

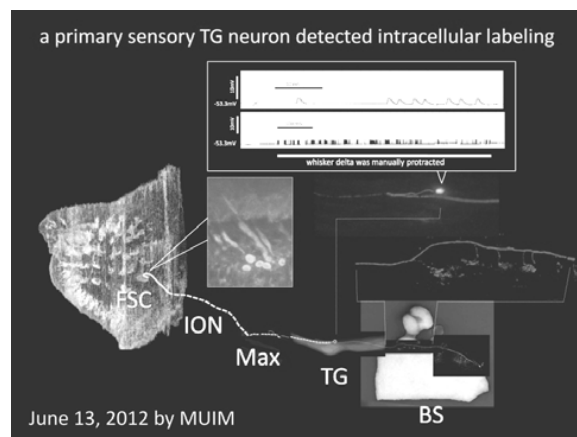
平成25年度 ユニット・講座研究

単一三叉神経節ニューロンの電気生理的・形態学的解析

熊本賢三, 榎原智美, 外村宗達, 高橋茉莉衣, 大槻妙子, 黒田大地 解剖学ユニット

三叉神経節の偽単極性ニューロンの末梢は主に顔面、口腔、鼻腔、歯などの顔面領域に神経終末を広げて感覚を支配し、中枢では中脳路核、主感覚核および脊髄路核からなる三叉神経感覚核においてシナプスを形成して感覚を二次ニューロンに伝達する。主感覚核は脊髄神経系の後索核と同等の性質を持ち顔面部の皮膚からの識別性触覚を受け入れ、脊髄路核は橋下部から第3頸髄にかけて下方へ続く長い核を形成し、吻側亜核、中間亜核および尾側亜核の3つに区分される。吻側亜核と中間亜核は口腔領域の感覚、尾側亜核は顔面および周辺領域の侵害・温度感覚を受け入れる。一方、齧歯類やネコでは顔面部にヒゲといわれる洞毛を持ち、これを支配する三叉神経主感覚核、中間亜核および尾側亜核は洞毛の配列を反映するモジュール構造を有している。我々はすでにラットの洞毛において6種類の感覚神経終末、Merkel endings, lanceolate endings, club-like endings, reticular endings, spiny endings, free nerve endings が分布することをこれまでに明らかにした。三叉神経節にある感覚一次ニューロン全体の入出力部位は明らかにされているが、個々の単一ニューロン全貌は未だ解明されておらず、末梢で形成する神経終末の形態と三叉神経感覚核におけるシナプス形成の詳細は不明である。我々は三叉神経感覚一次ニューロンの電気生理学的特性と末梢性・中枢性終末の形態を明らかにするために、顔面部洞毛内の感覚神経終末に注目し、3~5週齢のWistar系雄性ラット(体重40~120g)を用いて実験を行った。動物を深麻酔して脳定位装置に固定し、右頭頂骨の一部を除去し、実体顕微鏡下に脳組織を円筒に三叉神経節に至るまで除去後、脳硬膜を剥離した。剥離後、三叉神経節の表面が乾燥しないように生理食塩水を満たし、三叉神経一次ニューロンの細胞体に1μlの1Mの酢酸カリウムに溶解した15-20% neurobiotinを満したガラス電極を一次元油圧マイクロマニピュレータにて挿入した。皮膚表面をエアパフとvon Frey Hairにより刺激して受容野を探索し、反応電位を記録後、トレーサーを電気泳動的に細胞体に注入した。1匹のラットには1回のみトレーサーを注入し、単一の一次感覚ニューロンのみが組織化学により視覚化されるようにした。実験終了後、動物は20時間麻酔下に生存させた後、深麻酔して経心臓的に生理食塩水で前灌流し、1Mのリン酸緩衝液(PB)に溶解した8% formaldehydeで灌流固定した。固定後、頭部を摘出して同固定液に冷蔵庫内で浸漬した。洞毛部皮膚、上顎神経、三叉神経節および脳幹の一連の組織を実体顕微鏡下に剖出し、洞毛部皮膚進入部、脳底部正中の蝶形骨と後頭骨の縫合位、三叉神経根中央で切断した。標本は氷結防止処理後、クライオスタ

ットにて凍結連続浮遊切片とした。三叉神経節はAlexa594標識streptavidinに冷蔵庫内で一晚浸漬して標識ニューロン内のneurobiotinを可視化し、洞毛部皮膚および脳幹の全ての連続切片は、TSA強化反応後、同様にstreptavidinで標識した。全ての組織は封入し、蛍光顕微鏡にて観察し、必要な画像イメージを顕微鏡用デジタルカメラにて取得した。皮膚神経終末形態の確認のため、必要に応じて、切片を再びT-PBSにて洗浄後、ウサギ抗PGP9.5抗体を用いて免疫組織化学的に全ての軸索を可視化し(二次抗体; Alexa 488標識抗ウサギIgG)、共焦点レーザー顕微鏡システムにて観察した。また、洞毛内の神経終末の同定は、共焦点レーザーのみならず、



電子顕微鏡にても微細構造を確認している。下図に示すように洞毛内に位置する棍棒状終末を形成する感覚一次ニューロンの全景が明確にされている。末梢性軸索は、上顎神経内を走行して洞毛の下方から内部へ侵入し、海綿静脈洞内を上行し、ringwulst(輪状塊)の高さで外根鞘外側にある1個の棍棒状終末を形成していた。また、その中枢性軸索は三叉神経主感覚核に微細な有節状線維となり樹状に広く分布し、さらに主幹軸索は脊髄方向に下行して脊髄路核に向かって多数の側枝を出して樹状に広がっていた。また、洞毛を動かすことにより得られた反応電位も記録されており、この感覚神経終末が洞毛の動きを捕らえていることがわかる。現在、この感覚終末は7例が明らかにされており、いずれも同様の中枢性投射を形成しており、このタイプのニューロンの構造解析を進めている。このタイプのニューロンは、脊髄神経系の識別性触覚を伝える系と同様の中枢投射をしている。すなわち、脊髄では、識別性触覚のニューロンは脊髄の後角に終末し、さらに後索路を通して延髄の後索核にいたる。三叉神経系では、はじめに主感覚核に終末し、さらに枝を脊髄路核に延ばしている。

メルケル細胞とメルケル神経複合体を形成す

る神経終末を形成するニューロンを標識できた。これは、洞毛に間歇的に触れると発火するニューロンで、末梢性軸索は洞毛下部より内部に侵入し、海綿静脈洞内を上行し、外根鞘を貫いて分枝して数珠状線維となり、煉瓦状に配列するメルケル細胞と接するメルケル終末となっていた。中枢性軸索は棍棒状終末を形成するニューロンと同様の分布を示していた。

洞毛間の皮膚にある毛包の周囲に分布する柵状終末の一部を形成するニューロンを標識できている。1本の毛包周囲の柵状終末は多数のニューロンに支配されており、末梢性軸索は、そのうちの一部の槍型終末を形成していた。中枢性軸索は棍棒状終末を形成するニューロンと同様の分布を示していた。

さらに、いくつかの神経終末を形成する感覚一次ニューロンも標識されているが、ニューロンの全体像を得ることができていないものがある。

今後は、各神経終末について例数を集め、構造解析を行うと共に、中枢における軸索の投射領域と終末の分布状況と微細構造を明らかにすると共に、二次ニューロンについても解明していきたい。

【著書】

熊本賢三, 榎原智美; 皮膚器械受容器の構造・触覚認識メカニズムと応用技術-触覚センサ・触覚ディスプレイ-【増補版】第1章第2節:19-33, 下条 誠, 前野隆司, 篠田裕之, 佐野明人編 S&T出版 2014. 3. 19.

【論文および学会発表等】

外村宗達, Meir Inbal, 榎原智美, 黒田大地, 歌大介, 古江秀昌, 古田貴寛, Bagdasarian Knarik, Ahissar Ehud, 熊本賢三; Full visualization of single trigeminal ganglion neuron. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 講演プログラム・抄録集 P181 ポスター3P-H128

高橋茉莉衣, 榎原智美, 黒田大地, 藤原浩芳, 小田 良, 久保俊一, 熊本賢三; Distribution of Merkel cells around human finger nail 学会同上 P180 ポスター3P-H123

古田貴寛, 榎原智美, 金子武嗣; ラット洞毛の毛包内における器械受容器の形態的特徴と反応特性の関係 学会同上 P138 ポスター2P-G023

榎原智美, 外村宗達, 熊本賢三, 黒田大地, 歌大介, 古江秀昌, 古田貴寛, Ahissar Ehud; in vivo 単一神経細胞電位記録による三叉神経一次感覚ニューロンの形態学的解析 Neuro 2013, P3-1-144

榎原智美, 外村宗達, 熊本賢三, 歌大介, 古江秀昌; ラットヒゲニューロンにおける一次感覚ニューロンの機能形態の同時追究. 自然科学研究機構生理学研究所年報 第34巻 P165.(一般共同研究報告)