

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20639

研究課題名(和文) 加齢に伴う三叉神経領域における異常疼痛の発現機序の解明

研究課題名(英文) Influence of aging on pain sensation in the trigeminal region.

研究代表者

大竹 正紀 (OTAKE, Masanori)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00736621

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)：本研究の目的は、加齢現象が三叉神経領域における痛覚におよぼす影響を検討することである。そこで、老齢ラットと成熟ラットにおけるCFAによる痛み刺激に対応する単一ニューロン活動を記録し、三叉神経脊髄路核領域におけるpERK陽性細胞の数を経時的に比較検討した。また、セロトニン取り込み阻害薬の疼痛反応に対する影響について実験を行なった。成熟ラットの三叉神経脊髄路核のVi/Vc zoneでは、CFAによる痛み刺激によりニューロン活動が顕著に増加した。pERK染色陽性細胞の数は、2日目比べ、3日目をピークに5日目および7日目は有意に増加していた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to examine the influence of aging on pain sensation in the trigeminal region. Single neuronal activity corresponding to painful stimulation by Complete Freund's adjuvant (CFA) in aged rats and adult rats was recorded. The number of phosphorylated extracellular signal-regulated kinases (pERK) positive cells in the trigeminal spinal sub-nucleus caudalis (Vc) and trigeminal spinal sub-nucleus interpolaris (Vi) regions was examined and compared over time. Experiments were also conducted on the effects of serotonin uptake inhibitors on pain response by CFA. In the Vi/Vc zone of the trigeminal spinal nucleus of adult rats, neuronal activity increased markedly due to pain stimulation by CFA. The number of pERK staining positive cells peaked at day 3 and significantly more on days 5 and 7 compared to day 2.

研究分野：矯正歯科学

キーワード：疼痛 加齢 三叉神経

### 1. 研究開始当初の背景

猛スピードで高齢化が進む日本では、65歳以上の人口が総人口の25%を越えている(図1:総務省統計局:平成25年9月15日推計)。

また、高齢化率の上昇に伴い医療費が大きく国の財政の負担となっている。そのため単に長生きするのではなく、どうすれば健康的な老齢期を過ごすことができるかということが切実な問題である。

近年、老化の仕組みを解明する研究がクローズアップされている。生体信号系の一つである痛みの受容機構の加齢変化を解明することは、加齢に伴う身体機能の低下を防止するとともに、高齢者のQOLの向上につながる重要な研究テーマである。

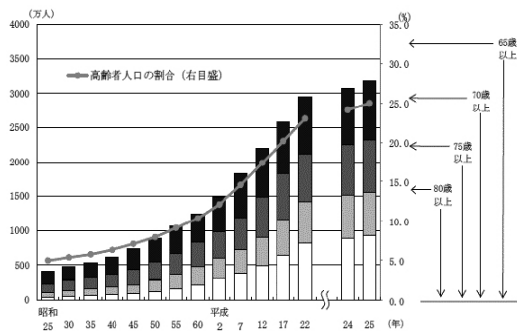


図1 高齢者人口および割合の推移

### 2. 研究の目的

超高齢化を迎えた日本においては、老年期の生活の質が問題となる。しかしながら、健やかに生活するために不可欠な加齢による痛覚受容の変化の研究は、ほとんどおこなわれていないのが実情である。本申請研究は、三叉神経領域における痛覚に対し、加齢現象がおよぼす影響について、以下の3点を目的として始めた。

1) 顔面領域に炎症をもつモデル動物を老齢ラットと成熟ラットの痛み刺激に対応する単一ニューロン活動の記録

・Fisher系ラットを、月齢30ヶ月まで飼育し実験に用いる。顔面領域に炎症をもつ老齢ラット(月齢30ヶ月)と成熟ラット(月齢9ヶ月)の炎症部位に痛み刺激を与え、三叉神経脊髄路核において痛み刺激に対応する単一ニューロン活動を記録し、比較検討する。

2) pERK (リン酸化 Extracellular signal-regulated kinase) 陽性細胞の同定

・近年、侵害刺激に対応してリン酸化する Extracellular signal-regulated kinase (ERK)の注目し、老齢ラットと成熟ラットの顔面領域に起炎物質を注射した後、経時的な延髄の切片標本作製し、三叉神経脊髄路核領域における pERK 陽性細胞を同定し、その数を比較する。pERKは侵害刺激が加えられた

場所部位によってリン酸化発現分布パターンが異なり、侵害刺激後に三叉神経脊髄路核領域内に発現する pERK 陽性細胞は体部位局在性を示すと報告されているため、本研究においては、加齢に伴う三叉神経系侵害情報処理の変調に関する機序の一端を解明することにつながると考えられる。

3) セロトニン取り込み阻害薬の疼痛反応に対する影響

・老齢ラットが成熟ラットに比べ四肢領域の痛覚が過敏になる原因として、加齢に伴い脊髄表層と深層のセロトニン含有神経細胞が著しく減少することが報告されている。本研究では、延髄内セロトニン取り込み阻害薬である Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRI)を使用し、加齢による痛覚障害の治療法の開発を検討する。

### 3. 研究の方法

1) 電気生理学的実験

予備実験として、成熟ラット(月齢9ヶ月)をペントバルビタールナトリウム(50 mg/kg, ip)にて全身麻酔する。ラットの顔面領域に痛み刺激を与え、三叉神経脊髄路核中間亜核と三叉神経脊髄路核尾側亜核との移行部 (Vi /Vc zone) およびこの部位から尾側に5.6 mm、吻側に1.6 mmの範囲(第一頸髄/第二頸髄: C1/C2 zone)に挿入した電極から、痛み刺激に対応する単一ニューロン活動を記録して解析する(図2)。

本実験として、顔面領域に起炎物質である Complete Freund's adjuvant (CFA)を注入した炎症モデル動物を老齢ラットと成熟ラットで作成し、炎症と加齢の要因が痛み受容機構にどの様に関与するかを調べるために、予備実験とおなじ手順の実験を行う。本実験では、三叉神経領域の侵害刺激に対する下行性疼痛抑制が、加齢に伴いどのように変化するかを明らかにするため、オピオイドレセプターの拮抗薬であるナロキソンを用いて、内因性モルヒネ様物質による下行性疼痛抑制系の賦活を検討する。

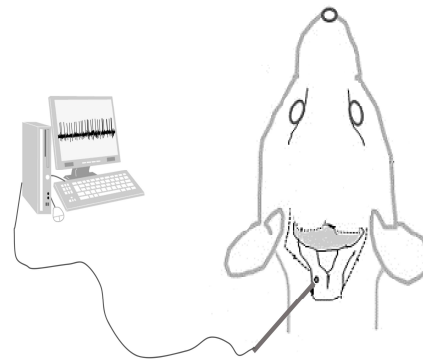


図2 三叉神経脊髄路核における単一ニューロン記録のイメージ

## 2) pERK 陽性細胞同定

麻酔したラット顔面領域に CFA を注入し、2、3、5、7 日後に再び麻酔し、4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定する。延髄と上部頸髄を含む全脳部位を摘出した後、通法に従い、Vi /Vc zone と C1/C2 zone の連続組織切片(厚さ 30 μm)を作製する。PBS で洗浄した切片を、Normal goat serum に反応させた後、Rabbit antiphospho-p44/42 MAP Kinase Antibody に反応させる。次いで、切片を Biotinylated goat anti-rabbit IgG と Peroxidase-conjugated avidin - biotin complex に反応させる。に反応させる。

この切片を 3,3'-diaminobenzidine-tetra HCl、Nickel ammonium sulfate および Peroxide 溶液に浸漬させ、PBS で洗浄後、切片をゼラチンコーティングされたスライドガラス上に連続的に貼り付け、脱水後カバーガラスにて封入を行う。

このように pERK 免疫染色が施された老齢ラットと成熟ラットの切片を観察し、pERK 陽性細胞の数を比較する。

## 3) セロトニン取り込み阻害薬の疼痛反応に対する影響

老齢ラットの神経系に生じる様々な変化の原因として、セロトニン含有神経細胞の著しい減少が挙げられる。その結果、下行性疼痛抑制系の機能が低下することにより痛覚過敏が起こると考えられる。本研究では、延髄内セロトニン取り込み阻害薬である Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRI) を微量注入し、疼痛域の変化および神経活動の変化を検索する。

## 4. 研究成果

### 1) 電気生理学的実験

成熟ラットの Vi /Vc zone における単一ニューロン活動の解析を行った結果、痛み刺激によりニューロン活動が顕著に増加した。さらに、成熟ラット顔面領域に起炎物質である CFA を注入した炎症モデル動物を作成し、オピオイドレセプターの拮抗薬であるナロキソンを用い、内因性モルヒネ様物質による下行性疼痛抑制系の賦活を検討し、結果を現在解析中である。

### 2) pERK 陽性細胞同定

免疫組織学的実験として、成熟ラット顔面領域に CFA を注入し 2、3、5、7 日後に再び麻酔し、4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定をおこない、延髄と上部頸髄を含む全脳部位を摘出し、Vi/Vc zone と C1/C2 zone の連続組織切片を作成した。この標本に pERK 免疫染色を行い、pERK 陽性細胞の数を調べた結果、pERK 陽性細胞の数は、CFA 注入後の 2 日目に比べ、3 日をピークに 5 日目および 7

日目は有意に増加していた。

## これからの展開

老齢ラットにおける顔面刺激に対する Vi /Vc zone の単一ニューロン活動(電気生理学実験)、Vi/Vc zone と C1/C2 zone の pERK 陽性細胞数の変化(免疫組織学的実験)および内因性モルヒネ様物質による下行性疼痛抑制系の加齢による影響(薬理学的実験)を調べ、痛覚受容の加齢に伴う変化について検討する。

## 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 1 件)

Kamimura R, Hossain MZ, Unno S, Ando H, Masuda Y, Takahashi K, Otake M, Saito I, Kitagawa J. Inhibition of the degrading of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) attenuated orofacial neuropathic pain following an injury to the trigeminal nerve in mice. Journal of Oral Science. 査読有, Vol.60, 2018, pp. 37-44.

### [学会発表](計 5 件)

大竹正紀, 森田修一, 齋藤功: 上顎切歯の唇側傾斜を伴う Angle Class division 1 上顎前突症例. 第 32 回甲北信越矯正歯科学会大会, 2017 年 7 月 9 日, 松本市, 抄録集: 50 頁.

大竹正紀, 丹原惇, 大竹正人, 高橋功次朗, 森田修一, 齋藤功: 混合歯列期に歯列弓拡大を行った症例における大白歯間幅径の長期的変化-第 2 報-. 第 75 回日本矯正歯科学会大会, 2016 年 11 月 18-20 日, 福岡市, 抄録集: 270 頁.

大竹正紀, 森田修一, 齋藤功: 上顎前歯の唇側傾斜を伴う Angle Class division 1 上顎前突症例. 第 31 回甲北信越矯正歯科学会大会, 2016 年 7 月 3 日, 新潟市, 抄録集: 52 頁.

大竹正紀, 森田修一, 齋藤功: Angle Class III 叢生症例. 第 30 回甲北信越矯正歯科学会大会, 2015 年 7 月 19 日, 新潟市, 抄録集: 74 頁.

大竹正紀, 丹原惇, 大竹正人, 高橋功次朗, 森田修一, 齋藤功: 混合歯列期に歯列弓拡大を行った症例における大白歯間幅径の長期的変化. 第 74 回日本矯正歯科学会大会, 2015 年 11 月 18-20 日, 福岡市, 抄録集: 270 頁.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大竹 正紀 (OTAKE, Masanori)  
新潟大学・大学院医歯学総合研究科歯科矯正学分野・助教  
研究者番号：00736621