

Fig. 4. Changes in DMPO-OH spectrum by the addition of 10,000 U/mL CAT and/or 1000 U/mL SOD (A). ESR measurement was examined at 10 min after incubation of 0.1 mM catechol with 0.1 mM NOC-7 and/or each enzymes. Changes in signal intensity by the reaction (B). The ordinate indicates the signal height of DMPO-OH relative to the MnO<sub>2</sub> internal marker signal.

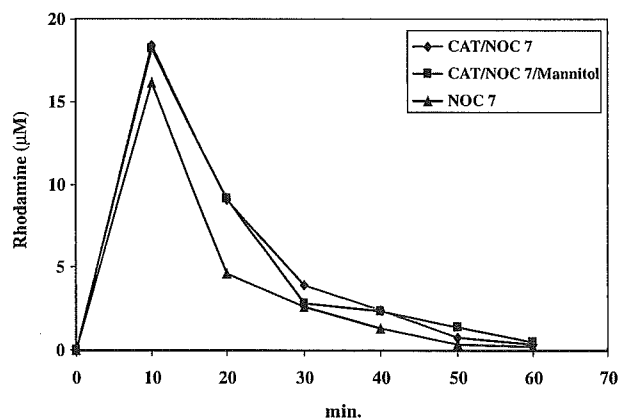


Fig. 5. Time-dependent changes of RD production in the solution of DHRD with NOC-7 (0.1 mM) alone, NOC-7/catechol (0.1 mM) and NOC-7/catechol/Mannitol (10 mM) were measured at 10-min intervals for up to 60 min.

former were higher than those in the latter until the end of the reaction. Furthermore, addition of mannitol had no effects on the amount of RD products generated in the DHRD/NOC-7/catechol mixture.

### *In vivo* animal experiment and measurement of nuclear 8-OHdG

Table 1 summarizes data for histopathological lesions in the forestomachs of rats given 0.2% NaNO<sub>2</sub> in the drinking water and 0.8% catechol in the diet for up to 2 weeks. In the combined group, mild cell infiltration in the submucosa was observed from 24 h of treatment, the lesion being exacerbated with edema at 1 week after the start of the experiment and replaced by fibrous components at the end of the experiment (Fig. 6A). Epithelial hyperplasia occurred from 24 h, and erosion and/or ulceration with severe inflammatory cell infiltration were found at 1 and 2 weeks (Fig. 6B). In contrast, there were no remarkable changes in the single agent groups (Figs. 6C and D). The data for 8-oxodG levels in forestomach epithelium of rats given combined treatment with 0.2% NaNO<sub>2</sub> and 0.8% catechol 12 h and 2 weeks after treatment are summarized in Fig. 7. Values for the combined treatment group were significantly elevated at all time points examined as compared to the controls. Immunohistochemically, in contrast to the negative results in non-treated rats (Fig. 8A), nitrotyrosine-positive forestomach epithelial cells of rats treated with NaNO<sub>2</sub> and catechol appeared from 12 h (Fig. 8B), the intensity increasing time-dependently (Fig. 8C). A very few iNOS-positive cells were found only in the infiltration cells at the submucosa beneath ulceration (Fig. 9).

### Discussion

It has been reported that compounds with a catechol structure have strong scavenging activity against NO [35] and catechol-estrogen is effectively oxidized by NO to its quinone form [25,26], so that the scavenging potential might imply generation of radicals. In the *in vitro* system applied here, to avoid direct reactions of NaNO<sub>2</sub> with catechol such as nitration, we used NOC-7 as a NO donor. Our UV-vis absorption spectroscopy data demonstrating that absorption near at 350 nm was increased concomitantly with decrease of catechol suggest formation of its relevant quinone [33]. In addition, the present ESR analysis made it clear that incubation of catechol with NO gave rise to ·OH. We also demonstrated a possible formation of semiquinone radical by means of detection of a specific ESR spectrum. It is well known that semiquinone radicals react with oxygen to produce O<sub>2</sub><sup>·-</sup>. Accordingly, we have hypothesized two possible pathways leading to formation of ·OH, one through decomposition of O<sub>2</sub><sup>·-</sup> and the other by generation of ONOO<sup>-</sup>, attributable to further reaction of O<sub>2</sub><sup>·-</sup> with excess NO. With a view to investigating which is predominant, we examined the effects of SOD and/or CAT on generation of ·OH in the reaction of NO with catechol. Both decomposition of O<sub>2</sub><sup>·-</sup> and the reaction of O<sub>2</sub><sup>·-</sup> with SOD result in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. Therefore, the facts that signal intensities of DMPO-OH were increased by SOD, not changed by CAT and completely inhibited by the two strongly suggest production of ONOO<sup>-</sup> in the reaction.

Table 1

Histopathological findings of the rat forestomach given 0.2% NaNO<sub>2</sub> in the drinking water, 0.8% catechol in the diet, or 0.2% NaNO<sub>2</sub> in the drinking water and 0.8% catechol in the diet for 12, 24 h, 1, 2 weeks

Group	Cont.	0.2% NaNO <sub>2</sub>				0.8% Catechol				0.8% Catechol + 0.2% NaNO <sub>2</sub>			
		12 h	24 h	1 week	2 week	12 h	24 h	1 week	2 week	12 h	24 h	1 week	2 week
<i>Epithelium</i>													
Hyperplasia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	++	++
Erosion/ulcer with inflammatory cell infiltration	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
<i>Submucosa</i>													
Edema	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	++	±
Cell infiltration	-	-	±	-	-	-	±	±	-	-	+	++	±
Fibrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++

-, no observed; ±, mild; +, moderate; ++, severe.

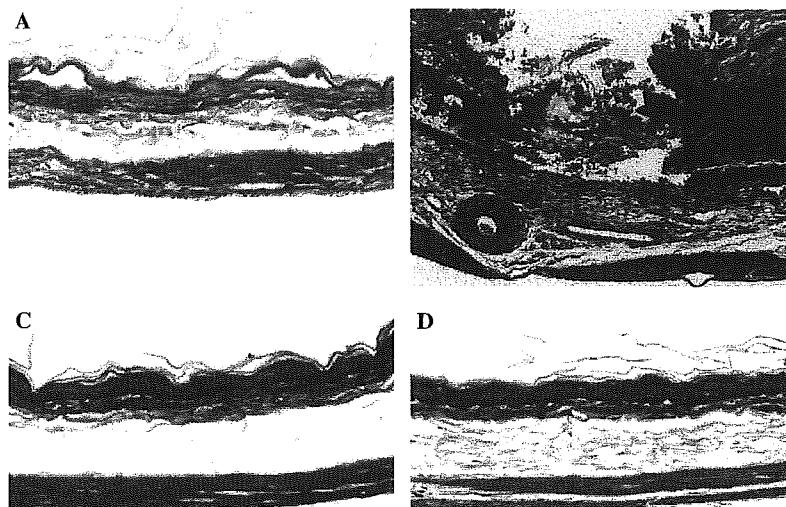


Fig. 6. Forestomachs of male rats co-treated with 0.2% NaNO<sub>2</sub> in the drinking water and 0.8% catechol in the diet for 12 h (A) or 2 weeks (B). Although there are no obvious alterations at 12 h, erosion surrounded by severe inflammatory cell infiltration is apparent together with epithelial hyperplasia after 2 weeks. H&E staining at 180× original magnification. (C) Forestomach of a male rat treated with 0.2% NaNO<sub>2</sub> in the drinking water for 2 weeks. (D) Forestomach of a male rat treated with 0.8% catechol in the diet for 2 weeks. There are no remarkable changes. H&E staining at 180× original magnification.

Then, we confirmed ONOO<sup>-</sup> production to make use of the nature that DHRD is specifically converted to RD by ONOO<sup>-</sup> [24]. In agreement with the fact that NO itself has also the ability to oxidize DHRD [29], the production of RD occurred in the incubation of DHRD with NOC-7 alone, disappearing at 60 min after the start of the incubation, which is due to NOC-7 possessing a short half life as a NO donor [36]. In the incubation of DHRD with NOC-7 and catechol, RD was produced in response to occurrence of NO, the increments from the base levels of RD resulting from the reaction of DHRD with NO being observed throughout the reaction. Additionally, the increase was not influenced by addition of a ·OH scavenger, mannitol in spite of ·OH having the ability to form RD from DHRD [25]. Therefore, the present data imply a possibility of ONOO<sup>-</sup> existing in course of ·OH formation due to the reaction of NO with catechol. The overall in vitro data allow us to propose a possible pathway that catechol reacts with NO originating from NaNO<sub>2</sub> under acid conditions,

consequently producing O<sub>2</sub>·<sup>-</sup> and finally generating ·OH by way of ONOO<sup>-</sup> due to O<sub>2</sub>·<sup>-</sup> reactions with NO (Fig. 10).

Co-administration of catechol in the diet and NaNO<sub>2</sub> in the drinking water to rats after fasting for 24 h here caused increase in 8-OHdG levels in DNA of the forestomach epithelium at 12 h after the treatment, the levels being dramatically elevated at the end of the experiment. While the initial increase was not accompanied by overt toxicity in the forestomach, histopathological lesions such as epithelial hyperplasia and submucosal edema with cell infiltration subsequently occurred, and finally erosion and/or ulceration with severe epithelial hyperplasia were found after 1 week of treatment. Since neither of the chemical alone caused such damages throughout the experimental period, it is highly probable that oxidative stress resulting from the reaction of catechol with NaNO<sub>2</sub> attacked nuclear DNA of epithelium followed by causing mucosal damage in the forestomach. In addition, immunohistochemical analysis showing nitrotyrosine formation strongly suggests generation of NO in the

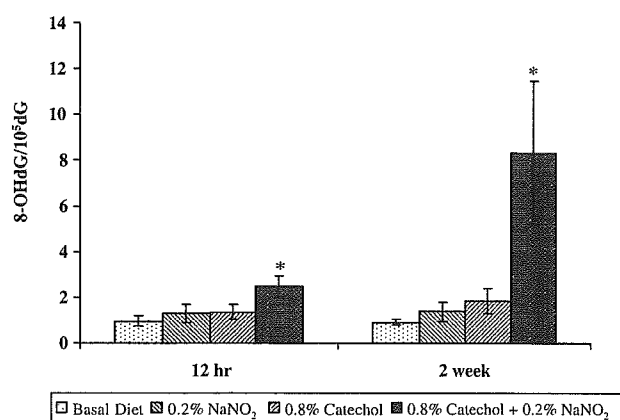


Fig. 7. Changes in 8-OHdG levels in forestomach epithelium of rats given 0.2% NaNO<sub>2</sub> in the drinking water, 0.8% catechol in the diet, or 0.2% NaNO<sub>2</sub> in the drinking water and 0.8% catechol in the diet for 12 h or 2 weeks. Values are means  $\pm$  SD of data for five samples collected from a total of 15 rats. \* Significantly different ( $P < 0.01$ ) from the control group.

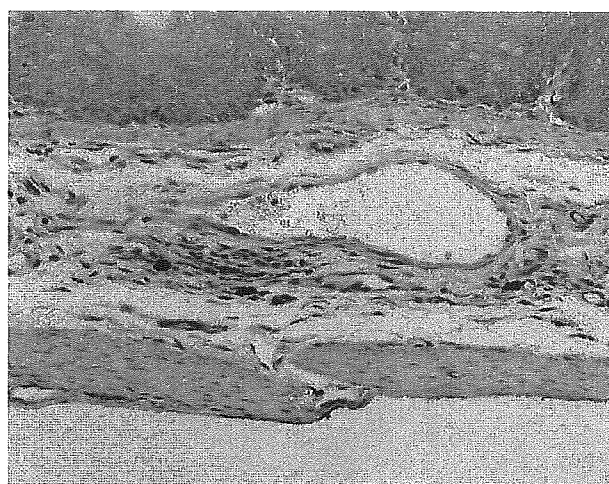


Fig. 9. Forestomach of a male rat co-treated with 0.2% NaNO<sub>2</sub> in the drinking water and 0.8% catechol in the diet for 2 weeks. A few iNOS-positive cells were found in the infiltration cells at submucosa.

reaction. Histological findings revealing severe infiltration of inflammatory cells around erosion and/or ulceration at 2 weeks after the start of the experiment might indicate contribution of endogenous NO generation via iNOS expression to remarkable elevation of 8-oxodG levels at that time [37]. The present immunohistochemical data demonstrated the existence of cells expressing iNOS, but contribution of endogenous NO to the pathogenesis still remains uncertain because of the number of the positive cells being very small. Our in vitro data suggest a possibility that not only hydroxyl radicals as a final product, but also ONOO<sup>-</sup> as an intermediate, participate in DNA base oxidation [38]. Additionally, it is

well known that ONOO<sup>-</sup> exhibits tissue damaging effects due to lipid peroxidation [39–41], protein modification including oxidation [42–44] and nitration [43,45], or mitochondrial dysfunction [46,47]. Interestingly, a recent report provided evidence that depletion of ATP resulting from activation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 after ONOO<sup>-</sup> induced DNA breakage compelled cell death, which could bridge the gap between oxidative stress and consequent cell necrosis [3,48]. Although, we did not confirm whether DNA strand breaks occurred concurrently with 8-OHdG formation under the present experimental conditions, this possibil-

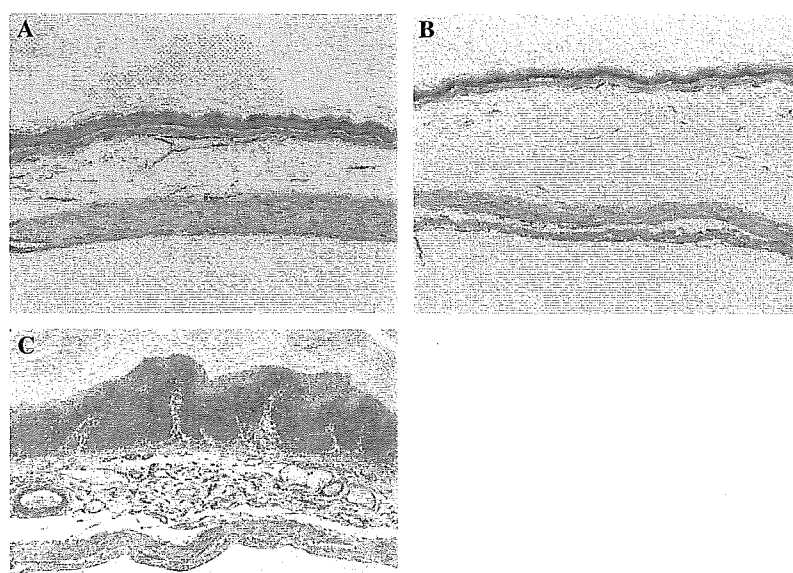


Fig. 8. Forestomachs of male rats no-treated (A) and co-treated with 0.2% NaNO<sub>2</sub> in the drinking water and 0.8% catechol in the diet for 12 h (B) and 2 weeks (C). Nitrotyrosine-positive cells were observed all over the epithelium at 12 h after the treatment and the increase of intensity was found at 2 weeks. Immunohistostaining for nitrotyrosine at 180 $\times$  original magnification.

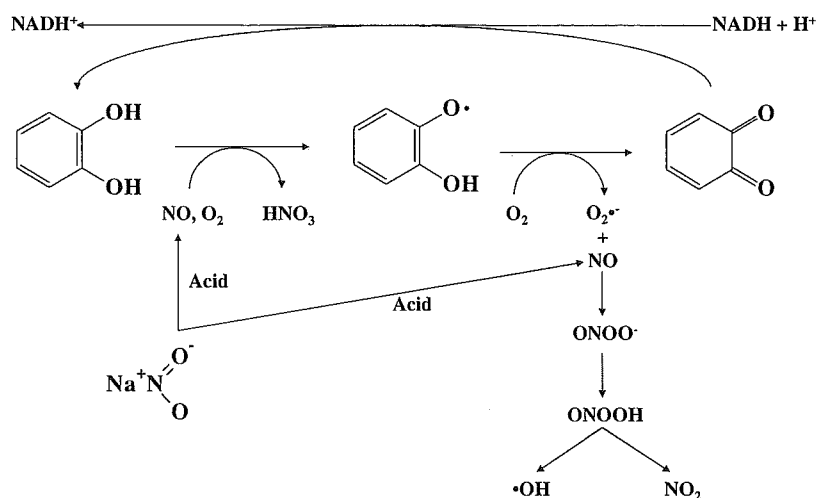


Fig. 10. Proposed pathways for the reaction of catechol with NaNO<sub>2</sub>, generating ·OH by way of ONOO<sup>·</sup>.

ity might give a clue for explanation of the existence of a time lag between oxidative DNA damage and epithelial cell death.

Despite the fact that catechol and NaNO<sub>2</sub> are both mutagenic in some in vitro systems [3,49], their individual carcinogenic potencies in the rat forestomach are equivocal [3–7,49], in contrast to the statistically significant incidence in combination [9,11]. Likewise, we have shown increases of cell proliferation in the forestomach epithelium following combined treatment, which was presumably a compensatory response to tissue damage judging from the present histological examination. Therefore, the co-administration may result in the conditions that epithelial cells in the forestomach harboring a large amount of 8-OHdG adduct are exposed to sustained mitogenic stimulation. Administration of catechol alone is able to induce tumors in the glandular stomach of rats, but combined exposure to NaNO<sub>2</sub> failed to exert any additional effects in this organ [9,11] and we did not find any histological alterations in the glandular stomach in the present study (data not shown). Taking into consideration our previous demonstration of no elevation of 8-OHdG levels in the glandular stomach, in contrast to the forestomach, in rats co-treated with ascorbic acid and NaNO<sub>2</sub> [21], catechol-induced glandular stomach carcinogenesis would appear to be involved in different mechanisms. In conclusion, the present study showed that NO derived from NaNO<sub>2</sub> under acidic conditions oxidizes catechol to its quinone, which gives rise to ONOO<sup>·</sup> and ·OH. These reactive species probably participate in induction of forestomach damage and cell proliferation, and thus be responsible for the forestomach carcinogenesis observed in rats given catechol and NaNO<sub>2</sub>.

#### Acknowledgments

We thank Ms. Machiko Maeda for handling the animal experiments, and Ms. Ayano Ogose and Ayako Kaneko for preparing histological slides. This work was supported by a

Grant-in-Aid from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

#### References

- [1] K. Inai, Y. Aoki, S. Tokuoka, *Gann* 70 (1979) 203–208.
- [2] G. Eisenbrand, B. Spiegelhalder, R. Preussmann, *Oncology* 37 (1980) 227–231.
- [3] IARC Working Group. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 71 (1999) 433–451.
- [4] M. Hirose, S. Fukushima, Y. Kurata, H. Tsuda, M. Tatematsu, N. Ito, *Cancer Res.* 48 (1988) 5310–5315.
- [5] M. Hirose, S. Fukushima, H. Tanaka, E. Asakawa, S. Takahashi, N. Ito, *Carcinogenesis* 14 (1993) 525–529.
- [6] A. Hagiwara, Y. Takesada, H. Tanaka, S. Tamano, M. Hirose, T. Shirai, *Toxicol. Pathol.* 29 (2001) 180–186.
- [7] T. Tanaka, M. Hirose, A. Hagiwara, K. Imaida, T. Shirai, N. Ito, *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 93–98.
- [8] Y. Yoshida, M. Hirose, K. Takaba, J. Kimura, N. Ito, *Int. J. Cancer* 56 (1994) 124–128.
- [9] M. Hirose, H. Tanaka, S. Takahashi, M. Futakuchi, S. Fukushima, N. Ito, *Cancer Res.* 53 (1993) 32–37, p. 346.
- [10] M. Kawabe, K. Takaba, Y. Yoshida, M. Hirose, *Jpn. J. Cancer Res.* 85 (1994) 17–25.
- [11] M. Hirose, S. Fukushima, R. Hasegawa, T. Kato, H. Tanaka, N. Ito, *Jpn. J. Cancer Res.* 81 (1990) 857–861.
- [12] S.S. Mirvish, *Cancer Res.* 54 (1994) 1948–1951.
- [13] G.M. McKnight, L.M. Smith, R.S. Drummond, C.W. Duncan, M. Golden, N. Benjamine, *Gut* 40 (1997) 211–214.
- [14] J.O. Lundberg, E. Weitzberg, J.M. Lundberg, K. Alving, *Gut* 35 (1994) 1543–1546.
- [15] K. Iijima, J. Grant, K. McElroy, V. Fyfe, T. Preston, K.E. McColl, *Carcinogenesis* 24 (2003) 1951–1960.
- [16] R. Radi, J.S. Beckman, K.M. Bush, B.A. Freeman, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 4244–4250.
- [17] J.S. Beckman, W.H. Koppenol, *Am. J. Physiol.* 271 (1996) C1424–C1437.
- [18] W.A. Pryor, G.L. Squadrito, *Am. J. Physiol.* 268 (1995) L699–L722.
- [19] C. Ducrocq, B. Blanchard, B. Pignatelli, H. Ohshima, *Cell. Mol. Life Sci.* 55 (1999) 1068–1077.
- [20] J-P. Jay-Gerin, C. Ferradini, *Biochimie* 82 (2000) 161–166.
- [21] K. Okazaki, Y. Ishii, Y. Kitamura, S. Maruyama, T. Umemura, M. Miyauchi, M. Yamaguchi, T. Imazawa, A. Nishikawa, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, M. Hirose, *Cancer Sci.* in press.

- [22] T.M. Cocks, J.A. Angus, Arch. Biochem. Biophys. 341 (1990) 364–372.
- [23] A. Samouilov, P. Kuppusamy, L. Zweier, Arch. Biochem. Biophys. 357 (1998) 1–7.
- [24] U. Amparo, M.L.-G. Pilar, M.G. Carmen, P. Jaime, M. Alicia, H. Guadalupe, C.E. Juan, O. Jpse-Enrique, M. Manuel, Free Radic. Biol. Med. 35 (2003) 1373–1381.
- [25] P. Benoit, M.C. Andre, K.-B. Suzanne, B. Sophie, L. Rosalie, J.-G. Jean-Paul, Chem. Res. Toxicol. 14 (2001) 547–554.
- [26] Y. Yoshie, H. Ohshima, Free Radic. Biol. Med. 24 (1998) 341–348.
- [27] E.L. Cavalieri, K.-M. Li, N. Balu, M. Saeed, P. Devanesan, S. Higginbotham, J. Zhao, M.L. Gross, E.G. Rogan, Carcinogenesis 24 (2002) 1071–1077.
- [28] H. Yoshioka, K. Sugiura, R. Kawahara, T. Fujita, M. Makino, M. Kamiya, S. Tsuyumu, Agric. Biol. Chem. 55 (1991) 2717–2723.
- [29] N.W. Kooy, J.R. Royall, H. Ischiropoulos, J.S. Beckman, Free Radic. Biol. Med. 16 (1994) 149–156.
- [30] D. Nakae, Y. Mizumoto, E. Kobayashi, O. Noguchi, Y. Konishi, Cancer Lett. 97 (1995) 233–239.
- [31] H. Kasai, Free Radic. Biol. Med. 33 (2002) 450–456.
- [32] H.J. Helbock, K.B. Beckman, M.K. Shigenaga, P.B. Walter, A.A. Woodall, H.C. Yeo, B.N. Ames, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 288–293.
- [33] K. Hirakawa, S. Oikawa, Y. Hiraku, I. Hirosawa, S. Kawanishi, Chem. Res. Toxicol. 15 (2002) 76–82.
- [34] F. Yamaguchi, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, T. Ariga, J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 2544–2548.
- [35] R. de la puerta, M.E. Martinez Dominguez, V. Ruiz-Gutierrez, J.A. Flavill, J.O. Hoult, Life Sci. 69 (2001) 1213–1222.
- [36] E. Otsuka, K. Hirano, S. Matsushita, A. Inoue, S. Hirose, A. Yamaguchi, H. Hagiwara, Eur. J. Pharmacol. 349 (1998) 345–350.
- [37] A.M. Knaapen, R.P. Schins, D. Polat, A. Becker, P.J. Borm, Mol. Cell. Biochem. 234–235 (2002) 143–151.
- [38] Y. Hattori, C. Nishigori, T. Tanaka, K. Uchida, O. Nikaido, T. Osawa, H. Hiai, S. Imamura, S. Toyokuni, J. Invest. Dermatol. 107 (1996) 733–737.
- [39] R. Radi, J.S. Beckman, K.M. Bush, B.A. Freeman, Arch. Biochem. Biophys. 288 (1991) 481–487.
- [40] V.M. Darley-Usmar, N. Hogg, V.J. O’Leary, M.T. Wilson, S. Moncada, Free Radic. Res. Commun. 17 (1992) 9–20.
- [41] H. Rubbo, R. Radi, M. Trujillo, R. Telleri, B. Kalyanaraman, S. Barnes, M. Kirk, B.A. Freeman, J. Biol. Chem. 269 (1994) 26066–26075.
- [42] A. Graham, N. Hogg, B. Kalyanaraman, V. O’Leary, V. Darley-Usmar, S. Moncada, FEBS Lett. 330 (1993) 181–185.
- [43] H. Ischiropoulos, A.B. al-Mehde, FEBS Lett. 364 (1995) 279–282.
- [44] Y. Kato, S. Kawakishi, T. Aoki, K. Itakura, T. Osawa, Biochem. Biophys. Res. Commun. 234 (1997) 82–84.
- [45] D. Francescutte, J. Baldwin, L. Lee, B. Mutus, Protein Eng. 9 (1996) 189–194.
- [46] J.P. Bolanos, S.J. Heales, J.M. Land, J.B. Clark, J. Neurochem. 64 (1995) 1965–1972.
- [47] T. Sakai, T. Ishizaki, T. Nakai, S. Miyabo, S. Matsukawa, M. Hayakawa, T. Ozawa, Free Radic. Biol. Med. 20 (1996) 607–612.
- [48] V.C. Besson, I. Margail, M. Plotkine, C. Marchand-Verrecchia, Free Radic. Res. 11 (2003) 1201–1208.
- [49] National Toxicology Program, Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser. 495 (2001) 1–274.

## 牛の脊柱からの背根神経節の除去に関する研究

木村 政治、平松 竜司、松井 利康、  
金井 克晃、九郎丸正道

### 要 約

新たに BSE の特定危険部位 (SRM) に指定された牛の背根 (脊髄) 神経節について、と畜場の協力を得て、まず量的計測を行い、さらにその脊柱からの除去がと畜場において可能かどうか検討した。現在、と畜場では平均して背根神経節の約 80% の除去が可能となっているが、100% の除去は現時点の技術では困難であると言わざるを得ない。と畜場での背根神経節の完全除去を達成するためには、今後さらなる技術の改良が必要である。

キーワード：伝達性海綿状脳症 (BSE)、特定危険部位 (SRM)、背根 (脊髄) 神経節

### 緒 言

2004 年、従来の脳、眼、脊髄、回腸遠位部に加えて、背根 (脊髄) 神経節が特定危険部位に指定されたことから、我が国では食用に供する牛は、と畜場において脊髄吸引除去後、背割りして背根神経節を含む脊柱全体を取り外して廃棄することによって、背根神経節も食肉から取り除かれることになった。ところが脊柱の廃棄に要する経費は膨大であり、また背根神経節を除いた脊柱自体には感染源としての危険性はなく、従来牛エキスやゼラチン等の原材料として食品や化粧品等に利用されてきた経緯がある。もし、と畜場において背根神経節を脊柱から完全に分離する手法が確立できれば、経済的にも資源の活用という点からも、その効果は大きい。本研究では、そのための基礎データを蓄積することを目的として、と畜場の協力を得て、と畜場において脊髄を取り除いた後に脊柱に残る、硬膜とそこに付随している脊髄神経を、背根神経節ができるだけ脊柱に残らないように引き剥がしたものをを用いて、まず背根神経節を形態計測学的に解析し、続いて背根神経節

がどの程度硬膜に付随しているか、すなわち脊柱から背根神経節がどの程度除去されているかを調査した。

### 材料および方法

#### 1. 牛の背根神経節の形態計測学的解析

Fig.1 は腰椎断面における背根神経節の位置を示した模式図である。と畜場において脊髄を取り除いた後に脊柱に残る硬膜は、背割りによって左右に二分されるので、そこから伸びる脊髄神経は、脊髄の各分節につき 1 本である。これらをナイフで切断しながら、硬膜が脊柱から引き剥がされる。このとき背根神経節より末梢側で切断し、背根神経節が硬膜に付随してくるようにするが、背根神経節は周囲の脂肪組織の中に埋もれて位置の確認が難しい場合があり、切断部位が背根神経節より中枢側になれば背根神経節は脊柱に残る。こうして得られた硬膜とその周辺を試料として、背根神経節の数及び重量、神経根の数、硬膜から背根神経節までの背根の長さを測定した。牛の背根神経節についてのこうした情報については、これまで詳しい報告はなされていない。

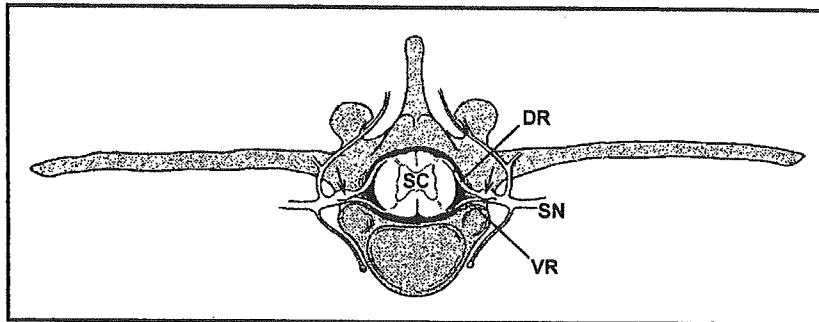


Fig.1 Location of dorsal root ganglia (arrows) at lumbar vertebral column.  
SC: spinal cord, DR: dorsal root, VR: ventral root, SN: spinal nerve.

引き剥がされた硬膜周辺からピンセットを用いて脂肪を除去すると背根神経節が現れる(Fig.2A,B)。これら多数の試料のうち第一頸神経から第五仙骨神経までの脊髄神経について、背根神経節が比較的好く硬膜に付随しているもの20点を選び、各背根神経節の個数及び重量、神経根(背根と腹根)の本数、及び硬膜から背根神経節までの長さを調べ、それぞれの平均値を表にまとめた。背根神経節が複数に分かれている場合は、その合計の重量を背根神経節の重量とした。背根と腹根は多くの根糸からなる(加藤・山内,1998)が、根糸が連続したひとまとまり(ひとたば)として硬膜を貫く箇所を神経根の本数とした。背根神経節が複数あって、あるいは背根が複数あって、硬膜から背根神経節までの背根の長さがそれぞれ異なる場合は、最も短いものを採用した。

また、頸神経、胸神経、腰神経、及び仙骨神経の各背根神経節の組織を光学顕微鏡で確認した。各背根神経節は、10%ホルマリン溶液による室温下24時間の浸漬固定に続いてパラフィンに包埋した。これを用いて4 $\mu$ m厚のパラフィン切片を作製し、HE染色を施した。

## 2. 牛の脊柱からの背根神経節の除去

脊柱から除去すべき背根神経節は牛1頭当たり、頸椎部8対16個、胸椎部13対26個、腰椎部6対12個、及び仙骨部5対10個の計32対64個(Sisson and Grossman,1975;山内・杉村・西田,1987)(背割り後の枝肉[半頭分]では32個)であり、尾骨部はこれに含まれていない。ここでは、1.と由来の同じ試料において、第一頸神経から第五仙骨神経までの脊髄神経の背根神経節が、どの程度脊柱から除去されているかを調べた。

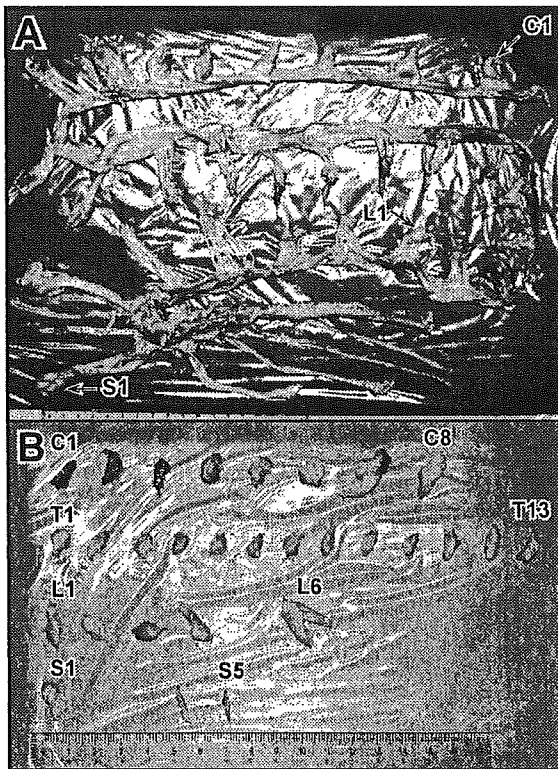


Fig.2 A:Whole figure of dorsal root ganglia (arrows) attached to dura mater. B:Dorsal root ganglia of cervical(C), thoracic(T), lumbar(L), and sacral(S) nerves.

硬膜周辺から脂肪を取り除いて、付随している背根神経節を明らかにし、頸椎部、胸椎部、腰椎部、及び仙骨部に関して、脊柱からの程度除去されているか(除去率)を算出した。算出に用いた牛硬膜は2003年7月から2005年1月までの計1155検体である。算出方法は背根神経節の全体が付随しているものを1とし、背根神経節の大部分が付随しているものを2/3、背根神経節の半分程度が付随しているものを1/2、背根神経節の一部が付随しているものを1/3、背根神経節が全く付随していないものを0として、第一頸神経から第五仙骨神経まで合計し、当該の背根神経節の数(32(枝肉当たり:半頭分))に対する割合を求めた。背根神経節の大きさの判定は、目視によるから必ずしも厳密なものではなく、また、背根神経節の大きさの1/3個分が除去率の百分率の約1%分に相当する。したがって除去率は小数点以下の数値に意味がないと考えられることから、有効数字は1の位までとした。

## 結果および考察

### 1. 牛の背根神経節の形態計測学的解析

背根神経節の形態計測の結果はTable1に示した。なおTable1において、S1からS8は第一頸神経から第八頸神経を表し、T1からT13は第一胸神経から第十三胸神経を、L1からL6は第一腰神経から第六腰神経を、S1からS5は第一仙骨神経から第五仙骨神経を表す。

背根神経節の個数は各背根神経節に概ね1個であったが腰神経、仙骨神経では複数ある場合も散見され、頸神経、胸神経でも稀に複数認められた。背根神経節は、複数ある際に、硬膜を引き剥がす時に1つが硬膜に付随し、他が脊柱に残った場合、誤って1つと数えられている可能性も否定できない。

背根神経節の重量はC7とL6を双峰としてその前後で目立って大きく、仙骨部の下位では小さかった。本研究では背根神経節の体積及び密度は測定していないが、印象として、大きい背根神経節ほど重かったので、背根神経節の密度は脊髄神経によって差が大きいとは考えにくい。また、太い脊髄神経ほどその膨大部である背根神経節は大きかった。

背根神経節の形状については、殆どの場合、L6あるいはその前後の脊髄神経で馬蹄形である以外は桿状で、特にS3から下位では他よりも細長い桿状であった。桿状の背根神経節の長軸の、背根の伸びる方向に対するおおよその向きはS3から下位では平行、そのほかでは直角であった。

神経根の数は仙骨神経で少なく、多くの場合、背根、腹根各1本の計2本であった。これ以外に特段の傾向は見られず、互いに同じ分節から出る脊髄神経の太さに大きな個体差はなかったが、神経根の数は、上述の仙骨神経以外では、2本から10本と、個体によりあるいは脊髄神経により様々であった。神経根は多数の根糸からなる太いものもあれば、比較的少数の根糸からなる細いものもあり、それらの出現に規則性は見出されず、脊髄神経の太さが同程度であるからといって必ずしも神経根の数も同程度とは限らなかった。また逆に、神経根の数が同程度でも、脊髄神経の太さが同程度とは限らなかった。

硬膜から背根神経節までの背根の長さは、上位の頸神経で短く、腰神経以降次第に長くなり、特に仙骨神経では顕著に長く100mmに達するものもあった。これは以下の理由による。

Table1 Quantitative data on dorsal root ganglia and spinal roots.  
(C1-8;1<sup>st</sup>-8<sup>th</sup> cervical nerve, T1-13;1<sup>st</sup>-13<sup>th</sup> thoracic nerve, L1-6;1<sup>st</sup>-6<sup>th</sup> lumbar nerve, S1-5;1<sup>st</sup>-5<sup>th</sup> sacral nerve)

	Number of ganglia	Weight (g) of ganglia	Number of spinal roots	Length(mm) of dorsal roots
C1	1.0	0.20	4.7	4
C2	1.0	0.26	4.5	4
C3	1.0	0.20	3.9	4
C4	1.0	0.25	3.9	4
C5	1.0	0.24	4.1	7
C6	1.1	0.50	4.4	12
C7	1.0	0.59	5.6	15
C8	1.0	0.31	5.4	20
T1	1.0	0.19	4.9	25
T2	1.1	0.16	5.1	26
T3	1.0	0.14	5.5	25
T4	1.0	0.14	5.7	22
T5	1.0	0.15	5.7	19
T6	1.0	0.16	5.9	16
T7	1.0	0.16	5.7	16
T8	1.0	0.17	5.8	16
T9	1.0	0.17	5.5	17
T10	1.0	0.15	4.7	19
T11	1.0	0.15	4.5	19
T12	1.0	0.18	4.9	15
T13	1.0	0.18	5.7	12
L1	1.1	0.21	6.1	12
L2	1.0	0.26	6.3	13
L3	1.1	0.27	6.5	21
L4	1.1	0.30	6.1	35
L5	1.1	0.43	4.1	52
L6	1.2	0.65	3.3	62
S1	1.1	0.44	2.4	75
S2	1.1	0.17	2.0	98
S3	1.2	0.07	2.1	106
S4	1.1	0.06	2.0	97
S5	1.0	0.05	2.0	92

脊髄は脊柱より短いので、脊髄の各分節とそれに対応する脊椎とのずれ(Sisson and Grossman,1975)は尾側に行くほど大きく、かつ一般に背根神経節は椎間孔付近にあるから、脊髄の各分節とその背根神経節との距離は尾側に行くほど大きい。しかも、特に仙骨部では背根神経節が仙骨の外の脂肪層中にわずかに飛び出して位置している。

Fig.3 は第七胸神経の背根神経節を光学顕微鏡で観察したものである。低倍率では多くの神経細胞体を含む背根神経節が観察され、また、中～高倍率では神経細胞体(矢印)と円形の核(矢頭)が明らかである。

## 2. 牛の脊柱からの背根神経節の除去

除去率の月毎の推移を Fig.4 に、背根神経節ごとの除去成績を Fig.5 に、さらに Fig.5 に硬膜から背根神経節までの背根の長さを重ねたものが Fig.6 である。

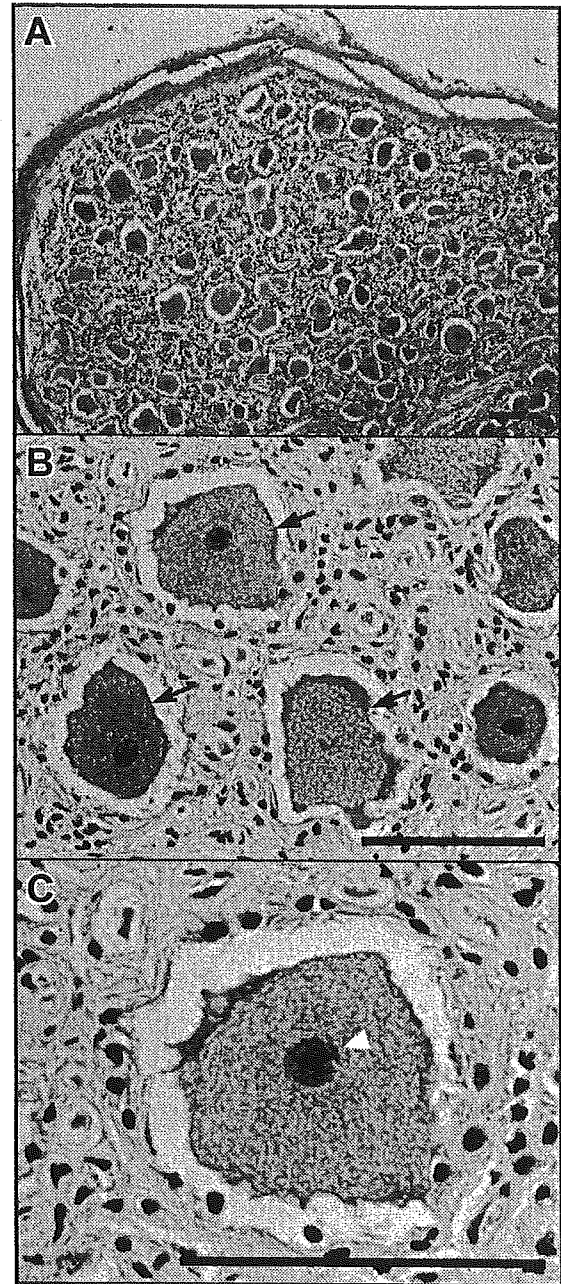


Fig.3 Lightmicrographs of dorsal root ganglion of 7<sup>th</sup> thoracic nerve. Bar=100 $\mu$ m

背根神経節の除去率は2003年7月の作業開始から同年10月まで飛躍的に向上し、その後漸増して2004年3月に80%に達した。これは除去すべき背根神経節の位置が明確になってきたことと、使用するナイフの改良によるものと思われる。しかしそれ以降はほぼ横ばいであった。除去率が安定して以降、最も除去されやすいのは頸部及び胸部の上位から中位の背根神経節であり、次いで腰部の上位、その次に胸部の下位と続き、最も除去されにくいのが腰部の下位及び仙骨部の背根神経節であった。

頸部及び胸部の上位から中位の背根神経節が脊柱から除去されやすいのは、硬膜から背根神経節までの背根の長さが短いことと、背根神経節がある程度大きいことに起因すると思われる。しかし、これと同じ条件下にある胸部下位と腰部上位



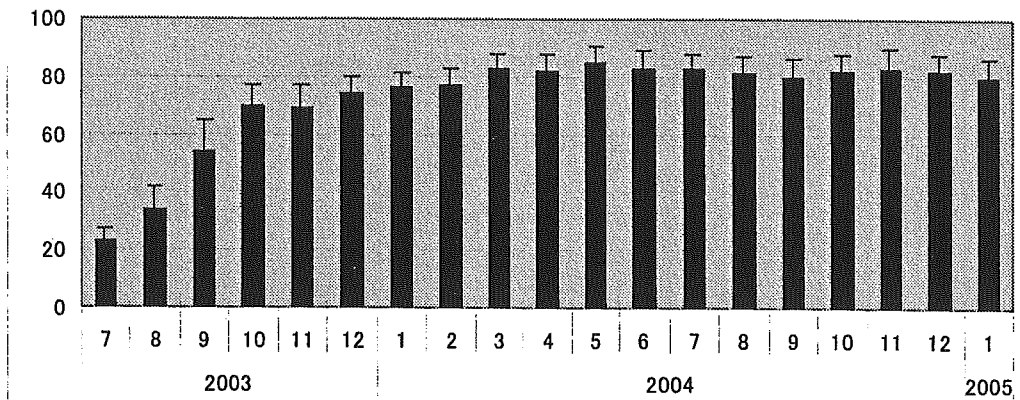


Fig.4 Elimination rate(%) of dorsal root ganglia at a certain slaughterhouse from 2003.7 to 2005.1

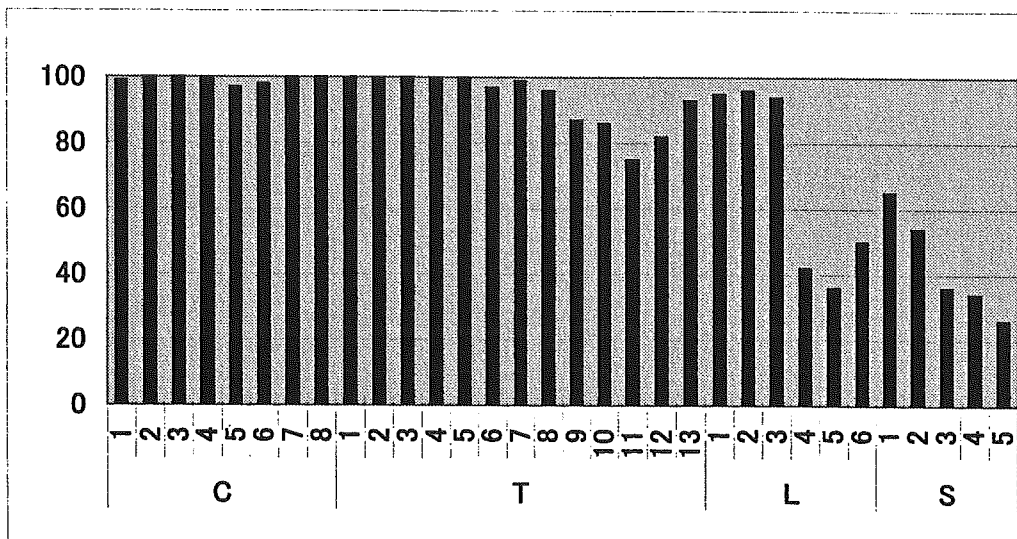


Fig.5 Elimination rate(%) of dorsal root ganglion per each spinal nerve.  
(C1-8;1<sup>st</sup>-8<sup>th</sup> cervical nerve, T1-13;1<sup>st</sup>-13<sup>th</sup> thoracic nerve,  
L1-6;1<sup>st</sup>-6<sup>th</sup> lumbar nerve, S1-5;1<sup>st</sup>-5<sup>th</sup> sacral nerve)

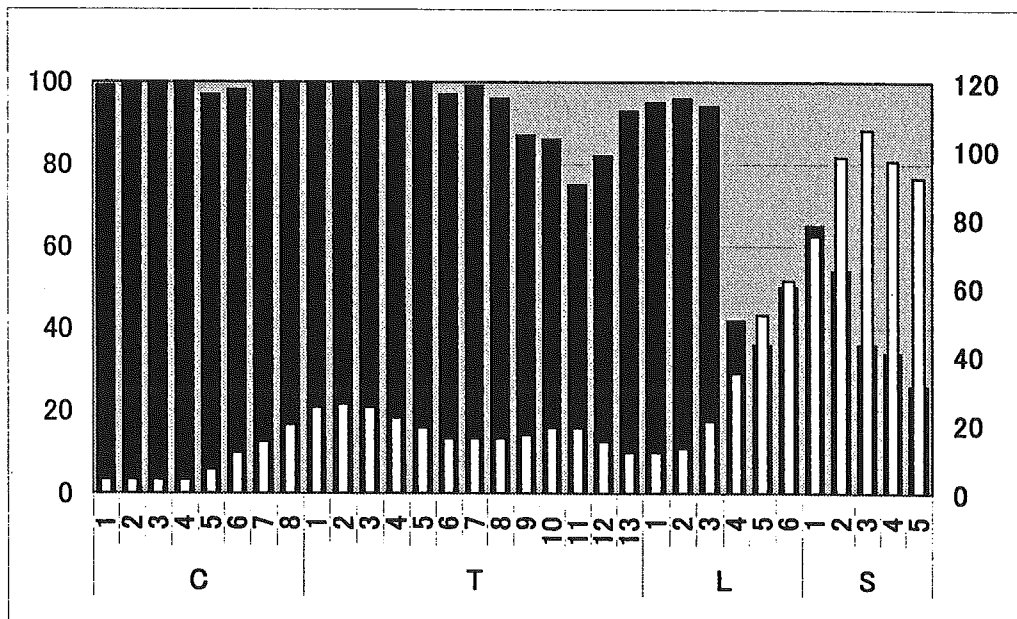


Fig.6 Relationship between the elimination rate(%) (■) of dorsal root ganglion per each spinal nerve and the length(mm) (□) of each dorsal root.  
(C1-8;1<sup>st</sup>-8<sup>th</sup> cervical nerve, T1-13;1<sup>st</sup>-13<sup>th</sup> thoracic nerve,  
L1-6;1<sup>st</sup>-6<sup>th</sup> lumbar nerve, S1-5;1<sup>st</sup>-5<sup>th</sup> sacral nerve)

の背根神経節について、後者の除去成績が頸部及び胸部の上位から中位のそれよりもわずかに低く、前者でさらに低くなる理由は不明である。腰部下位及び仙骨部の背根神経節が除去されにくいのは、背根の硬膜から背根神経節までの距離が長く(Fig.6)、殊に仙骨部の背根神経節は仙骨のわずかながら外に位置するので、背根神経節より中枢側で脊髄神経を切断してしまう傾向にあるためと思われる。なお、S1 とその前後の脊髄神経で背根神経節は大きいのであるから、腰部下位及び仙骨部の背根神経節が除去されにくいことと背根神経節の大きさとは無関係であろう。

牛の脊柱をゼラチンや牛エキスの原材料として利用するためには、と畜場において背根神経節が完全に脊柱から分離されなければならないが、これまでのところ技術的にその状況に

は達していない。今後さらなる除去技術の改良が必要である。

#### 引用文献

- 1) 加藤嘉太郎・山内昭二 (1998) 改著家畜比較解剖図説 養賢堂 東京 下巻 p294
- 2) 山内昭二・杉村誠・西田隆雄監訳 (1990) 獣医解剖学 近代出版 東京 p555
- 3) Sisson S. and Grossman J.D. (1975) The Anatomy of the Domestic Animals.vol.1. Saunders,Philadelphia pp1065-1068

#### 謝 辞

本研究は厚生労働科学研究費補助金により行ったものである。