

## 第 91 回麻布獣医学会 一般学術演題 10

## 脳挫傷モデルマウス astrocyte・microglia における acetylcholinesterase 発現局在の組織化学的検討

○堀尾 朋世, 坂上 元栄, 山本 雅子

麻布大学 解剖学第二研究室

【背景・目的】中枢神経系では、神経細胞の環境を整えるグリア細胞が存在する。中枢神経が虚血・挫傷などにより障害を受けると、これらのグリア細胞のうち microglia 及び astrocyte が形態変化を起こし、活性状態となることで死細胞の除去や炎症反応を起こす。Acetylcholinesterase (AChE) は、神経伝達物質である acetylcholine (ACh) を分解不活化する酵素である。近年、ACh が microglia の機能を制御することが報告された (Yan-Zhong, 2015)。一方で、astrocyte 活性化 *in vitro* モデルにて、AChE 阻害が、活性化による形態変化と astrocyte マーカーのグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) 発現増加を抑制し (Ozawa *et al.*, 2013), さらにその活性化に伴い AChE 発現が増加することが明らかとなった。これらのことから、AChE が、astrocyte と microglia の機能を制御する可能性が考えられるが、*in vivo* での astrocyte・microglia 活性時における AChE 発現局在に関する報告はみあたらない。そこで、本研究では、マウス脳挫傷モデルでの、astrocyte・microglia 活性化にともなう AChE と、ACh 分布を推測するための ACh の合成酵素である choline acetyltransferase (ChAT) の発現局在の変化を組織化学的に検討することを目的として研究を行った。

【方法】脳挫傷モデルは、C57BL/6NJcl マウス (8 週齢オス) を用い、深麻酔下で露出した右頭頂骨に、液体窒素で冷却した直径 2 mm ステンレス棒を 30 秒間密着させることで作製した。室温のステンレス棒を左頭頂骨に処置することで偽処置とした。処置から 3 および 7 日後に定法に従い還流固定・凍結切片を作製

し、HE 染色、そして AChE, GFAP, CD68 (活性化 microglia マーカー), ChAT のそれぞれに対する抗体を用いた蛍光免疫組織化学染色を行った。また AChE の活性については酵素組織化学染色を行った。

【結果】挫傷部位は 3 日後には神経細胞の欠損と、主に周囲において GFAP 陽性細胞、CD68 陽性細胞の増加が認められ、7 日後では、挫傷部位内部にもそれらの顕著な増加がみられた。一方、挫傷部位 AChE 陽性細胞も同様に増加し、その大半が、GFAP もしくは CD68 と共陽性であった。形態計測で得られた「GFAP 陽性細胞数に対する GFAP/AChE 共陽性細胞数の割合」は偽処置と比較し、挫傷処置 3 日後で増加傾向がみられ、7 日後では有意に増加した。また CD68 陽性細胞はほぼすべてが AChE 陽性であった。さらに、AChE の酵素組織化学染色陽性反応は、挫傷部位でみられ、免疫組織化学染色による AChE 抗体陽性反応部位と一致した。また、ChAT 陽性反応の増加が、挫傷部位 GFAP もしくは CD68 陽性細胞周囲で認められた。

【考察】以上の結果から、*in vivo* で脳挫傷の astrocyte・microglia 活性時に、これら細胞内に AChE が発現局在し、その AChE は活性を示すことが明らかとなった。また、挫傷部位の GFAP もしくは CD68 陽性細胞周囲で ChAT 陽性反応の増加がみられたことから、細胞周囲での ACh 合成が示唆された。このことから、これらの細胞が AChE 発現を増加し、周囲の ACh を分解不活化することで、自身の活性化が円滑に行える環境を整えていると考えられた。