

ラット胎仔の脊髄再生に関する実験的研究

山 崎 健

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11月6日

受理 平成13年12月7日

胎内手術によるラット胎仔の脊髄損傷モデルを作製し, 免疫組織化学的手法を用いてグリア細胞の変化を経時的に観察した。成熟ラットにおける脊髄損傷を対照手術群として比較を行い, 両者におけるグリア細胞環境の相違を探ることを本研究の目的とした。

脊髄損傷部において, 対照手術群では活性化されたアストロサイトの経時的な増生がみられたが, 胎内手術群では活性化されたアストロサイトは術後3日および7日の損傷後早期に僅かにみられるもののその後速やかに消退していた。対照手術群では術後21日および35日で脊髄損傷部に瘢痕形成がみられたが, 胎内手術群では認められなかった。また損傷部において, 胎内手術群では類円形のマクローファージ様の細胞が術後3日および7日の損傷早期にみられ, その後は消退していたが, 対照手術群では術後3日から21日まで認められた。胎内手術群ではマクローファージ様の細胞による破壊された組織の貪食, 処理が短時間で終了するためと考えられた。さらに損傷部では胎内手術群において術後21日および35日で脊髄の連続性を有するものには静止型のミクログリアがみられたが, 脊髄の連続性を有しないものでは静止型のミクログリアは認められなかった。

損傷部より頭側および尾側に5 mm離れた部分では, 対照手術群において術後21日および35日で白質に反応型ミクログリアが認められたが, 胎内手術群では認められなかった。胎内手術群ではワーラー変性が起こらないため, 反応型ミクログリアが出現しなかったと思われる。

本研究により神経再生に関するグリア細胞の役割が, グリア細胞自身や周囲の細胞の成熟度, 損傷部位, 損傷部周囲の状況などの要因で変化する可能性があること, および脊髄損傷後に生じる活性化されたグリア細胞の速やかな消失が損傷した中枢神経の修復に重要な意味を持つ可能性があることが示唆された。

Key words: 胎仔手術 (Fetal surgery), 脊髄損傷 (Spinal cord injury), アストロサイト (Astrocytes), ミクログリア (Microglia)

ヤツメウナギやイモリなど, ある種の脊椎動物では, 脊髄が切断されても再生するが, 哺乳動物では再生せず, たとえ再生しても機能的意義はないといわれてきた。しかし近年, 末梢神経⁸⁾, 中枢神経²⁷⁾, 培養細胞³⁹⁾, 神経栄養因子⁵⁾などの移植や使用により, 損傷脊髄の再生が試みられ, 軸索が再生し, 脊髄の機能が回復したとする報告が散見されており^{5,8,27,39)}, ヒトの脊髄損傷に対して, 失われた神経回路を再構築できる可能性があることが示唆されている。

中枢神経の再生を促進する方策として未成熟な脊髄を移植する意図は, 未成熟な脊髄は成熟した脊髄よりも再生軸索が伸長しやすい細胞環境にあると考えられているためである。胎仔神経組織では, 神経回路の形

成過程でさまざまな「手掛かり因子」(Guidance cues)^{22,45)}が発現して, 線維投射を誘導するとされている。「手掛かり因子」は損傷を受けた中枢神経の修復にも役割を果たしている可能性があり, 直接神経細胞に作用するものの他にグリア細胞などを介して間接的に影響を与えるものがあると考えられている²³⁾。

これまでの脊髄損傷後の神経再生の研究は再生軸索の伸長に主眼がおかれたものが多く, このような再生軸索の伸長に対するグリア細胞を含めた細胞環境の関与の検討はほとんど行われていない。本研究の目的は, 胎仔ラットの脊髄損傷モデルを作製し, 免疫組織化学的手法を用いて損傷脊髄におけるグリア細胞を経時的に観察し, 成熟ラットと比較することによって, 両者

におけるグリア細胞環境の相違を探ることである。

対象と方法

生後15週の成熟した雄・雌 Wistar 系ラットを同一ケージ内で飼育し、翌朝に膣栓が確認された雌ラットを妊娠母獣とした。膣栓を確認した日を妊娠0日と換算し、妊娠19日において胎内手術手技を用いた胎仔脊髄切断モデルを作製した。

なお、本研究のプロトコールは、広島大学医学部附属動物実験施設倫理委員会の承認を得ている。

脊髄切断モデル

1) 胎仔脊髄切断モデル

妊娠母獣の腹腔内に、0.5 ml/kg のペントバルビター

ル・ナトリウム（ネンブタール, Abbott Laboratories 社, North Chicago, U.S.A.）を投与し、剃毛後、腹部を切開して、子宮を露出させた。ラットの子宮は双角子宮であり、それぞれの子宮角に平均6匹、両側で12匹前後の胎仔が入っており、手術操作に都合の良い1匹の胎仔を選択し、その他の胎仔は腹腔内に還納した。選んだ胎仔を摂氏40度の暖かい生食を浸したガーゼで愛護的に包み、微小血管固定鉗子（瑞穂医科工業社, 東京）で胎仔を固定した。手術操作は手術用顕微鏡（オリンパス OME, オリンパス光学工業社, 東京）を用いて行った。

子宮壁は薄く、胎仔の体位を透見することができるので、肋骨を指標に第8～10胸椎レベルを確認し、



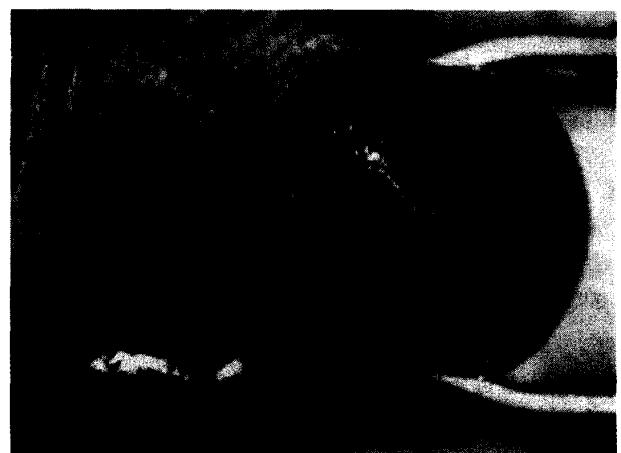
A



B



C



D

Fig. 1. Fetal surgery

- A. Four stay sutures using 10-0 monofilament nylon.
- B. Bulging of the amnion.
- C. Exposure of the lamina.
- D. Transected spinal cord.

子宮壁の切開創が拡大するのを防ぐため、子宮筋層に10-0 ナイロン糸で、胎仔脊髄を囲むように4本の支持糸をかけ、この結紮部位の間で子宮膜・羊膜を切開した。切開方向は胎仔の長軸方向に一致させた。第8～10胸椎の椎弓切除を行い、硬膜を切開し、レーザー・ブレード (FEATHER S BLADE, フェザー安全剃刀社, 大阪) を使用して脊髄を横切した。脊髄が完全に切断されたことを手術用顕微鏡下に確認したのち、胎仔皮膚を10-0 ナイロン糸で縫合し、次に羊膜、子宮膜を縫合して胎仔を腹腔内に還納した。母獣の腹部を縫合して手術を終了した (Fig. 1)。

胎内手術のために減少した羊水を、摂氏37度に加温した生理食塩水で縫合部が離開しない程度まで補った。胎仔は妊娠22日で自然分娩後、同一ケージ内で母獣に哺育させた。

2) 対照・成熟ラット脊髄切断モデル

生後7週齢の雄ラット (体重180～220 g) 20匹に対して、ペントバルビタール・ナトリウム 0.5 ml/kg を腹腔内に投与し、剃毛後に背部皮膚の正中縦切開を行い、傍脊柱筋を剥離し、第8～10胸椎の椎弓切除を行った。レーザー・ブレードを使用して脊髄を完全に横切したのち、傍脊柱筋、皮膚を各々縫合し手術を終了した。

評価方法

1) 胎仔脊髄切断モデル

脊髄切断を施行した妊娠19日を術後0日とし、分娩が行われた妊娠22日すなわち術後3日を生後0日とした。生後0, 4, 18, 32日において、胎内手術を行った仔獣の生存率、行動学的所見、脊髄の組織学的所見、脊髄の免疫組織化学的所見について評価した。なお、行動学的所見は幼若ラットでは評価することが困難なため、生後32日のラットのみを評価の対象とした。

A) 胎内手術を行った仔獣の生存率

自然分娩直後に出生した仔獣を観察し、手術を行った胎仔が存在しない場合を胎内死亡、存在するが死亡している場合を死産とした。また、出生後に母獣により捕殺された場合、あるいは虚弱による衰弱死を早期死亡とした。

B) 行動学的所見

術後35日 (生後32日) まで生存させた仔獣を対象に、motor performance score (MPS) を使用して行動学的評価を行った⁴⁶⁾。MPS は righting (寝返り反射), withdrawal reflex (疼痛刺激反射), beam walk (歩行能力) でラットの行動学的所見を点数化し、定量評価するための10点満点のスコアである。0～1点は運

動がほとんど見られず、2～3点は反射的な動きがみられるのみであり、4～5点では荷重のみなんとか可能であり、6～7点では協調運動は困難だが歩行でき、8～10点は正常とほとんど変わらず歩行可能である。ラット後肢の運動機能を運動可能群 (MPS 8～10点), 運動中等度可能群 (MPS 4～7点), 運動不能群 (MPS 0～3点) の3段階に分類した。

C) 脊髄組織の摘出と切片の作製

生後18, 32日のラットの腹腔内に、0.5 ml/kg のペントバルビタールナトリウムを投与し、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行ったのち、手術用顕微鏡を用いて脊髄のみを注意深く取り出して、摂氏4度の15%および20%蔗糖溶液にそれぞれ24時間浸漬した。その後、摘出した脊髄を凍結切片作製用包埋剤 (OCT compound, Miles No. 4583, Elkhart, Indiana, U.S.A.) で包埋し、摂氏-80度で凍結したのち、クリオスタット (HM 500-OM, Carl Zeiss 社, Germany) を使用して10 μ mの連続矢状断切片を作製した。なお生後0, 4日のラットは、氷上に3～5分置くことで仮死状態として、同様の処理を行った。

D) 組織学的観察

①ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色

H.E. 染色にて脊髄組織および細胞の形態を光学顕微鏡下に観察した。

②免疫組織化学染色

脊髄切片を pH 7.4, 10 mM 磷酸緩衝液 (Phosphate buffered saline, PBS) で3回洗浄のち、10%正常ウサギ血清あるいはラット血清に60分浸漬した。続いて、一次抗体として星状膠細胞 (アストロサイト) のマーカーにはウサギ抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (Biomedica社, Hayward, CA, U.S.A.) および小膠細胞 (ミクログリア) のマーカーにはラット抗 complement CR3 (OX-42) 抗体 (Biosys社, Compiègne, France) を使用し、摂氏4度で24時間反応させた。PBS で洗浄後、さらにビオチン化ヤギ抗ウサギ抗体あるいはビオチン化ウサギ抗ラット抗体 (Vector Laboratories社, Burlingame, CA, U.S.A.) を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1%過酸化水素水を含むメタノールで30分処理したのち、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Vector Laboratories社, Burlingame, CA, U.S.A.) と反応させた。PBS で洗浄後、アビジン・ビオチン複合体をジアミノベンチジン (diaminobenzidine, DAB) で発色させた。一次抗体のかわりに正常ヤギおよびウサギ血清加えたものを陰性対照とした。

2) 対照・成熟ラット脊髄切断モデル

脊髄切断後3, 7, 21, 35日目に, 組織学的所見, 免疫組織化学的所見について胎仔脊髄切断モデルと同様の評価を行い比較検討した。

3) 統計学的検討

OX-42 染色を行った切片については, 光学顕微鏡 (Optiphot-2, ニコン, 東京) にカラービデオカメラ (XC-003, ソニー, 東京) およびパーソナルコンピューター (Power Macintosh 8500/120, Apple Computer, CA, U.S.A.) を接続し, 読み込んだ画像よりコンピューター上で画像解析用ソフト Mac ASPECT (三谷商事, 福井) を用いて陽性細胞数のカウントを行った。このデータをもとに, Shinoda ら⁴¹⁾の Immunological score を用いて免疫染色の定量的評価を行った (Table 1)。脊髄切断部と切断部より頭側および尾側に 5 mm 離れた部位の, 細胞体や細胞突起の肥大, 伸長が認められる反応型の OX-42 陽性細胞のみをカウントし, 単位面積 (0.25 mm²) あたりの細胞数と細胞の形態を基準にそれぞれの部位の Immunological score を算出した。

対照と胎仔脊髄切断モデルの各群間における OX-42 陽性細胞の Immunological score の経時的変化は Kruskal-Wallis 検定, また各日における両群間の比

Table 1. Immunological score by Shinoda, M. et al. When immunoreactive fibrous process were noted the score were incremented by 0.5, 1 or 2 for small, moderate or large amounts of such fibrous materials.

Numbers of cells/0.25 mm ²	Points
0-3	0
4-7	0.5
8-12	1
13-20	1.5
21-40	2
41-100	3
101-200	4
200<	5

Table 2. Survival rate and course of death

	No.	No. (%)
Survival	25	33.3
Death	50	66.7
Fetal death	29	38.7
Stillbirth	11	14.7
Debility etc.	10	13.3
Total	75	100

較は Mann-Whitney 検定を用いて危険率 5%未満をもって有意差有りとした。

結 果

1) 胎内手術を行った仔獣の生存率・死亡原因 (Table 2)

胎内手術による胎仔の脊髄切断を行ったラット75匹のうち, 分娩時に生存していた仔獣は35匹であり, 胎内死亡は29匹, 死産は11匹であった。出生率は46.7%であった。分娩時に生存していた仔獣35匹のうち10匹は生後2週までにケージより消失しており, 母獣に捕食されたと考えられる早期死亡例であった。

脊髄を観察することができたのは25匹であった。生後0, 4, 18日にそれぞれ5匹, 残る10匹は生後32日で処置を行った。

2) 行動学的所見と組織学的所見の比較

生後32日で, 10匹の仔獣の行動学的所見を検討したところ, MPS 8~9点の運動可能群が3匹, 4~5点の運動中等度群が2匹, MPS 2点の運動不能群が5匹であった。運動可能群では多くの脊髄白質および灰白質の連続性が認められ, 運動中等度群では一部索状の白質および灰白質の連続性が認められるのみであった。運動不能群では脊髄は切断部で連続性が途絶し, 脊髄の途絶部位では白質が灰白質を包み込んでいた (Fig. 2)。

3) 組織学的所見

A) 対照・成熟ラット脊髄切断モデル

脊髄切断後3日では切断部に壊死組織がみられ, 白血球浸潤を伴っており, 著明な浮腫と軽度の炎症細胞浸潤がみられた。脊髄切断後7日では, マクロファージの浸潤が一層著明となり, 壊死組織はほとんど消失し, 空洞形成を伴っていた。切断部周囲には毛細血管の新生が多くみられた。脊髄切断後21日では, 壊死組織は消失し, 空洞形成が多くみられるようになり, グリア細胞の増生が進み, 切断部の境界が明瞭となっていた。切断後35日では切断部に膠原線維すなわち瘢痕組織の介在がみられた (Fig. 2)。

B) 胎仔脊髄切断モデル

脊髄切断後3日 (生後0日) では, 脊髄切断部に浮腫と軽度の炎症細胞浸潤がみられたが, 脊髄切断後7日 (生後4日) では, 損傷部に空洞形成はみられず, 切断部周囲の毛細血管の新生は軽度であった。脊髄切断後21日 (生後18日) では, グリア細胞の増生および空洞形成は認めず, 脊髄切断後35日 (生後32日) でも切断部には瘢痕組織の介在がみられなかった (Fig. 2)。

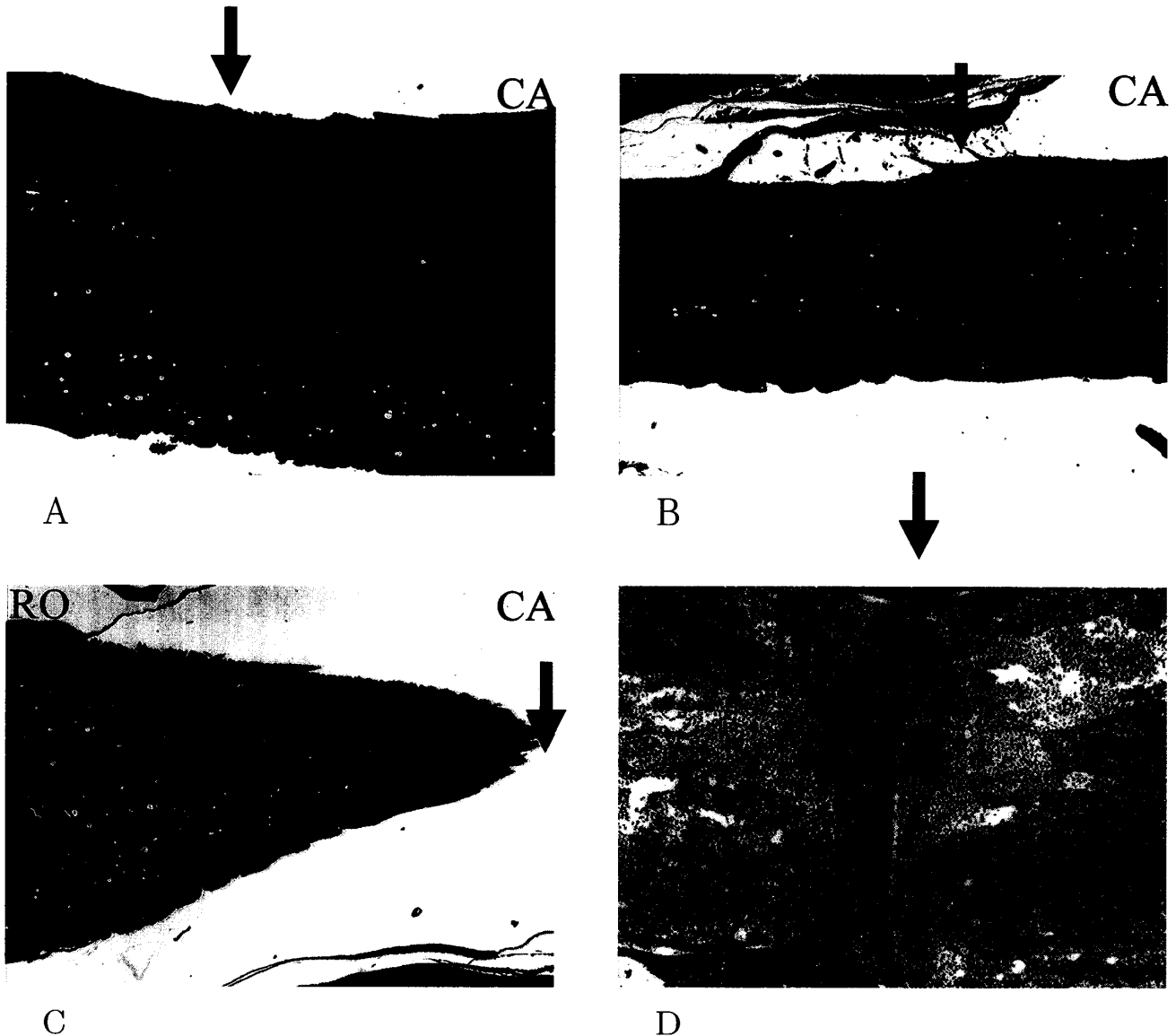


Fig. 2. Spinal cord at 5 weeks after fetal surgery (A, B, C) and adult surgery (D). Arrows show the lesion sites of the spinal cord.

A. Motor performance score (MPS) 8, able to walk faultlessly. Spinal cord was connected.

B. MPS 5, able to wait bearing. Spinal cord was connected partially. Very few nerve fibers traversed the lesion site.

C. MPS 2, unable to walk. The cut end of the spinal cord was separated by a space of one to two vertebral segments. White matter was wrapped around the spinal cord. Connective tissue scarring at the site of transection was absent.

D. In the adult rat there was significant connective tissue scar formation.

(RO: rostral, CA: caudal) (Scale bar=1 mm, applicable to all sections)

4) 免疫組織化学的所見

A) GFAP 染色

①対照・成熟ラット脊髄切断モデル

脊髄切断後3日では、壊死組織内にGFAP陽性細胞は認められなかったが、切断部周囲組織にはGFAP陽性細胞が認められ、その大きさは軽度肥大し、細胞突起がやや延長していた。脊髄切断後7日では、

GFAP陽性細胞はさらに肥大し、細胞突起も肥大、延長して損傷部との境界で密に配列していた。脊髄切断後21日では、切断部と周囲組織は次第に境界されて境界壁が形成され、この部分には多数のGFAP陽性細胞の増生とともに、境界部に細胞突起が密に配列していた。脊髄切断後35日では、さらにGFAP陽性細胞が増生し、細胞突起の配列も密になっており、切断

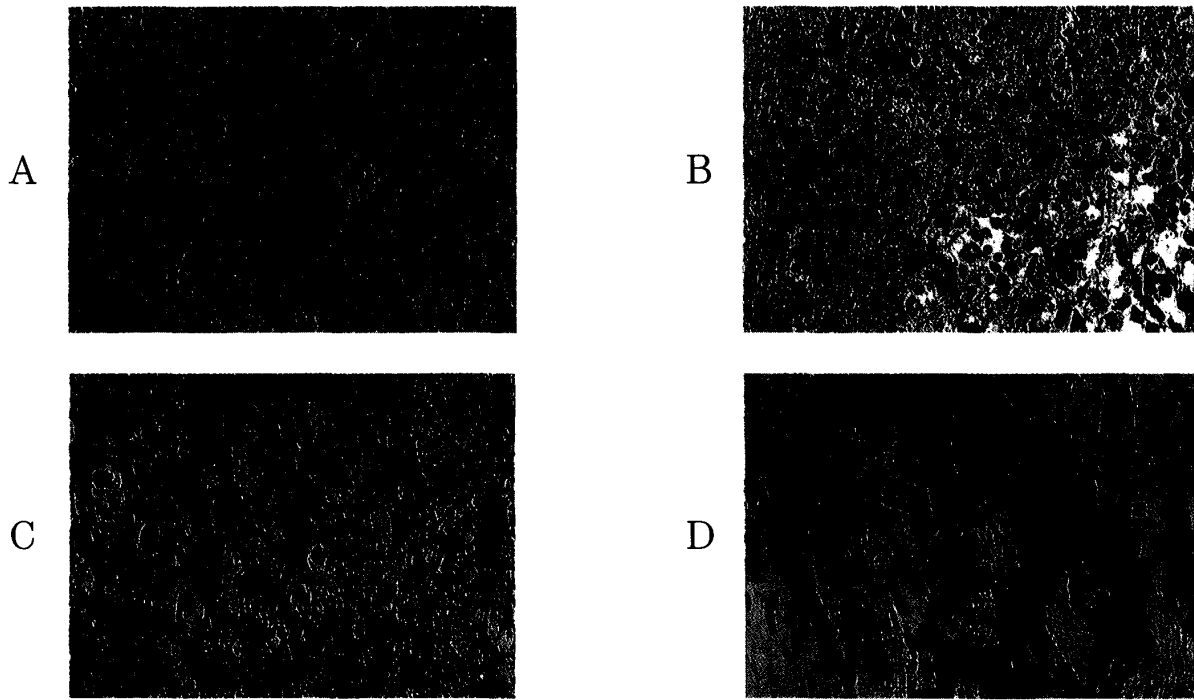


Fig. 3. In the adult rats GFAP immunostaining after spinal cord transection in the vicinity of the lesion. A. 3 days after surgery. B. 7 days after surgery. C. 3 weeks after surgery. D. 5 weeks after surgery. Glial reaction was increased from 3 days after surgery to 5 weeks after surgery. Five weeks after surgery there was significant glial or connective tissue scar formation in the adult rats. (Scale bar = 100 μ m, applicable to all sections)

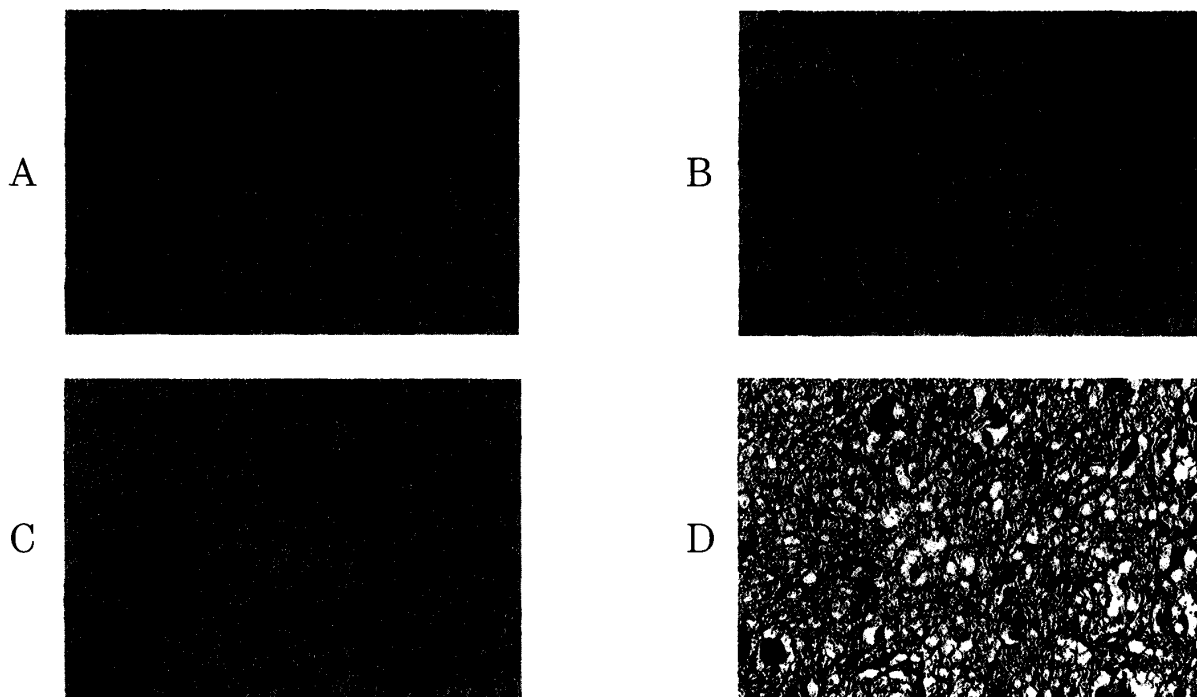


Fig. 4. In the fetal rats GFAP immunostaining after spinal cord transection in the vicinity of the lesion. A. 3 days after surgery. B. 7 days after surgery. The glial reaction was slightly increased. C. 3 weeks after surgery. D. 5 weeks after surgery. The glial reaction was restored. There was no significant glial or connective tissue scar formation in the offsprings, whereas there was the dense glial or connective tissue scar in the adult rats (Fig.3). (Scale bar = 100 μ m, applicable to all sections)

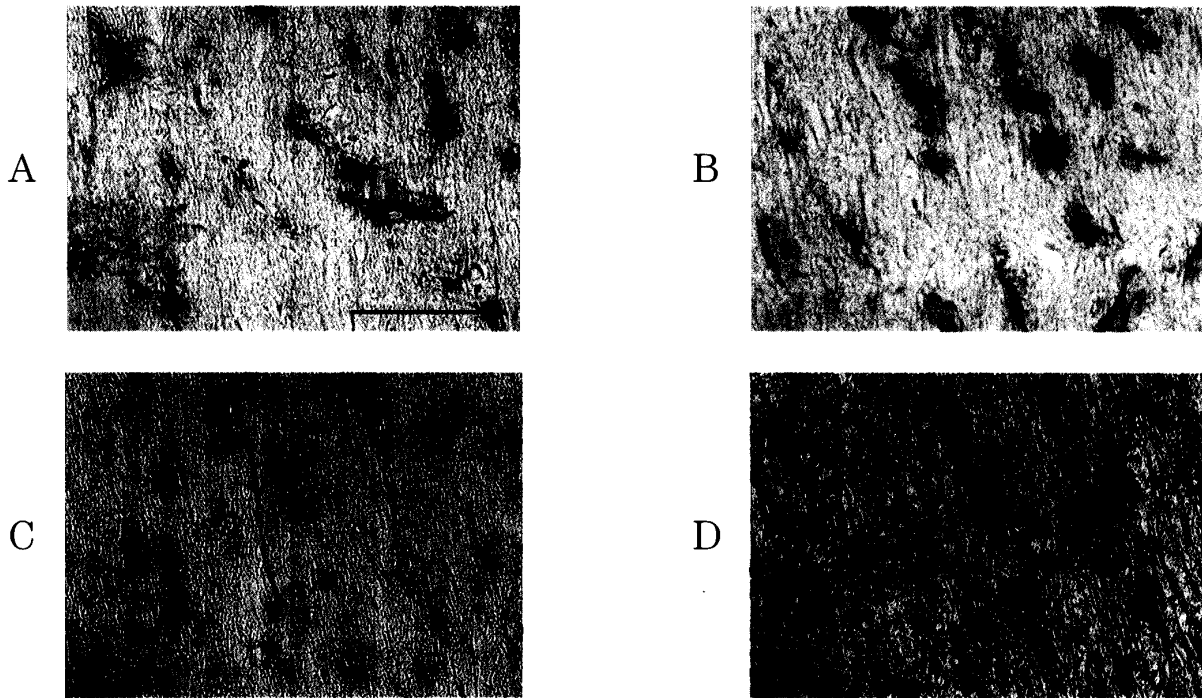


Fig. 5. In the adult rats OX-42 immunostaining after spinal cord transection in remote from the lesion to caudal side. A. 3 days after surgery. B. 7 days after surgery. In the white matter OX-42 positive cells were not activated. C. 3 weeks after surgery. D. 5 weeks after surgery. In the white matter OX-42 positive cells were activated. Fine antler like cytoplasmic processes were identifiable. These microglia were characterized by plump terminal knob formations containing myelin debris at the periphery of their antlers. (Scale bar = $100\ \mu\text{m}$, applicable to all sections)

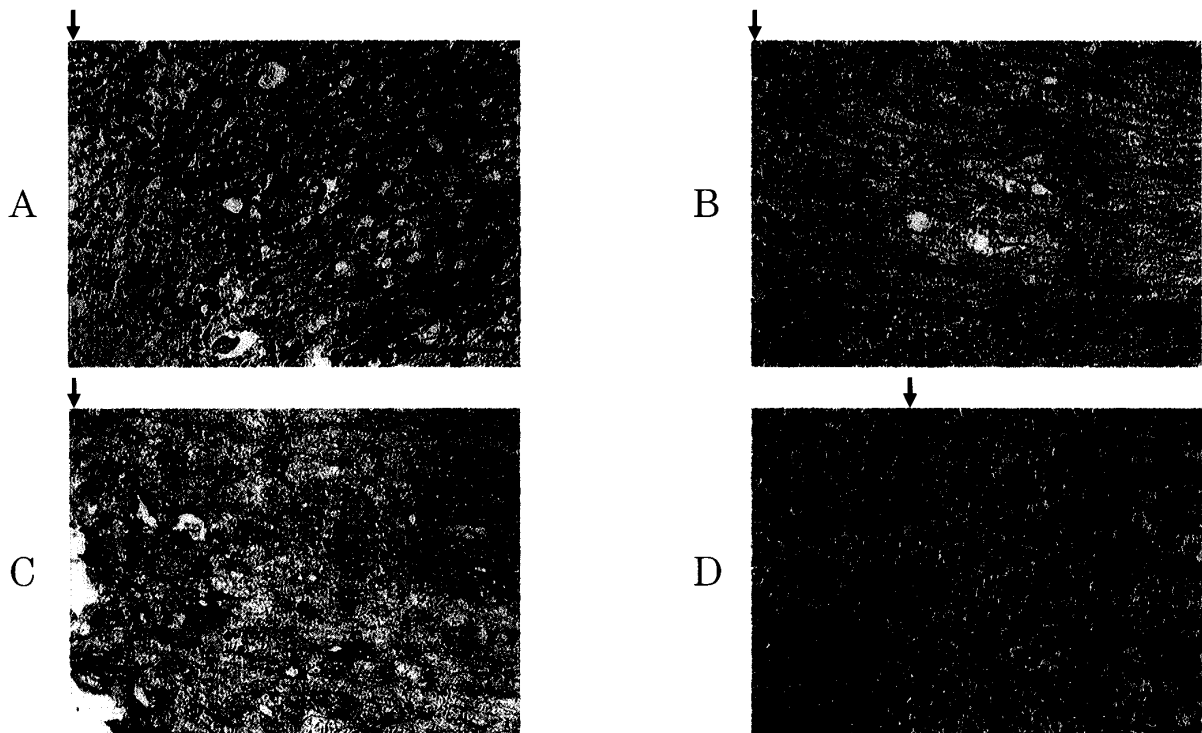


Fig. 6. In the adult rats OX-42 immunostaining after spinal cord transection in the vicinity of the lesion. Arrows show the lesion sites of the spinal cord. A. 3 days after surgery. B. 7 days after surgery. C. 3 weeks after surgery. OX-42 positive round cells were observed. D. 5 weeks after surgery. OX-42 positive round cell was not observed. (RO: rostral, CA: caudal) (Scale bar = $200\ \mu\text{m}$, applicable to all sections)

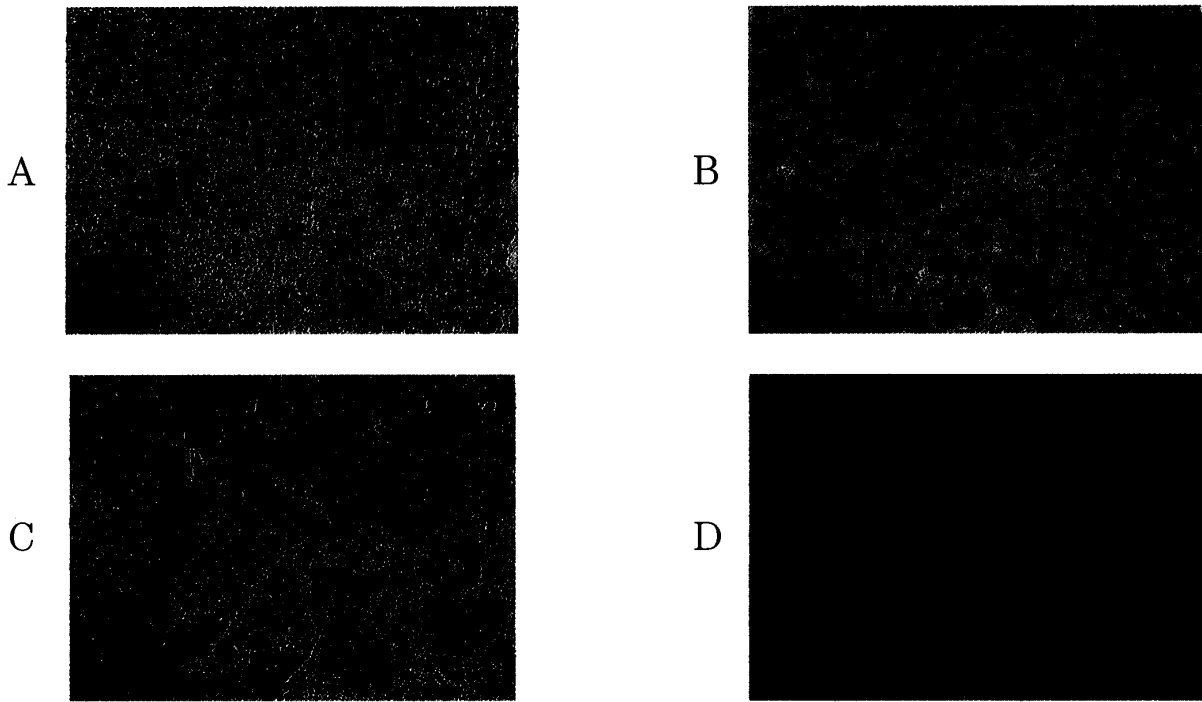


Fig. 7. In the fetal rats OX-42 immunostaining after spinal cord transection in remote from the lesion to caudal side.

A. 3 days after surgery. B. 7 days after surgery. C. 3 weeks after surgery. D. 5 weeks after surgery. In the white matter OX-42 positive cells were not activated. (Scale bar = 100 μ m, applicable to all sections)

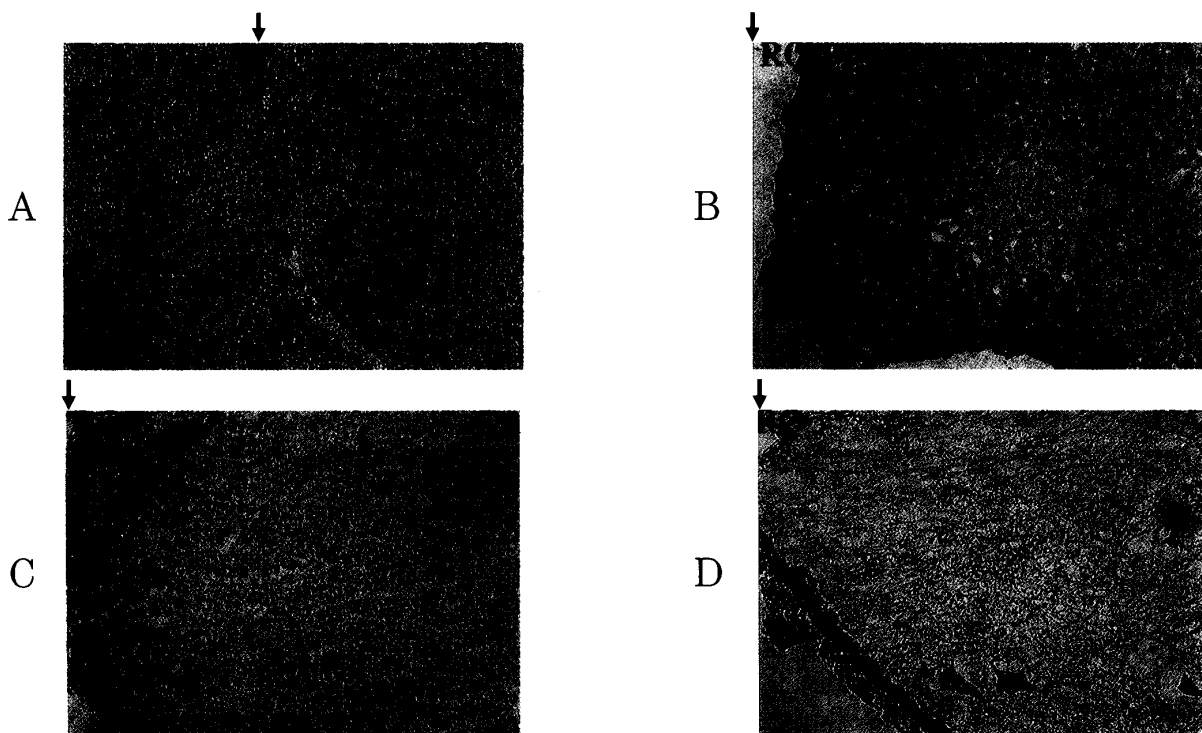


Fig. 8. In the fetal rats OX-42 immunostaining after spinal cord transection in the lesion site. Arrows show the lesion sites of the spinal cord.

A. 3 days after surgery. B. 7 days after surgery. C. 3 weeks after surgery. OX-42 positive round cells were observed. D. 5 weeks after surgery. OX-42 positive round cell was not observed. (RO: rostral, CA: caudal) (Scale bar = 200 μ m, applicable to all sections)

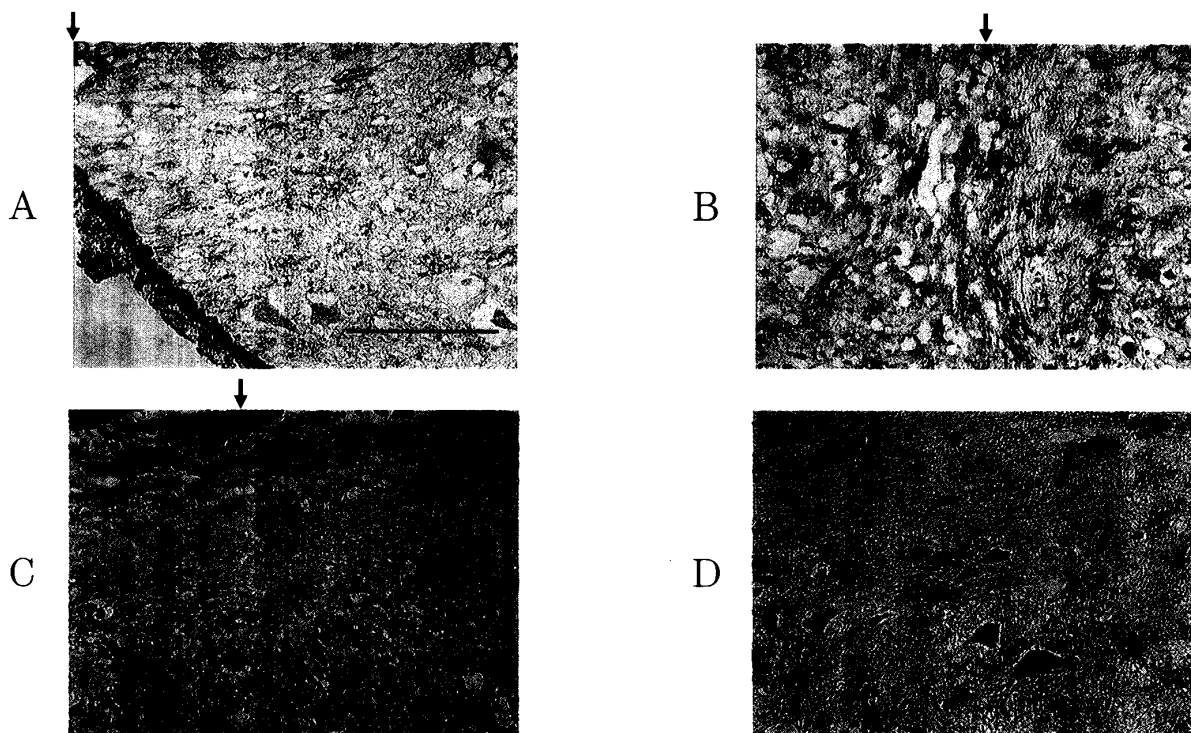


Fig. 9. OX-42 immunostaining at 5 weeks after fetal surgery. Arrows show the lesion sites of the spinal cord. A. MPS 2; OX-42 positive cell was not observed. B. MPS 5 C. MPS 8; OX-42 positive cell for resident microglia were observed. D. An uninjured control preparation. OX-42 positive cells were characterized by the presence of antler-like fine processes and slender cytoplasm similar to (B, C). (RO: rostral, CA: caudal) (Scale bar=200 μ m, applicable to all sections)

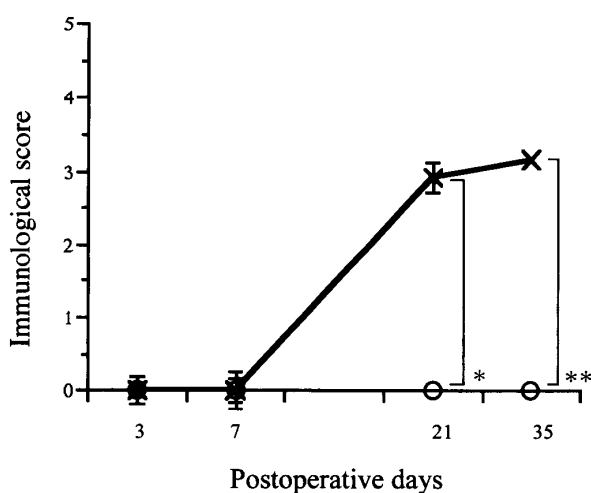


Fig. 10. Postoperative course of immunological score at remote from the lesion site. Immunological score of control group were significantly higher than fetal surgery group on day 21 (* $p < 0.01$) and on day 35 (** $p < 0.01$). (O: Fetal surgery group, X: Control group)

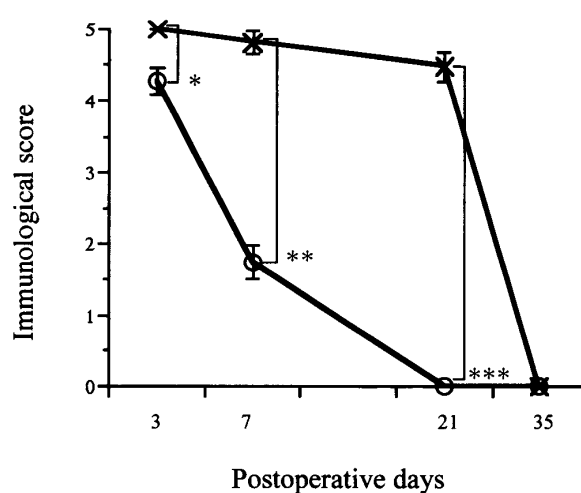


Fig. 11. Postoperative course of immunological score at the lesion site. Immunological score of control group were significantly higher than fetal surgery group on day 3 (* $p < 0.01$), on day 7 (** $p < 0.01$) and on day 21 (** $p < 0.01$). (O: Fetal surgery group, X: Control group)

部に膠原線維すなわち癒痕組織の介在がみられた。活性化された GFAP 陽性細胞の経時的な増生が認められた (Fig. 3)。

②胎仔ラット脊髄切断モデル

脊髄切断後3日(生後0日)では, 切断部周囲に GFAP 陽性細胞が認められたが, 肥大はみられず細胞突起も延長していなかった。脊髄切断後7日(生後4日)では, GFAP 陽性細胞は軽度肥大し, 細胞突起も軽度肥大, 延長していた。脊髄切断後21日(生後18日)および35日(生後32日)では, 切断部周囲の GFAP 陽性細胞は肥大せず, 細胞突起も肥大, 延長がみられず, 増殖もみられなかった。切断部には癒痕組織の介在はみられなかった。活性化された GFAP 陽性細胞は脊髄切断後早期に僅かにみられるものの, その後すみやかに消退していた (Fig. 4)。

B) OX-42 染色

①対照・成熟ラット脊髄切断モデル

切断部より頭側および尾側に 5 mm 離れた部分では, 白質において OX-42 陽性細胞の形態に経時的に変化がみられた。切断後3, 7日では明らかな変化がみられなかったが, 切断後21, 35日では突起が伸長し, 周囲の細胞を包み込むように円を描いており, OX-42 陽性細胞は活性化されていた (Fig. 5)。なお切断部より頭側に 5 mm 離れた部分と尾側に 5 mm 離れた部分との間には細胞の形態に相違はみられなかった。一方, 脊髄切断部において, 脊髄切断後3日では類円形の細胞突起の少ない OX-42 陽性細胞が認められた。切断後7, 21日でも同様な類円形の OX-42 陽性細胞が認められたが, 切断後35日では切断部周囲に類円形の OX-42 陽性細胞はみられなかった (Fig. 6)。

②胎仔ラット脊髄切断モデル

脊髄切断部より頭側および尾側に 5 mm 離れた部分では, 細胞突起の豊富な OX-42 陽性細胞が認められたが, 対照群でみられたような白質における細胞突起の伸長, 肥大はみられなかった (Fig. 7)。なお切断部より頭側に 5 mm 離れた部分と尾側に 5 mm 離れた部分の間には細胞の形態に相違はみられなかった。脊髄切断部においては, 脊髄切断後3日(生後0日), 切断後7日(生後4日)では類円形で細胞突起の少ない OX-42 陽性細胞が認められた。しかし切断後21日(生後18日), 切断後35日(生後32日)では類円形の OX-42 陽性細胞は全く認められなかった (Fig. 8)。また, 切断後21日(生後18日), 切断後35日(生後32日)で脊髄の連続性を有するラットにおいては, 細胞突起の豊富な静止型と思われる OX-42 陽性細胞が脊髄切

断部周囲組織でみられたが, 脊髄の連続性を有しない例では OX-42 陽性細胞は切断周囲部で全くみられなかった (Fig. 9)。

③OX-42 染色の定量的評価

脊髄切断部より 5 mm 離れた部分における OX-42 陽性細胞 (Fig. 10)

Immunological score は, 対照群では経時的に有意に増大していた ($p < 0.01$)。脊髄切断後21, 35日各日における対照群の Immunological score は胎仔脊髄切断モデルに比して有意に高かった ($p < 0.01$)。OX-42 陽性細胞の Immunological score は, 対照群では胎仔脊髄切断モデルと比較して経時的に有意に上昇していた。

脊髄切断部における OX-42 陽性細胞 (Fig. 11)

Immunological score は, 対照群, 胎仔脊髄切断モデルともに経時的に有意に減少していた ($p < 0.01$)。脊髄切断後3, 7, 21日各日における胎仔脊髄切断モデルの Immunological score は, 対照群に比して有意に低かった ($p < 0.01$)。類円形の OX-42 陽性細胞(マクロファージ様の細胞)は, 胎仔脊髄切断モデルの方が対照群より有意に早く消退していた。

考 察

脊髄再生の基礎研究

1928年に Cajal⁷⁾が哺乳動物の中樞神経の再生に否定的な報告を行って以来, 脊髄完全切断後の脊髄再生は不可能とされてきたが, 今日に至るまで様々な試みがなされている。その中でも, 現在有望と考えられている方策は大きく4つに大別される。第一は末梢神経が中樞神経のよい導通路となることに着目して, これを中樞神経に移植するものである⁸⁾。第二は神経栄養因子の使用により神経の再生を促そうとするものであり³⁹⁾, 第三は胎児中樞神経組織移植により幼弱な神経細胞やグリア細胞を補填することで軸索を誘導しようとするものである²⁷⁾。第四は未分化幹細胞の導入である²⁰⁾。これらの試みにより未だ不完全ではあるが新たな神経結合の形成と機能の回復が観察されている。さらに機能の著明な回復を得るためには神経投射の量, 距離, 部位局在に関して, より正常に近い投射を再構築することが必要であり, これらの方策の中でも第三, 第四の方法は特に有力視されている。

胎内手術

1918年に Mayer³³⁾がイヌ胎仔の卵巣摘出の報告をしてより, 胎内手術に関する実験的および臨床的研究がはじまった。現在では胎内手術は, 内視鏡的胎内手術^{15,34)}と開腹胎仔手術^{9,10,16,28,35,44,49)}に大別される。内

視鏡的胎内手術は、胎仔の生理的環境が維持され、胎仔への侵襲を最小限に抑えることができるが、止血などの手術手技が困難である、子宮内で胎仔は浮遊しているなどの理由で内視鏡手術の実施には問題が多い。開腹胎仔手術には、1) 子宮外妊娠法：胎仔を子宮外に出し、手術を行ったのち子宮内ではなく腹腔に還納して妊娠を継続する方法²⁸⁾、2) 子宮内還納法：胎仔の一部を子宮外に出して、手術を行ったのち子宮内に還納する方法^{10,49)}、3) 子宮切開法：子宮壁を小さく切開して、胎仔を子宮内に保ったまま手術を行う方法^{9,16,35,44)}がある。

ラットでは子宮外妊娠が不可能であり、また子宮内還納法は四肢に対しては有用と考えられるが脊髄では施行不能であるため、本研究では子宮切開法を選択した。この方法の利点として、1) 短時間で手術が済むこと、2) 胎仔を直接観察できるため、臍帯の血行障害を生じても体位変換による迅速な対応が可能なこと、などが挙げられる。ヒツジを使用した脊髄への内視鏡的胎内手術³⁴⁾などが近年報告されており、将来的には試みられるべき方法ではあるが、現時点では脊髄に対する手術としては、子宮切開法が簡便で問題点も少なく有用である。

仔獣の生存率、死亡原因

種による差はあるが、胎内手術は胎仔に与える影響が大きく、胎内死亡や流産の危険性が常に存在する。本研究では手術を行った胎仔が出生しなかった場合を胎内死亡、出生したが死亡していた場合を死産としたが、死亡した仔獣あるいは虚弱な仔獣は母獣により捕食されてしまうため両者を厳密に区別することは困難であった。胎内手術によるラット脊髄切断実験について、Arbright¹⁾は108胎仔中21匹(19.4%)が自然分娩に成功したが分娩7日以内に全て死亡したと報告しており、De beer¹²⁾は75胎仔中36匹(48.0%)が自然分娩に成功したとしているが、その後の胎仔の生存については記載がない。本研究の出生率は46.7%、出生後の捕食率は28.6%であり、過去の報告と比較すると良好な結果であった。臍帯の血行障害および羊水漏出の防止、加温生理食塩水による胎内温度の恒常化および漏出した羊水の補充などが役に立ったのであろう。生後2週までの早期死亡例は、全てケージより仔獣が消失していたため母獣に捕食されたものと思われる。捕食を防止できればさらに生存率の改善が期待できる。臍帯血行障害を来さない胎仔固定器具、恒温化のための胎仔用サーモスタット、胎仔の乾燥防止のための加湿器などの開発が必要と思われた。

行動学的所見と脊髄連続性

Stelzner⁴³⁾は生後5日までの新生ラットは胸髄を切断しても後肢の運動機能が回復するが脊髄の連続性は認められなかったと報告した。一方、Weber⁴⁸⁾は生後21日以降の成熟ラットでは胸髄を切断すると後肢の機能回復は得られなかったと報告している。このような横断部位における神経線維の連絡のない後肢の運動機能の回復については、幼若期は脊髄の運動路が未熟であるために、脊髄が切断されても切断部より末梢の脊髄が機能分化を起し、切断部以下の脊髄に歩行中枢ができるため後肢の機能が回復したと説明されている^{24,40)}。

また、Iwashita²⁷⁾は新生ラットの胸髄を切除して、相同部の胎仔脊髄組織を移植すると索路に連絡がみられ、運動学的にも電気生理学的にも正常に近い脊髄伝導路の構築がみられたと述べている。これらの研究は、各索路の正確な連絡があって初めて高度な後肢機能を再獲得できることと、損傷脊髄の修復には成熟した個体よりも胎仔のような幼若な環境が何らかの利点を有していることを示唆している。

本研究の胎仔脊髄切断モデルでは脊髄切断術後35日(生後32日)において、運動可能群では脊髄で多くの白質および灰白質の連続性が認められ、運動中等度群では一部索状の白質および灰白質の連続性がみられ、運動不能群では脊髄切断部で連続性が失われており、脊髄末梢断端は萎縮していた。MPSで評価した運動機能は脊髄の連続性と一致していた。川口²⁹⁾は、胎仔脊髄を鋭利な刃で切断すれば切断部が判別つかないほどの索路の再構築が起こる可能性があるとして述べており、運動可能群や運動中等度群では、再生線維が切断部を貫いて伸びたか、あるいは切断部まで到達していなかった発育途上の神経線維が切断後に切断部を貫いて伸びたか、いずれかにあたると思われた。いずれにしても、一旦、断絶した脊髄の連絡性が再び得られたものと考えられる。また本研究では胎仔脊髄切断後の脊髄の連続性にばらつきがみられた。このことは脊髄切断時の脊髄挫滅あるいは脊髄血行障害の強いものでは脊髄の各索路の連絡がうまく得られず、その程度の違いにより脊髄の連続性にも相違が生じたものと推察された。

脊髄切断後の癒痕形成

胎仔期の創傷治癒の特徴は、外傷に対する炎症反応と癒痕形成の欠如である。Dixon¹⁴⁾はラット胎仔皮膚の熱傷に対する炎症反応を観察し、胎生18日以降に受傷した胎仔では単球、多核白血球が出現するのに対し、胎生17日以前に受傷した胎仔ではこれら炎症細胞はみられなかったと報告した。Longaker³²⁾はヒ

ツジ胎仔の皮膚切開傷治癒を, 胎齢75, 100, 120日の胎仔と成体の間で比較し, 胎齢75, 100日の胎仔はコラーゲンの発現は成体に比べて早く, 2週以内に正常真皮に治癒したが, 胎齢120日の胎仔と成体は2週で癒痕組織がみられたと報告している。このことは胎生期中に創傷治癒様式が胎仔型より成熟型へ変化したことを示している。

胎仔期での中枢神経損傷時の組織反応について, 生田ら^{26,36)}は妊娠16日の胎仔ラット脳損傷においては癒痕の形成はみられなかったと報告し, 胎仔では中枢神経の細胞構築が疎になっており水分量が多いため, 既存の細胞外液中に出現するマクロファージによって正常な状態のまま, 死滅した細胞が速やかに除去されるため癒痕が生じないと推察している。また Berry ら⁴⁾は線維芽細胞の成熟度の差が, 癒痕形成の有無に関与している可能性があるとして述べている。本研究でも, 成熟ラットの脊髄切断部に膠原線維と癒痕形成がみられたが, 胎仔ラット脊髄切断モデルでは脊髄の連続性あるいは MPS にかかわらず, 癒痕形成を認めなかった。外傷に起因する炎症反応あるいは癒痕形成の欠如は, 胎仔脊髄の再生には有利な環境と考えられた。

アストロサイト

胎児神経組織では, 神経回路の形成過程で様々な手掛かり因子が発現され, 線維投射を誘導するとされている。ネトリン⁴⁵⁾は脊髄や脳幹の交連線維に対して軸索を引き寄せるような誘因活性を示し, 滑車神経に対しては反発活性を示し, セマフォリン²²⁾は神経に対して反発活性を示すことがわかっている。これら手掛かり因子は損傷を受けた中枢神経の修復にも役割を果たしている可能性があり, 直接神経細胞に働くものの他にグリア細胞を介して間接的に神経細胞に影響を与えるものがあると考えられている²³⁾。

アストロサイトは, NGF や IL-6 などの種々のサイトカインや神経栄養因子, 成長因子を合成する能力を持ち^{17,18)}, 神経組織と血管の間に介在し神経組織に必要な物質を選択輸送する役割を担っている²³⁾。通常, 神経組織に損傷が加わるとアストロサイトは活性化され増殖し, 大型の突起や豊富な細胞体を持つ反応性アストロサイトとなり, 神経栄養因子, 成長因子などを合成し病巣修復に役割を果たすとされている。ところが, 成熟した中枢神経では反応性アストロサイトは損傷部にグリア癒痕を形成し再生に対して阻害的に作動するとされ, 相反する作用を持っていることになり混乱を生じている⁶⁾。Das¹¹⁾は脊髄損傷時のグリア性癒痕形成は再生を妨げる原因ではなく, 再生が起こらなかった場合の修復機転と推察しておりそのような可能

性も否定できない。

一方, Barrett ら²⁾は新生ラットに対して脊髄切断実験を行い, 脊髄の再生はみられずアストロサイトの細胞突起, 細胞体の肥大, 増殖はともに軽度であり, 反応性アストロサイトの欠如が脊髄再生の欠如につながったと考察している。また Oyanagi ら³⁶⁾は胎仔ラット脳損傷において, 成熟ラットの損傷よりアストロサイトの反応が軽微で, glial scar の形成はごくわずかであったと報告した。

本研究における胎仔ラット脊髄切断モデルでは, 成熟ラット脊髄切断モデルと比較するとアストロサイトの細胞突起, 細胞体の肥大, 増殖はごく軽度であり, 活性化されたアストロサイトは脊髄切断後早期に僅かにみられるものの, その後すみやかに消退していた。本研究の結果とこれら過去の報告^{2,3)}をまとめると, 胎仔あるいは新生ラットの脊髄が損傷されると, アストロサイトは増殖, 肥大はせず, その反応は軽微だが損傷脊髄修復には差異があり, その原因にはいくつかの可能性が考えられる。損傷中枢神経の修復にアストロサイトは重要な働きを持っているが, アストロサイトの影響のみで決定されるわけではないため, 第一に新生仔と胎仔ラットにおいてアストロサイト以外の何か別の要因が異なっているため, 損傷中枢神経の修復に違いが出現する可能性がある。またアストロサイトにはいくつかのサブタイプがあり, 神経再生に促進的なものと阻害的なものが存在する可能性が指摘されており^{37,38)}, 第二に新生仔と胎仔ラットでは, アストロサイトのサブタイプが異なっている可能性がある。さらにアストロサイトの神経再生に果たす役割が個体の成熟度あるいは細胞環境で変化する可能性も指摘されており⁴²⁾, 第三に新生と胎仔ラットでは, アストロサイトの神経再生に対する役割が成長に伴い, 促進より阻害に変化する可能性も考えられる。アストロサイトのサブタイプを決定する方法の確立, 各場面における個々のアストロサイトの果たしている機能の解析が必要と思われた。

ミクログリア

ミクログリアは弱炭酸銀鍍銀染色陽性であり, 正常な中枢神経組織に存在する不規則な突起を持った小型の細胞 (分枝型ミクログリア), 損傷された中枢神経組織の破壊された組織を貪食, 処理する突起を持たない類円形の形態をした細胞 (アメーバ型ミクログリア), さらにこの両者の中間となる細胞 (中間型ミクログリア) に分類される¹³⁾。一般的に, 分枝型は静止型ミクログリア, 中間型とアメーバ型は反応型ミクログリアと考えられている。中枢神経での貪食, 処理が

ミクログリアの主な働きと思われてきたが、最近 MHC (major histocompatibility complex) 抗原が細胞表面に見られることが報告され²⁵⁾、中枢神経における抗原提示に関与していると考えられるようになった。また IL-1, IL-3, などのサイトカインが培養したミクログリアより合成されることも示され²¹⁾、ミクログリアの多様な働きが明らかになってきた。

本研究において対照群と胎仔ラット脊髄切断モデル間で、ミクログリアの反応に多くの相違がみられた。対照群では脊髄切断後21, 35日で脊髄切断部より頭側および尾側に5 mm 離れた部分で白質には反応型ミクログリアが認められたが、胎仔ラット脊髄切断モデルではみられなかった。成熟ラットの白質における反応型ミクログリアの増殖は、索路が切断されたのちに起こるワーラー変性が関係しており、変性した細胞の貪食、処理あるいは修復の過程によるミクログリアの活性化と考えられている^{19,30)}。胎仔ラット脊髄切断モデルでは神経回路が今だ未熟な状態で損傷を受けたためこのようなワーラー変性が起こらず、反応型ミクログリアが出現しなかったと考えられる。

脊髄切断部周囲において、胎仔ラット脊髄切断モデルでは類円形の OX-42 陽性細胞 (マクロファージ様の細胞) が損傷早期に発現し、すみやかに消退した。マクロファージ様の細胞による破壊された組織の貪食、処理が短時間で終了したためと思われる。このマクロファージ様の細胞は、損傷時にみられる単球由来のいわゆるマクロファージと、神経損傷によりマクロファージ様に変化したミクログリアの混合ではないかと考えている。損傷周囲部にアメーバ型ミクログリアのみならず、細胞突起や細胞体が肥大した中間型ミクログリアも観察されたことより、分枝型より中間型へ、中間型よりさらにアメーバ型へミクログリアが変化したものと考えられた^{30,47)}。

脊髄切断後21および35日の胎仔ラット脊髄切断モデルで、組織学的に脊髄が連続していたものには、静止型ミクログリアが脊髄切断部周囲でみられたが、脊髄が連続していなかったものではミクログリアが切断部周囲で全く認められなかった。これについては二つの可能性があると思われる。その第一は、ミクログリアが死滅してしまい、OX-42 抗体の認識物質である CR3 補体レセプターの活性が低下している可能性である。第二に、損傷により大量に出現した iC3b により CR3 補体レセプターが飽和されてしまい、ミクログリアは存在しているが内在化されて染色されていない可能性である⁴⁷⁾。ミクログリアの欠損と損傷中枢神経修復の欠如には、何らかの関わりはあるものと思わ

れるが、その機序については不明である。

アストロサイトの項で述べたことと類似しているが、ミクログリアにもいくつかのサブタイプがあり神経再生に促進的なものと阻害的なものが存在する可能性が指摘されている³⁸⁾。また Kreutzberg³¹⁾は神経細胞の損傷が甚大で多くの細胞死が生じるとミクログリアは貪食細胞様に形質転換して神経細胞を排除しようとするが、それ以外の多くの場合ではサイトカインを産生したりして神経細胞に保護的に働くことを顔面神経切除モデルで示した。アストロサイトと同様にミクログリアも損傷中枢神経の修復の役割を担っており、様々な要因でその細胞機能が変化する可能性を示唆している。

胎仔ラットと成熟ラット脊髄切断後のアストロサイトおよびミクログリアの免疫組織化学的反応の経時的な比較を行い、両者には多くの相違があることが判明した。活性化されたグリア細胞が損傷後早期に短時間ですみやかに消退することが損傷した中枢神経の修復に重要な意味を持つ可能性があること、神経再生に関するグリア細胞の役割が、グリア細胞自身や周囲の細胞の成熟度、損傷部位、損傷部周囲の状況などの要因で変化する可能性があることが示唆された。今後、多様性を示すグリア細胞の機能が様々な因子などの物質レベルで解明できれば、損傷後の中枢神経の再構築も可能と思われた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、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。また終始御支援、御指導くださいました藤本吉範講師、広島大学医学部保健学科梶原博毅教授に心より深謝いたします。さらに御協力くださいました整形外科教室の皆様、広島大学医学部衛生学田中純子講師、広島大学医学部保健学科堤恵理子助手に深く感謝いたします。

(本論文の要旨の一部は第30回日本創傷治癒研究会、第74回日本整形外科学会学術集会、4th Combined Meeting of the Orthopedic Research Societies of the U.S.A, Canada, Europe and Japan、第16回神経組織の成長再生移植研究会、第16回日本整形外科学会基礎学術集会において発表した。)

参 考 文 献

1. **Arbright, L.** 1987. Techniques of spinal cord surgery in fetal rats. *Neurosurgery* 20 : 240-242.
2. **Barrett, C. P., Donati, E. J. and Guth, L.** 1984.

- Differences between adult and neonatal rats in their astroglial response to spinal injury. *Exp. Neurol.* **84** : 374-385.
3. **Bernstein, D. R., Bechard, D. E. and Stelzner, D. J.** 1981. Neuritic growth maintained near lesion site long after spinal cord transection in the newborn rat. *Neurosci. Lett.* **26** : 55-60.
 4. **Berry, M., Maxwell, W. L., Logan, A., Mathewson, A., McConnell, P., Ashurst, D. E. and Thomas, G. H.** 1983. Deposition of scar tissue in the central nervous system. *Acta. Neurochir. Suppl.* **32** : 31-53.
 5. **Bregman, B. S., Kunkel-Bagden, E., Schnell, L., Dai, H. N., Gao, D. and Schwab, M. E.** 1995. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* **32** : 498-501.
 6. **Brown, B. S. and McCouch, G. P.** 1947. Abortive regeneration of the transected spinal cord. *J. Comp. Neurol.* **87** : 131-137.
 7. **Cajal, S. R.** 1928. Degeneration and Regeneration in the Nervous System, p. 533-542. Hafner, New York.
 8. **Cheng, H., Cao, R. and Olson, L.** 1996. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science* **273** : 510-513.
 9. 千葉敏雄 and Michael, R. H. 1999. 胎児外科の臨床-最先端の現況. *小児外科* **31** : 957-967.
 10. **Cowen, R. N. and Lauerenson, R.D.** 1959. Technique of operating upon the fetus of the rabbit. *Surgery* **45** : 321-323.
 11. **Das, G. D.** 1986. Neural transplantation in spinal cord under different condition of lesions and their functional significance. p.1-62, *In* G. D. Das and R. B. Wallace (eds.), *Neural Transplantation and Regeneration*. Springer. New York.
 12. **De Beer, F. C., Thomeer, R. T. W. M., Lakke, E., De Vries, J. and Voogd, J.** 1988. Spinal cord transections in fetal rats. Open intrauterine surgery with low mortality. *Brain Res.* **454** : 397-399.
 13. **Del Rio-Hortega, P. and Penfield, W.** 1927. Cerebral cicatrix: The reaction of neuroglia and microglia to brain wounds. *Johns Hopkins Hops. Bull.* **41** : 278-303.
 14. **Dixon, J. B.** 1960. Inflammation in the fetal and neonatal rat; the local reactions to skin burns. *J. Path. Bact.* **80** : 73-82.
 15. **Estes, J. M., Whitby, D. J., Lorenz, H. P., Longaker, M. T., Szabo, Z., Adzick, N. S. and Harrison, M. R.** 1992. Endoscopic creation and repair of fetal cleft lip. *Plast. Reconstr. Surg.* **90** : 743-749.
 16. 福原千史 1990. 胎内手術を応用した脛骨切除ラットに対する腓骨移行の実験的研究. *広島大学医学雑誌* **38** : 285-301.
 17. **Furukawa, S., Furukawa, Y., Satoyoshi, E. and Hayashi, K.** 1986. Synthesis and secretion of nerve growth factor by mouse astroglial cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136** : 57-63.
 18. 古川昭栄 1999. Glia細胞が産生する神経栄養因子, p. 281-315, *Glia細胞*. クバプロ出版. 東京.
 19. **George, R. and Griffin, J. W.** 1994. Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radiculotomy model. *Exp. Neurol.* **129** : 225-236.
 20. **Giovanini, M. A., Reier, P. J. and Eskin, Y. A.** 1997. Characteristics of human fetal spinal cord grafts in the adult rat spinal cord: influence of lesion and grafting conditions. *Exp. Neurol.* **164** : 523-534.
 21. **Giulian, D., Baker, T. J., Shin, L-C. and Lachman, L. B.** 1986. Interleukin 1 of the central nervous system is produced by amebiod microglia. *J. Exp. Med.* **164** : 594-604.
 22. **Goodman, C. S.** 1996. Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Ann. Rev. Neurosci.* **19** : 341-377.
 23. 濱登希子, 小倉明彦 1995. グリア細胞の機能に関する最近の知見. *生物物理* **35** : 7-12.
 24. **Hanada, Y., Naito, A., Watanabe, S., Komatsu, S. and Shimizu, Y.** 1986. Functional recovery of locomotive behavior in the adult spinal dog. *Tohoku. J. Exp. Med.* **148** : 373-384.
 25. **Hayes, G. M., Woodroffe, M. N. and Cuzner, M. L.** 1987. Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter. *J. Neurol. Sci. Bull.* **80** : 25-37.
 26. 生田房弘 1995. 成熟脳と胎児発育期脳内における病巣修復. *神経進歩* **39** : 939-948.
 27. **Iwashita, Y., Kawaguchi, S. and Murata, M.** 1994. Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. *Nature* **367** : 167-170.
 28. 桂木昌子 1994. 子宮外妊娠法による胎仔手術-第一報-. *日本形成外科学会誌* **14** : 268-278.
 29. 川口三郎 1991. 哺乳動物における中枢神経伝導路の再生. *神経科学レビュー* **4** : 100-132.
 30. **Koshinaga, M. and Whittemore, S. R.** 1995. The temporal and spatial activation of microglia in fiber tracts undergoing anterograde and retrograde degeneration following spinal cord lesion. *J. Neurotrauma* **12** : 209-222.
 31. **Kreutzberg, G. W.** 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* **19** : 312-318.

32. **Longaker, M. T., Whitby, D. J. and Adzick, N. S.** 1990. Studies in fetal wound healing. VII. Second and early third trimester fetal wounds demonstrate rapid collagen deposition without scar formation. *J. Pediatr. Surg.* **25** : 63–69.
33. **Mayer, A.** 1918. Über die Möglichkeit operativer Eingriffe beim lebenden Säugetierfötus. *Zentralbl. Gynäkol.* **42** : 773–776.
34. **Meuli, M., Meuli-Simmen, C. and Yingling, C. D.** 1996. In utero repair of experimental myelomeningocele saves neurological function at birth. *J. Pediatr. Surg.* **31** : 397–402.
35. **Nicholas, J. S.** 1925. Note on the application of experimental methods upon mammalian embryos. *Anat. Rec.* **31** : 385–394.
36. **Oyanagi, K., Yoshida, Y. and Ikuta, F.** 1986. The chronology of lesion repair in the developing rat brain: biological significance of the pre-existing extracellular space. *Virchows Arch. (A)*. **408** : 347–359.
37. **Rugde, J. S. and Silver, J.** 1990. Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *J. Neurosci.* **10** : 3594–3603.
38. 澤田 誠 1995. ミクログリアの発生と多様性. *細胞* **27** : 193–198.
39. **Schwab, M. E. and Thoenen, H.** 1985. Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic explants in culture irrespective of neurotrophic factors. *J. Neurosci.* **5** : 2415–2423.
40. **Shimizu, Y. and Harada, Y.** 1978. Structural and functional changes following spinal cord transection. *IBRO News.* **6** : 8.
41. **Shinoda, M., Hudson, J., Strömberg, I. L., Hoffer, B. J., Moorhead, J. W. and Olson, L.** 1995. Allogeneic grafts of fetal dopamine neurons: immunological reactive and adoptive immunizations. *Brain Res.* **680** : 180–195.
42. **Smith, G. M., Miller, R. H. and Silver, J.** 1990. Changing role of forebrain astrocytes during development, regenerative failure, and induced regeneration upon transplantation. *J. Comp. Neurol.* **251** : 23–43.
43. **Stelzner, D. J., Ershler, W. B. and Weber, E. D.** 1975. Effects of spinal transection in neonatal and weanling rats: survival of function. *Exp. Neurol.* **46** : 156–177.
44. 谷 祐子 2000. ラット胎内モデルで成長軟骨板を含んだ遊離移植骨は成長する. *広島大学医学雑誌* **48** : 53–64.
45. **Tessier-Lavigne, T., Maxwell, W. L., Logan, A., Mathewson, A., McConnell, P., Ashurst, D. E. and Thomas, G. H.** 1983. Deposition of scar tissue in the central nervous system. *Acta. Neurochir. Suppl.* **32** : 31–53.
46. **Von Euler, M., Akesson, E., Samuelsson, E., Seiger, A. and Sundström, E.** 1996. Motor performance score: a new algorithm for accurate behavioral testing of spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.* **137** : 242–254.
47. **Watanabe, T., Yamamoto, T., Saito, N., Kumagai, T. and Kayama, H.** 1999. Differential activation of microglia after experimental spinal cord injury. *J. Neurotrauma* **16** : 255–265.
48. **Weber, E. D. and Stelzner, D. J.** 1977. Behavioral effects of spinal cord transection in the developing rat. *Brain Res.* **125** : 241–255.
49. **Wells, L. J.** 1950. Subjection of fetal rats to surgery and repeated subcutaneous injection. *Anat. Rec.* **108** : 309–332.

Spinal Cord Injury and Regeneration in the Fetal Rats

Takeshi YAMASAKI

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

Because the immature spinal cord was nerve growth permissive, I examined glial reactions that influence regeneration of the spinal cord in a fetal rat spinal cord injury model.

Three, 7, 21, and 35 days after intrauterine surgery, offsprings were killed and the thoracic and lumbar spinal cords were carefully removed from the spinal column and then cut into 10 μ m longitudinal sections. These sections were stained with hematoxylin-eosin, anti-glial fibrillary acidic protein antibody (GFAP) as a marker of astrocytes, and anti-complement CR3 antibody (OX-42) as a marker of microglia.

I gathered two important points facts in my study. First, there was no significant glial reactions and connective tissue scar formation comparable to the dense glial or connective tissue scar that constitutes a barrier against regenerating axons in adult rats. Second, in the group with a good walking ability, the rostral and caudal spinal cord segment were connected at white matter. In the group with non walking ability, the spinal cord segment were separated. The reason for the difference in spinal cord conditions among survivors was still unknown. I conclude that responses and regeneration of damaged spinal cord axons differs between fetus rats and adult rats.