



Title	Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in fetal rat brains at embryonic day 15 and day 19
Author(s)	寺田, 春郎
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43213
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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	寺田春郎
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16422 号
学位授与年月日	平成13年5月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in fetal rat brains at embryonic day 15 and day 19 (胎生15日および19日齢のラット胎仔脳における一酸化窒素合成酵素陽性神経細胞の分布)
論文審査委員	(主査) 教授 岡田伸太郎 (副査) 教授 内山 安男 教授 吉峰 俊樹

論文内容の要旨

【目的】

一酸化窒素 (NO) は一酸化窒素合成酵素 (NOS) により、アルギニンから合成され、可溶性グアニル酸シクラーゼを強力に活性化し、目標細胞におけるサイクリック GMP のレベルを上げることで神経情報伝達をになう新しい物質として注目されている。免疫組織学的検討で、NOS 陽性細胞は中枢神経内に広く分布することが報告された。NO の胎生期における役割は不明であるが、シナプスの可塑性や神経細胞死を通じて神経細胞結合の生成に関与していることが示唆されている。我々は幼若期脳における NO のニューロン形成やシナプス形成における役割を解明する目的で、ニューロン形成の初期である胎生15日と、シナプス形成の活発な時期である胎生19日の胎仔を用い、免疫組織化学による発生学的検討を行った。

【方法】

胎生15日および19日の SD ラット胎仔を用いた。胎生15日の胎仔脳を0.5%グルタルアルデヒド、4%パラフォルムアルデヒドおよび0.25%ピクリン酸を含む0.1%リン酸緩衝液 (pH7.4) に浸漬固定した。胎生19日脳は同液で灌流固定した。いずれの脳も、グルタルアルデヒドを除く同液で2日間後固定後、15%ショ糖溶液に浸漬した。これらの脳は、ゼラチンに包埋した後、ビブラトームで50 μ mの厚さの切片を作製し、以後の免疫染色に用いた。0.3%過酸化水素水で切片を処理して内因性のペルオキシダーゼ活性を不活化した後に、抗 NOS 抗体 (1万倍) と4 $^{\circ}$ Cで7日間反応させた。ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体 (1000倍) と室温で1時間反応させ、次にアビジン・ビオチン複合体 (3000倍、ABC Kit, Vector Laboratories) と1時間反応させた後、DAB 変法で NOS の検出を行い、光顕的に観察し、陽性構造の分布を検討した。神経細胞の大きさは15 μ m以下を小型、16-20 μ mを中型、21 μ m以上を大型に分類した。

【成績】

(胎生15日脳) 視床下部と橋の2カ所に多数の NOS 陽性神経細胞の集団を認めた。第三脳室近傍の視床下部に小型の濃染する陽性細胞が密集して存在し、この細胞群の腹側および腹外側にも少数の陽性神経細胞が散在していた。中脳水道の腹側には突起をほとんど持たない小型の球形細胞からなる橋核の2つの細胞集団が認められた。

(胎生19日脳) NOS 陽性神経細胞は著しく増加し、前脳から延髄にいたるまで、広く散在する多数の NOS 陽性神経細胞集団が観察された。

大脳皮質では皮質板下層に短い突起を持つ単極の神経細胞が少数認められるのみであった。梨状葉皮質には単極性の小型の神経細胞を多数認めた。海馬には陽性細胞を認めなかった。線条体の腹外側 2/3 に非常に発達した突起を持った中型の濃染する神経細胞が存在した。淡蒼球腹側部・無名質にも小型の単極性神経細胞が多数見られた。扁桃体には突起を持った小型の神経細胞を認めた。

視床下部では視床下部室傍核に中型から大型の濃密な神経細胞の集団が見られた。視床下部背内側核および視床下部外側野にも陽性細胞が見られたが、視索上核には認められなかった。視床では視床室傍核・束傍核に多数の濃染する神経細胞が見られ、少数の陽性細胞が外側膝状体核・視床下核に存在し、視床下核の小型神経細胞は内側へ向けて短い突起を伸ばしていた。

脳幹で最も顕著な陽性神経細胞群は脚橋被蓋核および背外側被蓋核に認められた。脚橋被蓋核には小型の濃染する神経細胞が密集して見られ、背内側方向への広がりを見せた。橋の背側部では中型で発達した突起を持つ濃染する神経細胞が背外側被蓋核を形成していた。上丘・下丘の深層にも少数の神経細胞の分布が見られた。

延髄では NOS 陽性の細胞体や突起を持つ構造が舌下神経前置核・前庭神経脊髄核・孤束核・腹側巨大細胞性網様体核・外側傍巨大細胞核などに豊富に見られた。

【総括】

胎生期の NOS 陽性神経細胞は、胎生15日ラット胎仔の脳に既に発現し、それらは視床下部や橋を中心に認められた。一方胎生19日においては、NOS 陽性細胞はその大きさや突起の発達も増し、線条体・視床下部・視床・橋・延髄に広く分布していた。

今回の研究において我々は、成熟ラットの研究で NOS 陽性神経細胞の存在が示されている脳内の多くの構造に、胎生19日で既に多数の NOS 陽性神経細胞が認められ、その多くは発達した神経突起を伸ばしていることを、初めて明らかにした。胎生期の神経接合の生成に関与することが示唆されている NOS 陽性神経細胞が、シナプス形成の活発な胎生19日に、脳内の広範な領域に発現していることが示されたことは、その発達した神経突起を通して、この時期のシナプス形成に NO が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は胎生15日と、胎生19日のラット胎仔脳について、nNOS 抗体を用いた免疫組織化学により NOS 陽性神経細胞の分布を検討したものである。

免疫染色の結果、胎生15日で小型の NOS 陽性神経細胞が視床下部と橋を中心に既に発現している事が明らかにされた。胎生19日では線条体・橋・延髄の NOS 陽性神経細胞群には発達した神経突起が認められた。視床や視床下部には大型の NOS 陽性神経細胞の濃密な集団を認めた。

胎生期に見られる NOS 陽性神経細胞の分布は、成熟動物との比較から、1) 成熟動物と同様の分布を示す領域(線条体・橋)、2) 成熟動物で見られるが胎生19日で認められない領域(小脳・海馬・大脳皮質)、3) 胎生19日では神経細胞を認めるが成熟動物では減少する領域(視床束傍核・視床下部室傍核)や認められない領域(大脳皮質皮質板下層)に分類された。特に視床束傍核や視床下部室傍核には濃密な神経細胞の集団を認め、胎生期の分布の特徴であることが明らかにされた。

本研究は胎生期に一過性に存在する NOS 陽性神経細胞の存在を示し、その分布の特徴を明らかにした。よって NO の神経細胞結合の生成への関与を解明する上で、本論文の意義は大きく、学位を授与されるに値する研究である。