



Title	ラット脊髄自律神経系細胞への入力系に関する形態学的研究：免疫電顕二重染色法を用いて
Author(s)	河野，讓二
Citation	大阪大学，1989，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36036
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	こうのじょうじ 河野譲二
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8 5 7 5 号
学位授与の日付	平成元年3月24日
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ラット脊髄自律神経系細胞への入力系に関する形態学的研究 —免疫電顕二重染色法を用いて—
論文審査委員	(主査) 教授 塩谷弥兵衛 (副査) 教授 小野 啓郎 教授 津本 忠治

論文内容の要旨

〔目的〕

胸髄及び仙髄側角領域は、各々、交感神経及び副交感神経節前細胞の存在部位としてよく知られている。近年これらの領域には、enkephalinを始めとするペプチド系終末や、カテコールアミン系終末などが豊富に存在することが知られ、生理薬理学的にも、これらの自律神経系細胞に影響を与えていることが示唆されている。しかし、これらの自律神経系細胞とそれに入力する神経終末との関係は、形態学的には明かにされていない。そこで今回、新しく光顕及び電顕レベルで観察可能な免疫二重染色法を開発し、その方法を用い、胸髄交感神経節前細胞と仙髄副交感神経節前細胞への入力系に関して、どのような違いがあるのかを明かにする目的で実験を行なった。

〔方法〕

Wistar系雄ラット(約100g)を用い、0.1% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde 加リン酸緩衝液(pH 7.4, 300ml)にて灌流固定後、胸髄(Th 2, 3)及び仙髄(S 1, 2)を取り出し、Vibratomeにて、約25 μ m厚の切片を作成した。そして、交感及び副交感神経節前細胞は、それらの神経伝達物質であるアセチルコリンの合成酵素 choline acetyltransferase (CAT) に対するモノクローナル抗体(rat-mouse hybridoma より作成)を用い、アビジンビオチン法にて β -galactosidaseで標識した。そして、indolyl- β -galactoside (IbGa)を基質として呈色反応(IbGa 反応)を行ない、CAT 陽性細胞を描出した。一方終末の方は、rabbit で作成した抗enkephalin (ENK) 抗体、抗calcitonin gene-related peptide (CGRP) 抗体、抗phenylethanolamine-N-methyltransferase (PNMT, アドレナリン合成酵素)を用いPAP法にてperoxidaseで標識し

た。そしてdiaminobenzidine (DAB) 反応にて呈色反応を行ない、同一切片上にてCAT陽性細胞とENK陽性終末、CAT陽性細胞とCGRP陽性終末、CAT陽性細胞とPNMT陽性終末とを各々免疫二重染色した。そしてEpon樹脂包埋後、それらの関係について、光顕レベルでの観察を行ない、相関が示唆されるものについて超薄切片を作成し、電顕レベルでの観察を行なった。

〔成績〕

1) β -galactosidase と peroxidase を用いた免疫二重染色法について

光顕レベルでは、 β -galactosidase で標識されIbGa反応にて描出されたCAT陽性細胞は青緑色を呈しており、DAB反応で褐色に描出されたENK、CGRP、PNMT陽性終末とは容易に区別され、CAT陽性細胞とそれらの終末との関係を同一切片上で観察することができた。

電顕レベルでは、CAT陽性細胞は、IbGa反応産物の沈着した細胞として認められた。IbGa反応産物は、大きな棒状や球形の反応産物として認められ、DAB反応の細かな反応産物とは容易に区別できた。このような異なる二種の反応産物を指標として、電顕レベルにおいても二重染色が可能であった。

2) 胸髄及び仙髄側角のCAT陽性細胞と、ENK、CGRP、PNMT陽性終末との相関について

ENK陽性終末は、光顕レベルでは胸髄側角、仙髄側角ともにCAT陽性細胞を取り囲んだり、樹状突起に沿って走行する線維が多数認められたが、CAT陽性細胞とは少し離れCAT陽性細胞との相関が考えにくい領域にも多数の終末が認められた。そして、電顕レベルでは胸髄側角、仙髄側角ともにCAT陽性細胞にaxo-dendriticにシナプス結合していた。

CGRP陽性終末は、光顕レベルでは胸髄側角には殆ど認められなかったが、仙髄側角には、後角から後角の最外側を通り側角へと侵入する多くの終末が認められた。そして、電顕レベルでは仙髄側角において、CAT陽性樹状突起にaxo-dendriticにシナプス結合するCGRP陽性終末が認められた。

PNMT陽性終末は、光顕レベルでは胸髄側角に多数認められ、仙髄側角においても胸髄に比べ少ないものの認められた。そして、胸髄側角、仙髄側角ともに、CAT陽性細胞を取り囲んだり、樹状突起に沿って走行しており、CAT陽性細胞と離れて存在するような終末は殆ど認められなかった。そして、電顕レベルでは胸髄側角、仙髄側角ともに、axo-somatic, axo-dendriticにシナプス結合していた。

〔総括〕

1) β -galactosidase と peroxidase を用いた免疫二重染色法は、容易に光顕及び電顕観察が行なえ、細部にわたり二重標識可能な免疫電顕二重染色法である。

2) 脊髄内在性細胞からの入力を示すと考えられるENK陽性終末は、胸髄及び仙髄側角のCAT陽性細胞存在領域内やその周囲に非常に多く認められ、CAT陽性細胞に直接シナプス結合していた。これは、ENKの脊髄自律神経系細胞に対する抑制性の作用が、presynaptic inhibitionによるものではなく、monosynapticな作用であることを示唆する。

3) 知覚系の入力を示すと考えられるCGRP陽性終末は、仙髄側角には後角からの線維が多数認められ、直接CAT陽性構造にシナプス結合していた。しかし、胸髄側角には殆ど認められなかった。このことは、仙髄副交感神経節前細胞は、知覚系からの直接の入力を多く受けるのに対し、胸髄交感神経節前細胞は、知覚系からの直接の入力は殆ど受けないことを示している。

4) 上脊髄性の入力を示すと考えられる PNMT 陽性終末は、胸髄及び仙髄側角の CAT 陽性細胞存在領域内にのみ認められ、ENK 陽性終末の分布パターンとは異なっていた。これは、脊髄内在性の入力と上脊髄性の入力の違いを示していると考えられる。又、PNMT 陽性終末は、CAT 陽性細胞に直接シナプス結合しており、胸髄交感神経節前細胞を介し血管内圧の維持などの作用や、仙髄副交感神経節前細胞を介し骨髄臓器の調節作用などに関与することが示唆される。

5) 以上より、胸髄交感神経節前細胞と仙髄副交感神経節前細胞では、その受ける入力に大きな違いがあることが明かとなった。即ち、前者では上脊髄性の入力と脊髄内在性の入力を、後者ではそれらに加え、知覚系からの入力をも受けることが明かになった。

論文の審査結果の要旨

神経解剖学においては、形態学的に神経細胞間の相互関係を解析し、どのような機能的な意義を有しているかを明かにすることが非常に重要である。本研究では、光顕レベルのみならず、電顕レベルでの解析をも、容易に且つ精細に行なうことを可能にした免疫二重染色法の開発に成功し、その方法を用いて、脊髄自律神経系細胞への入力系とその活性物質について観察を行なっている。そして、胸髄交感神経節前細胞と、仙髄副交感神経節前細胞とでは、その受ける入力に大きな違いがあることを明かにした。これらの研究は、学位論文としてふさわしいものと考えられる。