

令和 3 年 6 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24151

研究課題名（和文）ラット三叉神経節における感覚モダリティの三次元分布の提供

研究課題名（英文）A three-dimensional distribution of sensory modality in the rat trigeminal ganglion

研究代表者

千堂 良造（Ryozo, Sendo）

鹿児島大学・鹿児島大学病院・助教

研究者番号：30852107

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：異所性疼痛に関連した、離れた部位の痛覚を担う神経細胞体同士が近接すると予想されることから、本研究ではラット三叉神経節における感覚モダリティの三次元的分布様式の提供を目指す。研究方法として、これまで申請者が確立した組織透明化技術、逆行性トレーサー、免疫組織化学染色を組み合わせた手法を応用して研究を行なった。本研究によって、ラット三叉神経節の相互作用に関する基礎研究を行うのに必要な形態学的基盤を把握することができた。今後の展開としては、異所性疼痛メカニズムの空間的側面からの解明、延いては末梢神経に対する神経障害性疼痛の新たな治療法への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

得られた結果より、今後の臨床研究やトランスレーショナルな研究への発展が期待される。展開としては、異所性疼痛メカニズムの空間的側面からの解明、延いては末梢神経に対する神経障害性疼痛の新たな治療法への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Since it is expected that nerve cell bodies responsible for pain sensation in distant sites related to ectopic pain will be close to each other, the aim of this study is to clarify a three-dimensional distribution pattern of sensory modalities in the rat trigeminal ganglion. As a research method, we applied a method that combines tissue clearing technology, retrograde tracer, and immunohistochemical staining. This study provided us with the morphological basis needed to conduct basic research on rat trigeminal ganglion interactions. As future developments, it is expected that the ectopic pain mechanism will be elucidated from the spatial aspect, and that it will be applied to new treatment methods for neuropathic pain for peripheral nerves.

研究分野：解剖生理学

キーワード：三叉神経節 感覚モダリティ 3次元分布

1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛に代表されるような非生理的疼痛では、障害された組織とは異なる離れた部位に痛みを感じることがしばしば認められる。このような異所性疼痛・関連痛のメカニズムは様々なものが報告されているが、そのうちの一つに、末梢神経の時点において病的神経細胞が支配部位の異なる正常神経細胞へ作用する可能性が示されている。口腔顔面領域の感覚神経である三叉神経では、三叉神経節において病的神経細胞による傍分泌が直接的に、あるいは衛生細胞を間接的に周囲の正常神経細胞へ影響すること (Goto et al. J Physiol Sci. 2016) や、GAP 結合を介して周囲の正常神経細胞へ作用すること (Yu Shin K et al. Neuron 2016) が報告されている。これらの仮説は病的神経細胞が支配部位の異なる正常神経細胞と三叉神経節内で相互作用を及ぼしうるだけ近接することが前提条件となる。

この仮説を示した研究ではラットで報告されてきたが、ラット三叉神経節での神経細胞体分布は報告により統一性を欠いており詳細が不明瞭であった。末梢組織ごとに対応した三叉神経節のソマトトピーを表現した報告などもみられるが、それぞれの領域の境界を詳細に言及したものはなかった。

2. 研究の目的

そこで、近年開発された組織透明化技術を応用し、逆行性トレーサーを組み合わせた手法で、領域ごとの境界に着目した、ラット三叉神経節における三次元的な局在地図の提供を目指した。これまでの研究手法では三叉神経節の背-腹側方向の神経細胞体の分布を網羅的に見ることは困難であったため、本研究では背-腹側方向への分布までも網羅的に見ることも目的とした。

さらには、それぞれの神経細胞体がどのような感覚刺激 (触覚、痛覚、温度感覚など) に対応するかの解明までも目指した。

3. 研究の方法

実験には8週齢の Sprague Dawley 系雄性ラット (250~350g) を用いた。麻酔下にて逆行性トレーサー (Fast Blue、テトラメチルローダミンデキストランアミン) を顔面の各領域へと注入した。注入部位は三叉神経第1枝として角膜・上眼瞼、第2枝として眼窩下神経・硬口蓋・上顎臼歯歯髄、第3枝として咬筋・下顎臼歯歯髄・舌とした。注入後一週間で灌流固定し、三叉神経節を摘出した。摘出した三叉神経節は凍結後、500 μ m ごとに冠状面に沿って切断し、1つの三叉神経節を3~4つのブロックへと分割した。各ブロックは組織透明化技術である iDISCO のプロトコルを一部最適化した上で、透明化処理を行なった。透明化処理の後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行い、光学切片厚約 5 μ m ごとに画像撮影を行なった。これにより、1つの三叉神経節は3~4つの 5 μ m ごとのスタック画像となった。各スタック画像を、三叉神経第3枝分岐部および全体像から位置合わせを行ない、Neurolucida で統合した。そして、各スタック画像の概形を模写した後、逆行性トレーサー陽性細胞の蛍光面積が最大となる深度でプロットし、三次元再構築を行なった。

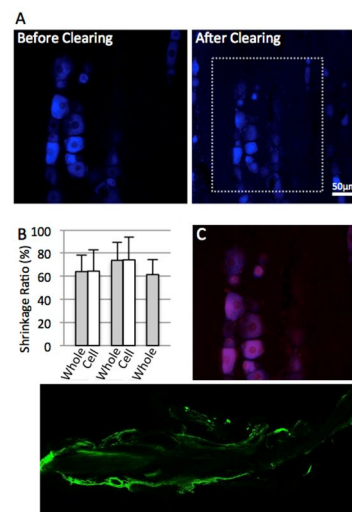
一方、同一サンプルを透明化前後で撮影し、透明化処理による内外側方向・吻尾側方向・背腹側方向への収縮率を算出した。これをもとに、透明化処理後の三次元再構築された画像を透明処理前の大きさとなるよう拡大補正を行なった。

得られた三次元再構築画像から、内外側方向、吻尾側方向および背腹側方向の平均値を算出し、各サンプルを平均値へと均一化した。内外側方向における幅径は第3枝分岐部における第1・2枝を、吻尾側方向における長径は第3枝分岐部から第3枝尾側膨隆部までを、背腹側方向における幅径は再構築画像の厚みを基準値とした。均一化した三次元再構築画像を1つの標準化モデルとして構築しなおし、これをもとに、各注入部位のオーバーラップを、三次元細胞体局在領域の重複する体積から解析した。その後、オーバーラップする可能性が示された注入部位を二つずつ組み合わせ、逆行性トレーサーによる二重標識を行ない、上記手順と同様に三次元再構築画像を得た。

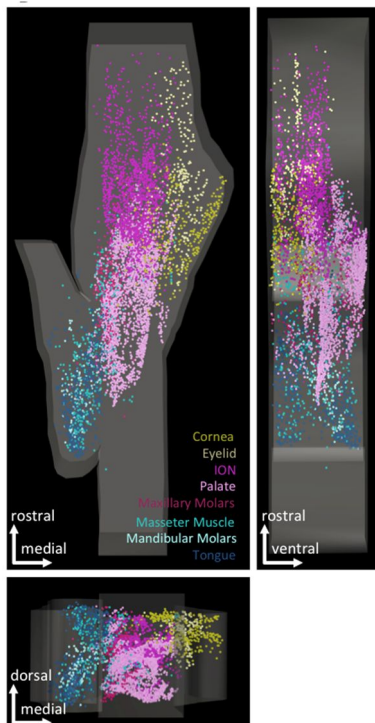
4. 研究成果

iDISCO 法はサンプル収縮を伴う手法で、組織内構造物の位置関係は変化しないとされている。確認のためラット三叉神経節における細胞体位置関係が不変かどうかを確認した。細胞体では、外-内側方向に $64.4 \pm 18.6\%$ 、吻-尾側方向に $74.2 \pm 19.6\%$ の収縮率であった。撮影像の全体から算出した収縮率は、外-内側方向に $64.3 \pm 13.9\%$ 、吻-尾側方向に $73.9 \pm 15.2\%$ 、背-腹側方向に $61.3 \pm 12.9\%$ であった。これらより、透明化後の画像を、収縮前のサイズへ拡大補正し重ね合わせたところ、細胞体の位置関係に大きな変化は認めなかった。

免疫組織化学染色については、プロトコルを最適化するため、



様々な条件で検討したが、浅層と深層での蛍光標識の差が強い結果しか得られなかった。今後、条件を再度見直すことで三叉神経節での組織透明化処理と免疫組織化学染色の組み合わせは可能となるとは考えられるが、現時点ではそこまで至らなかった。



そこで、得られた再構築画像をもとに、三叉神経節の標準化モデルを作成した(左図)。

第1枝の末梢領域である角膜、上眼瞼へ注入した結果、細胞体はTG内の吻側内側背側部を中心とした分布を示した。いずれの場合も、腹側部と分岐部より尾側部には細胞体を認めず、一部の細胞体は吻側外側部にまで広く分布する結果であった。第1枝領域では、角膜より上眼瞼のほうが、吻-尾側方向において分岐部に近い位置で細胞体が分布している傾向にあった。

第2枝の末梢領域である眼窩下神経においては、吻側部中央を中心とし、吻側部の外側部、内側部に及ぶ広い範囲に細胞体分布が認められた。背-腹側方向においては中央部に多く、腹側では少なくなる傾向が認められたものの、やはり広範囲に分布していた。同じく第2枝の末梢領域である口蓋の場合、眼窩下神経よりも尾側寄りの吻側部を中心とした分布であった。こちらも広範な分布様式を示したが、背-腹側方向においては、中央部から腹側部にかけて多く分布し、背側では少ない結果であった。上顎臼歯は、吻側外側部を中心とした分布であり、背-腹側方向は満遍なく細胞体が存在していた。背-腹側方向中央部に存在する細胞体の一部は、吻側内側部にまで広く広がっていた。第2枝領域内では、眼窩下神経は吻側部の吻側背側寄り、口蓋は吻側部の尾側腹側寄り、上顎臼歯は吻側部の外側部寄りという傾向にあった。

第3枝の末梢領域である咬筋においては、尾側部を中心に、吻側外側部まで多くの細胞体が分布しており、わずかに吻側内側部にも蛍光が観察された。背-腹側方向においても広く分布していた。下顎臼歯では、背側寄りでは吻側外側部からスタートし、腹側方向に行くに従って尾側部へと移行していく分布が観察された。舌では尾側部を中心に、吻側外側部にまで広がる分布を示した。腹側寄りにおいては、尾側部を中心とした分布となっていた。第3枝内では、各領域に若干の特徴的な分布傾向を認めるものの、細胞体が存在する部位が極端に異なるような像は得られなかった。

これを元に、各支配領域の細胞体が存在する範囲を50μmごとに囲んで行き、支配領域部として立体構造を作成、各領域構造の重なりを体積を解析した(下表)。

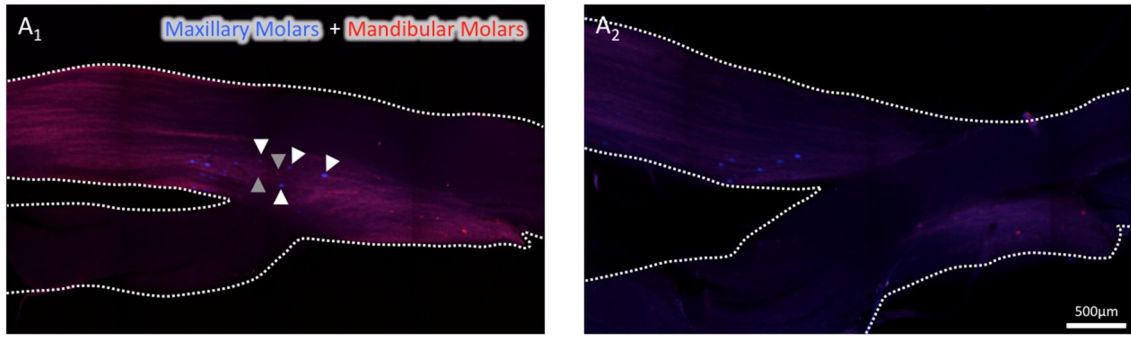
第3枝領域内は特に重なりが多く、第1枝領域、第2枝領域の中では口蓋と上顎臼歯が最も重なっていた。各枝の比較では、第2枝領域と第3枝領域の重なりが最も多かった。第3枝領域と第2枝領域の口腔内領域(上顎臼歯、口蓋)を比較したところ、口蓋と第3枝領域よりも、上顎臼歯と第3枝領域のほうがオーバーラップしている結果であった。

以上のことより三叉神経節において、異なる支配領域をもつ神経細胞体同士が近接しやすいのは第3枝内の各領域および、第2枝領域の中でも特に口腔内領域であることが考えられた。

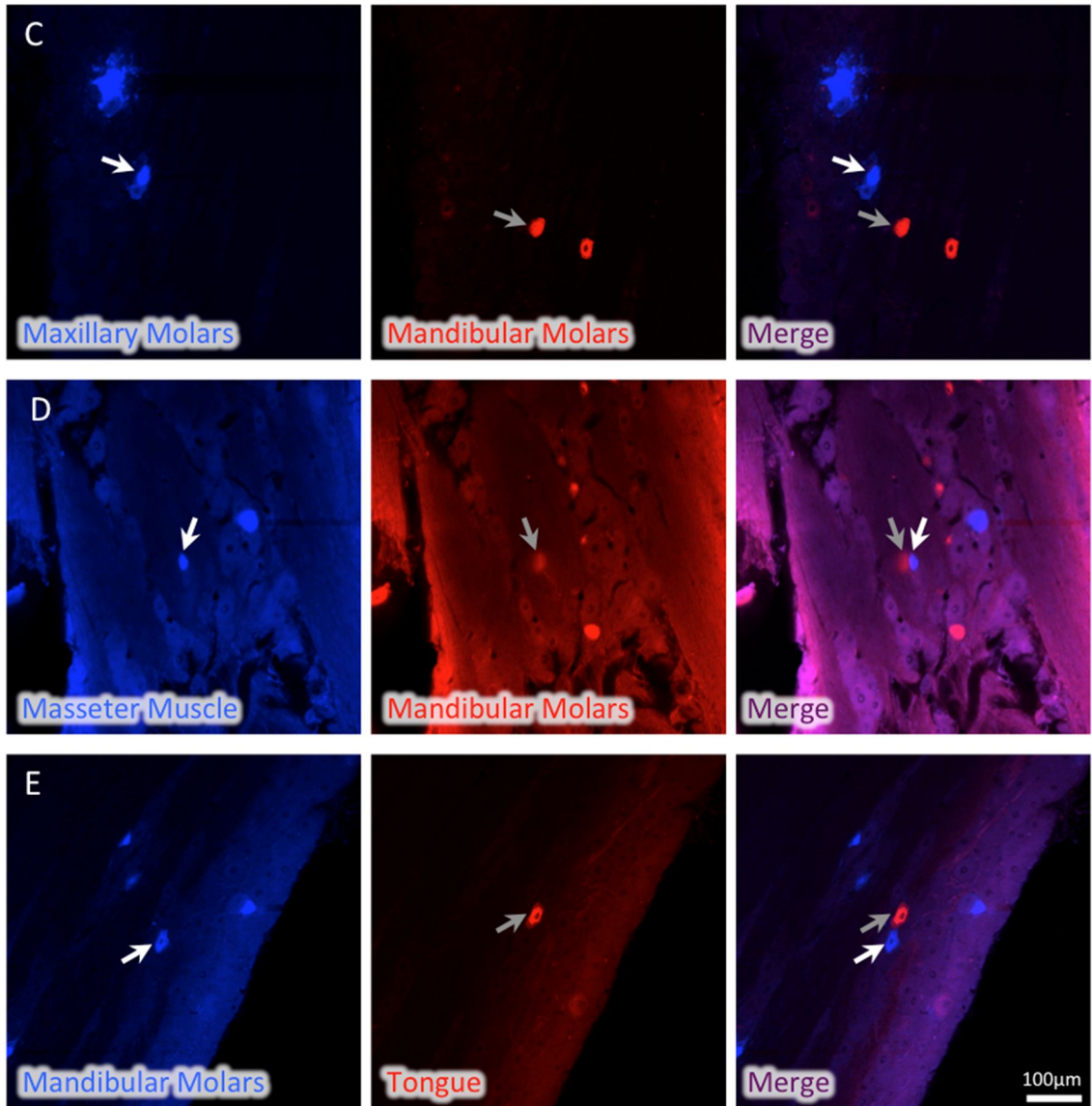
(A)	(B)	(A) (B) / (A)	(A) (B) / (B)	Average
角膜	上眼瞼	27.3%	22.1%	24.7%
眼窩下神経	硬口蓋	15.9%	20.6%	18.2%
眼窩下神経	上顎臼歯歯髄	6.8%	23.6%	15.2%
硬口蓋	上顎臼歯歯髄	19.2%	51.0%	35.1%
咬筋	下顎臼歯歯髄	10.5%	65.5%	38.0%
咬筋	舌	45.5%	53.9%	49.7%
下顎臼歯歯髄	舌	78.1%	14.8%	46.4%
第1枝	第2枝	21.3%	7.6%	14.4%
第1枝	第3枝	1.2%	0.8%	1.0%
第2枝	第3枝	18.4%	32.6%	25.5%
硬口蓋	第3枝	32.5%	22.3%	27.4%
上顎臼歯歯髄	第3枝	54.1%	13.9%	34.0%

特に領域が重なっている上顎臼歯、および第3枝内の咬筋、下顎臼歯、舌において、逆光トレーサーの二重標識にて観察を行った。上下臼歯の二重標識の低倍率像において、背側寄りに存在する吻側-尾側連続領域で各々の細胞体が混在しているのが確認された(下図A1)。腹側寄

りでは、吻側部と尾側部が離れており、上下臼歯の細胞体が混在することはなかった(下図 A2)。



また、上顎臼歯と下顎臼歯の二重標識像では、近くに細胞体が存在している部位を認めた(下図 C)。咬筋と下顎臼歯、下顎臼歯と舌はそれぞれ細胞体が近接した像が観察された(下図 4D,E)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------