

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791478

研究課題名（和文）三叉神経領域における痛覚伝達系の可塑性に関する免疫組織化学的検討

研究課題名（英文）Immunohistochemical study of the plasticity of the nociceptive transmission in the trigeminal region.

研究代表者

詫間 滋 (TAKUMA SHIGERU)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：60360921

研究成果の概要：口腔・顔面領域（三叉神経領域）の難治性疼痛や慢性痛の原因の一つと考えられる、延髄の三叉神経脊髄路核における可塑的变化を調べるため、新生仔 Capsaicin 処理（C線維の選択的脱落惹起）および新生仔 CFA 局所投与（投与局所の炎症惹起）を行った幼若ラットについて、脊髄路核の免疫組織化学的検討（酵素抗体法による免疫染色）を試みた。その結果、各組織切片の染色性は不安定であり、標本作製条件のより一層の均一化ならびに抗原賦活法を併用した免疫染色が必要と考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,900,000	0	2,900,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	150,000	3,550,000

研究分野：歯科麻酔学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：三叉神経脊髄路核，可塑性，免疫組織化学，痛覚，Capsaicin，幼若ラット

1. 研究開始当初の背景

(1)三叉神経系における可塑的变化

近年、痛みを単なる症状ではなくその状態自体が病態であるとの認識のもと、痛覚情報伝達メカニズムを理解しようとする機運にあるが、難治性疼痛や慢性痛の発生機序は未だ明らかになっておらず、三叉神経領域の疼痛は依然として未解決の重要課題である。口腔顎顔面領域の侵害（痛覚）情報は一次ニューロンから三叉神経脊髄路核においてシナ

プスを介して二次ニューロンに中継されるが、ここでの情報処理の可塑的变化が難治性疼痛・慢性痛の発生に重要な意味を持つことが明らかとなっている。

(2)免疫組織化学の必要性

報告者は過去の研究において、新生仔ラット脳幹スライス標本を対象に、電位感受性色素による光学測定の手法を用いた電気生理学的検討を行い、脊髄路核尾側亜核において細径求心線維（C線維）を介した侵害情報伝

達の果たす役割についての知見を得た (Brain Res. 906, 1-12)。その後、脊髄路核における神経線維の発芽 (sprouting) やサイレントシナプスの活性化といった微小形態・機能的変化、あるいは神経伝達物質・受容体の脊髄路核内分布を理解するためには、これに加えて組織学的な検討が不可欠であると考え、平成 17-18 年度科学研究費補助金 (課題番号: 17791431) による研究を立ち上げ、組織学的検討を開始した。組織学の分野において分子局在を明らかにする手段としては免疫組織化学的手法が極めて有用であり、痛覚情報伝達の可塑的变化に BDNF (脳由来神経栄養因子) を中心とする神経栄養因子や、サブスタンス P、CGRP (カルシトニン遺伝子関連ペプチド) といった神経ペプチドが深く関与していることが、近年この手法により明らかとなってきている。

(3) 延髄水平断スライス標本

報告者は過去の電位感受性色素を用いた電気生理学的研究において、生後 5-7 日齢の幼若ラット延髄の水平断スライス標本を確立した。この標本は脊髄路核へ入力する一次求心線維と、その入力を受ける二次ニューロンを同一標本内に含み、かつ脊髄路核の 3 亜核 (吻側・中間・尾側) を長軸方向に一望することが可能である。従って、脊髄路核における組織学的検討には最も適した標本であると考えられる。また新生仔 Capsaicin 処理ラットおよび新生仔 CFA (Complete Freund's Adjuvant) 局所投与ラットを用いて幼若ラット三叉神経脊髄路核における免疫組織化学的報告を行った報告は現在に至るまで殆ど見当たらない。電気生理学的研究で用いたものと同じ標本を、今回は組織学的研究の対象とすることにより、双方の研究を互いに補完して三叉神経領域の侵害情報伝達機構をより詳細に解析することが可能になると考えられる。

(4) 本研究の意義

日本国内のみならず諸外国からの報告を見渡しても、体幹における痛覚の一次中継核である脊髄後角と比較して三叉神経脊髄路核における論文は数少なく、三叉神経領域の疼痛に関する研究は遅れていると言わざるを得ない。口腔顎顔面領域の慢性痛・難治性疼痛の克服には、脊髄路核の侵害情報伝達処理システムおよび同核における可塑的变化の理解が不可欠であると考えられる。本研究では、複数の組織学的手法を用いたアプローチによって、電位感受性色素を用いた電気生理学的実験で得られた知見と併せて、三叉神経領域の侵害情報伝達機構に関する理解を飛躍的に進めることを目指した。

2. 研究の目的

新生仔ラットに Capsaicin を皮下投与することにより、全身の細径求心線維 (C 線維) の選択的な脱落が生じることが知られている。一方、Ruda らは新生仔ラットに CFA (Complete Freund's Adjuvant) を局所投与することにより C 線維の増加および二次ニューロンの反応が亢進することを報告した (Science, 289: 628-630, 2000)。本研究では、新生仔 Capsaicin 処理ラットおよび新生仔 CFA 局所投与ラットを用いて、三叉神経領域への慢性的侵害刺激により三叉神経脊髄路核に惹起される情報伝達の可塑的变化を、免疫組織化学的手法を用いて詳細に検討する、すなわち、脊髄路核への C 線維入力への減少、あるいは三叉神経領域における慢性炎症反応が、脊髄路核内神経栄養因子および神経ペプチドの分布に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究対象

検討する動物群は、i) 対照群、ii) 新生仔 Capsaicin 処理群、iii) 新生仔 CFA 投与群、iv) 新生仔 Capsaicin 処理 + 新生仔 CFA 局所投与群の 4 群とし、実験結果ならびに進行状況に応じてこの 4 群に carageenan 等の起炎物質局所投与による侵害刺激群を加えることとした。実験動物は妊娠ラットを購入し、生後 5-7 日齢の幼若ラットを研究対象とした。

(2) 前処理

新生仔 Capsaicin 処理は報告者の過去の生理学的検討 (Brain Res., 906: 1-12, 2001) と同様の条件にて、生後 2 および 3 日後に 50mg/kg をエーテル麻酔下に頸背部皮下投与した。新生仔 CFA 局所投与は、Ruda らの報告を参考として生後 4 日目にエーテル麻酔下に下顎神経領域への局所投与を行った。

【前処理プロトコール】

日齢	P2	P3	P4	P5	P6	P7
i) 群	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ii) 群	NCT	--NCT	-----	-----	-----	-----
iii) 群	-----	-----	CFA	-----	-----	-----
iv) 群	NCT	--NCT	--CFA	-----	-----	-----

(3) 記録システム

記録系は、当教室所有の顕微鏡 BX51 (オリンパス社) に、本研究費で購入した顕微鏡デジタルカメラ DP71 (オリンパス社) を接続し、組織標本のデジタル画像を保存できる環境を整備した。さらに、本科研費にて購入の落

射蛍光装置 BX2-FL (オリンパス社) を BX51 に組み込むことにより、蛍光抗体法による検討が可能な環境を整えた。

(4) 標本作製

i) - iv) 各群 5 - 7 日齢ラットに対して、心臓からの灌流固定を行った。まずエーテル深麻酔下でシャーレに四肢を固定、胸腹部を皮切し皮膚を剥離した。剣状突起をピンセットで挙上し、横隔膜を切開した後胸骨および右側肋骨を一塊として切除した。これにより心臓が直視できるため、心尖部より 24G サーフロー留置針 (テルモ社) の内筒を左心室に刺入・固定し、脱血路として右心耳を切開した後、輸液ボトルに満たした固定液を小児用点滴セットを用いて少なくとも 30 分間滴下、灌流固定した。固定液は 10% リン酸緩衝ホルマリンもしくは 4% パラフォルムアルデヒドを用いた。灌流固定後、拡大鏡下に固定液に浸漬した状態で抜脳し、灌流固定に用いたものと同じ固定液に一晩以上浸漬固定した。

固定後の標本は水洗の後、通法に従いエタノールによる脱水 (7 系列) を経てキシレンによる透徹 (3 系列) を行い、パラフィン浸透 (3 系列) の後、パラフィン包埋した。このパラフィンブロックを滑走式マイクローム (SM2000R: ライカ社) を用いて水平断スライスし、パラフィン切片を得た。

(5) クリューバ・バレラ染色

本染色法はルクソールファスト青による髄鞘染色と、クレシル紫によるニッスル染色を組み合わせた方法であり、髄鞘は青、神経細胞のニッスル小体が赤紫色に染色される。本研究では、免疫組織染色から得られる結果との比較のため、10% リン酸緩衝ホルマリンもしくは 4% パラフォルムアルデヒドリン酸緩衝液で灌流固定した、いずれのパラフィン切片に対しても同じく通法にて行った。概略は以下の通りである。

- ① 脱パラフィン・洗浄
- ② アルコール処理
- ③ ルクソールファスト青による髄鞘染色
- ④ 95% エタノール洗浄
- ⑤ 蒸留水洗浄
- ⑥ 炭酸リチウム水溶液による分別
- ⑦ 70% エタノールによる分別
- ⑧ 蒸留水による分別
- ⑨ クレシル紫によるニッスル染色
- ⑩ 95% エタノール分別
- ⑪ 脱水・透徹
- ⑫ 封入

(6) 免疫組織化学

4% パラフォルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定した標本から作成した水平断スライ

ス切片に対して、一次抗体として BDNF 抗体 (Chemicon 社) を反応させ、その後シンプルステイン MAX-P0 (ニチレイバイオサイエンス社)、同キットに含まれる基質溶液を作用させて染色を行った上で、クリューバ・バレラ染色標本との比較を行った。

4. 研究成果

(1) 前処理

新生仔 Capsaicin 投与は過去の研究同様に、生後 2 および 3 日後に Capsaicin 50mg/kg を頸背部皮下投与、CFA は生理的食塩水を加えて 3 倍溶液とし、右下顎の顎角部に約 25 μ l 皮下投与した。左側は対象とした。いずれもエーテル麻酔下に投与し、麻酔からの回復後に母親の下に戻した。対象群との成長発育の相違は認めなかった。

(2) 心臓灌流固定

心臓からの灌流固定は固定状態の良い標本を得るためには有効な手技であるが、生後数日の幼若ラットに対して行うには、微細な操作が要求されるために困難を伴う。報告者は過去の研究において幼若ラットに対する心臓からの灌流固定の手技を習得したものの、穿刺針の心臓刺入後、固定液の滴下を開始した際、四肢の硬直が十分でなく、抜脳時の組織の状態から見ても必ずしも良好な灌流固定がなされたと思われぬケースがあり、後述の免疫染色の結果を踏まえると、改良の余地があるものと考えられる。

(3) クリューバ・バレラ染色

本染色は髄鞘と細胞体 (ニッスル小体) を容易に分別することが可能であり、神経組織の染色法としては一般的なものである。本研究では水平断面で三叉神経脊髄路核を観察することが目的であり、三叉神経脊髄路を走行する一次求心線維と脊髄路核に存在する神経細胞が容易に観察できた。免疫組織化学を行う際、本法は比較検討の基礎資料として重要であると考えられた。

(4) 免疫組織化学

BDNF を対象に、クリューバ・バレラ染色を行ったのと同じ標本から得たスライス切片に対して、酵素抗体法による免疫染色を試みた。結果は、スライス毎に発色が不安定であり、群間の比較には至らなかった。原因の一つとして、固定不良、パラフィンブロック作成過程の問題 (脱水不良など) が考えられ、より一層の精度の向上が必要と思われた。パラフィン包埋標本では一般的に抗原性の低下が起こるとされており、免疫染色において良好な染色を得るためには、抗原賦活法を併

用することも考慮の余地があると考えられた。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

詫間 滋 (TAKUMA SHIGERU)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：60360921

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし