

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11308

研究課題名(和文) 三叉神経神経障害性疼痛におけるマクロファージサブタイプin vivoイメージング

研究課題名(英文) In vivo imaging for macrophage subtypes associated with neuropathic pain.

研究代表者

照光 真 (Terumitsu, Makoto)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：60401767

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)： 神経の損傷の後にその神経が異常再生することによって神経障害性疼痛が生じる。この過程で傷ついた神経には異常な炎症が持続すると考えられる。本研究では炎症の亢進と組織再生に關与するマクロファージの活性に着目した。抜歯や口腔外科手術などで損傷する可能性のある三叉神経で、神経障害性疼痛モデルラットを作成した。微少な鉄粒子を造影剤として用いると貪食性の高いマクロファージが貪食をして、MRIでこれを画像化した。神経損傷後の慢性期には、組織修復と腫瘍増生を起こすタイプのマクロファージが活性化が認められ、神経再生の異常に關与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Abnormal nerve regeneration after traumatic nerve injury is responsible for neuropathic pain. Pathological neuroinflammation is thought to persist in the disordered nerve. We hypothesized that some subtypes of macrophage are involved in this process, which exacerbates inflammation or enhances tissue regeneration. We established a rat model of neuropathic pain in the trigeminal nerve. A phagocytic macrophage ingests ultra-small iron particles administered systemically as a contrast agent. Thereafter, 7.0T MRI was used to observe the activation of the phagocytic macrophage in the chronic phase of nerve injury. The results suggest that a subtype of macrophage caused to enhance excessive tissue growth responsive to the inflammation, and was involved in pathological nerve regeneration.

研究分野： 歯科麻酔

キーワード： 三叉神経 神経障害性疼痛 神経炎症 マクロファージ USPIO MRI

1. 研究開始当初の背景

歯科用インプラントをはじめ歯科処置や口腔外科手術に伴い三叉神経は損傷する可能性がある。その際、神経障害性疼痛に進展して疼痛が増悪すると、ペインコントロールがきわめて困難となり生活の質を著しく障害する。神経障害には損傷神経の異常再生が関与し、神経腫の形成は感覚異常の要因の一つと考えられている。神経腫の形成機構を解明し、さらに異常再生の抑制をすることができれば、神経障害性疼痛を防ぐ一つの方法となりうるだろう。

われわれは、三叉神経の分枝である下歯槽神経や舌神経に対してMRIを用いた高空間分解能画像法と高コントラスト画像法を臨床応用に成功し、三叉神経の神経障害性疼痛の診断や治療方針の策定に用いている。さらに難治性の症例に対しては、病変部の切除と人工神経管による生体内神経再生治療を施行してきた。これらにより明らかにされた注目すべき所見として、神経周囲に結合組織が異常増生、さらに神経自体が異常に変形、これらの形態と症状が関連する、病理組織標本では神経損傷から年単位経過後も炎症性浸潤細胞の浸潤を認める、炎症の指標である“T2緩和時間延長”と“軸索損傷の指標である水分子の見かけの拡散係数上昇”が検出される場合がある。

上記所見は、形態異常は炎症による反応性変化で神経腫を形成、急性炎症期が過ぎても持続する慢性炎症が存在、すなわち神経障害性疼痛には炎症性サイトカインと神経免疫機構からなる神経炎症が関与していると考えられる。神経損傷後のある時期に過剰な神経炎症が、正常な神経再生を阻害して神経障害性疼痛へ進展していることが推論される。

マクロファージの活性化から免疫と炎症のカスケード反応が始まる。活性化マクロファージは大きく2種類のサブタイプに分極する。古典的な炎症反応のM1タイプは炎症促進に、一方M2は組織修復/炎症抑制に作用する。神経損傷で最初に活性化するのはM1で、次いでM2が活性化する。動物実験ではM1とM2活性のバランスの異常は損傷神経の異常再生につながることを示されている。実際、高いM1/M2比は脊椎損傷後の軸索再生を抑制する他、神経再生には、M1からM2へ活性の転換時期に重要な臨界期があるとされる。先行研究とは異なり、多くの口腔顔面の神経損傷は上下顎骨内で生じる、神経再生は神経周囲環境影響を受けることは明らかであり、骨損傷をともなった場合のM1とM2の変動の知見は乏しい。そこで本研究では将来のヒトへの臨床応用を想定して実験動物で“三叉神経の神経障害性疼痛に対して非侵襲的に生体内のM1/M2マクロファージ活動をイメージングすること”を試みた。

2. 研究の目的

下歯槽神経損傷から神経障害性疼痛を生じ

るラットのモデル動物の作成と行動評価を行う。超微小超常磁性酸化鉄(Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide: USPIO)を造影剤として用いて、MRIで生体のマクロファージイメージングを行い、M1とM2の活性を評価する。

3. 研究の方法

(1) モデル動物

臨床において神経障害が多い下歯槽神経損傷モデルを作成した。咬筋を切開して下顎骨外側を切削し、下歯槽神経を露出、最後方臼歯と下顎孔の midpoint で神経を部分断裂させた。Sham手術として反対側に神経露出のみを行った。7週の雄性SDラットを用いた。

(2) 行動実験

モデル動物は損傷神経の支配領域である下顎に異常感覚を生じるはずである。動物実験において口腔顔面領域にどのような慢性疼痛があるのかを計測することは容易ではない。本研究は、自発行動下の動物に対しオペラント条件付けを行い、報酬への行動を自動測定することにより疼痛関連行動の定量化を行った。コンデンスミルクで正の条件付けを行い、この報酬を得るためにはラットは温度刺激の提示部位に下顎を接触させなくてはならない。刺激温度は、33 から 47 まで上昇、47 を維持した後、7 まで下降して維持、再び 33 に戻る 630 秒の時系列で変化させた。温度刺激部位への接触時間(Ct)とミルク摂取時間(Lt)を計測し、報酬取得成功率に相当するLt/Ctを算出した。実験装置はFlorida大学で開発されたOPADを応用した。術前のコントロールと、術後1から2週に計測した。

(3) イメージング実験

モデル動物の行動実験後、実験動物中央研究所(川崎市)のBruker社7.0T MRIで画像データを取得した。

神経の病変部の形態評価を行うため3次元高分解能画像を高速勾配エコー法FISPにより撮像した。画像データは神経走行に沿った断面を設定して3次元情報を2次元平面に投影する神経画像法(3-dimensional volume rendering MR neurography: 3DVR-MRN)により画像処理を行った。

造影剤のUSPIOは、生体内で貪食能を有するM2マクロファージが取り込むはずである。超常磁性であるUSPIOは磁場の均一性を乱しMRI信号を局所的に低下させる。これはT2緩和時間の短縮として観察される。一方、M1の活動は炎症反応を亢進させ浮腫が生じ自由水が増加する、さらに組織破壊が進行すると水分子の拡散性が増加することが考えられる。このUSPIO造影前後での神経のMRI信号変化からM1/M2比が推察できるはずである。撮像は神経損傷後3週で行った。

4. 研究成果

(1) ラット自発行動下での疼痛関連行動

Lt と Lt/Ct は疼痛モデル群で有意に減少した。温度別に比較すると、33-38 と 38-42 への上昇では両群に差はなく、術後群では 42-47 で Lt が減少、47 維持では Lt と Ct とともに減少した。

侵害受容器が応答するとされるよりも低い温度条件では接触刺激と同等の刺激が下顎に加えられたと考えられ、これらは両群に差異はなかった。一方、温度が上昇した条件では高温に対する過敏反応により報酬への負の強化が作用したことが計測されたことが示唆される。本研究によるモデル動物は神経損傷後に神経障害性疼痛を生じていること、本行動実験は口腔顔面領域のラット自発行動下での疼痛関連行動を定量的に計測できることを示した。

(2) 損傷神経の病的変形

3DVR-MRN による神経 MRI は、モデル動物の下歯槽神経が損傷側で不整形に膨大していることが認められた(図1)。一方 Sham 手術側の下歯槽神経はスムーズな走行を示した(図2)。これは、外傷性神経腫の特徴的な形態であり、モデル動物で病的な神経再生が生じたことを示唆している。三角は下歯槽神経を、その下方にある矢印で示す組織は下顎前歯の歯髄。

図1 手術側の不整形に膨大した下歯槽神経

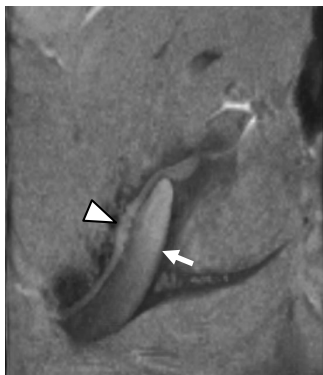


図2 Sham 手術側の正常な下歯槽神経

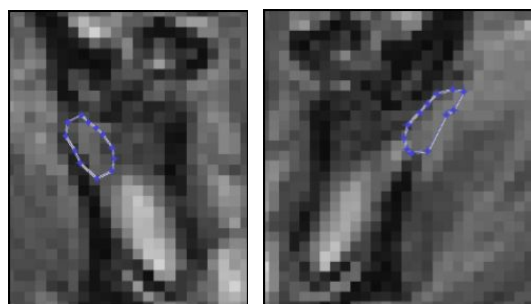


(3) T2 緩和時間の短縮

T2 緩和時間は、USPIO 造影剤投与前後で計測し、損傷神経部位に関心領域 (ROI) を設定して比較した(図3)。Sham 側では造

影前後に T2 緩和時間に有意差を認めなかった。一方、神経障害性疼痛側では T2 緩和時間が短縮した。すなわち、貪食能を持ち USPIO の集積により T2 緩和時間を短縮させ、逆に T2 緩和時間を延長させるような炎症亢進作用が低いマクロファージサブタイプの活性をとらえていることが示唆された。これは、M2 タイプのマクロファージの活動によるものとみられる。M2 活性の亢進が、抗炎症と組織修復作用に働き、これが過剰に働き腫瘍増生につながってゆくものと推測された。

図3 USPIO 造影後の画像と関心領域 (ROI)



Sham 手術側

神経障害側

(4) 研究の意義と展望

三叉神経神経障害性疼痛の神経炎症の過程を USPIO を用いたマクロファージイメージングにより非侵襲的に計測することができた。超常磁性酸化鉄製剤 (Super Paramagnetic Iron Oxide : SPIO) は肝臓のクoppa 細胞の造影にヒトでも用いられているため本件研究の手法は臨床応用にも可能性が開けている。

酸化鉄粒子の造影剤 M2 活性と神経腫形成の関連性を強く示唆する所見が得られたことにより、神経腫形成を阻害する治療戦略の基盤となった。

下歯槽神経病変部の免疫組織化学的な検索を分担研究者の佐藤由美子が検索をしている。これにより、より詳細なマクロファージサブタイプと神経腫や異常感覚との関連性が明らかになってゆく予定である。

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)

Terumitsu M, Matsuzawa H, Seo K, Watanabe M, Kurata S, Suda, A, Nakada T, High-contrast-resolution Imaging of Posttraumatic Mandibular Nerve by 3DAC-PROPELLER MRI: Correlation with the Severity of Sensory Disturbance. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology, 査読有, 2017 Jul;124(1):85-94. doi:

10.1016/j.oooo.2017.02.017. Epub 2017 Mar 14.

Terumitsu M, Hirahara M, Seo K, Dissection of retropharyngeal tissue by Parker Flex-Tip™ nasotracheal tube. Anesth Prog. 査読有, 64:240-243, 2017. doi: 10.2344/anpr-64-03-05

Seo K, Terumitsu M, Inada Y, Nakamura T, Shigeno K, Tanaka Y. Prognosis After Surgical Treatment of Trigeminal Neuropathy with a PGA-C Tube: Report of 10 Cases. Pain Medicine 査読有, 2016; 0: 1-9. doi: 10.1093/pm/pnw088

照光 真, 瀬尾 憲司, 松澤 等, 稲 有史, 中村 達雄, 茂野 啓示, 渡辺 将樹, 鈴木 清隆, 中田 力 三叉神経障害に対するPGA-C tubeによる生体内再生治療の高分解能神経MRIを用いた予後評価 Peripheral Nerve 査読有, 2015; 26(1): 71-79

〔学会発表〕(計 9件)

照光真, 神経損傷部位のMRIによる評価と対応 招待講演 神経障害性疼痛関連歯科学会合同シンポジウム2018 歯科における術後性神経障害性疼痛の知識と対応. 日本口腔顔面痛学会、日本口腔外科学会、日本歯科麻酔学会、日本歯科薬物療法学会 2018年3月4日、東京

照光真, 歯科麻酔におけるMRIの役割とは? 水分子の動態を反映した三叉神経病理イメージングから、中枢機能計測まで。三叉神経障害に対する核磁気共鳴学を用いた研究と臨床応用、新たな可能性について 招待講演 第45回日本歯科麻酔学会学術集会, 2017年10月13-15日, 松本

須田有紀子, 照光真, 瀬尾憲司, 2つの多変量解析を用いた下歯槽神経拡散強調画像データの分画化、第45回日本歯科麻酔学会学術集会, 2017年10月13-15日, 松本

吉川博之, 照光真, 倉田行伸, 須田有紀子, 田中裕, 弦巻立, 佐藤由美子, 金丸博, 小玉由記, 瀬尾憲司, 舌神経障害における舌乳頭萎縮に関連する異常所見の検討、第45回日本歯科麻酔学会学術集会, 2017年10月13-15日, 松本

Suda A, Matsuzawa H, Suzuki K, Seo K, Terumitsu M. Segregation of Fractions in the Peripheral Nerve from Diffusion Weighted Magnetic Resonance Imaging Data Utilizing Two Multivariate

Analyses. International Association for the Study of Pain, 16th World Congress on Pain 26-30 Sep, 2016, Yokohama, Japan.

Suda A, Terumitsu M, Matsuzawa H, Suzuki K, Seo K. Detection of Peripheral Nerve Fractions from Diffusion Weighted Image Series Using Two Multivariate Analyses. 12-16 Nov. 2016 Society for Neuroscience, San Diego, USA.

照光真, 吉川博之, 倉田行伸, 佐藤由美子, 山崎麻衣子, 須田有紀子, 瀬尾憲司, オペラント条件付けによる自発行動下ラットの疼痛関連行動の計測 第44回日本歯科麻酔学会学術集会, 2016年10月28-30日, 札幌

倉田行伸, 照光真, 須田有紀子, 田中裕, 弦巻立, 金丸博子, 吉川博之, 佐藤由美子, 平原三貴子, 山田友里恵, 瀬尾憲司, 顎部廓清術後に生じた舌の慢性疼痛に対して生体内再生治療の適応を検討した1症例、第44回日本歯科麻酔学会学術集会, 2016年10月28-30日, 札幌

照光真, 吉川博之, 倉田行伸, 佐藤由美子, 山崎麻衣子, 須田有紀子, 瀬尾憲司, ラットの下歯槽神経損傷モデルにおける神経MRイメージング法に関する予備研究 第43回日本歯科麻酔学会学術集会, 2015年10月30-11月1日, 東京

〔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

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/anesth/anesth.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

照光 真 (TERUMITSU, Makoto)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号：60401767

(2) 研究分担者

瀬尾 憲司 (SEO, Kenji)
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：40242440

吉川 博之 (YOSHIKAWA, Hiroyuki)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
研究者番号：20547575

佐藤 由美子 (SATO, Yumiko)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
研究者番号：70709857

(3) 連携研究者

小牧 裕司 (KOMAKI, Yuji)
公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・研究員
研究者番号：10548499

倉田 行伸 (KURATA, Shigenobu)
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：20464018

山崎 麻衣子 (YAMAZAKI, Maiko)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
研究者番号：40625422

(4) 研究協力者

()