

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19592317
 研究課題名（和文） 三叉神経領域における神経因性疼痛の解明と心因性ストレスの影響について
 研究課題名（英文）Neuropathic pain and psychological outcome of patients following oral surgery
 研究代表者
 太田 嘉英（OTA YOSHIHIDE）
 東海大学・医学部・教授
 研究者番号：60233152

研究成果の概要（和文）：

ラット immobilization model において唾液腺内の BDNF mRNA 発現の変化を検討した。その結果、immobilization stress によりラットの唾液腺導管部分は、BDNF を多く発現していることを確認した。当科で入院・手術を行う患者の周術期の精神状態と疼痛スコアを採取し検討を行った。その結果、予後のよい良性疾患では術後に精神状態の改善を示すが、悪性腫瘍患者のなかには、術後に抑うつ状態を示す患者も散見され、疼痛の遷延や機能障害の大きさに比例する傾向も認められた。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the neuropathic pain and psychological outcome of patients following oral surgery.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：神経因性疼痛、心因性疼痛、ストレス、BDNF、三叉神経

1. 研究開始当初の背景

痛みを伝える一次ニューロンは後根神経節・三叉神経節の細胞であり、その情報は脊髄後角・三叉神経脊髄路核などに伝えられさ

まざまな修飾を受ける。近年、神経自体の損傷によって生じる neuropathic pain の発生機序の研究が進み、特に神経損傷後に起こる中枢神経の機能異常、いわゆる central

sensitization が注目されている。末梢から C fibers を通じた侵害入力、1 次侵害性ニューロンに伝わり、興奮性神経伝達物質産生され、2 次ニューロンの鋭敏度が変化し、aspartate、glutamate などの興奮性アミノ酸が分泌され、N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 受容体を興奮させる。これによりカルシウムイオンの流入が促進し slow prolonged potentiation が生じ慢性疼痛が生じることが報告されている。このように、痛みは単なる受動的な情報ではなく、機能的変化や immediate early gene である *c-fos* などの遺伝子発現をもたらし、慢性的な痛みの病態を作り出すと考えられている。

近年、このようにして生じる central sensitization・慢性疼痛に、中枢神経における cyclooxygenase (COX)-2 の発現が関与していることがわかった (Samad TA, et al. Nature 410, 471-5, 2001.)。そこで、われわれは、三叉神経領域における慢性疼痛に NMDA や COX-2 発現が関与している可能性に注目し、NMDA antagonist や COX-2 inhibitor の先制鎮痛効果について検討を行ってきた (Ota Y, et. al. Int J Oral Maxillofac Surg. 2006; 35: 613-7.) (Ota Y, et. al. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006; 102: 591-5.)。その実験過程で、末梢神経損傷により神経ペプチドである CGRP (calcitonin gene related peptide) が増加することや、この発現制御に神経栄養因子群の NGF (nerve growth factor) や BDNF (brain derived neurotrophic factor) が働き、ニューロンの発生・分化・生存に重要な役目を果たし、central sensitization の発生に関与していることが示唆された。さらに、痛みのみならずストレスでも BDNF が発現し、唾液腺にも多く発現することが明らかとなり、現在、唾液中の BDNF 値を心因的ストレスマ-

ーカーとして応用できるのではないかと考えている (Tsukinoki K, et. al. Immobilization stress induces BDNF in rat submandibular glands. J Dent Res. 2006; 85: 844-8.)。

以前より、情動や心因的ストレスが慢性疼痛に関与していることは知られているが、その詳細なメカニズムはいまだに明らかとなっていない。その理由として情動や心因的ストレスを客観的に評価することが困難であったことが挙げられる。しかし、われわれが行ったストレスによる唾液腺導管細胞中の BDNF 発現や、すでに明らかになっている唾液中の chromogranin A (CgA) 発現、中枢神経レベルにおける neurokinin receptor、integrin- $\alpha 5$ の発現をストレスマーカーとして用いることで客観的評価を行うことが可能となる。これを応用することで、三叉神経領域の慢性疼痛・神経因性疼痛に、心因的ストレスがどのように影響し増幅するかメカニズムの一端を解明できると考える。

手術による神経因性疼痛は、時に遷延化し、非ステロイド系消炎鎮痛剤やオピオイドにも抵抗性を示すことを経験する。このような病態は、術後の患者の activity を抑制し回復を遅らせるのみならず、合併症を併発する可能性をはらんでいる。特に、口腔癌患者は、生命に対する危機感、術後の機能障害、社会復帰への不安など、さまざまな心因的ストレスを抱えている。このストレスが口腔癌患者の術後疼痛を遷延させ、増悪していることも十分予想できる。実験的に行った研究結果がすべて臨床に反映されるとは思われないが、神経因性疼痛・慢性疼痛とストレスの関係の一端でも明らかとなり治療法確立の助けになれば、患者の負担軽減になり QOL 向上につながると思われる。

2. 研究の目的

(1) 三叉神経領域の神経因性疼痛・慢性疼痛に対し、ストレスが中枢神経レベルでどのように影響しているか動物実験（ラット）によりそのメカニズムを明らかにする。

(2) 口腔外科手術後疼痛において心因的ストレスがどのように影響しているか、ヒューマンボランティアからアンケートと臨床検体（唾液）を経時的に採取し解析する。

3. 研究の方法

(1) 神経因性疼痛にともなう中枢神経での神経ペプチドと神経栄養因子の発現について

本実験には、三叉神経損傷モデルを用いた。神経因性疼痛の病態として末梢神経系から中枢神経系の可塑的变化が起こっていると考えられる。この変化に関わりがあると思われる NGF、BDNF、NT-3、neurokinin receptor の発現と疼痛時に発現する脳内の immediate early gene である *c-fos* を比較・検討を行う。

① 8 週齢 Sprague-Dawley male rat のオトガイ孔を結紮損傷し、神経因性疼痛を発生させる。神経損傷後、1 日後、3 日後、7 日後、14 日後の各群と control 群（それぞれ 3 匹ずつ）を経心的還流固定後、脳幹部、左右下歯槽神経、左右顎下腺を取り出し切片を作成する（脳幹部については連続切片）。

② 取り出した脳幹部、左右下歯槽神経、左右顎下腺に対し NGF、BDNF、NT-3、neurokinin receptor の発現をモノクロナール抗体を用いて SAB 法で免疫組織染色を行う。免疫染色により、NGF、BDNF、NT-3、neurokinin receptor の発現部位、強度、経時的変化について解析する。

③ 脳幹部に対し、疼痛時に発現する脳内の immediate early gene である *c-fos* につ

いても同様に免疫組織染色を行う。さらに、NGF、BDNF、NT-3、neurokinin receptor の発現と *c-fos* の発現を比較検討することで、疼痛とストレスの関連を解析する。

④ 免疫染色で NGF、BDNF、NT-3、neurokinin receptor、*c-fos* が強く発現している部位について、Laser Capture Microdissection を用いて細胞を取り出し、NGF、BDNF、NT-3、*c-fos* mRNA を抽出し、Light Cycler System (Roche) による RT-PCR にて遺伝子定量解析し発現強度の比較検討を行うことを予定した。

(2) ストレスにともなう中枢神経、唾液腺における神経ペプチドと神経栄養因子の発現について

ストレスにより中枢神経、唾液腺における神経ペプチドや神経栄養因子の発現を経時的に観察し、前年度に行った神経因性疼痛モデルと比較することでメカニズムを解析する。

① 8 週齢 Sprague-Dawley male rat を用いて immobilization stress model で実験を行う。ラットを木箱内で仰臥位にベルト固定し動けない状態でストレスを与える。ストレスを与える時間は 30 分、60 分、180 分とする（6 匹ずつ）。終了後、脳幹部、顎下腺を取り出し連続切片を作成する。

② 取り出した脳幹部、顎下腺に対し NGF、BDNF、NT-3、neurokinin receptor の発現をモノクロナール抗体を用いて SAB 法で免疫組織染色を行う。免疫染色により、NGF、BDNF、NT-3、neurokinin receptor の発現部位、強度、経時的変化について解析を行う。

③ 脳幹部に対し、疼痛時に発現する脳内の immediate early gene である *c-fos* につ

いても同様に免疫組織染色を行う。さらに、NGF、BDNF、NT-3、neurokinin receptor の発現と *c-fos* の発現を比較検討することで、ストレスとの関連を解析する。

- ④ 免疫染色で NGF、BDNF、NT-3、neurokinin receptor、*c-fos* が強く発現している部位について、Laser Capture Microdissection を用いて細胞を取り出し、NGF、BDNF、NT-3、*c-fos* mRNA を抽出し、Light Cycler System (Roche) による RT-PCR にて遺伝子定量解析し発現強度の比較検討を行う。
- ⑤ 前年度に行った三叉神経損傷モデルと immobilization stress model を比較し、神経因性疼痛とそれが引き起こすストレスが、単純なストレスとどのように違うかを解析する。

(3) 口腔外科手術患者における周術期ストレスと神経因性疼痛の関係について

情動や心因的ストレスが慢性疼痛に関与していることは知られているが、その詳細なメカニズムはいまだに明らかとなっていない。そこで、ストレスにより唾液腺導管細胞に BDNF が発現することを応用し、唾液中の BDNF や CgA を測定することがストレスの客観的指標になりうるかを解明し、さらにストレスと神経因性疼痛の関係を明らかにするため、臨床研究を行う。データ採取は、助手以上のスタッフ (10 名) の協力のもと行う。唾液中 BDNF、CgA の測定は本研究組織で行う。

- ① 東海大学附属病院口腔外科、東海大学附属八王子病院口腔外科で入院・全身麻酔下で手術を行う患者ボランティアを対象とする (250 + 100 = 350 名/年の見込み)。
- ② 術前 (入院時)、術後 3 日目、7 日目、14 日目に、Goldberg により開発された GHQ 精神健康調査票を記入してもらい、同時

に疼痛スコアである Visual Analog Scale (VAS)、唾液を採取する。

- ③ 採取した唾液中の BDNF、CgA の発現量は、ELISA 法で測定する。
- ④ 対照として、健常人ボランティア (約 100 名の予定) から GHQ チャートスコア、VAS スコア、唾液中 BDNF、CgA を採取する。
- ⑤ 唾液中 BDNF や CgA 値と GHQ スコアとの相関関係を統計学的に検定を行い、ストレスマーカーとして有用かを明らかにする。
- ⑥ GHQ チャートスコア、VAS スコア、唾液中 BDNF 値、CgA 値を比較することで、慢性疼痛とストレスの関係を明らかにする。
- ⑦ 疾患別に、GHQ チャートスコア、VAS スコア、唾液中 BDNF 値、CgA 値を比較することで周術期の管理について検討する。

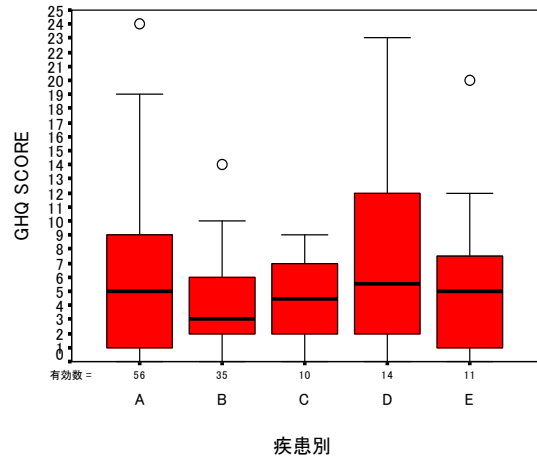
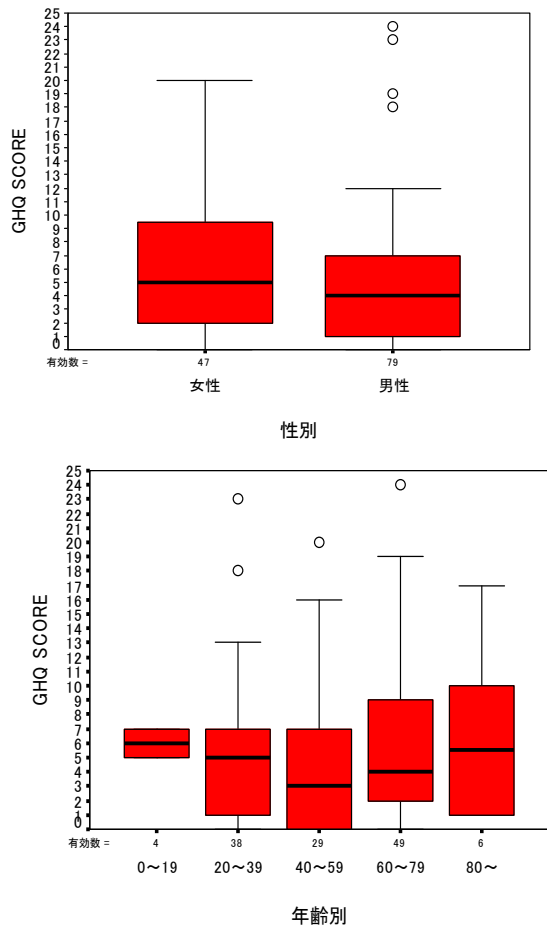
4. 研究成果

ラットのストレスモデル (immobilization stress) において中枢神経における NGF、BDNF、NT-3 の発現が抑制されるという報告 (Ueyama T, et al. Neurosci Res. 1997; 28, :103-110.) より、ストレスにともなう唾液腺内の BDNF mRNA 発現の変化を検討した。その結果、immobilization stress によりラットの唾液腺導管部分は、BDNF を多く発現していることを確認した。

情動や心因的ストレスが慢性疼痛に関与していることは知られているが、その詳細なメカニズムはいまだに明らかとなっていない。当科で入院・手術を行う患者のうち、本研究に対し説明のうえ同意・協力が得られたボランティアを対象に、周術期の精神状態と疼痛スコアを採取し検討を行った。精神状態は、ストレスコーピングインベントリー、Goldberg により開発された GHQ 精神健康調査票を使用し、疼痛スコアは VAS を用いた。この臨床研究の結果、予後のよい良性疾患では

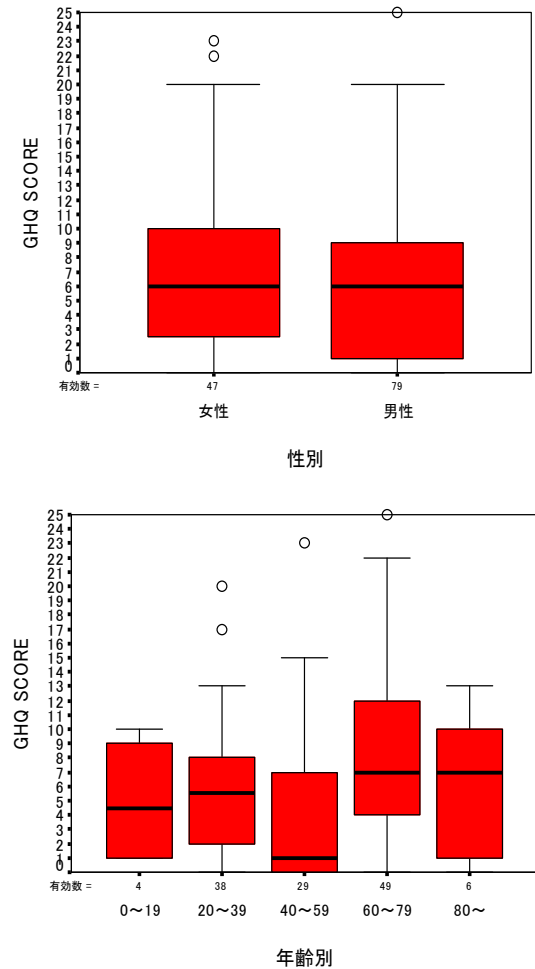
術後に精神状態の改善を示すが、悪性腫瘍患者のなかには、術後に抑うつ状態を示す患者も散見され、疼痛の遷延や機能障害の大きさに比例する傾向も認められた。さらに、ストレスにより唾液腺導管細胞に BDNF が発現することを応用し、唾液中の BDNF や CgA を測定し、ストレスマーカーとしての有用性との関連につき解析を行った。BDNF や CgA は、ストレスマーカーとして一定の評価は認められるが、日内変動があり、その他の修復因子も予想されることから現段階では安定したスケールとして用いるには難があると考えられた。今後もさらに検討を重ねる予定である。

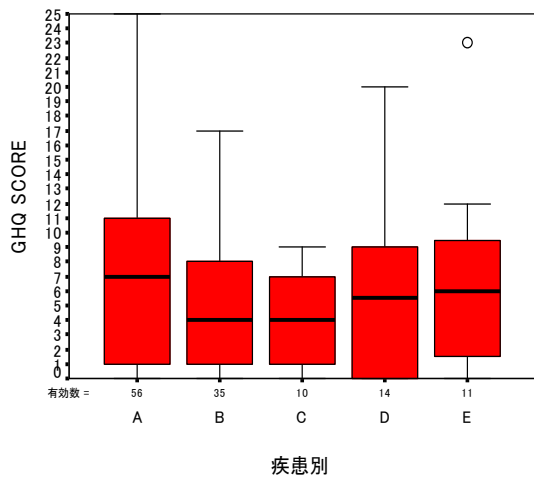
(術前の精神的ストレス状態)



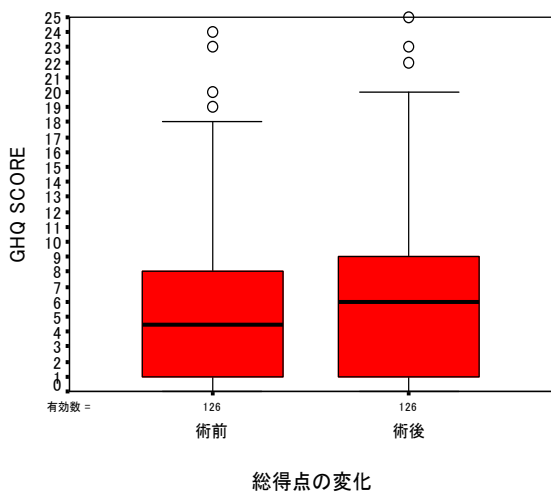
A 悪性腫瘍 B 嚢胞性疾患 C 良性腫瘍
D 外傷・骨折 E その他

(術後の精神的ストレス状態)

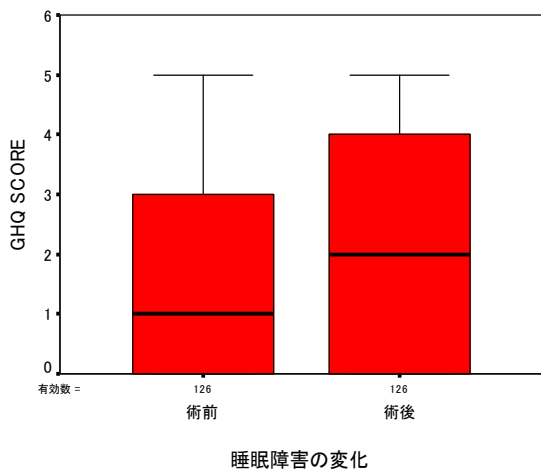




(術前・術後のストレス変動)

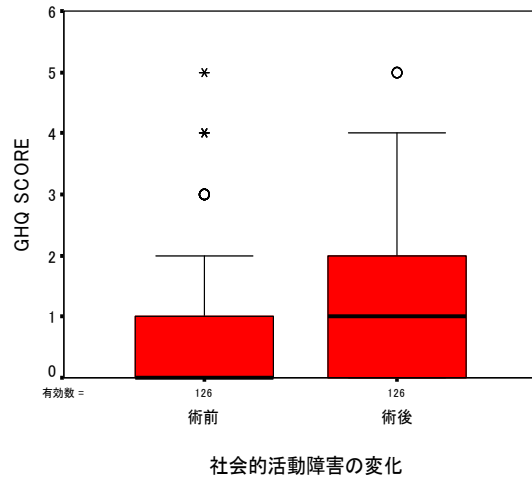


総得点の変化



睡眠障害の変化

睡眠障害は術前と比較して術後は有意に増悪していた。Wilcoxon の符号付順位検定 ($p=0.016$ *)



社会的活動障害の変化

社会的活動障害は術前と比較して術後は有意に増悪していた。Wilcoxon の符号付順位検定 ($p=0.002$ *)

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 9 件)

- ① Ota Y, Aoki T, et. al. (他 8 名、1 番目)
Determination of deep surgical margin based on anatomical architecture for local control of squamous cell carcinoma of the buccal mucosa. Oral Oncol. 2009; 45: 605-609. 査読有.

[学会発表] (計 43 件)

- ① Ota Y, Aoki T, Sasaki M, Kurabayashi H.
Classification based on depth of invasion for buccal cancer. 19th Congress of the European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery, Sept. 9th-12th 2008, Bologna, Italy.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 嘉英 (OTA YOSHIHIDE)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：60233152

(2) 研究分担者

青木 隆幸 (AOKI TAKAYUKI)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：80297209

(3) 連携研究者

()
研究者番号：