



Title	オトガイ神経損傷に伴う三叉神経節における非神経細胞の動態
Author(s)	角野, 公紀
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52332
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

オトガイ神経損傷に伴う
三叉神経節における非神経細胞の動態

大阪大学大学院歯学研究科
分子病態口腔科学専攻
口腔分化発育情報学講座
(口腔解剖学第一教室)

角野 公紀

2015年3月

目次

要約	1
緒言	3
材料と方法	8
結果	
1. 三叉神経節におけるサテライト細胞の動態	
(1) 正常動物の三叉神経節における細胞の微細構造	12
(2) オトガイ神経損傷後の三叉神経節における細胞の変化	12
2. 三叉神経節における Iba1 陽性細胞の動態	
(1) 正常動物の三叉神経節における Iba1 陽性細胞の特徴	15
(2) オトガイ神経損傷後の三叉神経節における Iba1 陽性細胞の変化	19
考察	
1. モデル動物の作製について	28
2. 実験に使用したマーカーについて	29
3. オトガイ神経損傷後の三叉神経節ニューロンの変化について	30
4. オトガイ神経損傷後の三叉神経節サテライト細胞の変化について	31
5. オトガイ神経損傷後の三叉神経節 Iba1 陽性細胞の変化について	33
結論	38
謝辞	39
文献	40

要約

末梢感覺神経を損傷すると種々の知覚異常が発症し、それに伴いニューロンやその周囲のグリア細胞等の非神経細胞の動態に変化が認められることが近年注目され、特に中枢ミクログリアと神経損傷後の疼痛との関連について研究が盛んに行われている。ミクログリアに相当する末梢神経系の細胞については明らかにされていないが、ミクログリアのマーカーである ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1)を発現する細胞が感覺神経節に存在することは知られている。しかしながら Iba1 陽性細胞の機能や属性に関しては不明な点が多い。

また軸索に損傷を受けると一次感覺ニューロンの細胞体やその周囲のサテライト細胞等の非神経細胞における各種遺伝子およびタンパクの発現が変化し、活動電位発生の閾値に影響を与えることが知覚異常の発症に関与していると考えられているが、末梢神経系における神経損傷後の非神経細胞の形態学的変化とこれらの分子の発現との関連については未だ不明な点が多い。

そこで本研究では 6 週齢雄性ラットオトガイ神経の慢性絞扼損傷(神経結紮)モデルと神経切断モデルを作製し、三叉神経節におけるサテライト細胞と Iba1 陽性細胞の動態について、透過型電子顕微鏡による形態学的検討及び免疫組織化学的検討を行った。免疫組織化学には Iba1、单球系細胞のマーカーである ED1、サテライト細胞のマーカーである small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel 3 (SK3)に対する抗体を用いた。

正常動物では複数のサテライト細胞がニューロンの全周を緊密に囲んでいたが、神経結紮後 2 週および神経切断後 2 週ではサテライト細胞とニューロンの間に間隙を認め、そこにサテライト細胞が突起を伸延させていた。結紮後 4 週では一部のニューロンで細胞質の部分的な欠損と、その部分でサテライト細胞同士の結合の断裂を認めた。切断後 4 週では多くのニューロンで細胞死の像が認められ、損傷ニューロンを取り囲むサテライト細胞同士の結合も断裂していた。このようなサテライト細胞の結合断裂によって、ニューロン周囲の環境を維持しているイオンやサイトカインの流出が起こり、知覚異常の発症に関与している可能性が考えられる。

また正常動物において、三叉神経節内ニューロン周囲に類円形で短い突起を持つ Iba1 陽性細胞が認められた。これらの Iba1 陽性細胞は ED1 を共発現するが、SK3 は発現せず、微細構造学的にはサテライト細胞の外側の結合組織領域に位置していた。

神経損傷後の三叉神経節内の第 3 枝支配ニューロン領域における Iba1 陽性細胞の数を計測したところ、慢性絞扼損傷モデルでは正常動物と比べ損傷後に細胞数が増加し、損傷後 1 週に細胞数がピークとなった。切断モデルでは神経損傷後 1 週から 2 週にかけて経時的に細胞数が増加を続けた。加えて微細構造を観察したところ、結紮後 2 週では Iba1 陽性細胞はサテライト細胞の外側細胞膜に沿うように突起を伸延させていたが、切断後 2 週では Iba1 陽性細胞が損傷を受けたニューロンとその周囲のサテライト細胞との間の隙間に侵入し、ニューロンの細胞質を取り込んでいる像も観察された。また、神経損傷後に Iba1 陽性細胞の ED1 発現が増加し、特に切断後 2 週で顕著に増加した。

これらのことから、Iba1 陽性細胞が細胞死したニューロンやサテライト細胞の貪食に関する単球系の細胞であることが示された。一方貪食の対象となる細胞の残骸等の少ない慢性絞扼損傷モデルでも、神経損傷後初期に Iba1 陽性細胞数が増加し、サテライト細胞の外側に沿うように長い突起を伸延させていたことから、神経損傷後初期にはサテライト細胞との間で何らかの情報伝達を行っていると考えられる。

以上のことから三叉神経節における Iba1 陽性細胞は免疫応答や貪食に関する細胞であると考えられる。

緒言

口腔顔面領域において、外傷や手術操作等により神経が損傷を受け、その後に痛覚過敏やアロディニア（異痛症）、異所性疼痛等の病的疼痛を発症し、長期に苦しむ患者がしばしば見られる。このような神経因性疼痛の病態生理学的な機序は未だ明らかになっておらず、症状も多様で難治性であることから、臨床において対応に苦慮することが多い。

これまでに臨床的な神経損傷に相当する様々なモデル動物が考案されてきた。特に脊髄神経や坐骨神経を損傷するモデルを用いた研究が盛んに行われており、慢性絞扼損傷モデル、部分結紮モデル、神経部分損傷モデル、神経切断モデルなどが確立されている（Challa, 2014）。また口腔顔面領域の知覚異常に関する研究においても、同様の神経損傷モデルが用いられている。

近年、これらのモデルを用いた知覚異常に関する研究が様々な観点から盛んに行われているが、その発症メカニズムは完全には解明されていない。口腔顔面領域の一般体性感覚は三叉神経が支配しており、一般体性感覚の一次ニューロンは三叉神経節に、二次ニューロンは三叉神経感覚核群（主感覚核および脊髄路核）に存在する。痛覚は主に三叉神経節に細胞体を持つ一次ニューロンによって感覚核群の全ての核および亜核（吻側亜核と尾側亜核）に伝達される。閉口筋の筋紡錘感覺と歯根膜感覺の伝導路は中脳路核を経由し、中脳路核の細胞は運動核に神経線維を送る（寺山と杉本, 2011; 吉田, 2011）。疼痛発症の原因に関する研究は、末梢神経系に属する三叉神経節と中枢神経系に属する感覚核群のそれぞれにおいて行われている。末梢神経系、中枢神経系のいずれにおいてもニューロンのみならずニューロンの近傍に存在するグリア細胞等の非神経細胞が疼痛の発症や持続に関与していることが近年注目されている。

中枢神経系ではグリア細胞としてアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアの存在が知られており、神経損傷後の動態に関する多くの報告がなされている。通常、アストロサイトは細胞外のイオンやタンパク、神経伝達物質の量の調節を行うことで、周囲の環境の恒常性を維持している（Mika et al., 2013）。アストロサイトは神経損傷に反応して活性化し、形態学的には細胞の肥

大化や中間径フィラメントの産生増加が認められ、これに伴い glial fibrillary acidic protein (GFAP) や vimentin、nestin 等の発現増加が観察される。また様々な炎症促進性物質の産生増加が認められることが知られている (Watkins and Maier, 2003)。

オリゴデンドロサイトはニューロン軸索をミエリン化する働きを持つ細胞である (Mekhail et al., 2012)。これにより有髓神経の軸索における跳躍伝導が可能となり、活動電位の発生やニューロンの発火を同期させるよう伝導速度を適切に調節することができると考えられている (Fields, 2008; Ullén, 2009)。軸索が損傷を受け脱髓すると、オリゴデンドロサイト前駆細胞が集まり、再ミエリン化を行う (Mekhail et al., 2012)。

ミクログリアは中枢神経系における免疫担当細胞であり、中枢神経系の状態を監視し、恒常性を維持する重要な役割を持つ。近年、神経損傷後の疼痛との関連が注目され、ミクログリアの研究が盛んである。正常時ではミクログリアは突起を分岐させた形態で細胞間の連絡網を形成しており、休止状態として中枢神経系全体に広く分散し存在している (ラミファイド型ミクログリア)。しかし神経損傷や外傷、毒素などの影響を受けた病的な状況下では瞬時に活性化し、形態学的には突起の短いアメーバ様で、食作用を示すようになる (アメボイド型ミクログリア) (Lecca et al., 2012)。また、ミクログリアに特異的に発現するタンパクであり、マーカーとして広く用いられている ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1) (Imai et al., 1996) が、神経損傷後に発現増加することが知られている (Ito et al., 1998)。ミクログリアによる監視は中枢神経系の秩序を保つ上で不可欠であるが、その一方で過剰に活性化したり制御できない状態に陥ったミクログリアは、アルツハイマー型認知症やパーキンソン病等の神経変性疾患の発症に関与すると考えられている。またニューロンが傷害を受けると、その傷害の程度によってシグナルが放出されるが、それに依存してミクログリアも治癒的な効果を示したり、為害的な作用をもたらしたりすると考えられている (Lai and Todd, 2008; Fumagalli et al., 2011; Lecca et al., 2012)。

一方、末梢神経系ではグリア細胞としてサテライト細胞とシュワン細胞の存在が知られている。サテライト細胞は感覚神経節内のニューロン周囲を全周取り囲んでおり、ニューロンの機能を支持する重要な役割を担っている (Hanani,

2005; Gunjigake et al., 2009; Katagiri et al., 2012)。サテライト細胞には内向き整流性 K⁺チャネル Kir4.1、ギャップジヤンクションを構成するサブユニットである connexin-43 (Cx43)、プリン受容体である P2Y₄受容体、可溶性グアニル酸シクラーゼ、低コンダクタンス Ca²⁺活性型 K⁺チャネル 3 (small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel 3: SK3) など、特異的なタンパクが発現している (Vit et al., 2006)。これらによって他の細胞からのシグナルを受容したり、周囲の環境変化に反応し自らシグナルを放出することで、ニューロン周囲の局所的環境を調節し、ニューロンの活動に影響を与えていている (Pannese et al., 2003; Hanani, 2005; Gunjigake et al., 2009)。これまでに神経損傷後の変化として、形態学的にはサテライト細胞の細胞増殖、結合組織領域への突起伸延、サテライト細胞同士間のギャップジヤンクション増加 (Hanani, 2005)、また GFAP や S100A4 発現増加 (Hanani, 2005)、Kir4.1 発現減少 (Tang et al., 2010)、低親和性ニューロトロフィン受容体 p75NTR の発現増加 (Nadeau et al., 2014) や P2Y₁₂受容体の発現増加 (Katagiri et al., 2012) なども報告されており、神経損傷後の疼痛発症機序にサテライト細胞が関与している。

シュワン細胞は軸索周囲を取り囲むことで多層膜状構造のミエリン鞘を形成し、軸索を絶縁ならびに支持する働きを持つ。ミエリン化された領域の間にはミエリン鞘の存在しないランヴィエの絞輪が存在し、この部分で活動電位が起こると、次の絞輪部まで活動電位が瞬時に伝播するため、跳躍伝導を可能にしている (Nave, 2010; Glenn and Talbot, 2013)。シュワン細胞はミエリン鞘形成に加え、末梢神経損傷後の再生過程である Wallerian 変性にも関与していることが知られている。シュワン細胞は分裂が終了している細胞であるが、神経損傷に反応して軸索から離れ脱分化し、自らが形成したミエリン鞘の貪食に関与するとともに、マクロファージを誘導しミエリン鞘の残骸を排除させる。軸索が再生するとシュワン細胞は再分化し、軸索の再ミエリン化を行う (Chen et al., 2007; Glenn and Talbot, 2013)。

このように中枢神経系、末梢神経系のそれぞれにおいてグリア細胞は神経系を維持する様々な働きを有している。これらは独立した細胞であるが、各グリア細胞が持つ働きや特異的に発現するタンパクなどの共通点から、中枢神経系

のグリア細胞と末梢神経系のグリア細胞は互いに類似する働きを持つ細胞であると考えられている。アストロサイトとサテライト細胞は共にカリウムチャネルやカルシウムチャネルを介してニューロン周囲の環境を維持し、GFAP を発現している (Nadeau et al., 2014)。また SK3 も両細胞で発現することが報告されている (Armstrong et al., 2005; Vit et al., 2006)。オリゴデンドロサイトとシュワン細胞はともにニューロン軸索のミエリン化に関与し、ATP 結合カセット輸送体 A2 (ATP-binding cassette transporter A2: ABCA2) を発現する (Zhou et al., 2002)。一方ミクログリアに相当する末梢神経系の細胞については明らかにされていないものの、ミクログリアのマーカーである Iba1 が、脊髄後根神経節や三叉神経節などの末梢感觉神経節内の細胞に発現することが報告されている。しかしながらこの Iba1 陽性細胞はマクロファージであるとする見解 (Franceschini et al., 2013; Ton et al., 2013) や、ミクログリアであるとする見解 (Mori et al., 2003; Patro et al., 2010) があり、統一された意見がない。また「ミクログリア」は中枢神経系に存在する細胞の呼称として定義されており、末梢感觉神経節内の細胞に対して用いるのは自然でないと考える。

以上のように、中枢神経系および末梢神経系におけるグリア細胞等の非神経細胞の動態が神経損傷後に変化し、知覚異常の発症や持続に関与していることが明らかになりつつある。しかしながら末梢神経系における神経損傷後の非神経細胞の形態学的变化と各種遺伝子およびタンパクの発現との関連については不明な点が多い。例えばサテライト細胞は上述のようにニューロン周囲を緊密に取り囲むことでその局所的環境の維持に関与し、神経損傷後にはニューロンとサテライト細胞の両者がシグナルを放出することが知られている (Pannese et al., 2003; Hanani, 2005; Gunjigake et al., 2009)。このシグナルが拡散していくことでその領域における神経興奮性が亢進し、神経因性疼痛を発症すると考えられているが (Hanani, 2012)、シグナルの拡散経路については十分に明らかになっていない。また、アストロサイトやミクログリアは神経損傷後に劇的に形態変化が認められることが知られているが (Watkins and Maier, 2003; Lecca et al., 2012)、サテライト細胞の形態変化については報告が少なく、光学顕微鏡レベルでは形態変化がほとんどないと考えられている。しかしながらサテライト細胞

はニューロンの周囲に密接して、薄く取り巻いている構造をしていることから、光学顕微鏡ではニューロンの細胞膜との判別も困難であるため、電子顕微鏡によるさらなる詳細な観察が必要であると考える。一方末梢感覺神経節内の存在が近年報告されている Iba1 陽性細胞は、上述のように研究者によって呼称が異なるだけでなく、その動態や細胞の役割についても、ニューロンの保護作用を持つのか、貪食能を持つのか、見解が統一されていない (Mori et al., 2003; Patro et al., 2010; Franceschini et al., 2013; Ton et al., 2013)。また、これまでの末梢神経系に関する研究は後根神経節を対象とした報告が多く、三叉神経節を対象としたものは少ないため、三叉神経節における非神経細胞の動態を解明することは口腔顔面領域の神経因性疼痛の治療に際して標的となる因子の特定に繋がり、非常に有意義である。そこで本実験では、三叉神経節における非神経細胞であるサテライト細胞と Iba1 陽性細胞の神経損傷後の動態に着目した。口腔顔面領域の臨床において、浸潤麻酔操作やインプラント埋入術、頸骨内腫瘍や口腔粘膜疾患の処置に伴う切開、著しく吸収した頸堤に装着した義歯による神経圧迫など、様々な原因による神経損傷の結果、知覚異常を発症する事例が多いオトガイ神経を本実験における損傷の対象として選択した。臨床的にも神経損傷の様式によって様々な知覚異常の症状を呈することから、慢性絞扼損傷モデルと神経切断モデルの 2 つのモデルを作製し、これらの細胞の動態を形態学的及び組織化学的に検討、比較した。

材料と方法

1. 実験動物

実験には、6～10週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラット（体重 200～400 g）30匹を用いた。明期 12 時間、暗期 12 時間の光条件下で固形飼料を与え、自由摂食・摂飲として飼育した。本実験は大阪大学大学院歯学研究科動物委員会の定める実験動物ガイドラインに従って行った。

2. モデル動物の作製

本実験ではオトガイ神経の慢性絞扼損傷（神経結紮）モデルと神経切断モデルを作製した。4%抱水クロラール（10 ml/kg b.w.）の腹腔内投与による麻酔下でラットの両側下口唇から頬部にかけて剃毛後、左側口角部後方の皮膚に切開を加え、左側オトガイ孔と左側オトガイ神経を剖出した。慢性絞扼損傷モデルでは、オトガイ神経のオトガイ孔から約 1 mm の位置で、神経に接する程度に緩く 1 力所 3-0 絹糸で結紮した。神経切断モデルでは、軸索の再生を防ぐためにオトガイ神経のオトガイ孔から約 1 mm の位置と約 3 mm の位置の 2 力所に強く 3-0 絹糸で結紮後、その間の軸索を切断、除去した。両モデルとも創部は合成吸収性縫合糸にて縫合した。反対側は sham ope として皮膚切開のみを行い、同様に縫合した。

3. 試料作製

神経損傷から 1 週後、2 週後、4 週後に試料を採取した。4%抱水クロラール（40 ml/kg b.w.）の腹腔内投与による深麻酔下でラットの心臓内にカテーテルを挿入し、0.02 M リン酸緩衝生理食塩水（phosphate-buffered saline: PBS, pH 7.4）で瀉血した。電子顕微鏡で微細構造を観察する試料については 2% グルタールアルデヒドおよび 1% パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液（phosphate buffer: PB, pH 7.2）、また免疫組織化学に供するものは 0.05% グルタールアルデヒドおよび 4% パラホルムアルデヒド含有 0.1 M PB、あるいは 4% パラホルムアルデヒド含有 0.1 M PB で灌流固定を行った。左右の三叉神経節を摘出し、4% パラホルム

アルデヒド含有 0.1 M PB にて 2~3 日後固定を行い、20% スクロース含有 0.02 M PBS に浸漬し、4°C で保存した。その後、クライオスタッフ (Leica CM3050 S) を用いて厚さ 40 μm の凍結切片を作製した。

4. 透過型電子顕微鏡切片の作製

微細構造の観察を行うものについては、凍結切片を 0.02 M PBS で洗浄後、三叉神経節の第 3 枝支配ニューロンを含む領域が中心となるように実体顕微鏡下でトリミングした。0.1 M PB にて洗浄後、1% 四酸化オスミウム (OsO_4) 含有 0.1 M PB で室温にて 20 分間反応させた。再度 0.1 M PB にて洗浄後、上昇エタノール系列で脱水し、プロピレンオキサイドに浸漬、Epok812 レジン（応研商事株式会社）に包埋して 60°C で一晩重合させた。三叉神経節第 3 枝支配ニューロンを含む領域をトリミングし、ウルトラミクロトーム (Leica EM UC6) にて厚さ 70 nm の超薄切片を作製し、Cu グリッド（応研商事株式会社）上に貼付けた。乾燥後、飽和酢酸ウランで 10 分間染色、蒸留水で洗浄後さらに 0.4% クエン酸鉛にて 5 分間染色することで電子染色を行った。蒸留水で洗浄し乾燥させ、透過型電子顕微鏡（日立 H-7650）にて観察した。

5. 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色は ABC 法 (avidin-biotin peroxidase complex method) (Hsu et al., 1981) および蛍光標識抗体法を行った。ABC 法では、まず作製した切片を 0.02 M PBS で洗浄後、内因性 peroxidase を不活化するため 0.3% 過酸化水素水を含む 0.02 M PBS で 30 分間処理した。0.02 M PBS で洗浄後、非特異的反応を抑制するため、室温で 1% normal goat serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA)、1% normal horse serum (Vector Laboratories)、1% normal swine serum (Vector Laboratories)、1% bovine serum albumin (BSA; Sigma, St. Louis, MO) を含む PBS で 30 分間ブロッキングを行ったのち、一次抗体として抗 Iba1 抗体（表 1）を 16~18 時間反応させた。0.02 M PBS で洗浄後、ビオチン標識二次抗体（表 2）を 90 分間反応させ、0.02 M PBS で洗浄後に ABC 試薬 (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories) を 90 分間反応させた。その後 0.02 M PBS、続いて 0.05 M トリス塩酸緩衝食塩水

(Tris-HCl buffered saline: TBS, pH 7.6) にて洗浄し、DAB 溶液 (0.04% 3, 3-diaminobenzidine および 0.003% 過酸化水素水含有 TBS) にて可視化し、0.08% ~0.1% 硫酸ニッケルアンモニウムで増感した。以上の反応後、0.05 M TBS、0.02 M PBS、蒸留水の順に洗浄し、ゼラチン表面処理を行ったスライドガラスに浮遊切片を貼付し、乾燥させた。メチレンブルーで対比染色を行い、上昇エタノール系列による脱水とレモゾールによる透徹後、マリノールにて封入し、光学顕微鏡にて観察した。一部の切片は DAB 溶液反応後、先に記した方法に従い透過型電子顕微鏡で観察した。

蛍光標識抗体法については、一次抗体（表 1）と反応させた後 0.02 M PBS で洗浄し、蛍光標識二次抗体（表 2）と 90 分間反応させた。0.02 M PBS、蒸留水の順に洗浄し、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories) で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM700) で観察した。また Iba1 と ED1、SK3 と ED1 の関係を明らかにするため、蛍光二重染色を行った。

表 1. 使用した一次抗体

抗体	動物種	製造	使用濃度	標識する細胞
抗 Iba1	ウサギ	Wako, Osaka, Japan	1:200	ミクログリア
抗 ED1	マウス	AbD Serotec, Oxford, UK	1:200	単球系細胞
抗 SK3	ウサギ	Alomone Labs, Jerusalem, Israel	1:200	アストロサイト サテライト細胞

表 2. 使用した二次抗体

抗体	製造	使用濃度
ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体	Dako, Glostrup, Denmark	1:500
Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体	Molecular Probes, Eugene, OR	1:250
Cy3 標識抗マウス IgG 抗体	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA	1:250

6. 定量解析

オトガイ神経の慢性絞扼損傷モデルおよび神経切断モデルの両側三叉神経節における、神経損傷から 1 週後、2 週後の Iba1 陽性細胞数を計測し、正常動物と比較した。損傷側および反対側の三叉神経節内の第 1 枝支配ニューロン領域、第 2 枝支配ニューロン領域、第 2 枝および第 3 枝支配ニューロン混合領域、第 3 枝支配ニューロン領域（図 1）のそれについて 18 枚ずつ共焦点レーザー顕微鏡を用いて $160 \mu\text{m} \times 160 \mu\text{m}$ の視野で撮影した。この撮影を正常動物、神経損傷から 1 週後、2 週後の各群について 3 匹ずつ行い、各領域につき 54 視野の画像を得た。DAPI で標識された核を含有する Iba1 陽性細胞の数を計測し、一視野あたりの平均値 \pm 標準誤差を求めた。統計学的評価には Wilcoxon の順位和検定を用い、 $p < 0.01$ で有意とした。

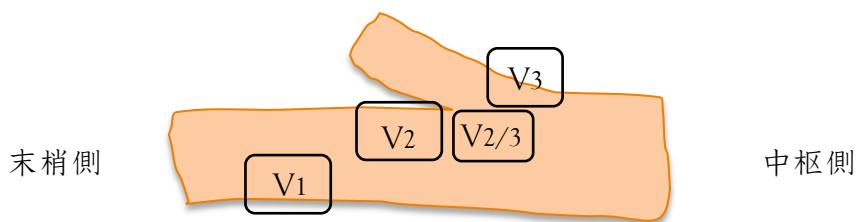


図 1. 三叉神経節における各枝支配ニューロンの局在

三叉神経節の各枝支配ニューロン領域について撮影を行った部位を示す。

V1: 第 1 枝支配ニューロン領域

V2: 第 2 枝支配ニューロン領域

V3: 第 3 枝支配ニューロン領域

V2/3: 第 2 枝および第 3 枝支配ニューロン混合領域

結果

1. 三叉神経節におけるサテライト細胞の動態

(1) 正常動物の三叉神経節における細胞の微細構造

正常動物の三叉神経節内の細胞を透過型電子顕微鏡にて観察すると、ニューロンの細胞膜の輪郭の形態は滑らかで、核が細胞の中心に位置し、核膜の輪郭は円形であった。細胞質内では、ミトコンドリアや小胞体などの細胞内小器官の構造を鮮明に確認することができた。また1つのニューロンの周囲に複数のサテライト細胞が認められ、同一のニューロンを取り囲んでいるサテライト細胞同士は連結しており、ニューロン表面が周囲の結合組織領域に対して露出しているような部分は認められなかった（図2A）。これらのサテライト細胞はニューロン全周を細胞膜に沿うように緊密かつ滑らかに取り囲んでおり、両者間に間隙はほとんど認められなかった（図2B,C）。

(2) オトガイ神経損傷後の三叉神経節における細胞の変化

オトガイ神経損傷後、損傷側の三叉神経節内の第3枝支配ニューロン領域を観察した。

神経結紮後2週では、ニューロンの細胞膜の輪郭の形態が波状に変化していたが、核は細胞の中心に位置し、核膜の輪郭の形態も円形のまま維持されていた。また細胞質や細胞内小器官には明らかな変化は認められなかった（図3A）。正常時と同様にニューロン周囲には複数のサテライト細胞が認められ、同一のニューロンを取り囲んでいるサテライト細胞同士の結合は維持されていた。しかしながらニューロンとサテライト細胞の間に間隙を認め、その部分にサテライト細胞が複雑な突起を伸延させていた（図3B）。

神経結紮後4週では、ニューロンに関しては神経結紮後2週とほぼ同様の像が認められた。また大部分では同一のニューロンを取り囲んでいるサテライト細胞同士の結合は維持されていた。しかしながらニューロンとサテライト細胞の間の間隙が神経結紮後2週より拡大しており、サテライト細胞の突起もさらに伸延して、ニューロン表面に接していた（図4A,B）。さらに、一部のニ

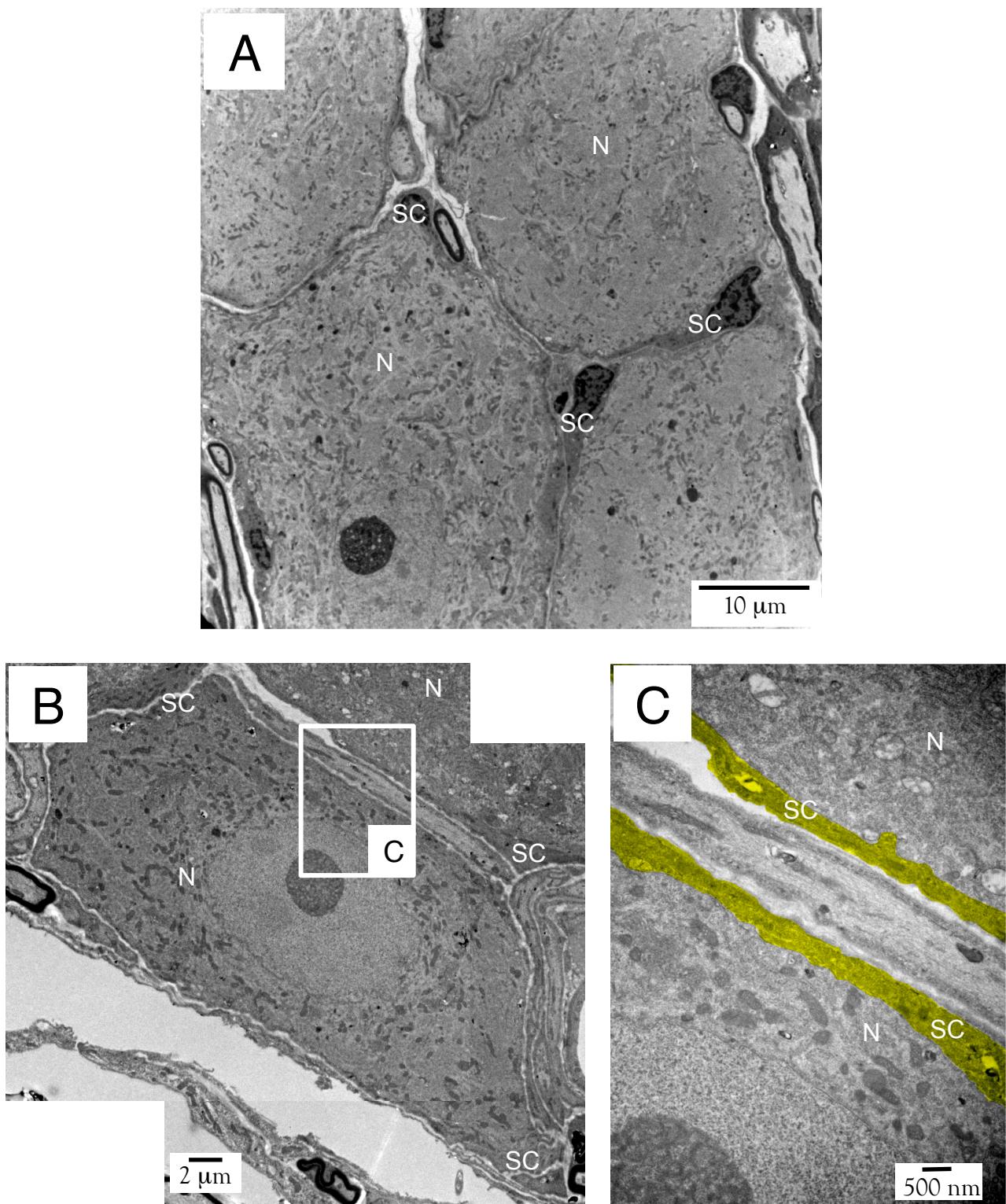


図2. 正常動物の三叉神経節における細胞の微細構造

A: ニューロンの周囲に複数のサテライト細胞を認める。B: ニューロン全周はサテライト細胞によって緊密かつ滑らかに囲まれている。C: Bの白枠で囲まれた領域の拡大像。サテライト細胞（黄色）とニューロンの間に隙間はほとんど認めない。

N: neuron, SC: satellite cell

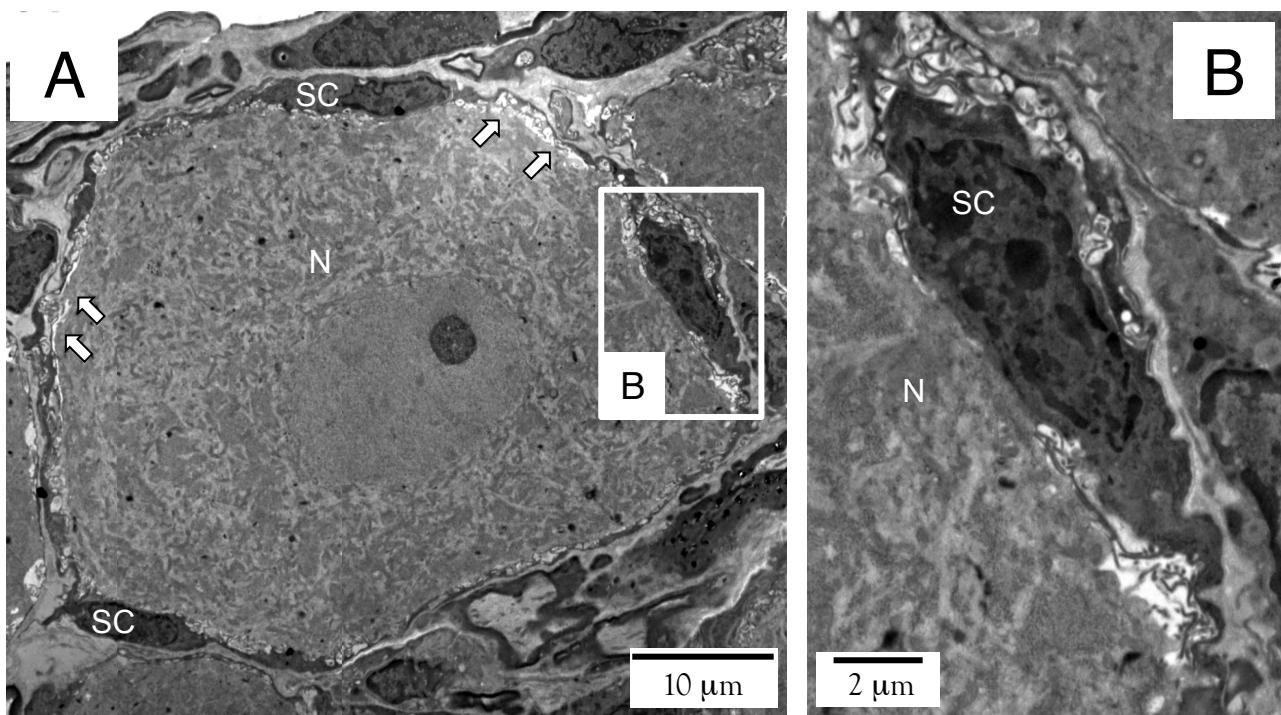


図3. オトガイ神経結紮後2週の三叉神経節における細胞の微細構造

A: ニューロン細胞膜の形態が波状（白矢印）に変化しているが、細胞質や細胞内小器官に明らかな変化を認めない。B: Aの白枠で囲まれた領域の拡大像。ニューロンとサテライト細胞との間に隙間を認め、その部分にサテライト細胞が複雑な突起を伸延させている。

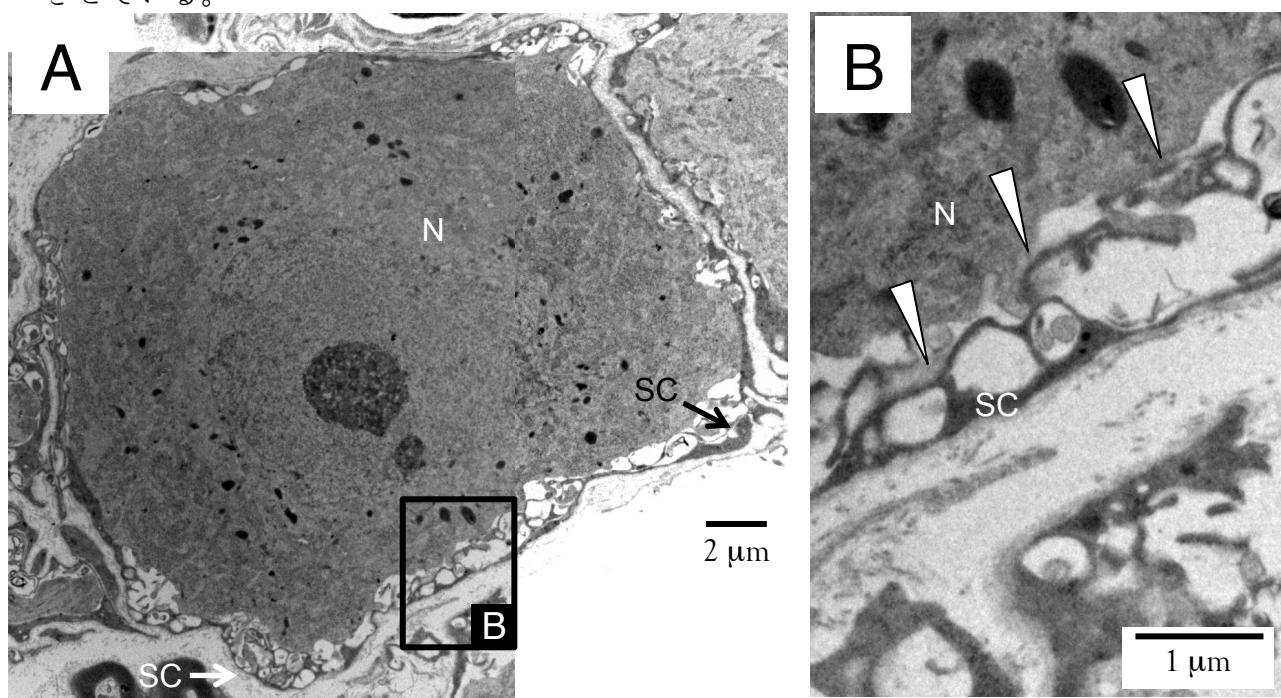


図4. オトガイ神経結紮後4週の三叉神経節における細胞の微細構造

A: ニューロンに関しては神経結紮後2週と同様の像を認めるが、ニューロンとサテライト細胞の間の隙間が神経結紮後2週より拡大している。B: Aの黒枠で囲まれた領域の拡大像。サテライト細胞の突起（矢頭）がさらに伸延し、ニューロン表面に接している。

N: neuron, SC: satellite cell

ニューロンでは細胞質が大きく欠損し、残存する細胞質内に電子密度の高い小粒状構造（リポフスチン顆粒）を多数認める場合もあった。細胞質が欠損した部分ではサテライト細胞も消失しており、同一のニューロンを取り囲んでいるサテライト細胞同士の結合はその部分で断裂していた（図 4C）。

神経切断後 2 週では、ニューロンは神経結紮後と比較し重度に変性しており、細胞膜の輪郭の形態は波状に著しく変化、ミトコンドリアや小胞体などの細胞内小器官の構造は明瞭に確認することができなかった（図 5A）。ニューロン細胞質内に空胞が形成されている場合もあった（図 5C）。ニューロンとサテライト細胞の間の間隙も神経結紮後に比べさらに拡大していた。この間隙内にサテライト細胞の突起を認めた。サテライト細胞も細胞質の変性が強く、空胞が形成されて細胞質の形態が不整となり、細胞内小器官の構造が判別できなかった（図 5B）。

神経切断後 4 週では、ニューロンの細胞膜の輪郭の形態は波状というよりは、えぐられたように凹凸が大きい形態となり、核膜も波状に変形していた。細胞内小器官の構造は不明瞭であった。細胞質内にリポフスチン顆粒を認める場合も多かった。ニューロンとサテライト細胞の間の間隙は神経切断後 2 週よりさらに拡大していた。サテライト細胞の突起は一部では認められたが神経結紮後ほど多くなく、大部分はニューロンと接しておらず、ニューロンとの間の空隙が目立っていた。また同一のニューロンを取り囲んでいるサテライト細胞同士の結合は断裂している場合が多くあった（図 6A, B）。ニューロンの細胞質が消失し、周囲に断裂したサテライト細胞だけが残されている像を認める場合もあった（図 6C）。

2. 三叉神経節における Iba1 陽性細胞の動態

(1) 正常動物の三叉神経節における Iba1 陽性細胞の特徴

正常動物の三叉神経節において Iba1 に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行うと、三叉神経節内に類円形で短い突起を持った Iba1 陽性細胞が広く散在していた。これらは特にニューロンを含む領域に多く認められ、分布に偏りは無く、均一に認められた（図 7A, B）。

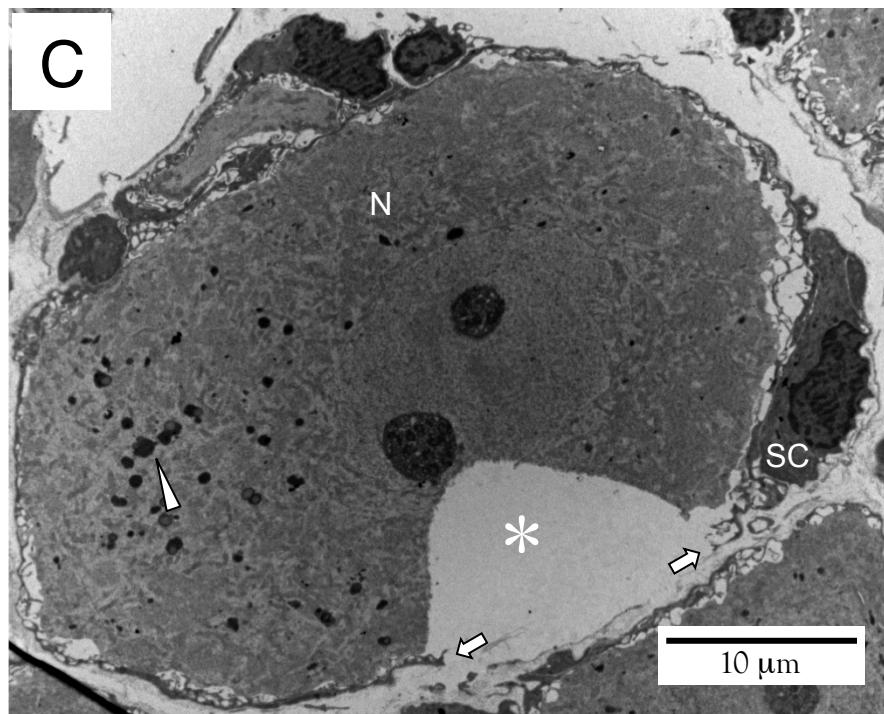


図4. オトガイ神経結紮後4週の三叉神経節における細胞の微細構造

C: ニューロンの細胞質が大きく欠損し（*）、残存する細胞質内にリポフスチン顆粒（矢頭）を認める。細胞質が欠損した部分ではサテライト細胞が消失し、サテライト細胞同士の結合が断裂している（2つの白矢印の間の部分）。

N: neuron, SC: satellite cell

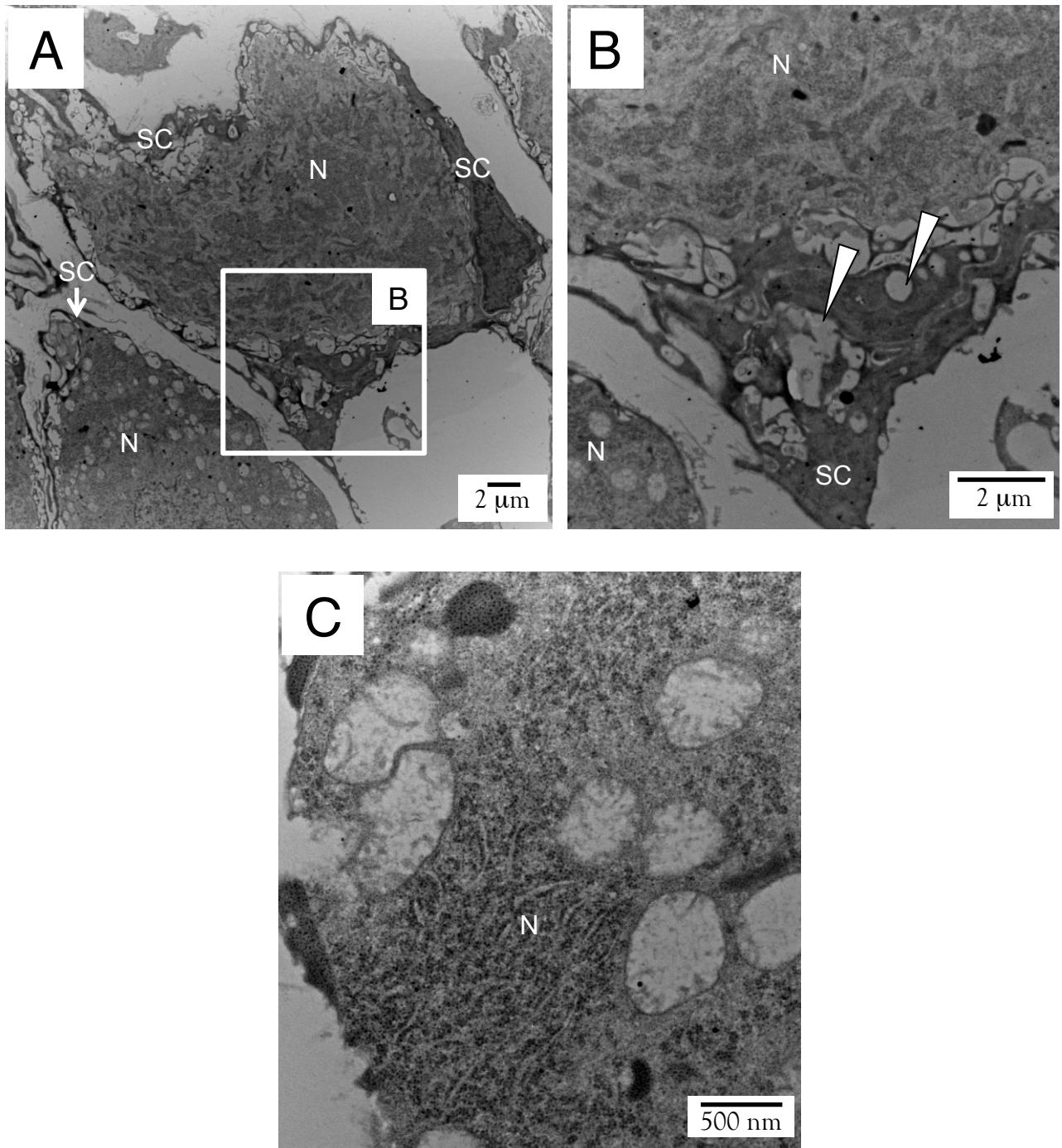


図5. オトガイ神経切断後2週の三叉神経節における細胞の微細構造

A: ニューロンの細胞膜が波状に変化し、細胞内小器官の構造は明瞭に確認することができない。神経結紮後と比較し、強く変性している。B: Aの白枠で囲まれた領域の拡大像。神経結紮後と比較し、ニューロンとサテライト細胞の間の間隙がさらに拡大している。サテライト細胞の細胞質の変性が神経結紮後より強く、空胞（矢頭）の形成を認める。C: ニューロンの細胞質内に多数の空胞変性像を認める。

N: neuron, SC: satellite cell

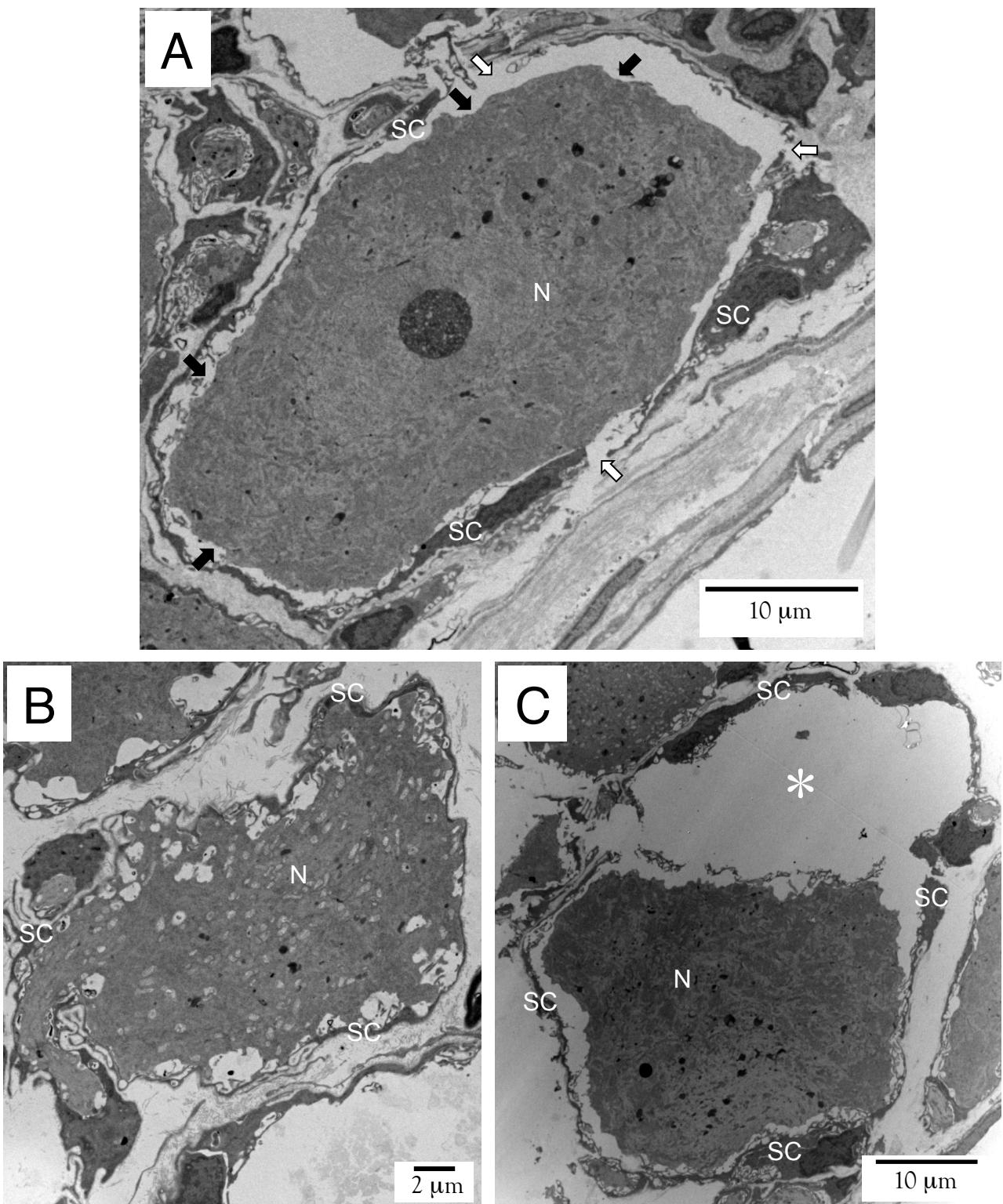


図6. オトガイ神経切断後4週の三叉神経節における細胞の微細構造

A: ニューロンの細胞膜が凹凸状に変化し（黒矢印）、細胞内小器官の構造は明瞭に確認することができない。ニューロンとサテライト細胞の間の間隙がさらに拡大し、大きな空隙となっている。サテライト細胞同士の結合が断裂している（白矢印）。

B: ニューロンの細胞膜の凹凸が大きくなり、細胞質内に空胞が多数形成されている。

C: ニューロンの細胞質が消失し（*）、周囲に断裂したサテライト細胞だけが残存している。

N: neuron, SC: satellite cell

次に Iba1 陽性細胞がどのような属性を有するかを検討するため、ED1 や SK3 を用いた蛍光二重染色を行った。すべての Iba1 陽性細胞は ED1 を共発現していたが、細胞によって発現量が多い場合と少ない場合があった。Iba1 は細胞膜や突起に発現しているため、その細胞の輪郭を形取るのに対し、ED1 は細胞膜や細胞質内に点状あるいは点の集合のように発現していた（図 8A）。一方、SK3 はニューロンの周囲を取り囲むような細いリング状に発現しており、ED1 と SK3 は共局在していなかった（図 8B）。さらにサテライト細胞と Iba1 陽性細胞の関係を詳細に確認するために、免疫組織化学染色後、透過型電子顕微鏡にて観察すると、ニューロン周囲を緊密に取り囲むようにサテライト細胞が認められ、その外側の結合組織領域に Iba1 陽性細胞が位置していた（図 9A）。細胞質から細胞表面の突起までほぼ全体的に、免疫染色によって電子密度が高くなっていた（図 9B）。以上のことから Iba1 陽性細胞はサテライト細胞とは異なる細胞であり、貪食能を有する単球系細胞であることが示された。

(2) オトガイ神経損傷後の三叉神経節における Iba1 陽性細胞の変化

オトガイ神経の慢性絞扼損傷モデルおよび神経切断モデルの両側三叉神経節における、神経損傷から 1 週後、2 週後の Iba1 陽性細胞を観察し、正常動物と比較した。

正常動物の三叉神経節では両側とも、Iba1 陽性細胞は前節 2-(1)（図 7B, 8A）で観察されたようにニューロンを含む領域内で均一に分布し、類円形で短い突起を有していた（図 10A）。神経損傷後の反対側では、正常動物と比較し明らかな変化を認めなかった（図 10B）。しかし神経結紮後の損傷側では、ニューロン周囲に Iba1 陽性細胞が多数集積しており、一部ではニューロンを取り囲むように位置し、長い突起を伸延させていた。この様子は、サテライト細胞がニューロンを取り囲む像に類似していた（図 10C, D）。神経切断後の損傷側でも同様に、ニューロン周囲への Iba1 陽性細胞の集積と突起の伸延が認められた（図 10 E, F）。

一視野あたりの Iba1 陽性細胞数の定量的解析を行った。慢性絞扼損傷モ

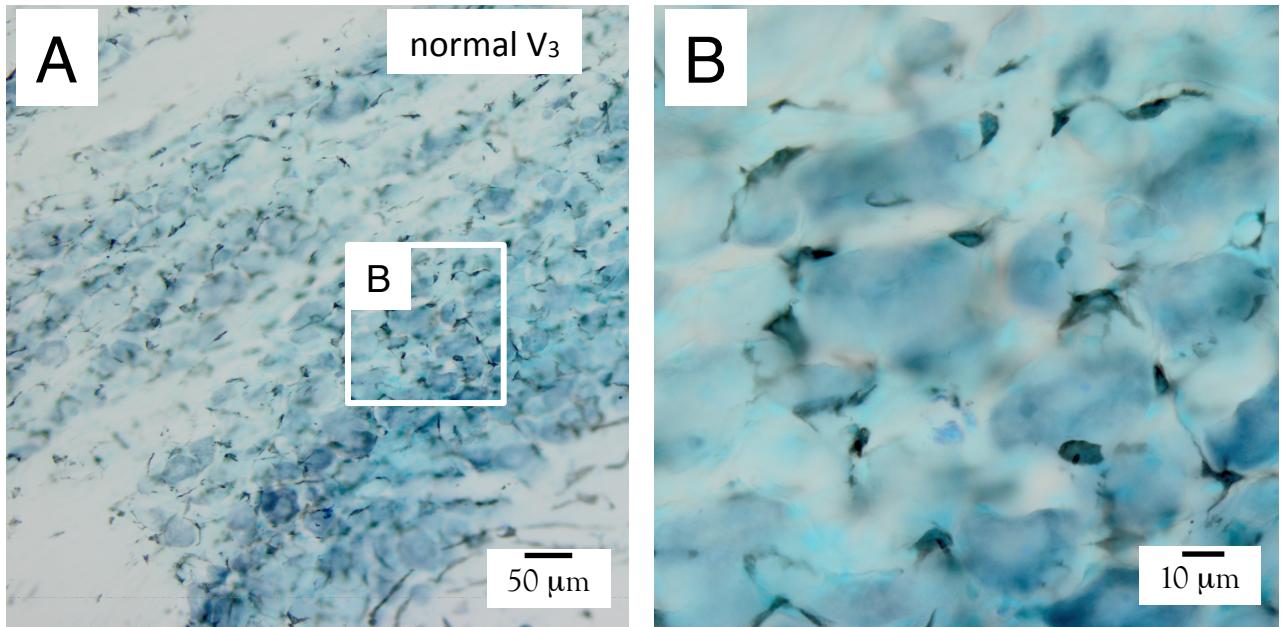


図7. 正常動物の三叉神経節におけるIba1陽性細胞の光学顕微鏡像

A: Iba1陽性細胞は三叉神経節内に広く散在しているが、特にニューロンを含む領域に多く認める。B: Aの白枠で囲まれた領域の拡大像。Iba1陽性細胞の形態は類円形で、短い突起を有している。

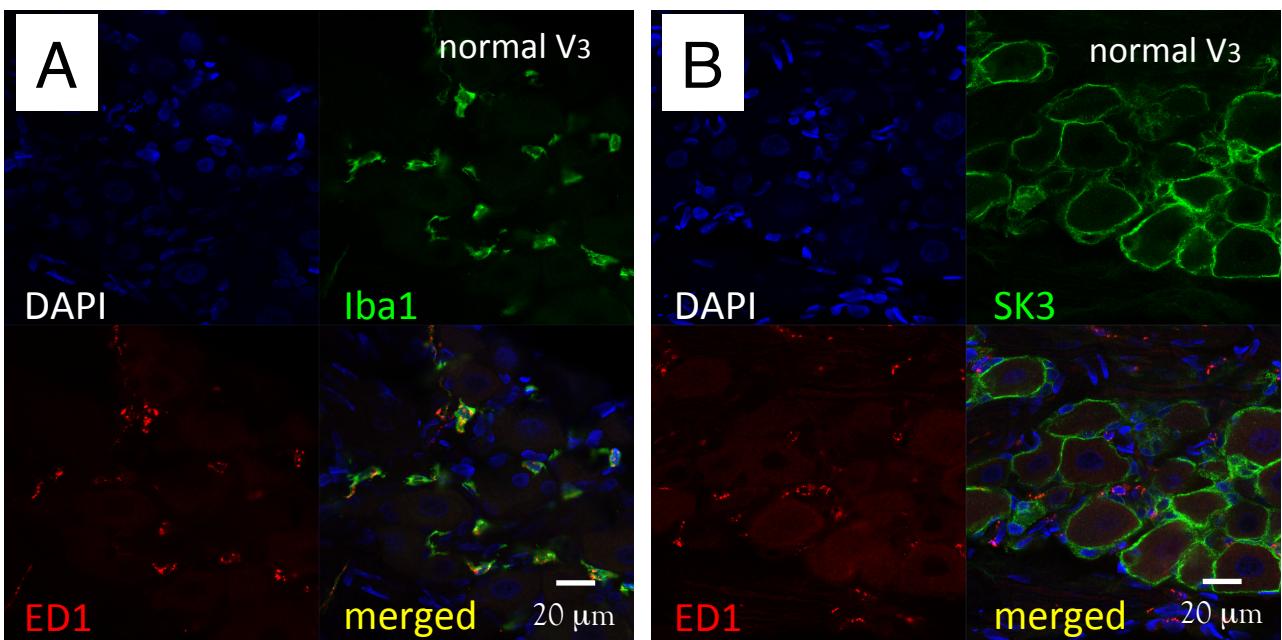


図8. 正常動物の三叉神経節におけるIba1陽性細胞の蛍光顕微鏡像

A: Iba1陽性細胞はED1を共発現する。ED1はIba1陽性細胞内に点状に発現している。B: ED1陽性細胞はSK3を発現せず、SK3はニューロンを取り囲むように発現している。

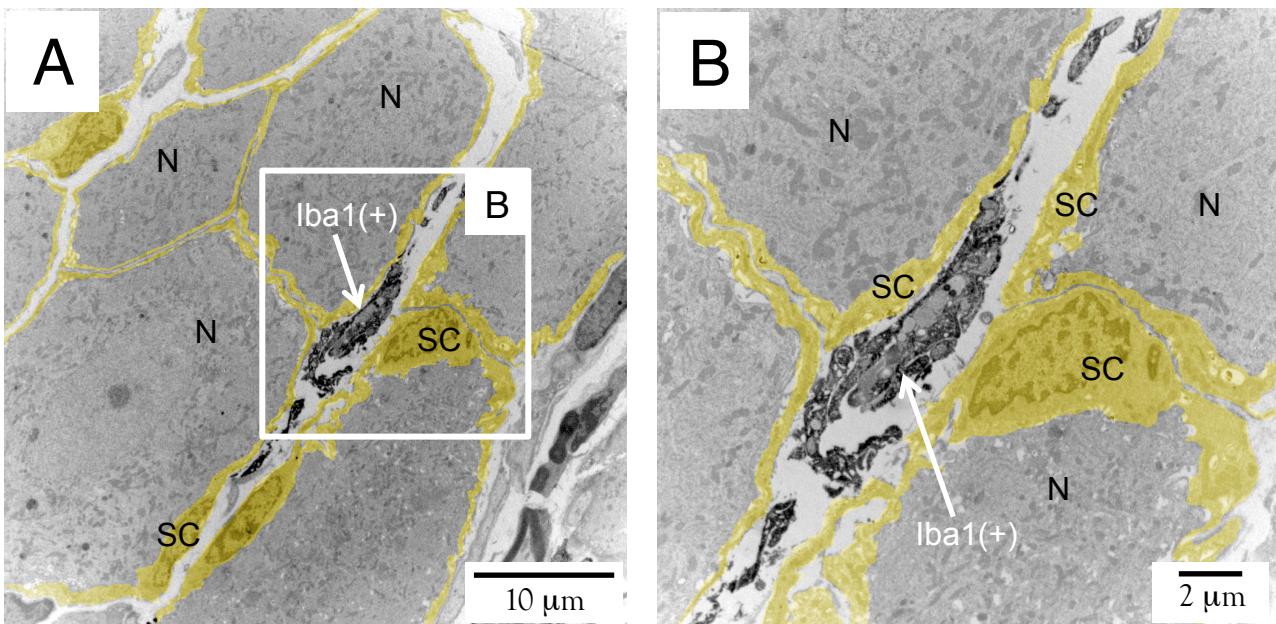


図9. 正常動物の三叉神経節におけるIba1陽性細胞の電子顕微鏡像

A: Iba1陽性細胞はサテライト細胞（黄色）の外側の結合組織領域に位置する。B: Aの白枠で囲まれた領域の拡大像。Iba1陽性細胞のほぼ全体で免疫染色により電子密度が高くなっている。

N: neuron, SC: satellite cell

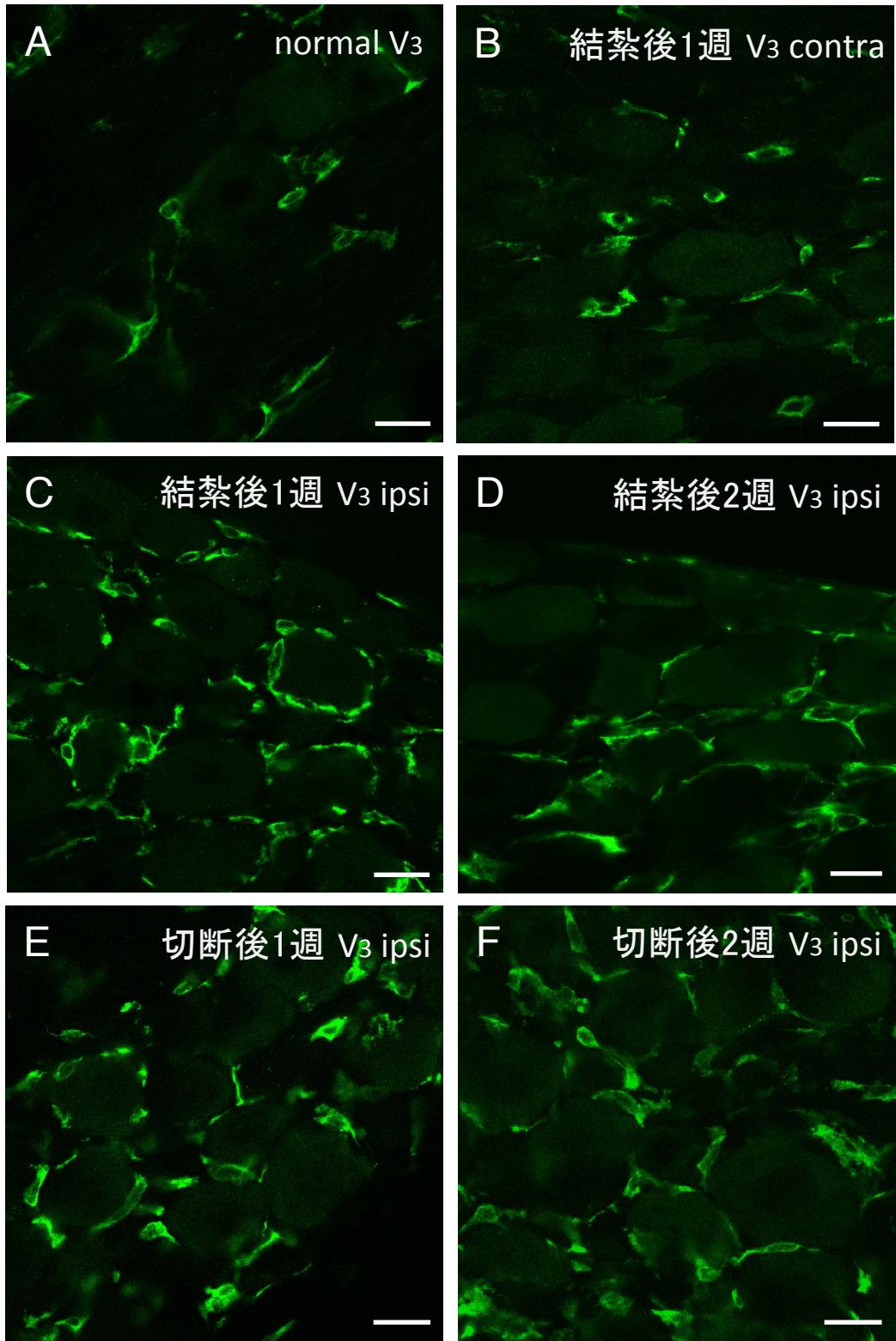


図10. オトガイ神経損傷後の三叉神経節におけるIba1陽性細胞の変化

三叉神経第3枝支配ニューロン領域の蛍光顕微鏡像を示す。A: 正常動物のIba1陽性細胞は類円形で短い突起を持つ。B: 神経結紮後の反対側 (contra) のIba1陽性細胞は、正常動物と比較し明らかな変化を認めない。C, D, E, F: 神経結紮および神経切断後の損傷側 (ipsi) のIba1陽性細胞はニューロンを取り囲むように位置し、突起を伸延させている。いずれもIba1陽性細胞数は正常動物より多い。

スケールバーはいずれも20 μm

ルにおける損傷側第3枝支配ニューロン領域 (V_3) では、正常動物 (normal) で 7.1 ± 0.3 個であったのに対し、損傷後1週 (PO1w) で 12.5 ± 0.4 個、損傷後2週 (PO2w) で 11.0 ± 0.7 個であり、有意に増加していた。損傷側第2枝および第3枝支配ニューロン混合領域 ($V_{2/3}$) では normal: 6.1 ± 0.2 個、PO1w: 12.6 ± 0.7 個、PO2w: 8.1 ± 0.3 個であり、損傷後で有意に増加していた。損傷側第2枝支配ニューロン領域 (V_2) および第1枝支配ニューロン領域 (V_1) では損傷後の有意な変化は認められなかった。反対側では V_1 の PO1w で有意差が認められた以外は、 V_3 、 $V_{2/3}$ 、 V_2 のいずれにおいても損傷後の有意な変化は認められなかった。以上をまとめると、損傷側の V_3 および $V_{2/3}$ では、損傷後1週で細胞数が正常動物や反対側と比較して有意に増加しピークとなり、損傷後2週では正常よりは有意に多いものの1週より減少したが、反対側では変化が認められなかった。また、 V_2 および V_1 では損傷側、反対側ともにはほとんど変化が認められなかった (図11)。

神経切断モデルにおける損傷側 V_3 では normal: 7.0 ± 0.3 個に対し PO1w: 12.0 ± 0.4 個、PO2w: 13.8 ± 0.5 個であり、有意に増加していた。損傷側 $V_{2/3}$ では normal: 6.1 ± 0.2 個に対し PO1w: 12.5 ± 0.5 個、PO2w: 9.4 ± 0.4 個であり、有意に増加していた。損傷側 V_2 、 V_1 では損傷後の有意な変化は認められなかった。反対側 V_3 では normal、PO1w に対し PO2w で有意差が認められた。反対側 $V_{2/3}$ では PO1w、PO2w 間以外では有意差が認められなかった。反対側 V_2 、 V_1 では損傷後の有意な変化は認められなかった。以上をまとめると、損傷側の V_3 では損傷後1週で正常動物や反対側と比較して顕著に増加し、さらに2週でも有意に増加したが、反対側では増加は認められなかった。損傷側の $V_{2/3}$ では、損傷後1週で細胞数が正常動物や反対側と比較して有意に増加しピークとなったが、反対側では増加は認められなかった。また、 V_2 および V_1 では損傷側、反対側ともにはほとんど変化が認められなかった (図12)。

次に慢性絞扼損傷モデルと神経切断モデルで、神経損傷から2週後の Iba1 陽性細胞の微細構造を透過型電子顕微鏡で観察し、正常動物と比較した。

慢性絞扼損傷モデルでは、前節1-(2) (図3、4) で観察されたようにニューロンとサテライト細胞の間に間隙が認められた。Iba1 陽性細胞は前節2-(1)

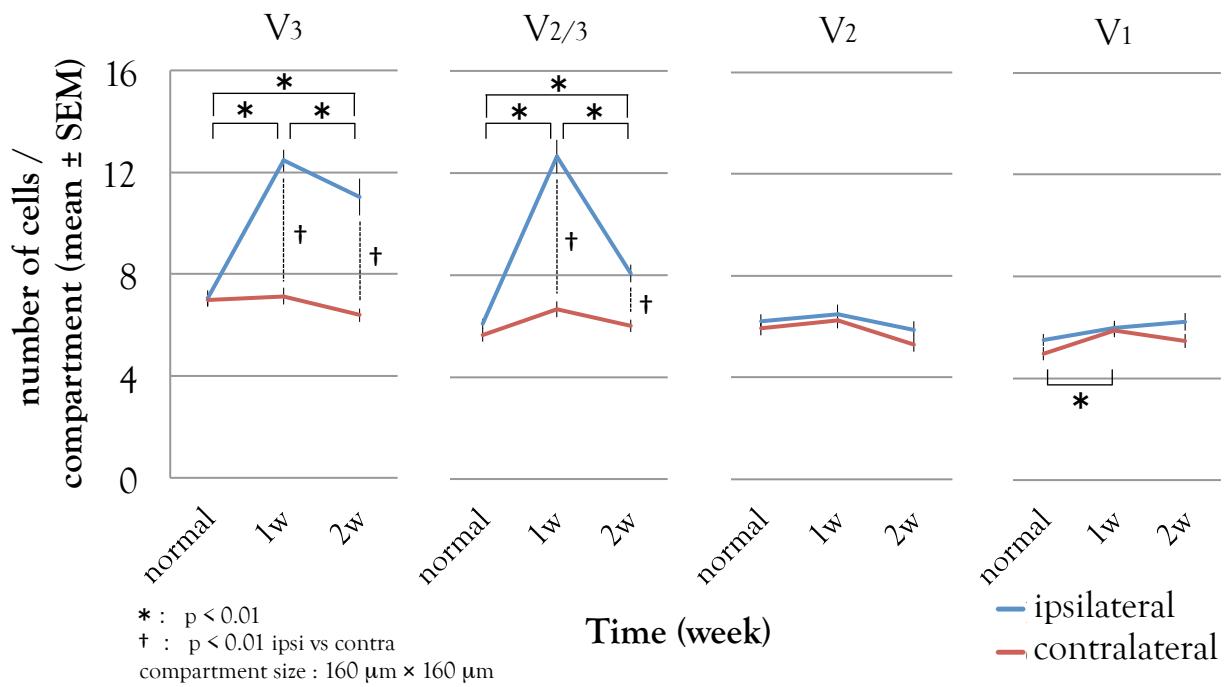


図11. 神経結紮後の三叉神経節におけるIba1陽性細胞の数

損傷側のV3およびV_{2/3}では、損傷後1週で細胞数が有意に増加しピークとなり、損傷後2週では正常よりは有意に多いものの、1週より減少した。反対側では変化が認められなかった。また、V2およびV1では損傷側、反対側ともにほとんど変化が認められなかった。

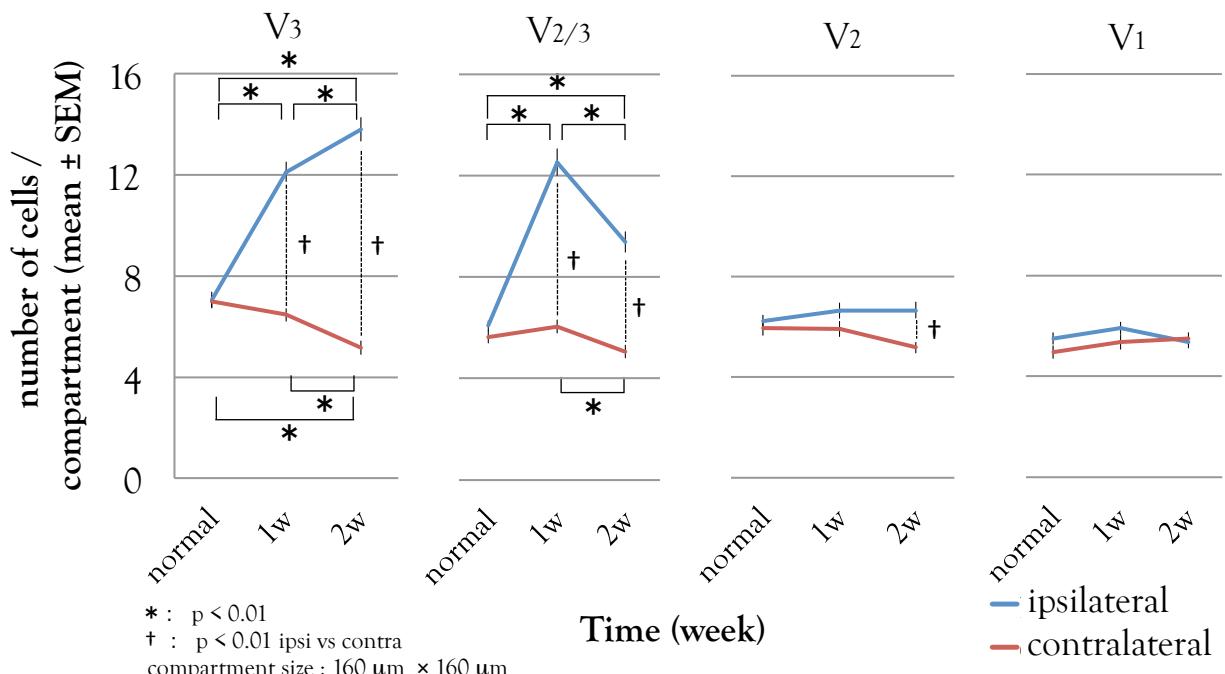


図12. 神経切断後の三叉神経節におけるIba1陽性細胞の数

損傷側のV3では損傷後1週で顕著に増加し、さらに2週でも有意に増加したが、反対側では増加は認められなかった。損傷側のV_{2/3}では、損傷後1週で細胞数が有意に増加しピークとなったが、反対側では増加は認められなかった。また、V2およびV1では損傷側、反対側ともにほとんど変化が認められなかった。

(図 9) で観察した正常動物と同様にサテライト細胞の外側の結合組織領域に位置していたが (図 13A)、サテライト細胞に沿うように長い突起を伸延させていた (図 13B)。

神経切断モデルでも慢性絞扼損傷モデルと同様にニューロンとサテライト細胞の間に間隙が認められ、Iba1 陽性細胞は大部分ではサテライト細胞の外側の結合組織領域に位置していたが、一部ではニューロンとサテライト細胞の間の間隙内に侵入している像も観察された (図 14A, B)。このような Iba1 陽性細胞はニューロン表面に接しており、その部分でニューロンの細胞質が多数の小片を伴って切り取られたように分離している像が認められた。また Iba1 陽性細胞の内部に、ニューロンの細胞質と同程度の電子密度であることから取り込まれたニューロンの一部であると考えられる領域を認めた (図 14C)。

さらに、慢性絞扼損傷モデルと神経切断モデルで、Iba1 陽性細胞の神経損傷後の ED1 発現の変化を観察し、正常動物 (図 15A) と比較した。神経結紮後 1 週の損傷側の三叉神経節内に ED1 発現の増加した Iba1 陽性細胞が認められたが (図 15B)、反対側では正常動物と比較して明らかな変化を認めなかつた (図 15C)。神経結紮後 2 週 (図 15D, E) や神経切断後 1 週 (図 15F, G)、神経切断後 2 週 (図 15H, I) でも同様の像が観察されたが、特に神経切断後 2 週の損傷側 (図 15H) では Iba1 陽性細胞の ED1 発現の増加が顕著であった。

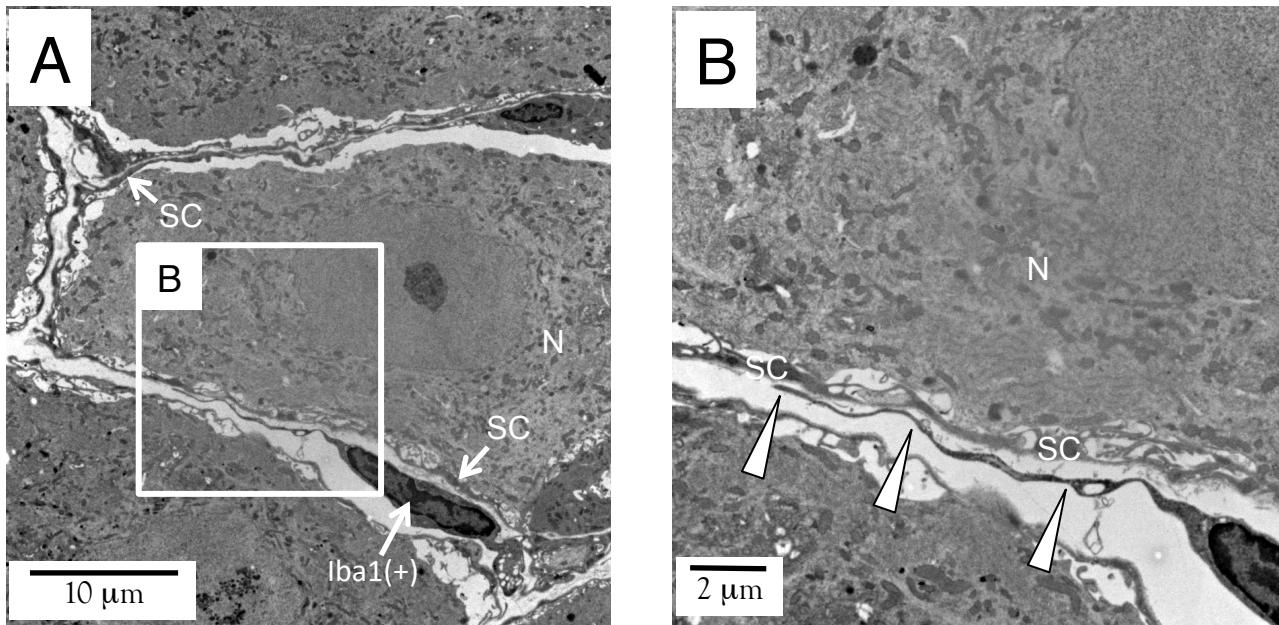


図13. オトガイ神経結紮後2週の三叉神経節における細胞の微細構造

A: Iba1陽性細胞は正常動物と同様にサテライト細胞の外側の結合組織領域に位置する。
B: Aの白枠で囲まれた領域の拡大像。Iba1陽性細胞はサテライト細胞に沿うように長い突起（矢頭）を伸延させている。

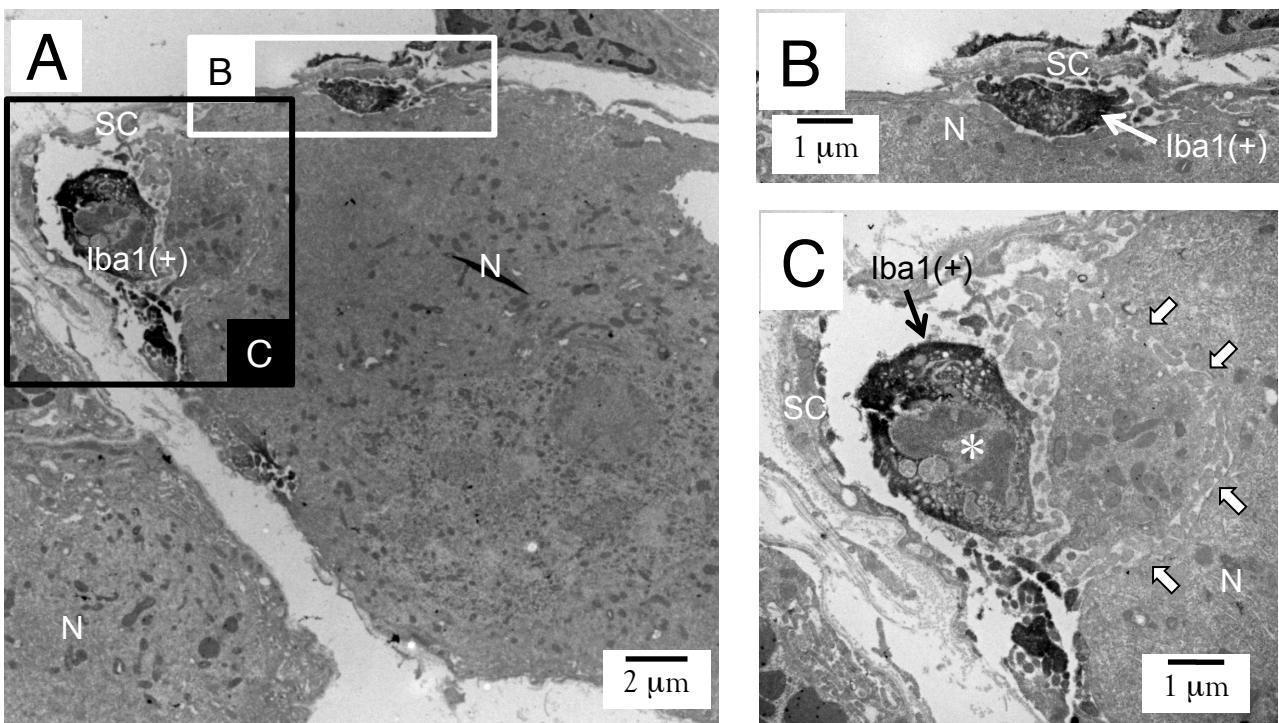


図14. オトガイ神経切断後2週の三叉神経節における細胞の微細構造

A: Iba1陽性細胞はニューロンとサテライト細胞の間の間隙内に位置している。B: Aの白枠で囲まれた領域の拡大像。C: Aの黒枠で囲まれた領域の拡大像。Iba1陽性細胞はニューロン表面に接しており、その部分でニューロンの細胞質が切り取られたように分離している（白矢印）。またIba1陽性細胞の内部に、取り込まれたニューロンの一部を認める（*）。

N: neuron, SC: satellite cell

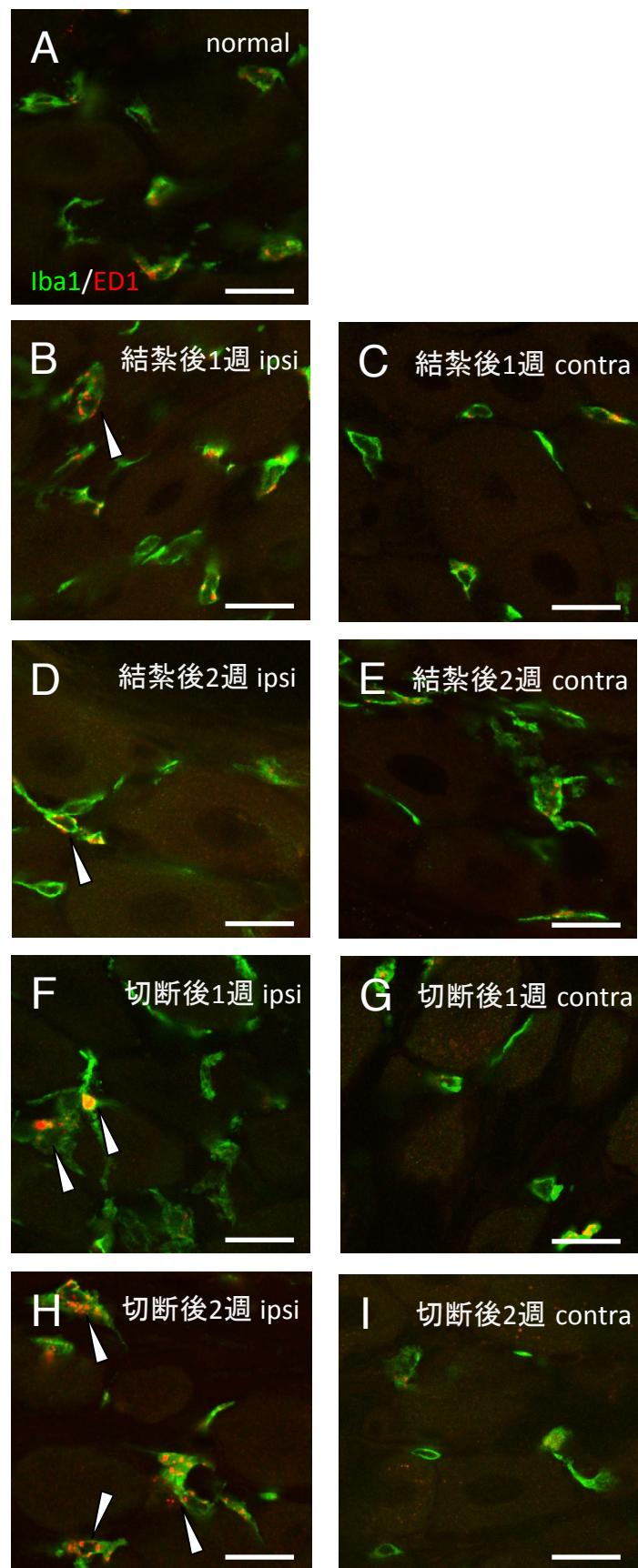


図15. 神経損傷後のIba1陽性細胞のED1発現の変化

損傷側の三叉神経節内にED1発現の増加したIba1陽性細胞（矢頭）が認められ、特に切断後2週で顕著である。一方反対側では明らかな変化を認めない。

スケールバーはいずれも20 μm

考察

1. モデル動物の作製について

本実験ではオトガイ神経の慢性絞扼損傷モデルと神経切断モデルを作製した。口腔顔面領域の神経因性疼痛の実験では、眼窩下神経、下歯槽神経、舌神経、オトガイ神経などを損傷したモデルが用いられることが多いが、本実験ではオトガイ神経を損傷の対象として選択した。その理由は、緒言で述べたように臨床的に損傷を受ける事例が多い神経であること、実験モデル作製に際し口腔外から神経にアプローチでき手術操作が単純で、なおかつ骨の削除を伴わないと比較的侵襲が軽度であること、などを考慮した為である。また過去の報告 (Takahashi et al., 2011) によると、オトガイ神経の剖出のみを行う sham ope では、機械的疼痛逃避行動の閾値や三叉神経脊髄路核における感覚に明らかな変化はなく、皮膚切開や神経剖出による炎症や末梢神経傷害の影響は認められなかったとしている。

神経損傷の様式は慢性絞扼損傷モデル、部分結紮モデル、神経部分損傷モデル、神経切断モデル、などが確立されている。外傷や腫瘍による慢性的な神経圧迫を再現しているのが慢性絞扼損傷モデルであり、アロディニアや痛覚過敏の症状を呈する。神経の挫傷を再現しているのが部分結紮モデルであり、即時的に温熱刺激や機械刺激に対してアロディニアや痛覚過敏の症状を呈するようになる。神経部分損傷モデルは神経の分枝のうち一部を堅固に結紮するモデルで、機械刺激に対して長期の痛覚過敏を呈する。神経切断モデルは軸索の再生を防ぐために神経を2カ所堅固に結紮し、その間の軸索を完全に切除するモデルで、感覚は麻痺するがその部分に痛みを感じる有痛性感覚脱失を呈する (Challa, 2014)。本実験では神経損傷がニューロンやその周囲の非神経細胞に与える経時的な影響を検討するため、慢性的な損傷（慢性絞扼損傷モデル）と急性的で重度な損傷（神経切断モデル）とを比較した。

2. 実験に使用したマーカーについて

本実験では Iba1、ED1、SK3 をマーカーとして使用した。

Iba1 はマクロファージとミクログリアに特異的に発現する、17kDa のカルシウム結合タンパクである (Imai et al., 1996; Imai and Kohsaka, 2002)。ミクログリアの機能の調節に関与しており、特にミクログリアの活性化に関わる分子である (Ito et al., 1998)。これまでに明らかになっているグリア細胞の分類では、ミクログリアが中枢神経系における免疫担当細胞であるのに対し、末梢神経系において免疫に関与するグリア細胞は明らかになっていない。しかしミクログリアのマーカーである Iba1 が末梢感覚神経節内の細胞に発現することが報告されていることから、本実験ではミクログリアに相当する末梢神経系のグリア細胞の候補として Iba1 陽性細胞に着目した。

ED1 は骨髓由来細胞のリソソーム膜上に発現する 110kD の糖タンパク CD68 を認識するマーカーである。単球やマクロファージなどの骨髓由来細胞は CD11b、CD14、CD68、CD163、CD169、CD204 などの抗原を有しているが、特に CD68 は様々な分化段階や活性状態の骨髓由来細胞に広く分布している (Damoiseaux et al., 1994; Horikawa et al., 2006)。これらのことから、ED1 陽性となれば貪食能を持つ単球系細胞であることが示され、さらに ED1 発現が増加すれば貪食能の増強を示すマーカーとなる。中枢神経系においてミクログリアが貪食能を持つことから、本実験では三叉神経節における Iba1 陽性細胞が貪食能を持つかどうかを検証するために用いた。

SK3 は低コンダクタンス Ca^{2+} 活性型 K^+ チャネル (SK) ファミリーに属するチャネルである。SK チャネルファミリーは活動電位の発生からリンパ球の活性化まで実に幅広い機能を持ち、SK1、SK2、SK3 が哺乳類の脳に存在することが知られている (Barfod et al., 2001)。近年、SK3 は中枢神経系ではアストロサイト (Armstrong et al., 2005)、末梢神経系ではサテライト細胞 (Vit et al., 2006) に発現していることから、両者のマーカーとして用いられている。

3. オトガイ神経損傷後の三叉神経節ニューロンの変化について

軸索損傷後のニューロンの変化に関しては古くから研究が行われている。形態学的には、損傷を受けたニューロンでは細胞体表面の輪郭が波状に変形し、核の位置が細胞の中心から偏位し、核膜の球状の形態が変形する。またニューロンがネクローシスに至る場合には、細胞質の膨張が認められたのち、細胞膜の破裂が起こる。細胞内小器官も肥大化し崩壊する (Sterman and Delannoy, 1985; Weinberg et al., 2000)。

本実験でも慢性的な損傷である神経結紮を行ってから2週以降でニューロンの細胞膜の形態が波状に変化した様子が観察され、結紮から4週後では一部のニューロンで細胞質の欠損やリポフוסチン顆粒の出現を認めた。リポフосチン顆粒は、細胞内の傷害を受けたタンパクや異物などがリソソームに取り込まれたものの、分解しきれなかったことによって形成され蓄積した不溶性色素であり、一般に加齢に伴う細胞質変性の指標であるとされている (Sohal and Donato, 1979; Pannese, 2011)。よってこれらの所見はいずれもニューロンが変性したことを見していると言える。

さらに急性的で重度な損傷である神経切断後では、神経結紮後に観察された上述した所見に加え、細胞内小器官の構造が不明瞭になり、細胞質内に空胞が形成されている場合もあったことから、ニューロンの変性がより進行していると考えられる。

図4Cで示したような細胞質の欠損に関しては、試料作製時の手技による人為的損傷の可能性も考えられたが、オトガイ神経損傷後の三叉神経節に対して損傷ニューロンのマーカーである activating transcription factor 3 (ATF3) (Tsujino et al., 2000) を用いて免疫組織化学染色後観察したところ、ATF3陽性ニューロンで同様の細胞質欠損の像が観察された (データ示さず)。このことより、細胞質の欠損は神経損傷に伴うニューロンの変性像の1つであると考えられる。

4. オトガイ神経損傷後の三叉神経節サテライト細胞の変化について

サテライト細胞に関する研究は後根神経節を対象とした報告が多く、三叉神経節を対象としたものはそれに比して少ない。近年、中枢神経系におけるグリア細胞が神経因性疼痛の発症や持続に関与していることが次第に明らかになり (Lai and Todd, 2008; Fumagalli et al., 2011; Lecca et al., 2012)、それに伴い末梢神経系における神経損傷後のグリア細胞の動態に関する研究が盛んになった。口腔顔面領域における研究も同様で、三叉神経節におけるサテライト細胞の分子生物学的な動態に関する研究が報告されている (Vit et al., 2006; Gunjigake et al., 2009; Katagiri et al., 2012) が、それに伴う形態学的变化との関連については明らかになっていない。

後根神経節における神経損傷後のサテライト細胞の形態学的変化、特に電子顕微鏡学的観察による研究は、ほぼ Pannese と Hanani らのグループによる総説 (Pannese, 1981; Hanani, 2005) に集約される。これらの報告によると、正常時のニューロン周囲は複数のサテライト細胞によって完全に取り囲まれており、形態学的に、そして機能的にも 1 つの単位を形成している。それぞれの単位の周囲には結合組織の領域があり、これによって他の単位と分離されている。またニューロンとサテライト細胞の間の距離は正常で約 20 nm 程度であり、ニューロン周囲の細胞外間隙は非常に小さい。本実験で観察された三叉神経節におけるニューロンとサテライト細胞の微細構造学的所見は、これらの報告と一致する。神経損傷後のサテライト細胞の変化に関しては様々な特徴が知られているが、形態学的にはサテライト細胞の増殖、サテライト細胞間のギャップジャンクションの増加、結合組織領域への突起伸延などが挙げられる。しかしながら本実験で観察された、ニューロンとサテライト細胞の間に広い間隙が形成され、その部分にサテライト細胞が複雑な突起を伸延させた像については、報告が無かった。類似する像として、正常時のサテライト細胞のニューロンに面している細胞膜に細かい突起 (microvilli) を認める場合があるとの報告 (Pannese, 1981) があるが、ニューロンとサテライト細胞の間に広い間隙が認められない点が異なる。突起の機能は不明であり、またこの現象が永続的にみられるのか一時的にみられるものなのか不明であると記されているが、同様の多数の突起がニュ

ーロンの細胞膜から突出し、一部がサテライト細胞に陷入することがあるとの報告 (Pannese, 2002; Hanani, 2005) があり、この突起によってニューロンの表面積が拡大し、サテライト細胞との間で化学物質の交換が増加すると考えられていることから、本実験で観察されたサテライト細胞の突起もニューロンとの情報伝達に関与していると考えられる。また神経損傷後にニューロンとサテライト細胞の間に広い間隙が形成される理由は不明である。しかし、ニューロンは普段からサテライト細胞との情報伝達の際に細胞外間隙を介してイオンやサイトカインの交換を行っており、特に神経損傷後にニューロンからの様々な分子の放出が増加すること (Vit et al., 2006; Hanani, 2012) から、ニューロンとサテライト細胞の間の細胞外間隙内の浸透圧が上昇することで間隙が拡大すると考えられる。

次に本実験で観察された各細胞の微細構造の変化と、知覚異常の発症との関連について考察する。まず神経損傷後の末梢神経系における感作のメカニズムであるが、いずれの場合も損傷を受けているのは末梢の軸索であるから、最初にそのニューロンの細胞体に変化が生じる。ニューロンが ATP や K^+ 、NO など様々な分子を放出することで、そのニューロンを取り囲んでいるサテライト細胞に変化が生じる。このニューロンとサテライト細胞の変化が、直接損傷を受けていない近隣のニューロンやそれを取り囲むサテライト細胞に ATP などの分子を介して波及し、その領域における神経興奮性が亢進することで神経因性疼痛が発症すると考えられている (Vit et al., 2006; Takeda et al., 2011; Hanani, 2012; Katagiri et al., 2012)。このような直接損傷を受けたニューロンから周囲の正常ニューロンへと ATP などの分子が拡散していく経路は、主にサテライト細胞間に存在するギャップジャンクションを用いていると考えられている (Hanani, 2012)。これに加えて本実験で観察された、同一のニューロンを取り囲んでいるサテライト細胞同士の結合の断裂によって、ニューロンとサテライト細胞の間の間隙に放出された様々な分子が間隙の外に拡散すると考えられるため、周囲の正常ニューロンへ影響を及ぼし神経興奮性を亢進させる経路になり得ると考えられる。

次に慢性絞扼損傷モデルと神経切断モデルで観察された各細胞の微細構造の

変化と、症状との関連について考察する。慢性絞扼損傷モデルでは、末梢の軸索に対する刺激が長期間に渡って持続することから、本実験で観察されたようなニューロンの変性やサテライト細胞の突起伸延、両細胞間の間隙の形成などの所見が損傷後4週でも回復することなく継続された。これに伴い神経興奮性的亢進が持続し、アロディニアや痛覚過敏の症状(Challa, 2014)が観察されると考えられる。一方神経切断モデルでは、慢性絞扼損傷に比べ損傷の程度が重度であることから、ニューロンにおける細胞質の変性や空胞形成、細胞質の消失などの所見が多く認められた。細胞死したニューロンは活動電位を発生できないため、その支配領域の感覚は麻痺する。一方、直接損傷を受けたものの細胞死には至らず変性が持続しているニューロンや、直接損傷を受けていないもののATPなどの分子の拡散により影響を受けたニューロンなどは、興奮性が亢進し活動電位を発生させやすいことから、有痛性感覚脱失の症状(Challa, 2014)が観察されると考えられる。

5. オトガイ神経損傷後の三叉神経節 Iba1陽性細胞の変化について

末梢神経損傷後に中枢神経系においてIba1陽性ミクログリアが増加すること(Ito et al., 1998)が明らかになって以降、様々な神経因性疼痛の研究で中枢神経系におけるIba1の動態が観察されている。末梢神経系においてもIba1を発現する細胞が存在することが報告されているものの、この細胞が何であるのかが特定されておらず、様々な見解が混在している。Tonらは脊髄神経を結紮したモデルラットの後根神経節においてIba1陽性細胞の存在と、その活性化について報告している。これによるとIba1陽性細胞はED1を共発現しておらず、MHC-IIを発現していることから、この細胞は組織常在性マクロファージに類似するような細胞であり、ミクログリアとは異なる活性化経路を持つと述べている。ただし通常の組織常在性マクロファージとも異なる動態を示したことから、組織常在性マクロファージであるとは断定していない(Ton et al., 2013)。またFranceschiniらは、野生型マウスおよび片頭痛モデルマウス(R192Qノックインマウス)の三叉神経節においてIba1陽性細胞の存在と、その動態について報告している。これによると、野生型マウス三叉神経節ではニューロン周囲にサテ

ライト細胞と Iba1 陽性マクロファージが存在し、Iba1 陽性マクロファージは ED1 や CD11b を共発現していたが、サテライト細胞のマーカーである glutamine synthetase (GS) は共発現していなかったと述べている。また野生型マウスの Iba1 陽性マクロファージは長い突起を有しているが、片頭痛モデルマウスの Iba1 陽性マクロファージは野生型と比較し突起が短縮し、細胞の体積が増加したと述べている (Franceschini et al., 2013)。一方 Patro らは、ラット坐骨神経損傷後の後根神経節における Iba1 陽性細胞の存在について報告している。これによると、サテライト細胞のマーカーである GFAP を発現しておらず、MHC-II を発現する Iba1 陽性細胞が認められ、神経損傷に反応して活性化したことから、後根神経節内にもミクログリアが存在し、ニューロンを保護する作用と神経損傷によってできた細胞の残骸を除去する作用を示す、と述べている (Patro et al., 2010)。また Mori らは、単純ヘルペスウイルスに感染したマウス三叉神経節における Iba1 陽性細胞の存在について報告している。これによると三叉神経節内のウイルスに感染した領域のニューロン周囲で Iba1 陽性細胞の増加と活性化を認めたと述べ、ニューロンを保護する作用を有すると考察している。この動態が中枢神経系におけるミクログリアの活性化の初期段階に類似していることから、三叉神経節内に Iba1 を発現するミクログリアが存在する、と報告している。しかし貪食能の発現は確認できなかったと述べている (Mori et al., 2003)。このように、末梢感覺神経節における Iba1 陽性細胞に対する呼称が各研究者によって異なり、またニューロンの保護作用を持つのか、貪食能を持つのかなど、細胞の役割についても統一された見解がない。

本実験でも Iba1 を発現する細胞が正常動物の三叉神経節内の特にニューロン周囲に認められ、サテライト細胞とは異なる細胞であるという結果が得られた。これは上述したような過去の報告 (Mori et al., 2003; Franceschini et al., 2013) と一致した。しかし、本実験で得られた Iba1 陽性細胞の神経損傷後の動態については、過去の報告と類似する点と相反する点とが混在している結果となった。

まず細胞の形態学的变化に関しては、中枢神経系におけるミクログリアは正常時では長い突起を分岐させた形態で休止しているが、神経損傷後には活性化し突起が短くなることが一般的に良く知られている (Lecca et al., 2012)。しかし

ながら本実験で観察された三叉神経節内の Iba1 陽性細胞は、正常時で突起の短い類円形の細胞であり、神経損傷後に突起を長く伸延させるという、中枢ミクログリアとは逆の形態変化を示した。これは中枢神経系と末梢神経系において Iba1 陽性細胞の役割が異なることに起因する相違であると考えられる。すなわち、中枢神経系では正常時ミクログリアは突起によって神経細胞間の連絡網を形成し、シナプスが正常に作動しているか監視していると言われているが、三叉神経節ニューロンでは細胞体へのシナプスが存在しないため監視が不需要であり、突起を伸延させていないと考えられる。また、神経損傷後に三叉神経節ニューロンから ATP が放出されること (Hanani, 2012)、神経損傷後に三叉神経節のサテライト細胞で P2Y₁₂ 受容体の発現が増加すること (Katagiri et al., 2012)、中枢ミクログリアの突起の伸延には P2Y₁₂ 受容体が関与すること (Haynes et al., 2006) が知られており、神経損傷後の細胞間情報伝達に ATP が関与していると考えられている。これらのことから、三叉神経節内の Iba1 陽性細胞も神経損傷後にニューロンから放出された ATP による情報伝達を受け、ニューロン周囲に遊走し、突起を伸延させるのではないかと考えられる。

次に細胞数の変化については、中枢神経系ではミクログリアが神経損傷後に増加することが知られている (Ito et al., 1998)。末梢神経節における報告はほとんど無いが、神経損傷後の後根神経節において Iba1 陽性細胞がニューロン周囲に集積することが知られている (Vega-Avelair et al., 2009)。本実験でもオトガイ神経の慢性絞扼損傷と神経切断のいずれの損傷後においても、三叉神経節内の損傷ニューロン周囲において Iba1 陽性細胞が増加したことから、過去の報告に類似する結果が得られた。しかし増加後の数の変化の仕方を慢性絞扼損傷モデルと神経切断モデルで比較すると、慢性絞扼損傷モデルでは損傷側の V₃、および V_{2/3}において、1 週後で細胞数がピークとなりその後減少したが、神経切断モデルでは損傷側の V₃において 1 週後から 2 週後にかけてさらに有意に増加した点が大きく異なることが明らかになった。このことから神経の損傷の程度の違いが、それぞれの病態の転帰における Iba1 陽性細胞の動態に影響を及ぼしたと推察される。そこで慢性絞扼損傷モデルと神経切断モデルで、神経損傷から 2 週後の Iba1 陽性細胞の微細構造を比較すると、両モデルとも Iba1 陽性細胞がサ

テライト細胞の外側細胞膜に沿うように長い突起を伸延させていたが、神経切断モデルではさらに図14で示すニューロンを貪食するような像も観察された。加えてIba1陽性細胞がED1を共発現しており、特に神経切断モデルでその発現の増強が認められたことを考慮すると、慢性絞扼損傷モデルより神経切断モデルにおいてIba1陽性細胞の貪食作用が強く認められるという結果になったと言える。以上をまとめると、損傷を受けて初期の段階では両モデルとも損傷の刺激によりニューロンが様々な分子を放出することでIba1陽性細胞がニューロン周囲に遊走してくると考えられる。しかし慢性絞扼損傷モデルでは損傷の程度が慢性的ながら軽度であり、ニューロンは変性した状態に陥るもの多くは細胞死には至らないため、Iba1陽性細胞が貪食する対象となる細胞の残骸等が少ないが、神経切断モデルでは損傷の程度が急性的で重度でありニューロンの変性が進行し細胞死に至る場合も多いことから、細胞の残骸等の貪食のためIba1陽性細胞が増加し続けたと考えられる。

一方、神経損傷後初期の段階で認められたIba1陽性細胞の増加については、貪食が主な目的であるとは考えがたい。なぜならば、神経切断モデルだけでなく、損傷の程度が比較的軽度な慢性絞扼損傷モデルでもIba1陽性細胞が増加したこと、また実際に慢性絞扼損傷モデルで観察されたニューロンは細胞膜の形態が波状に変化していたが、細胞質や細胞内小器官の構造は明瞭で変性が軽度であったこと、などから貪食の対象となる細胞の残骸等が神経損傷後初期の段階では少ないからである。Iba1陽性細胞がニューロン周囲のサテライト細胞の外側細胞膜に沿うように位置し、長い突起を伸延させていたことから、損傷ニューロン周囲のサテライト細胞との間で何らかの情報伝達が行われている可能性が考えられ、この情報伝達のためにニューロン周囲にてIba1陽性細胞数が増加したと考えられる。この情報伝達がニューロンの保護作用に関与しているか否かについてはさらなる研究が必要であるが、中枢神経系におけるミクログリアが神経損傷の程度に依存して損傷ニューロンから放出されるシグナル次第で治癒的にも為害的にも作用する(Lai and Todd, 2008; Lecca et al., 2012)ことを考慮すると、Iba1陽性細胞はニューロンに対する何らかの働きかけを行っていると考えられる。また慢性絞扼損傷モデルと神経切断モデルのいずれのV_{2/3}にお

いても、初期段階における Iba1 陽性細胞の増加が観察されたことについては、損傷を受けた V₃ のニューロン周囲で感作された Iba1 陽性細胞が、近傍に存在する本来損傷を受けていない V₂ のニューロン周囲に拡散していったことによるもので、異所性疼痛に関与している可能性も考えられる。

また本実験では Iba1 陽性細胞が ED1 を共発現するという結果が得られたが、これは ED1 を共発現する中枢ミクログリア (Origasa et al., 2001; Horikawa et al., 2006) や Franceschini らが報告した三叉神経節内の Iba1 陽性細胞 (Franceschini et al., 2013) に類似する特徴であるが、Ton らによる後根神経節内の Iba1 陽性細胞は ED1 を共発現しないという報告 (Ton et al., 2013) とは異なる結果となった。Ton らは自らの実験で Iba1 陽性細胞が ED1 を発現しなかった理由については、この細胞が過去に知られている組織常在性マクロファージと異なるタイプの細胞であるか、もしくは同じタイプの細胞であるものの異なる活性化経路を辿ったのではないかと考察している。すなわち、本実験や Franceschini らの報告で観察された三叉神経節内の Iba1 陽性 ED1 陽性細胞は、Ton らの報告した後根神経節内の Iba1 陽性 ED1 陰性細胞とは同一の細胞ではなく、三叉神経節と後根神経節において異なるサブタイプの Iba1 陽性細胞が存在する可能性が示唆される。

以上のことから本実験で観察された三叉神経節内の Iba1 陽性細胞は、マクロファージとも中枢神経系のミクログリアとも異なる動態を示す、免疫応答や貪食に関与する細胞であると考えられる。

結論

神経損傷後、ニューロンとサテライト細胞の間の間隙が拡大し、一部でニューロンを取り巻くサテライト細胞同士の結合が断裂した。これによってニューロン周囲の環境を維持しているイオンやサイトカインの流出を引き起こし、知覚異常の発症に関与している可能性が考えられる。神経切断後ではこれらの所見に加えて、ニューロンやサテライト細胞の細胞死も認めるため、知覚麻痺が発症すると考えられる。また Iba1 陽性細胞は神経切断モデルで経時的に細胞数や ED1 発現の増加を続けること、損傷ニューロンの細胞質を取り込む像が認められたこと等から、Iba1 陽性細胞が細胞死したニューロンやサテライト細胞の貪食に関与する单球系の細胞であることが示された。すなわち三叉神経節における Iba1 陽性細胞は、免疫応答や貪食に関与する細胞であると考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を授けて頂き、その立案と実施に際して終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました、大阪大学大学院歯学研究科分子病態口腔科学専攻 口腔分化発育情報学講座（口腔解剖学第一教室）
脇坂 聰 教授、本間 志保 講師に心より謝意を表します。あわせて、本研究の円滑な進展のために快適な研究環境を整え、御協力を頂きました、口腔解剖学第一教室の皆様に厚く御礼申し上げます。

文献

- Armstrong WE, Rubrum A, Teruyama R, Bond CT, Adelman JP (2005). Immunocytochemical localization of small-conductance, calcium-dependent potassium channels in astrocytes of the rat supraoptic nucleus. *Journal of Comparative Neurology* 491: 175-185.
- Barfod ET, Moore AL, Lidofsky SD (2001). Cloning and functional expression of a liver isoform of the small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel SK3. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 280: C836-842.
- Challa SR (2014). Surgical animal models of neuropathic pain: Pros and Cons. *International Journal of Neuroscience*, Early Online: 1-5.
- Chen ZL, Yu WM, Strickland S (2007). Peripheral regeneration. *Annual Review of Neuroscience* 30: 209-233.
- Damoiseaux JG, Döpp EA, Calame W, Chao D, MacPherson GG, Dijkstra CD (1994). Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology* 83: 140-147.
- Fields RD (2008). White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends in Neurosciences* 31: 361-370.
- Franceschini A, Vilotti S, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM, Nistri A, Fabbretti E (2013). TNF α levels and macrophages expression reflect an inflammatory potential of trigeminal ganglia in a mouse model of familial hemiplegic migraine. *PLoS One* 8: e52394.
- Fumagalli M, Lecca D, Abbracchio MP (2011). Role of purinergic signalling in neuro-immune cells and adult neural progenitors. *Frontiers in Bioscience* 17: 2326-2341.
- Glenn TD, Talbot WS (2013). Signals regulating myelination in peripheral nerves and the Schwann cell response to injury. *Current Opinion Neurobiology* 23: 1041-1048.
- Gunjigake KK, Goto T, Nakao K, Kobayashi S, Yamaguchi K (2009). Activation of satellite glial cells in rat trigeminal ganglion after upper molar extraction. *Acta Histochemica et Cytochemica* 42: 143-149.
- Hanani M (2005). Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Research Reviews* 48: 457-476.
- Hanani M (2012). Intercellular communication in sensory ganglia by purinergic receptors and gap junctions: implications for chronic pain. *Brain Research* 1487: 183-191.

- Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D (2006). The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature Neuroscience* 9: 1512-1519.
- Horikawa T, Komohara Y, Kiyota E, Terasaki Y, Takagi K, Takeya M (2006). Detection of guinea pig macrophages by a new CD68 monoclonal antibody, PM-1K. *Journal of Molecular Histology* 37: 15-25.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981). The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *American Journal of Clinical Pathology* 75: 816-821.
- Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S (1996). A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 224: 855-862.
- Imai Y, Kohsaka S (2002). Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1. *Glia* 40: 164-174.
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research* 57: 1-9.
- Katagiri A, Shinoda M, Honda K, Toyofuku A, Sessle BJ, Iwata K (2012). Satellite glial cell P2Y₁₂ receptor in the trigeminal ganglion is involved in lingual neuropathic pain mechanisms in rats. *Molecular Pain* 8: 23.
- Lai AY, Todd KG (2008). Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury. *Glia* 56: 259-270.
- Lecca D, Ceruti S, Fumagalli M, Abbracchio MP (2012). Purinergic trophic signalling in glial cells: functional effects and modulation of cell proliferation, differentiation, and death. *Purinergic Signalling* 8: 539-557.
- Mekhail M, Almazan G, Tabrizian M (2012). Oligodendrocyte-protection and remyelination post-spinal cord injuries: a review. *Progress in Neurobiology* 96: 322-339.
- Mika J, Zychowska M, Popolek-Barczyk K, Rojewska E, Przewlocka B (2013). Importance of glial activation in neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology* 716: 106-119.
- Mori I, Goshima F, Koshizuka T, Imai Y, Kohsaka S, Koide N, Sugiyama T, Yoshida T, Yokochi T, Kimura Y, Nishiyama Y (2003). Iba1-expressing microglia respond to herpes simplex virus infection in the mouse trigeminal ganglion. *Molecular Brain Research* 120: 52-56.

Nadeau JR, Wilson-Gerwing TD, Verge VM (2014). Induction of a reactive state in perineuronal satellite glial cells akin to that produced by nerve injury is linked to the level of p75NTR expression in adult sensory neurons. *Glia* 62: 763-777.

Nave KA (2010). Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468: 244-252.

Origasa M, Tanaka S, Suzuki K, Tone S, Lim B, Koike T (2001). Activation of a novel microglial gene encoding a lysosomal membrane protein in response to neuronal apoptosis. *Molecular Brain Research* 88: 1-13.

Pannese E (1981). The satellite cells of the sensory ganglia. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology* 65: 1-111.

Pannese E (2002). Perikaryal surface specializations of neurons in sensory ganglia. *International Review of Cytology* 220: 1-34.

Pannese E, Ledda M, Cherkas PS, Huang TY, Hanani M (2003). Satellite cell reactions to axon injury of sensory ganglion neurons: increase in number of gap junctions and formation of bridges connecting previously separate perineuronal sheaths. *Anatomy and Embryology* 206: 337-347.

Pannese E (2011). Morphological changes in nerve cells during normal aging. *Brain Structure and Function* 216: 85-89.

Patro N, Nagayach A, Patro IK (2010). Iba1 expressing microglia in the dorsal root ganglia become activated following peripheral nerve injury in rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 48: 110-116.

Sohal RS, Donato H Jr (1979). Effect of experimental prolongation of life span on lipofuscin content and lysosomal enzyme activity in the brain of the housefly, *Musca domestica*. *The Journals of Gerontology* 34: 489-496.

Sterman AB, Delannoy MR (1985). Cell body responses to axonal injury: traumatic axotomy versus toxic neuropathy. *Experimental Neurology* 89: 408-419.

Takahashi K, Watanabe M, Suekawa Y, Ito G, Inubushi T, Hirose N, Murasaki K, Hiyama S, Uchida T, Tanne K (2011). IL-1beta in the trigeminal subnucleus caudalis contributes to extra-territorial allodynia/hyperalgesia following a trigeminal nerve injury. *European Journal of Pain* 15: 467.e1-e14.

Takeda M, Matsumoto S, Sessle BJ, Shinoda M, Iwata K (2011). Peripheral and Central Mechanisms of Trigeminal Neuropathic and Inflammatory Pain. *Journal of Oral Biosciences* 53: 318-329.

Tang X, Schmidt TM, Perez-Leighton CE, Kofuji P (2010). Inwardly rectifying potassium channel Kir4.1 is responsible for the native inward potassium conductance of satellite glial cells in sensory ganglia. *Neuroscience* 166: 397-407.

寺山 隆司, 杉本 朋貞 (2011). 三叉神経一次知覚ニューロンの中権内投射と痛覚受容機構. *脳* 21 14: 376-379.

Ton BH, Chen Q, Gaina G, Tucureanu C, Georgescu A, Strungaru C, Flonta ML, Sah D, Ristoiu V (2013). Activation profile of dorsal root ganglia Iba-1 (+) macrophages varies with the type of lesion in rats. *Acta histochemica* 115: 840-850.

Tsujino H, Kondo E, Fukuoka T, Dai Y, Tokunaga A, Miki K, Yonenobu K, Ochi T, Noguchi K (2000). Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Molecular and Cellular Neuroscience* 15: 170-182.

Ullén F (2009). Is activity regulation of late myelination a plastic mechanism in the human nervous system? *Neuron Glia Biology* 5: 29-34.

Vega-Avelair D, Géranton SM, Fitzgerald M (2009). Differential regulation of immune responses and macrophage/neuron interactions in the dorsal root ganglion in young and adult rats following nerve injury. *Molecular Pain* 5: 70.

Vit JP, Jasmin L, Bhargava A, Ohara PT (2006). Satellite glial cells in the trigeminal ganglion as a determinant of orofacial neuropathic pain. *Neuron Glia Biology* 2: 247-257.

Watkins LR, Maier SF (2003). Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nature Reviews Drug Discovery* 2: 973-985.

Weinberg JM, Venkatachalam MA, Roeser NF, Nissim I (2000). Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 2826-2831.

吉田 篤 (2011). 口腔領域をめぐる神経基盤. *脳* 21 14: 372-375.

Zhou CJ, Inagaki N, Pleasure SJ, Zhao LX, Kikuyama S, Shioda S (2002). ATP-binding cassette transporter ABCA2 (ABC2) expression in the developing spinal cord and PNS during myelination. *Journal of Comparative Neurology* 451: 334-345.