

タイトル：

生体内凍結固定法が明らかにする再生軸索と循環動態の密接な関係性

1. 発表のポイント

・灌流固定法による一般的な標本作製では、灌流圧やアルコール使用の影響で組織細胞の収縮や血管の虚脱が生じ、生体の持つ形態学的特徴を歪める可能性が指摘されてきました。

・本研究では、「組織細胞形態を生体に近い状態で保存できる」として大野らによって提唱された生体内凍結固定法を損傷坐骨神経に応用し、形態学的評価を行いました。

・生体内凍結固定法では、拡張した血管内を流れる赤血球やその近傍を走行する軸索が観察されました。一方、灌流固定法では赤血球が血管外に漏出・凝集してしまうことが明らかとなりました。以上の結果は、生体内凍結固定法が損傷末梢神経における再生軸索と循環動態の密接な関係性を可視化するのに有効な手段であることを示しています。

2. 発表概要

埼玉県立大学大学院博士後期課程大学院生の福田京佑さん（第一著者）、同学 金村尚彦教授（責任著者）らの研究チームは、マウス損傷坐骨神経に対する生体内凍結固定法の応用が微小環境における再生軸索と循環動態をより生体に近い状態で可視化できることを明らかにしました。生体内凍結固定法で処理した損傷坐骨神経では、拡張した血管内を流れる赤血球やその近傍を走行する軸索が高度に保存されていました。一方、灌流固定法では、従来から指摘されてきた灌流圧やアルコール使用の影響により血管外に赤血球が漏出・凝集しました。以上の結果から、生体内凍結固定法が灌流固定法の課題を克服し、損傷坐骨神経の再生過程をより生体に近い状態で保存できる可能性が示されました。本研究成果は、2026年4月8日に *Acta Histochemica et Cytochemica* にオンライン公開されました。

3. 研究背景

末梢神経損傷後の再生は、ワーラー変性、軸索伸長、再髄鞘化、標的筋再支配といった多段階的な過程から構成されており、循環動態および免疫細胞の浸潤に強く依存しています。しかし、従来から行われてきた灌流固定法では血管の虚脱、組織細胞の収縮、可溶性タンパクの流出といったアーチファクトが生じており、損傷坐骨神経の形態学的評価に大きな影響を与えていた可能性がありました。そこで本研究では、生体内凍結固定法を損傷坐骨神経に応用し、再生する軸索と循環動態を可視化することに挑戦しました。

4. 研究内容

4-1. 生体内凍結固定法は走行する軸索を高度に保存する（図1）

生体内凍結固定法と灌流固定法で作製したマウス無傷坐骨神経によるヘマトキシリン・エオジン（HE）染色の組織画像を示します。生体内凍結固定法では軸索の配向が直線的であるのに対し、灌流固定法では組織細胞の収縮に伴い蛇行している様子が観察されました。これらの違いは、配向性の違いを客観的に評価するフラクタル解析値（FA value）でも証明されました。以上の結果から、生体内凍結固定法は灌流固定法によるアーチファクトを回避して、より生体に近い坐骨神経の可視化を可能にすることが示されました。

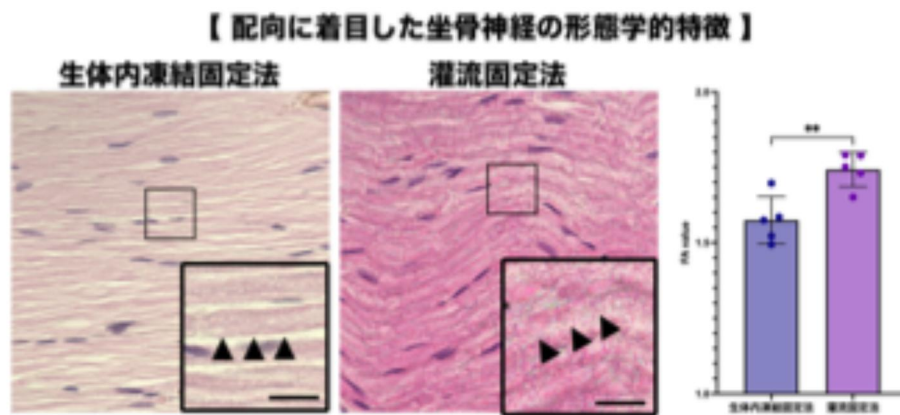


図1. マウス無傷坐骨神経における HE 染色の組織画像と FA value の結果を示す棒グラフ。補足説明：Scale bar は 10 μ m、黒矢頭は軸索を示します。

4-2. 生体内凍結固定法は血管内を流れる赤血球を高度に保存する（図 2）

生体内凍結固定法と灌流固定法で作製したマウス損傷坐骨神経（損傷 3 日目）による HE 染色の組織画像を示します。生体内凍結固定法では、拡張した血管内を流れる赤血球やその近傍を走行する軸索が観察されました。一方、灌流固定法では赤血球が血管外に漏出・凝集し、蛇行する軸索が観察されました。以上の結果から、生体内凍結固定法は血管内を流れる赤血球を高度に保存し、生体内の循環動態をより反映した組織画像の取得を可能にすることが示されました。

【 流動赤血球に着目した損傷坐骨神経の形態学的特徴 】

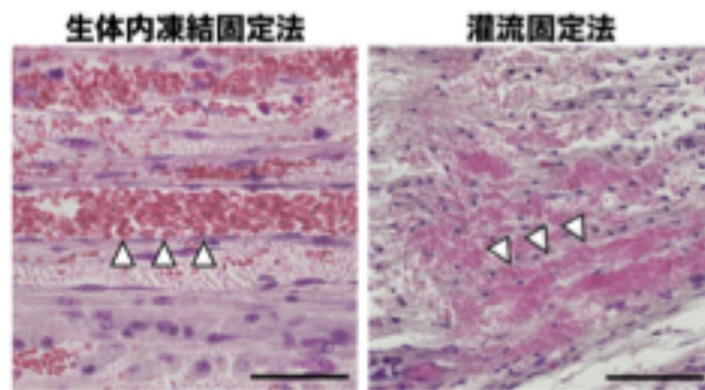


図 2. マウス損傷坐骨神経における HE 染色の組織画像。

補足説明：Scale bar は 50 μ m、白矢頭は赤血球を示します。

4-3. 生体内凍結固定法は免疫蛍光染色による再生軸索の標識も可能とする (図 3)

生体内凍結固定法で作製したマウス損傷坐骨神経 (損傷 3 日、7 日) による免疫蛍光染色の組織画像を示します。損傷 3 日と 7 日では、神経成長関連タンパク質である GAP43 (赤) 陽性反応がニューロフィラメントを標識する NF200 (緑) 陽性反応内を走行する所見が観察されました。以上の観察所見は、生体内凍結固定法で作製した損傷坐骨神経においても、可塑性のある軸索が伸長する過程を可視化できることを示しています。

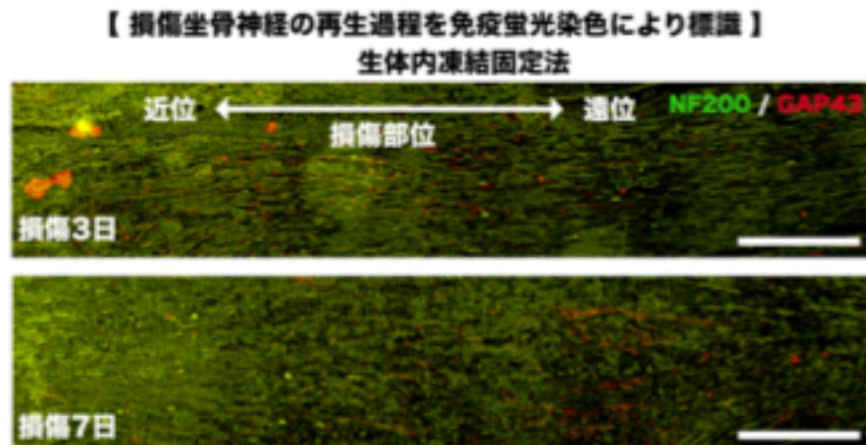


図 3. 損傷坐骨神経における免疫蛍光染色の組織画像。

補足説明：Scale bar は 250 μ m を示します。

5. 今後の展望

本研究を通じて、生体内凍結固定法は軸索の配向や血管内を流れる赤血球を高度に保存し、より生体に近い状態を可視化することが示されました。また、生体内凍結固定法が損傷坐骨神経における免疫蛍光染色でも、可塑性のある軸索の標識が可能であることが示されました。近年では、神経修復の文脈において、軸索と血管の相互作用が重要であることが知られています。生体内凍結固定法は、それらの相互作用を理解するための組織学的手法として新しいプラットフォームになる可能性があります。今後は生体内凍結固定法を活用した組織学的評価から軸索と血管の相互作用を紐解いていきます。

6. 用語解説

※1 生体内凍結固定法

循環血流を遮断することなく、生体内で標的組織を瞬間凍結することでより生体に近い状態を可視化するために Ohno らによって提唱された固定法です。

※2 Neurofilament 200 kDa (NF200)

神経細胞や突起に存在する分子量 200 kDa のタンパク質です。

※3 Growth-associated protein 43 (GAP43)

再生過程にある神経細胞や突起で高発現するタンパク質です。

7. 論文情報

雑誌名：Acta Histochemica et Cytochemica

題名：Application of In Vivo Cryotechnique for Morphological Visualization of Nerve and Vascular Structures in a Sciatic Nerve Crush Model

著者：Kyosuke Fukuda, Yuta Sakamoto, Satoshi Shimo, Takashi Amari, Chiharu Takasu, Keisuke Kubota, Kenji Murata, Naohiko Kanemura

DOI：10.1267/ahc.25-00048

8. 問い合わせ先

埼玉県立大学 保健医療福祉学部 理学療法学科 / 大学院保健医療福祉学研究科

教授 金村尚彦

E-mail：kanemura-naohiko@spu.ac.jp