

神経再生過程における軸索の空間パターン に関する研究

—神経再生過程を記述する新しい因子—

川崎医科大学 数学教室

有 田 清 三 郎

(昭和60年5月28日受付)

Studies on Spatial Patterns of Regenerating Axons as a New Factor Describing the Process of Nerve-Regeneration

Seizaburo Arita

Department of Mathematics, Kawasaki Medical School

(Accepted on May 28, 1985)

末梢神経の再生過程を電子顕微鏡写真上における再生軸索の空間配置という観点から考察した。再生神経の組織学的研究で、計量的な変量としてとりあげられてきた指標は再生神経の個数と面積(径)であったが、著者はこれらの指標に加えて、神経再生過程をさらに全体的に把握するため縫合部での再生神経の空間分布を考察した。

解析手法として空間パターン解析を用いたが、これは視察によるパターン分類を確率モデルを導入して、数量的見地から検証する方法である。

ラットの腓骨神経の同所性移植に基づく実験データを空間パターン解析した結果、再生軸索の空間パターンは再生の初期から後期にかけて

集塊型→ランダム型→規則型

と推移することが示され、神経の再生時には軸索は時間経過と共に、その相互の位置関係が大きく変動することが明らかにされた。

また、この軸索の空間パターンの推移は再生神経の成熟過程(軸索径の成熟)ともよく対応し、神経軸索の空間パターンは神経再生の進行を記述する新しい因子であることが示された。

Sections of free grafts of the common peroneal nerve of rats were examined electron micrographically, and the number, diameters and spatial patterns of the regenerating myelinated nerve fibers were analyzed at 4 week intervals until 24 weeks after the operation.

The number of myelinated nerves decreased and the diameters increased as regeneration progressed. At the initial stage of regeneration, the spatial pattern

showed clustered distribution. This was followed by distribution of a random type, and then a final stage of regular distribution. This means that during nerve regeneration not only the number and diameters of regenerating myelinated fibers, but also their mutual spatial relationship greatly changes. This change in spatial patterns corresponded well to the maturation of regenerating nerve grafts. The spatial pattern of axons seems to be a novel factor for describing the biological characteristics of nerve fiber regeneration.

Key Words ① Spatial pattern ② Regenerating axon
③ Nerve regeneration process

はじめに

切断等により損傷を受けた神経は、縫合術によってどのように再生・修復されるであろうか。これは整形外科学などの臨床医学をはじめ、生命科学においても大きな課題であるが、その再生メカニズムは未知な部分が多く、いまだ解明されていない。

この神経再生メカニズムを解明するため、組織学的な観点から研究が行われてきた。^{1)~8)} 従来の研究では、主として再生神経線維数^{1), 2), 4)~7)} や軸索直径などの神経線維の太さ^{2), 3), 8)} が取り扱われてきたが、著者はラットの腓骨神経の同所性移植による実験で、再生の初期から後期まで一定の時間をおいて、その断面の組織写真を観察するうちに、再生の初期では集塊を成し数カ所に集中して分布していた再生神経が、再生の中期ではランダムな散在に変化し、後期では比較的規則正しい配置で分布していくことを観察した。

著者はこの軸索の空間パターンが神経再生の一側面を記述する新しい因子となるのではないかと考えた。この視察を裏づけるため、組織写真上の再生軸索の配置をコンピュータ計測し、数量的な見地から再生軸索の空間パターン解析を試み、解析結果を組織学的な観点から考察した。

実験材料及び方法

体重 250~300 g の雄のラットの右腓骨神経に 2.5 cm の長さの同所性移植を行い、術後 24

週までの再生神経を 4 週間隔で観察した。^{9), 16)} 観測部位は末梢縫合部より 5 mm 中枢で、その全横断切片を作製し、この切断を単孔グリッド上に置き透過型電子顕微鏡 (HS-9) を使用し、2100 倍で 20 カ所撮影した。このネガフィルムを 3 倍に引き伸ばし 6300 倍の印画写真を作製した。写真上の有髄線維の軸索の中心及び長径、短径をディジタイザー (BID-PAD 1) を用いてコンピュータ計測した。また解析のために空間パターン解析のプログラムを作製し、ランダム点の発生、ランダム点と軸索、軸索間の最短距離を計算し、軸索の空間パターン解析を行った。¹¹⁾

空間パターン解析

神経線維や赤血球などの個体の空間配置は一般に空間パターン (spatial pattern) と呼ばれている。空間パターン解析は空間分布のランダム性の検定を利用して、個体の空間パターンを①規則型、②ランダム型、③集塊型の 3 つのカテゴリーに分類する方法である。解析方法としては大別して区画法と距離法とがある。区画法は空間を多くの区画に分け、その区画内の個体数を基に個体の空間パターンを分類する方法である。これに対して距離法は空間にランダムな点を散布させ、ランダム点と個体との距離、個体間の距離の対比によって空間パターンを分類する方法である。

本研究では距離法による解析手法を用い、空間パターン分類のための判定基準として Hopkins and Skellam の指標 $A^{13)}$ を採用し

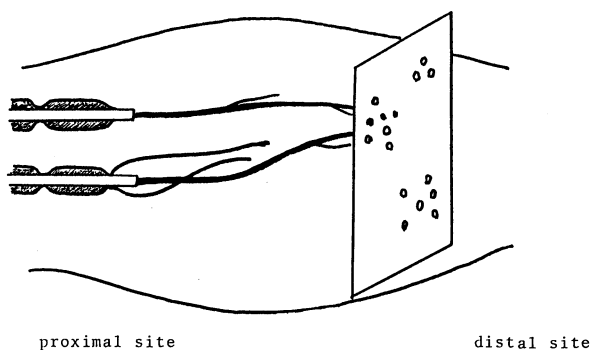


Fig. 1. Spatial distribution of regenerating axons in the transverse section.

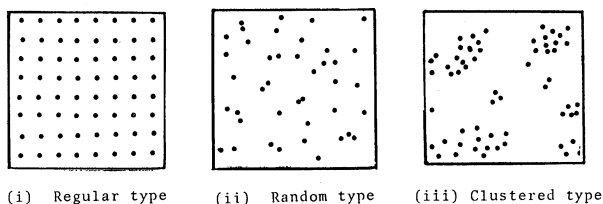


Fig. 2. Classification of spatial patterns.

た。この空間パターン解析のアプローチは樹木などの植物の分布¹⁵⁾ や動物のなわばり等に適用されているが、医用画像への適用¹⁰⁾ はきわめて少ない。

結 果

解析の対象としたのは正常及び再生8週、12週、20週の4群の有髄神経である。まず4群の神経線維数と軸索径を、次いで軸索の空間パターン解析の結果を示す。

1) 神経線維と軸索径

正常及び再生8週、12週、20週の神経線維数と軸索径の平均値及び標準偏差を Table 1 に

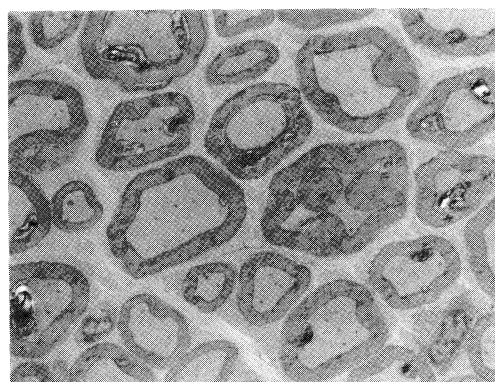
Table 1. Numbers of myelinated axons and their diameters.

	Number (per 100 μm^2)	Diameter (μm)
Regeneration (After 8 weeks)	7.175 \pm 3.027	2.059 \pm 2.314
Regeneration (After 12 weeks)	6.329 \pm 2.348	2.843 \pm 2.643
Regeneration (After 20 weeks)	3.195 \pm 1.700	3.343 \pm 2.610
Normal	2.567 \pm 1.084	6.129 \pm 2.476

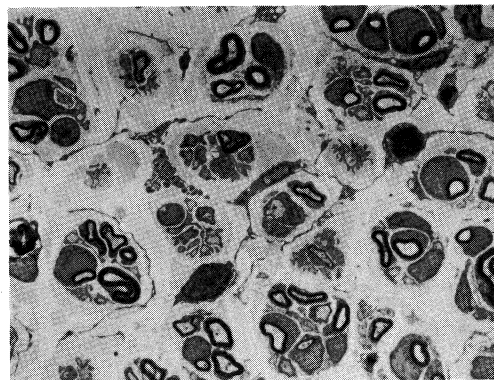
示す。径については長径と短径を計測し、軸索径として $\sqrt{\text{長径} \times \text{短径}}$ を採用した。この軸索径は対数正規分布に従うことが確かめられている。¹²⁾

2) 軸索の空間パターン解析

再生8週、12週、20週及び正常の各切片から10枚の写真標本を作製し、各写真ごとに空間パターン解析を行った。各写真標本における軸索空間パターンが3つの空間パターン・カテゴリーのいずれに属するかを判定し、この結果を Table 2 にまとめた。空間パターン解析の結果、正常ではすべてが規則型に分類されたのに対して、再生群では規則型のほかに集塊型、ランダム型の空間パターンの存在が示され、再生8週では主に集塊型とランダム型に、再生12週ではランダム型と規則型



(a) Normal



(b) Regeneration after 8 weeks

Fig. 3. Microscopic photos of transverse sections of peroneal nerves of rats.

に、再生20週では規則型に分類された。

Table 2. Results of spatial pattern analysis of myelinated axons.

	Spatial Pattern		
	regular	random	clustered
Regeneration (After 8 weeks)	1	5	4
Regeneration (After 12 weeks)	5	5	0
Regeneration (After 20 weeks)	8	2	0
Normal	10	0	0

考 察

末梢神経の再生過程について、多くの組織学的な報告がなされているが、その評価に用いられている指標は神経線維または軸索の個数と大きさ(直径など)であった。^{3), 5)}

神経が再生される過程は一般に次のように述べられている。^{19), 22)} 神経再生の初期には、切断された神経の末梢側は Schwann 細胞が崩壊し、軸索等も貪食される。Waller 変性を経て、一旦縮退した切断中枢側の軸索から、あらたに多数出芽(sprout)される。縫合部には切断の中枢側から末梢側にかけて膠原線維、線維芽細胞等により結合織が形成され、出芽した再生線維はこの結合織を架橋として末梢側へ伸長していく。本来有髄線維であったものは、この再生の途中から有髄化され、軸索も時間経過と共に成熟し、太くなってゆく。

この神経再生過程を形量学的な観点からみると、従来の研究では再生神経線維数(Number)と、成熟した再生線維または軸索の太さとしての径(Diameter)の二指標が検討されてきたが、ここではまず再生神経線維数と径について、次に再生軸索の空間パターンについて考察を行う。

1. 再生神経線維数と軸索径についての検討

Table 1 の実験結果より、正常の単位区画(100 μm^2) 当たりの平均有髄線維数 2.567 に対して、再生群のそれは、8週で7.175、12週で6.329、20週で3.195といずれも大きく増加し

ている。また時間経過と共に減少の傾向を示している。

Holmes and Young¹⁾ は家兎の脛骨神経について切断即縫合の実験を行い、再生時における再生神経線維数の増加を示し、また野村⁵⁾ は家兎に数度の同所性移植実験を試み、再生軸索を再切断・縫合すれば、そこでさらに軸索の増加再生がおり、再生線維数はある一定期間では切断回数が増えるほど、その数を増加させる特性のあることを確かめた。再生線維数の増加はこの外にも多くの研究者^{4), 6), 8), 20), 23)} によって確かめられており、今回の実験における再生線維数の増加も同様の特性を示したものと思われる。しかしながら 1 Schwann 柱における数本の再生線維をどう解釈するか等の不明な点も多く、再生線維数だけでは再生の度合いを説明することが難しい。

これに対し、Sanders and Young,²⁾ Gutmann and Sanders⁹⁾ は再生線維の太さを計量し、そこから再生の度合いを評価する方法を検討した。また Sunderland²⁰⁾ はラットの有髄軸索の径と有髄の厚さ等の検討も行っている。

今回の実験結果では、**Table 1** から平均軸索径は正常6.129 (μm) に対して再生8週では2.059、再生12週で2.843、再生20週で3.343と、再生の時間経過と共に太くなり、成熟の過程が示されている。

2. 再生軸索の空間パターンについての検討

再生神経の伸長を神経線維群の横断写真から形態学的に研究するとき、再生神経数や径が注目されたが、これに加えて本研究では再生線維が縫合部にどんな分布で配置されているかを検討した。

Figure 3 から正常では有髄神経は比較的規則正しく配列されているのに対し、再生8週では、その様式を異にしていることがわかる。また無髄線維は正常でもクラスター状の配列をしている。¹⁶⁾ 時間経過と共に、神経軸索の配列がどのように変化し、またそれがどのような再生メカニズムに由来するかを考察する。

1) 空間パターン解析の結果、ラット腓骨神経の有髄線維の空間パターンは、正常の神経で

は10枚の写真標本はすべて規則型に分類された。

神経の同所性移植後3日の間に移植片の神経線維は変性崩壊してしまうが、術後約10日目頃から切断断端より再生が始まる。^{1),20)} 実験結果では、再生群では各グループの10枚の写真標本は再生8週で(集塊型4, ランダム型5, 規則型1), 再生12週で(集塊型0, ランダム型5, 規則型5), 再生20週で(集塊0, ランダム型2, 規則型8)と分類された(**Table 2**)。またこの解析結果から正常、再生群(8, 12, 20週)の間には軸索の空間パターン・カテゴリーにおいて統計学的に有意な差が認められた。

この結果から、神経の再生過程では、軸索の空間パターンは時間の経過とともに

集塊型 → ランダム型 → 規則型
の順に推移することが示された。

2) 神経の再生過程をこのような再生神経の空間パターンの変化から論じた研究はきわめて少ない^{10),11),18)}が、この軸索の空間パターンが再生メカニズムとどのように関係しているかを考察する。

再生の初期では集塊型のパターンであったが、これは切断中枢側より出芽された数本の再生線維が集団を形成して縫合部を通過したためであろう。これに対して再生中期のランダム・パターンは縫合部において結合織が形成されたため、軸索は縦横に張りめぐらされた結合織の間隙を縫って末梢側への可能な通路を進み、その結果空間にランダムに散在したものと考えられる。再生の後期には規則型に分類され、比較的規則正しい配列を呈しているが、これは再生後期には切断面の多くの部分を有髄線維が占めてしまうことと、その間隙にある結合織が強固化され、縫合部を通過した神経線維には保護的に、また通過中あるいは通過前の神経線維には妨害的に働くためと考えられる。

またこの実験結果では再生8週から20週にかけて、軸索の直径は小から大となり、また線維数は次第に減少してその成熟過程を示す一つの指標とはなっているが、軸索径の大小ならびに線維数の多寡だけでは成熟過程のどの時期にあ

るかを判断することは難しい。そのためには別の規準をきめて対比させなくてはならない。しかし空間パターンの推移をみれば、それだけでも再生のどの時期にあるかを容易に推定することができるので、空間パターンの推移は、神経の再生過程を特徴づける、ひとつの新しい指標と考えられる。

3) 一般の末梢神経の再生過程では、軸索の数、直径ならびに空間配列は障害の度合い、手術の良否、再生能力(個体差)などによって異なり、再生の初期時点ですでに軸索径が大で空間パターンが規則型になっているものや、再生の最終時点に至ってもまだ軸索径が小さく、空間パターンも集塊型になっているものもある。一般の神経再生過程はきわめて複雑なものと思われるが、本研究でのラット腓骨神経による同所性移植実験によって得られた再生軸索の空間パターンは、神経再生過程の典型的なパターン推移を示したものと思われる。

またこのパターン推移の途中にみられたランダム・パターンは再生初期の集塊型の状態から正常の状態(軸索径が大きく、空間パターンが規則型)への移行期における重要なパターンであると思われる。

近年 Microsurgery の発達によりオリジナルな部位への神経縫合術として funicular nerve suture が行われるようになったが、再生軸索の misdirection をなくすためには、まだ多くの困難な障害がある。縫合術後にある点への刺激を別の部位で感じる等の misdirection は、神経縫合時には縫合部で再生軸索が全く無差別に末梢断端の Schwann に入る^{21),22)} いわゆる“再生神経のランダム結合”の存在を実証するものであろう。再生中期に示された軸索空間配列のランダム・パターンは、この神経ランダム結合と密接な関係があると思われるが、今後の課題として検討を行いたい。

4) 従来の再生線維の数と径だけからみる方法では、神経再生のある一面しかとらえることができなかったが、軸索の空間パターンの解析により、軸索が伸長していく際の位置的相互関係や全体の断面の中での空間配置もうかがうこ

とができ、空間パターン解析は再生メカニズムや生体の反応に関する研究の新しいアプローチと考えられる。

また本研究に使用した空間パターンの解析手法 (Hopkins and Skellam の距離法) は空間分布のランダム性の検定法に基づいた、ランダム型を中心にしたパターン分類法であるため、ランダム・パターンが重要な鍵となる場合には、この解析手法はより効力を発揮する。この意味からも空間パターン解析の再生神経への適

用は意義あるものと思われる。

稿を終えるにあたり、神経再生及び空間パターンの医学的意味づけに関して御指導をいただいた川崎医科大学薬理学教室斎藤泰一教授に、空間パターン解析の統計学的検討に御指導をいただいた川崎医科大学数学教室仮谷太一教授に感謝の意を表します。またラットの神経移植実験の共同研究で援助いただいた広島大学整形外科宮本義洋博士に感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) Holmes, W. and Young, J. Z.: Nerve regeneration after immediate and delayed suture. *J. Anat.* 77: 63, 1942
- 2) Sanders, F. K. and Young, J. Z.: The degeneration and re-innervation of grafted nerves. *J. Anat.* 76: 143, 1942
- 3) Gutmann, E. and Sanders, F. K.: Recovery of fibre numbers and diameters in the regeneration of peripheral nerves. *J. Physiol.* 101: 489—518, 1943
- 4) 荒川弥二郎: 末梢神経縫合術に関する基礎的研究. 十全会誌 74: 121, 1966
- 5) 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, 1970
- 6) 松田英雄, 山野慶樹, 中島一行, 島津 晃, 仮谷太一, 有田清三郎: 神経縫合部における再生過程の確率モデル. 整形外科 28: 1293—1267, 1977
- 7) Arita, S., Kariya, T. and Matsuda, H.: Stochastic model for the process of regeneration of nerve fibers passing through the site of nerve suture. *Proc. of International Conference of Cybernetics and Society, Tokyo*, 213—216, 1978
- 8) 宮本義洋, 有田清三郎, 仮谷太一: 末梢神経移植後の軸索再生に関する実験的研究: 有髄神経についての時系列解析. 整形外科 31: 1378—1380, 1980
- 9) Miyamoto, Y., Miyamoto, H. and Arita, S.: Nerve grafting: Time series and length series analysis of regenerated myelinated fibers. *In Posttraumatic peripheral nerve regeneration: Experimental basis and clinical implications*, ed. by Gorio, A. *et al.* New York, Raven Press. 1981, pp. 329—336
- 10) Arita, S., Miyamoto, Y. and Kariya, T.: On the distribution of axons. *Rept. Inst. Math. Soc. Kyoto Univ.* 384: 143—160, 1980
- 11) Arita, S.: The spatial pattern analysis of the regenerating axons of peroneal nerves in the rat. *Kawasaki med. J.* 10: 245—254, 1984
- 12) 宮本博子, 宮本義洋, 津下健哉, 有田清三郎, 堀 義己: 有髄軸索の平均直径と平均個数により軸索充填密度を推定する方法. 川崎医会誌 10: 349—360, 1984
- 13) Hopkins, B. and Skellam, J. G.: A new method for determining the type of distribution of plant individuals. *Annals of Botany* 18: 213—227, 1954
- 14) Byth, K. and Ripley, B. D.: On sampling spatial patterns by distance methods. *Biometrics* 36: 279—284, 1980
- 15) Pielou, E. C.: The use of point-to-plant distances in the study of the patterns of populations. *J. Ecol.* 47: 607—613, 1959
- 16) Miyamoto, Y., Arita, S., Hori, Y., Miyamoto, H., Hatano, E. and Tsuge, K.: A new computer

- assisted method for morphological assessment of peripheral nerve regeneration: Statistical analysis of spatial patterns of axons. *Hiroshima J. med. Sci.* 31: 2112—18, 1982
- 17) Hatano, E., Miyamoto, Y., Arita, S. and Hori, Y.: Application of computer system to analysis of muscle morphology: Statistical analysis of spatial pattern of muscle fibers. *Hiroshima J. med. Sci.* 33: 145—149, 1984
 - 18) Miyamoto, Y., Arita, S., Hori, Y. and Miyamoto, H.: Statistical analysis on spatial pattern to transected peripheral nerve regeneration. *In Posttraumatic peripheral nerve regeneration*, ed. by Gorio, A. New York, Raven Press. 1981, pp. 271—276
 - 19) Sunderland, S.: *Nerves and nerve injuries*. London, Livingstone. 1978, pp. 110—124
 - 20) Sunderland, S. and Roche, A.: Axon-Myelin relationship in peripheral nerve fibres. *Acta Anat.* 33: 1—37, 1958
 - 21) Cairns, H. and Young, J. Z.: Treatment wounds of peripheral nerves. *Lancet* 27: 123, 1940
 - 22) 野村 進：神経移植と再生—機能回復。草間・中井編：神経の変性と再生。東京，医学書院。1975，pp. 365—386
 - 23) 伊与暁洋：末梢神経縫合術の研究，特に縫合部における微細構造と機能再生との関係。中部整災誌 10: 522, 1967