

論文内容の要旨

論文提出者氏名 花田 圭司

論文題目 Peripheral Choline Acetyltransferase in Rat Skin Demonstrated by Immunohistochemistry

論文内容の要旨

アセチルコリンを神経伝達物質とするコリン作動性神経の形態を観察する最も直接的な方法は、アセチルコリン自体の局在を観察することである。しかし、アセチルコリンを組織標本中に固定することが難しいため、アセチルコリンの合成酵素であるコリンアセチル基転移酵素(choline acetyltransferase; ChAT)に対する免疫組織化学法が、従来コリン作動性神経の観察に最善の方法とされてきた。たしかに ChAT に対する免疫組織化学法は、中枢神経系のコリン作動性神経の検出には適しているが、末梢神経に存在するはずのコリン作動性神経を十分に検出することができなかった。ところが、最近同定された末梢型コリンアセチル基転移酵素(peripheral type of choline acetyltransferase; pChAT)に対する抗体を用いた免疫組織化学法は、腸管、眼、心臓などに存在する末梢性コリン作動性神経の同定を可能した。この抗体は末梢のコリン作動性神経を良好に染色する一方、中枢のコリン神経は認識しない特徴を示している。本研究は、pChAT 抗体を用いてラット皮膚におけるコリン作動性神経の存在を証明し、その解析をする目的でおこなわれた。

19匹のウィスターラットを使用し以下の実験を行い、全ての実験は倫理的な配慮のもとに施行した。

1、ラットの足趾皮膚において pChAT 抗体を用いた免疫組織化学法を行った。皮膚において pChAT 陽性を示す構造物は神経のみであり、真皮や脂肪組織内には pChAT 陽性の神経線維束が多数確認された。エクリン汗腺に接するように pChAT 陽性神経が認められ、これは交感神経節由来のコリン作動性交感神経の可能性が考えられた。また表皮真皮境界部には表皮に向かって放射状に分布する pChAT 陽性神経が多数存在し、後根神経節由来の知覚神経の可能性が示唆された。その他、血管を取り囲むように存在する pChAT 陽性神経や毛包周囲に柵状に配列する pChAT 陽性神経も検出された。

2、ラット腰部交感神経節において pChAT 抗体、アドレナリン神経のマーカ― (Tyrosine hydroxylase; TH) を用いた免疫組織化学法を施行した。交感神経節において、ほぼ全ての細胞体で pChAT が陽性あることを確認した。TH 陽性細胞と形態や分布を比較し結果の妥当性を証明した。

3、ラット腰部後根神経節において pChAT 抗体を用いた免疫組織化学法を施行し、後根神経節のほぼ全ての細胞において pChAT が陽性であることを確認した。しかし染色強度は細胞体の大きさにより違いがあり、小型の細胞は強く染色され、大型の細胞になるにつれ染色性が弱くなった。

4、足趾皮膚に存在するエクリン汗腺において、pChAT 抗体、他のアセチルコリンマーカ― (Acetylcholinesterase; AChE、common type of ChAT; cChAT、Vesicular acetylcholine transporter; VChT)、TH、知覚神経のマーカ― (substance P; SP) を用いた免疫組織化学法を施行した。複数の pChAT 陽性神経が個々のエクリン汗腺を取り囲み、かつ腺房に入り込むように存在することが証明された。他のアセチルコリンマーカ― (AChE、cChAT、VChT) 陽性の神経と pChAT 陽性の神経を比較し、コリン作動性神経の形態学的な証明における pChAT の優位性を明らかにした。

5、神経逆行性トレーサー (Fluoro-Gold) を用いて、ラット足趾皮膚への神経投射経路の証明をおこなった。Fluoro-Gold を片側のラット足趾皮膚へ注射投与したところ、後根神経節においては、注射した足趾と同側

の L3 から L6 レベル(主に L4, L5)において Fluoro-Gold 陽性の神経細胞が確認され、交感神経節においては、L1 から L5 レベルの細胞体の一部に標識神経が認められた。注射と反対側の後根神経節、交感神経節は全く標識されなかった。さらに Fluoro-Gold 陽性の細胞体が、ほぼ全て pChAT 陽性を示すことも証明した。

6、片側の腰部交感神経節を外科的に切除したラットにおいて、足趾皮膚の pChAT、TH、SP を用いた免疫組織化学法を施行した。片側の腰部交感神経節を切除すると、切除した方と同側の足趾皮膚において、エクリン汗腺周囲の pChAT 陽性神経が完全に消失した。反対側のエクリン汗腺周囲の pChAT 陽性神経は残存していた。手術側の TH 陽性神経が完全に消失していたことから片側の交感神経切除が確実に行われたことが証明された。これらの結果から、エクリン汗腺周囲の pChAT 陽性神経が交感神経節由来のコリン作動性神経である可能性が高いと考えられた。表皮真皮境界部、血管周囲の pChAT 陽性神経は、手術側も反対側も残存した(分布に左右差なし)。知覚神経のマーカ―である SP 陽性神経も表皮真皮境界部、血管周囲で変化を認めなかった。交感神経節由来ではない pChAT 陽性神経が皮膚には存在し、それが知覚神経である可能性が示唆された。

7、片側の腰部後根神経節を外科的に切除したラットにおいて、足趾皮膚の pChAT、TH、SP を用いた免疫組織化学法を施行した。表皮真皮境界部の pChAT 陽性神経は、手術と同側においてのみ消失し、SP 陽性神経も同時に消失をした。反対側の表皮真皮境界部 pChAT 陽性神経と SP 陽性神経は手術後も残存した。これらから、後根神経節由来、すなわち知覚神経としての pChAT 陽性神経が皮膚に存在することが示唆された。

本研究により、ラット皮膚および交感神経節における pChAT 陽性神経の存在が初めて証明された。皮膚で見出された pChAT 陽性神経は一部が交感神経節由来で、残りは後根神経節由来の知覚神経であった。

薬理学、生理学的実験により証明されていた、エクリン汗腺へ分布するコリン作動性交感神経が pChAT により明瞭に可視化され、その解像度においても過去に報告されたコリン神経のマーカ― (AChE、cChAT、VChT) より明らかに優位であることがわかった。通常ノルアドレナリンを神経伝達物質とする交感神経において、エクリン汗腺がコリン作動性の交感神経に支配されている謎を解明するにあたり、pChAT を用いた免疫組織化学法は重要な手段となりうると考える。

本研究におけるもう一つの知見は、ラット皮膚に pChAT 陽性の知覚神経が存在することを証明したことである。表皮真皮境界部、血管周囲、毛包周囲、爪床などに pChAT 陽性神経が数多く認められ、表皮真皮境界部の pChAT 陽性神経は自由神経終末のみでなく、その特徴的な構造から触覚小体の一部を構成しているものと考えられる。SP 陽性神経との分布の違いや、後根神経節における pChAT の染色性から、pChAT 陽性の知覚神経は侵害受容のみならず固有感覚など様々な感覚に関与している可能性が示唆された。血管を取り囲むように認められる pChAT 陽性の知覚神経については、SP 陽性神経との関係や過去の報告から血管拡張に関与している可能性が考えられる。そもそもコリン作動性の知覚神経の存在はあまり一般的ではなく、pChAT に対する免疫組織化学法は知覚神経とアセチルコリンの関係を解明する重要な手段の一つとなりうると考える。