

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861756

研究課題名(和文) 口腔顎顔面領域難治性慢性疼痛の発症機序解明と新たな治療展開

研究課題名(英文) Explication of the mechanism and new therapy in refractory chronic orofacial pain

研究代表者

山本 徹 (YAMAMOTO, Toru)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：20707335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：エンドセリンの口腔顎顔面領域における疼痛への関与について検討した。馴化を行い、7週齢のラット鼻毛部にエンドセリン-1を投与することによって、コントロール(生理食塩水)と比較して疼痛関連行動時間が増加し、エンドセリンの疼痛への関与が示唆された。またペントバルビタール麻酔下(50 mg/kg, i.p.)でラットの下顎骨を骨切削用歯科用エンジンを用いて切削し、下歯槽神経を露出させ、これを切断もしくは4-0絹糸で緩く結紮する手術を施行し、神経障害性疼痛モデルラット(切断・結紮)を作製した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of endothelin in orofacial pain. In the present study, the injection of endothelin-1(ET-1) at whisker pad prolonged the duration of the pain-related behavior. This result suggests that endothelin has some sort of effect for orofacial pain. Subsequently, we prepared the neuropathic pain model rat(transsection・ligation).

研究分野：神経障害性疼痛

キーワード：口腔顔面痛 エンドセリン 神経障害性疼痛

## 1. 研究開始当初の背景

口腔顎顔面領域に発症する神経障害性疼痛などの慢性疼痛は、患者の QOL を著しく低下させるにもかかわらず、麻薬性鎮痛薬や非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) などの従来の鎮痛薬では疼痛を十分にコントロールすることが難しく、早急な治療方法の確立が強く望まれている。

エンドセリンはブタ大動脈の血管内皮細胞から血管収縮作用を有する生理活性物質として 1988 年に単離、同定されたペプチドで、その心・血管系に対する作用から、従来は循環調節への関与、高血圧や様々な虚血性循環器疾患の病因または増悪因子としての役割が注目されてきたがエンドセリンが神経傷害や炎症、癌などで、その発症部位や血液中に高濃度に存在することが報告され (*Khodorova et al., J Pain, 2009*)、生体の侵害受容に關与する可能性が強く示唆されている。

さらに、口腔扁平上皮癌細胞からエンドセリンが放出されていることが報告され (*Hans et al., Brain Res Rev, 2009*)、口腔顎顔面領域の疼痛発生にもエンドセリンが關与している可能性が示唆されている。また、眼窩下神経を結紮する神経障害性疼痛モデルラットで、機械的刺激や熱刺激に対する逃避閾値は NSAIDs によって変化しないのに対し、エンドセリン受容体アンタゴニストでは上昇することが報告され、神経障害性疼痛に対するエンドセリン受容体の重要性も示唆されている (*Chichorro et al., Pain, 2006*)。

すでにわれわれは、一次神経系であるラット三叉神経節ニューロンでエンドセリンに関する研究を行い、脊髄後根神経節ニューロンではその存在が報告されていないエン

ドセリン B 受容体が三叉神経節ニューロンに存在していることと、その機能について報告した (*Yamamoto et al., J Dent Res, 2013*)。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔顎顔面の知覚を司る三叉神経領域の神経障害性疼痛に対するエンドセリン受容体の関与や役割を検討し、難治性の慢性神経障害性疼痛に対する治療への応用を目指すことにある。

## 3. 研究の方法

(1) 神経障害性疼痛 (慢性疼痛) モデルラットの作製

6 週齢 Wistar 系雄性ラットを購入後、1 週間馴化を行い、7 週齢の時点で実験を開始する。ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, i.p.) でラットの下顎骨を骨切削用歯科用エンジンをを用いて切削し、下歯槽神経を露出させ、これを切断もしくは 4-0 絹糸で緩く結紮する手術を施行し、神経障害性疼痛モデルラットを作製する。

(2) 自発痛、機械的異痛症 (アロディニア) および熱痛覚過敏の観察

自発痛の指標とされる顔面部を両肢でこする動作であるグルーミング時間を 10 分間計測する。また機械的異痛症 (アロディニア)、熱痛覚過敏の観察は、顔面皮膚に対して機械刺激および熱刺激を加えて、その逃避閾値 (潜時) を計測する。機械刺激には von Frey filaments (動物用 Semmes-Weinstein monofilament set, 室町機械) を使用し、熱刺激には輻射熱刺激装置を用いる。また BQ-123 (エンドセリン A 受容体アンタゴニス

ト), BQ-788 (エンドセリン B 受容体アンタゴニスト) を組み合わせグルーミング時間や逃避閾値の変化を記録する。

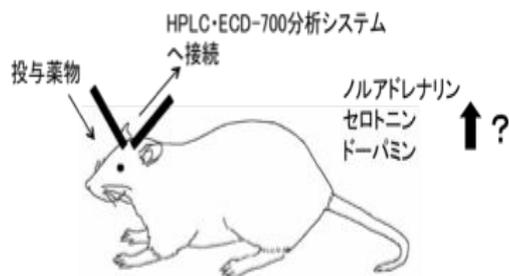
### (3) 免疫組織化学的検討

三叉神経脊髄路核尾側亜核は三叉神経支配領域からの侵害情報が入力することから、エンドセリン受容体アンタゴニストの局所もしくは全身への前処置が、三叉神経脊髄路核尾側亜核での c-fos の発現を抑制するか検討する。c-fos は何らかの侵害刺激に対し数分で遺伝子の転写が活性化され発現するため、疼痛刺激の指標とされている。侵害刺激後に c-fos の発現がピークになる 2 時間後に 4% パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定する。三叉神経脊髄路核尾側亜核を含む組織を摘出し凍結した後、クライオスタットを用いて厚さ 10  $\mu$ m の組織切片を作製し、DAB 発色による c-fos の免疫染色を行う。脱水、封入後、蛍光顕微鏡で観察し、蛋白発現を sham ope 群, ope 群 (薬物非投与群, BQ-123 投与群, BQ-788 投与群, BQ-123 + BQ-788 投与群) の計 5 群について解析・比較を行う。

### (4) 神経化学的検討

広く認められた信頼性の高い脳図譜 (brain map) が発表され、定位脳固定下でのマイクロダイアリスプローブ挿入が可能で、本研究課題で行うマイクロダイアリスも可能な実験動物として行動学的実験と同じ Wistar 系ラットを用いる。ペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) 全身麻酔下に、ラットにポリエチレンカテーテル (PE-10) を用いて、静脈内薬剤投与経路とする外頸静

脈カニューレーションを行う。その後脳定位固定装置に固定し、マイクロダイアリスプローブの先端を LC, RMg, ACC へ留置する。全身麻酔覚醒後 24 時間以降に、無麻酔、無拘束、自由行動状態のラットに今回申請するマイクロダイアリスシリンジポンプ (ESP-64, エイコム社) によってマイクロダイアリス灌流液 (人工脳脊髄液) の灌流を 1  $\mu$ l/min の流速で開始する。透析により脳内からプローブ内に流入してくるシナプス間隙に存在する神経伝達物質を含む灌流液をオートインジェクターによって、高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出器 (HPLC・ECD-700 分析システム: エイコム社) (現有) に注入し、灌流液サンプル中の神経伝達物質すなわちノルアドレナリン, セロトニン, ドーパミンを同時定量する。



## 4. 研究成果

エンドセリン-1 を投与することによって、コントロール (生理食塩水) と比較して疼痛関連行動時間が濃度依存性に増加し、エンドセリンの疼痛への関与が示唆された。またペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, i.p.) でラットの下神経神経を切断し神経障害性疼痛モデルラットを作製した。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 徹 (YAMAMOTO, Toru)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：20707335