

Title	三叉神経領域へのカプサイシン刺激による侵害受容に対するエストロゲンの影響
Author(s)	山形, 和彰
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52322
rights	This article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License (CC-BY-NC; https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

学 位 論 文

三叉神経領域へのカプサイシン刺激による侵害受容に対する
エストロゲンの影響

大阪大学 大学院 歯学研究科
統合機能口腔科学専攻 顎口腔先端麻醉学
山形 和彰

緒言

疼痛感受性には性差があり、男性よりも女性の方が痛みをより強く、頻回に、長く訴える傾向にある (Unruh et al., 1996)。さらにその傾向は、顎関節痛、非定型歯痛、三叉神経痛など頭頸部領域の痛みにおいても顕著であるとされる (Berkley., 1997)。このような性差が生じる原因として、閉経後の女性ではエストロゲン補充療法によって熱刺激に対する閾値が低下すること (Fillingim and Edwards., 2001) や顎関節症の症状が悪化すること (Leresche et al., 1997) などから、女性ホルモン、特にエストロゲン (Es) の疼痛感受性に対する修飾作用が考えられている。

一方、近年、末梢での侵害受容において、Transient receptor potential vanilloid type1 (TRPV1) と Anoctamin1 (ANO1) が注目されている。TRPV1 は、カプサイシン (Cap) や熱 (43 °C以上)、酸 (プロトン) に応答する Ca^{2+} 透過性の高い非選択性陽イオンチャネルであり (Caterina et al., 1997; Tominaga M and Tominaga T., 2005)、炎症時や組織損傷時にはその活性や発現が高まり、痛覚過敏を惹起することが知られている (Ji et al., 2002; Moriyama et al., 2003; Shinoda et al., 2011)。また、 Cl^{-} チャネルの一つである ANO1 は、マウスの後根神経節で TRPV1 と高率に共発現し、ANO1 の阻害剤により Cap 刺激や熱侵害刺激に対する疼痛関連行動が抑制されることから、侵害受容に対して、TRPV1 と共役的に重要な役割を果たすイオンチャネルであることが示唆されている (Cho et al., 2012; 富永ら., 2014)。さらにラットの TG で TRPV1 と ANO1 が共発現していることが明らかとなり、三叉神経系の侵害受容においても TRPV1 と ANO1 が重要な役割を果たすことが示唆されている (Kanazawa and Matsumoto., 2014)。しかし、Es が疼痛感受性を修飾するメカニズムにおいて、TRPV1 と ANO1 との関わりについては明らかになっていない。

そこで本研究では、卵巣摘出 (OVX) ラットに高容量又は低容量の 17β -エストラジオール-3-ベンゾアールゼ (E2) を短期間投与し、三叉神経第一枝支配領域 (眼球表面) に TRPV1 のリガンドである Cap を点眼した場合の、侵害受容に対する E2 の修飾作用を行動学的、免疫組織学的に検討した。さらに、三叉神経節 (TG) での TRPV1 及び ANO1 の mRNA 量に対する E2 の影響を Real-time PCR にて検討した。

実験方法

本研究は大阪大学歯学部動物実験委員会の承諾を得た（承認番号：動歯 22-008-0）。実験動物に対する取り扱いには NIH のガイドラインに従い、その苦痛及び使用動物数を最小限に留めるよう努力した。

1. E2 投与 OVX ラットの作製

Es の侵害受容に対する修飾作用を検討するため、血中 E2 濃度の多寡を再現した動物モデルを作製した。11 週齢、体重 210～230 g の雌性 Sprague-Dawley 系ラット（SLC, Shizuoka, Japan）を用いた。ペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg, i. p.）麻酔下で、両側の卵巣を摘出した（Ovariectomy ; OVX）。OVX 3 週後を実験日とし、Tashiro らの方法（Tashiro et al., 2007、2008、2014）を参考に、セサミオイル 200 μ l に溶解した低容量（4 μ g, Low-Estradiol, LE 群）または高容量（40 μ g, High-Estradiol, HE 群）の E2（Sigma, St. Louis, MO, USA）を実験 2 日前より 2 日間連続単回皮下投与した。実験日に E2 投与後の膺スミアの変化を検鏡で観察した。実験終了後、心臓の左室より動脈血を採取し、E2 EIA KIT（BioCheck Inc, Foster City, CA, USA）を用いて血清 E2 濃度を測定した。

2. 行動学的検討（Eye wipe test）

Cap 刺激に対する E2 の修飾作用を行動学的に検討するため、Price らの方法（Price et al., 2004）に準じ、Eye wipe test を行った。動物を観察用の透明アクリルチャンバーに入れ、少なくとも 60 分間静置して順応させた。その後、検者の片手で愛護的にラッ

トの頭部を固定し、マイクロピペットに採取した Vehicle または 1 mM Cap 溶液 10 μ l を左側眼球表面に滴下した。滴下後 5 分間、前足または後足で左眼を擦っている (Eye wipe)、または完全に閉眼している時間を疼痛関連行動時間として計測した。

3. 免疫組織学的検討 (c-Fos 免疫反応)

Cap 刺激に対する E2 の修飾作用を免疫組織学的に検討するため、ニューロン興奮性の指標である c-Fos 蛋白 (Hunt et al., 1987) の免疫反応を調査した。ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i. p.) 麻酔下で、マイクロピペットに採取した Vehicle、1 mM または 10 mM Cap 溶液 10 μ l を左眼球表面に滴下した。滴下 2 時間後に左心室から 100 ml の 0.02 M のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH7.4) で瀉血後、4 %パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (PB; pH7.4) 500 ml で灌流した。下位脳幹から上部頸髄を取り出し、同固定液にて 3 時間固定した後、30 %スクロース溶液 (4 $^{\circ}$ C) に浸漬した。厚さ 50 μ m の連続横断凍結切片を作製し、PB 溶液に回収した。切片は PBS で 20 分間洗浄し、1 %の正常ヤギ血清 (Vectastain; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で 20 分間処理し、ウサギ抗 c-Fos 抗体 (7000 倍希釈; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA) で 12 時間インキュベートした。PBS で洗浄の後、ビオチン化ヤギ抗ウサギ抗体で 2 時間インキュベートして洗浄し、その後アビジン-ビオチン-パーオキシダーゼ複合液 (ABC 液; Vectastain; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で 1 時間インキュベートした。パーオキシダーゼ活性を可視化するため、0.05 %ジアミノベンチジンテトラヒドロクロライド (DAB)、0.1 %硫酸ニッケルアンモニウム及び 0.01 %過酸化水素水を含む 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.2) で反応させた。切片は PB 及び蒸留水で洗浄し、ゼラチン被覆スライドにマウントし、パーマウント (Fisher Scientific, New Jersey, CA, USA) で封入した。抗体の特異性は、一次抗体

を適応しない場合には標識が陰性であることにより確認した。

c-Fos 免疫反応 (c-Fos-IR) 細胞発現は悶 (obex; 最後野の上端) を基準に、吻側+1.0 mm から-6.0 mm までの 10 枚毎の切片を顕微鏡下 ($\times 100$) で観察し、三叉神経脊髄路核中間亜核・尾側亜核の境界付近 (Vi/Vc, +0.5~-1.0 mm)、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Mid Vc, -1.5~-2.5 mm)、三叉神経脊髄路核尾側亜核・上部頸髄境界付近 (Vc/C1, -3.0~-5.0 mm) における c-Fos-IR 細胞数の平均値を比較した。Mid Vc と Vc/C1 は浅層部 (Laminae I/II) と大細胞部 (Laminae III-V) を区別して観察した。

4. 分子生物学的検討 (Real-time PCR)

TRPV1 及びそれと共役する ANO1 に対する E2 の修飾作用を分子生物学的に検討するため、Real-time PCR を用いて両イオンチャネルの mRNA 量を調査した。

ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i.p) 麻酔下で断頭後、三叉神経節の第一・二枝領域を摘出した。摘出した組織から、RNeasy micro kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて total RNA を抽出した。その後、サーマルサイクラー (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) で、Prime Script RT Master Mix (Takara, Tokyo, Japan) を用いて逆転写反応させ、cDNA を合成した。Real-time PCR は Roter gene 6000 (Qiagen, Valencia, CA, USA) で、KAPA SYBR FAST qPCR kit (NIPPON Genetics, Tokyo, Japan) を用いて行った。熱変性 (95 °C で 2 分)、増幅 (95 °C で 2 分、62 °C で 30 秒、40 サイクル) の反応条件で行い、TRPV1 と ANO1 の mRNA 量を Roter gene 6000 series software (Qiagen, Valencia, CA, USA) で相対定量解析し、 β -actin で補正した。

使用したプライマーは以下のとおりである。

β -actin : (forward) TGTTACCAACTGGGACGAC (reverse) GGTGTTGAAGGTCTCAAACAT

TRPV1: (forward) GACATGCCACCCAGCAGG (reverse) TCAATTCCCACACACCTCC

ANO1: (forward) CCATCAGAGCCAAAGACATCGG (reverse) GGGCTGTGGGACTGTGGTTGTTA

5. 統計解析

実験結果は、平均値±標準誤差で表した。統計解析は、二元配置分散分析と Scheffé's F test による多重比較、unpaired student's *t*-test を用い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

結果

1. E2 投与 OVX ラット

E2 投与後のスメア像は、LE 群では発情休止期に類似した白血球を主体とする像 (Fig. 1. a)、または発情後期に類似した白血球や少数の有核上皮細胞と角化上皮細胞が混在した像が見られた (Fig. 1. b)。一方、HE 群では発情前期に類似した有核上皮細胞のみ (Fig. 2. a)、または有核上皮細胞と角化上皮細胞が混在した像が見られた (Fig. 2. b)。E2 投与後の血中 E2 濃度は、HE 群では 101.8 ± 14.9 pg/ml (n=5)、LE 群では 5.71 ± 1.7 pg/ml (n=7) であった。

2. 行動学的検討 (Eye wipe test)

Vehicle 滴下による LE 群、HE 群の疼痛関連行動時間はそれぞれ 1.0 ± 0.3 秒、 1.4 ± 0.2 秒であり、両群間に差を認めなかった。

1 mM Cap 滴下では、LE 群が 64.8 ± 15.4 秒、HE 群が 143.4 ± 21.2 秒であり、いずれも Vehicle 滴下と比べ有意に延長した (ANOVA and Scheffé's F tset, $p < 0.05$, $p < 0.01$)。さらに、LE 群と比べ、HE 群の方が有意に長かった (ANOVA and Scheffé's F tset, $p < 0.01$) (Fig. 3)。

3. 免疫組織学的検討 (c-Fos 免疫反応)

左側眼球表面への Vehicle、1 mM、10 mM Cap 滴下により免疫陽性反応を示した細胞は、核が灰色から黒色に標識された (Fig. 4, 5)。滴下側では、1 mM、10 mM Cap 滴下により、標識細胞の多くは Vi/Vc 領域または Vc/C1 領域に発現し、二相性の分布を認めた (Fig. 6)。

三叉神経脊髄路核 Vi/Vc 領域での切片 1 枚あたりの c-Fos-IR 細胞数は、LE 群、HE 群それぞれ Vehicle 滴下で 13.1 ± 2.1 個、 11.5 ± 1.9 個、1 mMCap 滴下で 15.6 ± 2.5 個、 15.6 ± 1.5 個、10 mMCap 滴下で 22.3 ± 1.2 個、 22.2 ± 1.8 個であり、いずれも LE 群と HE 群に差は認めなかった。また、両群ともに 10 mMCap 滴下により Vehicle 滴下と比べ、有意に増加したが (ANOVA and Scheffé's F tset, $p < 0.05$)、1 mMCap と比べ有意な差を認めなかった (Fig. 7)。

三叉神経脊髄路核 Vc/C1 領域浅層部 (Laminae I / II) での切片 1 枚あたりの c-Fos-IR 細胞数は、Vehicle 滴下では LE 群、HE 群それぞれ 0.7 ± 0.4 個、 0.6 ± 0.3 個であった。1 mMCap 滴下ではそれぞれ 9.9 ± 1.1 個、 20.9 ± 2.5 個であり、HE 群の方が有意に増加した (ANOVA and Scheffé's F tset, $p < 0.05$)。10 mMCap 滴下ではそれぞれ 25.8 ± 1.5 個、 38.0 ± 3.7 個であり、HE 群の方が有意に増加した (ANOVA and Scheffé's F tset, $p < 0.05$)。また、LE 群は 1 mMCap 滴下では Vehicle 滴下と比べ差は認めなかったが、10 mMCap 滴下により Vehicle、1 mMCap 滴下と比べ有意に増加した (ANOVA and Scheffé's F tset, $p < 0.01$)。HE 群は 1 mMCap 滴下により Vehicle 滴下と比べ、10 mMCap 滴下により Vehicle、1 mMCap 滴下と比べ有意に増加した (ANOVA and Scheffé's F tset, $p < 0.01$) (fig. 8)。大細胞部 (Laminae III-V) での切片 1 枚あたりの c-Fos-IR 細胞数は、いずれの群も 3 個未満であった (Fig. 9)。

Mid Vc 領域浅層部 (Laminae I / II) での切片 1 枚あたりの c-Fos-IR 細胞数は、LE 群、HE 群それぞれ Vehicle 滴下で 1.2 ± 0.2 個、 1.0 ± 0.4 個、1 mMCap 滴下で 6.4 ± 1.1 個、 6.2 ± 1.1 個、10 mMCap 滴下で 11.6 ± 1.4 個、 11.1 ± 1.0 個であり、いずれも LE 群と HE 群に差を認めなかった。また、両群ともに 10 mMCap 滴下で Vehicle 滴下と比べ有意に増加したが (ANOVA and Scheffé's F tset, $p < 0.01$)、1 mMCap と比べ差を認めなかった (Fig. 10)。大細胞部 (Laminae III-V) での切片 1 枚あたりの c-Fos-IR 細胞数は、いずれの群も 3 個未満であった (Fig. 11)。

反対側でも滴下側と比べると発現数は少ないが、c-Fos-IR 細胞の発現を認めた (Fig. 12)。

4. 分子生物学的検討 (Real-time PCR)

TRPV1、ANO1 いずれの mRNA 量も LE 群と比べ、HE 群の方が有意に増加した (unpaired t -test, $p < 0.01$, $p < 0.05$) (Fig. 13)。

考 察

本研究から得られた主な結果は、Cap 刺激に対して HE 群の疼痛関連行動時間と三叉神経脊髄路核の Vc/C1 領域における c-Fos-IR 細胞数が増加したこと、さらに HE 群で TG における TRPV1 と ANO1 の mRNA 量が増加したことである。これらの結果は、E2 が Cap 刺激による疼痛感受性を Vc/C1 領域において亢進させること、さらにその機序の一つとして、E2 により TG における TRPV1 や ANO1 といったイオンチャネルの発現が亢進している可能性を示すものである。

1. E2 投与 OVX ラット

これまで Es の侵害受容に対する修飾作用を検討するために、OVX 動物に徐放性の E2 ペレットを埋入する方法 (Sanoja et al., 2005; Robbins., 2010; Hubscher., 2010) や E2 を皮下投与する方法 (Reed et al., 2009; Small et al., 2013; An et al., 2014) が用いられてきたが、生理的な血中濃度を再現する方法は未だコンセンサスが得られていない。E2 ペレットを埋入する方法は複数回投与の必要がなく、動物のストレスを軽減できる長所があるが、血中 E2 濃度が持続的に高濃度となる短所がある (Ström et al., 2012)。さらに、脳障害を惹起する危険性も報告されており (Ström et al., 2009, 2010)、本研究では OVX ラットに低容量または高容量の E2 を 2 日間皮下投与することで血中 E2 濃度の多寡を再現する動物モデルを作製した。OVX ラットに E2 を皮下投与する方法は、これまでに広く用いられているが、投与量、投与期間は様々である (Reed et al., 2009; Small et al., 2013; An et al., 2014)。また、その多くは OVX 動物を対照群とした E2 の有無による比較である。OVX 後は negative feedback の消失により下垂体ホルモン (卵胞刺激ホルモン, 黄体化刺激ホルモン) が過剰に分泌されるため、OVX 動

物ではこれらのホルモンの影響を除外できない(Tashiro et al., 2008)。Ajikaら(1972)は、OVX ラットに E2 を 1 日または 2 日間皮下投与すると、過剰に分泌された下垂体ホルモンが減少することを報告しており、本研究のモデルは侵害受容に対する E2 の影響を検討する目的に適していると考えられる。

本研究では、LE 群のスミア像が発情休止期または発情後期に類似した像が見られたのに対し (Fig. 1)、HE 群では発情前期に類似像が見られた (Fig. 2)。さらに、E2 投与後の血中 E2 濃度が HE 群では 101.8 ± 14.9 pg/ml、LE 群では 5.71 ± 1.7 pg/ml であり、ラットの生理的な血中 E2 濃度は約 2~145 pg/ml であることから (Isaksson et al., 2011)、血中 E2 濃度の多寡を生理的範囲内で再現したモデルを作製できたと考えられる。

2. 行動学的検討 (Eye wipe test)

眼球表面、特に角膜は、侵害受容伝達に重要な A δ 線維と C 線維が豊富に存在する組織の一つとされており (Rozsa and Beuerman., 1982)、Eye wipe test は、Cap で角膜を刺激した場合の行動学的評価法として、これまでも多く用いられてきた (Price et al., 2004; Neubert et al., 2008; Nakao et al., 2012)。本研究ではこれらの先行研究を参考に、Cap 濃度を 1 mM (約 0.03 %) として実験を行った。今回、Vehicle 滴下では LE 群、HE 群ともにわずかな反応しか認めなかったが、1 mMCap 滴下により LE 群、HE 群いずれも Vehicle 滴下と比べ、疼痛関連行動時間が有意に延長したことから (Fig. 3)、この疼痛関連行動は Cap 刺激により惹起されたと考えられる。さらに、1 mMCap 滴下で LE 群と比べ、HE 群の方が有意に疼痛関連行動時間が長かったことは、E2 が Cap 刺激による疼痛感受性を亢進させることを示唆するものである。

3. 免疫組織学的検討 (c-Fos 免疫反応)

末梢組織に侵害刺激が加えられると、脊髄後角や延髄に c-Fos が発現すること、さらに強度依存性に発現が増えることから、c-Fos は侵害刺激に対する脊髄や三叉神経脊髄路核ニューロンの活動性の指標として知られている (Iwata et al., 1995; Shimizu et al., 2006; Gao and Ji., 2009)。三叉神経領域に侵害刺激が加えられた場合、その情報は三叉神経脊髄路核に送られ、c-Fos-IR 細胞の発現が惹起される。本研究では、三叉神経脊髄路核での c-Fos-IR 細胞の発現を、眼球表面への Cap 刺激に対するニューロンの活動性の指標として使用した。

眼球表面への Cap 刺激により滴下側で誘導された c-Fos-IR 細胞の多くが、三叉神経脊髄路核の Vi/Vc 領域または Vc/C1 領域に発現し、二相性の分布を認めた (Fig. 6)。トレーサーを用いた神経回路標識において、眼球表面からの一次感覚神経は、Vi/Vc 領域または Vc/C1 領域の浅層部に投射することが明らかとなっている (Marfurt and Deltoro., 1987; Takemura et al., 1991; Gong et al., 2003; Panneton et al., 2010)。また、眼球表面への様々な侵害刺激により、Vi/Vc 領域及び Vc/C1 領域での c-Fos-IR 細胞の発現や ERK のリン酸化が誘導されることが知られており (Lu et al., 1993; Meng and Bereiter., 1996; Noma et al., 2008; Robbins et al., 2012)、本研究の結果はこれらの研究結果に一致すると考えられる。

これまでの報告から Vi/Vc 領域と Vc/C1 領域の機能については、差異があると考えられる。例えば Chang ら (Chang et al., 2010) は、眼球表面への Cap 刺激で誘導される c-Fos-IR 細胞は Vc/C1 領域では濃度依存性であるが、Vi/Vc 領域ではその傾向を認めないことを報告している。さらに Meng ら (Meng et al., 1996) は、Vc/C1 領域には特異的侵害受容ニューロンが比較的豊富に存在しているのに対し、Vi/Vc 領域のニューロンは、その多くが非侵害刺激に反応する低閾値機械刺激受容ニューロンであることから、

眼球表面からの侵害受容伝達に重要な領域は Vi/Vc 領域ではなく、Vc/C1 領域であるとしている。本研究でも、LE 群、HE 群ともに Vc/C1 領域での反応が Cap 刺激濃度依存性であるのに対し、Vi/Vc 領域ではその傾向を認めないこと、さらに Vehicle 滴下により、Vi/Vc 領域では 1 mM Cap 刺激時と同程度の c-Fos-IR 細胞の発現を認めたのに対し、Vc/C1 領域では発現がわずかであることから (Fig. 7.8)、Meng らの結果を支持するものであると考えられる。

以上より、本研究において 1 mM、10 mM Cap 滴下時、Vc/C1 領域での c-Fos-IR 細胞の発現が HE 群で有意に亢進したことは、E2 が Cap 刺激による疼痛感受性を Vc/C1 領域で亢進させたことを示唆するものである。Vi/Vc 領域の機能については、Vi/Vc をブロックすると涙の分泌が抑制されるが、Vc/C1 をブロックしても影響を受けないことから、涙の反射性分泌への関与を示唆する報告がある (Hirata et al., 2005)。本研究で認めた Vi/Vc 領域の c-Fos-IR 細胞の発現も、点眼刺激で惹起された涙の反射性分泌による神経興奮を反映している可能性がある。

また、本研究で反対側においても c-Fos-IR 細胞の発現を認めたが (Fig. 12)、これまでの報告から侵害刺激により両側の三叉神経脊髄路核に c-Fos-IR 細胞が発現することが知られており、その機序として自律神経系の関与や介在神経の反対側への投射が考えられている (Bereiter et al., 2002; Ogawa et al., 2003; Okada et al., 2011)。本研究でも同様の機序で、反対側での c-Fos-IR 細胞の発現が誘導されたと考えられる。

4. 分子生物学的検討 (Real-time PCR)

本研究での行動学的、免疫組織学的研究を踏まえ、TG における TRPV1 及びそれと共役する ANO1 の mRNA 量に対する、E2 の影響について Real-time PCR で検討した。その結果、HE 群の TG において TRPV1 mRNA と ANO1 mRNA 量が増加していた。この結果は、

E2がTRPV1やAN01の発現を亢進させ、侵害受容を高める可能性を示すものであり、TRPV1やAN01が女性の疼痛感受性のメカニズムを解明するうえで有力なターゲットになり得ることを示唆するものである。

EsはEs受容体を介し作用を発現する。Es受容体にはEs α とEs β の2つのサブタイプが存在することが知られているが、その分布様式は組織により異なるとされる(Amandusson and Blomqvist., 2013)。TGにはEs α と、発現は少ないがEs β のいずれも存在しており、Esがこれらの受容体を介し侵害受容を調節することが示唆されている(Bereiter et al., 2005)。本研究で認めたE2によるTRPV1 mRNAとAN01 mRNA量の増加が、いずれの受容体を介したものであるかについての検討は行っていないが、今後阻害薬を用いるなどして更なるメカニズムの解明が必要である。

また、今回はE2の作用についてTGに焦点を絞って検討を行ったが、Es α とEs β は三叉神経系においてTGだけではなく、三叉神経脊髄路核のMid VcとVc/C1の各領域にも多く存在するとされており(Bereiter et al., 2005)、E2がVc/C1領域で疼痛感受性を亢進させた可能性も否定できない。実際、E2がVc/C1領域において、細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)のリン酸化や、NMDA受容体の活性化によって疼痛感受性を亢進させることが報告されている(Tashiro et al., 2009)。よって、侵害受容に対するEsの修飾メカニズムは複雑であることが予想され、末梢及び中枢の両面において、今後さらなる検討が必要である。

結 語

- E2 は Cap 刺激による疼痛感受性を、Vc/C1 領域で亢進させることが示唆された。
- E2 が Cap 刺激による疼痛感受性を亢進させる機序の一つとして、E2 により TG における TRPV1 や ANO1 といったイオンチャネルの発現が亢進している可能性が示された。

本論文の要旨の一部は、第 42 回歯科麻酔学会総会・学術集会（平成 26 年 10 月）において発表した。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて戴き、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科統合機能口腔科学専攻高次脳口腔機能学講座（歯科麻酔学教室）の丹羽 均教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の進行に際し常に御助言、御指導を戴いた大阪大学大学院歯学研究科統合機能口腔科学専攻高次脳口腔機能学講座（歯科麻酔学教室）の杉村 光隆准教授に深甚なる謝意を表します。

最後に本研究に対して御理解、御協力戴きました大阪大学大学院歯学研究科統合機能口腔科学専攻高次脳口腔機能学講座（歯科麻酔学教室）教室員の皆様に厚くお礼申し上げます。

引用文献

Ajika K, Krulich L, Fawcett CP, McCann SM (1972) Effects of estrogen on plasma and pituitary gonadotropins and prolactin, and on hypothalamic releasing and inhibiting factors. *Neuroendocrinology*, 9:304-315.

Amandusson Å, Blomqvist A (2013) Estrogenic influences in pain processing. *Front Neuroendocrinol*, 34:329-349.

An G, Li W, Yan T, Li S (2014) Estrogen rapidly enhances incisional pain of ovariectomized rats primarily through the G protein-coupled estrogen receptor. *Int J Mol Sci*, 15:10479-10491.

Bereiter DA, Okamoto K, Bereiter DF (2005) Effect of persistent monoarthritis of the temporomandibular joint region on acute mustard oil-induced excitation of trigeminal subnucleus caudalis neurons in male and female rats. *Pain*, 117:58-67.

Bereiter D.A, Bereiter D.F, Ramos M (2002) Vagotomy prevents morphine-induced reduction in Fos-like immunoreactivity in trigeminal spinal nucleus produced after TMJ injury in a sexdependent manner. *Pain*, 96:205-213.

Berkley KJ (1997) Sex differences in pain. *Behav Brain Sci*, 20:371-380.

Cairns BE, Sim Y, Bereiter DA, Sessle BJ, Hu JW (2002) Influence of sex on reflex jaw muscle activity evoked from the rat temporomandibular joint. *Brain Res*, 957:338-344.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389:816-824.

Bereiter DA, Cioffi JL, Bereiter DF (2005) Oestrogen receptor-immunoreactive neurons in the trigeminal sensory system of male and cycling female rats. *Arch Oral Biol*, 50:971-979.

Chang Z, Okamoto K, Tashiro A, Bereiter DA (2010) Ultraviolet irradiation of the eye and Fos-positive neurons induced in trigeminal brainstem after intravitreal or ocular surface transient receptor potential vanilloid 1 activation. *Neuroscience*, 170:678-85.

Cho H, Oh U (2013) Anoctamin 1 mediates thermal pain as a heat sensor. *Curr Neuropharmacol*, 11:641-645.

Cook CD, Nickerson MD (2005) Nociceptive sensitivity and opioid antinociception and antihyperalgesia in Freund' s adjuvant-induced arthritic male and female rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 313:449-459.

Dominguez R, Hu E, Zhou M, Baudry M (2009) 17beta-estradiol-mediated neuroprotection and ERK activation require a pertussis toxin-sensitive mechanism involving GRK2 and beta-arrestin-1. *J Neurosci*, 29:4228-4238.

Fillingim RB, Edwards RR (2001) The association of hormone replacement therapy with experimental pain responses in postmenopausal women. *Pain*, 92:229-234.

Fischer L, Torres-Chávez KE, Clemente-Napimoga JT, Jorge D, Arsati F, de Arruda Veiga MC, Tambeli CH (2008) The influence of sex and ovarian hormones on temporomandibular joint nociception in rats. *J Pain*, 9:630-638.

Gao YJ, Ji RR (2009) c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? *Open Pain J*, 2:11-17.

Gong S, Zhou Q, LeDoux MS (2003) Blink-related sensorimotor anatomy in the rat. *Anat Embryol*, 207:193-208.

Hirata H, Okamoto K, Tashiro A, Bereiter DA (2004) A novel class of neurons at the trigeminal subnucleus interpolaris/caudalis transition region monitors ocular surface fluid status and modulates tear production. *J Neurosci*, 24 :4224-4232.

Hubscher CH, Fell JD, Gupta DS (2010) Sex and hormonal variations in the development of at-level allodynia in a rat chronic spinal cord injury model. *Neurosci Lett*, 477:153-156.

Hunt SP, Pini A, Evan G (1987) Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 6131:632-634.

Isaksson IM, Theodorsson A, Theodorsson E, Strom JO (2011) Methods for 17β -oestradiol administration to rats. *Scand J Clin Lab Invest*, 2011:583-592.

Iwata K, Kanda K, Tsuboi Y, Kitajima K, Sumino R (1995) Fos induction in the medullary dorsal horn and C1 segment of the spinal cord by acute inflammation in aged rats. *Brain Res*, 678:127-139.

Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ (2002) p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron*, 36:57-68.

Kanazawa T, Matsumoto S (2014) Expression of transient receptor potential vanilloid 1 and anoctamin 1 in rat trigeminal ganglion neurons innervating the tongue. *Brain Res Bull*, 106:17-20.

Kramer PR, Bellinger LL (2009) The effects of cycling levels of 17β -estradiol and progesterone on the magnitude of temporomandibular joint-induced nociception. *Endocrinology*, 150:3680-3689.

LeResche L, Saunders K, Von Korff MR, Barlow W, Dworkin SF (1997) Use of exogenous hormones and risk of temporomandibular disorder pain. *Pain*, 69:153-160.

Lu J, Hathaway CB, Bereiter DA (1993) Adrenalectomy enhances Fos-like immunoreactivity within the spinal trigeminal nucleus induced by noxious thermal stimulation of the cornea. *Neuroscience*, 54:809-818.

Marfurt CF, Del Toro DR (1987) Corneal sensory pathway in the rat: a horseradish peroxidase tracing study. *J Comp Neurol*, 261:450-459.

Meng ID, Hu JW, Benetti AP, Bereiter DA (1997) Encoding of corneal input in two distinct regions of the spinal trigeminal nucleus in the rat: cutaneous receptive field properties, responses to thermal and chemical stimulation, modulation by diffuse noxious inhibitory controls, and projections to the parabrachial area. *J Neurophysiol*, 77:43-56.

Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S, Tominaga M (2005) Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol Pain*, 17:1-3.

Nakao A, Takahashi Y, Nagase M, Ikeda R, Kato F (2012) Role of capsaicin-sensitive C-fiber afferents in neuropathic pain-induced synaptic potentiation in the nociceptive amygdala. *Mol Pain*, 8:51.

Neubert JK, King C, Malphurs W, Wong F, Weaver JP, Jenkins AC, Rossi HL, Caudle RM (2008) Characterization of mouse orofacial pain and the effects of lesioning TRPV1-expressing neurons on operant behavior. *Mol Pain*, 4:43.

Noma N, Tsuboi Y, Kondo M, Matsumoto M, Sessle BJ, Kitagawa J, Saito K, Iwata K (2008) 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.

Okada-Ogawa Akiko, Tsuboi Y, Kondo M, Kusama T, Imamura Y, Iwata K (2011) The study of migraine model rat with photophobia in the upper cervical spinal cord. *PAIN RESEARCH* 26:29-38.

Ogawa A, Ren K, Tsuboi Y, Morimoto T, Sato T, Iwata K (2003) A new model of experimental parotitis in rats and its implication for trigeminal nociception. *Exp. Brain Res*, 152:307-316.

Panneton WM, Hsu H, Gan Q (2010) Distinct central representations for sensory fibers innervating either the conjunctiva or cornea of the rat. *Exp Eye Res*, 90:388-396.

Price TJ, Patwardhan A, Akopian AN, Hargreaves KM, Flores CM (2004) Modulation of trigeminal sensory neuron activity by the dual cannabinoid-vanilloid agonists anandamide, N-arachidonoyl-dopamine and arachidonoyl-2-chloroethylamide. *Br J Pharmacol*, 141:1118-1130.

Reed WR, Chadha HK, Hubscher CH (2009) Effects of 17beta-estradiol on responses of viscerosomatic convergent thalamic neurons in the ovariectomized female rat. *J Neurophysiol*, 102:1062-1074.

Robbins A, Schmitt D, Winterson BJ, Meng ID (2012) Chronic morphine increases Fos-positive neurons after concurrent cornea and tail stimulation. *Headache*, 52:262-273.

Robbins MT, Mebane H, Ball CL, Shaffer AD, Ness TJ (2010) Effect of estrogen on bladder nociception in rats. *J Urol*, 183:1201-1205.

Rozsa AJ, Beuerman RW (1982) Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain*, 14:105-120.

Sanoja R, Cervero F (2005) Estrogen-dependent abdominal hyperalgesia induced by ovariectomy in adult mice: a model of functional abdominal pain. *Pain*, 118:243-245.

Shinoda M, Asano M, Omagari D, Honda K, Hitomi S, Katagiri A, Iwata K (2011) Nerve growth factor contribution via transient receptor potential vanilloid 1 to ectopic orofacial pain. *J Neurosci*, 31:7145-7155.

Shimizu K, Asano M, Kitagawa J, Ogiso B, Ren K, Oki H, Matsumoto M, Iwata K (2006) Phosphorylation of Extracellular Signal-Regulated Kinase in medullary and upper cervical cord neurons following noxious tooth pulp stimulation. *Brain Res*, 1072:99-109.

Small KM, Nag S, Mokha SS (2013) Activation of membrane estrogen receptors attenuates opioid receptor-likel receptor-mediated antinociception via an ERK-dependent non-genomic mechanism. *Neuroscience*, 255:177-190.

Ström JO, Theodorsson A, Ingberg E, Isaksson IM, Theodorsson E (2012) Ovariectomy and 17 β -estradiol Replacement in Rats and Mice: A Visual Demonstration. *J Vis Exp*, 64:4013

Ström JO, Theodorsson E, Hol ml, Theodorsson, A (2010) Different methods for administering 17beta-estradiol to ovariectomized rats result in opposite effects on ischemic brain damage. *BMC Neurosci*, 11:39.

Ström JO, Theodorsson A, Theodorsson E (2009) Dose-related neuroprotective versus neurodamaging effects of estrogens in rat cerebral ischemia: a systematic analysis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29:1359-1372.

Takemura M, Sugimoto T, Shigenaga Y (1991) Difference in central projection of primary afferents innervating facial and intraoral structures in the rat. *Exp Neurol*, 111:324-331.

Tashiro A, Bereiter DA, Thompson R, Nishida Y (2014) GABAergic influence on temporomandibular joint-responsive spinomedullary neurons depends on estrogen status. *Neuroscience*, 259:53-62.

Tashiro A, Okamoto K, Bereiter DA (2008) Morphine modulation of temporomandibular joint-responsive units in superficial laminae at the spinomedullary junction in female rats depends on estrogen status. *Eur J Neurosci*, 28:2065-2074.

Tashiro A, Okamoto K, Milam SB, Bereiter DA (2007) Differential effects of estradiol on encoding properties of TMJ units in laminae I and V at the spinomedullary junction in female rats. *J Neurophysiol*, 98:3242-3253.

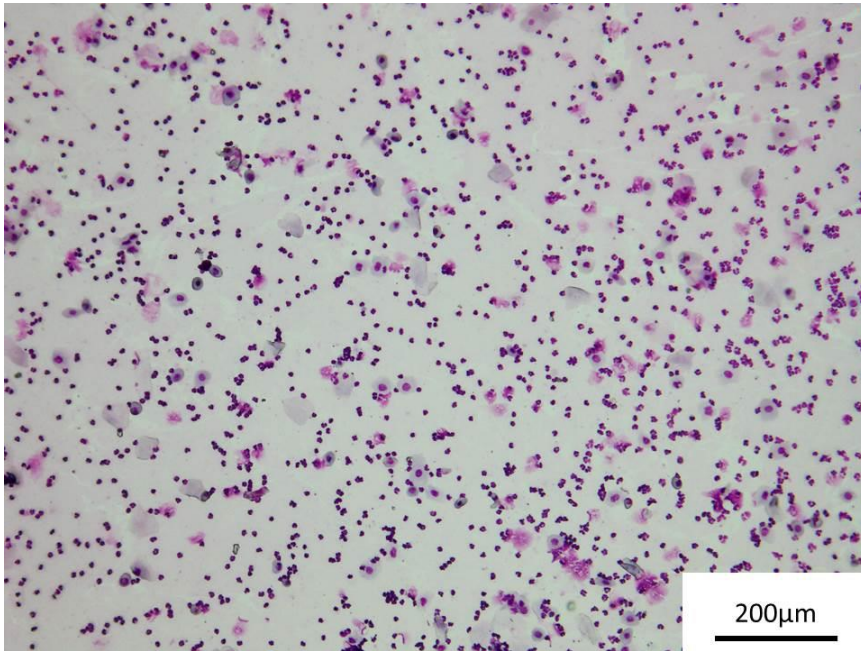
Tashiro A, Okamoto K, Bereiter DA (2009) NMDA receptor blockade reduces temporomandibular joint-evoked activity of trigeminal subnucleus caudalis neurons in an estrogen-dependent manner. *Neuroscience*, 164:1805-1812.

Tominaga M, Tominaga T (2005) Structure and function of TRPV1. *Pflugers Arch*, 451:143-150.

Unruh AM (1996) Gender variation in clinical pain experience. *Pain*, 65:123-167..

富永 真琴 (2014) TRPV1、TRPA1 による侵害刺激受容機構 *PAIN RESEARCH*, 29:76.

a



b

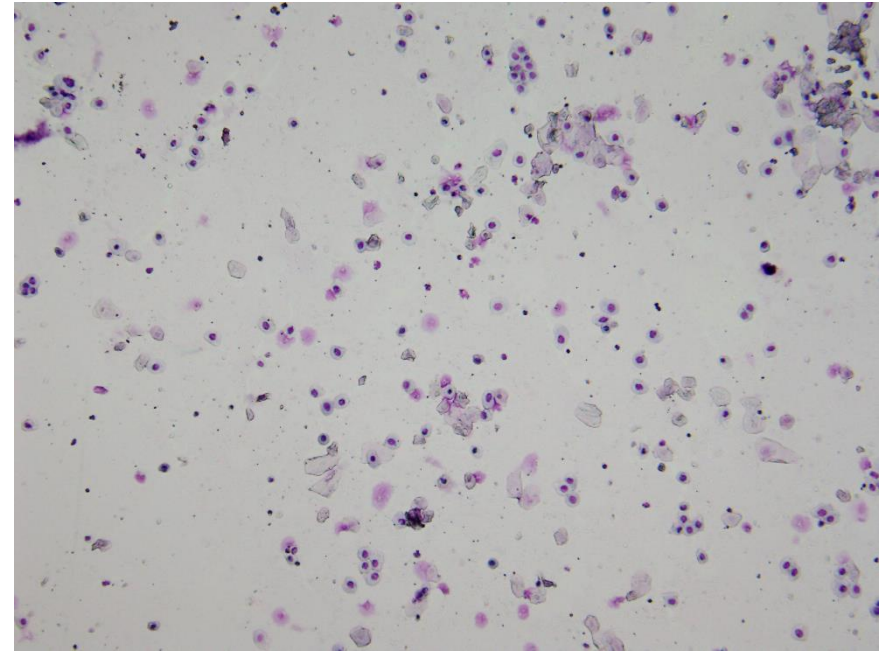
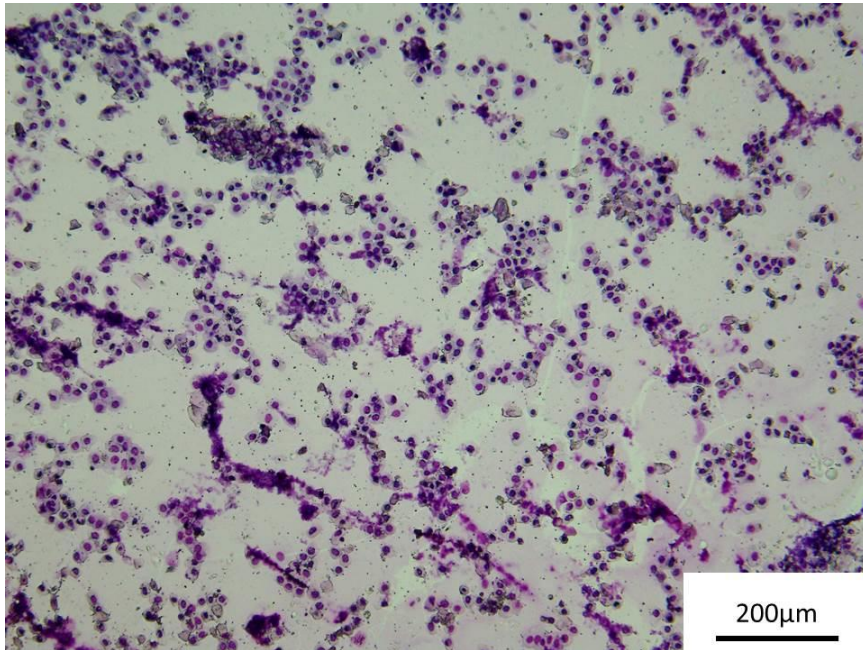


Fig.1 LE群の膾スミア像

LE群は発情休止期に類似した白血球を主体とする像(a)、または発情後期に類似した白血球や粘液、少数の有核上皮細胞と角化上皮細胞が混在した像(b)が見られた。

a



b

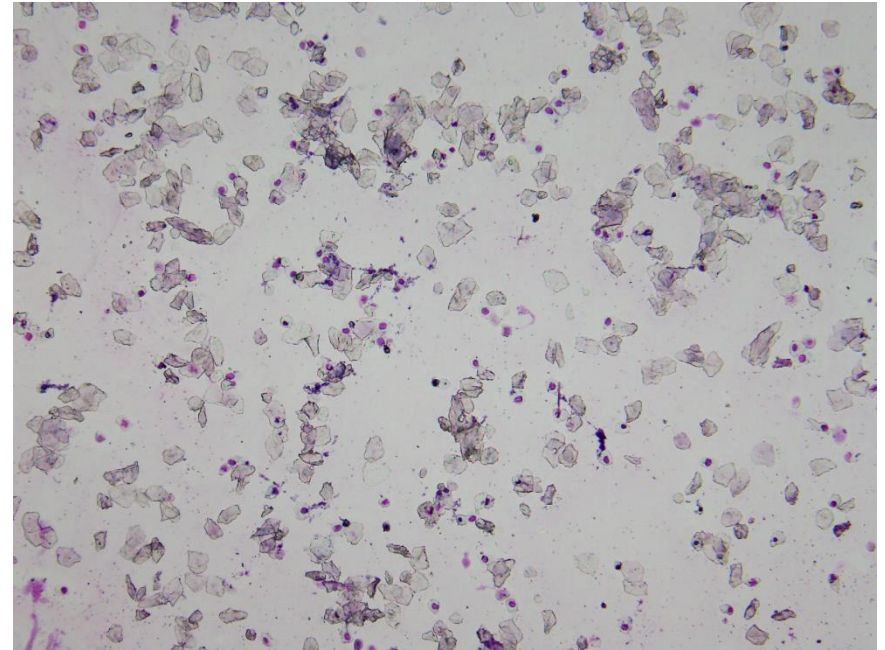


Fig.2 HE群の膾スミア像

HE群は発情前期に類似した有核上皮細胞のみ(a)、または有核上皮細胞と角化上皮細胞が混在した像(b)が見られた。

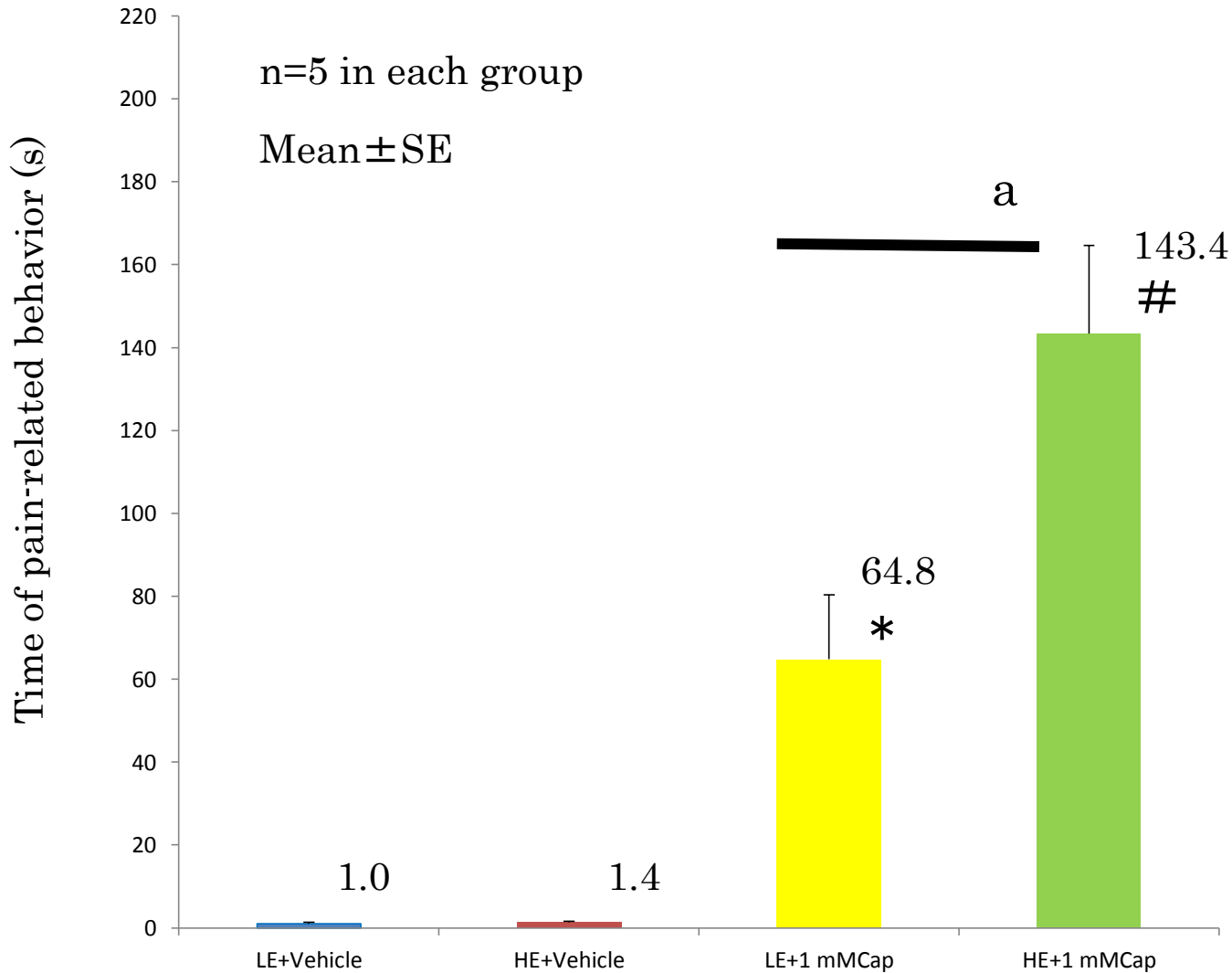
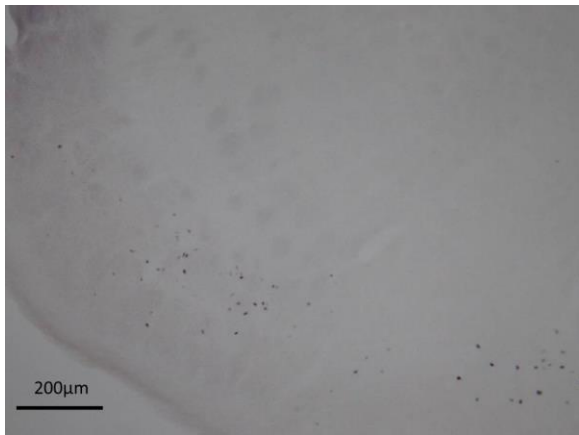


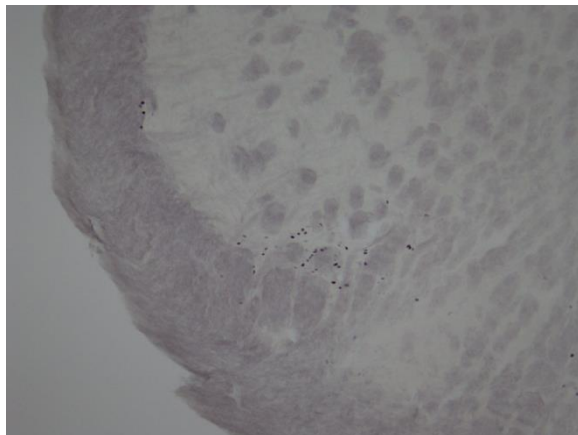
Fig.3 Eye wipe test

Eye wipe testによる疼痛関連行動時間を示す。1 mMCap滴下によりLE群、HE群ともに疼痛関連行動時間は延長した(ANOVA, *:p<0.05 vs LE+Vehicle, #:p<0.01 vs HE+Vehicle)。1 mMCap滴下ではHE群の方が有意に長くなった(ANOVA, a:p<0.01 vs LE+1 mMCap)。

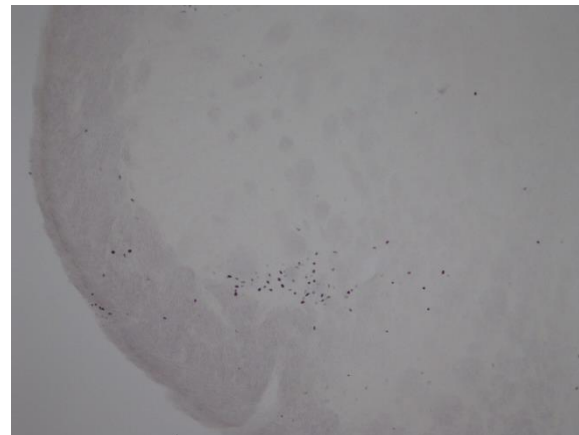
LE+Vehicle



LE+1 mMCap



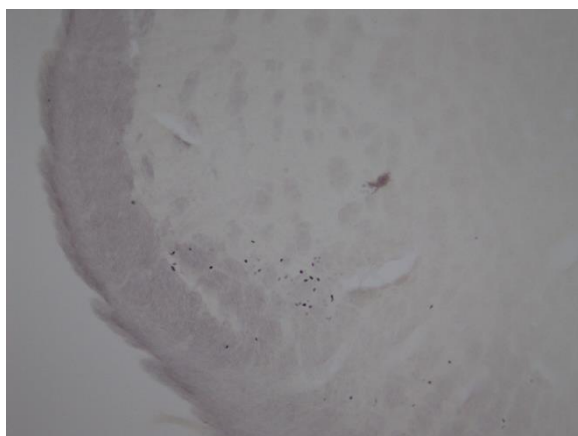
LE+10 mMCap



HE+Vehicle



HE+1 mMCap



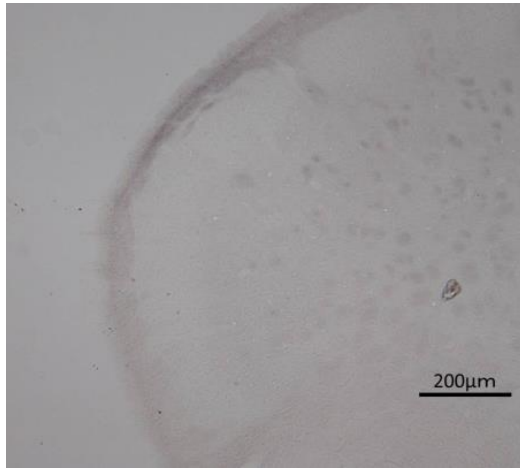
HE+10 mMCap



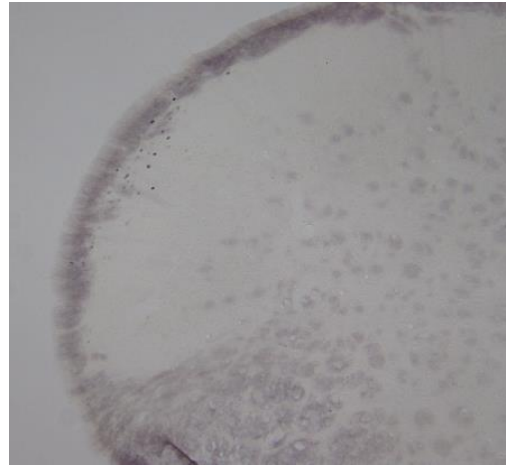
Fig.4 三叉神経脊髄路核Vi/Vcにおける顕微鏡写真

Vehicle、1 mM、10 mMCap滴下のいずれも、LE群とHE群の間に差はなかった。

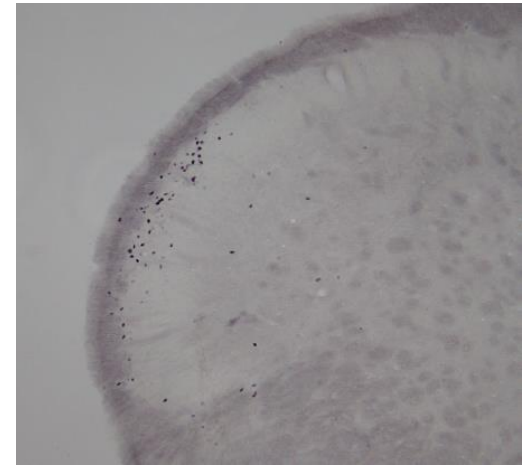
LE+Vehicle



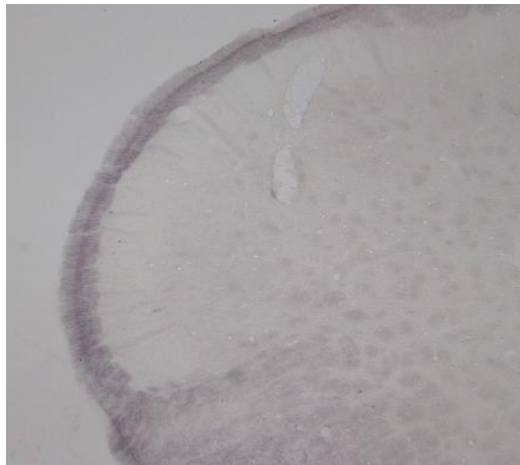
LE+1 mM Cap



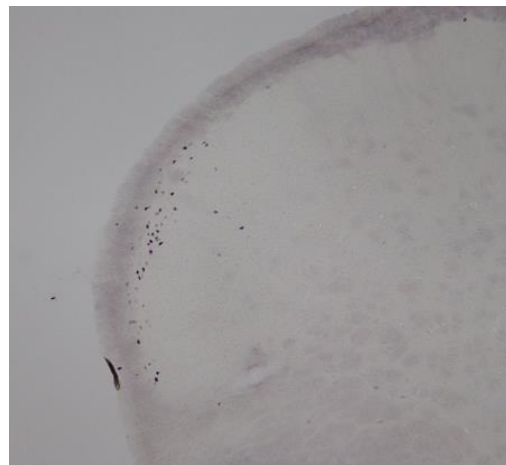
LE+10 mM Cap



HE+Vehicle



HE+1 mM Cap



HE+10 mM Cap

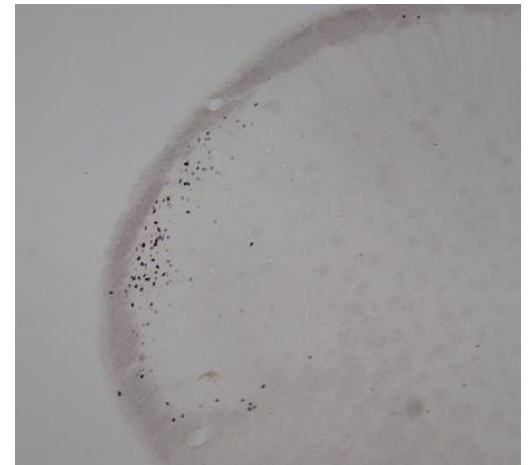


Fig.5 三叉神経脊髄路核Vc/C1における顕微鏡写真
1 mM、10 mM Cap滴下では、HE群の方が有意に増加した。

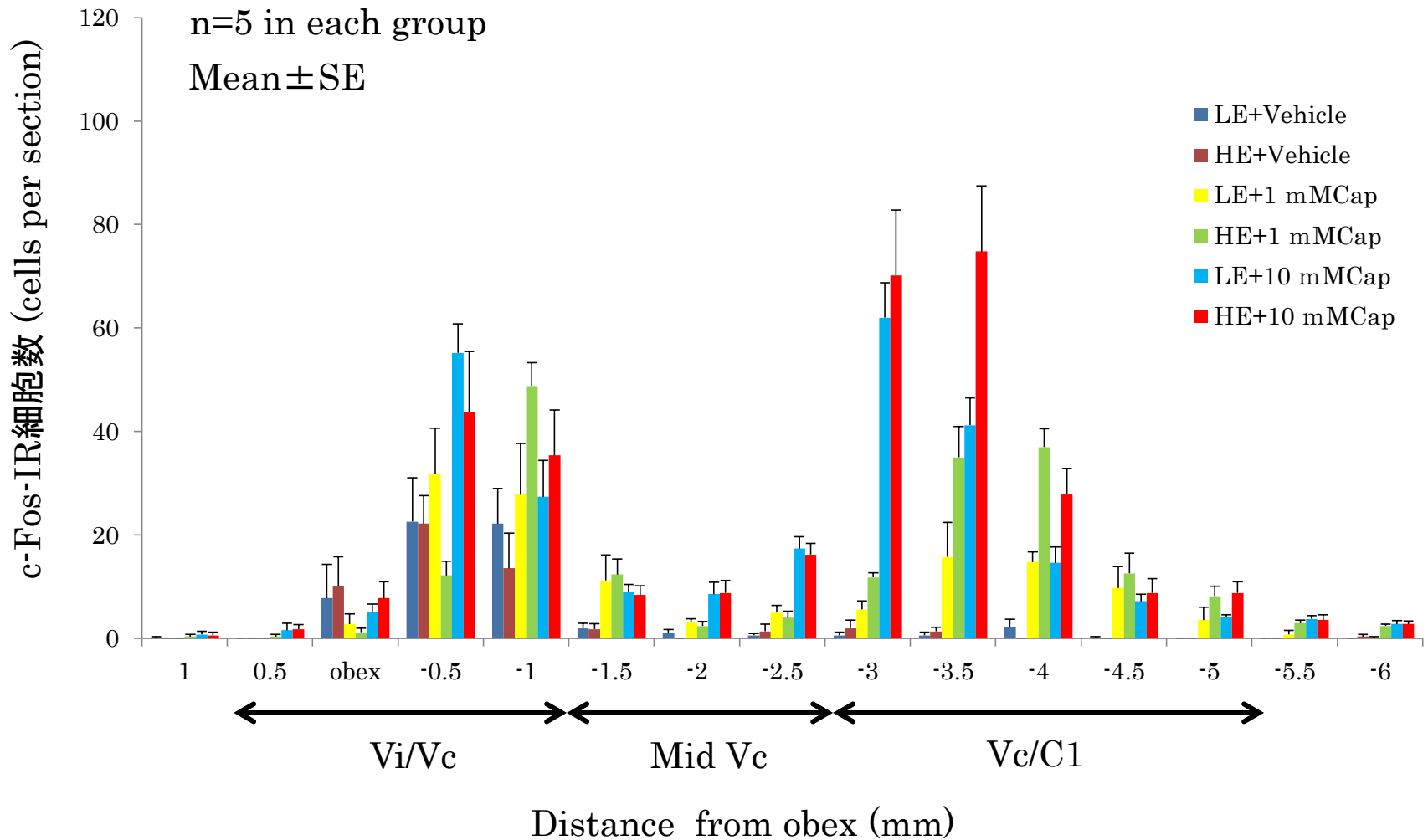


Fig.6 滴下側における三叉神経脊髄路核のc-Fos-IR細胞の発現分布
Vi/Vc領域及びVc/C1領域をピークとする二相性の発現分布を認めた。

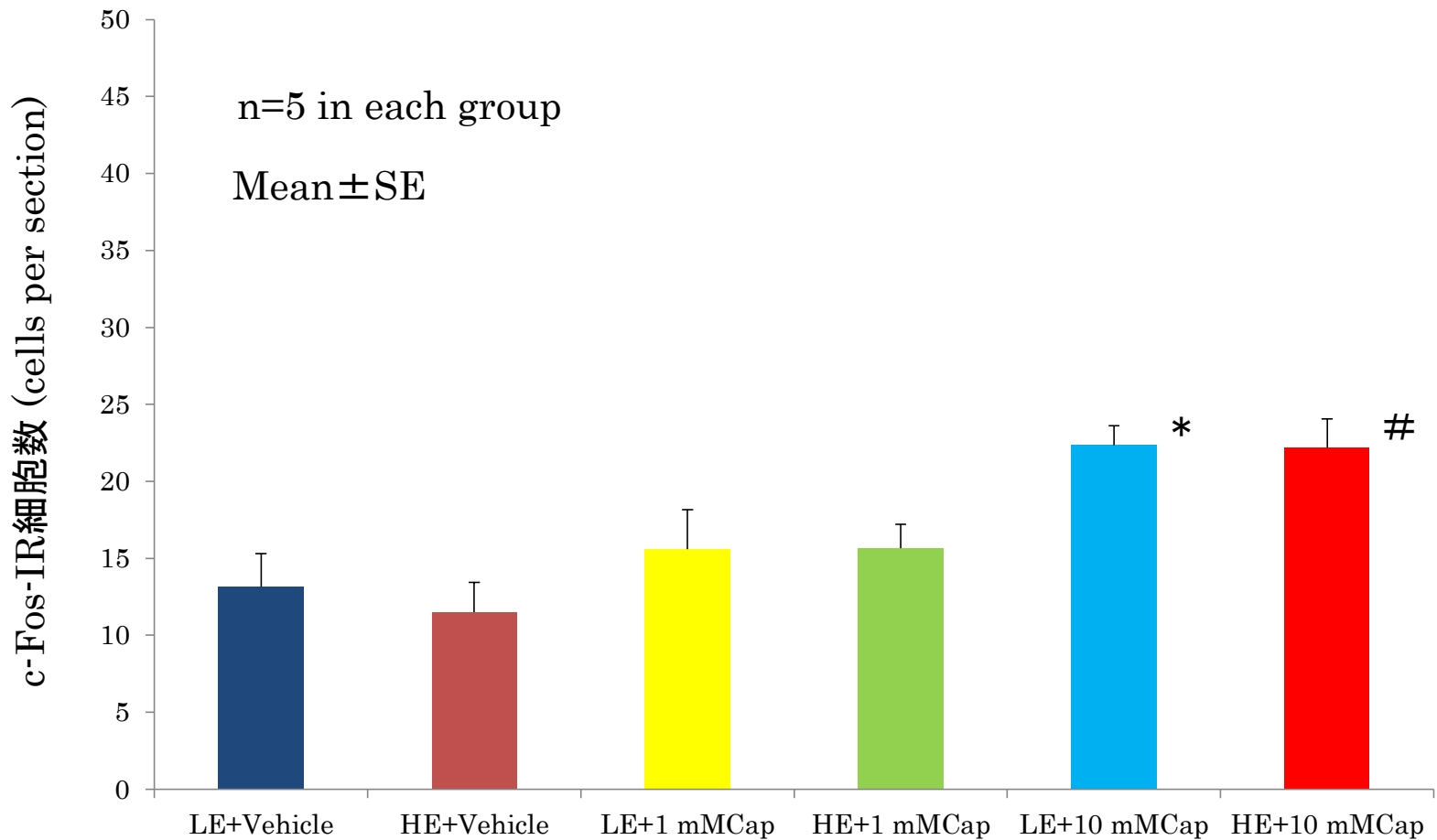


Fig.7 三叉神経脊髄路核Vi/Vcにおけるc-Fos-IR細胞数

Vehicle、1 mM、10 mMCap滴下のいずれも、LE群とHE群の間に差はなかった。両群ともに10 mMCap滴下では、Vehicle滴下と比べ有意に増加したが、1 mMCapとの差は認めなかった (ANOVA, *:p<0.05 vs LE+Vehicle, #p:<0.05 vs HE+vehicle)。

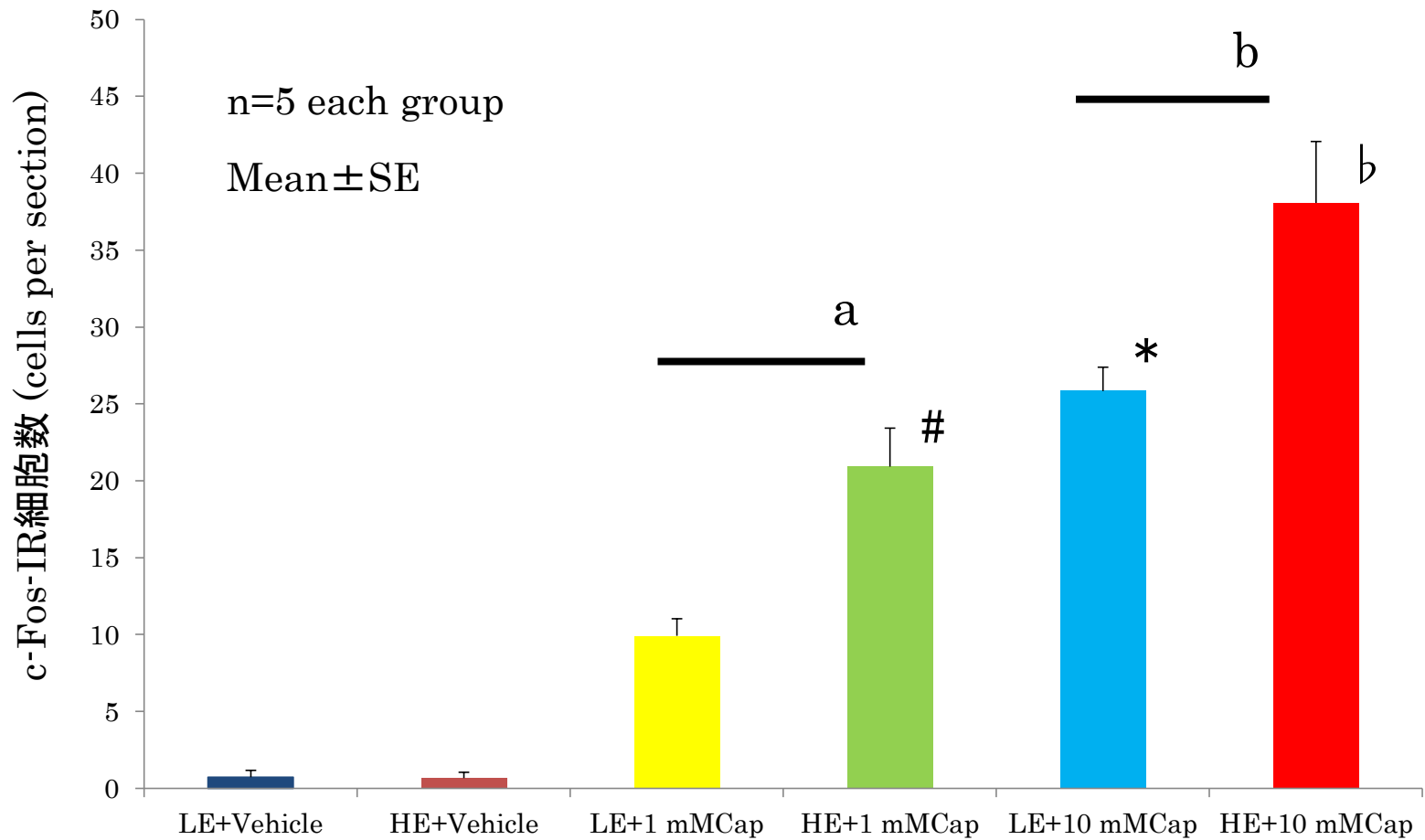


Fig.8 三叉神経脊髄路核Vc/C1浅層部におけるc-Fos-IR細胞数

1 mM、10 mM Cap滴下では、HE群の方が有意に増加した(ANOVA, a: $p < 0.05$ vs LE+1 mM Cap, b: $p < 0.05$ vs LE+10 mM Cap)。またLE群は10 mM Cap滴下によりVehicle、1 mM Cap滴下と比べ有意に増加したANOVA, *: $p < 0.01$ vs LE+Vehicle, LE+1 mM Cap)。HE群は1 mM Cap滴下によりVehicle滴下と比べ、10 mM Cap滴下によりVehicle、1 mM Cap滴下と比べ有意に増加した(ANOVA, #: $p < 0.01$ vs HE+vehicle, b: $p < 0.01$ vs HE+Vehicle, HE+1 mM Cap)。

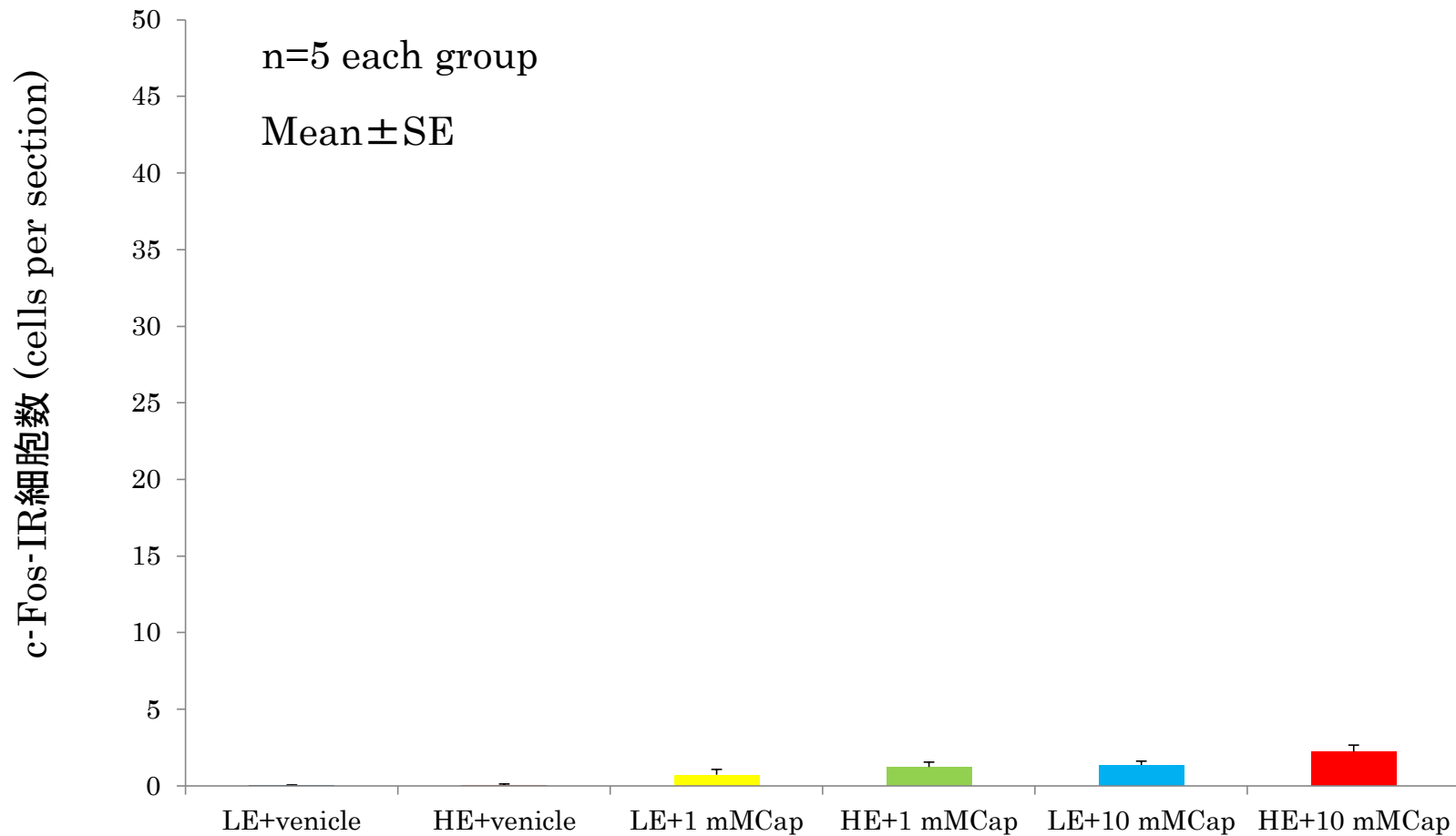


Fig.9 三叉神経脊髄路核Vc/C1大細胞部におけるc-Fos-IR細胞数
いずれの群も発現は3個未満であった。

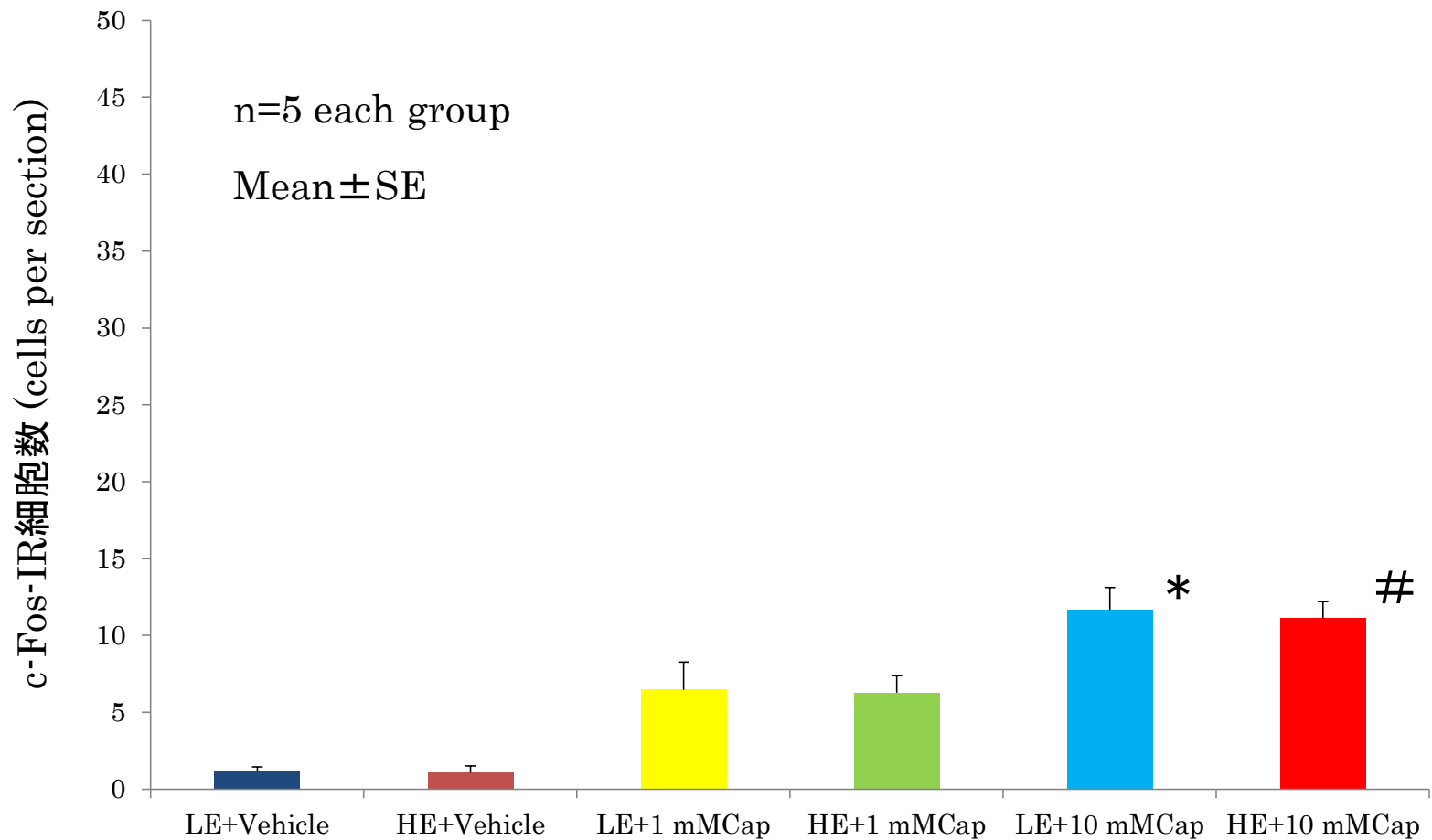


Fig.10 三叉神経脊髄路核Mid Vc浅層部におけるc-Fos-IR細胞数

Vehicle、1 mM、10 mMCap滴下のいずれも、LE群とHE群の間に差はなかった。両群ともに10 mMCap滴下では、Vehicle滴下と比べ有意に増加したが、1 mMCapとの差は認めなかった (ANOVA, *: p<0.01 vs LE+Vehicle, #: p<0.01 vs HE+Vehicle)。

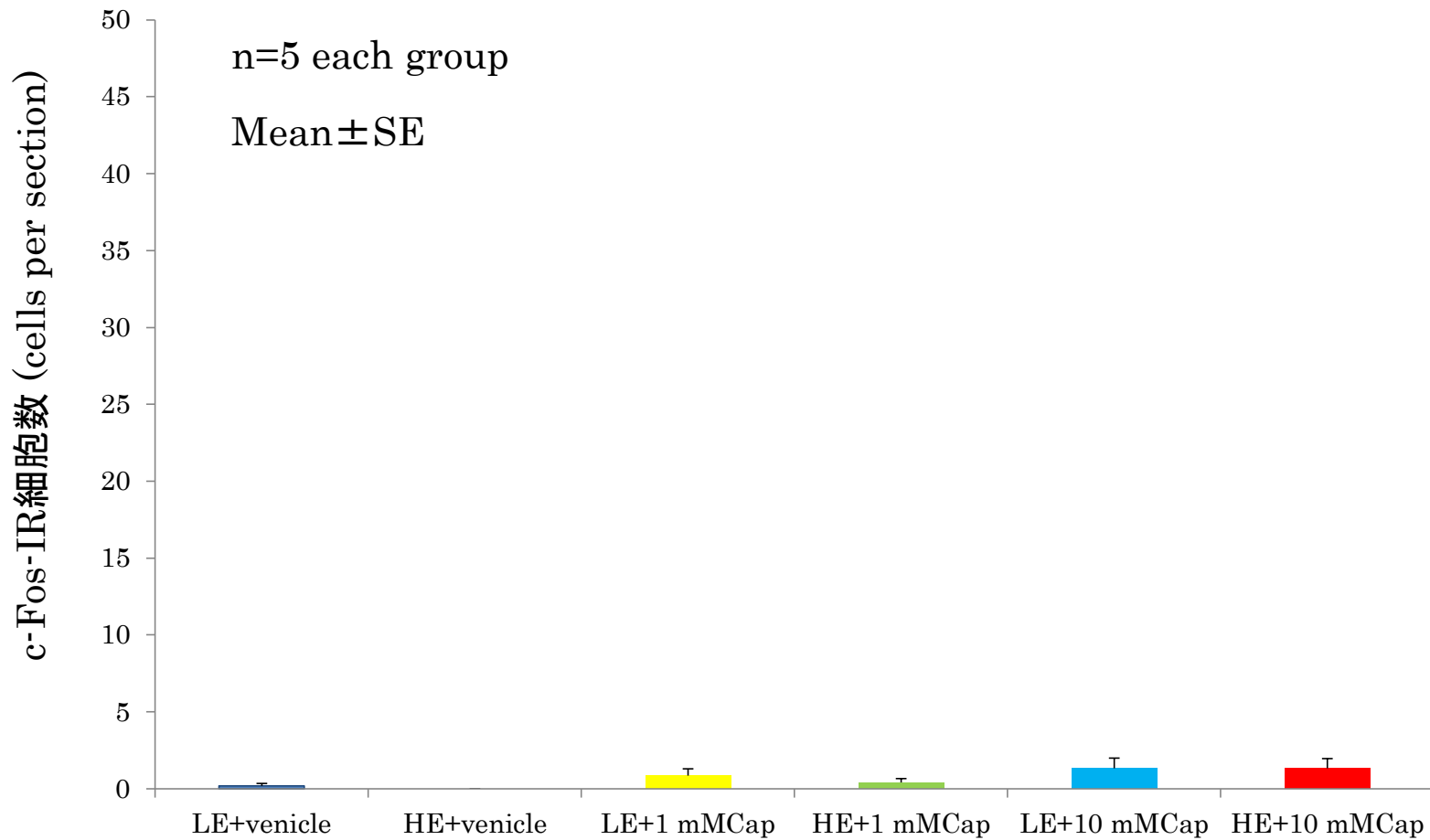


Fig.11 三叉神経脊髄路核Mid Vc大細胞部におけるc-Fos-IR細胞数
いずれの群も発現は3個未満であった。

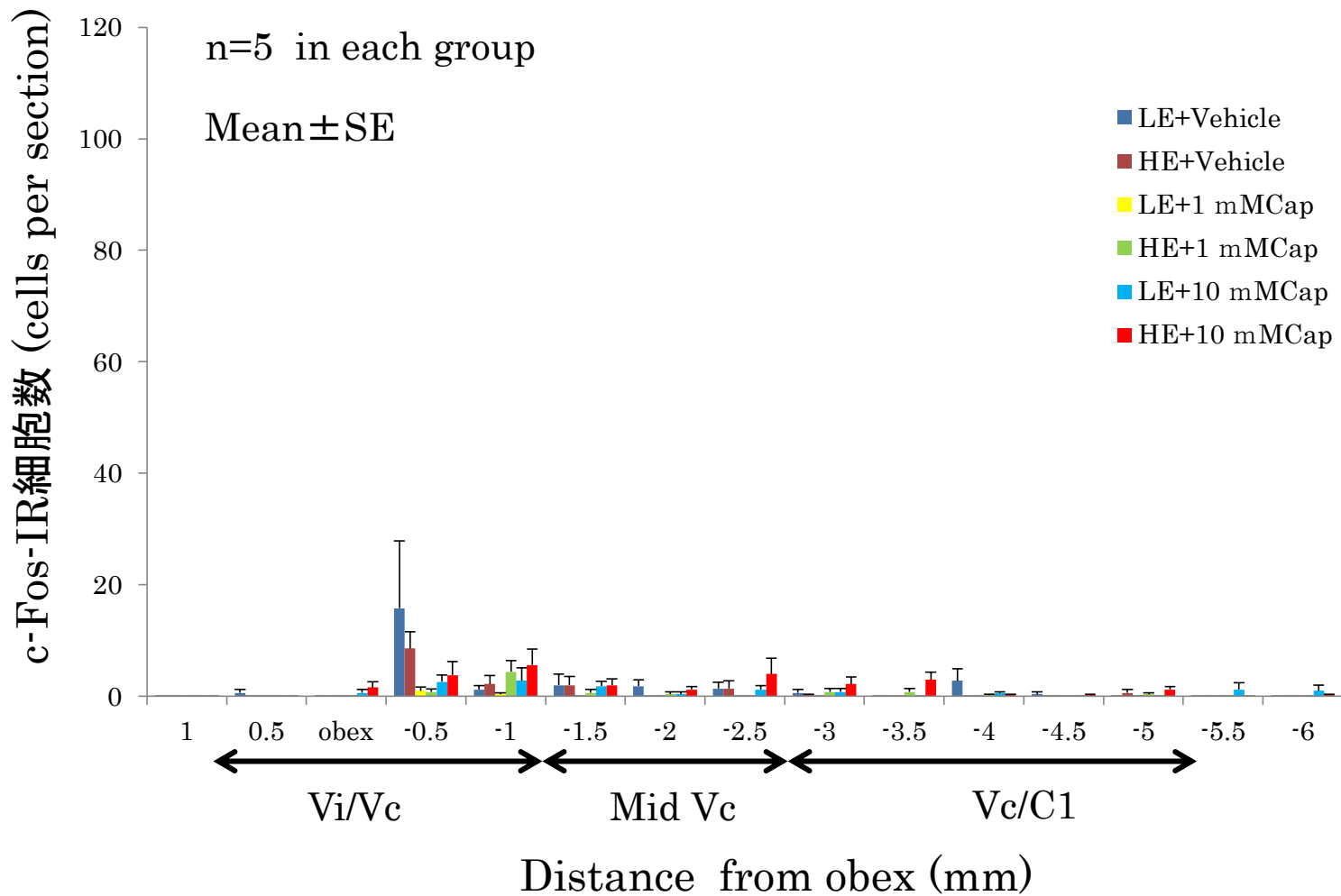
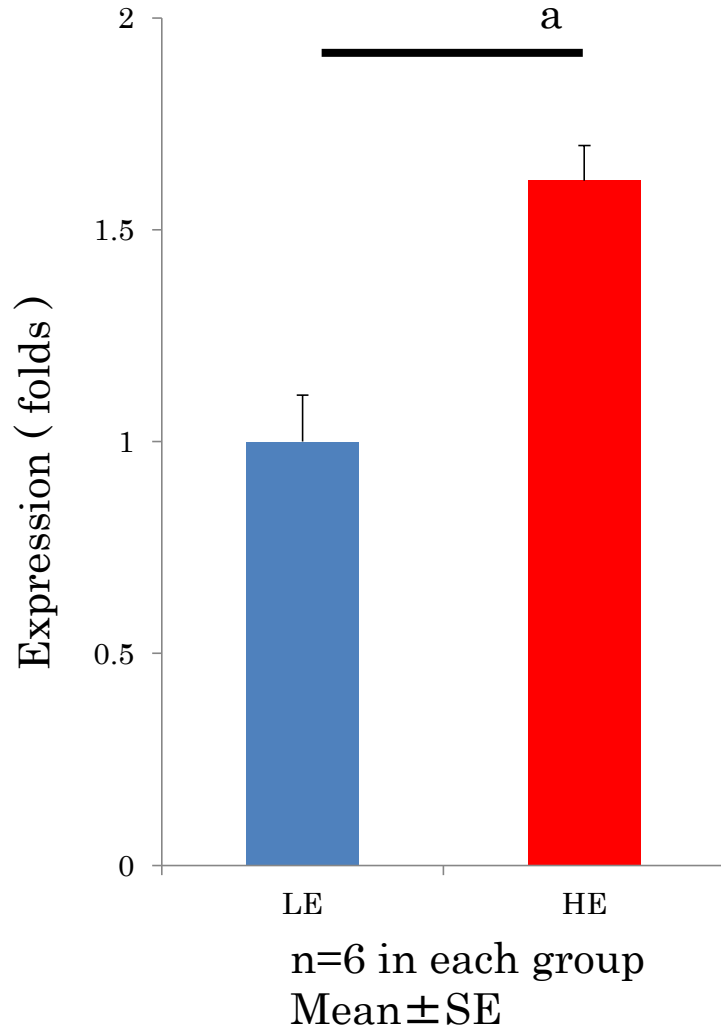


Fig.12 反対側における三叉神経脊髄路核のc-Fos-IR細胞の発現分布
 滴下側と比べると少ないが、反対側でもc-Fos-IR細胞の発現を認めた。

TRPV1 mRNA



ANO1 mRNA

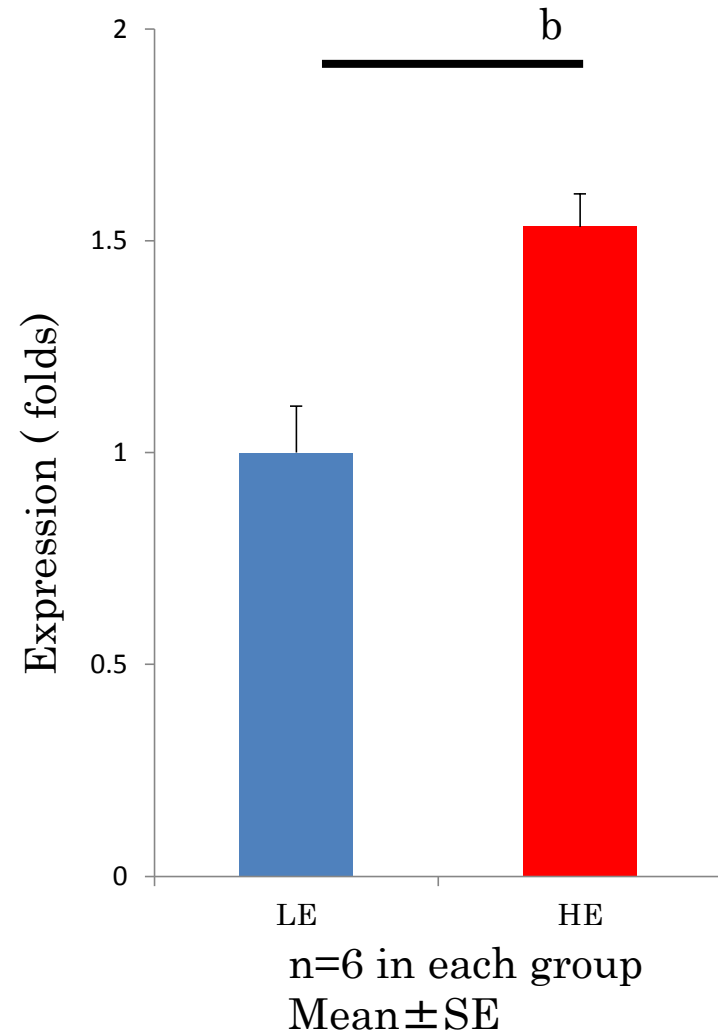


Fig.13 TGにおけるTRPV1とANO1のmRNA発現動態

いずれもHE群の方が有意に発現していた(unpaired *t*-test, a: $p < 0.01$, b: $p < 0.05$ vs LE)。