

氏名(本籍) 千野佳秀(滋賀県)
学位の種類 博士(医学)
学位記番号 博士(論)第297号
学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日 平成14年12月11日
学位論文題目 Colocalization of NO and VIP in neurons of the submucous plexus
in the rat intestine
(ラット腸管粘膜下神経叢におけるNOとVIPの共存に関する研究)

審査委員 主査 教授 谷 徹
副査 教授 工藤 基
副査 教授 藤山 佳秀

論文内容要旨

【目的】

Nitric Oxide (NO) は、消化管において消化管運動や粘膜の電解質分泌、ホルモン分泌に関与する non-adrenergic non cholinergic (NANC) inhibitory mediator の一つとして知られている。一方 VIP (vasoactive intestinal peptide) も、NANC inhibitory mediator の代表的なペプチドである事が知られている。これまで報告された多くの生理実験においては、NOとVIPは上記の消化管機能の制御において密接な機能連関がある事が知られている。

NOとVIPの消化管の壁内神経における共存については、ラットや犬を含む多種の動物で調べられているが、それらのほとんどは筋間神経叢で調べられており、粘膜下神経叢においてはほとんど調べられていない。その理由として、従来の方法では粘膜下層のNO神経はほとんど検出できないことが考えられる。NOが粘膜機能に関与し、VIPと機能連関があることを考えると、粘膜下層におけるNO神経の局在を形態学的に証明し、どのようにVIPと共存するかを評価することは極めて重要であると考えられる。

我々の実験では、動物にコルヒチンの前処理を行い、免疫組織化学の染色性を高める事により、粘膜下層での nNOS 含有神経の存在とVIP含有神経との共存を明かにする事ができた。

【方法】

コルヒチン処理ラットの胃から大腸におよぶ全腸管の切片を作成した。

〈Nitric oxide synthase (NOS) とVIPの免疫染色〉

各切片をトリプシン処理した後、VIPのモノクローナル抗体とともにPBSTに浸し4℃で5日間 incubate した。内因性 peroxidase 活性をとるために、0.1% H₂O₂ で30min 処理した後、室温で0.1% phenylhydrazine の溶解する0.1% PBS に浸した。biotinylated anti-mouse IgG に浸した後、2時間 avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) に浸した。最後に、0.01% 3,3'-diaminobenzidine と0.0003% H₂O₂ を含有する0.05M tris-HCl buffer (pH7.6) で反応させた。この反応で、VIP含有神経細胞は茶色に染められた。次に切片を1時間PBSTで洗浄した後、nNOSとともにPBSTに浸し4℃で5日間 incubate した。Biotinylated anti-rabbit IgG と反応させた後、同様にABC処理し0.01% 3,3'-diaminobenzidine と0.0003% H₂O₂、1% ammonium nickel sulfate を含有する0.05M tris-HCl buffer (pH 7.6) で反応させた。この反応で、nNOS含有神経細胞は紫に染められた。最後に切片は、ゼラチンコートスライドガラスにマウントした。

〈PGP-9.5の免疫染色〉

粘膜下層のすべての神経細胞を染めるために、上記と同様に、ABC法、DAB-Nickel反応を用いてPGP9.5含有細胞を染めた。

〈蛍光免疫染色〉

二重蛍光免疫染色をするために、トリプシン処理した切片を、nNOS抗体とVIP抗体を含有するPBS

Tに4℃で5日間浸し、Alexa Fluor488-labeled anti rabbit IgGとAlexa Fluor568-labeled anti mouse IgGと反応させ、蛍光顕微鏡にて観察した。

〈定量解析〉

粘膜下神経叢におけるnNOS-IR細胞の密度を調べるために、単価面積当たりの紫色単独染色細胞(nNOS-IR)の数を数えた。次に粘膜下神経叢の全細胞数に占めるnNOS-IR, nNOS/VIP-IR, VIP-IR細胞の比率を調べるために、紫色単独(nNOS-IR), 茶色単独(VIP-IR), 紫-茶色混合(nNOS/VIP-IR)に染まる細胞の数を数え、PGP9.5含有細胞に対する比率を調べた。以上の結果を各腸管部位で比較検討した。

【結果】

コルヒチン処理をしたラットの腸管ではnNOS-IR, VIP-IR神経細胞および神経線維の免疫染色性が、全腸管にわたり著明に増強した。nNOS含有神経細胞数(nNOS-IR and nNOS/VIP-IR)は、大腸や小腸に比べ胃体部、胃前底部で有意に少なかった。しかしながら、小腸と大腸では有意差はなかった。nNOS/VIP-IR細胞の全神経細胞に占める比率は、十二指腸から近位大腸までが45~55%、遠位大腸で66.4±5.1%におよんだ。nNOS-IR, nNOS/VIP-IR, VIP-IR神経細胞は、形、大きさともに類似しており、粘膜下層及び粘膜に長い軸索を伸ばしていた。上部消化管の粘膜下層では、nNOS単独及びVIP単独の神経線維が観察されたが、遠位大腸では、nNOSとVIPの両方に染まる神経線維が多く観察された。なお、蛍光二重染色においても、nNOS及びVIPの細胞レベルでの共存が観察された。

【考察】

本研究でラット腸管の粘膜下層において、nNOS含有神経の免疫組織化学に成功したのは、軸索流を止める物質として知られるコルヒチンを動物に前処置したことによると考えられる。また、クリオスタット20umの水平断切片は、whole mount preparationに比べて粘膜層と粘膜下層の観察に適した方法である。今回nNOS含有神経細胞は、VIP含有細胞と形、大きさとも似かよっており、VIPとの共通の生理機能を有する事が示唆される。さらに遠位大腸におけるnNOS/VIP-IR神経細胞の比率と近位大腸のそれに有意差があるのは、NaやCl分泌の制御において近位大腸と遠位大腸で差があるという生理学的所見とよく相関する。また粘膜下層のVIP含有神経は、粘膜及び粘膜下層に軸索をのばすmotor neuronとして知られており、これらの神経におけるnNOSとVIPの共存は、粘膜及び粘膜下層における機能の調節に両者が相互に関連して作用するものと考えられる。

【結論】

ラット腸管粘膜下神経叢において、nNOS含有神経が数多く存在しそのほとんどが、VIP含有神経と共存する。

学位論文審査の結果の要旨

本研究は、ラット腸管粘膜下神経叢におけるnNOS (neuronal nitric oxide synthase) 含有神経細胞を免疫組織学的に染色し、同時にVIP (vasoactive intestinal peptide) 含有神経細胞との共存を形態的および定量的に解析したものである。

5mg/kgのコルヒチンを腹腔内投与した雄のWistar ratsを用いて胃から大腸まで消化管全域の20 μmの凍結水平断切片を作成した。粘膜下層を多く含む切片を取り出し、免疫染色を行った。更に、粘膜下神経叢におけるnNOS含有神経細胞の密度、粘膜下神経叢の全細胞数に占めるnNOS陽性細胞(nNOS-IR)、nNOS, VIP両者陽性細胞(nNOS/VIP-IR)、VIP陽性細胞(VIP-IR)の比率を定量解析した。コルヒチン処理をしたラットの腸管では、nNOS-IR神経細胞の免疫染色性が、全腸管にわたり著明に増強した。定量解析においてnNOS含有神経細胞数は、小腸と大腸で有意差はないが多く染まった。nNOS/VIP-IR神経細胞の全神経細胞に占める比率は、十二指腸から近位大腸までが45~55%、遠位大腸で66.4±5.1%におよんだ。以上より、ラット腸管粘膜下神経叢には、nNOS含有神経細胞が数多く存在し、そのほとんどがVIP含有神経と共存することが結論づけられた。

本研究は、NO(nitric oxide)が粘膜の機能制御に関与し、VIPと機能連関があると言う生理学的実験による事実を形態学的に証明したものであり、博士(医学)の学位論文として価値があると認められた。