

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390481

研究課題名（和文） 歯髄炎における痛覚系-交感神経系のクロストークと新たな疼痛制御理論

研究課題名（英文） Crosstalk between sensory and sympathetic nerves in pulpitis and pain control

研究代表者

笹野 高嗣 (Sasano Takashi)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：10125560

研究成果の概要（和文）：

本研究は、末梢の痛覚系に交感神経が関与する事実を立証し、新たな疼痛制御理論を確立する試みである。まず、WGA-HRP 順行性標識法を用いて歯髄における交感神経の動態について検索した。その結果、歯髄炎において、交感神経は象牙芽細胞層およびその直下に発芽することが示された。次に、発芽した交感神経が痛みを修飾するか否かについて調べるための疼痛マーカーについて検索した結果、P2X4 遺伝子が急性痛のマーカーとして最も適していることが示された。

研究成果の概要（英文）：

This study was designed to determine the crosstalk between sensory and sympathetic nerves in pulpitis. The sympathetic nerve fibers were demonstrated to sprout in the inflamed pulp tissues. In the second place, the P2X4 gene expression was shown to be the most suitable nociceptive marker because of its sensitive response to pain stimuli.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	6,100,000	1,830,000	7,930,000

研究分野：口腔診断学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯痛、交感神経、歯髄炎、疼痛制御

1. 研究開始当初の背景

歯髄は神経と血管に富む組織であり、これら神経と血管は機能的に相関している。すなわち、感覚神経は痛みを中枢に伝達する途中で歯髄内の神経軸索を介して支配領域の血管拡張や血漿漏出を引き起こす（神経原性炎症）。周囲を硬組織で囲まれた閉鎖系の歯髄では、血管の拡張は歯髄内圧を亢進させ、感覚神経を刺激する結果、更なる痛みを引き起こす。かくして、「痛み－血管拡張－内圧亢進－痛み」の悪循環が成立する (Sasano et al, J Dent Res, 1994)。歯髄には自律神経である交感神経も存在している。交感神経の働きについて以前は、循環障害に関連する血管収縮作用のみが知られていたが、近年、痛みを修飾する可能性についてのエビデンスが確立してきた。痛みのメカニズムに交感神経が関与していることは古くから経験的に推察されており、痛みが環境変化や精神的ストレス、さらには気象変化（低気圧接近や気温低下）によって増強すること、交感神経ブロックが有効な場合があることなどが根拠となっている。1980年代後半、神経損傷動物モデルにおいて、感覚神経の損傷部位に交感神経が発芽し、交感神経刺激やカテコラミン（交感神経作動薬）によって痛覚過敏が生じることが報告され、この種の研究（交感神経の末梢における痛みの修飾：交感神経依存性疼痛）が数多く報告された。さて、冒頭に述べたように歯髄は解剖学的形態の特殊性から神経原性炎症を起こしやすい。この神経原性炎症に交感神経が関与していることが皮膚では既に報告されている。すなわち、ヒトの皮膚にカプサイシンを塗布することにより神経原性炎症を作成すると、自発痛に加え様々な刺激に対する痛覚過敏が誘発される。同部位にノルアドレナリンを投与すると、痛覚過敏が増強し、 $\alpha_{1,2}$ 受容体阻害薬（交感神経遮断剤の一種）によりこの痛みは減弱する。ここで重要なことは、交感神経依存性疼痛は遮断できるということである。我々は、歯髄炎の痛みにも交感神経が関与している事実を立証し、疼痛制御に

応用したいと考えている。しかしながら、歯髄炎における交感神経の発芽に関する報告はこれまでなく、歯痛と交感神経のクロストークについては知られていない。

2. 研究の目的

本研究では、歯髄の痛みに対する交感神経の末梢修飾機序を明らかにすることを目的として、神経の順行性輸送を利用した神経回路標識法により、直接的に交感神経を標識する方法を用い歯髄炎における交感神経の発芽およびその意義について検索する。さらに、発芽した交感神経が歯痛を修飾するか否かについて調べるための疼痛マーカーについて検索する。

3. 研究の方法

(1) 歯髄炎における交感神経の発芽について

本研究は東北大学医学部動物実験倫理委員会により承認が得られたプロトコールに基づいて動物の飼育および実験を行った。実験動物として体重 300～400g の成熟オス、ウィスター系ラット 14 匹を用いた。窩洞形成を行った 7 匹を炎症歯髄群とし、窩洞形成を行わなかった 7 匹を正常歯髄群とした。全ての動物は実験期間中、室温 24°C、規則的な明暗サイクル（8 時点灯、20 時消灯）のもとで飼育し、ラット用固形飼料ラボ MR ストック（船橋農場、千葉）と脱イオン水を自由に摂取させた。

①窩洞形成

ラットを 7 日間飼育し、エーテルにより鎮静後、ネブタール (1.0ml/Kg) を腹腔内に注入した。麻酔導入後、上顎左側第一臼歯近心咬頭に No. 1/2 ラウンドバーを用いて咬頭が無くなるまで窩洞を形成した。

②WGA-HRP 注入

臼歯窩洞形成後 18 日目、窩洞形成時と同様の方法で麻酔を行い、麻酔導入後、左側上顎神経節の末梢側 1/2 に対して 1 M 塩化カリウム水溶液に溶解した 5 % WGA-HRP (Wheat

germ agglutinin horseradish peroxidase, Toyobo Co., Japan) を 3 mL、ガラス毛細管 (先端内径 40~50 μ m) を繋げたマイクロシリンジ (Microliter syringe 701N, Hamilton, Switzerland) を用いて約 15 分間かけて注入した。5 %WGA-HRP 注入前には必ず、電気刺激装置 (Model SEN-1203; Nihon Koden, Japan) を用いて、銀電極にて左側上顎神経節を 2 ms、10 Hz、30 V のパルスで 10 秒間電気刺激し、動脈圧の上昇、舌尖左側部の血流の減少および左側眼瞼の開きにて上顎神経節の位置を確認した。なお、動脈圧は血压測定ラインとして左側大腿動脈にカテーテルを留置し、圧トランスデューサーを用い、血流は反射型レーザー Doppler 血流計 (LDF; ALF21R, Advance, Japan) を用いて持続的にモニターした。正常歯髓群に対しても同様の方法で WGA-HRP を注入し、コントロールとした。

③灌流固定

臼歯窩洞形成後 21 日目 (WGA-HRP を注入 72 時間後)、窩洞形成時と同様の方法で麻酔を行い、麻酔導入後、腹部大動脈を結紮した。ヘパリンを加えた 0.1 M リン酸緩衝液 (PB) 150 mL (37~40°C, pH 7.4) を左心室より流し脱血を行い、次いで 0.1 M PB で溶かした 4 %パラホルムアルデヒド (4°C) 400~500 mL を用いて灌流固定を行った。正常歯髓群においても同様の方法で灌流固定を行い、コントロールとした。

④光顕観察

灌流固定したラットから左側上顎臼歯部を顎骨ごと取り出し、4 %パラホルムアルデヒド水溶液に 3 時間浸漬固定した。その後、4 %スクロースを加えた 7.5%EDTA 溶液 (4°C, pH 7.4) にて 3 日間脱灰を行い、10%スクロースを含む 0.1 M PB に 1 晩および 20%スクロースを含む 0.1 M PB に 1 日浸漬した。

5 %CMC コンパウンド (Finetec Co., Japan) に包埋後、-80°C にて凍結ブロックを作製し、粘着フィルム法^{11,12)} により厚さ 30 μ m の切片を凍結マイクロトーム (CM3050S,

Leica Microsystems, Germany) を用いて作製した。作製した切片を TMB/タングステン酸法¹³⁾

(TMB:3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, Merck, Germany) を用いて染色し、暗視野照明法にて光顕観察 (Leica DMR, Leica Microsystems, Germany) を行った。さらに暗視野観察の後、同切片を HE 染色し同様に光顕観察を行った。

⑤電顕観察

灌流固定したラットから左側上顎臼歯部を顎骨ごと取り出し、4 %パラホルムアルデヒド水溶液と 1 %グルタルアルデヒドの混合液に 3 時間浸漬固定した。その後、4 %スクロースを加えた 7.5%EDTA 溶液 (4°C, pH 7.4) にて 3 日間脱灰を行い、10%スクロースを含む 0.1 M PB に 1 晩および 20%スクロースを含む 0.1 M PB に 1 日浸漬した。

光顕観察時の切片作製法と同様の方法で厚さ 16 μ m の切片を作製し、TMB/タングステン酸法¹³⁾ にて染色した。次に、エポキシ樹脂倒立包埋法にて包埋し、ウルトラマイクロトーム (Ultracut E, Reichert Jung, Germany) を用いて厚さ 90 nm の超薄切片を作製した。その後、超薄切片に鉛染色を施し、透過型電子顕微鏡 (H-7600, Hitachi, Japan) を用いて加速電圧 80 kV にて観察を行った。

⑥ WGA-HRP 反応物の計測

エポキシ樹脂超薄切片を用いて、正常歯髓群 (7 匹) および炎症歯髓群 (7 匹) の上顎左側第一臼歯近心咬頭直下歯髓表層部の単位面積当たり (120 \times 95 nm) の WGA-HRP 反応物数を明視野光顕観察にて計測した。また、Mann-Whitney's U test を用いて統計処理を行った。

(2) 疼痛マーカーについて

①Capsaicin および vehicle の注入、および三叉神経節の採取

ラットをジエチルエーテル吸入麻酔による非動化後、舌尖部左側に capsaicin (30 mM) または vehicle を注入した。注入後、一定の時間 (5 分、15 分、30 分および 60 分) ケー

ジ内に放置し、覚醒状態（通常 2～3 分でジエチルエーテル麻酔より覚醒）で断頭した。尚、コントロール群ではジエチルエーテル吸入麻酔後断頭した。断頭後即座（約 5 分以内）に RNase を不活化する RNA *later*TM (QIAGEN) の存在下に刺激側（左側）の三叉神経節を摘出後、その後急速冷凍（dry ice & n-Hexane dehydrated、-80°C）し、real time PCR 法による mRNA 発現量解析の試料として冷凍庫（-80°C）に保存した。

② mRNA 発現量の解析 (real time PCR)

三叉神経節の total RNA を Trizol-chloroform法 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) にて抽出し、ジェノミックDNAのコンタミネーションを DNAfreeTM (Ambion, Austin, TX, USA) で除去後、Super ScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて cDNA を作製した。その後、c-fos、SP [tachykinin 1 (tac 1)]、CGRP、NGF、BDNF LPA₁ (LPA受容体)、P2X₄ (ATP受容体)、および β-actin (内部標準) の遺伝子発現について、iCycler (Bio-Rad Hercules, CA, USA) を用いて real time PCR 解析を行った。なお、それぞれのプライマーシーケンスを Table 1 に、反応条件を Table 2 に示す。

③ 統計学的分析

全ての数値は、平均値±標準偏差で示した。Capsaicin 群および vehicle 群におけるコントロールと各時間群との有意差検定は、ANOVA 分散分析を行った後、Dunnett test による多重比較検定を行った。また、各時間群における capsaicin 群と vehicle 群の有意差検定は、F test の後、unpaired T test を用いて行った。また、各分子遺伝子発現の有意差検定は、ANOVA 分散分析を行った後、Post hoc test による多重比較検定を行なった。有意水準はいずれも 5%未満とした。なお、統計ソフトは SPSS 15.0 for Windows (SPSS Japan Inc., Tokyo Japan) を用いた。

4. 研究成果

(1) 歯髄炎における交感神経の発芽について

① 光顕観察

正常歯髄群：

HE 所見) 冠部歯髄において、それぞれの髄角部には二次象牙質の形成が若干認められ、その直下には、象牙芽細胞が比較的整然と柵状に配列していた。

暗視野所見) WGA-HRP 反応物は小さな点状物として観察された。この WGA-HRP 反応物は、主に二次象牙質形成部直下の歯髄表層にごくわずかに分布しているのが認められたが、歯髄中央部には殆どみられなかった。

炎症歯髄群：

HE 所見) 窩洞形成を行った咬頭の冠部歯髄において、窩洞形成部直下の髄角部に修復象牙質の形成が認められた。その直下の象牙芽細胞は正常歯髄と比較し、柵状配列は乱れていた。

暗視野所見) WGA-HRP 反応物は、主に修復象牙質形成部直下の歯髄表層に分布し、その分布の数は正常歯髄群に比べて明らかに増加していた。歯髄中央部には、正常歯髄群と同様に、殆どみられなかった。

② 電顕観察

正常歯髄群：光顕観察にて WGA-HRP 反応物が認められた二次象牙質形成部の象牙質、象牙前質および歯髄表層部を電顕にて観察した結果、光顕所見と同様に、象牙芽細胞層において象牙芽細胞は柵状に整然と配列していた。交感神経の神経終末を示す WGA-HRP 反応物は電子密度の高い塊状物として観察され、この反応物は象牙芽細胞層および象牙芽細胞層直下に散在していた。象牙芽細胞層において、WGA-HRP 反応物の大部分は象牙芽細胞体と近接していたが、1つの象牙芽細胞に複数の WGA-HRP 反応物の塊が観察されることは殆どなかった。象牙芽細胞層では無髄神経のみ観察され、有髄神経は認められなかった。象牙芽細胞層直下では無髄神経および有髄神経の両者が観察され、無髄神経終末の一部

には WGA-HRP 反応物が認められる場合があったが、有髄神経には WGA-HRP 反応物は観察されなかった。象牙質および象牙前質の象牙細管内においては、象牙芽細胞突起に近接して無髄神経終末が認められたが WGA-HRP 反応物は観察されなかった。

炎症歯髄群：正常歯髄と同様に、WGA-HRP 反応物が認められた窩洞形成部直下の修復象牙質形成部の象牙質、象牙前質および歯髄表層部を観察した。正常歯髄と比較し、修復象牙質直下の象牙芽細胞層において象牙芽細胞の配列は乱れており、この部位では WGA-HRP 反応物が多数認められた。WGA-HRP 反応物と象牙芽細胞体は互いに近接しており、正常歯髄とは異なり、WGA-HRP 反応物が数個かたまって観察される場合が多くみられた。象牙芽細胞層では正常歯髄と同様に無髄神経のみ観察され、有髄神経は認められなかった。また、修復象牙質形成により象牙前質に封入された象牙芽細胞が多くみられ、その象牙芽細胞体に近接して WGA-HRP 反応物が観察された。WGA-HRP 反応物は正常歯髄と同様に、象牙細管内の象牙芽細胞突起には認められなかった。

③WGA-HRP 反応物数

単位面積当たり (120×95nm) の WGA-HRP 反応物数は、正常歯髄群では平均 7.0 ± 2.2 個に対して、炎症歯髄群では平均 10.9 ± 2.9 個であり、正常歯髄群に比べ炎症歯髄群の WGA-HRP 反応物数は有意に増加していた ($P < 0.05$)。

(2) 疼痛マーカーについて

①c-fos について

Capsaicin 群の c-fos 遺伝子発現は、30 分群および 60 分群でコントロール群よりも有意に増加した (注入後 30 分で 2.50 倍、60 分で 2.16 倍)。一方、vehicle 群では、いかなる時間群においてもコントロール群との間に有意差はみられなかった。また、30 分群および 60 分群における、capsaicin 群の c-fos 遺伝子発現は vehicle 群に比べ有

意に高かった。

②神経ペプチドについて

1. SP (tac 1)

SP (tac 1) 遺伝子発現は、各時間群において、capsaicin 群、vehicle 群ともにコントロール群との間に有意差はみられなかった。

2. CGRP

Capsaicin 群の CGRP 遺伝子発現は、注入 60 分後でコントロール群に比べ有意に増加した (1.57 倍)。一方、vehicle 群では、いかなる時間群においてもコントロール群との間に有意差はみられなかった。なお、各時間群において capsaicin 群と vehicle 群との間に有意差はみられなかった。

③神経栄養因子について

Capsaicin 群および vehicle 群の NGF および BDNF 遺伝子発現は、いかなる時間群においてもコントロール群との間に有意差はみられなかった。なお、各時間群において capsaicin 群と vehicle 群との間に有意差はみられなかった。

④アロディニア関連分子について

1. LPA₁

Capsaicin 群の LPA₁ 遺伝子発現は、capsaicin 注入 30 分後でコントロール群よりも有意に増加した (1.65 倍)。一方 vehicle 群では、いかなる時間群においてもコントロール群との間に有意差はみられなかった。なお、30 分群において capsaicin 群と vehicle 群との間に有意差がみられた。

2. P2X₄

Capsaicin 群と vehicle 群の P2X₄ 遺伝子発現は、注入 60 分後にコントロール群と比べてそれぞれ 5.49 倍、2.75 倍に増加した。さらに、この時の capsaicin 群と vehicle 群との間に有意差がみられた。また、Capsaicin 注入後の P2X₄ 遺伝子発現量は、c-fos、CGRP、および LPA₁ 比べ、有意に大きかった [対 c-fos: $p = 0.0007$, $p = 0.0003$, 対 CGRP: $p <$

0.0001, 対 $LPA_1:p < 0.0001$]

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2件)

1. 笹野高嗣、口腔における痛みと反射性血管拡張 —とくに歯髄血流調節機構の特殊性について—、自律神経学、査読有、47、2010、117-123.
2. Shimeno Y, Sugawara Y, Iikubo M, Shoji N, Sasano T, Sympathetic nerve fibers sprout into rat odontoblast layer, but not into dentinal tubules, in response to cavity preparation, Neurosci Lett, 査読有、435、2008、73-77.

[学会発表] (計5件)

1. Shoji N, Sugimoto K, Kataura T, Onodera D, Sasano T, The effect of capsaicin stimulation to tongue on HPA axis, 88th International Association for Dental Research, 2010年7月16日、バルセロナ (スペイン).
2. 杉本是明、庄司憲明、笹野高嗣、ラット舌痛刺激による視床下部・下垂体のストレス応答遺伝子転写の定量、第64回日本口腔科学会学術集会、2010年6月24日、札幌.
3. 笹野高嗣、口腔における痛みと反射性血管拡張 —とくに歯髄血流調節機構の特殊性について—、第62回日本自律神経学会、2009年11月14日、和歌山.
4. 庄司憲明、片浦貴俊、杉本是明、笹野高嗣、舌カプサイシン刺激が視床下部—下垂体—副腎系に及ぼす影響—視床下部 CRH 遺伝子を指標として—、第3回三叉神経領域の感覚—運動統合機構研究会、2009年10月25日、軽井沢.
5. Yoichi Shimeno, Yumiko Sugawara, Masahiro Iikubo, Noriaki Shoji, Takashi Sasano, Absence of sympathetic innervation and sprouting in rat

dentinal tubules, IADR 86th General Session & Exhibition, 2008年7月3日、トロント (カナダ).

[その他]

ホームページ等

<http://www.ddh.tohoku.ac.jp/~shindan/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹野 高嗣 (Sasano Takashi)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：10125560

(2) 研究分担者

菅原 由美子 (Sugawara Yumiko)
東北大学・病院・助教
研究者番号：30235866

庄司 憲明 (Shoji Noriaki)
東北大学・病院・講師
研究者番号：70250800

阪本 真弥 (Sakamoto Maya)
東北大学・病院・講師
研究者番号：90157686

飯久保 正弘 (Iikubo Masahiro)
東北大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：80302157

佐藤 しづ子 (Sato Shizuko)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：60225274