

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592978

研究課題名(和文) 延髄侵害受容システムの可塑的变化におけるグリア細胞機能の免疫組織化学的検討

研究課題名(英文) Immunohistochemical study of the glial function on the plasticity of medullary nociception

研究代表者

詫間 滋 (TAKUMA, Shigeru)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60360921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：三叉神経脊髄路核における可塑的变化に対して、グリア細胞が果たす役割を明らかにする目的で、ラット水平断延髄スライス標本に対して免疫組織化学的検討を行った。当初、パラフィン切片に対する酵素抗体法での検討を試みたが、より効率的かつ有用な成果を得るためにラット延髄非凍結浮遊切片に対する蛍光抗体法を試みた。パラフォルムアルデヒドにて灌流固定した幼若ラット延髄標本を非凍結標本のまま50-100ミクロンの水平断連続切片とし、これを蛍光抗体法により染色した。その結果、スライス標本上の三叉神経脊髄路核内にミクログリア(Iba1)、アストロサイト(GFAP)の明瞭な蛍光染色像が得られ、本法の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of the glial function on the plasticity of the spinal trigeminal nucleus, immunohistochemical staining were performed on the horizontal slices of the rat medulla oblongata. At first, immunoenzyme technique were performed on the paraffin sections. Thereafter, immunofluorescence on the free-float sections were performed to obtain more efficient and valued results. After perfusion fixation with paraformaldehyde under deep anesthesia, the medulla oblongata were extirpated from neonatal rats. Thereafter, 50-100 micron-thick unfrozen horizontal slices of the medulla oblongata were made, then stained with fluorescent antibody method. As a result, high intensity fluorescence signals of microglia(Iba1) or astrocyte(GFAP) were observed in the spinal trigeminal nucleus. Thus, the usefulness of this method for the investigation of the glial functions in the spinal trigeminal nucleus was suggested.

研究分野：外科系歯学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：グリア細胞 ミクログリア アストロサイト 延髄 浮遊切片 蛍光抗体法

1. 研究開始当初の背景

古来痛みは疾患に随伴する一症状と考えられ、臨床では疾患に対する治療が優先し、疼痛への対応は必ずしも十分ではなかった。近年、痛みを単なる症状ではなくその存在自体が病態であるとの認識のもと、痛覚情報伝達メカニズムを理解しようとする機運が高まっているが、臨床的に重要である難治性疼痛や慢性痛の発生機序は未だ明らかでない。

長年、脳の機能はニューロンにより担われていると考えられ、グリア細胞すなわち、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトの役割は軽視されてきた。しかし近年、グリア細胞の機能が明らかになるにつれてその重要性がにわかに脚光を浴びるようになり、グリア細胞機能に関わる研究が活発に行われるようになってきた。井上らはミクログリア表面に発現する ATP 受容体の解析からその機能にアプローチし、ATP 刺激により活性化されたミクログリアから BDNF (脳由来神経成長因子) が放出されることを明らかにした (Nature, 438, 1017-1021, 2005)。このことから、グリア細胞、中でもミクログリアが侵害受容の可塑的变化において果たす大きな役割が示唆されていた。

2. 研究の目的

新生仔ラットに capsaicin を皮下投与することにより (新生仔 capsaicin 処理) 全身の細径求心線維 (C 線維) の選択的な脱落が生じることが古くから知られている (Nature, 270, 741-743, 1977)。一方、Ruda らは新生仔ラットに CFA (Complete Freund's Adjuvant) を局所投与することにより C 線維の増加および二次ニューロンの反応が亢進することを報告した (Science, 289, 628-630, 2000)。本研究では、新生仔 capsaicin 処理ラットおよび新生仔 CFA 局所投与ラットを用いて、三叉神経領域への慢性的侵害刺激により三叉神経脊髄路核に惹起される情報伝達の可塑的变化を、免疫組織化学的手法を用いて三次元的に検討する。すなわち、脊髄路核への C 線維入力への減少、あるいは三叉神経領域における慢性炎症反応が、脊髄路核内 BDNF および BDNF 受容体 (TrkB) の分布に及ぼす影響、また各群においてミクログリアがどのような振る舞いを見せるかを、水平、冠状、矢状の三方向から立体的に解析し、組織学的様態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 対象

検討する動物群は) 対照群、) 新生仔 capsaicin 処理 (NCT) 群、) 新生仔 CFA 局所投与 (CFA) 群、) NCT + CFA 群の 4 群とし、生後 5-7 日齢の幼若ラットを組織学的な研究

対象とする。

(2) 前処理

新生仔 capsaicin 処理は申請者の過去の生理学的検討 (Brain Res. 906, 1-12, 2001) と同様の手順・条件にて行う。すなわち、新生仔ラットに対して生後 2 日後および 3 日後に 50mg/kg をエーテル深麻酔下に頸背部皮下投与する。新生仔 CFA 局所投与は、Ruda らの報告 (Science, 289, 628-630, 2000) を参考として生後 4 日目にエーテル深麻酔下に三叉神経第 3 枝 (下顎神経) 領域への局所投与を行う

【前処理プロトコール】

生後日齢	P2	P3	P4	P5	P6	P7
) 対照群	-----	固定	固定	固定	固定	固定
) NCT 群	---NCT	--NCT	-----	固定	固定	固定
) CFA 群	-----	CFA	固定	固定	固定	固定
) NCT + CFA 群	---NCT	--NCT	--CFA	固定	固定	固定

(3) 標本作成

各群 5 - 7 日齢ラットに対して、エーテル深麻酔下に 4 % パラフォルムアルデヒドによる心臓からの灌流固定を行った。その後実体顕微鏡下で抜脳し、同固定液中で 4 一晩以上の浸漬固定を行った。

固定後の標本は水洗の後、通法に従いエタノールによる脱水 (7 系列) を経てキシレンによる透徹 (3 系列) を行い、パラフィン浸透 (3 系列) の後、パラフィン包埋した。このパラフィンブロックを滑走式マイクロトーム (SM2000R: ライカ社) を用いてスライスし、パラフィン切片とした。

(4) 免疫組織化学

酵素抗体法ならびに蛍光抗体法により行った (後述)。

4. 研究成果

(1) 酵素抗体法

三叉神経脊髄路および脊髄路核が一平面に含まれるスライスが組織学的検討に最適と考え、延髄パラフィンブロックから水平断パラフィン切片 (厚さ 5 ミクロン) を作成し、一次抗体として BDNF ならびに BDNF 受容体 (TrkB) さらに Iba (ミクログリア特異的抗体) を用いた酵素抗体法を試みた。しかしスライス毎の染色性が一定しないため、群間比較には適さないと考えられた。さらに固定から包埋、スライス切片作成、染色、観察に至る工程で多大な時間を要すること、さらに数ミクロンの切片から得られた組織画像を

三次元的に検討するには高度な解析技術が必要になることから、パラフィン包埋・酵素抗体法による検討は困難であると考えに至った。

そこで免疫染色方法を蛍光抗体法に切り替え、さらに三次元的検討に適する標本の条件を検討した。

(2) 蛍光抗体法

蛍光抗体法に用いる組織切片は、非固定もしくは固定標本を凍結標本とした後、スライス切片として切り出すのが一般的である。しかしこの方法は、凍結・切片作成に専用の設備・材料を必要とし、また凍結による標本組織への悪影響も考慮する必要がある。このため今回は、固定標本を非凍結でスライスすることとした。

柔らかい組織標本のスライスには、マイクロスライサー（ピプラトーム）と呼ばれる機械を用いるのが一般的である。これは、刃を装着したヘッド部分が高速で左右に振動しながら前進し、標本を数十ミクロンから数百ミクロンの厚みで薄切することが可能な機械である。一般的には非固定組織標本をスライスした後、*in vivo* の実験に用いることが多い。当教室所有のマイクロスライサー DTK3000w（堂坂イーエム社）を使用する予定であったが、試運転で修理不能の故障が判明したため、最新型のリニアスライサー PR07 を堂坂イーエム社から借り受け実験を行った。

報告者は過去の電気生理学的研究（Brain Res. 906, 1-12, 2001）でマイクロスライサーの扱いには習熟していたが、PR07 は駆動部分にリニアモーターを採用して不良振動が除去されており、滑らかな切片作成が可能という印象を受けた。実際に、今回用いた幼若ラット延髄標本は、成獣から得た標本と比較して脆弱な組織標本であるが、50 ないし 100 ミクロンの厚さでの連続切片作成が可能であった。

50-100 ミクロンの浮遊切片に対する蛍光抗体法は渉猟の限りあまり報告がないが、今回は日本組織細胞化学会主催の講習会で習得した以下のプロトコルを用いた。

【染色プロトコル】

切片作成

Triton X-100 による透過処理

ブロッキング

一次抗体反応

洗浄

二次抗体反応

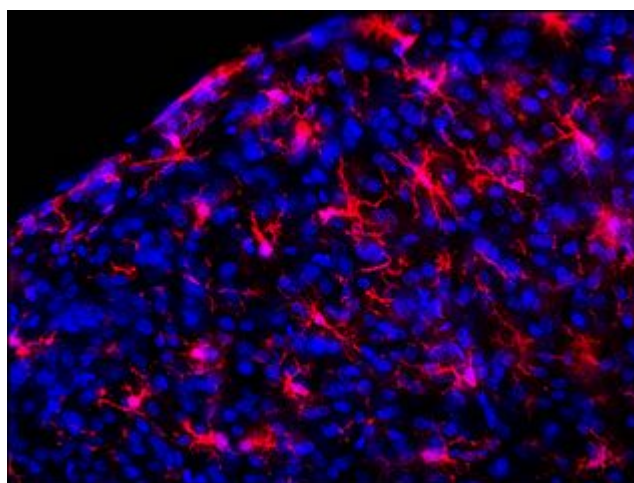
洗浄

封入

一次抗体として、ミクログリアに対しては Iba 抗体、アストログリアに対しては GFAP、二次抗体としては Alexa Fluoro® を用いた。

一次抗体を反応させる時間をどのように設定するかにもよるが、スライス切片作成から染色完了までの所要時間は概ね 2 日間から 3 日間であり、標本の保存性に課題（蛍光色素の退色）はあるものの極めて効率の良い方法であると考えられた。

下図は本法により染色して得られた画像（ミクログリア）である。DAPI にて同時染色した神経細胞の核とともに、ミクログリアが突起を含めて明瞭に観察される。アストログリアについても同様の染色結果が得られたため、侵害受容の一次中継核におけるグリア細胞動態の観察に対して、本法が有用であることが示唆された。



(3) まとめ

ラット延髄の非包埋・非凍結水平断連続スライス標本を、浮遊切片として蛍光抗体法に適用するプロトコルは、渉猟の範囲では過去に報告がない。加熱・凍結による標本の損傷や抗原性の低下が最小限に抑えられ、Z 軸方向の観察も 100 ミクロン程度の厚みで可能であるため、中枢神経のように三次元的検討が必要な組織の研究方法として、有用であると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

詫間 滋 (TAKUMA, Shigeru)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号 : 60360921

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし