

論文の内容の要旨

氏名：梶 佳 織

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：下歯槽神経損傷後に発症する顔面部異所性機械痛覚過敏に対する Connexin 43 の関与

下顎第三大臼歯の抜歯または顎変形症手術により下歯槽神経が損傷されると、損傷を受けていない三叉神経によって支配されている口腔顔面領域に異常疼痛が引き起こされることがある。これまでの研究から、下歯槽神経損傷により異所性機械痛覚過敏が発症することが知られ、そのメカニズムが徐々に解明されつつあるが、その発症機構に関しては不明な点が多く残されている。そのため、臨床の現場では姑息的な治療が行われ、原因療法を実施することができないのが現状である。最近、神経損傷による痛覚過敏の発症機構の一つとして、感覚神経節内における主要なギャップ結合構成タンパク質である Connexin 43 (Cx43) および衛星細胞の可塑的变化が一次ニューロンの興奮性調節に重要な役割を果たすことがわかってきた。本研究では、この点に注目し、行動学的、免疫組織化学的および行動薬理学的手法を用いて下歯槽神経損傷によって誘導されるラットの口髭部皮膚における機械痛覚過敏発症に対して、三叉神経節 (TG) に発現する Cx43 がいかなる役割を有するかを解明し、下歯槽神経損傷に起因する異所性痛覚過敏の新たな治療法の開発に寄与する基礎的データをを得ることを目的とした。

Sprague-Dawley 系雄性ラットを sodium pentobarbital (50mg/kg, i.p.) で麻酔し、左側咬筋上部顔面皮膚を切開し、さらに咬筋を歯槽骨が露出するまで開創した後、歯槽骨表面を切削し下歯槽神経 (IAN) を露出させた。露出後 IAN を切断して切断面間に隙間のないように下顎管に再配置し、IAN 切断 (IANX) モデルを作製した。IANX 後、左側上眼瞼部あるいは口髭部の同側および反対側の皮膚へ機械刺激を与えた時の頭部の逃避反射閾値 (MHWT) を測定した。行動試験に先立って、機械刺激を与えている間、ラットが前壁に小さな穴の開いたケージから鼻を突出したまま留まっているように約 1 週間毎日訓練した。MHWT は von Frey filament を用いて、各刺激強度で 5 回ずつ (持続時間: 1 秒) 測定し、3 回以上逃避行動を誘発した時の最低強度として算出した。また、あらかじめ口髭部皮膚あるいは下口唇部皮膚に逆行性トレーサーであるフルオロゴールド (FG) を生理食塩水に溶解して 4% 溶液としたもの 10 μ l を注射し、口髭部皮膚あるいは下口唇部皮膚を支配する TG 細胞を同定した。本研究では Grial Fibrillary Acid Protein (GFAP) 陽性 (-IR) 細胞または GFAP-IR かつ Cx43-IR (GFAP-IR/Cx43-IR) 細胞に周囲を 1/2 以上囲まれた FG 標識 TG 細胞数をカウントし、その割合を以下の式: GFAP-IR 細胞または GFAP-IR/Cx43-IR 細胞で囲まれた FG 標識 TG 細胞/FG 標識 TG 細胞の総数 \times 100% で算出し、発現を定量化した。その際、SensivMeasure を用いて細胞断面積を計測することによって分類した細胞群についての細胞のサイズに関する分析も実施した。さらに、あらかじめ IANX あるいは Sham 手術前に、ラットを sodium pentobarbital (50mg/kg, i.p.) で麻酔し、頭蓋骨を露出させ、小穴 (直径: 1 mm) を TG における三叉神経第一枝・第二枝領域 (V1-V2) と三叉神経第三枝領域 (V3) の分岐点直上の頭蓋骨 (後部泉門から 2.8 mm 前方、矢状縫合横方向に 2.7 mm) に向け、処置と同側の TG 内に穴を介してガイドカニューレを刺入 (頭蓋表面下方に 9 mm) し、ステンレス製の釘 3 本および歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。カニューレ刺入完了 1 週間後、ラットの運動障害がないことを確認し、TG 内に刺入したカニューレを介して選択的ギャップ結合阻害薬 (Gap27) の持続投与および単回投与あるいは衛星細胞活性化阻害薬 (Fluorocitrate: FC) の持続投与を行い、MHWT の測定およびウエスタンブロッティングによる TG 内の GFAP あるいは Cx43 のタンパク量の定量解析を行った。

その結果、以下の結論を得た。

1. IANX 後 1 日目から 14 日目まで、Sham 群に比較して有意な MHWT の低下を示した。また、IANX 後 8 日目、TG 内の Cx43 と GFAP 発現は、Sham 群に比較して有意に増加した。

2. IANX 後 8 日目, GFAP-IR 細胞または GFAP-IR/Cx43-IR 細胞に周囲を 1/2 以上囲まれた FG 標識 TG 細胞数は, TG の V2 および V3 で Sham 群と比較して有意に多かった。特に断面積 $199\mu\text{m}^2$ 以下の小型 FG 標識 TG 細胞数が有意に増加した。

3. IANX 後 1, 2, 4, 6, 8 日目において上眼瞼部皮膚と口髭部皮膚の MHWT の低下は, TG 内への Gap27 持続投与により有意に抑制された。また, IANX 後の上眼瞼部皮膚と口髭部皮膚の MHWT の低下は IANX 後 4 日目における TG 内への Gap27 単回投与によっても有意に抑制された。

4. IANX 後 8 日目, Gap27 持続投与群の GFAP-IR 細胞で囲まれた FG 標識 TG 細胞数は生理食塩水 (vehicle) 投与群に比べて有意に少なかった。また, IANX 群と Sham 群の間において全 FG 標識 TG 細胞数に有意な差はなかった。

5. IANX 後 8 日目, TG の V1-V2 および V3 における Cx43 と GFAP 発現増加は, Gap27 持続投与により有意に抑制された。さらに, FC の TG 内持続投与は, Cx43 発現の増加を有意に抑制した。

これらの知見から, TG における Cx43 により構成されているギャップ結合を介した衛星細胞の活性化の伝播が, 下歯槽神経損傷後の口髭部皮膚における異所性機械痛覚過敏の発症に重要な役割を果たしており TG 内における衛星細胞活性化の抑制は末梢神経損傷に起因した異所性疼痛を改善するための有望な治療法となりうることを示唆した。