HamaMed-Repository
浜松医科大学学術機関リポジトリ
浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

Immunocytochemical development of transferrin and ferritin immunoreactivity in the human pons and carebellum

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小沢, 浩 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1597

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第　３２０号	学位授与年月日	平成１２年　２月１８日
氏　　名	小　沢　　浩		
論文題目	Immunocytochemical development of transferrin and ferritin immunoreactivity in the human pons and cerebellum (ヒト橋・小脳におけるトランスフェリンおよびフェリチン陽性細胞の免疫組織化学的発達)		

博士(医学)　小　沢　　浩

論文題目

Immunocytochemical development of transferrin and ferritin immunoreactivity in the human pons and cerebellum.

(ヒト橋・小脳におけるトランスフェリンおよびフェリチン陽性細胞の免疫組織化学的発達)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

高度不飽和脂肪酸の脂質過酸化反応を鉄・酸素錯体が引き起こすことが示唆され、またアシドーシスの条件下でフェリチンやトランスフェリンからの鉄の遊離が促進されるという報告がなされるなど、新生児の脳虚血や低酸素血症による障害を考えるうえで鉄の動態解明が重要になってきた。しかし胎児・新生児脳における鉄代謝については充分な知見は得られていない。今回、我々はヒト脳(小脳・橋)のトランスフェリンとフェリチン陽性細胞の分布と発達を、抗トランスフェリンおよび抗フェリチン抗体を用い免疫組織化学的に検索し比較検討したので報告する。

〔材料ならびに方法〕

対象は神経病理学的に中枢神経系に特に異常を認めなかった、胎齢17週から年齢56歳までの剖検脳24例である。早産児は死亡時の修正週数とした。染色は以下の手順で行なった。10%ホルマリン固定後パラフィン包埋しておいた剖検脳を脱パラフィンして標本とした。脱パラフィンした切片は、まず組織中の内因性ペルオキシダーゼの活性を除去するために0.3%過酸化水素液にて処理し、10%ヤギ正常血清を作用させた後に一次抗体を反応させた。一次抗体として、トランスフェリンはウサギ抗トランスフェリン抗体(Dako社製)、フェリチンはウサギ抗ヒトフェリチン抗体(Dako社製)を用い、トランスフェリンは80倍、フェリチンは50倍に希釈後2時間インキュベートした。次に二次抗体としてビオチン標識抗ウサギIgGを用い1時間インキュベートし、続いてペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させ、3,3'-diaminobenzidine(DAB)にて発色させた。次に、ヘマトキシリンにて二重染色した後に封入した(ストレプトアビジン-ビオチン法)。小脳では顆粒細胞、プルキンエ細胞と白質のグリア細胞、橋では橋核と網様体の神経細胞とグリア細胞について、陽性細胞の出現を検討した。顕微鏡下で陽性細胞を-:陰性、±:陽性細胞が1/2以下、+:陽性細胞が1/2を超えるに分類し検討した。

〔結果〕

a) 小脳

トランスフェリンは、Purkinje細胞、外顆粒層および内顆粒層が胎齢18週に陽性になった。Purkinje細胞は成人例でも陽性であったが、顆粒層においては2歳以降再びトランスフェリン陰性となった。白質においてはオリゴデンドロサイトとアストロサイトが、胎齢24週以降トランスフェリン陽性になった。

フェリチンは胎齢24~25週に小脳白質で陽性となった。核が小さく円形で胞体が小さく、その形態からオリゴデンドロサイトと考えられた。神経細胞にはフェリチン陽性細胞は認められなかった。

b）橋

トランスフェリンは、橋核においては胎齢22週、網様体においては胎齢18週から陽性となった。グリアは網様体では胎齢18週から、橋底部においては胎齢24週から陽性になった。小脳と同様に形態よりオリゴデンドロサイトとアストロサイトと考えられた。

フェリチンは、橋底部においては胎齢24週、網様体においては胎齢20週から陽性になった。形態からオリゴデンドロサイトと考えられた。

〔結論〕

神経細胞については、小脳のPurkinje細胞、外および内顆粒層、橋の橋核、網様体においてトランスフェリンが陽性であり、フェリチンは神経細胞では染色されなかった。鉄はドーパミン、セロトニン、γ－aminobutyric acidの合成・機能に関係することが知られており、神経細胞に関係している鉄はトランスフェリンが関与している可能性があると思われた。発達については、小脳Purkinje細胞、顆粒層、橋網様体では、胎齢18週から、橋核では胎齢22週からトランスフェリン陽性となり、胎児期早期から神経細胞の成熟に関与していると考えられた。

グリアにおいては、トランスフェリン陽性細胞は形態からアストロサイト、オリゴデンドロサイトであった。フェリチン陽性細胞は形態からオリゴデンドロサイトと考えられた。トランスフェリン陽性細胞は、橋網様体は胎齢18週から、小脳白質では胎齢24週から陽性となった。フェリチン陽性細胞は橋網様体では胎齢20週から、小脳白質、橋底部では胎齢24週から陽性となった。グリアにおけるトランスフェリンの出現時期、その順序は、フェリチン陽性グリアと類似していた。

髄鞘化は内側縦束は胎齢20週、下小脳脚は胎齢24週、上小脳脚は胎齢26週から、小脳では胎齢27週に認められる。また髄鞘欠損ラットではトランスフェリン陽性細胞が認められないと報告されている。オリゴデンドロサイトがトランスフェリン・フェリチン陽性であること、トランスフェリン・フェリチン陽性細胞の出現が橋の網様体、小脳白質の順であり、出現時期も髄鞘化に近いことからトランスフェリン・フェリチン陽性細胞が髄鞘化に関係していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

脳においても鉄代謝は脳の形成、神経機能の維持、病変の修復などにおいて重要な役割を果たしていることが知られている。トランスフェリンはチトクローム酸化系、脂質酸化などの酵素反応に、フェリチンは鉄の細胞内貯蔵、解毒などに重要であるが、脳において髄鞘形成と関連していることが最近明らかになってきた。しかし、正常の胎児や新生児脳における鉄代謝の動態は充分に明らかにされていない。申請者は免疫組織化学染色によって人の脳における、トランスフェリンとフェリチン陽性細胞の分布、脳の発達との関連を、特に小脳と橋において比較検討した。

対象として病理学的に中枢神経系に異常を認めなかった、胎齢17週から年令56歳までの24剖検例のホルマリン固定された脳を用いた。解析は免疫組織化学染色によってトランスフェリンおよびフェリチンを染色し、小脳および脳幹部の橋について陽性細胞を定性的および定量的に解析した。

小脳においてトランスフェリンはPurkinje細胞、外顆粒層および内顆粒層において胎齢18週から陽性細胞を認め、顆粒層においては２歳以降陰性となった。小脳白質においてはオリゴデンドロサイトとアストロサイトが胎齢24週以降に陽性細胞が出現した。フェリチンは胎齢24－25週から小脳白質に陽性細胞

が出現し、その細胞は形態的にオリゴデンドロサイトとみなされた。神経細胞ではフェリチン陽性細胞は認めなかった。橋においては、トランスフェリンは神経細胞では胎齢18週に網様体に、胎齢22週に橋核に陽性細胞が出現した。グリア細胞では網様体で胎齢18週から橋核では胎齢24週から陽性を示した。フェリチンは網様体において胎齢20週から橋底部において胎齢24週から陽性細胞が出現し、発現している細胞は形態的にオリゴデンドロサイトとみなされた。さらに、申請者は副論文、参考論文において、フェリチン陽性細胞が小脳、橋で胎齢20週から25週に出現し、胎齢33週から36週でその発現細胞は急速に増加することを示し、その時期が発育期脳において髄鞘化が急速に起こる時期と一致していることを示した。

以上の結果より、トランスフェリンは神経細胞においては、胎齢18週から小脳のPurkinje細胞、顆粒層細胞、橋網様体で発現し、胎齢22週から橋の橋核で発現しはじめドーパミン、セロトニンなどの合成、神経機能に関わる可能性が示された。フェリチンは橋網様体では胎齢20週から、小脳白質、橋核では胎齢24週からオリゴデンドロサイトで発現し、髄鞘化の部位と順序がほぼ一致しており、その発現は髄鞘形成が急速に起る時期に先行して発現し、髄鞘形成に関与している可能性が示された。

論文審査委員会では、本研究がトランスフェリン、フェリチンの発現とその分布をヒトの脳でとくに胎生期に発育を追って調べられた最初の仕事であること、フェリチンがオリゴデンドロサイトで髄鞘形成に先行して発現し、髄鞘形成に一致してその発現が増加することを示したことは、興味ある結果であり脳の発育を考察する上で有意義な仕事として評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

1）脳におけるフェリチン、トランスフェリンは脳での発現を見ているのか、肝臓から来たものの結合を見ているのか
2）フェリチンがオリゴデンドロサイトでいかに髄鞘形成に関わっているか
3）トランスフェリンは神経細胞で何をしているのか
4）トランスフェリン欠損マウスとミエリン欠損マウスは同じ徴候を表すか
5）胎生期脳では鉄は染まりにくいのか、トランスフェリンがあれば鉄があるとしてよいか
6）肝、血中でのフェリチン、トランスフェリンの変化はどうなっているか
7）脳のフェリチンの発現；H－鎖とL－鎖の発現に脳では差があるのか
8）脳・血液関門は発育期脳でいつ頃形成され、それがフェリチン、トランスフェリンの脳内移入とどのように関連するか
9）フェリチンの大脳、脳底核、脊髄などでの発現についてはどうか
10）フェリチン、トランスフェリンの部位による発現の差はなぜ生ずると考えられるか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふわさしいと審査委員会全員一致で評価した。

論文審査担当者　主査　筒井祥博
副査　難波宏樹　副査　宮嶋裕明