

氏名	リベラ マリア ロサリオ パシス RIVERA, MARIA ROSARIO PACIS
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第472号
学位授与年月日	平成16年 3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	モルモットの表皮下神経線維に対するヒスタミン軟膏の経時的効果とその形態学的変化 ー共焦点レーザー顕微鏡および電子顕微鏡的研究ー
学位論文審査委員	(主査) 三原 基之 (副査) 井上 貴央 大浜 栄作

学位論文の内容の要旨

ヒスタミンは疼痛や痒痒の感覚受容器である感覚神経の自由神経終末の強力な刺激剤である。ヒスタミンを直接皮内投与すると特徴的な三重反応と痒痒が生じる。この三重反応は、ヒスタミンによる直接的血管拡張作用とそれに引き続いて感覚神経の自由神経終末から放出される神経ペプチドであるサブスタンスP (SP) によって真皮肥満細胞が刺激され、肥満細胞の脱顆粒に由来するヒスタミンでも生じるといわれている。一方、SP やカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) などの神経ペプチドは神経原性炎症を引き起こす。このような感覚神経が関与する生体反応の際の神経線維の形態学的研究は未だ行われていない。そこで著者はヒスタミン投与時の表皮下神経線維の様態を形態学的に究明することを試みた。

材料と方法

I 予備実験

0.1%、0.5%、1%、5%、10%、20%の各濃度のヒスタミン親水軟膏を作り、5名の成人ボランティアの前腕屈側に単純塗布した。生じた紅斑と痒痒の程度から本実験では10%軟膏を使用することにした。対照の親水軟膏 (基剤) 単独塗布では症状は生じなかった。

II 本実験

総数17匹のハートレイ系モルモット (雄、体重約 700-900g) の背部を剃毛し、10%ヒスタミン軟膏を単純塗布した。対照としてヒスタミン軟膏塗布部位より約 2 cm 離れた部位に基剤のみを塗布した。塗布後、5、10、20、30分、1、2、4、6、12、24時間目に皮膚生検を行なった。生検皮膚のうち蛍光抗体法および共焦点レーザー顕微鏡法の試料はまずザンボン液で固定し、凍結切片として皮表に対して並行あるいは垂直に切断した。切片はポリクローナル・ウサギ抗ヒト蛋白遺伝子産物 9.5 (PGP 9.5) で免疫染色後、ローダミン・イソチオシアネート標識ブタ抗ウサギ免疫グロブリンで蛍光染色した。次いで切片は二重染色のため、モノクローナル・ラット抗 SP 抗体あるいはモノクローナル・マウス抗 CGRP 抗体で免疫染色後、フルオレセイン・イソチオシアネート標識ウサギ抗ラットあ

るいは抗マウス免疫グロブリンで蛍光染色した。二重蛍光染色された試料は蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡で観察した。透過型電子顕微鏡法の試料は 2.5% グルタルアルデヒド液で固定後、1%オスミウム酸液で後固定した。その後、エポン 812 に包埋し、超薄切片は酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。

結 果

肉眼的所見：ヒスタミン軟膏塗布後 5 分で著明な紅斑が現れ、その後浮腫も生じたが、4-6 時間で完全消退した。

蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡所見：対照部位では PGP 9.5 陽性線維は表皮下で網状構造を作り、SP および CGRP はその線維上に点状あるいは顆粒状物質として認められた。ヒスタミン軟膏塗布 5 分後、SP および CGRP 陽性物質はもとより PGP 9.5 陽性線維までも著明に減少し、しかもその線維は断裂し、走行を追うのが困難であった。30 分後では PGP 9.5, SP, CGRP のすべての陽性反応物質は完全に消失した。2 時間後、PGP 9.5 陽性線維が真皮・表皮境界部に太い紐状構造として認められた。SPはみられなかったが、CGRPは真皮・表皮境界部に小さい点状物質としてみられた。4 時間後、PGP 9.5 陽性線維の網状構造が確認されたが、その線維はまだ不連続であった。6 時間以後は PGP 9.5、SP、CGRP とも対照と同じで完全回復とみなされた。

透過型電子顕微鏡所見：ヒスタミン軟膏塗布 5 分後、表皮下神経線維の軸索と軸索内のミトコンドリアに著明な浮腫、軸索内に多量のグリコーゲン顆粒がみられた。30分後、軸索全体が高電子密度物質あるいは細胞破壊物質で充たされた。1-2 時間後、軸索は軽度～中等度の浮腫のみがみられるまでに回復し、12時間以後では軸索は対照と異なる所見はなかった。シュワン細胞の胞体・突起は電子密度を増していたが、神経周膜細胞に異常は認められなかった。

考 察

モルモットの皮膚に10%ヒスタミン軟膏を単純塗布すると、5 分後に PGP 9.5 陽性線維、SPおよび CGRP 陽性物質は著明に減少し、軸索および軸索内のミトコンドリアの著明な浮腫、軸索内のグリコーゲンの著明な沈着がみられた。30分では PGP 9.5、SP、CGRP とも陽性反応物質は完全に消失し、軸索の破壊像がみられた。これらの器質的変化は 2 時間後から回復基調に入り、6 時間後では完全回復を示した。

結 語

モルモットの皮膚に経皮投与されたヒスタミンは表皮下感覚神経の軸索に一過性の器質的変化をもたらすが、ヒスタミン投与後 6 時間で完全回復し、この変化は短時間の可逆的なものである。

論文審査の結果の要旨

本研究はモルモットの皮膚を用いて、ヒスタミン軟膏を外用したとき表皮下神経線維がどのように変化するか、経時的に免疫組織化学的並びに電子顕微鏡学的に検討したものである。ヒスタミン軟膏外用5分後で神経線維、特に軸索のみに著明な変化が認められ、30分後では軸索の変性、壊死が確認された。この軸索は2時間後から回復像がみられ、6時間後では完全回復を示した。ヒスタミンは表皮下神経線維の軸索に明らかに器質的变化をもたらすが、その変化の回復は急速であった。本論文の内容は皮膚神経学及び皮膚感覚生理学の分野で初めて得られた知見であり、明らかに学術の水準を高めたものと認められる。