

歯根膜領域への刺激に対する
大脳皮質応答の *in vivo* 光学イメージング

箕 田 碧

明海大学大学院歯学研究科
歯学専攻
(指導：須 田 直 人 教授)

The Cerebral Cortex Response to Stimulation
of Periodontal Ligament Area by *in vivo* Optical Imaging

Aoi MINODA

Meikai University Graduate School of Dentistry
(Mentor : Prof. Naoto SUDA)

要 旨

矯正歯科治療における歯の移動に伴う疼痛は、主に歯根膜の感覚受容により惹起される。歯根膜を含む口腔領域の感覚は体部位の局在情報を保ったまま視床を経由し大脳皮質・体性感覚野に入力する。こうした体性感覚野に見られる体部位局在はヒトだけでなく齧歯類にも存在し、歯根膜領域へ電気刺激を行うと一次体性感覚野（S1）と二次体性感覚野（S2）および島皮質口腔領域（IOR：insular oral region）が応答すると報告されている。しかしながら、S1 と S2/IOR 間の情報処理には不明な点が多い。本研究では、S1 と S2/IOR の機能的な関連について *in vivo* 光学イメージングにより検討した。

ラット下顎切歯部歯根膜領域へ電気刺激を行うと、S1 と S2/IOR 領域に応答が観察された。次に、S1 と S2/IOR いずれか一方の初期応答部位を電気刺激すると、もう一方の領域に応答が得られた。さらに、S1-S2/IOR 間の神経活動を選択的ナトリウムイオンチャネル阻害薬により抑制したところ、S2/IOR 内初期応答部位への刺激に対して、S1 の応答強度のみが抑制前と比較して減弱した。以上の結果より、S1 と S2/IOR には双方向性の情報処理機構が存在し、相補的な情報処理が行われていることが示唆された。

牽引用語：歯根膜，大脳皮質，光学計測，ラット

Abstract

Pain during orthodontic tooth movement is primarily caused by the noxious stimulus to periodontal ligaments area. The nociception in orofacial region, including periodontal ligament, is transmitted to cerebral cortex via thalamus, and processed by the well-regulated somatotopy. Rats, like human, also have somatotopy, and it is reported that the electrical stimuli to periodontal ligaments elicit the activation of primary (S1) and secondary (S2) somatosensory cortex and insular oral region (IOR). However, the physiological cooperation pattern between S1 and S2/IOR was still unclear. Thus, the optical imaging was performed to clarify this association in the present study. Electrical stimuli to the periodontal ligament of the mandibular incisor evoked the simultaneous neural activation in S1 and S2/IOR. When the initial responsive area in S2/IOR was electrically stimulated after the injection of sodium channel blocker, tetrodotoxin, to the cortical region between S1 and S2/IOR, response was attenuated only in S1. These findings suggest that there is a dense intracortical connection fulfilling complementary processing between S1 and S2/IOR.

Key words: periodontal ligament, somatosensory cortex, optical imaging, rat

緒 言

矯正歯科治療における歯の移動では、局所で炎症に類似した反応が起こることが知られており¹⁾、多くの患者が治療中に急性かつ一過性の歯根膜痛を訴える²⁾。このような歯根膜痛では、歯根膜中の感覚受容器が重要な働きを担う³⁾。歯根膜には、触覚・圧覚の他、痛覚・温覚・冷覚の受容器が存在し、そのうち痛覚の受容器は高閾値侵害受容器およびポリモーダル受容器に分類される。高閾値侵害受容器は咀嚼中の異物発見に、ポリモーダル受容器（A δ およびC線維による支配がある）は歯根膜炎など病態下で応答すると考えられている³⁾。

歯根膜からの体性感覚情報は、延髄の三叉神経感覚複合核（三叉神経脊髄路核、三叉神経主知覚核）に入力している。これらの入力のうち識別知覚（触圧覚）は主知覚核に、主情知覚（温痛覚）は脊髄路核に投射する。なかでも痛覚は主に三叉神経脊髄路核の尾側亜核に投射する。二次ニューロンはその後、視床後内側腹側核にて三次ニューロンとシナプスを形成し、三次ニューロンが大腦皮質体性感覚野に軸索投射している⁴⁾。一般に、感覚情報は一次体性感覚野（S1）に入力し、次いで二次体性感覚野（S2）、連合野へと順次情報が送られて処理されていると考えられている⁵⁾。S1では感覚の弁別あるいは刺激部位の同定が行われ、S2では刺激強度や記憶に関する処理が行われていると推測されている⁵⁾。一方で、Liao ら⁶⁾は解剖学的に、視床から S1 および S2 へ独立した入力があり、S1 と S2 間にも両方向性に線維連絡があると報告している。

体性感覚野への情報入力は、身体の一部を脳内に投影するように投射しており、体部位局在地図を描くことができる。ラットにおける口腔領域の感覚は、側頭部に入力している⁷⁻⁹⁾。Nakamura ら⁸⁾や Horinuki ら⁹⁾は、ラットにおいて歯髄や歯根膜といった口腔内体性感覚に関連する部位が、S1だけでなく、島皮質に近接した S2 および島皮質口腔感覚野（IOR）にも位置することを報告している。また、ラットの歯根膜に電気刺激を行うと、S1 と S2/IOR に生じる応答の潜時が同時もしくは S2/IOR の方が

短いことも報告されている⁹⁾。

しかしながら口腔内体性感覚の情報処理機構および IOR を含めた皮質領域の情報処理に関しては未だ不明な点が多い。そこで、S1 と S2/IOR の関係に注目し、この 2 領域における歯根膜感覚の情報処理機構について明らかにする目的で、膜電位感受性色素を用いた *in vivo* 光学イメージングを行い解析した。

材料と方法

1. 実験動物

本研究は、明海大学歯学部動物実験倫理委員会における承認（A1536）のもと、明海大学歯学部動物実験実施規定に基づき行われた。実験には、5～6週齢のSprague-Dawley系雄性ラット（三協ラボサービス、東京）を用いた（ $n = 17$, 158.7 ± 2.5 g）。

手術は、ウレタン（SIGMA、東京）を 1.5 g/kg 腹腔内投与し全身麻酔下にて行った。麻酔深度は、侵害受容反射（正向反射および下肢屈曲反射）の消失をもって確認し、反射が消失するよう必要に応じてウレタンの追加投与を行った。

2. 光学計測

2-1. 全脳標本の作成

麻酔下のラット（ $n = 16$, 161.3 ± 10.5 g）は、通法⁸⁻¹¹⁾に従い、気管挿管を行い気道確保した後、脳定位固定装置（ナリシゲ社製、東京）に頭部固定した。続いて、左側側頭部の皮膚、側頭筋を剥離し、側頭部の頬骨弓および側頭骨を除去し、約 10×7 mm² の開窓を施した。さらに硬膜を除去し、露出させた脳表面に、生理食塩液に溶解した膜電位感受性色素（1 mg/ml saline, RH-1691, Optical Imaging, New York, USA）0.3 ml 滴下し、約 90 分間浸漬することで染色して観察野とした。側頭部に位置する観察野と CCD カメラを近接させるために、ラットの体位を 60° 側方傾斜させた状態で光学イメージングを行った（Fig. 1A）。

2-2. 刺激部位手術方法

歯根膜領域への電極留置手術：

エナメルワイヤー（直径：100 μ m, 多摩川電線、東京）の先端約 2.0 mm の金属面を露出させ、双極電極を作製した。双極電極は、ラットの下顎右側前歯部歯根膜領域

に挿入し刺激電極として用いた。電極先端は歯槽骨縁から約 5 mm 挿入した (Fig. 1B)。

大脳皮質体性感覚野への刺激電極留置：

タングステン電極 (UEWMECSE0N1M, FHC, Bowdoin, ME, USA) の先端を皮質表層から 0.3 mm の深さに挿入し電気刺激に用いた (Fig. 1B, C)。

2-3. 刺激方法

電気刺激装置 (SEN-8203, 日本光電, 東京) を使用し, 歯根膜領域および大脳皮質に電圧刺激 (1.0, 3.0, 5.0 V, 100 μ sec, 50 Hz, 5 trains) を行った。

2-4. 薬物処置

S1 と S2/IOR 間の皮質間連絡について検討するために, 選択的ナトリウムイオンチャネル阻害薬であるテトロドトキシン (TTX; 1 μ M) (和光純薬, 大阪) を用い, 神経の興奮発生・伝導を抑制した。Patton ら¹²⁾の方法に準じて, 先端の直径約 2.8 μ m のガラス管ニードルを使用して中大脳動脈と平行に約 5 mm にわたって, TTX を約 10 ヶ所ほぼ等間隔で点線状に, 皮質内 (電極刺入と同じ深さ 0.3 mm) へ微量注入した。TTX 注入前と注入 30 分後に歯根膜領域, あるいは S2/IOR への刺激を行い, TTX 注入前後の電圧刺激に対する応答を比較した。

2-5. 膜電位計測

膜電位感受性色素 RH-1691 の蛍光変化は, 通法⁸⁻¹¹⁾に従い実体顕微鏡 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を搭載した CCD カメラシステム (MiCAM02-HR, Brainvision, 東京) によって測定した。タングステン-ハロゲンランプ (CLS150XD, Leica Microsystems) を光源として, 励起フィルターとダイクロイックミラーにて波長 632 nm に補正した励起光を皮質表層に照射した。蛍光変化はロングパスフィルター ($\lambda > 650$ nm) で受光し検出した。なお, 使用した CCD カメラの有効受光面積は 6.4×4.8

mm², 画素数は 192 × 128 pixels (有効画素数 184 × 124 pixels) であった。

膜電位感受性色素は記録中に退色するため、刺激時の蛍光変化値から非刺激時の蛍光変化値を算出し補正した。サンプリング間隔は 4 ms (1frm = 4ms), 1 回の記録時間は 500 msec として 40 セットの補正を行うことで、ノイズ信号を軽減した。刺激時の記録と非刺激時の記録の間には、10 sec の間隔を空けた。データ解析には、Brain Vision Analyzer (Version 12.08.20; Brainvision) を用いた。その他の補正として、正規化 (DF/Fmax) と Spatial Filter (9 × 9) を行った。正規化は、背景画像中の最も明るい点の値を Fmax とし、背景画像の全点を Fmax で除算した。Spatial Filter 処理により近隣データ 9 × 9 pixel の値を平均値に変更した。応答領域の画像は、刺激に対する応答部位を保証するため、刺激前 10 フレームから得られた 3SD 分の値を削除して表示した。また、応答を明確にするために削除データの負の値は削除した。

興奮伝播の時空間的特性を解析するために、歯根膜領域刺激時における S1 内初期応答部位と S2 内初期応答部位に region of interest (ROI) を設定した。

応答の時間的解析を行うために、刺激開始から応答開始までの潜時と、ピークに達するまでの時間を計測した。時間の表示はフレーム (frms) 数として表した。

3. 組織化学染色による神経細胞の投射検索

Pentobarbital sodium (50 mg/kg, 腹腔内投与) にて麻酔後、ラットを脳定位固定装置に固定した。左側頭部を切開し側頭筋を筋膜ごと剥離し側頭骨を露出させた後、中大脳動脈と嗅裂の交点が可視化できるまで歯科用ドリルで骨を切削除去した。さらに、S1 相当部位として、交点から吻側へ 1.5 mm, 背側へ 2.4 mm の部位の骨を完全に除去し、先端の直径約 2.8 μm のガラス管ニードルを使用して露呈した皮質表層から深さ 0.3 mm に逆行性神経トレーサーである Fluorogold (3 % in saline, FG, Invitrogen-Molecular Probes, New York, USA) を約 0.1 μl 圧注入した。逆流を防ぐためニードルを溶液注入後 1 分間保持した。

ラットは麻酔から回復後 1 週間生存させ灌流固定した。灌流手順として Pentobarbital sodium で深麻酔した後、生理食塩水にて脱血し、0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4) に溶解した 4 % パラホルムアルデヒド（和光純薬）溶液で灌流固定を行った。その後、脳を取出し後固定として 4 % パラホルムアルデヒド溶液（4 °C）に一晩浸漬させた。翌日、固定した脳を 30 % スクロース溶液に浸漬し、凍結ミクロトーム（CM8150, Leica Microsystems）にて厚さ 50 μ m の大脳皮質スライス標本を作製した。FG の分布および投射の観察には蛍光顕微鏡（HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 ; キーエンス, 大阪）を用いた。位置確認は明視野で行い、FG 陽性細胞の観察は 470 nm の青色蛍光下で行った。

4. 統計

数値の表示は、平均 \pm 標準誤差とした。また Paired *t*-test により統計解析を行い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。統計ソフトには、エクセル統計 2015（社会情報サービス SSRI, 東京）を用いた。

結 果

1. 下顎右側切歯部歯根膜領域への電気刺激に対する皮質応答

ラットの下顎右側前歯部歯根膜にエナメルワイヤー双極電極を挿入 (Fig. 1B) し、刺激 (100 μ sec, 50 Hz, 5 trains) の電圧強度を 1.0, 3.0, 5.0 V の範囲で変化させ、大脳皮質での応答を光学イメージングにより計測した。その結果、潜時 (フレーム, frms) は S1 (1.0 V: 4.5 ± 0.3 frms, 3.0 V: 5.0 ± 1.2 frms, 5.0 V: 3.8 ± 0.5 frms) と S2 (1.0 V: 2.8 ± 0.5 frms, 3.0 V: 4.3 ± 1.1 frms, 5.0 V: 4.8 ± 0.6 frms) で刺激強度によって異なった。また、刺激強度 1.0 V においてのみ ($p < 0.05$) 有意差が認められ、S2の方がS1よりも短くなった (1.0V: 両側 $p = 0.04$, 3.0V: 両側 $p = 0.68$, 5.0V: 両側 $p = 0.42$)。

刺激に対する応答ピークに関しては Horinuki ら⁹⁾による報告と同様に、S1 と S2/IOR 領域の両方で、刺激強度ごとにほぼ同じ時間に単一ピークをもつ応答が得られた ((S1) 1.0 V: 11.3 ± 1.4 frms, 3.0 V: 9.3 ± 1.0 frms, 5.0 V: 7.8 ± 0.5 frms, (S2) 1.0 V: 11.3 ± 1.3 frms, 3.0 V: 8.3 ± 1.3 frms, 5.0 V: 7.8 ± 0.6 frms) (Fig. 1D, E, Fig. 2C)。この応答は計測した複数の個体でほぼ同じ位置に観察された (Fig. 1F, $n = 4$)。ただし、Fig. 2C に示したように刺激電圧強度が 1.0V では、一過性の急激なピークを示した他の電圧強度とは異なり、なだらかな上昇を伴う応答変化が認められた。

また、刺激強度を 1.0, 3.0, 5.0 V の範囲で増加させると、S1 と S2/IOR とともに初期応答部位を中心とした同心円状に応答面積が増加し (Fig. 2A, B), 応答強度も上昇した (Fig. 2C, D)。S1 および S2/IOR における初期応答領域に ROI をとり応答強度を両領域で比較すると、S1 (1.0 V: -0.19 ± 0.02 %, 3.0 V: -0.39 ± 0.04 %, 5.0 V: -0.48 ± 0.03 %) に比べ S2/IOR (1.0 V: -0.20 ± 0.04 %, 3.0 V: -0.42 ± 0.05 %, 5.0 V: -0.51 ± 0.05 %) の方が強い傾向があった (Fig. 2D)。

2. S1 と S2/IOR 内初期応答部位の皮質間連絡についての検討

2-1. 歯根膜領域刺激に応答した S1 および S2/IOR への電気刺激に対する皮質応答

下顎切歯歯根膜領域刺激に対し、S1 および S2/IOR に応答が得られたことを確認した後 (Fig. 3A), 同一個体の S1 もしくは S2/IOR の初期応答部位にタングステン電極を刺入し、もう一方の領域に応答が生じるか検討した。その結果、S1 内初期応答部位への電気刺激により S2/IOR に応答が惹起された (Fig. 3B)。同様に、S2/IOR 内初期応答部位への電気刺激により、S1 に応答が得られた (Fig. 3C)。得られた結果を中大脳動脈と嗅裂をランドマークとして重ね合わせると、皮質への電気刺激で得られた初期応答部位は、歯根膜領域刺激に対する初期応答部位にほぼ一致した (Fig. 3D)。また、歯根膜領域に電気刺激を行った場合と異なり (Fig. 2C, D), 刺激のタイミングに応じて 5 つのピークを持つ応答が計測された (Fig. 3E, F)。

2-2. TTX 皮質注入による S1-S2/IOR 間の皮質間連絡についての検討

歯根膜領域刺激に対する初期応答部位と S2/IOR 刺激に対する S1 応答部位が一致することを確認した後、S1 と S2/IOR 内初期応答部位に皮質間連絡があるか否か検討した。S1 と S2/IOR 間皮質の神経活動を抑制する目的で TTX を皮質内に微量注入した後、再び歯根膜領域および S2/IOR 内初期応答部位に対して電気刺激を行い、TTX 注入前後の刺激に対する応答を比較した。その結果、歯根膜領域刺激に対する応答は TTX 注入後、S1 および S2/IOR とともに有意 ($p < 0.05$) に減少した ((S1) 注入前: -0.37 ± 0.04 %, 注入後: -0.24 ± 0.03 %, (S2) 注入前: -0.42 ± 0.03 %, 注入後: -0.31 ± 0.03 %) (Fig. 4A, B, C)。一方、S2/IOR 刺激では TTX 注入後、刺激部位である S2/IOR に比べて S1 での応答のみ有意 ($p < 0.05$) に減少した ((S1) 注入前: -0.49 ± 0.03 %, 注入後: -0.40 ± 0.04 %, (S2) 注入前: -0.60 ± 0.02 %, 注入後: -0.59 ± 0.04 %) (Fig. 4D, E, F)。

3. 組織化学染色による S1-S2/IOR 間の皮質間連絡についての検討

S1 内初期応答部位相当部に逆行性神経トレーサーである FG を注入し、S2/IOR から S1 への神経投射を組織学的に検討した。その結果、FG 陽性細胞は、FG 注入部位

である S1 および同側の S2/IOR 皮質表層に散在した (Fig. 5)。これに対して, FG は対側の皮質には認められなかった (データは示さず)。

考 察

本研究では、S1 と S2/IOF における歯根膜感覚の情報処理機構について検討した。まず、膜電位感受性色素を用いた *in vivo* 光学イメージングによって、ラットの下顎前歯部歯根膜に電気刺激を行うと、刺激側の S1 と S2/IOF 領域に応答が観察された。次に S1 もしくは S2/IOF の初期応答部位に電気刺激を行うと、もう一方の初期応答部位に一致して応答が生じた。また、S1 と S2/IOF 間に TTX を注入すると、歯根膜領域刺激による応答は S1 と S2/IOF 両領域で減弱し、S2/IOF を電気刺激して得られる S1 応答も減弱した。また神経トレーサーを用いた検討から、S2/IOF から S1 への投射線維が存在することが明らかになった。

1) 歯根膜領域から大脳皮質への情報入力

本研究で用いた歯根膜刺激は通電によるものであり、どの受容器を刺激したか、あるいはどの神経線維を刺激したかを同定することは出来ない。しかし一般的に言われているように、刺激強度が小さければ A β などの太い神経線維を刺激しており、大きければ太い線維に加えて C 線維など細い線維を同時に刺激している可能性が高い¹³⁾。歯根膜刺激に対する皮質応答は、刺激強度依存的に増大したことから (Fig. 2C)、電気刺激によって動員される末梢神経の数に比例して皮質での応答が増大すると推測される。これは、末梢神経での興奮強度の増加により S1 と S2/IOF での応答領域が広がるという実験結果によって支持される (Fig. 2A, B)。

本研究において歯根膜領域を電気刺激すると、ほぼ同じ潜時もしくは S2 の方が若干短い潜時で S1 と S2/IOF に応答が生じたことは、S2 は S1 からの入力を受けてより高度な情報処理を行っているというこれまでの認識とは一致しないことが考えられる。この結果からは、最近 Liao ら⁶⁾がラット前肢への刺激実験によって報告したように、歯根膜領域においても視床から S1 と S2 各々に独立した入力が存在する可能性が考えられる。本研究の結果からも、S2/IOF の応答強度が S1 に比べ大きいことは (Fig.

2D, 4C), S1 を経由してから S2 へ伝えられる情報量が加算された結果と解釈することも可能である。本研究で示した S1 と S2/IOR 間の双方向性の機能的連絡は、この仮説を支持する。さらに、S1 と S2/IOR 間の皮質連絡を TTX によって抑制後、歯根膜領域刺激により 2 領域ともに応答が減弱したことは、この仮説を裏付けるものである。加えて、神経トレーサーを用いた検討でも、S2/IOR から S1 への投射線維が存在することが示された。

また、皮質刺激時と異なり、末梢刺激を行った場合には皮質における応答は、単一のピークを示す。これは、末梢刺激に対する応答は、均一な繊維ではなく伝導速度の異なる複数の繊維からなる繊維束によって中枢に伝導されることが一因であろう。その間、伝導路は複数のシナプスを経由し、他の入出力や介在ニューロンなどによる種々の修飾を受けている可能性が考えられる。

2) S1 と S2/IOR の役割

三叉神経系の主に痛覚を伝える上行性投射経路は、体幹部からの痛覚情報を伝える脊髓視床路に脳体幹部で合流し、網様体に側枝を出しながら視床に向かう。視床から更に大脳皮質へと投射するが、S1 へ投射する主たる視床核は、腹側基底核群（後外側腹側核，後内側腹側核，後下側腹側核: VPI）である。一方、S2 へは同じ腹側基底核群（主として VPI），後核群の他，髄板内核群の中の外側中心核からも投射がある⁵⁾。この上行性投射経路には内側系と外側系の 2 つがあり、それぞれ異なる機能を有していると考えられている。内側系は大脳辺縁系に投射し、機能的には主に痛みの情動的側面を担っていると考えられている。外側系は S1（もしくは S2）に投射し、体部位局在や強度など痛みの弁別的な側面を担っていると考えられている¹⁴⁾。

さらに、本研究で着目した島皮質には帯状回と同じように、侵害性の体性感覚刺激によって強く特異的に活性化されるニューロンがあり^{15,16)}、視床（とくに内側核群）と後内側腹側核から直接の投射を受ける。島皮質のニューロンは身体の内部状態に関

する情報を処理し、痛み応答の自律的な側面に寄与すると考えられている¹⁷⁾。

島皮質に障害を有する患者は、疼痛象徴不能症 (asymbolia for pain) を発症する¹⁷⁾。この患者では、侵害刺激を痛みと認識することは可能で、痛みの強さや、空間的、質的要因は識別できるものの、痛みに対する情動的応答が低下する。このように、島皮質は痛みの感覚的、情動的および認知的情報の統合を行う領域であると考えられる。

3) S1 と S2/IOR 間の投射が持つ意義

一般に S1 は、体性感覚の弁別あるいは刺激部位の同定を行うと考えられている。すなわち疼痛知覚に特異的な役割をもつというより、関連した体性感覚の空間的な情報処理に関与していると考えられる¹⁸⁻²¹⁾。一方、前述したように、S2/IOR では刺激強度や痛みに関する記憶の処理や、情動や認知的統合および自律的応答に関与する可能性がある。実際、S2/IOR は疼痛刺激に特異的に活動するのではなく、様々な非侵害性の体性感覚刺激に反応することが報告されており、これらの領域は全般的な体性感覚の統合に関与している^{18,22,23)}。

矯正歯科治療における歯の移動では、局所における組織改造に伴って、歯根膜の感覚閾値の低下によりしばしば急性疼痛が惹起される¹⁾。歯の移動に伴う急性疼痛は、咬合痛や打診痛として、歯の移動初期に感じられることが多い²⁾。このような歯の移動初期には、本研究と同じように、歯根膜内の感覚受容器を介して S1 と S2/IOR の活動性が上昇し空間的情報と情動に関する情報の交換を通じて、疼痛が総合的に評価され認知に至ると考えられる。矯正装置の調節後、歯の移動に伴う疼痛を訴える患者は、定期的な装置の再調節のたびに再度疼痛を訴える例が多い。歯の移動に伴う疼痛に関する S2/IOR における情動や記憶が S1 との相互連絡を通じて、装置再調節後の発痛にも関与している可能性がある。

結 論

S1 から S2/IOR に至る連絡様式その他, S2/IOR から S1 へ情報が伝播される連絡様式を確認し, S1 と S2/IOR 間の連絡は双方向性をもつことが示唆された。末梢からの感覚情報がこれらの皮質領野に伝わった際には, S1 と S2/IOR は相互に情報連絡を行い, 感覚の検知および質的評価に関わる認知的な情報処理の効率を高めていることが示唆された。

謝 辞

本論文を執筆するにあたり，全過程において御指導いただきました明海大学歯学部形態機能成育学講座歯科矯正学分野 須田直人教授，ならびに，明海大学歯学部形態機能成育学講座生理学分野 村本和世教授に深く感謝申し上げます。特に実験やデータ解析などで直接御指導いただいた明海大学歯学部形態機能成育学講座生理学分野 溝口尚子助教には深甚なる感謝を述べさせていただきます。また，本研究に対して多くのご協力をいただいた明海大学歯学部形態機能成育学講座歯科矯正学分野の教室員の皆様，並びに明海大学歯学部形態機能成育学講座生理学分野の皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 多田勉：歯の移動について．In：矯正臨床の基礎．与五沢文夫，初版，クインテッセンス出版，東京，pp110-159，2008
- 2) Sakamoto T, Sakamoto N: The pain response of the tooth caused by placement of a labial archwire. J Jpn Orthod Soc **48**, 59-65, 1989
- 3) 増田裕次：顎・口腔・顔面の体性感覚．In：基礎歯科生理学．森本俊文，山田好秋，二ノ宮裕三，岩田幸一編，第6版，医歯薬出版，東京，pp261-264，2014
- 4) 岩田幸一，篠田雅路：口腔・顔面の痛み．In：基礎歯科生理学．森本俊文，山田好秋，二ノ宮裕三，岩田幸一編，第6版，医歯薬出版，東京，pp265-271，2014
- 5) 吉村恵：感覚機能．In：標準生理学．小澤澥司，福田康一郎，第7版，医学書籍，東京，pp221-232，2011
- 6) Liao C, Yen CT: Functional Connectivity of the Secondary Somatosensory Cortex of the Rat. THE ANATOMICAL RECORD **291**, 960-973, 2008
- 7) Remple MS, Henry HW, Sarver DM: Organization of somatosensory cortex in the laboratory rat (*Rattus norvegicus*) : Evidence for two lateral areas joined at the representation of the teeth. J Comp Neurol **467**, 105-118, 2003
- 8) Nakamura H, Kato R, Sirakawa T, Koshikawa N, Kobayashi M: Spatiotemporal profiles of dental pulp nociception in rat cerebral cortex: an optical imaging study. J Comp Neurol **523**, 1162-1174, 2015
- 9) Horinuki E, Shinoda M, Shimizu N, Koshikawa N, Kobayashi M: Orthodontic force facilitates cortical responses to periodontal stimulation. J Dent Research **94**, 1158-1166, 2015
- 10) Fujita S, Kitayama T, Mizoguchi N, Oi Y, Koshikawa N, Kobayashi M: Spatiotemporal profiles of transcallosal connections in rat insular cortex revealed by in vivo optical imaging. Neuroscience **206**, 201-211, 2012
- 11) 北山稔恭：ラット扁桃体から島皮質への興奮性入力の時空間パターン特性．日大

歯学 **86**, 5-10, 2012

- 12) Patton MH, Bizup BT, Grace AA. The infralimbic cortex bidirectionally modulates mesolimbic dopamine neuron activity via distinct neural pathways. *Neuroscience* **33**, 16865-16873, 2013
- 13) Takemura M, Sugiyo S, Moritani M, Kobayashi M, Yonehara N. Mechanisms of orofacial pain control in the central nervous system. *Arch Histol Cytol* **69**, 79-100, 2006
- 14) 岩田幸一：感覚機能。In：基礎歯科生理学。森本俊文，山田好秋，二ノ宮裕三，岩田幸一編，第6版，医歯薬出版，東京，pp158-167，2014
- 15) Craig AD, Bushnell MC. The thermal grill illusion: unmasking the burn of cold pain. *Science* **265**, 252-255, 1994
- 16) Craig AD, Reiman EM, Evans A, Bushnell MC. Functional imaging of an illusion of pain. *Nature* **384**, 258-260, 1996
- 17) Basbaum AI, Jessell TM: Pain. In: PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE. Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell, Steven A. Siegelbaum, A. J. Hudspeth. Fifth Edition, The McGraw-Hill Companies, USA, pp530-555, 2013
- 18) 前岡 浩：痛みの中樞機構－脊髄と脳を中心に－，*Pain Rehabilitation* **5**, 11-17, 2015
- 19) Farrell MJ, Laird AR, Egan GF. Brain activity associated with painfully hot stimuli applied to the upper limb: a meta-analysis. *Hum Brain Mapp* **25**, 129-139, 2005
- 20) Peyron R, Laurent B, García-Larrea L. Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis. *Neurophysiol Clin* **30**, 263-288, 2000
- 21) Bingel U, Quante M, Knab R, Bromm B, Weiller C, Büchel C. Single trial fMRI reveals significant contralateral bias in responses to laser pain within thalamus and somatosensory cortices. *Neuroimage* **18**, 740-748, 2003
- 22) Frot M, Mauguière F. Timing and spatial distribution of somatosensory responses recorded in the upper bank of the sylvian fissure (SII area) in humans. *Cereb Cortex* **9**,

854-863, 1999

- 23) Coghill RC, Talbot JD, Evans AC, Meyer E, Gjedde A, Bushnell MC, Duncan GH.
Distributed processing of pain and vibration by the human brain. *J Neurosci* **14**,
4095-4108, 1994

Figure legend

Figure 1.

In vivo preparation for an optical imaging.

A. A schematic drawing of the *in vivo* rat preparation for optical imaging. The position of rats were inclined by 60 degree to the long axis to observe both the somatosensory and the insular cortices in the same field of view.

B. A diagram showing the periodontal ligament stimulation (PDL stimulation). Custom-made bipolar stimulating electrodes were inserted in right mandibular incisor. Arrow denotes the position of stimulation.

C. Central somatosensory pathways and cortical positions for electrical stimulation. Sensory information from the PDL is transmitted to the primary (S1) and the secondary (S2) somatosensory cortices, and the insular oral region (IOR) via the nucleus tractus spinalis (NTS) and the ventroposteromedial thalamic nucleus (VPM). Custom-made tungsten electrodes were inserted in the S1 or S2/IOR (magenta lines; a, b). The contact point of magenta lines and S1 or S2/IOR denote the position of stimulation. Rhinal fissure (RF) and middle cerebral artery (MCA) are shown by orange lines.

D. A representative of excitatory propagation responding to mandibular incisor PDL stimulation (5 pulses at 50 Hz). The intensity ($\Delta F/F$) and areas of responses are represented as the pseudo-color map. Time from the onset of stimulation is shown at the top of each panel. Electrical stimulation to the PDL were applied at the timing indicated by arrowheads. Blue and red circles indicate the location of regions of interest (ROIs) showed in E.

E. Typical optical responses in the S1 (blue) and the S2/IOR (red). These responses were recorded from two ROIs showed in D. Electrical stimulation was applied at the time indicated by arrows.

F. Spatial pattern of the initial and maximum responses to PDL stimulation obtained from 4

animals. The initial (left) and maximum (right) responsive areas were superimposed with reference to the MCA (vertical dotted line) and RF (horizontal dotted line). The number of overlapping images is represented by the gradation of colors; i.e. the area painted with deeper color showed as the larger numbers of animals.

Figure 2.

The intensity-dependent change in the optical signals induced by PDL stimulation.

A. Maximum optical responses to the mandibular right incisors PDL stimulation (5 pulses at 50Hz) at 1.0, 3.0 and 5.0 V.

B. Superimposed image showing the maximum responsive area. Each Maximum responses (1.0V, 3.0V, 5.0V) to the mandibular right incisors PDL stimulation were superimposed with reference to the MCA and RF. The detailed explanation for B is same as that in Fig. 1F.

C. The temporal profiles of optical signals in S1 (left) and S2/IOR (right) evoked by 1.0V (black line), 3.0V (blue line) and 5.0V (red line) of PDL stimulation. The ROIs for each record are shown in the image A (left). Electrical stimulation was applied at the times indicated by arrows. The horizontal and vertical lines shown in upper right indicate scales for time (100ms) and ratio of change in optical signal ($\Delta F/F$; 0.1 %), respectively.

D. Changes in the peak amplitude of optical signals over the increase of the stimulation intensity. Closed and open circles indicate peak amplitudes of optical signals in the S1 and the S2/IOR, respectively.

Figure 3.

Optical signals evoked by electrical stimulation to the cortical areas.

A. A pseudo-color map showing optical signals evoked by PDL stimulation. The horizontal bar indicates 1.0 mm.

- B. A pseudo-color map showing color-coded optical signals induced by electrical stimulation to the S1. Dotted lines indicate the position of the stimulating electrode.
- C. A pseudo-color map showing color-coded optical signals induced by electrical stimulation to the S2/IOR.
- D. Superimposed image showing the responsive cortical regions. Optical signals in images A, B, and C were superimposed. These three responsive areas were matched well regardless of the difference of stimulating regions. Blue circle in the S1 and red circle in the S2/IOR indicate the location of ROIs showing in E and F.
- E. Optical signals were evoked by electrical stimulation to the S1. Each optical signal was recorded from ROIs shown in image D. Electrical stimulation was applied at the time indicated by arrows.
- F. Optical signals were evoked by electrical stimulation to the S2/IOR. The recorded ROIs are same with those in E. The horizontal and vertical bars indicate 100 ms and 0.1 % (ratio of optical signals; $\Delta F/F$) in E and F, respectively.

Figure 4.

Effects of TTX-injection on the optical responses to the PDL and the S2/IOR stimulations. TTX was injected into the cortices to inhibit cortical transduction between the S1 and the S2/IOR.

A. Representative of excitatory propagation corresponding to the PDL stimulation (5 pulses at 50 Hz) before (upper panels) and after (lower panels) injecting TTX into the cortices. The area and amplitude of an optical signal ($\Delta F/F$) was represented as the pseudo-color map. And time from the onset of stimulation is shown at the top of each panel. TTX was injected along a thick dotted line shown in the lower left panel.

B. Temporal profiles of optical signals evoked by the PDL stimulation. Optical signals were

obtained at the ROIs in the S1 (left) and the S2/IOR (right) before (black line) and after (red line) injecting TTX. The positions of ROIs is shown in image A (blue color, left upper panel).

Electrical stimulation was applied at the time indicated by arrows.

C. Comparison of the peak amplitude of the optical signals ($\Delta F/F$) in the S1 (closed circles) and S2 (open circles). The peak amplitudes of an optical signals evoked by the PLD stimulation were compared before and after injecting TTX ($*p < 0.05$, paired *t*-test; Pre TTX vs. post TTX).

D. Representative of excitatory propagation corresponding to electrical stimulation to the S2/IOR (5 pulses at 50 Hz) before (upper panels) and after (lower panels) injecting TTX into the cortices. The detailed explanation for D is same as that in A.

E. Temporal profiles of optical signals evoked by the S2/IOR stimulation. Optical signals were recorded at the ROIs in the S1 (left) and the S2/IOR (right) before (black line) and after (red line in the S1 and orange line in the S2/IOR) injecting TTX. The position of ROIs is shown in image D (the top left upper panel). Electrical stimulation was applied at the time indicated by arrows.

F. Comparison of the peak amplitude of the optical signals ($\Delta F/F$) to the S2/IOR stimulation. Optical signals were recorded in the S1 (closed circles) and the S2 (open circles) before and after injecting TTX into the cortices. The optical signal evoked by S2/IOR stimulation after TTX-injection was significantly smaller than that before TTX-injection in the S1 ($*p < 0.05$, paired *t*-test).

Figure 5.

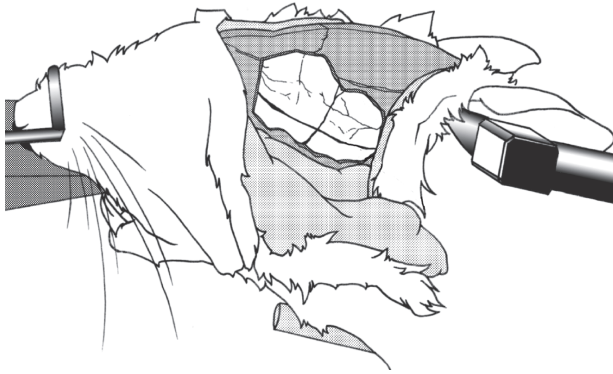
Spatial distribution of fluorogold (FG)-positive cells in the S1 and S2/IOR. FG, the retrograde tracer, was injected into the S1 region, and labelled cells were observed at the somatosensory and insular cortical region including S1 and S2/IOR using a fluorescent microscopy.

A. A fluorescent image of a parasagittal section of rat cortex at 7 days after injecting FG into the S1. S1 and S2/IOR are shown by boxed areas. MCA are indicated by dotted circles.

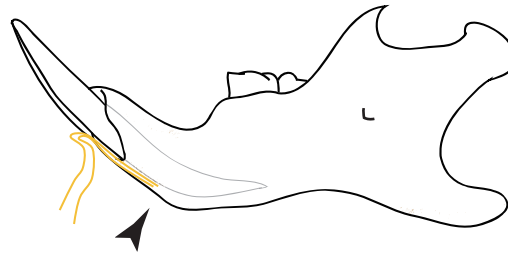
B. A magnified microphotograph of the boxed area seen in S2/IOR of image A. Yellow arrowheads denote FG-positive cell. Bars in images of A and B indicate 500 μ m.

Figure 1

A Rat position



B PDL stimulation



C S1 or S2/IOR stimulation

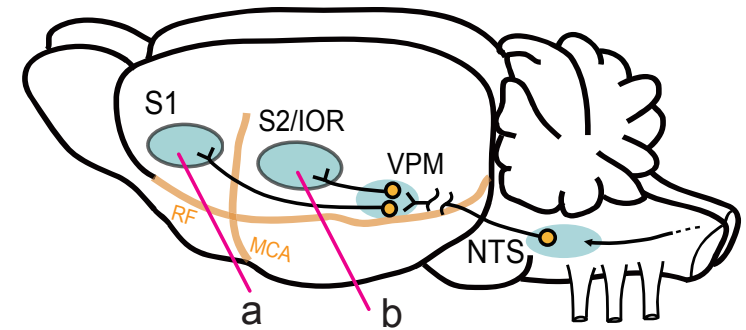


Figure 1

D Excitatory propagation evoked by PDL stimulation

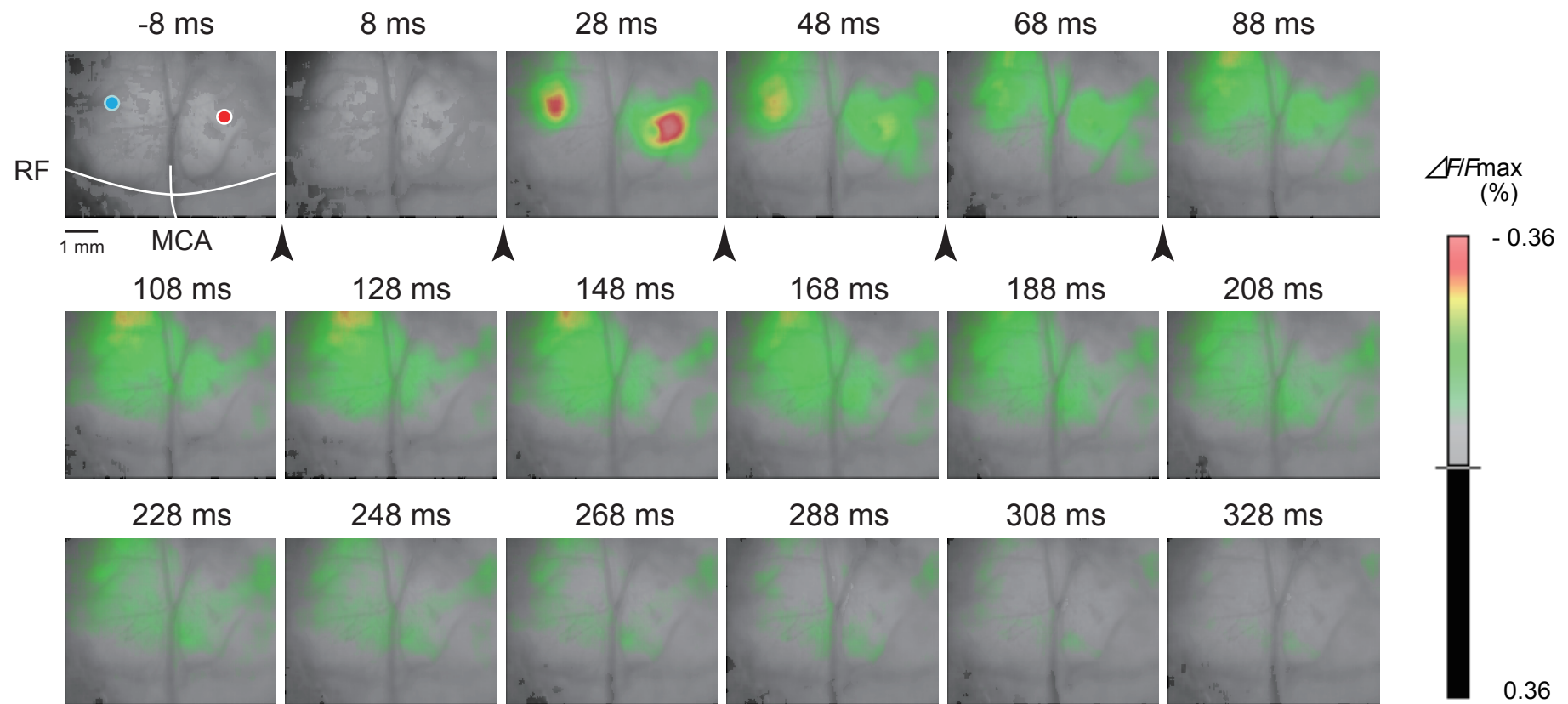


Figure 1

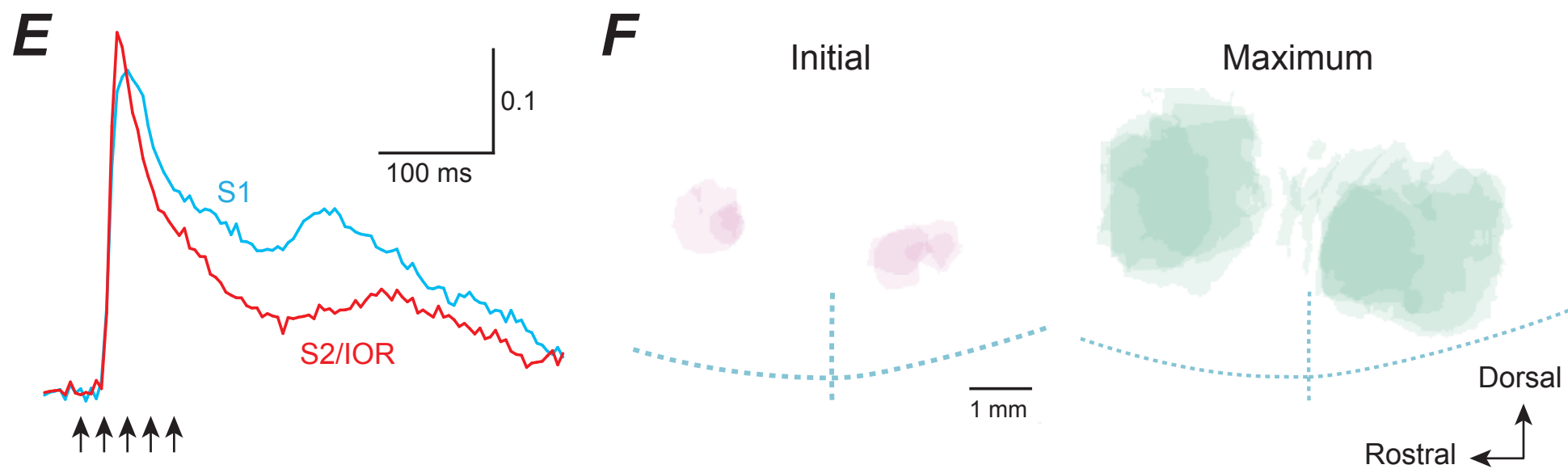


Figure 2

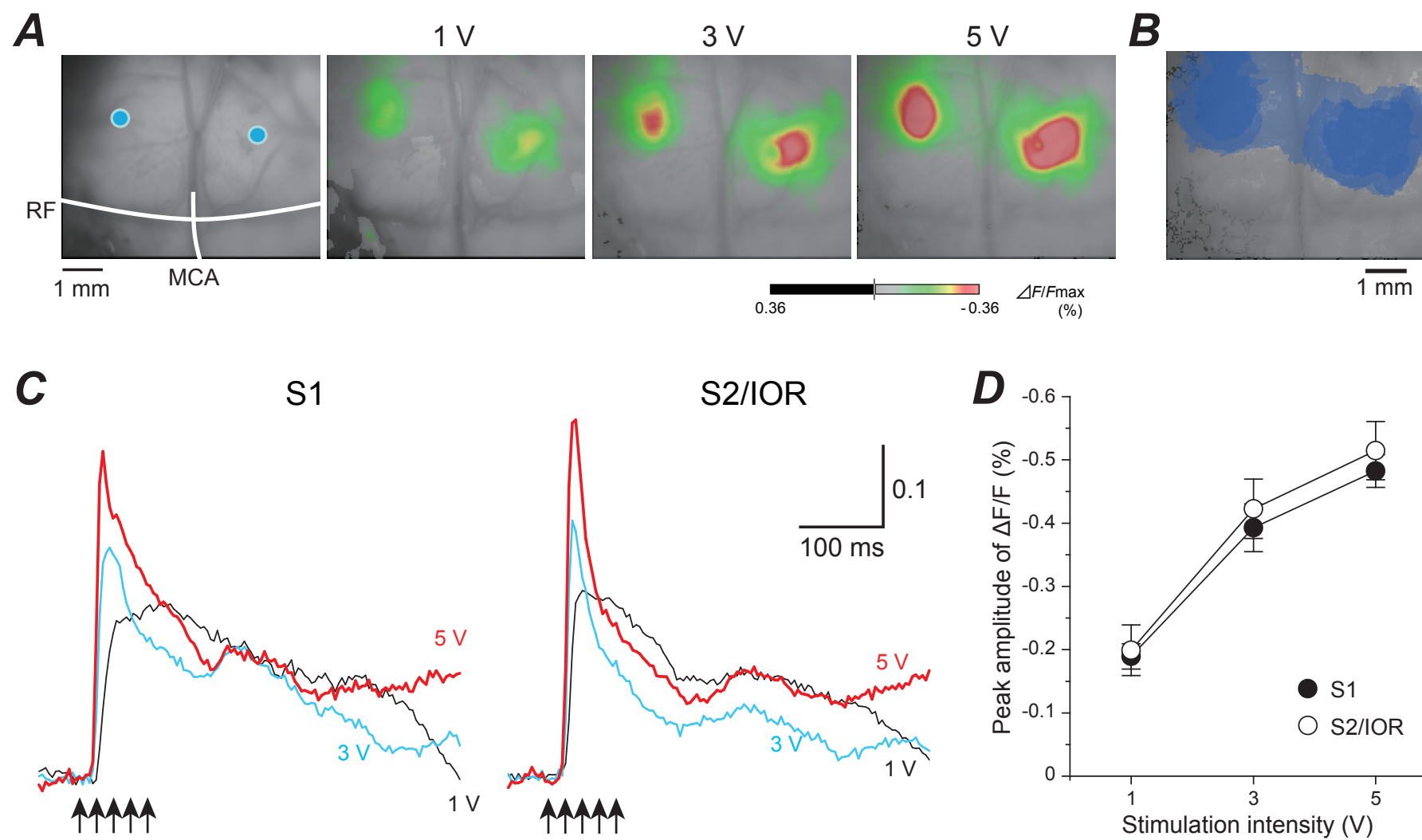


Figure 3

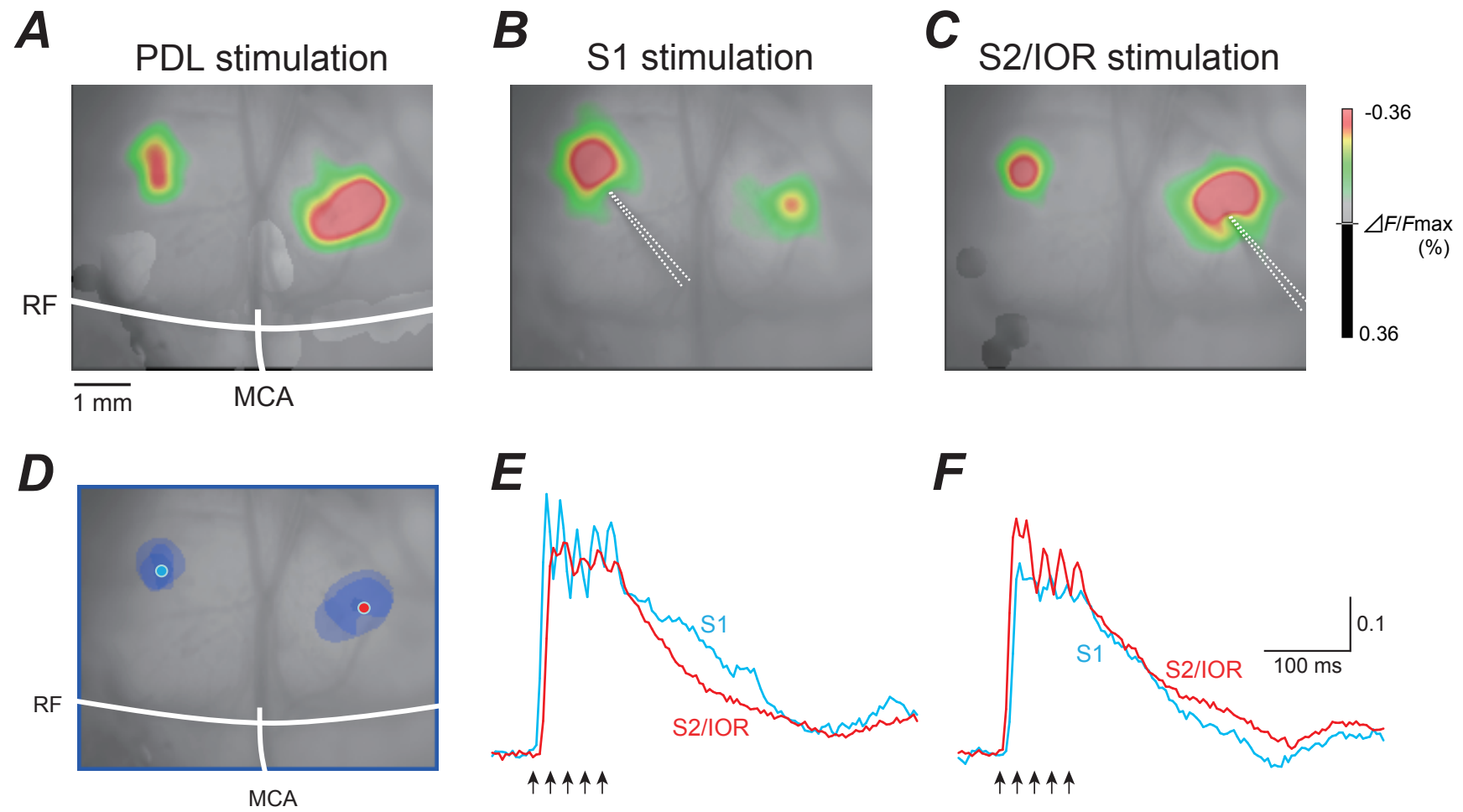


Figure 4

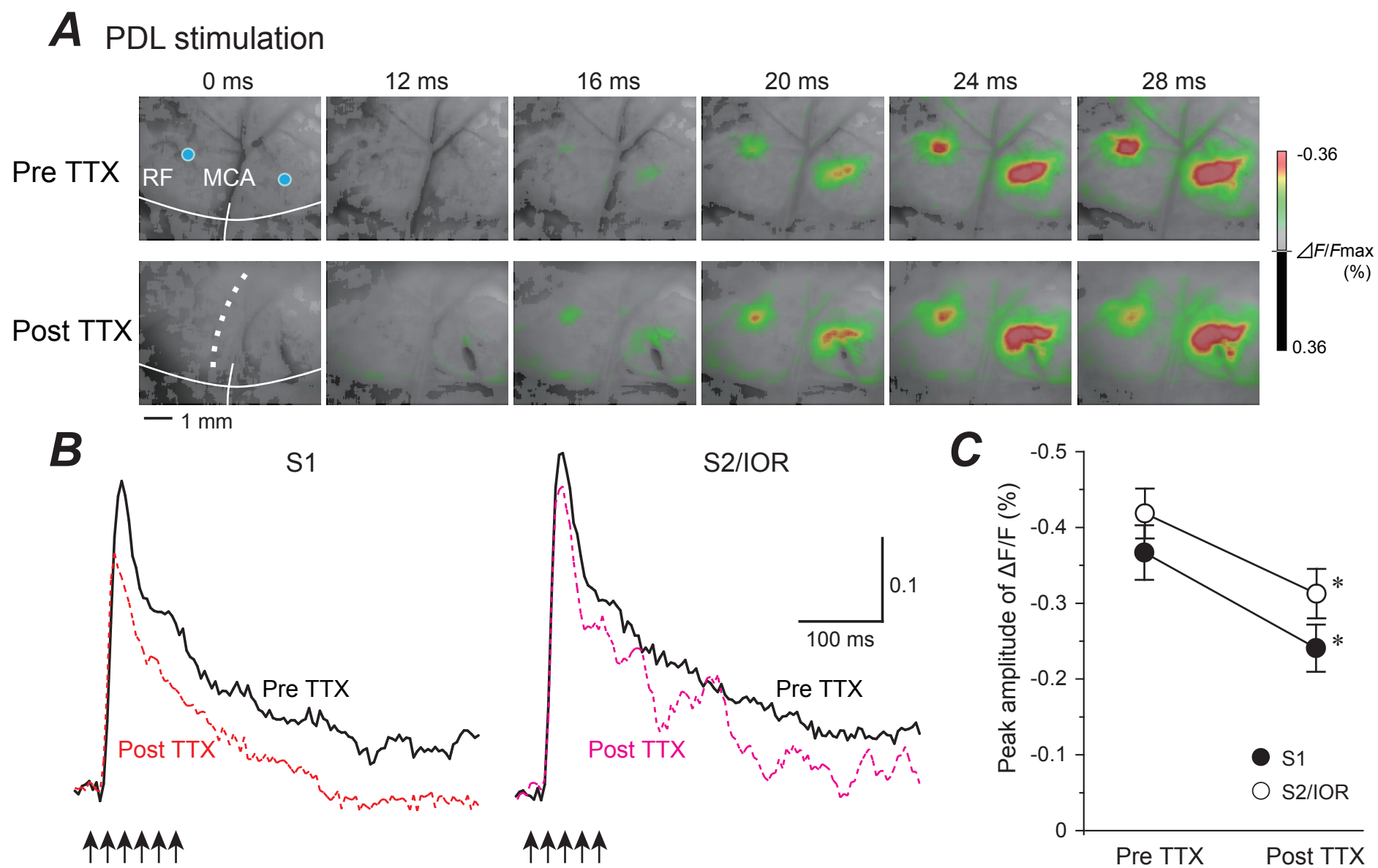


Figure 4

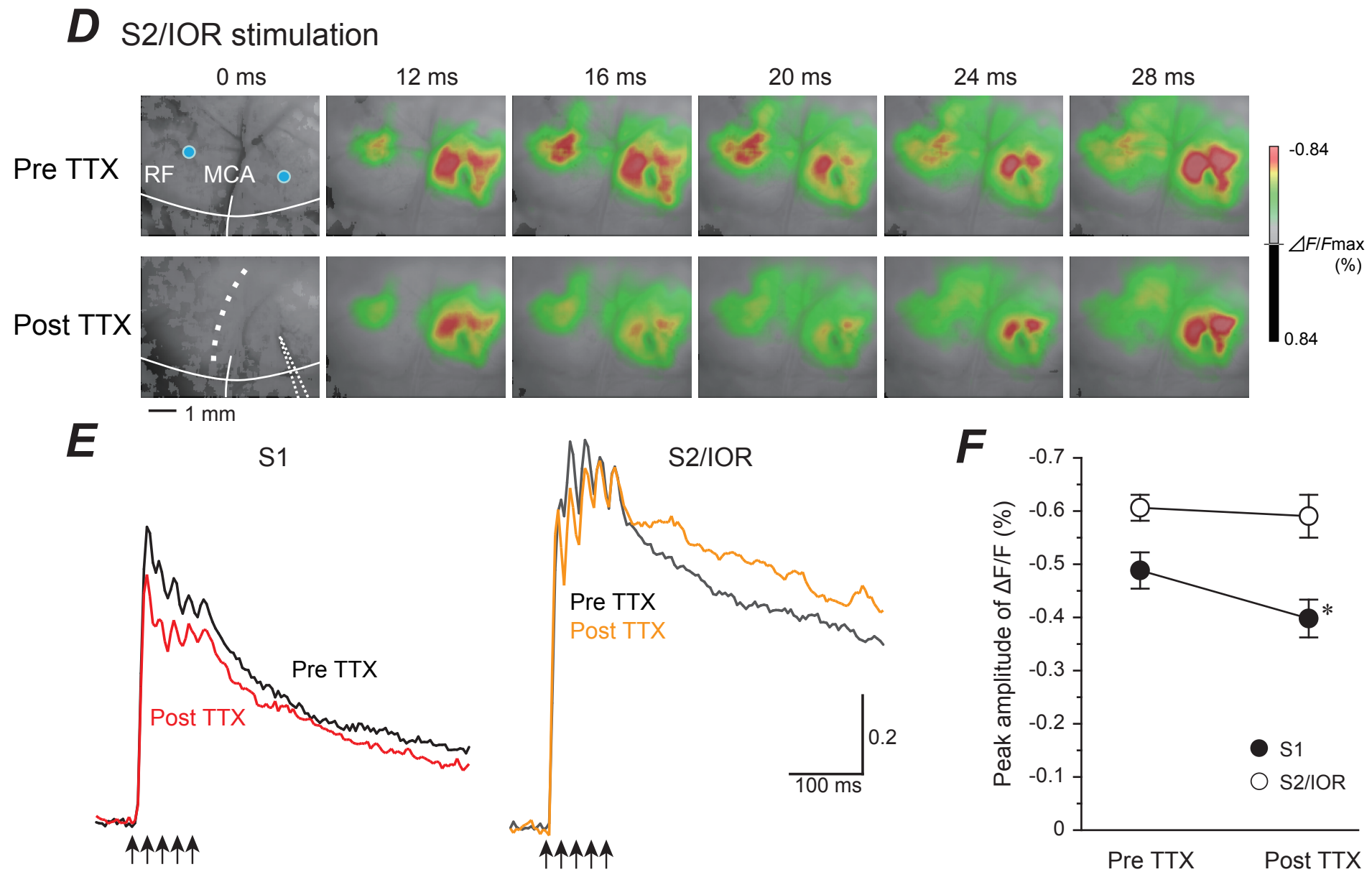


Figure 5

