

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592730

研究課題名(和文) 神経損傷を起因とする神経因性疼痛に対する QX-314 の麻酔効果の検討

研究課題名(英文) The relationship between local anesthetic effect of QX-314 and TRPV1 expression following inferior alveolar nerve transection in rats

研究代表者

北川 純一 (KITAGAWA, Junichi)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：50373006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：ラット下歯槽神経を切断し、神経障害性疼痛モデルラットを作製した。神経障害性疼痛を発症したラット群と疼痛を発症しなかったラット群に分類し、カプサイシンを併用した QX-314 をおとがい部に注射し、麻酔効果について検討した。さらに、各群ラットの三叉神経節におけるカプサイシン受容体 (TRPV1) の発現状態を観察した。

これらの結果から、神経切断後、神経障害性疼痛を発症した場合、QX-314 の作用発現に関与する TRPV1 チャネルを発現する C 線維数の減少が示された。つまり、臨床の場面で、神経が大きなダメージを受けた後に発症する神経障害性疼痛には、QX-314 の麻酔作用の発現は少ないことが予想される。

研究成果の概要(英文)：QX-314 with capsaicin has been reported to produce long-lasting block of acute pain. However, little is reported of their effectiveness on neuropathic pain (NP) after nerve injury which involves various biophysical and molecular changes in sensory neurons. In this study the effect of this combination was evaluated under NP and non-NP conditions after inferior alveolar nerve (IAN) transection. The magnitude of QX-314 with capsaicin induced local anesthetic block varied under various conditions; however, no block was observed under NP conditions at 2 weeks after transection. Immunohistochemical study revealed that the number of regenerated neurons with transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) expression gradually increased over time after transection. Unmyelinated neurons expressing TRPV1 regenerated slowly, especially in the presence of NP. In addition, TRPV1 expression shifted to myelinated fibers and this shift was more intense under NP than under non-NP conditions.

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：QX-314 TRPV1 カプサイシン 神経障害性疼痛 神経損傷 C 線維 痛覚

1. 研究開始当初の背景

痛覚は人間が安全にそして健康に生きていくために必要な警告信号としての役割を果たしている。しかしながら、しばしば、この痛みが何らかの原因で、過敏になり慢性的に耐え難い痛みになってしまうことがある。このような異常疼痛のほとんどは、治療が困難なものが多く、発症機序や病態が未だに不明なものが多い。これまでに申請者は、神経障害性疼痛モデル動物を用いた実験を行い、神経損傷後の異常疼痛(神経障害性疼痛)の発症機序に関する生理学的知見を報告してきた。眼窩下神経を緩く結紮した神経損傷モデルラット実験(Kitagawa et al., Eur J Neurosci, 2006; Kitagawa et al., J Oral Biosci, 2008)では、神経損傷後の神経障害性疼痛は、A線維(C線維ではなく)の興奮増大が原因であることを示唆し、下歯槽神経切断モデルラット実験(Saito et al., J Neurophysiol, 2008; Nakagawa et al., Mol Pain, 2010)により、神経切断後に神経障害性疼痛を発症する場合は、C線維の再生不良が認められることを明らかにした。

近年、リドカインの誘導体である QX-314 がカプサイシンとの併用により、運動神経を麻痺させず感覚神経のみ麻酔できることが示された(Binshtok et al., Nature, 2007 など)ため、次世代の麻酔薬として注目され、臨床応用も検討されている。QX-314 の作用機序は、カプサイシンが開放したカプサイシン受容体(TRPV1 チャンネル)を通して QX-314 が細胞内に入り込み、細胞内から Na チャンネルを阻害すると考えられている。すなわち、QX-314 の作用発現には TRPV1 チャンネルが必要である。TRPV1 チャンネルの多くは、C線維に発現することが知られているが、申請者がこれまでに報告した上述のような神経損傷後に発症する神経障害性疼痛の場合には、C線維の数が減少するため、TRPV1 チャンネルの発現数も減少することが予想される。つまり、QX-314 の作用が発現し難いことが考えられる。

歯科臨床の場面を考えると、埋伏知歯抜歯など組織侵襲が大きい処置後に多く発症する神経障害性疼痛では、支配神経が損傷した可能性が十分に考えられる。次世代の麻酔薬として期待される QX-314 は、神経障害性疼痛の病態によっては鎮痛効果を発現できない可能性が予想される。

本研究は、動物実験により、神経損傷(とりわけ神経切断)後に発症する神経障害性疼痛に焦点を当て、その異常疼痛の持続期間や神経切断したにも関わらず異常疼痛を発症しないなど、病態を詳細に分類し、それぞれの病態に対する QX-314 の麻酔効果を調べるとともに、C線維を含む受傷部再生神経線維における TRPV1 チャンネルの発現状態と神経障害性疼痛の発症の関連性を調べ、QX-314 の総合的な効果および適切な使用法の検討を行うことを目的としている。

2. 研究の目的

本研究は、神経損傷後の神経障害性疼痛の病態を分類し、それぞれについて、1)神経切断を伴う神経障害性疼痛の病態と QX-314 の麻酔効果、2)神経切断を伴う神経障害性疼痛の病態と再生神経線維における TRPV1 チャンネル発現状態の関連性、3)QX-314 の総合的な効果および適切な使用法の検討、について明らかにする。

1) 神経切断を伴う神経因性疼痛の病態と QX-314 の麻酔効果

新規麻酔薬として期待される QX-314 が作用を発現するには、TRPV1 チャンネルの存在が鍵となる。そのため、本申請研究では、神経が切断されるような損傷を受けた後の再生神経線維における TRPV1 チャンネルの発現数の増減が、QX-314 の麻酔効果に影響を与えることは充分考えられる。したがって、神経因性モデルラットを用いた行動学的実験(逃避行動実験)により、神経切断後に神経障害性疼痛を発症したグループと疼痛を発症しなかったグループに対し、QX-314 の麻酔効果を検討する。

2) 神経切断を伴う神経障害性疼痛の病態と受傷部再生神経線維における TRPV1 発現状態の関連性

本申請研究では、神経障害性モデルラットを作製し、神経損傷(切断)後に神経障害性疼痛を発症したグループと疼痛を発症しなかったグループに分類し、C線維を含む再生神経線維における TRPV1 チャンネル発現状態の変化と疼痛発症の関連性を検討する。

3) QX-314 の総合的な効果および適切な使用法の検討

これまでの QX-314 の麻酔効果に関する報告は、損傷を受けていない正常な神経を対象にしたものばかりである。しかしながら、申請者がこれまでに行ってきた神経切断後に発症する神経障害性疼痛の研究では、QX-314 の作用発現に大いに関与する TRPV1 チャンネルを主に発現している C線維の再生不良および数の減少が示されている。つまり、臨床の場面で、神経に大きなダメージを与えてしまった後に発症した神経障害性疼痛には、QX-314 の麻酔作用の発現は少ないことが予想される。本申請研究では、上述した 1)、2)の結果を総合的に判断し、ヒトへの臨床応用に対して適切な使用法を提案する。

3. 研究の方法

ラット下歯槽神経を切断し、切断面をあわせて下顎管に戻すことにより、神経障害性疼痛モデルラットを作製する。神経切断により神経障害性疼痛を発症したラット群(疼痛持続期間により、さらに分類)と疼痛を発症し

なかったラット群に分類する。これらの群に対して、カプサイシンを併用した QX-314 をラットおとがい部に注射し、麻酔効果の発現について検討する。さらに、病態により分類した各群のラットおとがい部皮下に逆行性蛍光トレーサー-FG 注射した後、三叉神経節を取り出し、TRPV1 および有髄神経線維マーカーである NF200 の免疫染色を行う。この免疫組織学的実験により、神経再生を示す FG(+), TRPV1 チャネルの存在を示す TRPV1(+) および有髄神経線維 (A 線維) を示す NF200(+) の重なり (マージ) の程度を評価する。これらの実験結果を総合的に検討し、総合的な QX-314 の麻酔効果や臨床適応について検討する。

1) 末梢神経切断による神経障害性疼痛モデルラットの作製

- ・ラットの下歯槽神経を切断し、切断面をあわせて下顎管に戻す。
- ・切断後 3 日目から、おとがい部へ von-Frey 刺激毛による機械刺激を与え、逃避行動を観察する。
- ・切断後 2 週間目までに逃避閾値 (von-Frey 刺激毛の圧力) が充分低下したラットを、神経障害性疼痛が発症したと判断する。

2) 神経切断を伴う神経障害性疼痛の病態の分類

- ・下歯槽神経切断後に疼痛を発症しないグループと疼痛を発症したグループに分け、さらに、疼痛発症グループを、疼痛の持続期間によって分類する。

3) 神経障害性疼痛の病態と QX-314 の麻酔効果

- ・下歯槽神経切断後に疼痛を発症したラットおよび皮膚を切開しただけの Sham ラットのおとがい部に、TRPV1 チャネルを解放するためのカプサイシン注射した後、QX-314 を注射する。そして、von-Frey 刺激毛を用いた逃避行動テストを行い、QX-314 注射部位に麻酔作用が発現するかどうかを調べる。

4) 神経切断を伴う神経因性疼痛の病態と受傷部再生神経線維における TRPV1 発現状態の関連性

- ・下歯槽神経切断後に疼痛を発症したラットおよび皮膚を切開しただけの Sham ラットの神経切断側 (Sham ラットは、皮膚切開側) の三叉神経節を取り出し、免疫組織染色を行う。三叉神経節を取り出す 2 日前に、ラットの神経切断側おとがい部皮下に逆行性蛍光トレーサー: Fluoro Gold (FG) を注入する。FG は、おとがい部皮下を支配している再生神経を逆行性に三叉神経節まで上がっていくので、どの程度の数の神経線維が再生されているかが確認できる。三叉神経節を取り出した後、スライスした切片に対して、TRPV1 および有髄神経線維のマーカーである NF200 の免疫染色を行う。

結果は、神経再生を示す FG(+), TRPV1 チャネルの存在を示す TRPV1(+) および有髄神経線維 (A 線維) を示す NF200(+) の重なり (マージ) の程度を評価する。すなわち、神経障害性疼痛の病態によって、TRPV1(+) がどのように分布しているのか (例えば、NF200(+) とマージされているものが多いのか? FG(+)) と NF200(-) (C 線維) に多いのか? TRPV1(+) の数の減少など) を調べる。

4. 研究成果

ラット下歯槽神経切断後、神経障害性疼痛を発症しない群と発症した群とに分け、それぞれ 2、3、4 週間ごとに QX-314 の麻酔効果を調べた。神経切断から 2 週間後に神経障害性疼痛を発症した群は、明らかな逃避閾値の低下を示した。さらに、この群における QX-314 投与は、逃避閾値に変化を示さず、麻酔作用の発現がほとんど観察されなかった。神経切断から 3、4 週間まで持続して神経障害性疼痛を発症している群に対する QX-314 投与は、神経切断からの時間経過が長いほど効果的に麻酔が作用することが観察された。つまり、これらの結果は、QX-314 の麻酔作用は神経障害性疼痛の病態に依存していることを示唆している。

また、免疫組織学的実験から、神経障害性疼痛を発症した場合、おそらく C 線維であろう細い神経線維において TRPV1 の発現数が減少していた。(図 1)

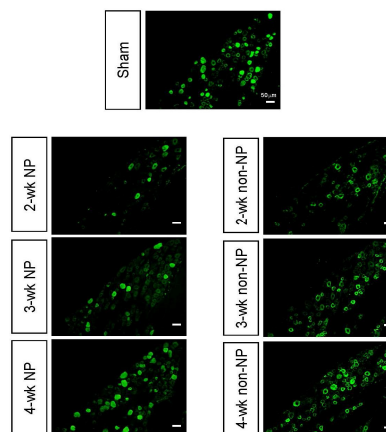


図 1: 三叉神経節における神経障害性疼痛発症後の TRPV1 の発現

Sham: 模擬手術, 2-wk NP: 下歯槽神経切断から 2 週間後に疼痛を発症した群, 2-wk non-NP: 切断から 2 週間後に疼痛を発症しなかった群, 3-wk NP: 切断から 3 週間後に疼痛を示した群, 3-wk non-NP: 切断から 3 週間後に疼痛を示さなかった群, 4-wk NP: 切断から 4 週間後に疼痛を示した群, 4-wk non-NP: 切断から 4 週間後に疼痛を示さなかった群

近年、感覚神経だけを麻酔できるとして注

目さている QX-314 は、神経損傷を起因とする神経障害性疼痛には十分な麻酔効果を発現しない可能性が示唆された。つまり、QX-314 の使用方法については、痛みの原因を充分考慮する必要があると考えられる。

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9件)

1. Mostafaezur RM, Shinoda M, Unno S, Zakir HM, Takatsuji H, Takahashi K, Yamada Y, Yamamura K, Iwata K, Kitagawa J: Involvement of astroglial glutamate-glutamine shuttle in modulation of the jaw-opening reflex following infraorbital nerve injury. *Eur J Neurosci*. 2014. in press. DOI: 10.1111/ejn.12562. (査読有)
2. Takahashi K, Shingai T, Saito I, Yamamura K, Yamada Y, Kitagawa J: Facilitation of the swallowing reflex with bilateral afferent input from the superior laryngeal nerve. *Neurosci Lett*, 562: 50-53, 2014. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.01.017. (査読有)
3. Takeda M, Takahashi M, Kitagawa J, Kanazawa T, Nasu M, Matsumoto S: Brain-derived neurotrophic factor enhances the excitability of small-diameter trigeminal ganglion neurons projecting to the trigeminal nucleus interpolaris/caudalis transition zone following masseter muscle inflammation. *Mol Pain*, 9: 49 (online journal), 2013. DOI: 10.1186/1744-8069-9-49. (査読有)
4. 北川純一, 高辻華子, 高橋功次郎, 真貝富夫: のどごしについての生理学的考察. *日本味と匂学会誌*, 20: 143-149, 2013. (査読有)
5. 高辻華子, 北川純一, 真貝富夫: のど越しの味と嚥下. *JOHNS*, 29: 57-60, 2013. (査読有)
6. Mostafaezur RM, Zakir HM, Takatsuji H, Yamada Y, Yamamura K, Kitagawa J: Cannabinoids facilitate the swallowing reflex elicited by the superior laryngeal nerve stimulation in rats. *PLoS ONE*, 7(11):e50703 (online journal), 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0050703. (査読有)
7. Zakir HM, Mostafaezur RM, Suzuki A, Suzuro Hitomi S, Suzuki I, Takeyasu Maeda T, Seo K, Yamada Y, Yamamura K, Lev S, Binshtok AM, Iwata K, Kitagawa J:

Expression of TRPV1 channels after nerve injury provides an essential delivery tool for neuropathic pain attenuation. *PLoS ONE*, 7(9):e44023 (online journal), 2012.

DOI: 10.1371/journal.pone.0044023. (査読有)

8. Mostafaezur RM, Zakir HM, Yamada Y, Yamamura K, Iwata K, Sessle BJ, Kitagawa J: The effect of minocycline on the masticatory movements following the inferior alveolar nerve transection in freely moving rats. *Mol Pain*, 8: 27 (online journal), 2012. DOI: 10.1186/1744-8069-8-27. (査読有)
9. Takatsuji H, Zakir HM, Mostafaezur RM, Saito I, Yamada Y, Yamamura K, Kitagawa J: Induction of the swallowing reflex by electrical stimulation of the posterior oropharyngeal region in awake humans. *Dysphagia*, 27: 473-480, 2012. (査読有)

[学会発表](計6件)

1. Kitagawa J: Physiological and pharmacological actions involved in pharyngeal and laryngeal sensation. 第87回日本薬理学会年会. 2014年3月19日(仙台). (招待講演)
2. 北川純一: のどごしについての生理学的考察. うま味研究会公開シンポジウム. 2013年5月31日(東京). (招待講演)
3. Takatsuji H, Kitagawa J, Yamada Y, Yamamura K: Facilitation of the swallowing reflex following administration of cannabinoids in rats. 第90回日本生理学会大会. 2013年3月28日(東京).
4. Zakir HM, Kitagawa J, Yamada Y, Mostafaezur RM, Yamamura K: Evaluation of the effect of QX-314 and TRPV1 expression following alveolar nerve injury. 第89回日本生理学会大会. 2012年3月30日(松本).
5. Mostafaezur RM, Kitagawa J, Yamada Y, Zakir HM, Yamamura K: Upregulation of astroglia in the trigeminal motor nucleus involves in the modulation of the orofacial reflex after neuropathic pain. 第89回日本生理学会大会. 2012年3月30日(松本).
6. 北川純一, Mostafaezur RM, Zakir HM, 山田好秋, 山村健介: カンナビノイドは嚥下反射を促進する. 第53回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2011年9月30日(岐阜市). (招待講演)

[図書](計1件)

1. 北川純一(分担)(日本口腔顎顔面痛学会編): 口腔顔面痛の診断と治療ガイドブック

ック.医歯薬出版.2013.229ページ(総ページ).

6.研究組織

(1)研究代表者

北川 純一 (KITAGAWA Junichi)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：5 0 3 7 3 0 0 6

(2)研究分担者

山村 健介 (YAMAMURA Kensuke)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：9 0 2 7 2 8 2 2

山田 好秋 (YAMADA Yoshiaki)

新潟大学・その他・理事

研究者番号：8 0 1 1 5 0 8 9