

— 総説 —

歯根膜ルフィニ神経終末の再生・発生過程

前田健康^{1,3}, 原田史子^{1,2}¹新潟大学大学院医歯学総合研究科・摂食環境制御学講座・顎顔面解剖学分野²新潟大学大学院医歯学総合研究科・摂食環境制御学講座・咬合制御学分野³新潟大学超域研究機構

Regeneration and Development of Periodontal Ruffini Endings

Takeyasu MAEDA^{1,3} and Fumiko HARADA^{1,2}¹*Division of Oral Anatomy, Department of Oral Biological Science,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan*²*Division of Orthodontics, Department of Oral Biological Science,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan*³*Center for Transdisciplinary Research, Niigata University, Niigata, Japan*

平成15年11月14日受付 11月14日受理

キーワード：歯根膜，ルフィニ神経終末，微細構造，発生，再生，神経栄養因子

Key words : periodontal ligament, Ruffini ending, ultrastructure, development, regeneration, neurotrophic factor

Abstract : The periodontal ligament has a rich sensory nerve supply which serves as a sensory apparatus in addition to tooth support. The periodontal ligament contains nociceptors and low-threshold mechanoreceptors. Stimuli applied to teeth easily evoke various oral reflexes, which make smooth mastication possible via the periodontal mechanoreceptors. Recent morphological and physiological studies have revealed that Ruffini endings, categorized in low-threshold slowly adapting type II, are essential mechanoreceptors in the periodontal ligament. The periodontal Ruffini endings are ultrastructurally characterized by expanded axon terminals filled with a number of mitochondria and by the presence of terminal or lamellar Schwann cells. The axon terminals of the periodontal Ruffini endings have finger-like projections, *i.e.* axonal spines, extending into the surrounding tissue to detect the deformation of collagen fibers. Many experimental studies also have revealed that periodontal Ruffini endings have high potential for neuroplasticity, confirmed by intense immunoreactivity for several markers such as p75-NGFR and GAP-43. Mechanical stimuli due to tooth eruption and occlusion might be a prerequisite for the differentiation and maturation of the periodontal Ruffini endings. Previous immunocytochemical studies have shown expression of TrkB, a high affinity neurotrophic factor receptor, in the periodontal Ruffini endings, suggesting brain derived neurotrophic factor (BDNF) is a candidate for neurotrophins involved in the regeneration and development of the periodontal Ruffini endings. Our recent immunocytochemical and quantitative analyses on BDNF-knockout mice have revealed the involvement of BDNF in the development, regeneration, survival and maintenance of the periodontal Ruffini endings. Further investigations are needed for clarifying the involvement of other growth factors and the molecular mechanism of the development and regeneration processes of the Ruffini endings.

抄録：歯根膜は歯の支持・固定装置として進化してきたが、その一方で豊富な知覚神経支配を受けており、感覚装置として機能している。歯根膜の知覚受容器は侵害受容器と低閾値機械受容器にわけられる。歯に加わる刺激は容易にさまざまな口腔反射を引き起こすが、この反射により咀嚼を円滑に制御することができる。近年の研究により、低閾値遅順応性タイプII型の伸展受容器であるルフィニ神経終末が歯根膜機械受容器として重要であることが明らかにされている。歯根膜ルフィニ神経終末はミトコンドリアを豊富に含んだ軸索終末と終末シュワン細胞の存在という微細構造学的特徴

をもっている。歯根膜ルフィニ神経終末の軸索終末から指状の原形質突起いわゆるaxonal spineが周囲の歯根膜組織中に伸び出し、歯根膜膠原線維の変形を感受する。多くの実験的研究により、歯根膜ルフィニ神経終末は潜在的に高い神経可塑性を有していることが示され、またこのことはp75-NGFRやGAP-43といったタンパクを強く発現することからも支持されている。歯根膜ルフィニ神経終末の分化・成熟には歯の萌出や咬合力といった機械的刺激が必要である。過去の免疫細胞化学的研究により、歯根膜ルフィニ神経終末が高親和性神経栄養因子受容体であるTrkBを強く発現していることが明らかにされ、このことから脳由来神経栄養因子 (BDNF) が歯根膜ルフィニ神経終末の再生・発生過程に関与する神経栄養因子の候補であると考えられた。最近のBDNFノックアウトマウスを用いた免疫細胞化学的研究ならびに統計解析による研究により歯根膜ルフィニ神経終末の発生、再生、生存、維持過程にBDNFが強く関与していることが明らかにされた。歯根膜ルフィニ神経終末の発生、再生過程に関わる他の神経栄養因子ならびに分子機構に関する研究がさらに必要である。

はじめに

咀嚼は顎の単なる動きという単純な運動ではなく、顎・口腔領域の多数の器官の複雑な機能と関連をもつ運動である。咀嚼は末梢効果器内の感覚器官からおこる感覚入力系、末梢効果器系を統合する中枢神経系、咀嚼筋群への出力系からの3系から制御されている。この咀嚼運動の感覚入力系の重要な構成要素のひとつに歯根膜からの入力系がある¹⁻³⁾。

歯根膜は歯と歯槽骨間に介在する密生結合組織である。歯根膜は歯の支持・固定装置として機能するばかりでなく、豊富な知覚神経支配を受け (図1 a), 口腔内の重要な感覚装置として機能する。歯根膜の感覚には痛覚に加え、触覚, 圧覚, 歯の位置感覚, 固有感覚 (深部感覚) があり, 前者を侵害受容器が, 後者を機械受容器が受容する。機械受容器が感受した情報は中枢神経系に伝えられ, さまざまな口腔反射を介し, 咀嚼の神経性制御に役立っている¹⁻³⁾。

歯根膜神経終末の組織学的検索は古くから行われてき

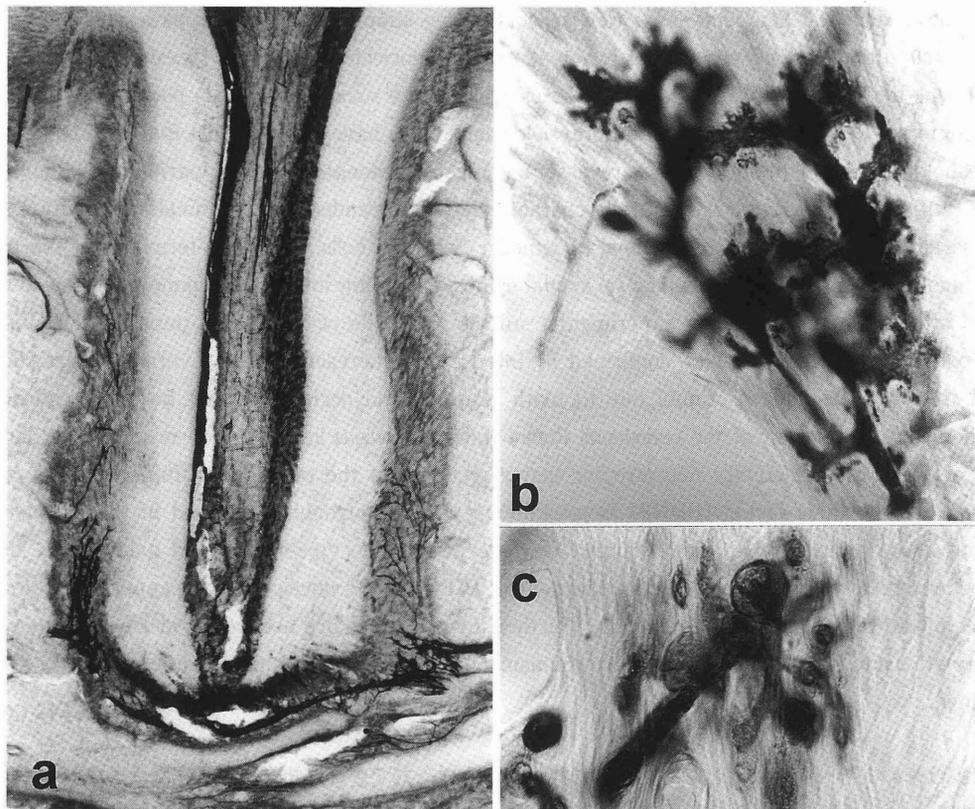


図1 歯根膜の神経分布 (a) と神経終末 (b, c)⁵⁾。a, b : protein gene product 9.5 免疫染色, c : S-100タンパク免疫染色。a : 根尖周囲, b : 歯根膜ルフィニ神経終末の強拡大像, c : S-100タンパク免疫染色による歯根膜ルフィニ神経終末。

たが、歯根膜が膠原線維に富む組織であること、また歯と歯槽骨間に位置するという解剖学的特殊性ならびに神経線維の組織学的同定法の困難さから、歯根膜神経ならびに終末形態、特に発生・再生過程に関する知見は乏しかった⁴⁻⁸⁾。1980年代後半から従来からこの分野の研究に用いられてきた神経鍍銀法に加え、軸索流を利用したオートラジオグラフィ法、電子顕微鏡法、さらには神経特異タンパクに対する抗体を用いた免疫細胞化学的手法が導入され、歯根膜神経の形態学的研究が飛躍的に進展した⁴⁻⁹⁾。これら一連の研究により、歯根膜の機械受容器として、低閾値伸展受容器^{9, 10)}であるルフィニ神経終末が重要であることが示されてきた^{4-8, 11-19)}。本稿では我々の研究グループで蓄積してきた研究成果を元に歯根膜ルフィニ神経終末の形態学的所見、特に歯根ルフィニ神経終末の発生・再生過程について概説する。

歯根膜機械受容器と歯根膜ルフィニ神経終末

図1bに典型的な歯根膜ルフィニ神経終末の光線顕微鏡像を示すが、この神経終末は膠原線維の密な皮下組織線維層、腱、靭帯、関節包、筋膜、毛包といった組織中に存在し、形態学的に樹枝状に分枝した太い軸索終末をもつ。約100年前に、ボローニャ大学の解剖・生理学の教授であったAngelo Ruffiniがヒト皮膚中にパチニ小体ともマイスナー小体とも異なる形態をもつ神経終末を発見した^{20, 21)}。彼が示した神経終末の多くはこれまで報告されていた神経終末の中間型に相当するものとみなされ、Sfamenti (1900)^{21, 22)}がこれら神経終末をルフィニ小体と命名した。Ruffini教授が報告したルフィニ小体は薄い結合組織性の被膜に包まれ、その中に神経線維が進入し、繰り返し分岐する神経終末であるが、歯根膜で見いだされているルフィニ神経終末は結合組織性の被膜構造を欠いている⁴⁻⁹⁾。従って、厳密な意味では歯根膜に認められるルフィニ神経終末はルフィニ様神経終末と呼ぶべきかもしれない。しかしながら、ルフィニ神経終末は微細構造学的にもゴルジ・腱装置と区別することが困難であり、ある程度の変異形が存在することから²¹⁾、現在では歯根膜に存在するルフィニ神経終末を歯根膜ルフィニ神経終末と呼んでいる。

電気生理学的には、歯根膜神経から速順応型 (rapidly adapting type) と遅順応型 (slowly adapting type) のインパルスが記録され、少なくとも2種類の機械受容器の存在が示唆されている²³⁻²⁸⁾。電子顕微鏡的研究ならびに免疫細胞化学的研究から、前者の低閾値遅順応性の応答を示す機械受容器のほとんどのものがルフィニ神経終末と考えられている^{4-8, 11-19)}。歯根膜ルフィニ神経終末についてByers (1985)¹²⁾は周囲基底膜構造または歯根膜膠原線維と接触する指状の突起をもつ膨大した

神経終末 (図2a)で、特徴的な形態をもつ終末シュワン細胞をもつもの (I型) とI型より小型で、指状の突起と基底膜が貧弱で、分岐状態が悪いもの (II型) の2種に分類している。これらI型とII型の歯根膜ルフィニ神経終末は通常、歯根膜中に混在している。一方、速順応性の機械受容器としては、皮膚機械受容器同様、マイスナー小体やパチニ小体に類似した神経終末が知られている。しかしながら、このタイプの神経終末の歯根膜での出現頻度は低く、これまで、イヌ、ネコ、サル、ヒトでわずかにその存在が形態学的に示されている^{5, 15, 18, 26)}のみであり、Byers (1985)¹²⁾はこれをIII型の知覚受容器と呼んでいる。

生理学的に歯根膜ルフィニ神経終末を支配するニューロンは三叉神経節と三叉神経中脳路核に存在することが示されている²⁹⁻³³⁾。しかしながら、中脳路核由来の歯根膜ルフィニ神経終末の分布に関する所見は乏しい。軸索流を利用したオートラジオグラフィ法による研究では、三叉神経節由来のルフィニ神経終末が根尖側1/3から歯根中央部歯根膜にかけて密に、また歯頸部付近にも分布しているが、中脳路核由来のものは切歯と犬歯根尖周囲に密に分布しているという³⁰⁾。

これまで明らかにされている歯根膜ルフィニ神経終末の光線顕微鏡的特徴を要約すると以下の4点に集約される。(1)歯根膜ルフィニ神経終末は歯の機能時に歯根膜線維が最も伸展される領域に集中している。(2)歯根膜ルフィニ神経終末は歯根膜膠原線維の密な領域で激しく分枝し、膠原線維の疎な血管周辺では分枝を示さない。(3)大型の歯根膜ルフィニ神経終末 (I型) の多くは根尖部周囲に密集している。(4)被膜性構造を欠く。

歯根膜にはこれに加えて、A δ 線維とC線維からなる侵害受容器、血管壁に分布するA δ 線維とC線維からなる終末の計7種類の神経終末が少なくとも存在すると考えられている。

歯根膜ルフィニ神経終末の微細構造

歯根膜感覚受容器の電子顕微鏡的所見 (図2a)を最初に提示したのはBeertsenら¹¹⁾であるが、彼らはこの構造物をルフィニ神経終末とは呼ばず、単に歯根膜感覚受容器と記載している。歯根膜機械受容器として歯根膜ルフィニ神経終末と命名したのはByers (1985)¹²⁾である。彼女は軸索流を利用したオートラジオグラフィ法と1000枚にのぼる連続超薄切片の観察により、歯根膜ルフィニ神経終末の微細構造学的特徴を明らかにした。

軸索終末の電子顕微鏡的特徴として、receptoplasm³⁴⁾があげられる。このreceptoplasmにはミトコンドリアの集団、さまざまな大きさ、形態の小胞、滑面小胞体ならび疎な細胞骨格タンパクが含まれる (図2b)。歯根膜

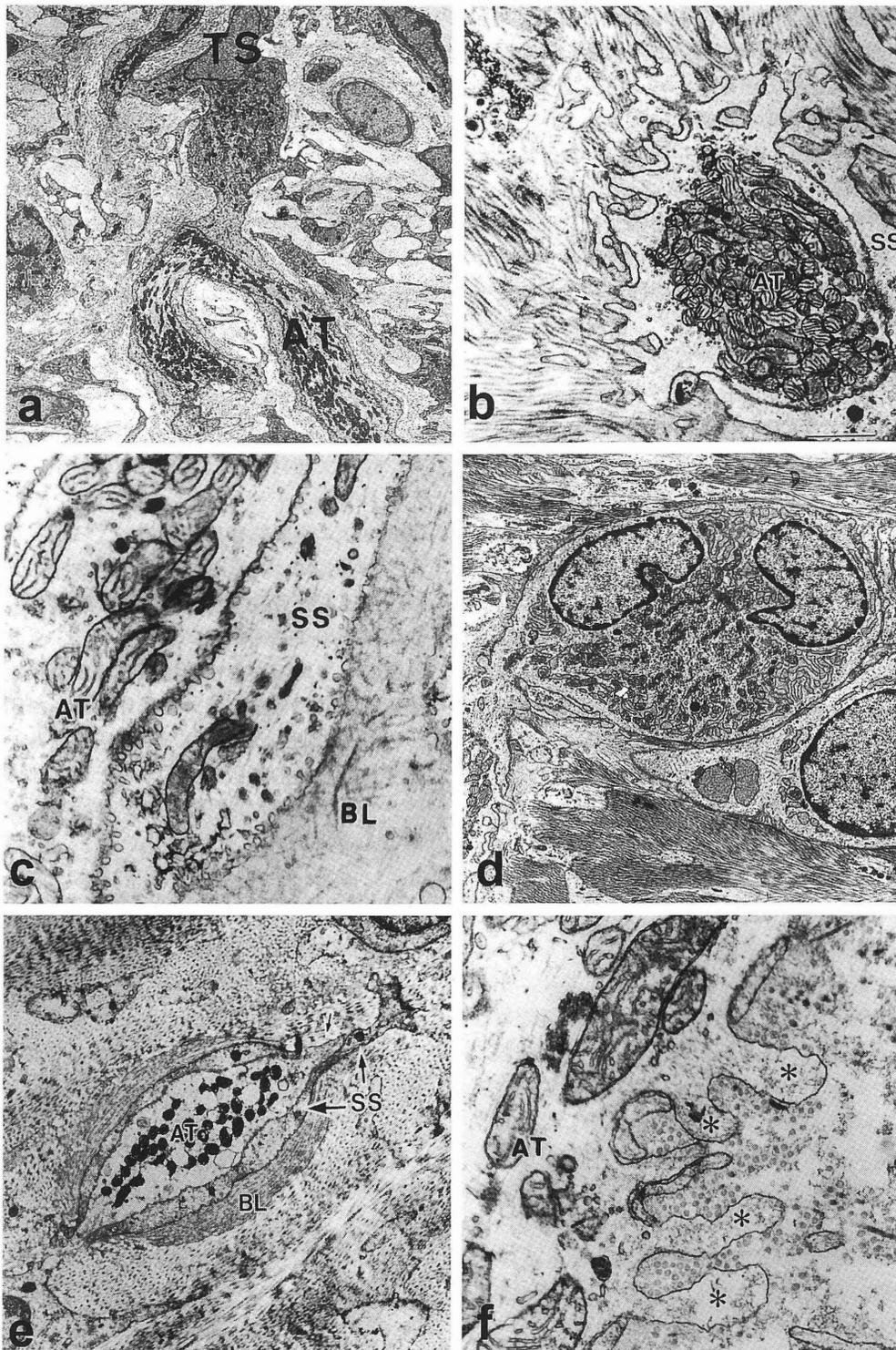


図2 歯根膜ルフィニ神経終末の電子顕微鏡像。a: 全体像¹³⁾, b: 軸索終末 (AT) の拡大像, c: 軸索終末 (AT) とシュワン鞘 (SS) の拡大像¹⁶⁾, d: 終末シュワン細胞の細胞体の拡大像¹⁶⁾, e: 軸索終末 (AT) と多層化した基底膜構造 (BL)¹⁶⁾, f: 軸索終末 (AT) から伸び出る指状の突起 (*) の拡大像¹⁴⁾。AT: 軸索終末, BL: 基底膜, TS: 終末シュワン細胞, SS: シュワン鞘。(許可を得て転載)。

ルフィニ神経終末の軸索終末もこのreceptoplasmの特徴を兼ね備え、I型のルフィニ神経終末では高閾値侵害受容器より特にreceptoplasmの量が多く⁴、また、軸索終末の細胞膜には多数のタコ壺様構造(caveole)がよく発達している(図2c)^{7, 12-14, 35}。

また、歯根膜ルフィニ神経終末にはテログリアの一種である特殊なシュワン細胞が付随している^{7, 12}。このシュワン細胞はS-100タンパク抗体に強く反応し(図1c)^{16, 17, 19}、高い非特異的コリンエステラーゼ活性を示す³⁶ことから、パチニ小体の層板細胞やマイスナー小体の薄板細胞に相当し³⁷、終末または層板シュワン細胞(terminal or lamellar Schwann cell)と呼ばれている^{7, 12}。層板細胞や薄板細胞は細胞質すなわち細胞内小器官に乏しいが、歯根膜ルフィニ神経終末に付随するこの終末シュワン細胞の細胞質は豊かで、その中には豊富なゴルジ装置、拡張した小胞体が含まれている(図2d)。終末シュワン細胞も層板細胞、薄板細胞および通常のシュワン細胞同様、歯根膜神経の再生・発生過程に重要な役割を果たすことが想像されている。

終末シュワン細胞体からは複数の軸索終末に向かってその細胞質突起が伸びだし、その細胞質突起が軸索終末をおおっている(図2a)^{7, 12-14, 35}。軸索終末をおおうシュワン鞘は複数個あり、その結果、シュワン鞘には切れ目が存在する(図2e)。I型のルフィニ神経終末ではシュワン鞘の切れ目からは軸索終末の指状の突起(microspikes^{38, 39}またはaxonal spines⁴⁰)と呼ばれる)が周囲歯根膜組織に伸びだしている(図2b, e, f)。II型のルフィニ神経終末ではこの指状の突起の形成は不完全で、軸索終末の一部が周囲に露出しているのみである⁹。一般に、機械受容器の軸索終末の横断面は扁平で、楕円形を示す(図2e)。axonal spinesは楕円形の長軸方向に形成されるという⁴⁰。このaxonal spinesの機能的な意義は完全に解明されていないが、周囲の膠原線維との局所解剖学的な位置関係(図2f)から¹⁴、この構造物は歯根膜膠原線維の変形を感受する場で、これによって歯根膜機械感覚が受容されることが容易に想像される。また、シュワン鞘表面にも無数のcaveoleが存在する(図2c)^{7, 12-14, 35}。さらに、軸索終末をおおうシュワン鞘の周囲には、成体では多層化を示す基底膜構造がみられる(図2a, d)。

光線顕微鏡および透過型電子顕微鏡による観察により、歯根膜ルフィニ神経終末が三次元的に複雑な構造をしていることは容易に想像される。Kannari¹³は電子顕微鏡下でパーソナルコンピュータを用いて、歯根膜ルフィニ神経終末の三次元立体復構を行ったが、画像解析装置の性能性から詳細な三次元像を得ることはできなかった。Takahashi-Iwanagaら⁴¹は水酸化ナトリウムを用いて歯根膜膠原線維を化学的に除去し、歯根膜ルフィニ神

経終末の立体構造を走査型電子顕微鏡下に描出することに成功した(図3a)。彼女らは軸索終末から伸び出る指状の軸索突起に加え、終末シュワン細胞から舌状の突起が伸びること(図3b)を明らかにし、この突起が歯根膜の主線維を抱え込んでいることから、歯根膜線維の伸展時に歯根膜ルフィニ神経終末の絶対的位置の保持に関与していると考察している。

歯根膜ルフィニ神経終末の神経可塑性

歯根膜は常に咬合力に暴露され、活発かつ恒常的な組織改造現象がおこっており、また歯根膜の膠原線維のターンオーバーは他の組織のもの5倍速いことが示されている⁴²⁻⁴⁴。このことは歯根膜中に含まれている歯根膜神経も組織改造現象に適応せざるを得ないことを意味する。また、実験的歯牙移動実験⁴⁵⁻⁴⁹、外傷性咬合付与実験^{50, 51}、歯牙再植実験⁵²により、歯根膜神経分布の再構築・再配列ならびに神経終末の形態変化が容易に生じることが明らかにされている。これらの事実は歯根膜神経が潜在的に高い神経可塑性を有していることを示唆する。

1990年以降、歯根膜神経の可塑性が注目され、上述の実験的研究に加え、神経の可塑性に関与する物質の検索が行われ、歯根膜ルフィニ神経終末における低親和性神経栄養因子受容体(low affinity nerve growth factor receptor; p75-NGFR)^{48, 53}やgrowth associated protein-43(GAP-43)⁵⁴の存在ならびに微細局在⁵⁵に関する報告がなされている。p75-NGFRならびにGAP-43は発生中や再生中の知覚神経系に出現し、神経の発生・再生過程に重要な役割を果たすが、成熟神経組織ではその合成は低下または停止することが知られている⁵⁴。しかしながら、歯根膜ルフィニ神経終末では成熟歯根膜組織においてもこの2種のタンパクが発現している⁵⁵。

p75-NGFRはすべての神経栄養因子と結合可能な受容体であるが、神経栄養効果の生物学的機能を惹起することはできず、局所の神経栄養因子濃度の保持にあたりと考えられている。成体歯根膜ではp75-NGFRの免疫反応は自由神経終末ではその細胞質に、歯根膜ルフィニ神経終末では軸索終末の細胞膜と終末シュワン細胞の細胞膜にも免疫反応が認められる⁵³。

一方、GAP-43は神経系細胞に出現するタンパク⁵⁴として記載されてきたが、歯根膜ルフィニ神経終末におけるGAP-43の免疫局在も他の組織における局在と異なり、歯根膜ルフィニ神経終末では軸索終末は免疫反応陰性で、軸索終末をおおうシュワン鞘のみが免疫反応陽性を示した⁵⁵。しかしながら、終末シュワン細胞の細胞体は免疫陰性を示した。非神経系細胞におけるGAP-43の出現に関する報告が数多くなされるようになっていくが、

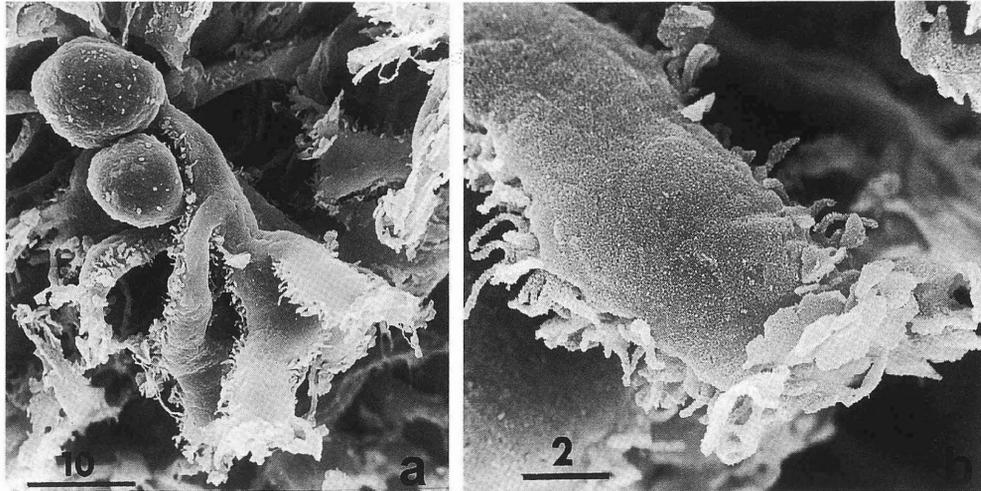


図3 化学的消化法による歯根膜ルフィニ神経終末の走査型電子顕微鏡像 (a) とその拡大 (b)。⁴¹⁾ (許可を得て転載)。

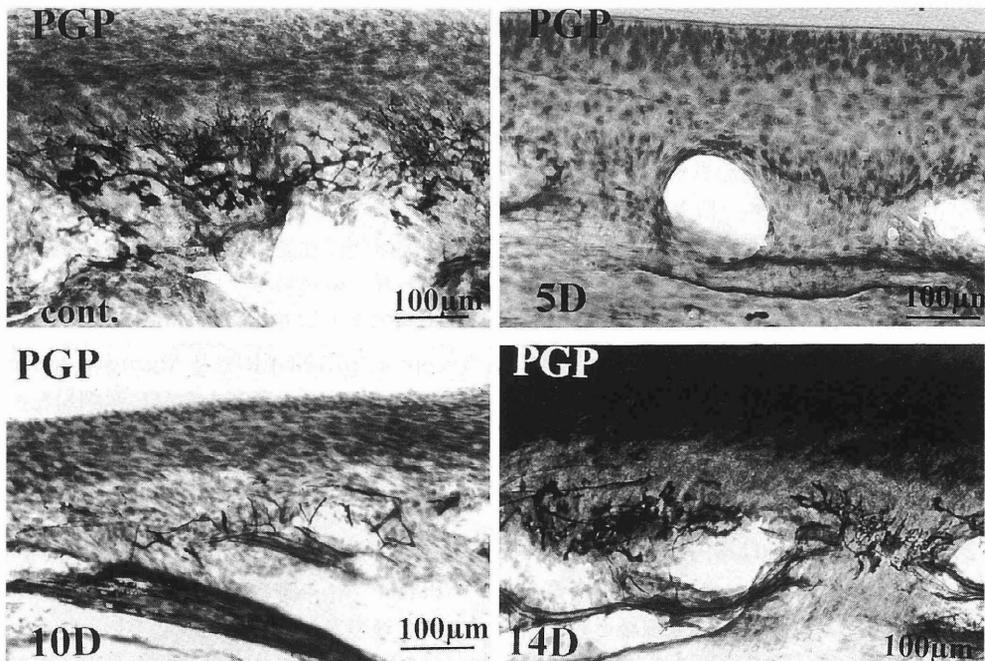


図4 下歯槽切断による歯根膜神経終末の形態変化⁶⁰⁾。protein gene product 9.5 (PGP) 免疫染色。cont: 対照群, 5D: 術後5日, 10D: 術後10日, 14D: 術後14日。(許可を得て転載)。

その存在意義には不明な点が多い。Hallら⁵⁶⁾とSchererら⁵⁷⁾はシュワン細胞の形態変化にこのタンパクが利用されるのではないかと述べていることから、歯根膜という特殊な場を考えるとこの考え方は受け入れやすい。一方、歯の実験的移動実験⁴⁶⁾、下歯槽神経傷害実験⁵³⁾では、GAP-43の免疫反応が一過性に軸索終末に観察されるようになり⁵⁸⁾、軸索終末の改造・再生現象にこのタンパクが関与していることが明らかにされている。

歯根膜ルフィニ神経終末の再生

末梢神経が損傷を受けると損傷部位から遠位側ではウォーラー変性が起こり、末梢神経の再生が起こる。Wakisakaらの研究グループ^{59, 60)}はラットの下歯槽神経を実験的に損傷させ、歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程を経日的に観察している(図4)。

下歯槽神経を露出させ、圧迫損傷を加えると、術後3日目でわずかに神経線維が残存するが、ほとんどの歯根膜神経は消失する。術後14日ではほぼ正常な動物と同じような分布を示す用になるが、軸索終末の分岐状態は悪く、

分岐状態が正常な動物と同じようになるのはほぼ28日頃であった(図5)⁵⁹⁾。一方、下歯槽神経を切断すると、切断後3-5日で歯根膜の神経線維はほとんど消失し(図4b)、切断後5~7日目頃から再生した神経線維が徐々に認められるようになり、切断10日目以降は前述した圧迫損傷の場合と同じ傾向を示した(図4c, d, 5)。他組織の機械受容器の再生実験と比較すると、歯根膜ルフィニ神経終末の再生はきわめて早く生じることがわかる^{59, 60)}。

また、神経損傷時に起こる変化の一つに、神経調節物質の産生の変化が知られている。通常、神経ペプチドは歯根膜ルフィニ神経終末には存在しない。しかしながら、下歯槽神経の障害により、一過性にneuropeptide Y (NPY)が発現することが明らかにされている(図6)⁶¹⁻⁶³⁾。NPYは通常、末梢神経系では交感神経の節後線維に含まれ、知覚神経には存在しないとされる。しかしながら、末梢知覚神経の損傷が起こると、知覚神経節の大型から中型の神経細胞にこのNPYの一過性の発現が認められ⁶⁴⁾、下歯槽神経の損傷でも三叉神経節に同様の変化が生じる⁶⁵⁾。下歯槽神経を損傷させると、歯根膜では圧迫損傷や切断後

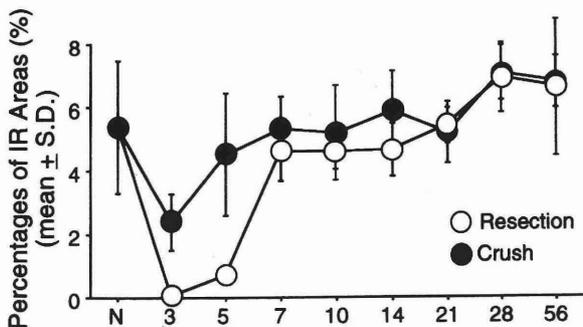


図5 下歯槽神経損傷による歯根膜神経分布密度の経日的変化⁷⁾。Crush: 圧迫損傷, Resection: 切断損傷。N: 対照群。(許可を得て転載)。

3日目頃からNPY陽性神経が出現し、14日目になると再生した歯根膜ルフィニ神経終末にNPYの発現が認められるようになった。その後、NPY陽性神経は徐々に減少し、神経損傷後56日目ではほとんど消失した。このNPYの変化は下歯槽神経の損傷によって神経線維が再生を開始したときに出現し始め、再生神経線維がほぼ正常な分布を示すようになると、最大になることを示している。NPYの知覚神経再生過程における機能には不明な点が多く残されているが、歯根膜ルフィニ神経終末の再生に何らかの関わりを有していることが考えられる。

さらに熱ショックタンパク (heat shock protein; Hsp) の一つであるHsp25が歯根膜ルフィニ神経終末の再生時に軸索終末、終末シュワン細胞に一過性に発現し、再生現象が進行するにつれ、その発現が消失することが最近明らかにされた⁶⁶⁾。

歯根膜ルフィニ神経終末の発生

ヒトを含め哺乳類は哺乳による乳児期を経て、咀嚼にて摂食を営むようになる。すなわち、吸啜から咀嚼への機能変換が行われる。この移行期には歯の萌出現象があり、このことは歯根膜という感覚受容の場が誕生することを意味する。生理学的には、吸啜から咀嚼への機能変換には中枢神経系の成熟化とともに歯の萌出現象と末梢神経系の発達の間接的関与が示唆されている⁶⁷⁻⁶⁹⁾。しかしながら、これまで歯根膜ルフィニ神経終末の発生・成熟過程に関する形態学的知見は少なく、わずかにNakakura-Ohshimaら^{35, 70)}のラット切歯歯根膜ルフィニ神経終末の生後発育を歯の萌出現象・咬合の成立過程に注目した免疫細胞化学的研究があるのみである。

歯根膜ルフィニ神経終末は細い自由神経終末を思わせる構造として歯根膜に出現する(図7a, b)。生後4日でも切歯は口腔内に露出していないが、歯根膜中の細胞成分、膠原線維量とともに神経線維の量も増し、歯根膜

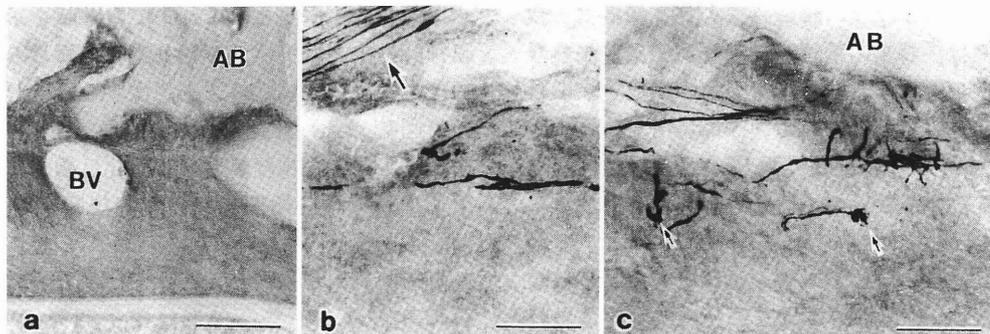


図6 ラット切歯歯根膜におけるneuropeptide Y (NPY) 陽性神経⁶¹⁾。a: 無処置群, b, c: 下歯槽神経傷害後の歯根膜に進入する神経束(b)と歯根膜(c)におけるNPY免疫活性の発現。大阪大学大学院脇坂聡教授の好意による。AB: 歯槽骨, BV: 血管。(許可を得て転載)。

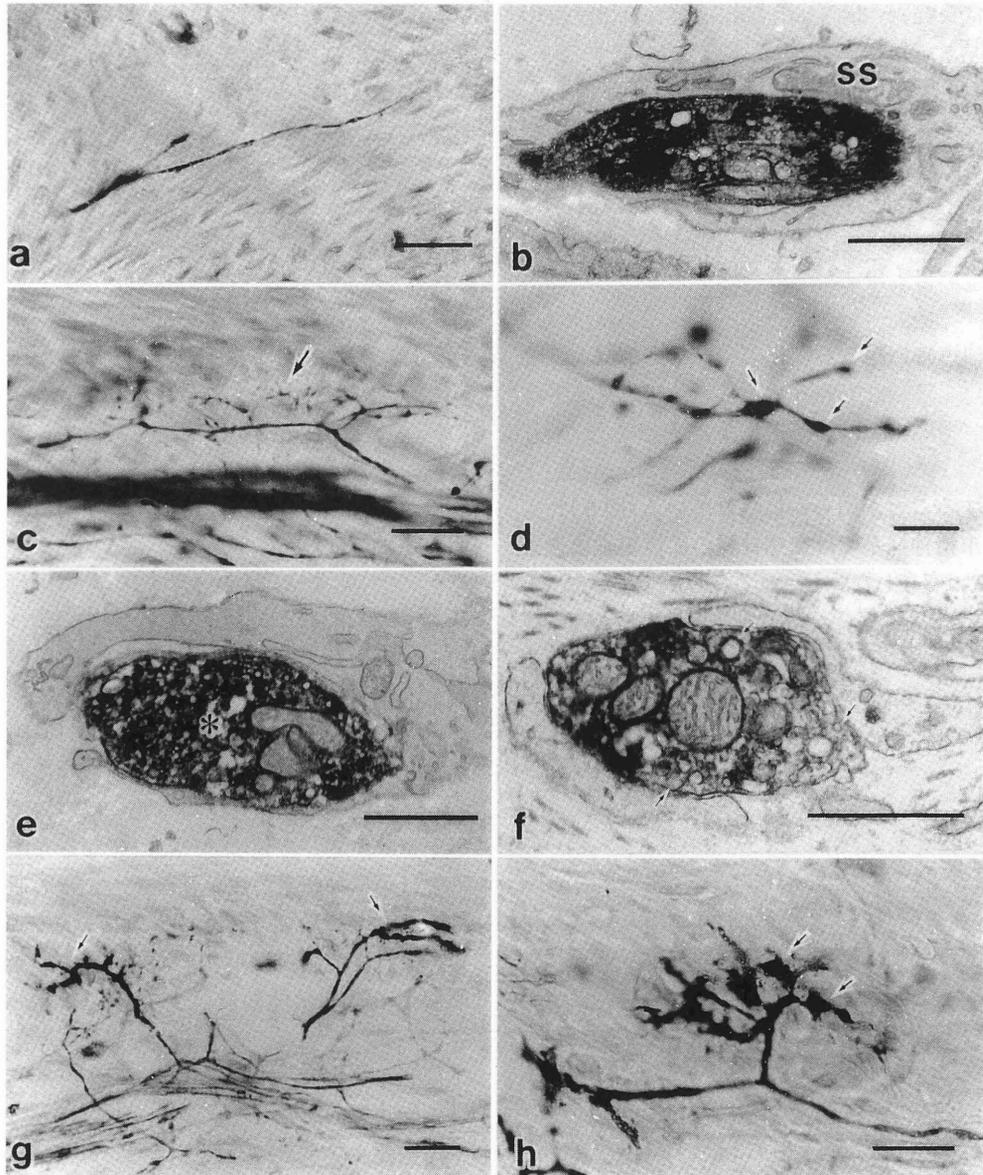


図7 ラット切歯歯根膜神経の生後発育の光顕像 (a, c, d, g, h) と免疫電顕像 (b, e, f)^{35, 70)}。protein gene product 9.5 (PGP) 免疫染色。a, b: 生後1日, c-f: 生後4日, g: 生後7日, h: 生後11日。(許可を得て転載)。

内で密な神経網を形成しはじめる。この神経網は成体歯根膜中で観察されるルフィニ神経終末の存在領域に一致する。このことは、将来の歯根膜神経支配領域に未熟なルフィニ神経終末が出現し、その後、終末の成熟がおこることを意味している。4日目興味深い所見はこの時期には歯根膜神経が分岐を繰り返す、樹枝状をとり(図7c)、その末端部に多くの数珠玉状構造を形成することである(図7d)。この膨隆部を電子顕微鏡下で観察してみると、複数のシュワン鞘が軸索を覆うようになる(図7e, f)。しかしながら、成熟した軸索終末とは異なり、axonal spinesの形成はまだ認められず、(図6e, f)。しかし、その中には大小さまざまな大きさの多数の小胞構造が観察され(図7f)、この構造は成長円錐を想

像させる。

切歯が萌出すると、これまで数珠状を示していた歯根膜神経の末端は棍棒状や釣り鐘状に膨らみ、光線顕微鏡的にもルフィニ神経終末を想像させる神経終末が出現する(図7g, h)。さらに、切歯間で咬合が確立されると歯根膜ルフィニ神経終末の成熟化は劇的に進行する。上下切歯の咬合開始期になると歯根膜ルフィニ神経終末は、より激しい樹枝状の分枝を示し、外形が不整な膨大した神経終末が多数みられるようになる。この光線顕微鏡でみられる不整な外形は電子顕微鏡下ではaxonal spineにほかならない(図7h)。臼歯咬合開始期になると、歯根膜ルフィニ神経終末の数、分布密度はさらに増加し、成体とほぼ同じとなる。axonal spinesもよく発達

し、この突起は複雑に分岐し、三次元的な広がりを示すようになる。このことを反映して光線顕微鏡レベルでも終末末端部にはおびただしい微小突起が観察されるようになる。このことは歯根膜ルフィニ神経終末では歯の萌出直後からその数の増加・成熟が急激に進行し、成熟過程には歯の萌出・咬合による機能刺激が密接に関わっている可能性を示唆している^{35, 70)}。

一方、機械受容器の興奮にはカルシウムイオンが関与しており⁷¹⁻⁷⁴⁾、このカルシウムイオンと高い親和性で結合するカルシウム結合タンパクが歯根膜ルフィニ神経終末に含むことが報告された⁷⁵⁻⁷⁸⁾。Asahitoら⁷⁹⁾はこれらカルシウム結合タンパクの中でも歯根膜ルフィニ神経終末に最も豊富に含まれるcalretinin (CR) に対する抗体を用いて、その生後発育過程を検索した。その結果、ルフィニ神経終末が形成された後、軸索終末にCRが発現し、咬合開始後、CR陽性線維の数が倍増することが明らかとなった。このCRの急激な増加は、歯根膜-咬筋反射の生後発育過程における咬筋から記録されたインパルス比とほぼ同じ(図8)であり、歯根膜ルフィニ神経終末の機能発現は形態形成終了後に起こることが示唆された。

皮膚機械受容器の発生過程にはシュワン細胞が重要な役割を果たしていることはよく知られている。しかしながら、歯根膜ルフィニ神経終末の終末シュワン細胞の生後発育は不明であった。Hayashiら⁸⁰⁾は終末シュワン細胞のマーカートンパクのひとつである非特異的コリンエステラーゼの酵素組織化学とS-100タンパクとprotein gene product 9.5 (PGP9.5) の免疫染色を用いて、終末シュワン細胞の生後発育を検討した。この研究によれば、終末シュワン細胞は将来歯根膜ルフィニ神経終末が配置される領域でクラスターの形成を行い、そこに軸索が伸展し、終末シュワン細胞と摂食後、軸索終末の成長が起こることを明らかにした。終末シュワン最奥の集積領域への軸索の伸展機構および軸索終末の膨大機構は未だ不

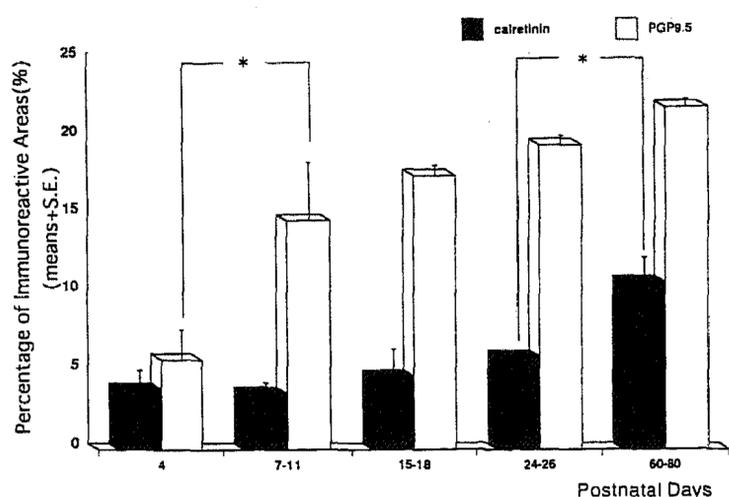


図8 生後発育におけるPGP 9.5陽性 (PGP9.5) とcalretinin陽性歯根膜神経の分布密度の経日的変化⁷⁹⁾。(許可を得て転載)。

明であるが、歯根膜ルフィニ神経終末とシュワン細胞には高親和性神経栄養因子受容体の一つであるTrkB^{80, 81)}と低親和性神経栄養因子受容体であるp75-NGFRが発現している^{48, 53)}ことから、歯根膜ルフィニ神経終末の発生に神経栄養因子・神経栄養因子受容体系が関与することが示唆される。

神経栄養因子と歯根膜ルフィニ神経終末の再生・発生過程

神経栄養因子は末梢ならびに中枢神経系で神経の発生、生存、再生、維持過程に重要な役割を果たしている⁸³⁻⁸⁸⁾。脳由来神経栄養因子 (brain derived neurotrophic factor; BDNF) は知覚神経に必須の神経栄養因子とみなされている⁸⁹⁻⁹²⁾。BDNFのノックアウトマウスの解析ではBDNFの消失により、知覚神経の欠損や減少が知られ、三叉神経節では大型の神経細胞の数の減少^{88-90, 92, 93)}、さらに皮膚機械受容器の消失^{92, 95-97)}が報告されている。これらの所見はBDNFが機械受容器の発生、生存、再生、維持過程に関与していることを想像させる。さらに、歯根膜ルフィニ神経終末がBDNFのリガンドであるTrkB^{80, 81)}ならびにp75-NGFR^{48, 53)}が発現していることが明らかにされていることから、歯根膜ルフィニ神経終末の発生、生存、再生、維持過程に関与している可能性が指摘されてきた。

我々はヘテロ型BDNFノックアウトマウスを繁殖、飼育させ、免疫細胞化学的手法を用いて歯根膜ルフィニ神経終末の形態学的解析をすすめている。なお、ヘテロ型マウスの血清中のBDNF濃度は野生型の約50%で、ホモ型は検出されないレベルにあることが報告されている⁹⁸⁾。また、ホモ型マウスは生後3週間しか生存できないことも示されている。

Alkharmahら⁹⁹⁾はヘテロ型BDNFノックアウトマウスの歯根膜ルフィニ神経終末の形成状態を免疫組織化学的手法ならびに画像解析法を用いて検討し、同腹の野生型マウスに比べ、神経分布密度で約20%の減少が生じること、I型ルフィニ神経終末の低形成、すなわち軸索終末に存在するaxonal spinesの消失、さらに軸索終末分岐の減少が起こることを明らかにし、BDNFが歯根膜ルフィニ神経終末の発生および成熟過程に関与していることを形態学的に示した。

最近、Haradaら¹⁰⁰⁾はAtsumiら¹⁰¹⁾の下歯槽神経切断モデルに従い、BDNFヘテロ型遺伝子欠損マウスの下歯槽神経切断後における歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程を免疫細胞化学的に検索した。その研究結果によれば、実験群では野生型とヘテロ型マウスの歯根膜ルフィニ神経終末は、下歯槽神経切断3日後にほとんど消失した。神経切断後7日から10日にかけて、野生型およびヘテロ

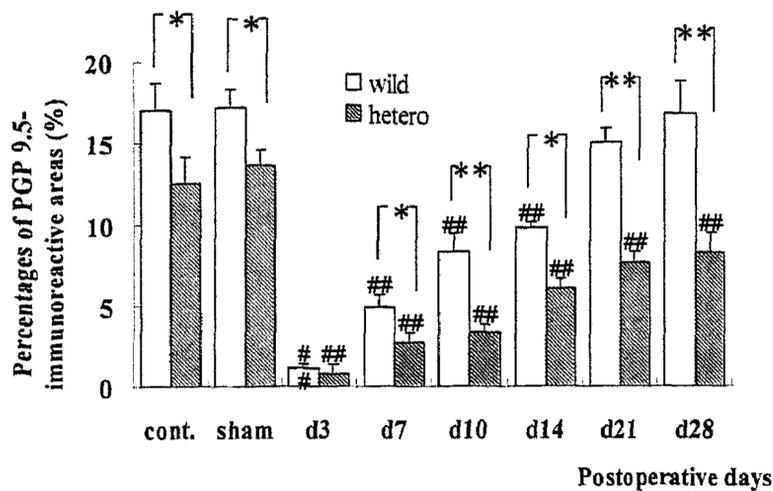


図9 下歯槽神経切断時における野生型 (wild) マウスとBDNFヘテロ型 (hetero) ノックアウトマウス下顎切歯歯根膜再生神経の分布密度の経日的変化¹⁰⁰⁾。cont: 対照群, sham: 偽処置群。*, #: $P < 0.05$, **, ##: $P < 0.01$ 。(許可を得て転載)。

型マウスの両群でともに歯根膜神経線維が再生し始めたが、歯根膜神経線維は細く、しばしば数珠状を呈し、ヘテロ型の神経分布密度は、野生型に比べ有意に低い値を示した。神経切断後14日の野生型マウスでは、ルフィニ神経終末に特徴的な樹枝状に分岐し膨大した終末構造が認められ、また神経分布密度は増加した。一方、ヘテロ型マウスでは歯根膜神経の経日的な増加を認めたが、神経線維は依然として数珠状で分岐程度に乏しく、神経分布密度は野生型マウスに比べ有意に低かった。神経切断後21日から28日の野生型マウスの歯根膜ルフィニ神経終末は形態学的に再生を完了し、sham群との間の神経分布密度に有意差を認めなかった。一方、ヘテロ型マウスでも膨大した終末構造は観察されたが、野生型に比べ分岐の程度は乏しく、神経切断後28日においてもPGP 9.5免疫陽性神経の分布密度はsham群の約60%であったという(図9)。Haradaら¹⁰⁰⁾の研究結果はBDNFの減少により歯根膜ルフィニ神経終末の再生遅延が引き起こされることが明らかにし、歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程においてBDNFが重要な役割を果たしていることを強く示唆している。

一方、Hoshinoら¹⁰²⁾はBDNF遺伝子欠損(ホモ型、ヘテロ型)マウスおよび野生型マウスにおける歯根膜ルフィニ神経終末の発達過程における役割を検討した。生後1週のすべての遺伝子型のマウスでは歯根膜神経線維は数珠状を呈し、ルフィニ神経終末様構造は存在しなかった。生後2週になると、全ての遺伝子型マウスで神経分布密度は上昇したが、いずれの遺伝子型マウスにおいても、神経終末はルフィニ神経終末に特徴的な形態を示さなかったが、生後3週までに野生型とヘテロ型マウスは、ルフィニ神経終末を发育させた。しかしながら、ホモ型マウスの歯根膜では、ほとんどルフィニ神経終末を観察することはできなかつた。さらに彼女らは歯根膜神経の

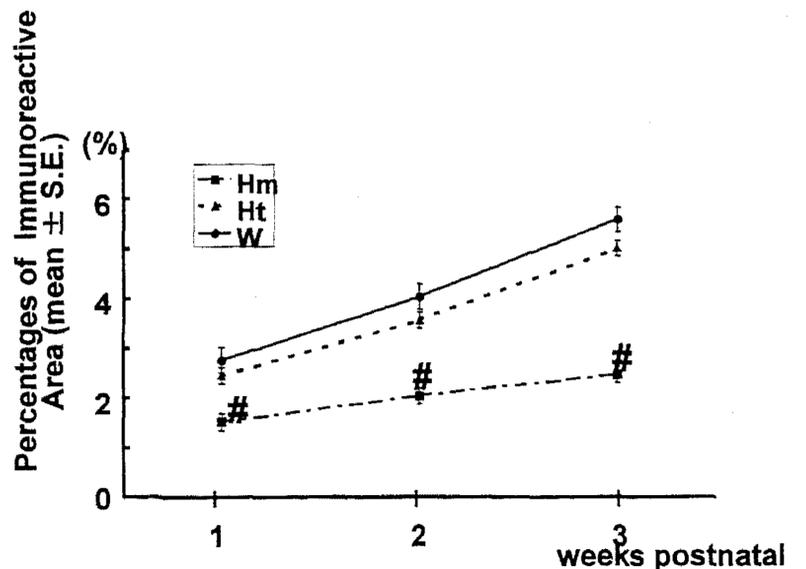


図10 野生型(W)マウス、BDNFヘテロ型(Ht)およびホモ型(Hm)ノックアウトマウス歯根膜神経の分布密度の経日的変化¹⁰²⁾。#: $p < 0.05$ 。(許可を得て転載)。

生後发育過程における神経分布密度の変化を統計学的に解析し、同一の生後期間における歯根膜中神経の分布密度はホモ型マウスが最も有意差をもって低い値を示したが、生後1週から3週にかけて、野生型とヘテロ型マウスの間に有意差は認めなかったと報告している(図10)。このHoshinoらの研究結果¹⁰²⁾も歯根膜ルフィニ神経終末の成熟過程にBDNFが関与していることを強く示唆している。しかしながら、Haradaら¹⁰⁰⁾およびHoshinoら¹⁰²⁾の研究結果からは歯根膜ルフィニ神経終末の再生過程ならびに初期成熟過程にTrkBと結合可能な他の神経栄養因子も関与していることが想像される。この点については今後の研究の進展が期待される。

おわりに

本総説では歯根膜機械受容器として必須のルフィニ神経終末の構造ならびに発生・再生過程について述べた。歯根膜という場は臨床的にも重要な場として位置づけられ、またその中に含まれる神経要素は“摂食・咀嚼”という生物の基本的な行動に密接な関係を有している。歯根膜神経支配の形態学的研究はかなり進展しているものの、歯根膜神経の発生・再生過程に関する成長因子の関わり、分子レベルでの制御機構は残念ながらほとんど解明されていない。今後はこの分野の研究の進展が望まれる。

謝 辞

稿を終わるにあたり、これら一連の研究を遂行するにあたり多大な協力を得た新潟大学大学院医歯学総合研究科摂食環境制御学講座顎顔面解剖学分野(旧歯学部口腔解剖学第二講座)教室員、講座に所属した諸兄ならびに

大学院生に感謝の意を表す。これらの研究の一部は科学研究費補助金 (63440069, 03454421, 05454488, 08457478, 12470382, 14370580), 学術フロンティア事業経費および平成12年度新潟大学プロジェクト推進経費 (学術的プロジェクトB) の補助を受けた。

文 献

- 1) Hannam, A. G. : The innervation of the periodontal ligament. In the periodontal ligament in health and disease, ed. Berkovitz, B. K. B., Moxham, B. J., Matthews, B., p. 173-196, Pergamon Press, Oxford, 1982.
- 2) Matthews, B. : Mastication. In applied physiology of mouth, ed. Lanelle, C. L. B., p. 199-242, Wrights, Bristol, 1975.
- 3) Taylor, A. : Neurophysiology of the jaws and teeth, Macmillan Press, London, 1990.
- 4) Byers, M. R. and Maeda, T. : Periodontal innervation : Regional specializations, ultrastructure, cytochemistry and tissue interactions. *Acta Med. Dent. Helv.*, 2 : 116-133, 1997.
- 5) 前田健康, 大島勇人 : 歯根膜ルフィニ神経終末の形態学的基盤. *解剖誌*, 73 : 119-134, 1998.
- 6) Maeda, T., Iwanaga, T., Takahashi, Y., Fujita, T. and Kobayashi, S. : Distribution of nerve fibers immunoreactive to neurofilament protein in rat molars and periodontium. *Cell Tiss. Res.*, 24 : 13-23, 1987.
- 7) Maeda, T., Ochi, K., Nakakura-Ohshima, K., Youn, S. H. and Wakisaka, S. : The Ruffini ending as the primary mechanoreceptor in the periodontal ligament : its morphology, cytochemical features, regeneration, and development. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 10 : 307-327, 1999.
- 8) Schroeder, H. E. : Periodontal ligament : In handbook of microscopic anatomy, ed. Oksche, A. and Vollrath, L., Vol. V/5, p. 170-233, Springer-Verlag, Berlin-Hederberg-New York, 1986.
- 9) Chambers, M. R., Andres, K. H., von Düring, M. and Iggo, A. : The structure and function of the slowly adapting type II mechanoreceptor in hairy skin. *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.*, 57 : 417-445, 1972.
- 10) Biemesderfer, D., Munger, B. L., Binck, J. and Dubner, R. : The pilo-Ruffini complex : a non-sinus hair and associated slowly-adapting mechanoreceptor in primate facial skin. *Brain Res.*, 142 : 197-222, 1978.
- 11) Beertsen, W., Everts, V. and van den Hoof, A. : Fine structure and possible function of cells containing leptomeric organelles in the periodontal ligament of rat incisor. *Arch. Oral Biol.*, 19 : 1099-1100, 1974.
- 12) Byers, M. R. : Sensory innervation of periodontal ligament of rat molars consists of unencapsulated Ruffini-like mechanoreceptors and free nerve endings. *J. Comp. Neurol.*, 231 : 500-518, 1985.
- 13) Kannari, K. : Sensory receptors in the periodontal ligament of hamster incisors with special reference to the distribution, ultrastructure and three-dimensional reconstruction of Ruffini endings. *Arch. Histol. Cytol.*, 53 : 559-573, 1990.
- 14) Kannari, K., Sato, O., Maeda, T., Iwanaga, T. and Fujita, T. : A possible mechanism of mechanoreception in Ruffini endings in the periodontal ligament of hamster incisors. *J. Comp. Neurol.*, 313 : 368-376, 1991.
- 15) Maeda, T., Kannari, K., Sato, O. and Iwanaga, T. : Nerve terminals in human periodontal ligament as demonstrated by immunohistochemistry for neurofilament protein (NFP) and S-100 protein. *Arch. Histol. Cytol.*, 53 : 259-265, 1990.
- 16) Maeda, T., Sato, O., Kobayashi, S., Iwanaga, T. and Fujita, T. : The ultrastructure of Ruffini endings in the periodontal ligament of rat incisors with special reference to the terminal Schwann cells (K-cells). *Anat. Rec.*, 223 : 95-103, 1989.
- 17) Sato, O., Maeda, T., Iwanaga, T. and Kobayashi, S. : Innervation of the incisors and periodontal ligament in several rodents : An immunohistochemical study of neurofilament protein and glia-specific S-100 protein. *Acta Anat.*, 134 : 94-99, 1989.
- 18) Sato, O., Maeda, T., Kannari, K., Kawahara, I., Iwanaga, T. and Takano, Y. : Innervation of periodontal ligament in the dog with special reference to the morphology of Ruffini endings. *Arch. Histol. Cytol.*, 55 : 21-30, 1992.
- 19) Sato, O., Maeda, T., Kobayashi, S., Iwanaga, T., Fujita, T. and Takahashi, Y. : Innervation of periodontal ligament and dental pulp in the rat incisor : An immunohistochemical investigation of neurofilament protein and glia-specific S-100

- protein. *Cell Tiss. Res.*, 251 : 13-21, 1988.
- 20) Ruffini, A. : Osservazioni critiche allo studio del dott. Andrea Rossi sulle terminazioni nervose di senso della pella dell'uomo. *Arch. Internatz.*, 11 : 16, 1893.
- 21) 佐野 豊 : 神経科学. 形態学的基礎I. ニューロンとグリア, 第1版, 金芳堂, 京都, 1995.
- 22) Sfamenti, P. : Gli organi nervosi terminali del Ruffini ed I corpuscol : del Pacini studiati nelle piante e nei polpastrelli del cane, del gatto e della scimia. *Bull. R. Accad. Sci. Torino*, 2 : 64-80, 1990.
- 23) Dubner, R., Sessle, B. J and Storey, A. T. : The neural basis of oral and facial function. Plenum Press, New York, 1978.
- 24) Pfaffmann, C. : Afferent impulses from the teeth due to pressure and noxious stimulation. *J. Physiol. (Lond.)*, 97 : 207-219, 1939.
- 25) Pfaffmann, C. : Afferent impulses from the teeth resulting from a vibratory stimulus. *J. Physiol. (Lond.)*, 97 : 220-232, 1939.
- 26) Lewinsky, W. and Stewart, D. : The innervation of the periodontal membrane of the cat with some observation on the function of the end organs found in that structure. *J. Anat.*, 71 : 232-235, 1973.
- 27) Cash, R. M and Linden, R. W. A. : The distribution of mechanoreceptors in the periodontal ligament of mandibular canine tooth of the cat. *J. Physiol. (Lond.)*, 330 : 439-447, 1982.
- 28) Linden, R., Millar, B. J. and Halata, Z. : Comparative physiological and morphological study of periodontal ligament mechanoreceptors represented in the trigeminal ganglion and the mesencephalic nucleus of the cat. *Anat. Embryol.*, 190 : 127-135, 1994.
- 29) Beaudreau, D. E. and Jerge, C. R. : Somatotopic representation in the gasserian ganglion of tactile peripheral fields in the cat. *Arch. Oral Biol.*, 13 : 247-256, 1968.
- 30) Byers, M. R. and Dong, W. K. : Comparison of trigeminal receptor location and structure in the periodontal ligament of different types of teeth from the rat, cat, and monkey. *J. Comp. Neurol.*, 279 : 117-127, 1989.
- 31) Jerge, C. R. : Organization and function of the trigeminal mesencephalic nucleus. *J. Neurophysiol.*, 26 : 379-392, 1963.
- 32) Marfurt, C. F. and Turner, D. F. : Sensory nerve endings in the rat orofacial region labeled by anterograde transganglionic transport of horseradish peroxidase. A new method for tracing peripheral nerve fibers. *Brain Res.*, 261 : 1-12, 1983.
- 33) Millar, J., Halata, Z. and Linden, R. W. A. : The structure of physiologically located periodontal ligament of mechanoreceptors of cat canine tooth. *J. Anat.*, 167 : 117-127, 1989.
- 34) Andres, K. H. and von Düring, M. : Morphology of cutaneous receptors. In handbook of sensory physiology. Somatosensory system. ed. Iggo, A., Vol. II, p. 3-28, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1972.
- 35) Nakakura-Ohashima, K., Maeda, T., Ohshima, H., Noda, T. and Takano, Y. : Postnatal development of periodontal Ruffini endings in rat incisors : An immunoelectron microscopic study using protein gene product 9.5 (PGP 9.5)-antibody. *J. Comp. Neurol.*, 362 : 551-564, 1995.
- 36) Maeda, T., Kannari, K., Sato, O., Kobayashi, S., Iwanaga, T. and Fujita, T. : Cholinesterase activity in terminal Schwann cells associated with Ruffini endings in the periodontal ligament of rat incisors. *Anat. Rec.*, 228 : 339-344, 1990.
- 37) Byers, M. R. and Yeh, Y. : Fine structure of subepithelial free and corpuscular trigeminal nerve endings in anterior hard palate of the rat. *Somatosensory Res.*, 1 : 265-279, 1984.
- 38) Saxod, R. : Development of origin of the Herbst analysis using cellular markers. *Dev. Biol.*, 32 : 167-178, 1973.
- 39) Spencer, P. S. and Schaumburg, H. H. : An ultrastructural study of the inner core of the Pacinian corpuscle. *J. Neurocytol.*, 2 : 217-235, 1973.
- 40) Munger, B. L. and Ide, C. : The structure and function of cutaneous sensory receptors. *Arch. Histol. Cytol.*, 51 : 1-34, 1988.
- 41) Takahashi-Iwanaga, H., Maeda, T. and Abe, K. : Scanning and transmission electron microscopy of Ruffini endings in the periodontal ligament of rat incisors. *J. Comp. Neurol.* 389 : 177-184, 1997.
- 42) Rippin, J. W. : Collagen turnover in the periodontal ligament under normal and altered functional forces. I. Young rat molars. *J. Periodont. Res.*, 11 : 101-107, 1976.
- 43) Skougard, M. R., Levy, B. M. and Simpson, J. :

- Collagen metabolism in skin and periodontal membrane of marmoset. *Scan. J. Dent. Res.*, 78 : 256-262, 1970.
- 44) Sodek, J. and Ferrier, J. M. : Collagen remodeling in rat periodontal tissues; compensation for precursor reutilization confirms rapid turnover of collagen. *Collagen Rel. Res.*, 8 : 11-21, 1988.
- 45) Furstman, L. and Bernick, S. : Clinical considerations of the periodontium. *Am. J. Orthod.* 61 : 138-155, 1972.
- 46) Kobayashi, H., Ochi, K., Saito, I., Hanada, K. and Maeda, T. : Alterations in ultrastructural localization of growth-associated protein-43 (GAP-43) in periodontal Ruffini endings of rat molars during experimental tooth movement. *J. Dent. Res.*, 77 : 503-517, 1998.
- 47) Kvinnsland, I. and Kvinnsland, S. : Changes in CGRP-immunoreactive nerve fibers during experimental tooth movement in rats. *Eur. J. Orthodont.*, 12 : 321-329, 1990.
- 48) Saito, I., Hanada, K. and Maeda, T. : Alteration of nerve growth factor-receptor expression in the periodontal ligament of the rat during experimental tooth movement. *Arch. Oral Biol.*, 38 : 923-929, 1993.
- 49) Saito, I., Ishii, K., Hanada, K., Sato, O. and Maeda, T. : Responses of calcitonin gene-related peptide-immunopositive nerve fibers in the periodontal ligament of rat molars to experimental tooth movement. *Arch. Oral Biol.*, 36 : 689-692, 1991.
- 50) Kvinnsland, I. and Heyeraas, K. J. : Effect of traumatic occlusion on CGRP and SP immunoreactive nerve fiber morphology in rat molar pulp and periodontium. *Histochemistry*, 97 : 111-120, 1992.
- 51) Sodeyama, T., Maeda, T., Takano, Y. and Hara, K. : Responses of periodontal nerve terminals to experimentally induced occlusal trauma in rat molars : An immunohistochemical study using PGP 9.5 antibody. *J. Periodont. Res.*, 31 : 235-248, 1996.
- 52) Yamada, H., Maeda, T., Hanada, K. and Takano, Y. : Re-innervation in the canine periodontal ligament of replanted teeth using an antibody to protein gene product 9.5 : an immunohistochemical study. *Endod. Dent. Traumatol.*, 15 : 221-234, 1999.
- 53) Byers, M. R. : Segregation of NGF-receptor in sensory receptors, nerves and local cells of teeth and periodontium demonstrated by EM-immunocytochemistry. *J. Neurocytol.*, 19 : 779-789, 1990.
- 54) Skene, J. H. P. : Axonal growth-associated proteins. *Ann. Rev. Neurosci.*, 12 : 127-156, 1989.
- 55) Maeda, T. and Byers, M. R. : Different localizations of growth-associated protein (GAP-43) in mechanoreceptors and free nerve endings of adult rat periodontal ligament, dental pulp and skin. *Arch. Histol. Cytol.*, 59 : 291-304, 1996.
- 56) Hall, S. M., Kent, A. P., Curtis, R. and Robertson, D. : Electron microscopic immunocytochemistry of GAP-43 within proximal and chronically denervated distal stumps of transected peripheral nerve. *J. Neurocytol.*, 21 : 820-831, 1992.
- 57) Scherer, S. S., Xu, Y-T., Roling, D., Wrabetz, L., Feltri, M. L. and Kamholz, J. : Expression of growth associated protein-43Kd in Schwann cells is regulated by axon-Schwann cell interactions and cAMP. *J. Neurosci. Res.*, 38 : 575-589, 1994.
- 58) Youn, S. H., Maeda, T., Kurisu, K. and Wakisaka, S. : Growth-associated protein-43 (GAP-43) in the regenerating periodontal Ruffini endings of the rat incisor following injury to the inferior alveolar nerve. *Brain Res.*, 787 : 41-48, 1998.
- 59) Wakisaka, S., Atsumi, Y., Youn, S. H. and Maeda, T. : Morphological and cytochemical characteristics of periodontal Ruffini ending under normal and regeneration processes. *Arch. Histol. Cytol.*, 63 : 91-113, 2000.
- 60) Hiroshima, K., Maeda, T., Hanada, K. and Wakisaka, S. : Calretinin-like immunoreactivity in the regenerating periodontal Ruffini endings of the rat incisor following injury to the inferior alveolar nerve. *Brain Res.*, 807 : 218-221, 1998.
- 61) Wakisaka, S., Youn, S. H., Kato, J., Takemura, M. and Kurisu, K. : Neuropeptide Y-like immunoreactive primary afferents in the dental pulp and periodontal ligament following peripheral nerve injury to the inferior alveolar nerve in the rat. *Brain Res.*, 712 : 11-18, 1996.
- 62) Wakisaka, S., Youn, S. H., Maeda, T. and Kurisu, K. : Immunoelectron microscopic analysis on

- neuropeptide Y in the periodontal ligament of rat incisor following peripheral nerve injury to the inferior alveolar nerve. *Brain Res.*, 729 : 259-263, 1996.
- 63) Youn, S. H., Sakuda, M., Kurisu, K. and Wakisaka, S. : Regeneration of periodontal primary afferents of the rat incisor following injury of the inferior alveolar nerve with special reference to neuropeptide Y-immunoreactive primary afferents. *Brain Res.* 752 : 161-169, 1997.
- 64) Wakisaka, S., Kajander, K. C. and Bennett, G. J. : Increased neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in rat sensory neurons following peripheral axotomy. *Neurosci. Lett.*, 124 : 200-203, 1991.
- 65) Sasaki, Y., Wakisaka, S. and Kurisu, K. : Effects of peripheral axotomy of the inferior alveolar nerve on the levels of neuropeptide Y in rat trigeminal primary afferent neurons. *Brain Res.*, 664 : 108-114, 1994.
- 66) Iijima, K., Harada, F., Hanada, K., Nozawa-Inoue, K., Aita, M., Atsumi, Y., Wakisaka, S. and Maeda, T. : Temporal expression of immunoreactivity for heat shock protein 25 (Hsp25) in the rat periodontal ligament following transection of the inferior alveolar nerve. *Brain Res.*, 979 : 146-152, 2003.
- 67) Moyers, R. E. : Development of the dentition and the occlusion. In handbook of orthodontics, 4th ed., p. 99-146, Year Book Medical Publishers Co., Chicago, 1973.
- 68) 飯沼 生 : イヌ離乳期の咀嚼機構に関する実験的研究. *小児歯誌*, 23 : 361-377, 1985.
- 69) 生野伸一 : 吸啜から咀嚼への移行期におけるイヌの咀嚼中枢の発達について. *小児歯誌*, 27 : 595-606, 1989.
- 70) Nakakura-Ohshima, K., Maeda, T., Sato, O. and Takano, Y. : Postnatal development of periodontal innervation in rat incisors : An immunohistochemical study using protein gene product 9.5 antibody. *Arch. Histol. Cytol.*, 56 : 385-398, 1993.
- 71) Blastein, M. P. : Calcium transport and buffering in neurons. *Trend Neurosci.*, 11 : 438-443, 1988.
- 72) Baimbrigge, K. G., Celio, M. R. and Roger, J. H. : Calcium binding proteins in nervous system. *Trends Neurosci.*, 15 : 303-308, 1992.
- 73) Tachibana, T. and Nawa, T. : Ultrastructural localization of Ca²⁺-ATPases in Meissner's corpuscle of the mongolian gerbil. *Arch. Histol. Cytol.*, 55 : 375-379, 1992.
- 74) Tachibana, T., Nawa, T., Mizuhira, V. and Yoshida, Y. : Ultrastructural localization of calcium in mechanoreceptors of the oral mucosa. *J. Neurophysiol.*, 21 : 745-753, 1992.
- 75) Ichikawa, H., Deguchi, T., Nakago, T., Jacobowitz, D. M. and Sugimoto, T. : Parvalbumin, calretinin and carbonic anhydrase in the trigeminal and spinal primary neurons of the rat. *Brain Res.*, 655 : 241-245, 1994.
- 76) Ichikawa, H., Jacobowitz, D. M. and Sugimoto, T. : Coexpression of calretinin and parvalbumin in Ruffini-like endings in the rat incisor periodontal ligament. *Brain Res.*, 770 : 294-297, 1997.
- 77) Ichikawa, H., Xia, C., He, Y-F. and Sugimoto, T. : Parvalbumin-immunoreactive nerve endings in the periodontal ligaments of rat teeth. *Arch. Oral Biol.*, 41 : 1087-1090, 1996.
- 78) Ochi, K., Wakisaka, S., Youn, S. H., Hanada, K. and Maeda, T. : Calretinin-like immunoreactivity in the Ruffini endings, slowly adapting mechanoreceptors, of the periodontal ligament of rat incisor. *Brain Res.*, 769 : 183-187, 1997.
- 79) Asahito, T., Ohshima, H., Hanada, K., Wakisaka, S. and Maeda, T. : Postnatal expression of calretinin-immunoreactivity in periodontal Ruffini endings in the rat incisor : a comparison with protein gene product 9.5 (PGP 9.5)-immunoreactivity. *Arch. Histol. Cytol.*, 62 : 57-69, 1999.
- 80) Hayashi, S., Nakakura-Ohshima, K., Ohshima, H., Noda, T., Honma, S., Wakisaka, S. and Maeda, T. : The development of terminal Schwann cells associated with periodontal Ruffini endings in the rat incisor ligament. *Brain Res.*, 858 : 167-71, 2000.
- 81) Ochi, K., Saito, I., Hanada, K. and Maeda, T. : Expression of TrkB-like immunoreactivity in non-neural cells of rat periodontal ligament. *Arch. Oral Biol.*, 42 : 455-464, 1997.
- 82) Atsumi, Y., Hayashi, S., Nakakura-Ohshima, K., Maeda, T., Kurisu, K. and Wakisaka, S. : Heterogeneous localizations of Trk B among individual periodontal Ruffini endings in the rat incisor. *Arch. Histol. Cytol.*, 62 : 435-440, 1999.

- 83) Barde, Y. A. : The nerve growth factor family. *Prog. Growth Factor Res.*, 2 : 237-428, 1990.
- 84) Richardson, P. M. : Neurotrophic factors in regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 1 : 401-406, 1991.
- 85) Bothwell, M. : Keeping track of neurotrophin receptors. *Cell*, 65 : 915-918, 1991.
- 86) Bothwell, M. : Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annl. Rev. Neurosci.*, 18 : 223-253, 1995.
- 87) Chao, M. V. : Neurotrophin receptors : a window into neuronal differentiation. *Neuron*, 9 : 583-593, 1992.
- 88) Meakin, S. O. and Shooter, E. M. : The nerve growth factor family of receptors. *Trends. Neurosci.*, 15 : 323-331, 1992.
- 89) Jones, K. R., Farinas, I., Backus, C. and Reichardt, L. F. : Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell*, 76 : 989-999, 1994.
- 90) Ernfors, P., Lee, K. F. and Jaenisch, R. : Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature*, 368 : 147-150, 1994.
- 91) Ernfors, P., Kucera, J., Lee, K. F., Loring, J. and Jaenisch, R. : Studies on the physiological role of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in knockout mice. *Int. J. Dev. Biol.*, 39 : 799-807, 1995.
- 92) Ernfors, P., Van De Water, T., Loring, J. and Jaenisch, R. : Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. *Neuron*, 14 : 1153-1164, 1995.
- 93) Ernfors, P., Lee, K. F., Kucera, J. and Jaenisch, R. : Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell*, 77 : 503-512, 1994.
- 94) Liu, X., Ernfors, P., Wu, H. and Jaenisch, R. : Sensory but not motor neuron deficits in mice lacking NT4 and BDNF. *Nature*, 375 : 238-241, 1995.
- 95) Fundin, B. T., Silos-Santiago, I., Ernfors, P., Fagan, A. M., Aldskogius, H., DeChiara, T. M., Phillips, H. S., Barbacid, M., Yancopoulos, G. D. and Rice, F. L. : Differential dependency of cutaneous mechanoreceptors on neurotrophins, trk receptors, and P75 LNGFR. *Dev. Biol.*, 190 : 94-116, 1997.
- 96) Liebl, D. J., Tessarollo, L., Palko, M. E. and Parada, L. F. : Absence of sensory neurons before target innervation in brain-derived neurotrophic factor-, neurotrophin 3-, and TrkC-deficient embryonic mice. *J. Neurosci.*, 17 : 9113-9121, 1997.
- 97) Carroll, P., Lewin, G. R., Koltzenburg, M., Toyka, K. V. and Thoenen, H. : A role for BDNF in mechanosensation. *Nat. Neurosci.*, 1 : 42-46, 1998.
- 98) Bianchi, L. M., Conover, J. C., Fritsch, B., DeChiara, T., Lindsay, R. M. and Yancopoulos, G. D. : Degeneration of vestibular neurons in late embryogenesis of both heterozygous and homozygous BDNF null mutant mice. *Development*, 122 : 1965-1973, 1996.
- 99) Alkhamrah, B. A., Hoshino, N., Kawano, Y., Harada, F., Hanada, K. and Maeda, T. : The periodontal Ruffini endings in the brain derived neurotrophic factor (BDNF) deficient mice. *Arch. Histol. Cytol.*, 66 : 73-81, 2003.
- 100) Harada, F., Hoshino, N., Hanada, K., Kawano, Y., Atsumi, Y., Wakisaka, S. and Maeda, T. : The involvement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the regeneration of periodontal Ruffini endings following transection of the inferior alveolar nerve. *Arch. Histol. Cytol.*, 66 : 183-194, 2003.
- 101) Atsumi, Y., Imai, T., Matsumoto, K., Sakuda, M., Kurisu, K. and Wakisaka, S. : Effects of neonatal injury of the inferior alveolar nerve on the development and regeneration of periodontal nerve fibers in the rat incisor. *Brain Res.*, 871 : 201-209, 2000.
- 102) Hoshino, N., Harada, F., Alkhamrah, B. A., Aita, M., Kawano, Y., Hanada, K. and Maeda, T. : Involvement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the development of periodontal Ruffini endings. *Anat. Rec.*, 274A : 807-816, 2003.