

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861758

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛緩和に対する低侵襲治療法の確立

研究課題名(英文) Establish of minimally invasive treatment method for neuropathic pain relief

研究代表者

大郷 英里奈 (DAIGO, Erina)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50707073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：低出力レベルレーザー治療(以下、LLLT)には疼痛緩和効果があると報告されている。神経障害性疼痛を生じた下歯槽神経損傷モデルラット(以下、損傷ラット)を用いて半導体レーザーによる LLLTの有効性を行動学および神経障害性疼痛の発症に重要な役割を担うグリア細胞の発現を免疫組織学的に検証した。行動学的検討では損傷ラットの疼痛閾値の低下を認めたのに対して、LLLTを施した損傷ラットでは閾値の低下は認められなかった。免疫組織学的検討では損傷ラットと比較してLLLTを施した損傷ラットにおいてグリア細胞の発現増加が認められた。以上よりLLLTは神経障害性疼痛に対して疼痛緩和効果がある可能性を認めた。

研究成果の概要(英文)：Low level laser treatment (LLLT) has been reported to have pain relief effect. Using inferior alveolar nerve injury in the rat (IANT) which developed neuropathic pain, this study verified the effectiveness of LLLT with semiconductor laser behaviorally and the expression of glial cells which play an important role in the onset of neuropathic pain immunohistologically. At the behavioral verification examination, the reduced of pain threshold was overserved in IANT, while the same trend wasn't observed in LLLT-treated IANT. On the other hand, at the immunohistological examination, the expression of the cells were recognized to have increased in LLLT-treated IANT compared to IANT. From the above, it was concluded LLLT may have pain relief effect for neuropathic pain.

研究分野：歯科麻酔

キーワード：神経障害性疼痛 半導体レーザー 低出力レベルレーザー治療 疼痛緩和効果

### 1. 研究開始当初の背景

外傷や手術により神経の損傷を引き起こすと神経障害性疼痛 (neuropathic pain) を生じることがある。口腔領域においても抜歯や抜髄処置、インプラント手術、伝達麻酔などにより生じることがある。神経障害性疼痛とは、持続的または間欠的な自発痛や痛覚過敏、さらに非常に微弱な機械的刺激でも激痛を生じるアロディニアといった特徴的な難治性の疼痛症状を呈し、患者の QOL を低下させる。

現在では、これらの治療として神経ブロック療法や三環系抗うつ薬を代表とする薬物療法が行われているが、いずれも治療抵抗性が高く、加えて悪心やふらつき等の高い侵襲度、副作用の点で問題がある。このことから副作用のほとんどない低侵襲性の治療法の確立が望まれる。

近年、この難治性の神経障害性疼痛の緩和を目的とした治療法として注目されているのがレーザー治療法である。

### 2. 研究の目的

レーザー治療法には高出力レベルレーザー治療 (High reactive-Level Laser Treatment) と低出力レベルレーザー治療 (Low reactive-Level Laser Treatment ; 以下 LLLT とする) の 2 つがある。特に LLLT には光生物学的および光化学的効果により組織の賦活化を期待した消炎・創傷治癒促進作用と疼痛緩和作用があるという。このうち疼痛緩和作用のメカニズムには神経の伝導抑制や血管拡張による血流の改善などの生理作用が報告されている。神経障害性疼痛を模倣した坐骨神経損傷モデルラットの研究報告では LLLT により感覚異常時に過剰に出現する炎症性サイトカイン分泌が抑制され、足底の痛覚閾値が緩和したという。他にも抗炎症性サイトカインによる炎症症状抑制が痛覚過敏を抑制するという報告もあるが、これらがレーザー照射によりどのような変化を示すかは不明である。

また近年では、神経を損傷した際、即座に神経損傷機構として働くミクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞の関与が指摘されているが、LLLT 照射による中枢神経系におけるグリア細胞の動態も未知数である。

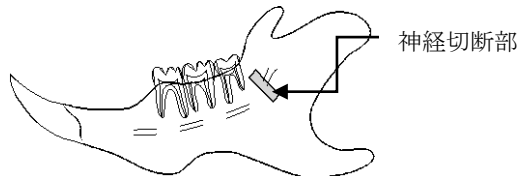
本研究では、下歯槽神経を切断した神経障害性疼痛モデルラットを作製し、レーザー光に対して組織の不可逆的变化を生じさせない LLLT の照射条件を設定する。その後、作製したラットの損傷部位に LLLT を施行した後、①行動学的解析による疼痛閾値の変化の観察、②損傷させた下歯槽神経を含んだ上位中枢部の三叉神経節および脳幹部 (三叉神経脊髄路核) を摘出し神経障害性疼痛に関与するグリア細胞の活性化および発現量の検討を行うために免疫組織学的変化の解析を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### [実験動物]

生後 6 週齢の SD 系雄性ラット (体重 150 ~ 250 g) を用いた。

飼育環境は 1 ゲージに 3 匹ずつ飼育し、固形飼料と飲料水 (水道水) を自由に摂取させた。飼育室は 24±2 度、湿度 50±5% に維持し、12 時間毎に明暗サイクルを繰り返した。  
[下歯槽神経損傷モデルラットの作製]



咬筋上皮より骨膜に達するように切開・剥離後、下顎孔から約 2mm の下顎管をマイクロモーターにて削合し、下歯槽神経を露出させる。その後、セーレにて神経を切断 (神経再生しないように神経切断端は 1mm の間隙をあける) し、切開部を縫合して閉創した。

これと同時に、手術の影響による神経障害を否定するために、下歯槽神経の切断は行わず、神経を露出させたのみで閉創を行った疑似手術も作製した。

#### [使用したレーザー装置]

波長 940nm の半導体レーザー iLase (Biolase 社製、米国)



#### [照射条件の設定]

- ・設定出力 ; 0.3W、
- ・CP1 モード (ゲーテッドパルス波、0.1 msecON→0.2msecOFF の 1 サイクル、平均出力 0.1W)、
- ・照射時間 ; 36 秒間
- ・照射距離 ; 患部から 1 mm 離れた距離
- ・総照射エネルギー量 ; 9J/cm<sup>2</sup>

上記の照射条件は予備実験および類似研究論文を参考にし、施術相当部皮膚上に LLLT を想定したレーザー照射を行った。

その 6 時間後に照射部皮膚上をカメラにて撮影し肉眼的に器質的变化 (上皮組織の蒸散や炭化層など) がないことを確認し、さらに同部の病理組織学的標本作製し同様の器質的变化 (上皮組織の融解、水疱形成、組織の実質欠損など) も認めないことを確認し設定した。\*詳細は省略とする。

#### [実験群]

以下の 3 群とした。

- ・疑似手術を行った群 (以下、Sham 群)
  - コントロールとして
- ・下歯槽神経損傷のみを行った群 (以下、Ope 群)
- ・下歯槽神経損傷+LLLT を行った群 (以下、Ope-Laser 群)

[使用した実験動物数]

- ・行動学的解析には各群ともに6匹ずつの合計18匹を使用した。
- ・免疫組織学的解析には各群ともに術後3および7日目各6匹ずつの合計36匹を使用した。

[実験方法]

下歯槽神経切断後または疑似手術後から7日目まで毎日、レーザー照射を行う。

- \*但し、免疫組織学的解析における術後3日目のラットに関しては、その時点までの照射とした。

1) 行動学的解析;

下歯槽神経損傷させる術前、術後1、3、5、7、14および21日目を対象に行った。Von Frey Filament (写真) (Bioseb 社製, USA) を用いて、損傷部周囲皮膚の感覚閾値を計測する。



◀実験に使用した Von Frey Filament

\*各ラットの痛覚に対する個体差を排除するために、損傷前と損傷後の閾値の相対値を数値化している。

2) 免疫組織学的解析;

下歯槽神経損傷をさせた術後3および7日目を対象に行った。

各群抜歯後3および7日目のラットをペントバルビタール麻酔薬による全身麻酔下にて、左心室より4%パラホルムアルデヒド溶液で10分程度の還流固定を行い、脳幹部を摘出後、同溶液にて48時間浸漬固定を行った。固定およびスクロース浸漬後、冷却したヘキササン中で急速凍結し、OCTコンパウンドで凍結包埋した。

凍結包埋ブロックをクライオスタットにより厚さ5μmの脳幹部三叉神経脊髄路核部の水平断連続凍結切片を作製した(模式図)。同切片を神経障害性疼痛に関与するグリア細胞のマーカーであるIba1(グリア細胞の1つであるミクログリアのマーカー)、GFAP(グリア細胞の1つであるアストロサイトのマーカー)の免疫染色を行った。

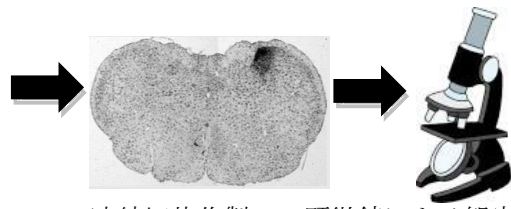
病理組織標本の観察および解析にはデジタルマイクロスコープ(KEYENCE社製、大阪)を用いて病理標本をスキャンし、ソフトウェア(NIHImage)を用いて行った。



施術部にレーザー照射



組織の摘出



凍結切片作製 顕微鏡による観察

組織学的計測は神経切断後のミクログリア、アストロサイトの形態変化と発現数をSham群、Ope群およびOpe+Laser群の3群間で比較検討した。

=Iba1およびGFAP発現領域と計測部位=

摘出した脳幹部のObex高さでの水平断連続切片上(組織図)の三叉神経脊髄路核部(四角で囲んだ部分)の各染色による細胞発現が最も確認できるところを中心に計測を行った。



統計学的解析には各群間はone-way ANOVA分析により統計処理を行った。群間内の比較にはPost hoc testとしてFisher検定を用いた。p ≤ 0.05を有意差ありとした。

尚、本研究のプロトコルは大阪歯科大学動物実験指針に基づき、動物実験委員会の承認を得て行った。(承認番号16-04008)

4. 研究成果

[行動学的解析]

この実験は神経障害性疼痛に対してレーザー照射による疼痛緩和効果を検証するために行った。

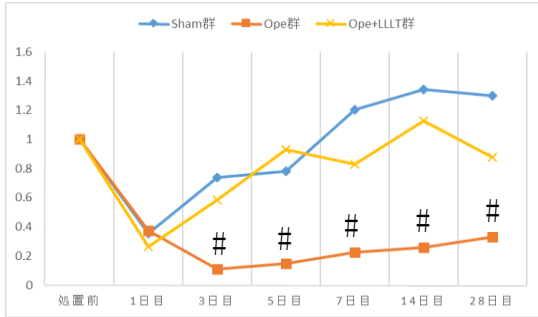
まず、処置前(この時期では処置予定部)の皮膚にVon Frey Filamentを用いて刺激を与え、その時の疼痛閾値を計測する。次に処置後に損傷部周囲皮膚に対して同様の刺激を与えて計測を行う。計測により得た数値をそれぞれ(処置後の疼痛閾値) / (処置前の疼痛閾値)として算出することでラット1匹ごとの疼痛に対する個体差を排除することができ、相対的な疼痛閾値の表示が可能となる。

グラフの数値は各群6匹の数値を平均したものをその群の閾値とした。

処置後1日目;3群間すべてにおいて、処置に伴う切開により損傷部皮膚の疼痛が強くなり現れていると考えられる。そのためFilamentによる刺激に対してかなり敏感に反応した。刺激に対する有意な差は認めなかった。

処置後3日目;Sham群では神経損傷がないため、疼痛閾値は上昇した。一方、Ope群では神経損傷によるアロディニア(非常に微弱な機械的刺激でも激痛を生じる現象)を生じたと考えられ、処置後1日目よりも顕著に





▲ 神経損傷周囲皮膚の疼痛閾値の変化  
 縦軸；処置前の疼痛閾値に対する処置後の疼痛閾値の相対値  
 横軸；処置後の経過日数  
 # ; p ≤ 0.05 VS Ope+Laser 群

疼痛閾値の低下を認めた。しかし、Ope+Laser 群では神経損傷があるにもかかわらず疼痛閾値は Sham 群と同程度まで上昇している。

処置後 5 日目～28 日目；Sham 群では徐々に疼痛閾値が上昇し、7 日目以降では処置前の閾値を上回った。これと同様に Ope+Laser 群でも多少不安定なところはあるものの、継続的に疼痛閾値の上昇を認めた。しかし Ope 群は継続的に疼痛閾値の僅かな上昇を呈するがアロディニアの状態が続いている。

処置後 3 日目以降では Sham 群および Ope+LLLT 群と比較して Ope 群では有意な疼痛閾値の低下を呈した。

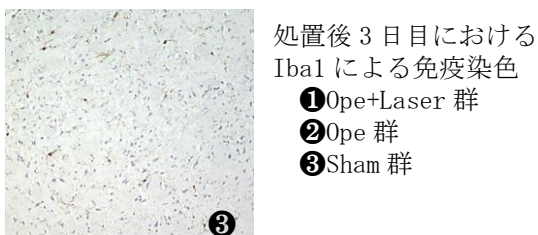
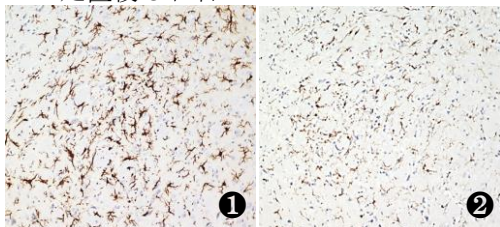
[免疫組織学的解析]

この解析は神経障害性疼痛に罹患した際、中枢神経系において即座に神経損傷機構として働くグリア細胞のミクログリア (Iba1 による免疫染色) とアストロサイト (GFAP による免疫染色) の発現状態や活性化状態 (細胞の肥大化や神経脚等の形態変化と呈する) を検証するために行った。

グリア細胞は神経損傷の初期には疼痛を引き起こす原因となるが、その後は神経線維修復に関与すると報告されている。

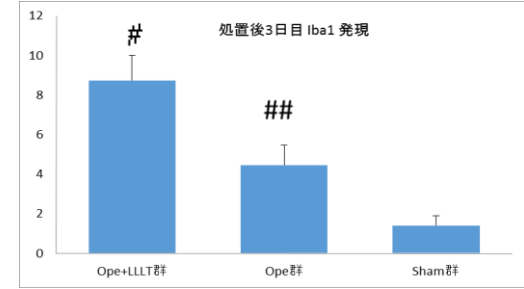
計測は「3. 研究の方法」の「Iba1 および GFAP 発現領域と計測部位」を参照。

= 処置後 3 日目 =



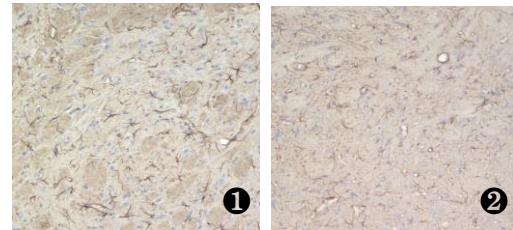
処置後 3 日目における Iba1 による免疫染色  
 ① Ope+Laser 群  
 ② Ope 群  
 ③ Sham 群

Iba1 について、Sham 群では細胞の発現量は  $1.407 \pm 0.499$  であるのに対し、Ope 群では  $4.460 \pm 1.004$  と有意に増加した。さらにミクログリアは肥大化し神経脚も伸びていた。それ以上に Ope+Laser 群において Ope 群と比較



▲ 処置後 3 日目における Iba1 の発現  
 縦軸；単位面積当たりの Iba1 染色面積  
 横軸；実験群  
 # ; p ≤ 0.05 VS Ope 群、Sham 群  
 # # ; p ≤ 0.05 VS Sham 群

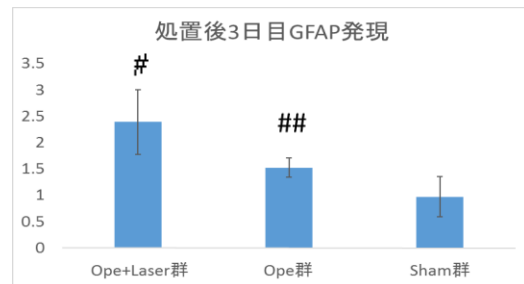
して  $8.730 \pm 1.269$  の発現量と増加し、更に細胞の肥大化と神経脚の伸展を認めた。



処置後 3 日目における GFAP による免疫染色

- ① Ope+Laser 群
- ② Ope 群
- ③ Sham 群

GFAP について、Sham 群は  $0.968 \pm 0.384$  に対して Ope 群では  $1.521 \pm 0.181$  と有意に増加している。細胞の形態的にも肥大化し神経脚も伸展していた。それ以上に Ope+Laser 群でも  $2.388 \pm 0.618$  と程度の発現を呈し、細胞の形態変化はさらに顕著であった。発現量よりは少ないが、Iba1 と同様の発現傾向を示した。



▲ 処置後 3 日目における GFAP の発現  
 縦軸；単位面積当たりの GFAP 染色面積  
 横軸；実験群  
 # ; p ≤ 0.05 VS Ope 群、Sham 群  
 # # ; p ≤ 0.05 VS Sham 群

=処置後 7 日目=

Iba1 および GFAP の発現量および細胞の形態的变化については処置後 3 日目と同じ傾向を示した（組織像、発現量に関するグラフは省略とする）。

[まとめ]

神経障害性疼痛においてレーザーの LLLT 照射により、行動学的には疼痛閾値の上昇を認めたことでアロディニアの状態、つまり慢性疼痛がかなり軽減させることができる可能性があり、また免疫学的解析においても神経損傷の早期の段階で、三叉神経脊髄路核において神経修復に関与するミクログリアやアストロサイト等のグリア細胞の反応が活発となり、細胞の肥大化や発現量の増加を認めた。

以上より、神経障害性疼痛に対するレーザー照射はグリア細胞の神経修復に関与する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 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

### ①大郷英里奈、大郷友規

- ・ 神経障害性疼痛に対する低反応レベルレーザー照射による中枢神経系への反応
- ・ 第 46 回日本慢性疼痛学会
- ・ 2017 年 2 月 17 日 稲森記念会館  
（京都府京都市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大郷 英里奈 (DAIGO, Erina)  
大阪歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：50707073