

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20308

研究課題名(和文) ホールマウント標本による末梢神経再生の観察

研究課題名(英文) The observation of peripheral nerve regeneration with whole mount specimens

研究代表者

親松 宏 (Oyamatsu, Hiroshi)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：70748607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの四肢末梢神経損傷モデルを作成し、抗ニューロフィラメント抗体を用いてを用いて免疫染色を行い、バックグラウンドを極力排除したホールマウント標本を作成することを目標とした。その結果、軸索を抗体で検出させることは十分可能であったが、同時にバックグラウンドが非常に強く出てしまい、標本全体がDABに染まり十分な観察ができない状態であった。抗体との反応時間、発色剤との反応時間、洗浄方法、など各工程を再確認しながら試行錯誤を重ねたが、バックグラウンドが強くなることを克服することが達成できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、末梢神経再生に関する研究が進んでいるが、末梢神経が再生する際に軸索と呼ばれる神経細胞の突起がどのように伸びていくかを三次元的に観察する様々な方法が開発されている。再生しつつある軸索が再生時期によってどのように伸びていくかを観察することが重要である。本研究においては、特別な遺伝子組換え動物やウイルスベクターを用いることなく、従来からある免疫染色方法を用いて、三次元的に末梢神経再生の様子を観察することを目標とした。研究成果としては最終的な目標を達成することはできなかったが、今後の可能性を示唆できるものであったと考える。

研究成果の概要(英文)：A rat forelimb peripheral nerve injury model was created, and immunostaining was carried out using anti-neurofilament antibody, and the goal was to make a whole mount sample which removed the background as much as possible. As a result, it was possible to detect axons with antibodies, but at the same time, the background was so strong that the entire specimen was stained with DAB that it was not possible to observe it sufficiently. Although trial and error were repeated while reconfirming the reaction time with antibodies, the reaction time with a coloring agent, and the washing method, it was not possible to overcome the fact that a strong background appeared.

研究分野：末梢神経再生

キーワード：末梢神経 神経再生 マイクロサージェリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

顔面神経麻痺や腕神経損傷といった末梢神経再生に対する再建は形成外科、整形外科分野において重要な治療の一つである。末梢神経が再生する際に軸索がどのように再生するかに関してはこれまで様々な観察方法が報告されているが、三次元的に切片ではない厚みのある標本を観察している報告は少ない。

Miwa, Zenzai, Tsuyoshi らはラット前肢の末梢神経損傷モデルにおける軸索再生経路を遺伝子組換えアデノウイルスベクターを用いて三次元的に観察することを報告しているが、検出率が小さいため、多くの再生軸索を観察することはできなかった¹⁾⁻³⁾。また、遠山は軸索単位にほぐした材料を用いて再生軸索をほぼ全長に渡って免疫染色できたことを報告した⁴⁾。

2. 研究の目的

本研究においては、これまでの報告をもとに末梢神経が再生していく際に再生軸索がどのように伸長していくか、また、どのように剪定・整理されていくかを神経のホルマウント標本に免疫染色を行った後に透徹化し、より立体的に様々な角度から観察することを目標とした。

3. 研究の方法

270g から 300g のオスの Wister ラットを使用した。ラットはペントバルビタールの腹腔内注射で麻酔を行った後に経心臓的に生理食塩水で灌流を行った。左前肢腕神経叢レベルを剖出し、尺骨神経を長さ 1 cm 摘出した(図 1)。摘出した神経をブアン固定液にて 4℃ で 4 時間の浸漬固定を行った。その後 TBS (Tris Bufferd Saline) で 1 時間洗浄。さらに TBST (TBS with Tween) で 1 時間洗浄してから、0.4% Block Ace (DS Pharma Biomedical) を用いて 2 時間ブロッキング。一次抗体である、モノクローナルマウス抗ニューロフィラメント H 抗体 (RT-97, Santa Cruz Biotechnology) 500 倍希釈を用いて、4℃ で 4 日間反応させた。その後、ビオチン標識抗マウス IgG を二次抗体に用いて 4℃ で 24 時間反応させた。PBS で洗浄した後に DAB (diaminobenzidine) を用いて 5 分間反応させて染色した。

4. 研究成果

神経内の軸索が染まるだけでなく、その周囲組織もすべて DAB に染まってしまい、全体が褐色になった。パラフィン切片標本(図 2、3)のように軸索特異的に染色することができなかった。

その後、

・一次抗体の濃度の変更

500 倍 1000 倍 1500 倍 2000 倍

・二次抗体の反応時間

4 24 時間 4 12 時間 4 6 時間

室温 4 時間 室温 2 時間

と条件を変えて免疫染色を行った。

しかし、バックグラウンドが強く出てしまうことを克服することができなかった。最終的に、当初の実験計画を進めることができず、学会発表及び論文投稿に至ることは不可能であった。

考察：

本実験で用いた抗ニューロフィラメント抗体 (RT97) は神経軸索を鋭敏に染色することのできる抗体であり、正常軸索、変性軸索、再生軸索ともに検出可能である⁶⁾。パラフィン切片では非常に良好な結果を得ることができたが⁶⁾、やはり切片では神経線維がぶつ切りになってしまい、例えば再生軸索 1 本 1 本の走行を追跡することは困難である。Hayashi らは再生軸索が特異的に発光するトランスジェニックマウスを用いて再生軸索の詳細な走行を報告したが⁷⁾⁸⁾、特殊な遺伝子組み換え動物を用いる必要がある。遠山らの方法では神経束を teasing (割く) 必要があるため⁴⁾、神経端側吻合のような実験モデルでは再生軸索を追跡するのが難しいことが予想される。

ゆえに、入手しやすい材料を用いて、より 3 次元的にかつ詳細に軸索を追跡できる手法が期

待されている。そのため本研究を行うこととした。

末梢神経束は図のような構造をしており⁵⁾(図4) その周囲を脂質成分に富んだ膜で覆われているのだが、界面活性剤を添加した緩衝液による標本洗浄により神経束内部まで抗体を浸透させることは可能であった。しかし、抗体反応時間や抗体濃度、洗浄方法などを試行錯誤したが標本全体がDABに染まってしまうことが克服できなかった。

Hamaらが開発した、Sca/eA2法⁹⁾やSca/eS法¹⁰⁾という固定組織の透明化技術(富士フィルム和光純薬株式会社よりキット発売)を用いて、透明化して組神経織の膜構造が変化した段階で免疫染色を行うことも試みるべきだったが時間不足により不可能だったため今後の課題であろう。

図1

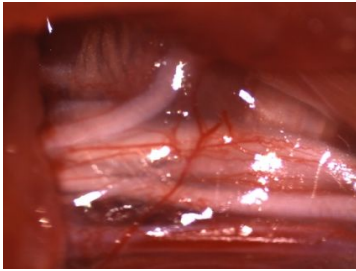


図2

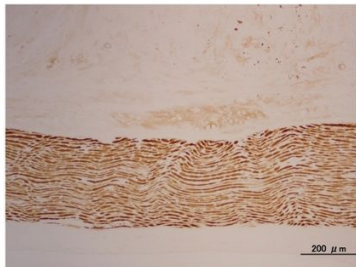


図3

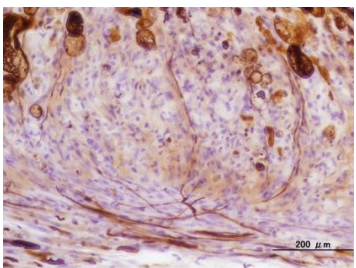
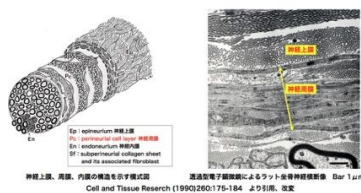


図4



参考文献

- 1) Miwa H et al.: J Neuropathol Exp Neurol. 60(7) 2001
- 2) Zenai K et al.: Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg. 38(3) 2004
- 3) Tsuyoshi H et al.: Arch Histol Cytol. 69(3) 2006
- 4) 遠山 稿二郎: 電子顕微鏡 28(1) 1992

- 5) Ushiki et al.: Cell and Tissue Reserch 260 1990
- 6) Oyamatsu H et al.: J Plast Surg Hand Surg 46 2012
- 7) Hayashi A et al.: Exp Neurol. 207(1) 2007
- 8) Hayashi A et al.: Exp Neurol. 211(2) 2008
- 9) Hama H et al.: Nat. Neurosci. 14 2011
- 10) Hama H et al.: Nat. Neurosci. 18 2015

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)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者：なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者：なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。