

氏名・（本籍）	相 見 良 成（京都府）
学 位 の 種 類	医学博士
学 位 記 番 号	医博第 88 号
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与年月日	平成 3 年 3 月 23 日
学位論文題目	Localization of NADPH-Diaphorase-Containing Neurons in Sensory Ganglia of the Rat (ラット知覚神経節における NADPH-ジアホラーゼ含有神経の局在)

審 査 委 員	主査 教授	前 田 敏 博
	副査 教授	森 渥 視
	副査 教授	木 村 宏

## 論 文 内 容 要 旨

### 〔目 的〕

Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH ジアホラーゼ) は NADPH を補酵素として要求する酵素群と共役して働き、生体内でさまざまな機能に関与することが知られている。本酵素は生体内においてほとんどあらゆる細胞に存在すると推測されているが、1983 年に開発された組織化学法によれば、中枢神経系の特定の脳領域で特定の神経細胞に強力な活性が限局性に分布することが示されていた。しかし、その機能的意義あるいは末梢神経系における NADPH ジアホラーゼの局在についてはほとんど不明であった。

本研究ではラットの末梢知覚神経系に焦点をあて、NADPH ジアホラーゼ陽性神経の局在および投射様式、ならびに他の神経ペプチドとの共存様式について、NADPH ジアホラーゼ組織化学法、逆行性トレーサー法、免疫組織化学法を組み合わせで検討した。

### 〔方 法〕

#### 1) NADPH ジアホラーゼ組織化学法

ウィスター系雄ラット（体重 150-200g）を用い、麻酔下に開胸し経心的に 4%パラホルムアルデヒドと 0.1%グルタルアルデヒドの混合液で灌流固定した。実体顕微鏡下に三叉神経節、節状神経節、後根神経節を摘出し、クリオスタットで 20  $\mu$ m の連続切片を作製し、ゼラチン塗布のスライドガラス上に張り付けた。NADPH ジアホラーゼの酵素組織化学染色は、基質と

して1 mMのNADPH、発色物質として2 mMのnitro blue tetrazoliumを含む0.1M 磷酸緩衝液中で、37℃で30-60分反応させることにより行った。

## 2) 逆行性トレーサー法

ラットの胃壁あるいは腹腔神経節に、50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度に溶解したTrue Blue溶液を10  $\mu\text{l}$ づつ注入し、7日後に節状神経節と後根神経節を摘出して蛍光顕微鏡で逆行性標識細胞を観察した。

## 3) 神経ペプチドの免疫組織化学法

上述した知覚神経節をカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)、サブスタンスP(SP)およびソマトスタチン(SOM)に対する抗体を用いる蛍光免疫組織化学で染色した。

## 〔結果〕

NADPH ジアホラーゼ陽性神経の分布様式は知覚神経節の種類あるいは脊髄レベルの違いによってかなりの差異が認められた。たとえば、三叉神経節ではNADPH ジアホラーゼ反応は小型神経細胞に認められたが、その数はきわめて少数で全神経節細胞数のおよそ0.3%にすぎなかった。これに対し節状神経節では、陽性反応は中型神経細胞に観察され、その数も全神経節細胞数の約30%を占めた。以上の脳神経節のほかに、脊髄の後根神経節に非常に特徴的な分節的分布様式が認められた。すなわち、NADPH ジアホラーゼ陽性神経は頸髄や仙髄にはほとんど認めなかったのに対し、胸腰髄とりわけ第5胸髄から第1腰髄レベルにかけて限局性に観察された。最も豊富な分布が認められた第8胸髄から第11胸髄では、全神経節細胞の約20%に陽性反応を認めた。同部位を連続切片で観察すると、NADPH ジアホラーゼ陽性神経線維は、前根、後根および脊髄神経に走行しているのが明瞭に観察された。なかでも交感神経幹への連絡路である交通枝に最も高密度な陽性神経線維が観察された。

前胃壁に逆行性トレーサーのTrue Blueを注入すると、第6胸髄から第1腰髄レベルの後根神経節に両側性に標識細胞が観察された。NADPH ジアホラーゼ酵素組織との二重染色を行うと、蛍光標識された一部の細胞がNADPH 活性を示すことが明らかとなった。腹腔神経節に蛍光色素を投与した場合も、胃壁注入時と比較すると標識細胞の数はさらに多く、ほぼ同様の分布様式をもって逆行性標識が認められた。

神経ペプチドの免疫組織化学ではいずれの神経節においてもCGRPあるいはSP陽性の神経細胞体が豊富に観察された。NADPH ジアホラーゼ酵素組織化学と神経ペプチドの免疫組織化学の二重染色法を行ってみると、ほとんどすべてのNADPH ジアホラーゼ陽性細胞がCGRP陽性かつSP陽性であった。しかし、SOMと共存するNADPH ジアホラーゼの例はほとんど認められなかった。

## 〔考察〕

NADPH ジアホラーゼは、知覚神経節の種類および後根の節分布に特異な分布を示すのみなら

ず、特定の神経細胞に限局することが初めて明らかとなった。知覚神経節の種類や脊髄後根レベルの相違により大幅な分布な偏りがあるという事実は、この酵素のもつ機能的意義を明らかにするうえで、好都合でもあり重要な所見と考えられる。たとえば、後根神経節においてはとりわけ胸腰髄レベルに豊富な分布があるという事実から、交感神経系すなわち内臓知覚との関連が強く示唆された。事実、交感神経幹との交通枝に豊富な NADPH 陽性の神経線維が観察された。この仮説を実験形態学的に立証するため、胃壁や腹腔神経節に蛍光色素を注入したところ、神経突起内を経由して NADPH ジアホラーゼ陽性神経に蛍光物質が蓄積することを確認した。以上より、胸腰髄レベルの後根神経節の NADPH ジアホラーゼ陽性神経は少なくとも一部は内臓知覚系に属するものと結論された。神経ペプチドとの共存様式では、NADPH ジアホラーゼ陽性神経は CGRP や SP とは共存するものの、SOM とは共存がほとんど認められなかった。内臓知覚系に属する神経節細胞は CGRP および SP を含有するが、SOM を含有する知覚神経節の神経は主として皮膚や筋肉を支配することが示されている。したがって、これらペプチドとの共存関係は脊髄後根神経節の NADPH ジアホラーゼ陽性神経が内臓知覚神経であることを裏づけるものである。

#### 〔結 論〕

ラット神経節における NADPH ジアホラーゼ陽性神経の局在、投射様式および神経ペプチドとの共存関係について明らかにした。とりわけその解剖学的特徴から、脊髄後根神経節における NADPH ジアホラーゼ陽性神経は内臓知覚系に関与することを立証した。

### 学位論文審査の結果の要旨

NADPH ジアホラーゼは、NADPH を補酵素とする酵素群と共役して多彩な生体機能の制御機構に関与し、多種類の細胞に存在する酵素である。中枢神経系では、非常に高い本酵素の活性が特定の神経細胞グループに特異的な局在を示すことが知られている。しかしこの様な強力な活性を示す本酵素がどのような機能的意義をもつのか、また中枢神経系のほかにも特異的な分布がみられるのかについては不明であった。本研究では、ラットの末梢知覚神経系に焦点を絞り、NADPH ジアホラーゼの細胞局在の種類およびその分布様式について組織化学的に詳細な検索を加え、ついで、逆行性トレーサー法ならびに免疫組織化学法を用いて、陽性神経細胞の投射様式ならびに神経ペプチドとの共存関係を調べ、神経解剖学的に検討したものである。

本研究でまず明らかになったことは NADPH ジアホラーゼが知覚神経節においてもある種の神経細胞に局在し、しかもそれら陽性細胞の分布密度が神経節の部位によって著しい差異を示すという事実である。最も高密度な分布を示す下位胸髄神経節の NADPH ジアホラーゼ陽性ニューロンについてその支配領域を調べたところ、胃壁などの腹腔内臓へ神経線維を送ることが示され

た。またこの脊髄神経節細胞には NADPH ジアホラーゼとサブスタンス P、CGRP が共存することが確かめられ、これら神経ペプチドが内臓知覚系に存在するという既報の事実と一致した。

本論文は、これまで全く不明であったといえる神経局在性の NADPH ジアホラーゼの生理的意義を解く手がかりを与え、最近明らかとなりつつある本酵素と NO 合成酵素の同一性とも照らし合わせ、神経科学の分野において重要な意義を有するもので、医学博士の学位論文として価値あるものと認める。