



Title	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
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	荒川 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經型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Ca²⁺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°Cで一昼夜後固定し、20%ショ糖を含む0.1M PBに浸漬し、厚さ60μm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、バルバルブミン(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、モノクロナール抗PV抗体、モノクロナール抗CB抗体、ポリクロナール抗CR抗体を用いて、4°C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/mlβ-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°C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 トリス-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、カバーグ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。一側を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、ウレタン麻酔下（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 2μlを注入した。2日間生存させた後エーテル深麻酔下で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限局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事を示す。

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亜核 (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-運動の中板制御機構の解明に重要な知見をえたえる。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。