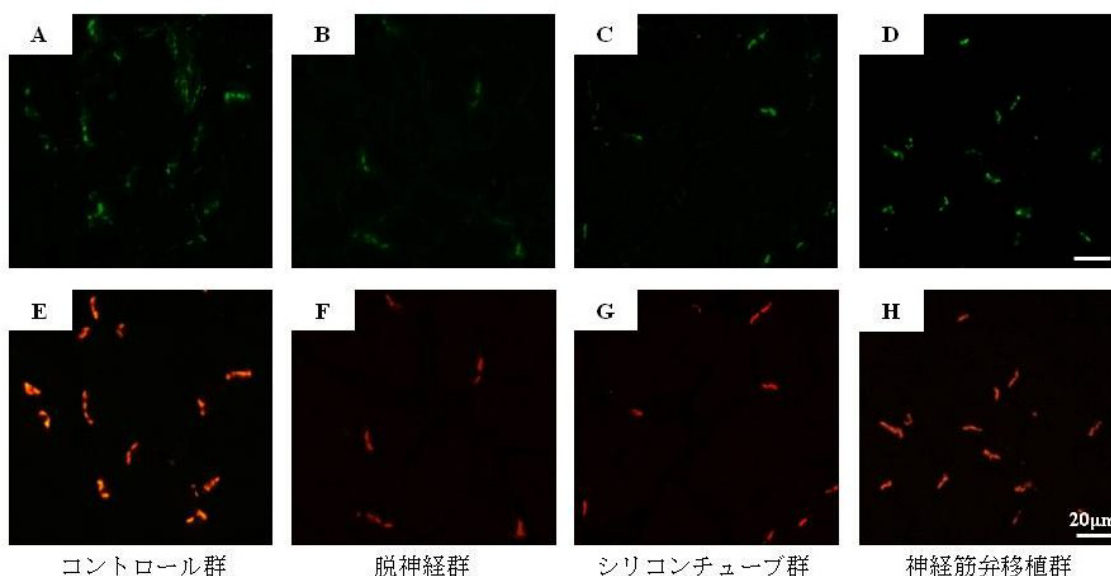


シリコンチューブ群における甲状披裂筋の筋線維で、中心核を有する筋線維の占める割合は、脱神経群と比較すると有意に多かった ($p<0.05$)。神経筋弁移植群におけるそれは、コントロール群、脱神経群、シリコンチューブ群いずれと比較しても有意に多かった ($p<0.01$)。

7-5. 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

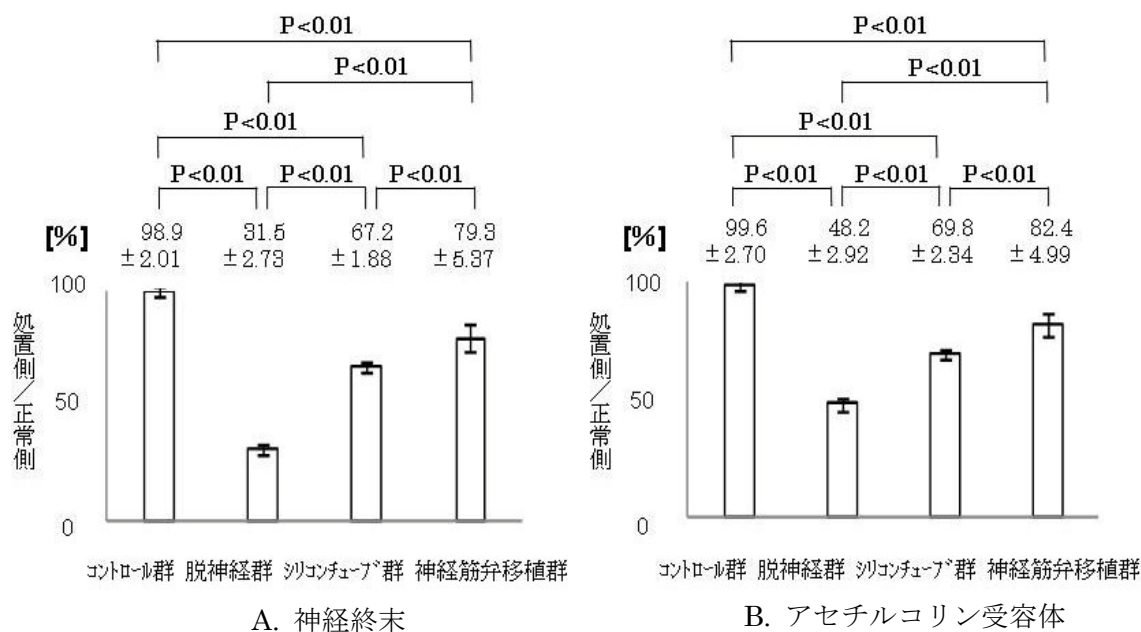
全ての群において、シナプトフィジン陽性の神経終末（図 6A-D）と α -BTX 陽性のアセチルコリン受容体（図 6E-H）を認めた。シリコンチューブ群の神経終末数（図 6C）とアセチルコリン受容体数（図 6G）は、脱神経群（図 6B,F）よりも多かった。神経筋弁移植群の神経終末数（図 6D）とアセチルコリン受容体数（図 6H）は、コントロール群（図 6A,E）と比較して少なかったが、脱神経群（図 6B, F）やシリコンチューブ群（図 6C, G）よりも多かった。神経終末数とアセチルコリン受容体数の T/U 比は、シリコンチューブ群は脱神経群より有意な増加を認め（ $p < 0.01$; 図 7A,B）、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



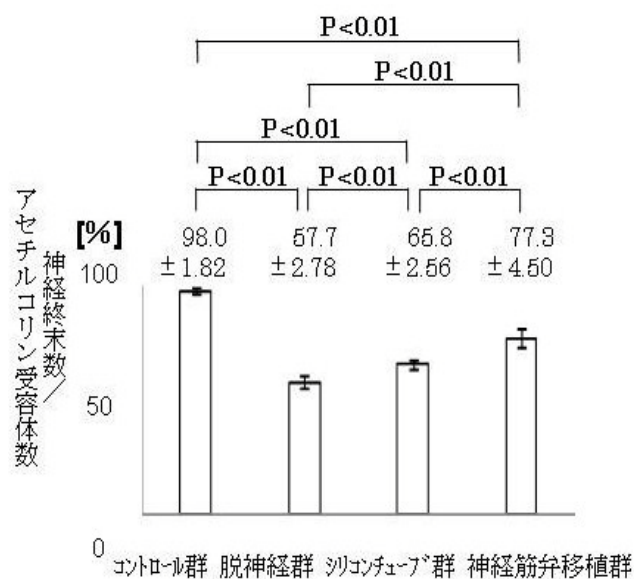
全ての群の神経筋接合部において、処置側の synaptophysin 陽性の神経終末（図 6A-D）と α -BTX 陽性のアセチルコリン受容体（図 6E-H）を認めた。シリコンチューブ群の神経終末数（図 6C）とアセチルコリン受容体数（図 6G）は、脱神経群（図 6B,F）よりも多かった。神経筋弁移植群の神経終末数（図 6D）とアセチルコリン受容体数（図 6H）は、コントロール群（図 6A,E）と比較して少なかったが、脱神経群（図 6B, F）やシリコンチューブ群（図 6C, G）よりも多かった。

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)。

8. 考察

8-1. 部分的神経支配が残存する声帯固定モデルの妥当性

反回神経の損傷はさまざまな声帯運動障害を引き起こし、完全な脱神経による著明な筋萎縮よりも、むしろ内喉頭筋に対して部分的な神経再支配を生じることが多い。いずれの場合も機能的には回復せず、声帯の内転と外転運動は妨げられたままである。これまでに、ラットの反回神経損傷モデルについての報告はいくつかあるが^{10,11}、損傷の強さや持続時間を標準化した報告はなかった。Tessemaらはラットの反回神経を脳動脈瘤の手術時に用いるクリップで圧迫損傷した動物モデルを作成した¹²。このモデルでは、筋電図上は過誤神経支配を示す所見が得られたが、呼吸に一致した正常の声帯運動が回復した。このモデル動物の反回神経は高度の変性に陥ったが、42日後にはほぼ健側と同様な程度まで組織学的な再生を示した。声帯の生理的運動が脱神経後42日で回復したという点で、この動物モデルは反回神経脱神経後に部分的再生を生じたうえで声帯が固定するという臨床像に認められる現象を再現しているとは言えない。そこで、ラット喉頭を用いてこの現象を再現するため、反回神経を一旦切断後、その断端をシリコンチューブ内に挿入し、部分的に反回神経再生を促した動物モデルを作成した。このシリコンチューブ群において、反回神経の軸索が中枢側断端からシリコンチューブ内を伸長再生することで、甲状披裂筋内において一旦消失した神経筋接合部が再形成されると同時に、筋萎縮がある程度抑制されること、また声帯が固定したままであることを確認した。声帯の可動性は回復しないが神経支配を有することは、誘発筋電図検査を用いて潜時が延長するものの誘発筋活動電位を認めることで電気生理学的に裏付けられた。以上よりその過程は違うものの、結果としてラットの反回神経切断後に神経の再生と甲状披裂筋の再支配を生じ、臨床像に則したモデルを作成することができたと考えられる。

8-2 部分的神経支配の存在する甲状披裂筋に対する神経筋弁移植術による効果の検討

神経筋弁移植群の誘発筋電図検査において、反回神経と頸神経ワナの中枢側を電気刺激することで、ともに甲状披裂筋に誘発活動電位を認めたことから、部分的に神経支配の存在する甲状披裂筋において、もともとの反回神経支配と移植した頸神経ワナからの支配による二重の神経支配が可能であることが示された。

部分的に神経支配の存在する甲状披裂筋が、神経筋弁移植術により新たな神経再支配を受けるプロセスについては以下の二つが考えられる。

- 1) 脱神経され、神経終末が消退した筋線維に対して、頸神経ワナより伸長した神経線維が新たな神経筋接合部を形成する。(図 8A)

- 2) 脱神経後も神経支配が残存する筋線維に、頸神経ワナよりの神経線維が伸長し新たな神経筋接合部を形成し、結果として単一筋線維が異なる由来の二つの神経線維の支配を受ける、いわゆる二重支配が確立される。(図 8B)

一般的に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おり⁶、この事実を踏まえると仮説 1)の方に妥当性があると考えられる。ただし哺乳動物の成長過程においての骨格筋線維に対する神経支配の確立の過程で、一時的に単一筋線維が異なる二重の神経支配を受け、その後成熟に伴って不要な神経支配が淘汰され、単一神経支配へ移行するとの報告があり¹³、同一の現象が神経移植直後に一時的に起こっている可能性は否定できないと思われる。いずれにせよ頸神経ワナの移植により新たな神経支配が確立され筋全体としての萎縮は抑制されるものと考えられた。

図 8 神経再支配のプロセス

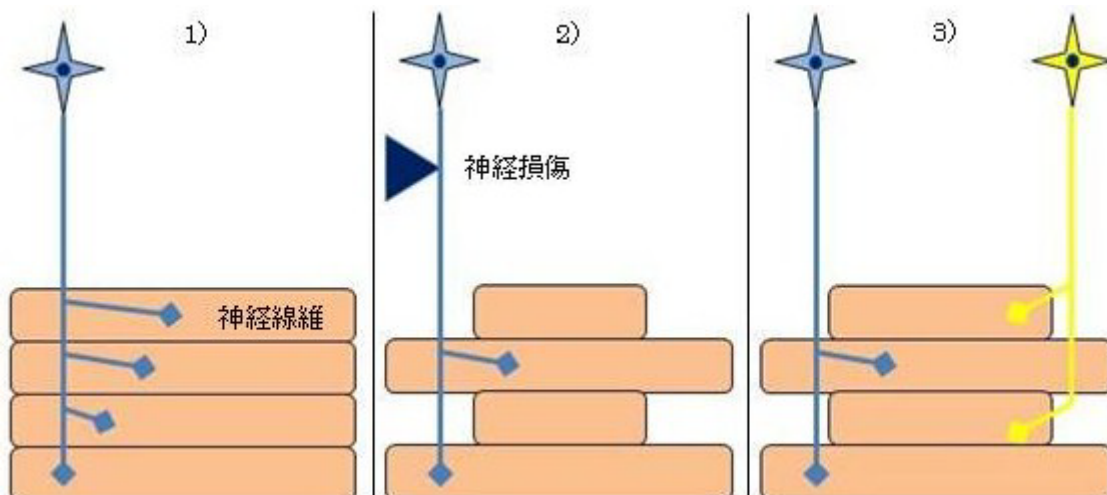


図 8A

- 1) 通常、単一筋線維は、単一の神経線維により支配を受けている。
- 2) 脱神経されると、部分的に神経支配は残存するが、それ以外の筋線維においては、神経終末は消退する。
- 3) 頸神経ワナよりの神経線維は、神経支配を受けていないこれらの筋線維に対して、選択的に伸長し新たな神経筋接合部を形成するが、すべての筋線維をカバーすることはないが結果として筋線維の全体的な萎縮を抑制する。

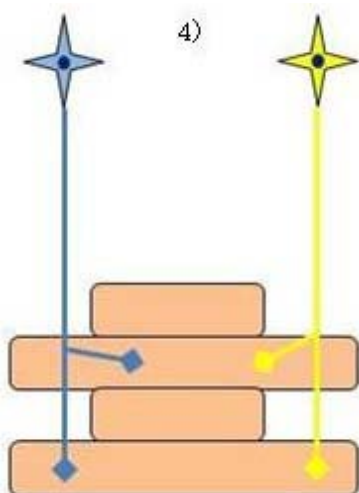


図 8B

上記 2 と同様のプロセスの後

- 4) 反回神経支配が残存する筋線維に対して、頸神経ワナよりの神経線維が伸長し、単一筋線維に対する神経の二重支配が確立される。

本研究では、神経再支配に伴い、筋線維の再生が起こる一つの指標として、核が細胞の中心に位置する筋線維の出現に着目した。新たな神経再支配に伴い、筋衛星細胞は筋線維に分化するとされている¹⁴。再生過程にある筋衛星細胞の核は細胞の中心に位置し、その後筋線維としての成熟に伴い胞体の辺縁に移動することが報告されている¹⁴。したがって、神経筋弁移植後に生じた神経再支配に伴う、再生過程にある筋線維の核は線維の中心に位置する。神経筋弁移植群の筋線維において中心核の占める割合は、コントロール群、脱神経群、シリコンチューブ群のいずれと比較しても有意に多かった。このことより部分的に神経支配の残存する甲状披裂筋は神経筋弁を移植することで少なくとも神経支配を受ける筋線維の数が増加した可能性が示唆された。

部分的に神経支配の存在する甲状披裂筋に、移植した頸神経ワナから新たな神経支配がどの程度生じるかは明らかではない。著者は、移植した頸神経ワナが、もともと存在するアセチルコリン受容体および新たに形成されたアセチルコリン受容体の双方に向かって伸長し、異所性神経から伸長した線維が新たな神経筋接合部を形成すると推察した。これは、運動神経が傷害される疾患において、異所性神経を移植することで神経支配が代償され、最終的に部分的な神経支配が確立されるという、一般的に受け入れられた概念である¹⁵。この過程において、移植する神経周囲に存在する瘢痕組織、神経移行に用いる神経線維の数および移植される側の筋線維の変性程度が、神経再支配の程度に影響すると報告されている¹⁶。興味深いことに、移植される側の筋活動電位が必要以上に高い場合、部分的に脱神経された筋線維に対する神経再支配に不可欠な、シュワン細胞の架橋構造形成が抑制され、結果として移植された神経線維からの軸索伸長が抑制されるとの報告がある¹⁷。したがって、移植される側の筋活動電位の上昇が緩やかな場合、移植された頸神経ワナの軸索伸長がある程度促進され、結果として、部分的に神経支配が存在していても、神経再支配の確立が促進されるものと推測した。

9. 結語

組織学的および電気生理学的な検証により、脱神経後、部分的に反回神経支配が存在する甲状披裂筋に対して、神経筋弁移植術を行うことによって、新たな神経支配の確立されることがラット喉頭を用いて確認された。以上より部分的反回神経支配の存在する声帯麻痺患者に対しても神経筋弁移植術が有効な術式であることが示唆された。

10. 参考文献

1. Crumley R. Laryngeal synkinesis revisited. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2000; 109; 365-371.
2. Gacek R. Morphologic correlates for laryngeal reinnervation. *Laryngoscope.* 2001; 111; 1871-1877.
3. Tucker HM. Long-term results of nerve-muscle pedicle reinnervation for laryngeal paralysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1989; 98; 674-676.
4. Kumai Y, Ito T, Udaka N, Yumoto E. Effects of a nerve-muscle pedicle on the denervated rat thyroarytenoid muscle. *Laryngoscope* 2006; 116:1027-1032.
5. Brown M, Ironton R. Sprouting and regression of neuromuscular synapses in partially denervated mammalian muscles. *J Physiol.* 1978; 278; 325-348.
6. Mark R. Selective innervation of muscle. *Br Med Bull.* 1974; 30; 122-125.
7. Miyamaru S, Kumai Y, Ito T, Sanuki T, Yumoto E. Nerve-muscle pedicle implantation facilitates re-innervation of long-term denervated thyroarytenoid muscle in rats. *Acta Otolaryngol.* 2009; 129:1486-1492.
8. Zeale D, Swelstad M, Fortune S, Rodriguez RJ, Chung SM, Valyi-Nagy K, Billante MJ, Billante CR, Garren K. Evoked electromyographic technique for quantitative assessment of the innervation status of laryngeal muscles. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2005; 114; 563-572.
9. Deschenese MR, Will KM, Booth FW, et al. Unlike myofibers, neuromuscular junctions remain stable during prolonged muscle unloading. *J Neurol Sci.* 2003; 210; 5-10.
10. Halum SL. Injection of autologous muscle stem cells (myoblasts) for the treatment of vocal fold paralysis. *Laryngoscope.* 2007; 117; 917-922.
11. Gayle E. Woodson. Spontaneous laryngeal reinnervation after recurrent laryngeal or vagus nerve injury. *Ann Otol Rhino Laryngol.* 2007; 116; 57-65.
12. Tessema B, Roark R, Pitman M, et al. Observations of recurrent laryngeal nerve injury and recovery using a rat model. *Laryngoscope.* 2009; 119; 1644-1651.
13. Mario Buffelli, Giuseppe Busetto, Carlo Bidoia, Morgana Favero, and Alberto Cangiano. Activity-Dependent Synaptic Competition at Mammalian Neuromuscular junctions. *News Physiol Sci* 2003; 19; 85-91.
14. Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 2001; 91; 534-551.
15. Tam S, Gordon T. Neuromuscular activity impairs axonal sprouting in partially denervated muscles by inhibiting bridge formation of perisynaptic Schwann cells. *J*

Neurobiol 2003; 57; 221-234.

16. Sorbie C, Porter TL. Reinnervation of paralysed muscles by direct motor nerve implantation. An experimental study in the dog. *J Bone Joint Surg Br* 1969; 51; 156-164.

17. Tam S, Gordon T. Mechanisms controlling axonal sprouting at the neuromuscular junction. *J Neurocytol.* 2003; 32; 961-974.