

氏 名	肖 春
授 与 し た 学 位	博 士
専 攻 分 野 の 名 称	歯 学
学 位 授 与 番 号	博 甲 第 2007 号
学 位 授 与 の 日 付	平 成 12 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	歯 学 研 究 科 歯 学 専 攻 (学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当)
学 位 論 文 題 名	ラ ッ ト 新 生 仔 に お け る 三 叉 神 経 1 次 求 心 ニ ュ ー ロ ン の 細 胞 死
論 文 審 査 委 員	教 授 山 本 敏 男 教 授 永 井 教 之 教 授 杉 本 朋 貞

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物のニューロンは、胎生期に一旦過剰に生産されるが、その一部は終生機能を持続する運命にあり、他は早期に破壊され消滅する運命にある。成長過程に見られるこのようなニューロンの選択の機構を解明することは、神経回路の形成や可塑性を理解するうえで極めて重要である。正常なラットの1次求心ニューロンは胎生期に急激に減少し、その後の減少は僅かとされる。しかし新生仔の1次ニューロンは極めて脆弱であり、種々の侵襲によって容易に細胞死が誘発されることから、ニューロン選択の機構は出生直後ではまだ機能していると思われる。以上の観点から、ラット新生仔に神経毒カプサイシンの全身投与および軸索切断の2種の侵襲を加え、それによって惹起される神経細胞死の特徴を分析した(研究1)。さらに、ラット神経系において1次ニューロンに特徴的なアポトーシス促進因子であるBaxに着目し、その免疫活性の生後発育における動態を、正常新生仔にみられる1次ニューロンの細胞死との関連において分析した(研究2)。

【研究方法】

1) S.D.ラット新生仔(生後1日)の背部皮下にカプサイシン(50 mg/kg)を投与、あるいは眼窩下神経を切断し、侵襲とした。術後0.5-48時間後にリン酸緩衝4%ホルムアルデヒド(pH 7.4, 光顕用)またはリン酸緩衝1%グルタルアルデヒド、1%ホルムアルデヒド(pH 7.3, 電顕用)で灌流固定した。三叉神経節を摘出し、光顕用には10 μm厚の凍結切片をスライドグラスに貼付、nick translation法によりDNA断片を染色し、Nissl 対比染色を施した。電顕用にはDNA断片の標識を行わず、通法に従って透過型電顕で観察した。一部のラットにはカプサイシンと同時にNGF(0.5 mg/kg)の皮下投与を行い、24時間後に光顕用に固定した。

2) 正常なS.D.系ラットを生後1日-2週間目、または成熟期に灌流固定し、三叉神経節を摘出した。光顕用には凍結切片を、電顕用にはビブラトーム切片を作成し、tailing法によりDNA断片を染色した。光顕用切片にはNissl対比染色を施し、電顕用切片はDNA断片陽性細胞を目標にトリミングを行い、通法に従って透過型電顕で観察した。光顕用切片の一部にはBaxタンパクに対する免疫染色(ABC法)を行い、

ニューロン毎に染色濃度を計測した。

【研究結果】

1) 新生仔にカプサイシンを投与した場合、24時間後をピーク（10%）としてDNAの断片化を示す（陽性）ニューロンの一過性の増加がみられ、48時間ではカプサイシン非投与の対照群と類似した低い値（1%未満）に戻った。電顕的には、多くのニューロンがアポトーシスの諸相を示した。神経切断24時間後では、神経節の上顎神経領域に多数の陽性細胞がみられ、電顕的にアポトーシスが確認された。成熟ラットに侵襲を加えても、アポトーシスは検出されなかった。なお、カプサイシンによる新生仔でのピーク時のアポトーシス（10%）は、NGFにより約7%に抑制された。

2) 出生直後の11日間では、故意に侵襲を加えずとも陽性ニューロンが観察され、電顕によりアポトーシスであることが確認された。神経節中の陽性ニューロンの割合（y%）は生後日数（x）と高い相関を示した（ $y = -0.083x + 0.877$, $r = 0.976$ ）。Baxの染色濃度は生後1日目で95%以上のニューロンが背景の1.5倍以上の高い値を示したが、経時的に低下し、2週目で成熟値と同様、95%以上のニューロンが背景の1.5倍未満となった。

【考察】

出生直後、2種の侵襲が1次ニューロンにアポトーシスを誘発した。この時期には、特に侵襲を加えずともアポトーシスが起った。アポトーシスの過程でtailing法によって細胞が染色される期間はわずか4-9時間に過ぎないとされている。この時間と本研究で得られた回帰関数をもとに計算すると、正常な発育過程で生後11日間にアポトーシスで失われる1次ニューロンは出生時の総数の12-24%にものぼることがわかる。したがって、一時点での陽性細胞の割合は極めて低い（1%未満）が、実は出生直後は1次ニューロンの生死の選択が活発に行われる時期といえる。本研究で用いた2種の侵襲は、末梢組織から1次ニューロン細胞体へのNGFの輸送を阻害する点で共通する。NGFの補填がカプサイシンによるアポトーシス誘発を抑制したことから、ラット新生仔の1次ニューロンはNGFに対する依存性が高いと考えられる。Bcl-2との存在比の大小によりアポトーシス感受性を決定するBaxが高濃度に存在することが、新生仔期のNGFに対する依存性を高める一因と考えられる。発生過程での1次ニューロンの選択は末梢受容野で合成されるNGFをめぐる競合によって行われるとの考えは決して目新しいものではないが、本研究ではこの説を支持する実験データを提示するとともに、選択がアポトーシスによって行われることを示した。

論文審査結果の要旨

本研究は、DNA断片をTUNEL法によって組織化学的に標識することにより、ラット新生仔へのカプサイシン投与によって惹起される1次求心ニューロンの細胞死の様態を、定性的かつ定量的に分析した。カプサイシンによる細胞死はアポトーシスの過程によることが明らかとなり、類似した1次ニューロンの細胞死は新生仔の末梢神経切断によっても誘発されることが明らかとなった。これらの侵襲による1次ニューロンの細胞死が新生仔に特有の現象であることから、発育期のニューロンが侵襲に対して感受性が高く、アポトーシスに陥りやすい条件を備えていることが推測された。アポトーシス促進因子Baxの免疫活性とDNA断片を、組織化学的に経時観察したところ次の2点が判明した。すなわちラットでは（1）正常の発育過程でも生後10日間ではアポトーシスが観察され、その頻度は生後日数の経過とともに漸減する、（2）1次ニューロンにおけるBaxの免疫活性は出生直後から漸減し、生後2週間で成熟値に達する。この研究は発生・発育過程における1次ニューロンの細胞死を直接的かつ定量的に観察し、正常発生・発育におけるニューロンの選択的破壊機構を理解する上で重要な知的貢献である。したがって、本研究を博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。