

# Experimental Studies on the Role of Transplanted Schwann Cells on 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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8051">http://hdl.handle.net/2297/8051</a>

## 末梢神経の再生におけるシュワン細胞移植に関する実験的研究

金沢大学医学部整形外科科学講座 (主任:野村 進教授)

池 田 和 夫

(昭和63年6月14日受付)

神経欠損部に対する培養シュワン細胞移植の有用性について検討した。生後1~2日のラットの坐骨神経から採取した培養シュワン細胞をコラーゲン溶液に浮遊し、シリコンチューブ内でゲル化させ、このチューブ(Sチューブ)を移植材料とした。Sチューブの両端をミリポアの膜で閉鎖したチューブ(S'チューブ)とコラーゲンゲルのみを注入したチューブ(CMチューブ)、生理食塩水を注入したチューブ(Pチューブ)、及び死滅シュワン細胞をコラーゲンゲルに包埋したチューブ(Dチューブ)も作成した。同系の成熟ラットの坐骨神経にチューブを移植し、経時的にチューブ内組織の変化を光顕的ならびに電顕的に検討した。なお、S'チューブに関しては切断した坐骨神経の中樞端のみ、または末梢端のみ縫合した群、健常神経近傍に移植した群を作成した。移植後10日で、SおよびS'チューブ内の培養シュワン細胞は互いに平行に長軸方向に縦列した。しかし、S'チューブで片側のみ神経断端と縫合した群と健常神経近傍に移植した群では、移植したシュワン細胞は球状~紡錐形のままであり、一定の配列をとって並ぶことはなかった。したがって、シュワン細胞が縦列するという現象は両側神経断端からの何らかの因子、例えば液性因子を認知することで生ずるものと考えられた。Sチューブ内の再生軸索は、シュワン細胞に沿って伸長し、12日目に中央部を通過、2週目には末梢側神経内に到達した。一方、P、CM、Dチューブのいずれの場合にも、再生軸索が末梢側神経内へ達するのは2週目以後であった。したがって、Sチューブ内の生きたシュワン細胞が、軸索再生速度を速める役割を果たしていると考えられた。再生有髄神経の数は、移植後4週目以降、S、Pチューブ間で同等であったが、CM、Dチューブは少ない傾向にあり、基質のコラーゲンゲルは軸索再生に対して阻害的に作用していると推定された。

---

**Key words** schwann cell, nerve graft, peripheral nerve, regeneration

---

末梢神経の大欠損がある場合の治療は、外科医にとり難問の一つであり、この欠損部を補うために、通常神経移植という方法が行われている<sup>1)</sup>。臨床的に現在用いられているのは、遊離自家神経移植である。しかし、移植神経採取には制限があるため、自家神経移植にかわる移植材料の開発が切望され、種々の方法が考案されている。たとえば、神経の欠損部に自己以外の神経組織をあてる同種神経移植は未だ研究の段階にあり、臨床的には成功していない<sup>2)</sup>。一

方、神経の欠損部に対して、欠損部を橋渡しする空管構造を保つことで神経再生を図ろうとする方法には、生体内組織を用いた血管移植<sup>3)</sup> mesothelial tube<sup>4)</sup>移植、神経周膜移植<sup>5)</sup>があり、また人工材料を用いたシリコンチューブ移植<sup>6)</sup>、biodegradable tube移植<sup>7)</sup>、millipore tube移植<sup>8)</sup>等があるが、これらも実験段階である。

さて、*in vivo*においては、末梢神経の再生軸索がシュワン細胞に沿って進んでいくことはよく知られ

---

Abbreviations: ABC, avidin-biotin-complex; Ara-C, cytosine arabinoside; BPE, bovine pituitary extract; CM-IA, Cell-Matrix type I-A; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; 5-FU, 5-Fluorodeoxyuridine; H-E, hematoxylin eosin; NGF, nerve growth factor.

ており<sup>11)</sup>、神経の再生過程にあたってシュワン細胞が重要な役割を果たしていると考えられている。最近、*in vitro*の実験から、シュワン細胞が軸索の伸長を促進することが明らかにされ<sup>12)</sup>、また、シュワン細胞が神経成長因子 (Nerve Growth Factor, NGF) や NGF 様神経突起成長因子を産生分泌していることも確かめられている<sup>13)14)</sup>。したがって、シュワン細胞が神経軸索の伸長促進や誘導作用を有しているとする

れば、シュワン細胞を神経欠損部に移植する方法は有効、かつ十分考慮に値すると思われる<sup>15)</sup>。しかしながら、これまでのところ培養シュワン細胞を用いた移植研究の報告は見当たらない。そこで本研究では、欠損のある末梢神経の再生におけるシュワン細胞移植の有用性について検討を行った。

## 材料および方法

### I. シュワン細胞の培養と移植チューブの作製

#### 1. シュワン細胞の調整

##### 1) 一次培養

生後1~2日のウイスター系ラットより、無菌的に両側の坐骨神経を採取し、Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) に室温で保存した。DMEM は、DMEM粉末(Flow Laboratory, 米国) 13.5g, ウシ胎仔血清 (Gibco, 米国) 150ml, ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (Gibco) 10ml, 炭酸水素ナトリウム 3.7g, 注射用蒸留水 840ml で作製した。実体顕微鏡下 (×16) にマイクロ摂子を用いて、坐骨神経の神経外膜と神経周膜を除去し、神経を細く引き裂いた。これを、セルマトリックス IA (C-M-IA; 新田ゼラチン, 大阪) を被覆した 60mm ペトリディッシュ (Falcon, # 3802, 米国) で培養した。CM-IA は、ウシから調整された酸可溶性 I 型コラーゲンである。培養液には、DMEM 10ml を用い、CO<sub>2</sub> 5.0% 37 °C の恒温器内で、48時間培養した。

##### 2) 二次培養

神経片を位相差顕微鏡下に、二次培養系に移した。ディッシュと培養液は同様のものを用いて、48時間培養した。

##### 3) 三次培養

35mm ペトリディッシュ (Falcon, # 3801) をラミニニン [Collaborative Research, 米国, 25 μg/dish] で被覆し、位相差顕微鏡下に、二次培養系より神経片を移した。培養液は DMEM 4ml/dish とし、ウシ下垂体抽出物 (Bovine Pituitary Extract, BPE, Collaborative Research) 30 μg/ml を加えた。

##### 4) 線維芽細胞の除去

培養系においては、シュワン細胞と線維芽細胞とを概ね区別できる<sup>16)17)</sup>。すなわち、位相差顕微鏡下に観察すると、シュワン細胞は、双極性ないし三極性を示す小型の光沢のある細胞であるのに対し、線維芽細胞は、細胞質の豊富なやや大型の多角形ないし星芒状の細胞形態をしめす。

本研究においては、一、二次培養の神経片から選出する細胞の大部分は線維芽細胞の形態を示したの

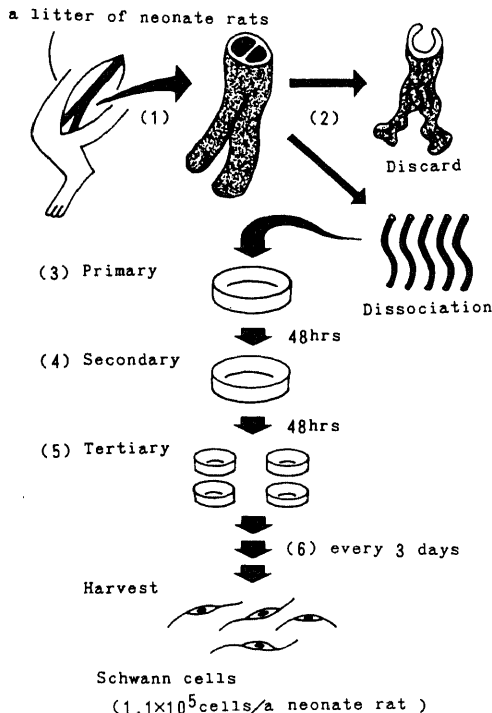


Fig.1. Flow chart for the preparation of Schwann cells *in vitro*.

- (1) A sciatic nerve is removed aseptically from a neonate rat and immersed in DMEM.
- (2) The nerve is cleaned of epineural and perineural connective tissues under a dissecting microscope and torn into small fascicles.
- (3) The explants are placed on a Cell Matrix IA coating 60mm-petri dish, and fed with DMEM.
- (4) After 48 hours, the primary explants are transferred onto a fresh dish coated with Cell Matrix IA.
- (5) Following 48 hours, the explants are reexplanted on four 35mm-petri dishes coated with laminin (25 μg/dish).
- (6) Culture medium (DMEM) containing bovine pituitary extract (30 μg/ml) is changed every 3 days.

で、培養神経片を移す場合に遊出線維芽細胞を培地に残すことによって混入する線維芽細胞をできるだけ除いた。つぎに三次培養では神経片から遊出する細胞はほとんどがシュワン細胞の形態を示したので、この細胞を収集した。しかし、なお数石状に増殖する線維芽細胞が一部に混入するため、これを3日毎に位相差顕微鏡下に熱した摂子で殺し、培養液(D-MEM+BPE)の交換を行い、培養シュワン細胞の純度を向上させた(図1)。

5) シュワン細胞の採取

三次培養10日目の培養細胞を0.025%トリプシン+0.02%エチレンジアミン四酢酸四ナトリウムにより単離浮遊させ、遠心(1500回転/分×5分)にて収集、これを再びDMEMに浮遊させて、単離シュワン細胞浮遊液として用いた。一部にメチレン青染色を行い細胞数を算定した。また、一部は継代し、抗S100蛋白抗体(フナコシ、東京)を用いた免疫蛍光抗体法により培養細胞の純度を確認した。

2. 移植チューブの作製

移植チューブ作製直前に調整したCM-IAに培養シュワン細胞を混合し、泡立てないように注意して、パスツールピペットで、滅菌済みのシリコンチューブ(内径2mm, 外径3mm, 長さ10mm)内に注入した。このチューブを37°C45分間静置することによってCM-IAをゲル化させ、シュワン細胞移植用チューブ(Sチューブ)とした。次にSチューブの両端にミリポア(マイレクスGV, 0.22μm, 日本ミリポアK.K.)の膜を10-0ナイロン糸4針で縫いつけて閉鎖したチューブを作製した(S'チューブ)。また、シュワン細胞を遠心管の底に収集した後、-80°Cで1分間凍結し37°Cで10分間解凍するという操作を6回繰り返す。死滅させたシュワン細胞を混入したチューブを同様な方法で作製した(Dチューブ)。いずれの場合においても一本のチューブにはシュワン細胞が10万個となるように調整した。対照として、CM-IAゲルだけを満たしたチューブ(CMチューブ)と、生理食塩水を注入したチューブ(Pチューブ)を用意した。

3. CM-IAの抗原性についての検討

ゲル化したCM-IAを5ml, 成熟ラットの背部皮下に埋入し、2週間後に麻酔下に皮膚と筋膜を含めて採取した。採取組織のパラフィン切片につきhematoxylin-eosin(H-E)染色をして観察した。

II. 移植チューブの設置

250g~300gのウィスター系成熟ラットを用い、ペントバルビタール(ネプタール, 大日本製薬, 大

阪)の腹腔内投与(40mg/kg)により全身麻酔した。その後、ラットを腹臥位で固定、手術用顕微鏡下に坐骨神経を露出し、以下の如くチューブを設置した。術後は、セフェム系抗生剤入り生理的食塩水で洗浄後、創を閉じた。

1. Sチューブ群

坐骨神経を大腿部で4mm切除した後、両側神経断端の神経上膜とSチューブを10-0ナイロン糸4針で縫合した。切断神経両端は1mmずつチューブ内に引きこまれるので、間隙は8mmとなった(図2-1)。

2. S'チューブ群

1) S'-1チューブ群

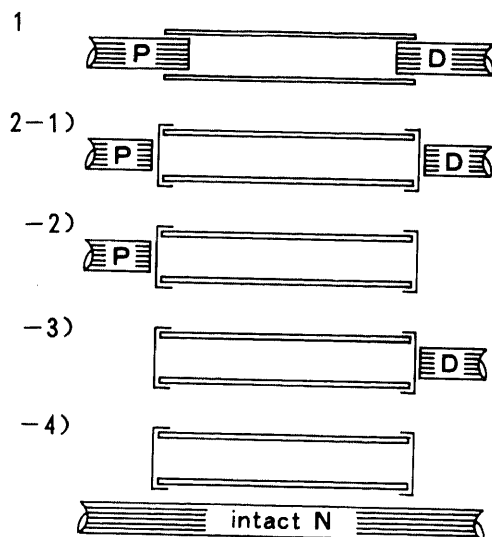


Fig. 2. Arrangements of silicone tubes.

1. Both stumps of the sectioned sciatic nerve are inserted into the silicone tube containing cultured Schwann cell (S tube) (10mm in length and 2mm in inner diameter). A gap between the stumps is 8mm.

2-1) The S tube, both ends of which are closed with the membrane of Millipore (S'tube), is implanted in a gap between proximal and distal stumps of the nerve. (S'-1).

2-2) The proximal end of S'tube is attached to the proximal stump of the nerve. The distal stump of the nerve is completely resected. (S'-2).

2-3) The distal end of the S'tube is attached to the distal stump of the nerve. (S'-3).

2-4) The S'tube is implanted near the intact sciatic nerve. (S'-4).

D, distal stump; N, nerve; P, proximal stump.

S' チューブを1. と同様に切断した坐骨神経の両断端に縫合した。

2) S'2 チューブ群

S' チューブを坐骨神経の中枢側断端のみに縫合し、遠位側を遊離した。神経の末梢断端は可能な限り切除した。

3) S'3 チューブ群

S' チューブを坐骨神経の末梢側断端のみに縫合し、近位側を遊離した。神経の中枢断端は、結紮しバイポラールで熱凝固させた。

4) S'4 チューブ群

ラットの坐骨神経を傷つけないように展開し S' チューブをその側方に埋込んだ (図2-2)。

3. 対照チューブ群

S チューブ群の対照として、CM, P, D チューブを1. と同様に切断神経の両断端に縫合した。

実験II-1. では、S チューブを68本、II-2. では、各群8本用いた。III-3. の CM, P チューブは各々60本、Dチューブは10本用いた。

III. 観察方法

1. 移植シュワン細胞のチューブ内での早期動態の観察

実験II-1. および2. の S チューブと S' チューブについて、7日目と10日目に各々4本を麻酔下に採取、10%緩衝ホルマリンで固定後、縦割切片を作成し、H-E 染色を行って光顕的に観察した。

2. チューブ内の神経再生の観察

実験II-1. および3. の S, P, CM チューブは移

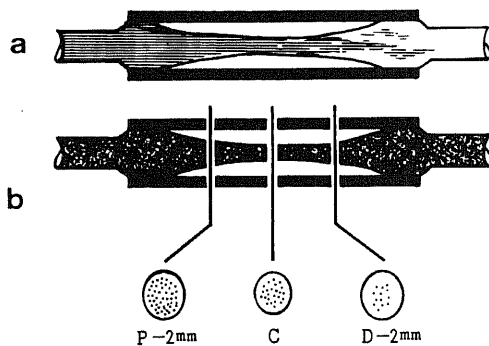


Fig. 3. Scheme showing the longitudinal section (a), and transverse section (b), of the tissues in the implanted tubes examined at various stages. In cut sections, center of the tube (c), 2mm proximal from the center (P-2mm), and 2mm distal to the center (D-2mm) are examined.

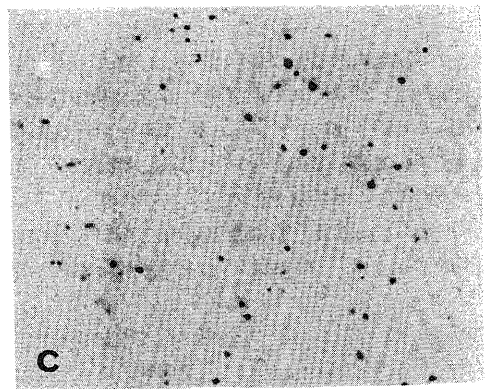
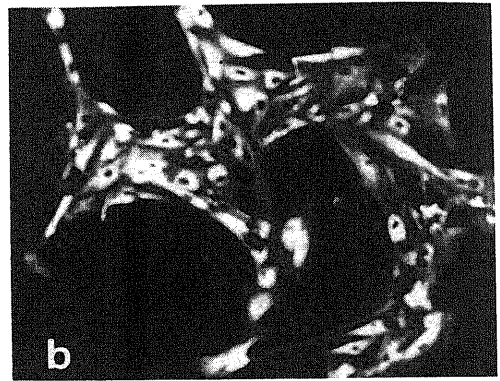
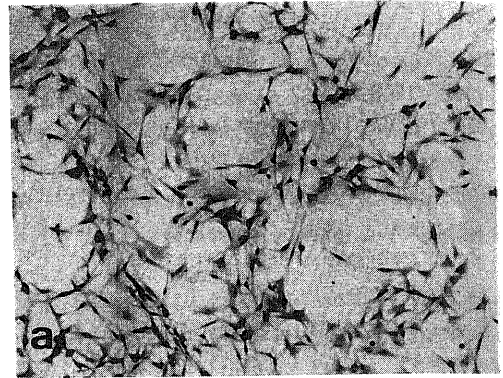


Fig. 4. a) Light micrograph of Schwann cells with bipolar or tripolar features at the tertiary culture. H-E stain.  $\times 75$ . b) Immunofluorescent micrograph of subcultured cells stained for S100 protein. All cells in this field are positive.  $\times 300$ . c) Transverse section of the S tube before implantation. H-E stain.  $\times 75$ .

植後5日, 7日, 10日, 12日, 2週, 3週, 4週, 6週, 8週, 12週にそれぞれ6本ずつ採取し, Dチューブは移植後5日, 7日, 2週, 4週, 8週にそれぞれ2本ずつ用い, 光顕的もしくは電顕的に観察した.

1) 光顕的観察

標本は10%緩衝ホルマリンで固定し, 縦断切片(図3-a)と横断切片(図3-b)を作製した. 横断標本は, チューブの中央(C), 中央から中枢へ2mm

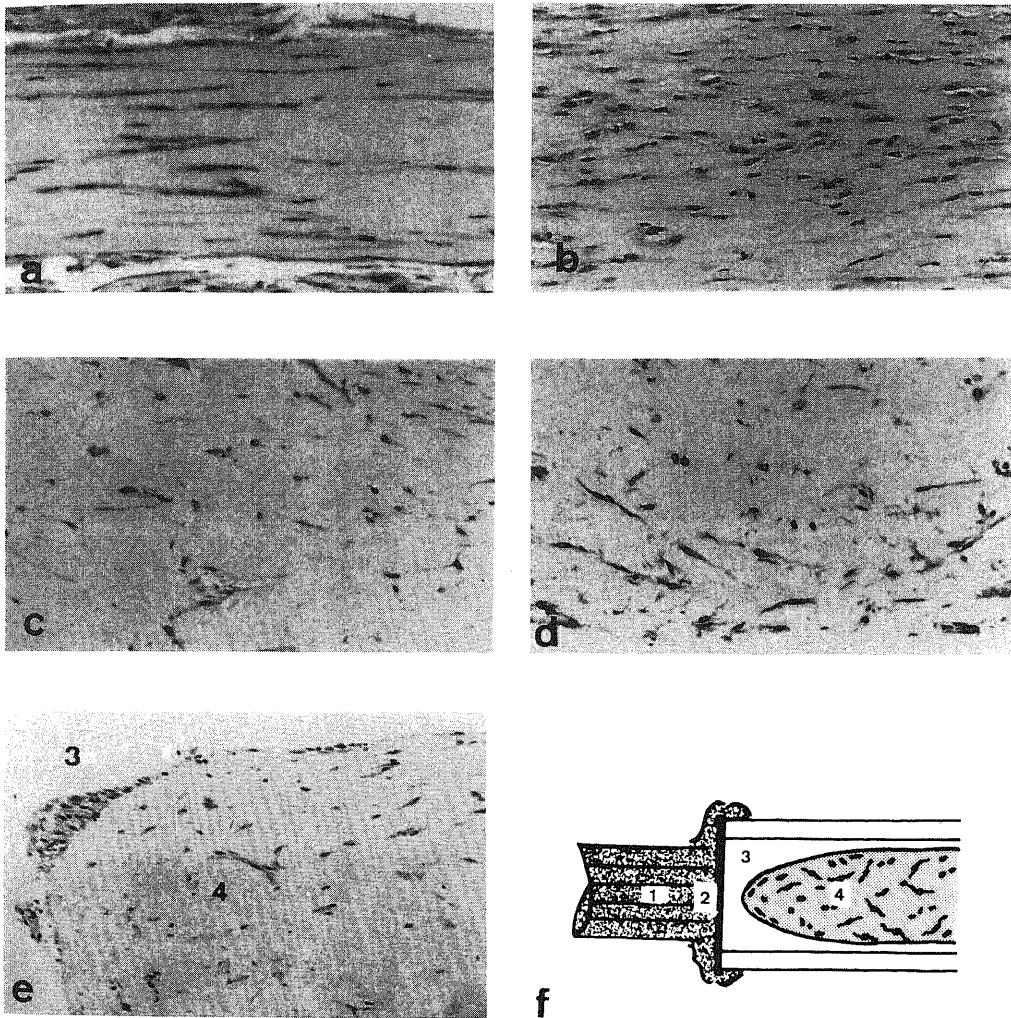


Fig.5. Light micrographs of longitudinal sections of each tube 10 days after implantation. H-E stain.

- a) Transplanted Schwann cells in the S tube become elongated longitudinally and lined up parallel with each other.  $\times 150$ .
- b) The Schwann cells in the S'-1 tube are transformed and arranged similar to the S tube.  $\times 150$ .
- c) The Schwann cells in the S'-2 tube are bulbous and scattered irregularly.  $\times 150$ .
- d) The Schwann cells in the S'-4 tube.  $\times 150$ .
- e) The proximal end of the S'-2 tube.  $\times 75$ .
- f) Scheme of the proximal or distal end of the S' tube.  
1, nerve stump; 2, Millipore membrane; 3, fluid; 4, shrunken gel containing transplanted Schwann cells.

(P-2mm), 中央から末梢へ 2mm (D-2mm) の3カ所を作成観察した. 染色は H-E 染色の他に, avidin-biotin-complex (A B C) 法<sup>19)</sup>により S100 蛋白と neurofilament (Labsystems, Oy, フィンランド) に対する免疫組織染色を行った.

## 2) 電顕的観察

標本は, 2.5%グルタルアルデヒドで1時間, 2%四酸化オスミウムで1時間固定したのち, 型の如く脱水しエポキシ樹脂に包埋した. ただし, 移植2週目からのラットにはあらかじめ深麻酔下に腹部大動脈より 130cm H<sub>2</sub>O の圧力で灌流固定 (2.5%グルタル

アルデヒド, 100ml) を行った. LKB ウルトラトームを用いて作成した超薄切片に酢酸ウラニール・硝酸鉛の二重染色を行い, 日立電子顕微鏡 HU-500 で観察した.

## 3) 再生有髄神経線維数の計測

4週目以後のエポキシ樹脂包埋標本 D-2mm の1 $\mu$ m切片にトルイジン青 (pH2.5) 髄鞘染色を行い, 光顕的に観察・写真撮影した. この拡大写真を用いて, 再生有髄神経線維数を計測した. 横断面を45° ずつ8区画に分け, 任意に2区画を選び計測した. また同時に, 再生神経幹の直径を計測した. なお対照と

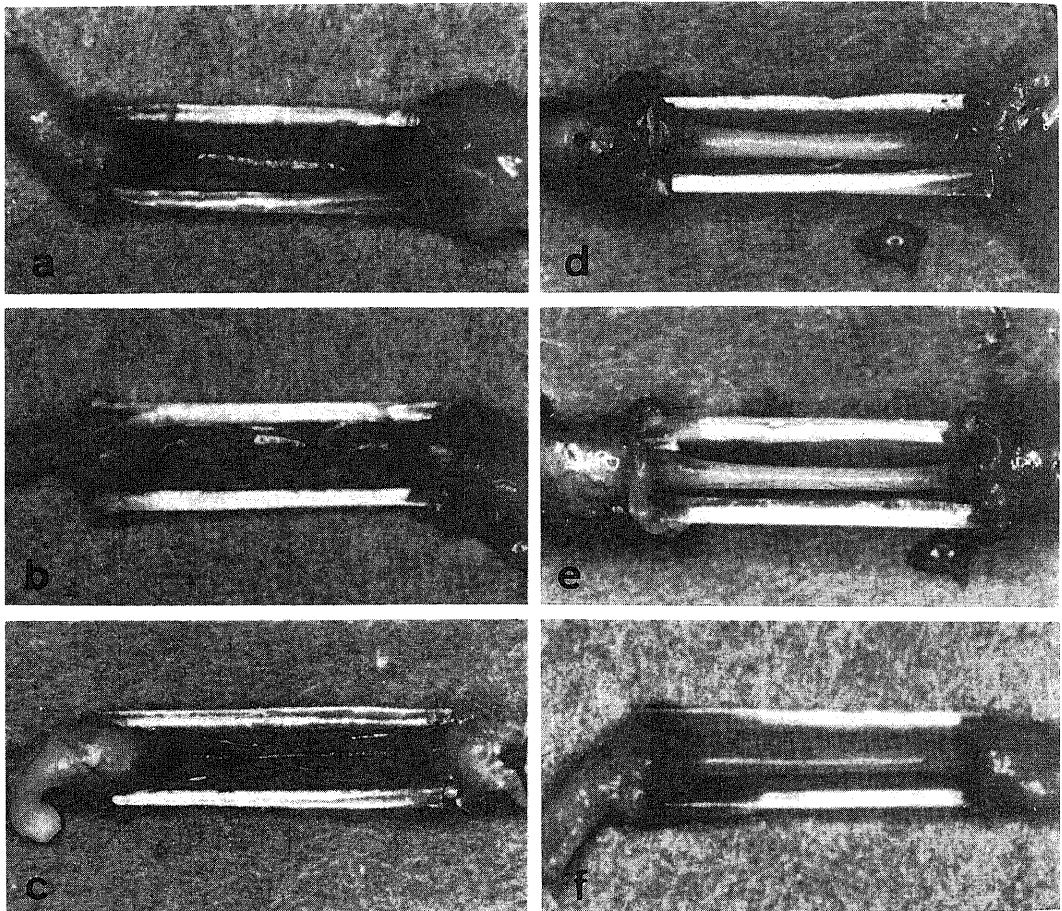


Fig. 6. Macroscopic views of the implanted tubes.  $\times 4.5$ .

- a) S tube after 10 days ;
- b) CM tube after 10 days ;
- c) P tube after 10 days ;
- d) S tube after 8 weeks ;
- e) CM tube after 8 weeks ;
- f) P tube after 8 weeks ;

Proximal stumps are left and distal stumps are right.



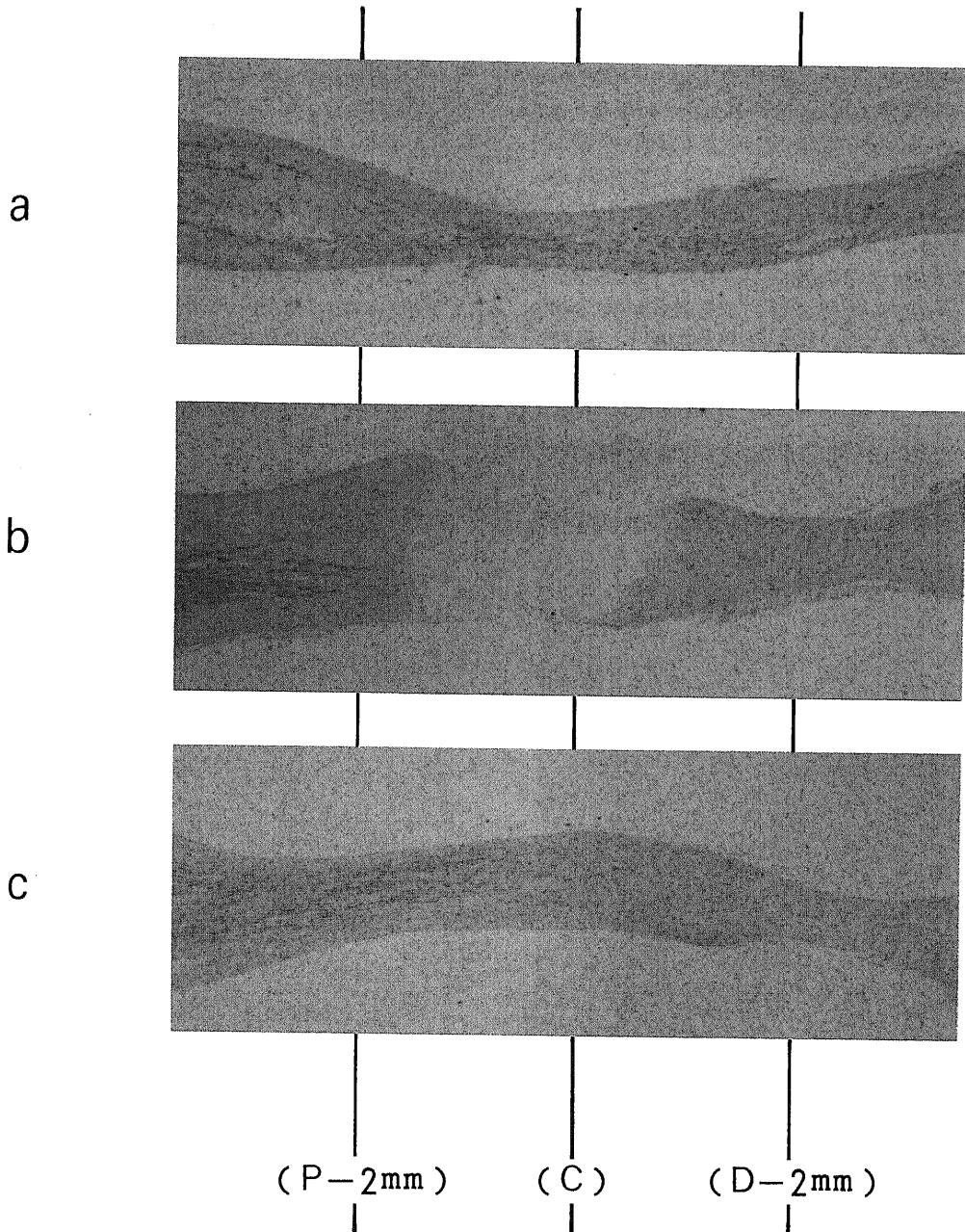


Fig. 7. Immunohistochemical micrographs of ingrowing tissues in S, CM, and P tubes stained for neurofilament.  
 a) S tube 12 days after implantation.  $\times 15$ .  
 b) CM tube after 12 days. Residual CM-IA is seen in the center of the specimen.  $\times 15$ .  
 c) P tube 12 days after implantation.  $\times 15$ .



して成熟ラット坐骨神経大腿中央部の標本で、同様の計測を行った。

### 成 績

#### I. シュワン細胞の単離培養と移植チューブについて

三次培養10日目の細胞は、大部分がS100蛋白陽性の二極性ないし三極性を示す小型の細胞で、シュワン細胞であることが確認された(図 4-a,b)シュワン細胞の純度は95~97%であった。

移植前のSチューブの横断面で観察されるシュワン細胞の核は、平均100個(n=4)で、32個/mm<sup>2</sup>であった(図 4-c)。正常ラット坐骨神経大腿部の横断面で観察される細胞の核は、平均570個(n=4)で、

1055個/mm<sup>2</sup>であり、Sチューブ内のシュワン細胞数は正常神経に比べかなり少数である。

CM-IAの抗原性については、背部皮下埋入2週間後の組織学的検索の結果、炎症細胞浸潤などの免疫反応性変化はほとんど認められなかった。

#### II. 移植シュワン細胞のチューブ内での早期動態について

Sチューブ群においては、球状であったシュワン細胞は7日目には紡錘形に伸長し、チューブの長軸方向に平行に配列するようになった。10日目にはその傾向が顕著となり、整然と長軸方向に縦列する細長いシュワン細胞が認められた(図 5-a)。このような所見は両端をミリポアの膜で閉鎖したS-1チューブ群の場合も同様であった(図 5-b)。ゲル自体は収縮して細くなると共に、シュワン細胞の密度はゲル

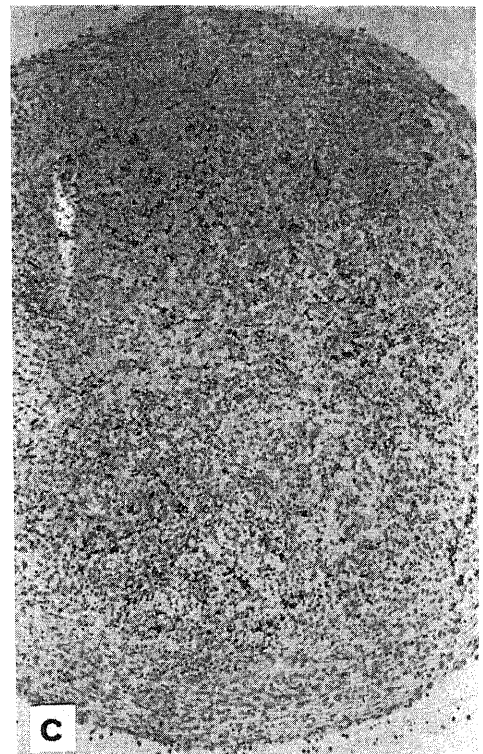
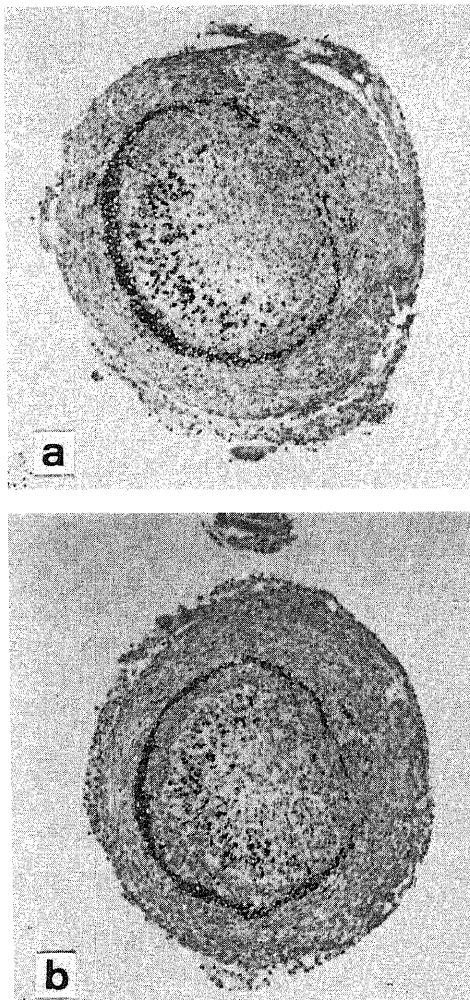


Fig. 8. Light micrographs of transverse sections of S and CM tubes 2 weeks after implantation.

- a) C section of S tube;
- b) D-2mm section of S tube;
- c) P-2mm section of CM tube.

Immunohistochemical stain for neurofilament.  $\times 75$ .

の中央よりもゲル周辺で高くなった。一方、S'-2, 3, 4 チューブ群においては、移植されたシュワン細胞の多くは球状ないし短紡錘形の形態に留まり、一定の方向性をもって配列は認められなかった(図 5-c,d)。S'チューブ群において、ミリポアの膜とゲルは10日目には開離しており、その間には漿液性の液体が貯留していた。収縮したゲルには、ミリポアの膜をこえて外部からシュワン細胞が侵入してくることはなかった(図 5-e,f)。

III. チューブ内の神経再生について

1. 肉眼的所見

Sチューブ群(図 6-a,d) : 5日目では、充填したコラーゲンゲルは収縮し、開離したゲルとシリコンチューブとの間は、淡黄褐色の漿液で充されていた。以後経時的に、ゲルは両端から侵入する組織にとりかこまれていった。3週目以後は、両側神経断端は、

光沢のある乳白色の組織で架橋されていた。

CM チューブ群(6-b,e) : 5日目では、充填したコラーゲンゲルが収縮していたが、Sチューブ群に比べ軽度であった。両側から侵入する組織は、ゲルを置換する形で増殖し、3週目に淡紅褐色の太い組織で架橋された。この間、残存するコラーゲンゲルと侵入組織との境界は明瞭であった。3週目から6週目まで、架橋組織は外径を減じ、また4週目からは光沢を有するようになった。

Dチューブ群 : CMチューブ群とほぼ同様の経過をたどった。

Pチューブ群(図 6-c,f) : 5日目では、内腔は淡黄褐色の液で充されており、その中央にはフィブリンが凝集し、両側神経断端を架橋していた。7日目以後両側から組織がフィブリンを置換しつつ増殖し、12日目に、両側神経切断部は細長い組織によって連

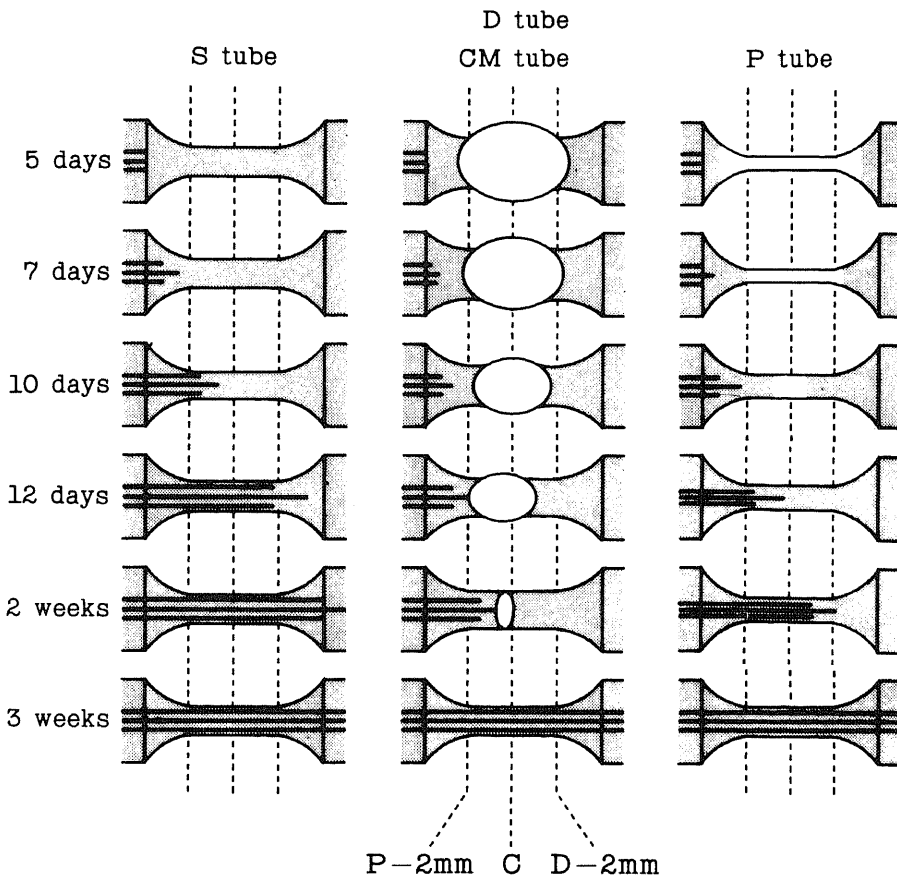


Fig. 9. Scheme of spatial-temporal progression of the regenerated axons and Schwann cells in implanted tubes.

▨ Area containing S 100 protein-positive cells. ▨ Regenerative axons.

続した。その後4週目までに、架橋組織は、淡紅褐色から乳白色へと変色した。

## 2. 組織学的所見

Sチューブ群：5日目にはコラーゲングル内にびまん性に S100 蛋白陽性の紡錐形細胞（シュワン細胞）が散在していた。後述する如く、CM チューブ群では、移植早期に残存しているコラーゲングル内にシュワン細胞はみとめられないので、この細胞は移植された培養シュワン細胞と考えられた。移植シュワン細胞は、7日目にはチューブの長軸方向に沿って縦列する傾向がみられたが、10日目ではその傾向が明瞭となった。横断面で、シュワン細胞はゲルの中央部よりも辺縁部で密度が高かった。両側から侵入する組織は、基質であるコラーゲンを吸収置換していった。とくにゲル中央部よりも辺縁部でその進行は速く、12日目には、両側から侵入した組織が合流連結した。

再生軸索の S チューブへの侵入は、7日目に明ら

かであった。軸索は、侵入した組織内とコラーゲングル内の紡錐形細胞に接して伸長していた。10日目には、P-2mm を通過し、12日目には D-2mm に達していた（図 7-a）。2週目にはかなりの数の軸索が D-2mm を通過し（図 8-b）、一部は末梢側神経内に侵入していた。横断切片標本で明らかなように、再生軸索は、充填したコラーゲングルの中央部よりも辺縁部に密集していた（図 8-a,b）。

CM チューブ群：5日目には、両側神経断端部にシュワン細胞を含む組織が増殖していた。少数の炎症細胞と紡錐形細胞とが、侵入した組織近傍のコラーゲングル内に認められたが、これらの細胞は S100 蛋白陰性であった。以後、チューブ内のコラーゲンは両端から吸収され、両側から侵入する組織によって置換されていった。3週目に、神経断端は両側から侵入した組織で架橋され、全長にわたってシュワン細胞が縦列していた。

再生軸索は、2週目までは中枢側神経断端から侵

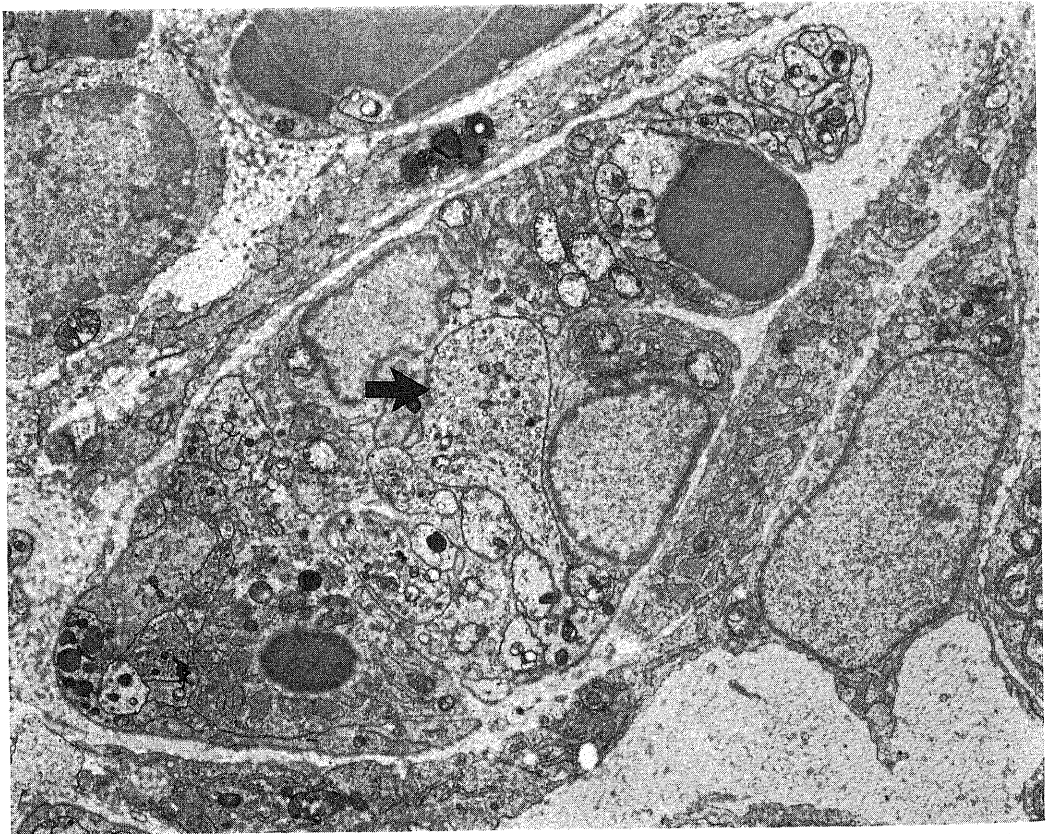


Fig.10. Electronmicrograph at a P-2mm section of regenerative tissue in the CM tube 2 weeks after implantation.

A growth cone or regenerated axon (arrow) is seen.  $\times 6,000$ .

入する組織の進行に一致して伸長しており、その組織に先行して、コラーゲングル内に侵入する軸索は認められなかった。再生軸索は12日目に P-2mm 付近に達し (図 7-b)、2週目で平均約 3.4mm 伸長していた。3週目には、軸索は末梢側神経内へ侵入していた。横断面で観察すると、再生軸索は再生神経幹の中央部に一様に分布しており (図 8-c)、S チューブ群でみられたような偏った進行態度は示さなかった。

D チューブ群：5日目に、コラーゲングル内には、炎症細胞や S100 蛋白陽性の生存細胞は認められなかった。その後の経過は、CM チューブ群と同様であった。

P チューブ群：5日目は両側神経断端から侵入する組織が、フィブリン基質に沿って増殖していた。この組織内にはシュワン細胞が混在していた。その組織先進部に近接するフィブリン基質内にも少数の紡錘形細胞と炎症細胞を認めたが、この部分の細胞

は S100 蛋白陰性であった。12日目には両側から侵入したシュワン細胞はチューブの中央付近で連続し、2週目には縦走配列した。

中枢側神経断端から伸長してきた再生軸索が、7日目に肉芽組織内に認められた。軸索は、12日目までは、中枢側の神経組織の増殖、進行に追従して伸長し、12日目に P-2mm を通過して中央付近に達していた (図 7-c)。2週目には D-2mm 付近に達し、3週目には末梢神経内へ侵入していた。横断面で観察すると、CM チューブ群同様、再生軸索は架橋組織の中央部にほぼ均一に分布していた。

3週目までの再生軸索の伸長距離とシュワン細胞の分布状態を各移植チューブ実験群ごとに平均化し、図 9 に模式的に示した。

### 3. 電子顕微鏡的所見

CM チューブ、P チューブでは、伸長する再生軸索は常に、中枢から侵入した血管内皮細胞、線維芽細胞、シュワン細胞、大食細胞などからなる肉芽組

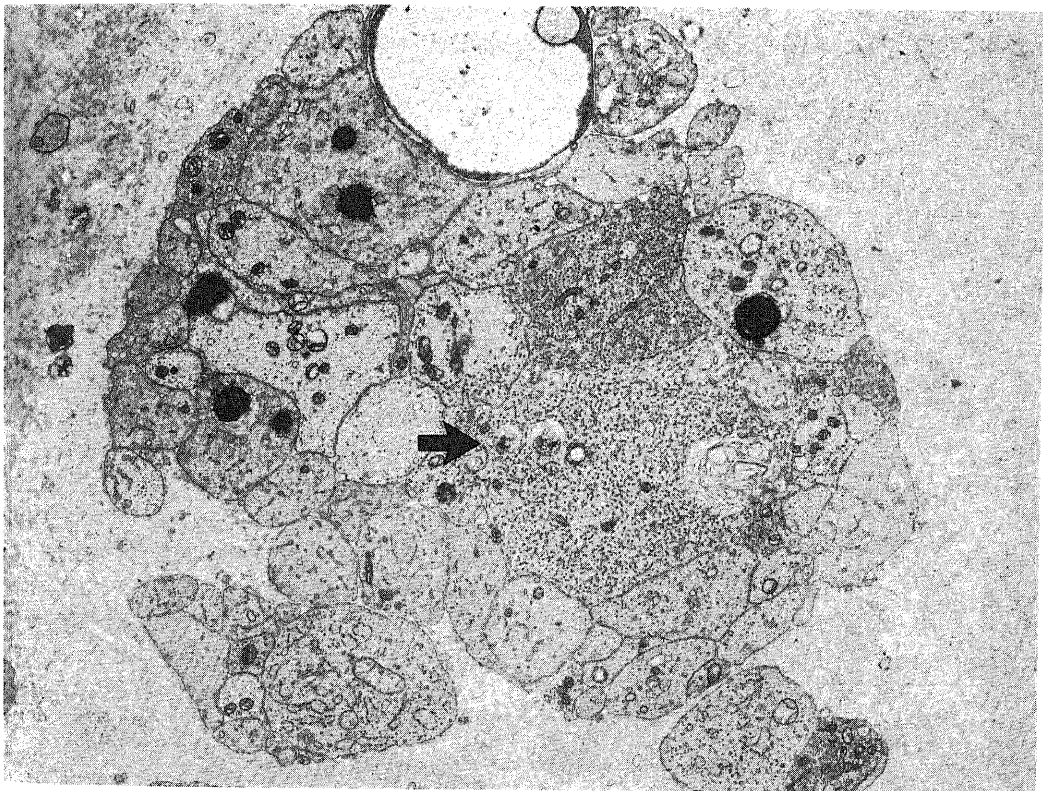


Fig.11. Electronmicrograph at 1mm distance from the proximal stump in the S tube 7 days after implantation. A growth cone of regenerated axon (arrow) is surrounded by transplanted Schwann cells.  $\times 6,000$ .

織内のシュワン細胞に接触もしくは囲まれていた(図10)。それに対してSチューブの7日目の所見では、周囲にCM-IAが残存する中で、シュワン細胞に囲まれた再生軸索の先端が認められた(図11)。これは、中枢からの侵入組織が存在していないので、移植したシュワン細胞と考えられた。

#### 4. 再生神経幹における所見

移植4週から12週における再生神経幹の直径、再生有髄神経の数について、トルイジン青染色を施して計測した結果を表1にまとめた。再生有髄神経の数はどの実験群においても12週までは増加傾向を認めたが、S, Pチューブに比してCM, Dチューブは少ない傾向にあった。SチューブとPチューブの間にはほとんど差はなかった。

### 考 察

末梢神経の組織欠損が著しい場合、この欠損部を補うために、通常遊離自家神経移植が行われている<sup>1)</sup>。しかし、移植神経採取部に愁訴が残ることや採取神経の長さや太さに限界があることから、新しい移植材料の研究が進められている。最近神経欠損部を空管で架橋しようとする実験が、種々報告されている<sup>4)~10)</sup>。最も繁用されているシリコンチューブ内(本研究でPチューブに相当)の軸索再生様式についてはかなり詳細に調べられている<sup>11)~19)</sup>。移植チューブの条件は、体液の浸透性を十分保ちながら炎症細胞の侵入を防ぎ、さらに末梢神経断端に由来すると考えられているNGF様物質の拡散を防げるというこ

とであるが<sup>20)</sup>、現在のところこの条件を満たすチューブはない。

最近では、チューブの材質の他にチューブ内腔の基質についても研究されている。その一つにコラーゲンゲルを使った実験がある<sup>21)~24)</sup>。コラーゲンが再生軸索やシュワン細胞の足場となり、またNGF様物質の保持にも役立つとして末梢神経の再生促進に有効であるとする意見がある<sup>22)</sup>。しかし、一方、Valentiniら<sup>20)</sup>の述べる如く、コラーゲンは再生阻害に働いても、決して促進することはないとする報告もあり、コラーゲンをを用いた再生実験の評価は一定していない。今回の実験ではPチューブ群のほうがCMチューブ群に比べて再生軸索の伸長が促進されていた。したがって、コラーゲンは再生軸索の伸長を阻害すると考えられる。コラーゲンに、NGFやラミニンなどの軸索伸長を促進すると考えられる物質を混ぜたチューブ移植の報告<sup>25)</sup>もあるが、これらの物質は非常に不安定で失活しやすく、その上、NGFは、効果発現に関してそれぞれの神経細胞特異性がきわめて強い<sup>26)</sup>。したがって、このような物質のみでは切断末梢神経の軸索再生の成績向上にはつながらないように思われる。

本研究では、シリコンチューブ内に封入した培養シュワン細胞が、軸索再生を促進する移植材料になり得るかを検討した。シュワン細胞を単離培養する方法は、大別して3種類の方法が知られている。第一はWood<sup>26)</sup>やBungeら<sup>27)</sup>の方法で、胎児もしくは新生仔のラットの後根神経節をコラーゲン上で培養し、後根神経節に混在する線維芽細胞を抗腫瘍剤であるシトシンアラビノシド(Ara-C)と5-フルオロウラシル(5-FU)を用いて殺す方法である。この方法ではAra-c, 5-FUによるシュワン細胞への殺細胞効果を見逃せず、採取されたシュワン細胞が、正常の機能を失う可能性がある<sup>16)</sup>。第二は、Brockesら<sup>17)</sup>の、免疫反応による細胞障害作用を利用して坐骨神経よりシュワン細胞を採取する方法である。この方法は、Ara-Cを用いて線維芽細胞の増殖をおさえ、さらにThyl-1という線維芽細胞膜表面と反応するシュワン細胞とは反応しない抗体を反応させ、補体を加えて混在する線維芽細胞を溶解させようというものである。この方法で得られたシュワン細胞の純度は高いが、操作が煩雑で特殊な抗体を必要とする。また抗腫瘍剤を用いている点も問題が残る。Bungeら<sup>27)</sup>及びBrockesら<sup>17)</sup>のどちらかの方法にしても、えられる細胞すべてがシュワン細胞ではなく、少数の線維芽細胞の混在は避けられない。第三の方法は、

Table 1. Diameter( $\phi$ ) of regenerated tissues and number of myelinated axons (My) at D-2mm sections in experimental tubes 4 weeks (W) and more after implantation.

		4 W	6 W	8 W	12 W
S tube	$\phi$	0.86	0.70	0.73	0.73
	My	5,064	5,544	7,920	8,292
CM tube	$\phi$	0.63	0.65	0.68	0.68
	My	1,236	4,724	4,400	6,264
P tube	$\phi$	0.73	0.82	0.80	0.62
	My	5,680	5,480	8,608	8,232
D tube	$\phi$	0.53	—	0.85	—
	My	1,072	—	5,976	—

Normal sciatic nerve My 6,914

浜岡ら<sup>28)</sup>が報告している二重寒天培地を用いた方法である。これは、線維芽細胞が寒天内では増殖が抑制されコロニーを形成できないのに対し、シュワン細胞がコロニーを形成することを利用して分離する方法である。この方法を用いることで、100%純粋なシュワン細胞を入手することは可能であるが、採取細胞が少ないことが欠点である。そこで、本実験では、以上の3つの方法の欠点を補った Askanas ら<sup>10)</sup>の explant-reexplant method に準じてシュワン細胞を分離した。この方法は、細胞殺傷性の薬剤を使うことなく簡単に大量のシュワン細胞が採取できる利点がある。ただし、本法でも得られる細胞は100%シュワン細胞ではないことは成績の章で示した通りである。

こうして得たシュワン細胞を CM-IA に埋入して、シリコンチューブにつめることで本研究の移植材料とした。近年、培養したシュワン細胞を末梢神経や中枢神経に移植すると、移植したシュワン細胞が軸索を囲んでミエリン鞘を形成するのみならず、コリン作動性神経軸索を伸長させるという報告もあり<sup>29,30)</sup>、培養シュワン細胞は *in vivo* の実験系にもどしても充分機能することが確かめられている。

神経断端に縫いつけた S チューブ群では、7日目から10日目で埋入したシュワン細胞が長軸方向に縦列した。S チューブではこのシュワン細胞が host より増生したものかもしれないという疑問が残るが、この現象はミリポアの膜で S チューブの両端を閉鎖して細胞の侵入を防いだ S'-1 群の場合にも同様に認められた。S' チューブにおいて、ミリポアの膜とゲルの境界付近の組織所見から、神経断端より侵入してきたシュワン細胞でないことは明らかである。一度培養系にもどしたシュワン細胞が *in vivo* で再びこのような縦列形態を取ることは興味深い。プラスチック上の培養で、細胞がお互い接触し合って鎖状につながることはしばしば観察されるが、このように一定の方向性をもって平行に配列することはない。また、三次元培養では一般にシュワン細胞は球状もしくは短紡錘形の形態をとる。したがって、移植したシュワン細胞は *in vitro* の培養系にはない何らかの因子に反応して、伸長し縦列していると考えられる。片側のみ神経断端が存在している S'-2,3 群のシュワン細胞においてはこの現象をみることはできないので、移植されたシュワン細胞が両側の神経断端を認知して縦列しているものと考えられる。少なくとも神経断端との直接接触がなくとも縦列は生じること、また、非切断神経近傍に放置した S'-4 群ではこ

のような現象は生じないことより、これは両側神経断端に由来する何らかの液性因子が関与している可能性が高いと思われる。

現在までの神経再生の方向性についての研究のほとんどが軸索についてであり、大部分は軸索とシュワン細胞が混在している *in vivo* の実験か<sup>31,32)</sup>、または後根神経節細胞培養による軸索の伸長をみた *in vitro* の実験であった<sup>33)</sup>。つまり、シュワン細胞独自の方向性に関する研究は今までのところない。今回の結果から、軸索が存在せず、基質のコラーゲンに方向性がない状況でも、シュワン細胞には方向性をもって配列する性格があることが明らかとなった。神経が再生する場合には、両断端が方向性のないフィブリン様物質で架橋され、次第に縦方向の線維配列となり、これにシュワン細胞が侵入してきて、長軸方向に縦列していくことが知られている<sup>11)</sup>。このシュワン細胞の縦列は、再生軸索やフィブリン様構造物に影響されていると考えるよりも、むしろ両側断端からの液性因子により、独自の性格として縦列していくものと考えられる。以上の所見から、これまで神経向性因子の研究は再生軸索にのみ主眼がおかれてきたが、今後はシュワン細胞にも注目していくことが重要と考えられた。

本研究では、S チューブ群では対照群に比べて再生軸索の伸長が促進されることが明らかになった。S チューブ内には、移植後5日目から7日目の間に軸索の侵入が開始するのであるが、伸長速度の速い軸索では14日目に末梢側に到達しているため、少なくとも8mmの距離を7日から9日で進んだことになる。これは、自家神経移植実験におけるラットの軸索伸長速度1.15mm/日の報告に近い<sup>34)</sup>。死滅したシュワン細胞を含有するDチューブでは、コラーゲンのみのCMチューブとほぼ同様の結果で軸索の伸長はSチューブより遅延した。このことは死滅したシュワン細胞には軸索伸長を促進する何らの作用も因子もないことを示している。特に注目されることは、Sチューブでは移植したシュワン細胞が早期に縦列することである。これがCMチューブ、Pチューブ、Dチューブとの相違点である。したがって、縦列したシュワン細胞が存在するために中枢側神経断端からシュワン細胞の遊走を待たずして軸索は伸びていけるものと考えられる。移植したシュワン細胞は、CM-IAの退縮に伴い、周辺部分に密度が高くなる。その部分に集中して軸索の再生を見ることも、その傍証といえよう。この時期の電顕的観察では、再生軸索は移植されたと推定されるシュワン



細胞表面に沿って伸長している。最近, *in vivo* や *in vitro* の実験からシュワン細胞膜表面, もしくは, シュワン細胞が分泌するある種の神経突起成長因子が, 軸索の伸長にきわめて重要な働きをしていることが明らかにされつつある。Heumann ら<sup>36)</sup>は, ラット坐骨神経を切断すると早期に切断部近傍, 特に末梢側のシュワン細胞が NGF を産生することを示し, Assouline ら<sup>16)</sup>は, 培養シュワン細胞が培養液中に NGF とは異なる神経突起成長因子を分泌することを報告している。局所で産生された NGF や NGF 様神経突起成長因子は, シュワン細胞膜表面からレセプターを介して再生軸索に吸収され, 神経細胞の栄養と再生軸索の誘導を行っているらしい<sup>36,37)</sup>。さらに, シュワン細胞が生成・分泌する細胞外物質, 特に基底膜<sup>38)</sup>や, その構成成分の一つであるラミニン<sup>39)</sup>, あるいはラミニンとヘパラン硫酸を含むプロテオグリカン複合物<sup>40)</sup>が末梢神経軸索の再生を誘導, 促進することも知られている。以上のようなこれまでの諸家の実験結果を考慮すると, 本研究でも, 移植されたと推定されたシュワン細胞の産生する種々の細胞外物質や細胞膜成分を介して, 神経欠損部における再生軸索の伸長が促進されていると推測される。

4週目に降にみられる再生軸索数, 再生神経幹の太さについてはかなり個体差があった。しかし, 全体的な傾向としては, コラーゲンゲルを封入した CM, Dチューブ群は Pチューブ群に比べて再生神経幹の直径, 有髄神経の数において劣っていた。これは CM-IA が神経の再生に対してむしろ阻害的に作用しているためであろう。長期的にみると Sチューブ群と Pチューブ群の成績にはほとんど差がなかったが, これは移植したシュワン細胞が10万個と少なかったことが影響しているのかもしれない。あるいは逆に, CM-IA の再生阻害作用に対し, 生きたシュワン細胞が相殺効果を及ぼした結果とも考えることができるかもしれない。現在臨床的に最も信頼できる方法として血管柄付神経移植が注目されており<sup>41)</sup>, その理論は移植した神経内のシュワン細胞の死滅を最小限として, 軸索伸長に役立てようとする試みである。我々の培養シュワン細胞移植もこの観点から, 将来有効な手段の一つになる可能性があると思われる。現時点では, このような人工的移植チューブを臨床応用するためには, まだかなりの課題が残されている。その第一は, ヒトシュワン細胞の培養技術の開発で, 本人から採取した神経片から, シュワン細胞を短期間に大量に得る方法が必要である<sup>42)</sup>。それに加えて, シュワン細胞を移植するための基質, 生

理的に好都合なチューブなどの開発も必要であり, 臨床的にはなお多くの基礎的研究を積み重ねねばならない。

## 結 果

末梢神経再生における培養シュワン細胞移植の有用性について, ラット坐骨神経を用いて検討した結果, 次の結論を得た。

1. 単離培養シュワン細胞10万個をコラーゲンゲルの基質内に容れた Sチューブ (内径 2mm, 長さ 10mm のシリコン外筒) を, 離断した坐骨神経間に移植すると, 移植時に球形であったシュワン細胞は, 移植後 7~10日目には細長い紡錘形細胞となり, チューブの長軸方向に平行に縦列した。このような現象は両端をミリポアの膜で閉鎖し神経断端よりのシュワン細胞の侵入を阻止した S'チューブにおいても同様に認められたので, 移植したシュワン細胞に生じた現象であることがわかった。この現象は S'チューブの片側, または両側を神経断端から遊離した場合にはみられなかった。したがって, 両側神経断端から放出される何らかの液生因子が, 移植したシュワン細胞の形態と配列に影響を与えているものと推定された。

2. Sチューブ実験群では, 中枢側神経断端から再生した軸索は, 12日目にはチューブの中央から 2mm 末梢側に到達し, 14日目には末梢側神経内へ侵入した。これに対し, コラーゲンゲルのみの CMチューブ, 死滅シュワン細胞埋入の Dチューブの場合には, 再生軸索の伸長は遅れ, チューブ中央を通過するのは14日目以後であり, 生理食塩水を容れた Pチューブでは12日目であった。したがって, Sチューブでは移植シュワン細胞は長軸方向に平行に縦列する事実と共に, 再生軸索伸長に際し誘導的役割を果たすものと考えられた。

3. CMチューブとDチューブの場合においては, SチューブやPチューブに比べて再生軸索が明らかに少なかった。したがって, コラーゲンゲル自体は軸索再生に関してむしろ阻害的に働くものと考えられた。

## 謝 辞

稿を終るに臨み, 御指導, 御校閲を賜った恩師野村進教授に深甚なる謝意を表します。また御教示を戴いた第一病理学教室, 中西功夫教授に心から感謝いたします。

本研究の遂行に際し, 御協力を戴いた第一病理学教室, 小田恵夫博士に感謝の意を表します。

本研究の一部は昭和62年度文部省科学研究費補助金 (B)



63570696号の援助を受けたことを感謝いたします。

### 文 献

- 1) Millesi, B. Y., Meissl, G. & Berger, A.: The interfascicular nerve-grafting of the median and ulnar nerves. *J. Bone Joint Surg.*, 54-A, 727-750 (1972).
- 2) Anderson, P. N., Mitchell, J., Mayor, D. & Stauber, V. V.: An ultrastructural study of the early stages of axonal regeneration through rat nerve grafts. *Neuropath. and Applied Neurobiol.*, 9, 455-466 (1983).
- 3) Tomita, K., Masuyama, S. & Nomura, S.: Fresh nerve xenografts administration and discontinuation of an immunosuppressive agent. *Neuro Orthopedics*, 2, 95-100 (1986).
- 4) 末松典明, 平山隆三, 熱田祐司, 渡壁 誠, 柴田 稔: 末梢神経欠損部への静脈移植法の実験的研究. *日手会誌*, 3, 98-101 (1986).
- 5) Lundborg, G. & Hansson, H. A.: Nerve regeneration through performed pseudosynovial tubes. *J. Hand Surg.*, 5-A, 35-38 (1980).
- 6) Lundborg, G. Hansson, H. A.: Regeneration of peripheral nerve through a preformed tissue space. Preliminary observations on the reorganization of regenerating nerve fibers and perineurium. *Brain Res.*, 178, 573-576 (1979).
- 7) Restrepo, Y., Merle, M. Michon, J., Folliquet, B. & Petry, D.: Fascicular nerve graft using an empty perineurial tube: An experimental study in the rabbit. *Microsurgery*, 4, 105-112 (1983).
- 8) Lundborg, G., Dahlin, L. B., Danielsen, N., Gelberman, R. H., Longo, F. M., Powell, H. C. & Varon, S.: Nerve regeneration in silicone chambers: Influence of gap length and distal stump components. *Exp. Neurol.*, 76, 361-375 (1982).
- 9) Seckel, B. R., Chiv, T. H., Nyilas, E. & Sidman, R. L.: Nerve regeneration through synthetic biodegradable nerve guides: Regulation by the target organ. *Plast. Reconstr. Surg.*, 74, 173-181 (1984).
- 10) Bassett, C. A. L., Campbell, J. B. & Husby, J.: Peripheral nerve and spinal cord regeneration: Factors leading to success of a tubulation technique employing millipore. *Exp. Neurol.*, 1, 386-406 (1959).
- 11) 野村 進: 末梢神経縫合部の線維構造について. *災害医学*, 9, 519-527 (1966).
- 12) Lundborg, G., Dahlin, L. B., Danielsen, N., Hansson, H. A., Johannesson, A., Longo, F. M. & Varon, S.: Nerve regeneration across an extended gap: A neurobiological view of nerve repair and the possible involvement of neuronotrophic factors. *J. Hand Surg.*, 7-A, 580-587 (1982).
- 13) Bunge, R. P.: Contributions of tissue culture studies to our understanding of basic processes in peripheral nerve regeneration. Gorio, A., Millesi, H. & Mingrino, S. (eds), *Posttraumatic Peripheral Nerve Regeneration*, 1st ed., p105-113, Raven Press, New York, 1981.
- 14) Assouline, J. G., Bosch, P., Lim, R., Kim, I. S., Jensen, R. & Pantazis, N. J.: Rat astrocytes and Schwann cells in culture synthesize nerve growth factor-like neurite-promoting factors. *Dev. Brain Res.*, 31, 103-118 (1987).
- 15) Aguayo, A. J.: Construction of graft. Gorio, A., Millesi, H. & Mingrino, S. (eds), *Posttraumatic Peripheral Nerve Regeneration*, 1st ed., p365, Raven Press, New York, 1981.
- 16) Askanas, V., Engel, W. K., Dalakas, M. C., Lawrence, J. V. & Caryer, L. S.: Human Schwann cells in tissue culture. *Arch. Neurol.*, 37, 329-337 (1980).
- 17) Brockes, J. P., Fieldes, K. L. & Raff, M. C.: Studies on cultured rat Schwann cells: establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res.*, 165, 105-118 (1979).
- 18) Hsu, S. M., Raine, L. & Fanger, H.: A comparative study of the PAP method and avidin-biotin-complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.*, 75, 734-738 (1981).
- 19) Longo, F. M., Manthorpe, M., Skaper, S. D., Lundborg, G. & Varon, S.: Neuronotrophic activities accumulate *in vivo* within silicone nerve regeneration chambers. *Brain Res.*, 261, 109-117 (1983).
- 20) Lundborg, G., Gelberman, R.H., Longo, F.

- M., Powell, H. C. & Varon, S. :** In vivo regeneration of cut nerves encased in silicone tubes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **41**, 412-422 (1982).
- 21) Hurtado, H., Knoops, B. & Phillippe Van Den Bosch Deaguilar :** Rar sciatic nerve regeneration in semipermeable artificial tubes. *Exp. Neurol.*, **97**, 751-757 (1987).
- 22) Satou, T., Nishida, S., Hiruma, S., Tanji, K., Takahashi, M., Fujita, S., Mizuhara, Y., Akai, F. & Hashimoto, S. :** A morphological study on the effects of collagen gel matrix on regeneration of severed rat sciatic nerve in silicone tube. *Acta Pathol. Jpn.*, **36**, 199-208 (1986).
- 23) Valentini, R. F., Aebischer, P., Winn, S. R. & Galletti, P. M. :** Collagen-and Laminin-containing gels impede peripheral nerve regeneration through semipermeable nerve guidance channels. *Exp. Neurol.*, **98**, 350-356 (1987).
- 24) Yannas, I. V., Orgill, D. P., Silver, J., Norregaard, T. V. Zervas N. T. & Shoene, W. C. :** Polymetric template facilitates regeneration of sciatic nerve across 15mm gap. *Trans. Soc. Biomat.*, **11**, 146 (1985).
- 25) McOuarrie, I. G. :** Acceleration of axonal regeneration in rat somatic motoneurons by using a conditioning lesion. Gorio, A., Millesi, H. & Mingrino, S. (eds). *Posttraumatic Peripheral Nerve Regeneration*, 1st ed., p49-58, Raven Press, New York, 1981.
- 26) Wood, P. M. :** Separation of functional Schwann cells and neurons from normal peripheral nerve tissue. *Brain Res.*, **115**, 361-375 (1976).
- 27) Bunge, M. B., Williams, A. K. & Wood, P. M. :** Neuron-Schwann cell interaction in basal lamina formation. *Dev. Biol.*, **92**, 449-460 (1982).
- 28) 浜岡寛士, 富田勝郎, 野村 進, 中西功夫, 小田憲夫 :** 二重寒天培地を用いたシュワン細胞培養法. *日整会誌*, **61**, S136 (1987).
- 29) Kromer, L. F. & Cornbrooks, C. J. :** Transplants of Schwann cell cultures promote axonal regeneration in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6630-6634 (1985).
- 30) Aguayo, A. J., Bunge, R. P., Duncan, I. D., Wood, P. M. & Bray, G. M. :** Rat Schwann cells, cultured in vitro, can ensheath axons regenerating in mouse nerves. *Neurology*, **29**, 589 (1979).
- 31) Cajal, S. R. Y. :** Experiments dealing with the transplantation of nerves or their products designed to prove especially an attractive or neurotrophic action on nerve sprouts. *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*, p329-361, Oxford University Press, London, 1928.
- 32) Politis, M. J. Ederle, K., & Spencer, P. S. :** Tropism in nerve regeneration in vivo. Attraction of regenerating axons by diffusible factors derived from cells in distal nerve stumps of transected peripheral nerves. *Brain Res.*, **253**, 1-12 (1982).
- 33) Bunge, R. P. & Wood, P. :** Studies on the transplantation of spinal cord tissue in the rat. *Brain Res.*, **57**, 261-276 (1973).
- 34) McCullough, C. J., Gagey, O., Higginson, D. W., Sandin, B. M., Crow, J. C. & Sebill, A. :** Axon regeneration and vascularization of nerve grafts. *J. Hand Surg.*, **9-B**, 323-327 (1984).
- 35) Heumann, R., Korsching, S., Bandtlow, C. & Thoenen, H. :** Changes of nerve growth factor synthesis in non-neuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J. Cell Biol.*, **104**, 1623-1631 (1987).
- 36) Taniuchi, M., Clark, H. B., Schweitzer, J. B. & Tohson, E. M. Jr. :** Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: Ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. *J. Neurosci.*, **8**, 664-681 (1988).
- 37) Sandrock, A. W. Jr. & Matthew, W. D. :** Substrate-bound nerve growth factor promotes neurite growth in peripheral nerve. *Brain Res.*, **425**, 360-363 (1987).
- 38) Ide, C., Tohyama, K., Yokota, R., Nitatori, T. & Onodera, S. :** Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Res.*, **288**, 61-75 (1983).
- 39) Mathorpe, M., Engvall, E., Ruoslahti, E., Longo, F. M., Davis, G. E. & Varon, S. :** Laminin promotes neuritic regeneration from cultured peripheral and central neurons. *J. Cell*

Biol., 97, 1882-1890 (1983).

40) Sandrock, A. W. & Matthew, W. D.: Identification of a peripheral nerve neurite growth-promoting activity by development and use of an *in vitro* bioassay. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 6934-6938 (1987).

41) Taylor, G. I. & Ham, F. J.: The free

vascularized nerve graft. Plast. Reconstr. Surg., 57, 413-425 (1976).

42) Pleasure, D., Kreider, B., Shuman, S. & Sobue, G.: Tissue culture studies of Schwann cell proliferation and differentiation. Dev. Neurosci., 7, 364-373 (1985).

**Experimental Studies on the Role of Transplanted Schwann Cells on Peripheral Nerve Regeneration** Kazuo Ikeda, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 97, 733—749 (1988)

Key words: schwann cell, nerve graft, peripheral nerve, regeneration

#### Abstract

The purpose of the present work is to evaluate the role of transplanted Schwann cells on the regeneration of transected peripheral nerves. Silicone tubes, 10mm in length and 2mm in inner diameter, that contained viable Schwann cells ( $1.0 \times 10^5$  cells/tube) in collagen gel matrix (S tube) were used for transplantation. Schwann cells were isolated from sciatic nerves of neonate Wistar rats and cultured three times for cell purity. S tubes were implanted in an 8mm gap between proximal and distal nerve stumps of transected sciatic nerves of adult Wistar rats, and were examined under light microscope and electronmicroscope over a certain period of time. As controls, tubes with collagen gel (CM tube), tubes with collagen gel matrix containing dead Schwann cells (D tube) and tubes with physiological saline (P tube) were used. Furthermore, S tubes, both ends of which were closed with Millipore membrane, were prepared (S' tube). Then, the following 4 types of experiments were performed: S' tubes were implanted between proximal and distal nerve stumps (S'-1), the proximal end of the S' tube was only attached to the proximal stump (S'-2), the distal end of the S' tube was only attached to the distal stump (S'-3), and the S' tube was implanted along the intact nerve (S'-4). Transplanted Schwann cells in S and S'-1 tubes became spindle in shape and lined up longitudinally parallel with each other at 7~10 days after surgery, while Schwann cells in S'-2,3,4 tubes remained bulbous and did not line up. It is suggested that Schwann cells may line up longitudinally due to unknown factors from both ends of nerve stumps. The regenerating axons growing into S tubes rapidly ran along the transplanted Schwann cells, which obviously passed the center of the S tube at 12 days and reached the distal nerve stump at 2 weeks after surgery. However, regenerating axons in cases of CM, D, and P tubes reached the distal nerve stump after 3 weeks. After 4 weeks, regenerating myelinated axons increased in number in S and P tubes, but became fewer in CM and D tubes. These findings indicate that the collagen gel matrix itself may impede the regenerative process of peripheral nerves. From the present study it is concluded that the transplantation of cultured Schwann cells may be useful for nerve regeneration.