

論文の内容の要旨

論文題目：

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

氏名： 成島三長

【背景】

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。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。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。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、さらに血管付き神経移植法など高度な治療法が開発されてきた。しかしこれらの方法においても、自然な表情や、満足いく十分な四肢機能を回復するレベルにまでは至っていない。現在の神経再生研究の治療戦略は、損傷された神経が十分に再成長し、元の神経支配を再度適切に得ることである。近年、人工神経管の開発や神経伸長因子の投与および iPS 細胞移植などが提案されているが、現状を打破するには至っていない。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癒痕化し再生軸索数が制限されることである。そこで中枢からの神経再生を待つ発想を転換し、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開発し、早期機能回復さらには早期神経細胞修復を目指すことにした。

これらを検討するにあたり、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モデルを作成することが必要であると考えた。さらに、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と考えた。

イカの巨大軸索は、一本の軸索直径が 500 μ m-1000 μ m の無髄神経であり、顕微鏡下に操作可能な太さである。また、ミエリン鞘の再生について検討しなくてもよい。電気生理学的実験においては *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の蓄積があった。これらを基に軸索実験を *in vivo* で行うことにより神経回復過程を経時的に追跡できるモデル動物として最適であると考え、イカ巨大軸索 *in vivo* モデルを確立することとした。

【方法】

はじめにイカの神経走行や神経の太さ・種類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の開発を検討した。さらにイカの新たな麻酔法を考案し、イカ侵害受容経路についても von Frey test を用いて検討することにした。

これらをもとに、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測定法、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* 観察法の開発および検討を行った。

【結果と考察】

実験装置はイカ一匹が入ることを前提に設計した。十分な濾過と温度管理が出来、イカ一匹が適度に一方向に動ける実験装置が完成した。組織学的検討では、外套長 20-35cm の adult ヤリイカにおいて最内側星状神経の巨大軸索直径は近位にくらべ遠位で有意に細かった。

実験を安定的に進めるため、イカの星状神経節ブロックおよび神経ブロックを考案し、人と同様に鎮痛効果が得られた。特に 1%および2%リドカイン麻酔後の平均麻酔効果持続時間は、 58.5 ± 6.05 分 と 37.5 ± 3.69 分であった。またエピネフリン入り 1%リドカインによる平均麻酔効果持続時間 102.5 ± 3.46 分であった。

また今回の研究中に stellate fin nerve (SFN)と名付けたヒレ神経と星状神経の間にある神経を検討したところ、SFN がヒレの感覚を司る重要な役割を果たしていることが明らかとなった。これにより mantle connective という神経を切断することで巨大軸索を *in vivo* で侵害受容反応なしに操作することが可能となった。イカの背側に存在するヒレ神経孔を同定の上、逆行性にヒレ神経に沿って外套を切開し、ヒレ神経と合流する星状神経内の巨大軸索を剥離同定に成功した。さらに薄いプラスチック製の鏡を背景として使用することで星状神経内の巨大軸索が *in vivo* で鮮明に識別可能となった。これによりイカ巨大軸索 *in vivo* 実験モデルを確立することができた。

さらにイカ巨大軸索の筋電図を 7°Cおよび 15°Cにおいて *in vivo* にて計測し、得られたデータから伝導速度を算出した。理論値と比較すると、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* で同じであった。今回のデータが、過去に報告されている *in vitro* での伝導速度と同等であったことによって、この *in vivo* 実験モデルが軸索鞘接合および軸索融合後の機能回復を観察するモデルとして適切であることが示された。

また共焦点蛍光顕微鏡および二光子顕微鏡を用いて、イカ軸索内の蛍光染色物質輸送の観察について検討した。染色液を巨大軸索内に注入し、*in vitro* で観察した。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軸索輸送の観察が可能であることが示された。これらを確認後、イカ巨大軸索 *in vivo* での観察について検討した。外套背側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、巨大軸索を退色少なく長時間観察できることがわかった。1 mmの深部まで観察ができ、低侵襲で自然に近い形の軸索内輸送観察が可能となった。イカの呼吸性変動のため軸索内観察は time-lapse にて画像を再構成する必要がある今後の検討課題である。二光子顕微鏡の利点である 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、微小管と軸索輸送物質を同時に観察でき新たな知見が得られる可能性がある。

今後、軸索輸送の途絶変化と軸索内輸送の再構築と神経機能回復過程をこのモデルを利用して確認後、最終的に軸索鞘接合および軸索融合法の確立を目指す。

【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ながら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。この実験モデルを用いて、*in vivo* で巨大軸索を切断後、軸索鞘接合または軸索融合を行い、神経トレーサーによる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新たな神経軸索即時治療法が開発できる可能性がある。ま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になると思われる。