

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861760

研究課題名(和文)口内炎モデルラットに発症する口腔内の痛みとその鎮痛メカニズム

研究課題名(英文)Mechanism of oral ulcer-induced pain in rats

研究代表者

人見 涼露 (Hitomi, Suzuro)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70548924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ガン治療の副作用として口内炎が発症するが、現在有効な治療法はなく臨床の場において早急な対策が必要とされている。本研究は口内炎による疼痛発症メカニズムを解明しリドカイン誘導体であるQX-314の効果を調べることを目的として、口内炎モデルラットにおける口腔内疼痛について検討した。その結果、口内炎により、自発痛や接触痛、化学物質による誘発痛を生じ、実際の臨床症状に近い疼痛を発症していた。また、その疼痛には粘膜上皮欠損による組織浸透性の増加が関与していることが考えられた。さらに、QX-314はこの口内炎疼痛の緩和に有効であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Although oral ulcers are induced as a side effect of chemo-radiotherapy in cancer patients, there are relatively few effective treatments for relief the oral ulcer-induced pain. In the present study, we investigated the pain mechanism in oral ulcer and determined analgesic effect of lidocaine derivative QX-314 on the pain in rats. Oral ulcer model rats induced spontaneous and mechanical- and chemical-evoked pain which is similar to clinical pain induced by oral ulcer. The pain is likely due to accelerated cell membrane permeability of substance in the ulcer region where the epithelial barrier was destroyed. QX-314 was effective on the oral ulcer-induced both spontaneous and mechanical pain relief long-lastingly.

研究分野：口腔生理学

キーワード：口内炎 疼痛

1. 研究開始当初の背景

口内炎は抗がん剤治療や放射線治療の副作用の一つであり、食事中的物理的な接触や味刺激などにより激痛が生じる。現在、局所麻酔薬のリドカインを用いた対症療法が主となっている。この方法は即効性があるものの効果時間が短く、痛覚以外の口腔内感覚全般を麻痺させてしまうことから、臨床現場では、口内炎による疼痛のみを抑制する方法が求められている。最近、膜不透過性リドカイン誘導体の QX-314 は、痛みの受容体である transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) チャネル孔を介して細胞内に導入することで痛み神経特異的に麻酔作用を示すことが報告された。QX-314 が口腔内疼痛に対する有効な鎮痛薬となる可能性が期待できる。

一方で、覚醒下動物における口腔内刺激が困難であるなど技術的な問題などから、これまで口腔内の疼痛に関する動物実験の報告は少ない。このそのため、口内炎による疼痛発症メカニズムについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、最近我々が新しく確立した口腔内疼痛評価法を用いて、(1)口内炎モデルラットにおける口腔内疼痛を評価し、三叉神経節細胞内でのタンパク変化を検討して、口内炎疼痛発症メカニズムを解明すること、(2)口内炎疼痛に対するリドカイン誘導体 QX-314 の鎮痛効果を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 口内炎モデルラットの作製

ペントバルビタール (50 mg/kg) にて麻酔したラットの下唇粘膜に、50%酢酸を浸したる紙を 30 秒間塗布することによって口内炎を惹起させた。コントロールラットは麻酔のみ行った。

(2) 疼痛行動観察

自発痛：プラスチックのボックスにラットを入れ、口腔内疼痛評価の指標として口腔周囲皮膚に対する rubbing 行動を 10 分間計測した。

機械的アロデニア：体保持用のボックスに酢酸処置前のラットを入れ、下唇粘膜および口ひげ部皮膚に対して機械刺激を加え、その逃避閾値（逃避時間）を計測した。機械刺激には von Frey filaments を使用した。覚醒下における下唇粘膜刺激は、以下に示す我々が開発した stable intraoral opening 法（安定開口法）を用いて行った。ペントバルビタール (50mg/kg) 麻酔下において、ラット下口唇皮膚に滅菌した 22 ゲージ相当の針を 5 ~ 7 mm 程度貫通させ、外れないように丸くピアス状に加工した。針に 4 g の重りを磁石で取り付け下方に牽引することで、下唇粘膜を安定して露出させた。安定した行動評価のために、針を取り付けてから 2 週間は針挿入部位の治癒と行動評価の訓練を行った。

カプサイシン誘発疼痛：酢酸処理 2 日目の覚醒下ラットに intraoral dropping 法（口腔内滴下法）を用いてカプサイシン溶液 (100 μ M) を滴下した後の rubbing 行動を 3 分間測定した。

(3) 三叉神経節における TRPV1 発現変化

あらかじめ逆行性トレーサーであるフルオロロゴールド (FG, 4%) を下唇粘膜に 10 μ l 注入することで口内炎部支配神経細胞を標識した。FG 注入 2 日後に口内炎を作製し、その 2 日後に麻酔下にて灌流固定した。摘出した三叉神経節を薄切し、TRPV1 抗体を用いて通法通り免疫組織化学的染色を行った。蛍光顕微鏡にて観察し、FG 陽性細胞における TRPV1 発現について解析を行った。

(4) 組織浸透性

酢酸処理 2 日目に FG を口内炎部位に 1 分間留置した後、口内炎部を含む下唇部を摘出し、薄切後、蛍光顕微鏡にて FG の組織内へ

の浸透性を確認した。

(5) 薬物投与

酢酸処理 2 日目に綿球に浸した 1% QX-314 または 1% リドカインを口内炎部に直接 5 分間留置させた。

4. 研究成果

酢酸処理 2 日目において、粘膜上皮が剥離し、炎症性細胞の強い浸潤が認められたことから、口内炎の発症を確認した。酢酸処理 5 日目まで口内炎は消失した。酢酸処理 2 日目において自発的 rubbing 時間が延長した (図 1A)。あらかじめ、下唇粘膜を安定して露出できるように処置および訓練を行ったラットの口内炎部へ機械刺激を加えた時の逃避閾値は、酢酸処理 2 日目以降に有意に低下した (図 1B)。一方で、口ひげ部機械刺激に対する逃避閾値に変化は認められなかった。これらのことから、自発痛および口内炎部の機械的アロディニアは酢酸処理 2 日目において最も強いことが示唆された。

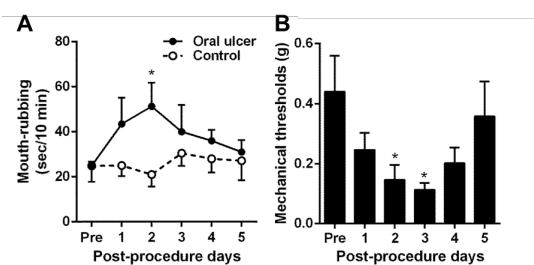


図1

次に、酢酸処理による TRPV1 への影響を調べるため、酢酸処理 2 日目のラットに対して口内炎部へのカプサイシン刺激に対する rubbing 行動を検討したところ、健常粘膜刺激と比べて行動時間が延長したことから、TRPV1 の感作が示唆された (図 2A)。しかし、口内炎部支配三叉神経節細胞における TRPV1 陽性細胞数は口内炎発症にもかかわらず変化しなかった (図 2B)。

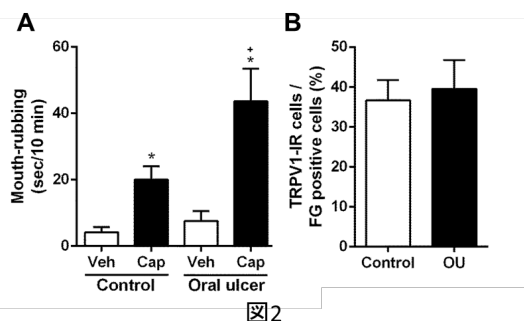


図2

また、口内炎部位において FG 浸透性の増強が認められ、FG 陽性三叉神経節細胞数も増加したことから、粘膜上皮が欠損したため口内炎深部への物質浸透性が亢進していることが考えられた (図 3)。

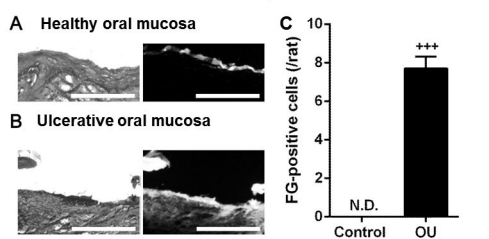


図3

QX-314 を酢酸処理 2 日目の口内炎部へ直接作用させたところ、リドカインと比較して QX-314 塗布 1 時間、2 時間後に機械的アロディニアの抑制が認められ (図 4A)、自発痛はリドカインと同程度抑制された (図 4B)。

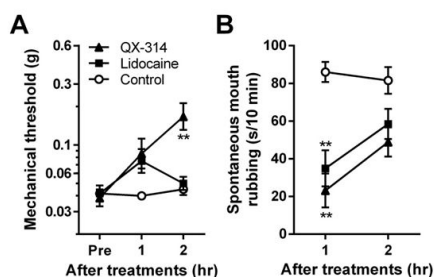


図4

このことから、QX-314 は口内炎部にて感作された TRPV1 のチャネル孔を介して細胞内に入ること、口内炎疼痛を抑制する可能性が示唆された。

本研究にて確立した口内炎モデルラットは、自発痛や接触痛、化学物質による誘発痛を生じ、実際の臨床症状に近い疼痛を発症し

ていた。この疼痛は口内炎発症による TRPV1 の感作と粘膜バリア欠損による物質浸透性の増加が関与していると考えられる。また、新規治療薬としての QX-314 は、この口内炎疼痛の緩和に有効であることが示された。今後のさらなる研究の継続によって、口腔内に発症した感覚異常発症メカニズムの解明や口内炎に対する新たな治療法開発に貢献できると考えられる。

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 4 件)

Hitomi S, Ono K, Miyano K, Ota Y, Uezono Y, Matoba M, Kuramitsu S, Yamaguchi K, Matsuo K, Seta Y, Harano N, Inenaga K. Novel methods of applying direct chemical and mechanical stimulation to the oral mucosa for traditional behavioral pain assays in conscious rats. *J Neurosci Methods*. 239:162-169, 2015.

Nakamura-Kiyama M, Ono K, Masuda W, Hitomi S, Matsuo K, Usui M, Nakashima K, Yokota M, Inenaga K. Changes of salivary functions in experimental periodontitis model rats. *Arch oral bio*. 59: 125-132. 2014.

Teramoto K, Tsuboi Y, Shinoda M, Hitomi S, Abe K, Kaji K, Tamagawa T, Suzuki A, Noma N, Kobayashi M, Komiyama O, Urata K, Iwata K. Changes in expression of growth-associated protein-43 in trigeminal ganglion neurons and of the jaw opening reflex following inferior alveolar nerve transection in rats. *Eur J Oral Sci*. 121(2):86-91, 2013.

Yamamoto T, Ono K, Hitomi S,

Harano N, Sago T, Yoshida M, Nunomaki M, Shiiba S, Watanabe S, Nakanishi O, Inenaga K. Endothelin Receptor-mediated Responses in Trigeminal Ganglion Neurons. *J Dent Res*. 92(4):335-9, 2013.

〔学会発表〕(計 9 件)

人見涼露, 小野堅太郎, 蔵満幸子, 山口喜一郎, 稲永清敏: 口内炎モデルラットにおける疼痛行動変化と口腔内疼痛発症メカニズム. 第 74 回九州歯科学会(北九州), 5 月, 2014

人見涼露, 小野堅太郎, 蔵満幸子, 山口喜一郎, 原野望, 宮野加奈子, 上園保仁, 的場元弘, 稲永清敏: 口内炎モデルラットにおける口腔内疼痛発症機構. 第 91 回日本生理学会大会, 鹿児島 (3 月), 2014.

S. Hitomi, K. Ono, S. Kuramitsu, K. Inenaga.: The mechanism of oral ulcer-induced pain hypersensitivity in rats. Asia-Pacific Conference, Fukuoka (January), 2014.

人見涼露, 小野堅太郎, 蔵満幸子, 山口喜一郎, 稲永清敏: 口内炎ラットにおける口腔内疼痛発症メカニズム. 第 7 回三叉神経領域の感覚—運動統合機構研究会, 新潟(11 月), 2013.

S. Hitomi, K. Ono, S. Kuramitsu, K. Miyano, Y. Uezono, M. Matoba, K. Inenaga.: Evaluation of oral ulcer-induced pain using newly developed behavioral assays in rats. Society for Neuroscience, San Diego (November), 2013.

人見涼露, 小野堅太郎, 宮野加奈子, 上園保仁, 的場元弘, 稲永清敏: 口内炎ラットにおける口腔内疼痛発症機構解明. 第 64 回西日本生理学会, 北九州 (10 月), 2013.

人見涼露: 口内炎による疼痛発症メカニズム. サテライトシンポジウム 11 口腔内の痛みを考えるー基礎から臨床までー 第 55 回歯科基礎医学会, 岡山 (9 月), 2013.

人見涼露, 小野堅太郎, 稲永清敏: 口内炎モデルラットを用いた口腔内疼痛の新規評価法と発症メカニズムの解明. 第 55 回歯科基礎医学会, 岡山 (9 月), 2013.

人見涼露, 小野堅太郎, 蔵満幸子, 稲永清敏: 口内炎モデルラットにおける口腔内疼痛発症機構の解明. 九州歯科学会, 北九州 (5 月), 2013.

6 . 研究組織

研究代表者

人見 涼露 (HITOMO, Suzuro)

九州歯科大学生理学分野・助教

研究者番号 : 70548924