

令和元年8月30日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11566

研究課題名(和文) 新たな歯痛治療法の確立を目指した口腔顔面痛の発症機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of the onset mechanism of orofacial pain with the aim of establishing a new treatment for toothache

研究代表者

清水 康平 (SHIMIZU, Kohei)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：10508609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄炎の発症は、口腔顔面皮膚、隣在歯髄および対合歯髄の興奮性増強を誘導する。その要因として、歯髄炎発症後の、三叉神経節におけるConnexin43, Satellite glial cell, TRPV1, IL-1, IL-1RI等の活性化および発現増強が関与することを明らかにした。また、咬筋の収縮持続は、三叉神経脊髄路核におけるpERK, アストロサイトの発現増強および活性化亢進を誘導し、歯髄の異所性痛覚過敏増強に寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この発症メカニズムの本態を解明することは、診査・診断法の精度そのものが向上するだけでなく、新たな治療法の確立も可能となり、極めて臨床的意義および患者貢献度の高いプロジェクトであるといえる。また患者の通院期間の短縮は結果として国の医療費削減にも寄与し、本研究推進による経済的影響も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The onset of pulpitis induces excitability enhancement of orofacial skin, adjacent dental pulp and paired dental pulp. It was clarified that activation and enhanced expression of Connexin 43, Satellite glial cells, TRPV1, IL-1, IL-1 RI, etc. in the trigeminal ganglia are involved as the factors. In addition, it was revealed that the contraction duration of the masseter muscle induces the enhanced expression and activation of pERK and astrocytes in the trigeminal spinal nucleus and contributes to the ectopic hyperalgesia enhancement of the dental pulp.

研究分野：歯科保存学

キーワード：関連痛 歯痛 歯髄炎 歯痛錯誤 非歯原性歯痛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

歯科治療において、患者の訴えに翻弄され“拙速な診査・診断”を行い、結果として“誤診”や“誤治療”を招いている症例も少なからず存在する。この誘因となるものは患者の訴える“原因不明の歯痛”が挙げられるが、その実態は“関連痛”や“異所性の疼痛異常”などの異常感覚と考えられ、原因部位の同定を困難にしている。この発症メカニズムの本態を解明することは、診査・診断法の精度そのものが向上するだけでなく、新たな治療法の確立も可能となり、極めて臨床的意義および患者貢献度の高いプロジェクトであるといえる。また患者の通院期間の短縮は結果として国の医療費削減にも寄与し、本研究推進による経済的影響も大きいと考えられる。そこで申請者は、歯髄炎に関連した異常疼痛発症メカニズムの解明を目的とし、以下の研究計画を起案した。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、神経細胞と Glia 細胞 (Microglia、Astrocyte) 間の細胞間情報伝達を担う GAP 結合である Connexin43 (Cx43) の末梢組織炎症後における活性化、および Glia 細胞が産生されているサイトカインのうち、特に IL-1 $\beta$  に着目し、この 2 つの領域での Glia 細胞、神経細胞およびサイトカインがいかなる機能連関で異所性疼痛発症に関与するかを解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 麻酔薬および麻酔方法

ラットをイソフルラン (4%) にて麻酔後、三種混合麻酔薬腹腔内投与 (塩酸メドトミジン 0.15mg/kg, ミダゾラム 2mg/kg, 酒石酸ブトルファノール 2.5mg/kg) を用いてラットをさらに深く麻酔し苦痛を最小限にする。

### (2) 研究計画 I: 急性歯髄炎により誘導される歯痛錯誤の末梢神経機構

#### ラット歯髄炎モデルの作成

上記の麻酔を施したラットの右側上顎第一臼歯への CFA (生理食塩水にて 50% に希釈) 投与後 3 日を歯髄炎期とする。

#### 同側第二臼歯への化学刺激により誘発される同側顎二腹筋筋放電 (EMG) の記録

右側上顎第一臼歯歯髄内 CFA 投与 3 日目で、ラットをイソフルラン (4%) にて麻酔後、同側顎二腹筋に 2 本の EMG 電極を挿入し筋放電量が安定するまで静置する。その後、同側第二臼歯を露髄し、カプサイシン (3.0  $\mu$ M, Wako) 投与を行い、投与前後の反射性顎二腹筋活動変化を経時的に記録し解析する。

#### 三叉神経節の活性化型 Satellite glial cell および Connexin43 の共発現の検索

右側上顎第一臼歯歯髄内 CFA 投与後および同側第二臼歯への逆行性神経トレーサーである FG 投与後 3 日目で、ラット麻酔後、通法に従い灌流固定を行う。灌流固定終了後に同側三叉神経節を摘出し、連続切片標本作成後、炎症のない第二臼歯支配神経細胞を標識する FG、三叉神経節内で Satellite glial cell の活性化マーカーである GFAP、およびグリア間に存在する Gap 結合を構成する Connexin43 との共発現を免疫組織学的手法にて解析する。

#### Connexin43 阻害薬による歯髄炎による異所性痛覚過敏抑制効果の検索

ラットを麻酔後、片桐らの方法に従い、ガイドカニューレを頭蓋骨表面から 9 mm 下方に挿入し、カニューレの先端が三叉神経節の表面にて接する状態に設置する。固定後、Connexin43 阻害薬 (ioxynil octanoate, 30  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ L/day) をガイドカニューレより 3 日間持続投与した後に、上記にて得られた結果をもとに、Connexin43 阻害薬の三叉神経節内微量投与により誘導される GAP 結合阻害により、第一臼歯の歯髄炎発症後に発現する隣在歯の痛覚過敏はどのような変調を受けるか上記と同様の方法で EMG を記録し、検索を行う。

### (3) 研究計画II：咬筋痛に誘導される歯髄痛覚過敏発症の中樞神経機構解明

#### ラット筋痛モデルの作成

上記の麻酔を施したラットの右側咬筋上の皮膚内に双極電極を挿入し、咬筋に電気刺激(10 mA, 200  $\mu$ s, 10 Hz, 30 min/day)を与えることにより過収縮を引き起こして咬筋痛モデルを作製する。

#### 咬筋と同側の上顎第一臼歯への化学刺激により誘発される筋放電 (EMG) の記録

経日的な咬筋過収縮後 14 日目でラットをイソフルラン (4%) にて麻酔後、咬筋と同側のオトガイ舌筋に 2 本の EMG 電極を挿入し、筋放電量が安定するまで静置する。その後、右側上顎第一臼歯にペーパーポイントに浸漬したカプサイシン (3.0  $\mu$ M, Wako) 投与し、投与前後の反射性オトガイ舌筋活動変化を経時的に検索する。

#### ラット咬筋への持続的電気刺激により誘発される逃避行動閾値変化の記録

同モデルラットの咬筋へ直径 6.32 mm の圧子を用いて加圧し、経日的な逃避反射閾値の変化を観察する。咬筋過収縮群および Sham 群にて記録を行う。

#### 三叉神経脊髄路核の細胞活性の検索

経日的な咬筋過収縮後 14 日目で、ラットをイソフルラン (4%) にて麻酔後、通法に従い灌流固定を行う。灌流固定終了後に三叉神経脊髄路核と上部頸髄を含む脳部分を摘出し、連続切片標本作成後、三叉神経脊髄路核内での Astrocyte の活性化マーカーである GFAP の発現を免疫組織学的手法にて解析する。

#### 三叉神経脊髄路核におけるアストログリア活性阻害薬の効果

上記、および で得られた結果に基づいて麻酔後、三叉神経脊髄路核へ mini-osmotic pump システムを付与する。その後、三叉神経脊髄路核へ 7 日間投与された Astrocyte 活性化阻害薬である MSO (9.0  $\mu$ g) は、持続的咬筋過収縮により誘導された逃避行動閾値変化や筋放電量にどのような変化を誘導するかについて解析を行う。

## 4. 研究成果

歯髄炎の発症は、口腔顔面皮膚、隣在歯髄および対合歯髄の興奮性増強を誘導する。その要因として、歯髄炎発症後の、三叉神経節における Connexin43, Satellite glial cell, TRPV1, IL-1 $\beta$ , IL-1RI 等の活性化および発現増強が関与することを明らかにした。また、咬筋の収縮持続は、三叉神経脊髄路核における pERK, アストロサイトの発現増強および活性化亢進を誘導し、歯髄の異所性痛覚過敏増強に寄与することを明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

1. Komiya H, Shimizu K, Ishii K, Kudo H, Okamura T, Kanno K, Shinoda M, Ogiso B, Iwata K (2018) Connexin 43 expression in satellite glial cells contributes to ectopic tooth-pulp pain. J Oral Sci, doi: 10.2334/josnusd.17-0452. (査読有り)
2. Watase T, Shimizu K, Komiya H, Ohara K, Iwata K, Ogiso B (2018) Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 channel expression in orofacial cutaneous hypersensitivity following tooth pulp inflammation. J Oral Sci, doi: 10.2334/josnusd.16-0854. (査読有り)
3. 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 (2018) Role of medullary astroglial glutamine synthesis in tooth pulp hypersensitivity associated with frequent masseter muscle contraction. Mol Pain, doi: 10.1177/1744806918763270. (査読有り)
4. Komiya H, Shimizu K, Noma N, Tsuboi Y, Honda K, Kanno K, Ohara K, Shinoda M, Ogiso B, Iwata K (2017) Role of Neuron-Glial Interaction Mediated by IL-1 $\beta$  in Ectopic Tooth Pain. J Dent Res, doi: 10.1177/0022034517741253. (査読有り)

5. Honda K, Shinoda M, Kondo M, Shimizu K, Yonemoto H, Otsuki K, Akasaka R, Furukawa A, Iwata K (2017) Sensitization of TRPV1 and TRPA1 via peripheral mGluR5 signaling contributes to thermal and mechanical hypersensitivity. *Pain*, 76, 1754-1764. (査読有り)
6. Noma N, Shimizu K, Watanabe K, Young A, Imamura Y, Khan J (2017) Cracked tooth syndrome mimicking trigeminal autonomic cephalgia: A report of four cases. *Quintessence Int*, 48, 329-337. (査読有り)
7. Noma N, Watanabe K, Sato Y, Imamura Y, Yamamoto Y, Ito R, Maruno M, Shimizu K, Iwata K (2017) Botulinum neurotoxin type A alleviates mechanical hypersensitivity associated with infraorbital nerve constriction injury in rats. *Neurosci Lett*, 637, 96-101. (査読有り)
8. Ibi H, Hayashi M, Yoshino F, Tamura M, Yoshida A, Kobayashi Y, Shimizu K, Lee MC, Imai K, Ogiso B (2017) Bactericidal effect of hydroxyl radicals generated by the sonolysis and photolysis of hydrogen peroxide for endodontic applications. *Microb Pathog*, doi:10.1016/j.micpath.2016.12.010 (Epub). (査読有り)
9. 清水康平, 羽鳥啓介, 大原絹代, 篠田雅路, 小木曾文内 (2016) 1つ上を目指す歯内療法へのアプローチ (IV) 抜髄 Initial Treatment (臨床編II) 歯内療法における打診痛を考察する, *日本歯科評論*, 76, 47-58. (査読有り)

〔学会発表〕(計5件)

1. 清水康平, 渡瀬哲郎, 小木曾文内 (2017) 咬筋痛に関与した歯髄痛覚過敏発症の神経機構解明. 第146回日本歯科保存学会秋季学術大会
2. 古宮宏記, 清水康平, 大原絹代, 高橋なつみ, 小木曾文内 (2017) 急性歯髄炎により誘導される歯痛錯誤の末梢神経機構. 第146回日本歯科保存学会秋季学術大会
3. 村山翔太, 武市収, 清水康平, 小林真之, 小木曾文内 (2016) 無髄神経欠損モデルラットにおける島皮質局所回路の変化. 第145回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 古宮宏記, 清水康平, 渡瀬哲郎, 篠田雅路, 岩田幸一, 小木曾文内 (2016) 急性歯髄炎により誘導される歯痛錯誤の末梢神経機構. 第21回日本口腔顔面痛学会学術大会
5. 渡瀬哲郎, 清水康平, 篠田雅路, 古宮宏記, 岩田幸一, 小木曾文内 (2016) 咬筋痛に誘発される歯髄痛覚過敏へのアストロサイトの関与. 第21回日本口腔顔面痛学会学術大会

〔図書〕(計1件)

1. 木ノ本善史 編著, 興地隆史, 新井恭子, 小木曾文内, 佐藤勸哉, 大島勇人, 松浦信幸, 泉 英之, 北村和夫, 澁川義幸, 長谷川誠実, 阿部 修, 吉川剛正, 田崎雅和, 清水康平, 加藤広之, 田中利典, 村松敬, 羽鳥啓介, 澤田則宏, 石井 宏, 五十嵐 勝, 大原絹代, 佐藤暢也, 清水花織, 北島佳代子, 篠田雅路, 岩波洋一 (2016) 抜髄 Initial Treatment 治療に導くための歯髄への臨床アプローチ, 株式会社ヒョーロン・パブリッシャーズ, 東京, 139-150.

〔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:

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：篠田 雅路

ローマ字氏名：SHINODA, Masamichi

所属研究機関名：日本大学

部局名：歯学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20362238

研究分担者氏名：本田 訓也

ローマ字氏名：HONDA, Kuniya

所属研究機関名：日本大学

部局名：歯学部

職名：ポスト・ドクトラル・フェロー

研究者番号（8桁）：20548945

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。