

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11748

研究課題名(和文) 口腔顔面領域の神経障害性疼痛モデルラットにおける神経栄養因子の疼痛制御機構の解明

研究課題名(英文) Effects of the neurotrophic factor in the orofacial neuropathic pain model rats

研究代表者

大山口 藍子 (Oyamaguchi, Aiko)

大阪大学・歯学研究科・招へい教員

研究者番号：70464237

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)：本研究では神経障害性疼痛モデル、炎症性疼痛モデル、知覚異常モデルを作製し、疼痛や感覚刺激に対する反応性を調べた。神経障害性疼痛モデルと炎症性疼痛モデルでは、機械刺激閾値、熱刺激閾値ともに低下した。知覚異常モデルでは、口腔粘膜の感覚閾値が低下したが、口髭部皮膚の機械刺激閾値は変化しなかった。知覚異常モデルにおいては、延髄三叉神経脊髄路核尾側亜核でc-Fos陽性細胞数が増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果から、疼痛反応の発現過程やその時間経過が異なる疼痛モデルと神経障害性疼痛モデルとを比較することによって、今後、神経系の再生に関わる重要な神経栄養因子が、疼痛制御や抑制に関わる神経成長因子の役割を明らかにする研究につなげていくことに社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：This study tested several pain models and compared the development of behavioral responses to pain and sensory stimulation. The models included infra-orbital nerve chronic constriction and crush injury models, masseter muscle pain model, and chronic hypoxia-induced dysesthesia model. In nerve-injury and muscle pain models, the mechanical and thermal thresholds were found to decrease after an experimental intervention but the time course changes differed between the two models. In dysesthesia mode, sensory thresholds of the oral mucosa were decreased while the mechanical thresholds of whisker pad skin were not altered. Chronic hypoxia-induced dysesthesia model were found to show an increase of c-Fos-positive cells in the trigeminal spinal subnucleus caudalis.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：神経障害性疼痛 炎症性疼痛 低酸素負荷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は現在のところ発症メカニズムが解明されておらず、決定的治療薬の報告はない。申請者自身も日々の診療の中で、抜歯や抜髄処置などの歯科治療後、偶発的に神経障害性疼痛を発症した患者に遭遇するが、その治療は難治性で長期間を有することが多いため、メカニズムの解明と治療法の開発の必要性を実感している。

臨床医学領域において、神経成長因子(NGF)やグリア由来神経活性因子(GDNF)などの神経栄養因子は、神経細胞が変性してゆく神経難病(アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症など)の治療薬、神経再生の促進薬、神経細胞死を防ぐ薬となる可能性が示唆されている。

NGF や GDNF を含む神経栄養因子は神経系の発達と成長に必須であり、神経栄養因子の GDNF family の 1 つであるアルテミンの全身投与が坐骨神経結紮モデルラットのアロディニアや熱痛覚過敏を量依存的に正常化するという報告(Luis R Gardell, Nature, 2003)がある。また、神経栄養因子は神経損傷や病変に対して、神経の可塑性を制御し(M.H.Ossipov, Curr Pain Headache Rep, 2011)、脊髄内での軸索再生を促進すると報告されている(Wang R, Nat Neurosci, 2008)。そこで、口腔顔面領域でみられる神経障害性疼痛においても、神経栄養因子に着目し神経損傷後の失った機能を元の状態へ修復するという重要な役割を果たす蛋白質であると予想し、今回の研究計画に至った。

2. 研究の目的

これまでの申請者の研究では、「三叉神経節小型細胞のペプチド性 C 線維と非ペプチド性 C 線維の侵害受容における役割」を明らかにするため、IB4 結合能陽性である非ペプチド性 C 線維のみを選択的に削除したラットを作製し、顔面領域での疼痛関連行動や免疫組織学的な解析を行ってきた。その結果、ホルマリン誘導侵害受容行動や、延髄後角尾側垂核(Vc)でのホルマリン誘導 c-Fos 発現(c-Fos は神経細胞活性化のマーカーとして広く使われており、痛み刺激により c-Fos 陽性細胞数から神経細胞の活動性を定量的に解析できる)が増加したという結果を得ている。したがって、IB4 陽性ニューロンは抗侵害受容効果の役割を果たすことを明らかにした(H23~H24 若手研究 B; Oyamaguchi A. Neurosci Res 2015)。さらに、アルテミンが非ペプチド性 C 線維神経再生を促進するという仮説から、同モデルラットに対し、アルテミンを顔面部へ単回前投与した後、ホルマリン誘導侵害受容行動を観察した。その結果、疼痛軽減する傾向があることを現在つかんでいる(H25~H26 若手研究 B)が、臨床を想定した病態モデルである神経結紮モデルについては未だ不明な点が残されている。

そこで今回、口腔顔面領域の神経障害性疼痛モデルとして眼窩下神経結紮モデルおよび眼窩下神経挫滅モデルを、炎症性疼痛モデルとして咬筋筋痛モデルを、全身性要因として低酸素負荷モデルを使用した。触刺激反応や熱刺激反応から疼痛関連行動を観察すること、また神経栄養因子が関わる疼痛制御に着目し各種口腔顔面痛の治療戦略の足がかりをつかむことを目的とする。

3. 研究の方法

実験動物：SD 雄性ラット(6~8 週齢)を用いて以下の実験を実施した。

眼窩下神経結紮モデル

全身麻酔下で、左側眼窩下神経を 4-0 chromic gut で 2 か所結紮した。結紮から 7 日後に、左側上口唇への熱刺激 (3x3 mm² 熱プローブ使用)・機械刺激 (2x2 mm² フォーセプス使用) に対する逃避閾値を測定し、コントロール群と比較した。3 回の測定を行い、その平均値を各個体の閾値とした。コントロール群は、眼窩下神経の明示処置のみを行った。

眼窩下神経挫滅モデル

全身麻酔下で、左側眼窩下神経を # 7 head-bent フォーセプスで 60 秒間挫滅した。挫滅から 2・4・7・14 日後に von Frey test を実施した。アクリル BOX (25×25×25cm) にラットをのせ 20 分間慣れさせた。その後、口髭部皮膚に von Frey フィラメント (0.04g、0.16g、0.6g、1g、2g、4g、8g、15g、26g) (MUROMACHI KIKAI CO., LTD.) を押し当て機械刺激を与えた。機械刺激により頭部引き込み反射を示す閾値を測定した。各加重で 5 回の測定を行い、3 回の頭部引き込み反射が認められた値をその個体の閾値とした。刺激の加重は低いものから行った。5 回中 3 回の頭部引き込み反射が認められた値より、一段階重い von Frey 刺激を行い、3 回以上の頭部引き込み反射を確認し、さらに一段階低い von Frey 刺激を行い 3 回以上の頭部引き込み反射を確認した上で、閾値を確定した。組織損傷を防ぐためカットオフは 26g として定義した。測定は眼窩下神経挫滅側と非挫滅側で行った。

炎症性疼痛モデル

完全フロインドアジュバント (Complete Freund Adjuvant; CFA) (1:1 oil/saline suspension, 25 µg Mycobacterium tuberculosis) をラット右咬筋の筋肉内部へ 50 µl 注入した。機械刺激閾値測定のため、CFA 注入 30 分後、5 時間後、24 時間後、3 日後、7 日後、14 日後に von Frey test を実施した。測定方法は、上記の眼窩下神経挫滅モデルで方法と同様である。測定は CFA 注入側と CFA 非注入側で行った。さらに、熱刺激閾値を、CFA 注入 30 分後、5 時間後、24 時間後、3 日後、7 日後、14 日後に測定した。ラットをアニマルホルダーに入れ、radiant heat stimulator を右咬筋相当部へ焦点をあてた。咬筋皮膚とプローブとの距離は 1cm とし、頭部引き込み反射を示すまでの潜時を chronometer で記録した。3 回の測定を行い、その平均値を各個体の閾値とした。26 の熱刺激から開始し組織損傷を防ぐためカットオフは 45 とした。測定は CFA 注射群とコントロール群で行った。

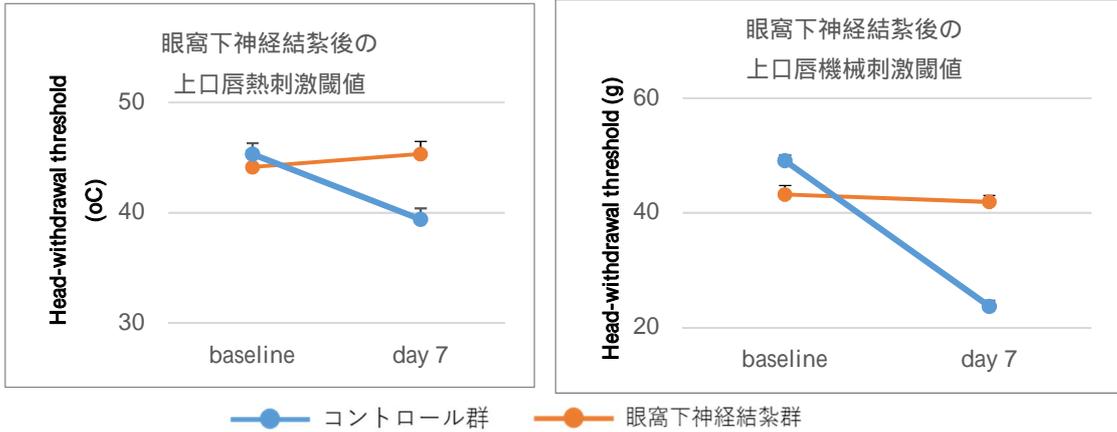
間歇的低酸素負荷による疼痛モデル

全身性要因の実験モデルとしてシナプス形成に影響を与える疼痛モデル間歇的低酸素負荷が、神経栄養因子の関与を見るために有効なモデルと考え実験を遂行した。間歇的低酸素は、飼育チャンパー内の酸素濃度を一時的に低下させて回復することを繰り返した。これを明期に 6 時間実施することにした。実験に先立ち、麻酔を施した実験動物において、実験と同様の周期で酸素濃度を低下させて、その変化に伴う経皮的に計測した血中酸素飽和度の変化を測定した。そして、慢性間歇的低酸素負荷を与える目的で、最大 16 日間これを繰り返した。口髭部皮膚および顔面部の粘膜 (口腔粘膜) における感覚閾値を測定した。さらに、慢性間歇的低酸素負荷を与えたのちに、灌流固定して脳組織切片を作製し、c-Fos タンパクの免疫染色をおこなった。

4. 研究成果

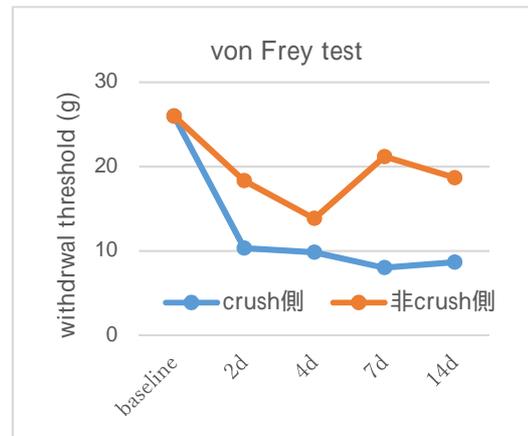
眼窩下神経結紮モデル

上口唇の熱刺激閾値は、眼窩下神経結紮から7日後において、コントロール群と比較して有意に低下した(下図左)。また、機械刺激閾値についても、結紮処置後7日目後に、コントロール群と比較して有意な低下を示した(下図右)。



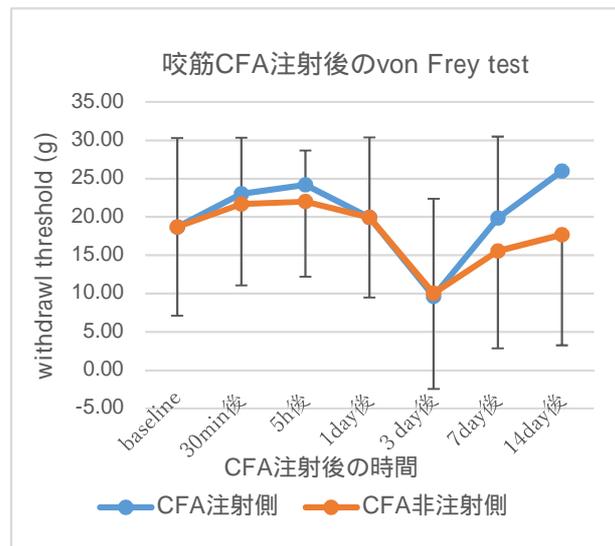
眼窩下神経挫滅モデル

眼窩下神経を挫滅したモデルでは、挫滅側では、von Frey test に対する引き込み反射の閾値が、処置後2~4日目以降になると低下し、その閾値低下は14日目まで持続した(右図)。一方、非挫滅側においても、処置後数日は引き込み反射の閾値が低下する傾向を示したが、一週間後にはBaselineのレベルまで回復する傾向を示した。



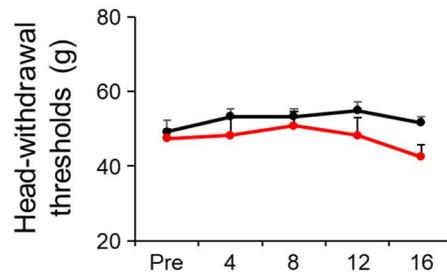
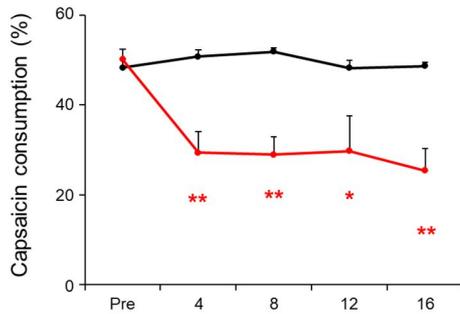
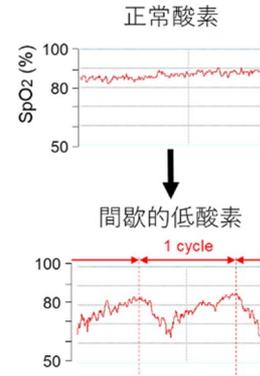
炎症性疼痛モデル

CFA注入側では、咬筋皮膚部に弱い腫脹を認めた。そして、von Frey test に対する引き込み反射の閾値は、CFA注入直後には大きな変化を認めなかったが、3日後に最も低い値をしめた。。一方、CFA非注入側においても、注入後3日後の機械刺激閾値が最も低下した。その後、両側において、機械刺激閾値が回復基調をしめし、14日後にはほぼbaselineと同程度となった。一方、咬筋皮膚に与えた熱刺激に対する反射閾値は、CFA注入5時間後において低下する傾向を示し、その傾向は、24時間後、3日後まで継続した。反対側では、注入側と異なり、熱刺激に対する反射閾値の低下を認めなかった。



間歇的低酸素負荷モデル

麻酔下における間歇的低酸素の負荷によって、チャンバー内の酸素濃度の周期変動と同様の周期で SpO₂ が低下と上昇を繰り返すことを確認した（右図）。間歇的低酸素負荷を付加すると、4日後にはカプサイシンに対する嫌悪行動が上昇し、口腔粘膜の感覚感受性が上昇した（下図左）。しかし、口髭部皮膚に与えた機械刺激に対する引き込み反射の閾値には変化を認めなかった（下図右）。また、16日間の慢性間歇的低酸素負荷後の動物では、三叉神経脊髓路核尾側亜核において c-Fos 陽性細胞数が増加した。



今後は、侵害受容行動や感覚運動機能、三叉神経節や三叉神経脊髓路核尾側亜核におけるニューロンやグリアの活性化を指標として、疼痛反応の発現過程やその時間経過が異なる疼痛モデルと神経障害性疼痛モデルとを比較することによって、神経系の再生に関わる重要な神経栄養因子が、疼痛制御や抑制に関わる神経成長因子の役割を明らかにする研究につなげる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岸本沙樹 片桐綾乃 大山口藍子 丹羽均 加藤隆史
2. 発表標題 慢性的間歇的低酸素負荷によるラットの口腔内感覚の変化のメカニズム
3. 学会等名 第13回三叉神経領域の感覚-運動統合機構研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸本沙樹 片桐綾乃 大山口藍子 丹羽均 加藤隆史
2. 発表標題 慢性間歇的低酸素負荷によるラット口腔顔面領域における体性感覚の変調
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	丹羽 均 (Niwa Hitoshi) (30218250)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	