

学位論文

炎症性疼痛による三叉神経節内の
vanilloid receptor subtype1 陽性細胞の
分布変化と咀嚼性刺激による影響

西 美香

広島大学大学院歯学研究科歯学系（歯科矯正学）専攻

主任：丹根 一夫 教授

2005 年

目次

緒言	1
材料と方法	6
I. 炎症による VR1 陽性細胞の発現についての検討	6
1. 三叉神経節 VR1 陽性細胞の検討	6
1) 実験動物と実験処置	6
2) 切片作製	6
3) VR1 の免疫組織化学染色	6
4) VR1 陽性細胞の観察と算定	7
2. 三叉神経節 VR1 二重陽性細胞の検出	8
1) 実験動物と実験処置	8
2) 切片作製	8
3) VR1 と CGRP または NF200 の二重標識蛍光抗体法	8
4) 二重陽性細胞の観察と算定	9
II. 咀嚼による炎症性疼痛抑制効果についての検討	9
1. 三叉神経節 VR1 陽性細胞の検出	9
1) 実験動物と実験処置	10
2) 切片作製	10
3) VR1 と CGRP または NF200 の二重標識蛍光抗体法	10
4) 二重陽性細胞の観察と算定	11
2. 三叉神経脊髄路核尾側核内の c-Fos 陽性細胞の検出	11

1) 切片作製	11
2) c-Fos の免疫組織化学染色	12
3) c-Fos 陽性細胞の観察と算定	12
III. 咀嚼による疼痛抑制機構におけるセロトニンの役割についての検討	12
1. 三叉神経節 VR1 陽性細胞の検出	13
1) 実験動物と実験処置	13
2) 切片作製	13
3) VR1 と CGRP または NF200 の二重標識蛍光抗体法	14
4) 二重陽性細胞の観察と算定	14
2. 三叉神経脊髄路核尾側核内の c-Fos 陽性細胞の検出	15
1) 切片作製	15
2) c-Fos の免疫組織化学染色	15
3) c-Fos 陽性細胞の観察と算定	15
結果	16
I. 炎症による VR1 陽性細胞の発現	16
1. 実験動物の行動	16
2. 炎症による三叉神経節 VR1 陽性細胞の発現	16
1) 三叉神経節 VR1 陽性細胞数の変化	16
2) 三叉神経節 CGRP 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の変化	18
3) 三叉神経節 NF200 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の変化	20
II. 咀嚼による炎症性疼痛抑制効果	22

1. 実験動物の行動	22
2. 炎症性疼痛への咀嚼の影響	22
1) 三叉神経節 CGRP 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の変化	22
2) 三叉神経節 NF200 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の変化	24
3) 三叉神経脊髄路核尾側核内の c-Fos1 陽性細胞数の変化	26
III. 咀嚼による疼痛抑制機構におけるセロトニンの役割	28
1. 実験動物の行動	28
2. 咀嚼による疼痛抑制機構でのセロトニンの役割	29
1) 三叉神経節 CGRP 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の変化	29
2) 三叉神経節 NF200 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の変化	31
3) 三叉神経脊髄路核尾側核内の c-Fos 陽性細胞数の変化	33
考察	37
1. 実験方法について	37
1) 侵害刺激受容モデルとしての実験的炎症の誘発について	37
2) CFA 皮下注射による VR1 の発現について	38
3) 標識二重蛍光抗体法について	38
4) 神経線維細胞の標識としての CGRP および NF200 について	39
5) 固形餌と液状餌による咀嚼性刺激の相違について	40
6) 神経細胞活性化の指標としての c-Fos について	41
7) セロトニン受容体作動薬および拮抗薬について	42
2. 炎症による三叉神経節 VR1 陽性細胞数の発現変化について	45

3. 咀嚼が三叉神経節 VR1 陽性細胞および三叉神経脊髄路核尾側核内の c-Fos 陽性細胞の炎症性変化に及ぼす影響	46
4. 三叉神経節 VR1 陽性細胞の炎症性変化に対する咀嚼と 5-HT ₃ 受容体作動薬 および拮抗薬の影響	48
5. 三叉神経脊髄路核尾側核内の c-Fos 陽性細胞数の変化に対する咀嚼と 5-HT ₃ 受容体作動薬および拮抗薬投与が及ぼす影響	49
結論	53
参考文献	55
謝辞	62

緒言

最近の研究により、咬合が身体平衡機能、呼吸・睡眠機能、記憶・学習能力などの全身の諸機能に影響を及ぼすことが報告されるようになり（川村, 1989; Yamamoto and Hirayama, 2001; Yamaga et al., 2002; Monteith, 2004）、形態的、機能的な正常咬合の獲得を目的とする矯正歯科治療の重要性が再認識されている。一方、矯正歯科治療における問題点の一つとして、歯の移動による疼痛や不快感が挙げられる。これらの症状の発現機序として、歯根膜の圧迫側における圧受容器を介した刺激伝達とブラジキニンなどの発痛物質の産生が報告されている（Yamasaki et al., 1985）。歯の移動による機械的刺激を含む顎顔面領域の侵害刺激は、末梢の侵害受容器において神経線維の電氣的興奮に変換され、無髄線維である C 線維および有髄線維である A δ 線維からなる一次ニューロンを介して三叉神経脊髄路核の二次ニューロンに伝達され、上行して視床を経て大脳皮質に至り疼痛として認識される。

Vanilloid receptor subtype 1 (VR1) は中枢神経系および末梢神経系に分布しており、内因性伝達物質であるアナンダミドや外因性刺激である熱やプロトンなどの様々な侵害刺激を受容し、神経線維の興奮を引き起こす受容体である（Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998; Zygmunt et al., 1999）。炎症発生時に、VR1 は炎症によって酸性化された組織のプロトンを受容するのみならず、炎症により活性化されたタンパク質リシン酸化酵素によるリン酸処理を受けて刺激受容閾値を低下させ、疼痛の増大や知覚過敏を引き起こすことが明らかにされている（Tominaga et al., 2001）。タンパク質リシン酸化酵素を活性化させる物質としては、発痛物質であるブラジキニン、アデニル三リン酸 (ATP)、神経成長因子などが挙げられる（Chuang et al., 2001; Tominaga et al., 2001; Sugiura et al., 2002）。ラット後脚に炎症を発生させた実験モデルでは、炎症部位の神経

線維および炎症関連領域を支配する脊髄後角と後根神経節においてVR1 免疫陽性線維と陽性細胞がそれぞれ増加したことが報告されている (Carlton and Coggeshall, 2001; Luo et al., 2004)。神経節における VR1 免疫陽性細胞の増加、および神経終末における VR1 免疫陽性神経線維の増加は、VR1 が受容する刺激を伝達する神経線維が増加したことを意味する。また、Amaya ら (2003) は、ラット後脚の炎症による脊髄後根神経節での VR1 免疫陽性細胞の増加が、VR1 の主な発現部位である C 線維細胞だけではなく (Caterina et al., 1997)、通常 VR1 陽性細胞がわずかしか認められない A δ 線維細胞においても認められたことを報告した。このようなラット後脚の炎症による VR1 免疫陽性細胞の分布の変化は、神経系の伝達路の可塑的变化を示唆する。脊髄後角と三叉神経脊髄路核は、一次ニューロンから二次ニューロンへの投射が神経線維の種類ごとに層状構造をなすなどの類似性が高いが、後根神経節から脊髄後角にかけての領域の疼痛伝達における VR1 の機能が解明される一方、三叉神経節の疼痛伝達における VR1 の関与については不明な点が多く残されている。本研究では、一次ニューロン C 線維の標識として抗 calcitonin gene related peptide (CGRP) 抗体を (Beland and Fitzgerald, 2001; Amaya et al., 2003)、一次 A 線維の標識として抗 neurofilament 200 kDa (NF200) 抗体を用い (Beland and Fitzgerald, 2001; Ma et al., 2001)、炎症による三叉神経節 VR1 陽性細胞発現の変化を検索した。

咀嚼運動は食物を適度に粉砕し、必要な栄養を摂取するという点において重要な生命維持機能の一つである。近年、咀嚼機能が食物栄養の摂取ばかりでなく、中枢神経系を含む全身諸機能に影響を及ぼすことが報告されている (Momose et al., 1997; Yamamoto and Hirayama, 2001; Oka et al., 2003)。咀嚼運動は、歯・歯周組織・咀嚼筋・顎関節・舌・顔面筋などの多数の組織器官が関与する複雑な運動であり、その調節には大脳皮質運動野顔面領域、大脳皮質咀嚼野、大脳辺縁系の扁桃核、大脳基底核など

の関与により (坂田と中村, 1996)、食物の硬さや粘性などにより咀嚼運動の速度やパターンが変化する (Thexton, 1992)。また、咀嚼運動により中枢神経系の咀嚼関連部位への血流増加が認められたことから、その部位の神経の活性が実証されている (Momose et al., 1997)。さらに、顎顔面骨格系への影響として成長期に軟らかい餌を与えた動物では軟骨の成熟抑制 (Kantomaa et al., 1994) や、下顎窩および下顎隆起の形態異常、オトガイの後退など (Tuominen, 1993) が報告されていることから、咀嚼が顎顔面骨格の成長に重要な影響を与えることが示唆されている。

中枢神経系への作用を生理学的に見ると、咀嚼によるラット大脳の中隔側座核でのドーパミン放出の増加 (Bradberry et al., 1991) など、神経伝達物質の放出促進効果が報告されている。成長期に軟らかい餌で飼育したラットおよびマウスにおける刺激回避行動の減少 (川村, 1989)、成熟後のマウス大脳皮質のシナプス形成抑制および空間記憶獲得能力の低下 (Yamamoto and Hirayama, 2001) なども示されている。また、高齢者を対象とした調査により、アルツハイマー型痴呆症を有する高齢者の残存歯数が健常高齢者と比較して少ないことが明らかにされた (重富ら, 1998)。さらに、このような中枢神経系への作用が、咀嚼による摂食量の抑制 (Sakata et al., 2003)、脂質代謝の促進 (Oka et al., 2003) などの全身性の効果を発揮することが明らかにされている。

咀嚼運動が神経系に与えるもうひとつの影響として、疼痛抑制効果が挙げられる。例えばヒト乳児の足踵部への刺激による心拍数の上昇や泣き声をあげる回数、洗面をつくる回数が 30 回分以上の吸啜運動により抑制されることや、ヒト女兒のガム咀嚼運動が疼痛を和らげることが報告されている (Blass and Watt, 1999; Lewkowski et al., 2003)。また、固形餌で飼育した成熟ラットでは、液状餌で飼育したラットと比較すると、炎症性疼痛の抑制やオピオイド神経系の活性化による鎮痛効果が発現することが示されている (Ogawa et al., 2003)。さらに、咀嚼運動などの規則的な運動が脳内のセ

ロトニン神経系を賦活させることから (Jacobs and Fornal, 1999)、疼痛抑制へのセロトニン神経系の関与も考えられているが (Lewkowski et al., 2003)、咀嚼性求心性刺激とセロトニン神経系の鎮痛効果との関連を検討した報告は見られない。

セロトニンは神経伝達物質の一種であり、その受容体は7グループ14サブタイプに分類される (Shen et al., 1993; Adham et al., 1993)。セロトニン受容体には、神経線維の興奮を促進するタイプと抑制するタイプが存在する。そして、セロトニン受容体の種類と存在部位により、セロトニンは複雑な作用を示す。5-HT₃受容体作動薬を脊髄腔内投与したラットでは咀嚼筋の筋活動量が増加するという報告 (Seo et al., 2002) があり、5-HT₃受容体と咀嚼運動との関連性が強く示唆されていることから、本研究では5-HT₃受容体に注目した。5-HT₃受容体は、興奮作用を有し (Bradley et al., 1986)、中枢神経系および末梢神経系に分布している。また、5-HT₃受容体は末梢の疼痛伝達路では一次ニューロンの末梢側および中枢側終末、二次ニューロンに投射する抑制性介在ニューロンでの発現が明らかにされている (Branchek et al., 1988; Hamon et al., 1989; Paul et al., 2001)。一次ニューロンの5-HT₃受容体作動は疼痛伝達を促進させるが、抑制性介在ニューロンの5-HT₃受容体作動は二次ニューロンに対して伝達抑制効果を示す。このため、侵害受容においては、一次ニューロン終末の5-HT₃受容体の賦活は疼痛を促進するが、抑制性介在ニューロン上の5-HT₃受容体の賦活は疼痛を抑制する。すなわち、刺激を受容する受容体の局在部位の相違により相反する作用を示すことになる。

本研究の目的は、顎顔面領域の炎症によるVR1の発現変化を検索することにより、顎顔面領域での疼痛伝達機構の一端を解明することとともに、咀嚼性刺激により賦活すると考えられる疼痛抑制機構が顎顔面領域の疼痛伝達に及ぼす影響を一次求心性ニューロンのレベルで解明することにある。さらに、咀嚼運動との関連が示唆されるセ

ロトニンが 5-HT₃ 受容体を介して、咀嚼性刺激により賦活される疼痛抑制機構に与える影響を検索した (図 1)。

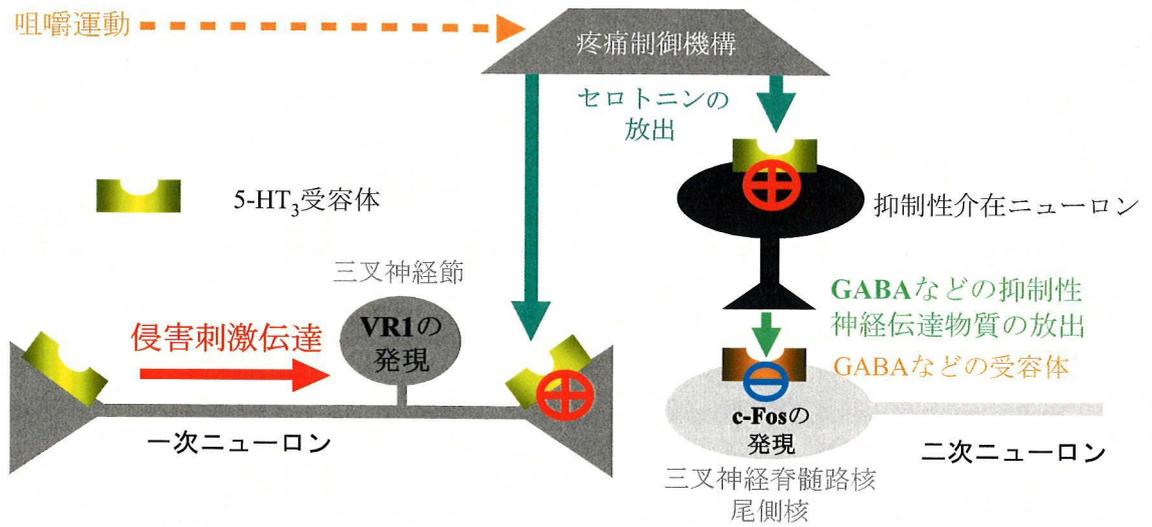


図 1 咀嚼性刺激によるセロトニンを介した疼痛抑制機構の予想模式図
寺山 (2003) より引用

材料と方法

I. 炎症による VR1 陽性細胞の発現についての検討

1. 三叉神経節 VR1 陽性細胞の検出

1) 実験動物と実験処置

実験動物として、8 週齢の Wistar 系雄性ラット（日本チャールズ・リバー、横浜）10 匹を用いた。動物の取り扱いは、広島大学実験動物取り扱い規定に従った。

実験処置は、ジエチルエーテル 3 ml/chamber（シグマ・アルドリッチ・ジャパン、東京）吸入による麻酔下で行った。慢性炎症の誘発には complete Freund's adjuvant (Sigma, St. Louis, USA) と生理食塩水を同量ずつ乳化液状に練和したもの（CFA）を用いた。実験群（n=5）では右側オトガイ部に CFA 50 μ l の皮下注射を、対照群（n=5）では同部に同量の生理食塩水を皮下注射した。

2) 切片作製

注射 2 日後、ペントバルビタール腹腔内投与（0.5 ml/kg）による深麻酔下で 4% パラホルムアルデヒド、0.1M リン酸緩衝液（PB; pH 7.4）を含む固定液を用いて灌流固定を行った。灌流固定後、三叉神経節を摘出し、4 $^{\circ}$ C 下で同固定液に浸漬した。後固定の後、4 $^{\circ}$ C 下で 25 %スクロースを含む 0.01M リン酸緩衝生理食塩液（PBS）に浸漬した。その後、凍結マイクロトーム（Leica, Wetzlar, Germany）を用いて、厚さ 30 μ m の凍結切片を作製し、シランコーティングスライドガラス（松浪硝子工業、大阪）に貼付し、乾燥させた。

3) VR1 の免疫組織化学染色

免疫染色は標識ストレプトアビジン・ビオチン（LSAB）法に準じて行った。まず、

内因性ペルオキシダーゼを不活化させるため、0.1%過酸化水素水を含む25%メタノール溶液で30分間処理し、PBSによる洗浄後、非特異的反応を抑制するために、室温で0.75%トリトンX-100と3%正常ヤギ血清を含むPBSでブロックし、一次抗体として5,000倍希釈したヤギ抗ウサギVR1抗体(Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland)を室温で一晩反応させた。PBS洗浄後、二次抗体として400倍希釈したビオチン化抗ウサギ抗体(Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA)を60分間反応させた。PBS洗浄後、400倍希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(DAKO, Glostrup, Denmark)を60分間反応させた。0.05M トリス塩酸緩衝液(TB)で洗浄後、DAB-Ni溶液(0.02%3,3-ジアミノベンチジン四塩酸塩、0.01%過酸化水素水、0.05MTB、0.08% ニッケルアンモニウム塩; pH 7.6; Sigma)を用いて発色させた。

免疫染色後、エタノールによる脱水処理を施し、エンテランで封入した。

4) VR1 陽性細胞の観察と算定

封入後、光学顕微鏡(BX-40; オリンパス光学工業, 東京)を用いて明視野照明下で組織の観察および写真撮影を行い、VR1 陽性細胞数を算定した。

Martin と Dolivo の報告(1983)に基づき、細胞構築学的に三叉神経節第三枝細胞体を他の二枝の領域と区分した。三叉神経節第三枝領域の細胞体は、三叉神経節分岐部の遠心枝側に隣接した狭い領域に集合している(図2)。100倍の光学顕微鏡下で、細胞体が褐色に濃染した細胞をVR1 陽性細胞と同定した。各個体から、無作為に切片2枚を選択し、第三枝領域のVR1 陽性細胞数を算定し、平均を算出した。各群の平均と標準偏差を算出し、Bonferroni/Dunn法を用いて実験群と対照群の有意差検定を行った。

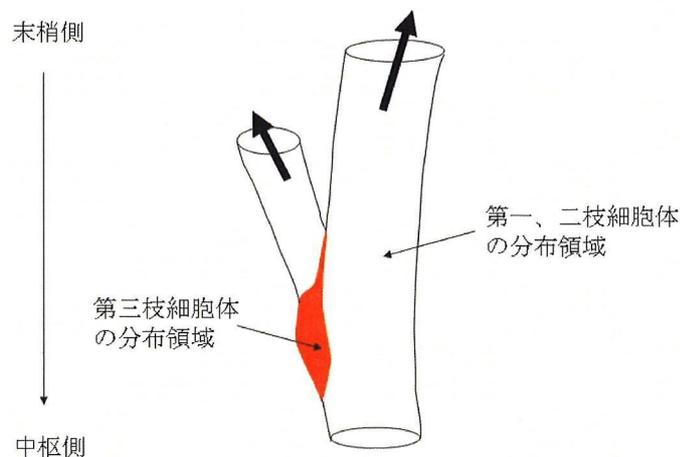


図 2 右側三叉神経節の腹側面観の模式図
MartinとDolivo (1983) より引用

2. 三叉神経節 VR1 二重陽性細胞の検出

1) 実験動物と実験処置

実験動物として、8 週齢の Wistar 系雄性ラット 10 匹を用いた。ジエチルエーテル吸入による麻酔下で、実験群 (n=5) には CFA 50 μ l を、対照群 (n=5) には同量の生理食塩水を右側オトガイ部に皮下注射した。

2) 切片作製

注射 2 日後、前述の手順にしたがって灌流固定、三叉神経節の摘出、25%スクロースを含む PBS への浸漬を行った。その後、凍結マイクロトーム (Leica) を用いて厚さ 20 μ m の凍結切片を作製し、シランコーティングスライドガラス (松浪硝子工業) に貼付し、乾燥させた。

3) VR1 と CGRP または NF200 の二重標識蛍光抗体法

免疫染色は二重標識蛍光抗体法に準じて行った。まず、非特異的反応を抑制するために、室温で 0.75% トリトン X-100 と 3% 正常ヤギ血清を含む PBS でブロッキングし、一次抗体として 5,000 倍希釈したヤギ抗ウサギ VR1 抗体を 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。

PBS 洗淨後、3%正常ヤギ血清を含む PBS でブロッキングし、二次抗体として 150 倍希釈した carboxymethyl indocyanine 3 (Cy3) 標識抗ウサギ抗体 (Zymed Laboratories, San Francisco, USA) を 60 分間反応させた。さらに、PBS 洗淨後、3%正常ロバ血清を含む PBS でブロッキングし、一次抗体として 500 倍希釈したマウスモノクローナル抗 calcitonin gene-related peptide (CGRP) 抗体 (BIOMOL International LP, Plymouth, USA) または 400 倍希釈したマウスモノクローナル抗 neurofilament 200kDa (NF200) 抗体 (Sigma) を 4℃で一晩反応させた。PBS 洗淨後、3%正常ロバ血清を含む PBS でブロッキングし、二次抗体として 200 倍希釈した fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウス抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA) を 60 分間反応させた。染色後、グリセリンで封入した。

4) 二重陽性細胞の観察と算出

封入後、落射式蛍光顕微鏡 (OPTIPHOT LABOPHOT, Nikon, 東京) 下で Cy3 (励起波長 530-570 nm) および FITC (励起波長 465-525 nm) に対し、それぞれの蛍光色素の励起波長に適した蛍光フィルターを用いて切片の観察および写真撮影を行った。

各細胞について、200 倍の蛍光顕微鏡下で蛍光に染色されたものを陽性とした。二重免疫陽性細胞は、VR1 と CGRP または NF200 の陽性反応を示すものとした。各個体から、無作為に切片 2 枚を選択し、第三枝領域の CGRP 陽性細胞数または NF200 陽性細胞数および各二重陽性細胞数を算定し、さらに CGRP 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合、NF200 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合を算出した。各群の平均と標準偏差を算出し、Bonferroni/Dunn 法を用いて実験群と対照群間の有意差検定を行った。

II. 咀嚼による炎症性疼痛抑制効果についての検討

1. 三叉神経節 VR1 陽性細胞の検出

1) 実験動物と実験処置

実験動物として、8 週齢の Wistar 系雄性ラット 10 匹を用い、全てのラットを 10 日間液状餌にて飼育した。11 日目にジエチルエーテル吸入による麻酔下にて右側オトガイ部に CFA 50 μ l の皮下注射を行った。注射翌日より固形餌群 (n=5) と液状餌群 (n=5) に分けて飼育した。

なお、ラット体重 1 kg あたりの 1 日の餌として、固形餌群では固形餌 (日本クレア, 東京) 50 g と水 200 ml を、液状餌群では粉末餌 (日本クレア) 50 g と水 200 ml を混合したものを用いて飼育した(図 3)。

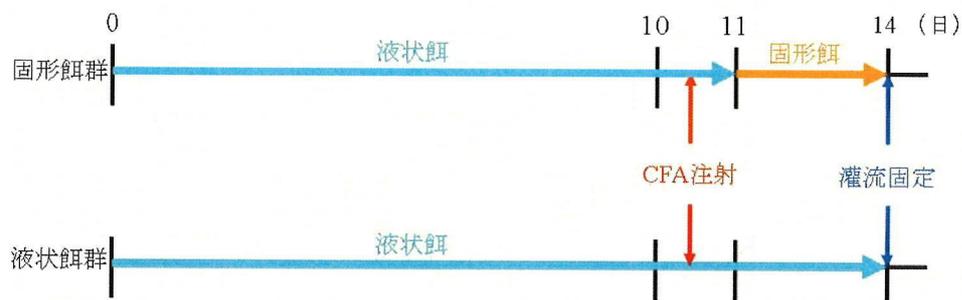


図 3 固形餌群および液状餌群の設定とタイムコース

2) 切片作製

注射 3 日後に前述の手順と同様に、ペントバルビタール深麻酔下での灌流固定、三叉神経節を含む脳の摘出、後固定、25%スクロースを含む PBS への浸漬、厚さ 20 μ m の凍結切片の作製を行った。

3) VR1 と CGRP または NF200 の二重標識蛍光抗体法

免疫染色は二重標識蛍光抗体法に準じて行った。まず、室温でトリトン X-100 と正常ヤギ血清を含む PBS でブロッキングし、一次抗体としてヤギ抗ウサギ VR1 抗体

(Alexis Biochemicals) を 4 °C で一晩反応させた。洗浄後、再び正常ヤギ血清を含む PBS でブロッキングし、二次抗体として Cy3 標識抗ウサギ抗体 (Zymed Laboratories) を 60 分間反応させた。さらに、PBS 洗浄後正常ロバ血清を含む PBS でブロッキングし、一次抗体としてマウスモノクローナル抗 CGRP 抗体 (BIOMOL international LP) またはマウスモノクローナル抗 NF200 抗体 (Sigma) を 4 °C で一晩反応させた。洗浄後、正常ロバ血清を含む PBS でブロッキングし、二次抗体として FITC 標識抗マウス抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) を 60 分間反応させた。染色後、グリセリンで封入した。

4) 二重陽性細胞の観察と算出

封入後、前述の方法に準じて切片の観察および写真撮影を行った。

各細胞について、200 倍の蛍光顕微鏡下で蛍光に染色されたものを陽性とした。二重陽性細胞は、VR1 および CGRP または NF200 の陽性反応を示すものと定義した。各個体から、無作為に切片 2 枚を選択し、第三枝領域の CGRP 陽性細胞数、NF200 陽性細胞数および各二重陽性細胞数を計測し、CGRP 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合、NF200 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合を算出した。各群の平均と標準偏差を算出し、Bonferroni/Dunn 法を用いて固形餌群と液状餌群間の有意差検定を行った。

2. 三叉神経脊髄路核尾側核内の c-Fos 陽性細胞の検出

1) 切片作製

前項の実験動物より摘出した脳幹部を 4 °C で前述の固定液に一晩浸漬した。後固定の後、4 °C 下で 25 %スクロース液を含む PBS に浸漬した。その後、厚さ 50 μm の三叉神経脊髄路核を含む脳幹部の前頭断連続凍結切片を作製した。

2) c-Fos の免疫組織化学染色

免疫染色は LSAB 法に準じて行った。まず、内因性ペルオキシダーゼを不活化させるため、0.1%過酸化水素水を含む 25%メタノール溶液で 30 分間切片の処理を行った。PBS による洗浄後、非特異的反応を抑制するために、室温で 0.75%トリトン X-100 と 10% 正常ヤギ血清を含む PBS でブロッキングし、一次抗体として 5000 倍希釈したヤギ抗ウサギ c-Fos 抗体 (Oncogene Resarch Products, Cambridge, USA) を室温で一晩反応させた。PBS 洗浄後、二次抗体として 400 倍希釈したビオチン化抗ウサギ抗体 (Vector Laboratories Inc.) を 60 分間反応させた。PBS 洗浄後、400 倍希釈したペルオキシダーゼ標識streptavidin (DAKO) を 60 分間反応させた。0.05 M TB で洗浄後、DAB-Ni 溶液 (pH 7.6; Sigma) を用いて発色させた。

免疫染色後、切片を乾燥させ、エタノールによる脱水処理を施し、エンテランで封入した。

3) c-Fos 陽性細胞の観察と算定

封入後、切片を暗視野および明視野照明下で、切片の観察および写真撮影を行った。Paxinos and Watson (1982) の脳図譜に基づいて細胞構築学的に三叉神経脊髄路核尾側核を浅層 (I-II層) と深層 (III-V層) に分類した。

100 倍の光学顕微鏡下で確認を行い、核が楕円形または円形で黒色を示す細胞を c-Fos 陽性細胞として算定した。各個体より無作為に 4 枚の切片を選択し、三叉神経脊髄路核尾側核を浅層と深層に分けて c-Fos 陽性細胞数の算定を行い、総和を算出した。各群の平均と標準偏差を算出し、Bonferroni/Dunn 法を用いて固形餌群と液状餌群間の有意差検定を行った。

III. 咀嚼による疼痛抑制機構におけるセロトニンの役割についての検討

1. 三叉神経節 VR1 二重陽性細胞の検出

1) 実験動物と実験処置

実験動物として、8 週齢の Wistar 系雄性ラット 20 匹を用いた。全てのラットを 10 日間液状餌にて飼育した。11 日目に実験動物を 2 群（各群 n=10）に分けた。ジエチルエーテル吸入による麻酔下にて、作動薬投与群（n=10）には 5-HT₃ 受容体作動薬である 2-methyl-5-hydroxytryptamine malcate (2-Me-5HT; SIGMA RBI, Natick, USA) 1 mg/kg を、拮抗薬投与群（n=10）には 5-HT₃ 受容体拮抗薬である 3-tropanylindole-3-carboxylate hydrochloride (tropisetron; SIGMA RBI) 10 mg/kg を生理食塩水に溶解させ、尾静脈より投与した。静脈内投与 30 分後に、両群ラットの右側オトガイ部に CFA 50 μ l の皮下注射を行った。注射翌日より、各群をさらに半数ずつ固形餌群（作動薬投与固形餌群; n=5, 拮抗薬投与固形餌群; n=5）と液状餌群（作動薬投与液状餌群; n=5, 拮抗薬投与液状餌群; n=5）に分けた。

実験期間中のラット体重 1 kg あたりの 1 日の餌として、固形餌群では固形餌 50 g と水 200 ml を、また液状餌群では粉末餌 50 g と水 200 ml を混和したものを用いて飼育した（図 4）。

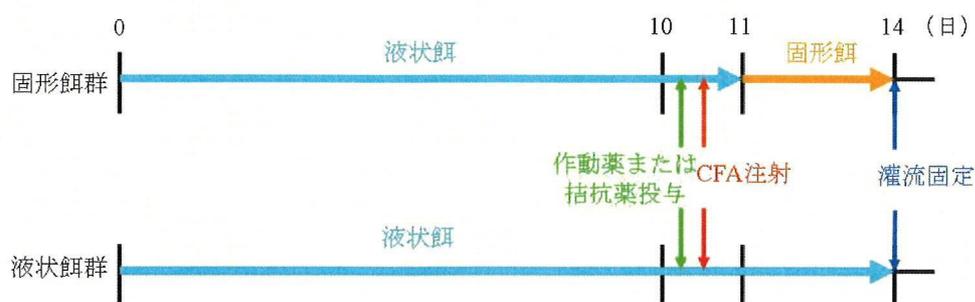


図 4 餌・薬物投与の設定および実験のタイムコース

2) 切片作製

CFA 注射 3 日後に、前述の手順と同様にペントバルビタール深麻酔下での灌流固定、

三叉神経節を含む脳の摘出、後固定、25%スクロースを含むPBSへの浸漬、凍結マイクロトーム (Leica) を用いた厚さ 20 μm の凍結切片の作製を行った。

3) VR1 と CGRP または NF200 の二重標識蛍光抗体法

免疫染色は二重標識蛍光抗体法に準じて行った。まず、トリトン X-100 と正常ヤギ血清を含む PBS でブロッキングし、一次抗体として、ヤギ抗ウサギ VR1 抗体 (Alexis Biochemicals) を一晩反応させた。PBS 洗浄後正常ヤギ血清を含む PBS でブロッキングし、二次抗体として Cy3 標識抗ウサギ抗体 (Zymed Laboratories) を 60 分間反応させた。さらに、PBS 洗浄後正常ロバ血清を含む PBS でブロッキングし、一次抗体としてマウスモノクローナル抗 CGRP 抗体 (BIOMOL International LP) またはマウスモノクローナル抗 NF200 抗体 (Sigma) を 4°C で一晩反応させた。PBS 洗浄後、正常ロバ血清を含む PBS でブロッキングし、二次抗体として FITC 標識抗マウス抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) を 60 分間反応させた。染色後、グリセリンにて封入した。

4) 二重陽性細胞の観察と算出

封入後、切片の観察および写真撮影を行った。

各細胞について、200 倍の蛍光顕微鏡下で、蛍光を認めるものを陽性とした。二重陽性細胞は、VR1 および CGRP または NF200 の陽性反応を確認して計測した。各個体から、無作為に切片 2 枚を選択し、第三枝領域の CGRP 陽性細胞数または NF200 陽性細胞数、および各二重陽性細胞数を算定し、CGRP 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合、NF200 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合を算出した。各群の平均と標準偏差を算出し、Bonferroni/Dunn 法を用いて、実験 II の 2 群を含む 6 群間の有意差の検定を行った。

2. 三叉神経脊髄路核尾側核内の c-Fos 陽性細胞の検出

1) 切片作製

前項の実験動物より脳幹部を摘出し、4°Cで前述の固定液に浸漬した。後固定後、25% スクロース液を含む PBS に浸漬し、凍結マイクロトーム (Leica) を用いて脳幹部の厚さ 50 μm の前頭断連続凍結切片を作製した。

2) c-Fos の免疫組織化学染色

免疫染色は LSAB 法に準じて行った。過酸化水素水を含むメタノール溶液で 30 分間切片の処理を行った。PBS による洗浄後、室温でトリトン X-100 と正常ヤギ血清を含む PBS でブロッキングし、一次抗体として、ヤギ抗ウサギ c-Fos 抗体 (Oncogene) と室温で一晩反応させた。PBS 洗浄後、二次抗体としてビオチン化抗ウサギ抗体 (Vector Laboratories) を 60 分間反応させた。PBS 洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (DAKO) と 60 分間反応させた。TB で洗浄後、DAB-Ni 溶液 (pH7.6; Sigma) を用いて発色させた。

免疫染色後、切片を乾燥させ、エタノールによる脱水処理を施し、エンテランを用いて封入した。

3) c-Fos 陽性細胞の観察と算定

封入後、切片を暗視野および明視野照明下で、観察および写真撮影を行った。

各個体より無作為に 4 枚の切片を選択し、三叉神経脊髄路核尾側核内の c-Fos 陽性細胞数を浅層と深層に分けて計測し、計測値の和を算出した。各群の平均と標準偏差を算出し、Bonferroni/Dunn 法を用いて実験 II の 2 群を含む 6 群間の有意差の検定を行った。

結果

I. 炎症による VR1 陽性細胞の発現

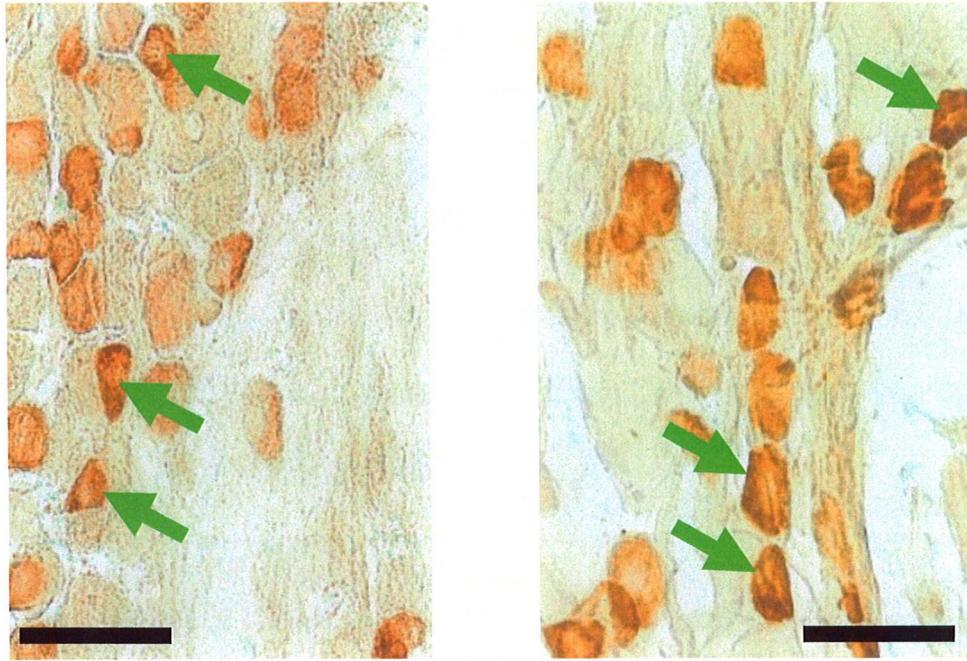
1. 実験動物の行動

実験動物は、エーテル吸入麻酔後 10 分以内にすべて覚醒した。麻酔覚醒直後に痙攣等の異常な反応は認められず、行動への麻酔の影響は認められなかった。また、CFA 注射部位周囲の腫脹と発赤を認めた。実験動物の特徴的な行動として、顔面部全体に対する毛繕いを認めたが、CFA 注射前と比較して頻度は変化しなかった。

2. 炎症による三叉神経節 VR1 陽性細胞の発現

1) 三叉神経節 VR1 陽性細胞数の変化

VR1 陽性細胞は、褐色に濃染した細胞体を有する細胞として容易に同定された (図 5)。同定された VR1 陽性細胞の多くは、直径 40 μm 以下の小径細胞であった。三叉神経節第三枝領域における VR1 陽性細胞数は、対照群および実験群でそれぞれ 81.8 ± 41.5 、 119.0 ± 47.6 であった (図 6)。対照群と比較し、実験群における VR1 陽性細胞数が有意に大きな値を示した。



対照群

実験群

矢印はVR1陽性細胞を示す。Scale bar = 100 μ m

図 5 三叉神経節におけるVR1免疫染色像

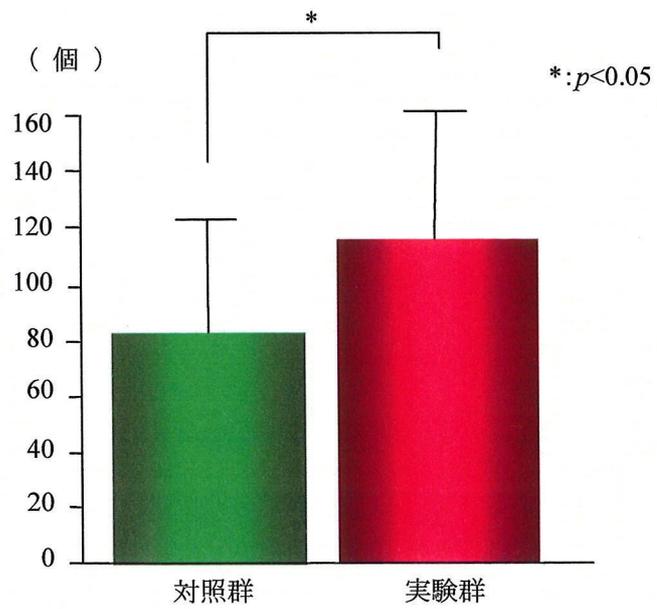


図 6 三叉神経節内のVR1陽性細胞数

2) 三叉神経節 CGRP 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の変化

三叉神経節において、VR1 陽性細胞は赤色の蛍光で標識された細胞として容易に同定された (図 7 a,d)。また、VR1 陽性細胞は主に小径細胞に認められ、一部は中径細胞 (直径 40-60 μm) にも認められた。CGRP 陽性細胞は緑色の蛍光で標識された細胞として容易に同定された (図 7 b,e)。CGRP 陽性細胞は主に小径細胞で認められたが、僅かながら中径以上の大きさの細胞でも認められた。

VR1 と CGRP の二重陽性細胞は、蛍光フィルタを交換することにより、赤色と緑色の蛍光で標識される細胞として同定された。二重陽性細胞は両群ともに、主に小径細胞で認められた (図 7 c,f)。

CGRP 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合は、対照群および実験群で、それぞれ $15.7 \pm 5.4\%$ 、 $28.1 \pm 6.0\%$ であった (図 8)。対照群と比較し、実験群における CGRP 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合が有意に大きい値を示した。

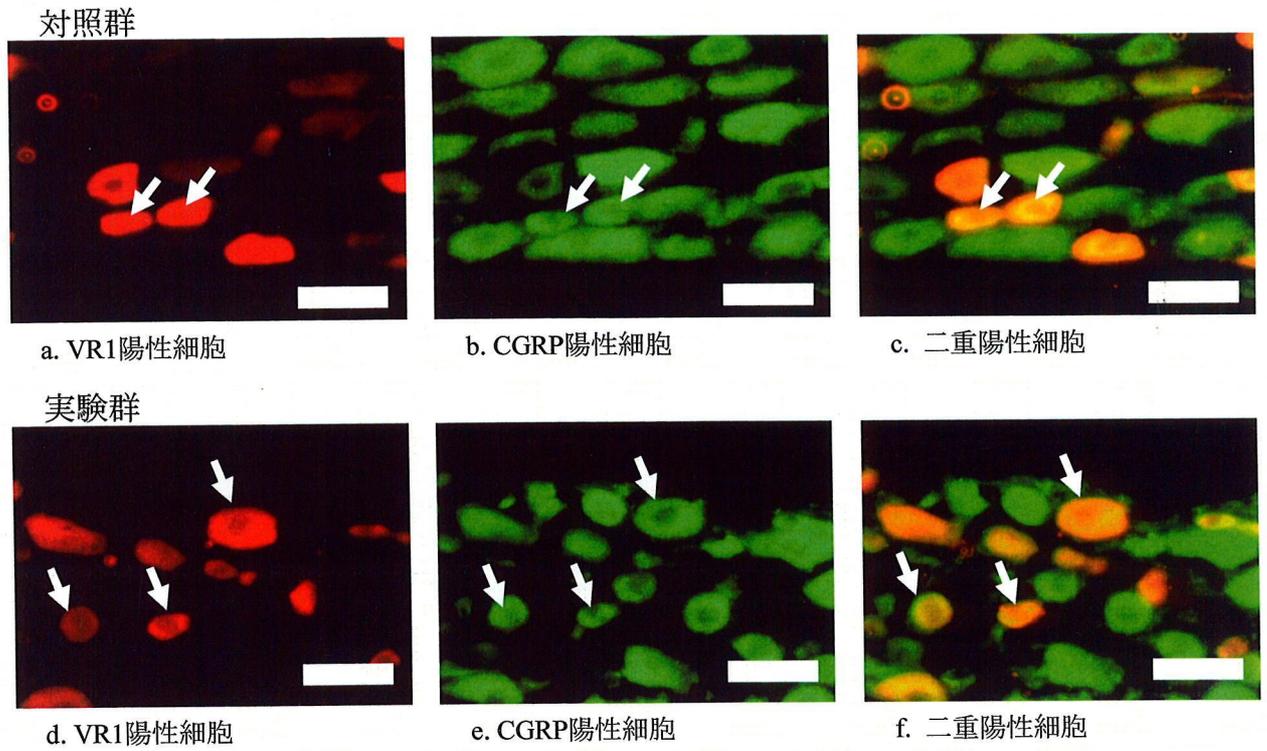


図 7 VR1とCGRPの二重免疫染色像 Scale bar = 50 μ m
矢印は二重陽性細胞を示す。

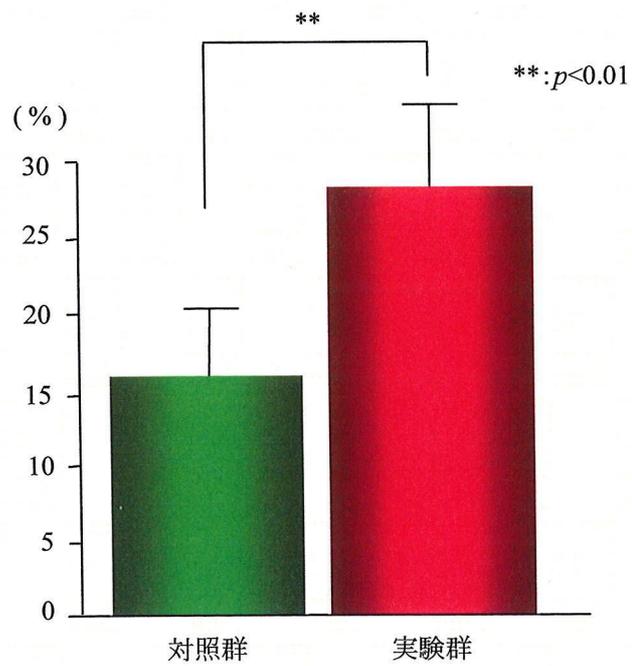


図 8 CGRP陽性細胞中のVR1陽性細胞の割合

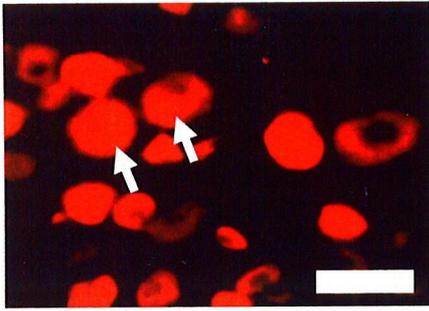
3) 三叉神経節 NF200 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の変化

VR1 陽性細胞は、前述のごとく赤色の蛍光で標識される細胞として容易に同定された (図 9 a,d)。NF200 陽性細胞は緑色の蛍光で標識される細胞として容易に同定された (図 9 b,e)。NF200 陽性細胞のほとんどは中径以上の細胞で認められた。

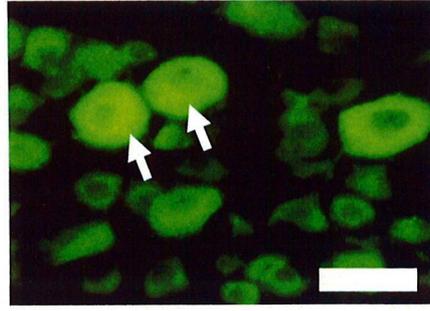
VR1 と NF200 の二重陽性細胞は、蛍光フィルタを交換することにより、赤色と緑色の蛍光で標識される細胞として認められ、両群ともに、主に中径細胞で認められた (図 9 c,f)。

NF200 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合は、対照群および実験群で、それぞれ $12.2 \pm 2.2\%$ 、 $24.0 \pm 5.9\%$ であった (図 10)。対照群と比較し、実験群における NF200 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合が有意に大きい値を示した。

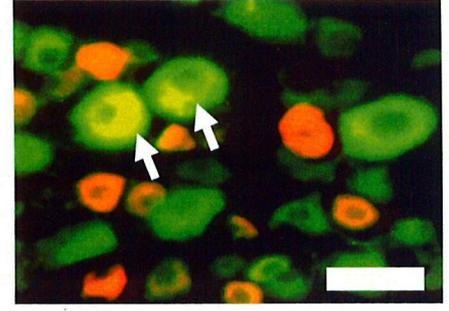
対照群



a. VR1陽性細胞

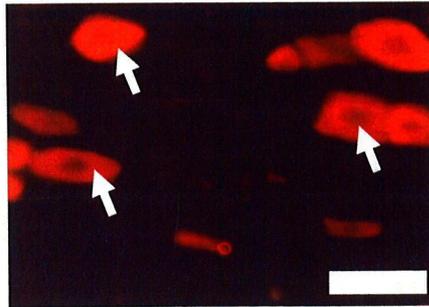


b. NF200陽性細胞

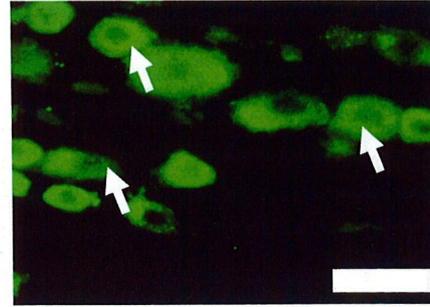


c. 二重陽性細胞

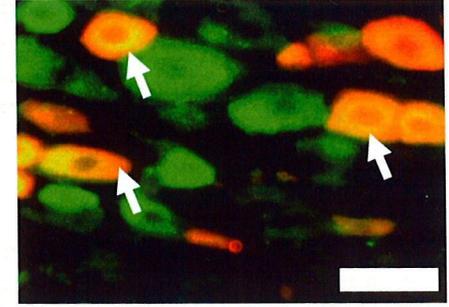
実験群



d. VR1陽性細胞



e. NF200陽性細胞



f. 二重陽性細胞

図 9 VR1とNF200の二重免疫染色像

Scale bar = 50 μ m
矢印は二重陽性細胞を示す。

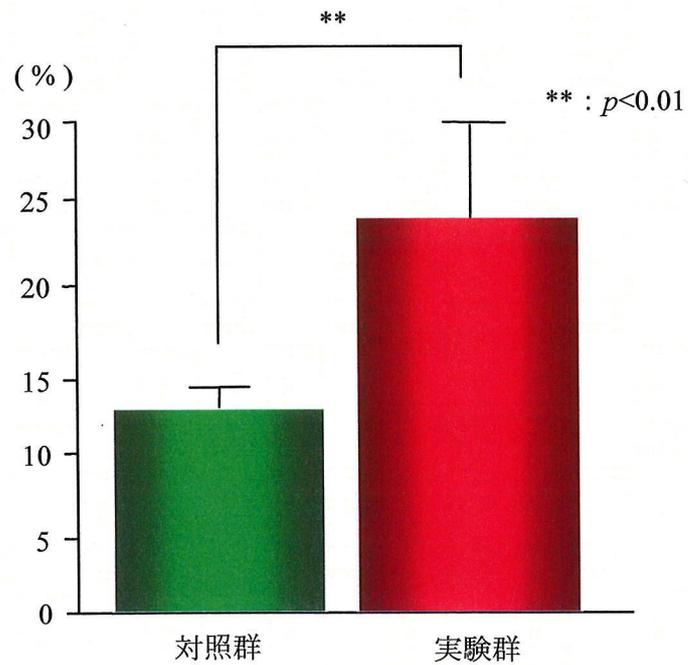


図 10 NF200陽性細胞中のVR1陽性細胞の割合

II. 咀嚼による炎症性疼痛抑制効果

1. 実験動物の行動

実験期間を通して体重の著しい減少はなく（図 11）、餌の性状の差異による摂食不良もほとんど認められなかった。また、液状餌の摂取に伴い前歯のわずかな挺出が確認されたものの、これに伴うストレス性の異常行動ならびに咬合の変化は実験期間中認められなかった。

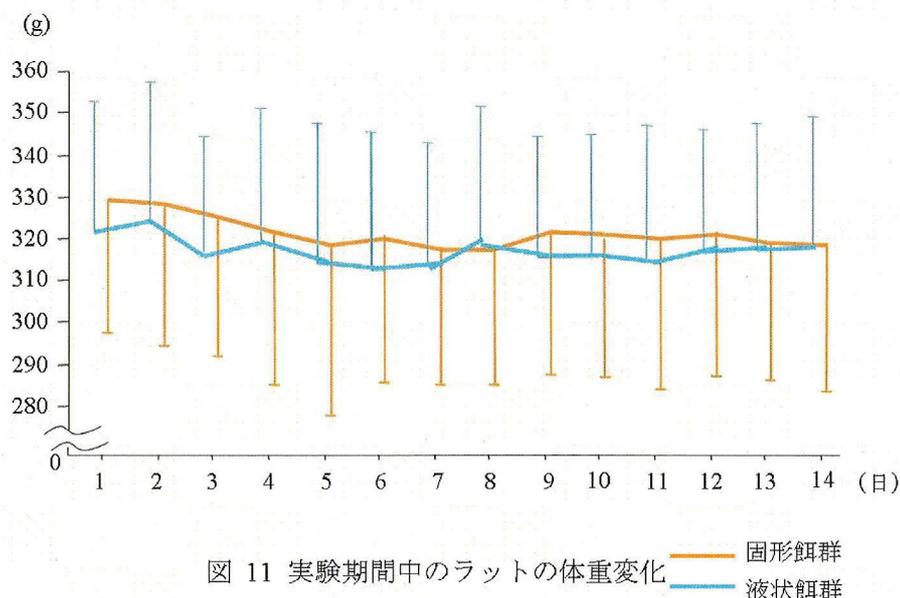


図 11 実験期間中のラットの体重変化

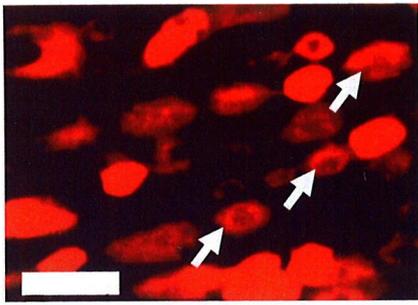
2. 炎症性疼痛への咀嚼の影響

1) 三叉神経節 CGRP 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の変化

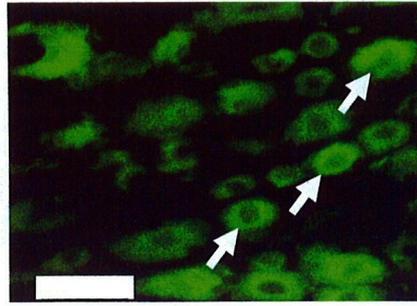
三叉神経節において、VR1 陽性細胞は赤色の蛍光で標識された細胞として（図 12 a,d）、CGRP 陽性細胞は緑色の蛍光で標識された細胞として同定された（図 12 b,e）。また、VR1 と CGRP の二重陽性細胞は、蛍光フィルタを交換することにより、赤色と緑色の蛍光で標識される細胞として同定された（図 12 c,f）。

CGRP 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合は、固形餌群および液状餌群で、それぞれ $25.4 \pm 3.3\%$ 、 $41.7 \pm 11.1\%$ であった（図 13）。固形餌群と比較して、液状餌群では、CGRP 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合は有意に大きい値を示した。

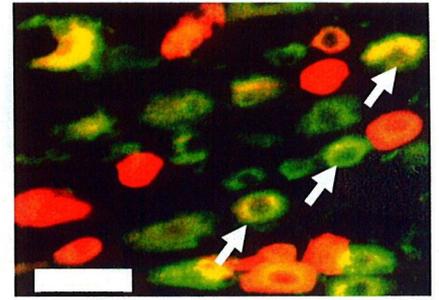
固形餌群



a. VR1陽性細胞

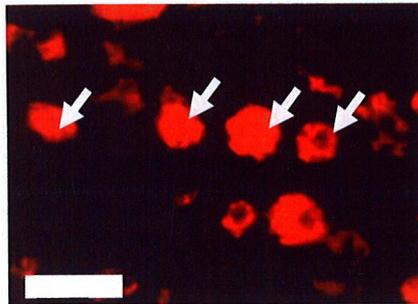


b. CGRP陽性細胞

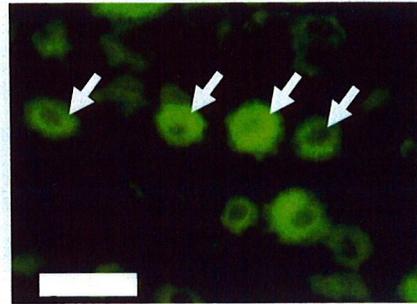


c. 二重陽性細胞

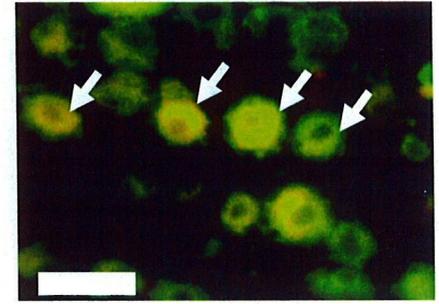
液状餌群



d. VR1陽性細胞



e. CGRP陽性細胞



f. 二重陽性細胞

図 12 VR1とCGRPの二重免疫染色像 Scale bar = 50 μ m
矢印は二重陽性細胞を示す。

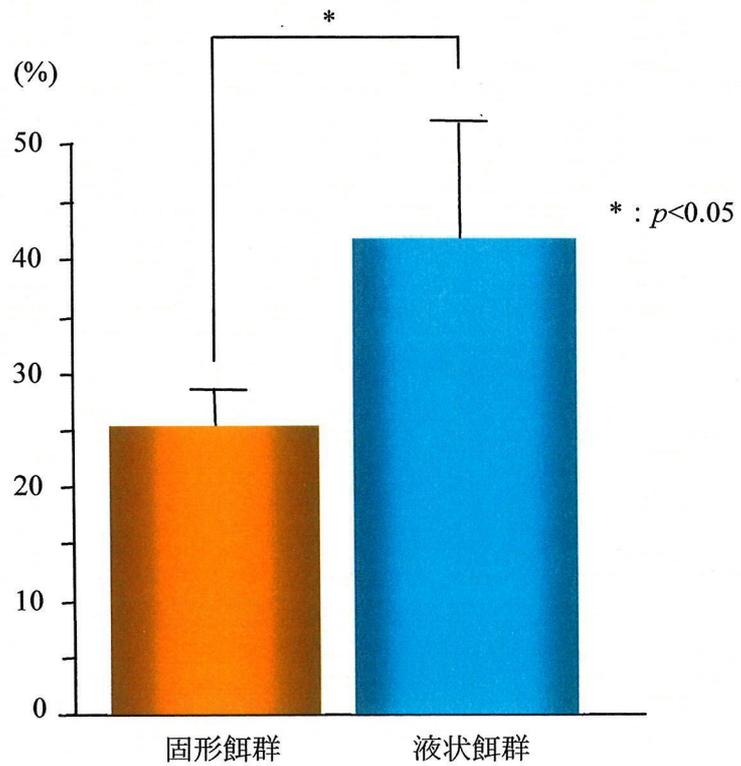


図 13 CGRP陽性細胞中のVR1陽性細胞の割合

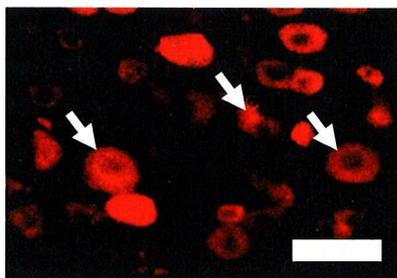
2) 三叉神経節 NF200 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の変化

三叉神経節において、VR1 陽性細胞は赤色の蛍光で標識された細胞として同定された (図 14 a,d)。また、NF200 陽性細胞は緑色の蛍光で標識された細胞として同定された (図 14 b,e)。

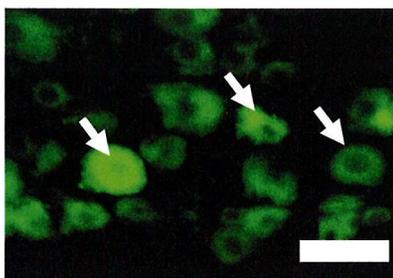
VR1 と NF200 の二重陽性細胞は、蛍光フィルタを交換することにより、赤色と緑色の蛍光で標識される細胞として同定された (図 14 c,f)。

NF200 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合は、固形餌群および液状餌群でそれぞれ $24.8 \pm 2.2\%$ 、 $31.1 \pm 9.4\%$ であり、液状餌群でわずかに大きい値を示したが、両群間の有意差は認められなかった (図 15)。

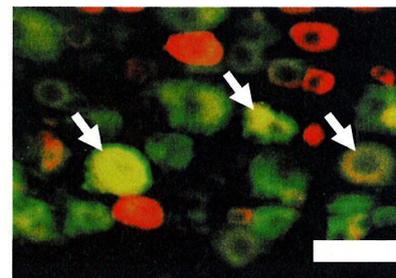
固形餌群



a. VR1陽性細胞

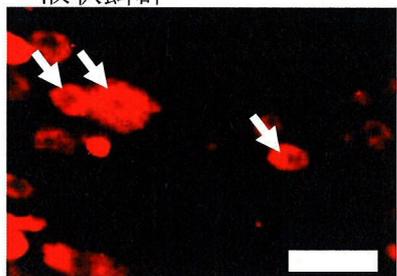


b. NF200陽性細胞

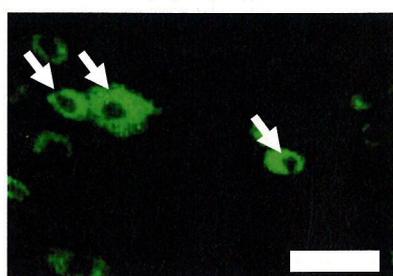


c. 二重陽性細胞

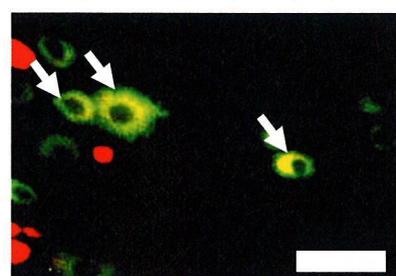
液状餌群



d. VR1陽性細胞



e. NF200陽性細胞



f. 二重陽性細胞

図 14 VR1とNF200の二重免疫染色像

Scale bar = 50 μ m

矢印は二重陽性細胞を示す。

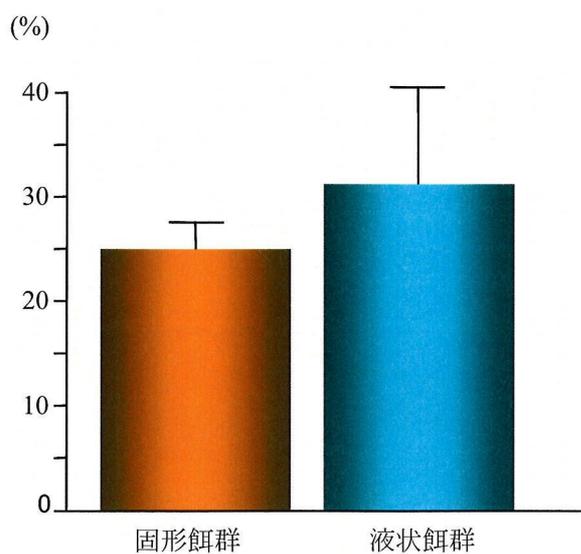


図 15 NF200陽性細胞中のVR1陽性細胞の割合

3) 三叉神経脊髄路核尾側核内の c-Fos 陽性細胞数の変化

三叉神経脊髄路核尾側核内の c-Fos 陽性細胞は、黒褐色の直径約 10 μm の円形または楕円形の核を有する細胞として同定され、両群の実験側の浅層および深層での発現が認められた (図 16)。

三叉神経脊髄路核尾側核浅層 (I-II層) の c-Fos 陽性細胞数は、固形餌群および液状餌群でそれぞれ 61.2 ± 40.3 、 167.4 ± 83.6 であった (図 17)。一方、同部深層 (III-V層) の c-Fos 陽性細胞数は、固形餌群および液状餌群でそれぞれ 19.8 ± 13.0 、 19.3 ± 11.9 であった (図 18)。固形餌群と比較し、液状餌群では、三叉神経脊髄路核尾側核浅層の c-Fos 陽性細胞数は有意に大きい値を示したが (図 17)、同部深層の c-Fos 陽性細胞数についての有意差は認められなかった (図 18)。

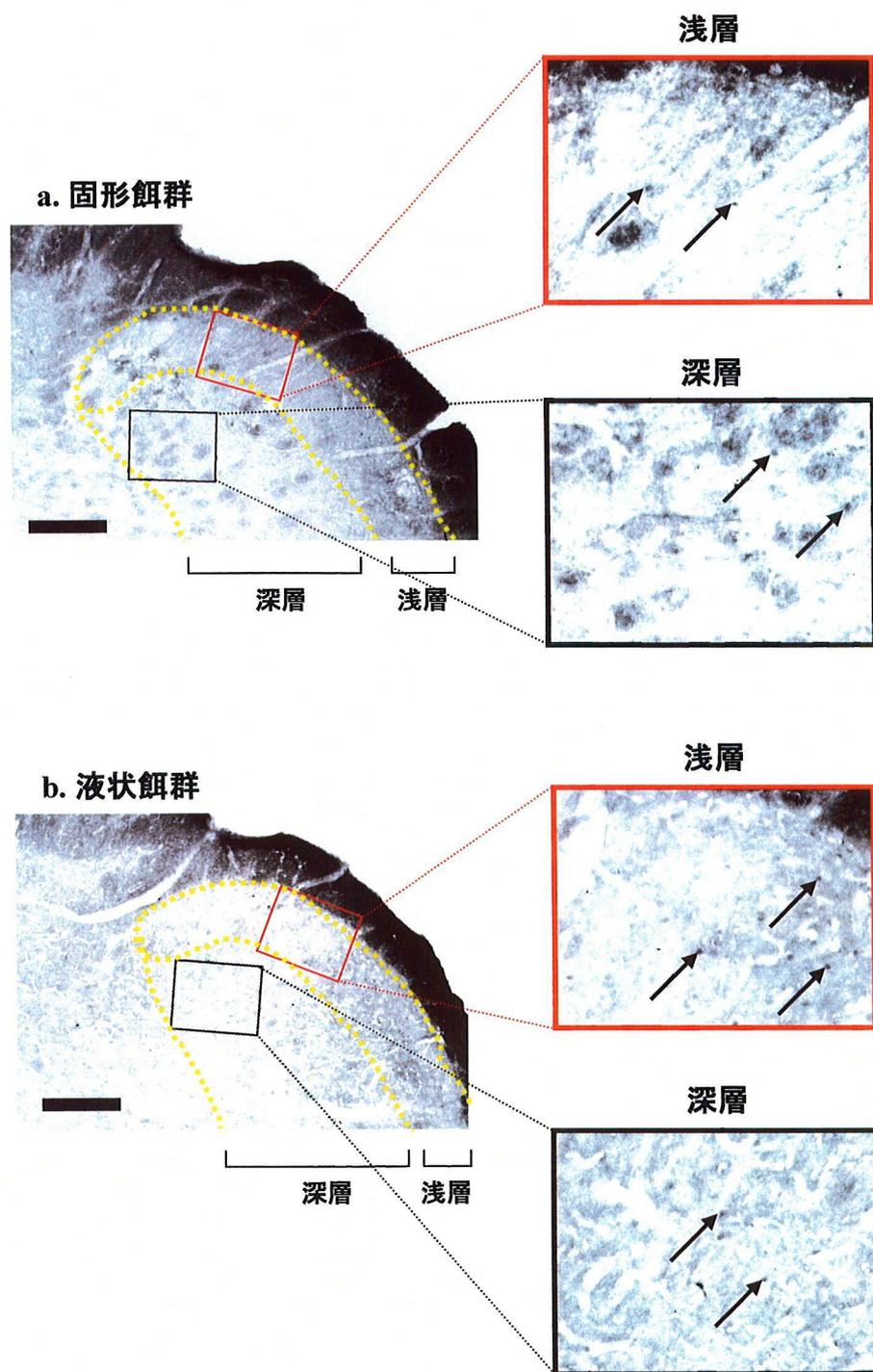


図16 三叉神経脊髄路核尾側核におけるc-Fos染色像とその強拡大像
 黄色の点線で囲む範囲は三叉神経脊髄路核尾側核を、矢印はc-Fos陽性細胞を示す。
 Scale bar = 200 μ m

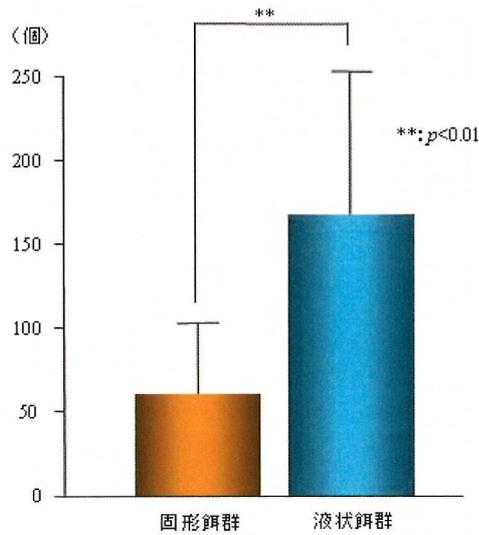


図 17 三叉神経脊髄路核尾側核浅層のc-Fos陽性細胞数

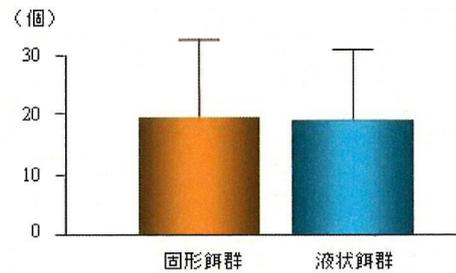


図 18 三叉神経脊髄路核尾側核深層のc-Fos陽性細胞数

Ⅲ. 咀嚼による疼痛抑制機構におけるセロトニンの役割

1. 実験動物の行動

実験期間中、CFA 注射の前後で体重の著明な変化は認められず (図 19)、餌の性状の差異による摂食不良は認められなかった。

実験動物への 5-HT₃ 受容体作動薬の静脈内投与による嘔吐、喘鳴などの異常行動は認められなかった。また、5-HT₃ 受容体拮抗薬の静脈内投与による影響も認められなかった。

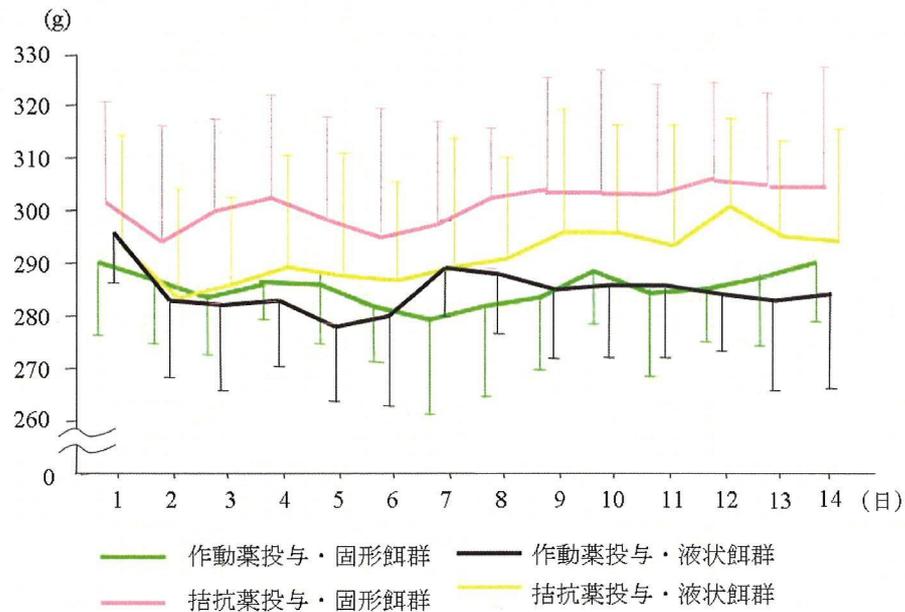


図 19 ラットの体重の変化

2. 咀嚼による疼痛抑制機構におけるセロトニンの役割

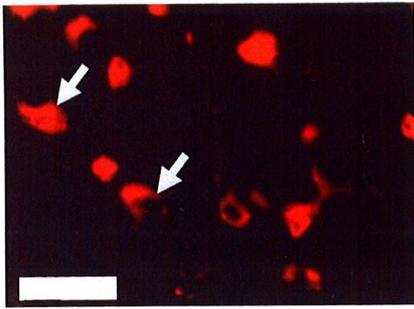
1) 三叉神経節 CGRP 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の変化

三叉神経節において、VR1 陽性細胞は赤色の蛍光で標識された細胞として (図 20 a,d,g,j)、CGRP 陽性細胞は緑色の蛍光で標識された細胞として (図 20 b,e,h,k)、VR1 と CGRP の二重陽性細胞は、蛍光フィルタを交換することにより、赤色と緑色の蛍光で標識される細胞として同定された (図 20 c,f,i,l)。

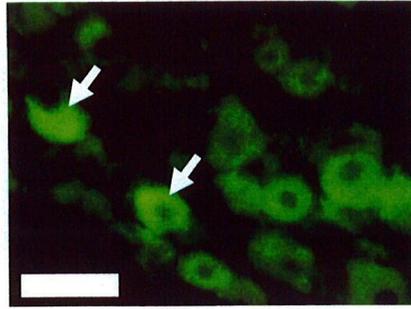
CGRP 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合は、作動薬投与固形餌群および拮抗薬投与固形餌群、作動薬投与液状餌群、拮抗薬投与液状餌群でそれぞれ $39.0 \pm 5.2\%$ 、 $28.6 \pm 8.6\%$ 、 $38.5 \pm 6.0\%$ 、 $36.4 \pm 3.2\%$ であった (図 21)。

CGRP 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合は、固形餌群において、作動薬投与により有意に大きい値を示したが、拮抗薬投与により僅かな増加を認めるものの有意差は認められなかった。一方、液状餌群においては、作動薬投与と拮抗薬投与による VR1 陽性細胞の割合に減少傾向は認められるものの、有意差は認められなかった。

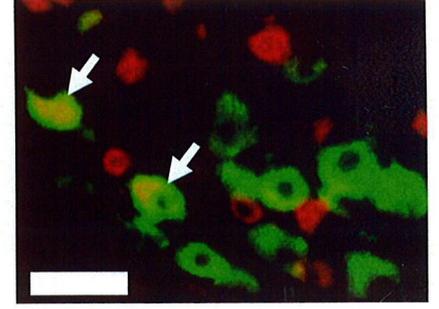
作動薬+固形餌群



a. VR1陽性細胞

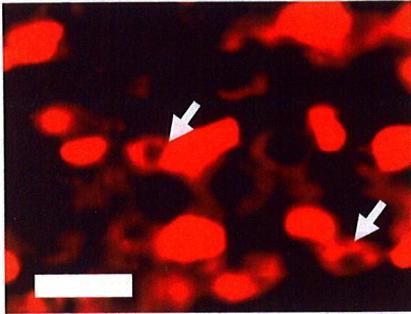


b. CGRP陽性細胞

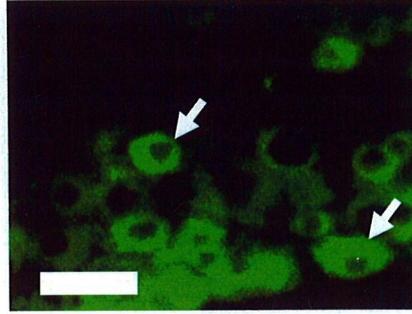


c. 二重陽性細胞

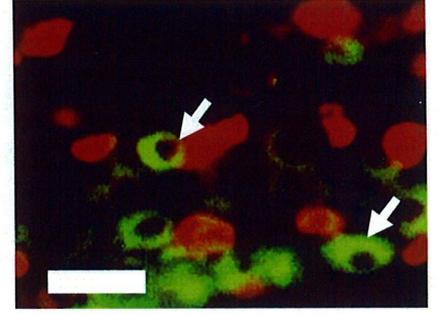
拮抗薬+固形餌群



d. VR1陽性細胞

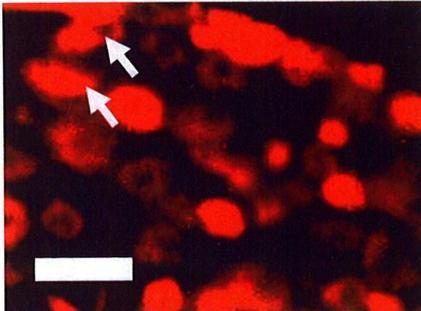


e. CGRP陽性細胞

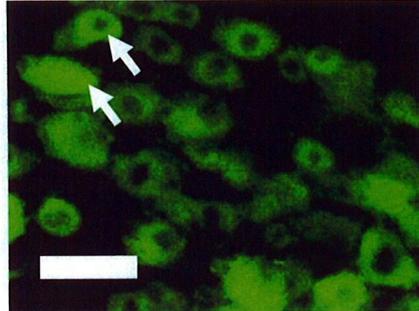


f. 二重陽性細胞

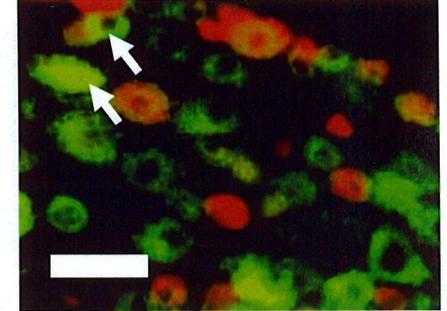
作動薬+液状餌群



g. VR1陽性細胞

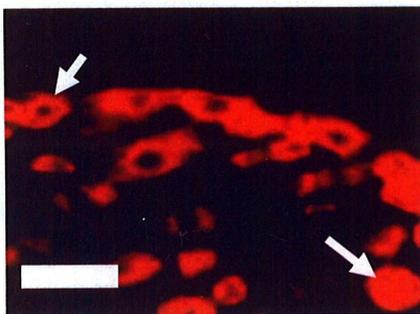


h. CGRP陽性細胞

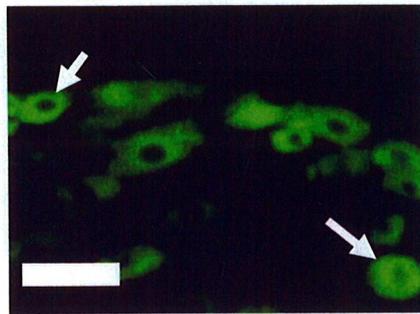


i. 二重陽性細胞

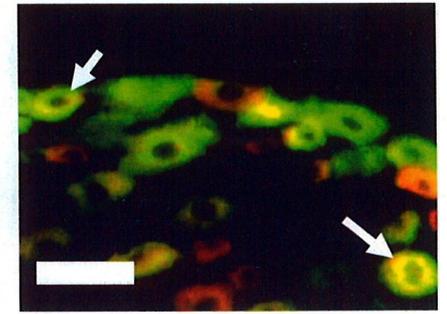
拮抗薬+液状餌群



j. VR1陽性細胞



k. CGRP陽性細胞



l. 二重陽性細胞

図 20 VR1とCGRPの二重免疫染色像

Scale bar = 50 μ m
矢印は二重陽性細胞を示す。

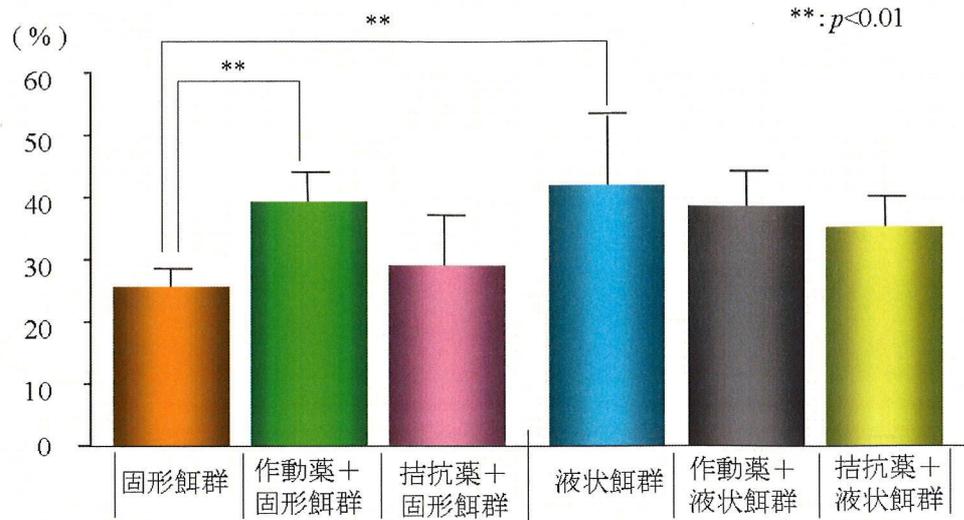


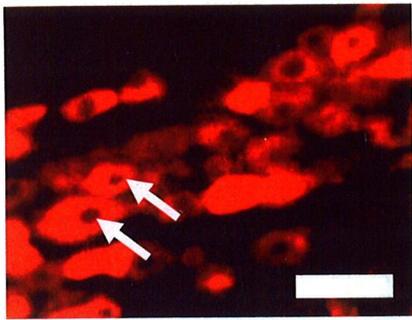
図 21 CGRP陽性細胞中のVR1陽性細胞の割合

2) 三叉神経節 NF200 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の変化

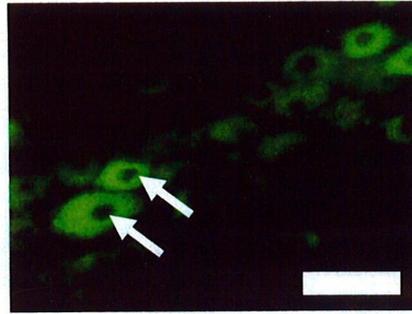
三叉神経節において、VR1 陽性細胞は赤色の蛍光で標識された細胞として (図 22 a,d,g,j)、NF200 陽性細胞は緑色の蛍光で標識された細胞として (図 22 b,e,h,k)、VR1 と NF200 の二重陽性細胞は、蛍光フィルタを交換することにより、赤色と緑色の蛍光で標識される細胞として同定された (図 22 c,f,i,l)。

NF200 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合は、作動薬投与固形餌群、拮抗薬投与固形餌、作動薬投与液状餌群、拮抗薬投与液状餌群でそれぞれ $29.9 \pm 13.7\%$ 、 $31.3 \pm 3.8\%$ 、 $35.9 \pm 9.0\%$ 、 $32.9 \pm 11.1\%$ であった (図 23)。固形餌群および液状餌群のいずれにおいても作動薬あるいは拮抗薬の投与による影響は小さかった。

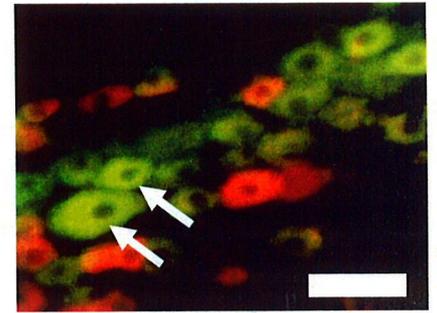
作動薬+固形餌群



a. VR1陽性細胞

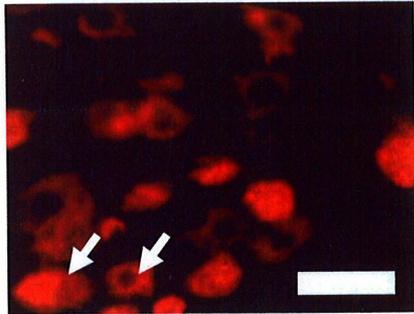


b. NF200陽性細胞

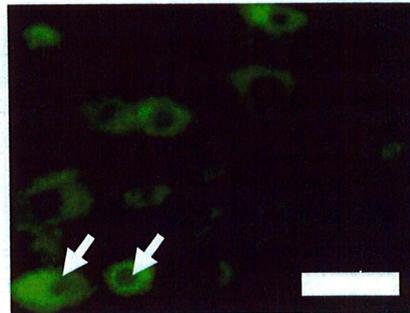


c. 二重陽性細胞

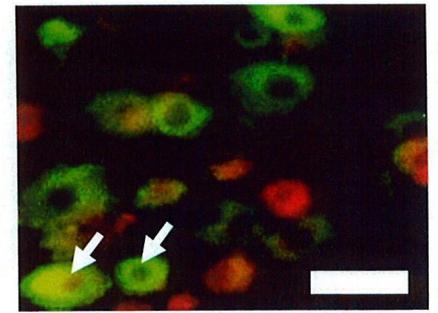
拮抗薬+固形餌群



d. VR1陽性細胞

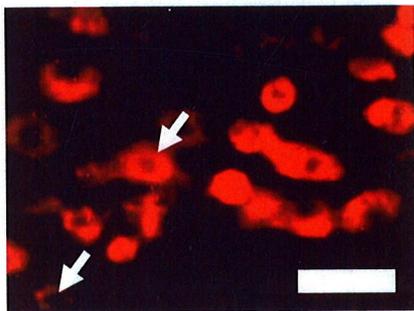


e. NF200陽性細胞

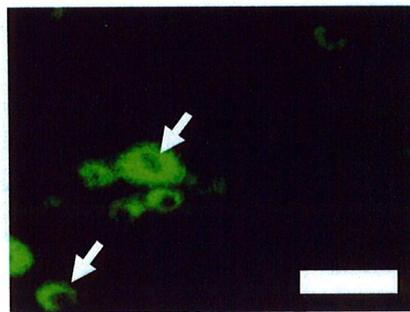


f. 二重陽性細胞

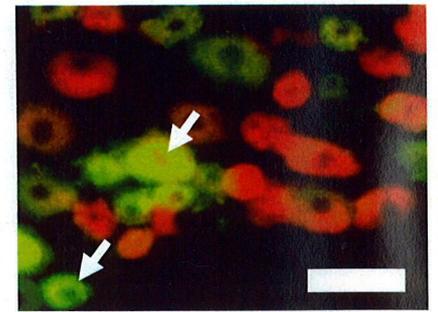
作動薬+液状餌群



g. VR1陽性細胞

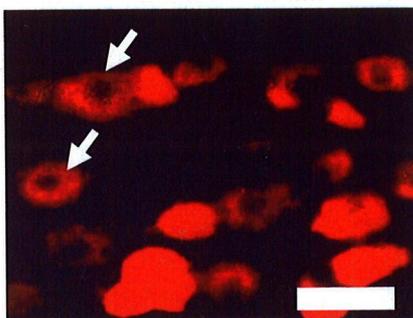


h. NF200陽性細胞

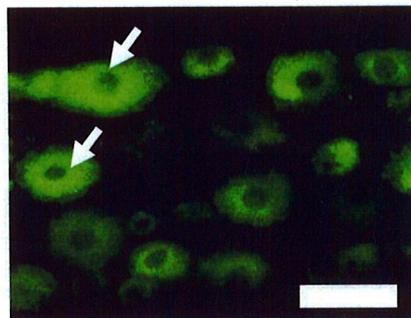


i. 二重陽性細胞

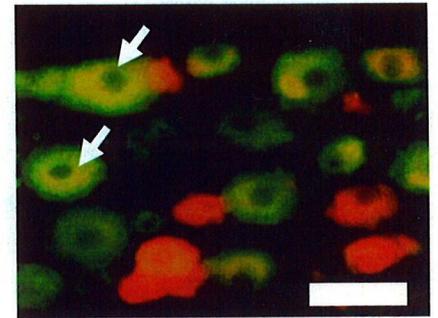
拮抗薬+液状餌群



j. VR1陽性細胞



k. NF200陽性細胞



l. 二重陽性細胞

図 22 VR1とNF200の二重免疫染色像

Scale bar = 50 μ m
矢印は二重陽性細胞を示す。

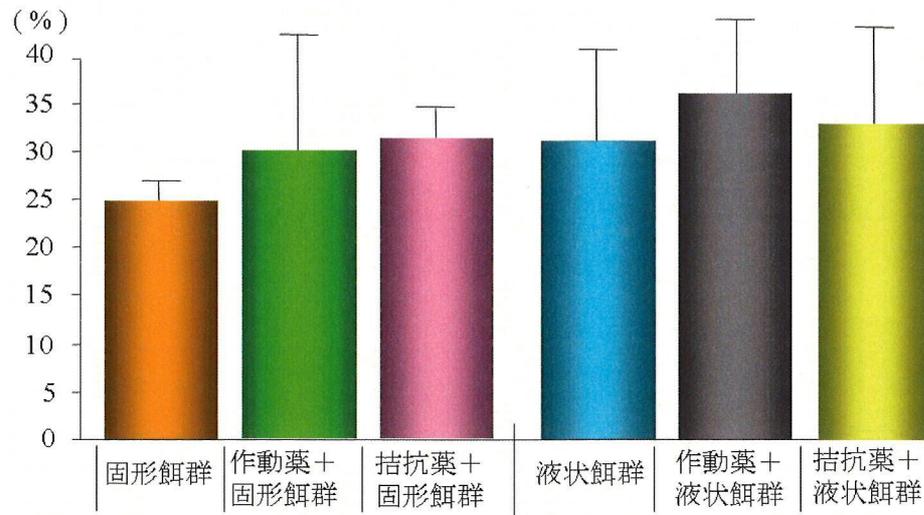


図 23 NF200陽性細胞中のVR1陽性細胞の割合

3) 三叉神経脊髄路核尾側核内の c-Fos 陽性細胞数の変化

三叉神経脊髄路核尾側核内の c-Fos 陽性細胞は、黒褐色の直径約 10 μm の円形または楕円形の核を有する細胞として同定され、全実験群の実験側の浅層および深層での発現が認められた (図 24)。

三叉神経脊髄路核尾側核浅層の c-Fos 陽性細胞数は、作動薬投与固形餌群および拮抗薬投与固形餌群、作動薬投与液状餌群、拮抗薬投与液状餌群でそれぞれ 75.8 ± 37.1 、 78.6 ± 35.3 、 105.3 ± 25.8 、 48.2 ± 7.7 を示した (図 25)。

同部深層の c-Fos 陽性細胞数は、作動薬投与固形餌群、拮抗薬投与固形餌群、作動薬投与液状餌群、拮抗薬投与液状餌群でそれぞれ 32.4 ± 36.0 、 43.2 ± 23.8 、 36.8 ± 30.0 、 28.0 ± 12.1 であった (図 26)。

同部浅層の c-Fos 陽性細胞数は、固形餌群において、作動薬投与、拮抗薬投与により増加傾向を示したものの、有意差は認められなかった。また、液状餌群においては、作動薬投与により僅かな減少を示すのみで有意な差は認められなかったのに対して、拮抗薬投与により有意な減少を示した (図 25)。なお、三叉神経脊髄路核尾側核深層の c-Fos 陽性細胞数については、投薬による影響は小さかった (図 26)。

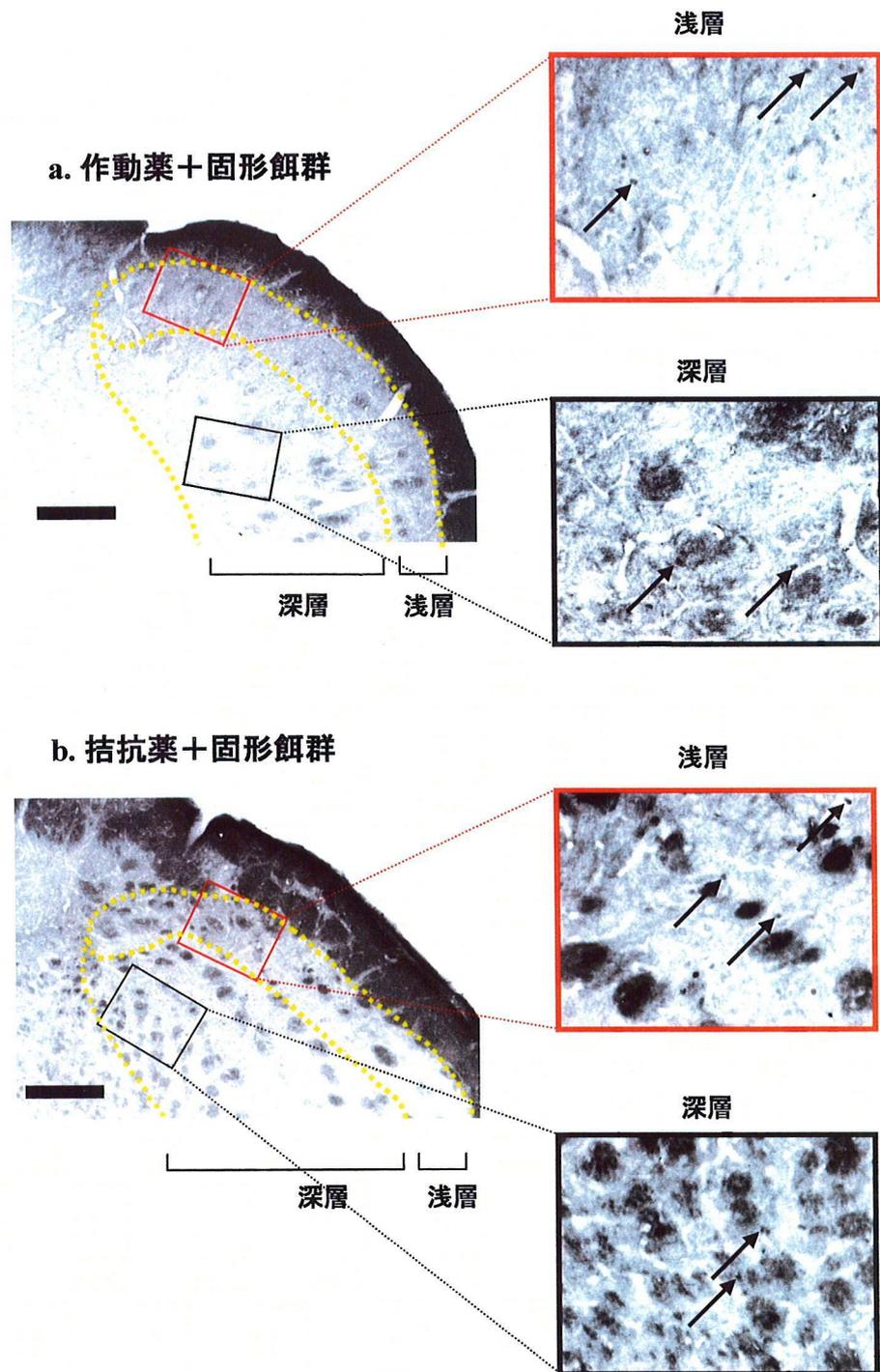


図24 三叉神経脊髄路核尾側核におけるc-Fos染色像とその強拡大像
 黄色の点線で囲む範囲は三叉神経脊髄路核尾側核を、矢印はc-Fos陽性細胞を示す。Scale bar = 200 μ m

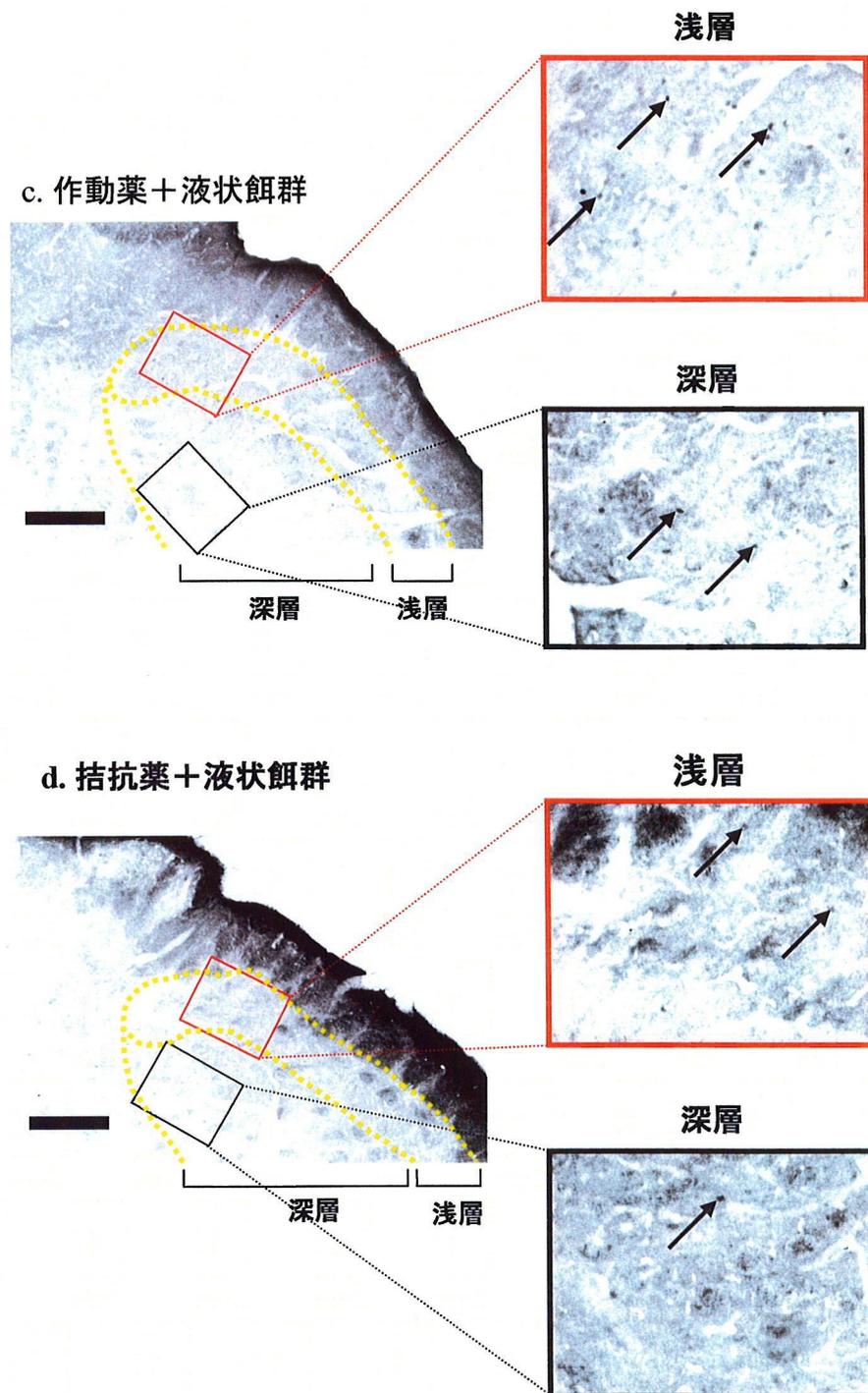


図24 三叉神経脊髄路核尾側核におけるc-Fos染色像とその強拡大像
 黄色の点線で囲む範囲は三叉神経脊髄路核尾側核を、矢印はc-Fos陽性細胞を示す。
 Scale bar = 200 μ m

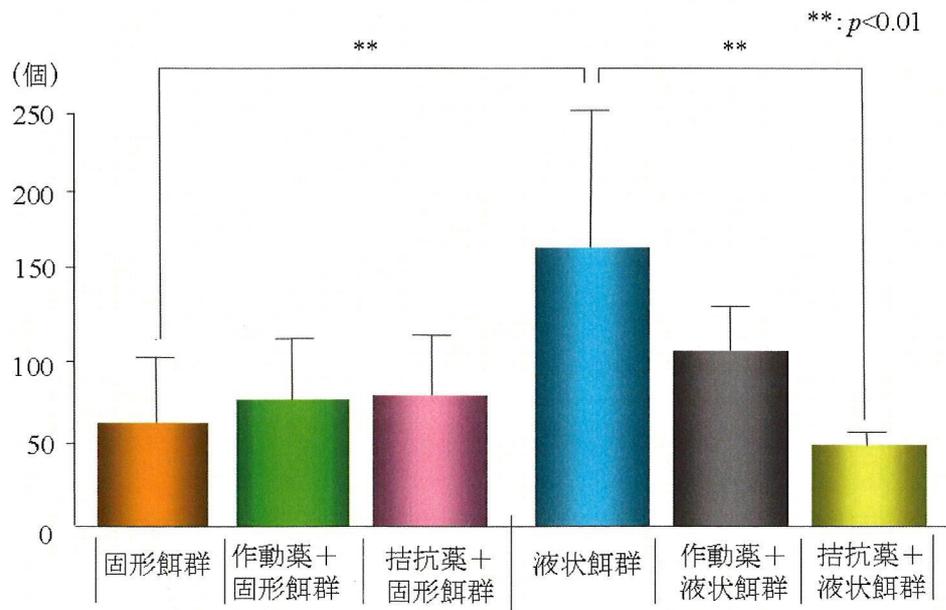


図 25 三叉神経脊髄路核尾側核浅層のc-Fos陽性細胞数

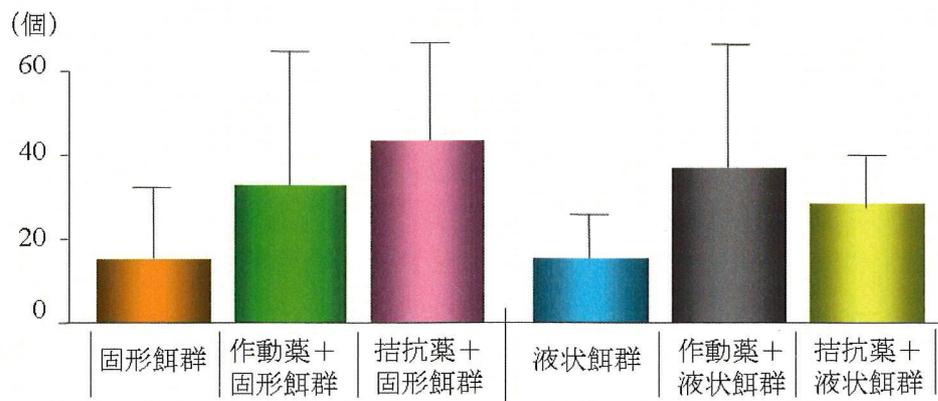


図 26 三叉神経脊髄路核尾側核深層のc-Fos陽性細胞数

考察

1. 実験方法について

1) 侵害刺激受容モデルとしての実験的炎症の誘発について

本実験では、CFA 皮下注射による末梢炎症を侵害受容モデルとして用い、顎顔面領域の疼痛伝達について VR1 を指標として検索した。

慢性炎症を引き起こすために、CFA 50 μ l をラット右側オトガイ部に皮下注射した。皮下への CFA 注射により、皮下組織の自由神経終末や血液中を遊走している T 細胞が刺激を受け、炎症を誘発することが可能である。(Schoenberg and Moore, 1961)。また、粘液状の CFA は組織内に長期間貯留し、組織に持続的な刺激を加えるため、慢性炎症を発症させることができる (Munoz and Sewell, 1984; Stein et al., 1988; Johnston et al., 1991)。炎症時には、ラットが四肢で炎症部位の表皮を擦ることが知られており (Rabin et al., 1985)、本研究でもその行動は認められたものの、予備実験で行った注射部位のヘマトキシリン・エオジン染色所見では、顔面擦過による新たな創傷は認められなかったため、実験動物に対し CFA 以外の侵害刺激は加わらなかったと考えられる。CFA の注入量については、ラット顔面領域皮下組織に CFA を注射し、10 時間後までの三叉神経脊髄路核尾側亜核の c-Fos 陽性細胞の発現変化に基づいて侵害刺激を定量化した研究 (Zhou et al., 1999) を参考に 50 μ l とした。

CFA を注射した右側オトガイ部には、右側オトガイ神経のみならず左側オトガイ神経にも分布しているが (Greene, 1935)、オトガイ神経は受容した刺激を主として同側の三叉神経節および三叉神経脊髄路核尾側核に伝達することから (平沢 1982)、本研究では、CFA 注射を行ったのと同側の三叉神経節および三叉神経脊髄路核尾側核についてのみ免疫組織化学的検索を行った。

2) CFA 皮下注射による VR1 の発現について

炎症性刺激による VR1 の発現変化として、ラット後脚へのカラゲニン注入による急性炎症が、炎症発生 2 時間後に後根神経節および脊髄後角での VR1 mRNA の増加を起し、増加した mRNA は中枢側および末梢側の神経終末に軸索内輸送されること (Tohda et al., 2001)、CFA 誘導性慢性炎症では炎症発生 2 日後に炎症部位および脊髄後角の VR1 免疫陽性線維が増加することが知られている (Carlton and Coggeshall, 2001; Luo et al., 2004)。これらの現象は、炎症性刺激受容数時間以内に VR1 mRNA を発現する一次ニューロン細胞体数が増加し、mRNA が神経終末へ輸送されること、さらに炎症発生数日間で mRNA が蛋白質に翻訳され、細胞体および神経終末で VR1 が増加していることを示唆する (Di Marzo et al., 2002)。刺激受容から VR1 発現増加に至る細胞内の反応は未だ不明である。しかし、一次ニューロン細胞体における VR1 陽性細胞数の増加は、VR1 が受容する刺激を伝達するニューロンの増加を示すため (Carlton and Coggeshall, 2001; Luo et al., 2004)、VR1 が受容した刺激の伝達亢進を意味する。したがって、炎症により三叉神経節中の VR1 発現ニューロンが増加し、炎症性刺激の伝達が亢進したと考えられる。よって、受容した炎症性刺激の大きさを定量化する上で VR1 は有用な指標と考えられるため、本研究で用いることとした。

3) 標識二重蛍光抗体法について

本研究の目的を達成するには、VR1、CGRP、NF200 などの細胞質に発現する蛋白質を明らかにする必要があった。蛍光抗体法には、暗視野観察のため非標識部分をはじめとして形態の全体像を把握し難いこと、紫外線照射により蛍光標識の褪色が起るため標本の長期保存が困難であること、などの短所があるものの、反応強度が実際の抗原量を反映しやすく、二重染色像が理解しやすいという大きな長所がある (渡辺と

中根、2002)。一方、酵素抗体法では一種類の色素がもう一方の色素より発色性が弱い場合、二種類の陽性反応の確認が困難になる可能性が高い。そこで、励起光の波長範囲が重複しない Cy3 と FITC の二種の蛍光色素を用いることにより、同一切片上で重複して分布する二種の抗原を観察できるという利点を持つ標識二重蛍光抗体法を選択した。

4) 神経線維細胞の標識としての CGRP および NF200 について

免疫組織化学的検索により、成熟ラット後脚に分布する CGRP 免疫陽性線維の 91 % が無髄線維であること (Ishida-Yamamoto and Senba, 1990) から、神経ペプチドの一種である CGRP は無髄線維の標識として頻用されている (Beland and Fitzgerald, 2001; Amaya et al., 2003)。正常な成熟ラットでは、後根神経節神経細胞の約 50 % (Ju et al., 1987)、三叉神経節神経細胞では約 30-40 % の神経細胞に CGRP 免疫陽性が認められている (Lee et al., 1985; Tsai et al., 1988; Alvarez et al., 1991)。また、ラット後脚の炎症により、炎症発生 2 日後の後根神経節では CGRP 陽性細胞の割合が 24 % から 32 % に増加したという報告がある (Hanesch et al., 1993)。以上の所見より、本研究では VR1 受容刺激を伝達する C 線維の変化の指標として、CGRP 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合を用いた。

一方、NF は神経細胞に発現する中間径フィラメントであり、特に今回用いた NF200 は有髄線維の軸索に多量に含まれるため (Reynolds et al., 1993; Lee and Cleveland, 1996)、有髄線維の標識として用いられている (Beland and Fitzgerald, 2001; Ma et al., 2001)。成熟ラットにおける免疫組織化学的検索では後根神経節神経細胞の 40 % (Ma, 2002) に NF200 免疫陽性が認められ、三叉神経節でも NF200 陽性細胞の存在が明らかにされている (Ruan and Burnstock, 2003) ことから、本研究でも NF200 を有髄線維である A 線

維の標識として使用した。また、CGRP と異なり、炎症による NF200 陽性細胞数の変化は生じない (Beland and Fitzgerald, 2001)。

5) 固形餌と液状餌による咀嚼性刺激の相違について

飼育中にラットが顎を動かして咬むことのできる餌以外の物体は、床敷きにしたウッドチップ、ケージの金網、給水管のみであるが、実験期間中にこれらを咬んでいる行動はほとんど認められなかった。

咀嚼する食物の硬さにより受容刺激が変化しやすい感覚受容器として、歯根膜の圧受容器や咀嚼筋群中の筋紡錘が挙げられる。硬い食物の咀嚼では、軟らかい食物の咀嚼よりも咬合力が大きく (Hardtmann et al., 1989)、歯根膜の感受する圧力は高くなる。また、軟らかい食物を咀嚼するよりも、硬い食物を咀嚼する方が、咀嚼頻度が高く、咀嚼筋の収縮時間が長い (Karkazis and Kossioni, 1997)、ヒト幼児では咀嚼筋の筋活動が増加する (Takada et al., 1994)、などの報告がなされている。本研究で用いた液状餌は粘性のある液体状態であったため、その摂取は咀嚼を行わなくても嚥下のみでも可能であることから、固形餌の摂取と比較し、咀嚼性刺激の大きさが小さいことは明白である。なお、ラット後脚の炎症性疼痛に対する咀嚼性刺激の影響を調べた Ogawa らの研究 (2003) を参考に、固形餌摂取期間は炎症誘導後 3 日間とした。

咀嚼が骨格系に与える影響として、成長期のウサギに軟らかい食物を与えると、固い食物の場合と比較し、下顎頭軟骨へ分化した間葉細胞および成熟した間葉細胞の割合が低く、成熟した軟骨の形成が抑制されていたこと (Kantomaa et al., 1994)、正常なウサギと比較して下顎窩や下顎隆起の形態が異なり、オトガイが後方に位置していたこと (Tuominen et al., 1993) などの報告があり、咀嚼による負荷が顎顔面部の骨・軟骨の成長・発育に重要であることが示唆されている。

中枢神経系への作用として、咀嚼による脳への血流量の増加 (Momose et al., 1997)、ラット大脳の中隔側座核でのドーパミン放出量の増加 (Bradberry et al., 1991) などが報告されている。また、このような中枢神経系への作用が、全身の健康に影響していることが示唆されている。例えば、咀嚼により活性化された三叉神経中脳路核のヒスタミンニューロンが、視床下部のヒスタミンニューロンを介して摂食量を抑制すること (Sakata et al., 2003)、軟らかい餌を与えられたラットでは体脂肪率が増加すること (Oka et al., 2003) などに基づいて、咀嚼が脂質代謝の促進作用を発揮することが示唆されている。さらに、軟らかい餌で飼育した幼弱ラットおよびマウスでは、刺激に対する回避行動が減少することや (川村, 1989)、離乳後に軟らかい餌で飼育したマウスでは成熟後に大脳皮質のシナプス形成抑制および空間記憶獲得能力の低下が認められること (Yamamoto and Hirayama, 2001) が報告されている。以上の報告より、咀嚼性刺激が中枢神経系の活性化、記憶、全身の代謝などにも影響することが示唆されている。

6) 神経細胞活性化の指標としての c-Fos について

本研究では、咀嚼性刺激が二次ニューロンである三叉神経脊髄路核尾側核への疼痛伝達に与える影響について、同部における c-Fos を指標として検索した。c-Fos は、末梢神経での侵害刺激受容に反応して、一次ニューロンの上位神経細胞において発現する c-fos 遺伝子の核内蛋白である。また、ストレスなどの非侵害性刺激を与えた場合にも、中枢神経系内での c-Fos の発現が確認されている。このことから、c-Fos の組織学的検索は神経系の活性状態の指標として有用で、かつ神経伝達経路と機能の関連を解明する手法としても有効と考えられている (Bullitt, 1990)。CFA のラット後脚への皮下注射 4 日後の脊髄後角や、顔面部への皮下注射 72 時間後の三叉神経脊髄路核尾側核で c-Fos 陽性細胞数の増加が認められたことから (Ma and Woolf 1996; Zhou et al. 1999)、

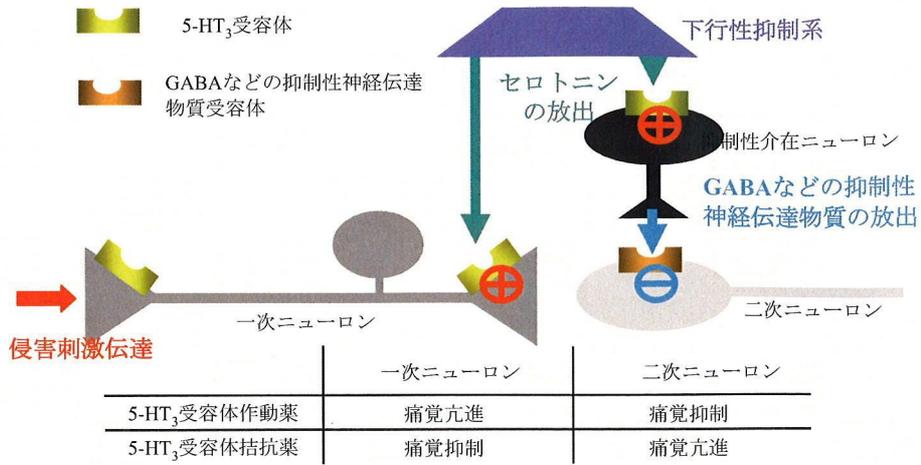
慢性炎症発生 2-3 日後での疼痛伝達路の検索にも c-Fos は有効であると考えられた。

7) セロトニン受容体作動薬および拮抗薬について

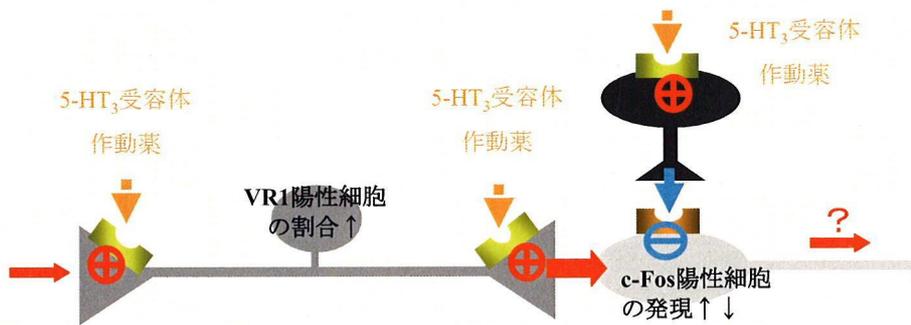
咀嚼運動・吸啜運動が疼痛抑制効果を有することが、ヒトを対象とした主観的疼痛についてのアンケート調査と行動生理学的観察による臨床試験 (Blass and Watt, 1999; Lewkoski et al., 2003)、およびラット脊髄後角の c-Fos 発現を調べた実験 (Ogawa et al., 2003) により報告されている。このような疼痛抑制効果の発現機構としてオピオイド神経系の関与が示唆されているが (Ogawa et al., 2003)、未だ不明な点が多い。また、咀嚼運動によりセロトニン神経系が賦活されることから (Jacobs et al., 2002) セロトニン神経系の関与も考えられているが、咀嚼性刺激による疼痛抑制効果とセロトニン神経系との関係を検討した報告は見られない。そこで、本研究では咀嚼性刺激による疼痛抑制効果に対するセロトニンの影響を解明するため、セロトニン受容体作動薬および拮抗薬を用いた。

セロトニン受容体は7グループ、14 サブタイプに分類される (Shen et al., 1993; Adham et al., 1993)。これらのセロトニン受容体のうち、5-HT₃ 受容体が三叉神経脊髄路核尾側核を介した反射運動に関与することから (Seo et al., 2002)、本研究では 5-HT₃ 受容体を介したセロトニンの作用を検索することとした。5-HT₃ 受容体は中枢神経系および末梢神経系に広く分布しており (Fozard, 1984; Kilpatrick et al., 1987; Morales et al., 1998)、疼痛伝達に関与する部位としては、一次ニューロンの末梢側終末および脊髄後角の浅層に投射する無髄一次求心線維の中核側終末 (Morales et al., 1998; Hamon et al., 1989) が報告されている。さらに、5-HT₃ 受容体作動薬の脊髄内投与が疼痛抑制効果を示すことから、抑制性介在ニューロンにおいても 5-HT₃ 受容体の存在が認められている (Paul et al., 2001)。このため、5-HT₃ 受容体作動薬の一種である 2-Methyl-5-tryptamine

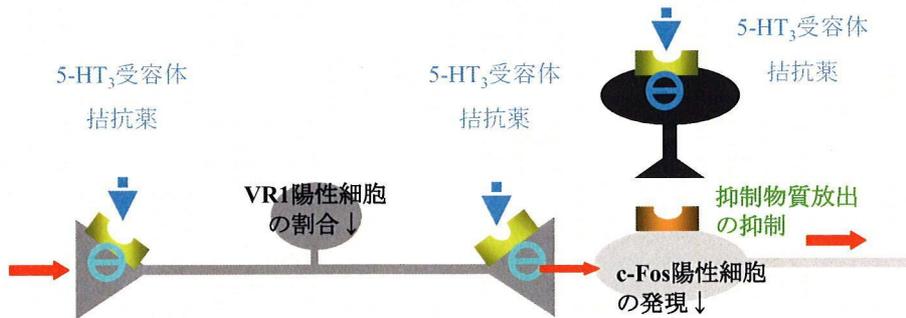
(2-Me-5HT) は末梢部位への皮下投与では疼痛受容の増大を引き起こす (Giordano, 1991; Meller et al., 1991; Moser, 1995) のに対し、脊髄腔内投与では疼痛抑制を引き起こす (Xu et al., 1994)。しかし、2-Me-5-HT 自体は発痛作用を持たない (Giordano, 1991)。また、5-HT₃ 受容体拮抗薬の一種である 3-tropanyl-indole-3-carboxylate hydrochloride (tropisetron®) は逆に末梢部位への皮下投与が疼痛抑制作用を発揮する (Giordano and Sacks, 1997; 図 27)。



a. 5-HT₃受容体の局在と作用



b. 5-HT₃受容体作動薬の影響



c. 5-HT₃受容体拮抗薬の影響

図 27 一次ニューロンと抑制性介在ニューロンにおける5-HT₃受容体の発現と、二次ニューロンへの作用
寺山(2003)より引用

本研究では、炎症直後の疼痛伝達作用の解明を目的とし、2-Me-5HT および tropisetron が脳血液関門を通過することから (Wolf, 2000; Glennon et al., 1992)、薬物の静脈内投与

を選択した。投与量については、2-Me-5HT に関して Xu ら (1994)、Doi-Saika ら (1997) Sasaki ら (2001) を、tropisetron に関しては、Fisher と Bedner (1992)、Huanf ら (1999)、Okamoto ら (2004) の研究を参考に決定した。

また、炎症直後の疼痛伝達への作用を調べるため、薬物の投与は炎症誘発直前の一回とした。2-Me-5-HT 静脈内投与による投与による副作用として、嘔吐 (Freeman et al., 1992)、消化管運動の亢進 (Blackshaw and Grundy, 1993; Desai et al., 1994)、徐脈・低血圧 (Eglen et al., 1995) などが挙げられるが、本実験期間中に、嘔吐および呼吸障害による喘鳴は認められなかった。5-HT₃ 受容体拮抗薬の健常動物への行動および生理学的機能への著明な影響は現在報告されておらず (Wolf, 2000)、臨床的には制吐剤として使用されている。

2. 炎症による三叉神経節 VR1 陽性細胞の発現変化について

オトガイ部の炎症により患側一次神経細胞体である右側三叉神経節での VR1 陽性細胞数の増加が明らかとなった。この結果から、顎顔面領域の炎症による三叉神経節での VR1 発現の増加が生じたこと、そして炎症による末梢側終末の VR1 の閾値の低下 (Chuang et al., 2001; Tominaga et al., 2001; Sugiura et al., 2002) が考えられることから、疼痛伝達が亢進していることが示唆された。

また、C 線維細胞および A 線維細胞中の VR1 陽性細胞の割合も、炎症により増加した。VR1 は主に C 線維に分布し (Tominaga et al., 1998)、A δ 線維に発現しているものは少数である (Ma et al., 2001)。炎症による VR1 陽性細胞の変化については、ラット後脚の CFA 誘導性炎症により後根神経節における C 線維細胞および A 線維細胞中の VR1 陽性細胞の増加 (Amaya et al., 2003) が報告されている。本研究において、炎症により三叉神経節の VR1 陽性細胞が C 線維細胞のみならず A δ 線維細胞でも増加したこ

とは、炎症により VR1 受容性刺激の伝達経路が変化したことを示唆する (Amaya et al., 2003)。さらに、C 線維が局在性の不明瞭な鈍い痛みを伝達するのに対し、A δ 線維が局在性の明瞭な鋭い痛みを伝達することから、炎症による VR1 陽性 A δ 線維細胞の増加は、臨床的にはより局在性の明瞭な鋭い痛みに変化したことを示唆する。このような伝達経路の変化が、炎症性熱知覚過敏などの慢性疼痛の遷延に至る機序の一端を説明しうるものと考えられた。

3. 三叉神経節 VR1 陽性細胞および三叉神経脊髄路核尾側核内の c-Fos 陽性細胞の発現と咀嚼の影響について

固形餌群では、液状餌群と比較して三叉神経節 CGRP 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合、およびその投射領域である三叉神経脊髄路核尾側核浅層の c-Fos 陽性細胞数がかつとも有意に小さい値を示した。一方、三叉神経節 NF200 陽性細胞中の VR1 陽性細胞の割合と三叉神経脊髄路核尾側核深層の c-Fos 陽性細胞数は咀嚼により変化を示さなかった。

ラット後脚炎症による脊髄後角での c-Fos 陽性細胞の発現が、固形餌の咀嚼により抑制され、さらに同研究においてオピオイド受容体阻害薬の投与により c-Fos 陽性細胞数の減少が抑制されたことから、咀嚼性刺激による疼痛抑制効果にオピオイド神経系が関与していることが報告されている (Ogawa et al., 2003)。また、咀嚼運動により縫線核のセロトニン作動性神経が賦活されることから (Jacobs et al., 2002)、セロトニン神経系の関与も示唆されている (Lewkoski et al. 2003)。しかし、咀嚼性求心性刺激による疼痛抑制機序については不明である。本研究結果より、咀嚼性刺激が一次ニューロン C 線維細胞での VR1 陽性細胞の発現を抑制するものの、A 線維細胞での VR1 陽性細胞の発現には影響しないことが示された。このような C 線維細胞での VR1 陽性細胞の発

現抑制は、C線維ニューロンがVR1を介して受容する炎症性刺激の伝達を抑制し、上位中枢へと伝達される興奮を減少させると考えられる (Amaya et al., 2003)。

三叉神経節線維の投射領域である三叉神経脊髄路核尾側核は解剖学的に表層から順にI-V層に分類される。一次神経の投射領域としては、疼痛伝達を行うC線維が第II層へ、有髄A δ 線維が第I層および第IV-V層へ、触覚伝達を行う有髄A β 線維が深層である第III-V層にそれぞれ投射している。

ラット後脚へのカプサイシンの投与が、脊髄後角のc-Fos陽性細胞を増加させることから (Strassman and Vos, 1993)、カプサイシンによりVR1が受容した刺激は二次ニューロンの興奮を起こし、c-Fosの発現を誘導することが明らかである。脊髄後角と三叉神経脊髄路核の解剖学的類似性から、本実験でも炎症が、一次ニューロン投射部位である三叉神経脊髄路核尾側核でのc-Fos陽性細胞の増加を起こすと考えられた。本研究の結果より、固形餌による咀嚼性刺激の増加は三叉神経脊髄路核尾側核浅層においても興奮を受容する二次ニューロンの増加を抑制するため、同部のc-Fos陽性細胞数が液状餌群と比較して小さい値を示したことが考えられた。また、三叉神経脊髄路核尾側核浅層は一次ニューロンC線維の投射領域であることから、c-Fos発現の抑制は三叉神経節C線維細胞におけるVR1陽性細胞の割合の増加抑制と関連した変化であると考えられる。一方、三叉神経脊髄路核尾側核深層には、A δ 線維は投射しているがC線維が投射しないことから、一次ニューロンでのVR1陽性細胞の発現抑制が少なかつたためにc-Fos陽性細胞数が変化しなかったと考えられる。

以上より、固形餌摂取による咀嚼性刺激の増加が、炎症による一次ニューロンC線維のVR1陽性細胞の増加を抑制し、一次線維が受容する侵害刺激の伝達を抑制することが示唆された。また、液状餌群ではC線維の投射領域を含む三叉神経脊髄路核尾側核浅層において神経活性の指標であるc-Fos陽性を示す細胞が増加することから、咀嚼

性刺激の減少により二次ニューロンでも侵害刺激の伝達が亢進していることが示された。

4. 炎症による三叉神経節 VR1 陽性細胞の発現に対する咀嚼と 5-HT₃ 受容体作動薬および拮抗薬の影響について

5-HT₃ 受容体はカプサイシン感受性一次ニューロン C 線維での免疫陽性が認められていることから (Kidd et al., 1993)、5-HT₃ 受容体が VR1 陽性細胞にも存在し、ニューロンの興奮伝達および VR1 の発現に影響を及ぼしている可能性が高い。本研究の結果でも、5-HT₃ 受容体作動薬投与により固形餌群における三叉神経節 C 線維細胞の VR1 陽性細胞の割合が増加した。これは、5-HT₃ 受容体を備えた VR1 陽性細胞が、5-HT₃ 受容体作動薬により興奮伝達を促進したため (Morales et al., 1998) と考えられる。また、固形餌群に対する 5-HT₃ 受容体拮抗薬の投与による変化がほとんど認められなかったことから、固形餌群の三叉神経節 C 線維細胞では炎症による 5-HT₃ 受容体の作動の影響は小さかったと考えられる。

液状餌群の三叉神経節 C 線維細胞中の VR1 陽性細胞の割合は、5-HT₃ 受容体作動薬の投与により大きな変化を示さなかった。一方で、液状餌群への 5-HT₃ 受容体拮抗薬投与が僅かな抑制を示したことから、液状餌群の一次ニューロン C 線維では既に一部の 5-HT₃ 受容体がセロトニンを受容し、興奮を促進していた可能性が示唆される。

三叉神経節の A 線維細胞での VR1 陽性細胞では、固形餌群および液状餌群のいずれにおいても、作動薬または拮抗薬の投与によるわずかな増加傾向を認めるのみであった。この結果は、炎症による有髄 A 線維細胞中の VR1 陽性細胞に対する咀嚼性刺激の影響がほとんど認められなかった結果とも一致している。また、カプサイシン非感受性の A δ 線維で 5-HT₃ 受容体免疫陽性が認められていることから (Zeitz et al., 2002)、

VR1 陽性 Aδ 線維における 5-HT₃ 受容体の作用は小さいと考えられる。

5. 三叉神経脊髄路核尾側核内の c-Fos 陽性細胞の発現に対する咀嚼と 5-HT₃ 受容体作動薬および拮抗薬投与の影響について

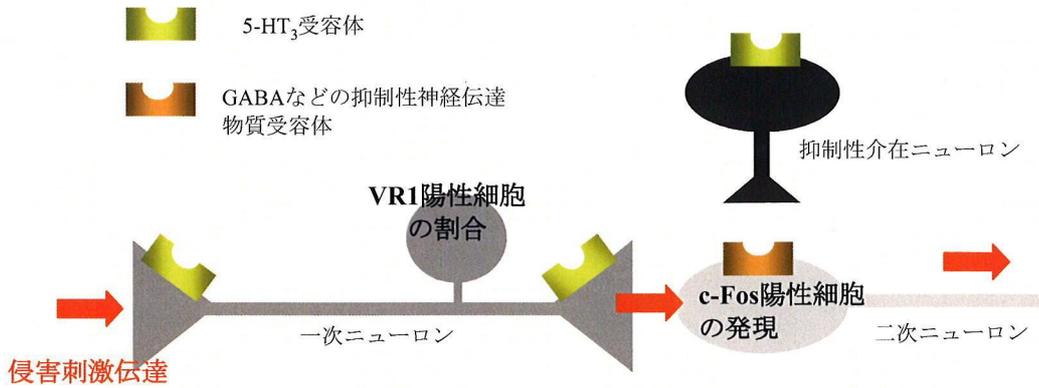
脊髄後角および三叉神経脊髄路核尾側核において 5-HT₃ 受容体の存在が確認されており (Gehlert et al., 1991; Kidd et al., 1993)、一次ニューロン C 線維の中枢側終末に 5-HT₃ 受容体が存在することが報告されている (Morales et al., 1998)。しかし、二次ニューロン細胞体における 5-HT₃ 受容体の局在は認められていない。また、薬理的に二次ニューロンに投射する抑制性介在ニューロンの細胞体における 5-HT₃ 受容体の存在が明らかにされているが (Paul et al., 2001)、介在ニューロンの細胞体の位置が明確でないことから、5-HT₃ 受容体作動薬および拮抗薬投与が三叉神経脊髄路核尾側核の c-Fos 陽性細胞発現に対して直接作用するか否かについては不明であった。

固形餌群では、作動薬と拮抗薬のいずれの投与によっても三叉神経脊髄路核尾側核浅層の c-Fos 陽性細胞数はほとんど変化を示さなかった。作動薬投与固形餌群の三叉神経節では VR1 陽性 C 線維細胞の割合が著しい増加を示したことから、三叉神経脊髄路核尾側核浅層での c-Fos 陽性細胞は、一次ニューロンから二次ニューロンへの興奮促進が抑制されたことを示唆する。その理由として、二次ニューロンに投射する 5-HT₃ 受容体を有する抑制性介在ニューロンによる興奮抑制効果が考えられる (Paul et al., 2001)。一方、拮抗薬投与固形餌群の三叉神経節における VR1 陽性 C 線維細胞の割合は変化しなかったことから、5-HT₃ 受容体拮抗薬の投与は、一次ニューロンから二次ニューロンへの伝達にほとんど影響を及ぼさなかったものと考えられる。以上のことから、固形餌群の三叉神経脊髄路核尾側核浅層では 5-HT₃ 受容体作動による興奮の促進および抑制のいずれの影響も小さいことが示唆された。

液状餌群では 5-HT₃ 受容体作動薬の投与により、三叉神経脊髄路核尾側核浅層の c-Fos 陽性細胞数はわずかな減少を示した。これは拮抗薬投与液状餌群の三叉神経節の VR1 陽性 C 線維細胞の割合がほぼ変化を示さなかったことを併せ考えると抑制傾向とも考えられる。しかし、固形餌群への 5-HT₃ 受容体作動薬投与による抑制と比較し、液状餌群での抑制効果は小さいことから、液状餌群が抑制効果を打ち消す興奮促進作用を有している可能性が考えられる。一方、液状餌群への拮抗薬の投与により、三叉神経脊髄路核尾側核浅層での c-Fos 陽性細胞数は著しい減少を示した。拮抗薬投与液状餌群の三叉神経節の VR1 陽性 C 線維がわずかな減少を示したが、三叉神経脊髄路核尾側核浅層の c-Fos 陽性細胞数の減少は大きく、ほぼ固形餌群と同程度の値を示したことから、拮抗薬投与が二次ニューロンに対し強い抑制効果を与えたことが示された。よって、液状餌群の三叉神経脊髄路核尾側核浅層では 5-HT₃ 受容体作動による興奮の促進が起きていたと考えられる。

以上より、固形餌群の三叉神経脊髄路核尾側核浅層ニューロンが 5-HT₃ 受容体による抑制性介在ニューロンの影響を示さない一方、液状餌群では 5-HT₃ 受容体作動による三叉神経脊髄路核尾側核浅層ニューロンの興奮促進が示唆された。このことは同時に、液状餌摂取による咀嚼性刺激の減少が 5-HT₃ 受容体作動による二次ニューロンの興奮促進を起こしている可能性を示唆する。

また、三叉神経脊髄路核尾側核深層の c-Fos 陽性細胞数は、三叉神経節 VR1 陽性 A 線維細胞の割合と同様に、固形餌群、液状餌群ともに作動薬または拮抗薬の投与によるわずかな増加傾向を示したのみであった。このことは、一次ニューロン A 線維での 5-HT₃ 受容体の存在は確認されているが (Zeitz et al., 2002)、一次ニューロンから二次ニューロンへの伝達に対して、5-HT₃ 受容体を介したセロトニンの影響をほとんど受けなかったためと考えられる (図 28)。



a. 固形餌群の三叉神経節C線維ニューロン・三叉神経脊髄路核尾側核浅層ニューロンにおける5-HT₃受容体の作動状態

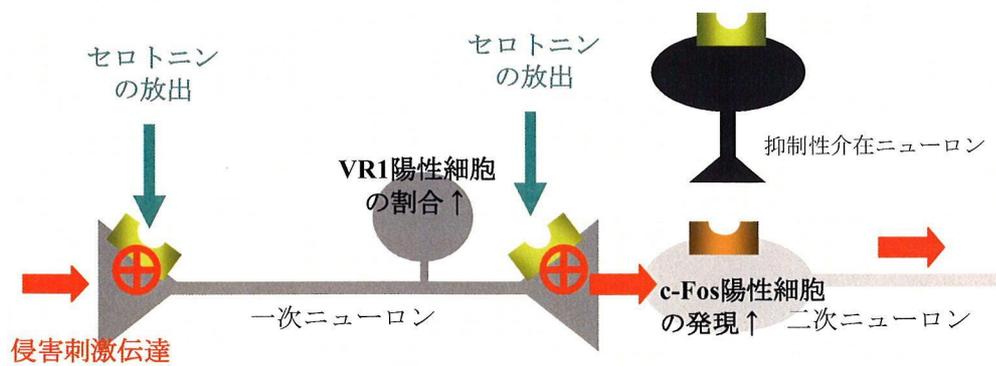


b. 固形餌群の三叉神経節C線維ニューロン・三叉神経脊髄路核尾側核浅層ニューロンにおける5-HT₃受容体作動薬の影響

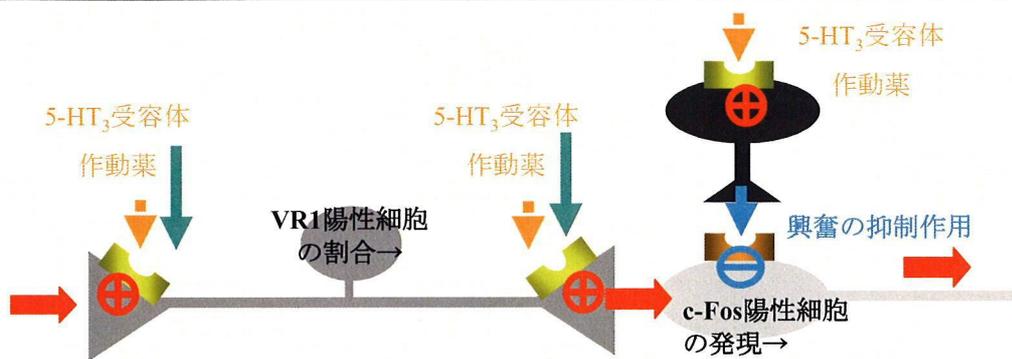


c. 固形餌群の三叉神経節C線維ニューロン・三叉神経脊髄路核尾側核浅層ニューロンにおける5-HT₃受容体拮抗薬の影響

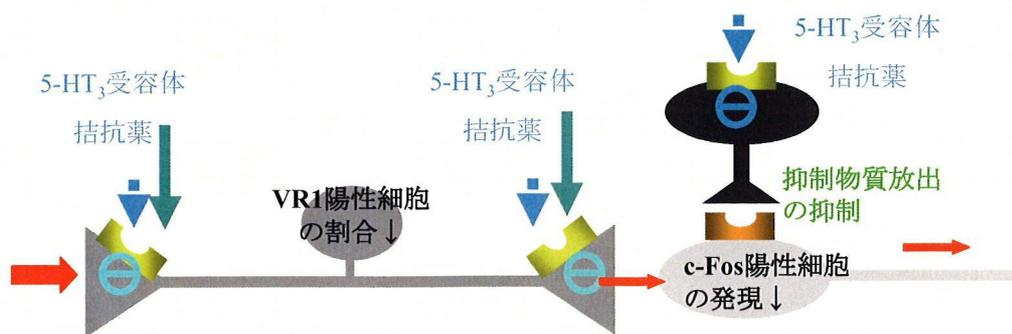
図28 固形餌群三叉神経節一次C線維ニューロンと三叉神経脊髄路核尾側核浅層ニューロンにおける5-HT₃受容体作動薬および拮抗薬の影響の模式図
寺山(2003)より引用



d. 液状餌群の三叉神経節C線維ニューロン・三叉神経脊髄路核尾側核浅層ニューロンにおける5-HT₃受容体の作動状態



e. 液状餌群の三叉神経節C線維ニューロン・三叉神経脊髄路核尾側核浅層ニューロンにおける5-HT₃受容体作動薬の影響



f. 液状餌群の三叉神経節C線維ニューロン・三叉神経脊髄路核尾側核浅層ニューロンにおける5-HT₃受容体拮抗薬の影響

図28 液状餌群三叉神経節一次C線維ニューロンと三叉神経脊髄路核尾側核浅層ニューロンにおける5-HT₃受容体作動薬および拮抗薬の影響の模式図
寺山(2003)より引用

結論

顎顔面領域の炎症発生時の三叉神経節 VR1 陽性細胞の発現と VR1 陽性細胞が有する神経線維の種類を検索し、咀嚼性刺激による疼痛抑制機構とこれに対するセロトニンの役割について検討した。その結果、以下の所見が明らかとなった。

1. 顎顔面領域の炎症により、三叉神経節 VR1 陽性細胞数は有意に増加した。また、CGRP 陽性細胞および NF200 陽性細胞における VR1 陽性細胞の割合がいずれも有意に増加した。
2. 咀嚼性刺激により、炎症性侵害刺激に対する三叉神経節 C 線維細胞中の VR1 陽性細胞の割合と、三叉神経脊髄路核尾側核浅層の c-Fos 陽性細胞の発現が抑制されたが、三叉神経節 A 線維細胞中の VR1 陽性細胞の割合および三叉神経脊髄路核尾側核深層の c-Fos 陽性細胞数に対する影響は認められなかった。
3. 固形餌群への 5-HT₃ 受容体作動薬投与により、三叉神経節 C 線維細胞中の VR1 陽性細胞の発現が有意に増加したが、三叉神経脊髄路核尾側核浅層の c-Fos 陽性細胞数は変化しなかった。一方、固形餌群への 5-HT₃ 受容体拮抗薬投与は、三叉神経節 C 線維細胞中の VR1 陽性細胞の割合、および三叉神経脊髄路核尾側核浅層の c-Fos 陽性細胞数にほとんど影響を与えなかった。
4. 液状餌群への 5-HT₃ 受容体作動薬投与により、三叉神経節 C 線維細胞中の VR1 細胞の割合、および三叉神経脊髄路核尾側核浅層の c-Fos 陽性細胞数はわずかに減少した。一方、5-HT₃ 受容体拮抗薬投与により、三叉神経節 C 線維細胞中の VR1 陽性細胞の発現がわずかに減少し、三叉神経脊髄路核尾側核浅層の c-Fos 陽性細

胞数は有意に減少した。

5. 固形餌群および液状餌群への 5-HT₃ 受容体作動薬または拮抗薬の投与は、三叉神経節 A 線維細胞中の VR1 陽性細胞の割合および、三叉神経脊髄路核尾側核深層の c-Fos 陽性細胞数に僅かに増加させたのみであり、大きな影響を示さなかった。

以上の結果から、顎顔面領域の炎症により、三叉神経節の C 線維および A 線維での VR1 陽性細胞が増加し、炎症性刺激受容が増大することが示された。また、咀嚼性刺激は炎症による三叉神経節 VR1 陽性細胞の増加に対して、C 線維における VR1 陽性細胞増加の抑制、および三叉神経脊髄路核尾側核浅層に伝達される興奮を抑制することが示唆された。さらに、咀嚼性刺激が 5-HT₃ 受容体を介したセロトニンによる三叉神経節 VR1 陽性 C 線維細胞の VR1 発現抑制と、三叉神経脊髄路核尾側核への疼痛伝達の抑制作用を惹起している可能性が示された。このような咀嚼性刺激による疼痛抑制作用の機序としては一次ニューロン終末の 5-HT₃ 受容体の機能抑制が考えられた。

参考文献

- Adham N, Kao HT, Schechter LE, et al. (1993). Cloning of another human serotonin receptor (5-HT_{1F}): a fifth 5-HT₁ receptor subtype coupled to the inhibition of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 408-12.
- Alvarez FJ, Morris HR, Priestley JV (1991). Sub-populations of smaller diameter trigeminal primary afferent neurons defined by expression of calcitonin gene-related peptide and the cell surface oligosaccharide recognized by monoclonal antibody LA4. *J Neurocytol* 20: 716-31.
- Amaya F, Oh-hashi K, Naruse Y, et al. (2003). Local inflammation increases vanilloid receptor subtype 1 expression within distinct subgroup of DRG neurons. *Brain Res* 963: 190-6.
- Beland B, Fitzgerald M (2001). Influence of peripheral inflammation on the postnatal maturation of primary sensory neuron phenotype in rats. *J Pain* 2: 36-45.
- Blackshaw LA, Grundy D (1993). Effects of 5-hydroxytryptamine on discharge of vagal mucosal afferent fibers from the upper gastrointestinal tract of the ferret. *J Auton Nerv Syst* 45: 41-50.
- Blass EM, Watt BL (1999). Sucking- and sucrose-induced analgesia in human newborns. *Pain* 83: 611-23.
- Bradberry CW, Gruen RJ, Berridge CW, et al. (1991). Individual differences in behavioral measures: correlations with nucleus accumbens dopamine measured by micro dialysis. *Pharmacol Biochem Behav* 39: 877-82.
- Bradley PB, Engel G, Feniuk W, et al. (1986). Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology* 25: 563-76.
- Branchek TA, Mawe GM, Gershon MD (1988). Characterization and localization of a peripheral neural 5-hydroxytryptamine receptor subtype (5-HT_{1P}) with a selective agonist, 3H-5-hydroxyindalpine. *J Neurosci* 8: 2582-95.
- Bullitt E (1990). Expression of c-fos-like protein as a marker of neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 296: 517-30.
- Carlton SM, Coggeshall RE (2001). Peripheral capsaicin receptors increase in the inflamed rat hind paw: a possible mechanism for peripheral sensitization. *Neurosci Lett* 310: 53-6.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, et al. (1997). The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-24.
- Chuang HH, Prescott ED, Kong H, et al. (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the

capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* 411: 957-62.

- Desai KM, Warner TD, Vane JR.B (1994). 5-HT₃ receptors do not mediate vagally-induced relaxation or contraction of the isolated stomach of the guinea pig. *J Pharmacol* 111: 346-50.
- Di Marzo V, Blumberg PM, Szallasi A. (2002) Endovanilloid signaling in pain. *Curr Opin Neurobiol* 2: 372-9.
- Doi-Saika M, Tokunaga A, Senba E (1997) Intradermal 5-HT induces Fos expression in rat dorsal horn neurons not via 5-HT₃ but via 5-HT_{2A} receptors. *Neurosci Res* 29: 143-9.
- Eglen RM, Lee CH, Smith WL, et al. (1995). Pharmacological characterization of RS 25259-197, a novel and selective 5-HT₃ receptor antagonist, in vivo. *Br J Pharmacol* 114: 860-6.
- Fisher MC, Bednar RJ (1992). 2-Deoxy-D-glucose antinociception and serotonin receptor subtype antagonists: test-specific effects in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 43: 1241-6.
- Fozard JR (1984). Neuronal 5-HT receptors in the periphery. *Neuropharmacology* 23(12B): 1473-86.
- Freeman AJ, Cunningham KT, Tyers MB (1992). Selectivity of 5-HT₃ receptor antagonists and anti-emetic mechanisms of action. *Anticancer Drugs* 3: 79-85.
- Gelhlert DR, Gackkenhetimer SL, Wong DT, et al. (1991). Localization of 5HT₃ receptors in the rat brain using [³H] LY278584. *Brain Res* 553: 149-54.
- Giordano J (1991). Analgesic profile of centrally administered 2-methylserotonin against acute pain in rats. *Eur J Pharmacol* 199: 233-6
- Giordano J, Sacks SM (1997) Sub-anesthetic doses of bupivacaine or lidocaine increase peripheral ICS-205 930-induced analgesia against inflammatory pain in rats. *Eur J Pharmacol*. 334: 39-41.
- Glennon RA, Young R, Dukat M (1992). 5-HT₃ agonist 2-methylserotonin as a training drug in discrimination studies. *Pharmacol Biochem Behav* 41: 361-4.
- Greene EC (1935). Anatomy of the rat. American Philosophical Society, Philadelphia, USA. pp.147.
- Hamon M, Gallissot MC, Menard F, et al. (1989). 5-HT₃ receptor binding sites are on capsaicin-sensitive fibers in the rat spinal cord. *Eur J Pharmacol* 164: 315-22.
- Hanesch U, Pfrommer U, Grubb BD, et al. (1993). Acute and chronic phases of unilateral inflammation in rat's ankle are associated with an increase in the proportion of calcitonin

- gene-related peptide-immunoreactive dorsal root ganglion cells. *Eur J Neurosci* 5: 154-61.
- Hardtmann G, Proschel P, Ott RW (1989). Masticatory forces and maximum jaw closure forces of complete denture wearers before and after bite opening. *Dtsch Zahnarztl Z* 44: 26-9.
- 平沢興 (1982). 分担解剖学 2 脈管学・神経系. 第 11 版、金原出版株式会社、東京. pp.406-8.
- Huang CT, Chen CF, Tsai TH (1999). Measurement and pharmacokinetic study of unbound tropisetron in rat blood by micro dialysis with high-performance liquid chromatography. *Int J Pharm* 182: 237-42.
- Ishida-Yamamoto A, Senba E (1990). Cell types and axonal sizes of calcitonin gene-related peptide-containing primary sensory neurons of the rat. *Brain Res Bull* 24: 759-64.
- Jacobs BL, Fornal CA (1999). Activation of 5-HT neuronal activity during motor behavior. *Neuropsychopharmacology* 21: 9S-15S.
- Jacobs BL, Martin-Cora FJ, Fornal CA (2002). Activity of medullary serotonergic neurons in freely moving animals. *Brain Res Rev* 40: 45-52.
- Johnston BA, Eisen H, Fry D (1991). An evaluation of several adjuvant emulsion regimens for the production of polyclonal antisera in rabbits. *Lab Anim Sci* 41: 15-21.
- Ju G, Hökfelt T, Brodin E, Fahrenkrug J, Fischer JA et al. (1987). Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells. *Cell Tissue Res* 247: 417-31.
- Kantomaa T, Tuominen M, Pirttiniemi P (1994). Effect of mechanical forces on chondrocyte maturation and differentiation in the mandibular condyle of the rat. *J Dent Res* 73: 1150-6.
- Karkazis HC, Kossioni AE (1997). Re-examination of the surface EMG activity of the masseter muscle in young adults during chewing of two test foods. *J Oral Rehabil* 24: 216-23.
- 川村早苗 (1989). マウスとラットの条件回避学習に及ぼす飼料硬度の影響. 歯基礎誌 31: 72-82.
- Kidd EJ, Laporte AM, Langlois X, et al. (1993). 5-HT₃ receptors in the rat central nervous system are mainly located on nerve fibers and terminals. *Brain Res* 612: 282-98.
- Kilpatrick G, Jones B, Tyers B (1987). Identification and distribution of 5-HT₃ receptors in rat brain using radioligand binding. *Nature* 330: 746-8.

- Lee Y, Kawai Y, Shiosaka S, et al. (1985). Coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P-like peptide in single cells of the trigeminal ganglion of the rat: immunohistochemical analysis. *Brain Res* 330: 194-6.
- Lee MK, Cleveland DW (1996). Neuronal intermediate filaments. *Ann Rev Neurosci* 19: 187-217.
- Lewkowski MD, Barr RG, Sherrard A, et al. (2003). Effects of chewing gum on responses to routine painful procedures in children. *Physiol Behav* 79: 257-65.
- Luo H, Cheng J, Han JS, et al. (2004). Change of vanilloid receptor 1 expression in dorsal root ganglion and spinal dorsal horn during inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant in rats. *Neuroreport* 22: 655-8.
- Ma QP, Woolf CJ (1996). Basal and touch-evoked fos-like immunoreactivity during experimental inflammation in the rat. *Pain* 67: 307-16.
- Ma QP, Hill R, Sirinathsinghi D (2001). Colocalization of CGRP with 5-HT_{1B/1D} receptors and substance P in trigeminal ganglion neurons in rats. *Eur J Neurosci* 13: 2099-104.
- Ma QP (2002). Expression of capsaicin receptor (VR1) by myelinated primary afferent neurons in rats. *Neurosci Lett* 319: 87-90.
- Martin X, Dolivo M (1983) Neuronal and transneuronal tracing in the trigeminal system of the rat using the herpes virus suis. *Brain Res* 273: 253-76.
- Meller ST, Lewis SJ, Brody MJ, et al. (1991). The peripheral nociceptive actions of intravenously administered 5-HT in the rat requires dual activation of both 5-HT₂ and 5-HT₃ receptor subtypes. *Brain Res* 561: 61-8.
- Momose I, Nishikawa J, Watanabe T, et al. (1997). Effect of mastication on regional cerebral blood flow in humans examined by positron-emission tomography with 150-labeled water and magnetic resonance imaging. *Arch Oral Biol* 42: 57-61.
- Monteith BD (2004). Altered jaw posture and occlusal disruption patterns following mandibular advancement therapy for sleep apnea: a preliminary study of cephalometric predictors. *Int J Prosthodont* 17: 274-80.
- Morales M, Battenberg E, Bloom FE (1998). Distribution of neurons expressing immunoreactivity for the 5HT₃ receptor subtype in the rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol* 402: 385-401.
- Moser PC (1995). The effect of 5-HT₃ receptor antagonists on the writhing response in mice. *Gen Pharmacol* 26: 1301-6.
- Munoz JJ, Sewell WA (1984). Effect of pertussigen on inflammation caused by Freund adjuvant.

Infect Immun 44: 637-41.

- Ogawa A, Motimoto T, Hu WJ, et al. (2003). Hard-food mastication suppresses complete Freund's adjuvant-induced nociception. *Neuroscience* 120: 1081-92.
- Oka K, Sakurae A, Fujise T, et al. (2003). Food texture differences affect energy metabolism in rats. *J Dent Res* 82: 491-4.
- Okamoto K, Imbe H, Tashiro A, et al. (2004). Blockade of peripheral 5HT₃ receptor attenuates the formalin-induced nocifensive behavior in persistent temporomandibular joint inflammation of rat. *Neurosci Lett* 367: 259-63.
- Paul D, Yao D, Zhu P, et al. (2001). 5-Hydroxytryptamine 3(5-HT₃) receptors mediate spinal 5-HT antinociception: An antisense approach. *J Exp Ther* 298: 674-8.
- Paxinos G, Watson C (1982). The rat brain in stereo coordinates. Academic Press, New South Wales.
- Rabin AG, Anderson EG, Levy RA (1985). Autotomy following limb denervation: effects of sparing selected afferents. *Pain* 21: 117-28.
- Reynolds R, Burri R, Herschkowitz N (1993). Retarded development of neurons and oligodendroglia in rat forebrain produced by hyperphenylalaninemia results in permanent deficits in myelin despite long recovery periods. *Exp Neurol* 124: 357-67.
- Ruan HZ, Burnstock G (2003). Localisation of P2Y₁ and P2Y₄ receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat. *Histochem Cell Biol* 120: 415-26.
- 坂田三弥、中村嘉男 (1996). 基礎歯科生理学. 第二版、医歯薬出版株式会社、東京 pp.315-339.
- Sakata T, Yoshimatsu H, Masaki T, et al. (2003). Anti-obesity actions of mastication driven by histamine neurons in rats. *Exp Biol Med* 228: 1106-10.
- Sasaki M, Ishizaki K, Obata H et al. (2001) Effects of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors on the modulation of nociceptive transmission in rat spinal cord according to the formalin test. *Eur J Pharmacol* 424: 45-52.
- Schoenberg MDD, Moore D (1961). Effect of Freund's adjuvant on sarcoma-180 in mice. Induced inflammation and reticuloendothelial alterations. *Arch Pathol* 72: 446-54.
- Seo K, Fujiwara N, Hu JW, et al. (2002). Intrathecal administration of 5-HT₃ receptor agonist modulates jaw muscle activity evoked by injection of mustard oil into the temporomandibular joint in the rat. *Brain Res* 934: 157-61.

重富俊雄, 浅野辰則, 加藤武司, 他 (1998). 口腔機能と老化に関する研究 痴呆の危険要因に関する疫学的検討. *口科誌* 47:403-7.

Shen Y, Monsma FJ Jr, Metcalf MA, et al. (1993). Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. *J Biol Chem* 268: 18200-4.

Sugiura T, Tominaga M, Katsuya H, et al. (2002). Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *Neurophysiol* 88: 544-8.

Stein C, Millan MJ, Herz A (1988). Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacol Biochem Behav* 31: 451-5.

Strassman AM, Vos BP (1993). Somatotopic and laminar organization of fos-like immunoreactivity in the medullary and upper cervical dorsal horn induced by noxious facial stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 331: 495-516.

Takada K, Miyawaki S, Tatsuta M (1994). The effects of food consistency on jaw movement and posterior temporalis and inferior orbicularis oris muscle activities during chewing in children. *Arch Oral Biol* 39: 793-805.

寺山 隆司 (2003). 下行性痛覚制御系とセロトニン *Clin Neurosci* 21: 638-40.

Thexton AJ (1992). Mastication and swallowing: an overview. *Br Dent J* 173: 197-206.

Tohda C, Sasaki M, Konemura T, et al. (2001). Axonal transport of VR1 capsaicin receptor mRNA in primary afferents and its participation in inflammation-induced increase in capsaicin sensitivity. *J Neurochem* 76: 1628-35.

Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, et al. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21: 531-43.

Tominaga M, Wada M, Masu M (2001). Potentiation of capsaicin-receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for-ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6951-6.

Tsai SH, Tew JM, McLean JH, et al. (1988). Cerebral arterial innervation by nerve fibers containing calcitonin gene-related peptide (CGRP): Distribution and origin of CGRP perivascular innervation in the rat. *J Comp Neurol* 271: 435-44.

Tuominen M, Kantomaa T, Pirttiniemi P (1993). Effect of food consistency on the shape of the articular eminence and the mandible. An experimental study on the rabbit. *Acta Odontol Scand* 51: 65-72.

- 渡辺慶一、中根一穂 (2002). 酵素抗体法. 第四版、学際企画、東京 pp.25, pp.99.
- Wolf H (2000). Preclinical and clinical pharmacology of the 5-HT₃ receptor antagonists. *Scand J Rheumatol* 113: S37-45.
- Xu W, Qiu XC, Han JS (1994). Serotonin receptor subtypes in spinal antinociception in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 269: 1182-9.
- Yamaga T, Yoshihara A, Ando Y, et al. (2002). Relationship between dental occlusion and physical fitness in an elderly population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57: M616-20.
- Yamamoto T, Hirayama A (2001). Effects of soft-diet feeding on synaptic density in the hippocampus and parietal cortex of senescence-accelerated mice. *Brain Res* 902: 255-63.
- Yamasaki K, Shibata K, Sibasaki Y (1985). The nature of pain reaction in the trigeminal associated with orthodontic tooth movement. *日矯歯誌* 44: 332-8.
- Zeitz KP, Guy N, Malmberg AB, Dirajlal S et al. (2002) The 5-HT₃ subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *J Neurosci* 22: 1010-9.
- Zhou Q, Imbe H, Dubner R, et al. (1999). Persistent Fos protein expression after orofacial deep or cutaneous tissue inflammation in rats: implications for persistent orofacial pain. *J Comp Neurol* 412: 276-91.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, et al. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400: 452-7.

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行および論文の作成上終始懇篤なるご指導ならびに御校閲を賜りました本学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座（歯科矯正学）丹根一夫教授に心から感謝いたします。

また、御校閲を賜りました同研究科創生・探索医科学講座（口腔解剖学第二）内田隆教授、創生・病態探求医科学講座（歯科薬理学）土肥敏博教授に深謝いたします。

また、多大なご指導、ご協力を頂きました本学顎口腔頸部医科学講座（歯科矯正学）田中栄二助教授、同講座邊峰朗助手、長崎大学医学部・歯学部附属病院歯科臨床系診療部門岩部龍典助手ならびに本学顎口腔頸部医科学講座（歯科矯正学）の教室員各位に感謝いたします。