

## 平成29年度 独創的研究助成費 実績報告書

平成30年3月20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	中脳橋被蓋交連ニューロンの化学的性質					
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>脳幹の中脳橋被蓋は、コリン作動性ニューロンが局在している領域として知られている。また、この領域にはカルシウム結合タンパクのカルレチニン（CR）やカルビンディンを含むニューロンが存在することも知られている。中脳橋被蓋は、視床、腹側被蓋野、橋延髄網様体など、脳内で両側性に広汎な投射を示す。本研究では、左脳の中脳橋被蓋へ逆行性神経トレーサーの FluorGold (FG) を注入し、右脳の中脳橋被蓋で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 CR に対する免疫染色を同時におこない、対側の中脳橋被蓋へ投射する交連ニューロンに CR を含むものがあるか調べた。</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、左脳の中脳橋被蓋に、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%パラホ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、30%蔗糖緩衝液の浸透を受けた後、その中脳橋部位は、厚さ30<math>\mu</math>mの8シリーズの連続横断切片とされた。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、フルオロゴールド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を検出するための免疫組織化学、あるいは細胞構築を知るためにニッスル染色おこなった。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、それぞれ右脳の中脳橋被蓋部域で同定するとともに、左脳の中脳橋被蓋へ投射している細胞をあらわすフルオロゴールドにより逆行性に標識された細胞を、同じく右脳の中脳橋被蓋部で同定した。結果として、中脳橋被蓋で、FG で標識されるとともに CR 免疫陽性を示す二重標識細胞が観察されるとともに、さらに ChAT 免疫陽性をも示す三重標識された細胞がみいだされた。</p> <p>なお、研究成果の一部は、コ・メディカル形態機能学会第16回学術集会にて発表した。形態・機能、16巻、38ページ、2017</p>					
成果資料目録	なし					

