

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463073

研究課題名(和文) 口腔顔面部神経障害性疼痛の発症機序の解明とその治療法の確立

研究課題名(英文) The elucidation of the pathogenesis of the orofacial neuropathic pain and its treatment strategy

研究代表者

吉田 充広 (Yoshida, Mitsuhiro)

広島大学・病院(歯)・講師

研究者番号：40364153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では神経障害性疼痛の発症機序を中枢神経系におけるグリア細胞の作用を時系列的に解明し、その発症機序に神経栄養因子がどのように関係しているかを明らかにすることを目指した。グリア細胞の活動は慢性痛形成前に活発化し、慢性痛形成後には活性が減弱することが予想された。また、神経栄養因子の産生の促進は、熱刺激に対する反応潜時には影響しなかったが、慢性疼痛に伴ううつ様症状は軽減させることが予想された。

研究成果の概要(英文)：In this study we tried to clarify how microglia cells are activated chronologically and how brain-derived neurotrophic factor relate the mechanism of pathogenesis of neuropathic pain in the central nervous system. Microglia cells are activated before developing chronic pain. The activation of microcells are decreases after developping chronic pain. The facilitation of the secretion of brain-derived neurotrophic factor did not affect the reaction latency to heat stimulation, but ameliorated depressive symptom with chronic pain.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：神経障害性疼痛 慢性疼痛 神経栄養因子 グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

神経系の一次的な損傷や機能異常、あるいはそれによって引き起こされる神経障害性疼痛の多くは難治性で、患者の生活の質の低下、医療費高騰に大きな影響を及ぼしている。また、神経障害性疼痛患者の多くは、気分障害(うつ症状)を併発し、それによる経済的損失は約2兆円という試算もある。このような状況の中、現在、神経障害性疼痛に対する治療として、神経ブロック療法、薬物療法、理学療法等が行われているが、どの治療法も完全に効果が期待できるものではない。したがって、この研究では、神経障害性疼痛およびそれに随伴するうつ症状の発症機序を解明し、より効果のある治療法が開発しようと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、神経障害性疼痛の発症機序を、脊髄後角から皮質・中脳脊髄路、大脳辺縁系に至る神経系におけるグリア細胞の相互作用を時系列的に解明し、その発症機序に脳由来神経栄養因子がどのように関係しているのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究計画では、ラット下歯槽神経結紮による神経障害性疼痛モデルおよび薬剤による慢性疼痛発症モデルを使用して研究を行う予定であったが、モデルの完全な安定性が得られなかったため、多くの先行研究があるラット坐骨神経結紮モデルを使用し、抗うつ薬であるイミプラミンの投与により脳由来神経栄養因子と慢性疼痛およびそれに随伴するうつ症状の発症の機序を解明するための基盤となる研究を進めた。

実験には雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。坐骨神経結紮モデルは、ラットをイソフルラン麻酔下、左背側大腿部皮膚を切開し、坐骨神経を露出させ、不完全に結紮した。術後、運動障害や運動麻痺のみられたものは実験から除外した。

ラット坐骨神経結紮モデルにおいて経日的(術前、術後3日、7日、10日、14日、21日)に熱刺激に対する反応潜時(痛覚過敏)をプランターテスト装置(Ugobasile, LMS 7370S, 7371)で計測した。反応潜時は左右の後脚を交互に5分おきに計測し、その結果は、最大値と最小値を除いて平均値を求め、右側の健常後脚と左側の障害後脚で比較をした。

また、坐骨神経結紮後21日での強制水泳試験における不動時間を計測した。強制水泳試験は、Porsolt et al. (1978)が報告した方法に基づいて行い、 24 ± 0.5 度の水を満たした透明なプラスチックの水槽(45×35×60 cm)にラットを入れ5分間における不動時間の測定を行った。後脚を動かさなくなった時を不動時間と判定した。ラットを水槽から取り出した後は、タオルで水気を取り、暖かいケージに15分間入れた後にホームケージに戻した。

ラット坐骨神経結紮モデルにおけるイミ

プラミン(セロトニンの再取り込み阻害薬)の効果を解明するために、イミプラミンを坐骨神経結紮後10~22日にかけて5mg/日を腹腔内投与し、その投与4時間後に熱刺激に対する反応潜時およびの強制水泳試験における不動時間を計測した。

また、イミプラミン投与の効果が5,7-DHT(脳幹由来-5HT神経毒)、anti-BDNF(脳由来神経栄養因子)抗体、K252a(TrkB受容体阻害薬)の脳室内投与で影響を受けるかどうかを探索した。これらの薬剤を脳室内投与するためのカニューレは、頭蓋骨のbregmaから尾側に1mm、右側に1.5mm、深さ3.5mmのところを設置した。薬剤の投与はハミルトンシリンジを用いて、1 μ /minの速度で、5 μ lの用量で行った。

(2) 慢性痛形成に至る過程でのマイクログリアの時系列的な作用を明らかにするための基盤的研究を行うため、口腔顔面部慢性痛の発症過程が観察できる動物モデルを使用した研究を行った。

イソフルラン麻酔下で Sprague-Dawley 系雄性ラットの右側咬筋に3% carrageenan(100 μ l)を注入し、慢性疼痛に至る疼痛の発症状況を継時的に観察した。また、マイクログリア活性抑制剤であるミノサイクリンを腹腔内投与(40mg/kg/日)による疼痛の発症状況の変化を観察し、慢性疼痛発症でのマイクログリア活性の関与を検討した。

疼痛発症の評価は von Fray 電子痛覚測定装置(Von Frey 2390)による機械的刺激および Aceton test による冷刺激によって行った。von Fray 電子痛覚測定装置による測定では、フィラメントを咬筋部の皮膚に当て、顔面を背ける、引っ込める等の刺激から逃げようとした値(VFT 値)を測定した。冷刺激に対する行動評価としては Acetonn を咬筋部に少量塗布し、自発痛の行動とされる Forepaw face rubbing、Lower lip skin/cheek rubbing、Hindpaw face scratching の発現時間の計測を行った。疼痛および行動の評価は、carrageenan 注入前、carrageenan 注入をした4時間後、8時間後、24時間後、1週間後、2週間後、3週間後、4週間後、5週間後、6週間後に、carrageenan を注入した右側、および反対側の左側で行った。測定は左右を交互(5分おき)に7回行い、最大値と最小値を除いて平均値を求め評価した。

4. 研究成果

(1) 神経障害性疼痛でのイミプラミン(抗うつ薬)の効果

イミプラミンの投与は、ラット坐骨神経結紮後の熱刺激に対する反応潜時の低下には影響を与えなかった。強制水泳試験における不動時間延長はイミプラミンの投与により抑制された。

強制水泳試験でのイミプラミン投与の効果は、5,7-DHT、anti-BDNF 抗体、K252a の脳室内投与で拮抗された。

これらのことから、イミプラミンは脳幹由来-5HT 含有神経の活性化と脳由来神経栄養因子の産生促進を介してうつ症状が軽減させるのではないかと予想された。また、イミプラミン投与のみでは、疼痛の軽減は起こらず、神経障害性疼痛の治療には疼痛とうつ症状の2面から考えて行く必要があることが示唆された。

(2) 慢性痛形成に至る過程でのマイクログリアの時系列的な作用

Carrageenan の咬筋注入による慢性痛の発症過程について

Carrageenan の咬筋内投与後約 24 時間まで急性痛が発症し、投与後約 2 週間で慢性痛に移行し、その後投与後 4 週間まで慢性痛が継続することが確認された。(図 1)

マイクログリアの時系列的な作用について

マイクログリア活性抑制剤投与(ミノサイクリン)を急性痛発症前(carrageenan の咬筋内投与直前)から行った群では、急性痛の発症を抑制することはなかったが、慢性痛の発症は抑制されることが確認された。(図 2)

また、マイクログリア活性抑制剤投与を慢性痛発症後(carrageenan の咬筋内投与 2 週間後)から行った群では慢性痛発症は抑制されないことが確認された。

これらのことから、急性痛発症の時期においてマイクログリアが慢性痛の形成に関与していることが予想され、慢性痛の発症を予防するには、できるだけ早い時期にマイクログリアの活動を抑制することが重要だと考えられる。(図 3)つまりマイクログリアの活性は慢性疼痛形成における末梢性および中枢性の感作に関与していると考えられた。

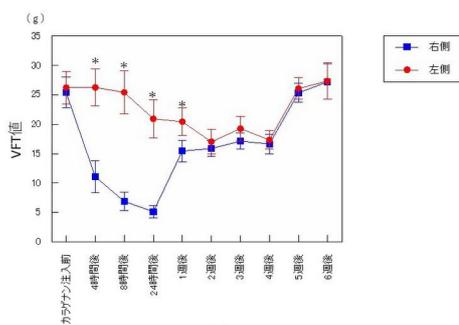


図 1 : Carrageenan咬筋投与後のVFT値

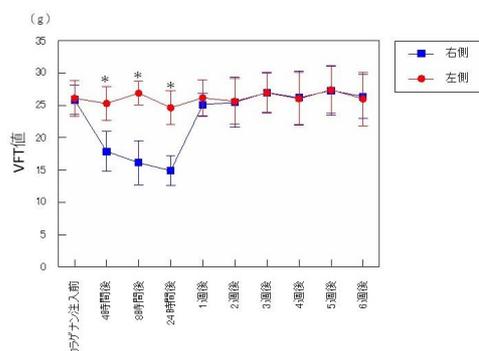


図 2 : ミノサイクリン投与群のVFT値

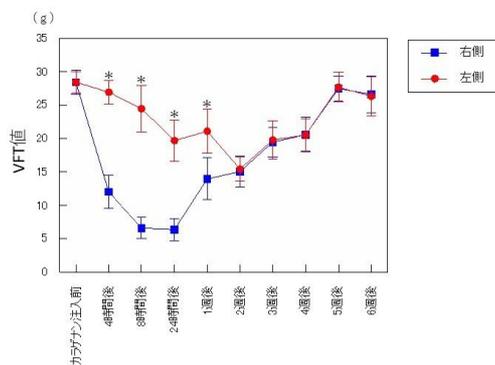


図 3 : 慢性痛期ミノサイクリン投与群のVFT値

なお、Aceton test による冷刺激による疼痛評価では、測定値のばらつきが非常に大きく、測定値の結果解析までには、至らなかった。

本研究で使用した、Carrageenan の咬筋注入による慢性痛モデルは、厳密には、侵害受容性疼痛モデルであり、神経障害性疼痛モデルではないが、慢性痛発症の原因である末梢性および中枢性の感作では、神経障害性疼痛と侵害受容性疼痛に共通するメカニズムが考えられており、慢性疼痛形成とマイクログリア活性の関係を明らかにする基盤的研究結果が得られたと考えている。今回の研究では、ミノサイクリンの全身的投与で検討を行ったが、今後、脊髄後角部、脳室内への局所投与を行い、慢性痛形成におけるマイクログリアの中枢性感作への関与について明らかにしていきたいと考えている。

慢性疼痛の原因は、神経障害性疼痛、侵害受容性疼痛、心理社会的な要因(うつ、不安症状等)に分けられるが、長引く痛みでは複数の原因が関与していると考えられている。今後は、神経障害性疼痛だけでなく、侵害受容性疼痛、心理社会的な要因にも目を向けた、研究に取り組みたいと考えている。

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)

1. 情動ストレスが慢性化した頭頸部筋・筋膜痛患者の交感神経活動に与える影響, 椎葉俊司、布巻昌仁、左合徹平、原野望、吉田充広、坂本和美、小野堅太郎、北村知明、鱒見進一日本口腔顔面痛学会雑誌, 8巻, 1号, pp.7-pp.11, 2015, 査読有

2. Comparison of Pain Tolerance Thresholds of Upper Limb to Identify the Most Appropriate Venipuncture Site, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Mitsuhiro Yoshida, Shunji Shiiba, Teppei Sago, Masahito Nunomaki, Nozomu Harano, Seiji Watanabe; 73; 850.e1-pp.850.e5, 2015, 査読有

3. Dura-evoked neck muscle activity involves purinergic and

N-methyl-D-aspartate receptor Mechanisms, Yao Dongyuan, Yoshida Mitsuhiro, Sessle Barry J., Neuroreport; 26; 1155-1160, 2015, 査読有

4. Imipramine Ameliorates Pain-related Negative Emotion via Induction of Brain-derived Neurotrophic Factor, Yasuda S, Yoshida M, Yamagata H, Iwanaga Y, Suenaga H, Ishikawa K, Nakano M, Okuyama S, Furukawa Y, Furukawa S, Ishikawa T, Cellular and molecular neurobiology, 34; 1199-1208, 2014, 査読有

〔学会発表〕(計3件)

1. Mitsuhiro Yoshida, Yoshitaka Shimizu, Keita Yoshida, Akari Mukai, Mitsuru Doi, Masahiro Irifune: The analgesic effect of flurbiprofen in combination with acetaminophen: comparison to that with fentanyl, International Association for Dental Research, Seoul, Republic Of Korea, 2016年06月22日~25日

2. 安田聖子, 岩永泰武, 藤村博和, 吉田充広, 福原佳世子, 石川敏三: 抗うつ薬 Imipramine のラット慢性疼痛における気分障害改善と神経栄養因子(BDNF)誘導作用, 第36回日本疼痛学会, 大阪, 2014年06月20日~21日

3. 石川敏三, 安田聖子, 石川浩三, 藤村博和, 井田唯香, 岩永泰武, 吉田充広: ノイロトロピンの痛覚-情動系機能障害改善効果: 脳由来神経栄養因子(BDNF)誘導作用, 第36回日本疼痛学会, 大阪, 2014年06月20日~21日

3.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 充広 (Yoshida Mitsuhiro)

広島大学・病院(歯)・講師

研究者番号: 40364153

(2) 連携研究者

石川 敏三 (Ishikawa Toshizou)

山口大学・医学部・保健学科・教授

研究者番号: 90034991