

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09868

研究課題名(和文) 矯正歯の移動に伴う異所性疼痛に対するレスベラトロールの役割

研究課題名(英文) The role of resveratrol for heterotopic pain caused by orthodontic dental movement

研究代表者

島津 徳人 (Shimazu, Yoshihito)

麻布大学・生命・環境科学部・准教授

研究者番号：10297947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、実験的歯の移動を誘導することにより矯正処置側の左口ひげ部分への異所性痛覚過敏が観察された。異所性痛覚過敏の発現に関わるSpVc WDR ニューロンの過興奮がレスベラトロールの慢性投与により、おそらく歯根膜で産生されるプロスタグランジンの産生に関わるCox-2の活性を抑制して緩和することが推測された。おそらく三叉神経節内のニューロン間クロストークを減弱させることにより、レスベラトロールが矯正治療時に使用されるNSAIDsに代わる鎮痛薬として使用できる可能性、すなわち補完代替医療に貢献することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果として、レスベラトロールは矯正治療時に使用されるNSAIDsに代わり、副作用のない鎮痛薬として使用できる可能性、すなわち補完代替医療に貢献することが示唆された。これに加えて本研究の結果は、矯正処置時の歯の移動による三叉神経支配領域の炎症性痛覚過敏において、レスベラトロールが有効であるということが、歯科の臨床上有用であるインプラントなどの処置後に発生する三叉神経痛等の神経障害性疼痛においても効果が期待できることが推察された。今後、臨床応用を視野に入れた更なる研究が期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated whether administration of resveratrol attenuates the experimental tooth movement (ETM)-induced ectopic hyperalgesia associated with hyperexcitability of SpVc neurons. The threshold of escape from mechanical stimulation applied to the ipsilateral whisker pad in rats exposed to ETM was significantly lower than seen in control rats. The lowered mechanical threshold exposed to ETM had almost returned to the level of sham-treated rats following administration of resveratrol. The mean mechanical threshold of nociceptive SpVc neurons was significantly lower but the lower threshold could be reversed by administration of resveratrol. These results suggest that resveratrol attenuates ETM-induced mechanical ectopic hyperalgesia via suppression of peripheral and/or central sensitization. These findings support the idea that resveratrol is a potential therapeutic agent for the prevention of ETM-induced ectopic hyperalgesia.

研究分野：口腔病理学

キーワード：歯の矯正移動 ラット 臼歯 疼痛 三叉神経節 ニューロン グリア細胞 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

一般的に、歯科矯正治療を含む歯科臨床においては、炎症性疼痛緩和の治療には NSAIDs が使用され、Cox-2 の制御による侵害受容器の受容体を介する末梢性感作の抑制により、炎症性痛覚過敏が緩和される。NSAIDs には胃腸・腎障害などの副作用があり、その使用には制約が生じる。したがって、NSAIDs に替わる副作用のない鎮痛薬の候補として、食品成分の持つ疼痛緩和の可能性を探索することを目的とした本研究は補完代替医療の視点よりその重要性は大きい。現在まで、動物実験モデルを用いた矯正学的な歯の移動に伴う痛覚過敏発現に関わる侵害受容ニューロンの過興奮性に対するレスベラトロールの修飾作用を病態生理学的役割を系統的に解析した研究は見当たらない。歯科矯正処置後にとめられる「歯の移動に伴う炎症性疼痛」の発症機序の詳細は不明である。歯科矯正時の疼痛緩和の目的で「抗炎症性鎮痛薬」が使用されているが、疼痛緩和効果に付随して矯正学的な歯の移動を抑制することが指摘されている。最近、食物成分を含む薬物に頼らない疾病治療、即ち「補完代替医療」が注目されている。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでに、食品の生体調節機構に注目して、三叉神経領域での炎症性痛覚過敏とこの病態に重要な役割を担う疼痛伝達ニューロンの活動が、ポリフェノールの一種である「レスベラトロール」により緩和されることを明らかにしてきた。歯科矯正処置に伴う異所性痛覚過敏の緩和に対してもレスベラトロールの緩和効果が期待されることから、本申請課題では、矯正装置を装着後、実験的歯の移動に伴う「炎症性異所性痛覚過敏」が、「レスベラトロール」により歯の移動を損なわずに緩和される可能性を病態生理学的に系統解析することを目的とした。本研究は、矯正学的な歯の移動に伴う異所性疼痛の緩和に対して、食品成分由来の化学物質「レスベラトロール」により調節される可能性を明らかとし、補完代替医療として食品成分の持つ疼痛緩和の可能性に新たな知見を加えることができる。さらに、これらの知見は歯科臨床領域における異常疼痛発現機構の病態解明に基礎を与え、レスベラトロールが、歯科矯正処置を行う際の歯の移動を損なわず異常疼痛緩和に有効な健康食品の開発、薬物に頼らない疾病治療「補完代替医療」や、「副作用のない鎮痛薬」の開発に貢献する可能性を明らかとすることができるので重要性が高い。

3. 研究の方法

1. 歯科矯正処置及びレスベラトロールの投与

本研究では、雄性 Wistar ラットを使用した。動物は、無処置群、矯正処置群、矯正処置 + レスベラトロール群の 3 群に分けた。深麻酔状態にて、左側上顎第 1 臼歯に対して 10g の荷重を一定に負荷するため、NiTi 製コイルスプリングを連結したクランプを動物口腔内で装着し、これを「矯正処置群」とした。一方、何も処置を施さなかったものを「無処置群」、矯正処置群ラットに連日レスベラトロール (2mg/kg, i.p.) 投与したものを「矯正処置 + レスベラトロール群」とした。レスベラトロールはジメチルスルホキシド (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) に溶解させ 250 μ l に分注して保存した。矯正処置前日から電気生理学の実験までの 4 日間にわたり、レスベラトロールを慢性的に投与した。

2. 行動学的解析による逃避反射閾値の測定

異所性痛覚過敏の指標としての逃避反射閾値の測定については、矯正処置を行った前日から矯正処置を行った 3 日後までにおいて、von Frey hairs (0.16, 1, 2, 4, 6, 15, 26, 60g) を用いてラットの逃避反射を測定した。von Frey hairs の刺激を口ひげ部分に段階的に連続して与え、逃避反射の閾値は 3 回刺激を与えて少なくとも 1 回、ラットが顔を背けたときの von Frey hairs の値を逃避反射閾値とした。

3. 三叉神経脊髄路核尾側亜核・広作動域ニューロン活動の細胞外記録

ラットをソムノペンチルで麻酔後、頸静脈にソムノペンチルで満たした静脈カテーテルを通して 2-3 mg/kg/h を追加し麻酔状態を維持した。麻酔深度は屈曲反射の有無によって確認した。体温は電気生理学的記録中、体温制御装置を用いて 37.0 ± 0.5 を維持した。ラットを脳定位固定装置に固定し、SpVc に刺入したガラス微小電極より WDR ニューロンのスパイクを細胞外記録した。単一ニューロンの活動は Paxinos と Watson のラットの脳アトラスを参照し、SpVc 領域に 0.5M 酢酸ナトリウム水溶液含有 2% ポンタミンスカイブルーを満たしたガラス微小電極を刺入し行った。ニューロン活動はアンプを用いて増幅し、0.3-10KHz のフィルターを用いてオシロスコープでモニターし、Power Lab と Chart 5 software によって記録し解析した。

4. 電気生理学的解析の実験プロトコール

電気生理学的解析では三叉神経第2枝支配領域である口ひげ部分の機械刺激に応じる SpVc WDR ニューロン活動の細胞外記録において、小筆を用いて受容野を探索した。その後、von Frey hairs を用いて受容野を特定し単一ユニット記録を行った。受容野探索作業時の機械刺激による感覚神経の末梢性感作を防ぐため小筆による受容野の特定はできる限り迅速に行った。侵害性のピンチ刺激は、被験者に適用したときに痛みを誘発するピンセット (約 100g) を用いて受容野の中心部に与えた。左口ひげ部分の皮膚への機械刺激に応じる SpVc WDR ニューロンを同定後、左口ひげ部分に刺激を加えていないタイミングで自発的に発火しているかによって自発放電があるか否かを特定した。次に無処置、矯正処置、矯正処置 + レスベラトロール群において機械刺激によって誘発される発火頻度を比べた。非侵害刺激として von Frey hairs 0.16, 0.4, 1, 2, 4, 6, 10g、侵害刺激として von Frey hairs 15, 26, 60g とピンセット (100g 相当) を用いて、一番小さい刺激で発火した値をニューロン機械刺激の閾値とした。ニューロンの機械的受容野は von Frey hairs を用いて特定し、トレーシングペーパーを用いてトレースした後に定量した。機械刺激によって誘発された WDR ニューロンユニット活動は、誘発された活動電位の発火頻度からバックグラウンドの発火頻度を差し引くことで定量化を行なった。機械刺激に応答する SpVc WDR ニューロンが痛覚過敏のメカニズムに貢献し口腔顔面領域の関連痛に伴う痛みに関与していることが報告されているため、本研究は侵害刺激のみに応じる特異的侵害ニューロンを対象とはせず、SpVc WDR ニューロン活動においてレスベラトロールの効果に着目した。本実験では、SpVc WDR ニューロンの自発放電、機械刺激による発火頻度、機械刺激の閾値及び受容野サイズの平均値について3群のラットで比較した。

4. 研究成果

1. 矯正処置による逃避反射閾値の低下

無処置群、矯正処置群、矯正処置 + レスベラトロール群ラットにおける逃避反射閾値の変化の比較を図 1 に示す。矯正処置群ラットの左側口ひげ部分に対する von Frey hairs による機械刺激の逃避反射閾値は、処置前と比較して処置 1 日目から 3 日目において有意に低下した (無処置群 vs 矯正処置群, 3 日目, $67.1 \pm 3.1g$ v.s. $24.1 \pm 2.2g$, $F=127.8$, $P<0.05$)。矯正処置群ラットにおいて、矯正処置を施していない右側口ひげ部分の閾値および無処置群において 1 日目から 3 日目まで大きな差は見られなかった。

2. レスベラトロールの慢性投与による逃避反射閾値に対する効果

矯正処置を施した動物において、1 日前からレスベラトロール (2mg/kg, i.p.) を投与しておくとして 1 日目の矯正処置群ラットの機械刺激に対する逃避反射閾値の低下は、矯正群動物に比べて有意差は無いものの閾値の上昇が見られた。その後 3 日目に有意な回復が見られた。図 1 に示すように、矯正処置群ラットにおける機械刺激に対する逃避反射閾値の低下は、矯正処置後、3 日間のレスベラトロールの慢性投与 (2mg/kg, i.p.) により無処置レベルまで有意に回復した。

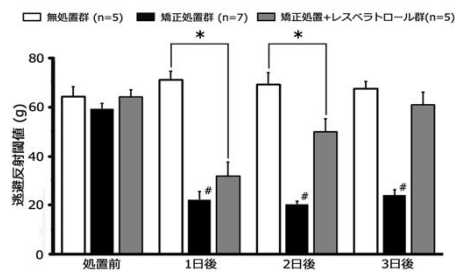


図 1: 逃避反射閾値の変化の比較

von Frey hairs を用いて無処置群、矯正処置群、矯正処置+レスベラトロール群のラットの同側の口ひげ部分においての異所性痛覚過敏を評価し、データは平均 ± 標準誤差で表した。

3. 三叉神経脊髄路・尾側亜核・広作動域ニューロンの特徴

本実験では、左口ひげ部分に受容野を持ち、非侵害、侵害刺激に応答する合計 20 個の SpVc WDR ニューロン (無処置群 (n=5), 矯正処置群 (n=8), 矯正処置 + レスベラトロール群 (n=7)) を解析対象とした。図 2 に示すように、記録部位は主に三叉神経上顎枝の三叉神経脊髄路核への一次ニューロン (三叉神経節ニューロン) の投射部位に一致していた。これらのニューロンの記録部位は、SpVc (Obex-0.25~1.5mm) の第 I 層~第 IV 層に分布していた。単一ユニットによって得られたスパイクの機械刺激に対する応答パターンを典型例を図 2D (上段: 活動電位; 下段: スパイクヒストグラム) に示す。受容野中央部に与えた侵害機械刺激に対し、刺激強度に比例して放電頻度は段階的に増加した。SpVc WDR ニューロンの活動の刺激強度と放電頻度との関係を示したものを図 2E に示す。

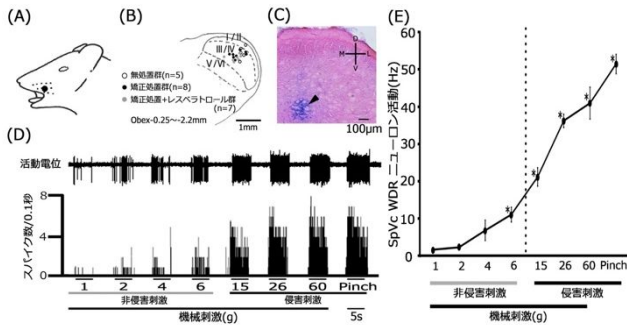


図 2: 顔面皮膚領域の機械刺激に応答する SpVc WDR ニューロンの一般的性質
 (A) SpVc WDR ニューロンの顔面領域 (口ひげ部分) における受容野の 1 例を示す。(B) 顔面領域における非侵害、侵害刺激に反応する無処置群、矯正処置群、矯正処置 + レスベラトロール群の SpVc WDR ニューロンの分布図。(C) 延髄組織切片の写真。D: 背側、V: 腹側、L: 外側、M: 内側の方向をそれぞれ示す。矢頭は記録部位を示す。(D) 非侵害及び侵害刺激に誘発される SpVc WDR ニューロンの放電パターンの典型例。(E) SpVc WDR ニューロン活動の刺激強度 - 放電頻度の関係を示す ($P < 0.05$, 1g vs. 4g, 6g, 15g, 26g, 60g, Pinch, $n = 5$).

4. 矯正処置による三叉神経脊髄路・尾側亜核・広作動域ニューロンの興奮性の変化

図 3 は口ひげ部分への非侵害 (0.16, 1, 2, 4, 6g) および侵害刺激 (15, 26, 60g, Pinch) に応じる SpVc WDR ニューロンの放電頻度に対する無処置群、矯正処置群、矯正処置 + レスベラトロール群の典型的なスパイクヒストグラムを示している。図 3 A, 3B に示すように矯正処置群での SpVc WDR ニューロンは、無処置群と比較すると非侵害刺激 (0.16, 1, 2, 4, 6g) に対して放電頻度の有意な増加が確認された。侵害刺激 (15, 26, 60, Pinch) による SpVc WDR ニューロン反応の発火頻度の平均は無処置群より矯正処置群の方が有意に高い値を示した ($n = 4$, $P < 0.05$) (図 4A, 4B)。矯正処置群の機械刺激による閾値の平均値は無処置群 ($n = 4$) の $1.7 \pm 0.5g$ と比較して $0.2 \pm 0.02g$ と有意に減少した (図 4B, $F = 16.0$, $P < 0.05$)。矯正処置群の自発放電の発火頻度の平均は無処置群と比較して有意に増加した (図 4C)。矯正処置群における受容野サイズは、無処置群の $17.4 \pm 0.7mm^2$ と比較して $24.8 \pm 1.2mm^2$ と有意に増加した (図 4D, $F = 20.6$, $P < 0.05$)。

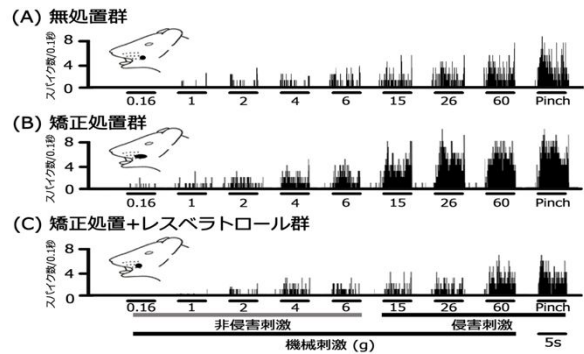


図 3: 非侵害および侵害刺激による SpVc WDR ニューロン活動
 矯正処置群におけるニューロン活動を誘発する機械閾値の減少、刺激を加えていないタイミングで自発的に発火する自発放電の増加、受容野サイズの増加および刺激に誘発される放電が、レスベラトロール投与により無処置レベルまで回復した。

5. 矯正処置による三叉神経脊髄路・尾側亜核・広作動域ニューロンの興奮性増大に対するレスベラトロール慢性投与の効果

行動学的解析による逃避反射閾値の測定から得られた結果より、レスベラトロールの 3 日間連続投与は異所性痛覚過敏を緩和することが判明したため、電気生理学的解析では矯正処置 3 日目のラットにおいて SpVc WDR ニューロンの過興奮に対しレスベラトロール慢性投与の効果を検討した。本実験では、レスベラトロールを 3 日間投与し、矯正処置群ラットの左口ひげ部分への機械刺激に反応する 7 個の SpVc WDR ニューロンを解析した。解析した 7 個全てのニューロンにおいて過興奮はレスベラトロールの慢性投与により無処置レベルまで回復していた。矯正処置群ラットへレスベラトロール慢性投与を行った際の非侵害 (0.16, 1, 2, 4, 6, 10g) 及び侵害 (15, 26, 60g, Pinch) 刺激に反応する SpVc WDR ニューロンの放電頻度の典型例を図 3C に示した。3 日間レスベラトロールを慢性投与した矯正処置群ラットにおいて SpVc WDR ニューロンの非侵害及び侵害機械刺激に反応する放電頻度は、無処置群レベルまで回復した。さらに、図 3 や図 4C に示すように、矯正処置群ラットにおける低下した機械閾値及び増加した自発放電頻度を無処置ラットに相当するレベルまで回復させた。図 4A に示すように、矯正処置群ラットにおける SpVc WDR ニューロンの平均放電頻度はレスベラトロールを投与することにより非侵害、侵害機械刺激のどちらも有意に減少した (図 3A, $P < 0.05$)。レスベラトロールを投与した矯正処置群ラットの平均機械閾値も無処置群レベルまで有意に回復した (図 3C, 図 4B,

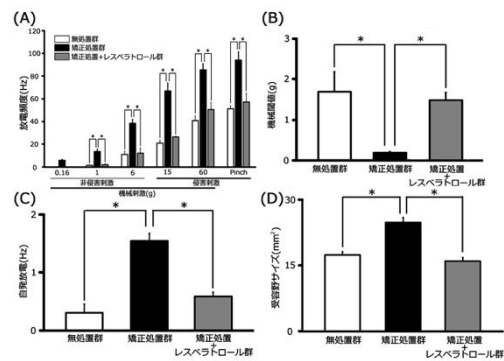


図 4: 顔面皮膚への機械刺激に反応する SpVc WDR ニューロン活動の平均発火頻度、機械閾値、自発放電および受容野サイズの比較
 (A) 各ラット群の口ひげ部分に適応された機械刺激 (非侵害および侵害) により誘発された SpVc WDR ニューロンの平均発火頻度。(B) 各ラット群における SpVc WDR ニューロンの平均機械閾値の比較 (C) 各ラット群における SpVc WDR ニューロンの平均受容野サイズの比較 (D) 各ラット群における SpVc WDR ニューロンの平均自発放電の比較。それぞれのグラフは有意差 * : $p < 0.05$ とし、無処置群 ($n = 5$) と矯正処置群 ($n = 8$) および矯正処置 + レスベラトロール群 ($n = 7$) の間で比較した。

P<0.05)。矯正処置群ラットにおける SpVc WDR ニューロンの自発放電もレスベラトロールを投与することで有意に減少し (図 4C, P<0.05)、平均受容野サイズも無処置群レベルまで回復した (図 4D, P<0.05)。

6. まとめ

本研究成果としてレスベラトロールは、矯正治療時に使用される NSAIDs に代わり、副作用のない鎮痛薬として使用できる可能性、すなわち補完代替医療に貢献することが示唆された。これに加えて本研究の結果は、矯正処置時の歯の移動による三叉神経支配領域の炎症性痛覚過敏においてレスベラトロールが有効であるということが、歯科の臨床上有用であるインプラントなどの処置後に発生する三叉神経痛等の神経障害性疼痛においてもレスベラトロールの投与が効果を示す可能性があるかと推察される。今後、臨床応用を視野に入れた更なる研究が期待される。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Okubo N, Ishikawa H, Sano R, Shimazu Y, Takeda M. | 4. 巻 128 |
| 2. 論文標題 Effect of resveratrol on the hyperexcitability of nociceptive neurons associated with ectopic hyperalgesia induced by experimental tooth movement | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Eur J Oral Sci . | 6. 最初と最後の頁 275-283 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/eos.12722 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|-------|---|-------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 武田 守 (Takeda Mamoru) (20227036) | 麻布大学・生命・環境科学部・教授 (32701) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |