

顔面皮膚の histamine 刺激によって活性化する  
ミクログリアの動態

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

米本 久史

(指導：岩田 幸一 教授, 篠田 雅路 准教授)

## 緒言

痒みは非常に不快な感覚で、臨床的にも様々な薬物の副作用として引き起こされることが知られている<sup>1,2)</sup>。しかし、その発症メカニズムが不明であることから、痒みを取り除くために行われる処置は、原因療法ではなく対症療法が適応される場合が多い<sup>3,4)</sup>。従来の研究では、痒みは痛覚が弱まった時に起こる感覚であり、痛覚情報伝達に関与する無髄のC線維と同様の神経線維によって伝えられると考えられていた<sup>5)</sup>。しかし、最近では histamine 刺激によって特異的に活性化するC線維が同定され、痛みと痒みが異なる神経機構で引き起こされることが明かにされた<sup>6)</sup>。

脊髄レベルにおいては、ネコ足裏への histamine 投与にのみ応答し、機械および温度侵害刺激には応答しない視床投射ニューロンが存在することが報告され、脊髄レベルにおいても histamine に特異的な応答を示すニューロンの存在が確かめられた<sup>7)</sup>。このようなニューロンは受容野が不明瞭で、histamine の注入のみに反応することから、特異的侵害受容ニューロンや広作動域ニューロンと異なり、histamine 特異ニューロンとして分類されている。また、結合腕傍核に軸索を送る三叉神経脊髄路核ニューロンにおいて、histamine, chloroquine および capsaicin を顔面皮下に注入することによって発現する c-Fos タンパクを調べた研究において、侵害刺激と痒み刺激とが同一ニューロンによって活性化する可能

性も示されている<sup>8)</sup>。以上から、痒みの情報処理において、三叉神経脊髄路核ニューロンは痒み特異的な応答を示すものと、痛覚と痒みの両方の情報処理に関係したものが存在する可能性があると考えられる。

これまでの研究により、延髄を含む中枢神経系にはミクログリア、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトの三種類が報告されている<sup>9)</sup>。これらのグリア細胞はニューロンの構造的な支持細胞として、またニューロンの栄養細胞としての機能を有すると考えられてきた<sup>9)</sup>。しかし、最近の研究で、グリア細胞は直接ニューロンに作用して、ニューロン活動を変調することが明かにされた<sup>10)</sup>。グリア細胞の中でも、特にミクログリアとアストロサイトはニューロン活動に対して強い変調作用を示すことが知られている<sup>11)</sup>。末梢神経損傷や組織に炎症が起こると、一次ニューロンの中枢端から ATP が放出される。ATP はミクログリアの膜上に存在する P2X<sub>4</sub> 受容体に結合しミクログリアの活性化が誘導される。一方、アストロサイトは一次ニューロンの中枢端と二次ニューロン間に存在するシナプス領域において、グルタミンを取り込みグルタミン酸を合成して放出することにより、二次ニューロン活動を強く亢進させることが報告されている<sup>11)</sup>。また、ミクログリアとアストロサイトは活性時期が異なっている。末梢神経障害や末梢組織に炎症が惹き起こされると、最初に活性化されるのはミクログリアであり、それに引き続いてアストロサイトが活性化される。さらに、最近

の研究では、活性型ミクログリア細胞から transforming growth factor alpha や vascular endothelial growth factor が放出され、これらの分子がアストロサイトの活性化に影響を与えることが報告されており、これら二種類のグリア細胞は異なるメカニズムで活性化し、ニューロン活動の変調に関与するにもかかわらず、お互いに機能連絡を有することが明らかになった<sup>12)</sup>。このようなミクログリアやアストロサイトによる二次ニューロンの活動性変調は疼痛に関係するニューロンだけでなく痒み情報処理に関与する二次ニューロンにも変調をかける可能性が考えられる。しかし、活性型グリア細胞がいかなるメカニズムで、痒み情報処理に関与する二次ニューロン活動の変調に関与するかについては不明な点が多く残されている。

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発現する Iba1 陽性細胞の延髄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ミクログリアの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>13)</sup>。実験には Sprague-Dawley 系雄性ラット 10 ひき頭を用いた。

### 1. Histamine 投与

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。灌流固定終了後に延髄を含む全脳部位を摘出し、同様の固定液で 4°C にて 2 日間、後固定を行った。

### 2. 抗 Iba1 抗体による免疫染色

取り出した三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) および上部頸髄 (C1) 領域を含む

脳脊髄標本を 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、脳脊髄標本を O.C.T. compound (Sakura Finetek, Torrance) で包埋してドライアイスで凍結し、三叉神経脊髄路核を含む延髄の連続切片標本 (厚さ 50  $\mu\text{m}$ ) を作製して 3 切片毎に 1 切片を取り出し、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、厚さ 50  $\mu\text{m}$  の切片を 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  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% TritonX-100 diluted in 0.01M PBS with 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、一次抗体である rabbit anti-rat Iba1 antibody (1: 1000, Wako, Osaka) 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 M PBS にて洗浄し、MAS-GP (Matsunami, Tokyo) でコートしたスライドガラスに貼り付け、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, NIH, USA)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 ± 標準誤差で表し，有意差検定には Mann-Whitney U test を用いた。また，有意水準は  $p < 0.05$  とした。

## 結果

### 1. 延髄およびC1領域におけるIba1陽性細胞の形態と分布

Fig. 1は口ひげ部への histamine 注入後 Vc で検出された Iba1 陽性細胞の強拡大組織標本写真を示している。赤の矢印で示したように、Iba1 陽性細胞は、垂体型の細胞体を有する像として観察された。また、細胞体からは周囲に複数の突起を出している。Fig. 2には、histamine の口ひげ部への注入5分後、延髄および上部頸髄領域で認められた Iba1 陽性細胞の組織標本写真を示した。Histamine および生理的食塩液を口ひげ部へ注入したラットにおいて、多くの Iba1 陽性細胞が延髄の三叉神経脊髄路核中間亜核(Vi)、Vc および上部頸髄の C1 において検出された。また、Iba1 陽性細胞は刺激と対側においても観察された。特に histamine 刺激と同側の Vc 表層では高い分布密度で Iba1 陽性細胞が検出された。また、この Iba1 陽性細胞の分布は Vc および C1 領域の背側から腹側にかけてほぼ均一な密度を示しており、分布密度に偏りは認められなかった。

### 2. Vc および C1 の表層における Iba1 陽性細胞の吻尾的広がり

Fig. 3は Vc および C1 領域の表層における Iba1 陽性細胞の吻尾側方向の広がり示している。Fig. 3A に示したように、histamine 刺激と同側表層部で、obex



から 720~1440  $\mu\text{m}$  尾側部において、生理的食塩液注入群に比べ有意に高密度の Iba1 陽性細胞発現を認めた。また、それよりさらに尾側の obex から 2160  $\mu\text{m}$  尾側部では histamine 注入群の方がやや高い発現を認めたが、有意差はなかった。一方、histamine 注入および生理的食塩液刺激と対側においては、obex から 720~2160  $\mu\text{m}$  尾側部の範囲において Iba1 陽性細胞発現密度に違いは認められなかった (Fig. 3B)。

### 3. Vc および C1 の深層における Iba1 陽性細胞の吻尾的広がり

本研究では obex から 720~2160  $\mu\text{m}$  尾側部の範囲において、深層部に発現した Iba1 陽性細胞密度に関しても解析を行った。深層部においては、histamine 刺激と同側において、どのレベルにおいてもやや発現密度が高い傾向を認めたものの、有意差はなかった (Fig. 4A)。また、対側においても分布密度に有意差は認められなかった (Fig. 4B)。

### 4. 網様体および孤束核に発現した Iba1 陽性細胞

Fig. 5 は網様体 (RF) および孤束核 (NTS) において検出された Iba1 陽性細胞の吻尾側方向の分布密度を示している。Fig. 5A~D で示した RF においては histamine 刺激および生理的食塩液刺激共に同側および対側で、まばらな Iba1 陽

性細胞発現を認めた。吻尾方向の分布密度をみると、同側と対側、histamine と生理的食塩液刺激共に有意な差は認められなかった。また、NTS においては非常に高密度な Iba1 陽性細胞発現が左右対称的に認められた (Fig. 5E および F)。また、NTS においても histamine 刺激と生理的食塩液刺激において、吻尾方向の分布密度の広がりには有意差は認められなかった (Fig. 5I)。

## 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活性化するミクログリアの発痒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、延髄および上部頸髄における活性型ミクログリアの発現様式の解析を行った。その結果、Vi, Vc および C1 領域に多くの Iba1 陽性細胞発現を認めた。また、RF および NTS においても Iba1 陽性細胞が検出された。

### 1. ミクログリアの活性化

従来多くの研究により、神経損傷や組織における炎症により、脊髄後角において、強いミクログリアの活性化が誘導されることが報告されている<sup>11,14)</sup>。現在、ミクログリアの活性化に関しては、ほとんどの研究者は形態学的な変化の有無によって判断している<sup>15)</sup>。すなわち、ミクログリアは活性化すると、細胞体が膨化し細胞体から突出している樹状突起が短くなる。本研究においても、顔面皮膚に histamine を注射して Vc および C1 領域で検出された Iba1 陽性細胞は Fig. 1 に示したように、比較的大型の細胞体と、細胞体から突出する複数の短縮した樹状突起を認めた。過去の研究と本研究結果から、顔面皮膚の histamine

刺激によって Vc および C1 領域から検出された Iba1 陽性細胞は活性型ミクログリアであると判断できる。

## 2. Vc および C1 領域におけるミクログリア活性化とニューロン活動

ミクログリアは非常に数が多く、神経細胞と神経細胞の間に隙間なく存在し、神経細胞に対して様々な作用を及ぼすことが知られている<sup>16)</sup>。また、活性化したミクログリアは複数の突起を伸ばしたり、締めたりと活発に動くことが知られており、これによって神経組織に対する作用を発揮している<sup>14)</sup>。ミクログリアの働きとして、神経細胞の構造的な維持、神経細胞の栄養、あるいは老廃物の処理などが知られているが、最近の研究で、神経細胞の活動性変調にも重要な働きを有することが明かにされてきた<sup>14)</sup>。末梢神経が損傷を受けると、損傷神経の興奮が異常に亢進し、損傷神経の中枢端から ATP を初めとする様々な物質が放出され 2 次ニューロンに作用することが知られている<sup>11)</sup>。特に ATP はミクログリア細胞に発現している P2X<sub>4</sub> あるいは P2X<sub>7</sub> 受容体に結合し、ミクログリア細胞の活性化を促す。活性化したミクログリアには形態学的な変化が誘導され、それに引き続き、活性型ミクログリアから様々な物質が放出される。このことから、顔面皮膚への histamine 注射によって活性化されたミクログリアは、顔面の皮膚を支配する神経の中枢端から ATP が放出されたことによって誘導さ

れたものと想像される。さらに、histamine 注入によって活性化したミクログリアからは様々な物質が放出される可能性が考えられる。これまでの報告では、活性型ミクログリアからは Brain Derived Neurotropic Factor (BDNF)や Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ) が放出され、直接的に神経細胞の活動性を変調することが知られている<sup>11)</sup>。おそらく、本研究で histamine 注射によって活性化したミクログリアからも、BDNF や TNF $\alpha$ が放出され、2次ニューロン活動が増強され、これによって上位中枢に痒みを引き起こすための情報が伝えられると考えられる。

### 3. RF および NTS におけるミクログリアの機能

本研究では histamine 刺激により RF において弱いミクログリアの活性化, NTS には強いミクログリアの活性化が観察された。RF および NTS の両領域とも、自律神経系応答に対して重要な役割を担う領域として知られている<sup>17-19)</sup>。特に histamine 刺激に対して強いミクログリア活性を示した NTS は、口腔顔面領域からの侵害入力を受けて、これによって自律神経系の反応を変化させることが知られている<sup>18)</sup>。このことから、NTS 領域において活性化したミクログリアはこの領域に存在するニューロン活動を変調させ、痒みによる自律神経系応答の変調に関与する可能性があると考えられる。一方で、自律神経系調節に関与する

と考えられている RF 領域において活性化が認められたミクログリアは、活性化の程度が低いこと、また histamine と生理食塩水刺激に対して活性化にほとんど違いが見いだせなかったことなどから、RF 領域の神経活動の変調に関与する可能性は低いと考えられる。しかし、これら両領域から検出された活性化型ミクログリアが histamine 投与により惹き起こされる痒み感覚と、これに関連する自律系応答に対してはほとんど明らかにされていない。この点を解明するためにはさらなる詳細な研究がなされる必要があると考えられる。

## 結論

Fig. 6には本研究とこれまでの研究結果から想定される痒みの発症機構を示した。本研究では発痒物質として histamine を用いたが、顔面皮膚に様々な痒みを引き起こす刺激が加えられると、無髄の C 線維が興奮し、活動電位が Vc および C1 の神経細胞へと送られる。これによって、Vc および C1 神経細胞とミクログリアとが様々な物質を介した情報伝達を行い、結果的にミクログリアの活性化が促進する。活性化型ミクログリアからは幾つかの分子が放出され、Vc および C1 神経細胞の活動性はさらに亢進し、この神経興奮は上位中枢へと送られ、顔面皮膚に痒みが引き起こされると考えられる。しかし、本研究では顔面皮膚の histamine 刺激によるミクログリアと神経細胞との情報のやり取りに関する直接的な証拠をつかんでいない。痒みの神経機構の全貌を明らかにするためには、この点についてより詳細な研究がなされる必要があると考えられる。

## 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) Faubion SS, Sood R, Kapoor E (2017) Genitourinary syndrome of menopause: management strategies for the clinician. *Mayo Clin Proc* 92, 1842-1849.
- 4) Rajagopalan M, Saraswat A, Godse K, Shankar DS, Kandhari S, Shenoj SD, Tahiliani S, Zawar VV (2017) Diagnosis and management of chronic pruritus: An expert consensus review. *Indian J Dermatol* 62, 7-17.
- 5) Schmelz M (2015) Itch and pain differences and commonalities. *Handb Exp Pharmacol* 227, 285-301.
- 6) Chuquilin M, Alghalith Y, Fernandez KH (2016) Neurocutaneous disease: Cutaneous neuroanatomy and mechanisms of itch and pain. *J Am Acad Dermatol* 74, 197-212.
- 7) Andrew D, Craig AD (2001) Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. *Nat Neurosci* 4, 72-77.
- 8) Jinks SL, Simons CT, Dessirier JM, Carstens MI, Antognini JF, Carstens E (2002) C-fos induction in rat superficial dorsal horn following cutaneous application of



noxious chemical or mechanical stimuli. *Exp Brain Res* 145, 261-269.

9) Allen NJ, Lyons DA (2018) Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* 362, 181-185.

10) Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC (2016) Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res* 51, 1-40.

11) Inoue K, Tsuda M (2018) Microglia in neuropathic pain: Cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Neurosci* 19, 138-152.

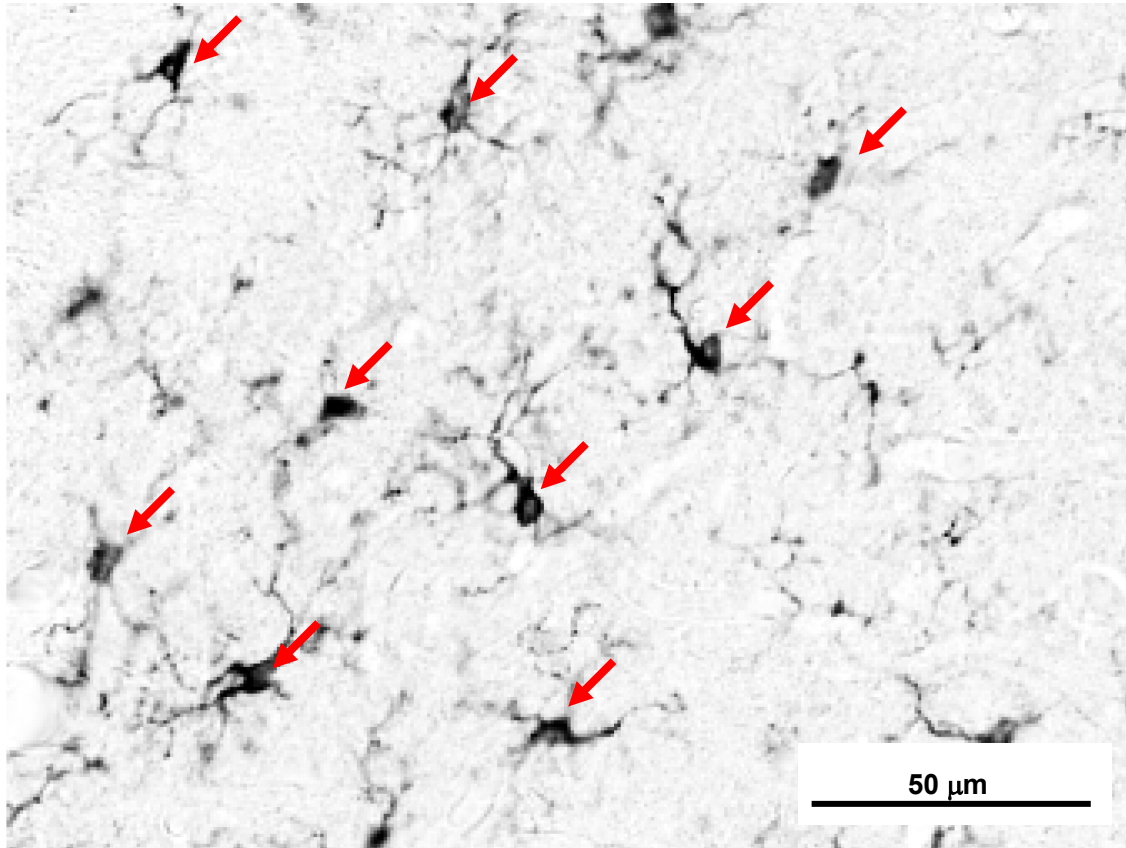
12) Rothhammer V, Borucki DM, Tjon EC, Takenaka MC, Chao CC, Ardura-Fabregat A, de Lima KA, Gutierrez-Vazquez C, Hewson P, Staszewski O, Blain M, Healy L, Neziraj T, Borio M, Wheeler M, Dragin LL, Laplaud DA, Antel J, Alvarez JI, Prinz M, Quintana FJ (2018) Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature* 557, 724-728.

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

14) Tsuda M, Beggs S, Salter MW, Inoue K (2013) Microglia and intractable chronic pain. *Glia* 61, 55-61.

15) Salter MW, Stevens B (2017) Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med* 23, 1018-1027.

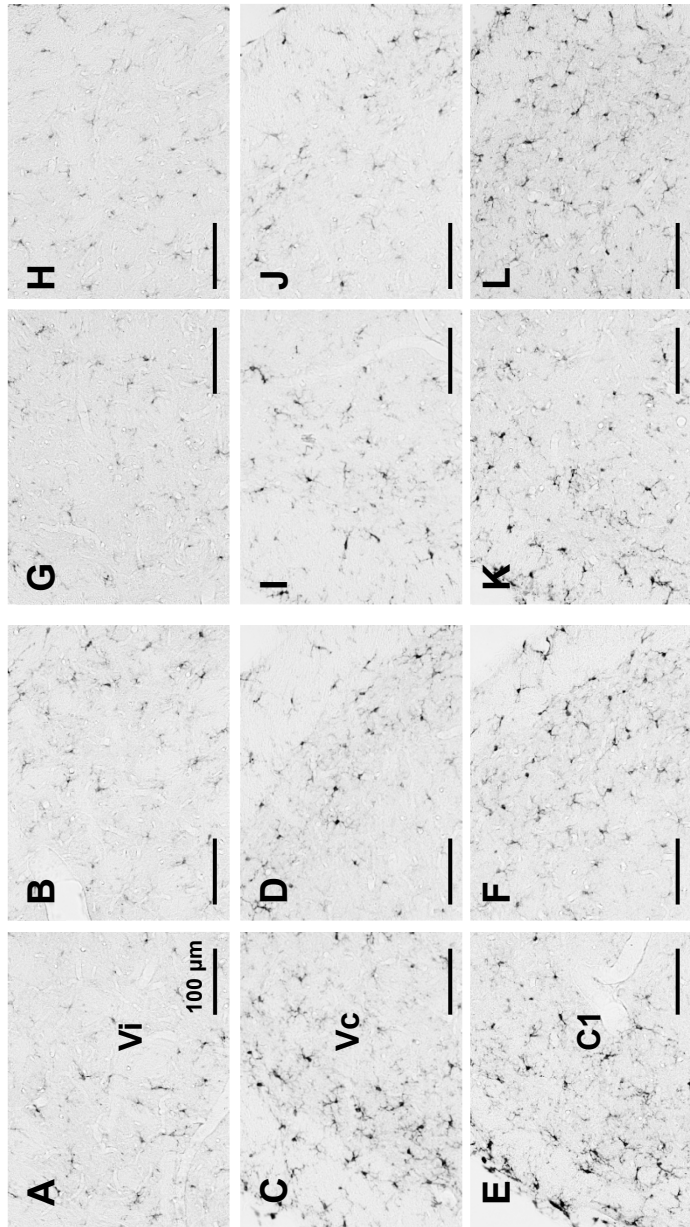
- 16) Salter MW, Beggs S (2014) Sublime microglia: Expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell* 158, 15-24.
- 17) Sevoz-Couche C, Brouillard C (2017) Key role of 5-HT3 receptors in the nucleus tractus solitarii in cardiovagal stress reactivity. *Neurosci Biobehav Rev* 74, 423-432.
- 18) Tsujimura T, Kondo M, Kitagawa J, Tsuboi Y, Saito K, Tohara H, Ueda K, Sessle BJ, Iwata K (2009) Involvement of ERK phosphorylation in brainstem neurons in modulation of swallowing reflex in rats. *J Physiol* 587, 805-817.
- 19) Liu RH, Tang JS, Hou ZL (1989) Electrophysiological identification of spinally projecting neurons in the lateral reticular nucleus of the rat. *Brain Res* 481, 350-355.



**Fig. 1**

口ひげ部への histamine 投与により Vc 表層で検出された  
Iba1 陽性細胞の強拡大像

赤矢印:典型的な Iba1 陽性細胞



**Fig. 2**

**口ひげ部への histamine 投与により延髄及び上部頸髄で検出された**

**Iba1 陽性細胞**

**Histamine 投与群:同側 Vi(A), 対側 Vi(B), 同側 Vc (C), 対側**

**Vc(D), 同側 C1 (E), 対側 C1(F), Saline 投与群:同側 Vi(G), 対側**

**Vi(H), 同側 Vc (I), 対側 Vc(J), 同側 C1 (K), 対側 C1(L)**

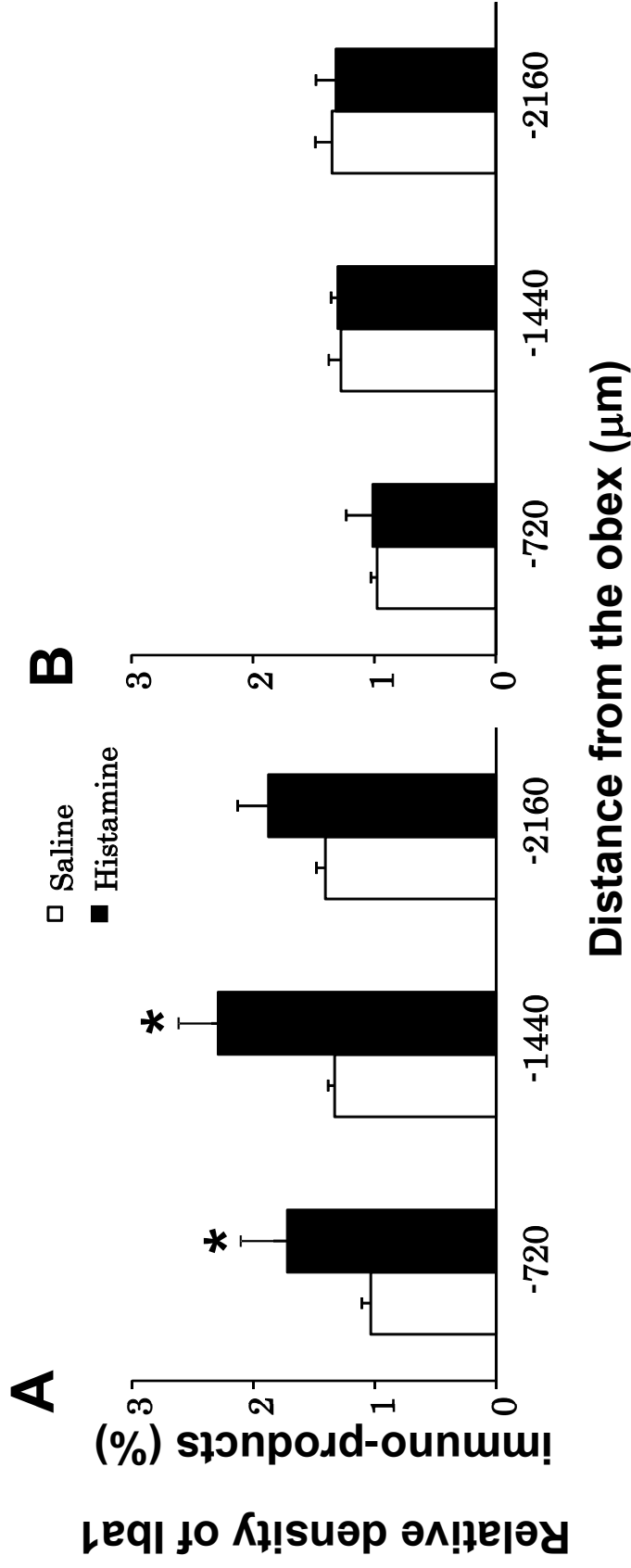
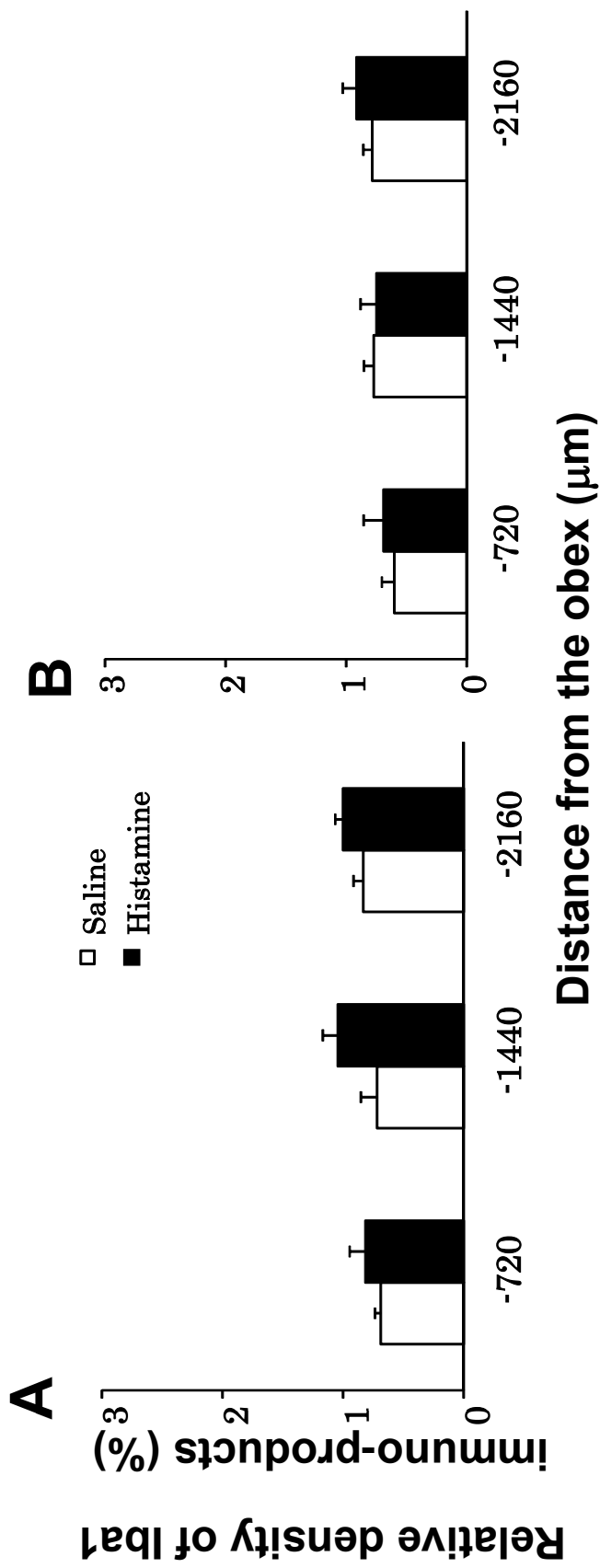


Fig. 3

Vc 表層部に発現した Iba1 陽性細胞の分布密度

A: 刺激と同側の行ける陽性細胞密度, B: 刺激と反対側における陽性細胞密度

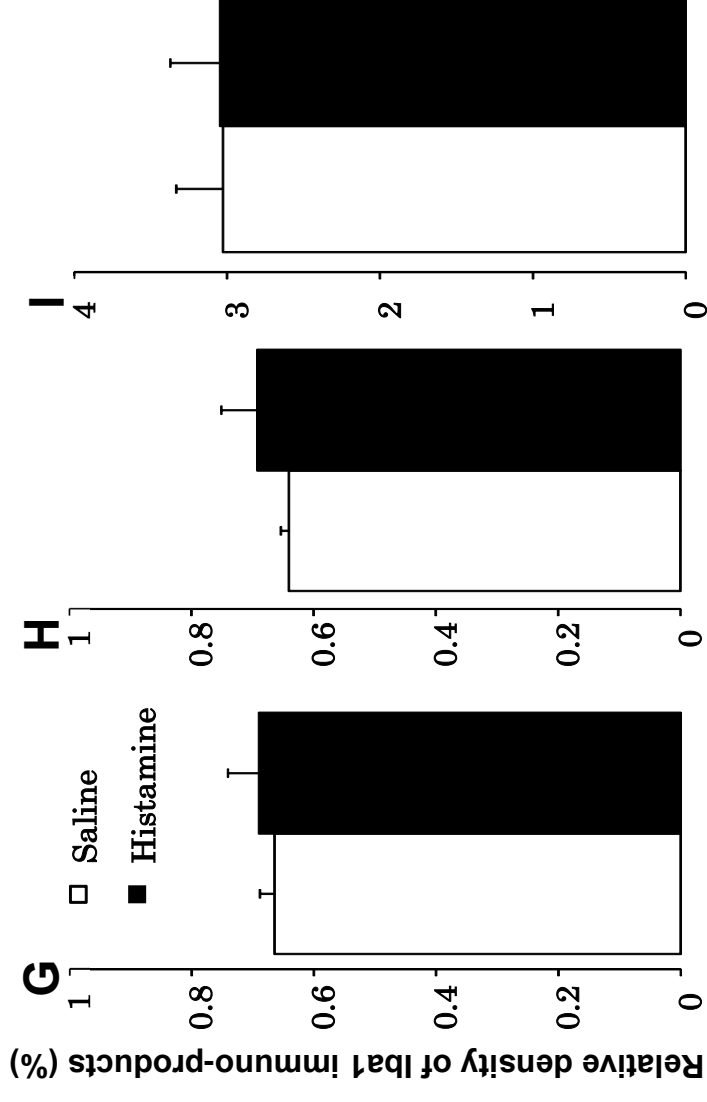
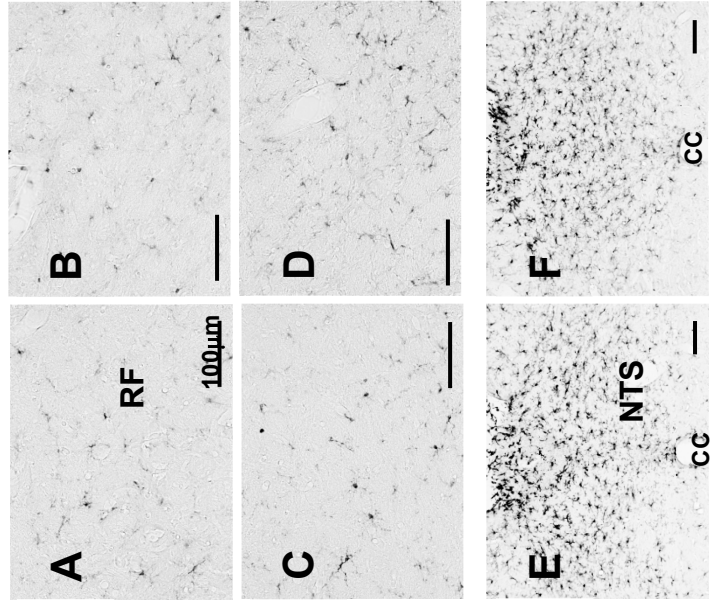
\*  $p < 0.05$



**Fig. 4**

Vc 深層部に発現した Iba1 陽性細胞の分布密度

A: 刺激と同側における Iba1 陽性細胞密度, B: 刺激と対側における Iba1 陽性細胞密度



**Fig. 5**

網様体(RF)および孤束核(NTS)に発現した Iba1 陽性細胞の組織標本写真とその分布密度  
 histamine 投与群: 同側 RF(A), 対側 RF(B), NTS(E), Saline 投与群: 同側 RF(C), 対側 RF(D), NTS(F)  
 G: histamine 刺激と同側の RF における Iba1 陽性細胞の分布密度, H: histamine 刺激と対側の RF における Iba1 陽性細胞の分布密度, I: NTS における Iba1 陽性細胞の分布密度  
 cc: 中心管

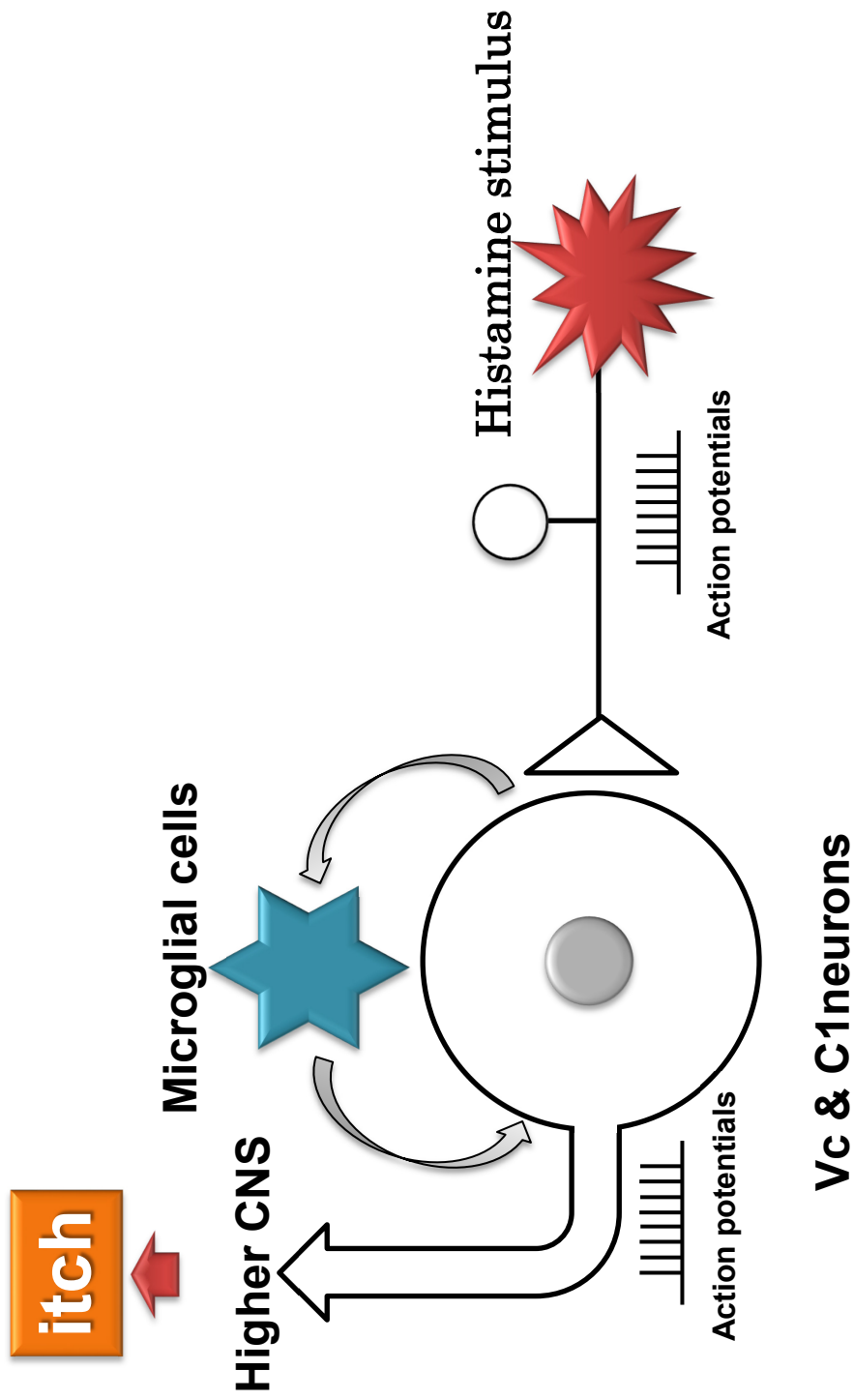


Fig. 6  
 顔面皮膚の histamine 刺激によって引き起こされる痒み発症の神経機構を示した模式図