

ストレス性脳機能障害におけるウイルス持続感染の影響

平成 25 年 5 月 24 日受付

齋藤 敏之
西野 佳以
京都産業大学総合生命科学部

要 旨

ストレスによる過剰な副腎皮質ホルモン (CORT) 分泌により、脳の海馬や前頭前野において神経変性や萎縮がおり、さらに心的外傷後ストレス障害 (PTSD) 等の脳機能障害にむすびつくと考えられている。近年、ストレスに起因すると思われる脳機能障害が増加していることから、その背後に脳の調節系の破綻に絡む何らかの因子が潜んでいると考えられるが、解明に至っていない。本研究では、潜在性因子の一つとしての向神経性ウイルスに焦点をあて、ストレスによる脳機能障害との関連性を明らかにすることを目的としている。

脳の中では海馬や前頭前野等に亜鉛含有神経網が存在する。これらの脳の領域がストレスにより障害や萎縮がおこる部位であることを考え合わせると、亜鉛含有神経の変化とストレスによる脳機能障害との間に何らかの因果関係があると推測される。

亜鉛含有神経網は Timm 染色法により可視化できる。これまでの研究では Timm 染色プロトコルに多くの改変が加えられており、汎用性の高い、簡便なプロトコルがない。そこで、これまで報告されている Timm 染色法に技術的な再検討を加え、より汎用性のある染色プロトコルの確立を目指した。マウスを用いた今回の検証では、海馬を対象とする簡便な Timm 染色法を確認した。現在、向神経性ウイルスや CORT の亜鉛含有神経に対する影響を細胞レベルで解析するため、脳神経細胞の初代培養法の検証と標本の評価を進めている。

キーワード：亜鉛、硫化銀法、海馬、ストレス、ウイルス

1. はじめに

ストレス作用因子によって生じるストレス反応はネガティブフィードバック機構により収束する [1, 2]。しかしながら、過大なストレス刺激や長期のストレス刺激は脳に障害を与える。なかでも海馬や前頭前野において神経傷害やそれらの領域の萎縮を引き起こすことが知られている [3-7]。このような病態はストレス反応軸のフィードバック機構の破綻により副腎皮質ホルモ

ンが過剰に分泌されることに起因すると考えられている [3-7]。脳の中には亜鉛含有領域が存在することが組織学的研究で明らかにされている [8-10] が、亜鉛陽性反応を示す脳の領域には海馬や前頭前野等のストレスによって神経変性や萎縮がおこる部位が含まれている。亜鉛の役割については不明な点が多いが、グルタミン酸等の神経伝達物資の貯蔵・放出に関与していることが考えられている。一方、過剰量の亜鉛はカルシウムと同様、毒性を示す可能性が指摘されており、ストレスによる脳神経変性や萎縮との因果関係が注目されている。

シナプス小胞内の亜鉛はTimm 染色法により可視化することが可能である [8-10]。これまでの研究ではTimm 染色プロトコールに多くの改変が加えられており [8-10]、標準化された染色プロトコールがない状況である。そこで、この染色技術とプロトコールの再検討を行った。また、分離・培養した神経細胞を用いて同様の解析を進めるため、脳神経系の初代培養法を検証した。

2. 材料および方法

本実験は、京都産業大学動物実験委員会の承認を得て行った。

C57BL6J ならびに ICR マウスは明暗サイクルならびに温湿度が調節された SPF 飼育施設にて飼育し、約 1 週間の馴致期間を経た後、実験に供した。

(1) 脳血管灌流

マウスにペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル 60 mg/kg) を腹腔内投与し、全身麻酔を施した。必要に応じて、イソフルランの吸入麻酔を追加した。

腹部を正中線に沿って切開した後、胸骨ならびに肋骨を切開、心臓を露出した。心尖部に小切開を加えた後、左心室より大動脈起始部に灌流用カニューレを挿入・固定した。氷冷下でヘパリン含有 0.1 M リン酸緩衝液、次いで、0.4%あるいは1%硫化ナトリウム含有 0.1 M リン酸緩衝液と 4% パラホルムアルデヒドを含む灌流液にて脳を血管灌流した。灌流終了後、脳を摘出し、4℃でパラホルムアルデヒドによる後固定を行った。

(2) 切片作成

パラホルムアルデヒドにて後固定した脳を 30% ショ糖水溶液に 2~3 日間静置した。その後、30~50 μm の厚さで凍結切片を作成し、あらかじめポリリジンコートしたスライドガラスに貼り付けて乾燥させた後、染色に用いた。

(3) Timm 染色法と Nissl 染色法

Timm 染色液にはアラビアゴム、10% 乳酸銀、2% ハイドロキノロンと 3% クエン酸混合液を 50:1:10 の割合で混合したものを用いた。また、染色時における照明や加温の必要性を合わせて検

討した。Timm 染色法による染色後、常法に従って Nissl 染色による二重染色を行った。

(4) 脳神経細胞の初代培養

イソフルラン吸入によりマウスに全身麻酔を施した後、Aoyagi ら [11] の方法に準じて、胎齢 17 日のマウス胎児から大脳皮質あるいは海馬を取り出し、初代培養を行った。その後、神経細胞からの樹状突起の伸長状況などを経時的に観察した。

3. 結果と考察

(1) 海馬切片における Timm 染色と Nissl 染色

図 1 に暗黒下で海馬切片を 75 分、Timm 染色液に浸漬して染色を行った後に、Nissl 染色を行った時の顕微鏡像を示した。

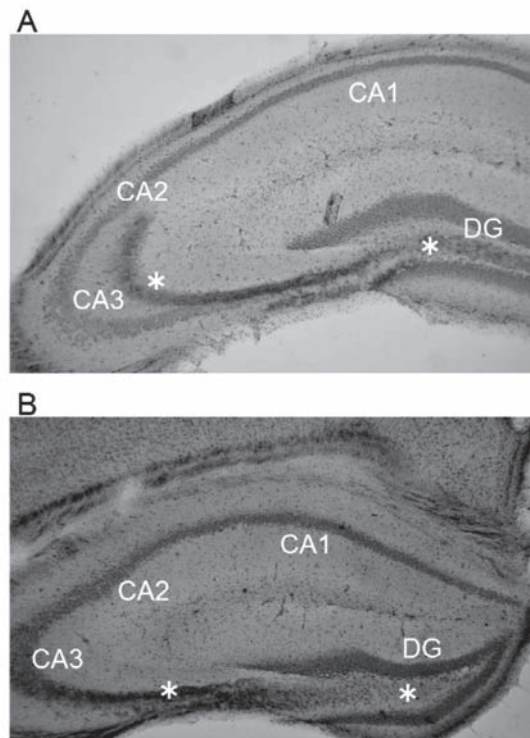


図 1. マウス海馬凍結切片を Timm 染色法と Nissl 染色法にて二重染色した時の顕微鏡像(例)。切片は海馬体の異なる 2 か所から作成した。*印は Timm 陽性反応部位を示す。DG；歯状回。

Timm 陽性反応を示した神経網（*の部分）は歯状回や CA3 の歯状回側、一部は CA3 の海馬采側においても観察された。Timm 陽性反応を呈した箇所は Nissl 染色陽性箇所と異なっていた。Timm 陽性反応は神経網が存在するところに認められることがこれまでの研究で明らかにされている [8-10]。今回の所見は海馬内でも Timm 陽性反応を呈する箇所が CA3 の歯状回側のみならず、CA3 の海馬采側にも存在したことは、グルタミン酸を含む神経網の広がり多様性を示していると考えられる。

今回の検討で、Timm 陽性反応を得るためには脳を硫化ナトリウムやパラホルムアルデヒドにて血管灌流する際にその手順を適切に設定する必要があることも判明した。灌流手順を変更すると、必ずしも良好な Timm 反応が得られない（未発表知見）。また、0.4%、1%、いずれの濃度の硫化ナトリウムを含むリン酸緩衝液を灌流しても、Timm 染色反応を得ることができた。一方、スライド上に染色液を滴下して暗黒下で室温にて 1 時間の染色を行った後、60℃で加温したプレート上で 45 分間の染色を追加すると、切片全体が急速に黒色化し、Timm 染色より鍍銀染色様の像を得た。この黒色反応は神経の好銀性を示す反応であると考えられる。また、光を照射して Timm 染色を行うことは、切片全体を短時間に急速に黒色化させることから、染色度合いを調節することが極めて困難であり、適切な手法ではなかった。

(2) 初代脳神経培養

図 2 に胎齢 17 日の ICR マウス胎児から分離・培養した大脳皮質神経細胞の顕微鏡像を示した。培養 3 日目で樹状突起が伸長し、5 日目では樹状突起同士の結合が増え、密になる様子を観察することができた。現在、さらに長期間培養可能な手法と条件を検証している。また、海馬由来の神経細胞の培養を試みている。これまでの検証で、5 日程度の培養が可能であった。

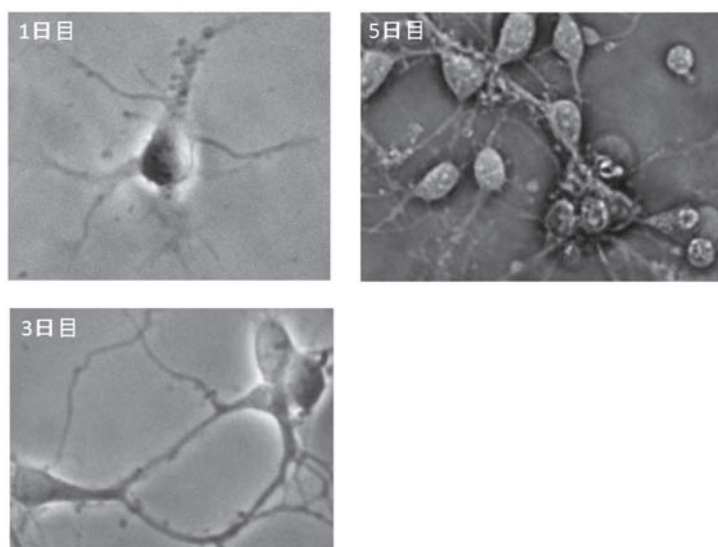


図 2. 大脳皮質由来の初代神経細胞の、培養後 1 日目、3 日目および 5 日目の顕微鏡像。

4. 今後の展開

(1) 個体レベルでの研究

これまでの一連の検討により、マウスの脳を対象にした Timm 染色法をほぼ確立することができた。また、マウスを用いて、より侵襲の少ない方法で長期間、ストレスホルモンレベルを上昇させることが可能となっていることから、人為的な短期ならびに長期のストレスホルモン処置による海馬等の神経機能変化、神経変性を定性的に解析するための研究を行う。また、向神経性ウイルスの影響を解析すべく、準備を進めている。

(2) 培養細胞レベルでの研究

ストレスホルモンや向神経ウイルスが神経細胞に及ぼす影響を細胞レベルで解析するため、培養細胞を利用した研究を進める。図2に示すように、大脳由来の神経細胞の分離・培養が可能となった。海馬から分離した神経細胞についても大脳由来の神経細胞に比べて生存期間がやや短いものの、培養が可能となっている。これらの培養系にバイオイメージングの手法などをあわせて活用することにより、ストレスホルモン、向神経性ウイルスが脳神経細胞に及ぼす影響とそのしくみについて基礎的な知見を得るための解析を進める。

参考文献

- [1] Selye H. (1936). Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. *Br. J. Exp. Pathol.* 17: 234-248.
- [2] Herman J.P. and Cullinan W. E. (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary- adrenocortical axis. *Trends in Neurosci.* 20: 78-84.
- [3] Sapolsky R.M. and Pulsinelli W.A. (1985) Glucocorticoids potentiate ischemic injury to neurons: therapeutic implications. *Science* 229: 1397-1400.
- [4] Uno H., Tarara R., Else J. G., Suleman M. A. and Sapolsky R. M. (1989) Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates. *J. Neurosci.*: 9: 1705-1711.
- [5] Sapolsky, R.M. (1999). Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp. Gerontol.* 34:721-732.
- [6] Sorrells S. F., Caso J.R., Munhoz C. D. and Sapolsky, R. M. (2009) The stressed CNS: when glucocorticoids, aggravate inflammation. *Neuron* 64:33-39.
- [7] Zhe D., Fang H. and Yuxiu S. (2008) Expressions of hippocampal mineralocorticoid receptor (MR) and glucocorticoid receptor (GR) in the single-prolonged stress-rats. *Acta Histochem. Cytochem.* 41 (4): 89-95.
- [8] 藤井龍平 (1984) 海馬領域の発生学的・組織学的・電子顕微鏡学的研究. *岡山医誌* 8: 537-551.
- [9] 吉田和典 (1996) てんかんモデルラットにおける海馬歯状回神経線維の形態学的変容過程. *福井医科大学一般教育紀要* 16:1-15.

- [10] de Paulo C. H. and Mello L.E.A.M. (1985) Neo-Timm staining in the thalamus of chronically epileptic rats. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 38: 1677-1682.
- [11] Aoyagi N., Uemura K., Kuzuya A., Kihara T., Kawamata J., Shimohama S., Kinoshita A., and Takahashi R. (2010) PI3K inhibition causes the accumulation of ubiquitinated presenilin 1 without affecting the proteasome activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391: 1240-1245.

Progress report: Influence of virus infection in stress-induced neuronal dysfunction in the mouse brain

Toshiyuki SAITO

Yoshii NISHINO

Abstract

Recently, number of patients tends to increase suffering from such neuronal dysfunction as major depression, and post-traumatic stress syndrome (PTSD). Severe or repeated-stress causes the brain malfunction possibly due neuronal degeneration and atrophy in the prefrontal cortex and hippocampus caused by prolonged secretion of glucocorticoid. However, factors remain to be unevaluated yet to cause the neuronal dysfunction under stressful condition. One possibility may be viral infection in the brain, which does not produce any pathological changes in healthy individuals.

The purpose of this study is to examine and to evaluate whether viral infection may cause apparent damage in zinc-containing neuropil in the brain of the animals that are exposed to stress hormone.

To visualize the zinc-containing neuropil, Timm-staining method is often used. There are many variants in this technique, so that it is much less comprehensive for experimenters. No common protocol has been issued.

In our study, we re-investigated the Timm-staining protocol using mouse, in addition to perfusion and fixation manner with sodium sulfide and paraformaldehyde. Through this study, we obtained the simple and comprehensive protocol for use. On the other hand, neuronal cells were isolated from the fetal brains and were cultured to get any early sign of neural degeneration by exposure to stress hormone, and to analyze involvement of viral infection in the stress-induced neuronal damages. In next coming study, we shall reveal influence of glucocorticoid and viral infection on the zinc-positive neuropil by use of the histological Timm-staining method and by use of bio-imaging techniques.

Keywords: zinc, silver staining method, hippocampus, stress, virus