

学位論文

ラット三叉神経節における支配領域による
神経細胞局在の三次元構築

石田 麻依子

大学院歯学独立研究科顎口腔機能制御学講座

(主指導教員：金銅 英二教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士（歯学）

学位申請論文

Three-Dimensional Reconstruction of Neuron
Localization by Regions of Innervation in the
Rat Trigeminal Ganglion

Maiko Ishida

Department of Oral and Maxillofacial Biology, Graduate School
of Oral Medicine

(Chief Academic Advisor: Professor Eiji Kondo)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in
Dentistry)

要旨

三叉神経節は、眼神経、上顎神経、下顎神経の3枝に分枝し、その末梢枝は頭頸部で広範囲に分布している。三叉神経節内には、これらの神経細胞体が集まっており、それぞれの領域の細胞体の局在には神経節内で偏りがあることが知られている。しかしながら、これまでの報告における表現は統一性に欠け、詳細も不明である。そこで神経損傷マーカーの ATF3 (activating transcription factor 3) 抗体を用いて三叉神経節内の神経細胞体の局在を三次元構築し、各神経切断群間で比較検討をおこなった。

ラットの三叉神経において眼窩上神経、眼窩下神経、下歯槽神経、舌神経それぞれの切断群（各 n=3）と、各神経に至るまでの組織の切開や剥離を加えて、目的の神経を切断しない対照モデル（各 n=1）を作製し、ATF3 の発現がピークとなる 7 日後に三叉神経節を摘出し、100 μm 毎の水平断切片を作製した。これらの切片を ATF3 抗体と、神経細胞のみを染色する NeuN 抗体、すべての細胞の核を染色する DAPI 抗体を用いた免疫組織化学に供し、光学顕微鏡下で画像データとしてコンピューターに取り込み、スライスごとに重ねて三叉神経節を復元するように三次元構築をおこなった。

ラット三叉神経節は、二つに分岐しており、第1枝、第2枝から外側へ向かう枝が3枝となる。三叉神経節内における神経細胞集団は、大きく二つの領域に分かれており、1つは吻側（吻側領域）に、もう一つは尾側（尾側領域）に局在していた。これら2つの領域は三叉神経節の背側では融合しており（吻側・尾側連続領域）、腹側では分離していた。ATF3 と NeuN の二重陽性細胞を観察した結果、眼窩上神経切断後の ATF3 陽性細胞の局在は、吻側領域において内側に、眼窩下神経切断後の ATF3 陽性細胞の局在は、吻側領域内ほぼ全域に分布しており、眼窩上神経切断後の ATF3 陽性細胞領域を含んでいた。下歯槽神経切断後の ATF3 陽性細胞の局在は主に尾側領域に発現し、吻側・尾側連続領域では点在していた。また、吻側

領域において広範囲に散在していた。舌神経切断後では，下歯槽神経切断後とほぼ同じ領域で ATF3 陽性細胞局在が確認された。眼窩下神経と下歯槽神経，舌神経の各切断後の ATF3 陽性細胞の局在は吻側・尾側連続領域で混在しており，各神経領域の境界は不明瞭であった。

以上より，ラット三叉神経節内における神経細胞局在には，異なる領域の神経細胞が混在する箇所が存在していた。同じ神経節内における損傷した神経細胞が近接する非損傷の神経細胞に何らかの物質を伝達することが異所性感覚異常の発症につながっているという説もあり，今回の結果は，この異所性感覚異常のメカニズム解明の基礎データになりうると考えられる。

緒言

三叉神経は顎顔面領域の一般体性知覚と、咀嚼筋などの骨格筋の運動を司る混合性神経である。このうち知覚神経線維は、脳底部に存在する三叉神経節内の細胞体から 3 本の主枝、すなわち眼神経、上顎神経および下顎神経に分かれて末梢へと軸索を伸ばしている。これらの主枝は、ヒトではそれぞれ上眼窩裂、正円孔および卵円孔を通過して頭蓋腔外に出て、頭頸部に広く分布する¹⁾。

ラット三叉神経節内における神経細胞局在様式は吻側に眼窩上神経、眼窩下神経を含む第 1・2 枝領域（吻側領域）、尾側に下歯槽神経、舌神経を含む第 3 枝領域（尾側領域）の神経細胞が多く存在していることは既に知られているが²⁻⁴⁾、第 1 枝領域と第 2 枝領域が混在しているという報告³⁾や混在していないという報告⁴⁾、さらに第 2 枝領域と第 3 枝領域が重なっているという報告³⁾、反対に領域が明瞭に区別できるという報告⁴⁾もあり、各神経領域に関する報告は統一性に欠け、詳細は不明である。

本実験では、ラット三叉神経のうち眼神経（第 1 枝）の枝として眼窩上神経、上顎神経（第 2 枝）の枝として眼窩下神経、下顎神経（第 3 枝）の枝として下歯槽神経と舌神経をそれぞれ切断し、三叉神経節内の ATF3 (activating transcription factor 3) 陽性細胞の局在を観察した。ATF3 は ATF/CREB ファミリーに属するストレス応答遺伝子であり、細胞周期の抑制や細胞死に関わることが知られている⁵⁾。また、末梢神経損傷後、神経細胞内において他の転写酵素と結合し、細胞内の転写活性を上げ、軸索の再生に関与しているという報告もある⁶⁻⁹⁾。神経損傷マーカーとしての役割は 2000 年に Tsujino ら¹⁰⁾により初めて報告され、以降神経損傷に関連する研究で広く用いられている。感覚神経では、坐骨神経損傷の研究¹⁰⁻¹⁴⁾や眼窩下神経損傷の研究^{10, 11)}など多く報告されており、さらに交感神経幹の損傷により上頸神経節での ATF3 発現を調べた研究もある¹⁵⁾。また、神経損傷と炎症による ATF3 発現を比較した論文に

よると、炎症でもわずかに ATF3 が発現する報告もある¹⁶⁾。

今回の実験では ATF3 の神経損傷マーカーとしての性質を利用して、末梢軸索に損傷を受けた神経細胞を三叉神経節内で同定した。さらに、三叉神経節内における神経細胞体の分布や位置関係を立体的に把握するためにコンピューターを用いて組織像から三次元構築をおこない観察した。

組織を染色した標本から得たデジタル画像を立体構築することで、組織の内部構造を観察した報告はあるが^{17, 18)}、三叉神経節内における神経細胞体の局在を観察した報告はない。今回用いたソフトで三次元構築すると、全方向からの観察が可能となるが、詳細な比較観察をおこなうために、背面と内側面の 2 点から各神経切断に対応する神経細胞局在様式を比較し、検討をおこなった。

実験動物および方法

1. 実験動物

7 週齢の Sprague Dawley (SD) 系雄性ラット (日本エスエルシー、静岡; 200~250 g) を用いた。実験動物の取り扱いについては、松本歯科大学動物実験委員会の承認を得て、『松本歯科大学実験動物取り扱い規定』ガイドラインに従いおこなった。

2. 神経切断モデルラットの作製および組織の摘出

神経切断時にはラットに麻酔薬 (ソムノペンチル, 50 mg/kg, 共立製薬株式会社, 東京) を腹腔内投与し、深麻酔をおこない実験した。

1) 眼窩上神経切断モデルラットの作製 (n=3)

頭頂部を剃毛し、頭皮を切開し、皮膚を左眼球上まで鈍的に剥離し、眼窩上神経を露出させピンセットで把持し、約 1 mm の長さをハサミにて切断し摘出した。その後頭皮を縫合し、閉創した。比較

対照として切断群と同様の手順で眼窩上神経を露出，明示した後，神経を切断せずそのまま閉創したラットを眼窩上神経切断の対照モデル（ $n=1$ ）とした．

2) 眼窩下神経切断モデルラットの作製（ $n=3$ ）

ラットを開口させ，口蓋左側と左頬粘膜との境界部を切開し，眼窩下神経を露出させピンセットで把持し，約 1 mm の長さをハサミにて切断し摘出した．比較対照として切断群と同様の手順で眼窩下神経を露出，明示した後，切断せずそのまま閉創し，眼窩下神経切断の対照モデル（ $n=1$ ）とした．

3) 下歯槽神経切断モデルラットの作製（ $n=3$ ）

左側顔面皮膚を剃毛し，頬部皮膚を切開し，咬筋を筋線維の走向に沿って鈍的に剥離し，下顎骨外側面を露出させた．同部での骨内を走向する下歯槽神経を確認し，その周辺の骨をラウンドバーを装着した歯科用エンジンにて除去後，下歯槽神経を露出させピンセットで把持し，約 1 mm の長さをハサミにて切断し摘出した．その後，咬筋剥離部と頬部皮膚を縫合し閉創した．比較対照として切断群と同様の手順で下顎管を明示した後，切断せずにそのまま閉創し，下歯槽神経切断の対照モデル（ $n=1$ ）とした．

4) 舌神経切断モデルラットの作製（ $n=3$ ）

ラットを開口させ，舌尖端に針糸固定をして舌を牽引し，左舌小帯近くの粘膜を剥離し，舌神経を露出させピンセットで把持し，約 1 mm の長さをハサミにて切断し摘出した．その後舌粘膜を縫合し，閉創した．比較対照として切断群と同様の手順で，舌神経を露出し，明示した後，切断せずにそのまま閉創し舌神経切断の対照モデル（ $n=1$ ）とした．

3. 灌流固定，組織取り出しと後固定

各神経切断 7 日後に三叉神経節の摘出をおこなった。組織摘出時にはラットを神経切断時と同様の深麻酔をした後，固定液（4 % paraformaldehyde, 0.1 M phosphate buffer (0.1 M PB)) で灌流固定をおこない，三叉神経節を摘出した。三叉神経節については，頭蓋腔から脳幹部などを除去して，脳底部，脳硬膜を丁寧に剥離して三叉神経節を露出し，慎重に摘出した。組織を摘出した後，ただちに灌流固定で用いた固定液にて後固定した。

4. 切片作製

固定材料は 10 %，20 %，30 % sucrose にて脱水した。OCT Compound (Sakura, USA) で包埋し，ドライアイスにて凍結した。凍結ミクロトーム (Leica, Germany) を -35°C にセットし，厚さ $10\ \mu\text{m}$ の水平断凍結切片を作製し， $100\ \mu\text{m}$ 毎の切片をスライドガラスに貼付した。

5. 免疫蛍光染色

切片を固定液（4 % paraformaldehyde, 0.1 M PB）で固定した後 0.1 M PB で洗浄し，可溶化液（10 % TritonX-100, 0.1 M PB）で反応した後 0.1 M PB で洗浄した。ブロッキング（1% Broking Reagent (Roche, Germany), 0.1 M Phosphate buffer saline (0.1 M PBS)) をおこなった後，0.1 M PBS で希釈した一次抗体と反応させ（ 4°C ，24 時間），Wash buffer (0.1 M PBS, 0.2 % Tween20) で洗浄した。その後 0.1 M PBS で希釈した二次抗体と反応させ（ 4°C ，24 時間）Wash buffer で洗浄した後，Fluoromount-G (Beckman Coulter, USA) にて封入した。一次抗体には Anti NeuN mouse monoclonal antibody (Millipore, Massachusetts) (500 倍) と Anti ATF3 rabbit IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology, California) (200 倍) を用いた。二次抗体には Alexa Fluor 594 goat anti mouse IgG, Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG (Life technologies, California) (1000 倍) を用いた。対比染色として

Cellstain DAPI（同仁化学研究所，熊本）（1000倍）を用いた．

6. 画像取り込み，三次元構築

切片は，オールインワン光学顕微鏡 BZ-8000（KEYENCE，大阪）で画像を観察し，取り込んだ画像はグラフィックソフトの Adobe Illustrator（Adobe systems, California）にて NeuN と ATF3 の二重陽性細胞の外形と三叉神経節外形をマークした．3DCG（Three-dimensional computer graphics）作成ソフトの Shade（e-frontier，東京）にデータをインポートし，スライス平面画像に切片の厚みを持たせて立体化し，得られたスライス順に重ねて元の三叉神経節を再現するよう三次元構築をおこなった．それぞれのスライスに対し透明になる効果を設定し，ATF3 陽性細胞に対しては黄緑色に発色させ，一方向からの観察でも深部の ATF3 陽性細胞の局在を観察できるようにした．

結果

1. 三叉神経節内における神経細胞の局在

神経細胞特異的タンパク質である NeuN を用いてラット三叉神経節内における神経細胞領域を観察した．ラット三叉神経節は，二つに分岐しており，外側へ向かう枝が第3枝となり，残りは第1枝と第2枝となる．神経細胞体集団はおおまかに吻側領域と尾側領域の二つの領域に分かれている．これら二つの領域は三叉神経節の背側寄りでは分岐部から連続しており（吻側・尾側連続領域）（図1），腹側寄りでは二つの領域が完全に分離していた（図2）．

2. 各神経切断後の ATF3 陽性細胞の観察

作製した組織標本に対して，ATF3 が発現している細胞が神経細胞であることを確認するため，神経細胞マーカーである NeuN と ATF3 の二重染色をおこない，両者に染まる陽性細胞を観察した．

1) 眼窩上神経切断後の ATF3 陽性細胞の局在

眼窩上神経切断後の三叉神経節内における ATF3 陽性細胞は，背面からの観察において吻側領域における内側部に局限しており，同領域の中央から外側や分岐部周辺には陽性細胞は存在していなかった．内側面からの観察では陽性細胞の背・腹側方向への陽性細胞の偏りは明瞭ではなく，背側から腹側の全域に多くの陽性細胞を認めた（図 3a）．眼窩上神経切断の対照モデルにおいては切断群での陽性細胞局在と同一領域内に数個の陽性細胞が散在していた（図 3b）．

2) 眼窩下神経の ATF3 陽性細胞の局在

背面からの観察において ATF3 陽性細胞は吻側領域の内側から外側までほぼ全域に認められ，吻側・尾側連続領域にも陽性細胞が点在していた（図 4a）．内側面からの観察では背・腹側方向への陽性細胞の偏りは明瞭ではなく，背側から腹側の全域に多くの局在を認めた（図 3c）．眼窩下神経切断の対照モデルにおいては切断群での陽性細胞局在と同一領域において数個の陽性細胞が散在していた（図 3d）．

3) 下歯槽神経の ATF3 陽性細胞の局在

背面からの観察では主に尾側領域に ATF3 陽性細胞が局在しており，吻側領域で陽性細胞が多数散在していた．吻側・尾側連続領域にも陽性細胞が点在していた（図 4b）．内側面からの観察では背側よりも腹側で陽性細胞が少なくなる傾向がみられた（図 3e）．下歯槽神経切断の対照モデルにおいては吻側領域のみに陽性細胞が散在していた（図 3f）．

4) 舌神経の ATF3 陽性細胞の局在

背面からの観察では，尾側領域に多く ATF3 陽性細胞が局在して

おり，吻側領域内に数個の陽性細胞が散在していた（図 5）．吻側・尾側連続領域にも陽性細胞が点在していた．内側面からの観察では腹側で陽性細胞が少なくなる傾向がみられた（図 3g）．舌神経切断モデルの対照モデルにおいては尾側領域のみに陽性細胞が点在していた（図 3h）．

考察

1. 三叉神経節内における神経細胞標識について

神経節内における神経細胞体の局在を解析する方法として，神経切断をおこない，細胞変性を起こしている細胞局在を観察する方法²⁾や，神経トレーサーを用いる方法^{3) 19-23)}が知られている．現在，主に用いられている方法は逆行性神経トレーサーであり，末梢にトレーサーを投与した後に神経節内神経細胞体を観察することでトレーサー注入部分に軸索を伸ばす神経細胞体を同定することができる^{3) 19-23)}．しかしながら，逆行性神経トレーサーを用いた細胞標識では末梢における取り込み効率や軸索における輸送効率による影響が否定できない．また，神経トレーサー自身がつもつ毒性や免疫組織化学的に効率よく検出できるかどうかといった性質²³⁾も考慮する必要がある．これに対して，今回神経細胞の標識に用いた ATF3 は神経損傷マーカーであり，神経トレーサーとは用途が異なる．末梢神経切断後，損傷を受けた神経細胞を特異的に検出できることから¹⁰⁾，主に疼痛に関連する研究で用いられている^{10-14) 16) 24) 25)}．本研究においては，三叉神経節内における損傷神経に対応する神経細胞の局在を解剖学的に検証する為に用いた．ATF3 陽性細胞を明確に確認できることから，過去の神経トレーサーを用いた報告³⁾と比較して，より正確に細胞局在を把握することができたと考えられる．観察した細胞は NeuN と ATF3 の二重陽性細胞を対象とし，サテライトグリア細胞との関連や神経細胞のサイズの鑑別，特に小型の神経細胞のような疼痛に関連する細胞の特定はおこな

わなかった。

2. 三次元構築について

観察した組織切片を立体構築することにより，背面からの観察のみならず，多方向から三叉神経節内の神経細胞局在を観察することができた．側面からの観察により，眼窩上神経，眼窩下神経切断後の ATF3 陽性細胞局在様式は，吻側領域の背側から腹側へかけて偏りなく分布していた．これに対し下歯槽神経と舌神経切断後の陽性細胞局在様式は尾側領域において背側では発現細胞は多く存在し，腹側では少なくなる傾向がみられた．ラット三叉神経節内における背・腹側方向の神経細胞分布については電気生理学的に観察した舌神経細胞の報告があり²⁶⁾，この論文と今回の結果は一致していた．

組織標本から立体構築した画像を側面から観察し，背・腹側方向における神経細胞局在の広がりを確認できたことは，電気生理学的な研究の基礎データとなると考えられる．また，今までラット口腔顔面領域における異所性感覚異常の原因について，これまで三叉神経節内に発現する原因物質の解明に焦点が当てられていたが，この手法を用いることで，三叉神経節内における原因物質の空間的な広がりとは異所性感覚異常の発現との関係が明らかになることが期待できる．

3. ラット三叉神経節内における吻側尾側連続領域における神経細胞の局在分布について

Thalakoti ら³⁾の報告では，吻側領域と尾側領域の 2 つの神経細胞領域が第 3 枝の分岐部周辺で一部連続していた．これに対し Liverman ら⁴⁾の報告は，吻側領域と尾側領域の 2 つの領域は完全に分離していた．今回，NeuN を用いて背側から腹側までの神経細胞の局在領域を評価した結果では，背側のスライスでは吻側尾側連続領域が存在したが，腹側のスライスではこれらが分離していた．このことから Thalakoti ら³⁾と Liverman ら⁴⁾の報告ではそれぞれ

観察した部位が異なっていたために細胞の局在様式が異なっていたことが示唆された。また Thalakoti ら³⁾の報告では、吻側領域内で内側の第 1 枝領域と外側の第 2 枝領域に分離していたが、本研究ではどの部位でも第 1 枝である眼窩上神経、第 2 枝である眼窩下神経の細胞体集団は分離していなかった。

4. 眼窩上神経と眼窩下神経の細胞局在領域の比較

Thalakoti ら³⁾の報告によると、ラット三叉神経節内における吻側領域の内側半分は第 1 枝領域、外側半分は第 2 枝領域という局在様式を示していた。今回の実験結果では、眼窩上神経の細胞局在は内側に限局されていた一方で、眼窩下神経切断後の ATF3 陽性細胞は吻側領域の最外側から最内側まで広く分布していた (図 3a, c)。このことから Thalakoti ら³⁾の報告と異なり、眼窩上神経の細胞局在領域は眼窩下神経の細胞局在領域と重複していることが分かった。

陽性細胞の数については、眼窩上神経切断よりも眼窩下神経切断の方が陽性細胞数が多かった。これは、ラットの眼窩下神経線維束が眼窩上神経の線維束よりも明らかに太いことが関連している可能性が考えられる。しかし、舌神経の神経線維側は眼窩下神経に比べ顕著に細いにも関わらず、尾側領域の広範囲で多数の陽性細胞が分布していたことから、切断した神経線維側の太さと陽性細胞の数との関係は不明である。

5. 眼窩下神経，下歯槽神経，舌神経の細胞局在領域の比較

Thalakoti ら³⁾は、吻側・尾側連続領域において第 2 枝領域と第 3 枝領域がわずかに重複していると報告している。今回の結果でも眼窩下神経切断後もしくは下歯槽神経，舌神経の切断後，いずれもこの吻側・尾側連続領域に ATF3 陽性細胞がみられ，第 2 枝と第 3 枝の神経細胞局在領域の境界は不明瞭であった (図 4a, b)。

下歯槽神経切断後は，尾側領域と吻側・尾側連続領域のみでなく，

吻側領域にも陽性細胞が観察された。しかし、下歯槽神経切断の対照モデルにおいても同様に吻側領域内に陽性細胞がみられたことから、この部位の陽性細胞は、処置過程でラットの頬部皮膚を切開した際に第2枝領域の神経を切断した影響により ATF3 を発現した可能性が示唆された。これに対し、舌神経の切断は口腔底から処置を行うため、上顎神経支配領域を損傷することなく神経を切断することができる。舌神経切断群においても、下歯槽神経切断モデルと同様に第3枝領域と吻側・尾側連続領域での局在に加え、吻側領域にも陽性細胞が少数みられた(図5)。このことから下顎神経の細胞体は吻側領域にも散在している可能性が示唆された。

6. 下歯槽神経と舌神経の細胞局在領域の比較

今回の実験では、下顎神経は下歯槽神経切断と舌神経切断の2つの比較をおこなった。これらの神経切断後の ATF3 陽性細胞は同じ領域に局在していたことから、下歯槽神経と舌神経の神経細胞集団はほぼ全て重複していることが分かった。これは、下顎神経に属する神経枝の細胞が、すべて同一領域内にモザイク状に混在していたことを示している。

7. 三叉神経節内の神経細胞局在領域の重複に関して

神経障害性疼痛の研究において、神経損傷時に非損傷神経の支配領域に感覚異常を発症する神経損傷動物モデルがいくつか知られている^{25, 27-31)}。この異所性感覚異常の詳細な発症メカニズムはまだ解明されていないが、神経節内で損傷を受けた神経細胞が隣在する非損傷神経細胞に対してなんらかの影響を与え、異所性感覚異常を起こす可能性がある^{と報告されている^{30, 31)}}。Shinoda ら³¹⁾はラットの下口唇に炎症が起きると三叉神経内において神経成長因子である NGF が発現し、非損傷神経細胞に感作し、第2枝領域であるヒゲの基部で TRPV1 を活性化し、感覚異常を起こすと報告している。この仮説では、損傷と非損傷の神経細胞同士が近接している

ことが前提条件となる。また，Gunjigake ら²⁴⁾はラットの上顎大臼歯を抜歯すると三叉神経節内において，サテライトグリアの活性化が第3枝領域に認められ，これが異常疼痛発現に関与すると報告している。これ以外にもサテライト細胞などのグリア系の感覚異常への関与を示唆する論文も認められた^{32, 33)}。三叉神経領域では異所性感覚異常を発症するモデルとして下歯槽神経を切断すると上顎神経領域で感覚異常を発症する動物モデル^{25, 29, 30)}が知られている。眼窩下神経と下顎神経の細胞体とのわずかな混在と異所性感覚異常発症の関連は不明であるが，眼窩上神経細胞と眼窩下神経細胞，そして下歯槽神経細胞と舌神経細胞は多数の細胞体が三叉神経節内で混在していたことから，舌神経切断後に下歯槽神経支配領域に感覚異常が発現するか，または眼窩下神経切断後に眼窩上神経支配領域に感覚異常が発現するかを解析することで，この仮説を検証することが可能であると考えられ，異所性感覚異常の発症メカニズム解明につながることを期待できる。

結語

切断損傷した神経細胞を特異的に可視化した ATF3 陽性細胞の分布を三次元構築して観察したことにより，切断された神経細胞の局在を正確かつ詳細に知ることができた。各神経切断後の ATF3 陽性神経細胞の観察から，眼窩上神経，眼窩下神経，下歯槽神経および舌神経の細胞局在にはそれぞれ特徴があり，眼窩下神経細胞の局在は眼窩上神経細胞の局在領域全体を覆うぐらいまで広く分布し，また下歯槽神経の細胞局在や舌神経の細胞局在は眼窩下神経細胞局在領域の一部と重複していた。異なる神経支配の細胞体同士が近接していることは，異所性感覚異常のメカニズムの解明につながる可能性があると考えられる。

謝辞

稿を終えるに臨み，本研究の推進にあたり終始ご懇意なるご指導を賜った松本歯科大学大学院顎口腔機能制御学講座 金銅英二教授に深甚なる謝意を表します。また，研究を推進するにあたり，変わらぬご指導を頂いた松本歯科大学口腔解剖学第一講座 奥村雅代助教に心から感謝の意を表します。

最後に研究に際し，終始ご配慮とご協力を頂いた松本歯科大学歯科麻酔学講座 澁谷 徹教授ならびに歯科麻酔学講座の皆様にお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 金子丑之助 (2000) 日本人体解剖学 (上), 19 版, 523-31, 南山堂, 東京.
- 2) Gregg JM, Dixon AD (1973) Somatotopic organization of the trigeminal ganglion in the rat. *Archs Oral Biol* **18** : 487-98.
- 3) 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** : 1008-25.
- 4) Liverman CS, Brown JW, Sandhir R, Klein RM, McCarson K, Berman NE (2009) Oestrogen increases nociception through ERK activation in the trigeminal ganglion: evidence mechanism of allodynia. *Cephalalgia* **29** : 520-31.
- 5) 北嶋繁孝 (2007) ATF3 の細胞運命制御と疾患とのかかわり. *実験医学* **25** : 212-7.
- 6) Kiryu-Seo S, Kiyama H (2011) The nuclear events guiding successful nerve regeneration. *Front Mol Neurosci* **4** : 53, doi:10.3389/fnmol.2011.00053.eCollection 2011.
- 7) Tsuzuki K, Noguchi K, Mohri D, Yasuno H, Umemoto M,

- Shimobayashi C, Fukazawa K, Sakagami M (2002) Expression of activating transcription factor 3 and growth-associated protein 43 in the rat geniculate ganglion neurons after chorda tympani injury. *Acta Otolaryngo* **122** : 161–7.
- 8) Wang T, Molliver DC, Jing X, Schwartz ES, Yang FC, Samad OA, Ma Q, Davis BM (2011) Phenotypic switching of nonpeptidergic cutaneous sensory neurons following peripheral nerve injury. *PLoS One* **6** (12) : e28908, doi:10.1371/journal.pone.0028908.
- 9) Stenberg L, Kanje M, Dolezal K, Dahlin LB (2012) Expression of activating transcription factor 3 (ATF3) and caspase 3 in Schwann cells and axonal outgrowth after sciatic nerve repair in diabetic BB rats. *Neurosci Lett* **515** : 34–8.
- 10) 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. *Mol Cell Neurosci* **15** : 170–82.
- 11) Tsuzuki K, Kondo E, Fukuoka T, Yi D, Tsujino H, Sakagami M, Noguchi K (2000) Differential regulation of P2X₃ mRNA expression by peripheral nerve injury in intact and injured neurons in the rat sensory ganglia. *Pain* **91** : 351–60.
- 12) Li Y, Xi C, Niu M, Liu X, Chi Z, Wang X, Yan J (2011) Contralateral neuropathology in dorsal root ganglia in a rat model of noncompressive disc herniation. *Neurosci Lett* **493** : 49–54.
- 13) Malaspina A, Ngoh SF, Ward RE, Hall JC, Tai FW, Yip PK, Jones C, Jokic N, Averill SA, Michael-Titus AT, Priestley JV (2010) Activation transcription factor 3 activation and the development of spinal cord degeneration in a rat model of

- amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* **169** : 812–27.
- 14) Carlton SM, Du J, Tan HY, Nesic O, Hargett GL, Bopp AC, Yamani A, Lin Q, Willis WD, Hulsebosch CE (2009) Peripheral and central sensitization in remote spinal cord regions contribute to central neuropathic pain after spinal cord injury. *Pain* **15** : 265–76.
- 15) Zigmond RE, Vaccariello SA (2007) Activating transcription factor 3 immunoreactivity identifies small populations of axotomized neurons in rat cervical sympathetic ganglia after transection of the preganglionic cervical sympathetic trunk. *Brain Res* **23** : 119–23.
- 16) Dall A, Lynn B, Pang SJ (2005) Pressure and stretch mechanosensitivity of peripheral nerve fibres following local inflammation of the nerve trunk. *Pain* **117** : 462–72.
- 17) Taguchi M, Chida K (2003) Computer reconstruction of the three-dimensional structure of mouse cerebral ventricles. *Brain Res Protoc* **12** : 10–5.
- 18) Scallet AC, Meredith J (2002) Quantitative three-dimensional reconstruction: feasibility for studies of sexually dimorphic hypothalamic development in rats. *Neurotoxicol Teratol* **24** : 81–5.
- 19) Pieribone VA, Aston-Jones G (1988) The iontophoretic application of Fluoro-Gold for the study of afferents to deep brain nuclei. *Brain Res* **475** : 259–71.
- 20) Westerhaus MJ, Loewy AD (2001) Central representation of the sympathetic nervous system in the cerebral cortex. *Brain Res* **903** : 117–27.
- 21) Hayakawa T, Zheng JQ, Seki M (1999) Direct parabrachial nuclear projections to the pharyngeal motoneurons in the rat: an anterograde and retrograde double-labeling study.

- Brain Res **816** : 364–74.
- 22) Oyag S, Ito J, Honjo I (1988) Topographic study of the feline trigeminal ganglion via the horseradish peroxidase tracer method. Brain Res **476** : 382–3.
- 23) 小早川靖 (2003) ラット三叉神経末梢枝からの三叉神経感覚核群への投射に関する研究—コレラトキシン b サブユニットによる再検討—. 広大歯誌 **35** : 184–200.
- 24) Gunjigake K, Goto T, Nakao K, Kobayashi S, Yamaguchi K (2009) Activation of satellite glial cells in rat trigeminal ganglion after upper molar extraction. Acta Histochem Cytochem **42** : 143–9.
- 25) Okumura M, Kondo E (2010) The effect of Gabapentin on the expression of genes in the trigeminal ganglia of inferior alveolar nerve-transected neuropathic pain model rats. Pain Res **25** : 171–8.
- 26) 小松偉二, 田端孝義, 林治秀, 真柳秀昭 (1998) ラット三叉神経節における舌機械需要ニューロンの反応特性. J Oral Biol **40** : 179–86.
- 27) Fukuda T, Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo M, Miyoshi K, Dai Y, Noguchi K (2012) Re-evaluation of the phenotypic changes in L4 dorsal root ganglion neurons after L5 spinal nerve ligation. Pain **153** : 68–79.
- 28) Ohara K, Shimizu K, Matsuura S, Ogiso B, Omagari D, Asano M, Tsuboi Y, Shinoda M, Iwata K (2013) Toll-like receptor 4 signaling in trigeminal ganglion neurons contributes tongue-referred pain associated with tooth pulp inflammation. J Neuroinflammation **10** : 139, doi: 10.1186/1742-2094-10-139.
- 29) Tseng WT, Tsai ML, Iwata K, Yen CT (2012) Long-term changes in trigeminal ganglionic and thalamic neuronal

- activities following inferior alveolar nerve transection in behaving rats. *J Neurosci* **32** : 16051–63.
- 30) Sugiyama T, Shinoda M, Watase T, Honda K, Ito R, Kaji K, Lee J, Ohara K, Takahashi O, Echizenya S, Iwata K (2013) Nitric oxide signaling contributes to ectopic orofacial neuropathic pain. *J Dent Res* **92** : 1113–7.
- 31) Shinoda M, Asano M, Omagari M, Honda K, Hitomi S, Katagiri A, Iwata K (2011) Nerve growth factor contribution via transient receptor potential vanilloid 1 to ectopic orofacial pain. *J Neurosci* **31** : 7145–55.
- 32) Vit JP, Jasmin L, Bhargava A, Ohara P T (2006) Satellite glial cells in the trigeminal ganglion as a determinant of orofacial pain. *Neuron Glia Biol* **2** : 247–57.
- 33) Bartel DL (2012) Glial responses after chorda tympani nerve injury. *J Comp Neuro* **520** : 2712–29.

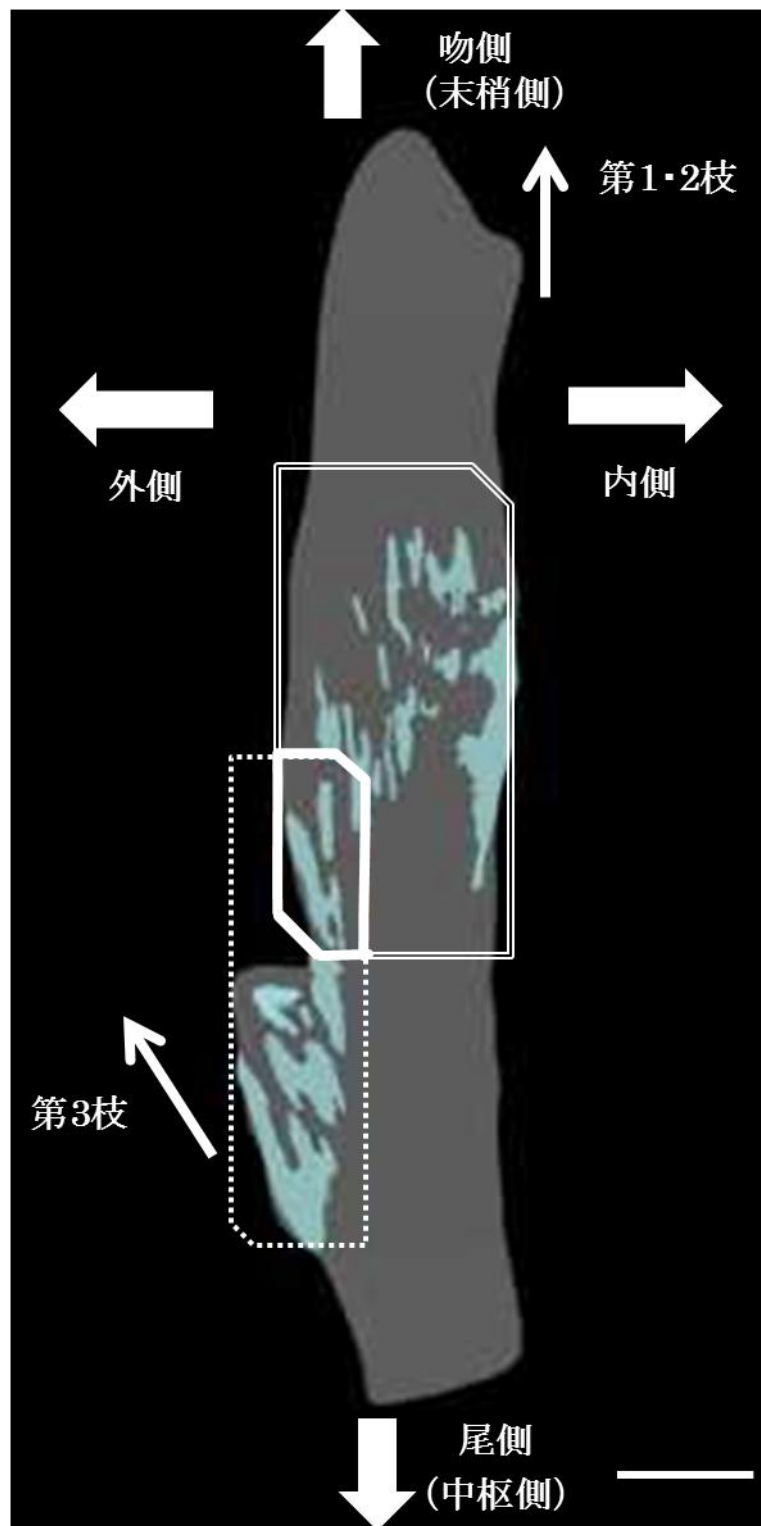


図1

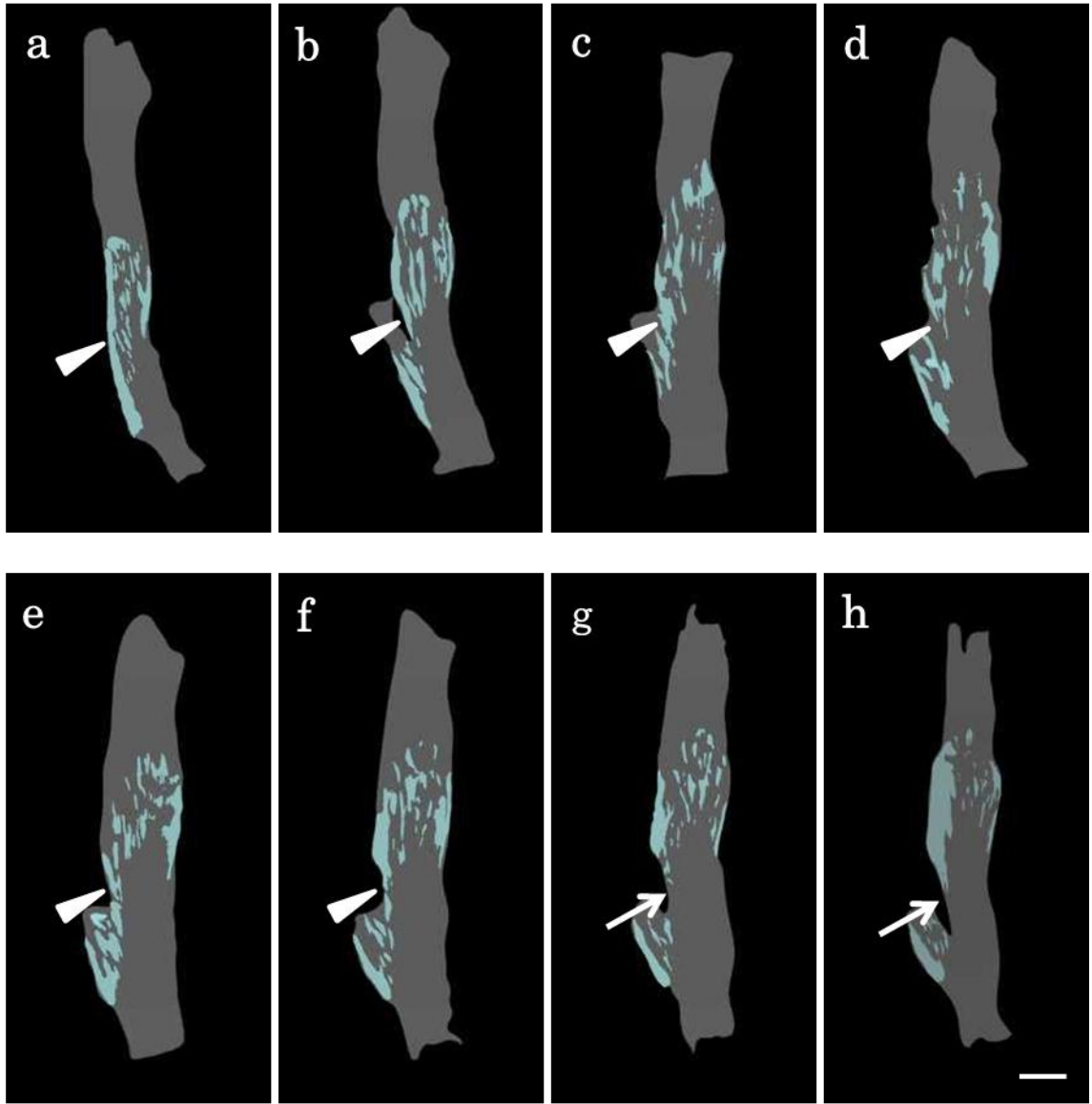


图2

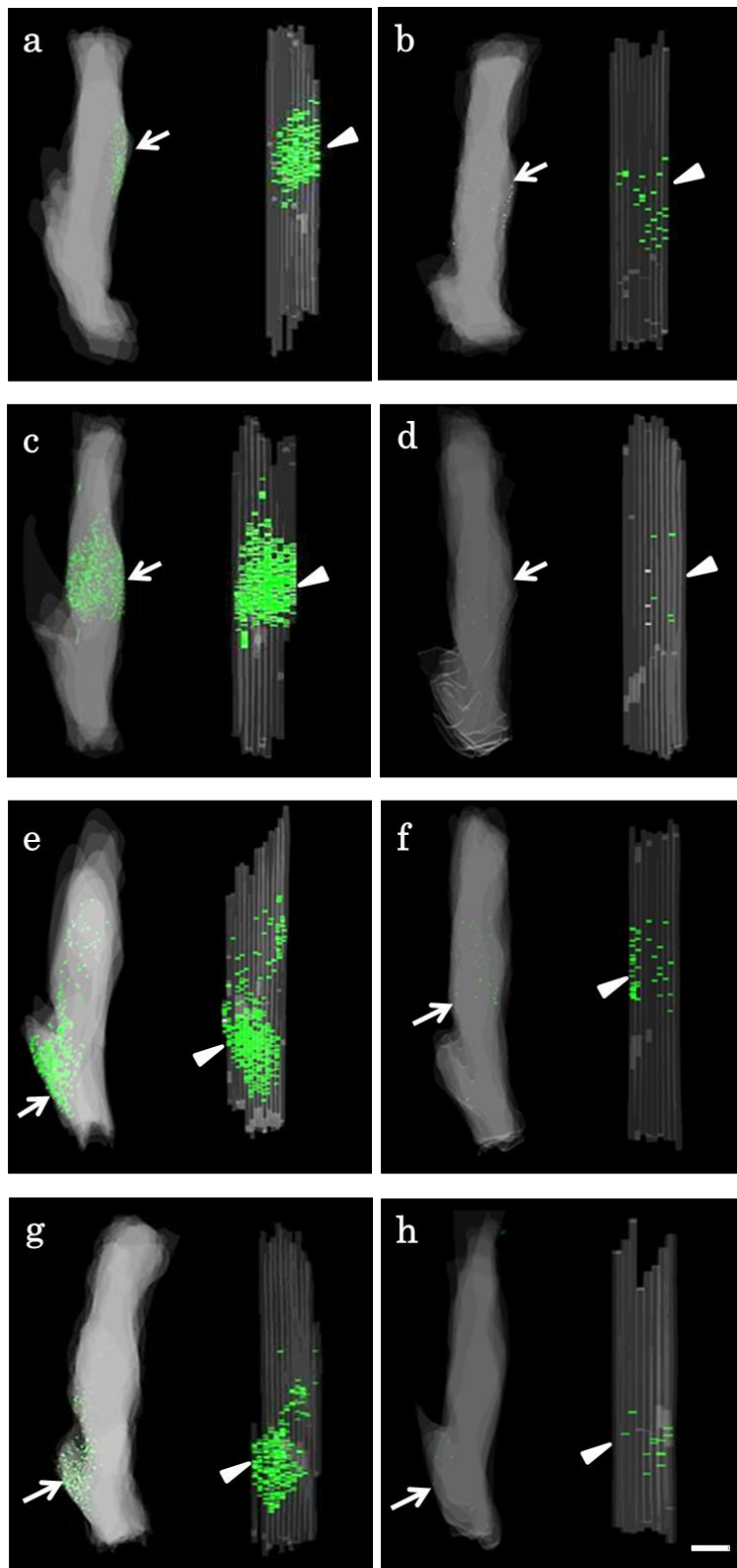


图3

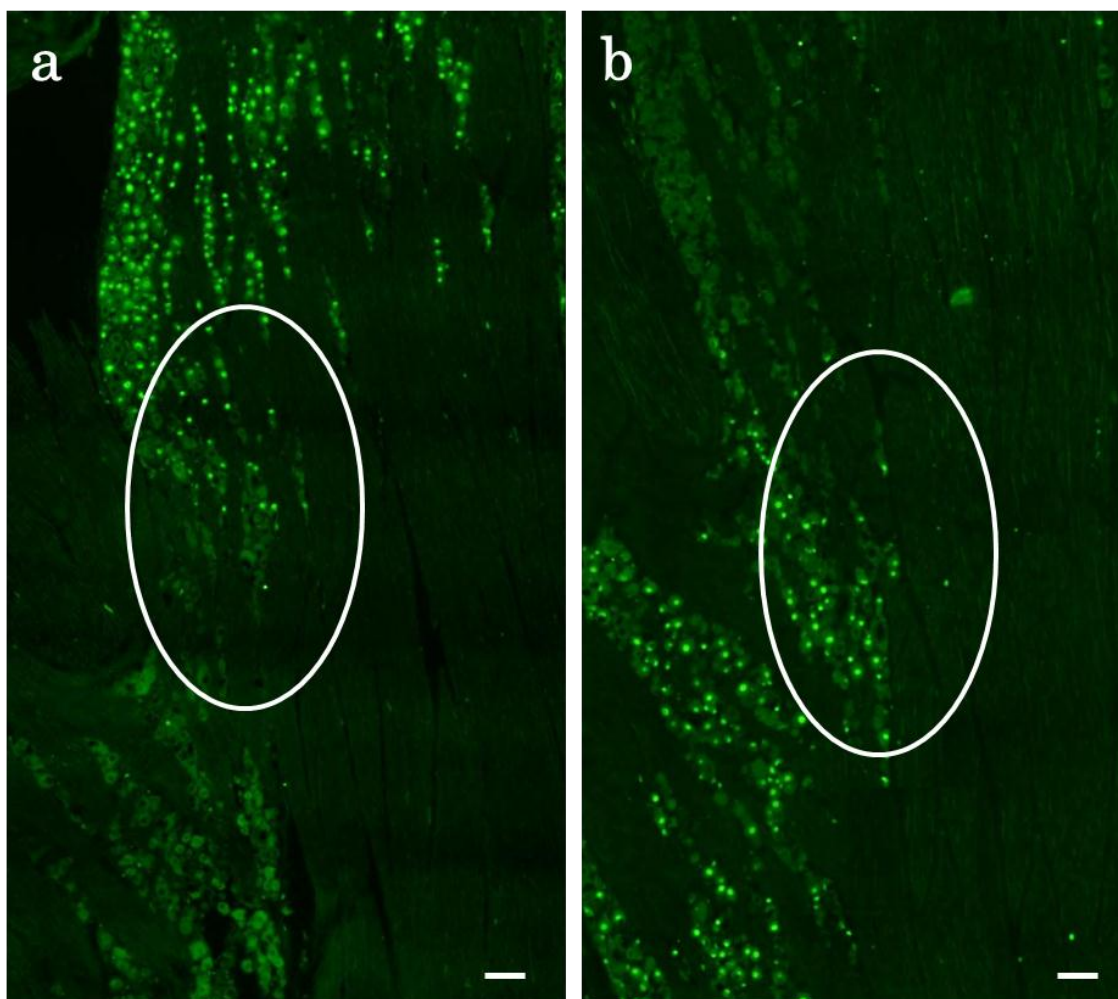


图 4

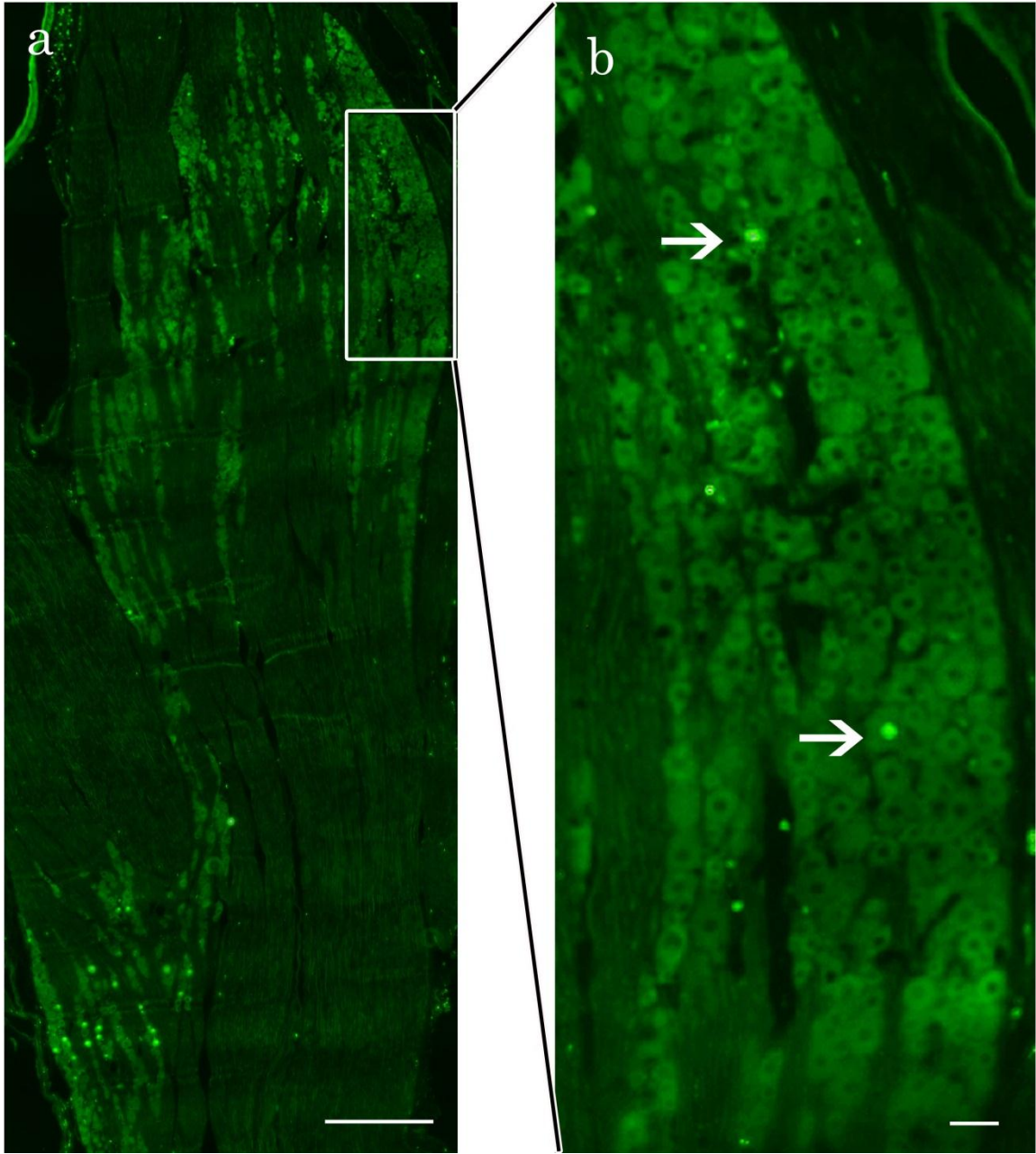


图5

図 1：ラット三叉神経節内における神経細胞局在

ラット三叉神経節の外形と NeuN で染色された神経細胞の局在をマークし，3DCG ソフトに取り込み三次元構築した像を示す。

ラット三叉神経節は，二つに分岐しており，外側へ向かう枝は第 3 枝となり，残りは第 1 枝，第 2 枝となる。神経細胞局在領域は大まかに吻側領域（二重線）と尾側領域（点線）に分かれており，この 2 つの領域が重なる部分を吻側・尾側連続領域（実線）とする（スケールバー：1 mm）。

図 2：ラット三叉神経節の水平断画像

NeuN で染色された神経細胞局在をスライスごとに表示する。100 μm 毎の水平断スライスを背側から腹側に順次 a~h とする。背側寄りでは吻側領域は尾側領域と連続している（矢頭）。腹側寄りでは吻側領域は尾側領域と分離している（矢印）（スケールバー：1 mm）。

図 3：各神経切断後の ATF3 陽性細胞の局在

眼窩上神経切断後（a），眼窩上神経切断の対照モデル（b），眼窩下神経切断後（c），眼窩下神経切断の対照モデル（d），下歯槽神経切断後（e），下歯槽神経切断の対照モデル（f），舌神経切断後（g），舌神経切断の対照モデル（h）。各図左側が背面，右側が内側面を示す。上面の細胞局在を矢印，内側面の細胞局在を矢頭で示す（スケールバー：1 mm）。

図 4：眼窩下神経と下歯槽神経の神経切断後の ATF3 陽性細胞局在
眼窩下神経切断後（a）下歯槽神経切断後（b）示す。丸で囲んだ部分は吻側・尾側連続領域を示す。両神経切断共に ATF3 陽性細胞局在様式の境界は明瞭ではない（スケールバー：100 μm ）。

図 5：吻側領域における舌神経切断後の ATF3 陽性細胞の局在

舌神経切断後の三叉神経節の組織像を示す（a：弱拡大，b：強拡大）。

吻側領域内の細胞局在中に舌神経切断後の ATF3 陽性細胞が散在する（矢印）（図 5a スケールバー：500 μm 図 5b スケールバー：50 μm ）。