

申請者	学科名	スポーツシステム工学 科	職名	准教授	氏名	柳原 衛 印
調査研究課題	中脳橋被蓋の視床投射ニューロンと含有カルシウム結合タンパク					
交付決定額	250,000					
調査研究組織	氏名		所属・職	専門分野	役割分担	
	代表	柳原 衛	情報工学部スポーツシステム工学科・准教授	神経解剖学	全体	
	分担者					
調査研究実績の概要	<p>脳幹部の中脳から橋にかけての被蓋部に位置する、主にコリン作動性ニューロンで構成されている中脳橋被蓋核は、睡眠・覚醒の調節、行動における動機づけ、さらには歩行運動や筋緊張の調節など、多様な機能に関与しており、視床をはじめとして種々の脳部位へ神経連絡している細胞集団である。この中脳橋被蓋核には、コリン作動性ニューロンの他、グルタミン酸作動性やGABA作動性のニューロンも混在していることが知られている。また、これらニューロンのなかには、カルシウム結合タンパクのカルビンディンやカルレチニンを含むニューロンも存在する。</p> <p>本研究では、中脳橋被蓋核のニューロンの化学的性質の違いとその投射部位との関係を明らかにする目的で、特に、睡眠・覚醒の調節と関係の深い、視床へ投射する中脳橋被蓋ニューロンの化学的性質について、アセチルコリンおよびカルシウム結合タンパクの1種であるカルレチニンについて検索した。</p>					

調査研究実績の概要	<p>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、間脳の視床に、蛍光性神経トレーサーであるフルオロゴールドをマイクロシリンジで圧注入した。生存期間を3日間おいた後、深麻酔下で、心臓から4%パラフォルムアルデヒド溶液を流し込み、脳を灌流固定した。頭部から取り出された脳は、凍結マイクロトームを使用して、厚さ30μmの連続横断切片とされた。視床部位の切片は、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、フルオロゴールドの注入部位を同定した。中脳橋の部位の切片には、アセチルコリンおよびカルレチニンを検出するための免疫組織化学を、浮遊法によりおこなった。</p> <p>切片を、正常ロバ血清で処理した後、ヤギ抗コリンアセチル転位酵素 (ChAT) 抗体およびウサギ抗カルレチニン抗体と同時に反応させた。次に切片をビオチン化ロバ抗ウサギ抗体およびAlexaFluor 488 標識ロバ抗ヤギ抗体の混合液中で反応させたのち、さらにAlexaFluor 594 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免疫陽性細胞を、それぞれ中脳橋被蓋領域で同定するとともに、視床へ投射している細胞をあらわしている、フルオロゴールドにより逆行性に標識された細胞を、同じく中脳橋被蓋部で同定した。波長480nmの励起光下でAlexaFluor 488は緑色の蛍光を発するので、ChAT免疫陽性細胞は緑色の蛍光を発する細胞として、また560nmの励起光下でAlexaFluor 594は赤色の蛍光を発するので、カルレチニン免疫陽性細胞は赤色の蛍光を発する細胞として観察される。さらに、360nmの励起光下では、フルオロゴールド標識細胞が金色の蛍光を発する細胞として観察される。中脳橋被蓋領域をそれぞれの励起光下で撮影し、その画像をコンピューター上で重ね合わせ処理を施し、それぞれの蛍光で単一に、あるいは異なる2種類の蛍光で二重に、さらには3種類すべての蛍光を発する三重に標識された細胞を検索した。結果として、視床髄板内核背外側領域を中心にフルオロゴールドが注入された例で、フルオロゴールドにより逆行性に標識されるとともにChAT免疫陽性を示した二重標識細胞が多数みられた。これらのなかに、さらに加えてカルレチニン免疫陽性を示す三重標識された細胞が存在した。中脳橋被蓋ニューロンは視床の広い範囲へ投射していることが知られている。視床の他の部位へのトレーサー注入を行い、実験例を増やして検証してゆくことが今後求められる。</p>
-----------	--

成果資料目録	
--------	--