

再生軸索の空間パターン解析について

川崎医科大学 数学教室

有田 清三郎

広島大学医学部 整形外科

宮本 義洋

(昭和57年9月11日受理)

The Spatial Pattern Analysis of the Regenerated Axons

Seizaburo Arita

Department of Mathematics, Kawasaki Medical School, Kurashiki, 701-01

Yoshihiro Miyamoto

Department of Orthopedic Surgery, Hiroshima University,

School of Medicine, Hiroshima, 734

(Received on Sept 11, 1982)

末梢神経の横切組織写真を観察すると、神経軸索は正常では規則性のある配置が多くみられる。神経線維が一度切断され縫合術後、再生過程に入ると、軸索の空間配置は全く様式を異にし、経時的にも変化していくように思われる。

我々は軸索の空間配置（空間パターン）が神経の再生過程を特徴づけるひとつの指標となりうるかを検討するため、再生神経の軸索について、距離法による空間パターン解析を試みた。ラットによる実験データの解析結果、神経の再生過程では、軸索の空間パターンは集塊→ランダム→規則型と推移することが示唆された。

Abstract

The analysis of the spatial pattern was originally proposed as the test for the randomness of the spatial distribution. In this paper we use it as the method of the classification of the spatial distributions, such as the clustered, the random or the regular distribution.

We apply the spatial pattern analysis by the distance method to the transected cells in the tissue photographs by an electron microscope. The aim of this paper is to show that by the term of the spatial patterns, the process of maturation of regenerated axons can be described.

From the analysis of the experimental results it is suggested that the spatial pattern of regenerated axons is changed from the clustered to the regular through the random and thus gradually approaches to the normal pattern.

1. はじめに

組織写真上に細胞がどんなパターンで配置されているか、すなわち細胞がどんな空間分布をしているかは、細胞が計測領域内に何個あるか（密度）と同様に興味ある課題である。

このような個体の空間配置を一般に“空間パターン (Spatial pattern)”とよぶ。空間パターンの解析方法には、区画法と距離法がある。区画法は計測領域を多数の区画にわけ、区画内の個数を count し、区画あたりの個数の分散と平均個数との大小比較により個体がランダムに分布（すなわちポアソン分布）するかどうかを解析する方法である。

区画法では区画の大きさのとり方によって得られる解析結果も異なってくる。この難点の一部を補うものとして距離法による解析アプローチが提案された^{3),5),7)}。この距離法は平面上にランダムにとった点と個体との最近接距離、個体間の最近接距離にもとづく方法である。

樹木などの植物、昆虫などの動物の生息状況や動物のなわばりの分布等に、この空間パターン解析が適用^{9),11),12)}されたが、医学の臨床面への適用例^{1),6)}は少ない。また実際的な適用にあたっての種々の改良が試みられてきた^{2),4),8),10)}。

ここでは、この空間パターン解析を組織写真上の細胞の配置に適用した。具体的には、神経軸索の再生過程において、この空間パターンが神経再生過程の成熟度を表わす指標となりうるかについて検討した。

ラットの腓骨神経の神経移植の実験結果について空間パターン解析を行なった結果、神経の再生過程では軸索の空間パターンが、集塊→ランダム→規則型と推移することが示唆された。

2. 距離法による空間パターン解析

距離法による空間パターン解析は、まず軸索を点で代表させ、ランダムな点から軸索に至る距離と軸索間の距離を比較する方法である。距離としては、最近接距離（最も近い軸索に至る距離）を採用する。

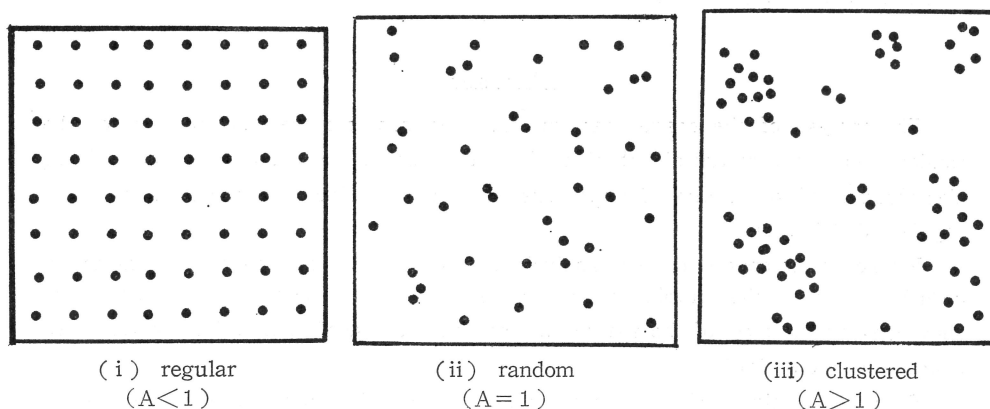


Fig. 1 The classification of the spatial patterns.

The spatial patterns are classified into the following classes.

By the value of Hopkins's Index A , $A=1$ then axons are randomly distributed; $A>1$ then clustered; $A<1$ then regularly.

この解析方法は本来個体の空間パターンがランダム（すなわちポアソン分布）であるかどうかを検定する方法であったが、さらに空間パターンを①規則型、②ランダム、③集塊型の3つに分類し、このランダム性の検定量を3つのパターンの判別基準に利用したものである。3つのパターンの典型的な例を図1で示す。

距離法による空間パターン解析では多くの指標が提案されているが、よく使用される Hopkins & Skellam⁵⁾の指標Aについて解説する。

いま、空間にランダムに散布された点を P_i^* とする。点 P_i^* から最近接の軸索に至る距離を $r(P_i^*-M)$ と記す。一方軸索の中からランダムに選ばれた軸索を M_j^* とし、点 M_j^* から最近接の軸索に至る距離を $r(M_j^*-M)$ と記す。

このとき

$$A = \frac{\sum_{i=1}^n \{r(P_i^*-M)\}^2}{\sum_{j=1}^n \{r(M_j^*-M)\}^2}$$

を Hopkins & Skellam の指標という。

点 P_i^* はランダムに分布しているから、軸索 M がランダムに分布しているならば、 A の期待値 $E(A)$ は1となる。軸索が集塊型に分布しているならば $A > 1$ 、軸索が規則型に分布しているならば $A < 1$ となる。集塊型では $A > 1$ 、規則型では $A < 1$ なることを図2を用いて簡単に説明しよう。

図2で、軸索を●印で記す。平面上にランダムに散布された点 P^* の最近接の軸索を M とする。またランダムに選ばれた軸索 M^* の最近接の軸索を M' とする。

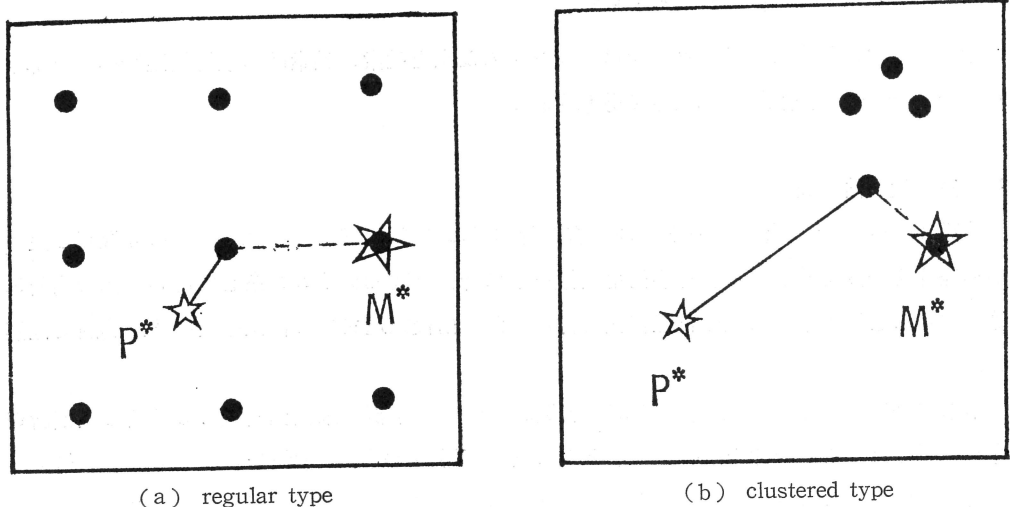


Fig. 2 The spatial patterns and their distances.
The axons are denoted by the symbol ●.
The random point is marked by ☆ and the selected axons by ★.

図2の(a)では軸索は規則型の分布を呈している。点 P^* から点 M に至る距離は、点 M^* から点 M に至る距離より小さいから、 $r(P^*-M)/r(M^*-M)$ は1より小さい。点 P^* が軸索 M に一致したときは、分母、分子が等しくなる。変数 A はそれぞれの距離の平方の和の比であるが、点 P^* は平面上でランダムに選ばれた点であるから、軸索が規則型の分布を呈しているときには、 $A < 1$ が推測される。

一方、図2の(b)では軸索は集塊型の分布を呈している。図では $r(P-M) > r(M^*-M)$ となり、 $A > 1$ が推測される。

A の値が期待値1からどのくらい有意な差があるかを調べるため、新しい統計量

$$x = A/(A+1)$$

を導入する。変数 x について次の統計的性質が得られる。

〔定理〕 n が十分大きいとき、変数 x の分布は平均 $E(x) = 1/2$ 、分散 $V(x) = \frac{1}{4(2n+1)}$ の正規分布で近似できる。

これを利用すると、空間パターンについての規則型、ランダム、集塊型の判定基準は次のようになる。

有意水準 $\alpha = 0.05$ で、軸索の空間パターンは次のように分類される。

- (1) $x < \frac{1}{2} - \frac{1}{\sqrt{2n+1}}$ ならば規則型、
- (2) $\frac{1}{2} - \frac{1}{\sqrt{2n+1}} \leq x \leq \frac{1}{2} + \frac{1}{\sqrt{2n+1}}$ ならばランダム、
- (3) $x > \frac{1}{2} + \frac{1}{\sqrt{2n+1}}$ ならば集塊型。

換言すれば、軸索の空間パターンは、ランダムな点と軸索、軸索間の最近接距離から計算される変数 x と、軸索数 n によって分類される。

3. 実験結果

体重 250~300g の雄のラット48匹の右腓骨神経に 1.0, 1.5, 2.0, 2.5cm の4種類の長さの神経片を一度切離し、これを手術用顕微鏡下に針付き10-0ナイロン糸を使用して元の場所に縫合することにより同所性の神経移植を行なった。術後24週までの再生軸索を4週間隔で観察した。

中枢縫合部より 5mm 末梢、末梢縫合部より 5mm 中枢、末梢側断端の3個所の全横断切片を作製した。この切片を単孔グリッド上に置き、透過型電子顕微鏡を利用して2,100倍で10カ所撮影した。このネガフィルムを3倍に拡大し、6,300倍の印画写真を作製した。

この写真を 350×350mm の active tablet area を持つ Graf/Pen, Model GP₃ と、Mini-Computer NOVA-01 システムを使用し、神経軸索の周長、長径を入力した。入力されたデ

ータより長径の中心点を中心点として、計測軸索と等面積の円でシミュレートした。一部の隣接軸索が重なって画かれている所があるのはこのためである。図3, 4, 5は写真標本の1例である。(黒点は無髄神経を示している。)

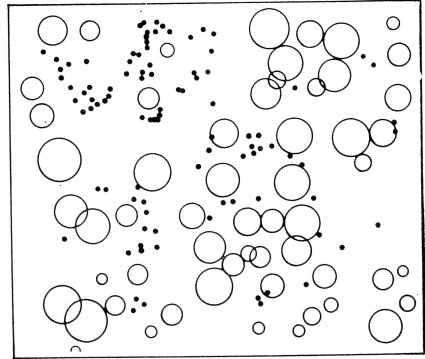
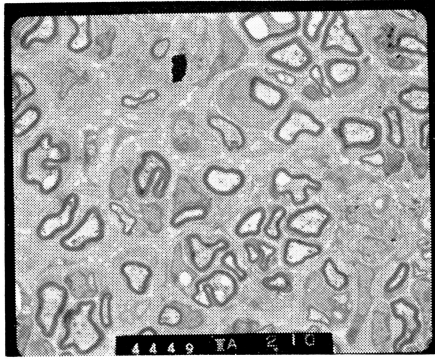


Fig. 3 The random distribution of regenerated axons after 4 weeks.

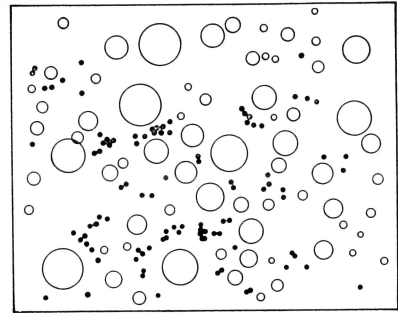
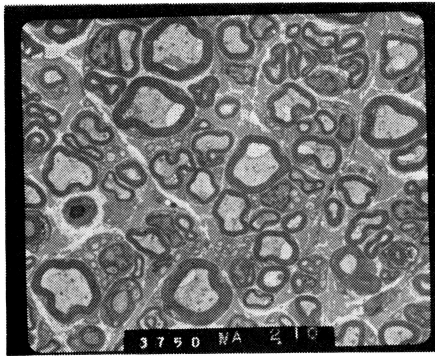


Fig. 4 The regular distribution of regenerated axons after 16 weeks.

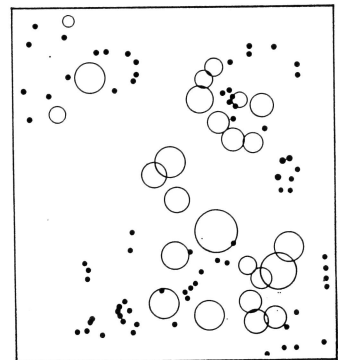
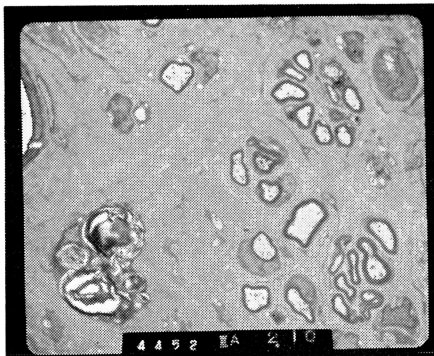


Fig. 5 The clustered distribution of regenerated axons after 4 weeks.

図3は術後4週経過の横切組織写真が示されている。解析の対象となった領域内に存在する軸索個数は57個である。一方コンピュータにより乱数発生させ、ランダムな点を作り、点と軸索、軸索間の最近接距離 $\sum \{r(P_i^* - M)\}^2$ と、 $\sum \{r(M_j^* - M)\}^2$ を計算すると、 $A=0.929$,

$x=0.482$ $1/\sqrt{2n+1}=0.09$ が得られた。これにより軸索はランダムな分布をすることが示された。

図4は術後16週の組織写真であるが、 $n=69$ 、 $A=0.481$ 、 $x=0.325$ となり規則型の空間パターンと判定された。図5(術後4週)では $n=25$ 、 $A=2.412$ 、 $x=0.707$ となり、集塊型のパターンと判定された。

術後4, 12, 16週及び正常の各切片から10枚の写真標本を作り、各写真ごとに空間パターン解析を適用し、この3つの分布のいずれに属するかを判定した。

これらの結果をまとめると、表1のようになった。

Table 1 The experimental results of the spatial pattern on axons of peroneal nerves. (“(Re.)” indicates regenerated axons after weeks.)

pattern	clustered	random	regular
Normal	0	2	8
(Re.) 4 weeks	8	2	0
(Re.) 12 weeks	1	7	2
(Re.) 16 weeks	0	5	5

4. 考 察

1) 正常では神経軸索の空間パターンは規則型を呈することが多く、再生の初期では、集塊型やランダムパターン、成熟過程ではランダムや規則型のパターンが多いことが示された。このことから、神経の再生過程では軸索の空間パターンは 集塊→ランダム→規則型と推移することが示唆された。また空間パターンは再生神経の成熟度を表わすひとつの指標となりうることを示された。

2) 表1の結果は、術後の経過時間に対応して空間パターンも 集塊→ランダム→規則型と移行していることを示しているが、実際の再生過程では手術の良否、個体の再生能力のちがいなどにより、再生の最終段階が集塊あるいはランダムパターンにとどまる場合や、その反対に、比較的短期間のうちに規則型パターンに到達する場合もある。すべての軸索が再生過程では、このような時間経過でこれと全く同じ空間パターンを経由するとは限らないが、この実験では個体差があまりなく、ほぼ同程度の手術を各個体に施したと考えられるので、実験結果による集塊→ランダム→規則型の空間パターン推移は神経軸索の再生パターンを特徴づける典型例のひとつと考えられる。

3) 再生神経の再生の度合いを特徴づけるためには、この空間パターンの分類のほかに、再生軸索の平均個数、平均径、平均面積、充填率などを関連させて考えなければならないが、この空間パターンが再生軸索の平均個数、平均径、充填率などとどんな関係にあるかを調べることにより、再生過程のより詳細な検討が可能となる。

4) 空間パターン解析では、軸索を点で代表させたが、現実の組織写真では、軸索は大小さまざまな面積をもった円、だ円または星形の形状を呈しており、かつ non-overlap の個体配置である。逆の立場から考えると、面積の大きささまざまな図形（たとえば半径がいろいろな値をとる円）をランダムに散在させたときの中心点の分布は、通常の点をランダムに配置させたものと異なってくる。より現実的な空間配置を考察するためには、面積を有する図形の配置という別の観点からの研究が必要であろう。

文 献

- 1) 有田清三郎, 宮本義洋, 仮谷太一: 神経軸索の分布について。京都大学数理解析研究所講究録 384: 143-160, 1980
- 2) Byth, K. and Ripley, B. D.: On sampling spatial patterns by distance methods. *Biometrics* 36: 279-284, 1980
- 3) Clark, P. J. and Evans, F. C.: Distance to nearest neighbour as a measure of spatial relationships in populations. *Ecology* 35: 445-453, 1954
- 4) Diggle, P. J.: On parameter estimation and goodness of fit testing for spatial point patterns. *Biometrics* 35: 87-101, 1979
- 5) 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
- 6) Miyamoto, Y., Arita, S., Hori, Y. and Miyamoto, H.: Statistical analysis on spatial pattern of transected peripheral nerve regeneration, posttraumatic peripheral nerve regeneration; Experimental basis and clinical implications. Ed. by Gorio, A. New York, Raven Press. 1981, pp. 271-275
- 7) Morisita, M.: Measuring of the dispersion of individuals and analysis of the distributional patterns. *Mem. Fac. Asc. Kyushu Univ., Ser. E (Biol.)* 2: 215-253, 1959
- 8) Mountford, M. D.: On E. C. Pielou's index of non-randomness. *J. Ecol.* 49: 271-275, 1961
- 9) Pielou, E. C.: The use of point-to-plant distances in the study of the patterns of plant populations. *J. Ecol.* 47: 607-613, 1959
- 10) Ripley, B. D.: Modeling spatial patterns. *J. of the Royal Statistical Society, Ser. B* 39: 172-212, 1977
- 11) Strand, L.: A model for stand growth. IUFRO Third Conference Advisory Group of Forest Statisticians 207-216, 1972
- 12) 種村正美, 尾形良彦: 点の空間配置パターンを測る—なわばりの生態学。数理科学 213: 11-16, 1981