

主論文の要旨

**Muscle spindle reinnervation using transplanted
embryonic dorsal root ganglion cells after
peripheral nerve transection in rats**

末梢神経切断後のラットにおける神経細胞移植による
筋紡錘の神経再支配

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
運動・形態外科学講座 手の外科学分野

(指導：平田 仁 教授)

浅野 研一

【緒言】

筋紡錘は骨格筋における proprioceptor であり、伸張反射や協調運動に関与している。末梢神経切断後の骨格筋において筋紡錘の数は減り、形態は劣化することが知られている。一方神経縫合や神経移行などの外科的手技によって骨格筋の再神経支配が起ると筋紡錘は回復する。現在までのところ神経細胞移植による筋紡錘の影響を調べた研究報告はない。本研究では末梢神経切断後に後根神経節細胞移植によって感覚神経線維の回復と骨格筋における筋紡錘への再神経支配を調べることが目的である。

【対象および方法】

8 週齢ラットの坐骨神経を切断し、遠位は脛骨神経と腓骨神経に分離し、近位の神経断端は結紮を行い臀筋内に埋没した。胎生 14 日の胎児から顕微鏡下に後根神経節を採取して(Fig. 1A)、採取した組織を調整して後根神経節細胞を 100 万/10 μ l となるようにした。神経切断後 1 週間してから脛骨神経内に後根神経節細胞の移植を行った(Fig. 1B)。対象は正常群(n=12)・移植なし群(n=12)・移植群(n=12)を設定し、神経細胞移植後 2 か月と 6 か月に評価を行った(Fig. 1C)。組織学的評価は脛骨神経とひらめ筋に行った。脛骨神経においては近位と遠位の二か所に分けて(Fig. 1D)、近位側を移植部の細胞を調べるために、遠位側を神経線維の密度を調べるために使用した。神経線維の密度は Image J software を使用して計算した。下腿三頭筋を採取して腓腹筋とひらめ筋に分け、ひらめ筋の筋湿重量を測定した。ひらめ筋を 100 μ m の厚さで切片に作製し、神経筋接合部と筋紡錘を BZ-9000 microscope と A1Rsi Confocal fluorescence microscopy を使用して評価した。神経筋接合部は α -bungarotoxin を使用して免疫染色によって特定し、筋紡錘は Ca²⁺結合蛋白である calbindin D-28k によって錘内筋と被膜を免疫染色で特定した。統計には一元配置分散分析を用いて、p<0.05 を有意差ありと判断した。

【結果】

移植部の脛骨神経において神経線維と神経細胞体を観察できた(Fig. 2A、B)。脛骨神経の遠位部において移植群は移植なし群に比べて移植後 6 か月で有意に神経線維の改善を認めた(正常群:125、移植なし群:0、移植群:77/10000 μ m²) (Fig. 3)。ひらめ筋の筋湿重量は 3 群間で有意差を認めず、移植群では神経筋接合部においてほとんど再支配は認めなかった(Fig. 4)。Calbindin D-28k 陽性の筋紡錘数は移植後 2 か月で移植なし群・移植群共に有意に減少したが、移植群では神経の再支配と染色性の維持を認めた(正常群:17、移植なし群:10、移植群:11) (Fig. 5)。移植後 6 か月で移植なし群では calbindin D-28k 陽性の筋紡錘は消失したのに対して移植群では認めた(正常群:18、移植なし群:0、移植群:4.3) (Fig. 6 A、B)。また移植群での再生神経の形態は non-spiral なものが多かったが、一部に spiral なものを認めた(Fig. 6C)。

【考察】

本研究では後根神経節細胞移植によって感覚神経線維の回復と骨格筋における筋紡錘への神経再生を示した。さらに錘内筋線維の calbindin D-28k への染色性は移植群において神経切断後 6 か月で維持されていた。筋紡錘は歩行中の姿勢保持とバランスに重要な役割をしており、末梢神経損傷に伴って構造的変化が起こることが知られている。脱神経後にはほとんどすべての筋紡錘は委縮し、最終的には消失する。しかし、筋肉の再神経支配が起こると筋紡錘の数と形態的な劣化は改善する。筋紡錘の再生はその被膜と錘内筋の生存に依存している。筋紡錘は γ 運動神経と I a・II 感覚神経によって支配を受けている。 γ 運動神経は筋紡錘の形成に関与することが考えられるが、ラットの新生児期において筋紡錘の形成や分化に運動神経は必須ではないという報告もある。本研究において、後根神経節細胞のみの移植によって脱神経後の筋紡錘の形態を維持することができた。

筋紡錘の形態変化に関して、末梢神経損傷や下肢の非荷重や年齢の影響が報告されており、神経修復後には筋紡錘への神経は先細ったものや不規則な形をとるとされている。加齢ラットの筋紡錘への神経は spiral なものが減り、non-spiral な形態をとることが知られている。また糖尿病マウスの筋紡錘においても不規則な神経支配となることが報告されている。本研究において、神経細胞移植後のラットの多くの筋紡錘も同様に non-spiral で不規則な形態を示した。

Calbindin D-28k はビタミン D 依存性の Ca^{2+} 結合蛋白であり、細胞内の Ca^{2+} の恒常性の維持に重要な役割をはたしている。Calbindin D-28k への染色性は中枢・末梢神経や腎臓・膵臓で報告されている。さらに網膜における cones and horizontal cells、内耳における cochlear and vestibular hair cells と筋紡錘の被膜と錘内筋などの感覚経路において報告されている。筋紡錘における錘内筋線維の calbindin D-28k への染色性は脱神経後 1 か月で減少し、2 か月すると消失することが知られている。本研究では一部の筋紡錘は再神経支配され、錘内筋線維の calbindin D-28k への染色性は移植群において神経切断後 6 か月において維持されていた。

長期の脱神経後の骨格筋において、運動神経の回復に先行して感覚神経を回復させることで機能回復が良いことが報告されている。運動神経の修復と後根神経節細胞移植を組み合わせることによって、骨格筋の機能改善が期待される。また腕神経叢麻痺患者では筋紡錘への感覚神経線維を維持することにより筋肉の拘縮が減ることが分かっており、後根神経節細胞移植によって筋紡錘の感覚神経線維を再支配することで拘縮への治療となる可能性がある。

【結語】

神経細胞移植による治療は骨格筋における機械的な感覚機能を調整するための選択的標的として役立つ可能性がある。