

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20377

研究課題名(和文) 口内炎粘膜疼痛に対する細菌感染の影響と抗菌ペプチドの役割

研究課題名(英文) Involvement of oral bacterial invasion and antibacterial peptides in oral ulcerative mucositis-induced pain

研究代表者

人見 涼露 (Hitomi, Suzuro)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70548924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：口内炎ができるるとひどい痛みが生じるが、その痛みがどのように発症するのかよく分かっていない。本研究では、口内炎部から組織内に侵入した口腔内細菌と口内炎の痛みとの関係を明らかにするために、口内炎モデルラットを用いて痛みの評価と抗菌作用を持つ遺伝子の発現レベルを調べた。口内炎により自発痛や接触痛が生じたが、抗菌薬を投与することでこれらの痛みは減弱した。また口内炎の発症に伴い、神経や口内炎部組織での抗菌作用を持つ遺伝子発現レベルが増強した。口内炎部から細菌が侵入し、痛みを伴う口内炎が発症すること、その際に神経や口内炎部組織から抗菌物質が分泌される可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Oral ulcerative mucositis induces severe pain. However, the pain mechanisms are not well known. To reveal whether oral bacteria invaded from the ulcer region are involved in the oral ulcerative mucositis-induced pain, we evaluated the pain-related behavior and gene expression level using oral ulcerative mucositis model rats. Spontaneous and mechanical pain are observed in the model and an antibacterial drug inhibited the pain. An antibacterial peptide mRNA in trigeminal ganglion and the ulcer region were upregulated in the model. These results suggested that oral ulcerative mucositis-induced pain is caused by bacterial invasion into the mucosal tissue and antibacterial peptides are released from ganglion cells and ulcer region.

研究分野：口腔生理学

キーワード：口内炎 口腔内細菌 抗菌物質 疼痛 感染性炎症

1. 研究開始当初の背景

咬傷や火傷, 不適義歯などにより口腔内に潰瘍が形成されると, 口腔粘膜バリアが失われ組織内への口腔内細菌侵入が引き起こされる。粘膜上皮の破壊自体による痛みに加えて, この感染は炎症を引き起こすことから口内炎疼痛を増悪させ, 治癒を遅らせると考えられる。これらの痛みは会話や食事時に誘発されて患者に苦痛を強いるだけでなく, 口腔清掃も困難になることからより感染を助長して, 栄養不良に陥るなど負のスパイラルに陥ってしまう。しかし, これまで, 口腔粘膜防御層の破綻による疼痛発症機序については, ほとんど研究されていない。

最近, ラット口腔粘膜への酢酸処理後 2 日目に白斑を伴う潰瘍を生じ自発痛や機械的痛覚過敏を示すことを報告した (Hitomi et al., 2015)。また, 酢酸処理による口腔潰瘍形成は, 血中白血球数を有意に増加させ, これが抗菌薬の給水投与により抑制するという結果を得た。つまり, 口腔潰瘍による口腔粘膜バリア機能の欠損は組織への細菌感染を引き起こしており, 感染性炎症に伴う発痛物質やサイトカインなどにより疼痛を誘発している可能性が考えられる。

予備実験において, 口腔潰瘍モデルラットの三叉神経節において, 抗菌作用を示す 2 つのペプチド遺伝子の発現量増加が認められた。その一つであるヘプシジンは肝臓由来の抗菌ペプチドで, 鉄代謝を調節することでグラム陽性・陰性菌, 真菌に対して抗菌作用を示すことが報告されている。もう一つはセリンプロテアーゼインヒビター 3 であり, 抗菌作用を持つ。しかし, このような抗菌ペプチドが口腔潰瘍発症においてどのような役割を担っているのかについてはこれまで全く報告されていない。

2. 研究の目的

口腔粘膜防御層の破壊を伴う口腔粘膜炎により引き起こされる口腔内疼痛に対して, 組織内細菌侵入がどのように関与しているのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 口腔粘膜炎モデルの作製

口内炎モデル: ペントバルビタール (50 mg/kg) 麻酔したラットの下唇粘膜に, 50% 酢酸を浸したろ紙 (3×3 mm) を 30 秒間塗布した。

口内炎増悪モデル: あらかじめ, 1 日おきに 3 回 5-フルオロウラシル (40 mg/kg) を腹腔内投与し, その 2 日後に上記と同様に酢酸処理を行った。

外傷性口腔粘膜炎モデル: 麻酔下において, 角ワイヤーをラット下顎前歯間に挟み, 角ワイヤーの先端が下唇粘膜に触れるように結紮線及びスーパーボンドを用いて歯牙に固定した。

(2) 口腔粘膜炎の評価

肉眼的評価: 以下指標を用いて評価した。Score 0: 正常粘膜。Score 0.5: 異常なピンク色かどうか疑わしい。Score 1: わずかだが明確な赤みがある。Score 2: 強い赤みがある。Score 3: 白斑形成のみ (潰瘍なし)。Score 4: 9mm² の 1/2 未満の上皮剥離 (潰瘍)。Score 5: 9mm² の 1/2 以上の上皮剥離 (潰瘍)。Score 6: Score 5 及び下口唇の腫脹

口腔粘膜炎部位の HE 染色: ペントバルビタール麻酔下にて摘出した下唇粘膜組織のパラフィン切片を作製し, HE 染色にて顕微鏡下で炎症性細胞の組織浸潤程度について観察した。

(3) 疼痛関連行動評価

自発痛: プラスチックボックス (30×30×30 cm) にラットを入れ, 口腔内疼痛に關与することが知られている顔面グルーミング行動 (ラビング時間) を 10 分間計測した。

機械的アロディニア: 麻酔下にて予めラットのオトガイ皮膚に装着した磁性リングに, 磁石で 4g の加重をかけて下唇粘膜を露出させた (安定開口法)。覚醒下にて, 体保持用のボックス (7×7×15 cm) にラットを入れ, von Frey 毛を用いて直接露出した粘膜へ機械刺激を加え, 逃避閾値を測定した。

(4) 炎症関連物質の定量

麻酔下にて摘出した下唇粘膜組織から口腔粘膜炎部をブロックとして切り出し, 重量測定後ホモジナイズしてサンプルを作製した。プロスタグランジン E₂, プラジキニン, インターロイキン - 1 を ELISA 法にて測定した。

(5) 組織内細菌定量

(4) と同様に摘出した口腔粘膜組織ブロックを一定量のリン酸緩衝食塩水に入れ, 30 秒間超音波をかけて組織内の細菌を溶液中に漏出させた。これを BHI 寒天培地に播種し, 2 日後にコロニー数を数えることで細菌量を定量した。

(6) 細菌感染抑制の影響

スルファメトキサゾール (800 mg/l) とトリメトプリム (400 mg/l) の混合溶液を各モデルの粘膜炎作製前から飲水させて投与した。

(7) 抗菌ペプチドレベルの検討

口内炎モデルラットから摘出した三叉神経節および口内炎組織を用いて, リアルタイム RT-PCR 法にて抗菌ペプチドであるヘプシジンおよびセリンプロテアーゼインヒビター 3 の RNA 定量を行った。

4. 研究成果

口内炎モデルラットにおいて, 酢酸処理 2

日目に潰瘍を伴う明らかな口内炎が発症した(図 1A)．口内炎増悪モデルでは，下口唇の腫脹がみられ，口内炎の顕著な増悪が認められた．外傷性口腔粘膜炎モデルでは，ワイヤー装着後 1 日目に粘膜下膿瘍を伴う潰瘍が認められた(図 1B)．各処置により異なる所見を示す 3 種類の口腔粘膜炎モデルが完成した．

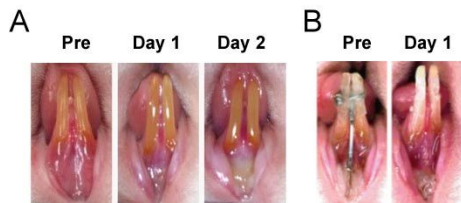


図 1

三種類のモデルにおける疼痛評価を行ったところ，口内炎および口内炎増悪モデルでは酢酸処理 2 日目に，外傷性口内炎モデルではワイヤー装着 1 日目に自発痛および機械的アロディニアが認められた．口内炎モデルと比較して口内炎増悪モデルでは疼痛が悪化していた．

口内炎部組織中の細菌コロニー数は全モデルにおいて好気性菌および嫌気性菌ともに増加した．しかし，外傷性口腔粘膜炎モデルにおいては，その増加程度は低かった．また，口内炎モデルにおいて，炎症性サイトカインであるインターロイキン - 1 β ，プラジキニンおよびプロスタグランジン E₂ 量が増加した．

次に，組織内に侵入した細菌が口腔粘膜炎の程度や疼痛に関与しているかどうかを調べるために，抗菌薬を飲料水に混ぜて口腔粘膜炎発症前から摂取させた．その結果，各モデルで増加した細菌コロニー数はコントロールレベルまで減少した．また，口内炎モデルおよび口内炎増悪モデルにおいては，口内炎の肉眼的所見(visual score)が減少し，疼痛の抑制が認められた(図 2)．一方で，外傷性口腔粘膜炎モデルにおいては，肉眼的所見

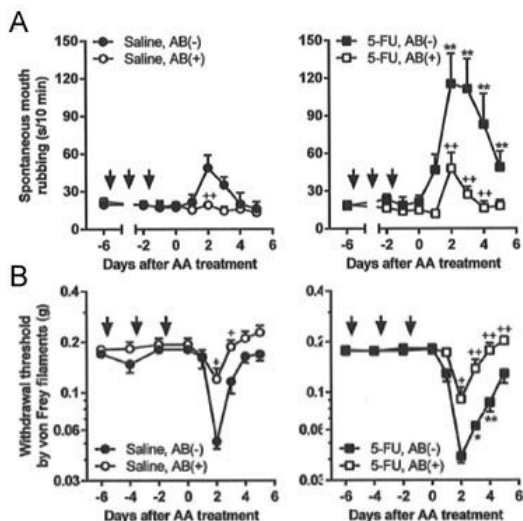


図 2

は若干の減少が認められたが，疼痛に変化は認められなかった．おそらく口腔粘膜炎発症による細菌コロニー数の増加程度が他のモデルに比べて低かったことが関与していると考えられる．

抗菌ペプチドとして知られるヘプシジン及びセリンプロテアーゼインヒビター 3 について，口内炎モデルラットの三叉神経節における mRNA を測定した．その結果，*Hamp* (ヘプシジン)および *Serpina3n* (セリンプロテアーゼインヒビター 3) は，コントロール(Naive)群と比べて有意に増加した(図 3A: *Hamp*)．しかし，抗菌薬投与群では増加は認められなかった．さらに，潰瘍部位における *Hamp* mRNA 量も酢酸処理 2 日目で増加し，抗菌薬処置での増加は認められなかった(図 3B)．

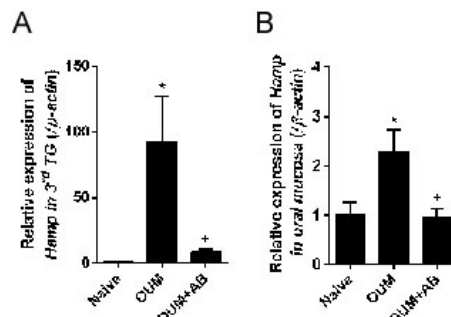


図 3

以上の結果より，酢酸処理や持続性の機械刺激による口腔粘膜上皮の破壊が感染性炎症を引き起こし，疼痛を伴う潰瘍性口内炎を発症すること，同時に，感覚ニューロンおよび潰瘍部位において抗菌作用を持つ遺伝子発現が増強される可能性が示唆された．

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 4 件)

Hitomi, S., Ono, K., Terawaki, K., Matsumoto, C., Mizuno, K., Yamaguchi, K., Imai, R., Omiya, Y., Hattori, T., Kase, Y., Inenaga, K.: [6]-gingerol and [6]-shogaol, active ingredients of the traditional Japanese medicine hangeshashinto, relief oral ulcerative mucositis-induced pain via action on Na⁺ channels. *Pharmacol Res.* 117: 288-302, 2017. 査読有
DOI:10.1016/j.phrs.2016.12.026

Ito, M., Ono, K., Hitomi, S., Nodai, T., Sago, T., Yamaguchi, K., Harano, N., Gunnjigake, K., Hosokawa, R., Kawamoto, T., Inenaga, K.: Prostanoid-dependent spontaneous pain and PAR2-dependent

mechanical allodynia following oral mucosal trauma: involvement of TRPV1, TRPA1 and TRPV4. Mol Pain. 13. 2017. 査読有
DOI:10.1177/1744806917704138

Hitomi, S., Ono, K., Yamaguchi, K., Terawaki, K., Imai, R., Kubota, K., Omiya, Y., Hattori, T., Kase, Y. and Inenaga, K.: The traditional Japanese medicine hangeshashinto alleviates oral ulcer-induced pain in a rat model. Arch. Oral Biol. 66: 30-37, 2016. 査読有
DOI:10.1016/j.archoralbio.2016.02.002

Yamaguchi, K., Ono, K., Hitomi, S., Ito, M., Nodai, T., Goto, T., Harano, N., Watanabe, S., Inoue, H., Miyano, K., Uezono, Y., Matoba, M. and Inenaga, K.: Distinct TRPV1- and TRPA1-based mechanisms underlying enhancement of oral ulcerative mucositis-induced pain by 5-fluorouracil. Pain. 157(5):1004-20, 2016. 査読有
DOI:10.1097/j.pain.0000000000000498

〔学会発表〕(計 23 件)

人見涼露, 小野堅太郎, 野代知孝, 伊藤美紗, 正木千尋, 細川隆司, 稲永清敏, 酢酸誘発口内炎モデルラットにおける疼痛関連因子の変化, 第 58 回歯科基礎医学会, 2016 年 8 月 24-26 日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)

人見涼露, 小野堅太郎, 山口喜一郎, 寺脇潔, 松本千波, 大宮雄司, 稲永清敏, Shogaol と gingerol は Nav を介して口内炎疼痛を抑制する, 第 93 回日本生理学会, 2016 年 3 月 22-24 日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)

人見涼露, 小野堅太郎, 山口喜一郎, 寺脇潔, 松本千波, 大宮雄司, 稲永清敏, 半夏瀉心湯による口内炎疼痛抑制には shogaol および gingerol の Nav 抑制作用が関与する, 第 9 回三叉神経領域の感覚運動統合機構研究会, 2015 年 11 月 28-29 日, (福岡県・志賀島)

S. Hitomi, K. Ono, K. Yamaguchi, Y. Omiya, K. Terawaki, K. Inenaga, Ginger-contained shogaol and gingerol inhibit oral ulcer-induced pain through sodium channel blockage, Society for neuroscience 2015, 2015 年 10 月 17-21 日, Chicago (U.S.A)

人見涼露, 小野堅太郎, 山口喜一郎, 寺脇潔, 松本千波, 大宮雄司, 稲永清敏, 半夏瀉心湯による口内炎疼痛抑制には shogaol および gingerol の Nav1.8 抑制作用が関与する,

第 66 回西日本生理学会, 2015 年 10 月 9-10 日, 久留米大学筑水会館(福岡・久留米市)

6. 研究組織

研究代表者

人見 涼露 (HITOMI, Suzuro)

九州歯科大学健康増進学講座生理学分野・助教

研究者番号: 70548924