

Title	口腔顔面一次求心性神経の中枢終末領域とラット三叉神経孤束核複合体でのNADPH-diaphorase活性
Author(s)	辻尾, 篤俊
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41517
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	つじ おお つ とし 辻 尾 篤 俊
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学位記番号	第 1 4 5 5 8 号
学位授与年月日	平成11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系専攻
学位論文名	「口腔顔面一次求心性神経の中枢終末領域とラット三叉神経孤束核複合体での NADPH-diaphorase 活性」
論文審査委員	(主査) 教授 野首 孝祠 (副査) 教授 重永 凱男 助教授 脇坂 聡 助教授 中川 浩一

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知覚核群内では NADPH-d 陽性ニューロンは三叉神経脊髄路核吻側亜核 (Vo)、傍三叉神経核 (paraV) や尾側亜核 (Vc) に認められる。Vo 背内側部の散在性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) 外側部に形成する。本研究は、三叉神経核と孤束核での NADPH-d 標識ニューロンと口腔顔面支配神経の中枢投射領域との関係および、神経切断、三叉神経根切断、末梢の炎症や臼歯露髄後に、これらの中枢投射領域における NADPH-d の酵素組織化学的な変化について詳細に観察した。

[研究方法]

二重色法：実験には、計12匹の雄性S-D系ラット (250-300g) を用いた。WGA-HRPの越神経節輸送を用いて鼓索神経 (CT)、舌神経 (LN)、下歯槽神経の口腔内枝 (IAN)、および口腔外枝 (オトガイ神経 MN) の中枢終末領域を標識するため、各神経に麻醉下で2.8%ポリアクリルアミドゲルに溶解した5% WGA-HRPを2 μ lを注入した。1~2日後、0.5%パラホルムアルデヒドと2.5%グルタルアルデヒドを含むpH7.3の0.1Mリン酸緩衝溶液 (PB) の固定液で灌流固定した。脳と上部頸髄を取り出した後、4℃の同固定液で6時間以上の後固定を行い、その後30%蔗糖含有0.1MPB溶液に沈むまで浸漬した。厚さ60 μ mの凍結連続横断切片をマイクロトームにて作製し、切片を0.25%トリトンX-100を含有する0.1MPBで5分間前反応させた。続いて新たに調整した0.5mg/ml β -NADPHと0.2mg/ml ニトロブルーテトラゾリウムを含有する0.1MPB溶液にて、攪拌器上で0.5~1時間37℃で反応しNADPH-dを現像した。その後0.1M酢酸緩衝溶液 (pH3.3)にて洗浄し、テトラメチルベンチジンで中枢終末域のWGA-HRPを現像した。二重染色の後、切片を蒸留水で洗浄しゼラチン被覆スライドグラスにマウントし、カメラルシダ描画装置付き光学顕微鏡で、標識ニューロンと中枢終末をそれぞれ明視野と暗視野で描画した。

定量分析：実験には計32匹を用いた。神経損傷が越シナプス性にNADPH-d活性に与える影響を調べるため、以下の処置を一側性 (左側) に行った。LNまたはLANを結紮し末梢側を切断した。臼歯を露髄させ慢性歯髄炎を起こした。50 μ lのcomplete Freund's adjuvant (CFA;Sigma)を舌に注入し、炎症性刺激を与えた。三叉神経根切断術を行い、一次求心性入力を除去した。また、対照実験としてシャムオペレーションを行った。受容野が離れた神

経切断の影響を見るために、坐骨神経を結紮し末梢側を切断した。術後1週間CFA注入では3日後に、上記と同様の方法で切片を作製し、NADPH-d活性の可視化を行った。光学顕微鏡により、明視野で標識ニューロン数を計測した。Vo/Snでは、すべてのNADPH-d標識ニューロンを数え、Vcでは門から尾側に連続した5枚の切片上のすべてのNADPH-dニューロンを数えた。対照群とシャムオペレーション群との統計学的有意差検定には、1要因による分散分析法を用い、多重比較にはFisher's PLSD-testにより評価した。

[結果ならびに考察]

NADPH-d 標識ニューロンと口腔顔面一次求心性神経の中樞終末領域の空間的分布

Voの最吻側部では、NADPH-dニューロンはすべて背内側部に散在した。LN, IANとMNの標識終末域はそれぞれ背内側、中央と背外側を占めたが、CTの標識終末はなかった。Voの吻尾的中央の高さでは、NADPH-d標識ニューロンはSnの外側部に密な叢を形成し、この高さで明確となるÅströmの背内側核(dm)に散在した。LN, IANとMNの標識終末はそれぞれdmの背側、中央と背外側を占めたが、CTの標識終末はなかった。Voの尾側1/3では、多数のNADPH-d標識ニューロンがVoから背側に延長するSnの外側に密集し、dmに散在した。LN, CT, IANとMNの標識終末はそれぞれ背側、最背側、中央と外側を占めた。いずれの高さでもNADPH-d標識ニューロンとはLNが最も良く重複し、CTとIAN(尾側1/3のみ)では一部が重複し、MNでは希に重複した。

Vcでは、NADPH-d標識ニューロンはparaVと浅層部に多く存在したが、ほぼ均一に背内側-腹外側軸に沿って疎に分布した。CTからの標識終末はなく、NADPH-d標識ニューロンはLNからの標識終末と最も良く重複し、IANとMNの終末は中程度に重複した。

口腔顔面神経傷害後のNADPH-dニューロン

Vo/Snの対照群の左と右のNADPH-d標識ニューロン数(平均値±S. E. M.)はそれぞれ684.3±108.0と691.3±106.7であった。LN切断1週間後、同側、(436.0±72.6, P<0.01)と反対側、(487.5±73.3, P<0.05)で有意に減少した。IAN切断(同側、662.0±67.7, 反対側、700±62.1)と坐骨神経切断では有意に変化しなかった。シャムオペレーションでは有意ではないが、両側で増加する傾向があった(同側、751.0±22.4, 反対側、796.5±49.6)。三叉神経根切断はシャムオペレーションと比較して同側で有意に減少した(591.5±32.6, P<0.05)が、反対側では有意差はなかった(711.8±35.3)。舌へのCFAの注入では、両側とも標識ニューロンの数は増加する傾向を示した(同側、828.3±36.0, 反対側、835.3±50.1)。歯髄の露出では両側とも有意に増加した(同側、973.5±54.3, 反対側、1081.3±52.3, P<0.01)。

Vcの対照群の左と右のNADPH-d標識ニューロン数はそれぞれ138.3±23.4と163.8±37.3であった。LN切断、坐骨神経切断とシャムオペレーションでは、両側で増加する傾向を示したが、(LN切断、同側、200.5±64.4, 反対側、182.8±58.6; 坐骨神経切断、同側、209.5±30.6, 反対側、265.5±22.5; シャムオペレーション、同側、199.0±23.7, 反対側、190.3±32.8)、統計学的な有意差はなかった。三叉神経根切断では同側(87.3±17.7)でシャムオペレーションと比較、もしくは反対側(195.5±22.9, P<0.05)と比較して有意に減少したが(P<0.05)、対照群とは有意差はなかった。舌へのCFA注入では両側で有意に増加した(同側、372.8±26.3, 反対側、374.0±21.8, P<0.01)。歯髄の露出でも両側で有意に増加した(同側、319.0±21.1, 反対側、319.3±38.0, P<0.01)。

[結論]

Vo/SnとVcのNADPH-d活性は三叉神経一次求心性線維からの入力、特に舌神経からの入力により維持、調節されていることが示唆された。

VcのNADPH-d活性は炎症性刺激で両側性に上昇したが、神経切断等の刺激には変化しなかった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、三叉神経感覚核と孤束核において一酸化窒素合成酵素のマーカであるnicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d)陽性ニューロン及び口腔顔面支配神経の中樞投射領域をWGA-HRPで同時に標識して空間的相互関係を明らかにした。さらに神経切断、三叉神経根切断、末梢の炎症や臼歯露髄

後の NADPH-d 陽性ニューロンの変化について定量的に観察したものである。

その結果、三叉神経脊髄路核吻側亜核-孤束核複合体並びに三叉神経脊髄路核尾側亜核のニューロンでの NADPH-d 活性は、三叉神経一次求心性線維からの入力により越シナプス性に維持、調節されていることが明らかとなった。

以上より、本研究は口腔顔面領域支配神経の中樞制御機構を解明する上で極めて重要な示唆を与えるものであり、博士（歯学）の学位を取得する資格があるものと認める。