

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659828

研究課題名(和文) 活イカの巨大軸索を用いた軸索機能再建に関する研究

研究課題名(英文) functional reconstruction of axon with using a giant axon of squid in vivo

研究代表者

成島 三長 (Narushima, Mitsunaga)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80431873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：神経移植などは再生における有効な手段として臨床に应用されているが、完全に満足いく効果が得られない場合も多い。そこでWaller変性する前に神経軸索をつなぐ実験を構築することとした。活イカ巨大軸索を用いて観察することを目指した。計画前には明らかでなかった活イカの疼痛対策を行うため、高侵襲実験法に対する麻酔法を確立した。また巨大電気生理学的な軸索刺激および伝導速度計測法を確立した。同時に蛍光マーカーを用いて軸索輸送の動きを観察し軸索輸送の回復過程を観察する方法については、ミトコンドリア染色の困難さと想定よりも高倍率が必要であることが分かり、今後染色法や染色標的の変更により可視化を検討中である

研究成果の概要(英文)：Nerve transplantation is applied clinically as a valid strategy for regeneration, but it may not be obtained an effect entirely satisfactory in many cases. We conceived to construct the experimental connecting of the axons before occurring Waller degeneration. For this purpose, a squid giant axon was used. For overcoming the nociceptive reaction of active squid beyond the scope of the assumption, it was established anesthesia methods for severe invasive study. I also have established a conduction velocity measurement method and axonal stimulation huge electrophysiological. It was difficult to establish live imaging to observe the recovery process of axonal transport using a fluorescent marker at the same time, because it needed high magnification of microscope for observing mitochondrial staining. Now we started to dye axonal flow by changing the target.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：ワラー変性 神経 軸索 イカ

1. 研究開始当初の背景

切断・坐滅により神経は Waller 変性を起こすことが知られている。現在の医学では変性後の神経をいかに再生させるかが最重要とされている。神経移植などは再生における有効な手段として臨床に応用されているが、完全に満足のいく効果が得られない場合も多い。その理由は

)筋などは再生神経到達前に萎縮して本来の機能回復を得られない。

)神経軸索再生時に神経鞘が癒痕化し再生軸索数が制限される。

ことである。そこで神経鞘をつないで再生を待つのではなく、Waller 変性を回避し軸索が変性する前に“軸索をつなく”ことで、完全な即時神経機能回復を目指した。

2. 研究の目的

Waller 変性する前に切断された神経軸索をどのようにつなぐか？その突破口は“細胞融合法”にあると考えている。この分野に関しては、1986年 Bittner らにより *in vitro* で crayfish の軸索を切断後、ポリエチレングリコールを用いて融合を行った報告がある。(Brain Research, 1986; 5:351-55) また 2000年 Shi らは、ポリエチレングリコールを用いた神経傷害修復を報告した。

(J Neurocytol 2000 29(9):633-43) (Fig2) さらに 2010年に Wesley C. Chang らが *in vitro* にて Axon microelectrofusion 法を報告し、2本の axon を交叉融合した。(Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2010 ;2(2):151-61)(Fig3)

こういった先進的研究が世界で萌芽的におこってきている現在、軸索再建の可否について臨床的な知識とともに基礎研究を行っていく段階にあると考えている。

生きたイカ(活イカ)の巨大軸索を用いて、まず軸索内断裂後の軸索内輸送がどのように変化し回復するか、蛍光マ-

カーと電気生理学的手法を用いて機能的回復過程について検討を行う。イカを用いた実験では、0.8mm 前後と巨大な軸索であるため軸索内部を容易かつ詳細に確認することが可能となる。また *in vitro* におけるイカ神経の電気生理学的手法およびデータは過去に多くの研究者による蓄積がある。このイカ巨大軸索を用いた軸索再建過程を *in vivo* で行うことにより、Waller 変性を起こすことなく神経回復をきたす過程を経時的に追跡できる。軸索をつなぐ“神経融合”に向けた第一歩となると考えている。この神経融合法が樹立されれば、基礎分野における神経機能実験の新たなモデルとなるのみならず、臨床的に顔面神経麻痺や四肢麻痺などの神経再建さらには眼球移植などの革新的な即時神経機能回復治療につながると考えた。

3. 研究の方法

平成 23 年度は生きたヤリイカ(冬季)およびスルメイカ(夏季)を用いて、

1)巨大軸索の正常軸索内輸送の観察手法を確立すること。

2)圧迫による軸索挫滅後、軸索機能再生の変化を経時的に電気生理学的手法および分子解剖学的手法を用いて観察する。電気生理学的には軸索に対し電気刺激を行い、筋電図および神経伝導速度等を適宜計測し機能回復過程を観察する。同時に蛍光マーカーを用いて軸索輸送の動きを観察し軸索輸送の回復過程を観察することを計画した。

In vivo ヤリイカ巨大軸索実験モデルの確立

巨大軸索の電気生理学的手法を用いた *in vivo* 伝導速度変化について検討を行った。

イカ神経軸索は過去に多くの研究者によって実験がなされているが現在ではな

かなかデータ収集が難しい。この解剖学的資料および *in vitro* 電気生理学的資料については、スミソニアン博物館所蔵で多くの貴重なデータ類が保管されており、実験を迅速に進めるためこれらの資料収集を行い我々の実験データおよび実験を進める上での比較検討の参考資料とした。

In vivo における正常活イカ軸索切断後の再生に関する検討を圧迫実験と同じ手法を用いて行い、圧迫挫滅実験の電気生理学的・分子解剖学的データおよびスミソニアン博物館のデータをもとに比較検討した。

4. 研究成果

平成 23 年度は切断後再接合の前段階として の過程を行っている段階で、当初予定しなかったイカの疼痛による *in vivo* 実験法の最適化について再検討を行う必要が生じた。

このため、イカの麻酔法の確立をする必要が生じ、これを改善する目的でイカの神経ブロック法を考案した。具体的には星状神経節に対して、局所麻酔薬を用いて、神経ブロックを行ったところ外套およびヒレ神経の無痛状態を確立できた。さらに麻酔薬濃度の最適化を行った。これに合わせてイカの侵害受容行動モデルの作成をおこなった。つまりイカの侵害受容の行動反応として、1) jet escape 2) all dark 3) fluttering を決定し、この反応より、イカの侵害受容反応の閾値を計測した。これによりイカの巨大軸索 *in vivo* モデルとしてのみならず、イカを用いた痛み刺激モデルを安定的に使用できるようになった。

イカを用いた実験の多くは motor nerve に関するもので、知覚神経に関わるものについてはほとんど未知の領域であった。しかし疼痛コントロールについて検討する過程で、イカの somatosensory

経路に関する知見を得た。今後イカを用いた神経研究に関して、運動神経軸索のみならず感覚神経についても検討することが可能となり、またその神経伝達物質に関する脊椎動物との対比や相同性により、知覚神経の *in vivo* 実験法など使用の広がりができる。

・ *In vivo* における正常活イカ軸索の電気生理学的データを取得し、巨大軸索の伝導速度を計測することが可能となった。伝導速度は、過去の *in vitro* のデータと比較しほぼ同等のデータを得ることができた。圧迫による電気生理学的変化を記録し、巨大軸索の損傷に対する電気生理学的変化の。これにより巨大軸索を摘出した際と同等のデータを *in vivo* で取得するモデルを作成した。

軸索内輸送を確認する適切な蛍光マーカー使用法を確立すべく検討を行った。軸索内微小管および微小管上を走行するモータータンパクのうち KIF1b によって運ばれるミトコンドリアを蛍光マーカーにて染色し、経時的変化を実体顕微鏡および蛍光顕微鏡にて観察し、適切な濃度および使用方法についても検討したが、十分な染色を得られず。現在他の蛍光色素を用いて軸索輸送に関する検討を二光子顕微鏡を用いて行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

成島 三長(Narushima Mitsunaga)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80431873

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

・鷺津 正夫 (Washizu Masao)
東京大学工学部産業機械工学科
鷺津・小穴研究室・教授
研究者番号： 10201162

・桜井 泰憲(Sakurai Yasunori)
北海道大学水産学部 海洋生物資源科
学部門 資源生物学分野・教授
研究者番号：30196133

・西村 嘉洋(Nishimura Yoshihiro)
鈴鹿医療科学大学 薬学部神経生理学
・教授
研究者番号：40172704

・近藤 健二 (Kondo Kenji)
東京大学医学部耳鼻咽喉科・講師
研究者番号：40334370