反回神経損傷後の疑核における塩基性線維芽細胞増殖因子の発現

讃岐 徹治¹⁾・湯本 英二²⁾・兵頭 政光¹⁾・河北 誠二¹⁾
小森 正博¹⁾・本吉 和美¹⁾

Expression of Basic Fibroblast Growth Factor in the Nucleus Ambiguus in Rats following Unilateral Recurrent Laryngeal Nerve Injury

Tetsuji Sanuki¹⁾, Eiji Yumoto²⁾, Masamitsu Hyodo¹⁾,
Seiji Kawakita¹⁾, Masahiro Komori¹⁾ and Kazumi Motoyoshi¹⁾

Basic fibroblast growth factor (bFGF), which is a member of fibroblast growth factor family, has been demonstrated to play important roles in neural development and regeneration. In this study, we investigated the expression pattern of bFGF in the rat nucleus ambiguus (NA) following unilateral recurrent laryngeal nerve (RLN) injury and discussed the roles of bFGF on neural regeneration.

This study involved thirty-three rat subjects. In the first group (n=15), the left RLN was crushed with forceps at the location of the seventh tracheal ring. In the second group (n=15), the left RLN was resected for 5mm in length. The brainstems of rats were excised on the 1st, 3rd, 7th, 14th and 28th days after the procedure in both groups. In the normal group (n=3), rats served as controls. The brainstems were rapidly frozen and 20 μ m-thick serial sections were cut on a cryostat. The sections were processed for immunohistochemical staining using anti-bFGF antibody. The expression of bFGF in the NA was quantitatively evaluated via an image analysis technique.

Although a weak expression of bFGF in the NA was identified in the normal group, the expression had increased in the crushed and resected groups. In particular, bFGF was expressed up to 7 times as much as in the untreated side on the 14th day following RLN resection.

These findings suggest that the expression of bFGF in the NA is promoted by RLN injury and that it is deeply associated with a regeneration of the injured nerve by preventing lesion-induced neural death.

Key words: 疑核, 塩基性線維芽細胞増殖因子, 反回神経, 神経再生

はじめに

近年, 神経損傷時に種々の神経栄養因子が神経損傷部のみならず神経核においても発現することが明らかにされ, 神経再生過程における神経栄養因子の関与が注目されている¹⁾²⁾. われわれは神経栄養因子が反回神経脱神経後の神経再生に及ぼす効果について, 神経成長因子 (nerve growth factor), 毛様体神経栄養因子 (ciliary neurotrophic factor), 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, 以下 bFGF) を反回神経切断端間に局所投与することにより検討した. その結果, これら3種類の神経栄養因子の中では bFGF が神経再生に最も促進的に作用することを報告した³⁾. しかしこの研究は神経栄養因子の作用効果を反回神経損傷部で検討したものであり, 神経再生過程において重要な要因の一つである神経核, すな

わち疑核の機能維持に対する神経栄養因子の効果は未だ明らかになっていない. そこで今回, 神経切断部で反回神経再生に最も促進的に作用した bFGF の, 反回神経脱神経後の疑核神経細胞における発現様式を免疫組織学的に検討した. その結果と bFGF 発現の意義について考察を加えて報告する.

方 法

実験には生後11~12週齢の Wistar 系雄性ラット33匹を用い, 愛媛大学医学部動物実験指針に従って行った.

動物は圧迫群と切断群 (各15匹) および前処置を加えない正常群 (3匹) の3群に分けた. 圧迫群と切断群はペントバルビタール腹腔内投与 (30mg/kg) にて全身麻酔後, 前頸部を正中切開して手術用顕微鏡下に左反回神経を慎重に露出した. 同神経を喉頭への進入部より 10mm 中枢側

1) 愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学教室

2) 熊本大学医学部耳鼻咽喉科学教室

1) Department of Otolaryngology, Ehime University School of Medicine, Ehime

2) Department of Otolaryngology - Head and Neck Surgery, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto

で以下の2通りの方法で前処置した。①圧迫群：2.0kg/cm² 圧，持針部の幅1mmのマイクロサージャリー用持針器により神経を5秒間圧迫した。②切断群：反回神経を中枢側に向かって5mm切除し，神経断端には特に処置を加えなかった。

正常群の3匹と，圧迫群および切断群では処置後それぞれ1，3，7，14，28日の各3匹ずつを前述と同様の方法で全身麻酔した後，生理食塩水にて経心的に灌流し，さらに4%パラホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液(0.1M PBS, pH 7.4)で灌流固定した。その後，開頭して脳幹を摘出し，同灌流液中に5分間浸漬した後固定した。ついで脳幹を液体窒素で冷却したイソペンタン内で急速凍結し，クライオスタットを用いて，反回神経の運動神経核である疑核神経細胞が含まれる舌下神経核吻側から下オリーブ核尾側まで，20μm厚の連続切片を作成した。

1. 免疫組織学的検討

作成した切片はLabeled Streptavidine Biotin法を用いてbFGFの免疫染色を行った。まず0.25%カラゲニン，5%ウシ血清アルブミン加0.1MPBSで1時間処理し，内因性ペルオキシダーゼを失活させた。次いで正常ウシ血清アルブミンを加えた後，1次抗体(抗bFGF抗体，250倍希釈)を45分間反応させた。さらに2次抗体(ビオチン標識抗マウスIgG・ウサギ抗体，500倍希釈)を30分間反応させた後，ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンにて処理し，ジアミノベンチジンにて発色させた。標本は光学顕微鏡(以下，光顕)にて観察した。なお疑核の同定にはラット脳アトラス⁴⁾を参考にした。

2. bFGF 発現の定量的評価

光顕の組織像を鏡筒上に設置したCCDカメラ(富士写真フイルム社，FUJIX HC-300)を通してパーソナルコン

図1 画像処理によるbFGF発現の定量的比較法

- a：光顕像をCCDカメラを通してコンピューターに取り込み，疑核神経細胞を含む領域を選択する。
- b：選択範囲の画像をグレースケール256階調に変換する。
- c：閾値を設定し，免疫染色陽性部分を抽出する。
- d：白黒2階調に画像を変換して，疑核の免疫染色陽性部分の画素数を計測する。

ピューター (Apple 社, Power Macintosh 7600/132) に取り込んだ (図 1 a). 処置側および非処置側の疑核を画像解析ソフト (NIH image) を用いて以下の方法で画像処理し, bFGF 発現量を定量的に比較した. まず疑核を含む矩形領域のグレースケール256階調の画像 (図 1 b) を免疫反応陽性部分が抽出されるように閾値設定 (図 1 c) した後, 白黒2階調に画像を変換した (図 1 d). この画像より, 疑核における bFGF 陽性の神経細胞の面積, すなわちピクセル画素数を計測した⁵⁾⁶⁾. 各脳幹ごとに連続切片の1枚おきにこの計測を行い, 反回神経を支配する疑核が存在する範囲に相当する計40枚の切片での計測値を処置側, 非処置側ごとに合計した. 脳幹ごとの合計値を処置側 (左側:L) と非処置側 (右側:R) と比較 (L/R 比) することにより, bFGF 発現量を定量化し, 処置後の経過日数ごとに発現量の変化を検討した. なお今回は, 各処置後日数ごとの検討数が3匹と少ないため, 統計学的検討は行わなかった.

結 果

1. 免疫組織学的検討

正常群の疑核神経細胞も軽度ながら褐色に染色され bFGF の存在が確認できた. 圧迫群では処置の1日後には, 処置側と非処置側との間で神経細胞の染色性に明らかな差を認めなかったが, 3日後では処置側の神経細胞がわずかに濃く染色され, 7日後では非処置側との差がより明らかとなった (図 2). しかし14日後および28日後には, 両者間でほとんど差が見られなかった.

一方, 切断群では処置の1日後以降処置側が非処置側に比べて濃く染色され, 14日後に最も強い染色性を示した (図 3). 28日後には処置側の染色性は14日後に比べ減弱したが, 非処置側よりはやや強かった.

2. bFGF 発現の定量的評価

正常群では bFGF 発現に明らかな左右差は認めなかった (L/R 比: 101%). 圧迫群では処置の1, 3日後では,

図 2 圧迫群の疑核神経細胞における bFGF 免疫染色結果
a: 処置側 (処置後7日) bFGF が神経細胞の細胞質内に強く発現している.
b: 非処置側 (処置後7日) bFGF 発現は, 処置側に比べて弱い.

図 3 切断群の疑核神経細胞における bFGF 免疫染色結果
a: 処置側 (処置後14日) bFGF が神経細胞の細胞質内に強く発現している.
b: 非処置側 (処置後14日) bFGF 発現は, 処置側に比べて弱い.

図4 圧迫群と切断群におけるbFGF発現量(平均値)の定量的比較
圧迫群では処置の7日後に非処置側の225%に増加するが、1、3、14、28日後は増加がみられない。一方、切断群ではすべての時期で非処置側に比べ増加した。発現のピークは14日後にあり、発現量も圧迫群に比べ多い。

L/R比が98%および107%で処置側と非処置側との間のbFGF発現にほとんど差がなかったが、7日後には225%に増加した。14、28日後には、それぞれ109%および85%であり、処置側と非処置側との間に差は見られなかった。

切断群では、1日後ですでにL/R比が156%と処置側のbFGF発現が増加していた。その後もL/R比は増加を続け、14日後には最大の685%に達した。28日後には14日後に比べL/R比は減少したが、160%と依然として高値であった(図4)。

考 察

bFGFはこれまでに9種類が確認されている線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor)群の一つである。bFGFは正常の神経細胞内にも存在し⁷⁾、中胚葉系組織の形成や四肢形成などへの関与、神経再生に対する作用などがあるとされている^{8)~10)}。神経損傷後には神経損傷部および神経細胞において発現量が増加することも報告されている¹⁾²⁾¹¹⁾。しかし、反回神経脱神経後のbFGF発現動態は未だ解明されておらず、特に運動神経核である疑核での検討はなされていない。

今回われわれは、一側反回神経脱神経後の疑核神経細胞におけるbFGF発現を免疫組織学的に検討し、さらにその結果を画像処理的手法を用いて、非処置側と定量的に比較した。本法はMizeら⁵⁾が報告した手法で、組織の観察と定量的検討を同一標本上で比較的簡便に行うことができ、疑核のように神経細胞が散在性に存在する場合には、特に有効な解析方法であると考えられる。

今回の検討において反回神経に損傷を加えることにより、疑核でのbFGF発現量は圧迫群および切断群ともに非処置側に比べて増加した。また、圧迫群と切断群を比較すると、より強い神経損傷と考えられる切断群は圧迫群に比べてbFGFの発現が早期より増加し、増加した期間も長かつ

た。また発現量も切断群の方が圧迫群に比べて大きかった。Huberら¹⁾はラット舌下神経の神経損傷程度が異なるモデルを用いて、bFGF発現の経時的变化を検討した。その結果、神経挫滅では3日目に舌下神経核のbFGF発現量が最も増加し、16日目には非処置側と同じレベルに戻った。神経切断では11日目に発現量が最も増加し、28日目でも非処置側より高値であった。また舌下神経損傷後、損傷部位においても神経細胞と同様にbFGF発現の経時的变化が認められたとも報告した¹⁾。彼らの研究や本研究により、疑核や舌下神経核などの運動神経細胞では神経末梢部の損傷後の神経再生過程においてbFGF発現が増加することが明らかとなった。bFGF発現増加の機序としては、①bFGFは、神経組織に広く存在するとされており⁷⁾¹¹⁾、神経損傷部より遊離された多量のbFGFが損傷部位中枢端より取り込まれ、逆行性軸索輸送により神経核に達した¹²⁾¹³⁾、②神経損傷により一部の神経細胞が変性を起こし、その結果放出されたbFGFが神経核に取り込まれるか、もしくは結合することにより神経細胞におけるbFGFが増加した¹⁴⁾¹⁵⁾などの可能性が考えられる。しかし、この点に関しては未だ推測の域を出ず、今後の検討が必要であると考えられる。

Huberら¹⁾は舌下神経核で増加したbFGFは神経再生に関与するタンパク質の増加を促し、神経損傷により引き起こされる神経細胞死を防止していると報告した。また小森³⁾は、神経損傷部にbFGFを投与することにより、損傷部位での神経再生が促進されるとともに、疑核においても神経細胞の萎縮防止効果があったと報告した。このようなことから、神経核で発現したbFGFは、神経損傷により引き起こされる神経細胞の萎縮や変性を防止する効果があるものと考えられる。すなわち、bFGFなどの神経栄養因子は神経末梢の損傷部のみならず、神経細胞においても神経再生にとって重要な機能を担っていると結論づけられる。さらに、神経切断と圧迫という神経損傷程度の違いにより、運動神経核でのbFGF発現量に違いがあることは、bFGF発現に関与する一種の自己調節機構が存在していることも示唆された。

ま と め

一側反回神経脱神経後の疑核神経細胞におけるbFGF発現様式を免疫組織学的に観察し、さらに画像処理的手法により非処置側と定量的に比較した。

圧迫群では処置の1~3日後ではbFGF発現量に変化がなく、7日後に非処置側と比較して増加した。一方、切断群では、処置の1日後よりbFGF発現量が増加し14日後に最大となり、その後も発現増加が持続した。またbFGF発現の増加率も、圧迫群に比べて大きかった。この違いは神経損傷程度の違いに基づくものと考えられ、bFGFなどの神経栄養因子が神経細胞の機能維持に深く関与していることが示唆された。

本論文の要旨は、第11回日本喉頭科学会（平成11年3月、広島市）において口演した。

参 考 文 献

- 1) Huber K et al : Expression of fibroblast growth factor-2 in hypoglossal motoneurons is stimulated by peripheral nerve injury. *J Comp Neurol* 382 : 189~198, 1997.
- 2) Grothe C et al : Expression of fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor 1 messenger RNAs in spinal ganglia and sciatic nerve: regulation after peripheral nerve lesion. *Neuroscience* 76 : 123~135, 1997.
- 3) 小森正博 : 反回神経再生に対する神経栄養因子の効果. *耳鼻臨床* 92 : 677~686, 1999.
- 4) Palkovits M & Brownstein MJ : Map and guide to microdissection of the rat brain, 81~207, Elsevier, New York, 1988.
- 5) Mize RR : Quantitative image analysis for immunocytochemistry and in situ hybridization. *J Neurosci Methods* 54 : 219~237, 1994.
- 6) Toyokuni S et al : Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: Its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab Invest* 76 : 365~374, 1997.
- 7) Matsuyama A et al : Localization of basic fibroblast growth factor-like immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res* 587 : 49~65, 1992.
- 8) Grothe C et al : Basic FGF-like immunoreactivity in the developing and adult rat brainstem. *J Comp Neurol* 305 : 328~336, 1991.
- 9) Korsching S : The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci* 13 : 2739~2748, 1993.
- 10) Chen YS et al : Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF)-neutralizing antibody and platelet factor 4 on facial nerve regeneration. *Exp Neurol* 155 : 274~283, 1999.
- 11) Grothe C & Wewetzer K : Fibroblast growth factor and its implications for development and regeneration neurons. *Int J Dev Biol* 40 : 403~410, 1996.
- 12) Grothe C & Unsicker K : Basic fibroblast growth factor in the hypoglossal system: specific retrograde transport, trophic, and lesion-related responses. *J Neurosci Res* 32 : 317~328, 1992.
- 13) Grothe C & Janet T : Expression of FGF-2 and FGF receptor type 1 in the adult rat brainstem: effect of colchicine. *J Comp Neurol* 353 : 18~24, 1995.
- 14) Yoshida K & Gage FH : Fibroblast growth factors stimulate nerve growth factor synthesis and secretion by astrocytes. *Brain Res* 538 : 118~126, 1991.
- 15) Cornelio GC et al : Fibroblast growth factor (FGF) levels in the developing rat brain. *Dev Brain Res* 52 : 241~246, 1990.

別刷請求先 〒791-0295 愛媛県温泉郡重信町大字志津川
愛媛大学医学部耳鼻咽喉科学教室 讃岐徹治