

# 低出力超音波パルスによる切断下歯槽神経の機能的再生に対する 脳由来神経栄養因子の役割

遠藤 千登世<sup>1,2</sup> 土持 茜<sup>1,2</sup> 本吉 満<sup>1,2</sup> 篠田 雅路<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> 日本大学歯学部歯科矯正学講座

<sup>2</sup> 日本大学大学院歯学研究科口腔構造機能学分野

<sup>3</sup> 日本大学歯学部生理学講座

**要旨:** 損傷下歯槽神経(IAN)への低出力超音波パルス(LIPUS)刺激は、神経再生を促進することが報告されているが、その詳細なメカニズムは不明である。近年、脳由来神経栄養因子(BDNF)は神経細胞の生存維持に重要な役割を果たしていることが報告された。本研究では、IAN切断(IANX)モデルラットを用いて、LIPUS刺激による切断IANの機能的再生に対するBDNFの役割を検討した。IANX後14日目まで、IANX部直上皮膚にLIPUS刺激を連日施行した。IANX後、von Frey filamentsによる下唇部への機械刺激に対する逃避閾値を経的に測定した。また、IANX後14日目まで、LIPUS刺激と同時にBDNF拮抗薬をIANX部に投与し、下唇部への機械刺激に対する逃避閾値を測定した。さらに、IANX後5日目、IANX部におけるBDNFの局在を免疫組織化学的に、BDNF量をwestern blot法にて解析した。また、三叉神経節におけるBDNF受容体であるTrkB発現を免疫組織化学的に解析した。IANX部へのLIPUS刺激により、下唇部への機械刺激に対する逃避閾値の回復が促進された。またBDNF拮抗薬のIANX部への投与により、LIPUS刺激による逃避閾値の回復促進が抑制された。切断後5日目、IANX部においてBDNFがシュワン細胞に発現し、LIPUS刺激によりBDNF量が増加した。また、三叉神経節(TG)においてTrkB陽性TGニューロンが確認された。以上より、LIPUS刺激によってIANX部のシュワン細胞においてBDNF産生が増強し、その増強したBDNFシグナルは切断IANの感覚機能の再生を促進することが示唆された。

**キーワード:** 低出力超音波パルス, 下歯槽神経損傷, 脳由来神経栄養因子, 神経再生, シュワン細胞

## Functional regeneration of the transected inferior alveolar nerve by low-intensity pulsed ultrasound via brain-derived neurotrophic factor signaling

Chitose Endo<sup>1,2</sup>, Akane Tsuchimochi<sup>1,2</sup>, Mitsuru Motoyoshi<sup>1,2</sup>, Masamichi Shinoda<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthodontics, Nihon University School of Dentistry

<sup>2</sup>Division of Oral structural and Functional Biology, Nihon University Graduate School of Dentistry

<sup>3</sup>Department of Physiology, Nihon University School of Dentistry

**Abstract:** Purpose: Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) stimulation has been reported to promote the functional recovery of the injured inferior alveolar nerve (IAN), but the detailed mechanism is unknown. Recently, it was reported that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plays an important role in neuroregeneration. In this study, we examined the role of BDNF in the LIPUS-induced functional regeneration of transected IAN (IANX). Methods: LIPUS stimulation was applied daily on the skin directly above the transected IANX with or without the administration of BDNF antagonist into the site of the transected IANX, and the head withdrawal threshold for mechanical stimulation to the lower lip by von Frey filaments was measured for 14 days after the IANX transection. On day 5 after IANX transection, the localization and the amount of BDNF in the transected IAN was examined. In addition, the expression of TrkB in the trigeminal ganglion was identified. Results: LIPUS stimulation to the site of the transected IANX enhanced the recovery from mechanical hypoalgesia of the lower lip, which was suppressed by BDNF antagonism in the site of the transected IANX. Moreover, BDNF was expressed in Schwann cells in the transected IAN,

(受付: 令和3年4月28日)

責任著者連絡先: 篠田雅路

日本大学歯学部生理学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

TEL : 03-3219-8112

FAX : 03-3219-8341

E-mail : shinoda.masamichi@nihon-u.ac.jp

and the amount of BDNF was increased by the LIPUS stimulation. In addition, TrkB positive neurons were identified in the trigeminal ganglion. Conclusion: These results suggest that LIPUS stimulation enhances sensory functional regeneration of the transected IAN via the signaling of BDNF released from Schwann cells at the transected IAN.

**Keywords:** low-intensity pulsed ultrasound, inferior alveolar nerve transection, brain-derived neurotrophic factor, nerve regeneration, Schwann cell

## 緒 言

顎矯正手術、埋伏智歯の抜歯や歯科用インプラント下顎骨埋入などの顎顔面領域の手術では、しばしば三叉神経第Ⅲ枝である下歯槽神経 (IAN) が損傷される<sup>1,3)</sup>。特に、顎矯正のための下顎枝矢状分割骨切り術においては、オトガイ部皮膚領域の体性感覚障害が必発する<sup>4)</sup>。歯科臨床において、このような体性感覚障害を改善するためにビタミン B<sub>12</sub> 投与による治療が行われているが、顕著な奏功はみられないため、効果的な新規治療法の開発が望まれている<sup>5,6)</sup>。

近年、末梢組織損傷部位への低出力超音波パルス (LIPUS) 刺激は、損傷組織の血管新生を誘導することによって創傷治癒を促進すると報告されている<sup>7,8)</sup>。創傷治癒の促進メカニズムの詳細は明らかではないが、LIPUS 刺激は、末梢組織損傷部位のさまざまな細胞からの脳由来神経栄養因子 (BDNF) などの液性因子の放出を誘導し、その液性因子が損傷細胞の再生を促進すると考えられる<sup>9)</sup>。神経成長因子関連遺伝子ファミリーの一つである BDNF は、高親和性受容体である tropomyosin-related kinase B (TrkB) に結合することによりさまざまな生理活性を示す<sup>10)</sup>。たとえば BDNF シグナルは、脊髄におけるシナプス形成と後根神経節ニューロンの軸索伸長を誘導することにより、末梢神経系の発達に重要な役割を果たすことが報告されている<sup>11-13)</sup>。さらに、培養シュワン細胞への LIPUS 刺激は、BDNF 遺伝子の発現増強し、培養シュワン細胞からの BDNF 放出を促進することが報告されている<sup>14)</sup>。しかしながら、IAN 損傷部位の BDNF シグナル増強は、IAN 損傷に起因する口腔顔面領域の体性感覚障害にどのような影響を及ぼすのかは明らかではない。

本研究では、IANX 後のオトガイ部皮膚の機械痛覚鈍麻に対する LIPUS 刺激の効果、三叉神経節 (TG) における TrkB 発現細胞の同定、LIPUS 刺激による IANX 部の BDNF 発現細胞の同定および BDNF 量の変化、IANX 後の LIPUS 刺激による機械痛覚鈍麻改善に対する TrkB 拮抗薬の効果を解析し、LIPUS 刺激による切断 IAN の感覚機能再生に対する BDNF の役割について検討した。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

Sprague-Dawley 系雄性ラット (n = 55, 150-250 g, 日本エスエルシー, 静岡) を使用し、実験を施行した。恒温 (23°C) および恒湿 (55%) で 12 時間明暗サイクル (7 時点灯, 19 時消灯) の十分な飼料と水を摂取できる環境下で、ラットを飼育した。本研究は、国際疼痛学会の動物実験ガイドラインを遵守し<sup>15)</sup>、日本大学歯学部動物実験委員会の承認 (承認番号: AP18 DEN020-2) を受け行われた。実験に際して、動物の苦痛を最小限にするよう配慮し、使用動物数は必要最小限とした。

### 2. IAN 切断モデルラットの作製

2% イソフルラン (Mylan, Canonsburg, PA, USA) による吸入麻酔下にて、塩酸メドミジン (0.15 mg/kg, ゼノアック, 郡山), ミダゾラム (2 mg/kg, サンド, 東京) および酒石酸ブトルファノール (2.5 mg/kg, 明治製菓ファルマ, 東京) を含む三種混合麻酔薬の腹腔内投与により深麻酔した。ラットを保温パッド上に仰臥位にした状態で、左咬筋直上の顔面皮膚を切開して咬筋を露出させた。咬筋を切開剥離して歯槽骨の表面を露出させた後、カーバイドバーにて歯槽骨を切削除去して IAN を露出させた。IAN を注意深く引き出してオトガイ孔から 5 mm 遠位の IAN を完全に切断した後、切断した IAN を下顎管に再配置した。切開された咬筋および顔面皮膚を 4-0 絹糸にて縫合した。

### 3. LIPUS 刺激

2% イソフルラン (Mylan) 吸入によりラットを麻酔し、左側臥位にて LIPUS 刺激用プローブ (直径: 18 mm) を IAN 切断部の直上の顔面皮膚表面に設置した。BR-Sonic-Pro (伊藤超短波, 川口) を用いて、LIPUS 刺激用プローブを介して LIPUS 刺激 (20 分/日, 1.0 MHz, 30 mW/cm<sup>2</sup>) を施行した (LIPUS 刺激群)。LIPUS 刺激は、IANX 後 14 日間、1 日 1 回施行した。上記と同一の操作を行い、LIPUS 刺激のみ行わないものを LIPUS 非刺激群とした。

### 4. オトガイ部皮膚への機械刺激に対する逃避反射閾値の測定

まず、ラットを鼻と口を突き出すことができる穴のある暗いケージに数分間とどまるように訓練した。訓練が完了した後、オトガイ部皮膚への機械刺激に対する逃避

反射閾値(HWT)の測定を以下のように施行した。オトガイ孔直上の左顔面皮膚を von Frey filament(1, 1.4, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 26 および 60 g; Touch-Test Sensory Evaluator, North Coast Medical, Morgan Hill, CA, USA)を用いて、機械強度の昇順で機械刺激した。カットオフ強度は 60 g に設定した。機械刺激 5 回のうち 3 回以上逃避行動を引き起こした機械刺激強度を HWT し、3 回測定した HWT の平均値を各ラットの HWT と定義した。IANX 前および IANX 後 1, 3, 5, 7, および 14 日目まで、LIPUS 刺激群および LIPUS 非刺激群における HWT を測定した。なお、HWT の測定はすべて盲検下で施行した。

#### 5. TrkB antagonist 投与

IANX 後 0 日目から 14 日目まで、HWT を測定後に TrkB antagonist (ANA12, 2.5 nmol, 10  $\mu$ l, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) または vehicle (0.9% 生理食塩水) を IANX 部に注射した (2 回/日)。IANX 前および IANX 後 1, 3, 5, 7, および 14 日目まで、LIPUS 刺激群の HWT を上記の方法に従って測定した。

#### 6. 免疫組織化学的染色

IANX 後 5 日目、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) の腹腔内注射による深麻酔下にて経心的に生理食塩水 (pH 7.4) に続いて 4% パラホルムアルデヒドを灌流し、固定した。切断部 IAN を含む左下顎骨および左 TG を摘出し、同固定液にて後固定した。K-CX (ファルマ, 東京) を使用して、下顎骨を脱灰した。下顎骨と TG を 20% スクロースに 4°C で 12 時間浸漬した後、Tissue-Tek (サクラファインテックジャパン, 東京) に包埋した。脱灰された下顎骨と TG の切片 (厚さ: 15  $\mu$ m) を作製し、MAS-GP コートスライドガラス (松浪硝子工業, 大阪) に貼り付け、室温にて乾燥した。下顎骨切片を 0.01 M リン酸緩衝液 (PBS) を用いて洗浄し、下顎骨切片は 0.3% Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Germany) で希釈された抗 BDNF ウサギモノクローナル抗体 (1:200, Abcam, Cambridge, UK) および抗グルタミンシンターゼ (GS) マウスモノクローナル抗体 (1:100, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に 4% 正常ヤギ血清とともに 4°C で 12 時間浸漬した。TG 切片は 0.3% Triton X-100 (Merck) で希釈された抗 TrkB ウサギモノクローナル抗体 (1:200, Abcam) および抗 GS マウスモノクローナル抗体 (1:100, Thermo Fisher Scientific), または抗 ionized calcium binding adapter protein 1 (Iba1) ウサギモノクローナル抗体 (1:250, 富士フイルム和光純薬, 大阪) に 4% 正常ヤギ血清とともに 4°C で 12 時間浸漬した。各切片を洗浄し、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG (1:200, Thermo Fisher Scientific) および Alexa Fluor 568 標識ヤギ抗ウサギ IgG (1:200, Thermo Fisher Scientific) に 23°C で 2 時間浸漬した。

その後、各切片を洗浄し、PermaFluor aqueous mounting medium (Thermo Fisher Scientific) で封入した。BZ-9000 (キーエンス, 東京) を用いて、IANX 部における BDNF および GS 共陽性細胞、TG における TrkB, GS および Iba1 陽性細胞を観察した。また、一次抗体の非存在下では、特異的な免疫反応は検出されなかった。

#### 7. ウエスタンブロッティング

IANX 後 5 日目、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) の腹腔内注射による深麻酔下にて、経心的に 0.9% 生理食塩水 (pH 7.4) を灌流した。IANX 部を摘出し、溶解緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, pH 8.0, 10% glycerol, 1% NP40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 g/mL leupeptin, 10  $\mu$ g/mL aprotinin, and 0.05 mM sodium vanadate) 中で粉砕した。ホモジネートを遠心分離して上清を抽出し、タンパク質アッセイキット (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) でタンパク量を測定した。タンパク量を 30  $\mu$ g に調整したサンプルを Laemmli サンプルバッファー (Bio-Rad) に溶解して熱変性させた後、10% Mini-protein TGX プレキャストゲル (Bio-Rad) にて電気泳動を行った。電気泳動したタンパク質を転写した PVDF メンブレン (Bio-Rad) を 3% ウシ血清アルブミン (BSA, Bovogen, Australia) に 30 分間浸した後、0.1% Tween 20 (Bio-Rad) を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBST) で洗浄した。PVDF メンブレンを抗 BDNF ウサギポリクローナル抗体 (1:2000, Abcam) または抗  $\beta$ -actin マウスモノクローナル抗体 (1:200, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) に 4°C で 12 時間反応させた。TBST で洗浄後、ヤギ抗ウサギ Horseradish peroxidase 標識ポリクローナル抗体 (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) に 23°C で 2 時間反応させた。Western Lightning ELC Pro (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) でタンパク結合抗体を検出した後、ChemiDoc MP system (Bio-Rad) で可視化した。 $\beta$ -actin 量を内部標準とした。

#### 8. 統計学的解析

測定した HWT のデータが等分散性および正規性を満たしていないため、Kruskal-Wallis 検定とそれに続く Dunn の多重比較検定を HWT の統計学的解析に用いた。HWT は箱ひげ図で示され、ボックスは中央値と四分位範囲 (25~75%) を示し、上下のひげは最大値と最小値を示す。測定した BDNF 量のデータは等分散性および正規性を満たすため、統計学的解析には Student の *t* 検定を用いた。データは平均  $\pm$  標準誤差として示す。*p* 値が 0.05 未満の場合、統計学的に有意であるとした。

## 結 果

### 1. 顔面皮膚の HWT 変化

IANX 後 1 日目から 5 日目まで、顔面皮膚の HWT が

有意に上昇した。IANX 後 7 日目以降, 上昇した HWT は IANX 前の値に回復した ( $p < 0.01$ ) (図 1)。IANX 後 3 日目および 5 日目, LIPUS 非刺激群と比較し LIPUS 刺激群の HWT が低い傾向にあったことから (Day 3,  $p = 0.07$ ; Day 5,  $p = 0.09$ ), IANX 部への LIPUS 刺激が HWT の回復を促進する傾向にあったと考えられる。IANX および LIPUS 刺激開始後 3 日目以降, ANA12 投与群の HWT は vehicle 投与群と比較して高かったことから (Day 3,  $p = 0.07$ ; Day 5,  $p = 0.09$ ; Day 7,  $p < 0.05$ ; Day 14,  $p = 0.01$ ), ANA12 の IANX 部への投与は LIPUS 刺激による HWT の回復促進を阻害したと考えられる。HWT 測定期間中, 運動障害および鎮静, 炎症性変化または異常疼痛などの兆候は見られなかった。

### 2. 三叉神経節の TrkB, GS および Iba1 陽性細胞

IANX 後 5 日目, LIPUS 刺激群の刺激側 TG において TrkB 陽性 TG ニューロン, GS 陽性細胞および Iba1 陽性細胞が観察された(図 2)。TrkB は, TG ニューロンの細胞膜上に発現した。

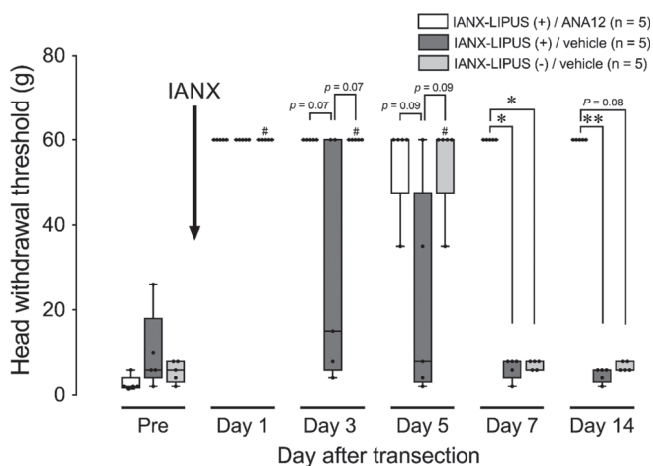


図 1 IANX 前および IANX 後のオトガイ部皮膚への機械刺激に対する Head withdrawal threshold の変化。Pre: IANX 前。  
#  $p < 0.05$  vs. HWT on Pre, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

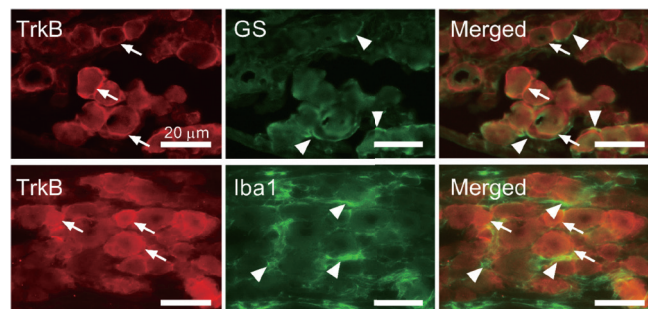


図 2 IANX 後 5 日目の, TG における TrkB, GS および Iba1 陽性細胞。矢印: TrkB 陽性細胞を示す。矢頭(上段): GS 陽性細胞を示す。矢頭(下段): Iba 陽性細胞を示す。

### 3. IANX 部の BDNF 発現

IANX 後 5 日目, LIPUS 刺激側 IANX 部において, BDNF かつ GS 陽性細胞が観察された(図 3 A)。また, LIPUS 刺激群の IANX 部における BDNF 量が LIPUS 非刺激群と比較し, 有意に多かった(図 3 A)。

### 考 察

人間の聴覚を超える周波数の音響力学的エネルギーである超音波は, 診断, 治療あるいは外科手術などのさまざまな医療分野で広く応用されている<sup>16)</sup>。治療や手術で使用される超音波の強度範囲は 30~70 W/cm<sup>2</sup> であり, この刺激強度は組織に形態学的変化を引き起こすと考えられている<sup>17)</sup>。一方, 超音波強度範囲が 75 mW/cm<sup>2</sup> 以下である LIPUS 刺激は組織に明らかな形態学的変化を起こさず, *in vitro* において骨芽細胞の増殖を著しく増強させることが報告されている<sup>18)</sup>。また, 末梢組織への LIPUS 刺激は末梢組織における細胞内シグナル伝達を調節し, 局所循環と血管新生を促進する<sup>19)</sup>。実際に, 0.5 MHz かつ 50 mW/cm<sup>2</sup> での大腿骨骨折部位への経皮的 LIPUS 刺激は, 軟骨形成に関する遺伝子発現を増強し, 骨折治癒を促進した<sup>20)</sup>。本研究では, IANX 部への経皮的な連日 LIPUS 刺激 (20 min/day, 1.0 MHz, 30 mW/cm<sup>2</sup>) は, IANX 後 5 日目においてオトガイ部皮

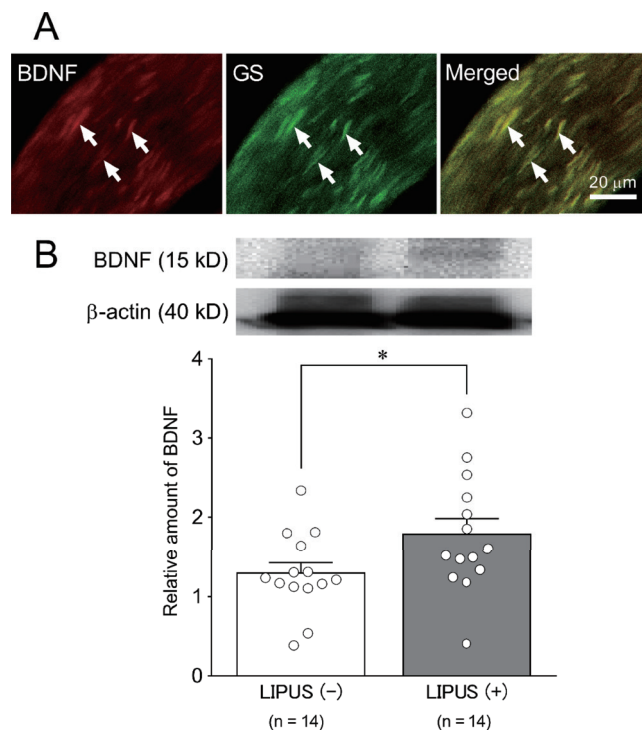


図 3 IANX 後 5 日目の, IANX 部における BDNF 発現。白丸は各個体の値を示す。(A) IANX 後 5 日目の再生 IANX。矢印: IANX 部の BDNF かつ GS 陽性細胞を示す。(B) IANX 部の相対的 BDNF 量。\*  $p < 0.05$ 。

膚の痛覚鈍麻からの回復を有意に促進した。さらに、LIPUS 刺激期間中、運動障害、異常行動または鎮静効果は見られず、LIPUS 刺激側皮膚に病理学的変化は観察されなかった。よって、顔面部皮膚を介した IANX 部への経皮的 LIPUS 刺激は、切断 IAN の痛覚機能回復の促進に有効であることが示された。しかしながら、本研究で用いた LIPUS 刺激のプロトコルは、げっ歯類の IANX 後の体性感覚障害に効果的であることを示しており、ヒトの末梢神経損傷後の体性感覚障害に対する LIPUS 刺激の臨床応用のためには、さらなる研究が必要である。

神経成長因子ファミリーの一つである BDNF は、神経細胞の生存、樹状突起や軸索の伸長、シナプス機能調節、神経伝達物質の放出といった多岐にわたる機能調節に重要な役割を果たしている<sup>21)</sup>。BDNF は神経細胞膜上の高親和性受容体である TrkB に結合し、TrkB の二量体化や構造修飾を起こすことにより、いくつかの細胞内シグナル伝達経路を活性化させる<sup>22)</sup>。本研究では IANX 後 5 日目、切断 IAN のシュワン細胞に BDNF が発現し、IANX 後の連日 LIPUS 刺激により IANX 部の BDNF 量が増加した。この結果は、IANX 後の連日 LIPUS 刺激によって、切断 IAN のシュワン細胞における BDNF 合成および放出が促進されたことを示唆している。過去の研究から、超音波刺激された培養シュワン細胞において、細胞生存の長期化と細胞増殖の促進が誘導されることが知られている<sup>14)</sup>。さらに最近の研究では、LIPUS 刺激により活性化するシュワン細胞内シグナル伝達経路が明らかになりつつある。例えば、シュワン細胞への LIPUS 刺激により細胞膜上のストレッチ活性化イオンチャネルを活性化し、細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)1/2 のリン酸化が促進される<sup>23)</sup>。ERK1/2 のリン酸化は cyclic adenosine monophosphate(cAMP) 応答配列結合タンパク(CREB)シグナル伝達の活性化を引き起こし、細胞増殖の促進とアポトーシスの抑制を誘導する<sup>23)</sup>。さらに、CREB の細胞内活性化は、BDNF などの神経栄養因子の産生を促進することがわかっている<sup>24)</sup>。したがって、本研究で施行した IANX 部への LIPUS 刺激は、切断 IAN 周囲のシュワン細胞における CREB シグナル伝達カスケード活性化を介した BDNF 産生および放出を促進した可能性が示唆される。しかしながら本研究では、シュワン細胞における LIPUS 刺激による BDNF 産生を誘導する細胞内シグナル伝達経路の解明に至っておらず、さらなる研究が必要である。

本研究において、IANX は三叉神経Ⅲ枝支配領域であるオトガイ部皮膚に機械痛覚鈍麻を誘発した。5日間の IANX 部への連日 LIPUS 刺激は、同部位の機械痛覚鈍麻からの回復を促進した。さらに、TG ニューロンは BDNF の高親和性受容体である TrkB が発現しており、継続的な TrkB antagonist の IANX 部投与は連日

LIPUS 刺激による機械痛覚鈍麻からの回復を抑制した。このことから、損傷 TG ニューロンにおける TrkB を介したシグナル伝達は、皮膚の機械痛覚を司る軸索の機能的再生を促進し、機械痛覚鈍麻からの回復を促進すると考えられる<sup>25)</sup>。TrkB シグナルによって誘導されたホスファチジルイノシトール 3-キナーゼリン酸化(PI3K)に起因する CREB 活性化は、軸索突起の伸長を促進する<sup>26)</sup>。さらに、TrkB シグナルは cAMP 分解酵素であるホスホジエステラーゼ(PDE)を阻害することによって、組織損傷部位の初期の成長円錐伸長に重要な役割を果たす cAMP の産生を促進する<sup>27,28)</sup>。この報告は、損傷末梢神経再生の促進は TrkB シグナルによる cAMP を介した効果であることを示唆するものである。そのうえ、TrkB シグナルによって活性化される分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ/ERK 経路も、PDE を阻害することにより cAMP の増加をもたらすことが知られている<sup>27)</sup>。これらの報告に加えて本研究の結果から、持続的な LIPUS 刺激によってシュワン細胞から放出される BDNF が切断 IAN の神経膜上の TrkB に結合し、その TrkB シグナルが CREB 活性化または cAMP の増加に起因した切断 IAN の機能的再生を加速することにより、オトガイ部皮膚の機械痛覚鈍麻を回復させることが示唆された。

## 結 論

LIPUS によるラット切断 IAN の感覚機能再生に対する BDNF の役割について行動薬理的、生化学的および免疫組織化学的に詳細な検討を加え、以下の結論を得た。

1. IANX 部への LIPUS 刺激が、オトガイ部皮膚の機械痛覚鈍麻の回復を促進した。
2. ANA12 の IANX 部投与は、LIPUS 刺激による機械痛覚鈍麻の回復促進を抑制した。
3. IANX 後 5 日目、LIPUS 刺激側 TG において TrkB 陽性ニューロンが観察された。
4. IANX 後 5 日目、LIPUS 刺激側 IANX 部において BDNF 陽性シュワン細胞が観察され、BDNF 量が LIPUS 非刺激群と比較し有意に多かった。

本研究遂行にあたり、多大なるご協力を頂いた日本大学歯学部生理学講座の皆様へ厚く御礼申し上げます。本研究は日本大学歯学部総合歯学研究所研究費および上村安男・治子研究費の助成により行われた。

なお、本研究に関して、利益相反はありません。

## 文 献

- 1) Deppe H, Mücke T, Wagenpfeil S, Kesting M, Linsenmeyer E, Tölle T (2015) Trigeminal nerve injuries after mandibular oral surgery in a university outpatient setting--a retrospective analysis of 1,559 cases. Clin Oral Investig 19, 149-157.

- 2) Tay AB, Lai JB, Lye KW, Wong WY, Nadkarni NV, Li W, Bautista D (2015) Inferior alveolar nerve injury in trauma-induced mandible fractures. *J Oral Maxillofac Surg* 73, 1328-1340.
- 3) Veitz-Keenan A, Keenan JR (2015) Trials needed to identify best management of iatrogenic inferior alveolar and lingual nerve injuries. *Evid Based Dent* 16, 29.
- 4) Coulthard P, Kushnerev E, Yates JM, Walsh T, Patel N, Bailey E, Renton TF (2014) Interventions for iatrogenic inferior alveolar and lingual nerve injury. *Cochrane Database Syst Rev* 4, 005293.
- 5) Phillips C, Essick GK, Chung Y, Blakey G (2012) Non-invasive therapy for altered facial sensation following orthognathic surgery: an exploratory randomized clinical trial of intranasal vitamin B12 spray. *J Maxillofac Trauma* 1, 20-29.
- 6) Lee CH, Lee BS, Choi BJ, Lee JW, Ohe JY, Yoo HY, Kwon YD (2016) Recovery of inferior alveolar nerve injury after bilateral sagittal split ramus osteotomy (BSSRO) : a retrospective study. *Maxillofac Plast Reconstr Surg* 38, 25.
- 7) Kim JR, Oh SH, Kwon GB, Namgung U, Song KS, Jeon BH, Lee JH (2013) Acceleration of peripheral nerve regeneration through asymmetrically porous nerve guide conduit applied with biological/physical stimulation. *Tissue Eng Part A* 19, 2674-2685.
- 8) Acar AH, Yolcu U, Altindis S, Gul M, Alan H, Malkoc S (2016) Bone regeneration by low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound therapy in the rabbit calvarium. *Arch Oral Biol* 61, 60-65.
- 9) Yang FY, Lu WW, Lin WT, Chang CW, Huang SL (2015) Enhancement of neurotrophic factors in astrocyte for neuroprotective effects in brain disorders using low-intensity pulsed ultrasound stimulation. *Brain Stimul* 8, 465-473.
- 10) Guo W, Nagappan G, Lu B (2018) Differential effects of transient and sustained activation of BDNF-TrkB signaling. *Dev Neurobiol* 78, 647-659.
- 11) Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1, 549-553.
- 12) English AW, Liu K, Nicolini JM, Mulligan AM, Ye K (2013) Small-molecule trkB agonists promote axon regeneration in cut peripheral nerves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 16217-16222.
- 13) McGregor CE, English AW (2018) The role of BDNF in peripheral nerve regeneration: activity-dependent treatments and Val66 Met. *Front Cell Neurosci* 12, 522.
- 14) Zhang H, Lin X, Wan H, Li JH, Li JM (2009) Effect of low-intensity pulsed ultrasound on the expression of neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor in cultured Schwann cells. *Microsurgery* 29, 479-485.
- 15) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.
- 16) Ritchie R, Collin J, Coussios C, Leslie T (2013) Attenuation and de-focusing during high-intensity focused ultrasound therapy through peri-nephric fat. *Ultrasound Med Biol* 39, 1785-1793.
- 17) Harle J, Salih V, Mayia F, Knowles JC, Olsen I (2001) Effects of ultrasound on the growth and function of bone and periodontal ligament cells *in vitro*. *Ultrasound Med Biol* 27, 579-586.
- 18) Katiyar A, Duncan RL, Sarkar K (2014) Ultrasound stimulation increases proliferation of MC3 T3-E1 preosteoblast-like cells. *J Ther Ultrasound* 2, 1.
- 19) Tanaka E, Kuroda S, Horiuchi S, Tabata A, El-Bialy T (2015) Low-intensity pulsed ultrasound in dentofacial tissue engineering. *Ann Biomed Eng* 43, 871-886.
- 20) Yang KH, Parvizi J, Wang SJ, Lewallen DG, Kinnick RR, Greenleaf JF, Bolander ME (1996) Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. *J Orthop Res* 14, 802-809.
- 21) Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J (2018) BDNF: A key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity. *Cell Mol Neurobiol* 38, 579-593.
- 22) Park H, Poo MM (2013) Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 14, 7-23.
- 23) Peng DY, Reed-Maldonado AB, Lin GT, Xia SJ, Lue TF (2020) Low-intensity pulsed ultrasound for regenerating peripheral nerves: potential for penile nerve. *Asian J Androl* 22, 335-341.
- 24) Ding S, Zhuge W, Yang J, Wen F, Xu Z, Wang X, Zhuge Q (2017) Insulin resistance disrupts the interaction between AKT and the NMDA receptor and the inactivation of the CaMKIV/CREB pathway in minimal hepatic encephalopathy. *Toxicol Sci* 159, 290-306.
- 25) McGregor CE, Irwin AM, English AW (2019) The Val66 Met BDNF polymorphism and peripheral nerve injury: Enhanced regeneration in mouse Met-carriers is not further improved with activity-dependent treatment. *Neurorehabil Neural Repair* 33, 407-418.
- 26) White DM, Walker S, Brenneman DE, Gozes I (2000) CREB contributes to the increased neurite outgrowth of sensory neurons induced by vasoactive intestinal polypeptide and activity-dependent neurotrophic factor. *Brain Res* 868, 31-38.
- 27) Souness JE, Aldous D, Sargent C (2000) Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors. *Immunopharmacology* 47, 127-162.
- 28) Gao Y, Nikulina E, Mellado W, Filbin MT (2003) Neurotrophins elevate cAMP to reach a threshold required to overcome inhibition by MAG through extracellular signal-regulated kinase-dependent inhibition of phosphodiesterase. *J Neurosci* 23, 11770-11777.