

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463065

研究課題名(和文) 交感神経活動が咀嚼筋の痛み、分化、機能および神経線維分布に与える影響

研究課題名(英文) Study for influences of activities of sympathetic nerve for pain, differentiation, function and innervation of the masticatory muscles

研究代表者

佐藤 淳 (SATO, Jun)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号：60319069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：難治性の慢性口腔顎顔面疼痛の患者数は増加している。その主体は咀嚼筋などの筋痛であることが多い。筋痛は過度な肉体的、精神的ストレスなどで悪化する。本研究では交感神経活動が慢性の咀嚼筋疼痛などに影響するかを臨床的研究および動物実験で検索した。臨床研究からは頸部にソフトレーザーを照射して交感神経活動を抑制することにより咀嚼筋痛の閾値の変化が生じ、痛みを有する患者ほど交感神経の影響が強くなる可能性が示された。動物実験では交感神経切除を行ったウサギでは咀嚼筋の筋線維数の変化や変性が認められ、交感神経活動が咀嚼筋の分化・機能に影響する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The number of the patients with refractory and chronic orofacial pain is increasing. Many sources of the pain are originated from muscle pain. Muscle pain gets worse by excessive physical and mental stresses. The aim of this study is to elucidate the relationships between pain of the masticatory muscles and activities of sympathetic nerve using some clinical and experimental studies. Clinical studies indicated that inhibition of the activity of sympathetic nerve by irradiation with soft laser to cervical region may cause the changes of threshold of muscle pain. The degree of the change was more prominent in patients with muscle pain than the healthy controls. Experimental studies using growing rabbits indicated that enzyme histochemical adaptive responses and morphological changes of the masseter masticatory muscles after sympathectomy of superior cervical ganglion were observed.

研究分野：口腔外科学、口腔内科学一般

キーワード：咀嚼筋 交感神経 副交感神経 口腔顎顔面痛 慢性疼痛 ウサギ

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔顎顔面の慢性疼痛は摂食機能や QOL 自体を低下させ、仕事効率の低下やうつ状態への移行などにつながる。頭頸部の慢性筋痛の生涯有病率は約 80%ともいわれている。筋痛は筋収縮の持続により局所の浮循環不全が生じて、乳酸などの発痛産物が蓄積して生じると考えられていた。しかし最近の知見では、交感神経系が痛覚系を興奮させ交感神経系の機能障害が血流障害を生じるなど、筋痛への交感神経の強い関与が報告されている。これまでに慢性難治性口腔顎顔面疼痛と交感神経系および感覚・運動神経の関係を系統的に解析した研究は少ない。慢性の咀嚼筋障害は小学生～高齢者と幅広い年齢層に発症するが、その遺伝的・環境的要因の関与もわかっていない。

(2) 難治性の口腔顎顔面疼痛の患者数は増加している。特に慢性の咀嚼筋疼痛を訴えることが多い。慢性筋痛は寒冷時や過度なストレス負荷時に増加することが多く、痛みの発症や増悪・持続には感覚神経のみならず交感神経系が深く関与していると考えられるが、その病態・成因解析は十分になされていない。また、日常の診療の中で交感神経活動を簡単にモニターする方法は確立されていない。

(3) 咀嚼筋の形態、機能、分化、成長などを精査するには筋病理検査が必須である。しかしヒトの咀嚼筋を用いての筋病理検査は倫理的に困難である。私たちは以前から顎関節構造および筋線維構成がヒトと類似したウサギを用い、その実験モデルの確立と咀嚼筋の筋病理検査を継続してきた。交感神経系の活動が咀嚼筋の形態、機能、分化などにどのような影響を与えるかは、世界的にもあまりわかっていない。

2. 研究の目的

(1) 口腔顎顔面領域の慢性筋痛（咀嚼筋、頸部の筋）は肉体的・精神的なストレス負荷時に増加することが多く、その痛みの発症や増悪・持続には交感神経系が深く関与していると考えられている。しかしその病態・成因解析は十分になされていない。そこで本研究の目的は、口腔顎顔面疼痛患者における交感神経活動の亢進・抑制時の筋の興奮性・代謝活性の変化を、筋の興奮性の指標となる筋の触診による疼痛閾値の変化などの指標を用いて明らかにすることである。また非侵襲的に繰り返し採取可能である唾液を用いて、唾液中のサイトカイン濃度と交感神経活動の関連についても検討する。

(2) 咀嚼筋の形態、機能、分化を精査するには筋病理検査が必須であるが、ヒトの咀嚼筋の筋病理検査は倫理的に困難である。動物実験として咀嚼筋の形態・機能がヒトに類似しているウサギを用いて、交感神経切除や soft

food diet および寒冷刺激などが咀嚼筋の分化・成長・性質、形態、代謝などに与える影響を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 【動物実験】難治性の慢性口腔顎顔面疼痛の患者は増加傾向にあり、その主体は筋痛であることが多い。まだ解明が不十分である咀嚼筋における交感神経活動や soft food diet と筋線維の分化・代謝活性の関連についてウサギを用いて検索した。

ウサギの交感神経切除モデルの確立：研究分担者の北川は 20 年来、一貫として咀嚼筋の研究を継続して、筋生理学的検査を用いての咀嚼筋の研究では多くの研究実績を挙げている。本研究で使用するウサギの交感神経切除モデルについて、安全に短時間で作成できるように方法論の確立を行う。

成長期のウサギを用いて、交感神経切除術を行い、交感神経系活動が咀嚼筋の成長・分化に与える影響を筋病理組織学的に明らかにする。本研究では成長期のウサギに対して交感神経切除群と交感神経刺激群を設定してそれぞれの咬筋および内側翼突筋・外側翼突筋の筋病理組織学的所見および酵素活性などの変化を明らかにする。これにより咀嚼筋の成長・分化、成長後の変化に対する交感神経系活動の影響を明らかにする。交感神経切除術：生後 3 週齢（離乳期）のウサギの片側の交感神経を切除した (n=6)。一方、交感神経刺激群として寒冷刺激暴露（8 × 60 分 × 2 回/日）を予定した (n=4)。神経切除を行わないコントロール群 (n=4) を設定した。6 か月後に安楽死させて咬筋、側頭筋、内側・外側翼突筋（上頭、下頭）を採取して直ちに急速凍結し -80 以下で保存。クリオスタットで凍結連続切片を作製、actomyosin ATPase、NADH-TR、Gomori-trichrome、HE 染色を施行した。ATPase、NADH-TR 染色に基づき筋線維をタイプ 1, 2A, 2B, 2C に分類した。画像解析装置を用い各筋線維の比率、直径を算出した。

Soft food diet: ウサギ（日本白色種）10 匹を使用した。離乳期 3 週齢より粉末飼料飼育の実験群 5 匹 (soft diet)、固形飼料飼育の対照群 5 匹 (control) とした。24 週齢で、咬筋を採取後直ちに急速凍結し -80 以下で保存。クリオスタットで凍結連続切片を作製、actomyosin ATPase、NADH-TR、Gomori-trichrome、HE 染色を施行した。ATPase、NADH-TR 染色に基づき筋線維をタイプ 1, 2A, 2B, 2C に分類した。画像解析装置を用い各筋線維の比率、直径を算出した。ATPase、NADH-TR 染色により、筋線維をタイプ 1, 2A, 2B, 2C に分類、各筋のタイプ 1 面積率、タイプ別構成比率、筋線維直径を測定した。

(2) 顎顔面疼痛患者の研究：

北海道大学病院歯科診療センターを受診

した慢性の顎顔面疼痛患者および健常ボランティアに対してインフォ・ムド・コンセントを行い、書面で同意が得られた患者に研究に参加してもらった。

対象症例の鑑別：顎顔面診査、X線・MRI検査により器質的疾患患者を除外する。咀嚼筋の圧痛などの局所所見から咀嚼筋障害患者を診断する。

Cold Pressor (CP) 刺激は冷水内に下肢部を一定時間つけることにより全身の交感神経活動を亢進させる。被験者に4×2分間の冷水刺激を右下肢に付与する。刺激前後で血圧、心拍数、SpO₂のモニタ・管理、筋圧計で疼痛閾値を測定するCP刺激下で筋生理学検査を行うことにより筋の興奮性と交感神経系活動の関連を明らかにする。

星状神経節ブロック (SGB) は交感神経活動を抑制することにより難治性の顎顔面疼痛患者への有効性が報告されている。しかしSGBは重篤な合併症もある。星状神経節近傍の低出力レ・ザ・照射が低侵襲でSGBと同様な効果があるとの報告もある。当科では顎顔面疼痛患者に対して年間30例以上のSGBおよびレ・ザ・照射を行っている(図1)。SGB・レ・ザ・照射前後で筋生理学検査を行う。星状神経節へのソフトレ・ザ・照射前後の咬筋部の筋圧の疼痛閾値を比較する。

唾液中のタンパクは交感神経活動に依存して分泌が更新する。CP刺激時、星状神経節近傍レ・ザ・照射試行時の唾液中のサイトカインの測定により交感神経活動の推移をモニタ・する。唾液は10分間の安静後に唾液採取キット (Salivette®) を用いると1分間ほどで採取可能である。



図1 星状神経節へのソフトレ・ザ・照射

4. 研究成果

(1) 動物実験：

ウサギの交感神経切除モデルの確立：研究分担者の北川の所有するウサギに対する麻酔法、顎部手術術式により安全に交感神経切除モデルが確立できた。

交感神経切除による咬筋の筋病理学的変化：顎関節構造および筋線維構成がヒトと類似した成長期のウサギを用い、交感神経切除が咬筋浅層・深層の組織化学的および形態学的特徴に及ぼす影響について検討した。生後3週齢(離乳期)のウサギの片側の交感神経を切除して、6か月後に咀嚼筋を病理組織学的に検討した。10匹のウサギを用いて交感神経切除群：6例、交感神経切除を行わないコントロール群：4例とした。交感神経刺激群

としての寒冷曝露については条件設定が十分でず、ウサギがショックを起こすなど予期せぬ問題が生じて保留となった。交感神経切除後も摂食などへの影響は少なく、体重も両群間で有意な差は生じなかった。咬筋を採取して浅層と深層に分けて凍結連続切片を作製した。咬筋浅層、深層とも交感神経群とコントロール群のタイプ1線維が占める面積率に有意差を認めなかった(浅層:P=0.29, 深層:P=0.83)。咬筋浅層では交感神経切除群でタイプ1線維数がコントロール群と比較して有意に減少していた(P=0.03)(図2)。

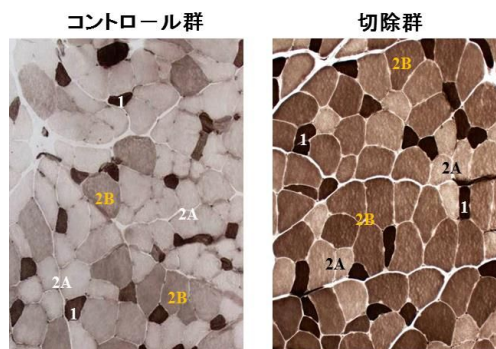


図2 交感神経切除群の咬筋の変化

深層では交感神経切除群ではコントロール群と比較してタイプ2A線維数が有意に減少(P=0.02)していた。またタイプ2B線維数は増加傾向であった(P=0.05)。交感神経切除群とコントロール群の各筋線維の長径に有意差は認めなかった。また交感神経切除群ではNADH-TRの活性低下が観察された。本研究において成長期のウサギの交感神経切除が咬筋の浅層、深層の筋線維Typeの数に変化を及ぼすことが明らかになった。また、咬筋深層においては交感神経切除が筋の代謝活性の低下に繋がる可能性が示された。ウサギの咬筋の浅層、深層の筋線維の走行は個体差もあり、その機能的な意義は明らかではないが、交感神経活動が筋線維の分化および代謝活性に重要な役割を演じている可能性が示された。

交感神経切除による内側翼突筋・外側翼突筋の筋病理学的変化：顎関節構造および筋線維構成がヒトと類似した成長期のウサギを用い、交感神経切除が咬筋以外の内側翼突筋・外側翼突筋などの組織化学的および形態学的特徴に及ぼす影響について検討した。同様に生後3週齢(離乳期)のウサギの片側の交感神経を切除して、6か月後に咀嚼筋を病理組織学的に検討した。10匹のウサギを用いて交感神経切除群：6例、交感神経切除を行わないコントロール群：4例とした。内側翼突筋および外側翼突筋を採取した。平成27年度には再度標本を作製して再評価した。閉口筋である内側翼突筋は咬筋と同様の変化を示したが、外側翼突筋では上頭、下頭でそれぞれ異なった結果を示し解釈に課題が残った(図3)。

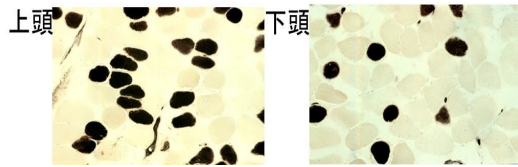


図3 外側翼突筋の上頭・下頭の組織像

実験群において、筋線維の大小不同、opaque線維の出現といった変化が認められた。閉口筋である咬筋および内側翼突筋に順応性変化が起こった可能性が考えられた。一方、外側翼突筋の機能がこれらの筋とは異なるために、閉口筋とは異なった順応性変化を生じたと考えられた。

Soft food diet による咬筋の筋病理変化：成長期のウサギを用いて持続的な soft food diet が咬筋の分化、形態に及ぼす影響を検索した。ATPase, NADH-TR 染色により、筋線維をタイプ 1, 2A, 2B, 2C に分類、各筋のタイプ 1 面積率、タイプ別構成比率、筋線維直径を測定した。soft food diet 群では control 群に比較してタイプ 1 およびタイプ 2B 面積率が低下する傾向を示した。Soft food diet により強い咀嚼力や咀嚼の持続が不要となり、閉口筋である咬筋に順応性変化が起こった可能性が考えられた。

(2) 顎顔面疼痛患者の研究：

咀嚼筋の臨床的研究：慢性の顎顔面疼痛を有する患者のうち非定型歯痛と診断された 22 例に関して臨床的研究を行った。交感神経ブロックに類似した効果を有するといわれる顎部の星状神経節に対するソフトレ - ザ - 照射を複数回行ったが疼痛軽減の有意な結果は認められなかった。これらの患者に対しては、抗うつ剤や抗不安薬などの薬物療が最終的には効果が認められることがわかった。また健常ボランティア 6 例に対して寒冷刺激前後と顎部星状神経節ソフトレ - ザ - 照射前後の咀嚼筋圧痛の程度を比較した。寒冷刺激群では圧痛閾値が低下していた ($P=0.045$)。平成 26 - 27 年にかけて慢性口腔顎顔面疼痛患者の臨床研究：症例の追加は 5 例になった。星状神経節に対するソフトレ - ザ - 照射前後の血圧、脈拍を測定した。コントロール群に比較した患者群ではレ - ザ - 照射後の血圧、脈拍の低下率が多い傾向にあったが有意差はなかった ($P=0.12$)。慢性疼痛患者における交感神経亢進状態が示唆された。しかしソフトレ - ザ - 照射後も咀嚼筋圧痛の閾値に変化は乏しく、リアルタイムでの交感神経活動の評価方法の問題が残った。本研究期間は平成 27 年度で終了であるが、引き続き平成 28 年度以降は客観的な交感神経・副交感神経活動の評価方法を導入して改善する予定である

寒冷刺激前後の唾液中の炎症性サイトカイン濃度：健常ボランティア 5 名に対して寒冷刺激を与え、その前後の唾液を採取して交

感神経活動と唾液中の炎症性サイトカイン濃度の関連を調べた。唾液中の IL-6 濃度の中央値は刺激前：0.3 pg/ml、刺激後：0.5 pg/ml であった。健常者であったことが原因と思われるが、唾液中のサイトカイン濃度は低くなり、刺激前後の濃度に有意差は認めなかった ($P>0.99$)。また、TNF- については全例で検出限界以下で比較ができなかった。唾液は非侵襲的に繰り返し外来診療室で採取できる有用な検体である。交感神経活動の変化にリアルタイムに関連するタ - ゲットの同定や、その測定方法などについては今後の研究の課題となった。

<引用文献>

Kitagawa Y, Sato J, Kuriyama M, Sano K, Hashimoto K. Ring fibers visualized by electron microscopy in a Japanese patient with malignant hyperthermia. *Odontology*, 2011; 99: 101-4.

Pal-Silva MD, Ueda AK, et al. Morphological aspects of rabbit masseter muscle after cervical sympathectomy. *Int. J. Pathol* 2001; 82: 123-8.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Sato J, Ohuchi M, Wada M, Ohga N, Asaka T, Yoshikawa K, Miyakoshi M, Hata H, Satoh A, Kitagawa Y. Differences in sequential post-treatment salivary IL-6 levels between patients with and without locoregional recurrences of oral squamous cell carcinoma: part III of a cohort study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 査読有 2015, 120: 751-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oooo.2015.08.016>

Sato J, Kitagawa Y, Yamazaki Y, Hata H, Asaka T, Miyakoshi M, Okamoto S, Shiga T, Shindoh M, Kuge Y, Tamaki N. Advantage of FMI50-PET over FDG-PET for predicting histological response to preoperative chemotherapy in patients with oral squamous cell carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 査読有 2014; 41 (11): 2031-41. DOI 10.1007/s00259-014-2810-y

Kitagawa Y, Sato J, Ogasawara T, Nojyo Y, Enomoto S, Sabo K. Enzyme histochemical adaptive response of the medial pterygoid muscle and two heads of the lateral pterygoid muscle to long-term soft diet feeding in growing rabbits. *Odontology*. 査読有 2014; 102: 272-8. DOI 10.1007/s10266-013-0127-0

Sato J, Ohuchi M, Abe K, Satoh T, Abe

T, Yamazaki Y, Satoh A, Notani K, Kitagawa Y. Correlation between salivary interleukin-6 levels and early locoregional recurrence in patients with oral squamous cell carcinoma: Preliminary study. Head & Neck 査読有 2013, 35(6), 889-94.
DOI 10.1002/hed.23056

〔学会発表〕(計5件)

佐藤 淳、小笠原利行、佐野和生、北川善政。上顎神経節切除の動物モデルの確立とウサギの咬筋の組織学変化。第28回日本顎関節学会学術大会。2015年7月4日「名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)」。

Sato J, Kitagawa Y, Watanabe S, Asaka T, Ohga N, Miyakoshi M, Hata H, Okamoto S, Shiga T, Shindoh M, Tamaki N. FMISO-PET reflects not only hypoxia but also cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. 第22回国際口腔外科学会(ICOM 2015, International Conference of Oral and Maxillofacial Surgery)。2015年10月29日「メルボルン(オーストラリア)」。

佐藤 淳、大内 学、浅香卓哉、吉川和人、大賀則孝、秦 浩信、佐藤千晴、佐藤 明、北川善政。口腔扁平上皮癌患者の治療後の唾液中のIL-6濃度のモニタリングは局所再発の予測に有用である。第68回日本口腔科学会。2014年5月9日「京王プラザホテル(東京都・新宿区)」。

佐藤 淳、小笠原利行、佐野和生、北川善政。交感神経切除が成長期のウサギの咬筋におよぼす影響について。第27回日本顎関節学会。2014年7月20日「九州大学医学部百年講堂(福岡県・福岡市)」。

Sato J, Yamazaki Y, Satoh A, Notani K, Kitagawa Y. Continued monitoring of salivary interleukin-6 levels may predict early and late locoregional recurrence in patients with oral squamous cell carcinoma. 第21回国際口腔外科学会(ICOM 2013)。2013年10月、「バルセロナ(スペイン)」。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 淳 (SATO, Jun)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・講師
研究者番号: 60319069

(2) 研究分担者

北川 善政 (KITAGAWA, Yoshimasa)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・教授
研究者番号: 00224957

山崎 裕 (YAMAZAKI, Yutaka)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・教授
研究者番号: 90250464