

令和元年5月29日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11533

研究課題名(和文)咀嚼筋痛障害モデル動物を用いた咀嚼筋痛障害に伴う慢性痛発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the disease mechanism of chronic pain associated with masticatory muscle pain disorder using masticatory muscle pain disorder model animal

研究代表者

隈部 俊二 (KUMABE, Shunji)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：30288774

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)：本研究では咀嚼筋痛障害の治療法開発に向けた基礎研究として、咀嚼筋痛障害に伴う慢性痛発症機序の解明、ならびに咀嚼筋痛モデル動物の開発を目指した。脊髄でのグリア細胞の活性化が炎症性疼痛や神経因性疼痛、痛覚過敏やアロディニアの発現機序への関与が示唆されていることから、本研究ではモデル動物作製の前に、咬筋に刺激を与えた際の脳幹におけるグリア細胞の活性化について検討した。炎症性要因であるLPSおよび侵害要因である6%高張食塩水を投与して咀嚼筋に炎症を起こした場合、局所の炎症は消退してもなお脳幹においてマイクログリアおよびアストロサイトの活性化が持続し、痛みの慢性化に移行する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔顎顔面領域の神経損傷由来の慢性痛に関しては、先行研究で数多くのことが解明されてきた。しかし咀嚼筋痛障害の病態について未だ解明されていない点が多く、治療法も確立されていなかった。

本研究により、咀嚼筋に炎症を起こした場合、局所の炎症は消退してもなお脳幹においてグリア細胞および細胞内情報伝達系の活性化が持続し、痛みの慢性化に移行する可能性があることが示唆された。このことより、咀嚼筋痛障害や筋筋膜痛症候群の治療のターゲットの1つとしてグリア細胞を検討する必要があることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this basic research study focused on developing a treatment for masticatory muscle pain disorder, we experimentally induced inflammation in the masseter muscles. In addition, we aimed to try that we developed the model rats of myofascial pain syndrome. Glia have been linked to inflammatory hyperalgesia, and it has been suggested that the activation of glia in the spinal cord is involved in mechanisms underlying inflammatory pain, neurogenic pain, hyperalgesia, and allodynia. We investigated the role of astrocytes in the Vc by examining histological changes in the masseter muscle and Vc over time. When inflammation in the masticatory muscle was induced by the administration of LPS, which is an inflammatory factor, and a 6% sodium chloride solution, which is an infringing factor, activated microglia and astrocytes in the Vc, even after local inflammation had subsided, which suggested a transition to chronic pain.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：咀嚼筋痛障害 筋筋膜痛症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

咀嚼筋痛障害は顎関節症 (Temporomandibular disorders: TMD) の主要な病態であり、痛みを苦しむ患者は非常に多い。International Association for the Study of Pain は、咀嚼筋痛の発症要因として咀嚼筋への過負荷 (噛みしめ等) 微小外傷、筋の局所的炎症を挙げている。

咀嚼筋痛は 2-3 個の筋肉に限局した慢性的な筋痛である筋筋膜痛症候群 (myofascial pain syndrome: MPS) によるものが多いと考えられている。一般的に歯列接触癖 (Tooth Contacting Habit) の除去やスプリントの使用により除痛を試みるが、スプリントが無効な場合、全身に広がる慢性的な筋痛である線維筋痛症 (fibromyalgia syndrome: FMS) に移行する症例であると報告された。

MPS および FMS は血液検査や X 線検査などで異常所見はないが、筋や筋膜のトリガーポイントを伴い、痛覚過敏や関連痛を併発する。また MPS の活動性トリガーポイントで、サブスタンス P や TNF などの炎症性サイトカインが高濃度に確認された。このため、局所炎症に伴うポリモーダル受容器の感作が疼痛発現に関与していると考えられている。さらに、FMS は中枢性感作により痛覚過敏やアロディニアが生じることや、ドーパミンシステムが機能破綻していることも報告された。

口腔顎顔面領域の神経損傷由来の慢性痛に関しては、先行研究で数多くのことが解明されてきた。しかし、本研究開始当時は咀嚼筋痛障害の病態について未だ解明されていない点が多く、治療法も確立されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では咀嚼筋痛障害の治療法開発に向けた基礎研究として、咀嚼筋痛障害に伴う慢性痛発症機序の解明を目指した。まず研究の基礎となる咀嚼筋痛障害モデル動物を作製し、咀嚼筋痛時の中枢および局所における経時的変化について、組織化学的、生理学的、ならびに生化学的手法を用いて検索することにした。

モデル動物の作製にあたって、刺激する試薬や刺激の頻度、観察期間などに関する条件設定が必要であった。従って、本研究ではラット腭腹筋痛障害モデル作製を行った先行研究 (末尾引用文献番号 ~) を参考にし、当該研究に準じた方法でモデル動物を作製することを目指した。

3. 研究の方法

本実験は本学動物実験委員会の承認を得た上で (承認番号: 17-02002 号)、国際疼痛学会のガイドラインに従って行われた。

Sprague-Dawley rat (male, n=30, 250g, Japan SLC Inc., Japan) を用い、Sodium pentobarbital (70mg/kg, i.p., Nembutal, Dainippon Sumitomo Pharma, Japan) にて麻酔した後、以下の条件で刺激した。

L-L group (control, n=30); rat left masseter (LMM) に lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich, MO, USA) 2 µg/kg (50 µl) を注射した。24 時間後、同一部位に LPS (50 µl) を注射した。

L-S6 group (experimental, n=30); rat LMM に LPS 2 µg/kg (50 µl) を注射した。24 時間後、同一部位に 6% sodium chloride solution (S6, 50 µl, 5 times per 90 min) を注射した。

LPS は免疫と炎症性要因として、S6 は侵害要因として投与した。

刺激開始 1 日、3 日 (n=10)、1 週、ならびに 2 週後に脳幹および咬筋を取り出し、脳幹の形態変化の過程を Hematoxylin-Eosin (HE) 染色にて観察した。次に microglia および astrocyte、ならびに phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK) の脳幹での発現について検索するために免疫組織化学的染色を行い、免疫陽性細胞数をカウントした。

LMM については炎症性サイトカインの 1 つである TNF (tumor necrosis factor ; Chemicon, USA)、ならびに急性痛に関与しているといわれている bradykinin receptor B2 (BKR2; ENZO Life science, USA) の発現を検索するために免疫組織化学的染色を行い、免疫陽性細胞数をカウントした。

免疫陽性細胞数は、脳幹および咬筋に発現した免疫陽性細胞数をカウントして、One-way ANOVA (Excel 2010; Microsoft, USA, statistically significant: *p<0.05) により経時的変化を統計学的に解析した。

4. 研究成果

LMM における TNF および BKR2 の発現は実験群および対照群ともに試薬投与後 1 日後に著明に認められたが、投与 7 日後にほぼ消失した。BKR2 免疫陽性細胞の発現も TNF 免疫陽性細胞の

発現と同様に L-L group (control)と

L-S6 group の間に有意差はなかった。

脳幹の Trigeminal subnucleus caudalis (Vc)では、実験群において試薬投与後7日に astrocyte 陽性細胞 (図2) および pERK 陽性細胞の発現を著明に認めた。pERK 陽性細胞の発現は、Vc dorsomedial region のみならず laterodorsal side および central region でも認められた。GFAP 免疫陽性細胞の発現が顕著に認められた L-S6 group について、刺激7日後の ipsilateral および contralateral 間における GFAP 免疫陽性細胞発現を比較した結果、吻側から尾側にかけての全ての観察ポイントにおいて ipsilateral の方が GFAP 免疫陽性細胞が顕著に発現していた。ipsilateral および contralateral とともに、Vc 吻側より尾側で顕著に発現していた。

Vc に存在する microglia および MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase)については、microglia および p-p38 MAPK が咬筋への侵害刺激に応答して活性化し、応答が経時的に増強することを報告した。

炎症性要因である LPS および侵害要因である 6% sodium chloride solution を投与して咀嚼筋に炎症を起こした場合、局所の炎症は消退してもなお Vc において astrocyte および pERK の活性化が1週間程度持続し、痛みの慢性化に移行する可能性があることが示唆された。

今回得られた研究結果をもとにさらに実験を行ってデータを解析し、痛みの慢性化のメカニズムを明らかにするとともに、咀嚼筋痛障害モデル動物の開発に活かしていきたい。

<引用文献>

Hashimoto T, Sakurai H, Ohmichi Y et al. (2005) A trial to develop an experimental model for chronic myopathic pain. PAIN RESEARCH 20: 15-20.

Hashimoto T, Kumazawa T (2006) Assessment of chronic pain-like behaviors in rats induced by muscle lesion. JJSAM 56: 809-814.

Yamaguchi Y, Hashimoto T, Sakurai H et al. (2011) Low rather than high dose lipopolysaccharide 'priming' of muscle provides an animal model of persistent elevated mechanical sensitivity for the study of chronic pain. Eur J Pain 15: 724-731.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

KUMABE S, NAKATSUKA M, KIM JY, INUI-YAMAMOTO C, JIN K, JUE SS, SHIN JW, TAMURA I. Astrocyte activation in the brainstem evoked by inflammatory stimulation of the masticatory muscle, Journal of Dental and Oral Health, 査読有, 3巻, 2017, 094, 6ページ.

[学会発表] (計1件)

NAKATSUKA M, KUMABE S. Activated pERK pathway in the brainstem was induced by masseter inflammation. The 26th Biennial Joint Meeting of the International Society for Neurochemistry (ISN), 2017.

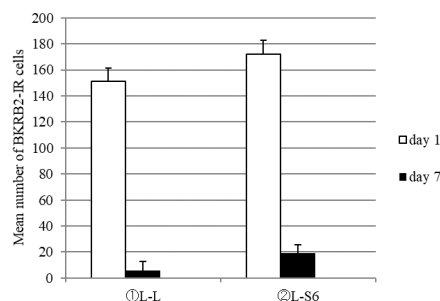


図1 ラット左側咬筋における BKR2 免疫陽性細胞の発現比較

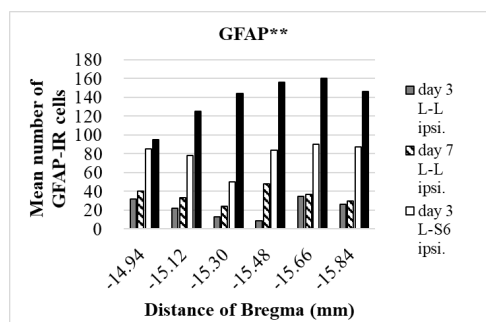


図2 ラット三叉神経脊髄路核における GFAP 免疫陽性細胞の発現比較

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：乾 千珠子（山本 千珠子）

ローマ字氏名： INUI-YAMAMOTO Chizuko

所属研究機関名：大阪大学

部局名：歯学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）： 00419459

研究分担者氏名：中塚 美智子

ローマ字氏名： NAKATSUKA Michiko

所属研究機関名：大阪歯科大学

部局名：医療保健学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）： 70368158

研究分担者氏名：神 光一郎

ローマ字氏名： JIN Koichiro

所属研究機関名：大阪歯科大学

部局名：医療保健学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）： 00454562

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。