

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17321

研究課題名(和文) 歯の移動が情動や自律神経系に及ぼす影響は、脳内でフィードバックコントロールされるか

研究課題名(英文) Do the influences of orthodontic tooth movement on emotional and autonomic nervous systems receive feedback control?

研究代表者

大原 春香 (Ohara, Haruka)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：40754726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラットで、歯根膜感覚が入力し得る視床のVPMcvmに順行性トレーサーを注入した所、標識終末が、これまでに予想されてきた大脳皮質一次体性感覚野、二次体性感覚野、一次運動野(無顆粒性大脳皮質外側部)、二次運動野(無顆粒性大脳皮質内側部)ではなく、顆粒性島皮質の小部位(dGlrvs2)のみに認められた。さらにdGlrvs2に順行性トレーサーを注入した所、標識終末が三叉神経上核に認められた。以上より、歯科矯正の歯牙移動で賦活される歯根膜感覚は顆粒性島皮質に伝達されて情動や自律神経系に影響を与えるが、その影響は、顆粒性島皮質からの下行性投射によってフィードバックコントロールされている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科矯正の歯牙移動で生ずる歯根膜感覚は、痛みや感覚異常、違和感をもたらす、持続すると情動と自律神経系にまで影響が及び、不快感、ストレスなどを患者さんに起こす。この所見は、本研究で明らかになった、歯根膜感覚が情動や自律神経機能に関わる島皮質に投射される上行路が存在するためと考えられる。しかし、この影響に、患者さんは次第に「慣れる」のが一般的である。この所見は、本研究で明らかになった、歯根膜感覚が入力する島皮質から、歯根膜感覚の島皮質への上行路の中継部位への下行路によって、上行路がフィードバックコントロールされるためと考えられる。以上のように、歯科矯正臨床に重要な基礎科学情報を提供した。

研究成果の概要(英文)：In rats, injection of an anterograde tracer BDA in the caudo-ventromedial edge of ventral posteromedial thalamic nucleus which possibly receives sensation from the periodontal ligament resulted in the distribution of BDA-labeled terminals in the dorsal part of granular insular cortex rostroventrally adjacent to the rostralmost part of secondary somatosensory cortex (dGlrvs2), but not in the primary and secondary somatosensory cortices and the primary and secondary somatomotor cortices. In addition, the BDA injection into the dGlrvs2 resulted in the distribution of labeled terminals in the supratrigeminal nucleus through which the sensation from periodontal ligament is conveyed to dGlrvs2. These results suggest that the sensation from periodontal ligament caused by orthodontic tooth movement makes influence on the emotional and autonomic functions of the insular cortex, and that the influence receives feedback control of the dGlrvs2 which receives the sensation from periodontal ligament.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯科矯正 歯牙移動 情動 自律神経 島皮質

### 1. 研究開始当初の背景

歯科矯正で行う歯牙移動によって生ずる歯根膜感覚は、歯に矯正力がかかっている間中、継続して生じ、特に移動の開始後暫くは強い痛みや感覚異常、違和感が生じる。この感覚異常が持続すると情動と自律神経系にまで影響が及んで、不快感、いらいら、ストレスなどの不定愁訴を起し、患者さんを苦しめることも少なくない。この臨床所見は、歯根膜感覚が脳内の情動や自律神経機能関連部位に伝達される可能性を示している(Yamashiro et al. 1998 J Dent Res 77) が、伝達部位とその経路は不明である。

三叉神経系の感覚情報の伝達機構の特徴は、他の神経系とは異なり、脊髄後根神経節に相当する三叉神経節のニューロンによって伝達されるものに加え、神経細胞体が脳内の(中脳から橋のレベルに位置する)三叉神経中脳路核に存在する一次求心性神経である三叉神経中脳路核ニューロンによっても伝達されることである。少なくともヒトでは、閉口筋筋紡錘の感覚は三叉神経中脳路核ニューロンのみによって、他の口腔顔面の感覚のほぼ全ては三叉神経節のニューロンのみによって運ばれるが、唯一歯根膜感覚だけは両ニューロンによって運ばれる。歯根膜感覚がこのような二重支配を受けていることは、その生物学的(機能的)重要性を示していると考えられている。歯に与えられた矯正力は両ニューロンを賦活し、このうち意識に上る歯根膜感覚は三叉神経節ニューロンによって橋、延髄に存在する三叉神経感覚核に伝達されたのち、視床を經由して大脳皮質体性感覚野に伝達され、感覚情報(末梢の感覚刺激部位、感覚の種類と量など)の弁別にかかわると考えられている。一方、中脳路核ニューロンによって運ばれる閉口筋筋紡錘感覚と歯根膜感覚は意識に上らない深部感覚であり、三叉神経運動核や三叉神経上核などの三叉神経運動核に直接投射する運動前ニューロンを含む橋延髄部に伝達され、顎反射に働くことがよく知られている。しかし、これらの感覚が、より上位の脳のどこに伝達されるのかは全く不明であった。最近、我々のグループは、意識に上らない深部感覚は三叉神経上核を経て、意識に上る感覚とは異なる視床部位に伝達されることを発見した(Yoshida, Ohara et al. 2017 Brain Struct Funct 222)。しかし、伝達される大脳皮質部位は不明なままであったので、島皮質などの情動や自律神経系に関わる皮質部位に伝達されるかどうか不明であった。

上記のように、歯科矯正治療における歯牙移動で生ずる歯根膜感覚によって引き起こされる情動や自律神経系への影響は、持続することがあるものの、次第に減弱するのが一般的である。しかし、歯牙に与えられる矯正力は持続しているため、生ずる歯根膜感覚も持続している筈なのに、情動や自律神経系への影響はなぜ減弱するのだろうか。歯牙移動処置を受けている患者さんには、「次第に慣れてきますよ」と説明するが、その「慣れ」はどうして起きるのだろうか。どのような脳神経機構がこの「慣れ」を起しているのかは不明なままであった。

### 2. 研究の目的

意識に上らない深部感覚が、三叉神経中脳路核ニューロンによって、三叉神経上核に伝達された後、これまで予想されてきた視床の後内側腹側核の吻背外側部ではなく尾腹内側縁に伝達されることが明らかになった(Yoshida, Ohara et al. 2017 Brain Struct Funct 222)。しかし、視床後内側腹側核腹内側縁からさらに大脳皮質のどの部位に、どのように歯根膜感覚が伝達されるのかは不明であったので、それを動物実験で解明することを本研究の第一の目的とした。情動や自律神経系に關与する島皮質に伝達されるのではないかと仮説を立てた。歯根膜感覚が島皮質に伝達することで、歯牙移動が情緒や自律神経系に影響を与えるのではないかと考えた。

上行路によって大脳皮質に伝達された視覚、聴覚や皮膚粘膜感覚は、その皮質部位から、上行路の感覚の中継部位に至る下行投射を出す系があることが報告されている(Tomita et al. 2012 Neuroscience 200; Akhter, Ohara et al. 2014 Neuroscience 266)。この下行路は、上行する感覚情報をフィードバックコントロールしていると考えられている。歯牙移動が惹起する歯根膜感覚によって生ずる情動や自律神経系への影響が、経時的に減弱するという所見は、意識に上らない歯根膜感覚の情動や自律神経系に関わる皮質部位への上行路の中継部位に、その皮質部位からの下行投射が存在し、上行伝達を抑制的(ネガティブ)にフィードバックコントロールしている可能性が考えられる。歯科矯正で意識に上らない歯根膜感覚の上行伝達が持続するに従って、このネガティブフィードバック回路がより強く働くのではないかと、この仮説を立てた。本仮説を支持する基礎データを動物実験で得ることが本研究の第二の目的である。

### 3. 研究の方法

歯科矯正の臨床所見を参考にして立てた上述の2個の仮説を証明するため、体重250~310gのWistar系雄性ラットを用い、in vivo 実験1-3を行った。実験は、大阪大学大学院歯学研究科実験動物取り扱い指針に則り行った。使用する動物は最小限になるように努めた。全ラットの実験中の麻酔のため、ケタミン(+キシラジン)を筋肉内投与した。実験中は、眼球の自発運動や角膜反射が起きない麻酔深度を維持するため、必要に応じて麻酔薬を追加投与した。加熱パッドを用い、ラットの直腸温を37°C~38°Cに維持した。また、心電図を連続的にモニターした。生存期間終了後のラットの灌流固定は、ペントバルビタールの腹腔内投与による深麻酔下で行った。

ヒト、サル、ネコでは三叉神経中脳路核ニューロンは、閉口筋筋紡錘感覚と歯根膜感覚の両

方を伝達し、本研究ではその中の歯根膜感覚の大脳皮質への投射を調べることを目指している。その方法として、ヒト、サル、ネコで、f-MRI を使って歯根膜感覚を生じさせた時の大脳皮質の賦活部位を探索することが考えられるが、その賦活部位に至った歯根膜感覚が、本研究で調べたい三叉神経中脳路核ニューロン経由の意識に上らない歯根膜感覚なのか、三叉神経節ニューロン経由の意識に上る弁別的な歯根膜感覚のいずれであるのかは区別できない。よって、この方法は適当ではない。また、当然であるが、本研究で用いる神経トレーサーの脳内注入法をヒト、サル、ネコで用いることはできない。

ヒト、サル、ネコでは三叉神経中脳路核ニューロンは歯根膜感覚に加え、閉口筋筋紡錘感覚も伝達する。ネコを用いた Shigenaga グループの研究で、三叉神経中脳路核ニューロンが伝達する両感覚はいずれも三叉神経上核に伝達されるが、両者の投射はいずれも三叉神経上核内に広く分布し局在性は示さなかった (Shigenaga et al. 1998 Brain Res 445 & 448)。この所見は、三叉神経中脳路核ニューロン経由の両感覚の三叉神経上核からの上行伝達経路は、混在しているとまでは言えないかもしれないが、極めて近接している可能性が高いことを示している。なお、本研究では、神経トレーサーの脳内注入法が許されるラットを用いる。ラットの三叉神経中脳路核ニューロンには、歯根膜感覚を伝達するものはほとんどなく、閉口筋筋紡錘感覚のみを伝達するものだけである (Fujio, Ohara et al. 2016 Neuroscience 324)。以上より本研究では、ラットの三叉神経中脳路核ニューロンによって伝達される三叉神経上核経由の閉口筋筋紡錘感覚の伝達経路を明らかにする。本研究で明らかになる経路に相当する経路がヒトにも存在し、ヒトの意識に上らない歯根膜感覚もその経路で伝達される、と考えた。

#### 実験 1: 三叉神経中脳路核ニューロンが伝達する歯根膜感覚が視床経由で伝達される大脳皮質部位と、その投射の様態の解明

右側の咬筋を被っている皮膚に局所麻酔薬であるリドカインを投与した後、切開し、咬筋内で咬筋神経を剖出した。その咬筋神経に電気刺激用双極性フック電極を装着した後、動物を脳定位固定装置に固定した。神経トレーサーの視床への注入はすべて左側を狙った。我々の研究で、ラットの三叉神経上核経由で伝達される咬筋筋紡錘感覚が視床の後内側腹側核尾腹内側縁 (VPMcvm) に伝達されることが明らかになっている (Yoshida, Ohara et al. 2017 Brain Struct Funct 222)。VPMcvm の背側を覆う大脳頭頂部の皮膚に局所麻酔薬である lidocaine を投与した後、皮膚を切開し、頭頂骨の一部を除去した。露出した頭頂葉を被う硬膜を開窓し、頭頂葉の一部を露出した。順行性トレーサーである biotinylated dextranamine (BDA, 10,000 MW) 10% を溶解した 0.01 M リン酸緩衝液を封入したガラス管微小電極を、脳硬膜の開窓部から垂直に、VPMcvm を狙って刺入した。以前の研究 (Yoshida, Ohara et al. 2017 Brain Struct Funct 222) で用いた電気生理学的な判断基準に従い、咬筋神経の電気刺激に対する応答および閉口運動 (閉口筋の伸張) 時の応答を調べることで注入目標部位 (VPMcvm) の位置を決定した。なお、閉口運動は、手に持って口腔内に挿入したプラスチック棒を使って、数秒間下顎を下制した。ガラス管微小電極から記録した電位波形は増幅してから、300 Hz-3 kHz のフィルターを通した後、領域電位は 20 kHz の、ユニット電位は 10 kHz の標本抽出率でコンピューターに保存した。その後、電気生理学的に決定された注入目標部位 (VPMcvm) に、2  $\mu$ A の+電流を 8 分間から 12 分間通電して BDA を微量注入した。BDA 注入の終了後、ガラス管微小電極を慎重に引き抜き、刺激電極を咬筋神経から外し、皮膚の全ての切開部を縫合した。鎮痛薬 (flurbiprofen axetil, 3.3 mg/kg) と抗生物質 (cefotiam hydrochloride, 66 mg/kg) を腹腔内投与し、麻酔から回復させ、動物ケージに戻した。注入後の生存期間中、ラットの一般的な行動、体重、および出血や炎症などの術後合併症の有無をチェックした。

#### 実験 2: 実験 1 で明らかになった VPMcvm が投射する大脳皮質部位 (後述する島皮質の dGlrvs2) が閉口筋筋紡錘感覚の入力部位であることを解明

実験 1 と同様に、右側の咬筋を被っている皮膚に局所麻酔薬であるリドカインを投与した後、切開し、咬筋内で咬筋神経を剖出した。その咬筋神経に電気刺激用双極性フック電極を装着した後、動物を脳定位固定装置に固定した。実験 1 で明らかになった、閉口筋筋紡錘感覚が入力する視床の VPMcvm からの投射を受ける左側の大脳皮質部位 (後述する dGlrvs2) の背側に位置する頭頂部の皮膚に局所麻酔薬である lidocaine を投与した後、皮膚を切開し、頭頂骨の一部を除去した。露出した大脳頭頂葉を被う硬膜を開窓し、頭頂葉の一部を露出した。記録部位のマーキングが可能な 3% HRP (horseradish peroxidase) を溶解した生理学的食塩水を封入したガラス管微小電極を、脳硬膜の開窓部から垂直に (後述する) dGlrvs2 を狙って刺入した。咬筋神経の電気刺激に対する応答と、閉口運動 (閉口筋の伸張) 時の大きな応答を記録した。閉口運動は、手に持って口腔内に挿入したプラスチック棒を使って、数秒間下顎を下制した。ガラス管微小電極から記録した電位波形は増幅してから、300 Hz-3 kHz のフィルターを通した後、領域電位は 20 kHz の、ユニット電位は 10 kHz の標本抽出率でコンピューターに保存した。その後、最も大きな応答が記録出来た部位のマーキングのために、2  $\mu$ A の+電流を 1 分間から 2 分間通電して HRP を微量注入した。BDA の注入後、ガラス管微小電極を慎重に引き抜き、刺激電極を咬筋神経から外し、皮膚の全ての切開部を縫合した。

#### 実験 3: 三叉神経中脳路核ニューロンが伝達する歯根膜感覚が視床経由で伝達される大脳皮質

## 部位からの下行路を解明する

実験2と同様の手順に従う。ただし、順行性トレーサーである biotinylated dextranamine (BDA, 10,000 MW) 10% を溶解した 0.01 M リン酸緩衝液を封入したガラス管微小電極を、実験1と同じ電気生理学的な判断基準に従って同定した dGlrvs2 を狙って刺入した。dGlrvs2 に、2  $\mu$ A の+電流を7分間から15分間通電して BDA を微量注入した。BDA 注入の終了後、ガラス管微小電極を慎重に引き抜き、刺激電極を咬筋神経から外し、皮膚の全ての切開部を縫合した。鎮痛薬 (flurbiprofen axetil, 3.3 mg/kg) と抗生物質 (cefotiam hydrochloride, 66 mg/kg) を腹腔内投与し、麻酔から回復させ、動物ケージに戻した。注入後の生存期間中、ラットの一般的な行動、体重、および出血や炎症などの術後合併症の有無をチェックした。

## 切片の作成とデータ分析

実験1と3ではトレーサーの注入の6日~7日後に、実験2では注入の直後に、ペントバルビタールを腹腔内投与してラットを深麻酔し、上行大動脈から 0.02 M リン酸緩衝食塩水 (PhBS, pH 7.4) 100 ml、4% パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (PhB, pH 7.4) 300 ml、10% シュクロースを含む 0.02% PB (pH 7.4) 100 ml を順次灌流した。灌流固定後に全脳を摘出し、25% シュクロースを含む 0.02 M PB (pH 7.4, 4 °C) に2日間から3日間浸漬した。実験1と3では全脳を、実験2では間脳より上位の脳を凍結させ、厚さ 60  $\mu$ m の連続冠状断切片をマイクロームを用いて作成した。切片は連続性を保って3セットに分けた。

実験1と3で BDA を注入したラットの切片は、0.02 M PBS (pH 7.4) で洗浄後、ABC 反応 (100 倍希釈の avidin-biotin-peroxidase complex [ABC, Vector, CA] を含む 0.02 M PhBS [pH 7.4] に浸漬) 後、diaminobenzidine (DAB) 反応 (0.04% DAB、0.06% 過酸化水素と 0.08% 硫酸ニッケルアンモニウムを含む 0.1 M PhB [pH 7.4] で反応) を行った。実験2で HRP を注入したラットの切片は DAB 反応を行った。反応が終了した全切片をゼラチンで被覆したスライドガラスに貼り付け、乾燥させた。3セットの切片のうちの各1セットは neutral red または thionin で対比染色した。全ての切片をアルコールにて脱水後、レモゾールにて透徹し、カバーガラスをかけた。

実験1で VPMcvm から、実験2と3で dGlrvs2 から記録された領域電位をコンピューターに保存し、PowerLab 8/30 (ADInstruments, Sydney, Australia) を用いてオフライン解析を行った。咬筋神経に与えた連続した6回から9回の電気刺激に対する応答を、各記録部位毎に平均した。光学顕微鏡に接続した camera lucida (描画装置) を使用して、脳構造、トレーサーの注入部位、トレーサーで標識された軸索および軸索終末を描出した。切片の顕微鏡写真は、光学顕微鏡に接続されたデジタルカメラ (Pixera Pro 150ES, CA, USA) を用いて撮影した。全ての顕微鏡写真は、画像のコントラストを調整しながら Photoshop CS2 (Adobe Systems, CA, USA) を用いて処理した。

## 4. 研究成果

実験1では、3匹のラットで BDA 注入部位は VPMcvm によく限局していた。これらの注入例では、順行性標識終末が、島皮質の中の小部位 (二次体性感覚野に接してその吻腹側に位置する顆粒性島皮質 [GI] 内の背側部、dGlrvs2) のみに認められた。これまで一般的に予想されてきた大脳皮質一次体性感覚野、二次体性感覚野、一次運動野 (無顆粒性大脳皮質外側部)、二次運動野 (無顆粒性大脳皮質内側部) には認められなかった。実験2では、dGlrvs2 から咬筋神経の電気刺激で短潜時の応答が、開口運動時に持続的な発火が記録出来た。これら実験1と2の結果は、三叉神経中脳路核ニューロン経由の感覚は、顆粒性島皮質の小部位に伝達されることを示している。歯科矯正の歯牙移動で賦活される歯根膜感覚が、顆粒性島皮質に伝達されることで、情動や自律神経系に影響を与えている可能性が示された。

実験3では、3匹のラットで BDA 注入部位は dGlrvs2 によく限局していた。これらの注入例では、順行性標識終末が、注入部位と同側優位で両側性に、三叉神経上核に認められた。この結果は、三叉神経中脳路核ニューロン経由で顆粒性島皮質に上行伝達される感覚は、顆粒性島皮質ニューロンの下行性投射によってフィードバックコントロールされている可能性を示している。この神経回路によって、歯科矯正の歯牙移動で賦活される歯根膜感覚によって惹き起こされる情動や自律神経系への影響が、継時的に減弱する可能性が示された。

本脳神経科学研究によって、歯科臨床に重要・有益な情報を提供することができた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

Ikenoue Etsuko, Akhter Fatema, Tsutsumi Yumi, Sato Fumihiko, Ohara Haruka, Uchino Katsuro, Furuta Takahiro, Tachibana Yoshihisa, Yoshida Atsushi: Transcortical descending pathways through granular insular cortex conveying orofacial proprioception: Brain Res.: 11-19, 1687, 2018, 査読有  
DOI: 10.1016/j.brainres.2018.02.033

Tsutsumi Yumi, Tachibana Yoshihisa, Sato Fumihiko, Furuta Takahiro, Ohara Haruka, Tomita Akiko, Fujita Masatoshi, Moritani Masayuki, Yoshida Atsushi: Cortical and

〔学会発表〕(計0件)  
該当なし

〔図書〕(計0件)  
該当なし

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)  
該当なし

取得状況(計0件)  
該当なし

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：山城 隆

ローマ字氏名：YAMASHIRO, takashi

研究協力者氏名：岡 綾香

ローマ字氏名：OKA, ayaka

研究協力者氏名：佐藤 文彦

ローマ字氏名：SATO, fumihiko

研究協力者氏名：上村 夢

ローマ字氏名：UEMURA, yume

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。