

## 末梢神経慢性伸張における神経細胞体の病態

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/4530">http://hdl.handle.net/2297/4530</a>

## 末梢神経慢性伸張における神経細胞体の病態

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻機能再建学

(旧講座名：整形外科学)

(主任：富田勝郎教授)

山 内 大 輔

慢性伸張に伴う末梢神経障害の病態解明を目的に、第7腰髄後根神経節細胞の形態学的・免疫組織学的変化を検討した。家兎の大腿骨に創外固定器を装着し、1日4.0 mm (4 mm伸張群)、2.0 mm (2 mm伸張群) および0.8 mm (0.8 mm伸張群)の速度で延長することにより坐骨神経を30 mm伸張した。伸張終了直後、伸張終了後3週及び8週の時点で評価した。坐骨神経を切断した切断群も同様に評価した。神経細胞体の核が偏心性に移動した軸索反応陽性細胞率の検討では、正常群ではほとんど陽性細胞を認めなかった。切断群では $17.9 \pm 5.5\%$  (切断後1週)、 $23.4 \pm 3.7\%$  (切断後3週)、 $13.1 \pm 2.4\%$  (切断後8週)と高い陽性率を示した。4 mm伸張群では $6.7 \pm 1.8\%$  (伸張終了直後)、 $11.3 \pm 1.3\%$  (伸張終了後3週)、 $2.8 \pm 0.6\%$  (伸張終了後8週)と切断群ほどではないが増加していた。軸索反応は再生に必要な蛋白合成を行う変化のため、神経の再生の進行と共に軸索反応陽性細胞率は減少する。切断群では切断後1, 3, 8週を通して高い軸索反応陽性率を示した。4 mm伸張群では伸張終了後3週で有意な増加を認め、神経細胞体では再生に必要な蛋白合成が活発に行われていることがわかった。しかし、4 mm伸張後8週群では陽性細胞率は正常群と比べ有意差はなく、軸索反応は持続していなかった。このことから、4 mm伸張群ではより長期の経過観察により軸索の機能は回復する可能性があると考えた。2 mm伸張群では陽性細胞率の増加傾向を示したが、どの時期においても正常群と比べ有意差はなかった。これは一過性神経不動化 (neurapraxia) の状態を反映しており、家兎坐骨神経を安全に伸張できる限界速度であると考えた。0.8 mm伸張群では正常群と比べて陽性細胞率の増加はほとんど見られず、この伸張速度は神経細胞に障害を与えない安全な速度と考えた。電子顕微鏡による観察では切断群の軸索反応陽性細胞では核膜の強い不整像を認めた。これに対し、4 mm伸張群の核膜の不整像は切断群と比べて出現頻度は少なく、部位も限局し、不整の程度も小さかった。また、2 mm伸張群や0.8 mm伸張群では不整像は存在しなかった。つまり、同じ軸索反応ではあるが伸張群は切断群よりはるかに軽度な軸索反応しか生じず、伸張群でも伸張速度に応じて軸索反応の程度が決まると考えた。免疫組織染色により、神経突起先端の成長円錐の構成蛋白である成長関連蛋白43 (GAP-43) 及び神経突起の伸張を促進する神経ペプチドであるニューロペプチド-Y (NPY) の陽性細胞率を検討した。その結果、4 mm伸張後3週群のGAP-43とNPYの陽性細胞率は切断群ほどではないが、正常群と比べ有意に増加していた。2 mm伸張群では正常群と比べて有意差はなかったが、増加傾向を示し、0.8 mm伸張群では正常群と比べて陽性細胞率の増加はほとんど認められなかった。このGAP-43とNPYの発現は、伸張による軸索障害に対する修復機転を表すものと考えた。以上より、末梢神経慢性伸張による軸索障害に対し、神経細胞体は伸張速度に応じて再生に必要な蛋白合成を行っていることが判明した。

**Key words** elongation, dorsal root ganglion, axon reaction, growth associated protein-43, neuropeptide-Y

現在、外傷や腫瘍切除により末梢神経欠損が生じた場合は自家神経移植を行うことが一般的であるが、その成績は満足できるものではない<sup>1)2)</sup>。その理由は縫合部が2か所になること、血行のない組織であること、採取量に限界があるためである<sup>3)~5)</sup>。そこで、末梢神経の欠損に対して神経を延長して欠損部を補填する神経延長術が試みられてきた。それにはティッシュエクспанダーを神経幹の下に設置して延長する方法<sup>6)~8)</sup>や神経断端を縫合糸で結紮して延長する方法がある<sup>9)10)</sup>。本法の利点は血行のある神経で欠損部を補填でき、なおかつ縫合部も1か所で済むことである。しかし、ティッシュエクспанダーを用いた方法では神経には延長力だけではなく、圧迫力も加わることが考えられる。伸張した神経に圧迫損傷を加えてその機能的回復

を検討した実験がある。それによると慢性伸張された神経は健常神経では問題にならないほどの軽微な圧迫力でも容易にWaller変性に陥り、障害範囲も圧迫部を中心に広範囲に及ぶ<sup>10)</sup>。したがって、ティッシュエクспанダーを用いた神経延長は臨床的に用いた場合、機能回復に不利と考えられる。しかし、損傷された神経を直線状に伸張できればこの欠点は解決される。Margiottaら<sup>9)</sup>はラット坐骨神経の中枢端を結紮した糸をネジで巻き取ることにより神経延長が可能であったと述べているが、その機能的評価までは行っていない。Orbayら<sup>4)</sup>は猫の尺骨神経の中枢断端を結紮した糸を巻き取ることにより、3cmの延長を行い良好な成績を報告している。しかし、対象が3匹と少なく、神経周囲組織の著明な癒着が認められ臨床応用はまだ

平成14年6月5日受付，平成14年7月25日受理

Abbreviations : GAP-43, Growth associated protein-43; NPY, neuropeptide-Y

されていない。したがって、現実的には神経縫合後に脚延長を行う方法が検討されている<sup>11)</sup>。この方法では神経周囲の癒着は少なく、臨床应用到有望である。そこで、神経を延長して神経欠損を補う方法の基礎的実験として、健全な神経の伸張実験がまず必要である<sup>12)13)</sup>。当教室の森下<sup>14)</sup>は家兎の大腿骨を創外固定器で3 cm延長して間接的に坐骨神経の伸張を行い、伸張速度の違いによる神経障害について検討した。この3 cmという距離は坐骨神経に対して約30%の伸張に相当する。その結果、1日0.8 mm以下の神経伸張は伝導障害なしに伸張可能であるが、2.0 mm以上では神経はWaller変性には陥らないのにもかかわらず伝導障害をきたすと報告した。さらに中山<sup>15)</sup>は、1日2.0 mmの伸張速度では伸張終了後8週には回復するが、1日4.0 mmの伸張速度では伸張終了後8週においても伝導性の回復が認められないことを報告した。岡田<sup>16)</sup>、Ikedaら<sup>17)</sup>は1日4.0 mmの伸張速度は軸索の小径化、軸索流の障害および神経血液関門の破綻が生じていることを報告し、この変性に陥らずに伝導障害が持続する病態を神経活動停滞化 (axonoleptostasis) と呼んだ。このように慢性伸張に対する軸索の状態は解明されてきているが、神経細胞体に生じる反応の検討は未だない。本研究では、家兎坐骨神経慢性伸張モデルを用いて神経細胞体の変化に注目して検討を行った。

#### 対象および方法

##### I. 慢性神経伸張モデルの作成

体重2.5 kgの雄、日本白色家兎66羽を実験動物として使用した。家兎に塩酸ケタミン (三共, 東京) を筋肉内注射 (40–50 mg/kg) し、その後ペントバルビタール (大日本製薬, 東京) を静脈内投与 (30–50 mg/kg) して全身麻酔を行なった。左大腿骨を外側から展開して、全周性に骨膜を剥離した。4本のハーフピン (OR-HM65-5025, Jaquet orthopedie S.A., Geneva, Switzerland) を骨軸に垂直に刺入後、当科で作製した骨延長器を装着した。この延長器はネジを一回転させることで、0.8 mm延長できる機構を持っている。Thread wire saw (越屋, 金沢)<sup>18)</sup>を用いて骨幹部で骨切りを行った。創を閉じる前に、アミノグルコシド系抗生物質 (カナマイシン, 明治) 20 mg入り生理食塩水100 mlを用い洗浄した。筋膜・皮膚の縫合を行い、手術を終了した。創の治癒を得るために1週間待機し、その後延長を開始した。1日に1回の延長操作を行った。延長速度は、1日4.0 mm (4 mm伸張群: n=6)、1日2.0 mm (2 mm伸張群: n=6) と1日0.8 mm (0.8 mm伸張群: n=6) とした。森下<sup>14)</sup>の実験と同様に総延長30 mmまで脚延長を行った。4 mm伸張群および2 mm伸張群は伸張終了直後、伸張終了後3週および8週で評価した。0.8 mm伸張群は伸張終了直後で評価した。また、坐骨神経を坐骨結節部で切断・結紮してWaller変性に陥らせた切断群も作製した。この切断群を神経切断後1, 3, 8週の3群作製した (各群n=6)。正常群として健全家兎を使用した (n=6)。

##### II. 組織学的検討

それぞれの待機期間を経た後、塩酸ケタミン (三共, 東京) を筋肉内注射 (40–50 mg/kg) し、その後ペントバルビタール (大日本製薬, 東京) を静脈内投与 (30–50 mg/kg) して深麻酔下に開胸した。左心室から大動脈弓に冠動鏡液用カニューレを挿入し、ヘパリンナトリウム (和光化薬, 大阪) を10単位/ml含有の生理食塩水3 lで灌流し、2.5%グルタルアルデヒド-2%パラホルムアルデヒド-0.1Mリン酸緩衝液3 lを灌流して固

定を行なった。灌流中は大静脈を切断し開放しておいた。固定終了後に背側から腰椎の椎弓を切除し第7腰椎後根神経節を摘出した。第7腰椎後根神経節は坐骨神経からの軸索に対応しており<sup>14)</sup>、摘出時にも第7腰椎神経が坐骨神経に移行していることを肉眼で確認した。摘出した第7腰椎後根神経節は、2%グルタルアルデヒド-0.1Mリン酸緩衝液を用いて8時間浸潤固定した。後根神経節を半切し、それぞれ光学顕微鏡および電子顕微鏡での観察に用いた。

##### 1. 光学顕微鏡による後根神経節の検討

第7腰椎後根神経節の標本をエチルアルコール脱水後パラフィン包埋した。60 μm毎に厚さ2 μmの切片を8枚作製してトルイジンブルー染色を行った。光顕下に核小体が明瞭に観察される後根神経節細胞を数えた。その中で、核が偏在した細胞を軸索反応陽性細胞とし、その数から陽性細胞率 (軸索反応陽性細胞数/全細胞数) を算出した。

##### 2. 免疫組織染色による後根神経節の検討

第7腰椎後根神経節のパラフィン切片を作製し、キシレンで脱パラフィンした。3%過酸化水素水加水メタノール処置を行い、内因性ペルオキシダーゼを失活させた。10%兎正常血清でブロッキング後、一次抗体を4℃で一晩反応させた。一次抗体として用いたのは、抗GAP-43 (Growth associated protein-43) 抗体 (Mouse anti-GAP-43, 33-5000, ZYMED LABORATORIES INC., South San Francisco, USA)、および抗NPY (neuropeptide Y) 抗体 (sheep anti-neuropeptide Y polyclonal antibody, AB1583, CHEMICON International, Inc., Temecula, USA) の2種で、前者は500倍に希釈して、後者は5000倍に希釈して用いた。その後、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (avidin-biotin-peroxidase complex) 法<sup>19)20)</sup>にしたがい、抗GAP-43抗体ではビオチン標識抗マウス抗体 (ヒストファイン SAB-PO(M)キット, ニチレイ, 東京) を抗NPY抗体ではビオチン標識抗ヤギ抗体 (ヒストファイン SAB-PO(G)キット, ニチレイ, 東京) を用いた。ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ヒストファイン SAB-POキット, ニチレイ) に順次反応させ、四塩酸ジアミノベンチジン (diaminobenzidine tetrahydrochloride) で発色させた。第7腰椎後根神経節は60 μm毎に2 μmの切片を8枚作製し、それぞれ抗GAP-43抗体、抗NPY抗体で染色した。細胞質が染色された細胞を陽性細胞とした。ヘマトキシリン液

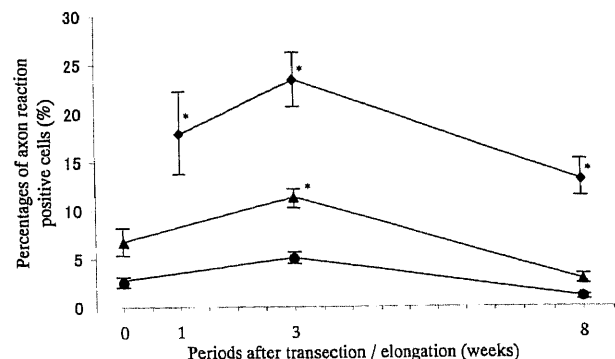


Fig. 2. Percentages of axon reaction-positive cells of the 7th lumbar root ganglion neurons. ◆, sciatic nerve transection group; ▲, 4.0 mm/day elongation group; ●, 2.0 mm/day elongation group. Data are  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ . \*  $P < 0.05$  compared with control group ( $0.1 \pm 0.1\%$ ).



に10秒間浸して核染した。光顕下に核小体が明瞭に観察される陽性細胞数および全後根神経節細胞数を数えた。その数から陽性細胞率(抗GAP-43抗体, 抗NPY抗体陽性細胞数/全細胞数)を算出した。組織学的検討で得られた成績は、すべて平均

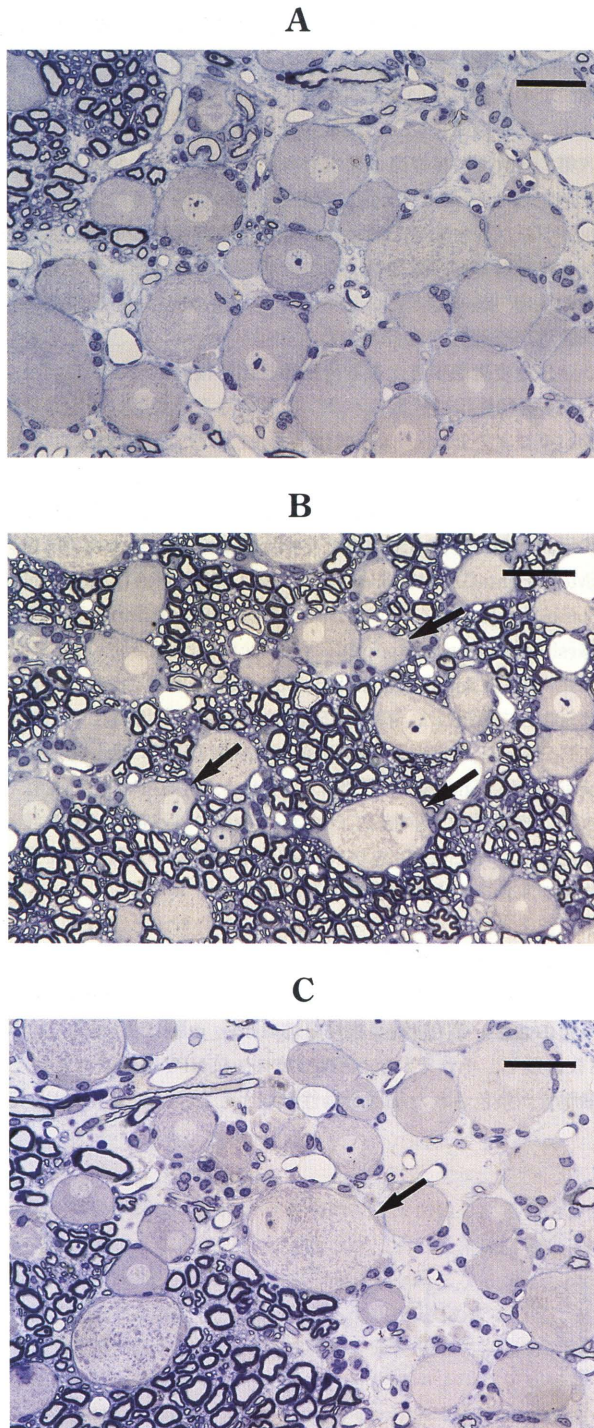


Fig. 1. Photomicrograph of dorsal root ganglion neurons (Toluidine blue stain).

(A) A circular, centrally located nucleus is evident. There are few axon reaction-positive cells in the control group. (B) Large numbers of axon reaction-positive cells are observed three weeks after sciatic nerve transection. (C) Some axon reaction-positive cells are apparent three weeks after 4.0 mm/day elongation. The cell numbers are lower than those of the transection group. The arrow indicates axon reaction-positive cells. Scale bar indicates 25  $\mu$ m.

値±標準誤差( $\bar{X} \pm \text{SEM}$ )で示した。各群間の有意差の判定には、多重比較検定(Tukey-Kramer法)を用いて検討を行った。 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

### 3. 電子顕微鏡による後根神経節の検討

1%オスミウム酸-0.1Mリン酸緩衝液で後固定を行なった。

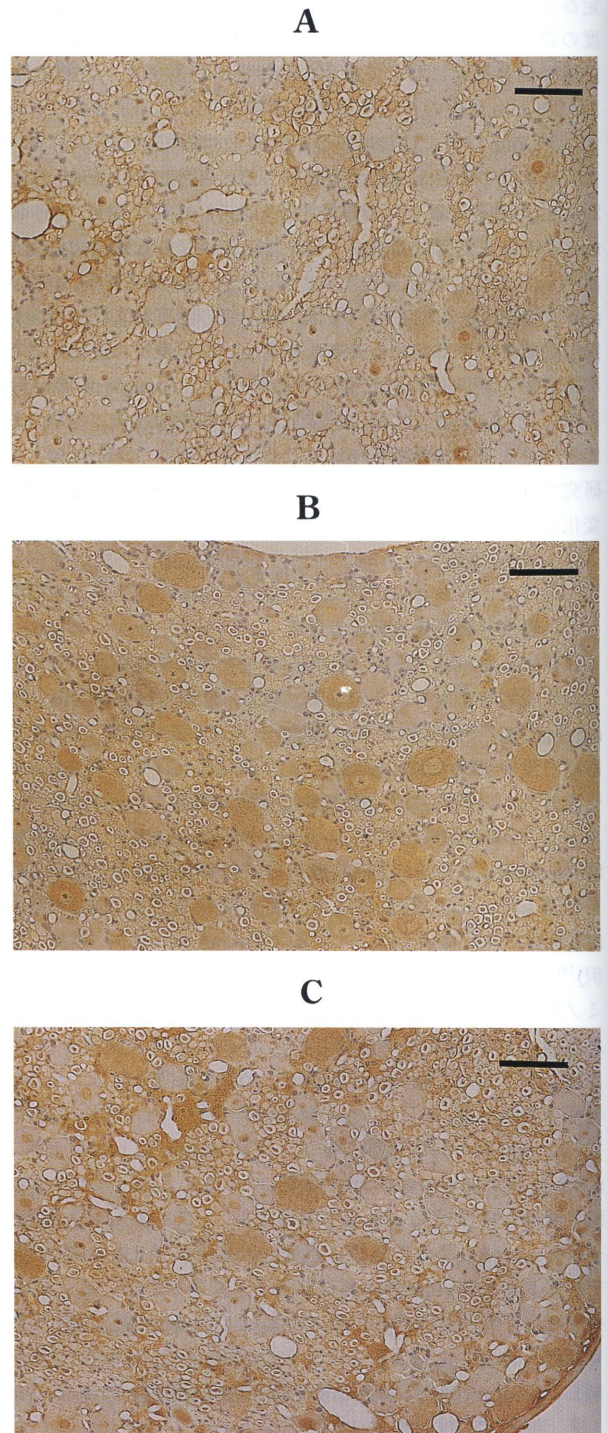


Fig. 3. Seventh lumbar dorsal root ganglion neurons are immunostained with anti-growth associated protein-43 (GAP-43) antibody. (A) Small numbers of GAP-43-positive cells are observed in the control group. (B) Large numbers of GAP-43-positive cells are observed three weeks after sciatic nerve transection. (C) Some GAP-43-positive cells are apparent three weeks after 4.0 mm/day elongation. The cell numbers are lower than those of transection group. Scale bar indicates 50  $\mu$ m.



その後、エチルアルコールで脱水しエポン812に包埋して、第7腰髄後根神経節の横断超薄切片を作製して、H-300型透過型電子顕微鏡(日立、東京)を用いて観察した。すべての実験群、対照群について標本を作製して観察した(n=66)。

## 成 績

全例で大腿骨の30mmの延長が可能であった。創部の感染を生じた家兎は認めなかった。固定終了時に坐骨神経を観察し、全例で坐骨神経が伸張されていることを確認できた。

### I. 光学顕微鏡による後根神経節の検討

トリジンブルー染色では、正常群の後根神経節細胞の核は細胞の中心にあり、核膜も円形を保っていた(図1A)。軸索反応陽性細胞率は $0.1 \pm 0.1\%$ とほとんど陽性細胞を認めなかった。

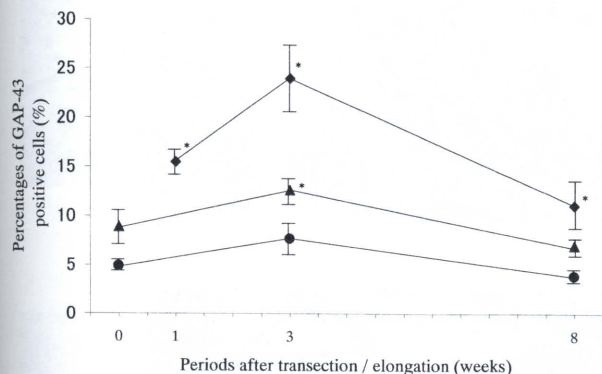


Fig. 4. Percentages of GAP-43-positive cells in the 7th lumbar root ganglion neurons. ◆, sciatic nerve transection group; ▲, 4.0 mm/day elongation group; ●, 2.0 mm/day elongation group. Data are  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ . \*  $P < 0.05$  compared with control group ( $1.6 \pm 0.6\%$ ).

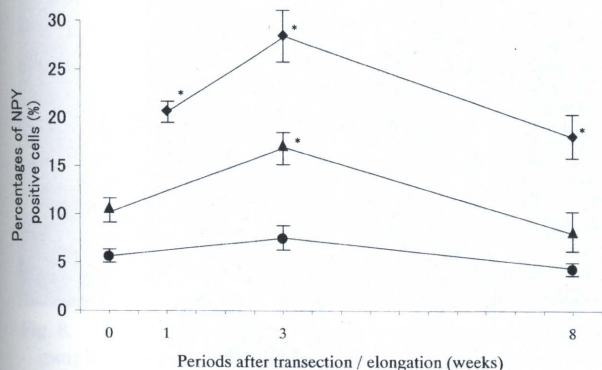


Fig. 6. Percentages of NPY-positive cells in the 7th lumbar root ganglion neurons. ◆, sciatic nerve transection group; ▲, 4.0 mm/day elongation group; ●, 2.0 mm/day elongation group. Data are  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ . \*  $P < 0.05$  compared with control group ( $2.1 \pm 1.0\%$ ).

これに対し、切断群の後根神経節細胞の核は偏心性に移動し、核膜は円形を呈さなくなった(図1B)。切断群の軸索反応陽性細胞率は $17.9 \pm 5.5\%$ (切断後1週),  $23.4 \pm 3.7\%$ (切断後3週),  $13.1 \pm 2.4\%$ (切断後8週), いずれの時点でも正常群に比べて有意に増加していた。4mm伸張群でも軸索反応陽性細胞を認め

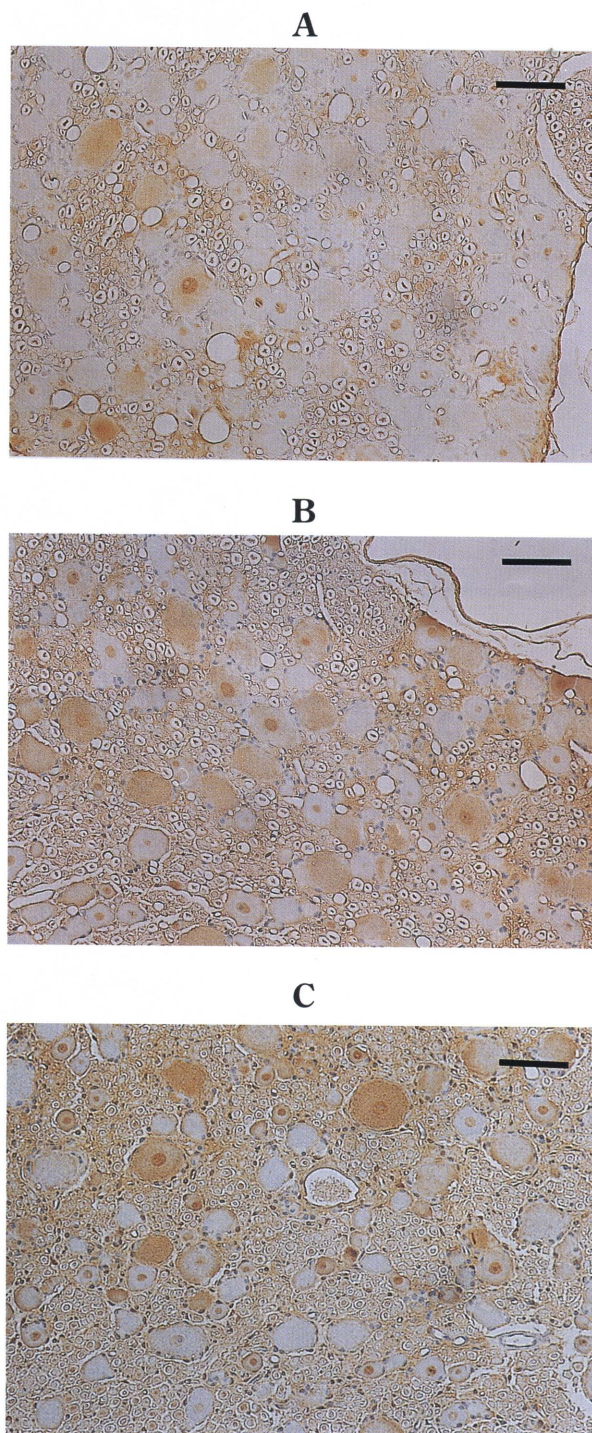


Fig. 5. Seventh lumbar dorsal root ganglion neurons are immunostained with anti-neuropeptide-Y (NPY) antibody. (A) Small numbers of NPY-positive cells are observed in the control group. (B) Large numbers of NPY-positive cells are observed three weeks after sciatic nerve transection. (C) Some NPY-positive cells are apparent three weeks after 4.0 mm/day elongation. The cell numbers are lower than those of transection group. Scale bar indicates  $50 \mu\text{m}$ .



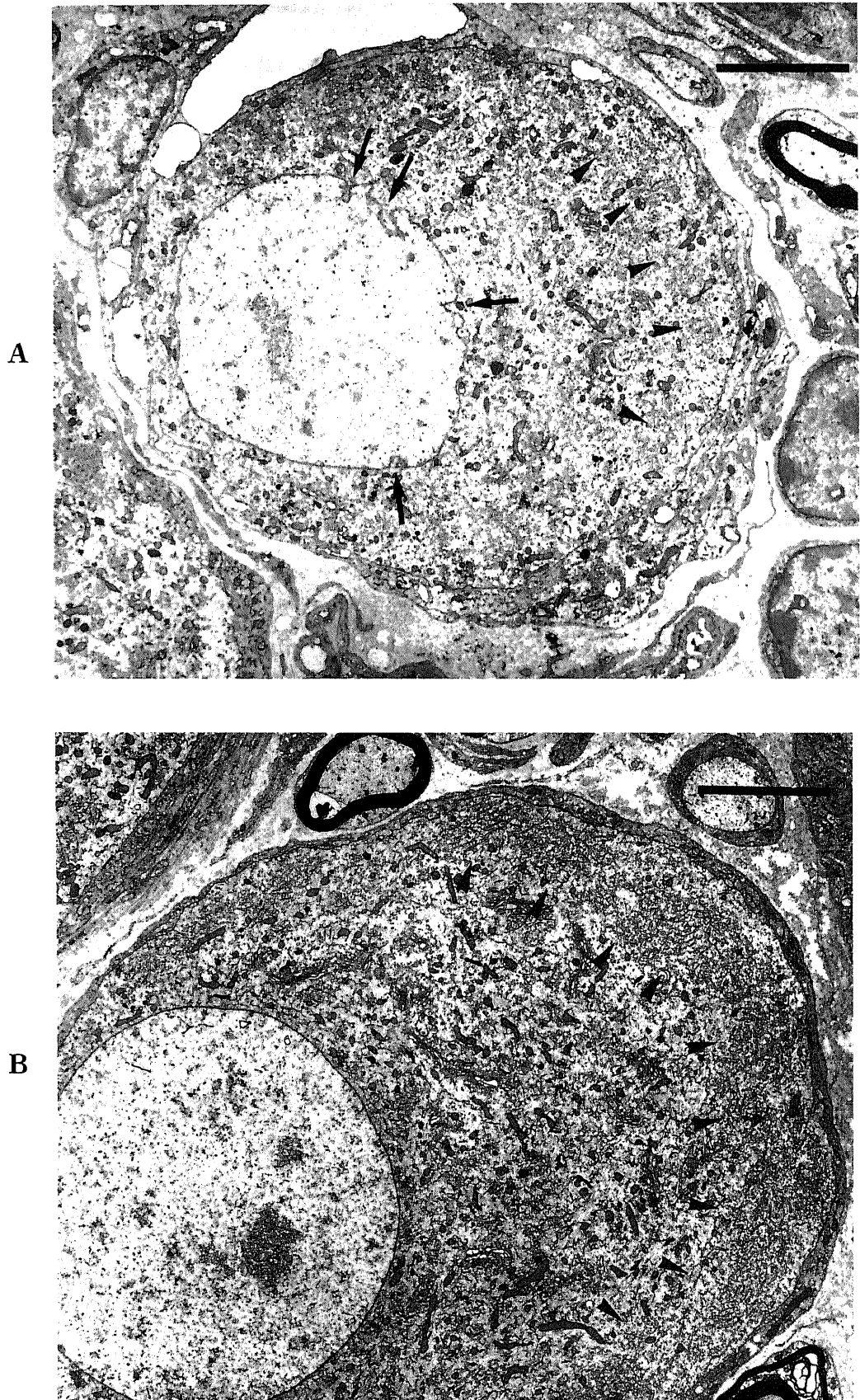


Fig. 7. Electron micrograph of dorsal root ganglion neurons. (A) Eccentric location of the nucleus, irregularity of nuclear outline and dispersion of Nissl substance are evident in the first week after sciatic nerve transection. (B) Eccentric position of the nucleus and aggregation of Nissl substance at the peripheral aspect of the cell are observed immediately after elongation of 4.0 mm/day. The arrow indicates the irregularity of nuclear outline. The arrow head indicates the aggregation of Nissl substance at the peripheral aspect of the cell. Scale bar indicates 5  $\mu$ m.

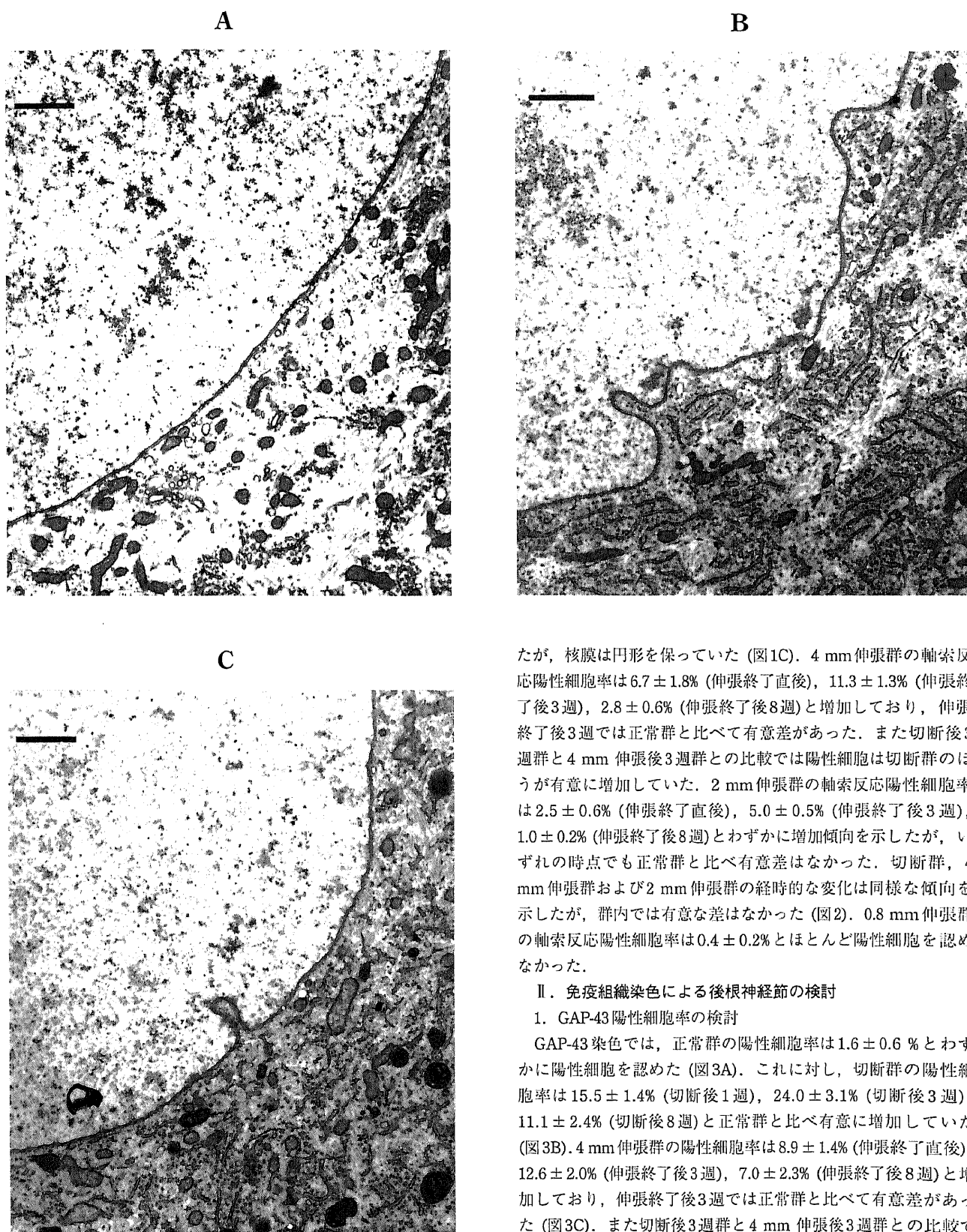


Fig. 8. Electron micrograph of nuclear outline of dorsal root ganglion neurons. (A) A smooth, round nuclear outline is present in the control group. (B) Remarkable irregularity of nuclear outline and nuclear capping (the appearance of Nissl substance adjacent to the nuclear surface) are evident in the first week after sciatic nerve transection. (C) Slight irregularity of nuclear outline is observed immediately after elongation of 4.0 mm/day. Scale bar indicates 1  $\mu$ m.

たが、核膜は円形を保っていた (図1C)。4 mm伸張群の軸索反応陽性細胞率は $6.7 \pm 1.8\%$  (伸張終了直後),  $11.3 \pm 1.3\%$  (伸張終了後3週),  $2.8 \pm 0.6\%$  (伸張終了後8週)と増加しており、伸張終了後3週では正常群と比べて有意差があった。また切断後3週群と4 mm伸張後3週群との比較では陽性細胞は切断群のほうが有意に増加していた。2 mm伸張群の軸索反応陽性細胞率は $2.5 \pm 0.6\%$  (伸張終了直後),  $5.0 \pm 0.5\%$  (伸張終了後3週),  $1.0 \pm 0.2\%$  (伸張終了後8週)とわずかに増加傾向を示したが、いずれの時点でも正常群と比べ有意差はなかった。切断群、4 mm伸張群および2 mm伸張群の経時的な変化は同様な傾向を示したが、群内では有意な差はなかった (図2)。0.8 mm伸張群の軸索反応陽性細胞率は $0.4 \pm 0.2\%$ とほとんど陽性細胞を認めなかった。

## II. 免疫組織染色による後根神経節の検討

### 1. GAP-43陽性細胞率の検討

GAP-43染色では、正常群の陽性細胞率は $1.6 \pm 0.6\%$ とわずかに陽性細胞を認めた (図3A)。これに対し、切断群の陽性細胞率は $15.5 \pm 1.4\%$  (切断後1週),  $24.0 \pm 3.1\%$  (切断後3週),  $11.1 \pm 2.4\%$  (切断後8週)と正常群と比べ有意に増加していた (図3B)。4 mm伸張群の陽性細胞率は $8.9 \pm 1.4\%$  (伸張終了直後),  $12.6 \pm 2.0\%$  (伸張終了後3週),  $7.0 \pm 2.3\%$  (伸張終了後8週)と増加しており、伸張終了後3週では正常群と比べて有意差があった (図3C)。また切断後3週群と4 mm伸張後3週群との比較では、切断群のほうが有意に陽性細胞は増加していた。2 mm伸張群の陽性細胞率は $4.9 \pm 0.7\%$  (伸張終了直後),  $7.7 \pm 1.4\%$  (伸張終了後3週),  $3.9 \pm 0.7\%$  (伸張終了後8週)とわずかに増加傾向を示したが、いずれの時点でも正常群と比べ有意差はなかった。これらの経時的な変化は同様な傾向を示したが、群内での有意差はなかった (図4)。0.8 mm伸張群の陽性細胞率は $2.0 \pm$

0.7%とわずかに陽性細胞を認めたが、正常群と比べて差はなかった。

## 2. NPY陽性細胞率の検討

NPY染色では、正常群の陽性細胞率は $2.1 \pm 1.0\%$ とわずかに陽性細胞を認めた(図5A)。これに対し、切断群の陽性細胞率は $20.7 \pm 1.4\%$ (切断後1週)、 $28.5 \pm 4.0\%$ (切断後3週)、 $18.1 \pm 2.9\%$ (切断後8週)と正常群と比べ有意に増加していた(図5B)。4mm伸張群の陽性細胞率は $10.6 \pm 2.0\%$ (伸張終了直後)、 $17.1 \pm 1.4\%$ (伸張終了後3週)、 $8.2 \pm 0.9\%$ (伸張終了後8週)と増加しており、伸張終了後3週では正常群と比べて有意差があった(図5C)。また切断後3週群と4mm伸張後3週群との比較では陽性細胞は切断群のほうが有意に増加していた。2mm伸張群の陽性細胞率は $5.6 \pm 0.7\%$ (伸張終了直後)、 $7.5 \pm 1.8\%$ (伸張終了後3週)、 $4.3 \pm 0.7\%$ (伸張終了後8週)とわずかに増加傾向を示したが、いずれの時点でも正常群と比べ有意差はなかった。これらの経時的な変化は同様な傾向を示したが、群内での有意差はなかった(図6)。0.8mm伸張群の陽性細胞率は $2.0 \pm 0.8\%$ とわずかに陽性細胞を認めたが、正常群と比べて差はなかった。

## Ⅲ. 電子顕微鏡による後根神経節の検討

正常群では核は細胞の中心に位置していた。切断群では核が辺縁移動した細胞が多く観察された。核は円形を呈せず、核膜には多くの不整像を認めた(図7A)。Nissl小体が辺縁のみに残存した中心性色素融解の像も観察された。伸張群でも核が辺縁移動した細胞が観察された。核はほぼ円形であったが、4mm伸張群では時に不整像を認めた。中心性色素融解の像も観察された(図7B)。核膜に着目すると正常群の核膜は明瞭で辺縁は整っていた(図8A)。これに対し、切断群の核膜には強い不整像やニッスル小体の集簇(nuclear capping)を認めた(図8B)。これらの像は切断後1, 3, 8週どの時期においても共通であった。伸張群では核膜の不整像を呈する細胞は4mm伸張群にのみ存在し、2mm伸張群や0.8mm伸張群では存在しなかった。この4mm伸張群の核膜の不整像は切断群と比べて出現頻度は少なく、部位も限局し不整の程度も小さかった(図8C)。切断群・伸張群ともに核小体やミトコンドリアには変化は認められなかった。

## 考 察

本研究は軸索の慢性伸張に伴った神経細胞体の変化についての初めての基礎的な報告である。慢性伸張に対して神経細胞体は軸索反応を生じ、神経突起先端の成長円錐の構成蛋白(GAP-43)や、その神経突起の伸張を促進する神経ペプチド(NPY)を発現した。これらの反応は4mm伸張群では強く生じていたが、0.8mm伸張群では生じていなかった。したがって、神経細胞体は伸張速度に応じて再生に必要な蛋白合成を行っていることが明らかになった。

このような伸張操作後に生じる変化を検討するためには軸索切断後の神経細胞体の状態との比較が重要である。神経細胞にとって、その細胞体は蛋白をはじめとした生存の維持にかかわる物質の産生と補給の中核である。したがって細胞体から切り離された軸索はそれ自体で生き続けることはできず、やがて崩壊して消失する<sup>21)</sup>。Nisslは軸索が切断された場合、その影響は細胞体にも及ぶことを報告した。そして、辺縁部を残して中心部のNissl小体が消失することを報告し、これを中心性色素

融解と呼んだ。この変化はニューロンが変性して死へと向かう退行性の変化ではなく、再生に必要な蛋白を合成するための変化として軸索反応と呼ばれている<sup>22)</sup>。軸索反応の所見として、もっとも明瞭な形態変化は中心性色素融解、細胞体の肥大、核の偏位と言われている。しかし、これら以外にも様々な構造上の変化が生じることが報告されている。家兎やラットの神経の切断実験では軸索反応の他に核膜の不整像、Nuclear capping(ニッスル小体が核の周囲を包む)や核小体の凝集・偏位などの変化が報告されている<sup>23)24)</sup>。Nathanielら<sup>25)</sup>は軸索切断後の核膜の変化について検討し、核膜の不整像や核膜孔の増加は神経切断後3日目より出現することを報告し、これらの変化は再生に必要な蛋白を合成するための変化であると述べている。本研究の結果からは切断群の軸索反応を生じた細胞では強い核膜の不整像を認めた。これに対して4mm伸張群の核膜の不整像は切断群と比べて出現頻度は少なく、部位も限局し不整の程度も小さかった。また2mm伸張群や0.8mm伸張群では不整像は存在しなかった。つまり、同じ軸索反応ではあるが伸張群は切断群よりはるかに軽度な軸索反応しか生じず、伸張群でも伸張速度に応じて軸索反応の程度が決まると考えた。

軸索反応を生じた細胞でも再生神経が標的に到達した場合には軸索反応は消失することが知られている<sup>21)</sup>。また、坐骨神経の再生を阻害した実験で、軸索の機能が回復しない場合の神経細胞体の変化も検討されている。その結果、核の偏位度は術後2週で一度ピークを迎え、その後やや低下するものの術後1か月から15か月間は偏位度は変わらず、回復が生じないものは軸索反応は持続する<sup>26)</sup>。本研究の結果からは切断群では内尾<sup>26)</sup>の報告と同様に切断後1, 3, 8週を通して正常群と比べて有意に高い軸索反応の陽性率を示した。また、4mm伸張群の軸索反応の陽性率も伸張終了後3週では正常群と比べて有意な増加を認め、高度な軸索障害を反映していた。しかし、伸張終了後8週では正常群と比べ有意差はなく、軸索反応は持続していなかった。したがって、4mm伸張群においては長期の経過観察により、軸索の機能は回復する可能性があると考えた。2mm伸張群の軸索反応の陽性率は全体的に低く、正常群と比べて有意差はなかった。これは一過性神経不動化(neurapraxia)の状態を反映したものと考えた。0.8mm伸張群ではほとんど陽性細胞の増加は認められず、この速度での伸張は神経細胞に障害を与えないことがわかった。

神経細胞は無酸素、中毒物質、放射線や機械的圧迫などの強い外因が急激に働いた場合には壊死を生じる。また軸索切断により、幼若な動物だけではなく<sup>27)~29)</sup>、成体でもアポトーシスが生じるとの報告<sup>30)31)</sup>がある。Liら<sup>32)</sup>は、成体マウスの神経根の引き抜き実験では、アポトーシスではなく壊死が生じると報告している。本研究の結果からは切断群や4mm/日の伸張であっても壊死やアポトーシスの像は存在しなかった。したがって4mm伸張群による軸索障害の程度は神経細胞体に壊死やアポトーシスを生じさせるほど強くはなく、神経細胞体には再生のための蛋白合成能が十分保たれていると考えた。

再生神経細胞にみられる蛋白合成変化はニューロフィラメント蛋白の合成抑制、チューブリンおよびアクチンの合成増加やGAP-43発現量の増加などがある<sup>33)</sup>。これらは軸索突起伸張が盛んな発生初期の状態と同様に再生神経が標的に到達するまで持続する。GAP-43は軸索伸張に際して神経突起先端に形成される成長円錐の構成蛋白であり、新たな細胞骨格の構築に役立つ



つ<sup>34)35)</sup>。発生過程においても軸索突起の成長円錐にのみ存在し、成長に伴ってその量が減少し、成熟動物ではほとんど検出されない<sup>36)</sup>。つまり、GAP-43は軸索の伸張や再生時にのみ発現する。GAP-43は標的との結合が失われたという傷害シグナルにより発現する。したがって、軸索と神経終末の標的細胞との接触により傷害シグナルが消失すると同時にGAP-43の発現は抑制される。逆に神経の再生を阻害した場合には活性は低下しない<sup>37)38)</sup>。本実験の結果からも切断群では切断後1, 3, 8週を通して正常群と比べて有意に高いGAP-43の陽性率を示した。伸張群でもGAP-43は伸張速度に応じて増加しており、4 mm伸張後3週群では正常群と比べて有意差があった。中山ら<sup>15)</sup>は4 mm伸張群においてランビエ絞輪部を電子顕微鏡で観察することにより軸索膜の損傷が生じていることを報告している。したがって、GAP-43はこの軸索膜の修復に使われているものと考えた。また、0.8 mm伸張群では正常群と比べてGAP-43陽性細胞の増加を認めず、軸索の損傷がほとんどない状態を反映しているものと考えた。

軸索切断により後根神経節細胞ではNPYをはじめ、血管作動性腸管ポリペプチド (vasoactive intestinal polypeptide) やガランニン (galanin) などさまざまな神経伝達物質である神経ペプチドが産生されることが知られている<sup>39)40)</sup>。これらの神経ペプチドは神経の再生時に神経突起にまで運ばれて作用する。NPYには神経突起の伸張を促進する作用がある<sup>41)42)</sup>。NPYの発現はGAP-43と同様に傷害シグナルにより調節される<sup>43)</sup>。本研究の結果からは伸張群ではNPYは伸張速度に応じて増加しており、4 mm伸張後3週群では正常群と比べて有意差があった。この神経突起の伸張を促進するNPYの発現は伸張による軸索損傷に対する修復反応と考えられた。

以上のことから、慢性伸張における軸索障害では神経細胞体は伸張速度に応じて再生に必要な蛋白合成を行っていることが明らかとなった。しかし、4 mm/日といった過度の速度での伸張では、再生に必要な蛋白合成は生じているものの、伸張終了後8週では軸索障害は修復されない。したがって、家兔坐骨神経の伸張速度の限界は2 mm/日であると考えた。また、神経細胞体に障害を与えない伸張速度は0.8 mm/日と判明し、これは臨床で行われている脚延長術の延長速度である1.0 mm/日の妥当性を支持する結果であった。

## 結 論

家兔の大腿骨を延長することにより、坐骨神経を慢性的に伸張した。4 mm伸張群、2 mm伸張群および0.8 mm伸張群の3群を作製した。伸張終了直後、伸張終了後3週および8週に後根神経節細胞の組織学的・免疫組織学的評価を行い、切断群・正常群と比較検討した。

1. 4 mm伸張群では、神経細胞体は軸索反応を生じ、神経突起先端の成長円錐の構成蛋白 (GAP-43) やその神経突起の伸張を促進する神経ペプチド (NPY) を発現するなど、再生に必要な蛋白合成を活発に行っていることが判明した。しかし、伸張終了後8週では軸索反応は持続しておらず、4 mm伸張群では長期の経過観察により軸索の機能が回復する可能性があると考えた。

2. 2 mm伸張群では神経細胞体に軸索反応やGAP-43・NPYの発現をわずかに認めた。これは一過性神経不動化 (neurapraxia) の状態を反映しており、家兔坐骨神経を安全に

伸張できる限界速度であると考えた。

3. 0.8 mm伸張群では神経細胞体の変化をほとんど認めなかった。したがって、この速度での伸張は神経細胞に障害を与えないことがわかった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師富田勝郎教授に深甚なる謝意を表します。また直接御指導を賜りました金沢大学医学部整形外科学講座池田和夫講師、そして組織学的実験および検討において御指導を賜りました同医学部解剖学第二講座田中重徳教授に深謝致します。最後に本研究を遂行するにあたり、御協力を戴きました解剖学第二講座白石昌武技官、整形外科学講座笠井洋子氏に感謝の意を表します。なお、本論文の要旨は第16回日本整形外科基礎学術集会 (広島, 2001) において発表した。

## 文 献

- 1) Mackinnon SE, Hudson AR. Clinical application of peripheral nerve transplantation. *Plast Reconstr Surg* 90: 695-699, 1992
- 2) Best TJ, Mackinnon SE, Bain JR, Makino A, Evans PJ. Verification of a free vascularized nerve graft model in the rat with application to the peripheral nerve allografts. *Plast Reconstr Surg* 92: 516-525, 1993
- 3) Taylor GI. The free vascularized nerve graft. *Plast Reconstr Surg* 57: 413-426, 1976
- 4) Orbay J, Lin H, Kummer FJ. Repair of peripheral nerve defects by controlled distraction: a preliminary study. *Bull Hosp Jt Dis* 52: 7-10, 1993
- 5) Doi K, Tamaru K, Sakai K. A comparison of vascularised and conventional sural nerve grafts. *J Hand Surg [Br]* 17: 670-676, 1992
- 6) Endo T, Nakayama Y. Histologic examination of peripheral nerves elongated by tissue expanders. *Br J Plast Surg* 46: 421-425, 1993
- 7) Hall GD, Van Way CW, Fei' Tau Kung, Compton-Allen M. Peripheral nerve elongation with tissue expansion techniques. *J Trauma* 34: 401-405, 1993
- 8) Wood RJ, Adson MH, Vanbeek AL, Peltier GL, Zubkoff MM, Bublick MP. Controlled expansion of peripheral nerves: comparison of nerve grafting and nerve expansion / repair for canine sciatic nerve defects. *J Trauma* 31: 686-690, 1991
- 9) Margiotta MS, Usal H, Karp NS, Dublin BK, Sagiroglu J, Ting V, Kasabian AK. A nerve distraction model in the rat. *Ann Plast Surg* 40: 486-489, 1998
- 10) Ikeda K, Yokoyama M, Tomita K, Tanaka S. Vulnerability of the gradually elongated nerve to compression injury. *Hand Surgery* 6: 29-35, 2001
- 11) Marios D, Vekris, Michael Bates, Julia K. Terzis. Optimal time for distraction osteogenesis in limbs with nerve repairs: Experimental study in the rat. *J Reconstr Microsurg* 15: 191-201, 1999
- 12) 安部幸雄, 土井一輝, 酒井和裕, 山本久司, 河合信也. 血行動態の変化からみた末梢神経延長の限界 - 低速延長による実験的検討 -. *日手会誌* 12: 472-476, 1995
- 13) Skoullis TG, Vekris MD, Terzis JK. Effect of distraction osteogenesis on the peripheral nerve: experimental study in the

- rat. *J Reconstr Microsurg* 14: 565-574, 1998
- 14) 森下 裕. 末梢神経慢性伸張における神経障害に関する基礎的研究. *十全医会誌* 103: 857-869, 1994
- 15) 中山博文. 末梢神経慢性伸張障害後の回復に関する実験的研究. *十全医会誌* 104: 483-491, 1995
- 16) 岡田和子. 末梢神経慢性伸長に伴う神経活動停滞化の病態について. *十全医会誌* 109: 165-176, 2000
- 17) Ikeda K, Okada K, Tomita K, Tanaka S. Pathogenesis of the gradually elongated nerve. *Hand Surgery* 6: 167-175, 2001
- 18) Tomita K, Kawahara N. The threadwire saw : a new device for cutting bone. *J Bone Joint Surg* 78-A: 1915-1917, 1996
- 19) Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) In Immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-588, 1981
- 20) Hsu SM, Raine L, Fanger H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* 75: 734-738, 1981
- 21) 佐野 豊. 神経科学形態の基礎. I. ニューロンとグリア, 第1版, 金芳堂, 京都, 1995
- 22) Lieberman AR. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int Rev Neurobiol* 14:49-124, 1971
- 23) Aldskogius H. Fine structural changes in nerve cell bodies of the adult rabbit dorsal motor vagal nucleus during axon reaction. *Neuropathol Appl Neurobiol* 4: 323-341, 1978
- 24) Serman AB, Delannoy MR. Cell body responses to axonal injury: traumatic axotomy versus toxic neuropathy. *Exp Neurol* 89: 408-419, 1985
- 25) Nathaniel EJ, Nathaniel DR. Electron microscopic studies of spinal ganglion cells following crushing of dorsal roots in adult rat. *J Ultrastruct Res* 45: 168-182, 1973
- 26) 内尾祐司. 急性・慢性圧迫障害の病態. *日整会誌* 69:342-357, 1995
- 27) Snider WD, Thanedar S. Target dependence of hypoglossal motor neurons during development in maturity. *J Comp Neurol* 279: 489-498, 1989
- 28) 八木沼洋行. 神経系の発生過程におけるプログラム細胞死. *神経進歩* 40:173-186, 1996
- 29) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972
- 30) Groves MJ, Christopherson T, Giometto B, Scaravilli F. Axotomy-induced apoptosis in adult rat primary sensory neurons. *J Neurocytol* 26: 615-624, 1997
- 31) Edstrom A, Ekstrom PA, Tonge D. Axonal outgrowth and neuronal apoptosis in cultured adult mouse dorsal root ganglion preparations: effects of neurotrophins, of inhibition of neurotrophin actions and of prior axotomy. *Neuroscience* 75: 1165-1174, 1996
- 32) Li L, Houenou LJ, Wu W, Lei M, Prevette DM, Oppenheim RW. Characterization of spinal motoneuron degeneration following different types of peripheral nerve injury in neonatal and adult mice. *J Comp Neurol* 396: 158-168, 1998
- 33) Bisby MA, Tetzlaff W. Changes in cytoskeletal protein synthesis following axon injury and during axon regeneration. *Mol Neurobiol* 6: 107-123, 1992
- 34) Zuber MX, Goodman DW, Karns LR, Fishman MC. The neuronal growth-associated protein GAP-43 induces filopodia in non-neuronal cells. *Science* 244: 1193-1195, 1989
- 35) Meiri KF, Pfenninger KH, Willard MB. Growth-associated protein, GAP-43, a polypeptide that is induced when neurons extend axons, is a component of growth cones and corresponds to pp46, a major polypeptide of a subcellular fraction enriched in growth cones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 3537-3541, 1986
- 36) Goslin K, Schreyer DJ, Skene JH, Banker G. Development of neuronal polarity: GAP-43 distinguishes axonal from dendritic growth cones. *Nature* 336: 672-674, 1988
- 37) Basi GS, Jacobson RD, Virag I, Schilling J, Skene JH. Primary structure and transcriptional regulation of GAP-43, a protein associated with nerve growth. *Cell* 49: 785-791, 1987
- 38) Schreyer DJ, Skene JH. Fate of GAP-43 in ascending spinal axons of DRG neurons after peripheral nerve injury: delayed accumulation and correlation with regenerative potential. *J Neurosci* 11: 3738-3751, 1991
- 39) Wakisaka S, Kajander KC, Bennett GJ. Increased neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in rat sensory neurons following peripheral axotomy. *Neurosci Lett* 124: 200-203, 1991
- 40) Noguchi K, De Leon M, Nahin RL, Senba E, Ruda MA. Quantification of axotomy-induced alteration of neuropeptide mRNAs in dorsal root ganglion neurons with special reference to neuropeptide Y mRNA and the effects of neonatal capsaicin treatment. *J Neurosci Res* 35: 54-66, 1993
- 41) Nahm I, Shin T, Watanabe H, Masuko S. Neurite regeneration in the cat recurrent laryngeal nerve: an immunohistochemical study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 249: 385-388, 1992
- 42) White DM, Mansfield K. Vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y act indirectly to increase neurite outgrowth of dissociated dorsal root ganglion cells. *Neuroscience* 73: 881-887, 1996
- 43) Verge VM, Richardson PM, Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T. Differential influence of nerve growth factor on neuropeptide expression in vivo: a novel role in peptide suppression in adult sensory neurons. *J Neurosci* 15: 2081-2096, 1995



**Nerve cell body responses to gradual elongation of peripheral nerves.** Daisuke Yamauchi. Department of Orthopaedic Surgery, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 – J. Juzen Med Soc., **111**, 218 – 227 (2002)

**Key words** elongation, dorsal root ganglion, axon reaction, growth associated protein-43, neuropeptide-Y

#### **Abstract**

The purpose of this study was to examine the pathogenic changes in nerve cell bodies during gradual peripheral nerve elongation. Elongation of the sciatic nerve was achieved by applying an external lengthener to the femur of Japanese white rabbits. Elongation rates were 4.0 mm/day (4-mm group), 2.0 mm/day (2-mm group), or 0.8 mm/day (0.8-mm group) for a final elongation of 30 mm. Immediately upon completion of the elongation, and three and eight weeks thereafter, the seventh lumbar dorsal root ganglion (DRG) was exposed and examined. The group which had undergone transection of the sciatic nerve (transection group) was assessed one, three and eight weeks following the procedure. The DRG cells which showed axon reaction and positive immunoreactivity to growth-associated protein-43 (GAP-43) and neuropeptide-Y (NPY) were counted. Electron micrographs showed an eccentric nuclear location in the axon reaction-positive cells. While the intact DRG contained few cells that showed axon reaction, the DRG of the transection group contained  $17.9 \pm 5.5\%$  of such cells one week,  $23.4 \pm 3.7\%$  three weeks, and  $13.1 \pm 2.4\%$  eight weeks after the transection. The corresponding figures for the DRG of the 4-mm group were  $6.7 \pm 1.8\%$  immediately after elongation,  $11.3 \pm 1.3\%$  three weeks, and  $2.8 \pm 0.6\%$  eight weeks afterwards. Although the 4-mm group contained fewer axon reaction-positive cells than the transection group, the number was significantly greater than that for the intact DRG. The fact that the axon reaction-positive cells of the 4-mm group increased three weeks after elongation and had decreased by eight weeks demonstrates that the DRG cells recovered from the damage caused by elongation of the peripheral nerves. The axon reaction-positive cells of the 2-mm group increased only a little, while those of the 0.8-mm group showed virtually no change. These results suggest that elongation was not harmful for the DRG cells of the 0.8-mm group. The immunoreactivities of GAP-43 and NPY changed in parallel with the ratios of axon reaction-positive cells. In conclusions, 0.8 mm/day is a safe elongation speed in terms of its effect on the nerve cell bodies. The nerve cell bodies were damaged by elongation of 4.0 mm/day, unlike those of the nerve transection group, but proved to be capable of recovery.