

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

喉頭 (2009.06) 21巻1号:1～5.

機能的電気刺激による神経筋接合部の変化についての検討

野村研一郎, 片田彰博, 國部勇, 太田亮, 原湊保明

機能的電気刺激による神経筋接合部の変化についての検討

野村 研一郎・片田 彰博・國部 勇・太田 亮
原 潤 保 明

Effects of Electrical Stimulation on Neuromuscular Junctions in Denervated Muscles

Kenichiro Nomura, Akihiro Katada, Isamu Kunibe,
Ryo Ota and Yasuaki Harabuchi

Functional electrical stimulation (FES) has been proposed as a potential treatment for restoring the motor functions of denervated motor systems. Furthermore, FES on denervated muscle has the potential to prevent muscle atrophy and promote reinnervation.

In this study, to assess these effects of FES, we evaluated what kind of changes occurred in neuromuscular junctions (NMJ) by FES to muscle after denervation. Tibialis anterior muscles of rats were used for this study. A sciatic nerve anastomosis was performed after having cut off the nerve. We applied electric stimulation (2Hz, 0.5ms, 4.0mA) three days a week to the rats. Electric stimulation was performed using surface electrode percutaneously for an hour. The rats were euthanized 2, 4 or 8 weeks after treatment. To evaluate the number of axon nerve terminals and acetylcholine receptors (AChRs), synaptic vesicles of the nerve endings were labeled using antisynaptophysin antibody and AChRs were labeled by α -Bungarotoxin. We analyzed the effects of FES by counting the number of AChRs and axon nerve terminals. The number of AChRs decreased slightly after denervation for the group that did not receive electrical stimulation; whereas, the group that did have electrical stimulation to the denervated muscles increased the number of AChRs. After denervation the number of nerve terminals decreased at once and gradually increased according to completion of reinnervation. Electrical stimulation promoted regenerating nerve terminals during the reinnervation process. From the results of this study, we confirmed that electrical stimulation promoted regenerating NMJ during reinnervation process.

Key words: 反回神経麻痺, 筋萎縮, 機能的電気刺激, 神経筋接合部

はじめに

反回神経麻痺による喉頭の運動機能の障害は、脱神経によって内喉頭筋が収縮しなくなることに起因する。一般的に末梢神経は中枢神経と異なり神経再生が旺盛であるため、支配神経が切断されたとしても、切断部位で神経吻合をおこなうことによって神経の再支配を誘導することが可能である。そのため、腫瘍の切除などのために反回神経が切断された場合には、その後の内喉頭筋の神経再支配を期待し、神経吻合や筋弁移植などが行われている。この再支配は筋の廃用性萎縮を防ぐことに有効であるとの報告があるものの、運動機能の回復については満足できる結果が得られないことが多い。その原因として内喉頭筋の神経再支配は作用の異なる声門開大筋と声門閉鎖筋のそれぞれに選択的に起こるわけではなく、作用の異なる筋に選択性のない過誤支配が生じることが挙げられる。

近年、脱神経により麻痺した筋に微小電気刺激を加え筋収縮させることで失われた運動機能の回復を図る機能的電気刺激 (functional electrical stimulation: FES) が注

目されており、脳梗塞や脊髄損傷後の運動機能の回復に応用されつつある。我々はこれまで麻痺している喉頭の運動機能を回復させる治療法の一つとして FES が応用可能であるか検討を行ってきた^{1, 2)}。その結果、実験動物のレベルでは、反回神経切断後の喉頭に電気刺激を用いて声門開大運動や声門閉鎖運動を誘発することができ、呼吸機能や発声機能が改善することが確認されている²⁾。また、Zealearらは、反回神経を切断し再吻合した後に、後輪状披裂筋を電気刺激し続けることで、単に声門開大運動を誘発するだけではなく、筋の萎縮を抑制し、さらに選択的な筋の神経再支配が誘導されることを報告した³⁾。これは脱神経後の筋に加える電気刺激が FES として運動機能を回復させるだけでなく、筋萎縮抑制、神経再支配の誘導にも有効的な治療手段となる可能性を示唆するものである。しかし電気刺激が筋の神経再支配に及ぼす影響についてはまだまだ不明な点が多く、神経再支配の選択性のみならず、再支配を促進するのか否かについても多くの議論があるところである。今回我々は、脱神経後の筋に加えた電気刺激が神経再支配にどのような影響を及ぼすのか明らかにする

ために、ラットの下肢をモデルとして、神経切断後に吻合を行い、筋の再支配を誘導する際に、再支配を受ける筋に電気刺激を加え続けることによって、筋線維や再生する神経終末にどのような変化が生じるのか解析した。

方 法

実験には成ラット (Sprague-Dawley rat 250~300g, 51頭) を用いた。動物モデルは以下の3群を作成した。1) 神経切断群, 19頭 (以下切断群と略す), 2) 神経切断後に再吻合を行う群, 17頭 (以下再吻合群と略す), 3) 再吻合後に機能的電気刺激を加える群, 15頭 (以下刺激群と略す) の3群である。ラットはペントバルビタール腹腔内投与にて麻酔後、右臀部に皮膚切開を加え右坐骨神経を露出した。切断群は、右坐骨神経を切断後に再吻合を防ぐ為に両端を4-0絹糸にて結紮した。再吻合群は、神経切断後即時に顕微鏡下で9-0ナイロンを用いて神経上膜を縫合した。刺激群は、神経吻合後、同日よりペントバルビタール腹腔内投与での麻酔下で、表面電極を用いて、吻合部より尾側の下腿部に、振幅4.0mA, 持続時間0.5ms, 頻度2Hzの電気刺激を1回1時間、週に3日行った。それぞれの群とも神経切断後から2週後, 4週後, 8週後にペントバルビタール深麻酔下に両側の前脛骨筋を摘出した。筋肉はイソペンタンと液体窒素を用いて凍結処理した後に、筋の中央部で筋線維にほぼ直行する方向で厚さ8 μ mの切片を作成した。筋線維の観察の為にヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡下で連続した2枚の切片で10倍視野 (0.145mm²) をそれぞれ一枚ずつ撮影した。解析には画像解析ソフト (Adobe Photoshop, Image J) を用い撮影した2枚の画像内に存在する筋線維数と平均の筋線維断面積を求めた。また同一個体の左側 (無処置側) の筋も同様に解析を行い、それぞれの個体について無処置側の平均断面積を100%とした処置側の相対値を算出した。

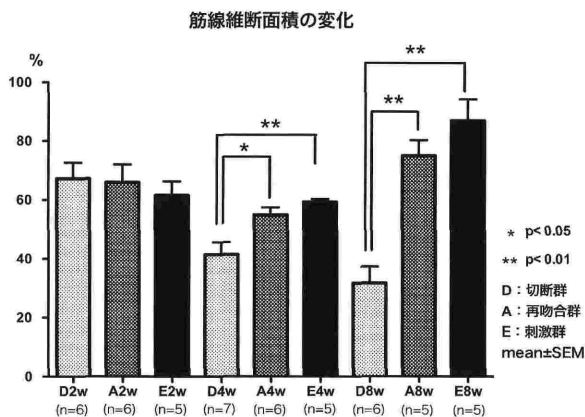


図1 各群での脱神経2週後 (2w), 4週後 (4w), 8週後 (8w) における処置側の筋線維断面積を無処置側と比較した値 (処置側/無処置側) の変化。4週後, 8週後の切断群と比較して、それぞれ同週の再吻合群, 刺激群で有意差を認めた。 (unpaired t test)

神経終末とアセチルコリン受容体の観察には蛍光2重染色法を用いた。神経終末に対しては、Fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識した神経終末に存在するシナプス小胞の膜蛋白に対する抗体である抗Synaptophysin抗体 (PROGEN) を用いた。アセチルコリン受容体に対しては、Rhodamine で標識したアセチルコリン受容体に高い親和性をもつヘビ毒素である α -Bungarotoxin (Sigma) を用いた。連続した切片4枚で蛍光顕微鏡下に切片全体に存在するアセチルコリン受容体数, 神経終末数を数え, その平均値を求めた。個体により切片面積, 筋線維数が異なるため筋線維数当たりの値を算出し検討を行った。

結 果

1. 筋線維断面積の変化

2週後には3群とも健側に比較して60%程度の断面積の減少を認めた。切断群では4週後には42%, 8週後には32%とさらなる減少を認めた。一方で再吻合群と刺激群では4週後から回復傾向を認め、それぞれ55%, 59%と両者とも切断群と比較して有意な回復を認めた。8週後には更なる回復を認め再吻合群で75%, 刺激群では87%と健側に近い回復を認め両者とも切断群と比較して統計的に有意差を認めた。4週後, 8週後において刺激群は再吻合群と比較し高い値であったが統計的な有意差は認めなかった (図1)。また筋全体での筋線維数は各群間において差は認めず, 10倍視野内の筋線維数は筋萎縮により増加, 筋線維断面積の回復により減少を認めた。

2. アセチルコリン受容体数

2週後では切断群, 再吻合群とも減少を認めたが, 刺激群では減少すること無く逆に受容体数の有意な増加を認めた。再吻合群は4週後には増加に転じるものの, 8週後になると4週後と変化は認めなかった。一方で刺激群では4週後から8週後までに更なる増加傾向を認めたが, 有意差は認めなかった (図2)。

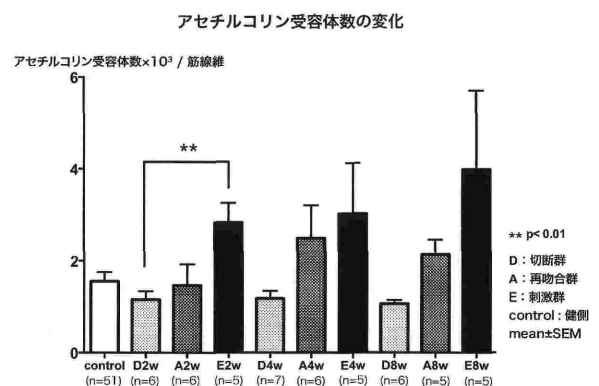


図2 処置側の筋線維あたりのアセチルコリン受容体数の変化。2週後の刺激群で切断群と比較して有意に高値であった。 (unpaired t test)

3. 神経終末数

2 週後では全ての群において神経終末の存在を認めず、4 週後から再吻合群、刺激群ともに神経再生を認めた。8 週後ではそれぞれさらに増加を認め、有意差はないものの刺激群は再吻合群と比較してより多くの神経終末が再生する傾向を認めた (図 3)。

4. 神経筋接合部数

筋の神経再支配が完了し、再び筋収縮が誘発されるためには、筋に存在するアセチルコリン受容体と、再生した神経終末が接着し、新たな神経筋接合部が形成されることが必要である。そこでアセチルコリン受容体全体のなかで、神経終末と接着し神経筋接合部を形成している割合を算出した。4 週後のアセチルコリン受容体のうち再吻合群では 18%、刺激群では 33% に神経筋接合部の形成を認め、8 週後ではそれぞれ 74%、81% とさらなる増加を認めた。刺激群は再吻合群と比較して高い数値を認めたが統計学的有意差を認めるには至らなかった (図 4)。

考 察

喉頭は呼吸、気道反射、嚥下、発声などの多彩な機能に関係する。一側性の反回神経麻痺では一般的に呼吸障害などの生命に直結する症状は出現しないものの、患者の QOL に関連した発声機能障害が問題となる。さらには両側性の反回神経麻痺では呼吸障害が一番の問題となり、気管切開、声帯切除術等の発声機能を犠牲にした治療を選択せざるを得ない場合もある。近年、様々な神経の障害による機能障害に対して、機能的電気刺激 (functional electrical stimulation: FES) を用いた機能回復の試みが注目されている。耳鼻咽喉科領域での機能回復の手法としては、聴覚機能を回復させる人工内耳がすでに一般的な手技として確立している。さらに、FES は感覚機能補助のみならず、運動機能補助に関しても応用され、耳鼻咽喉科領域では、顔面神経麻痺や反回神経麻痺に対する運動機能回復への応用が検討されている。反回神経麻痺に対する FES では両側反回神経麻痺により呼吸障害を起こした患者の一侧の後輪状披裂筋に FES を加える喉頭ペーシングの手技により、声門を一定のサイクルで開大させ、気管孔の閉鎖が可能になった症例の報告もされている^{4, 5)}。また最近ではイヌを用いた実験で、内喉頭筋の刺激に適した小さな電極を用いた両側の喉頭ペーシングによって、より効率的な声門開大運動を誘発することが可能となったことが報告されている⁶⁾。

一方で FES は、失われた運動機能を回復させるだけではなく、脱神経後の筋に加える電気刺激の効果により、筋の萎縮性変化を抑制することや^{7, 8)}、神経再支配を促進する可能性があることにも注目されている^{3, 9, 10)}。これは、脱神経後の筋に加える電気刺激が FES として運動機能を回復させるばかりではなく、筋萎縮抑制、神経再支配にも有効的な治療手段となる可能性を示唆するものである。そこで今回我々は、FES が特に神経再支配に与える影響に関して注目し、ラットの下肢を用いて坐骨神経切断後に吻合を行った筋に電気刺激を加え、筋線維の形態変化と神経筋接合部の変化の検討を行った。

以前に我々は筋線維の変化に関してラットの喉頭を用いて、脱神経後の甲状披裂筋に FES を加えることで筋萎縮性変化を抑制することが可能であること明らかにしている¹⁾。また Zealear らは、イヌの後輪状披裂筋に長期間 FES を加えつづけることで筋萎縮が抑制できたことを報告している⁸⁾。今回のラットの下肢を用いた実験でも、電気刺激を加えた刺激群は、2 週間後には一時健側の約 60% 程度に筋線維の萎縮を認めるものの、その後回復し 8 週後には健側とほぼ同様の値を示した。電気刺激が筋萎縮抑制の効果があることが再確認される結果であったが、さらに効果的な結果を得るためには、刺激パラメータや刺激を与える時間、時期、期間などについてはより詳細な検討が必要であると考えられた。

今回は、さらに電気刺激が神経筋接合部の再形成に与え

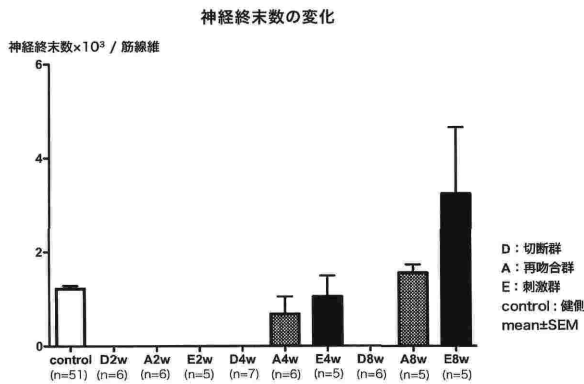


図 3 処置側の筋線維あたりの神経終末数の変化
4 週後から再吻合群、刺激群において神経再生を認めた。刺激群は再吻合群と比較してより多くの神経終末が再生する傾向を認めた。

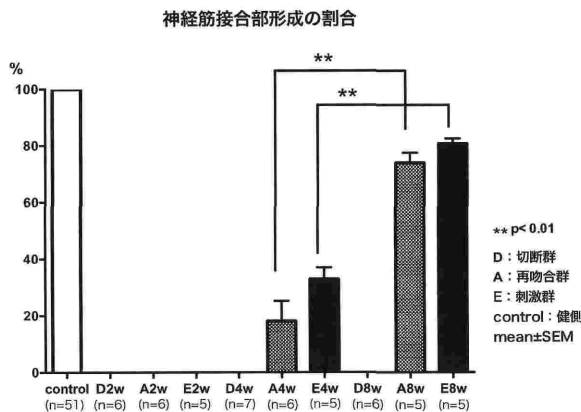


図 4 処置側のアセチルコリン受容体に対する神経終末数の割合の変化
8 週後の再吻合群、刺激群はそれぞれ 4 週後の同群と比較して有意に高値であった。(unpaired t test)

る影響についても検討をおこなった。神経筋接合部は節前である神経終末と節後のアセチルコリン受容体で形成される。ラットのヒラメ筋を用いた実験¹¹⁾では、アセチルコリン受容体数は脱神経後、約10日後から減少し約2ヶ月で半減するが、脱神経直後より100Hzの電気刺激を加える事で、その数を減少させる事無く維持されたことが報告されている。今回の実験では、電気刺激の条件が異なるものの、刺激群で2週後、4週後、8週後と徐々に増加傾向を認めた。アセチルコリン受容体の発現の制御の一つとして、伸張してくる神経終末自身より神経放出因子 (Neural Agrin) が分泌され、脱神経後に不安定な状態となったアセチルコリン受容体が凝集し、新たな安定化したアセチルコリン受容体を形成することが報告されている¹²⁾。しかし脱神経後に神経終末は48時間程度で急速に消失することが知られており¹³⁾、少なくともこの脱神経後48時間の時点から神経再支配が起こるまでの期間には、神経終末由来の神経放出因子以外の制御機構が働いていると推察される。近年、筋細胞の側にもアセチルコリン受容体の発現を制御している MuSK (Muscle Specific Kinase) が存在することが注目されている。Kim らは、神経放出因子の存在しない状態では、MuSK がアセチルコリン受容体の発現を制御し、神経再支配を誘導することを報告している¹⁴⁾。今後、脱神経後に筋に加える電気刺激が MuSK に与える影響についての詳細な検討が必要であると思われる。

神経筋接合部の節前である神経終末に関して、現在までに FES が脱神経後の神経再生に与える影響に関してさまざまな検討がなされている。しかし神経再支配を促進する報告がある一方で⁹⁾、再支配を阻害する報告もあり^{8, 15)}依然として議論のあるところである。今回の検討では、刺激群では、2週間後では他の群と同様に神経終末の存在を認めず、再支配に要する時間が短縮されているとは考えにくい結果であった。しかし4週後、8週後には再吻合群と比較し、その数が増加しており、神経再生が促進されている傾向を認めた。神経再支配を促進するとの報告のなかには分子生物学的手法により詳しい解析がなされているものもあり、ラットの大腿神経を脱神経直後に1時間のみ40Hzの電気刺激を加えることにより、神経栄養因子の一つである BDNF (brain-derived neurotrophic factor) の発現が増加するとの報告もある¹⁶⁾。また脱神経後の筋線維に残存しているアセチルコリン受容体に向かって神経再支配が進んでいくという報告もあり¹²⁾、脱神経後の FES によってアセチルコリン受容体がより高率に維持されることが神経再支配を促進している可能性も考えられる。

アセチルコリン受容体に再生した神経終末が結合した状態で形成される神経筋接合部の割合は、有意ではないものの刺激群の方が再吻合群より高い値を示していた。これは脱神経後に筋に加える電気刺激が神経再支配に促進的に働くことを示しているものと考えられ、速やかな再支配の確率を誘導する手段として有効である可能性を示唆するものであった。しかし電気刺激に用いる周波数、強度、刺激期

間など刺激手段の変化が再支配にどのように影響を与えるのか、またより分子生物学的な詳細な基礎的研究を行うことで、今後さらに良好な結果を得ることが可能と思われ、今後の更なる検討が必要である。

ま と め

脱神経後の筋に加える機能的電気刺激による神経筋接合部の変化についての検討を、ラットの下肢をモデルとして免疫組織学的手法にて検討した。アセチルコリン受容体数、神経終末ともに刺激を加えた群で、神経吻合のみを行った群と比較して高い傾向を認めた。機能的電気刺激が機能回復、筋萎縮抑制のみならず、神経再支配の誘導にも効果的に働き、この点においても治療手段として有効である可能性を示唆するものであった。

本論文の要旨は、第20回日本喉頭科学会学術講演会(佐賀)にて口演した。

文 献

- 1) 片田彰博, 野中 聡, 國部 勇ほか: 脱神経後の内喉頭筋萎縮に対する機能的電気刺激の効果. 日気食会報 54: 270~276, 2003.
- 2) Katada A, Nonaka S, Adachi M et al: Functional electrical stimulation of laryngeal adductor muscle restores mobility of vocal fold and improves voice sounds in cats with unilateral laryngeal paralysis. *Neurosci Res* 50: 153~159, 2004.
- 3) Zealear DL, Rodriguez RJ, Kenny T et al: Electrical stimulation of a denervated muscle promotes selective reinnervation by native over foreign motoneurons. *J Neurophysiol* 87: 2195~2199, 2002.
- 4) Zealear DL, Rainey CL, Herzon GD et al: Electrical pacing of the paralyzed human larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 105: 689~693, 1996.
- 5) Zealear DL, Swelstad MR, Sant'Anna GD et al: Determination of the optimal conditions for laryngeal pacing with the Itrel II implantable stimulator. *Otolaryngol Head Neck Surg* 125: 183~192, 2001.
- 6) Katada A, Van Himbergen D, Kunibe I et al: Evaluation of a deep brain stimulation electrode for laryngeal pacing. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 117: 621~629, 2008.
- 7) Kidd GL: Electrical stimulation for disuse muscle atrophy. *Lancet* 2: 1025, 1988.
- 8) Zealear DL, Billante CR, Chongkolwatana C et al: The effects of chronic electrical stimulation

- on laryngeal muscle physiology and histochemistry. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 62 : 81~86, 2000.
- 9) Al-Majed AA, Neumann CM, Brushart TM et al : Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *J Neurosci* 20 : 2602~2608, 2000.
- 10) Brushart TM, Hoffman PN, Royall RM et al : Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron. *J Neurosci* 22 : 6631~6638, 2002.
- 11) Andreose JS, Fumagalli G, Lomo T : Number of junctional acetylcholine receptors: control by neural and muscular influences in the rat. *J Physiol* 483(Pt 2) : 397~406, 1995.
- 12) Nguyen QT, Sanes JR, Lichtman JW : Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nat Neurosci* 5 : 861~867, 2002.
- 13) Winlow W, Usherwood PN : Ultrastructural studies of normal and degenerating mouse neuromuscular junctions. *J Neurocytol* 4 : 377~394, 1975.
- 14) Kim N, Burden SJ : MuSK controls where motor axons grow and form synapses. *Nat Neurosci* 11 : 19~27, 2008.
- 15) Zeale DL, Billante CL, Chongkolwatana C et al : The effects of chronic electrical stimulation on laryngeal muscle reinnervation. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 62 : 87~95, 2000.
- 16) Al-Majed AA, Brushart TM, Gordon T : Electrical stimulation accelerates and increases expression of BDNF and trkB mRNA in regenerating rat femoral motoneurons. *Eur J Neurosci* 12 : 4381~4390, 2000.
-

別刷請求先 〒078-8510 北海道旭川市緑が丘東2条
1丁目1番1号

旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室
野村研一郎