

論文の内容の要旨

氏名：鎌 倉 聡

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：舌乾燥により延髄に発現する c-Fos 陽性細胞の分布様式

口腔乾燥症は様々な原因によって引き起こされるが、多くの場合、口腔の乾燥感だけでなく舌に痛みを発症する。これまでの舌を乾燥状態に保持し舌乾燥モデルラットを作製した研究によると、舌乾燥によって舌には機械痛覚過敏が発症するが、熱痛覚過敏は引き起こされないことが明らかになっている。また、三叉神経脊髄路核尾側亜核（Vc）から記録した舌入力を受ける侵害受容ニューロンは侵害機械刺激に対して有意に高頻度 spike 応答を示すことも報告されている。さらに、このような舌を乾燥したモデルラットにおいては、舌そのものには全く炎症所見が見られないことも明らかにされている。このように、舌の乾燥による舌痛は炎症などの器質的変化がないにもかかわらず発症するが、そのメカニズムは明らかにされていない。一方、乾燥舌に関する研究では、乾燥させた舌への侵害機械刺激によって、Vc および上部頸髄（C1-C2）領域に多くのリン酸化 ERK 発現が誘導されることが明らかにされている。おそらくこれらの Vc および C1-C2 領域には舌の侵害情報を受ける侵害受容ニューロンが存在し、舌の侵害情報処理を担っているものと考えられる。さらに、舌からの侵害情報は Vc や C1-C2 領域だけでなく、孤束核（NTS）にも入力することが知られている。おそらく、NTS においても多くのニューロンが舌乾燥によって活性化する可能性が高く、舌乾燥によって駆動されるニューロンがこの領域から多数検出される可能性がある。

しかし、これらの研究では舌乾燥後に侵害機械刺激を初めとする様々な侵害刺激を与えて検索を行うため、純粋に乾燥だけによってどれくらいのニューロンが活性化するかは不明である。これまでの多くの研究により、三叉神経損傷や、口腔顔面領域に炎症が引き起こされると、Vc および C1-C2 領域から検出される侵害受容ニューロンは、侵害刺激に対する応答性の増加だけでなく、高頻度の自発放電を示すことが多い。おそらく舌を乾燥することによって駆動されるニューロンも高頻度の自発放電を示すものと想像される。従来の研究によって、c-Fos は侵害刺激を与えてから 2 時間をピークに活性化したニューロンの核内に発現が認められることがわかっており、比較的ゆっくりした反応性変化を検出するのに適したニューロンの活性化マーカーであると考えられている。

本研究では、舌の乾燥のみによって Vc および C1-C2 領域に存在するニューロンの自発活動が変調するか否かを解明するため、c-Fos 陽性細胞発現を指標に、舌乾燥によって活性化される延髄ニューロンの発現様式について詳細な解析を行い、舌乾燥によって引き起こされる舌痛覚過敏の発症機構の一端を解明することを目的とした。

ラットを 2%イソフルラン（Mylan, Canonsburg, PA）と空気が環流するプラスチック容器内に保持し浅麻酔後、舌を口腔外へ突出させ、毎日 2 時間、7 日間舌を乾燥させ（舌乾燥群）、舌の侵害機械刺激に対する逃避反射閾値の測定および免疫組織学的解析に用いた。同様に浅麻酔下で舌を出さずに毎日 2 時間、プラスチック容器内に放置し、7 日間続けたラットを sham 群とした。

舌乾燥または sham 処置を 7 日間行った後、2%イソフルランによる浅麻酔下にて、舌の左半側（舌先端より 3 mm）へ徐々に加えた機械刺激に対する舌のひっこめ反射が生じた刺激強度を反射閾値（TWT）とし、舌乾燥群と sham 群において計測した。先端がフラットなフォーセプス（4mm square; PANlabs, Barcelona, Spain）を用いて機械刺激（0 g-150 g, 10 g/sec, cut off: 150 g）を与えた。機械刺激は 10g/s の刺激速度をマニュアルでコントロールし、0 g から反射閾値まで連続的に加えた。舌乾燥および sham 群とも、乾燥処置後 2 時間経過した時点で測定を行った。また、舌乾燥および sham 処置前に機械刺激に対する TWT のベースラインを測定した。

舌乾燥あるいは sham ラットの延髄および上部頸髄を舌に刺激を加えることなく取り出し、厚さ 50 μm の連続凍結切片を作製し、0.01 M リン酸緩衝液（PBS）で洗浄した後 10% normal goat serum およ

び 3% Triton-X100 を含む 0.01M PBS に 2 時間インキュベートした。次に, rabbit anti-c-Fos polyclonal antibody (1:10000, Ab5, Oncogene Science)に室温で 24 時間インキュベートした。0.01M PBS で洗浄した後 biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:600; Vector Labs, Burlingame, CA, USA)に 37°C で 2 時間インキュベートした。次に, avidine-biotin-complex (1:100; ABC, Vector Labs)に室温で 2 時間インキュベートした。0.01M PBS で洗浄後さらに 0.05M Tris Buffer (TB) で洗浄し, 0.035% 3,3'-diaminobenzidine-tetra HCL (DAB, Sigma), 0.2% nickel ammonium, 0.05% peroxide を加えた 0.05 M TB (pH 7.4)に室温で 5 分間インキュベートした。免疫反応後, MAS-coated slide (Matsunami Tokyo Japan) にマウントして, 脱水, 脱アルコールを行ない封入した。

本研究では舌へ機械刺激を与えるために, 舌乾燥ラットおよび sham ラットをイソフルランによって浅く麻酔した。そのため, 本実験で得られた TWT は舌の侵害刺激に対する頭部の逃避行動ではなく舌のひっこめ反射閾値を示している。前述の理由で, 覚醒動物を用いて測定したこれまでの様々な逃避閾値に比較して分散が非常に小さな値を示した。第 1 図に示したように, 麻酔ラットの舌へ侵害機械刺激を与え誘発される舌のひっこめ反射閾値は舌乾燥群のほうが sham 群に比べ有意に低い値を示した (舌乾燥群: 83.8 ± 2.0 g, sham 群: 108.1 ± 2.1 g, 各 $n=4$)。

従来の研究により, c-Fos タンパクは神経細胞の核に発現することが明らかにされている。舌乾燥ラットでは Vc, C1-C2, 延髄網様核 (RF) および NTS において, 核に c-Fos 免疫陽性反応を示す多数の神経細胞が確認された。Vc において c-Fos 陽性細胞は, 両側性に背側部の表層部を中心に広く分布していた。また, Vc の強拡大像をみると, 神経細胞の核に c-Fos 免疫陽性反応が観察された。C1 領域では, Vc 領域に比べ少数ではあるが背内側部で表層から深層にかけて c-Fos 陽性細胞が検出された。さらに, RF においても少数, 両側性に発現を認めた。NTS においては比較的多くの c-Fos 陽性細胞が両側性に観察された。舌乾燥ラットおよび sham ラットのどちらも c-Fos 陽性細胞は左右の差がなく両側性に分布していた。また, NTS および RF においては舌乾燥ラットと sham ラットにおいてほぼ同様の分布パターンを示していた。

本研究ではそれぞれのレベルにおいて 3 枚ずつの切片上において検出された c-Fos 陽性細胞数の平均値を吻尾方向に配列したが, 発現数は obex (0 μ m) 付近と obex から 2880 μ m 尾側部にピークを有する 2 峰性の分布を示していた。舌乾燥ラットの Vc および C1-C2 領域に発現した全 c-Fos 陽性細胞数と sham ラットの c-Fos 陽性細胞数を比較した。本研究ではそれぞれの群の表層から深層にかけて分布している c-Fos 陽性細胞をすべて換算して全細胞数を比較した。その結果, ここに示したように舌乾燥ラットの方が sham ラットに比べ有意に多くの c-Fos 陽性細胞発現を認めた (各 $n=6$)。

以上の結果から舌乾燥に伴う舌痛発症には Vc および C1-C2 領域に存在する侵害受容ニューロンが重要な働きを有する可能性が示された。また, これらの領域に分布する c-Fos 陽性細胞は 2 峰性の分布を示したことから, 舌痛症における侵害情報処理は吻側部領域と尾側部領域では異なるメカニズムが存在する可能性があるかと推察された。