

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11324

研究課題名(和文)筋性顎関節症に対するボトックスを用いた新規治療法開発

研究課題名(英文)Development of novel therapeutic methods using Botox for masseter muscle pain

研究代表者

野間 昇(NOMA, Noboru)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：70386100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ION(high)群では、改良A型ボツリヌス毒素(200pg)注入後2週間でVon Frey毛に対する疼痛閾値は他の群と比較して有意に上昇した(一方、pin prickに対する疼痛閾値(grooming)はION(high)群は他の群と比較し上昇傾向にあったが、有意な差は認めなかった。三叉神経脊髄路核尾側亜核～上頸髄レベルでのp-ERK陽性細胞の総数ではION+BoNT(High)群ではION+BoNT(Low)群に比較しp-ERK陽性細胞数が減少した。以上の結果から、改良A型ボツリヌス毒素は慢性疼痛を軽減する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of botulinum neurotoxin type A (BoNT-A) on mechanical allodynia and hyperalgesia associated with infraorbital nerve constriction (ION-CCI) in rats. ION-CCI rats received a subcutaneous BoNT-A injection into the whisker pad area on day 7 postoperatively and underwent pain assessment on days 14 and 21 postoperatively. Rats were assigned to one of four treatment groups(n = 5 each): ION-CCI + BoNT-A 20 pg (low-dose group), ION-CCI + BoNT-A 200 pg (high-dose group), IONCCI+ saline, and Sham. Mechanical allodynia and hyperalgesia were evaluated preoperatively (baseline) and on days 7, 14, and 21 postoperatively. BoNT-A administration. The present findings suggest that, by suppressing Vc neuronal activity, high-dose intradermal injection of BoNT-A at the site of ION innervation alleviates mechanical facial allodynia and hyperalgesia associated with ION-CCI.

研究分野：口腔顔面痛

キーワード：慢性疼痛 ION-CCI P-ERK

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯科臨床において歯、顎、顔の痛み（口腔顔面痛）は多くの日本国民が有していることから歯科医師にとって最大の研究テーマであるといえる。筋・筋膜性疼痛症候群はくいしばりや歯ぎしりなどで咀嚼筋が慢性的に疲労して索状硬結（こり）またはトリガーポイントが形成されると咀嚼筋から離れた場所（歯牙や歯槽骨など）に関連痛として痛みを生じる。これまで申請者らはカナダのトロント大学歯学部 Barry J Sessle 教授との共同研究により口腔内諸器官と顔面部にカプサイシン刺激を行ったモデル動物を用い、中枢神経系における侵害受容伝達経路の違い（体部位局在）や関連痛のメカニズムの一端を明らかにしてきた。すなわち同じ疼痛刺激に対して、口の中の痛みの方が顔面部の痛みより広く感じて反対側にまで及ぶことがあるため、痛みが特定できにくいことを証明した。

(2) 神経障害性疼痛は、“灼けるような”痛みの特徴づけられる慢性疾患で口腔顔面に痛みを訴えることが多い。これまでの基礎研究では足底部への A 型ボツリヌス毒素局所投与で鎮痛効果が得られているが、口腔顔面領域への A 型ボツリヌス毒素局所投与の研究報告はない。申請者らは神経障害性疼痛モデルにおいて IL-6、IL-1、IL-12、IL-17 などのサイトカインの変動が神経障害性疼痛発症に大きく関与することを明らかにした。一方、神経障害性疼痛の治療に関する研究として、IL-12p40 が抗侵害受容作用を示し、プレガバリン局所塗布が顔面部の機械的痛覚過敏を軽減することを明らかにした。

2. 研究の目的

(1) 非歯原性疼痛の中で、最も多くみられる病態は顎関節症、筋・筋膜性疼痛症候群である。筋性疼痛の患者は慢性的な筋疲労により索状硬結（こり）が認められ、咀嚼筋の疼痛のみならず筋とは離れた部位（歯牙や歯周組織）に疼痛を訴えることがある。このように原因部位と疼痛部位は一致しないことがあり、臨床現場においては、歯髄炎などと誤診され抜髄や抜歯などの処置を受ける患者が多い。今回申請者は、咬筋圧痛（原因部位）とそれに伴う関連痛（疼痛部位）に焦点をあて、顎顔面領域の異常疼痛および関連痛の神経機構の一旦を解明してボトックスを用いた新たな治療法の開発を目指す。

(2) 近年、A 型ボツリヌス毒素療法は全身の様々な領域に発症するあらゆる疼痛異常の新たな治療法として注目を浴びている。三叉神経損傷に起因する口腔顔面の痛覚異常に対しても臨床応用が徐々に進められているが、その作用機序が明らかにされていないことから、適応症例の選択、あるいは投与量や投与回数などに関する的確な使用法が定め

られていないのが現状である。

そこで、申請者は口腔顔面痛の中でも特に難治性であるとされている顔面部神経障害性疼痛に注目し、A 型ボツリヌス毒素の航空顔面痛に対する鎮痛作用に関する基礎研究を計画した。本研究では神経障害性疼痛モデル動物を作製し、行動学および免疫組織学的手法を用いて顔面部に発症した神経障害性疼痛に対する A 型ボツリヌス毒素の鎮痛機構を明らかにすることを目的とし、口腔顔面痛に対する新たな治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

Sprague Dawley 系雄性ラットを sodium pentobarbital (50 mg/kg i.p.) で麻醉し、左側頬粘膜に切開を加え左側眼窩下神経を剖出し神経結紮 (ION-CCI) あるいは剖出のみの sham 処置 (sham 群) を施し、切開部は絹糸で縫合。手術後 1 週間で改良 A 型ボツリヌス毒素 (20pg or 200pg) 及び saline を左側口ひげ部に 10ul 皮下投与し、ION 低濃度 (low) 群、ION 高濃度 (high) 群、ION (saline) 群とした。行動学的実験: Von Frey 毛, pin prick を使用し眼窩下皮膚部位の機械的逃避反応閾値の経時的变化 (術前, 1 週間, 2 週間, 3 週間) を解析した。組織学的解析として左側口髭部皮膚組織の組織学的変化を検討するために Hematoxyline-Eosin (HE) 染色を行った。60g、10 分間 (1 Hz) 刺激後の三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) における p-ERK 陽性細胞数を免疫組織学的に解析した。三叉神経節における P2X3 の発現様式を ION 高濃度 (high) 群、ION (saline) 群間で確認した。

4. 研究成果

(1) 改良 A 型ボツリヌス毒素の行動学研究 ION (high) 群では、改良 A 型ボツリヌス毒素 (200pg) 注入後 2 週間で Von Frey 毛に対する疼痛閾値は他の群と比較して有意に上昇した (機械的疼痛反応閾値は 21 日目の ION+BoNT (High or Low) 群、ION+saline 群の 3 群間において高濃度 BoNT を投与して群では有意に差を認めた)。一方、pin prick に対する疼痛閾値 (grooming) は ION (high) 群は他の群と比較し上昇傾向にあったが、有意な差は認めなかった (図 1)。

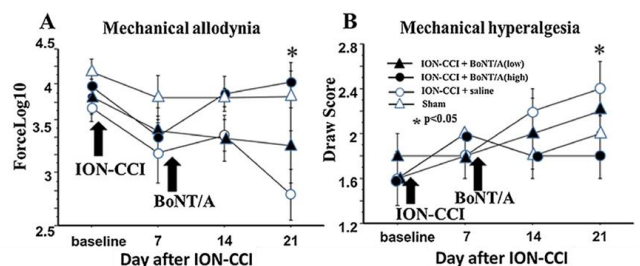


図 1 行動学研究 (ボトックスの影響)

次に、ボトックスの運動障害などの副作用により顔面逃避閾値の低下が起こっているかどうか、確かめるために Rotarod test (回転装置を乗せてから、落下するまでの時間(秒)を計測)を行った。

Sham ラットでは Rotarod 時間は平均して 100~140 秒で落下した。ION+botox (low) では Rotarod 時間は 80~110 秒で落下した。ION+botox (high) では 100~120 秒で落下した。ION+botox (low) または (high) とともに落下時間は短縮したものの有意な差はなく、ボトックスの運動障害はないことが示唆された(図2)。

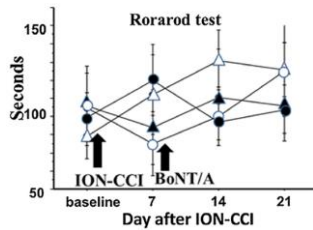


図2 Rotarod test(副作用の影響)

(2) 行動学研究(intact rat)

ボトックスの作用が末梢(顔面皮膚)で影響しているかどうかを調べるために、神経障害性モデルではなく、intact rat で行動学的実験を行った。Intact rat に botox (high) を口ひげ部に挿入し、2週間後に機械的アロディニア、痛覚過敏を測定した。触覚刺激では、ION+botox (high) では intact+saline に比較し、上昇したものの有意な差はみられなかった。一方、機械的的刺激では、Draw Score(口ひげ引っかき行動)では ION+botox (high) は intact+saline に比較し、減少したが、有意な差はみられなかった(図3)。以上のことから、末梢皮膚のみに作用して、疼痛緩和されることは否定された。

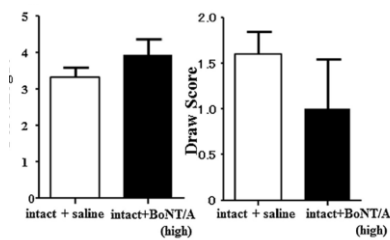


図3 intact rat におけるボトックスの影響

(3) 免疫組織学的研究(末梢皮膚)

①ボトックス注入後 21 日目の左側口髭部の皮膚組織の Hematoxyline-Eosin (HE) 染色では Sham 群と BoNT 群では炎症性細胞の浸潤を認めず、皮膚組織の形態変化や筋萎縮も認めなかった(図4)。このことはボトックスにより末梢の組織に形態的な変化がないことが推測される。

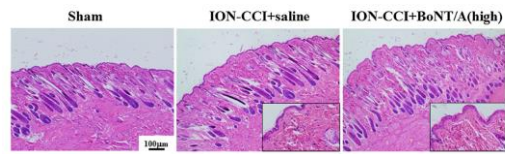
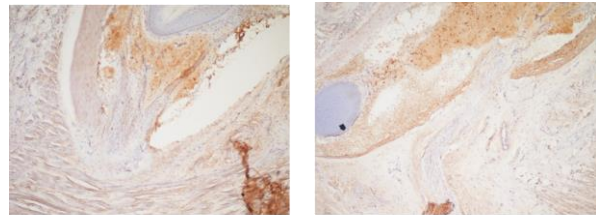


図4 ボトックス投与後の皮膚組織 (HE)

②次にC線維選択的に染色できる β -tubulin の抗体を用いて、ボトックスがC線維に与える影響について検討した。

CCI 群にボトックスを注入し、2週間後、還流固定後、口ひげ部の皮膚を取り出し、 β -tubulin 染色を行った。CCI+BoNT 群は CCI 群に比較し、濃度の低下を認めた(図5)。ボトックスはC線維の萎縮に関与している可能性を示している。



CCI

CCI+BoNT

図5 ボトックス投与後 β -tubulin 染色

(4) 免疫組織学的研究(中枢神経)

Sham 群、ION-CCI+saline では三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)~上頸髄レベル(C2)に脊髄背側に p-ERK 陽性細胞を認めた(図6)。侵害機械刺激(60g、10min)後の Vc~C2 での p-ERK 陽性細胞では発現パターンは OBEX を基準として尾側に-720mm から増加し-1440mm でピークとなった。その後 -2160mm より徐々に減少し-2880mm、-3600mm より尾側で消失した。0mm、-720mm、-1440mm、-2160mm、-2880mm、-3600mm の各セクションでは ION+BoNT (High or Low) 群、ION+saline 群の3群間において有意な差はみられなかった(図7)。三叉神経脊髄路核尾側亜核~上頸髄レベルでの p-ERK 陽性細胞の総数では ION+BoNT (High) 群では ION+BoNT (Low) 群に比較し p-ERK 陽性細胞数が減少した(図8)。

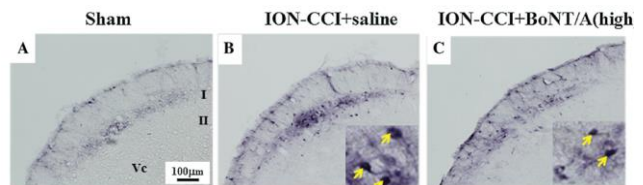


図6 三叉神経脊髄路核尾側亜核における p-ERK 発現

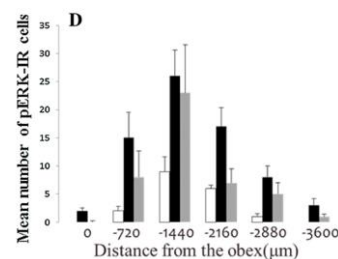


図7 Vc, C2 における p-ERK の発現パターン

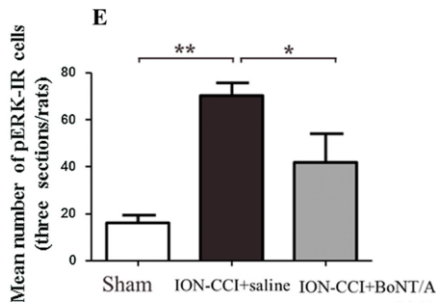


図8 Vc, C2におけるp-ERK数の比較

(5) 免疫組織学的研究 (三叉神経節)

三叉神経節における P2X3 陽性細胞では確実に染色するため、先ず DAB で三叉神経節内の P2X3 細胞の局在、支配領域を確認した(図9)。その後、蛍光染色 (P2X3) を行った(図10)。いずれも三叉神経節第2枝領域に細胞染色を認めた。

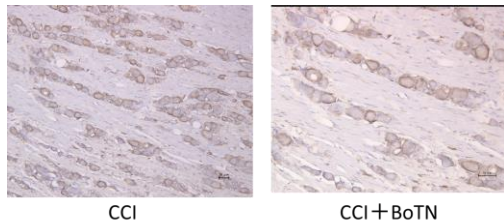


図9 三叉神経節 (TG) における P2X3 細胞像 (DAB)

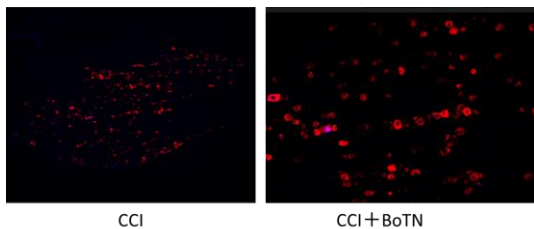


図10 TGのP2X3細胞像(免疫染色)

ION 高濃度 (high) 群が ION(saline)群と比較し、減少傾向であったが、有意な差はみられなかった。今回、三叉神経脊髄路核尾側亜核～上頸髄レベルでのマイクログリアの免疫染色も行ったが、ボツクス群において優位な発現を認め、我々の見解とは異なった結果となった (data not shown)。

以上、(1)～(4)の結果から、口腔顔面痛に対するボツクスの効果は、末梢皮膚、末梢(三叉神経節)、中枢神経(三叉神経脊髄路核～上部頸髄)に作用し、生じていることが考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Watase T, Shimizu K, Ohara K, Komiya H, Kanno K, Hatori K, Noma N, Honda K, Tsuboi Y, Katagiri A, Shinoda M, Ogiso B, Iwata K. Role of medullary astroglial glutamine synthesis in tooth pulp hypersensitivity associated with frequent masseter muscle contraction. 査読有, Mol Pain. 2018 Jan-Dec;14:1744806918763270. doi: 10.1177/1744806918763270.
- ② Noma N, Watanabe K, Sato Y, Imamura Y, Yamamoto Y, Ito R, Maruno M, Shimizu K, Iwata K. Botulinum neurotoxin type A alleviates mechanical hypersensitivity associated with infraorbital nerve constriction injury in rats. 査読有, Neurosci Lett. Jan 10; 2017;637:96-101. doi: 10.1016/j.neulet.2016.11.043.
- ③ Komiya H, Shimizu K, Noma N, Tsuboi Y, Honda K, Kanno K, Ohara K, Shinoda M, Ogiso B, Iwata K.:Role of Neuron-Glial Interaction Mediated by IL-1 β in Ectopic Tooth Pain. 査読有, J Dent Res. 2017 Nov 1:22034517741253.
- ④ Khan J, Noma N, Imamura Y, Eliav E. : Effect of Pregabalin and Diclofenac on tactile allodynia, mechanical hyperalgesia and pro inflammatory cytokine levels (IL-6, IL-1 β) induced by chronic constriction injury of the infraorbital nerve in rats. 査読有, Cytokine. Oct 25. 2017, pii: S1043-4666(17)30294-6.
- ⑤ Khan J, Noma N, Young A, Thomas D. Pro and anti-inflammatory cytokine levels (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10) in rat model of neuroma. 査読有, Pathophysiology. Apr 11. 2017, pii: S0928-4680(16)30103-1. doi: 10.1016/j.pathophys.2017.04.001
- ⑥ 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. 査読有, Mol Pain. Apr 26;12 2016, pii: 1744806916641680. doi: 10.1177/1744806916641680.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Noma N, Watanabe K, Imamura Y, Iwata K: BOTULINUM NEUROTOXIN TYPE A ALLEVIATES MECHANICAL HYPERSENSITIVITY ASSOCIATED WITH INFRAORBITAL NERVE CONSTRICTION INJURY IN RATS, Neuropathic Pain (NeuPSIG) 2017

- ② Nakaya Y, Okada A, Shinoda M, Noma N, Matsukawa Y, Imamura Y, Iwata K: ERK-GluR1 phosphorylation in trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons is involved in pain associated with dry tongue. the 16th World Congress on Pain (IASP) 2016
- ③ Noma N, Imamura Y: Injection of Botulinum Neurotoxin Type A alleviates Neuropathic Orofacial Pain. The American Academy of Oral Medicine 2016
- ④ Noma N, Dezawa K, Imamura Y, Iwata K(2015) Administration of Botulinum neurotoxin type A alleviates infraorbital nerve constriction-induced mechanical allodynia The 9th Congress of the European Pain Federation, EFIC® 2015

[図書] (計 10 件)

- ① 野間 昇 (2017) 非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) 口腔顔面痛の診断と治療 ガイドブック第二版日本口腔顔面痛学会 編, 医歯薬出版株式会社, 東京, 93-100.
- ② 野間 昇 (2017) 顎関節症 診療ハンドブック: 顎関節症の治療法 (薬物療法) メディア株式会社, 東京, p112, 113.
- ③ 野間 昇 (2017) 顎関節症 診療ハンドブック: 顎関節症になると起こる問題 (筋性顎関節症) メディア株式会社, 東京, p22, 23.
- ④ 野間 昇・安藤彰啓 (2017)開業医がみる口腔と顔面の痛み: 5.危険な痛み — SNOOP5(RED Flags), 側頭動脈炎, 脳腫瘍—日本歯科評論 No.897 Vol.77 (8) P127-132
- ⑤ 野間 昇・安藤彰啓 (2017)開業医がみる口腔と顔面の痛み: 4.Burning Mouth Syndrome(BMS)への対応—日本歯科評論 No.897 Vol.77 (7) P97-102
- ⑥ 野間 昇・安藤彰啓 (2017)開業医がみる口腔と顔面の痛み: 3.根管治療後のしびれとクラックトウース (破折歯) の痛み*開業医ができる感覚検査法としびれ (初期) へのアプローチ—日本歯科評論 No.895 Vol.77 (5) P87-92
- ⑦ 野間 昇・安藤彰啓 (2017)開業医がみる口腔と顔面の痛み: 2.1分, 10分, 1時間 (短時間) 持続する口腔顔面痛を訴える患者が受診したら —歯髄疾患と非歯原性疼痛 (頭痛疾患): 鑑別診断のポイント—日本歯科評論 No.895 Vol.77 (5) P101-106
- ⑧ 野間 昇・安藤彰啓 (2017)開業医がみる口腔と顔面の痛み: 1.痛みの基本と

筋・筋膜性疼痛による歯との関連痛/筋・筋膜性疼痛へのアプローチ: familiar pain の再現方法—これはいつもの痛みか? 日本歯科評論 No.894 Vol.77 P99-104

- ⑨ 野間 昇 (2016) 痛みの Clinical Neuroscience(12)Functional pain Disorder 口腔顔面痛 最新医学 71 巻 6号 Page1190-1193
- ⑩ 野間 昇, 今村佳樹 (2015) 各論 B 口腔顔面痛 (顎関節機能異常症候群). 痛みの臨床テキスト (小川節郎編), 南江堂, 東京, 161-165

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野間 昇 (NOMA, Noboru)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号: 70386100