

Experimental Studies on the Role of the Schwann Cell in Peripheral Nerve Regeneration

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	http://hdl.handle.net/2297/8067

末梢神経再生におけるシュワン細胞の 役割についての実験的研究

金沢大学医学部整形外科学講座 (主任: 野村 進教授)

橋 本 二 美 男

(昭和63年10月1日受付)

末梢神経自家移植において再生軸索に対するシュワン細胞の役割については種々の議論がある。家兔の坐骨神経を3 cm にわたって切断し、凍結・解凍してシュワン細胞の死滅した凍結神経自家移植群 (凍結移植群)、新鮮神経自家移植群 (新鮮移植群)、2週間前にあらかじめ切断して変性させてシュワン細胞の増加した変性神経自家移植群 (変性移植群) の3群を作成し、シュワン細胞の果たす役割を組織学的、電気生理学的にまた微小血管造影を行って検討した。結果は、凍結移植群でシュワン細胞は2週目には4 mm 移植片内に毛細血管を伴って進入し、4週目には移植片全長に認められ、再生軸索は2週目で2, 3 mm, 3週目で移植片全長の2分の1, 4週目で移植片全長を通過していた。新鮮移植群では2週目で移植片全長の3分の2まで再生軸索が達し、3週目には軸索の先端が末梢縫合部を越えていた。変性移植群では再生軸索は2週目で移植片の2分の1まで達し、3週目には移植片を通過した軸索は末梢へ一部進入してした。微小血管造影では凍結移植群は2週目で毛細血管が移植片内に4 mm 進入し、4週目で移植片全長にわたって血行再開がみられた。新鮮移植群、変性移植群では1週目より血行が再開していた。M波、C-NAP の出現時期は凍結移植群では16週、14週、新鮮移植群では12週、9週、変性移植群では14週、10週であった。以上の所見より、再生軸索はシュワン細胞の存在する移植片では通過が速く、シュワン細胞が死滅した移植片では両端よりシュワン細胞が入り込むまで通過が遅れることが証明され、シュワン細胞の存在が軸索誘導に役立っていることが証明された。

Key Words frozen autograft, peripheral nerve, predegenerated autograft, regeneration, Schwann cell

神経移植には自家、同種、異種移植が考えられる。同種及び異種移植では免疫反応が存在するため新鮮な神経は用いられず、免疫反応を抑制した保存神経を実験的に使用している。その場合保存神経片の細胞成分はすべて死滅しており、神経片は再生軸索を通過させる通路としての役割をもつだけでよいとしているが、その成績は不良である。我々は新鮮自家移植の優索性は免疫反応がないばかりか、軸索誘導組織といわれるシュワン細胞が生存しているためであると考えている¹⁾。

一方、Ideら²⁾は凍結して細胞成分を殺した自家神経

片を移植し、残存する基底膜内に再生軸索が通過することから再生神経線維はその通路としてシュワン細胞そのものではなくその基底膜が必要であると述べ、シュワン細胞の重要性を否定している。このように末梢神経の再生におけるシュワン細胞の役割には現在なお意見の一致をみていない。

そこで著者は自家神経移植におけるシュワン細胞の役割を調べるため動物実験にて細胞成分のない凍結移植片、切断後変性させて細胞成分を増加させた変性移植片およびコントロールとして新鮮移植片の3群を作成し、再生軸索の伸長に関し形態学的ならびに電気生

Abbreviations: C-NAP, compound nerve action potential; H-E, Hematoxylin-eosin; 新鮮移植群, 新鮮神経自家移植群; 凍結移植群, 凍結神経自家移植群; 変性移植群, 変性神経自家移植群。

理的検索を行った。

対象および方法

1. 実験動物および手術方法

2.5-3.0kgの白色成熟家兎180羽を用いて実験を行った。ペントバルビタール・ナトリウム 0.4-0.5 mg/kgの耳介静脈内麻酔下に、左大腿の外側広筋と大腿二頭筋間より侵入し坐骨神経を展開した。坐骨神経の脛骨・腓骨神経の分岐部から中枢までの長さ3 cmを切断して移植片として用い、神経移植は9-0ナイロン糸で脛骨神経、腓骨神経を各々3針、2針にて中枢、末梢とも神経上膜縫合をおこなった。手術操作はすべて無菌的に行い、神経の切断、縫合は顕微鏡下に出来るだけ伴走血管を損傷しないようにした。以下3群に分けて実験を行った。

1. 凍結移植群 (frozen nerve graft)

移植片をIdeの方法²⁾に準じて-90°Cで5分間凍結し、室温で5分間かけて解凍しこれを5回繰り返した。これによって移植片内のシュワン細胞はほぼ死滅するためacellular nerve graftを作成したことになる。これを元の坐骨神経に移植した。

2. 新鮮移植群 (fresh nerve graft)

坐骨神経を移植片部分を含めて5 cmに渡って完全に剝離、挙上した。そして中枢側で切断し直ちにその場で縫合し、末梢でも同様の操作を行った。

3. 変性移植群 (predegenerated nerve graft)

右側の坐骨神経を露出し、脛骨神経と腓骨神経が分かれる部位より中枢約4 cmの所で切断した。2週間後、切断部位より1 cm末梢で長さ3 cmの変性した坐骨神経を移植片として取り出して左側の坐骨神経に移植した。この際左坐骨神経は3 cm切除し、中枢と末梢をそのまま移植片の中枢、末梢と縫合した。移植片内のシュワン細胞は増加し、cellular nerve graftを作成したことになる。

II. 観察方法

1. 組織学的検索方法

坐骨神経を移植、縫合後、1週、2週、3週、4週、6週目に摘出し、コの字形に成型したガラス棒に神経の両端を固定縫着して神経の長さを変えことなく固定液に浸した。

1) 蟻酸鍍銀軸索染色法(野村変法³⁾): 蟻酸アルコール固定・染色後セロイジン包埋し、10-15 μ mの連続縦断切片標本を作製した。再生軸索は茶褐色ないし黒褐色に染色され、その他の組織は淡黄色を呈し明瞭に区別される。

2) Hematoxylin-eosin (H-E) 染色法 :

Millonigの変法緩衝ホルマリンによって固定し、パラフィン包埋し4-6 μ mの縦断切片を作製し染色した。本法は2週目、4週目、6週目について行った。

2. 微小血管造影法

移植後1週、2週、4週目の家兎について行った。約38°Cに加温したヘパリン加生理食塩水(ヘパリン50単位/ml)を約100mm Hgの加圧で腹部大動脈より注入しつつ、腹部大静脈より瀉血操作を行った。流出液が透明化したのちに、約38°Cの2%ゼラチン・20%墨汁加生理食塩水を300-500ml注入した。爪床が黒変する時をもって注入を中止した。この家兎全体を約5-6時間冷却し、坐骨神経を摘出し10%ホルマリン液で固定した。次いでセロイジン包埋の後100 μ mの連続縦断切片を作製し、光学顕微鏡下に観察した。

3. 電気生理学的検索法

3群について各々20羽の家兎を使用した。耳介静脈内麻酔下で、中枢側縫合部より1 cm近位から下腿遠位1/3まで皮切を加え坐骨神経、腓骨神経および前脛骨筋を露出させた。刺激電極はJ字形の双極電極(ユニークメディカル社、東京)を用い、坐骨神経の中枢側縫合部より1 cm近位で電極の先に引っかけるようにして神経幹を直接刺激し、周囲とは完全に絶縁した。導出電極は1針同心型針電極を用い、前脛骨筋の筋腹中央部に数回刺入して誘発筋電図M波を記録した。刺激波形は持続時間0.1msecの矩形波で、繰り返し周波数は1 Hzの最大上刺激を加え、平均加算8回を行った。M波の記録に先立って線維自発電位の有無を確認し、針先が筋肉内に入っていることを確かめた。

続いて中枢側縫合部より末梢5 cmで、腓骨神経が膝窩動脈を越えた所に別のJ字形刺激電極を置き、刺激電極と記録電極間距離を6 cmとして神経活動電位(compound nerve action potential, C-NAP)を記録した。導出電極は誘発筋電図で用いた電極をそのままの位置で使用した。従って測定は順向性であり、持続時間0.1msecの矩形波で5 Hz、閾値の2倍から3倍の電圧で刺激した。平均加算は32回から64回を行った。

観察は6週目より毎週行い、12週目以降は隔週毎に20週目まで行った。各週の測定した家兎の数は9週目までは2羽から4羽、10週目以降は4羽から9羽について行った。なお変性移植群は途中で死亡することが多く、20週目は3羽しか測定できなかった。また同一家兎を用いての観察は2週間以上の間隔をあげ最高6回まで行った。

実験に先立ち、数回に及ぶ坐骨神経、腓骨神経の剝離、挙上によって神経に損傷が加わり測定に影響を与

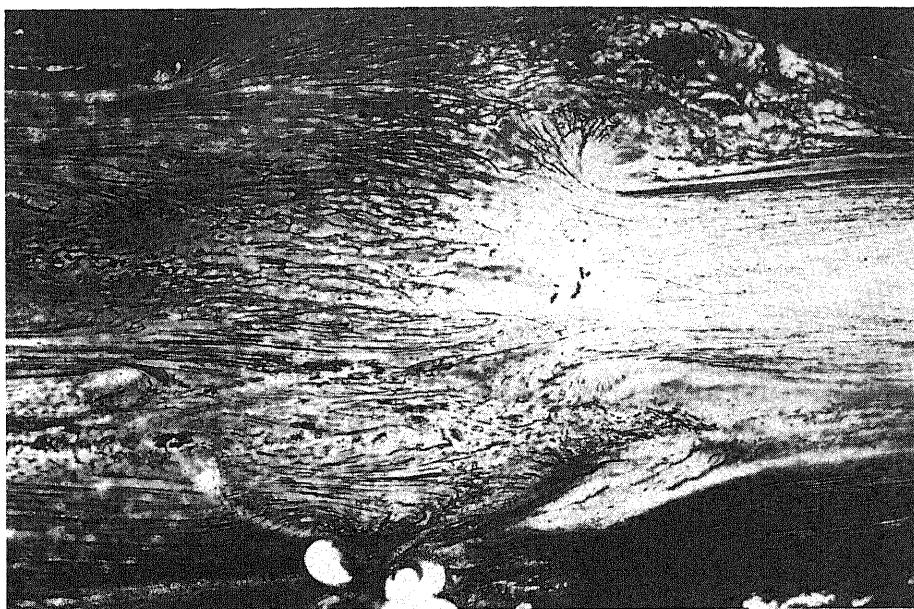


Fig. 1. Longitudinal section of the proximal suture site one week after frozen nerve grafting. On the left side of the suture line, retrograde Wallerian degeneration of the nerve fibers is seen. The left side of the following longitudinal sections is the proximal side of the nerve. Silver-impregnated stain, $\times 40$.

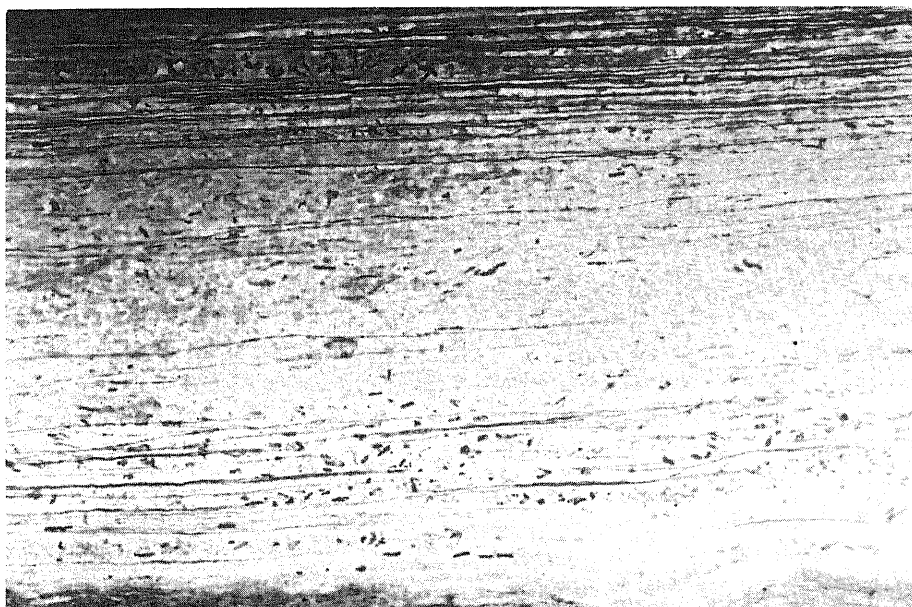


Fig. 2. Midportion of the frozen nerve graft 3 weeks after transplantation. Only a few fibers with small diameters are regenerating through the axon debris of the graft. Silver-impregnated stain, $\times 100$.

えている可能性がありこれを調べる目的で正常な家兎5羽、9神経を使用して最高4回まで2週間おきに誘発筋電図M波、C-NAPを測定した。刺激電極、導出電極は3群の測定と同じ位置に来るように設置した。なお測定中は室温24°Cに保つようにした。

III. 統計学的検定

得られた計測値はすべて $\text{mean} \pm \text{SD} (n)$ で示した。多群間の平均値の比較には分散分析後 Duncan の多重比較法を用いた。 $p < 0.05$ を有意とした。

成 績

I. 組織学的所見

1. 軸索鍍銀染色所見

1) 凍結移植群

移植1週目：中枢断端付近の軸索は逆行性変性を示し、再生軸索は細く分枝して縫合部へ伸長している(図1)。移植片についてみると軸索は細かく分断され、霧状、顆粒状の様な像を呈している。中枢、末梢の縫合部近くではわずかに膨化、分断し、連珠状の変性像を認める。

移植2週目：中枢側縫合部では断端から多数の細い再生線維が分枝し、移植片に進入している。しかし、移植片へは2、3mm までしか進入せず残りの大

部分は1週目と同じく細かい顆粒状の残渣物が吸収されずそのままである。

移植3週目：中枢側縫合部にはさらに多数の再生線維が移植片に進入している。移植片の中枢側では軸索の破壊吸収が進行し、顆粒状の残渣物の中を再生軸索が移植片全長の2分の1まで達している(図2)。また移植片の末梢側縫合部に近づくに変性した軸索の吸収が進んでいる。

移植4週目：中枢断端より進入した再生軸索の数は増加している。移植片全長にわたって再生線維が走行し、少数のものは末梢側縫合部に達している。

移植6週目：再生軸索はさらに密となり移植片を長軸方向に走行し、末梢側縫合部より末梢に進入している。

2) 新鮮移植群

移植1週目：中枢側縫合部では断端より細い再生軸索が分枝している。わずかに再生軸索が縫合部を越えて移植片に進入しているのが観察される(図3)。移植片内は変性軸索が膨化、分断されてその残渣が点状に連なりワーラー変性に陥っている。

移植2週目：移植片に進入する再生軸索の数は増加し、その先端は移植片の3分の2まで達している。移植片内の変性軸索は破壊吸収が進み、その残渣は顆

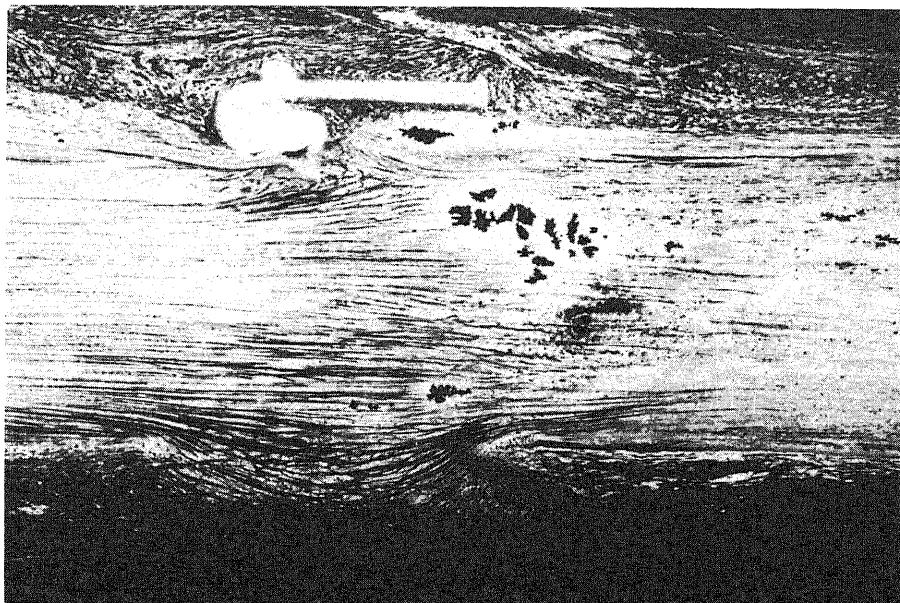


Fig. 3. Longitudinal section of the proximal suture site one week after fresh nerve grafting. Many regenerating axons are outgrowing from the axons stumps, and some axons are growing into the graft. Silver-impregnated stain, $\times 40$.

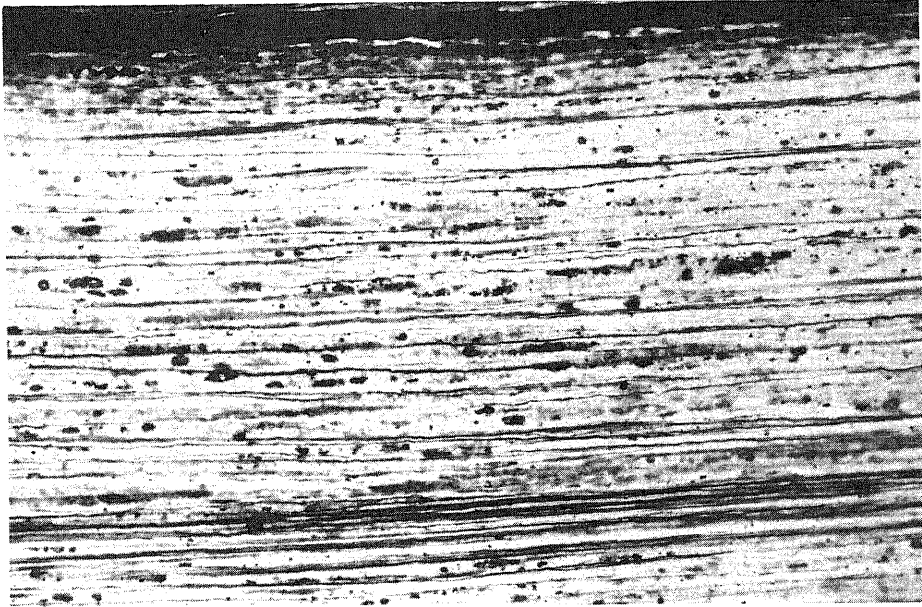


Fig. 4. Midportion of the fresh nerve graft 2 weeks after surgery. The fibers with small diameters are regenerating through the axon debris of the graft. Silver-impregnated stain, $\times 100$.



Fig. 5. Midportion of the predegenerated nerve graft one week after transplantation. A slight amount of axon debris is scattered. Silver-impregnated stain, $\times 100$.

粒状、連珠状と多彩で、中枢側では再生軸索と混在している(図4)。

移植3週目：中枢断端より移植片に進入する再生線維はさらに増加し、長軸方向に走行して末梢側縫合部を越えるものもみられる。しかしその数は少なく、細径の軸索である。移植片内の顆粒状に変性した軸索は吸収が進んでいる。

移植4週目、6週目：再生軸索はさらに増加し、密に束形成をしながら移植片に進入しているのが観察される。移植片内の変性軸索は再生軸索の周囲にわずかに顆粒状の残渣として認められるのみである。末梢側縫合部およびその末梢でも再生線維が増加している。

3) 変性移植群

移植1週目：中枢断端から再生した軸索は中枢側縫合部を越えて一部は移植片に進入している。移植片内は変性した髄鞘や軸索がすでにかなり吸収され、顆粒状の残渣は少なくなっている(図5)。

移植2週目：中枢側より進入する再生線維の数は増加し、再生線維の先端は移植片の2分の1まで達している。

移植3週目：再生軸索はさらに増加し、密に束形成をなして移植片に進入している。すでに末梢側縫合部に達する線維もあるが細径で数も少ない。

移植4週目、6週目：経時的に再生軸索は増加し、末梢側縫合部は多数の線維が通過している(図6)。移植片の変性軸索は再生軸索の周囲にわずかに顆粒状の残渣として観察される。

以上の軸索鍍銀染色の所見は図7、8、9に模式的に示す。

2. H-E 所見

1) 凍結移植群

移植後2週目、中枢側縫合部は断端より増生した細胞群により架橋され連続している。さらに長軸方向に配列したシュワン細胞索が移植片に4mm 進入し、大小の空胞が認められる。またシュワン細胞索の進入部位には毛細血管も認められる。さらに末梢になると移植片内にはほとんど細胞や毛細血管は認められず、endoneurial tube の残渣物は吸収されないまま無構造となっている。末梢側縫合部においても同様の所見である(図10)。移植後4週目、移植片内には全長にわたってシュワン細胞索が密に形成されている。多数の毛細血管が移植片内外に進入、増生し、血管の中に赤血球を含んでいるのが認められる。移植後6週目になるとシュワン細胞索がさらに密に形成され、血管の増生はさらに著しい。

2) 新鮮移植群

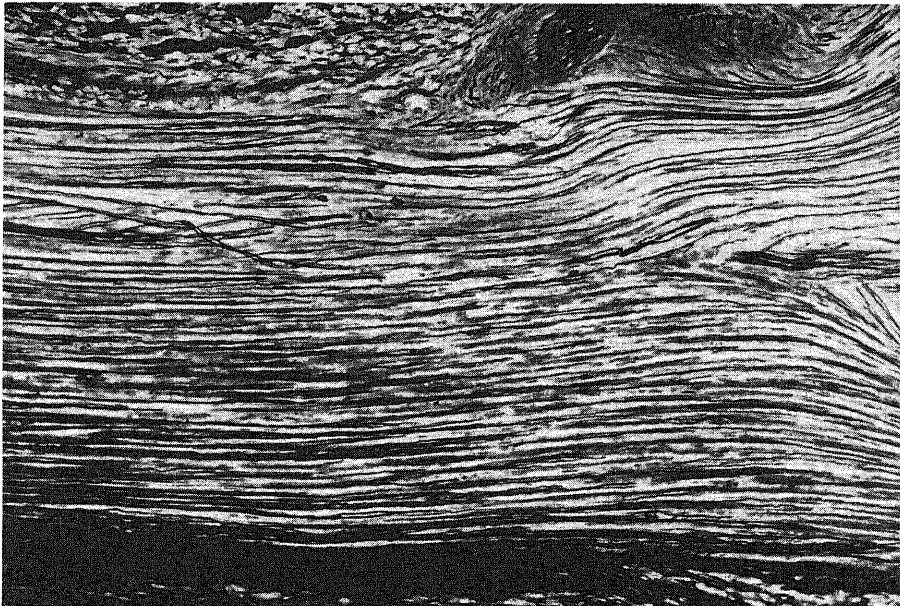


Fig. 6. Longitudinal section of the distal suture site 4 weeks after predegenerated nerve grafting. Many regenerating axons pass through the distal suture site. Silver-impregnated stain, $\times 100$.

移植後2週目、中枢側では逆行性ワーラー変性に陥った部位は空胞状変化が見られる。中枢側縫合部ではシュワン細胞索が移植片に向かって増加している(図11)。移植片は全長にわたって既にシュワン細胞索が認められ、空胞状変化を伴っている。拡張した毛細血管の増生も移植片内外に認められる。末梢側でも同様にシュワン細胞の増加と空胞状変化が著しい。移植後4週目になると移植片内はシュワン細胞索が密に形成され、また移植片周囲の血管増生が盛んである。

3) 変性移植群

移植後2週目、中枢側断端より増生した細胞群は移植片内のシュワン細胞索と連絡し、全長にわたってシュワン細胞索を形成している。空胞状変化も著しく、新鮮移植群と同程度の所見である。また拡張した毛細血管が移植片の内外に認められる。4週目、6週目になると空胞状変化は楕円形、紡錘形の核を有する細胞群の増加とともに減少している(図12)。

II. 微小血管造影所見

1. 凍結移植群

移植後1週目：移植片の中枢・末梢両縫合部の周囲には微細血管が軽度再生しているが、移植片周囲の大部分にはまだ血管は再生していない。神経束内血管は縫合部付近でやや不規則な走行となり、移植片に向かって伸びている。しかし、移植片への進入はわずかで縫合部付近にとどまっている(図13)。

移植後2週目：移植部より中枢側では神経幹内外の血管は1週目よりさらに数を増し、怒張、蛇行しながら縫合部に進入している。この部分の神経束内血管は樹枝状に徐々に数を増し、縫合部から移植片に3~4mm 進入している。移植片中央部周囲では血管の増生が全く見られず、血液の供給がないことを示している。末梢側縫合部に近づくると再び移植片内に神経束内血管が進入している。

移植後4週目：両縫合部の中枢、末梢側では神経幹内外の血管は2週目よりさらに増加している。移植片の両縫合部近くで神経束内血管は一部直線的に走行

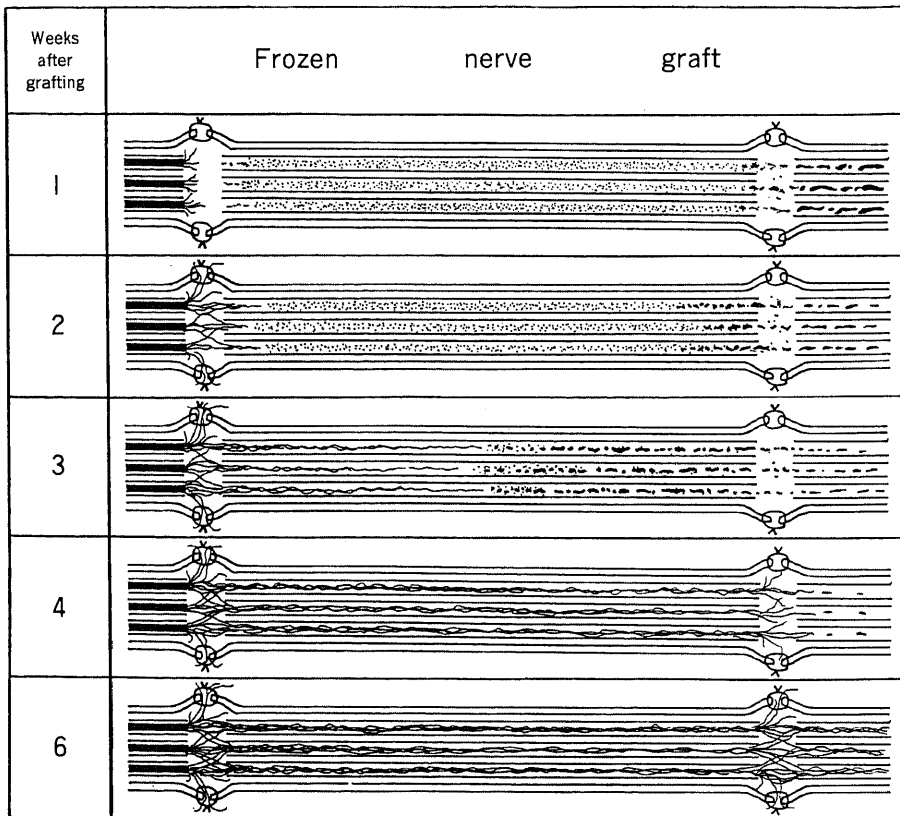


Fig. 7. Diagrammatic representation of frozen nerve graft. The axons regenerate through a half length of the graft 3 weeks after grafting and through the distal suture site 4 weeks after grafting.

しているものも認められる。また神経束周囲血管は神経束内血管と互いに吻合して移植片中央部へと向かい、移植片部は全長にわたって血管が再生している(図14)。

2. 新鮮移植群

移植後1週目：両縫合部の中枢、末梢側では血管が屈曲、蛇行して縫合部に向かっている。縫合部は樹枝状に分枝した神経束内血管が蛇行、屈曲しながら移植片に進入している。そして数はまだ少ないがすでに移植片全長にわたって走行している。多くは直線的に比較的規則正しく配列している(図15)。

移植後2週目：移植片の神経束周囲血管の増生は特に豊富で不規則な走行を呈し錯綜している。神経束内血管も数を増し直線的に走行している。

移植後4週目：縫合部周囲およびその中枢、末梢では血管は増生し口径も増している。移植片の神経束周囲血管の増生は豊富で移植片内への分枝、吻合も見られる。また神経束内血管の走行は直線的で数も2週

目より増加している。

3. 変性移植群

移植後1週目：新鮮移植群と同様に両縫合部およびその周囲の血管増生は盛んである。また移植片全長にわたり血行の再開がみられる。縫合部付近の神経束内血管は中枢、末梢よりの直線的な走行が次第に乱れ、分枝、蛇行も強くなる。縫合部をすぎて移植片中央部になるにしたがって長軸方向に走行し、口径の太さも減少してくる。

移植後2週目：両縫合部、移植片の周囲の血管は怒張して口径を増し、さらに増生している。神経束内血管は縫合部付近で樹枝状に分枝するが、移植片の大部分で直線的に走行している。またその数も1週目より増えているが移植片中央部へ行くにしたがって細くなっている(図16)。

移植後4週目：移植片周囲の樹枝状に分枝した血管や太い神経束周囲血管に対し、移植片内の神経束内血管は規則正しく直線的に走行している。

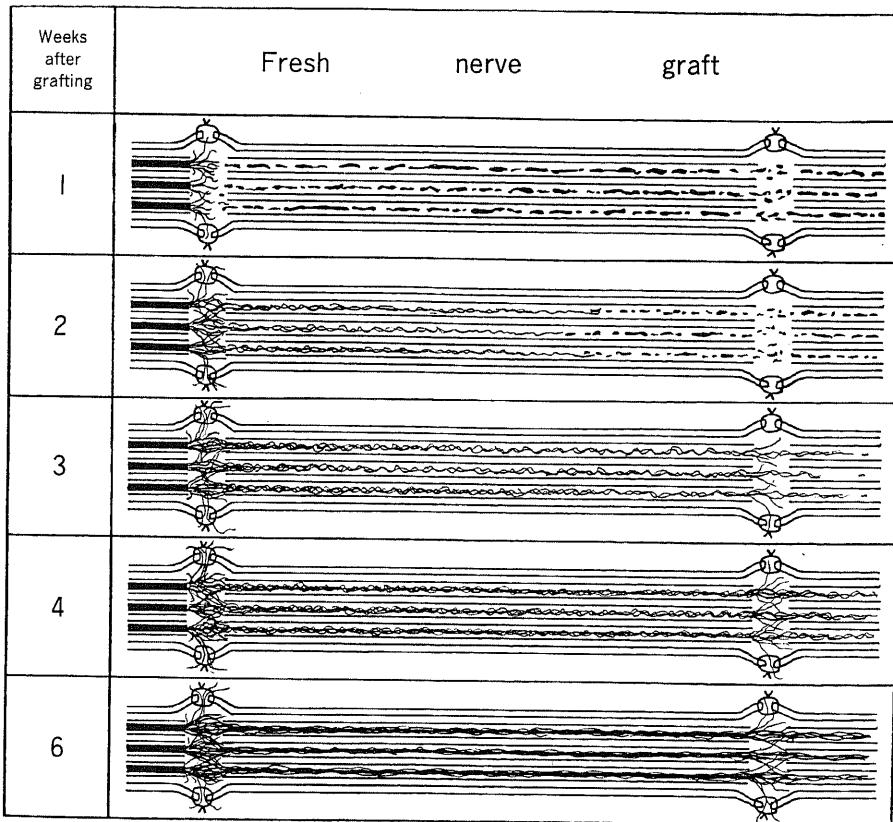


Fig. 8. Diagrammatic representation of fresh nerve graft. The regenerating axons pass through the distal suture site 3 weeks after grafting.

III. 電気生理学的所見

正常家兎5羽9神経を用いて誘発筋電図M波およびC-NAPを測定した。M波の振幅は初回は 11.22 ± 2.17 mV, 2回目以降は 13.78 ± 2.44 mV, 12.00 ± 5.39 mV, 12.89 ± 6.57 mV (mean \pm S. D.)であった。初回と2回目では有意に振幅の増大を認めたが ($p < 0.05$), 3, 4回目は差がなかった。潜時は初回 2.13 ± 0.31 msec, 2回目以降は 2.99 ± 0.46 msec, 3.00 ± 0.39 msec, 3.48 ± 0.52 msec (mean \pm S. D.)で初回とくらべ4回目まですべて有意に遅延していた ($p < 0.05$)。従ってM波の潜時は多数回の検査で測定値に有意の変化があるため評価するのは不適当と判断した。振幅については2回目に有意差がみられたが測定操作によって減少しないことが確認されたため出現時期とともに評価の対象とした。

C-NAPの振幅は初回 1.09 ± 0.44 mV, 2回目以降は 0.61 ± 0.23 mV, 0.55 ± 0.24 mV, 0.76 ± 0.50 mV (mean \pm S. D.)で2, 3回目は有意に減少していた

($p < 0.05$)。潜時は初回 0.56 ± 0.11 msec, 2回目以降は 0.64 ± 0.12 msec, 0.55 ± 0.08 msec, 0.51 ± 0.08 msecですべて初回と有意差はなかった。以上よりC-NAPは潜時が多数回検査でも測定値に変化がなくこれを評価の対象とした。

1. 誘発筋電図M波について

M波の波形は測定期間中すべて多相性を示し、正常家兎の2, 3相の波形とは異なっていた。M波の判定に当たっては振幅が 300μ V以上で多相性の波形をM波陽性とした。測定した家兎の全例にM波が出現した週を出現時期とした。凍結移植群では16週目で7例全例にM波を認めこれを出現時期とした。新鮮移植群では12週目, 変性移植群では14週目であった。またM波の出現が最も早いのは凍結移植群では14週目(5羽中1羽), 新鮮移植群(4羽中2羽), 変性移植群(4羽中2羽)では11週目であった(図17)。従って凍結移植群は新鮮移植群よりおよそ4週M波の出現が遅く, 変性移植群ではほぼ同じか2週程度遅れていた。

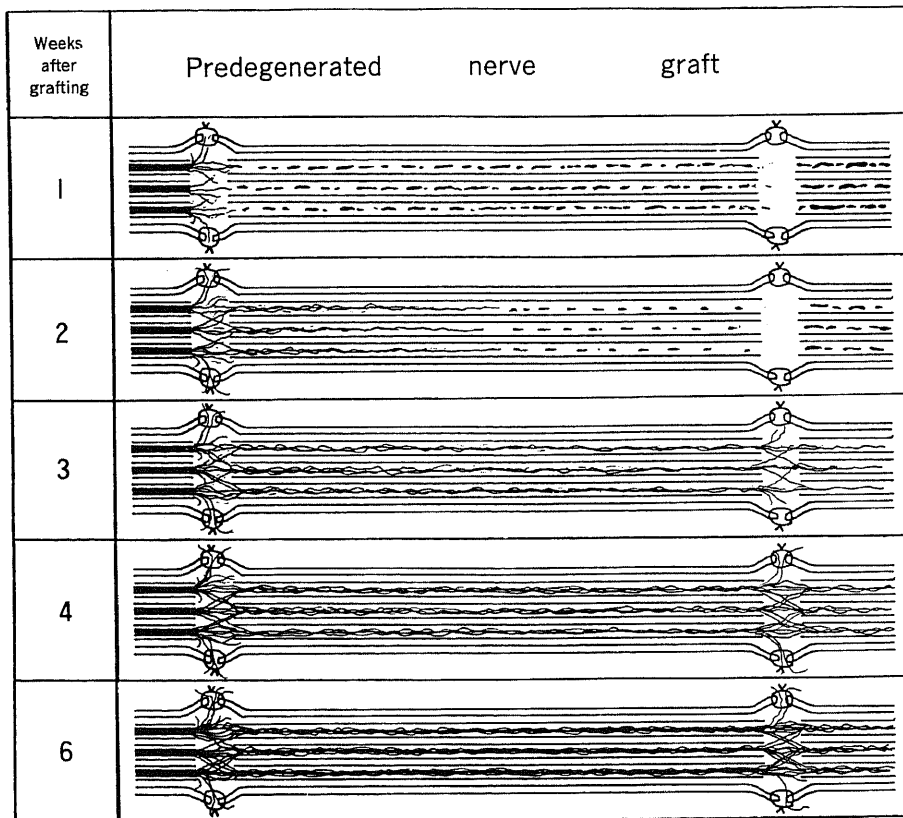


Fig. 9. Diagrammatic representation of predegenerated nerve graft. The regenerating axons pass through the distal suture site 3 weeks after grafting as well as fresh nerve graft.

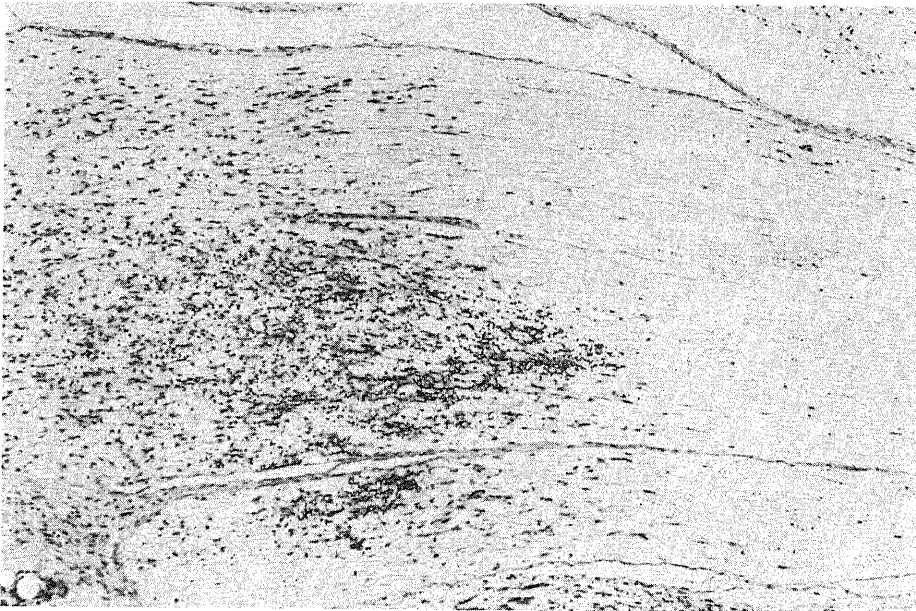


Fig.10. Proximal portion of the frozen nerve graft 2 weeks after surgery. Passage of Schwann cells and other cells is seen at about 4 mm distal from the proximal suture site. Hematoxylin-eosin stain, $\times 40$.



Fig.11. Proximal suture site of the fresh nerve graft 2 weeks after surgery. There are large number of cells in the proximal stump and graft. Hematoxylin-eosin stain, $\times 40$.

振幅についてみると新鮮移植群では12週で平均1.21mV, 14週で1.83mV, 16週で2.10mV, 18週で4.97mV, 20週では6.04mVで順調に増大していた。変性移植群では12週で平均0.53mV, 14週で1.80mV, 16週で3.00mV, 18週で5.53mV, 20週では5.23mVであった。凍結移植群では16週で平均1.28mV, 18週で1.18mV, 20週では2.06mVであった。凍結移植群は新鮮移植群に比べ18, 20週において有意に振幅が低値であった ($p < 0.05$)。変性移植群は新鮮

移植群と比べて有意の差はみられなかった。

2. C-NAP について

家兎の腓骨神経を刺激し、坐骨神経から得られた誘発電位から潜時、伝導速度および出現時期を測定、評価した。潜時は波形の多分裂傾向が強く一つ一つの波形が判然としないものが多いため、最初の陽性電位の頂点、または活動電位の立ち上がりまでを計測した。伝導距離は電極間の距離(6 cm)とし、伝導速度は潜時と伝導距離より算出した。伝導速度については新鮮

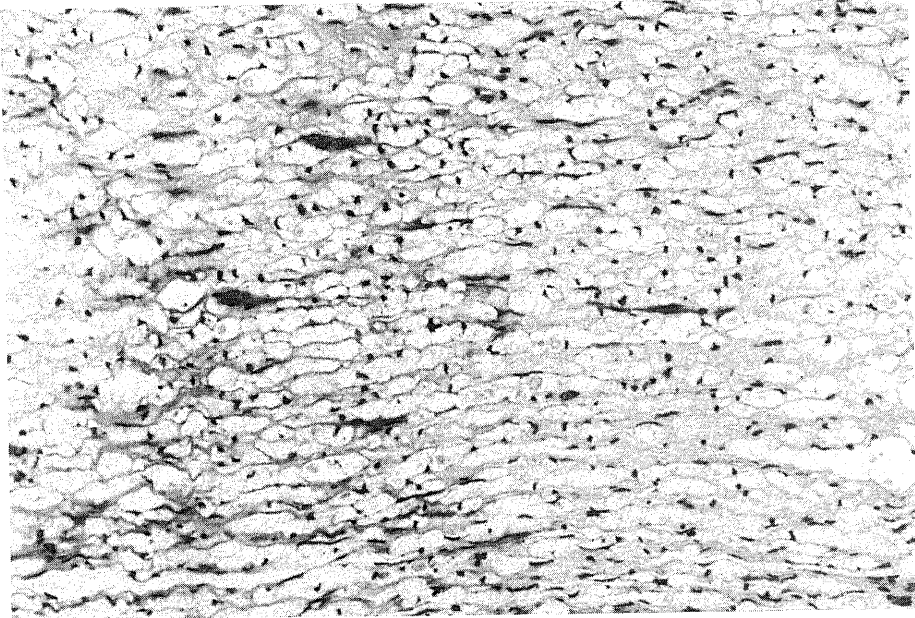


Fig.12. Midportion of the predegenerated nerve graft 2 weeks after surgery. There is change of vacuolation in the endoneurial tubes. Hematoxylin-eosin stain, $\times 100$.

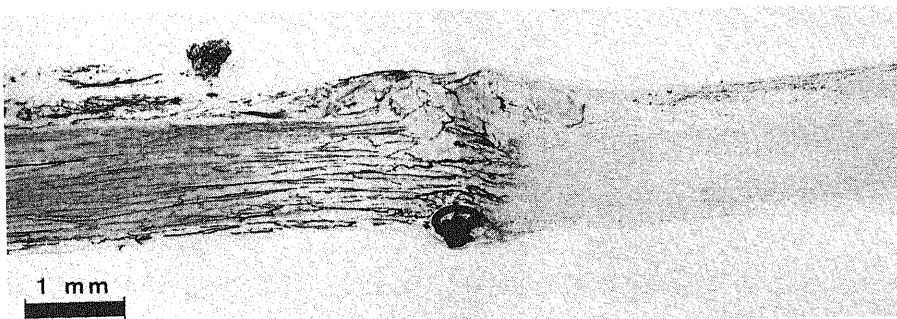


Fig.13. Microangiogram one week after frozen nerve grafting. Intrinsic vessels from the proximal segment are visible passing through the suture site, but revascularization is not seen in the graft.

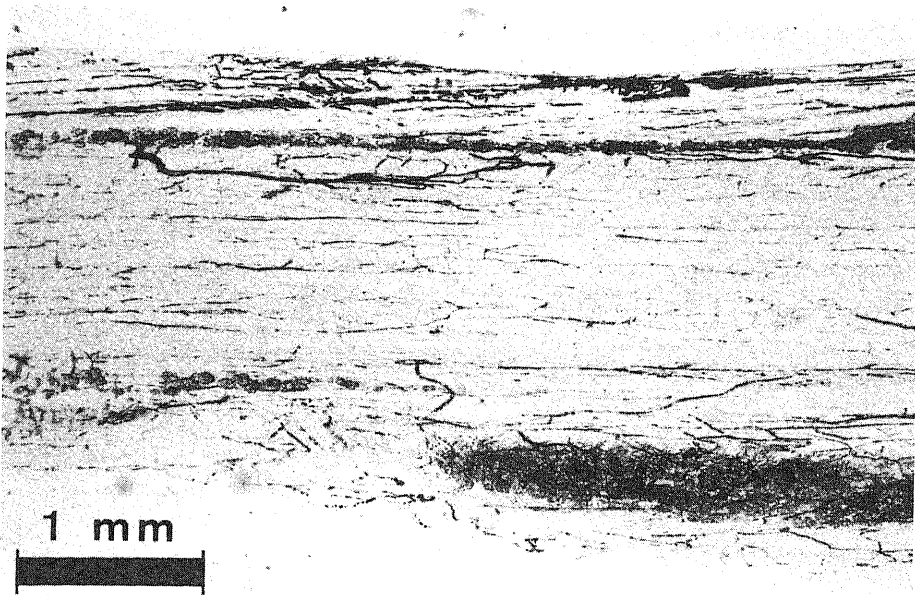


Fig.14. Microangiogram 4 weeks after frozen nerve grafting. Revascularization is seen at the midportion of the graft.

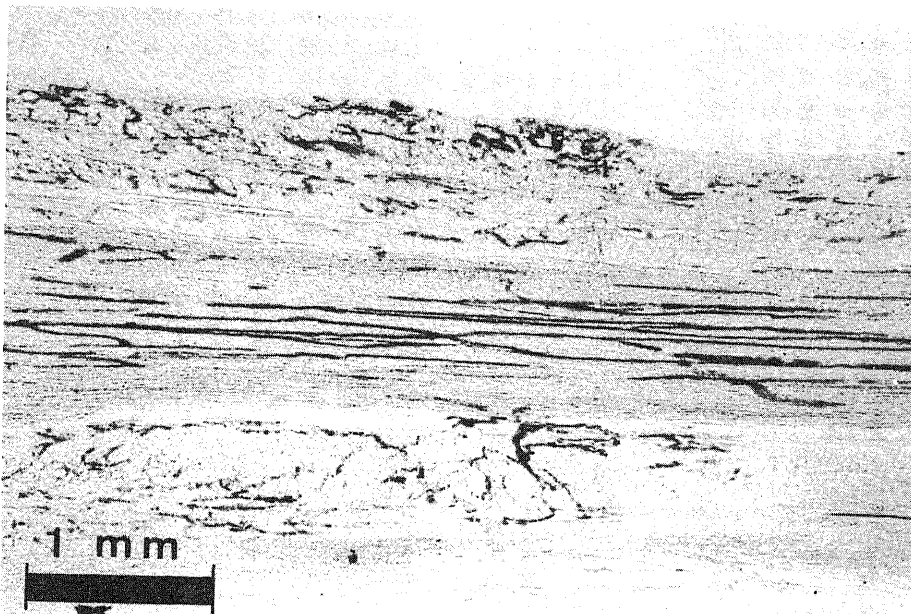


Fig.15. Microangiogram one week after fresh nerve grafting. Adequate revascularization is seen at the midportion of the graft.

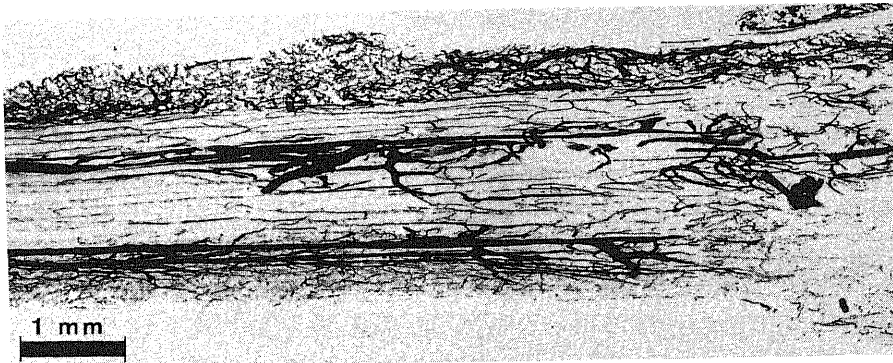


Fig.16. Microangiogram 2 weeks after predegenerated nerve grafting. The large and small vessels are patent in the graft and distal suture site.

Table 1. Properties of compound nerve action potential after implantation of 3 kinds of nerve grafts

	Weeks after grafting	Amplitude (μV)	Latency (msec)	Conduction velocity (m/sec)
Fresh nerve graft	9	7.75 \pm 3.36	2.10 \pm 0.43	29.02 \pm 4.80 (n = 4)
	10	8.66 \pm 3.30	2.03 \pm 0.23	29.77 \pm 2.93 (n = 3)
	11	20.00 \pm 7.35	1.63 \pm 0.10	37.03 \pm 0.94 (n = 4)
	12	12.67 \pm 4.27	1.58 \pm 0.26	38.70 \pm 4.20 (n = 6)
	14	24.86 \pm 9.85	1.41 \pm 0.23	43.57 \pm 6.24 (n = 7)
	16	25.75 \pm 8.03	1.18 \pm 0.11	51.31 \pm 4.41 (n = 8)
	18	34.00 \pm 9.93	1.25 \pm 0.16	48.91 \pm 5.61 (n = 6)
Frozen nerve graft	20	60.67 \pm 15.50	1.04 \pm 0.10	59.12 \pm 6.31 (n = 9)
	11	11.33 \pm 0.94	2.30 \pm 0.17	26.20 \pm 1.56* (n = 3)
	12	15.33 \pm 8.99	1.76 \pm 0.36	35.13 \pm 6.22 (n = 3)
	14	19.60 \pm 10.38	1.64 \pm 0.37	38.06 \pm 6.90 (n = 5)
	16	18.86 \pm 6.75	1.49 \pm 0.17	40.80 \pm 5.02* (n = 7)
Predegenerated nerve graft	18	18.00 \pm 2.45	1.45 \pm 0.23	42.32 \pm 5.95 (n = 4)
	20	42.50 \pm 21.51	1.20 \pm 0.23	52.18 \pm 10.24 (n = 6)
	10	14.25 \pm 6.42	2.00 \pm 0.08	30.05 \pm 1.06 (n = 4)
	11	13.75 \pm 5.40	2.24 \pm 0.46	27.85 \pm 5.81* (n = 4)
	12	14.25 \pm 9.34	1.83 \pm 0.17	33.10 \pm 2.80 (n = 4)
	14	18.80 \pm 6.27	1.75 \pm 0.24	34.78 \pm 4.27 (n = 5)
Predegenerated nerve graft	16	21.00 \pm 12.30	1.66 \pm 0.19	36.86 \pm 4.11* (n = 5)
	18	27.00 \pm 9.00	1.43 \pm 0.09	42.13 \pm 2.60 (n = 4)
	20	22.67 \pm 11.12	1.15 \pm 0.23	54.23 \pm 10.98 (n = 3)

Values are expressed as mean \pm SD(n).

*, $p < 0.05$, compared with conduction velocity of compound nerve action potential in fresh nerve grafting at each week by ANOVA followed by Duncan's multiple comparison.

移植群では9週目の29.0m/sから20週目の59.1m/sまで約2倍に伸びていた。凍結移植群、変性移植群も経時的に増大していたが新鮮移植群に比べ低値傾向を示し、有意に差のある週もみられたが20週では有意差はなく、各々平均約7m/s、5m/s遅い程度であった(表1)。出現時期を決定するに際し、振幅は最も大きい陽性電位頂点と最も大きい陰性電位の頂点までとし、波形と artifact を混同するのを防ぐため5 μ V未満の振幅はC-NAPなしと判定した。出現時期は凍結移植群では14週目、新鮮移植群では9週目、変性移植

群では10週目であった。また最も早い出現は凍結移植群では10週目(4羽中1羽)、新鮮移植群で7週目(4羽中1羽)、変性移植群で8週目(4羽中1羽)であった。従って出現時期は新鮮移植群に比べ凍結移植群は約3週から5週遅れ、変性移植群では約1週遅れがみられた(図18)。

考 察

生体内において末梢神経が再生し、遠隔の目的終末に達するためには再生軸索を誘導するための生きたシュワン細胞索すなわち B \ddot{u} ngner band の存在が重要

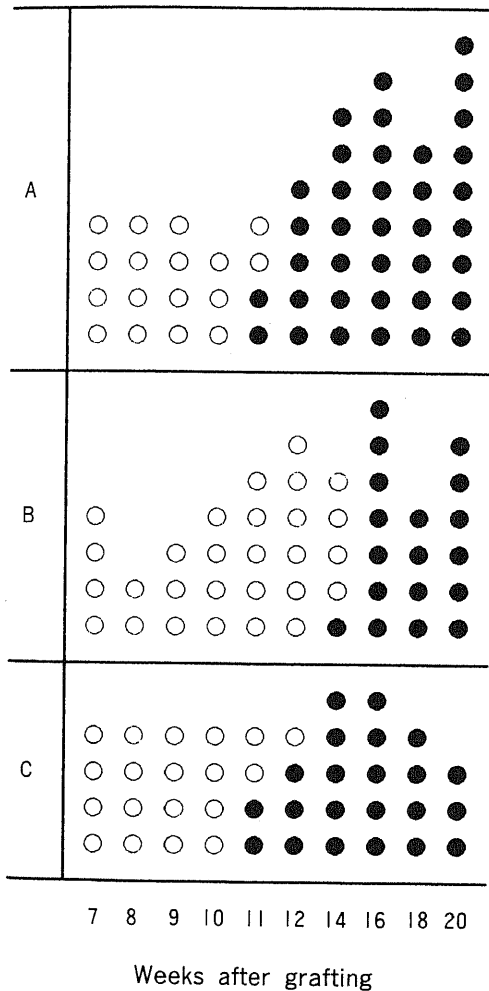


Fig.17. Recovery of M-wave after implantation of fresh nerve graft (A), frozen nerve graft (B) and predegenerated nerve graft (C). Open and closed circles represent individual rabbits without or with detectable M-waves, respectively, after regeneration periods indicated below.

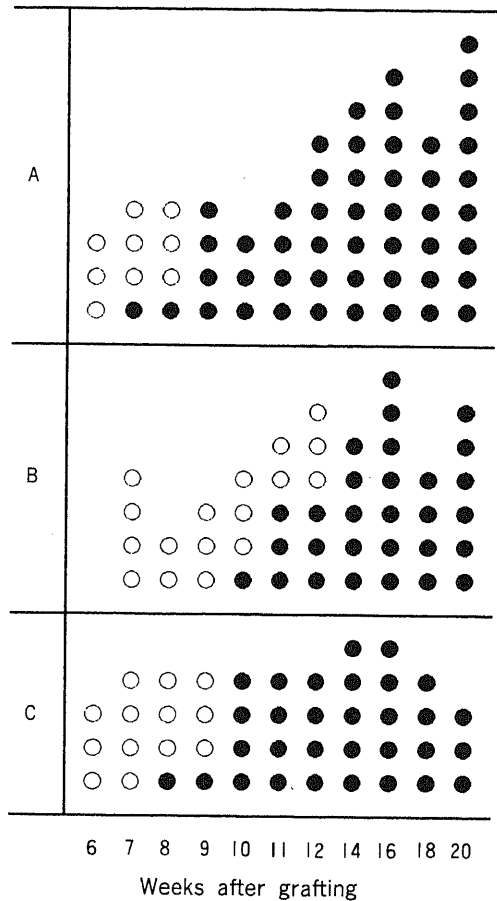


Fig.18. Recovery of compound nerve action potential after implantation of fresh nerve graft (A), frozen nerve graft (B) and predegenerated nerve graft (C). Open and closed circles represent individual rabbits without or with detectable compound nerve action potentials, respectively, after regeneration periods indicated below.

であると Weiss⁹⁾, Weddel⁹⁾, 野村¹⁰⁾ら多くの研究者が指摘している。

これに対し, Hentowa⁷⁾, Denny-Brown⁸⁾らは neural scar 内でシュワン細胞索が再生軸索を導くという考え方に反対している。さらに Marmor⁹⁾, 諸富ら¹⁰⁾は同種あるいは異種神経移植において「他の臓器と異なり, 末梢神経移植においては移植片自身の細胞が必ずしも生きていなければならない, 移植片自身は recipient の再生軸索を正しい方向に誘導する導管としての役割を果たせばよい」と強調している。最近では Ide ら²⁾が凍結, 解凍を繰り返しシュワン細胞を死滅させた移植片を作製し, 自家移植する実験から次のような結論を述べている。移植片を顕微鏡で観察すると凍結によっても残存するシュワン細胞の基底膜が再生軸索の足場となっており, 再生線維はその通路としてシュワン細胞そのものではなく基底膜に囲まれた空間を必要としていることが明らかになったという。また筋肉を凍結して基底膜構造を残存させた移植片でも再生軸索は通過し得たとの報告¹¹⁾もある。

一方, あらかじめ神経を切断し, 変性神経内のシュワン細胞の増殖期, すなわちシュワン細胞の活性の最も高い時期にこれを移植すると再生軸索の誘導が更に容易になるとする観点から, 変性神経を移植する実験も多い。その結果変性移植片は新鮮移植片より優れているとする報告¹²⁾¹³⁾があれば反対に軸索の伸長には有意の差はないと強調する報告¹⁴⁾¹⁵⁾があり, 変性移植片におけるシュワン細胞の役割については未だ混乱がみられる。

そこで本実験では凍結移植群, 新鮮移植群, 変性移植群の3群の移植実験を行い, 再生軸索が移植片を通過する際シュワン細胞が必要か否か, あるいは再生軸索の伸長速度に影響を及ぼすか否かを検討した。

再生軸索の伸長についてみると, 凍結移植群では2週目まではほとんど移植片内に進入しておらずわずか2, 3mmであり, 3週目で急激に伸長し移植片の2分の1まで達し, 4週目で移植片全長を通過した。新鮮移植群ではすでに2週目で移植片の3分の2まで再生軸索は進入し, 3週目では末梢縫合部を越える軸索もみられた。明らかに凍結移植群では2週目まで再生軸索の伸長の遅れが著しい。H-E染色所見と重ね合わせてみると2週目の凍結移植群の細胞群の位置と再生軸索のそれはほぼ同じであった。すなわち中枢側縫合部より進入したシュワン細胞は4mmほど移植片内へ進入するが, 再生軸索も2~3mmまで入り込み, 移植片のそれより末梢部のシュワン細胞の存在しない所には再生軸索は存在しない。Gulati¹⁶⁾は4cmの変性

移植片と凍結移植片を中枢側のみ縫合した実験を行い, 変性移植片では全長にわたって軸索が通過したのに凍結移植片では2cmまでしか充分には再生しなかったと報告した。この凍結移植片では末梢からのシュワン細胞の進入は期待できず, 中枢側からのみシュワン細胞が進入する。そして24週目でも移植片の末梢側断端には再生軸索がみられなかったことから再生軸索はシュワン細胞の存在するところまでしか伸長しなかったという。一方, 著者の移植片では4週目には両断端からのシュワン細胞の進入は移植片全長にわたっており, 軸索が末梢側縫合部を通過し得たのはこのためであると考えられる。この事実生きてきたシュワン細胞は長い距離を伸長する再生軸索にとっては重要であり, 凍結移植片, つまり基底膜構造のみを有する移植片は再生軸索を支えられないとする意見¹⁰⁾と一致し, シュワン細胞索が軸索を誘導することを示唆するものである。一般に神経移植の実験では少なくとも3cm以上の移植片を用いなければその実験は信用できない¹⁷⁾。これは僅かの距離では移植片がどのような条件でもあるいは移植しなくとも再生をみるからである。同種や異種神経移植の実験で多い0.5cm程度の移植片やチューブなどの挿入, あるいは凍結神経移植などにより電顕的その他の方法で再生軸索がどこに存在したとする実験は実験としての価値がなく, 臨床的には神経の大きな欠損を補うため神経移植を行うのであって, 再生軸索が何cm伸びるか, 終末器官まで達しうるか, それにはシュワン細胞が必要かが問題である。従って著者は移植神経の長さを3cmとして実験を行った。当教室の増山¹⁸⁾も4cmの異種神経移植実験において移植される動物の免疫反応を抑制し, 再生軸索が移植片内の生きてい異種のシュワン細胞に誘導されていることを証明した。

なお変性移植群は新鮮移植群より再生軸索の伸長はやや遅く, 2週目で移植片の2分の1, 3週目で末梢側縫合部を通過していた。神経を切断し2週後に移植する場合, 移植片内ではシュワン細胞の増殖, 活性は高まるとされ, 新鮮移植より有利であるという研究が多い¹²⁾¹³⁾。しかしこのことに関し, 逆に新鮮移植片より有利とは言えないとする報告も多く¹⁴⁾¹⁵⁾, Hall¹⁹⁾は変性神経移植では変性軸索の残渣の除去は急速であるが引き続きの再生軸索の成長は新鮮神経移植でみられるより遅いと述べており, 本実験結果も同様であった。

移植片の血行再開について, 新鮮移植片や変性移植片では1週目ですでに神経束内血管が再開していた。Weiss & Taylor²⁰⁾によれば移植片は5日間血行がなければ壊死に陥り結合織に置換され, 再生軸索の伸長

は阻止されるという。従ってこれらの移植片では移植後早期より血行が再開していると考えられ、シュワン細胞を移植片内で生きたまま移植したと判断できる。これに対し凍結移植片では新生血管は2週目でも移植片両端部にわずかに進入する程度で殆ど移植片は無血(壊死)状態を示し、移植片全長にわたって血行が再開したのは4週目であった。

凍結移植片における血行再開の遅延とシュワン細胞索の関係についてみると2週目の移植片内への血管進入部位と細胞群の進入部位は両端部に限られ、4週目に移植片全長にわたって血行が再開した時にはシュワン細胞索も移植片のすべてでみられた。このように血管とシュワン細胞索の進入が平行している所見はシュワン細胞が血行なしでは生きられないという事実と共に、再生軸索もシュワン細胞なしには生存できないことを示している。凍結移植片では血行再開の遅延がシュワン細胞索の進入にも悪影響を及ぼし、さらには再生軸索の伸長を遅延させたものと考えられる。

神経再生の機能的検査法としての電気生理学的検査は有用であり、筋電図学的所見は神経再生の早期徴候とその予後を知る上で最も信頼できるものとされている²¹⁾。

誘発筋電図M波について、活動電位は多相性でその出現は新鮮移植群と変性移植群が各々12週目、14週目であったのに対し、凍結移植群では16週目と著しい遅れがみられた。多相性のM波は、単一筋単位中の興奮に時間的ズレが生じて発生し、髄鞘形成の未完成な時期に発生するとされている²²⁾。この時期において組織学的には繊細な再生軸索が終板内で未熟な細網を形成していることが報告されている²³⁾。つまり多相性のM波は髄鞘の未熟な再生軸索が終板内に達しはじめた時期に出現し、髄鞘形成が完成するまで発生し続けるとされている²⁴⁾。従って凍結移植群における多相性のM波の出現の遅延は、未熟な再生軸索が終板に達するのに新鮮移植群より4週目程度遅いことが類推される。

誘発筋電図M波の最大振幅値の平均は、新鮮移植群、変性移植群では12週目の1.21mVから20週目では6.04mV、5.23mVと急激に増大しているのに対し、凍結移植群では20週目でも2.06mVであった。最大振幅値と組織学的所見との関係は再生軸索の大径軸索密度と正の相関関係にあるとする説²⁵⁾や、再生線維の総数と相関するとする説²⁶⁾も報告されている。本実験において、凍結移植群の最大振幅値の平均が新鮮移植群の16週目に相当する低値であることから、凍結移植群においては再生軸索の誘導、伸長の遅れや再生軸索密度の低いことが類推される。

坐骨神経や脛骨、腓骨神経などを直接刺激して得られた活動電位すなわち compound nerve action potential はM波と同じく神経再生を早期に他覚的に検査する方法として用いられている²⁷⁾。

C-NAPの出現時期について、新鮮移植群では9週目で、変性移植群では10週目で出現したのに対し、凍結移植群は14週目であった。神経活動電位の導出について齊藤²⁸⁾はイヌの純知覚神経を用いて測定し、6 μ m以上の神経線維が存在してはじめて導出可能であることが判明したと報告している。従ってC-NAPの導出は一定の大きさ以上の直径の再生軸索が通過していることを示すものであり、凍結移植群では新鮮移植群より遅れて通過したものと推定できる。

以上より組織学的検査では凍結移植群のシュワン細胞の存在しない endoneurial tube には再生軸索がみられず、血管の進入とともにシュワン細胞索が進入し引き続いて再生軸索が通過するという時間的経過をとるため、初めからシュワン細胞の生きている新鮮移植群や変性移植群に比べ凍結移植群の再生速度が遅れていた。また機能的回復を調べる電気生理学的検査においても凍結移植群は新鮮移植群に比べ回復時期の遅延を認めた。よって生きたシュワン細胞の存在は再生軸索の誘導に重要な役割をもつと判断できる。

結 論

再生軸索の伸長にシュワン細胞が必要かを調査する目的で家兔の坐骨神経を用いて3cmの移植片を作成し、シュワン細胞の死滅した凍結移植群、新鮮移植群、シュワン細胞の増殖した変性移植群の3群について組織学的検査、微小血管造影、電気生理学的検査を行って検討し以下の結論をえた。

1. 凍結移植群では再生軸索は移植後2週目では2、3mmまでしか移植片に進入せず、3週目で移植片の1/2、4週目で全長を通過した。新鮮移植群、変性移植群では2週目で移植片の2/3、1/2まで再生軸索は進入し、3週目には全長にわたって通過していた。

2. 新鮮移植群、変性移植群は移植片内のシュワン細胞は生存していたが、凍結移植群では2週目でも移植片内に約4mmしかシュワン細胞索が進入せず、移植片全長にわたって細胞群がみられるには4週間を要した。

3. 移植片の血行は新鮮移植群、変性移植群では1週目ですでに再開していた。凍結移植群では移植片内への血管進入は2週目では約4mmであり、4週目で全長に及んでいた。以上より、凍結移植群では血行と

共にシュワン細胞が移植片に入り、再生軸索は中枢断端よりシュワン細胞の入っている所まで伸長できる。

4. 電気生理学的検索では誘発筋電図M波の出現は凍結移植群では16週目で新鮮移植群、変性移植群と比べ3~4週、2~3週遅れていた。またC-NAPの測定で伝導速度は凍結移植群は新鮮移植群より遅延する傾向がみられた。出現時期は凍結移植群が14週目で、新鮮移植群の9週目、変性移植群の10週目と比べ4~5週遅れていた。

5. 変性移植群は新鮮移植群よりも優れていることはなかった。

以上より、末梢神経の再生においてシュワン細胞は再生軸索の誘導、伸長において重要な働きをしていることが示唆された。

謝 辞

稿を終るに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました恩師野村進教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また実験遂行にあたり御協力頂いた湯上博文部技官、教室諸兄に感謝致します。

文 献

- 1) 野村 進: 神経移植と再生, 神経の変化と再生 (草間敏夫, 中沢恒幸編), 第1版, 365-386頁, 医学書院, 東京, 1975.
- 2) Ide, C., Tohyama, K., Yokota, R., Nitatori, T. & Onodera, S.: Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Res.*, **288**, 61-75 (1983).
- 3) 野村 進: 神経縫合部より末梢の再生線維増加に関する実験的研究. *脳・神経外傷*, **2**, 41-57 (1970).
- 4) Weiss, P.: In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber. *J. Exp. Zool.*, **68**, 393-448 (1934).
- 5) Weddell, G.: Axonal regeneration in cutaneous nerve plexuses. *J. Anat.*, **77**, 49-62 (1942).
- 6) 野村 進: 末梢神経再生の基礎的問題. *災害医学*, **11**, 28-35 (1968).
- 7) Hentowa, F.: Regeneration der peripherischen Nerven. *Z. Gesam. Neurol. Psychiat.*, **147**, 791-806 (1933).
- 8) Denny-Brown, D.: Importance of neural fibroblasts in the regeneration of nerve. *Arch. Neurol. Psychiat.*, **55**, 171-215 (1946).
- 9) Marmor, L.: Regeneration of peripheral nerves by irradiated homografts. *J. Bone and Joint Surg.*, **46-A**, 383-394 (1964).
- 10) 諸富武文, 平沢泰介: 末梢神経同種移植の現況. *臨床整形外科*, **6**, 119-130 (1971).
- 11) Fawcett, J. W. & Keynes, R. J.: Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve repair. *J. Neurosurg.*, **65**, 354-363 (1986).
- 12) Dickson, R. A., Dinley, J., Rushworth, G. & Colwin, A.: Delayed (degenerate) interfascicular nerve grafting: a new concept in peripheral nerve repair. *Br. J. Surg.*, **64**, 698-701 (1977).
- 13) Holmes, W.: Histological observations on the repair of nerves by autografts. *Br. J. Surg.*, **35**, 167-173 (1947).
- 14) Sanders, F. K. & Young, J. Z.: The degeneration and re-innervation of grafted nerves. *J. Anat.*, **76**, 143-166 (1941).
- 15) Sunderland, S.: *Nerves and Nerve Injuries*. 2nd ed., p603-636, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1978.
- 16) Gulati, A. K.: Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. *J. Neurosurg.*, **68**, 117-123 (1983).
- 17) Seddon, H. J.: Nerve grafting. *J. Bone Joint Surg.*, **45-B**, 447-461 (1963).
- 18) 増山 茂: 免疫抑制剤 Rabbit-Anti-Mouse-Thymocyte Serum 投与下における新鮮異種神経移植の研究. *日手会誌*, **1**, 821-834 (1985).
- 19) Hall, S. M.: Regeneration in cellular and acellular autografts in the peripheral nervous system. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **12**, 27-46 (1986).
- 20) Weiss, P. & Taylor, A. C.: The viability of isolated nerve fragments and its modification by methylene blue. *J. cell. comp. Physiol.*, **27**, 87-103 (1946).
- 21) Sanders, F. K. & Whitteridge, D.: Conduction velocity and myelin thickness in regenerating nerve fibers. *J. Physiol.*, **105**, 152-174 (1946).
- 22) Sunderland, S.: *Nerves and Nerve Injuries*. 2nd ed., p108-132, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1978.
- 23) 堀 浩: 筋電図の手引き, 第1版, 53-54頁, 南山堂, 東京, 1981.
- 24) 村上白土: 骨格筋に於ける神経終末の変性及び再生と筋の刺激伝導能並びにれん縮. *中部整災誌*, **6**, 232-258 (1963).
- 25) 光嶋 勲, 波利井清紀: 血管柄付神経移植の研究

—第4報 癒痕内へ移植した神経の軸索再生に関する電気生理学的検索—。日形会誌, 4, 9-15 (1984).

26) 山田 均, 玉置哲也, 野口哲夫, 小林健一, 高野治雄, 辻 陽雄: 末梢神経部分損傷における電気生理学的識別と臨床応用に関する研究 (第2報). 整形外科, 31, 1366-1368 (1980).

27) Kline, D. G., Hackett, E. R. & May, P. R.:

Evaluation of nerve injuries by evoked potentials and electromyography. J. Neurosurg., 31, 128-136 (1969).

28) 斉藤次彦: 神経切断縫合後の sensory nerve action potential の実験的研究. 日大医誌, 30, 299-311 (1971).

Experimental Studies on the Role of the Schwann Cell in Peripheral Nerve Regeneration Fumio Hashimoto, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 97, 956—973 (1988)

Key words: frozen autograft, peripheral nerve, predegenerated autograft, regeneration, Schwann cell

Abstract

The present study was performed to examine the role of the Schwann cell in peripheral nerve regeneration. Three-centimeter segments of rabbit sciatic nerve were used for transplantation. They were divided into the following groups: (1) frozen nerve grafts with Schwann cells killed by freezing and thawing prior to grafting; (2) fresh nerve grafts; (3) predegenerated nerve grafts which consisted of nerve segments that had been allowed to degenerate for 2 weeks. The grafts were studied histologically, electrophysiologically and microangiographically to examine the role of the Schwann cell. In the frozen grafts, Schwann cells accompanied by capillaries were seen in the proximal 4-mm region by 2 weeks after surgery, and had extended to the distal suture site by 4 weeks. Regenerating axons passing through the grafts were observed in the proximal 2, 3-mm region 2 weeks after the transplantation, and in the midportion of grafts 3 weeks after surgery. Four weeks later, axons had regenerated through out the entire 3-cm length of grafts. In the proximal two-third region of the fresh grafts, regenerating axons were seen 2 weeks after surgery, and had passed through the entire grafts by 3 weeks. In the predegenerated grafts, axons which had regenerated through the one-half region 2 weeks after grafting were seen in the distal suture site by 3 weeks. Capillaries penetrated through the proximal 4-mm region of the frozen grafts 2 weeks after surgery, and the entire grafts by 4 weeks. Revascularization was already observed in the entire grafts of both fresh and predegenerated segments 1 week after the operation. Evoked muscle action potential (M wave) and compound nerve action potential were recorded firstly at 16 and 14 weeks after surgery with the frozen grafts, at 12 and 9 weeks with the fresh grafts, and at 14 and 10 weeks with the predegenerated grafts. The results showed that regenerating axons passed more rapidly through the grafts containing viable Schwann cells than the grafts lacking viable Schwann cells. It was concluded from this study that Schwann cells possessed the ability to support axonal regeneration.