

Title	Preproenkephalin gene expression in the rat spinal cord after noxious stimuli.
Author(s)	野口, 光一
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37134">https://hdl.handle.net/11094/37134</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

## 【1】

氏名・(本籍)	野 口 光 一
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8727 号
学位授与の日付	平成元年 5 月 15 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	Preproenkephalin gene expression in the rat spinal cord after noxious stimuli. (ラット脊髄における侵害刺激に伴う神経活性物質の遺伝子発現に関する研究: in situ ハイブリダイゼーション法による解析)
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正彌 (副査) 教授 塩谷弥兵衛 教授 小野 啓郎

## 論 文 内 容 の 要 旨

## (目 的)

従来サブスタンスP (SP) およびエンケファリン (ENK) は、脊髄の痛覚伝達系において重要な役割を担っている事が、多くの生理学的・形態学的研究により示唆されている。そこで本研究では個々の細胞レベルで mRNA を捉えることが可能な in situ ハイブリダイゼーション法を用いて、侵害刺激に伴う脊髄レベルでの両ペプチドの遺伝子発現の動態を形態学的に把握し、神経活性物質の生合成の観点から SP と ENK の意義を検討した。

## (対象及び方法)

実験動物には 100-150 g のウイスター系ラットを用い、侵害刺激として右側足底に 5%ホルマリン 100  $\mu$ l を皮下注射した。未注射ラット及び注射後 1, 3, 8, 24 時間経過したラットを灌流固定し、L5 脊髄及び両側後根神経節を摘出、厚さ 15  $\mu$ m の凍結切片を作成した。プローブとしては、プレプロタキキニン A (PPTA, 625 塩基対, 京都大 中西教授より供与) 及びプレプロエンケファリン (PPE, 936 塩基対, 都立精神研 吉川教授より供与) cDNA を Multiprime random primer labeling system にて、<sup>35</sup>S 標識して用いた。in situ ハイブリダイゼーション法により、cDNA と特異的な mRNA のハイブリッド形成を行った後、オートラジオグラフィにて組織切片の観察を行った。陽性ニューロンは細胞上の銀粒子数の S/N 比で判定し、PPTA プローブでは 3 以上、PPE プローブでは 5 以上の細胞を陽性ニューロンとした。対照実験としては足底に生理食塩水を注射したラットを用いた。また反応の特異性を確認する為に非標識プローブを用いた競合試験を行い、陽性シグナルの消失を確認した。

## (成 績)

### 1) L5 後根神経節における PPTA 遺伝子発現

多くの PPTA 陽性ニューロンは小型であり、その分布は免疫組織化学法の結果とよく一致していた。ホルマリン注射24時間後では、注射側の後根神経節で  $17.2 \pm 2.5\%$  のニューロンが PPTA 陽性であり、反対側では  $11.6 \pm 1.3\%$  が陽性であった。又、時間経過をみると注射後1時間では両側に差はなく、3時間以後有意に注射側の後根神経節に PPTA 陽性ニューロンの増加が観察された。なお、生理食塩水を注射したラットでは陽性ニューロンの増加は観察されなかった。

### 2) L5 脊髄における PPE 遺伝子発現

PPE 陽性ニューロンは脊髄全体に分布していたが、特に後角表層 (I, II 層) 及び深層 (IV~VI 層) で数多く観察された。ホルマリン注射後、これらの層において PPE mRNA の増加が観察された。後角深層では注射後1時間で既に陽性ニューロンの増加が同側で見られ、少なくとも24時間は増加は持続していた。S/N比10以上の強陽性ニューロンも注射前の約5倍に増加していた。一方、後角表層では PPE 陽性ニューロンは漸増傾向を示し、24時間では注射前の約2倍であった。又、反対側の表層、深層でも、その程度は同側より軽度ながら、PPE 陽性ニューロンの増加が観察された。他の部位 (III, VII~X 層) では陽性ニューロンの増加は見られなかった。

## (総 括)

脊髄における神経活性物質の遺伝子発現の *in situ* ハイブリダイゼーション法による検索の結果、個々の細胞レベルでの mRNA を捉えることができ、さらに誘導実験による mRNA の発現量の変化を形態学的に把握することが可能となった。これは隣あうニューロンでさえ異なった機能を持つと言われる heterogeneity の高い神経系の解析には、大きな手段になると考えられる。

侵害刺激によって一次知覚ニューロンでは PPTA の、脊髄後角介在ニューロンにおいては PPE の遺伝子発現が増加したことは、その産物である SP や ENK の生合成の痛覚情報による活性化を意味している。以上の事により後根神経節の小型細胞の SP、脊髄後角介在ニューロンの ENK が痛覚伝達に重要な役割を呈することが明らかとなった。また、侵害刺激に対する脊髄後角介在ニューロンの反応において、時間的及び部位的な多様性が存在することが明らかとなった。これは脊髄における複雑な情報伝達の modulation を反映していると考えられ、今後解決すべき興味深い問題であると思われる。

## 論文の審査結果の要旨

本研究は脊髄痛覚伝達系における神経活性物質の意義を明らかにする為に、*in situ* ハイブリダイゼーション組織化学法という新しい手段を用いて、侵害刺激によるサブスタンス P 及びエンケファリンの遺伝子発現の変化を検索したものである。その結果、侵害刺激による両ペプチドの生合成の増加が脊髄や後根神経節において形態学的に証明され、脊髄痛覚伝達系における両ペプチドの重要性が明らかとなった。本研究は方法論においても、またその結果の意義においても脳神経研究に寄与するところ大であり、博士論文として値すると認められる。