

氏名	李 月 玲
授与した学位	博 士 学
専攻分野の名称	歯 学
学位授与の番号	博 甲 第 2162号
学位授与の日付	平 成 13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	ラット新生仔の坐骨神経切断後の足蹠刺激に対する脊髄後角侵害受容ニューロンのc-fos応答
論文審査委員	教授 松尾 龍二 教授 山本 敏男 教授 杉本 朋貞

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### <目的>

脊髄神経の1次求心ニューロンは脊髄後角に投射し、個々の神経は後角内に明瞭な体性局在を示す投射領域(1次ニューロンの終末域)を持っている。幼若動物で、末梢神経を損傷すると、損傷を受けた1次ニューロンが失われ、その終末域に、隣接領域から、他の1次ニューロンの軸索中枢枝が出芽し侵入する。こうして形成された新しい神経回路が後角内2次ニューロンに侵害情報を伝達する能力を持つか否かを検証することが本研究の目的である。

#### <材料と方法>

S.D.系ラットを用いた。出生直後の手術には低体温麻酔を用い、成熟後の手術と侵害刺激は、ネンプタール(20mg/kg)とウレタン(650mg/kg)の腹腔内投与によった。灌流固定にはエーテルを用いた。

脊髄後角内の無髄1次ニューロン終末の陰性標識。出生直後に一側、成熟後(7週間後)に反対側の坐骨神経(Sc)を切断した。成熟後には、必要に応じて伏在神経(Sa)あるいは後大腿皮神経(PC)の切断を追加した。さらに1週間後に4%ホルムアルデヒドで灌流固定した。腰髄の50  $\mu$ m凍結切片にHRP標識*Bandeiraea simplicifolia* isolectin B4 (IB4)を結合させ、DAB法で発色させた。神経切断によって生じる脊髄後角内のIB4染色の欠落(陰性標識)を指標に、損傷を受けた神経(1次ニューロン)の終末域を検索した。

c-fosの誘発実験。出生直後に一側、成熟後(8週間後)に反対側のScを切断し、2日後に両側の足蹠を熱湯に浸漬(52°C、20秒)してSaの侵害刺激とした。一部のラットには成熟後の切断を行わず、両側の大腿後面中央部に5%ホルマリン30 mlを皮下注射してPCの侵害刺激とした。刺激の2時間後に4%ホルムアルデヒドで灌流固定を行い、腰髄の50  $\mu$ m凍結切片にc-Fosの免疫染色を施した。また、比較のため成熟ラットの一側のScを切断し(慢性切断)、19日後に反対側のScを切断(急性切断)、2日後にSaの侵害刺激を加え、c-fosを誘発した。

## <研究結果>

### 無髄1次ニューロンの腰髄後角への投射様式の変化

成熟後にScを切断した側では、IB4による陰性標識がみられた。陰性標識は、第3-5腰髄(L3-5)の内側3/4に見られたが、そのうちL3全体とL4吻側では陰性部の中央に正常な染色性を示す部分が残存した。この残存部分は、Saの切断によって消失した。L4/5境界部では、内側3/4全体に陰性染色がみられ、PCを同時に切断すると陰性染色はさらに外側に向かって拡大し、正常な染色濃度を示す領域は最外側約1/8を残すのみとなった。

出生直後のSc切断では、陰性染色領域は成熟後の切断の場合と比べて大きく縮小した。L3/4境界部から吻側では、IB4結合による強い染色が内外側的ほぼ全域に見られた。L4/5境界部では染色性の大幅な低下は後角の内側1/2にとどまった。成熟後のSc切断との差は、L3ではSaの、L4/5境界部ではPCの1次ニューロンの出芽が、Scの終末域に侵入したためであることがわかった。

### 伏在神経からの侵害情報によるc-fos発現

Sc切断の時期(出生直後・急性・慢性)にかかわらず、c-fos陽性細胞は、L3のI、II層に最も多く見られたが、成熟後の急性切断と比較して、出生直後の切断では、L3-5の各レベルで2-3倍の陽性細胞の増加がみられ、慢性切断では増加は更に著しかった。L3尾側で陽性細胞の内外側的分布をみると、急性切断では陽性細胞はSaの終末域である内側から2番目の1/4に集中し(1切片あたり約17個)、最内側1/4では約6個に過ぎなかった。これに対し、最内側1/4に見られる陽性ニューロン数は、出生直後の切断と慢性切断の両者とも、約26個に増加した。内側から2番目の1/4では、慢性切断で著しく増加したが、(52個)出生直後の切断では増加は小さかった(26個)。

### 後大腿皮神経からの侵害情報によるc-fos発現

L4-5に多くのc-fos陽性細胞が誘発された。L4中位から尾側のすべてのレベルで、出生直後のSc切断により陽性細胞の増加の傾向がみられ、L4/5移行部では出生直後の切断により約2倍程度の有意の増加がみられた。L4尾側部では神経切断を行わない場合、後角の内側半には陽性細胞がほとんどみられなかったが(約1個)、出生直後にSaを切断した場合、著明な増加が見られた(24個)。内側から3番目の1/4でも14から21個と増加の傾向がみられたが、有意差は検出できなかった。

## <考察と結論>

出生直後のラットのScを切断すると、脊髄後角内で隣接する領域に投射するSaやPCの1次ニューロンの軸索中枢枝が出芽し、Scの投射領域に侵入した。SaやPCの侵害刺激により、後角表層で誘発されるc-fos陽性ニューロンは、出生直後のSc切断によって増加したが、その増加は刺激を伝えた神経からの出芽が侵入した領域で最も著しかった。一方、出芽が起こらないとされている成熟後のSc切断でも、慢性期にc-fos陽性ニューロンの増加がみられたが、その増加は主として刺激を伝えたSaの投射領域にみられた。出生直後の神経切断後に生じる隣接領域からの1次ニューロンの軸索中枢枝の出芽は、侵入した領域で新たなシナプス回路を形成し、その領域にある2次ニューロンに侵害情報を伝達する。

## 論文審査結果の要旨

この研究は、ラットの坐骨神経 (Sc) を出生直後に切断し、入力遮断を受けた脊髄後角表層における 1 次求心ニューロン軸索中枢内終末の体性局在の再構築と、それに伴う脊髄後角内 2 次ニューロンの侵害刺激に対する反応の変化を成熟後に解析したものである。

出生直後に Sc を切断すると、脊髄後角内で隣接する領域に投射する伏在神経 (Sa) や後大腿皮神経 (PC) の 1 次ニューロン軸索中枢枝が出芽し、Sc の投射領域に侵入した。Sa や PC の侵害刺激により、後角表層で誘発される c-fos 陽性 2 次ニューロンは、出生直後の Sc 切断によって増加したが、その増加は刺激を伝えた神経からの出芽が侵入した領域で最も著しかった。一方、出芽が起こらないとされている成熟後の Sc 切断でも、慢性期 (3 週間後) に c-fos 陽性ニューロンの増加がみられたが、その増加は Sa 本来の投射領域に著しく、Sc 領域での増加は比較的小さかった。これらの結果から、出生直後の神経切断後に生じる隣接領域からの 1 次ニューロンの軸索中枢枝の出芽は、侵入した領域で新たなシナプス回路を形成し、その領域にある 2 次ニューロンに侵害情報を伝達することがあきらかとなった。

この研究は、侵害情報処理機構が、成長発育過程に加わった侵襲の結果、形態と機能の両面において可塑性変化をとげることが示したものであり、本申請論文は博士 (歯学) の学位に値するものと判定する。