

Title	三叉神経吻側垂核-孤束核複合領域におけるNADPH-diaphorase及びカルシウム結合蛋白陽性ニューロンについて
Author(s)	宗川, 昇
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43654
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

【4】

氏名	崇川 <small>のぼる</small> 昇
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 16918 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学基礎系専攻
学位論文名	三叉神経吻側亜核-孤束核複合領域における NADPH-diaphorase 及びカルシウム結合蛋白陽性ニューロンについて
論文審査委員	(主査) 教授 重永 凱男 (副査) 教授 上崎 善規 講師 瑞森 崇弘 講師 長島 正

論文内容の要旨

【目的】

一酸化窒素 (NO) を合成する特定のニューロン群が三叉神経脊髄路核吻側亜核 (Vo) の吻背内側部 (Vor) 及び背内側部 ("nucleus dorsomedialis" of Åström; dm) と孤側核 (Sn) の複合領域に存在することが、NADPH-diaphorase (NADPH-d) の酵素組織化学法又は神経型 NO 合成酵素 (nNOS) の免疫組織化学法を用いて明らかとなっている。NO は Ca^{2+} の細胞内への流入により産生が誘導される。Vo/Sn において NO 産生ニューロンがどのようなカルシウム結合蛋白 (CBPs) を持つのか、さらに陽性ニューロンの解剖学的特徴については不明である。本研究では Vo/Sn における NADPH-d 及び CBPs の共存関係や、細胞の形態学的特徴、視床への投射について検討を行った。

【方法】

免疫組織化学法

実験には雄性 S-D 系ラット15匹を用いた (体重250~300g)。エーテル深麻酔下で、100ml の生食水に続き4%のパラホルムアルデヒドを含む0.1M リン酸バッファー (PB; pH7.4) 500ml の固定液を、心臓から灌流した。脳を取り出した後、同じ固定液を用いて4℃で一昼夜後固定し、20%ショ糖を含む0.1M PB に浸漬し、厚さ60 μ m の連続凍結切片をミクロトームで作製した。切片は吻尾方向に三枚ごとに配分し、3種類の同等の連続切片群とした。

切片は PB を添加した生理的食塩水 (PBS) で20分間洗浄し、パルパルブミン (PV) 又はカルビンチン (CB) 染色においては3%正常ウマ血清及び1%正常ウシ血清で、カルレチニン (CR) 染色においては3%正常ブタ血清及び1%BSA で、いずれも室温で30分間ブロッキングを行った。次いで3種類の一次抗体すなわち、モノクローナル抗 PV 抗体、モノクローナル抗 CB 抗体、ポリクローナル抗 CR 抗体を用いて、4℃で16時間インキュベートした。切片は PBS で洗浄後、ラット IgG で前吸収したビオチン化ウマ抗マウス IgG 又はビオチン化ブタ抗ウサギ IgG でインキュベートし、続いて ABC complex と室温で90分間反応させた。切片を PBS で洗浄し、さらに NADPH-d を検出するための染色を行った。すなわち、まず0.25%Triton X-100を含む0.1M PB で5分間前反応させた後、0.5mg/ml β -NADPH 及び0.2mg/ml ニトロブルーテトラゾリウムを含む反応液に37℃で30-60分間、切片をインキュベートした。反応は0.1M PB で洗浄することによって停止させた。

過酸化酵素活性を調べるため、切片を0.04%DAB及び0.003%過酸化水素を含む0.05M トリシュー塩酸バッファー (pH7.2) に浸漬した。切片は0.1M PB及び蒸留水で洗浄し、ゼラチン被覆スライドにマウント、風乾、カバーガラスをかけパーマウントで封入した。

Vo/SnにおけるNADPH-d陽性ニューロンとCB、CR及びPV免疫陽性ニューロンの数を両側において計測した。一例を1例と見なしたので、CB及びPV染色においては5匹のラットから10例を、しかしCR染色に関しては2匹しか満足できる2重染色が出来なかったため4例となった。3匹のラットではNADPH-d染色は明瞭でありながらCRの染色が不明瞭であった。これらの切片はニュートラルレッドで染色し、Vor及びdm/Snのニューロンの細胞体の大きさについてカメラルシダ描画装置を備えた光学顕微鏡を用いて計測した。NADPH-dニューロン及びCBPs陽性ニューロンの細胞体の大きさ(投影面積)はNIH Imageソフトを用いて、スキャナーで取り込んだ外形をデジタイザーで計測した。Vor及びdm/Snのニューロンの細胞体の大きさは、4枚の代表切片における平均84~227個のニューロンを計測して求めた。統計上の有意差はANOVAを用いて行いFisher's PLSD-testで $P < 0.05$ を有意と見なした。

神経路探求の実験では、ウレタン麻醉下(1.3g/kg, i.p.)でラットを脳定位固定装置に固定し、視床内側基底核群に微小ガラスピペットを刺入、5%HRP $2\mu\text{l}$ を注入した。2日間生存させた後エーテル深麻醉下で1%パラホルムアルデヒド、1.25%グルタルアルデヒドを含む0.1M PB 500mlの固定液を心臓から灌流した。通法に従い切片を作製し、TMBで反応させ、逆行性に取り込まれた標識ニューロンを三叉神経感覚核で観察した。

【結果】

Vo/Snの特定のニューロンがNADPH-d陽性を示し、核を除く細胞体が青く染色された。CB、CR及びPVの免疫陽性反応は、主に細胞体と樹状突起に局限した茶色の反応生成物により識別できた。NADPH-d陽性ニューロンはVor及びdmの内側、及びSnの吻外側部に分布した。CB及びCR免疫陽性ニューロンは主にVoの背側部及びSnに分布した。対照的に、PV免疫陽性ニューロンはVoの腹側部に分布した。Vor、dm/SnではNADPH-d陽性ニューロンはCB(40%)及びCR(20%)と共存し、PVとは共存しなかった。Vorのニューロンの平均細胞体面積はdm/Snのものより大きかった。NADPH-d、CB、CR陽性ニューロンはVor及びdm/Snでは平均よりも小さく、PV陽性ニューロンはNADPH-d陽性ニューロンより大きかった。視床から逆行性に標識されたニューロンはVor、dm/Snには存在せず、NADPH-d陽性ニューロンは視床への投射ニューロンではないと考えられる。

以上の結果はNADPH-d酵素組織化学及びCB、CR及びPV免疫組織化学法により特定のニューロン群をVo/Snで同定することができることを示す。

論文審査の結果の要旨

本研究は、NADPH-diaphorase (NADPH-d)の酵素組織化学法及びカルシウム結合蛋白(CBPs)の免疫組織化学法による二重染色を行い、三叉神経脊髄路核吻側垂核(Vo)／孤側核(Sn)の複合領域の特定のニューロン群の形態学的特徴を明らかにした。さらにVo/Snニューロンは視床への投射が少ないことも明らかにした。

以上の結果は、Vo/Snの特定ニューロンがNADPH-d及びCBPs陽性であり、感覚-運動反射機構に関与する事を示しており、三叉神経系の感覚-運動の中枢制御機構の解明に重要な知見をあたえる。よって本研究者は、博士(歯学)の学位を授与するに値するものと認める。