

舌乾燥ラットの延髄に出現する活性型アストロサイトの分布様式

小野 瀬 弘 記

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻
(指導: 岩田幸一 教授, 篠田雅路 准教授)

要旨: 舌乾燥あるいはシャム処置を施したラットの舌に対して isoflurane 浅麻酔下で機械刺激を与え, HWRT を測定した結果, 舌の機械刺激に対する HWRT は, シャム群に比べ乾燥群の方が, 有意に低い値を示した。三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) においては, 深層部に比較して表層部により多くの GFAP 陽性細胞が観察された。NTS においては, 乾燥群およびシャム群共に中心管の背側部に両側性に出現した。三叉神経第 I 枝領域においては, obex から尾側へ 5,040 μm までのどの領域においても多くの GFAP 陽性細胞を認めた。乾燥群において GFAP 陽性細胞は obex から 2,160 μm 尾側領域でピークを示し, それより尾側に行くにしたがって減少していた。三叉神経第 II 枝領域では obex から 1,440 μm 尾側部領域にピークを示していた。三叉神経第 III 枝領域における GFAP 陽性細胞は, obex から尾側へ 2,160 μm のレベルにおいてピークを示していた。NTS における分布様式は Vc および上部頸髄 (C1/C2) 領域とは異なり, 吻側から尾側にかけてほぼ均一な出現パターンを示していた。以上から, Vc に出現した活性型アストロサイトは舌乾燥によって引き起こされる舌の機械痛覚過敏発症に関与するのに対し, NTS の活性型アストロサイトは舌乾燥に関連する様々な自律神経系応答に関与する可能性が示された。

キーワード: 口腔乾燥, 舌痛, アストロサイト, 三叉神経脊髄路核尾側亜核, 上部頸髄

緒 言

口腔は食物摂取, 発話あるいは呼吸など, 他の臓器にはない複数の特殊な機能を有している。このような口腔の機能を正常に維持するためには, 口腔粘膜が湿潤な状態である必要がある。口腔粘膜は乾燥状態におかれると損傷を受ける。口腔粘膜の乾燥は, 粘膜の損傷だけでなく, 乾燥した口腔粘膜を支配する神経線維に対しても障害を与える可能性がある。

過去の多くの研究により, 神経が損傷を受けると, 損傷神経には高頻度スパイク発射を示す損傷電位が誘導されることが報告されている¹⁻⁴⁾。損傷電位に引き続き一次ニューロンには高頻度の自発活動が引き起こされ, ニューロンの活動性はさらに亢進する。このような損傷神経の過興奮が長期間にわたって持続すると, 神経節細胞においてサイトカインや神経ペプチドの合成が進む⁵⁻⁸⁾。神経節細胞における様々な物質の合成亢進は末梢神経系の感作を誘導し, 神経興奮はさらに亢進する。末梢神経系の興奮性の増加は中枢神経系に伝えられ, 中枢神経系の興奮性の増大を引き起こすことが知られている⁹⁾。

口腔顔面領域における侵害情報は三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) および上部頸髄である C1/C2 領域, あるいは孤束核 (NTS) へと送られる¹⁰⁻¹³⁾。Vc および C1/C2 に存在する侵害受容ニューロンは活動性を増強させ, それに従って様々な分子の合成が進み, やがて感作され

る¹⁴⁾。このような Vc および C1/C2 の侵害受容ニューロンの興奮性の増強は, 結果的に口腔顔面領域にアロディニアや痛覚過敏を引き起こす^{11,15)}。侵害受容ニューロンが感作される過程で, 周辺領域に存在するミクログリアやアストログリアも活性化され, 侵害受容ニューロンに対して興奮性変化を及ぼすことが報告されている^{16,17)}。活性化されたグリア細胞はサイトカインをはじめとする様々な物質を合成し, 放出することが知られている¹⁸⁾。活性型グリア細胞から放出された物質は, NTS に存在するニューロンにも活動性変化を誘導することが報告されているが, その詳細は明らかにされていない。

また, Nakaya ら¹⁹⁾は舌乾燥ラットにおいて, 舌への機械あるいは熱刺激に対する頭部ひっこめ反射閾値を測定し, 機械刺激に対する閾値の低下はみられるものの, 熱刺激に対する閾値の低下はないと報告している。この結果は, 舌乾燥によって機械受容器の興奮性の亢進, それに引き続く Vc および C1/C2 ニューロン活動の活動性増強が引き起こされる可能性を示している。しかしながら, このような舌乾燥によって Vc および C1/C2 領域に誘導される一連の変化がグリア細胞活性化亢進に関与するか否かについては全く不明である。そこで, 本研究では Vc および C1/C2 領域に存在する侵害受容ニューロン活動の変調に大きな影響を及ぼすと考えられるアストロサイトに注目し, Vc および C1/C2 におけるアストロサイトの舌乾燥に伴う活性化様式を明らかにすることを目的とした。

(受付: 令和 2 年 1 月 17 日)

〒 101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

材料および方法

本研究は、日本大学動物実験委員会の許可を得(承認番号：AP18 DEN014-1)、同指針および国際疼痛学会の基準に従って行われた²⁰⁾。

1. 舌乾燥モデルラットの作製および頭部ひっこめ反射閾値の測定

実験には Sprague-Dawley 系雄性ラット 20 頭を用いた。動物を 2% isoflurane にて麻酔した状態で仰臥位にし、毎日 1 時間、舌を口腔外に牽引して乾燥させた。乾燥を 7 日間継続させ、舌乾燥モデルラット(乾燥群)を作製した(n = 10)。一方、シャムラットは舌を牽引せず乾燥させることなく毎日 2% isoflurane にて麻酔した状態で 1 時間仰臥位にし、これを 7 日間継続した(シャム群)(n = 10)。舌乾燥あるいはシャム処置後 7 日目に isoflurane 浅麻酔下で、舌の左側辺縁部に先端の表面積が 4 mm² のデジタルピンセット (Panlab, S.L., Barcelona, Spain) を用いて機械刺激(0–150 g, 10 g/s, cut off: 150 g)を与え、頭部ひっこめ反射閾値(HWRT)を測定し、舌に機械痛覚過敏が起きているか否かを判定した。

2. 脳標本の取り出しおよび抗 GFAP 抗体による Vc, C1/C2 および NTS の免疫染色

舌乾燥あるいはシャム処置を 7 日間施したラットを sodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.) で深く麻酔し、500 ml 生理食塩液にて脱血後、0.1 M phosphate buffer にて希釈した 4% paraformaldehyde 溶液 (pH7.4, 4°C) 500 ml を用いて灌流固定を行った。灌流固定終了後に延髄を含む全脳部位を摘出し、同じ固定液を用い 4°C で 2 日間、後固定を行った。取り出した脳脊髄標本を 0.01 M phosphate buffered saline (PBS) にて希釈した 20% スクロース溶液 (w/v) に移し換え、2 日間、4°C に保存した。

24 時間 4°C で保存した脳標本をドライアイスで凍結し、ミクロトームを用いて三叉神経脊髄路核を含む延髄の連続切片標本(厚さ 50 μm)を作製して 3 切片毎に 1 切片を取り出し、以下の方法によって nickel-cobalt 加 3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB, 東京化成) 染色を施した。まず、厚さ 50 μm の切片を、0.3% H₂O₂ に 30 分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを不活性化した後、0.01 M PBS にて 5 分間の洗浄を 3 回行った。洗浄終了後、0.3% Triton X-100 / 5% normal goat serum (NGS)-PBS に 1 時間浸漬し、ブロッキングを行った。その後、4°C で一次抗体である rabbit anti-rat glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:1,000; Merck Millipore Billerica, MA, USA) に 3 日間浸漬し、0.01 M PBS にて 10 分間の洗浄を 3 回行った。次いで切片を二次抗体である biotinylated goat anti-rabbit IgG (H+L) (1:600; Vector laboratories Burlingame, CA, USA) に室温で 2 時間浸漬した。その後 ABC kit (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて室温で 1

時間、酵素抗体反応を行った。0.01 M PBS で 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、DAB を用いて反応産物を可視化した。次いで、切片を 0.01 M PBS にて洗浄し、MAS-GP でコートしたスライドガラス (Matsunami, 東京) に貼り付け、室温にて乾燥させた後、アルコールとキシレンにより脱水・透徹を行い、封入剤 (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA) を用いて封入した。また、DAB 反応させた GFAP 陽性細胞を光学顕微鏡下で観察し、Vc, C1/C2 領域および NTS の顕微鏡写真を撮影して Image J software (Research Services Branch National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて GFAP 陽性細胞密度の解析を行った。

3. 統計学的解析

データは平均 ± 標準誤差で表し、有意差検定には Student's *t*-test を用いた。また、*p* < 0.05 を有意ありと判定した。

結 果

1. 舌の機械刺激に対する HWRT

7 日間、舌乾燥あるいはシャム処置を施したラットの舌に対して isoflurane 浅麻酔下で機械刺激を与え、HWRT を測定した。Fig. 1 に示したように、舌の機械刺激に対する HWRT は、シャム群に比べ乾燥群の方が有意に低い値を示した。

2. 延髄における GFAP 陽性細胞の分布

Fig. 2 に乾燥群の延髄における GFAP 陽性細胞の組織標本写真を示す。GFAP 陽性細胞は細胞体が黒色に染まった点状の構造物と細胞体から突出する複数の突起からなる形態を有していた。Vc においては多くの GFAP 陽性細胞が広く分布している様子が観察された (Fig. 2 A)。特に Vc においては、深層部に比較して表層部により多くの GFAP 陽性細胞が観察された。また、GFAP 陽性細胞の背腹側的な分布をみると、腹側部領域では密度がやや低く (Fig. 2 A および B)、中央部から背側部においてより高密度の分布を示していた (Fig. 2 B, C および D)。さらに、NTS においても中心管の背側部で両側性に多くの GFAP 陽性細胞を認めた (Fig. 2 E および F)。一方、シャム群では Vc 全体に少数の GFAP 陽性細胞が認められた (Fig. 2 G, H, I および J)。一方、NTS においては乾燥群と同様、シャム群においても多くの GFAP 陽性細胞が見られた (Fig. 2 K および L)。

3. 三叉神経第 I 枝支配 Vc および C1/C2 領域における GFAP 陽性細胞の吻尾的広がり

Fig. 3 は三叉神経第 I 枝支配領域における GFAP 陽性細胞の吻尾的広がりを示している。本研究では、三叉神経の投射領域である obex から尾側へ 5,040 μm までの領域を Vc および C1/C2 として解析を行った。Fig. 3 に示したように obex から尾側へ 5,040 μm までのどの領域に

においても多くの GFAP 陽性細胞を認めた。乾燥群において GFAP 陽性細胞は obex から 2,160 μm 尾側領域においてピークを示しそれより尾側に行くにしたがって出現量は減少していた。一方、シヤム群においても GFAP 陽性細胞が見られたが、シヤム群では乾燥群よりやや尾側の obex より -3,600 μm にピークを示す分布を示していた。また、GFAP 陽性細胞の出現量を比較すると、乾燥

群とシヤム群では、obex から 2,160 μm 尾側部において乾燥群で有意に多くの GFAP 陽性細胞を認めた。

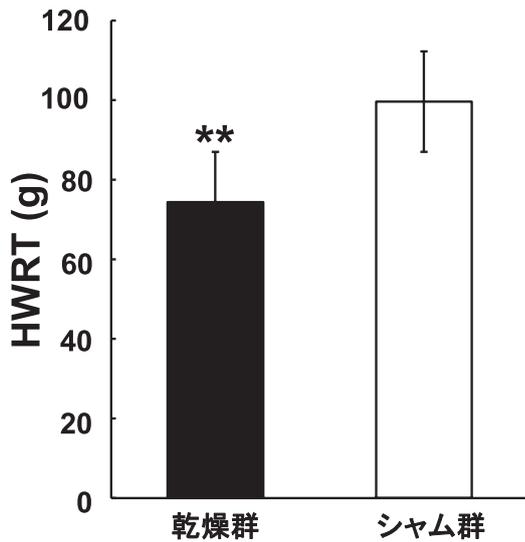


Fig. 1 乾燥およびシヤム群の舌に対する機械刺激によって引き起こされる HWRT
HWRT：頭部ひっこめ反射閾値，**： $p < 0.01$

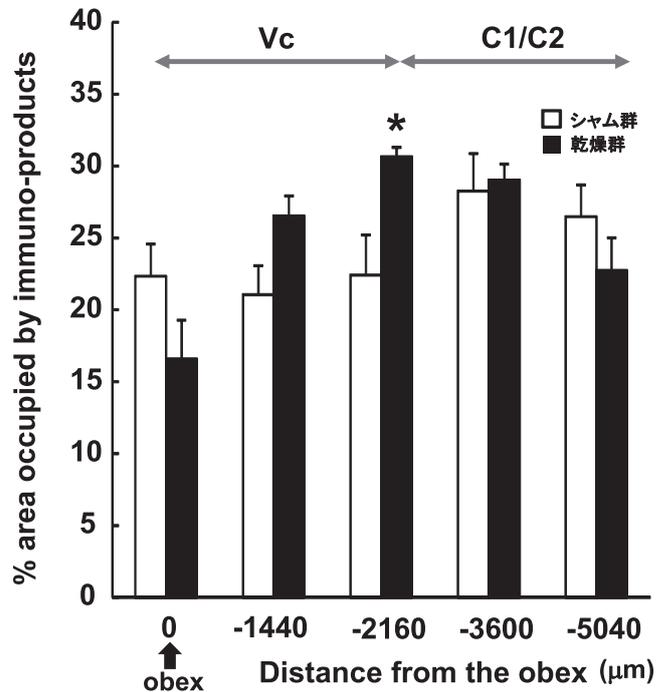


Fig. 3 舌乾燥ラットの第 I 枝の Vc および C1/C2 領域における GFAP 陽性細胞の割合
Obex から -2,160 μm の部位において GFAP 陽性細胞の有意に多くの分布が認められた。*： $p < 0.05$

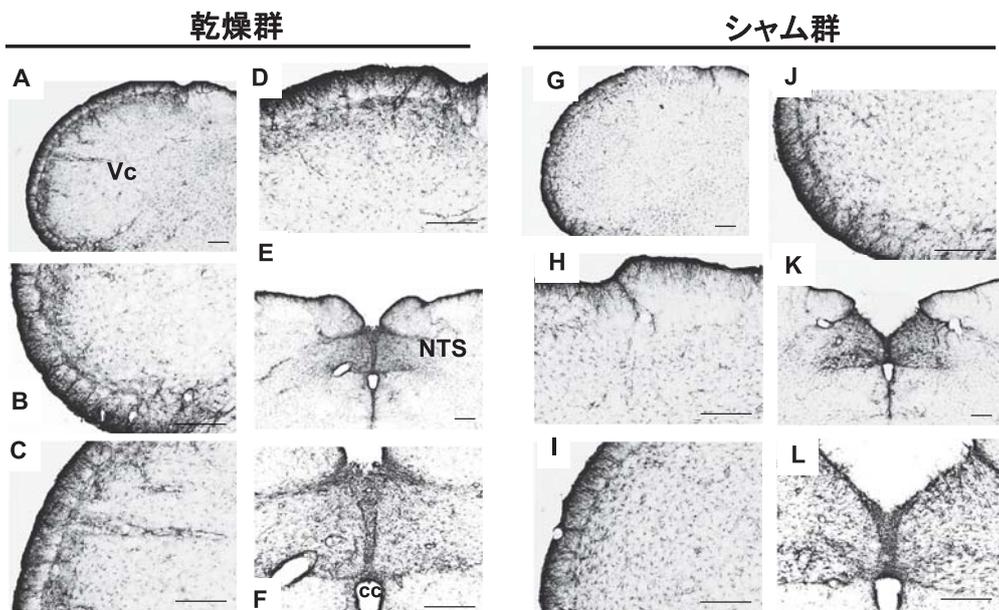


Fig. 2 乾燥群の延髄における GFAP 陽性細胞の組織標本写真
A,G：三叉神経脊髄路核尾側亜核，B,H：第 I 枝領域，C,I：第 II 枝領域，D,J：第 III 枝領域，
E,K：NTS の弱拡大写真，F,L：NTS の強拡大写真，cc：中心管，
スケールバー：200 μm

4. 三叉神経第II枝支配領域におけるGFAP陽性細胞の吻尾的広がり

Fig. 4は三叉神経第II枝支配領域におけるGFAP陽性細胞の吻尾的広がりを示している。乾燥群においてはobexから1,440 μ m尾側部領域にピークを有する分布を示していた(Fig. 4)。一方で、シヤム群においては、明らかなピークは認められず、obexレベルから尾側5,040 μ mまで、ほぼ均一な分布を示していた。また、乾燥群においてピークを認めたobexから尾側へ1,440 μ mのレベルにおいては乾燥群の方がシヤム群に比べGFAP陽性細胞が有意に多く認められた。

5. 三叉神経第III枝支配領域におけるGFAP陽性細胞の吻尾的広がり

三叉神経第III枝支配領域におけるGFAP陽性細胞は、乾燥群においてobexから尾側へ2,160 μ mのレベルにピークを示していた(Fig. 5)。一方で、シヤム群においてはobexレベルが最も少なく、それより尾側部ではほぼ均一な分布を示していた。また、obexより2,160 μ mから3,600 μ mのレベルにおいては、シヤム群に比べ乾燥群の方が有意に多くのGFAP陽性細胞を認めた。

6. NTSにおけるGFAP陽性細胞の吻尾的分布

本研究ではNTSにおいても多くのGFAP陽性細胞を認めた(Fig. 1およびFig. 6)。NTSにおける分布様式はVcおよびC1/C2領域とは異なり、吻側から尾側に向け

て、ほぼ均一な出現パターンを示していた。また、乾燥群とシヤム群を比較しても、出現量に有意な違いが認められなかった。

考 察

従来の研究から、唾液腺の損傷、唾石あるいは腫瘍、またはシェーグレン症候群によって唾液分泌が障害されると、口腔粘膜は乾燥し、口腔感覚障害、咀嚼障害あるいは嚥下障害など様々な口腔機能障害が引き起こされることが報告されている^{21,22)}。口腔粘膜の乾燥は粘膜を支配する神経を損傷し、感覚障害だけでなく神経障害性疼痛を発症する。しかし、口腔乾燥による口腔粘膜の痛みがどのようなメカニズムで起こされるかについては不明な点が多く残されている。本研究では、舌乾燥モデルラットを作製し、舌乾燥に伴う舌痛発症の神経機構の一端を解明した。

1. 舌乾燥と舌の痛覚

本研究では舌乾燥7日目に、舌の機械刺激に対してHWRTの有意な低下が認められ、またその値は約75gであり過去の研究結果とほぼ同様であった。さらに、機械刺激だけでなく熱刺激に対するHWRTについても報告があり、舌乾燥では熱刺激に対する痛覚過敏は起こされないとされている¹⁹⁾。これらのことから、舌を乾燥すると、熱に対してではなく機械刺激に対してのみ痛覚過

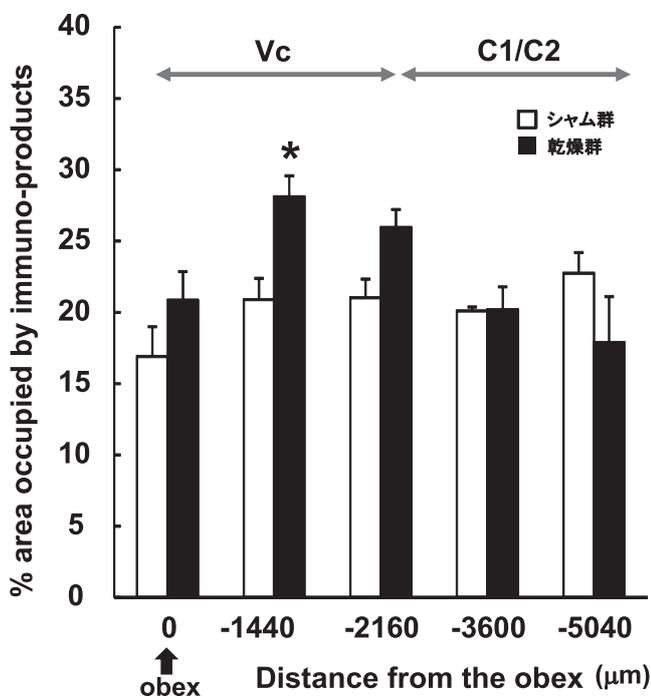


Fig. 4 舌乾燥ラットの第II枝のVcおよびC1/C2領域におけるGFAP陽性細胞の割合
Obexから-1,440 μ mの部位においてGFAP陽性細胞の有意に多くの分布が認められた。*: $p < 0.05$

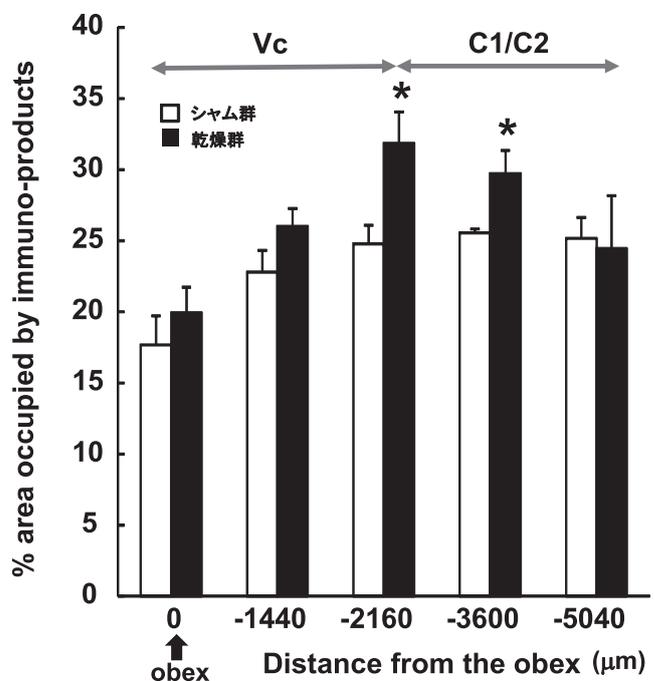


Fig. 5 舌乾燥ラットの第III枝支配VcおよびC1/C2支配領域におけるGFAP陽性細胞発現の割合
Obexから-2,160 μ mおよび-3,600 μ mの部位においてGFAP陽性細胞の有意に多くの分布が認められた。*: $p < 0.05$

敏が発症すると考えられる。

2. Vcにおける活性型アストロサイトの分布様式

これまでの研究ではアストロサイトをはじめとする様々なグリア細胞はニューロンの形態維持や栄養供給などの役割を担っており、ニューロンの興奮性には大きな作用を示さない細胞であると考えられてきた²³⁾。しかし、近年、アストロサイトやミクログリアは、ニューロン活動の変調に直接関与することが明かにされてきた²⁴⁾。本研究では、Vcの表層部領域に多くのGFAP陽性細胞を認めた。形態学的解析によりVc表層部には無髄のC線維および細径の有髄神経線維であるA δ 線維が投射すると報告されている²⁵⁾。C線維やA δ 線維を介して入力を受けるVc表層ニューロンは、その多くが特異的侵害受容(NS)ニューロンであると報告されている¹⁵⁾。このことから、本研究で観察された多くのGFAP陽性細胞、すなわち活性型アストロサイトは、NSニューロンの活動性変調に関与すると考えられる。

また、三叉神経第I枝、II枝およびIII枝支配領域におけるGFAP陽性細胞の分布をみると、第III枝支配領域においてやや高い出現を認めるものの、どの三叉神経枝支配領域においてもVc表層部で多く観察された。この結果から、アストロサイトの活性化領域が口腔顔面の侵害情報を強く受けるVcの表層部を中心に拡大するものと推定される。すなわち、アストロサイトの活性化には明らかな体部位局在性が存在しないと考えられる。

3. Vcニューロンとアストロサイトの関係

これまでの研究から、末梢組織に侵害刺激が加えられると、興奮した神経節細胞において、神経ペプチド、サイトカインあるいは神経成長因子など様々な物質の合成が亢進し、放出されることが報告されている¹⁸⁾。これらの物質は神経節細胞周囲に存在するアストロサイトを活性化し、神経節細胞の活動性はさらに増強する。一次ニューロンの活動性の増強が長く続くと、一次ニューロ

ンは感作され、二次ニューロンであるVcやC1/C2ニューロンの活動性の増強を引き起こす^{11,15)}。二次ニューロンの活動が増強するとニューロンとグリア細胞との機能的な連絡によって、アストロサイトやミクログリアが活性化するといわれている^{16,17)}。本研究で、Vcにおいて観察された多くの活性型アストロサイトも、上述のメカニズムによって活性化されたものと考えられる。特に、最近の研究で、アストログリアの活性化亢進によって、一次ニューロンから放出されるグルタミン酸の量が増加して二次ニューロン活動が亢進されることが明らかにされ、シナプス伝達に変調をかけると報告されている¹⁸⁾。本研究においても多くのGFAP陽性細胞がVc表層部において検出されていることから、この領域における一次ニューロンと二次ニューロンのシナプス伝達がアストロサイトのグルタミン酸を介した経路によって調節されている可能性がある。

4. NTSに出現した活性型アストロサイトの働き

NTSは様々な自律神経系応答に関与するといわれているが、強く侵害情報も受けており、非常に複雑な機能を有する領域として知られている²⁶⁻²⁸⁾。本研究ではこの領域に多くのGFAP陽性細胞を認めたが、活性型アストロサイトがニューロン活動の変調に強く関与すると報告されていることから勘案すると、舌の乾燥によって、活性型アストロサイトを介してNTSニューロン活動が増強している可能性がある。おそらく、舌乾燥によってNTSニューロン活動が亢進し、様々な自律神経系応答の変調が誘導されているものと推定される。しかし、著者の研究ではシャム群においても多くのGFAP陽性細胞を観察していることから、NTSにおけるニューロン活動の変調には舌乾燥以外の入力に関与も考えられる。今後はこの点を解明するため、さらなる研究が必要である。

結 論

麻醉ラットの舌を乾燥させ作製した舌乾燥モデルラットを用いて、延髄におけるGFAP陽性細胞分布について解析を行い、以下の結論を得た。

1. 7日間、舌乾燥あるいはシャム処置を施したラットの舌に対してisoflurane浅麻酔下で機械刺激を与え、HWRTを測定した結果、舌の機械刺激に対するHWRTは、シャム群に比べ乾燥群の方が、有意に低い値を示した。
2. Vcにおいては、深層部に比較して表層部により多くのGFAP陽性細胞が観察された。
3. NTSにおいては、乾燥群およびシャム群共に中心管の背側部に両側性に出現した。
4. 三叉神経第I枝領域においては、obexから尾側へ5,040 μ mまでのどの領域においても多くのGFAP陽性細胞を認めた。乾燥群においてGFAP陽性細胞

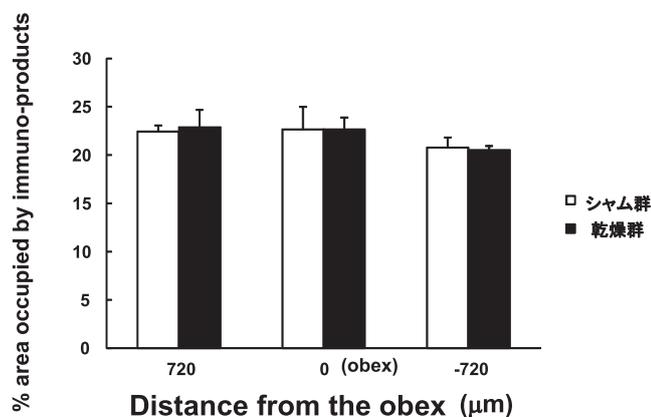


Fig. 6 舌乾燥ラットのNTSにおけるGFAP陽性細胞の割合
NTSにおいては乾燥群とシャム群の間に有意な分布の違いは認められなかった。

は obex から 2,160 μm 尾側領域でピークを示し、それより尾側に行くにしたがって減少した。

5. 三叉神経第II枝領域では GFAP 陽性細胞は obex から 1,440 μm 尾側部領域にピークを示した。
6. 三叉神経第III枝領域における GFAP 陽性細胞は、obex から尾側へ 2,160 μm のレベルにおいてピークを示した。
7. NTS における分布様式は Vc および C1/C2 領域とは異なり、吻側から尾側にかけてほぼ均一な出現パターンを示した。

以上から、Vc に出現した活性型アストロサイトは舌乾燥によって引き起こされる舌の機械痛覚過敏発症に関与するのに対し、NTS の活性型アストロサイトは舌乾燥に関連する様々な自律神経系応答に関与する可能性が示された。

本論文の作成にあたり、日本大学歯学部生理学講座岩田幸一教授および篠田雅路准教授にご指導をいただきましたことに対して深く感謝いたします。また、実際に実験を推進するにあたって、多くのご助言とご指導をいただきました生理学講座の諸先生方および渋谷郁子専修研究員に心から感謝の意を表します。

本論文に関して開示すべき利益相反はありません。

文 献

- 1) Wall PD, Waxman S, Basbaum AI (1974) Ongoing activity in peripheral nerve: injury discharge. *Exp Neurol* 45, 576-589.
- 2) Wiesenfeld Z, Lindblom U (1980) Behavioral and electrophysiological effects of various types of peripheral nerve lesions in the rat: a comparison of possible models for chronic pain. *Pain* 8, 285-298.
- 3) Devor M, Raber P (1983) Autotomy after nerve injury and its relation to spontaneous discharge originating in nerve-end neuromas. *Behav Neural Biol* 37, 276-283.
- 4) Devor M, Govrin-Lippmann R, Raber P (1985) Corticosteroids suppress ectopic neural discharge originating in experimental neuromas. *Pain* 22, 127-137.
- 5) De AK, Ghosh JJ (1990) Inflammatory responses induced by substance P in rat paw. *Indian J Exp Biol* 28, 946-948.
- 6) Lees JG, Fivelman B, Duffy SS, Makker PG, Perera CJ, Moalem-Taylor G (2015) Cytokines in neuropathic pain and associated depression. *Mod Trends Pharmacopsychiatry* 30, 51-66.
- 7) Sulaiman W, Nguyen DH (2016) Transforming growth factor beta 1, a cytokine with regenerative functions. *Neural Regen Res* 11, 1549-1552.
- 8) Zhang ZJ, Jiang BC, Gao YJ (2017) Chemokines in neuron-glia cell interaction and pathogenesis of neuropathic pain. *Cell Mol Life Sci* 74, 3275-3291.
- 9) Latremoliere A, Woolf CJ (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10, 895-926.
- 10) Hu JW (1990) Response properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in the rat's trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) related to cutaneous and deep craniofacial afferent stimulation and modulation by diffuse noxious inhibitory controls. *Pain* 41, 331-345.
- 11) Iwata K, Takahashi O, Tsuboi Y, Ochiai H, Hibiya J, Sakaki T, Yamaguchi Y, Sumino R (1998) Fos protein induction in the medullary dorsal horn and first segment of the spinal cord by tooth-pulp stimulation in cats. *Pain* 75, 27-36.
- 12) Kawabata A, Itoh H, Kawao N, Kuroda R, Sekiguchi F, Masuko T, Iwata K, Ogawa A (2004) Activation of trigeminal nociceptive neurons by parotid PAR-2 activation in rats. *Neuroreport* 15, 1617-1621.
- 13) Noma N, Tsuboi Y, Kondo M, Matsumoto M, Sessle BJ, Kitagawa J, Saito K, Iwata K (2008) Organization of pERK-immunoreactive cells in trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following capsaicin injection into oral and craniofacial regions in rats. *J Comp Neurol* 507, 1428-1440.
- 14) Suzuki I, Tsuboi Y, Shinoda M, Shibuta K, Honda K, Katagiri A, Kiyomoto M, Sessle BJ, Matsuura S, Ohara K, Urata K, Iwata K (2013) Involvement of ERK phosphorylation of trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons in thermal hypersensitivity in rats with infraorbital nerve injury. *PLoS One* 8, e57278.
- 15) Iwata K, Tashiro A, Tsuboi Y, Imai T, Sumino R, Morimoto T, Dubner R, Ren K (1999) Medullary dorsal horn neuronal activity in rats with persistent temporomandibular joint and perioral inflammation. *J Neurophysiol* 82, 1244-1253.
- 16) Okada-Ogawa A, Suzuki I, Sessle BJ, Chiang CY, Salter MW, Dostrovsky JO, Tsuboi Y, Kondo M, Kitagawa J, Kobayashi A, Noma N, Imamura Y, Iwata K (2009) Astroglia in medullary dorsal horn (trigeminal spinal subnucleus caudalis) are involved in trigeminal neuropathic pain mechanisms. *J Neurosci* 29, 11161-11171.
- 17) Shibuta K, Suzuki I, Shinoda M, Tsuboi Y, Honda K, Shimizu N, Sessle BJ, Iwata K (2012) Organization of hyperactive microglial cells in trigeminal spinal subnucleus caudalis and upper cervical spinal cord associated with orofacial neuropathic pain. *Brain Res* 1451, 74-86.
- 18) Chiang CY, Dostrovsky JO, Iwata K, Sessle BJ (2011) Role of glia in orofacial pain. *Neuroscientist* 17, 303-320.
- 19) Nakaya Y, Tsuboi Y, Okada-Ogawa A, Shinoda M, Kubo A, Chen JY, Noma N, Batbold D, Imamura Y, Sessle BJ, Iwata K (2016) ERK-GluR1 phosphorylation in trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons is involved in pain associated with dry tongue. *Mol Pain* 12, 1744806916641680.
- 20) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.
- 21) Field EA, Rostron JL, Longman LP, Bowman SJ, Lowe D, Rogers SN (2003) The development and initial validation of the Liverpool sicca index to assess

- symptoms and dysfunction in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Oral Pathol Med* 32, 154-162.
- 22) Al Hamad A, Lodi G, Porter S, Fedele S, Mercadante V (2019) Interventions for dry mouth and hyposalivation in Sjogren's syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Oral Dis* 25, 1027-1047.
- 23) Herculano-Houzel S (2014) The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* 62, 1377-1391.
- 24) Brekke E, Morken TS, Sonnewald U (2015) Glucose metabolism and astrocyte-neuron interactions in the neonatal brain. *Neurochem Int* 82, 33-41.
- 25) Dubner R, Bennett GJ (1983) Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annu Rev Neurosci* 6, 381-418.
- 26) Machado BH, Mauad H, Chianca Junior DA, Haibara AS, Colombari E (1997) Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii. *Braz J Med Biol Res* 30, 533-543.
- 27) Baude A, Strube C, Tell F, Kessler JP (2009) Glutamatergic neurotransmission in the nucleus tractus solitarii: structural and functional characteristics. *J Chem Neuroanat* 38, 145-153.
- 28) Sevoz-Couche C, Brouillard C (2017) Key role of 5-HT3 receptors in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular stress reactivity. *Neurosci Biobehav Rev* 74, 423-432.