

と呼ばれ、脳幹に存在している可能性が考えられている。図1-27に示したように、片頭痛発作発生器が活性化されると spreading depression や脳血管収縮が生じ前兆を呈し、その後三叉神経血管系の異常な活性化や脳主幹動脈および脳硬膜動脈の血管拡張や神経原性炎症など、神経説、三叉神経血管説および血管説で唱えられた病態により頭痛を生じると考えられている。なお、spreading depressionについては、これ自身が三叉神経血管系を活性化する場合(図1-27 A)と、三叉神経血管系などに影響せず平行に進行するのみ(図1-27 B)との考え方があり結論は出ていない。

緊張型頭痛の病態生理

緊張型頭痛の病巣の1つに頭頸部筋群があげられている。頭頸部筋群に疲労や過剰な運動負荷がかかると運動神経末端からアセチルコリンが過剰に分泌され、その結果多量の Ca^{2+} 放出が起こり、筋肉は持続的に収縮した状態となる。このため筋肉のエネルギー必要量は増大するが、血管は筋収縮により圧迫され十分な血流を得られず、エネルギー供給は低下する。このようなエネルギー不足を修復するため周囲の肥満細胞やSchwann細胞などから炎症性物質が放出され、感覚神経終末や自律神経終末を刺激し、痛みが誘発される刺激点である trigger point が形成されると考えられている。このような trigger point を有する病態は筋膜痛症候群と呼ばれ、緊張型頭痛の病因

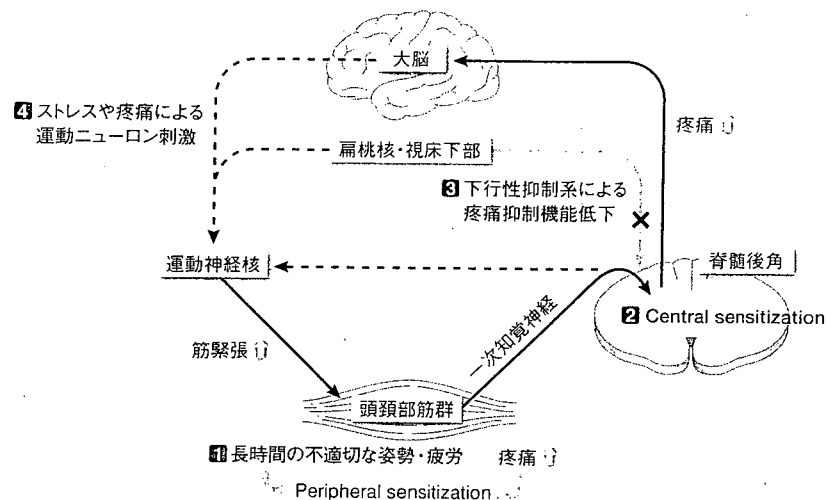


図1-28 緊張型頭痛の病態生理

(清水利彦・鈴木明宏: 緊張型頭痛の診断と治療. *Brain Medical* 17: 21-32, 2005. 一部改変)

の1つと考えられている。

このような頭頸部筋群の状態に加え中枢神経の関与が示唆されている緊張型頭痛は、以下のような病態で説明されることがある(図1-28)。

①長期間の不適切な姿勢などは頭頸部筋群の緊張を高め、疼痛を生じ、疼痛物質の放出を誘発して一次知覚神経終末を興奮させる。疼痛物質の連続的感作により peripheral sensitization が生じ、弱い刺激でも疼痛を感じるようになる。

②脊髄後角への入力の変延は central sensitization を起こし、脊髄後角の二次ニューロンを興奮させる。

③緊張型頭痛患者では下行性疼痛抑制系の機能が低下し、疼痛が緩和されない。

④ストレスや疼痛は運動神経核を刺激して筋肉の緊張を増し、緊張型頭痛を増悪させる。

群発頭痛の病態生理

群発頭痛の疼痛部位は三叉神経第1枝領域が中心である。また、発作時 Horner 徴候を伴う症例も多く交感神経障害が存在することより、内頸動脈分岐部より遠位から海綿静脈洞付近にかけての病変が想定される。さらに、発作中にみられる流涙や鼻汁分泌などは、中間神経から翼口蓋神経節を経て分布する大[浅]錐体神経の副交感神経線維の亢進症状と考えられる。翼口蓋神経節の破壊や薬物によるブロックを行うと、副交感神経亢進症状の抑制だけでなく、疼痛も軽減されることから、翼口蓋神経節に分布している三叉神経線維も群発頭痛に関与していると考えられている。これら三叉神経血管系や副交感神経系の活性化により血管周囲に炎症を起こし、三叉神経第1枝や交感神経にも影響を及ぼし、特有の症状を形成するものと推察される。

このような末梢性の障害と考えられる症状は、群発頭痛において時間的周期性をもって出現することが多いため視床下部の関与が推測されている。視床下部は松果体におけるメラトニン産生を調節しているが、群発頭痛患者では血中メラトニン濃度の日内変動に異常が報告されている。

以上のように、群発頭痛では視床下部からの時間的な調節を受け、三叉神経血管系や副交感神経系の活性化が引き起こされた結果、頭痛が発生すると考えられる。

Annual Review 神經 2007

2007年1月25日發行

中外医学社

□ XIV. 自律神経疾患

2. 脳血管の自律支配神経

慶應義塾大学神経内科専任講師 清水利彦
同 教授 鈴木則宏

key words nerve fibers innervating cerebral blood vessels, sympathetic nerve, parasympathetic nerve, sensory nerve, regulation of cerebral blood flow

要 旨

脳血管の外膜には、交感神経、副交感神経、感覚神経線維が存在し血管反応性の調節に関与している。これらの神経線維は、脳自身に起源を発する intrinsic innervation と脳の外の神経節に最終的な起源を有する extrinsic innervation に大別される。Intrinsic innervation に関しては、前脳基底核などの脳内神経核が脳実質内血管を直接支配するだけでなく近接する神経細胞やアストロサイトが脳内神経核からの線維連絡を受け血管反応性に関与しているとの知見が最近報告されている。Extrinsic innervation では脳血管支配神経に関連する神経節に新しい神経伝達物質や受容体の存在が認められ、これらの脳血管に対する反応性が報告されている。また交感神経、副交感神経および感覚神経が相互に影響し血管反応性を調節している可能性も指摘されてきている。このように以前は脳血管を支配する自律神経線維がそれぞれ独立して血管反応性を調節していると考えられていたが、最近では脳血管支配に関係する自律神経線維、脳実質内神経細胞やアストロサイトなどが相互に影響をおよぼしながら血管反応性を調節しているのではないかと考えられている。

動 向

自律神経には、交感神経、副交感神経および内臓性求心性線維の3つの神経系が存在する。交感神経および副交感神経は遠心路として作用し、古典的な神経伝達物質としてそれぞれ norepinephrine (NE) および acetylcholine (ACh) を含有している。内臓性求心性線維は内臓からの情報を中枢に伝える経路であり substance P (SP) などの神経ペプチドが伝達物質である。

脳血管の外膜に神経線維が存在することは1600年台後半に Thomas Willis により確認され、免疫組織染色により、NE や neuropeptide Y (NPY) を含有する交感神経、ACh, vasoactive intestinal peptide (VIP) および nitric oxide synthase (NOS) を有する副交感神経が存在することが明らかにされている。同時に SP や calcitonin gene-related peptide (CGRP) および neurokinin A などを神経伝達物質とし三叉神経を主な起源とする神経線維が存在している。本稿ではこれら感覚神経線維もあわせて解説していくこととする¹⁻⁴⁾。

脳血管支配神経は、脳自身に起源を発する intrinsic innervation と脳の外の神経節に最終的な起源を有する extrinsic innervation に大別され

る^{1,2)}。それぞれの神経系の起源と神経伝達物質は、順行性神経軸索トレーサー、逆行性神経軸索トレーサーおよび免疫組織化学の組み合わせにより明らかにされてきている (図1)。

Intrinsic innervationに関しては、前脳基底核、

縫線核、青斑核などが脳実質内血管周囲の支配神経の起源とされ、これらの神経核の脳血管に対する反応性についての研究が行われてきた。最近では、脳実質内血管に近接する神経細胞やアストロサイトが脳内神経核からの線維連絡を受け血管反

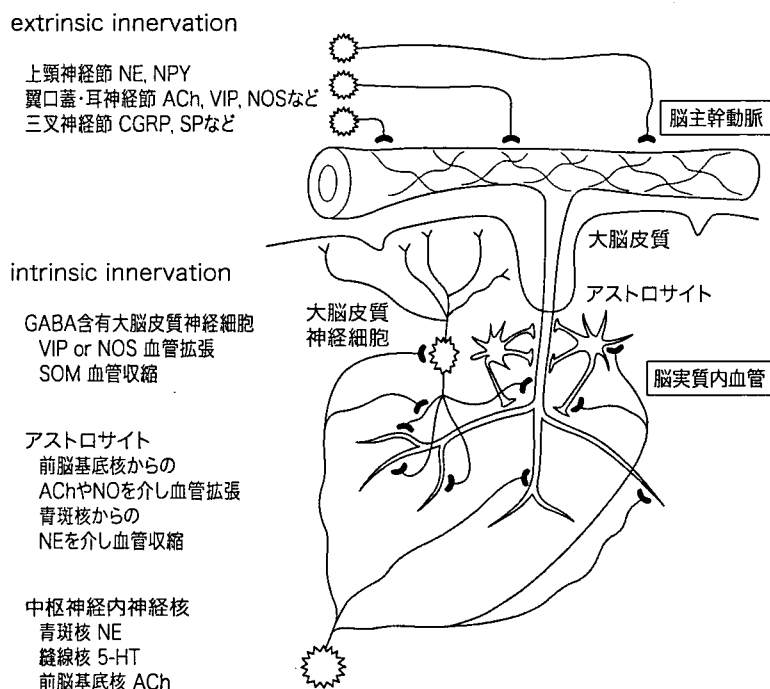


図1 extrinsic innervationとintrinsic innervationによる脳血管調節機構 (文献4を一部改変)

脳血管のうち脳主幹動脈などの脳軟膜動脈は脳の外の神経節に最終的な起源を有しており、extrinsic innervationとよばれている。Extrinsic innervationにおいて交感神経線維は、上頸神経節を起源としNE、NYPを含有する。副交感神経線維は翼口蓋神経節、耳神経節のほか内頸動脈神経節、海綿静脈洞神経節を起源とし、ACh、VIP、NOSなどを神経伝達物質としている。感覚神経は、三叉神経節のほか内頸動脈神経節、後根神経節を起源としてSP、CGRPを含む。

これに対し、脳自身に起源を発する脳血管支配神経のシステムはintrinsic innervationとよばれ前脳基底核、青斑核、縫線核などの脳内神経核からのそれぞれACh、NEおよび5-HTを神経伝達物質とする神経線維を脳実質内血管に送っている。

さらにこれらの神経核からvaricositiesを有する遠心性線維が脳実質内血管周囲に存在している局所の神経細胞および脳実質内血管を取り巻くアストロサイトに近接していることが最近明らかにされている。

脳実質内血管に接するニューロンでGABAを含有している神経細胞の一部は血管の拡張または収縮を誘発し、さらにVIPまたはNOSと共存する神経細胞は血管拡張作用を示し、SOMと共存する神経細胞は脳血管収縮作用を有するとされている。

アストロサイトは、前脳基底核からAChとNOを含む神経線維の影響により脳実質内血管を拡張させ、青斑核からのNE作動神経により収縮させる。

ACh: acetylcholine, CGRP: calcitonin gene-related peptide, NE: norepinephrine, NO: nitric oxide synthase, NPY: neuropeptide Y, SOM: somatostatin, SP: substance P, VIP: vasoactive intestinal peptide, 5-HT: 5-hydroxytryptamine

応性の調節に関与しているとの実験結果が累積されつつある。この他に脳実質内血管周囲の神経細胞やアストロサイトが血管反応調節に関与することが明らかにされてきている⁴⁾。

Extrinsic innervationに関連する神経節では新しい神経伝達物質や受容体の存在が免疫組織染色や*in situ* hybridizationで認められ、それらの脳血管に対する反応性が報告されている⁵⁾。また交感神経、副交感神経および感覚神経が独立して血管反応性を調節しているのではなくこれらの神経系が相互に関連している可能性を示すデータも散見される⁶⁾。その他脳血管支配神経の発育過程や疾患での変性過程などについての知見もあり、これらについて概説する⁴⁾。

A. Intrinsic innervation (脳内からの血管支配) について

脳実質内動脈は前脳基底核 (nucleus basalis)、青斑核 (locus coeruleus)、縫線核 (raphe nucleus) などの脳内神経核からのそれぞれACh, NEおよび5-HT (5-hydroxytryptamine, serotonin) を神経伝達物質とする神経線維による支配を受けている (図1)⁴⁾。さらにこれらの神経核から varicosities を有する遠心性線維が脳実質内血管周囲に存在している局所の神経細胞および脳実質内血管を取り巻くアストロサイトに近接していることが最近明らかにされてから、脳内神経核、局所の神経細胞およびアストロサイトによる構成体は“neurovascular unit”とよばれ脳実質内血管の神経性調節に関与していると考えられるようになった (図1)⁷⁾。また血管内皮細胞、血管平滑筋細胞およびアストロサイトにもこれら神経伝達物質の受容体が存在することはこれらの考えを示唆している⁴⁾。

1. 脳内神経核とアストロサイトの役割

前脳基底核から脳実質内血管へ投射している神経線維はAChとNOを含有し、同部位の刺激は大脳皮質の脳血流量を増加させ、ACh受容体阻害剤またはNOS活性の抑制によりこの血流増加が減弱することが知られている。また最近その構造が同定されたACh受容体の一つである muscarinic M5受容体が脳血管に存在し脳血管拡張に関与することが明らかにされた⁸⁾。さらに他の多くの muscarinic ACh受容体がアストロサイトに存在することから血管作動性物質の放出を通じてアストロサイトが脳血流調節に関与している可能性も考えられている⁹⁾。

5-HTを含有している縫線核の電気刺激では、脳幹の刺激部位により大脳皮質の脳血流量は増加もしくは低下することが知られている。アストロサイトでは5-HT受容体のサブタイプが数種類存在することが報告されているが、脳実質内血管への影響はまだ明らかにされていない⁴⁾。

これに対し、青斑核では脳血流調節に対するアストロサイトの役割がより明確にされてきている。青斑核のNE作動神経を電気刺激すると大脳皮質脳血流量が減少することはよく知られている。さらに青斑核から脳実質内血管周囲に到達する神経線維は脳実質内血管よりアストロサイトが主なターゲットであることが明らかにされている。このことは海馬の脳スライスにNEを投与するとアストロサイト細胞体と脳実質内血管周囲に近接しているアストロサイト突起内の細胞内Ca²⁺の濃度が増加し、さらにアストロサイトの突起に隣接する脳実質内血管に収縮が生じることからも明らかとされている¹⁰⁾。

このようにアストロサイト細胞内Ca²⁺濃度の上昇は、脳血管収縮に関与するとの報告がある一方で、電気刺激で神経細胞の活動性を上昇させた後やシナプスから放出された glutamate によりアストロサイト内の細胞内Ca²⁺濃度が上昇すると

脳実質内血管が拡張するとの報告もある^{11,12)}。このようなアストロサイト細胞内Ca²⁺濃度上昇による脳血管反応性に対する矛盾したデータは、実験系の違いによるとする意見もあるが結論は得られていない⁴⁾。

2. 脳実質内血管周囲に存在するニューロンの役割

大脳と小脳皮質の血管周囲に存在する神経細胞は脳血管反応性の調節に関与している可能性が示唆されていた。この血管周囲に存在する神経細胞は、前述したような前脳基底核や縫線核からの神経線維入力をうけ、脳血管との間を取りもつことから局所介在ニューロン (local interneuron) とよばれることもある。脳スライス標本中の脳実質内血管周囲に存在する神経細胞を脱分極させ血管反応性の変化を検討すると脳実質内血管に接するGABA含有ニューロンの一部は血管の拡張または収縮を誘発することが明らかにされている¹³⁾。これらGABA含有ニューロンについて、そのsubpopulationは明らかにされていないが、VIPまたはNOSと共存する神経細胞は血管拡張作用を示し、somatostatin (SOM) と共存する神経細胞は脳血管収縮作用を有するとされている。

このNOS/NPYまたはSOMと共存するGABA含有ニューロンの70%が前脳基底核からのACH含有神経線維と連絡している。また30~40%のニューロンは縫線核からの5-HT含有神経線維と連絡があることから、脳実質内血管周囲に存在する神経細胞は独自に血流調節を行っているのではなく、前脳基底核などの脳内神経核からもコントロールを受けることで脳血流を調整しているのではないかと考えられている。

大脳皮質の脳実質内血管周囲に存在するニューロンと同様のはたらきを示す細胞として小脳ではじめにPurkinje細胞が脳血流増加に関連すると考えられていたが¹⁴⁾、その後星状細胞 (stellate

cell) がその役割を有していることが明らかにされた¹⁵⁾。さらに小脳スライスを用いた検討では星状細胞を興奮させると脳内および軟膜血管を拡張させるのに十分なNOを放出させることも示されている⁴⁾。

以上のようにintrinsic innervationについては、脳内の神経核の他に、アストロサイトおよび脳実質内血管周囲に存在するニューロンが関与する可能性が示されてきている。しかし、一部の脳実質内血管周囲の神経細胞やアストロサイトを介した局所の変化が上流に存在する抵抗血管に伝達される機序や頭蓋内圧を一定に保つ機構はまだ明らかにされておらず、これらの機序の検討は今後の課題の一つと考えられる。

B. Extrinsic innervation (神経節からの血管支配) について

脳血管に対して収縮作用を示す交感神経線維は、extrinsic innervationにおいて上頸神経節を起源とし内頸動脈にそって上行し内頸動脈神経となり頭蓋内に入り脳血管に分布する。

副交感神経線維は翼口蓋神経節、耳神経節、内頸動脈神経節を主な起源としている (図2)。翼口蓋神経節は、ラットでは翼突神経の先端に位置し、翼口蓋神経節から篩骨孔の間にある膜様の構造物を通り、篩骨孔より頭蓋内に入り、脳血管に分布する。耳神経節からの線維は小浅錐体神経、大浅錐体神経、大深錐体神経を経て、内頸動脈神経とともに上行し、脳血管に分布する。内頸動脈神経節は大浅錐体神経が側頭骨内で内頸動脈の外側に接して通過し、上頸神経節の頭蓋内枝である交感神経の内頸動脈神経と合流して翼突管神経となる部位に位置する小神経節である。この神経節からの節後線維は、大深錐体神経を経て耳神経節からの線維とともに脳血管に至る。内頸動脈神経節には、副交感神経系の神経伝達物質を含む神経

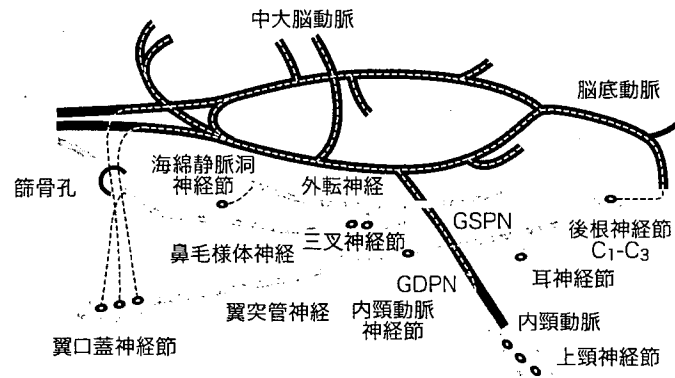


図2 extrinsic innervationにおけるラット脳血管支配神経の起源と経路^{1,3)}

交感神経は上頸神経節から内頸動脈にそって頭蓋内に到達する。副交感神経線維は翼口蓋神経節から篩骨孔との間にある膜様の構造物を通り、頭蓋内に入り脳血管に分布する。耳神経節からは、大浅錐体神経 (GSPN)、大深錐体神経 (GDPN) を経て、上頸神経節からの神経とともに内頸動脈にそって上行し、脳血管に分布する。内頸動脈神経節からは、大深錐体神経 (GDPN) を経て耳神経節からの線維とともに脳血管に至る。また海綿静脈洞神経節からの副交感神経線維は外転神経から内頸動脈に至り脳血管に分布することが最近明らかにされた。感覚神経系は、三叉神経節、内頸動脈神経節および後根神経節を起源とする。三叉神経節からの線維の分枝である鼻毛様体神経を経て翼口蓋神経節からの神経線維とともに篩骨孔を経て頭蓋内に入り脳血管に分布する。

細胞の他に、感覚系の神経細胞も存在している^{1,16,17)}。

ヒト脳血管の副交感神経線維は翼口蓋神経節、内頸動脈神経節の他に海綿静脈洞神経節を主な起源としている¹⁸⁾。内頸動脈神経節から脳血管に至る経路はヒトにおいてほぼラットと同様であるが、翼口蓋神経節からの線維は、ヒトでは、海綿静脈洞内から内頸動脈に到達し脳血管に分布する。海綿静脈洞神経節は、海綿静脈洞内の外転神経と内頸動脈の間に存在しVIPおよびAChを含有している。節後線維は直接内頸動脈へ分布する群と外転神経を尾側に進み脳底動脈に到達する群にわかれている (図3)。

このようにヒトでは脳血管支配に海綿静脈洞神経節が関与をするが、ラットでも海綿静脈洞内の神経節が脳血管を支配する副交感神経の起源の一つであることが最近明らかにされた。中大脳動脈に逆行性の神経軸索トレーサーを application すると同側の海綿静脈洞の神経節、海綿静脈洞の神

経叢および外転神経に集積が認められたことより、これらの神経節からの副交感神経線維は外転神経から内頸動脈に至り脳血管に分布すると考えられている¹⁹⁾。

感覚神経は、三叉神経節、内頸動脈神経節および後根神経節を起源としている。ラットでは、三叉神経の枝である鼻毛様体神経を経て翼口蓋神経節からの神経線維とともに篩骨孔を経て頭蓋内に入り脳血管に分布する^{1,20)}。鼻毛様体神経の電気刺激は脳血流量を増加させることが動物実験で明らかにされている²¹⁾。

脳血管支配神経はこれまで述べてきたように古典的な神経伝達物質や神経ペプチドを伝達物質として含有しているが、最近、脳血管において新しい血管作動性物質や受容体を含有する神経線維の存在が確認されている。

Ca²⁺結合タンパクの一つでEF-hand familyに属するcalbindin D-28kの存在がラット脳血管と三叉神経節および後根神経節など神経節に認めら

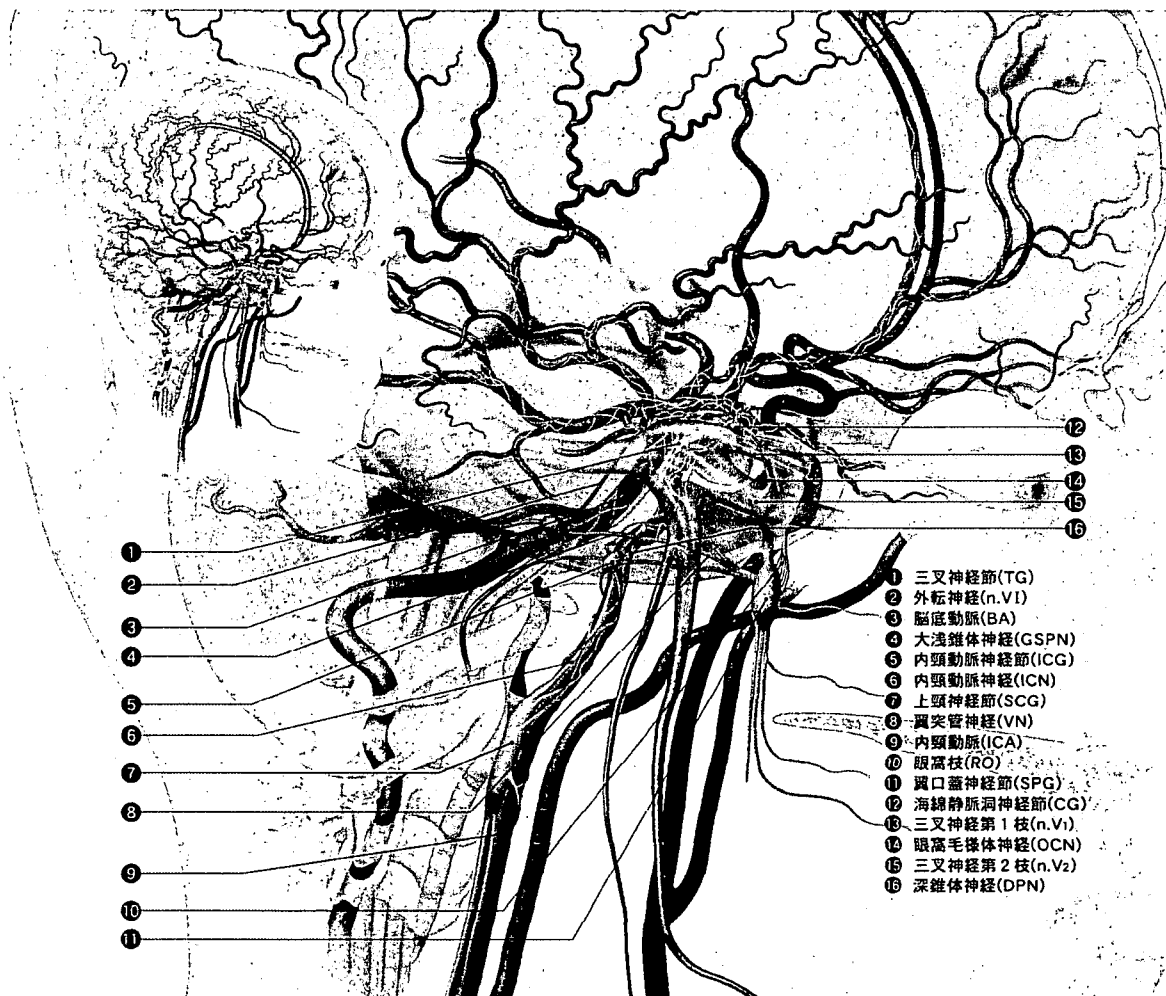


図3 extrinsic innervationにおけるヒト脳血管支配神経の起源と経路 (文献18より転載, イラスト作成・矢田 明氏)

交感神経は上頸神経節(⑦)から内頸動脈にそって頭蓋内に到達する(黄緑色)。
 感覚神経(緑色)の中で三叉神経第1枝である眼神経領域(⑬)からの線維は海綿静脈洞内で直接内頸動脈に分布する群と、外転神経(②)を尾側にすみ脳底動脈に分布する群にわかれる。
 サルでは三叉神経第2枝の上頸神経(⑮)を発した線維が上頸神経とともに翼口蓋窩に至り、眼窩毛様体神経(⑭)として分枝し反転するように海綿静脈洞に入り内頸動脈に至る経路が明らかにされているがヒトにおいてはまだ明らかではない¹⁾。
 内頸動脈神経節(⑤)からの神経線維は、深錐体神経(⑯)を通り内頸動脈に達し、内頸動脈神経とともに頭蓋内を上行し脳血管に分布する。
 副交感神経線維(オレンジ色)の中で翼口蓋神経節(⑪)からの線維は、その眼窩枝(⑩)から眼窩毛様体神経(⑭)を感覚神経とともに尾側に向い、海綿静脈洞内で内頸動脈に到達し、その後血管壁にそって上行し脳血管に分布する。
 内頸動脈神経節(⑤)からの神経線維も、感覚神経とともに深錐体神経(⑯)を通り内頸動脈に達し、内頸動脈神経とともに頭蓋内を上行し脳血管に分布する。
 海綿静脈洞神経節(⑫)は、海綿静脈洞内の外転神経(②)と内頸動脈の間に存在し節後線維は直接内頸動脈へ分布する群と外転神経を尾側に進み脳底動脈に到達する群にわかれる。

れる。その機能については明らかでないが細胞内 Ca^{2+} 濃度の緩衝作用を有すると考えられている²²⁾。

また tachykinin peptide family に属し SP に高い親和性をもつ NK_1 受容体も脳血管、上頸神経節、翼口蓋神経節、耳神経節、内頸動脈神経節および三叉神経節に分布していることが明らかにされている。さらに NK_1 受容体抗体陽性の神経線維は副交感神経系の神経線維である VIP と共存しており、このことは脳血管において SP が神経伝達物質として作用するのみでなく神経調節因子としても働く可能性を示している^{23,24)}。

PACAP (下垂体性アデニレートサイクラーゼ活性ペプチド) は視床下部から放出され、下垂体でアデニレートサイクラーゼ活性を上昇させる神経ペプチドで N 末端アミノ酸残基の 68% が VIP の N 末端アミノ酸残基と同様な構造を示し、脳血管に対して用量依存性に血管拡張および血流増加作用をもつことが報告されている。PACAP は、脳血管、翼口蓋神経節および耳神経節での分布が報告され NOS および VIP と共存している²⁵⁾。

Endothelin-1 (ET-1) を含有する神経線維はラット脳底動脈で認められていたがヒト中大脳動脈周囲の神経線維でもその存在が報告されている。また感覚神経と交感神経の denervation による研究から脳血管周囲の ET-1 含有神経線維は三叉神経からの感覚神経と共存している可能性が考えられている。薬理的には ET-1 が感覚神経の調節因子であり、また ET-1 が節後交感神経の神経細胞で合成分泌されることが示されている²⁶⁾。

これらの他最近、セロトニン受容体の一つである $5HT_{1B}$ 受容体、ATP 受容体である P_2X_3 受容体陽性の神経が認められ、これらは感覚神経系の脳血管支配神経との共存が確認されている⁵⁾。

C. 脳血管周囲の神経叢の構造支配神経と血管の連絡

このような特徴をもっている脳血管支配神経では外膜の表面の一部に perivascular nerve bundle とよばれる太い神経束が観察されている。この神経束はそこから外膜の中を貫通し外膜と中膜の境界まで達する。この外膜深部にある神経叢は“terminal plexus”, “deep plexus” または“intrinsic plexus”などとよばれ、“terminal plexus”と中膜平滑筋層とは 60~500nm 程度の距離で接している³⁾。さらにニューロトランスミッターが放出されると考えられる軸索が数珠状に腫大した varicosity を有していることから局所的に血管反応性を調節している可能性も考えられている。また“terminal plexus”の分布形態から平滑筋層の最外層しか神経支配の影響を受けないのではないかと考えられている³⁾。これは、VIP の受容体の一つで VIP と PACAP の両方に親和性をもつ VPAC1 やアデノシン受容体およびムスカリン受容体が中膜にあり血管外膜の副交感神経と近接していることとも一致する^{27,28)}。

SP および CGRP などを含むしている感覚神経線維の神経終末は guinea-pig やヒトでは血管外膜のみ観察され外膜と中膜の境界近くには発見されないとされているが、外膜と中膜の境界付近で観察されたとする報告もある³⁾。

一方、ヒト大脳皮質において副交感神経線維が小および細動脈では中膜まで、毛細血管では血管内皮細胞まで到達していたとも報告されており²⁹⁾、脳血管支配神経が血管平滑筋や内皮細胞とどのような連絡をもっているのかは今後の詳細な検討が必要である。

D. 脳血管支配神経の発達過程

脳血管支配神経の発達過程については、動物や

ヒトで多くの検討が行われてきた。

マウス脳血管において生後の発達をみた検討では、生後1日でNE含有神経線維の存在が確認されている。これに対しACh含有神経線維は生後1週間を経ってから存在することが報告されている。その後3~4週間で交感および副交感神経はほぼ完全に発育する。また脳血管には血管に対し縦走する神経線維と輪状に走行する神経線維があるが、発育過程では縦走線維の方が早く出現するとされている³⁰⁾。

ラットでは、NEおよびNPYを含有する交感神経線維は内頸動脈付近から成長し生後3日までには内頸動脈全体に広がり、生後5日頃までには後交通枝を通り椎骨動脈からの神経と脳底動脈中間部でオーバーラップすることが観察されている³¹⁾。

一方、AChおよびVIPを含有する副交感神経線維は主に内節骨動脈から発達し、Willis動脈輪前半部を生後1週間までに支配し、生後2週までには脳底動脈遠位部に到達することが明らかにされている³¹⁾。これに対し内頸動脈系からの神経線維の発育は中大脳動脈付近にとどまるのみでNOS含有の副交感神経線維も同様の傾向を示すことが最近報告された³²⁾。またこれらAChとVIPを含有する副交感神経線維は生後21日頃までには成長したラットとほぼ同様の分布密度を示すとされている。

椎骨脳底動脈系における副交感神経線維は交感神経線維の発達と異なり生後30日を過ぎても脳底動脈尾側部であまり多く観察されない。この原因として副交感神経線維は椎骨動脈系からの神経線維と内節骨動脈系から発達する神経線維のオーバーラップが脳底動脈上で生じないためではないかと考えられている。

さらにVIPとNOS神経の成長をラットで比較した検討では、椎骨脳底動脈ではNOS含有神経線維はVIP含有神経線維より遅れて出現するがその後の神経線維の分布範囲および分布密度はVIP

含有神経線維とNOS含有神経線維で差を認めないことから両神経線維とも同一の起源より発達していくものではないかと推測されている³³⁾。

脳血管を支配する神経線維は様々な動物でその存在が報告されている³⁾。大部分の動物において脳動脈前半部の神経支配が椎骨脳底動脈系と比較し密となっている。その中でこうもりおよびニワトリは椎骨脳底動脈系に存在する神経線維の密度が脳動脈前半部の神経線維の密度に比較し高いと報告されている³⁴⁾。こうもりでは椎骨脳底動脈系が内頸動脈系に比較し著しく発達しているためとされているが、それ以外のほとんどの動物で脳動脈前半部の神経支配が椎骨脳底動脈系に比べ密となっている理由については明らかにされていない。最近、脳血管の中で椎骨脳底動脈は中胚葉から発生するが、脳動脈前半部は神経系の起源である神経堤細胞に由来することが報告されており、脳血管支配神経線維の分布密度の部位による違いを説明する可能性の一つとして注目されている³⁵⁾。

なおヒト脳底動脈では胎生12週で血管に対し縦走するNEとACh含有神経線維の出現が報告されている。その後、血管に対し輪状に走行する神経線維が徐々に増加し、20週までに完了する。NPYおよびVIP含有神経線維は胎生16週までに脳底動脈に対し縦走する神経線維がはじめに観察され、その後血管に対し輪状に走行する神経線維が徐々に増加し、24週までに発達が完了するとされている³⁶⁾。

E. 脳血管支配神経の年齢および疾患による変化

このような経過で発達する脳血管支配神経であるが、年齢や疾患によりその分布範囲や密度が変化していく。

ACh含有脳血管支配神経の分布密度について加齢による変化をラットで観察すると成人に当た

る生後15カ月のラットおよび老年に当たる生後22カ月のラットは若年に相当する生後6カ月のラットと比べると明らかに神経線維の密度が低下していることから、加齢によりACh含神経線維の密度は減少すると考えられている³⁷⁾。

一方、Alzheimer病の患者では健常者と比較し前大脳動脈領域の脳血管支配神経密度が低下しており、加齢による脳血管支配神経密度低下の分布と異なることから、疾患によっても脳血管支配神経の密度が変化すると考えられるようになった³⁸⁾。

さらに嗅覚を消失させたラットでの脳血管支配神経をprotein gene product (PGP) 9.5. で染色し神経線維の密度を測定すると嗅覚消失群では前大脳動脈の密度の有意な減少が観察されている。このことから神経細胞の代謝が変化するとそれに関連した領域の血流の減少がおき、血流調節に関与する脳血管支配神経も変化する可能性が示されている³⁹⁾。

このような加齢や神経疾患の他に、高血圧の脳血管支配神経に及ぼす影響についてもspontaneously hypertensive rat (SHR) を用い脳血管支配神経の神経線維密度の変化が検討されている。この検討からは血管収縮性に働く交感神経線維であるNEおよびNPY含有神経線維はコントロールと比較しSHRで密度が高くなるが、ACh, VIP, SPなど血管拡張性に働く神経線維では密度に差を認めなかったことから、SHRでは血管収縮作用をもつ神経線維密度が上昇することで血液脳関門の破綻を妨げ高血圧脳症への進展を抑制しているのではないかと考えられている⁴⁰⁾。

糖尿病において脳血管支配神経が減少することは以前から報告されているが⁴¹⁾、最近では脳血管でのNOS含有神経線維と関連する神経細胞の変化が検討された。これによると軽度の糖尿病ではNOS含有神経線維が減少するがインスリン治療により回復する。しかし、糖尿病が重症化する

と神経節のNOS含有神経細胞の消失が不可逆的におこり、同時に脳血管平滑筋の不可逆性肥厚が生じるとされ、脳血管支配神経の面からも糖尿病の早期治療が推進されている⁴²⁾。

なお、脳血管支配神経の再生については上頸神経節のdenervationによる再生過程を観察した研究が報告されている。神経線維の再生はdenervationの4~6週後に近位の内頸動脈から始まるが、再生された神経線維は蛍光染色では弱い信号強度を示し、varicosityに乏しいとされている。再生は9~12カ月後で終了するが、正常の約半分程度にまでしか再生されない⁴³⁾。

F. 脳血管支配神経の機能

脳血管支配神経は血管の収縮と拡張に関与しているが、この血管の反応性は、血管の部位により異なることが報告されている⁴⁴⁾。さらに脳血管拡張機能を有する神経がラットにおいて三叉神経の枝である鼻毛様体神経と翼口蓋神経節からの副交感神経節後線維が篩骨孔から頭蓋内に入ることが明らかにされてから、このextrinsic innervationの実験系を用いた研究が数多く行われ脳梗塞や片頭痛の病態の解明に大きな役割を果たしてきたことは周知の事実である。それらの研究の中で最近行われたものとしてcortical spreading depression (CSD) とextrinsic innervationによる血管調節の関係を調べたものがある。この研究では鼻毛様体神経の慢性的なdenervationによりCSD後の脳血流増加の程度が減少することから、CSDは三叉神経と副交感神経を活性化し血管反応性の神経伝達物質を放出させるのではないかと考えられている⁴⁵⁾。

またcapsaicinを前投与したラットにおいて鼻毛様体神経を電気刺激するとコントロールに比較し、脳血流量の増加の程度が低いことから、capsaicinの慢性投与は脳血管支配神経からSPや

CGRPを放出させ、鼻毛様体神経電気刺激時の血管拡張作用を減弱させると考えられている⁴⁶⁾。

感覚神経は逆行性刺激により脳血管拡張反応を示す一方で、順行性刺激により脳幹を経由するか、軸索を介し交感または副交感神経と連絡し血管反応性に影響を及ぼしている可能性がある。これは翼口蓋神経節に三叉神経からの感覚神経線維が観察されることから解剖学的にも明らかにされている。生理学的にはdiving reflexがこの血管調節機構を示す現象と考えられている。Diving reflexは顔面の冷感刺激で徐脈、末梢血管収縮、血圧上昇などがおこる現象でこの際、全身の血管抵抗の上昇と血管収縮がみられるが、脳血管抵抗は他の末梢血管抵抗の増加に比べて弱く、脳血管収縮の程度も全身の血管収縮より少ないとされている。その原因として感覚神経を介した副交感神経の関与が考えられている⁴⁷⁾。

このような感覚神経と副交感神経の関連の他に、交感神経と副交感神経が脳血管上で互いに影響している可能性も示唆されている⁴⁸⁾。このことは、Willis動脈輪前半部において電子顕微鏡を用いた検討でNOS含有神経と交感神経線維の共存が認められたことから考えられるようになり⁴⁹⁾、いくつかの研究結果も報告されている⁴⁸⁾。

ブタ脳血管において、脳血管の交感神経線維上にあるACh受容体alpha7-nicotinic acetylcholine receptors (alpha7-nAChRs)をニコチンで刺激するとNOを介した血管拡張がおこることが明らかにされた⁶⁾。さらにAlzheimer病の病因となるbeta-amyloid peptides (Abetas)がこの交感神経線維にあるalpha7-nAChRsの受容体をブロックして血管拡張を抑制することからAlzheimer病の早期に起こる脳血流低下に関与している可能性も示唆されている⁵⁰⁾。

むすび

以上、脳血管支配神経について、その解剖、発

育および機能について最近の知見を含み概説した。脳血管支配神経について、以前は交感神経や副交感神経線維がそれぞれ独立して血管反応性を調節していると考えられていた。しかし最近intrinsic innervationでは、血管周囲の局所神経細胞やアストロサイト、extrinsic innervationではそれぞれの脳血管支配神経が相互に作用し脳血管の神経性調節に関与しているのではないかと考えられるようになってきている。今後は、intrinsic innervationとextrinsic innervationの関係や、神経性調節とその他の因子と関連などについての検討が行われ、脳梗塞や片頭痛に対するよりよい治療薬の開発につながっていくことが期待される。

文献

- 1) 鈴木則宏. 脳血管の神経支配. 脳神経. 1993; 45: 6-19.
- 2) Branston NM. Neurogenic control of the cerebral circulation. Cerebrovasc Brain Metab Rev. 1995; 7: 338-49.
- 3) Bleys RL, Cowen T. Innervation of cerebral blood vessels: morphology, plasticity, age-related, and Alzheimer's disease-related neurodegeneration. Microsc Res Tech. 2001; 53: 106-18.
- 4) Hamel E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. J Appl Physiol. 2006; 100: 1059-64.
- 5) 清水利彦, 鈴木則宏. 新しい脳循環調節神経. Clin Neurosci. 2004; 22: 403-5.
- 6) Si ML, Lee TJ. Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors on cerebral perivascular sympathetic nerves mediate choline-induced nitroergic neurogenic vasodilation. Circ Res. 2002; 91: 62-9.
- 7) Cohen Z, Bonvento G, Lacombe P, et al. Serotonin in the regulation of brain microcirculation. Prog Neurobiol. 1996; 50: 335-62.
- 8) Yamada M, Lamping KG, Duttaroy A, et al. Cholinergic dilation of cerebral blood vessels is abolished in M(5) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98: 14096-101.
- 9) Harder DR, Zhang C, Gebremedhin D. Astrocytes

- function in matching blood flow to metabolic activity. *News Physiol Sci.* 2002; 17: 27-31.
- 10) Mulligan SJ, MacVicar BA. Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature.* 2004; 431: 137-8.
 - 11) Filosa JA, Bonev AD, Nelson MT. Calcium dynamics in cortical astrocytes and arterioles during neurovascular coupling. *Circ Res.* 2004; 95: e73-81.
 - 12) Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, et al. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci.* 2003; 6: 43-50.
 - 13) Cauli B, Tong XK, Rancillac A, et al. Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *J Neurosci.* 2004; 24: 8940-9.
 - 14) Thomsen K, Offenhauser N, Lauritzen M. Principal neuron spiking: neither necessary nor sufficient for cerebral blood flow in rat cerebellum. *Physiol.* 2004; 560(Pt 1): 181-9.
 - 15) Yang G, Huard JM, Beitz AJ, et al. Stellate neurons mediate functional hyperemia in the cerebellar molecular layer. *J Neurosci.* 2000; 20: 6968-73.
 - 16) Suzuki N, Hardebo JE, Owman Ch. Origins and pathways of cerebrovascular vasoactive intestinal polypeptide-positive nerves in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1988; 8: 697-712.
 - 17) Shimizu T. Distribution and pathway of the cerebrovascular nerve fibers from the otic ganglion in the rat: anterograde tracing study. *J Auton Nerv syst.* 1994; 49: 47-54.
 - 18) 清水利彦, 鈴木則宏. 脳血管支配神経. *Brain Rescue.* 2005; 9: 14-7.
 - 19) Bleyers RL, Thrasivoulou C, Cowen T. Cavernous sinus ganglia are sources for parasympathetic innervation of cerebral arteries in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21: 149-56.
 - 20) Suzuki N, Hardebo JE, Owman Ch. Origins and pathways of cerebrovascular nerves storing substance P and calcitonin gene-related peptide in rat. *Neuroscience.* 1989; 31: 427-38.
 - 21) Fukuda M, Suzuki N, Maruyama S, et al. Effects of sumatriptan on cerebral blood flow under normo- and hypercapnia in rats. *Cephalalgia.* 2002; 22: 468-73.
 - 22) Shimizu T, Suzuki N, Takao M, et al. Calbindin-D28k in cerebrovascular extrinsic innervation system of the rat. *Auton Neurosci.* 2000; 84: 130-9.
 - 23) Shimizu T, Koto A, Suzuki N, et al. Occurrence and distribution of substance P receptors in the cerebral blood vessels of the rat. *Brain Res.* 1999; 830: 372-8.
 - 24) Suzuki N, Shimizu T, Takao M, et al. Neurokinin-1 receptors in the cerebrovascular vasoactive intestinal polypeptide-containing nerves in the rat. *Auton Neurosci.* 2002; 95: 103-11.
 - 25) Edvinsson L, Suzuki N, Shimizu T, et al. Origin and Co-localization of nitric oxide synthase, CGRP, PACAP, and VIP in the cerebral circulation of the rat. *Microsc Res Tech.* 2001; 53: 221-8.
 - 26) Loesch A, Burnstock G. Endothelin in human cerebrovascular nerves. *Clin Sci (Lond).* 2002; 103 Suppl 48: 404S-7S.
 - 27) Fahrenkrug J, Hannibal J, Tams J, et al. Immunohistochemical localization of the VIP1 receptor (VPAC1R) in rat cerebral blood vessels: relation to PACAP and VIP containing nerves. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000; 20: 1205-14.
 - 28) Di Tullio MA, Tayebati SK, Amenta F. Identification of adenosine A1 and A3 receptor subtypes in rat pial and intracerebral arteries. *Neurosci Lett.* 2004; 366: 48-52.
 - 29) Tayebati SK, Di Tullio MA, Tomassoni D, et al. Localization of the m5 muscarinic cholinergic receptor in rat circle of Willis and pial arteries. *Neuroscience.* 2003; 122: 205-11.
 - 30) Kobayashi S, Tsukahara S, Sugita K, et al. Histochemical studies on the postnatal development of autonomic nerves in mice cerebral arteries. *Histochemistry.* 1981; 73: 15-20.
 - 31) Ando K, Ishikawa A, Kawakami H, et al. Development of AChE-positive, NA-containing and VIP- and NPY-immunoreactive nerves in the major cerebral arteries of the rat. *Anat Embryol (Berl).* 1991; 184: 25-32.
 - 32) Ando K, Mishima Y, Sakai M. Development of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves in the cerebral arteries of the rat. *J Vet Med Sci.* 2004; 66: 933-40.
 - 33) Ando K, Yoshida S, Yamauchi H, et al. Separate

- development of nitric oxide synthase- and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerves arising from the vertebral artery in the rat. *J Vet Med Sci.* 2006; 68: 125-30.
- 34) Kusaba H, Ando K, Noboru M, et al. Comparative study of the innervation of acetylcholinesterase-positive nerves in the cerebral arterial tree of birds. *Animal Sci J.* 2002; 73: 143-7.
- 35) Etchevers HC, Vincent C, Le Douarin NM, et al. The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development.* 2001; 128: 1059-68.
- 36) Kawamura K, Takebayashi S. The development of noradrenaline-, acetylcholinesterase-, neuropeptide Y- and vasoactive intestinal polypeptide-containing nerves in human cerebral arteries. *Neurosci Lett.* 1994; 175: 1-4.
- 37) El-Assouad D, Tayebati SK. Cholinergic innervation of pial arteries in senescent rats: an immunohistochemical study. *Mech Ageing Dev.* 2002; 123: 529-36.
- 38) Bleys RL, Cowen T, Groen GJ, et al. Perivascular nerves of the human basal cerebral arteries: II. Changes in aging and Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996; 16: 1048-57.
- 39) van Denderen JC, van Wieringen GW, Hillen B, et al. Zinc sulphate-induced anosmia decreases the nerve fibre density in the anterior cerebral artery of the rat. *Auton Neurosci.* 2001; 94: 102-8.
- 40) Kawamura K, Takebayashi S. Perivascular innervation of the cerebral arteries in spontaneously hypertensive rats--an immunohistochemical study. *Angiology.* 1991; 42: 123-32.
- 41) Lagnado ML, Crowe R, Lincoln J, et al. Reduction of nerves containing vasoactive intestinal polypeptide and serotonin, but not neuropeptide Y and catecholamine, in cerebral blood vessels of the 8-week streptozotocin-induced diabetic rat. *Blood Vessels.* 1987; 24: 169-80.
- 42) Cellick S, Anderson PN, Foxwell NA. Nitroergic neurodegeneration in cerebral arteries of streptozotocin-induced diabetic rats: a new insight into diabetic stroke. *Diabetes.* 2005; 54: 212-9.
- 43) Kobayashi S, Tsukahara S, Tsuji T, et al. Histochemical studies on the regeneration of aminergic nerves in rat cerebral artery after superior cervical ganglionectomy. *Histochemistry.* 1983; 77: 57-62.
- 44) Jansen-Olesen I, Gulbenkian S, Engel U, et al. Peptidergic and non-peptidergic innervation and vasomotor responses of human lenticulostriate and posterior cerebral arteries. *Peptides.* 2004; 25: 2105-14.
- 45) Reuter U, Weber JR, Gold L, et al. Perivascular nerves contribute to cortical spreading depression-associated hyperemia in rats. *Am J Physiol.* 1998; 274 (6 Pt 2): H1979-87.
- 46) Ayajiki K, Fujioka H, Shinozaki K, et al. Effects of capsaicin and nitric oxide synthase inhibitor on increase in cerebral blood flow induced by sensory and parasympathetic nerve stimulation in the rat. *J Appl Physiol.* 2005; 98: 1792-8.
- 47) Brown CM, Sanya EO, Hiltz MJ. Effect of cold face stimulation on cerebral blood flow in humans. *Brain Res Bull.* 2003; 61: 81-6.
- 48) Toda N, Okamura T. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. *Pharmacol Rev.* 2003; 55: 271-324.
- 49) Tsuchida A, Handa Y, Nojyo Y, et al. Ultrastructure of NADPH diaphorase-positive nerve fibers and their terminals in the rat cerebral arterial system. *J Chem Neuroanat.* 2001; 21: 267-75.
- 50) Si ML, Long C, Yang DI, et al. Statins prevent beta-amyloid inhibition of sympathetic alpha7-nAChR-mediated nitroergic neurogenic dilation in porcine basilar arteries. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005; 25: 1573-85.



ELSEVIER

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainresBRAIN
RESEARCH

Research Report

Distribution and origin of TRPV1 receptor-containing nerve fibers in the dura mater of rat

Toshihiko Shimizu^{a,*}, Haruki Toriumi^a, Hideki Sato^b, Mamoru Shibata^c, Eiichiro Nagata^d,
Kyoko Gotoh^a, Norihiro Suzuki^a

^aDepartment of Neurology, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 160-8582, Japan

^bDepartment of Neurology, Saitama City Hospital, Japan

^cDepartment of Neurology, National Hospital Organization Tokyo Medical Center, Japan

^dDepartment of Neurology, School of Medicine, Tokai University, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 30 July 2007

Available online 10 August 2007

Keywords:

TRPV1 receptor

Dura mater

Trigeminal ganglion

CGRP

Nociception

Migraine

ABSTRACT

We examined the distribution and origin of the nerve fibers innervating the dura mater of the rat that show immunoreactivity for the TRPV1 receptor (TRPV1-IR). Nearly 70% of the nerve fibers showing TRPV1-IR in the dura mater also exhibited CGRP-IR. Using a combination of immunohistochemistry and a retrograde tracer technique, we detected tracer accumulation in 0.6% of the neurons in the trigeminal ganglion and a few neurons in the dorsal root ganglion; half of the neurons in the trigeminal ganglion were small- and medium-sized ($\leq 1000 \mu\text{m}^2$). Among the tracer-accumulated neurons in the trigeminal ganglion, approximately 25% exhibited TRPV1-IR. Furthermore, nearly 80% of the tracer-accumulated small- and medium-sized neurons in the trigeminal ganglion that exhibited TRPV1-IR also exhibited CGRP-IR. Our findings indicate that the TRPV1 receptor in the dura mater and sensory ganglia may contribute to the pathophysiology of migraine, providing an important clue for the development of therapeutic strategies for migraine.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Headache can occur as a result of the activation of pain-sensitive cranial structures, such as cranial and cervical muscles, ligaments, vasculature and the dura mater. Among these, the dura mater has been recognized as one of the most important regions because of its ability to facilitate the conduction of nociceptive sensation and of its being a major site of neurogenic inflammation, a phenomenon putatively related to the development of migrainous headache (Moskowitz, 1984).

The dura mater is innervated by sensory nerve fibers containing neuropeptides like calcitonin gene-related peptide (CGRP)

or substance P; these nerve fibers originate mainly from the trigeminal ganglion (TG) (Andres et al., 1987; Messlinger et al., 1993; Reuss et al., 1992; Uddman et al., 1989). Immunohistochemical and molecular biological observations have revealed that, in addition to such neuropeptides, the transient receptor potential vanilloid subfamily member 1 (TRPV1) receptor is also expressed in the sensory ganglia (Helliwell et al., 1998). Moreover, the TRPV1 receptor is also reportedly expressed in the nerve fibers of peripheral tissues, such as the paw skin, the cornea and the bladder in several species (Hou et al., 2002; Ichi-kawa and Sugimoto, 2001; Murata and Masuko, 2006; Szallasi and Blumberg, 1999).

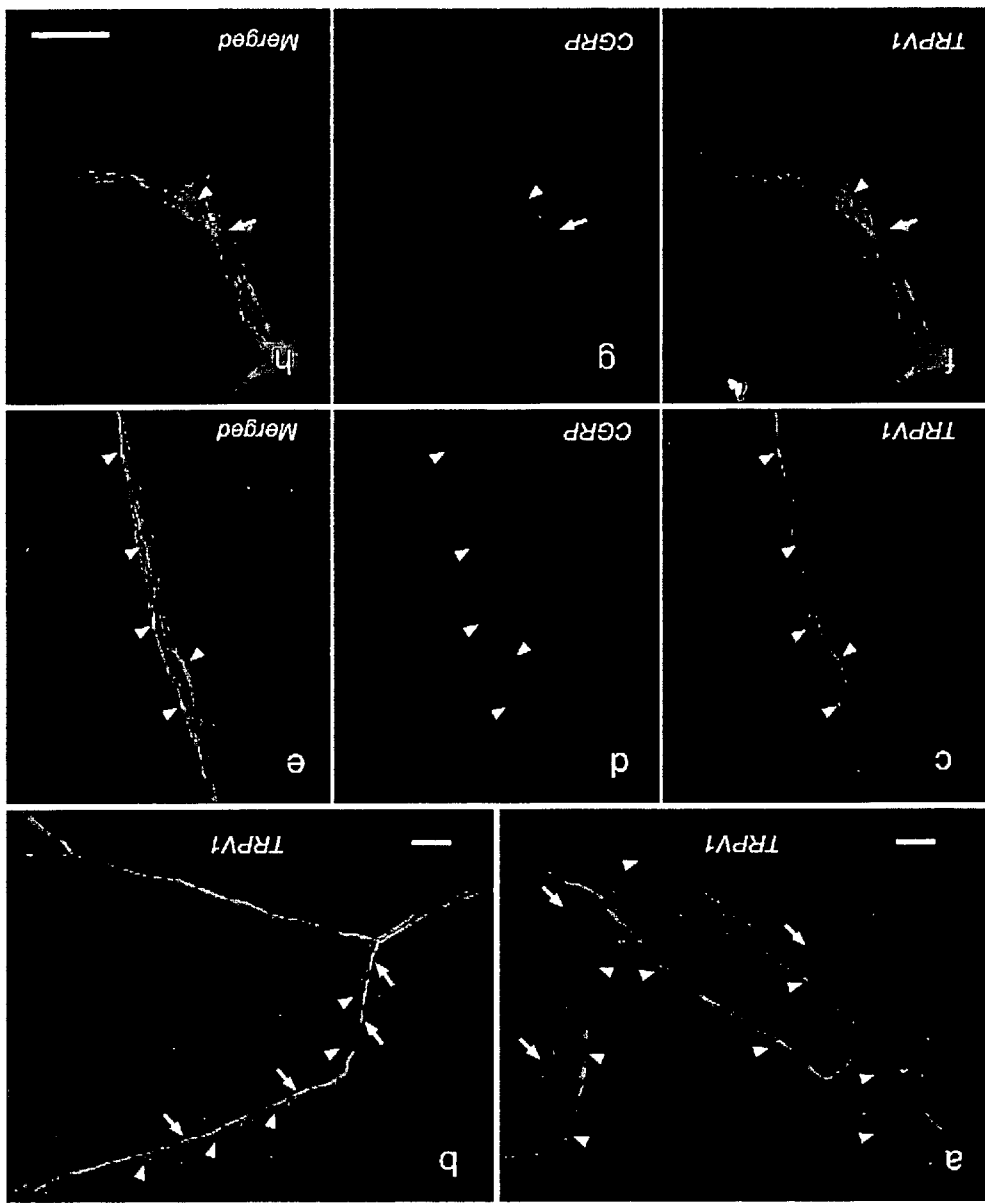
* Corresponding author. Fax: +81 3 3353 1272.

E-mail address: shimizu-toshi@umin.ac.jp (T. Shimizu).

TRPV1 receptor might regulate vascular responses via controlling the release of CGRP (Jansen et al., 1990). The activation of the TRPV1 receptors has been reported to cause vasodilatation of the dural blood vessels by promoting the release of CGRP from the sensory nerve fibers (Akerman et al., 2003, 2004; Dux et al., 2003). Although the existence of the TRPV1 receptor in the dura mater has been recently reported, its precise origin remains obscure (Koizumi et al., 2005). In this study, we investigated the distribution of immunoreactivity for the TRPV1

The TRPV1 receptor is a capsaicin, proton- and heat-sensitive cation-selective channel and has been shown to have a role in conducting nociceptive signals to the central nervous system (Szallasi et al., 2006). Double labeling immunohistochemistry has demonstrated that several neurons in the sensory ganglia showing immunoreactivity for the TRPV1 receptor (TRPV1-IR) also exhibited CGRP-IR (Hou et al., 2002; Ichikawa and Sugimoto, 2001; Murata and Masuko, 2006). Furthermore, the results of a physiological experiment revealed that the

Fig. 1 - Immunohistochemical examination of the dura mater in whole-mount preparations. (a) Nerve fibers with varicosities expressing TRPV1-IR (arrowheads) were observed in the vicinity of the middle meningeal artery (arrows). Scale bar, 100 μ m. (b) Thick (arrows) and fine nerve fibers (arrowheads) showing TRPV1-IR were also found away from the blood vessels in the nerve bundle. Scale bar, 100 μ m. (c, d) Double labeling for TRPV1 (c; green) and CGRP (d; red) immunoreactivity. Nerve fibers with TRPV1-IR also exhibiting CGRP-IR (arrowheads). These nerve fibers are shown as yellow in the merged image (e) of panels c and d. (f, g) Double labeling for TRPV1 (f; green) and CGRP (g; red) immunoreactivity. Spiral nerve fibers showing TRPV1-IR did not contain CGRP-IR (arrowheads). Conversely, arrows indicate CGRP-IR nerve fibers without TRPV1-IR. (h) Merged image of panels f and g. Scale bar, 50 μ m for panels c-h.



receptor in the dura mater and sensory ganglia. In addition, we used immunofluorescence histochemistry and a neural retrograde tracer technique to identify the origins of the TRPV1-IR-positive neurons that innervate the dura mater. We believe that our results provide clues to elucidate the role of the TRPV1 receptor in the pathogenesis of headache.

2. Results

2.1. Immunohistochemistry of the dura mater

The nerve fibers showing TRPV1-IR were mainly observed around the middle meningeal artery (Fig. 1a). Fibers exhibiting TRPV1-IR were also found away from the blood vessels (Fig. 1b). TRPV1-IR was mostly detected in fine fibrous nerve fibers with varicosity-like structures, although a few thick nerve fibers also exhibited TRPV1-IR (Fig. 1b). Double labeling immunohistochemistry with a combination of antibodies to CGRP revealed that approximately 70% of the TRPV1-IR nerve fibers showed co-localization of TRPV1-IR and CGRP-IR (Figs. 1c, d, e; range, 68–76%, $n=62$ fibers from three animals). However, we also found TRPV1-IR nerve fibers not showing CGRP-IR and nerve fibers expressing only CGRP-IR (Figs. 1f, g, h).

2.2. Subpopulations of the neurons showing TRPV1-IR in the TG and DRG

Neurons showing TRPV1-IR were observed in the TG (Figs. 2a, b, c) and dorsal root ganglia (DRG; C₂; Figs. 2d, e, f), but not in the sphenopalatine (SPG), otic (OTG), or superior cervical ganglia (SCG).

We counted a total of 1850 neurons in the TG and 579 neurons in the DRG of four ganglia (one ganglion per animal). In both the ganglia, about 80% of all the neurons were small- and medium-sized neurons (range, 79–93% in the TG, 77–85% in the DRG). Both in the TG and DRG, an analysis of the residuals showed a significantly higher proportion of small- and medium-sized neurons (TG, $Z=10.9$, $P<0.001$; DRG, $Z=4.8$, $P<0.001$).

In the TG, nearly 25% of the small- and medium-sized neurons (range, 19–32%) and 3% of the large-sized neurons (range, 1–5%) showed TRPV1-IR. After quantitative analyses of double labeling immunohistochemistry with antibodies to CGRP, we found that 40% of the neurons exhibiting TRPV1-IR also exhibited CGRP-IR (range, 27–62% of the small- and medium-sized neurons, and 50–80% of the large-sized neurons) (Figs. 3a, b).

In the DRG, about 30% of the small- and medium-sized neurons (range, 20–40%) and only a few large-sized neurons were positive for TRPV1-IR. Approximately one-third of the small- and medium-sized neurons showing TRPV1-IR also exhibited CGRP-IR. A statistical analysis showed no preferential association of the proportion of TRPV1-IR neurons with the cell size (TG, $Z=0.3$, $P>0.05$; DRG, $Z=2.2$, $P>0.05$).

2.3. Retrograde tracer study

Tracer-accumulated neurons were observed in the TG, DRG, SPG and SCG on the side ipsilateral to the tracer application. While neurons showing TRPV1-IR were observed in both the TG and DRG, only a few of these neurons in the DRG exhibited tracer accumulation; therefore, we performed a quantitative analysis of the neural populations only in the TG.

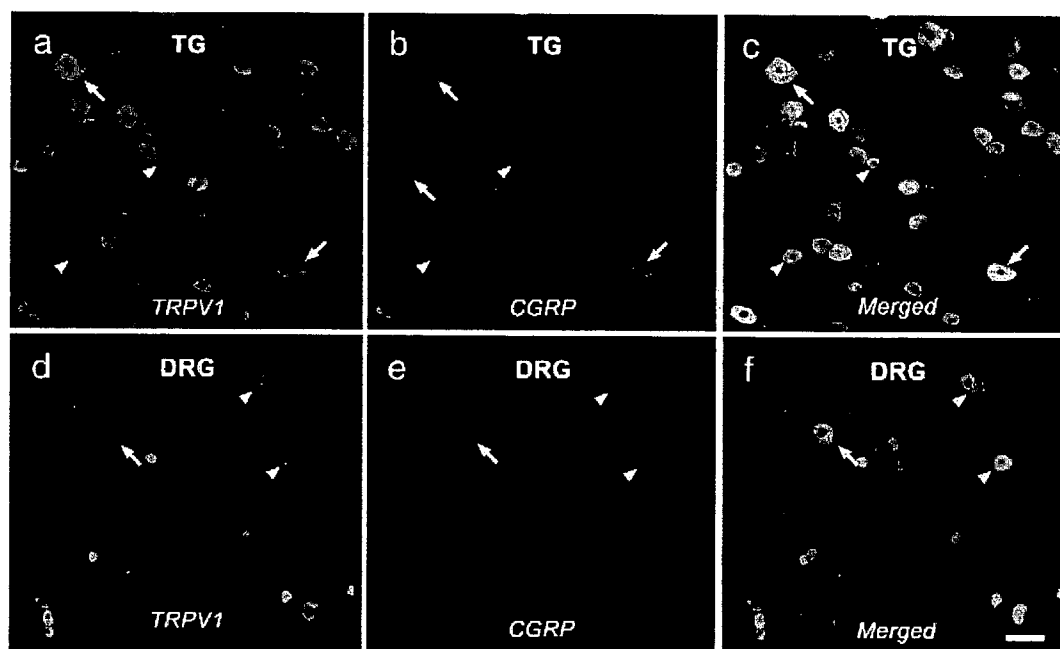


Fig. 2 – Double labeling for TRPV1 (green; a, d) and CGRP (red; b, e) immunoreactivity in the TG (a, b, c) and DRG (d, e, f). Arrowheads indicate small neurons showing both TRPV1-IR and CGRP-IR. Arrows show large neurons showing both TRPV1-IR and CGRP-IR. (c) Merged image of panels a and b. (f) Merged image of panels d and e. Neurons showing that both TRPV1-IR and CGRP-IR are shown in yellow in the merged image. Scale bar, 50 μm for all.

Tracer accumulation was detected in 0.6% of the neurons in the TG (n=30,845 neurons from two animals). Among these neurons showing tracer accumulation, 57% were small- and medium-sized (range, 27-64%) and 43% were large-sized (Figs. 4a-d, 5). As shown in Fig. 5, among the small- and medium-sized tracer-accumulated neurons, 20% showed both TRPV1 and CGRP-IR and 4% exhibited only TRPV1-IR. On the other hand, 1% of large neurons showed both TRPV1 and CGRP-IR and 0.3% exhibited only TRPV1-IR. Furthermore, about 80% of the tracer-accumulated small- and medium-sized neurons exhibiting TRPV1-IR also exhibited CGRP-IR. Meanwhile, only a few large-sized tracer-accumulated neurons exhibited TRPV1-IR in these cells, precluding an adequate assessment of co-localization. An analysis of the residuals showed the relative proportion of neurons exhibiting TRPV1-IR and CGRP-IR among the tracer-accumulated neurons with TRPV1-IR to be significantly higher than that exhibiting TRPV1-IR and CGRP-IR among the total TG neurons with TRPV1-IR (Z=2.8, P<0.005).

3. Discussion

Our immunohistochemical study revealed the existence of nerve fibers in the dura mater that were positive for TRPV1-IR. Our study also indicated that these TRPV1-IR-positive nerve fibers originated from the TG and DRG. Nearly half of the tracer-accumulated neurons in the TG exhibited TRPV1-IR positivity; as discussed below, most of these tracer-accumulated neurons were small- and medium-sized neurons.

3.1. Technical considerations

In our study, we utilized True Blue as a retrograde tracer to explore the origin of the neurons innervating the dura mater. Although the possibility of leakage to the surrounding tissues is a concern, this technique has previously been shown to be an effective method for investigating the innervation of small vessels (Suzuki et al., 1988). In addition, we built a small bank

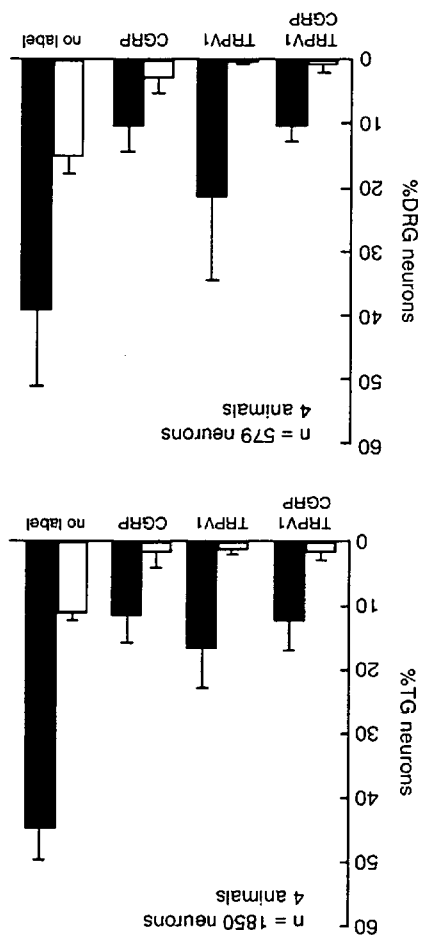


Fig. 3 - Histogram summarizing the quantitative data from double labeling for TRPV1 and CGRP immunoreactivity in the TG (a) and DRG (b). The open bars show large-sized neurons (>1000 μm^2), and the solid bars indicate small- and medium-sized neurons ($\leq 1000 \mu\text{m}^2$). The bars show the mean \pm SD.

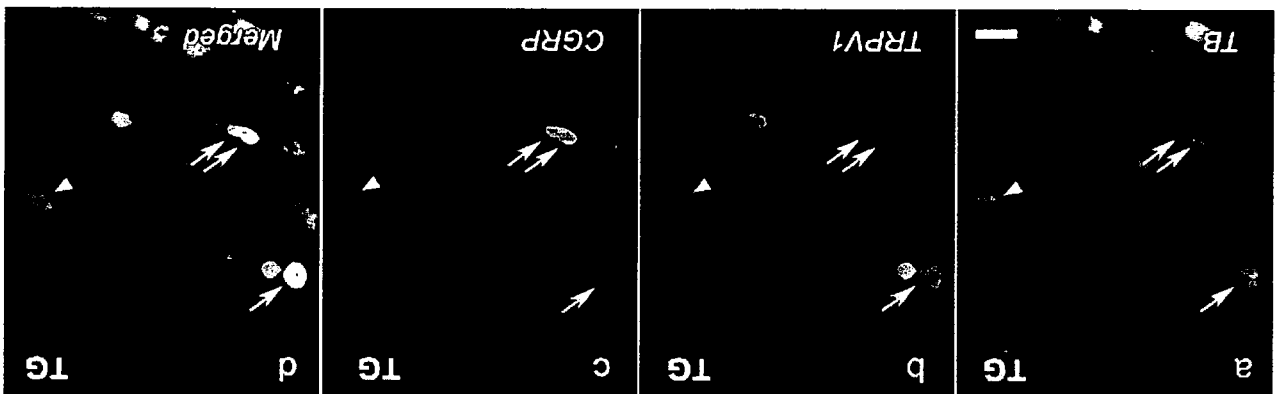


Fig. 4 - Sections of TG (a, b, c, d) containing neurons retrogradely labeled with True Blue (a), TRPV1-IR (b) and CGRP-IR (c). Application on the dura mater. Arrows indicate retrogradely labeled small- and medium-sized neurons expressing TRPV1-IR and CGRP-IR. Arrowheads indicate retrograde tracer accumulation in small neurons showing neither TRPV1-IR nor CGRP-IR. (d) Merged image of panels a, b and c. In the merged image, retrogradely labeled neurons showing both TRPV1-IR and CGRP-IR are shown in white. Scale bar, 50 μm for all.

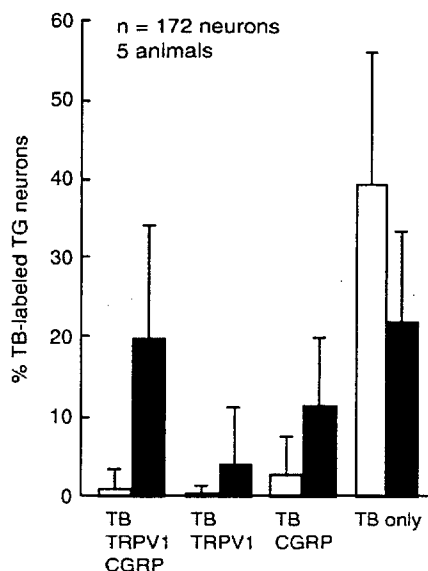


Fig. 5 - Histogram summarizing the neurochemical profiles of retrogradely labeled neurons with True Blue (TB) in relation to TRPV1-IR and CGRP-IR and their association with the neuronal size in the TG. Open bars show large-sized neurons ($>1000 \mu\text{m}^2$), and the solid bars indicate small- and medium-sized neurons ($\leq 1000 \mu\text{m}^2$). The bars show the mean \pm SD.

around the tracer application site using carboxylate cement to prevent the oozing of the tracer in this experiment. These procedures prevented the tracer from leaking to other peripheral sites.

In the TG, tracer-accumulated neurons were observed in 0.6% of the total neurons. To calculate this result, we counted the total number of TG neurons, examining 30,845 neurons from two animals. Other studies have reported that about 55,000 cells are present in the TG at the time of birth (Henderson et al., 1994) and that 33,000 axons were present in the adult infraorbital nerve (Jacquin et al., 1984). These previous findings suggest that the number of TG neurons may have actually been higher than what we counted. Although the ratio of tracer-accumulated neurons may actually be lower, the percentage of tracer-accumulated neurons seems to be appropriately labeled from a single dural site. Accordingly, we believe that our tracer experiment was properly conducted.

3.2. Populations of neurons exhibiting TRPV1-IR and the nature of nerve fibers exhibiting TRPV1-IR in the dura mater

The percentage of TRPV1 receptor containing neurons and the proportions of large and small neurons exhibiting TRPV1-IR, as well as the co-localization pattern of neurons exhibiting CGRP-IR, that were observed in the present study were reasonably consistent with the data reported by other studies (Ichikawa and Sugimoto, 2001; Murata and Masuko, 2006).

The tracer accumulation pattern in our study was similar to that in a previous study (Uddman et al., 1989). In terms of the DRG, most of the tracer studies exploring the origins of the nerves innervating the dura mater indicated that tracer-

labeled neurons were observed mainly in the C₂ of the DRG (Uddman et al., 1989; Liu et al., 2004). In addition, neurons in the C₂ dorsal horn have been reported to receive sensory input from supratentorial dura mater and the superior sagittal sinus (Goadsby and Zagami, 1991; Bartsch and Goadsby, 2002); therefore, we observed only the C₂ of the DRG in this study.

Our retrograde tracer study revealed that the majority of the TRPV1-IR neurons innervating the dura mater were small- and medium-sized neurons. Immunohistochemical data from the sensory ganglia were also consistent with the findings in the dura mater, and TRPV1-IR was mainly observed in fine fibers with varicosity-like structures. Although the neurons in the DRG that have small diameters are unmyelinated or have thinly myelinated axons are concerned with thermal sensation and nociception (Gardner et al., 2000), the nerve fibers innervating the dura mater are known to conduct only pain-invoked signals (Ray and Wolff, 1940). Therefore, our observations imply that the nerve fibers exhibiting TRPV1-IR in the dura mater may mainly conduct nociceptive signals.

Compared with the DRG, clear functional correlations based on neuronal size are not available in the TG, especially for the neurons innervating the dura mater. However, Levy and Strassman (2002) recently reported the existence of dural nerve fibers that responded to mechanical stimulation and originated in the TG. Although no established functional distinction based on the size of the neurons presently exists, our data on the relationship between neuronal size and TRPV1-IR may provide important insight as to the neuronal features in the TG innervating the dura mater.

3.3. Functional implications of nerve fibers exhibiting TRPV1-IR

Several studies have reported that the activation of TRPV1 receptors causes vasodilatation. Furthermore, based on the finding that this vasodilatory response is attenuated by the administration of a CGRP receptor antagonist, it seems likely that the activation of the TRPV1 receptor promotes the release of CGRP from sensory nerve endings that are co-localized with the TRPV1 receptors; this, in turn, induces vasodilation (Akerman et al., 2003, 2004; Dux et al., 2003; Jansen et al., 1990). Based on these previous findings, we expected to observe the co-localization of TRPV1-IR and CGRP-IR nerve fibers in the dura mater. The results of our experiments revealed that, although all of the nerve fibers exhibiting TRPV1-IR in the dura mater did not show CGRP-IR, many of the nerve fibers exhibited both TRPV1-IR and CGRP-IR. These dura mater observations are consistent with our data showing a significant proportion of neurons with tracer accumulation in our retrograde tracer study to exhibit both high TRPV1 and high CGRP-IR as compared to the total ganglion cell population. In addition, our data provide a strong anatomical basis for the contention that vasodilation in the dura mater can be caused by the TRPV1 receptor-mediated release of CGRP (Akerman et al., 2003). We also observed that TRPV1-IR nerve fibers did not exhibit CGRP-IR in the dura mater. When TRPV1 receptors in the dura mater are activated by inflammation, these nerve fibers presumably transmit