

令和 2 年 5 月 23 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17300

研究課題名(和文)薬物療法に依存しない慢性疼痛緩和法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a chronic pain relief method that does not depend on drug therapy

研究代表者

大郷 英里奈 (Daigo, Erina)

大阪歯科大学・歯学部・講師(非常勤)

研究者番号：50707073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経損傷により神経障害性疼痛が生じる。この疼痛が長期化するとうつ病を発症する可能性が高く、うつ病有病率も非常に高い。本研究では疼痛緩和効果を有するレーザー治療をうつ病を併発した神経損傷ラットを用いて基礎的に検証した。その結果、神経修復に関与するグリア細胞の発現増加と活性促進、損傷周囲組織の疼痛過敏の減少を認めた。これはうつ病薬物服用の減量とそれに伴う副作用のリスクの抑制にも繋がると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまではレーザー治療による疼痛緩和効果に対して懐疑的な意見が多かった。しかし、本研究により、中枢神経系に存在し神経損傷時に即座に神経修復機構として働くグリア細胞の活性化とその細胞動態の解明、さらに治療に伴う副作用の有無を明らかにすることで臨床応用へのEBMの確立に貢献できると考える。さらに、慢性疼痛化しやすいうつ病患者へのレーザー応用は薬物服用の減量による副作用出現の抑制にも寄与できると考える。

研究成果の概要(英文)：Nerve damage often causes neuropathic pain. If this pain is prolonged, depression is likely to develop and the prevalence of depression is very high. In the present study, laser treatment having a pain-relieving effect was fundamentally verified using nerve-injured rats with depression. As a result, increased expression and activation of glial cells involved in nerve repair and decreased pain hypersensitivity in the tissues surrounding the injury were observed. We believe that this will also lead to a reduction in the dose of depressive drug and a reduction in the risk of side effects.

研究分野：歯科麻酔

キーワード：神経障害性疼痛 低反応レベルレーザー治療 うつ病 下歯槽神経損傷 半導体レーザー 疼痛緩和効果

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。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、日本国内で神経障害性疼痛患者数は約 660 万人と推定されるという報告がある(日本大学医学部小川節郎教授調べ)。神経障害性疼痛とは手術や外傷による神経の損傷に起因する疼痛である。歯科領域では抜歯や麻酔抜髄、伝達麻酔、インプラント手術等により生じることがある。この疼痛は持続的または間欠的な自発痛や痛覚過敏、さらに非常に微弱な物理的的刺激でも激痛を生じるアロディニアと呼ばれる特異的で難治性の慢性疼痛を呈し、患者の QOL の低下を招く。さらに、長期化することで「うつ病」を発症させる可能性もある。特に、神経障害性疼痛患者のうつ病有病率は非常に高く (Gen Hosp Psychiatry. 1995; 17(6): 399-413)、さらにうつ病患者においては「痛み」に対する抵抗性の低下も報告されている (Psychosom Med. 1994; 56(4): 345-352)。

神経障害性疼痛の治療法は三環系抗うつ薬を代表とする薬物療法が第一選択 (Pain. 1992; 49(2): 205-219) とされるが、治療抵抗性が高く、鎮痛効果を得るよりも少量の投与で副作用を発現する危険性がある。さらに、うつ病を併発した患者では神経障害性疼痛に対する投与量よりも多量で、服用期間も長期に及ぶため、悪心やふらつき等の副作用の問題がある。

前述より、薬物療法による副作用のリスクを軽減させることができ、低侵襲性の治療法の確立が望まれる。近年、この目標を達成し、難治性の慢性疼痛の緩和に有効な治療法としてレーザー治療が注目されている。

レーザー治療には生物の生存閾値を超えた不可逆的な反応で組織の切開や蒸散等に用いられる高反応レベルレーザー治療と細胞の生存閾値内で可逆的な反応を呈する低出力レベルレーザー治療 (Low reactive Level Laser Therapy ; 以下 LLLT) がある。特に、LLLT には光生物学的および光化学的效果により組織の賦活化を期待した消炎・創傷治癒促進効果や疼痛緩和効果がある。中でも、疼痛緩和効果では神経の伝達抑制や血管拡張による血流改善などの生理作用が多数報告されている。

神経障害性疼痛モデルの実験動物を使用した研究において、LLLT により神経障害性疼痛の感覚異常の発現に最も関与するとされる炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  の過剰発現を抑制により痛覚閾値の緩和を認めた (J Comp Neurol. 2012 Sep 1; 520(13): 2903-16)。しかし、神経損傷した際、即座に神経修復機構として働くミクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞やマクロファージが注目を浴びようになっている (Nature. 2003; 424(6950): 778-783, J Neurosci. 2008 Nov 26; 28(48): 12775-87, J Neurosci. 2009 Sep 9; 29(36): 11161-71。) もの、LLLT による中枢神経系への効果については未知数である。

### 2. 研究の目的

うつ病を発症させる処置を行ったのち下歯槽神経を損傷させたモデルラットに対して疼痛緩和を目的とした LLLT を行い、その後の疼痛に関する行動学的解析および神経修復機構として働くグリア細胞の三叉神経脊髄路核における細胞の発現変化および形態学的変化を解析することである。

### 3. 研究の方法

#### < 実験動物 >

生後 6 週齢の SD 系雄性ラット (体重 150 ~ 250g) を用いた。飼育環境について、1 ゲージに 3 匹ずつ飼育し、固形飼料と飲用水 (水道水) を自由に摂取させた。飼育室は 24  $\pm$  2 °C、湿度 50  $\pm$  5% に維持し、12 時間毎の明暗サイクルとした。

#### < うつ病発症モデルの作製 >

強制水泳試験法 (Nature. 1977 Apr 21; 266(5604): 730-2.) に準じてラットにストレスを与えていく。その後、発症の妥当性を検証するために血中コルチコステロン濃度 (ストレス負荷後に上昇する) を計測し上昇していると確認できたものを「うつ病モデル」として実験に使用した。

#### < 下歯槽神経損傷モデルの作製 >

咬筋上皮より骨膜に達するように切開・剥離後、下顎孔から約 2mm の下顎管をマイクロモーターにて削合し、下歯槽神経を露出させる。その後、セーレにて神経を切断 (神経再生しないように神経切断端は 1mm の間隙をあける) し、その後縫合して閉創した。これと同時に、手術の影響による神経障害を否定するために、下歯槽神経の切断は行わず、神経を露出させたのみで閉創を行った疑似手術も作製した。



#### < 半導体レーザー装置および照射条件 >

・ Biolase 社製 iLase、波長 940nm、レーザーチップ径 0.4mm  
・ 設定出力 ; 0.3W、CP1 モード (ゲートッドパルス波、0.1msec ON 0.2msec OFF の 1 サイクル、平均出力 0.1W) 照射時間 26 秒間、照射距離は患部から 15 mm 離れた距離、総照射エネルギー量約 9.2 J/cm<sup>2</sup>。



\* 上記の照射条件は予備実験および類似研究論文を参考にし、施術相当部皮膚上に LLLT を行った。その 6 時間後に照射部皮膚上をカメラにて撮影し肉眼的に器質的变化 (上皮組織の蒸散や炭化層など) がないこと、さらに同部の病理組織学的標本作製し同様の器質的变化 (上皮組織の融解、水泡形成、組織の実質欠損など) もないことを確認した上で決定した。

#### < 実験群 >

対照群として Ope 群 (神経損傷のみ) 実験群として Ope-L 群 (神経損傷後、LLLT を行った) Sham-L 群 (神経損傷疑似手術後、LLLT を行った) の 3 群とした。また、使用したラットは行動

学的解析には各群ともに6匹ずつの合計18匹、免疫組織学的解析には術後3、5、7、14および28日目でも各6匹ずつの合計90匹を使用した。

<実験方法>

Ope-L群およびSham-L群は7日目まで毎日、LLLTを行う(但し、免疫組織学的解析における術後3および5日目のラットに関しては、その時点まで毎日のLLLTとした)。

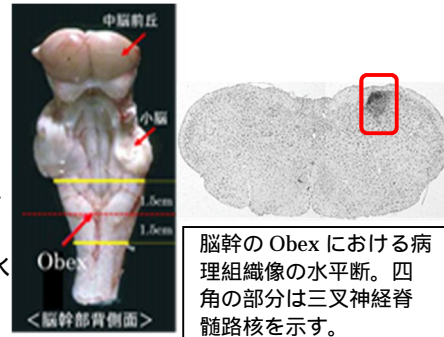
)行動学的解析;

下歯槽神経を損傷させる術前、術後1、3、5、7、14、21および28日目を対象に行った。Von Frey Filament(写真)を用いて、損傷部周囲皮膚の感覚閾値を計測する。(但し、各ラットの痛覚に対する個体差を排除するために、損傷前と損傷後の閾値の相対値を数値化した。)



)免疫組織学的解析;

ペントバルビタール麻酔薬による全身麻酔下にて、左心室より4%パラホルムアルデヒド溶液で10分程度の還流固定を行い、脳幹部を摘出後、同溶液にて48時間浸漬固定を行った。固定およびスクロース浸漬後、冷却したヘキサン中で急速凍結し、OCTコンパウンドで凍結包埋した。凍結包埋ブロックをクライオスタットにより厚さ10μmの脳幹部三叉神経脊髄路核部の水平断連続凍結切片を作製した(模式図)。同切片を神経障害性疼痛に関与するグリア細胞のマーカーである



脳幹のObexにおける病理組織像の水平断。四角の部分は三叉神経脊髄路核を示す。

Iba1(グリア細胞の1つであるミクログリアのマーカー)、GFAP(グリア細胞の1つであるアストロサイトのマーカー)の1次抗体を用いて反応させ、続いて二次抗体を反応させたのちにDABを用いて発色を行い、病理組織標本を観察した。

病理組織標本の観察および解析にはデジタルマイクロスコープ(KEYENCE社製、大阪)を用いて標本をスキャンし、ソフトウェア(NIHimage)を用いて行った。組織学的計測は神経切断後のミクログリア、アストロサイトの形態変化と発現量(染色面積を全体の面積との割合で表示)を3群間で比較検討した。

= Iba1 および GFAP 発現領域と計測部位 =

摘出した脳幹のObex高さでの水平断連続切片上(組織図)の三叉神経脊髄路核部(四角で囲んだ部分)の各染色による細胞発現が最も確認できるところを中心に計測を行った。統計学的解析には各群間はone-way ANOVA分析により統計処理を行った。群間内の比較にはPost hoc testとしてFisher検定を用いた。p 0.05未満を有意差ありとした。

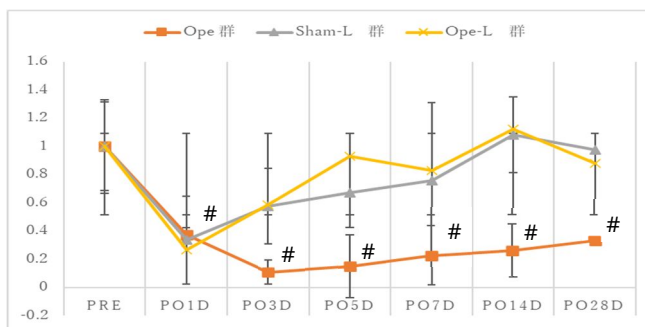
尚、本研究のプロトコルは大阪歯科大学動物実験指針に基づき、動物実験委員会の承認を得て行った。(承認番号18-01002)

4. 研究成果

)行動学的解析;

この実験は神経障害性疼痛に対して、LLLTによる疼痛緩和効果を検証するために行った。

今回の計測方法は処置前(この時期では処置予定部)の皮膚にVon Frey Filamentを用いて刺激を与え、その時の疼痛閾値を計測する。次に処置後に損傷部周囲皮膚に対して同様の刺激を与えて計測を行う。この計測により得た数値をそれぞれ(処置後の疼痛閾値)/(処置前の疼痛閾値)として算出することで個体差を排除することができ、相対的な疼痛閾値を表示が可能となる。グラフの数値は各群6匹の数値を平均したものをその群の閾値とした。



神経損傷周囲皮膚の疼痛閾値変化 { 縦軸; 処置前の疼痛閾値に対する処置後の疼痛閾値の相対値  
横軸; 処置後の経過日数  
# ; p 0.05 VS Ope-L群

処置後1日目は3群間すべてにおいて、疼痛閾値の低下が認められる。これは手術により損傷部の皮膚の炎症性の疼痛が出現したためと考えられる。炎症性疼痛のためhypersensitivity(弱い疼痛刺激も強い疼痛刺激としてとらえる状態)が生じ、von Frey filamentによる刺激に対し敏感に反応した。

処置後3日目はSham-L群では疼痛閾値の上昇が認められた。一方Ope群では神経損傷によるアロディニア(非常に微弱な機械的刺激でも激痛を生じる現象)を生じたと考えられ、1日目の



疼痛閾値よりもさらに閾値の低下を認めた。しかし、Ope-L 群では神経損傷が生じているにもかかわらず疼痛閾値は Sham-L 群と同等にまで上昇した。

処置後 5 日目～28 日目は Sham-L 群では徐々に疼痛閾値の上昇が認められ、14 日目には処置前とほぼ同じレベルまで疼痛閾値が上昇した。Sham-L 群と同様に、Ope-L 群も徐々に疼痛閾値が上昇し処置後 14 日目にもほぼ処置前と同等の疼痛閾値のレベルまで上昇が認められた。一方 Ope 群は 28 日間にわたって若干の疼痛閾値の上昇はあるものの処置前の疼痛閾値と同レベルまでには上昇せず、処置前の閾値よりも低いレベルで推移しアロディニア状態を示していた。

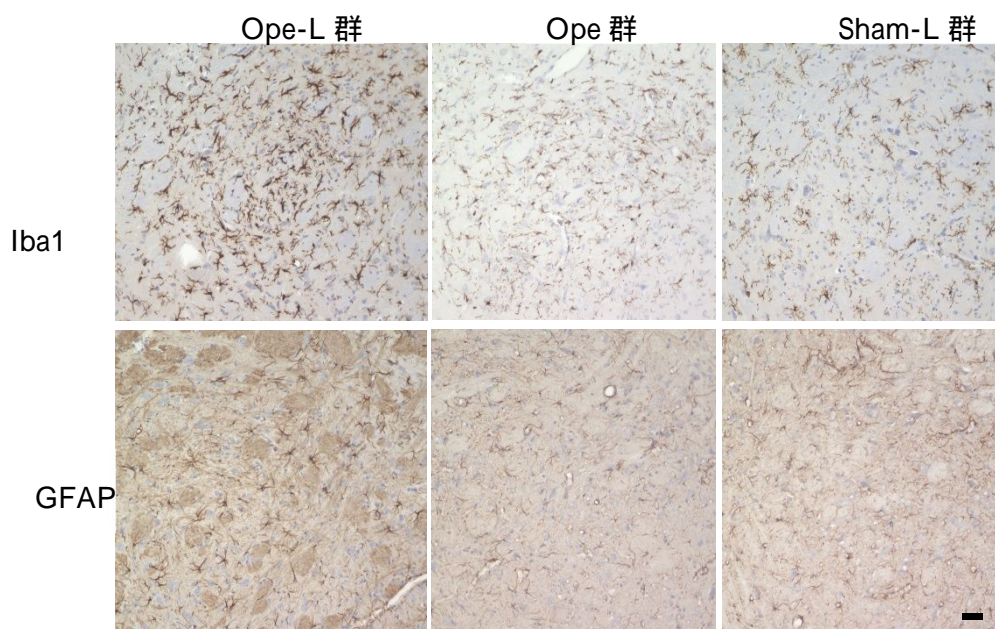
以上のことより Ope-L 群は Ope 群と比較して有意に疼痛閾値の上昇を認め、Sham-L 群とほぼ同等の疼痛閾値までの回復を認めた。

免疫組織学的解析

この解析では神経障害性疼痛に対して、中枢神経系において即座に神経修復機構として働くグリア細胞のミクログリア (Iba1 による免疫染色) とアストロサイト (GFAP による免疫染色) の発現や活性化 (細胞の肥大化や神経脚等の形態変化を呈する) を検証するために行った。このグリア細胞は神経損傷の初期には疼痛を引き起こす原因となるが、その後は神経線維修復に関する事が報告されている。

計測は「3. 研究の方法」の「Iba1 および GFAP 発現領域と計測部位」を参照。

< 処置後 3 日目 >

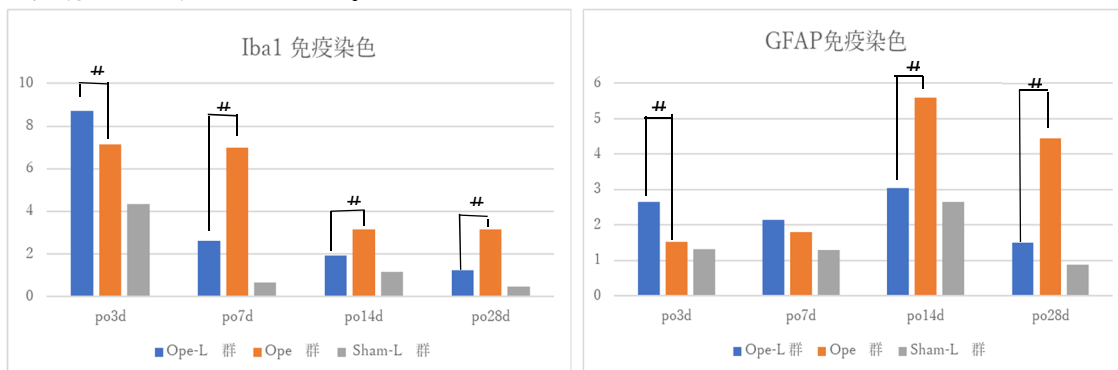


処置後 3 日目における Iba1 と GFAP の免疫染色像

Scale bar 50 μm

Iba1 は処置後 3 日目において Sham-L 群では発現量はわずかであったのに対し、Ope 群と Ope-L 群では有意に発現量が増加していた。さらに Ope 群との比較において、Ope-L 群は有意に発現量が増加しており、ミクログリアの細胞体の肥大化と神経脚の伸長も認められた。

しかし、処置後 7 日目には Iba1 の発現量は Ope 群と比較して減少し、逆に Ope 群の Iba1 の発現量の上昇が認められた。その後 14 日目、28 日目と経時的に発現量は減少していき、Sham-L 群の発現量に近くなっていった。



処置後の経時的な Iba1 と GFAP の発現 縦軸；単位面積当たりの Iba1 と GFAP の染色面積  
横軸；実験群

# ; p 0.05 vs Ope-L 群

GFAP について、処置後 3 日目の Sham-L 群では発現量はわずかであったのに対し、Ope 群と

Ope-L 群では有意に発現量が増加していた。さらに、Ope 群との比較において Ope-L 群が有意に発現量が増加しており、アストロサイトの細胞体の肥大化と神経脚の伸展も認められた。

しかし GFAP も Iba1 と同様に処置後 7 日目からは Ope-L 群は発現量の減少が認められ、Ope 群と有意な差が認められなくなり、処置後 14 日目には Ope-L 群と比較して有意に発現量が減少し、Sham-L 群とほぼ同等のレベルまで減少した。処置後 28 日目にも処置後 14 日目と同様に Ope 群と比較して有意に発現量の減少が認められた。

<まとめ>

本研究結果から神経障害性疼痛に対する LLLT は、行動学的検証において損傷部周囲皮膚の痛覚閾値の上昇を認めたことでアロディニアの状態、つまり慢性疼痛の軽減ができる可能性が推察された。また、免疫組織学的解析では、下歯槽神経損傷の早期の段階で三叉神経の中核である脊髄路核に存在し神経修復に係るグリア細胞（ミクログリア、アストロサイト）の肥大化や発現量の増加を呈するという細胞の活性化を認めた。その後、経時的にグリア細胞の発現が減少した。

一般的に、ミクログリアの早期の活性化および発現量の増加は炎症性サイトカインなどの様々なメディエーターを放出し、疼痛状態を励起させる（Scholz and Woolf 2005）。この状態が神経障害性疼痛で認めるアロディニアを生じさせている可能性が高い。その一方、ミクログリアはこの異常な疼痛状態を抑えるために抗炎症性サイトカインの放出により炎症性サイトカインの活性の抑制も行う。つまり、このような神経障害性疼痛が長引くのはこのフィードバック機構がうまく機能していないためであると考えられている。

今回、LLLT によりグリア細胞を早期に活性化し、その後は経時的に発現量の減少を呈したことについて、LLLT がグリア細胞を活性化させることにより早期に抗炎症性サイトカインなどの抗炎症性因子を分泌し、その後グリア細胞自身で炎症を抑制する方向に作用したのではないかと考えられる。

以上より、神経障害性疼痛に対する LLLT はグリア細胞を介して初期の疼痛が緩和され、その後の神経修復機構も有意に活性化させることが可能であると示唆された。また、うつ病を発症している場合においても、LLLT によりアロディニアの状態を完治させることは不可能であるが、ある程度の疼痛緩和効果は期待できる可能性があると考えられる。そのため、これらの患者は服薬の減量が可能となり、さらに副作用のリスクもある程度抑制することにつながると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Erina Daigo, Yishihiro Momota	4. 巻 52(1)
2. 論文標題 Rat hind paw behavior in response to an inferior alveolar nerve injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Osaka Dental University	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大郷英里奈、大郷友規、石川正嗣、福岡宏士
2. 発表標題 神経障害性疼痛モデルラットにおける低反応レベルレーザー治療による疼痛緩和効果
3. 学会等名 日本レーザー歯学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考