

## 学位論文題名

## Effect of neonatal capsaicin treatment on neural activity in the medullary dorsal horn of neonatal rats evoked by electrical stimulation to the trigeminal afferents : an optical, electrophysiological, and quantitative study

（幼若ラット三叉神経求心路電気刺激により三叉神経脊髄路核尾側亜核内に惹起される神経活動に対して新生仔 Capsaicin 処理の及ぼす影響：  
光学的、電気生理学的、数量的研究）

## 学位論文内容の要旨

三叉神経脊髄路核尾側亜核(延髄後角)は口腔顔面領域における侵害情報伝達の一次中継核として機能し、一次求心線維を介した痛みの情報はここで二次ニューロンへと伝達される。無髄求心線維を介した入力やグルタミン酸受容体が、Wind-up や LTP といった一次中継核における可塑的变化に深く関与することが微小電極を用いた手法によって示唆されており、三叉神経脊髄路核尾側亜核においても同様にこれらの可塑的变化が報告されている。しかし、これまでの単一微小電極を用いた電気生理学的な研究手法では、細胞集団として機能する神経核の活動を広範囲にわたって同時記録することは極めて困難である。近年、これを補完するものとして膜電位感受性色素を用いた光学測定の手法が中枢神経系の様々な領域で用いられるようになってきたが、三叉神経脊髄路核に関しては哺乳類の生後動物での報告は今のところ見当たらない。一方、無髄線維の永続的な脱落を引き起こす新生仔 Capsaicin 処理は侵害情報伝達機構の研究に広く用いられており、組織学的には Capsaicin 処理後数十分後から後根神経節もしくは三叉神経節の B 細胞に形態学的変化を生じることが報告されているが、処理後数日の間に侵害情報伝達の一次中継核を対象とした電気生理学的実験に用いた報告は数少なく、侵害情報伝達系における短期的な機能的変化の有無については十分明らかにはされていない。以上のような背景を踏まえ本研究は、無髄求心線維を介して幼若ラット三叉神経脊髄路核尾側亜核に惹起されるシナプス伝達において、NMDA 型、非 NMDA 型グルタミン酸受容体のいずれが主要な役割を果たしているかを明らかにし、さらに新生仔 Capsaicin 処理後数日での尾側亜核内神経伝達における機能的変化について検討することを目的として、電位感受性色素を用いた光学記録および電場電位同時記録を行った。また、新生仔 Capsaicin 処理による三叉神経根の形態的变化を透過型電子顕微鏡を用いて検証した。

5-7日齢 Wister ラットから摘出した脳幹より水平断スライス標本(厚さ 400  $\mu$  m)ないし傍矢状断ブロック標本を4°C Krebs 標準液(NaCl 128, KCl 1.7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.24,  $\text{MgSO}_4$  1.3,  $\text{CaCl}_2$  2.4,  $\text{NaHCO}_3$  26, glucose 10 (mM), pH7.4) 下に作成し、電位感受性色素 RH482 または RH795 で染色した。三叉神経脊髄路(水平断スライス標本)もしくは三叉神経根(傍矢状断ブロック標本)をそれぞれ幅 0.1ms、強度 0.5mA もしくは 5.0mA にて電気刺激することにより尾側亜核に惹起される光学応答を Deltaron-1700 システムにて 0.6 ミリ秒毎に記録し、ガラス微小電極を用いた電場電位同時記録を行った。標準液、低  $\text{Mg}^{2+}$  灌流液、非 NMDA 型グルタミン酸受容体遮断薬 6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2,3-dione (CNQX) 投与、NMDA 型グルタミン酸受容体遮断薬 DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5) 投与の各条件下における記録を比較検討した。さらに、生後2日および3日後の2度にわたって Capsaicin(8-methyl-N-vanylyl-6-nonnenamide) 50mg を皮下投与(新生仔 Capsaicin 処理)した幼若ラットより作成した標本から記録した光学シグナルを Normal 標本の記録と比較した。また透過型電子顕微鏡写真より三叉神経根における無髓線維数/有髓線維数、および無髓線維数/Schwann cell subunits を対照群、Capsaicin 処理群について算出し、比較検討した。

水平断スライス標本においては脊髄路電気刺激(刺激幅 0.1ms、強度 0.5mA)後、光学シグナルはまず刺激部位近傍に 0.6 msec 以内の潜時をもって起こり、引き続き同部位より約 500  $\mu$  m 内側に進んだ後、刺激から約 4 msec の潜時をもって吻尾側に広がった後約 200 ミリ秒間持続した。一方、傍矢状断ブロック標本では、三叉神経根電気刺激(刺激幅 0.1ms、強度 5.0mA)後、光学シグナルは約 8 msec の潜時をもって吻側に起こり、約 4 msec の間に尾側へ至った後、スライス標本と同様に約 200 ミリ秒間持続した。光学シグナルの強さは通常尾側の方が吻側に比較してより大きく、長持続性の応答は尾側領域に観察される傾向にあった。

尾側亜核における光学シグナルは短潜時高振幅の速成分とそれに引き続き長持続性の遅成分とから構成され、同一標本において同時に記録した電場電位と類似の時空間特性を示した。速成分は非 NMDA 型グルタミン酸受容体遮断薬 CNQX (10  $\mu$  M) により消失し、遅成分は低  $\text{Mg}^{2+}$  灌流液下で著明に増強し、また NMDA 型グルタミン酸受容体遮断薬 AP5 (30  $\mu$  M) で著しく減少した。それに対して刺激部位近傍の光学シグナルは極めて潜時の短い一過性の成分のみからなり、低  $\text{Mg}^{2+}$  灌流液および CNQX、AP5 投与の各条件下において著明な変化を認めなかった。一方、Capsaicin 前処理ラットから作成した標本では、脊髄路核尾側亜核の光学シグナルにおいて遅成分が著明に減弱し、対照群で AP5 を投与した場合と極めて類似した時間経過を示した。電子顕微鏡学的検討では、同日齢 Capsaicin 前処理ラット三叉神経根において無髓線維数/有髓線維数、および無髓線維数/Schwann cell subunits の値に有意な減少が確認された。

従って、三叉神経一次求心線維を介して三叉神経脊髄路核尾側亜核に惹起される神経活動は、速成分には非 NMDA 型受容体、遅成分には NMDA 型受容体を介した伝達が深く関与することが示され、特に無髓求心線維を介した入力は後者に深く関与していること、さらに新生仔 Capsaicin 処理後数日以内に、脊髄路核内の神経伝達において機能的な変化が既に生じ

ていることが間接的に示唆された。三叉神経脊髄路核は吻尾方向に長い構造であり、一次求心線維からの入力は一三叉神経脊髄路を吻側から尾側へ進みながら各レベルで脊髄路核に入力するという解剖学的特性から、三叉神経脊髄路核に脊髄後角を対象とした研究に用いられるような冠状断スライスを適用することは困難である。本研究で用いた標本ならびに実験手法は、対象が発育途上の幼若動物であることを考慮する必要はあるが、三叉神経脊髄路核における侵害情報伝達を検索する際の有用な手段と成り得るものと考えられる。さらに、単一ニューロンを対象とした微小電極を用いた電気生理学的手法をこれに組み合わせることにより、より詳細な情報が得られる可能性があるものと思われる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 赤 池 忠  
副 査 教 授 福 島 和 昭  
副 査 教 授 脇 田 稔

## 学位論文題名

Effect of neonatal capsaicin treatment on neural activity  
in the medullary dorsal horn of neonatal rats evoked  
by electrical stimulation to the trigeminal afferents :  
an optical, electrophysiological, and quantitative study

(幼若ラット三叉神経求心路電気刺激により三叉神経脊髄路核尾側亜核内に  
惹起される神経活動に対して新生仔 Capsaicin 処理の及ぼす影響 :

光学的、電気生理学的、数量的研究)

審査は、赤池、福島および脇田の各審査担当者が学位申請者に対して提出論文の内容ならびにそれに関連する事項について口頭試問により行った。はじめに学位申請者が本研究を構想した経緯、本研究に関連する歴史的背景、本研究の目的・材料と方法・結果・考察、および今後の研究の展望などを説明した後、提出論文の内容ならびにそれに関連する事項について試問した。

三叉神経脊髄路核尾側亜核(延髄後角)は口腔顔面領域における侵害情報伝達の一次中継核として機能し、一次求心線維を介した痛みの情報はここで二次ニューロンへと伝達される。無髄求心線維を介した入力やグルタミン酸受容体が、Wind-up や LTP といった一次中継核における可塑的变化に深く関わるのが微小電極を用いた手法によって示唆されており、三叉神経脊髄路核尾側亜核においても同様にこれらの可塑的变化が報告されている。しかし、これまでの単一微小電極を用いた電気生理学的な研究手法では、細胞集団として機能する神経核の活動を広範囲にわたって同時記録することは極めて困難である。近年、これを補完するものとして膜電位感受性色素を用いた光学測定の手法が中枢神経系の様々な領域で用いられるようになってきたが、三叉神経脊髄路核に関しては哺乳類の生後動物での報告は今のところ見当たらない。一方、無髄線維の永続的な脱落を引き起こす新生仔 Capsaicin 処理は侵害情報伝達機構の研究に広く用いられているが、処理後数日の間に侵害情報伝達の一次中継核を対象とした電気生理学的実験に用いた報告は数少なく、侵害情報伝達系における短期的な機能的変化の有無については十分明らかにはされていない。

以上のような背景を踏まえ学位申請者は、無髄求心線維を介して幼若ラット三叉神経脊髄路核尾側亜核に惹起されるシナプス伝達において、NMDA 型、非 NMDA 型グルタミン酸受容

体のいずれが主要な役割を果たしているかを明らかにし、さらに新生仔 Capsaicin 処理後数日での尾側亜核内神経伝達における機能的変化について検討することを目的として、電位感受性色素を用いた光学記録および電場電位同時記録を行った。また、新生仔 Capsaicin 処理による三叉神経根の形態的変化を透過型電子顕微鏡を用いて検証した。

5-7日齢 Wister ラットから摘出した脳幹より水平断スライス標本(厚さ 400  $\mu$ m)ないし傍矢状断ブロック標本を 4°C Krebs 標準液下に作成し、電位感受性色素 RH482 または RH795 で染色した。三叉神経脊髄路(水平断スライス標本)もしくは三叉神経根(傍矢状断ブロック標本)を電気刺激することにより尾側亜核に惹起される光学応答を Deltaron-1700 システムにて 0.6 ミリ秒毎に記録し、ガラス微小電極を用いた電場電位同時記録を行った。低  $Mg^{2+}$  やグルタミン酸受容体遮断薬投与の各条件下における記録を比較検討し、さらに新生仔 Capsaicin 処理ラット(生後 2 日および 3 日後の 2 度にわたって Capsaicin 50mg を皮下投与)より作成した標本から記録した光学シグナルを Normal 標本の記録と比較した。また透過型電子顕微鏡写真より三叉神経根における無髄線維数/有髄線維数、および無髄線維数/Schwann cell subunits を対照群、Capsaicin 処理群について算出し、比較検討した。

尾側亜核における光学シグナルは短潜時高振幅の速成分とそれに引き続く長持続性の遅成分とから構成され、同一標本において同時に記録した電場電位と類似の時空間特性を示した。速成分は非 NMDA 型グルタミン酸受容体遮断薬 CNQX (10  $\mu$ M) により消失し、遅成分は低  $Mg^{2+}$  灌流液下で著明に増強し、また NMDA 型グルタミン酸受容体遮断薬 AP5 (30  $\mu$ M) で著しく減少した。それに対して刺激部位近傍の光学シグナルは極めて潜時の短い一過性の成分のみからなり、低  $Mg^{2+}$  灌流液および CNQX, AP5 投与の各条件下において著明な変化を認めなかった。一方、Capsaicin 前処理ラットから作成した標本では、脊髄路核尾側亜核の光学シグナルにおいて遅成分が著明に減弱し、対照群で AP5 を投与した場合と極めて類似した時間経過を示した。電子顕微鏡学的検討では、同日齢 Capsaicin 前処理ラット三叉神経根において無髄線維数/有髄線維数、および無髄線維数/Schwann cell subunits の値に有意な減少が確認された。

従って、三叉神経一次求心線維を介して三叉神経脊髄路核尾側亜核に惹起される神経活動は、速成分には非 NMDA 型受容体、遅成分には NMDA 型受容体を介した伝達が深く関与することが示され、特に無髄求心線維を介した入力は後者に深く関与していること、さらに新生仔 Capsaicin 処理後数日以内に、脊髄路核内の神経伝達において機能的な変化が既に生じていることが示唆された。

以上のような概要説明がなされた後、審査担当者より論文内容およびその関連事項、すなわち電気刺激等の実験条件、単一微小電極による電気生理学的手法と光学記録法の相違点、侵害受容系におけるグルタミン酸受容体の役割、新生仔 Capsaicin 処理の具体的手法ならびに電顕を用いた数量的検討の妥当性などについて種々の試問がなされた。学位申請者はこれらの質疑に対して明快かつ適切な説明をもって回答し、本研究に関連する事項のみならず、専門および関連領域についても十分な学識と理解を有していることが認められた。また本研究は三叉神経脊髄路核尾側亜核に惹起される神経活動に対するグルタミン酸受容体、および無髄求心線維入力の関与を多角的、総合的に検討しており、今後の発展性も期待できる。特に本研究で採用した傍矢状断ブロック、水平断スライスの両標本を用いた光学記録法は脊髄路核の解剖学的形態を考慮したものであり、尾側亜核における可塑的変化の記録等、今後さらに発展してゆく可能性が高いと思われる、三叉神経領域における侵害受容系の研究に大きく寄与することが期待できると認められた。

以上より、主査ならびに副査は、本研究論文が学位論文として認められ、本学位申請者は博士（歯学）の学位を授与されるに値すると認定した。