

# 末梢神経再生時の Ciliary neurotrophic factor (CNTF) 発現に関する実験的形態学的研究

清水 隆 司

近畿大学医学部第2病理学教室

## 抄 録

末梢神経損傷後の変性過程及び再生過程における毛様体神経栄養因子 (ciliary neurotrophic factor: CNTF) の発現について、本邦における報告は見られない。諸外国においては、挫滅もしくは切断一再吻合モデルを用いた分子生物学的研究が幾らか見られるが、CNTF の発現の見られる Schwann cell の詳細な形態や、如何なる時期及び axon との相互関連において発現するのかに注目した詳細な報告は見られない。そこで、CNTF 発現と myelinated axon 及び Schwann cell の形態的所見を、光顕的及び電顕的、免疫組織学的、そして計測的に観察し検討を行った。ラットの坐骨神経を切断後、空管移植モデルを作成し、術後2, 5, 7日, 2, 3, 4週, 2, 4ヶ月目に、空管内の再生神経を含む約3 cm の神経を採取した。切断後2日~1週にかけて、変性所見を呈する myelinated axon では、Schwann cell 以外にも axon に CNTF の陽性像が見られた。また、切断後3週で空管内が架橋され、切断後4週で空管内の再生神経には細い myelinated axon が散見されるようになり、その外周に見られる myelin-related Schwann cell の胞体に CNTF を発現するものが見られた。それら myelinated axon を CNTF 陽性と CNTF 陰性のものに分け、各々の myelinated axon について組織計測的に検討したところ、myelin の厚さが0.27  $\mu\text{m}$  以上、myelinated axon の太さが1.65  $\mu\text{m}$  以上の再生有髄神経の myelin-related Schwann cell の胞体に有意に CNTF 陽性像が認められた。中でも axon の太さより myelin の厚さとの関与がより強く示唆された。

**Key words :** CNTF, nerve regeneration, Schwann cell, peripheral nerve, chamber model, rat

## 緒 言

毛様体神経栄養因子 (ciliary neurotrophic factor: CNTF) は embryonic chick eye tissue で合成され、毛様体神経細胞の生存維持を行う因子として発見され<sup>1-3</sup>、1979年 Varon らにより CNTF として報告<sup>4</sup>された。その後、精製<sup>5,6</sup>、クローニング<sup>7,8</sup>された。そして CNTF が毛様体神経節細胞以外にも、運動ニューロン<sup>9,10</sup>、感覚ニューロン<sup>5</sup>、交感神経系<sup>11,12</sup> など多数の部位に作用し、それら神経細胞の生存維持を行うことが明らかになってきた<sup>5,6,9,10</sup>。さらに、末梢神経では CNTF が坐骨神経に多く含まれ<sup>6,13,14</sup>、myelin-related Schwann cell 内に存在することが明らかとなった<sup>15,16</sup>。そして、CNTF に関する分子生物学的研究が進むにつれて、CNTF はシグナルペプチドを持たないため細胞外へ分泌されず、末

梢神経損傷後の Waller 変性、逆行変性に際して、myelin の崩壊が起こることにより、CNTF が Schwann cell 外へ放出され、作用を示すと考えられるようになり、その意味で CNTF は傷害を受けることにより作用する傷害因子とも言われている<sup>17</sup>。そして、傷害を受けると Schwann cell における CNTF 産生が停止し、再生が進行するに従って再び Schwann cell に発現してくると言われている<sup>18,19,20</sup>。しかし、再生してきた myelinated axon の Schwann cell 全てに CNTF が発現しているのかどうか、そして発現していないものがあるのであれば、どのような Schwann cell には発現がみられていないのか、また、Schwann cell と axon の関係がどのようなになれば CNTF の発現が見られるのかという詳細な形態学的研究の報告はない。そこで、以前から当教室で用いられてきた空管移植モデルを作成

し、空管の中に新しく再生してくる神経の再生過程において、光顕的及び電顕的、計測的に観察し、CNTF 発現と Schwann cell の動態, myelinated axon の形態的变化との間に如何なる関係があるか検討を加えた。

### 材料及び方法

Fisher 系雄ラット (日本クレア株式会社), 11週齢, 200-200 g を用い, pentobarbital sodium (3 mg/100 g) の腹腔内投与による麻酔後, 大腿外側に皮切を行う。実体顕微鏡下に坐骨神経を露出した後, 坐骨結節から遠位に約1.2 cm の部分で神経を切断し, 長さ 9 mm, 内径 1 mm, 外径 1.5 mm のシリコンチューブに両神経切断端を挿入し, 神経断端間距離が 5 mm となるように10-0ナイロン縫合糸を用い, チューブと神経上膜を縫合することで固定した。また, チューブ内腔には, 当教室での再生神経線維の伸長が促進されるという実験結果<sup>21</sup> から用いられているコラーゲン・ゲル・マトリックス (新田ゼラチン株式会社, pH 3.0 0.3% Cell matrix II と, 0.08 M 水酸化ナトリウム溶液に対して HEPES 4.77 g, 塩化ナトリウム 8.19 g を加え濾過滅菌した緩衝液を 9 : 1 で混合し調整したもの) を注入した。上記の操作を左右両側について行った。右側は光学顕微鏡 (光顕) 試料とし, 左側は電子顕微鏡 (電顕) 試料もしくは免疫電子顕微鏡 (免疫電顕) 試料とした。術後は, 湿度 50±10%, 気温 21±3°C, 昼夜を12時間サイクルの条件下で飼育し, 飼料は日本クレア株式会社の飼育繁殖固形飼料 (CE-2) と水道水を自由摂取させた。術後 2, 5 日, 1, 2, 3, 4 週, 2 ケ月そして 4 ケ月の 8 群に分け各々の時期にラットを麻酔下で屠殺した。ラットは手術群として 1 群 5 匹 (4 週の群のみ 10 匹) とし計 45 匹, また, 非手術群として 11 週齢, 200-220 g のものを 5 匹用いた。計 9 群総数 50 匹を用いた。

#### 1. 光学顕微鏡的観察

手術群の各群 5 匹において, 屠殺後, 右側のシリコンチューブを含む約 3 cm の坐骨神経を採取した後, 直ちにシリコンチューブに割を入れ, ザンボニー固定液にて 4°C, 24 時間, 浸漬固定を行った。そして翌日, シリコンチューブを除去した。非手術群では坐骨結節から遠位側へ約 3 cm の坐骨神経を採取した後, そのままザンボニー固定液にて 4°C, 24 時間, 浸漬固定を行った。固定後は両群とも, 通常の光顕用標本作製段階を経て, 坐骨神経を長軸方向に (一部は短軸方向に) パラフィン包埋した後, 3 µm に薄切し連続切片を作製し 4 枚を続けて選択し, 各々順に, hematoxylin-eosin (HE) 染色, Bodian

染色を行い, さらに Rabbit Anti-Cow S-100 polyclonal antibody (S-100 抗体) (DAKO 社) と Rabbit Anti-rat CNTF polyclonal antibody (CNTF 抗体) (BML 社から提供) を一次抗体として用いた免疫組織化学染色を行った。

#### hematoxylin-eosin (HE) 染色

脱パラフィン後, 水洗し, 以後, 型のごとくヘマトキシリンとエオジンで染色した後, 分別, 透徹, 封入を行った。

#### Bodian 染色

脱パラフィン後, 水洗し, 1% 重クロム酸カリウム水溶液に 50 分間浸漬する。その後, 水洗し, 底に 5 g の銅板を静置した 1% プロテイン銀溶液に 37°C にて約 24 時間浸漬する。翌日水洗し, ハイドロキノン 1.0 g, 無水硫酸ナトリウム 4.0 g, 蒸留水 100 ml で調整した還元液にて 10 分間還元した後, 水洗し, 0.2% 塩化金酸水溶液に 40 分間浸漬し, 水洗後, 2% シュウ酸水溶液に 25 分間入れ, 置換調色した。そして, 水洗後, 1% チオ硫酸ナトリウムにて 10 分間定着を行い, 再び水洗し, 脱水, 透徹, 封入を行った。

S-100 と CNTF 抗体を用いた免疫組織化学染色 (S-100 染色, CNTF 染色)

脱パラフィン後, 0.3% 過酸化水素水加メタノールにて室温で 30 分間反応させ内因性ペルオキシダーゼ活性を抑えた。そして, 0.01 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後, 0.05% のアクチナーゼ E 溶液を滴下し室温で 20 分間反応させ, 蛋白分解酵素処理を行った。再び PBS で洗浄後, 10% 正常ヤギ血清 (NGS) を滴下し, 室温で 20 分間反応させ抗体による非特異的反応を抑えるようにした。続いて, S-100 抗体 (DAKO 社), CNTF 抗体 (BML 社より提供) を 5% NGS で各々, 400 倍希釈, 500 倍希釈し, 滴下した後, 4°C にて 24 時間反応させた。その後 PBS で洗浄し, 二次抗体として biotinylated anti rabbit IgG (H+L) (Vector) を 5% NGS で 200 倍に希釈したものを用い, 室温で 30 分間反応させた。再び PBS で洗浄し, avidin-biotinylated peroxidase complex (ABC) (Vector) (A : B : PBS = 1 : 1 : 50) と室温で 60 分間反応させ, PBS で洗浄, 0.04% の DAB 溶液で S-100 は 20 秒間, CNTF は 7 分間発色させた。DAB との反応は同一抗体においては, 同時に同時に行った。その後, 水洗し, ヘマトキシリンにて核染を行い, 再び水洗した後, 脱水, 透徹, 封入を行った。negative control としては一次抗体の代わりに 500 倍希釈した正常ウサギ血清 (NRS) を用いた。

#### 免疫組織化学染色による計測方法

標本上, 図 1 に示すように近位断端から遠位側へ

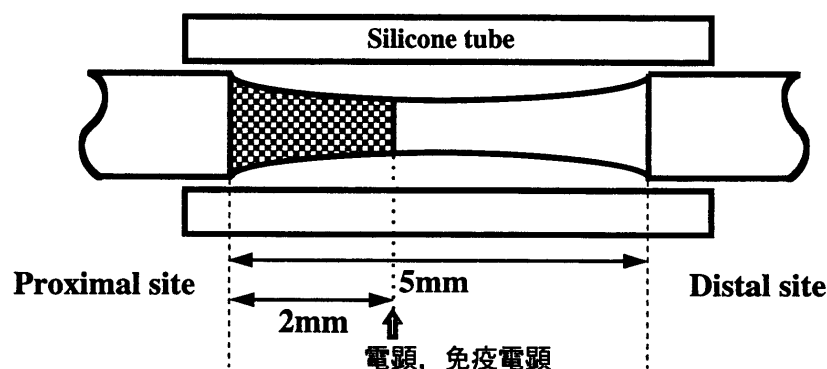


図1  
近位断端から遠位側へ2mmの範囲を再生神経の検索対象とし、S-100, CNTFの免疫組織染色における計測を行い、また、電頭、免疫電頭では、遠位側へ2mmの部分の横断面における観察、計測を行った。

2mmの範囲の再生神経を検索対象とし、紡錘形細胞の密度が高い部分を1標本から3ヶ所選択し、そのDAB陽性面積の平均値を求め、それらを各標本について行い、その後各群の平均を求めた。計測は、Cell analysis systems CAS 200（製造元 Becton Dickinson 社、発売元エムアンドエム社）を用いて行った。まず、40倍の対物レンズを用いて顕微鏡画像を入力し、単位面積（11980  $\mu\text{m}^2$ ）あたりのDABで発色した部分の光の発色強度を測定することにより、DAB陽性面積、つまりS-100陽性 Schwann cellとCNTF陽性 Schwann cellの各々の占める面積を測定した。いずれも、DABの発色がnegative controlより強い部分を陽性とした。

## 2. 電子顕微鏡的観察

### 透過型電頭

術後2週、4週、4ヶ月の群のうち、屠殺後3匹において、左側（4週のもののみ右側）のシリコンチューブを含む約3cmの坐骨神経を採取した後、直ちにシリコンチューブに割を入れ、2.5% glutaraldehyde 液中にて4°C、8時間、前固定を行った、シリコンチューブを除去した後、0.1 M cacodylate buffer で8時間洗浄し、その後2%  $\text{OsO}_4$  液中で2時間、後固定を行った。再び0.1 M cacodylate buffer で20分間洗浄し、アルコール脱水を行い、n-butyl glycidyl ether で20分間、2回置換を行い、その後n-butyl glycidyl etherと包埋剤エポン樹脂の混合液に一晩浸透させた。そして、神経近位断端から約2mm遠位側の再生神経横断面（図1）が観察できるように切り出し、シリコン平板を用い、エポン樹脂に包埋した。作製したエポンブロックを、Ultra-microtome（Porter 社）を用い、薄切し、約80nmの超薄切片を作製した。超薄切片は電子染色（酢酸ウラニル水溶液に30分、その後クエン酸鉛溶液に5分）を行った後、透過型電子顕微鏡（H-7100、日立製作所）で観察した。

### 免疫透過型電頭

術後2週、4週、4ヶ月の群、各々2匹、10匹、2匹及び非手術群5匹において、屠殺後、手術群では左側のシリコンチューブを含む約3cmの坐骨神経を採取した後、直ちにシリコンチューブに割を入れザンボニー固定液にて4°C、24時間、浸漬固定を行った。非手術群では坐骨結節から遠位側へ約3cmの坐骨神経を採取した後、そのままザンボニー固定液にて4°C、24時間、浸漬固定を行った。手術群では固定後シリコンチューブを除去した。そして両群とも、続いて20%サッカロース液にて24時間浸漬した。その後、手術群では近位断端から遠位側へ約2mmの部分が観察できるように、再生神経を切り出し（図1）、非手術群では採取した神経の中央を切り出し、Tissue-Tec Cryomold 1号にTissue-Tec O.C.T Compoundを用いて再生神経を横断面がでるように包埋し、液体窒素で十分に冷却した2-methylbutan内で凍結した。そして、Cryocut 1800（LEICA）を用いて20  $\mu\text{m}$ に薄切し、シランコーティングしたスライドガラスに付着させ約30分間風乾した。作製した凍結切片は、まず免疫染色を行った。0.3%過酸化水素水加PBSにて室温で30分間反応させ内因性ペルオキシダーゼ活性を抑えた。0.1 M glycine 溶液で洗浄後、10% NGSを滴下し、室温で20分間反応させ抗体による非特異的反応を抑えるようにした。続いて、CNTF抗体（BML社より提供）をdilution buffer（1% gelatin, 2% sodium chloride, 0.1% polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween20), 1% BSAを含む0.1 M phosphate buffer pH 7.4）で、500倍希釈し、滴下した後、4°Cにて24時間反応させた。その後 washing buffer（2% sodium chloride, 0.5% Tween20, 1% skim milkを含む0.01 M phosphate buffer pH 7.4）で洗浄し、二次抗体として biotinylated anti rabbit IgG（H+L）（Vector）を5% NGSで200倍に希釈したものをを用い室温で30分間反応させた。再び washing buffer で洗浄し、ABC（Vector）（A：

B : PBS = 1 : 1 : 50) と室温で60分間反応させた。washing buffer で洗浄し最後に一回 PBS で洗浄した後、0.04%の DAB 溶液で7分間発色をさせた。DAB との反応は、全て同時に同時に行った。PBS で洗浄し、引き続き電顕標本の作製に移った。まず1% OsO<sub>4</sub> 液を滴下し、室温で30分間固定を行った。0.1M cacodylate buffer で洗浄後、アルコール脱水を行い、n-butyl glycidyl ether と包埋剤エポン樹脂の混合液を滴下し、室温にて1時間、置領浸透させ、スライドガラス上で電子顕微鏡用ゼラチンカプセル No. 00を用い、エポキシ樹脂に包埋した。60°Cにて48時間乾燥後、スライドガラスよりエポンブロックを取りし、Ultra-microtome (Porter 社)を用い、薄切し、約80 nm の超薄切片を作製した。超薄切片は電子染色 (酢酸ウラニル水溶液に5分、その後クエン酸鉛溶液に1分)を行った後、透過型電子顕微鏡 (H-7100, 日立製作所) で観察した。

#### 免疫透過型電顕標本の計測方法

作製した免疫透過型電顕試料 (非手術群5切片、術後4週目の群10切片) 各々において、myelinated axon の密度が最も高い部分を選び、非手術群は3000倍、手術群は4800倍にて連続20視野 (各々、約15400 μm<sup>2</sup>, 約6000 μm<sup>2</sup>) を観察した。写真を撮影した後、CNTF 陽性のものと CNTF 陰性のものに分け、それらを CCD カメラ (ソニー社) を使用して画

像入力し、画像解析装置 LUZEX FS (ニコン社) を用いて各々 CNTF 陽性のもの、陰性のものについて myelinated axon の直径 (長径に対して垂線を引いた短径の一番長い部分の myelin の最外層から最外層までを計測し直径とした。一部については myelin を含まない axon のみの直径も計測した。) と myelin の厚さ (直径を計測した同一部分の myelin の厚さを計測した。) を計測した。CNTF 陽性、陰性の判別については、非手術群の myelin-related Schwann cell と同等の DAB 発色強度を示したものを CNTF 陽性とした。

#### 3. 統計処理

免疫組織化学染色陽性面積の計測では、比較した2群間の経時的変化は、Hotelling の T<sup>2</sup> 検定を行い、 $p < 0.05$  で有意差ありと判断した。各時点での比較は Welch's t-test を用い、 $p < 0.05$  で有意差ありと判断した。また、myelinated axon の太さ、及び myelin の厚さの計測では、各々の判別特性分析を行い、cutoff 値、及び両者の response operating characteristic (ROC) 曲線を比較検討した。

## 結 果

### 1. 光学顕微鏡的所見

#### 非手術群

免疫組織化学染色において、CNTF は S-100 とほ

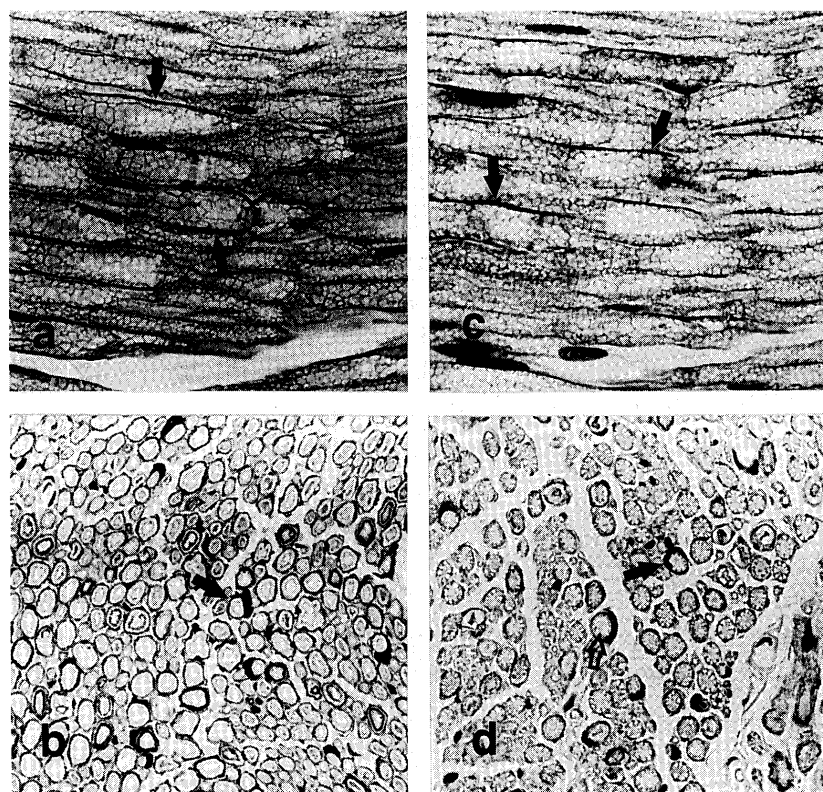


図2  
非手術群の S-100 染色 (a : 縦断面, b : 横断面), CNTF 染色 (c : 縦断面, d : 横断面) (全て×500)  
CNTF は S-100 とほぼ同様の染色態度を呈し (closed arrows), Schwann cell に陽性像を示した。正常においては、axon に CNTF 陽性像は認めらなかった (open arrow)。

表1 axon における CNTF 陽性像の経時的変化

	Proximal site				Distal site		
	area 1	area 2	area 3		area 5	area 6	area 7
2日	—	±	+		±	±	±
5日	—	—	+		+	+	+
1週	—	—	±		±	±	±
2週	—	±	—	—	—	—	—
3週	—	±	—	—	—	—	—
4週	—	±	—	—	—	—	—
2ヶ月	—	—	—	—	—	—	—
4ヶ月	—	—	—	—	—	—	—
正常	—	—	—	—	—	—	—

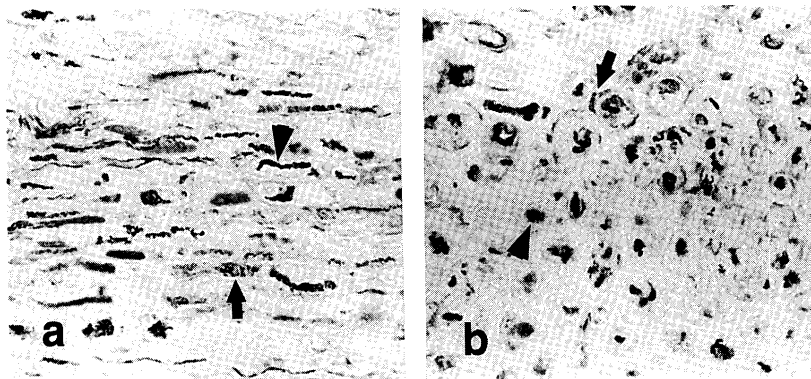


図3  
切断後5日目の変性が見られている部分のCNTF染色(a:縦断面, b:横断面)(×500)  
myelin debris (arrow) 及び正常ではCNTF陽性像を示さなかったaxon (arrow head)に陽性像が見られている。

は同様の染色態度を示し、S-100<sup>22,23</sup> 同様 Schwann cell に陽性像を示した。また、CNTF は axon, 神経周膜, 神経上膜等の結合織, そして血管には陽性像を示さなかった(図2)。

#### 手術群

切断後2日で、近位断端では逆行性変性、遠位断端では Waller 変性が見えはじめ、5日～1週になると myelin の崩壊、axon の断片化している像が顕著となる。それらの時期において、Waller 変性を呈している部分、逆行性変性を呈している部分の myelin debris 及び正常では陰性だった axon に CNTF 陽性像が観察された(表1, area 3, 5-7)(図3)。一方、Schwann cell における CNTF の染色性の低下が見られた。そして、切断後2週になると変性部分の myelin debris 及び axon における CNTF 陽性像は観察されなくなる。しかし、切断後2週～4週にかけては、逆行性変性を呈している部分よりやや近位側の axon に CNTF 陽性像を示す部分が観

察された(表1, area 2)。切断後2週になると、近位断端の逆行性変性が見られた部分に再生が始まってくるようになり、細い長楕円形の核でやや豊かな胞体を持つ紡錘形細胞の増生が見られ、Bodian 染色では sprouting axon も見られる。また、チューブ内にも前述と同様の少数の紡錘形細胞及び細い少数の regenerating axon(図4c)が観察されるようになる。それら紡錘形細胞は S-100 陽性細胞であり(図4a)、Schwann cell と考えられた。しかし、CNTF は陰性であった(図4b)。また、遠位断端付近においても紡錘形細胞の増生を認めるが、これら紡錘形細胞も S-100 陽性、CNTF 陰性であった。切断後3週になると個体差は多少見られるが、チューブ内への紡錘形細胞の増生が高度となり、断端間が架橋されるようになる。切断後4週になるとそれらのほとんどが長軸方向に並び増生がより高度となる。それら増生している細胞のほとんどが S-100 陽性であり(図4d)、これらも Schwann cell と考え

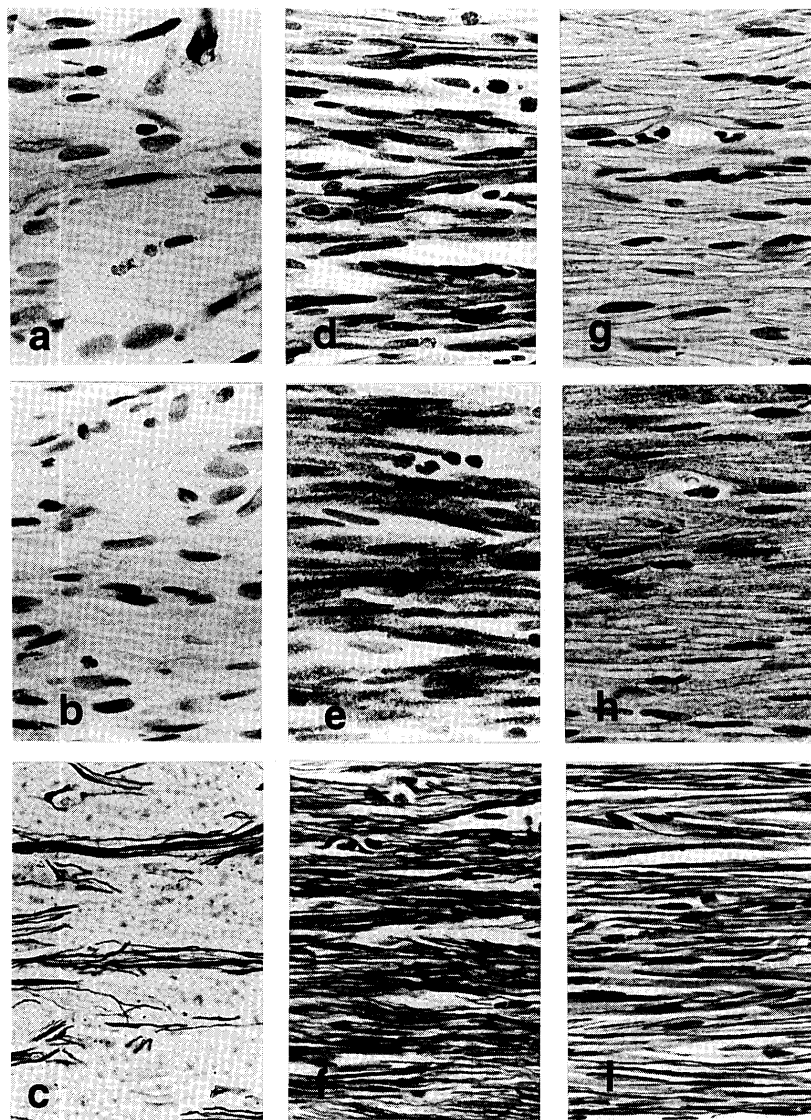


図 4

図 1 の格子模様部分における再生神経の観察である。(全て×500) 各々, 切断後 2 週目の S-100 染色(a), CNTF 染色(b), Bodian 染色(c) 切断後 4 週目の S-100 染色(d), CNTF 染色(e), Bodian 染色(f) 切断後 4 ヶ月目の S-100 染色(g), CNTF 染色(h), Bodian 染色(i) 切断後 2 週では少数の Schwann cell を認めるが(a), CNTF 陰性であった(b), また, 少数の sprouting axon が見られる(c). 切断後 4 週になると増生してきた Schwann cell に CNTF が陽性像を示すようになってくる(e), sprouting axon も多数散見され, 太くなってくる(f). 切断後 4 ヶ月では, 正常の末梢神経で見られるように Schwann cell が axon に接するようになる形をとるものも見られるようになり(g), 大部分に CNTF 陽性像が観察される(h), axon も切断後 4 週のものとは太くなっている(i).

られる。この時期になると近位断端から, CNTF がそれら Schwann cell に陽性像を示すようになってくる(図 4 e)。また, sprouting axon も多数散見され(図 4 f), 切断後 3 週から 4 週になるにつれて axon も太くなってくる。切断後 2 ヶ月, 4 ヶ月となるとチューブ内の紡錘形細胞は, 切断後 3～4 週の頃に見られたものと比べると, やや胞体が少なくなり, 正常の末梢神経で見られるように axon に接するような形をとるものも見られる。そして, それらの紡錘形細胞の大部分に CNTF が陽性となり, S-100 とほぼ同様の染色態度をとるようになる(図 4 g, h)。また, 多数の太い regenerating axon も観察される(図 4 i)。

## 2. 免疫組織化学染色 (S-100, CNTF) 陽性面積の計測

切断後 7 日迄はチューブ内に Schwann cell の増

生が見られないため S-100, CNTF とともに単位面積 (11980  $\mu\text{m}^2$ ) 当たりの陽性率は 0 であった。切断後 2 週となると S-100 陽性面積は単位面積当たり 14.95% と増加するが, CNTF 陽性面積は 1.29% とほぼ 0 に近い値であった。以降, 切断後 3 週, 4 週となるにつれ, S-100, CNTF とともに面積の増加が認められたが, いずれも S-100 陽性面積が CNTF 陽性面積を上回っていた。また, 切断後 4 週以降は S-100, CNTF とともに plateau に近い状態を示したが, これら陽性面積は正常神経で見られる値より高いレベルであった。そして切断後 2 ヶ月～4 ヶ月にかけては S-100 陽性面積の減少が見られた。切断後 4 週の CNTF 陽性面積には, ややばらつきが見られた(図 5)。

## 3. 電子顕微鏡的所見

myelinated axon には厚い myelin が見られ, そ

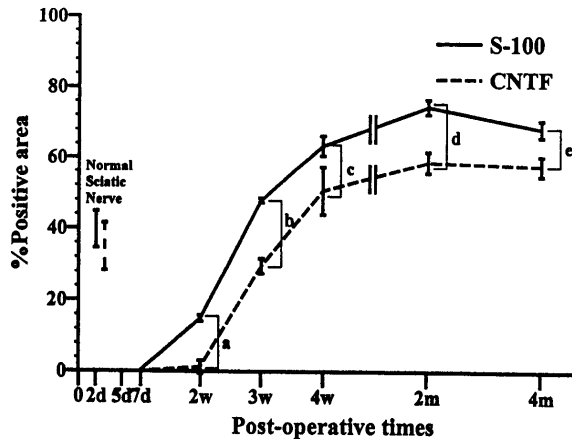


図5 免疫組織化学 (S-100, CNTF) 陽性面積の計測  
データは mean±SD で示す. そして切断後2週～4ヶ月の各時点を一a～eとした. 比較した2群間の経時変化は Hotelling の  $T^2$  検定を行い,  $P < 0.01$  で有意となった. 各時点での比較は Welch's t-test を行い, a, b, d, e においては  $P < 0.01$  で有意となり, c においては  $P < 0.05$  で有意となった.

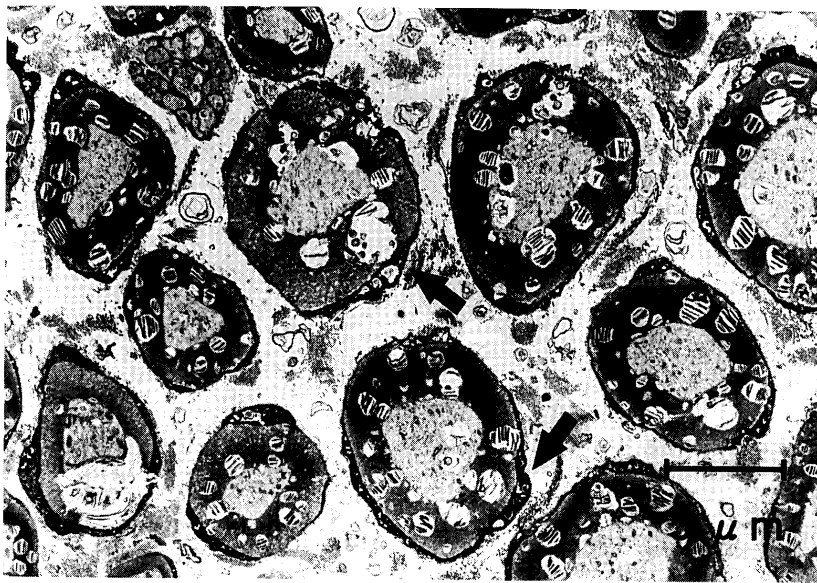


図6  
非手術群の免疫電顕像である. myelinated axon の外周にある Schwann cell の胞体に CNTF 陽性像 (arrows) が観察される.

これらの外周に薄く観察される Schwann cell の胞体に免疫電顕で CNTF 陽性所見が認められた. axon 及び myelin には CNTF 陽性像は認められなかった. また, unmyelinated axon を取り巻く Schwann cell にも CNTF 陽性像は見られなかった (図6).

#### 手術群

切断後2週では, Schwann cell が sprouting axon と接していたり, Schwann cell の胞体が sprouting axon を取り巻いたりしている像が所々に観察される (図7 a) が, それら Schwann cell の胞体に CNTF は陰性であった (図7 b). 切断後4週となると, 切断後2週で見られたような Schwann cell が sprouting axon と接していたり, 取り巻いたりしている像も見られるが, Schwann cell が myelin を形成している像が散見されるようになる. myelinated axon には, myelin が厚いもの, 薄いものと多彩であり, また種々の太さの axon が観察される (図8 a). しかし, それらは正常の myelinated axon と比べる

と非常に myelin は薄く, axon は細い. 免疫電顕で見ると, それら myelinated axon の中には myelin の外周に見られる Schwann cell の胞体に CNTF が陽性となっているものが見られる. 観察される myelinated axon の中では myelin が厚く, axon の太いものに CNTF の発現を認めており (図8 b) myelin が薄く, axon が細いものには CNTF の発現が見られないもの (図8 c) が多い. また myelinated axon の太さが同じくらのものでは myelin が厚いものには CNTF の発現が見られ, myelin が薄いものには CNTF の発現が見られない傾向にある (図8 d). 中には axon は細いが厚い myelin を有するものに CNTF の発現を認めるものも見られる. CNTF 陽性の myelin-related Schwann cell と CNTF 陰性の myelin-related Schwann cell について形態的差異を求めて比較観察を行ったが, 粗面小胞体, リボゾーム等に顕著な差は認められなかった. 切断後4ヶ月では切断後4週のものとは比べ, 太い



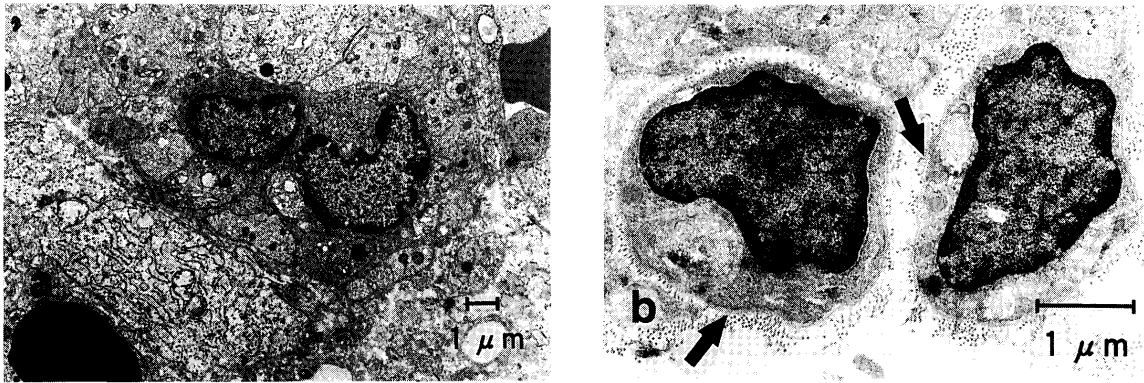


図7 切断後2週目の電顕像である。aは通常電顕像、bは免疫電顕像である。  
a：Schwann cellがsprouting axonと接していたり、Schwann cellの胞体がsprouting axonを取り巻いたりしている像が観察される。  
b：Schwann cellの胞体にCNTFは陰性であった (arrows)。

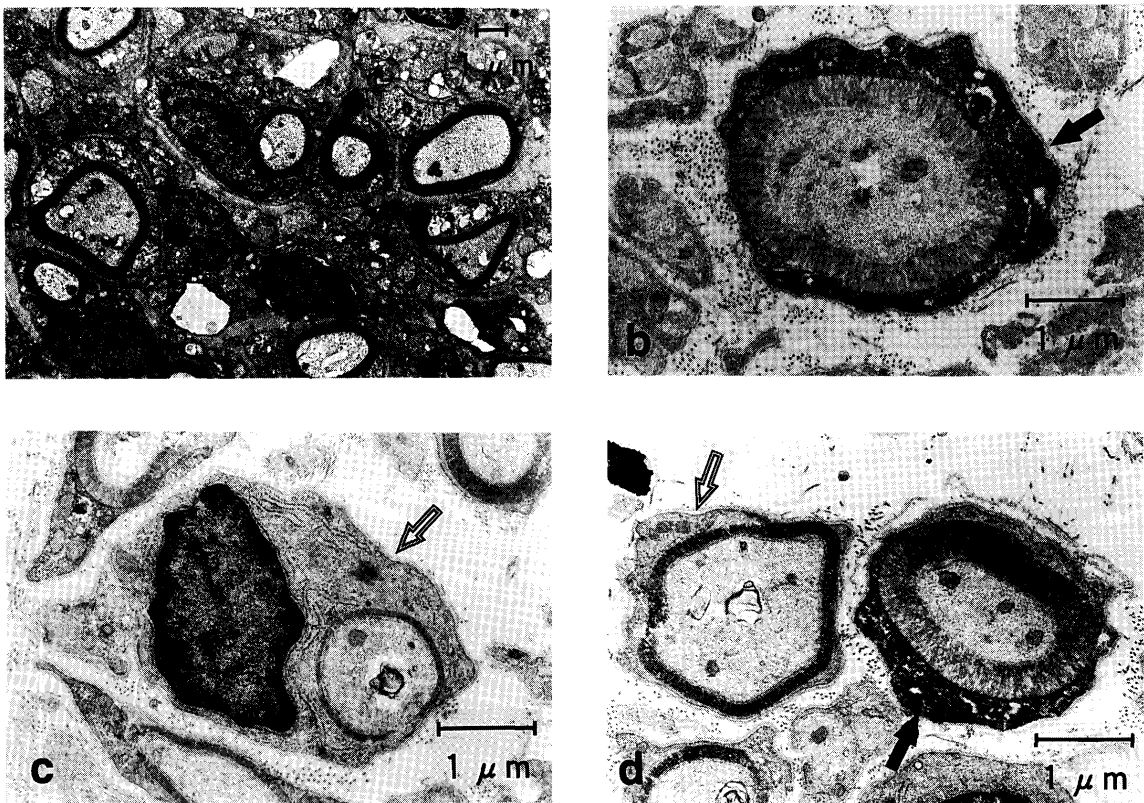


図8 切断後4週目の電顕像である。aは通常電顕像、b-cは免疫電顕像である。  
a：Schwann cellがsprouting axonと接していたり、取り巻いたりしている像も見られるが、多種多様なmyelinated axonが散見されるようになる。  
b：観察されるmyelinated axonの中ではmyelinが厚く、axonの太いものにCNTF陽性像 (closed arrow) を認めている。  
c：myelinが薄く、axonが細いものにはCNTF陽性像 (open arrow) が見られていない。  
d：myelinated axonの太さが同じくらいのものではmyelinが厚いものにCNTF陽性像 (closed arrow) が見られ、myelinが薄いものにはCNTF陽性像 (open arrow) が見られない傾向にある。

axon 及び厚い myelin が多数観察されるようになっており、compartmentation もはっきりしてくる。そして、その大部分の myelinated axon の外周に見

られる Schwann cell の胞体に CNTF 陽性像が観察された。しかし、中には切断後4週で見られたような細さの myelinated axon も見られ、Schwann



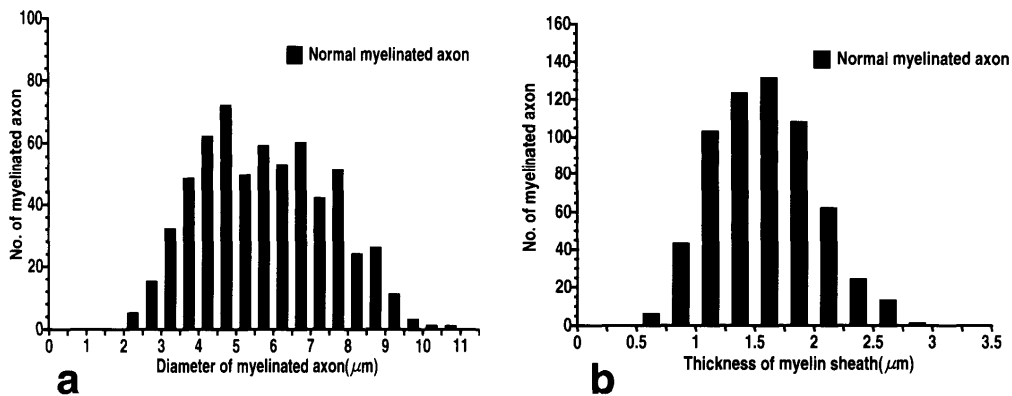


図9 非手術群, 正常の myelinated axon, 614本における計測  
a : myelinated axon の直径の計測  
b : myelin の厚さの計測

cell の胞体に CNTF が陰性のものも見られた。CNTF 陽性像は, 再生した myelinated axon においても, 外周に見られる Schwann cell の胞体に見られるだけで, axon, myelin に陽性像は見られなかった。

#### 4. myelinated axon の直径の計測

##### 非手術群

計測した15400  $\mu\text{m}^2$  の中に CNTF の陽性像が見られている myelinated axon は計614本観察された。それらの myelin を含めた神経線維の直径を計測したところ, 直径は2.23~10.83  $\mu\text{m}$  まで分布が見られた(図9 a)。そして95%信頼区間を求めるところ2.42~9.15  $\mu\text{m}$  であった。

##### 手術群

myelinated axon の太さ, myelin の厚さが最も多種多様な時期である切断後4週の群, 10匹を計測した計6000  $\mu\text{m}^2$  の中には, CNTF 陽性のもの, CNTF 陰性のものを含め myelinated axon は計1130本観察された。それらの myelin を含めた神経線維の直径を計測したところ, 直径は0.48~4.4  $\mu\text{m}$  まで分布が見られた。その中で直径が1~1.5  $\mu\text{m}$  のものでは CNTF 陽性率が20%であるのに対して, 1.5~2  $\mu\text{m}$  では60%, 2~2.5  $\mu\text{m}$  では86%, 2.5  $\mu\text{m}$  以上では100%と myelinated axon の直径が大きくなるにつれ, CNTF 陽性率の上昇が認められた(図10 a)。そこで, 判別特性分析を行い, 特異度曲線と感度曲線の交点における値を cutoff 値としたところ1.65となり, その感度及び特異度は79%であった。

#### 5. myelin の厚さの計測

##### 非手術群

myelinated axon の直径を計測したのと同じ CNTF が陽性像を示している神経線維, 計614本について, それらの myelin の厚さを計測したところ

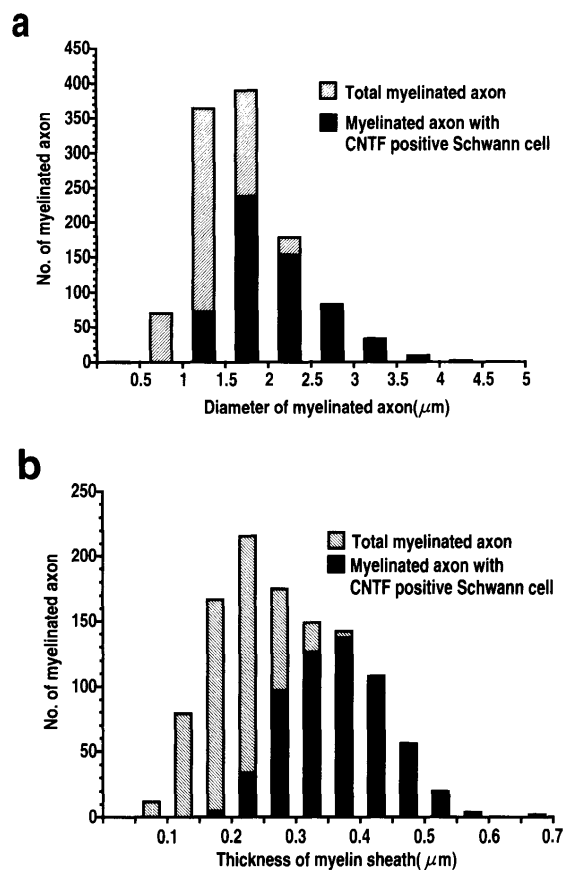


図10 切断後4週目の再生 myelinated axon, 1130本における計測  
a : myelinated axon の直径の計測  
b : myelin の厚さの計測

0.57~2.99  $\mu\text{m}$  まで分布が見られた(図9 b)。そして95%信頼区間を求めたところ0.74~2.41  $\mu\text{m}$  であった。

##### 手術群

myelinated axon の直径を計測したのと同じ神

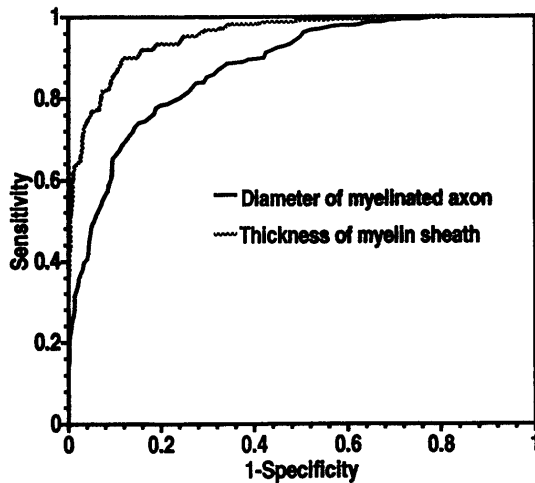


図11 myelinの厚さ及びmyelinated axonの太さの計測結果からの各々のresponse operating characteristic (ROC) 曲線

経線維, 計 1130 本について, それらの myelin の厚さを計測したところ  $0.07 \sim 0.66 \mu\text{m}$  まで分布が見られた. その中で一番度数分布が多かったのは  $0.2 \sim 0.25 \mu\text{m}$  のものであり, その部分の CNTF 陽性率は 16% であった. 以降 CNTF 陽性率は  $0.25 \sim 0.3 \mu\text{m}$  では 55%,  $0.3 \sim 0.35 \mu\text{m}$  では 85%,  $0.35 \sim 0.4 \mu\text{m}$  では 96%,  $0.4 \mu\text{m}$  以上では 100% と myelin が厚くなるに従い CNTF の陽性率の上昇が認められた(図 10 b). そこで, 判別特性分析を行い, 特異度曲線と感度曲線の交点における値を cutoff 値としたところ 0.27 となり, その感度及び特異度は 88% であった. そして, myelin の厚さと myelinated axon の太さの判別特性分析の結果から両者の相関 (ROC 曲線) を比較検討したところ, myelin の厚さの計測の方がどの感度においても特異性が高く (図 11), 統計学的に CNTF の発現を検討する場合, myelinated axon の太さの計測より myelin の厚さを計測する方が有用であるという結果となった.

## 考 察

一般的に, 神経細胞の分化誘導, 突起伸長, 生存機能維持作用を有する物質のことを神経栄養因子と呼んでおり, それに代表されるのが神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) である. NGF は 1951 年に Montalcini により発見, 報告<sup>24</sup>された. 以降, 脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF)<sup>25</sup>, neurotrophin-3 (NT-3)<sup>26,27</sup>, neurotrophin-4 (NT-4)<sup>28</sup>, neurotrophin-5 (NT-5)<sup>29</sup>, CNTF など多くの神経栄養因子が報告されている. そして BDNF, NT-3, NT-4, NT-5 は NGF とその構造に類似性があることにより NGF ファミ

リーと呼ばれている. しかし, CNTF は細胞からの分泌に必要なシグナルペプチドを持たず, NGF ファミリーには属さないと考えられており, 現在のところ分泌経路は不明である. また, 成人ラットにおいて, CNTF はその発現が坐骨神経, 視神経, 脊髄, 嗅球と非常に限局されており<sup>13,30</sup>, 発現が見られるのは非神経細胞である Schwann cell や astrocyte, astrocyte-like cell, oligodendrocyte-like cell と言われている<sup>31</sup>. そして, 末梢神経が損傷を受け, 髄鞘が崩壊することによって, Schwann cell 内に存在した CNTF が細胞外に放出され作用する. つまり傷害を受けたときに出現してくる“傷害因子”と考えられると Thoenen や Sendtner らは報告<sup>17,18</sup>している. そして Curtis らは, それら Schwann cell から放出された CNTF が神経節細胞まで逆行性に軸索内を輸送すると報告<sup>32</sup>している. また, 生後 1 日齢のラットの顔面神経を切断すると顔面神経核の神経細胞の 80% 以上が消失するが, 切断近位端へ CNTF 投与により顔面神経細胞死が予防できるという報告<sup>33</sup>もある.

末梢神経において, myelinated axon の myelin は Schwann cell が形成している. 現在, 坐骨神経の CNTF の発現は Schwann cell の中でも myelin-related Schwann cell に見られると言われており<sup>15</sup>, 本研究においても非手術群の myelin-related Schwann cell に CNTF の陽性像が見られた. 末梢神経が損傷されると, axon の破壊と myelin の崩壊が起こり, 近位断端では逆行性変性, 遠位側では Waller 変性が見られる. そして CNTF mRNA と CNTF protein のレベルを計測することにより, それら変性が起こった部分では CNTF 発現の低下が起こることが報告<sup>18,19,20</sup>されている. 本研究においても, 切断後 2 日から逆行性変性, Waller 変性が見られ, 切断後 5 日目より免疫組織化学染色において Schwann cell における CNTF の染色性の低下が見られ始めた. CNTF の発現が Friedman ら<sup>15</sup> や Smith ら<sup>20</sup> が提唱する axon-Schwann cell の interaction に関与するものとすれば, これら CNTF の発現の低下は変性時の axon の破壊と myelin の崩壊により axon と Schwann cell の接触がなくなったためと考えられる. また, 同時期において Waller 変性 (表 1, area 5-7) の所見を呈する断片化した axon 及び myelin debris には, 正常時とは異なり CNTF 陽性であった. これらは Thoenen<sup>17</sup> や Sendtner ら<sup>18</sup> が提唱する Schwann cell から外へ放出された CNTF と思われた. そのうち axon にも陽性像を示したことは, 異常時には CNTF が逆行性に軸索内輸送されていくとの Curtis ら<sup>32</sup> の提唱を示

唆する形態的所見と思われた。そして、逆行性変性を示す部分(表1, area 3)でも同様の所見が得られた。

また、再生時期である切断後2週～4週にかけて、逆行性変性(表1, area 3)を呈していた部分よりやや近位側の axon(表1, area 2)に CNTF 陽性像を示す部分が観察された。これらは area 2 の本来あった myelin-related Schwann cell に変化が起これ、Schwann cell から放出されたものに由来するのかもしれない。さらに、それら CNTF が再生時期に sprouting が起こる部分よりやや近位側の axon に陽性像を示していることより、局所で何か作用をしているのかもしれない。しかし、これらのことを理由付ける所見及び報告は見られず、結局、この部分の axon 内における CNTF の由来及び意味は不明であり、今後、解明される必要がある。そして、変性した axon 及び myelin が処理されるに従い、再生が始まる。再生現場における CNTF の発現については、Sendtner らの crush model による報告<sup>18</sup>によると、損傷後16日～33日にかけて crush 部分より遠位側の神経において CNTF mRNA の増加が見られ、損傷後30日では CNTF protein の増加も見られるとしている。しかし、それらを免疫組織化学染色で見てみると CNTF 陽性細胞が見られたのは再生神経線維に接している数カ所で、全ての Schwann cell が CNTF 陽性かどうかが、はっきりしなかったとしている。また、他の報告においても、正常では myelin-related Schwann cell に CNTF の発現が見られるため、再生時に発現してくる CNTF も myelin-related Schwann cell に出現してくるのだろうとされているだけで、実際、再生してきた myelinated axon の Schwann cell 全てに CNTF が発現が見られると言う報告はなく、また、Schwann cell がどのように axon を myelinate したときに出現して来るかという報告もない、本研究ではそれらの点について注目し検討した。

まず光顕所見において、切断後約2週では、近位断端及びチューブ内に増生した Schwann cell に CNTF は陰性であったが、切断後3～4週となるにつれ、Schwann cell に CNTF が陽性像を示すようになる。それら Schwann cell は長軸方向に並び、その周囲の再生軸索は太くなってきていることより、これらは Friedman ら<sup>15</sup> や Smith ら<sup>20</sup> が提唱する axon-Schwann cell interaction の関与を支持する所見と思われた。また、経時的な Schwann cell の増生の程度と、CNTF の発現の程度を、通常 Schwann cell のマーカーである S-100 と比較するため各々の単位面積(11980  $\mu\text{m}^2$ ) 当たりの陽性率を計測した。

まず、非手術群では S-100, CNTF とも同じ染色態度をとっているが、S-100 陽性面積が CNTF 陽性面積を軽度上回っていた。これは S-100 が均一、一様に染まり、CNTF は顆粒状に染まってくる染色態度の違いによるものと思われた。手術群切断後2週では CNTF はほぼ0%に近い値であったのに比べ S-100 は14.95%と増加している。これは Schwann cell が増生するが myelination が起こっていないためと考えられた。そして切断後3週、4週になると S-100 と平行し CNTF の値も経時的に増加していくが、S-100 陽性面積が CNTF 陽性面積を上回っていた。これは axon が伸長し myelination が起こるよりも Schwann cell の増生の方が高度なためと思われた。また、切断後4週以降も S-100 陽性面積が CNTF 陽性面積を上回っていることに関しては、遅れて伸長してくる sprouting axon もあり、時間差による myelination の差によるものが一因として考えられた。実際、免疫電顕において切断後4ヶ月になっても切断後4週で見られたぐらいの細さの myelinated axon が少数散見され、その Schwann cell に CNTF が陰性のものも見られた。S-100 及び CNTF 発現の4週以降の移り変わりが plateau になってきていることについては、Schwann cell の増生が peak に達しているためと考えられる。これらの時期において、CNTF, S-100 ともに正常な神経より高い陽性面積率を示したのは、再生時には Schwann cell が紡錘形細胞として胞体が広く観察されるのに対して、正常では myelinated axon の最外層と核の周囲に少し Schwann cell の胞体が観察されるだけであるためと考えられた。そして S-100 陽性面積が2ヶ月から4ヶ月にかけてやや減少しているが、これは時期が経つに連れて myelination が進行するため、上記の理由と同様、正常の myelinated axon に近い形態をとるようになり、計測上 Schwann cell が小形化しているため、及び end plate 等の末梢へ到達できなかった myelinated axon が淘汰され、それに伴い Schwann cell が減少し、以降正常の値に近づいていくため、などの理由が考えられた。そして、peak となっても陽性面積が約80%を越えないのは計測した単位面積内に陽性像を取らない fibroblast 等の細胞や血管及びその周囲結合組織、組織間隙等が存在するためと考えられた。また、切断後4週の CNTF 陽性面積に他の時期よりばらつきが見られたのは、この時期が Schwann cell の増生、axon の伸長が激しく起こりだす時期であり、myelination の程度に個体差があるためと考えられた。

CNTF の発現をより詳細に検討するために透過

型電顕及び透過型免疫電顕的観察を行った。まず非手術群、正常のCNTF陽性像を示す計614本のmyelinated axonの直径及びmyelinの厚さを計測したところ、その直径は $2.42\sim 9.15\ \mu\text{m}$ の間に、myelinの厚さは $0.74\sim 2.41\ \mu\text{m}$ の間に全体の95%が分布しており、切断後4週に見られたmyelinated axonより太く、myelinは厚かった。次に、再生神経についてみると、光顕においてはCNTFの発現がほぼ見られなかった切断後2週ではmyelinated axonは観察されず、CNTF発現が見られただす切断後4週でmyelinated axonが散見されるようになっており、このことはCNTFの発現にaxon-Schwann cell interactionが関与していることを示唆するものと考えられた。また、免疫電顕所見においても、切断後2週の群においては、Schwann cellとaxonが接していたり、Schwann cellがaxonを取り囲んだりするだけのmyelinationが見られないものには、CNTFの発現が見られないことが明確となった。そして、myelinated axonの太さ、myelinの厚さが最も多種、多様である切断後4週においては、myelinが厚くaxonが太いものにはCNTFの発現が見られ、myelinが薄くaxonが細いものには発現が見られない傾向が同じ標本内で顕著であった。そこで、無作為に100本のmyelinated axonを選択し、CNTF陽性のもの、CNTF陰性のものに分け各々のaxonの太さ、myelinの厚さ、myelinated axonの太さ(myelinとaxonを含む)そしてmyelin/axon ratioを求めたところ、myelinated axon及びaxonの太さ、myelinの厚さの値が大きくなればCNTFの発現が見られる傾向があり、myelin/axon ratioはCNTF陽性のもの、CNTF陰性のものとの間に顕著な差は見られなかった。そして、再生時においてaxonが太くなるにつれてmyelinationが進行していくことを考慮し、myelinated axonの太さを計1130本について計測したところ、myelinated axonの直径が、 $1.65\ \mu\text{m}$ 以上のものに有意にCNTF陽性像が認められた。しかし、myelinated axonの太さがほぼ同じものではmyelinが厚いものにCNTFの発現が見られ、また少数ではあるが、axonは細いが厚いmyelinを有するものにCNTFの発現を認めるものも観察された。そして、myelinの厚さが $0.27\ \mu\text{m}$ 以上のものでは有意にCNTF陽性像が認められた。これらのことからCNTFの発現はaxonの太さよりmyelinationと一層深い関係があると考えられ、また図11に示したROC曲線による統計学的検討においても、CNTFの発現はmyelinated axonの太さよりmyelinの厚さに深い関与があると考えられた。

myelinationはaxonの直径が $1\ \mu\text{m}$ 以上になると起こりだすと言われており<sup>34,35</sup>、Duncanはmyelinationはaxonの太さに依存しており、myelinated axonとして見え始めるのは、その直径が $2\ \mu\text{m}$ 弱のころであると報告<sup>34</sup>している。axonが太くなるに従いmyelinationが起こってくることを考慮すれば、axonの細いものにはmyelinは薄く、axonが太いものにはmyelinが厚いという傾向にあることが言える。当教室の細川の報告<sup>36</sup>においても、経時的にaxonの直径が太くなり、myelin/axon ratioも大きくなるとしている。そして、一般に再生神経においては、myelin形成のある太い線維が神経成熟度が高いと言われている。本研究の結果、myelinated axonの太さが $1.65\ \mu\text{m}$ 以上、myelinの厚さが $0.27\ \mu\text{m}$ 以上になれば、その再生有髄神経のSchwann cellにCNTF陽性像が有意に見られており、CNTFは有髄神経線維として成熟度が高くなるに従い、発現が見られる傾向にあると考えられる。そして、前述のようにmyelinationの進行と深い関係があると考えられた。中枢神経系においてはCNTFは神経細胞の生存維持に関与していると言われていたが、末梢神経においては、Smithら<sup>20</sup>がmyelinを形成するSchwann cellのintracellular functionをしているのではないかとしているが、明確には今だ解明されていない。本研究においては、末梢神経損傷後の変性初期には、断片化したaxonにCNTF陽性像が見られ、変性後期になっても逆行性変性を呈している部分よりやや近位側のaxonにCNTF陽性像を示す部分が観察されていることより、Schwann cellより細胞外へ放出されたCNTFは逆行性に軸索内輸送され神経節細胞の維持にも関わっているかもしれないが、末梢神経損傷部の近位、遠位の各局所においてもaxonの維持等の何か作用をしているのではないかと思われた。また、再生時期においては、myelinが厚く、axonが太くなると、myelinated axonのSchwann cellにCNTFの発現が見られ、その発現時期から考えると、以降淘汰されずに残っていくと思われる有髄神経線維の維持に関わっているのではないかと思われた。それは、Schwann cellのmyelin維持機能の一端を示しているものと思われる。また、再生有髄神経のmyelin-related Schwann cellにおけるCNTFの発現は、正常有髄神経線維で見られるのと同様に、以降傷害を受けたときにSchwann cellから細胞外へ放出できるように再び出現してきているのかもしれない。そう考えると、再生有髄神経のmyelin-related Schwann cellにおけるCNTFの発現は、有髄神経として機能することができぐらいに再生神

経の成熟度が高くなり始めていることを示している所見とも考えられる。

本研究では、末梢神経再生時における CNTF の発現時期とその局在及び CNTF 発現が見られる Schwann cell を含めた myelinated axon の形態的特徴を明らかなものとした。今後、末梢神経損傷時、再生時における CNTF receptor の出現、動態及び局在等を含めた CNTF の末梢局所への影響の解明も必要と考える。また、前述のごとく CNTF の投与が神経細胞死の抑制に有効であることから、CNTF は末梢神経損傷後の変性時、再生時に作用を示す物質であると考えられ、これからの末梢神経外科領域における臨床応用が期待される物質と考えられた。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲賜りました橋本重夫教授、佐藤隆夫講師、蛭間慎吾講師、そして第2病理助手（現 Laboratory of Molecular Genetics, P&S, Columbia University）丹司 紅博士に深甚なる謝意を捧げます。また、御校閲頂きました形成外科上石 弘教授ならびに御協力頂いた第2病理学教室の皆様心から感謝いたします。

本論文の各部については、第84回、85回日本病理学会総会（平成7年4月、名古屋、平成8年4月、東京）及び、第4回日本形成外科学会基礎学術集会（平成7年10月、倉敷）にて発表した。

### 文 献

- Helfand SL, Smith GA, Norman KW (1976) Survival and development in culture of dissociated parasympathetic neurons from ciliary ganglia. *Developmental Biology* 50: 541-547
- Varon SS (1978) Trophic mechanisms in the peripheral nervous system. *Ann Rev Neurosci* 1: 324-361
- Adler R, Landa KB, Manthorpe M, Varon S (1979) Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science* 204: 1434-1436
- Varon S, Manthorpe M, Adler R (1979) Cholinergic neuronotrophic factors: I. survival, neurite outgrowth and choline acetyltransferase activity in monolayer cultures from chick embryo ciliary ganglia. *Brain Research* 173: 29-45
- Barbin G, Manthorpe M, Varon S (1984) Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor. *J Neurochem* 43: 1468-1478
- Manthorpe M, Skaper SD, Williams LR, Varon S (1986) Purification of adult rat sciatic nerve ciliary neuronotrophic factor. *Brain Res* 367: 282-286
- Lin L-FH, Mismar D, Lile JD, Armes LG, Butler ET, Vannice JL, Collins F (1989) Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Science* 246: 1023-1025
- Stockli KA, Lottspeich F, Sendtner M, Masiakowski P, Carroll P, Gotz R, Lindholm D, Thoenen H (1989) Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* 342: 920-923
- Arakawa Y, Sendtner M, Thoenen H (1990) Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J Neurosci* 10: 3507-3515
- Sendtner M, Arakawa Y, Stockli KA, Kreutzberg GW, Thoenen H (1991) Effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on motoneuron survival. *J Cell Sci* 15: 103-109
- Blottner D, Brüggemann W, Unsicker K (1989) Ciliary neurotrophic factor supports target-deprived preganglionic sympathetic spinal cord neurons. *Neurosci Lett* 105: 316-320
- Ernsberger U, Sendtner M, Rohrer H (1989) Proliferation and differentiation of embryonic chick sympathetic neurons: effects of ciliary neurotrophic factor. *Neuron* 2: 1275-1284
- Williams LR, Manthorpe M, Barbin G, Sampedro NM, Cotman CW, Varon S (1984) High ciliary neuronotrophic specific activity in rat peripheral nerve. *Int Dev Neurosci* 2: 177-180
- Millaruelo AI, Sampedro MN, Yu J, Cotman CW (1986) Neurotrophic activity in the central and peripheral nervous systems of the cat. effects of injury. *Brain Research* 374: 12-20
- Friedman B, Scherer SS, Rudge JS, Helgren M, Morrissey D, McClain J, Wang DY, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, Ip NY (1992) Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. *Neuron* 9: 295-305
- Rende M, Muir D, Ruoslahti E, Hagg T, Varon S, Manthorpe M (1992) Immunolocalization of ciliary neuronotrophic factor in adult rat sciatic nerve. *Glia* 5: 25-32
- Thoenen H (1991) The changing scene of neurotrophic factors. *TINS* 14: 165-170
- Sendtner M, Stockli KA, Thoenen H (1992) Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. *J Cell Biol* 118: 139-148
- Rabinovsky ED, Smith GM, Browder DP, Shine HD, McManaman JL (1992) Peripheral nerve injury down-regulates CNTF expression in adult rat sciatic nerves. *J Neurosci Res* 31: 188-192
- Smith GM, Rabinovsky ED, McManaman JL, Shine HD (1993) Temporal and spatial expression of ciliary neurotrophic factor after peripheral nerve injury. *Exp Neurol* 121: 239-247
- 佐藤隆夫 (1986) コラーゲン・ゲル・マトリックスを使った末梢神経再生機序に関する実験的形態学的研究. *近畿大医誌* 11: 407-422
- Sugimura K, Haimoto H, Nagura H, Kato K, Takahashi A (1989) Immunohistochemical differential distribution of S-100a and S-100b in the peripheral nervous

- system of the rat. *Muscle and nerve* 12: 929-935
23. Spreca A, Rambotti MG, Rende M, Saccardi C, Aisa MC, Giambanco I, Donato R (1989) Immunocytochemical localization of S-100b protein in degenerating and regenerating rat sciatic nerves. *J Histochem Cytochem* 37: 441-446
  24. Montalcini RL, Hamburger V (1951) Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool* 116: 321-362
  25. Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengeler B, Masiakowski P, Thoenen H, Barde YA (1989) Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341: 149-152
  26. Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD (1990) Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247: 1446-1451
  27. Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344: 339-341
  28. Hallböök F, Ibáñez CF, Persson H (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in xenopus ovary. *Neuron* 6: 845-858
  29. Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A (1991) Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* 7: 857-866
  30. Stockli KA, Lillien LE, Näher-Noé M, Breitfeld G, Hughes RA, Raff MC, Thoenen H, Sendtner M (1991) Regional distribution, developmental changes and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. *J Cell Biol* 115: 447-459
  31. Dobrea GM, Unnerstall JR, Rao MS (1992) The expression of CNTF message and immunoreactivity in the central and peripheral nervous system of the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 66: 209-219
  32. Curtis R, Adryan KM, Zhu Y, Harkness PJ, Lindsay RM, DiStefano PS (1993) Retrograde axonal transport of ciliary neurotrophic factor is increased by peripheral nerve injury. *Nature* 365: 253-255
  33. Sendtner M, Kreutzberg GW, Thoenen H (1990) Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 345: 440-441
  34. Duncan D (1934) A relation between axon diameter and myelination determined by measurement of myelinated spinal root fibers. *J Comp Neurol* 60: 437-471
  35. Matthews MA (1968) An electron microscopic study of the relationship between axon diameter and the initiation of myelin production in the peripheral nervous system. *Anat Rec* 161: 337-352
  36. Hosokawa K (1990) An experimental study of peripheral nerve regeneration by utilizing a collagen film comparison with a silicone tubing method. *Acta Med Kinki Univ* 16: 23-38