

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月20日現在

機関番号：34318

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21792041

研究課題名（和文）

顎関節症などの慢性筋痛に見られる性差に ATP 受容体は関与するか？

研究課題名（英文）

Effects of ATP receptor on sex difference of chronic muscle pain (temporomandibular disorder)

研究代表者 伊藤 和憲 (ITO KAZUNORI)

明治国際医療大学・鍼灸学部・准教授

研究者番号：90351353

研究成果の概要（和文）：

エストロゲンなどの性ホルモンの変化により生じた痛みにはATPは関与するのか検討した。

ラットにカラゲニンを注入による行動学的な検討では、卵巣を摘出した後にエストロゲンを補充した際に痛み関連行動が増加、侵害受容ニューロンの反応性（閾値や受容野）は高まる傾向にはあった。しかし、髄腔内にP2X受容体のアンタゴニストであるPPADSを投与したところ、侵害受容ニューロンの活動は変化が認められなかった。

以上のことから、エストロゲンを補充したラットで認められる痛みの増加とATP受容体には関連性が低い可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Since sex hormones are believed to play a role in these ailments, our study examined the influence of ovariectomy with or without estrogen replacement on the development of muscle pain in rats. Sprague-Dawley rats were equally divided into a male group (Male), ovariectomized female group (OVX), and ovariectomized, estrogen-supplemented female group (OVX+E₂). All rats were injected with 3% λ-carrageenan (0.1 ml, im) in the left gastrocnemial (GS) muscle. We subsequently measured pain thresholds. Pain thresholds in OVX and Male groups were higher than in the OVX+E₂ group prior to injection. Pain thresholds decreased sharply and were at their lowest in all groups 1-2 days post injection. They returned to baseline levels by week 6 in all but the OVX+E₂ group.

On the other hand, after surgery, the P2XR antagonist PPADS (100 μg) or phosphate-buffered saline (as control) was continuously superfused over the MDH. Nociceptive-specific (NS) in anesthetized rats, after baseline values of neuronal properties were assessed. In the Male and OVX group, PPADS produced prolonged and neuroplastic changes reflecting CS, i.e., increased neuronal receptive field size and pinch evoked responses and decreased activation threshold. In contrast, in the OVX+ E₂ group, PPADS also produce to changes in neuronal properties. These data suggest that P2X receptors may be not involved in the initiation of CS in MDH nociceptive neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,600,000	480,000	2,080,000
22年度	600,000	180,000	780,000
23年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：慢性疼痛、ATP、性ホルモン

1. 研究開始当初の背景

顎関節症や線維筋痛症、さらには緊張型頭痛などの慢性的な筋痛疾患には性差が存在することが知られている。しかしながら、その他の慢性痛と知られている神経障害性疼痛や関節リウマチ、CRPSなどの疾患には明らかな性差は存在していない。以上の事実から、慢性的な筋痛疾患には、従来の痛み物質に加えて、エストロゲンなどの性ホルモンが関与している可能性が指摘されている。実際に、我々が以前行った研究では、筋肉の痛覚閾値は、性周期により変化することが報告されており、特にエストロゲンの濃度が増加する時期には、筋肉の痛覚閾値は低下していた（未発表）。このことから、慢性筋痛にはエストロゲンの変化が重要であるといえる。

その一方で、神経障害性疼痛などの慢性的な痛みには P2X 受容体のような ATP 受容体が関与していることが報告されている。特に P2X4 は痛みの慢性化と強い因果関係があり、P2X4 をノックアウトしたマウスでは神経障害性疼痛の痛みを軽減させるとの報告がある。このことから、痛みの慢性化には P2X 受容体が大きく関与している可能性がある。

そこで、性差が存在する慢性的な筋痛モデルで、ATP 受容体の反応性や感受性などが、性ホルモン、特にエストロゲンなどの影響を受けている可能性が予想される。そのため、近年、ATP 受容体の機能に性ホルモンが関与するかが注目されている。

2. 研究の目的

顎関節症や線維筋痛症などの慢性的な筋肉痛に認められる痛みの性差に①エストロゲンが関与しているのか、②ATP 受容体の機能はエストロゲンの濃度に影響されるのかを検討する必要がある。そのため、本研究では、安定的に研究できる慢性的な筋痛モデルをラットで作成するとともに、そのモデルを用いて、三叉神経脊髄路核尾側亜核から侵害受容ニューロンを記録した際のニューロンの活動変化、さらにはエストロゲンを投与した際のニューロン活動の反応性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 慢性筋痛モデルの作成（行動学的検討）

ラットの腓腹筋に、過去に実験動物の筋痛モデルとして報告されている、①3%カラゲニンの筋注モデル、②5%高張食塩水の繰り返し筋注モデル、ならびに③伸張性収縮運動によ

る筋痛モデルの3つを作成することで、一番安定的に筋痛が継続する方法を検討した。実験動物は、行動実験を行う前に最低2週間の訓練期間を設け、その後実験に使用した。

3%カラゲニンの筋注モデルでは、3%のカラゲニンを筋肉に注入し、経過を観察した。また、5%高張食塩水モデルでは、5%高張食塩水を筋肉に投与後、5日後に再び高張食塩水を投与することで経過を観察した。伸張性収縮運動による筋痛モデルでは、麻酔下で筋肉を電気刺激することで筋肉を収縮させ、その収縮した筋肉を他動的に引き伸ばすことで伸張性収縮負荷とし、筋肉痛を作成した。なお、モデルの作成はすべてSD雄ラットとし、各群6匹とした。

すべてモデルは、痛みの行動学的変化を検討するために、無麻酔下で von Frey test ならびに Randall-Selitto test を測定することとし、モデル作成前、直後、1-7日、2-8週間測定を行った。なお、それぞれの測定は、毎回10回測定し、最低値と最高値の2回を省いた計6回の値の平均値を採用した。

(2) 慢性筋痛モデルを用いた性ホルモンの影響（行動学的検討）

3%カラゲニン注入モデルを用いて、雄と雌による痛覚閾値の変化を検討するために、上記に示した行動学的な指標を用いて確認した。なお、実験にはSD雌ラット4例を用いた。

また、エストロゲンの影響を詳細に検討するために、卵巣を摘出したラットと卵巣を摘出後にエストロゲンを補充したラットに対して、3%カラゲニンをラットの腓腹筋に注入した際の行動学的な変化を各群4例ずつ検討した。なお、卵巣の摘出は実験開始の2週間前に行うこととし、スメアに性周期がないことを確認した上で、実験に用いた。また、エストロゲンを補充したラットに関しては、卵巣摘出後にスメアを確認した後、浸透圧によりエストロゲンが投与できるように作成したエストロゲンチューブを頸部に埋め込み、スメア像が発情期の像で安定したのを確認して、実験に用いた。

(3) 三叉神経脊髄路核尾側亜核の侵害受容ニューロンの反応性について

筋肉の痛みに対するニューロンレベルの反応として、性差が存在するかを検討するために、雄 (n=8) と雌 (n=4) のラット、さらには卵巣を摘出したラット (n=6) と卵巣摘出後

にエストロゲンを補充したラット(n=4)を用いて検討を行った。測定は、ウレタン麻酔下にて静脈・動脈・気管のカニューレーションを行った後、定位脳固定装置に固定し、後頸部から延髄を露出させ、人工呼吸器下で、頸静脈より筋弛緩剤と麻酔薬の混合液を連続的に投与した。ニューロンの記録部位は、左の延髄の三叉神経脊髄路核尾側亜核で、オシロスコープでモニターしながら、ガラス電極を10 μ mずつ刺入し、顔面部の皮膚を触り、ニューロンが反応する受容野を特定した。なお、今回は、侵害刺激にのみ反応する特異的侵害受容ニューロン(NSニューロン)を対象とした。

測定は受容野とピンチ刺激の痛覚閾値、閾値の1.5倍で5秒間刺激した際のニューロンの発火数を指標とし、3%カラゲニン投与前・投与後5分・10分・25分・35分・45分・55分まで7回測定した。なお、カラゲニンは、マイクロシリンジにて左の咬筋に投与した。

(4) エストロゲン補充ラットに対する P2X 受容体アンタゴニストの効果

卵巣のみ摘出したラットと、卵巣摘出後に高濃度エストロゲンを補充したラットの2群で P2X 受容体アンタゴニストである PPADS の効果を検討した。方法は、実験開始2週間前に卵巣を摘出し、エストロゲンを補充したラットのスメアを確認し、性周期に変化がないことを確認し、実験に用いた。

(3)と同様の手術を行った後、両群の髄腔内に P2X 受容体のアンタゴニストである PPADS (100 μ g) をマイクロシリンジポンプで連続的に投与し、1時間経過した段階からニューロンの記録を開始した。

なお、測定は受容野とピンチ刺激の痛覚閾値、閾値の1.5倍で5秒間刺激した際のニューロンの発火数を指標とし、3%カラゲニン投与前・投与後5分・10分・25分・35分・45分・55分まで7回測定した。なお、カラゲニンは、マイクロシリンジにて左の咬筋に投与した。

4. 研究成果

(1) 慢性筋痛モデルの作成 (行動学的な検討)

①カラゲニンの筋注モデルでは一過性に皮膚の痛覚過敏がみられるものの、6週間ほど安定した筋痛が得られたが、②高張食塩水のモデルでは長期間安定した筋痛は得られなかった。また、③伸張性収縮運動によるモデルは、筋痛は作成されるものの、痛みは1週間前後で回復するため、痛みの持続時間は短時間であり、慢性モデルとしては妥当ではなかった。以上のことから、カラゲニンの筋注により長期的に安定した痛覚過敏が認められたことから、カラゲニンモデルは筋痛モデルとして妥当であると考えられた。

(2) 慢性筋痛モデルを用いた性ホルモンの影響 (行動学的検討)

3%カラゲニン注入モデルを用いて、雄と雌による痛覚閾値の変化を行動学的な指標も用いて確認したところ、雄に比べて雌ラットで閾値が低下する傾向にはあるものの両群に差は認められなかった。その理由として、雌のラットの性周期はまちまちであり、一定の性周期でないことが影響しているものと考えられた。そこで、卵巣を摘出することで性周期を一定にしたラットと、高濃度のエストロゲンを補充したラットを比較したところ、卵巣摘出後に高濃度のエストロゲンを注入したラットでは、卵巣摘出しただけのラットと比べて閾値の低下が認められた。ただし、閾値低下期間の延長などの変化は認められなかった。以上のことから、エストロゲンの補充がラットの痛覚閾値に関する行動学的な指標を変化させる可能性があり、性ホルモン、特にエストロゲンが慢性筋痛モデルの痛覚閾値に影響している可能性が示唆された。

(3) 三叉神経脊髄路核尾側亜核の侵害受容ニューロンの反応性について

三叉神経脊髄路核尾側亜核(延髄後角: Caudalis)から記録された侵害受容(NS)ニューロンを指標に、咬筋に3%カラゲニンを注入したときの変化を検討した。雄、雌ともに、咬筋にカラゲニンを注入してしばらくすると、NSニューロンの受容野は拡大し、ピンチによって得られるニューロンの閾値にも低下がみられる傾向にあった。また、閾値の1.5倍で受容野を5秒間刺激した際のニューロンの発火数に関しても、増加する傾向にあった。

一方、健常ラットでは性差は認められなかったことから、卵巣摘出したラットと卵巣を摘出した後に高濃度エストロゲンを補充したラットの2群で比較した結果では、卵巣摘出のみを行ったラットに比べて、高濃度のエストロゲンを補充したラットでは延髄後角の侵害受容ニューロンの反応性(閾値や受容野)は高まる(受容野の拡大や閾値の上昇など)傾向にはあった。しかし、例数が少ないこともあり、両群に有意差は存在しなかった。

(4) エストロゲン補充ラットに対する P2X 受容体アンタゴニストの効果

卵巣を摘出した後に高濃度エストロゲンを補充したラットと卵巣摘のみをしたラットの両群の髄腔内に P2X 受容体のアンタゴニストである PPADS (100 μ g) を事前投与して(3)と同様の実験を行ったところ、両群とも侵害受容ニューロンの活動は抑制される傾向にあったものの、抑制率に関しては両群で差は認められなかった。

以上のことから、慢性筋痛で性差が生じる原因に様々な理由が考えられるが、高濃度のエストロゲンを補充したラットで認められる痛みの増加とATP受容体には関連性が低い可能性が示唆された。

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)

- ① Itoh K, Chiang CY, Li Z, Lee JC, Dostrovsky JO, Sessle BJ. Central sensitization of nociceptive neurons in rat medullary dorsal horn involves purinergic P2X7 receptors. Neuroscience, 192, 721-31, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.06.083>

[学会発表] (計3件)

- ① 伊藤和憲. Effects of suramin on mustard oil-induced sensitization in trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn). 日本疼痛学会, 2009.
- ② Itoh K. Influence of ovariectomy on the development of delayed onset muscle soreness (DOMS) in female rats. 13th World Congress on Pain, 2010.
- ③ 伊藤和憲. 線維筋痛症に対する鍼灸治療の効果とその可能性. 日本線維筋痛症学会, 2011.

[図書] (計1件)

伊藤和憲: 図解 痛みの鎮痛の基礎としくみ (秀和システム)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 和憲 (ITO KAZUNORI)

明治国際医療大学・鍼灸学部・准教授

研究者番号: 90351353

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし