

## 論文の内容の要旨

氏名：中 谷 有 香

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：舌乾燥に起因する舌痛覚過敏の経日変化

口腔乾燥には、加齢、ストレス、唾液腺障害、偏食、喫煙、シェーグレン症候群などの全身疾患、薬剤の副作用などの様々な要因が影響する。口腔乾燥症の患者は様々な口腔内症状を訴えるが、その中でも特に原因不明の舌痛を訴えることが多い。乾燥に起因する舌痛は発症機序が不明であるために、治療に当たっては原因治療を行うことができず、対症療法が行われているのが現状である。口腔乾燥による痛みの発症機序が明らかになれば、口腔乾燥症で苦しむ患者にとって光明となると思われる。そこで、本研究では口腔乾燥により舌痛が引き起こされるメカニズムの一端を解明することを目的とした。

Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットにイソフルラン吸入による浅麻酔を施し、毎日 2 時間、14 日間舌を口腔外に引き出して、舌を含む口腔内を乾燥状態にすることで、舌乾燥モデルラット（舌乾燥群）を作製した。また、口を閉じた状態を保ち同様の吸入麻酔のみを施したラットを sham 群として研究に用いた。舌乾燥による疼痛発症メカニズムについて、侵害刺激に対する行動学的解析および、侵害刺激に対するニューロンの興奮性マーカーである phosphorelated extra cellular signal-regulated kinase (pERK) を指標とした免疫組織化学的解析により検討した。

舌乾燥処置前から処置後 14 日まで、浅麻酔下に舌にデジタルフォーセプスを用いて定量的な機械刺激を加え、逃避反射閾値を経日的に測定した。その結果舌乾燥群では、処置後 7 日から sham 群と比較して有意な閾値の低下を示し、この閾値の低下は 14 日も続いた。一方、舌乾燥中止後 16 日（舌乾燥 30 日目）には、処置前の機械刺激に対する逃避反射閾値まで回復した。

三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) における pERK 陽性細胞発現を二重蛍光免疫組織学的に解析した。舌乾燥 7 日目に sodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.) でラットに深麻酔を施し、生理食塩液にて灌流した後、0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) に溶解した 4%パラホルムアルデヒド固定液を用いて灌流固定を行った。IHC は、ミクロトーム (SM2000R, Leica) にて厚さ 30 $\mu$ m の連続切片を作製し、0.3% triton X-100/3% NGS in 0.01M PBS に室温で 2 時間浸漬し、ブロッキングを行った。Rabbit anti-phospho-p44/42 mitogen activated protein kinase (MAPK), (Thr202/Tyr204) 抗体 (1: 300) で 4 $^{\circ}$ C, 3 日間インキュベートし、さらに mouse anti-neuronal nuclei (NeuN), (1: 1000; Millipore) 抗体に 4 $^{\circ}$ C 24 時間インキュベートしたのち、goat Alexa Fluor 568 IgG (1: 200; Invitrogen) と goat anti-mouse Alexa Fluor 488 IgG (1: 200; Invitrogen) を用いて、遮光下に室温で 2 時間インキュベートした。その後 PBS で 10 分 3 回洗浄し、PermaFluor (Thermo scientific) を用いてスライドガラスに封入し、蛍光顕微鏡 (BZ9000, Keyence) で観察した。Vc における pERK 陽性細胞と神経細胞マーカーである NeuN の発現を二重蛍光免疫組織学的染色にて観察した。また、diamino benzidine (DAB) 染色を用いて Vc における pERK 陽性細胞の発現様式を解析した。舌乾燥 2 時間後にラットの舌に機械刺激を加えて 5 分後に灌流固定し、抗 pERK 抗体染色のために、浮遊組織切片を室温で 2 時間、0.3% tritonX-100 / 3% normal goat serum (NGS) in 0.01 M PBS に浸漬し、ブロッキングを行い、4 $^{\circ}$ C で 72 時間 rabbit anti-phosphor-p44 / 42 MAPK (Thr202 / Tyr204) antibody (1: 1000; Cell Signaling) に浸漬した。その後 0.01 M PBS にて洗浄し、室温で 2 時間 goat anti-rabbit IgG (1: 600; Vector Laboratories) に浸漬した。その後 0.01 M PBS にて切片を洗浄し、室温で 1 時間 peroxidase-conjugated avidin-biotin complex (1: 100; Vector Laboratories) で酵素抗体反応を行った。さらに、0.01 M PBS にて洗浄後、0.05 M Tris buffer (TB) で 10 分間洗浄し、0.035% 3,3'-DAB-tera HCL (Sigma Aldrich), 0.2% nickel ammonium sulfate そして 0.05 M TB (pH7.4) に 0.05% peroxide を加えて発色させた。切片は 0.01 M PBS で洗浄し、MAS-GP コーディングス

ライド (Matsunami) に貼り付け、乾燥させ、一連のアルコール (50–100%) とキシレンで脱水および脱脂し、カバーガラスと Eukitt (O.Kindler) を用いて封入した。光学顕微鏡下で均質で灰-黒色の点状の構造物を有する pERK 陽性細胞を確認した。舌乾燥後には機械刺激を加えた同側の Vc の背側部、両側延髄網様体 (RF) および両側孤束核 (NTS) に多くの pERK 陽性細胞の発現を認めた。一方、三叉神経領域の侵害刺激の受容に関与するとされる三叉神経傍核 (Pa5) への pERK 陽性細胞発現は認められなかった。これまでの研究で舌からの侵害情報処理において重要とされている Vc に注目し、この領域に発現した pERK 陽性細胞数を解析した。舌への機械刺激により発現した pERK 陽性細胞は舌乾燥群において sham 群に比べ有意に増加していた。また、舌乾燥 14 日で舌乾燥を中止した場合、通算 30 日目 (舌乾燥中止後 16 日目) には、舌の機械刺激で誘発される pERK 陽性細胞数が、舌乾燥 7 日目と比較して有意に減少した。

本研究によって得られた主要な知見を以下に示す。

1. 舌乾燥により、舌への機械刺激に対して痛覚過敏が発症した。
2. 舌乾燥後、舌への機械刺激によって Vc, NTS および RF に pERK 陽性細胞の発現を認めた。
3. 舌乾燥ラットの三叉神経第三枝領域 (Vc の背側部) では pERK 陽性細胞数の有意な増加が認められた。
4. 舌乾燥によって生じた舌の痛覚過敏は、舌乾燥を中止することにより回復した。
5. 舌乾燥後の舌への侵害刺激によって Vc の背側部で pERK 陽性細胞の増加が認められたが、舌乾燥を中止することにより有意に減少した。

以上から、舌乾燥によって引き起こされる舌の機械痛覚過敏には ERK のリン酸化が重要な役割を担っている可能性が示された。さらに、この舌痛覚過敏は舌乾燥を中止することで徐々に回復することから、神経損傷モデルにおける痛覚過敏と異なり、末梢神経における何らかの変化が中心的な役割を担っている可能性が考えられた。