



Title	間歇的低酸素負荷によるラット口腔顔面領域の疼痛閾値低下とその神経学的メカニズム
Author(s)	岸本, 沙樹
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/87960
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

間歇的低酸素負荷による

ラット口腔顔面領域の疼痛閾値低下とその神経学的メカニズム

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻 高次脳口腔機能統合学講座

岸本 沙樹

要約

閉塞性睡眠時無呼吸症候群 (obstructive sleep apnea: OSA) は、睡眠中に繰り返す動脈血酸素飽和度の低下を特徴とし、口腔顔面痛のリスク因子となる。そこで本研究では、齧歯類の睡眠期 (明期) に慢性間歇的低酸素 (chronic intermittent hypoxia: CIH) を負荷する OSA モデルラットを用い、口腔顔面領域の疼痛閾値低下に対する transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) の関与を検討した。

OSA モデルラットは、CIH (最低酸素濃度: 5%, 6 分間隔, 明期 6 時間/日) を 8 日間または 16 日間連続して行うことで作成した。CIH 群は、角膜および口腔粘膜における TRPV1 agonist であるカプサイシン刺激に対し、疼痛閾値の低下を示した。三叉神経節では、TRPV1 陽性ニューロン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド陽性ニューロン、活性型サテライトグリアの発現が、CIH 群において増加した。特に、大型の TRPV1 陽性ニューロンの発現比率の増加が、CIH 群で顕著であった。また、三叉神経脊髄路核尾側亜核の表層における TRPV1 陽性中枢側神経終末の密度は、CIH 群で高かった。舌へのカプサイシン刺激による侵害情報は、この TRPV1 陽性中枢側神経終末が入力する領域の二次ニューロンにおいて、細胞外シグナル調節キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase: ERK) のリン酸化を生じさせた。舌へのカプサイシン刺激に応答した三叉神経脊髄路核尾側亜核におけるリン酸化 ERK 陽性ニューロン数、および無刺激状態の三叉神経脊髄路核中間亜核～第二頸髄における cFos 陽性ニューロン数は、CIH 群で多かった。CIH による疼痛閾値低下と一次ニューロンおよび二次ニューロンにおける変化は、CIH 8 日間の後に正常酸素状態に戻して 8 日間飼育すると、CIH 前と同様の状態に回復した。これらの結果は、明期の CIH が、TRPV1 を介する三叉神経節および三叉神経脊髄路核中間亜核～第二頸髄の侵害受容ニューロンの感作を惹起し、CIH 依存的に角膜と口腔粘膜の疼痛閾値を低下させることが示唆された。

緒言

閉塞性睡眠時無呼吸症候群 (obstructive sleep apnea: OSA) の患者数は全世界で 10 億人と推定されており、中程度から重度の OSA 患者数は 4 億 5000 万人に上る (Benjafield et al., 2019)。OSA は、慢性疼痛を惹起する可能性が指摘されており (Nadeem et al., 2014)、OSA 患者の慢性疼痛の有病率は 36% に上る (Athar et al., 2019)。また、健康成人に対する睡眠分断や、睡眠中の低酸素状態により、疼痛感受性の増加、炎症反応の亢進や自発痛の増悪が生じる (Finan et al., 2013; Doufas et al., 2013; Haack et al., 2009)。さらに OSA は、口腔灼熱症候群、ドライアイに伴う眼痛など、病因が解明されていない口腔顔面痛への関与が示唆されており (Lee et al., 2014; Olmos, 2016; Ayaki et al., 2018)、口腔灼熱症候群の患者の 67% (Lopez-Jornet et al., 2015)、ドライアイ患者の 45% (Kawashima et al., 2016) に睡眠障害が併発すると報告されている。

低酸素状態では、疼痛の発症に関与する transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) の活性化が *in vitro* の研究により証明されている (Ristoiu et al., 2011)。TRPV1 は一次求心性線維の A δ 線維と C 線維に特異的に発現する陽イオンチャネルであり、熱、プロトン、カプサイシン刺激によって活性化する (Tominaga et al., 1998)。OSA の関与が示唆されている口腔灼熱症候群においては舌、ドライアイにおいては角膜へのカプサイシン刺激に対する感受性が増加することが示された (Yilmaz et al., 2007; Kaido et al., 2020)。また、TRPV1 は口腔顔面痛において、一次ニューロン、二次ニューロンにおける変化が報告されている。TRPV1 は三叉神経節ニューロン (一次ニューロン) の約 40~50% に発現し (Alamri et al., 2015)、三叉神経の損傷や口腔顔面領域の炎症により三叉神経節ニューロンで発現が増加する (Luo et al., 2021; Pei et al., 2007)。さらに、炎症性疼痛の条件下の三叉神経節において、TRPV1 陽性ニューロンの表現型が変化し、TRPV1 を発現する大型のニューロンが増加することが明らかにされている (Pei et al., 2007)。三叉神経節の TRPV1 陽性ニューロンの軸索中枢側は、三叉神経脊髄路核尾側亜核

(trigeminal spinal subnucleus caudalis: Vc) の表層に入力、終止する (Bae et al., 2004)。口腔顔面痛発症時には、Vc の表層に終止する TRPV1 陽性軸索の密度が増加することが示されている (Pei et al., 2007)。

三叉神経節の TRPV1 陽性ニューロンは、その半数近くがカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide: CGRP) を共発現する (Bae et al., 2004)。CGRP は三叉神経節ニューロンが産生する神経ペプチドの一種であり、侵害情報を伝える C 線維または A δ 線維を持つ神経節ニューロンに多く発現する (Ishida-Yamamoto et al., 1989; Iyengar et al., 2017)。CGRP は Naïve ラットの三叉神経節ニューロンの約 16% に発現し (Price et al., 2007)、神経損傷により三叉神経節ニューロンにおいて CGRP の発現が増加する (Mikuzuki et al., 2017)。また、三叉神経節ニューロンの周囲には痛みの調節に関わるサテライトグリアが存在し (Hanani, 2005)、これらは神経損傷や炎症により活性化される (Katagiri et al., 2012; Matsuura et al., 2013)。CGRP は、三叉神経節ニューロンから放出され、周囲のサテライトグリアを活性化させることで、痛みの増悪をもたらす要因となる (Mikuzuki et al., 2017)。

細胞外シグナル調節キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase: ERK) は、分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ (mitogen activator protein kinase: MAPK) の 1 つであり、脊髄後角へ侵害情報が入力する際に生じるシグナル伝達において重要な役割を果たす (Ji et al., 1999; Ji et al., 2009)。三叉神経支配領域では、口腔および顔面へのカプサイシン刺激により、Vc 表層のニューロンにて ERK のリン酸化が生じる (Noma et al., 2008; Okada et al., 2019; Saito et al., 2017)。Vc における侵害受容ニューロンの同定には、神経活動のマーカである cFos も一般的に用いられている。cFos は、侵害刺激に応答し、その発現パターンは部位特異性を示す (Strassman et al., 1993a)。顔面領域への熱刺激では、Vc 表層において cFos 陽性ニューロンが認められる (Strassman et al., 1993b)。このような Vc ニューロンの活性化は侵害刺激のみならず、急性の低酸素負荷によっても生じることが報告され、低酸素条件下での頭痛のメカニズムの解明に有用であると考えられている (Waldmann et al., 2021)。

中枢神経系のグリア細胞であるアストロサイトやミクログリアは、三叉神経脊髄路核～上部頸髄にも存在する。末梢神経系のサテライトグリアと同様に、アストロサイト、ミクログリアも、神経損傷や炎症により活性化する (Kreutzberg, 1996; Eddleston et al., 1993)。活性型アストロサイトのマーカーである Glial fibrillary acidic protein (GFAP)、および活性型ミクログリアのマーカーである Ionized calcium-binding adaptor molecule-1 (Iba1) の発現増加は、侵害情報伝達を担うニューロンの興奮性を増加させると考えられている (Okada-Ogawa et al., 2009; Shibuta et al., 2012; Huang et al., 2013)。

本研究では、OSA で生じる頻回の低酸素状態が、TRPV1 の発現増加を伴う末梢感作と中枢感作を惹起することで、口腔顔面痛の潜在的な一因になると仮説を立てた。OSA の動物モデルとしては、明期 (齧歯類の睡眠時間帯) の慢性間歇的低酸素負荷 (chronic intermittent hypoxia: CIH) が報告されている (Navarrete-Opazo et al., 2014)。そこで、この OSA モデルを用い、TRPV1 を介した疼痛閾値低下と末梢および中枢神経系の変化について、行動学的、免疫組織学的に検討した。

方法

動物実験は大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を受けて実施した（承認番号：H29-032）。すべての動物実験は以下の規定に従った；ARRIVE guideline 2.0 (Percie du Sert et al., 2020)、the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23, 1996 年改訂)、the guidelines of the International Association of the Study of Pain (PHS Low 99-158, 2002 年改訂)。実験には、体重 200~400 g の合計 146 匹の雄性 Sprague-Dawley ラット（日本 SLC, 静岡, 日本）を使用した。この内の 2 匹は行動観察実験の環境に順化できなかつたため、実験から除外した。実験動物は 12 時間毎に明暗サイクルをコントロールした恒温の環境で、水とエサを自由に摂取することができるケージで飼育した（明期 8:00~20:00, 暗期 20:00~8:00, 23°C）。この環境下で少なくとも 7 日間飼育した後、実験に用いた。実験に使用する動物の数は、倫理規定に従い最小限に抑えた。各実験群への動物の振り分けは無作為に行った。さらに実験群を盲検化し、以下の実験を実施した。

1. CIH

1.1. 実験デザインと CIH プロトコル

実験には、以下の 3 群を用いた (Fig. 1A)；①正常酸素 (21% O₂) 状態で 16 日間飼育した群 (Norm16d 群)、②6 時間/日の間断的低酸素負荷を 16 日間行った群 (Hypo16d 群)、③8 日間の間断的低酸素負荷を行った後、正常酸素状態で 8 日間飼育した群 (Hypo8d+norm8d 群)。各実験のタイムポイントを Fig. 1A に示す。瞬目回数の測定は、0 日目、4 日目、8 日目、12 日目、16 日目に行った。カプサイシン溶液 2 瓶選択テストは、-1 日目と 0 日目、3 日目と 4 日目、7 日目と 8 日目、11 日目と 12 日目、15 日目と 16 日目のそれぞれ 2 日連続で行った。免疫組織化学染色実験に用いる脳サンプルは、間断的低酸素負荷 8 日目、および全実験群の 16 日目に採

取した。CIH は、開始日を 0 日目とし、毎日 14:00~20:00 に行った (Fig. 1B)。行動観察実験と脳サンプルの採取は、前日の間歇的低酸素負荷終了から 12 時間以上経過した 8:00~14:00 に行った。「0 日目」は CIH 開始前のベースラインを示し、間歇的低酸素負荷は行動観察実験を行った後に開始した。「16 日目」は 0 日目から 15 日目までの 16 回の間歇的低酸素負荷を行った翌日を示す。

間歇的低酸素負荷は、密閉されたアクリル樹脂のチャンバー (W25×D41×H17 cm³) にラットを入れ、窒素または圧縮空気を送り込む方法を用いた (Fletcher et al., 1992)。まず、3 分間で最低酸素濃度が 5% になるようにチャンバーに窒素 (7.0-8.8 L/min) を注入し、その後、圧縮空気を 3 分間注入することで正常酸素状態に戻した。この合計 6 分間のサイクルを 1 日 8 時間繰り返した (Fletcher et al., 1992; Lin et al., 2007; Fig. 2A)。チャンバーへの窒素または圧縮空気の注入は、自動制御で切り替えた (SEVENz Planning Inc., 東京, 日本)。チャンバー内の酸素濃度は継続して測定した (XP-3180, 新コスモス電機, 大阪, 日本)。

1.2. 血液ガス分析

全身麻酔 (2.5 mg/kg ブトルファノール [明治製菓製薬, 東京, 日本], 0.375 mg/kg メデトミジン [ZENOAQ, 福島, 日本], 2.0 mg/kg ミダゾラム [サンド, 東京, 日本], intraperitoneal administration (i.p.)) を施し、右大腿動脈に採血用カテーテルを留置した。麻酔下でラットを低酸素用チャンバーに入れ、safeCLINITUBES キャピラリーチューブ (Lot #HQ-02, RADIOMETER, Brønshøj, Denmark) を用いて 100 μ l 採血した。まずは全個体、正常酸素状態で 1 回目の採血を行い、2 回目は正常酸素状態 (Normoxia-Normoxia) または低酸素状態 (Normoxia-Hypoxia) で採血した。低酸素状態での採血は、低酸素負荷の 6 分のサイクルを 2 回行った後の 3 回目の最低酸素濃度時 (5%) に行った。採血直後に ABL800 FLEX 血液ガス分析装置 (RADIOMETER) により、動脈血酸素飽和度 (arterial oxygen saturation: SaO₂) と pH を測定した。

2. 行動観察実験

2.1. 瞬目回数

ラットを実験開始1時間前に専用のケージ (W21×D32×H13 cm³) に移し、環境に馴化させた。カプサイシン溶液 (0.33 μM, 1.0 μM; 15 μl) を、マイクロピペットを用いて左眼に滴下し、3分間の瞬目回数を測定した。眼瞼の完全な閉鎖と部分的な閉鎖を瞬目とした。0.33 μM カプサイシン点眼による瞬目回数を測定し、生理食塩水で眼球表面をよく洗浄した後、1時間以上の間隔を空けて1.0 μM カプサイシンを点眼し、瞬目回数を測定した。なお予備実験では、1時間の間隔を開けて1.0 μM のカプサイシンを点眼し、脱感作が生じないことを確認した。測定は、CIH 期間の0日目、4日目、8日目、12日目、16日目に行った (Fig. 1A)。瞬目回数測定用のカプサイシン溶液は、10%エタノールおよび10%Tween80 にカプサイシン (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を溶解し10.0 mM としたものを、使用直前に生理食塩水で希釈した。

2.2 カプサイシン溶液2瓶選択テスト

ラットを実験開始1時間前に専用のケージ (W21×D32×H13 cm³) に移し、環境に馴化させた。22時間の絶水後、2瓶法によるカプサイシン溶液選択テストを2時間 (Boucher et al., 2014; Simons et al., 2002) 行った。カプサイシン溶液 (0.33 μM または1.0 μM) とその溶媒 (vehicle) の2瓶を隣接して配置し、ラットは自由に摂取できる状態とした。測定は、CIH 期間の-1日目と0日目、3日目と4日目、7日目と8日目、11日目と12日目、15日目と16日目のそれぞれ2日間連続して実施した。瓶の位置による選択制の偏りを補正するため、連続する2日間で瓶の左右を入れ替えた。1個体あたり0.33 μM または1.0 μM のどちらか一方のカプサイシン濃度のみのテストを行った。2時間のテスト前後の vehicle およびカプサイシン溶液の重量を測定し、カプサイシン溶液の消費割合 (カプサイシン消費量 / vehicle + カプサイシン消費合計量) を算出した。連続する2日間で計測したカプサイシン消費割合の平均値を、各個体のカプサイシン溶

液選択率とした。テストを行わない期間（22 時間の絶水と 2 時間の測定期間以外）は、飼育ケージ内の水を自由に摂取させた。テスト用のカプサイシン溶液は、50%エタノールにカプサイシンを溶解し 10.0 mM としたものを、蒸留水で希釈した。Vehicle は、0.33 μ M カプサイシン溶液に対しては 0.0017%エタノールを、1.0 μ M カプサイシン溶液に対しては 0.005%エタノールを、蒸留水に溶解し用いた。

3. 免疫組織化学染色

CIH8 日目、実験群 3 群の 16 日目の脳サンプルを用いた (Fig. 1A)。ペントバルビタールナトリウム (80 mg/kg, i.p.) による深麻酔下で、0.1 M リン酸緩衝液 (Phosphate buffer: PB, pH = 7.4) で希釈した 1%パラホルムアルデヒド、続いて 4%パラホルムアルデヒドで経心的に還流固定した。下部脳幹から上部頸髄を含む脳および三叉神経節を採取し、0.1 M PB で希釈した 4%パラホルムアルデヒドで後固定した (4°C, 24 時間)。

3.1 三叉神経節における TRPV1 陽性ニューロン、CGRP 陽性ニューロン、GFAP 陽性サテライトグリアの発現

三叉神経節は、0.01 M リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate-buffered saline: PBS) で希釈した 30%スクロースに 24 時間浸漬し (4°C)、ドライアイス上で Tissue Tek (Sakura Finetek, CA, USA) に包埋した。三叉神経節の長軸に沿って厚さ 10 μ m の連続切片を作製し、120 μ m ごとにスライドガラスに貼り付け、乾燥させた。切片は 50%エタノールに 30 分間浸漬した後 0.01 M PBS で洗浄し、5%正常ヤギ血清 (#16210072, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) と 0.3% Triton X-10 (Sigma-Aldrich, MI, USA) に希釈した一次抗体を反応させた (4°C, 48 時間)。一次抗体の希釈倍率を以下に示す; Rabbit anti-TRPV1 (1:1000, ACC-030, Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel)、Rabbit anti-CGRP (1:500, #8198, Lot #113M4760, Sigma-Aldrich)、Mouse anti-GFAP (1:800, #MAB360, Millipore, Billerica, MA, USA)。続いて、Rabbit anti-TRPV1 ま

たは Rabbit anti-CGRP を反応させた切片には Alexa Fluor 488 goat anti-Rabbit IgG (1:500, #A11008, Invitrogen, Paisley, UK) を、Mouse anti-GFAP を反応させた切片には Alexa Fluor 568 goat anti-Mouse IgG (1:500, #A11001, Invitrogen) を二次抗体に用い、室温で 2 時間反応させた。0.01 M PBS で洗浄した後、切片を封入した。

染色後の切片は、各スライドガラスの標本から 4 枚の切片を無作為に抽出し、蛍光顕微鏡 (BZ-X800, KEYENCE, 大阪, 日本) を用いて解析した。TRPV1 陽性ニューロン数、CGRP 陽性ニューロン数、または GFAP 陽性サテライトグリアに取り囲まれるニューロン数、および免疫組織化学的に染色されなかったニューロン数を計測した (BZ-H4A, BZ-H4M, BZ-H4C, KEYENCE)。全ニューロン数に対する TRPV1 陽性ニューロン数、CGRP 陽性ニューロン数、GFAP 陽性サテライトグリアに取り囲まれるニューロン数それぞれの割合 (%) を、眼神経、上顎神経、下顎神経の 3 枝領域 ($675 \times 565 \mu\text{m}^2$) に分けて算出した (Thalakoti et al., 2007)。GFAP 陽性サテライトグリアに取り囲まれるニューロンは、GFAP 陽性サテライトグリアに周囲を 3 分の 2 以上囲まれたニューロンとした。免疫組織化学染色による陽性ニューロンおよび染色されなかったニューロンは、輝度により、以下のように判別した。陽性ニューロン: 90 以上、陰性ニューロン: 50-90 (BZ-H4A, BZ-H4M, BZ-H4C, KEYENCE)。また同じ領域で、TRPV1 陽性ニューロンのサイズを測定し (WinROOF 2021, 三谷, 福井, 日本)、小型ニューロン ($< 500 \mu\text{m}^2$)、中型ニューロン ($500-1000 \mu\text{m}^2$)、大型ニューロン ($> 1000 \mu\text{m}^2$) に分類した (Sugimoto et al., 1997)。予備実験として、一次抗体または二次抗体を使用せずに、免疫組織化学染色を行い、TRPV1 陽性ニューロン、CGRP 陽性ニューロン、GFAP 陽性サテライトグリアが観察されないことを確認した。

3.2. Vc における TRPV1 陽性中枢側神経終末の発現

下部脳幹から上部頸髄を含む脳は、0.01 M PBS で希釈した 30%スクロースに 24 時間浸漬した (4°C)。三叉神経脊髄路核中間亜核 (trigeminal spinal subnucleus interpolaris: Vi) から第二

頸髄 (upper cervical spinal cord: C2) の領域にて、厚さ 40 μm の連続冠状断切片を作製し、160 μm 毎に回収した。切片は 0.3% hydrogen peroxide (H_2O_2) を含むメタノールに室温で 1 時間浸漬した後、0.01 M PBS で洗浄し、5% 正常ヤギ血清 (#16210072, Thermo Fisher Scientific) と 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) にて 1 時間ブロッッキング処理を行った。一次抗体は、Rabbit anti-TRPV1 (1:4000, ACC-030; Alomone Labs Ltd.) を 0.3% Triton X-100 を含む 0.01 M PBS で希釈し、4°C で 24 時間反応させた。続いて、ビオチン化ヤギ抗ウサギ二次抗体 (1:1000, BA1000, Vector Laboratories, CA, USA) を室温で 2 時間反応させた。Vectastain Elite ABC Rabbit IgG Kit (PK-6101, Vector Laboratories) を用いて、アビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体を二次抗体に反応させた。続いて、ペルオキシダーゼに DAB (3,3'-Diaminobenzidine) を反応させ (imPACT®DAB, SK-4105, Vector Laboratories)、反応物を可視化した。切片をスライドガラス (MAS-GP, 松並, 大阪, 日本) に貼り付け、封入した後、顕微鏡 (BZ-X800, KEYENCE) で観察した。

門から尾側 1.0、3.0、5.0 mm の切片を各個体から 1 枚ずつ選択し、解析した。門の位置は第 4 脳室の尾側終末部であり、Vi の尾側下端より約 500 μm 吻側の位置とした (Yoshida et al., 1991)。延髄および上部頸髄の吻尾側的な位置はラットの脳幹の解剖学的ランドマークによって決定した (Molander et al., 1989; Strassman et al., 1993a)。TRPV1 陽性中枢側神経終末は、輝度 0-130 (BZ-H4A, BZ-H4M, BZ-H4C, KEYENCE) と設定し、密度を測定した。Vc の眼神経、上顎神経、下顎神経から求心性入力がある I-II 層において (Noma et al., 2008; Nord, 1967)、各々 100 \times 100 μm^2 の領域を設定し、測定した。

3.3. Vc における TRPV1 陽性中枢側神経終末と phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK) 陽性ニューロンの発現

ペントバルビタール麻酔下 (80 mg/kg, i.p.) で、カプサイシン溶液 (1.0 mM) に浸したメラミンスポンジ (3.0 \times 3.0 \times 3.0 mm³) を Naïve ラットの舌背に 3 分間留置した。刺激部以外への

カプサイシンの漏出を避けるため、下唇、上唇、口蓋をバラフィルム (Bemis Flexible Packaging, IL, USA) で覆った。カプサイシン刺激開始から 5 分後に、灌流固定を行った。

冠状断切片 (厚さ: 40 μm , 間隔: 160 μm) を、50%エタノールに 30 分間浸漬した後 0.01 M PBS で洗浄し、5%正常ヤギ血清 (#16210072, Thermo Fisher Scientific) と 0.3%Triton X-100 (Sigma-Aldrich) にて 1 時間ブロッキング処理を行った。一次抗体の Guinea pig anti-TRPV1 (1:1000, BN300-122, Lot #401615, Novus Biologicals, CO, USA) 、 Rabbit anti-pERK1/2 (1:600, #9101, Lot #21, Cell Signaling Technology, MA, USA) をブロッキング溶液で希釈し、4°Cで 48 時間反応させた。その後、二次抗体 Alexa Fluor 488 goat anti-guinea pig IgG および Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (1:500, Invitrogen) を室温で 2 時間反応させた。切片をスライドガラス (MAS-GP, 松並) に吻尾的に貼り付け、封入した後、蛍光顕微鏡 (BZ-X800, KEYENCE) で観察した。

3.4. Vi から C2 における pERK 陽性ニューロンの発現

3.3.と同様の方法で、ペントバルビタール麻酔下 (80 mg/kg, i.p.) で、カプサイシン溶液 (0.33 μM または 1.0 mM) に浸したメラミンスポンジ (3.0×3.0×3.0 mm³) を舌背に 3 分間留置し、刺激開始から 5 分後に、灌流固定を行った。

連続する冠状断切片 (厚さ: 40 μm , 間隔: 160 μm) を、0.3% H₂O₂を含むメタノールに室温で 1 時間浸漬した後、0.01 M PBS で洗浄し、5%正常ヤギ血清 (#16210072, Thermo Fisher Scientific) と 0.3%Triton X-100 (Sigma-Aldrich) にて 1 時間ブロッキング処理を行った。一次抗体は、Rabbit anti-pERK1/2 (1:1000, #9101, Lot #21, Cell Signaling Technology) を 0.3%Triton X-100 を含む 0.01 M PBS で希釈し、4°Cで 24 時間反応させた。続いて、ビオチン化ヤギ抗ウサギ二次抗体 (1:1000, BA1000, Vector Laboratories) を室温で 2 時間反応させた。Vectastain Elite ABC Rabbit IgG Kit (PK-6101, Vector Laboratories) を用いて、アビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体を二次抗体に反応させた。続いて、ペルオキシダーゼに DAB を反応させ

(imPACT®DAB, SK-4105, Vector Laboratories)、反応物を可視化した。切片をスライドガラス (MAS-GP, 松並) に貼り付け、封入した後、顕微鏡 (NIS-Elements-BR, ニコン, 東京, 日本) を使用して観察した。

脳幹下部から C2 (30~40 枚/匹) の pERK 陽性ニューロン数は、門から吻側 2.0 mm~尾側 6.5 mm の範囲において、0.5 mm 間隔で切片を分類し、計測した。pERK 陽性ニューロン数の平均値を以下の領域で比較した。Vi 領域 (Vi: 門から+2.0~+1.0 mm)、Vi/Vc 移行部 (Vi/Vc: 門から +0.5~-0.5 mm)、Vc 中央部 (Middle-Vc: 門から-1.0~-4.0 mm)、尾側 Vc/C2 領域 (Caudal-Vc/C2: 門から -4.5~-6.5 mm)。Middle-Vc、Caudal-Vc/C2 領域は、表層 (I-II 層) と深層に分けて pERK 陽性ニューロン数を計測した。解析領域は、眼神経、上顎神経、下顎神経が入力するすべての領域を含む背側から腹側を範囲とした (Noma et al., 2008; Nord, 1967)。pERK 陽性ニューロン数は左右両側を計測し、合計した。

3.5. Vi から C2 における cFos 陽性ニューロンの発現

連続する冠状断切片 (厚さ: 40 μ m, 間隔: 160 μ m) を、0.3% H₂O₂ を含むメタノールに室温で 1 時間浸漬した後、0.01 M PBS で洗浄し、5% 正常ヤギ血清 (#16210072, Thermo Fisher Scientific) と 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) にて 1 時間ブロッキング処理を行った。一次抗体は、Rabbit anti-cFos (1:5000, #170-121416, EnCor Biotechnology Inc., Florida, USA) を 0.3% Triton X-100 を含む 0.01 M PBS で希釈し、4°C で 24 時間反応させた。続いて、ビオチン化ヤギ抗ウサギ二次抗体 (1:1000, BA1000, Vector Laboratories) を室温で 2 時間反応させた。Vectastain Elite ABC Rabbit IgG Kit (PK-6101, Vector Laboratories) を用いて、アビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体を二次抗体に反応させた。続いて、ペルオキシダーゼに DAB を反応させ (imPACT®DAB, SK-4105, Vector Laboratories)、反応物を可視化した。切片をスライドガラス (MAS-GP, 松並) に貼り付け、封入した後、顕微鏡 (NIS-Elements-BR, ニコン) を使用して観察した。解析は、3.4. と同様の方法で行った。

3.6. Vc から C2 における GFAP 陽性細胞、Iba1 陽性細胞の発現

連続する冠状断切片（厚さ：40 μm ，間隔：160 μm ）を、0.3% H_2O_2 を含むメタノールに室温で 1 時間浸漬した後、0.01 M PBS で洗浄し、5% 正常ヤギ血清（#16210072, Thermo Fisher Scientific）と 0.3% Triton X-100（Sigma-Aldrich）にて 1 時間ブロッキング処理を行った。一次抗体は、Rabbit anti-GFAP (1:2000, Dako, Glostrup Denmark) または Rabbit anti-Iba1 (1:1000, Wako, 東京, 日本) を 0.3% Triton X-100 を含む 0.01 M PBS で希釈し、4°C で 24 時間反応させた。続いて、ビオチン化ヤギ抗ウサギ二次抗体 (1:1000, BA1000, Vector Laboratories) を室温で 2 時間反応させた。Vectastain Elite ABC Rabbit IgG Kit (PK-6101, Vector Laboratories) を用いて、アビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体を二次抗体に反応させた。続いて、ペルオキシダーゼに DAB を反応させ (imPACT®DAB, SK-4105, Vector Laboratories)、反応物を可視化した。切片をスライドガラス (MAS-GP, 松並) に貼り付け、封入した後、顕微鏡 (NIS-Elements-BR, ニコン) を使用して観察した。

門から尾側 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mm の切片を各個体から 1 枚ずつ選択し、解析した。眼神経、上顎神経、下顎神経が入力する表層 (I-II 層) の各 100 \times 100 μm^2 の範囲を撮影した。ImageJ (1.52a, NIH, Bethesda, Maryland, USA) を用いて、各領域における GFAP 陽性細胞または Iba1 陽性細胞の占有率を測定した。測定した占有率は眼神経、上顎神経、下顎神経の各領域において、個体ごとの平均値を算出した。

4. 統計分析

データは平均 \pm 標準誤差で表した。血液ガス分析と行動観察実験の結果は、Two-way ANOVA と post hoc Bonferroni test を用いて統計解析し、ベースライン値 (Day0 または Day-1&0) を基準とし、経時的に比較した。各個体の値はグラフ中に点で表した。免疫組織化学染色実験における三叉神経節の TRPV1 陽性ニューロン数の割合、CGRP 陽性ニューロン数の割合、

GFAP 陽性サテライトグリアに取り囲まれるニューロン数の割合、Vi から C2 の pERK 陽性ニューロン数、cFos 陽性ニューロン数、GFAP 陽性細胞占有率、Iba1 陽性細胞占有率の結果は Kruskal-Wallis test と post hoc Dann test を用いて統計解析した。グラフは各群の中央値、第 1 四分位数、第 3 四分位数、最大値、最小値を示す。TRPV1 陽性ニューロンのサイズの比率は、カイ二乗検定を用いて統計解析した。統計解析は、GraphPad Prism version 7.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) または ORIGINPRO version 2019b (OriginLab Corporation, Massachusetts, USA) を使用した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果

1. 間歇的低酸素負荷中の SaO₂、pH

低酸素状態（酸素濃度 5%）での SaO₂ は $41.8 \pm 9.5\%$ であり、正常酸素状態の $86.9 \pm 1.3\%$ と比較し、有意に低かった（Fig. 2B: Normoxia-Normoxia, $n = 5$; Normoxia-Hypoxia, $n = 6$. Normoxia-Normoxia pre, $86.56 \pm 1.42\%$; post, $86.96 \pm 1.33\%$; Normoxia-Hypoxia pre, $84.58 \pm 3.80\%$; post, $41.88 \pm 9.55\%$. Normoxia-Hypoxia pre vs. post, $p < 0.001$; Normoxia-Normoxia post vs. Normoxia-Hypoxia post, $p < 0.001$ ）。低酸素状態での動脈血の pH は 7.34 ± 0.02 であり、正常酸素状態の 7.25 ± 0.01 よりも有意に高かった（Fig. 2C: Normoxia-Normoxia pre, 7.25 ± 0.01 ; post, 7.25 ± 0.01 ; Normoxia-Hypoxia pre, 7.28 ± 0.01 ; post, 7.34 ± 0.02 . Normoxia-Hypoxia pre vs. post, $p = 0.016$; Normoxia-Normoxia post vs. Normoxia-Hypoxia post, $p < 0.001$. Same rat in Fig. 2B）。

2. 角膜と舌におけるカプサイシン刺激に対する疼痛閾値の低下

2.1. 瞬目回数

低濃度カプサイシン溶液（ $0.33 \mu\text{M}$ ）の点眼に対する瞬目回数は、Hypo8d+norm8d 群の Day8 に、Norm16d 群と比較し、有意に増加した（Fig. 3A: Norm16d, $n = 8$; Hypo8d+norm8d, $n = 7$. Norm16d Day0, 11.13 ± 1.33 回; Day4, 10.25 ± 1.25 回; Day8, 10.38 ± 0.92 回; Day12, 9.75 ± 1.08 回; Day16, 10.50 ± 1.10 回; Hypo8d+norm8d Day0, 9.43 ± 0.81 回; Day4, 16.57 ± 2.89 回; Day8, 19.29 ± 1.89 回; Day12, 14.57 ± 2.53 回; Day16, 8.43 ± 0.48 回. Norm16d vs. Hypo8d+norm8d Day8, $p = 0.002$; Day0 vs. Day4, $p = 0.010$; Day8, $p < 0.001$ ）。CIH の解除後である Hypo8d+norm8d 群の 12 日目、16 日目の瞬目回数は Norm16d 群と同じレベルに戻った（Fig. 3A: Norm16d Day16, 10.50 ± 1.10 回; Hypo8d+norm8d Day16, 8.43 ± 0.48 回）。低濃度

カプサイシン溶液 (0.33 μ M) の点眼に対する瞬目回数は、Hypo16d 群の Day4、Day8、Day12、Day16 に Norm16d 群と比較し、有意に増加した (Fig. 3A: Hypo16d, n = 6. Day0, 10.00 ± 0.97 回; Day4, 20.83 ± 2.27 回; Day8, 21.17 ± 1.25 回; Day12, 17.67 ± 1.98 回; Day16, 17.50 ± 1.77 回. Norm16d vs. Hypo16d Day4, $p < 0.001$; Day8, $p < 0.001$; Day12, $p = 0.013$; Day16, $p = 0.044$; Day0 vs. Day4, $p < 0.001$; Day8, $p < 0.001$; Day12, $p = 0.010$; Day16, $p = 0.012$)。Hypo16d 群の Day16 の瞬目回数は、Hypo8d+norm8d 群と比較し、有意に多かった (Fig. 3A: Hypo16d Day16, 17.50 ± 1.77 回; Hypo8d+norm8d Day16, 8.43 ± 0.48 回. Hypo16d vs. Hypo8d+norm8d Day16, $p = 0.003$)。

高濃度カプサイシン溶液 (1.0 μ M) の点眼に対する瞬目回数は、Hypo8d+norm8d 群の Day4、Day8 に、Norm16d 群と比較し、有意に増加した (Fig. 3B: Norm16d Day0, 17.13 ± 1.53 回; Day4, 17.63 ± 1.05 回; Day8, 17.88 ± 0.97 回; Day12, 17.88 ± 1.72 回; Day16, 17.38 ± 1.38 回; Hypo8d+norm8d: Day0, 17.57 ± 1.15 回; Day4, 28.14 ± 3.38 回; Day8, 31.71 ± 1.80 回; Day12, 20.71 ± 2.34 回; Day16, 19.43 ± 1.88 回. Norm16d vs. Hypo8d+norm8d Day4, $p = 0.003$; Day8, $p < 0.001$; Day0 vs. Day4, $p = 0.001$; Day8, $p < 0.001$. Same rat in Fig. 3A)。Hypo8d+norm8d 群の Day12、Day16 の瞬目回数は Norm16d 群と同じレベルに戻った (Fig. 3B: Norm16d Day16, 17.38 ± 1.38 回; Hypo8d+norm8d Day16, 19.43 ± 1.88 回)。高濃度カプサイシン溶液 (1.0 μ M) の点眼に対する瞬目回数は、Hypo16d 群の Day4、Day8、Day12、Day16 に Norm16d 群と比較し、有意に増加した (Fig. 3B: Hypo16d Day0, 17.17 ± 0.48 回; Day4, 32.00 ± 1.73 回; Day8, 31.83 ± 3.35 回; Day12, 31.00 ± 2.66 回; Day16, 30.00 ± 3.02 回. Norm16d vs. Hypo16d Day4, $p < 0.001$; Day8, $p < 0.001$; Day12, $p < 0.001$; Day16, $p < 0.001$; Day0 vs. Day4, $p < 0.001$; Day8, $p < 0.001$; Day12, $p < 0.001$; Day16, $p < 0.001$)。Hypo16d 群の Day12、Day16 の瞬目回数は、Hypo8d+norm8d 群と比較し、有意に多かった (Fig. 3B: Hypo16d Day16, 30.00 ± 3.02 回; Hypo8d+norm8d Day16, 19.43 ± 1.88 回. Hypo16d vs. Hypo8d+norm8d Day12, $p = 0.010$; Day16, $p = 0.007$)。

Hypo16d 群と Hypo8d+norm8d 群の瞬目回数は、低濃度カプサイシン溶液、高濃度カプサイシン溶液のどちらにおいても Day8 で最大となり、Hypo16d 群は Day16 まで瞬目回数の増加が継続した。

2.2. カプサイシン溶液選択率

低濃度カプサイシン溶液 (0.33 μ M) の選択率は、Hypo8d+norm8d 群の Day3&4、Day7&8 において、Norm16d 群と比較し、有意に低下した (Fig. 3C: Norm16d, n = 5; Hypo8d+norm8d, n = 6. Norm16d Day-1&0, 48.28 \pm 1.87%; Day3&4, 50.73 \pm 1.55%; Day7&8, 51.86 \pm 0.83 %; Day11&12, 48.19 \pm 1.72 %; Day15&16, 48.66 \pm 0.74%; Hypo8d+norm8d Day-1&0, 50.99 \pm 1.45%; Day3&4, 30.24 \pm 5.19%; Day7&8, 33.00 \pm 4.38%; Day11&12, 40.73 \pm 2.36%; Day15&16, 46.49 \pm 4.21%. Norm16d vs. Hypo8d+norm8d Day3&4, p = 0.021; Day7&8, p = 0.046; vs. Day-1&0: Day3&4, p < 0.001; Day7&8, p = 0.004) 。Hypo8d+norm8d 群の Day15&16 における低濃度カプサイシン溶液の選択率は、Norm16d 群と同じレベルに戻った (Fig. 3C: Norm16d Day15&16, 48.66 \pm 0.74%; Hypo8d+norm8d Day15&16, 46.49 \pm 4.21%) 。Hypo16d 群の Day3&4、Day7&8、Day11&12、Day15&16 における低濃度カプサイシン溶液の選択率は、Norm16d 群と比較し、有意に低下した (Fig. 3C: Hypo16d, n = 7. Hypo16d Day-1&0, 50.12 \pm 2.21 %; Day3&4, 29.39 \pm 4.74%; Day7&8, 28.92 \pm 4.01 %; Day11&12, 29.71 \pm 7.87%; Day15&16, 25.34 \pm 4.88%. Norm16d vs. Hypo16d Day3&4, p = 0.009; Day7&8, p = 0.004; Day11&12, p = 0.041; Day15&16, p = 0.003; Day-1&0 vs. Day3&4, p < 0.001; Day7&8, p < 0.001; Day11&12, p < 0.001; Day15&16, p < 0.001) 。Hypo16d 群の Day15&16 における低濃度カプサイシン溶液の選択率は、Norm16d 群と同じレベルに戻った Hypo8d+norm8d 群と比較し、有意に低かった (Fig. 3C: Hypo16d Day15&16, 25.34 \pm 4.88%; Hypo8d+norm8d Day15&16, 46.49 \pm 4.21%. Hypo16d vs. Hypo8d+norm8d Day15&16, p = 0.006) 。

高濃度カプサイシン溶液 (1.0 μ M) の選択率は、Hypo8d+norm8d 群の Day3&4、Day7&8、

Day11&12 において、Norm16d 群と比較し、有意に低下した (Fig. 3D: Norm16d, n = 6; Hypo8d+norm8d, n = 6. Norm16d Day-1&0, $26.91 \pm 1.11\%$; Day3&4, $29.31 \pm 1.11\%$; Day7&8, $27.73 \pm 0.94\%$; Day11&12, $26.19 \pm 1.22\%$; Day15&16, $26.23 \pm 0.60\%$; Hypo8d+norm8d Day-1&0, $26.28 \pm 1.91\%$; Day3&4, $9.17 \pm 1.30\%$; Day7&8, $9.10 \pm 2.06\%$; Day11&12, $10.83 \pm 2.29\%$; Day15&16, $19.34 \pm 3.38\%$. Norm16d vs. Hypo8d+norm8d Day3&4, $p < 0.001$; Day7&8, $p < 0.001$; Day11&12, $p < 0.001$; Day-1&0 vs. Day3&4, $p < 0.001$; Day7&8, $p < 0.001$; Day11&12, $p < 0.001$; Day15&16, $p = 0.046$)。Hypo8d+norm8d 群の Day15&16 における高濃度カプサイシン溶液の選択率は、Norm16d 群と同じレベルに戻った (Fig. 3D: Norm16d Day15&16, $26.23 \pm 0.60\%$; Hypo8d+norm8d Day15&16, $19.34 \pm 3.38\%$)。Hypo16d 群の Day3&4、Day7&8、Day11&12、Day15&16 における高濃度カプサイシン溶液の選択率は、Norm16d 群と比較し、有意に低下した (Fig. 3D: Hypo16d, n = 6. Hypo16d Day-1&0, $29.51 \pm 2.75\%$; Day3&4, $14.25 \pm 2.15\%$; Day7&8, $10.59 \pm 2.49\%$; Day11&12, $9.10 \pm 1.93\%$; Day15&16, $5.32 \pm 1.68\%$. Norm16d vs. Hypo16d Day3&4, $p < 0.001$; Day7&8, $p < 0.001$; Day11&12, $p < 0.001$; Day15&16, $p < 0.001$; Day-1&0 vs. Day3&4, $p < 0.001$; Day7&8, $p < 0.001$; Day11&12, $p < 0.001$; Day15&16, $p < 0.001$)。Hypo16 群の Day15&16 における高濃度カプサイシン溶液の選択率は、Norm16d 群と同じレベルに戻った Hypo8d+norm8d 群と比較し、有意に低かった (Fig. 3D: Hypo16d Day15&16, $5.32 \pm 1.68\%$; Hypo8d+norm8d Day15&16, $19.34 \pm 3.38\%$. Hypo16d vs. Hypo8d+norm8d Day15&16, $p < 0.001$)。

Hypo8d+norm8d 群のカプサイシン溶液選択率は低濃度、高濃度のどちらにおいても、CIH 期間中は低下し、CIH 解除後の Day15&16 には CIH 前と同じレベルに戻った。Hypo16d 群のカプサイシン溶液選択率は低濃度、高濃度のどちらにおいても低下し、Day16 まで継続した。

すなわち、角膜、口腔粘膜におけるカプサイシンに対する疼痛閾値は、CIH により有意に低下した。

3. 三叉神経節における TRPV1 陽性ニューロン数の割合、CGRP 陽性ニューロン数の割合、GFAP 陽性サテライトグリアに取り囲まれるニューロン数の割合

3.1. TRPV1 陽性ニューロン数の割合

Fig. 4A に、Norm16d 群 (16 日目) と Hypo16d 群 (16 日目) の三叉神経節下顎神経領域における TRPV1 陽性ニューロンの蛍光顕微鏡写真を示す。

三叉神経節眼神経領域の TRPV1 陽性ニューロン数の割合は、CIH により増加した (Fig. 4B, Ophthalmic nerve)。TRPV1 陽性ニューロン数の割合は、Hypo8d 群、Hypo16d 群において Norm16d 群と比較し、有意に高かった。Hypo8d+norm8d 群は、Norm16d 群と差はなかった (Fig. 4B, Ophthalmic nerve: Norm16d, n = 6; Hypo8d, n = 6; Hypo16d, n = 6; Hypo8d+norm8d, n = 6. Norm16d, $23.89 \pm 3.42\%$; Hypo8d, $39.65 \pm 2.58\%$; Hypo16d, $42.92 \pm 2.31\%$; Hypo8d+norm8d, $26.75 \pm 2.32\%$. Norm16d vs. Hypo8d, $p = 0.048$; Norm16d vs. Hypo16d, $p = 0.009$; Hypo16d vs. Hypo8d+norm8d, $p = 0.029$)。

三叉神経節上顎神経領域の TRPV1 陽性ニューロン数の割合は、Hypo16d 群において、Norm16d 群と比較し、有意に高かった (Fig. 4B, Maxillary nerve: Norm16d, $20.17 \pm 2.37\%$; Hypo8d, $38.74 \pm 1.90\%$; Hypo16d, $46.81 \pm 1.61\%$; Hypo8d+norm8d, $23.02 \pm 3.55\%$. Norm16d vs. Hypo16d, $p = 0.002$; Hypo16d vs. Hypo8d+norm8d, $p = 0.007$)。

三叉神経節下顎神経領域の TRPV1 陽性ニューロン数の割合は、CIH により増加した (Fig. 4B, Mandibular nerve)。TRPV1 陽性ニューロン数の割合は、Hypo8d 群、Hypo16d 群において Norm16d 群と比較し、有意に高かった。Hypo8d+norm8d 群は、Norm16d 群と差はなかった (Fig. 4B, Mandibular nerve: Norm16d, $21.55 \pm 2.20\%$; Hypo8d, $49.41 \pm 1.07\%$; Hypo16d, $44.47 \pm 1.53\%$; Hypo8d+norm8d, $36.87 \pm 2.90\%$. Norm16d vs. Hypo8d, $p < 0.001$; Norm16d vs. Hypo16d, $p = 0.037$)。

CIH により TRPV1 陽性ニューロン数の割合は増加し、その経時的な変化は、CIH による角膜、口腔粘膜におけるカプサイシン刺激に対する疼痛閾値の低下と一致した。

3.2. CGRP 陽性ニューロン数の割合

Fig. 4C に、Norm16d 群 (16 日目) と Hypo16d 群 (16 日目) の三叉神経節下顎神経領域における CGRP 陽性ニューロンの蛍光顕微鏡写真を示す。

三叉神経節眼神経領域の CGRP 陽性ニューロン数の割合は、CIH により増加した (Fig. 4D, Ophthalmic nerve)。CGRP 陽性ニューロン数の割合は、Hypo8d 群、Hypo16d 群において Norm16d 群と比較し、有意に高かった。Hypo8d+norm8d 群は Norm16d 群と差はなかった (Fig. 4D, Ophthalmic nerve: Norm16d, n = 6; Hypo8d, n = 6; Hypo16d, n = 6; Hypo8d+norm8d, n = 8. Norm16d, $18.04 \pm 1.05\%$; Hypo8d, $30.31 \pm 1.39\%$; Hypo16d, $27.77 \pm 1.22\%$; Hypo8d+norm8d, $24.47 \pm 1.88\%$. Norm16d vs. Hypo8d, $p = 0.002$; Norm16d vs. Hypo16d, $p = 0.016$)。

三叉神経節上顎神経領域の CGRP 陽性ニューロン数の割合は、CIH により増加した (Fig. 4D, Maxillary nerve)。CGRP 陽性ニューロン数の割合は、Hypo8d 群、Hypo16d 群において Norm16d 群と比較し、有意に高かった。Hypo8d+norm8d 群は Norm16d 群と差はなかった (Fig. 4D, Maxillary nerve: Norm16d, $17.27 \pm 0.80\%$; Hypo8d, $27.94 \pm 1.85\%$; Hypo16d, $27.01 \pm 1.37\%$; Hypo8d+norm8d, $24.87 \pm 1.46\%$. Norm16d vs. Hypo8d, $p = 0.007$; Norm16d vs. Hypo16d, $p = 0.006$)。

三叉神経節下顎神経領域の CGRP 陽性ニューロン数の割合は、CIH により増加した (Fig. 4D, Mandibular nerve)。CGRP 陽性ニューロン数の割合は、Hypo16d 群において Norm16d 群と比較し、有意に高かった。Hypo8d+norm8d 群は Norm16d 群と差はなかった (Fig. 4D, Mandibular nerve: Norm16d, $20.80 \pm 2.13\%$; Hypo8d, $29.91 \pm 1.79\%$; Hypo16d, $34.08 \pm 1.17\%$; Hypo8d+norm8d, $27.82 \pm 2.34\%$. Norm16d vs. Hypo16d, $p = 0.002$)。

CIH により CGRP 陽性ニューロン数の割合は増加し、その経時的な変化は、CIH による TRPV1 陽性ニューロン数の割合の増加と、角膜および口腔粘膜におけるカプサイシン刺激に対

する疼痛閾値の低下の経時的変化と一致した。

3.3. GFAP 陽性サテライトグリアに取り囲まれるニューロン数の割合

Fig. 4E に、Norm16d 群 (16 日目) と Hypo16d 群 (16 日目) の三叉神経節下顎神経領域における GFAP 陽性サテライトグリアの蛍光顕微鏡写真を示す。GFAP 陽性サテライトグリアに周囲を 3 分の 2 以上囲まれたニューロンを GFAP 陽性サテライトグリアに取り囲まれるニューロンとした。

三叉神経節眼神経領域の GFAP 陽性サテライトグリアに取り囲まれるニューロン数の割合は、CIH により増加した (Fig. 4F, Ophthalmic nerve)。GFAP 陽性サテライトグリアに取り囲まれるニューロン数の割合は、Hypo8d 群、Hypo16d 群において Norm16d 群と比較し、有意に高かった。Hypo8d+norm8d 群は Norm16d 群と差はなかった (Fig. 4F, Ophthalmic nerve: Norm16d, $n = 6$; Hypo8d, $n = 6$; Hypo16d, $n = 6$; Hypo8d+norm8d, $n = 6$. Norm16d vs. Hypo8d, $p = 0.033$; Norm16d, $2.47 \pm 0.53\%$; Hypo8d, $42.76 \pm 12.97\%$; Hypo16d, $50.31 \pm 10.95\%$; Hypo8d+norm8d, $3.06 \pm 0.98\%$. Norm16d vs. Hypo16d, $p = 0.009$; Hypo8d vs. Hypo8d+horm8d, $p = 0.042$; Hypo16d vs. Hypo8d+norm8d, $p = 0.012$. Same rat in Fig. 4B)。

三叉神経節上顎神経領域の GFAP 陽性サテライトグリアに取り囲まれるニューロン数の割合は、CIH により増加した (Fig. 4F, Maxillary nerve)。GFAP 陽性サテライトグリアに取り囲まれるニューロン数の割合は、Hypo8d 群、Hypo16d 群において Norm16d 群と比較し、有意に高かった。Hypo8d+norm8d 群は Norm16d 群と差はなかった (Fig. 4F, Maxillary nerve: Norm16d, $3.43 \pm 2.42\%$; Hypo8d, $38.23 \pm 13.36\%$; Hypo16d, $44.15 \pm 7.49\%$; Hypo8d+norm8d, $3.20 \pm 1.01\%$. Norm16d vs. Hypo8d, $p = 0.029$; Norm16d vs. Hypo16d, $p = 0.008$; Hypo16d vs. Hypo8d+norm8d, $p = 0.037$)。

三叉神経節下顎神経領域の GFAP 陽性サテライトグリアに取り囲まれるニューロン数の割合は、CIH により増加した (Fig. 4F, Mandibular nerve)。GFAP 陽性サテライトグリアに取り囲

まれるニューロン数の割合は、Hypo8d 群、Hypo16d 群において Norm16d 群と比較し、有意に高かった。Hypo8d+norm8d 群は Norm16d 群と差はなかった (Fig. 4F, Mandibular nerve: Norm16d, $1.58 \pm 0.68\%$; Hypo8d, $35.13 \pm 7.95\%$; Hypo16d, $34.02 \pm 8.68\%$; Hypo8d+norm8d, $1.54 \pm 0.40\%$. Norm16d vs. Hypo8d, $p = 0.012$; Norm16d vs. Hypo16d, $p = 0.015$; Hypo8d vs. Hypo8d+norm8d, $p = 0.026$; Hypo16d vs. Hypo8d+norm8d, $p = 0.033$)。

CIH によって GFAP 陽性サテライトグリアに取り囲まれるニューロン数の割合が増加した。これは、CIH による TRPV1 陽性ニューロン数の割合の増加、CGRP 陽性ニューロン数の割合の増加、さらに、角膜および口腔粘膜におけるカプサイシン刺激に対する疼痛閾値の低下の経時的変化と一致した。

3.4. 三叉神経節における TRPV1 陽性ニューロンのサイズ

三叉神経節における中型および大型の TRPV1 陽性ニューロンの比率は、Hypo16d 群において Norm16d 群と比較し、有意に増加した (Fig. 5, Ophthalmic nerve: Norm16d, $n = 6$; Hypo16d, $n = 6$. Norm16d $< 500 \mu\text{m}^2$, 83.21% ; $500\text{-}1000 \mu\text{m}^2$, 14.60% ; $> 1000 \mu\text{m}^2$, 2.19% ; Hypo16d $< 500 \mu\text{m}^2$, 68.19% ; $500\text{-}1000 \mu\text{m}^2$, 24.07% ; $> 1000 \mu\text{m}^2$, 7.75% . Norm16d vs. Hypo16d, $p < 0.001$. Fig. 5, Maxillary nerve: Norm16d $< 500 \mu\text{m}^2$, 87.56% ; $500\text{-}1000 \mu\text{m}^2$, 10.67% ; $> 1000 \mu\text{m}^2$, 1.78% ; Hypo16d $< 500 \mu\text{m}^2$, 58.40% ; $500\text{-}1000 \mu\text{m}^2$, 33.44% ; $> 1000 \mu\text{m}^2$, 8.15% . Norm16d vs. Hypo16d, $p < 0.001$. Fig. 5, Mandibular nerve: Norm16d $< 500 \mu\text{m}^2$, 77.19% ; $500\text{-}1000 \mu\text{m}^2$, 20.74% ; $> 1000 \mu\text{m}^2$, 2.07% ; Hypo16d $< 500 \mu\text{m}^2$, 60.25% ; $500\text{-}1000 \mu\text{m}^2$, 31.56% ; $> 1000 \mu\text{m}^2$, 8.20% . Norm16d vs. Hypo16d, $p < 0.001$. Same rat in Fig. 4B)

CIH により三叉神経節ニューロンの表現型が変化し、中型・大型ニューロンも、TRPV1 を発現するようになったと考えられる。

4. Vc に入力する TRPV1 陽性中枢側神経終末

TRPV1 陽性中枢側神経終末は、Vc の I-II 層の背腹側的、内外側的、吻尾側的に観察された (Bae et al., 2004; Pei et al., 2007; Fig. 6A) 。 Vc の眼神経、上顎神経領域における TRPV1 陽性中枢側神経終末の密度は、Hypo16d 群と Norm16d 群で差はなかった (Fig. 6B, Ophthalmic nerve: Norm16d, n = 6; Hypo8d, n = 6; Hypo16d, n = 6; Hypo8d+norm8d, n = 6. Norm16d, 5.58 ± 1.26%; Hypo8d, 3.91 ± 0.90%; Hypo16d, 5.33 ± 1.45%; Hypo8d+norm8d, 3.31 ± 0.85%. Fig. 6B, Maxillary nerve: Norm16d, 2.77 ± 0.86%; Hypo8d, 4.01 ± 0.95%; Hypo16d, 3.96 ± 0.94%; Hypo8d+norm8d, 3.20 ± 0.67%. Same rats in Fig. 4B) 。 一方、下顎神経領域の TRPV1 陽性中枢側神経終末の密度は、Norm16d 群と比較し、Hypo16d 群で有意に高かった (Fig. 6B, Mandibular nerve: Norm16d, 1.71 ± 0.38%; Hypo8d, 5.46 ± 1.06%; Hypo16d, 5.97 ± 1.14%; Hypo8d+norm8d, 1.89 ± 0.51%. Norm16d vs. Hypo16d, p = 0.020; Hypo16d vs. Hypo8d+norm8d, p = 0.017) 。

これらの結果は、CIH が TRPV1 陽性中枢側神経終末から Vc ニューロンへの侵害情報入力を増加させることを示唆している。

5. Vi から C2 における舌へのカプサイシン刺激に応答する pERK の発現

舌へのカプサイシン刺激 (1.0 mM) によりリン酸化した pERK 陽性ニューロンは、TRPV1 陽性ニューロンの中枢側神経終末が入力する Vc の背側、表層に発現することを確認した (Fig. 6C) 。 Fig. 7A に、Norm16d 群 (16 日目) と Hypo16d 群 (16 日目) における Vc の pERK 陽性ニューロンの顕微鏡写真を示す。舌へのカプサイシン刺激が、Vi/Vc と Middle-Vc Laminae I-II に存在するニューロンの ERK リン酸化を惹起した (Fig. 7A-C) 。 この部位は既存の報告で、舌の感覚を支配する末梢ニューロンからの入力があるとされている部位である (Noma et al., 2008) 。

CIH 前 (Day-1&0) では、0.33 μ M のカプサイシン溶液選択率は約 50% であり (Fig. 3C) 、この濃度は舌を含む口腔粘膜に対し、侵害受容の閾値以下であると考えられる。舌への低濃度カ

プサイシン刺激 (0.33 μ M) によりリン酸化した pERK 陽性ニューロン数は、Middle-Vc Laminae I-II において、無刺激の Naïve 群と比較し、Hypo16d 群で有意に多かった (Fig. 7B, Middle-Vc Laminae I-II: Naïve-NS, n = 5; Norm16d, n = 6; Hypo8d, n = 6; Hypo16d, n = 6; Hypo8d+norm8d, n = 6. Naïve-NS, 4.58 ± 1.26 ; Norm16d, 5.77 ± 1.40 ; Hypo8d, 7.55 ± 0.98 ; Hypo16d, 10.56 ± 1.60 ; Hypo8d+norm8d, 7.22 ± 1.43 . Naïve-NS vs. Hypo16d, $p = 0.021$)。Vi/Vc の pERK 陽性ニューロン数も増加したが、無刺激の Naïve 群および Norm16d 群と比較し、有意な差はなかった (Fig. 7B, Vi/Vc: Naïve-NS, 3.14 ± 0.94 ; Norm16d, 3.73 ± 1.36 ; Hypo8d, 8.08 ± 2.08 ; Hypo16d, 9.94 ± 2.44 ; Hypo8d+norm8d, 8.15 ± 2.94)。また、Vi と Caudal-Vc/C2 Laminae I-II の pERK 陽性ニューロン数も、無刺激の Naïve 群および Norm16d 群と比較し、有意な差はなかった (Fig. 7B, Vi: Naïve-NS, 0.13 ± 0.08 ; Norm16d, 0.03 ± 0.03 ; Hypo8d, 0.03 ± 0.03 ; Hypo16d, 0.25 ± 0.13 ; Hypo8d+norm8d, 0.17 ± 0.14 . Fig. 7B, Caudal-Vc/C2 Laminae I-II: Naïve-NS, 1.88 ± 0.31 ; Norm16d, 2.46 ± 0.60 ; Hypo8d, 1.40 ± 0.41 ; Hypo16d, 1.44 ± 0.37 ; Hypo8d+norm8d, 1.53 ± 0.53)。

舌への高濃度カプサイシン刺激 (1.0 mM) によりリン酸化した pERK 陽性ニューロン数は、Vi/Vc と Middle-Vc Laminae I-II において、無刺激の Naïve 群と比較し、Norm16d 群で有意に多かった (Fig. 7C, Vi/Vc: Naïve+NS, n = 5; Norm16d, n = 5; Hypo8d, n = 5; Hypo16d, n = 6; Hypo8d+norm8d, n = 6. Naïve-NS, 3.14 ± 0.94 ; Norm16d, 32.29 ± 4.14 ; Hypo8d, 13.03 ± 1.27 ; Hypo16d, 13.06 ± 3.41 ; Hypo8d+norm8d, 24.37 ± 3.46 . Naïve-NS vs. Norm16d, $p < 0.001$. Fig. 7C, Middle-Vc Laminae I-II: Naïve-NS, 4.58 ± 1.26 ; Norm16d, 28.05 ± 2.87 ; Hypo8d, 12.48 ± 2.30 ; Hypo16d, 16.92 ± 1.78 ; Hypo8d+norm8d, 18.19 ± 1.57 . Naïve-NS vs. Norm16d, $p < 0.001$)。一方、低濃度カプサイシン刺激 (0.33 μ M) への応答とは異なり、高濃度カプサイシン刺激 (1.0 mM) によりリン酸化した pERK 陽性ニューロン数は、Hypo16d 群において増加が認められなかった (Fig. 7C, Vi/Vc: Naïve-NS vs. Hypo8d+norm8d, $p = 0.007$; Middle-Vc Laminae I-II: Norm16d vs. Hypo8d, $p = 0.041$)。また、Vi と Caudal-Vc/C2 Laminae I-II の pERK 陽性ニ

ニューロン数は、無刺激の Naive 群および Norm16d 群と比較し、有意な差はなかった (Fig. 7C, Vi: Naive-NS, 0.13 ± 0.08 ; Norm16d, 0.60 ± 0.32 ; Hypo8d, 0.17 ± 0.13 ; Hypo16d, 0.06 ± 0.06 ; Hypo8d+norm8d, 0.41 ± 0.19 . Fig. 7C, Caudal-Vc/C2 Laminae I-II: Naive-NS, 1.88 ± 0.31 ; Norm16d, 3.28 ± 0.32 ; Hypo8d, 1.70 ± 0.13 ; Hypo16d, 2.05 ± 0.30 ; Hypo8d+norm8d, 2.14 ± 0.48)。

すなわち、CIH により舌への低濃度カプサイシン刺激 ($0.33 \mu\text{M}$) によりリン酸化した pERK 陽性ニューロン数は増加し、高濃度カプサイシン刺激 (1.0 mM) によりリン酸化した pERK 陽性ニューロン数は減少することが確認された。

6. Vi から C2 における cFos 陽性ニューロンの発現

Fig. 8A に Norm16d 群 (16 日目) と Hypo16d 群 (16 日目) の Vc における cFos 陽性ニューロンの顕微鏡写真を示す。Norm16d 群と比較し Hypo16d 群では、Vc の表層および深層において多くの cFos 陽性ニューロンが観察された (Fig. 8A)。吻尾的には、cFos 陽性ニューロンは Vi から C2 に分布していた。Norm16d 群と比較し Hypo16d 群では、特に門から尾側において、cFos 陽性ニューロン数が多かった (Fig. 8B)。cFos 陽性ニューロン数は、Vi/Vc、Middle-Vc Laminae I-II、Caudal-Vc/C2 Laminae I-II の Hypo16 群において Norm16d 群と比較し、有意に多かった (Fig. 8C, Vi: Norm16d, $n = 5$; Hypo8d, $n = 6$; Hypo16d, $n = 6$; Hypo8d+norm8d, $n = 6$. Norm16d, 5.37 ± 0.88 ; Hypo8d, 1.11 ± 0.42 ; Hypo16d, 6.58 ± 2.53 ; Hypo8d+norm8d, 1.06 ± 0.37 . Fig. 8C, Vi/Vc: Norm16d, 23.33 ± 4.92 ; Hypo8d, 21.42 ± 5.07 ; Hypo16d, 48.23 ± 5.99 ; Hypo8d+norm8d, 22.72 ± 5.32 . Norm16d vs. Hypo16d, $p = 0.003$. Fig. 8C, Middle-Vc Laminae I-II: Norm16d, 5.39 ± 0.66 ; Hypo8d, 9.55 ± 2.60 ; Hypo16d, 24.61 ± 2.72 ; Hypo8d+norm8d, 13.52 ± 3.16 . Norm16d vs. Hypo16d, $p = 0.003$. Fig. 8C, Caudal-Vc/C2 Laminae I-II: Norm16d, 5.43 ± 0.38 ; Hypo8d, 5.17 ± 1.45 ; Hypo16d, 22.41 ± 3.93 ; Hypo8d+norm8d, 8.76 ± 1.15 . Norm16d vs. Hypo16d, $p = 0.019$; Hypo8d vs. Hypo16d, $p = 0.002$)。Hypo8d+norm8d 群は

Norm16d 群と同じレベルであり、後発的な増加は認められなかった。

これらの結果から、CIH によって Vc 表層におけるニューロンの自発的な興奮が増加している可能性が示唆された。

7. Vc から C2 におけるグリア細胞の発現

7.1. GFAP 陽性細胞の占有率

Fig. 9A に、Norm16d 群 (16 日目) と Hypo16d 群 (16 日目) の Vc における GFAP 陽性細胞の顕微鏡写真を示す。

眼神経領域の GFAP 陽性細胞の占有率は、CIH による変化は認められなかった (Fig. 9B, Ophthalmic nerve: Norm16d, n = 6; Hypo8d, n = 6; Hypo16d, n = 6; Hypo8d+norm8d, n = 6; Norm16d, $4.15 \pm 0.48\%$; Hypo8d, $4.49 \pm 0.63\%$; Hypo16d, $3.90 \pm 0.29\%$; Hypo8d+norm8d, $5.25 \pm 0.44\%$) 。

上顎神経領域の GFAP 陽性細胞の占有率は、CIH による変化は認められなかった (Fig. 9B, Maxillary nerve: Norm16d, $3.92 \pm 0.55\%$; Hypo8d, $3.45 \pm 0.37\%$; Hypo16d, $4.08 \pm 0.49\%$; Hypo8d+norm8d, $4.80 \pm 0.47\%$) 。

下顎神経領域の GFAP 陽性細胞の占有率は、CIH による変化は認められなかった (Fig. 9B, Mandibular nerve: Norm16d, $4.99 \pm 0.82\%$; Hypo8d, $3.52 \pm 0.45\%$; Hypo16d, $3.15 \pm 0.40\%$; Hypo8d+norm8d, $4.86 \pm 0.22\%$. Hypo16d vs. Hypo8d+norm8d, $p = 0.044$) 。

CIH に起因する活性型アストロサイトの発現に、変化は認められなかった。

7.2. Iba1 陽性細胞の占有率

Fig. 9C に、Norm16d 群 (16 日目) と Hypo16d 群 (16 日目) の Vc における Iba1 陽性細胞の顕微鏡写真を示す。

眼神経領域の Iba1 陽性細胞の占有率は、Hypo8d 群、Hypo8d+norm8d 群において Norm16d

群と比較し、有意に低かった (Fig. 9D, Ophthalmic nerve: Norm16d, n = 6; Hypo8d, n = 6; Hypo16d, n = 6; Hypo8d+norm8d, n = 6. Norm16d, $10.80 \pm 0.82\%$; Hypo8d, $6.17 \pm 0.32\%$; Hypo16d, $7.10 \pm 0.81\%$; Hypo8d+norm8d, $4.89 \pm 0.37\%$. Norm16d vs. Hypo8d, $p = 0.001$; Norm16d vs. Hypo8d+norm8d, $p = 0.015$. Same rat in Fig. 9B)。

上顎神経領域の Iba1 陽性細胞の占有率は、Hypo8d 群、Hypo8d+norm8d 群において Norm16d 群と比較し、有意に低かった (Fig. 9D, Maxillary nerve: Norm16d, $10.97 \pm 0.76\%$; Hypo8d, $4.67 \pm 0.37\%$; Hypo16d, $9.30 \pm 0.72\%$; Hypo8d+norm8d, $6.26 \pm 0.53\%$. Norm16d vs. Hypo8d, $p = 0.002$; Norm16d vs. Hypo8d+norm8d, $p = 0.039$; Hypo8d vs. Hypo8d+norm8d, $p = 0.027$)。

下顎神経領域の Iba1 陽性細胞の占有率は、Hypo8d 群において Norm16d 群と比較し、有意に低かった (Fig. 9D, Mandibular nerve: Norm16d, $9.42 \pm 0.58\%$; Hypo8d, $4.91 \pm 0.30\%$; Hypo16d, $6.46 \pm 0.59\%$; Hypo8d+norm8d, $6.46 \pm 0.59\%$. Norm16d vs. Hypo8d, $p = 0.002$)。

CIH によって、活性型ミクログリアの発現は抑制された。

これらの結果から、CIH による Vc ニューロンの興奮性上昇に対する、アストロサイト、ミクログリアの関与は低いと考えられる。

考察

本研究で明らかとなった、明期の CIH による口腔顔面領域の疼痛閾値、三叉神経節および三叉神経脊髄路核ニューロンに生じた変化を以下に要約する。(1) 角膜および口腔粘膜へのカプサイシン刺激に対する疼痛閾値が低下した。(2) 三叉神経節の TRPV1 陽性ニューロン数の割合、CGRP 陽性ニューロン数の割合、GFAP 陽性サテライトグリアに取り囲まれるニューロン数の割合は増加した。(3) 三叉神経節における大型の TRPV1 陽性ニューロンの比率は増加した。(4) Vc 表層に入力する TRPV1 陽性中枢側神経終末の密度は増加した。(5) 舌への低濃度カプサイシン刺激に応答する Vc の pERK 陽性ニューロン数が増加し、高濃度カプサイシン刺激に応答する pERK 陽性ニューロン数は減少した。(6) Vc の cFos 陽性ニューロン数が増加した。(7) Vc の GFAP 陽性細胞の占有率に変化はなく、Iba1 陽性細胞の占有率は減少した。(8) TRPV1 を介する疼痛閾値の低下、三叉神経節および Vc における神経応答は可逆的だった。これらの結果から、明期の CIH が、三叉神経節ニューロンの TRPV1 活性化を引き起こし、角膜および口腔粘膜のカプサイシン刺激に対する疼痛閾値の低下、および Vc の神経応答を増強する可能性が示唆された。

1. CIH 動物モデル

齧歯類への明期の CIH は、OSA 動物モデルとして確立されている (Navarrete-Opazo et al., 2014)。CIH は、酸素濃度、期間、および 1 日当たりの低酸素状態となる回数により、神経保護的または神経障害的な相反する影響を及ぼすと報告されている。中程度の低酸素状態 (最低酸素濃度: 9% - 16%) かつ低酸素状態となる回数が少ない (3 - 15 回/日) 場合は、神経保護的な作用をもたらす (Navarrete-Opazo et al., 2014)。重度の低酸素状態 (最低酸素濃度: 2% - 8%) かつ低酸素状態となる回数が多い (48 - 2400 回/日) 場合は、神経障害を惹起する (Navarrete-Opazo

et al., 2014)。間歇的低酸素負荷時の最低酸素濃度を 5%とした本研究では、ペントバルビタール麻酔下の正常酸素状態で SaO_2 は約 86%、低酸素状態で SaO_2 は約 42%だった。ケタミンとキシラジンで麻酔したラットの SaO_2 は、正常酸素状態では約 83%~87%であり、1 時間の低酸素状態（最低酸素濃度: 13.5%）で SaO_2 は約 45%まで低下するという報告がある (Davieds et al., 2016)。一方、重度の OSA 患者では、夜間の最低 SaO_2 が約 75%まで低下するケースがある (Doufas et al., 2013)。このような過去の報告における OSA 患者と OSA モデル動物で観察された最低 SaO_2 の違いは、麻酔による影響によって生じている可能性が考えられる。最低 SaO_2 の程度に差はあるが、 SaO_2 の低下を認める点においては OSA 患者と OSA モデル動物に共通している。また、OSA モデル動物は、睡眠時に OSA 患者の低酸素状態が間歇的に生じる病態を再現している。ただし、OSA モデル動物に負荷する低酸素状態の変動は規則的にコントロールされており、OSA 患者の低酸素状態の程度と周期性の多様性を完全に反映させることはできない。動物実験にはこれらの制限はあるが、OSA モデル動物は睡眠時に低酸素状態になる点、さらにそれが間歇的である点において OSA 患者の睡眠時の症状を模倣している。本研究の CIH プロトコルは、ラットの睡眠時間帯である明期において、間歇的低酸素負荷による十分な SaO_2 の低下を誘発できることから、重度の低酸素状態を伴う OSA モデルとして使用した。

2. CIH に起因する三叉神経節ニューロンでの TRPV1 の発現

OSA 患者は、睡眠分断と睡眠中の SaO_2 の低下により、痛覚過敏を呈することがある。睡眠分断と睡眠中の SaO_2 の低下は、健康成人においても、炎症の亢進や自発痛の増加を引き起こす (Doufas et al., 2013; Finan et al., 2013; Haack et al., 2009)。一方、OSA の治療の一つである、睡眠中の Continuous Positive Airway Pressure (CPAP) による気道への持続的な陽圧は、OSA 患者における SaO_2 の低下を改善し、睡眠の連続性を確保する。CPAP 治療を受けた OSA 患者では、CPAP を使用していない OSA 患者と比較し、疼痛閾値が上昇すると報告されている (Khalid et al., 2011)。これらの知見は、OSA によって誘発される痛覚過敏が可逆的である可能

性を示している。OSA によって誘発される痛覚過敏の神経学的メカニズムの詳細は解明されていないが、酸化ストレスが臓器や細胞の機能に強く影響する可能性がある。OSA モデル動物において、免疫機構に関わるリンパ球である cluster of differentiation (CD) 4 陽性細胞、CD8 陽性細胞の細胞死は、睡眠の分断よりも、間歇的な低酸素状態により生じる (Cubillos-Zapata et al., 2020)。また、CIH への曝露は、低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor: HIF) -1 α の反応性増加とミトコンドリアによる活性酸素の産生増加の相互作用により、酸化ストレスを惹起すると報告されている (Prabhakar et al., 2007; Guzy et al., 2005; Kietzmann et al., 2005; Semenza et al., 2007)。組織の酸素利用効率を低下させると、潜在的に末梢感作 (Hillery et al., 2011; Kallenborn-Gerhardt et al., 2012; Linley et al., 2012) や中枢感作 (Lee et al., 2012) が生じ、侵害情報伝達が増強されることも *in vitro* および *in vivo* の基礎研究において証明されている (Ristoiu et al., 2011; Hillery et al., 2011; Chuang et al., 2009)。すなわち、睡眠中の SaO₂ の低下が、OSA モデル動物の口腔顔面領域の痛覚過敏の発症と維持に強く影響する可能性がある。

眼や口腔粘膜に疼痛が生じている状態では、三叉神経節ニューロンにおいて TRPV1 の発現が増加する (Bereiter et al., 2018; Araya et al., 2017)。TRPV1 は熱やカプサイシン刺激によって活性化されるが (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998)、HIF-1 α の活性化を伴う酸化ストレスによっても TRPV1 の活性化が生じ、末梢組織の疼痛を惹起することが報告された (Ristoiu et al., 2011; Naziroğlu et al., 2020)。つまり、本研究において、CIH が三叉神経節ニューロンの TRPV1 発現を増加させ、眼および口腔粘膜におけるカプサイシン刺激に対する疼痛閾値の低下をもたらした可能性が示唆される。さらに、CIH 解除後に正常酸素状態に戻すと、疼痛閾値低下と三叉神経節ニューロンで生じる変化が CIH 前と同様の状態に戻ることから、明期の CIH が TRPV1 を介した末梢感作を惹起しうることも考えられる。

三叉神経節ニューロンは細胞体の大きさによって、小型 (< 500 μm^2)、中型 (500–1000 μm^2)、大型 (> 1000 μm^2) に分類され、それぞれが求心性 C 線維、A δ 線維、A β 線維を持つ (Sugimoto et al., 1997)。三叉神経節に存在する TRPV1 陽性ニューロンは、小型または中型であるが (Bae

et al., 2004)、口腔顔面領域の炎症性疼痛発症時には、大型の TRPV1 陽性三叉神経節ニューロンの比率が増加する (Pei et al., 2007)。同様の表現型の変化が、本研究の CIH 群においても認められた (Fig. 5)。また、TRPV1 陽性三叉神経節ニューロンの大部分は、痛みの慢性化に関与する substance P および CGRP を共発現する (Bae et al., 2004)。さらに、神経障害性疼痛発症時には、大型の CGRP 陽性三叉神経節ニューロンの比率が増加することも報告されている (Mikuzuki et al., 2017)。これらのデータは、CIH によるエピジェネティックな変化が、三叉神経節ニューロンの表現型の変化を誘発し、口腔顔面痛を悪化させる可能性があることを示唆する。

TRPV1 の発現増加および表現型変化のメカニズムには、以下の 2 つの可能性が考えられる。

①炎症と DNA メチレーションの低下、および②神経ペプチドの発現である。OSA モデル動物では、OSA 患者で認められるように、低酸素状態が炎症カスケードを活性化すると考えられる (Wu et al., 2020; Kheirandish-Gozal et al., 2019)。一方、口腔顔面領域の末梢組織で炎症が生じた際には、三叉神経節ニューロンにおける TRPV1 発現が増加し、その結果、病的な疼痛をもたらすことが知られている。この TRPV1 の発現増加は、三叉神経節における global DNA メチレーションの低下、とくに DNA methyltransferase (DNMT) 3a により調節されると報告されている (Bai et al., 2020)。また、高齢マウスでは、CIH によって DNMT の機能低下を引き起こす (Liu et al., 2016)。したがって、本研究では、CIH により活性化される炎症カスケードや CIH そのものが、末梢神経系で DNA メチレーションを低下させ、TRPV1 発現を増加させた可能性がある。また、組織損傷の際に痛覚過敏が生じるメカニズムのひとつに、侵害刺激を受容するイオンチャネルの発現増加がある。末梢組織損傷に伴い、マスト細胞、マクロファージなどから炎症メディエーターが末梢組織に放出され、神経終末に受容されると、三叉神経節ニューロンにおける Nerve growth factor (NGF) の発現を介し、TRPV1 の発現が増加する (Basbaum et al., 2009; Iyengar et al., 2017)。さらに、神経原性炎症においては、脊髄後根神経節で NGF の発現が増加する (Yanik et al., 2020)。神経原性炎症は、末梢側神経終末から末梢組織へ放出された substance P や CGRP といった神経ペプチドが炎症性細胞に作用することで誘発されることが知

られている (Basbaum et al., 2009)。すなわち本研究では、CIH により三叉神経節ニューロンの CGRP 発現が増加することから、CGRP の三叉神経節ニューロンの末梢側神経終末からの放出が神経原性炎症を惹起し、三叉神経節ニューロンにおいて NGF が誘導され、その結果、TRPV1 の発現が増加した可能性が考えられる。

3. CIH による三叉神経節における末梢感作

CGRP は三叉神経節ニューロンに発現する神経ペプチドの一種であり、C 線維または A δ 線維を介して、痛覚の伝達に関与する (Ishida-Yamamoto et al., 1989; Iyengar et al., 2017)。本研究では、CIH8 日目から CIH を行った期間に限定し、三叉神経節ニューロンにおける CGRP 発現が増加した。三叉神経節の TRPV1 陽性ニューロンは、その半数近くが CGRP を共発現する (Bae et al., 2004)。さらに、CGRP は神経伝達物質として機能することから、CIH により TRPV1 の発現が増加することで、三叉神経節ニューロンの神経終末への感覚入力が増加し、三叉神経節ニューロンにおける CGRP 発現も増加した可能性が考えられる。しかし、本研究では、CGRP の表現型の変化を解析しておらず、また、CIH による経時的な TRPV1 発現の増加とタイムコースが同一であった。よって、TRPV1 および CGRP を発現するニューロンのどちらが先に CIH による変化を生じるかは、不明であり、さらなる研究が必要である。

三叉神経節ニューロンはその周囲をサテライトグリアにより取り囲まれている (Hanani, 2005)。サテライトグリアは、神経損傷や炎症が生じた際に活性化し、疼痛の調節に関与することが報告されている (Katagiri et al., 2012; Matsuura et al., 2013)。また、三叉神経節ニューロンから放出された CGRP が、サテライトグリアに発現する CGRP 受容体 (Lennerz et al., 2008) に結合することで、サテライトグリアが活性化する (Mikuzuki et al., 2017)。さらに、活性化したサテライトグリアは一酸化窒素 (Nitric oxide: NO) を放出し、三叉神経節ニューロンの CGRP 産生を促進する。このポジティブフィードバックにより疼痛が増強すると考えられている (Liang et al., 2020)。このことから、本研究では、三叉神経節ニューロンにおいて、CIH に起因

する TRPV1 と CGRP の発現が増加し、さらに三叉神経節内に放出された CGRP がサテライトグリアを活性化することで、ニューロン-グリア相互作用が増強された結果、末梢感作が生じたと考えられる。

4. 口腔顔面領域のカプサイシン刺激に対する疼痛閾値の低下と中枢感作

角膜および口腔粘膜におけるカプサイシン刺激に対する疼痛閾値の低下が、ドライアイや糖尿病性神経障害ラットで生じることが報告されている (Bereiter et al., 2018; Okada et al., 2021)。本研究では、角膜および口腔粘膜へのカプサイシン刺激に対する、濃度依存的な疼痛閾値の低下が認められた。

舌へのカプサイシン刺激は、TRPV1 を発現する三叉神経節ニューロンを介して (Caterina et al., 1997; Liu et al., 1996)、Vc の表層に入力する (Carstens et al., 1998; Carstens et al., 1995)。TRPV1 陽性ニューロンは、三叉神経脊髄路核主感覚核、三叉神経脊髄路核吻側亜核、三叉神経脊髄路核中間亜核 (Vi)、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc)、上部頸髄に投射するが、特に Vc の I 層および II 層の外層に密集して投射する (Bae et al., 2004)。そのため本研究では、TRPV1 陽性の神経終末の多くが入力する Vc の I-II 層を中心に Vi から C2 において pERK 陽性ニューロンと cFos 陽性ニューロンの解析を行った。また、神経損傷モデルでは、三叉神経節における TRPV1 発現の増加とともに、Vc の I-II 層に入力する TRPV1 陽性中枢側神経終末が増加するという報告がある (Kim et al., 2014)。加えて、TRPV1 は一次ニューロンの中枢側神経終末で発現し、substance P や CGRP の放出に関わることも報告されている (Murata et al., 2006)。本研究では、TRPV1 陽性ニューロンの中枢側神経終末が発現する Vc の I-II 層において、舌へのカプサイシン刺激 (1.0 mM) によりリン酸化した pERK 陽性ニューロンが観察された (Fig. 6C)。これらの結果から、Vc 表層で ERK のリン酸化を生じたニューロンが、口腔顔面領域の感覚を支配する TRPV1 陽性三叉神経節ニューロンの中枢側神経終末から持続的な入力を受けていると考えられる。さらにその Vc の侵害受容ニューロンの中枢感作が、CIH に起因する口腔顔面痛の発

症に関わることを強く示唆している。

ペントバルビタール麻酔下での舌への低濃度カプサイシン刺激 (0.33 μM) から 5 分後の pERK 陽性ニューロン数は、Middle-Vc において、無刺激の Naïve 群と比較し、Hypo16d 群で多かった (Fig. 7B)。この結果は、pERK 発現のピークが口腔顔面組織への侵害刺激から 5 分後であり (Noma et al., 2008)、また、カプサイシンで舌を刺激してから 5~10 分後のニューロンの自発発火頻度が増加するという過去の知見と時間的に一致する (Carstens et al., 1998)。さらに、口腔顔面領域への侵害刺激に応答する二次ニューロンは、三叉神経脊髄路核において体部位局在を示す (Strassman et al., 1993a)。本研究では、舌へのカプサイシン刺激によりリン酸化した pERK 陽性ニューロンが、主に Vi/Vc と Middle-Vc の背側に存在した (Fig. 7B; Fig. 6C)。この領域も、既知の報告と一致した (Noma et al., 2008)。

2 瓶法によるカプサイシン溶液選択テストで観察された低濃度カプサイシン溶液 (0.33 μM) の選択率は、正常酸素状態での飼育時では約 50%であった (Fig. 3C)。この結果は、口腔内のカプサイシンの検知閾がラットやマウスで約 0.33 μM であったという以前の報告と一致する (Simons et al., 2001; Simons et al., 2002)。舌への 330 μM カプサイシン刺激は Vc ニューロンを興奮させるが、ペントバルビタール麻酔下での 33 μM カプサイシン刺激は Vc ニューロンを興奮させないという報告もある (Dessirier et al., 2000)。本研究では、Hypo16d 群において、舌への低濃度カプサイシン刺激 (0.33 μM) によってリン酸化した Vc の pERK 陽性ニューロン数は、無刺激の Naïve 群と比べて有意に多かった (Fig. 7B)。すなわち、本研究の CIH プロトコルは、炎症や神経損傷を伴わずに中枢感作や舌痛を誘発すると考えられ、口腔灼熱症候群のように医学的に原因不明の痛覚過敏の発症機序を解明できる可能性がある。さらに、口腔内および皮膚への低濃度のカプサイシン塗布は、末梢感作を生じることが報告されている (Green, 1998)。これらのことから、CIH により疼痛閾値が低下したメカニズムとして、三叉神経節ニューロンの TRPV1 陽性侵害受容の空間的な増加、侵害受容器の興奮性の増加、中枢神経への侵害受容伝達の増強が考えられる (Dessirier et al., 2000)。

本研究では、CIHにより舌へのカプサイシン刺激に応答するVcのpERK陽性ニューロン数が増加したが、CIHが角膜へのカプサイシン刺激に応答するVcのpERK陽性ニューロンを増加させるかは不明である。Vcの眼神経領域におけるTRPV1陽性中枢側神経終末の密度は、CIHによって増加しなかった(Fig. 6B)。角膜を支配する三叉神経節ニューロンの30%がTRPV1を含むが、Vcへ投射するニューロンのうち、TRPV1を含むものは2%に過ぎないとの報告がある(Hegarty et al., 2014)。したがって、TRPV1陽性神経の中枢への投射密度は、眼神経が入力するVc領域のニューロンのCIHによる興奮性に影響を与える可能性がある。

5. ViからC2における自発的な神経活動の増加

cFosは神経活動のマーカーとされ、眼や舌を含む口腔顔面領域への侵害刺激により三叉神経脊髄路核ニューロンにて、体部位局在に応じた発現を示す(Strassman et al., 1993a)。本研究では、侵害刺激を加えなくとも、CIH群のVi/VcからC2におけるcFos発現が増加した。つまり、CIHによりVcニューロンの自発的な発火が増加している可能性が考えられる(Inami et al., 2020)。この自発的な発火をもたらすニューロンの閾値の低下が起こった機序には、前述した三叉神経節ニューロンにおけるTRPV1の発現増加に加え、CGRPの発現増加が関与すると考えられる。三叉神経節ニューロンで発現したCGRPは中枢側神経終末に運ばれ、Vcで放出される。三叉神経節ニューロン中枢側神経終末から放出されたCGRPをVcニューロンが受容すると、protein kinase A (PKA)、protein kinase C (PKC)が活性化される。続いて、Vcニューロンから放出されたNOを三叉神経節ニューロンの中枢側神経終末が受容することで、三叉神経節ニューロンの中枢側神経終末からの神経伝達物質放出が促進される。この持続的な侵害情報入力、VcニューロンのMAPKカスケードを駆動し、N-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体を活性化することにより、Vcニューロンの興奮性を増加させる(Iyengar et al., 2017; Benarroch, 2011)。すなわち、本研究では、CIHによって三叉神経節ニューロンで発現が増加したCGRPが中枢側神経終末に輸送され、NMDA受容体の活性化を起こすことで、Vcニューロンの興奮性を増加さ

せたと考えられる。

6. Vc における活性型グリア細胞の中樞感作への関与

本研究では、CIH によるアストロサイトの活性化は認められず、ミクログリアの活性化は抑制された。アストロサイトやミクログリアは、神経損傷や炎症により活性化を示し、侵害情報伝達に関わる Interleukin (IL) -1 β 、IL-6、Tumor Necrosis Factor (TNF) - α 、プロスタグランジン、アデノシン三リン酸 (Adenosine triphosphate: ATP) などの物質を放出することで、ニューロンの興奮性を増加させる (Watkins et al., 2003; Liu et al., 2009; Okada-Ogawa et al., 2009; Shibuta et al., 2012)。また、海馬のアストロサイトは、CIH プロトコルにより、活性化 (最低酸素濃度 10%, 6 分サイクル, 8 時間, 10 日間, Aviles-Reyes et al., 2010)、または活性化の抑制 (最低酸素濃度 10%, 8 分サイクル, 8 時間, 12 日間, Snyder et al. 2009) という、相反する反応を示す。海馬のミクログリアは、CIH (最低酸素濃度 5%, 2 分サイクル, 8 時間, 28 日間) により活性化を示す (Dong et al., 2018)。その一方、in vitro の実験系において、低酸素状態による HIF-1 α の活性化がミクログリアのオートファジーを誘導することで、ミクログリアの細胞死が生じると報告されている (Yang et al., 2014)。すなわち、本研究の結果を含め、CIH に対する中枢神経系のグリア細胞の応答については、統一した見解が得られていない。特にアストロサイトに関する報告は少ないため不明な点は多く残るが、本研究の CIH プロトコルは、Vc におけるアストロサイトを活性化を生じさせず、一方でミクログリアの細胞死を惹起した結果、活性型ミクログリアが減少した可能性が考えられる。

7. 末梢組織へのカプサイシン刺激による脱感作

本研究では、Vc の I-II 層において、舌への高濃度カプサイシン刺激 (1.0 mM) によりリン酸化した pERK 陽性ニューロン数は、Norm16d 群と比較し、Hypo16d 群で有意に抑制された (Fig. 7C)。つまりカプサイシン刺激に対する脱感作も生じていたことが示唆される。ヒトの舌は、カ

プサイシンの検知閾（約 0.3~3.3 μM ）では温かいという感覚が生じ、30~300 μM のカプサイシンでは熱いという感覚が生じる（Karrer et al., 1991）。一方、高濃度のカプサイシン刺激（300 μM , 15 分）では、脱感作が起きる（Karrer et al., 1991）。ヒトにおいてカプサイシン誘発性の脱感作は、A δ 線維よりも C 線維で顕著である（van Neerven et al., 2020）。また、高濃度のカプサイシンは局所投与で麻酔効果を示すことから（Kohane et al., 1998; Su et al., 1999）、神経障害性疼痛の治療に用いられている。このカプサイシンの局所投与による鎮痛効果のメカニズムは、TRPV1 を発現する末梢の侵害受容器の一時的な不活性化であり（Caterina et al., 1997; Wang et al., 2017）、不活性化に伴い、感覚が消失すると考えられている（Nolano et al., 1999; Ragé et al., 2010）。この感覚消失は、TRPV1 を介した一次ニューロンへの Ca^{2+} の流入に起因する（Wang et al., 2017）。TRPV1 agonist の末梢組織への局所投与による神経終末の不活性化は、投与領域に限定され、感覚神経節ニューロンの変性は生じない（Karai et al., 2004）。したがって、CIH 群の Vc における高濃度カプサイシン刺激（1.0 mM）に応答する pERK 陽性ニューロンの発現抑制は、末梢側神経終末の TRPV1 の脱感作が生じたためであると考えられる。

ただし、本研究では重度の CIH を負荷しており、低酸素状態によるニューロンの細胞死が生じ、脱感作が引き起こされた可能性も否定できない。睡眠中の CIH は、ラットの大脳皮質と海馬のニューロンの細胞死を誘発する（Aviles-Reyes et al., 2010）。OSA に起因するニューロンの病的な変化は、認知、知覚、記憶、学習の障害につながる可能性が示唆されている（Decary et al., 2000）。本研究では CIH 群の三叉神経脊髄路核におけるニューロンの総数を解析していないため、細胞死によるニューロンの総数が減少した可能性を排除することはできない。さらに、CIH 群の高濃度のカプサイシン刺激に対する疼痛閾値の低下は、ERK のリン酸化以外の細胞内シグナル系が動員されて生じている可能性も考えられる。

8. 研究の限界

本研究では、CIH によるラットの低酸素状態により末梢感作および中枢感作が生じ、疼痛閾

値が低下した機序の一端を明らかにした。しかし、疼痛閾値の低下をもたらす原因が、睡眠時の低酸素状態のみとは断言できない。睡眠障害に関連する疼痛を惹起する要因とし、抑うつ状態、不安、視床下部-下垂体-副腎系の活性化が報告されている (Whibley et al., 2019)。OSA モデル動物においても、不安行動の増加 (Fan et al., 2021)、視床下部-下垂体-副腎系の活性化 (Ma et al., 2009) が生じることが報告されている。本研究においても CIH によるラットへの低酸素状態に加え、CIH に伴うストレス負荷が疼痛閾値の変化に影響を与えた可能性がある。したがって、本動物モデルにおける疼痛閾値の変化へのストレスの関与を明らかにすることは、今後の課題の一つである。

OSA 患者の夜間の周期的な低酸素状態は、痛みを増強し (Doufas et al., 2013)、健康成人に対する睡眠分断は疼痛閾値を低下させる (Rosseland et al., 2018)。一方、OSA と慢性口腔顔面痛を併発する患者の一部は、侵害刺激に対して痛覚鈍麻を示す (Smith et al., 2009)。動物実験では、CIH (最低酸素濃度 10%、90 秒サイクル、8 時間) を 3 週間行ったラットにおいて、後肢への熱刺激に対する疼痛閾値が上昇すると報告されている (Wu et al., 2015)。このように本研究と相反する事象も報告されている。これらの異なる結果をもたらす要因としては、OSA の要素である睡眠の分断と睡眠中の低酸素状態のどちらが優勢であるかが患者によって異なること (Charokopos et al., 2018)、睡眠中の低酸素状態の程度が患者によって異なること (Ugur et al., 2014)、OSA モデル動物が OSA の要素である睡眠の分断を反映していない可能性があること (Gozal et al., 2001) が考えられる。本研究においても、 SaO_2 の周期的な低下は認められたが、脳波測定を行っていないため、睡眠の分断が生じていたかは不明である。ただし、睡眠時の最低 SaO_2 の低下に伴い、起床時の頭痛の発生頻度が上昇すること (Doufas et al., 2013) からも、睡眠時の周期的な低酸素状態は、三叉神経支配領域の疼痛感受性の上昇に大きな影響を与えると考えられる。今後は、CIH が睡眠状態の相互作用がどのように疼痛閾値の変化に影響を与えるかを検証する必要がある。

結論

明期の CIH により角膜と口腔粘膜のカプサイシン刺激に対する疼痛閾値の低下が生じた。その機序として、CIH による三叉神経節ニューロンにおける TRPV1 の発現増加、および TRPV1 を発現するニューロンの表現型の変化による末梢感作が惹起されることが示唆された。また、CGRP 発現、活性型サテライトグリア発現の増加は、三叉神経節ニューロンの侵害情報伝達の促進に関与していると考えられる。さらに、TRPV1 を発現する三叉神経節ニューロンから Vc ニューロンへの侵害情報入力の増加により、Vc ニューロンの興奮性の増大が生じることが明らかとなった。CIH を解除すると CIH 前と同様の疼痛閾値に戻ることから、CIH の神経系に対する作用は可逆的である。したがって、明期の CIH は、TRPV1 の発現増加を介した口腔顔面痛の潜在的な発症要因となりうることが示唆された。

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、ご懇切なご指導を賜りました大阪大学歯学研究科高次脳口腔機能学講座（歯科麻酔学教室）の丹羽均教授と高次脳口腔機能統合学講座（口腔生理学教室）の加藤隆史教授、片桐綾乃講師に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり、多くのご助言とご協力を頂きました、歯科麻酔学教室、口腔生理学教室の教室員の方々に厚く御礼申し上げます。

Figure Legend

Fig. 1

実験計画

A：実験群と実験計画。CIHの開始は0日目の14：00～20：00であり、15日目（Hypo16d群）または7日目（Hypo8d+norm8d群）がCIHの最終日となる。免疫組織化学染色に使用する脳サンプル採取と行動観察実験は実験群の下に記載した日程で行った。

B：低酸素負荷を行う1日のスケジュール。14：00～20：00にCIH、8：00～14：00に行動観察実験または免疫組織化学染色に使用する脳サンプル採取を行った。

IHC：immunohistochemistry

Fig. 2

間歇的低酸素負荷中の酸素飽和度とpH

A：間歇的低酸素負荷中のチャンバー内の酸素濃度。3分間で酸素濃度を5%まで低下させ、その後の3分間で21%に戻す。

B：Naïveラットにおける平均SaO₂。黒線：Normoxia-Normoxia、赤線：Normoxia-Hypoxiaを表す。

C：Naïveラットにおける平均pH。黒線：Normoxia-Normoxia、赤線：Normoxia-Hypoxiaを表す。

** p < 0.01：(Normoxia-) Normoxia vs. (Normoxia-) Hypoxia。# p < 0.05、## p < 0.01：pre vs. post。

Norm16d：正常酸素16日群、Hypo16d：間歇的低酸素負荷16日群、Hypo8d+norm8d：間歇的低酸素負荷8日+正常酸素8日群

Fig. 3

眼および口腔粘膜におけるカプサイシン刺激に対する疼痛閾値

A、B：カプサイシン点眼によって誘発された瞬目回数（A：0.33 μ M カプサイシン刺激、B：1.0 μ M カプサイシン刺激）。

C、D：カプサイシン溶液 2 瓶選択率（C：0.33 μ M カプサイシン溶液。D：1.0 μ M カプサイシン溶液）。

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$: vs. Norm16d。# $p < 0.05$ 、## $p < 0.01$: vs. Day0。§ § $p < 0.01$: vs. Hypo8d+norm8d。

Norm16d：正常酸素 16 日群、Hypo16d：間歇的低酸素負荷 16 日群、Hypo8d+norm8d：間歇的低酸素負荷 8 日 + 正常酸素 8 日群

Fig. 4

三叉神経節における TRPV1 陽性ニューロン、CGRP 陽性ニューロン、GFAP 陽性サテライトグリアの発現

A：三叉神経節下顎枝の TRPV1 陽性ニューロンの顕微鏡写真。矢頭は TRPV1 陽性ニューロンを示す。スケールバー = 100 μ m。

B：三叉神経節眼神経、上顎神経、下顎神経領域における TRPV1 陽性ニューロン数の割合。

C：三叉神経節下顎枝の CGRP 陽性ニューロンの顕微鏡写真。矢頭は CGRP 陽性ニューロンを示す。スケールバー = 100 μ m。

D：三叉神経節眼神経、上顎神経、下顎神経領域における CGRP 陽性ニューロン数の割合。

E：三叉神経節下顎枝の GFAP 陽性サテライトグリアの顕微鏡写真。矢頭は GFAP 陽性サテライトグリアに取り囲まれるニューロンを示す。スケールバー = 100 μ m。

F：三叉神経節眼神経、上顎神経、下顎神経領域における GFAP 陽性サテライトグリアに取り囲

まれるニューロン数の割合。

点線： $p < 0.05$ 、実線： $p < 0.01$

Norm16d：正常酸素 16 日目、Hypo8d：間歇的低酸素負荷 8 日目、Hypo16d：間歇的低酸素負荷 16 日目、Hypo8d+norm8d：間歇的低酸素負荷 8 日 + 正常酸素 8 日目

TRPV1：transient receptor potential vanilloid 1; CGRP：calcitonin gene-related peptide; GFAP：glial fibrillary acidic protein。

Fig. 5

三叉神経節眼神経、上顎神経、下顎神経領域における小型、中型、大型の TRPV1 陽性ニューロンの比率

白色：小型ニューロン、灰色：中型ニューロン、黒色：大型ニューロン (Fig. 4 と同一個体)。

** $p < 0.01$

Norm16d：正常酸素 16 日目、Hypo16d：間歇的低酸素負荷 16 日目

Fig. 6

Vc の表層における TRPV1 陽性中枢側神経終末

A：間歇的低酸素負荷 16 日目の Vc の表層における TRPV1 陽性中枢側神経終末の顕微鏡写真。

左：黒線で囲んだ範囲が、Vc の眼神経（下）、上顎神経（中央）、下顎神経（下）の領域を示す。

スケールバー = 500 μm 。右：左の顕微鏡写真の黄色の線で囲んだ範囲の強拡大写真。スケールバー = 100 μm 。

B：眼神経、上顎神経、下顎神経領域における TRPV1 陽性中枢側神経終末の平均密度。

点線： $p < 0.05$ 。

C：舌に 1.0mM カプサイシン刺激を加えた Naïve ラットの Vc 表層における TRPV1 陽性中枢側神経終末および pERK 陽性ニューロンの顕微鏡写真。左列上：TRPV1 陽性中枢側神経終末、左

列中央：pERK 陽性ニューロン、左列下：TRPV1 陽性中枢側神経終末と pERK 陽性ニューロンを重ね合わせた顕微鏡写真。スケールバー = 500 μm 。右列：黄色の線で囲んだ範囲の強拡大写真。スケールバー = 100 μm 。

Norm16d：正常酸素 16 日目、Hypo8d：間歇的低酸素負荷 8 日目、Hypo16d：間歇的低酸素負荷 16 日目、Hypo8d+norm8d：間歇的低酸素負荷 8 日 + 正常酸素 8 日目

Vc：三叉神経脊髄路核尾側亜核、TRPV1：transient receptor potential vanilloid 1、pERK：リン酸化細胞外シグナル調節キナーゼ

Fig. 7

Vi から C2 における舌へのカプサイシン刺激によりリン酸化した pERK 陽性ニューロンの発現
A：Vc における pERK 陽性ニューロンの顕微鏡写真。

左：Norm16d 群。スケールバー = 100 μm 。中央：Hypo16d 群。スケールバー = 100 μm 。右：Hypo16d 群（中央）点線部の強拡大写真。矢頭は pERK 陽性ニューロンを示す。スケールバー = 25 μm 。

B：舌への 0.33 μM カプサイシン刺激によりリン酸化した pERK 陽性ニューロン数。

C：舌への 1.0 mM カプサイシン刺激によりリン酸化した pERK 陽性ニューロン数。

点線： $p < 0.05$ 、実線： $p < 0.01$

Naïve-NS：無刺激 Naïve ラット、Norm16d：正常酸素 16 日目、Hypo8d：間歇的低酸素負荷 8 日目、Hypo16d：間歇的低酸素負荷 16 日目、Hypo8d+norm8d：間歇的低酸素負荷 8 日 + 正常酸素 8 日目

Vi：三叉神経脊髄路核中間亜核；Vc：三叉神経脊髄路核尾側亜核；Vi/Vc：三叉神経脊髄路核中間亜核/尾側亜核移行部；C2：第二頸髄；P：尾側；pERK：リン酸化細胞外シグナル調節キナーゼ

Fig. 8

Vi から C2 における cFos 陽性ニューロンの発現

A: Vc における cFos 陽性ニューロンの顕微鏡写真。上: Norm16d 群。スケールバー = 100 μm 。

中央: Hypo16d 群。スケールバー = 100 μm 。下: Hypo16d 群 (中央) 点線部の強拡大写真。

矢頭は cFos 陽性ニューロンを示す。スケールバー = 25 μm 。

B: Vi から C2 における cFos 陽性ニューロンの吻尾的分布。黒: Norm16d 群、赤: Hypo16d 群。

C: cFos 陽性ニューロン数。

点線: $p < 0.05$ 、実線: $p < 0.01$

Norm16d: 正常酸素 16 日目、Hypo8d: 間歇的低酸素負荷 8 日目、Hypo16d: 間歇的低酸素負

荷 16 日目、Hypo8d+norm8d: 間歇的低酸素負荷 8 日 + 正常酸素 8 日目

Vi: 三叉神経脊髄路核中間亜核、Vc: 三叉神経脊髄路核尾側亜核、Vi/Vc: 叉神経脊髄路核中間

亜核/尾側亜核移行部、C2: 第二頸髄; P: 尾側

Fig. 9

Vc から C2 における GFAP 陽性細胞、Iba1 陽性細胞の占有率

A: Vc における GFAP 陽性細胞の顕微鏡写真。左: Norm16d 群。スケールバー = 100 μm 。中

央: Hypo16d 群。点線で囲んだ四角の範囲が、Vc の眼神経 (下)、上顎神経 (中央)、下顎神

経 (上) の領域を示す。スケールバー = 100 μm 。右: Hypo16d 群 (中央) 下顎神経領域の高倍

率写真。スケールバー = 10 μm 。

B: Vc から C2 の眼神経、上顎神経、下顎神経領域における GFAP 陽性細胞の占有率。

C: Vc における Iba1 陽性細胞の顕微鏡写真。左: Norm16d 群。スケールバー = 100 μm 。中央:

Hypo16d 群。点線で囲んだ四角の範囲が、Vc の眼神経 (下)、上顎神経 (中央)、下顎神経 (上)

の領域を示す。スケールバー = 100 μm 。右: Hypo16d 群 (中央) 下顎神経領域の高倍率写真。

スケールバー = 10 μm 。

D: Vc から C2 の眼神経、上顎神経、下顎神経領域における Iba1 陽性細胞の占有率。

点線 : $p < 0.05$ 、実線 : $p < 0.01$

Norm16d : 正常酸素 16 日目、Hypo8d : 間歇的低酸素負荷 8 日目、Hypo16d : 間歇的低酸素負荷 16 日目、Hypo8d+norm8d : 間歇的低酸素負荷 8 日 + 正常酸素 8 日目

Vc : 三叉神経脊髄路核尾側亜核、C2 : 第二頸髄、GFAP : glial fibrillary acidic protein、Iba1 : Ionized calcium-binding adaptor molecule-1

参考文献

- Alamri A, Bron R, Brock JA, Ivanusic JJ (2015), Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 expressing corneal sensory neurons can be subdivided into at least three subpopulations. *Frontiers in Neuroanatomy* 9:71.
- Araya EI, Nones CFM, Ferreira LEN, Kopruszinski CM, Cunha JMD, Chichorro JG (2017), Role of peripheral and central TRPV1 receptors in facial heat hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Research* 1670:146-155.
- Athar W, Card ME, Charokopos A, Akgün KM, DeRycke EC, Haskell SG, Yaggi HK, Bastian LA (2020), Obstructive sleep apnea and pain intensity in young adults. *Annals of the American Thoracic Society* 17(10):1273-1278.
- Aviles-Reyes RX, Angelo MF, Villarreal A, Rios H, Lazarowski A, Ramos AJ (2010), Intermittent hypoxia during sleep induces reactive gliosis and limited neuronal death in rats: implications for sleep apnea. *Journal of Neurochemistry* 112:854-869.
- Ayaki M, Tsubota K, Kawashima M, Kishimoto T, Mimura M, Negishi K (2018), Sleep disorders are a prevalent and serious comorbidity in dry eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 59: DES143-DES150.
- Bae YC, Oh JM, Hwang SJ, Shigenaga Y, Valtschanoff JG (2004), Expression of vanilloid receptor TRPV1 in the rat trigeminal sensory nuclei. *The Journal of Comparative Neurology* 478:62-71.
- Bai G, Ross H, Zhang Y, Lee K, Ro JY (2020), The role of dna methylation in transcriptional regulation of pro-nociceptive genes in rat trigeminal ganglia. *Epigenetics Insights* 13:2516865720938677.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009), Cellular and molecular mechanisms of

- pain. *Cell* 139(2):267-284.
- Benarroch EE (2011), CGRP Sensory neuropeptide with multiple neurologic implications. *Neurology* 77(3):281-287.
- Benjafield AV, Ayas NT, Eastwood PR, Heinzer R, Ip MSM, Morrell MJ, Nunez CM, Patel SR, et al. (2019), Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *The Lancet Respiratory Medicine* 7:687-698.
- Bereiter DA, Rahman M, Thompson R, Stephenson P, Saito H (2018), TRPV1 and TRPM8 channels and nocifensive behavior in a rat model for dry eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 59:3739-3746.
- Boucher Y, Simons CT, Carstens MI, Carstens E (2014), Effects of gustatory nerve transection and/or ovariectomy on oral capsaicin avoidance in rats. *Pain* 155:814-820.
- Carstens E, Kuenzler N, Handwerker HO (1998), Activation of neurons in rat trigeminal subnucleus caudalis by different irritant chemicals applied to oral or ocular mucosa. *The Journal of Neurophysiology* 80:465-492.
- Carstens E, Saxe I, Ralph R (1995), Brainstem neurons expressing c-Fos immunoreactivity following irritant chemical stimulation of the rat's tongue. *Neuroscience* 69:939-953.
- 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.
- Charokopos A, Card ME, Gunderson C, Steffens C, Bastian LA (2018), The Association of Obstructive Sleep Apnea and Pain Outcomes in Adults: A Systematic Review. *Pain Medicine* 19:S69-S75.
- Chuang HH, Lin S (2009), Oxidative challenges sensitize the capsaicin receptor by covalent cysteine modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:20097-20102.

- Cubillos-Zapata C, Almendros I, Díaz-García E, Toledano V, Casitas R, Galera R, López Collazo E, Farre R, et al. (2020), Differential effect of intermittent hypoxia and sleep fragmentation on PD-1/PD-L1 upregulation. *Sleep* 43:1-9.
- Davieds B, Gross J, Berger MM, Baloglu E, Bärtzsch P, Mairböurl H (2016), Inhibition of alveolar Na transport and LPS causes hypoxemia and pulmonary arterial vasoconstriction in ventilated rats. *Physiological Reports* 4: e12985.
- Decary A, Rouleau I, Montplaisir J (2000), Cognitive deficits associated with sleep apnea syndrome: A proposed neuropsychological test battery. *Sleep* 23:369-381.
- Dessirier JM, Simons CT, Sudo M, Sudo S, Carstens E (2000), Sensitization, desensitization and stimulus-induced recovery of trigeminal neuronal responses to oral capsaicin and nicotine. *The Journal of Neurophysiology* 84:1851-1862.
- Dong P, Zhao J, Li N, Lu L, Li L, Zhang X, Yang B, Zhang L, et al. (2018), Sevoflurane exaggerates cognitive decline in a rat model of chronic intermittent hypoxia by aggravating microglia-mediated neuroinflammation via downregulation of PPAR- γ in the hippocampus. *Behavioural Brain Research* 347:325-331.
- Doufas AG, Tian L, Davies MF, Warby SC (2013), Nocturnal intermittent hypoxia is independently associated with pain in subjects suffering from sleep-disordered breathing. *Anesthesiology* 119:1149-1162.
- Eddleston M, Mucke L (1993), Molecular profile of reactive astrocytes—Implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54(1):15-36.
- Fan Y, Chou MC, Liu YC, Liu CK, Chen CH, Chen SL (2021), Intermittent hypoxia activates n-methyl-d-aspartate receptors to induce anxiety behaviors in a mouse model of sleep-associated apnea. *Molecular Neurobiology* 58(7):3238-3251.
- Finan PH, Goodin BR, Smith MT (2013), The association of sleep and pain: an update and a path

- forward. *The Journal of Pain* 14:1539-1552.
- Fletcher EC, Lesske J, Qian W, Miller CC 3rd, Unger T (1992), Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. *Hypertension* 19:555-61.
- Gozal D, Daniel JM, Dohanich GP (2001), Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. *The Journal of Neuroscience* 21(7):2442-50.
- Green BG (1998), Capsaicin desensitization and stimulus-induced recovery on facial compared to lingual skin. *Physiology & Behavior* 65:517-523.
- Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, Simon MC, Hammerling U, et al. (2005), Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metabolism* 1:401-408.
- Haack M, Lee E, Cohen DA, Mullington JM (2009), Activation of the prostaglandin system in response to sleep loss in healthy humans: potential mediator of increased spontaneous pain. *Pain* 145:136-141.
- Hanani M, (2005), Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Research. Brain Research Reviews* 48(3):457-476.
- Hegarty DM, Hermes SM, Largent-Milnes TM, Aicher SA (2014), Capsaicin-responsive corneal afferents do not contain TRPV1 at their central terminals in trigeminal nucleus caudalis in rats. *The Journal of Chemical Neuroanatomy* 61-62:1-12.
- Hillery CA, Kerstein PC, Vilceanu D, Barabas ME, Retherford D, Brandow AM, Wandersee NJ, Stucky CL (2011), Transient receptor potential vanilloid 1 mediates pain in mice with severe sickle cell disease. *Blood* 118:3376-3383.
- Huang HC, Nakatsuka M, Iwai Y (2013), Activation of microglial cells in the trigeminal subnucleus caudalis evoked by inflammatory stimulation of the oral mucosa. *Okajimas Folia Anatomica Japonica* 89(4):137-145.

- Inami Y, Uta D, Andoh T (2020), Neuronal hyperexcitability and astrocyte activation in spinal dorsal horn of a dermatitis mouse model with cutaneous hypersensitivity. *Neuroscience Letters* 720:134784.
- Ishida-Yamamoto A, Senba E, Tohyama M (1989), Distribution and fine structure of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive nerve fibers in the rat skin. *Brain Research* 491:93-101.
- Iyengar S, Ossipovb MH, Johnson KW (2017), The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine. *Pain* 158(4):543-559.
- Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ (1999), Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nature Neuroscience* 2:1114–1119.
- Ji RR, Gereau RW, Malcangio M, Strichartz GR (2009), MAP kinase and pain. *Brain Research Reviews* 60:135-148.
- Kaido M, Inoue S, Kawashima M, Ishida R, Nakamura S, Tsubota K (2020), Capsaicin induced pain sensitivity in short tear break-up time dry eye. *The Ocular Surface* 18:620-626.
- Kallenborn-Gerhardt W, Schröder K, Del Turco D, Lu R, Kynast K, Kosowski J, Niederberger E, Shah AM, et al. (2012), NADPH oxidase-4 maintains neuropathic pain after peripheral nerve injury. *The Journal of Neuroscience* 32:10136-10145.
- Karai L, Brown DC, Mannes AJ, Connelly ST, Brown J, Gandal M, Wellisch OM, Neubert JK, et al. (2004), Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control. *The Journal of Clinical Investigation* 113:1344-1352.
- Karrer T, Bartoshuk L (1991), Capsaicin desensitization and recovery on the human tongue. *Physiology & Behavior* 49:757-764.
- 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.

Kawashima M, Uchino M, Yokoi N, Uchino Y, Dogru M, Komuro A, Sonomura Y, Kato H, et al. (2016), The association of sleep quality with dry eye disease: the Osaka study. *Clinical Ophthalmology* 10:1015-21.

Khalid I, Roehrs TA, Hudgel DW, Roth T (2011), Continuous positive airway pressure in severe obstructive sleep apnea reduces pain sensitivity. *Sleep* 34:1687-1691.

Kheirandish-Gozal L, Gozal D (2019), Obstructive sleep apnea and inflammation: proof of concept based on two illustrative cytokines. *The International Journal of Molecular Sciences* 20:459.

Kietzmann T, Görlach A (2005), Reactive oxygen species in the control of hypoxia inducible factor-mediated gene expression. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16:474-486.

Kim YS, Chu Y, Han L, Li M, Li Z, LaVinka PC, Sun S, Tang Z, et al. (2014), Central terminal sensitization of TRPV1 by descending serotonergic facilitation modulates chronic pain. *Neuron* 81(4): 873-887.

Kohane DS, Yieh J, Lu NT, Langer R, Strichartz GR, Berde CB (1998), A re-examination of tetrodotoxin for prolonged duration local anesthesia. *Anesthesiology* 89:119-131.

Kreutzberg GW (1996), Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences* 19(8):312-318.

Lee CF, Lin KY, Lin MC, Lin CL, Chang SN, Kao CH (2014), Sleep disorders increase the risk of burning mouth syndrome: a retrospective population-based cohort study. *Sleep Medicine* 15:1405-1410.

Lee DZ, Chung JM, Chung K, Kang MG (2012), Reactive oxygen species (ROS) modulate AMPA receptor phosphorylation and cell-surface localization in concert with pain-related behavior. *Pain* 153:1905-1915.

- Lennerz JK, Rühle V, Ceppa EP, Neuhuber WL, Bunnett NW, Grady EF, Messlinger K (2008), Calcitonin receptor-like receptor (CLR), receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the rat trigeminovascular system: differences between peripheral and central CGRP receptor distribution. *The Journal of comparative neurology* 507(3):1277-1299.
- Liang H, Hu H, Shan D, Lyu J, Yan X, Wang Y, Jian F, Li X, et al. (2020), CGRP modulates orofacial pain through mediating neuron-glia crosstalk. *Journal of Dental Research* 100(1):98-105.
- Lin M, Liu R, Gozal D, Wead WB, Chapleau MW, Wurster R, Cheng ZJ (2007), Chronic intermittent hypoxia impairs baroreflex control of heart rate but enhances heart rate responses to vagal efferent stimulation in anesthetized mice. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology* 293(2):H997-1006.
- Linley JE, Ooi L, Pettinger L, Kirton H, Boyle JP, Peers C, Gamper N (2012), Reactive oxygen species are second messengers of neurokinin signaling in peripheral sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: E1578-1586.
- Liu H, Qiu H, Yang J, Ni J, Le W (2016), Chronic hypoxia facilitates Alzheimer's disease through demethylation of gamma-secretase by downregulating DNA methyltransferase 3b. *Alzheimer's & Dementia* 12:130-143.
- Liu L, Simon SA (1996), Capsaicin-induced currents with distinct desensitization and Ca²⁺ dependence in rat trigeminal ganglion cells. *The Journal of Neurophysiology* 75:1503-1514.
- Liu X, Wang JJ, Sun L, Chen LW, Rao ZR, Duan L, Cao R, Wang MQ (2009), Involvement of medullary dorsal horn glial cell activation in mediation of masseter mechanical allodynia induced by experimental tooth movement. *Archives of Oral Biology* 54(12):1143-1150.

- Lopez-Jornet P, Lucero-Berdugo M, Castillo-Felipe C, Zamora Lavella C, Ferrandez-Pujante A, Pons-Fuster A (2015), Assessment of self-reported sleep disturbance and psychological status in patients with burning mouth syndrome. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 29(7):1285-90.
- Luo Y, Suttle A, Zhang Q, Wang P, Chen Y (2021), Transient receptor potential (TRP) ion channels in orofacial pain. *Molecular Neurobiology* 58:2836-2850.
- Ma S, Mifflin SW, Cunningham JT, Morilak DA (2008), Chronic intermittent hypoxia sensitizes acute hypothalamic-pituitary-adrenal stress reactivity and Fos induction in the rat locus coeruleus in response to subsequent immobilization stress. *Neuroscience* 154(4):1639-47.
- Matsuura S, Shimizu K, Shinoda M, Ohara K, Ogiso B, Honda K, Katagiri A, Sessle BJ, et al. (2013), Mechanisms underlying ectopic persistent tooth-pulp pain following pulpal inflammation. *PLoS One* 8(1):e52840.
- Mikuzuki L, Saito H, Katagiri A, Okada S, Sugawara S, Kubo A, Ohara K, Lee J, et al. (2017), Phenotypic change in trigeminal ganglion neurons associated with satellite cell activation via extracellular signal-regulated kinase phosphorylation is involved in lingual neuropathic pain. *European Journal of Neuroscience* 46:2190-2202.
- Molander C, Xu Q, Rivero-Melian C, Grant G (1989), Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat: II. The cervical and upper thoracic cord. *The Journal of Comparative Neurology* 289:375-385.
- Murata Y, Masuko S (2006), Peripheral and central distribution of TRPV1, substance P and CGRP of rat corneal neurons. *Brain Research* 1085(1):87-94.
- Nadeem R, Bawaadam H, Asif A, Waheed I, Ghadai A, Khan A, Hamon S (2014), Effect of musculoskeletal pain on sleep architecture in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep & Breathing* 18:571-577.

- Navarrete-Opazo A, Mitchell GS (2014), Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *The American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307: R1181-1197.
- Nazıroğlu M, Öz A, Yıldızhan K (2020), Selenium and neurological diseases: focus on peripheral pain and TRP channels. *Current Neuropharmacology* 18:501-517.
- Nolano M, Simone DA, Wendelschafer-Crabb G, Johnson T, Hazen E, Kennedy WR (1999), Topical capsaicin in humans: parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation. *Pain* 81:135-145.
- 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. *The Journal of Comparative Neurology* 507:1428-1440.
- Nord SG (1967), Somatotopic organization in the spinal trigeminal nucleus, the dorsal column nuclei and related structures in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 130:343-356.
- Okada S, Iwata K, Katagiri A (2021), Pathognomonic hypersensitivity of the oral mucosa and tongue induced by diabetes mellitus accompanied by saliva reduction in rats. *Journal of Oral & Facial Pain and Headache* 35:54-61.
- Okada S, Katagiri A, Saito H, Lee J, Ohara K, Iinuma T, Bereiter DA, Iwata K (2019), Differential activation of ascending noxious pathways associated with trigeminal nerve injury. *Pain* 160:1342-1360.
- Okada-Ogawa A, Suzuki I, Sessle BJ, Chiang CY, Salter MW, Dostrovsky JO, Tsuboi Y, Kondo M, et al. (2009), Astroglialin medullary dorsal horn (trigeminal spinal subnucleus caudalis) are involved in trigeminal neuropathic pain mechanisms. *The Journal of Neuroscience* 29(36):11161-11171.

- Olmos SR (2016), Comorbidities of chronic facial pain and obstructive sleep apnea. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 22:570-575.
- Pei L, Lin CY, Dai JP, Yin GF (2007), Facial pain induces the alteration of transient receptor potential vanilloid receptor 1 expression in rat trigeminal ganglion. *Neuroscience Bulletin* 23:92-100.
- Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, et al. (2020), The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology* 18: e3000410.
- Prabhakar NR, Kumar GK, Nanduri J, Semenza GL (2007), ROS signaling in systemic and cellular responses to chronic intermittent hypoxia. *Antioxidants & Redox Signaling* 9:1397-1403.
- Price TJ, Flores CM (2007), Critical evaluation of the colocalization between calcitonin gene-related peptide, substance P, transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 immunoreactivities, and isolectin B4 binding in primary afferent neurons of the rat and mouse. *The Journal of Pain* 8:263-272.
- Rag e M, Van Acker N, Facer P, Shenoy R, Knaapen MW, Timmers M, Streffer J, Anand P, et al. (2010), The time course of CO₂ laser-evoked responses and of skin nerve fibre markers after topical capsaicin in human volunteers. *Clinical Neurophysiology* 121:1256-1266.
- Ristoiu V, Shibasaki K, Uchida K, Zhou Y, Ton BT, Flonta ML, Tominaga M (2011), Hypoxia-induced sensitization of transient receptor potential vanilloid 1 involves activation of hypoxia-inducible factor-1 alpha and PKC. *Pain* 152:936-945.
- Rosseland R, Pallesen S, Nordhus IH, Matre D, Bl agestad T (2018), Effects of sleep fragmentation and induced mood on pain tolerance and pain sensitivity in young healthy adults. *Frontiers in Psychology* 9:2089.
- Saito H, Katagiri A, Okada S, Mikuzuki L, Kubo A, Suzuki T, Ohara K, Lee J, et al. (2017),

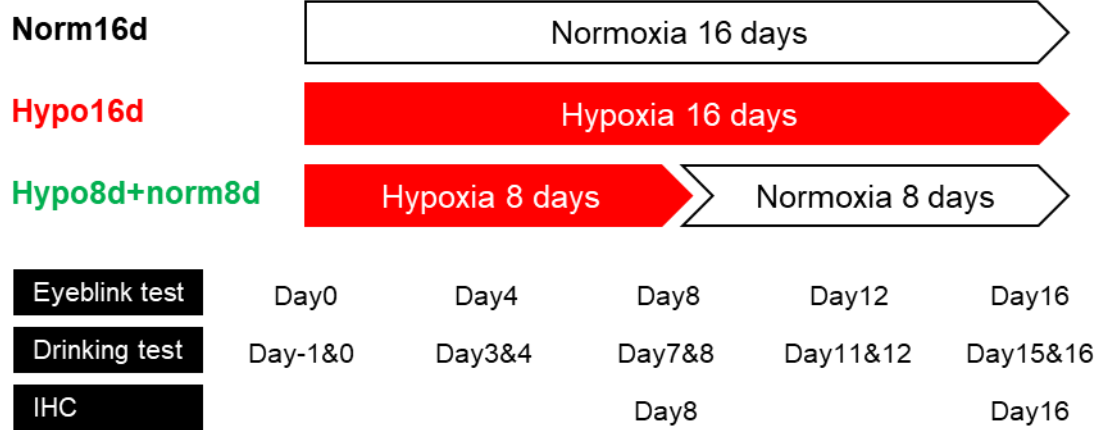
- Ascending projections of nociceptive neurons from trigeminal subnucleus caudalis: A population approach. *Experimental Neurology* 293:124-136.
- Semenza GL, Prabhakar NR (2007), HIF-1-dependent respiratory, cardiovascular, and redox responses to chronic intermittent hypoxia. *Antioxidants & Redox Signaling* 9:1391-1396.
- Shibuta K, Suzuki I, Shinoda M, Tsuboi Y, Honda K, Shimizu N, Sessle BJ, Iwata K (2012), Organization of hyperactive microglial cells in trigeminal spinal subnucleus caudalis and upper cervical spinal cord associated with orofacial neuropathic pain. *Brain Research* 1451:74-86.
- Simons CT, Dessirier JM, Jinks SL, Carstens E (2001), An animal model to assess aversion to intra-oral capsaicin: increased threshold in mice lacking substance p. *Chemical Senses* 26:491-497.
- Simons CT, Gogineni AG, Iodi Carstens M, Carstens E (2002), Reduced aversion to oral capsaicin following neurotoxic destruction of superficial medullary neurons expressing NK-1 receptors. *Brain Research* 945:139-143.
- Smith MT, Wickwire EM, Grace EG, Edwards RR, Buenaver LF, Peterson S, Klick B, Haythornthwaite JA (2009), Sleep disorders and their association with laboratory pain sensitivity in temporomandibular joint disorder. *Sleep* 32:779-790.
- Snyder B, Duong P, Trieu J, Cunningham RL (2009), Androgens modulate chronic intermittent hypoxia effects on brain and behavior. *Hormones and Behavior* 106:62-73.
- Strassman AM, Vos BP (1993a), Somatotopic and laminar organization of fos-like immunoreactivity in the medullary and upper cervical dorsal horn induced by noxious facial stimulation in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 331:495-516.
- Strassman AM, Vos BP, Mineta Y, Naderi S, Borsook D, Burstein R (1993b), Fos-like immunoreactivity in the superficial medullary dorsal horn induced by noxious and innocuous thermal stimulation of facial skin in the rat. *Journal of neurophysiology* 70(5):1811-1821.
- Su X, Wachtel RE, Gebhart GF (1999), Capsaicin sensitivity and voltage-gated sodium currents in

- colon sensory neurons from rat dorsal root ganglia. *The American Journal of Physiology* 277: G1180-1188.
- Sugimoto T, Fujiyoshi Y, He YF, Xiao C, Ichikawa H (1997), 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. *Neuroscience Research* 28:361-371.
- Thalakoti S, Patil VV, Damodaram S, Vause CV, Langford LE, Freeman SE, Durham PL (2007), Neuron-glia signaling in trigeminal ganglion: implications for migraine pathology. *Headache* 47:1008-1023.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, et al. (1998), The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain producing stimuli. *Neuron* 21:531-543.
- Ugur KS, Ark N, Kurtaran H, Kizilbulut G, Yuksel A, Gunduz M (2014) Anterior palatoplasty for selected mild and moderate obstructive sleep apnea: preliminary results. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 271(6):1777-83.
- van Neerven SGA, Mouraux A (2020), Capsaicin-induced skin desensitization differentially affects a-delta and c-fiber-mediated heat sensitivity. *Frontiers in Pharmacology* 11:615.
- Waldmann D, Messlinger K (2021), Transient activation of spinal trigeminal neurons in a rat model of hypoxia-induced headache. *Pain* 162:1153-1162.
- Wang S, Wang S, Asgar J, Joseph J, Ro JY, Wei F, Campbell JN, Chung MK (2017), Ca²⁺ and calpain mediate capsaicin-induced ablation of axonal terminals expressing transient receptor potential vanilloid 1. *Journal of Biological Chemistry* 292:8291-8303.
- Watkins LR, Maier SF (2003), Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nature reviews drug discovery* 2(12):973-985.

- Whibley D, AlKandari N, Kristensen K, Barnish M, Rzewuska M, Druce KL, Tang NKY (2019), Sleep and pain: A systematic review of studies of mediation. *The Clinical Journal of Pain* 35(6): 544–558.
- Wu J, Li P, Wu X, Chen W (2015), Chronic intermittent hypoxia decreases pain sensitivity and increases the expression of HIF1 α and opioid receptors in experimental rats. *Sleep & Breathing* 19:561-568.
- Wu MF, Chen YH, Chen HC, Huang WC (2020), Interactions among obstructive sleep apnea syndrome severity, sex, and obesity on circulatory inflammatory biomarkers in patients with suspected obstructive sleep apnea syndrome: A Retrospective, cross sectional study. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17:4701.
- Yang Z, Zhao T, Zou Y, Zhang JH, Feng H (2014), Hypoxia induces autophagic cell death through hypoxia-inducible factor 1a in microglia, *PLOS ONE* 9(5): e96509.
- Yanik BM, Dauch JR, Cheng HT (2020), Interleukin-10 reduces neurogenic inflammation and pain behavior in a mouse model of type 2 diabetes. *Journal of Pain Research* 13:3499–3512.
- Yilmaz Z, Renton T, Yiangou Y, Zakrzewska J, Chessell IP, Bountra C, Anand P (2007), Burning mouth syndrome as a trigeminal small fibre neuropathy: Increased heat and capsaicin receptor TRPV1 in nerve fibres correlates with pain score. *Journal of Clinical Neuroscience* 14:864-871.
- Yoshida A, Dostrovsky JO, Sessle BJ, Chiang CY (1991), Trigeminal projections to the nucleus submedius of the thalamus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 307:609-625.

Fig. 1

A



B

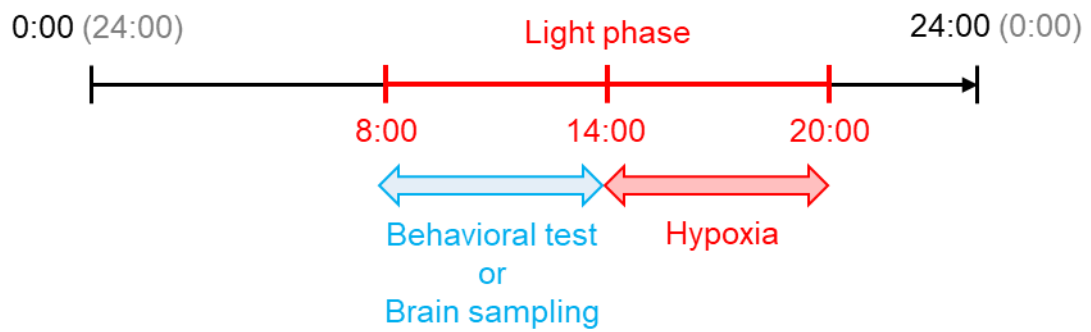


Fig. 2

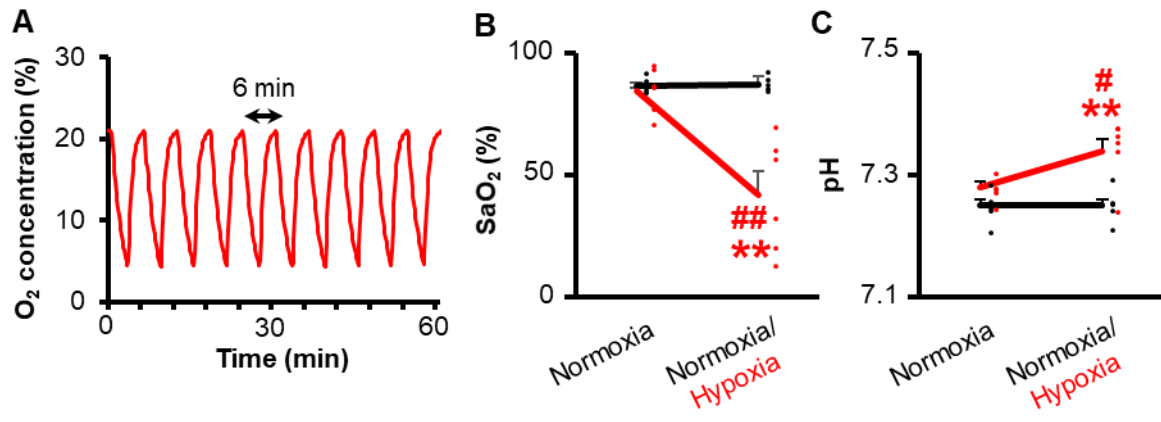


Fig. 3

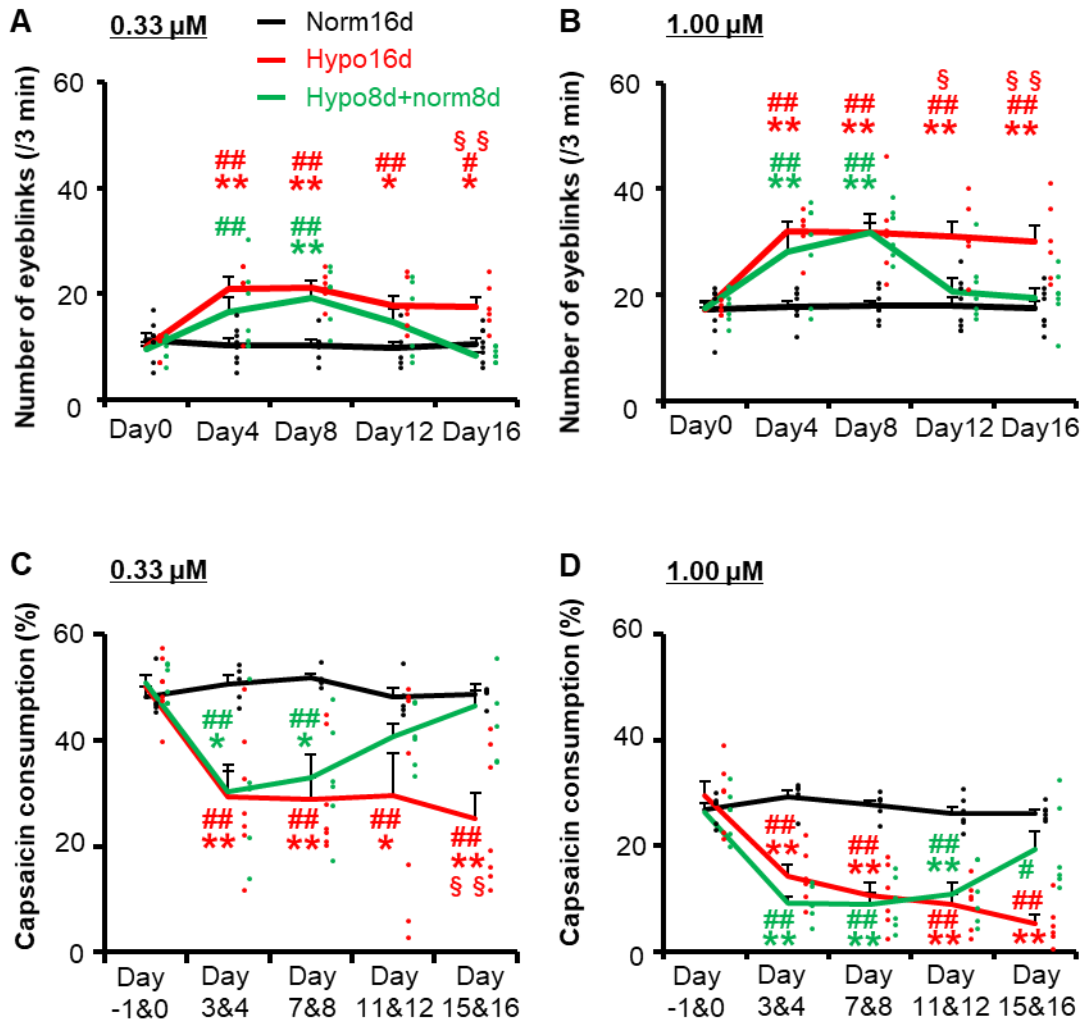


Fig. 4

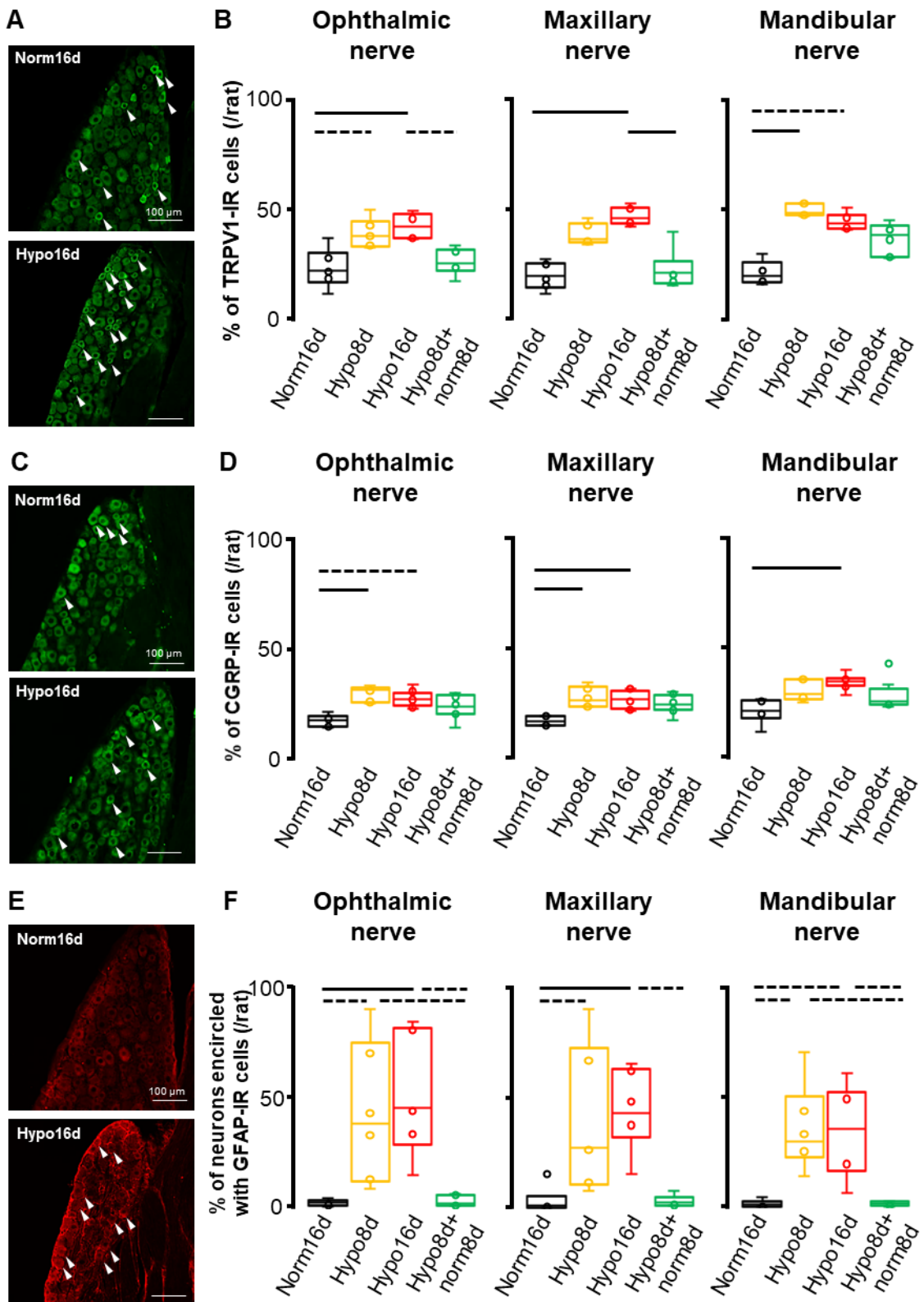


Fig. 5

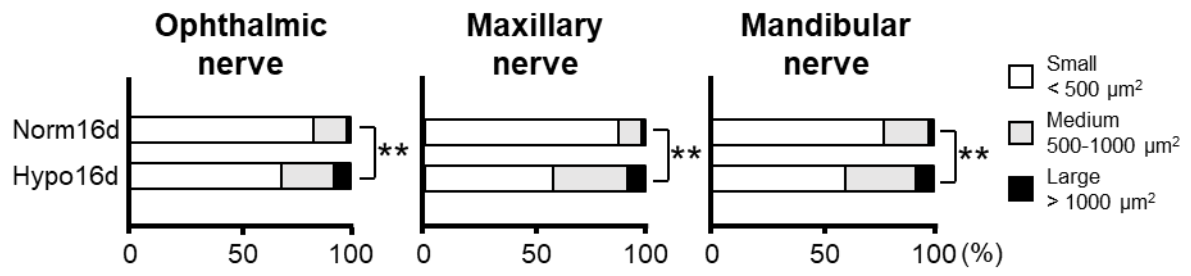


Fig. 6

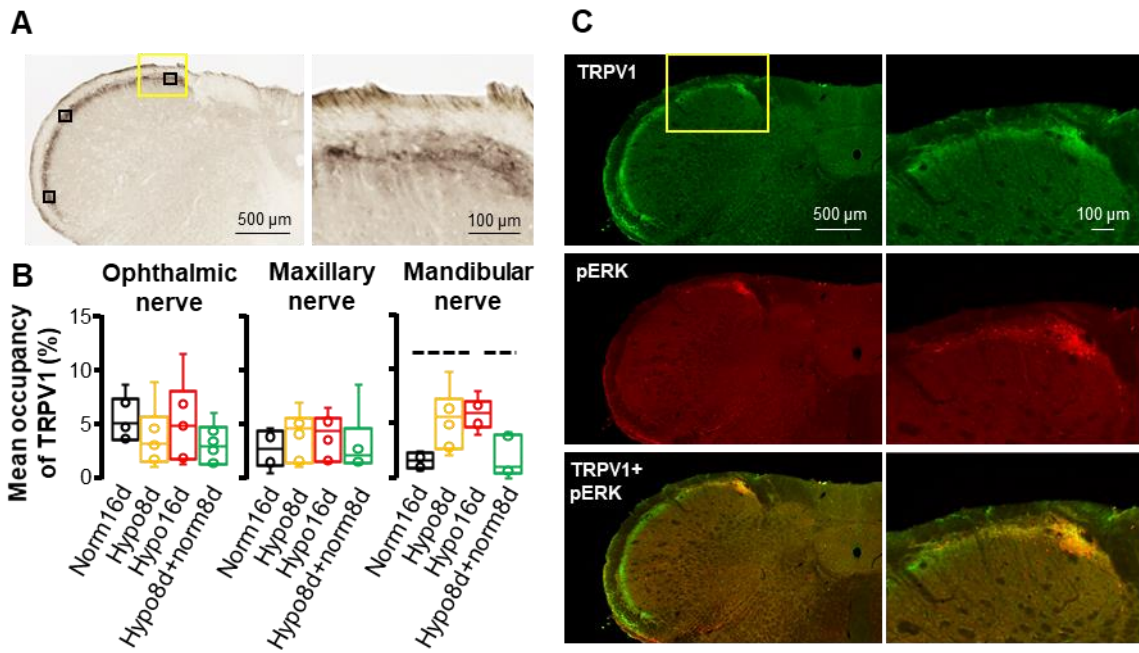


Fig. 7

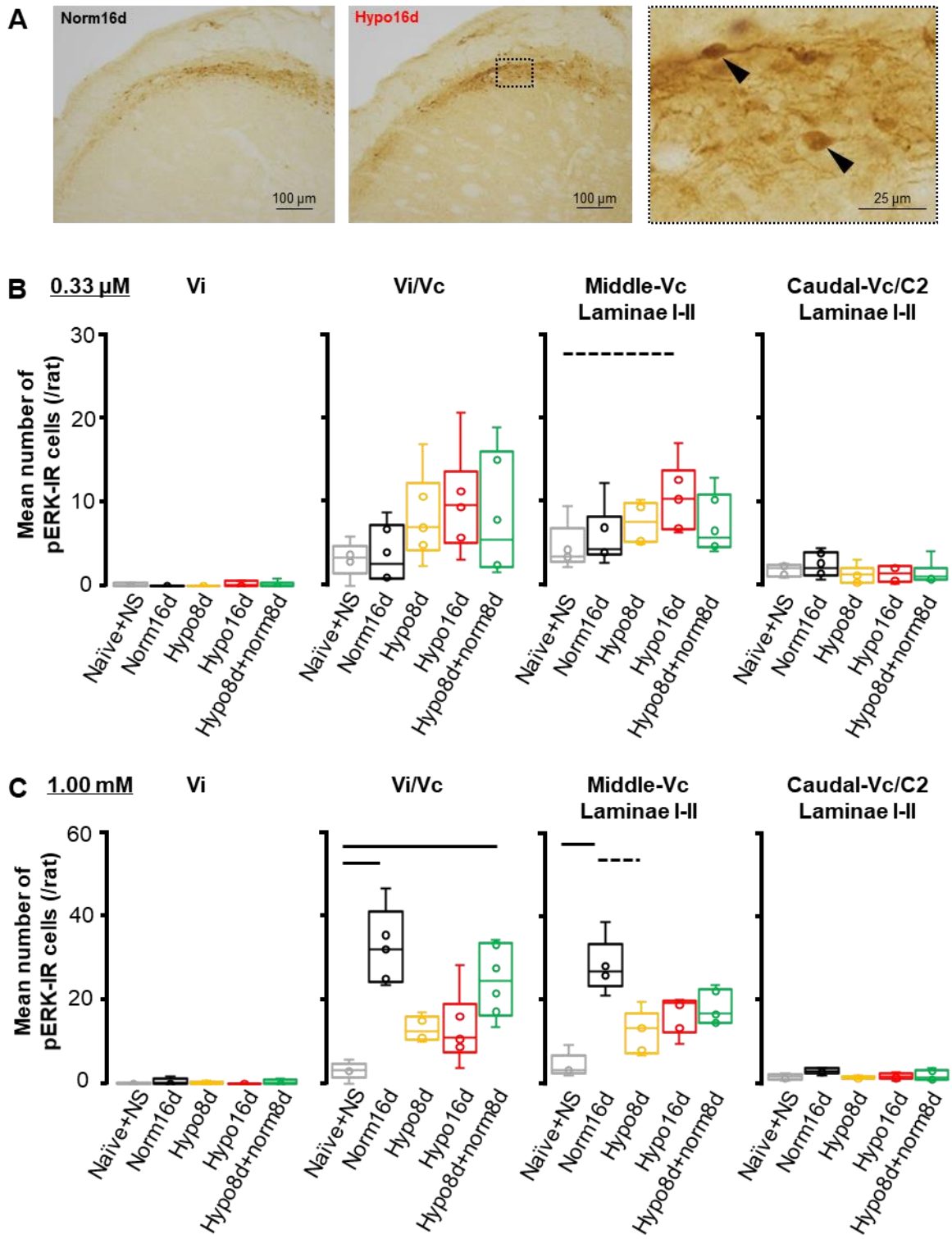


Fig. 8

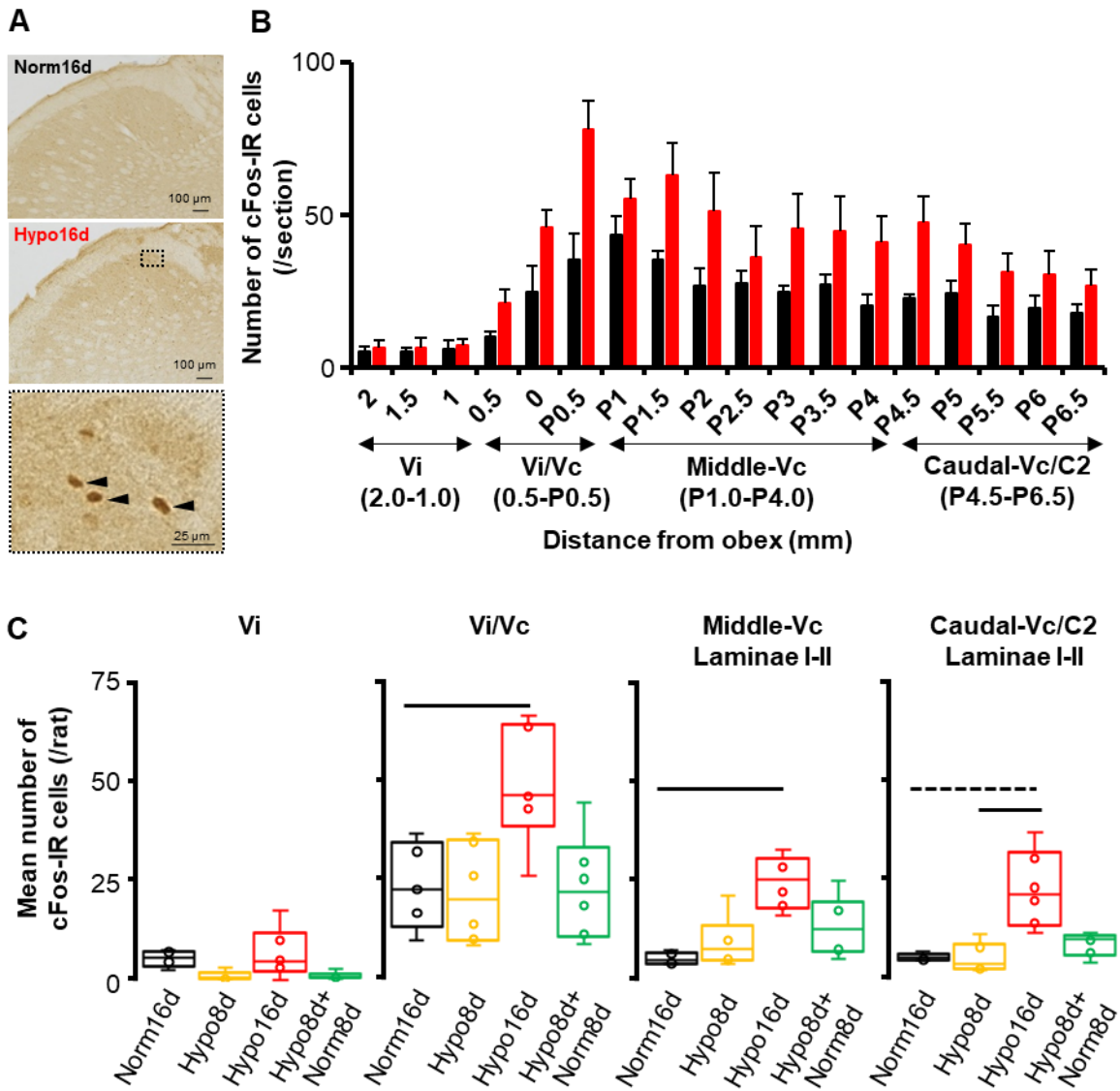


Fig. 9

