

顔面皮膚の C 線維刺激により活性化する延髄ニューロンの
歯髄炎による興奮性増強

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

浅香 淳一

(指導：篠田 雅路 教授, 人見 涼露 助教)

要旨

目的：歯髄炎によって誘導される口腔顔面領域の異所性異常疼痛に対する延髄の侵害受容ニューロンとミクログリアの機能連関の詳細は不明である。本研究では、歯髄炎モデルラットを用いて、歯髄炎後の口髭部皮下へのカプサイシン（Cap）注射によるC線維の特異的活性化によって生じる延髄の侵害受容ニューロンおよびミクログリアの活性化動態を解析した。

方法：完全フロイントアジュバント（CFA）の上顎歯髄投与による歯髄炎ラットを作製した。CFA投与後3日目に口髭部皮下へCap注射し、注射側三叉神経脊髄路核尾側亜核（Vc）、両側孤束核（NTS）および両側網様体（RF）における興奮した侵害受容ニューロン数および活性型ミクログリアを免疫組織化学的に解析した。

結果：歯髄炎後の口髭部皮下へのCap注射後、注射側Vc中間部において、興奮した侵害受容ニューロン数は増加したが、注射側Vc背側部および注射側Vc腹側部では変化は見られなかった。両側NTSおよび両側RFにおいて、歯髄炎後の口髭部皮下へのCap注射後、興奮した侵害受容ニューロンが観察されたが、コントロール群と比較して差はみられなかった。また、Cap注射側Vc、両側NTSおよびRFに活性型ミクログリアが観察された。

結論：歯髄炎による患側Vc、両側NTSおよび両側RFにおけるミクログリアの活性化は、顔面領域からのC線維を介した入力による同側Vcの侵害受容ニューロンの興奮性変調に関与する可能性が示唆された。

キーワード：歯髄炎、異所性疼痛、三叉神経脊髄路核尾側亜核、侵害受容ニューロン、ミクログリア

Abstract

Purpose: It is well known that pulpitis induces ectopic pain in a wide area of the orofacial region.

However, the detailed mechanism is unknown. In this study, the property of nociceptive neuronal excitation in trigeminal spinal subnucleus caudalis (Vc) caused by the C fibers stimulation using capsaicin (Cap) injection into the whisker pad skin and its involvement of the microglial activation in the medulla were assessed in pulpitis rats.

Methods: Complete Freund's adjuvant (CFA) was administrated into the maxillary pulp. On day 3 after CFA injection, the number of excited nociceptive neurons and activated microglia in the ipsilateral Vc, bilateral solitary nucleus (NTS) and bilateral reticular formation (RF) were examined immunohistochemically following Cap injection in the ipsilateral whisker pad skin.

Results: The number of the phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK) positive neurons after the Cap injection was increased in the ipsilateral middle region of Vc, but not the caudal or dorsal region of Vc. The pERK positive neurons after the Cap injection were observed in the bilateral NTS and RF, but there was no difference in the number of pERK positive neurons compared to the vehicle-injected group. In addition, microglial activation was induced in the middle region of ipsilateral Vc, bilateral NTS, and RF by pulpitis.

Conclusion: These results suggest that the activated microglia in the middle region of Vc ipsilateral to pulpitis play an important role in the enhanced hyperexcitability of the nociceptive neurons in the middle of Vc induced by C fiber stimulation to the orofacial region.

Keywords: pulpitis, ectopic pain, trigeminal spinal subnucleus caudalis, nociceptive neuron, microglia

緒 言

歯髄炎により、歯痛だけでなく口腔顔面の広い領域に異常疼痛が誘発されるが、この異常疼痛は、三叉神経節 (TG) ニューロン、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) ニューロン、孤束核 (NTS) や網様体 (RF) のニューロンの興奮性増強が関与すると考えられている¹⁻³⁾。TG においては、歯髄炎による歯髄投射 TG ニューロンの興奮性亢進だけではなく、TG 内に存在する衛星細胞の活性化によって口腔顔面の広い領域に投射する TG ニューロンの興奮性も増強され、歯髄以外の口腔顔面領域に痛みが誘発される⁴⁾。さらに、TG ニューロンに生じた異常興奮は Vc に伝えられ、この領域に存在する侵害受容ニューロンの興奮性を増強させることが知られている⁵⁾。この Vc における侵害受容ニューロン興奮性増強はさらに、各三叉神経枝の支配領域を超えた Vc の広い領域に存在する侵害受容ニューロンの興奮性を亢進させる⁵⁾。

Vc に存在する侵害受容ニューロンは、特異的侵害受容 (NS) ニューロンと広作動閾 (WDR) ニューロンに分類されている。NS ニューロンは侵害刺激に対してのみ反応するのに対し、WDR ニューロンは侵害刺激および非侵害刺激の両方に応答する⁶⁾。また、これらの侵害受容ニューロンは反応性の違いだけでなく、Vc 内における分布も異なっている。NS ニューロンは主に無髄の C 線維が入力する Vc 表層に分布するのに対し、WDR ニューロンは Vc 深層に多く分布し、口腔顔面の侵害情報処理に対して異なる機能を有すると考えられている⁶⁾。

これらの侵害受容ニューロン周囲に多く存在するミクログリアは、口腔顔面領域の炎症や三叉神経損傷によって強く活性化する⁷⁾。活性化した延髄のミクログリアは、Vc の侵害

受容ニューロンと強い機能連関をもつことから、侵害受容ニューロンの活動性変調に伴う異所性口腔顔面痛発症に対して重要な働きを有すると考えられているが、いまだに不明な点が多く残されている⁵⁾。特に口腔顔面領域の痛覚情報伝達において重要な働きを有するC線維の入力を受けるVc侵害受容ニューロンとミクログリアの機能連関が口腔顔面の異所性異常疼痛に対し、どのように関与するかについてはほとんど知られていない。

本研究では歯髄炎モデルラットを作製し、口髭部皮下へのカプサイシン投与によるC線維の特異的活性化によって生じるVc、NTSおよびRFにおけるニューロンおよびミクログリアの活性化動態を解析し、歯髄炎に起因する口腔顔面の異所性異常疼痛発症機構の一端を解明することを目的とした。

材料および方法

1. 実験動物

実験には, Sprague-Dawley 系雄性ラット (n=8, 100-200g, 日本エスエスエルシー, 静岡) を使用した。ラットは 12 時間明暗サイクル (午前 7 時点灯, 午後 7 時消灯) で恒温恒湿の環境下におき, 十分な飼料と水で飼育した。本研究は, 日本大学動物実験委員会の承認 (承認番号: AP20DEN010-2) を受け, 国際疼痛学会の動物実験ガイドラインに従い行われた⁸⁾。実験に際して, 動物の苦痛を最小限にするよう配慮し, 使用動物数は必要最小限とした。

2. 歯髄炎モデルラットの作製およびカプサイシン注入

2% イソフルラン (Mylan, Canonsburg, PA, USA) による吸入麻酔下にて, 塩酸メドミジン (0.15 mg/kg, i. p.), ミダゾラム (2 mg/kg, i. p.) および酒石酸ブトルファノール (2.5 mg/kg, i. p.) を 0.9% 生理的食塩水に溶解した三種混合麻酔薬を腹腔内投与して深く麻酔した後, ラットを保温パッド上に仰臥位にした状態で, 右側上顎第一臼歯の咬合面を切削し, 露髄させた。50% complete Freund's adjuvant (CFA, Merck, Darmstadt, Germany) を十分染み込ませた #20 ペーパーポイント (ジーシー, 東京) を髄腔内に挿入し, 常温重合レジン (ユニファストII, ジーシー) を用いて切削部を封鎖し, Pulp-CFA 群とした。また, 右側上顎第一臼歯歯冠部を切削し仮性露髄させた群をコントロール群とした。

Pulp-CFA 群およびコントロール群ラットを作製後 3 日目に, 前述の三種混合麻酔薬を腹腔内に投与して深く麻酔した後, 右側口髭部皮下にカプサイシン (10 μ l, 10 mM, 富士

フィルム和光純薬, 大阪) を注射した。注射 5 分後, 両群ラットを 0.9% 生理的食塩水 (500 ml) で経心的に脱血灌流し安楽死させ, 0.1 M リン酸緩衝液に溶解した 4% パラホルムアルデヒド固定液 (pH 7.4) にて灌流固定した。灌流固定終了後に脳幹領域を摘出し, 同一の固定液に 4°C にて 1 日間浸漬し, 後固定を行った。

3. 延髄における pERK 陽性ニューロンおよび Iba1 陽性細胞

取り出した Vc を含む脳幹標本を 0.01 M phosphate buffered saline (PBS) にて希釈した 20% スクロース溶液 (w/v) に 2 日間, 4°C にて浸漬した。その後, 脳幹標本をドライアイスで凍結し, Vc を含む延髄の連続切片標本 (厚さ : 50 μ 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, Merck) 染色を施した。厚さ 50 μ m の切片を 0.3% 過酸化水素水を付加した 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, 正常ヤギ血清 (5%) と 0.3% Triton X-100 を含む PBS 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 anti-phospho-p44/42 MAP kinase (pERK) rabbit monoclonal antibody (1: 1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) あるいは anti-Iba1 rabbit polyclonal antibody (1: 2000, 富士フィルム和光純薬) に 4°C で 1 日間浸漬した。0.01 M PBS にて切片を 10 分間 3 回洗浄した後, 二次抗体である biotinylated goat anti-rabbit IgG (H+L) (1: 500, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) に室温で 2 時間浸漬した。その後 VECTASTAIN ABC kit (Vector Laboratories) を用いて室温で 1 時間アビジン・ビオチン標識酵素複合体と反応させた。0.01 M PBS による

10 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、0.01% 過酸化水素水加 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 コートスライドガラス（松浪硝子工業，大阪）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。右側 Vc 背側部，右側 Vc 中間部および右側 Vc 腹側部，両側 NTS および両側 RF における pERK 陽性ニューロンおよび Iba1 陽性細胞を光学顕微鏡下で観察した。また両群とも 1 観察部位について 1 ラット当り 3 切片を用いて，各 Vc 領域の吻尾側方向の pERK 陽性ニューロン分布およびニューロン数の解析を行った。

4. 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 Student's *t*-test を用いた。また，有意水準は $\alpha=0.05$ とした。

結 果

本研究では深麻酔下にて、歯髄炎モデルラットの右側口髭部皮下にカプサイシンを注射し、右側 Vc 背側部、右側 Vc 中間部および右側 Vc 腹側部、両側 NTS および両側 RF における pERK 陽性ニューロンおよび Iba1 陽性細胞について解析を行った。その結果、Pulp-CFA 群への右側口髭部皮下カプサイシン注射後、右側 Vc 中間部における pERK 陽性ニューロン数が有意に増加した。また、右側 Vc、両側 NTS および両側 RF において多くの Iba1 陽性細胞が観察された。

1. カプサイシン注射側 Vc における pERK 陽性細胞発現

右側 Vc 背側部では、細胞質、核および樹状突起が濃染された pERK 陽性ニューロンが Vc 表層に限局して観察された (図 1A, B)。Pulp-CFA 群の右側 Vc 背側部における吻尾側方向の pERK 陽性ニューロン分布パターンおよび pERK 陽性ニューロン数は、コントロール群と比較して有意差は認められなかった (図 1C)。また、右側 Vc 背側部 pERK 陽性ニューロン数も有意差は認められなかった (図 1D)。

右側 Vc 中間部においても、細胞質、核および樹状突起が濃染された pERK 陽性ニューロンが Vc 表層に限局して観察された (図 2A, B)。両群とも obex 付近から約 4000 μm 尾側領域まで pERK 陽性ニューロンが観察され、obex から 720 μm ~1440 μm 尾側領域における Pulp-CFA 群の pERK 陽性ニューロン数がコントロール群に比べ有意に多かった (図 2C)。また、Pulp-CFA 群の右側 Vc 中間部 pERK 陽性ニューロン数もコントロール群に比べ有意に多かった (図 2D)。

右側 Vc 腹側部においても、表層部に多くの細胞質、核および樹状突起が濃染された pERK 陽性ニューロンが認められた (図 3A, B)。両群とも、pERK 陽性ニューロンは obex から尾側方向に均一な分布を示し、obex から 4320 μm 尾側部において、Pulp-CFA 群の pERK 陽性ニューロン数がコントロール群よりも有意に多かった (図 3C)。右側 Vc 腹側部の pERK 陽性ニューロン数に有意差は認められなかった (図 3D)。

2. 両側 NTS および両側 RF における pERK 陽性細胞発現

両群の両側 NTS および両側 RF において、pERK 陽性ニューロンが観察された。両側 NTS において、Pulp-CFA 群の方がコントロール群に比較して多くの pERK 陽性ニューロンが観察された (図 4A, B)。また、両側 RF でも pERK 陽性ニューロンが観察されたが、両側 RF の間および Pulp-CFA 群とコントロール群の間で pERK 陽性ニューロン数に違いは観察されなかった (図 4C, D, E, F)。

3. 延髄における Iba1 陽性細胞発現

Pulp-CFA 群の右側 Vc, 両側 NTS および両側 RF において、Iba1 陽性細胞が観察された (図 5)。特に、両側 NTS における Iba1 陽性細胞分布密度が Vc, RF と比較して高い傾向を認めた (図 5D)。本研究で観察された Iba1 陽性細胞は、細胞体が膨化し、太く短い突起を持つことから、活性型ミクログリアであると判断できた。

考 察

歯髄に炎症が引き起こされると、歯髄の痛みだけでなく口腔顔面の広い領域に異常疼痛が誘発されることが知られている^{9,10}。このような歯髄炎に起因して口腔顔面領域の広い領域に引き起こされる痛みは、TGニューロン、Vcニューロン、NTSやRFのニューロンの興奮性増強が関与すると考えられている¹⁻³。過去の多くの研究において、ニューロンに存在する mitogen-activated protein kinase family の一つとして知られている ERK は、活動電位発生後の数分以内にリン酸化されることがわかっており、pERK はニューロンの興奮マーカーとして用いられている¹¹⁻¹³。本研究では、pERK を指標としてニューロンの興奮を可視化し、Vcニューロン、NTSやRFニューロンの興奮性変化の解析を試みた。

過去の研究から、Vc領域には口腔顔面領域からの侵害情報を含む様々な感覚情報が投射すると報告されている⁵。これらの領域は構造的に細胞が層構造をなして配列しており、表層部には無髄のC線維が深層には有髄のAβ線維が投射している。Vc領域は脊髄後角と同様な層構造を有することから延髄後角とも呼ばれ、侵害情報を含む様々な体性感覚情報処理において重要な働きを有することが知られている³。侵害情報伝達において重要な働きを有するC線維の強い投射があるVcの表層には、強い侵害刺激にのみ反応を示すNSニューロンが存在する⁶。本研究において、歯髄炎発症後の口髭部皮下へのカプサイシン注射によって検出されたVcのpERK陽性ニューロンは、小型の細胞体を有するものと扁平で大型の細胞体を有するものが観察された。これまでの脊髄後角ニューロンの形態を解析した研究から、上位中枢へと投射軸索を送る投射ニューロンの多くは脊髄後角の表層に分布し、その細胞体は扁平で大型であることが報告されている¹⁴。一方で、介在ニュー

ロンは小型の細胞体を有する円形の細胞であることが明らかにされている¹⁴⁾。以上のことから、歯髄炎発症後の口髭部皮下へのカプサイシン注射によって Vc において発現した pERK 陽性ニューロンには投射ニューロンと介在ニューロンの両方が含まれると考えられる。カプサイシン感受性の投射ニューロンは強い痛み情報を直接上位中枢へ伝えるのに対し、介在ニューロンは痛み感覚の変調に関与していると推察される。

歯髄炎による異所性口腔顔面痛に関する研究から、歯髄炎が発症すると顔面の広い領域に機械アロディニアが発症することが知られている^{15,9,10)}。これまでに、三叉神経第 I 枝領域からの侵害情報は Vc 腹側部、三叉神経第 II 枝領域からの侵害情報は Vc 中間部、三叉神経第 III 枝領域からの侵害情報は Vc 背側部にそれぞれ入力することが分かっている^{5,3)}。本研究では、Pulp-CFA 群で口髭部皮下へのカプサイシン注射によって有意に多くの pERK 陽性ニューロンが認められたのは Vc 中間部のみであった。Vc 中間部は三叉神経第 II 枝からの侵害情報が入力する領域であることから、歯髄炎発症後の口髭部皮下へのカプサイシン注射によって引き起こされる C 線維の興奮入力、Vc 中間部に存在する侵害受容ニューロンのみ興奮性を増大させることが示された。以上のことから、歯髄炎発症後に三叉神経第 II 枝領域皮膚で生じる異常疼痛は Vc 中間部の侵害受容ニューロンの興奮性増大に起因すると考えられるが、歯髄炎発症後に口腔顔面の広い領域に生じる異所性異常疼痛は、Vc 全体の投射ニューロンや介在ニューロンの興奮性増大に起因するものではないと考えられる。よって、歯髄炎による異所性口腔顔面痛は三叉神経節内情報伝達機構の可塑的変化が関与するのではないかと考えられる^{3,16)}。

これまでの研究で、NTS は全身からのさまざまな侵害入力を受け、自律神経系の機能調

節において重要な働きを有する中継核であるといわれている¹⁷⁾。本研究では、Pulp-CFA 群における口髭部皮下へのカプサイシン注射後に NTS で非常に多くの pERK 陽性ニューロンを検出したのに対し、コントロール群では少数の pERK 陽性ニューロンが認められただけであった。この結果は、口髭部皮下へのカプサイシン刺激ではなく、歯髄の炎症により亢進した歯髄から侵害情報が NTS に直接送られ、NTS ニューロンの興奮性を増強したことを意味すると考えられる。NTS ニューロンは内臓の痛覚と同様¹⁷⁾、歯髄からの侵害入力を受けて自律神経系応答を調節しているものと思われる。

RF の機能に関しては、NTS と同様に呼吸や循環といった自律神経応答調節に関与するという報告があるが、その他の機能に関してはほとんど研究がなされていない¹⁸⁾。そのため、歯髄炎発症後の口髭部皮下へのカプサイシン注射によって RF に発現した pERK 陽性ニューロンがどのような疼痛調節機構に関与しているかは不明である。RF の疼痛調節機構を明らかにするには、さらに電気生理学的手法を用いた機能解析を行う必要があると思われる。

三叉神経損傷や口腔顔面領域の炎症により、延髄に存在するミクログリアに強い活性化が誘発されることが知られている¹⁹⁾。また、活性型ミクログリアで合成・分泌されるさまざまなサイトカインは、周囲に存在するニューロンの興奮性増強を誘発することが報告されている^{20,21)}。さらに、ミクログリアは活性化すると細胞体が膨化し、樹状突起が太く短くなるといった形態学的変化を呈することがわかっている²²⁾。本研究では、Pulp-CFA 群の Vc 全体、NTS および両側 RF において、ミクログリアの活性化が観察された。よって、これらの領域で活性化したミクログリアは、それぞれの領域に存在するニューロンの活動性

増強に関与している可能性が考えられる。しかしながら、Pulp-CFA 群の口髭部皮下へのカプサイシン注射によっておこる pERK 陽性ニューロンの有意な増加は Vc 中間部でのみ観察されている。したがって、歯髄炎に起因して Vc 全体で活性化したミクログリアは、C 線維入力によって活性化する Vc の侵害受容ニューロンの興奮性変調には関与しないのかもしれない。歯髄炎が発症すると顔面の広い領域に機械アロディニアが発症することが知られていることから、機械刺激である A δ 線維入力が Vc 全体の侵害受容ニューロンが興奮性を増大させ、その興奮性増大にはミクログリア活性化が関与する可能性がある。また、NTS や RF への C 線維入力によって活性化する Vc の侵害受容ニューロンの興奮性変調に活性型ミクログリアが関与する可能性も示唆されるが、今後さらなる研究が必要である。

結 論

歯髄炎ラットの口髭部皮下へのカプサイシン注射によって延髄で生じる pERK 陽性ニューロンおよび Iba1 陽性細胞の発現様式について詳細な検討を加え、以下の結論を得た。

1. カプサイシン注射側 Vc 背側部において Pulp-CFA 群とコントロール群間で、口髭部皮下へのカプサイシン注射後の吻尾側方向の pERK 陽性ニューロン分布パターンおよび陽性ニューロン数に有意差は認められなかった。
2. カプサイシン注射側 Vc 中間部において pERK 陽性ニューロン数は、obex から 720 μm から 1440 μm 尾側で Pulp-CFA 群の方がコントロール群に比べ有意に多かった。
3. カプサイシン注射側 Vc 腹側部において両群とも pERK 陽性ニューロンは obex から尾側方向に均一に分布した。また、obex から 4320 μm 尾側のみ Pulp-CFA 群の方がコントロール群より有意に多くの pERK 陽性ニューロンが観察された。
4. 両側 NTS において Pulp-CFA 群の方がコントロール群に比べ多くの pERK 陽性ニューロンが観察された。
5. RF においては両側で pERK 陽性ニューロンが観察され、カプサイシン注射側と対側、および Pulp-CFA 群とコントロール群間で pERK 陽性ニューロン数に差は観察されなかった。
6. Pulp-CFA 群のカプサイシン注射側 Vc、両側 NTS および両側 RF において活性型ミクログリアが観察された。

以上の結果から、歯髄炎により Vc、NTS および両側 RF においてミクログリアが活性化するが、このミクログリアの活性化は顔面領域からの C 線維入力によって応

答する Vc 中間部の侵害受容ニューロンの興奮性変調に関与する可能性が示唆された。

謝辞およびその他の特記事項

本研究遂行にあたり、格別なるご指導およびご校閲を賜りました日本大学歯学部生理学講座の篠田雅路教授および人見涼露助教に心より感謝申し上げます。また、本研究に際し、多大なるご協力を頂いた日本大学歯学部生理学講座の皆様に厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は日本大学歯学部総合歯学研究所研究費および上村安男・治子研究費の助成により行われた。本研究に関して、利益相反はありません。

文 献

- 1) Hayashi H, Sumino R, Sessle BJ (1984) Functional organization of trigeminal subnucleus interpolaris: nociceptive and innocuous afferent inputs, projections to thalamus, cerebellum, and spinal cord, and descending modulation from periaqueductal gray. *J Neurophysiol* 51, 890-905.
- 2) Jung JY, Seong KJ, Moon IO, Cho JH, Kim SH, Kim WJ (2013) Ginsenosides have a suppressive effect on c-fos expression in brain and reduce cardiovascular responses increased by noxious stimulation to the rat tooth. *Korean J Physiol Pharmacol* 17, 121-125.
- 3) Shinoda M, Kubo A, Hayashi Y, Iwata K (2019) Peripheral and central mechanisms of persistent orofacial pain. *Front Neurosci* 13, 1227.
- 4) Kaji K, Shinoda M, Honda K, Unno S, Shimizu N, Iwata K (2016) Connexin 43 contributes to ectopic orofacial pain following inferior alveolar nerve injury. *Mol Pain* 12, 1744806916633704.
- 5) Iwata K, Sessle BJ (2019) The evolution of neuroscience as a research field relevant to dentistry. *J Dent Res* 98, 1407-1417.
- 6) Iwata K, Imai T, Tsuboi Y, Tashiro A, Ogawa A, Morimoto T, Masuda Y, Tachibana Y, Hu J (2001) Alteration of medullary dorsal horn neuronal activity following inferior alveolar nerve transection in rats. *J Neurophysiol* 86, 2868-2877.
- 7) Chiang CY, Dostrovsky JO, Iwata K, Sessle BJ (2011) Role of glia in orofacial pain. *Neuroscientist* 17, 303-320.
- 8) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.

- 9) Ohara K, Shimizu K, Matsuura S, Ogiso B, Omagari D, Asano M, Tsuboi Y, Shinoda M, Iwata K (2013) Toll-like receptor 4 signaling in trigeminal ganglion neurons contributes tongue-referred pain associated with tooth pulp inflammation. *J Neuroinflammation* 10, 139.
- 10) Komiya H, Shimizu K, Noma N, Tsuboi Y, Honda K, Kanno K, Ohara K, Shinoda M, Ogiso B, Iwata K (2018) Role of neuron-glia interaction mediated by IL-1 β in ectopic tooth pain. *J Dent Res* 97, 467-475.
- 11) Dai Y, Iwata K, Fukuoka T, Kondo E, Tokunaga A, Yamanaka H, Tachibana T, Liu Y, Noguchi K (2002) Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. *J Neurosci* 22, 7737-7745.
- 12) Suzuki I, Tsuboi Y, Shinoda M, Shibuta K, Honda K, Katagiri A, Kiyomoto M, Sessle BJ, Matsuura S, Ohara K, Urata K, Iwata K (2013) Involvement of ERK phosphorylation of trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons in thermal hypersensitivity in rats with infraorbital nerve injury. *PLoS One* 8, e57278.
- 13) Hitomi S, Okada-Ogawa A, Sato Y, Shibuta-Suzuki I, Shinoda M, Imamura Y, Ono K, Iwata K (2017) Enhancement of ERK phosphorylation and photic responses in Vc/C1 neurons of a migraine model. *Neurosci Lett* 647, 14-19.
- 14) Braz J, Solorzano C, Wang X, Basbaum AI (2014) Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron* 82, 522-536.
- 15) Matsuura S, Shimizu K, Shinoda M, Ohara K, Ogiso B, Honda K, Katagiri A, Sessle BJ, Urata K, Iwata K (2013) Mechanisms underlying ectopic persistent tooth-pulp pain following pulpal

inflammation. PLoS One 8, e52840.

- 16) Kanno K, Shimizu K, Shinoda M, Hayashi M, Takeichi O, Iwata K (2020) Role of macrophage-mediated Toll-like receptor 4-interleukin-1R signaling in ectopic tongue pain associated with tooth pulp inflammation. *J Neuroinflammation* 17, 312.
- 17) Cortelli P, Pierangeli G (2003) Chronic pain-autonomic interactions. *Neurol Sci* 24 Suppl 2, S68-70.
- 18) Martins I, Tavares I (2017) Reticular formation and pain: The past and the future. *Front Neuroanat* 11, 51.
- 19) Iwata K, Shinoda M (2019) Role of neuron and non-neuronal cell communication in persistent orofacial pain. *J Dent Anesth Pain Med* 19, 77-82.
- 20) Inoue K, Tsuda M (2018) Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Neurosci* 19, 138-152.
- 21) Tozaki-Saitoh H, Tsuda M (2019) Microglia-neuron interactions in the models of neuropathic pain. *Biochem Pharmacol* 169, 113614.
- 22) Asano S, Hayashi Y, Iwata K, Okada-Ogawa A, Hitomi S, Shibuta I, Imamura Y, Shinoda M (2020) Microglia-astrocyte communication via C1q contributes to orofacial neuropathic pain associated with infraorbital nerve injury. *Int J Mol Sci* 21, 6834.