



氏 名 鍋 島 謙 一 (昭和46年12月20日生)  
 本 籍 地 高 知 県  
 学 位 の 種 類 博士 (歯学)  
 学 位 授 与 番 号 岩医大院歯博第214号  
 学 位 授 与 の 日 付 平成17年 3 月25日  
 学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当者 (博士課程修了者)  
 学 位 論 文 題 目 未熟及び成熟ラット脊髄後根神経節細胞の ATP 刺激に対する細胞内カルシウムイオン濃度変動の画像解析

## 論文内容の要旨

### I. 研究目的

細胞内のエネルギー源であるアデノシン三リン酸 (ATP) は、細胞外では炎症や痛覚に関連した伝達物質として働いている。これまで、痛みを感知する後根神経節細胞は ATP に対する受容体を有すると報告されてきたが、神経節細胞の周りを囲んでいる衛星細胞には言及されてこなかった。また、生後発育過程における反応性の変化についても調べられてこなかった。有効な消炎・鎮痛効果を得るための基礎データ取得を目的として、組織形態をできるだけ保った後根神経節 (DRG) で、神経節細胞と衛星細胞が、ATP に対してどのような反応を示すか検討した。

### II. 研究方法

1. 生後 8 週齢 SD 系成熟雄性ラットと胎齢 20 日の出生直前の SD 系ラットを用いた。炭酸ガスで安楽死させた後、DRG を摘出した。
2. 摘出した DRG に  $\text{Ca}^{2+}$  感受性色素を負荷した後、ATP やその類似物質で刺激した時の細胞内カルシウムイオン濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 変動をレーザー顕微鏡で画像解析した。

### III. 研究成績

#### 1. ATP によって引き起こされる変動

未熟ラットでは殆どの神経節細胞が一樣に小型であったのに対し、成熟ラットでは様々の大きさに分化していたが、いずれにおいても、ATP (100 $\mu\text{M}$ ) で一部の神経節細胞と多くの衛星細胞に  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変動を認めた。神経節細胞の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変動は、急激な上昇とそれに続くゆっくりとした減衰からなっており、このパターンは未熟ラットと成熟ラットとで差が認められなかった。衛星細胞の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変動はスパイク状を呈することが多く、この反応は未熟ラットでは、単発性であったが、成熟ラットでは律動的に繰り返された。

#### 2. DRG のプリン受容体サブタイプ

カルシウム変動が、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  に依存するかどうか、あるいは P2X や P2Y 受容体のアゴニスト ( $\alpha$ ,  $\beta$ -メチレン ATP や UTP) で刺激したときの反応を見比べて、サブタイプを推測したところ、神経節細胞のみならず衛星細胞も P2X と P2Y 受容体が機能している事が示唆された。2つのサブタイプが存在することに関しては、未熟と成熟ラット間に差を認めなかった。

### IV. 考察及び結論

ATP に対して、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変動する神経節細胞は、未熟ラットと成熟ラットともに決して多いといえなかった。反応した細胞は P2X あるいは P2Y 受容体が機能していると考えられた。一方、ATP に対して反応する衛星細胞は神経節細胞より多く、その受容体はやはり、P2X あるいは P2Y 受容体と思われた。今回の実験で神経節細胞の多くが反応しなかった理由の一つに、衛星細胞が神経細胞全体を覆っていることが考えられた。衛星細胞がバリアとして働き、ATP が到達しにくいということがあったかもしれない。しかしながら、衛星細胞の覆いが不完全

な未熟ラットの DRG でも反応する神経節細胞はむしろ少なかったことから、P2 受容体が機能している DRG の神経節細胞は、これまで考えられているほど多くないかもしれない。

発育段階が未熟な状態と成熟した状態の DRG の  $[Ca^{2+}]_i$  変動パターンを比較したところ、神経節細胞の形態には大きな相違が見られたものの、ATP に対する反応性に関してははっきりした違いは認められなかった。一方、衛星細胞では、未熟ラットの反応が一過性であったのに対し、成熟ラットでは律動的な  $[Ca^{2+}]_i$  変動が観察された。これは、生後の成熟発達段階において衛星細胞では ATP に対する  $[Ca^{2+}]_i$  変動機構が大きく変化している事を示している。この衛星細胞の律動的な  $[Ca^{2+}]_i$  変動は、神経節細胞へも何らかの影響を与えているものと思われるが、それに関して詳細は不明である。また、P2X と P2Y 受容体の一つの細胞に同時に発現して機能しているかどうかという点も、今後の検討課題となる。

### 論文審査の結果の要旨

#### 論文審査担当者

主査 教授 城 茂 治 (歯科麻酔学講座)  
副査 教授 北 田 泰 之 (口腔生理学講座)  
副査 教授 名 和 橙黄雄 (口腔解剖学第二講座)

アデノシン三リン酸 (ATP) は炎症や痛みの発生に重要な役割を演じていることから、ATP の脊髄後根神経節 (DRG) に対する作用は比較的良好に研究されている。しかし、これらの研究のほとんどは、主として単離された神経節細胞での観察であるが、実際の生体では神経節細胞は衛星細胞に取り囲まれている。本研究の目的は、このような生体での組織形態を可及的に保った DRG 標本を用い、細胞内カルシウムイオン濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の変動を観察して、ATP による神経節細胞の反応のみならず衛星細胞の反応性を明らかにすることにある。

胎齢20日の未熟ラットと生後8週の成熟ラットから DRG を剖出し、その神経節細胞および衛星細胞の ATP による  $[Ca^{2+}]_i$  変動を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、検討した。

未熟・成熟ラットともに、ATP による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇反応は、衛星細胞では約40%にみられ、神経節細胞では僅か1~3%にしかみられなかった。しかし、これらの反応は、細胞外  $Ca^{2+}$  の依存あるいはアゴニスト刺激による実験結果からすると、P2X あるいは P2Y のプリン受容体を介することが示唆された。 $[Ca^{2+}]_i$  の上昇反応の様式をみると、神経節細胞では急峻に上昇し、次いでゆっくりした下行が観察されたが、衛星細胞ではスパイク状の反応であった。また、神経節細胞では、未成熟と成熟 DRG 間に有意な反応差は認められなかったが、衛星細胞では未熟 DRG で単発性のスパイク状反応であったが成熟 DRG では律動的変動を示した。

今回の実験結果から、DRG の神経節細胞および衛星細胞には P2 受容体の存在することが判った。また、本実験では、その意義までは言及できないものの、ATP への反応は衛星細胞で神経節細胞よりも多いことも明らかになった。さらに、ATP による  $[Ca^{2+}]_i$  の律動的変動は、成熟した衛星細胞でのみで観察されたことから、生後発育における細胞内情報伝達系の変化を示唆している可能性がある。

以上より、本論文は、DRG における神経節細胞および衛星細胞の ATP に対する反応性の相違を示唆するものであり、これらの役割を究明する重要な手がかりとなりうることから、学位論文に値すると認められる。しかし、一方では、多くの疑問点も新たに投げられたことになり、更なる研究が必要であり、今後の成果に期待する所が大きい。

### 試験・試問の結果の要旨

本研究の方法、結果および結果に対する考察、さらには脊髄後根神経節 (DRG) の組織所見、細胞内カルシウムイオン濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ )、P2 受容体などに関する知識や内容などについて試問したところ、的確かつ十分な回答が得られた。また歯科麻酔学、麻酔全般に対する知識も十分に有し、学位授与に値する学識と研究指導能力を有するものと認めた。