

## 同種移植神経片の中間に介在させた 自家神経片が神経再生に与える影響

杉 田 直 樹

広島大学医学部整形外科学講座 (主任: 生田義和教授)

受付 平成 13 年 9 月 25 日

受理 平成 13 年 11 月 22 日

本研究の目的は, ラットを用いて新鮮同種神経の中間に自家神経を介在させた場合に, 神経再生にどのような効果を及ぼすかを検討することである。Lewis ラットの坐骨神経に作製した欠損部に, DA ラットから採取した神経片を移植した。この同種移植神経片の中間にレシピエントの小自家神経片を介在させて移植したものを介在群, 自家神経の代わりに同種神経を介在させたものを対照群とした。免疫抑制剤としてシクロスポリンを手術前日から術後12週間, 毎日皮下投与した。両群とも移植後12, 13, 14, 15, 16, 24週目に安楽死させ, 前脛骨筋湿重量の測定と, 移植神経の組織学的, 免疫組織化学的検査をして, 以下の結果を得た。すなわち介在群, 対照群とも免疫抑制剤中止後4週目に前脛骨筋湿重量, 総有髄線維数, 有髄軸索径が最も減少していたが, 両群間で比較すると, 介在群の方が対照群に比べて有意に多かった。また, 介在群では, 免疫抑制剤中止後4週目に移植神経内の OX 抗体に対する染色性が対照群に比べて有意に高く, レシピエント神経片のシュワン細胞によって有髄化された同種神経の再生線維が多いことを確認した。すなわち, レシピエントの神経断端からばかりでなく, 移植神経片の中央に移植された自家神経片からもシュワン細胞が移動していることが推察された。

**Key words :** Peripheral nerve allograft, Cyclosporin, Nerve regeneration, Interposed nerve graft, Immunohistochemistry

四肢の広範囲の末梢神経欠損では, 切断端を直接縫合することが困難で, 神経移植を必要とすることが少なくない。しかし, 神経の供給量には制限があり, また, 神経採取部位の脱落症状は避けられない。これまで自家神経移植に代わる方法として, 新鮮同種移植<sup>21, 30-32)</sup>, 凍結融解処理同種移植<sup>14, 15, 26)</sup>, シリコンチューブなどを利用した人工神経<sup>10, 20, 27)</sup>, 筋肉移植<sup>11, 13)</sup>などの基礎的研究が行われてきた。これらの実験における最大軸索再生距離は, 凍結融解処理神経では30 mm<sup>26)</sup>, シリコンチューブを用いた場合は 10 mm<sup>20)</sup>, 筋肉移植では 20 mm<sup>8)</sup>が限界と報告されており, 自家神経移植に代わる方法としては新鮮同種神経移植が最も有効と思われる<sup>14)</sup>。末梢神経のシュワン細胞にはクラス I, II 抗原が存在し, これが主要抗原提示細胞となり拒絶反応を引き起こす<sup>2)</sup>ことはすでに知られている。一方, 適切な免疫抑制下では同系移植とほぼ同等な神経再生が得られる<sup>6, 18)</sup>ことが報告されている。しかし, 免疫

抑制剤中止後の再生軸索の変化については意見の一致をみていない。すなわち, 同種シュワン細胞は拒絶されて再生軸索は脱髄し, 二次的に軸索も変性するとの考え方<sup>16, 30)</sup>と, 再生軸索は変性しないとの考え方<sup>22, 25)</sup>があるが, 著者はこれまでに報告された実験結果<sup>16, 29)</sup>から, 再生軸索の脱髄に引き続いて二次的に軸索も変性すると考えている。一方, 末梢神経同種移植においては, 免疫抑制剤中止後にレシピエント神経断端からレシピエント由来のシュワン細胞が同種移植神経内に移動して, ドナーのシュワン細胞に置換すると報告されている<sup>3, 17, 24)</sup>。移植神経の中間に自家神経片を介在させ, レシピエント断端からの置換に加え, 自家神経片からもシュワン細胞が移植神経へ移動・置換するならば, 免疫抑制中止後に同種シュワン細胞が拒絶されても, レシピエントのシュワン細胞によって広範囲な脱髄は免れ, 二次的な軸索変性を防止しうる可能性があると考えた。

そこで著者は、ラットを用いて新鮮同種神経片の中間に小さな自家神経片を介在させた場合と、同種神経のみを移植した場合での再生を比較し、免疫抑制剤の投与中止後に、介在させた自家神経片が神経再生にどのような効果を及ぼすかを、組織学的、免疫組織化学的に検討した。

## 材料と方法

### 1. 実験方法

主要組織適合抗原系の異なる2種類の近交系ラット(ともに雄, 体重: 200~250 g)を用い, DA ラット(RT1<sup>a</sup>) (日本エスエルシー, 浜松) をドナーとし, Lewis ラット(RT1<sup>b</sup>) (日本チャールズリバー, 横浜) をレシピエントとして移植実験を行った。同種移植片の中間にレシピエントの坐骨神経を介在させ, 全長25 mm として移植したものを介在群, レシピエントの神経の代わりにドナーの神経を介在させたものを対照群とし, 各群それぞれ36匹作成した。手術方法は, ペントバルビタール(40 mg/kg) を腹腔内注入して全身麻酔下に行った。まずレシピエントの左坐骨神経の大腿中央部より10 mm の自家神経片を採取した。次にドナーの左大腿から25 mm の坐骨神経を採取し, その採取した神経片を中枢, 末梢両端より10 mm の部分で一旦切離した。介在群では同種神経片の中央部から5 mm の神経片を採取し, 自家神経片5 mm と置き換え, 全長25 mm の自家神経介在同種移植神経としてレシピエントの左坐骨神経欠損部へ移植した。神

経は手術用顕微鏡下に, 各接合部を各々3針ずつ10-0 ナイロン糸にて神経上膜縫合した。一方, 対照群では同種神経片の中央部5 mm の神経片を180度回転させ, 全長25 mm の同種移植神経としてレシピエントの左坐骨神経欠損部へ移植し, 同様に縫合した(Fig. 1)。免疫抑制剤としてシクロスポリン(ノバルティスファーマ, 東京) を, 手術前日から手術後12週まで, 毎日5 mg/kg ずつ背部皮下に投与し, その後中止した<sup>6)</sup>。両群とも移植後12, 13, 14, 15, 16, 24週目に6匹ずつ安楽死させ, 神経を採取して評価した。

### 2. 評価方法

筋湿重量の健側比, 移植神経の組織学的評価, 有髄線維の定量的評価, 免疫組織学的評価を行った。組織学的評価および免疫組織化学的评价では末梢側の同種移植片の中央より標本を採取し, 有髄線維の定量的評価では移植神経末梢側縫合部から5 mm 遠位部のレシピエントの神経を採取した(Fig. 2)。

#### (1) 筋湿重量評価

介在群と対照群の全ての週で両側の前脛骨筋を採取し, 筋湿重量を計測して健側比で示した。

#### (2) 組織学的評価

介在群と対照群の全ての週で標本を採取し, 10%ホルマリン固定後, パラフィン包埋を行い, 横断切片を作成して, ヘマトキシリン・エオジン染色にて光学顕微鏡下に観察した。

#### (3) 有髄線維の定量的評価

介在群と対照群の全ての週で標本を採取し, グルタルアルデヒドとオスミウム酸による二重固定後, エポキシ包埋を行った。横断切片作成後, トルイジンブ

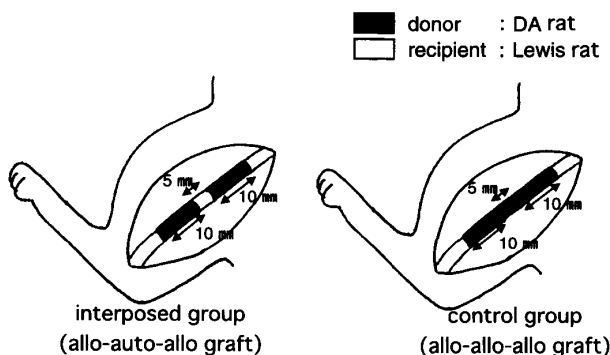


Fig. 1. Operative procedure.

A sciatic nerve gap (10 mm in length) was repaired by a 25 mm allograft in which a 5 mm segment of autologous nerve was sutured between the two halves of the 20 mm allograft (interposed group) and a 5 mm segment of allograft was sutured between the two halves of the allograft (control group).

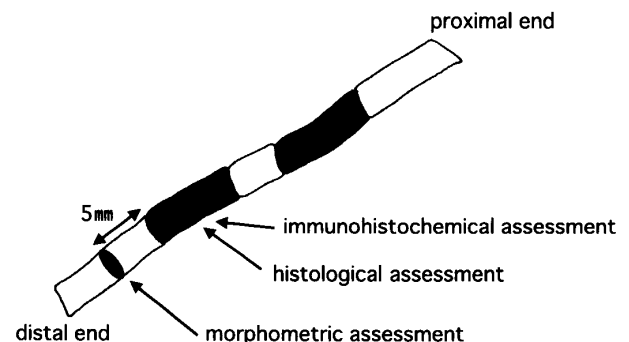


Fig. 2. Cross-sections were obtained from segments of the mid-portion of the distal grafted nerve (histological assessment and immunohistochemical assessment) and of the host nerve 5 mm distal to the distal suture site (morphometric assessment of nerve fibers).

ルー染色を行い、光学顕微鏡 (Optiphot-2, ニコン社, 東京) 下に有髄線維数, 有髄軸索径をコンピューター画像解析装置 Mac ASPECT (三谷商事, 福井) を用いて測定した。まず有髄線維数は, 光学顕微鏡下 ( $\times 400$ ) に少なくとも全神経横断面積の10%の領域の有髄線維数を計算し, 全神経の面積に換算したものを総有髄線維数とし, 有髄軸索径は光学顕微鏡下 ( $\times 1000$ ) に1視野で40線維, 神経全体で最低200線維の有髄軸索径を測定した。

#### (4) 免疫組織化学的評価

介在群と対照群の全ての週で標本を採取し, 厚さ  $5\mu\text{m}$  の凍結切片を作成した。約1時間の風乾, ついでアセトンにて10分間浸漬後, pH 7.4 の 0.01 M 磷酸緩衝液 (phosphate buffered saline, 以下 PBS) で3回洗浄した。非特異的反応を抑制するために10%家兎血清に60分間浸漬した。次に一次抗体としてシュワン細胞に対するポリクローナル抗体である家兎抗 S-100 蛋白抗体 (ニチレイ社, 東京) と, Lewis ラットの MHC class 1 抗原に対するモノクローナル抗体であるマウス OX-3 抗体 (Sera-lab, Westbury, NY, USA), DA ラットの MHC class 1 抗原に対するモノクローナル抗体であるマウス MN4-91-6 抗体 (Oxford Biomarketing Limited, Oxford, UK) を用いて  $4^\circ\text{C}$  冷蔵庫内にてそれぞれ24時間反応させた。PBS で洗浄後, ビオチン化ヤギ抗家兎 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), 抗マウス抗体 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) をそれぞれ二次抗体として室温で30分間反応させた。PBS で洗浄後, 組織内の内因性ペルオキシダーゼを抑制するために0.6%過酸化水素を含むメタノールで30分間処理した。PBS で洗浄後, ペルオキシダーゼ標識ストربتアビジン (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) と反応させた。PBS で洗浄後, ジアミノベンチジン (diaminobenzidine, 以下 DAB) で発色させた。また, 一次抗体の代わりに PBS を加えたものを陰性コントロールとした。

免疫染色の結果は定量顕微鏡システム CAS-200 イメージ分析装置 (Becton Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) にて定量的に評価した<sup>4)</sup>。すなわち, 光学顕微鏡 ( $\times 400$ ) 下に DAB の発色強度を測定し, 陰性コントロールの発色強度を閾値として, 各標本において閾値を超えた発色強度を示す領域を陽性領域とし, 神経横断面積全体に占める陽性領域の割合を百分率で示した。

#### (5) 統計処理

介在群, 対照群内での各週間の有意差の有無と, 各

週における介在群, 対照群間の有意差の有無を調査するために, 一元配置分散分析法を用い, 多重比較検定として Bonferroni/Dunn 検定を行い, 危険率 5%未満をもって有意差ありとした。

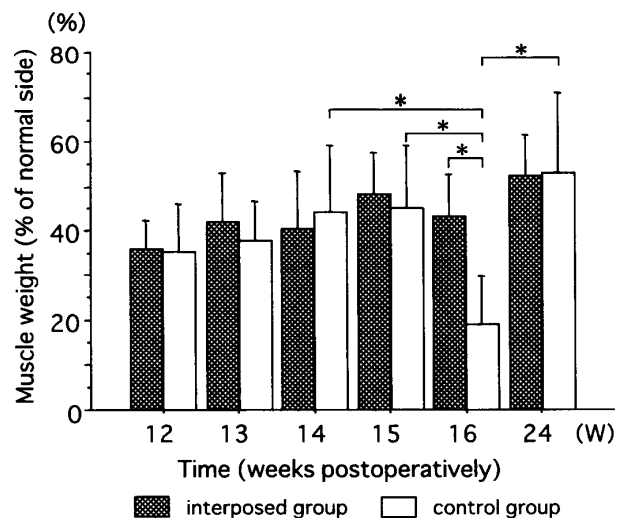
## 結 果

### 1. 筋湿重量の評価

前脛骨筋湿重量は, 介在群では移植後12週から16週において各週間で有意差を認めなかった。対照群では12週から15週において各週間で有意差を認めなかったが, 16週にて低下し, 14週, 15週との間で有意差を認めた。また, 16週において対照群は介在群に比べ有意に低下していた (Fig. 3)。

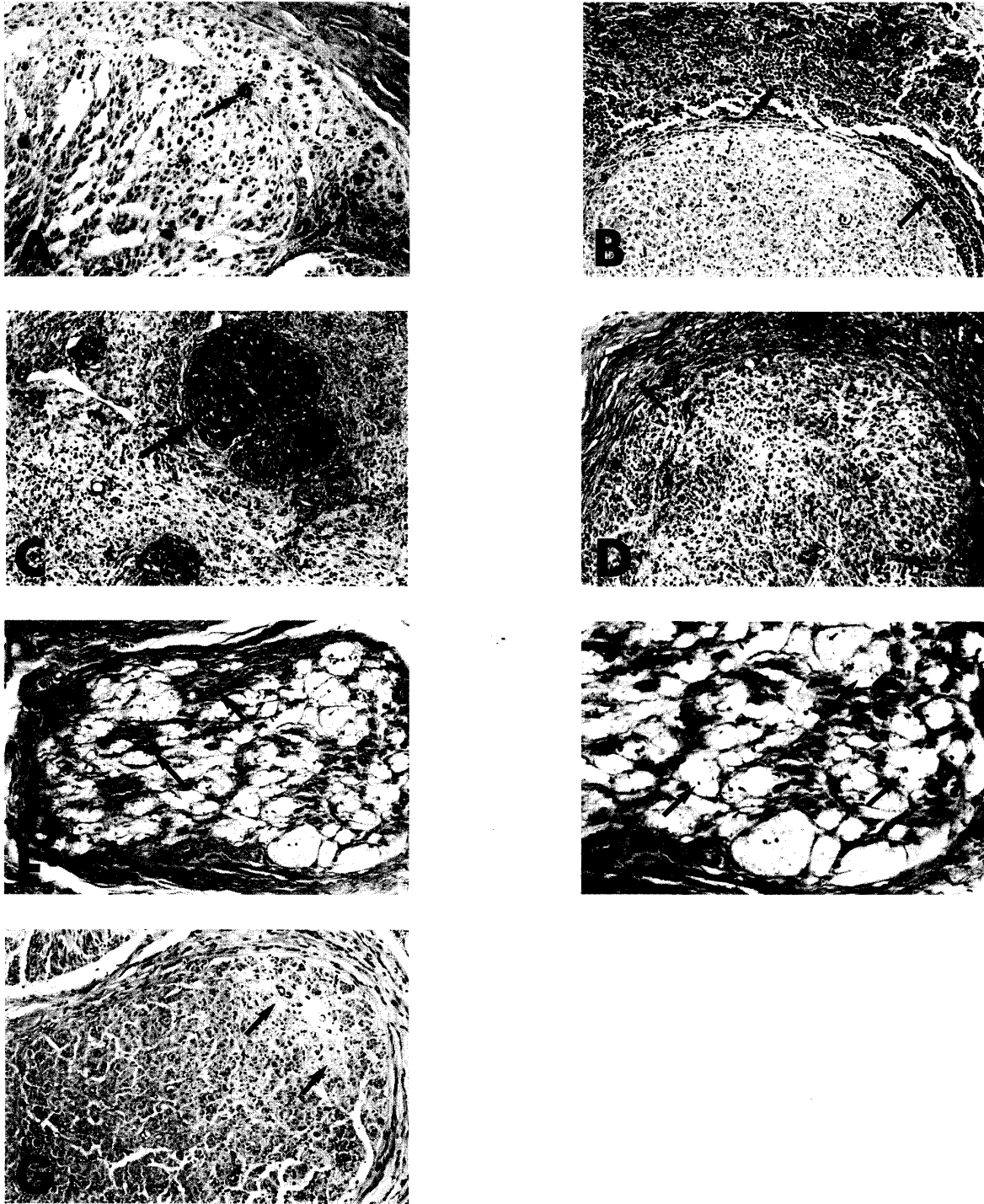
### 2. 組織学的評価

対照群: 移植後12週では, 神経周膜および神経線維束内外の血管周囲にリンパ球を主体とする軽度の炎症細胞浸潤が見られた。13週では神経周膜に炎症細胞浸潤が目立つようになり, 神経線維束内にも炎症細胞浸潤が増加してきた。14週では神経周膜および神経線維束内の炎症細胞浸潤はさらに強くなり, 神経周膜の線維化が目立つようになった。神経線維束では, 内部に分布する動脈性血管に, 肉芽組織形成による閉



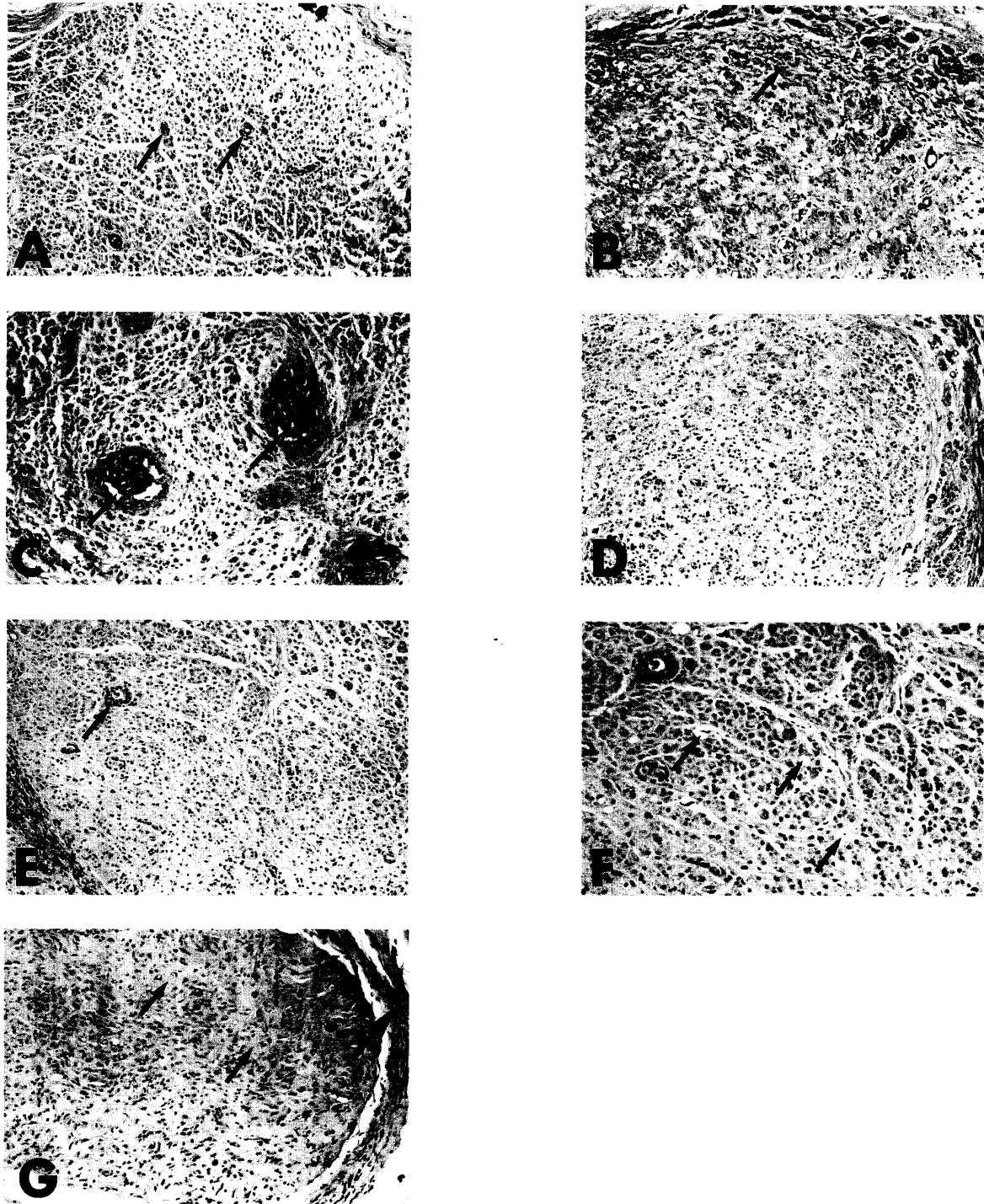
**Fig. 3.** Weight of the anterior tibial muscle (mean  $\pm$  standard deviation).

In the interposed group, no significant differences could be demonstrated from 12 to 16 weeks. In the control group, the muscle weight started to decrease after 14 weeks, and at 16 weeks was significantly less than at 14, 15 and 24 weeks ( $p < 0.05$ ). At 16 weeks, the muscle weight of the control group was significantly less than that of the interposed group. (\* $p < 0.05$ )



**Fig. 4.** The control group (allo-allo-allo group).

A (12 weeks): Minimal infiltration of the inflammatory cells around the perineurium and perivascularum of the graft was observed (arrows). B (13 weeks): Infiltration of the inflammatory cells became conspicuous in the perineurium and intraneural tissue (arrows). C (14 weeks): Diffuse infiltration of numerous inflammatory cells became marked. Arrow shows granulated formation in the arterial vessel. D (15 weeks): Infiltration of the inflammatory cells had begun to decrease slightly, and fibrosis of the neural tissue had progressed. Arrow shows fibrosis of the perineurium. E (16 weeks): The inflammatory response, with the destruction of the Schwann cells and the myelin sheath, was most marked. Arrows show the fibrosis of the intraneural tissue. F (16 weeks. Large magnification of Fig. E): Arrows show marked swelling and degeneration of Schwann cells and the axons. G (24 weeks): The inflammatory reaction had almost disappeared. Arrows show the fibrosis of the intraneural tissue. (Hematoxylin and eosin staining. A-E, G;  $\times 100$ , F;  $\times 150$ )



**Fig. 5.** In the interposed group (allo-auto-allo group).

A (12 weeks): Minimal infiltration of the inflammatory cells around the perineurium and the perivascular of the graft was observed. B (13 weeks): Infiltration of the inflammatory cells was observed, but it was slighter than in the control. C (14 weeks): Light diffuse infiltration of inflammatory cells and partial fibrosis of the intraneural tissue began to appear. Arrows show granulated formation in the arterial vessel. D (15 weeks): Infiltration of the inflammatory cells had become slight and the fibrosis of the neural tissue was progressed. E (16 weeks): Infiltration of the inflammatory cells was comparatively slight. Arrow shows the inflammatory cells around the perivascular. F (16 weeks. Large magnification of Fig. E): Arrows show slight swelling and degeneration of Schwann cells and the axons. G (24 weeks): The inflammatory reaction had almost disappeared. Large arrow shows the fibrosis of the perineurium and small arrows show that of the intraneural tissue. (Hematoxylin and eosin staining. A-E, G;  $\times 100$ , F;  $\times 150$ )

塞性変化が見られるようになった。15週では血管病変は見られなくなり、神経周膜および神経線維束内の炎症細胞浸潤はやや消退し、線維化が進行した。16週では神経線維束の傷害は最も強く、神経線維束内の線維化が目立ち、残存する有髄線維の髄鞘や軸索の腫大と変性を伴っていたが、24週では神経線維束内に線維化は見られるものの、有髄線維は増加し、炎症反応はほとんど消退していた (Fig. 4)。

介在群：移植後12週の組織所見は対照群とほとんど同様で、神経周膜および神経線維束内外の血管周囲にリンパ球を主体とする軽度の炎症細胞浸潤が見られた。13週では炎症細胞浸潤は見られるが、対照群と比較して軽度であった。14週では神経周膜および神経線維束内の炎症細胞浸潤と線維化が見られるが、対照群と比較して軽度であった。神経線維束内の動脈性血管の閉塞性病変も見られたが、対照群と比較してその程度は軽度であった。15週では神経線維束内の血管病変は消失し、炎症細胞浸潤は軽微となったが、神経周膜および神経線維束内の線維化が見られるようになった。16週では神経周膜および神経線維束内に炎

症細胞浸潤が見られるが、比較的軽度であり、また線維化を伴ってはいるが、有髄線維の脱落は軽度で、対照群に見られた髄鞘や軸索の腫大、変性はごく少数に見られるのみであった。24週では神経線維束内外の線維化は見られるものの、炎症細胞浸潤はほとんど消退した (Fig. 5)。

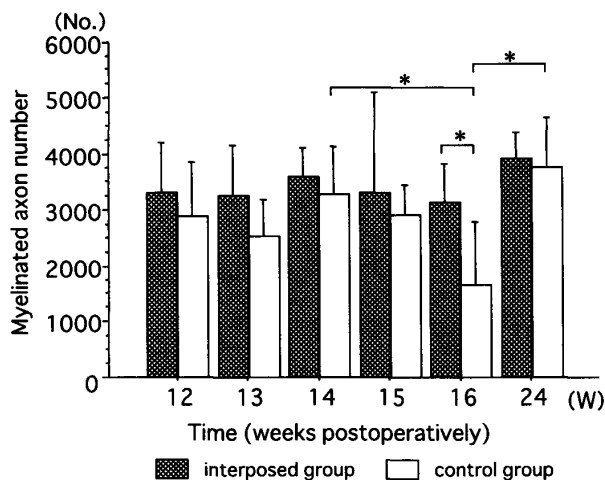
### 3. 有髄線維の定量的評価

#### (a) 有髄線維数

有髄線維数は、介在群では12週で有髄線維の再生があり、14～16週で軽度の減少がみられるものの各週間で有意差を認めなかった。対照群では12週で有髄線維の再生を認めたが、14週から減少、さらに16週では14週よりも有意に減少していた。16週において対照群では介在群に比べ有意に減少していた (Fig. 6)。

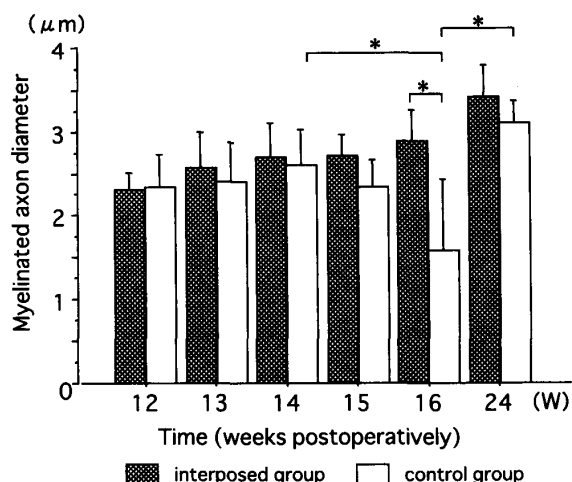
#### (b) 有髄軸索径

介在群では12週以降徐々に増加していたが、12週から16週において各週間で有意差を認めなかった。対照群では14週から16週にかけて低下し、16週においては14週よりも有意に減少していた。また、16週において対照群では介在群に比べ有意に低下していた (Fig. 7)。



**Fig. 6.** Number of myelinated axons (mean  $\pm$  standard deviation).

Many immature myelinated axons were seen at 12 weeks in both groups. In the interposed group, the number of myelinated axons tended to decrease after 14 weeks, but no significant differences could be demonstrated in any week. In the control group, the number of myelinated axons started to decrease after 14 weeks, and at 16 weeks was significantly fewer than at 14 and 24 weeks ( $p < 0.05$ ). At 16 weeks, the number of myelinated axons of the control group was significantly fewer than in the interposed group. (\* $p < 0.05$ )



**Fig. 7.** Myelinated axon diameter (mean  $\pm$  standard deviation).

In the interposed group, the myelinated axon diameter tended to increase after 12 weeks, but no significant differences could be demonstrated from 12 to 16 weeks. In the control group, the myelinated axon diameter started to decrease after 14 weeks, and at 16 weeks was significantly smaller than at 14 and 24 weeks ( $p < 0.05$ ). At 16 weeks, the myelinated axon diameter of the control group was significantly smaller than in the interposed group. (\* $p < 0.05$ )

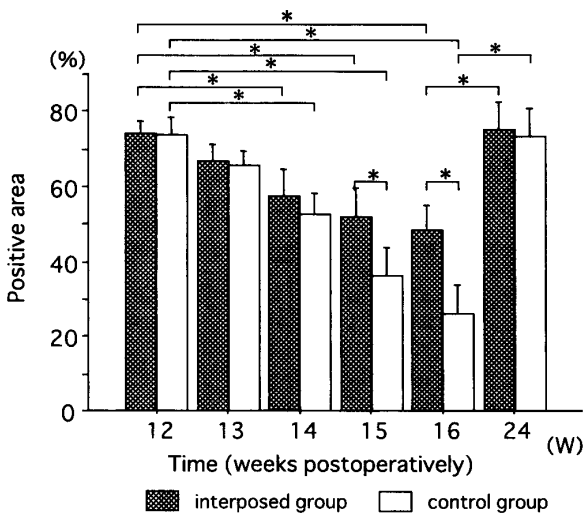
4. 免疫組織化学的評価

(a) 抗 S-100 蛋白抗体に対する染色性

抗 S-100 蛋白抗体に対する染色陽性の領域は、介在群では12週では高値を示していたが、13週以降16週まで徐々に縮小し、14, 15, 16週では12週に比べ有意に縮小していた。対照群でも12週では高値を示し、13週以降16週まで徐々に縮小し、14, 15, 16週では12週に比べ有意に縮小していた。また、15, 16週において対照群では介在群に比べ有意に縮小していたが、24週では介在群と同等の高値を示していた (Fig. 8)。

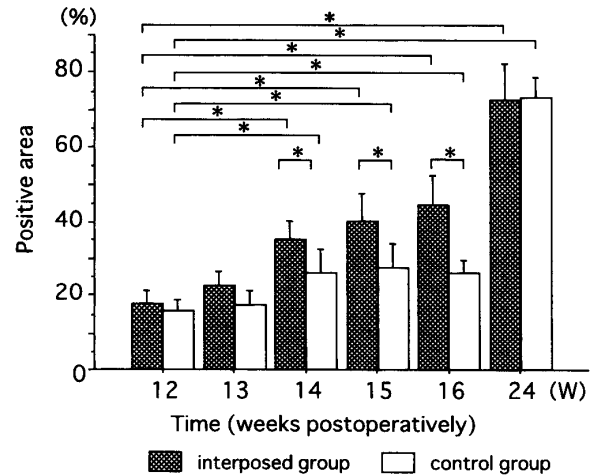
(b) OX-3 抗体に対する染色性

OX-3 抗体に対する染色陽性の領域は、介在群では12週でわずかに認められ、13週以降24週まで徐々に拡大し、14, 15, 16, 24週では12週に比べ有意に拡大していた。対照群でも12週でわずかに認めており、13週以降24週まで徐々に拡大し、14, 15, 16, 24週では12週に比べ有意に拡大していた。また、14, 15, 16週において介在群では対照群に比べ有意に拡大していたが、24週では対照群と同等の高値を示していた (Fig. 9)。



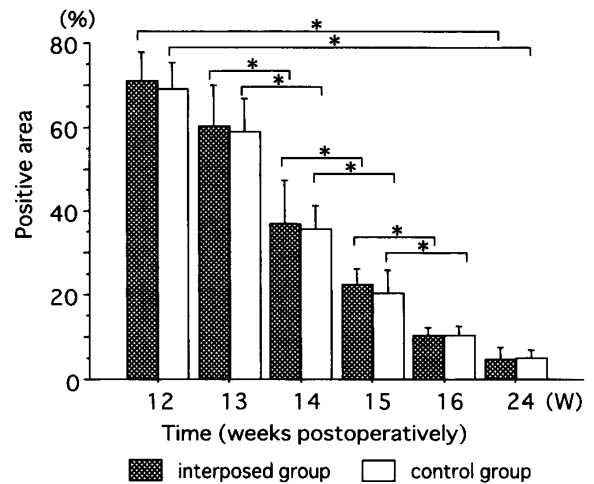
**Fig. 8.** Area immunostained by S-100 antibody (mean ± standard deviation).

In the interposed group, the maximal positive area stained by anti-S100 antibody was seen at 12 and 24 weeks. The positive area started to decrease after 12 weeks, and at 14, 15 and 16 weeks was significantly smaller than at 12 weeks ( $p < 0.05$ ). In the control group, the postoperative course was similar to that of the interposed group. At 15 and 16 weeks, the positive area of the control group was significantly smaller than in the interposed group. ( $*p < 0.05$ )



**Fig. 9.** Area immunostained by OX-3 antibody (mean ± standard deviation).

In the interposed group, the minimal positive area stained by OX-3 antibody was seen at 12 weeks. The positive area started to increase after 12 weeks, and at 14, 15, 16 and 24 weeks was significantly greater than at 12 weeks ( $p < 0.05$ ). In the control group, the postoperative course was similar to that of the interposed group. At 14, 15 and 16 weeks, the positive area of the interposed group was significantly greater than in the control group. ( $*p < 0.05$ )



**Fig. 10.** Area immunostained by MN4-91-6 antibody (mean ± standard deviation).

In the interposed group, the maximal positive area stained by MN4-91-6 antibody was seen at 12 weeks. The positive area started to decrease after 12 weeks, and at 14, 15, 16 and 24 weeks was significantly smaller than at 12 weeks ( $p < 0.05$ ). In the control group, the postoperative course was similar to that of the interposed group. ( $*p < 0.05$ )



### (c) MN4-91-6 抗体に対する染色性

MN4-91-6 抗体に対する染色陽性の領域は、介在群では12週で高値を示していたが13週以降縮小し、24週ではわずかに認めるのみであった。13週から16週まで各週間に有意の縮小を認めた。対照群でも12週で高値を示していたが13週以降縮小し、24週ではわずかに認めるのみであった。13週から16まで各週間に有意の縮小を認めた。また、各週における介在群と対照群の間で有意差を認めなかった (Fig. 10)。

## 考 察

### 1. 免疫抑制剤中止後の拒絶反応

ラットを用いた末梢神経欠損の再建術において、自家神経を介在させることで通常よりも長い距離の神経再生を獲得した報告が散見される。自家神経片を Smahel ら<sup>28)</sup>は静脈管内に、Maeda ら<sup>23)</sup>、Francel ら<sup>12)</sup>はシリコンチューブ内に、Calder ら<sup>9)</sup>は凍結融解筋の中央に介在させ、自家神経片から遊走したシュワン細胞により神経再生が促進したと報告した。自験例の対照群では免疫抑制剤投与中止後4週において、神経線維束内の線維化が目立ち、残存する有髄線維の髄鞘や軸索の腫大、変性を伴ってきたが、自家神経片を介在させた介在群では髄鞘や軸索の腫大、変性は軽度であり、前脛骨筋湿重量、有髄線維数も有意に多かった。これらのことから、ドナー由来のシュワン細胞が拒絶されて脱髄に陥った結果、二次的に変性した再生軸索の数が対照群に比べて介在群の方が少なかったと考えられた。すなわち、末梢神経同種移植においては、免疫抑制剤中止後にレシピエント神経断端からレシピエント由来のシュワン細胞が同種移植神経内に移動・置換する<sup>3,17,24)</sup>ことから、介在群ではレシピエントの両神経断端ばかりでなく、介在させた自家神経片からもレシピエント由来のシュワン細胞が移植神経内に移動・置換し、より多くの再生軸索がレシピエント由来のシュワン細胞で覆われることで広範囲な脱髄は免れ、二次的な軸索変性に至るものが少なかったと推察した。

### 2. レシピエントとドナーのシュワン細胞の相互関係

末梢神経同種移植実験において、免疫抑制剤中止後のレシピエントとドナーのシュワン細胞の相互関係に関する報告がみられる。Aguayo ら<sup>1)</sup>、Ansselin ら<sup>3)</sup>はドナーにシュワン細胞の基底膜を二重に有する trembler mouse を用いて、電子顕微鏡によるレシピエントのシュワン細胞の移植神経内への移動を報告し、Midha ら<sup>24)</sup>、Berger ら<sup>7)</sup>、Ishida ら<sup>17)</sup>は主要組織適合抗原の違いを利用して、免疫組織化学染色によりレシ

ピエントのシュワン細胞の移動を報告した。Takata ら<sup>29)</sup>は免疫組織学的手法を用い、免疫抑制剤投与中にレシピエントのシュワン細胞が移動し、一部の軸索はレシピエントのシュワン細胞で架橋されるため、拒絶反応による軸索変性を免れることを報告した。著者は免疫組織化学的に評価し、染色領域を CAS-200 イメージ分析装置にて計測することで定量評価を試み、さらに詳細な分析を行った。

免疫抑制剤中止直後の12週では移植神経内におけるドナーの MHC class 1 抗原に対する抗体 (MN4-91-6 抗体) の染色陽性領域は介在群、対照群とも高値を示していたが、レシピエントの MHC class 1 抗原に対する抗体 (OX-3 抗体) の染色領域は介在群、対照群ともわずかに認めるのみであった。よって、移植神経内のシュワン細胞の大部分は免疫抑制によって拒絶されないで残存するドナー由来のシュワン細胞と思われた。しかし、OX-3 抗体で染色される細胞がわずかではあるが認められており、レシピエント由来のシュワン細胞の移植神経内への移動が、免疫抑制剤投与中にも部分的に生じていることが明らかとなった。

有髄線維数が減少し始める14週から最も減少した16週、つまり拒絶が進行する過程において、MN4-91-6 抗体の染色陽性領域は介在群、対照群とも縮小し、16週ではわずかに認めるのみであった。抗 S-100 蛋白抗体に対する染色陽性領域も介在群、対照群とも縮小しており、残存したドナー由来のシュワン細胞が拒絶反応により減少したことを示していた。また、有髄線維数が最も減少した16週、つまり拒絶が最も進行した時点において、介在群は対照群に比較してその有髄線維数は有意に多く、OX-3 抗体の染色陽性領域についても介在群は対照群に比し有意に拡大していた。つまり、介在群の方が移植神経内のドナー由来のシュワン細胞がより多くのレシピエント由来のシュワン細胞によって置換され、より多くの再生軸索がレシピエント由来のシュワン細胞によって覆われることで広範囲な脱髄を免れ、残存したものと考えられた。

24週では OX-3 抗体の染色陽性領域は介在群、対照群とも高値を示していたが、MN4-91-6 抗体の染色領域は介在群、対照群ともわずかに認めるのみであった。よって、移植神経内のシュワン細胞の大部分は移動してきたレシピエント由来のシュワン細胞と思われた。また、対照群では前脛骨筋湿重量、有髄線維数、有髄軸索径とも介在群とほぼ同等に回復していた。ラットを用いた末梢神経同種移植において、Zalewski ら<sup>32)</sup>は免疫抑制剤中止後の拒絶反応により神経は脱髄を起こして軸索は再生しないと報告しているが、多くの著者



ら<sup>16,22,25,29,30</sup>)は免疫抑制剤中止後の拒絶反応により神経は脱髄を起こして軸索は減少するが、その後再び軸索は再生すると報告している。Lassner ら<sup>19</sup>)はモノクローナル抗体を用いて同種神経移植における細胞性免疫反応を観察し、拒絶反応は同種移植神経を無細胞にするが、その神経構造自体は破壊せず、拒絶反応後も軸索導管として機能すると述べている。また、Gulati<sup>14</sup>)はシュワン細胞の基底膜のみの無細胞神経導管では短い距離の神経再生しか得られず、長い距離の神経再生にはシュワン細胞の存在が必要であると報告している。よって、24週において対照群が介在群とほぼ同等の回復が得られた機序として考えられることは、拒絶反応によるドナー由来のシュワン細胞の消失によって移植神経がシュワン細胞の基底膜のみを有する無細胞な神経導管となったため、軸索再生とレシピエント由来のシュワン細胞の移植神経内への移動が容易となり<sup>15</sup>)、急速な神経再生が生じたためであると考えた。また、ラットを用いた同種神経移植において免疫抑制剤投与群と非投与群を比較した場合、移植神経が25 mm 長までは非投与群でもいくらかの神経再生が認められた<sup>7,16</sup>)とする報告もあるが、免疫抑制剤投与群の方が非投与群に比べ神経再生は良好であった<sup>6,16,21,25</sup>)と報告されている。自験例では免疫抑制剤非投与群を設定していないため単純な比較はできないが、これらの報告例から免疫抑制剤非投与例よりは介在群の方が神経再生が良好ではないかと推察された。

以上のことから同種神経片内に自家神経片を介在させることは神経再生を促進させる効果があると考えられた。その機序として、レシピエントのシュワン細胞は、中枢と末梢の神経断端のみならず、介在させた自家神経片からもドナーの神経内に移動することで、免疫抑制剤中止後にドナー由来のシュワン細胞が拒絶されても、レシピエント由来のシュワン細胞によって再生軸索が覆われて広範な脱髄を免れ、二次的な軸索変性を防止し得たことが推察された。

本研究により、移植神経の中間に自家神経を介在させる末梢神経新鮮同種移植は、通常と同種神経を移植した場合よりも良好な神経再生を得ることが可能であり、臨床問題となるような広範囲の神経欠損への応用の可能性が示された。しかし、実際にレシピエントのシュワン細胞がどの程度の距離まで移動可能なのか、あるいは良好な神経再生を得るには、移植した同種神経に対しどれくらいの自家神経片の量が必要なのかなどの点が今後臨床応用上での検討課題である。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御指導、御校閲を賜った恩師生田義和教授に深甚なる謝意を捧げます。また、研究に直接懇篤なる御指導を賜った広島大学整形外科石田 治助手、広島大学保健学科梶原博毅教授に心より深謝致します。また、定量顕微鏡システム CAS-200 イメージ分析装置の使用を許可していただきました広島大学外科学第二講座浅原利正教授に深く感謝致しますとともに、終始御支援、御協力下さいました杉田孝助教授、宗重 博助教授、教室員各位に厚く感謝致します。

(本論文の要旨の一部は第26回日本マイクロサージャリー学会、第44回日本手の外科学会、第15、16回日本整形外科学会基礎学術集会上において発表した。)

## 参 考 文 献

1. **Aguayo, A. J., Attiwell, M., Trecarten, J., Perkins, S. and Bray, G. M.** 1977. Abnormal myelination in transplanted Trembler mouse Schwann cells. *Nature* **265** : 73-75.
2. **Anselin, A. D. and Pollard, J. D.** 1990. Immunopathological factors in peripheral nerve allograft rejection: Quantification of lymphocyte invasion and major histocompatibility complex expression. *Neurol. Sci.* **96** : 75-88.
3. **Anselin, A. D., Westland, K. and Pollard, J. D.** 1990. Low-dose, short-term Cyclosporin A does not protect the Schwann cells of allogenic nerve grafts. *Neurosci. Lett.* **119** : 219-222.
4. **Bacus, S. S., Ruby, S. G., Weinberg, D. S., Chin, D., Ortiz, R. and Bacus, J. W.** 1990. HER-2/neu oncogene expression and proliferation in breast cancers. *Am. J. Pathol.* **137** : 103-111.
5. **Bain, J. R., Mackinnon, S. E., Hudson, A. R., Falk, R. E., Falk, J. A. and Hunter, D. A.** 1988. The peripheral nerve allograft: A dose-response curve in the rat immunosuppressed with Cyclosporin A. *Plast. Reconstr. Surg.* **82** : 447-455.
6. **Bain, J. R., Mackinnon, S. E., Hudson, A. R., Falk, R. E., Falk, J. A. and Hunter, D. A.** 1988. The peripheral nerve allograft: An assessment of regeneration across nerve allografts in rats immunosuppressed with Cyclosporin A. *Plast. Reconstr. Surg.* **82** : 1052-1066.
7. **Berger, A. and Lassner, F.** 1994. Peripheral nerve allografts: Survey of present state in an experimental model of the rat. *Microsurgery* **15** : 773-777.
8. **Bryan, D. J., Miller, R. A., Costas, P. D.,**

- Wang, K. K. and Seckel, B. R.** 1993. Immunocytochemistry of skeletal muscle basal lamina grafts in nerve regeneration. *Plast. Reconstr. Surg.* **92** : 927-940.
9. **Calder, J. S. and Green, C. J.** 1995. Nerve-muscle sandwich grafts: The importance of Schwann cells in peripheral nerve regeneration through muscle basal lamina conduits. *J. Hand. Surg.* **20B** : 423-428.
  10. **Danielsen, N., Pettmann, B., Vahlsing, H. L., Manthorpe, M. and Varon, S.** 1988. Fibroblast growth factor effects on peripheral nerve regeneration in a silicone chamber model. *J. Neurosci. Res.* **20** : 320-330.
  11. **Fawcett, J. W. and Keynes, R. J.** 1986. Muscle basal lamina: A new graft material for peripheral nerve repair. *J. Neurosurg.* **65** : 354-363.
  12. **Francel, P. C., Francel, T. J., Mackinnon, S. E. and Hertl, C.** 1997. Enhancing nerve regeneration across a silicone tube conduit by using interposed short-segment nerve grafts. *J. Neurosurg.* **87** : 887-892.
  13. **Glasby, M. A., Gschmeissner, S. G., Hitchcock, R. J. I. and Huang, C. L-H.** 1986. The dependence of nerve regeneration through muscle grafts on the availability and orientation of basement membrane. *J. Neurocytol.* **15** : 497-510.
  14. **Gulati, A. K.** 1988. Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. *J. Neurosurg.* **68** : 117-123.
  15. **Ide, C., Tohyama, K., Yokota, R., Nitatori, T. and Onodera, S.** 1983. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Res.* **288** : 61-75.
  16. **Ishida, O., Daves, J., Tsu-Min, T., Breidenbach, W. C. and Firrell, J. C.** 1993. Regeneration following rejection of peripheral nerve allografts of rats on withdrawal of Cyclosporin A. *Plast. Reconstr. Surg.* **92** : 916-926.
  17. **Ishida, O., Martin, A. and Firrell, J. C.** 1993. Origin of Schwann cells in peripheral nerve allograft in the rat after withdrawal of Cyclosporin A. *Reconstr. Microsurg.* **9** : 233-236.
  18. **Ishida, O., Ochi, M., Miyamoto, Y., Ikuta, Y. and Akiyama, M.** 1989. Suppression by cyclosporine of cellular and humoral reactivity after peripheral nerve allografts in mice. *Transplantation* **48** : 824-829.
  19. **Lassner, F., Schaller, E., Steinhoff, G., Wonigeit, K., Walter, G. F. and Berger, A.** 1989. Cellular mechanisms of rejection and regeneration in peripheral nerve allografts. *Transplantation* **48** : 386-392.
  20. **Lundborg, G., Dahlin, L. B., Danielsen, N., Gelberman, R. H., Longo, F. M., Powell, H. C. and Varon, S.** 1982. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. *Exp. Neurol.* **76** : 361-375.
  21. **Mackinnon, S. E., Hudson, A. R., Bain, J. R., Falk, R. E. and Hunter, D. A.** 1987. The peripheral nerve allograft: An assessment of regeneration in the immunosuppressed host. *Plast. Reconstr. Surg.* **79** : 436-446.
  22. **Mackinnon, S. E., Midha, R., Bain, J. R., Hunter, D. A. and Wade, J. A.** 1992. An assessment of regeneration across peripheral nerve allografts in rats receiving short courses of Cyclosporin A immunosuppression. *Neuroscience* **46** : 585-593.
  23. **Maeda, T., Mackinnon, S. E., Best, T. J., Evans, P. J., Hunter, D. A. and Midha, R. T. R.** 1993. Regeneration across stepping-stone nerve grafts. *Brain Res.* **618** : 196-202.
  24. **Midha, R., Mackinnon, S. E. and Becker, L. E.** 1994. The fate of Schwann cells in peripheral nerve allograft. *J. Neurol. Exper. Neurol.* **53** : 316-322.
  25. **Midha, R., Mackinnon, S. E., Evans, P. J., Best, T. J., Hare, G. M. T., Hunter, D. A. and Falk-Wade, J. A.** 1993. Comparison of regeneration across nerve allografts with temporary or continuous Cyclosporin A immunosuppression. *J. Neurosurg.* **78** : 90-100.
  26. **Osawa, T., Tohyama, K. and Ide, C.** 1990. Allogeneic nerve grafts in the rat, with special reference to the role of Schwann cell basal laminae in nerve regeneration. *J. Neurocytol.* **19** : 833-849.
  27. **Seckel, B. R., Chiu, T. H., Nyilas, E. and Sidman, R. L.** 1984. Nerve regeneration through synthetic biodegradable nerve guides: Regulation by the target organ. *Plast. Reconstr. Surg.* **74** : 173-181.
  28. **Smahel, J. and Jentsch, B.** 1986. Stimulation of peripheral nerve regeneration by an isolated nerve segment. *Ann. Plast. Surg.* **16** : 494-501.
  29. **Takata, H., Ishida, O., Ochi, M. and Ikuta, Y.** 1999. Rejection and regeneration in peripheral nerve homografts in rats after withdrawal of Cyclosporin: Morphological and immunohistochemical assessment. *Scand. J. Plast. Reconstr. Hand. Surg.* **33** : 373-377.
  30. **Yu, L. T., England, J., Hickey, W. F., Sumner, A., Rostami, A. and Larossa, D.** 1989. Survival and function of peripheral nerve allografts after cessation of long-term Cyclosporin A immunosuppression in rats. *Transpl. Proc.* **21** : 3178-3180.
  31. **Zalewski, A. A. and Gulati, A. K.** 1984. Failure of cyclosporin A to induce immunological unresponsiveness to nerve allograft. *Exp. Neurol.* **83** : 659-663.
  32. **Zalewski, A. A., Silvers, W. K. and Gulati, A.**

**K.** 1982. Failure of host axons to regenerate through a once successful but later rejected long nerve allograft. *J. Compar. Neurol.* **209** : 347–351.

## Influence of Interposed Segment of Autologous Nerve on Nerve Regeneration in Peripheral Nerve Allografts

Naoki SUGITA

Department of Orthopaedic Surgery, Hiroshima University School of Medicine  
(Director: Prof. Yoshikazu IKUTA)

An interposed segment of autologous nerve was used to enhance the distance over which peripheral nerve allografts would support effective nerve regeneration. Sciatic nerve allografts from DA-RT1<sup>a</sup> rats were transplanted into Lewis-RT1<sup>l</sup> rats. A sciatic nerve gap (10 mm in length) was repaired by a 25 mm allograft in which a 5 mm segment of autologous nerve was sutured between the two halves of the 20 mm allograft (interposed group), and a 5 mm segment of allograft was sutured between the two halves of the allograft (control group). Cyclosporin A was administered subcutaneously (5mg/kg/day) for 12 weeks. Six rats from each of the groups were sacrificed at 12, 13, 14, 15, 16, and 24 weeks after the graft. Nerve regeneration was evaluated using the weight of the anterior tibial muscle, histological, morphometric and immunohistochemical assessment. At 16 weeks postoperatively, the degree of nerve regeneration in the interposed group was significantly better than in the control group. It is concluded that a nerve allograft with an interposed autograft enhances regeneration superior to the ordinary allograft, because of the migration of host-derived Schwann cells into the graft from not only the proximal and distal host nerve stumps but also the interposed autograft.