

Title	ラット脳および頸髄でのNADPH-diaphoraseの個体発生： 特に三叉神経—孤束核複合体について
Author(s)	岩瀬, 勝也
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40810
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	岩瀬勝也
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第13787号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床専攻
学位論文名	「ラット脳および頸髄での NADPH - diaphorase の個体発生 -特に三叉神経-孤束核複合体について-
論文審査委員	(主査) 教授 野首 孝祠 (副査) 教授 重永 凱男 講師 米原 典史 講師 林堂 安貴

論文内容の要旨

【研究目的】

一酸化窒素 (NO) は、近年脳内で重要な情報伝達に関与することが注目されている。NO を産生するニューロンは NO 合成酵素の一つである nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - diaphorase (NADPH - d) の酵素組織化学法により染色でき、成ラットの脳幹三叉神経覚核群内では NADPH - d 陽性ニューロンは三叉神経脊髄路核吻側垂核 (SpVo)、傍三叉神経核や尾側垂核 (SpVc) に認められる。SpVo 背内側部の陽性ニューロン群に続き、その背側部に密な陽性ニューロン群を孤束核 (Sn) 吻外側部に形成する。本研究は、胎生期から成ラットまでの脳および脊髄における NADPH - d の個体発生を調べ、特に三叉神経系での発生について詳細に報告することを目的とした。

【研究方法】

妊娠後 12, 15, 17 と 20 日目の S-D 系ラットから、それぞれの妊娠期において約 10 匹の胎児を採集した。胎児では各ステージ 3~4 匹ずつ、頭蓋に切れ目を入れた後 2.5% グルタルアルデヒドと 0.5% パラホルムアルデヒドを含む pH 7.3 の 0.1M リン酸緩衝溶液 (PB) の固定液で 2 時間浸漬固定した。出生後 0, 4, 10, 14, 20 日目と成ラットでは、エーテル麻酔下で各ステージ 3~8 匹ずつ、同固定液 (200 ml/体重 100 g) で左心室より灌流固定した。その後、胎生期及び出産後の脳と上部頸髄を取り出し、同固定液にて 4℃ で 12~36 時間、後固定した後 0.1M PB に溶解した 20% 蔗糖溶液に沈むまで浸漬した。厚さ 60 μm の凍結連続横断及び矢状断切片をマイクロトームにて作製した。切片は 0.25% トリトン X-100 を含む 0.1M PB で 5 分間前反応した後 0.5 mg/ml β-NADPH (Oriental Yeast) と 0.2 mg/ml ニトロブルーテトラゾリウム (Sigma) を含む反応液で、37℃ に保ち攪拌器上で 0.5~1 時間反応した。その後切片は 0.1M PB と蒸留水で洗浄し、スライドガラスに張り付け、風乾後パーマウントで封入した。

SpVo と Sn 吻側部の細胞体の大きさの分析は、カメラルシーダ描画装置を用いて代表的な矢状断切片に含まれる全てのニューロンを描画し、コンピュータ画像解析装置を用いて投影面積を計測した。細胞数と細胞体の大きさの分析は一要因における分散分析法 (ANOVA) を用いて行った。平均間の多重比較検定は Scheffé's F-test を用い、SpVo と Sn の比較は t-test を用いた。脳内での NADPH - d 標識の強さは、陽性ニューロンの数と染色の強さをもとに視覚的比較によって行った。

【結果ならびに考察】

胎生 12 日目 (E12) の脳では NADPH-d 陽性ニューロンはなく、血管内皮細胞に標識が出現した。脈管での標識は全ての期間中一貫して存在するが、成長につれ減少した。E15 では SpVo の背内側部には 114 ± 13.6 個、 $N = 4$ (平均±標準誤差、 N は個体数) で Sn の吻外側部の 55.8 ± 4.8 個、 $N = 4$ より有意に多くの陽性ニューロンが出現した。両方の核の陽性ニューロンの数は E17 にそれぞれ有意に増加した (327.8 ± 28.3 , $N = 4$; 230.3 ± 24.8 , $N = 4$)。SpVo は胎生期で発達を終え、出生後わずかに減少する傾向があった。Sn では出生後も徐々に増加し E20 からは SpVo を凌ぐようになり、成ラットではそれぞれ 232.1 ± 18.2 , $N = 8$; 547.6 ± 30.2 , $N = 8$ であった。陽性ニューロンの細胞体の大きさは E15 でそれぞれ $73.8 \pm 3.4 \mu\text{m}^2$, $n = 66$; $53.7 \pm 2.1 \mu\text{m}^2$, $n = 52$ (平均±標準誤差、 n は計測した細胞数) であり、胎生期では SpVo の方が有意に大きい。SpVo では E17 でプラトーに達したが ($104.1 \pm 5.0 \mu\text{m}^2$, $n = 58$)、Sn では出生後 4 日目 (P4) であった ($108.8 \pm 2.9 \mu\text{m}^2$, $n = 110$)。これらの時期において、両方の核とも成ラット ($113.8 \pm 2.9 \mu\text{m}^2$, $n = 132$; $118.4 \pm 4.1 \mu\text{m}^2$, $n = 151$) との差がなくなり、P4 で Sn が SpVo に追いついた形となった。SpVc では、背内側大細胞部に P4 で、浅層部に P10 で陽性ニューロンが出現した。

上記以外の核における陽性ニューロンの主な出現様式は、以下の通りである。

胎生期 網様体、脚橋被蓋核、脊髄前庭核、背外側被蓋核、頸髄の V/VI, IX と X 層、楔状束核、不確縫線核、舌下神経周囲核、大脳皮質の V と VI 層、内側中隔核、脳弓下器官、分界条床核、線条体、視床室傍核、視床下部の視索前野、外側野と腹内側核、後交連核大細胞部、中脳中心灰白質の背外側部、脚間核、縫線核の線状核など。
出生後 薄束核、結合腕傍核、内側および背側縫線核、Sn の内側および尾外側、頸髄の I/II と III/IV 層、傍三叉神経核、嗅球、カエハ島、大脳皮質の II, III と IV 層、対角帯、海馬、扁桃核、視床の様々な核、視床下部の室傍核と視索上核、視蓋前域、上丘など。小脳では分子層の細胞と顆粒細胞層の細胞に標識が出現した。

SpVo と Sn より早期に出現する陽性ニューロンは無く、P14 以降では新たに出現しなかった。SpVo と Sn では他の脳に先がけ E15 から陽性ニューロンが出現し、胎生期に数と大きさの発達をほぼ達成する。その後樹状突起や細胞体間の距離を増大し、神経突起網を発達させた。SpVo と Sn の陽性ニューロンを含む領域は口腔内および口腔周囲からの一次求心性入力を受け、上記 NO 産生ニューロンが口腔領域の感覚運動反射機構に胎生期から重要な働きをすることが考えられる。

【結論】

SpVo と Sn の NADPH-d 陽性ニューロンはその数と大きさの発達に差があり、近接した陽性ニューロン群でありながら独立した役割を担うものと考えられる。他の神経核に先がける、胎生期初期の NADPH-d の発現は、NO/cyclic guanosine monophosphate (cGMP) 機構が原始的な口腔顔面周囲の感覚運動反射機能のための重要な役割を持つことを示唆している。また、SpVc の NADPH-d 陽性ニューロンは SpVo や Sn と異なり、出生後から知覚弁別や侵害受容過程に働いていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、酵素組織化学法を利用し、胎生期から成ラットまでの脳および頸髄における一酸化窒素合成酵素の一つである nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - diaphorase (NADPH-d) の個体発生を光学顕微鏡学的に調べ、特に三叉神経系について詳細に解析したものである。

その結果、三叉神経脊髄路核吻側垂核と孤束核吻外側部の NADPH-d 陽性ニューロンは他の部位より早く胎生期早期に出現し、互いに、また他の部位とも数と大きさの発達に差が認められる。また、三叉神経脊髄路核尾側垂核の NADPH-d 陽性ニューロンは出生後に出現することを明らかにした。

以上より、本研究は発生中の脳内における一酸化窒素の機能を解明する上できわめて重要な指針を与えたものであり、博士(歯学)の学位を得る資格があるものと認める。