

脱神経期間に着目した末梢神経損傷後の
運動介入の効果に関する研究

埼玉県立大学大学院
保健医療福祉学研究科
博士論文（要約）

2023年3月

学籍番号 2291004

峯岸 雄基

目次

要旨

1. 略語一覧	1
2. 序論	3
3. 研究Ⅰ：脱神経期間の異なる坐骨神経圧挫モデルに対する運動介入が運動機能回復に及ぼす影響	11
4. 研究Ⅱ：末梢神経損傷後の運動機能回復促進に寄与する電気生理学的および分子生物学的要因の検討	23
5. 総合的考察	43
6. 研究限界と今後の展望	46
7. 結語	48
8. 謝辞	49

要旨

末梢神経は中枢神経系とは異なり、損傷後に旺盛な神経再生が生じることは広く知られているが、運動機能が完全に回復することは稀である。特に四肢近位部の神経損傷後は、一般的に転帰不良であり、運動機能障害が長期的に残存する。末梢神経再生に対する理学療法研究は古くから行われてきたが、末梢神経の再生促進を目的として臨床応用されているものは未だ存在しない。臨床場面における末梢神経損傷後の理学療法介入は、二次的障害予防のための関節可動域運動や装具作製、電気刺激などが治療の中心となっている。本邦における末梢神経障害の患者数は推定 1000 万人にのぼるとされ、末梢神経損傷者に対する効果的な理学療法戦略の確立が求められている。

末梢神経損傷後の神経学的変化として、Seddon 分類における Axonotmesis や Neurotmesis が生じると、損傷部位より遠位の軸索や髄鞘では Waller 変性が生じ、支配領域にある骨格筋は脱神経状態となる。損傷軸索は旺盛な再生能を有するものの、神経筋接合部

(Neuromuscular junction: NMJ) における再神経支配の割合の低下や伝達不全が生じ、神経と筋における接続性が運動機能回復を阻害する要因の一つとなる。また、損傷部位より近位に位置する脊髄神経回路においては、運動ニューロンと近位樹状突起に投射している神経終末を引き剥がす現象である Synaptic stripping が生じ、筋紡錘から運動ニューロンへ投射する一次求心性ニューロン終末は、神経と筋の再接続が得られた後でさえ引き剥がされたままとなる。この一次求心性ニューロンの撤退も、運動機能回復の低下に大きく関与している。

齧歯類を用いた基礎研究において、末梢神経損傷後の機能回復を促進するために神経活動依存的治療が広く使用されてきた。その中でも運動

療法として、トレッドミル運動の効果は諸家により報告され、適度な負荷量（低負荷から中負荷の運動強度）で適切な時期（神経損傷後早期）から運動介入をすることが、神経再生や機能的回復に有効であることは明らかとなっている。末梢神経損傷後に運動機能障害が残存する要因として、再生軸索が標的器官に到達するまでの脱神経期間の長さが、神経損傷後の運動機能回復を規定する重要な要因と考えられている。しかし、運動開始までの脱神経期間の長さの違いが運動機能回復に及ぼす影響を比較検討した報告はない。

本研究の仮説として、坐骨神経圧挫モデルに対するトレッドミル運動の効果として、運動開始までの脱神経期間の長さの違いが損傷後の運動機能回復に大きく影響し、その差異には損傷部位より末梢に位置するNMJの接続性と、中枢に位置する脊髄神経回路の可塑的变化が大きく関与するのではないかと設定した。本研究では、脱神経期間の異なる坐骨神経圧挫モデルを作製し、運動開始までの脱神経期間の長さの違いが運動機能回復に及ぼす影響を、NMJにおける再神経支配と脊髄神経回路の組織学的連結性との関係性とともを検証した（研究Ⅰ）。また、運動介入により運動機能回復が促進する要因を明らかにするために、電気生理学解析や分子生物学的解析を用いて検証した（研究Ⅱ）。

研究Ⅰの結果として、坐骨神経軸索断裂後は、運動開始までの脱神経期間の長さにかかわらず、運動介入は運動機能回復を促進した。研究Ⅱの結果として、運動開始までの脱神経期間の長さにかかわらず、運動介入はNMJの再神経支配を促進した。また、運動介入は運動終板の形態学的変化を抑制し、神経筋伝達効率を改善することで運動機能回復の促進に寄与した。運動ニューロンと一次求心性ニューロンとの再接続に関しては、運動開始までの脱神経期間が短い場合はシナプス被覆率が増加

したが、運動開始までの脱神経期間を延長した場合、運動の有無に関わらず減少したままであった。以上のことから、運動開始までの脱神経期間が短い場合、損傷部位より末梢に位置する NMJ の機能的回復と中枢に位置する脊髄神経回路の可塑的変化が互いに関連して、運動機能回復の促進に寄与した。一方、運動開始までの脱神経期間が長い場合、一次求心性ニューロンは運動ニューロンから撤退したままであり、損傷部位より末梢に位置する NMJ の機能的回復が運動機能回復の促進に寄与した。

本研究の最も重要な新規性は、末梢神経軸索断裂後の脱神経期間の長さにより、損傷部位より末梢に位置する NMJ と中枢に位置する脊髄神経回路では、**Therapeutic time window**（疾患に対する治療法が限られた時間内で有効な場合のその許容時間）がそれぞれ異なることを示した点である。そのため、運動開始までの脱神経期間の長さに応じて、理学療法戦略を決定することが末梢神経損傷後の運動機能回復を促進するために重要である。また、本研究結果は、予後不良要因である罹病期間や手術待機時間の長い術後患者に対して、運動介入（リハビリテーション介入）により機能回復を促進し得る可能性を有している。したがって、本研究結果により、末梢神経損傷者に対する理学療法戦略の構築に向けた、運動療法の有効性の意義確立の一助となる基礎的データを提供できると考える。

1. 略語一覧

本章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

本章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

2. 序論

2.1. 末梢神経損傷の概要

末梢神経損傷は、外傷や圧迫、牽引、絞扼などの物理的要因や、糖尿病や感染性疾患、腫瘍、血行不全などの疾病を原因として生じ、運動機能および感覚機能の喪失、疼痛、異常感覚、筋萎縮など神経の構成内容や損傷状態により多種多様な臨床症状を呈する。一般人口の 2.4%、55 歳以上の 8.0%が何らかの末梢神経障害を有すると報告し、本邦における末梢神経障害の患者数は、推定 1000 万人にのぼるとされている。末梢神経再生に対する理学療法研究は古くから行われてきたが、末梢神経の再生促進を目的として臨床応用されているものは未だ存在しないことが現状である。臨床場面における末梢神経損傷後の理学療法介入は、二次的障害予防のための関節可動域運動や装具作製、電気刺激などが治療の中心となっている。そのため、末梢神経損傷者に対する効果的な理学療法戦略の確立が求められている。

2.2. 末梢神経系の構造と機能

末梢神経の軸索は、神経細胞の突起であり、その軸索径は有髄神経で 2~10 数 μm である。数千本の軸索が神経周膜に包まれて神経束を形成し、1~数本の神経束が神経上膜に囲まれて末梢神経を構成している。神経周膜は強靱な結合組織で **mechanical barrier** として神経を保護するとともに内圧を一定に保っている。また、固有の透過性を持ち **diffusion barrier** として神経束内の環境を維持している。末梢神経の機能的役割として、興奮の伝達と軸索輸送を有する。前者の機能では、末梢の感覚情報は感覚神経を介して中枢神経系に伝わり、中枢神経系からの指令は運動神経または交感神経を介して末梢の組織・器官系へ伝える伝導路の

役割を担っている。後者の機能では、細胞体で生成される神経興奮物質、ミトコンドリアや軸索の形態を維持する微小管などを末梢に輸送し、軸索の形態と機能を維持する。さらに、軸索輸送により神経終末に輸送される神経向性因子により筋や感覚受容器の形態を維持する。

身体の運動は、大脳皮質や末梢からの刺激が運動ニューロンを介して伝達され、骨格筋の収縮により引き起こされる。この骨格筋の収縮は、脊髄前角にある運動ニューロンの最先端になる神経終末と、骨格筋を結ぶ唯一のシナプスである神経筋接合部（Neuromuscular junction: 以下 NMJ）を介して制御されている。前シナプス部位である運動ニューロンの神経終末から神経伝達物質であるアセチルコリン（Acetylcholine: 以下 ACh）が放出され、後シナプス部位に存在するニコチン性のアセチルコリン受容体（Acetylcholine receptor: 以下 AChR）に結合することによって骨格筋の収縮が誘導される。神経終末は、運動終板（Motor end plate: 以下 MEP）とよばれる筋膜上の特殊な部位と繋がっている。運動ニューロンによる筋収縮の効率的な制御には、この MEP における AChR の高度な凝集が必須である。

本文章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

本文章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

運動の指令を伝達する運動ニューロンの細胞体は、脊髓前角に位置し、多くのニューロンの入力を受ける。運動ニューロンへの重要な入力の1つは、Ia群の求心性ニューロンと、より少ない程度ではあるがII群の求心性ニューロンから生じ、筋の長さやダイナミクスを知らせ、それぞれ筋紡錘の一次終末と二次終末を支配している。Ia求心性ニューロンは脊髓灰白質のLamina V/VI領域、VII領域、IX領域に投射し、異なる種類の介在ニューロンや運動ニューロンに対してシナプスを形成する。Lamina IX領域では、Ia求心性ニューロンが高密度なシナプスアーバーを形成し、同名運動ニューロンプール内のほとんどの運動ニューロン（90%以上）と機能的に接続し、伸張反射の基礎を形成している。

2.3. 末梢神経損傷後に生じる神経学的変化

末梢神経損傷の分類は、一般的にSeddon分類とSunderland分類が用いられる。Seddonは、1本の神経線維に着目し、損傷の程度を3つに分類した。Sunderlandは、1本の神経幹と神経束や神経を取り巻く内膜、周膜、外膜の損傷程度によってI～V度までの5つに分類した。Seddon分類における一過性神経伝導障害（Neurapraxia）は、Sunderland分類のI度に該当し、髄鞘のごく一部に軽度の異常はあるが、軸索の断裂を伴わない一過性の伝導障害である。Seddon分類における軸索断裂（以下Axonotmesis）は、Sunderland分類のII度、III度に該当する。軸索の断裂によりWaller変性を生じるが、シュワン管や神経周膜の連続性は保たれているため、損傷近位部から再生軸索の伸長が開始し、元の標的器官へ到達する。Seddon分類における神経断裂（以下

Neurotmesis) は、Sunderland 分類のIV度、V度に該当する。軸索、髄鞘、シュワン細胞、神経周膜の全ての構造体の連続性が断たれた状態で、神経の自然回復は期待できず、神経縫合術や神経移植術が適用となる。神経縫合術や神経移植術を行うと、神経伸長過程において、間違っただ標的器官へ到達する可能性があり、手術後にはある程度の過誤神経支配が不可避となる。

損傷部位より遠位に位置する神経学的変化として、Seddon 分類における Axonotmesis や Neurotmesis が生じると、損傷部位より遠位の軸索や髄鞘では Waller 変性が生じ、支配領域にある骨格筋は脱神経状態となる。脱神経筋では、神経支配が失われたことに伴う筋萎縮や線維化、筋線維タイプ変化といった変性が生じる。また、末梢神経は損傷後に旺盛な軸索再生能を有するものの、NMJ における再神経支配の割合の低下や伝達不全が生じ、神経と筋における接続性が運動機能回復を阻害する要因の一つとなる。

また、損傷部位より近位に位置する脊髄神経回路においても、末梢神経損傷に伴う変化が生じる。脊髄前角に位置する運動ニューロンには、多くの興奮性および抑制性ニューロンが接続する。末梢神経損傷後は、軸索が切断された運動ニューロンと近位樹状突起に投射している神経終末を引き剥がす現象である Synaptic stripping が、興奮性シナプスおよび抑制性シナプスを含むシナプス入力約半数で生じる。これらの多くの入力は、軸索切断後 3~6 ヶ月で自然回復するものの、筋紡錘から運動ニューロンへ投射する Ia 求心性ニューロン終末のシナプスマーカーである小胞型グルタミン酸トランスポーター1 (Vesicular glutamate transporter 1: 以下 VGLUT1) は、末梢において神経と筋の再接続が得られた後でさえ Synaptic stripping が生じたままである。この運動ニュー

ーロンからの Ia 求心性ニューロン終末の Synaptic stripping は、機能障害 (Impairment) レベルとしては、末梢神経損傷後の伸張反射の喪失に寄与する重要な要因であると考えられている。また、能力障害 (Disability) レベルとして、神経損傷後に生じる歩行中の関節間協調性の喪失は、筋紡錘からの固有受容性フィードバックの喪失と一致すると報告されている。したがって、運動ニューロンからの Ia 求心性ニューロン終末の Synaptic stripping は、臨床場面で認められる運動機能回復の低下に大きく関与していると考えられる。

2.4. 末梢神経損傷後の運動機能障害の残存要因

末梢神経は中枢神経系とは異なり、損傷後に旺盛な神経再生が生じることが広く知られている。しかしながら、ヒトの四肢近位部での神経損傷後は転帰不良であり、運動機能障害が長期的に残存する。ヒトの回復過程は、数週間以内に自然回復する神経再生研究の標準的モデルである齧歯類の坐骨神経圧挫モデルに比べ対照的である。

この要因は、脱神経期間の延長と軸索の損傷程度に大別される。ヒト運動ニューロンの軸索は、齧歯類と同様の 1-3mm/日の再生速度であるにも関わらず、齧歯類よりも長い距離を再生して、標的器官である NMJ に到達する必要がある。これは再神経支配までの脱神経期間が長いことを意味している。先行研究で、支配筋の完全脱神経を伴う手根管症候群と肘部管症候群の両患者において、症状発現から手術までの期間が短いほど、運動機能回復の程度が高いことを報告されている。したがって、脱神経期間の長さは、神経損傷後の運動機能回復を規定する重要な要因であるといえる。後者の要因としては、前述の通り、Seddon 分類における Neurotmesis は、全ての神経構造体の連続性が断たれた状態で、神経

の自然回復は期待できず、神経縫合術や神経移植術が適用となる。神経縫合術や神経移植術を行うと、神経伸長過程において間違った標的器官へ到達する可能性があり、外科的修復後はある程度の過誤神経支配が不可避となる。この標的特異性のない神経再生により生じる過誤神経支配は、運動機能回復を阻害する大きな要因となる。

2.5. 神経再生研究で用いられる実験動物モデルの特徴

神経再生研究で用いられる動物モデルは、Seddon 分類で考えると、Axonotmesis モデルと Neurotmesis モデルに大別される。前者の Axonotmesis モデルは、神経圧挫モデルが実験モデルとして挙げられる。しかし、ラットやマウスモデルの場合は数週間以内に運動機能の自然回復が得られるため、長期的な理学療法介入の効果検証は困難である問題点がある。後者の Neurotmesis モデルは、神経切断・修復モデルや神経切断・縫合モデル、神経切断・自家神経移植モデル、神経切断・人工神経移植モデル、神経切断・同種処理神経移植モデルが実験モデルとして該当する。Axonotmesis モデルである神経圧挫モデルに比べ、軸索再生に時間を要するため脱神経期間が長く、機能回復がプラトーになる時期は遅くなる。しかし、実験モデル作製時に神経を切断することで、すべての構造体の連続性が一度断たれた状態となるため、過誤神経支配は不可避である。そのため、運動機能回復を阻害する要因が脱神経期間の延長によるものか、過誤神経支配によるものか不明瞭となる問題点がある。

上記モデルの問題点を解決するモデル作製方法として、過誤神経支配を生じさせずに、脱神経期間を延長させることで運動機能障害が残存するマウス坐骨神経圧挫モデルが報告されている。このモデルは、Axonotmesis モデルである神経圧挫モデルと同一の手法で坐骨神経に圧

挫損傷を行い、再神経支配が生じる前に同じ圧挫部位に対して圧挫損傷を繰り返すことで、過誤神経支配を生じさせずに脱神経期間を延長させる現象モデルである。この現象モデルを採用することで、脱神経期間の延長に起因する運動機能障害の成因が検証可能となる。

2.6. 末梢神経損傷に対する理学療法介入の効果

末梢神経再生に対する理学療法研究は古くから行われてきたが、末梢神経の再生促進を目的として臨床応用されているものは未だ存在しないことが現状である。臨床場面における末梢神経損傷後の理学療法介入は、二次的障害予防のための関節可動域運動や装具作製、電気刺激などが治療の中心となっている。

齧歯類を用いた基礎研究においては、末梢神経損傷後の機能回復を促進するために、電気刺激や運動介入などの神経活動依存的治療が広く使用されてきた。末梢神経損傷後のトレッドミル運動は、神経再生や運動機能回復を促進することが諸家により報告され、運動強度および運動の開始時期に関する検討が多数行われてきた。運動強度に関して、低負荷から中負荷の運動介入は、神経発芽や伸長、再生軸索の成熟を促進するが、高負荷の運動介入は神経再生に悪影響を及ぼすことが示唆されている。したがって、適度な運動強度は神経再生に有効であるが、過度な運動強度では神経再生に対し不利に働く可能性がある。また、運動開始のタイミングに関しては、神経損傷後早期（損傷3日後）から運動介入を行うことで、軸索再生の促進、神経伝導検査におけるM波振幅の回復、運動ニューロンとIa求心性ニューロン終末との再接続の促進およびH反射振幅の回復が生じることが報告されている。また、支配筋の再神経支配直後に運動介入を開始した場合には、M波振幅の回復は生じるもの

の、運動ニューロンと Ia 求心性ニューロン終末との間の再接続は乏しく H 反射振幅の回復は得られないことが報告されている。したがって、損傷後のトレッドミル運動の開始時期の違いは、損傷部位より末梢に位置する NMJ と、中枢に位置する脊髄神経回路の可塑的变化に異なる効果を及ぼす可能性がある。

以上のことを踏まえると、適度な負荷量（低負荷から中負荷の運動強度）で適切な時期（神経損傷後早期）から運動介入をすることが、神経再生や機能的回復に有効であることは明らかとなっている。しかしながら、運動機能回復の阻害要因となり得る脱神経期間の長さに着目した先行研究は乏しく、運動開始までの脱神経期間の長さの違いが運動機能回復に及ぼす影響を比較検討した報告はない。したがって、どの程度の脱神経期間までであれば運動介入の効果が得られるのか未解明である。

2.7. 研究目的と仮説

坐骨神経圧挫モデルに対するトレッドミル運動の効果として、運動開始までの脱神経期間の長さの違いが損傷後の運動機能回復に大きく影響し、その差異には損傷部位より末梢に位置する NMJ の接続性と、中枢に位置する脊髄神経回路の可塑的变化が大きく関与するのではないかと仮説を立てた。そこで本研究の目的は、脱神経期間の異なる坐骨神経圧挫モデルを用いて、運動開始までの脱神経期間の長さが運動機能回復に及ぼす影響を、神経筋接合部の接続性と脊髄神経回路の可塑的变化に着目して探索することとした。

3. 研究 I : 脱神経期間の異なる坐骨神経圧挫モデルに対する運動介入が運動機能回復に及ぼす影響

3.1. 背景と目的

末梢神経損傷後は、低負荷から中負荷の運動強度でトレッドミル運動を行うことで、損傷軸索再生や運動機能回復を促進することが諸家により報告されている。しかし、末梢神経損傷後の脱神経期間の長さは、運動機能回復を規定する重要な要因であるにも関わらず、運動開始までの脱神経期間の違いが運動機能回復に及ぼす影響について検討されていない。そこで研究 I では、脱神経期間の異なるラット坐骨神経圧挫モデルを現象モデルとして作製し、運動開始までの脱神経期間の長さの違いが運動機能回復に及ぼす影響を検証した。さらに、運動機能障害の残存に関与し得る NMJ の再神経支配の割合と、脊髄運動ニューロンに投射する神経回路の可塑的变化を免疫組織化学染色により検証した。以上により、運動開始までの脱神経期間の長さの違いが運動機能回復に及ぼす影響を、NMJ における再神経支配と脊髄神経回路の組織学的連結性との関係性ととともに検証した。

3.2. 方法

3.2.1. 倫理的配慮

本学研究倫理審査委員会の承認後（承認番号 30-12）、動物実験基本計画書および実施計画書に従い研究を実施した。実験動物に対し、外科的介入への疼痛軽減措置を実施し、実験に用いる動物数は最小限とした。

3.2.2. 対象と研究デザイン

Sprague-Dawley系雄性ラット10週齢48匹を対象とした。ラットは、脱神経期間の長さや運動介入の有無に応じて、以下の4群に無作為に分けた：(1) 坐骨神経圧挫後に安静する群 (Sciatic nerve crush and sedentary group: 以下 SC 群, n = 8)、(2) 坐骨神経圧挫後に運動実施する群 (Sciatic nerve crush and exercised group: 以下 SC-EX 群, n = 8)、(3) 7日ごとに複数回の坐骨神経圧挫後に安静する群 (Multiple sciatic nerve crush and sedentary group: 以下 MSC 群, n = 8)、(4) 7日ごとに複数回の坐骨神経圧挫後に運動実施する群 (Multiple sciatic nerve crush and exercised group: 以下 MSC-EX 群, n = 8)。SC 群と MSC 群の対側後肢(左側)をそれぞれの偽手術群 (Sham surgery group: 以下 SHAM 群) とした (各 n = 8)。すべてのラットは、最後の圧挫後 35 日までフォローアップした。

3.2.3. 実験モデル作製

実験動物麻酔装置を用いてイソフルランで導入麻酔を実施した。深麻酔は、体重計測後に三種混合麻酔薬で腹腔内麻酔を実施した。外科的介入の終了後、メデトミジン拮抗薬 (アンチセダン) を皮下注射した。三種混合麻酔薬は、塩酸メデトミジン (ドミツール) とミダゾラム (ドルミカム) と酒石酸ブトルフェール (ベトルフェール) を生理食塩水で混合させることにより作製した。

外科的介入として、ラットを腹臥位にし、右殿部から大腿中央まで皮膚切開した。大腿二頭筋と外側広筋との間の筋間中隔をメスで切開し、右坐骨神経を露出した。坐骨切痕より10mm遠位部を、非鋸歯状の止血鉗子を用いて、180秒間圧挫することで幅2 mmの圧挫損傷を行った。

圧挫部位のマーキングは粉末炭素を使用した。圧挫後、神経を再配置し、筋は4-0縫合糸を用いて閉創し、皮膚は自動縫合器を用いて縫合クリップで閉創した。圧挫7日後に、腓腹筋外側頭でM波が消失していることを確認した。複数回坐骨神経を圧挫するモデルは、7日ごとに同じ圧挫部位を再度圧挫することで、過誤神経支配を生じさせずに脱神経期間を延長する現象モデルを作製した。具体的には、7日ごとに坐骨神経の圧挫を繰り返し、計5回の圧挫損傷を行うことで、脱神経期間を延長する実験モデルを作製した。SHAM群は剃毛後に皮膚と筋を切開し、左坐骨神経を露出後に閉創した。

3.2.4. 運動介入

SC-EX 群と MSC-EX 群は、最後の圧挫 3 日後からトレッドミル運動を開始した。ラットは、トレッドミル上を速度 10 m/min で 60 分間、週 5 回歩行した。

3.2.5. 行動学的解析

3.2.5.1. 感覚機能評価

感覚機能の回復は、Pinprick test を用いて評価した。後肢足底面の外側部（坐骨神経の感覚野）を 5 領域に分け、最も外側のつま先から踵にかけて試験した。試験器具には Insect pins を使用した。刺激により明確な反応（速い逃避反射と発声）が誘発された場合にのみ陽性と判定し、この領域について 1 とした。陰性の場合には 0 とした。Pinprick score は各領域における反応を加算し、0 から 5 の 6 段階でスコアリングした（0: 感覚神経の再神経支配なし、5: 完全な再神経支配）。同側の伏在神経領域は陽性対照として試験し、常に陽性反応を誘発するか評価した。

3.2.5.2. 運動機能評価

運動機能の回復は、Sciatic functional index（以下 SFI）を用いて評価した。ラットは、木製の板で囲まれたアクリル板上を歩行し、通路の端に暗いシェルターボックスを設置した。歩行中の足跡は、歩行路の下に設置したデジタルビデオカメラで動画撮影し、最も足底接地面積が大きい 1 歩行周期を抽出した。抽出した足跡の画像から、画像解析ソフト ImageJ/Fiji を用いて以下の 3 つのパラメータを測定した：(1) 最長をつま先と踵までの間の長さ（Paw length: PL）、(2) 第 1 趾と第 5 趾の間の距離（Toe spread: TS）、(3) 第 2 趾と第 4 趾の間の距離（Intermediary toe spread: ITS）。測定した値は、以下の数式に代入することで SFI を算出した。SFI の平均値は、異なる 3 つの足跡から算出した。

$$SFI = -38.3 \times \frac{EPL - NPL}{NPL} + 109.5 \times \frac{ETS - NTS}{NTS} + 13.3 \times \frac{EIT - NIT}{NIT} - 8.8$$

E : Experimental（実験側；右後肢）

N : Normal（正常側；左後肢）

PL : Paw length（最長をつま先と踵までの間の長さ）

TS : Toe spread（第 1 趾と第 5 趾の間の距離）

ITS : Intermediate toe spread（第 2 趾と第 4 趾の間の距離）

3.2.6. 組織採取

最後の圧挫後 35 日時点で、各群の後肢よりヒラメ筋（Soleus muscle, 以下 SOL）と長趾伸筋（Extensor digitorum longus muscle, 以下 EDL）を採取し、組織学的解析に供した。また、脊髄 L4-5 領域を組織学的解析

に供した。

3.2.7. 筋組織に対する組織学的解析

3.2.7.1. 組織標本作製

採取した SOL と EDL は、ドライアイス・アセトンによる急速凍結包埋を行い、ディープフリーザーにて-80°Cで保管した。クライオスタットを使用し、厚さ 60 μm で 15 枚の連続縦断切片を作製した (3 枚/1 スライドガラス)。

3.2.7.2. 免疫組織化学染色

切片を風乾後、0.01 M Phosphate buffered saline (以下 PBS) で洗浄した。その後、Antibody Diluent with Background Reducing Components (Dako) を用いてブロッキングした。一次抗体として、Anti-neurofilament 200kDa antibody (以下 NF200; Sigma-Aldrich) を使用した。二次抗体として Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (abcam)、Alexa Fluor 594 conjugate α -bungarotoxin (以下 α -BTX; Invitrogen) を使用した。

3.2.7.3. 筋再神経支配の組織学的定量化

染色後、蛍光顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE) を用いて、NMJ の形態画像を撮影した。連続縦断切片のスライドガラスの偶数番号を撮影対象とした。画像取得は、すべて 400 倍の倍率にて行なった。

α -BTX で標識した MEP に NF200 陽性軸索の侵入が観察された NMJ では「再神経支配あり」と定義し、 α -BTX で標識した MEP に NF200 陽性軸索の侵入が観察されなかった NMJ では「再神経支配なし」と定義

した。再神経支配の割合を算出するために、各筋について少なくとも 300 の NMJ を計数した。

3.2.8. 脊髄組織に対する組織学的解析

3.2.8.1. 組織標本作製

採取した脊髄は、4% Paraformaldehyde（以下 PFA）in 0.1M Phosphate buffer（以下 PB）に浸漬し、4°Cで 48 時間固定した。PBS で組織を十分に洗浄し、20%スクロースを含む PBS に 24 時間浸漬した。その後、Tissue-Tek OCT compound で脊髄を包埋し、-80°Cのディープフリーザーで保管した。包埋した組織は、クライオスタットを使用し、厚さ 40 μm で連続横断切片を作製した。

3.2.8.2. 免疫組織化学染色

切片を風乾後、PBS-TX で洗浄した。その後、Antibody Diluent with Background Reducing Components を用いてブロッキングした。一次抗体として、Anti-HuC/HuD antibody（Invitrogen）、Anti-vesicular glutamate transporter 1 antibody（以下 VGLUT1; Synaptic Systems）、Anti-synaptophysin antibody（以下 SYN; Millipore）を使用した。二次抗体として、Alexa Fluor 350 goat anti-mouse IgG（Invitrogen）、Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG（Invitrogen）、Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgM μ chain（Invitrogen）を使用した。

3.2.8.3. 運動ニューロンに対するシナプス被覆率の解析

HuC/HuD 陽性の運動ニューロンは、脊髄前角の Lamina IX 領域に位置し、最大直径 $\geq 25 \mu\text{m}$ で、無蛍光で明確な核を持ち、認識可能な細胞

境界を持つ場合にのみ解析対象とした。画像取得は、蛍光顕微鏡 BZ-X700 を用いて、すべて 400 倍の倍率にて行なった。

画像解析は、画像解析ソフト ImageJ/Fiji を用いた。具体的には、シナプス関連タンパク質に免疫反応する構造物との接触を調べるために、HuC/HuD 陽性運動ニューロン周囲に関心領域 (Region of interest: 以下 ROI) を作成した。運動ニューロンの細胞外形は、DAPI フィルタで撮影した画像をもとに決定し、ROI マネージャーを用いて画像上の ROI の位置情報を記録した。その後、TRITC フィルタおよび GFP フィルタで撮像した各画像に、記録した ROI を適用し、ROI の線上に沿った蛍光強度の測定値としてプロットプロファイルを作製した。平均値と標準偏差を足した値を閾値として、閾値を超えた ROI 全体の割合 (シナプス被覆率) を算出した。このシナプス被覆率は、シナプス関連タンパク質の免疫反応性 (Immunoreactive: 以下 IR) と運動ニューロンの接触を示すものと定義した。1 匹あたり 15 個の運動ニューロンを分析し、VGLUT1 免疫反応性 (以下 VGLUT1-IR) および SYN 免疫反応性 (以下 SYN-IR) のシナプス被覆率を決定した。

3.2.9. 統計学的解析

統計処理には、統計解析ソフト R version3.6.1 を使用した。有意水準は 5%とした。一元配置分散分析および Tukey HSD 法による多重比較を用いて、再神経支配の割合とシナプス被覆率を群間で比較した。二元配置分散分析と Bonferroni 法による多重比較を用いて、各時点での群間および同一群内における SFI の比較を行った。Scheirer-Ray-Hare 検定と Bonferroni 法による多重比較を用いて、各時点での群間および同一群内における Pinprick score の比較を行った。

3.3. 結果

3.3.1. Pinprick score の経時的変化

感覚機能の回復は、すべての群で最後の圧挫後 10 日時点から開始した (SC 群と SC-EX 群は最初の圧挫後 10 日時点、MSC 群と MSC-EX 群は最初の圧挫後 38 日時点から回復し始めた)。最後の圧挫後 24 日時点で、すべての群で完全な感覚機能の回復を示した (SC 群と SC-EX 群は最初の圧挫後 24 日時点、MSC 群と MSC-EX 群は最初の圧挫後 52 日時点で完全な感覚機能の回復を示した)。各時点において、それぞれ SC 群、SC-EX 群、MSC 群、MSC-EX 群との間に有意差はなかった。

3.3.2. Sciatic functional index の経時的変化

SC-EX 群における運動機能の回復は、最後の圧挫後 14 日時点から 24 日時点まで SC 群に比べ有意に高く、最後の圧挫後 14 日時点から 35 日時点まで MSC 群および MSC-EX 群に比べ有意に高かった。さらに、MSC-EX 群における運動機能の回復は、最後の圧挫後 21 日時点から 35 日時点まで、MSC 群に比べ有意に高かった。

3.3.3. 神経筋接合部における再神経支配の割合の比較

SOL の再神経支配の割合は、SC-EX 群および SC 群は SHAM 群より低値であったが有意差はなかった。EDL の再神経支配の割合は、SC 群は SHAM 群に比べ有意に低かった。SC-EX 群と SC 群の間では、SOL と EDL とともに再神経支配の割合に有意な差はなかった。脱神経期間を延長したモデルでは、SOL と EDL の再神経支配の割合は、MSC 群と MSC-EX 群ともに SHAM 群に比べ有意に低かった。しかし、MSC-EX 群と MSC 群の間では、SOL と EDL とともに再神経支配の割合に有意

な差はなかった。

3.3.4. 運動ニューロンに対するシナプス被覆率の比較

VGLUT1-IR 末端との接触割合は、SC 群では SHAM 群に比べ有意に低く、SC-EX 群では SC 群に比べ有意に高かった。脱神経期間を延長したモデルでは、MSC 群と MSC-EX 群ともに、VGLUT1-IR 末端の被覆率は、SHAM 群に比べ有意に低かった。VGLUT1-IR 末端との接触割合とは対照的に、SYN-IR 末端との接触は、すべての群間で有意な差を認めなかった。

3.4. 考察

本研究では、脱神経期間の異なるラット坐骨神経圧挫モデルを用いて、運動開始までの脱神経期間の長さの違いが運動機能回復に及ぼす影響を、NMJ における再神経支配と脊髄神経回路の組織学的連結性との関係性から検証した。本研究では、運動介入の有無に関わらず、NMJ の再神経支配の割合に差はなかった。しかし、運動介入は、脱神経期間の長さに関わらず、軸索断裂後の運動機能回復を促進した。さらに、運動ニューロンと一次求心性ニューロンとの再接続に関しては、運動開始までの脱神経期間が短い場合、VGLUT1 含有構造と運動ニューロンとの接触が増加したが、運動開始までの脱神経期間を延長した場合、運動の有無に関わらず減少した。

SOL と EDL における再神経支配の割合は、運動開始までの脱神経期間の長さにかかわらず、運動群と非運動群との間で有意な差はなかった。先行研究にて、電気生理学的解析を用いて、ラット坐骨神経切断・縫合後のトレッドミル運動が筋再神経支配の割合を促進することを報告されている。また、ラット坐骨神経圧挫後の再神経支配の割合を電子顕微鏡的観察にて検討し、損傷後 28 日時点で完全な再神経支配が得られることが報告されている。本研究における組織学的解析のタイムポイントは、最後の圧挫後 35 日時点のみであった。そのため、組織採取時よりも早期の時点で再神経支配が完了していた可能性があり、その結果として、運動の有無による再神経支配の割合に有意な差がなかった可能性がある。最後の圧挫後 35 日時点の SFI は、脱神経期間が長いモデルは短いモデルに比べ低値であり、SC-EX 群と MSC-EX 群はそれぞれ SC 群と SMC 群に比べ高値であった。そのため、トレッドミル運動は、運動開始までの脱神経期間の長さにかかわらず運動機能の回復を促進した。再神経支

配の結果を踏まえると、本研究において非運動群で運動機能回復が阻害された要因として、NMJ における神経筋伝達効率が不十分であり、NF200 陽性軸索と α -BTX の共局在で検討した NMJ の組織学的連結性は大きく関与していなかったことが推察される。

運動ニューロンにおけるシナプスの変化について、SC-EX 群の VGLUT1-IR 末端のシナプス被覆率は SC 群に比べて有意に高かった。先行研究にて、トレッドミル運動が運動ニューロンにおける脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor: 以下 BDNF) およびニューロトロフィン 3 (Neurotrophin 3: 以下 NT3) の発現を増加させることが報告されている。また、BDNF ノックアウトマウスを用いて、末梢神経損傷後の Synaptic stripping に対する運動の効果は、運動ニューロンにおける BDNF 発現に依存することが報告されている。神経切断後の NT-3 投与は、軸索切断した運動ニューロンの興奮性シナプス後電位を有意に増加させる。一次求心性ニューロンと運動ニューロン間のシナプス結合が破壊されたトランスジェニックマウスでは、生後 NT-3 を投与することにより、シナプス結合の機能が回復することが報告されている。したがって、SC-EX 群では、トレッドミル運動により運動ニューロンにおける BDNF および NT3 の発現が増加し、運動ニューロンと一次求心性ニューロンとの結合が回復した可能性がある。SYN-IR 末端のシナプス被覆率には、全群で有意差はなかった。先行研究にて、ラット坐骨神経切断・縫合モデルを用いて、損傷後 4 週以降では SYN-IR のシナプス被覆率が、非損傷群に比べ有意な差を認めなかったことが報告されている。抗 SYN 抗体は、前シナプス末端を標識するシナプスマーカーである。一次求心性ニューロンを除くほとんどの軸索終末が、Synaptic stripping から自然回復することが報告されており、本研究の結果と一

致する。

以上をまとめると、運動開始までの脱神経期間の長さの違いは、再神経支配と運動ニューロンの組織学的連結性に異なる影響を及ぼすことを示唆し、運動開始までの脱神経期間の長さにかかわらず、運動介入は運動機能回復を促進した。SC-EX 群は SC 群に比べ、NMJ の再神経支配の割合は運動介入の有無で有意な差を認めなかったが、運動機能回復は最後の圧挫後 14 日時点から 24 日時点まで有意に高かった。脱神経期間を延長したモデルにおいては、MSC-EX 群は MSC 群に比べ、NMJ の再神経支配の割合と脊髓回路の組織学的変化は運動介入の有無で有意な差を認めなかったが、運動機能回復は最後の圧挫後 21 日時点から 35 日時点まで有意に高かった。したがって、研究 I では、運動介入の有無で組織学的解析結果に有意な差がなかったにも関わらず、運動機能回復に有意な差が生じた成因を明らかにできなかった。そのため、電気生理学的解析や分子生物学的解析を用いた追加の検証により、この運動機能回復の差がどこに起因しているのか明らかにする必要がある。

4. 研究Ⅱ：末梢神経損傷後の運動機能回復促進に寄与する電気生理学的および分子生物学的要因の検討

4.1. 背景と目的

研究Ⅰより、坐骨神経軸索断裂後は、運動開始までの脱神経期間の長さにかかわらず、運動介入は運動機能回復を促進することがわかった。しかし、運動介入の有無で組織学的解析結果には有意な差がなかったため、運動機能回復に有意な差が生じた成因は不明であった。そのため、研究Ⅱの目的は、坐骨神経軸索断裂後の運動介入により運動機能回復が促進する要因を明らかにすることとし、研究Ⅰと同様の脱神経期間の異なるラット坐骨神経圧挫モデルを作製し、電気生理学解析や分子生物学的解析を用いた追加の検証を行った。

4.2. 方法

4.2.1. 倫理的配慮

本学研究倫理審査委員会の承認後（承認番号 2020-4）、動物実験基本計画書および実施計画書に従い研究を実施した。実験動物に対し、外科的介入への疼痛軽減措置を実施し、実験に用いる動物数は最小限とした。

4.2.2. 対象と研究デザイン

本章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

本章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

4.2.3. 実験モデル作製

外科的介入として、ラットを腹臥位にし、右殿部から大腿中央まで皮膚切開した。次に、大腿二頭筋と外側広筋との間の筋間中隔をメスで切開し、右坐骨神経を露出した。坐骨切痕より 10mm 遠位部を、非鋸歯状の止血鉗子を用いて、180 秒間圧挫することで幅 2 mm の圧挫損傷を行った。圧挫部位のマーキングは、粉末炭素を使用した。圧挫後、神経を再配置し、筋は 4-0 縫合糸を用いて閉創し、皮膚は自動縫合器を用いて縫合クリップで閉創した。圧挫 7 日後に、腓腹筋外側頭で M 波が消失していることを確認した。複数回坐骨神経を圧挫するモデルは、7 日ごとに同じ圧挫部位を再度圧挫することで、過誤神経支配を生じさせずに脱神経期間を延長する現象モデルを作製した。

4.2.4. 運動介入

本章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

4.2.5. 行動学的解析

4.2.5.1. 感覚機能評価

感覚機能の回復は、Pinprick test を用いて評価した。後肢足底面の外側部（坐骨神経の感覚野）を 5 領域に分け、最も外側のつま先から踵に

かけて試験した。試験器具には Insect pins を使用した。刺激により明確な反応(速い逃避反射と発声)が誘発された場合にのみ陽性と判定し、この領域について 1 とした。陰性の場合には 0 とした。Pinprick score は各領域における反応を加算し、0 から 5 の 6 段階でスコアリングした (0: 感覚神経の再神経支配なし、5: 完全な再神経支配)。同側の伏在神経領域は陽性対照として試験し、常に陽性反応を誘発するか評価した。

4.2.5.2. 運動機能評価

運動機能の回復は、SFI を用いて評価した。ラットは、木製の板で囲まれたアクリル板上を歩行し、通路の端に暗いシェルターボックスを設置した。歩行中の足跡は、歩行路の下に設置したデジタルビデオカメラで動画撮影し、最も足底接地面積が大きい 1 歩行周期を抽出した。抽出した足跡の画像から、画像解析ソフト ImageJ/Fiji を用いて以下の 3 つのパラメータを測定した：(1) 最長のつま先と踵までの間の長さ (Paw length: PL)、(2) 第 1 趾と第 5 趾の間の距離 (Toe spread: TS)、(3) 第 2 趾と第 4 趾の間の距離 (Intermediary toe spread: ITS)。測定した値は、以下の数式に代入することで SFI を算出した。SFI の平均値は、異なる 3 つの足跡から算出した。

4.2.6. 電気生理学的解析

本章については、2 年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

本章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

4.2.7. 逆行性神経トレーサー注入

再神経支配した運動ニューロンを標識するために、組織採取の7日前に、イソフルラン吸入麻酔下で、1% Cholera Toxin Subunit B, Alexa Fluor 555 Conjugate（以下 CTB-555, Invitrogen）を腓腹筋内側頭

(Medial head of gastrocnemius muscle: 以下 MGAS) に、Hamilton Syringe で 10 μ L 注入した。

4.2.8. 組織採取

組織学的解析用のサンプルは、フォローアップ後に三種混合麻酔薬による深麻酔下で開胸し、生理食塩水で経心的に脱血を行った後、4% PFA in 0.1 M PB で灌流固定を行った。各群から LGAS と、脊髄 L3-6 領域を採取した。

分子生物学的解析用のサンプルは、フォローアップ後に三種混合麻酔薬による深麻酔下で開腹し脱血死させ、各群から LGAS を採取した。組織採取は、氷上で迅速に行った。

4.2.9. 筋組織に対する組織学的解析

4.2.9.1. 組織標本作製

採取した LGAS は、ヘキサン・イソペンタン混合液による急速凍結包埋を行い、ディープフリーザーにて -80°C で保管した。凍結包埋した組織はクライオスタットを使用し、厚さ 60 μm で 15 枚の連続縦断切片を製作した (3 枚/1 スライドガラス)。

4.2.9.2. 免疫組織化学染色

切片を風乾後、PBS を用いて洗浄した。洗浄後、Blocking One Histo (ナカライテスク) を用いてブロッキングした。一次抗体として

本文章については、2 年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

を用いた。二次抗体として Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (abcam)、Alexa Flour 647 conjugate α -BTX (Invitrogen)

を使用した。

4.2.9.3. 運動終板の形態学的評価

染色後、蛍光顕微鏡 BZ-X700 を用いて、MEP の形態画像を撮影した。連続縦断切片のスライドガラスの偶数番号を撮影対象とした。画像取得は、すべて 400 倍の倍率にて行なった。

本文章については、2 年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

4.2.10. 脊髄組織に対する組織学的解析

4.2.10.1. 組織標本作製

灌流固定後に採取した脊髄は、4% PFA in 0.1M PB に浸漬し、4°C で 24 時間後固定した。PBS で組織を十分に洗浄し、20%スクロースを含む PBS に 24 時間浸漬した。その後、Tissue-Tek OCT compound で脊髄を包埋し、-80°C のディープフリーザーで冷凍し保管した。包埋した組織は、クライオスタットを使用し、厚さ 40 μm で連続横断切片を作製した。

4.2.10.2. 免疫組織化学染色

切片を風乾後、PBS-TX を用いて洗浄した。その後、Blocking One Histo を用いてブロッキングした。一次抗体として、Anti-VGLUT1 antibody (Synaptic Systems)、Anti-Glutamic acid decarboxylase 67kDa antibody (以下 GAD67; Sigma-Aldrich) を使用した。二次抗体として、Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen)、Alexa Fluor

488 goat anti-mouse IgG (abcam) を使用した。

4.2.10.3. 運動ニューロンに対するシナプス被覆率の解析

CTB-555 標識運動ニューロンは、細胞体を埋めつくし、近位樹状突起まで伸びる標識があり、無蛍光で明確な核を持ち、認識可能な細胞境界を持つ場合のみ解析対象とした。画像取得は、蛍光顕微鏡 BZ-X700 を用いて、すべて 400 倍の倍率にて行なった。

画像解析は、画像解析ソフト ImageJ/Fiji を用いた。シナプス関連タンパク質に免疫反応する構造物との接触を調べるために、運動ニューロン周囲に ROI を作成した。運動ニューロンの細胞外形は、TRITC フィルタで撮影した画像をもとに決定した。ROI は、運動ニューロンの細胞体と近位樹状突起に作成し、細胞体から 25 μm よりも伸ばさないように注意した。ROI マネージャーを用いて画像上の ROI の位置情報を記録した。その後、Cy5 フィルタおよび GFP フィルタで撮像した各画像に、記録した ROI を適用し、ROI の線上に沿った蛍光強度の測定値としてプロットプロファイルを作製した。平均値と標準偏差を足した値を閾値として、閾値を超えた ROI 全体の割合（シナプス被覆率）を算出した。このシナプス被覆率は、シナプス関連タンパク質の免疫反応性（IR）と運動ニューロンの接触を示すものと定義した。1 匹あたり 15 個の運動ニューロンを分析し、VGLUT1-IR および GAD67 免疫反応性（以下 GAD67-IR）のシナプス被覆率を決定した。

4.2.11. ウェスタンブロットティング

本章については、2 年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

本章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

4.2.12. 統計学的解析

統計処理は、統計解析ソフト R version3.6.1 を使用した。有意水準は5%とした。一元配置分散分析および Tukey HSD 法による多重比較を用いて、MEP の面積と周囲面積、シナプス被覆率、タンパク発現量を群間で比較した。二元配置分散分析と Bonferroni 法による多重比較を用い

て、各時点での群間および同一群内における SFI、LGAS における CMAP の潜時と最大振幅、MNCV の比較を行った。Scheirer-Ray-Hare 検定と Bonferroni 法による多重比較を用いて、各時点での群間および同一群内における Pinprick score の比較を行った。

4.3. 結果

4.3.1. Pinprick score の経時的変化

Pinprick score で評価した感覚機能の回復は、すべての群で最後の圧挫後 3 日時点から 17 日時点まで、INTACT 群に比べ有意に低かった。各時点において、それぞれ SC 群、SC-EX 群、MSC 群、MSC-EX 群との間に有意差はなかった。

4.3.2. Sciatic functional index の経時的変化

SFI で評価した運動機能の回復は、すべての群で最後の圧挫後 3 日時点から 31 日時点まで、INTACT 群に比べ有意に低かった。SC-EX 群における運動機能の回復は、最後の圧挫後 14 日時点から 24 日時点まで SC 群に比べ有意に高く、最後の圧挫後 14 日時点から 84 日時点まで MSC 群および MSC-EX 群に比べ有意に高かった。SC-EX 群と INTACT 群との間では最後の圧挫後 35 日以降有意な差を認めず、SC 群と INTACT 群との間で最後の圧挫後 42 日以降有意な差を認めなかった。MSC-EX 群における運動機能の回復は、最後の圧挫後 21 日時点から 84 日時点まで、MSC 群に比べ有意に高かった。MSC-EX 群と MSC 群は、最後の圧挫後 3 日時点から 84 日時点まで、INTACT 群に比べ有意に低かった。

4.3.3. 腓腹筋外側頭における複合筋活動電位の経時的変化

本章については、2 年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

本章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

4.3.4. 運動神経伝導速度の経時的変化

SC-EX 群の MNCV は、最後の圧挫後 8 週時点で SC 群に比べ有意に高く、最後の圧挫後 12 週時点で INTACT 群との間に有意な差を認めなかった。SC 群の MNCV は、最後の圧挫後 8 週から 12 週時点まで INTACT 群に比べ有意に低値であった。脱神経期間を延長したモデルでは、MSC-EX 群および MSC 群の MNCV は、最後の圧挫後 8 週から 12 週時点まで INTACT 群に比べ有意に低値であった。興味深いことに、どちらの時点においても、MSC-EX 群と MSC 群との間に有意な差を認めなかった。

4.3.5. 運動終板の形態学的変化

本章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

本章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

4.3.6.

発現量

本章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

4.3.7. 運動ニューロンに対するシナプス被覆率

最後の圧挫後 4 週時点における VGLUT1-IR 末端との接触割合は、SC-EX 群は SC 群に比べ有意に高値であった。SC 群は INTACT 群に比べ有意に低かったが、SC-EX 群は INTACT 群との間に有意な差を認めなかった。MSC-EX 群と MSC 群は、それぞれ INTACT 群に比べ有意に低かったが、MSC-EX 群と MSC 群との間に有意な差を認めなかった。

GAD67-IR 末端との接触割合は、SC-EX 群と SC 群は、それぞれ INTACT 群に比べ有意な差を認めず、SC-EX 群と SC 群との間にも有意な差を認めなかった。MSC-EX 群と MSC 群は、それぞれ INTACT 群に比べ有意に低かったが、MSC-EX 群と MSC 群との間に有意な差を認めなかった。

最後の圧挫後 8 週時点における VGLUT1-IR 末端との接触割合は、SC 群は INTACT 群に比べ有意に低かったが、SC-EX 群は INTACT 群ならびに SC 群との間に有意な差を認めなかった。GAD67-IR 末端との接触

割合は、MSC 群は INTACT 群に比べ有意に低かったが、MSC-EX 群と INTACT 群との間に有意な差を認めなかった。

最後の圧挫後 12 週時点における VGLUT1-IR 末端との接触割合は、SC-EX 群と SC 群は、それぞれ INTACT 群に比べ有意な差を認めず、SC-EX 群と SC 群との間にも有意な差を認めなかった。MSC-EX 群と MSC 群は、それぞれ INTACT 群に比べ有意に低かったが、MSC-EX 群と MSC 群との間に有意な差を認めなかった。興味深いことに、GAD67-IR 末端との接触割合は、すべての群で有意差を認めなかった。

4.4. 考察

本研究では、脱神経期間の異なるラット坐骨神経圧挫モデルを用いて、運動介入により運動機能回復が促進する要因を明らかにするために検討を行った。その結果、運動開始までの脱神経期間の長さにかかわらず、運動介入は NMJ の再神経支配を促進した。また、

本文章については、2 年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

運動ニューロンと一次求心性ニューロンとの再接続に関しては、運動開始までの脱神経期間が短い場合、VGLUT1 含有構造と運動ニューロンとの接触が増加したが、運動開始までの脱神経期間を延長した場合、運動の有無に関わらず減少したままであった。

まず、運動介入が CMAP の振幅に及ぼす影響を考察していく。SC-EX 群の振幅は、最後の圧挫後 4 週時点で SC 群に比べ有意に高かった。INTACT 群との比較では、SC-EX 群は最後の圧挫後 8 週から 12 週時点まで有意な差を認めず、SC 群は最後の圧挫後 12 週時点で有意な差を認めなかった。脱神経期間を延長したモデルでは、MSC-EX 群の振幅は、最後の圧挫後 4 週から 12 週時点まで MSC 群に比べ有意に高かった。INTACT 群との比較では、MSC-EX 群および MSC 群は、最後の圧挫後 4 週から 12 週時点まで INTACT 群に比べ有意に低かった。CMAP の振幅の回復は、再神経支配される筋線維の数によって決定するとされている。以上のことから、末梢神経圧挫後は、運動開始までの脱神経期間の長さにかかわらず、運動介入は NMJ の再神経支配を促進することを示した。先行研究にて、ラット坐骨神経切断・修復モデルを用いて、損傷後 3 日から開始したトレッドミル運動が、SOL の最大 M 波振幅を非運動群に比べて有意に改善したことが報告されている。また、ラット坐骨神

経切断・縫合モデルを用いて、SOL での M 波導出後（損傷後 21～28 日目）に開始したトレッドミル運動が、SOL の最大 M 波振幅を非運動群に比べて有意に改善したことが報告されている。これらの先行研究は、本研究で用いた実験モデルとは異なるため、直接的な比較は出来ないものの、末梢神経損傷後の運動開始のタイミングに関わらず、再神経支配の割合を改善することを示唆している。したがって、運動開始までの脱神経期間の長さに関わらず、NMJ の再神経支配を促進した本研究結果を支持するものと考ええる。

脱神経期間の長さと CMAP の振幅の関係に関して、MSC 群と MSC-EX 群は、それぞれ INTACT 群、SC 群、SC-EX 群に比べ CMAP の振幅が有意に低かった。先行研究においても、脱神経期間を延長したモデルほど足部内在筋における再神経支配の割合が低値を示しており、本研究の結果を支持するものである。

本文章については、2 年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

次に、運動介入が CMAP の潜時と MNCV に及ぼす影響を考察していく。SC-EX 群の潜時は、最後の圧挫後 4 週から 8 週時点まで SC 群に比べ有意に短縮した。INTACT 群との比較では、SC-EX 群および SC 群は

最後の圧挫後 12 週時点で有意な差を認めなかった。SC-EX 群の MNCV は、最後の圧挫後 8 週時点で SC 群に比べ有意に高かった。INTACT 群との比較では、SC-EX 群は最後の圧挫後 12 週時点で有意な差を認めず、SC 群は最後の圧挫後 8 週から 12 週時点まで有意に低値であった。CMAP の潜時は、神経に沿ったインパルスの伝導時間と、NMJ での伝達時間を含んだ指標である。

本文章については、2 年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

一方、脱神経期間を延長したモデルでは、MSC-EX 群の潜時は、最後の圧挫後 4 週から 12 週時点まで MSC 群に比べ有意に短縮した。MSC-EX 群の MNCV は、最後の圧挫後 8 週から 12 週時点まで MSC 群との間に有意な差を認めなかった。これらの結果で興味深いのは、最後の圧挫後 12 週時点において、MSC-EX 群の潜時は MSC 群に比べ有意に短縮していたにも関わらず、MNCV は MSC-EX 群と MSC 群との間で有意な差を認めなかったことである。つまり、脱神経期間を延長したモデルでは、運動介入の有無により再生軸索の再髄鞘化の程度には有意な差を認めず、NMJ における神経筋伝達時間にのみ有意な差が生じたことを示唆している。SFI で評価した運動機能回復に関して、最後の圧挫後 84 日（12 週）時点において、MSC-EX 群は MSC 群に比べ SFI 値が有意に高かった。以上のことから、運動開始までの脱神経期間を延長した場合は、NMJ における神経筋伝達時間の短縮が運動機能回復の促進要因として大きく関与した可能性がある。

本文章については、2 年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

本文章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

本文章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

最後に、運動介入が運動ニューロンにおけるシナプス変化に及ぼす影響を考察していく。本研究では、CTB-555 標識運動ニューロンと一次求心性ニューロン末端との再接続（VGLUT1-IR 末端のシナプス被覆率）、運動ニューロンと抑制性シナプス末端との再接続（GAD67-IR 末端のシナプス被覆率）を調べた。脱神経期間が短いモデルにおける運動ニューロンと VGLUT1-IR 末端との接触割合は、最後の圧挫後 4 週時点において SC-EX 群は SC 群に比べ有意に高値であった。最後の圧挫後 8 週時点では、SC-EX 群は SC 群との間に有意な差を認めなかったが、SC 群は INTACT 群に比べ有意に低かった。最後の圧挫後 12 週時点では、SC-EX 群と SC 群は、それぞれ INTACT 群に比べ有意な差を認めず、SC-EX 群と SC 群との間にも有意な差を認めなかった。これらの結果は、軸索断裂後の脱神経期間が短い場合は、運動介入により早期の時点で運動ニューロンと一次求心性ニューロンとの再接続が図られること、また、時間は要するものの軸索断裂後は自然治癒により再接続が図られること

を示した。先行研究において、末梢神経を切断した後は、一次求心性ニューロンが運動ニューロンから撤退したままであったのに対して、末梢神経軸索断裂後は、末梢神経切断後に比べ運動ニューロンと一次求心性ニューロンとの再接続が良好に回復したことと本研究結果は一致する。

一方、脱神経期間を延長したモデルにおける運動ニューロンと VGLUT1-IR 末端との接触割合は、最後の圧挫後 4 週時点から 12 週時点まで、MSC-EX 群と MSC 群との間に有意な差を認めなかった。また、MSC-EX 群と MSC 群は、それぞれ INTACT 群に比べ有意に低かった。これらの結果は、運動開始までの脱神経期間を延長した場合、運動介入の有無にかかわらず、一次求心性ニューロン末端は運動ニューロンから撤退したままであったことを示した。先行研究において、ラット坐骨神経切断・縫合モデルに対して損傷後の運動開始のタイミングを遅延させた場合（損傷後 21～28 日より開始）、早期に運動開始（損傷 3 日後に開始）した群に比べ、VGLUT1-IR 末端のシナプス被覆率が有意に低値であったことが報告され、損傷後の運動開始のタイミングが遅延することで、一次求心性ニューロン末端が運動ニューロンから撤退したままであることを示した。また、ラット L3-L6 神経根切断モデルを用いて、運動神経を切断せずに感覚入力が脊髄神経回路に与える影響を検討し、L3-L6 神経根切断後に VGLUT1-IR が有意に減少し、切断後 3 日から運動介入を行っても VGLUT1-IR は増加しなかったことが報告されている。これらの先行研究の結果を踏まえると、脊髄神経回路の可塑的变化には運動ニューロンへの求心性入力が必要であり、軸索断裂後に脱神経期間を延長することで、運動ニューロンへの求心性入力遮断された状態が延長された場合は、運動介入による運動ニューロンと一次求心性ニューロンとの再接続を促進する効果は得られないことを示唆している。

以上をまとめると、本研究では、運動開始までの脱神経期間が短い場合、損傷部位より末梢に位置する NMJ の機能的回復と中枢に位置する脊髄神経回路の可塑的变化が互いに関連して、運動機能回復の促進に寄与することを示した。一方、運動開始までの脱神経期間が長い場合、一次求心性ニューロンは運動ニューロンから撤退したままであり、損傷部位より末梢に位置する NMJ の機能的回復が運動機能回復の促進に寄与することを示した。

5. 総合的考察

本章では、研究Ⅰと研究Ⅱを統合した考察を行なっていく。

本研究では、坐骨神経損傷モデルに対するトレッドミル運動の効果として、運動開始前の脱神経期間の長さの違いは損傷後の運動機能回復に大きく影響し、その差異には損傷部位より遠位に位置する神経筋接合部と、近位に位置する脊髄神経回路の回復の違いが大きく関与するのではないかと仮説を立てて研究を行った。その結果、運動開始までの脱神経期間が短い場合、損傷部位より末梢に位置する NMJ の機能的回復と中枢に位置する脊髄神経回路の可塑的变化が互いに関連して、運動機能回復の促進に寄与した。一方、運動開始までの脱神経期間が長い場合、一次求心性ニューロンは運動ニューロンから撤退したままであり、損傷部位より末梢に位置する NMJ の機能的回復が運動機能回復の促進に寄与した。これらの結果は、本研究の仮説を支持するものである。

本研究の最も重要な新規性は、末梢神経軸索断裂後の脱神経期間の長さにより、損傷部位より末梢に位置する NMJ と中枢に位置する脊髄神経回路では、Therapeutic time window がそれぞれ異なることを示した点にある。脱神経期間を延長したモデルに対する運動介入は、NMJ の機能的回復が運動機能回復の促進に寄与したことから、NMJ は脊髄回路に比べて Therapeutic time window がより許容的であるといえる。したがって、運動開始までの脱神経期間の長さに応じて、理学療法戦略を決定することが運動機能回復を促進するために重要である。

本文章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

本文章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

最後に、本研究の意義と応用可能性に関して考察する。先行研究において、絞扼性神経障害者における術後予後予測因子として罹病期間が重

度障害の要因であること、神経移植術後の予後不良因子として手術待機時間が関与することが報告されている。本研究の結果では、運動開始までの脱神経期間を延長した場合においても運動機能回復を促進した。そのため、罹病期間や手術待機時間の長い術後患者においても、運動介入（リハビリテーション介入）により機能回復を促進し得る可能性がある。本研究結果により、末梢神経損傷者に対する理学療法戦略の構築に向けた、運動療法の有効性の意義確立の一助となる基礎的データを提供できると考える。

6. 研究限界と今後の展望

本研究の実施にあたって、いくつかの研究限界がある。第一の研究限界として、本研究では過誤神経支配の可能性をできる限り棄却して、脱神経期間の長さと言動介入効果の関係を検証するために、7日ごとに同じ圧挫部位を再度圧挫することで脱神経期間を延長する現象モデルを採用した。しかし、臨床場面における末梢神経損傷者の病態像とは異なるため、本研究結果を臨床場面に応用するにはいくつかの制限が伴う。病態像に近いモデルとしては、坐骨神経切断後に数週間期間を空けてから遅延縫合する **Chronic denervation** モデルが用いられている。そのため、**Chronic denervation** モデルを用いた検証を行い、病態像に近いモデルに対して脱神経期間の長さと言動介入効果の関係を調査していく必要がある。第二の研究限界として、本研究ではイソフルラン吸入麻酔下で NCS を行ったことである。塩酸ケタミンと塩酸キシラジンの混合麻酔薬による NCS では、単シナプス反射を抑制しないことが報告されており、H 波記録が可能である。本研究ではイソフルラン吸入麻酔下での NCS であったため、H 波は記録されず、脊髄運動ニューロンに対するシナプス入力の機能的回復を検討することができなかった。そのため、H 波を記録するために、塩酸ケタミンと塩酸キシラジンの混合麻酔薬に変更した追加の NCS の検証が必要である。

本文章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

本文章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

最後に、損傷後の再生軸索の組織学的解析が行えていないことが挙げられる。本研究における CMAP 振幅や MNCV の回復程度、SFI の結果より、軸索断裂後の運動介入は軸索再生や再髄鞘化を促進したことが推察されるが、再生軸索における形態学的変化は不明である。そのため、今後は免疫組織化学染色や電子顕微鏡的観察を用いた形態学的評価を行い、電気生理学的解析や行動学的解析との関係について検証していく必要がある。

7. 結語

本研究では、ラット坐骨神経軸索断裂モデルに対するトレッドミル運動の効果を、運動開始までの脱神経期間の長さに着目し、組織学的解析や電気生理学的解析、分子生物学的解析を用いて運動機能回復を促進する要因を検証し、以下の結論を導いた。

- (1) 末梢神経軸索断裂後は、運動開始までの脱神経期間の長さにかかわらず、神経筋接合部の再神経支配を促進した。
- (2) 運動開始までの脱神経期間が短い場合、運動介入は損傷軸索の再髄鞘化を促進した。
- (3) 運動開始までの脱神経期間が短い場合、運動介入は神経筋接合部の機能的回復および脊髄運動ニューロンと一次求心性ニューロンの再接続を促進することで、運動機能回復の促進に寄与した。

本文章については、2年以内に学術雑誌で掲載予定のため、非公開

- (5) 末梢神経軸索断裂後の脱神経期間の長さにより、損傷部位より末梢に位置する神経筋接合部および中枢に位置する脊髄神経回路では、それぞれ **Therapeutic time window** が異なる

8. 謝辞

本研究を進めるにあたり、本当に多くの方々に御世話になりました。ここに深く感謝の意を評します。

本論文の主査 埼玉県立大学 保健医療福祉学部 健康開発学科 検査技術科学専攻 廣渡祐史教授、および副査 埼玉県立大学 保健医療福祉学部 理学療法学科 西原賢教授、北海道大学大学院 保健科学研究所 前島洋教授には博士論文審査会におきまして多大なる御助言を賜りました。深く感謝申し上げます。

本研究の指導補助として、御指導を賜りました埼玉県立大学保健医療福祉学共通教育科 田中健一教授、埼玉県立大学保健医療福祉学部理学療法学科 今北英高教授に心より深く感謝を申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり御指導を賜りました埼玉県立大学 保健医療福祉学部 理学療法学科 村田健児助教、広島国際医療福祉専門学校 理学療法学科の武本秀徳先生に深く感謝を申し上げます。

大学院生活におきましては、幸いにも多数の友人、後輩たちとの出会いに恵まれ、大いなる刺激をいただきました。特に、多くの時間を共有しました博士研究員の小曾根海知さん、岡優一郎さん、大学院生の加納拓馬さん、佐藤路晃さんに感謝を申し上げます。そして、大学院生活を支えてくれた妻と家族に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究活動全般にわたり格別なる御指導と御高配を賜りました指導教員である埼玉県立大学大学院 保健医療福祉学研究科 研究科長 金村尚彦教授に深く感謝申し上げます。学部卒業研究に始まり大学院博士後期課程まで一貫して指導教員を務めていただきました。私の成長にも辛抱強く付き合ってください、本当にありがとうございました。先生のご指導を糧に今後も努力を続けて参ります。