

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11272

研究課題名(和文) 顎肩部の筋筋膜性疼痛をトリガーとする咬筋痛の治療法開発に向けた神経機構の解明

研究課題名(英文) Neural mechanism for developing therapy for masseter muscle pain triggered by myofascial pain in the neck shoulder

研究代表者

久保 亜抄子 (KUBO, Asako)

日本大学・歯学部・ポスト・ドクトラル・フェロー

研究者番号：70733202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯の噛みしめなどによる咬筋の痛みや肩こりは、有訴者が比較的多い疾患であるにも関わらず、生命予後に関わる疾患ではないことから、その成因や分子機構の解明研究が遅れている。そこで今回、肩の代表的な筋である僧帽筋に神経成長因子を投与して筋痛を引き起こし、同時に咬筋に電気刺激を行う「肩こりを伴う咬筋痛の動物モデル」を作成した。神経成長因子を単独投与した群や咬筋を単独電気刺激した群では痛覚過敏は引き起こされなかった一方、本モデルにおいては咬筋の機械痛覚過敏(筋収縮時痛)が引き起こされた。このことから、肩の痛みがあることで咬筋の痛覚過敏が引き起こされることがあきらかとなった。

研究成果の概要(英文)：As soreness of the masseter muscle caused by tooth clenching or stiff shoulders are not diseases related to life prognosis, the study about their origins and molecular mechanisms do not well studied. Therefore, in this study, "an animal model of masseter muscle pain accompanying stiff shoulders" was developed in which the nerve growth factor was injected to the trapezius muscle causing muscle pain and the electrical stimulation was applied on the masseter muscle at the same time. No hyperalgesia was induced in the group treated with nerve growth factor (NGF) alone or in the group with the electrical stimulation of the masseter muscles alone, whereas mechanical hyperalgesia of the masseter muscle (ie. pain during muscle contraction) was caused in the NGF injected and stimulated model. It was demonstrated that the painfulness of the shoulder causes hyperalgesia of the masseter muscle.

研究分野：神経生理学

キーワード：咬筋痛 顎関節症 神経成長因子 機械痛覚過敏

1. 研究開始当初の背景

顎関節症患者のうち約 80%は咀嚼筋障害による痛みを訴えるといわれている。それらの患者は睡眠時もしくは覚醒時においても無意識に歯を噛みしめている場合も多く、さらに頸・肩の筋緊張を有していることも多い。

日本における筋骨格系疼痛の罹患率は成人の 42%に上り、その中でも頸・肩こりの有訴者率は男女とも上位を占める。それらの多くは筋の硬結と特異的な圧痛点を有する筋・筋膜性疼痛症候群と考えられているが、これは長時間に及ぶスマートフォン使用や PC デスクワークなどの現代の生活習慣を背景として、頸背部筋に長時間の伸張性収縮運動を強いていることに一因があると推測されている。筋の伸張性収縮運動は、他の運動様式に比べ筋に過度な負担をかけ、最も筋の圧痛閾値低下を引き起こすことが知られている。咀嚼筋痛も慢性的な頸・肩の筋痛も顕著な炎症状態は認められず、消炎鎮痛薬が奏功しないことも多いことから、炎症性疼痛とは異なる成立機序を有すると推測されている。

筋痛は、生命予後に関わる疾患ではないため、これまで筋痛を対象とした研究はあまり行われてこなかったが、筋の痛み(機械痛覚過敏)は筋収縮という機械刺激により引き起こされることから、QOL や日常生活意欲・社会活動意欲を低下させ、社会経済的な損失を招いている。さらに、これまで顕著な炎症がみられない頸部・体幹部の筋痛と顎顔面の筋痛の関係はまったく明らかにされてこなかった。

2. 研究の目的

顎顔面部領域における痛みには咀嚼筋障害(顎関節症型)や緊張型頭痛といった筋緊張に由来するものが非常に多い。顎関節症患者の多くは咀嚼筋障害による痛みを訴えるといわれているが、これらの患者では慢性的な頸・肩こりの有訴率も高く、以前から頸肩の筋痛と頭頸部の筋痛との強い関連性が示唆されている。しかしながら、両者の関連についてはまったく明らかにされてこなかったことから、本研究では、顕著な炎症所見のない慢性的な頸肩部筋痛(筋・筋膜性症候群)により咬筋の機械痛覚過敏が引き起こされることを明らかにし、さらにその分子メカニズムを解明する。最終的に口腔顔面領域における筋機械痛覚過敏の予防や治療法を開発するための基盤をつくることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 筋痛モデル動物の作製

研究代表者らのこれまでの研究結果で、筋の伸張性収縮(肩こりの原因)により NGF が放出されて筋痛が引き起こされること、NGF を下腿の筋に投与すると筋痛が引き起こされることが明らかとなっていることから、僧

帽筋への NGF 投与によって頸肩部に筋痛を引き起こすこととした。また、咬筋への電気刺激による筋収縮を行うことにより、歯の噛みしめを模倣した。顎関節症(咬筋痛)は女性の罹患率が高いことから雌性 Sprague-Dawley ラットを使用して、NGF 投与の投与量・投与期間・投与タイミングの検討ならびに咬筋電気刺激の刺激量・刺激期間・刺激タイミングの検討を行った。種々の検討結果から、NGF はストップガイドを取り付けた 31G 注射針を用いて投与深度を一定にして 1 日あたり 40 μg 投与し、咬筋への電気刺激強度は、1.5 mA (単収縮の約 10 倍) 持続時間 200 μsec とし、あきらかな咬筋の強縮が引き起こされる 100 Hz で、2 秒毎の繰り返し刺激を毎日 30 分間、NGF 投与と同日に行った。最終的に、投与及び刺激は 10 日間繰り返し行った。

(2) 咬筋機械逃避閾値の測定

6 週齢雌性ラットを十分馴化・ハンドリングした後に、咬筋の圧痛閾値の測定を開始した。圧痛閾値は、無麻酔下にてデジタルフォンプレイに直径 3.2 mm の先端が鈍なプローブを装着して投与及び刺激の前に測定した。圧痛閾値の測定値が安定した後、刺激を開始し、開始 1 日前から 20 日後までの期間、1-3 日毎に圧痛閾値を測定した。測定は投与及び刺激をする前に実施した。NGF 投与 + 電気刺激群 (NGF+ES 群)、NGF 単独投与群 (NGF+needle 群)、電気刺激単独群 (PBS+ES 群) の 3 群を設定し、それぞれの閾値の変化を比較した。

(3) 免疫組織化学的解析

NGF 群、ES 群、NGF+ES 群それぞれについて、延髄および顎髄の免疫組織化学的解析を行った。各群の動物を脱血後、4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定し、延髄・顎髄を取り出し、40 μm 厚の凍結切片を作成した。この切片に対して、ミクログリアやマクロファージのマーカーである Iba-1 の抗体を用いて染色し、各群間での三叉神経脊髄路核中間亜核・尾側亜核および顎髄後角における Iba-1 陽性細胞の割合を比較した。

4. 研究成果

(1) 咬筋の機械逃避閾値の変化 (図 1)

最終的に、NGF 単独 (NGF+needle) 群 8 頭、ES 単独 (PBS+ES) 群 7 頭、NGF+ES 群 10 頭を使用して咬筋圧痛閾値を比較した。刺激開始後 7 日目までは 3 群間でも各群内 (0 日との比較) にも機械逃避閾値に有意な変化はなかったが、刺激開始後 9、11、12、13、14 日目において、NGF 単独群に比較して NGF+ES 群で有意な閾値低下がみられ (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$)、12、13 日目において、ES 単独群と比較しても有意な閾値低下がみられた (#; $p < 0.05$, ##; $p < 0.01$)、NGF+ES 群内では、9、11、12 日目において 0 日と比較して有意

な閾値低下がみられた (\$; p<0.05, \$\$\$ p<0.001)。一方、NGF 単独群と ES 単独群の間には有意差はなく、また NGF 単独群内・ES 単独群内においても有意差はみられなかった。NGF + ES 群において閾値低下が最大であったのは 12 日目であった。

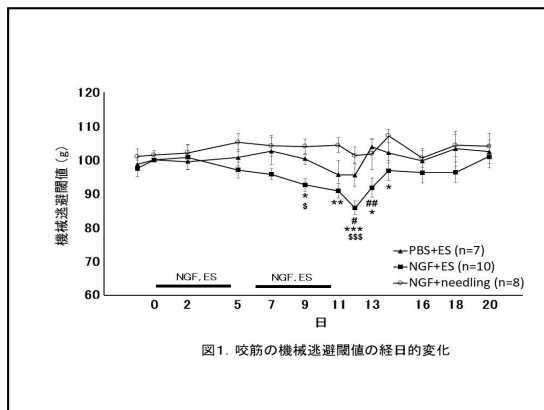


図1. 咬筋の機械逃避閾値の経日的変化

(2) 免疫組織化学的解析 (図2、図3)

NGF + ES 群において閾値低下が最大であったのは 12 日目であったことから、12 日目に各群の動物を灌流固定し、免疫組織化学的解析を行った。まず、ミクログリアやマクロファージのマーカーである Iba-1 抗体を用いて延髄における Iba-1 陽性細胞の解析を行った。咬筋に完全フロインドアジュバントを投与して炎症を引き起こした後に興奮性を示す延髄二次ニューロンは、三叉神経脊髄路核中間亜核・尾側亜核移行部 (Vi/Vc) 内では背側 1/3(dorsal)と腹側 1/3(ventral)で増加する報告があることから (Imbe, et al., Brain Res., 1999) このエリアでの Iba-1 陽性細胞が占める面積を解析したが、NGF 単独群・ES 単独群・NGF+ES 群間で有意な差はなかった。さらに三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) においても解析したが、群間で有意差はなかった (図2)。

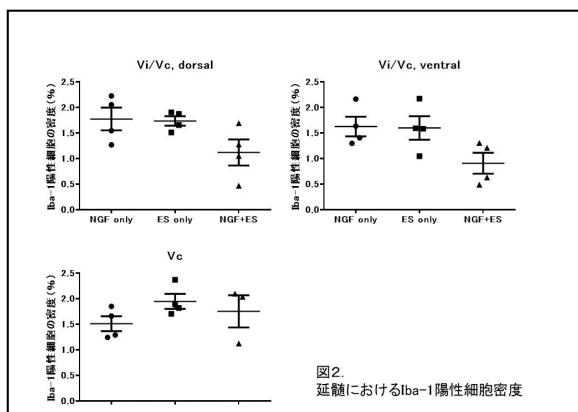


図2. 延髄におけるIba-1陽性細胞密度

同様に、上位頸髄 (C1, C2) における Iba-1 陽性細胞密度を解析したところ、C1, C2 ともに、ES 単独群に比較して NGF+ES 群で有意な発現低下がみられた (図3. *; p<0.05)。

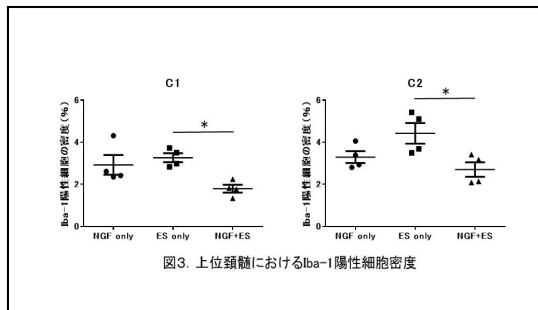


図3. 上位頸髄におけるIba-1陽性細胞密度

(3)まとめ

本研究により、歯の噛みしめなどによる咬筋の過剰収縮とともに僧帽筋痛 (肩こり) が起こることで、咬筋の痛覚過敏が引き起こされることがあきらかとなった。すなわち本結果から、臨床像に近い咬筋痛モデル動物を確立できた。一方、閾値の最大低下時にはミクログリアの活性化は引き起こされていなかった。一般的に、雄性動物を用いた動物実験において、脊髄や延髄ミクログリアが活性化することにより、痛覚過敏が起こることや痛覚過敏が持続することが報告されてきたが、近年、雌性動物においては、ミクログリアの活性化と痛覚過敏は無関係であるという報告がなされている (Sorge, et al., Nature Neurosci., 2015)。本研究においても、ミクログリアの活性化はみられず、上位頸髄においては活性化ミクログリア密度が有意に低下したことから、筋痛覚過敏においても雌性動物には独自の痛覚過敏形成機構が存在することが示唆された。

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 5 件)

Akihiko Furukawa, Masamichi Shinoda, Asako Kubo, Kuniya Honda, Ryuta Akasaka, Yoshiyuki Yonehara, Koichi Iwata: Endothelin Signaling Contributes to Modulation of Nociception in Early-stage Tongue Cancer in Rats. Anesthesiology. 2018 Feb 15. doi: 10.1097/ALN.0000000000002139. (査読有)

Lou Mikuzuki, Hiroto Saito, Ayano Katagiri, Shinji Okada, Saori Sugawara, Asako Kubo, Kinuyo Ohara, Jun Lee, Akira Toyofuku, Koichi Iwata: Phenotypic change in trigeminal ganglion neurons associated with satellite cell activation via extracellular signal-regulated kinase phosphorylation is involved in lingual neuropathic pain. Eur J Neurosci. 46(6):2190-2202, 2017. (査読有)

Hiroto Saito, Ayano Katagiri, Shinji Okada, Lou Mikuzuki, Asako Kubo, Tatsuro Suzuki, Kinuyo Ohara, Jun Lee, Nobuhito Gionhaku,

Toshimitu Iinuma, David A Bereiter, Koichi Iwata: Ascending projections of nociceptive neurons from trigeminal subnucleus caudalis: A population approach. *Exp Neurol.*, 293:124-136, 2017. (査読有)

Asako Kubo, Masamichi Shinoda, Ayano Katagiri, Mamoru Takeda, Tatsuro Suzuki, Junichi Asaka, David C. Yeomans, and Koichi Iwata: Oxytocin alleviates orofacial mechanical hypersensitivity associated with infraorbital nerve injury via vasopressin 1A receptors of the rat trigeminal ganglia. *PAIN*, 158(4):649-659, 2017. (査読有)

Yuka Nakaya, Yoshiyuki Tsuboi, Akiko Okada-Ogawa, Masamichi Shinoda, Asako Kubo, Jui Yen Chen, Noboru Noma, Dulguun Batbold, Yoshiki Imamura, Barry J Sessle, Koichi Iwata. ERK-GluR1 phosphorylation in trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons is involved in pain associated with dry tongue. *Molecular Pain*, Apr 26:12, 2016. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

Asako Kubo, Masamichi Shinoda, David C. Yeomans, Koichi Iwata: Oxytocin suppresses facial mechanical hypersensitivity following nerve injury via voltage-gated potassium channel mechanisms in the rat trigeminal ganglia. *EFIC2017*, 2017.

Norio Hotta, Asako Kubo, and Kazue Mizumura: Chondroitin sulfate suppresses the low-pH induced mechanical response in thin muscle afferents of rats. *International Society for Autonomic Neuroscience (ISAN 2017)*, 2017.

Asako Kubo, Masamichi Shinoda, David C. Yeomans, Koichi Iwata: Orofacial cutaneous mechanical hypersensitivity following infraorbital nerve injury is attenuated by peripheral Oxytocin in rats. *16th World Congress on Pain*, 2016.

Asako Kubo, Masamichi Shinoda, David C. Yeomans, Koichi Iwata: Oxytocin alleviates orofacial hypersensitivity following infraorbital nerve injury in rats. *Neuroscience 2015*, 2015.

〔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

久保 亜抄子 (KUBO, Asako)
日本大学・歯学部・ポストドク fellows
研究者番号：70733202

(2) 研究分担者

篠田 雅路 (SHINODA, Masamichi)
日本大学・歯学部・准教授
研究者番号：20362238

片桐 綾乃 (KATAGIRI, Ayano)
大阪大学・歯学研究科・助教
研究者番号：40731899

本田 訓也 (HONDA, Kuniya)
日本大学・歯学部・ポストドク fellows
研究者番号：20548945
(平成 29 年 3 月 21 日削除)

(3) 連携研究者

岩田 幸一 (IWATA, Koichi)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号：60160115

(4) 研究協力者

なし