

## 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 5月 20日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22792024

研究課題名（和文） 三叉神経系神経因性疼痛モデル群の発症と治癒のメカニズムの解析

研究課題名（英文） Analysis for pathogeny and healing of trigeminal neuropathic pain model rats

研究代表者

奥村 雅代 (OKUMURA MASAYO)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10362849

研究成果の概要（和文）：4種の三叉神経損傷モデルを作成して口髭部の機械刺激閾値を検証したところ、ほぼ例外なく閾値が低下するのは「眼窩下神経結紮モデル」のみであり、「下歯槽神経切断モデル」では約半数でのみ閾値低下が見られた。しかし「下歯槽神経切断モデル」のラットの解析では、神経細胞における神経損傷を示す遺伝子発現上昇にも、延髄におけるマイクログリアの活性化の程度にも分布にも、機械刺激閾値低下の有無との相関は見られなかった。

研究成果の概要（英文）：Four models of trigeminal nerve injury were tested for mechanical threshold on whisker pad. The mechanical allodynia was induced in all “infraorbital nerve ligation model” rats, but in only the half of “inferior alveolar nerve transaction model” rats. Therefore, another half of “inferior alveolar nerve transaction model” rat did not develop the mechanical allodynia. However, neither alterations of gene expression in trigeminal ganglion that indicate the nerve injury, nor microglial activation in the medullary dorsal horn that thought to be closely related to the pathogenic mechanism of allodynia, had a correlation with the occurrence of allodynia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、外科系歯学

キーワード：神経因性疼痛、モデルラット、延髄、マイクログリア

### 1. 研究開始当初の背景

組織の損傷により誘発される神経因性疼痛は、損傷箇所が治癒した後も持続する痛みで、神経組織の物理的または機能的異常により発生する感覚であると考えられる。この疼痛もしくは感覚異常は、損傷した神経の支配領域を超えて非損傷神経の支配領域にま

で拡大することもしばしばで、その複雑なメカニズムについては不明な点が多い。

神経因性疼痛における神経組織の変化を細胞レベル、分子レベルで解析するにはモデル動物が不可欠である。「神経因性疼痛モデル」はラットの神経軸索を切断、もしくは結紮して作成するものが主流で、それぞれにつ

いて痛覚過敏やアロディニアといった感覚異常症状、それに付随して末梢神経及び中枢神経系組織において様々な変化が起こることが知られている。末梢神経分布の変化、神経節内神経細胞体におけるチャネル類や各種受容体の発現量やシグナル分子のリン酸化レベルの変化、延髄におけるミクログリアの活性化等、感覚異常の発症との関連が指摘される現象がいくつも報告されているが、それぞれの神経枝の末梢側支配領域－神経細胞体－中枢側投射領域を明確に対応させることはできていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、神経線維の走行も神経節内の細胞体配置も単純で、中枢側投射領域も広い三叉神経系を対象として解析を行う。これまでに、三叉神経節の第Ⅲ枝と第Ⅱ枝の神経細胞体を含む領域をそれぞれ分離抽出することが可能であること、第Ⅲ枝と第Ⅱ枝それぞれの情報が延髄後角の別の領域に投射すること等をすでに明らかにしている。これは第Ⅲ枝と第Ⅱ枝の末梢側支配領域－神経細胞体－中枢側投射領域のそれぞれを区別して解析できることを示している。

これまでも用いてきた「下歯槽神経切断モデル」は、三叉神経の第Ⅲ枝の一部である下歯槽神経を切断することで、眼窩下神経の支配領域である上嘴唇に感覚異常が発現する。一方で「眼窩下神経結紮モデル」では、三叉神経の第Ⅱ枝の一部である眼窩下神経を結紮することでその支配領域である上嘴唇に感覚異常が発現する。すなわち「下歯槽神経切断モデル」は非損傷神経の支配領域に広がる異所性感覚異常のモデル、「眼窩下神経結紮モデル」は損傷神経の支配領域におきる同所性感覚異常のモデルであり、本研究ではこの違いに注目する。

「眼窩下神経結紮モデル」「眼窩下神経切断モデル」「下歯槽神経結紮モデル」「下歯槽神経切断モデル」の四つのモデルについて組織レベル、分子レベルの解析を行い、それぞれのモデルにおける感覚異常の発症する部位との関連性から、なぜ感覚異常が起こるのか、なぜそれが非損傷神経の支配領域にまで観られるのか、といった疑問の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 手術

6～8週齢の雄のSDラットを用い、手術はペントバルビタールナトリウムによる麻酔下で行った。下歯槽神経は頬部の皮膚を切開、筋組織を割いて下顎骨の表面を露出し、その表面を歯科用エンジンで削って下顎管を開放し、切断もしくは手術用縫合糸による結紮を行った。眼窩下神経は口腔内粘膜を割き、

口蓋側部を上顎骨沿いに眼窩方向へ切開して露出し、前方へと走行している神経の全てに対して切断もしくは手術用縫合糸による結紮を行った。

### (2) 薬剤の延髄投与

神経処置手術の7日～10日前、ペントバルビタールナトリウムによる麻酔下にて後頭部を切開し、後頭骨と第一頸椎の間の大槽に穴をあけ、延髄部に先端が届くようにPE10カテーテルを留置、縫合した。

薬剤はハミルトンシリンジにてこのカテーテルから1日1回投与した。

### (3) real-time PCR

ラットから摘出した三叉神経節を第Ⅲ枝神経細胞領域と、第Ⅰ枝第Ⅱ枝神経細胞領域に分離し、それぞれからtotal RNAを抽出、cDNAの合成を行い、これを用いてreal-time PCRを行った。

### (4) 行動テスト

ラットの口髭部をvon fray filamentで刺激し、逃避閾値を測定した。ラットの頭部そのものが動いてしまうため、60gを上限值とした。一日一回、午後に一匹ずつ測定することとし、測定値が安定してから3日後に各種手術を行った。その後2日、4日、5日、6日、7日と測定を行った。手術前3日間と手術後5日～7日の測定結果の間に有意差がある個体をアロディニア発症、有意差がない個体をアロディニア発症なしとした。

### (5) 免疫蛍光染色

手術後7日目のラットから脊髄/延髄部を摘出し、ドライアイスで急速凍結した。これを尾側から吻側へ25μm厚で凍結切片を作成し、10枚毎に免疫染色を行った。

染色にはミクログリアのマーカーとして抗CD11b抗体、活性化神経細胞のマーカーとして抗Fos抗体、侵害受容神経細胞軸索のマーカーとして抗CGRP抗体、核のマーカーとしてDAPIを用い、二次抗体はAlexa色素結合抗体を用いた。

## 4. 研究成果

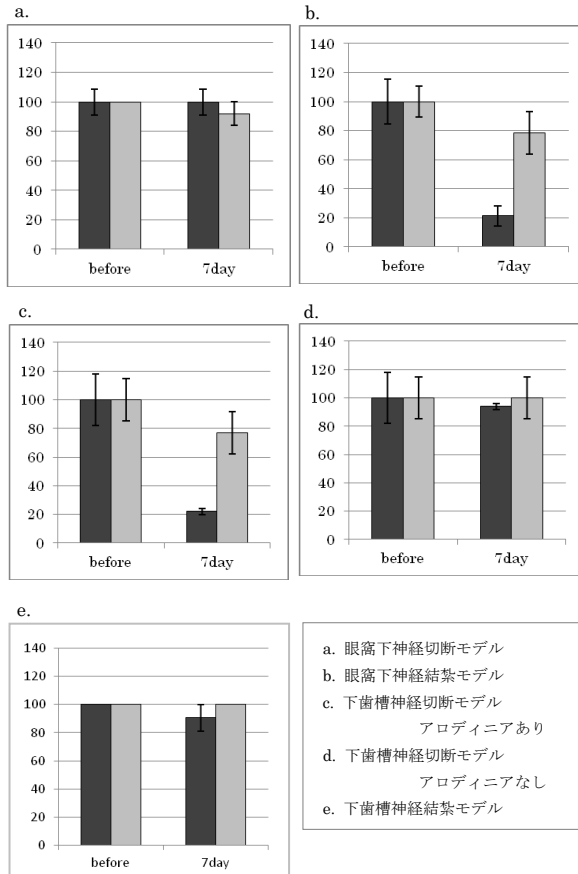
### (1) アロディニアに対する薬剤の効果

下歯槽神経切断によって口髭部に生じるアロディニアは、カルシウムチャネルブロッカーGabapentinの脊髄投与もしくは抗鬱薬Amitriptylineの腹腔投与により抑制された。また薬剤投与後の三叉神経節第Ⅲ枝神経細胞領域における遺伝子発現の解析によると、神経損傷後に発現レベルが上昇していた遺伝子の多くがAmitriptyline投与後に抑制されていた。その一方でGabapentin投与で抑制されたのはカルシウムチャネルのサブユ

ニットである CACNA2D1 の発現上昇のみだった。しかし L タイプカルシウムチャネル活性化剤である FPL64176、S(-)Bay K 8644 を延髄投与しても機械刺激閾値の変化もなければ遺伝子発現上昇の抑制も起こらず、このチャネルの活性制御による双方向性の制御ではないことがわかる。

### (2) 各モデルにおけるアロディニアの発症

「眼窩下神経結紮モデル」「眼窩下神経切断モデル」「下歯槽神経結紮モデル」「下歯槽神経切断モデル」の四つのモデルについて口髭部の機械刺激逃避閾値を測定した。



「眼窩下神経切断モデル」では口髭部のアロディニアは観察されなかった。これは口髭部に分布している神経そのものである眼窩下神経が切断されているため、口髭部の感覚は麻痺しているためと考えられる。

「下歯槽神経結紮モデル」でも口髭部アロディニアは一例も発症しなかったが、「下歯槽神経切断モデル」では約半数にアロディニアが発症し、残り半数には発症しなかった。つまり、同じ神経に対する損傷でも、損傷の種類が違えばアロディニアの発症に差が見られた。

「眼窩下神経結紮モデル」ではほぼすべてのラットで閾値の低下が見られた。下歯槽神経切断モデルが損傷神経の支配する領域外

で異常が起こる異所性疼痛であるのに対して、眼窩下神経結紮モデルは損傷した神経の支配領域に症状が現れる同所性疼痛であり、これは坐骨神経を用いた神経因性疼痛モデルに相当するものと予想される。測定値としては下歯槽神経切断モデルにおいて発症するアロディニアと同程度であったが、眼窩下神経結紮モデルのほとんどのラットは von fray filament による刺激後に scratching 行動を示し、下歯槽神経切断により生じるアロディニアとは厳密には異なるものであることが示唆された。

### (3) 各モデルの延髄におけるマイクログリアの活性化

神経因性疼痛と重要な関連があるとされているのが脊髄/延髄におけるグリア細胞の活性化である。そこで4つの神経損傷モデルそれぞれについて術後7日目の延髄におけるマイクログリアの活性化状態を観察した。

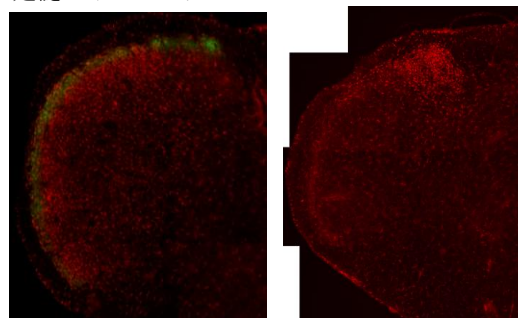
末梢三叉神経から延髄への神経線維は、第I枝、第II枝、第III枝がそれぞれ独自の領域に投射している。第I枝は最も腹側、第III枝は最も背側、第II枝はそれらの間の広範囲に投射している。これは第I枝領域(眉部)、第II枝領域(口髭部)、第III枝領域(下顎部)にカプサイシンを投与し、1時間後に摘出した延髄における Fos の免疫反応を観察することでも確認された。

「眼窩下神経結紮モデル」と「眼窩下神経切断モデル」では延髄後角外側部全体にマイクログリアが観察され、第II枝の一部である眼窩下神経が損傷したことでその投射領域でマイクログリアが活性化したものと考えられる。2つのモデル間に特に差は見られなかった。

「下歯槽神経結紮モデル」「下歯槽神経切断モデル」では延髄後角の最背側にマイクログリアの活性化が観察され、第III枝の一部である下歯槽神経が損傷したことでその投射領域でマイクログリアが活性化したものと考えられる。ここでも2つのモデル間に差は見られなかった。

これらの結果はマイクログリアは損傷の種類によらず、損傷した神経の中核投射領域全体で見られたと言える。

#### 延髄マイクログリア



眼窩下神経損傷後

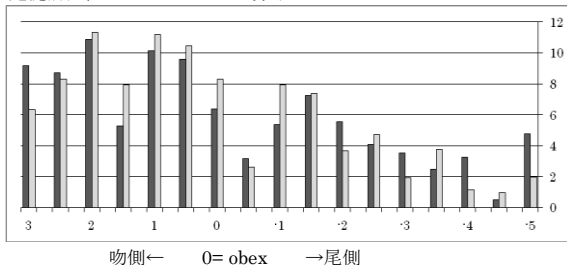
下歯槽神経損傷後

(4) 下歯槽神経切断モデルにおけるアロディニアを発症したラットと発症しなかったラットの比較

「下歯槽神経切断モデル」では、同じ神経に同じ処置を行っているにも関わらず、約半数では口髭部に明らかなアロディニアを発症したが、残りの半数では機械刺激逃避閾値低下は全く見られなかった。

術後7日目に摘出した三叉神経節における遺伝子発現を real time PCR にて解析したところ、NPY を始めとした神経ペプチドや神経損傷マーカーと言われる Fos や ATF3 といった神経損傷後に発現が上昇することが知られている遺伝子の発現が上昇していた。この発現上昇にはアロディニア発症ラットと発症しなかったラットの間には有意差はなく、半数のラットでアロディニアが発症しなかった理由が神経切断術の失敗によるものではないことが示される。

延髄活性化マイクログリアの分布



同時に摘出した延髄を尾側から延髄に連続切片として観察し、延髄後角に見られるマイクログリアの吻尾側方向の分布を観察し、これをアロディニア発症ラットと発症しなかったラットを比較した。その結果、マイクログリアの活性化量、分布ともに大きな差は見られなかった。これはマイクログリアの活性化だけではアロディニア発症に不十分であることを示しており、さらなる解析が必要である。

## 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1件)

① Okumura M, Kondo E. The effect of Gabapentin on the expression of genes in the trigeminal ganglia of inferior alveolar nerve-transected neuropathic pain model rats. PAIN RESEARCH 査読有、vol. 25 2010 pp171-178  
<http://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ci3painr&vo=25&nu=3>

[学会発表] (計4件)

① 奥村雅代、大木恵美、岡本学、田所治、金

銅英二、三叉神経領域の神経損傷によるアロディニアと延髄マイクログリアの活性化の関連、第34回日本疼痛学会、2012年07月21日、熊本

② 大木絵美、奥村雅代、岡本望、金銅英二、三叉神経節神経細胞の侵害刺激に伴う非翻訳領域転写産物の発現上昇の解析、第16回日本口腔顔面痛学会、2011年10月9日、神戸

③ 奥村雅代、金銅英二、下歯槽神経切断モデルラットにおける分子レベルの変化とアロディニア発症の関連、第33回日本疼痛学会、2011年7月22日、松山

④ Masayo Okumura, Eiji Kondo, Gene expression in rat trigeminal ganglion neurons after inferior alveolar nerve injury. IASP 13th World Congress on Pain. 2010年8月30日, Montréal, Canada

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥村 雅代 (OKUMURA MASAYO)  
松本歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：10362849