《総 説》

神経再生リハビリテーション医療と神経筋病理学

千野 直一^{*1}

Regenerative Neuro-rehabilitation and Neuromuscular Pathology

Naoichi CHINO^{*1}

Abstract : Regenerative medicine, which aims to restore, replace or regenerate cells and tissues using novel approaches such as iPS therapy, is currently a big issue in the field of rehabilitation medicine. Neurological recovery has been proved using marmoset monkeys with spinal cord lesions and Hematoxylin-Eosin and Luxol fast blue staining were adopted to identify the increased number of neurons at the spinal cord level. In regenerative medicine, pathophysiological findings demonstrating the recovery of motor units can provide direct evidence of neuromuscular function. In the field of rehabilitation medicine, the final common pathway, e.g. intramuscular nerve fibers and neuromuscular junctions, will be the target used to identify the recovery of motor function. Present physiatric modalities such as electrical or magnetic stimulations and therapeutic exercises will serve as the strategic applications used in neuromuscular regeneration treatments. The methylene blue vital staining method is a classical technique that when combined with the recently developed functional fluorescent protein staining along with transgenic procedures and confocal endomicroscopy examinations will illuminate our investigations into the degree of regenerative success obtained. These neuromuscular pathologies at the spinal cord level as well as the lower motor neuron level will allow us to more clearly determine the efficacy of various physical modalities used in rehabilitation medicine. The regenerative medicine era will require rehab efforts not only for treating spinal cord lesions but also for treating brain damaged patients in the future. (Jpn J Rehabil Med 2015 ; 52 : 760-768)

Key words : iPS (Induced Pluripotent Stem Cell) 治療, 神経筋病理学 (neuromuscular pathology), メチレンブルー生体染色法 (methylene blue vital staining), 機能性蛍光タンパク質染色法 (functional fluorescent protein staining), 共焦点微小内視鏡検査法 (confocal endomicroscopy examination)

はじめに

20 世紀後半から開発が始まった幹細胞 (Embryonic Stem : ES) 治療法は, ヒト胎児の胚盤胞期の内部細胞塊より作られる幹細胞株が元になるために, 倫理的にも経済的にも種々の問題を抱えていた。ところが, 京都大学山中伸弥教授は iPS 細胞 (Induced Pluripotent Stem Cell) を人工的に, しかも, 患者自身の細胞から自己の臓器の細胞を作成できるようになり, 再生医療が多くの診療分野において現実味をおびて

きた¹⁾。

ことに, iPS 細胞を用いた神経再生医療は, 我々の専門領域であるリハビリテーション (以下, リハ) 医学への大きな期待と希望をもたらすものとなり, 山中伸弥教授が 2012 年末にノーベル生理・医学賞受賞の報に接するや, 日本リハ医学会より早く, 米国リハ医学専門医会の機関誌である「Am J Phys Med Rehabil」の 2013 年 3 月号に「The Nobel Prize, Stem Cells, and Rehabilitation」という巻頭言が掲載された²⁾。

周知のように 1947 年, Dr F Krusen によって体系

2015 年 6 月 3 日受付, 2015 年 9 月 20 日受理

^{*1} 医療法人社団永生会研究開発センター/〒 193-0942 東京都八王子市棚田町 583-15

Eisei Hospital Rehabilitation Research and Development Center

E-mail : naochino@mbg.nifty.com

作られた「リハビリテーション医学：Rehabilitation Medicine」は、専門医会創設時は「物理医学：Physical Medicine」という名称であったが、1949年に「リハビリテーション：Rehabilitation」が追加されて、現在の米国専門医制度の1つの分野として、「物理医学とリハビリテーション：Physical Medicine and Rehabilitation：PM&R」になっている。

リハ医学での診断と治療は「物理医学：Physical Medicine」が主体となることは言うまでもない。そして、神経筋骨格系の障害によって「動けなくなった症状：Dysmobility」の診断と治療、ならびに患者（児）の社会復帰を目的とする医学・医療の専門分野であったが、時代の変遷と相俟って、現在では「リハ医学」の守備範囲は神経筋骨格系から、呼吸循環器系、認知機能、摂食嚥下機能などに広がっている³⁾。

具体的な説明を加えるなら、リハ医学の主体は、動けなくなった「随意運動障害の診断と治療」にあり、その病態検索や治療のターゲットは、大脳より脊髄に至る中枢神経から、運動単位（前角細胞、末梢神経、神経筋接合部、筋線維）の運動・感覚コントロール機構全体に関わる。そして、新しい“神経再生医療”の時代に、リハ医学の基礎として今までに培われてきた、運動単位を中心とする、神経筋病理学や筋電図・臨床神経生理学の応用が焦眉の急となっていることをリハ医学・医療関係者は改めて認識しなければならない。

現時点で、iPS細胞による再生医療の動物実験ターゲットは頸部脊髄レベルである⁴⁾。その脊損高位においては脊髄前角細胞が損傷されることによる末梢神経障害に準ずるリハ治療法が施されるが、脊損部位より下位レベルでは中枢神経麻痺であり、リハ治療では痙縮などへの対応が必要となる。将来的に神経再生医療は、脊髄より中枢の、大脳、小脳など、所謂、脊髄上（supraspinal）神経経路へも実用化されることであろう。

そこで、本稿では脊髄から遠心性、求心性神経線維ならびに神経筋接合部、筋線維を中心に、従来からリハ医学で用いられた神経筋の病理学の検体検査法などと合わせて、染色法の歴史的変遷などを概説し、若手リハ科専門医がリハ医学の基礎研究手段の1つとして参考になるように解説する。

末梢神経・筋組織標本の特徴

中枢神経（大脳、小脳、脊髄など）の病理標本は肝臓や腎臓と同じように組織を採取し作製した標本を顕微鏡で検索する。

例えば、iPS細胞を用いた脊髄損傷動物の治療実験において、iPS細胞移植動物とコントロール動物の脊髄レベルでの神経細胞再生の比較には、通常のHE（Hematoxylin-Eosin）染色やLEB（Luxol fast blue）染色が用いられている⁴⁾。

一方、末梢神経線維や筋組織が肝臓や腎臓などの臓器と異なるところは、神経線維や筋線維は収縮性が著しく、組織の採取法や固定法が容易でないことである。また、神経線維は運動線維でも感覚線維でも、組織切片を取り出すことによって、運動麻痺あるいは感覚障害をきたすために神経幹からの生検は一般的には施行されない。そのために、運動神経線維は筋肉内に分布されている筋内神経線維（intramuscular nerve fibers）を特定して採取、染色、固定して観察する。一方、感覚神経線維は切除によって、比較的臨床的に障害が少ないように、腓腹神経幹の部分切除法が用いられる場合がある⁵⁾。

本稿では筋内神経線維（intramuscular nerve fibers）の病理標本を中心に述べるが、筋内神経線維は運動神経線維のみではなく、筋紡錘（muscle spindle）や、求心性線維の病態も観察される。

メチレンブルー生体染色法

筋内神経線維の病態を検索するメチレンブルー生体染色法は1950年後半から70年代に広く用いられた。原法はCoers Cによるが⁶⁾、筆者が1970年代に利用したのはAwad Eによる変法である⁷⁾。リハ医学の基礎研究のみならず、臨床での病態検索にも比較的容易に用いられるので、具体的な染色法の手技を説明する（表）。

筋内神経線維の検体を摂取する際には、まず、表皮上から電気刺激装置を用いて、いわゆる「モーターポイント」（表面電気刺激点直下の筋腹に神経線維が走行している）を求めて、その箇所をマジック・インキでマークする。

人体からの病理検体摂取に際しては、症状を示す筋群からの標本摂取が第一となるが、症状が全身的なのであれば、標本摂取後に皮切部の瘢痕が目立たない

表 メチレンブルー生体染色法（文献7より）

- 1) メチレンブルーを生食液で0.05%に希釈。
- 2) #30 G注射針使用。
- 3) 神経・筋検体を摂取。
- 4) 検体を長軸方向に約5 mmで分切し、酸素飽和器へ移行。
- 5) 生食ガーゼ上に載せた検体を酸素飽和器内で、37°C、1時間。
- 6) モリブデン酸アンモニア飽和-4°C、冷蔵庫内一昼夜。
- 7) 水道水で1時間、水洗い。
- 8) 10%フォルマリン液に1時間浸す。
- 9) 検体を長軸方向に、約1.5 mmに分切する。
- 10) 検体を2枚のスライドガラスに挟み、手指にて圧縮する。
- 11) アルコール液、50, 80, 95, 100%の順に浸し、最後にキシレン液で2回、脱水する。
- 12) スライドガラス上に検体をカバーガラスを載せて永久標本。

ように、中殿筋などが対象となる。

約15 mmの皮切を加え、できるだけ鈍的に筋腹表層に達し、先に用意した0.04%希釈メチレンブルー溶液を30 Gの細い注射針を用いて、視野範囲の筋腹内に筋線維が膨隆するくらい力強く注入する。

検体標本摂取に際して注意しなければならない点は、筋線維や神経線維は収縮性であるために、検体標本を摂取するまえに幅約10 mmのmuscle biopsy clampなどで筋線維を挟み、clampの外枠に沿って鋭利なメスで切り取り、筋肉収縮によるアーチファクトを防ぐ。

摂取した検体標本を、長軸方向に約3 mm幅に切り分け、表に示した手順で、染色し、永久標本として顕微鏡下で観察する。

ラット、マウス等の動物実験においては、前脛骨筋や下腿三頭筋など、筋腹全体を検体標本にする場合が多いが、その際には人体標本摂取用のものより大きいmuscle biopsy clampを用いると便利である。

1. ラットでの末梢神経破壊実験と神経再生像

成熟ラットの坐骨神経周囲にアルコールの一種であるpropylene glycol 100%溶液を注入して、神経幹を化学的にブロックする。神経ブロック後に、直後の脱神経から神経麻痺が完全に回復するのは注入後約14週であり、その期間の神経線維ならびに神経筋接合部をメチレンブルー生体染色法によって検索した自験例について述べる。

被験筋は坐骨神経へのpropylene glycol注入により

一時的に完全麻痺を来した前脛骨筋全体を病理標本とし、対側前脛骨筋を対称標本とした。

図1はメチレンブルー生体染色による正常な神経筋の顕微鏡写真である。濃く染まっているのが神経線維で、末端の円形状の神経筋接合部に達している。神経線維に交差して走行する筋線維は薄く染まって見える。

Propylene glycol注入による脱神経変性は48時間後には筋内神経線維は分裂状で連続性がなくなり、一部は壊死状に融解されている（図2）。この時期には神経筋接合部ははっきりと染色されない。

神経線維の再生像は、propylene glycol注入後、6週間で筋内神経線維がビーズ状の膨隆を持ちながらも連続して観察されるようになり、神経筋接合部も染色される（図3）。

これらの、脱神経ならびに神経再生の病理像は臨床的な麻痺とその回復過程に相関していることが示唆された⁸⁾。

2. ニューロパチーのメチレンブルー生体染色像

リハ科で診断・治療する患者のなかで、全身筋力低下を訴える場合は少なくない。原疾患あるいは投薬の副作用などによって、ニューロパチー（peripheral neuropathy）を来すものもある。そのような場合には神経症状と合わせて神経の病態を把握することが必要となる。殊に、リハ治療プログラムを処方する際には、筋力増強運動は慎重に施行しなければならないからである。

筆者がリハ医学研修中に遭遇した、悪性腫瘍と糖尿病性ニューロパチーの症例を示す。

1) 悪性腫瘍に伴うニューロパチー

73歳の男性。大腸癌術後18カ月頃より下肢の筋力低下による歩行障害を訴えてリハ科を受診。明らかな下垂足歩行を示し、下肢末梢の筋力は両側対称に2/5であった。感覚障害は明らかでない。電気診断学検査で下肢末梢筋に脱神経電位を認め、腓骨神経伝導速度は、右：33.0 m/秒、左：33.4 m/秒と遅延していた。

メチレンブルー生体染色は右短腓骨筋で施行され、筋内神経線維の線維断裂、膨隆像（図4）や神経筋接合部の分裂像が観察された。神経障害の原因は代謝異常、栄養障害などが議論されたが、はっきりした要因は不詳とされた⁷⁾。

2) 糖尿病性ニューロパチー

リハ治療中の糖尿病患者（男性5名、女性5名、年

図1 ラット前脛骨筋内神経線維

濃く染まっているのが神経線維と神経筋接合部。神経線維と交差して薄く染色されて見えるのが筋線維（自験例）。

図3 ラット神経線維の再生像

神経ブロック後6週目。神経線維の連続性が認められる。線維の膨隆像は残っている（自験例）。

図2 ラット筋内神経線維の脱神経像

神経ブロック後2日目。神経線維の断裂と融解像が見られる（自験例）。

図4 悪性腫瘍患者のニューロパチー像（文献7より）
神経線維の断裂像（脱神経）が観察される。

齢26～75歳，罹患期間2～15年）で，9名は下肢腱反射減退か消失し，1名は感覚，深部覚が著明に障害されていた。

メチレンブルー生体染色所見で多く見られた所見は，筋内神経線維の一部断裂や著明な膨隆像（図5），発芽現象（sprouting）（図6）が観察された。糖尿病患者においては，末梢神経での脱神経と再生が繰り返されていることが示唆された⁹⁾。

機能性蛍光タンパク質染色法 (functional fluorescent protein staining) と末梢神経生体検査法

1980年代になると，神経筋接合部の病態像の研究

は，機能性蛍光タンパク質染色法が利用されるようになった。いわゆる「4-Di-2-ASP 染色法」ともいわれ，本体の化学成分は4-(4-diethylaminostyryl)-N-methylpyridinium iodideである。この蛍光染色は生体動物の神経筋接合部を中心に，神経線維も染色できる¹⁰⁾。

この染色法は，成熟マウスを使った実験で，繊細な技術を要する検索法である。まず，マウスの頸部前方を麻酔下で露出し，気切して人工呼吸器を装着し，左胸乳突筋の中央部を実験対象とする。

マウスは生きたままで，蛍光染色物：4-Di-2-ASPで露出された頸部を3分間浸し，その後，生食で洗い流す。次に，図7-Aに示すように，胸乳突筋中央部で神経筋接合部が集合している箇所を円形状の輪っか

図5 糖尿病患者のニューロパチー像（文献9より）
神経線維の膨隆像（ballooning）がみられる。

図6 糖尿病患者の神経再生像（文献9より）
左上に見える神経筋接合部から神経線維が発芽延長して
新たな神経筋接合部を形成している（sprouting）。

（support）で持ち上げて、その筋肉の表面に、カバーガラス（coverslip）を載せて（筋肉部を輪っかとカバーガラスで少し圧迫気味に挟むように）光学顕微鏡で観察する（図7-B）。

一連の観察後に、マウスの前頸部の切開創は閉じられ、経時的に同様な皮膚切開と気管挿管、4-Di-2-ASPで染色し、胸乳突筋中央部を観察する。先行実験で、同じ神経筋接合部が同定され、観察できることが確かめられている（図8）。

この実験系で、マウスの筋内へ入る末梢神経を圧迫挫圧で部分麻痺を起こし、その後の回復の様子を観察したものでは、神経圧迫挫圧後1週間で、末梢神経から一時的に発芽（sprout）様の膨隆像が出現するこ

図7 マウスの左胸乳突筋の神経線維生体観察法
（文献10より）

A：胸乳突筋中央部の神経筋接合部を背側から金属輪っか（support）で持ち上げる。B：顕微鏡側面図。胸乳突筋表面にカバーガラス（coverslip）を載せて少し圧迫を加えて神経線維、神経筋接合部を観察する。

とが報告されている。

また、遺伝子導入マウス（transgenic mice）を用いて、被検体の末梢神経軸索、神経筋接合部のシナプス前後で、特異的な染色となるようにして検索すると、個々の領域での病態が観察できるようになった^{11,12)}。

更に、近年、注目されるようになった四肢のしびれ、痛み、筋けいれん、自律神経異常などをきたす Small-fiber neuropathy¹³⁾ の病態検索に31名の患者の筋肉と皮膚の生検を行い、蛍光タンパク質染色法により、myelin（髄鞘）が欠如した状態やシュワン細胞活性が蛍光色素の濃度によって区別できることが報告されている¹⁴⁾。

図8 マウスの左胸乳突筋の神経線維並びに神経筋接合部 (文献10より)
A: 同一神経終末枝が10日間隔で観察されたもの. B: 同じく, 30日間隔で観察されたもの. 30日間隔った同一神経終末枝に明らかな異常像が見られなかった.

共焦点微小内視鏡検査法 (confocal endomicroscopy examination)

末梢神経・神経筋接合部の生体観察の技術は21世紀になると更に進歩し, 学術雑誌電子版の論文付属資料としてビデオ (YouTube のようなもの) を自分のパソコンで動画として見られる.

この研究は, 通常の筋電針に直径1.5 mmの共焦点微小内視鏡 (confocal endomicroscopy: CEM) を合体させた検査用具である. 前項で述べた神経線維蛍光染色法で染めた末梢神経線維を, 針筋電図でモニターしながら神経線維, 神経筋接合部に近づけ, 共焦点内視鏡から出るレーザー光線によって観察する¹⁵⁾.

図9-Aに示す共焦点微小内視鏡に針筋電合体型のプロープ (probe) を麻酔下の実験動物 (マウス) の腓腹筋内に走行する脛骨神経に沿って神経線維ならびに神経筋接合部を観察, 評価する.

神経線維ならびに神経筋接合部は YFP fluorescence で染色されており, プロープから放出されたレーザー光線によって観察できる. また, レーザー光線放出エネルギー量によって, 神経線維の状態が変化して見える (図9-B, D, E, G).

最初の観察から7日経た時期で, 同じ神経筋接合部にプロープを位置させることも可能で, 神経線維ならびに神経筋接合部の経時的な観察ができる. さらに, 刺激誘発電位が変わらないことから, 共焦点微小内視

図9 共焦点微小内視鏡検査法（文献15より一部改変）

A：通常の筋電針に直径1.5 mmの共焦点微小内視鏡を接続した像。B, D, E：マウスの脛骨神経（蛍光タンパク質で染色後）のレーザー光全出力での観察像（B：蛍光タンパク質染色が良好。D：染色を洗い流した20分後には神経線維が見えにくい。E：60分後に内視鏡プローブを動かして染色された神経線維が映し出される）。G：マウスの脛骨神経を共焦点微小内視鏡検査し、7日後に同じ神経を再確認できた像。HとI：同一の神経終末が7日間隔で観察可能であり、筋電誘発電位も同一の波形が記録された。これにより、蛍光タンパク質染色やレーザー光照射によって神経線維や神経筋接合部に何ら障害が生じていないことが証明された。

鏡検査は経時的に試行しても検査部位への損傷がないことが検証されている（図9-HとI）。

現時点で、本法は臨床的に応用されてはいないものの、末梢神経、神経筋接合部の病態検索、更には、神経再生リハビリ医療での客観的検証には有効な手技として期待される。

考 察

中枢神経損傷の機能回復は望めない、というのが長い間、常識のように考えられた。しかしながら、20

世紀後半から中枢神経に可塑性があることが認められるようになり、患者自身の持つ潜在的な回復機能とリハビリ治療が相乗して、残存する機能を最大限に活用することが中枢神経損傷の治療戦略となった。

21世紀に入ると、新たに、iPS細胞治療などが導入され、すでに、眼科領域での浸出型加齢黄斑変性症への臨床応用が2014年に開始されたことも報道され、今や、パーキンソン病や中枢神経損傷の治療法の実用化への研究も飛躍的に進歩している。

リハビリ医学・医療関係者にとって一大関心事は、京都

大学の山中伸弥教授、慶應義塾大学生理学教室の岡野栄之教授と整形外科の中村雅也教授グループが marmoset monkey を使って、頸髄損傷動物に iPS 細胞を移植し、劇的に回復する実験を成功させたことである⁴⁾。

頸髄損傷による損傷は、損傷部位では脊髄前角細胞を中心に損傷されるために、前角細胞、末梢神経、神経筋接合部、筋組織を含む、モーターユニット (motor unit)、つまり、末梢神経損傷、並びに、感覚神経系統の障害をきたす。一方、損傷部位の下位レベルでの障害は、中枢神経麻痺となるために、頸髄損傷は、中枢神経と末梢神経損傷の病態検索と治療方法を探るモデルであり、リハ医療で用いる物理的治療法 (電気刺激、磁気刺激、運動療法など) が多くに活用されなければならないし、神経再生医療での治療効果を客観的且つ非侵襲的に評価するためには、筋電図・神経伝導検査が必要である。さらに神経再生を病理学的に確認するための神経筋の病理学的検索によって重要な科学的エビデンスが提供される。

メチレンブルー生体染色法は動物実験で、人工的に作られた末梢神経障害の障害度、脱神経変性と神経再生の経緯を観察する時に比較的簡便に利用できるばかりでなく、臨床的に人体の末梢神経ニューロパチーなどの診断にも応用される。

メチレンブルー生体染色法は 1960～1980 代にかけて我が国でも、斎藤篤、初山泰弘両氏の業績^{16,17)}が見られるものの、1980 年代以降この染色法が使用された論文は皆無となった。

20 世紀末から 21 世紀初頭にかけて開発された、Lichtman JW らによる蛍光染色法¹⁰⁾は、後続する遺伝子混入法を加味して、末梢神経線維と神経筋接合部前・後の化学的特性を共焦点微小内視鏡を用いて直視的に観察できるようになり¹⁵⁾、人体へ応用するまでには至っていないものの、神経再生医療での今後の研究が期待される。

神経再生医療はリハ医学専門の中でも新たな研究課題として取り組んで行かなければならないテーマであり、iPS 細胞治療は脊髄障害、パーキンソン病などの臨床応用が取りざたされているが、将来的には脳血管障害、頭部外傷などへの移植医療も間近になっていると考えるべきであろう。そして、神経再生医療では、神経終末が元の筋線維へ到達するか否か、また、経時的な病態変化が大きな関心事となる。

本稿で対象とした病理組織は末梢神経・筋線維が中心となるが、モーターコントロール (motor control) は複雑であり、病理学的に神経線維や筋肉内器官 (神経筋接合部: neuromuscular junction, 筋紡錘: muscle spindle, ゴルジ器官: Golgi tendon organ など) の同定とその病態検索も忘れてはならない。

21 世紀に入って、iPS 細胞による神経再生医療の進歩は、従来のリハ医学の将来的展望へも大きな変革をもたらすものであり、近年、米国のコロンビア大学に新設された「リハ医学講座」は、「リハと再生医学: Department of Rehabilitation and Regenerative Medicine」と命名され、リハ医学は将に神経再生医療を包括するものであることを先鞭づけたものであり、我が国においても真剣に取り組むべきことと考える¹⁸⁾。

おわりに

21 世紀初頭の iPS 治療法の開発、殊に再生医療 (regenerative medicine) の出現により、中枢神経障害に対するリハ医学・医療の存在価値が今まで以上に高められた。それと併せて、リハ治療が神経再生治療に如何に効果的であるかの新しい戦略の構築が求められている。

神経再生の効果判定は、臨床的なものと併せて、病理学的検証が必須であり、運動機能の最終器管である、神経線維、神経筋接合部、筋線維の病理・形態検索が重要な課題となる。

病理学的には組織標本作製や染色法など特異的な手法が近年開発され、リハ医療による治療効果判定に多に利用されるべきものとする。

そしてリハ科専門医には、臨床家として神経筋骨格系疾患の新しい診断法と治療戦略の確立が求められるといえよう。

本稿の一部は第 10 回 6 大学リハビリ・カンファレンス (旭川市, 2015 年 5 月) で発表した。

文 献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676
- 2) Frontera WR: The Nobel prize, stem cells, and rehabilitation. *Am J Phys Med Rehabil* 2013; 92: 189-190
- 3) 千野直一: リハビリテーション医学の専門性を求めて—物理医学と iPS 細胞—. *Jpn J Rehabil Med* 2014; 51: 337-342

- 4) Kobayashi Y, Okada Y, Itakura G, Iwai H, Nishimura S, Yasuda A, Nori S, Hikishima K, Konomi T, Fujiyoshi K, Tsuji O, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H : Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity. *PLoS One* 2012 ; 7 : e 52787
- 5) 岡 信幸 (著), 秋口一郎 (監) : カラーアトラス 末梢神経の病理. 中外医学社, 東京, 2010
- 6) Coers C : The vital staining of muscle biopsies with methylene blue. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1952 ; 15 : 211-215
- 7) Awad EA : Motor-point biopsies in carcinomatous neuropathy. *Arch Phys Med Rehabil* 1968 ; 49 : 643-649
- 8) Chino N, Awad EA, Kottke FJ : Pathology of propylene glycol administered by perineural and intramuscular injection in rats. *Arch Phys Med Rehabil* 1974 ; 55 : 33-38
- 9) Awad EA : Motor-point biopsies in diabetic neuropathy. *Arch Phys Med Rehabil* 1970 ; 51 : 418-422
- 10) Lichtman JW, Magrassi L, Purves D : Visualization of neuromuscular junctions over periods of several months in living mice. *J Neurosci* 1987 ; 7 : 1215-1222
- 11) Magrassi L, Purves D, Lichtman JW : Fluorescent probes that stain living nerve terminals. *J Neurosci* 1987 ; 7 : 1207-1214
- 12) Zuo Y, Lubischer JL, Kang H, Tian L, Mikes M, Marks A, Scofield VL, Maika 19 S, Newman C, Krieg P, Thompson WJ : Fluorescent proteins expressed in 20 mouse transgenic lines mark subsets of glia, neurons, macrophages, and 21 dendritic cells for vital examination. *J Neurosci* 2004 ; 24 : 10999-11009
- 13) Lapate G, Streif E, Harms M, Weihl C, Pestronk A : Cramps and small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 2013 ; 48 : 252-255
- 14) Dori A, Lapate G, Keeling R, Pestronk A : Myovascular innervation : axon loss in small-fiber neuropathies. *Muscle Nerve* 2015 ; 50 : 514-521
- 15) Brown R, Dissanayake KN, Skehel PA, Ribchester RR : Endoscopy and electromyography of neuromuscular junction *in situ*. *Ann Clin Transl Neurol* 2014 ; 1 : 867-883
- 16) 斎藤 篤 : 脊柱側弯症背筋の組織学的筋電図学的研究—特に神経終末を中心として—. 千葉医学会雑誌 1964 ; 40 : 284-302
- 17) 初山泰弘 : 脱神経筋の再生に関する組織学的研究—特にcollateral branching (側副枝形成) を中心として—. 日本整形外科学会雑誌 1964 ; 38 : 375-393
- 18) Department of Rehabilitation and Regenerative Medicine, University of Columbia, HP (web site) : Available from URL : <http://cumc.columbia.edu/rehab>