

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890199

研究課題名(和文) ラマン分光顕微鏡を用いた新たな末梢神経再生評価法の検討

研究課題名(英文) Application of Raman spectroscopy for visualizing biochemical changes during peripheral nerve injury

研究代表者

森崎 真介 (Morisaki, Shinsuke)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20627294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：ラマン分光顕微鏡を用いて、末梢神経の細胞および組織を非染色で観察し、末梢神経再生の評価法となりうるかを検討した。正常な坐骨神経を採取したのち長軸切片を作製し、ラマン顕微鏡で観察した。後根神経節およびシュワン細胞のピークはそれぞれ異なるパターンを有していた。正常末梢神経組織をラマン顕微鏡で観察したところ、2853, 2885, 2909 cm⁻¹に強いピークを認めた。さらに損傷坐骨神経の経時的観察の結果、この2853cm⁻¹に対する2940cm⁻¹のピーク比が術後3週まで有意に上昇し、4週目に低下した。ラマン顕微鏡は非染色で神経再生変化を検出できる可能性があることを示した。

研究成果の概要(英文)：Raman spectroscopy can be used for analysis of objects by detecting the vibrational spectrum using label-free methods. This imaging method was applied to analysis of peripheral nerve regeneration by examining the sciatic nerve in vitro and in vivo. Raman spectra of intact nerve tissue had three particularly important peaks in the range 2800-3000 cm⁻¹. Spectra of injured sciatic nerves showed significant changes in the ratio of these peaks. Analysis of cellular spectra suggested that the spectrum for sciatic nerve tissue reflects the axon and myelin components of this tissue. The relative change in the axon to myelin ratio showed a similar initial increase, followed by a decrease at 28 days after injury. Thus, our results suggest that label-free biochemical imaging with Raman spectroscopy can be used to detect turnover of axon and myelin in peripheral nerve regeneration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：末梢神経 ラマン顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

申請者は、末梢神経再生をテーマに分子生物学的および分子イメージングの手法を用いて、末梢神経再生過程を可視化する手法を開発してきた。この結果、以下のような重要な知見を明らかにした。

- グルココルチコイド受容体のシュワン細胞における発現動態を免疫組織化学的に明らかにし、末梢神経再生過程に重要な機能を担うことを見出した。
(Morisaki, GLIA 2010)
- MRI の拡散テンソル法が、末梢神経再生の非侵襲的イメージング技術として、有用であることを明らかにした。
(Morisaki, J of Magn Reson Imaging 2011)

しかし、これらの知見からは、いまだ末梢神経再生可視化の応用段階には達していない。

近年、生体内イメージング技術が進歩し、さまざまな分野で細胞や組織動態を可視化する試みがなされている。そのうちの一つにラマン顕微鏡がある。物質にある波長の光を当てると通常は同じ波長の光が散乱する(レイリー散乱)。しかし、一部の散乱光はその物質を構成する分子の分子振動によって波長が変化する(ラマン効果)。

分子は固有のラマン散乱光を発するため、蛍光色素などの標識を用いずに、試料の分子情報を取得できる。

ラマン散乱光の強度をグラフ化して(ラマンスペクトル)、個々のピークを解析する。検出されたピークは分子の化学構造およびその配行を反映しており、既知の波長の情報と帰属させることで、物性を明らかにできる。医学においては、動脈硬化や悪性腫瘍の診断ツールとして応用研究がすすんでいる。

本手法を末梢神経の再生に応用する試みはまだない。そこで本研究では、本技術を用いて、末梢神経の再生過程を化学反応の見地から解明し、診断法として応用することを目指す。

われわれはすでに、本研究の基礎段階を開始しており、以下のような今後の展開が期待できる結果を得ている。すなわち、

- ラマン顕微鏡でラット坐骨神経の長軸切片を観察したところ、神経組織に特徴的な波形が抽出できたこと。
- 損傷坐骨神経では、正常組織とは異なる波長変化を認めること。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の3つである。

- ラマン顕微鏡による末梢神経再生過程の観察し、特徴的な波形が得られるかを検討する。

- ラマンスペクトル結果と他の解析法と比較検討し、その分析手法の妥当性及び感受性を検討する。
- ラマン顕微鏡による末梢神経再生評価法のための応用的課題を克服する。

申請者の着目したラマン顕微鏡は、化学結合に着目した全く新しい評価法であり、末梢神経障害の評価法として、従来の方法では観察できなかった新たな知見がえられる可能性がある。そこで本研究では、ラマン顕微鏡により末梢神経の再生過程を詳細に観察し、評価法としての有用性を検討する。

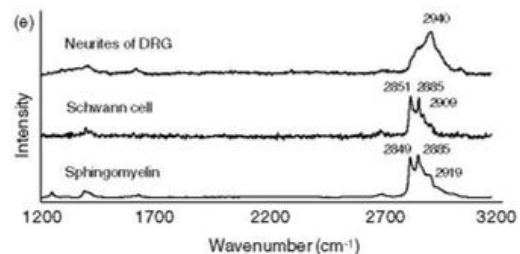
3. 研究の方法

(1)細胞レベルの検討として、胎生 13 日のマウスおよび産後 2 日目のラットからそれぞれ摘出した後根神経節およびシュワン細胞の初代培養を行い、ラマン顕微鏡で細胞の生体信号を検出した。ラマン顕微鏡は LabRAM ARAMIS (Horiba Jobin-Yvon) を使用した。

(2)組織レベルの検討として、6 週齢 SD ラットの正常な坐骨神経を採取したのち長軸切片を作製し、ラマン顕微鏡で観察した。ピーク変化を培養細胞から得られたピークとの比較を行った。次に 5 分間結紮した後解除した圧挫損傷モデルを作製し、術後 7, 14, 21, 28 日目に末梢神経を摘出し、長軸切片を作製した。損傷部から遠位 5mm の部位をラマン顕微鏡で観察した。連続切片を用いて免疫組織化学染色により、軸索に NF200、髄鞘に Myelin Basic Protein (MBP) をマーカーとして使用し、ラマンのピーク変化との相違を比較検討した。

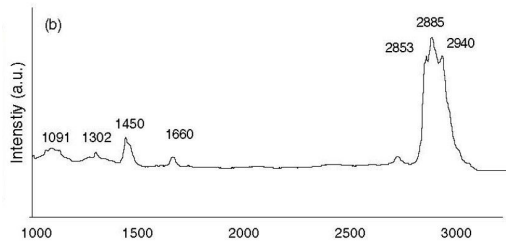
4. 研究成果

- (1) 後根神経節およびシュワン細胞のピークはそれぞれ 2940 cm^{-1} 、2853, 2885, 2909 cm^{-1} であった。髄鞘の代表的な成分であるスフィンゴミエリンも同様に解析したところ、シュワン細胞と類似のピークパターンを示した。

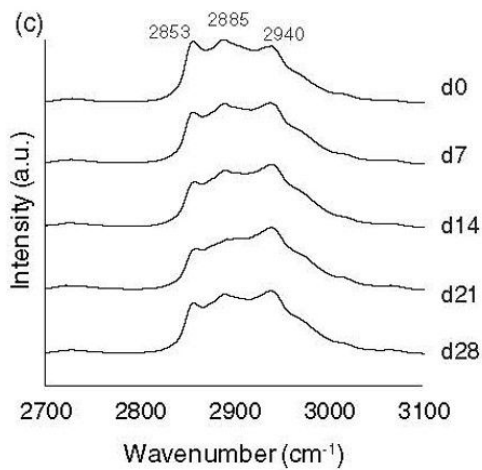


- (2) 正常末梢神経組織をラマン顕微鏡で観察したところ、2853, 2885, 2909 cm^{-1} に強いピークを認めた。これらのピークは過去の報告から 2853 cm^{-1} および 2885 cm^{-1} は主に脂質に含まれる CH_2 基を、2940 cm^{-1} は主に蛋白質に含まれる CH_3 基を反映し

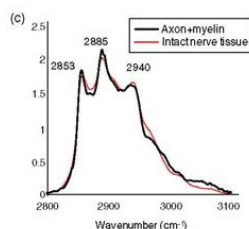
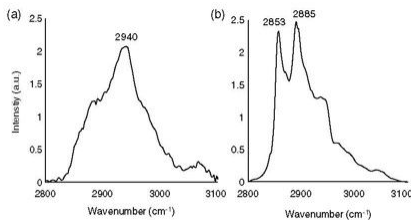
たものであると考えられた。



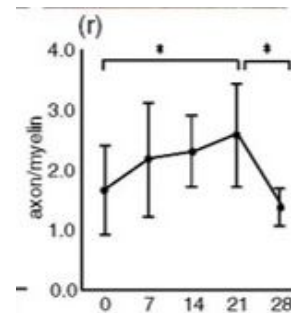
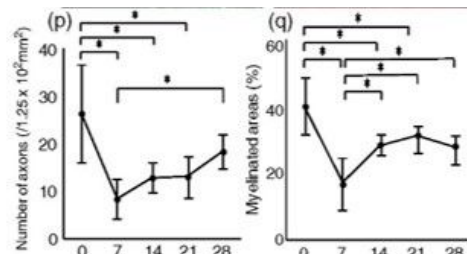
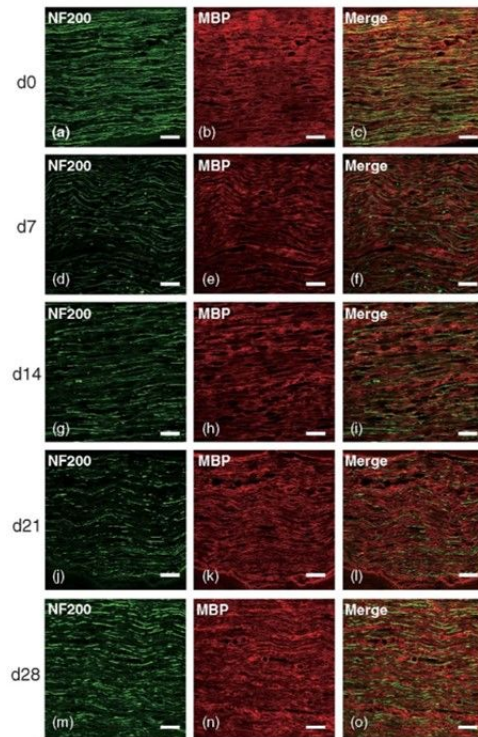
- (3) 損傷坐骨神経の経時的観察の結果、この 2853cm^{-1} に対する 2940cm^{-1} のピーク比が術後 3 週まで有意に上昇し、4 週目に低下した。



- (4) 細胞のマッピング測定のアverageスペクトルをもとに坐骨神経組織のラマンスペクトルを分光した。組織のスペクトルは軸索成分と髄鞘成分の波形から合成されることが明らかになった。



- (5) 免疫組織化学染色による軸索数と髄鞘面積の比率は、ラマン顕微鏡で観察されたピーク変化と一致していた。



- (6) これらの結果、 2853 2885 2940cm^{-1} の3相のピークが損傷後に変化し、そのピーク比が有意に変化した。ピーク比を末梢神経再生の指標として応用できる可能性がある。免疫組織化学染色は、形態学変化を反映するが、ラマンスペクトルは、分子の化学構造の変化を反映している。ラマンスペクトル解析の問題点として、ラマ

ン散乱光は非常に微弱であること、生体からの自家蛍光の影響があることから、検知しにくいことがある。非侵襲的な評価には、皮膚上からラマン散乱を観察できる必要があり、顕微鏡の性能の向上が必要である。ラマン顕微鏡は非染色で神経再生変化を検出できる可能性があることを示した。以上から、ラマン分光顕微鏡は末梢神経再生を非染色で検出し、末梢神経の新たな診断法につながる可能性を示した点で、医学的に価値があると考えられる。

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)

Morisaki S, Ota C, Matsuda K, Kaku N, Fujiwara H, Oda R, Ishibashi H, Kubo T, Kawata M. Application of Raman spectroscopy for visualizing biochemical changes during peripheral nerve injury in vitro and in vivo. J Biomed Opt. 2013 Nov 1;18(11):116011.

[学会発表](計 2件)

Morisaki S, Ota C, Matsuda K, Fujiwara H, Oda R, Kubo T, Kawata M: Application of Raman spectroscopy for visualizing biochemical changes during peripheral nerve injury in vitro and in vivo, Neuroscience 2013, San Diego, USA, 2013.11.9-13

森崎真介, 藤原浩芳, 小田 良, 山崎哲朗, 勝見泰和: 久保俊一ラマン分光顕微鏡による末梢神経の再生評価, 第 24 回日本末梢神経学会学術集会, 新潟, 2013.8.23-24

6. 研究組織

(1)研究代表者

森崎 真介 (Morisaki, Shinsuke) 京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 20627294