

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21042

研究課題名（和文）筋痛モデルラットによる咀嚼筋痛受容機構解明ならびに治療法開発の基盤形成

研究課題名（英文）Elucidation of the receptor mechanism of masticatory muscle pain in muscle pain model rats and formation of a basis for the development of therapeutic methods.

研究代表者

生田目 大介（IKUTAME, Daisuke）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・助教

研究者番号：10910218

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本実験では下降性疼痛抑制系を機能低下させるレセルピンを、5週齢 SD系雄性ラットの咬筋相当部へ皮下注射を行い作製した咬筋痛モデルラットを使用した。第1に咬筋痛による逃避反射閾値の変化を経時的に測定し、レセルピン注入群はナীব群と比較し注入後3日目から10日目まで有意な低下を認めた。第2に三叉神経節に発現するグリア細胞より遊離した炎症性サイトカインCXCL2の免疫組織学的解析を行い、レセルピン注入群はナীব群と比較し有意な増加を認めた。以上より、レセルピン注入による機械痛覚過敏の発症およびグリア細胞の活性化の増大の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去の研究では、顎関節へのCFA注入後、三叉神経節に存在するTNF-陽性の咬筋投射ニューロンは増加し、咬筋への機械刺激に対する機械的頭部反射閾値は有意に低下したと報告されている。さらに、私の研究室の報告では、口腔顔面痛モデルラットにおいて、三叉神経節に存在するグリア細胞の活性化、およびサイトカイン遊離の増加が認められた。本研究ではレセルピン注入による機械痛覚過敏の発症およびグリア細胞の活性化の増大の可能性が示されたため、咀嚼筋痛の伝達メカニズムの一端が解明されたと考えられる。これは、今後本研究を進めていく上で必要不可欠な報告であり、その解明が与える意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In this experiment, we used 5-week-old male SD rat model of masseter muscle pain created by subcutaneously injecting reserpine. Reserpine impairs function of the descending pain inhibitory system, into the masseter muscle. First, the change in withdrawal reflex threshold due to masseter muscle pain was measured over time, and a significant decrease was observed in the reserpine injection group compared with the naive group from 3 days to 10 days after injection. Secondly, immunohistochemical analysis of the inflammatory cytokine CXCL2 released from glial cells expressed in the trigeminal ganglion showed a significant increase in the reserpine-injected group compared to the naive group. These results suggest that reserpine injection may induce mechanical hyperalgesia and increase glial cell activation.

研究分野：口腔科学およびその関連分野

キーワード：咬筋痛 線維筋痛症 グリア細胞 炎症性サイトカイン レセルピン

1. 研究開始当初の背景

過去の研究では、顎関節への CFA 注入後、三叉神経節に存在する TNF- α 陽性の咬筋投射ニューロンは増加し (図 1)、咬筋への機械刺激に対する機械的頭部反射閾値は有意に低下し、その低下は TNF- α 中和抗体の三叉神経節への継続投与によって抑制されたと報告されている (Ito et al. J Oral Facial Pain Headache. 2018)。

さらに、私の研究室の報告では、眼窩下神経結紮による口腔顔面痛モデルラットにおいて、三叉神経節に存在するグリア細胞の活性化、およびサイトカイン遊離の増加が認められた。

また、グリア細胞の活性化を抑制するミノサイクリンの投与によって痛みの軽減、および三叉神経節内のサイトカインの減少が認められた (Afroz et al. Int J Mol Sci. 2019)。

このような研究の学術的背景をもとに、本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、咀嚼筋痛の伝達メカニズム、およびグリア細胞機能抑制薬であるミノサイクリンの鎮痛効果や作用機序はどのようになっているのかであり、その解明が与える意義は大きい。

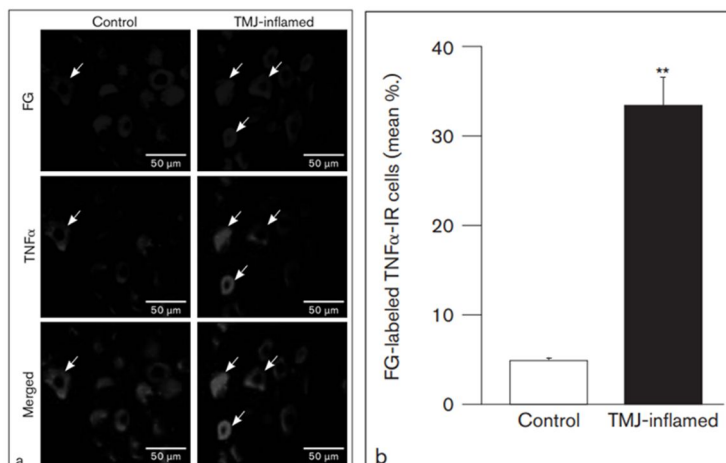


図 1. 三叉神経節における TNF- α 発現

2. 研究の目的

近年、口腔顔面痛のメカニズムについて様々な研究がなされている。眼窩下神経結紮モデルを用いたラットの口腔顔面領域での神経障害性疼痛は三叉神経節におけるグリア細胞を活性化させ、炎症性サイトカインである CXCL2 の遊離を増加させる (Iwasa et al. Neurosci Lett. 2019)。また、坐骨神経損傷モデルを用いたラットでは炎症性サイトカインである CXCL1 によって神経障害性疼痛が誘発され、グリア細胞機能抑制薬のミノサイクリンの投与によって軽減することが報告されている (Morales et al. Eur J Pharmacol. 2019)。このような背景を基に本研究では、咬筋痛モデルを用いて、咀嚼筋痛の伝達メカニズム、およびミノサイクリンの鎮痛効果や作用機序を解明することで、咀嚼筋痛治療におけるミノサイクリンなどのグリア細胞機能抑制薬の臨床応用法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

本研究では、Sprague-Dawley 雄ラットを使用した (体重 200-250g, CLEA Japan, 大阪, 日本)。ポリカーボネート製の透明ケージ (長さ: 38cm, 幅: 33cm, 高さ: 17.5cm) に紙製の床敷を敷いて飼育した。実験に使用したすべてのラットは、12 時間毎に切り替わる明暗サイクル、19-21°C に維持された室温、および餌と水を自由に摂取できる環境下にて飼育した。なお、本研究は徳島大学の承認 (徳島大学動物実験委員会: 承認日; 2021 年 11 月 1 日) を受け、国際疼痛学会の指針に従い実施した。

(2) 薬物

レセルピン (Nacalai Tesque, 東京, 日本) は、1mg/ml となるように 0.5% 酢酸を用いて希釈した。

(3) 咬筋痛モデル

生理食塩水で希釈した三種混合麻酔薬 (酒石酸ブトルファノール 5.0 mg/kg, ミダゾラム 4.0 mg/kg, 塩酸メドミジン 0.75 mg/kg) の腹腔内 (i.p.) 投与による深麻酔下にて、SD ラットの左側顎下三角より前方 5 mm, 上方 5 mm の位置にレセルピンを 1 日 1 回 3 日連続で 1mg/kg s.c. を行い、Reserpine 群とした。対照群として、三種混合麻酔薬の i.p. 投与後に 0.5% 酢酸の 1mg/kg s.c. を行った群を Control 群とした。また、三種混合麻酔薬の i.p. 投与のみを行った群を Naive 群とした。

(4) 咬筋相当部機械刺激に対する頭部引っ込み反射閾値の測定

2%イソフルラン (Mylan) 吸入による浅麻酔下にて、デジタルフォンフライ (Bioseb) を用いて、左側顎下三角より前方 5 mm, 上方 5 mm の位置に機械刺激を加え、ラットが頭部引っ込み反射を誘発した機械刺激の最低強度を機械的頭部引っ込み反射閾値 (MHWT) とした。機械刺激は、刺激強度を一定の割合で増加させ (10 g/s), 組織損傷を防ぐために上限値は 100 g とした。機械刺激による MHWT の測定は、3 分間隔で 3 回行い、その平均値を各マウスの MHWT とした。なお、MHWT 測定は、レセルピン注入前日からレセルピン注入後 17 日目まで盲検条件下で実施した。

(5) 免疫組織化学染色

生理食塩水で希釈した三種混合麻酔薬の i.p. 投与による深麻酔下にて、0.9% 生理食塩水 (50 mL) を用いて経心的に脱血し安楽死させた後、4%パラホルムアルデヒド固定液 (PFA) による灌流固定を行い、三叉神経節を摘出した後、PFA に 4 で 24 時間浸漬し後固定を行った。後固定した三叉神経節は、0.01 M phosphate buffer saline (PBS) に浸漬 (6 時間) し、freezing microtome (Leica) を使用して水平断の切片 (厚さ: 30 μ m) を作製した。1 ラットあたり 7 枚の切片 (120 μ m 毎) を免疫組織化学染色による解析に使用した。

三叉神経節における CXCL2 陽性細胞 CTCF の解析

レセルピン注入後 5 日目における、三叉神経第三枝領域の CXCL2 陽性細胞の全細胞蛍光 (CTCF, The corrected total cell fluorescence) の変化について解析を行った。3%ウシ血清アルブミン (3%BSA, Bovine serum albumin) に室温 (23°C) で 1 時間浸漬することで、非特異的反応のブロッキングを行った。続いて、一次抗体として抗 CXCL2 ウサギポリクローナル抗体 (50 倍希釈, abcam) に 4°C で 24 時間反応させた後、PBS により洗浄した。その後、二次抗体として Alexa Fluor 488 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (250 倍希釈, Abcam) に室温で 1 時間反応させた。切片の封入後、オールインワン顕微鏡 BZ-X800 (Keyence) を使用し、背景に比べ 2 倍以上の染色強度を示す細胞を陽性とし、Image J (NIH) を使用して CXCL2 陽性細胞の CTCF の計測および解析を行った。

(6) 統計学的解析

各データは平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表した。有意差検定には、one-way または two-way analysis of variance (ANOVA) を用い、Bonferroni's multiple comparison test にて多重比較した。免疫組織化学的解析には Student's t-test を用いた。有意差水準は $\alpha=0.05$ とした。

4. 研究成果

(1) 結果

咬筋相当部機械刺激に対する頭部引っ込み反射閾値の測定

Reserpine 群の MHWT は、control 群と比較しレセルピン注入後 3 日目から 10 日目まで有意な低下を認めた ($P<0.05$)。また、naive 群と比較しレセルピン注入後 3 日目から 10 日目まで有意な低下を認めた ($P<0.05$)。さらに、Reserpine 群の MHWT は、レセルピン注入後 5 日目に最低値を示した (図 2)。

三叉神経節における CXCL2 陽性細胞 CTCF の変化

切開後 5 日目に、Reserpine 群および Control 群の CXCL2 陽性細胞 CTCF は、naive 群と比較し有意に増加し、Reserpine 群の CXCL2 陽性細胞 CTCF は、Control 群と比較し有意に増加が増強した。

(2) 考察

以上の結果より、レセルピン注入による機械痛覚過敏の発症およびグリア細胞の活性化の増大の可能性が示された。これらは、不明点の多い咀嚼筋痛の伝達メカニズムの解明の一端となり得る。また、将来的な展望としては、三叉神経節内にグリア細胞機能抑制薬としての効果を持つミノサイクリンを直接投与することによって、咀嚼筋痛による逃避反射閾値の変化がどのように改善するのかを経時的に観察することを考えている。これらは、咀嚼筋痛治療の新規治療法および臨床的判断の基準に対する基礎的データを与えることが期待できる。最終的に、本研究が完結することで、咀嚼筋痛による慢性的な疼痛に苦しむ患者にとって福音となり得る。

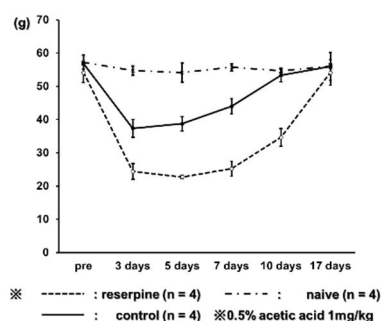


図 2 . Reserpine pain model

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------