

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861494

研究課題名(和文) In vivo 活イカ巨大軸索を用いた早期可逆的軸索機能回復の可能性に関する研究

研究課題名(英文) The possibility of early axonal functional recovery using the squid giant axon

研究代表者

成島 三長 (Narushima, Mitsunaga)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80431873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：生きたヤリイカ・スルメイカ等を用いて活イカの水溫調節可能な専用水槽内にて低温状態に鎮静し、in vivo巨大軸索観察法を確立し、蛍光色素注入法の確立した。神経軸索圧迫や巨大軸索瘻孔形成後の変化の観察実験を行った。二光子顕微鏡を用いることで巨大軸索全周の観察が可能であることが明らかとなった。clampによる巨大軸索神経損傷変化とclamp解除による再疎通後の神経再結合を模した機能回復過程の形態学的・電気生理学的観察および切断後の軸索変化を観察した。軸索変性が最長30分までのclampでは生じないことを確認できた。

研究成果の概要(英文)：We controlled squid body under a low temperature. Aster established giant axon in vivo model, we investigated and invented new dye injection method to giant axon. We performed the study about clamp of giant axon. We confirmed that axonal recover was occurred up to 30 minutes after clamping.

研究分野：形成外科

キーワード：神経 軸索 イカ

1. 研究開始当初の背景

癌などの腫瘍切除後、マイクロサージェリー技術を用いて神経吻合・神経移植・血管付き神経筋移植などを行っている。しかし神経再生に関しては人間本来の回復能力に依存している。このため、

I)神経再生までに一般的に数カ月かかり、効果器である筋などは再生神経到達前に萎縮してしまい本来の機能回復を得られない。II)神経軸索再生時に神経痕が生じ再生軸索数が制限される。

様々な神経再生誘導因子が報告されているが、臨床において現状を打破するには至っていない。そこで発想を転換し、神経の軸索変性が不可逆的に生じる前に、軸索の末梢側を中枢側の神経細胞と再接合し、軸索輸送を再生させることで即時神経機能再生が行えるのではないかと本研究を発想するに至った。

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”にあると考えた。(Fig 1)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) 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)

こういった先進的研究が始まりつつある現在、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た。

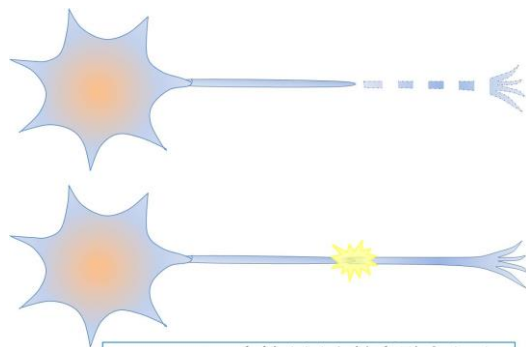


Fig 1: Waller 変性(上)と軸索融合(下)

3. 研究の方法

このため、軸索蛍光リアルタイムイメージング法を確立し、イカの巨大軸索を、*in vivo* で直視下に巨大軸索をクランプし、蛍光イメージング法と電気生理学的手法を用いてクランプ後の変化を検討することとした。

イカの巨大軸索は 1909 年 Weiss が初めて報

告し、その後 1930 年代に Young らによって詳しい研究がなされた。(Fig2)

特に電気生理学実験においては Hodgkin と Huxley が巨大軸索を用いたイオン電流研究で電気生理学分野を発展させ 1963 年にノーベル賞を受賞している。



Fig2: *in vivo* 神経軸索実験

しかし現在イカを用いた実験はほとんどなされていない。理由はイカの飼育が困難であったため、実験が *ex vivo* で軸索を切り出して行う軸索膜の研究であり、本当の意味での神経細胞の研究でなかったことが原因と考えられる。これに対して我々は、世界で初めてヤリイカの *in vivo* 神経実験法を確立し報告してきた。(2010年第25回 神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会 in 大阪) (Fig2)



Fig 3: イカ巨大軸索

イカの軸索は直径 0.8mm 前後と巨大であるためイカの軸索内部を容易かつ詳細に確認することが可能となる。(Fig3) 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実験を *in vivo*で行うことにより、一本の軸索が Waller 変性を起こさず軸索機能を回復する過程をリアルタイムに経時的に追跡できる。イカ巨大軸索を *in vivo* で clamp 後再開通させ、神経トレーサーによる軸索輸送変化の観察および電気生理学的に軸索機能回復過程を観察することにより、軸索再構築を確認し、“軸

索融合”への道筋をつけることで、いままで成し遂げられていない即時神経回復の新しい神経治療が開発できると考えた。

活イカを水温調節の可能な専用水槽内にて低温状態で鎮静し神経ブロックによる半身麻酔を行った後、(Fig4)

背側より巨大軸索を露出させ、(John R. Bower, Yasunori Sakurai et al ; Aquaculture, 1999 170 (2), 127-130) In vivo で実験を行ってきたが、予期しなかったイカの疼痛(侵害受容反応)コントロールに関しての検討を行い、イカの新しい麻酔法(神経節ブロック)を確立した。(2013年11月形成外科学会基礎学術集会 in 新潟)(Fig4) さらに詳細なイカ神経軸索走行の解析も行い、電気生理学的手法の確立を行った。



Fig4 : イカ半身麻酔

またリアルタイムに in vivo で一本の神経細胞の軸索内輸送の動向を観察する手法をより洗練化するため、蛍光色素を用いてミトコンドリア染色を行う実験手法を開発することとした。この電気生理学的手法と蛍光色素によるリアルタイム軸索湯用観察手法を獲得したのち、神経細胞の作動による機能をも同時に観察することとした。まずはコントロールデータを取得したのち、巨大軸索を圧迫することによる、neurapraxia の状態を作成し、またイカ巨大軸索におけるWaller 変性がどのように起こるかを継時的観察を行った。

4. 研究成果

生きたヤリイカ・スルメイカ等を用いて活イカの水温調節可能な専用水槽内にて低温状態に鎮静し、まずは詳細なイカ神経軸索走行の解析も行い、電気生理学的手法の確立を行った。これにより、いままで軸索を取り出し、数時間で軸索が実験に使えなくなるような in vitro の実験系ではなく、イカが生きている状態かつ巨大軸索も完全な状態で神経の確認しまたそれを筋電図という運動機能を評価する手立てを獲得することができた。次に in vivo 巨大軸索観察法を確立し、蛍光色素注入法の確立した。

軸索内輸送の確認方法の確立に関しては、現在東京大学医学部医用生体工学講座 生体情報学分野 浦野泰照教授 神谷真子助教とともに蛍光プローブを用いた軸索機能

リアルタイムイメージング手法の確立に向けて実験をおこなった。イカ軸索内の染色についてはライソゾームの染色が可能であることが示された。(Fig 5) またさらに簡便な mitotracker によるミトコンドリア染色がイカ巨大軸索内のミトコンドリアにおいても可能であることが分かったため、これを用いて in vivo にて注入を行い、ミトコンドリアの順行性および逆行性輸送について輸送速度を含めて確認することが可能となった。また二光子顕微鏡を用いることで巨大軸索全周の観察が可能であることが明らかとなった。コントロールデータを取得したのち、神経軸索圧迫や巨大軸索瘻孔形成後の変化の観察実験を行った。(Fig 6)

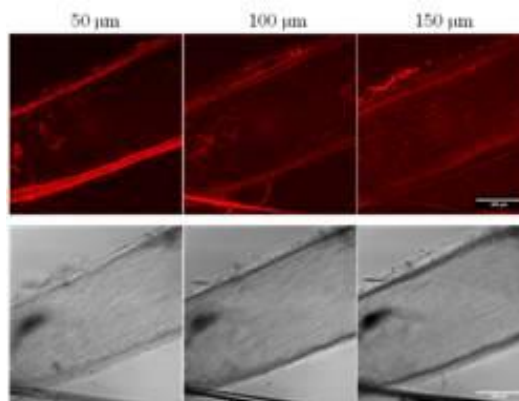


Fig5 : 蛍光イメージング

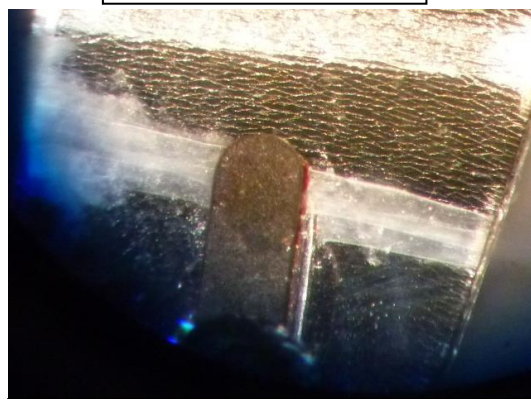


Fig6 : 巨大軸索 clamp

マイクロクリップにて直接圧迫を行った。一定時間後にクリップを取り外し軸索機能回復過程を電気生理学的手法および解剖学的手法を用いて解析をおこなった。また巨大軸索に孔を開け神経損傷後の経時的变化も同様の手法を用いて検討した。clamp による巨大軸索神経損傷変化と clamp 解除による再疎通後の神経再結合を模した機能回復過程の形態学的・電気生理学的観察および切断後の軸索変化を観察した。軸索変性が最長 30 分までの clamp では生じないことを確認できた。今後、これらの実験を元に waller 変性モデルを作成したのち、細胞融合法を用いた即時

再建実験を行う必要があると考える。

参考文献

Anderson EJ, Demont E. 2005. The locomotory function of the fins in the cephalopod *Loligo pealei*. *Mar Freshwat Behav Physiol* 38:169-189.

Bower JR, Sakurai Y, Yamamoto J, Ishii H. 1999. Transport of the ommastrephid cephalopod *Todarodes pacificus* under cold-water anesthesia. *Aquacult* 170:127-130.

Bullock T, Horridge G. 1965. Structure and function in the nervous systems of invertebrates. Chapter 25 Cephalopoda, 1433-1515.

Cooper JE. 2011. Anesthesia, analgesia, and euthanasia of invertebrates. *ILAR J* 52:196-204.

Hodgkin AL, Huxley AF. 1952. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116:449-472.

Kandel ER, Schwartz J, Jessell T. 2013. Principles of Neural Science, 5th Edition, McGraw-Hill Companies, Inc Chapter 22:468-490.

Matsumoto G, Tasaki I. 1977. A study of conduction velocity in nonmyelinated nerve fibers. *Biophys J* 20:1-13

Sereni E, Young JZ. 1932. Nervous degeneration and regeneration in cephalopod. *Pubt Staz Zool Napoli* 12:173-208.

Shigeno S, Yamamoto M. 2002. Organization of the nervous system in the pygmy cuttlefish, *Idiosepius paradoxus* Ortmann (Idiosepiidae, Cephalopoda). *J Morphol* 254(1), 65-80.

Tasaki I, Takenaka T. 1963. Resting and action potential of squid giant axons intracellularly perfused with sodium-rich solutions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 50:619-26.

Terada, S, Kinjo M, Hirokawa N. 2000. Oligomeric tubulin in large transporting complex is transported via kinesin in squid giant axons. *Cell* 103:141-155.

Urso-Baiarda F, Grobbelaar AO. 2006. Practical nerve morphometry. *J Neurosci*

Methods 156:333-41.

Williams LW. 1909. The anatomy of the common squid, *Loligo pealii*, Lesueur. Leiden-Holland, New York.

Zullo L, Hochner B. 2011. A new perspective on the organization of an invertebrate brain. *Commun Integr Biol* 4:26-29.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

いかをいかにいかすか (査読無)

成島三長 Toba super Aquarium(TSA) 2015:67 14-15

[学会発表] (計5件)

1) 気づかないいかに気づくか

成島三長 第23回形成外科学会基礎学術集会 (2014/10/09) キッセイ文化ホール (長野県、松本)

2) 侵害受容実験モデルと神経ブロック法の開発

成島三長 第25回日本末梢神経学会 (2014/08/29) ホテルルビノ京都堀川(京都市、上京区)

3) 各種血管付き神経移植による再建法と実験研究

成島三長 第26回日本末梢神経学会 (2015/09/18) ホテルビエナビスタ (長野県、松本)

4) イカ巨大軸索 *in vivo* 実験モデルを用いた軸索内輸送の可視化

成島三長 第24回日本形成外科学会基礎学術集会 (2015/10/08) 岩手県民会館 (岩手県、盛岡)

5) Local anesthesia and analgesia in Cephalopods: a model of nociceptive behavior using stellate ganglion and nerve blocks. Mitsunaga Narushima

CIAC (2015/11/09) Hakodate Kokusai Hotel (Hokkaido Hakodate)

[図書] (計0件)

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・講師
研究者番号: 80431873