

神経生検法

山口大学大学院医学系研究科神経内科学講座

神田 隆

末梢神経生検で大切なことは何か？

- ① 厳密に適応を決めること
- ② 腓腹神経を確実に同定すること
- ③ 美しい標本を作ること

の3点に尽きる。このレクチャーの目的は、②③を達成するための技術的ポイントを解説することにある。

1) 末梢神経生検の適応

末梢性ニューロパチーは神経内科領域では患者数・疾患の種類とも極めて多く、診断・治療の両面で重要な位置を占めている。末梢神経生検はこの疾患群の病変の主座そのものを採取し、顕微鏡下に観察するという大きな advantage をもった検査である。

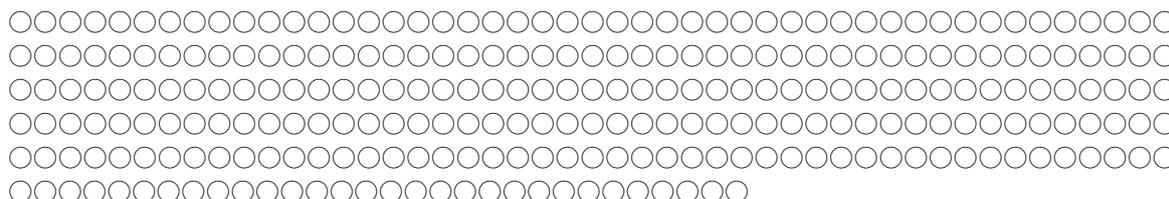
筆者は神経生検の適応を、基本的には、

- (1) 末梢神経内に specific な所見があり、その証明が診断的意義を有するもの
- (2) 末梢神経での病変プロセスが推定可能で、これが診断的価値を有するもの
- (3) その他

【略歴】

神田 隆 *Takashi Kanda*

山口大学大学院医学系研究科神経内科学講座



の3者に分けている。(1)は具体的にはアミロイドーシス(家族性・原発性とも)におけるアミロイド沈着の証明、Hansen氏病での癩菌の証明、サルコイドニューロパチーでの神経束内サルコイド結節の証明などで、(2)にはvasculitic neuropathyでの血管炎や軸索変性所見の証明、炎症性ニューロパチーで観察される神経束内の炎症所見や脱髄プロセスの証明などが含まれる。(3)には末梢神経障害の重症度や予後を判定したり、また、その成因や病態を追求する上での一助とする目的が含まれる。

術後に切除した神経の脱落症状をきたすため、生検しうる神経は感覚神経(sensory nerve)に限定される。従って、sensory neuropathy, sensorimotor neuropathy, autonomic neuropathyでは病変が病理学的所見に反映される可能性が大きいが、純粋なmotor neuropathyでは参考所見にとどまる。また、patchyな病変分布を示す疾患、たとえば多発性単神経炎やAIDP、CIDPなどの炎症性ニューロパチーでは、採取した神経の部分に必ずしも病変が存在するとは限らない。また、上記(1)に示したような疾患特異性のある病変を採取された標本中に見いだすことはむしろ少ない。末梢神経生検はこのような診断的限界を有すること、侵襲的な検査であることなどを考え合わせると、むやみに適応範囲をひろげることは厳に慎まねばならない。一方、意味のある所見を見つけたそうとする努力は常に必要で、1枚の切片から得られる情報は、読む神経内科医の臨床経験や正確な電気生理学的データを加味することで更に大きなものとなる。この意味では、末梢神経生検の適応は術者と主治医の生検標本の読みに関する知識や経験によって大きく左右されるといっても過言ではない。

2) 生検部位の選択

生検部位としては一般的には腓腹神経 sural nerve が選択される。腓腹神経以外に浅腓骨神経、伏在神経などを生検部位としている論文も散見されるが、これらの神経にのみ病変が限局していると考えられる症例を除いては積極的に選択する理由に乏しいので、以降の記述は腓腹神経生検に限定したものと理解されたい。腓腹神経で生検を行う理由は以下の6つに集約される。

- (1) ヒトでは運動成分を含まない、従って、生検後に運動麻痺をきたさない(但しこれには異論があり、ヒトでも少量の運動成分が含まれているという説が有力。しかし、切除後に運動麻痺をきたすことはない)
- (2) 下肢の遠位端にあるため、各種ニューロパチーで病理学的変化をつかまえやすい
- (3) 比較的外傷の影響を受けにくい(腓骨とアキレス腱の盛り上がりの間の凹んだ部分)

を走行するため)

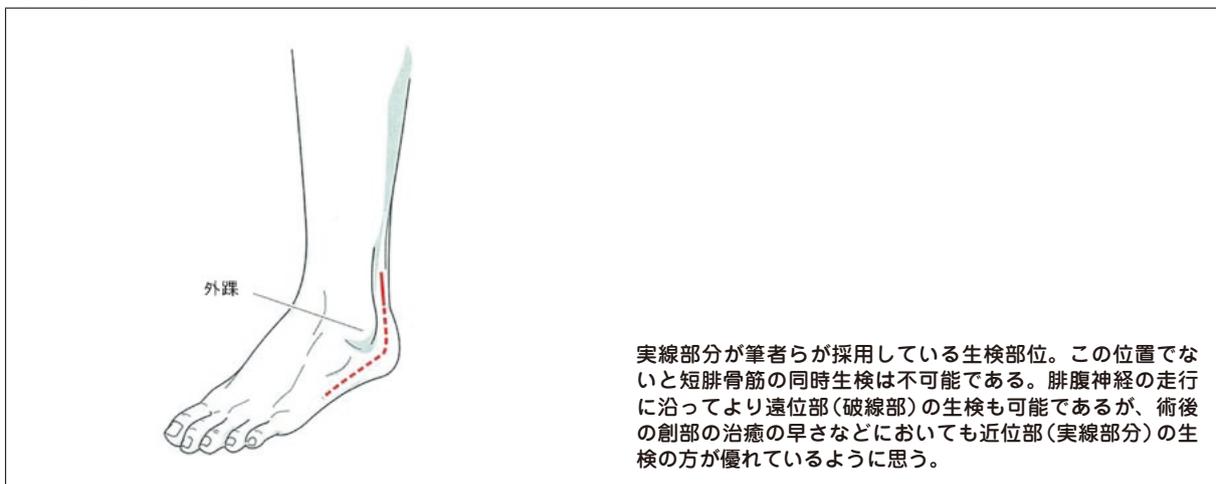
(4) ルチーンに感覚神経伝導検査を行う神経であるため、電気生理学的情報との対比が可能

(5) 解剖学的破格が少ない（私の経験では“存在しなかった”ことがない）

(6) 過去に多くの症例の蓄積があり、それらとの対比が可能

また、高位の腓腹神経生検（**図1**）では同時に短腓骨筋生検が可能で、1カ所の切開で神経・筋の生検ができるという利点も見逃せない。

（図1）



3) 生検手技の実際

神経生検は筋生検と同じく、手術室を利用するのが理想的であるが、ベッドサイドでも決して不可能な手技ではない。従って、緊急に神経生検が必要な状況下（たとえば急性に進行する血管炎性ニューロパチーが疑われるような症例）では、手術室の確保に固執することなく生検を進めて欲しい。患者の体位はうつ伏せ、あるいは手術肢側を上にした斜め45°仰臥位または側臥位で手術肢を膝で90°屈曲した形、のいずれかがとられる。どちらの体位でも腓腹神経が術者に直視できる格好になる。呼吸状態に問題がなければ、患者さんにとってはうつ伏せが楽なようである（**図2**）。

採取部位は外踝直下から distal をとる場合もあるが、ここでは、筆者の施設で日常的

(図2)



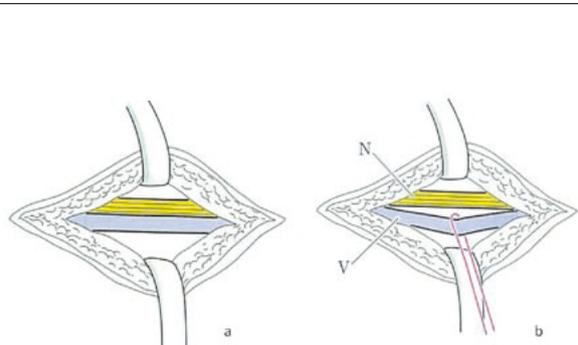
切開部位を中心に広範な消毒を行う。この患者ではうつ伏せの体位をとっている。

(図3)



- a. 切開創を鈍的に剥離すると、筋膜より浅いところに2本の縦に走る構造物が見える。腓腹神経には血管には無い縦に走る線が認められ、絹のような光沢がある。この図のように小伏在静脈よりも深いところを走る場合が多い。この部位では腓腹神経は2本に分かれて走っていることもしばしば観察される。
- b. 小伏在静脈(V)に糸をかけ、腓腹神経(N)との分離をかけたところ。くれぐれも神経と静脈を取り違えることのないように注意する。切断時に患者さんが感じる“電気が走ったような”感覚は、採取したものが神経であることの有力な裏付けの一つである。

(図4)



腓腹神経(上)と小伏在静脈(下)をしっかり分離する。

に行っている高位の生検法を紹介する。この方法では、短腓骨筋の採取も可能である(後述)。外踝後方で外踝上縁より約2横指上方、アキレス腱との間の部位を中心に剃毛し、十分な消毒を行う。静脈確保は必須である。十分な局所麻酔の後、腓骨とアキレス腱の間(こころもちアキレス腱寄りが多い)に、アキレス腱と平行に3-4cm程度の切開を入れる(図1)。結合組織を鈍的に剥離していくと、切開創と平行に走行する直径2-3mmの2本の管状ないし平板状構造物が認められるようになる。この2本が小伏在静脈と腓腹神経に相当する(図3)。多くの場合、小伏在静脈は腓腹神経よりも表面に近いところを走行するが、この2者の区別は思ったほど簡単ではない。とくに、高齢者では静脈壁のfibrosisが進行するが、若年者でも一見して血管には見えないケースにときどき遭遇する。この2つを鑑別するポイントは、(1)神経はよくみると絹のような光沢があり、数本の縦に走行する数本の神経束の“束”として認められる、(2)血管は直角に分岐するが、神経は直角に枝を出すことはない、などである。ここまでのプロセスで血管などが腓腹神経上を横走しているような場合は、確実に結紮して無用な出血を避けることが重要である。出血するとますます両者の弁別は難しくなる。

腓腹神経を確認したら、小伏在静脈を十分に剥離し、採取する神経全体が直視下に入るようにする(図3, 4)。ここで気をつけるべきことは、決して神経をつまんだり引っ張ったりしない(末梢神経はpreparation artifactの極めて出やすい臓器である)ことである。位置覚・振動覚の強く障害された患者さんでは、生検中、とくに痛み刺激を与えた際に下肢が動いて清潔操作を不可能にすることがしばしば経験される。このような場合、介助者に下肢を固定しておいてもらうことが必要になる。近位端に軽く浸潤麻酔を施した後、軽く糸をかけて(強く結ばないこと)神経束を少し浮かせ、鋭いメスないし剪刀で一気に切断する。言うまでもないことであるが、神経の切断は必ず近位端から行う。切断の瞬間には患者さんは“電気が走ったような”強いしびれ感あるいは痛みを感じるので、必ず直前にこれから切離す旨を告げる必要がある。続いて遠位端を切離し、腓腹神経の採取は終了する。遠位端と近位端で切除の角度を変えておけば、生検後も材料の遠位端、近位端の区別ができ、便利である。筋生検と異なり筋膜縫合の必要はない。止血を十分に確認したら皮膚縫合を行う。

上記の方法は腓腹神経の“total biopsy”、すなわち、全腓腹神経を採取してくる方法であるが、このほかに、腓腹神経を短冊状に切り取ってくる“fascicular biopsy”という方法がある。腓腹神経は5-14本位の神経束nerve fascicleからなっており、この一部だけを採取してくるのであれば、当然、生検後のhypesthesiaの領域は狭くなる、ということが期待される。ただし、短冊状に切り取ってくることに若干の技術的修練が必要で

preparation artifactの可能性が大になることや、fascicular biopsyによってむしろ生検後の不快な dysesthesia, paresthesia の頻度が高くなるなどの意見もあり、筆者はこの方法を最近是用いていない。Fascicular biopsy の弱点はもう1つある。血管炎に基づく neuropathy は神経生検の適応となる最も重要な疾患の一つであるが、観察面積を限定することでその診断に重要な epineurium の情報や、各神経束毎の病変の程度の差異を検出しにくくなるデメリットは看過し得ない。したがって、これから腓腹神経生検を始めようという先生方には total biopsy をお勧めする。

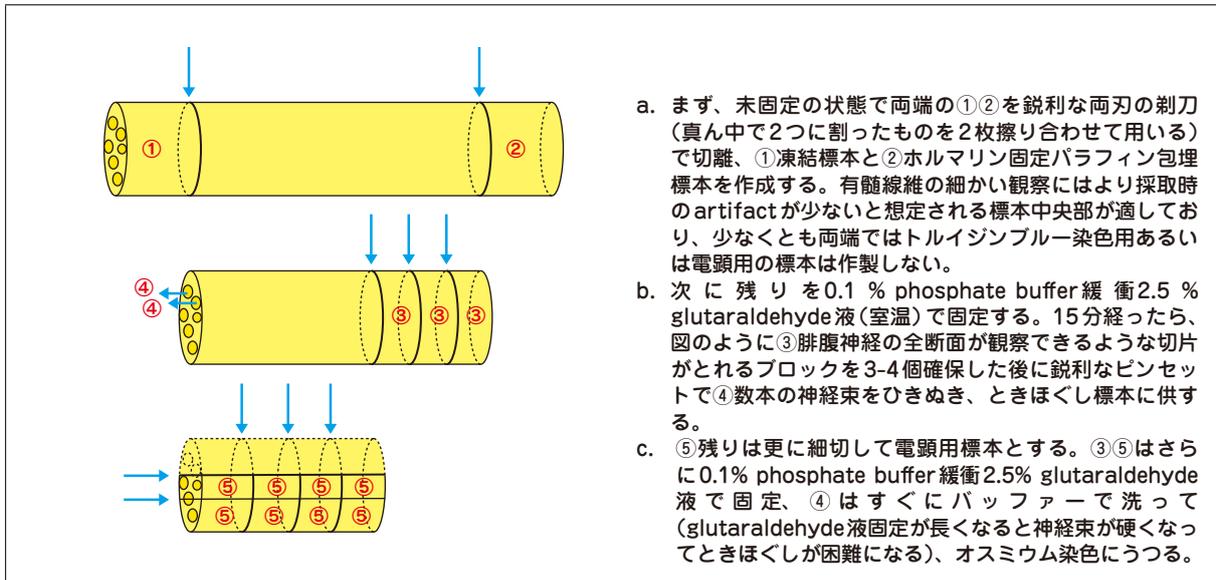
腓腹神経生検後にさらに短腓骨筋生検を行いたい場合は、神経生検後の止血を確認した後、さらに結合組織を鈍的に剥離して深部へと進む。腓腹神経が腓骨・アキレス腱の中間よりもややアキレス腱寄りに位置するのに対し、短腓骨筋はやや腓骨寄りであることに留意する。筋膜を見つけたらメスで切開し、通常の筋生検と同じ方法で筋肉標本を切除する。一般に行われる筋生検の部位と違って短腓骨筋は深い位置にあるため、切除後の筋膜縫合がしばしば困難となる。筋膜切開前に筋膜に糸を通しておくなどの工夫が必要である。

生検施行後は2-3日は術肢に体重をかけないように指導し、基本的に移動は車椅子で行う。とくに、短腓骨筋の同時生検を行った場合には注意が必要である。術後数日間～数週間の間は生検部位の圧迫や足首を曲げた際の電撃痛などを訴える場合が多いが、これらの症状は時間とともに軽減していくことが多い。一時的なものであること、原疾患の悪化によるものではないことなどをよく説明する必要がある。術後7-10日で抜糸可能である。生検後は切除した腓腹神経の支配領域に hypesthesia, paresthesia が残存するが、正常末梢神経には軸索再生能力があり(1日最大で約1mm弱と言われている)、時間とともに徐々に回復することが多い。ただし、ニューロパチーの基礎疾患によっては回復プロセスに若干の variation があることもよく説明する必要がある。

4) 切除検体の処理

標準的には(1)凍結標本、(2)パラフィン包埋標本、(3)エポン包埋標本(トルイジンブルー染色で光顕標本となり、また、電顕標本となる)、(4)ときほぐし標本、の4種類を作成する。**図5**は、4種類の標本をどこから作製するかの大体的目安として参考にしてほしい。

(図5)



(1) 凍結標本 ①

筋生検での絶対的な有用性に比べると、神経生検での凍結標本の有用性はさほどでもないと言わざるを得ないが、血管炎が疑われる例などで、答がすぐ出て速やかに適切な治療に移る判断を可能にするのは凍結切片をおいて他にはない。また、ニューロパチーの分子学的研究の発展に伴って、生検材料を用いた新たな生化学的・免疫組織学的検索が将来的に必要な可能性もあり、凍結標本は是非ルチーンに確保しておくことをお勧めする

凍結固定法は筋生検の場合と全く同じである。厚さ5mmほどに切ったコルク台の上にトラガンドゴムを水で溶いたものを土台としてのせ、その中に末梢神経を埋め込むような要領で立てる。末梢神経は基本的に横断面で観察するので、ここでは腓腹神経の長軸がコルク台に垂直になるようにするのがコツだが、慣れないとなかなか難しい。これを液体窒素+イソペンタンのコンビネーションで急速凍結する。100-200mlのビーカーにイソペンタン(2-メチルブタン)を2/3位入れたものをゆっくり液体窒素につけて、イソペンタンを凝固点まで冷やす。イソペンタンが凝固点まで達したかどうかはビーカーの底に白い結晶が見え始めたかどうかで判断する。結晶が見え始めた段階でイソペンタンはすでに-160℃まで冷えているので、ここで検体のコルク部分を大きなピンセットでつかみ、イソペンタンの中に一気に沈めて約30秒-1分間よく攪拌する。急速凍結が終了した検体はビニール袋に入れ、蓋のついたガラス小瓶(筆者は通常サイズのシンチレーションバイアルを愛用している)に入れ、deep freezerで保管する。腓腹神経検体は小さいのでイソペ

ンタン内での凍結にはほとんど時間がかからず、筋生検ほど frozen artifact に気を遣う必要はないが、指で不用意に触ったりするとすぐに溶けてしまうので要注意。液体窒素＋イソペンタンが使用できない場合はアセトン＋ドライアイスのコンビネーションでも代用可能である。

凍結切片はクリオスタットで作製する。末梢神経組織はクリオスタット切片が非常に作りにくいものの一つである。大体 $10\ \mu\text{m}$ 位の厚さが切りやすいと思われる。血管炎の診断には HE と EVG が有用である。Gomori Trichrome 変法では美しい髄鞘染色が得られる。この他、炎症性疾患での浸潤リンパ球のサブセット解析など、凍結切片を用いた免疫組織化学が有用になるケースも意外に多い。

(2) パラフィン包埋標本 ②

中性緩衝ホルマリンを用いて固定した後、通常のパラフィン包埋を行う。HE、Congo 赤、KB などがよく用いられる染色法で、血管炎の診断には EVG も極めて有用である。

血管炎やアミロイド沈着、サルコイド結節、炎症細胞浸潤などの評価には欠かせない標本であるが、個々の線維の形態を見て病変の性質を判断する(たとえば、病的課程の主体が脱髄か軸索変性かの評価など)というレベルの診断には全く不向きである。神経束の変形もほとんど不可避で、美しい円形の標本が得られることはほとんどない。

(3) トルイジンブルー染色標本 ③と⑤

エポン包埋トルイジンブルー染色厚切り標本は、電子顕微鏡用の超薄切片作製前の副産物であるが、非常に美しい髄鞘染色が薄い切片で得られる(厚さ $1\ \mu\text{m}$ 前後)ため、現在では末梢神経標本観察の世界的なスタンダードとなっている。この標本を artifact なく、美しく作製することが正しい末梢神経疾患の診断に直結する。

エポン包埋標本の前固定には 0.1M リン酸緩衝 2.5% グルタルアルデヒド液を用いる。グルタルアルデヒド単独では組織浸透性が余りよくないため、ここに $1\text{-}2\%$ のパラホルムアルデヒドを加えた固定液が一般臓器の固定では広く用いられるが、パラホルムアルデヒドを混入すると固定液の浸透圧が跳ね上がり、これが神経束の高度の変形をきたす原因にしばしばなるため、筆者は薦めない。採取した腓腹神経は放っておくと長軸方向に収縮し、このままで固定すると神経全体が波打った形になって非常に見苦しい標本になる。標本をまっすぐな形で固定する方法はいくつかあるが、筆者の行っている方法はごく簡単に採取した神経を堅い紙(名刺ぐらいのものがよい)の上に軽いテンションをかけてまっすぐ載せるといったものである(図6)。名刺に乗った腓腹神経検体をゆっくり 0.1M リン酸緩

(図6)



神経束は名刺上に軽く伸ばして固定液に漬ける。

衝2.5%グルタルアルデヒド液中に浸す。固定時には同液は室温に戻しておくこと（冷蔵庫から出してすぐ固定しないことが大切）。

通常の電顕固定と少し異なるポイントを以下に記す。末梢神経標本作製の際は、電顕的常識に反することをいくつかやらないといけない。電顕に詳しい技師に処理を丸投げしては、美しくかつ診断の役に立つ末梢神経の標本はできない。

(a) 急いで細切しないことが第1のポイント。検体を細かく切って固定液の浸透をよくすることは電顕前固定のイロハであり、電顕に熟練した技師に検体を渡せば即座に細かい(1辺2-3mmくらい)組織に切ってくれるであろうと思われる。しかし、神経束がグルタルアルデヒド固定によってある程度硬くなる前に標本を細切すると、細切面近辺から拡がるartifactで見るに堪えない標本になる。基本的には1時間以上2.5%グルタルアルデヒド液に浸けたのちに細切を開始すること。下に述べる全体を観察する標本(③)以外は長軸方向に3mm程度の長さで、直径は2mmを超えないぐらいに切る(⑤)と固定の条件がよいが、小さくしすぎるとartifactが出やすくなる。細切後はすぐにバッファー洗浄にうつらず、更に数時間2.5%グルタルアルデヒド液に浸けておく方がよい。ただし、ときほぐしに用いる標本だけは、同液に15分以上漬けるとオスミウムの発色が悪くなり、加えて硬くなって非常にときほぐしにくくなる。ときほぐし標本用の神経束は別個に15分固定の段階で分離し、バッファーで洗浄してグルタルアルデヒドを洗い落とす作業が必要になる。

(b) 腓腹神経の全体が観察できるような横断切片ができるようなブロックを最低1個かならず作成する(③)。これは腓腹神経束を縦方向に分割しないでまるまる固定する形に

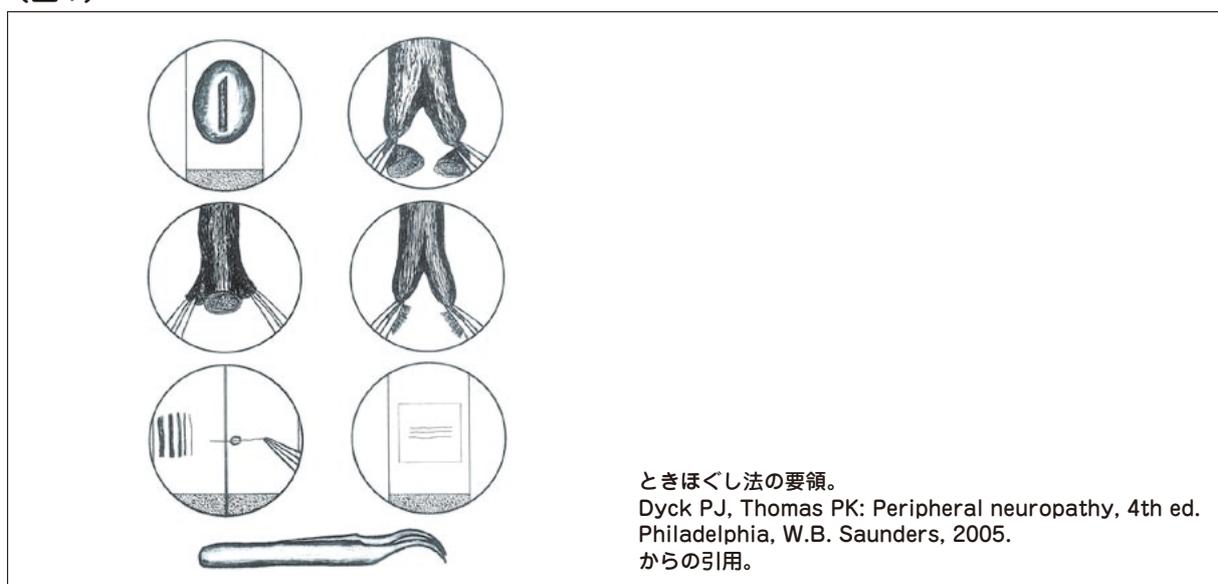
なり、電顕的常識からはとんでもない大きさのブロックということになる。2.5%グルタールアルデヒド液、オスミウム液で十分な時間固定することで固定不良(とくに標本の中央部におこりやすい)を回避することができる。

2.5%グルタールアルデヒド液で十分に前固定した検体は、バッファー洗浄の後2%オスミウム酸で再固定し、型通りエポン包埋を行う。基本的に横切りの標本は有用性が乏しいので、ブロックには輪切り標本ができるような形で包埋する。

(4) ときほぐし標本 ④

2.5%グルタールアルデヒド液に15分間(この15分間はきわめてcritical。短すぎるとときほぐしの際にSchmidt-Lantermann切痕の開大などのartifactが大量に入って見苦しい標本になり、長すぎると神経束全体が硬くなってときほぐし困難となる)つけたあとに抜き取った神経束(1~2本でよい)を十分にバッファー洗浄した後、1.5%オスミウム酸で24-48時間染色を行う。続いて33%、66%、100%グリセリン中に各一昼夜浸軟する。ときほぐし法の概略は図7参照。やわらかくなった神経束は、スライドグラス上にのせて実体顕微鏡下に2本の鋭利なピンセットを用いてperineuriumを剥がし、スライドグラス左端におく。ここで各有髓線維を1-3本ずつ程度に分離する。分離した線維はピンセットで一端をつまんでスライドグラス上をひきずって行けば、線維の全長がまっすぐに伸びて後からの観察に都合がよい。バルサムその他で封入して永久標本とする。ときほぐしに用いるピンセットは鋭利でかつ先が揃っていないと使い物にならない。筆者はVigor

(図7)



社またはDumoxel社の3号、5号ピンセットを常時用意し、時折実体顕微鏡下で先端を研ぎながら使用している。

5)最後に

本検査法は侵襲的な検査であり、適応の決定について極めて専門的な判断を要求されるのはもちろん、手術手技、固定法から標本作製や標本の読みまで、高度な知識と経験を必要とする手技である。現状では専門家の指導下に神経生検の経験を積むことができる施設は国内にそれほど多くはなく、今回のセミナーがそれを補う一助になれば幸いである。腓腹神経生検で得られる所見には特異的なものは比較的少ない。臨床所見や電気生理学的検査その他の臨床検査から得られた情報を総合してニューロパチーの診断に至るのがふつうであるが、新しい所見を標本の中から見いだしていこうとする努力は常に必要であることも強調しておきたい。また、本法はあくまでも末梢神経の末端の一部を見ているに過ぎず、末梢神経系全体の病理像の理解のためには、前角細胞や後根神経節、脊髄前後根、末梢神経幹の近位部と遠位部、軸索最末端(感覚終末、筋終板)などについて三次元的に把握する視点が要求されよう。

参考教科書

個々の疾患の病理所見についてはオリジナルの文献をあたっていただくのが最良であるが、そうやってしまうだけでは余りに不親切なので、以下に参考になりそうなものを数編挙げる。

〈和文〉

末梢神経生検の概要を知るには

1. 神田 隆：末梢性ニューロパチーの病理形態学. 神経研究の進歩 47: 481-491, 2003.
筆者が末梢神経標本の基本的な病理所見について概説した総説。
2. 朝長正徳, 桶田理喜編 神経病理学—基礎と臨床, 朝倉書店, 1992.
3. 朝長正徳, 桶田理喜編 神経病理学カラーアトラス, 朝倉書店, 1992.
両著とも筆者が末梢神経の項を分担執筆している。初版が刊行されてから20年近く経った書籍であるが、最近価格を下げた普及版が出ている。このレクチャーに加えて上記総説と併せてお読みいただければ、末梢神経病理の概要は理解できるようになると思う。
4. 岡 伸幸：カラーアトラス末梢神経の病理, 中外医学社, 2010.
昨年出版されたばかりのカラーアトラス。写真が美しく、神経内科で扱う末梢神経疾患の病理全般を網羅した内容になっている。

最低限の知識を得るには

5. 神田 隆：医学生、研修医のための神経内科学, 中外医学社, 2008.
筆者が医学生・研修医向けに書いた教科書。末梢神経生検についてはごくエッセンスのみを4ページ強の長さを書いてある。ここだけお読みいただければ最低限の知識はつくと思います。

〈英文〉

1. Asbury AK, Johnson PC: Pathology of peripheral nerve. Vol.9. , Major problem in pathology. Philadelphia, W.B. Saunders, 1978
古い本で現在では入手が困難であるが、末梢神経の正常像・構成細胞から病理学的変化までコンパクトにまとめられている。
2. Dyck PJ, Thomas PK: Peripheral neuropathy, 4th ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 2005.
ニューロパチーに関する大著。末梢神経病理にもかなりページを割いている。
3. Midroni G, Bilbao JM: Biopsy diagnosis of peripheral neuropathy. Butterworth-Heinemann, 1995.
標本作成技術の高さが光る本で、技師さんの名前が表紙にクレジットされている。アトラスとしてもとても美しい。残念ながら絶版で入手は難しい。
4. Vital C, Vallat J-M: Ultrastructural study of the human diseased peripheral nerve. New York, Elsevier, 1987.
生検末梢神経の電顕像を中心に解説。

