



Title	神経障害性疼痛に対するTRPM2の関与
Author(s)	吉川, 千晶
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/91856">https://doi.org/10.18910/91856</a>
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

神経障害性疼痛に対する TRPM2 の関与

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻 高次脳口腔機能学講座（歯科麻酔学教室）

吉川 千晶

## 緒言

神経障害性疼痛は、体性感覚神経系に關与する病変または疾患が原因となり、疼痛感受性の増加や自発痛が引き起こされたものである (Scholz et al, 2019)。例えば、帯状疱疹後神経痛や、三叉神経痛、糖尿病などに起因する神経障害による痛みなどが挙げられる。神経障害性疼痛の罹患率は 6.9~10% (van Hecke et al, 2014) で、その発症は、QOL の著しい低下と相関する (Rowbotham, 2002)。痛みに伴って、患者の 70%以上が睡眠障害を訴え (Smith et al, 2000)、また、抑うつや不安等 (Argoff, 2007) の症状が生じることもある。これらの症状が高じれば、就業や社会生活の維持が困難になる場合もあり (Meyer-Rosberg et al, 2001)、神経障害性疼痛の治療の重要性は高い。

口腔顔面領域にも神経障害性疼痛は存在する。その多くは医原性で、歯科臨床で日常的に行われている抜髄や抜歯は、機械的に神経や血管を切断する処置であること、さらに口腔外科処置では舌神経や下歯槽神経を損傷する危険性もあり、その結果神経障害性疼痛を引き起こし得る (千葉ら、2008)。このような患者の多くは、食事や会話の障害を訴え、QOL の低下が著しい。

神経障害性疼痛の治療法の主体は、薬物療法であるが、通常、痛みに対して用いられる非ステロイド性抗炎症薬や麻薬性鎮痛薬は奏功しない場合が多い (高塚、2021)。そのため、薬物療法には、抗うつ薬や抗てんかん薬が用いられる。しかし、その薬物療法にしても、一

部の患者で軽度もしくは中等度の痛みの緩和が得られるのみであり、効果が全く認められない患者も多い (Finnerup et al, 2015)。また、これらの薬物の副作用には、倦怠感、めまい、眠気等があるため、十分な量の薬物を使用できない場合も存在する (Cavalli et al, 2019)。つまり、従来の薬物療法では、神経障害性疼痛を十分に緩和しているとは言えない状況である。このような状況を打開するべく、新たな治療薬の開発を目指す研究が行われているが、根本的な治療薬の報告はなされていない (津田、2021)。したがって高い鎮痛効果を持ち、副作用の少ない、新たな作用機序を持った薬物が望まれている。

神経障害性疼痛の発症には、感覚神経の末梢性感作と中枢性感作が大きく関与している。要約すると、末梢組織の細菌感染や外傷により、炎症細胞や免疫細胞の浸潤が生じると、浸潤したそれらの細胞から、プロスタグランジン E<sub>2</sub>、セロトニン、ヒスタミン等の様々な分子が放出される。これらの分子が、一次ニューロンの末梢端に存在する各々の受容体に結合し、細胞内情報伝達系を活性化させることで、一次侵害受容ニューロンの興奮性が増大する。口腔顔面領域では、一次侵害受容ニューロンの細胞体が存在する三叉神経節において、神経損傷により細胞内に神経型一酸化窒素合成酵素 (neuronal nitric oxide synthase: nNOS) の発現が増加し、一酸化窒素 (NO) の合成が進む (Sugiyama et al, 2013)。細胞体から放出された NO は、三叉神経節に存在するサテライトグリア細胞の活性化や非損傷神経の興奮性を増加させ (篠田、2019)、末梢性感作が生じる。また、一次侵害受容ニューロンの興奮によって、そのニューロンの中枢端から、グルタミン酸が放出され、反復的な一次ニューロンの

興奮下ではグルタミン酸と結合した NMDA 受容体が活性化し、二次ニューロンが興奮する (Woolf and Salter, 2000)。さらに、持続的な一次ニューロンの興奮はサブスタンス P や CGRP、ATP 等の合成やそれらの中枢端からの放出を促進する。それらの神経伝達物質が二次ニューロンの受容体に結合すると、extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化を介して NMDA 受容体の興奮性を増強する (Milligan and Watkins, 2009)。その他、様々な神経調節機構の変調により、中枢性感作が生じる。

神経障害性疼痛の発症にはミクログリアが関与し、その活性化が生じていることはよく知られている (Ren et al, 2010; Costigan et al, 2009; Calvo et al, 2012)。活性化したミクログリアからはさまざまなケミカルメディエーターが放出され、二次ニューロンやグリア細胞に作用する。ミクログリアの活性化の経路は完全に解明されているわけではないが、脊髄後角ニューロンから放出された ATP は、ミクログリアの P2X4 受容体を介してミクログリアを刺激する (Masuda et al, 2016)。また、一次ニューロンの中枢端からケモカインの一つであるフラクタルカイン (FKN) が遊離され、ミクログリアの FKN 受容体に結合することで三叉神経脊髄路核尾側亜核 (trigeminal spinal subnucleus caudalis :Vc) のミクログリアが活性化する (Gao and Ji, 2010)。さらに、IFN- $\gamma$  受容体がミクログリアに発現しており (Asano et al, 2019)、IFN- $\gamma$  を介して活性化したミクログリア自身も IFN- $\gamma$  を放出し (Hanisch et al, 2007; Kawanokuchi et al, 2006) さらに、近傍のミクログリアを活性化する可能性などが報告されている。

ミクログリアには transient receptor potential (TRP)スーパーファミリーの一つである TRP melastatin 2 (TRPM2)が発現している (Kraft et al, 2004)。TRPM2 の C 末端には、アデノシン二リン酸リボース (ADPR) を加水分解する NUDT9 酵素と類似性を有する Nudix 様ドメインが存在し、N 末端には IQ 様カルモジュリン結合モチーフが存在する (Sumoza-Toledo and Penner, 2011 ; Wang et al, 2018)。TRPM2 は、過酸化水素などの活性酸素種 (ROS) により直接的に、あるいは、ADPR の産生を介して間接的に活性化される  $Ca^{2+}$ 透過性の非選択的カチオンチャネルである (Kashio et al, 2012; Takahashi et al, 2011)。TRPM2 の阻害剤として、flufenamic acid (FFA), 2-(3-methylphenyl) aminobenzoic acid (3-MFA), N-(p-amylicinnamoyl) anthranilic acid (ACA), and 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB)、などが報告されている (Zhang et al, 2021)。またイミダゾール環を有する抗真菌薬であるクロトリマゾールとエコナゾール、ミコナゾールは、TRPM2 の不可逆的拮抗作用をもつことが確認されている (Hill et al, 2004 ; Togashi, 2008)。

TRPM2 遺伝子欠損マウスを用いた、末梢神経損傷による神経障害性疼痛モデルが、疼痛関連行動の有意な減弱を示した (Nakagawa et al, 2014) ことから、TRPM2 が神経障害性疼痛の発症やミクログリアの活性化に関与することが示唆される。TRPM2 が神経障害性疼痛に関与しているならば、治療のための新たな標的となる可能性を持つ。そこで本研究では、ラットの眼窩下神経を結紮して作製した口腔顔面領域の神経障害性疼痛モデルを使用して、神経障害性疼痛と TRPM2 の関係を明らかにすることを目的とした。

## 実験方法

本研究計画は NIH の実験動物の飼育と取扱いのガイドラインに沿って立案したものであり、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（動歯- R-01-013-0）。

### 1. 眼窩下神経結紮による神経障害性疼痛モデルラットの作製

実験には、7 週齢の雄性 Wistar ラット（170～190 g；日本 SLC, 静岡）を用いた。眼窩下神経（infraorbital nerve：ION）の慢性絞扼神経損傷（chronic constriction injury：CCI）による神経障害性疼痛ラット（ION-CCI ラット）を作製した（Maegawa et al, 2020）。

三種混合麻酔薬（ミダゾラム、2.0 mg/kg、丸石製薬株式会社、大阪、日本；ブトルフェノール、2.5 mg/kg、明治アニマルヘルス株式会社、熊本、日本；メデトミジン 0.375 mg/kg、日本全薬工業株式会社、福島、日本；溶媒は生理食塩水）をラットの腹腔内に投与し、左側の whisker pad の端を 10mm 切開し、筋組織等を避けて眼窩下神経を露出させた。絹糸（4-0）を 2 本神経の下に通し、2 mm の間隔で緩やかに結紮した。切開創は絹糸（4-0）で縫合した。神経結紮を除く同様の処置（sham operation）を施したラットを sham 群とした。

### 2. von Frey filament を用いた機械的刺激に対する逃避反応の閾値の測定（von Frey test）

機械的刺激に対する逃避反応の閾値の測定は、Maegawa ら (2020) の方法を参考に行った。まずラットを直径 6cm×長さ 15cm のプラスチック製の円筒形の容器に入れる。その容器の一方の末端には、ラットが鼻口部のみを出せる程度の直径 2cm の大きさの穴が開いている。実験開始前 3 日前からラットをその容器に入れ、馴化させた。その後、0.04、0.16、0.6、1.0、2.0、4.0、8.0、15.0、26.0 g の von Frey filament (Semmes-Weinstein Von Frey esthesiometer、室町機械株式会社、東京、日本) を用いて、whisker pad 中央部に機械的刺激を与え、ラットが 5 回中 3 回以上の逃避反応を示した時の von Frey filament の最小値を逃避反応の閾値とした。

まず、神経結紮を実施する前に逃避反応の閾値を測定し、26.0 g 以下で反応するラットは実験から除外した。それ以外のラットに神経結紮あるいは sham operation を行い、処置後 3 日目に von Frey test を行った。15.0 g 以下で逃避反応の閾値の低下を示したラットを ION-CCI ラットとして、以降の実験に使用した。

### 3. 三叉神経脊髄路核尾側亜核 (trigeminal spinal subnucleus caudalis :Vc) のミクログリア上の

#### TRPM2 に対する免疫組織学的検討

眼窩下神経結紮の 1 日、3 日、7 日後、ラットにペントバルビタール 80 mg/kg (東京化学工業、東京、日本) を腹腔内投与し、100 ml の 0.01 M リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline: PBS、pH 7.4) を用いて瀉血し、その後 300 ml の 4%パラホルムアルデヒ

ド（富士フィルム和光純薬株式会社、大阪、日本）を含む PBS を用いて灌流固定を行った。灌流固定終了後に脳を取り出し、4 °C の同固定液で一晩浸漬して固定した後、30%スクロースを含む PBS (4 °C) に移した。その後、マイクローム（大和光機工業株式会社、埼玉、日本）を用いて、脳幹を含む部位の厚さ 50  $\mu\text{m}$  の連続横断凍結切片を作製した。

切片を PBS で洗浄後、10%正常ヤギ血清 (S-1000、Vector Laboratories、CA、USA) でブロッキングを行い、一次抗体である抗 TRPM2 抗体(1:500、NB110-81601、Novus Biologicals、CO、USA) と二次抗体の結合した抗 ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1) 抗体である Anti Iba1 rabbit red fluorochrome(635)-conjugated (1:500、013-26471、富士フィルム和光純薬株式会社) を 4 °C 冷所にて遮光下に一晩反応させた。切片を PBS で洗浄後、二次抗体である Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG [H+L](1:500、A11008、Thermo Fisher Scientific、MA、USA) を室温にて 2 時間反応させた。その後、PBS で洗浄し、スライドガラスに貼り付け、VECTASHIELD Mounting Medium (H-1000、Vector Laboratories) を用いて封入した。

切片の観察・撮影は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (TCS SP8、Leica、Wetzlar、Germany) を用い、Vc を吻尾的に観察した。免疫反応性の検討には obex から 1200、1350、1500、1650、1800 $\mu\text{m}$  に位置する代表切片 5 枚を用いた。Image J (ver. 1.53 NIH、MD、USA) を用いて、Iba1 と TRPM2 が共局在している部位の面積を算出し、視野の面積に対する割合を算出した (Maegawa et al, 2021、2022 の方法を参考)。

#### 4. TRPM2 の拮抗薬であるミコナゾール投与が逃避反応に与える影響の検討

TRPM2 の拮抗薬であるミコナゾール（ミコナゾール硝酸塩、134-12661、富士フィルム和光純薬株式会社）を投与し、機械的刺激に対する逃避反応の閾値に与える影響を検討した。本研究では神経結紮 3 日目に過敏性が確認できた個体にミコナゾールの投与を行った。投与法は、連続投与と単回投与の 2 通りの方法を検討した。

連続投与の場合、眼窩下神経結紮の 3、4、5、6 日目にミコナゾール 10 mg/kg を 1 日 1 回腹腔内投与し、最終投与から 24 時間後の神経結紮から 7 日目に von Frey test を行い、逃避反応の閾値を測定した。単回投与の場合、眼窩下神経結紮の 3 日目にミコナゾール 10 mg/kg を腹腔内投与し、その 15、30、45、60 分後に von Frey test を行い、逃避反応の閾値の変化を記録した。

ミコナゾールはジメチルスルホキシド（dimethyl sulfoxide : DMSO ; 043-07216、富士フィルム和光純薬株式会社）に溶解して使用した。DMSO は生理食塩水と混和し、DMSO の配合を 1%とした。以降、ION-CCI ラットに対し、ミコナゾールを投与した群をミコナゾール群、溶媒である DMSO を投与した群を vehicle 群と表記する。

#### 5. TRPM2 の拮抗薬であるミコナゾールが Vc に発現するニューロンとミクログリアの活性化に与える影響の検討

ミコナゾールを4日間連続投与したラットに対し、神経結紮の7日後に15.0gのfilamentを用いて、ラットのwhisker pad中央部に1Hz、5分間の機械的刺激を加える。その5分後に灌流固定を行った。灌流固定終了後に脳を取り出し、4℃の同固定液で一晩浸漬して固定した後、30%スクロースを含むPBS(4℃)に移した。その後、マイクローム(大和光機工業株式会社、埼玉、日本)を用いて、脳幹を含む部位の厚さ50µmの連続横断凍結切片を作製した。

ニューロンの活性化の指標となる抗phosphorylated extracellular signal-regulated kinase(pERK)抗体陽性細胞と活性化ミクログリアの指標となる抗CD68抗体陽性細胞の数を検討するため、以下の処理を行った。切片をPBSで洗浄後、5%正常ヤギ血清(S-1000、Vector Laboratories)でブロッキングを行い、一次抗体である抗pERK抗体(1:200、Pospho-p44/42 MAPK(Erk1/2)(Thr202/Tyr204)、#4370、Cell Signaling Technology、MA、USA)を4℃で一晩反応させた。切片をPBSで洗浄後、二次抗体であるウサギ抗ヤギ抗体(1:200、BA-1000、Vector Laboratories)を室温にて1時間反応させた。同様に、切片をPBSで洗浄後、5%正常ウマ血清(S-2000、Vector Laboratories)でブロッキングを行い、一次抗体である抗CD68抗体(1:400、GTX41868、GeneTex、CA、USA)を4℃で一晩反応させた。切片をPBSで洗浄後、二次抗体であるマウス抗ウマ抗体(1:200、BA-2000、Vector Laboratories)を室温にて1時間反応させた。その後、PBSで洗浄し、0.05% diaminobenzidine tetrahydrochloride、0.1% ammonium nickel sulphate、0.01% 過酸化水素を含む0.05 M Tris-

HCl buffer (pH 7.2)で反応させた。PBS で洗浄後、スライドガラスに貼り付け、Mount-Quick (DM-01、コスモ・バイオ株式会社、東京、日本) を用いて封入した。切片の観察には光学顕微鏡 (BX51、Olympus、東京、日本) を用いた。

ミコナゾールを投与した群をミコナゾール群とし、溶媒である DMSO を投与した群を vehicle 群とした。

## 6. 統計学的解析

結果は平均値±標準誤差として表した。統計解析には統計解析ソフト SPSS(ver. 24、IBM、NY、USA) を使用して行った。機械刺激に対する逃避反応の閾値 (von Frey test) の変化に対しては、反復測定二元配置分散分析を行った後、*post-hoc* test に Bonfferroni を用いた。また免疫組織学的結果に対する統計学的解析は、二元配置分散分析および t 検定を用いた。二元配置分散分析を行った後、*post-hoc* test に Tukey-Kramer を用いた。全ての統計学的解析において、危険率  $p < 0.05$  で有意差ありとした。

## 結果

### 1. 眼窩下神経結紮モデルラットの作製

本研究では結紮後7日目までのモデルラットを使用するため、結紮前から結紮後7日目までの機械的刺激に対する閾値の変化を測定した。分散分析の結果、処置要因の主効果および日数要因の主効果、さらに交互作用に有意差を認めた[順に  $F(2, 16) = 33.237, p < 0.001$ ;  $F(1, 8) = 171.633, p < 0.001$ ;  $F(2, 16) = 33.237, p < 0.001$ ]。眼窩下神経結紮を行った ION-CCI 群( $n = 5$ )では結紮前と比べ、結紮後3日目、7日目に有意な閾値の低下を示した( $p < 0.001$ )。一方、sham 群( $n = 5$ )では、いずれの時点においても閾値の低下は認められなかった。sham 群と比較すると、ION-CCI 群では3日目と7日目で有意に閾値が低下していた( $p < 0.001$ , Fig. 1)。

### 2. Vc のミクログリア上の TRPM2 の免疫反応性の検討

抗 TRPM2 抗体と抗 Iba1 抗体を用いて、Vc におけるミクログリア上の TRPM2 の発現を免疫組織化学的に検討した (Fig. 2 A、B)。抗 Iba1 抗体で標識されたミクログリアと、抗 TRPM2 抗体での標識部位は重なり合うことが確認された。これにより、TRPM2 はミクログリア上に発現していることが確認された。TRPM2 の発現は、吻尾的に結紮側の Vc 全域にわたって認められた。静止型のミクログリアは長く、分岐した突起と小さな細胞体を有す

るのに対し、活性化したミクログリアは増殖し、太い突起とより大きな細胞体を有するアメーバ状の形態をとる (Tsuda et al, 2005; Hains and Waxman, 2006)。Sham 群では静止型ミクログリアが発現しており、ION-CCI 群では、活性型のミクログリアが多く発現していた (Fig. 2 B)。

ION-CCI 群の Vc におけるミクログリア上の TRPM2 の免疫反応性の分散分析の結果、処置要因の主効果および日数要因の主効果、さらに交互作用に有意差を認めた [順に  $F(2, 16) = 49.039, p < 0.001$ ;  $F(1, 8) = 844.561, p < 0.001$ ;  $F(2, 16) = 52.455, p < 0.001$ ]。結紮後 1 日目と比べて結紮後 3 日目と 7 日目では有意に増加していた ( $p < 0.001$ )。sham 群と比較すると、ION-CCI 群の結紮後 3 日目と 7 日目で TRPM2 の免疫反応性にそれぞれ有意な増加が見られた ( $p < 0.001$ , Fig. 3)。

### 3. ミコナゾールが機械的刺激に対する逃避行動に与える効果の検討

TRPM2 の不可逆的拮抗作用のあるミコナゾールが機械的刺激に対する逃避行動に与える効果について、von Frey テストを用いて検討した。

4 日間の連続投与の場合の分散分析の結果、球面性の仮定が成り立っていなかったため、Huynh-Feldt による自由度の修正を行った。その結果、処置要因の主効果および日数要因の主効果、さらに交互作用に有意差を認めた [順に  $F(1.227, 12.265) = 16.914, p = 0.001$ ;  $F(1, 10) = 8.993, p = 0.006$ ;  $F(1.227, 12.265) = 8.993, p = 0.008$ ]。ミコナゾール群 ( $n = 6$ )

では、結紮後 7 日目においてミコナゾールの投与前の結紮後 3 日目と比較して有意に機械的刺激に対する閾値が上昇していた ( $p < 0.001$ )。またミコナゾール群と vehicle 群( $n = 6$ )間においては、結紮後 7 日目にミコナゾール群で有意な上昇が認められた( $p = 0.009$ , Fig. 4)。

一方、ミコナゾールの単回投与の場合の分散分析を行った結果、球面性の仮定が成り立っていないため、Huynh-Feldt による自由度の修正を行った。その結果、処置要因の主効果および日数要因の主効果、さらに交互作用に有意差を認めた[順に  $F(1.816, 18.16) = 10.332, p = 0.001$  ;  $F(1, 10) = 6.304, p = 0.031$  ;  $F(1.816, 18.16) = 4.0, p = 0.04$ ]。ミコナゾール群( $n = 6$ )では投与前と比較して 15 分後から 60 分後までの 15 分間隔のすべての時点において有意な閾値の上昇が認められた(15 分後 :  $p = 0.001$  ; 30 分後 :  $p = 0.002$  ; 45 分後 :  $p = 0.001$  ; 60 分後 :  $p = 0.004$ )。また、vehicle 群( $n = 6$ )と比較すると、15 分後の時点においてミコナゾール群で有意に閾値が上昇していた ( $p = 0.024$ ) が、30 分後の時点では、両群間に有意差は認められなかった ( $p = 0.05$ , Fig.5)。

#### 4. ミコナゾールが Vc におけるニューロン及びミクログリアの活性化に及ぼす影響の検討

Vc のニューロンの活性化を確認するために、抗 pERK 抗体陽性細胞数を計測した。ION-CCI ラットの whisker pad 部の刺激後、Vc 表層に抗 pERK 抗体陽性細胞の発現が認められた (Fig6A, B)。抗 pERK 抗体陽性細胞は、vehicle 群、ミコナゾール群ともに obex から約

1950~2250 $\mu$ m 尾側の Vc 表層において多く発現していたため、その部位の切片 5 枚について解析を行った。抗 pERK 抗体陽性細胞数は、vehicle 群と比較してミコナゾール群で有意に減少した ( $p = 0.047$ , Fig.7)。

抗 CD68 抗体陽性細胞は、Vc の全域にわたって吻尾的に認められたが、抗 pERK 抗体陽性細胞数が観察された obex から 1950~2250 $\mu$ m 尾側の Vc の背腹的中央部、表層のミクログリアの活性化にミコナゾール投与の影響があるかを検討するため、同部位の切片 5 枚を抽出して解析を行った。抗 CD68 抗体陽性細胞数はミコナゾール群では vehicle 群と比較して、有意に減少した ( $p < 0.001$ , Fig. 8 A、B、Fig. 9)。

## 考察

本研究から得られた主な結果は、ION-CCI ラットの Vc におけるミクログリア上の TRPM2 の免疫反応性が増加したこと、また TRPM2 の拮抗薬であるミコナゾールを投与すると、機械的刺激に対する逃避反応の閾値が上昇し、Vc の抗 pERK 抗体陽性細胞数と抗 CD68 抗体陽性細胞数の減少が認められたことである。

### 1. 眼窩下神経結紮による神経障害性疼痛モデルについて

本研究では神経障害性疼痛と TRPM2 との関係を調べるために、モデル動物として、眼窩下神経を結紮したラットを用いた。神経障害性疼痛モデルとしては、坐骨神経結紮モデルが広く用いられている (Bennett et al, 1988; Bridges D et al, 2001; Wang et al, 2003; Hogan et al, 2002; Maves et al, 1993; Kim et al, 1992; Seltzer et al, 1990; Decosterd et al, 2000; Rode et al, 2005; Bourquin et al, 2006) が、本研究では口腔顔面領域の神経障害性疼痛に焦点を当てるため、眼窩下神経結紮 (ION-CCI) モデルを採用した。ION-CCI ラットは口腔顔面領域の神経障害性疼痛モデルとして多くの研究で用いられ、神経結紮の 3 日後から機械的刺激に対する逃避反応の閾値の低下が認められ、21 日後まで持続する (Suzuki et al, 2013)。本研究の ION-CCI ラットにおいても同様の変化が認められ、神経障害性疼痛モデル動物として適切であると考えられた。

## 2. 神経障害性疼痛とミクログリアの活性化の関係

神経障害性疼痛の発症のメカニズムは解明には至っていないが、その発症にミクログリアが関与することが知られている (Tsuda et al, 2004; Tsuda et al, 2005; Coull et al, 2005; Inoue, 2006)。

ION-CCI モデルにおいても Vc のミクログリアの活性化が生じることが報告され (Shibuta et al, 2012)、Vc~C1 の広い範囲におけるミクログリアの活性化が、同領域の神経興奮性の亢進に関与し、機械的アロディニアを発症させる (Shibuta et al, 2012)。本研究においても、結紮3日目には Vc の逃避閾値の低下とミクログリアの活性化が認められ、そのミクログリア上には TRPM2 が発現していた。

ミクログリアの活性化についての経路が完全に明らかになっているわけではない。L4 脊髄神経を切断したマウスの脊髄後角において、3日目にはマクロファージの浸潤はわずかであるが、7日目、14日目で増加し、マクロファージが存在する領域は、常在性ミクログリアの活性化領域とほぼ一致していた (Nakagawa et al, 2013)。神経損傷の3日目をピークに常在性ミクログリアが活性化し、その後、7日目、14日目にマクロファージの浸潤が生じることが示唆される (Nakagawa et al, 2013)。本研究の結果からはマクロファージとミクログリアの区別は不可能であるが、神経障害性疼痛の発症に関して、中枢においては、先にミクログリアが関与し、その後、浸潤してきたマクロファージが関与すると考えられる。ミクログリアと浸潤マクロファージは、細胞体の大きさや突起の数や長さなどの形態学的特徴、電

気生理的特徴、また動的特性で異なる (Feng et al, 2019) が、多くの免疫学的特性を共有している (Koso et al, 2016)。Iba1 はミクログリアとマクロファージの両方に発現するタンパク質であるため、今回、抗 Iba1 抗体陽性細胞はミクログリアだけでなく、浸潤したマクロファージである可能性も排除できない。ミコナゾールの効果がミクログリアだけでなく、浸潤したマクロファージの TRPM2 にも作用している可能性もある。

### 3. 神経障害性疼痛と TRPM2 の関係

TRPM2 ノックアウトマウスを用いた、L4 脊髄神経切断や、坐骨神経部分結紮による末梢神経損傷モデルは、疼痛関連行動の有意な減少を示すことから、TRPM2 が神経障害性疼痛に関与することが示唆されている (Nakagawa et al, 2014)。また、坐骨神経部分結紮モデルにおいて、後角内ミクログリアの TRPM2 の mRNA が増加し (Nakagawa et al, 2013)、この所見も TRPM2 が神経障害性疼痛と関連することを示唆している。

本研究では、眼窩下神経結紮後に Vc におけるミクログリアの活性化を示す形態変化とミクログリア上の TRPM2 免疫反応性の増加を認めたことは、これらの報告と矛盾しない。また、whisker pad 部の機械的刺激により抗 pERK 抗体陽性細胞が多く発現していた領域の抗 CD68 抗体陽性細胞数が TRPM2 の拮抗薬であるミコナゾール投与によって減少したことは、TRPM2 を介した、ミクログリアの活性化の抑制を示唆している。この変化は、機械的刺激に対する閾値の上昇と Vc における抗 pERK 抗体陽性細胞数の減少を伴っていた。

#### 4. ミコナゾールの TRPM2 への作用

ミコナゾールは TRPM2 の不可逆的拮抗薬とされている (Hill et al, 2004)。TRPM2 遺伝子欠損マウスからの培養ミクログリアを用いた研究 (Haraguchi et al, 2013; Miyake et al, 2016) から、TRPM2 はミクログリアでの NO 産生に関与することが報告されている。NO 産生の増加は、一次ニューロン終末からの伝達物質増加を引き起こし、二次ニューロンの NMDA 受容体の活性化を進行させる (Iyengar et al, 2017)。ミコナゾール投与による TRPM2 の拮抗は、NO 産生を抑制することによって、神経障害性疼痛を抑制する可能性がある。しかし行動学的な評価に留まるが、ミコナゾールによる TRPM2 の拮抗によって得られた閾値の上昇が投与 15 分後という短期間で生じることから、TRPM2 を介した NO 産生の抑制に起因するような反応である可能性は低い。ミクログリアは LPS/IFN $\gamma$  によって誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase: iNOS) が誘導される (川原ら、2004)。本研究においても iNOS が誘導された可能性がある。ミコナゾールは iNOS にも結合することが報告されており (Yeo et al, 2020)、ミコナゾールが iNOS に直接的に作用するならば、投与後短時間での効果発現も可能性があるのではないかと考える。同じく iNOS が誘導される活性化マクロファージでは iNOS が転写・誘導されることで、サイトカインなどの物質にさらされてから数時間後に NO の産生を開始し、数時間にわたって大量の NO が合成されることがわかっている (Xie et al, 1992)。

活性化ミクログリアは、眼窩下神経結紮後 1 日目ではなく、3 日目をピークに Vc 領域で

多く観察され、7日目から14日目まで持続するという報告がある (Shibuta et al, 2012)。

TRPM2 の出現も同時期と考え、ミコナゾールの効果を観察するには、ミクログリアの活性化が顕著な結紮後3日目から7日目がよいと判断した。

ミコナゾールを単回投与した後、一度上昇した逃避閾値が投与30分以降、再び低下するという現象が認められた。この理由として単回投与では全ての TRPM2 が拮抗されるとは限らず、拮抗されず残った TRPM2 では  $\text{Ca}^{2+}$  の流入が生じ、その後のカスケード反応が続ぎ、投与から時間が経過するほど、その影響が現れた可能性が考えられる。LPS や IFN- $\gamma$  を投与すると、30分から60分後に緩やかにミクログリア内に  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が誘導されるが、TRPM2 遺伝子欠損マウスではこの現象は生じなかった (Miyake et al, 2014) ことから、ミコナゾールにより拮抗されずに残った TRPM2 が存在するミクログリアでは、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇に暫く時間を要するため、45分や60分後に閾値が再び低下した可能性も考えられる。またラットに $^3\text{H}$ -ミコナゾール 1 mg(50 $\mu\text{Ci}$ )/kg を静注し、2コンパートメントモデルで算出した半減期は $\alpha$ 相 0.69 時間、 $\beta$ 相 21.74 時間であり (持田製薬株式会社、2021)、およそ40分で血中濃度は約半分に減少する。また、今回のように腹腔内投与を行った場合、肝臓での初回通過効果を受けることになるが、ミコナゾールは肝臓における初回通過効果による代謝を受けやすいことが示唆されている (持田製薬株式会社、2021)。よって、本研究におけるミコナゾール単回投与後30分以降の効果の減少は、ミコナゾールの血中濃度の経時的な減少も関与している可能性がある。

## 5. 抗 pERK 抗体陽性細胞発現部位における抗 CD68 抗体陽性細胞数の変化

坐骨神経結紮ラットの CD68 発現の有意な増加は CCI 損傷後に認められ、また結紮 7 日目の抗 CD68 抗体陽性細胞が抗 Iba-1 抗体陽性細胞と一致することが確認されている (Li et al, 2013)。本研究で行った 5 分間の機械刺激では、刺激前後の抗 CD68 抗体陽性細胞の発現量は変化しないと考えられる。

ION-CCI ラットの Vc では、アストログリアやミクログリア細胞ではなく、ニューロンで ERK がリン酸化されている (Suzuki et al, 2013)。口腔顔面領域に侵害刺激が伝わると、数分以内に Vc ニューロンに ERK のリン酸化が生じ、抗 pERK 抗体陽性細胞として検出される。ERK のリン酸化は侵害刺激強度に依存して抗 pERK 抗体陽性細胞数を増加させる (Kobayashi, 2011)。ただし、pERK は侵害刺激後 10 分経過すると減少し、抗 pERK 抗体陽性細胞数が半減するとの報告もある (Gao and Ji, 2009)。

結紮 7 日目に上顎 whisker pad 部皮膚を 15.0 g の von Frey filament で 5 分間刺激したところ、抗 pERK 抗体陽性細胞が obex から 1950~2250 $\mu$ m 尾側の Vc 表層において多く発現していた。ミコナゾールは、機械刺激に対する同部位の抗 pERK 抗体陽性細胞数と抗 CD68 抗体陽性細胞数を減少させ、神経障害性疼痛を改善した。

過去の報告では、ION-CCI 後 3 日目に、結紮側の上顎 whisker pad 部皮膚を 15.0 g の von Frey filament で刺激したところ、Vc の第 2 枝領域の抗 pERK 抗体陽性細胞数が sham ラットに比べ有意に多かった (Shibuta et al, 2012)。また、処置後 7 日目の sham ラットお

よび ION-CCI ラットにおいて、6.0 g の非痛覚刺激および 60 g の痛覚刺激を 15 分間与えると結紮側の Vc の表層に多数の抗 pERK 抗体陽性細胞が観察され、sham ラットおよび ION-CCI ラットの非結紮側の Vc には抗 pERK 抗体陽性細胞は観察されなかった (Suzuki et al, 2013)。さらに、6.0 g の刺激を与えた場合、抗 pERK 抗体陽性細胞は obex から尾側 1.4mm にほぼ限局して存在し、60 g の刺激では obex から尾側 1.4mm をピークに、尾側に約 2.9mm の範囲に存在していた。一方、ION-CCI ラットに 60g の機械的刺激を 1 Hz で 10 分間、結紮側に与えた場合、obex から尾側約 2400 $\mu$ m に抗 pERK 抗体陽性細胞が発現していたという報告もある (佐藤ら、2018)。このように、抗 pERK 抗体陽性細胞の発現する位置は、報告により違いはあるものの、Vc の表層の比較的狭い範囲に限局している。

#### 6. 抗真菌薬としてのミコナゾールの投与量と今回の投与量との比較

Candida 感染ラットに対するミコナゾールの筋肉内投与量は 50 mg/kg/日で 85%の生存率を示し、100 mg/kg/日で 100%の有効性を示したとの報告がある。また、20 匹のラットを使った毒性試験ではミコナゾールを筋肉注射で 1 日 100 mg/kg の用量で 10 日間投与しても、副作用は認められていない (Balk et al,1978)。ミコナゾール 30mg/kg~60 mg/kg のラットの静脈内投与では、中枢神経系および末梢神経系、及び骨格筋に対しほとんど影響を及ぼさないという報告もある (持田製薬株式会社、2021)。

ラットの坐骨神経を鉗子でクランプして作製された sciatic nerve crush injury モデルに対

して、ミコナゾールを7日間連続投与すると、軸索の再生、感覚の回復、シュワン細胞の増殖等は認められるが、ミコナゾールに由来すると考えられる明らかな有害作用は報告されていない (Lin et al, 2018)。また、本研究で用いたミコナゾールの1回の投与量は、この研究で用いられたものと同じである。ラットに  $^3\text{H}$ -ミコナゾール 1 mg(50 $\mu\text{Ci}$ )/kg を単回静注した場合、投与 5 分後の組織内濃度は血液 1.97  $\mu\text{g eq./g}$ 、脳 1.62  $\mu\text{g eq./g}$  で、分布率は血液 12.66、脳 0.96 であり、脳へのミコナゾールの分布が確認されている (持田製薬株式会社、2021)。今回の実験では、ミコナゾールの抗真菌作用については評価していないが、腹腔内投与された 10 mg/kg のミコナゾール濃度では既報の抗真菌作用よりも用量が低いため、本研究では抗真菌作用の影響は少ないものと推測される。ただし、ヒトの神経障害性疼痛の治療に用いるミコナゾールの適切な投与量については、今後の検討が必須である。

## 結語

TRPM2 は、神経障害性疼痛の治療のための新たな標的分子となる可能性がある。また、その拮抗薬であるミコナゾールはドラッグリポジショニングとして神経障害性疼痛の治療薬となる可能性を持つ。

本論文の内容の一部は、第 49 回日本歯科麻酔学会学術集会（2021 年，オンライン開催）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口腔科学専攻高次脳口腔機能学講座（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口腔科学専攻高次脳口腔機能学講座（歯科麻酔学教室）の前川博治助教に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の円滑な進展のためご理解、ご協力頂きました歯科麻酔学教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- Argoff CE. The coexistence of neuropathic pain, sleep, and psychiatric disorders: a novel treatment approach. *Clin J Pain*. 2007;23(1):15-22.
- Asano S, Okada-Ogawa A, Abe S, Tsukuda A, Imamura Y. Involvement of IFN- $\gamma$  of trigeminal spinal subnucleus caudalis microglia in neuropathic pain in rats with infraorbital nerve injury. *Nihon Shikamasuigaku Zasshi*. 2019;47(2):34-40.
- Balk MW, Crumrine MH, Fischer GW. Evaluation of miconazole therapy in experimental disseminated candidiasis in laboratory rats. *Antimicrob Agents Chemother*. 1978;13(2):321-5.
- Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988;33:87-107.
- Bourquin AF, Suveges M, Pertin M, Gilliard N, Sardy S, Davison AC, Spahn DR, Decosterd I. Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. *Pain*. 2006;122:1-14.
- Bridges D, Thompson SW, Rice AS. Mechanisms of neuro-pathic pain. *Br J Anaesth*. 2001;87:12-26.
- Calvo M, Dawes JM, Bennett DLH. The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. *Lancet Neurol*. 2012;11(7):629-42.

- Cavalli E, Mammana S, Nicoletti F, Bramanti P, Mazzon E. The neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2019;33: 2058738419838383.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci.* 2009;32:1-32.
- Coull JAM, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature.* 2005;438(7070):1017-21.
- Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain.* 2000;87:149-58.9.
- Feng L, Murugan M, Bosco DB, Liu Y, Peng J, Worrell GA, Wang HL, Ta LE, Richardson JR, Shen Y, Wu LJ. Microglial proliferation and monocyte infiltration contribute to microgliosis following status epilepticus. *Glia.* 2019;67(8):1434-1448.
- Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, Gilron I, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Kamerman PR, Lund K, Moore A, Raja SN, Rice AS, Rowbotham M, Sena E, Siddall P, Smith BH, Wallace M. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2015;14(2):162-73.
- Gao YJ and 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.

- Gao YJ and Ji RR. Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacol Ther.*2010;126(1):56-68.
- Hains BC, Waxman SG. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2006;26:4308-4317.
- Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 2007;10(11):1387-94.
- Haraguchi K, Kawamoto A, Isami K, Maeda S, Kusano A, Asakura K, Shirakawa H, Mori Y, Nakagawa T, Kaneko S. TRPM2 contributes to inflammatory and neuropathic pain through the aggravation of pronociceptive inflammatory responses in mice. *J Neurosci.* 2012;32:3931-3941.
- Hill K, McNulty S, Randall AD. Inhibition of TRPM2 channels by the antifungal agents clotrimazole and econazole. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004;370:227-237.
- Hogan Q. Animal pain models. *Reg Anesth Pain Med.* 2002;27:385-401.
- Inoue K. The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release. *Pharmacol Ther.* 2006;109(1-2):210-26.
- Iyengar S, Ossipov MH, Johnson KW. The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine. *Pain.* 2017;158(4):543-559.
- Kashio M, Sokabe T, Shintaku K, Uematsu T, Fukuta N, Kobayashi N, Mori Y, Tomonaga M.

Redox signal-mediated sensitization of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(17):6745-50.

- Kawanokuchi J, Mizuno T, Takeuchi H, Kato H, Wang J, Mitsuma N, Suzumura A. Production of interferon-gamma by microglia. *Mult Scler.* 2006;12(5):558-64.
- Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain.* 1992;50:355-63.
- 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;10:7-12.
- Koso H, Tsubako A, Lai CY, Baba Y, Otsu M, Ueno K, Nagasaki M, Suzuki Y, Watanabe S. Conditional rod photoreceptor ablation reveals Sall1 as a microglial marker and regulator of microglial morphology in the retina. *Glia.* 2016 Nov;64(11):2005-24.
- Kraft R, Grimm C, Grosse K, Hoffmann A, Sauerbruch S, Kettenmann H, Schultz G, Harteneck C. Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286(1):C129-37.
- Li K, Tan YH, Light AR, Fu KY. Different peripheral tissue injury induces differential phenotypic changes of spinal activated microglia. *Clin Dev Immunol.* 2013:901420.
- Lin T, Quir S, Yan L, Zhu S, Zheng C, Zhu Q, Liu X. Miconazole enhances nerve regeneration

and functional recovery after sciatic crush injury. *Muscle and Nerve*. 2018;57:821-828.

- Maegawa H, Usami N, Kudo C, Hanamoto H, Niwa H. Dopaminergic Modulation of Orofacial Mechanical Hypersensitivity Induced by Infraorbital Nerve Injury. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(6):1945.
- Maegawa H, Yoshikawa C, Usami N, Hanamoto H, Kudo C, Niwa H. Anti-calcitonin gene-related peptide antibody attenuates orofacial mechanical and heat hypersensitivities induced by infraorbital nerve injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;569:147-153.
- Maegawa H, Yoshikawa C, Usami N, Niwa H. Cerebroventricular administration of anti-calcitonin gene-related peptide antibody reduces the increase of dopamine D2 receptor observed in the trigeminal spinal subnucleus caudalis following infraorbital nerve ligation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022;614:78-84.
- Masuda T, Ozono Y, Mikuriya S, Kohro Y, Tozaki-Saitoh H, Iwatsuki K, Uneyama H, Ichikawa R, Salter MW, Tsuda m, Inoue K. Dorsal horn neurons release extracellular ATP in a VNUT-dependent manner that underlies neuropathic pain. *Nat Commun*. 2016;12;7:12529.
- Maves TJ, Pechman PS, Gebhart GF, Meller ST. Possible chemical contribution from chronic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1993;54(1):57-69.
- Meyer-Rosberg K, Kvarnström A, Kinnman E, Gordh T, Nordfors LO, Kristofferson A. Peripheral neuropathic pain--a multidimensional burden for patients. *Eur J Pain*. 2001;5(4):379-

89.

- Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(1):23-36.
- Miyake T, Shirakawa H, Kusano A, Sakimoto S, Konno M, Nakagawa T, Mori Y, Kaneko S. TRPM2 contributes to LPS/IFN $\gamma$ -induced production of nitric oxide via the p38/JNK pathway in microglia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;444(2):212-7.
- Miyake T, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Reactive oxygen species signaling in the regulation of microglial functions—TRP channel-mediated novel mechanisms of microglial activation. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2016;147(1):6-11.
- Nakagawa T, Isami K, Haraguchi K, So K, Asakura K, Shirakawa H, Kaneko S. Involvement of spinally-infiltrated immune cells in peripheral nerve injury-induced neuropathic pain: roles of TRPM2. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2013;142(5):215-20.
- Nakagawa T, Isami K, Haraguchi K, So K, Asakura K, Shirakawa H, Kaneko S. Roles of transient receptor potential melastatin 2 expressed on immune cells in neuropathic pain. *YAKUGAKU ZASSHI.* 2014;134(3):379-386.
- Ren K, Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med.* 2010; 16(11):1267-76.
- Rode F, Jensen DG, Blackburn-Munro G, Bjerrum OJ. Centrally-mediated antinociceptive actions

of GABA-A receptor agonists in the rat spared nerve injury model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2005;516:131-8.

- Rowbotham DJ. Neuropathic pain and quality of life. *Eur J Pain.* 2002;6 Suppl B:19-24.
- Scholz J, Finnerup NB, Attal N, Aziz Q, Baron R, Bennett MI, Benoliel R, Cohen M, Cruccu G, Davis KD, Evers S, First M, Giamberardino MA, Hansson P, Kaasa S, Korwisi B, Kosek E, Lavand'homme P, Nicholas M, Nurmikko T, Perrot S, Raja SN, Rice ASC, Rowbotham MC, Schug S, Simpson DM, Smith BH, Svensson P, Vlaeyen JWS, Wang SJ, Barke A, Rief W, Treede RD; Classification Committee of the Neuropathic Pain Special Interest Group (NeuPSIG), and Task Force for the Classification of Chronic Pain of the International Association for the Study of Pain (IASP). The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. *Pain.* 2019;160(1):53-59.
- Seltzer ZR, Dubner Y Shir. A novel model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain.* 1990;43:205-212.
- 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; 27;1451:74-86.
- Smith MT, Perlis ML, Smith MS, Giles DE, Carmody TP. Sleep quality and presleep arousal in chronic pain. *J Behav Med.* 2000;23(1):1-13.

- Sugiyama T, Shinoda M, Watase T, Honda K, Ito R, Kaji K, Urata K, Lee J, Ohara K, Takahashi O, Echizenya S, Iwata K. Nitric oxide signaling contributes to ectopic orofacial neuropathic pain. *J Dent Res.*2013;92(12):1113-1117
- Sumoza-Toledo A, Penner R. TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling. *J Physiol.* 2011;589(7):1515-25.
- 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.
- Takahashi N, Kozai D, Kobayashi R, Ebert M, Mori Y. Roles of TRPM2 in oxidative stress. *Cell Calcium.* 2011;50(3):279-87.
- Togashi K, Inada H, Tominaga M. Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate(2-APB). *Br J of Pharmacol.* 2008;153(6),1324–1330.
- Tsuda M, Inoue K, Salter MW. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci.* 2005;28(2):101-7.
- Tsuda M, Mizokoshi A, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Inoue K. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia.* 2004;45(1):89-95.

- van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain*. 2014;155(4):654-662.
- Wang L, Fu TM, Zhou Y, Xia S, Greka A, Wu H. Structures and gating mechanism of human TRPM2. *Science*. 2018;362(6421):eaav4809
- Wang LX, Wang ZJ. Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55:949-65.
- Woolf C.J. and Salter M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* . 2000;288:1765-1769
- Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 1992;256(5054):225-8.
- Yeo IJ, Yun J, Son DJ, Han SB, Hong JT. Antifungal drug miconazole ameliorated memory deficits in a mouse model of LPS-induced memory loss through targeting iNOS. *Cell Death Dis*. 2020;11(8):623.
- Zhang H, Yu P, Lin H, Jin Z, Zhao S, Zhang Y, Xu Q, Jin H, Liu Z, Yang W, Zhang L. The Discovery of Novel ACA Derivatives as Specific TRPM2 Inhibitors that Reduce Ischemic Injury Both In Vitro and In Vivo. *J Med Chem*. 2021;64(7):3976-3996.
- 川原 浩一, 森 正敬, 中山 仁. ミクログリアにおける NO 誘導性アポトーシスと小胞

体ストレス. 日本薬理学雑誌. 2004;124(6):399-406.

- 佐藤 有華, 今村 佳樹, 岩田 幸一, 岡田 明子.眼窩下神経損傷モデルラットにおける神経障害性疼痛の発症機構.日大歯学. 2018;92(1).43-50.
- 篠田 雅路.顎顔面口腔領域における疼痛伝達機構の可塑的变化. 日本口腔顔面痛学会雑誌. 2019;11(1).9-14.
- 高塚 直能. 鎮痛補助薬——抗うつ薬、Ca<sup>2+</sup>チャネル  $\alpha_2\delta$  リガンド、ケタミン、抗けいれん薬、抗不整脈薬、ステロイド.月刊薬事. 2021.63(1):59-64.
- 千葉 雅俊, 樋口 景介, 近藤 武光, 越後 成志. 歯科治療を契機に発症した三叉神経領域の神経因性疼痛の臨床像. 日本口腔科学会雑誌. 2008; 57(4):379-384.
- 津田 誠.アストロサイトと神経障害性疼痛. 実験医学. 2021 ;39(15):2393-2398.
- 持田製薬株式会社.医薬品インタビューフォーム 口腔・食道カンジダ症治療剤 ミコナゾール フロリードゲル経口用 2%.2021.改定第 8 版
- 持田製薬株式会社.医薬品インタビューフォーム 深在性真菌症治療剤 ミコナゾール フロリード注 200mg.2021.第 10 版

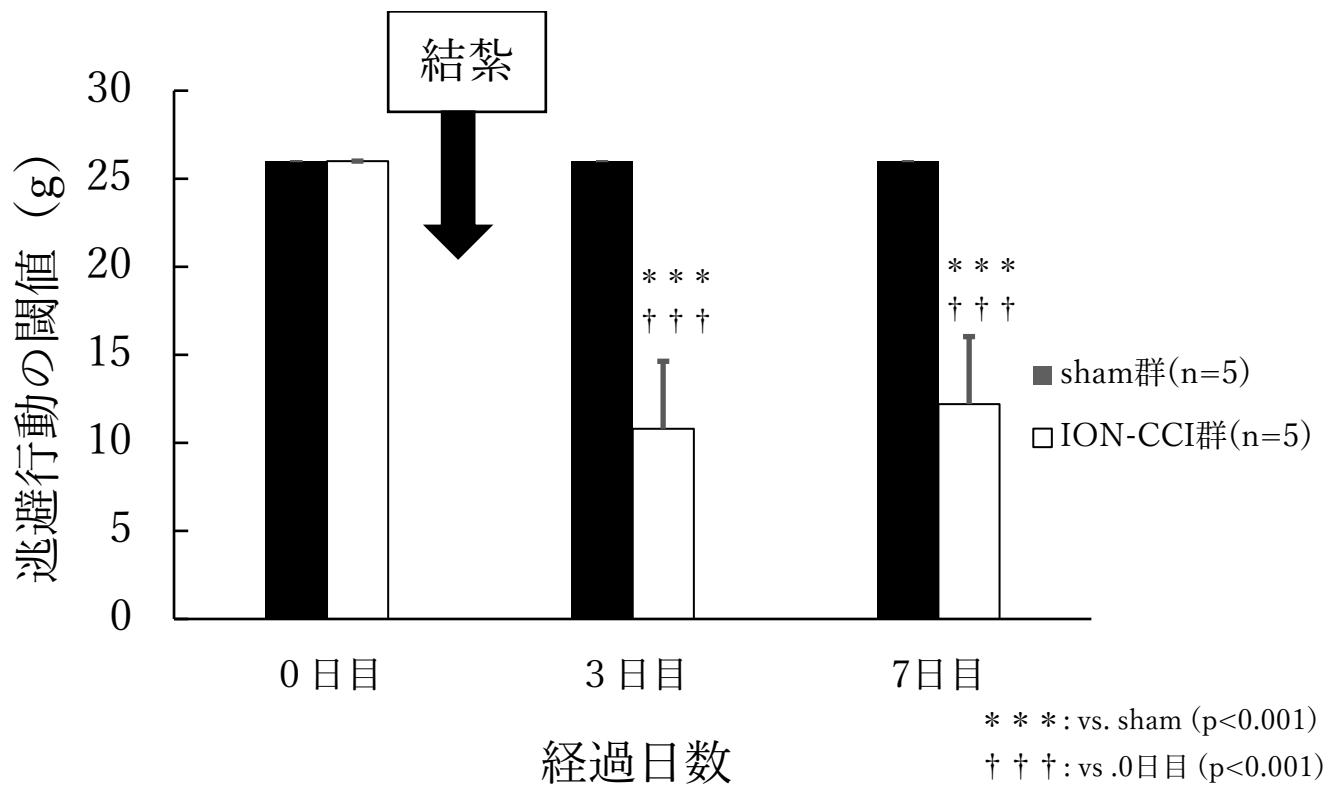


Fig.1 . 結紮後の逃避行動の閾値の変化

眼窩下神経を結紮した後の逃避行動の閾値の変化を示す (平均±標準誤差)。眼窩下神経結紮を行った ION-CCI 群は、結紮前と比べ、結紮後 3 日目、7 日目に有意な閾値の低下を示した。一方、sham 群にはいずれの時点においても閾値の低下は認められなかった。ION-CCI 群は sham 群と比較して、3 日目と 7 日目で有意な閾値の低下を示した。

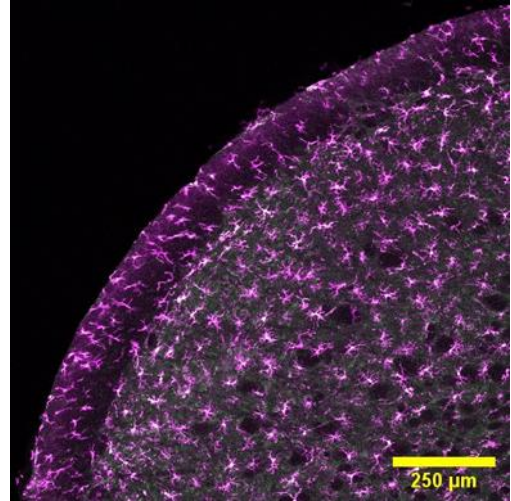
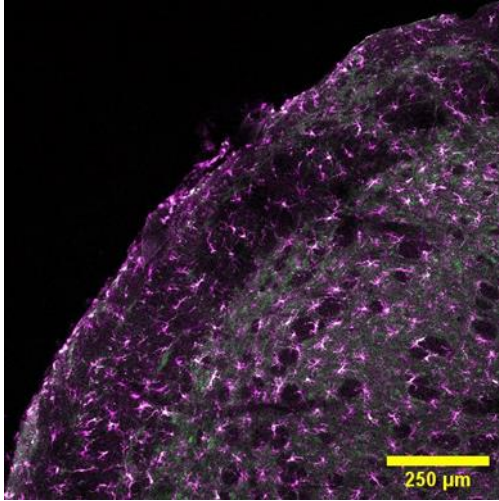
A

sham 群

ION-CCI 群

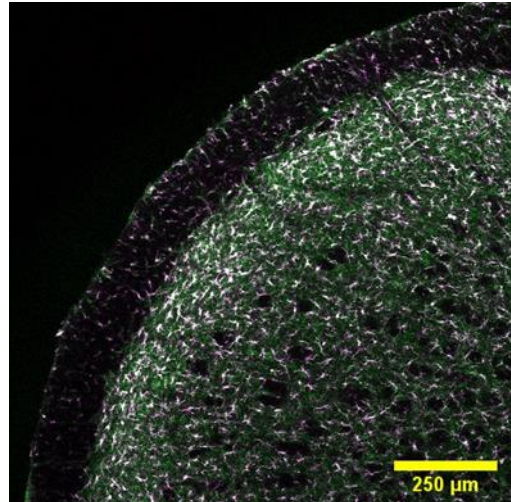
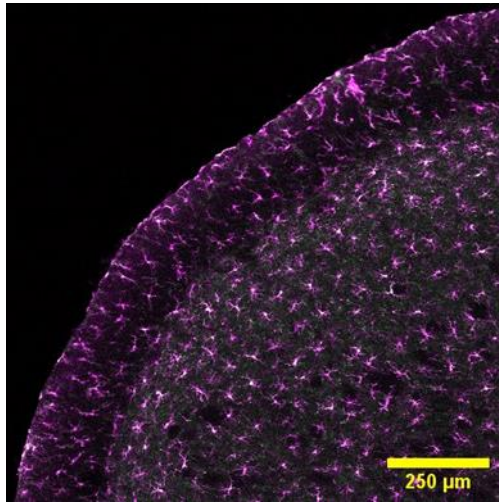
結紮後

1 日目



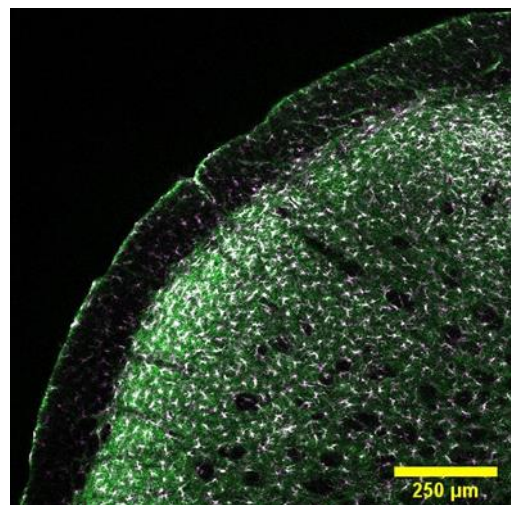
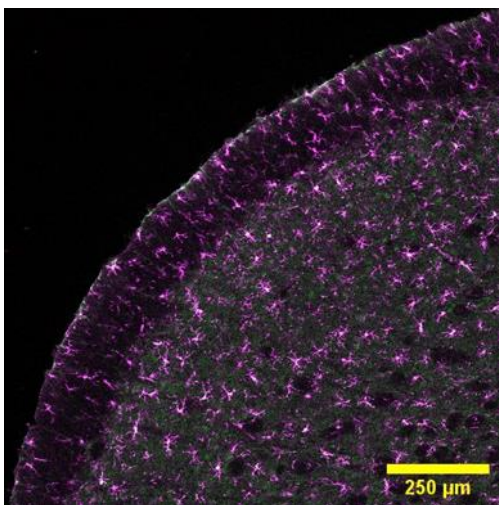
結紮後

3 日目



結紮後

7 日目

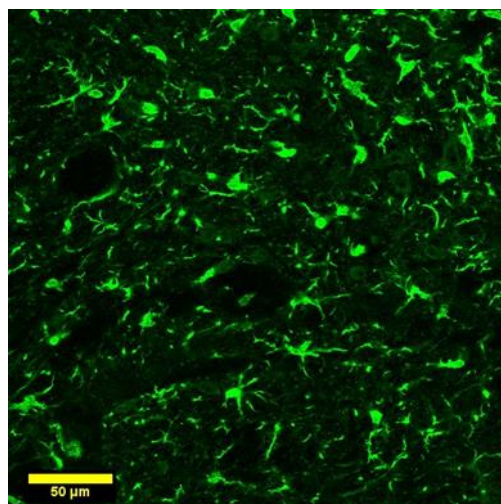
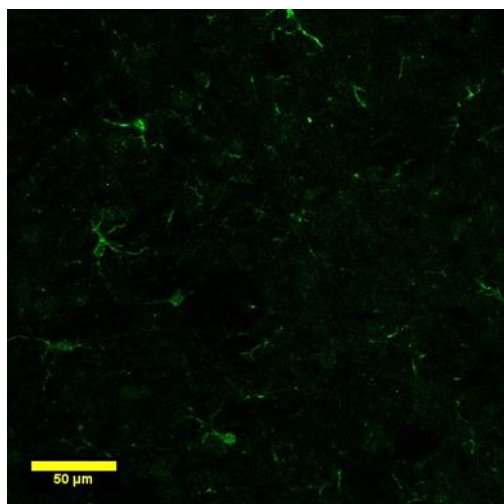


B

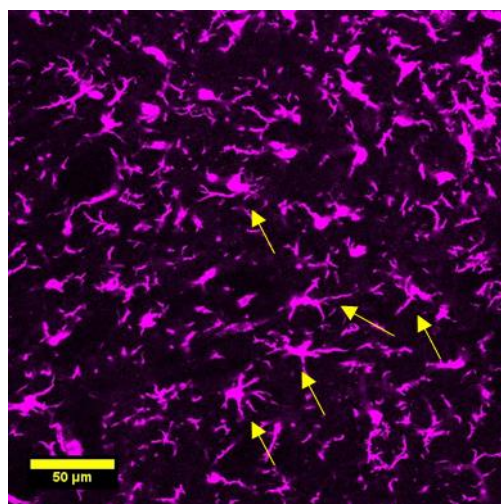
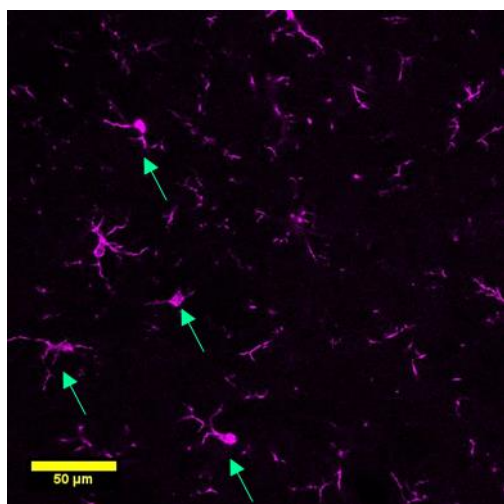
sham 群 (3 日目)

ION-CCI 群(3 日目)

TRPM2



Iba1



merged

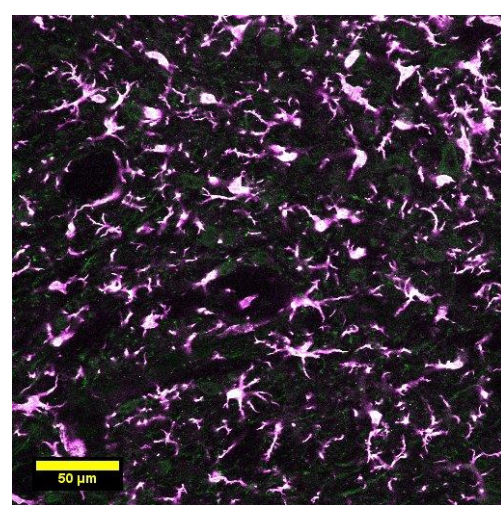
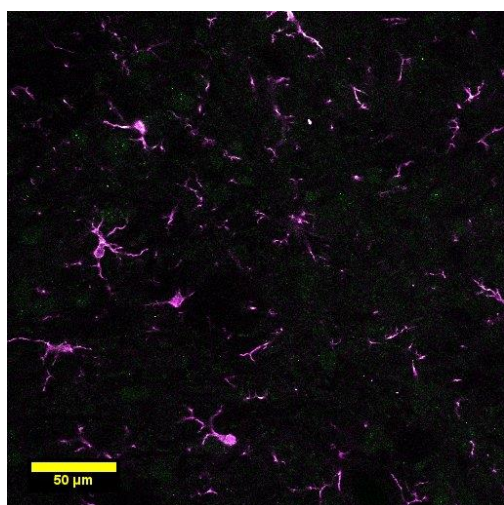


Fig.2 . Vc のミクログリアに発現している TRPM2

A. 抗 Iba1 抗体で標識されたミクログリア（マゼンタ）と、抗 TRPM2 抗体での標識部位（緑）を重ね合わせた顕微鏡写真を示す。両者は重なり合うことが確認された。これにより、TRPM2 はミクログリア上に発現していることが確認された。

B. 神経結紮後、3 日目に活性型ミクログリアが認められた（黄色の矢印）。sham 群には活性型ミクログリアは認められず、静止型ミクログリアが認められた（緑の矢印）。

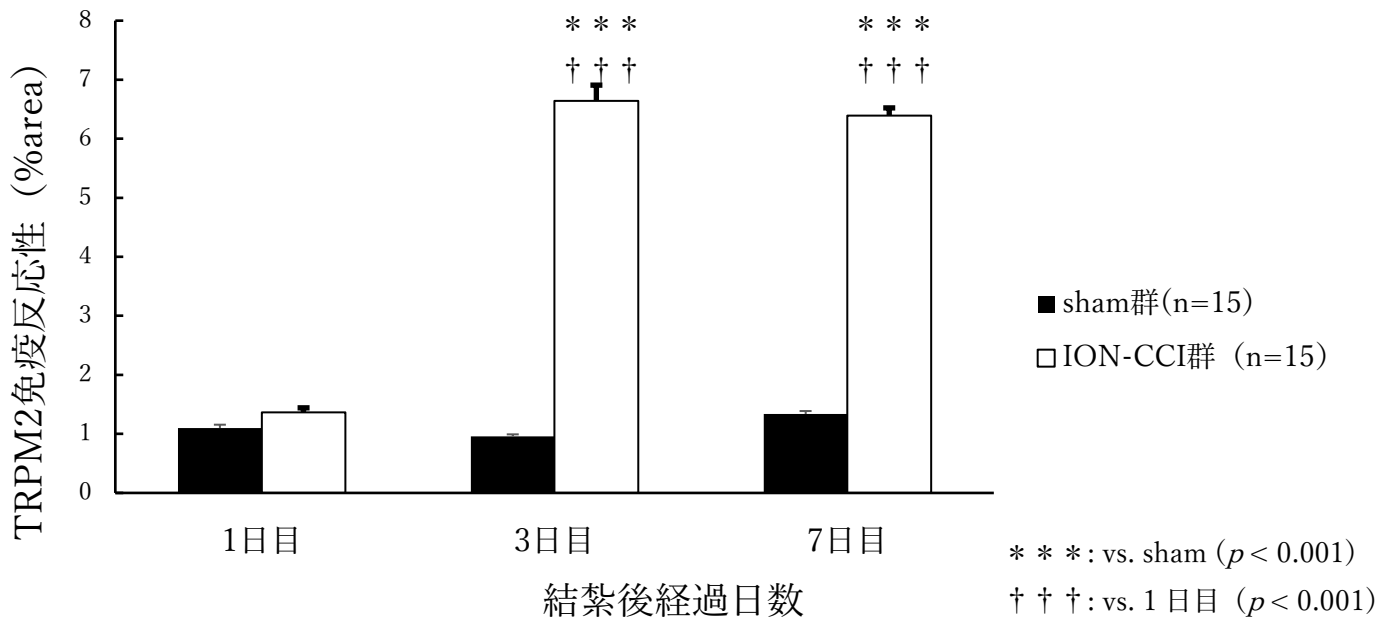


Fig.3 . Vc のミクログリア上の TRPM2 の免疫反応性

眼窩下神経結紮後の日数経過に伴う Vc のミクログリア上の TRPM2 の免疫反応性の変化を示す（平均±標準誤差）。Vc のミクログリア上の TRPM2 の免疫反応性は、ION-CCI 群において、結紮後 1 日目と比べて、結紮後 3 日目と 7 日目では有意な増加を認めた。ION-CCI 群の結紮後 3 日目と 7 日目は sham 群との比較でそれぞれ有意な増加を示した。

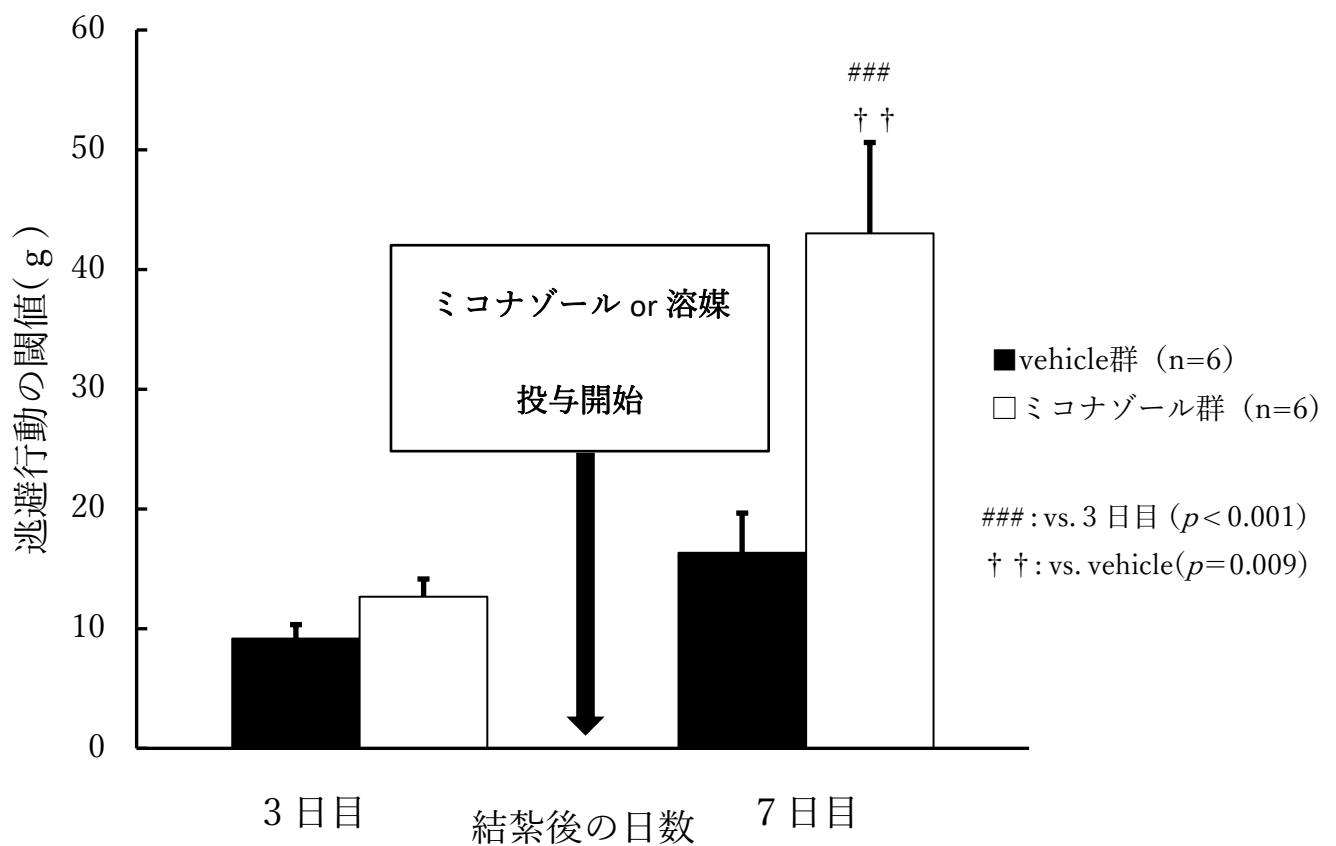


Fig.4 . ミコナゾールの連続投与による効果

ミコナゾールの連続投与を4日間行った場合の逃避行動の閾値の変化を示す(平均±標準誤差)。ミコナゾール群では結紮7日目において、3日目と比較して有意に機械的刺激に対する閾値が上昇していた。また、結紮後7日目において、ミコナゾール群と vehicle 群と比較すると、ミコナゾール群で有意な閾値の上昇が認められた。

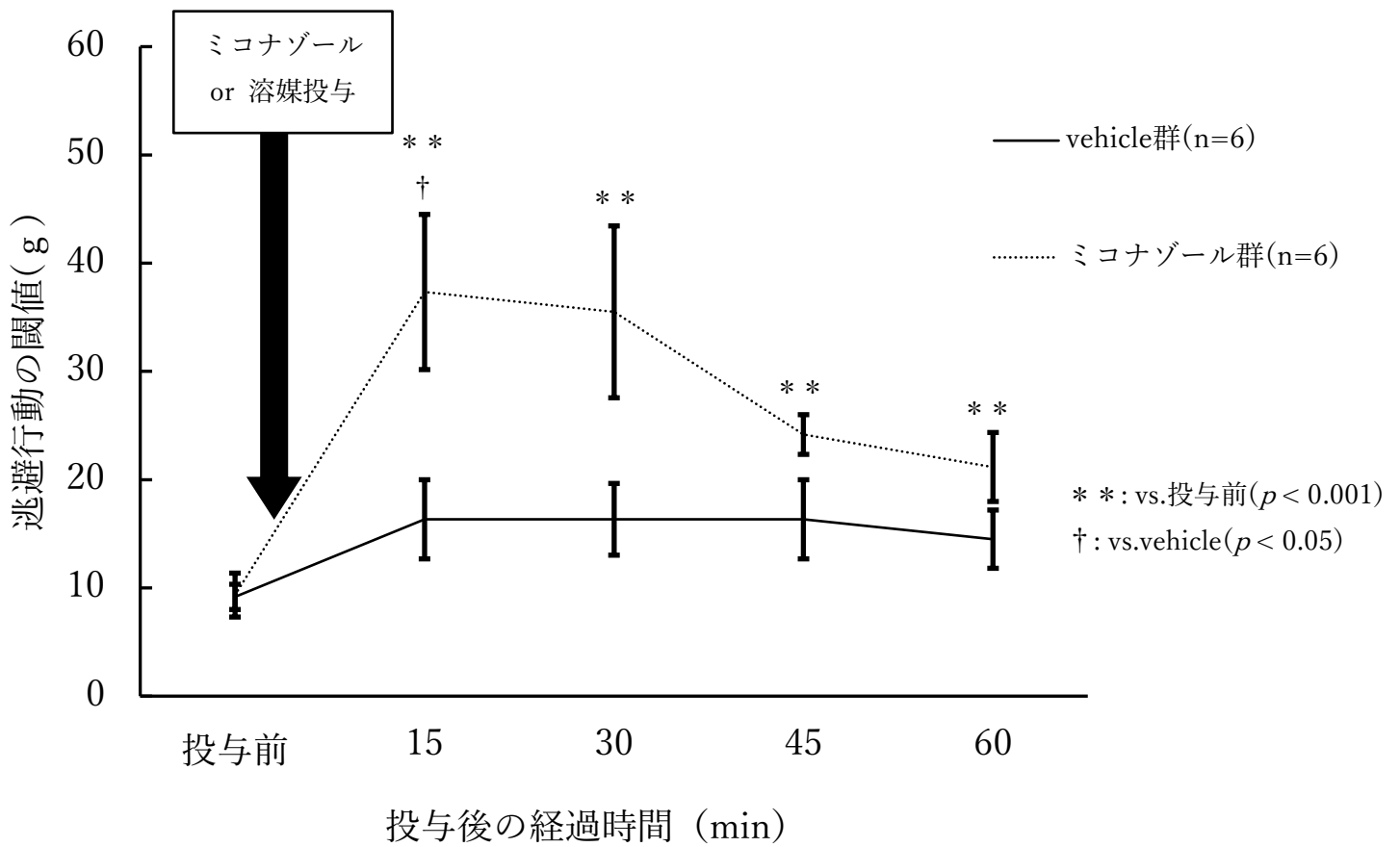


Fig.5 . ミコナゾールの単回投与による効果

結紮後3日目のION-CCIラットに対し、ミコナゾールを単回投与した場合の経時的な閾値の変化を示す(平均±標準誤差)。

ミコナゾール群では、投与前と比較して15分後から60分後までの全ての時点において有意な閾値の上昇が認められた。またvehicle群と比較すると15分後の時点においてはミコナゾール群で有意に閾値が上昇していた。

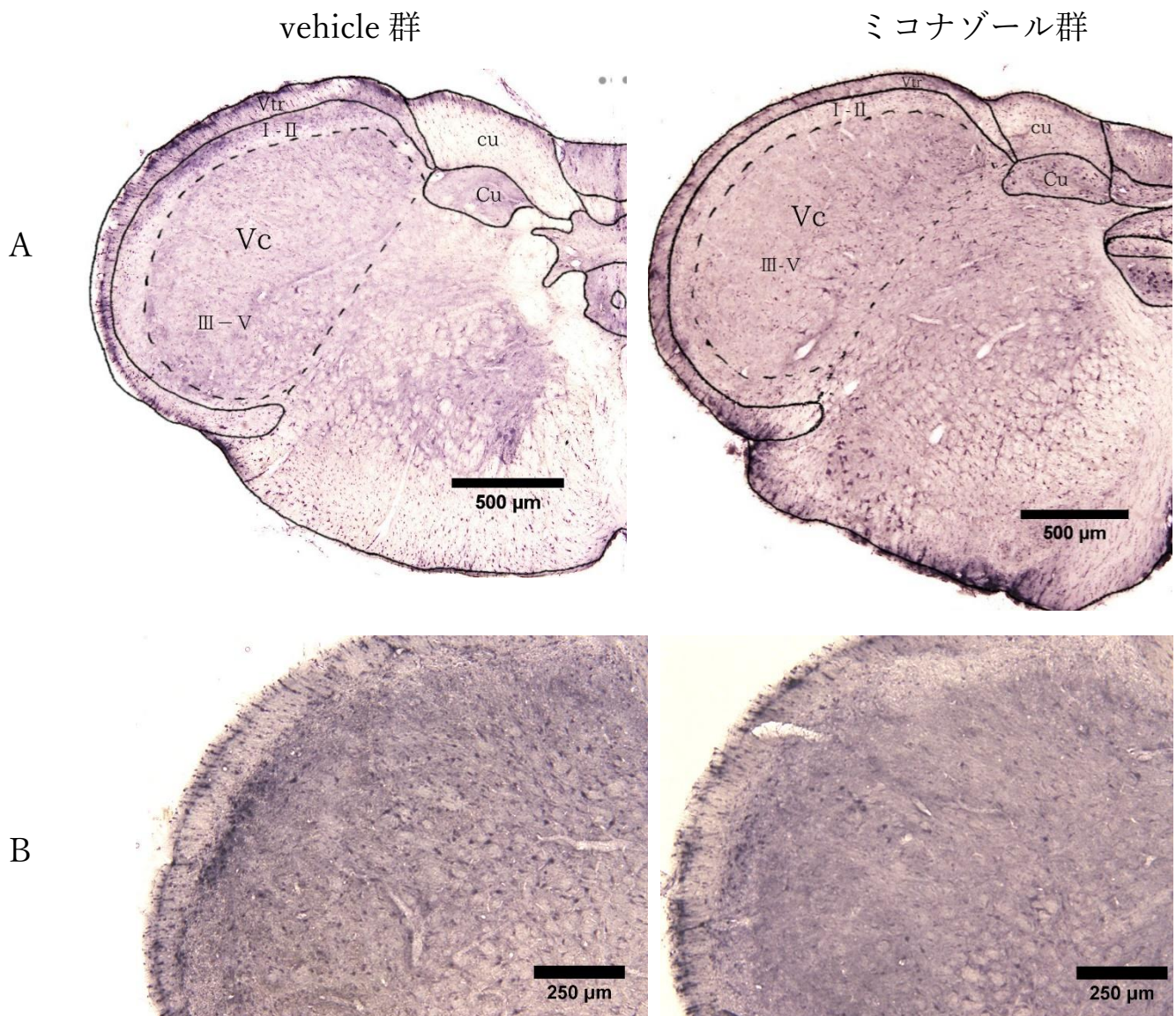


Fig.6 . Vc 表層に発現した抗 pERK 抗体陽性細胞

ミコナゾールが Vc のニューロンの活性化に及ぼす影響を確認するために、ION-CCI ラットの whisker pad 部を刺激した後、抗 pERK 抗体を用いて免疫染色した。

A. vehicle 群、ミコナゾール群ともに obex から約 1950～2250μm 尾側の Vc 表層(I-II層)に抗 pERK 抗体陽性細胞の発現が認められた。

B. 最も抗 pERK 抗体陽性細胞が発現していたそれぞれの切片の強拡大写真を示す。

Vc : trigeminal subnucleus caudalis ; Vtr : spinal trigeminal tract ; Cu : cuneate nucleus ; cu : cuneate fasciculus

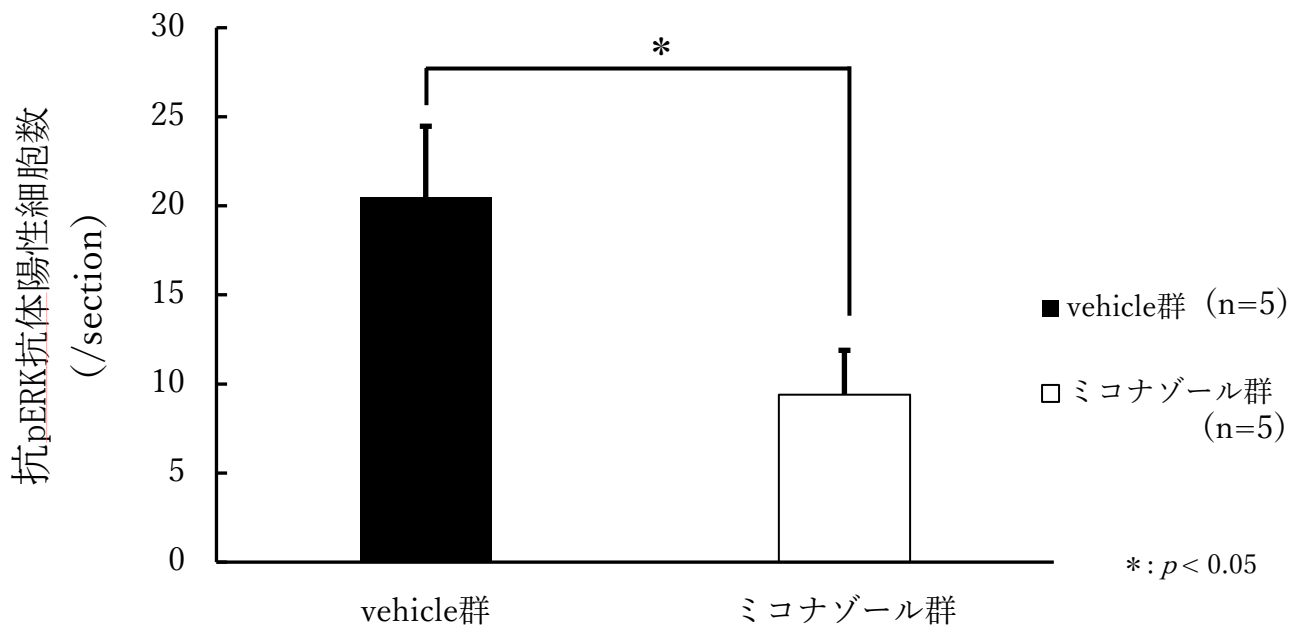
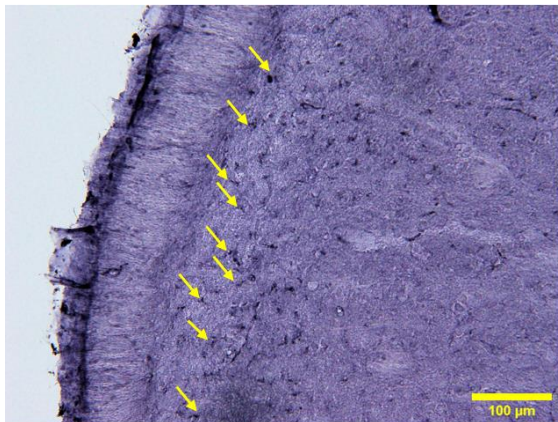


Fig.7 . Vc 領域に発現した抗 pERK 抗体陽性細胞数の比較

ミコナゾールが Vc のニューロンの活性化に及ぼす影響を確認するために、ION-CCI ラットの whisker pad 部を刺激した後、抗 pERK 抗体を用いて免疫染色を行った。obex から約 1950~2250 $\mu$ m 尾側の抗 pERK 抗体陽性細胞数を、同部位の切片 5 枚を抽出して解析した (平均 $\pm$ 標準誤差)。抗 pERK 抗体陽性細胞数は vehicle 群と比較してミコナゾール群で有意に減少した。

A. vehicle 群



B. ミコナゾール群

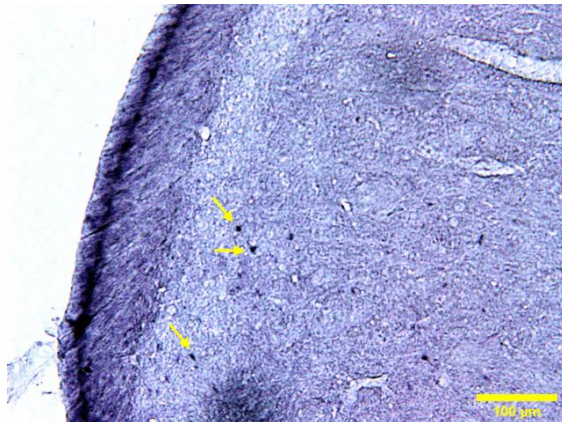


Fig.8 . Vc に発現した抗 CD68 抗体陽性細胞

obex から約 1950~2250μm 尾側の Vc の顕微鏡写真を示す。ミクログリアの活性化を評価するため、ION-CCI ラットの whisker pad 部を刺激した後、抗 CD68 抗体を用いて免疫染色を行った。Vc 表層に抗 CD68 抗体陽性ミクログリア（黄色の矢印）の発現が認められた。

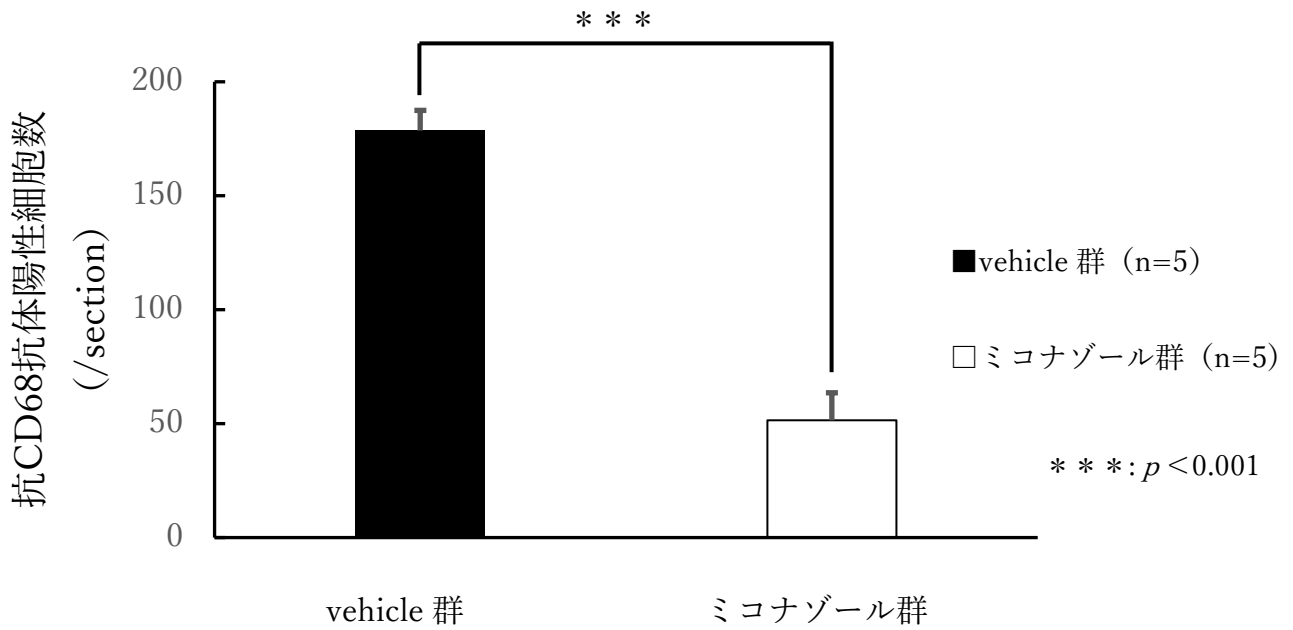


Fig.9 . Vc 表層に発現した抗 CD68 抗体陽性細胞数の比較

ION-CCI ラットの whisker pad 部を刺激した後、抗 CD68 抗体を用いて免疫染色を行った。obex から約 1950~2250 $\mu$ m 尾側の同部位の切片 5 枚を抽出して抗 CD68 抗体陽性細胞数を解析した (平均 $\pm$ 標準誤差)。抗 CD68 抗体陽性細胞数は vehicle 群と比較してミコナゾール群で有意に減少した。