Osaka University Knowledge Archive

Title	口腔顔面領域の知覚伝達における三叉神経節由来leucine-enkephalin陽性神経による調節に関する研究
Author(s)	浄徳, 佳之
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41220
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【 8 】

氏　　名	浄　徳　佳　之（じょう　とく　よし　ゆき）
博士の専攻分野の名称	博　　士（歯　　学）
学 位 記 番 号	第　14236　号
学位授与年月日	平成11年1月7日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	「口腔顔面領域の知覚伝達における三叉神経節由来leucine-enkephalin陽性神経による調節に関する研究」
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授　作田　正義 (副査) 教 授　伊集院直邦　助教授　丹羽　均　講 師　前田　定秋

論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

歯科口腔外科領域において三叉神経を介する疼痛伝達機序の研究は重要である。痛みの受容と伝達において，内因性オピオイドペプチドであるmethionine-enkephalinとleucine-enkephalin (Leu-Enk) は，中枢及び末梢神経系に広く分布し，調節的役割を果たしていることが知られている。その作用機序としては，主に脊髄後角の一次知覚神経終末からの伝達物質遊離の抑制，脳幹部での下行性抑制系の賦活化が考えられているが，それ以外に後根神経節においても知覚伝達を調節していることを示唆する報告もなされている。一方，口腔顔面領域を支配する知覚神経の細胞体が存在する三叉神経節においても，これらオピオイドペプチドを含む神経が存在することが報告されているが，その分布，投射部位及び生理的役割については明らかにされていない。

本研究は，三叉神経節におけるLeu-Enk陽性神経の分布とその末梢投射領域，及びオピオイド受容体の存在について免疫組織化学的，薬理学的実験を行い，三叉神経節内におけるLeu-Enkによる知覚伝達の調節の可能性について検討を加えたものである。

【実験方法】

(1) 免疫組織化学

モルモット（雄性，体重200～250 g）をZamboni液で灌流固定後，三叉神経節，鼻腔粘膜，歯肉，上顎骨及び下顎骨骨膜を摘出した。三叉神経節内のLeu-Enk陽性細胞の分布を調べるために12 μmの凍結切片を作製し，一次抗体としてLeu-Enkの抗血清を用いPAP法により染色した。鼻腔粘膜，歯肉，骨膜のLeu-Enk陽性神経の分布を調べるために40 μmの凍結切片を作製し，一次抗体としてLeu-Enkの抗血清，二次抗体としてLRITC標識抗家兎IgGロバ血清を用いて間接蛍光抗体法により染色した。また三叉神経節内のLeu-Enk及びsubstance P (SP) 陽性神経の分布を調べるために20μmの凍結切片を作製し，一次抗体としてLeu-Enkの抗血清とSPのラットモノクロナール抗体，二次抗体としてFITC標識抗家兎IgG山羊血清とRITC標識抗ラットIgG山羊血清を用いて間接蛍光抗体法により二重

染色を行った。また，間接蛍光抗体法により免疫染色した三叉神経節の切片の一部は，共焦点レーザー顕微鏡により焦点深度を2 μm ずつ変化させて蛍光画像を取得した後，立体画像の構築を行った。三叉神経節内の Leu-Enk 陽性細胞の末梢投射領域を調べるため Fluoro-Gold（FG）を鼻腔内，眼窩下神経及び下歯槽神経に投与し，逆行性に三叉神経節細胞をラベルした。

(2) 下歯槽神経切断及び鼻腔粘膜へのカプサイシン刺激

三叉神経節内の Leu-Enk 陽性細胞の末梢神経切断及び侵害刺激による影響を調べた。モルモットをウレタン麻酔下にて顎下部の皮膚を切開し，顎二腹筋と内側翼突筋の間を開き，下顎骨内側の下顎孔の入口で下歯槽神経を剖出して切断し，断端はそのままで縫合した。また，モルモットの片側の鼻腔内に C-fiber を介して強い疼痛刺激を与えるとされるカプサイシン溶液30 mM，25 μl を注入した。この処置を1回/日で3日間，5日間及び7日間行った。上記の処置を行った動物について(1)と同様の方法により三叉神経節の Leu-Enk の免疫染色を行い，実験側と反対側を比較した。

(3)三叉神経節のオピオイド受容体

(a)ミクロオートラジオグラフィー

モルモットの三叉神経節を摘出し，20 μm の凍結切片（未固定）を作製してスライドガラスに張り付けた後，リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中にて [^{3}H]-Leu-Enk と1時間，25°Cでインキュベーションを行った。同緩衝液にて3回洗浄後，常法に従ってミクロオートラジオグラフィーを行った。切片を現像固定後，トルイジンブルーで染色を行った。

(b)膜分画を用いた結合実験

モルモットの三叉神経節を摘出し，0.32 M ショ糖溶液でホモジナイズ後，常法に従い細胞膜分画を調整した。オピオイドリガンドとして [^{3}H]-Leu-Enk，[^{3}H]-DAMGO（μ タイプ），[^{3}H]-DPDPE（δ タイプ）を用いて膜分画との結合をフィルター法により調べた。

【結果】

(1)モルモット三叉神経節において多くの小型神経細胞が Leu-Enk を含み，これらの細胞は第1枝及び第3枝領域に豊富に存在し，第2枝領域では少なかった。

(2)鼻腔粘膜，歯肉，骨膜において Leu-Enk を含む自由神経終末が観察され，FG を用いたトレーサー実験からこれらの神経線維の少なくとも一部は三叉神経節由来であることが明らかになった。また，三叉神経節のすべての領域で末梢に神経線維を投射する細胞に占める Leu-Enk 陽性細胞の割合はほぼ同じであった。

(3)カプサイシンの鼻腔粘膜への長期投与により三叉神経節第1枝領域での Leu-Enk 陽性細胞が減少した。また，下歯槽神経の切断5日後において三叉神経節第3枝領域での Leu-Enk 陽性細胞が減少した。

(4)三叉神経節内において Leu-Enk を含む神経線維が一次知覚神経の細胞体を取り囲んでいる像が観察された。

(5)三叉神経節切片への [^{3}H]-Leu-Enk 結合のミクロオートラジオグラフィーを行った結果，神経細胞体上に密に [^{3}H]-Leu-Enk の特異的結合を示す silver grain が観察され，三叉神経節内にオピオイド受容体が存在することが示唆された。また三叉神経節膜分画へのオピオイド受容体サブタイプ選択的リガンドを用いた結合実験から，三叉神経節には μ 受容体及び δ 受容体が存在していることが示された。

(6)片側の下歯槽神経を切断して5日後に三叉神経節を摘出し，第3枝領域を切り出しホモジナイズし，その膜分画への [^{3}H]-DPDPE の結合量を調べた結果，実験側の結合量は反対側と比較して有意に減少していた。

【結論】

三叉神経節内において多数の Leu-Enk を含む細胞が存在し，その神経線維の一部を鼻腔粘膜，歯肉，骨膜に投射していることが明らかとなった。Leu-Enk を含む神経線維が三叉神経節内の細胞体を取り囲んでいる像が観察され，またオピオイド受容体が存在することも明らかになった。これらの結果から，口腔顔面領域の知覚伝達において三叉神経節内で Leu-Enk が調節的役割を果たしている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は三叉神経節内における Leucine-enkephalin による知覚伝達の調節の可能性について検討するために，モルモット三叉神経節を対象として Leucine-enkephalin 陽性神経の分布とその末梢投射領域およびオピオイド受容体の存在について，免疫組織化学的，薬理学的実験を行ったものである。

その結果，三叉神経節において末梢に神経線維を投射する多くの小型神経細胞が Leucine-enkephalin を含むこと，Leucine-enkephalin を含む神経線維が一次知覚神経の細胞体を囲むこと，また細胞体上に密にオピオイド受容体が存在することを明らかにした。さらに，末梢神経損傷により，三叉神経節における Leucine-enkephalin 陽性細胞およびオピオイド受容体の有意な減少が示された。これらの結果より，Leucine-enkephalin 陽性神経は三叉神経節内において知覚伝達の調節的役割を果たしていることが示唆された。

本論文は，口腔顔面領域の知覚伝達系において新たな調節機構の存在の可能性を示したものであり，三叉神経を介する疼痛伝達機構の重要な一端を明らかにしたものである。よって本論文は博士（歯学）の学位請求に十分値するものと認める。