

マイスナー小体の発生過程についての考察（第4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 (4th Report)

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

Abstract: Our aim is to explain generation process of Meissner Corpuscle (MC), as the first step towards artificial reproduction. Previous study revealed that the generation of MC in mice starts on the 2nd postnatal day (Pd2) and ends on 25th day (Pd25). The conventional method provides detailed-structural images of MC but modest information of generation due to the sequent interchanged samples. In this article, we propose a novel staining and live-observation method, involved with fluorescent lipophilic carbocyanine DiOC₁₆(3) and two-photon microscopy.

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[1]。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 (Pd2) 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[3]。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 [5][6] (図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。

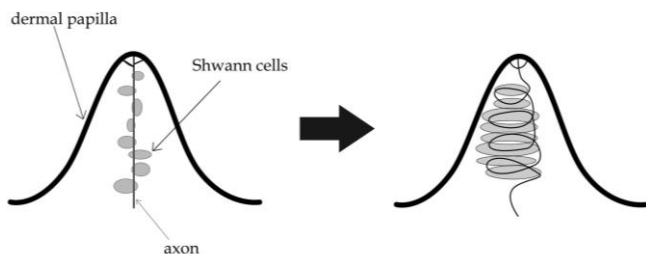


Fig. 1 Transformation of 1st axon.

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[5][6]。しかし、これによって得られ

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[2]では、指断面試料を免疫染色して、共焦点顕微鏡で立体形状を観察する方法について提案した。この手法を用いて、発生過程を1日おきに観察した[8]。対象期間はPd4-Pd13であり、毎回異なるマウス試料を使用した。神経細胞マーカーPGP9.5を用い、共焦点顕微鏡によって、マイスナーの神経軸索の時間的な変化を観察した。Pd4の試料では1本目の神経軸索が真皮乳頭に入り、先端が曲がっていた。その後、神経軸索の数が徐々に増え、これまで知られている状態 [6][5] になることが確認された。

この方法では、マウスを灌流固定して、指を液体窒素により凍結し、凍結されたブロックから25 μ m厚の切片を作成する。この過程において、組織が変形あるいは損傷する可能性がある。切片の厚みはマイスナー小体の直径10 μ mよりも大きいが、小体全体が欠けることなく取り出されることは稀である。また、日齢ごとに個体が異なるため、成長速度が異なる可能性がある。もし切断しない観察法があれば、同じ個体の同じ箇所の小体を立体観察し続けることができる。

本稿では、そのような観察法の確立を目指す試みについて報告する。DiOC₁₆(3)色素を神経細胞マーカーとして用い、二光子顕微鏡で神経軸索を蛍光観察する。これにより観察対象を切断せずに生きたまま、連続観察を行えるか確認する。同じマウス個体の同じ指をPd5、Pd7、Pd9、Pd12、Pd14、Pd16時点で観察した。指先に見られた神経軸索の様子を報告する。なお、マイスナー小体を形成している最中のような神経軸索もいくつか確認されたが、まだ確証は得られたおらず、さらなる検証が必要である。

2. 観察方法

2.1 蛍光染色

DiOC₁₆(3)はカルボシアニン蛍光色素の一つであり、物理化学や生物物理の分野で広く用いられている。細胞膜脂質層に入り込んで神経軸索を強く蛍光標識できる。注入後、時間経過とともに側方拡散していくことにより、注入部位より遠い領域の軸索終末までも標識することが可能である [9]。

マウスナー小体をなす神経軸索は後根神経節から始まり、腕神経叢、肘、手の平、指の基節骨を通過する。その後、骨の左右に沿って指先まで伸びる。この神経の走行経路を図2に示す。

本研究で DiOC₁₆(3)結晶体 (Molecular Probes 社)を Ethanol 99.5 溶液に入れ(10mg/mL)、超音波器で溶かした。また容器を遠心回転し、先端直径 50-60 μ m の注入針を入れた。針の先端は 65 度の面取りがされている。実験した ICR マウスの新生児(Pd2) 12 匹を氷箱に入れ、低体温状態にした。DiOC₁₆(3)をマウスの人差し指、中指、薬指のそれぞれの基節骨の脇に注入した。なお一箇所当たり 2-3 μ L とした。その後マウスは母親のもとに戻して育てさせた。

DiOC₁₆(3)は神経軸索先端まで拡散するのを待ため、二日間おいた。Pd4 のマウスを立体蛍光顕微鏡(接眼レンズ 10 倍と対物レンズ 1.6 倍、計 16 倍)で観察し、DiOC₁₆(3)が指先まで届いていることを確認した(図3)。根元の強く光っている点は注入箇所である。この時期マウスの肌はほぼ透明であり、顕微鏡の下で骨の左右において二本の線が光っていることを観察された。この線は指の末節の中央部分まで続いていた。

2.2 立体観察

2.2.1 事前準備

緒言で述べたように、マウスにおいてマウスナー小体の発生は Pd2 から始まり、Pd25 までに完了する。本

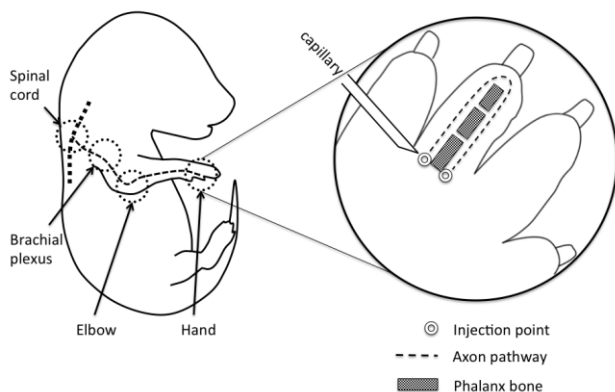


Fig. 2 Illustration of neural pathway and injection places

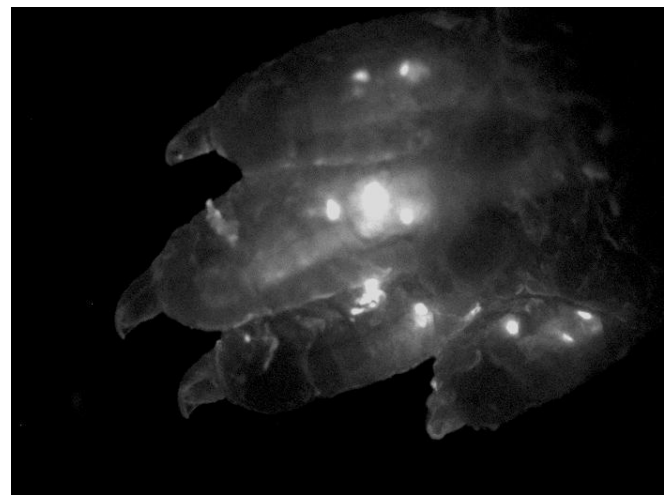


Fig. 3 Image of mouse finger after injection at Pd4

研究では同じマウスの同じ指を Pd5、Pd7、Pd9、Pd12、Pd14、Pd16 時点で観察した。撮影は一時間程度で終了し、その後マウスを母親に戻した。

マウスを麻酔するため、Somnopenyl 原液を 40 倍 PBS 溶液に溶かした。これを Pd5 のマウスには 100 μ L 注入した。マウスの成長に伴い、十分に麻酔するための注入量も増える。本研究では Pd7 と Pd9 に 150 μ L、Pd12 と Pd14 と Pd16 には 180 μ L を注入した。マウスが動かない状態になった後、シャーレ上に載せた。

マウスが生きたままであるため、心臓の拍動による微細振動が発生する。振動を減らすため、マウスの手を固定する。5g Agarose S 粉体を 100mL PBS 溶液に入れ(濃度 5%)、電子レンジを用いて 80 $^{\circ}$ C まで加熱して溶かした。その後、50 $^{\circ}$ C まで冷やした。マウスの手を固定用に作成した治具の上に乗せて、アガロス化合物を周りに流し入れた。アガロス化合物が固まる前に、薄いガラスフィルムを指先の上に乗せた。また、フィルムの上にリング状の重りを載せ、指を軽く治具に押し付けた。図4に治具の構成を示す。

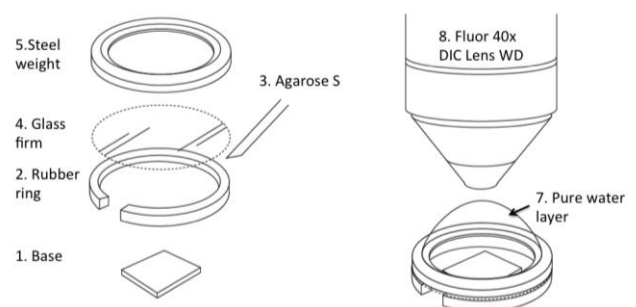


Fig. 4 Illustration of fixation parts

本研究で用いる二光子顕微鏡のレンズは水浸型なので、レンズとガラスフィルム間に純水層を用意した。ガラスフィルムと重りの間に水が漏れるような隙間はなく、表面張力によって水は凸形状をなした。

2.2.2 二光子顕微鏡

二光子顕微鏡は1つの蛍光分子に2つの光子を同時に吸収させることにより、分子を励起する。励起波長は共焦点顕微鏡より2倍になり、すなわち赤外線である。生体組織はこの波長範囲において吸収係数が低いため、深部まで到達し、蛍光像を得ることができる。生きた脳の神経回路網を解析するなどに利用されている[10]。

本研究ではNikon A1RMP 顕微鏡を用いた。対物レンズはNikon Fluor 40x DIC M/N2 WD であり、波長 900nm で観察した。指の表面から深さ方向に 100 μ m まで 0.925 μ m の刻みで走査した。解像度は 512 \times 512 pixels であった(0.16 μ m/pixel)。連続画像を画像処理ソフト ImageJ で重ね合わせた。

3. 結果

Pd5、Pd7、Pd9、Pd12、Pd14、Pd16 時点で撮影した結果をそれぞれ図 5-10 に示す。表面から深さ 50 μ m までは表皮であり、その下の真皮の神経軸索網を観察する。

Pd5 時点において、神経軸索はほぼまっすぐであった(図 5)。真皮乳頭は形成されていないが、表皮と真皮の境界領域で神経軸索は若干曲がっていた。図 5 において白い矢印は表皮と真皮の境界領域に侵入した神経軸索を示す。Pd7 時点では真皮内の神経軸索が増えていた(図 6)。表皮と真皮の境界領域に軸索が分岐し始め、表皮方向に伸びていた。

マイスナー小体の形成開始は Pd9 時点で確認された。真皮が急速に広がり、表皮と真皮の境界領域も乳頭形状になった。そこに位置する神経軸索はらせん形状に変形していた(図 7 の米記号)。青い線はコラーゲンの自家蛍光である。表面から縦軸線に沿って 60 μ m の深さに正体不明の円形の物体が見られた(図 7 の白丸)。この物体は直径 10 μ m ほどであり、特に骨の近くに位置していた。

Pd12 時点において神経軸索もつながって網になった。円形物体の数が増え、楕円形状になり、真皮乳頭にも見られるようになった(図 8)。同様の傾向は Pd14 でも確認された。この時点において神経網は視野全体に範囲を広げた(図 9)。

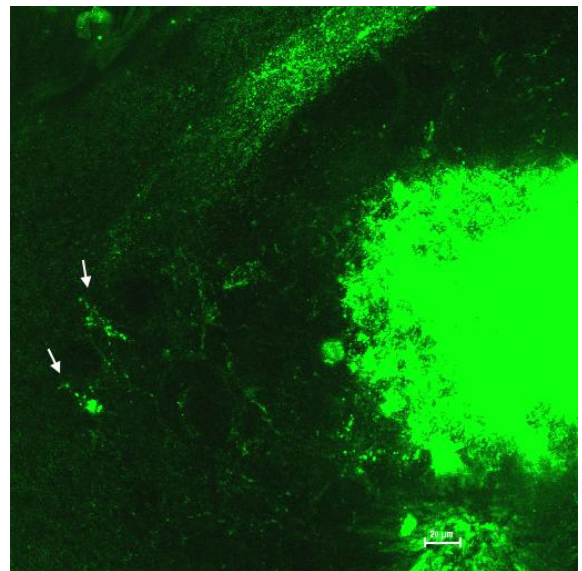


Fig. 5 Mouse fingertip at Pd5

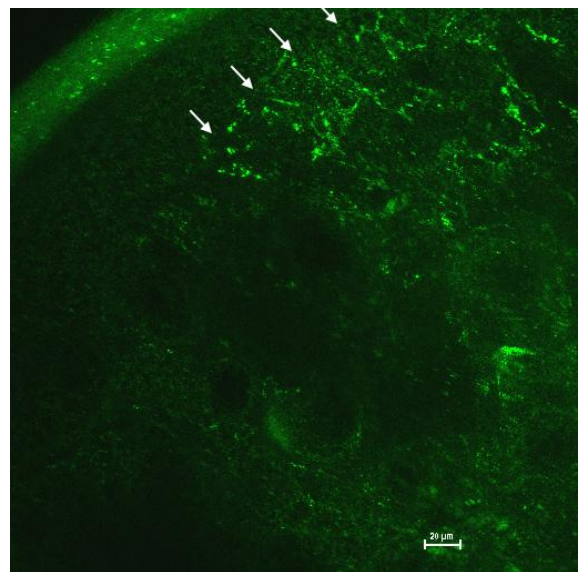


Fig. 6 Mouse fingertip at Pd7

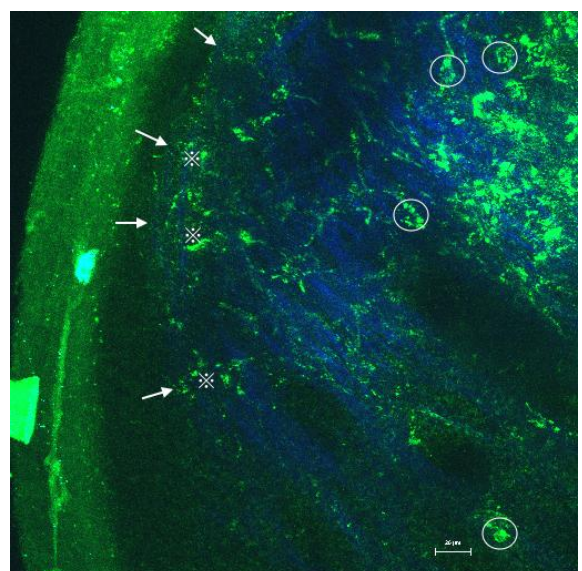


Fig. 7 Mouse fingertip at Pd9

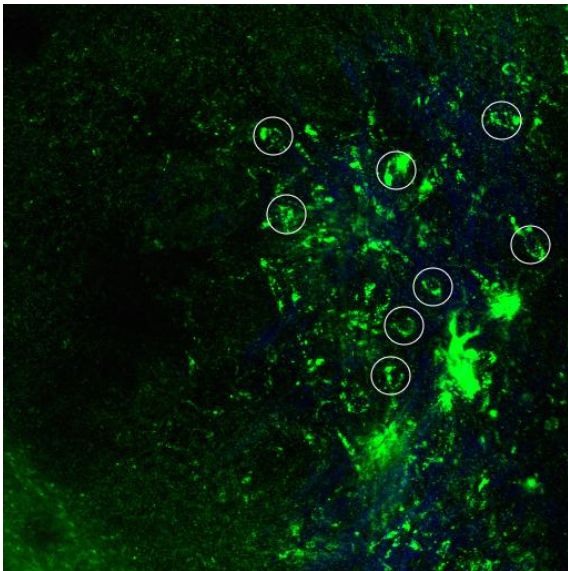


Fig. 8 Mouse fingertip at Pd12

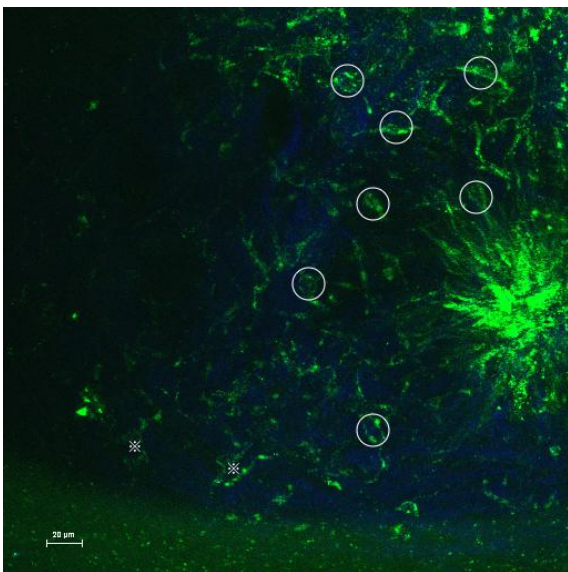


Fig. 9 Mouse fingertip at Pd14

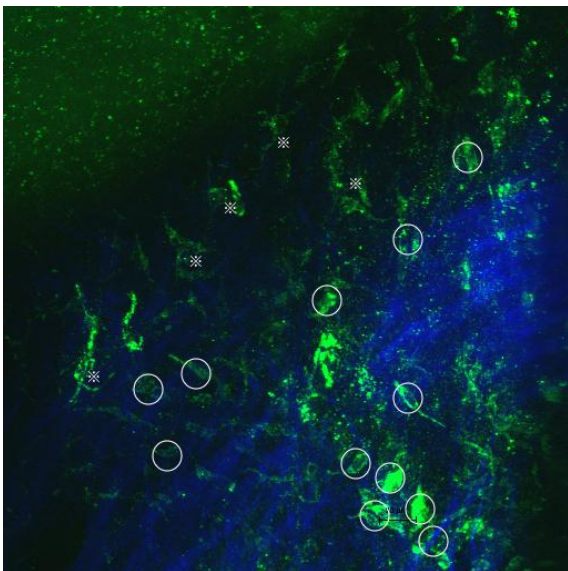


Fig. 10 Mouse fingertip at Pd16

Pd16 時点において真皮がさらに広がった. 表皮と真皮の境界領域にはマイスナー小体のような卵形状が出現した. 図 10 は表皮と真皮の境界領域の写真を示す. らせん状の物体 (米記号) は表皮に垂直であり, 円形の物体はそれらより深い位置に集まって, その形状は一方向に伸びて楕円形になった.

4. 考察

4.1 同一個体の断続的な観察

結果より本稿で提案・検討した技術の実用性が示された. マウスの指先において神経回路網を生体内に観察できる. 対象として用いたマウスは通常通り成長し, 同一個体を断続的に観察できる. マイスナー小体の発生過程の解明において切片を作成する方法では個体差が問題となるが, 本手法ではそのような問題は生じない. また実験コストが削減にもつながる. ただし, 本手法によりマイスナー小体の発生過程を解明するためには, 以下のような課題を解決することが必要である.

まずマウスの成長に伴い, 指が太くなり, 真皮が広がるのが課題である. 同一個体の同じ指について毎回同じ箇所 (マイスナー小体が配置される場所) を撮影するのは困難である. 何らかの標識を置き位置が分かるようにする必要である.

もう一つの課題は解像度が低いことである. 簡単な方法としては 60x, 100x のような高倍率レンズを用い, 1024x1024 pixels の高画質写真を撮影することが考えられる. しかし, 撮影のためのスキャン時間が大幅に長くなるため, マウスが途中で覚醒したり, 負担が増大する恐れがある.

4.2 インタラクティブな観察環境

従来の研究[3][4]は免疫染色法により, 厚さ数 μm の切片を作製して行われていた. この薄さの試料に外部から刺激を作用させるのは困難である. 一方, 本研究の手法は対象を切断せずに行うので, 指が静的な刺激を受けている状態で観察することも期待される. 例えば, ガラスフィルム上の重りを変えると皮膚の変形量を変えることができる. それぞれの重りに対する機械受容器の変形を観察できる. これにより従来研究の仮説[11]を検討できる可能性もある.

本稿でマイスナー小体に着目した理由はその特徴的ならせん構造(直径 $20\mu\text{m}$)により見分けが付きやすいためである. ただし, DiOC₁₆(3) 蛍光色素を指基の神経束に注入しており, その神経束から伸びた軸索は他の機械受容器にもつながる. すなわち, 本研究のライブ観察技術はマイスナー小体に限らず他の機械受容器にも適用可能と考えられる.

4.3 円形物体について

Pd9 以降の観察において正体不明な円形物体が見られた。節 2.1 に述べたように、DiOC₁₆(3)は細胞膜脂質層に入り込んで拡散する。このため神経細胞以外の細胞が染まった可能性はある。しかし DiOC₁₆(3)が細胞間を移動することは考え難い。他には血管や血流による移動も考えらるが、血管は一つの細胞ではなく、また血流の場合には色素が薄められて見えなくなる可能性が高い。従って、この円形物体は神経軸索がこのような形状をなしていると考えるのが妥当と思われる。

5. 結言

本稿では、マウスの指先に形成される神経回路網を二光子顕微鏡によって生体内で観察した。これにより同一個体の神経が成長する様子を観察した。ただし、マウスの成長に伴って指が拡大し、神経網も複雑になるため、同じ神経軸索を追跡することは困難である。マイスナー小体の発生過程を調べるため今後はこの課題の解決に取り組む。また、深い位置に観察され正体不明な円形物体についても解明する。

ライブ観察技術は機械受容器についてインタラクティブな観察環境を提供する。マイスナー小体の発生過程研究に限らず、指先を押し付けた時の小体の変形を観察するような実験にも対応できる。マイクロニューログラムと併用できる可能性もある。さらに、同一個体で生きたまま繰り返し実験できるのでコストを抑えることにもつながる。

謝辞

名古屋大学医学部・宮田教授、正岡氏、川上民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, Takayuki Hoshi, Yoshihiro Tanaka, Akihito Sano: Proposal of tactile sensor development based on tissue engineering, Proc. Of IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems 2013 (IROS 2013), 2013.
- [2] 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.
- [3] M. Albuérne, 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.

- [4] 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.
- [5] C. Ide: Development of Meissner corpuscle of mouse toe pad, *Anat. Rec.*, vol. 188, no. 1, pp. 49-67, 1977.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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 3 報), 第 15 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 (SI2014) 論文集, 2014.
- [9] T. Terashima, T. Ochiishi, T. Yamauchi: Alpha calcium/calmodulin-dependent protein kinase II immunoreactivity in corticospinal neurons: combination of axonal transport method and immunofluorescence. *Anat. Embryol.* 192: 363-382, 1997.
- [10] R. Kawakami, K. Sawada, A. Sato, T. Hibi, Y. Kozawa, S. Sato, H. Yokoyama and T. Nemoto: Visualizing hippocampal neurons with in vivo two-photon microscopy using a 1030 nm picosecond pulse laser, *Scientific Reports* 3, 2013.
- [11] S. Kuroki, H. Kajimoto, T. Nara, N. Kawakami and S. Tachi: Consideration of mechanical filtering system of the Meissner corpuscle, SICE Annual Conference, 2008.