

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月10日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791836

研究課題名（和文） 交感神経抑制による歯痛制御理論の確立

研究課題名（英文） Study on possible sympathetic modulation of dental pain

研究代表者

示野 陽一（SHIMENO YOICHI）

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：70447168

研究成果の概要（和文）：ウイスター系雄性成熟ラットの上顎臼歯に窩洞形成を行い、窩洞形成後14日目の歯髄内の交感神経の状態について WGA-HRP 順行性標識法を用い光学顕微鏡および電子顕微鏡にて観察した。その結果、窩洞形成後の歯髄内の象牙芽細胞層における交感神経は窩洞形成を行わなかったラットの同部位に比べて有意に増加していた。しかし、窩洞形成の有無に関わらず、象牙細管内の象牙芽細胞突起には交感神経の神経終末は存在しないことが示された。

研究成果の概要（英文）：This study was designed to determine if sympathetic nerve fibers exist in dentinal tubules in rat normal dental pulp, and if they sprout into the dentinal tubules in response to artificial cavity preparation in dentin. Sympathetic nerve fibers in rat molar dental pulp were labeled using an anterograde axonal transport technique involving injection of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase (WGA-HRP) into the superior cervical ganglion (SCG). They were then observed using light and electron microscopes. In normal dental pulp (control), scattered WGA-HRP reaction products were observed in unmyelinated nerve endings in the odontoblast layer and subodontoblastic region. In injured pulp 3 weeks after cavity preparation, reaction products were about 1.8-times more plentiful in the above areas (versus control pulp). However, no labeled nerve fibers were observed in the dentinal tubules in either control or injured dental pulp. These results indicate that although sympathetic nerve fibers do indeed sprout in rat dental pulp in response to cavity preparation, they do not penetrate into the dentinal tubules in which postganglionic nerve endings derived from the SCG were not originally present.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：交感神経依存性疼痛、歯痛、末梢修飾機序

## 1. 研究開始当初の背景

自律神経活動をつかさどる交感神経が痛

みの発生・維持に重要な役割を演じていることは古くから知られており、その末梢修飾機

序については、これまで交感神経の血管収縮作用に基づく痛みの悪循環説（痛み→交感神経興奮→血管収縮→血流低下→組織障害→痛み）が有望であったが、近年、交感神経と痛覚線維の間の相互作用（cross talk）が皮膚領域で明らかとなった。すなわち、痛覚線維は正常では交感神経やノルアドレナリン局所投与に対して反応しないが、受容野に神経損傷や炎症が起こると反応するようになること、また、この反応は交感神経受容体（ $\alpha_2$ ）阻害薬の前投与によって消失することが報告された。痛みが増強されるメカニズムとしては、交感神経の興奮が末梢レベルや脊髄神経節内での異常連絡を形成し痛覚線維を興奮させると考えられている。

歯痛は日常の歯科臨床において最も頻繁にみられる症状であるが、この痛みに関与するかどうかについては現在のところ不明である。しかしながら、歯痛は気圧、血圧、情動に左右されること、また、突発性歯痛が交感神経依存性疼痛の範疇に含まれる可能性を示唆する報告があることなどから、歯痛に対する交感神経の末梢修飾機構が存在する可能性は大きい。

## 2. 研究の目的

歯痛の最大の原因となる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した。

## 3. 研究の方法

### <対象および方法>

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、ネンプタール（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。

### (2) WGA-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 1M 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 3mL、ガラス毛细管（先端内径 40~50  $\mu$ 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 2ms、10Hz、30V 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ドプラー血流計（LDF; ALF21R, Advance, Japan）を用いて持続的にモニターした。正常歯髄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 0.1M リン酸緩衝液（PB）150mL（37~40°C, pH 7.4）を左心室より流し脱血を行い、次いで 0.1M PB で溶かした 4% パラホルムアルデヒド（4°C）400~500mL を用いて灌流固定を行った。正常歯髄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 0.1M PB に 1 晩および 20% スクロースを含む 0.1M 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、粘着フィルム法により厚さ 30  $\mu$ m の切片を凍結ミクロトーム（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（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0.1M PBに1晩および20%スクロースを含む0.1M 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 $\mu$ mの切片を作製し、TMB/タングステン酸法にて染色した。次に、エポキシ樹脂倒立包埋法にて包埋し、ウルトラミクロトーム(Ultracut E, Reichert Jung, Germany)を用いて厚さ90nm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80kVにて観察を行った。

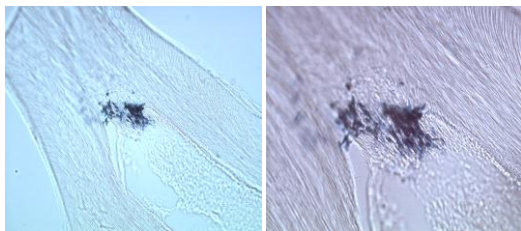
#### (6) WGA-HRP 反応物の計測

エポキシ樹脂超薄切片を用いて、正常歯髄群(7匹)および炎症歯髄群(7匹)の上顎左側第一臼歯近心咬頭直下歯髄表層部の単位面積当たり(120 $\times$ 95nm)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。

### 4. 研究成果

#### (1) 光顕観察

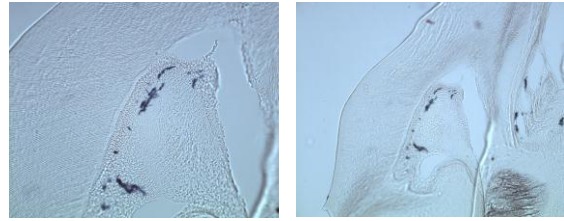
①正常歯髄群：髄角部直下にTBE染色されたWGA-HRP反応物が確認された。また、拡大像では、二次象牙質の走行に沿って染色されているのが確認できた(Fig. 1)。このWGA-HRP反応物は、主に二次象牙質形成部直下の歯髄表層にごくわずかに分布しているのが認められたが、歯髄中央部には殆どみられなかった。



(Figure 1)

#### ②炎症歯髄群：

暗視野観察では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(Fig. 2)。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。

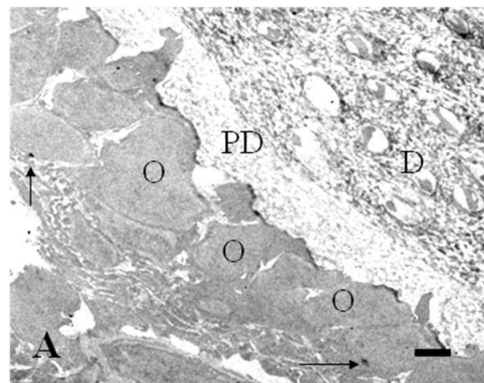


(Figure 2)

#### (2) 電顕観察

①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。

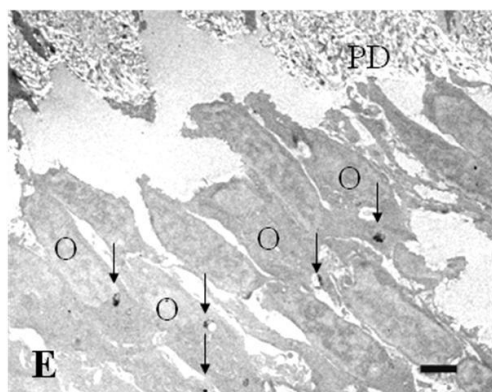


D；象牙質、PD；象牙前質、O；象牙芽細胞、矢印：WGA-HRP 反応物、Scale bars：2 $\mu$ m

(Figure 3)

②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

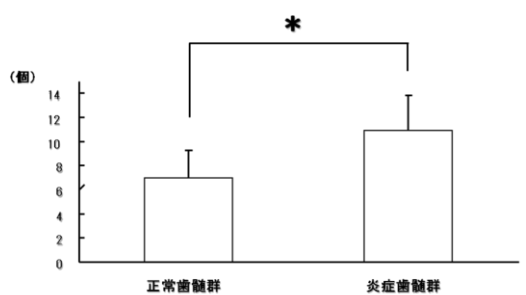
WGA-HRP 反応物が多数認められた。WGA-HRP 反応物と象牙芽細胞体は互いに近接しており、正常歯髄とは異なり、WGA-HRP 反応物が数個かたまって観察される場合が多くみられた。象牙芽細胞層では正常歯髄と同様に無髄神経のみ観察され、有髄神経は認められなかった。また、修復象牙質形成により象牙前質に封入された象牙芽細胞が多くみられ、その象牙芽細胞体に近接して WGA-HRP 反応物が観察された。WGA-HRP 反応物は正常歯髄と同様に、象牙細管内の象牙芽細胞突起には認められなかった。



D ; 象牙質、PD ; 象牙前質、O ; 象牙芽細胞、矢印 : WGA-HRP 反応物、Scale bars : 2 μm (Figure 4)

### (3) WGA-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) (Fig. 5)。



(\* : P < 0.05 : Mann-Whitney's U test) (Figure 5)

以上の結果から、歯髄炎によって歯髄内の交感神経が発芽し、有意に増加することを明らかにした。このことから、発芽した交感神経が痛みを修飾していることが予想される。すなわち、発芽した交感神経と感覚神経の相互作用 (cross-talk) により、感覚神経の神

経活動が増幅され痛みが増強される可能性が示唆される。本研究の成果は、「歯痛に対する交感神経の影響」について学術的な根拠を示した点で基礎医学的な意義があるが、同時に、慢性歯痛など非定型歯痛に対する解決策、治療法として臨床的な意義が大きい。今後、交感神経の制御による歯痛制御の治療法が普及する可能性が期待できる。

### 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 1 件)

庄司憲明, 示野陽一, 菅原由美子, 飯久保正弘, 佐藤しづ子, 笹野高嗣、歯痛に関する診断学的研究-歯痛に及ぼす交感神経の影響について-第16回日本歯科放射線学会臨床画像大会 第6回 Oral Medicine and IVR 研究会 (2011年10月1日 新潟)

[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

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

示野 陽一 (SHIMENO YOICHI)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院

非常勤講師

研究者番号 : 70447168