

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 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22592256
 研究課題名（和文） 卵巣摘出動物における口腔顔面領域の神経因性疼痛の制御機構の解明
 研究課題名（英文） Modulatory influence of ovariectomy on orofacial neuropathic pain in rats
 研究代表者
 杉村 光隆（SUGIMURA MITSUTAKA）
 大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
 研究者番号：90244954

研究成果の概要（和文）：1. 卵巣摘出（ovx）ラットの眼窩下神経結紮（pIONL）による三叉神経第 2 枝領域神経障害性疼痛に対する牛車腎気丸（GJG）の慢性投与の効果、von Frey test による痛覚閾値の経時的な変化より解析した。その結果、GJG の神経障害性疼痛に対する鎮痛効果は、慢性投与により徐々に発現する可能性があると考えられた。また、ovx+GJG 群と sham+GJG 群での痛覚閾値の違いは ovx に起因しており、ovx が GJG の鎮痛効果の減弱因子となる可能性が示唆された。

2. 当該モデルを用いてエストラジオール（Es）補充療法の効果を同様に調べた結果、Es は急性炎症に対しては増悪因子として、また神経障害性疼痛に対しては寛解因子として作用することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We studied the effects of goshajinkigan (GJG) on mechanical hypersensitivity in ovariectomized rats with infraorbital nerve injury using the von Frey test. The results showed the potential development of gradual analgesic action with chronic administration of GJG. In addition, a difference was apparent between the ovariectomy and sham operation groups, and thus ovariectomy itself may reduce the analgesic effect induced by GJG. Examination of the effects of estradiol (Es) replacement in the same model indicated that Es acted to aggravate acute inflammation while mitigating chronic conditions such as neuropathic pain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：卵巣摘出、更年期、神経障害性疼痛、三叉神経、女性ホルモン、口腔顔面痛、エストロゲン、漢方

1. 研究開始当初の背景

更年期障害では女性ホルモンのバランスの乱れによって、口腔顔面領域での疼痛感覚が変化すると報告されている。一方、歯科ペインクリニック外来では更年期障害に伴う女性患者の割合が高く、そのような患者では歯科治療で生じた口腔顔面領域の神経傷害によって痛みの感じ方が変化することがあるが、詳細は不明である。また、このような患者に対しては漢方薬が有効な場合がある。そこで本研究では更年期様状態の動物モデルの口腔顔面領域に神経傷害による疼痛を発症させ、そこへ痛みを伴わない触覚刺激を加えた場合の痛み方の変化、およびその変化に関わる遺伝子学的なしくみを検索した。さらに、神経傷害による疼痛に対して鎮痛効果が期待される漢方薬の有効性を検討した。漢方が呈する鎮痛のしくみを解明することは、西洋医学との相補的医療を進展させるためにも、意義深いと考えている。

2. 研究の目的

歯科ペインクリニック外来の患者内訳に占める割合が高い更年期障害の女性患者では、歯科治療で生じた口腔顔面領域の神経傷害によって痛みの感じ方が変化することがある。これを想定した更年期様モデルラットの三叉神経第2枝領域に神経障害性疼痛を発症させ、当該疼痛に起因した疼痛関連行動を含む自由行動活性や当該領域への機械的触刺激に対する経時的な疼痛閾値の変化を検討し、我々の臨床的観察から得られた所見を検証する。さらに、当該患者に臨床で用いる漢方薬が疼痛軽減に寄与するか、当該疼痛に対する修飾作用を検討する。

3. 研究の方法

(1) 更年期様状態モデルラットでの神経障害

性疼痛モデルの作製

ペントバルビタール (50mg/kg ip) 麻酔下に、8週齢の雌性 Wistar Kyoto ラット(WKY)の卵巣を摘出(ovx)して更年期様状態を作り、2週間後に眼窩下神経を結紮(pIONL)して、三叉神経第2枝に神経障害性疼痛モデルを作製する。

(2) モデルラットの自由行動活性と機械的刺激に対する反応性の検討

1) 実験ケージ (25×40×20 cm) にモデルラットを1匹ずつ入れて、モデル作製前後における行動をデジタルビデオに7分間録画し、次に示す行程およびカテゴリーで行動活性を後解析する。

【工程】 卵巣摘出直前、眼窩下神経結紮直前、2、7、14、28日後の計6ポイント

【スコア化される対象となる行動】

- a. 探索行動 (walking, running, climbing, rearing and sniffing)
- b. freezing (無動化、固縮)
- c. face + body grooming (手足が顔面に接触する、手足、舌、前歯が顔面あるいは前足以外の体に接触する)

以上を記録されたビデオテープにて弁別し、各カテゴリーに費やされた総時間でスコア化することによって行動活性の解析を行う。

2) 行動活性解析のビデオ撮影後、機械的刺激によるモデルラットの反応性を調べるため、von Frey テストを行う。神経障害性疼痛を評価する本テストは、直径の異なる6種類(2)のプラスチックモノフィラメントを傷害領域へ1秒間圧接し、刺激に対する逃避反応をスコア化する。

3) 実験終了後、子宮重量を測定し、卵巣摘出に伴う更年期様状態であることを確認する。

- ※ 卵巣摘出によりエストラジオール(卵胞ホルモン)が減少することが確かめられている。
- ※ 以上の行動学的調査は、熟達した一人の検者が行う。

(3) 本モデルでの Real time PCR による疼痛関連タンパクのターゲット遺伝子 mRNA の定量

1) 卵巣摘出直前、眼窩下神経結紮直前、結紮 28 日後に断頭し、三叉神経節を速やかに摘出してドライアイスで氷冷する。

2) RNA 抽出キットを用いて、三叉神経節より total RNA を抽出し、DNase で処理後、逆転写試薬にてサーマルサイクラーにより cDNA 合成を行う。cDNA は、特異的オリゴヌレオチドと蛍光プローブを用い、RT-PCR Step One Plus-01 (Applied Biosystems、現有)にて増幅する。

3) mRNA はラットの SP(Tac1)、CGRP、ER1、ER2、GPR30、TRPV1 をコードしたターゲット mRNA に特異的な TaqMan assays にて、triplicate で定量する。目的の PCR プロダクトが検出されると定量され、相対的な mRNA の転写レベルは comparative C_T 法で計算される。

4) なお、実験終了後、子宮重量を測定し、更年期様状態を確認する。

※ 対照群は開腹術のみで卵巣摘出はしない sham 手術を行い、適宜スミアチェックを実施し、estrus phase(発情期)に実験する。

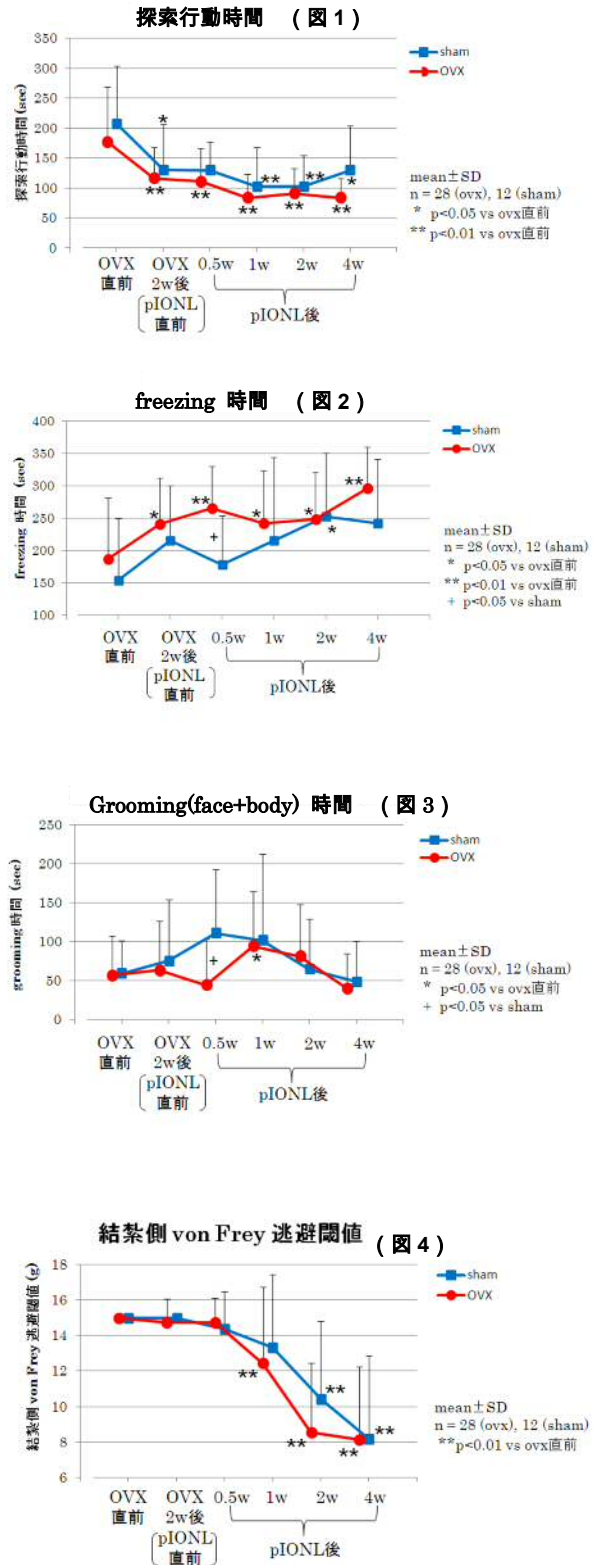
(4) 本モデルに漢方薬またはエストラジオール(Es)を投与した場合の行動活性と機械的刺激に対する反応性の検討

1) 眼窩下神経結紮時より鎮痛効果が期待される牛車腎気丸を 21 日間経口投与し、2. に準じて 6 ポイントで行動活性の解析および von Frey テストを行う。

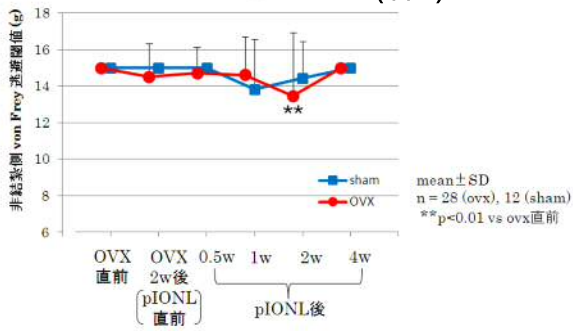
2) Es は ovx 1 週間後に後背部に Es のペレットを埋入し、あとは(2)に準ずる。

4. 研究成果

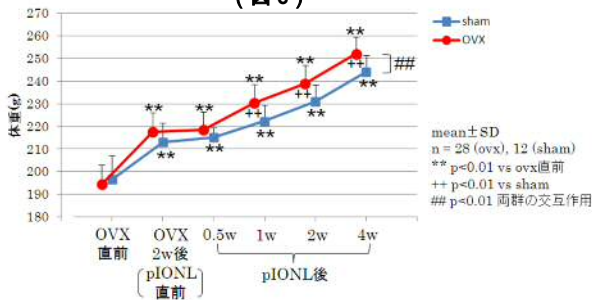
(1) モデルラットの自由行動活性と機械的刺激に対する反応性



非結紮側 von Frey 逃避閾値 (図 5)



体重 (図 6)

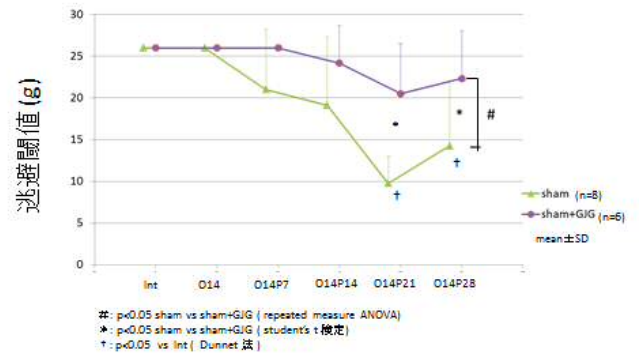


- 1) pIONL 前の ovx は、機械的触刺激による逃避反応にはあまり影響しないが、自由行動活性を低下させる(図 1, 2)。
 - 2) pIONL 後も、ovx による行動活性の低下は持続し神経障害性疼痛がその助長因子となっていると考えられる(図 1, 2)。神経障害性疼痛の発現に伴い grooming 活性が一過性に亢進するが、痛み感受性の増強につれてその亢進も減弱することが伺える(図 3)。
 - 3) ovx によって、pIONL 後の神経障害性疼痛に伴う結紮側の疼痛閾値は早期から経時的に低下する(図 4)。非結紮側でも閾値は一過性に低下しており、ovx が修飾因子となっている可能性がある(図 5)。
 - 4) ovx 後の体重増加には、女性ホルモン(エストロゲン等)の減少による摂食の亢進や自由運動活性の低下が関与していると考えられる(図 6)。
- (2) ovx ラットの pIONL による三叉神経第 2 枝領

域神経障害性疼痛に対する牛車腎気丸(GJG)の慢性投与の効果

Von Frey test (sham vs sham+GJG)

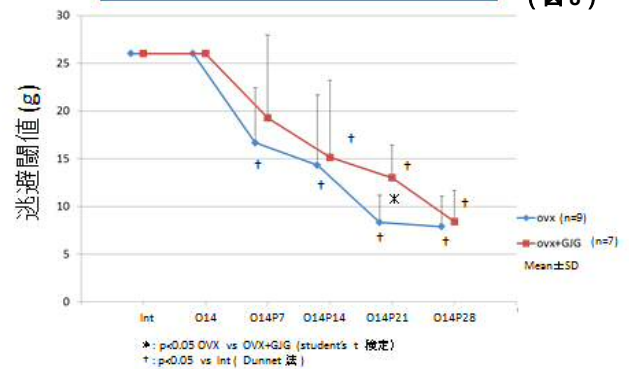
(図 7)



##: p<0.05 sham vs sham+GJG (repeated measure ANOVA)
*: p<0.05 sham vs sham+GJG (student's t 検定)
†: p<0.05 vs Int (Dunnett 法)

Von Frey test (OVX vs OVX+GJG)

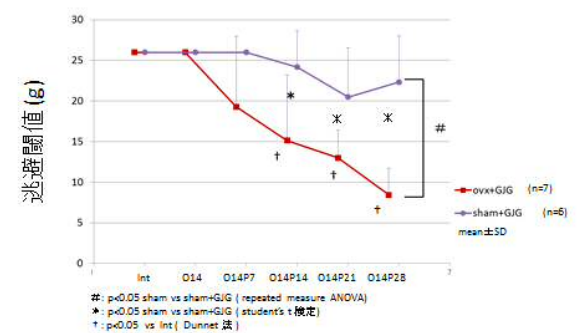
(図 8)



*: p<0.05 OVX vs OVX+GJG (student's t 検定)
†: p<0.05 vs Int (Dunnett 法)

Von Frey test (ovx+GJG vs sham+GJG)

(図 9)

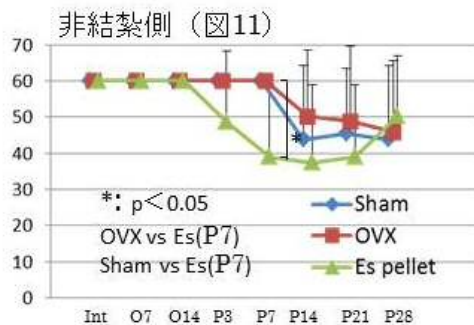
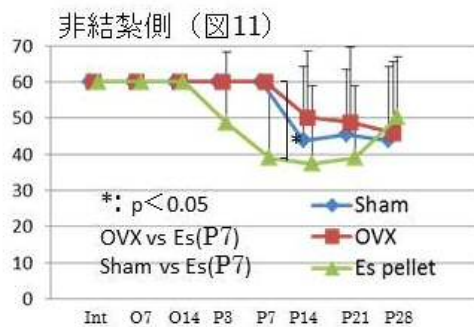


##: p<0.05 sham vs sham+GJG (repeated measure ANOVA)
*: p<0.05 sham vs sham+GJG (student's t 検定)
†: p<0.05 vs Int (Dunnett 法)

ovx+GJG 群と ovx 群との間には投与 21 日後に有意差を認めたが、両群間に交互作用はなかった(図 8)。sham+GJG 群と sham 群との間には交互作用と投与 21、28 日後に両群間

に有意差を認めた(図 7)。ovx+GJG 群と sham+GJG 群との間には交互作用と投与 14、21、28 日後に有意差を認めた(図 9)。GJG の神経障害性疼痛に対する鎮痛効果は、慢性投与により緩徐に発現する可能性がある。sham+GJG 群と ovx+GJG 群での痛覚閾値の違いは ovx に起因しており、ovx が GJG の鎮痛効果の減弱因子となる可能性が示された。

(3) ovx ラットの pIONL による三叉神経第 2 枝領域神経障害性疼痛に対するエストラジオール (Es) 補充療法の効果



pIONL 後の急性炎症期(結紮後 3~7 日)では、結紮側において ovx+Es+pIONL 群で有意に閾値が低下した。一方、神経障害性疼痛と考えられる結紮後 21~28 日では ovx+pIONL 群で最も閾値が低下し、ovx+Es+pIONL 群では結紮後 21~28 日で閾値の上昇傾向を認めた(図 10)。以上より、Es は急性炎症に対しては増悪因子と

して、また神経障害性疼痛に対しては寛解因子として作用する可能性がある。非結紮側でも急性炎症期に閾値の低下を認めた。

pIONL から 28 日後に三叉神経節を摘出し、当該部位での疼痛関連遺伝子 (ER1, ER2, GPR30, TRPV1, CGRP, Tac1) の mRNA の発現について検討を行った。この結果、OVX+pIONL 群で CGRP の mRNA の発現が増加傾向を示した以外は有意な差は認めなかった。

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)

[学会発表](計 4 件)

- 1) 山形和彰、杉村光隆、吉田好妃、瀧 邦高、丹羽 均: 卵巣摘出ラットに発症させた神経障害性疼痛に対する牛車腎気丸の効果, 第 17 回日本口腔顔面痛学会, 2012 年 11 月 3 日, 東京、慶應義塾大学病院
- 2) 山形和彰、杉村光隆、吉田好妃、瀧 邦高、丹羽 均: 卵巣摘出ラットに発症させた神経障害性疼痛に対する牛車腎気丸の効果, 第 40 回日本歯科麻酔学会, 2012 年 10 月 6 日, 福岡、アクロス福岡
- 3) Yoshida M, Sugimura M, Yamagata K, Niwa H: Trigeminal neuropathic pain-related behavior in ovariectomized rats, 第 59 回日本麻酔科学会, 2012 年 6 月 8 日, 神戸, 神戸ポートピアホテル 神戸国際展示場
- 4) 杉村光隆, 丹羽 均: 卵巣摘出動物の口腔顔面領域の神経因性疼痛による行動学的変化, 第 39 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 2011 年 10 月 9 日, 神戸市, 神戸国際会議場

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉村 光隆 (SUGIMURA MITSUTAKA)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号:90244954

(2)研究分担者

丹羽 均 (NIWA HITOSHI)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号:30218250