

Title	慢性口腔顔面痛モデルを用いた片頭痛の増悪因子とし ての三叉神経系感作の解明
Author(s)	遠山, 緑
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52334
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

# 学位論文

慢性口腔顔面痛モデルラットを用いた片頭痛の増悪因子としての

三叉神経系感作の解明

大阪大学大学院歯学研究科

統合機能口腔科学専攻 顎口腔先端麻酔学(歯科麻酔学教室)

遠山 緑

片頭痛は、人口の10%近くが罹患する疾患である。特徴としては、片側性、拍動性の激 烈な発作で、月に数回の発作時には日常生活の継続が困難となるほどであるため、患者の Quality of life は著しく阻害される。発作の前兆として、閃輝暗点などの視覚異常、四肢脱 力、頭部から上肢にかけてのアロディニア、生あくびなどの随伴症状が認められることが 多い。

片頭痛の発症メカニズムについては、三叉神経血管説が最も有力なメカニズムとして考 えられているが、いまだ完全に解明されていないのが現状である。三叉神経血管説では、 何らかの刺激により硬膜血管周囲の三叉神経終末が刺激され、神経終末から substance P、 CGRP (calcitonin gene related peptide) などの神経伝達物質が放出されることで、硬膜 に神経原性炎症と血管拡張が起こる。この末梢の反応により、さらに三叉神経の興奮が増 強し、順行性伝導することで、視床そして大脳皮質に伝達され、頭痛が発症すると考えら れている (Moskowitz MA, 1984)。

現在、片頭痛発作の前兆としての頭部皮膚のアロディニアが、治療薬であるトリプタン 製剤の早期服薬の指標とされている(清水,2005)。また、片頭痛発作時には、患者の79% で頭部や前腕部の痛覚閾値が低下し、アロディニアが惹起されるという報告(Burstein R et al.,2000)や、片頭痛の罹患期間が長ければ長いほど、発作が高頻度であればあるほど、三 叉神経系の中枢性感作による頭頸部や四肢のアロディニアが合併しやすくなるという報告 (Mathew NT et al.,2004)がある。さらに、アロディニアの発生、つまり三叉神経血管系 の興奮が頻回になると、疼痛調節系の変調や感覚系ニューロンの障害を引き起こし、片頭 痛を慢性化させるという報告(Louter MA et al.,2013)もある。すなわち、片頭痛発作の たびに三叉神経系が感作され続けることにより、片頭痛の病態を悪化させるという悪循環 を引き起こすと考えられている。

また、片頭痛は三叉神経第一枝領域だけでなく、第二枝や第三枝領域の口腔顔面痛とも

1

密接な関連をもち、歯科臨床において鑑別診断が求められる代表的疾患である(和嶋,2005)。 例えば、片頭痛が原因で非歯原性歯痛が生じるという報告(Namazi MR, 2001)や、片頭 痛の一種として三叉神経第二、三枝に限局して生じる「顔面片頭痛(Facial migraine)」と いう病態が報告(Pinto A et al., 2009)されている。以上より、片頭痛の病態には三叉神経 第一枝だけでなく第二枝や第三枝の興奮や感作が大きく関与していることが推測される。

神経障害性疼痛モデルの一つである慢性絞扼神経損傷(chronic constriction injury: CCI) モデルは、機械刺激に対してアロディニアを示すことが報告されている(Vos BP et al., 1994)。アロディニアの発症メカニズムは、強い持続的な炎症や神経損傷後、その末梢部位 における Nerve growth factor (NGF)の産生増加、TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1)受容体の活性化亢進、脊髄後角のシナプス部位におけるミクログリア細胞の活 性化、NMDA 受容体の活性化亢進などの可塑的変化が惹起されて、その支配神経に末梢性 感作と中枢性感作が誘導される結果、神経の興奮性が増強され、アロディニアが確立する と考えられている(Woolf CJ and Thompson SW., 1991; Woolf CJ et al., 1994; Tsuda M et al., 2003; Basbaum AI et al., 2009)。

そこで、本研究では、片頭痛の増悪因子における三叉神経系感作の役割を明らかにする ことを目的として、片頭痛誘発動物モデルに対し、三叉神経第二枝の慢性絞扼神経損傷に よる三叉神経の感作が、片頭痛発作にどのような影響を与えるかについて検討した。

 $\mathbf{2}$ 

### 実験方法

実験動物に対する苦痛および使用動物数は最小限に留めるように努力した。当研究計画 は、NIH の実験動物の飼育と取扱いのガイドラインに沿ったものであり、大阪大学大学院 歯学研究科動物実験委員会の審査を受け、承認を得た(No.24-014, No.26-018)。

1、慢性口腔顔面痛(神経障害性疼痛)モデルラットの作製

実験には、6 週齢の雄性 Sprague Dawley ラット(体重 250-300 g)(日本チャールズリ バー、横浜、日本)を用いた。

慢性口腔顔面痛(神経障害性疼痛)モデルの作製は Vos (Vos BP et al., 1994)、Henry (Henry MA et al., 2007)らの方法を参考にして行った。ラットにペントバルビタール (ソ ムノペンチル®、共立製薬、東京、日本) 50 mg/kg の腹腔内投与により全身麻酔を行い、 右側 whisker pad 皮下に 1 %キシロカイン (アストラゼネカ、大阪、日本) で局所麻酔を 行った。同部位の端に 5 mm の切開をいれ、筋組織等をよけて右側眼窩下神経 (infraorbital nerve: ION)を露出させた。黒ナイロン糸 (4-0)を神経の下に通し、2 mm 間隔をあけ、 2 か所を緩やかに結紮し、閉創した。反対側は無処置とした。対照として、右側眼窩下神経 の剖出のみ行い閉創したラットを Sham 群とした。

2、機械刺激に対する逃避閾値の測定(von Frey test)

ラットを 20 cm 四方の箱の上で 10 分間放置し、環境に馴化させた。その後、0.6、1、2、 4、8、15、26 g の von Frey filament (室町機械、東京、日本)を用いて、結紮側の whisker pad の中央部に機械刺激を与え、ラットが 5 回の刺激中 3 回以上逃避行動を示す von Frey filament の最小値を逃避閾値として記録した。測定はまず眼窩下神経結紮 (chronic constriction injury to rat's infraorbital nerve: CCI-ION)前に行い、26 g 以下で反応する ものは本実験より除外した。それ以外のラットには、結紮手術あるいは模擬手術を行い、 結紮後7日、14日、21日目に von Frey test を行った。

CCI-ION を行ったラットのうち、結紮後 21 日目の逃避閾値が結紮直前の逃避閾値より 低下(15 g以下)したラットを慢性口腔顔面痛(神経障害性疼痛)発症とし、以下の実験 に用いた。測定値が 26 gより低下しなかったラットは本実験から除外した。

### 3、片頭痛モデルラットの作製と行動観察

結紮後 14 日目に、ペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内投与によりラットに全身麻酔 を行い、脳定位固定装置(ナリシゲ、東京、日本)に固定した。頭部正中皮下に1%キシロ カインで局所麻酔を行い、頭皮を正中切開し、頭蓋骨を露出させた。ラウンドバーにて右 側頭蓋骨の一部を除去して、右側横行静脈洞上の硬膜を露出させ、カニューレを硬膜の表 面に当たるように植立し、頭蓋骨に歯科用レジンにて固定した。結紮後 21 日目(カニュー レ植立後 7 日目)に、カニューレより 10 mM カプサイシン (Cap) 20 µl をマイクロシリ ンジを用いて硬膜上に注入した。10 mM カプサイシン溶液は、カプサイシン (3.1 mg、和 光純薬工業、大阪、日本)を 100 %エタノール (65.2 µl、和光純薬工業)に溶解後、Tween-80 (65.6 µl, polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate,和光純薬工業)を加えて、生理的食 塩水 (871.8 µl) で希釈して作成した。また 100 %エタノール、Tween-80 および生理的食 塩水を混合した溶液を Vehicle (Vehi)として用いた(志賀, 2011)。

行動観察は、結紮後21日目(カニューレ植立後7日目)に、ラットを無作為に以下の4 群に分けて比較検討した。

(1) Sham+Vehi 群: Sham ラットに Vehicle をカニューレより投与した群 (n=8)

(2) CCI-ION+Vehi 群: CCI-ION ラットに Vehicle をカニューレより投与した群 (n=5)

(3) Sham+Cap 群: Sham ラットにカプサイシンをカニューレより投与した群 (n=14)
(4) CCI-ION+Cap 群: CCI-ION ラットにカプサイシンをカニューレより投与した群 (n=13)
実験は 9:00 から 16:00 までの間に行った。ラットを観察用ケージに入れ、カニューレ

より 10 mM カプサイシンもしくは Vehicle をマイクロシリンジを用いて 20 µl 投与した。 その後、ビデオカメラにて行動を 30 分間撮影した。この間に、(1) Immobilization (不動 化):休息を含む全く動かない状態、(2) Exploration (探索行動):歩行、起立、におい かぎ行動、(3) Face Grooming (顔面領域の毛づくろい):前足での顔面領域の毛づくろい 行動、を観察し、それぞれの行動の合計持続時間を計測した。

4、片頭痛モデルラットの作製と免疫組織化学的検討

結紮後 21 日目に、ペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内投与によりラットに全身麻酔 を行い、脳定位固定装置に固定した。頭部正中皮下に 1 %キシロカインで局所麻酔を行い、 頭皮を正中切開し、頭蓋骨を露出させた。ラウンドバーにてラットの右側頭蓋骨の一部を 除去して、右側横行静脈洞上の硬膜を直径 3 mm 露出させた。2 時間後、硬膜上に 10 mM カプサイシンあるいは Vehicle を浸した綿球を留置し、その 4 分後に、ペントバルビタール の腹腔内過量投与下にて、0.01 M リン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH7.4)で脱血し、4 %パ ラホルムアルデヒドを含む PBS を用いて灌流固定を行った。灌流固定終了後、右側三叉神 経節 (TG)、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) および上部頸髄 (C1-C2) を摘出し、4 ℃ で同固定液に浸漬して後固定したのち、30 %スクロース溶液に移し換え、4 ℃で保存した。

(1) ABC 法

灌流したラットの TG、Vc および C1-C2 において、phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK)の免疫組織化学的染色を行った。

クライオスタット(Leica CM3050 S, Leica, Wetzlar, Germany)を用いて、TGから厚 さ 10 μmの連続凍結水平断切片を作製し、スライドに貼り付けた。スライドに貼り付けた 切片は 0.3 %過酸化水素水を含むメタノールで内因性ペルオキシダーゼを不活性化した後、 1 %正常ヤギ血清(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)でブロッキングを行い、 一次抗体であるウサギ抗 pERK 抗体(phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2), 1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) で 24 時間インキュベートした。切片を PBS で洗浄後、二次抗体であるビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(Vector Laboratories)で 1 時間インキュベートし、その後、アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合液(Vector Laboratories)で 1 時間インキュベートした。ペルオキシダーゼ活性を可視化するため、切 片を 0.05 %ジアミノベンチジンテトラハイドロクロライド(DAB)、0.1 %硫酸ニッケルア ンモニウムおよび 0.01 %過酸化水素水を含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液(pH7.2)(Vector Laboratories)で処理した。その後、アルコール脱水し、パーマウント(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)で封入した。

ミクロトーム(リトラトーム REM-710、大和光機工業、埼玉、日本)にて、Vc、C1-C2 から厚さ 40 μmの連続凍結横断切片を作製した。3 切片おきに1切片を取り出して、浮遊 切片とし、TGの場合と同様にABC法による DAB 染色を行った。その後、ゼラチン被覆 スライドにマウントして、アルコール脱水し、パーマウントで封入した。

抗体の特異性は、吸収抗体を用いた場合と一次抗体を適用しない場合において標識が陰性であることにより確認した。

ABC 法により免疫染色した TG、Vc および C1-C2 は光学顕微鏡(OLYMPUS BX 51, OLYMPUS, 東京, 日本)にて詳細に観察した。TG の抗 pERK 抗体陽性細胞発現は、10 校ごとに 1 切片を抽出し、200 倍率の条件で 1 視野あたりの全細胞数が約 60 個である部位 を 1 切片から 3 か所選択して、全細胞数における抗 pERK 抗体陽性細胞数の割合を算出し た。Vc、C1-C2 の抗 pERK 抗体陽性細胞発現は、Obex(最後野の上端)から 6480 µm 尾 側の間で、6 枚ごとに 1 切片を抽出し、切片上に認められた抗 pERK 抗体陽性細胞数をカ ウントして、算出した。

(2) 蛍光二重染色

灌流したラットの TG から ABC 法の場合と同様に切片を作製した。10%正常ヤギ血清で ブロッキングを行い、一次抗体であるウサギ抗 pERK 抗体(1:1000, Cell Signaling Technology) とニューロンのマーカーであるマウス抗 NeuN 抗体(1:1000, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) で 24 時間インキュベートした。切片を PBS で洗浄後、二次抗体で ある Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG と Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG(1:400, Invitrogen, Carsbad, CA, USA) にて 2 時間インキュベートし、その後、Fluoromount

(Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA) を用いて封入した。

蛍光二重染色をした TG は共焦点レーザー顕微鏡 (Axio Imager 2, ZEISS, Jena, Germany) を用いて詳細に観察した。

5、統計学的解析

結果は平均値±標準偏差として表した。

機械刺激に対する逃避閾値の変化(von Frey test)に対する統計学的解析において、経時的変化の差の検定は反復測定一元配置分散分析(post hoc Tukey-Kramer test)を用いて解析した。また、各測定日における2群の統計学的比較にはStudent's t-test を用いて解析した。危険率は p<0.05 で有意差ありとした。

行動評価、抗 pERK 抗体陽性細胞数および抗 pERK 抗体陽性細胞数の割合に対する統計 学的解析には、一元配置分散分析 (post hoc Tukey-Kramer test)を用いた。危険率は p<0.05 で有意差ありとした。

7

#### 結果

 CCI-ION モデルラットの機械刺激に対する逃避閾値の変化(von Frey test)(Fig.1)
 本実験において、CCI-ION (n=121)によるアロディニア発症率は 34.7 %であった。(ア ロディニア発症群: n=42)

CCI-ION モデルラットは結紮前と比較して、結紮後7日、14日、21日目において、機 械刺激に対する逃避閾値が有意に低下した。また、CCI-ION モデルラットの逃避閾値は、 Sham 群(n=50)と比較して、結紮後7日、14日、21日目の各日において有意に低下した。

#### 2、行動評価

(1) Immobilization (不動化) (Fig.2A)

Immobilization の合計持続時間は、Sham+Vehi 群で 179±185 秒、CCI-ION+Vehi 群で 312±334 秒、Sham+Cap 群で 661±354 秒、CCI-ION+Cap 群で 1069±422 秒であった。 Sham+Cap 群において、Sham+Vehi 群と比較して Immobilization の合計持続時間が有意 に延長した。また、CCI-ION+Cap 群において、Sham+Vehi 群、CCI-ION+Vehi 群、 Sham+Cap 群と比較して Immobilization の合計持続時間が有意に延長した。

(2) Exploration (探索行動) (Fig.2B)

Exploration の合計持続時間は、Sham+Vehi 群で 1414±309 秒、CCI-ION+Vehi 群で 1252±283 秒、Sham+Cap 群で 993±336 秒、CCI-ION+Cap 群で 637±348 秒であった。 Sham+Cap 群において、Sham+Vehi 群と比較して Exploration の合計持続時間が有意に短 縮した。また、CCI-ION+Cap 群において、Sham+Vehi 群、CCI-ION+Vehi 群と比較して Exploration の合計持続時間が有意に短縮し、Sham+Cap 群との比較では短縮傾向がみら れた (*p*=0.052)。 (3) Face Grooming (顔面領域の毛づくろい) (Fig.2C)

Face Grooming の合計持続時間は、Sham+Vehi 群で 95±71 秒、CCI-ION+Vehi 群で 151±73 秒、Sham+Cap 群で 77±42 秒、CCI-ION+Cap 群で 71±75 秒であり、どの群にお いても有意な差は認められなかった。

3、免疫組織化学的検討

(1) 三叉神経節 (TG)

抗 pERK 抗体陽性細胞がニューロンであるかどうかを同定するため、ニューロンのマー カーである NeuN との蛍光二重染色を行った。抗 pERK 抗体陽性細胞はすべて抗 NeuN 抗 体陽性を示していたことより、本研究で検出された抗 pERK 抗体陽性細胞はニューロンで あることが確認された(Fig.3A, B, C)。

また、TG における抗 pERK 抗体陽性細胞数の割合について比較したところ、抗 pERK 抗体陽性細胞数の割合は、Sham+Vehi 群で 3.0±0.4 %、CCI-ION+Vehi 群で 4.7±0.2 %、 Sham+Cap 群で 5.9±0.5 %、CCI-ION+Cap 群で 9.9±2.2 %であった(Fig.4, 5)。CCI-ION +Cap 群において、抗 pERK 抗体陽性細胞数の割合は Sham+Vehi 群、CCI-ION+Vehi 群、 Sham+Cap 群と比較して有意に多い値を示した。

(2) 三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc)、上部頸髄 (C1-C2)

各群において、大部分の抗 pERK 抗体陽性細胞は Vc、C1-C2 I 層と II 層の腹外側に密集 して分布していた(Fig.6)。

カプサイシン投与の影響を検討するため、Sham+Vehi 群と Sham+Cap 群を比較したと ころ、Obex から 3600 µm 尾側部において抗 pERK 抗体陽性細胞数は、Sham+Cap 群で有 意に多い値を示した(Fig.7)。また、CCI-ION+Vehi 群と CCI-ION+Cap 群を比較したと ころ、Obex より 2160 µm から 6480 µm 尾側部において抗 pERK 抗体陽性細胞数は、 CCI-ION+Cap 群で有意に多い値を示した。 片頭痛モデルに対する CCI-ION の影響を検討するため、Sham+Cap 群と CCI-ION+Cap 群を比較したところ、Obex から 3600 µm と 4320 µm 尾側部において抗 pERK 抗体陽性細 胞数は、CCI-ION+Cap 群で有意に多い値を示した。 考察

### 1、慢性口腔顔面痛モデルラットについて

本研究で使用した CCI-ION モデルは、三叉神経領域の慢性口腔顔面痛(神経障害性疼痛) モデルの一つとして、広く実験に用いられている(Vos BP et al., 1994; Kernisant M et al., 2008; Shibuta K et al., 2012; Suzuki I et al., 2013)。この CCI モデルは、末梢神経結紮 による慢性障害を与えることで、化学刺激、機械刺激、温熱刺激に対してアロディニア(感 覚異常)を示すようになるといわれている(Vos BP et al., 1994; 讃岐ら, 2007)。例えば、 眼窩下神経の CCI モデルでは、結紮後1日目から機械刺激に対しアロディニアが発症し、 少なくとも21日目までアロディニアが持続するという報告がある(Suzuki I et al., 2013)。

アロディニアが発症するメカニズムとしては、神経損傷や強い持続的な炎症により、そ の末梢部位における NGF の産生増加、TRPV1 受容体の活性化亢進、脊髄後角のシナプス 部位におけるミクログリア細胞の活性化、NMDA 受容体の活性化亢進などの可塑的変化が 惹起されて、その支配神経に末梢性感作と中枢性感作が誘導される結果、神経の興奮性が 増強され、アロディニアが確立すると考えられている(Woolf CJ and Thompson SW., 1991; Woolf CJ et al., 1994; Tsuda M et al., 2003; Basbaum AI et al., 2009)。三叉神経領域にお いても、眼窩下神経結紮後、Vc および C1-C2 でのミクログリア細胞の活性化、ニューロキ ニン1 受容体の発現増加や TG でのカリウムイオンチャネルの変化などにより、三叉神経 の感作が誘導されると考えられている(Xu M et al., 2008; Takeda M et al., 2011)。

以上より、本研究において結紮直前と比較し、結紮後21日目において三叉神経第二枝領 域への機械刺激に対する逃避閾値が結紮直前より低下したものをアロディニア発症とし、 それらのラットを三叉神経が感作された慢性口腔顔面痛モデルとして本実験に使用した。

本実験におけるアロディニア発症率は34.7%であり、31%であったという報告(讃岐ら, 2007)とほぼ一致する。他の部位に比べ発症率が低いのは、術野が狭く、操作性に乏しい ためと考えられる。

#### 2、片頭痛モデルラットについて

片頭痛は何らかの機序により三叉神経血管系が刺激され、神経終末から substance P、 CGRP などの神経伝達物質が放出され、硬膜に無菌性炎症である神経原性炎症と血管拡張 が起こり発症するという説(三叉神経血管説)が現在までのところ最も有力とされている (Moskowitz MA, 1984)。この説に加え、硬膜に分布する三叉神経の興奮と感作が、片頭 痛に深く関与しているということが徐々に明らかとなってきている(Bernstein C and Burstein R, 2012)。

現在までに片頭痛モデルラット作製の方法として、三叉神経節に電気刺激を与える方法 や、硬膜にカプサイシン、炎症性メディエーター、マスタードオイルなどの化学刺激を与 える方法が報告されている(Shepheard SL et al., 1995; Kemper RH et al., 1997; Strassman AM et al., 1996; Okada-Ogawa A et al., 2011)。

本研究では、片頭痛モデルラット作製のため、TRPV1 受容体アゴニストであるカプサイ シンを硬膜上に投与する方法を選択した。非選択的な陽イオン透過性を持つイオンチャネ ルである TRPV1 受容体は、一次感覚ニューロンのうち主に無髄 C線維に存在し、polymodal 侵害受容器として機能しており、カプサイシンや 43 ℃以上の熱、酸(プロトン)によって 活性化する(Caterina MJ et al., 1997; Gunthorpe MJ and Chizh BA, 2009; Moran MM et al., 2011)。この TRPV1 受容体は脳硬膜に分布する三叉神経に存在し、脳硬膜に生じた侵 害刺激の情報伝達に関与しているという報告(Shimizu T et al., 2007)や、片頭痛の治療 薬であるスマトリプタンがカプサイシンによる TRPV1 受容体の活性化を抑制するという 報告(Evans MS et al., 2012)がある。また、片頭痛の前兆時に認められる現象である大 脳皮質拡延性抑制(Cortical Spreading Depression)により、細胞外のプロトンが増加す ることで、脳硬膜に存在する TRPV1 受容体が活性化され、片頭痛が発症するという報告が ある(Iwashita T et al., 2013)。以上より、TRPV1 受容体の活性化が片頭痛発症に深く関 与していると考えられる。

3、行動変化に対する硬膜へのカプサイシン刺激と CCI-ION の影響

本研究において、Sham+Cap 群は、Sham+Vehi 群と比較して、Immobilization の合計 持続時間が有意に延長し、逆に Exploration の合計持続時間が有意に短縮した。過去に、ラ ットに片頭痛を誘発すると侵害刺激に対する行動としての Immobilization が増加するとい う報告がある (Kemper RH et al., 1998; Melo-Carrillo A and Lopez-Avila A, 2013)。そし て、この行動変化は、片頭痛患者において体動により症状が増悪されるため、行動が制限 されるという臨床症状と類似する。これらのことより、本研究においても、硬膜へのカプ サイシン刺激により片頭痛が誘発されたと考えられた。

さらに、CCI-ION+Cap 群は Sham+Cap 群と比較して、Immobilization の合計持続時間 が有意に延長し、逆に Exploration の合計持続時間が短縮する傾向がみられた。以上より、 眼窩下神経結紮により、硬膜へのカプサイシン投与により誘発された片頭痛がより増強さ れた可能性が考えられた。

4、pERK発現に対する硬膜へのカプサイシン刺激と CCI-ION の影響

侵害刺激に対するニューロンの活動性の指標として、一般的に c-Fos や pERK がよく用いられている。末梢組織への侵害刺激により、脊髄後角や Vc に c-Fos の発現が認められるという報告(Hunt SP et al., 1987; Iwata K et al., 1995)があることより、c-Fos は古くから、侵害刺激に対するニューロンの活動性の指標として用いられてきた。しかし、運動負荷といった持続的な非侵害刺激に対しても c-Fos は発現する(Neumann S et al., 2008)ことから、必ずしも痛みに特異的なマーカーとは言い切れず、また実際、痛覚伝達機序にどのように関与するのかほとんど解明されていない(Gao YJ and Ji RR, 2009)。一方、細胞

外シグナル調節キナーゼ(ERK) は分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK) フ アミリーの1つであり、さまざまな刺激によりMAPK経路が活性化されるとリン酸化され、 細胞外のシグナルを核内へ伝達する役割を担っている。痛覚伝達においては、末梢組織の 侵害刺激により、脊髄後角、後根神経節、三叉神経節において、pERK が発現することが 報告されている(Ji RR et al., 1999; Zhuang ZY et al., 2005; Iwashita T et al., 2013)。ま た、ラットの末梢組織への侵害刺激によるTRPV1受容体を介した痛覚情報伝達は、一次ニ ユーロンにおける ERK のリン酸化を介しているという報告(Dai Y et al., 2002) がある。 現在、多くの研究によって、侵害刺激により放出される神経伝達物質が痛覚伝達に関与す る NMDA 受容体などを活性化することで、ERK がリン酸化され、その結果、痛みが生じ ることが分かってきている(Gao YJ and Ji RR, 2009)。以上より、近年、pERK は侵害刺 激に対するニューロンの活動性のより特異的な指標として、広く用いられるようになって きている(Shimizu K et al., 2006; Shoda E et al., 2009)。そこで本研究では、TG、Vc お よび C1-C2 におけるニューロンの活動性を確認するため、これらの部位における pERK 発 現を免疫組織化学的染色にて検討した。

本研究において、CCI-ION+Cap 群で、TG における抗 pERK 抗体陽性細胞の割合が Sham +Cap 群と比較して有意に多くなったことから、CCI-ION により、三叉神経一次ニューロ ンの活動性がさらに亢進したことが示唆された。過去に、第一大臼歯支配神経に炎症を起 こすと、TG のサテライト細胞が活性化し、第二大臼歯を支配する神経にも興奮が伝導し、 TG における pERK 発現が増加するという報告(Matsuura S et al., 2013)や、三叉神経第 三枝に炎症を起こすと、TG における NGF の増加により、第三枝だけでなく第二枝も感作 され、その結果、痛覚過敏が惹起されるという報告(Shinoda M et al., 2011)がある。以 上より、本研究で観察された TG での三叉神経の活動性の増強(pERK 発現の増加)は、三 叉神経第二枝障害(眼窩下神経結紮)により、第一枝においても末梢性感作が誘導された ためと考えられた。 本研究において抗 pERK 抗体陽性細胞は、Vc および C1-C2 領域の I 層と II 層の腹外側 に多く発現していた。Vc および C1-C2 には体部位局在性が認められ、三叉神経第一枝は腹 外側に投射するという報告(Yokota T and Nishikawa N, 1980; 川本, 1993)があることよ り、本研究で観察された抗 pERK 抗体陽性細胞発現の局在は、硬膜へのカプサイシン投与 による三叉神経第一枝の活動性を反映していると考えられる。

本研究で Obex から 3600 µm と 4320 µm 尾側部において、CCI-ION+Cap 群は Sham+Cap 群と比較して、抗 pERK 抗体陽性細胞数が有意に多い値を示した。この領域に おいて、Sham+Vehi 群と Sham+Cap 群を比較したところ、抗 pERK 抗体陽性細胞数が Sham+Cap 群で有意に多い値 (Obex から 3600 µm 尾側部)、あるいは多い傾向 (p=0.079、 Obex から 4320 µm 尾側部) が認められた。硬膜へのカプサイシン刺激により発現する抗 pERK 抗体陽性細胞数は、Vc および C1-C2 において、Obex レベルと Obex から 3600 μm 尾側部でピークを有するという報告(志賀,2011)があることより、硬膜へのカプサイシン 刺激で活性化される三叉神経第一枝は Obex から 3600 μm、4320 μm 尾側部付近に多く投 射していることが示唆された。以上より、三叉神経第一枝が多く投射していると考えられ る領域においてのみ、CCI-ION+Cap 群は Sham+Cap 群と比較して、抗 pERK 抗体陽性細 胞数が有意に多くなったと考えられることから、CCI-ION により、Vc、C1-C2 における三 叉神経第一枝の活動性がより亢進したことが示唆された。頸髄神経(C2-C4 間)切断によ り、Vc、C1-C2 で ERK のリン酸化やアストログリア細胞の活性化が起こることで、切断 した神経以外の顔面領域の神経が中枢性に感作され、その支配領域にアロディニアが惹起 されるという報告(Kobayashi A et al., 2011)があることより、本実験で認められた Vc、 C1-C2 での三叉神経第一枝の活動性の増強は、三叉神経第二枝障害(眼窩下神経結紮)に よる中枢性感作も強く関与していると考えられた。

また、本研究において CCI-ION+Vehi 群と CCI-ION+Cap 群を比較すると、Obex より 2160 µm から 6480 µm 尾側部で抗 pERK 抗体陽性細胞数は、CCI-ION+Cap 群で有意に多

15

い値を示した。広範囲で有意差が認められたのは、硬膜へのカプサイシン投与による影響 に加え、CCI-ION による影響が重なったためと考えられる。

#### 結 語

本研究の結果より、CCI-ION により三叉神経第二枝の持続的な興奮が起こり、それによ り三叉神経第一枝の末梢性感作と中枢性感作が誘導されることで、第一枝の興奮が増強さ れ、その結果、片頭痛が増悪したと推測された。以上より、口腔顔面領域の慢性疼痛疾患 の存在は、片頭痛の増悪因子となり得る可能性が示唆された。また、本研究の結果は片頭 痛の随伴症状であるアロディニアと三叉神経系の感作のメカニズムを解明する一助となる と期待される。

本論文の要旨の一部は、第 41 回日本歯科麻酔学会学術集会(2013 年、横浜)、第 42 回 日本歯科麻酔学会学術集会(2014 年、新潟)、Neuroscience 2014(2014, Washington DC, USA) にて発表した。

#### 謝 辞

稿を終えるに臨み、本研究を行う機会を与えていただき、終始懇切なる御指導、御鞭撻 を賜りました大阪大学大学院歯学研究科ロ腔科学専攻高次脳ロ腔機能学講座(歯科麻酔学 教室)の丹羽均教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の進行に際し常に御助言、御指導を戴いた大阪大学大学院歯学研究科ロ腔科学専 攻高次脳ロ腔機能学講座(歯科麻酔学教室)の工藤千穂講師に深甚なる謝意を表します。

最後に本研究の円滑な進展のため御理解、御協力頂きました歯科麻酔学教室教室員の皆 様に厚く御礼申し上げます。

### 引用文献

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. Cell. 2009; 139(2): 267-84.

Bernstein C, Burstein R. Sensitization of the trigeminovascular pathway: perspective and implications to migraine pathophysiology. J Clin Neurol. 2012; 8(2): 89-99.

Burstein R, Yarnitsky D, Goor-Aryeh I, Ransil BJ, Bajwa ZH. An association between migraine and cutaneous allodynia. Ann Neurol. 2000; 47(5): 614-24.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature. 1997; 389(6653): 816-24.

Dai Y, Iwata K, Fukuoka T, Kondo E, Tokunaga A, Yamanaka H, Tachibana T, Liu Y, Noguchi K. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. J Neurosci. 2002; 22(17): 7737-45.

Evans MS, Cheng X, Jeffry JA, Disney KE, Premkumar LS. Sumatriptan inhibits TRPV1 channels in trigeminal neurons. Headache. 2012; 52(5): 773-84.

Gao YJ, Ji RR. c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? Open Pain J. 2009; 2: 11-17.

Gunthorpe MJ, Chizh BA. Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway. Drug Discov Today. 2009; 14(1-2): 56-67.

Henry MA, Freking AR, Johnson LR, Levinson SR. Sodium channel Nav1.6 accumulates at the site of infraorbital nerve injury. BMC Neurosci. 2007; 8: 56.

Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. Nature. 1987; 328(6131): 632-4.

Iwashita T, Shimizu T, Shibata M, Toriumi H, Ebine T, Funakubo M, Suzuki N. Activation of extracellular signal-regulated kinase in the trigeminal ganglion following both treatment of the dura mater with capsaicin and cortical spreading depression. Neurosci Res. 2013; 77(1-2): 110-9.

Iwata K, Kanda K, Tsuboi Y, Kitajima K, Sumino R. Fos induction in the medullary dorsal horn and C1 segment of the spinal cord by acute inflammation in aged rats. Brain Res. 1995; 678(1-2): 127-39.

Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ. Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. Nat Neurosci. 1999; 2(12): 1114-9.

川本 博也. 三叉神経領域の Mononeuropathy に関する実験的研究. 九州歯科學會雜誌. 1993; 47(1): 222-234.

Kemper RH, Meijler WJ, Ter Horst GJ. Trigeminovascular stimulation in conscious rats. Neuroreport. 1997; 8(5): 1123-6.

Kemper RH, Spoelstra MB, Meijler WJ, Ter Horst GJ. Lipopolysaccharide-induced hyperalgesia of intracranial capsaicin sensitive afferents in conscious rats. Pain. 1998; 78(3): 181-90.

Kernisant M, Gear RW, Jasmin L, Vit JP, Ohara PT. Chronic constriction injury of the infraorbital nerve in the rat using modified syringe needle. J Neurosci Methods. 2008; 172(1): 43-7.

Kobayashi A, Shinoda M, Sessle BJ, Honda K, Imamura Y, Hitomi S, Tsuboi Y, Okada-Ogawa A, Iwata K. Mechanisms involved in extraterritorial facial pain following cervical spinal nerve injury in rats. Mol Pain. 2011; 7: 12.

Louter MA, Bosker JE, van Oosterhout WP, van Zwet EW, Zitman FG, Ferrari MD, Terwindt GM. Cutaneous allodynia as a predictor of migraine chronification. Brain. 2013; 136(Pt 11): 3489-96.

Mathew NT, Kailasam J, Seifert T. Clinical recognition of allodynia in migraine. Neurology. 2004; 63(5): 848-52. Matsuura S, Shimizu K, Shinoda M, Ohara K, Ogiso B, Honda K, Katagiri A, Sessle BJ, Urata K, Iwata K. Mechanisms underlying ectopic persistent tooth-pulp pain following pulpal inflammation. PLoS One. 2013; 8(1): e52840.

Melo-Carrillo A, Lopez-Avila A. A chronic animal model of migraine, induced by repeated meningeal nociception, characterized by a behavioral and pharmacological approach. Cephalalgia. 2013; 33(13): 1096-105.

Moran MM, McAlexander MA, Bíró T, Szallasi A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. Nat Rev Drug Discov. 2011; 10(8): 601-20.

Moskowitz MA. The neurobiology of vascular head pain. Ann Neurol. 1984; 16(2): 157-68.

Namazi MR. Presentation of migraine as odontalgia. Headache. 2001; 41(4): 420-1.

Neumann S, Braz JM, Skinner K, Llewellyn-Smith IJ, Basbaum AI. Innocuous, not noxious, input activates PKCgamma interneurons of the spinal dorsal horn via myelinated afferent fibers. J Neurosci. 2008; 28(32): 7936-44.

Okada-Ogawa A, Tsuboi Y, Kondo M, Kusama T, Imamura Y, Iwata K. The study of migraine model rat with photophobia in the upper cervical spinal cord. Pain Res. 2011; 26(1): 29-38

Pinto A, Arava-Parastatidis M, Balasubramaniam R. Headache in children and adolescents. J Can Dent Assoc. 2009; 75(2): 125-31.

讃岐 拓郎, 佐久間 泰司, 姜 由紀, 安東 大器, 小谷 順一郎. ラット眼窩下神経 CCI モデル に対するホルマリン刺激. 日本歯科麻酔学会雑誌. 2007; 35(2): 158-62.

Shepheard SL, Williamson DJ, Williams J, Hill RG, Hargreaves RJ. Comparison of the effects of sumatriptan and the NK1 antagonist CP-99,994 on plasma extravasation in Dura mater and c-fos mRNA expression in trigeminal nucleus caudalis of rats. Neuropharmacology. 1995; 34(3): 255-61.

Shibuta K, Suzuki I, Shinoda M, Tsuboi Y, Honda K, Shimizu N, Sessle BJ, Iwata K Organization of hyperactive microglial cells in trigeminal spinal subnucleus caudalis and upper cervical spinal cord associated with orofacial neuropathic pain. Brain Res. 2012; 1451: 74-86.

志賀 淑. 硬膜の侵害入力を受ける三叉神経脊髄路核尾側亜核および上部頸髄ニューロンの分布様式. 日大歯学誌. 2011; 85(4): 155-60.

Shimizu K, Asano M, Kitagawa J, Ogiso B, Ren K, Oki H, Matsumoto M, Iwata K. Phosphorylation of Extracellular Signal-Regulated Kinase in medullary and upper cervical cord neurons following noxious tooth pulp stimulation. Brain Res. 2006; 1072(1): 99-109.

清水 俊彦. EBM に基づいた頭痛治療トリプタン製剤の使い方. 医学のあゆみ. 2005; 215(14): 1112-7

Shimizu T, Toriumi H, Sato H, Shibata M, Nagata E, Gotoh K, Suzuki N. Distribution and origin of TRPV1 receptor-containing nerve fibers in the dura mater of rat. Brain Res. 2007; 1173: 84-91.

Shinoda M, Asano M, Omagari D, Honda K, Hitomi S, Katagiri A, Iwata K. Nerve growth factor contribution via transient receptor potential vanilloid 1 to ectopic orofacial pain. J Neurosci. 2011; 31(19): 7145-55

Shoda E, Kitagawa J, Suzuki I, Nitta-Kubota I, Miyamoto M, Tsuboi Y, Kondo M, Masuda Y, Oi Y, Ren K, Iwata K. Increased phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in trigeminal nociceptive neurons following propofol administration in rats. J Pain. 2009; 10(6): 573-85.

Strassman AM, Raymond SA, Burstein R. Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. Nature. 1996; 384(6609): 560-4.

Suzuki I, Tsuboi Y, Shinoda M, Shibuta K, Honda K, Katagiri A, Kiyomoto M, Sessle BJ, Matsuura S, Ohara K, Urata K, Iwata K. Involvement of ERK phosphorylation of trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons in thermal hypersensitivity in rats with infraorbital nerve injury. PLoS One. 2013; 8(2):e57278. Takeda M, Tsuboi Y, Kitagawa J, Nakagawa K, Iwata K, Matsumoto S. Potassium channels as a potential therapeutic target for trigeminal neuropathic and inflammatory pain. Mol Pain. 2011; 7: 5.

Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K. P2X<sub>4</sub> receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. Nature. 2003; 424(6950): 778-83.

Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. J Neurosci. 1994; 14(5 Pt 1): 2708-23.

和嶋 浩一. Orofacial pain(口腔顔面痛学)からみた頭痛. 医学のあゆみ. 2005; 14: 1186-89.

Woolf CJ, Safieh-Garabedian B, Ma QP, Crilly P, Winter J. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. Neuroscience. 1994; 62(2): 327-31.

Woolf CJ, Thompson SW. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. Pain. 1991; 44(3): 293-9.

Xu M, Aita M, Chavkin C. Partial infraorbital nerve ligation as a model of trigeminal nerve injury in the mouse: behavioral, neural, and glial reactions. J Pain. 2008; 9(11): 1036-48.

Yokota T, Nishikawa N. Reappraisal of somatotopic tactile representation within trigeminal subnucleus caudalis. J Neurophysiol. 1980; 43(3): 700-12.

Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, Ji RR. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. Pain. 2005; 114(1-2): 149-59.



Fig.1

眼窩下神経結紮によるアロディニア発症の時間的変化(平均値±標準偏差)
CCI-ION 群(n=42)は結紮前と比較して、結紮後7日、14日、21日目において逃避閾値が有意に低下した。\*: p<0.05 vs day 0</li>
CCI-ION 群の逃避閾値は、Sham 群(n=50)と比較して、結紮後7日、14日、21日目において有意に低下した。#: p<0.05 vs Sham</li>





С



## Fig.2

カプサイシン投与による行動変化(平均値±標準偏差)\*: p<0.05

A: Immobilization の合計持続時間。CCI-ION+Cap 群は Sham+Cap 群と比較して、 Immobilization の時間が有意に延長した。

B: Explorationの合計持続時間。CCI-ION+Cap群はSham+Cap群と比較して、Explorationの時間が短縮する傾向がみられた(*p*=0.052)。

C: Face Grooming の合計持続時間。どの群においても有意な差は認められなかった。







TG における抗 pERK 抗体陽性細胞と抗 NeuN 抗体陽性細胞の組織標本写真

A: 抗 pERK 抗体陽性細胞 、B: 抗 NeuN 抗体陽性細胞、C: A と B の標本を重ね合わせた 写真。各写真の矢印は、抗 pERK 抗体陽性細胞 (A)、抗 NeuN 抗体陽性細胞 (B)、これら が merge した細胞 (C) を示す。抗 pERK 抗体陽性細胞はすべて抗 NeuN 抗体陽性であっ た。







D



# Fig.4

TG における抗 pERK 抗体陽性細胞の組織標本写真

A: Sham+Vehi 群、B: CCI-ION+Vehi 群、C: Sham+Cap 群、D: CCI-ION+Cap 群 矢印は抗 pERK 抗体陽性細胞を示す。CCI-ION+Cap 群において、最も多く抗 pERK 抗体 陽性細胞が発現した。



TG 領域に発現した抗 pERK 抗体陽性細胞数の割合(平均値±標準偏差) \*: *p*<0.05 vs Sham+Vehi, CCI-ION+Vehi, Sham+Cap CCI-ION+Cap 群(n=5)では、抗 pERK 抗体陽性細胞数の割合が Sham+Vehi 群(n=5)、 CCI-ION+Vehi 群(n=5)、Sham+Cap 群(n=5)と比較して有意に多い値を示した。





Obex から 4320 µm 尾側部における抗 pERK 抗体陽性細胞の組織標本写真 A: Sham+Vehi 群、B: CCI-ION+Vehi 群、C: Sham+Cap 群、D: CCI-ION+Cap 群 各群において、大部分の抗 pERK 抗体陽性細胞は I 層と II 層の腹外側に密集して分布して いた。CCI-ION+Cap 群において、最も多く抗 pERK 抗体陽性細胞が発現した。



Vc、C1-C2 に発現した抗 pERK 抗体陽性細胞の分布(平均値±標準偏差)

\*: *p*<0.05

Sham+Cap 群では、Obex から 3600 µm 尾側部で抗 pERK 抗体陽性細胞数が Sham+Vehi 群と比較して有意に多い値を示した。また、CCI-ION+Cap 群では、Obex より 2160 µm か ら 6480 µm 尾側部で抗 pERK 抗体陽性細胞数が、CCI-ION+Vehi 群と比較して有意に多い 値を示した。さらに、CCI-ION+Cap 群では、Obex から 3600 µm と 4320 µm 尾側部で抗 pERK 抗体陽性細胞数が、Sham+Cap 群と比較して有意に多い値を示した。