

論文の内容の要旨

氏名：古 宮 宏 記

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Involvement of neuron-satellite glial cell interaction mediated by IL-1 β in development of ectopic tooth pain following tooth pulp inflammation

（歯髄炎に伴う異所性歯痛発症における IL-1 β を介したニューロン-衛星細胞連関の関与）

歯髄炎が発症すると、原因歯以外の歯に痛みが生じる「歯痛錯誤」が引き起こされることが知られている。歯痛錯誤は「誤診」や「誤治療」の原因になる可能性があり、歯科臨床においては無視することができない大きな問題となっている。この誘因として、「関連痛」や「異所性疼痛」などの異常疼痛が考えられるが、その発症メカニズムには未だ不明な点が多く残されており、その解明は診断精度の向上や適切な治療に貢献すると考えられ、臨床的意義は大きい。

歯髄に炎症が起こると、三叉神経節ニューロンの興奮性が著しく増大し、高頻度の活動電位が三叉神経脊髄路核尾側亜核や上部頸髄などへ伝えられる。このような状態が長期間持続すると三叉神経節ニューロンは感作され、同ニューロンにおいて炎症性サイトカインやケミカルメディエーターが合成されて三叉神経節内に放出され、衛星細胞が活性化される。活性化した衛星細胞は細胞体が膨化し、三叉神経節ニューロンと同様に様々な分子を合成して三叉神経節内に放出する。

脊髄の神経節ニューロン周囲に存在する衛星細胞は connexin 43 (Cx43)などで構成されるギャップ結合を介して、衛星細胞相互間の情報伝達を行うと報告されている。このことから、歯髄に炎症が起こると、三叉神経節ニューロンに過興奮が誘導され、これにより衛星細胞が活性化し、さらに Cx43 発現が亢進することによって衛星細胞の活性化が三叉神経節内に広がる可能性がある。一方で、活性化した衛星細胞や遊走した貪食細胞からは種々のサイトカインが放出される。特に、インターロイキン-1 β (IL-1 β)は三叉神経節ニューロンに存在する interleukin-1 receptor type I (IL-1RI)に結合し、その興奮性をさらに増強させると考えられている。これら一連の細胞内情報伝達は、最終的に transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)の発現を増加させ、結果として隣在歯を支配する三叉神経節ニューロンの興奮性を増大させる可能性がある。以上の仮説に基づき、本研究では、歯髄炎に起因した異所性痛覚過敏の神経機構解明を目的として以下に示す一連の実験を行った。

実験 1 では、ラット歯髄炎発症後の隣在歯における侵害受容の変化に対する三叉神経節内でのタンパク合成の関与を検討した。まず、ラットを 2%イソフルランおよび三種混合麻酔薬（塩酸メドミジン 0.15 mg/kg, ミダゾラム 2 mg/kg, 酒石酸ブトルファノール 2.5 mg/kg)の腹腔内投与により全身麻酔を施し、注水下でラウンドバーを用いて右側上顎第一臼歯 (M1)を慎重に切削して露髄させた。その後、50% complete Freund's adjuvant (CFA)あるいはその溶媒 (vehicle)に浸漬したペーパーポイントを髄腔内に挿入した後に歯科用セメントにて仮封を行い、それぞれ CFA 群と vehicle 群とした。3 日後、2% イソフルランにて麻酔し、同側顎二腹筋に双極電極を挿入して筋放電量が安定するまで静置し、同側上顎第二臼歯 (M2)を同様の方法で露髄し、ペーパーポイントに浸漬した 3.0 μ M capsaicin を歯髄に投与した。投与前後の反射性顎二腹筋活動 (D-EMG)を経時的に計測し、EMG の area under curve (AUC)の変化について解析を行った。その結果、CFA 誘導性歯髄炎ラット群における D-EMG は、歯髄炎発症後 3 日目でコントロール群と比較して有意に増大していた。次に M2 を支配する三叉神経節ニューロンと衛星細胞の空間的位置関係を明らかにするため、ペーパーポイントに浸漬した逆行性トレーサーである 10% Fluorogold (FG)を M2 に投与して歯科用セメントにて仮封した。3 日後、通法に従いラットを還流固定して組織切片を作製し、衛星細胞のマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP)および Cx43 の発現変化を免疫組織学的に検出した。切片を蛍光顕微鏡下で観察し、三叉神経節における FG 陽性ニューロン周囲の GFAP および Cx43 の発現変化を解析した。その結果、Cx43 と共発現を示した GFAP 陽性細胞によって囲まれた FG 陽性ニューロン数は、vehicle 群に比べ歯髄炎群において有意に増加していた。

実験 2 では、歯髄炎発症により亢進した隣在歯の侵害受容性増大に対するギャップ結合阻害薬の効

果について検討を加えた。実験 1 と同様の方法で全身麻酔を施したラットの頭蓋にカニューレを設置し、三叉神経節第 2 枝領域へギャップ結合を構成する Cx43 の特異的阻害薬である Gap26 を経目的に前投与した群を Gap26 群、Gap26 の溶媒を投与した群 (vehicle 群) をコントロールとした。Gap26 投与開始より 3 日後、実験 1 と同様の方法で M1 に CFA を投与した。さらに、その 3 日後に M2 に capsaicin を投与し、D-EMG を経時的に計測し、EMG の AUC の変化について解析を行った。また Gap26 による三叉神経節内のタンパク合成の変化を明らかにするため、M1 に CFA、M2 に FG を投与し、三叉神経節における FG 陽性ニューロン周囲の GFAP および Cx43 の発現変化を免疫組織学的に解析した。その結果、三叉神経節内への Gap26 投与により、D-EMG の AUC は、vehicle 群と比較し Gap26 群で有意に抑制された。また三叉神経節内では、Cx43 と共発現する GFAP 陽性細胞によって囲まれた FG 陽性ニューロン数の有意な減少が認められた。

実験 3 では、歯髄炎発症後の三叉神経節内における IL-1 β 、IL-1RI、TRPV1 の発現変化を免疫組織学的に検索した。その結果、IL-1 β と共発現する GFAP 陽性細胞によって囲まれた FG 陽性ニューロン数、IL-1RI 陽性かつ FG 陽性ニューロン数、および TRPV1 陽性かつ FG 陽性ニューロン数の有意な増加が認められた。

実験 4 では、歯髄炎発症による隣在歯の侵害受容性亢進および三叉神経節内でのタンパク合成の変化に対する IL-1RI の拮抗薬の効果を検討した。実験 2 と同様の方法で全身麻酔を施したラットの頭蓋にカニューレを設置し、三叉神経節第 2 枝領域へ interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) を経目的に前投与した群を IL-1ra 群、IL-1ra の溶媒を投与した群 (vehicle 群) をコントロールとした。IL-1ra 投与開始より 3 日後、M1 に CFA を投与した。さらに、その 3 日後に M2 に capsaicin を投与し、D-EMG を経時的に計測し、AUC の変化を解析した。また IL-1ra 投与による三叉神経節内のタンパク合成変化を検索するため、M1 に CFA、M2 に FG を投与後、三叉神経節における FG 陽性ニューロンでの TRPV1 の発現変化を免疫組織学的に解析した。その結果、三叉神経節内への IL-1ra 投与により、D-EMG の AUC は、vehicle 群と比較して有意に抑制された。また三叉神経節内では、TRPV1 陽性かつ FG 陽性ニューロン数が有意に減少した。

実験 5 では、歯髄炎発症後の三叉神経節内における貪食細胞のマーカーである ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1) および IL-1 β の発現変化を免疫組織学的に検索した。その結果、Iba-1 陽性かつ IL-1 β 陽性細胞によって囲まれた FG 陽性ニューロン数の有意な増加が認められた。

以上のことから、M1 の歯髄炎は M2 に痛覚過敏を発症させることが示された。そのメカニズムとして、歯髄炎による三叉神経節ニューロンの興奮性増強には、(1) 衛星細胞の活性化に伴う Cx43 の発現増加、(2) 炎症により活性化した衛星細胞および貪食細胞での IL-1 β の合成および放出、(3) M2 支配ニューロンにおいて発現増加した IL-1RI への IL-1 β 結合、(4) M2 支配ニューロンでの TRPV1 の発現増加という一連の過程が関与することが示された。以上のメカニズムにより、M2 支配ニューロンの感受性が増大し、M2 の異所性痛覚過敏が発症すると推察された。