

# 末梢神経慢性伸張に伴う神経活動停滞化の病態について

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/2297/9477">http://hdl.handle.net/2297/9477</a>

## 末梢神経慢性伸張に伴う神経活動停滞化の病態について

金沢大学医学部医学科整形外科科学講座 (主任: 富田勝郎教授)

岡田和子

脚伸張に伴う神経障害の予防と、神経延長術の臨床応用を目的として、慢性伸張による末梢神経障害を検討した。家兎大腿骨に創外固定器を装着し、1日2.0 mm (2 mm延長群) および4.0 mm (4 mm延長群) の速度で延長することにより、坐骨神経を合計30 mm (正常坐骨神経長の約30%相当) まで延長した。2 mm延長群では、軸索横断面の抗リン酸化ニューロフィラメント (p-NF) 抗体に対する染色性は、対照群と同様であった。これに対し、4 mm延長群では、個々の軸索の抗p-NF抗体での染色面積は減少していた。さらに抗p-NF抗体に対する染色性を失った軸索が出現し、その数は、延長終了直後、3週、8週と経過するにつれて増加する傾向を示した。軸索の抗チューブリン抗体に対する染色性は、2 mm延長群、4 mm延長群ともに、それぞれ抗p-NF抗体に対する染色性と同様の結果であった。第7腰髄後根神経節細胞1000個あたりの抗p-NF抗体陽性細胞の数は、対照群が $174.9 \pm 6.6$ 個に対し、Waller変性群 $388.0 \pm 17.8$ 個、4 mm 1週後群 $233.9 \pm 12.6$ 個、4 mm 3週後群 $233.8 \pm 10.6$ 個で、4 mm延長群はWaller変性群ほどの増加は認めなかったが、対照群に比べ有意に増加していた ( $p < 0.05$ )。対照群では、静脈内に投与されたエバンスブルーアルブミン (Evans blue-albumin, EBA) の神経束内への漏出は認めなかった。これに対し、2 mm延長群ではEBAはわずかに神経束内に漏出しており、4 mm延長群ではEBAは明らかに神経束内に漏出していた。4 mm延長群の軸索では、ニューロフィラメントのリン酸化が障害されており、微小管も損傷されていることから、軸索流の障害が生じていると考えられた。また4 mm延長群の軸索では、血液神経関門の機能破綻をきたしたと考えられた。以上より、4 mm延長群において、軸索流の障害と血液神経関門の機能破綻をきたしたことが、Waller変性に陥らないにもかかわらず、伝導障害が回復しない一因と考えた。2 mm延長群では、軽度の血液神経関門の損傷を生じたために、一過性の伝導障害をきたしたと考えられた。4 mm延長群の神経では、軸索の小径化と軸索流の停滞がみられ、変性も回復もせずその活動が停滞しているという意味から、この病態を神経活動停滞化 (axonoleptostasis) と表現した。2 mm延長群の神経は一過性神経不動化 (neurapraxia) の状態と考えられ、保存的治療により伝導障害は回復する。これに対し、4 mm延長群の神経活動停滞化は、いったん陥ると治療法のない神経障害と考えられ、その予防に細心の注意を払うことが重要と考えた。神経の機能回復という点から考えると、家兎坐骨神経においては、1日2.0 mmが延長速度の限界と考えられた。

---

**Key words** peripheral nerve injury, elongation, axonal flow, blood-nerve barrier
 

---

末梢神経に欠損が生じた場合の再建は、現在のところ神経移植術が行われている。しかし、神経移植術には、縫合部が2か所になること、ドナーとして用いることのできる神経の長さや径には限りがあること、また神経採取部に知覚鈍麻や過敏といった愁訴を残しうる、といった問題点がある。これらの問題点を解決するために、培養シュワン細胞による人工神経<sup>13)</sup>や、同種神経移植が試みられている<sup>14)</sup>が、縫合部はやはり2か所であることが問題となる。さらに同種神経移植では、免疫抑制剤を長期にわたり服用しなければならないなど、まだ解決すべき問題点は多い。これらの問題に対する新しい解決法として、神経延長術が近年試みられている<sup>5, 10)</sup>。この方法には、縫合部が1か所で済むこと、必要な長さだけ延長で補填することができること、神経の径はほぼ同じであること、また損傷された神経そのものを延長するので、健常部を犠牲にしないこと、など多くの利点がある。しかし、その基礎的研究はまだ十分とはいえない。Margiottaら<sup>5)</sup>は、ラット坐骨神経を切断し、近位端に糸を

かけて神経だけを延長するモデルを作製したが、神経を物理的に延長することができたと述べるにとどまり、延長した神経の機能的評価は行っていない。また、ティッシュエクспанダーを用いた神経延長の実験では、Woodら<sup>6)</sup>が、イヌ坐骨神経を4~6週かけて2 cm延長することができたが、神経周膜の肥厚を認めたと報告した。またHallら<sup>7)</sup>は、ラット坐骨神経をティッシュエクспанダーを用いて40%の延長を行うと、伝導障害と浮腫を認めたと報告した。しかしいずれの報告も、延長神経の病態や、その損傷が可逆的かどうかという点についての検討はない。神経延長術を実際に臨床応用するには、延長による神経障害の病態を明らかにし、その予防や可逆性について検討していく必要がある。森下ら<sup>11)</sup>は、家兎大腿骨を延長することによって坐骨神経慢性伸張モデルを作製した。それによれば、家兎坐骨神経を約30%延長する場合、0.8 mm/日以下の速度では安全に延長できたが、2.0 mm/日以上では伝導障害を生じていた。また中山<sup>12)</sup>は同様のモデルを用い、2.0 mm/日で延長し

平成12年3月1日受付, 平成12年4月13日受理

Abbreviations: EBA, Evans blue-albumin; NF, neurofilament; p-NF, phosphorylated neurofilament

た神経は8週後に伝導障害の回復が認められたが、4.0 mm/日で延長した神経では回復は認められなかったと報告した。したがって、この両者の速度で延長した神経障害の相違を調べることで、延長中の神経の病態および回復の可能性などを予想できるのではないかと考え、このモデルを用いて実験を行った。

#### 対象および方法

体重約2.5 kg前後の雄、日本白色家兎42羽を実験動物として使用した。家兎に対して塩酸ケタミン(三共、東京)を筋肉内注射(50~60 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)して全身麻酔を行い、大腿骨を側方より展開した。4本のハーフピン(OR-HM65-5020, 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。さらに骨幹部で骨切りし、カナマイシンスプレー(明治製薬、東京)を噴霧後、筋膜、皮膚縫合を行い手術を終了した。創の治癒を待つために1週間待機した後、延長を開始した。

この骨延長器は、ネジを1回転させることで0.8 mm延長できる機構となっており、延長は1日に1度、ネジを必要量だけ回転させることによって行った。延長距離は1日2.0 mm(以下2 mm 3週後群とする、n=6)および4.0 mm(以下4 mm群とする、n=27)とし、合計30 mmまで延長した。4 mm群は、延長終了直後群(n=6)、1週後群(n=6)、3週後群(n=12)、および8週後群(n=3)を作製し、坐骨神経と第7腰椎後根神経節を摘出して評価した。対照は対側の坐骨神経および第7腰椎後根神経節とした。また坐骨切痕の高さで坐骨神経を切断、結紮したWaller変性群(n=9)も作製した。

#### I. 神経延長率の検討

坐骨神経を坐骨結節から前脛骨筋進入部まで露出して、その腓骨神経成分の長さを測定した。また大腿骨を摘出して大転子先端から顆部下端までの長さを測定した。得られた数値はすべて $\bar{x} \pm \text{SEM}$ で表した。神経、大腿骨とも、延長側と対照側の長さの差を延長分とした。骨延長分に対する神経延長分の割合と、神経延長分を対照側の神経長で除した神経延長率を算出した(n=33)。

#### II. 組織学的検討

##### 1. 免疫組織染色による軸索内細胞骨格の検討

塩酸ケタミン(三共)を筋肉内注射(50~60 mg/kg)し、その後ペントバルビタール(大日本製薬)を静脈内投与(30~50 mg/kg)して、深麻酔下に開腹、開胸した。腹部大動脈に18G静脈留置針を、また左心室から大動脈弓に関節鏡排液用カニューレを挿入し、双方から0.1Mリン酸緩衝液21、続いて4%パラホルムアルデヒド-0.1Mリン酸緩衝液21で灌流固定した。灌流中は、大静脈を切断し開放しておいた。坐骨神経を坐骨結節から前脛骨筋進入部までを一塊として摘出した。さらに背側から腰椎を露出して椎弓を切除し、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>12)</sup>、摘出時にも第7腰椎神経が坐骨神経に参加していることを肉眼で確認している。4%パラホルムアルデヒド-0.1Mリン酸緩衝液で後固定し、エタノール脱水後、パラフィン包埋した。

坐骨神経および第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。0.3% Triton-X 100(和光、大阪)加0.1Mリン酸緩衝生理食塩水を1時間浸透させたのち、

0.3%過酸化水素加メタノール処理を行い、内因性ペルオキシダーゼを失活させた。1%ウシ血清アルブミン(和光)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、抗リン酸化ニューロフィラメント(phosphorylated neurofilament, p-NF)抗体(SMI31, Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, USA)、および抗チューブリン抗体(T9002, Cedarlane Laboratories Ltd., Hornby, Canada)の2種で、前者は5000倍希釈、後者は500倍希釈して用いた。これは、あらかじめ予備実験を行い、適正に染色された希釈倍率のものを用いた。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>14)15)</sup>に従って、ビオチン標識抗マウスIgG抗体(BA-2000, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA)、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(P 0397, DAKO A/S, Glostrup, Denmark)に順次反応させ、四塩酸ジアミノベンチジン(diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)で発色させた。

1) 摘出した坐骨神経の中央部で1 cm長の神経片と、その近位、遠位に1.5 cm離れた部分で1 cmの神経片を採取し、標本を作製した。横断切片において、抗p-NF抗体による免疫染色を行い、染色性を比較検討した(4 mm群、n=15; 2 mm 3週後群、n=3; Waller変性群、n=9)。また、経時的な染色性の変化を比較するために、対照群(n=6)と、4 mm延長終了直後群(n=6)、4 mm 3週後群(n=6)、4 mm 8週後群(n=3)の標本を用い、以下の方法で検討を行った。神経の横断面の光学顕微鏡写真をパーソナルコンピューター(Power Macintosh 8100/80, Apple Computer, Inc., Cupertino, USA)にAdobe Photoshop™ Version 3.0(Adobe Systems Inc., Mountain View, USA)を用いて取り込んだ。そのコンピューター画像上に、100  $\mu\text{m}$ 四方の範囲を任意に4か所設定した<sup>16)</sup>。その範囲内の、染色された軸索の数と、染色性を失った軸索数を数え、軸索100本あたりの染色性を失った軸索の割合を算出した。神経の横断面において、ヘマトキシリンで核染される細胞のほとんどはシュワン細胞である<sup>17)</sup>。そして、このシュワン細胞に隣接する無

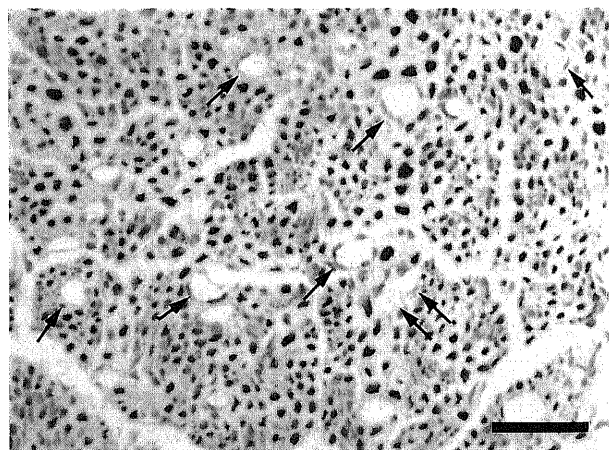


Fig. 1. Light micrograph of elongated sciatic nerve immunostained with anti-phosphorylated neurofilament (p-NF) antibody. The empty area surrounded by Schwann cells (counterstained with hematoxylin) indicates the axon lost its p-NF immunoreactivity. This is called an "immunologically empty axon" (arrows). Scale bar indicates 50  $\mu\text{m}$ .

染色領域は、抗原性のある細胞骨格を失った軸索 (immunologically empty axon) である。したがって、この無染色領域を伴うシュワン細胞の数を、染色性を失った軸索数として数えた (図1)。各群の数値の平均値の差は、Bartlett検定によ

り異分散であったので、Kruskal-Wallis検定後、Scheffeの多重比較法により検定した。危険率5%をもって有意差ありと判定した。

2) 前述と同様の方法で、抗チューブリン抗体で免疫染色し、

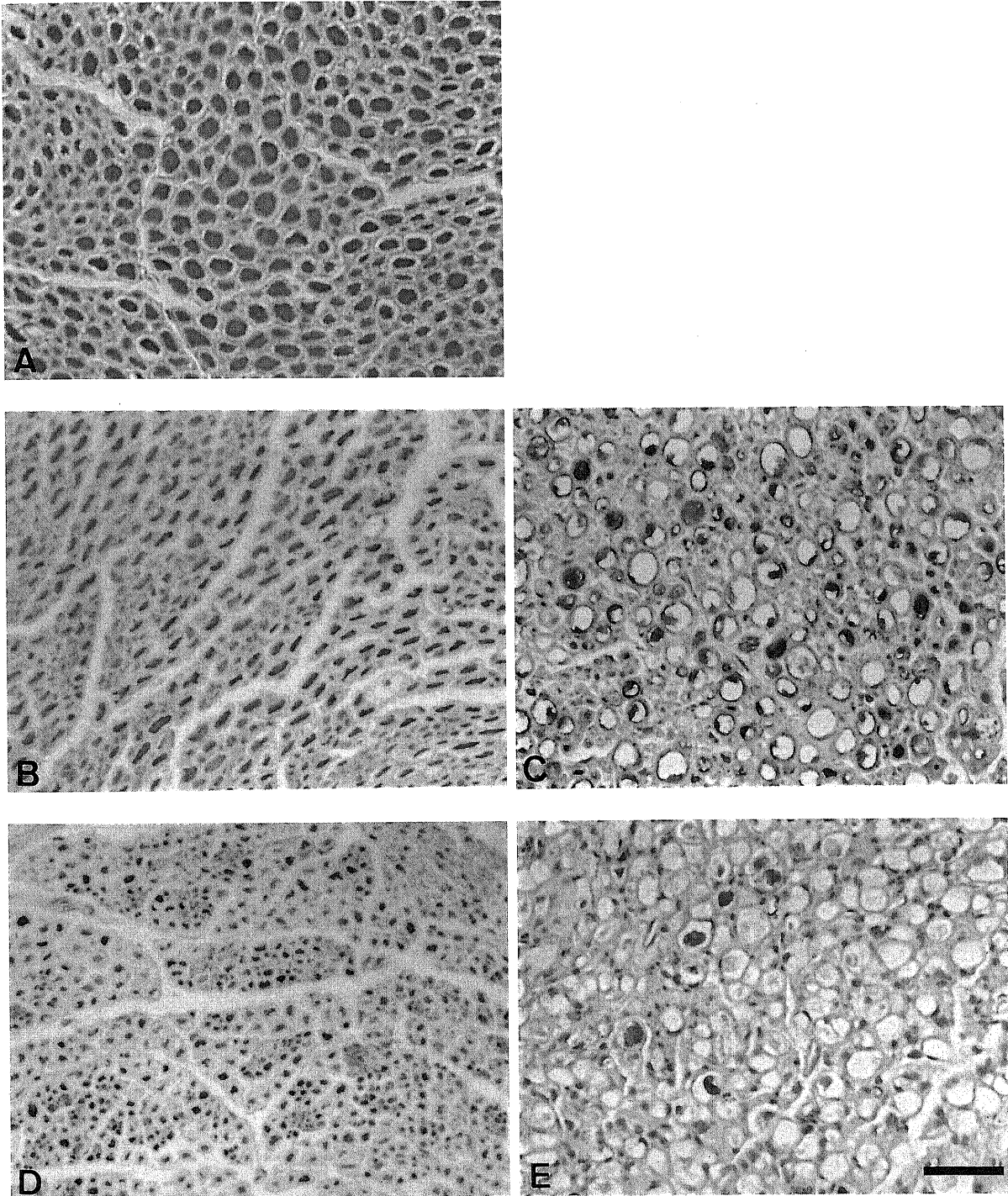


Fig. 2. Light micrograph of transected sciatic nerve immunostained with anti-phosphorylated neurofilament (p-NF) antibody. (A) Control. p-NF immunoreactivity is clearly observed in axons, which exhibit dense and homogeneous immunoreactivity. (B) Proximal segment of transected nerve one week after transection. The axons include dense and homogeneous immunoreactivity, but the immunoreactive area is smaller than that of the control. (C) Distal segment of transected nerve one week after transection. There are fewer p-NF positive axons and the immunoreactivity is granular or nonhomogeneous. (D) Proximal segment of transected nerve three weeks after transection. Immunoreactivity is similar to that seen in (B). (E) Distal segment of transected nerve three weeks after transection. Immunoreactivity of the axons has almost vanished. All micrographs have the same magnification. Scale bar indicates 50  $\mu$ m.

染色性を比較検討した (4 mm 群,  $n=15$ ; 2 mm 3週後群,  $n=3$ ; Waller 変性群,  $n=9$ )。チューブリンは主要な軸索内細胞骨格のひとつで、軸索流の舞台である微小管の基本構成タンパクである。

3) 第7腰髄後根神経節は、 $10\ \mu\text{m}$ の連続切片を作製し、1枚のスライドガラス上に $60\ \mu\text{m}$ 毎に1枚の割合で計8切片並べてのせ、抗p-NF抗体で染色した。ヘマトキシリンで核染色し、光学顕微鏡下に核小体が明瞭に観察される後根神経節細胞を1枚のスライドガラス上ですべて数えた。さらにその中で、抗p-NF抗体染色陽性となった細胞数をすべて数えて、後根神経節細胞1000個あたりの陽性細胞数の割合を算出した。各群の数値の平均値の差は、Bartlett検定により等分散であったので、一元配置分散分析後、Scheffeの多重比較法により検定した (4 mm 群,  $n=12$ ; Waller 変性群,  $n=6$ )。危険率5%をもって有意差ありと判定した。

## 2. 血液神経関門の検討

Rydevikら<sup>18)</sup>の方法に準じて、以下の方法で神経内血管の透過性を観察した。リンゲル液100 mlにエバンスブルー (和光, 大阪) 1 g, ウシ血清アルブミン (和光) 5 gを溶解した後、セフ

ァデックスカラム (G-25, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 中を通して遊離エバンスブルーを除去し、エバンスブルーアルブミン (Evans blue-albumin, EBA) 溶液を作製した。延長終了後3週経過した家兎に、EBAを10 ml/kg 静脈内投与し、30分後に腹部大動脈から10%ホルマリン溶液500 mlを灌流して固定した。坐骨神経の中央部を採取し、10%ホルマリン溶液で1時間後固定した後、 $10\ \mu\text{m}$ の凍結横断切片を作製し、蛍光顕微鏡で観察した (4 mm 群,  $n=6$ ; 2 mm 群,  $n=3$ )。蛍光顕微鏡下では、神経組織の自家蛍光は観察されず、EBAの自家蛍光は赤色として観察される。神経が障害を受けて血管透過性が亢進すると、正常では血管外へ漏出しないEBAが神経束内へ漏出する<sup>19)</sup>。神経束内のEBAは、灌流しても除去されずに残るため、投与したEBAのうちで漏出した部分だけが蛍光顕微鏡下で観察することができる。

## 成 績

### I. 坐骨神経の延長率

家兎大腿骨長は、対照群で平均 $102.2 \pm 3.1\ \text{mm}$ 、実験群で $132.0 \pm 3.6\ \text{mm}$ であり、延長分は平均 $29.8 \pm 1.4\ \text{mm}$ であった。

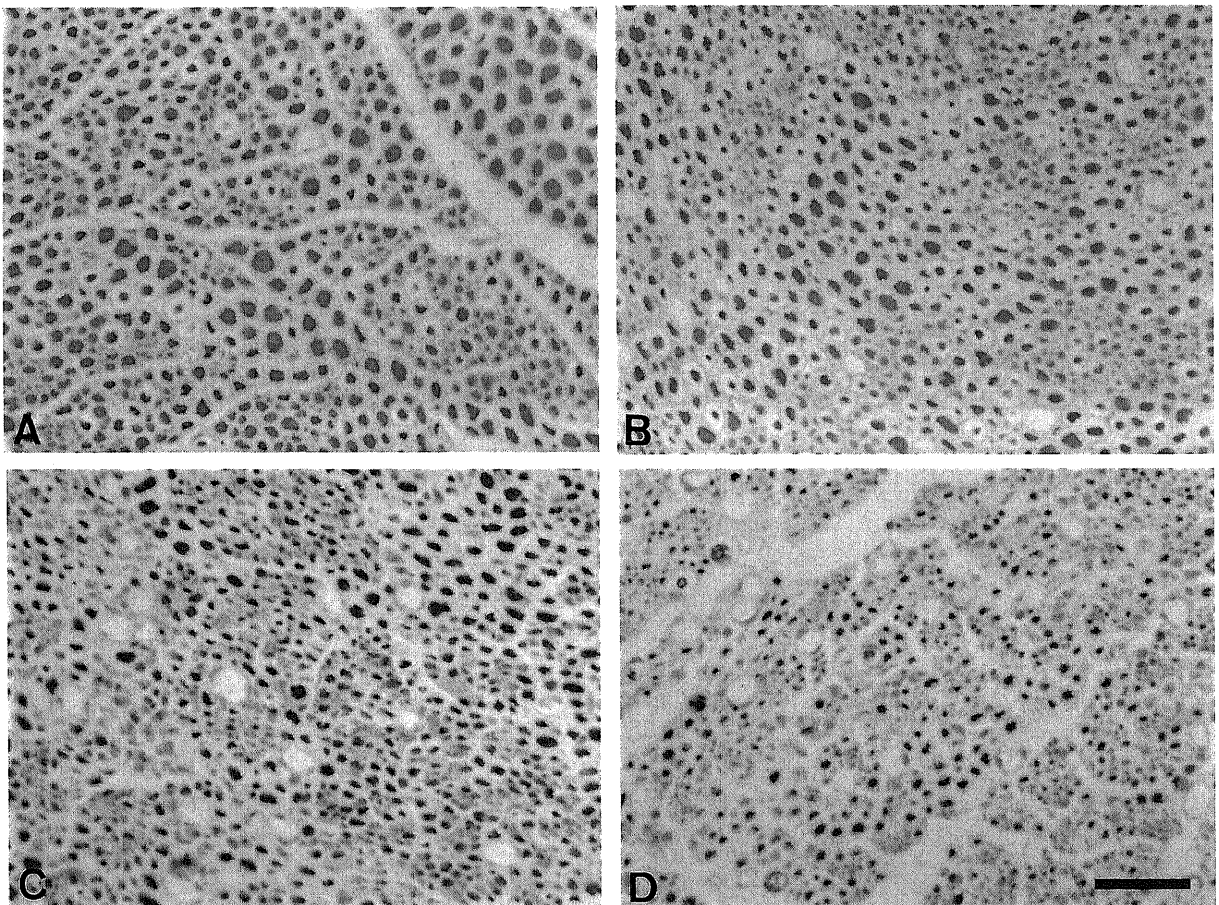


Fig. 3. Light micrograph of middle segment of elongated sciatic nerve immunostained with anti-phosphorylated neurofilament antibody. The immunoreactivity of axons is dense and homogeneous in all groups. (A) Three weeks after 2.0 mm/day elongation. Immunoreactivity of the axons is similar to that of the control. (B, C, D) 4.0 mm/day elongation group. The immunoreactive area in every axon became smaller than that of the control, and following elongation, more and more axons show loss of immunoreactivity; (B) immediately after, (C) three weeks after, (D) eight weeks after elongation. All micrographs have the same magnification. Scale bar indicates  $50\ \mu\text{m}$ .

神経長は、対照群で平均  $83.7 \pm 4.1$  mm, 実験群で  $111.2 \pm 5.4$  mm であり, 延長分は平均  $28.0 \pm 2.0$  mm であった. 正常神経長に対する神経延長率は平均  $33.5 \pm 3.1\%$  であった. また, 骨延長分に対する神経延長分の割合は平均  $94.2 \pm 7.0\%$  であった.

## II. 組織学的検討

### 1. 軸索内細胞骨格の検討

#### 1) 軸索の抗 p-NF 抗体に対する染色性

##### i. 対照群, Waller 変性群

対照群では, 神経の近位 (図 2A), 中央, 遠位いずれの部位でも軸索に一致して均一に染色されていた. 切断後 1 週の Waller 変性群の, 切断部より中枢では, 軸索に一致して均一に染色されていたが, 対照群に比べて個々の軸索の染色面積が減少していた (図 2B). 切断部より末梢では, 髄鞘の内側に縁取るように染色されて中央が抜けている軸索, 不規則な形に染色される軸索, ニューロフィラメント (neurofilament, NF) の崩壊産物と思われる顆粒状の壊死組織片<sup>20)</sup>を有する軸索が多く認められた. また染色性を失った軸索も出現していた (図 2C). 切断後 3 週経過しても, 切断部より中枢では切断後 1 週と同様の染色性を示した (図 2D). しかし切断部より末梢では, ほと

んど軸索は染色性が失われており, 顆粒状の壊死組織片がわずかに残存していた (図 2E).

##### ii. 実験群

2 mm 3 週後群は, 対照群と同様で, 軸索に一致して均一に染色されていた (図 3A). 4 mm 延長終了直後群は, どの部位も個々の軸索の染色面積は対照群に比較して減少していたが, 均一に染色されていた. また染色性を失った軸索も出現していた (図 3B). 4 mm 3 週後群では, 均一に染色されていたが, 染色面積は対照群に比べて減少したままであった (図 3C). また延長終了直後群に比べ, 染色性を失った軸索が多くなっている傾向が認められたが, 統計学的有意差はなかった (表 1). 4 mm 8 週後群では, 壊死組織片を有する軸索が数個出現していたが, ほぼ均一に染色されていた. 軸索の染色面積は対照群に比べて減少したままであった (図 3D). 4 mm 8 週後群の染色性を失った軸索の数は, 対照群, 4 mm 延長終了直後群, 4 mm 3 週後群のいずれの群と比較しても有意に増加していた (表 1). またいずれの群においても, 染色性を失った軸索数の, 神経の近位, 中央, 遠位での差はなかった.

##### 2) 軸索の抗チューブリン抗体に対する染色性

Table 1. Number of immunologically empty axon to anti-phosphorylated neurofilament antibody per 100 axons in control group and 4.0 mm/day elongation group

Group	Number of immunologically empty axon		
	Proximal	Middle	Distal
Control	0	$0.7 \pm 0.7$	0
Immediately after elongation	$1.5 \pm 0.2$	$1.1 \pm 0.2$	$1.9 \pm 0.3$
Three weeks after elongation	$9.4 \pm 1.9$	$8.4 \pm 1.9$	$8.0 \pm 1.2$
Eight weeks after elongation	$21.7 \pm 2.5$	$23.8 \pm 2.9$	$23.1 \pm 3.3$

All results are expressed as  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ . \* $P < 0.05$ ; \*\*No significance.

Table 2. Number of immunologically empty axon to anti-tubulin antibody per 100 axons in control group and 4.0 mm/day elongation group

Group	Number of immunologically empty axon		
	Proximal	Middle	Distal
Control	$0.3 \pm 0.1$	$0.3 \pm 0.2$	$0.3 \pm 0.2$
Immediately after elongation	$1.8 \pm 0.4$	$2.9 \pm 0.4$	$2.5 \pm 0.3$
Three weeks after elongation	$12.9 \pm 2.4$	$11.7 \pm 2.3$	$11.6 \pm 1.5$
Eight weeks after elongation	$19.9 \pm 1.8$	$19.0 \pm 1.3$	$19.8 \pm 3.2$

All results are expressed as  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ . \* $P < 0.05$ ; \*\*No significance.

### i. 対照群, Waller 変性群

対照群は、神経の近位、中央、遠位いずれの部位でも軸索に一致して均一に染色されていた。切断後1週のWaller変性群の、切断部より中枢では、軸索は均一に染色されているが、染色面積が著しく減少していた。切断部より末梢では軸索の染色性は完全に失われていた。また、抗チューブリン抗体で染色される壊死組織片は、中枢、末梢ともに認められなかった。切断後3週のWaller変性群は、切断部の中枢、末梢ともに、それぞれ切断後1週と同様の所見で変化はなかった。

### ii. 実験群

2 mm 3週後群では、対照群と同様に均一に染色されていた(図4A)。4 mm 延長終了直後群では、対照群に比較して個々の軸索の染色面積は減少していたが、均一に染色されていた。一部で染色性を失った軸索が出現していた(図4B)。4 mm 3週後群では、均一に染色されていたが、染色性を失った軸索が対照群、延長終了直後群に比べて増加していた(図4C)。その数は、対照群に比べて有意に増加していたが、延長終了直後群との間には有意差はなかった(表2)。4 mm 8週後群では、均一に染色されていたが、染色性を失った軸索が、対照群、延長終了直後

群、3週後群のいずれの群と比較しても増加していた。その数は、対照群や延長終了直後群に比べて有意に増加していたが、3週後群との間には有意差はなかった(図4D, 表2)。またいずれの群においても、染色性を失った軸索数の神経の近位、中央、遠位での差はなかった。

### 3) 後根神経節細胞の抗p-NF抗体陽性細胞数の変化

後根神経節細胞1000個あたりの染色陽性細胞数は、対照群(図5A)で $174.9 \pm 6.6$ 個であった。切断後1週のWaller変性群(図5B)では $388.0 \pm 17.8$ 個であり、対照群に比べて有意に多かった。4 mm 1週後群では $233.9 \pm 12.6$ 個、4 mm 3週後群(図5C)では $233.8 \pm 10.6$ 個で、いずれも対照群に比較して有意に多かった。延長群とWaller変性群の間にも有意差を認めたが、1週後群と3週後群の間には差はなかった(図6)。

### 2. 血液神経関門の検討

対照群では神経束内にEBAの漏出は全く認められなかった。2 mm 3週後群では、わずかながら漏出しているのが観察された(図7A)。4 mm 3週後群ではEBAは明らかに神経束内に漏出していた。また神経周膜周囲の疎性結合組織にもEBAの自家蛍光が観察された(図7B)。

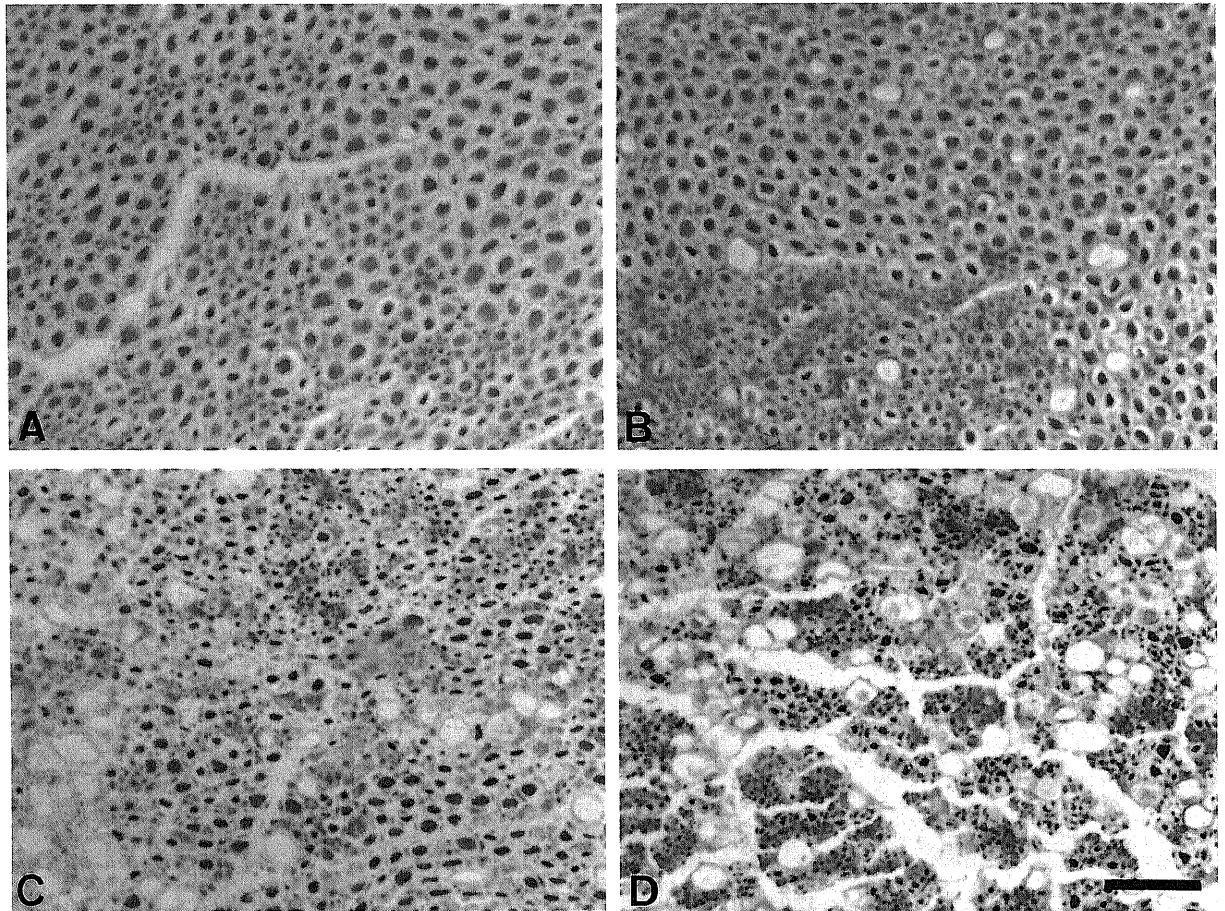


Fig. 4. Light micrograph of middle segment of elongated sciatic nerve immunostained with anti-tubulin antibody. The immunoreactivity of axons is dense and homogeneous in all groups. (A) Three weeks after 2.0 mm/day elongation. Immunoreactivity of the axons is similar to that of the control. (B, C, D) 4.0 mm/day elongation group. The immunoreactive area in every axon became smaller than that of the control, and following elongation, more and more axons show loss of immunoreactivity; (B) immediately after, (C) three weeks after, (D) eight weeks after elongation. All micrographs have the same magnification. Scale bar indicates 50  $\mu$ m.

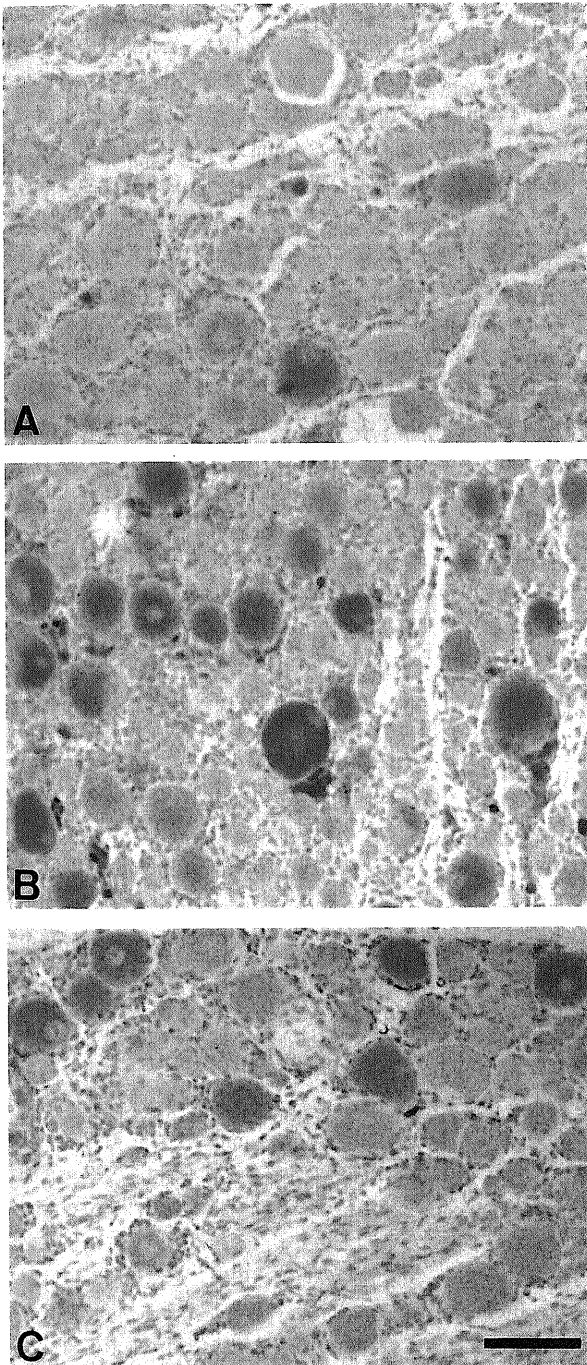


Fig. 5. Seventh lumbar dorsal root ganglia cells immunostained with anti-phosphorylated neurofilament (p-NF) antibody. p-NF positive cells are observed three weeks after 4.0 mm/day elongation (C). Their number is significantly higher than that of the control group (A), but not as high as that seen one week postoperatively in the sciatic nerve transection group (B). All micrographs have the same magnification. Scale bar indicates 50  $\mu$ m.

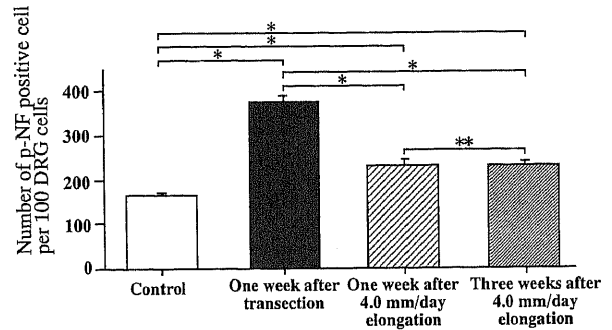


Fig. 6. The number of phosphorylated neurofilament positive cells in the 7th lumbar dorsal root ganglia. The difference in mean values among the groups was analyzed with one-way ANOVA using Scheffe's multiple comparison. \* $P < 0.05$ ; \*\*No significance.

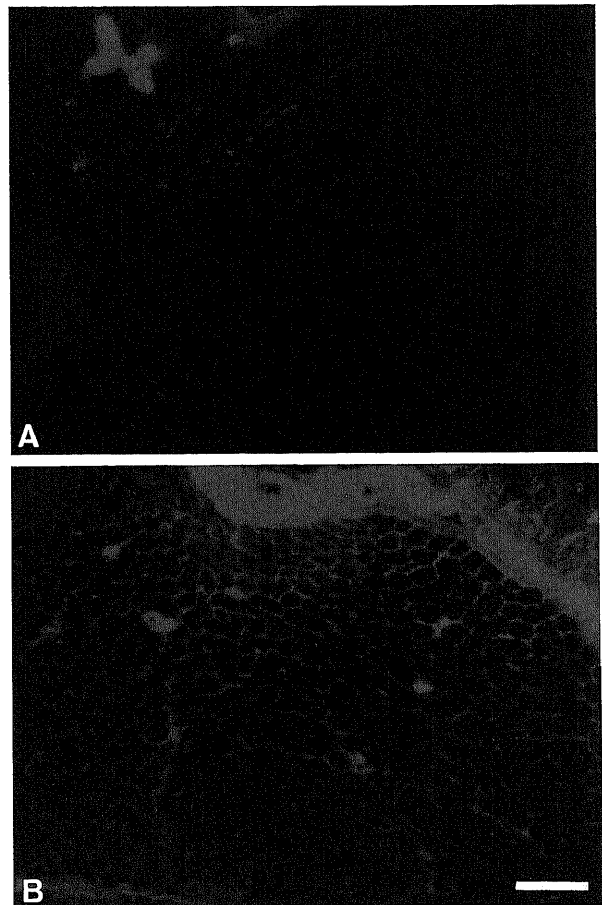


Fig. 7. Fluorescent micrograph of sciatic nerve. Evans blue-albumin (EBA) was injected intravenously into rabbits 30 minutes before the sciatic nerve was severed. EBA leaking into the endoneurial space emits a red fluorescence. Leakage of EBA is not observed in the control group. Leakage of EBA is minor three weeks after elongation in the 2.0 mm/day group (A), and patent in the 4.0 mm/day elongation group (B). All micrographs have the same magnification. Scale bar indicates 50  $\mu$ m.



## 考 察

神経欠損部の新たな補填法として、神経延長術が最近注目されている。延長の方法としては、大きく2つに分けることができる。一つはティッシュエキスパンダーを用いて神経だけを直接延長する方法である。もう一つは、骨切りを行い、骨延長することにより間接的に神経を延長する方法である。ティッシュエキスパンダーを用いた慢性伸張モデルで、van der Weyら<sup>10)</sup>は、家兎坐骨神経を機能を温存したまま6週間で約40%延長可能であったが、伝導速度の遅延を認めたと報告した。一方、骨延長による神経の延長モデルで安部ら<sup>21)</sup>は、家兎坐骨神経を0.45 mm/日および1.35 mm/日で延長した場合、延長率の増加とともに伝導速度は遅延したと報告した。さらに安部は、軸索、髄鞘に損傷を生じた40%の延長率が、延長の臨界点と報告している。40%の延長での組織学的所見としては、van der Wey<sup>22)</sup>も安部<sup>21)</sup>も神経線維間の浮腫と、軸索と髄鞘の分離を報告している。van der Weyは、これらの組織学的変化は延長によるものであって、圧迫による変化はほとんど認めなかったと報告している。しかしティッシュエキスパンダーによる方法では、延長した神経をさらに慢性の圧迫状態に曝すことになる。つまりこの神経は、同じ延長率であっても、骨延長による方法での純粋に伸張力だけが作用した神経に比べ、易損性の状態にあると考えられる。このことは、実際に延長した神経を用いて欠損部の補填を行う際に、ティッシュエキスパンダーを取りはずしたり、神経を周囲組織から剥離したりといった操作が加わることを考えると、不利と考えられる。したがって、純粋に神経欠損の補填法の基礎的データを収集する方法としては、骨延長による神経延長術のモデルの方が有利と考えた。

神経の延長速度については、速ければ速いほど治療期間が短くてすむ。しかしその反面、急速に神経を延長すると、伝導障害を生じたり<sup>23)</sup>、脱髄や浮腫をきたしたり<sup>24)</sup>、血行障害が生じたり<sup>25)</sup>する可能性がある。したがって、どの程度の速度で神経を延長すれば障害が生じるのかを知る必要がある。神経は、その粘弾性体という物理的特性<sup>26)</sup>から、緩徐に伸張した場合には、急性伸張した場合より、高度の延長に耐えうると考えられている。著者のモデルの坐骨神経では、急性伸張の場合の限界として報告の多い6~13%<sup>26)</sup>の約3~4倍の、平均33.5%の延長が行なわれた。安部<sup>21)</sup>は、家兎坐骨神経を1.35 mm/日で40%まで延長すると、神経の機械的損傷に加えて血流障害が生じるために、部分的なWaller変性を認めたと報告した。しかし、Waller変性に陥る前段階の軸索の病態についての検討はなされていない。著者のモデルでも森下ら<sup>11)</sup>は、光学顕微鏡像および電子顕微鏡像で軸索の髄鞘からの分離が認められたと報告した。しかし軸索そのものの変化については、中山<sup>13)</sup>が4 mm延長8週後群でランビエ絞輪部の細胞骨格の減少を認めたと報告しているにすぎない。以上より著者は、神経を緩徐に延長した場合に軸索そのものに生じる変化を明らかにするために、軸索内細胞骨格に着目して検討を行った。

NFは軸索内細胞骨格の主要な構成タンパクであり、神経細胞および軸索を形態的に完全な状態に維持する役割を担っている。NFには分子量の違う3種のサブユニットがあり、それぞれNF-H(分子量200kDa)、NF-M(160kDa)、NF-L(68kDa)と分類される<sup>30)</sup>。NF-Lが芯を形成し、NF-Mがその周囲を取り巻き、一本の軸を形成している。そしてNF-Hがその軸どうしを連結

することで一本の軸索を形成している<sup>31)</sup>。このうち、分子量の大きい2種は、そのC末端に多数のリン酸基を持っている。NF間の連結は、リン酸化されたNF-HのC末端部が架橋を形成することにより行われる<sup>32)</sup>。またNFどうしの間隔をNF-Hのリン酸化による静電的反発力によって保つことで、軸索径が維持されている<sup>31)</sup>。したがって、軸索径の決定にはNFの量<sup>33)</sup>とNFのリン酸化が重要な役割を担っていることになる。つまり軸索内に輸送されるNFの量が減少したり、NFのリン酸化が障害されれば軸索は小径化する。森下<sup>12)</sup>は、延長神経の横断切片をトルイジンブルー染色し、軸索断面積を計測した。それによれば、4 mm群の平均軸索面積は、対照群に比べ46.2%減少していた。本実験で認められた4 mm延長終了直後群の、軸索の染色面積の減少は、森下の報告における小径化と一致するものと考えられる。さらに本実験においては、4 mm 3週後群、4 mm 8週後群の軸索は、小径化したままであった。そのうえ、染色性を失った軸索が出現し、経過とともにその数は増加する傾向を認めた。特に8週後群では、染色性を失った軸索が有意に増加していた。de Waeghら<sup>34)</sup>は、突然変異で髄鞘形成不全を生じたTremblerマウスを用いて、NFのリン酸化が軸索膜と髄鞘の相互作用によりプロテインキナーゼが活性化されて軸索内で行われることを報告した。したがって、局所的な脱髄によってこの相互作用が崩れると、NFのリン酸化が障害される。このような軸索では、NF間の静電的反発力が消失することで、軸索は小径化し、軸索流が遅滞すると報告した。著者のモデルでは、過度の速度での延長操作(1日4 mm延長群)によって、軸索と髄鞘との間に分離が生じた<sup>11)</sup>。この部分では、軸索と髄鞘の相互作用として局所で行われるはずのNFのリン酸化が障害されていると考えられる。その結果、延長された神経においても軸索流の停滞が生じることとなり、神経細胞から新たに軸索へと送り出されるNFの量が減少することが予想される。この機序により、延長後の軸索が小径化し、8週経過しても軸索径が回復しないことが説明できるものと考えた。

Nixonら<sup>35)</sup>によれば、軸索内のNFは、遅い軸索流(0.5~0.7 mm/日、SCaグループ)で輸送される。一方、軸索内で固定されて細胞骨格を構築しているNFは、半減期が55日で、軸索の部位によらず一定の割合で分解される。これは、古くなったNFが局所でタンパク分解をうけていることを示している。そして分解されたNFの部分には、遅い軸索流で輸送されてきた新しいNFが沈着し、NFの構築を維持する<sup>36)</sup>。つまり軸索流が障害されると、半減期にしたがって分解されたNFは修復されないことになる。したがって、4 mm群では、軸索流が障害されているため、NFが局所で分解されても新しいNFが添加されることはなく、時間が経過するにつれて染色性を失った軸索数が増加していったと考えた。また各群において、染色性を失った軸索の数は、坐骨神経の近位、中央、遠位の間で差はなかった。Hoffmanら<sup>35)</sup>によれば、神経細胞から末梢へのNFの輸送量が減少すると、軸索径の萎縮は細胞体側から末梢側へと進行する。つまり、本実験においても近位の方が染色性を失った軸索数が多くなると考えられた。しかし、Hoffmanの実験では、まず細胞体側に問題があつて輸送量が減少するモデルであり、延長神経におけるような全体にわたる軸索障害は想定していない。したがって、各部位の間で差がなかったのは、軸索流が停滞し、軸索局所でのNFの分解に、新しいNFがほとんど沈着できなかったことを示していると考えた。

正常の神経においては、高リン酸化型のNFは主として軸索に、低リン酸化型のものは細胞体および樹状突起に分布している<sup>40</sup>。NFは、主に細胞体から軸索内へ移送されてからリン酸化される。しかし軸索が障害を受けると、正常ではほとんど染色されない抗p-NF抗体で細胞体が染色されるようになる<sup>41,42</sup>。この原因については、軸索が障害を受けたことで、細胞体内でのNFのリン酸化が一過性に亢進した結果と考えられる<sup>39,41,42</sup>。NFは細胞体内でリン酸化されてしまうと、すでに細胞骨格を構築している軸索内のNFへの結合が阻害されると考えられる。そのため、p-NFは軸索内へ積み出されずに細胞体内に蓄積すると考えられる。本実験では、4 mm群の後根神経節細胞は抗p-NF抗体で染色陽性となった。これは、過度の速度での延長という軸索への障害により、NFの細胞体内でのリン酸化が亢進し、蓄積したためであると考えた。Rosenfeld<sup>43</sup>は、ラット坐骨神経を切断して、後根神経節細胞が抗p-NF抗体で染色される割合を調べた。そして切断した場合には、1～10日間は27～47%にまで染色陽性細胞の増加が観察されたが、3週後には対照群と同じレベルにまで減少したと報告した。したがって本実験では、切断後1週の後根神経節細胞を比較検討の対象とした。そして4 mm 3週後群の他、4 mm 1週後群も作製して染色陽性細胞数を比較した。その結果、4 mm 1週後群の抗p-NF抗体陽性細胞数は、Waller変性群(38.8%)ほどの増加はなかったものの、対照群(17.5%)に比べて有意に増加しており(23.3%)、かつ4 mm 3週後群もその数は減少しなかった(23.3%)。Rosenfeld<sup>43</sup>は、挫滅損傷モデルの場合には、3週経過しても染色陽性細胞数は約40%と増加したままであったと報告した。そして切断モデルと挫滅損傷モデルの染色性の違いは、おそらくNFのリン酸化のパターンを変化させるシグナルがあって、それが神経損傷の性質や部位によって異なるためだろうと推察している。したがって、本実験の結果からは、過度の速度での延長によって、挫滅損傷に類似したタンパク合成の変化が細胞体に出現したと考えられた。

チューブリンは主要な軸索内細胞骨格のひとつであり、微小管の基本構成タンパクである。Hirokawa<sup>44</sup>は、ラット坐骨神経軸索の急速凍結ディープエッチ像の観察を行い、NFの架橋構造の間に、微小管が束を形成して存在していることを報告した。この微小管は、神経細胞から神経終末部へむけての軸索輸送のレールとして機能している<sup>39,44</sup>ので、その損傷は、軸索流の障害を意味する。本実験では、軸索の抗チューブリン抗体に対する染色性は、NFと同様に経過とともに減少した。過度の速度での延長によりNFのリン酸化障害が生じ、静電的反発力が減少した軸索では、NFと微小管による整然とした格子構造が保たれなくなる。このような微小管配列の乱れが、軸索流の停滞を引き起こしたと考えた。

毛細血管の内皮細胞は、形態学的に連続性、有窓性、不連続性の3群に分類される<sup>45</sup>。神経束内の毛細血管の内皮細胞は、このうちの連続性のタイプであり、血管透過が最も生じにくいと言われている。このタイプの毛細血管での物質透過は、内皮細胞接合部が解離してできる間隙を通ることにより行われる。炎症などの刺激により、血管内皮細胞からヒスタミンなどの血管作動性物質が放出されると、内皮細胞は収縮し、接合部に間隙ができる。ここから血漿タンパクなどの漏出が生じるのが、炎症による血管透過性亢進のメカニズムである<sup>46</sup>。そして神経系においてこのような反応が生じることが、血液神経関門の破

綻である。神経に圧迫障害が加わると、それに反応して前述のごとく血管透過性が亢進し、浮腫が生じる。神経束内浮腫により、神経束内圧が上昇して神経内血管が閉塞し、虚血が生じる。そして虚血は更なる血管透過性の亢進といった悪循環を引き起こす<sup>47</sup>。これが圧迫障害による血液神経関門の破綻のメカニズムである<sup>47-50</sup>。一方Lundborg<sup>51</sup>は、ウサギ脛骨神経の急性伸張障害モデルを用いて、神経の循環動態を検討した。そして、伸張によって神経束の断面積が減少すること自体が、神経束内圧を上昇させ、循環障害を引き起こすと報告した。また神経束内にはリンパ系がないため<sup>17</sup>、いったん浮腫が生じると消退に時間がかかり、線維化が発生すると考えられている<sup>49</sup>。著者のモデルにおいて、延長終了後3週経過した神経で、神経内血管の透過性は明らかに亢進していた。過度の速度での延長により、神経束内血管の内皮細胞も過度に引き伸ばされ、内皮細胞から血管作動性物質が遊離し、EBAが神経束内に漏出したと考えられる。この神経束内圧の上昇による虚血も、伝導障害の回復を妨げる一因と考えた。一方、2 mm 3週後群では軽度のEBAの漏出を認めたが、一過性で回復し得る程度の障害を示している。なお、4 mm群では、神経周膜周囲の疎性結合組織にもEBAの自家蛍光が観察された。しかし、神経束内血管の血管透過性亢進を引き起こす程度の圧迫、伸張、虚血などの障害が加わっても、神経周膜のバリア機能は保たれているという報告が多い<sup>47,49-52</sup>。したがって、神経束外の血管が、過度の速度での伸張により損傷されたために、神経周膜周囲にEBAが漏出したものと考えている。

4 mm群の神経では、軸索において軸索流の障害と、血液神経関門の機能破綻が生じていた。また細胞体におけるタンパク合成にも挫滅損傷に類似した変化をきたしていた。延長速度が1日4 mmと過度であれば、慢性伸張によるこれらの障害は回復しなかった。これは中山<sup>13</sup>により報告された、伝導障害は回復しないが、Waller変性に陥ることもない状態の神経の障害を現している。つまりこの神経は、回復も変性もしないまま、その活動が停滞した状態である。これまで、末梢神経が徐々に延長されるといったことは自然界にはなかったわけで、脚延長術が行われるようになって初めて明らかになった病態である。ラット坐骨神経の急性圧迫モデルで、微小管は損傷されるがWaller変性には陥らない病態が報告されている<sup>53</sup>。このモデルは、Bauwens<sup>54</sup>の神経羸瘦化(axonocachexia)という病態にきわめて類似している。これは圧迫性神経障害で、圧迫部より末梢にまで軸索の狭窄がおよんだ状態である。しかし神経羸瘦化は電気生理学的所見のみから解釈されており、組織学的検討はなされていない。著者のモデルでは、原因が限局した圧迫病変ではなく、延長により神経全長にわたり変化が生じる点が異なっている。著者は、この延長による病態を、神経が小径化したままで(lepto-)、回復も変性もせず、その活動が停滞している(stasis)という意味から、神経活動停滞化(axonoleptostasis)と表現した。神経羸瘦化は圧迫性神経障害であるので、圧迫解除すなわち神経剥離術により回復しうる。しかし神経活動停滞化は、その原因から考えて、いったん陥ると治療のない神経障害であるといえる。したがって、神経欠損の治療に神経延長術を応用する場合、過度の速度で延長して神経活動停滞化に陥らせてはいけない。1日2.0 mmで延長した神経は、一過性神経不働化(neurapraxia)<sup>55</sup>の状態と考えられ、障害は一過性で回復するので、縫合後の神経は確実に再生に向かうと考えられる。し

たがって、神経を延長する場合には、一過性神経不動化と神経活動停滞化といった病態を念頭に、延長速度を考えていくことが重要である。

### 結 論

家兎大腿骨を緩徐に延長することにより、坐骨神経を約30%延長するモデルを作製した。本実験モデルで、坐骨神経および第7腰椎後根神経節の組織学的検討を行い、以下の結論を得た。

1. 4.0 mm/日で延長すると、軸索内でのNFのリン酸化が障害され、微小管の損傷も認められた。これは経時的に進行した。また2.0 mm/日で延長した場合、その損傷は軽微であった。
2. 4.0 mm/日で延長すると、第7腰椎後根神経節に抗p-NF抗体陽性細胞が出現した。
3. 4.0 mm/日で延長した坐骨神経では、神経束内血管の血管透過性が亢進していた。2.0 mm/日では、その程度は軽度であった。
4. 4.0 mm/日という過度の速度での延長により、軸索流の障害と血液神経関門の機能破綻を生じ、神経活動停滞化(axonoleptostasis)といった病態を引き起こすと考えられた。
5. 神経の機能回復という点からは、2.0 mm/日が延長速度の限界であった。

### 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捧げます。また終始直接の御指導を賜りました池田和夫講師に心より感謝の意を表します。さらに本実験の遂行にあたり御協力いただきました、金沢大学第二解剖学講座田中重徳教授および白石昌武、中村恒夫両文部技官、金沢大学第三解剖学講座北尾康子助手に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は、The 2nd Congress of the Asian Pacific Federation of Societies for Surgery of the Hand (Singapore, 1999)、第42回日本手の外科学会(東京, 1999)、The 54th Annual Meeting of American Society for Surgery of the Hand (Boston, 1999)、第14回日本整形外科学会基礎学術集会(奈良, 1999)において発表した。

### 文 献

- 1) 池田和夫. 末梢神経の再生におけるシュワン細胞移植に関する実験的研究. 十全医会誌 97: 733-749, 1988
- 2) Ikeda K, Oda Y, Nakanishi I, Tomita K, Nomura S. Cultured Schwann cells transplanted between nerve gaps promote nerve regeneration. *Neuro-Orthopedics* 11: 7-16, 1991
- 3) Berger A, Lassner F. Peripheral nerve allografts: survey of present state in an experimental model of the rat. *Microsurgery* 15: 773-777, 1994
- 4) Mackinnon SE, Midha R, Bain J, Hunter D, Wade J. An assessment of regeneration across peripheral nerve allografts in rats receiving short courses of Cyclosporin A immunosuppression. *Neuroscience* 46: 585-593, 1992
- 5) 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
- 6) 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
- 7) Hall GD, Van Way CW, Kung FT, Compton-Allen M. Peripheral nerve elongation with tissue expansion techniques. *J Trauma* 34: 401-405, 1993
- 8) Milner RH, Wilkins PR. The recovery of peripheral nerves following tissue expansion. *J Hand Surg* 17B: 78-85, 1992
- 9) 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
- 10) van der Wey LP, Polder TW, Merks MHJH, Stegeman DF, Vingerhoets DHM, Gabreels-Festen AAWM, Spauwen PHM, Gabreels FJM. Peripheral nerve elongation by laser Doppler flowmetry controlled expansion: functional and neurophysiological aspects. *J Neurol Sci* 124: 149-155, 1994
- 11) 森下 裕, 池田和夫, 富田勝郎, 田中重徳. 脚延長が及ぼす末梢神経障害の検討—家兎坐骨神経を用いた実験的研究—. 日手会誌 10: 267-270, 1993
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) Matsui T, Takahashi K, Moriya M, Tanaka S, Kawahara N, Tomita K. Quantitative analysis of edema in the dorsal nerve roots induced by acute mechanical compression. *Spine* 23: 1931-1936, 1998
- 17) Sunderland S. *Nerve and Nerve Injuries*, 2nd ed, p31-58, Churchill Livingstone, Edinburgh London, 1978
- 18) Rydevik B, Lundborg G, Nordborg C. Internal tissue reaction induced by internal neurolysis. *Scand J Plast Reconstr Surg* 10: 3-8, 1976
- 19) Olsson Y. Studies on vascular permeability in peripheral nerves. Distribution of circulating fluorescent serum albumin in normal, crushed and sectioned rat sciatic nerve. *Acta Neuropathol* 7: 1-15, 1966
- 20) Trojanowski JQ, Lee VM-Y, Schlaepfer WW. Neurofilament breakdown products in degenerating rat and human peripheral nerves. *Ann Neurol* 16: 349-355, 1984
- 21) 安部幸雄, 土井一輝, 酒井和裕, 山本久司, 河合伸也. 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
- 22) van der Wey LP, Gabreels-Festen AAWM, Merks MHJH, Polder TW, Stegeman DF, Spauwen PHM, Gabreels FJM. Peripheral nerve elongation by laser Doppler flowmetry controlled expansion: morphological aspects. *Acta Neuropathol* 89: 166-171, 1995
- 23) Brown R, Pedowitz R, Rydevik B, Woo S, Hargens A, Massie J, Kwan M, Garfin SR. Effects of acute graded strain on

- fferent conduction properties in the rabbit tibial nerve. *Clin Orthop* 296: 288-294, 1993
- 24) Wall EJ, Massie JB, Kwan MK, Rydevik BL, Myers RR, Garfin SR. Experimental stretch injury - Changes in nerve conduction under tension -. *J Bone Joint Surg [Br]* 74-B: 126-129, 1992
- 25) Beris AE, Naka KK, Skopelitou A, Kosta I, Vragalas V, Konitsiotis S, Bontioti E, Soucacos PN. Functional assessment of the rat sciatic nerve following intraoperative expansion: The effect of recovery duration on behavioural, neurophysiological, and morphological measures. *Microsurgery* 17: 568-577, 1996
- 26) 長谷川利雄. 末梢神経伸張損傷に関する実験的研究. *日整会誌* 66: 1184-1193, 1992
- 27) Tanoue M, Yamaga M, Ide J, Takagi K. Acute stretching of peripheral nerves inhibits retrograde axonal transport. *J Hand Surg* 21B: 358-363, 1996
- 28) Wall EJ, Kwan MK, Rydevik BL, Woo SL-Y, Garfin SR. Stress relaxation of a peripheral nerve. *J Hand Surg* 16A: 859-863, 1991
- 29) Haffek J. Stretch injury of peripheral nerve: acute effects of stretching on rabbit nerve. *J Bone Joint Surg [Br]* 52-B: 354-365, 1970
- 30) Hoffman PN, Lasek RJ. The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons. *J Cell Biol* 66: 351-366, 1975
- 31) Hirokawa N, Glicksman MA, Willard MB. Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the neuronal cytoskeleton. *J Cell Biol* 98: 1523-1536, 1984
- 32) Julien JP, Mushynski WE. The distribution of phosphorylation sites among identified proteolytic fragments of mammalian neurofilaments. *J Biol Chem* 258: 4019-4025, 1983
- 33) Nixon RA, Sihag RK. Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. *Trends Neurosci* 14: 501-506, 1991
- 34) de Waegh SM, Lee VM-Y, Brady ST. Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68: 451-463, 1992
- 35) Hoffman PN, Griffin JW, Price DL. Control of axonal caliber by neurofilament transport. *J Cell Biol* 99: 705-714, 1984
- 36) Nixon RA, Logvinenko KB. Multiple fates of newly synthesized neurofilament proteins: Evidence for a stationary neurofilament network distributed nonuniformly along axons of retinal ganglion cell neurons. *J Cell Biol* 102: 647-659, 1986
- 37) Ochs S, Brimijoin WS. Axonal transport. In Dyck PJ, Thomas PK (eds), *Peripheral Neuropathy*, 3rd ed, p331-344, Saunders, Philadelphia, 1983
- 38) Ochs S, Jersild Jr RA, Li JM. Slow transport of freely movable cytoskeletal components shown by beading partition of nerve fibers in the cat. *Neuroscience* 33: 421-430, 1989
- 39) Hoffman PN, Thompson GW, Griffin JW, Price DL. Changes in neurofilament transport coincide temporally with alterations in the caliber of axons in regenerating motor fibers. *J Cell Biol* 101: 1332-1340, 1985
- 40) Sternberger LA, Sternberger NH. Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 6126-6130, 1983
- 41) Goldstein ME, Cooper HS, Bruce J, Carden MJ, Lee VM-Y, Schlaepfer, WW. Phosphorylation of neurofilament proteins and chromatolysis following transection of rat sciatic nerve. *J Neurosci* 7: 1586-1594, 1987
- 42) Rosenfeld J, Dorman ME, Griffin JW, Sternberger LA, Sternberger NH, Price DL. Distribution of neurofilament antigens after axonal injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 46: 269-282, 1987
- 43) Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol* 107: 1449-1459, 1988.
- 44) Thomas PK, Berthold CH, Ochoa J. Microscopic anatomy of the peripheral nervous system. In Dyck PJ, Thomas PK (eds), *Peripheral Neuropathy*, 3rd ed, p28-73, Saunders, Philadelphia, 1983
- 45) Bennett HS, Luft JH, Hampton JC. Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. *Am J Physiol* 196: 381-390, 1959
- 46) 神原 武. 炎症性血管反応機構. 現代病理学大系5 (飯島宗一, 石川栄世, 影山圭三, 他編), 第1版, 79-94頁, 中山書店, 東京, 1995
- 47) Rydevik B, Lundborg G. Permeability of intraneural microvessels and perineurium following acute, graded experimental nerve compression. *Scand J Reconstr Surg* 11: 179-187, 1977
- 48) Kobayashi S, Yoshizawa H, Hachiya Y, Ukai T, Morita T. Vasogenic edema induced by compression injury to the spinal nerve root. *Spine* 18: 1410-1424, 1993
- 49) Lundborg G. Structure and function of the intraneural microvessels as related to trauma, edema formation, and nerve function. *J Bone Joint Surg [Am]* 57-A: 938-948, 1975
- 50) 山中一良. 圧迫神経障害に関する実験的研究 - 血液神経関門に対する神経剥離操作の影響 -. *日整会誌* 66: 714-727, 1992
- 51) Lundborg G, Rydevik B. Effects of stretching the tibial nerve of the rabbit. A preliminary study of the intraneural circulation and the barrier function of the perineurium. *J Bone Joint Surg [Br]* 55-B: 390-401, 1973
- 52) Lundborg G, Nordborg C, Rydevik B, Olsson Y. The effect of ischemia on the permeability of the perineurium to protein tracers in rabbit tibial nerve. *Acta Neurol Scand* 49: 287-294, 1973
- 53) Kitao A, Hirata H, Morita A, Yoshida T, Uchida A. Transient damage to the axonal transport system without Wallerian degeneration by acute nerve compression. *Exp Neurol* 147: 248-255, 1997
- 54) Bauwens P. Electrodiagnostic definition of the site and nature of peripheral nerve lesions. *Ann Phys Med*: 149-154, 1960
- 55) Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain* 66: 237-288, 1943

**Axonoleptostasis Due to Incremental Peripheral Nerve Elongation** Kazuko Okada, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **109**, 165 — 176 (2000)

**Key words** peripheral nerve injury, elongation, axonal flow, blood-nerve barrier

**Abstract**

The aims of this study were to clarify the pathogenesis of peripheral nerve injury during incremental nerve elongation and to determine the optimal lengthening rate for peripheral nerve elongation. The femurs of rabbits were lengthened by 30 mm in increments of either 2.0 mm/day or 4.0 mm/day by using an external fixator. In the group undergoing 2.0 mm/day elongation (2-mm group), the phosphorylated neurofilament (p-NF) immunoreactivity of axons was similar to that of the control group. In the group with 4.0 mm/day elongation (4-mm group), the p-NF immunoreactive area in every axon was reduced compared to that of the control, and after eight weeks, more and more axons showed loss of p-NF immunoreactivity. The tubulin immunoreactivity of axons became little less than the p-NF immunoreactivity in both the 2-mm and 4-mm groups. The number of p-NF positive cells per 1000 7th lumbar dorsal root ganglia (L7DRG) cells of the 4-mm group was significantly higher than that of the control group ( $p < 0.05$ ), but not as high as that seen one week postoperatively in the sciatic nerve transection group. Leakage of Evans blue-albumin (EBA) into the endoneurial space was clearly evident in the 4-mm group, minor in the 2-mm group, and not observed in the control group. Abnormal p-NF immunoreactivity in axons and L7DRG cells suggests the impairment of NF phosphorylation. In addition, abnormal tubulin immunoreactivity in axons suggests the obliteration of microtubules. These results indicate impairment of the axonal flow. Furthermore, EBA leakage in the 4-mm group indicates destruction of the blood-nerve barrier function, while in the 2-mm group this damage was so minor that the conduction block was only temporary. The elongation speed of 4.0 mm/day results in conduction block but no Wallerian degeneration of the elongated nerve. This is a novel pathological condition for which the term "axonoleptostasis" has been coined. Impairment of the axonal flow and destruction of the blood-nerve barrier function produced "axonoleptostasis" under stationary conditions. The elongation speed of 2.0 mm/day therefore appears to be the critical point for avoiding "axonoleptostasis" during peripheral nerve elongation for nerve repair without grafting.