

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11355

研究課題名(和文) 矯正の歯の移動に伴う疼痛発現：三叉神経節ニューロン-グリアのクロストークの役割

研究課題名(英文) The role of neuron-glia cells crosstalk within the trigeminal ganglion in orthodontic pain

研究代表者

島津 徳人 (Yoshihito, Shimazu)

麻布大学・生命・環境科学部・准教授

研究者番号：10297947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラット臼歯の矯正学的な歯の移動に伴う歯根膜由来の三叉神経節ニューロンの興奮性増強に対する三叉神経節内のニューロン-グリア細胞間クロストークの病態生理学的役割を明らかにするために、行動学・電気生理学・免疫組織化学的手法にて系統的に解析した。その結果、上顎臼歯への矯正力の付与に伴い上顎顔面皮膚に異所性痛覚過敏が認められた。歯根膜の炎症に伴い顔面皮膚への機械刺激に対する三叉神経脊髄路核尾側亜核広作動域ニューロンの閾値の低下と発火頻度が増加することにより発現することが判明し、三叉神経節ニューロンの興奮性に対するニューロン-グリア細胞間のクロストークが重要な役割を果たすことが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to investigate the functional role of neuron-glia cells crosstalk within the trigeminal ganglia on the enhancement of neuronal excitability of trigeminal ganglion in experimentally tooth-movement (ETM) rat, using behavioral, electrophysiological and immunohistochemical studies. In the present study, we established ETM rat model for examining orthodontic pain. Behavioral analysis revealed that occurrence of spontaneous pain and ectopic hyperalgesia in the whisker pad area was observed in the maxillary ETM rat. Electrophysiological study demonstrated that mechanical discharge frequency of trigeminal spinal nucleus caudalis neurons in the ETM rats was significantly increased due to the decrement of mechanical stimulus threshold. Taken together, these findings strongly suggest that neuron-glia cells crosstalk within the trigeminal ganglia may contribute to the ETM-induced ectopic inflammatory hyperalgesia.

研究分野：矯正・小児系歯学

キーワード：歯の矯正移動 ラット 臼歯 疼痛 三叉神経節 ニューロン グリア細胞 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

歯科矯正処置を行う際の歯の移動に伴う疼痛は、一般に数日間継続後、次第に消失するが、場合によっては食物の咀嚼時、継続した痛みを伴い、治療を継続する際に障害となることが報告されており、急性および慢性疼痛発現機構の関与が示唆されている (Bergius et al. 2000; Krishman et al., 2007)。現在までのところ、矯正処置の歯の移動に伴う疼痛発症および継続機構の詳細は不明な点が多い。したがって、矯正治療時に矯正器具を装着することにより生じる疼痛発現機序の解明は、新たな歯科矯正処置時の疼痛緩和法開発に貢献し、患者の QOL を高める治療を行うためにも、歯科臨床で重要度が高いと考えられる。

一般に、三叉神経支配領域で生じた炎症/組織損傷による侵害情報は、一次ニューロンである三叉神経節ニューロンを介して、三叉神経脊髄路尾側亜核と上部頸髄後角領域に投射し上位中枢に伝達されることが知られている。これらの疼痛発現には、三叉神経系の侵害情報伝達経路において生じる可塑的变化には一次求心路の変化(末梢性感作)とこれに起因して生じる二次ニューロンレベルの変化(中枢性感作)の二つが考えられる。実験的に歯の矯正移動を行うことにより、局所的に炎症を誘導させ、疼痛関連行動を確認したラットにおいて、疼痛伝達の二次ニューロンの存在する三叉神経脊髄路尾側亜核領域においてニューロン興奮性の指標となる c-fos 陽性細胞の発現増加が見られることが報告されている (Kato et al., 1994; Yamashiro et al. 1997; Krishman et al., 2007)。さらに最近、歯の矯正移動処置は三叉神経脊髄路尾側亜核と上部頸髄後角領域の疼痛伝達に関わる侵害受容ニューロンだけではなく、この領域でニューロン活動を修飾するマイクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞が活性化されることが報告され、グリア細胞代謝阻害薬の局所投与で歯の矯正移動に伴う動物の疼痛関連行動 (Face grooming behavior) やアロディニアなどの症状が抑制される事実が報告されている (Liu et al., 2009; Hasegawa et al. 2012; Liu et al., 2009)。したがって、これらの知見は、矯正処置による歯の移動に伴う疼痛誘発機序に三叉神経疼痛伝達路の侵害受容ニューロンとグリア細胞のクロストーク(化学シグナルの相互作用)が重要な役割を演じていることを強く示唆している。

近年、三叉神経節を含む、一次感覚神経節内において神経細胞体及びニューロン周囲を取り囲みニューロン活動を修飾するサテライトグリア細胞から傍分泌(パラクリン分泌)された様々な生理活性物質が近傍ニューロンに作用してその機能を修飾することが判明してきた (Amir and Devor 2000; Takeda et al., 2009)。実際、三叉神経節内において、シナプスを介さずに細胞体より

Adenosine triphosphate (ATP)、Substance P (SP)などの化学伝達物質が分泌され、細胞体の興奮性を修飾する可能性が示唆され (Matsuka et al. 2001)、三叉神経支配領域の炎症時、三叉神経節からの ATP や SP の分泌が増加することが知られている (Matsuka et al. 2001; Takeda et al. 2005)。また、三叉神経節内においてサテライトグリア細胞が炎症により、活性化され、サイトカイン Interleukin-1 (IL-1)、tumor necrosis factor (TNF- α) を分泌し三叉神経節ニューロンの興奮性を増強させることにより、痛覚過敏が発現する可能性が報告されている (Takeda et al. 2007, 2008; Zhang et al., 2007)。最近、歯の矯正移動により、損傷を受けた三叉神経節ニューロンの周囲のサテライトグリア細胞が Nerve growth factor を産生しギャップジャンクションを介して損傷ニューロンを修復する可能性が報告された (Kurata et al. 2013)。実験的に歯の矯正移動により生じる炎症に関連した疼痛関連行動誘導に伴い ATP やケモカインの受容体 (P2X3、CCR2) の免疫組織活性が三叉神経節ニューロンで増加する事実 (Yang et al. 2009; 2014) が示された。また、In vivo の条件下において、三叉神経支配領域の炎症モデル動物の痛覚過敏に伴い、自発痛発現に関わる三叉神経節内の侵害受容性三叉神経節ニューロンの自発的活動電位の増加が電気生理学的に確認され、SP や IL-1 の受容体の阻害薬の局所的な投与により、これらの興奮が減弱されることが確認されている (Takeda et al. 2005, 2008)。したがって、感覚神経節内の化学シグナルの傍分泌機構が炎症により誘導される自発痛などの疼痛発現に重要な役割を演じ、これらの受容体が疼痛緩和の分子標的となる可能性を示唆している。おそらく、歯の移動に伴う機械的圧迫による炎症が歯根膜に分布する三叉神経節ニューロンとサテライトグリア細胞間のシグナルクロストークを活性化させこの部位を支配する侵害受容性三叉神経節ニューロンの興奮性を増強させる可能性が推定される。

2. 研究の目的

歯の移動に伴う歯根膜由来の三叉神経節ニューロンの興奮性増強に対する三叉神経節内のニューロン-グリア細胞間クロストークの病態生理学的役割を明らかにするために、(1) まず、矯正処置モデル動物の作成を行い歯の移動の確認と疼痛関連行動(自発痛と誘発痛)の特徴を調べた。(2) 次に電気生理学的手法を用いて、歯の矯正移動により疼痛関連行動に関わるニューロン活動が変調するかを微小電極による単一ユニット活動記録による解析し、(3) 最後に、歯根膜支配の三叉神経節ニューロン周囲のグリア細胞の活性が変調するか否かを GFAP (glial fibrillary acidic protein) 活性とサ

イトカイン(IL- β , TNF) 産生が炎症により誘導されるかを逆行性蛍光標識および免疫組織化学法を用いて対照動物と比較検討した。

2. 研究の方法

1) 矯正処置

7週齢の雄性 Wistar 系ラット (SLC) を用いて、麻布大学動物実験委員会のガイドラインに従って飼育した。実験動物には飼育期間を通して、粉末餌 (MF、オリエンタル酵母) を不断給餌し、水道水を自由摂飲させた。

動物搬入から5日間の予備飼育において体重変化や全身状態に異常を認めなかった実験動物について、ペントバルビタール (64.8mg/kg) を腹腔内投与し、深麻酔状態を維持した。

矯正装置の装着に先立ち、上顎第一臼歯歯根膜部に蛍光色素 (2% Fluorogold : FG, 10 μ l) をマイクロシリンジにて注入し、この部位を支配する三叉神経節ニューロンを蛍光標識した。その後、切歯-第一臼歯間に矯正装置を装着した。矯正装置の装着に必要なすべての口腔内処置は歯科用ルーペによる直視下で遂行した。最初に、第一臼歯にクランプを装着するため、歯科用エンジンとスチールラウンドバーにて第一臼歯の頬面と口蓋面の歯頸部寄りエナメル質部分に小窩を形成した。NiTi コイルスプリング (15g 荷重) の片側に臼歯部クランプを取り付け第一臼歯に設置した。もう片方のスプリング断端はスーパーボンドを使用して上顎切歯部に固着し、実験群とした。対照群としては、矯正力を付与していない無処置動物を用いた (対照群)。

2) 関連痛の評価 (逃避反射閾値の測定)

ラット顔面皮膚口ひげ部分に生じる関連痛の指標としての逃避反射閾値の測定は、矯正力を付加してから 10 日間までの同部位の顔面皮膚領域における機械的痛覚過敏を von Frey hairs により試験し、評価した。ラットの逃避反射閾値を評価するために、口ひげ部分に von Frey hairs (1, 2, 4, 6, 15, 26, 60, 100g) で段階的に機械刺激を与えた。それぞれの von Frey hairs による刺激は、一連の試験において 3 回ずつ行った。

3) 三叉神経脊髄路核尾側亜核広作動域 (SpVc) ニューロン活動の細胞外単一ユニットによる記録

電気生理学的記録は、矯正処置 3 日後に行った。動物をペントバルビタールナトリウム (64.8mg/kg) を腹腔内に投与して麻酔を行った。必要に応じて頸静脈に挿入したカテーテルから 2-3mg/kg/hr の割合で追加麻酔を

行った。麻酔の濃度は、足へのピンチ刺激に応答する屈曲反射の有無により確認した。直腸内温度は、体温制御装置 (DC Temperature Controller, 40-90-8D, FHC, Texas, USA) を用いて 37.5 ± 5 の範囲を維持した。ラットを脳定位固定装置に固定し、SpVc 領域から単一ニューロン活動の細胞外記録を行った。Paxinos 及び Watson の脳アトラスに従い、2% ポンタミンスカイブルー及び 0.5M 酢酸ナトリウムを充填したガラス電極を用いて、単一ニューロン活動を記録した。ニューロン活動は、アンプ (World Precision Instruments : DAM80, Florida, USA) により増幅し、0.3-10KHz のフィルターを用いてオシロスコープ (IWATSU, SS-7602, Nagano, Japan) でモニターし、Power Lab Chart5 ソフトウェア (AD Instruments) で解析した。

SpVc WDR ニューロン活動の細胞外記録は、繰り返し刺激による受容野拡大及び末梢性受容器の末梢性感作を避けるため受容野特定作業はできるだけ速やかに行き、受容野の探索のための機械刺激は小筆を用いて行った。左口ひげ部分へ小筆で刺激し、その後 von Frey hairs により単一ニューロン活動を同定した。口ひげ部分に対する SpVc WDR ニューロンの同定後、自発放電の有無を調べた。我々は、実験群と対照群のインパルスの発火頻度を比較した。機械刺激の閾値は von Frey hairs (1, 4, 6, 15, 60g) を用い非侵害レベル (2~10g) から侵害レベルの刺激を 5 秒間刺激した。本研究におけるデータは平均 \pm 標準誤差で表した。統計学的解析には、電気生理学的データを Tukey-Kramer 法や Dunnett 法などの分散分析を用いて行った。統計的有意差水準は、 $p < 0.05$ とした。

3. 研究成果

1) ラット上顎第一臼歯を用いた矯正学的歯の移動モデルの確立

矯正装置の装着処置においては、全身麻酔下での臼歯部への侵襲を必要としたため、すべての実験動物は処置翌日に 3~5 g の体重減少を示した。ただし、処置後 2 日目以降では体重増加を続け、所定の観察期間において死亡例には遭遇しなかった。

動物モデルを用いた矯正学的な歯の移動処置においては、負荷される矯正力の性質 (荷重量、作用方向、作用期間、負荷頻度など) を規定することにより、動物の麻酔導入から NiTi コイルスプリングの装着まで 30 分程度で完了できるようになった。今回の NiTi コイルスプリング矯正装置を装着した動物実験例では、最長 14 日間の観察期間に矯正装置の脱落・破損は 3 例にとどまり、相同な負荷条件下では臼歯移動様式の再現性も高いことが確かめられた。

図1に矯正装置装着後5日目の上顎試料の実体顕微鏡像を示している。対照側の第一臼歯から第三臼歯は互いに接触していたが、実験側の第一・第二臼歯は歯間離開をきたしており、矯正力の負荷により第一臼歯が遠心移動していた。

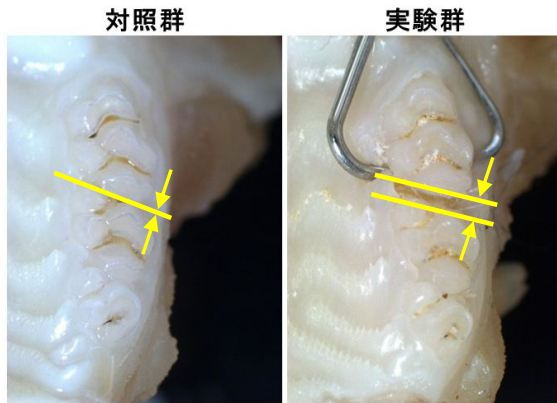


図1

摘出された上顎臼歯部の脱灰薄切標本の顕微鏡観察においては、対照側の第一臼歯から第三臼歯のいずれの歯根横断面像においても、生理的な遠心移動を反映して近心窩壁では骨形成、遠心窩壁では骨吸収の特徴が観察された。近心窩壁では、広い範囲にわたって類骨層が形成されており、その表面にはほぼ立方状の骨芽細胞が配列していた。さらに、歯根セメント質の表面にもセメント芽細胞の付着が認められ、この歯槽骨とセメント質に挟まれた歯根膜腔では、毛細血管の多くが歯槽骨表面に近接して存在し、線維芽細胞の核や線維束は牽引方向に沿って配列していた。遠心側では、多数の多核細胞が骨表面に接して配列していた。矯正処置後3日目の脱灰横断面像では、近心窩壁に接する程度まで歯根が偏位しており、第二臼歯の近心2根は歯槽窩内のほぼ中央に位置することが確認できた。また、骨髓腔側から多数の破骨細胞が出現し、歯槽骨の背部骨吸収が顕著となり、一部分断された歯槽骨も生じていた。ただし、圧迫・変性に陥った歯根膜部分に相当する歯槽骨表面では破骨細胞は出現せず、分断された歯槽骨の歯根膜側では骨吸収反応は全く認められなかった。牽引・拡張された遠心側歯根膜組織においては、歯根膜線維の伸展と細胞成分の歯槽骨表面からの離脱が特徴であり、細胞密度は疎になったが、広範囲の組織変性や細胞死は検出されなかった。

2) 矯正処置による疼痛異常(自発痛・痛覚過敏)の発現

第一臼歯の近心移動に伴う疼痛(自発痛)の関連行動について、Face Grooming 行動を指標とした定量解析(ビデオカメラによる行動解析)を実施したところ、矯正力の負荷後1日でFace Grooming 行動が最大値(実験群 74.4 ± 22.1 秒 vs. 対照群 22.3 ± 5.05 秒)を示し、矯正力負荷後5日目には無処置群と同

一レベル(実験群 29.0 ± 8.03 秒 vs. 対照群 25.7 ± 2.95 秒)にまで回復することが確かめられた。

また、歯の近心移動に伴う誘発痛の有無を検証する目的で、ラット口ひげ部分における von Frey hair による逃避反射閾値を測定したところ、矯正力付与後1~3日目に von Frey hair による口ひげ部分への機械刺激による逃避反射閾値は、矯正群は対照群と比較して有意に低下し痛覚過敏を示した(図2)。

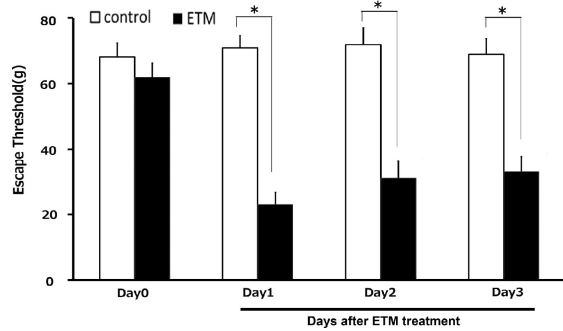


図2

3) 矯正処置による疼痛異常に関わるニューロン活動の変調

上顎臼歯の矯正力付与後にみられた顔面皮膚口ひげ部分での関連痛(異所性痛覚過敏)がみとめられたことから、顔面皮膚への機械刺激に応じる三叉神経脊髄路核尾側亜核広作動域ニューロンの興奮性の変化について検証したところ、機械刺激(1, 4, 6, 15, 60g)に応答する SpVc ニューロンの興奮閾値は低下しており、また、平均発火頻度は対照群と比較して矯正力を付与した実験群において有意に大きな値を示し興奮性が増大していることが確認された(図3)。また、対照群と比較して実験群では自発放電を示すニューロンが多い傾向が観察された。

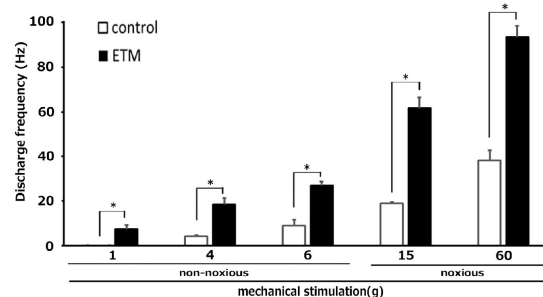


図3

本研究のまとめ

- 上顎第一臼歯の矯正学的歯の移動による刺激が三叉神経支配領域である口吻部の疼痛異常(自発痛・異所性痛覚過敏)が誘導されることを実験的歯の矯正モデルにおいて確認された。
- 顔面皮膚への機械刺激に対する三叉神経脊髄路核尾側亜核広作動域ニューロ

ンの興奮閾値の低下と発火頻度の増加により発現することが判明した。

- (3) 異所性疼痛が生じる部位が歯の移動に伴う矯正力による歯根膜の炎症部位とは異なる顔面皮膚領域であることから、三叉神経節ニューロンの興奮性に対するニューロン-グリア細胞間のクロストークが重要な役割を果たすことが強く示唆された。
- (4) なお、今回の申請課題において、矯正力の付与によるグリア細胞の活性化とサイトカイン合成が亢進するかを検証するうえで、Fluoro Goldで標識された三叉神経節ニューロン近傍に存在するグリア細胞のTNF とIL-1 の発現局在を多重免疫標識法を用いて調べる必要があり、これらの複数の抗体を用いた多重免疫染色法の条件を策定中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

- ・ <https://lab-navi.azabu-u.ac.jp/lf-04/index.html>
- ・ <https://www.azabu-u.ac.jp/sp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

島津 徳人 (SHIMAZU Yoshihito)
麻布大学・生命・環境科学部・准教授
研究者番号：10297947

(2)研究分担者

武田 守 (TAKEDA Mamoru)
麻布大学・生命・環境科学部・教授
研究者番号：20227036

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()