



Title	初代培養三叉神経節細胞に対する発痛物質の作用
Author(s)	滝内, 聡
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39085
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 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

【2】

氏名	滝内 聡
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 11828 号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学基礎系専攻
学位論文名	初代培養三叉神経節細胞に対する発痛物質の作用
論文審査委員	(主査) 教授 齋藤 喜八 (副査) 教授 松浦 英夫 助教授 脇坂 聡 助教授 松尾 龍二

論文内容の要旨

【研究目的】

一次知覚神経における痛みの受容機構を解析するため、三叉神経節細胞の初代培養を行い、免疫組織化学的手法を用いて細胞を同定し、細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変化を指標として発痛物質の作用について検討した。

【研究方法】

体重200~250gの雄性モルモットから三叉神経節を摘出、collagenase, trypsin による酵素処理を行い、poly-D-lysine でコーティングしたカバーガラス上で培養を行った。培養液は牛胎児血清、及び NGF を含む DMEM を用い、さらに神経細胞以外の細胞増殖抑制のため cytosine arabinoside を添加した。

培養細胞を Zamboni 液で固定後、間接蛍光抗体法により免疫染色を行った。一次抗体には neurofilament protein (NFP), substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP) の各抗体を、二次抗体には lissamine rhodamine 標識した IgG 抗体を使用した。

本培養細胞にカルシウムイオン蛍光プローブ指示薬である fura-2/AM を取り込ませた後、倒立蛍光顕微鏡のステージにセットし、人工脳脊髄液による灌流下にて2波長蛍光測定法 (340nm, 380nm) により経時的に蛍光強度を測定し、ARGUS-50/CA システム (浜松フォトリクス) を用いて $[Ca^{2+}]_i$ を解析した。

発痛物質は bradykinin (BK), histamine, acetylcholine (ACh), SP, serotonin, capsaicin を使用した。

【結果及び考察】

(1) 本培養細胞は、培養開始後2日目には突起を伸ばし始め、7日目には数本の突起を伸ばし、線維がネットワークを形成した。本培養細胞のほとんどのものは NFP 陽性反応を示し、神経細胞であることが示された。また、SP 陽性、CGRP 陽性反応を示した細胞の割合はそれぞれ8%、10%であった。

(2) B_2 受容体の作動薬である BK (10^{-9} ~ 10^{-6} M) の刺激により一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がみられた。 10^{-5} M BK により反応を示した細胞は測定した全細胞中31%であった。しかし、 B_1 受容体の作動薬である des-Arg⁹-BK の刺激では変化はみられなかったことにより、本培養細胞には B_2 受容体が存在し、BK による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に関与することが示唆された。

(3) Histamine (10^{-5} ~ 5×10^{-4} M) の刺激により $[Ca^{2+}]_i$ の一過性の上昇が生じ、 5×10^{-4} M histamine により

測定細胞中29%の細胞において反応がみられた。この histamine の刺激による反応は H_1 受容体の拮抗薬である pyrilamine の前処置により拮抗されたが、 H_2 受容体の拮抗薬である cimetidine の前処置では影響を受けなかった。また、 H_1 受容体の作動薬である 2-pyridylethylamine の刺激により histamine と同様の $[Ca^{2+}]_i$ の増加がみられたが、 H_2 受容体の作動薬である impromidine の刺激では反応はみられなかった。これらの結果、本培養細胞には H_1 受容体が存在し、histamine による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に関与することが示唆された。

(4) ACh ($10^{-5} \sim 5 \times 10^{-5} M$) の刺激により $[Ca^{2+}]_i$ の一過性の上昇がみられ、 $5 \times 10^{-5} M$ ACh により測定細胞中16%の細胞で反応がみられた。ACh 刺激による反応はムスカリン様 ACh 受容体の拮抗薬である atropine の前処置により拮抗されたが、ニコチン様 ACh 受容体の拮抗薬である hexamethonium の前処置では影響を受けなかった。また、carbachol の刺激により ACh と同様の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がみられたが、nicotine の刺激では反応はみられなかった。これらの結果、本培養細胞にはムスカリン様 ACh 受容体が存在し、ACh による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に関与することが示唆された。

(5) Capsaicin ($10^{-8} \sim 10^{-5} M$) の刺激により $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がみられ、その大きさは他の発痛物質と比較して大きく、持続時間も長かった。 $10^{-5} M$ capsaicin により反応した細胞は測定した細胞中14%であった。

(6) SP の刺激で $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した細胞は測定細胞中3%であり、その上昇は非常に小さなものであった。また、serotonin の刺激では $[Ca^{2+}]_i$ に変化はみられなかった。この結果、SP, serotonin は本培養細胞には発痛物質として作用しない可能性が示唆された。

(7) BK, histamine, ACh, capsaicin の刺激により $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がみられた細胞について免疫染色を行った結果、SP あるいは CGRP 陽性反応を示す細胞が多くみられた。

【結論】

本培養細胞には B_2 受容体、 H_1 受容体、ムスカリン様 ACh 受容体が存在し、発痛物質は各々の受容体を介して $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ、興奮を引き起こすことが明らかとなり、本研究で用いられた方法は一次知覚神経における痛みの受容及び伝達の研究に有用であることが示された。また、これら発痛物質に反応した培養細胞が免疫組織化学的に SP, CGRP 陽性を示したことから、SP, CGRP が痛みの伝達時において神経伝達物質あるいは神経伝達調節因子として機能している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は一次知覚神経における痛みの受容機構を検討する目的でモルモットの三叉神経節細胞の初代培養を行い、免疫組織化学的手法を用いて細胞を同定し、細胞内カルシウムイオン濃度の変動を指標として発痛物質の作用を調べたものである。その結果、各種発痛物質の刺激により本培養細胞は各々の受容体を介して細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を引き起こすことが示された。また、サブスタンス P 及び CGRP が一次知覚神経における痛覚の伝導に関与する可能性が示唆された。

本研究で得られた知見は一次知覚神経における痛みの受容及び伝達機構の研究に重要な指針を与えるものであり、博士(歯学)の学位を得る資格があるものと認める。