凍結乾燥異種神経移植の実験的研究

神谷 祐二

Experimental studies on the lyophilized nerve heterografts

Yuji KAMIYA

Abstract: Experiments were performed to investigate regrowth of the rat sciatic nerve through lyophilized heterografts of 10 mm length prepared from the rabbit or rat sciatic nerve. The results were as the following:

1) Regenerating axons were able to extend through the grafted nerve in both the hetero and homografted lyophilized nerves. However, regrowth through the hetero grafts was delayed by about 4 weeks as assessed by the number of regenerating nerve fibers, latency of the EMG evoked by electrically stimulating the ipsilateral sciatic nerve, and time course of the concentration of γ -enolase in the nerve.

2) Regeneration was apparently retarded by inflammatory responses, but once regenerated axons passed through the hetero graft in which intense connective tissue proliferation was noted, regeneration proceeded rapidly, eventually catching the recovery rate of the homo grafted group. At the end of the 48 week observation period no significant differences between hetero and homografted groups were noted in terms of evoked EMG latency, rate of myelinated fiber regeneration, and γ -enolase concentration in the nerve.

3) In both the hetero and homografted groups, the recovery of β -enolase concentration of the muscles started from the 8th postoperative week. The recovery of wet weight of the muscles on the operated side started from the 12th postoperative week in the hetero grafted group, and from the 8th postoperative week in the homografted group.

4) The degree of recovery of the wet weight of the fast-twitch muscles was superior to that of the slow-twitch muscles. As to β -enolase concentrations the fast-twitch muscles recovered to near-normal levels, while the slow-twitch muscles increased to attain a level between normal fast-and slow-twitch muscle levels.

To summarize, although there is a small difference in the period immediately after operation, lyophilized hetero and homografts can, within 48 postoperative weeks, have comparable properties measurable by histological, electrophysiological and biochemical methods.

Key words: lyophilized nerve hetero-grafting (凍結乾燥異種神経移植), electromyographic response (誘発筋電図), β -and γ -enolase ($\beta \cdot \gamma$ エノラーゼ)

結 言

一般に末梢神経損傷の修復には神経の断端を適合させ

る端々縫合を行うが、神経断端を新鮮化した後その surgical gap の大きい場合には、縫合部の緊張が大きくなり、縫合部血流障害による壊死や縫合部の断裂が生じ、神経機能の良好な回復は望めない¹⁻³⁾。そこでこのよう

愛知学院大学歯学部第1口腔外科学教室
(主任: 深谷昌彦教授)
1st Department of Oral and Maxillofacial Sur-

gery, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University
(Chief: Prof. Masahiko Fukaya)
受付日: 平成元年1月10日

な場合には神経移植が行われている。神経移植には、自家、同種、および異種移植があり、この内現在もっとも臨床に応用されているのは自家神経移植である。口腔外科領域でも Hausamen ら^{6,9)}や Wessberg ら^{6,7)}により、下顎骨切除時の下歯槽神経に、腓腹筋神経や大耳介神経が移植されて以来、本邦においても野間や^{8,9)}北山ら¹⁰⁾により、同様な報告がなされるようになった。しかしながら、自家神経移植では、神経採取による採取部の知覚や運動麻痺が避けられないことや、移植部に良く適合した神経を自由に採取することは困難であり、その臨床的有用性にも関わらず、なお、広く一般に行われているとはいいがたい。このため、自家神経に替わる移植材料の基礎的な研究が行われ、凍結乾燥神経移植の有用性が報告されるようになり、整形外科領域では一部臨床応用もなされてきた^{11,12)}。一方、神経移植による神経再生を組織学的に、あるいは生理学的に観察した報告は数多くみられるが^{11,13-18)}、その支配筋の生化学的検索を行ったものは教室の中山¹⁹⁾の報告の他はほとんどみられない。そこで、著者は採取や保存が簡単で、太さや長さも容易に選択できる凍結乾燥異種神経移植による神経再生の可能性を探るために、ラット坐骨神経に家兎脛骨神経の凍結乾燥異種神経を移植し、逐的に神経再生による変化を生理学的、組織学的に検索し、さらに、神経再支配による神経や筋の影響を生化学的に検索し、凍結乾燥同種神経移植と比較検討したので報告する。

研究 方 法

1. 実験動物

donor として 1.5~2.0 kg 雄白色家兎 14 羽と 250~300 g ウイスター系雄ラット 42 匹を用いた。recipient として 250~300 g ウイスター系雄ラット 90 匹を実験に供した。

2. 凍結乾燥神経の作製法

凍結乾燥異種神経採取は家兎の坐骨神経を可及的に損傷を与えないように注意して取り出し、メスにて脛骨神経と腓骨神経に分離し、脛骨神経を生理食塩水にて洗浄した。この後、当教室の高井²⁰⁾の凍結乾燥法に準じて凍結乾燥異種神経を作製し、真空度 0.03 torr に減圧した滅菌バイアル瓶内で遮光、常温にて保存した。凍結乾燥同種神経採取にはラット坐骨神経を、可及的に損傷を与えないよう注意して取り出し、生理食塩水で十分洗浄した後、前述の方法にて作製、保存した。

3. 神経移植法

1 群各 6 匹のラットを、ペントバルビタール腹腔内麻酔下にて、腹臥位に固定した。片側大腿骨相当部に約 40 mm の皮膚切開を行い、坐骨神経を露出させ、その中央部 10 mm を切除した。生理食塩水に約 30 分間湿潤させた凍結乾燥神経をそれぞれ 10 mm に裁断し、手術用顕微鏡下に 10-0 モノフィラメントナイロン糸を用いて、

上記の欠損部に神経周膜上膜縫合にて移植した。4-0 ナイロン糸を用い筋膜および皮膚縫合にて創を閉鎖した。

以上の方法にて凍結乾燥異種神経移植群（以後異種群と略す）および凍結乾燥同種神経移植群（以後同種群と略す）を作製した。異種群、同種群ともに対照側の同名神経および筋を対照として用い、比較検討した。また、有意差の判定には t 検定を用いた。

4. 検索方法

移植片およびその周囲組織の肉眼的観察の後、電気生理学的検索を行い屠殺した。神経、筋組織を採取し組織学的、生化学的検索を行った。

1) 肉眼的観察

ペントバルビタール腹腔内麻酔下で、ラットを腹臥位に固定し、下肢より坐骨神経相当部に皮膚切開を加え、神経移植部を剥離観察した。

2) 電気生理学的検索

所定期間飼育したラット大腿筋、ヒラメ筋、長指伸筋、前脛骨筋の遠心部筋束を注意深く露出した。さらに、中極側縫合部より 10 mm 中極側に刺激電極を置き、末梢筋組織中に双心針電極を刺入し、誘発筋電図を記録した（図 1）。刺激は、1 Hz、持続時間 10~30 μ sec、0.5 mA の矩形波とした。対照側も同様にして、誘発筋電図を記録し、立ち上がり潜時（以後潜時と略す）を求めた。異種群、同種群で得られた潜時の対照側に対する回復率を求め、比較検討した。

3) 組織学的検索

移植後所定の期間飼育したラットを瀕血屠殺し、移植片より中極側と末梢側にそれぞれ 15 mm 神経を付けて採取した。中性ホルマリンによる固定後、通法のごとくパラフィン包埋をしたのち、染色にはヘマトキシリン・エオジン染色（H-E 染色）、ルクソールファースト青・ボディアン 鍍銀重染色（LFB-B 染色）を行い、移植片の縦断面と移植片中央部、移植片より 15 mm 末梢側部の横断面について、光学顕微鏡下に移植片と周囲組織との関係および軸索の再生について観察した。また横断組織標本を用い 400 倍光学顕微鏡下で、単位面積当りの再生有髄軸索密度をマニュアルカウントし、異種群と同種群を比較した。

4) 筋湿重量の検索

異種群、同種群の手術側腓腹筋外側頭、ヒラメ筋、長指伸筋、前脛骨筋の筋湿重量を測定し、対照側の同名筋に対する割合を比較検討した。

5) 生化学的検索

神経再生に伴う神経関連蛋白 γ エノラーゼ（ γ サブユニットの総和）濃度の変化と、神経再生に伴う筋組織中の筋関連蛋白 β エノラーゼ（ β サブユニットの総和）濃度変化を検討した。

(1) 試料採取法

移植後各週齢のラットを瀕血屠殺し、神経は移植部よ

図 1 誘発筋電図測定法

り 15 mm 末梢の所より採取し、氷冷下生理食塩水中で神経周膜を取り除いた後 -80°C にて凍結保存した。筋も同様に速筋型の長指伸筋と遅筋型のヒラメ筋を採取し、同時に凍結保存した。対照側神経および同名筋も同様に摘出して対照群とした。

(2) 測定法

加藤ら²²⁻²³⁾によって開発された、 β -D-ガラクトシダーゼを標識酵素とする酵素免疫測定法であるサンドイッチ法を用い、図2に示す方法により γ および β エノラーゼ濃度を測定した。蛋白量測定には、Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California) を使用し、測定値は mg 蛋白量当りで示した。

結 果

1. 肉眼的所見

異種群は炎症反応が強く、移植後2週には著しい発赤と浮腫がみられ、出血しやすかった。一方、同種群にも発赤が認められるものの、炎症性反応は軽度で、軽度の浮腫を伴っていた。4週になると、異種群の発赤や浮腫は減少したものの、周囲は血管に富む瘢痕性組織で覆われ、剥離がやや困難であった。同種群では発赤は少なく、周囲組織の瘢痕形成も少なく、剥離も容易であった。8週では異種群はさらに周囲組織との癒着が顕著となり、同種群では中極側および末梢側縫合部に周囲組織との軽度の癒着がみられた。また異種群は同種群より発赤がより強く残り、炎症反応が強いことがうかがわれた。16週では異種群は脂肪組織と瘢痕性組織に覆われるようになり、発赤も軽減した。同種群は全体が薄い瘢痕性組織に覆われるようになった。24週以降では異種群、

同種群ともに大量の瘢痕性組織の増生により剥離は困難となり、48週には発赤は両群ともに軽度残存したが、末梢側縫合部より末梢の神経は正常色で、対側の神経の太さより少し細い状態まで回復しており、同種群、異種群間に明らかな差異を認めなかった(写真1)。

2. 生理学的検索

筋電図の採取は異種群では移植後8週より1群6匹中3匹で採取されたが、1群6匹全部で採取されるようになるには12週を要した。同種群では8週にはすでに1群6匹全部で筋電図の採取が可能であった。異種群8週では持続時間の長い多相性の比較的低振幅の活動電位を認め、12週まで一部これが観察された。同種群では、すでに8週には多相性の活動電位は一部認めるのみであり、12週以降には認めなかった(写真2)。各筋における潜時を図3～6に示した。

1) 腓腹筋外側頭における潜時

異種群では、移植後8週 $8.9 \pm 1.0 \text{ msec}$ ($< \text{平均} \pm \text{標準偏差}$) ($> \text{対照側に対する回復率 } 21 \pm 3\%$)、(以後括弧内は対照側に対する回復率を示す)、48週では $2.4 \pm 0.4 \text{ msec}$ ($70 \pm 8\%$) であった。一方、同種群では、8週には $6.7 \pm 1.2 \text{ msec}$ ($27 \pm 5\%$)、48週には $2.3 \pm 0.1 \text{ msec}$ ($71 \pm 5\%$) を示した(図3)。

異種群は同種群に比較して潜時が長い傾向を示し、移植後12週では危険率5%で有意差を認めたが、24週、48週では有意差を認めなかった。

2) ヒラメ筋における潜時

異種群移植後8週では $10.7 \pm 3.3 \text{ msec}$ ($20 \pm 6\%$)、48週では $2.7 \pm 0.3 \text{ msec}$ ($64 \pm 14\%$) であったのに対し、同種群8週は、 $7.9 \pm 1.7 \text{ msec}$ ($28 \pm 9\%$)、48週では $2.4 \pm 0.2 \text{ msec}$ ($71 \pm 8\%$) であった(図4)。

図 2 エノラーゼ測定法

腓腹筋と同様に、異種群の方が同種群よりも潜時が長い傾向にあるものの有意差はなかった。

3) 長指伸筋における潜時

異種群移植後 8 週の潜時は、 11.2 ± 1.1 msec (17 ± 1 %), 48 週では、 2.7 ± 0.3 msec (70 ± 7 %) であった。同種群では、8 週 7.3 ± 1.2 msec (28 ± 6 %), 48 週 2.7 ± 0.1 msec (67 ± 4 %) であった (図 5)。

有意差検定では 8 週に 5 % の危険率で有意差を認めたが、12 週以降では両群に差はなかった。

4) 前脛骨筋における潜時

異種群 8 週では、 9.8 ± 1.9 msec (21 ± 5 %), 48 週では 3.0 ± 0.5 msec (62 ± 7 %) であり、同種群では、8 週 7.5 ± 1.8 msec (27 ± 8 %) で、48 週には 2.7 ± 0.1

msec (68 ± 4 %) であった (図 6)。

長指伸筋と同様な経過をたどり、8 週、12 週では潜時の差が異種群、同種群で認められるものの、16 週以降においては両群の差はほとんどなく、潜時の改善も軽度であり、有意差検定では両群間に有意差を認めなかった。

潜時の変化は異種群、同種群ともに、また筋の種類にも関係なく、移植後 8 週より 12 週までに急激な潜時の短縮を示した後、48 週にいたるまで徐々に回復した。

3. 組織学的所見

1) 移植後 2 週

異種群中極側縫合部では、著明な円形細胞浸潤がみられ、移植片は著しく腫大しており、再生軸索の移植片への侵入は認めなかった。移植片中央部には、一部細胞浸

写真 1 肉眼の所見

①異種群 2週 ②同種群 2週 ③異種群 48週 ④同種群 48週

写真 2 腓腹筋外側頭における誘発筋電図

①異種群 8週 ②異種群 48週 ③同種群 8週 ④同種群 48週

図3 腓腹筋外側頭における潜時

図4 ヒラメ筋における潜時

潤の認めない壊死部も存在した(写真3, 4)。同種群では、円形細胞浸潤は少なく、移植片への再生軸索の侵入が認められ、まばらながら移植片中央部に再生軸索が観察された(写真5, 6)。

2) 移植後4週

異種群では多くの血管増生を認め、移植片の腫大は減少し、再生軸索が中枢側縫合部を越えて移植片へ侵入しているところが認められた(写真7)。しかしながら、

移植片中央部には2週でみられた壊死部が一部残存するものも認められた。また、末梢側縫合部では、移植片を通った再生軸索が、末梢側に侵入している部分もみられた(写真8)。同種群では、全体に円形細胞浸潤は少なく、血管の増生も異種群ほどには認められなかった。移植片中央部では、再生軸索の走行も整うようになり、明らかに末梢側縫合部を越えて、シュワンチューブ内へ侵入しているところが認められた(写真9)。

図 5 長指伸筋における潜時

図 6 前脛骨筋における潜時

3) 移植後8週

異種群において移植片内の軸索走行は整うようになり、移植片や周囲組織への円形細胞の浸潤も軽度となり、線維性結合組織の増殖が認められるようになった。また末梢側縫合部を越えた再生軸索は、末梢側のシュワンチューブ内に侵入していた(写真10)。移植部末梢の横断面の観察では、異種群、同種群ともに増殖したシュワン細胞の中に小さな有髄軸索が散見されるようになった(写真11)。

た(写真11)。

4) 移植後16週

異種群、同種群ともに移植片周囲には脂肪組織がみられ、中枢側ならびに末梢側縫合部において再生軸索の走行の乱れは軽度となった。

5) 移植後24週

移植片の横断所見では、異種群は再生軸索が線維性結合組織によりいくつかに分断されるものがあったが、同

写真 3 異種群 2週 (H-E 染色, $\times 20$)
中枢側縫合部

写真 6 同種群 2週 (LFB-B 染色, $\times 60$)
移植片中央部

写真 4 異種群 2週 (H-E 染色, $\times 40$)
移植片中央部

写真 7 異種群 4週 (LFB-B 染色, $\times 40$)
中枢側縫合部

写真 5 同種群 2週 (H-E 染色, $\times 25$)
中枢側縫合部

写真 8 異種群 4週 (LFB-B 染色, $\times 60$)
末梢側縫合部

種群は再生軸索が比較的まとまった集合を見せ、線維性結合組織による分割は少なかった。また、再生有髄軸索は大きいものから小さいものまで不揃いであった。

6) 移植後48週

再生した移植部軸索は、両群ともに太くなり、比較的整った走行となった(写真12, 13)。両群ともに再生神

経周囲には厚い脂肪組織や線維性結合組織が認められ、線維性結合組織によって神経束は分断されていた(写真14, 15)。また移植部末梢側では、再生有髄軸索の大径化が両群ともに認められ、髄鞘の直径は大きなものから小さなものまで不揃いであった(写真16, 17)。両群間では、移植部周囲の線維性結合組織量が異種群に多少多

写真 9 同種群 4週 (LFB-B 染色, $\times 60$)
末梢側縫合部

写真 12 異種群 48週 (LFB-B 染色, $\times 320$)
移植部中央部

写真 10 異種群 8週 (LFB-B 染色, $\times 60$)
末梢側縫合部

写真 13 同種群 48週 (LFB-B 染色, $\times 320$)
移植部中央部

写真 11 異種群 8週 (LFB-B 染色, $\times 320$)
移植部 末梢側横断面

写真 14 異種群 48週 (H-E 染色, $\times 50$)
移植部横断面

いが著明な差はないと思われた。

4. 再生有髄軸索密度の検索

再生有髄軸索は移植後8週より両群ともに観察されるようになり、16週まで急速に増加した後、24週まで緩徐な増加を示したが、その後はほとんど変化しなかった。両群の再生有髄軸索密度を比較すると、移植後8週にお

いて異種群が軽度の再生の遅れを示し、危険率5%で有意差を認めるも、その後には有意な差を認めなかった(図7)。

5. 筋湿重量の検索

1) 腓腹筋外側頭

異種群では、移植後8週まで急速な筋湿重量の減少が

写真 15 同種群 48週 (H-E 染色, ×60)
移植部横断面

写真 16 異種群 48週 (LFB-B 染色, ×320)
移植部末梢側横断面

写真 17 同種群 48週 (LFB-B 染色, ×320)
移植部末梢側横断面

みられ、8週を境に増加傾向となり、16週までに急速な増加が起こり、その後は大きな変動はみられなかった。同種群では移植後4週まで筋湿重量の減少がみられたが、8週ではすでに増加傾向となっており、やはり16週までは急速な増加を示すが、それ以降はほとんど差を認めなかった。異種群の対照側に対する割合は移植後4週で $27.2 \pm 4.2\%$ 、8週で $18.9 \pm 3.9\%$ 、48週で $65.3 \pm 9.8\%$ であった。同種群の対照側に対する割合は、4週で $24.8 \pm 4.0\%$ 、8週で $32.6 \pm 6.8\%$ 、48週で $64.1 \pm 11.1\%$ であった。移植後8週および12週では危険率1%で異種群、同種群に有意差を認めた(図8)。

2) ヒラメ筋

腓腹筋と同様な変動がみられ、異種群の対照側に対す

図 7 再生有髄軸索密度

図 8 筋湿重量 (腓腹筋外側頭)

図 9 筋湿重量 (ヒラメ筋)

る割合は、移植後4週 $33.6 \pm 8.0\%$ 、8週 $23.1 \pm 9.1\%$ 、48週 $69.4 \pm 7.0\%$ であった。同種群では、4週 $26.3 \pm 3.4\%$ 、8週 $39.2 \pm 8.9\%$ 、48週 $66.6 \pm 9.1\%$ となった(図9)。異種群、同種群間には移植後8週では危険率5%で有意差を認めるものの、12週以降では有意差を認めなかった。

3) 長指伸筋

異種群、同種群ともに腓腹筋と同様な変化をたどり、異種群は移植後8週で $29.3 \pm 5.8\%$ 、同種群は4週で $37.5 \pm 4.0\%$ まで低下した後、増加して48週では、異種群 $92.7 \pm 10.0\%$ 、同種群 $88.2 \pm 9.4\%$ となった(図10)。

両群間には8週において危険率1%で有意差を認めた。

4) 前脛骨筋

異種群、同種群ともにまったく腓腹筋と同様な経過をたどり、異種群移植後8週で $24.3 \pm 10.6\%$ まで低下して、48週では $73.8 \pm 7.3\%$ まで増加した。同種群では4週で $30.3 \pm 3.6\%$ と減少した後、48週では $81.8 \pm 9.5\%$ と増加した(図11)。両群間には8週において危険率5%で有意差を認めた。

移植後48週の対照側に対する割合は、長指伸筋が最も良く約90%で、次いで前脛骨筋の約75%、腓腹筋、ヒラメ筋では増加が悪く約65~70%であった。

図 10 筋湿重量 (長指伸筋)

図 11 筋湿重量 (前脛骨筋)

6. 生化学的検索

1) 末梢側神経組織における γ エノラーゼ濃度

(1) 対照群

対照側神経組織中の γ エノラーゼ濃度は、大きな逐日的変化を伴わず、平均 30.5 ± 1.3 pmol/mg 蛋白の濃度であった。

(2) 異種群

移植後4週では、 2.95 ± 0.47 pmol/mg 蛋白 (対照群の $9.87 \pm 2.03\%$) と低下したが、8週より増加傾向を示し 4.78 ± 1.80 pmol/mg 蛋白 ($16.5 \pm 4.3\%$) となり、その後24週まで急激な増加を示した後、増加傾向は弱ま

り、48週には 20.4 ± 3.1 pmol/mg 蛋白 ($70.6 \pm 8.7\%$) となった。

(3) 同種群

移植後4週では 4.81 ± 0.76 pmol/mg 蛋白であったが8週より急激に増加し、 8.92 ± 1.88 ($29.9 \pm 6.4\%$) となり、その後徐々に増加傾向は低下し、48週には 18.4 ± 3.7 pmol/mg 蛋白 ($65.8 \pm 7.3\%$) を示した。

異種群の濃度は、移植後8週で危険率1%の有意差をもって同種群より低濃度であった。しかしながら、異種群の回復が同種群より急激なため、移植後16週には異種群濃度が同種群濃度を上回るようになった。その後48

図 12 γ エノラーゼ濃度

週まで異種群濃度は、同種群濃度より高い回復を示した
が有意差はなかった (図12).

2) 筋組織中のβエノラーゼ濃度

(1) 長指伸筋

① 対照群

平均 841 ± 25 pmol/mg 蛋白の濃度を示した.

② 異種群

移植後4週まで濃度の低下がみられ 223 ± 38 pmol/mg 蛋白 (対照群の $26.4 \pm 3.4\%$) まで低下した. その後増加して, 8週では 267 ± 68 pmol/mg 蛋白 ($28.0 \pm 10.3\%$) となり, 8週より16週にかけて急激な増加がみられた. 16週以降も徐々にその濃度は回復し, 48週には, 729 ± 73 pmol/mg 蛋白 ($80.7 \pm 6.3\%$) まで回復した.

③ 同種群

移植後4週で 241 ± 41 pmol/mg 蛋白 ($29.3 \pm 7.0\%$) と低下した後, 8週で 369 ± 97 pmol/mg 蛋白 ($48.7 \pm 9.6\%$) と増加し, 48週には 707 ± 90 pmol/mg 蛋白 ($78.8 \pm 7.2\%$) まで増加し続けた.

異種群の濃度は, 移植後8週で危険率5%の有意差をもって同種群より低濃度であった (図13).

(2) ヒラメ筋

① 対照群

平均 154 ± 9 pmol/mg 蛋白とその濃度は長指伸筋の約1/6であった.

② 異種群

移植後4週には 84.4 ± 21.5 pmol/mg 蛋白 ($56.6 \pm 12.5\%$) まで低下したが, その後は増加がみられ, 8週には対照群以下の 125 ± 28 pmol/mg 蛋白 ($62.0 \pm 9.4\%$) であるが, 12週には 195 ± 64 pmol/mg 蛋白 ($151 \pm 46\%$) となって対照群を越えるようになり, 16週まで急激な増加を示した. その後の増加は軽度で, 48週には 467 ± 108 pmol/mg 蛋白 ($304 \pm 71\%$) となった.

③ 同種群

移植後4週には 67.0 ± 38.2 pmol/mg 蛋白 ($33.2 \pm 10.8\%$) まで低下したが, 移植後8週で 179 ± 51 pmol/mg 蛋白 ($118 \pm 44\%$) と対照群を越えて増加し16週まで急激に増加した. 16週より48週まで軽度の増加を示し48週には 460 ± 135 pmol/mg 蛋白 ($277 \pm 83\%$) となった.

異種群の濃度は, 移植後8週で危険率1%, 12週で5%の有意差をもって同種群より低濃度であった (図14).

考 察

口腔領域における末梢神経損傷修復には現在自家神経移植が行われ, ほぼ満足の行く結果が得られているが, 自家神経移植は修復したい新たな神経損傷を起こすことであり, 神経損傷に伴う重大な機能障害がない限り積極的に臨床応用することはできない. そこで自家神経以

図 13 βエノラーゼ濃度 (長指伸筋)

図 14 βエノラーゼ濃度 (ヒラメ筋)

外の移植材料を見つけることができれば臨床への貢献は非常に大きく、その基礎的な研究が望まれるところである。凍結乾燥異種および同種神経移植は1943年Weiss²⁴⁾により初めて報告され、その後も欧米ではJackoby²⁵⁾やSingh²⁶⁾らに報告が見られる。本邦でも越智ら^{16,17)}や中

山¹⁹⁾は、ラット凍結乾燥同種神経移植において移植片内に再生軸索を認め、凍結乾燥同種神経移植の有用性を報告している。そこで著者は、ラット坐骨神経において凍結乾燥異種神経移植と凍結乾燥同種神経移植を行い、移植片の組織反応の差による軸索再生の違いを組織学的、

電気生理学的、あるいは筋湿重量の回復において検索するとともに、凍結乾燥異種神経移植による神経、筋の回復過程を神経・筋関連蛋白濃度を調べることにより検討した。

1. 機能的軸索再生について

再生軸索とその標的器官との機能的結合の観察法として、支配筋の収縮の視診、触診、歩容の観察、筋張力の測定、筋重量の測定、筋電図測定法などがある²⁷⁾が、再生軸索の筋組織への機能的な結合を客観的に評価する方法として、誘発筋電図の記録が有用である^{28,29)} また、筋電図所見は、神経再生の早期徴候を知る上で最も信頼できるものとされており^{28,29)}、著者は異種群と同種群の再生軸索と筋の機能的結合の差を判定するために、坐骨神経の刺激によって誘発される筋電図の採取と潜時の測定を行った。

正常な筋では個々の運動神経は散在性に筋線維を支配しているので、誘発筋電図において単相ないしは数相の誘発波となるのに対し、再生神経が支配する筋では、個々の神経が局在した筋線維を支配しているために、各筋線維は持続時間の短い電位変動を局在化して起こし、伝導速度の違いが多相性の誘発波を導く。さらに多相性の誘発波は、大部分は髄鞘の未熟な再生軸索が終板内に達し始めた時期に出現し³⁰⁾、髄鞘形成が完成するまで発生し続くといわれている³¹⁾ 本研究の異種群では8~12週から、同種群では8週頃から、多相性の振幅の小さな筋電図が観察されたことより、このころに再生軸索の筋組織への到達が起こったことが明らかであり、異種群の再生軸索の筋組織への到達は、同種群より約4週ほど遅延したことが示された。

潜時は両群ともに、またいずれの筋においても、移植後8~12週に著明な回復が認められ、16週以降は48週まで緩やかな回復が認められた。異種群と同種群の潜時を比較すると、異種群は同種群より常に長く、異種群の潜時の回復は一般的には劣っていた。しかしながら、移植後8週から16週には有意差を認めるものもみられたが、それ以降ではほとんど差を認めなくなった。これは軸索再生時に移植片に存在した強い組織反応が軸索の再生を抑制し、再生軸索と筋との機能的な結合を遅らせたものの、いったん母床の組織反応が収まり軸索再生がなされると、その後の軸索の成熟には大きな影響を及ぼし続けることは少なく、異種群と同種群の差異が消失したためと推察される。

一方、運動神経伝導速度は、軸索直径、髄鞘の有無、ランヴィエ絞輪間の距離に関連があり、周囲組織の圧迫や血流障害によっても影響を受ける^{1,29,31)} また神経再生がなされても完全な回復は困難と考えられており、70~80%程の回復しか得られないとされている^{15,27,32)} 本研究では伝導速度は測定していないが、潜時での移植後48週の回復をみると、長指伸筋は異種群70%、同種群

67%であり、腓腹筋は異種群70%、同種群71%であった。ヒラメ筋は異種群64%、同種群71%であり、前脛骨筋では異種群62%、同種群68%であった。回復パターンが腓腹筋とヒラメ筋、長指伸筋と前脛骨筋で似通っていたが、筋の種類による潜時の回復には有意差はなかった。また潜時の回復は異種群、同種群ともに60~70%で、異種群が最終的に有意に劣ることはなかった。

2. 組織学的軸索再生について

凍結乾燥異種神経移植は移植片の組織適合性の違いにより起こる強い組織反応により、移植片は全く異物として作用するのみで失敗に終わるといわれてきた^{2,13,33)}。一方、Weiss²⁴⁾は凍結乾燥異種神経移植は失敗したが、残存する結合組織の管構造の表面が整っていると、再生する軸索を導く通路として役立つと述べている。著者は異種群、移植後4週において、明らかに移植片の外廓構造に従って移植片内を伸長する再生軸索を観察したことより、ラットの10 mmという短い凍結乾燥異種神経移植では、軸索の再生が起こり、異種移植片も再生軸索を導く通路となると考える。しかし、異種群の再生軸索の伸長は同種群より明らかに遅れており、移植後2週には移植片中央部に細胞浸潤の抑制されているところが観察された。4週には再生軸索は末梢側縫合部に到達しているものの、末梢側縫合部を明らかに越えるのは、異種群では約8週であるのに対し、同種群では4週であり、異種群は同種群より4週程遅れた。これは同種群に比べ異種群では神経周辺および神経管内の組織反応が強く、再生軸索が瘢痕組織に絞扼されその伸長が障害されたものと考えられる。また、瘢痕を通過するのに要する期間 initial delay について、Jurecka ら³⁴⁾や光嶋ら³⁵⁾は、瘢痕部の線維芽細胞の活性が強いものほど initial delay の延長が起こると述べている。そこで異種群では、移植部に見られた強い組織反応が線維芽細胞の活性化を起こし、同種群より initial delay の延長が起こったものと思われる。しかし、いったん再生軸索が移植片を通過すると同種群、異種群ともに再生軸索走行は徐々に整うようになり、移植後24週には太い軸索もみられるようになり、移植後48週には異種群、同種群ともに神経束間にも線維性結合組織の侵入を認め、両群に著明な差異を認めなかった。

神経再生の組織学的な定量評価の試みが、再生軸索や再生有髄軸索の直径や密度においてなされており、種々な所見が述べられている^{27,32,35,36)}。移植部末梢側神経幹内の有髄軸索密度は、再生軸索が標的器官に到達してから一定値を示すことが明らかであり^{27,36,37)}、再生大径有髄軸索密度の増加が大きいものほど再生神経の成熟がよいと考えられている³⁵⁾。一方、前野²⁷⁾は非機能的な軸索再生においても、再生有髄軸索の大径化と有髄軸索の逐日的な増加が起こることを報告し、機能的結合ではシュワンチューブ内の再生線維数の減少が起こることを証明

している。本研究では異種群、同種群ともに移植後8週より再生有髄軸索が観察され、8週では同種群の方が多数観察されたが16週以降では両者に差は認めなかった。また24週以降では再生有髄軸索密度はほぼ一定となった。このことより、両群ともに機能的な軸索再生が起こり、両群の軸索の成熟に関しては、再生有髄軸索密度で考える限り、移植後8週には差を認めるものの、16週以降では差がないと考えられる。また、光嶋ら^{35,36)}は血管柄付遊離自家神経移植において、移植床に焼きごてによる瘢痕形成を行っても、軸索密度や再生軸索の直径に影響を及ぼさなかったと報告している。著者も両群の比較より、再生した軸索は軽度の線維性結合組織の形成量の差では、移植部末梢側神経幹内の軸索成熟には大きな影響を及ぼすことはないとする。

3. 筋湿重量回復について

神経切断後の筋萎縮は1～2週を経過してからみられ、その後急速に進行するといわれており^{38,39)}、神経再生に伴う筋湿重量の回復は70～90%とされている^{30,39,40)}。畑野ら^{39,40)}はラットの坐骨神経切断縫合実験においてこれを調べ、前脛骨筋の筋湿重量回復は、神経縫合後3か月間は急速で、1か月当り10%程の増加を示し、その後は筋湿重量の増加は少なくなり、7か月目で67%であったとしている。神経移植と縫合では直接の比較は困難であるが、異種群、同種群ともに前脛骨筋での回復は48週で70～80%となり、畑野ら³⁹⁾の切断縫合実験よりも軽度良好な回復率が得られた。しかしながら、著者の成績では同種群において、移植後48週には長指伸筋は約90%、前脛骨筋は約80%、腓腹筋外側頭、およびヒラメ筋は約65%の結果を得、筋の種類により筋湿重量の回復に差のあることを認めた。異種群においても同様に筋の種類による回復率の差が認められ、長指伸筋は約90%と最も良く回復したのに対し、前脛骨筋は約75%、腓腹筋外側頭、ヒラメ筋は約65～70%の回復率であり、最も速筋型の長指伸筋の回復がよく、遅筋型線維を幾分含む前脛骨筋や腓腹筋がこれに次いで、最も遅筋型のヒラメ筋の回復は劣ると考えられた。

筋湿重量の回復時期は、同種群では移植後8週より認められるのに対し、異種群では12週より認められ、4週ほどの差を認めた。異種群および同種群における筋湿重量回復時期の違いは、組織学的に認められた initial delay の差と良く相関していた。また電気生理学的にも誘発筋電図における多相性誘発波の観察される時期の差とも良く相関していた。また筋湿重量の回復は、移植後16週には軽度の差となり、異種群、同種群には最終的な筋湿重量回復に差異はなかった。神経再生に伴う筋湿重量の回復は、軸索流と筋線維の栄養との関係⁴¹⁾や、血液循環障害による筋の栄養障害³³⁾などによって異なると考えられているが、筋組織の違いによる回復の差異は、筋自体の再生能力に差があることによるものか、神経再生

後の運動機能回復の差異によるものか、あるいは再生軸索の影響によるものとも考えられるが、明らかではない。

4. 再生軸索の生化学的検討

エノラーゼ (2-phospho-D-glycerate hydrolyase) は解糖系の酵素であり、動物組織中には3種のサブユニット (α , β , γ) があり、5種類のアイソザイム ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\gamma\gamma$, $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$) が見つかっている。 γ サブユニットを含むエノラーゼ ($\gamma\gamma$, $\alpha\gamma$) は神経組織に多量に存在することから神経組織関連蛋白と考えられている。また、 γ エノラーゼは神経細胞体で合成され、遅い軸索流により末梢に運ばれていることから^{43,43)}、神経機能との関わりが示唆されている⁴⁴⁾。最近、Kato と Satoh²¹⁾は、神経再生時にはラット末梢神経の再生軸索中に γ サブユニット、ことに $\alpha\gamma$ 型が増加することを述べており、神経切断では $\alpha\gamma$ 型、 $\gamma\gamma$ 型ともに著明に減少したままで、ほとんど変化をみせないといっている。そこで再生軸索中の γ エノラーゼ濃度の測定により、神経再生における遅い軸索流の回復程度を判定することが可能と考えられる。

ラット坐骨神経切断縫合後の γ エノラーゼ濃度回復について、松下ら⁴⁵⁾は縫合後2週には対側の10%に低下したが、その後徐々に増加し、20週には52%まで回復したといっている。著者の研究では、異種群、同種群ともに移植後4週まで松下ら⁴⁵⁾と同様な γ エノラーゼ濃度の低下がみられたが、8週では異種群、同種群ともに γ エノラーゼ濃度の回復がみられ、再生軸索がこの時期に移植片を越えて末梢側神経管内に伸張してきたことが示された。組織学的検索において再生軸索が末梢側縫合部を明らかに越えた時期は異種群では8週であり、同種群では4週であった。しかしながら、 γ エノラーゼ濃度の回復でみる限り、再生軸索は異種群においても移植後4週から8週の間に移植部の末梢側神経管内に伸張したことが示された。一方、組織学的検索で明らかのように、同種群では移植後4週には末梢側縫合部を再生軸索が越えてはいるが、 γ エノラーゼ濃度に変動を与えるほど末梢側神経管内深くは伸張していないことがうかがえる。さらに移植後8週にみられた異種群、同種群における γ エノラーゼ濃度の有意な差は、異種群末梢側神経管内への再生軸索の伸張が、同種群より明らかに抑制されていることを示している。しかしながら、移植後12週以降では異種群と同種群の γ エノラーゼ濃度には有意な差を認めないことより、いったん再生軸索が末梢側神経管内を通過すれば、 γ エノラーゼ濃度の回復は抑制され続けることはないと考えられる。そこで、長期的な観察ではこの指標を用いる限り、遅い軸索輸送で運ばれる γ エノラーゼ濃度の回復は異種群が同種群に劣るとはいえず、凍結乾燥異種神経移植においても凍結乾燥同種移植とほぼ同等な軸索再生を促すことができると考えられる。

5. 筋の生化学的検討

エノラーゼの β サブユニット ($\alpha\beta$, $\beta\beta$) は骨格筋, 心筋などの横紋筋組織に高濃度で存在し, 特に速筋型の筋 (タイプ II 線維を多く含む) に多く含まれている⁴⁶⁾。ラットの長指伸筋, 腓腹筋, 前脛骨筋は速筋型の筋であり, β エノラーゼを高濃度で有するのに対し, ヒラメ筋は遅筋型の筋 (タイプ I 線維を多く含む) であり, β エノラーゼ濃度は低い⁴⁵⁾。また, 神経切断により筋組織中の β エノラーゼ濃度の低下が起こることや^{45, 47)}, 筋の成熟に関連して濃度変化が起こることが知られている²²⁾。さらに, 交叉神経支配により支配神経を変えたり^{47, 48)}, 除神経下に速筋型あるいは遅筋型の運動ニューロンの発火パターンに似た電気刺激を与える実験⁴⁹⁾などにより, 筋の性質が変わることが知られ, 神経機能と筋組織中の β エノラーゼ濃度は密接に関連しているため, 筋障害の指標や神経回復に伴う筋回復程度を知る指標としての β エノラーゼの有用性が指摘されている^{19, 22, 47, 50)}。

軸索再生による β エノラーゼ濃度の回復について, Matushita ら⁴⁷⁾はラット坐骨神経の切断縫合実験を行い, 切断後2週において最も低下した後, 再生軸索が縫合部を越えてから徐々に増加して, 移植後20週では長指伸筋は70%, ヒラメ筋は300%まで増加したといっている。また, 中山¹⁹⁾も同種神経移植により長指伸筋の β エノラーゼ濃度は, 移植後48週には正常値の約80%まで回復するのに対し, ヒラメ筋の β エノラーゼ濃度は正常値を越えて約300%まで増加することを示した。そこで, 一般に神経再生による筋の再支配は無秩序になされと考えられている³⁵⁾にもかかわらず, 長指伸筋の濃度がヒラメ筋のそれと同一の水準にならない原因について, ①速筋型運動ニューロンと遅筋型運動ニューロンとはそれぞれ標的筋細胞とある程度の親和性を持つこと, ②筋細胞自体に β エノラーゼ産生力の差があることなどが考えられている^{19, 47)}。著者の研究においても同様に, 異種群, 同種群ともに移植後48週には, 速筋型の筋である長指伸筋は正常値の約80%まで回復したのに対し, 遅筋型の筋であるヒラメ筋は, 正常値を越えて約300%まで増加した。しかしながら, ヒラメ筋 β エノラーゼ濃度が長指伸筋濃度と同程度となることはなく, 正常なヒラメ筋と長指伸筋の中間的な性質となった。

一方, 異種群, 同種群における β エノラーゼ濃度の有意な差は, 長指伸筋では移植後8週に, ヒラメ筋では移植後8週~12週に認められ, 異種群の筋回復は同種群よりもわずかながら遅れることが明らかである。しかしながら, これらの時期に認められた β エノラーゼ濃度の差は, 移植後16週以降には認められず, 長期的な観察における筋回復は β エノラーゼ濃度を指標としても, 異種群は同種群と同程度であると考えられる。

さらに, 筋の回復時期を示す指標を比較すると, 電気生理学的に筋電図の採取の可能となった時期と, β エノ

ラーゼ濃度の回復が認められた時期は一致した。一方, 筋湿重量を指標とした場合, 異種群は移植後8週ではまだ回復傾向を示さなかったことより, 筋の回復時期は, 他の指標を用いた場合より少し遅れて現れると考えられた。

結 語

ラット坐骨神経に10 mmの凍結乾燥異種および同種神経移植を行い, 軸索の再生と筋の回復を比較検討し次のような点を明らかにした。

1. 凍結乾燥異種神経移植において移植片の外郭構造に従って軸索再生が起こることを認めた。

2. 再生軸索が移植片を通過する時期は組織学的検索, 誘発筋電図立ち上がり潜時の測定あるいは γ エノラーゼ濃度測定により, 異種群は同種群よりも約4週遅れた。

3. 異種群では同種群に比較して, より強い炎症反応が起こり, 再生軸索が移植片を通過するのが抑制されるが, いったん軸索が再生されればその軸索の成長は周囲の瘢痕組織により特に抑制されることはなく, 潜時の回復や再生有髄軸索密度, さらに γ エノラーゼ濃度回復も長期的観察では同種群とほぼ同等となった。

4. β エノラーゼ濃度回復は異種群, 同種群ともに移植後8週より観察されたが, 筋湿重量回復は異種群は12週より, 同種群は8週より観察された。一方, 長期的な観察では異種群の β エノラーゼ濃度や筋湿重量の回復は同種群とほぼ同程度であった。

5. 異種群, 同種群ともに筋の種類により回復程度は異なり, 筋湿重量では速筋型の筋ほどよく回復し, 遅筋型の筋は劣った。一方, β エノラーゼ濃度では速筋型の筋は正常値近くまで回復したのに対し, 速筋と遅筋の中間的な性質となった。

以上より, 凍結乾燥異種神経移植では, 組織学的, 電気生理学的, 生化学的な諸検索において, 移植片を再生軸索が通過する時期が凍結乾燥同種神経移植より遅れるものの, 長期的な観察ではほぼ同程度の神経および筋の回復が得られることが判明した。

稿を終えるに当たり, 終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜った本学第1口腔外科学教室深谷昌彦教授ならびに本学生理学教室佐藤豊彦教授, 愛知県発達障害者研究所生化学部長加藤兼房博士に深甚の謝意を表します。また, 終始ご指導ご教示いただきました第1口腔外科学教室高井克慈助教授に深謝するとともに, ご協力いただきました教職員各位に厚くお礼申し上げます。

本論文の要旨は, 第40回日本口腔科学会総会 (昭和61年5月, 福岡), 第31回日本口腔外科学会総会 (昭和61年10月, 久留米) において報告した。

引用文献

- 1) 中里哲夫：末梢神経縫合時の縫合部張力に関する実験的検討。北海道整形災害外科雑誌 30: 1-8 1986.
- 2) 広谷速人, 山本 潔：神経移植術—その適応と手技のポイント— 災害医学 20: 41-48 1977.
- 3) Millesi, H., Meissl, G., et al.: Further experience with interfascicular grafting of the median, ulnar, and radial nerves. *J Bone & Joint Surg* 58A: 209-218 1976.
- 4) Hausamen, J.E., Samii, M., et al.: Repair of the mandibular nerve by means of autologous nerve grafting after resection of the lower jaw. *J max-fac Surg* 1: 74-78 1973.
- 5) Hausamen, J.E., Samii, M., et al.: Indication and technique for the reconstruction of nerve defects in head and neck. *J max-fac Surg* 2: 159-167 1974.
- 6) Wessberg, J.A., Wolford, L.M., et al.: Bilateral microneurosurgical reconstruction of inferior alveolar nerves via autogenous sural nerve transplantation. *Oral Surg* 52: 465-470 1981.
- 7) Wessberg, J.A., Wolford, L.M., et al.: Experiences with microsurgical reconstruction of the inferior alveolar nerve. *J Oral Maxillofac Surg* 40: 651-655 1982.
- 8) 野間弘康, 山根源之, 他：下顎骨切除後の下歯槽神経欠損を大耳介神経の遊離移植により再建した1症例。日口外誌 25: 692-698 1979.
- 9) Noma, H., Kakizawa, T., et al.: Repair of the mandibular nerve by autogenous grafting after partial resection of the mandible. *J Oral Maxillofac Surg* 44: 31-36 1986.
- 10) 北山誠二, 梅村長生, 他：下顎骨切除後の大耳介神経移植の経験。日口外誌 26: 797-803 1980.
- 11) Marmor, L.: The repair of peripheral nerves by irradiated homografts. *Clin Orthop* 34: 161-169 1964.
- 12) Campbell, J.B., Bassett, C.A.L., et al.: Frozen-irradiated homografts shielded with microfilter sheaths in peripheral nerve surgery. *J Trauma* 3: 303-311 1963.
- 13) 青山邦彦：ヌードマウスにおける新鮮異種神経移植の研究。中部整災誌 25: 1126-1138 1982.
- 14) 平沢泰介：電子線大量照射による異種神経移植に関する実験的研究。京府医大誌 78: 369-388 1969.
- 15) 玉井和夫：新鮮同種移植における組織適合性に関する実験的研究。京府医大誌 94: 331-344 1985.
- 16) 越智浩一, 古屋光太郎, 他：凍結乾燥同種神経移植に関する実験的研究。整形外科 29: 1304-1306 1978.
- 17) 越智浩一, 磯部 饒, 他：凍結乾燥同種神経移植の実験的研究。整形外科 32: 1405-1407 1981.
- 18) 荒井孝和：凍結乾燥同種神経移植についての基礎的研究—電顕所見を中心として—。日手会誌 1: 797-802 1985.
- 19) 中山和久：凍結乾燥同種神経移植に関する実験的研究—組織学的・電気生理学的検索および神経・筋関連蛋白の測定—。日口外誌 34: 1225-1274 1988.
- 20) 高井克憲：凍結乾燥軟骨に関する研究—凍結乾燥軟骨の作成法—。日口外誌 30: 1099-1103 1984.
- 21) Kato, K. and Satoh, T.: Changes in the concentration of enolase isozymes and S-100 protein in degenerating and regenerating rat sciatic nerve. *J Neurochem* 40: 1076-1081 1983.
- 22) Kato, K., Shimizu, A., et al.: Tissue distribution, developmental profiles and effect of denervation of enolase isozymes in rat muscles. *Biochem Biophys Acta* 841: 50-58 1985.
- 23) Kato, K., Suzuki, F., et al.: Determination of brain enolase isozymes with an enzyme immunoassay at the level of single neurons. *J Neurochem* 37: 998-1005 1981.
- 24) Weiss, P. and Taylor, C.: Repair of peripheral nerves by grafts of frozen-dried nerve. *Proc Soc Exp Biol and Med* 52: 326-328 1943.
- 25) Jackoby, W., Fahlbusch, R., et al.: Transplantation lyophilisierter homoioplastisch Nerven zur Überbrückung peripherer Nervendefekte beim Menschen. *Fortsch Med* 88: 183-184 1970.
- 26) Singh, R., Lange, S.A.: Experience with homologous lyophilized nerve grafts in the treatment of peripheral nerve injuries. *Acta Neurochirurgica* 32: 125-130 1975.
- 27) 前野紘一：再生末梢神経線維の成熟に関する実験的検討—終末器官との機能的結合の影響について—。中部整災誌 25: 1795-1808 1982.
- 28) 椎名晋一, 福沢 等, 他：臨床検査講座11臨床生理学。第2版, 医歯薬出版, 東京, 1979, 157-174頁。
- 29) Sanders, F.K. and Whitteridge, D.: Conduction velocity and myelin thickness in regenerating nerve fibers. *J Physiol* 105: 152-174 1946.
- 30) 村上白士：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攣縮に関する研究。中部整災誌 6: 232-258 1963.
- 31) 光嶋 勲, 波利井清紀：血管柄付神経移植の研究—第4報瘢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.
- 32) 難波泰樹：末梢神経縫合後の神経再生の研究—軸索内輸送および電気生理学的、組織学的所見について— 中部整災誌 25: 673-686 1982.
- 33) 野村 進：末梢神経外科治療の進歩. 外科治療 24: 323-333 1971.
- 34) Jurecka, W., Ammerer, H.P., et al.: Regeneration of a transected peripheral nerve. An autoradiographic and electron microscopic study. *Acta neuropath (Berl)* 32: 299-312 1975.
- 35) 光嶋 勲, 波利井清紀：血管柄付神経移植の研究, 第3報：瘻痕内に移植した神経の軸索再生に関する組織定量的検索. 日形会誌 3: 871-881 1983.
- 36) 光嶋 勲, 波利井清紀, 他：血管柄付神経移植の研究, 第2報：移植神経の軸索再生に関する組織定量的検索. 日形会誌 3: 303-312 1983.
- 37) 伊藤鉄雄：末梢神経の外科. 医学書院, 東京, 1977, 64-81頁.
- 38) 野村 進編集：整形外科MOOK, 19末梢神経損傷. 金原出版, 東京, 1981, 158-170頁.
- 39) 畑野栄治, 平松伸夫, 他：整形外科領域における組織移植：その3, 脱神経筋と神経縫合後の筋肉の回復過程について. 広島医学 36: 1289-1295 1983.
- 40) 畑野栄治, 生田義和, 他：神経縫合とその予後. 整形外科 31: 1380-1383 1980.
- 41) 初山泰弘：末梢神経損傷のリハビリテーション. 災害医学 16: 498-506 1973.
- 42) Marangos, P.J., Zomzely-Neurath, C., et al.: Determination and characterization of neuron specific protein (NSP) associated enolase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 68: 1309-1316 1976.
- 43) Barady, S.T. and Lasek, R.J.: Nerve-specific enolase and creatine phosphokinase in axonal transport: Soluble proteins and the axoplasmic matrix. *Cell* 23: 515-523 1981.
- 44) Perez, V.J., Olney, J.W., et al.: Wallerian degeneration in rabbit optic nerve: Cellular localization in the central nervous system of the S-100 and 14-3-2 proteins. *J. Neurochem* 17: 511-519 1970.
- 45) 松下秀典, 加藤兼房, 他：神経切断縫合および交叉縫合にともなう長指伸筋, ヒラメ筋の β -enolase 含量の変動. 神経化学 24: 583-585 1985.
- 46) Ibi, T., Sahashi, K., et al.: Immunohistochemical demonstration of β -enolase in human skeletal muscle. *Muscle & Nerve* 6: 661-663 1983.
- 47) Matsushita, H., Yamada, S., et al.: Muscle-specific β -enolase concentrations after cross and random innervation of soleus and extensor digitorum longus in rats. *Exp Neurol* 93: 84-91 1986.
- 48) Buller, A.J. and Lewis, D.M.: Further observations on mammalian cross-innervated skeletal muscle. *J Physiol* 178: 343-358 1965.
- 49) Lomo, T., Massoulié, J., et al.: Stimulation of denervated rat soleus muscle with fast and slow activity patterns induces different expression of acetylcholinesterase molecular forms. *J Neurosci* 5: 1180-1187 1985.
- 50) 奎野謙次, 陸 重雄, 他：神経筋疾患における血清 muscle-specific enolase 値の分析—新しい筋障害の指標としての可能性について— 臨床神経 23: 852-860 1983.