

申請者	学科名	人間情報工学科	職名	准教授	氏名	柳原 衛
調査研究課題	腹側被蓋野へ投射する中脳橋被蓋ニューロンの含有カルシウム結合タンパクの検索					
調査研究組織	氏名	所属・職		専門分野	役割分担	
	代表	柳原 衛	情報工学部人間情報工学科・准教授	神経解剖学	全体	
	分担者					
調査研究実績の概要	<p>中脳にある主にドーパミン細胞から構成される腹側被蓋野は、報酬系としての快の情動の生成などに働いている部位として知られている。この腹側被蓋野への入力の一つに、中脳橋被蓋からのものが知られている。中脳橋被蓋は、外背側被蓋核および脚橋被蓋核より成り、コリン作動性ニューロンのほか、グルタミン酸作動性、あるいはGABA作動性をしめすニューロンで構成されている。また、これらのニューロンのなかに、カルビンディンおよびカルレチニンなどのカルシウム結合タンパクを含むニューロンが存在することも報告されている。本研究では、腹側被蓋野へ蛍光性の神経トレーサーであるフルオロゴールドを注入し逆行性標識細胞を検索するとともに、コリンアセチル転移酵素（ChAT）およびカルレチニンに対する免疫染色を同時におこない、腹側被蓋野へ投射する脚橋被蓋核および外背側被蓋核ニューロンにカルレチニンを含むものがあるかについて調べた。</p>					

調査研究実績
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、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30 μ mの連続横断切片とされた。中脳部位の切片は、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。

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と同時に反応させた。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AlexaFluor647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部域で同定するとともに、腹側被蓋野へ投射している細胞をあらゆ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、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観察される。他方、カルレチニン免疫陽性細胞は、AlexaFluor647の蛍光として冷却CCDカメラを通して検出される。したがって、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免疫陽性細胞、およびカルレチニン免疫陽性細胞を同定すると同時に、フルオロゴールドで逆行性に標識された細胞も同定した。さらにはそれらで多重に標識された細胞も同定した。