

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

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

大槻 克彦

(指導：岩田 幸一 教授，篠田 雅路 准教授)

## 緒言

痒みは様々な原因で引き起こされることが報告されているが、その詳細なメカニズムについては不明な点が多く残されている<sup>1,2)</sup>。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<sup>3-5)</sup>。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、痒みが痛み感覚の一種ではないことが証明された<sup>6)</sup>。

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報告されている<sup>7)</sup>。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、transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) channel, sodium channelまたはATP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<sup>8,9)</sup>。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<sup>10,11)</sup>。これらの受容体の中で、histamine受容体は痒みの発症に重要な働きを有することが明らかにされてきた<sup>12)</sup>。

これらの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、発生した活動電位は三叉神経節へと伝達される。特に、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<sup>13,14)</sup>。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<sup>15-17)</sup>。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されると報告されている<sup>17)</sup>。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 Iba1 をマーカーとして用い macrophage 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役割の一端を明らかにすることを目的とした。

## 材料および方法

本研究は、日本大学歯学部実験動物委員会の許可（承認番号：AP17D038）を得、同委員会の指針および国際疼痛学会の基準に従って行われた<sup>18)</sup>。実験には Sprague-Dawley 系雄性ラット 10 頭を用いた。

### 1. Histamine 投与

2% isoflurane にて麻酔し、さらに三種混合麻酔薬 (butorphanol (2.5 mg/kg), medetomidine (0.375 mg/kg), midazolam (2.0 mg/kg), i. p.) で深く麻酔したラットを保温パッド上に仰臥位にした状態で、0.9%生理的食塩液に溶解した histamine 溶液 (10  $\mu$ l, 5  $\mu$ g/ $\mu$ l) を左側口ひげ部皮下に静かに注入した。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。

### 2. 抗 Iba1 抗体および GFAP 抗体を用いた免疫染色

取り出した三叉神経節を 0.01 M phosphate buffered saline (PBS) にて希釈した 20% スクロース溶液 (w/v, 4°C) に 2 日間浸漬した。その後、三叉神経節を O.C.T. compound (Sakura Finetek, Torrance) で包埋してドライアイスで凍結し、三叉神経節の連続切片標本 (厚さ 13  $\mu$ m) を作製して MAS-GP でコートしたスライドガラス (Matsunami, Tokyo, Japan) に貼り付け、以下の方法によって nickel-cobalt 加 3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB, Sigma, St Louis) 染色を施した。まず、切片を 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加 0.01 M PBS に 30 分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを不活性化した後、0.01 M PBS にて 5 分間の洗浄を 3 回行った。洗浄終了後、0.3% Triton X 100 加 0.01M PBS で希釈した 5% normal goat serum (NGS) に 1 時間浸漬し、ブロッキングを行った。その後、macrophage のマーカーとして rabbit anti-rat Iba1 antibody (1: 1000, Cell Signaling Technology, Danvers) または活性化した衛星細胞のマーカーとして GFAP (1: 1000, Merck Millipore, Billerica) に 4°C で 3 日間浸漬し、0.01 M PBS にて 10 分間の洗浄を 3 回行った。次いで切片を二次抗体である biotinylated goat anti-rabbit IgG (H+L) (1: 500, Vector Labs, Burlingame) に室温で 2 時間浸漬した。その後 ABC kit (Vector Labs, Burlingame) を用いて室温で 1 時間、反応させた。0.01 M PBS による 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、0.01% hydrogen peroxide 加 DAB を用いて反応産物を可視化した。次いで、切片を 0.01

MPBSにて洗浄し，室温にて乾燥させた後，アルコールとキシレンにより脱水および透徹を行い，封入した。また，Iba1 陽性細胞を DAB 反応させた切片を光学顕微鏡下で観察し，Vc および C1 領域の表層部および深層部の顕微鏡写真を撮影し，Image J software (Research Services Branch)を用いて Iba1 陽性細胞密度の解析を行った。

### 3. 統計学的解析

データは平均  $\pm$  標準誤差で表し，有意差検定には Mann-Whitney U test を用いた。また， $p < 0.05$  を有意ありと判定した。

## 結果

口ひげ部に histamine を投与することによって、Fig. 1 に示したように三叉神経第 I 枝から第 III 枝にかけて広い領域に多くの Iba1 陽性細胞発現を認めた。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。

### 1. 三叉神経第 I 枝領域から検出された Iba1 陽性細胞の形態と分布

Fig. 1A および B は口ひげ部への生理的食塩液あるいは histamine 注入後三叉神経節の第 I 枝領域で検出された Iba1 陽性細胞の組織写真を示している。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、多くの Iba1 陽性細胞発現を認めた。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、単位面積当たりの Iba1 陽性細胞が占める領域を計測した結果、histamine 注入群は  $0.56 \pm 0.05\%$ 、生理的食塩液注入群は  $0.25 \pm 0.03\%$  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領域を占めていた ( $p < 0.01$ , Fig. 2B)。

### 2. 三叉神経第 II 枝領域における Iba1 陽性細胞の分布

Fig. 3 には三叉神経第Ⅱ枝領域における Iba1 陽性細胞の発現様式を示している。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，神経節細胞と神経線維の間に挟まれた領域に分布をしていた (Fig. 3A および B)。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 ( $p < 0.01$ )。

### 3. 三叉神経第Ⅲ枝領域における Iba1 陽性細胞の分布様式

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 Iba 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 (Fig. 4A および B)。

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  $0.31 \pm 0.04\%$  であるのに対し，生理的食塩液注入群では  $0.19 \pm 0.06\%$  で，両者に有意な違いは認められなかった ( $p > 0.05$ )。

### 4. 三叉神経第Ⅱ枝領域における GFAP 陽性細胞の分布

本研究では macrophage だけでなく、神経節細胞の周囲に多く見られる衛星細胞についても活性化の有無について検索した。Fig. 5 の矢印で示したように、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。

## 考察

本研究は顔面皮膚に引き起こされる痒みの神経機構を解明するため、発痒物質である histamine を口ひげ部皮膚に注入することによって早期に発現する macrophage の痒み感覚発症に対する役割を明らかにすることを目的に、免疫組織学的手法を用いて、三叉神経節における macrophage の発現様式の解析を行った。その結果、三叉神経節の第 I 枝および II 枝領域においては histamine 注入群で有意に多くの Iba1 陽性細胞発現を認めた。また、histamine 注入によってわずかではあるが衛星細胞の活性化も認められた。

### 1. 痒みと macrophage の集積

従来の研究では痒みは痛みに達しない感覚としてとらえられ、痛みと同様の神経機構によって受容されると考えられてきた<sup>3-5)</sup>。しかし、近年、histamine 刺激に対して特異的に反応を示す脊髄視床路に軸索を持つニューロンが同定され、痒みと痛覚とは異なるメカニズムで発症することが明かにされた<sup>6)</sup>。

Histamine の受容体には、H1~H4 の四種類のサブタイプが知られており、これらは自由神経終末に存在することが知られている<sup>9)</sup>。Histamine による痒みは H1 遮断薬によって抑制されることから、H1 受容体は histamine 投与による急性の痒み発症に関与すると考えられている<sup>19)</sup>。Histamine が受容体に結合すると、自

由神経終末を支配する無髄のC線維の活動性が上昇する<sup>20)</sup>。発生した活動電位は神経節を通過して脊髄後角に送られ、この領域に存在するニューロン活動を亢進させると報告されている<sup>6)</sup>。従来の報告から、神経節細胞の興奮性が長期間にわたって増強すると、一次ニューロンは感作され、サイトカインや神経ペプチドあるいはATP等、様々な物質の合成が進み神経節細胞から放出される。これらの物質の働きにより神経節周囲には多くのmacrophageが集積することが知られている<sup>17)</sup>。おそらく本研究で観察された多くのmacrophageも、同様のメカニズムで集積されたものと考えられる。集積したmacrophageにおいても、様々な分子の合成が促進し放出され、ニューロンの興奮性はさらに増強し、強い痒みが発症するものと考えられる。

## 2. 三叉神経の各枝領域におけるmacrophage発現の違い

本研究では、口ひげ部にhistamineを注入することによって、第II枝および第III枝領域に有意に多くのIba1陽性細胞すなわちmacrophageの集積が観察された。これに対し、第III枝領域では有意なmacrophageの発現を観察することができなかった。これは、ラットの三叉神経節細胞の解剖学的配列が原因であると考えられる。つまり、Fig. 1に示したように、ラットの三叉神経節では、第I枝と第II枝領域の神経節細胞が混在しているのに対し、第III枝領域は独立し

た領域に細胞体が密集した構造を持っている。このような解剖学的構造から、第Ⅰ枝および第Ⅱ枝領域においてはニューロン同士の機能連関が密に行われ、その結果として、これら両領域における macrophage の集積が第Ⅱ枝支配領域である口ひげ部への histamine 注入によって有意に増加したものと推察される。

### 3. 痒み発症に対する衛星細胞の関与

これまでの多くの研究により、口腔顔面領域の炎症や三叉神経損傷によって、三叉神経節細胞周囲に存在する多くの衛星細胞が活性化されることが報告されている<sup>13, 15, 16)</sup>。活性型の衛星細胞からはサイトカインや神経ペプチドなど様々な物質が合成され放出されることが知られている<sup>15, 16)</sup>。これらの物質により神経節細胞の活動性はさらに亢進する。本研究ではわずかではあるが、histamine 注入によって GFAP 陽性細胞すなわち活性型衛星細胞発現を認めた。Histamine 注入後 5 分という短時間で活性型衛星細胞の出現を認めたことから、より長い時間経過を経るとより多くの衛星細胞の活性化が誘導され、痒み感覚が亢進する可能性があると考えられる。

## 結論

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、多くのIba1陽性細胞出現を認めた。また、単位面積当たりでIba1陽性細胞が占める領域を計測した結果、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。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。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注入群と生理的食塩液注入群では、両者に有意な違いは認められなかった ( $p > 0.05$ )。また、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発現するmacrophageの集積が重要な働きを有する可能性が示された。

## 文 献

- 1) Ebata T (2016) Drug-induced itch management. *Curr Probl Dermatol* 50, 155-163.
- 2) Wong LS, Wu T, Lee CH (2017) Inflammatory and noninflammatory itch: implications in pathophysiology-directed treatments. *Int J Mol Sci* 18, pii: E1485.
- 3) Lynn B (1992) Capsaicin: actions on C fibre afferents that may be involved in itch. *Skin Pharmacol* 5, 9-13.
- 4) Schmelz M (2015) Itch and pain differences and commonalities. *Handb Exp Pharmacol* 227, 285-301.
- 5) Chuquilin M, Alghalith Y, Fernandez KH (2016) Neurocutaneous disease: cutaneous neuroanatomy and mechanisms of itch and pain. *J Am Acad Dermatol* 74, 197-212.
- 6) Andrew D, Craig AD (2001) Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. *Nat Neurosci* 4, 72-77.
- 7) Raja SN, Meyer RA, Campbell JN (1988) Peripheral mechanisms of somatic pain. *Anesthesiology* 68, 571-590.
- 8) Yaksh TL (1993) The spinal pharmacology of facilitation of afferent processing evoked by high-threshold afferent input of the postinjury pain state. *Curr Opin*

Neurol Neurosurg 6, 250-256.

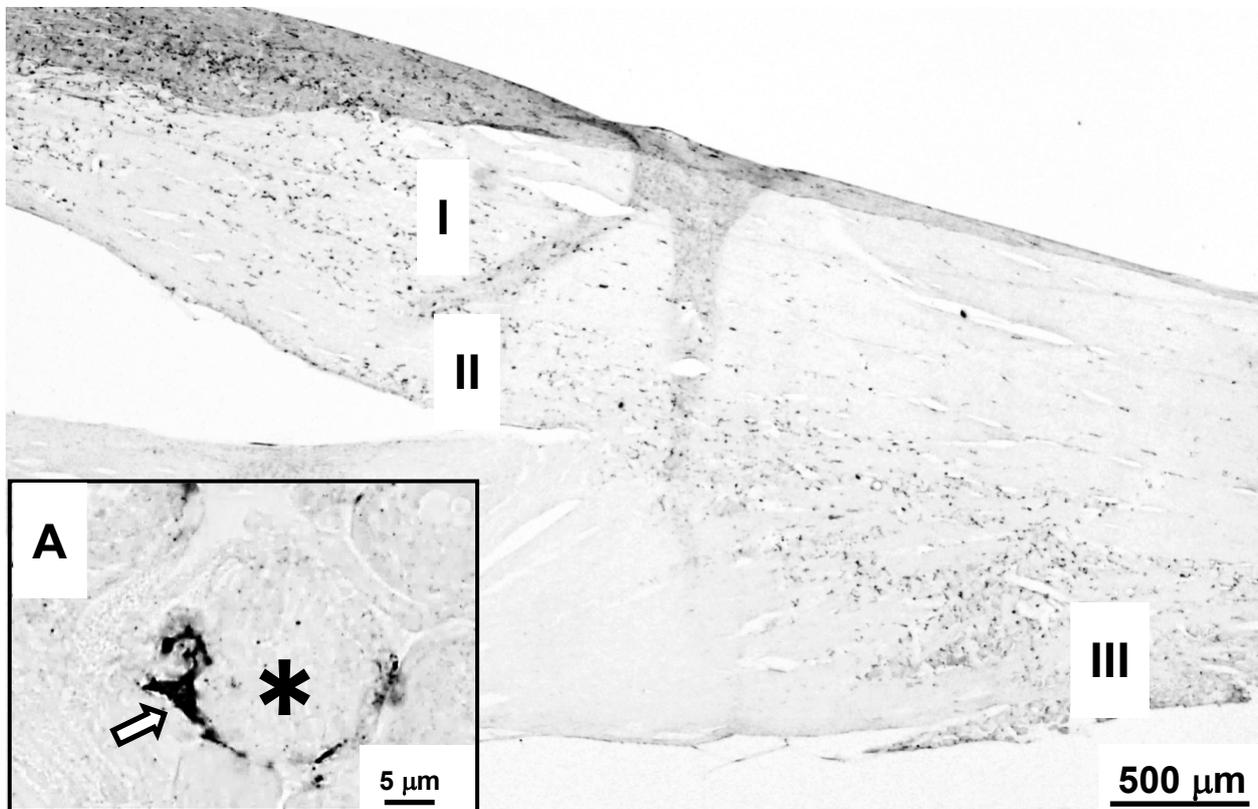
- 9) Sann H, Pierau FK (1998) Efferent functions of C-fiber nociceptors. *Z Rheumatol* 57 Suppl 2, 8-13.
- 10) Perl ER (1996) Cutaneous polymodal receptors: characteristics and plasticity. *Prog Brain Res* 113, 21-37.
- 11) Tominaga M (2007) The role of TRP channels in thermosensation. In: WB Liedtke, S Heller, editors: CRC Press/Taylor & Francis.
- 12) Dhand A, Aminoff MJ (2014) The neurology of itch. *Brain* 137, 313-322.
- 13) Huang LY, Gu Y, Chen Y (2013) Communication between neuronal somata and satellite glial cells in sensory ganglia. *Glia* 61, 1571-1581.
- 14) Zigmond RE, Echevarria FD (2019) Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury. *Prog Neurobiol* 173, 102-121.
- 15) Goto T, Oh SB, Takeda M, Shinoda M, Sato T, Gunjikake KK, Iwata K (2016) Recent advances in basic research on the trigeminal ganglion. *J Physiol Sci* 66, 381-386.
- 16) Iwata K, Katagiri A, Shinoda M (2017) Neuron-glia interaction is a key mechanism underlying persistent orofacial pain. *J Oral Sci* 59, 173-175.
- 17) Batbold D, Shinoda M, Honda K, Furukawa A, Koizumi M, Akasaka R, Yamaguchi

S, Iwata K (2017) Macrophages in trigeminal ganglion contribute to ectopic mechanical hypersensitivity following inferior alveolar nerve injury in rats. *J Neuroinflammation* 14, 249.

18) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.

19) Kashiba H, Senba E (2001) [Primary sensory neurons expressing histamine H1-receptor mRNA]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 118, 43-49.

20) Handwerker HO (2010) Microneurography of pruritus. *Neurosci Lett* 470, 193-196.



**Fig. 1**

**Histamine の顔面皮膚投与により三叉神経節において観察された Iba1 陽性細胞の組織標本写真**

**A: Iba1 陽性細胞の強拡大像、\* : 三叉神経節細胞、I : 三叉神経第 I 枝領域、II : 三叉神経第 II 枝領域、III : 三叉神経第 III 枝領域**

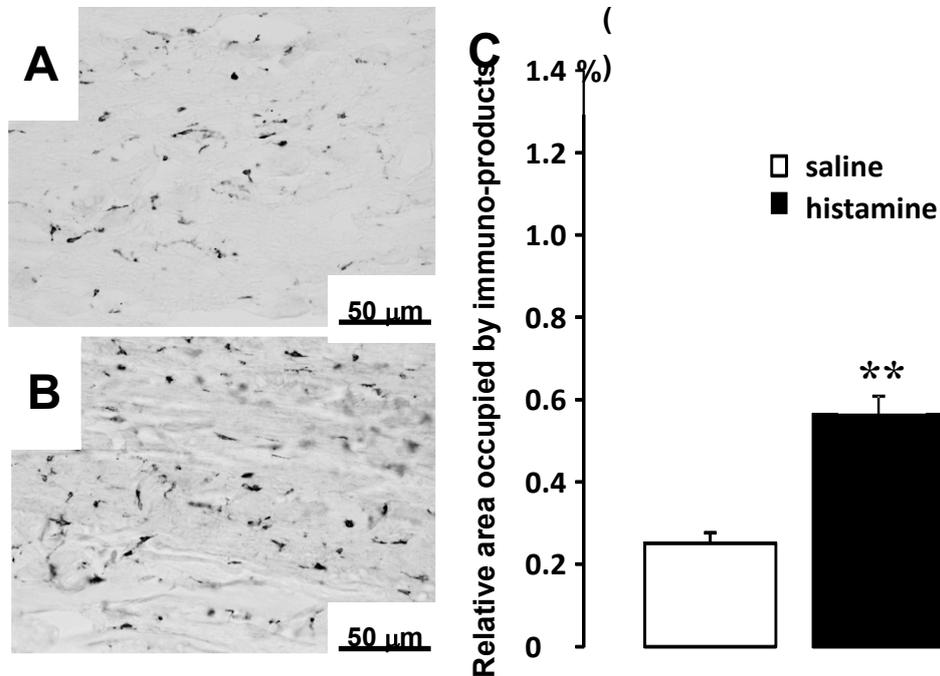


Fig. 2

生理的食塩液あるいは histamine の顔面皮膚投与により三叉神経第 I 枝領域において観察された Iba1 陽性細胞の組織標本写真および Iba1 陽性細胞が占める領域の割合

A: 口ひげ部皮膚に生理的食塩液を注入したラットの三叉神経節に発現した Iba1 陽性細胞、B: histamine を注入したラットの三叉神経節、C: Iba1 陽性細胞の占める領域の割合を示したグラフ. \*\*:  $p < 0.01$

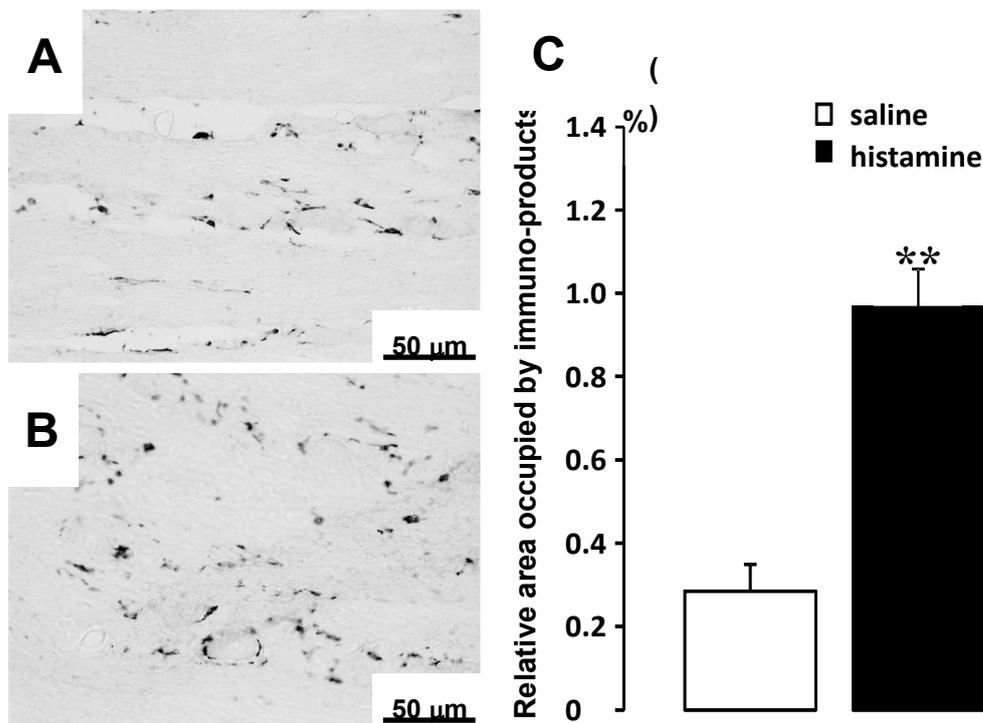


Fig. 3

生理的食塩液あるいは histamine の口ひげ部皮膚投与により三叉神経第Ⅱ枝領域において観察された Iba1 陽性細胞の組織標本写真および Iba1 陽性細胞が占める領域の割合

A: 生理的食塩液の口ひげ部皮膚投与後、三叉神経節で観察された Iba1 陽性細胞の組織標本写真、B: histamine の口ひげ部皮膚投与後に観察された Iba1 陽性細胞の組織標本写真、C: Iba1 陽性細胞の占める領域の割合を示したグラフ。

\*\* $p < 0.01$

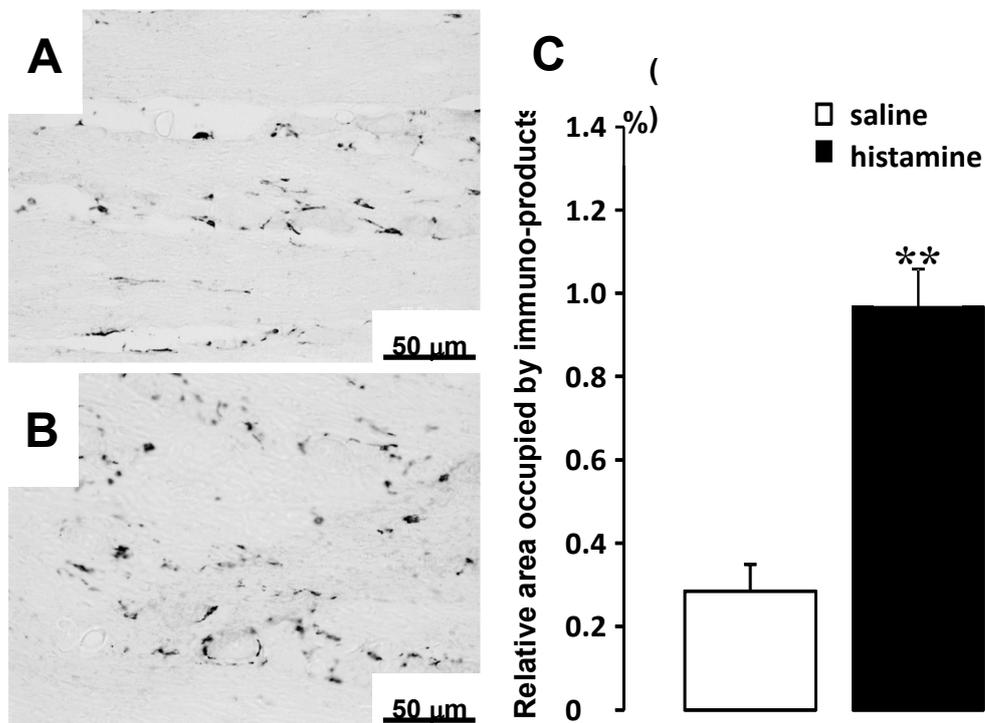
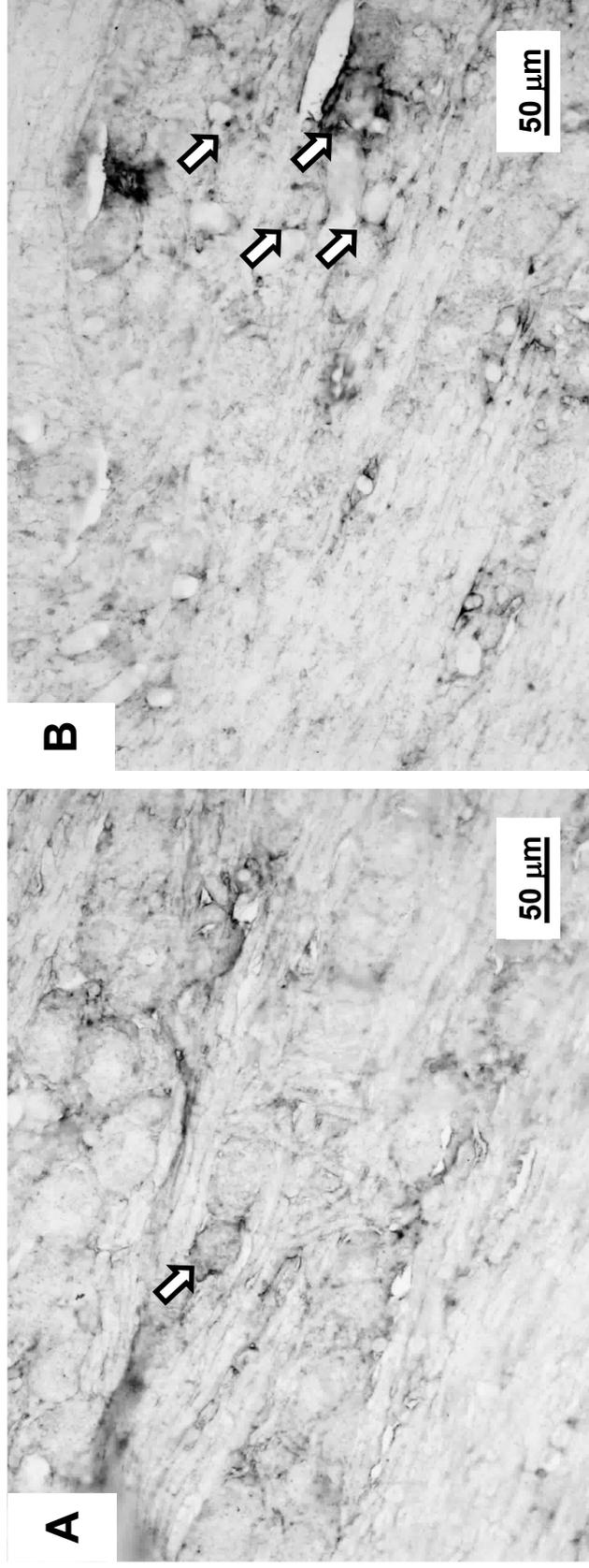


Fig. 3

生理的食塩液あるいは histamine の口ひげ部皮膚投与により三叉神経第Ⅱ枝領域において観察された Iba1 陽性細胞の組織標本写真および Iba1 陽性細胞が占める領域の割合

A: 生理的食塩液の口ひげ部皮膚投与後、三叉神経節で観察された Iba1 陽性細胞の組織標本写真、B: histamine の口ひげ部皮膚投与後に観察された Iba1 陽性細胞の組織標本写真、C: Iba1 陽性細胞の占める領域の割合を示したグラフ。

\*\* $p < 0.01$



**Fig. 5**  
生理的食塩液および histamine の口ひげ部皮膚投与により三叉神経第Ⅱ枝領域  
において観察された GFAP 陽性細胞の組織標本写真  
A: 生理的食塩液投与、B: histamine 投与、矢印は GFAP 陽性細胞

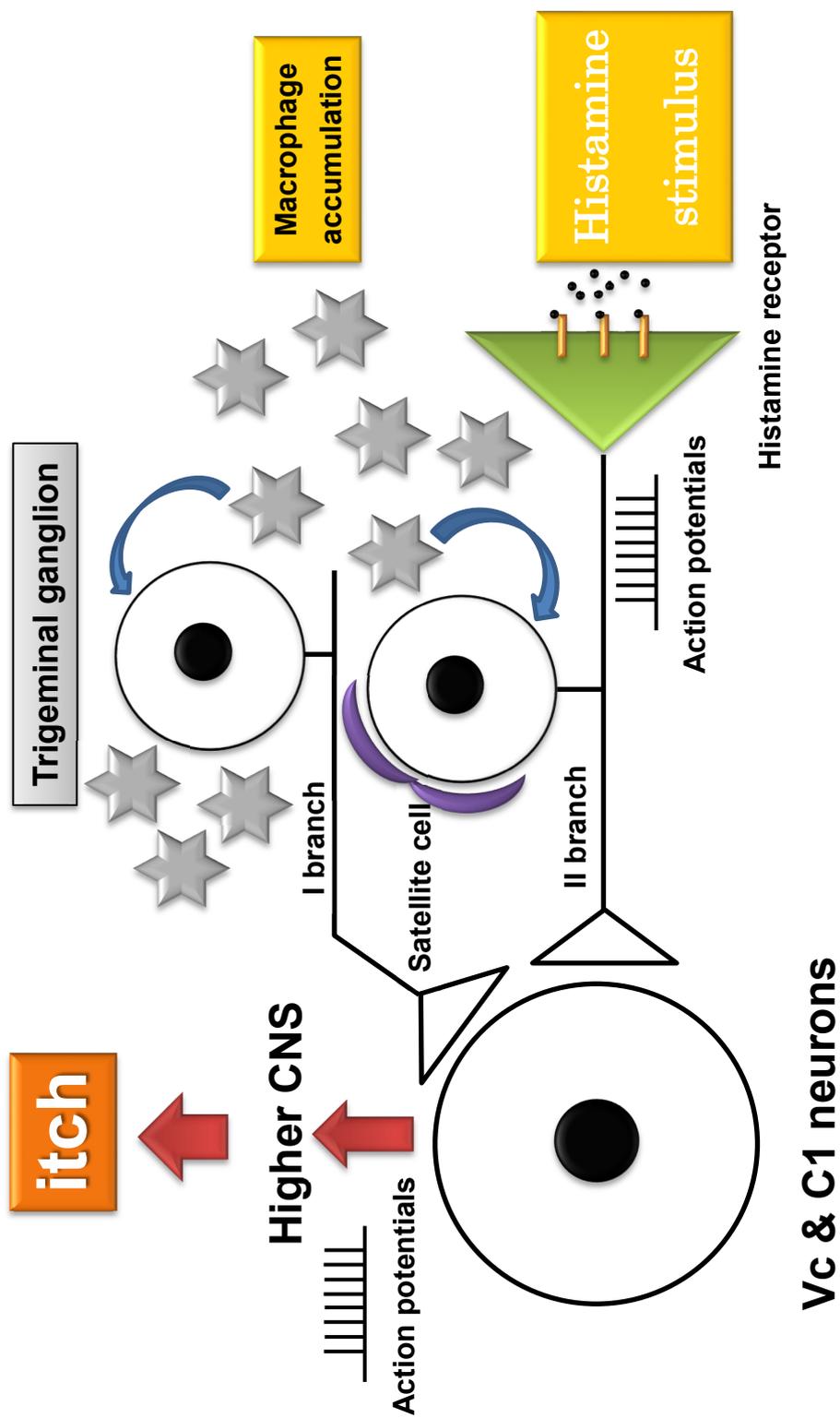


Fig. 6

顔面皮膚の histamine 刺激によって引き起こされる痒み発症の末梢神経機構を示した模式図