

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21791962

研究課題名(和文) 延髄痛覚情報伝達システムの可塑性における免疫組織化学的手法による三次元的解析

研究課題名(英文) Three-dimensional immunohistochemistry of the plasticity of the nociceptive transmission in the medulla oblongata.

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

研究成果の概要(和文)：

口腔・顔面領域(三叉神経領域)の難治性疼痛や慢性痛の原因の一つと考えられる、延髄の三叉神経脊髄路核における可塑的变化を調べるため、新生仔 capsaicin 処理(C線維の選択的脱落惹起)および新生仔 Complete Freund's adjuvant 局所投与(投与局所の痛覚過敏惹起)を行った幼若ラットについて、脊髄路核の水平、冠状、矢状の三方向切片を対象とした三次元的な免疫組織化学的検討を試みた。その結果、各標本から得られる切片は一方向のみであることに加え標本間の染色性が必ずしも均一でないことから、本法による三次元的検討は困難であり、立体的解析のためには異なるアプローチが必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：

The plasticity in the trigeminal spinal nucleus is thought to be one of the causes of orofacial intractable pain or chronic pain. To investigate this plasticity in the medulla oblongata, immunohistochemistry was applied to neonatal rats treated by capsaicin (induces selective C-fiber decrease) or locally injected Complete Freund's adjuvant (induces local hyperalgesia). Three-dimensional analysis was planned using horizontal, coronal, and sagittal slices made from medulla oblongata of these animals. However, because staining condition of each slices were ununiform, and slices in different direction could not made from one sample, three-dimensional analysis were not accomplished and different approach thought to be necessary.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：歯科麻酔学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：三叉神経脊髄路核、可塑性、免疫組織化学、痛覚、Capsaicin、幼若ラット

## 1. 研究開始当初の背景

かつて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、疼痛への対応は十分とは言えなかった。近年、

痛みを単なる症状ではなくその状態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、難治性疼痛や慢性痛の発生機序は未だ明らかではない。三叉神経領域において

は、口腔顎顔面領域の侵害（痛覚）情報は、一次ニューロンから延髄の三叉神経脊髄路核においてシナプスを介して二次ニューロンに中継されるが、この部位における情報処理の可塑的变化が難治性疼痛・慢性痛の発生に重要な役割を持つことがわかってきている。しかしながら、体幹における痛覚情報の中継点である脊髄後角が分節状の構造を持ち、冠状断スライスによる研究が比較的容易であるのに対して、三叉神経脊髄路核尾側亜核（延髄後角）は吻尾方向に長い解剖学的構造を持ち、さらに頭蓋最深部に存在するため実験標本作製が困難であることなどから、その重要性とは裏腹に、この領域の研究は立ち遅れていると言わざるを得ない。

報告者は過去の研究において、新生仔ラット脳幹スライス標本を対象に、電位感受性色素による光学測定の手法を用いた電気生理学的検討を行い、脊髄路核尾側亜核において細径求心線維（C線維）を介した侵害情報伝達の果たす役割についての知見を得た（Brain Res., 906, 1-12）。そして、脊髄路核における情報伝達の可塑的变化に重要な役割を持つと考えられる神経線維の発芽（sprouting）や、サイレントシナプスの活性化といった微小形態・機能的変化、あるいは神経伝達物質・受容体の脊髄路核内分布を理解するためには、これに加えて組織学的な検討が不可欠であると考え、平成17-18年度科学研究費補助金（課題番号：17791431）により組織学的研究基盤を整備し、引き続き平成19-20年度科学研究費補助金（課題番号：19791477）ではこれに免疫組織化学的手法を導入した。この背景には、組織学分野において分子局在を明らかにする手段としては免疫組織化学的手法が極めて有用であり、痛覚情報伝達の可塑的变化にBDNF（脳由来神経栄養因子）を中心とする神経栄養因子や、サブスタンスP、CGRP（カルシトニン遺伝子関連ペプチド）といった神経ペプチドが深く関与していることが、近年この手法により明らかとなってきたことがあった。

前述の電位感受性色素を用いた電気生理学的研究において報告者が確立した、生後5-7日齢の幼若ラット延髄の水平断スライス標本は、脊髄路核へ入力する一次求心線維と、その入力を受ける二次ニューロンを同一標本内に含ませることが可能であり、かつ脊髄路核の3亜核（吻側・中間・尾側）を長軸方向に一望することが可能である。従って、脊髄路核における組織学的検討には最も適した標本であると思われた。しかしながら、脊髄路核の機能的構造を三次元的に理解するには、これに冠状断および矢状断の標本を加えて立体的な検討を行うことが必要と考えられた。

## 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、脊髄路核内神経栄養因子および神経ペプチドの分布に及ぼす影響を水平、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) 研究対象

検討する動物群は、i)対照群、ii)新生仔Capsaicin処理群、iii)新生仔CFA投与群、iv)新生仔Capsaicin処理+新生仔CFA局所投与群の4群とし、実験結果ならびに進行状況に応じてこの4群にcarageenan等の起炎物質局所投与による侵害刺激群を加えることとした。実験動物は妊娠ラットを購入し、生後5-7日齢の幼若ラットを研究対象とした。

### (2) 前処理

新生仔Capsaicin処理は報告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、生後2および3日後に50mg/kgをエーテル麻酔下に頸背部皮下投与した。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日目にエーテル麻酔下に下顎神経領域への局所投与を行った。

### 【前処理プロトコール】

日齢 P2 P3 P4 P5 P6 P7

i)群-----固定---固定---固定  
ii)群 NCT--NCT -----固定---固定---固定  
iii)群-----CFA---固定---固定---固定  
iv)群 NCT--NCT--CFA---固定---固定---固定

### (3) 標本作製

i) - iv) 各群 5 - 7 日齢ラットに対して、心臓からの灌流固定を行った。まずエーテル深麻酔下でシャーレに四肢を固定、胸腹部を皮切し皮膚を剥離した。剣状突起をピンセットで挙上し、横隔膜を切開した後胸骨および右側肋骨を一塊として切除した。これにより心臓が直視できるため、心尖部より 24G サーフロー留置針 (テルモ社) の内筒を左心室に刺入・固定し、脱血路として右心耳を切開した後、輸液ボトルに満たした固定液を小児用点滴セットを用いて少なくとも 30 分間滴下することにより灌流固定した。固定液は 4% パラフォルムアルデヒドリン酸緩衝液を用いた。灌流固定後、拡大鏡下で固定液に浸漬した状態で抜脳し、灌流固定に用いたのと同じ固定液に 4°C で一晩以上浸漬固定した。

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ミクローム (SM2000R: ライカ社) を用いて水平断、冠状断、あるいは矢状断スライスし、パラフィン切片を得た。

#### (4) クリューバ・バレラ染色

三次元的な解析を行うための基礎資料として、水平断、冠状断および矢状断の各パラフィン切片に対してクリューバ・バレラ染色を行った。

本染色法はルクソールファスト青による髄鞘染色と、クレシル紫によるニッスル染色を組み合わせた方法であり、髄鞘は青、神経細胞のニッスル小体が赤紫色に染色される。染色法の概略は以下の通りである。

- ① 脱パラフィン・洗浄
- ② アルコール処理
- ③ ルクソールファスト青による髄鞘染色
- ④ 95% エタノール洗浄
- ⑤ 蒸留水洗浄
- ⑥ 炭酸リチウム水溶液による分別
- ⑦ 70% エタノールによる分別
- ⑧ 蒸留水による分別
- ⑨ クレシル紫によるニッスル染色
- ⑩ 95% エタノール分別
- ⑪ 脱水・透徹
- ⑫ 封入

#### (5) 免疫組織化学

4% パラフォルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定した標本から作成した水平断、冠状断、ならびに矢状断スライス切片に対して、一次抗体として BDNF 抗体 (Chemicon 社) を反応させ、その後シンプルステイン MAX-PO (ニチレイバイオサイエンス社)、同キットに含まれる基質溶液を作用させて染色を行った上

で、クリューバ・バレラ染色標本との比較を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 前処理

新生仔 Capsaicin 投与は過去の研究同様に、生後 2 および 3 日後に Capsaicin 50mg/kg を頸背部皮下投与、CFA は生理的食塩水を加えて 3 倍溶液とし、右下顎の顎角部に約 25  $\mu$  l 皮下投与した。左側は対象とした。いずれもエーテル深麻酔下に投与し、麻酔からの回復後に母親の下に戻した。対象群との成長発育の明らかな相違は認めなかった。

### (2) 心臓灌流固定

心臓からの灌流固定は固定状態の良い標本を得るためには有効な手技であるが、生後数日の幼若ラットに対して行うには、微細な操作が要求されるために困難を伴う。報告者は過去の研究において幼若ラットに対する心臓からの灌流固定の手技を習得したものの、穿刺針の心臓刺入後、固定液の滴下を開始した際、四肢の硬直が十分でなく、抜脳時の組織の状態から見ても必ずしも良好な灌流固定がなされたと思われないケースがあり、後述の免疫染色の結果を踏まえると、固定液の送液にポンプを用いるなどの改良の余地があるものと考えられた。

### (3) クリューバ・バレラ染色

本染色は髄鞘と細胞体 (ニッスル小体) を容易に分別することが可能であり、神経組織の染色法としては一般的なものである。本研究では水平・冠状・矢状の三断面で三叉神経脊髄路核を観察することが目的であり、三叉神経脊髄路を走行する一次求心線維と脊髄路核に存在する神経細胞が容易に観察できた。免疫組織化学を行う際、本法は比較検討の基礎資料として重要であると考えられた。

### (4) 免疫組織化学

BDNF を対象に、クリューバ・バレラ染色を行ったのと同じ標本から得た水平断、冠状断、矢状断の各スライス切片に対して、酵素抗体法による免疫染色を試みた。結果は、同一標本からは物理的に一方向のみのスライス切片しか得られず、また同一群内でも標本間では染色性が異なることから、各群内において三次元的検討は困難であり、従って群間の比較には至らなかった。今後の課題としては、安定した免疫染色が各切片で得られるを前提として、同一方向スライスの重ね合わせなどの手法を用いた立体的な検討等、異なるアプローチが必要と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔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