



Effects of Prelesioned Peripheral Nerve Graft on Nerve Regeneration in the Rat Spinal Cord

妹尾, 栄治

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-11-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2279

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002279>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	妹 尾 栄 治	（徳島県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博ろ第1658号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成10年11月11日	
学位論文題目	Effects of Prelesioned Peripheral Nerve Graft on Nerve Regeneration in the Rat Spinal Cord （ラット脊髄再生における既損傷末梢神経移植の効果）	

審査委員	主査 教授 玉 木 紀 彦	
	教授 寺 島 俊 雄	教授 岡 村 均

論文内容の要旨

はじめに

長年の間、中枢神経線維の再生能力はないと考えられてきたが、近年になり末梢神経を視神経や脊髄に移植する実験が行われ、切断された神経線維がシュワン細胞の支持を得ることで再生できる事が明らかにされた。これらの報告は回復が悲観的であった中枢神経の損傷で、自己のシュワン細胞を利用する新たな可能性として期待できるものである。しかし現段階では再生する神経線維の数は限られており、移植するシュワン細胞の量的または何らかの機能的不足が推察される。

従来シュワン細胞の移植実験の多くは末梢神経を組織片として単に摘出した状態で用いた為、移植片内のシュワン細胞の条件は限られていた。今回我々は末梢神経の損傷部で、その近位側の再生部に現われる幼若なシュワン細胞に注目した。このシュワン細胞は再生軸索に沿って遊走する細胞で近位端の親細胞から分裂し、活発に増殖する性質を持っている。また神経細胞体の生存や神経軸索の伸長に必要な栄養因子も豊富に発現することが期待できる。本研究は、このような“反応性”シュワン細胞が中枢神経の再生修復に対してより促進的に働くか否かを調べる目的で行われた。

実験はラットの坐骨神経から分岐して平行に走る総腓骨神経と脛骨神経を移植片として用いた。総腓骨神経は7日間結紮し、シュワン細胞を反応性に増殖させ、この神経片と平行に走る無処置の脛骨神経の神経片を一塊の移植片として摘出した。そしてこの移植片を一部の組織を除去した脊髄後索に自家移植し、1～16週後において再生軸索の伸長とシュワン細胞や脊髄グリア細胞の関与について形態学的に比較検討を行った。

方法と対象

Sprague-Dawley 系ラット10～15週齢、250～400g、雄を合計41匹使用した。

移植片の作製：坐骨神経を露出して遠位側にたどり、総腓骨神経のみを6～0絹糸で結紮し、平行に走る脛骨神経は温存した。

移植手術：結紮後7日目にC1椎弓を切除し、上部頸髄部を露出して、両側の後索を約1mm角に除去した。次に7日前の総腓骨神経の結紮部を露出して糸を除去した後に、その近位側の神経片を平走

する腓骨神経と一塊（約1 mm 角）にして摘出した。そしてこの移植片の結合組織を除去し、脊髄後索に移植した。この際移植片は、既損傷側の総腓骨神経片と無処置側の脛骨神経片とが後正中溝を境に対称になるよう、各々左側もしくは右側後索に接するように移植した。

光顕および電顕観察：移植後1～2週（6匹）、4～8週（10匹）、12～16週（10匹）で、2.5% glutaraldehyde, 5% paraformaldehyde, 0.1mol/L cacodylate buffer (pH7.4) の混合液を使用して経心臓的に灌流固定を行い、移植部を中心に脊髄組織を摘出した。そしてこれらの組織を1 mmの厚さで冠状断（後索の線維が長軸方向に沿い正中で左右の後索が対称に見える断面）矢状断、横断にトリミングして、1% osmium で後固定を行い、段階的なエタノール脱水後にエポン812で包埋した。これらのブロックから準超薄切片を作製し、トルイジンブルー染色を行い光学顕微鏡で観察した。そして透過型電子顕微鏡用として超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛による二重染色を行った。

結果

移植片：結紮7日後に摘出した移植片で、既損傷側のシュワン細胞と無処置側のシュワン細胞の数を比較した。既損傷側は無処置側の約5倍の数で、結紮によりシュワン細胞が増殖したのを確認できた。移植後1～2週：移植片の尾側と後索の接触する部位、すなわち後索の再生軸索が移植片内に伸長する“移行部”を識別でき、特にこの“移行部”から移植片内に注目して観察した。

無処置側と既損傷側の移植片内は結合組織や細胞片、マクロファージにより占められたが、既損傷側の一部では、すでにシュワン細胞に囲まれた再生軸索を認めた。移行部に注目すると、無処置側ではミトコンドリアと小胞が集積した再生（発芽）軸索や変性に向かい膨張した神経軸索が多数認められ、これらをアストロサイトの突起が取り囲んでいた。再生軸索を囲んだシュワン細胞は少数であった。これに対し既損傷側の移行部ではアストロサイトの所見が乏しく、マクロファージによる貪食が活発で、無処置側に比べ広い細胞間隙であった。そして無処置側と同様に多数の再生軸索を認めたが、大部分はシュワン細胞が取り囲み薄い髄鞘を形成していた。

移植後4～8週：移植片内は細胞片やマクロファージが消退し、シュワン細胞の髄鞘を巻いた再生軸索が既損傷側と無処置側ともに確認された。しかし無処置側は移行部でグリア瘢痕が形成され、再生軸索は移植片の尾側にとどまり少数であった。これに比べ既損傷側では、グリア瘢痕の形成がなく、多数の再生軸索が移植片内のほぼ全域で認められた。

移植後12～16週：移植片内は移植後4～8週の所見と同様で、シュワン細胞による髄鞘を巻いた再生軸索は冠状断、矢状断、横断のいずれの断面においても既損傷側で明らかに多く認めた。（移植片中心部の横断面の観察で、既損傷側の再生軸索の数は無処置側より約10倍多く認めた。）また無処置側の移行部では厚いグリア瘢痕が形成されたが、既損傷側では認められず、再生軸索はオリゴデンドロサイトとシュワン細胞の髄鞘を巻き、移植片内へ走行した。

再生軸索の移行部の電顕所見：移植後1～2週の再生軸索はオリゴデンドロサイトの突起や髄鞘を欠損し、反応性に進展したアストロサイトや遊走してきたシュワン細胞に囲まれていた。この再生軸索を囲んだアストロサイトとシュワン細胞は相互に接して細胞の筒を形成し、その外側に連続した共通の基底膜を持った。移植後4～8週の再生軸索はシュワン細胞の髄鞘が厚くなり、その尾側の後索側でもオリゴデンドロサイトの薄い髄鞘を認められ、一部では両細胞によるランビエの後輪が形成された。しかし大部分の移行部はシュワン細胞の髄鞘化が先行し、オリゴデンドロサイトの髄鞘化は遅延していた。移植後12～16週ではオリゴデンドロサイトの髄鞘化が進み、シュワン細胞とランビエの後輪を多く認めた。

考察

末梢神経の再生早期には多数の成長円錐やマクロファージが出現し、シュワン細胞を刺激して活発な分裂増殖を促す。そして反応性に増殖したシュワン細胞が、再生軸索の足場となる接着因子や伸長する栄養因子を豊富に発現するとされている。また損傷早期から出現する多数のマクロファージは、ワーラー変性の組織を短期間で貪食して再生に適した経路を作り出す。一方中枢神経ではマクロファージの出現が遅れ貪食作用も乏しいとされており、再生に不都合な要因とされている。既損傷側の移植片は末梢神経の再生過程の活発な時期の組織であった。無処置側に比べ多数の再生軸索を導いた結果は、シュワン細胞の量的な充実の他の、反応性を高めたシュワン細胞の機能的な効果やマクロファージの効果もあったと推測される。

既損傷側の移行部は、移植後早期から多数のシュワン細胞を認めた。このシュワン細胞がアストロサイトのグリア瘢痕の形成を抑制した可能性が考えられる。再生軸索を囲んだシュワン細胞が移植後早期よりアストロサイトに接した電顕所見はアストロサイトの性状に影響を与えたのではないかという推論を持たせた。

中枢神経損傷後の早期に反応性の高いアストロサイトと後にグリア瘢痕を形成するアストロサイトとは性質が根本的に異なるという意見がある。損傷後早期の中枢神経ではシュワン細胞の有無にかかわらず、成長円錐がアストロサイトに接して一定の距離を伸長する発芽を認める。この時期のアストロサイトは神経線維の伸長を妨げず、むしろ初期の再生（発芽）を促進する可能性がある。移植後1～2週の無処置側移行部の所見からは、この見解を支持できる印象を持った。すなわち損傷後早期のアストロサイトは再生の初期（発芽）に良好な環境を提供するが、再生を継続させる働きはなく、何らかの補助（例えば今回の実験の如くシュワン細胞）がなければグリア瘢痕に至ると考えられる。

中枢神経の再生阻害因子として、古くからオリゴデンドロサイトが知られている。最近ではオリゴデンドロサイトのミエリン蛋白に対する抗体産生腫瘍を移植したラットで皮質脊髄路の再生の報告が目される。しかし一方で視神経にオリゴデンドロサイトの欠損部を持つ mutant rat を用いた実験では、再生がオリゴデンドロサイトの完全に欠損した環境でも阻害され、反対にオリゴデンドロサイトのミエリンが多量に存在する部位でもシュワン細胞により再生できたと報告されている。中枢神経の再生はオリゴデンドロサイトの因子を完全に除去しても充分でないと考えられる。

結論

既損傷側移植片内の反応性シュワン細胞が、無処置側のシュワン細胞に比べ再生軸索の伸長をより効果的に促進した。反応性シュワン細胞は、より早く再生軸索を囲んだアストロサイトに接触して、再生に好ましい影響を与える事ができたと考えられる。この接触により細胞の筒を形成して、再生を阻害する因子から神経軸索を保護し、さらに隣接したアストロサイトがグリア瘢痕化する事も抑制できたのかもしれない。今回の実験は中枢神経の再生を促進する反応性シュワン細胞の効果を初めて明らかにした。

論文審査の結果の要旨

長年の間、中枢神経線維の再生能力はないとされてきたが、近年になり末梢神経を視神経や脊髄に移植する研究が行われ、切断された神経線維がシュワン細胞の支持を得て再生できる事が明らかになってきた。本研究は末梢神経の損傷部で、その近位側の再生部の活発に増殖する性質を持ったシュワン細胞に注目し、このような“反応性”シュワン細胞の脊髄後索の再生に及ぼす効果を検討したものである。

（方法と対象）成熟雄 SD ラット41匹の坐骨神経から分岐した直後の総腓骨神経のみを6-0絹糸で結紮し、伴走する脛骨神経は温存した。結紮後7日目に上部頸髄C1の両側の後索を約1mm角に除去した。次に7日前の総腓骨神経の結紮部の糸を除去し、その近位側の神経片を伴走する腓骨神経と一塊（約1mm角）に摘出して脊髄後索に移植した。この際移植片は、既損傷側の総腓骨神経片と無処置側の脛骨神経片とが後正中溝を境に対称になるよう、各々左右の後索に接して移植した。移植後1～2週、4～8週、12～16週で灌流固定し、トルイジンブルー染色にて光学顕微鏡で移植片の既損傷側と無処置側を比較観察した。さらに超薄切片を作製し透過型電子顕微鏡用で観察した。

（結果）移植後1～2週：移植片の尾側と後索の境界“移行部”に注目すると、無処置側は発芽再生した神経軸索を多数認めたが、これらを囲んだ大部分は密集して突起を進展したアストロサイトであった。一方の既損傷側ではアストロサイトの密集はなく、再生軸索の多くはシュワン細胞が囲んでいた。

移植後4～8週：移植片内は、シュワン細胞の髄鞘を巻いた再生軸索が両側ともに確認された。しかし無処置側の移行部はグリア瘢痕が形成され、再生軸索は移植片の尾側に限られ少数であった。一方、既損傷側ではグリア瘢痕はなく、多数の再生軸索が移植片内のほぼ全域で認められた。

移植後12～16週：移植後4～8週の所見と同様で、再生軸索は既損傷側で明らかに多く認めた。移植片中心部の横断面では、既損傷側の再生軸索の数は無処置側の約10倍多く認めた。

再生軸索の電顕所見：移植後1～2週の再生軸索はオリゴデンドロサイトの突起を欠損し、反応性に進展したアストロサイトや遊走してきたシュワン細胞に囲まれていた。このアストロサイトとシュワン細胞は相互に接して細胞の筒を形成し、その外側に連続した共通の基底膜を持っていた。移植後4～8週にはシュワン細胞の髄鞘が厚くなり、移植後12～16週にはオリゴデンドロサイトの髄鞘化も進み、シュワン細胞とランビエの後輪を形成した。

（考察）末梢神経の再生早期には多数の成長円錐やマクロファージが出現し、シュワン細胞を刺激して活発な分裂増殖を促す。そしてこれらのシュワン細胞が、再生軸索の足場となる接着因子や伸長を促進する栄養因子を豊富に発現するとされている。既損傷側の移植片はまさに末梢神経の再生の活発な時期の組織で、この反応性にあったシュワン細胞が、無処置側のシュワン細胞に比べ脊髄後索の再生をより効果的に促進した。反応性シュワン細胞は、より速やかに再生軸索を囲むアストロサイトに接触でき、再生に好ましい影響を与えたことが示唆された。両細胞が早期に接触することで再生軸索を囲む細胞の筒が形成され、再生阻害因子から神経軸索を保護できた可能性と同時に、シュワン細胞に接したアストロサイトはグリア瘢痕化する事も抑制された可能性が示唆された。

以上、本研究は中枢神経の再生について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった脊髄再生に対する反応性シュワン細胞の効果について、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、本研究者は、博士（医学）を得る資格があると認める。