

回転振盪負荷による小脳内 Parvalbumin と GABA の 変化に関する観察

—免疫組織化学を用いた検討—

藤田保健衛生大学

大学院医学研究科・整形外科学専攻（指導教授：吉澤英造）

馬場 尊

緒 言

1. 中枢神経疾患の運動療法

運動療法は、中枢神経疾患のリハビリテーションにおいて重要な治療手段の1つであり、姿勢や運動障害の改善および動作能力の向上を目的として行われている。

しかし、運動療法の中枢神経疾患に対する効果の実証やその作用機序の解明についてはいまだ研究段階にあり、議論の必要などである。すなわち、運動療法は、他動運動、自動運動など、いわゆる「運動 (action, movement)」を利用した治療法であるが、この「運動」が中枢神経系に及ぼす影響を十分に証明し得た報告は意外なほど少ない。これは、末梢運動器（骨、筋）疾患に対する運動療法が、疼痛、拘縮、筋萎縮などの病態の治癒促進に用いられ、その効果が証明されていることとは対照的である³。

その理由は、運動療法に関する基礎的な研究が非常に困難だからであろう。つまり、随意運動を対象とするため、実験動物には高等な哺乳類を使用しなければならない場合が多いという実験環境、条件の制約がある。そして、ヒトでは、覚醒し行動中の中枢神経の生理学的あるいは生化学的な変化を非侵襲的に観察することが困難だからである。

2. リハビリテーション医学における小脳研究の意義

さて、中枢神経系の運動療法において、小脳

は非常に重要な器官である。それは、小脳失調症が、代表的な中枢性運動障害であるばかりでなく、小脳が運動学習において中心的役割を果たしていると考えられているからである。

小脳が障害された時に起こる重大な症状は運動失調症である。小脳は運動制御器官であるため、その障害は運動の調節障害、すなわち、失調症としてあらわれる。従って、運動の調整を主たる方法論の1つとする運動療法が重要な治療法になることは明らかである。実際、そのために proprioceptive neuromuscular facilitation (PNF)、Frenkel 体操などの治療法が提唱されてきた。しかし、これら様々な治療手段の各病態に対する適応やその作用機序などは今後の検討課題として残されたままになっており、解明が待たれる。そして、この解明は、小脳が運動に果たしている役割をより詳細に示すことにもつながる。つまり、小脳失調症の運動療法に関する研究は、異常の運動学、いわば運動の病理学を追求することに他ならない。

一方、生理学的には、小脳は中枢神経のなかでは非常によく研究されている器官といえる⁴。それは、小脳が比較的少数の細胞要素と均一な構造を有しているためであり、コンピュータシミュレーションによる詳細な機能モデルが提唱され、実際の神経細胞の反応とも比較されてきている。しかし、その機能がすべて明らかにされているわけではない。例えば、小脳が重要な役割を担っていると考えられる運動学習の機構も現象論的にはかなり詳細に捕らえつつはある

が、それを実際の訓練場面に応用し得るほど具体的にはなっていない。従って、この分野はさらに多面的な研究手段の確立、そしてその知見の蓄積が必要にならう。そして、これらの知見は運動療法の効果の考察に役立ち、運動失調症の新たな治療法の開発にもつながるはずである。

以上のような背景を踏まえて、リハビリテーション医学における小脳研究の基礎の一助となるべく今回の実験を行った。すなわち、他動運動による非侵襲的な小脳刺激法を考案し、それを実験動物に負荷し、免疫組織化学的手法を用いて小脳内の神経細胞の変化を観察した。

小脳神経細胞内の calcium binding proteins (以下、CaBPs と略す) の1つである parvalbumin (以下、PV と略す) を目的物質として、考案した運動刺激による小脳神経細胞内の PV 量の変化を形態学的に観察し得るかを確認した。また、他の神経伝達物質についてもその変化が観察しうるかを検討した。

以上のことが確認されれば、小脳内の神経伝達物質の研究、小脳-脳幹、小脳-大脳の神経路の生理学的、生化学的研究にこの負荷法を応用でき、他動運動刺激の神経回路への影響やさらには運動療法の理論づけの基礎となる知見を得ることができよう。

3. 今回の実験の概要

今回の研究は、小脳の求心性線維の興奮状態を人為的に負荷を加え変化させて、小脳内の生理学的、生化学的变化を形態学的に捕らえることを目的とした。

実験は、①目的物質 (PV) を標識するための一次抗体の濃度の決定、②無負荷である定常状態での PV の小脳内での分布の観察、③求心性線維の1つである登上線維切断時の PV の変化の観察、④運動負荷による求心性線維興奮時の PV の変化の観察、⑤運動負荷による求心性線維興奮時の他の目的物質 (γ-アミノ酪酸)

の観察、の5シリーズとした。

第1章で目的物質と免疫組織化学について述べ、第2章において各実験の結果と考察を記した。そして第3章では総括的な考察を行った。

第1章 今回の実験の目的物質と免疫組織化学

1. Parvalbumin (PV) について

PV は細胞内の CaBPs の1つである。

カルシウムイオン (Ca^{2+}) は、細胞内のセカンドメッセンジャーとして知られている⁶。そのため多くの細胞には、 Ca^{2+} イオン濃度を調節する、またそれによって反応する色々な種類の CaBPs が存在している⁷。CaBPs の多くは EF-hand family に属し Ca^{2+} を結合させるための特徴的なアミノ酸配列を持っている⁷。CaBPs は現在約150種類ほどあり、詳細な性格の解明がなされていないものも多いが、その役割は大きく2つに分けられる⁵ (表1)。

その1つは、 Ca^{2+} のセカンドメッセンジャーとしての役割を媒介するもの、つまり、ある反応の発動因子としての役割を有するものである。この役割を持つ CaBPs としては、広く神経細胞や骨格筋細胞内に存在している calmodulin や troponin-C などが知られている。

もう1つは、より受動的なものであり、細胞内の Ca^{2+} の濃度を調節するもの、すなわち、緩衝物質としての役割を有するものである。数多くの物質があり、そのうち中枢神経において多く見られるものは、PV、calbindin-D28K、calretinin である。これらは中枢神経内でそれぞれ特徴ある分布を示すが、その機能との詳細な関連は未だ明らかにされていない。一般的には、神経細胞興奮時の Ca^{2+} 濃度上昇を緩衝し、次の反応への準備や細胞内の恒常性を保つための役割を担うといえるが、細胞内のある未知の反応の発動因子になっている可能性も否定できない⁵⁻⁷。

さて、PV は、脊椎動物の骨格筋、神経系、

表1 神経系の主なカルシウム結合蛋白

A. Present in most cell types, including neurons

EF-hand family

Calmodulin
(ubiquitous calcium-dependent modulator of protein kinases and other enzymes)
Calpains
(calcium-dependent proteases)
 α -Actinin

Other families

Annexins
(Ca^{2+} -phospholipid-binding proteins; of unknown function, but implicated in exocytosis)
Protein kinase C

Gelsolin
(and other cytoskeleton-associated proteins)

B. Present in certain cell types in CNS

EF-hand family

Parvalbumin
(in some neurons)
Calbindin-D28k
(in some neurons)
Calretinin
(in some neurons)
Recoverin, visinin
(in photoreceptors; regulate guanylyl cyclase)
S100 α , β
(in glia; effect on phosphorylation and neurite outgrowth)

文献5より改編

内分泌腺の細胞に存在する CaBPs である⁸。哺乳類の中樞神経系では大脳皮質、海馬、小脳、脊髄に多く分布している。神経細胞としては、主として介在ニューロンに存在するが、小脳のプルキンエ細胞や視床網様核のニューロンのような長い軸索を持ったニューロンにも多く存在する。また、calbindin-D28K の存在するニューロンには少なく、自律神経に関連したニューロンには少ないことが知られている⁸。神経伝達物質との関連では、 γ -アミノ酪酸 (GABA) 含有ニューロンに多く存在し、また、生理学的には、高頻度興奮性ニューロン (fast-firing

neuron) に多いと言われている^{8,9}。

PV の神経細胞内での機能の詳細は、未だ明らかにされていないが、大きな役割の1つとして前述した Ca^{2+} の緩衝作用が挙げられている。

神経細胞の興奮時には細胞内の Ca^{2+} の濃度が上昇し、これが引き金になって細胞内の情報伝達が行われる⁶。すなわち、 Ca^{2+} は細胞内でセカンドメッセンジャーとしての役割を担っている。しかし一方で、 Ca^{2+} が細胞毒として作用することも広く知られた事実である⁶。そのため、細胞内の Ca^{2+} 濃度が長時間高いまま持続することは細胞死を引き起こすことになる。従って、細胞内に放出された Ca^{2+} は、セカンドメッセンジャーの役割を終えた後、速やかにその濃度を下げられる必要がある。実際、虚血に陥った神経細胞や筋萎縮性側索硬化症などの変性疾患において、PV の濃度が上昇していることが確認されており¹⁰、細胞毒である Ca^{2+} を緩衝しようとするこの役割を裏付けるものといえよう。また、高頻度興奮性ニューロンに多く存在するという報告も PV の緩衝作用を裏付けることと考察できる。すなわち、高頻度に興奮するためには、一度興奮によって上昇した Ca^{2+} の濃度を速やかに低下させ、次の反応に備えなければならないため、十分な Ca^{2+} に対するより確かな緩衝作用が必要になるといえるからである。

小脳内における PV の分布は、各小葉に比較的均等に分布しているという報告が一般的だが^{7,8}、第I葉と第X葉に多い傾向を認めたという報告もあり、定説には至っていない⁷。

またプルキンエ細胞の細胞体、核、軸索、終末、樹状突起、樹状突起の棘、そして、籠細胞と星状細胞の細胞体と終末に存在する一方、顆粒層の細胞には存在しないと言われている⁶⁻⁸。PV を産生するための mRNA もそれぞれの PV を含有する神経細胞で確認されている¹¹。

これらの小脳の神経細胞はすべて GABA 含

有ニューロンでもある。他方、小脳には他に GABA 含有ニューロンと考えられるゴルジ細胞が存在するが、これは PV 陽性細胞ではない。その理由はこの細胞が高頻度興奮性ニューロンでないことによると考えられている⁸。

小脳の代表的神経細胞であるプルキンエ細胞内における PV の分布については、個々の細胞により異なっていて著明な特徴は不明である⁶⁻⁸が、全般的には、細胞体に比較して樹状突起、軸索、終末に多いという報告がある。また、プルキンエ細胞の細胞体には PV の多いものと少ないものがあるという報告もある⁸。以上の所見は、観察時の個々のプルキンエ細胞の興奮状態の差を PV 量の変化としてとらえている可能性を示唆するものなのかもしれない。

2. γ-アミノ酪酸 (GABA) について

GABA はアミノ酸神経伝達物質であり、最も重要な抑制性神経伝達物質として知られている。中枢神経系には高濃度に存在する一方、他の末梢臓器には痕跡程度にしか認められない。

小脳に存在する主要な 5 種類の神経細胞のうち、顆粒細胞を除く 4 種類の細胞つまり、プルキンエ細胞、星状細胞、籠細胞、ゴルジ細胞が、GABA を伝達物質としてしていると考えられている。一般に GABA 含有神経細胞は介在ニューロンであることが多いと言われており、プルキンエ細胞のように長い軸索を持つニューロンはむしろまれな例である。プルキンエ細胞では、その細胞体には GABA がほとんど検出されず、神経終末に多いことが分かっている¹³。

3. 免疫組織化学¹⁴

ある特定の物質の組織内での局在を同定するために、標的物質を抗原とした特異抗体を用いて標識、検出する手法が、免疫組織化学である。免疫組織化学の大きな特徴は、抗原抗体反応という特異的かつ感度の高い結合反応に基づいている点にある。

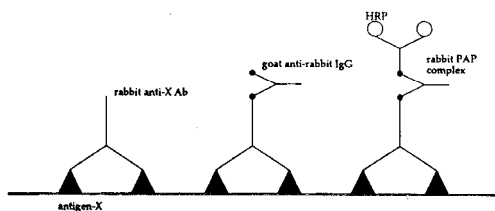


図1 PAP法の原理 (文献14より改編)

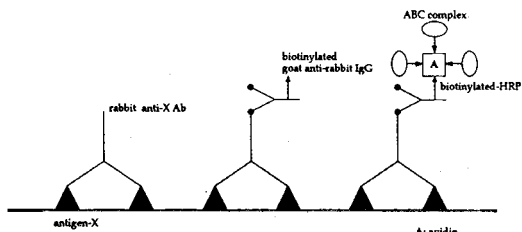


図2 ABC法の原理 (文献14より改編)

その手法としては、特異抗体を直接標識して用いる直接法と、特異抗体は直接標識せず、標識した IgG 抗体を特異抗体の上に重ねて観察する間接法とがある。一般に神経系における検討では、より感度の高い間接法を用いる場合が多い。

可視化のための標識物質としては、蛍光色素を用いる蛍光抗体法と、酸化還元酵素の一種である horseradish peroxidase (HRPO) を使用しその検出にあたって 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) を用いる酵素抗体法とがある。今回の実験では酵素抗体法である peroxidase anti-peroxidase method (PAP 法) と avidin biotin peroxidase complex method (ABC 法) を用いた。それぞれの原理を図に示す (図1, 2)。

第2章 小脳求心性線維の興奮変動による小脳内 PV と GABA の変化の観察。

実験1. 抗 PV 抗体濃度の決定と小脳内 PV 陽性細胞の観察

目的

免疫組織化学を用いて、予備的に小脳内の

PV の分布の概要を観察した。細胞内 PV の濃度の差を検出し得るかどうか、すなわち、個々の神経細胞の PV 染色の程度に差を認めるかどうか観察し、これまでの報告と相違がないか検討した。同時に、適切な抗 PV 抗体濃度を決定した。

方 法

対象は、8～10週齢、体重250～350g、オスの Sprague-Dawley ラット（以下 SD ラットと略す）3匹とし、その小脳を実験に用いた。ネンブタール（60mg/kg 体重）腹腔麻酔下に、上行大動脈より pH 7.4 のリン酸緩衝生理食塩液（PBS）で灌流後、4%パラフォルムアルデヒドと0.4%ピクリン酸含有の0.1Mリン酸緩衝液を用いて灌流固定を行った。その後速やかに脳を摘出し、4℃の15%蔗糖含有の0.1Mリン酸緩衝液に2日間浸漬した。

小脳の標本は、25 μ m の凍結切片をクリオスタットマイクロトームで作製した。

染色には ABC 法を用いた。

抗 PV 抗体の濃度は、5,000倍、10,000倍、20,000倍希釈の3種とし、それぞれ3例の標本において観察した。

染色された切片はスライドガラスに封入後、光学顕微鏡にて観察をした。

結 果

籠細胞や星状細胞の存在する分子層に PV 陽性細胞が観察された（図3、4）。顆粒層では PV 陽性細胞は観察されなかった。プルキンエ細胞は全て PV 陽性であったが、濃く染まった細胞と薄く染まった細胞とが不規則に存在した。また、PV 陽性プルキンエ細胞の周囲は PV 陽性線維により取り込まれていた。

小脳核ではプルキンエ細胞の終末と思われるものが染色された。

抗 PV 抗体の濃度を変えた染色については、全ての標本において、5,000倍、10,000倍、20,000倍希釈の3種による染色性の相違を光学顕微鏡では観察し得なかった（図5～7）。

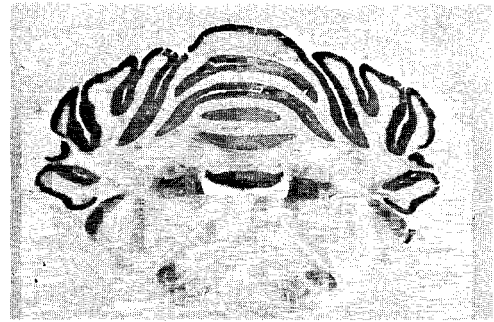


図3 小脳の前額断面
抗 PV 抗体は10,000倍



図4 小脳皮質の PV 陽性細胞
矢印は PV プルキンエ細胞、矢頭は PV 淡染プルキンエ細胞
g：顆粒層。m：分子層 倍率100倍

考 察

これまで、小脳内の PV の分布については、プルキンエ細胞、籠細胞、星状細胞に存在すると言われている。従って、この実験で観察された結果は、これまでの報告と矛盾するものではなかった。しかし、分子層内のプルキンエ細胞以外の PV 陽性の細胞体が、星状細胞、籠細胞のいずれであるかを同定することは、形態的な相違が認められなかったため困難であった。

籠細胞の終末はほとんど PV に染色されていた。プルキンエ細胞の濃度体は濃く染まるものと薄く染まるものに分けられた。

さて、プルキンエ細胞は、西洋梨形をした大型の細胞体を有する小脳の神経細胞であり、ラットでは約1.8万個存在する¹⁵。この細胞群は小脳皮質の分子層と顆粒層との境界域に1列横隊

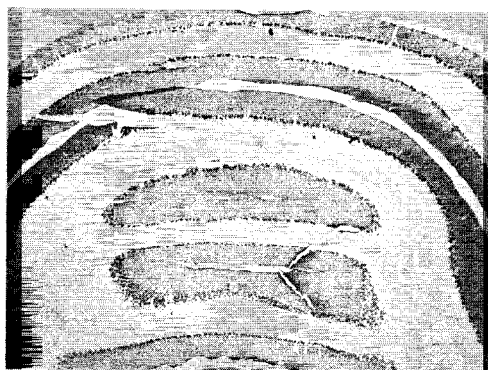


図5 抗PV抗体5,000倍の小脳前額断面
上段は小脳虫部, 下段は半球部。倍率20倍

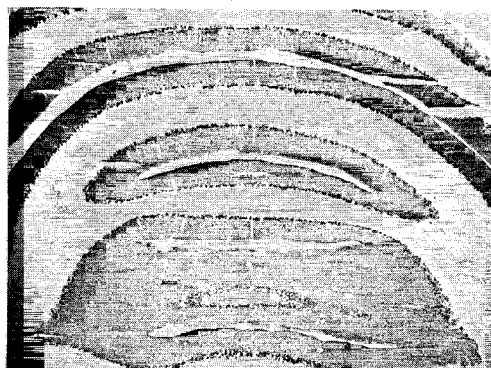


図6 抗PV抗体10,000倍の小脳前額断面
上段は小脳虫部, 下段は半球部。倍率20倍

に配列し、この層はプルキンエ細胞層と呼ばれる。プルキンエ細胞の樹状突起は、小脳小葉の長軸に対して直角な面(矢状面)に、よく茂った樹木のように細胞体から分子層の浅部にまで扁平扇状に広がっている(図8)。樹状突起は、多数の棘を備え、これらに平行線維や登上線維の軸索終末がシナプスを作っている。

プルキンエ細胞の線維は有髄であり、一般に小脳核のニューロンにシナプス結合をするが、小脳虫部や片葉などのプルキンエ細胞の一部は、その線維を前庭神経核にも送っている。また、プルキンエ細胞の線維は側枝を有し、その細胞体や近位樹状突起および顆粒層内のゴルジ細胞にシナプス結合している。

プルキンエ細胞は、細胞皮質からの唯一の遠心性細胞である。すなわち、小脳への求心線維の興奮は、結局、プルキンエ細胞で統合され出

力される。

プルキンエ細胞の細胞体が濃染するものとしてでないものが存在することは以前より報告されているが、考察はなされていない。これには、構造上あるいは機能上、PVを多く含有する細胞とそうでない細胞の分布が一定の傾向にあるか、あるいは、固定時におけるそれぞれのプルキンエ細胞の興奮頻度を反映しているという2つの可能性が考えられる。

プルキンエ細胞には、苔状線維-顆粒細胞-平行線維路、そして、登上線維路が大きな求心線維として存在している。それぞれは、プルキンエ細胞の樹状突起に終末を送っている。これらの求心性線維の興奮がほぼ同時に起こったときには長期抑圧現象という特徴的な現象が起こるとされている。すなわち、平行線維の信号が、樹状突起のグルタミン酸受容体において抑制さ

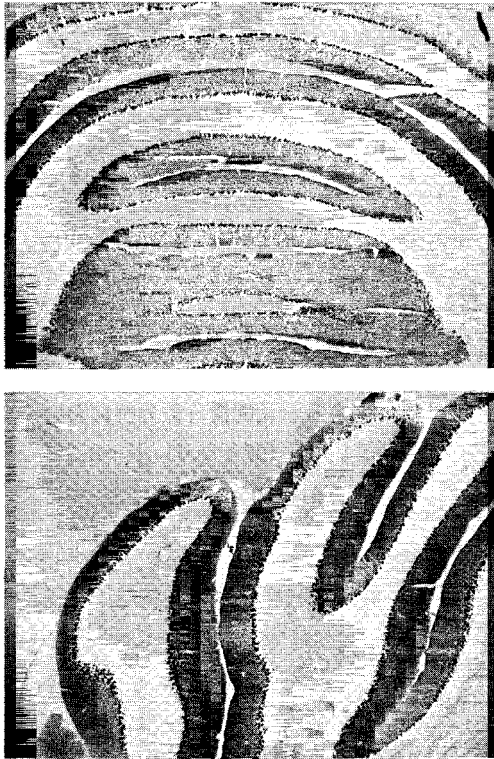


図7 抗PV抗体20,000倍の小脳前額断面
上段は小脳虫部, 下段は半球部。倍率20倍

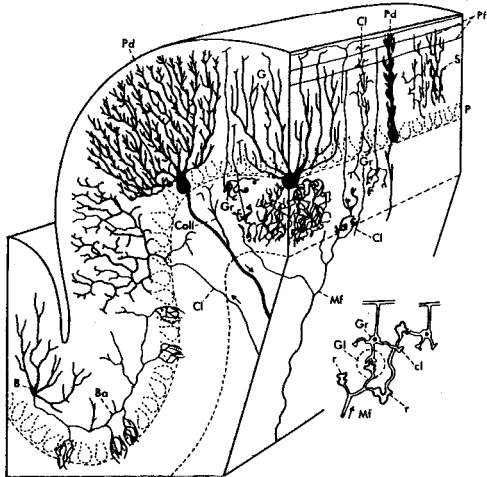


図8 小脳皮質の細胞構築
B: 籠細胞, Ba: 籠細胞の軸索, Cl: 登上線維
cl: 顆粒細胞の樹状突起先端の爪
Coll: プルキンエ細胞の反回側枝, G: ゴルジ細胞
Gr: 小脳糸球, Gr: 顆粒細胞, Mf: 苔状線維
P: プルキンエ細胞, Pd: プルキンエ細胞の樹状突起
Pf: 平行線維, r: 苔状線維のロゼット
S: 星状細胞 (Brodal, 1981より。文献15から改編)

れる現象である(図9)。また、この現象は、その持続時間の長さや広がりから、運動制御や運動学習に根本的な影響を与えていると考えられている¹⁶⁻²⁰。

この長期抑圧現象が起こっているプルキンエ細胞では興奮刺激が抑制されているため、細胞体内の Ca^{2+} 濃度は低くなっており、PVの濃度は上昇していないことが想像される。組織を固定した時のそれぞれのプルキンエ細胞への入力状態が異なっていれば、興奮している細胞、興奮していない細胞が存在し、それぞれのプルキンエ細胞体においてPVの濃度の差異が生じ

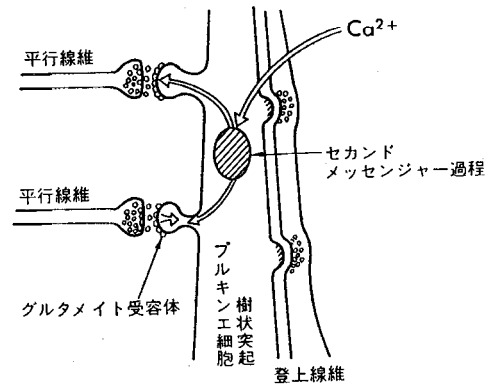


図9 プルキンエ細胞樹状突起における長期抑圧現象(文献20より)

ることは考えやすい。

さて、今回の一連の実験は、小脳への入力状態の変化によるPVの染色性の変化を形態学的に捕らえることを目的の1つとした。したがって、一次抗体の濃度の差により染色性が著しく変動するようであれば、PVの変化を有意に捕らえることができないと考えた。このために、濃度の異なる5,000倍、10,000倍、20,000倍の3種類の一次抗体溶液を作製し染色を試み、予備的な検討とした。そして、顕微鏡的にはこれらの濃度差による染色性の差違は観察されなかった。以上の結果から、以降の実験に用いる一次抗体の濃度を10,000倍に決定した。すなわち、

この濃度で抗原を標識すれば過不足なく染色可能で、10,000倍希釈の一次抗体溶液は少なくとも濃淡2倍までの安全率を有すると考えられたためである。

実験2. PV濃染プルキンエ細胞の小脳内分布の観察

目 的

実験1において、個々のプルキンエ細胞の細胞体のPV濃度には差違のあることが観察された。そこで実験2では、細胞体が良く染色されている細胞(PV濃染プルキンエ細胞)の小脳内での分布に一定の法則性、すなわち偏りがあるのかどうか、各小葉間、虫部、中間部、半球

顕微鏡を用いて細胞体が濃染しているプルキンエ細胞の数を数えた。矢状断切片では各小葉間のPV濃染プルキンエ細胞数を同様に数えた。全体のプルキンエ細胞数に対する割合を求め、傾向を検討した。

結 果

矢状断切片におけるPV濃染プルキンエ細胞の分布は図11に示すようになった。すなわち、その出現頻度は、7~81%と各小葉間について個体ごとに大きなばらつきを認めた。統計的には繰り返しのある一元配置分散分析において、各小葉間のF値は0.407となり、 $P=0.915$ で、有意差を認めなかった(図10)。

前額断切片における観察でも、分布の虫部、