

博士論文

軸索鞘接合による神経軸索即時再建のためのイカ巨大軸索  
in vivo 実験モデルの確立

成島 三長

## 目次

要旨	3
序文	
神経損傷研究の背景と目的	
1.1.神経軸索損傷の種類と自然経過	4
1.2.神経損傷に対する外科治療と限界点	5
1.3.軸索鞘接合による神経軸索即時再建の可能性	7
1.4.イカ巨大軸索を in vivo に用いる理由	9
方法	
軸索鞘接合法確立に向けた実験動物（イカ）の選択と in vivo モデル作成	
2.1.イカ実験装置の開発	12
2.2.イカ神経および巨大軸索の解剖学的検討	12
2.3.イカ麻酔法の確立とイカ侵害受容経路の解明	14
軸索鞘接合の成立確認のための実験法の開発	
2.4.イカ巨大軸索 in vivo 剥離法と in vivo 顕微鏡下観察法	20
2.5.イカ巨大軸索 in vivo 電気生理学的刺激法および計測法	21
2.6.二光子顕微鏡および共焦点顕微鏡によるイカ巨大軸索	
軸索内輸送の in vivo 観察法	22

## 結果

### 軸索鞘接合法確立に向けた実験動物（イカ）の選択と in vivo モデル作成

3.1 イカ実験装置の開発 23

3.2.イカ神経および巨大軸索の解剖学的検討 24

3.3.イカ麻酔法の確立とイカ侵害受容経路の解明 29

### 軸索鞘接合の成立確認のための実験法の開発

3.4.イカ巨大軸索 in vivo 剥離法と in vivo 顕微鏡下観察法 41

3.5.イカ巨大軸索 in vivo 電気生理学的刺激法および計測法 44

3.6. 二光子顕微鏡および共焦点顕微鏡によるイカ巨大軸索

軸索内輸送の in vivo 観察法 46

考察 50

結論 59

参考文献 60

## 要旨

切断された神経軸索が Waller 変性する前に、軸索鞘接合または軸索融合を行うことで早期回復できるのではと着想した。軸索膜の融合について *in vitro* での報告はあったが、実際の機能回復や軸索内輸送変化については全く不明であった。このため軸索実験モデルとしてイカ巨大軸索 *in vivo* 実験法を確立した。本実験モデルにおいて、一本の神経を直視下に観察し、同時に二光子顕微鏡を用いて軸索内輸送変化の観察や、筋電図を用いて運動神経の機能回復を確認することができる。本実験モデルは軸索鞘接合による神経軸索即時再建ひいては軸索融合法による即時神経機能回復という新たな治療法の開発に向けて有用であると考えられる。

## 序文

### 1.1 神経軸索損傷の種類と自然経過

神経は身体の運動、感覚および自律機能制御をする最も重要な組織である。神経の切断・挫滅により神経は Waller 変性をはじめとするさまざまな変化を起こすことが 19 世紀中ごろより明らかとなってきた[1]。神経損傷により軸索や髄鞘が断裂し、Waller 変性が傷害部位から、軸索の末梢側方向へ生じる。さらに傷害部から中枢側の神経細胞体側へ逆行性変性が生じる。変性後生き延びた神経細胞が軸索末端より growth cone を形成し、再生を開始する。神経再生に関しては数多くの研究がなされ、多くの伸長因子ガイダンス因子や阻害因子が報告されてきた[2-9]。臨床的には再生神経が神経損傷後断裂部を超えるのに一か月、その後 1 mm/日で伸長するとされている[10]。したがって顔面神経損傷などの場合で筋まで 10 cm のところで損傷した場合、最も早く再生神経が到達し再生するまでに 4 か月かかることになる。

末梢神経損傷に関して、Seddon らや Sunderland らによって、細分類がなされている。Seddon らは①神経無動作(neurapraxia)②軸索断裂(axonotmesis)③神経断裂(neurotmesis)の 3 段階に分類している(図 1 A)。Neurapraxia は一過性伝導ブロックの状態です。圧迫が解除されれば早期に機能回復する。Axonotmesis は軸索鞘(endoneural tube)損傷はないため、過誤支配は起こらないとされており、数週間～数か月で回復する。neurotmesis は神経完全断裂のため Waller 変性後の再生過程で過誤支配を来し、また再生に時間を要するため完全回復に至らないことが多い。また Sunderland らは、5

段階に分類している(図 1A)。臨床的には Seddon の 3 度および Sunderland の 3-5 度において神経再建などの外科的治療が行われている。

## 1.2 神経損傷に対する外科治療と限界点

神経軸索損傷は外科的治療を行う対象疾患であるだけでなく、時には耳下腺癌の切除など命を救うためにやむなく医原性に損傷せざるを得ない場合もしばしばある。損傷に対する現在の外科的治療は基本的に神経自身の再生能力に依存している。神経の物理的断裂があった場合に、神経の再生する場を設けるため神経縫合術や神経移行術、神経移植術、神経筋肉移植が行われる (図 1 B)。

神経縫合は古代ギリシャの Paulus Aegineta (625–690 ac)によってすでにその概念が記載されている [11]。1864 年に Laugier と Nelaton によって人に対して初めて施行されて以来、神経の断裂があるものの神経線維間のギャップがなく直接吻合が可能な場合に行われる最も基本的な治療法である(図 1 Ba)[12]。これに対し神経移植術は神経線維間にギャップがあり直接吻合が不可能な場合に行われ、腓腹神経や外側大腿皮神経など他部位で採取しても機能的問題が少ない感覚神経線維が移植片として使用される(図 1 Bc)。

臨床上効果的であると考えられている血管付き神経移植法は光嶋らによって報告されている [10, 13]。これは神経の栄養血管を神経とともに採取する方法である。神経移植時に血管吻合を付加することにより移植神経鞘内のシュワン細胞などの死滅を防ぎ温存することによって神経回復速度を上げる術式である。単純な神経移植に比

べて約2倍の回復速度があると言われている[10, 13]。

近位側の神経断端が何らかの理由により再吻合できない場合には、顔面神経麻痺の際の舌下神経移行術や咬筋神経移行術など他の神経を移行する神経移行術を用いることもある（図1 Bb）。神経移植術や神経縫合術は急性期や亜急性期の神経損傷に行われることが多いのに対して、神経筋移植術は損傷麻痺後、6-12か月の慢性期に行われることが多い。神経と筋体およびその栄養血管を一塊として挙上し移植する（図1 Bd）。これは効果器である筋体や効果器がすでに損傷が時間経過し萎縮変性または拘縮して神経再生のみではこれらの機能を回復できない場合に、神経のみでなく効果器である筋体も同時に移植する方法である。広背筋や薄筋、腹直筋などが用いられることが多い[14-16]。

しかしこれらの方法をもってしても、自然な表情や満足いく十分な四肢機能回復するまでには至っていない。特に顔面神経麻痺における口角下制筋、前頭筋などの微細な筋や声帯麻痺、四肢末梢の筋麻痺に関しては、ほぼ改善を得られないのである。つまり現状としては粗大な運動筋を元より弱い筋力で再建することは可能であるが、表情などの様々な筋の協調運動や巧緻運動を回復することができない[16-17]。

このため神経筋移植術を施行された患者の中には、施行された治療により不自然な表情になり、治療自体を悔いているものもいる。

現在の神経再生研究の治療戦略は、損傷された神経根が十分に再成長し、元の神経支配を再度適切に得ることである。近年では、人工神経管の開発や神経伸長因子の投

与および iPS 細胞移植などにより、神経再生が改善するとの報告がある[18. 19]。しかし動物実験において良好な結果が得られても、臨床上では現在行われている治療とほとんど差がないか、それ以下の場合もあり、残念ながら現状を打破するには至っていない。血管付き神経移植においても満足のいく効果が得られない場合も多い。その理由はⅠ)筋組織が再生神経到達前に萎縮変性し本来の機能回復を得られない、Ⅱ)神経軸索再生時に神経鞘が瘢痕化し再生軸索数が制限されること、Ⅲ)再生時に過誤支配を起こすことである。つまり、効果器である筋体が萎縮変性する前に、神経末端が瘢痕形成に阻害されずに効果器と再接続されることが機能回復の最重要点である。

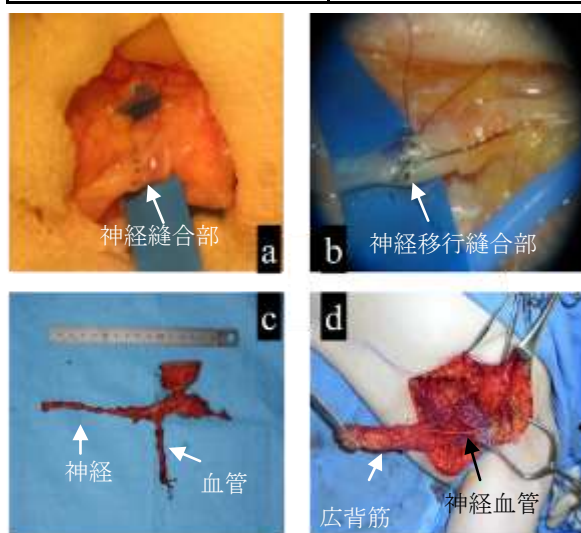
### 1.3 軸索鞘接合による神経軸索即時再建の可能性

中枢からの神経再生を待つのではなく、傷害された軸索鞘または軸索の末梢端と中枢端をつなぐ、軸索鞘接合および軸索融合法を行うことができれば、neurotmesis の段階を axonotmesis または neurapraxia の段階へ改善させ、早期機能回復さらには早期神経細胞修復の可能性がある（図 1 C）。つまり、従来の神経再生法では実現不可能であった精密な機能再建が可能になる。この実験モデルを確立し、in vivo で切断後、軸索鞘接合および軸索融合を確立できれば、軸索内構造変化の観察および電気生理学的機能回復過程を観察することにより、いままで成し遂げられていない神経回復の新たな神経軸索即時再建法の開発実験が可能となる。



A

Classification of Nerve Injury	
Seddon	Sunderland
Neurapraxia	I
Axonotmesis	II
-	III
-	IV
Neurotmesis	V



B

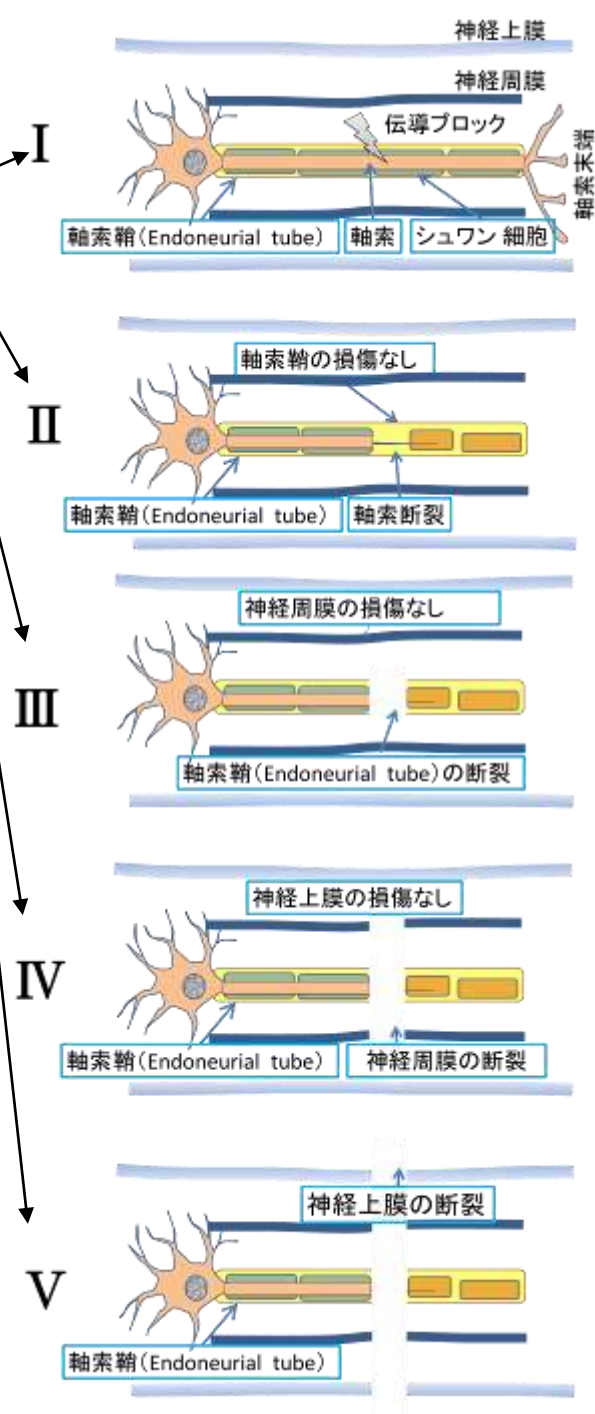
図 1 (A) Seddon and Sunderland classifications of nerve injury

右は Sunderland classification 模式図

(B) 神経損傷に対する外科的治療法

a;神経縫合、b;神経移行術、

c;血管付き神経採取(外側大腿皮神経)、d;血管付き神経筋組織採取 (広背筋弁)



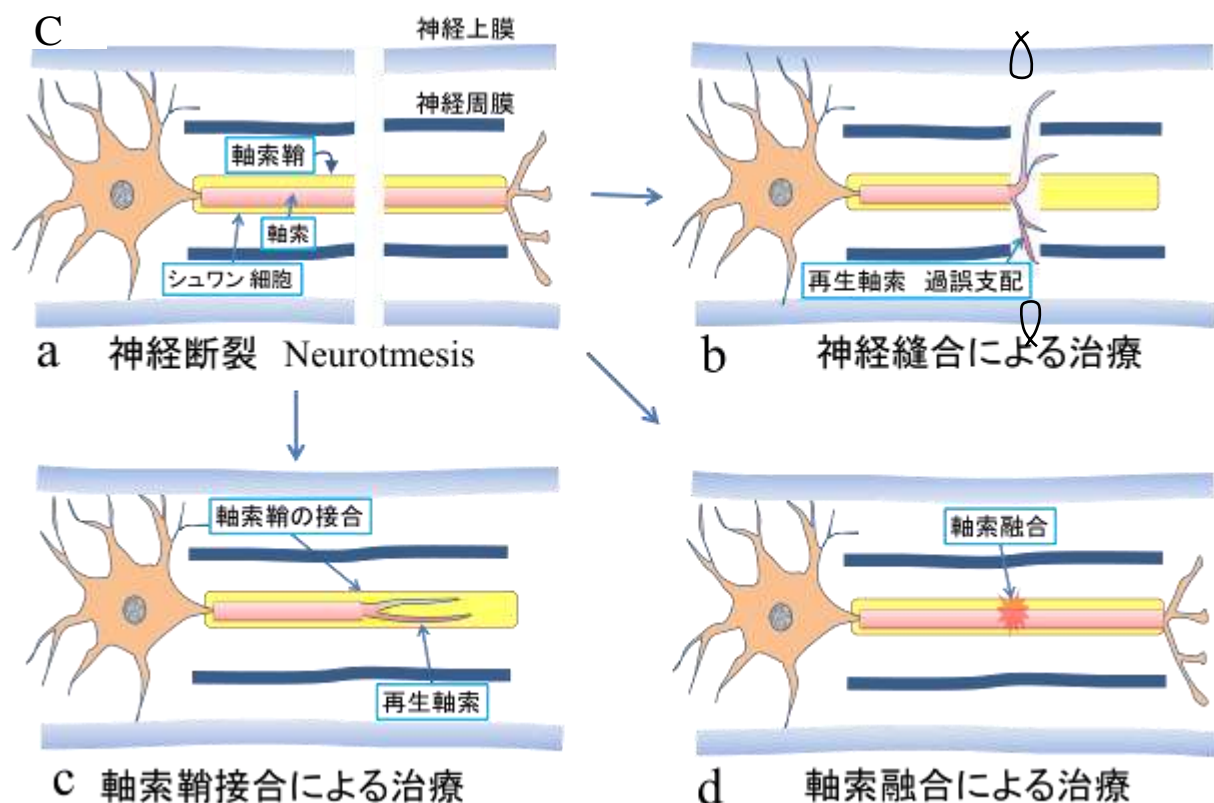


図1 (C) 神経損傷(a)に対する従来法(b)と開発をめざす新治療法(c,d)  
a; 神経断裂(Neurotmesis), b; 神経縫合法, c; 軸索鞘接合法, d; 軸索融合法

#### 1.4 イカ巨大軸索を in vivo に用いる理由

軸索鞘接合または軸索融合法の開発研究にあたり、一本の軸索を切断し、その軸索両断端を可視化し操作できる動物モデルを作成することが必要であると考えた。モデルの条件としては、軸索鞘や軸索の再生過程を観察するため軸索輸送を経時的に可視化しながら同時に電気生理学的検討ができることが重要である。そこで、一本の軸索として太く直視下に確認でき、多くの神経学的知識の蓄積がある動物であることが重要であった。実験モデルとしてラット末梢神経は、細い軸索（径 1-10 $\mu$ m）を数千本まとめた神経束のため一本の軸索操作が困難であった。さらに有髄神経のため髄鞘形成についても考慮しなければならず、モデルを単純化できないと考えた。他モデルとして後根神経節からの培養神経は、一本で無髄神経である点は良いが、細く in vivo

での神経機能回復を確認できないことが難点であった。このため実験モデルとしての条件を満たすことが難しく、軸索が太い実験動物としてイカの巨大軸索を考慮した。

イカの巨大軸索は 1909 年 Williams が初めて報告し、その後 1930 年代に Young らによって解剖学的研究がなされた[20, 21]。イカ巨大軸索は無髄神経でミエリン鞘のような構造を持たない。軸索の脂質二重層の外側には多くのシュワン細胞が 2-4 層にわたって取り囲んでおりマクロでは一様な筒となっている。外套と呼ばれるイカの筒状体部左右に 8-10 本ずつ存在し、星状神経節と呼ばれる外套近位から放射状に末梢へ広がっており、このうち最内側の星状神経が直線状に走っている。また一本の巨大軸索直径が 500 $\mu$ m-1000 $\mu$ m であり、人の軸索直径（約 5 $\mu$ m）と比較すると 100-200 倍の太さがある。マイクロサージェリーを行う者にとって、500 $\mu$ m-1000 $\mu$ m は顕微鏡下に自由自在に操作可能な太さである。また電気生理学的実験においては 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てきたため 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多くの蓄積がある[22-24]。これを基に軸索再生過程を in vivo で行うことにより、神経機能を長期的に追跡できる。さらにイカ巨大軸索 in vivo 軸索内輸送の観察が可能となれば、神経細胞機能も経時的に追跡できる。またイカ巨大軸索は無髄神経のため、有髄神経特有の跳躍伝導のもとになる規則正しい髄鞘形成のための再ミエリン化について検討しなくてもよいことも重要な利点であった。このため、軸索実験を実施する上でモデル動物として使用するのに最適であると考え、イカを選択するに至った。

イカは非常に繊細であるためかつて飼育が困難であった。過去の実験は *in vitro* で、軸索を切り出して行われており、本当の意味での神経細胞の研究ではなく細胞膜の研究であった[23]。さらに軸索を切り出した軸索膜は *in vivo* の場合に比べて Na イオンに対して 10 倍以上も漏れやすくなり、代謝によって膜内外の濃度差を維持できなくなり興奮性が失われる[23]。実験も *in vitro* では 12 時間が限度であり再生や機能再建の実験には使用できなかった。また *in vivo* 実験に関する手技や知識はほとんど無かった[23]。

そこで本研究では、軸索鞘接合および軸索融合法に向けた重要な第一歩としてイカ巨大軸索 *in vivo* 実験モデルを確立するためにイカの神経解剖について詳細な検討を行ったのち、安定的に *in vivo* 実験を行うための実験装置を検討した。

また実験を開始した際にはイカの侵害受容反応についての報告はあったが、詳細については不明であった。[25. 26]。しかし実験中の操作によってイカが暴れ、実験続行が不可能となる事態に直面し、*in vivo* 実験モデルを確立するため、イカの麻酔法を検討し、イカ侵害受容経路についても検討をすることにした。麻酔法の確立ののち、イカ巨大軸索 *in vivo* 剥離法と *in vivo* 顕微鏡下観察法、イカ巨大軸索 *in vivo* 電気生理学的刺激法および計測法、二光子顕微鏡および共焦点顕微鏡による軸索内輸送の *in vivo* 観察法の開発および検討を行った。

## 方法

### 軸索鞘接合法確立に向けた実験動物（イカ）の選択と *in vivo* モデル作成

#### 2.1 イカ実験装置の開発

実験に先立って神経の太さや性質および飼育の難しさを検討し、ヤリイカ (*Loligo Bleekeri*, (以下イカ) 外套長 20-35cm, adult) を用いることとした。理由は、値段および量的に比較的入手しやすいイカの中で、スルメイカや剣先イカに比べ、性質がおとなしく実験中に墨を吐きにくいいためである。また幼少のヤリイカは巨大軸索が細く短い、20 cm以上の adult のヤリイカは巨大軸索のサイズがスルメイカ約 0.2 mm 剣先イカ約 0.5 mm よりも太いため選択した。

実験装置は、すでに報告されている大型の円形水槽を用いることは不可能であった。そこで実験前後の飼育時は中型の円形水槽を利用し、実験の際にはイカ一匹が入ることを前提とした水槽を設計することとした。十分な濾過と温度管理が出来る、またイカの初速がついても壁に激突して傷害を受けることの無いように、イカ一匹がある程度一方向に動けるがほぼ静置させる大きさの実験装置とした。また *in vivo* にて軸索内輸送を確認したり筋電図の計測をするため、イカ体幹部背側を露出させるようにすることも重要と考えた。そこで水を抜いて水槽の水位を簡単に下げさせることが出来るように水路となるホースの接続部を前方に配置した。これらを用いてイカを十分に生きた状態に保てるか、また最内側の巨大軸索の露出操作が可能か検討を行った。

#### 2.2. イカ神経および巨大軸索の解剖学的検討

神経軸索の解剖学的検討のためイカ 10 匹（外套長 20-35cm, adult）を用いた。イカの体幹部における神経は脳から星状神経節に神経が投射したのち、星状神経節で神経を乗り換える。星状神経節から出た巨大軸索を含む星状神経が外套（体幹部）を支配する（図 2 A,B）。8-10 本ある星状神経のうち、最内側の星状神経が長く採取しやすいため今回の研究ではこの最内側の星状神経を用いた（図 2B）。本文中および図やグラフの星状神経（stellate nerve: SN）との記載は、この最内側の星状神経を指すこととする。またヒレの支配神経である fin nerve (FN)は直接脳からヒレに投射している。FN と SN、さらに FN と SN をつないでいるが詳細は不明な神経線維(stellate fin nerve: SFN とした) の位置、走行、組織、神経数および軸索直径について検討を行った。

### 組織学的検討

SN、FN、SFN について星状神経節から末梢側 5 mm の位置 (SNp,FNp,SFN) および SN、FN について 3cm 末梢(SNd,FNd)にて軸索数を検討した（図 2B）。 2.5%グルタルアルデヒドと酸化オスミウムにて一昼夜固定したのち、アルコールおよび酸化プロピレンにて脱水処理を行った。その後エポキシレジン包埋し、ウルトラミクロトームを用いて 3 $\mu$ m 厚でスライスし、トリジンブルー染色をおこなった。

### 画像取得と軸索カウントおよび軸索計測

切片を 40 倍にて顕微鏡撮影し、bmp または tif にて保存した。

この画像を Urso-Baiarda (2006) らの報告している imageJ(NIH)を用いた方法にて軸索数および各軸索の断面積を計測した[37]。標本表面のくずやグリア細胞などの混入を

防ぐため、半径  $1\mu\text{m}$  (面積  $3\mu\text{m}^2$ ) を最小とした。すべてのイカ軸索は無髄神経のため、G-ratio は評価しなかった。それぞれ 20 標本をまとめたのち、 $5\mu\text{m}^2$  の間隔でヒストグラムをそれぞれ作成し、その傾向を検討した。

## 2.3. イカ麻酔法の確立とイカ侵害受容経路の解明

### 麻酔方法

イカを実験用水槽に移したのち、安静状態にするため麻酔前に二時間以上おいた。麻酔は 27G 針にて片側に星状神経節ブロックを行った (図 2C)。リドカインの濃度は臨床上頻度の高い 0.5%・1%・2%およびエピネフリン効果も確認するためエピネフリン入り 1%リドカイン(1% LE (1:100,000) 含有)を用いた。量による麻酔効果の影響を排除するため、投与量はすべて 1ml とした。それぞれの濃度に対してイカ 24 匹 (各 6 匹ずつ, 20-35cm, adult) を用いて検討した。

### 行動学的評価方法

麻酔法の検討には、von Frey test(VFT)を用いた[25]。VFT は von Frey Hair(VFH)と呼ばれる、決まった圧力を加えることが出来る太さや固さの異なったフィラメントを用いる。これを圧力の低い順に刺激部位にフィラメントが曲がるまで押し当て、侵害受容反応を示す圧力値(g)を計測する。VFH は、0.04g-60g までの 15 本(Touch-Test® Sensory Evaluators NC12775-99:20 Piece Monofilaments North Coast Medical Inc, CA, USA)を用いて検討した。イカ自身が VFH の圧力によって水中に沈むか体が傾くことによる誤判定を防ぐため、最大値を 60g とした。イカが侵害受容反応を示す行動学的

指標を all dark, fin flutter, jet escape の 3 項目とした。All dark とは、イカが危険を感じた時に、警戒色として腕先から筒先まで全身を一気に暗色に変色させることを指す [38]。Fin flutter は、一般的に安静時 1-2Hz で波打つように動いているヒレが、機械的刺激に対してラットの tail flutter のようにヒレの振幅を増大させることを示す [39]。Jet escape は、イカが危険を感知したり驚いた際の逃避反応である [40]。この際イカは外套を急速に収縮させ漏斗から外套内の海水を急激に排出することで、高速で移動する。この三指標がすべて認められた時に、侵害受容反応陽性と判定した。

## 評価部位

部位別での知覚の違いについても検討するため、頭部および体幹部、ヒレでのコントロールデータを調査した。図 2A のように正中から 2 cm 外側に頭部（眼球正中ライン (H)）、体幹部（外套近位端から 5 cm 末梢 (Mp) と 10 cm 末梢 (Md)）、ヒレ最大幅部 (Fp) とその末梢 5 cm (Fd) の 5 点を左右両側で VFT を 24 匹に対して 15 分間隔でそれぞれ 3 回行った。

## 麻酔評価

コントロールデータを確認後、星状神経節ブロックを片側に行った。機械刺激に対する反応評価は麻酔後 5 分を初回として、その後 15 分後から 15 分間隔で 120 分まで行った。(15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 分) VFT は最小単位から始め、陽性反応が見られたところの数値(g)を記録した。麻酔後陽性反応は、麻酔と反対側の外套・ヒレにて評価した(図 2C)。また麻酔後平衡感覚の維持、腕による払いのけ、墨の排出 や麻



酔中毒症状について観察した。体表面の色素胞変化も経時的に観察記録した。麻酔効果については人の *protective sensation* としての VFT10g を参考に、VFT10g を最小麻酔閾値とした[35. 36]。また麻酔注入後から VFT10g 以下になるまでの時間を麻酔効果時間とした。

## 知覚神経の解明

イカ *in vivo* モデルを検討するにあたり、解剖によって存在が明らかとなった機能不明の SFN および FN について、麻酔法と神経切断実験によってその役割を検討した。神経節ブロック後、2x1 cmの孔を神経節より末梢にあげ、目的の神経を顕微鏡下に同定し露出させた。SFN 単独での切断は、技術的に他の神経を損傷せずに行うことが難しいため、SN とともに行った。反応評価は先述の麻酔評価と同様 VFT を利用した。反応確認のため Fp・Fd とともにヒレ最長幅部末端から 1 cm内側の点 (FI) も測定点とした(図 2A,2D)。麻酔切断前にコントロールを三回調べたのち、星状神経をブロック後目的の神経を切断し、麻酔の影響を除外するため 3 時間後に切断後の VFT を 15 分間隔で 3 回(180, 195, 210 分)施行した。切断部位は FNp, FNd, と SFN+SNp および mantle connective(MC)の 4 パターンで行い、それぞれ 6 匹ずつ計 24 匹(20-35cm, adult)を用いて施行した (図 2D)。体性感覚評価時には、all dark と fin flutter を神経切断側の対側にて評価した。運動神経評価は神経切断側において all dark とヒレの左右対称的な動きが認められた場合を陽性反応とした。またこれらの反応が部分的に欠損したり部分的に陽性反応を示すかについても観察した。

## 統計学的解析

データは平均±SEM（標準誤差）にて表した。統計処理は、Student's t-test と Tukey's test による analysis of variance (ANOVA)で行った。統計解析は、エクセル(Microsoft Corporation, USA) およびExcel analysis software (Social Survey Research Information Co., Ltd, Japan)にて行った。

## 倫理面への配慮

使用する実験動物に関しては東京大学動物実験講習会を受講し、東京大学医学系研究科動物実験委員会にて動物実験計画の承認（承認番号（医-P13-052, 医-P13-122））を得た。実施する際には動物の愛護及び管理に関する法律に基づくとともに、動物の愛護及び管理に関する施策を総合的に推進するための基本的な指針、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準、動物の処分方法に関する指針、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針を踏まえて、科学的観点、動物愛護の観点、安全確保の観点及び環境保全の観点から、適正に動物実験を実施した。

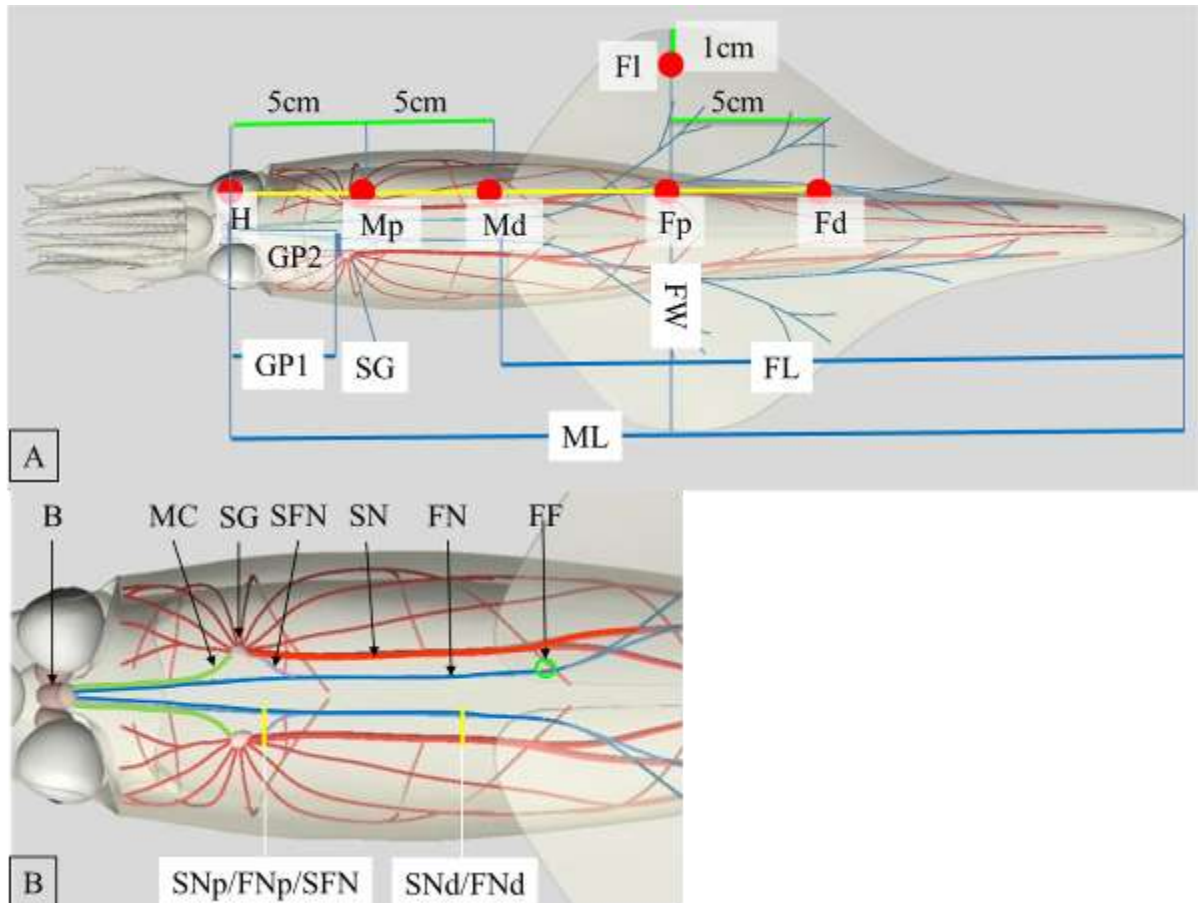


図2：(A) イカ 外套 (mantle) ,ヒレ(fin) 星状神経節 (SG; stellate ganglion) の計測部位 (ML; 外套長、FL;ヒレ長、FW;ヒレ幅、GP1;外套近位端から星状神経節までの距離、 GP2;外套正中から星状神経節までの距離)

**von Frey Test 刺激部位**は、眼球中心間を結んだ線上で正中より外側 2 cmの位置を頭部(H)とし、そこから 5 cm末梢側に外套近位部(Mp)さらに 5 cm末梢に外套遠位部(Md)とした。ヒレ最大幅部(FW)との交点をヒレ近位部(Fp)、その 5 cm末梢をヒレ遠位部(Fd)、FW の外側端から 1 cm内側をヒレ外側部(FI)とした。麻酔効果判定は H,Mp,Md,Fp,Fd にて VFT を行い、神経切断実験では Fp,Fd,FI にて VFT を行った。

**(B)イカ外套神経とヒレ神経解剖図**：外套部の神経支配は脳(B)より出て、mantle connective(MC：緑線)を通り、星状神経節(SG)に到達する。SG より星状神経(赤線)が放射状に伸びそれぞれの部位を支配する。その最内側の星状神経(SN：赤太線)は、ヒレ神経(FN：青線)とともに外套内側末梢へ向かう。ヒレ神経(FN,青線)は脳(B)から出て、外套内側を通りヒレ神経孔(FF:緑丸)より外套を貫き被膜下に出たところで、放射状に神経が分離し、ヒレ末梢に向かって分岐していく。星状ヒレ神経(SFN,紫線)はSNとFNの間を接続する。黄線：神経組織採取部位：星状神経節から 5 mm末梢の位置(SNp:最内側星状神経近位部,FNp:ヒレ神経近位部,SFN：星状ヒレ神経)および 3cm 末梢(SNd,FNd)にて神経組織を採取し軸索数・軸索断面積を検討した(詳細は図4参照)。



図 2(C) イカ麻酔法プロトコール：片側の星状神経節にリドカインを 1ml 注射(a)後、VFT にて両側の赤点上で閾値(g)を判定する(b)。判定基準は麻酔側・非麻酔側のどちらを VFT にて刺激した場合も、all dark, fin flutter, jet ejection の三兆候が非麻酔側で陽性であった場合とする(c)。回復期には両側で三兆候が見られるようになるが、判定は非麻酔側とする(d)。

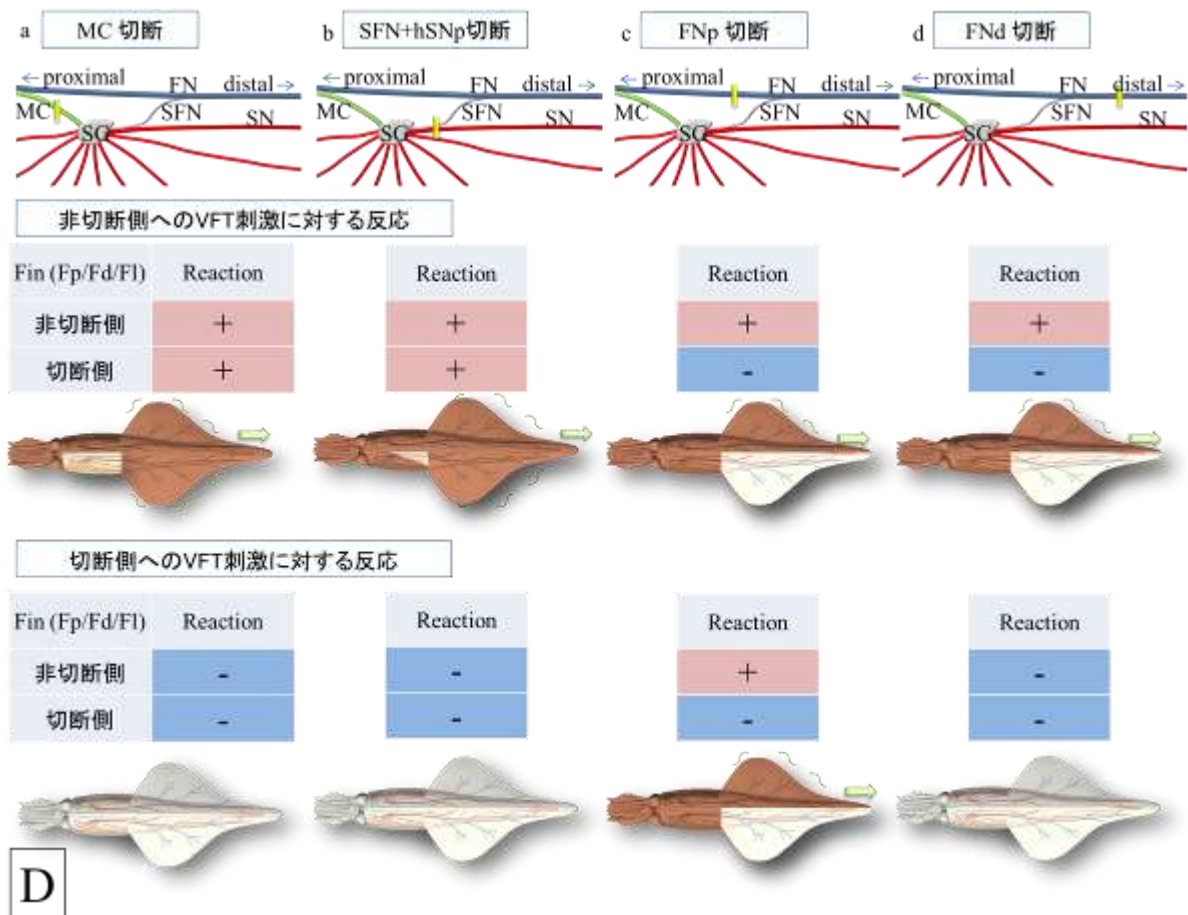


図2 (D) 神経切断後のVFTに対するヒレ反応変化：VFT時にall dark, fin flutterが認められた場合、認められた側（切断側または非切断側）の反応を陽性(+)とする。黄線：神経切断部位 a:mantle connective(MC)切断, b:星状ヒレ神経+最内側星状神経(SFN+SN)切断, c:ヒレ神経近位部(FNp)切断,d:ヒレ神経遠位部(FNd)切断

## 軸索鞘接合の成立確認のための実験法の開発

### 2.4. イカ巨大軸索 in vivo 剥離法と in vivo 顕微鏡下観察法

外套背側から巨大軸索にアプローチする方法を検討することとした。最長で最内側星状神経へダメージを与えることなく巨大軸索を周囲より手早く確実に剥離同定し、顕微鏡下に観察および操作ができる方法を検討した。どの程度イカおよび神経をコントロールとして観察可能か検討を行った。さらに軸索クランプ、軸索瘻孔作成、軸索鞘縫合の可否についてイカ12匹(20-35cm, adult)を用いて検討した。

## 2.5. イカ巨大軸索 in vivo 電気生理学的刺激法および計測法

イカ最内側星状神経を in vivo にて剥離同定したのち、海水水面がイカ背側よりやや低くなるよう調整し、巨大軸索を海水から露出させる。内径 1.5 mm 長さ 5 mm のチューブ状シリコンゴムと 3 mm の離れた 2 本の白金線を内側に備えた電極による刺激電極を用いて、軸索周囲に装着し、5 cm 程度離れた外套末梢に針電極を外套長軸に直交するように 2 本刺入した。アースは外套末梢に置いた(図 9A)。周囲の電気ノイズを軽減するため、水槽の周りをアルミニウムシートで覆った。筋電図・誘発電位検査装置 (ME-6012 Nihonkoden ニューロパック X1) を用いて刺激実験をイカ 12 匹 (20-35cm, adult) に行った。

### 筋電図の測定

神経の活動電位は、刺激電極位置を移動し、軸索上の二か所で筋電図を計測し、筋電図として記録した。筋電図波形の立ち上がり時間を、近位から遠位で引いた値から計算し、両者の間の距離と合わせて神経伝導速度を計測した。解析ソフトとしてミユキ技研のナーコスライトを用いた。フィルターは 20-3,000 Hz とした。電気刺激遅延時間 5ms、持続時間は 500 $\mu$ s、水温 7 と 15 $^{\circ}$ C の条件で解析した。

### 軸索伝導速度の予測

イカの神経伝導速度  $v$  は  $v=0.9\sqrt{d}$  m/s (units  $V = \text{m/s}$  and  $d = \mu\text{m}$ ) で求められる [23]。ただしこれは 20 $^{\circ}$ C における値である。神経伝導速度は温度によってイカの神経伝導速度  $v'$  は、温度を  $T^{\circ}\text{C}$  として  $v'=0.62T+6.46$  m/s で表される一次関数に近似する [23, 34]。

巨大軸索神経における 7、15°Cでの神経伝導速度を予測し、実測との比較検討を行った。また、得られた軸索面積より、ヒストグラムのピークにおける伝導速度を  $V = 0.9 \sqrt{d}$  (units  $V = \text{m/s}$  and  $d = \mu\text{m}$ ). として計算し、過去論文と比較検討することとした[23]。(CV:  $V1 = 1.9 \pm 0.2 \text{ m/s}$ ,  $V2 = 2.7 \pm 0.3 \text{ m/s}$ , and  $V3 = 3.3 \pm 0.2 \text{ m/s}$  (mean  $\pm$  SEM)[25]。

## 2.6. 二光子顕微鏡および共焦点顕微鏡によるイカ巨大軸索軸索内輸送の

### **in vivo 観察法**

軸索鞘接合または軸索融合の確認の方法として *in vivo* で軸索輸送の再開通を確認する方法を確立する必要がある、軸索内輸送の可視化のためにさまざまな試みを行った。軸索輸送を確実にかつ最小限の侵襲で蛍光標識する方法を検討した。可視化対象として大型のミトコンドリアと、逆行性輸送に関してリソソームを選択した。軸索内のミトコンドリアおよびリソソームを蛍光標識できるかを調べるために、まずは *in vitro* からイカ 6 匹 (20-35cm, adult) を用いて検討を行った。神経軸索をイカから切り離し、ミトコンドリアの染色は MitoTracker Orange (200nM) および MitoTracker Green (200nM), リソソームの染色については HMGR(100mM), HMSiRCOH(100mM)を使用した。直接注入には先端径 10 $\mu\text{m}$  前後の微小ガラス管を用いた (図 10A)。微小ガラス管に蛍光色素を入れ、*in vivo* にて巨大軸索に直接穿刺し、Femtojet (Eppendorf) (pressure 400-1000 hPa)を用いて、色素注入を行った。後述するが、上記の蛍光染色法では穿刺部位からの試薬の漏れ出しが問題となったため、物理的な穿孔を生じない蛍光染色を模索した。



結果的にはセンダイウィルス (HVJ 石原産業 Genom one neo) を用いた蛍光色素注入法について検討を行った。センダイウィルスは膜融合を起こし軸索内へ到達する。HVJ250 $\mu$ l に MitoTracker Orange (50 $\mu$ gx2) と MitoTracker Green (50 $\mu$ gx2) を添加するとこれらが HVJ に封入される。この HVJ を剥離露出した SN へ 0.1ml 注入した。この際巨大軸索内を損傷したり刺入しないように行った。注入後 1 時間のところで二光子顕微鏡 (Nikon A1R MP) を用いて in vitro および in vivo 観察を行った。

## 結果

### 軸索鞘接合法確立に向けた実験動物 (イカ) の in vivo モデル作成

#### 3.1.イカ実験装置の開発

濾過装置 (エーハイム 1260) と水槽用クーラー (ゼンスイ ZC-130 OE クーラー) を取り付けた水槽 (50x20x20cm) を設置した (図 3)。濾過にはサンゴ砂を使用し、生物学的濾過槽とした。海水は、天然海水を用いた。イカの酸素供給は外套中央部付近にある鰓にてなされているため、酸素ポンプを頭側に置き、水流が頭側から外套方向に流れるように設置した。この装置でイカの継続観察が可能か検討した。長期飼育用水槽とは違い、実験用水槽では水槽幅が 20cm のため、実験中のイカが向きを変えることがなく、また長さ 50 cmとしたためイカ自身が水槽内でほとんど移動せずホバリングのような状態で水槽内にとどまり、呼吸性の動き以外大きく動くことはなかった。このため in vivo 実験をする上でイカの移動がなくこのサイズ



の水槽が実験をする上で適していることが分かった。またイカが jet escape する際も、ダメージを受けずに実験を継続することが可能であった。海水の深さについては背面を露出させる際に海水を濾過槽への水路を利用して水位を操作しやすい位置に下げることが容易であった。

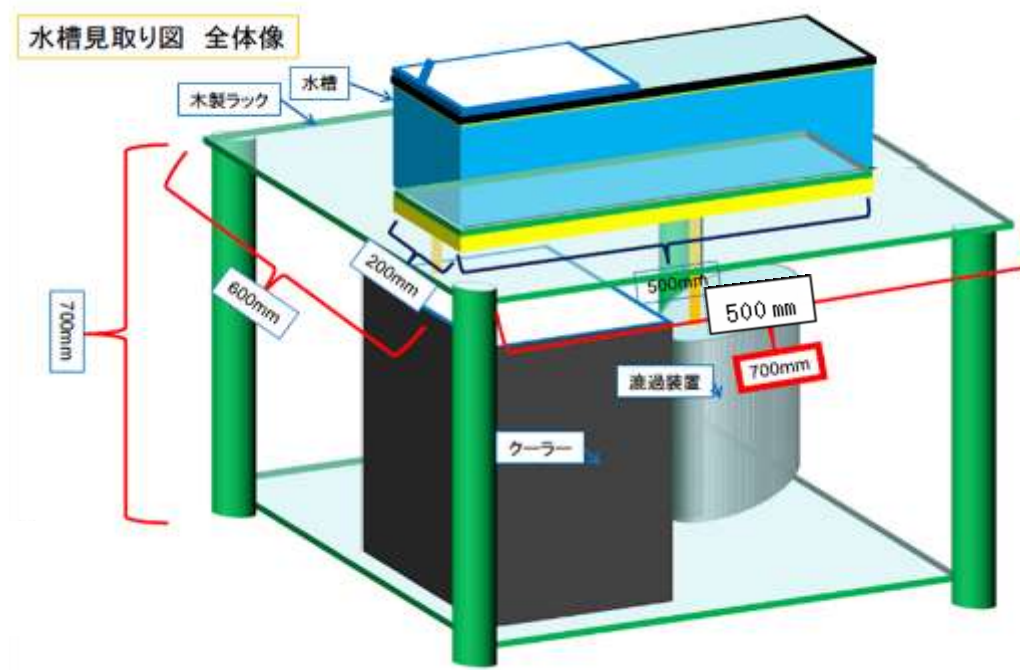


図3 イカ実験装置図

### 3.2.イカ神経および巨大軸索の解剖学的検討

外套長 27–33 cm (mean  $\pm$  SEM:  $31.6 \pm 0.60$  cm [ $n = 10$ ])のものをを用いた。星状神経節は外套近位端から  $38.5 \pm 0.5$  mm (mean  $\pm$  SEM 35–40 mm [ $n = 10$ ])で、遠位で正中から 5.5–7 mm (mean  $\pm$  SEM:  $6.25 \pm 0.15$  mm [ $n = 10$ ])の位置にあった(図 2A)。また神経節の大きさは縦 5–6 mm (mean  $\pm$  SEM:  $5.85 \pm 0.13$  mm [ $n = 10$ ])、横 3–3.5 mm (mean  $\pm$  SEM.:  $3.15 \pm 0.076$  mm [ $n = 10$ ])であった(図 4A)。外套背側表面からの深さは 4–6 mm (mean  $\pm$  SEM:  $4.55 \pm 0.22$  mm [ $n = 10$ ])であった。この星状神経節から外套外側に向かって放射

状に 7-10 本 (mean±SEM:  $8.6 \pm 0.21$  [n = 10]) の星状神経を認めた。ヒレ神経は脳から最内側星状神経と平行に走行しヒレ近位部で外套を貫いたのち、放射状にヒレ全体に投射する(図 2B)。この外套を貫く神経孔(FN)は左右に 1 つずつあり、孔の大きさは 1.6-1.9mm、位置はヒレ近位端から 2-8 mm (mean±SEM:  $4.5 \pm 0.35$  mm [n = 10]) 内側で、3-10mm (mean±SEM:  $7.9 \pm 0.38$  mm [n = 10]) 末梢であった。星状神経から出た神経の一部が 1-2 cm 末梢にて分岐しヒレ神経と合流した (SFN) (図 4B)。この SFN の構造は末梢部位の標本には認めなかった。(SNd, FNd).(図 4 B,C) また SFN には巨大軸索を認めなかった。

#### 組織学的検討と伝導速度の算出

これらの軸索について詳細な組織学的検討を行った(図 4E)。

SFN は FN と SN との間に挟まれるように存在していた(図 4B,D)。軸索数は  $1327.75 \pm 99.38$  本 (mean ± sem: 777 ~ 2515) で、平均軸索面積は  $133.9 \pm 11.62 \mu\text{m}^2$  (mean±sem: 46 ~ 238) であった。SFN20 本の合計軸索数は 26555 でヒストグラムを検討した。ヒストグラムは全体としては指数関数的な形状を示したが、10, 50,  $85 \mu\text{m}^2$  にそれぞれピークが示唆された (図 5 B,C)。

FN には巨大軸索は存在せず、星状神経節近位 (FNp) に比べ、SFN が合流するため遠位 (FNd) のほうが太くなっていた(図 4C,D)。FNp と FNd の軸索数は  $2705.2 \pm 92.61$  本 (mean±sem: 1836 ~ 3568) と  $4256.4 \pm 194.67$  本 (mean±sem: 2874 ~ 5879) であった(図 5A)。また FNp と FNd の軸索面積はそれぞれ  $231.5 \pm 17.4 \mu\text{m}^2$

(mean±sem: 63-349) と  $149.2 \pm 12.29 \mu\text{m}^2$  (mean±sem: 61-253)であった。FNp および FNd それぞれ 20 本の合計軸索数は 54104 と 85128 でヒストグラムを検討した。ヒストグラムより全体としては指数関数的な形状を示したが、FNp では  $10 \mu\text{m}^2$ ,  $80 \mu\text{m}^2$  と  $100 \mu\text{m}^2$  に FNd では  $10 \mu\text{m}^2$ ,  $80 \mu\text{m}^2$  にそれぞれピークが示唆された。

最内側 SN の近位 SNp および遠位 SNd の平均軸索数は  $1911 \pm 129.6$  本 (mean±sem) と  $1523 \pm 87.7$  本 (mean±sem)であった (図 5A,C)。また平均軸索面積は、SNp および SNd は  $176.9 \pm 14.14 \mu\text{m}^2$  (mean±sem:) と  $161.7 \pm 11.25 \mu\text{m}^2$  (mean±sem:) SNp および SNd それぞれ 20 本の合計軸索数は 40733 と 30464 であった。これらのヒストグラム全体としては指数関数的な形状をしめしたが、SNp では  $10 \mu\text{m}^2$ ,  $50 \mu\text{m}^2$  と  $100 \mu\text{m}^2$  に SNd では  $10 \mu\text{m}^2$ ,  $55 \mu\text{m}^2$  と  $95 \mu\text{m}^2$  にそれぞれピークが示唆された。

これらのピークから理論的な伝導速度をそれぞれ算出した。10, 50, 80,  $100 \mu\text{m}^2$  において伝導速度はそれぞれ 1.70, 2.54, 2.86, 3.02 m/s であった。これらのピークは統計学的有意差を認めなかったが、Robyn らの報告する(CV:  $V1 = 1.9 \pm 0.2$  m/s,  $V2 = 2.7 \pm 0.3$  m/s, and  $V3 = 3.3 \pm 0.2$  m/s (mean ± SEM)に含まれていた [25]。FNp における平均面積が統計学的有意差をもって他の神経よりも太かった。(SNp:  $p < 0.05$ , SFN, SNd, FNd :  $p < 0.01$ ). また SFN は最も平均面積が小さく統計学的有意差をもって FNp よりも細かった。SNp の平均軸索数は SNd に比べて有意差をもって多かった。(n = 20;  $p < 0.05$ ). SNp と SNd の 巨大軸索の直径は  $645.7 \pm 23.5 \mu\text{m}$  (SNp) と  $513.1 \pm 16.9 \mu\text{m}$  (SNd) であり、有意差をもって SNd が細かった。(n = 20;  $p < 0.01$ ).

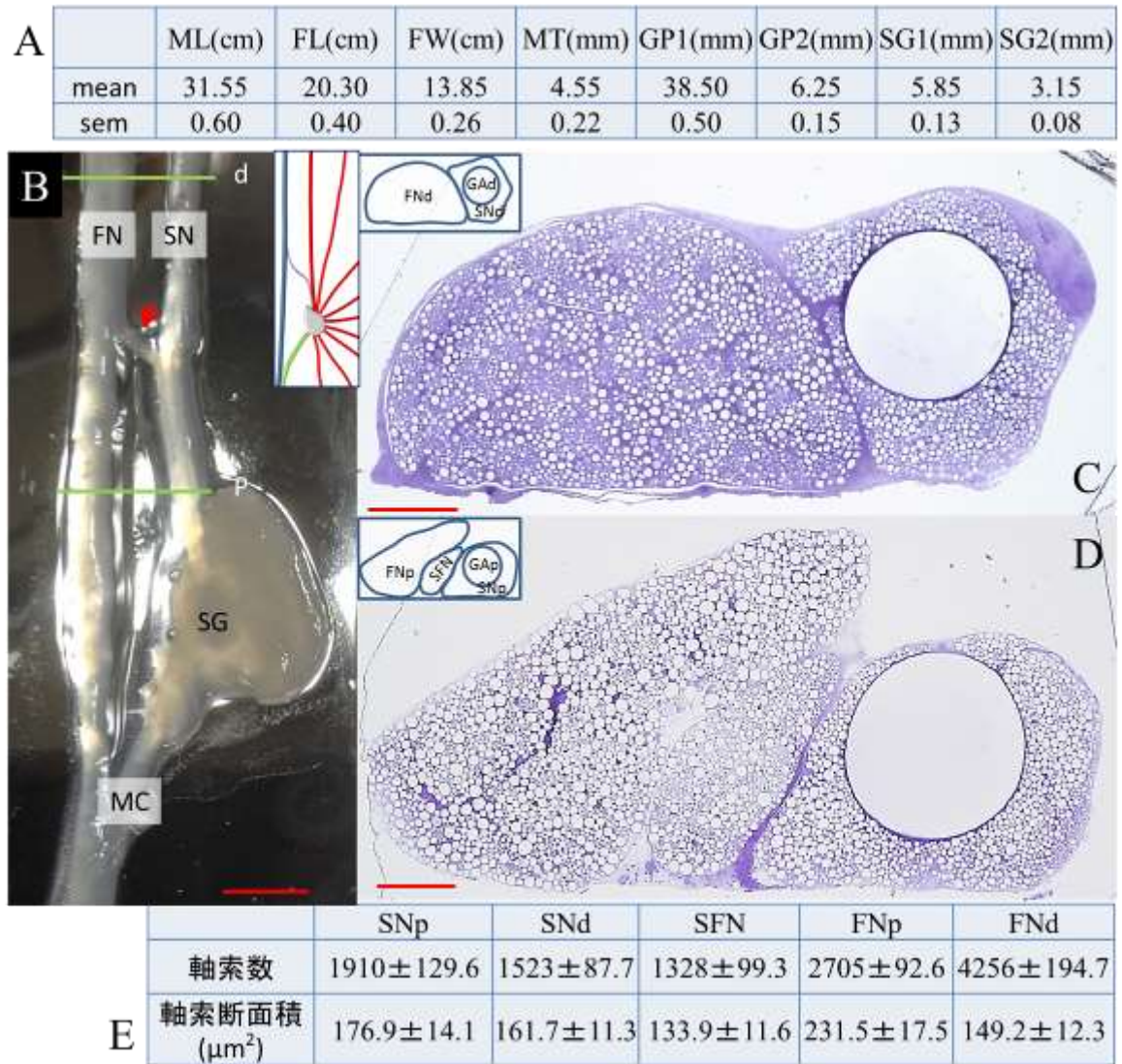
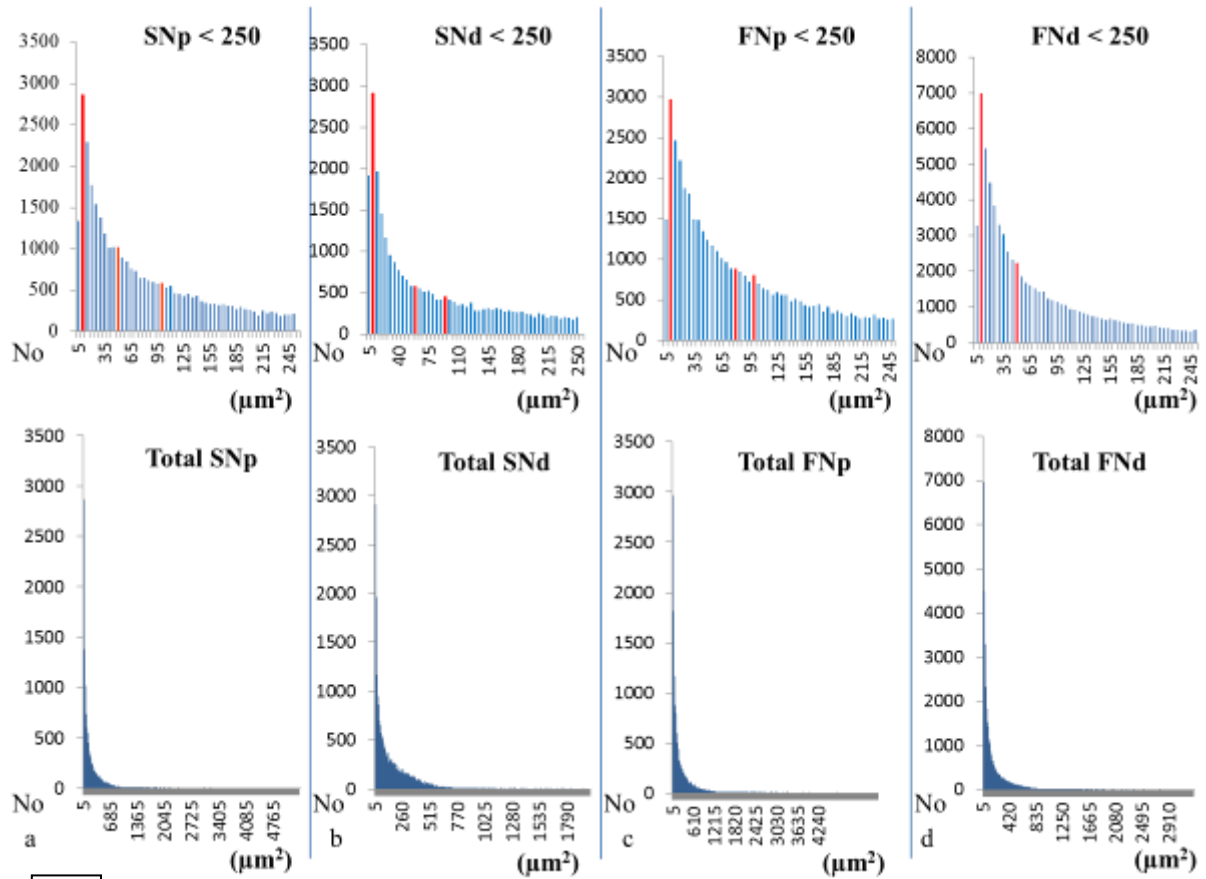
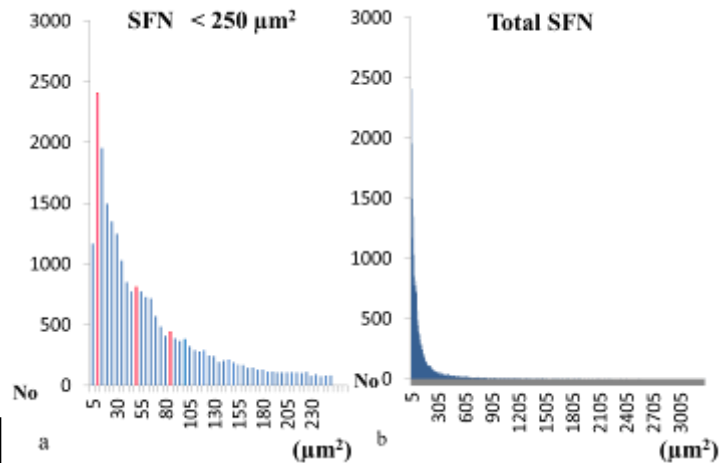


図4 (A) イカ (*Loligo Breckeri*) 外套ヒレおよび巨大軸索・神経節サイズ (図 2A 参照), (B) イカ星状神経節と星状神経、ヒレ神経 赤矢印: 星状ヒレ神経(SFN), Scale bar: 5mm, (C) 末梢 (d) における神経の組織断面 Scale bar: 300μm, (D) 近位 (p) における神経の組織断面 Scale bar: 300μm, (E) 各神経の平均本数および平均軸索断面積 (μm<sup>2</sup>:mean±sem) ML:外套長, FL:ヒレ長, FW: ヒレ幅, MT: 外套厚み, GP1:外套近位端から星状神経節までの距離, GP2:外套正中から星状神経節までの距離, SG1: 星状神経節長軸長, SG2: 星状神経節短軸長. SNd:星状神経遠位部, FNd:ヒレ神経遠位部, SNp:星状神経近位部, FNp:ヒレ神経近位部, SFN:星状ヒレ神経, MC:mantle conective, SG:星状神経節, SN;星状神経, FN:ヒレ神経, Fp:ヒレ近位部, Fd:ヒレ遠位部, Fl:ヒレ外側部.



A



B

図 5 (A) 最内側星状神経 (SNp/SNd) とヒレ神経(FNp/FNd)の軸索断面積と軸索数のヒストグラム (イカサンプル数=20, a; SNp:  $n=40733$ . b; SNd:  $n=30464$ . c; FNp 軸索数:  $n=54104$ . d; FNd:  $n=85128$  上段: 限定範囲のヒストグラム ( $3 < x < 250 \mu\text{m}^2$ ) 下段: 全範囲のヒストグラム. 赤線: ピークポイント, (B) a: 星状ヒレ神経(SFN) の軸索断面積ヒストグラム 限定範囲( $3 < x < 250 \mu\text{m}^2$ ) 赤線: ピークポイント, b: stellate fin nerve (SFN) の面積比較グラフ (イカサンプル数=20、SFN; $n = 26555$ ).

C	平均軸索数 (Range)	平均断面積 ( $\mu\text{m}^2$ )	最大軸索面積 ( $\mu\text{m}^2$ )	ピーク値の 推定伝導速 度 (m/s)	ピーク値 ( $\mu\text{m}^2$ )
星状ヒレ 神経 (SFN)	1327.75 $\pm$ 99.38 (777–2515)	133.9 $\pm$ 11.62 (46–238)	1703.6 $\pm$ 152.0 (488.0–3279.0)	1.70, 2.54, and 2.90	10, 50, and 85
ヒレ神経 近位部 (FNp)	2705.2 $\pm$ 92.61 (1836–3568)	231.5 $\pm$ 17.4 (63–349)	2167.6 $\pm$ 224.1 (939.0–4801.0)	1.70, 2.86, and 3.02	10, 80, and 100
ヒレ神経 遠位部 (FNd)	4256.4 $\pm$ 194.67 (2874–5879)	149.2 $\pm$ 12.29 (61–253)	1525.3 $\pm$ 150.2 (445.0–3286.0)	1.70 and 2.54	10 and 50
星状神経 近位部 (SNp)	1911 $\pm$ 129.6 (1358–4002)	176.9 $\pm$ 14.14 (42–284)	1734.3 $\pm$ 257.2 (480–5430)	1.70, 2.54, and 3.02	10, 50, and 100
星状神経 遠位部 (SNd)	1523 $\pm$ 87.7 (1076–2821)	161.7 $\pm$ 11.25 (80–298)	1314.8 $\pm$ 77.1 (804–1939)	1.70, 2.60, and 2.99	10, 55, and 95

図 5 (C) それぞれの神経の軸索数、軸索断面積、ピーク値、ピーク値の推定伝導速度の比較

### 3.3 イカ麻酔法の確立とイカ侵害受容経路の解明

#### 行動学的評価（コントロール）

麻酔法を確認する前に、まずイカの正常時侵害受容反応の閾値についてイカ 6 匹を用いて検討した。頭部からヒレ末梢までの VFT の平均閾値は  $2.50 \pm 0.11$  g であった。また 侵害受容反応の最大値平均は 6.5g( $6.50 \pm 0.25$  g [n = 40]) 頭部からヒレ末梢にかけて VFT 値は徐々に増加していたが、統計学的有意差はなかった(図 6A)。

## 行動学的評価（麻酔後）

全体的な傾向として、麻酔注入直後より麻酔効果が発現し、経時的に刺激に対する反応が回復してきた（図 6B）。

### リドカイン濃度の違いによる麻酔効果の検討

1%および 2%リドカインによる星状神経節ブロックによりイカ外套部近位・遠位 (Mp/Md)およびヒレ部近位・遠位(Fp/Fd)の完全半身神経麻痺を認めた。最大閾値は 60g 以上であった。頭部の VFT 閾値は麻酔前と麻酔後で統計学的有意差はなかった。(n = 24;  $P > 0.05$  Fig. 10). 0.5%リドカインの注入は半側全体に効いたのは 1/6 匹のみで、他 1/6 匹で Mp で麻酔効果が見られたものがあり、他は VFT 閾値が 10g を超えず麻酔効果を認めなかった（図 6C）。

### リドカイン麻酔後のピーク時間

1%および 2%リドカインによる星状神経節ブロックにより麻酔後 5 分後に最大閾値のピークに達した。2%リドカインの最大閾値(Mp, Md, Fp, and Fd)は(n = 6 each: 60.0  $\pm$  0.0 g, 60.0  $\pm$  0.0 g, 54.3  $\pm$  15.67 g, and 54.3  $\pm$  5.67 g)であった。これらの値は部位による統計学的有意差は認めなかった。(n = 6/group;  $p > 0.05$  ANOVA, followed by Tukey' s test).対側の非麻酔側の閾値とは統計学的有意差を認めた。

### 麻酔効果の持続時間

1%および2%リドカイン麻酔後の Mp, Md, Fp, Fdにおけるそれぞれ麻酔効果持続時間を図 6D, 6E (n = 6/group, mean  $\pm$  SEM)に示した。2%, および 1%リドカインによる

平均麻酔効果持続時間は、それぞれ  $58.5 \pm 6.05$  min と  $37.5 \pm 3.69$  min ( $n = 24/\text{group}$ ,  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ )であった。部位による統計学的有意差は1%、2%リドカインともなかった。 $(n = 6/\text{group}; P > 0.05$  ANOVA, followed by Tukey's test)。0.5%リドカインで麻酔効果を認めたイカ個体での麻酔効果時間は Mp, Md, Fp, および Fd の部位で それぞれ  $22.5 \pm 8.1$  min, 30 min, 15 min, 30 min, ( $n = 2$  at Mp,  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ;  $n = 1/\text{group}$  at Md, Fp, Fd)であった。

この結果より、1%リドカインと2%リドカインは局所ブロック効果として十分な麻酔鎮痛効果を示すことが分かった。また効果はチェック初回の麻酔後5分後には麻酔側半側に発現し、対側および両側頭部には影響を与えなかった。

#### 麻酔におけるエピネフリン効果

エピネフリン入り1%リドカインによるブロック後の最大閾値と効果発現時間はすべての部位においてそれぞれ  $>60.0 \pm 0.0$  g と  $5 \pm 0$  min であった( $n = 6/\text{group}$ ,  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ) (図 6D)。エピネフリン入り1%リドカインによる Mp, Md, Fp, と Fd におけるそれぞれの麻酔効果持続時間は図 6D に示した( $n = 6/\text{group}$ )。エピネフリン入り1%リドカインによる平均麻酔効果持続時間は、 $102.5 \pm 3.46$  min であった( $n = 24/\text{group}$ ,  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ )。部位による統計学的有意差はなかった( $n = 6/\text{group}; P > 0.05$ )。エピネフリン入り1%リドカインによる麻酔効果は、1%・2%リドカインに比べて、麻酔効果持続時間は有意差をもって延長した。 $(n = 6/\text{group}; p < 0.05)$  (図 6E)。VFT の最大閾値および発現時間には、すべての部位において麻酔の違いによる有意差はなかった。 $(n$



= 6/group;  $P > 0.05$ ).

## 補足実験

麻酔後色素胞の機能は経時的に回復した。回復時間は Md で  $81.0 \pm 8.22$  min、Fd で  $84 \pm 27.25$  min ( $n = 5/\text{group}$ : mean  $\pm$  SEM)であった。すべての個体において麻酔実験中は、正常姿勢を保っていた。また墨を排出したり、嘔吐したり、払いのけ動作および麻酔による中毒症状を示すものはなかった。

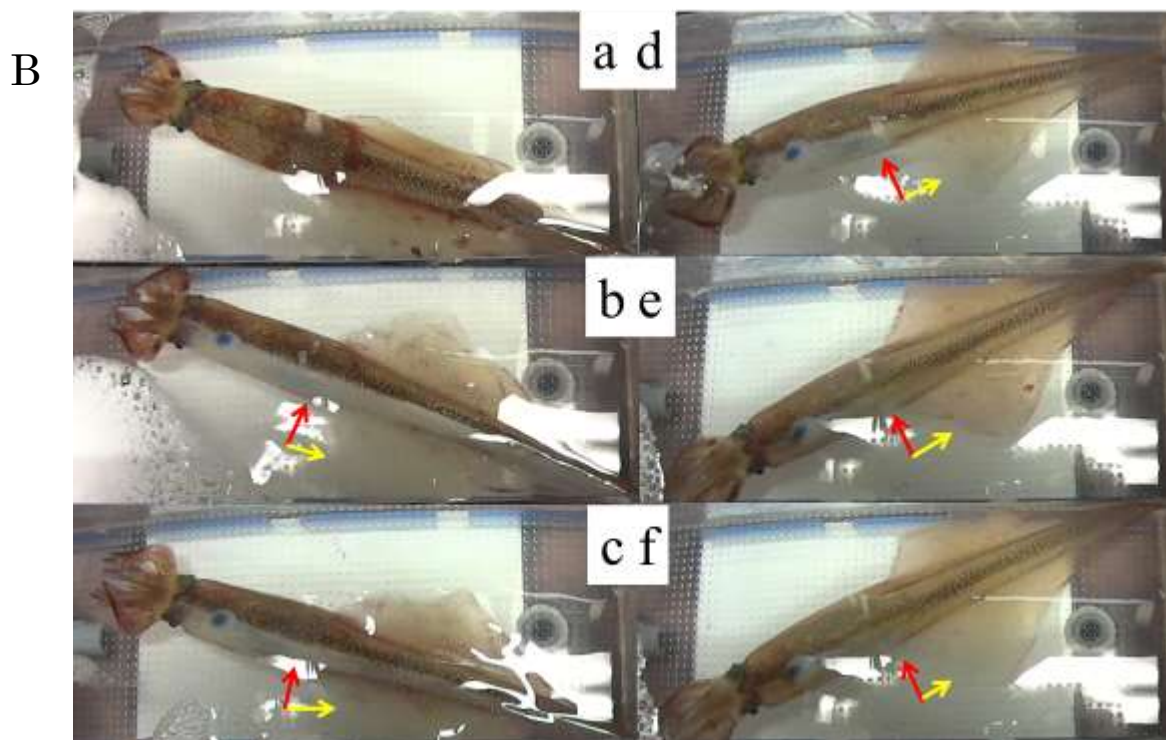
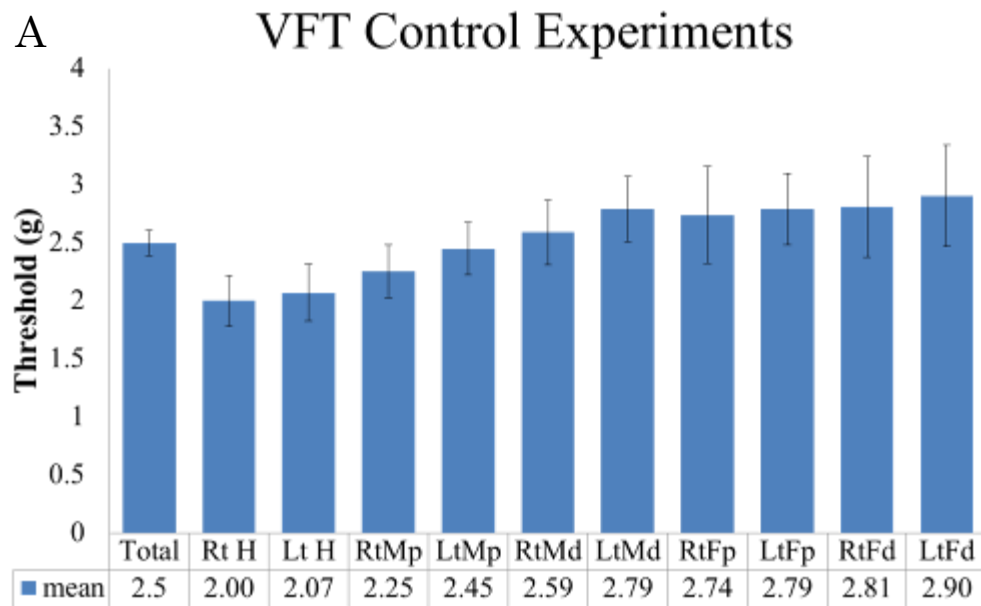


図 6 (A) von Frey Test(VFT)に対する各部位の平常時反応閾値グラフ.H,Mp,Md,Fp,Fdの左右(Lt, Rt)で測定, (B)麻酔後のヒレおよび外套部色素胞の経時的変化. a;麻酔前. b;麻酔直後(片側完全麻痺) c; 麻酔 5 分後(ヒレにまだらな体色回復). d; 麻酔 15 分後(広範囲なヒレ体色の回復と限定的な外套部の体色回復). e 麻酔 20 分後;(ヒレの完全体色回復と外套部のまだらな回復). f;麻酔 30 分後 (ヒレの完全体色回復と外套部のほぼ完全体色回復).赤矢印: 外套部の色素変化, 黄色矢印;ヒレ部の色素変化

C

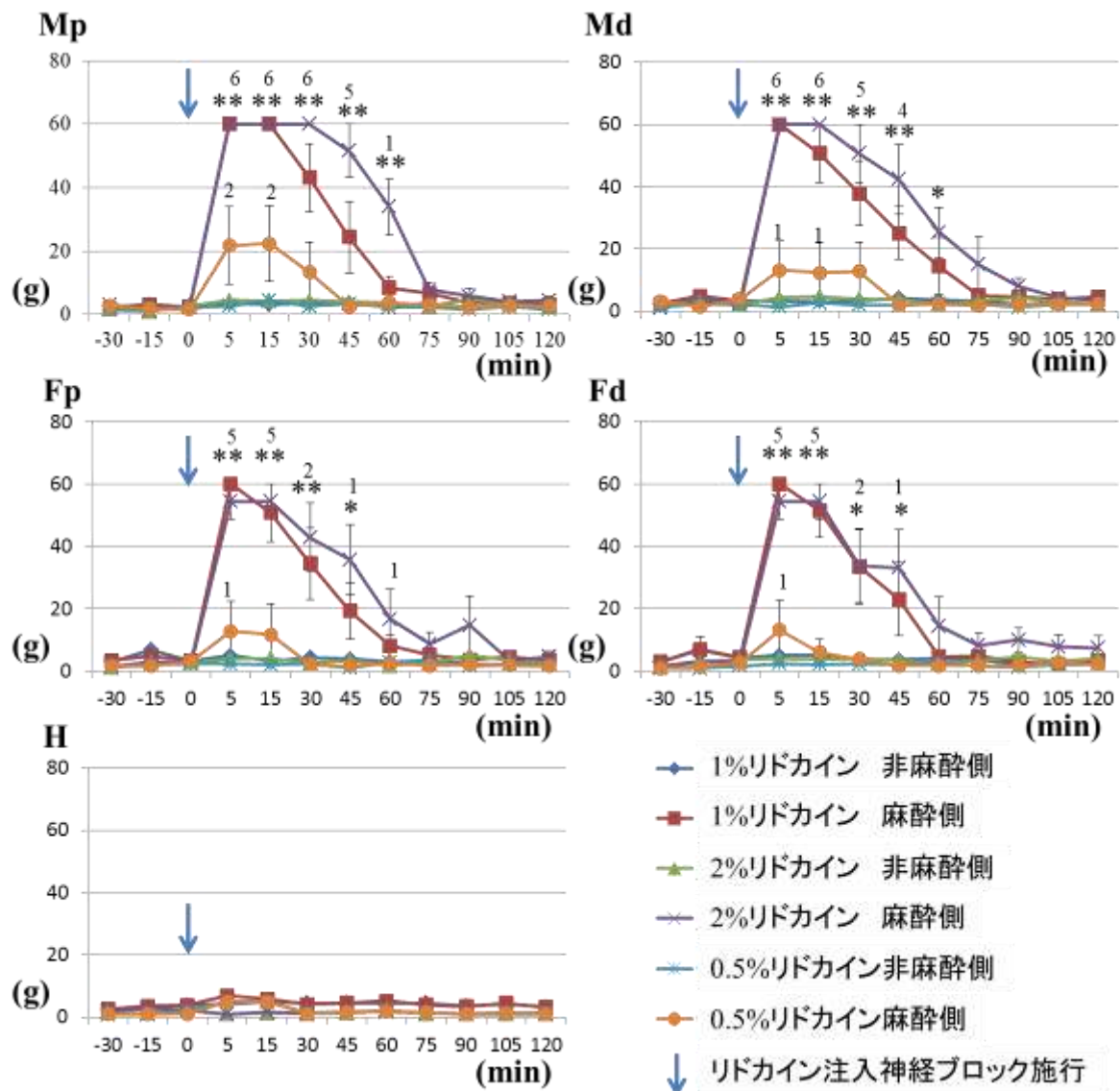


図 6 (C) 1%リドカイン, 2%リドカイン, 0.5%リドカインによる星状神経節ブロック後の VFT に対する閾値変化(mean  $\pm$  SEM) (0.5%: n = 6; 1%: n = 6; 2%: n = 6)

麻酔 30 分前より 3 回 VFT にてコントロールデータを取得 (図 6A 参照)。その後、リドカイン注入による神経ブロックを行い(青矢印)、VFT にて閾値の変化を継続的に観察した。縦軸: VFT 刺激に対する反応閾値 (g) 横軸: 経過時間 (分)

2%リドカインと 0.5%リドカインのグラフ上数値: 60gVFT に反応のなかった n 数, asterisk,  $P < 0.05$ ; two asterisks,  $P < 0.01$  各時点での麻酔側と非麻酔側の反応値(g)の比較 followed by a Student's t-test

Mp: 外套部近位部、Md: 外套部遠位部、Fp: ヒレ近位部、Fd: ヒレ遠位部、H: 頭部 (刺激部位詳細は図 2 A を参照)

D

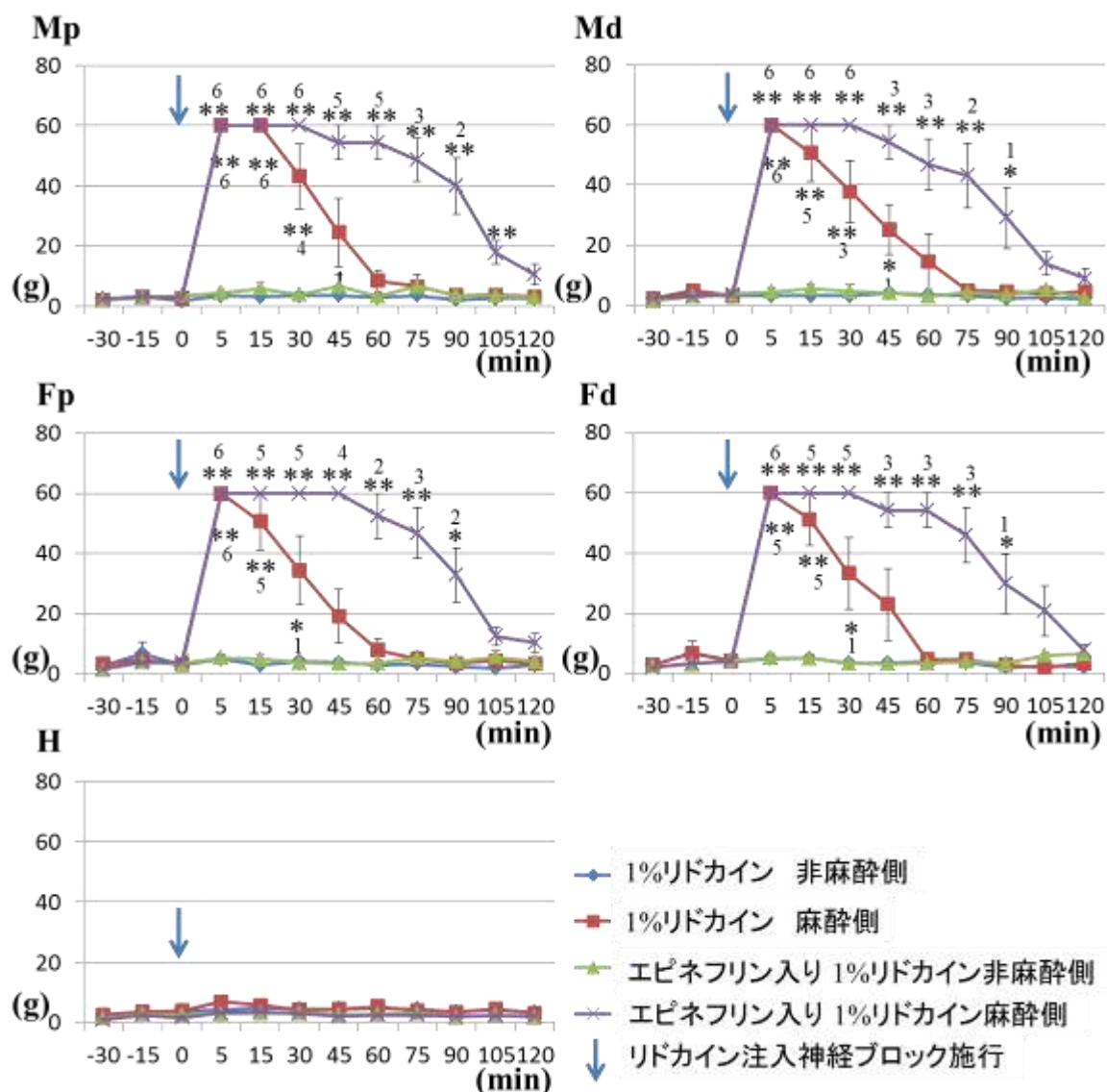


図 6 (D) 1%リドカインとエピネフリン入り 1%リドカインによる星状神経節ブロック後の VFT に対する閾値変化 (1%L: n = 6; 1%LE: n = 6)

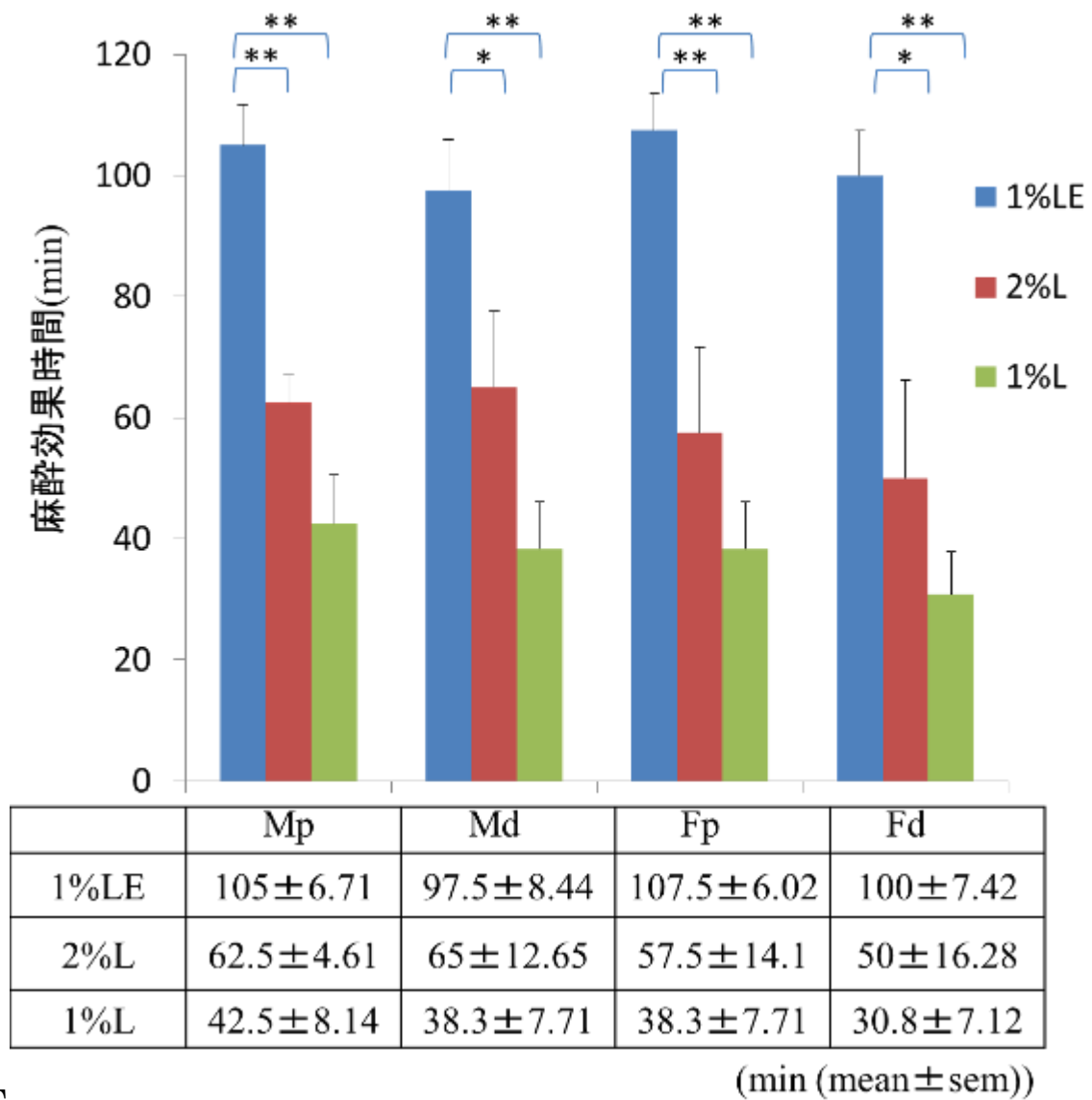
麻酔 30 分前より 3 回 VFT にてコントロールデータを取得。

その後、リドカイン注入による神経ブロックを行い(青矢印)、VFT にて閾値の変化を継続的に観察した。縦軸：VFT 刺激に対する反応閾値 (g) 横軸：経過時間 (分)

グラフ上数値: 60gVFT に反応のなかった n 数, asterisk,  $P < 0.05$ ; two asterisks,  $P < 0.01$

各時点での麻酔側と非麻酔側の反応値(g)の比較 followed by a Student's t-test

Mp: 外套部近位部、Md: 外套部遠位部 Fp: ヒレ近位部 Fd: ヒレ遠位部 H: 頭部  
(刺激部位詳細は図 2 A を参照)



E

図 6 (E)各部位におけるエピネフリン入り 1%リドカイン(1%LE)、2%リドカイン(2%L)、1%リドカイン(1%L)の麻酔効果時間 (min) (mean ± SEM) (n = 6/group; asterisk, P < 0.05, two asterisks, P < 0.01 [ANOVA followed by Tukey's test]).

## 知覚神経の解明

### SFN/SNp,FNp,FNd 切断による行動学的検討

神経切断実験前にすべての個体において VFT にて fin flutter, jet escape, all dark の陽性反応を示すことを確認した。Fp,Fd,Fl における VFT の閾値はそれぞれ  $2.54 \pm 0.13$  g,  $2.91 \pm 0.15$  g,  $7.80 \pm 0.35$  g であった。Fl における VFT 閾値は他の部位に比べて有意差をもって低かった( $P < 0.01$ )。

神経切断後の VFT の結果はそれぞれ図 2D および図 7A に示した。MC または SFN/SNp 切断後、神経非切断側のヒレを VFH にて刺激すると、神経切断側および非切断側の両側のヒレにおいて all dark と fin flutter を同期的に認めた(図 2D)。MC または SFN/SNp 切断後、神経切断側のヒレを VFH にて刺激すると、60g の VFH を用いても両側ヒレに陽性反応は認めなかった(図 7A)。この結果から、MC または SFN は、ヒレの運動神経の経路とは関連がないが、MC または SFN 切断によってヒレの感覚神経経路が遮断されることが示唆された。

FNp 切断や FNd 切断後、神経非切断側のヒレを VFH にて刺激すると、神経非切断側のヒレのみ all dark と fin flutter を認め、神経切断側のヒレは弛緩性の運動麻痺状態で反応しなかった。FNp 切断後、神経切断側のヒレを VFH にて刺激すると、神経非切断側を刺激した時と同じ反応を示した。これに対して FNd 切断後、ヒレの神経切断側を VFH にて刺激したところ、神経切断側および神経非切断側のどちらも陽性反応を示さなかった。この結果より FNd 切断はヒレ神経の運動および感覚神経経路に影響

響を与えるが、FNp 切断はヒレの感覚神経経路をブロックせず、運動神経経路のみ遮断することが示唆された。

これらの実験結果から、ヒレの運動およびヒレの色素胞変化に関わる運動神経は脳から FNp、FNd を通りヒレ筋肉および小胞体筋に達するのに対し、ヒレの機械的侵害受容を伝える体性感覚神経は FNd から SFN を通って星状神経節に到達すること、さらに体性感覚神経は星状神経節から脳神経節へ MC を通って到達することが示唆された（図 7B）。

### 補足的観察

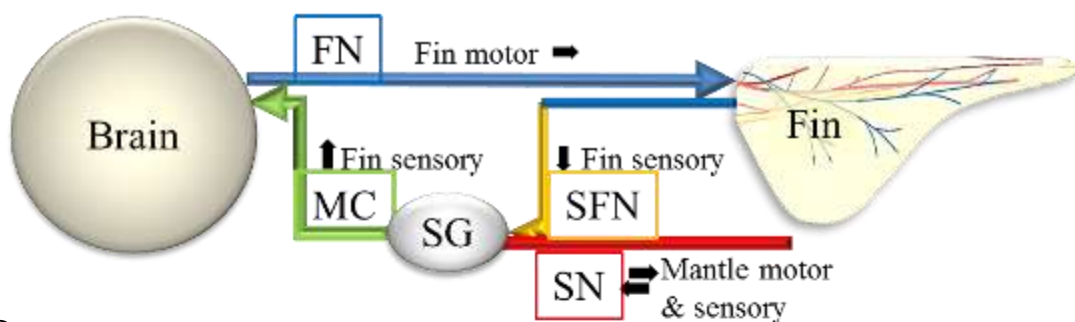
これらの切断実験中に運動神経の部分麻痺（ヒレ運動部分的麻痺や色素胞変化の部分麻痺）や感覚神経の部分麻痺（Fp Fd Fl のうちの一部のみ反応なし）は認めなかった。実験中すべての個体において仰向けになるなどの姿勢異常は認めなかった。

A

		SFN/SNp 切断			FNp 切断			FNd 切断		
刺激部位	反応確認	Fp	Fd	Fl	Fp	Fd	Fl	Fp	Fd	Fl
非切断側	非切断側	2.19± 0.29g	2.99± 0.28g	11.11± 0.73g	5.17± 0.58g	5.67± 0.52g	15.33± 1.98g	3.06± 0.339 g	3.56± 0.20 g	11.44± 1.09 g
	切断側	+	+	+	-	-	-	-	-	-
切断側	切断側	> 60.0g	> 60.0g	> 60.0g	-	-	-	> 60.0g	> 60.0g	> 60.0g
	非切断側	-	-	-	7.50± 1.31 g	7.39± 1.32 g	15.33± 1.98 g	-	-	-

図7 (A) 神経切断実験。各神経切断後の VFT に対する切断側および非切断側の反応とその閾値。SFN/SNp 神経切断後、神経非切断側のヒレを VFH にて刺激すると、神経切断側および非切断側の両側のヒレにおいて陽性反応を示す。SFN/SNp 切断後、切断側のヒレを VFH にて刺激すると、60g の VFH を用いても両側ヒレに陽性反応は認めない。FNp 切断および FNd 切断後、非切断側のヒレを刺激すると、非切断側のヒレのみ陽性反応を示し、切断側のヒレの反応は陰性であった。FNp 切断後、切断側のヒレを刺激すると、非切断側を刺激した時と同じ反応を示した。これに対して FNd 切断後、ヒレの切断側を刺激したところ、切断側および非切断側のどちらも陽性反応を示さなかった。SFN:星状ヒレ神経, SNp:星状神経近位部, FNp:ヒレ神経近位部, FNd:ヒレ神経遠位部, Fp:ヒレ近位部, Fd:ヒレ遠位部, Fl:ヒレ外側部,





B

Species	Invertebrate ( <i>Loligo.bleakeri</i> )		Vertebrate ( <i>Homo sapiens</i> )	
Part	Fin		Foot	
Nerve	SFN Sensory	FNp Motor	Dorsal Root Sensory	Ventral Root Motor sympathetic
Mean Axon size	Small	Large	Small	Large
Peaks and Kinds of axons (diameter)	<b>Unmyelinated</b> 10 $\mu\text{m}^2$ (3.6 $\mu\text{m}$ ) 50 $\mu\text{m}^2$ (8 $\mu\text{m}$ ) 85 $\mu\text{m}^2$ (10.4 $\mu\text{m}$ )	<b>Unmyelinated</b> 10 $\mu\text{m}^2$ (3.6 $\mu\text{m}$ ) 80 $\mu\text{m}^2$ (10.1 $\mu\text{m}$ ) 100 $\mu\text{m}^2$ (11.3 $\mu\text{m}$ )	<b>Unmyelinated</b> C: 0.2–1.5 $\mu\text{m}$ <b>Myelinated</b> A $\delta$ : 1–6 $\mu\text{m}$ A $\beta$ : 6–12 $\mu\text{m}$ A $\alpha$ : 12–20 $\mu\text{m}$	<b>Unmyelinated</b> (sympathetic) C: 0.2–1.5 $\mu\text{m}$ B: 3 $\mu\text{m}$ <b>Myelinated</b> (motor) A $\delta$ : 1–6 $\mu\text{m}$ A $\alpha$ : 12–20 $\mu\text{m}$
Satellite station	Stellate Ganglion	Direct from Brain lobes	Dorsal Root Ganglion	Direct from Spinal Cord
Lidocaine	Effective	Effective	Effective	Effective

C

図 7(B)ヒレ感覚神経とヒレ運動神経の走行経路図。イカ神経切断実験の結果から、ヒレの運動およびヒレの色素胞変化に関わる運動神経は脳 (brain) からヒレ神経 (FN) を通りヒレ筋肉および小胞体筋に達するのに対し、ヒレの機械的侵害受容を伝える体性感覚神経はヒレ神経(FN)遠位部から星状ヒレ神経 (SFN) を通って星状神経節 (SG) に到達すること、さらに体性感覚神経は星状神経節から脳神経節へ mantle connective(MC)を通して到達することが示唆された。(C)人の四肢とイカヒレの運動神経・感覚神経の比較 (\*Kandel et al. 2013) イカヒレの運動神経および感覚神経の経路は、人などの脊椎動物における末梢神経の経路と似た経路を形成している。また人の運動神経に比べて感覚神経の軸索径が、細い傾向があるのに対して、イカにおいても運動神経に比べて感覚神経の軸索径が細いことが示唆される。MC: mantle connective, FN: ヒレ神経, SN: 星状神経 SFN:星状ヒレ神経, SG: 星状神経節, SNp: 星状神経近位部, FNp:ヒレ神経近位部, FNd: ヒレ神経遠位部, Fp:ヒレ近位部, Fd : ヒレ遠位部, Fl:ヒレ外側部,

## 軸索鞘接合の成立確認のための実験法の開発

### 3.4. イカ巨大軸索 *in vivo* 剥離法と *in vivo* 顕微鏡下観察法

SN は星状神経節から出たのち FN と伴走し、FN が fin foramen (FF) を通って外套を貫きヒレへ分布するところで FN と別れ外套やや外側に向かって走る(図 2B)。このため、イカの背側から FN を同定し、逆行性に外套から FF を貫き筋体内部に入ったところで SN に合流するのでここで確実に巨大軸索を露出できると考えた(図 2B)。巨大軸索を含んだ SN は FN とともにペンと呼ばれる背面の軟骨側面を走行しており、その部分を切開したところ、露出可能であった(図 8)。背部を適宜切開剥離すると神経や血管を損傷するため、長く巨大軸索を剥離したい場合、FF から入るのが最も安全確実であると思われた。FF はヒレ近位端から  $4.5 \pm 0.35\text{mm}$  (mean  $\pm$  s.e.m.) 内側で  $7.9 \pm 0.38\text{mm}$  (mean  $\pm$  s.e.m.) 末梢 に存在することが解剖学的検討から示された。このためヒレ近位 1 cm 内側の 1 cm 尾側より表層を切開したところ、ヒレが外套へ付着する筋体が外套長軸と並行にスジ状に透見された。これを薄く剪刀で切開したところ約 1.5 mm 径の FN を認めた。FN を近位に剥離したところ外套を貫く FF を認めた。0.3 mm の栄養血管を損傷しないように気を付けながら、神経孔を血管剥離子にて拡張したのち、先が鈍な剪刀を用いて神経孔に沿って外套背側やや内側を切開した。5-8 cm 切開したのち、開創器を切開した外套にかけて開創した。開創した内部の FN を露出し、その外側から合流する SN を同定した。周囲の被膜から SN を剥離した。この際細い分枝を認めた場合には、できるだけ神経本幹から離れたところで切離した。SN 近位

に2本太い血管が横走していたため、必要に応じてバイポーラで焼灼後切離または9-0 ナイロン糸で結紮切離した。

周囲の軸索を除去し、巨大軸索のみにする場合、実体顕微鏡下には背景である外套の筋体が白色のため、巨大軸索の存在を確認することが不可能であった。そこで厚さ1 mm幅5 mm x 長さ10 mmのプラスチック製の鏡を作成し、神経軸索を損傷しないよう神経の下層に挿入した。これにより実体顕微鏡からの光が反射して神経の下から光を当てると同等の効果と位相差顕微鏡のような陰影をもたらし、SN内の巨大軸索がin vivoで鮮明に識別可能となった(図8,10B)。これによりin vivoにてイカの巨大軸索に蛍光色素の注入観察が可能となった(図10B)。また鑷子・27G針・微小剪刀にて必要に応じた範囲で剥離・切離等の操作することが可能となった(図8)。

#### 軸索クランプ・軸索瘻孔作成・軸索鞘縫合の可否について

イカ巨大軸索in vivo剥離法が確立したところで、様々な操作が可能か検討を行った。まず軸索クランプは30g圧クリップにて可能であった(図8C)。クランプ部周囲の軸索内に白色物質が集積した。1時間のクランプ後解除したところ、この白色物質は徐々に拡散した。また軸索も直視下の観察では24時間まで明らかな変性は認めなかった(図8C)。次に瘻孔作成はマイクロ剪刀を用いた。瘻孔作成後6時間で瘻孔より中枢側で軸索が徐々に狭窄していくのを認めた(図8B)。最後に軸索切断後、縫合の可否について検討した。切断はマイクロ剪刀にて可能であった(図8Db)。切断後12-0ナイロンを用いて軸索鞘の縫合を試みたところ縫合可能であった(図8De,f)。

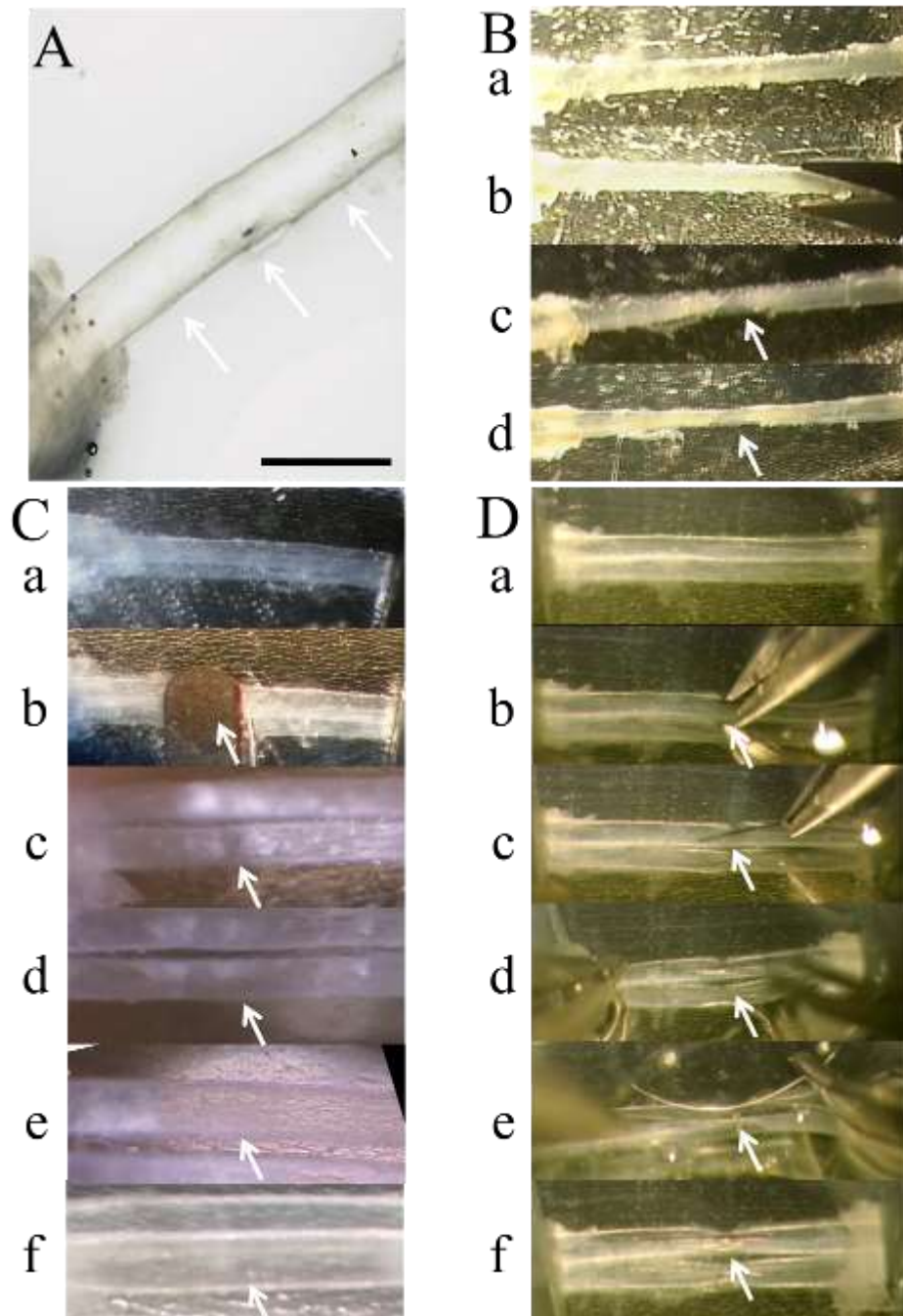


図8 (A) イカ巨大軸索 in vivo 剥離後。Scale bar:1mm, 矢印:巨大軸索 (B) a イカ巨大軸索 in vivo 瘻孔形成前, b マイクロ剪刀にて瘻孔作成, c 瘻孔作成後 1 時間, d 瘻孔作成後 6 時間, 矢印:瘻孔作成部位 (C) イカ巨大軸索 in vivo クランプ a 剥離後, b クランプ中 (一時間), c クランプ解除直後, d クランプ解除後 60 分, e クランプ解除後 6 時間, f クランプ解除後 24 時間 矢印:クランプ部位 (D), イカ巨大軸索 in vivo 切断後軸索鞘再吻合 a; 巨大軸索剥離後, b; 切断 c; intravascular stent (IVaS 6-0) 挿入 d 切断面の確認 e intravascular stent (IVaS) 使用による軸索鞘縫合(12-0 ナイロン), f 縫合後

### 3.5.イカ巨大軸索 in vivo 電気生理学的刺激法および計測法

神経を刺激し、外套筋から筋電図を導出したところ、筋電図波形を認めた(図 9A,B)。

刺激位置を変えた 2 点の筋電図記録波形を比較し、波形までの潜時の差と記録位置の差を元にイカ巨大軸索の伝導速度の計測を行った(図 9C)。7°Cにおいて  $V=11.12 \pm 4.62$  m/sec( $n=6$ ; mean  $\pm$  SD range: 7.15 to 18.75)、15°Cにおいて  $V=19.05 \pm 4.79$  m/sec ( $n=6$ ; mean  $\pm$  SD range: 12.5 to 25) であった(図 9D)。また計測後巨大軸索刺激部位の末梢をクリップにてクランプすると筋肉の収縮を認めなくなり、波形も平坦化した。

$v'=0.62T+7.725$  m/s 7°Cとして  $v=12.065$  m/s、15°Cとして  $V=17.025$  m/s の理論値と比較すると、7°Cではほぼ理論値であるが、15°Cで理論値より 2m/s ほど速かった。15°Cの伝導速度は有意差をもって 7°Cの伝導速度より速かった。(n=6,  $P<0.05$  followed by Student t-tests) クランプ後 5 分でクランプを解除したところ、25m/sec から 18.1m/sec へ伝導速度は低下していたが、軸索機能の回復を認めた(図 9E)。

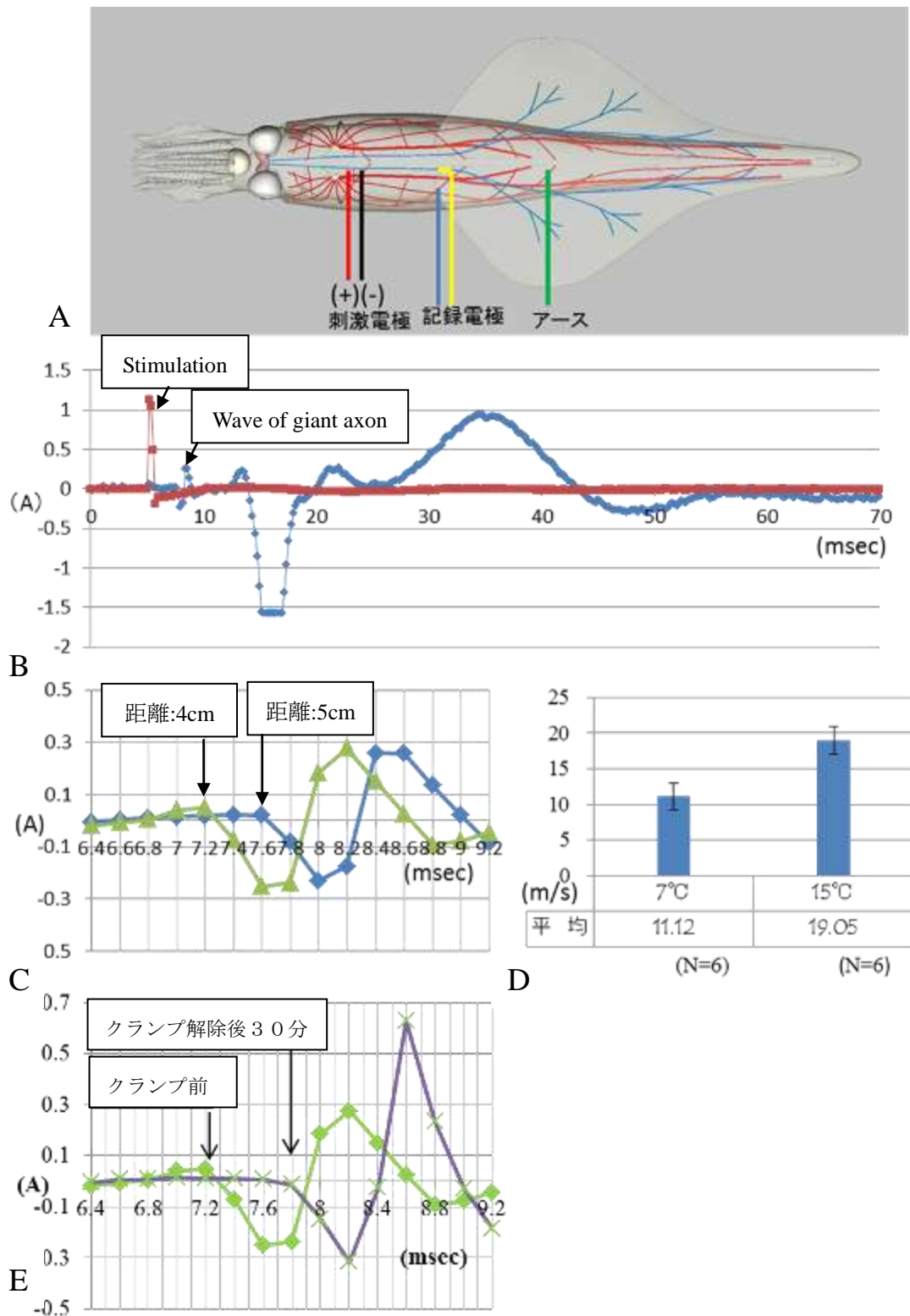


図9 (A)イカ巨大軸索 in vivo 電気刺激および記録法模式図 (B) イカ最内側星状神経 in vivo 刺激時筋電図波形 距離 5 cm 赤線：刺激波形 青線：筋電図波形 (C)イカ巨大軸索 in vivo 筋電図 拡大図 (刺激部位から記録部位までの距離 4 cm と 5 cm) (D)7°C と 15°Cにおけるイカ巨大軸索 in vivo 伝導速度値比較 (E) イカ最内側星状神経 in vivo クランプ前後の巨大軸索筋電図波形変化

### 3.6. 二光子顕微鏡および共焦点顕微鏡によるイカ巨大軸索軸索内輸送の

#### in vivo 観察法

#### 軸索内輸送の観察における蛍光色素の検討

注入後巨大軸索を含んだ SN を採取し、共焦点顕微鏡（Leica Microsystems, SP2,lens:20X.）にて観察した。軸索内には巨大軸索の長軸方向に平行に蛍光斑点を認め、ミトコンドリア、リソソームがそれぞれ確認できた（図 10C）。次に、巨大軸索に MitoTracker を注入したのち採取し、二光子顕微鏡を用いて観察を行った。犠牲死から観察までの時間が充分短い条件では、細かな斑状の粒子が輸送されるのを認めた（図 11）。得られた画像を解析したところ、粒子の大きさは  $1.95\mu\text{m}$  から  $4.86\mu\text{m}$  ( $n=10$ ,  $\text{mean} \pm \text{SD}$ , 中央部:  $1.95\text{--}3.25\mu\text{m}$ 、軸索辺縁部:  $2.33\text{--}4.86\mu\text{m}$ ) 平均粒子径は  $2.87 \pm 0.85\mu\text{m}$  ( $n=10$ ,  $\text{mean} \pm \text{SD}$ , 中央部:  $2.61 \pm 0.47\mu\text{m}$ , 軸索辺縁部:  $3.12 \pm 1.11\mu\text{m}$ ) であった。軸索流は双方向性で軸索辺縁部では  $8.86 \pm 4.34\mu\text{m/s}$  ( $n=5$ ,  $\text{mean} \pm \text{SD}$ )、軸索中央部では  $10.43 \pm 2.70\mu\text{m/s}$  ( $n=5$ ,  $\text{mean} \pm \text{SD}$ ) であり、統計学的有意差は認めなかった ( $p > 0.05$ ) が中央部の軸索流がやや速かった（図 11）。能動的な軸索流であるかどうかを確認するため、既知の薬剤で軸索流を停止・再開できるかどうかを検討した。1%リドカインを添加すると直後に輸送は停止した。海水にて洗浄したところ再度輸送が再開された。しかし時間経過とともに斑点が徐々に集簇し、軸索流が緩やかとなり最終的には流れが停止するのを認めた。



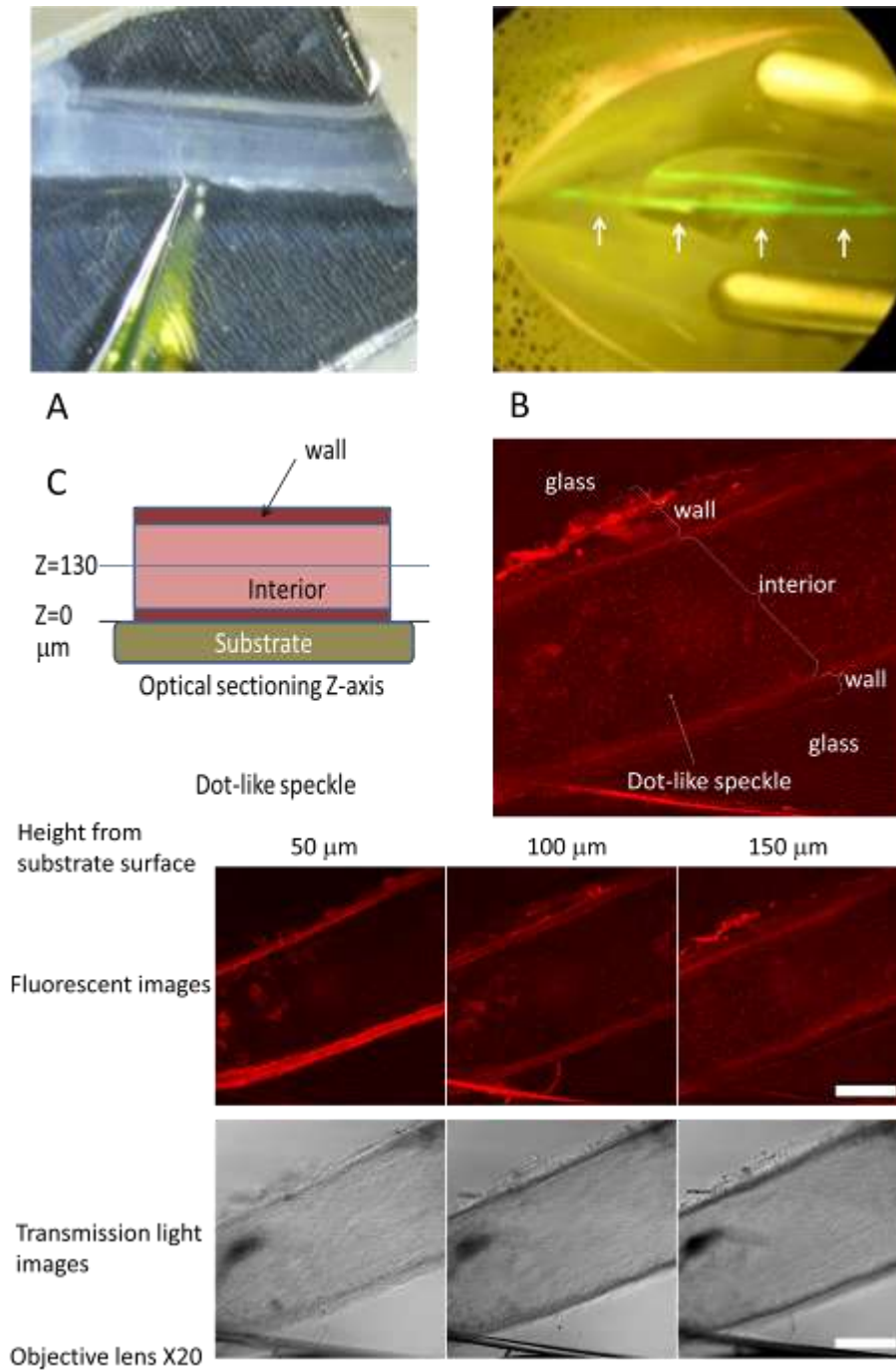


図 10 (A)イカ巨大軸索 *in vivo* 蛍光色素のガラス管によるマイクロインジェクション, (B)イカ巨大軸索 *in vivo* 実体顕微鏡蛍光観察 (二本のうち上側は下敷き鏡反射による), (C)共焦点顕微鏡を用いたイカ巨大軸索 *in vitro* リソソーム観察 (HMRG(100 mM)) Scale bar:200μm



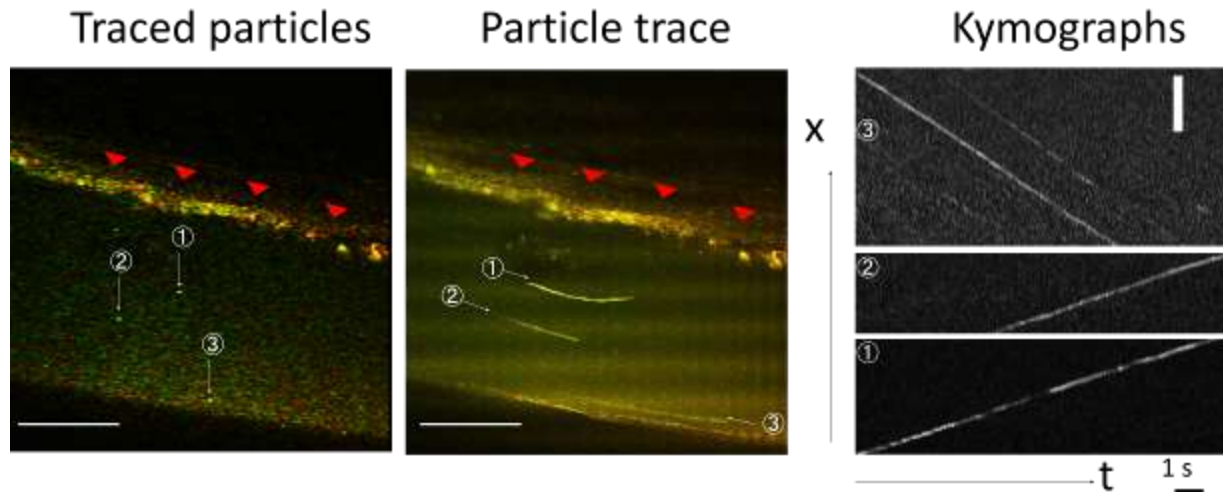


図 11 (A)二光子顕微鏡によるイカ巨大軸索 *in vitro* ミトコンドリア軸索輸送観察 上方：軸索辺縁、赤矢印：巨大軸索外側縁、下方；軸索中央部、①,②：ミトコンドリア順行性軸索輸送、③：ミトコンドリア逆行性軸索輸送 Scale bar: 100 $\mu$ m (B)二光子顕微鏡によるイカ巨大軸索 *in vitro* ミトコンドリア軸索輸送観察(Z projection)、上方：軸索辺縁、赤矢印：巨大軸索外側縁、下方；軸索中央部、→の方向へ輸送 ①,②：ミトコンドリア順行性軸索輸送、③：ミトコンドリア逆行性軸索輸送 white bar: 100 $\mu$ m (13sec) (C) Kymographs ①,②：ミトコンドリア順行性軸索輸送、③：ミトコンドリア逆行性軸索輸送 white scale bar: 50 $\mu$ m

## HVJ の使用による低侵襲的軸索内染色法

HVJ に MitoTracker Green を封入した蛍光色素溶液を作成後、最内側 SN を露出させ、巨大軸索を損傷しないように 0.1ml を神経上膜内に注入した。注入 1 時間後に *in vitro* で軸索内を観察した。巨大軸索内での染色は、直接穿刺と同様に蛍光斑点を認めた(図 12A,12C)。辺縁部に比べ中央部が特に強く染色を認めた。これらの結果から、HVJ を用いてまず MitoTracker による軸索輸送を *in vivo* で観察する方法を採用した。

## 二光子顕微鏡による *in vivo* 軸索内輸送観察法

二光子顕微鏡(Nikon Japan)での *in vivo* イカ観察において、問題点はイカ鎮静と接眼レンズの神経への接着方法であった。そこで二光子顕微鏡の台座に寄せられるイカ水

槽を作成し、先に開発した麻酔法および神経切断法を用いて侵害受容反応なしにイカ外套およびヒレを固定した。次に SN の表層にある外套筋体を接眼レンズのサイズに合わせてすり鉢状に切除した (図 12B)。接眼レンズは水浸レンズ(Nikon PlanApo  $\lambda$  20  $\times$ )を用いた。軸索はイカの外套の動きにより上下運動を一定のリズムで繰り返した。このため軸索内観察はタイムラプスにて画像を再構成し評価することが可能であった (図 12C)。

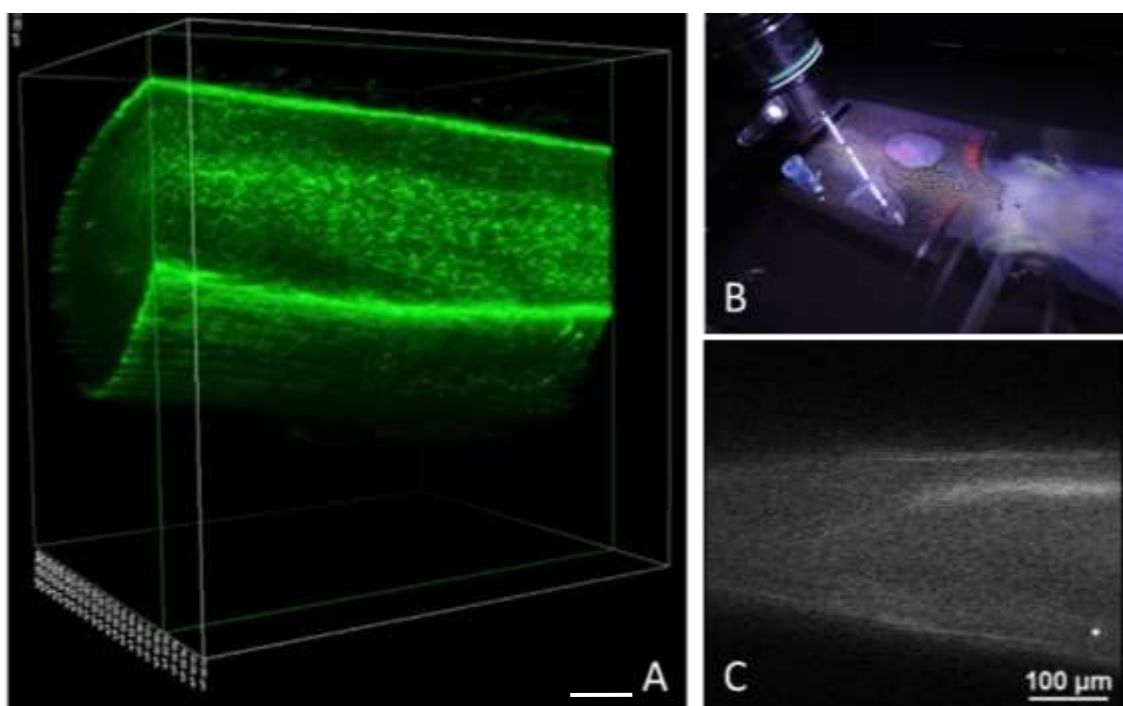


図 12 (A) マイクロインジェクション不要の HVJ と MitoTracker を用いたイカ巨大軸索ミトコンドリア染色と軸索内輸送観察 (二光子顕微鏡) 軸索中心部にミトコンドリアが濃染されている。Scale bar: 100  $\mu$  m (B) in vivo 実験中 : 二光子顕微鏡下にイカ巨大軸索を配置 (C)二光子顕微鏡によるイカ巨大軸索軸索内ミトコンドリア輸送 in vivo 観察

## 考察

### イカ巨大軸索 in vivo モデルの制御

#### イカ麻酔法と運動神経、感覚神経に関する検討

実験を開始した際にはイカの侵害受容反応についての報告はあったが、詳細については不明であった。[25. 26]。しかし実験中イカが激しく暴れ、外套が裂け内腔から内部臓器が飛び出すことが多発し、軸索実験がその時点で継続困難となった。今回イカ巨大軸索 in vivo 実験モデルを作成するため、この原因を解明し、麻酔法を確立させる必要に迫られた。今回の実験の結果から、イカの神経節ブロックおよび神経ブロックにて人間と同様に侵害受容反応抑制効果が得られた[27. 28]。特に 1%キシロカインでは 30 分ほど侵害受容反応抑制効果が得られ、短い時間の手術操作の場合には適している。エピネフリン入り 1%キシロカインでは 100 分ほどの侵害受容反応抑制効果が得られるため複雑な実験をする場合に適している。人では 0.5%, 1%, および 2% リドカインの効果はそれぞれ 14 分, 20 分, 27 分とされている[27. 28]。またエピネフリン入りリドカインは 280 分とされている。リドカインのみの効果時間は人よりもイカにおいて長かったが、エピネフリンの効果は人のほうが延長効果が高かった。

また今回の研究中に SFN を再発見し、これがヒレの感覚神経にとって重要な役割を果たしていることを証明した。今までイカにおいて運動神経と感覚神経を区別するために様々な染色方法や遺伝子導入が検討されてきたが不明な点が多かった[29-32]。今回の発見で、無脊椎動物における哺乳類ともいわれるイカにおいて人と同じような

神経の分類があることが示唆され、また感覚神経線維は、運動神経線維に比べて細い神経である可能性が高いことが分かった。またヒレ神経の運動および感覚神経の走行を哺乳類と比較した場合、哺乳類の後根および後根神経節の形態に類似していることが考えられた。これらにより侵害受容反応を含む知覚に関する生物の進化についても検討が可能となる。またこの麻酔法は、イカに関する神経科学のみならず生理学的研究を行う際や様々に応用できる貴重な発見である。

最大の成果は星状神経節に中枢からつながる **mantle connective** を切断しさえすれば、片側体幹部ヒレの完全知覚脱失が得られ、イカの巨大軸索を完全な鎮静下に剥離挙上することができ、イカ巨大軸索 **in vivo** 観察モデルを確立したことである。このことは今後の神経科学において有意義と考える。また知覚神経と運動神経を区別できることは、将来的に、巨大軸索から細い神経を軸索鞘接合または軸索融合するにあたって重要である。人の神経は  $5\mu\text{m}$  ほどであるが、イカの細い神経の平均直径は  $10\text{--}15\mu\text{m}$  でありやや太く、かつこれらの細い軸索も無髄神経であるため、有髄神経のようにミエリン形成やランビエ絞輪の再構築を考慮せずに、神経の機能再構築を確認できる。巨大軸索のみならずこの細い軸索も軸索実験モデルとして有用である。感覚神経軸索と運動神経軸索が軸索鞘接合または軸索融合した場合にどのような事象が起こるかについての検討も臨床応用前に必要である。このことを検討する際には、今回明らかとなった **FNp** と **SFN** を用いて、同じ術野でヒレの運動神経 (**FNp**) と感覚神経 (**SFN**) を分離し、これらを融合させる実験を行うことで、どのような変化が起こりうるかを

検討することができる。

### イカ巨大軸索 *in vivo* 剥離法および直視下観察法の開発

今まで、*in vivo* でのイカ神経実験法は存在せず、巨大軸索を採取する場合、腹側から大きく切開した状態で巨大軸索を剥離同定し、切離した上で採取しており、*in vivo* での実験は不可能であった[33]。これに対し、イカの神経解剖を再度詳細に検討し、ヒレ神経孔を目印に巨大軸索に確実に到達する方法を考案した。この方法では巨大軸索を傷つけることなく *in vivo* で神経節からヒレ付着部まで最長約 5 cm の巨大軸索を露出させることが可能となった。さらに軸索実験において巨大軸索クランプ、瘻孔作成、軸索鞘縫合の技術を用いて *in vitro* と *in vivo* の機能回復における比較を行うことで新たな知見が得られると考えられる。

### イカ *in vivo* 筋電図測定法の開発

Du Bois-Reymond が 1843 年にすでに神経と筋肉に発生する電流を発見して以来、神経の電気現象の研究は多く報告されている[23]。イカ筋電図については、1970 年代に施行され、Hodgkin、Huxley らによって神経の情報伝達機構の解明がこの電気生理学的手法とその理論によって進められた[22-24, 33]。

これらはすべて *in vitro* で行われていたが、*in vitro* での実験は、軸索内灌流のため原形質はローラー圧出や、吸引およびたんぱく分解酵素による酵素法での溶解によって実験前に除去され、人工溶液を流すことが必須であった[23]。この方法では、最長 24 時間までの実験が可能と言われている。しかし細胞内構造を除去しており、軸索のみ

を取り出した状態で、細胞骨格および神経機能が再構築されることは不可能であり、軸索鞘接合や軸索融合による機能回復を確認することは不可能なモデルであった[23]。そこで軸索内灌流をすることなく、*in vivo* でのデータを採取し、*in vitro* でのデータと比較検討する必要があった。

そこで *in vivo* 軸索観察法を用いて軸索を露出させ、シリコン白金電極により軸索に負荷をかけることなく 7°C と 15°C における計算値より神経伝達速度を算出した[34]。その結果 15°C で理論値よりやや速かったが 7°C ではほぼ理論値であり伝導速度に関しては *in vivo* と *in vitro* で同じであり、*in vitro* のデータを今後参考として使用できることがわかった。さらに巨大軸索を用いた神経遮断モデルでは、電気生理学的にどのような変化が起こるかを継続的に観察が可能である。将来的には軸索融合後の機能回復を筋電図を用いて観察するモデルとなることが示された。

### 軸索形態および軸索内輸送の観察

神経の軸索輸送は 1920 年に Matsumoto らが培養交感神経のミトコンドリアをヤヌス黒で染色し移動速度を観察して以来多くの試みがなされてきた[41]。様々な方法を用いて、軸索輸送は神経線維の伸長やシナプス形成、神経伝達物質の放出、受容体発現など神経細胞の形態形成や機能の大部分に深くかかわっていることが明らかにされてきた[42]。その観察法を大別すると、放射性物質で標識した物質の動きを測定する間接法と軸索輸送を顕微鏡で直接観察する直接法がある。

McEwen らは放射性物質の細胞内注入後、軸索末端にて貯留した放射活性タンパク

質を検出することにより軸索輸送速度を測定した[43]。この計測により順行性軸索輸送は 400 mm/day および数 mm/day であったと報告されている[43]。逆行性輸送は 250 mm/day とされている。このことから anterograde fast flow/slow flow と retrograde slow flow の輸送があることが明らかとされてきた。しかし放射性物質を用いる場合、投与した物質が血中を介して輸送される可能性があること、前駆物質そのものの輸送や投与物質の漏れなどによるアーチファクトが生じることなどの欠点がある[42]。

これに対し、顕微鏡下の観察は、生きた軸索を観察することができ軸索輸送をリアルタイムに観察可能となる。1948 年 Weiss らによって軸索を圧迫するとその中枢側に物質が蓄積し、圧迫を解除するとそれらが末梢側に移動することが報告された[44]。さらに Tsukita と Ishikawa らによって電子顕微鏡を用いた輸送軸索遮断法によって順行性の小胞体や管状構造が、逆行性の多胞体、リソソームなどの輸送物質の観察同定法が報告されてきた[45]。しかしこの方法では蓄積した物質の蓄積量で計算するため反転した移動分があり輸送速度を正確には求められない[42]。

これに対し、Allen らは video-enhanced contrast-differential interference contrast 法(VEC-DIC 法ビデオ増感顕微鏡法)によって細胞が生きた状態で観察できることを報告し、軸索内の微小管に沿って物質が輸送されていることが証明された[46]。これは光学顕微鏡で得られた動画を元にコンピュータ処理にて高倍率に拡大できるシステムである。このシステムを用いて Allen および Vale らは、モータータンパクを発見した[46-48]。その際使用した実験動物がイカであった。彼らはイカの前駆物質のみをスライドグラス

の上に採取し、これを VEC-DIC 法にて観察することで、粒子が微小管に沿って移動するのを発見した。この粒子を動かすためにモーター蛋白があり、またこの動きに ATP が必要であることを証明した[47]。そしてこれをキネシンと名付けた[48]。この際の移動する粒子のスピードは、 $2.2 \pm 0.2 \mu\text{m/s}$  と報告している。比留間らは培養神経を用いてこの方法にさらに Rhodamin123 で染色したミトコンドリアを観察する実験を行った[42]。この結果ミトコンドリアは、軸索内で順行性と逆行性の両方向に輸送され、順行性は  $0.55 \pm 0.11 \mu\text{m/s}$  で輸送され、逆行性は  $0.60 \pm 9.10 \mu\text{m/s}$  であった[42]。また順行性輸送されるミトコンドリアの 10%が途中で反転することが示唆された。逆行性輸送では反転されない。また順行性に輸送されたミトコンドリアは分裂して逆行性輸送に代わることも示唆されている。しかしこの VEC-DIC 方法は、投射型顕微鏡を用いるため、イカを利用する場合、軸索を取り出し *in vitro* で実験する必要があった。最終目的である軸索鞘接合および軸索融合を、細胞体として機能的な再疎通すなわち軸索輸送の再開を確認するためには *in vivo* での軸索輸送観察が必須であった。

このため *in vivo* で顕微鏡下に軸索内特定の物質輸送の動態を解析するには、観察に際して蛍光色素の使用が必須であると考えた。今回さまざまな蛍光タンパクを用いてイカ軸索内輸送の観察に臨み、ミトコンドリア染色に MitoTracker, リソソーム染色には HMRG を用いて、イカにおいてもラットなどと同様軸索輸送を確認できることが明らかとなった。今回の観察により統計学的有意差はなかったが、中心部が速い輸送を担い、辺縁はやや緩やかな流れであることが観察された[49]。



今回の軸索輸送速度に関する検討では、過去に報告された fast flow の輸送速度 (400mm/day) やミトコンドリアの輸送速度(0.55 $\mu$ m/s)に比べ速い輸送速度が示唆された[47]。モータータンパクの速度に関しては、ウサギ腸腰筋のミオシン II の速度が 8 $\mu$ m/s, シャジクモの原形質流動に係わるミオシンモーター-の速度が 60 $\mu$ m/s との報告もある[50]。細胞骨格は一般的にポリマーになった後は移動しないと言われているが、微小管が細胞体から軸索内に細胞質ダイニンにより送り出されるとの報告もある[51]。速さの違いは in vitro と in vivo の違いによるのか、またはほかに原因があるかについては今後の検討が必要である。

近年、サイトフルオロメトリーやレーザー共焦点顕微鏡でスキャンして軸索輸送を解析する方法も報告されている[42]。今回の実験において蛍光色素の染色可否についての検討には、レーザー共焦点顕微鏡を用いた。さらに退色や時間的制約を考慮し、二光子顕微鏡を使用したところ、退色少なく長時間の観察が可能であることがわかった。軸索傷害時の軸索内容の流出も確認可能であることが明らかとなった。二光子顕微鏡を用いて in vivo で巨大軸索を観察できるようにしたことで、周囲の細い軸索を剥離除去して巨大軸索を露出することなく観察が 1 mm の深部まで可能となり、低侵襲で自然に近い形の神経軸索内輸送の観察が可能となった。いままで細い軸索径の神経を二次元で観察してきた軸索内輸送が、巨大軸索を in vivo で観察できることで三次元的にまた経時的に確認できるようになった。

今まで軸索への染色は、微小ガラス管を用いた薬剤の軸索直接穿刺であったが、軸

索への侵襲および傷害の原因となりうることが少なからず認められた。短時間の実験であればこの傷害も軽微なものであるが、軸索鞘接合および軸索融合後の軸索輸送の再構築を観察する実験モデルとするには、できるだけ軸索への傷害を減らすことが重要であった。このため、細胞融合法に用いる HVJ を用いて蛍光色素の埋入法を試み、MitoTracker による染色が確認できた。直接穿刺することなく巨大軸索内に蛍光色素染色が可能であることが明らかとなった。最近では注入以外にリポフェクションによる遺伝子導入法もあるが、不活化したセンダイウィルスエンベロープに蛍光色素を封入するだけで、軸索鞘接合および軸索融合後の軸索輸送を煩雑な操作や機械的損傷なしに観察することが可能となった。

今後さらに、二光子顕微鏡による Second Harmonic Generation イメージング法を応用して軸索内の微小管も同時に描出可能になれば、軸索鞘接合および軸索融合後の微小管修復過程とミトコンドリアの修復への関与に関する新たな知見が得られる可能性がある[52]。

### 軸索鞘接合に向けた今後の展望と課題

今後はまずこのモデルを利用して軸索クランプによる軸索輸送の途絶後変化と、再開通による軸索内細胞骨格の再構築と神経機能回復過程を確認する。これにより未だ不明であるイカの Waller 変性が起こるタイミングについて検討する。次に切断後軸索鞘接合による neurotmesis から axonotmesis への改善について検討するため、切断された軸索の軸索鞘縫合後の再生過程を明らかにする。最終的には neurotmesis の段階か

ら neurapraxia の段階へ改善させる新しい治療法開発に向けて軸索融合法を確立することを目指す予定である。

ただしイカの巨大軸索は無髄神経であり、人の運動神経や感覚神経のような髄鞘のある有髄神経での検討が今後必要である。しかし、軸索融合治療という戦略は neurotmesis の状態を neurapraxia の状態へ改善させることを目標にしている。有髄神経の Neurapraxia は、圧迫などによって軸索は保たれるがミエリン鞘が部分的に脱髄した状態であり、脱髄後再ミエリン化により数時間から数か月で回復する[53.54]。このことから有髄神経を軸索融合できた場合、イカの巨大軸索の軸索融合による機能回復より再ミエリン化に要する時間分だけ余分に回復までの時間を要する可能性があるのではないかと考えている。

自然界において、線虫では軸索が切断された場合、24 時間以内に切断された軸索末梢を中枢側が認識して自然に融合を起こすことが報告されている[2]。このような自然に軸索融合が起こらない人間を含めた動物において、軸索鞘や神経軸索をつなぐ方法の一つとして細胞融合法がある。細胞融合法には、電気的、化学的、生物学的な手法がある。電気的細胞融合法は、電気パルスを一時的に軸索表面に当てて瘻孔を形成する[55. 56]。この瘻孔同士が点で接触している場合に二点の軸索同士に密着および融合が起こる。Zimmermann らや Wesley C. Chang らはこの方法を用いて培養細胞で GFP シグナルがもう一方の軸索内末梢に広がる現象を報告している[55.56]。次にポリエチレングリコール(PEG)を用いた科学的細胞融合法では 1986 年 Bittner らが in vitro

で crayfish の軸索を切断後、軸索膜を融合したと報告している[57]。また Shi らは、PEG を用いた坐骨神経や脊髄圧挫後の神経修復を報告している[58, 59]。他にレーザーやウィルスを用いて融合させる生物学的細胞融合法も報告されている[60-62]。

今回確立したイカ巨大軸索 in vivo 実験モデルを用いて、in vivo にて軸索を切断後軸索鞘接合または軸索融合し、神経トレーサーによる軸索内構造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。これにより軸索再構築を確認し、軸索早期再生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たな神経再建治療が開発できる可能性がある。これにより臨床的に現在是不可能である顔面神経麻痺や四肢麻痺などの自然な表情や四肢の巧緻機能をふくめた即時機能再建が可能となる。移植と神経再生技術とを組み合わせることで脊椎損傷後機能回復さらには顔面移植や眼球移植などの今までの技術では難しい中枢神経系神経損傷に対しても応用でき、革新的な即時神経機能回復治療につながると考えられる。この目的を達成することは、数 mm の血管・神経を扱うマイクロサージェリーから数  $\mu\text{m}$  の軸索を扱うナノサージェリーへと現代医療の大きな転換点となる。

## 結論

軸索鞘接合による神経軸索即時再建のためのイカ巨大軸索 in vivo 実験モデルを確立した。このモデルによって、単一軸索の軸索内輸送を可視化し、さらにその神経機能を筋電図にて評価することが可能となった。これは軸索鞘接合および軸索融合法の開発のみならず、今後幅広く神経科学に利用できる有用な実験モデルである。

## 参考文献

1. Augustus W; Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 140: 423-429, 1850.
2. Neumann B, Nguyen KCQ, Hall DH, Ben-Yakar A, Hilliard MA; Axonal regeneration proceeds through specific axonal fusion in transected *C. elegans* neurons. Dev. Dyn 240:1365-1372, 2011.
3. Harel NY, Strittmatter SM; Can regenerating axons recapitulate developmental guidance during recovery from spinal cord injury? Nat Rev Neurosci 7: 603–616, 2006.
4. Neumann S, Woolf CJ; Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury. Neuron 23: 83–91, 1999.
5. Neumann S, Bradke F, Tessier-Lavigne M, Basbaum AI; Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. Neuron 34:885–893, 2002.
6. Hammarlund M, Nix P, Hauth L, Jorgensen EM, Bastiani M; Axon regeneration requires a conserved MAP kinase pathway. Science 323:802–806, 2009.
7. Yiu G, He Z; Glial inhibition of CNS axon regeneration. Nat Rev Neurosci 7: 617–627, 2006.
8. Pasterkamp RJ, Anderson PN, Verhaagen J; Peripheral nerve injury fails to induce growth

of lesioned ascending dorsal column axons into spinal cord scar tissue expressing the axon repellent Semaphorin3A. *Eur J Neurosci* 13: 457–471, 2001.

9. Ghosh-Roy A, Chisholm AD; *Caenorhabditis elegans*: a new model organism for studies of axon regeneration. *Dev Dyn* 239:1460–1464, 2010.

10. Koshima I, Kiyonori H; Experimental study of vascularized nerve grafts: morphometric study of axonal regeneration of nerves transplanted into silicone tubes. *Annals of plastic surgery* 14: 235-243, 1985.

11. Holmes W; The repair of nerves by suture. *J Hist Med Allied Sci* 6:44-63,1951.

12. 橋川和信; 神経修復に関わる手術手技 1 末梢神経縫合 *PEPARS*78: 16-22, 2013.

13. Koshima I, Kiyonori H; Experimental study of vascularized nerve grafts: Multifactorial analyses of axonal regeneration of nerves transplanted into an acute burn wound. *The Journal of hand surgery* 10: 64-72, 1985.

14. Terzis JK, Magnus EN; Analysis of 100 cases of free-muscle transplantation for facial paralysis. *Plastic and reconstructive surgery* 99:1905-1921,1997.

15. Harii K, et al; Free gracilis muscle transplantation, with microvascular anastomoses for the treatment of facial paralysis: A preliminary report." *Plastic and reconstructive surgery* 57: 133-143,1976.

16. Takushima A, et al; "Fifteen-year survey of one-stage latissimus dorsi muscle transfer for treatment of longstanding facial paralysis." *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic*

Surgery 66:29-36, 2013.

17. 柏克彦編; 神経修復法—基本知識と実践手技—PEPARS : 78 2013.
18. Sasaki R, et al; PLGA artificial nerve conduits with dental pulp cells promote facial nerve regeneration. Journal of tissue engineering and regenerative medicine 5: 823-830, 2011.
19. Uemura T, et al; Transplantation of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres for peripheral nerve repair. Biochemical and biophysical research communications 419: 130-135, 2012.
20. Leonard WW; The anatomy of the common squid .Leiden-Holland, Library and Printing-Office late. E.J. Brill, 1909.
21. Sereni E, Young JZ; Nervous degeneration and regeneration in Cephalopods. Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli 12: 176-208, 1932.
22. Hodgkin AL, Huxley AF; Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. J Physiol 116:449–472, 1952.
23. Gen M; The phenomenon and reality of neural excitation Chapter 3 the electrical phenomenon of neural excitation. Shingo Iizumi.37–108, 1981.
24. Tasaki I, Takenaka T; Resting and action potential of squid giant axons intracellularly perfused with sodium-rich solutions. Proc Natl Acad Sci U S A 50:619–26, 1963.
25. Crook RJ, Hanlon RT, Walters ET; Squid have nociceptors that display widespread long-term sensitization and spontaneous activity after bodily injury. J Neurosci

33:10021–10026, 2013.

26. Cooper JE; Anesthesia, analgesia, and euthanasia of invertebrates. ILAR J 52:196–204, 2011.

27. Berde CB, Strichartz GR; Local Anesthesia: Miller's Anesthesia 7th edition: 913–939, 2009.

28. Wiedling VS; Xylocaine. Anesthesist. 119 –126, 152. 1952

29. Sakaue Y, Bellier JP, Kimura S, D'Este L, Takeuchi Y, Kimura H; Immunohistochemical localization of two types of choline acetyl transferase in neurons and sensory cells of the octopus arm: Brain Struct Funct. 219:323–341, 2014.

30. Buresi A, Croll RP, Tiozzo S, Bonnaud L, Baratte S; Emergence of sensory structures in the developing epidermis in *sepia officinalis* and other coleoid cephalopods. J Compar Neurol 522:3004–3019, 2014.

31. Sato C, Hirota K, Matsumoto G; Neuronal specificity of subtype SQSC1 of squid putative sodium channel. Biochem Biophys Res Commun 26:807–813, 1995.

32. Rosenthal JJ, Gilly WF; Amino acid sequence of a putative sodium channel expressed in the giant axon of the squid *Loligo opalescens*. Proc Natl Acad Sci USA 90:10026–10030, 1993.

33. Webb DA, Young JZ; Electrolyte content and action potential of the giant nerve fibres of *loligo*. The Journal of physiology 98: 299–313, 1940.



34. Joshua JCR, Francisco B; Seasonal Variation in Conduction Velocity of Action Potentials in Squid Giant Axons. *Biol.Bull.* 199:135-143, 2002.
35. Feng Y, Schlosser F, Sumpio B; The Semmes Weinstein monofilament examination as a screening tool for diabetic peripheral neuropathy. *J Vasc Surg* 50:675–682, 2009.
36. Jeng C, Michelson J, Mizel M; Sensory thresholds of normal human feet. *Foot Ankle Int* 6:501–504,2000.
37. Urso-Baiarda F, Grobbelar AO; Practical nerve morphometry. *J Neurosci Methods.*156:333-341, 2006.
38. Hanlon RT, Maxwell MR, Shashar N, Loew ER, Boyle, KL; An Ethogram of Body Patterning Behavior in the Biomedically and Commercially Valuable Cephalopod *Loligo pealei*. *Biol Bull* 197:49–62, 1999.
39. Anderson EJ, Demont E; The locomotory function of the fins in the cephalopod *Loligo pealei*. *Mar Freshwat Behav Physiol* 38:169–189, 2005.
40. Andrews PLR, Darmaillacq AS, Dennison N, Gleadale IG, Hawkins P, Messenger JB, Osorio D, Smith VJ, Smith JA. The identification and management of pain, suffering and distress in cephalopods, including anesthesia, analgesia and humane killing. *J Experim Mar Biol Ecol* 447:46–64, 2013.
41. Matsumoto T; The granules, vacuoles and mitochondria in the sympathetic nerve-fibers cultivated in vitro. *Johns Hopkins Hosp Bull* 31: 91-93, 1920.

42. 比留間弘美 片倉隆 川上倫; 軸索輸送の測定. 脳神経 50:703-710,1998.
43. McEwen BS, Bernice G; Fast and slow components in axonal transport of protein. The Journal of cell biology 38 : 494-508,1968.
44. Weiss P, Helen BH; Experiments on the mechanism of nerve growth. Journal of experimental zoology 107: 315-395, 1948,
45. Tsukita S, Harunori I; The movement of membranous organelles in axons. Electron microscopic identification of anterogradely and retrogradely transported organelles. The Journal of cell biology 84: 513-530, 1980.
46. Allen RD, Nina SA, Jeffrey LT; Video - enhanced contrast, differential interference contrast (AVEC - DIC) microscopy: A new method capable of analyzing microtubule - related motility in the reticulopodial network of allogromia laticollaris. Cell motility 1: 291-302, 1981.
47. Vale RD, Schnapp BJ, Reese TS, Sheetz MP; Movement of organelles along filaments dissociated from the axoplasm of the squid giant axon. Cell 40:449-454, 1985.
48. Vale RD, Reese TS, Sheetz MP, Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. Cell 42:39-50, 1985.
49. Jolla L, Blount P, Rodriguez M; Fast Axonal Transport in Squid Giant Axon. Science218:1980-1982, 1982.
50. 豊島至; axon の物質輸送機構. 脳神経 50:691-702, 1998.

51. AhmadFJ, Echeverri CJ; cytoplasmic dynein and dynactin are required for the transport of microtubules into axon. *J Cell Biol* 140:391-402, 1998.
52. Kwan AC, Dombeck DA, Webb WW; Polarized microtubule arrays in apical dendrites and axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 11370-11375, 2008.
53. William WC; Evaluation and management of peripheral nerve injury *Clinical Neurophysiology* 119:1951-1965, 2008
54. Dianna Q, Shawin JB; Nerve Conduction Studies and Electromyography in theEvaluation of Peripheral Nerve Injuries. *The University of Pennsylvania Orthopaedic Journal*12: 45-51, 1999
55. Zimmermann U; Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. *Reviews in Physiology, Biochemistry, Pharmacology* 105:175–256, 1986.
56. Chang WC, Hawkes E, Keller CG, Sretavan DW; Axon repair: surgical application at a subcellular scale. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2:151-161. 2010.
57. Bittner G, Ballinger M, Raymond M; Reconnection of severed nerve axons with polyethylene glycol. *Brain Res* 367:351-355, 1986.
58. Donaldson J, Riyi S, Richard B; Polyethylene glycol rapidly restores physiological functions in damaged sciatic nerves of guinea pigs. *Neurosurgery* 50: 147-157, 2002.
59. Shi R, Borgens RB; Anatomical repair of nerve membranes in crushed mammalian spinal cord with polyethylene glycol. *Journal of neurocytology* 29: 633-643, 2000.

60. Suzuki K, et al; Reconstituted fusion liposomes for gene transfer in vitro and in vivo. Gene Therapy and Regulation 1: 65-77, 2000.
61. Dutch RE, Theodore SJ, Robert A; Lamb. Virus membrane fusion proteins: biological machines that undergo a metamorphosis. Bioscience reports 20: 597-612 , 2000.
62. Ohkohchi N, et al; New technique for producing hybridoma by using laser radiation. Lasers in surgery and medicine 27: 262-268, 2000.

## 謝辞

本研究において、東京大学医学部形成外科の光嶋勲教授には、当教室の教授として研究のご指導、ご支援をいただきました。深く感謝の意を表します。研究の立案、実験手技、論文執筆まで、さまざまな面においてご指導、ご鞭撻をいただきました東京大学医学部耳鼻咽喉科近藤健二先生および松本有先生に深く感謝の意を表します。また、東京大学工学部バイオエンジニアリング 鷲津正夫教授、ケネディオケヨ先生、黒澤修先生には、研究手技や内容について実験初期から貴重なご意見およびご指導をいただきました。また、鈴鹿医療科学大学 薬学部 西村嘉洋教授には電気生理学的研究手技や研究内容についてご指導をいただきました。北海道大学水産学部桜井泰憲教授、水産総合研究センター高原英生先生、JAMSTEC 滋野修一先生および鳥羽水族館辻晴仁氏には、イカの飼育から生態に関する知識と技術についてご指導いただきました。また、浦野泰照教授 神谷真子先生 関山裕詩教授 伊藤伸子先生には研究執筆において貴重な蛍光色素のご提供など多大なるご助力、ご意見ご指導をいただきました。この場を借りてお礼申し上げます。また研究にご協力いただきました大政直也氏、宮川大輝氏 上田和毅先生 Gerhard Mundinger 先生 鈴木健太氏にお礼申し上げます。研究執筆において多大なるご協力をいただきました成島知里先生、高橋忍先生 高橋久美子氏 成島有史氏 成島順子氏に改めて感謝の意を表したいと思います。