

# 末梢神経慢性伸張障害後の回復に関する実験的研究

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/2297/9151">http://hdl.handle.net/2297/9151</a>

## 末梢神経慢性伸張障害後の回復に関する実験的研究

金沢大学医学部整形外科学講座 (主任: 富田勝郎教授)

中山博文

末梢神経は緩徐に伸張すれば、機能を温存したままでも延長することが可能である。しかし、その延長速度が速すぎた場合には障害を生じる。この障害が時間の経過とともに、どのように回復するかについて検討した。日本白色家兎の大腿骨を漸次延長することで、坐骨神経の慢性伸張モデルを作成した。延長は30mmまでとし、伸張速度により二群に分けた。すなわち、2.0mm/日群 (I群) と、4.0mm/日群 (II群) とした。評価は延長直後 (I群, 10羽; II群, 10羽) および、延長8週後 (I群, 15羽; II群, 15羽) に行った。電気生理学的には、複合神経活動電位と分節脊髄活動電位を観察し、組織学的には延長神経中央部を顕微鏡および顕微鏡で観察した。また、延長された神経の軸索流の状態を調べるため、コムギ胚芽凝集素-西洋ワサビペルオキシターゼ (wheat germ agglutinin conjugated horse radish peroxidase, WGA-HRP) を腓骨神経断端より吸収させ、標識された脊髄前角細胞の観察を10羽について行った。複合神経活動電位では、I群は延長直後に電位の振幅は  $142.5 \pm 43.5 \mu V$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) と低下したが、8週後には  $337.5 \pm 14.9 \mu V$  と有意 ( $p < 0.05$ ) に回復が認められた。II群は延長直後に、波形はほとんど消失の状態であり、8週後にも回復は認められなかった。分節脊髄活動電位では、I群は延長直後に電位の振幅は  $36.3 \pm 18.0 \mu V$  と低下したが、8週後には  $107.5 \pm 41.1 \mu V$  と有意 ( $p < 0.05$ ) に回復が認められた。顕微鏡的観察では、両群ともワーラー変性や神経内膜の線維化などの病的変化は認めなかった。しかし顕微鏡的観察では、I群の延長直後にはランビエ絞輪部の軸索の延長・髄鞘層板-軸索角の鋭角化および軸索膜の軽度の不整を認めた。しかしながら、8週後には修復が起り、これらの組織変化は認められなかった。これに対して、II群の延長直後ではこれらの組織変化がより顕著に認められ、8週後には軸索膜の不整が増強していた。I群では延長直後および8週後ともに、脊髄前角にWGA-HRPの逆行性軸索輸送による標識細胞が観察された。しかし、II群ではいずれの時期にも、前角細胞は標識されず、逆行性軸索流の障害が認められた。以上のことから、末梢神経の慢性伸張障害は、ワーラー変性を主体とした急性伸張障害とは異なり、ランビエ絞輪部の軸索の延長・髄鞘層板-軸索角の鋭角化および軸索膜の不整といった組織変化が一つの原因と考えられ、2.0mm/日の延長速度 (I群) では延長8週後に組織変化の修復がおこるが、4.0mm/日の延長速度 (II群) では回復は認められず、この障害は永続するものと考えられた。したがって、末梢神経の漸次延長術を行なう場合には、組織の不可逆的变化をきたす前に延長速度を緩めることが必要である。そのためには臨床上頻回に電気生理学的検査を施行し、波形の消失を認める以前に施行する事が重要であると考えられた。

---

**Key words** peripheral nerve, elongation, stretch injury

---

外傷などで、末梢神経に欠損を生じた場合、自家神経移植が行われている<sup>1)~4)</sup>。しかし、縫合部が2ヶ所あるため、再生神経の通過が困難であったり<sup>5)~7)</sup>、採取神経に数や長さ・直径の制限があるため<sup>8)</sup>、成績は端々縫合に比べ劣っている<sup>9)~10)</sup>。このような場合に、末梢神経を延長する事が可能であれば、移植は不要となり術後成績の向上が期待できる。その試みは、Higett<sup>11)</sup>が1943年にイヌを用いて行ったのが初めてである。坐骨神経を膝窩部で切断、膝屈曲位で中枢断端を腓骨に縫合し、術後徐々に膝を伸ばすことで、5cmの延長を得たと報告している。しかし、その機能的回復は芳しいものではなかった。最近では、ティッシュエクステンダーを用いた神経延長の試みも報告されているが、まだ実験段階である<sup>12)</sup>。神経延長自体を目的としているわけではないが、臨床的には、脚延長術に伴う神経延長が問題となる場合が多い。De Bastiani<sup>13)</sup>が仮骨延長法を紹介した

のに伴い、脚延長術が盛んに行われるようになった。下肢を8cm延長したといった報告も見られる<sup>14)</sup>が、その延長速度が速かったために末梢神経障害を生じた症例<sup>15)~16)</sup>もある。このような障害は、ほとんどが待機しているだけで回復しているが、その限界についての見解を述べた論文はない。これまで、急性伸張障害についての実験報告<sup>17)~20)</sup>は多いが、慢性伸張障害に関する報告<sup>21)~22)</sup>は少ない。森下によれば、家兎坐骨神経の30mmの慢性伸張モデルで、0.8mm/日の速度の延長は障害を与えなかった<sup>23)</sup>。しかし、2.0mm/日および4.0mm/日の延長速度では、延長終了時に伝導障害を認めた。本研究は森下のモデルの中で、延長直後に伝導障害の明らかであった群 (2.0mm/日および4.0mm/日) をその状態でひき続いて8週間経過させ、慢性的に伸張された神経の機能的障害および組織学的変化ならびにそれらの回復の有無について検討を加えた。

平成7年5月31日受付, 平成7年7月31日受理

Abbreviations: C-NAP, compound nerve action potential; SSAP, segmental spinal cord action potential; WGA-HRP, wheat germ agglutinin-conjugated horse radish peroxidase

## 対象および方法

## 1. 対象

体重約 2.5kg の雄、日本白色家兎を実験動物として用いた。実験に要した家兎の総数は50羽（電気生理学的検討20羽，組織学的検討30羽）であった。塩酸ケタミン（三共，東京）40mg/kg を筋注した後に，耳介静脈から点滴路を確保した。ペントバルビタール（ダイナポット，大阪）30mg/kg を静脈内に投与して全身麻酔を行った。右下側臥位とし，左大腿部外側を剃毛・消毒後，約 5cm の皮切を行った。左大腿骨を展開し，骨膜を全周性に剝離した。径 2.2mm のドリルを用い穴を開け，創外固定用のピン（OR-HM65-5025 ハウメディカ，ステインズ，イギリス）を4本設置した。まず，大腿骨に垂直に第1ピンを大転子に，残りの3本は延長器をガイドとして用い刺入した。中央2本のピン間隔を 1.7cm とした。骨切りが骨幹部中央になるように注意した。その後，当科で作製した延長器を装着した（図1）。歯科用スチールバー（ブシュ，エンゲルストリッシェン，ドイツ）No. 4 を研磨器に付けて骨切りを行った後，洗浄を行い創を閉じた。創の安静のために，1週間待機してから延長を開始した。延長器はネジを1回転させると，0.8mm 延長できるように作製した。24時間毎に 2.0mm（I群）および 4.0mm（II群）の延長を行った。30mm までの延長を行い，延長直後（I群，10羽；II群，10羽）と延長8週後（I群，15羽；II群，15羽）の坐骨神経について検討を行った。

## 2. 方法

## 1) 神経伸張率

大腿骨の延長によって坐骨神経が確実に伸張されたかを検討した。大腿骨の延長後の X-P を用いて，大腿骨の延長距離を計

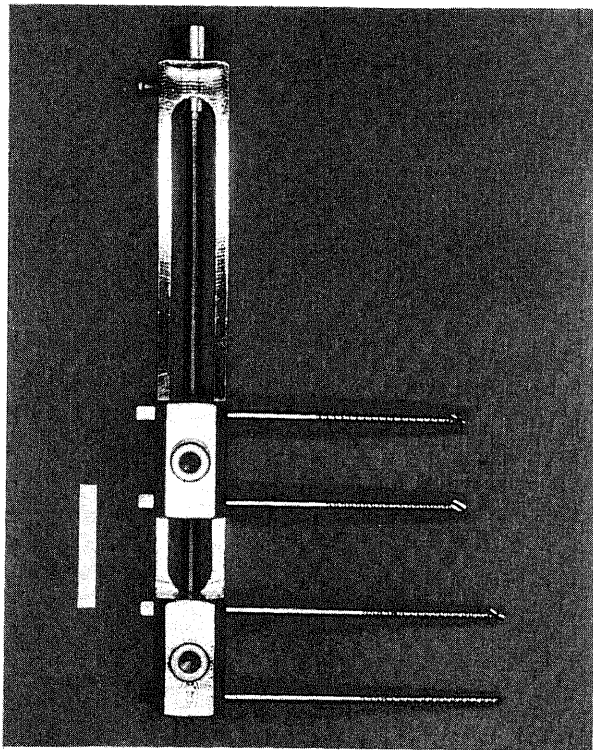


Fig. 1. The femur lengthener used in this experiment. This lengthener can lengthen the rabbit femur 0.8 mm at each turn of screw. The scale bar indicates 10 mm.

測した。両側の坐骨神経を展開し，坐骨切痕部より腓骨小頭部までの神経長の実測を行った。I群，II群ともに，延長直後および延長8週後の神経伸張率（延長側神経実測長-健側神経実測長/健側神経実測長）を算出した（ $n=16$ ）。

## 2) 電気生理学的検討

塩酸ケタミン（三共）を 40mg/kg 筋注した後に，ペントバルビタール（ダイナポット）30mg/kg を静脈内に投与して全身麻酔を行った。その後，気管切開下に人工呼吸器 R-10（アイカ，松戸）に接続し，室内空気にて調節呼吸を行った。体位は腹臥位とし，臭化パンクロニウム（三共）を 1mg/kg 静脈内投与し，

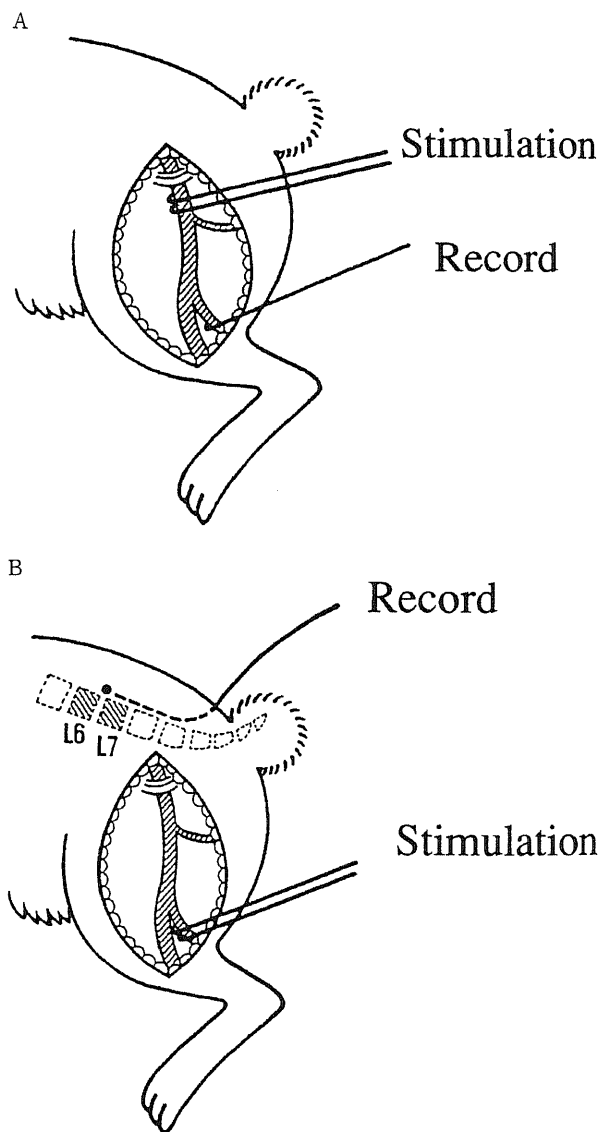


Fig. 2. A diagram showing the method of the recording system. (A) The compound nerve action potential (C-NAP). A stimulating electrode is placed on the sciatic nerve at the level of the sciatic notch and a recording electrode is placed on the peroneal nerve at the level of the fibular head. A basic needle electrode was inserted into the gastrocnemius muscle. (B) The segmental spinal cord action potential (SSAP). A stimulating electrode is placed on the peroneal nerve at the level of the fibular head and a recording electrode is placed at the level of the lumbar 6/7 epidural space.

非動化した。主に運動神経成分を表わす複合神経活動電位 (compound nerve action potential, C-NAP)<sup>23)</sup>と、主に感覚神経成分を表わす分節脊髄活動電位 (segmental spinal cord action potential, SSAP)<sup>23,24)</sup>を測定した。まず、坐骨切痕部で坐骨神経を展開、末梢へ追跡し腓骨小頭部の腓骨神経筋肉進入部まで展開した。坐骨切痕部の坐骨神経に双極電極 (ユニークメデカル, 大阪) を、腓骨小頭部の腓骨神経に単極電極を設置した (図 2-A)。また、第 6 腰椎および第 7 腰椎間の硬膜外背側に 5mm 間隔の硬膜外電極 (ユニークメデカル) を挿入した (図 2-B)。室温は 25°C に保った。筋電計システム DISA 1500 (ダンテック, スコプランド, デンマーク) を用い、各群において延長直後および 8 週後に測定を行った。

#### i) C-NAP

坐骨神経の坐骨切痕部で電気刺激を行い、腓骨神経の筋肉進入部で C-NAP を導出した。刺激部位は双極電極を、導出部位は単極電極を用いた。基準電極は腓骨筋に刺入した。電気刺激は、0.05msec の矩形波で頻度を 1HZ、強度を最大上刺激とし、16回の加算平均を行った。得られた波形から、潜時、振幅、持続時間を計測した (n=16)。

#### ii) SSAP

腓骨神経の筋肉進入部で電気刺激を行い、第 6 腰椎および第 7 腰椎間の硬膜外で SSAP を導出した。基準電極は傍脊柱筋に刺入した。刺激部位は双極電極を、導出部位は単極電極を用いた。電気刺激は、0.05ms 矩形波で頻度を 10HZ、強度を最大上刺激とし、64回の加算平均を行った。得られた波形から、潜時、振幅、持続時間を計測した (n=16)。

また、手術による坐骨神経の影響をみるために、手術前後の波形の変化も観察した (n=4)。

#### 3) 組織学的検討

塩酸ケタミン (三共) を 40mg/kg 筋注した後に、ペントバルビタール (ダイナポット) 30mg/kg を静脈内に投与して全身麻酔を行った。開腹後に腹部大動脈に灌流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 含有の生理食塩水を 3リットルで灌流し脱血した後、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リットルを灌流して固定を行った。両側の坐骨神経を摘出、神経中央部で細切片にし、2% グルタルアルデヒド-0.1M リン酸緩衝液にて 8時間浸潤固定した後、1% オスミウム酸-0.1

M リン酸緩衝液で後固定を行った。その後、エチルアルコールで脱水し、エポン 812 に包埋した (n=20)。

#### i) 光学顕微鏡的観察

坐骨神経中央部の横断および縦断の薄切切片 (2 $\mu$ m) を作製し、トルイジンブルー染色を行い観察した。また、脛骨神経成分および腓骨神経成分の面積を画像解析装置を使用して算出した (n=20)。

#### ii) 電子顕微鏡的観察

同様に坐骨神経中央部の横断および縦断の薄切切片 (50nm) を作成し、透過型電子顕微鏡 HS-8 & H-500 型 (日立, 東京) で観察を行った (n=15)。

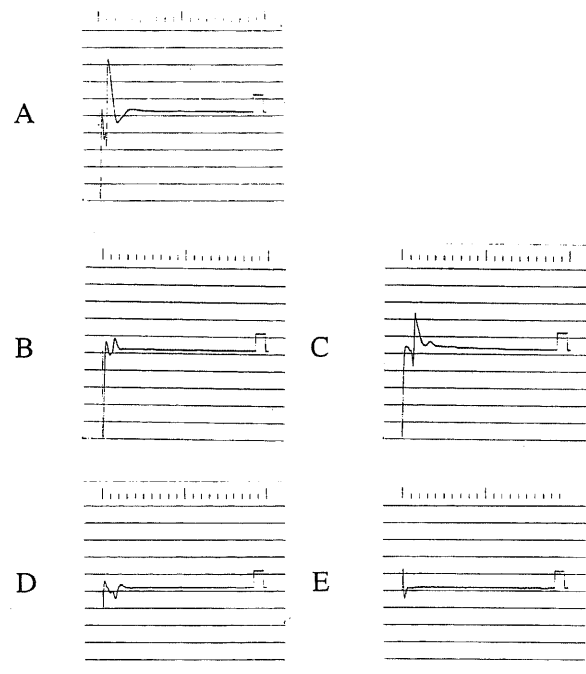


Fig. 3. Representative compound nerve action potential (C-NAP) of each period. (A) Control. The waves from contralateral intact nerve. (B) Group I immediately after elongation. (C) Group I 8 weeks after elongation. (D) Group II immediately after elongation. (E) Group II 8 weeks after elongation.

Table 1. Compound nerve action potential (C-NAP)

Group	Time after elongation (week)	No. of rabbits used	No. of C-NAP-positive rabbits	Amplitude ( $\mu$ V)	Latency (msec)	Duration (msec)
Control	no elongation	16	16	540.6 $\pm$ 250.5	1.1 $\pm$ 0.17	2.5 $\pm$ 1.01
I	0 <sup>a)</sup>	4	4	142.5 $\pm$ 43.5	1.3 $\pm$ 0.05	2.7 $\pm$ 0.25
	8	4	4	337.5 $\pm$ 14.9	1.2 $\pm$ 0.26	3.3 $\pm$ 0.37
II	0	4	2	65.0	1.4	1.1
	8	4	1	30.0	1.2	1.5

The data are expressed as  $\bar{x} \pm SD$ .

a) Immediately after elongation.

※ P<0.05

### iii) 脊髄前角細胞の観察

延長直後または8週後に、Oldfieldら<sup>29)</sup>の方法に従い脊髄前角細胞の染色性を観察した。麻酔後、両側の腓骨神経を展開・切断し、その中枢断端に0.5%コムギ胚芽凝集素-西洋ワサビペルオキシターゼ、(wheat germ agglutinin-conjugated horse radish peroxidase, WGA-HRP)<sup>29)</sup> 0.2mlを入れたチューブをかぶせた。24時間後に、2%パラホルムアルデヒド-0.1Mリン酸緩衝液3リットルで灌流固定を行った。腰部脊髄(L4~L7)を摘出し、20%サッカロース-0.1Mリン酸緩衝液内で冷所(4℃)保存した。3日後にゼラチン包埋後に腰部脊髄膨大部で冠状面凍結切片(70μm)を30枚作成した。テトラメチルベンジジン(tetramethylbenzidine, TMB)反応にて脊髄前角細胞を染色した(n=10)。

### 4) 統計学的検討方法

成績は $\bar{x} \pm SD$ で示した。得られたデータの2群間の有意差判定には対応のないt検定を用い、p値が0.05未満の場合に有意差ありと判定した。

## 成 績

### I. 神経伸張率

I群の神経伸張率は、延長直後に23.4±1.63%であり、8週後は21.5±2.21%であった。II群の神経伸張率は、延長直後に24.0±2.66%であり、8週後は23.4±2.20%であった。各群間および時間経過による神経伸張率に有意の差はなかった。大腿骨延長量は全体の平均が28.2±3.1mm、神経延長は平均26.08±3.0mmであり、神経延長が大腿骨延長により有効になされていた。

### II. 電気生理学的検討

手術前後ではC-NAPおよびSSAPの波形に変化を認めず、手術操作による影響はないと判断された。

#### 1. C-NAP

I群では延長直後に波形の多相化と振幅の低下が認められたが、潜時と持続時間に延長は認めなかった。振幅は142.5±43.5μVと、健側の540.6±250.5μVに比べ有意に低下していた。8週後には、波形の多相化と持続時間の延長が認められた。振幅は延長直後に比べ、8週後は337.5±14.9μVと有意に増大していた。持続時間は延長直後の2.7±0.25msecに比べ、3.3±0.37msecと有意に延長していた。II群では、延長直後に

2羽で、8週後には3羽で波形が消失していた。波形の認められた中では、延長直後および8週後の振幅はそれぞれ65.0μV、30.0μVであった(表1, 図3)。

#### 2. SSAP

I群では、延長直後に振幅が36.3±18.0μVと、健側の86.9±48.8μVと比べ有意な減少が認められた。潜時および持続時間に有意な延長はなかった。8週後では振幅は107.5±41.1μVであり、延長直後に比べ有意な増大を認めた。持続時間は、延長直後の0.60±0.08msecに比べ、8週後では0.83±0.13msecと有意に延長していた。II群では、延長直後に3羽で、8週後には4羽で波形が消失していた(表2, 図4)。

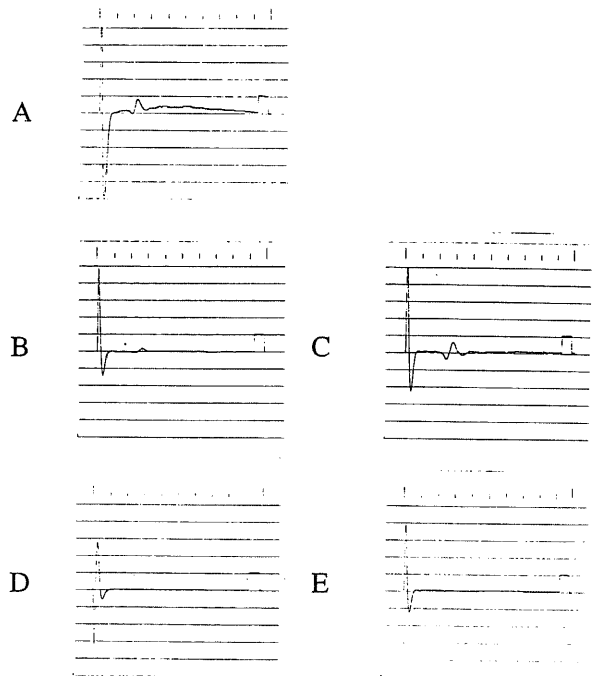


Fig. 4. Representative segmental spinal cord action potential (SSAP) of each group. (A) Control. The waves from contralateral intact nerve. (B) Group I immediately after elongation. (C) Group I 8 weeks after elongation. (D) Group II immediately after elongation. (E) Group II 8 weeks after elongation.

Table 2. Segmental spinal cord action potential (SSAP)

Group	Time after elongation (week)	No. of rabbits used	No. of SSAP-positive rabbits	Amplitude (μV)	Latency (msec)	Duration (msec)
Control	no elongation	16	16	86.9±48.8	2.0±0.19	0.81±0.14
I	0 <sup>a)</sup>	4	4	36.3±18.0	2.23±0.17	0.60±0.08
	8	4	4	107.5±41.1	2.45±0.14	0.83±0.13
II	0	4	1	40.0	2.6	0.8
	8	4	0			

The data are expressed as  $\bar{x} \pm SD$ .

a) Immediately after elongation.

※ P<0.05

### Ⅲ. 組織学的検討

#### 1. 光学顕微鏡的観察

脛骨神経成分および腓骨神経成分の面積は、健側で各々  $977.5 \pm 108.7 \mu\text{m}^2$  および  $100.0 \pm 23.4 \mu\text{m}^2$  であった。Ⅰ群の延長直後ではそれぞれ  $734.9 \pm 44.5 \mu\text{m}^2$  および  $62.8 \pm 10.5 \mu\text{m}^2$ 、Ⅱ群で  $716.5 \pm 33.7 \mu\text{m}^2$  および  $80.9 \pm 12.1 \mu\text{m}^2$  であった。Ⅰ群の8週後では  $772.9 \pm 112.8 \mu\text{m}^2$  および  $67.8 \pm 17.7 \mu\text{m}^2$ 、Ⅱ群で  $792.9 \pm 23.6 \mu\text{m}^2$  および  $56.1 \pm 0.2 \mu\text{m}^2$  であった。健側に比べ、各々の群は有意に減少していた。しかし、延長直後と8週後とは有意な差は認めなかった。組織学的観察では、Ⅰ・Ⅱ群ともに延長

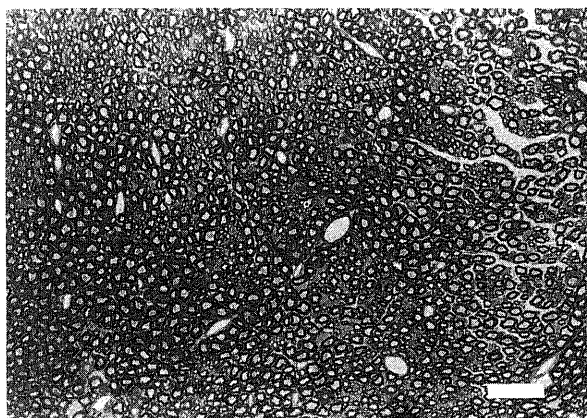
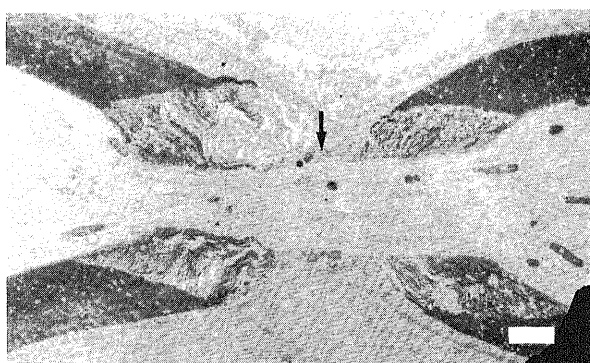
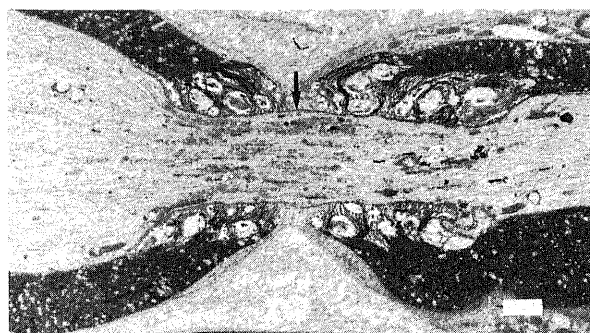


Fig. 5. The histological appearance of the sciatic nerve stained with toluidine blue of group II 8 weeks after elongation. There is no demyelination, endoneurial edema nor fibrosis change 8 weeks after elongation. The scale bar indicates 50  $\mu\text{m}$ .



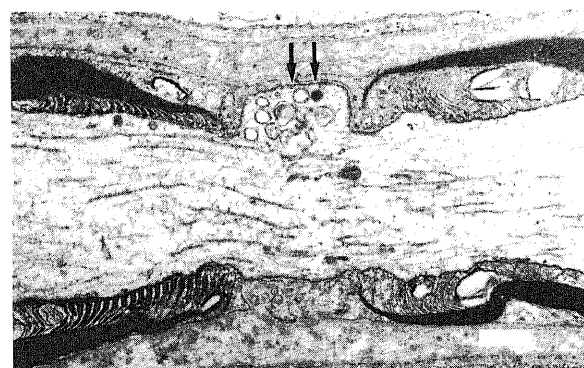
A



B



C



D

Fig. 6. Electron micrographs showing a longitudinal section of the Ranvier's node. (A) Group I immediately after elongation. (B) Group I 8 weeks after elongation. (C) Group II immediately after elongation. (D) Group II 8 weeks after elongation. The paranodal region lose its natural shape under tension. The nodal gap was elongated to 1.4  $\mu\text{m}$  in (A) and 2.5  $\mu\text{m}$  in (B). The arrow indicates the axolemma. The extent of the irregularity decreases in (C). The irregularity increases in (D). In addition the basement membrane is thin and neurofilaments of the axon decrease. The scale bar indicates 1  $\mu\text{m}$ .

直後に、脱髄性変化や軸索変性は認めなかった。8週後では、炎症細胞の浸潤・神経内膜の線維化・神経周膜の肥厚等の慢性炎症を示す変化は認められなかった(図5)。また、神経再生を表すシュワン管の集簇といった所見も認めなかった。

#### 2. 電子顕微鏡的観察

Ⅰ群の延長直後では、ランビエ絞輪部の軸索の延長・髄鞘層板-軸索角の鋭角化および軸索膜の軽度の不整が認められた(図6-A)。基底膜の連続性は保たれており、断裂や肥厚といった所見はなかった。軸索の細胞骨格(神経細線維や微小管)に異常な集積や脱落はなかった。8週後にはランビエ絞輪部の軸索の延長・髄鞘層板-軸索角の鋭角化及び軸索膜の軽度の不整は認められず、ほぼ正常と言える組織像であった(図6-B)。Ⅱ群の延長直後ではランビエ絞輪部の軸索の延長・髄鞘層板-軸索角の鋭角化および軸索膜の軽度の不整がより顕著に認められた(図6-C)。基底膜は不鮮明になっているが、断裂は認めなかった。8週後では、傍絞輪部の髄鞘の著明な伸張がみられ、軸索膜の不整は延長直後よりもかえって顕著になっていた(図6-D)。基底膜は、より不鮮明となり一部連続性が断たれている部分が認められた。軸索の細胞骨格は著しく減少していた。

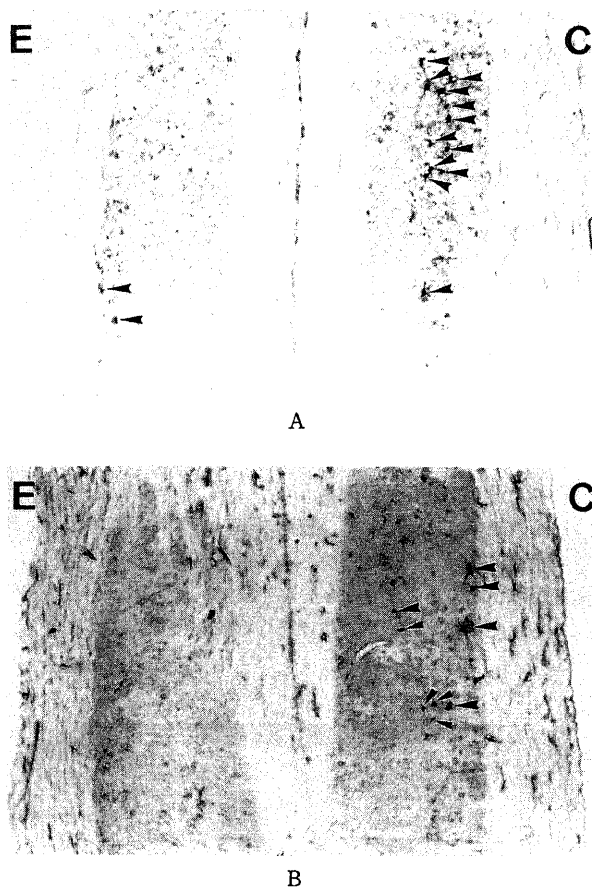


Fig. 7. Histological appearance of the coronal section at the level of the lumbar 5-7 segment stained by wheat germ agglutinin horseradish peroxidase. (A) Eight weeks after elongation in group I. The ventral horn cells were stained bilaterally. (B) Eight weeks after elongation in group II. The ventral horn cells were not stained on the elongated side. E, elongated side; C, control side.

### 3. 脊髄前角細胞の染色性について

I群では延長直後および8週後ともに、標識された脊髄前角細胞が認められた(図7-A)。しかし、その数は健側に比べ減少していた。これに対してII群では延長直後および8週後ともに脊髄前角細胞の染色性は全く認められなかった(図7-B)。

### 考 察

末梢神経の伸張に関する実験は、生体外での破損限界を生体力学的に知るための実験と、生体内での牽引損傷を機能的・組織学的に知るための実験の二つに大別できる。Wertheim<sup>19</sup>が1847年に坐骨神経・正中神経などの破損限界を報告、Harless<sup>20</sup>が1859年に牽引損傷神経の病理学的検討を行ったのが、その始まりである。その後、物質特性を調べるための牽引実験<sup>18)~20)27)</sup>が行われ、牽引損傷に最も抵抗する神経組織は神経周膜であること<sup>28)</sup>が解明されてきた。また、末梢神経を生体内で伸張させる実験<sup>18)29)</sup>では、神経周囲の結合組織や血管などを温存したまま行えるので、機能的変化の検討が可能な利点がある。末梢神経の血流に関して、Lundborg<sup>30)</sup>は急性伸張では全長の約8%の牽引から血流が低下し始め、15%では虚血となると報告した。また、電気生理学的臨界点については、土居<sup>21)</sup>は

全長の8%、西尾<sup>31)</sup>は10~13%、Highet<sup>11)ら</sup><sup>28)</sup>は11%、Wall<sup>32)</sup>は6~12%と述べている。

以上の実験は、臨床的には腕神経叢引き抜き損傷等を念頭においた、急性神経伸張に関する研究である。現在まで慢性伸張に関する研究が少なかったのは、臨床的に対応する病態がなかったからである。しかし、近年脚延長術の進歩に伴い、徐々に延長された末梢神経についての基礎的研究が待たれるようになった<sup>33)</sup>。また、末梢神経が機能を温存されたまま延長できれば、欠損のある神経修復時に神経移植術が不要となり、成績の向上が期待できる。実際、ティッシュエクパンダーを用いた神経延長術の試みも報告されている<sup>12)34)35)</sup>。しかしティッシュエクパンダーで神経を延長する際には、神経に伸張のみならず、絞扼や摩擦などの障害も加わり、その病態は複雑になる。したがって、慢性神経伸張の基礎的研究をする場合のモデルとしてはふさわしくない。神経に直接侵襲を加えず、純粋に延長のみを行なえる、脚延長術をモデル化したものが良いと言える。森下は日本白色家兎を用いたそのモデルで、2.0mm/日以上以上の延長速度で30mmの延長を行なうと、光顕レベルでは異常を認めないが、電気生理学的に伝導障害を認めたと報告し<sup>29)</sup>、その原因を電顕レベルにおける、ランビエ絞輪部の延長・軸索の髄鞘からの解離にあるとした。しかし、これらはすべて延長終了直後の所見であり、その後経時的に変性が進むのか、修復が起こるのかについては検討されていない。本研究では、同様な30mm延長モデルを用いて、2.0mm/日延長(I群)、4.0mm/日延長(II群)の回復の有無を電気生理学的および組織学的に検討した。

I群の延長8週後には、C-NAP、SSAPともに延長直後に比べ、振幅が有意に増大し回復傾向が認められた。また、持続時間が有意に延長したことは、延長直後に伝導性を消失していた神経線維が回復し、潜時の遅れた波として出現したものと考えられた。潜時の遅延が認められなかったのは、伝導速度の速い大径線維には延長による障害が加わりにくかったためと考えられた。これに対してII群では、C-NAP、SSAPともに延長直後にそれぞれ2羽、3羽に波形の消失が認められていた。延長8週後には波形の消失はそれぞれ3羽、4羽に認められ、回復傾向は認められなかった。したがって電気生理学的には、I群では回復の可能性があるのに対して、II群では伝導性の回復は期待できないものと考えられた。

長谷川の家兎坐骨神経急性伸張モデルによれば、神経伸張率が11.8%の場合、3週間後にはワーラー変性および神経束内の膠原線維の著しい増加が認められた<sup>29)</sup>。つまり急性伸張では、牽引により軸索の断裂が生じ、ワーラー変性が伝導性消失の主因である。Seddon分類<sup>36)</sup>のアクソノトメーシス、Sunderland分類<sup>37)</sup>の4度の病態である。しかし、本モデルにおいては、I群およびII群ともに光顕的観察では、ワーラー変性は認められず、Seddon分類のニューラプラキシア、Sunderland分類の1度に相当する。伝導性が消失しても、ワーラー変性は生じないという電気生理学所見と組織学的所見との解離が見られる。これは、森下も指摘したところであるが、この伝導性の消失は8週後にもII群では継続しており、この病態は永続するものと考えられる。このような病態は、慢性神経伸張障害に特異的なものと考えられる。これは、電顕的に観察されたランビエ絞輪部の軸索の延長・髄鞘層板一軸索角の鋭角化および軸索膜の不整が一つの原因となりうると考えた。Schneider<sup>47)</sup>や土居<sup>21)</sup>もラン

ランビエ絞輪部の延長を指摘している。髄鞘に覆われていない部分の軸索面積が増加する事により、活動電位の単位面積当たりのイオンの流出が減少し伝導障害が起こると考えられている<sup>36)</sup>。また、ランビエ絞輪部の延長を呈する病態は、空気止血帯による圧迫障害で報告されている<sup>37)</sup>。しかし、本実験で示したような、絞輪部の鋭角化や軸索膜の不整は認められない。軸索膜の不整について報告した研究はないが、ザリガニやイカの巨大軸索を用いた実験では、軸索膜のイオンの活発な出入りが証明<sup>38)</sup>されており、伝導障害に果たす役割は大きいものと考えられる。つまり電氣的興奮が伝導される際に、絞輪周囲の細胞外腔に貯えられている Na イオンが軸索膜を通して取り込まれ、新しい興奮が起こるとされている<sup>40)41)</sup>。したがって軸索膜と髄鞘を軸索に固定させる傍絞輪部が跳躍伝導に最も重要な関係があると言える。本実験で認められた軸索膜の不整および髄鞘層板軸索角の鋭角化は、まさにこの部位での形態的变化であり、伝導障害の原因が起こした一つの現象としてとらえる事が出来る。これらの所見は延長8週後には、I群で修復傾向が認められたのに対して、II群では顕著となっていた。II群における、基底膜の不鮮明化および軸索内細胞骨格の希薄化は、8週の間には障害が進行したものと考えられる。これらの所見は、伝導性がI群で回復傾向を示したのに対して、II群では回復が認められなかった事実に対応する。末梢神経が伸張されると神経束内圧が上昇し、細静脈・毛細管・細動脈の順に閉塞する<sup>4)</sup>。宇賀治<sup>42)</sup>は7%の伸張で神経束内血流量は減少し、18%の伸張で血流は完全に停止すると述べている<sup>4)</sup>。Lundborgら<sup>39)</sup>も8%の伸張で神経束内の静脈の鬱血を引き起し、15%の伸張で血流の停止を起すと報告している。本モデルでは、23%の伸張を行っており、電気生理学的伝導障害の原因として、血流障害も否定できない。しかし、これらの報告はすべて急性伸張実験であり、慢性伸張であれば血流は延長に適應していくと考えられる。下肢の30%延長例の患肢で、サーモグラフィでも温度低下を認めておらず、臨床的には血流障害はあったとしても軽微と考えられている<sup>43)</sup>。また、本モデルでは電気生理学的に障害を生じてから8週後にも、阻血後の変化である神経内浮腫および神経内線維化を認めていない。また、阻血障害後に生じる微小神経束化 (microfasciculation) による神経再生所見も認めていない<sup>37)</sup>。延長直後に血流障害が起ったとしても、阻血状態が持続したとは考えにくい所見である。しかし、勿論何%かの血流減少は考えられるわけで、血流については今後の課題と考えている。

本モデルでは、逆行性軸索流を利用した WGA-HRP で I 群では前角細胞の染色を認めたが、II群では染色を認めなかった。前角細胞が染色されないということは、逆行性軸索流の停滞を示し、神経終末での老廃物や神経成長因子 (nerve growth factor) の運搬に支障をきたしていることを示している<sup>44)~46)</sup>。したがって神経損傷後に長期にわたって WGA-HRP で染色されないということは、神経細胞の機能と構造の維持に障害をきたすと考えられる。これは、II群の8週後に電顕で認められた、軸索内の細胞骨格の希薄化と関連づけて考えられる。

本実験から、末梢神経慢性伸張障害とその回復の限界について考察してみる。家兎坐骨神経において2.0mm/日の延長速度では、延長終了後に伝導障害が生じるものの、8週の待機によって回復が認められる。4.0mm/日の延長速度のII群では、8週待機しても回復は認められない。電気生理学的に、I群で

は延長終了時点で波形が認められることが、波形の痕跡化・消失しているII群との大きな違いである。ある限界を超えて延長速度を速くすると、シュワン細胞が延長量に適應できず、ランビエ絞輪部の延長を補正できないまま延長終了時となる。I群のシュワン細胞は、8週待機する間に細胞体をさらに延長させて、絞輪部の延長に適應している。軸索もほぼ正常像を呈している。したがって、家兎坐骨神経の30mm延長であれば、2.0mm/日の延長速度は延長終了時に障害を認めるものの、修復可能な範囲であると言える。延長終了直後の光学顕微鏡的組織像では、II群はI群と比べ大きな差を認めないものの、この時点で修復不能な障害が加わっているものと考えられる。この障害は、電子顕微鏡的観察でもI群との質的变化は捉えられず、ランビエ絞輪部の軸索の延長・髄鞘層板-軸索角の鋭角化および軸索膜の軽度の不整の所見がより顕著に認められたにとどまった。しかし、8週待機する間にシュワン細胞も軸索も組織学的所見が増悪し、修復傾向の認められたI群とは明らかに異なっている。したがって4.0mm/日の延長速度は、末梢神経に不可逆的障害を与えるとと言える。しかし、この組織損傷形態は、現在使用されている Sunderland<sup>4)</sup>、Seddon<sup>36)</sup>の分類に、あてはまらない病態である。もっと速い延長速度、つまり急性伸張であればアクトノトメーセスとして分類される病態となるが、II群の損傷形態はこれとは異なる。すなわち、ワーラー変性に陥ることなく、ニューラプラキシアが永続するという、慢性神経伸張障害に特異的な病態として位置づけられると考えている。もし、シュワン細胞や軸索の生活力 (viability) といったものを定量できる方法があれば、修復不能の限界となる延長速度を知りえる可能性がある。また、本実験からは慢性伸張がシュワン細胞と軸索とどちらを主に障害するのかについては推察できなかった。

脚延長術または末梢神経延長術は、今後ますます盛んに行われるようになると予想される。したがって、それらに伴う末梢神経障害についての基礎的データは重要である。本モデルから、末梢神経慢性伸張の場合、伝導障害が生じた時点で待機または伸張を緩めることにより、機能の回復が望めることがわかった。これは、伝導障害が生じた時点で軸索断裂の危険性のある急性伸張障害との大きな相違点である。また、その延長速度については、電気生理学的検査において波形の消失を生じる以前に速度を緩め待機することが望ましい。

## 結 論

家兎の大腿骨を延長する事により、坐骨神経を間接的に伸張した。2.0mm/日延長群 (I群) および 4.0mm/日延長群 (II群) を作成し、それぞれ延長直後、および8週後に電気生理学的検査および組織学的検討を行った。

1. 電気生理学的検査においてI群は延長直後に伝導障害を認めたが、8週後には回復傾向を示した。II群では延長直後に、波形の痕跡化・消失を認め、8週後にも回復を認めなかった。

2. I、II群ともに8週経過しても、ワーラー変性・慢性炎症細胞の浸潤・神経内膜の線維化・神経周膜の肥厚等の所見はなかった。

3. 電子顕微鏡的観察ではI群の延長直後には、ランビエ絞輪部の軸索の延長・髄鞘層板-軸索角の鋭角化および軸索膜の軽度の不整が認められた。8週後にはそれらの組織変化の修復



像が認められた。Ⅱ群の延長直後では同様の組織変化がより顕著に認められ、8週後には、軸索膜の不整の増悪・基底膜の不鮮明化・軸索内細胞骨格の希薄化が認められた。

4. 逆行性軸索流による脊髄前角細胞染色において、Ⅰ群では染色を認めたが、Ⅱ群では8週後にも認めず、軸索流の停滞が示唆された。

5. 伝導性が回復しない場合、その組織変化の主因はワラー変性や神経束内線維化ではなく、ランビエ絞輪部の軸索の延長・髄鞘層板一軸索角の鋭角化および軸索膜の不整と考えられた。これはニューラプラキシアが永続するという、慢性神経伸張障害に特異的な損傷形態であると考えられた。

### 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と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。また直接御指導を賜りました金沢大学解剖学第二講座田中重徳教授、整形外科池田和夫助手、解剖学第二講座守屋円助手ならびに、森下裕助手をはじめとする整形外科末梢神経班の諸先生方に深謝いたします。最後に本研究の遂行に当たり、御協力を戴きました検査部湯上博技官、解剖学第二講座白石昌武技官、工作部田畑繁之技官に感謝の意を表わします。

尚、本論文の要旨は第10回創外固定研究会(1994, 横浜)および第10回日本整形外科学会基礎学術集会(1994, 神戸)において発表しました。

### 文 献

- 1) Bunnell, S.: Nerve grafts. *Am. J. Surg.*, **44**, 64-75 (1939).
- 2) Sanders, F. K.: The degeneration and re-innervation of grafted nerves. *J. Anat.*, **76**, 143-166 (1942).
- 3) Brooks, D.: The place of nerve grafting in orthopaedic surgery. *J. Bone Joint Surg.*, **37-A**, 299-305 (1955).
- 4) Millesi, H., Meissl, G. & Berger, A.: Further experience with interfascicular grafting of the median, ulnar radial nerves. *J. Bone Joint Surg.*, **58-A**, 209-218 (1976).
- 5) 野村 進: 末梢神経外科治療の進歩. *外科治療*, **24**, 323-333 (1975).
- 6) Bora, W. J.: Peripheral nerve repair in cats. *J. Bone Joint Surg.*, **49-A**, 659-666 (1967).
- 7) 野村 進: 末梢神経再生による機能回復機序について. *整形外科*, **17**, 85-92 (1966).
- 8) Sunderland, S.: *Nerves and Injuries*, 2nd ed., Churchill Livingstone, London, 1978.
- 9) 野村 進: 神経移行術および自家移植術. 第19回日本医学会総会誌, 932-935 (1975).
- 10) 平沢泰介: 神経移行術. *整形外科 MOOK*, **19**, 127-143 (1981).
- 11) Highet, W.: The effects of stretching nerves after suture. *Brit. J. Surg.*, **31**, 355-369 (1943).
- 12) Manders, E. K.: Elongation of peripheral nerve and viscera containing smooth muscle. *Clin. Plastic Surg.*, **14**, 551-562 (1987).
- 13) De Bastiani, G.: Limb lengthening by callus distraction (Callotasis). *J. Pediatr. Orthop.*, **7**, 129-134 (1987).
- 14) 平川 寛: 下肢延長術12例の長期成績. *別冊整形科*, **19**, 100-104 (1991).
- 15) Galardi, G., Comi, G., Lozza, L. & Marchettini, P., Novarina, M., Facchini, R. & Paronzi, A.: Peripheral nerve damage during limb lengthening. *J. Bone and Joint Surg.*, **72-B**, 121-124 (1990).
- 16) 村島隆太郎: 下肢脚延長中の運動神経伝導速度の変化. *日本創外固定研究会誌*, **2**, 117 (1991).
- 17) Denny-Brown, D. & Doherty, M. M.: Effects of transient stretching of peripheral nerve. *Arch. Neurol. Psychiat.*, **54**, 116-129 (1945).
- 18) 天谷信二郎: 末梢神経牽引損傷に関する実験的研究—生体内牽引による神経外抵抗因子について—. *中部整災誌*, **28**, 2199-2210 (1985).
- 19) Wertheim.: *Memorie sur L' elasticite et la cohesion des principaux tissus du corps humain*. *Ann. Chim. Phys.*, **3**, 385-414 (1847).
- 20) Liu, C. T., Benda, C. E. & Lewey, F. H.: Tensile strength of human nerves. *Arch. Neurol. Psychiat.*, **59**, 322-336 (1948).
- 21) 土居宗算: 末梢神経伸張損傷に関する実験的研究—電気生理的变化と形態的变化について—. *日手会誌*, **6**, 1141-1052 (1990).
- 22) 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).
- 23) 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).
- 24) 松田英雄: 末梢神経損傷と障害—診断—. *日手会誌*, **9**, 931-946 (1993).
- 25) Oldfield, B. J. & McLachlan, E. M.: Uptake and retrograde transport of HRP. by axons of intact and damaged peripheral nerve trunks. *Neurosci. Lett.*, **6**, 135-141 (1977).
- 26) Mizuno, N. & Konishi, A.: Localization of masticatory motoneurons in the cat and by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *J. comp. Neurol.*, **164**, 105-116 (1975).
- 27) Wood, R. J.: Controlled expansion of peripheral nerves: Comparison of nerve grafting and nerve expansion/repair for canine sciatic nerve defects. *J. Trauma.*, **31**, 686-690 (1991).
- 28) Harless. & Haber.: *Die Muskelkrämpfe bei der Nervenvertrocknung*. *Z. rat. Med.*, 219-257 (1859).
- 29) 中条正博: 末梢神経牽引損傷に関する実験的研究—神経内抵抗因子について—. *中部整災誌*, **29**, 1-11 (1986).
- 30) Lundborg, G. & Rydevic, B.: Effects of stretching the tibial nerve of the rabbit. *J. Bone Joint Surg.*, **55-B**, 390-401 (1973).
- 31) 西尾昭彦: 末梢神経の伸展性損傷に関する実験的研究. *医学研究*, **36**, 172-188 (1966).
- 32) Wall, E. J. & Massie, J. B.: Experimental stretch neuropathy. *J. Bone Joint Surg.*, **74-B**, 126-129 (1992).
- 33) Young, N. L., Davis, R. J., Bell, D. F. & Redmond, D. M.: Electromyographic and nerve conduction changes after tibial lengthening by the Ilizarov method. *J. Pediatr. Orthop.*, **13**, 473-477 (1993).
- 34) Milner, R. H.: The effect of tissue expansion on

- peripheral nerves. *British J. Plastic Surg.*, **42**, 414-421 (1989).
- 35) Milner, R. H.: The recovery of peripheral nerves following tissue expansion. *J. Hand Surg.*, **17B**, 78-85 (1992).
- 36) Seddon, H.: *Surgical Disorders of the Peripheral Nerves*, 2nd ed., Churchill Livingstone., Edinburgh, 1975.
- 37) Dyck, P. J.: *Peripheral Neuropathy*, 3rd ed., Saunders., Philadelphia, 1993.
- 38) 長谷川光広: ワーラー変性早期におけるランヴェリエ絞輪および傍絞輪の超微構造変化—超薄切片および凍結割断レプリカによる研究—. *十全医会誌*, **98**, 257-277 (1989).
- 39) Peracchia, C. & Robertson, J. D.: Increase in osmiophilia of axonal membranes of crayfish as a result of electrical stimulation, asphyxia, or treatment with reducing agents. *J. Cell Biol.*, **51**, 223-239 (1971).
- 40) 河野邦雄: 軸索の微細形態. 代謝, **18**, 515-525 (1981).
- 41) Ellisman, M. H.: Molecular specializations of the axon membrane at nodes of Ranvier are not dependent upon myelination. *J. Neurocytol.*, **8**, 719-735 (1979).
- 42) 宇賀治行雄: 末梢神経牽引による神経内血流動態に関する実験的研究—レーザードップラー法による血流測定—. *十全医会誌*, **97**, 989-1002 (1988).
- 43) 木村知史, 井上明生: 脚延長の限界. *日本創外固定研究会誌*, **2**, 125-128 (1991).
- 44) Grafstein, B.: Intracellular transport in neurons. *Physiol. Rev.*, **60**, 1167-1283 (1980).
- 45) 黒木正則: 軸索流の基礎, 第3回末梢神経を語る会, (1980).
- 46) 山本長三郎: 臨床家に必要な末梢神経の生理学, 末梢神経損傷, *Mook*, **19**, 18-26 (1981).
- 47) Schneider, D.: Die Dehnbarkeit der markhaltigen Nervenfasern des Frosches in Abhängigkeit von Funktion und Struktur. *Z. Naturf.*, **7-B**, 38-48 (1952).

**Recovery after Peripheral Nerve Injury Due to Gradual Elongation** Hirofumi Nakayama, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **104**, 483—491 (1995)

**Key words** peripheral nerve, elongation, stretch injury

#### Abstract

The purpose of this study is to clarify how fast the peripheral nerve can be stretched gradually without inducing nerve conduction block and to assess whether the damage to the peripheral nerve would heal or not. Rabbit femur were gradually elongated to 30 mm at the rate of 2.0 mm/day (group I) and 4.0 mm/day (group II) using the femur lengthener to stretch the sciatic nerve indirectly. Immediately after lengthening, 10 rabbits from each group were examined; 8 weeks after lengthening, 15 rabbits from each group were also examined. The sciatic nerves were evaluated electrophysiologically, using compound nerve action potential (C-NAP) and segmental spinal cord action potential (SSAP). The peak amplitude of C-NAP decreased to  $142.5 \pm 14.9 \mu\text{V}$  immediately after lengthening of group I and it recovered to  $337.5 \pm 14.9 \mu\text{V}$  8 weeks after lengthening ( $p < 0.05$ ). The peak amplitude of SSAP decreased  $36.3 \pm 18.0 \mu\text{V}$  immediately after lengthening of group I and it recovered to  $107.5 \pm 41.1 \mu\text{V}$  ( $p < 0.05$ ) 8 weeks after lengthening. Both of the peaks had almost disappeared in group II and were eliminated 8 weeks after lengthening. Histologically, both Waller's degeneration and endoneurial fibrosis did not occur in any group in any period. Ranvier's node was elongated, axolemma was irregular, and the paranode straightened in each group while the extent of damage was more severe in group II than in group I immediately after lengthening. The damage was repaired in group I 8 weeks after lengthening; however they became worse in group II. In addition, the basement membrane became thin and indistinct, and the number of neurofilaments in the axon decreased in group II. These findings might suggest a close relationship to conduction block. Since wheat germ agglutinin horseradish peroxidase was absorbed from the sectioned peroneal nerve stump, the ventral horn cells of the lumbar spine were stained in group I. However, they were not stained in group II in any period. The lengthening speed of 4.0 mm/day causes irreversible damage to the peripheral nerve and its main histological changes are elongation of Ranvier's node, irregularity of axolemma, and straightened paranode. On the other hand, a 2.0 mm/day lengthening speed causes nerve damage immediately after lengthening, but it will recover during an 8 week waiting period. Recovery from gradual lengthening injury of the peripheral nerve was expected when the wave of the electrophysiological examination had not yet disappeared.