

マイスナー小体の発生過程についての考察（第3報）

○PHAM QUANG TRUNG, 星 貴之, 田中 由浩, 佐野 明人 (名古屋工業大学)

Consideration of Generation Process of Meissner Corpuscle (3rd Report)

○PHAM QUANG TRUNG, Takayuki HOSHI, Yoshihiro TANAKA and Akihito SANO (NITech)

Abstract: We purpose to reproduce Meissner corpuscles artificially. In order to do that, it is necessary to make a deep research about the generation process. Previous studies revealed that the generation of Meissner corpuscles in mice starts on the 2nd postnatal day and ends on the 25th day. This implies Meissner corpuscles in mice are more accessible objects compared to ones in primates. In this article, we observe Meissner corpuscles in fingers of mice younger than 13 days old.

1. 緒言

マイスナー小体の構造と触知覚との関係についてはこれまでに理論解析や数値解析がなされている。実物は皮膚の中に埋もれており、また微細であるため、取り出して物理的な特性などを直接観察することは困難である。そのため未解明な点も多く残されている。

この課題に対して、我々は細胞工学を用いてマイスナー小体を皮膚の外において人工的に再現することを提案している。また精度よく再現するための準備として、生体内におけるマイスナー小体の発生過程を調査している。

マウスのマイスナー小体は生後 2 日目 (P2) から発生が始まり、25 日までに完了することが報告されている[2]。発生段階の初期には一本の無髄神経軸索が真皮乳頭に入り、その後らせん形状をなす [4][5] (Fig.1)。続いて数本の軸索が入り込み、マイスナー小体が完成する。軸索がらせん形状をなす機序については未解明であり、我々はその解明を目指している。

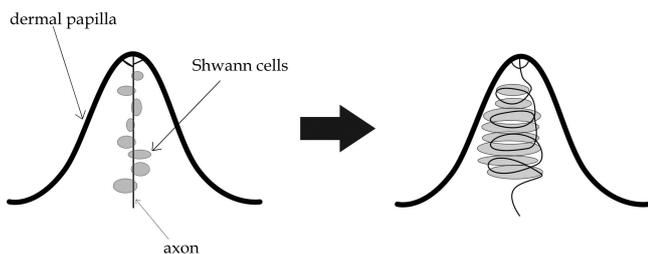


Fig. 1 Transformation of 1st axon.

マイスナー小体の観察は、サルあるいはマウスの指断面を染色し、顕微鏡で二次元構造を観察する方法がよく用いられている[4][5]。それで得られるのは真皮乳頭を一方からみた空間情報のみであり、奥行方向の形状については知ることができない。らせん形状を把握するには立体形状を観察できることが望ましい。

前報[1]では、断面をとることなく、後根神経節から染料を神経軸索に注入し、多光子顕微鏡で三次元構造を観察する方法について提案・考察した。ただしこの手法は、皮膚組織の透明化が必要であり、また染料が背中から指先端まで到達するか未確認である。

マウスのマイスナー小体の直径は 10-20 μm 程度である[2]。標本切片の厚さを 30 μm 程度とすれば、これにマイスナー小体全体が含まれる可能性がある。この厚さであれば共焦点顕微鏡により三次元構造を観察することが可能である[3]。この手法を用いて、発生過程を 1 日おきに観察した。対象期間は P4-P13 とした。神経細胞マーカー PGP9.5 を用い、共焦点顕微鏡によって神経軸索の分布を蛍光観察した。

本稿では、上記の観察結果について報告する。またマイスナー小体の分布には特徴的なパターンが見られた。これと発生過程との関係について考察する。

2. 観察方法

2.1 切片準備

ICR マウスの新生児 8 匹を PFA 溶液で固定した(灌流固定)。心臓の下側から注射針を差し込み、マウスの大きさに応じて数秒から 2-3 分間 PFA を流し入れた。右前肢中指を切り離し、20%スクロースにより置換した。OCT compound に包埋し、液体窒素により凍結した。凍結されたブロックから 25 μm 厚の切片をとり、スライドグラスに載せた。一枚当たり 20 枚の切片を並べ、三枚にわたって試料を作製した。

免疫染色するため、神経軸索に反応する一次抗体の PGP9.5 (Ultraclone Ltd.) (濃度 1:400) に切片を浸漬し、一夜冷保存した。蛍光標識のため、rabbit 由来の二次抗体 (濃度 1:200) に浸漬した。アルミ箔で包み、暗室に一時間置いたあと、PBS Az+溶液で三回洗浄した。

2.2 共焦点顕微鏡

共焦点顕微鏡 Olympus FV1000 を用いて、切片を一枚

ずつ観察・撮影した。波長 473nm のダイオードレーザーで蛍光させ、10 倍の接眼レンズと 20 倍および 40 倍の対物レンズ（総合的に 400 倍）で観察した。解像度 800×600 pixels で撮影した。また深さ方向に 1 μm 刻みで走査した。

3. 結果

3.1 時間方向の変化

緒言で述べたように、マウスにおいてメイスナー小体の発生は P2 から始まり、P25 までに完了する。P4 の試料では、一本目の神経軸索が真皮乳頭に入り、先端が曲がっていた (Fig.2)。また真皮からは二本目が入ろうとしている様子が観察された。一日後の P5 では、真皮から進入しようとする神経軸索の数が増えていた。P7 ではメイスナー小体に関連した神経軸索かどうか判断がつかない軸索が増えていた。P12 では神経軸索が集まりカプセルを形成しようとしている様子が見られた。P13 では成熟したメイスナー小体と同様の卵形状が形成されていた。

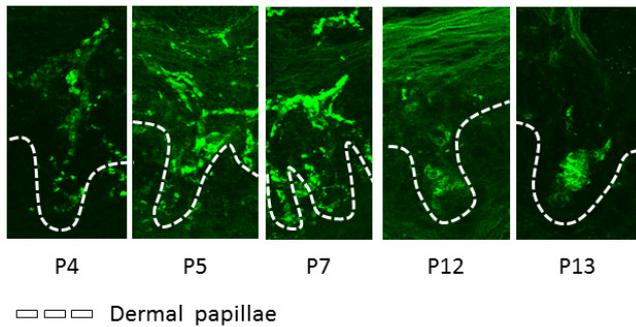


Fig. 2 Development of Meissner Corpuscle (P4 to P13).

3.2 空間方向の分布

指の中心線、縦軸線、横軸線を Fig.3 のように定義する。P12, P13 においてはメイスナー小体が卵形状をなしつつある。

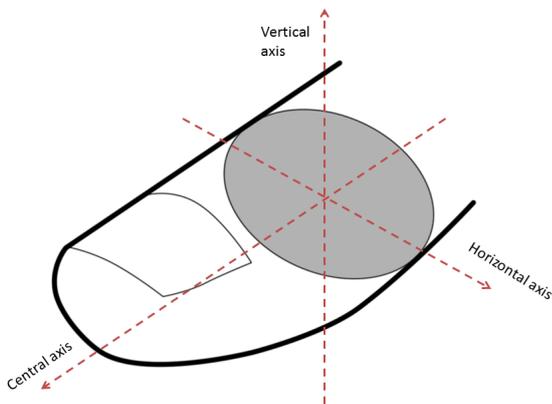


Fig. 3 Definition of central, vertical, and horizontal axes.

P13 において 1μm ずつ深さを変えて観察することにより、メイスナー小体の断面が徐々に変化することかららせん形状であることが確認できた。なお 1μm 刻みの走査を全ての切片に対して行う時間がかかりすぎるため、これ以降は 25μm 全体の観察結果を用いる。

メイスナー小体は指先においてもっとも高密度に存在することが確認された。これは過去の知見[6]とも合致する。さらに、P13 において中央付近のメイスナー小体同士の距離が中心軸に沿って大きくなる様子が観察された (Fig.4)。中央からもっとも近いメイスナー小体までの距離 d をもって中央付近でのメイスナー小体の密度を表す指標とする。Fig. 4 において、縦軸線の角度が切片ごとに若干異なる点に注意。

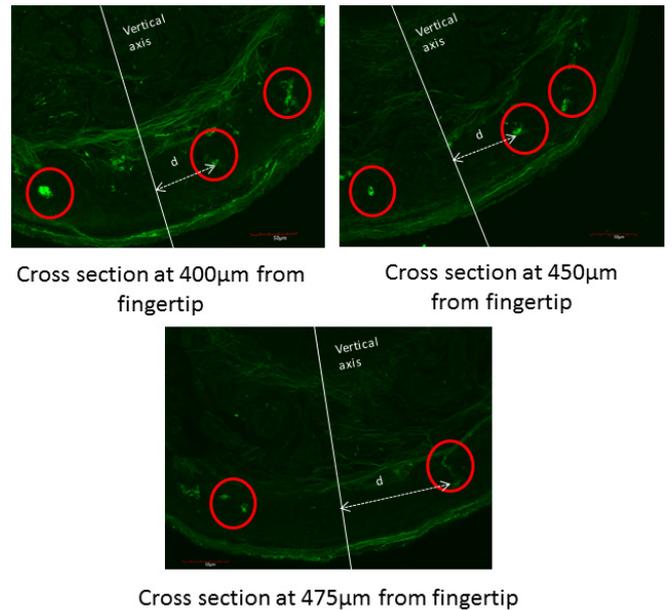


Fig. 4 Meissner corpuscle distribution at different positions (P13).

Fig.5 は距離 d の変化を中心線に沿って示したものである。メイスナー小体が観察されなかった切片についてはプロットせず、線を途切れさせることで示した。

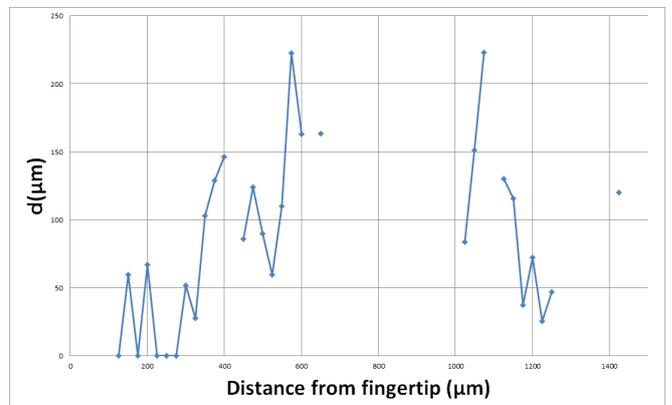


Fig. 5 Distance between vertical axis and neighbor Meissner corpuscle at different positions along central axis (P13).

先端から 400 μm 程度離れた位置でマイスナー小体の中央における密度が低くなる. 500 μm 付近, 1200 μm 付近で再び中央における密度が高くなる様子が見られる.

4. 考察

4.1 共焦点顕微鏡による観察

前章において, 抗体 PGP9.5 で免疫染色した試料を共焦点顕微鏡で観察することにより, マイスナー小体の発生過程について傾向を把握できることが示された. ただし, 現状のままでは詳細な情報は得られず, 神経軸索がらせん形状をなす過程の理解には至らない可能性がある. 課題として以下の二つが挙げられる.

神経細胞マーカー PGP9.5 はあらゆる神経軸索を染色する. マイスナー小体の存在位置を確認することはできるが, 小体に関連しない軸索も染色されて観察を阻害する. ただし, 例えばシュワン細胞マーカー S100などを併用することで無髄神経軸索からなるマイスナー小体を見分けられる可能性がある.

また蛍光の強さによってマイスナー小体の形状を誤解する可能性がある (Fig.6), 照明強度の調整や奥行方向の追跡などを注意深く行う必要がある.

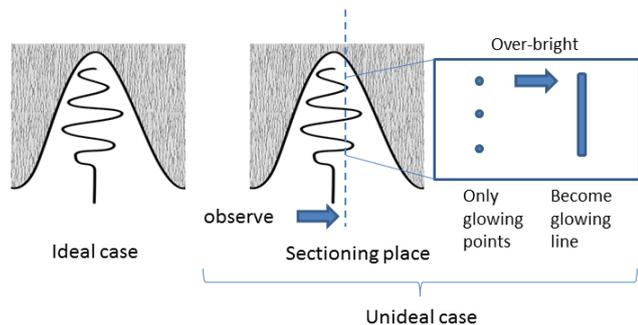


Fig. 6 Ideal and unideal cases of cross-section observation.

4.2 中央付近の密度

マイスナー小体の中央付近の密度の中心軸に沿った変化は, P13 だけではなく P12 においても同様に 500 μm 付近で密度が再び高くなる傾向が観察された (Fig.7). この傾向の原因はまだ不明である. 発生が完了する P25 までこの傾向が保持されるかどうかの確認は今後の課題である.

中央軸に沿って高密度と低密度の領域が現れることには, 関節との関係が想起される. すなわち末節骨から中節骨へかけての領域である. Fig. 8 にマイスナー小体の分布についての仮説を示す. 今回の実験時には指の関節間の距離を測っていなかった. 今後, 距離を測ったのちに切片を作製・観察し, マイスナー小体の分布と関節の関係を調べる.

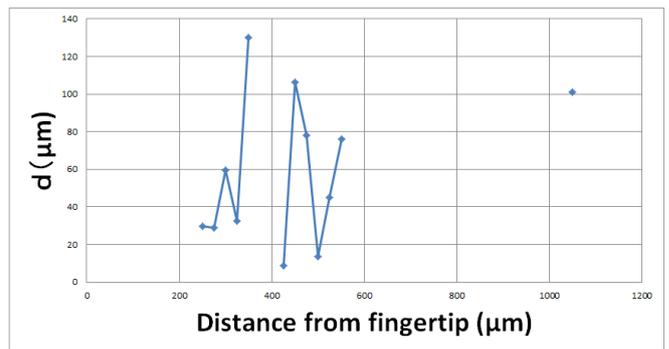


Fig. 7 Distance between vertical axis and neighbor Meissner corpuscle at different positions along central axis (P12).

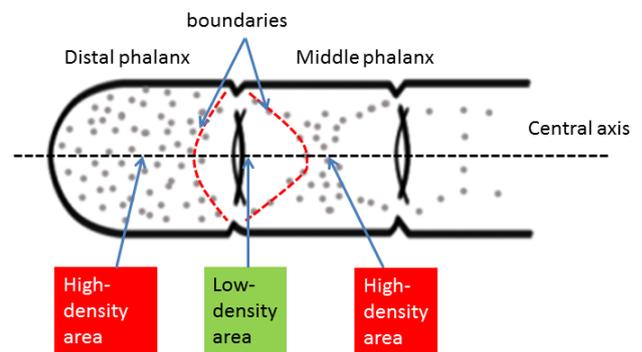


Fig.8 Hypothesis of relationship between Meissner Corpuscle distribution along central axis and finger joint.

5. 結言

本稿では, 共焦点顕微鏡によるマイスナー小体の発生過程の観察結果を報告した. 立体形状の観察が期待されたが今回は指の中心軸に沿った方向の中央付近の密度の知見が得られるにとどまった. レーザーの強度調整や, 高倍率レンズの利用を今後試みる.

マイスナー小体の密度分布は P13 の前後についても調査し確認する必要がある. このような偏りは, 受容野など触知覚とも関係することが考えられ, 興味深い.

謝辞

名古屋大学医学部・宮田教授, 正岡氏の協力のもと動物実験を行った. ここに謝意を表す.

参考文献

- [1] Pham Quang Trung, 星貴之, 田中由浩, 佐野明人: マイスナー小体の発生過程についての考察 (第 2 報), 第 14 回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会 (SI2013) 論文集, pp. 665-666, 2013.

- [2] M. Albuerne, J. De Lavallina, I. Esteban, F.J. Naves, I. Silos-Santiago, and J.A. Vega: Development of Meissner-like and Pacinian sensory corpuscles in the mouse demonstrated with specific markers for corpuscular constituents, *Anat. Rec.*, vol. 258, no. 3, pp. 235-242, 2000.
- [3] P. Castano, C. Rumio, M. Morini, A. Jr. Miani, and S.M. Castano: Three-dimensional reconstruction of the Meissner corpuscle of man, after silver impregnation and immunofluorescence with PGP 9.5 antibodies using confocal scanning laser microscopy, *J. Anat.*, vol. 186, pp. 261-270, 1995.
- [4] C. Ide: Development of Meissner corpuscle of mouse toe pad, *Anat. Rec.*, vol. 188, no. 1, pp. 49-67, 1977.
- [5] W.E. Renshan and B.L. Munger: The development of Meissner corpuscles in primate digital skin, *Dev. Brain Res.*, vol. 51, no. 1, pp. 35-44, 1990.
- [6] Å.B. Vallbo and R.S. Johansson: Properties of cutaneous mechanoreceptors in the human hand related to touch sensation, *Hum. Neurobiol.*, vol. 3, no. 1, pp. 3-14, 1984.