

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592035

研究課題名（和文） 三叉神経損傷による神経因性疼痛発症メカニズムの研究

研究課題名（英文） Study on Pathogenesis of Neuropathic Pain Following trigeminal Nerve Injury

研究代表者

杉本 朋貞 (SUGIMOTO TOMOSADA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50135729

研究成果の概要（和文）： 三叉神経の末梢神経は痛みの認識に関連する侵害情報を三叉神経系の吻側亜核と尾側亜核に伝達する。末梢神経切断により、吻側亜核の神経細胞は非侵害性の刺激に対しても痛み刺激に対すると同様の反応を示すようになる。一方尾側亜核や脊髄後角では末梢神経切断によって、侵害刺激に反応する神経細胞の数が増加する。末梢神経系にアデノシン A1 受容体のアゴニストを投与すると、脊髄後角の神経細胞の過剰反応と神経障害性の痛覚過敏が抑制される。

研究成果の概要（英文）： The trigeminal nerve conveys nociceptive signals to the subnuclei oralis and caudalis. Following peripheral nerve injury, weak innocuous peripheral stimulation induces oralis neuronal responses similar to those evoked by noxious stimulation. On the other hand the number of neurons in the subnucleus caudalis and the spinal dorsal horn responding to noxious peripheral stimulation increases following trigeminal and spinal nerves. Activation of peripheral adenosine A1 receptors suppresses the injury-induced hyper-responsiveness of dorsal horn neurons and attenuates neuropathic hyperalgesia.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000   | 2,080,000 |
| 2011年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 2012年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：神経切断、三叉神経、神経障害性疼痛、吻側亜核、尾側亜核、脊髄後角、アデノシン A1 受容体

## 1. 研究開始当初の背景

口腔や顔面は疼痛を主訴とする各種疾患の好発部位である。口腔・顔面痛はその症状自体がおおきな苦痛であるばかりでなく、摂食や会話など口腔顔面の機能を大きく損なう場合が多いため、その原因・発症機序を解明し、ひいては予防や治療の方法を確立することが歯学研究の重要課題のひとつである。口腔・顔面痛のうち、末梢神経系に加わる各種の侵襲によって引き起こされる神経障害性疼痛 (neuropathic pain) は、痛覚過敏 (hyperalgesia) や異痛症 (allodynia) など、健常者では痛みを引き起こさないような些細な刺激が強い痛みを引き起こすことから、三叉神経系の神経伝達が病的に亢進した結果であると考えられる。以上の状況より本研究代表者は実験動物における三叉神経系や脊髄神経系をモデルとして、体性感覚系の侵害情報処理機構の解明と末梢神経損傷が末梢及び中枢神経系内の侵害情報処理機構に与える影響の分析を研究テーマとして研究活動を行ってきた。その結果、成熟後に脊髄神経切断などの侵襲をこうむった場合、1次ニューロンは細胞死に陥ることなく生存を続けるが、それら1次ニューロンに接続する脊髄後角2次ニューロンには器質的変化が誘発され、末梢の痛み刺激に対して過剰な反応を示すことが明らかとなった (文献1-3)。一方、正常な三叉神経系の侵害情報処理機構について行った一連の研究から、口腔内の痛みを伝える侵害受容1次ニューロンは三叉神経尾側亜核だけでなく、吻側亜核にも投射していることが証明され、吻側亜核に存在する2次ニューロンは口腔内の痛み刺激に敏感に反応することが明らかとなった (文献4-6)。従って三叉神経系の末梢神経損傷においては、脊髄神経系の神経切断から得られた知識から類推するだけでなく、実際

に三叉神経の末梢枝を切断することによって、異常な興奮伝達が発生する部位を特定することが不可欠である。

## 2. 研究の目的

当初の目的：三叉神経知覚核群のうち末梢から痛みの感覚情報を中継するのは尾側亜核のみで、主知覚核、吻側亜核および中位亜核はもっぱら触・圧覚の情報を中継するものと考えられてきた。しかし、本申請者らの研究で、正常なラットにおいて吻側亜核のニューロンは痛み刺激に敏感に反応することがわかった。また、神経障害性疼痛では触・圧の刺激によっても強い痛みが誘発されることから、神経損傷後の動物では尾側亜核以外の領域においてもニューロンの興奮性が病的に増大し、痛み情報の伝達に類似した現象が起こっていると考えられる。本研究ではラットの三叉神経を切断し、切断を受けた神経あるいは、その近辺に分布する神経に触・圧の刺激に対応する弱い電気刺激を加え、痛み刺激によって2次ニューロン内で活性化するc-Fosタンパク合成を指標に、三叉神経知覚核群の各領域において病的な侵害情報の伝達が行われる部位とその強度を分析する。

追加した目的：さらに研究の進捗状況から必要となったため、以下の目的を追加した。すなわち、三叉神経知覚核群のうち、尾側亜核と相同であるとされる脊髄後角ニューロンを用い、脊髄神経切断後の興奮性変化に対するアデノシン A1 受容体のアゴニスト投与の影響を検索し、痛覚異常とc-Fos発現の関連を分析することである。

## 3. 研究の方法

(1) ペントバルビタール麻酔下で、ラットの舌神経もしくは下歯槽神経を切断し、3~14日後に同神経に電気刺激(0.1 mA または 10 mA、5 ms の矩形波 ; 5 Hz ; 10 分間) を加えた。2

時間後に灌流固定を行い、脳幹の50  $\mu$  m厚凍結切片を作成し、c-Fosの免疫染色を行った。

(2) ペントバルビタール麻酔下で、ラットの脛骨神経を切断し、3~14日後に後肢足蹠を52°Cの熱湯に20秒間浸漬することによって侵害刺激を加えた。2時間後に灌流固定を行い、腰髄の50  $\mu$  m厚凍結切片を作成し、c-Fosの免疫染色を行った。このモデルを用い、アデノシン A1 受容体作動薬である chlorocyclic pentyladenosine (CCPA) を熱刺激の10分前に腓骨頭付近の皮下に0.1 mM投与し、c-Fos発現への影響を観察した。

(3) 研究方法(2)の神経損傷後3~14日目に von Frey hairを用いて後肢足蹠の機械的刺激に対する逃避行動の誘発閾値の測定を、また同部の侵害性の輻射熱刺激に対する逃避行動の潜時の測定を行い、刺激の10分前に投与したCCPAの影響を観察した。

(4) 上記(1)~(4)に対し、神経損傷の省略、刺激の省略、CCPA投与の省略等の対照実験を適宜実施した。

#### 4. 研究成果

(1) 三叉神経知覚核群のうち脊髓路核尾側亜核では、末梢神経損傷後に2次ニューロンの興奮性が変化し、神経因性疼痛の発症に関与する可能性が示唆されている。一方、三叉神経の他の部位においては、末梢神経損傷後にどのような変化が起こっているかはほとんど知られていない。今年度の研究は、舌神経もしくは下歯槽神経損傷後、舌神経に電気刺激を加え、c-Fos タンパクの免疫活性の発現を指標に三叉神経知覚核群各部のニューロンの興奮性の変化を調べたものである。

舌神経損傷後に同神経に電気刺激を行うと、非損傷群と比較して、三叉神経脊髓路核の吻側亜核において c-Fos 陽性細胞数が有意に増加した。一方、下歯槽神経損傷後に舌神経に電気刺激を行うと、非損傷群と比較し

て、三叉神経脊髓路核の尾側亜核において c-Fos 陽性細胞数が有意に増加した。また舌神経切断後の吻側亜核における c-Fos 応答の増強は、有髄神経線維のみを興奮させるとされる弱い刺激 (0.1 mA) に対応するものであったが、下歯槽神経切断後の尾側亜核での c-Fos 応答の増強は無髄神経線維をも興奮させる強い刺激 (10 mA) に対応するものであった。また、中位亜核や主知覚核では、神経切断の有無にかかわらず陽性細胞はほとんどみられなかった。

以上の結果は、神経損傷後の神経因性疼痛の発症において、三叉神経系の侵害情報の1次中継核として知られる尾側亜核のみならず、吻側亜核のニューロンの興奮性の変化が重要な役割を果たしていることを示唆するものであり、これらふたつの部位が異なる種類の刺激に対して異常な興奮を起こすことを示している。

(2) 脛骨神経切断により、ラット後肢足部の部分的除神経を行った。3日後に足部に侵害性熱刺激を加え、2時間後に第5腰髄の組織切片にc-Fos タンパクの免疫組織化学染色を施すと、正常ラットの刺激と比較して後角表層に誘発されるc-Fos 陽性ニューロンの数が減少した。切断2週間後に同様の刺激を行うと、3日後と比較してc-Fos 陽性ニューロンの数が大幅に増加したことから、この時期には脊髄後角の侵害受容2次ニューロンが、総腓骨神経を経由する侵害情報に対し、c-Fosの過剰応答を現すことが示された。切断2週間後、刺激の直前に腓骨頭付近の皮下にCCPA溶液を投与した場合、後角2次ニューロンにおけるc-Fosの誘発が有意に抑制された。この効果が生理食塩水投与によって得られなかったことから、CCPAはその生理活性によってc-Fosの過剰応答を抑制したと考えられる。またこの効果はCCPA投与側にみられたもの

であり、血行を介しての全身的な拡散によるものではなく、CCPA 投与部位付近の局所的な作用によるものと考えられる。本研究で CCPA の皮下注射を行った腓骨頭の前下方は、後肢足部皮膚を支配領域に含む総腓骨神経が皮下の浅層を通過する部位に相当するため、CCPA は総腓骨神経に含まれる 1 次侵害受容ニューロンの興奮性を低下させることによって、侵害性熱刺激に対する応答を抑制したものと推測された。

(3) 同実験系で後肢足部への刺激によって誘発される痛覚関連行動の分析を行った。von Frey hair を用いた機械的刺激に対する逃避行動の誘発閾値は脛骨神経切断により上昇したが、切断 2 週間後には切断前の値を下回るまでに低下した。また侵害性の輻射熱刺激に対する逃避行動の潜時も同様に一過性の延長と、2 週間後の短縮がみられた。このモデルに対して c-Fos の誘発実験と同様の方法で CCPA を投与したところ、機械的刺激に対する反応にはなんら影響がみられなかったが、侵害性熱刺激に対する逃避行動の潜時は切断 2 週間後に CCPA 投与側に反対側と比較して有意の短縮が認められた。

以上の結果を総合すると、①脛骨神経切断後の c-Fos の過剰応答が神経障害性疼痛を反映するものであること、および②同神経切断後の熱刺激に対する痛覚過敏が末梢神経系のアデノシン A1 受容体の活性化によって抑制されることが示唆される。

## 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 3 件)

① Fujisawa N, Terayama R, Yamaguchi D, Omura S, Yamashiro T, Sugimoto T, Fos

protein-like immunoreactive neurons induced by electrical stimulation in the trigeminal sensory nuclear complex of rats with chronically injured peripheral nerve, *Experimental Brain Research*, 219 巻, 2012, 191-201, 査読有

② 寺山隆司, 杉本朋貞, 三叉神経一次知覚ニューロンの中枢内投射と痛覚受容機構, *脳* 21, 14 巻, 2011, 82(376)-85(379), 査読無

③ Terayama R, Fujisawa N, Yamaguchi D, Omura S, Ichikawa H, Sugimoto T, Differential activation of mitogen-activated protein kinases and glial cells in the trigeminal sensory nuclear complex following lingual nerve injury, *Neuroscience Research*, 69 巻, 2011, 100-110, 査読有

[学会発表] (計 9 件)

① 大村晋司, 末梢神経損傷後の中枢神経における 1 次ニューロンの収斂投射の研究, 日本解剖学会第 67 回中国・四国支部学術集会, 2012 年 10 月 20 日, 宇部

② 寺山隆司, 末梢神経損傷後の口腔痛覚過敏における延髄後角での収斂投射の関与, 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 18 日, 名古屋

③ 寺山隆司, 三叉神経一次知覚ニューロンの中枢内投射と痛覚受容機構, 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演), 2012 年 3 月 27 日, 甲府

④ 寺山隆司, 舌神経損傷後の三叉神経知覚核群における MAP kinase およびグリア細胞の活性化, 日本解剖学会第 66 回中国・四国支部学術集会, 2011 年 11 月 13 日, 徳島

⑤ 山口大輔, 末梢神経損傷後の脊髄後角ニューロンの過剰興奮に対するアデノシン A1 受容体アゴニスト

2-chloro-N(6)-cyclopentyladenosine

(CCPA)の効果, 日本解剖学会第 66 回中国・四国支部学術集会, 2011 年 11 月 13 日, 徳島

⑥ 寺山隆司, Differential activation of mitogen-activated protein kinases and glial cells in the trigeminal sensory nuclear complex following lingual nerve injury, 第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 17 日, 横浜

⑦ 藤澤直子, 末梢神経損傷後の舌神経刺激に対する三叉神経二次知覚ニューロンの応答, 第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会, 2011 年 3 月 30 日, J. Physiol. Sci. (Vol. 61, Suppl. 1)誌上開催

⑧ 藤澤直子, 末梢神経損傷後の吻側亜核におけるニューロンの興奮性の変化, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010 年 9 月 21 日, 東京

⑨ 寺山隆司, 末梢神経損傷後の三叉神経知覚核群における MAP kinase およびグリア細胞の活性化, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010 年 9 月 21 日, 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉本 朋貞 (SUGIMOTO TOMOSADA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 50135729

### (2) 研究分担者

松香 芳三 (MATSUKA YOSHIZO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号 : 90243477 (2010 年度のみ)

### (3) 連携研究者

寺山 隆司 (TERAYAMA RYUJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 : 60333689

### (4) 研究協力者

藤沢 直子 (FUJISAWA NAOKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生

研究者番号 : なし

山口 大輔 (YAMAGUCHI DAISUKE)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生

研究者番号 : なし

大村 晋司 (OMURA SHINJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生

研究者番号 : なし

土屋 泰規 (TSUCHIYA YASUNORI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生

研究者番号 : なし