

ニワトリ後角における
NOS含有ニューロンとサブスタンスP含有
第一次求心性神経終末との関係

坂本宏史

Nitric oxide synthase containing
neurons in the chicken spinal
dorsal horn - special reference to their
involvement in pain transmission

Hiroshi Sakamoto, PhD

Key Words: chicken, spinal cord, immunocytochemistry,
nitric oxide, pain

Abstract

Nitric oxide synthase (NOS) has been known to exist in DRG neurons and in the spinal dorsal horn. It has been proposed that nitric oxide participates in the transmission of nociceptive inputs at the spinal level. We have been studying nociceptive information regulatory systems using chicken spinal cord from the point of view of comparative anatomy. In this study, we investigated NOS-containing neurons in the chicken cervical cord in terms of the following aspects: 1) the distribution and morphological characteristics of the NOS-containing neurons, 2) co-localization with GABA and or the substance P receptor, and 3) the positional relation with substance P-containing axon terminals, and substance P receptor-containing neuronal elements.

Using NOS1 immunohistochemistry and NADPH diaphorase histochemistry, we observed a high occurrence of several morphological types of NOS-containing neurons in the laminae I and II, and a low occurrence of the same neurons in the lamina III of the chicken dorsal horn. Their cell bodies were fusiform, triangular, or multipolar, and their size varied from 3.8 to 11.9 micrometer in minor axis. GABA-/ substance P receptor-immunohistochemistry was combined with NADPH diaphorase histochemistry to examine the occurrence of co-localization between them. We observed that some of the NOS-containing neurons showed GABA-immunoreactivities but none of the NOS-containing neurons showed substance P receptor-immunoreactivities. The substance P receptor-containing neurons were, however, often contacted by NOS-containing axon terminals. By double immunohistochemical staining using rat anti-substance P and rabbit anti-NOS1 antibodies, we found substance P-containing terminals often contacted NOS-containing neurons. These contacts between substance P-containing axon terminals and NOS-containing neurons were confirmed by immunohistochemical electron microscopy.

緒 言

一酸化窒素 (NO) は、一部の神経細胞によって合成・放出され、すみやかに近隣の神経細胞に取り込まれ、対象となる神経細胞が持つサイクリックGMPをリン酸化することによって、活動に影響を与えると考えられている²⁴⁾。このNOを発生させることができる神経細胞は、特異的に一酸化窒素合成酵素 (NOS) を含有する。脊髄の後角表層部に、多くのNOS含有神経細胞 (細胞体および神経線維) が分布することが報告されている (マウス¹⁰⁾、ラット^{1, 9, 10, 16, 17, 21, 26)}、ハムスター²¹⁾、モルモット⁸⁾、ウサギ¹⁶⁾、ネコ¹⁰⁾、リスザル¹⁰⁾、キジ¹⁶⁾。この部位は中枢神経系で最初に、身体各部の感覚情報が集められる場所であることから、NOが脊髄レベルにおいて感覚情報伝達に関与することが示唆されている^{10, 26)}。一方、「疼痛」の感覚 (侵害情報) を、中枢神経系に運ぶ第一次求心性 (感覚) 神経細胞に、11個のアミノ酸からなるP物質 (substance P, SP) と呼ばれる神経伝達物質ないし調節物質が、特異的に含有されることから、SPに対する特異抗体を用いた免疫組織化学は、侵害情報を伝達する第一次求心性神経線維の同定に利用されている。

われわれは、ニワトリを実験動物に用いて、比較解剖学的な立場から、侵害情報の伝達機構を調べてきた。これまでに、ニワトリ脊髄後角表層部では、一般に実験動物として用いられるラットやマウスなどと異なり、SPを含有する第一次求心性神経線維が第II層全体に広く分布すること、電子顕微鏡レベルでは、この第II層内にSP含有第一次求心性神経終末が、シナプス系球体¹¹⁾ と呼ばれる構造を高頻度に形成することを明らかにした²²⁾。シナプス系球体において、SP含有神経線維終末は、中心に位置し、他の複数の軸索終末や樹状突起とシナプスを相互に形成し、複雑な情報のやり取りの結果、その活動が調節されていると考えられる。

ハムスターやラットを用いた最近の研究から、SP含有軸索終末がNOS陽性の神経細胞に接触すること²¹⁾、シナプス系球体の中で、NOS含有樹状突起が第一次求心性神経終末と接触する場所も確認されている¹⁾。また、脊髄後角表層部にある抑制性伝達物質として知られるGABAを含有する神経細胞の一部は、同時にNOSも含有するという報告がある^{1, 17)}。

この研究では、ニワトリ脊髄後角で、NOS陽性神経要素について以下の3点、すなわち1) NOSを含有する神経細胞の分布と形態学的特徴、2) GABAおよびP物質受容体を共存させるかどうか、3) P物質含有神経線維終末との位置的關係、に注目して、比較解剖学的見地からNOの侵害情報の伝達への関わりを考察した。

方 法

脊髄の固定

ニワトリ (体重800 gから2kg) の心臓から、4%パラホルムアルデヒドと0.5%グルタールアルデヒドを含む固定液 (0.1M リン酸緩衝液 pH7.4) で灌流固定を行った。脊髄頸膨大

部を取り出して、長さ数ミリメートルのブロックにし、同じ固定液の中でさらに5時間浸漬固定した。脊髄のブロックを固定液から取り出し、リン酸緩衝液中で、厚さ50 μ mの、一部は横断切片、残りは水平断（縦断）切片にした。これらの横断／縦断切片を、以下の方法でNOS、GABA、SP受容体、SPの局在を可視化した後、光学顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡、電子顕微鏡で観察した。

NOSの組織化学的標識（光学顕微鏡で観察）

nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d) は、NOSと同じであることが確認されていることから^{5, 14, 23)}、切片の一部には、NADPH-d組織化学法²⁶⁾をおこなった。すなわち、切片をリン酸緩衝液（pH7.4）で洗浄後、1mg/ml β -NADPH, 0.5mg/ml nitro blue tetrazoliumと0.3%トリトンX-100含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で2時間反応させた。

免疫組織化学

他の切片は、以下の手順で免疫組織化学法により、NOS、GABA、SP受容体、SPを単独ないし、2つの物質を同時に、標識した。

蛍光免疫組織化学法（共焦点レーザー顕微鏡で観察）

- ①各抗原に対する特異抗体の溶液中で、3晩4 $^{\circ}$ Cで振盪し、反応させた。
- ②蛍光色素（Cy2、Cy3）で標識された、①の特異抗体に結合する2次抗体を1晩4 $^{\circ}$ Cで反応させた。
- ③PBSで切片を洗浄後、スライドグラス上にグリセリンで封入した。

アビジン・ビオチン複合体（ABC）法（電子顕微鏡・光学顕微鏡で観察）

- ①NOSに対するウサギ特異抗体で、上述のように脊髄切片を3晩反応させた。
- ②PBS洗浄後、ビオチン化抗ウサギIgG抗体で1時間 室温で反応させた。
- ③PBS洗浄後、過酸化酵素結合アビジンを1時間 室温で反応させた。
- ④PBS洗浄後、0.1%過酸化水素水を含むDiaminobenzysine 溶液を15分反応させ、NOS局在部位を可視化させた。

NOSをABC法で標識した切片の一部を電子顕微鏡用に1%四酸化オスミウム溶液（リン酸緩衝液、pH7.4）で1時間後固定後、アルコール系列で脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。さらに、包埋された脊髄から、ウルトラミクロトームで約100nm厚の超薄切片を作製し、クエン酸鉛溶液と酢酸ウラン溶液で電子染色した。

さらに、一部の超薄切片は、電子染色直前に、抗SP特異抗体を用いた後述の免疫金コロイド法によって、SP含有神経要素を標識し、NOS含有神経要素とSP含有神経要素の関係を調べた。

免疫金コロイド法

- ①超薄切片上の抗原を露出させるため、飽和メタ過ヨウ素酸ナトリウムで1時間処理した。
- ②切片を蒸留水で洗浄後、ウサギ全血清で10分間処理した。
- ③ラット抗SP抗体溶液で一晩室温反応させた。
- ④PBS洗浄後、金コロイド標識ウサギ抗ラットIgG抗体で、1時間室温で反応させた。

結 果

1. NOS含有神経細胞の分布と形態学的特徴

脊髄後角表層部で、NOSを含有する神経細胞は、I層とII層全体に多く分布し、III層にもやや低い密度で観察された(図1)。多くのNOS含有神経細胞は図1c、d(矢印)に見られるように、吻尾方向に樹状突起を伸ばし、双極性を呈していた。NOS含有神経細胞の大きさは、短径で3.8~11.9 μm の範囲であった(図2)。ときおり、図1cに鋸で示したような、三角形や多極性を呈したNOS含有神経細胞も見られた。

電子顕微鏡で、NOS含有神経細胞は、細胞膜や細胞質内の小器官の膜に酸化されたdiaminobenzidine 反応産物の沈着で確認される。NOS含有神経細胞は、電子密度の低い明るい核質など、一般的な神経細胞の特徴を持ち、また、シナプス部に見られるような小胞がみられた(図3矢印)。

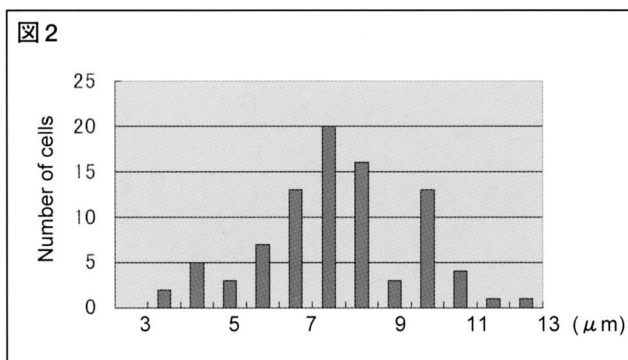


図2 NOS含有神経細胞の大きさ(短径)の分布。

NOS神経細胞の突起は、シナプス系球体中にもしばしば観察され、中心にある第一次求心性神経線維の終末と接触していた。両者の間にはしばしばシナプスも確認された(図5)。シナプス系球体を構成するNOS含有神経突起は、形態学的特徴から、樹状突起(図4a D)、シナプス小胞含有樹状突起(図4b, c VCD)、軸索終末(図4 AT)と思われた。

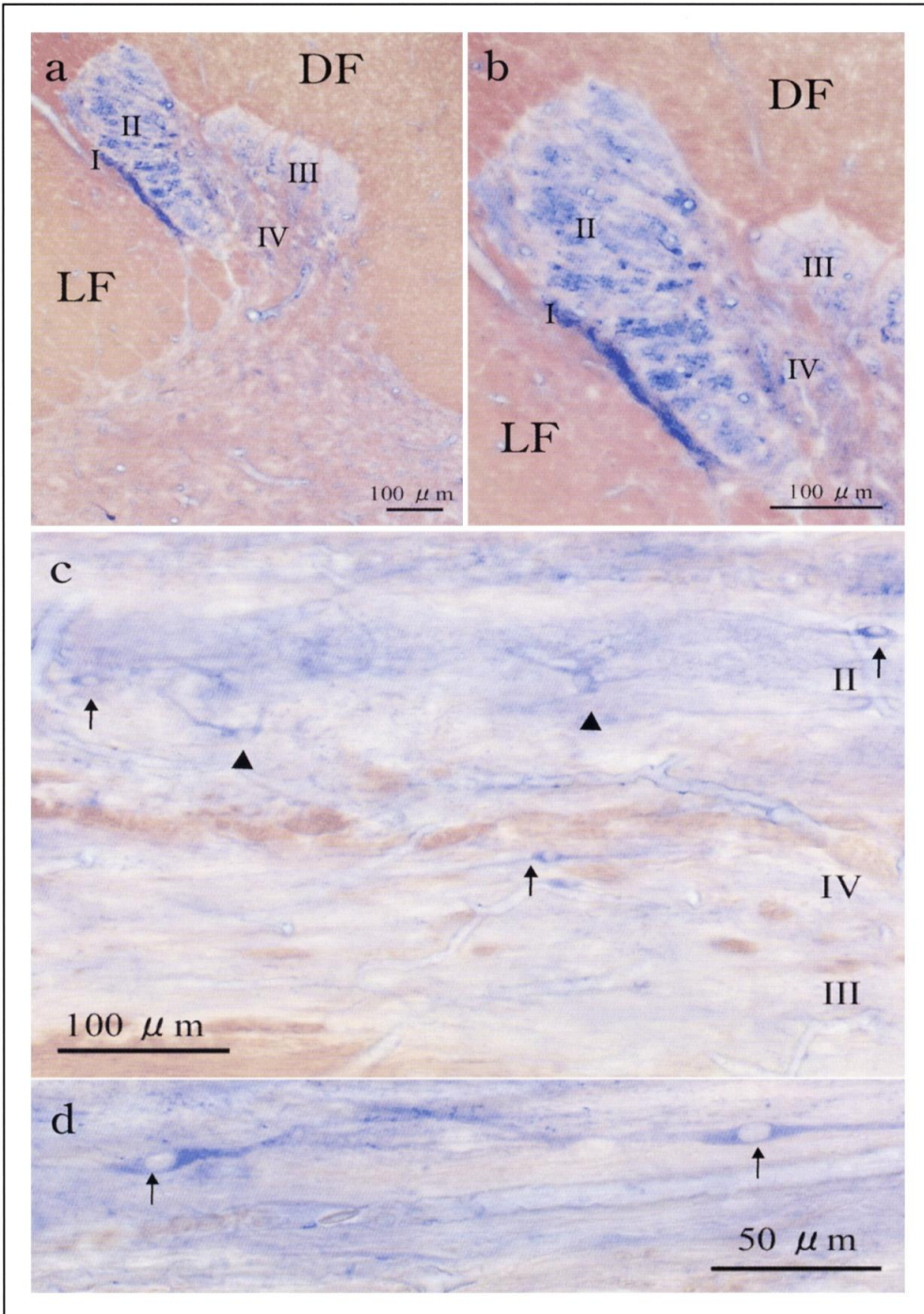
2. NOS含有神経細胞のGABAおよびSP受容体との共存性

図5a, b, cで示したように、NOS含有神経細胞の一部は、同時にGABAを含有することが確認された。一方、SP受容体とNOSとの、同一神経細胞内での共存は観察されなかった(図5d, e)。

3. NOS含有神経細胞とSP含有軸索終末との関係

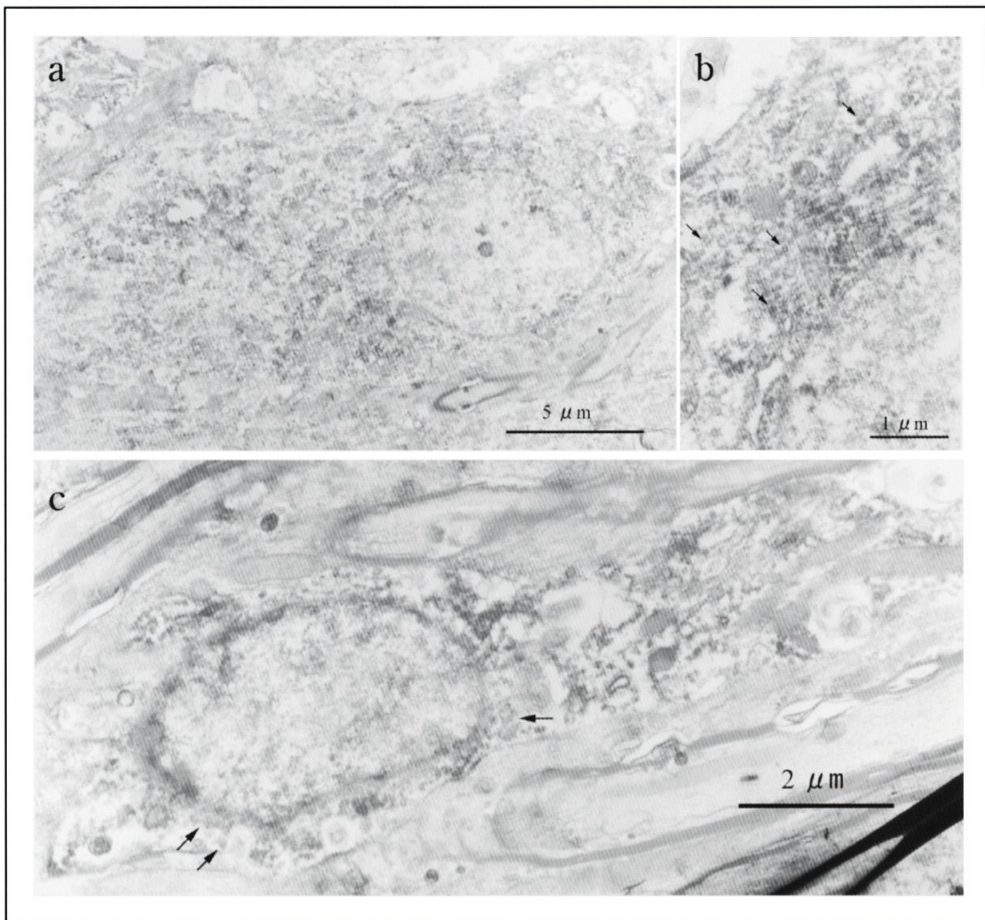
図5f, g, 図6, 図7で示したとおり、NOS含有神経細胞の細胞体やその突起はしばしば、SPを含有する軸索終末と接触していた。NOS含有神経細胞の形(双極性、多極性)に関係なく、SP軸索終末を高密度に受けるものとほとんど受けないものが観察された。

電子顕微鏡レベルでは、ABC法で標識されたNOS含有神経細胞体と樹状突起上に免疫金コロイド法で標識されたSP含有軸索終末が接触するところが確認された(図8a, b)。シナプス系球体の中でも、NOS含有神経要素とSP含有第一次求心性神経線維終末とが接触し、シナプスを形成するところが確認された(図8c)。



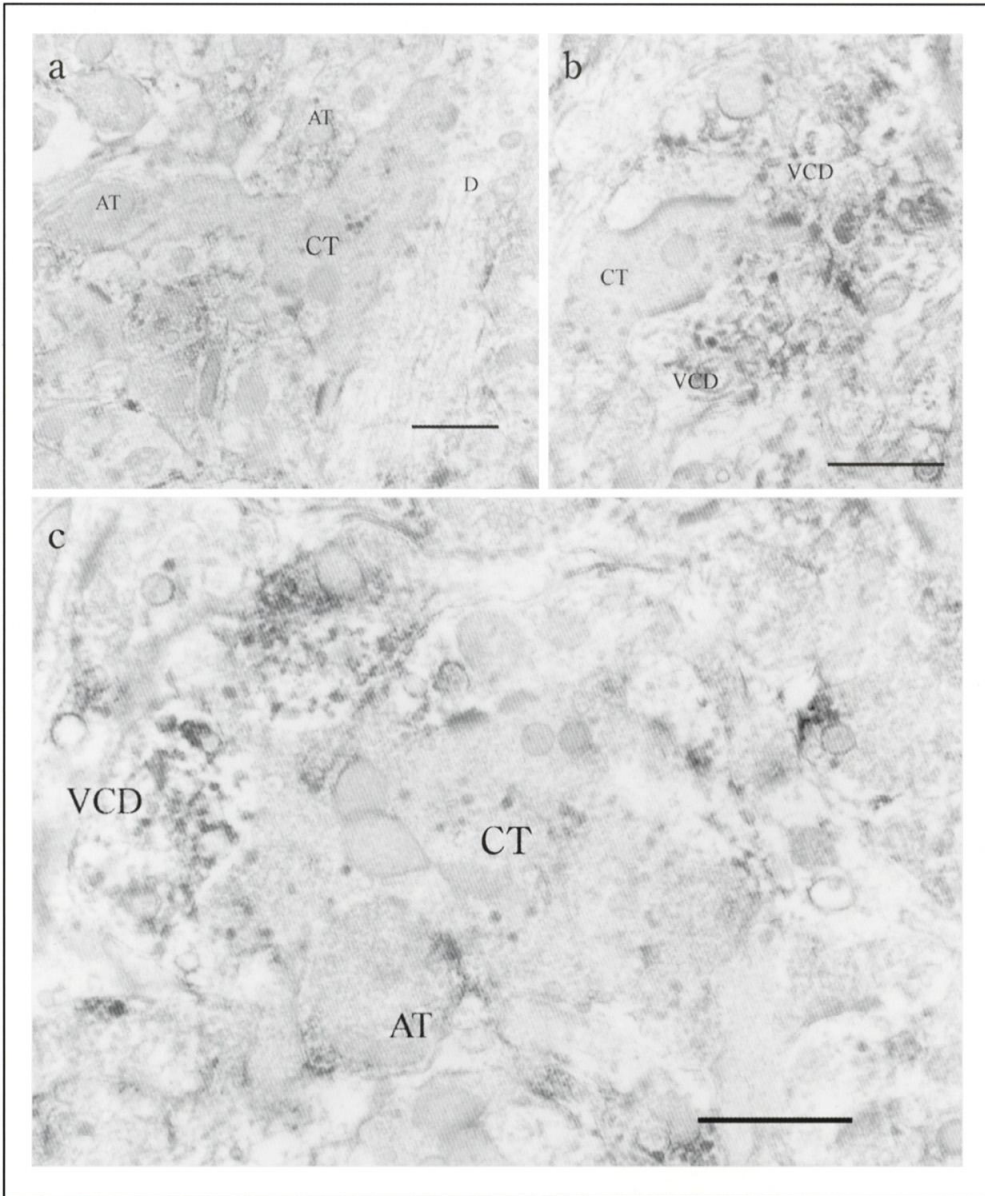
ローマ数字I~IVは、ニワトリの脊髄の層分けを示す (Brinkman and Martin, 1973)。a, b ニワトリ脊髄後角の横断面、DFは後索、LFは側索を示す。NOS (青紫色に染まった) 反応陽性要素(NADPH-d 組織化学)は、I層とII層に多く分布し、III層にも少数のNOS陽性要素が観察された。c, d ニワトリ脊髄を水平 (縦) 断し、NADPH-d 組織化学をおこなった例。多くのNOS陽性細胞は主な樹状突起を吻尾方向に伸ばす、双極性を示す神経細胞であった (矢印)。ときおり、多極性 (鏟) や三角形をした神経細胞も確認された。

図3



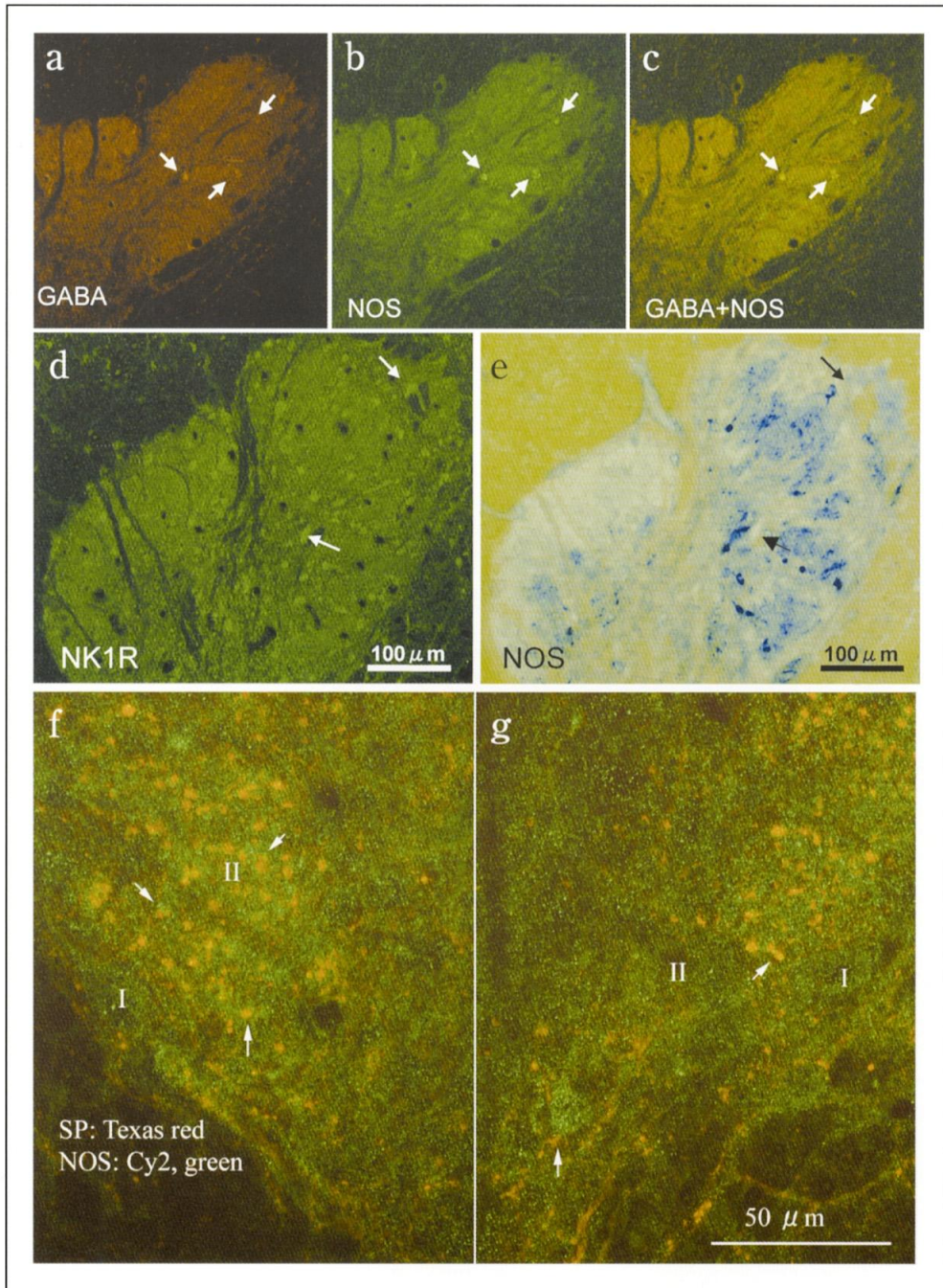
a NOS含有神経細胞の電子顕微鏡写真の一例。bは、aの一部の拡大、矢印は、小胞を示す。c 小型のNOS含有神経細胞の一例。矢印は、小胞を示す。

図4

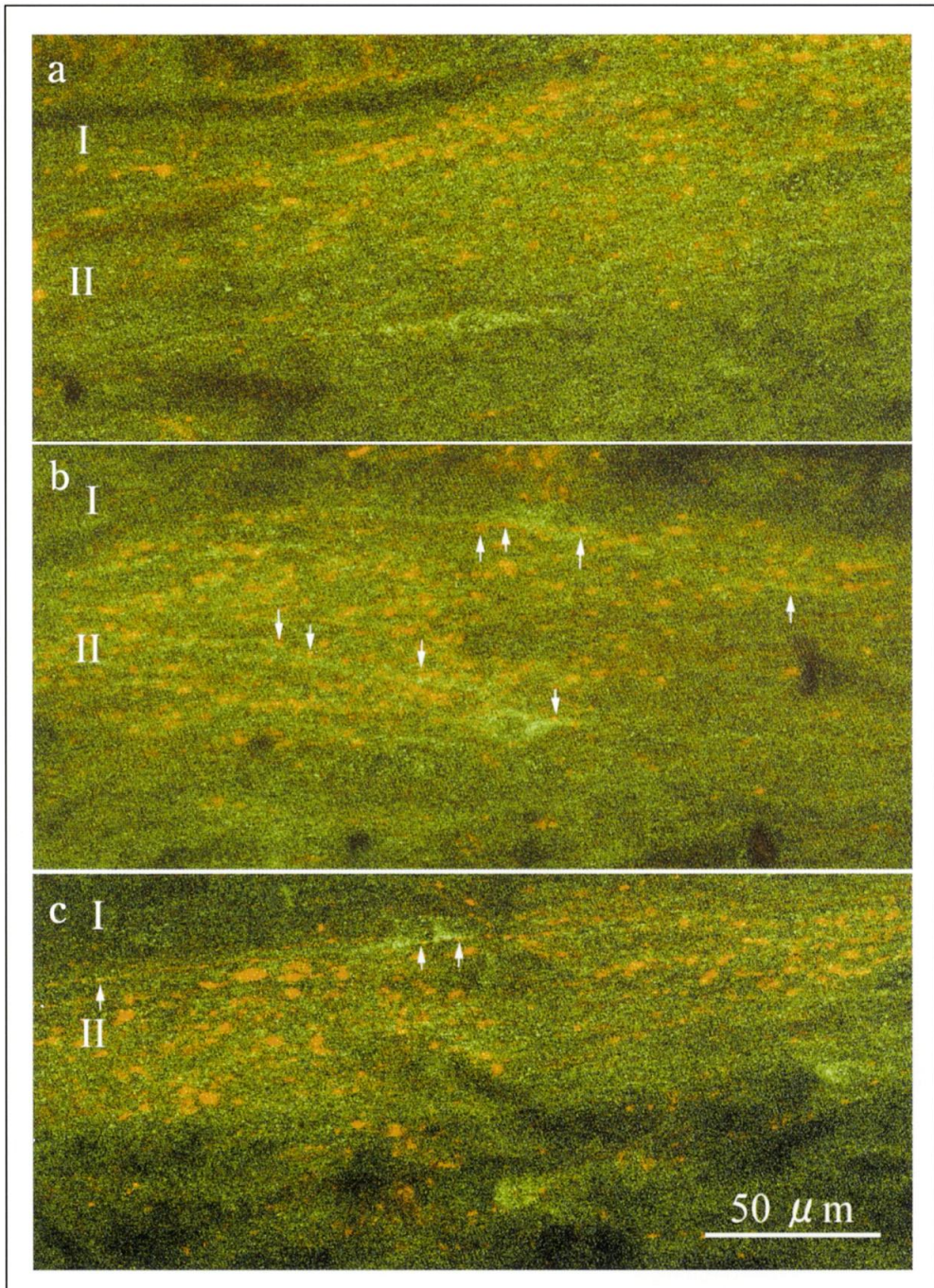


シナプス系球体で、NOSの局在は、樹状突起 (D)、小胞含有樹状突起(VCD)、神経終末(AT)に認められた。第一次求心性神経線維の中枢枝の終末 (CT) にはNOSの反応性は認められなかった。barは1 μ m。

図5

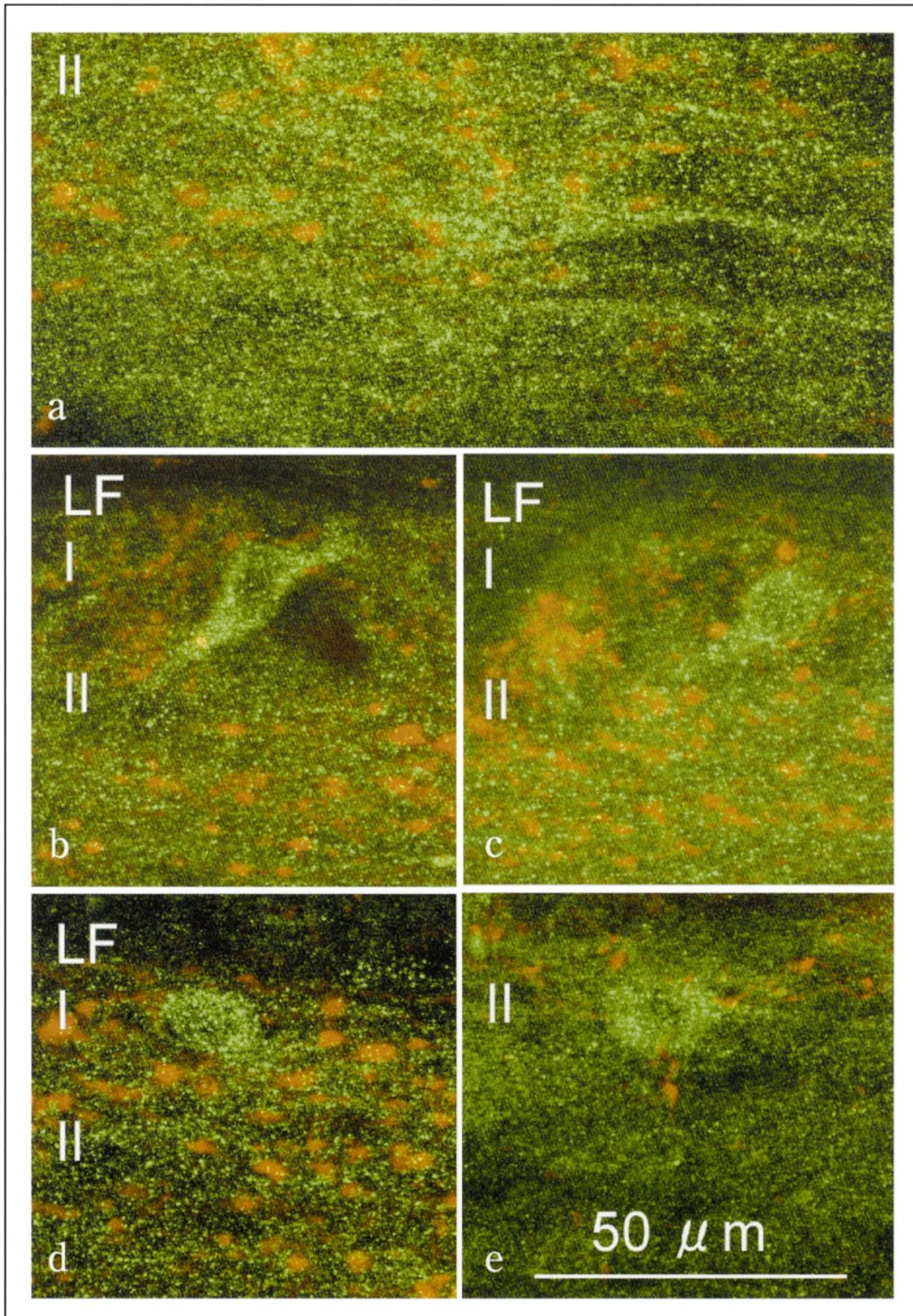


a GABAの局在を免疫蛍光法 (Cy3、赤色) で示した。b NOS含有神経細胞の局在を示す (Cy2、緑色)。c GABAとNOSの局在を同時に表したところ、この例では数個の細胞に両者の共存 (矢印) が見られた。d SP受容体陽性の神経細胞 (矢印) は、eのNOS組織化学反応を示さなかった。f, g SP (Cy3、赤色) とNOS (Cy2、緑色) を免疫組織化学的に二重標識すると両者が、隣接しているところ (矢印) が、観察された。

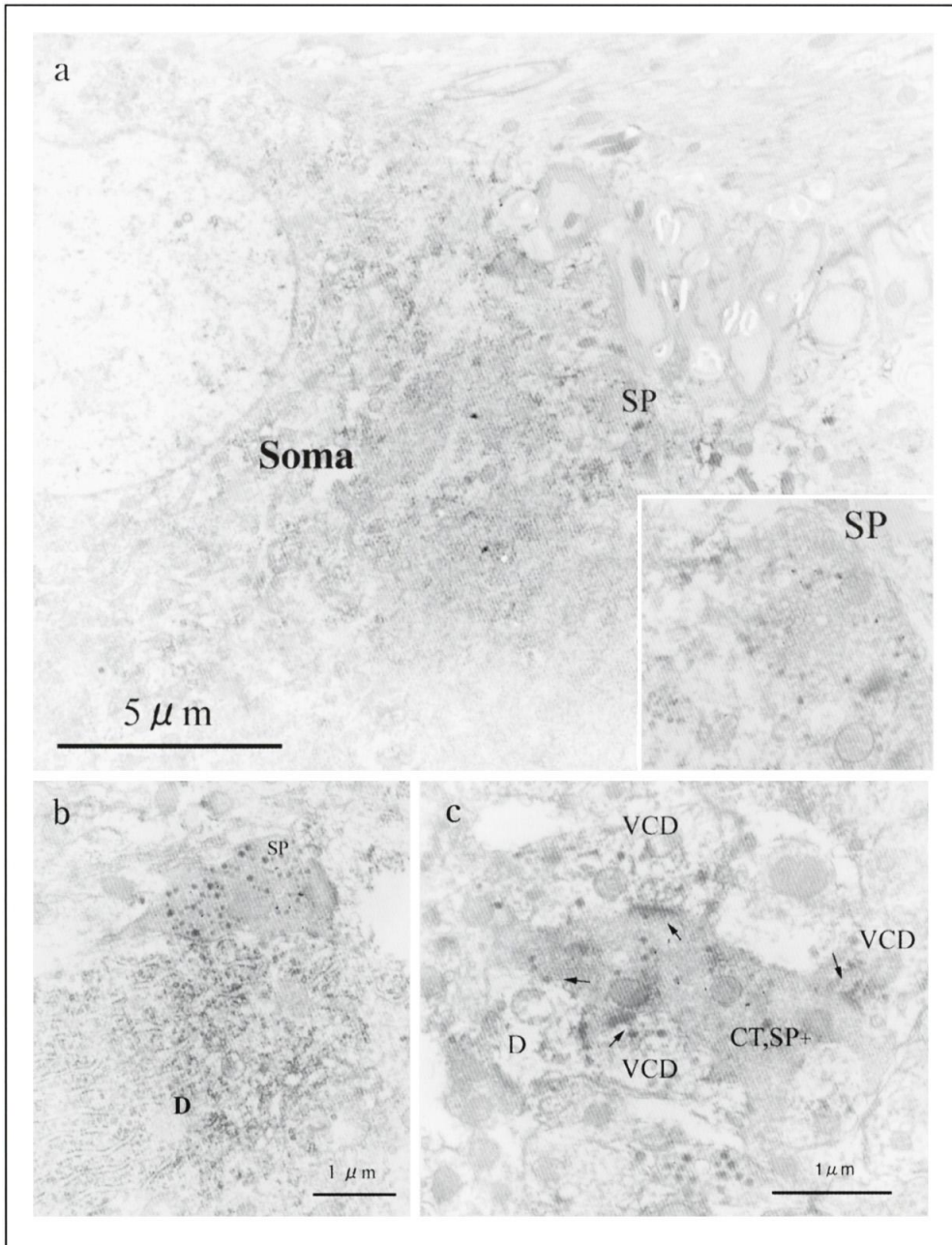


a, b, cは、双極性のNOS神経細胞（Cy2、緑色）とSP神経終末（Cy3、赤色）の関係を示す。SP終末を細胞体および樹状突起に密に受ける細胞（矢印）とほとんど受けない細胞が見られた。

図7



a, b, c, d, e では、多極性のNOS神経細胞 (Cy2、緑色) とSP神経終末 (Cy3、赤色) との関係が見られる。SP神経終末を密にうける細胞と、ほとんど受けない細胞が見られた。



免疫二重染色後、電子顕微鏡で、NOS陽性神経細胞(a、Soma)および近位樹状突起(b、D)を観察したところ、NOS陽性神経細胞上(ABC法)に接触するSP神経線維終末(金コロイド法)が観察された。c シナプス系球体では、SP含有神経終末(CT)がNOS含有神経細胞の樹状突起(D)や、小胞含有樹状突起(VCD)と直接接触するところの確認された。両者にはしばしばシナプス(矢印)も観察された。

考 察

1. NOS含有神経細胞の分布と形態的特徴について

これまでにNADPH-d組織化学や抗NOS抗体を用いた免疫組織化学により、マウス¹⁰⁾、ラット^{1, 9, 10, 16, 17, 21, 26)}、ハムスター²¹⁾、モルモット⁸⁾、ウサギ¹⁶⁾、ネコ、リスザル¹⁰⁾、さらに鳥類ではキジ¹⁶⁾の脊髄で、NOS含有神経細胞の分布が調べられている。共通点は、後角表層部には、NOS含有神経細胞が高密度に分布することである。今回著者が調べた、ニワトリにおいても、I、II層に多くのNOS含有神経細胞が観察され、従来の報告が確認された。したがって鳥類以上では、NOSの脊髄後角表層部における豊富な分布は、一般的であり、この部位で細い第一次感覚神経線維の分布と重なることから、Valtschanoffら(1992)が最初に指摘したように、NOが感覚情報の脊髄内処理に関与することが、想像される。

今回、ニワトリ後角表層部に見られたNOS含有神経細胞は、大きさ、細胞体の形や樹状突起の伸び方において、多様性が見られた。これらの多様性が、NOS含有神経細胞の機能的多様性を反映させているかどうかは、現在のところ不明であるが、ラットにおいて後角表層部における神経細胞の大きさや形態の違いは、生理学的な違いと一致するという研究報告¹²⁾からニワトリにおいてもその可能性が類推される。

2. NOSとGABA、SP受容体との共存性について

これまでに、ラット脊髄後角内のコリン作動性神経細胞のほぼすべて、GABA作動性神経細胞の一部が、NOSを同時に発現し¹⁷⁾、神経線維終末の中でもGABAとNOSが共存することが確認されている¹⁾。したがって、ラットのNOを産生する脊髄後角神経細胞は、アセチルコリンやGABAも産生・放出する能力を持っていると考えられる。同様にニワトリのNOS含有神経細胞も、GABA作動性神経細胞の一部と重なったことから、少なくとも一部はGABAを化学伝達物質として合成・放出しているものと思われる。

観察されたニワトリ脊髄後角のNOS神経細胞は、これまで著者らが報告した、SP受容体含有神経細胞と形態的特徴が似ていたため、NOSとSP受容体の二重染色を行ったところ、それぞれは、異なる神経細胞に現れた。ラットでも、NOSとSP受容体を発現する神経細胞は、別の集団を形成すること²⁰⁾が報告されており、それを確認することができた。一方、SPと同属の化学伝達物質neurokinin Bに最も親和性の高い受容体であるNK3受容体はNOS含有神経細胞の一部(37%)に発現していることから⁶⁾、SPがNK3受容体を介し、NOS含有神経細胞に作用している可能性も考えられる。

3. NOS含有神経細胞とSP含有軸索終末との関係

ニワトリ脊髄で、コンフォーカル顕微鏡と、電子顕微鏡を用いて、NOS神経細胞とSP含有軸索終末が直接、接触しているところが観察された。これまでラットで、NOS含有神経細胞にSP含有軸索終末が接触しているというReuss and Reussの報告(2001)があるほか、やはりラットで、第一次感覚神経細胞の軸索終末とNOS含有神経細胞の樹状突起が接触するところが報告されている¹⁾。また、NOが、侵害刺激の伝達に関わる、ないし、伝達を抑制するという研究報告は、数多くあり^{3, 4, 7, 13, 18, 19, 25)}、神経因性疼痛や炎症性疼痛時

にはNOの産生が増加する、逆にNOの産生をNOS阻害剤等で抑制することにより、疼痛自体が緩和されると考えられる。

結 論

ニワトリの脊髄後角表層部に、SPを含む神経終末と重なるようにNOS含有神経細胞の分布が認められた。NOS含有神経細胞は、大きさや樹状突起の方向、SP含有軸索終末との接触の様子から、多様性があることが想像された。一方、これまでの研究報告との類似性から、ニワトリにおいても、NOS含有神経細胞の一部は、侵害刺激の伝達に、深く関わっていると考えられた。

参考文献

- 1) Bernardi PS, Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Schmidt HH, and Rustioni A (1995) 'Synaptic interactions between primary afferent terminals and GABA and nitric oxide-synthesizing neurons in superficial laminae of the rat spinal cord' *J Neurosci.* 15:1363-1371
- 2) Brinkman R, and Martin AH (1973) 'A cytoarchitectonic study of the spinal cord of the domestic fowl *Gallus gallus domesticus*. I. Brachial region' *Brain Res.* 29(56):43-62
- 3) Chapman V, Buritova J, Honoré P, and Besson JM (1995) '7-Nitro-indazole, a selective inhibitor of neuronal nitric oxide synthase, reduces formalin evoked c-Fos expression in dorsal horn neurons of the rat spinal cord' *Brain Res.* 697:258-261
- 4) Cizková D, Lukáčová N, Marsala M, and Marsala J (2002) 'Neuropathic pain is associated with alterations of nitric oxide synthase immunoreactivity and catalytic activity in dorsal root ganglia and spinal dorsal horn' *Brain Res Bull.* 58:161-171
- 5) Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, and Snyder SH (1991) 'Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues' *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(17):7797-7801
- 6) Ding YQ, Lu CR, Wang H, Su CJ, Chen LW, Zhang YQ, and Ju G (2002) 'Two major distinct subpopulations of neurokinin-3 receptor-expressing neurons in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord' *Eur J Neurosci.* 16:551-556
- 7) Dolan S, Kelly JG, Huan M, and Nolan AM (2003) 'Transient up-regulation of spinal cyclooxygenase-2 and neuronal nitric oxide synthase following surgical inflammation' *Anesthesiology* 98:170-180
- 8) Doone GV, Pelissier N, Manchester T, and Vizzard MA (1999) 'Distribution of NADPH-d and nNOS-IR in the thoracolumbar and sacrococcygeal spinal cord of the guinea pig' *J Auton Nerv Syst.* 77:98-113
- 9) Dun NJ, Dun SL, Forstermann U, and Tseng LF (1992) 'Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat spinal cord' *Neurosci Lett.* 147:217-220
- 10) Dun NJ, Dun SL, Wu SY, Forstermann U, Schmidt HH, and Tseng LF (1993) 'Nitric oxide synthase immunoreactivity in the rat, mouse, cat and squirrel monkey spinal cord' *Neuroscience* 54(4):845-857
- 11) Gobell S (1976) 'Dendroaxonic synapses in the substantia gelatinosa glomeruli of the spinal trigeminal nucleus of the cat' *J Comp Neurol.* 167(2):165-176
- 12) Hantman AW, van den Pol AN, and Perl ER (2004) 'Morphological and physiological features of a set of spinal substantia gelatinosa neurons defined by green fluorescent protein expression' *J Neurosci.* 24(4):836-842
- 13) Honoré P, Chapman V, Buritova J, and Besson JM (1995) 'Reduction of carrageenin oedema and the

- associated c-Fos expression in the rat lumbar spinal cord by nitric oxide synthase inhibitor' *Br J Pharmacol.* 4:77-84
- 14) Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, and Vincent SR (1991) 'Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase' *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(7):2811-2214
 - 15) Kluchová D, Rybářová S, Miklosová M, Lovásová K, Schmidtová K, and Dorko F (2001) 'Comparative analysis of NADPH-diaphorase positive neurons in the rat, rabbit and pheasant thoracic spinal cord. A histochemical study' *Eur J Histochem.* 45:239-248
 - 16) Kluchová D, Klimčík R, and Kloc P (2002) 'Neuronal nitric oxide synthase in the rabbit spinal cord visualised by histochemical NADPH-diaphorase and immunohistochemical NOS methods' *Gen Physiol Biophys.* 21:163-174
 - 17) Laing I, Todd AJ, Heizmann CW, and Schmidt HH (1994) 'Subpopulations of GABAergic neurons in laminae I-III of rat spinal dorsal horn defined by coexistence with classical transmitters, peptides, nitric oxide synthase or parvalbumin' *Neuroscience* 61:123-132
 - 18) Leong S, Liu H, and Yeo J (2000) 'Nitric oxide synthase and glutamate receptor immunoreactivity in the rat spinal trigeminal neurons expressing Fos protein after formalin injection' *Brain Res.* 855:107-115
 - 19) Mao J, Price DD, Zhu J, Lu J, and Mayer DJ (1997) 'The inhibition of nitric oxide-activated poly(ADP-ribose) synthetase attenuates transsynaptic alteration of spinal cord dorsal horn neurons and neuropathic pain in the rat' *Pain* 72:355-366
 - 20) Nazli M, and Morris R (2000) 'Comparison of localization of the neurokinin 1 receptor and nitric oxide synthase with calbindin D labelling in the rat spinal cord' *Anat Histol Embryol.* 29(3):141-143
 - 21) Reuss MH, and Reuss S (2001) 'Nitric oxide synthase neurons in the rodent spinal cord: distribution, relation to Substance P fibers, and effects of dorsal rhizotomy' *J Chem Neuroanat.* 21:181-189
 - 22) Sakamoto H, and Atsumi S (1989) 'Substance P-immunoreactive elements in laminae I and II of the chicken spinal cord: a light- and electron-microscopic study' *Neurosci Res.* 7(2):103-116
 - 23) Schmidt HH, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, and Murad F (1992) 'Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction' *J Histochem Cytochem.* 40(10):1439-1456
 - 24) Schmid HA, and Pehl U (1996) 'Regional specific effects of nitric oxide donors and cGRP on the electrical activity of neurons in the rat spinal cord' *J Chem Neuroanat.* 10: 197-201
 - 25) Traub RJ, Solodkin A, and Gebhart GF (1994) 'NADPH-diaphorase histochemistry provides evidence for a bilateral, somatotopically inappropriate response to unilateral hindpaw inflammation in the rat' *Brain Res.* 647:113-123
 - 26) Valtschanoff JG, Weinberg RJ, and Rustioni A (1992) 'NADPH diaphorase in the spinal cord of rats' *J Comp Neurol.* 321:209-222
 - 27) Vizzard MA, Erdman SL, Erickson VL, Stewart RJ, Roppolo JR, and De Groat WC (1994) 'Localization of NADPH diaphorase in the lumbosacral spinal cord and dorsal root ganglia of the cat' *J Comp Neurol.* 339:62-75

