

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の化学的性質					
交付決定額	300,000					
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>中脳後部から橋にかけての被蓋部に存在する主にアセチルコリン作動性ニューロンにより構成される中脳橋被蓋核は、覚醒とレム睡眠の誘発や維持に深くかかわるとともに、運動の制御、あるいは報酬系の賦活など、多様なはたらきを行っていることが知られている。このような多様な働きは、脳橋被蓋ニューロンが、視床をはじめとして、前脳基底部、さらには黒質や腹側被蓋核など、種々の脳部位へ投射をしていることから理解される。また、これらの中脳橋被蓋核には、異なる興奮の様式を示す神経細胞が混在していることも明らかになってきている。近年、組織解剖学的な研究は、中脳橋被蓋核は、アセチルコリン作動性ニューロンのほか、グルタミン酸作動性、およびGABA作動性ニューロンで構成されることを明らかにするとともに、含有するカルシウム結合タンパクの違いなどと組み合わせて、中脳橋被蓋ニューロンをその化学的性質の違いから、さらに区分してゆく試みがおこなわれている。</p> <p style="text-align: right;">次頁に続く</p>					

<p>調査研究実績 の概要</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種であるカルビンディンについて検索した。</p> <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、フルオロゴールド等の蛍光性神経トレーサー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30<math>\mu</math>m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ビディ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）抗体およびマウス抗カルビディンD-28K抗体と同時に反応させた。次にビオチン化ロバ抗マウス抗体とに反応させたのち、さらにAlexaFluor 488 標識ロバ抗ヤギ抗体および Cy3 標識アビジンと反応させた。標本は封入後、蛍光顕微鏡下で観察し、アセチルコリン産生細胞であるChAT免疫陽性細胞、およびカルビディンD-28K免疫陽性細胞を、それぞれ中脳橋被蓋部域で同定した。また、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Cy3は赤色の蛍光を発するので、カルビディンD-28K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、ChAT免疫陽性を示しかつカルビディン免疫陽性を示す二重標識され得た細胞は見いだされなかった。後部視床へフルオロゴールドが注入された例では、ChATおよびカルビディン陽性でかつフルオロゴールドで標識された三重標識細胞は観察されなかった。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>
-----------------------	---

<p>成果資料目録</p>	
---------------	--