

平成30年度 独創的研究助成費 実績報告書

平成31年3月22日

報告者	学科名	人間情報工学科	職名	准教授	氏名	柳原 衛
研究課題	中脳橋被蓋カルビンディン・カルレチニン発現ニューロンの神経投射					
研究組織	氏名	所属・職		専門分野	役割分担	
	代表	柳原 衛	情報工学部人間情報工学科・准教授	神経解剖学	全体	
	分担者					
研究実績の概要	<p>脳幹部の中脳から橋にかけてその背側部に位置する中脳橋被蓋の外背側被蓋核（LDT）および脚橋被蓋核（PPT）は、覚醒やレム睡眠の発現と維持、筋緊張の調節、行動の動機づけや報酬など、多様な機能に関与していることはよく知られている。これらの部位は、おもにコリン作動性ニューロンで構成されるが、ほかに GABA 作動性、およびグルタミン酸作動性ニューロンなどが存在することが知られている。また、それらのニューロンが、種々の発火パターンをしめすことも知られている。またこれらのニューロンの中には、カルビンディンやカルレチニンなどのカルシウム結合タンパクを含有するものが存在していることも知られている。本研究では、LDT および PPT ニューロンの投射領域の1つである視床、特に視床前核へ、逆行性神経トレーサーのフルオロゴールド (FG) を注入し、逆行性に標識された細胞を中脳橋被蓋で検索するとともに、コリンアセチル転移酵素 (ChAT)、カルレチニン、およびカルビンディンに対する免疫染色をおこない、中脳橋被蓋へ投射する視床前核ニューロンにカルレチニンやカルビンディンを含むものがあるか調べた。</p>					

※ 次ページに続く

研究実績
の概要

実験動物として、ラットを使用した。麻酔されたラットを、脳定位装置に固定した後、左脳の視床前核に、脳アトラスに従いFGを圧注入した。生存期間を3日間おいた後、深麻酔下で、脳を4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定した。取り出された脳は、30%蔗糖緩衝液の浸透を受けた後、厚さ30 μ mの8シリーズの連続横断凍結切片とされた。第1シリーズの切片は、直ちにスライドガラスへ貼り付けられ、蛍光顕微鏡の360nmの励起光下で観察し、FGの注入部位を同定した。他のシリーズの切片には、アセチルコリン、およびカルレチニンあるいはカルビンディンを検出するための免疫組織化学をおこなった。免疫組織化学では、切片を正常ロバ血清で処理した後、ヤギ抗ChAT抗体および、ラビット抗カルレチニン抗体あるいはマウス抗カルビンディン抗体とそれぞれ同時に反応させた。次に切片をビオチン化ロバ抗ラビット抗体あるいは抗マウス抗体、およびAlexaFluor 488 標識ロバ抗ヤギ抗体の混合液中でそれぞれ反応させたのち、さらにAlexaFluor594 標識ストレプトアビジンと反応させた。標本はグリセロールとリン酸緩衝液との混合液で封入後、蛍光顕微鏡下で観察した。アセチルコリン産生細胞であることを示すChAT免疫陽性細胞、およびカルレチニンあるいはカルビンディン免疫陽性細胞を、それぞれ中脳橋被蓋部域で同定するとともに、視床前核へ投射している細胞をあらわすFG標識細胞を、同じく同定した。結果として、中脳橋被蓋で、FGで標識されるとともにカルレチニンあるいはカルビンディン免疫陽性を示す二重標識細胞が観察された。さらに、FGで標識されるとともに、カルレチニン免疫陽性およびChAT免疫陽性をも示す三重標識された細胞がLDTおよびPPTにみられた。