反回神経の変性および再生過程の形態学的観察

南 仁成, 進 武幹, 渡 辺 宏
前 山 忠嗣, 森 川 郁郎, 梅 崎 俊郎

Morphological Observation of the Degeneration and Regeneration Process of the Recurrent Laryngeal Nerve

Insung Nahm, M.D., Takemoto Shin, M.D., Hiroshi Watanabe, M.D.,
Tadatsugu Maeyama, M.D., Ikuro Morikawa, M.D.,
and Toshiro Umezaki, M.D.

Department of Otolaryngology, Saga Medical School, Saga

Paradoxical movements and abnormal electromyographical findings of laryngeal muscles following recurrent laryngeal nerve (RLN) injury may reflect quantitative and qualitative defects in the reinnervation process. The purpose of this study was to clarify morphological changes caused by reinnervation after freezing nerve injury.

Hartley guinea pigs weighing 300-400 g were anesthetized with pentobarbital. The left RLN was injured by freezing (-80°C) at the level of the 10th tracheal ring. At intervals ranging from 2 weeks to 6 months, animals were reanesthetized and horseradish peroxidase (HRP) was injected into the left posterior cricoarytenoid (PCA) muscle. Animals were fixed by perfusion 48 hours after the HRP injection, and examined for the presence of retrogradely labeled perikarya in the medulla oblongata. Projections to the individual laryngeal muscles, as well as entire RLN, were also recruited as normal controls. On the other hand, we researched the histological degeneration and regeneration process of RLN following freezing injury.

Injection of HRP in normal PCA muscle labeled a well defined area within the ipsilateral nucleus ambiguus. From two to six months after the freezing injury, the number of labeled neurons increased gradually from 11 to 73. In addition, we were able to observe that the area occupied by neurons which project to the PCA muscle expanded, but was confined within the region of perikarya projecting to the normal RLN. Through the light and electron microscopic observations, most axons degenerated within 3 days and showed regenerative sprouting by 7 days after the injury. One of the most striking feature of nerve regeneration after freezing injury is rapid sprouting and maturing of regenerating axons compared to the other injuries. Target specific reinnervation was not accomplished even after freezing injury which produced minimum disorganization to the structure of RLN fibers.

Key words : misdirected regeneration, recurrent laryngeal nerve,
freezing nerve injury

は じ め に

末梢神経は損傷されるとその部より末梢側はワラー変性に陥るが、その後再生が起こってくる。反回神経のように同一神経が拮抗筋を支配している場合には、再支配が正確に行われないと神経は再生しても機能障害が生じることは、実験的にも、また臨床的にもよく知られている。われわれは、軸索とシュワン細胞などの細胞成分のみを死滅させる目的で、モルモットの反回神経に凍結損傷を加え、その変性と再生の過程を最長6カ月まで観察した。損傷部より末梢の変化を光顕および電顕を用いて観察し、またHRP標識法を用いて内喉頭筋を支配する運動神経細胞の再配列を観察した。

研究材料および方法

実験には計22匹のモルモットを用い、正常対照群と凍結損傷群の二群に分けた。正常対照群としては9匹(体重600~900g)を用いた。Sodium pentobarbital(ネンブタール, 30 mg/kg B.W.)で腹腔内麻酔の後、前頸部皮膚を正中切開して喉頭および反回神経を露出した。3匹の左甲状披裂筋(内筋)および側輪状披裂筋(側筋)と3匹の後輪状披裂筋(後筋)に生理食塩水に溶かした30% HRP (Sigma, type VI) 2~3 μ lを微小ガラス管を用い注入した。残りの3匹については左反回神経を第10気管輪で切断し、その中枢側をHRP溶液が入っているガラスチューブに入れて、アロンアルファ®で固定した。

HRP注入48時間後、再びネンブタールによる深麻酔下で開胸し、心尖部より上行大動脈にカニューレを挿入した。カニューレを通して生理食塩水200 mlを灌流し、ついで1.25% glutaraldehyde-1.5% paraformaldehyde-0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4) 500 mlにて灌流固定を行った。

固定後、直ちに延髄、喉頭および左反回神経を摘出した。摘出した延髄は30% sucroseを含む4°Cのリン酸緩衝液(pH 7.4)に24時間浸漬後、厚さ50 μ mの連続横断凍結切片を作製した。HRP陽性細胞の検出には, tetramethyl benzidine(TMB)を用いた^{1,2)}。中性赤による比

較染色後、光学顕微鏡により疑核内 HRP 陽性細胞を観察し、その数と分布を二次元的に構成した。

凍結損傷群は13匹(体重300~400)を用い、左反回神経に輪状軟骨の下縁から12 mmの部で凍結損傷を加えた。凍結には-80°Cのdry iceで処理したピンセットを用い、凍結と溶解(室温)を10秒ずつ3回繰り返した。2週間から6カ月後、同側の後筋にHRPを注入し、正常群と同様の方法で再生運動ニューロンの分布を調べ、正常対照群と比較した。

変性および再生過程の組織学的観察のためには、灌流固定後直ちに損傷した所から3~6 mm末梢側の神経を2 mmの長さで採集した。同一の固定液に4°Cで12時間浸漬して、2%四酸化オスミウムによる2時間の後固定の後、型通り脱水を行い、スパー樹脂包埋を行った。試料はミクロトームで超薄切片を作製し、1%酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛にて二重電子染色してJEOL-100CX型電子顕微鏡で観察した。

結 果

1. HRP 標識細胞の分布

正常対照群(表1, 図1): 反回神経全体のHRP陽性細胞はobexの尾側約2.0 mmから吻側約2.0 mmの高さまで存在し、その数が二つのピークを示すのが認められた。そのうち内筋および側筋の運動ニューロンはobexの尾側約2.0 mmから吻側約0.5 mmまで存在し、後筋のそれはやや吻側にかたより、obexの尾側約1.0 mmより吻側0.5 mmまで認められた。

二次元的に観察すると、後筋注入例の標識細胞は反回神経全体の運動ニューロンの分布領域の中で吻側1/3では全領域に広がって見られたが、それより尾側では腹側部の方に集中していた。一片、内筋および側筋注入例の標識細胞は全体領域に存在し、広い範囲にわたって散在しているように認められた。このように反回神経支配の後筋と内筋および側筋の運動ニューロン分布領域にはわずかながら差が認められた。

凍結損傷群(表2, 図2): 延髄内の後筋運動ニューロンの標識細胞は凍結損傷2カ月後に初めて認められ、その数が徐々に増加し、6カ月後には正常対照群と殆ど差は認められなかつ

表1 Summary of results following the injection of HRP into intrinsic laryngeal muscles and recurrent laryngeal nerve of the guinea pig (正常対照群)

Injection site	Animal number	Labeled neurons	
		NA	RFN
TA・LCA	3	67* (48-83)**	
PCA	3	71 (58-88)	
RLN	3	118(96-133)	55(47-63)

NA, nucleus ambiguus; RFN, retrofacial nucleus: TA-LCA, thyroarytenoid-lateral cricoarytenoid muscles; PCA, posterior cricoarytenoid muscle; RLN, recurrent laryngeal nerve. *Mean, **range.

図1 正常対照群における延髄内 HRP 標識細胞の領域
PCA, posterior cricoarytenoid muscle; TA・LCA, thyroarytenoid-lateral cricoarytenoid muscles; RLN, recurrent laryngeal nerve; C, caudal, R, rostral; D, radial distance from the margin of the 4th ventricle or central canal; N, number of cells.

た。6 カ月後の標識された後筋運動ニューロンの分布領域を正常対照群と比較してみると、やや尾側、すなわち内筋および側筋支配ニューロンの領域にまで広がっているのが認められた。これを二次元的にみでみると、後筋を再支配した再生神経の一部（少なくとも20%）が正常後筋運動ニューロン領域の外に散在して広がっているのが観察された。

2. 末梢神経の組織学的変化 (図3)

凍結損傷3日後に反回神経の損傷部より末梢側では軸索がほぼ完全に消失し、髄鞘の破壊が

表2 Summary of results after injection of HRP into posterior cricoarytenoid muscle following various intervals after freezing injury of recurrent laryngeal nerve (凍結損傷群)

Time interval	Animal number	Labeled cells in nucleus ambiguus
2 weeks	2	0
1 month	2	0
2 months	3	19* (0-57) **
3 months	2	11 (0-22)
4 months	2	47 (46-47)
6 months	2	73 (52-94)

*Mean, **range.

図2 反回神経凍結損傷6ヵ月後、後筋を再支配した運動ニューロンの分布領域 (* location of labeled cells)

著明であった。1週間後には変性は完了し、髄鞘を貪食している大型の食細胞が多数認められた。シュワン細胞は増殖し、未熟な小型の axon sprout を数多く含む axon-schwann cell unit を形成していた。この時期の軸索あるいはシュワン細胞核の一定の面積あたりの数を数えると、正常の4倍以上に増加していた。10日後からは髄鞘が形成されながら axon-schwann cell unit はそれぞれの成熟した神経線維に再構築されていくのが観察された。再生線維はその後、徐々に正常の形に近づき、3ヵ月目には神経線維の数と大きさはほぼ正常になったが、まだ形態は不規則な形を呈していた。

図3 反回神経凍結損傷後、末梢側の変性および再生の過程

A, 3日後; B, 7日後; C, 14日後; D, 3ヵ月後。

Axon-Schwann cell unit (arrow) と Growth cone (star) が見られる。Bar = 2 μ m

考 察

神経再生における *misdirected regeneration* を最初に報告したのは Lipschits³⁾ であり, これを反回神経において確認したのは Siribodhi⁴⁾ が初めてである。彼らはイヌの実験的反回神経麻痺の声帯運動および声帯固定位置についての研究の中で反回神経の *misdirected regeneration* を筋電図を用いて検討していた。さらに富田⁵⁾ はヒト反回神経麻痺患者でこの *misdirected regeneration* を筋電図学的に証明した。

広戸⁶⁾ はその機序として反回神経は損傷されると, 他の末梢神経と同じように, 中枢端から再生してくる個々の分枝と筋肉との結合は損傷前の結合とは無関係に行われるので, 単一軸索より再生した神経分枝のすべてが損傷前には支配していなかった筋肉を新しく支配する場合もあるし, 単一軸索よりの数分枝がおのおの別々に数個の筋を支配する場合もあり, 上喉頭神経外枝のように, 神経と筋肉との対応が1対1の場合, あるいはほかの末梢神経のようにいくつかの協力筋を支配する場合は *misdirected regeneration* がおこっても機能障害が生じないが, 特に反回神経のように, 同一神経が拮抗筋を支配している場合には機能障害を生じると説明した。

さて, 末梢神経の再生軸索は損傷後シュワン細胞の表面に沿って伸びることが明らかとなっている⁷⁾。シュワン細胞は再生軸索の通路であると同時に, 再生軸索を誘引したり, その成長を促す栄養物質を出すものと考えられ, 神経再生に不可欠のものとされてきた⁷⁾。さらに, 井手⁸⁾ はまわりの組織をできるだけ正常のまま残して, シュワン細胞など細胞成分だけを死滅させる目的で, 凍結処理した神経を元の場所に植えて経時的に観察した結果, シュワン細胞なしでも基底膜さえ温存されていれば再生軸索が基底膜のトンネル内を伸びていくことを証明した。

以上のことよりわれわれは, 細胞成分のみを障害して基底膜はそのまま保存する凍結損傷をこの実験に用いた。凍結損傷における *misdirected regeneration* を証明するために, 主に形

態学的変化に主眼をおいて, 末梢側の再生過程の観察と同時に逆行性標識法を用いて延髄内の後筋運動ニューロンの再配列を観察した。

逆行性標識法による動物の内喉頭筋支配運動ニューロンの延髄内分布の同定は Hinrichsen and Ryan⁹⁾ (ラット), Yoshida et al.¹⁰⁾ (ネコ), Davis and Nail¹¹⁾ (ネコ, ウサギ), Hisa et al.¹²⁾ (イヌ), Okubo et al.¹³⁾ (ウサギ) などによって詳しく調べられている。反回神経全体の運動ニューロン領域と内転筋である内筋および側筋領域, 外転筋である後筋領域を比較して見ると基本的に他の動物種と一致していた。しかし, 反回神経全体の運動ニューロン分布領域で吻側にもう一つの小型の標識細胞群が *retrofacial nucleus* 内に存在した。これらの運動ニューロンは反回神経内の細い神経線維を送り, 気管や食道の筋肉を支配している¹⁴⁾。

後筋運動ニューロンの延髄内再配列を経時的に観察してみると, 凍結損傷6カ月後の再生後筋運動ニューロンは, 反回神経全体の領域に幅広く散在していて, 定量的に観察するとその20%程度が本来の後筋運動ニューロン領域以外, すなわち側筋および内筋領域で認められた。この所見は内転筋支配神経細胞による外転筋への *misdirected regeneration* が生じたことを意味している。

次に組織学的な末梢側の変化では, まず凍結損傷でもその末梢側はすべてワラー変性が起こるのが認められた。神経周膜や神経上膜の変化は軽度で結合組織は少量増える程度であった。変性した軸索や髄鞘はまわりのシュワン細胞によって貪食され, 外からのマクロファージの遊走は少なかった。増殖したシュワン細胞や axon sprout の増加率は機械的損傷, すなわち *crushing injury* あるいは切断縫合に比べたら少ないが, 再生の形態的变化の過程は同様であった¹⁵⁾。神経再生の特徴である axon-schwann cell unit や growth cone の形成なども凍結以外の損傷後の再生過程と同様であった。

今回の実験結果より, 比較的軽度の損傷であり, 基底膜を保つ凍結損傷においても, 機械的損傷と同様に, *misdirected regeneration* が起こりうることを証明された。このような *misdirected regeneration* の機序にはまだまだ不明な

点が多く、今後さらに検討する必要がある。

ま と め

軸索とシュワン細胞などの細胞成分のみを死滅させる目的で凍結損傷をモルモットの反回神経に加え、その変性と再生の過程を最長6カ月まで観察した。後筋への HRP 注入の結果では、2 カ月目から標識細胞が認められ6 カ月目には正常対照群の後筋支配運動神経の数とほぼ同じ数にまで回復した。しかしながら、再生運動神経細胞体の分布の分析結果より、本来の後筋支配領域以外の細胞体からの投射も起こっていることが確認された。損傷部より末梢側では損傷後、軸索が完全に消失し髄鞘の破壊がみられたが、1 週後には細い再生軸索が多数観察された。再生神経の形態は3 カ月後でもなお不規則であった。

稿を終えるにあたり、ご指導を賜った千葉大学医学部解剖学教室千葉胤道教授に感謝致します。

本研究は昭和63年度科学研究費補助金（研究課題番号：62570781）交付を受けた。

本論文の要旨は第40回日本気管食道科学会学術講演会（昭和63年11月12日、広島、広島厚生年金会館）において発表した。

文 献

- 1) Mesulam, M.M.: TMB for HRP neurohistochemistry: A non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J. Histochem. Cytochem.*, 26 : 106-117, 1978.
- 2) Mesulam, M.M., et al.: Additional factors influencing sensitivity in the TMB method for HRP neurohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 28 : 1255-1259, 1980.
- 3) Lipschitz, R.: Beiträge zur Lehre von der Facialislähmung nebst Bemerkungen zur Frage der Regeneration. *Msschr. Psych. Neurol.*, 20 : 84, 1959.
- 4) Siribodhi, C., et al.: Electromyographic studies of laryngeal paralysis and regeneration of laryngeal motor nerves in dogs. *Laryngoscope*, 73 : 148-164, 1963.
- 5) 富田英寿: 反回神経麻痺の筋電図学的研究. *日耳鼻*, 70 : 964-985, 1967.
- 6) 広戸幾一郎: 発声機構の面よりみた喉頭の病態生理. *耳鼻臨床*, 59 : 229-291, 1966.
- 7) Cajal, S.R.: *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*, Hafner, London, 1968 (Facsimile of the 1928 Edition), p.238.
- 8) 井手千束: 末梢神経の再生. *電子顕微鏡*, 21 : 167-173, 1987.
- 9) Hinrichsen, C.F.L., and Ryan, A.T.: Localization of laryngeal motoneurons in the rat: Morphological evidence of dual innervation? *Exp. Neurol.*, 74 : 341-355, 1981.
- 10) Yoshida, Y., et al.: Arrangement of motoneurons innervating the intrinsic laryngeal muscles of cats as demonstrated by horseradish peroxidase. *Acta Otolaryngol.*, 94 : 329-334, 1982.
- 11) Davis, P.J., and Nail, B.S.: On the location and size of laryngeal motoneurons in the cat and rabbit. *J. Comp. Neurol.*, 230 : 13-32, 1984.
- 12) Hisa, Y., et al.: Nucleus ambiguus motoneurons innervating the canine intrinsic laryngeal muscles by the fluorescent labeling technique. *Exp. Neurol.*, 84 : 441-449, 1984.
- 13) Okubo, J., et al.: Localization of rabbit laryngeal motoneurons in the nucleus ambiguus. *Exp. Neurol.*, 96 : 528-539, 1987.
- 14) Gacek, R.R., and Lyon, M.J.: Fiber components of the recurrent laryngeal nerve in the cat. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 85 : 460-471, 1976.
- 15) Bray, G.M., and Aguayo, A.J.: Regeneration of peripheral unmyelinated nerves. Fate of the axonal sprouts which develop after injury. *J. Anat.*, 117 : 517-529, 1974.