

論文の内容の要旨

氏名：大槻克彦

博士の専攻分野名称：博士（歯学）

論文題名：顔面皮膚の痒み刺激は三叉神経節内に macrophage を誘導する

Facial itch stimulus causes macrophage accumulation in the trigeminal ganglion

従来の研究では痒みは痛みを起こさない程度の弱い刺激によってC線維が活性化することによって引き起こされる感覚で、痛み感覚の一種と考えられていた。しかし、C線維の中にはhistamineに対して、特異的に反応するものが存在することが報告され、痒みが痛覚の一種ではないことが証明された。

従来の研究で、C線維の末梢端は自由神経終末の形態をなしており、特殊な受容器を持たないといわれている。自由神経終末の膜表面にはhistamine, serotoninあるいはbradykininなどに対する受容体、TRP channel, Na channelまたはATPに対する受容体など、様々な受容体が存在することが知られている。これらの受容体のほとんどは侵害情報処理に関係するといわれ、多くの研究がなされてきた。その中でも、histamine受容体は痒みの発症に重要な働きを有することが明かにされて以来、痒みの受容体としての機能に関する研究が進められている。

様々な受容体に対するリガンドの結合や温・熱・冷あるいは機械刺激によって自由神経終末に活動電位が発生すると、発生したスパイクは三叉神経節へと伝えられるが、末梢神経系の興奮性が高いと、神経節細胞からは様々な分子が放出され、神経節細胞周囲に存在するsatellite cellの活性化や、macrophageの遊走が促される。特に三叉神経系においては、三叉神経の損傷や口腔顔面の炎症により三叉神経節内において、多くのmacrophageが集積することが報告されている。三叉神経節内に集積したmacrophageからは種々のcytokineが放出され、これによって三叉神経節細胞活動が変調を受けると報告されている。このような背景から、著者は痛覚だけでなく痒みの発症機構に関しても、macrophageが関与する可能性があるという仮説を立てた。

そこで、本研究では痒みを誘発することが知られているhistamineを顔面皮下に投与することによって出現するIba1陽性細胞の三叉神経節における分布様式を検索し、痒み感覚情報処理機構に対するmacrophageの役割の一端を明らかにすることを目的とした。

実験にはSprague-Dawley系雄性ラット10匹を用いた。2% isofluraneにて麻酔し、さらにsodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.)で深く麻酔したラットを用い、痒みを発症させるためにhistamine溶液(10 μ l, 5 μ g/ μ l)を左側口ひげ部皮下に注入した。また、vehicleとして0.9%生理的食塩液を同量、同部位に注入し、コントロールとした。histamine溶液あるいはvehicle溶液を注入してから5分後に500 ml生理食塩液にて脱血後、0.1 M phosphate bufferにて希釈した4% paraformaldehyde溶液(pH 7.4, 4°C) 500 mlを用いて灌流固定を行った。灌流固定終了後に三叉神経節を摘出し、同様の固定液で4°Cにて2日間、後固定を行った。取り出した三叉神経節の連続切片標本(厚さ13 μ m)を作製してrabbit anti-rat Iba1 antibody (1:1000) および mouse anti-GFAP monoclonal antibody (1:1000)を用いて免疫染色を施し、Iba1陽性細胞およびGlial fibrillary acidic protein (GFAP)陽性細胞を0.035% 3,3'-diaminobenzidine-tetra HClに反応させた三叉神経節の切片を光学顕微鏡下で観察して顕微鏡写真を撮影し、ImageJ software (Research Services Branch, NIH, USA)を用いて陽性細胞密度の解析を行った。

口ひげ部にhistamineを投与することによって、三叉神経第I枝から第III枝にかけて広い領域に多くのIba1陽性細胞を認めた。Iba1陽性細胞は弱拡大顕微鏡写真では黒色に染色されたドットとして観察されたが、強拡大像をみると一つひとつのドットは三叉神経節細胞を取り囲むように存在していた。また、衛星細胞の活性化もわずかではあるが認められた。

生理的食塩液およびhistamineの口ひげ部皮下への注入によって、第I枝領域に多くのIba1陽性細胞を認めた。検出されたIba1陽性細胞は様々な形態を有し、神経節細胞および神経線維の間に挟まれ多様な分布様式を示していた。また、Iba1陽性細胞の単位面積当たりで陽性細胞が占める領域を計測した結果、histamine注入群は 0.56 ± 0.05 、生理的食塩液注入群は 0.25 ± 0.026 でhistamine注入群の方が生理的食塩液注入群よりも有意に広い領域を占めていた($p < 0.01$)。

第II枝領域で検出されたIba1陽性細胞も第I枝領域で認められたIba1陽性細胞と同様に様々な形態を有しており、分布も神経節細胞と神経線維の間に挟まれたような分布を示していた。第II枝領域におけるIba1陽性細胞が占める面積の割合はhistamine注入群が $0.97 \pm 0.09\%$ 、生理的食塩液注入群が $0.28 \pm 0.07\%$ であり、histamine注入群の方が生理的食塩液注入群よりも有意に広い面積を占めていた($p < 0.01$)。

第III枝領域においても、第I枝および第II枝領域で検出された Iba1 陽性細胞と同様の分布を認めた。また、この領域で観察された Iba1 陽性細胞の形態も他の領域で観察されたものと同様、様々な形態を有していた。histamine 注入群と生理的食塩液注入群における Iba1 陽性細胞が占める面積を比較すると、histamine 注入群が 0.31 ± 0.04 であるのに対し、生理的食塩液注入群では 0.19 ± 0.06 で、両者に有意な違いは認められなかった ($p > 0.05$)。また、衛星細胞の活性化も histamine の口ひげ部への注入によって、わずかではあるが、神経節細胞を取り囲むように、活性型衛星細胞が検出された。

以上の結果から、histamine 注入により顔面皮膚に発症する痒みには三叉神経節に出現する macrophage の集積が重要な働きを有する可能性が示された。