

# Transplantation of Autologous Peripheral Nerve Tissue into Injured Spinal Cord in Rats

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/2297/8319">http://hdl.handle.net/2297/8319</a>

## ラット脊髄損傷モデルにおける自家末梢神経移植

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

田 口 博 基

(平成4年2月3日受付)

本研究の目的は、損傷脊髄に自家末梢神経を移植することにより脊髄の神経再生を促し、経時的に再生神経の超微形態を明らかにすることである。ラットの半側脊髄損傷モデルに自家総腓骨神経片を移植した後、1週間から1年間にわたり、移植片と脊髄を光顕的、電顕的、ならびに免疫組織化学的に検索した。移植片内においては、移植後2週目までにほぼ全ての軸索および髄鞘が一旦変性像を示したが、3週目になるとまず無髄神経が出現し、その後末梢型髄鞘に覆われた有髄神経が出現した。さらに、時間の経過とともに、再生神経線維は数の増加と直径の増大を示した。西洋ワサビ過酸化酵素 (horseradish peroxidase, HRP) を用いたトレーサー実験では、移植片内の再生軸索の起源となる細胞は大部分が脊髄内の神経細胞であったが、一部は損傷部近傍の後根神経節細胞であった。HRPは移植片の挿入部より上下各7mmまでの脊髄灰白質全域の神経細胞に陽性であることより、この範囲に含まれる神経細胞が移植片内に再生軸索を伸ばしていることがわかった。移植片の挿入部近傍の脊髄内においては、末梢型髄鞘に覆われた再生神経線維が、ことに血管周囲に多数みられた。再生神経線維に隣接する星状膠細胞の突起には一部に基底膜がみられた。末梢型髄鞘が破壊あるいは貪食される像はみられなかった。以上より、ラット損傷脊髄においては、自家末梢神経の移植により脊髄内の神経細胞の軸索再生と髄鞘形成を促す環境が形成されることがわかった。本モデルは脊髄損傷患者の治療に対する基礎的研究に有用であり、神経移植が脊損患者の治療に応用できる可能性があると考えられた。

---

**Key words** regeneration, remyelination, Schwann cell, spinal cord injury, transplantation

---

魚類、両棲類あるいは爬虫類などの下等脊椎動物では、中枢神経系は一担損傷を受けても著しい再生能力を示すことが知られている。たとえば Kirsche<sup>1)</sup>は1925年メダカを用いて、Hooker<sup>2)</sup>は1927年カエルを用いて脊髄切断実験を行ない、脊髄が再生されることを報告した。さらに、Clearwaters<sup>3)</sup>は1954年脊損後のニワトリの脊髄内に再生神経を確認した。しかしながら、哺乳類においては、1928年に Cajal<sup>4)</sup>がウサギの脊髄切断実験において、再生神経は一担出現するものの数日後には消失することを報告して以来、中枢神経系の再生はありえないとされてきた。しかし近年、Kao<sup>5)6)</sup>や Richardson<sup>7)</sup>は、顕微鏡下にラットの脊髄を横断した腔内に末梢神経を自家移植することにより、哺乳類においても中枢神経の再生が起こることを示した。この後、損傷を受けた中枢神経系の機能回復を目的とした実験が数多くなされるようになった<sup>8)~14)</sup>。しかし、脊髄損傷後の神経再生を目的とする実験で扱われたこれらの損傷モデルは、移植組織を挿入するための腔隙を作成したもの<sup>5)6)</sup>、移植片挿入操作による微小損傷を利用したもの<sup>14)</sup>、あるいは完全に横断したもの<sup>7)</sup>などである。したがって、損傷の大きさや病理組織学的変化がヒトの脊髄損傷と異なる点より、これらはモデルとしては不十分なものと思われる。さらに、従来の報告では移植後に再生した神経線維がどのような運命をたどるかについては詳細な検索はなされていない。そこで本研究においてはラットを用いてヒトの脊髄損傷モデルを作成し、脊髄の神経再生が

生ずる過程を形態学的に詳細に検索した。

## 材料および方法

25匹の雌ウイスターラット (体重 90~190g; 4~9 週齢) を使用した。

## 1. モデル作成

## 1. 半側脊髄損傷の作成

抱水クロラル (400mg/kg) の腹腔内投与による全身麻酔のもとに、手術顕微鏡下にまず第7~9胸椎の高さで2~3椎体の椎弓を切除し、可及的に外側部まで脊髄を露出した。次に、正中部の血管を避けマイクロ鋸子 (AESCULAP AG社, Tuttlingen, ドイツ) の先端で脊髄の左半側を挟み、パネ秤 (大和製衡, 明石) による計測上500g以上の負荷を加えて、30秒間持続的に圧迫した。

## 2. 移植片の作成

同じ動物の右下肢より総腓骨神経を摘出し、長さ約12mmの移植片を作成した。

## 3. 移植手術

移植片を脊髄損傷部の硬膜上に置いた後、31ゲージ針により損傷部の約5mm上下の硬膜に小切開を加えた後に、脊髄に小刺創を作成し、移植片の両端を小孔より脊髄内に挿入した (図1-A)。次に、上下挿入部近傍の硬膜を10-0ナイロン糸で結紮し、糸の両端を皮下にのばし、移植片挿入部の目印とした。

---

Abbreviations: GFAP, glial fibrillary acidic protein; HRP, horseradish peroxidase; NCAM, neural cell adhesion molecule; NGF, nerve growth factor; PNS, peripheral nervous system; TMB, tetramethylbenzidine

最後に術野と皮下との癒着を防ぐ目的で、背部皮下の脂肪組織を硬膜外腔に起き、筋層と皮膚を縫合した。術後、損傷側の下肢の完全麻痺と移植片摘出による腓骨筋麻痺がみられたが、ラットは歩行可能であった。

## II. 移植片内再生軸索の形態学的観察

移植後、1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 25, 30, 35, 40, 50, 60週目(120~400g; 6~60週齢)に、カコジル酸緩衝液に3%グルタルアルデヒドおよび2%パラホルムアルデヒドを溶解した固定液を用いて、全身麻酔下のラットを経心臓的灌流法により前固定した。同固定液に24時間浸した後、脊髓を移植片とともに摘出し、厚さ約1mmの横断あるいは矢状断切片を作成した。標本は20%蔗糖液に一晩浸した後、カコジル酸緩衝液に2%四酸化オスミウムを加えた固定液で2時間、後固定を行い、エタノール系列で脱水し、エポンとアラールダイトに包埋した。移植片を含む脊髓横断および矢状断

の1 $\mu$ mの組織切片をトルイジンブルー染色で光顕的に観察した後に、部位と方向を確認して超薄切片を作成した。最後に、ウラニウムと酢酸鉛で2重染色し、日立(東京)H-600型または日本電子(東京)100b型電子顕微鏡にて観察した。

## III. 西洋ワサビ過酸化酵素 (horseradish peroxidase, HRP) 法による再生軸索の神経細胞標識

### 1. HRP の注入

移植後30週(初回手術時、生後7週齢)のラットに対し、全身麻酔下に移植手術時の創を再度切開し、目印の10-0ナイロン糸をたどり、脊髓および移植片を露出した。移植片の下に6 $\times$ 10mmのゴム片を敷いた上で、小麦胚芽凝集素結合10%西洋ワサビ過酸化酵素 (wheat germ agglutinin horseradish peroxidase, WGA-HRP) (東洋紡, 敦賀) をゼルフォームにしみ込ませ、移植片中央部の切断端に接触させた。3時間後にフィブリン糊(ティンール)(イムノ AG, Vienna, オーストリア)で

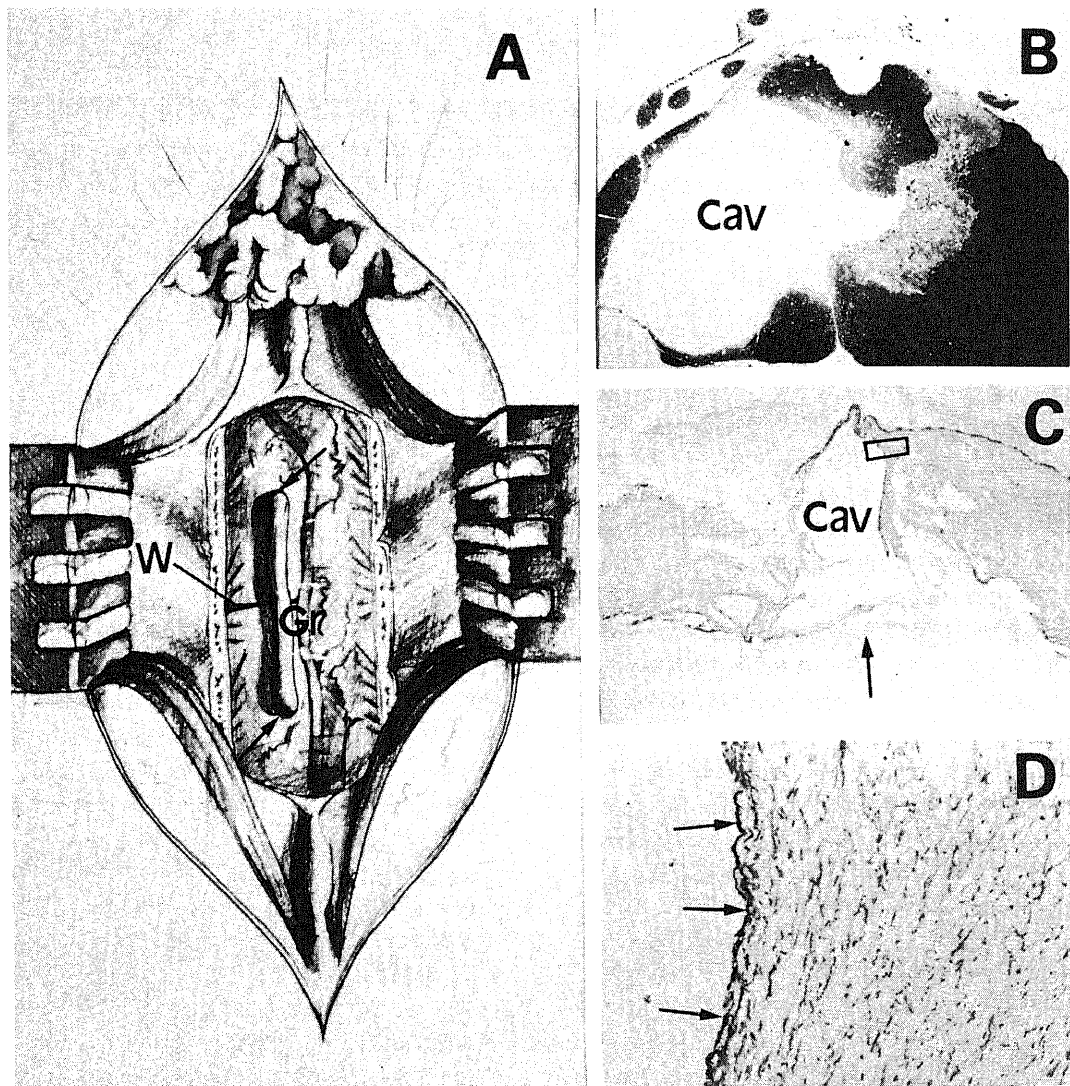


Fig. 1. Injury and transplantation model. (A) Diagram of dorsal view of the spinal cord after transplantation of peroneal nerve autograft (Gr). W, wound made by pinching; ↑, graft-insertion site. (B), (C) and (D) Light micrographs of the spinal cord 50 weeks (B) and 60 weeks (C, D) after transplantation. (B) A cross section of the spinal cord close to the injury site, showing a large cavity (Cav) measuring 1.2mm in the axial diameter. (Toluidine blue stain $\times$ 27). (C) A sagittal section. Arrow indicates injury site. Cav, cavity. (GFAP stain $\times$ 15). (D) High magnification of the rectangle in Fig. 1-C. The cavity wall is abundant in GFAP-positive fibrillary astrocytes (arrows). (GFAP stain $\times$ 300).

HRP を含んだゼルフォームと移植片を被い、フィブリン糊が凝固するのを待って30分後に閉創した。48時間後にパラホルムアルデヒドで灌流固定を行なった。なお、HRP の注入直前に移植片の中央部より長さ 1mm の光顕ならびに電顕標本を摘出し、再生線維の有無を検索した。

2. HRP 標本の作成

HRP 注入48時間後のラットを、全身麻酔下にリン酸緩衝液に2%パラホルムアルデヒドを溶解した前固定液で経心臓的に灌流固定した。固定後、脳、脊髄および後根神経節を摘出し、前固定液に一晚、20%蔗糖液に半日浸した。標本は、長さ5~10mm に細切後、35%ゼラチン水溶液に包埋し、ビブラトーム (堂阪イーエム社、京都) を用いて厚さ 60 μm の矢状断切片を作成した。各標本をスライドガラスに張り付け、Tetramethylbenzidine (TMB) 法<sup>19)</sup>に従いテトラメチルベンチジンを色原体として HRP と30分間反応させた。反応終了後、切片を5%モリブデン酸アンモニウム水溶液に30分間浸し、TMB による反応産物を安定化させた後に、キシレンに封入し光顕にて観察した。

IV. 損傷部および移植片挿入部の光顕的観察

3匹の動物 (移植後18週 2例, 54週 1例) は、2%パラホルムアルデヒドのみで経心臓的灌流固定を行い、摘出した移植片を含む脊髄を、1匹 (18週) は凍結し、他の2匹 (18, 54週) はパラフィンに包埋した。次いで移植片中央部の横断切片および損傷部と移植片挿入部の矢状断切片を作成し、2型星状膠細胞を抗 A2B5 抗体で、glial fibrillary acidic protein (GFAP) を抗 GFAP 抗体を用いてそれぞれ免疫組織化学的に、また再生軸索を鍍銀染色を用いて光顕にて観察した。

V. 対照群の作成

4匹の動物では、8mm の末梢神経移植片を脊髄に挿入せず損傷対側の硬膜上に置き、対照とした。移植後 6, 8, 12, 18 週で4%パラホルムアルデヒドによる経心臓的灌流固定後、移植片中央部の横断切片を作成し、トルイジンブルーおよび鍍銀染色を用いて再生線維の有無を観察した。

成 績

手術顕微鏡による観察では、25匹中17匹で移植片は脊髄に生着していた。

1. 損傷部の観察

損傷後の50週の脊髄損傷部では、灰白質を中心に0.8×1.2×2.0mm の大きさの空洞が形成されていた (図1-B)。損傷後60週では、空洞の周囲に厚さ 20 μm 以下のグリア性癍痕がみられた (図1-C, D)。

II. 移植片の経時的变化

1. 光顕像

移植片を含む脊髄の横断像で、硬膜上に位置し神経周膜により取り囲まれた移植片は、後根線維と容易に識別された (図2-A, B, 図3-A)。移植後1週目の移植片内では、残存した線維の中に変性した軸索と髄鞘が混在していた (図4-A)。移植後2週目には、ほとんど全ての軸索がワーラー変性に陥り、貪食された髄鞘のみが多数みられた (図4-B)。移植後3週目には、移植片の中央部はシュワン細胞で満たされ、正常な有髄神経は完全に消失していたのに対して、挿入部付近では多数の変性線維の間に髄鞘を有する再生線維が少数みられた (図4-C)。移植後6週目には、移植片中央部の全域にわたり有髄

線維が明瞭にみられた (図5-A)。移植後12週には、有髄線維がさらに増加し、かつ太くなっていた (図5-B)。その後、20, 30, 40, 50週目 (図5-C) には、時間の経過とともに有髄線維はその数と直径が増加した。また、移植後20週目と50週目においては、神経周膜の外にも再生線維がみられた。

2. 電顕像

移植後3週目の移植片をみると、ほとんど全ての有髄神経は消失し、髄鞘残渣を貪食した大食細胞が多数みられた (図4-D)。移植片の神経周膜に近い部位には、シュワン細胞に囲まれた数個の有髄神経線維群がみられた。有髄神経は直径が 0.1~1.2 μm で、1000 μm<sup>2</sup> につき0.8個みられた。

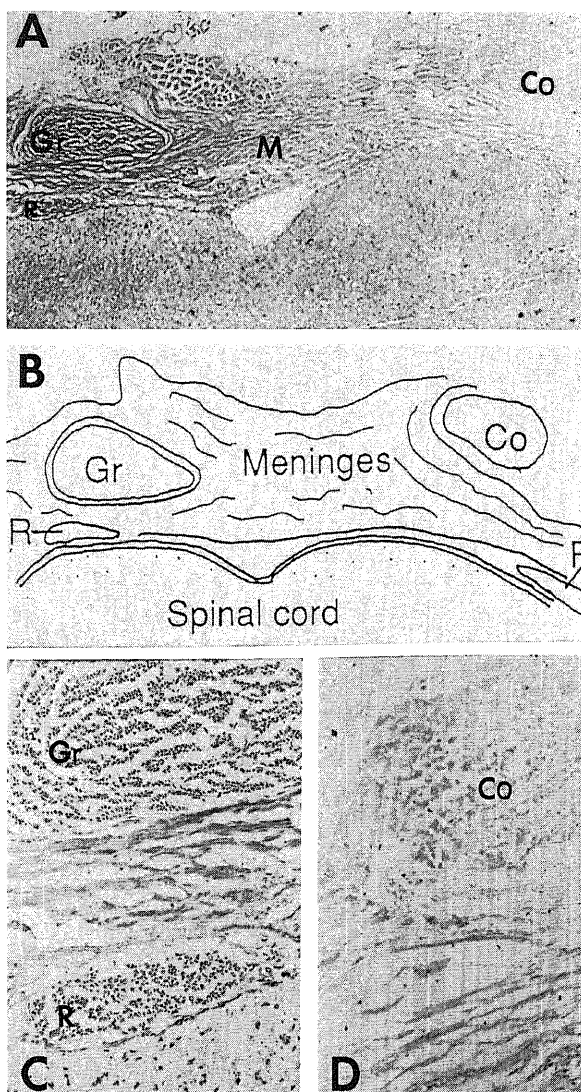


Fig. 2. Light micrographs of a cross section of the spinal cord with the graft and the control tissue. A small fragment of peroneal nerve as a control (Co) was put on the dura, but neither end was inserted into the spinal cord. (A) Eighteen weeks after transplantation. Gr, graft; M, meninges; R, dorsal rootlets. (Silver stain×90). (B) A schematic drawing of Fig. 2-A. (C) High magnification of the graft (Gr) in the Fig. 2-A. Note numerous regenerated axons. R, rootlet. (Silver stain×250). (D) High magnification of the control tissue (Co) in the Fig. 2-A. (Silver stain×250).

わずかにみられた有髄神経の一部には、有髄化の初期にシュワン細胞の先端が陥入することによりできる軸索間膜(mesoaxon)の部分に複数の接合部がみられた(図4-E). 移植後3週目以後の移植片内には明らかな経時的变化が認められた(図5, 表1). すなわち、有髄神経の軸索の最大径は6週で約 $3.5\mu\text{m}$ , 20週以降で $4.5\mu\text{m}$ , 髄鞘の最大幅は6週で $0.4\mu\text{m}$ , 20週以降で $1\mu\text{m}$ であった. また、有髄神経の密度は、 $1000\mu\text{m}^2$ につきそれぞれ、6週では1.2個, 12週では15~33個, 20週では25~54個, 50週では28~86個と次第に増加していた. 無髄神経は直径が $0.1\sim 2\mu\text{m}$ で、6, 12, 20, 50週の密度は $1000\mu\text{m}^2$ につき、それぞれ、26~65個, 25~40個, 28~55個, 30~60個と経時的に増加傾向がみられた.

### Ⅲ. HRP を用いた実験

HRP 陽性の軸索は移植片から脊髄内に放射状に侵入していた(図6-A). 損傷部より上下各6髓節にわたり左右の後根神経節を調べたところ、損傷部を含めそれ以下の4髓節にて脊髄損傷を加えた左側の後根神経節にのみ HRP 陽性細胞がみられた. 連続切片による検索では、HRP 反応は損傷側の脊髄内の神経細胞にのみ陽性で(図6-B, C), 非損傷側の右半側脊髄ではみられなかった. この HRP 陽性神経細胞は、移植片挿入部の上下各7mmの脊髄灰白質内に分布していた(図6-D). Rexedの脊髄灰白質の分類<sup>17)</sup>によると、脊髄内の標識細胞は損傷部より吻側では4, 5, 7, 8層に、損傷部より尾側では4, 5, 7, 8, 10層にみられたが、8, 9層にある大型神経細胞は HRP 陰性であった. HRP 陽性の脊髄内神経細胞と、後

根神経節細胞の比はおおよそ5:1であった.

### Ⅳ. 移植片脊髄境界部の観察

#### 1. 光顕

移植後6週目の移植片脊髄境界部の、移植片内においては、髄鞘の残渣とともに有髄、無髄の再生神経線維がみられた(図7-A, D). 移植片に接する脊髄表面には、最大 $25\mu\text{m}$ の厚さのGFAP陽性の領域がみられた(図7-B). GFAP陽性細胞は、脊髄内のみならず移植片内にもみられた(図7-E). A2B5陽性細胞は移植片の挿入部付近にもみられたが、前側索の白質に比べその発現は少なかった(図7-C, F).

#### 2. 電顕

移植後3週目では、移植片の中央部では再生神経線維はほとんどみられないが、脊髄との境界部では、残存した鋸歯状の基底膜に接して多数のシュワン細胞の突起が伸びており、この内側に無髄神経の伸展がみられた(図8). 基底膜に直接接した無髄神経はみられなかった. 脊髄内では、血管腔の近傍でシュワン細胞により有髄化された再生軸索がみられた(図9-A, B, C). これに接するように星状膠細胞の突起が伸展しており、その表面には一部、基底膜がみられた. 有髄線維のなかにはランヴィエ絞輪が散見された(図10).

#### Ⅴ. 対照群

両断端を脊髄に挿入していない移植片を硬膜上に置いた対照群では、移植後6~18週目に、移植片は消失しているか、または、残存していてもその中には再生軸索は存在しなかった(図2-A, B, C, D).

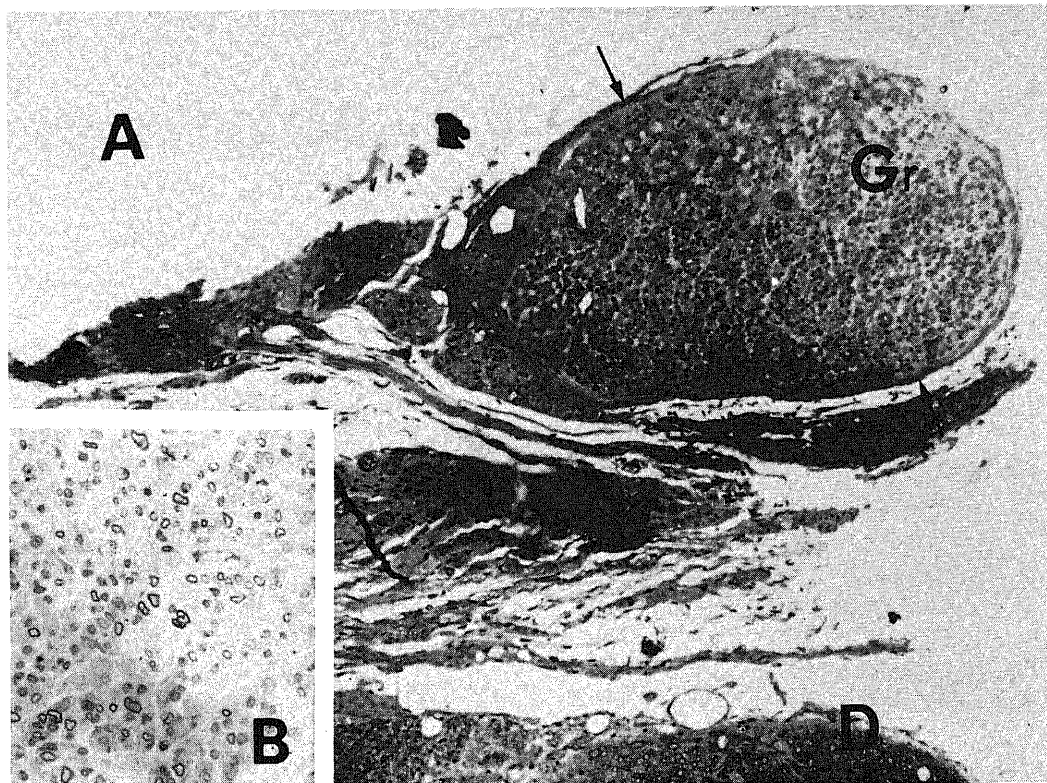


Fig. 3. Light micrograph of a cross section at the midportion of the graft and the spinal cord. (A) Graft (Gr) is surrounded by intact perineurium (arrows). D, left dorsal column. (toluidine blue stain $\times 150$ ). (B) High magnification of the graft in Fig. 3-A. A number of regenerated fibers are seen. Twelve weeks after transplantation. (Toluidine blue stain $\times 480$ ).



考 察

脊髄損傷の実験モデルとしては、これまでいくつかのものが報告されている。たとえば、イヌの露出した脊髄におもりを落下させる Allen<sup>18)</sup> のモデル、ネコの腰髄におもりをのせる Hall<sup>19,20)</sup> の知覚運動障害モデル、脊髄表面に衝撃端子による負荷

を加え圧感知器により実際の負荷を記録する Bresnahan<sup>21)</sup> のモデル、水圧を利用して挫傷を作成する Sullivan<sup>22)</sup> のモデル、ラットの脊髄硬膜外からクリップを用いる Rivlin<sup>23)</sup> の圧迫損傷のモデルなどである。これらのうち Rivlin<sup>23)</sup> のモデルは、再現性の高さと経済性に加え、臨床的に完全横断症状を呈しても形態学的に脊髄が完全に切断されていないというヒトの

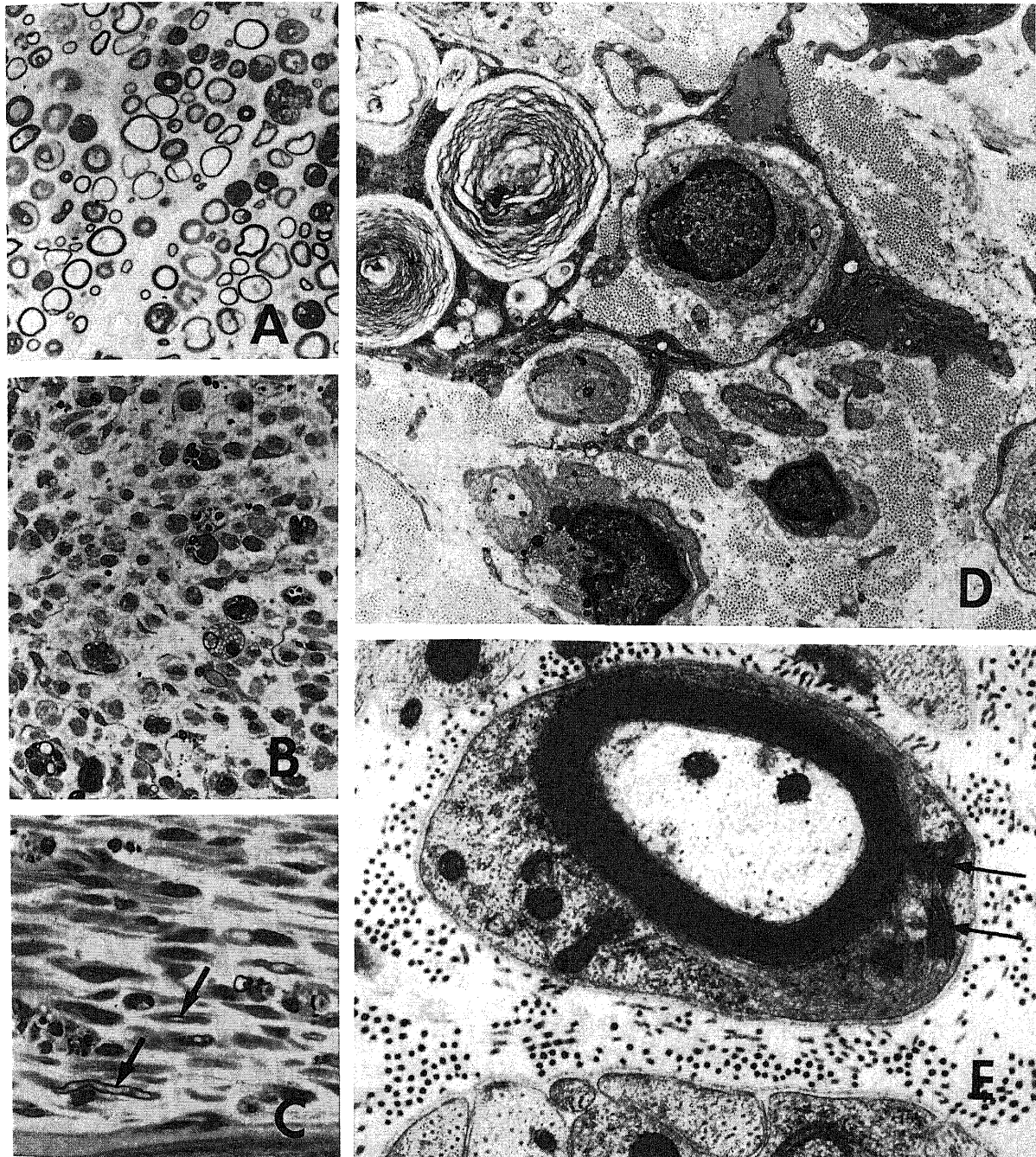


Fig. 4. Degenerating and regenerating fibers between one week and three weeks after transplantation. Light micrographs of a cross section at the midportion of the graft 1 week (A) and 2 weeks (B) after transplantation. (A) Degenerated fibers and myelin debris are seen among intact fibers. (Toluidine blue stain×480). (B) Almost all nerve fibers are degenerated. (Toluidine blue stain×480). (C) Light micrograph of a sagittal section of the graft close to the graft-spinal cord interface. A small number of regenerated nerve fibers (arrows) are seen. Three weeks after transplantation. (Toluidine blue stain×480). (D) Electron micrograph of the midportion of the graft. A small number of regenerating unmyelinated nerve fibers are scattered among myelin debris. Three weeks after transplantation, ×7,500. (E) Electron micrograph of the midportion of the graft. Note aberrant junctions (arrows) in elongated mesoaxon. Three weeks after transplantation, ×30,000.

脊髄損傷<sup>29)</sup>に類似している。このモデルにおいて、損傷後の病理学的変化をみると、灰白質を中心とした出血性壊死や全域におよぶ浮腫状変化、梗塞性変化などがみられ、さらに、30%の例に脊髄空洞症がみられる<sup>29)</sup>。Iizuka ら<sup>29)</sup>によれば先端圧 40g の

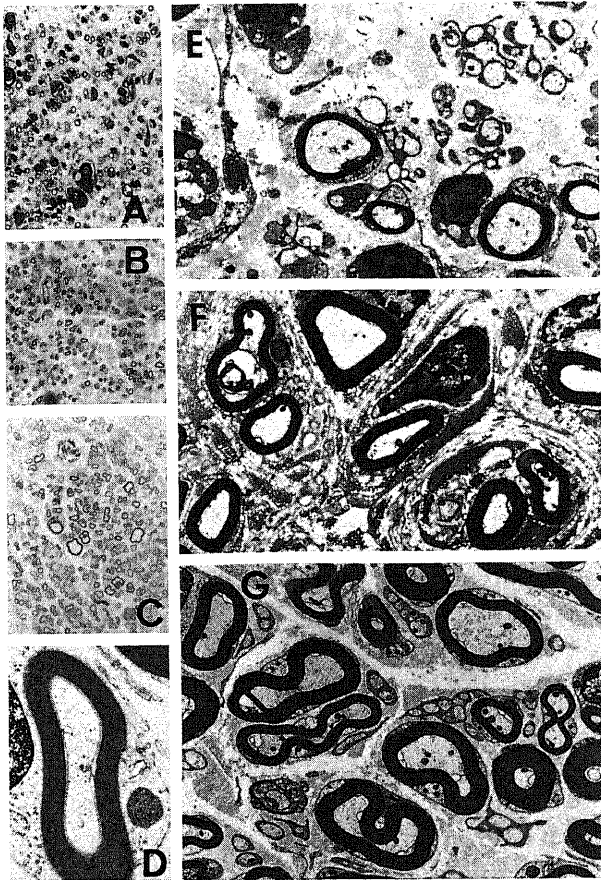


Fig. 5. Regenerating fibers between 6 weeks and 50 weeks. (A),(B) and (C) Light micrographs of the midportion of the graft 6 weeks (A), 12 weeks (B) and 50 weeks (C) after transplantation. Myelinated fibers increased in number and the myelin sheaths became thick during the time course. (Toluidine blue stain  $\times 420$ ). (E),(F) and (G) Electron micrographs of 5-A, B and C, respectively,  $\times 6,000$ . (D) High power view of Fig. 5-G, showing PNS (peripheral nervous system)-type myelination by Schwann cell. The myelin sheath consists of 29 lamellae with a repeated period of 140 Å,  $\times 18,000$ .

血管遮断用クリップを用いてラットの脊髄を30秒間圧迫すると、病理組織学的に脊髄切断と同様の変化をきたす。本実験の損傷負荷は Iizuka らのものより大きく、術後ほぼ全例において損傷側のみ下肢の完全麻痺を生じていた。したがって、本実験で用いた方法により完全横断と同程度の損傷が作成されたと考えられる。しかも、半側のみに損傷を限局したことにより排尿障害の出現の頻度が低いため生存率が高く、長期間の観察には有利であった。移植後1年目の損傷部付近をみると、損傷部を中心に空洞が広がり、その周囲は薄い反応性グリオシスを呈し、ヒト脊髄損傷の慢性期の所見<sup>29)</sup>に類似していた。

移植片に利用した総腓骨神経は、切断後数時間から視神経で既に報告されたものと同様の変性を示した。すなわち、ラット視神経切断後の超微構造の変化を電顕および凍結割断レプリカ法を用いて経時的に観察した Hasegawa らの報告<sup>30)</sup>によれば、視神経の軸索の変化は切断後4時間から始まり3~4日目で著明となり、さらに11日目で正常な神経線維の数は10%以下に減少し、21日目にはほとんどの軸索が変性している。本研究では、使用した移植片が末梢神経組織であり、その変性は中枢神経組織の変性よりやや速い傾向を示した。

移植3週目の移行部においては、蛇行した基底膜に沿ったシュワン細胞の突起に接して小型の無髄線維が伸びていた。Ide ら<sup>29)</sup>は、マウスの末梢神経を数ミリ摘出した後、シュワン細胞を取り除き基底膜のみを残した組織を元に戻すと、10日目には基底膜に沿って再生線維の伸展がみられたと報告している。しかし、本実験では基底膜と再生軸索の間には必ずシュワン細胞が介在しており、これは条件の差異によるものと思われる。すなわち、移植片内にシュワン細胞が存在する条件下では、残存したシュワン細胞が筒状になった移植片の残存基底膜に沿ってまず突起を伸展し、ついでそのシュワン細胞の内側に沿って無髄神経が伸展し、最終的にその一部の軸索がシュワン細胞により有髄化されるものと思われる。有髄線維の数が経時的に増加する事実は、当初は無髄であった軸索が後に有髄化していくことを示唆していた。

哺乳類においては従来、中枢神経は再生しないとされてきたが、これとは対照的に末梢神経が盛んに再生する機序については多数の報告がなされている<sup>30)~31)</sup>。末梢神経と中枢神経の根本的差異は、末梢神経組織内には基底膜とシュワン細胞が存在することである。基底膜は、ラミニンとⅣ型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンを主成分としている。このうちラミニンはシュワン細胞から分泌されるといわれ<sup>30)</sup>、損傷後にはその分泌が亢進する<sup>31)</sup>。シュワン細胞表面の基底膜に発現したラミ

Table 1. Regeneration of myelinated and unmyelinated fibers

	Time after transplantation (weeks)				
	3	6	12	20	50
Myelinated fibers					
number (/1000 $\mu\text{m}^2$ )	0.08	1.2	15-33	25-54	28-86
diameter ( $\mu\text{m}$ )	1.8	3.5	4.2	4.5	4.5
thickness of myelin ( $\mu\text{m}$ )	0.3	0.4	0.8	1	1
Unmyelinated fibers					
number (/1000 $\mu\text{m}^2$ )	0.8	26-65	25-40	28-55	30-60
diameter ( $\mu\text{m}$ )	0.1-1.2	0.3-2	0.3-2	0.3-2	0.1-2

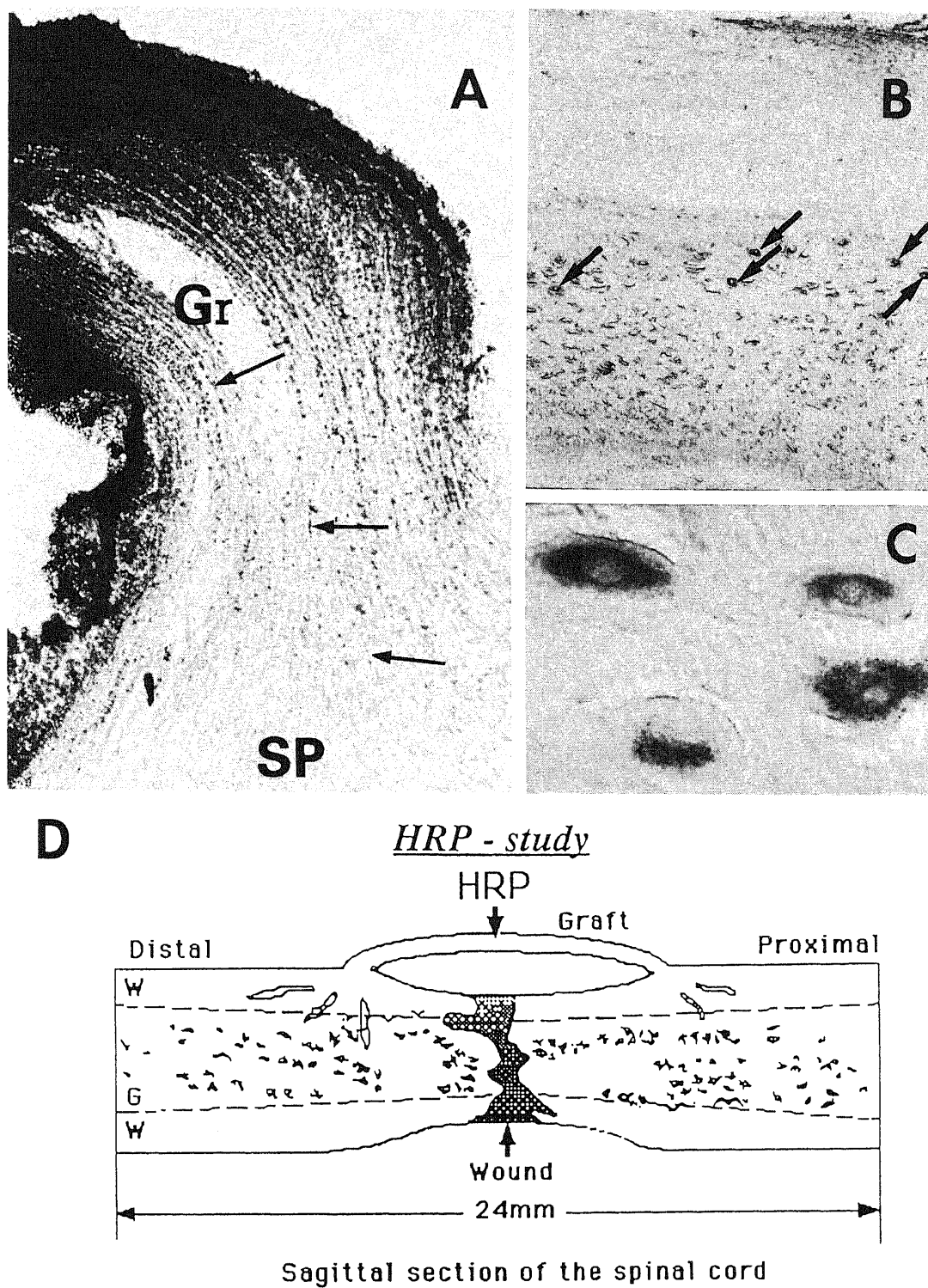


Fig. 6. HRP-study. (A) Light micrograph of a sagittal section at the region of the graft (Gr)-spinal cord (SP) interface. A number of HRP-labeled axons (arrows) are extended from the graft into the spinal cord. Twenty-seven weeks after transplantation,  $\times 120$ . (B) Light micrograph of a sagittal section of the spinal cord, showing HRP-labeled spinal neurons (arrows) in the gray matter,  $\times 64$ . (C) Light micrograph of HRP-labeled spinal neurons in the anterior horn,  $\times 320$ . (D) A schematic drawing showing the distribution of the HRP-labeled neurons. HRP-positive neurons are diffusely scattered in the gray matter as far as 7mm from the each graft-insertion site. W, white matter; G, gray matter.



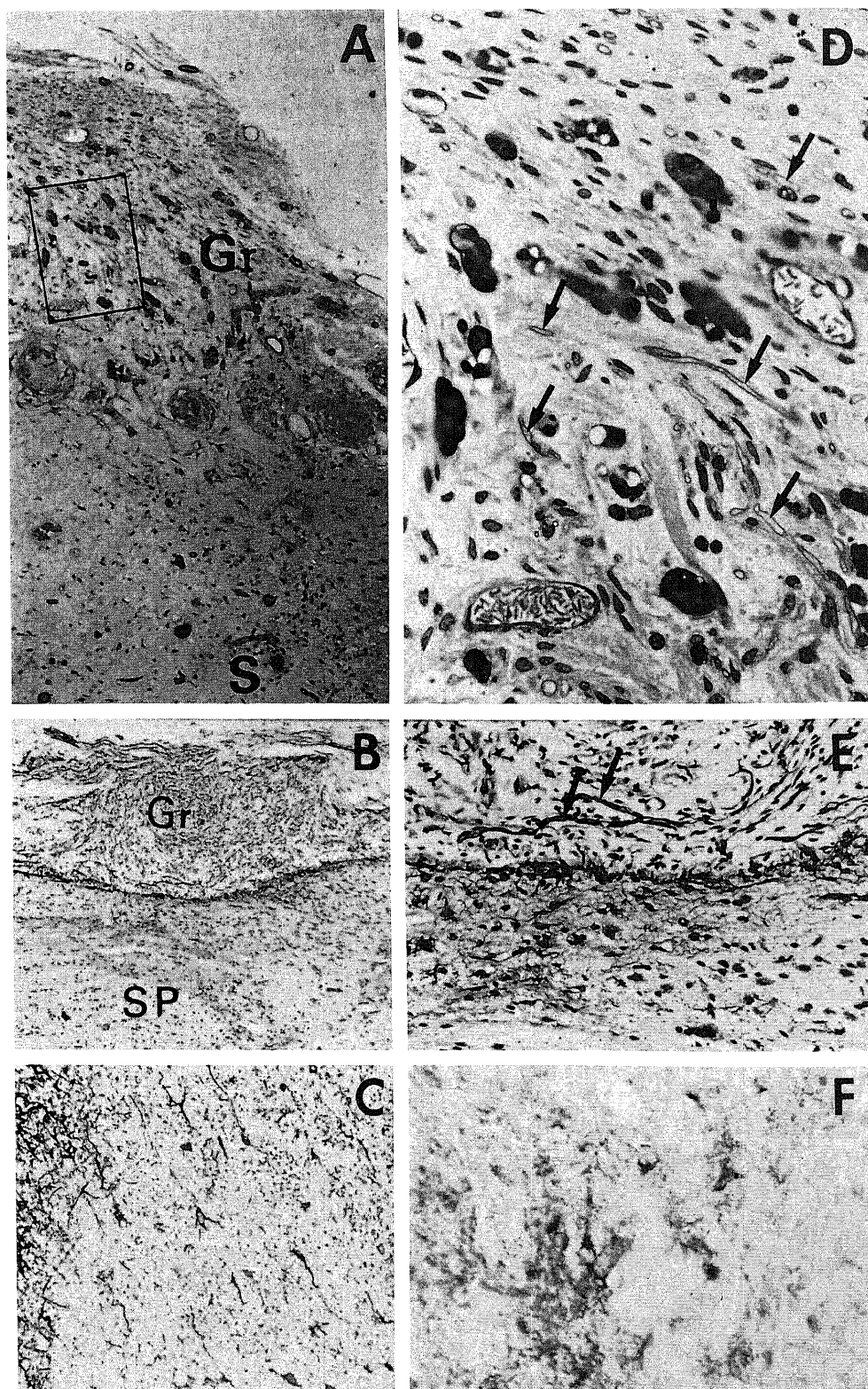


Fig. 7. Observation of the graft-insertion portion. (A) and (D) Light micrographs of a sagittal section at the region of the graft-insertion portion. (A) Six weeks after transplantation. Gr. graft; S, spinal cord. (Toluidine blue stain  $\times 100$ ). (D) High magnification of the rectangle in Fig. 7-A, showing abundant axonal regeneration in the graft. Arrows, myelinated fibers. (Toluidine blue stain  $\times 430$ ). (B) and (E) Light micrographs of the spinal cord (SP), showing GFAP positive zone. (B) Eighteen weeks after transplantation. Gr, graft. (GFAP stain  $\times 160$ ). (E) High magnification of the spinal cord-graft interface in Fig. 7-B. Note several GFAP-positive fibers (arrows) in the graft. (GFAP stain  $\times 320$ ). (C) and (F) Light micrographs of the spinal cord reacted with anti-A2B5 antibody. Fifty-four weeks after transplantation. (C) Antero-lateral column located far from the graft-insertion site. Glial processes are clearly stained with anti-A2B5 antibody,  $\times 320$ . (F) The graft-insertion site. A2B5-positive cells are less conspicuous,  $\times 380$ .

ニンは、再生軸索の先端にある成長円錐表面の受容体であるインテグリンと結合することにより軸索伸展を支持する<sup>39</sup>。また、シュワン細胞はラミニンの存在下で初めて分化を示し髄鞘を形成する<sup>39</sup>。すなわち基底膜は軸索の伸展のみならず、シュワン細胞の髄鞘形成にとって不可欠のものである。一方、シュワン細胞は髄鞘を形成して太い軸索をとり囲むものと、髄鞘を形成しないで細い軸索をとり囲むものに分けられる<sup>39</sup>。後者はその表面に持続的に神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) 受容体<sup>39</sup> や細胞接着分子である neural cell adhesion molecule

(NCAM)<sup>39</sup>を発現している。また、損傷時には、変性軸索を処理するために遊走してきた大食細胞がインターロイキン1を産生し、これがシュワン細胞の NGF 産生を高めるとともに表面にその受容体を発現させる<sup>39</sup>。再生軸索の先端にもこれら NGF, NCAM に対する受容体が発現しており、シュワン細胞から分泌された NGF が成長円錐に作用することにより軸索伸長が促進される<sup>39,40</sup>。したがって、末梢神経組織を中枢神経に移植することにより、中枢神経組織には存在しないラミニンやシュワン細胞などが再生軸索の伸展を促進している可能性がある。

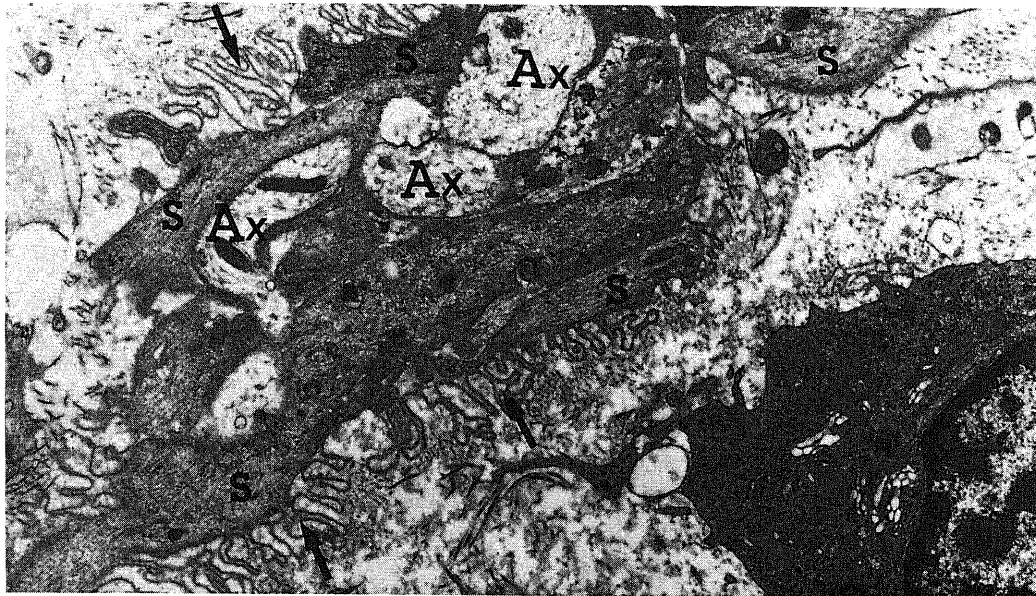


Fig. 8. Electron micrograph of the graft close to the graft-insertion site. Many processes of Schwann cell (s) are attached to the inner surface of basal lamina of the scaffolds (arrows). Regenerating axons (Ax) are engulfed by the processes of Schwann cells. Three weeks after transplantation,  $\times 25,000$ .

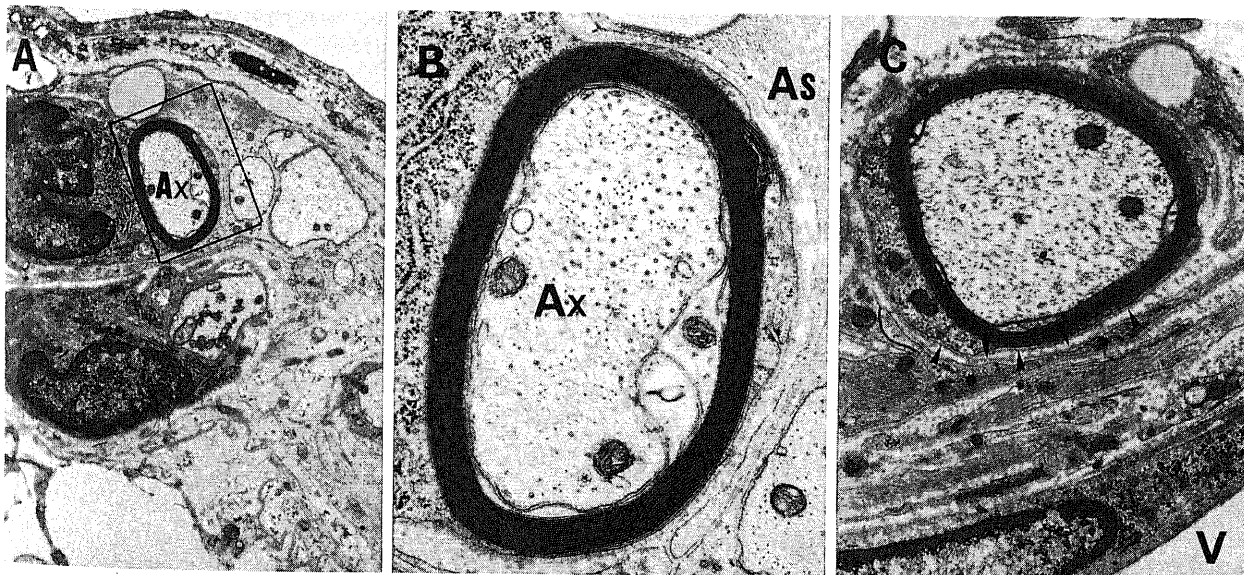


Fig. 9. Observation of the graft-spinal cord interface. (A) Electron micrograph of the spinal cord, showing a regenerated axon (Ax) with PNS-type myelin. Three weeks after transplantation,  $\times 7,000$ . (B) Higher magnification of the rectangle in Fig. 8-A. An astrocytic process (As) is closely apposed to the axon without glial basal lamina,  $\times 30,000$ . (C) Electron micrograph at the region of the graft-spinal cord interface, showing an axon with PNS-type myelin in the vicinity of the perivascular space. Note that the astrocytic process (asterisks) with basal lamina (large arrow heads) is apposed to the Schwann cell basal lamina (small arrow heads). V, vessel. Three weeks after transplantation,  $\times 28,000$ .

Fernandez ら<sup>38)</sup>は成熟ラットの低位胸髄に坐骨神経の断端を挿入した後、1ヶ月目に移植片内に伸展してきた再生軸索の起源を HRP を用いて検索した。その結果、本実験と同様、再生軸索の起源となる神経細胞は移植片近傍の灰白質全体にわたり分布していた。しかし、HRP 陽性細胞の数は後根神経節細胞の方が脊髄の5倍で正反対であった。この理由としては、以下の可能性があげられる。本実験では、移植部位から5mmの非常に近い場所に存在する脊髄損傷が神経再生に影響をおよぼした可能性がある。すなわち、損傷による星状膠細胞のラミニン形成能の亢進<sup>39)</sup>、あるいは遊走炎症細胞により刺激された同細胞による NGF、インターロイキン6産生の亢進<sup>40)41)</sup>などが、中枢神経の再生過程に促進的に作用したかも知れない。中枢神経系の主要構成成分の一つである星状膠細胞は、従来神経再生に対し抑制的に働くと考えられてきた<sup>42)~44)</sup>。たとえば、ラット後根神経節細胞を脳内に移植すると移植片と脳の間で反応性星状膠細胞による境界膜が形成され、これが神経節細胞からの神経再生を阻止する<sup>44)45)</sup>。また、Carlstedt<sup>46)</sup>は、ラットの脊髄後根を神経節の近位側で切断し脊髄内に移植すると、反応性星状膠細胞による境界膜はきわめて薄いにもかかわらず再生軸索はこの膜を越えられなかったと報告した。最近の培養実験では星状膠細胞がむしろ軸索の伸展を促進しており<sup>47)48)</sup>、瘢痕部では他の細胞成分が抑制的に働くと考えられるようになった<sup>49)~52)</sup>。すなわち分化した希突起膠細胞および中枢性髄鞘の膜成分が神経再生に対する抑制因子であることが明かにされつつある<sup>50)52)</sup>。この抑制因子に対する抗体を分泌する腫瘍をラット脳内に移植すると、脳脊髄液系を介してこの抗体が作用し、神経再生を促進するという報告も追加されている<sup>53)</sup>。本研究において、GFAP 陽性細胞

が移植片内にみられたにもかかわらず、脊髄内より軸索が伸びていた事実は、星状膠細胞の瘢痕が少なくとも神経再生の障害にはなっていないことを示す。しかも、一部の星状膠細胞の表面に基底膜の発現がみられ、さらに星状膠細胞が軸索周囲腔に侵入したりミエリンを貪食した像はみられなかったことより、星状膠細胞は神経再生に対して抑制的に作用するのではなく、むしろ促進的に作用している可能性を示すものである。

ラット視神経由来の星状膠細胞を培養して免疫組織化学的に検索すると、その前駆細胞には A2B5 陰性のものと陽性のものが存在し、陽性細胞はやがて2型星状膠細胞へ分化することが最近報告された<sup>54)</sup>。A2B5 の発現していない未熟な星状膠細胞は神経再生に対して促進的な効果を示すのに対し、A2B5 を発現した星状膠細胞は瘢痕形成に作用して抑制的な効果を示すとされる<sup>55)</sup>。本研究においては、移植片の挿入部では A2B5 陽性細胞が他の脊髄内の部位に比べ減少していたため、再生軸索の伸展に関しては有利な環境であったと思われる。

本研究においては、脊髄から移植片内へ再生軸索が伸展することは明らかにし得たが、この再生軸索が生理的機能をもつか否か、また、再び脊髄内に伸展していくか否かについては確認し得なかった。これらの点については、電気生理学的手法や HRP 法をも駆使してさらに長期間にわたる詳細な検討が必要であろう。

## 結 論

脊髄損傷を作成したラットに自家末梢神経を移植すると、脊髄の神経再生がみられた。

1. 移植片は実験2週目までにほぼ完全にワラー変性に陥

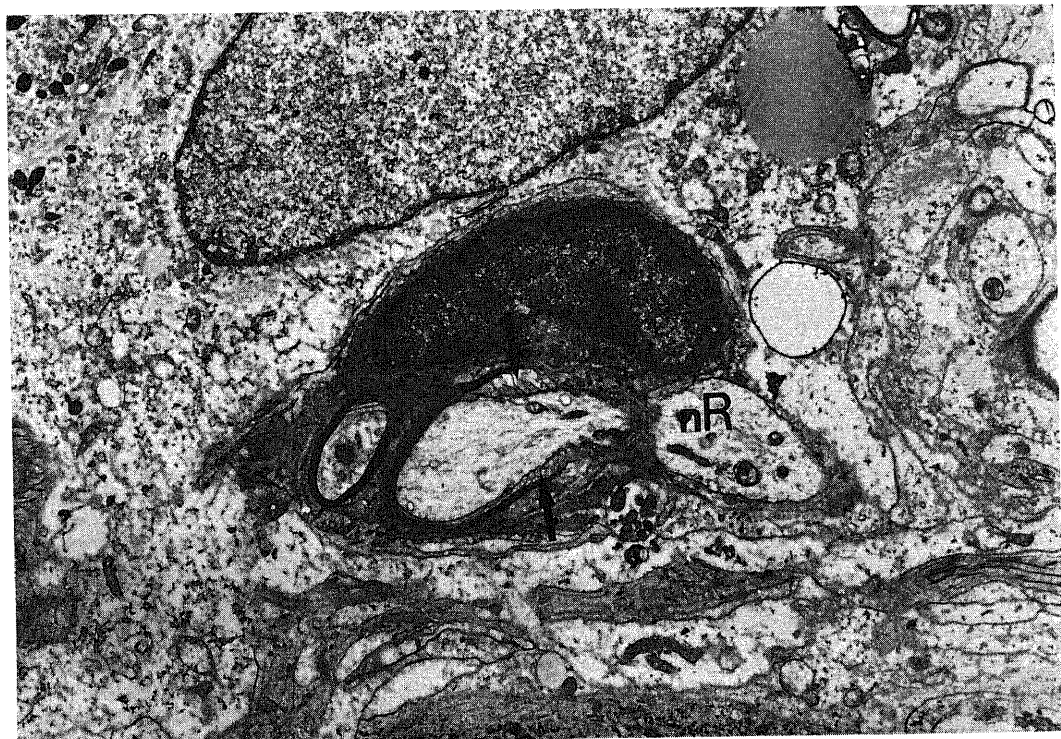


Fig.10. Electron micrograph at the region of the graft-spinal cord interface, showing a node of Ranvier (nR) in a regenerated fiber. Arrows indicate paranode structure. Three weeks after transplantation,  $\times 12,000$ .



り基底膜とシュワン細胞のみが残った。

2. まず残存基底膜に接してシュワン細胞の突起が伸展し、ついでこの突起に包まれるようにして、再生軸索が移植片内に伸展していた。

3. 観察期間を通じて再生神経は数の増加と直径の増大を続けた。これは、移植片内のシュワン細胞や基底膜が長期にわたり神経の再生を促進する効果を維持するためと思われた。

4. 星状膠細胞は神経再生に対し促進的な要素をもつものと推測された。

5. 本モデルは中枢神経再生の機序を検討する上できわめて有用である。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました脳神経外科学教室山下純宏教授に深甚の謝意を捧げます。また直接御指導を賜りました同教室長谷川光広助手に深謝致します。また、HRP法に関して懇切な御指導を賜った解剖学第3講座工藤基教授、ならびに多大なるご協力を戴きました脳神経外科学教室山崎哲盛助教授はじめ諸先生方に深謝致します。本研究の遂行に当たり、御協力を戴きました電子顕微鏡技術員横田輝一氏、山口稔毅氏、ならびに当教室今村明子技官に感謝の意を表します。

尚、本論文の要旨は、The first International Neurotrauma symposium (1991, Fukushima) および第6回神経組織の成長・再生・移植研究会 (1991, 東京) において発表した。

## 文 献

- 1) Kirsche, W.: Die regenerativen Vorgänge am Rückenmark erwachsener Teleostier nach operativer Kontinuitätsrennung. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*, **56**, 190-265 (1950).
- 2) Hooker, D. & Nicholas, J. S.: The effect of injury to the spinal cord of rats in prenatal stages. *Am. J. Physiol.*, **81**, 503 (1927).
- 3) Clearwaters, K. P.: Regeneration of the spinal cord of the chick. *J. Comp. Neurol.*, **101**, 317-330 (1954).
- 4) Cajal, S. R. Y.: Degeneration of interrupted nerves. *In* R. M. May (trans. & ed.), *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. vol. 1, 2nd ed., p66-99, Hafner publishing Co., London & New York, 1968.
- 5) Kao, C. C.: Comparison of healing process in transected spinal cords grafted with autogeneous brain tissue, sciatic nerve, and nodose ganglion. *Exp. neurol.*, **44**, 424-439 (1974).
- 6) Kao, C. C., Chang, L. W. & Bloodworth J. M. B. Jr.: Axonal regeneration across transected mammalian spinal cords. *Exp. neurol.*, **54**, 591-615 (1977).
- 7) Richardson, P. M., McGuinness U. M. & Aguayo A. J.: Axons from CNS neurones regenerate into PNS grafts. *Nature*, **284**, 264-265 (1980).
- 8) Yoshifusa, S.: Transplantation of cultured cerebellar autografts into the spinal cords of chronic paraplegic dogs. *In* C. C. Kao, R. P. Bunge & P. J. Reier (eds), *Spinal Cord Reconstruction*, 1st ed., p359-366, Raven Press, New York, 1983.
- 9) Goldsmith, H. S., Steward, E., Chen, W. F. & Duckett, S.: Application of intact omentum to the normal and traumatized spinal cord. *In* C. C. Kao, R. P. Bunge & P. J. Reier (eds), *Spinal Cord Reconstruction*, 1st ed., p235-244, Raven Press, New York, 1983.
- 10) Gage, F. H., Stenevi, U., Carlstedt, T., Foster, G., Bjorklund, A. & Aguayo, A. J.: Anatomical and functional consequences of grafting mesencephalic neurons into a peripheral nerve "bridge" connected to the denervated striatum. *Exp. Brain Res.*, **60**, 584-589 (1985).
- 11) Blakemore, W. F., Crang, A. J. & Patterson, R. C.: Schwann cell remyelination of CNS axons following injection of cultures of CNS cells into areas of persistent demyelination. *Neurosci. Lett.*, **77**, 20-24 (1987).
- 12) Houle, J. D. & Reire, P. L.: Transplantation of fetal spinal cord tissue into the chronically injured adult rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, **269**, 535-547 (1988).
- 13) Crang, A. J. & Blakemore, W. F.: Remyelination of demyelinated rat axons by transplanted mouse oligodendrocytes. *Glia*, **4**, 305-313 (1991).
- 14) So, K. F. & Aguayo A. J.: Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. *Brain Res.*, **328**, 349-354 (1985).
- 15) Mesulam, M. M.: Tetramethylbenzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J. Histochem. Cytochem.*, **26**, 106-117 (1978).
- 16) 伊藤和夫: HRPの順行性, 逆行性標識. *生体の化学*, **36**, 360-362 (1985).
- 17) Rexed, B.: The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.*, **96**, 415-496 (1952).
- 18) Allen, A. R.: Surgery of experimental lesion of spina column. A preliminary report. *JAMA*, **57**, 878-880 (1911).
- 19) Hall, E. D., McCall, J. M., Chase, R. L., Yonkers, P. A. & Braughler, J. M.: A nonglucocorticoid steroid analog of metyleprednisolone duplicates its high-dose pharmacology in models of central nervous system trauma and neuronal membrane damage. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **242**, 137-142 (1987).
- 20) Hall, E. D.: Spinal cord compression model. The first Internat. Neurotr. Symp. Abst., p91 (1991).
- 21) Bresnahan, J. C.: An electron-microscopic analysis of axonal alterations following blunt contusion of the spinal cord of the Rhesus monkey (*Macaca Mulatta*). *J. Neurosci.*, **37**, 59-82 (1978).
- 22) Sullivan, H. G., Martinez, J., Becker, D. P., Miller, J. D., Griffith, R. & Wist, A. O.: Fluid-percussion model of mechanical brain injury in the cat. *J. Neurosurg.*, **45**, 520-534 (1976).
- 23) Rivlin, A. S. & Tator, C. H.: Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg. Neurol.*, **10**, 39-43 (1978).
- 24) Rivlin, A. S. & Tator, C. H.: Resional spinal cord blood flawa in rats after severe cord trauma. *J. Neurosurg.*, **49**, 844-853 (1978).



- 25) Iizuka, H., Yamamoto, T., Iwasaki, Y., Konno, H. & Kadoya, S.: Experimental spinal cord injury: quantitation of axonal damage by automated image analysis. *J. Neurosurg.*, **64**, 304-308 (1986).
- 26) Hasegawa, M., Taguchi, H., Ikeda, K., Yamashita, T. & Yamashita, J.: Pathology of cervical spinal cord injury: Case report. The first Internat. Neurotr. Symp. Abst., D1 (1991).
- 27) Hasegawa, M., Rosenbluth, J. & Isise, J.: Nodal and paranodal structural changes in mouse and rat optic nerve during Wallerian degeneration. *Brain Res.*, **452**, 345-357 (1988).
- 28) Ide, T., Thoyama, K., Yokota, R., Nitatori, T. & Onodera, S.: Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Res.*, **288**, 61-75 (1983).
- 29) Ide, T.: Nerve regeneration through the basal lamina scaffold of the skeletal muscle. *Neurosci. Res.*, **1**, 379-391 (1984).
- 30) Bunge, M. B., Clark, M. B., Dean, A. C., Eldridge, C. F. & Bunge, R. P.: Schwann cell function depends upon axonal signals and basal lamina components. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **281**-287 (1990).
- 31) 湯浅茂樹, 今城純子, 鶴嶋英夫, 川村光毅: 神経栄養因子の全て: 末梢神経再生の面から. *Clin. Neurosci.*, **9**, 1326-1330 (1991).
- 32) Reichardt, L. F. & Tomaselli, K. J.: Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.*, **14**, 531-570 (1991).
- 33) Mirsky, R. & Jessen, K. R.: Schwann cell development and the regulation of myelination. *Semin. neurosci.*, **12**, 423 (1990).
- 34) Rutishauer, U., Hoffman, S. & Ederman, G. M.: Binding properties of a cell adhesion molecule from neural tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 685-689 (1982).
- 35) Lindholm, D., Heumann, R., Meyer, M. & Thoenen, H.: Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neural cells of rat sciatic nerve. *Nature*, **330**, 658-659 (1987).
- 36) Johnson, Jr. E. M., Taniuchi, M. & DiStefano, P. S.: Expression and possible function of nerve growth factor receptors on Schwann cells. *Trends Neurosci.*, **11**, 299-304 (1988).
- 37) Bunge, R. P. & Hopkins, J. M.: The role of peripheral and central neuroglia in neural regeneration in vertebrates. *Semin. Neurosci.*, **2**, 509-518 (1990).
- 38) Fernandez, E., Pallini, M. D. & Mercani, D.: Effect of topically administered nerve growth factor on axonal regeneration in peripheral nerve autografts implanted in the spinal cord of rats. *Neurosurgery*, **26**, 37-42 (1990).
- 39) Hagg, T., Muir, D., Engvall, E., Varon, S. & Manthorpe, M.: Laminin-like antigen in rat CNS neurons: distribution and changes upon brain injury and nerve growth factor treatment. *Neuron*, **3**, 721-732 (1989).
- 40) 九島洋一, 濱登希子, 畠中 寛: 生後ラット培養中胚ニューロンとインターロイキン-6. 第33回日本神経化学学会大会論文集, 286-287 (1990).
- 41) Carmann-Klzan, M., Vige, X. & Wise, B. C.: Regulation by interleukin-1 of nerve growth factor secretion and nerve growth factor mRNA expression in rat primary astroglial cultures. *J. Neurochem.*, **56**, 636-643 (1991).
- 42) Penfield, W.: The mechanisms of critical contraction in the brain. *Brain*, **50**, 499-517 (1927).
- 43) Liuzzi, F. J. & Lasek, R. J.: Astrocytes block axonal regeneration in mammals by activating the physiological stop pathway. *Science*, **237**, 642-645 (1987).
- 44) Windle, W. F., Clemente, C. D. & Chambers, W. W.: Inhibin of formation of a glial barrier as a means of permitting a peripheral nerve to grow into the brain. *J. Comp. Neurol.*, **96**, 359-369 (1952).
- 45) Clemente, C. D.: The regeneration of peripheral nerves inserted into the cerebral cortex and the healing of cerebral lesions. *J. Comp. Neurol.*, **109**, 123-151 (1958).
- 46) Carlstedt, T.: Regenerating axons from nerve terminals at astrocytes. *Brain Res.*, **347**, 188-191 (1985).
- 47) Banker, G. A.: Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science*, **209**, 809-810 (1980).
- 48) Baehr, M. & Bunge, R. P.: Growth of adult rat retinal ganglion cell neurites on astrocytes. *Glia*, **3**, 293-300 (1990).
- 49) David, S., Bouchard, C., Tsatas, O. & Giftochristos, N.: Macrophages can modify the nonpermissive nature of the adult mammalian central nervous system. *Neuron*, **5**, 463-469 (1990).
- 50) Caroni, P. & Schwab, M. E.: Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J. Cell Biol.*, **106**, 1281-1288 (1988).
- 51) Hatten, M. E., Liem, K. H., Shelanski, M. L. & Mason, C. A.: Astroglia in CNS injury. *Glia*, **4**, 233-243 (1991).
- 52) Caroni, P. & Schwab, M. E.: Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron*, **1**, 85-96 (1988).
- 53) Schnell, L. & Schwab, M. E.: Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin associated neurite growth inhibitors. *Nature*, **343**, 269-272 (1990).
- 54) Raff, M. C.: Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science*, **243**, 1450-1453 (1989).
- 55) Smith, G. M., Miller, R. H. & Silver, J.: Astrocyte transplantation induces callosal regeneration in postnatal callosal mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **495**, 185-205 (1987).

**Transplantation of Autologous Peripheral Nerve Tissue into Injured Spinal Cord in Rats** Hiroki Taguchi,  
Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. Juzen Med Soc., **101**, 305 - 317  
(1992)

**Key words** regeneration, remyelination, Schwann cell, spinal cord injury, transplantation

**Abstract**

The purpose of this study is to investigate axonal regeneration in the damaged spinal cord of rats by grafting autologous peripheral nerve tissue with reference to the morphology of regenerating nerve fibers over a period of time. A peroneal nerve autograft was transplanted to the unilaterally injured spinal cord. Between 1 week to 50 weeks after grafting, the graft and the spinal cord were studied by light and electron microscopic, immunohistochemical, and horseradish peroxidase (HRP) technique. Axons in the grafted tissue were completely degenerated within two weeks. Three weeks after grafting, however, a small number of unmyelinated fibers appeared again at the midportion of the graft. Regenerating fibers showed an increase in number and size over time. The thickness of myelin sheaths also increased, and nodes of Ranvier were observed. HRP-positive cells were seen not only in the dorsal root ganglion (DRG) but also in the spinal cord gray matter. HRP-positive spinal neurons were located as far as 7 mm above and below the site of graft insertion, indicating that these neurons introduced regenerated axons into the graft. Electron microscopic observation of the spinal cord close to the graft-insertion site revealed that regenerated axons with PNS-type myelin were conspicuously present in the vicinity of the perivascular space. The astrocytic processes were sometimes surrounded by basal lamina, and were closely apposed to the regenerated nerve fibers. There was no phagocytotic activity of PNS-type myelin by astrocytes during the period of observation. These data suggest that a peripheral nerve autograft to the injured spinal cord can provide enough milieu for CNS nerve regeneration and remyelination, and that this model can be used for further investigation into the possibility of recovery of the damaged human spinal cord.