

末梢神経損傷後の中枢神経における 1 次ニューロンの収斂投射の研究

大村晋司

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔機能解剖学分野

1. 諸言

末梢神経損傷は痛覚過敏やアロディニアなど、様々な痛覚異常が誘発される。組織損傷の直接の結果として発生する痛みに加えて、損傷を受けた神経の末梢受容野に痛みを感じる場合もあれば、受容野以外の領域にも痛みを感じる場合もある。脊髄後角においては、知覚性の 2 次ニューロンの体性局在配列が破壊され、本来の受容野から隔離されたニューロンが本来の受容野以外の領域の皮膚の刺激に応答することが報告されている¹⁻⁴⁾。また Sugimoto ら (1993) は、末梢神経切断後により、損傷を受けていない侵害受容 1 次ニューロンの刺激による脊髄後角での c-Fos の誘発が増強されることを報告している⁵⁾。これに類似した c-Fos の過剰誘発は延髄後角においても報告されており、Nomura ら (2002) はラットの whisker pad の侵害刺激による c-Fos の誘発が下歯槽神経の損傷によって増強されることを証明している⁶⁾。さらに、我々は、末梢神経を損傷後の三叉神経に無髄神経線維を興奮させ得る強度の電気刺激を加える実験を行った結果、損傷を受けていない神経を刺激した場合に c-Fos の過剰応答が観察されることを発見した⁷⁾。これらの結果は、末梢神経損傷が損傷を受けていない侵害受容 1 次ニューロンの興奮伝達を促進することを示唆しており、神経損傷後に損傷神経の支配領域の周囲に放散する痛覚過敏を反映するものかもしれない。また、この現象が誘発されるメカニズムは正確には解明されていないものの、神経損傷後に中枢神経系内での 1 次ニューロンの体性局在配列の再編が起こっている可能性が考えられる。

extracellular signal-regulated kinase (ERK) は mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーの一員であり、学習や記憶、痛覚過敏などの現象に ERK のリン酸化が関与することが知られている^{8, 9)}。脊髄や延髄の後角では、c-Fos と同様にリン酸化 ERK (以下 p-ERK) は侵害刺激によって誘発される^{10, 11)}。このため、p-ERK の発現は侵害刺激による侵害需要ニューロンの興奮のマーカーとして利用されて

きた。ただし p-ERK は c-Fos と比較してその発現の潜時と持続時間が極めて短いことが知られている^{10, 12)}。

本研究では、延髄後角の 2 次ニューロンに対し、異なる末梢受容野を持つ複数の 1 次損害受容ニューロンが収斂投射するか否かを組織切片上で分析し、そのような収斂投射が神経障害性疼痛や c-Fos の過剰誘発に関与する可能性を検討することを目的に設定した。今回使用する実験系では、舌に 5%ホルマリンを注射することによって舌神経に含まれる 1 次ニューロンからの侵害情報伝達を誘発し、これとは別に下歯槽神経に電気刺激を加えることによって下歯槽神経に含まれる 1 次ニューロンからの侵害情報伝達を誘発する。1 匹のラットに 2 種の刺激を時間をかえて行い、その後、延髄の組織切片に c-Fos と p-ERK の免疫二重染色を施すことにより、それぞれの刺激による興奮伝達の様相を同時に観察する。この系に対し予め下歯槽神経の切断を加えることで、収斂投射のパターンに対する神経切断の効果を検討することが可能になる。なお、神経障害性疼痛との関連をみるためには、舌背にカプサイシン溶液を塗布することによって誘発される痛覚関連行動に対する下歯槽神経切断の効果を分析する。

2. 材料ならびに方法

2-1. 実験動物

神経切断手術時に体重 180-200 g の雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。飼育室温は 20℃に保ち、日照時間は 12 時間、食事と飲水は自由とした。本研究で行った動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」（昭和 48 年法律第 105 号）、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」（昭和 55 年総理府告示第 6 号）、米国「実験動物の管理と使用に関する指針」（1996 年改訂 NIH Publications No. 80-23）、および「動物実験指針」（平成 15 年、岡山大学自然生命科学研究支援センター）、に定められた事項を遵守して行った。特に使用する動物数を可及的に少なくし、すべての実験過程で動物に対する苦痛を最小限にとどめるよう配慮した。

2-2. 手術

ペントバルビタールナトリウム（40-50mg/kg）の腹腔内投与による全身麻酔下で、右側の神経に手術を行った。下歯槽神経切断では、皮膚を切開し、咬筋を鈍的に剥離し、下顎骨の外面を歯科用バーで削

除して下顎管を開放した。7-0 絹糸で下歯槽神経を結紮し、その遠位部を切断した後、軟組織を縫合した。シャム手術では神経を露出したが、結紮切断を省略した。下歯槽神経切断を受けた 20 匹と同神経切断のシャム手術を受けた 10 匹を組織化学的分析に用い、行動分析に同神経切断及びシャム手術を受けた各 6 匹を用いた。

2-3. c-Fos 単染色

下歯槽神経切断 (n=5) あるいは同神経切断のシャム手術 (n=5) の 14 日後にラットを再度麻酔し、5%ホルマリン 100 μ l を右側の舌縁の粘膜下に注射した。2 時間後に灌流固定のため、生理食塩水、次いで 4%パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を左心室から灌流した。その後、上部頸髄と下位脳幹を一塊として摘出し 4%パラホルムアルデヒド溶液に 24 時間浸漬固定後、20%ショ糖を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) に 48 時間浸漬した。門から第 1 頸髄までの組織から厚さ 50 μ m の 1 枚おきの前頭断凍結切片を作成し、浮遊切片として peroxidase-anti-peroxidase (PAP) 法による免疫組織学的染色を行った⁵⁾。内因性ペルオキシダーゼの除去のため、切片を 80%メタノールと 0.3%過酸化水素水を含む溶液に 1 時間浸漬し、次いで 3%正常ヤギ血清で 1 時間処理した後、一次抗体 (抗 c-Fos ウサギ抗体、SantaCruz Biotechnology Inc, CA, USA ; 1:8,000) と 3 日間 4℃で反応させた。その後、切片をヤギ抗ウサギ IgG (Cappel West Chester, PA, USA ; 1:300)、さらに PAP (Cappel ; 1:3000) と各 1 時間反応させた後、ニッケル増感 DAB 法により免疫反応産物の可視化を行った。切片をスライドグラスに貼付し、アルコール脱水の後、キシレンで透徹し、エンテラン (Entellan, Merck, Darmstadt, Germany) を用いて封入した。

c-Fos 様免疫活性はニューロンの核内に限局していたため、c-Fos 様免疫活性を示す顕微鏡像を以後 c-Fos 様免疫活性陽性ニューロン、略して c-Fos 陽性ニューロンと呼ぶ。分析のため、描画装置を装着した顕微鏡を用い、暗視野照明で切片の構造を白紙上にトレースした後、明視野照明で c-Fos 陽性ニューロンをプロットした。c-Fos 陽性ニューロンの吻尾的分布の分析のため、一切片あたりの c-Fos 陽性ニューロン数を門からの距離に対してプロットしたヒストグラムを作成した。また、c-Fos 陽性ニューロン誘発の程度の分析には、c-Fos 陽性ニューロンを最も多く含む切片を 5 枚選び、1 切片あたりの c-Fos 陽性

ニューロン数をラットごとに記録した。

2-4. c-Fos と p-ERK の免疫二重染色

2 次ニューロンへの収斂投射を分析するため、二重染色を行った。本研究では下歯槽神経の電気刺激に対する応答を ERK のリン酸化で、5%ホルマリンの舌粘膜下投与の侵害刺激に対する応答を c-Fos 発現によって検出した。従って、c-Fos と p-ERK の二重染色を受けるニューロンが下歯槽神経と舌神経のそれぞれに含まれる侵害受容 1 次ニューロンからの収斂投射を受けていたものと考えられる (図 1)。下歯槽神経切断あるいは同神経切断のシャム手術の 3、7 あるいは 14 日に (各手術/日数ごとに 5 匹ずつ) ラットを麻酔し、灌流固定の 2 時間前に 5%ホルマリン 100 μ l を右側の舌縁の粘膜下に注射した。ついで、下歯槽神経 (あるいはその近位切断端) を再露出し、双極電極を設置し、5 mA, 5 ms の矩形波 (5 Hz) で 10 分間刺激を行った。この刺激条件は神経束内の無髄神経線維を興奮させるに必要十分なものとして過去の研究で広く用いられている¹³⁻¹⁷⁾。ホルマリン刺激の 2 時間後、かつ電気刺激の 5 分後に上述の方法でラットを灌流固定し、脳と脊髄を摘出、保管した。

上述の方法で 1 枚おきの 50 μ m 厚連続凍結切片を作成し、抗 c-Fos 抗体 (1:8000) とマウス抗リン酸化 p-44/42 MAP キナーゼ単クローン抗体 (Cell Signaling, Beverly, MA, USA ; 1:2000) の混合物と室温で 48 時間反応させ、Alexa-488 標識抗ウサギ IgG 抗体及び Alexa-568 標識抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA ; 1:1000) によって可視化した。染色の対照には 1 次抗体を除いて行った。反応後の切片はスライドガラスに貼付し、DAKO Fluorescent Mounting Medium (DAKO, Carpinteria, CA, USA) を用いて封入し、蛍光顕微鏡に装着した CCD カメラで撮影を行った。ニューロンの細胞体に p-ERK 様免疫活性が観察される場合、細胞質が一様に強い蛍光を発しており、そのサイズと形態からニューロンであることが同定されたため、このような像を p-ERK 陽性ニューロンと呼ぶが、神経交織が疎に蛍光を発する場合は活性部位の同定が困難であったため、分析から除外した。定量化のため延髄後角を第 I 及び II 層 (I / II 層) と第 III 及び IV 層 (III / IV 層) に分けて、それぞれに含まれる c-Fos 陽性ニューロン、p-ERK 陽性ニューロン及び二重標識ニューロンを計数した。統計的分析のため、個体ごとに最も多くの c-Fos 陽性ニューロンを含む 5 枚の切片を選び、その平均値を記録した。

2-5. 行動分析

行動分析に用いたラットは組織学的検索に用いない 12 匹であった。下歯槽神経切断およびシャム手術の 14 日後に、15-20 mg/kg (i. p.) のペントバルビタールナトリウムで麻酔を行った。この麻酔条件下では、ラットは角膜反射と屈曲反射を示すが、自発運動はみられなかった。カプサイシン処置に対する痛覚関連行動を記録するため、ビデオカメラによる撮影を行った。カプサイシン (Wako Co., Japan) を、10%エタノール、10% Tween 80、80%生理食塩水から成る溶媒に 1.5%の割合で溶解したものを原液とし、これを蒸留水で希釈して最終濃度 0.01%のカプサイシン溶液を調整した。マイクロピペットに 10 μ l のカプサイシン溶液をとり、ピペットの先端が舌粘膜以外の部分に触れないよう注意しつつ、舌背に溶液を滴下した。なおこのカプサイシン濃度が、神経損傷を受けていないラットにリッキング、顔のスクラッチング、逃避などの痛覚関連行動を誘発する最低限のものであることは、予備実験において確認している。本研究では痛覚関連行動としてカプサイシン処置からリッキングが開始されるまでの潜時と、リッキングの持続時間の 2 項目を計測した。

2-6. 統計学的解析統計学的分析

組織学的研究では各群 5 匹からのデータを使用し、行動分析には各群 6 匹からのデータを使用した。本論文中のデータは平均値±標準誤差で表し、統計学的分析には一元配置分散分析 (ANOVA) と Tukey-Kramer テストを用い、有意水準は 0.05 とした。

3. 結果

3-1. 下歯槽神経損傷後のホルマリン舌刺激による c-Fos タンパク発現

舌へのホルマリン刺激は刺激側の延髄後角に多量の c-Fos 陽性ニューロンを誘発し、反対側にも少数ではあるが c-Fos 陽性ニューロンがみられた (図 1)。これら c-Fos 陽性ニューロンの多くは延髄後角表層の背内側 1/3 に集中し (図 1A, B)、深層では比較的少数であった。吻尾的には、c-Fos 陽性ニューロンは門の尾側 0.0-0.2 mm のあいだに最も多くみられた (図 1C)。下歯槽神経切断群とシャム手術群のあいだに c-Fos 陽性ニューロンの分布領域の差はみられなかった。c-Fos 陽性ニューロン数の分析は延髄後

角をⅠ/Ⅱ層とⅢ/Ⅳ層にわけて行ったが、下歯槽神経切断 14 日後の切断側Ⅰ/Ⅱ層 (64.0 ± 4.67) ではシャム手術 (44.7 ± 3.50) と比較して有意な増加がみられた (図 2)。また、Ⅲ/Ⅳ層についても同様に優位な増加がみられた (切断群 ; 19.8 ± 2.28 : シャム手術 ; 12.4 ± 2.21 、図 2)。切断 (またはシャム手術) の反対側延髄後角でも、切断後に増加の傾向がみられたものの、有意差は検出できなかった。

3-2. 下歯槽神経損傷後の延髄後角ニューロンへの収斂投射

延髄後角ニューロンへの侵害受容 1 次ニューロンの収斂投射を検出するため、ホルマリン刺激と電気刺激の後に c-Fos と p-ERK の二重免疫染色を行った。c-Fos の誘発は舌のホルマリン刺激により、ERK のリン酸化の誘発は下歯槽神経の電気刺激によって行った。図 3 に示すように、延髄後角にはいずれか一方、あるいは両方の免疫活性を示すニューロンが検出された。核内に強い赤色の蛍光を示す細胞は c-Fos 陽性ニューロンであり、舌神経からの侵害情報の伝達を受けたものと考えられる。一方、細胞質に広がる緑色の蛍光を示すものは p-ERK 陽性ニューロンであり、下歯槽神経からの侵害情報の伝達を受けたものと考えられる。二重染色されたニューロンでは細胞質の緑色の蛍光を透して濃い赤色または黄色の核が観察され、舌神経と下歯槽神経の両者からの侵害情報の伝達を受けたものと考えられる。

図 5 に示すように、c-Fos と p-ERK の二重染色像は下歯槽神経切断後のいずれの生存期間においても観察された。いずれか一方または両方の染色を示すニューロンの大部分は延髄後角の背内側 1/3 に分布していた。またこれらのニューロンは、吻尾的には門の尾側 0.0-0.2 mm のあいだに最も多くみられた。延髄後角に含まれる c-Fos 陽性ニューロン、p-ERK 陽性ニューロン及び二重標識ニューロンを、Ⅰ/Ⅱ層とⅢ/Ⅳ層に分けて計数し、二重標識ニューロンの数は c-Fos と p-ERK の両方の陽性ニューロン数に含めて分析を行った。舌のホルマリン刺激によって誘発される c-Fos 陽性ニューロン数はシャム手術群と比較して下歯槽神経切断の 14 日後に有意に増加した (切断群 ; 47.4 ± 4.80 : シャム手術群 ; 26.7 ± 2.21 、図 5)。深層の c-Fos 陽性ニューロン数も下歯槽神経切断の 14 日後に有意に増加した (切断群 ; 17.4 ± 2.07 : シャム手術群 ; 7.16 ± 1.37 、図 5)。c-Fos 陽性ニューロンは反対側にもみられたが、切断による有意な増加は検出されなかった。下歯槽神経の電気刺激により、大量の p-ERK 陽性ニューロンが観察されたが、下歯槽神経切断による増加は認められなかった (図 5)。p-ERK 陽性ニューロンは刺激の反対側

にはほとんどみられず、下歯槽神経切断による変化も認められなかった。c-Fos と p-ERK の二重標識ニューロンは主として刺激側の延髄後角表層にみられた。二重標識ニューロンは下歯槽神経切断の 14 日後に著しく増加した（切断群； 15.2 ± 0.98 ；シャム手術群； 4.64 ± 0.63 、図 5）。二重標識ニューロンは延髄後角の深層においても、下歯槽神経切断の 14 日後に有意の増加を示した（切断群； 3.08 ± 0.29 ；シャム手術群； 0.96 ± 0.13 、図 5）。二重標識ニューロンは刺激の反対側にはほとんどみられず、下歯槽神経切断による変化も認められなかった。

3-3. 痛覚関連行動

行動観察に用いたすべてのラットが 0.01 %カプサイシン処置に対して痛覚関連行動を示した。シャム手術を行ったラットで、リッキングの潜時は 5-6 秒、リッキングの持続時間は約 80 秒であった（図 6）。一方シャム手術群と比較して下歯槽神経切断群ではリッキングの潜時が有意に短縮して 2.15 ± 0.36 秒となり、持続時間も有意に延長した（ 153 ± 10.3 秒、図 6）。

4. 考察

本研究は、三叉神経系の末梢神経損傷後に見られる 2 次ニューロンの c-Fos 過剰応答と痛覚過敏に対する、侵害情報の収斂の可能性を検討したものである。その結果下歯槽神経の損傷が、舌へのホルマリン注射に対する 2 次ニューロンの c-Fos 応答を増強すること及び舌へのカプサイシン塗布に対する痛覚関連行動を増強することが確認され、さらに舌神経と下歯槽神経に含まれる侵害受容 1 次ニューロンからの収斂投射を受けると考えられる c-Fos と p-ERK の二重標識ニューロンが増加することが証明された。

末梢受容野の侵害性の機械的及び熱刺激に応答する c-Fos 陽性ニューロンは、脊髄後角及び延髄後角で体性局在を示し、その数は刺激強度に依存して増加することが知られている^{6, 36-40)}。本研究においても、c-Fos 陽性ニューロンは延髄後角の背内側部に大きく限局しており、c-Fos の誘発を見た過去の研究やトレーサーを用いて 1 次ニューロンの中枢内投射を分析した報告と一致している^{7, 33, 35)}。従って今回の研究で観察された c-Fos 陽性ニューロンは、舌神経支配領域へのホルマリン注射によって誘発されたも

のと考えられる。この c-Fos 陽性ニューロンは、下歯槽神経損傷の 14 日後に著しい増加を示した。延髄後角は三叉神経系の侵害受容 1 次ニューロンの投射を受ける部位である¹⁸⁻²⁷⁾ことから、今回観察された c-Fos の過剰応答は口腔内あるいはその周辺に発症する神経障害性疼痛を反映するものと推測される。末梢神経損傷後に支配領域の近接する別の神経に含まれる侵害受容 1 次ニューロンからの侵害情報伝達による c-Fos の誘発が増強されるというこの現象は、切断神経や刺激部位を変えた実験で、三叉神経系と脊髄神経系の両方で報告された過去の報告と類似している⁵⁻⁷⁾。この現象は、除神経を受けた領域の周囲に起こる痛覚過敏を説明するものと考えられる。事実、本研究の行動分析において示された下歯槽神経切断による口腔内カプサイシン処置に対する痛覚関連行動の増強は、末梢神経損傷による除神経領域周辺の痛覚過敏と言えよう。

MAPK は各種の侵害刺激によるニューロンの細胞内情報伝達において重要な役割を果たしている^{11, 28, 29, 30)}。このうち、ERK は刺激強度に依存して刺激後約 5 分をピークに急速にリン酸化を受け、2 時間後にはコントロールレベルを回復する^{10-12, 30-32)}。これらの知見をもとに、本研究では c-Fos の誘発に加えて ERK のリン酸化を侵害受容 2 次ニューロンの興奮のマーカーとして利用した。その結果、下歯槽神経の電気刺激の 5 分後には、延髄後角の背内側 1/3 に多数の p-ERK 陽性ニューロンが観察されたが、下歯槽神経切断はこの ERK のリン酸化に影響を与えなかった。この結果は、強い電気刺激を加える神経を予め切断しておいても誘発される c-Fos 陽性ニューロンの数に増加がみられないという過去の報告と一致する^{7, 15)}。従って、口腔内を支配する神経を切断しても、損傷された侵害受容 1 次ニューロンがなんらかの理由で興奮した場合には、その情報伝達が促進されることはないと考えられる。

c-Fos と p-ERK の二重染色の実験では、下歯槽神経切断の 14 日後に舌のホルマリン刺激と下歯槽神経の電気刺激の両方に応答するニューロン数が増加した。この現象のメカニズムとして幾通りかの可能性が挙げられる。たとえば延髄後角の侵害受容 2 次ニューロンは、本来複数の侵害受容 1 次ニューロンからの収斂投射を受けているが、通常はそれらの投射のうち特定のものだけが 2 次ニューロンに c-Fos を誘発するに足る興奮を伝達することができるのかもしれない。そして、ニューロンがそのような優位のシナプス入力を失った場合、正常な状態で十分な興奮伝達ができなかったシナプスの伝達効率が上昇して 2 次ニューロンを発火させるのかもしれない。Sugimoto ら(1994) は一つの脊髄後根を切断した場合、

隣接する後根線維からの収斂投射による興奮伝達が増強されることを報告している³⁴⁾。口腔内を支配する下顎神経の各枝に含まれる 1 次ニューロンの中枢内終末やそれらが接続する 2 次ニューロンは、延髄後角を含む三叉神経知覚核群内において互に近接することが知られている^{7,33)}。舌神経と下歯槽神経の 1 次ニューロンの延髄後角内終末はいずれも後角の吻側部の背内側を占め、大きく重複するため、互いに干渉しやすい位置にあるといえる。このため、下歯槽神経の損傷により、舌神経からの興奮伝達が促進されたものではないだろうか。この他にも、下歯槽神経の損傷が刺激となって舌神経の侵害受容 1 次ニューロンの中枢内終末が出芽を起こし、新たなシナプスが形成されるといった説明が理論的には可能であるが、そのような仮説を支持するような形態変化は現時点で報告されていない。

5. 結論

ラット下歯槽神経の切断は、1) 舌のホルマリン刺激による延髄後角での c-Fos の誘発を増強し、2) 口腔内へのカプサイシン処置によって誘発される痛覚関連行動を増強し、3) 舌のホルマリン刺激と下歯槽神経の電気刺激の両者に応答する延髄後角ニューロンの数を増加させた。実験結果は、複数の侵害受容 1 次ニューロンからの収斂投射が三叉神経末梢枝の部分的損傷後にみられる神経障害性疼痛に関与することを示唆するものである。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う貴重な機会を与えていただき、終始御懇篤なるご指導と御高覧を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔機能解剖学分野、杉本朋貞教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、終始懇切なる御指導御鞭撻をいただきました口腔機能解剖学分野、寺山隆司准教授に深く感謝致します。最後にさまざまな面で御協力御援助いただきました口腔機能解剖学分野の諸先生方に深く御礼申しあげます。

参考文献

- 1) Devor M, Wall PD :Reorganisation of spinal cord sensory map after peripheral nerve injury. *Nature* 276:75-76 . 1978.
- 2) Hylden JL, Nahin RL, Dubner R :Altered responses of nociceptive cat lamina I spinal dorsal horn neurons after chronic sciatic neuroma formation. *Brain Res* 411:341-350. 1987.
- 3) Lisney SJ :Changes in the somatotopic organization of the cat lumbar spinal cord following peripheral nerve transection and regeneration. *Brain Res* 259:31-39.1983.
- 4) Markus H, Pomeranz B, Krushelnycky D :Spread of saphenous somatotopic projection map in spinal cord and hypersensitivity of the foot after chronic sciatic denervation in adult rat. *Brain Res* 296:27-39. 1984.
- 5) Sugimoto T, Ichikawa H, Hijiya H, Mitani S, Nakago T:c-Fos expression by dorsal horn neurons chronically deafferented by peripheral nerve section in response to spared, somatotopically inappropriate nociceptive primary input. *Brain Res* 621:161-166 . 1993.
- 6) Nomura H, Ogawa A, Tashiro A, Morimoto T, Hu JW, Iwata K : Induction of Fos protein-like immunoreactivity in the trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following noxious and non-noxious mechanical stimulation of the whisker pad of the rat with an inferior alveolar nerve transection. *Pain* 95:225-238. 2002.
- 7) Fujisawa N, Terayama R, Yamaguchi D, Omura S, Yamashiro T, Sugimoto T : Fos protein-like immunoreactive neurons induced by electrical stimulation in the trigeminal sensory nuclear complex of rats with chronically injured peripheral nerve. *Exp Brain Res* 219:191-201. 2012.
- 8) Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ: Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci* 26:696-705 .2003.
- 9) Ji RR, Woolf CJ:Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis* 8:1-10 . 2001.
- 10) Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ: Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci* 2:1114-1119 . 1999.
- 11) Noma N, Tsuboi Y, Kondo M, et al. :Organization of pERK-immunoreactive cells in trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following capsaicin injection into oral and craniofacial regions in rats. *J Comp Neurol* 507:1428-1440 . 2008.
- 12) Shimizu K, Asano M, Kitagawa J, et al.:Phosphorylation of Extracellular Signal-Regulated Kinase in medullary and upper cervical cord neurons following noxious tooth pulp stimulation. *Brain Res* 1072:99-109 . 2006.

- 1 3) Devor M, Govrin-Lippmann R: Axoplasmic transport block reduces ectopic impulse generation in injured peripheral nerves. *Pain* 16:73-85. 1983.
- 1 4) Hughes AS, Averill S, King VR, Molander C, Shortland PJ: Neurochemical characterization of neuronal populations expressing protein kinase C gamma isoform in the spinal cord and gracile nucleus of the rat. *Neuroscience* 153:507-517 . 2008.
- 1 5) Molander C, Hongpaisan J, Grant G : Changing pattern of c-FOS expression in spinal cord neurons after electrical stimulation of the chronically injured sciatic nerve in the rat. *Neuroscience* 50:223-236 . 1992.
- 1 6) Shortland P, Molander C : The time-course of abeta-evoked c-fos expression in neurons of the dorsal horn and gracile nucleus after peripheral nerve injury. *Brain Res* 810:288-293. 1998.
- 1 7) Tokunaga A, Kondo E, Fukuoka T, Miki K, Dai Y, Tsujino H, Noguchi K : Excitability of spinal cord and gracile nucleus neurons in rats with chronically injured sciatic nerve examined by c-fos expression. *Brain Res* 847:321-331 . 1999.
- 1 8) Dallel R, Ricard O, Raboisson P : Organization of parabrachial projections from the spinal trigeminal nucleus oralis: an anterograde tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 470:181-191. 2004.
- 1 9) Dubner R, Bennett GJ: Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annu Rev Neurosci* 6:381-418. 1983.
- 2 0) Luccarini P, Cadet R, Saade M, Woda A : Antinociceptive effect of morphine microinjections into the spinal trigeminal subnucleus oralis. *Neuroreport* 6:365-368. 1995.
- 2 1) Raboisson P, Bourdiol P, Dallel R, Clavelou P, Woda A . Responses of trigeminal subnucleus oralis nociceptive neurones to subcutaneous formalin in the rat. *Neurosci Lett* 125:179-182. 1991.
- 2 2) Sessle BJ: Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med* 11:57-91. 2000.
- 2 3) Sugimoto T, Fujiyoshi Y, He YF, Xiao C, Ichikawa H : Trigeminal primary projection to the rat brain stem sensory trigeminal nuclear complex and surrounding structures revealed by anterograde transport of cholera toxin B subunit-conjugated and *Bandeiraea simplicifolia* isolectin B4-conjugated horseradish peroxidase. *Neurosci Res* 28:361-371. 1997a.
- 2 4) Sugimoto T, Fujiyoshi Y, Xiao C, He YF, Ichikawa H: Central projection of calcitonin gene-related peptide (CGRP)- and substance P (SP)-immunoreactive trigeminal primary neurons in the rat. *J Comp Neurol* 378:425-442. 1997b.
- 2 5) Sugimoto T, He YF, Funahashi M, Ichikawa H: Induction of immediate-early genes c-fos and

- zif268 in the subnucleus oralis by noxious tooth pulp stimulation. *Brain Res* 794:353-358.1998a.
- 2 6) Sugimoto T, He YF, Xiao C, Ichikawa H :c-fos induction in the subnucleus oralis following trigeminal nerve stimulation. *Brain Res* 783:158-162 . 1998b.
- 2 7) Woda A: Pain in the trigeminal system: from orofacial nociception to neural network modeling. *J Dent Res* 82:764-768. 2003.
- 2 8) Dai Y, Iwata K, Fukuoka T, et al.:Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. *J Neurosci* 22:7737-7745. 2002.
- 2 9) Ji RR, Befort K, Brenner GJ, Woolf CJ:ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 upregulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci* 22:478-485. 2002.
- 3 0) Liu Y, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Noguchi K: Activation of extracellular signal-regulated protein kinase in dorsal horn neurons in the rat neuropathic intermittent claudication model. *Pain* 109:64-72 . 2004.
- 3 1) Kawasaki Y, Kohno T, Zhuang ZY, et al.: Ionotropic and metabotropic receptors, protein kinase A, protein kinase C, and Src contribute to C-fiber-induced ERK activation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in dorsal horn neurons, leading to central sensitization. *J Neurosci* 24:8310-8321. 2004.
- 3 2) Wang H, Dai Y, Fukuoka T, Yamanaka H, Obata K, Tokunaga A, Noguchi K .Enhancement of stimulation-induced ERK activation in the spinal dorsal horn and gracile nucleus neurons in rats with peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* 19:884-890. 2004.
- 3 3) Takemura M, Sugimoto T, Sakai A:Topographic organization of central terminal region of different sensory branches of the rat mandibular nerve. *Exp Neurol* 96:540-557 . 1987.
- 3 4) Sugimoto T, Hara T, Shirai H, Abe T, Ichikawa H, Sato T :c-fos induction in the subnucleus caudalis following noxious mechanical stimulation of the oral mucous membrane. *Exp Neurol* 129:251-256. 1994.
- 3 5) Takemura M, Sugimoto T, Shigenaga Y:Difference in central projection of primary afferents innervating facial and intraoral structures in the rat. *Exp Neurol* 111:324-331 . 1991.
- 3 6) Bullitt E:Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 296:517-530. 1990.
- 3 7) Hunt SP, Pini A, Evan G:Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 328:632-634. 1987.
- 3 8) Strassman AM, Vos BP : Somatotopic and laminar organization of fos-like immunoreactivity

in the medullary and upper cervical dorsal horn induced by noxious facial stimulation in the rat. J Comp Neurol 331:495-516 .1993.

- 3 9) Strassman AM, Vos BP, Mineta Y, Naderi S, Borsook D, Burstein R : Fos-like immunoreactivity in the superficial medullary dorsal horn induced by noxious and innocuous thermal stimulation of facial skin in the rat. J Neurophysiol 70:1811-1821 . 1993.
- 4 0) Terayama R, Nagamatsu N, Ikeda T, et al.: Differential expression of Fos protein after transection of the rat infraorbital nerve in the trigeminal nucleus caudalis. Brain Res 768:135-146 . 1997.

附図説明

図 1. 舌へのホルマリン刺激による延髄後角ニューロンの c-Fos 発現。下歯槽神経切断 (IAN-TS) またはシャム手術の 14 日後に刺激を行い、免疫活性をニッケル増感 DAB 法により発色させた。明視野顕微鏡像 (A) のスケールバーは $200\ \mu\text{m}$ で、同視野のトレース (B) に示す数字は門から尾側への距離を示す。c-Fos 陽性ニューロンの吻尾的分布を示すヒストグラム (C) は、門からの距離に対して、I/II 層と III/IV 層に分けて計数した 1 切片あたりの c-Fos 陽性ニューロンを示す。

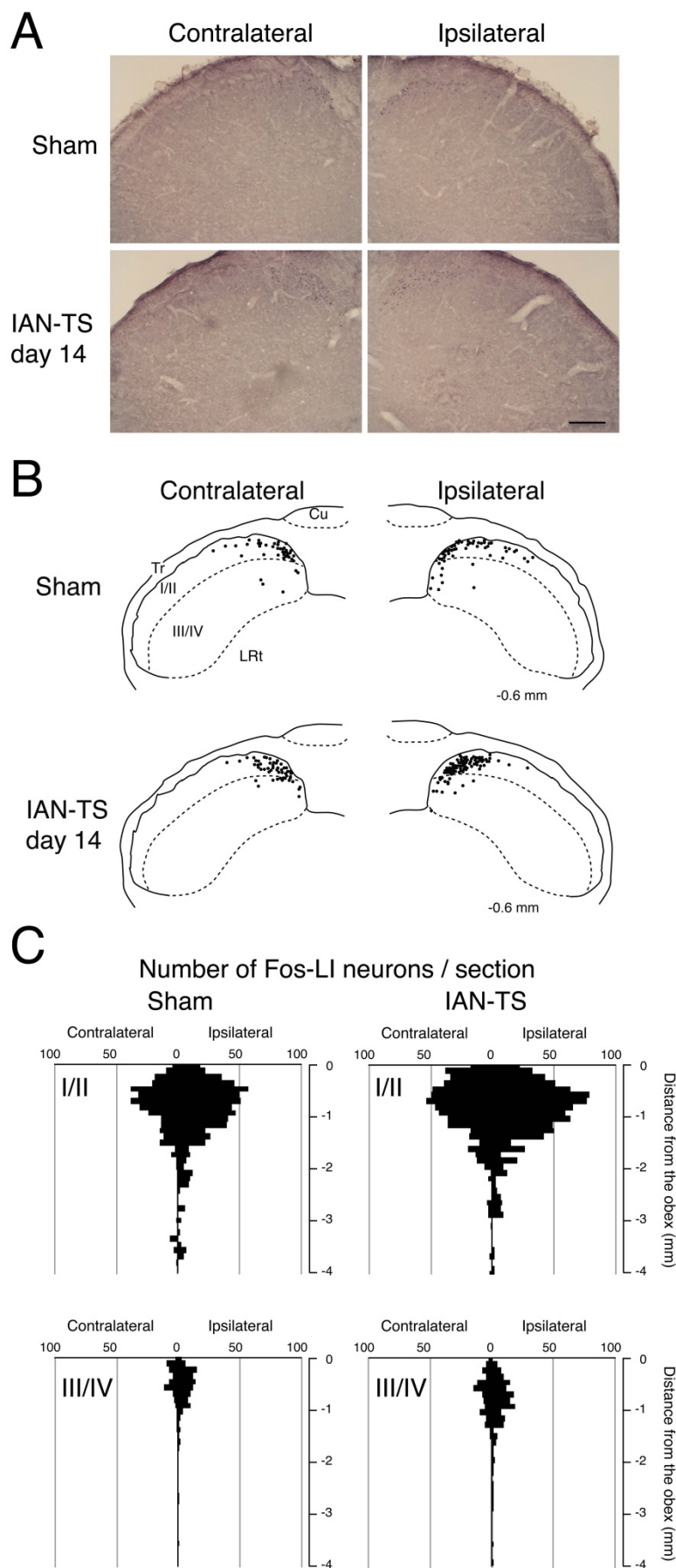
図 2. 舌へのホルマリン刺激による延髄後角ニューロンの c-Fos 発現。下歯槽神経切断 (IAN-TS) 14 日後に刺激を行い、免疫活性をニッケル増感 DAB 法により発色させ、c-Fos 陽性ニューロンを最も多く含む 5 枚の切片を選び、I/II 層 (A) と III/IV 層 (B) に分けて 1 切片あたりの c-Fos 陽性ニューロンを算出した。I/II 層、III/IV 層ともに切断/刺激側にシャム手術群と比較して c-Fos 陽性ニューロンの有意な増加がみられる ($*p < 0.05$, Student's *t*-test)。エラーバーは標準誤差を示す。

図 3. c-Fos と p-ERK の免疫二重染色。下歯槽神経切断 14 日後に舌のホルマリン刺激と下歯槽神経切断端の電気刺激を行った例を示す。同一視野で c-Fos (A)、p-ERK (B) および両者の重ね合わせ (C) の像を示し、c-Fos 単独、p-ERK 単独及び二重染色像をそれぞれ矢頭、矢印、二重矢頭で示す。Scale bar = $50\ \mu\text{m}$

図 4. 下歯槽神経損傷後 3 日、7 日、14 日後とシャム手術 14 日後のラットに対し舌のホルマリン刺激と電気刺激を施した延髄後角の蛍光二重染色像。c-Fos は赤色、p-ERK は緑色に染色されており、矢頭は延髄後角における 2 重染色像を示す。実線は延髄後角の輪郭、破線は II/III 層の境界および IV/V 層の境界を示す。Scale bar = $100\ \mu\text{m}$.

図 5. 蛍光抗体法による免疫染色の定量解析。下歯槽神経損傷 3 日、7 日、14 日後とシャム手術 14 日後のラットに対し、舌へのホルマリン注射と電気刺激を施した。c-Fos 陽性ニューロンを最も多く含む 5 枚の切片の延髄後角を I/II 層 (左側)、と III/IV 層 (右側) に分けて数えた c-Fos 陽性ニューロン数 (上)、p-ERK 陽性ニューロン数 (中)、二重染色標識ニューロン数 (下) の平均値と標準誤差を示す。下歯槽神経損傷 14 日後の群は c-Fos 陽性ニューロン数、二重染色数ともに偽手術群に対して表層および深層で有意に増加している。 ($**P < 0.01$; $***P < 0.001$, ANOVA with post-hoc Tukey-Kramer test).

図 6. カプサイシン処置後のリッキングの潜時 (A) と持続時間 (B) の平均値と標準誤差。シャム手術群と比較して下歯槽神経損傷群 (IAN) はリッキングの潜時の短縮と持続時間の延長を示す。 ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$, Student's *t*-test).



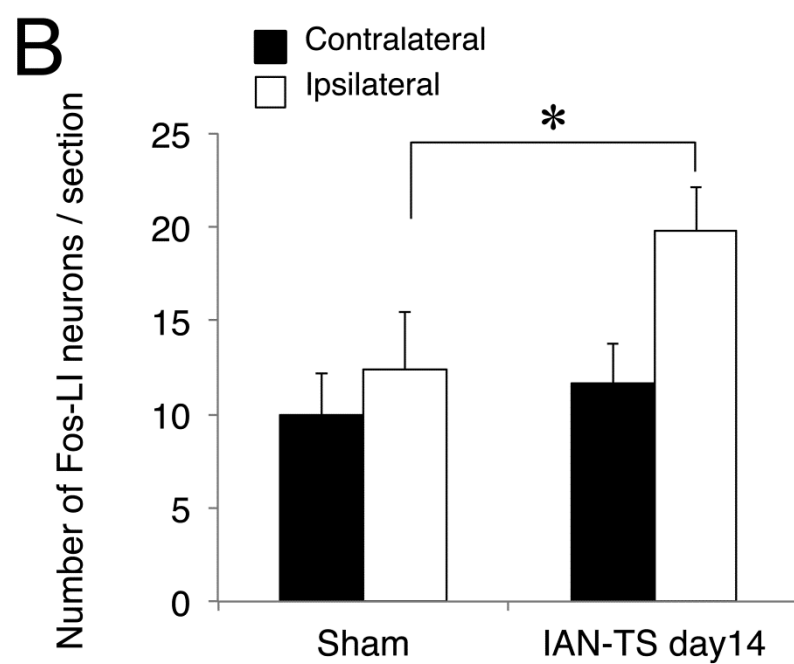
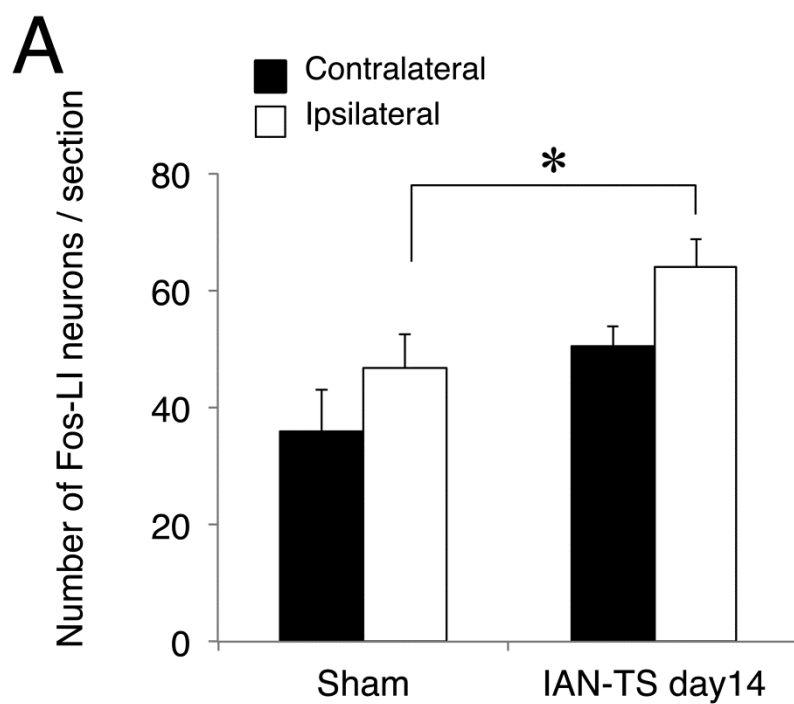


图 3

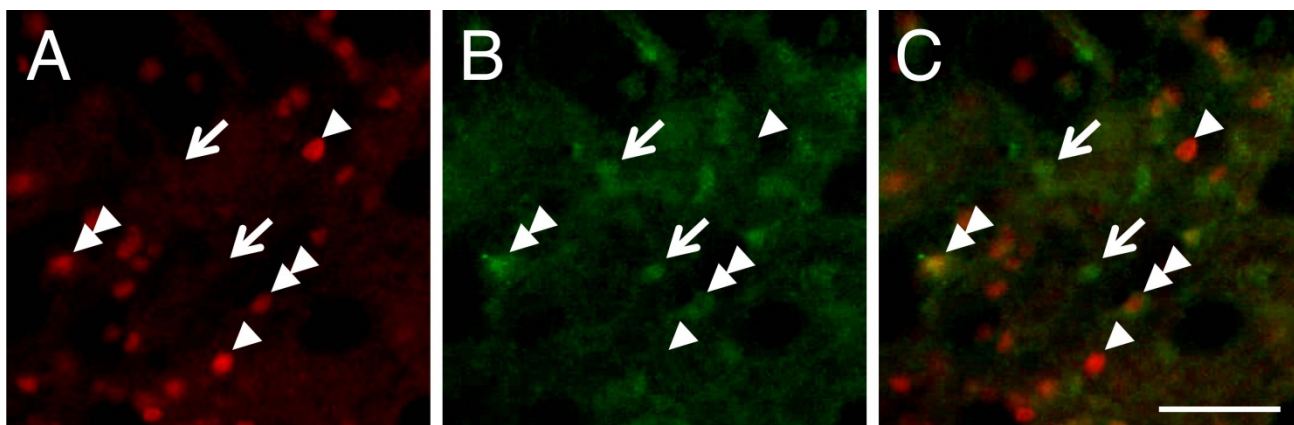


图 4

