

学位論文

ラット関連疼痛モデルにおける疼痛発現に対する
炎症性サイトカインの影響

高橋 拓史

広島大学大学院医歯薬学総合研究科
顎口腔頸部医科学講座歯科矯正学分野

(主指導教員：丹根 一夫 教授)

2009 年

目次

緒言	1
試料と方法	
1. 実験動物	5
2. オトガイ神経切断・挫滅手術	5
3. von Frey filaments を用いた機械的疼痛逃避行動試験と機械刺激の付与	5
4. 薬剤の髄膜下投与	
1) IL-1ra または MK-801 投与	6
2) TNF-alpha 中和抗体投与	7
3) Recombinant TNF-alpha 投与	7
5. 免疫組織化学染色	8
結果	
1. ラットオトガイ神経切断・挫滅モデルの神経因性疼痛モデルとしての有用性	10
2. ラットオトガイ神経切断モデルの三叉神経脊髄路核における神経膠細胞の局在	
1) 三叉神経脊髄路核の GFAP 免疫陽性細胞の変化	13
2) 三叉神経脊髄路核の CD11b 免疫陽性細胞の変化	15
3. ラットオトガイ神経切断モデルの三叉神経脊髄路核における IL-1beta と神経因性疼痛との関連性	
1) 三叉神経脊髄路核の星状膠細胞における IL-1beta の発現	17
2) IL-1beta 拮抗薬の髄膜下投与による機械的疼痛逃避行動の変化	18
4. ラットオトガイ神経切断モデルの三叉神経脊髄路核における二次ニューロンの活性化と IL-1beta の関連性	
1) IL-1ra 投与後の三叉神経脊髄路核における二次ニューロン活性化の検討	20
2) 三叉神経脊髄路核における IL-1RI、NeuN、c-Fos の局在	23

5. ラットオトガイ神経切断モデルの三叉神経脊髄路核における NMDA 受容体と神経因性疼痛との関連性	24
6. 神経因性疼痛と TNF-alpha との関連性	
1) 三叉神経節における TNF-alpha の局在	26
2) TNF-alpha 拮抗薬の髄膜下投与による機械的疼痛逃避行動の変化	27
3) Recombinant TNF-alpha の髄膜下投与による痛覚過敏発現	29
考察	
1. 実験モデルの設計について	30
2. von Frey filaments による機械的疼痛逃避行動テストについて	30
3. 神経因性疼痛における星状膠細胞と小膠細胞の活性化について	32
4. 神経因性疼痛と c-Fos 免疫陽性細胞との関連性について	33
5. 神経因性疼痛と IL-1 beta との関連性について	33
6. 神経因性疼痛と NMDA 受容体との関連性について	36
7. 神経因性疼痛と TNF-alpha との関連性について	36
総括	39
謝辞	40
文献	41

緒言

痛覚は、身体の損傷や障害が生じた時に、身体を防御して障害を最小限にする上できわめて重要な感覚である。しかし、糖尿病による神経因性の手足の痛み、帯状疱疹治癒後の痛みなどの慢性化した疼痛は、痛みの原因となる身体の異常の警告、すなわち身体防御機能としての意味を有していないため病的疼痛と考えられている(Sweet, 1984; 津田と井上, 2008)。顎顔面・口腔領域においても、顔面皮膚部の放散痛や関連痛を伴う慢性歯髄炎、持続性の灼熱痛を伴う抜歯後カウザルギー、顎関節機能異常症候群などで発現する慢性疼痛が知られており、歯科医師と患者のいずれにおいても大きな問題である(Koyess and Fares, 2006)。このような慢性疼痛のうち神経損傷を伴う形質変化や機能異常を生じている場合は神経因性疼痛と呼ばれ、脊髄神経系と比べて三叉神経系においてより多く発現する(Sweet, 1984)。特に、口腔、顔面、頸部では、原因疾患部位より離れた部位に発生するいわゆる慢性の関連疼痛(Koyess and Fares, 2006)が頻繁に発生することが知られている。歯髄炎の原因歯を正確に同定することができないのはその一例である(Koyess and Fares, 2006)。また、顎関節炎は放散性疼痛を併発することが知られている(横田, 2001)。

このように、慢性関連疼痛は患者のQOLを低下させ、その原発疾患の治療を妨げるため、適切な疼痛治療が必要となるが、疼痛発生部位が原因疾患と離れていることに加え、既存の鎮痛薬である非ステロイド性抗炎症薬やモルヒネが奏功しないことが治療をより困難にしている。そこで、三叉神経系における関連疼痛発生の解明を目指した研究が行われ、ラットのオトガイ神経あるいは下歯槽神経切断後に、三叉神経第二枝によって支配される whisker pad に機械的痛覚過敏が発生することが明らかにされている(Nomura et al., 2002; Piao et al., 2006)。末梢神経であるオトガイ神経切断後に中枢神経系の神経膠細胞が活性化することから、中枢神経系の感作が神

神経因性疼痛発症に関連していることが示唆されている(Piao et al., 2006)ものの、その詳細な発生機序は解明されていない(Nomura et al., 2002)。

顎顔面領域における痛みを含む感覚刺激は、一次求心性感覚神経の興奮を介して、三叉神経脊髄路核の二次ニューロンに伝達され、さらに上位の視床や大脳皮質神経細胞へ伝達され、特定の感覚として認知される(横田, 2001)。末梢神経から二次ニューロンへの上行性経路は、慢性疼痛の発症機序を解明する上で重要と考えられており、これまでに多くの研究者によって検討が進められてきた(Guo et al., 2002; Obata and Noguchi, 2008; Strassman and Vos, 1993; Strassman et al., 1993; Watanabe et al., 2003)。しかしながら、これらの疼痛研究の多くは、二次ニューロンの末梢側終末である脊髄後角または三叉神経脊髄路核の神経細胞に焦点を置いてきた(Guo et al., 2002; Marchand et al., 2005; Strassman and Vos, 1993; Strassman et al., 1993; Watanabe et al., 2003)。一方、最近の研究において中枢神経の非神経系細胞である星状膠細胞や小膠細胞が神経の傷害または炎症に伴って形態的に大きく変化すること(Guo et al., 2007; Jin et al., 2003; Piao et al., 2006)、星状膠細胞または小膠細胞の阻害薬を投与すると慢性疼痛が緩和されること(Guo et al., 2007; Qin et al., 2006; Ying et al., 2006; Meller et al., 1994; Milligan et al., 2000; Milligan et al., 2003; Piao et al., 2006)から、神経因性疼痛と神経膠細胞の関係が注目されてきた。星状膠細胞と小膠細胞の神経因性疼痛との因果関係については長い間不明であったものの、近年、ATP 受容体のサブタイプである P2X₄ 受容体が脊髄の小膠細胞に発現すること(Tsuda et al., 2003)、炎症性サイトカインの一種である Interleukin (IL)-1beta が星状膠細胞に発現し(Zhang et al., 2008)、ともに慢性疼痛に深く関与していることが明らかとなった。

このように、最近の研究において炎症性サイトカインと慢性疼痛との関連性が注目されており(Watkins et al., 2003)、末梢組織の炎症または末梢神経の傷害によって

中枢神経系である脊髄または三叉神経脊髄路核において IL-1beta の発現が増加すること(Guo et al., 2007; Raghavendra et al., 2003; Raghavendra et al., 2004; Samad et al., 2001; Zhang et al., 2008)、IL-1 受容体の拮抗薬である IL-1ra を投与すると慢性疼痛が抑制されること(Guo et al., 2007; Milligan et al., 2001; Zhang et al., 2008)から、慢性疼痛と IL-1beta との関連性が示されている。また、イオンチャンネル型の N-methyl -D-aspartate (NMDA) 受容体は、二次ニューロンに発現して痛覚の伝達に関係していることが知られている(Petrenko et al., 2003)が、IL-1beta は NMDA 受容体によって誘発される細胞内のカルシウムイオンの内向き整流を増加させ(Yang et al., 2005)、細胞内カルシウム濃度を増加させるとの報告がある(Viviani et al., 2003)。さらに、他の炎症性サイトカインである tumor necrosis factor(TNF)-alpha が痛覚過敏に関与していることが示唆されており、TNF-alpha の拮抗薬が神経因性疼痛を緩和することが示されている(Schafers et al., 2003a; Schafers et al., 2003b; Sommer et al., 1998)。このような背景から、三叉神経系の関連疼痛においても IL-1beta、TNF-alpha、NMDA 受容体に関与しているとの仮説を設定した。

前述したように、口腔、顔面、頸部においては、慢性の関連疼痛が多発すること、さらに既存の鎮痛薬が奏功しないことから、有効な治療法の確立が望まれている。このことから、顎顔面領域に特化した関連疼痛モデルを用いてその発症機序を解明することは、治療法を開発する上できわめて重要であると考えられる。本研究では最初に関連疼痛実験モデルの確立を試み、次に三叉神経脊髄路核の神経膠細胞と炎症性サイトカインに着目し、ラットオトガイ神経切断による神経因性慢性疼痛モデルを用いて神経因性疼痛の発現機序を明らかにすることを目的とし、以下の項目について検討した。

1. オトガイ神経切断・挫滅による神経因性関連疼痛モデルとしての有効性を、眼窩下神経の支配領域である whisker pad と、下顎神経支配である masseter について検討した。
2. オトガイ神経切断後、中位核尾側核移行域、尾側核での神経膠細胞の活性を検討した。
3. オトガイ神経切断モデルにおける、神経因性関連疼痛と三叉神経脊髄路核における IL-1beta の関連性を検討した。
4. オトガイ神経切断後の三叉神経脊髄路核における二次ニューロンの活性化と神経因性関連疼痛について検討した。
5. オトガイ神経切断モデルにおける、神経因性関連疼痛と NMDA 受容体との関係について検討した。
6. オトガイ神経切断モデルにおける、神経因性関連疼痛と TNF-alpha との関係について検討した。

試料と方法

1. 実験動物

実験動物として 8 週齢雄性 Sprague-Dawley ラット(日本チャールズ・リバー, 横浜)を用いた。動物の取り扱いは、広島大学実験動物内規にしたがって行われた。

2. オトガイ神経切断・挫滅手術

ペントバルビタール(大日本住友製薬, 大阪)腹腔内投与(0.5 ml/kg)による深麻酔下で以下の手術を行った。神経因性関連疼痛誘発のため Bennett and Xie(1988)の方法に準じて、挫滅群(n=5)では左側オトガイ神経を剖出後、歯科用ピンセットで 20 秒間挟むことにより神経を挫滅し、切断群(n=5)では 5-0 号絹製縫合糸(アルフレックスファーマ, 大阪)を用いて結紮後、近位側を切断した。対照群(n=5)ではオトガイ神経の剖出のみを行い、直ちに皮膚縫合を行った。

3. von Frey filaments を用いた機械的疼痛逃避行動試験と機械刺激の付与

疼痛閾値を測定する行動テストとしては von Frey filaments (North Coast Medical, Inc., Morgan Hill, CA, USA)を用いて行った。術者は綿の手袋を装着し、ラットが後ろ足で立って、術者の手のひらに屈みこむように訓練した。Whisker pad(洞毛植立部皮膚)および masseter(咬筋表面部皮膚)に、屈曲圧が 0.02-100 g の von Frey filaments を押し当て、頭を急激に動かした場合を反応有りと判断した。von Frey filaments を 5 回押し当てた時の反応回数を記録して、反応頻度(反応回数/5)を計算し、刺激反応曲線を作成した後、GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)を用いて回帰曲線を作成し、EF50 値(effective force 50)を算出した。EF50 値は 50%の頻度で von Frey filaments に反応する値として用

いられる。

また、c-Fos の発現様相をみる場合には、IL-1ra (Recombinant Human IL-1 Receptor Antagonist, ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Rehovot, Israel) または生理食塩水(生食) 髄膜下投与 24 時間後、あるいは未処置のラットの whisker pad に von Frey filaments を用いて 5 秒間の非侵害性刺激(8.0 g)を 5 秒間隔で 10 分間与えた。

4. 薬剤の髄膜下投与

処置前の行動テスト後、薬剤投与の準備を行った。ペントバルビタール(大日本住友製薬)による全身麻酔下で、ポリエチレンチューブ(PE10; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)を埋入し、チューブ先端を髄膜下に位置させ、他端を皮膚外に位置させカニューレとした。次いで、傷口を絹糸により縫合し、消毒した。外科的侵襲による疼痛の影響を排除するため 1 週間の休息期を設けた後、行動テストを再開した。その後、オトガイ神経切断処置を行い、それぞれのタイムコースにしたがって行動テストを遂行した。

1) IL-1ra または MK-801 投与

まず、オトガイ神経の切断処置を行った 1 週間後、実験群には IL-1beta 受容体の拮抗薬である IL-1ra (n=5, 5 pg) または NMDA 受容体の拮抗薬である MK-801 (Sigma, St. Louis, MO, USA; n=5, 5 µg) を生食に溶解した液を、対照群(n=5)には生食をそれぞれ 100 µl のハミルトンシリンジを用いて 50 µl ずつ投与した。その後、タイムコースにしたがって行動テストを行った(図 1)。

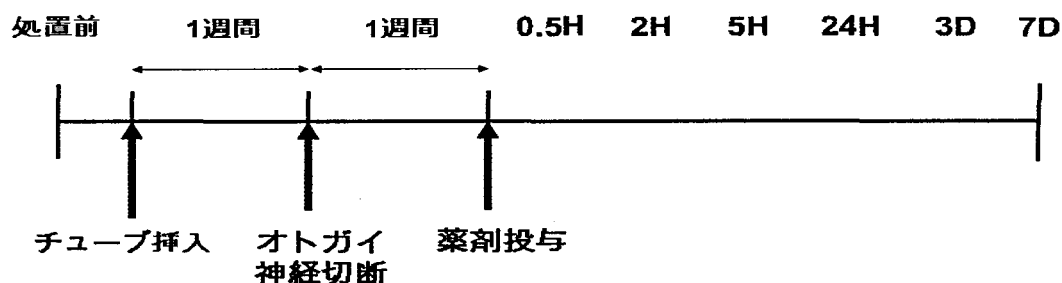


図1 薬剤投与および von Frey filaments による機械的疼痛逃避行動テストのタイムコース

2) TNF-alpha 中和抗体投与

まず、オトガイ神経切断処置の1週間後、実験群には TNF-alpha 中和抗体(HyCult biotechnology, Uden, Netherlands; n=5、1.25 pg)を生食に溶解した液を、対照群には Normal rabbit serum(NRS; n=5)を 100 μ l のハミルトンシリンジを用いて 50 μ l ずつ投与した。その後、タイムコースにしたがって行動テストを行った(図1)。

3) Recombinant TNF-alpha 投与

実験群には Recombinant TNF-alpha (PeproTech EC Ltd., London, UK; n=5、0.1pg, n=5、0.001pg)を生食に溶解した液を、対照群には NRS(n=5)を 100 μ l のハミルトンシリンジを用いて 50 μ l ずつ投与した。その後、タイムコースにしたがって行動テストを行った(図2)。

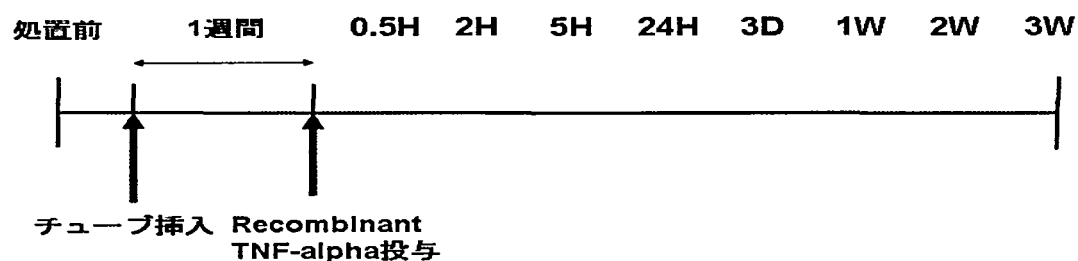


図2 Recombinant TNF-alpha 投与および von Frey filaments による機械的疼痛逃避行動テストのタイムコース

5. 免疫組織化学染色

ペントバルビタール(大日本住友製薬)腹腔内投与(0.5 ml/kg)による深麻酔下で、3.5 % パラホルムアルデヒド(メルクジャパン, 東京)、0.1M リン酸緩衝液(PB; pH 7.4 シグマアルドリッチジャパン, 東京)を含む固定液を用いてラットの灌流固定を行った。なお、c-Fos の発現様相をみる場合は、刺激 2-3 時間後に c-Fos が多く発現することから、刺激 2 時間後にラットの灌流固定を行った。

灌流固定後、脳幹と三叉神経節を摘出し、同固定液に 3 時間浸漬した。次に、4 °C で 30 %スクロースを含む 0.01M リン酸緩衝生理食塩液(PBS; 三菱化学ヤトロン, 東京)に 3 日間浸漬した。その後、凍結ミクロトーム(Leica, Wetzlar, Germany)を用いて、厚さ 30 μ m の連続凍結切片を作製した。

免疫組織化学染色は浮遊切片法により行った。まず、内因性ペルオキシダーゼを不活化させるため、1 %過酸化水素水を含む PBS で 30 分間処理し、0.1 %トリトン X-100(シグマアルドリッチジャパン)を含む PBS(PBST)による洗浄後、非特異的反応を抑制するために、室温で 3 % Normal goat serum を含む PBST でブロッキングし、一次抗体に一晚浸漬した。Avidin biotinylated horseradish peroxidase complex(ABC)法については、PBSTで洗浄後、ビオチン化二次抗体に 60 分間反応させた。PBS で洗浄後、80 倍希釈した ABC 溶液(DAKO, Glostrup, Denmark)を 60 分間反応させた。PBS で洗浄後、DAB 溶液(0.02 % 3,3-ジアミノベンチジン四塩酸塩; DAKO)を用いて発色させた。免疫組織化学染色後、エタノールによる脱水処理を施しエンテラン(和光純薬, 大阪)で封入し、光学顕微鏡(BX-40; オリンパス光学工業, 東京)を用いて明視野照明下で観察と写真撮影を行った。蛍光標識抗体法については、一次抗体に浸漬後 PBST で洗浄し、蛍光標識二次抗体と 120 分間反応させた。染色後、Vectarshield(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)で封入し、共焦点レーザー顕微鏡(Lsm5 Pascal; Carl Zeiss, Oberkochen,

Germany) 下で Alexa Fluor 488 (適正励起波長 496 nm) および Alexa Fluor 568 (適正励起波長 578 nm) に対し、レーザーを照射し切片の観察および写真撮影を行った。

ABC 法と蛍光標識抗体法については、一次抗体として、マウス抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (ABC 法 ; 1:100,000, 蛍光標識抗体法 ; 1:10,000; Millipore, Bedford, CA, USA)、マウス抗ラット CD11b 抗体 (ABC 法 ; 1:1,000, 蛍光標識抗体法 ; 1:400; AbD, Serotec, Raleigh, NC, USA)、ウサギ抗 IL-1beta 抗体 (ABC 法 ; 1:1,000, 蛍光標識抗体法 ; 1:100; Endogen, Woburn, MA, USA)、ウサギ抗 TNF-alpha 抗体 (蛍光標識抗体法 ; 1:1,200; Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel)、ウサギ抗 c-Fos 抗体 (ABC 法 ; 1:20,000, 蛍光標識抗体法 ; 1:2,000; Oncogene Science Inc., Cambridge, MA, USA)、ウサギ抗 IL-1R I 抗体 (蛍光標識抗体法 ; 1:100; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)、マウス抗 NeuN 抗体 (蛍光標識抗体法 ; 1:3,000; Milipore) を用いた。また、二次抗体としてビオチン化抗ウサギ抗体 (1:400; Vector Laboratories Inc.)、ビオチン化抗マウス抗体 (1:400; Vector Laboratories Inc.)、Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ抗体、Alexa Fluor 568 標識抗マウス抗体 (1:400; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) を用いた。

結果

1. ラットオトガイ神経切断・挫滅モデルの神経因性疼痛モデルとしての有用性

ラットオトガイ神経切断・挫滅モデルが、顎顔面領域における神経因性関連疼痛モデルとして有効か否かを、眼窩下神経の支配領域である whisker pad と下顎神経支配である masseter への機械的疼痛逃避行動テストにより検証した。

Whisker pad における患側では、オトガイ神経切断群は対照群と比較して術後 1 日から 56 日目まで有意に小さい EF50 値を示し、無傷である処置前と比較しても同様であった。また、オトガイ神経挫滅群は対照群と比較して術後 3 日から 28 日目まで、処置前と比較しても 1 日から 56 日目まで有意に小さい EF50 値を示した。一方、健側では同一群内での経時的な変化、および各群間において有意差は認められなかった(図 3)。

Masseter における患側については、オトガイ神経切断群では対照群と比較してほとんど差が認められなかったものの、処置前と比較すると術後 1 日から 56 日目まで有意に小さい EF50 値を示した。一方、オトガイ神経挫滅群では同一群内での経時的な変化、および各群間において有意な差は認められず、健側においても同様であった(図 4)。

以上の結果より、ラットオトガイ神経切断・挫滅モデルが神経因性疼痛モデルとして有用であることが確認された。

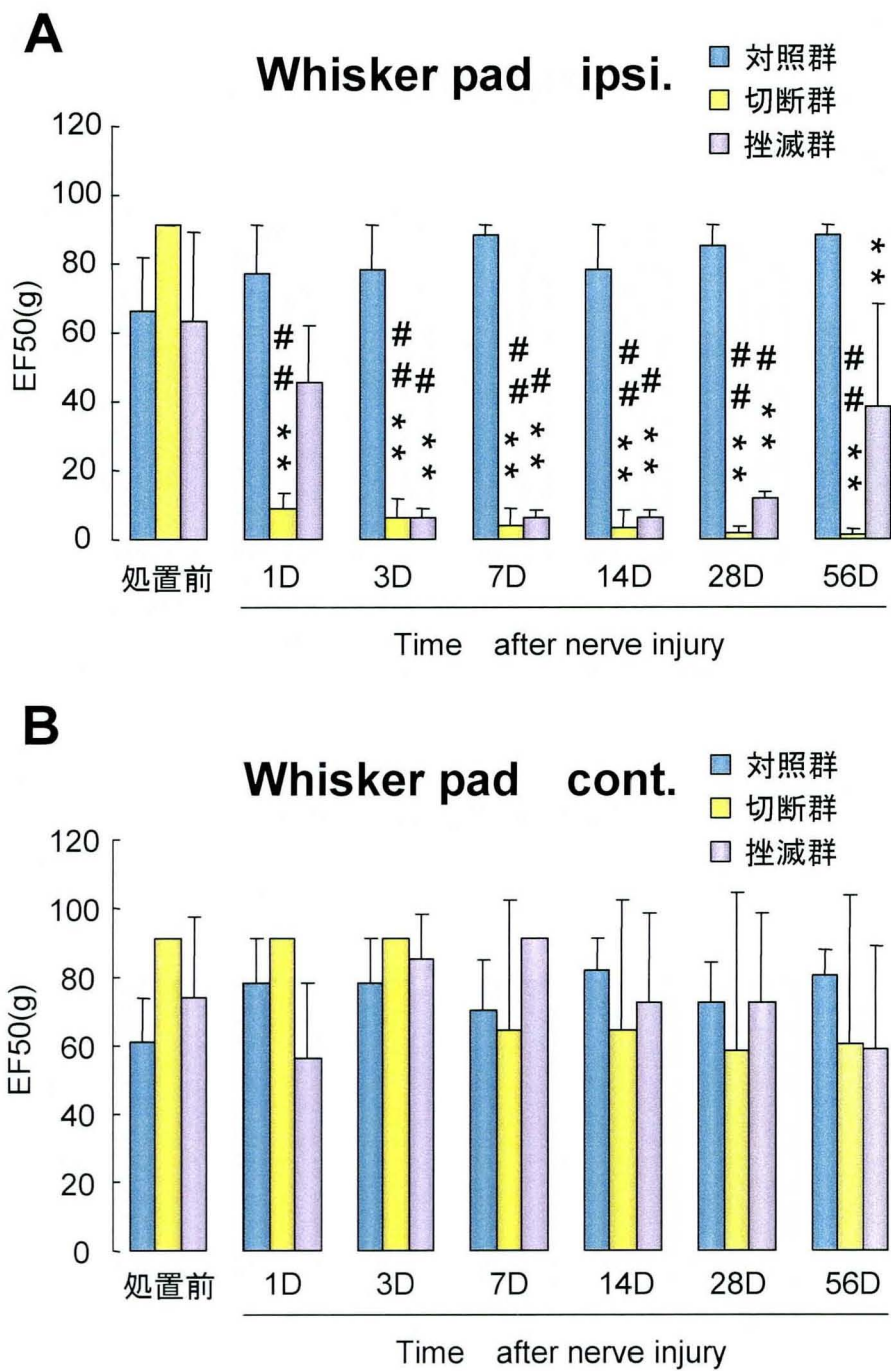


図3 Whisker pad における機械的疼痛逃避行動テストの EF50 値の変化

A; Whisker pad ipsi. B; Whisker pad cont.

*: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ 実験群と対照群の比較

#: $p < 0.05$ ##: $p < 0.01$ 処置前との比較 各群 $n=5$.

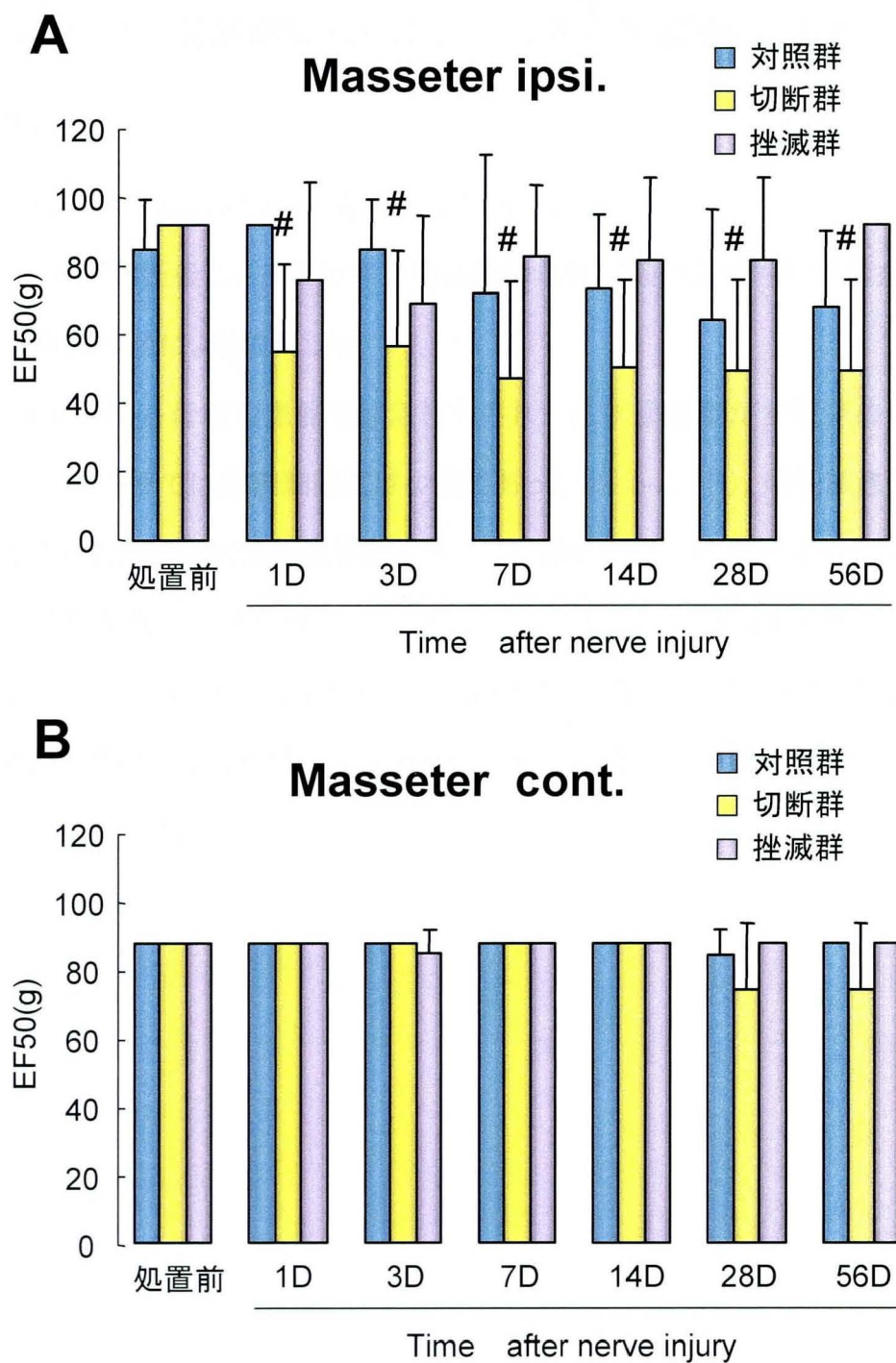


図 4 Masseter における機械的疼痛逃避行動テストの EF50 値の変化

A; Masseter ipsi. B; Masseter cont.

#: $p < 0.05$ 処置前との比較 各群 $n=5$.

2. ラットオトガイ神経切断モデルの三叉神経脊髄路核における神経膠細胞の局在

1) 三叉神経脊髄路核の GFAP 免疫陽性細胞の変化

オトガイ神経切断後に、三叉神経脊髄路核の星状膠細胞の活性化状態を、GFAP 免疫組織化学染色により検索した。

中位核尾側核移行域の患側では活性化された星状膠細胞が多数認められたが(図 5-A, C)、健側では発現細胞数は少数であった(図 5-A, B)。尾側核患側において活性化された星状膠細胞は浅層および深層に認められたが(図 5-D, G, F, I)、健側では発現細胞数は少数であった(図 5-D, G, E, H)。また、活性化された星状膠細胞では、細胞体および突起の肥大化が認められた(図 5-C, F, I)。一方、静止状態にある星状膠細胞では、細胞体および突起に顕著な形態変化が認められなかった(図 5-B, E, H)。

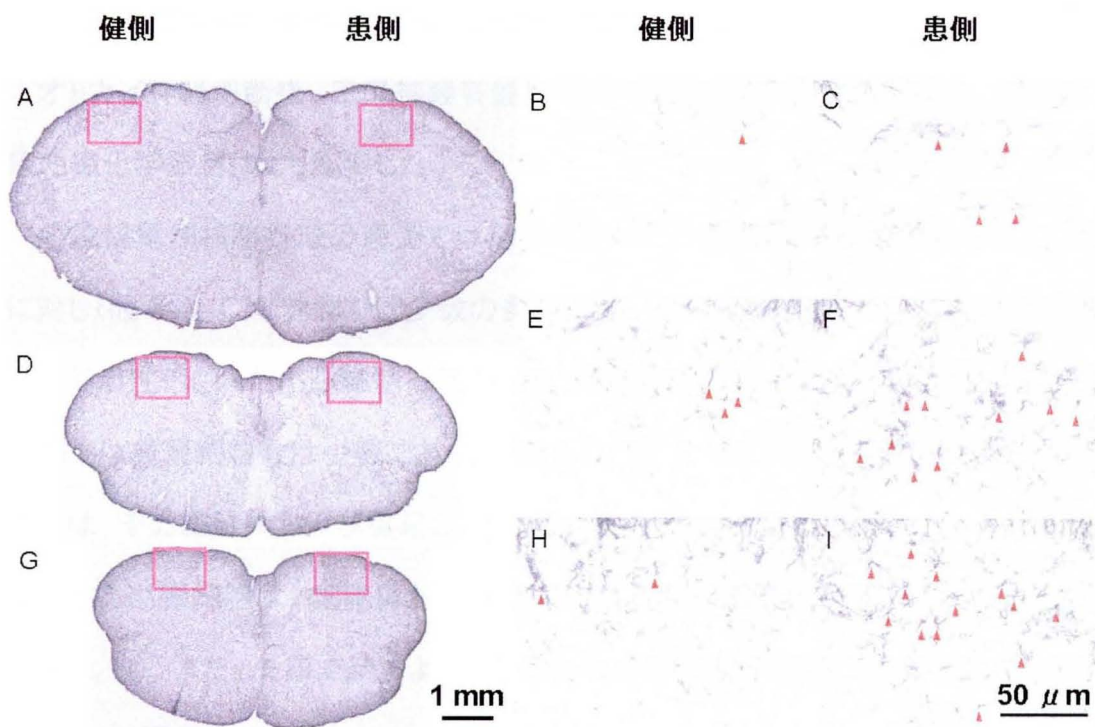


図5 三叉神経脊髄路核におけるGFAP染色像

A;三叉神経脊髄路核中位核尾側核移行域(obex-0mm)における弱拡大像

B;Aの健側枠内の強拡大像

C;Aの患側枠内の強拡大像

D;三叉神経脊髄路核尾側核(obex-1.5mm)における弱拡大像

E;Dの健側枠内の強拡大像

F;Dの患側枠内の強拡大像

G;三叉神経脊髄路核尾側核(obex-3.0mm)における弱拡大像

H;Gの健側枠内の強拡大像

I;Gの患側枠内の強拡大像

矢頭はGFAP免疫陽性細胞を示す。実験群は神経切断後1週間目のラットを用いた。

2) 三叉神経脊髄路核の CD11b 免疫陽性細胞の変化

オトガイ神経切断後、三叉神経脊髄路核の小膠細胞の活性化状態を、CD11b 免疫組織化学染色により検索した。

中位核尾側核移行域の患側では活性化された小膠細胞が多数認められていたのに対し(図 6-A, C)、健側では少数の発現にとどまった(図 6-A, B)。尾側核の患側において活性化された小膠細胞は浅層および深層に認められたが(図 6- D, G, F, I)、健側では発現細胞数は少数であった(図 6-D, G, E, H)。また、活性化された小膠細胞では、その細胞体および突起の肥大化が認められた(図 6-C, F, I)。一方、静止状態にある小膠細胞は、細胞体および突起に顕著な形態変化が認められなかった(図 6-B, E, H)。また、矢印で示すように患側では小膠細胞が塊状に凝集しているのが認められた(図 6-F, I)。

以上の結果より、オトガイ神経切断後、三叉神経脊髄路核において星状膠細胞と小膠細胞が活性化していることが明らかとなった。

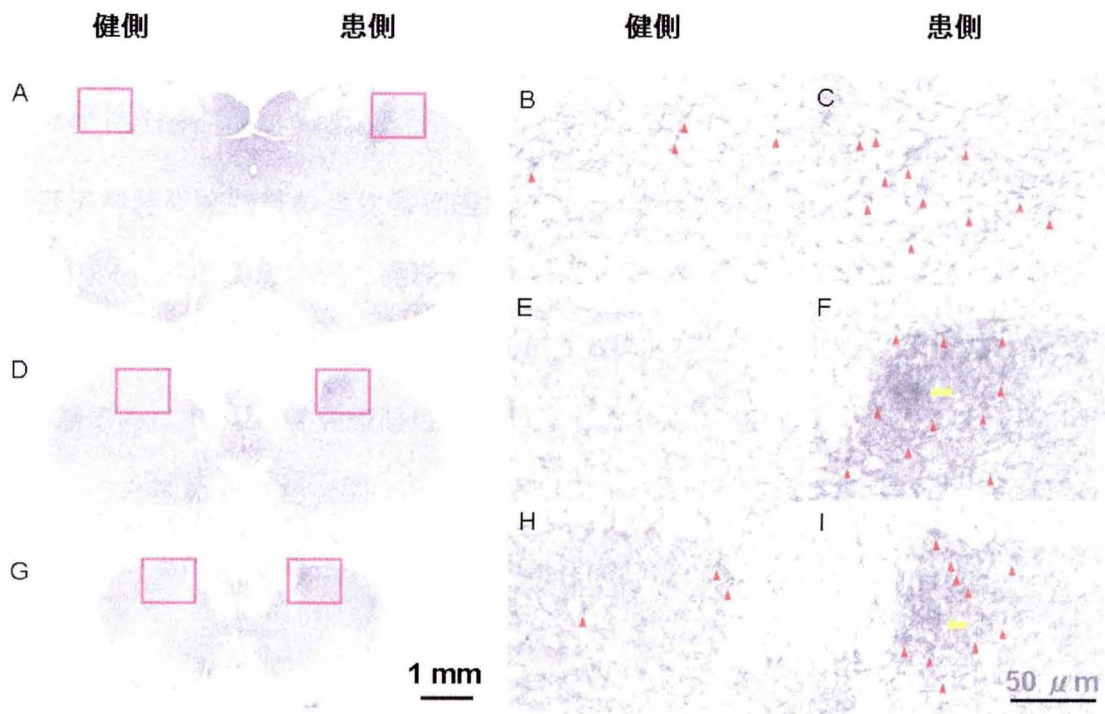


図6 三叉神経脊髄路核におけるCD11b染色像

A; 三叉神経脊髄路核中位核尾側核移行域(obex-0mm)における弱拡大像

B; Aの健側枠内の強拡大像

C; Aの患側枠内の強拡大像

D; 三叉神経脊髄路核尾側核(obex-1.5mm)における弱拡大像

E; Dの健側枠内の強拡大像

F; Dの患側枠内の強拡大像

G; 三叉神経脊髄路核尾側核(obex-3.0mm)における弱拡大像

H; Gの健側枠内の強拡大像

I; Gの患側枠内の強拡大像。

矢頭はCD11b免疫陽性細胞を示す。矢印はCD11b免疫陽性細胞の塊状凝集を示す。実験群は神経切断後1週間目のラットを用いた。

3. ラットオトガイ神経切断モデルの三叉神経脊髄路核における IL-1beta と神経因性疼痛との関連性

1) 三叉神経脊髄路核の星状膠細胞における IL-1beta の発現

IL-1beta が星状膠細胞に発現しているか否かを GFAP との二重蛍光標識抗体法により検討した(図 7-A, B, C)。オトガイ神経切断 1 週間後、尾側核の患側では浅層のみに IL-1beta 免疫陽性細胞は多数発現したものの(図 7-E, F)、健側では少数のみ認められた(図 7-D)。また、IL-1beta 免疫陽性細胞が星状膠細胞に発現しているのが確認された(図 7-B, C, E, F, H, I)。

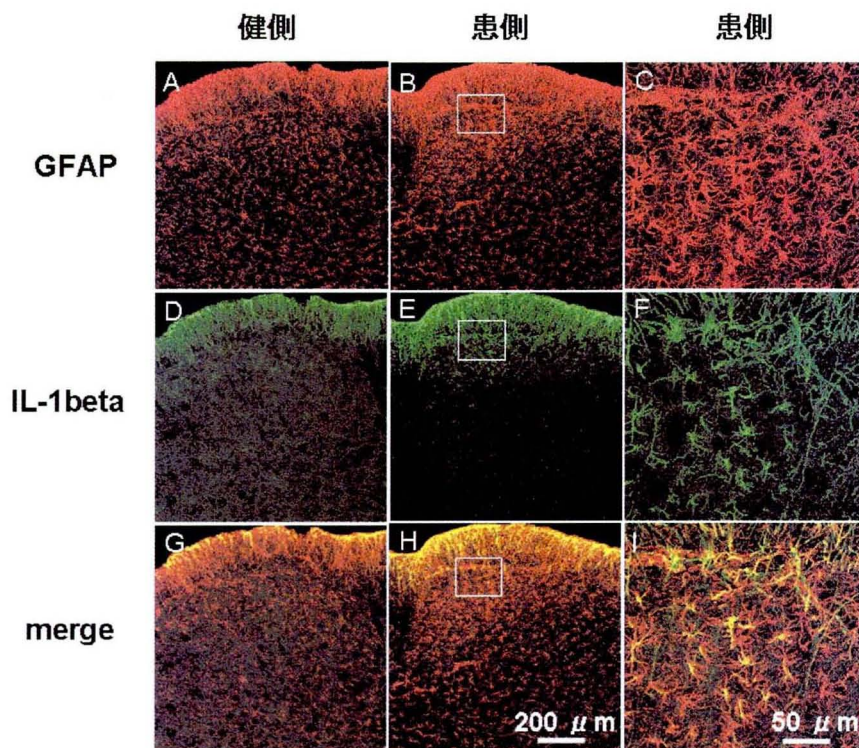


図 7 三叉神経脊髄路核尾側核における IL-1beta と GFAP の二重蛍光染色像
A、B、C;GFAP 染色像 D、E、F;IL-1beta 染色像 G、H、I;IL-1beta 染色像と
GFAP 染色像の重ね合わせ C、F、I;枠内の強拡大像。染色は神経切断後 1 週間
目のラットの脳幹を用いた。

2) IL-1beta 拮抗薬の髄膜下投与による機械的疼痛逃避行動の変化

IL-1beta の拮抗薬投与による神経因性疼痛の抑制を検索するため、IL-1beta の拮抗薬である IL-1ra を髄膜下投与し機械的疼痛逃避行動テストを行なった。その結果 whisker pad において、患側では薬剤投与前と比較し薬剤投与後 24 時間、3 日目で実験群の EF50 値が有意に増加した。また、実験群を対照群と比較しても同様であった。一方、健側では同一群内の経時的変化および実験群と対照群との間には有意な差は認められなかった(図 8)。

以上の結果より、オトガイ神経切断後、三叉神経脊髄路核の星状膠細胞に IL-1beta が発現することが明らかとなり、IL-1beta と神経因性疼痛との関わりが強く示唆された。

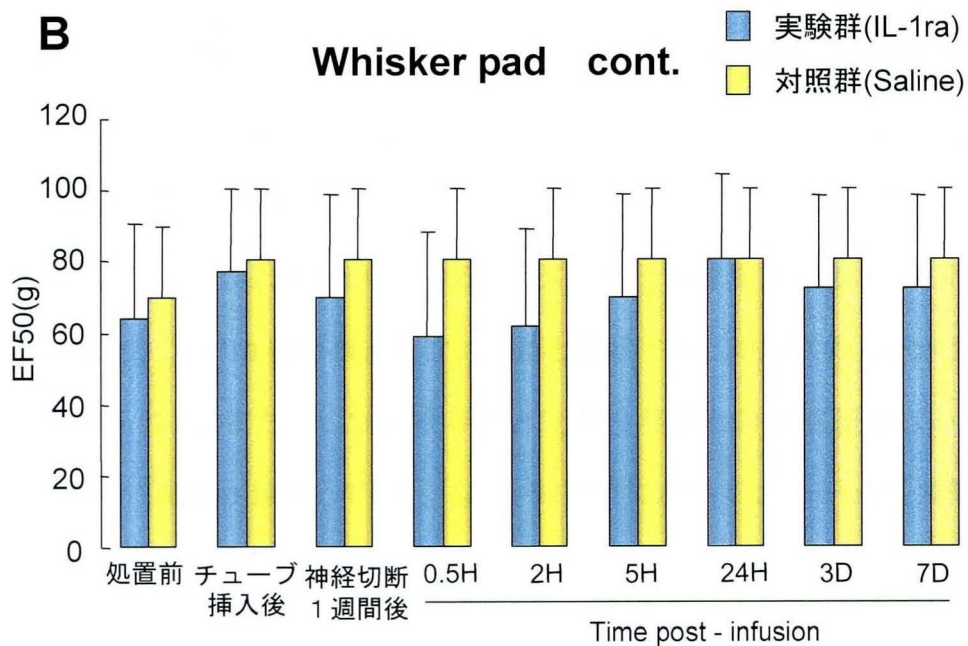
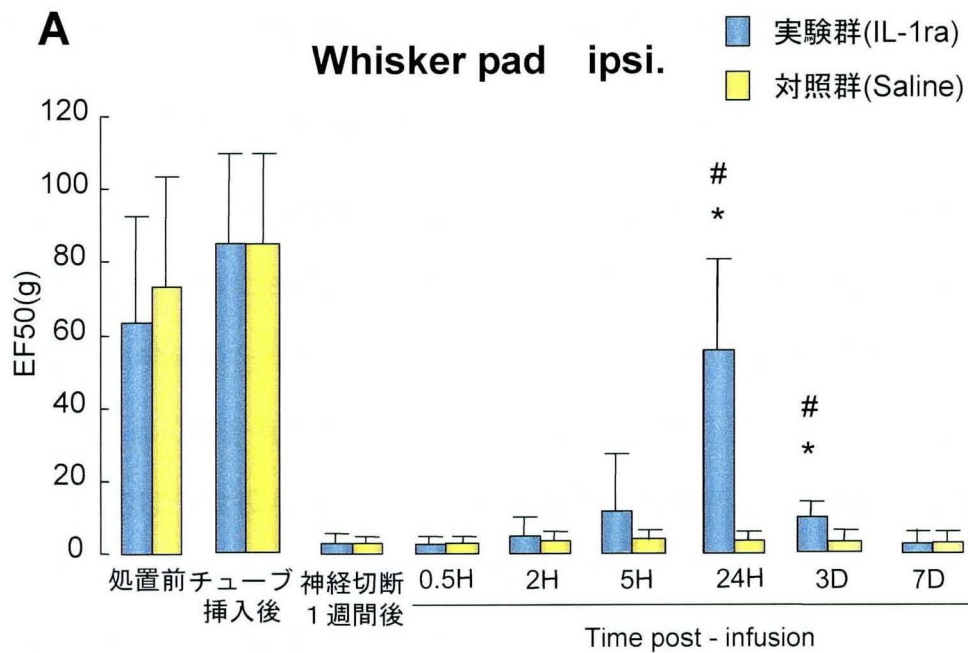


図 8 IL-1ra 髄膜下投与による EF50 値の変化

A: Whisker pad ipsi. B: Whisker pad cont.

*: $p < 0.05$ 実験群と対照群の比較

#: $p < 0.05$ 神経切断 1 週間後との比較 各群 $n = 5$.

4. ラットオトガイ神経切断モデルの三叉神経脊髄路核における二次ニューロンの活性化と IL-1beta の関連性

1) IL-1ra 投与後の三叉神経脊髄路核における二次ニューロン活性化の検討

三叉神経脊髄路核における二次ニューロンの活性化を検討するために c-Fos 蛋白の免疫組織化学染色を行った。c-Fos 免疫陽性細胞は黒褐色の直径約 10 μm の円形または楕円形の核を有する細胞として同定することができた(図 9-C, F, I)。c-Fos 免疫陽性細胞は生食投与群において、中位核尾側核移行域から尾側核にわたる広範囲に分布していた(図 10)。生食投与群の浅層では、患側に多数の c-Fos 免疫陽性細胞が認められ、生食投与群、IL-1ra 投与群、対照群でそれぞれ 25.7 ± 12.4 、 6.9 ± 4.3 、 3.4 ± 1.5 (平均 \pm 標準偏差)となり、生食投与群と他の2群の間に有意差が認められた。また、健側では 14.9 ± 9.7 、 4.5 ± 2.5 、 1.9 ± 1.6 (平均 \pm 標準偏差)となり、生食投与群と対照群との間に有意差が認められた。一方、深層の患側では、生食投与群、IL-1ra 投与群、対照群でそれぞれ 4.7 ± 3.9 、 0.8 ± 0.5 、 0.4 ± 0.4 (平均 \pm 標準偏差)、健側で 3.5 ± 3.2 、 1.4 ± 0.2 、 0.5 ± 0.6 (平均 \pm 標準偏差)となり(図 11)、有意差がないものの、IL-1ra 投与群または対照群と比較するとより多くの c-Fos 免疫陽性細胞が認められた。また、IL-1ra 投与群と生食投与群との有意差がないものの、c-Fos 免疫陽性細胞が減少していた。なお、対照群においては、c-Fos 免疫陽性細胞はほとんど認められなかった(図 9、10、11)。

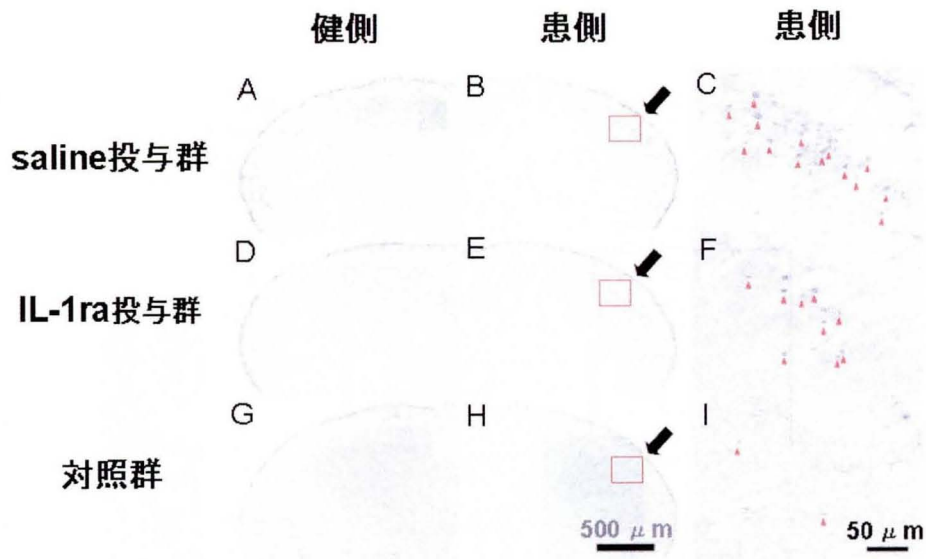


図 9 オトガイ神経切断モデルラットに対する機械刺激後の三叉神経脊髄路核尾側核における c-Fos 染色像

A、B、C; saline 投与、 D、E、F; IL-1ra 投与、 G、H、I; 対照群 C、F、I; 枠内の拡大像。矢印は尾側核における c-Fos 免疫陽性細胞強発現部位を示し、矢頭は c-Fos 免疫陽性細胞を示す。

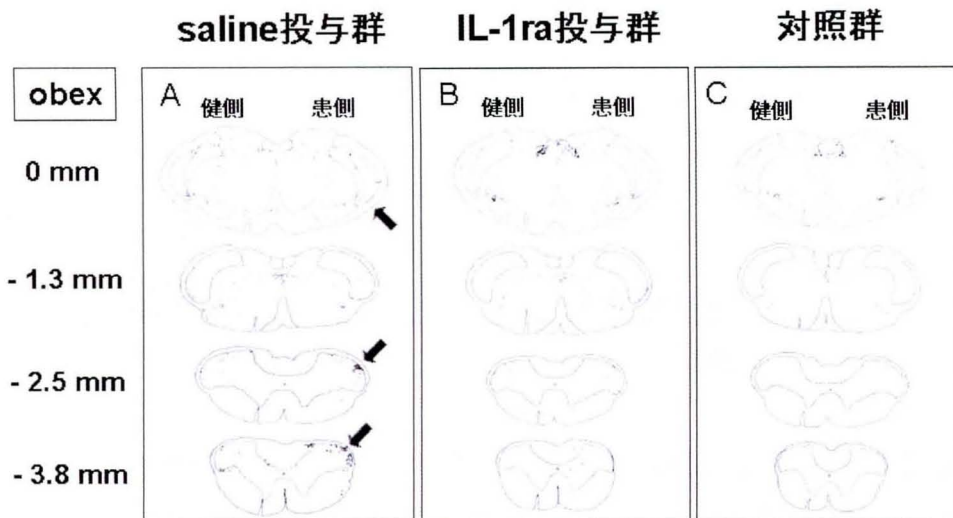


図 10 オトガイ神経切断モデルラットに対する機械刺激後の三叉神経脊髄路核における c-Fos 発現の模式図

A; saline 投与群 B; IL-1ra 投与群 C; 対照群。矢印は c-Fos 免疫陽性細胞強発現部位を示す。

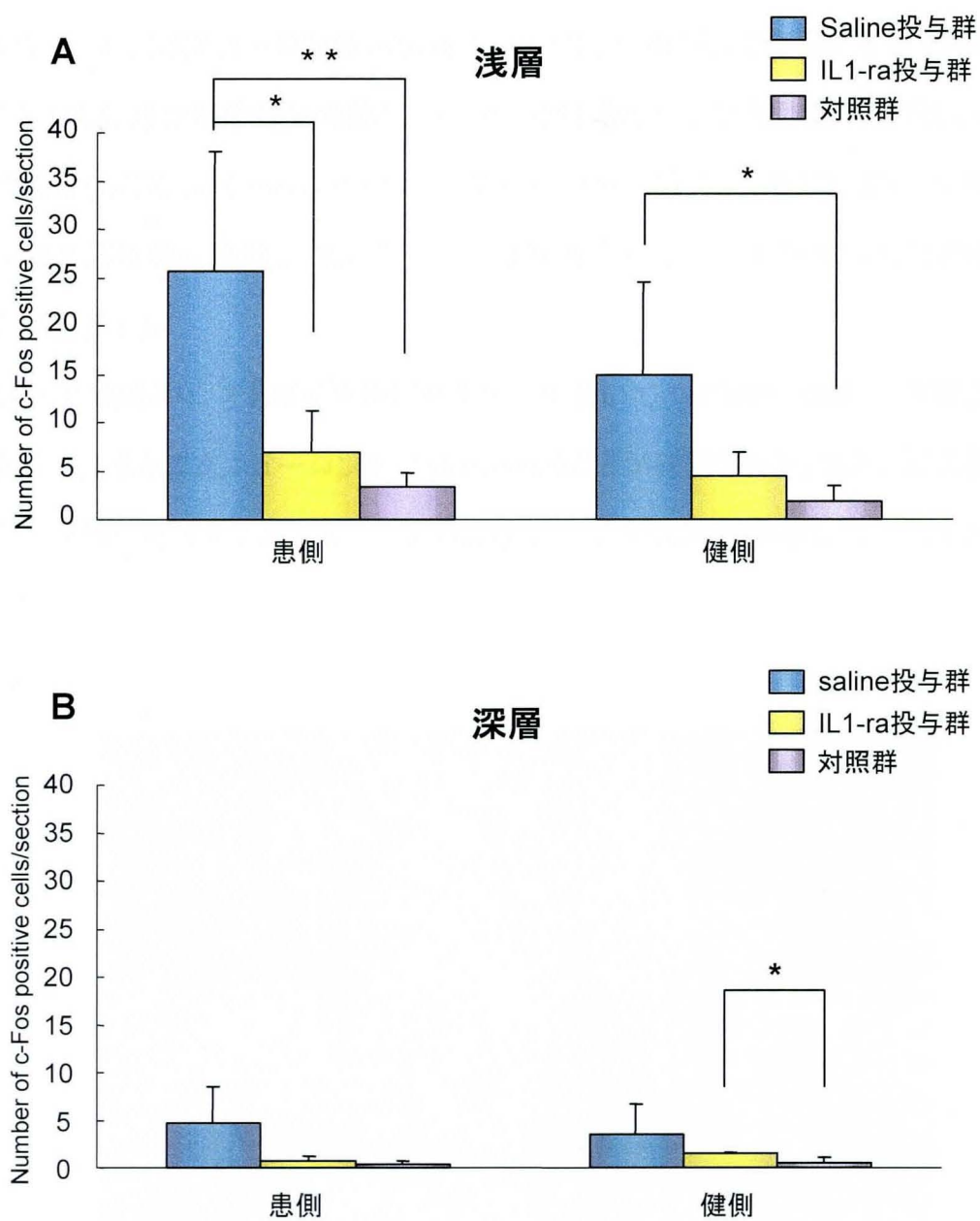


図 11 オトガイ神経切断モデルラットに対する機械刺激後の三叉神経脊髄路核における c-Fos 免疫陽性細胞数

A; 浅層 (lamina I - II) B; 深層 (lamina III - V)

*: $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$

2) 三叉神経脊髄路核における IL-1R I、NeuN、c-Fos の局在

活性化した二次ニューロンの細胞膜に、IL-1R I が発現しているか否かを検索した。IL-1R I 免疫陽性反応は細胞膜に、NeuN 免疫陽性反応は細胞質に発現し、これらの免疫陽性反応は同一のニューロンに発現していた(図 12-A,B,C)。また、c-Fos 免疫陽性反応は核に発現し、IL-1R I 免疫陽性反応と同一のニューロンに認められた(図 12-D,E,F)。

以上の結果より、オトガイ神経切断モデルにおいて、whisker pad への非侵害性刺激を加えると二次ニューロンが活性化されることが確認された。また、三叉神経脊髄路核浅層における二次ニューロンの活性化に IL-1 beta が関与していることが示唆された。

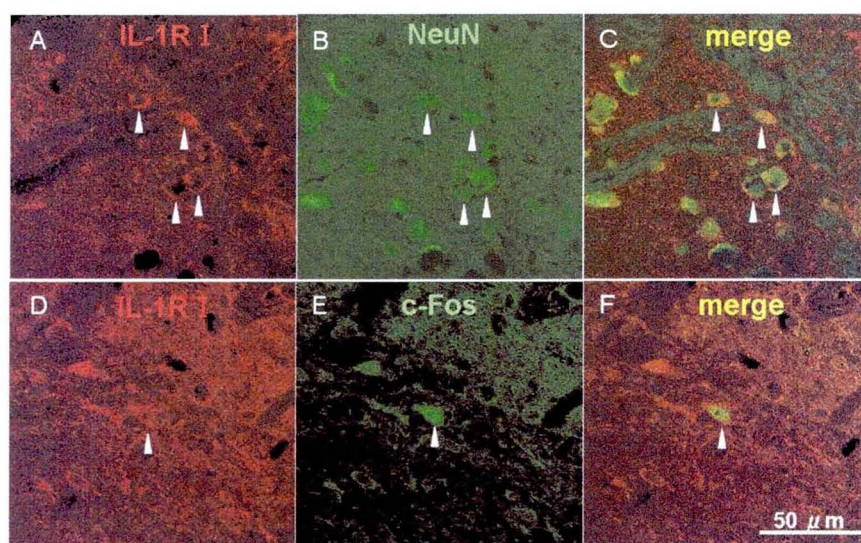


図 12 三叉神経脊髄路核尾側核における IL-1R I と NeuN、IL-1R I と c-Fos の二重蛍光免疫染色像

A、D; IL-1R I 染色像 B; NeuN 染色像 C; IL-1R I 染色像と NeuN 染色像の重ね合わせ E; c-Fos 染色像 F; IL-1R I 染色像と c-Fos 染色像の重ね合わせ。矢頭は免疫陽性細胞を示す。染色は神経切断後 1 週間目のラットの脳幹を用いた。

5. ラットオトガイ神経切断モデルの三叉神経脊髄路核における NMDA 受容体と神経因性疼痛との関連性

NMDA 受容体の拮抗薬投与による神経因性疼痛の抑制を検索するため、NMDA 受容体の拮抗薬である MK-801 を髄膜下投与し行動テストを行なった。Whisker pad において、患側では薬剤投与前と比較し薬剤投与後 2 時間、5 時間後に実験群の EF50 値が有意に増加した。また、実験群を対照群と比較しても同様の結果が認められた。一方、健側では同一群内の経時的変化および実験群と対照群との間には有意な差は認められなかった(図 13)。

以上の結果より、NMDA 受容体の活性化が神経因性疼痛の維持に関与していることが示唆された。

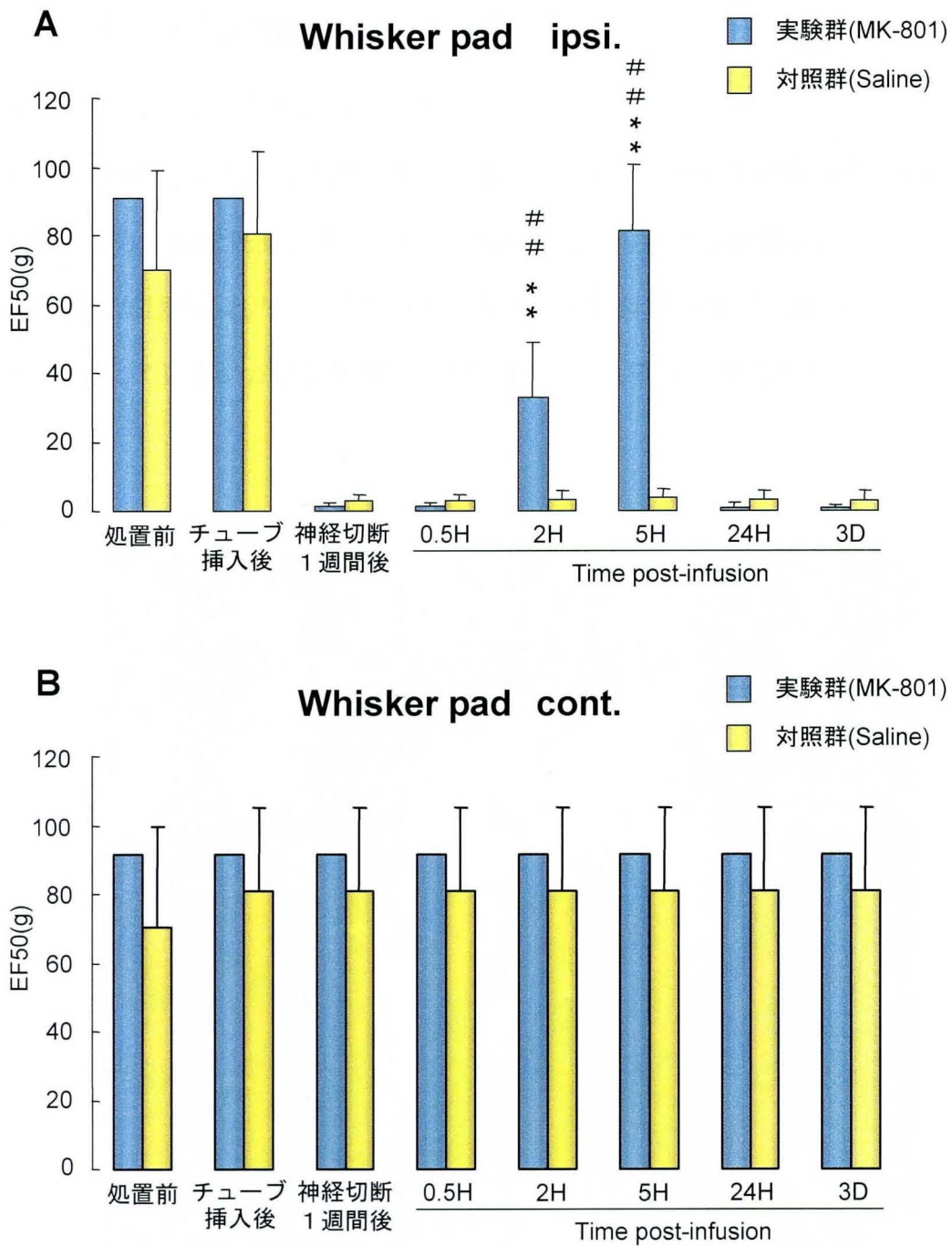


図 13 オトガイ神経切断モデルにおける MK-801 髄膜下投与による EF50 値の変化

A: Whisker pad ipsi. B: Whisker pad cont.

*: $p < 0.05$ *: $p < 0.01$ 実験群と対照群の比較

#: $p < 0.05$ #: $p < 0.01$ 神経切断 1 週間後との比較 各群 $n = 5$.

6. 神経因性疼痛と TNF-alpha との関連性

1) 三叉神経節における TNF-alpha の局在

オトガイ神経切断により、三叉神経節において TNF-alpha が誘発されるか否かを検索するため免疫蛍光染色を行った。その結果、大小さまざまな径のニューロンに免疫陽性反応が認められた(図 14)。また、軸索にも免疫陽性反応が認められた。なお、データは示していないが、三叉神経脊髄路核では免疫陽性反応は認められなかった。

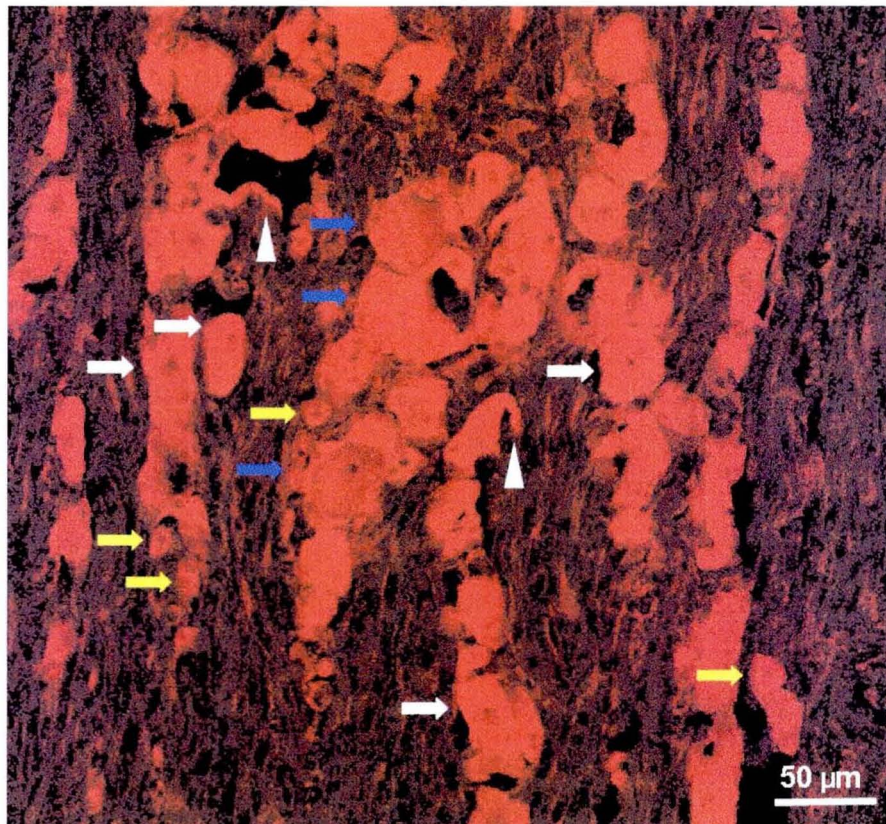


図 14 三叉神経節における TNF-alpha 免疫蛍光染色像

黄色の矢印; 小さなニューロン 白色の矢印; 中程度のニューロン

青色の矢印; 大きなニューロン 白色の矢頭; 軸索。

染色は神経切断 1 週間後のラットの脳幹を用いた。

2) TNF-alpha 拮抗薬の髄膜下投与による機械的疼痛逃避行動の変化

オトガイ神経切断モデルにおいてTNF-alpha 中和抗体を投与すると痛覚過敏が抑制されるか否かを検討した結果、実験群患側 whisker pad では、薬剤投与前と比較し薬剤投与後 2 時間、5 時間目で EF50 値が有意に増加した。また、実験群を NRS を投与した対照群の EF50 値と比較したところ同様の結果を認めた。一方、健側では同一群内での経時的な変化、および各群間の EF50 値に有意な差は認められなかった(図 15)。

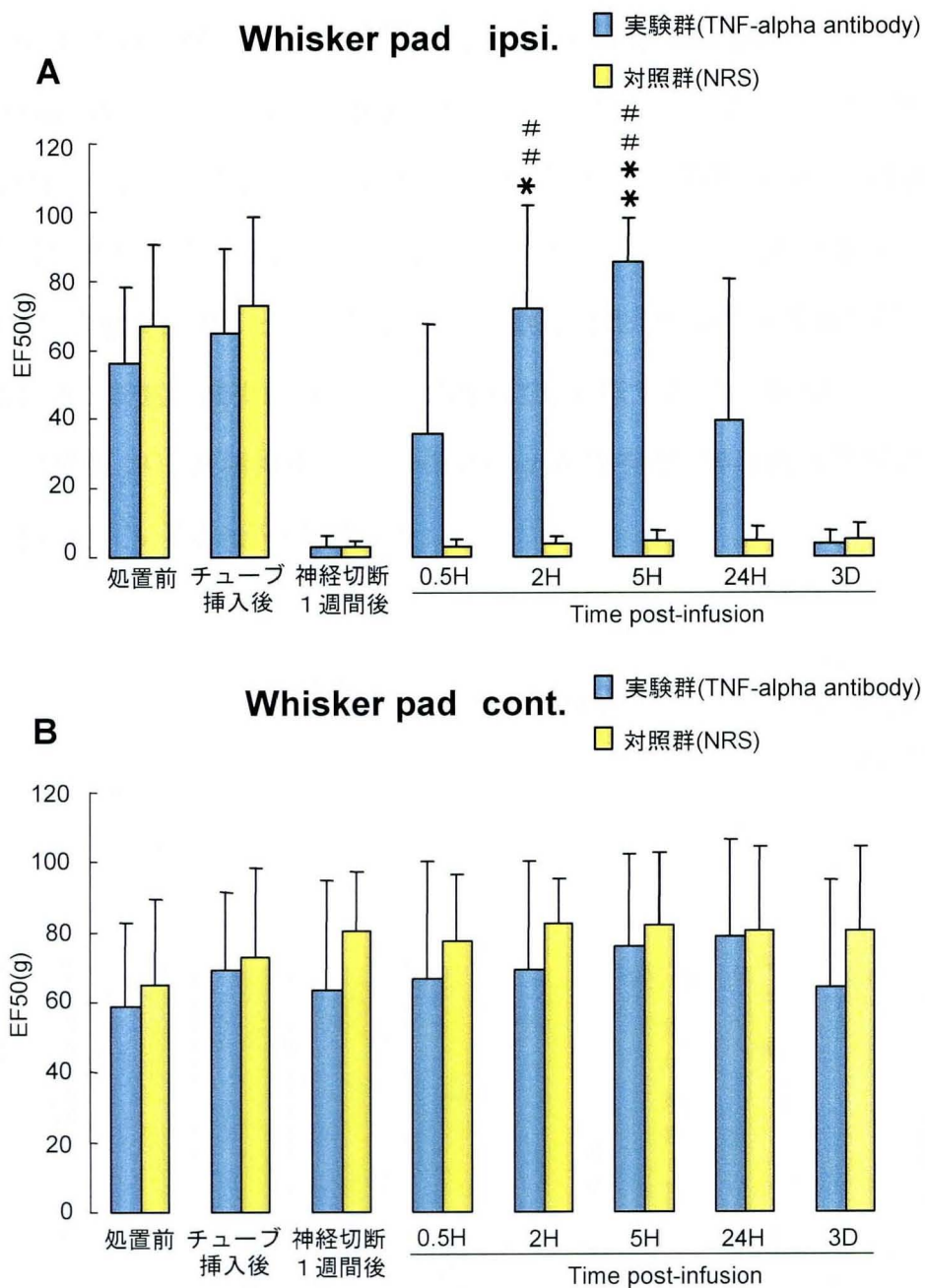


図 15 オトガイ神経切断モデルにおける TNF-alpha 中和抗体髄膜下投与による EF50 値の変化

A: Whisker pad ipsi. B: Whisker pad cont.

*: $p < 0.05$ *: $p < 0.01$ 実験群と対照群の比較

#: $p < 0.05$ #: $p < 0.01$ 神経切断 1週間後との比較 各群 n=5.

3) Recombinant TNF-alpha の髄膜下投与による痛覚過敏発現

Recombinant TNF-alpha の髄膜下投与による疼痛への影響について検討を行った。Whisker padにおいて、高濃度群で対照群と比較し薬剤投与後24時間、3日目までEF50値が有意に減少した。また、処置前と比較しても薬剤投与後24時間目までEF50値が有意に減少した。低濃度群では対照群と比較し薬剤投与後3日、1週間目でEF50値が有意に減少し、処置前と比較しても同様であった(図16)。

以上の結果より、末梢神経でのTNF-alphaの存在が、神経因性疼痛発現、促進機序に関与していることが示唆された。

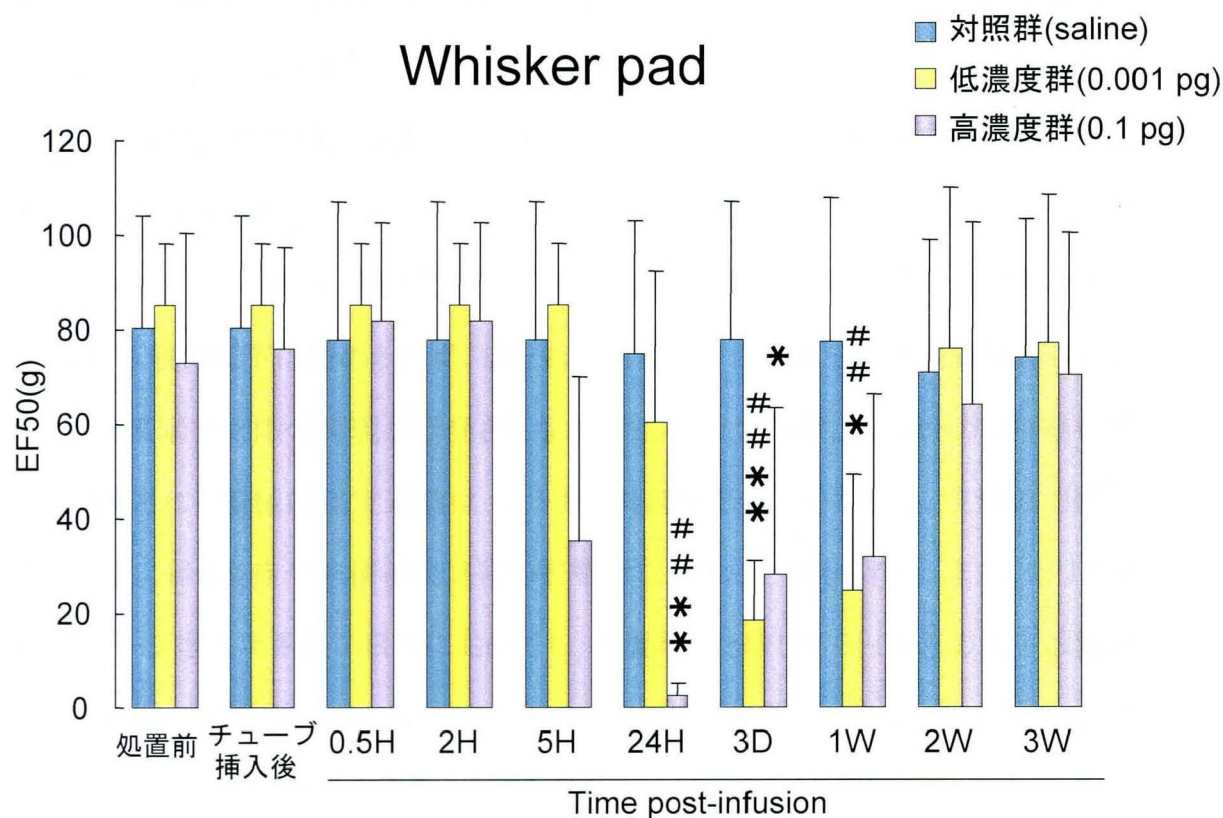


図16 Recombinant TNF-alpha 髄膜下投与によるEF50値の変化

*: $p < 0.05$ *: $p < 0.01$ 実験群と対照群の比較

#: $p < 0.05$ #: $p < 0.01$ 処置前との比較 各群 n=5.

考察

1. 実験モデルの設計について

本実験では、オトガイ神経の切断・挫滅に伴う皮膚の切開や神経剖出などの外科的処置の影響を検討するため、オトガイ神経の剖出のみを行い、直ちに皮膚縫合を行った動物を対照群(n=5)として設定した。また、同様の目的で薬剤の投与目的のために埋入したポリエチレンチューブ埋入手術の影響を調べるために、ポリエチレンチューブ埋入を行った7日後、疼痛逃避行動テストを行った。さらに、手術による影響を少なくするために、手術器具は滅菌し、皮膚切開する際には皮膚を消毒し、切開創を極力小さくするように努めた。

末梢組織の炎症や神経の損傷は中枢神経感作を誘発し、機械的疼痛逃避行動の閾値の低下を引き起こし、あるいはc-Fos免疫陽性細胞数を増加させると報告されている(Iwata et al., 1998)。本研究の対照群では偽手術後24時間以降、処置前と比較してEF50値の低下は認められず、また偽手術後7日目では三叉神経脊髄路核ではc-Fos免疫陽性細胞の発現が誘発されなかった。以上の結果より、オトガイ神経切断後に誘発される機械的痛覚過敏は、オトガイ神経切断によるもので、皮膚の切開や神経剖出に伴う炎症や末梢神経傷害の影響はなかったと考えられる。また、ポリエチレンチューブ埋入手術後7日目においても、処置前と比較してEF50値の低下は認められなかった。このことから、ポリエチレンチューブ埋入手術によってwhisker padに機械的痛覚過敏は誘発されなかったことが示された。

2. von Frey filaments による機械的疼痛逃避行動テストについて

Whisker padには三叉神経第二枝の枝である眼窩下神経が、masseterには三叉神経第三枝である頬神経が分布している(平沢と岡本, 1992)。三叉神経第三枝の支

配下にあるオトガイ神経の傷害または下口唇への complete Freund's adjuvant (CFA) 注入により、上顎神経支配下の whisker pad と下顎神経の枝である頬神経が分布する masseter にも痛覚過敏が現れた。このように、傷害した部位より離れた無傷部位に痛みを知覚する現象は関連痛と呼ばれている(Koyess and Fares, 2006)。本研究においては、オトガイ神経を切断すると患側の whisker pad に機械的痛覚過敏が発生したが、この実験結果は以前報告された実験結果(Nomura et al., 2002; Piao et al., 2006) と類似していた。さらに、データは示していないが、CFA の下口唇への注入によってオトガイ神経切断と同様に whisker pad に機械的痛覚過敏の発生を確認した。CFA の下口唇注入によって誘発される whisker pad と下口唇の機械的痛覚過敏の時間経過は、興味深いことにほぼ同じであった。すなわち、三叉神経第三枝からの異常な感覚入力末端又は中枢性の感作を誘発し、三叉神経第二枝支配領域である whisker pad に機械的痛覚過敏を誘発すると考えられる。慢性歯髄炎や顎関節の慢性炎症が関連疼痛を誘発することが知られているが、本研究結果はこれらの臨床知見と非常に類似している。したがって、本実験モデルを用いて関連疼痛の発生機序の解明や治療法の開発が期待できる。

本研究では、オトガイ神経切断後に whisker pad において大きく疼痛逃避閾値が低下したものの、masseter においては疼痛逃避閾値の低下は whisker pad と比較するとわずかであった。Whisker pad に分布している眼窩下神経は非常に良く発達しており神経線維の直径も太い。一方、masseter に分布している頬神経は下顎神経の枝であるが、眼窩下神経と比較すると発達が貧弱で神経線維の直径も細い。したがって、皮膚に分布する神経細胞体の数と中枢神経に投射する範囲は、眼窩下神経の方が頬神経より大きいことになる。後述するように、オトガイ神経切断後に神経節または中枢神経において感作が引き起こされた可能性が大きい。したがって、オトガイ神経切断後、眼窩下神経の方が頬神経より、神経節または中枢神経においてより大き

な影響を受けたため whisker pad の方がより強く機械的痛覚過敏を発現した可能性が考えられる。

オトガイ神経切断後、whisker pad に誘発される神経因性疼痛が小膠細胞の阻害薬である minocycline によって抑制されることから中枢性の感作が示唆されているものの(Piao et al., 2006)、神経因性疼痛の詳しい発生機序については不明である(Nomura et al., 2002; Piao et al., 2006)。神経傷害後に脊髄後角においてシナプス結合の再構築が行われ、これによって神経因性疼痛を誘発しているという報告がある(Woolf et al., 1992; Woolf et al., 1995; Woolf and Salter, 2000)。また、その発現機序のひとつとして、神経傷害により太径神経線維(A β 線維)が本来の分布領域である深層から、細径神経線維(C 線維)の終末部位である浅層に侵入することが考えられている。しかし、本研究では神経切断後、24 時間以内に痛覚過敏が発生している。A β 線維がシナプス結合の再構築を行うには数週間が必要(Woolf et al., 1992; Woolf et al., 1995)であり、本研究で観察された早期の痛覚過敏は、シナプス結合の再構築によって誘発されたものではないと考えられる。

3. 神経因性疼痛における星状膠細胞と小膠細胞の活性化について

本研究結果より、オトガイ神経切断後、三叉神経脊髄路核中位核尾側核移行域、尾側核における星状膠細胞、小膠細胞の発現は亢進したが、この結果は過去の報告(Piao et al., 2006)と一致した。本研究ではオトガイ神経切断後、患側にのみ痛覚過敏が発現したが、星状膠細胞や小膠細胞の活性化も患側のみで観察されたことから、星状膠細胞と小膠細胞が疼痛の活性化に関与するという過去の報告(Fu et al., 1999; Garrison et al., 1994; Guo et al., 2007; Milligan et al., 2001; Piao et al., 2006)を裏付ける結果となった。活性化した星状膠細胞や小膠細胞からはサイトカインなどの生理活性物質が放出されることが知られている(Hanisch, 2002; Inoue,

2002; Watkins and Maier, 1999)。このことから、本研究で検討した三叉神経脊髄路核においては、肥大化した星状膠細胞と小膠細胞からサイトカインが放出され、痛覚過敏が誘発されたと考えられる。

4. 神経因性疼痛と c-Fos 免疫陽性細胞との関連性について

体性感覚神経系における中枢神経の神経活性化の指標として、c-Fos 蛋白質は幅広く使用されている。実際、顎顔面領域に侵害刺激や温熱刺激を加えた場合 (Strassman and Vos, 1993; Strassman et al., 1993; Sugimoto et al., 1998b)、咬筋に炎症を誘発した場合 (Ikeda et al., 2003)、歯髄にマスタードオイルを付与または電気刺激を加えた場合 (Iwata et al., 1998; Sugimoto et al., 1998a)、三叉神経脊髄路核の広範囲に c-Fos 免疫陽性細胞数が増加したと報告されている。Whisker pad、下口唇に侵害刺激を加えた場合にも、三叉神経脊髄路核の浅層と深層に c-Fos 免疫陽性細胞数が増加した (Strassman and Vos, 1993)。

本研究では、オトガイ神経切断後 7 日目に非侵害刺激を whisker pad に加えると特異的侵害受容ニューロンが分布する三叉神経脊髄路核浅層に c-Fos 免疫陽性細胞数が増加したものの、広作動域ニューロンの分布する三叉神経脊髄路核深層には c-Fos 免疫陽性細胞数の増加は認められなかった。このことから、特異的侵害受容ニューロンが活性化し、広作動域ニューロンは活性化しなかったことが示唆される。また、これらの結果は、オトガイ神経切断後に whisker pad における疼痛逃避行動閾値が低下したと整合する。

5. 神経因性疼痛と IL-1beta との関連性について

炎症後、脊髄または三叉神経脊髄路核において IL-1beta 発現が上昇し (Guo et al., 2007; Raghavendra et al., 2004; Zhang et al., 2008)、IL-1beta は星状膠細胞

に発現する(Guo et al., 2007; Zhang et al., 2008)と報告されている。神経傷害モデルにおいても炎症モデルと同様に、脊髄において IL-1beta が上昇する(Detloff et al., 2008; Winkelstein et al., 2001)。一方、in vitro の実験では小膠細胞にも IL-1beta が発現する(Black et al., 2008; Flanary and Streit, 2006)という報告もあり、神経傷害モデルにおいて IL-1beta を産生するのがどの神経膠細胞によるものか不明であった(Zhang et al., 2008)。

本研究では過去の報告と同様に(Blackbeard et al., 2007; Lee et al., 2008; Piao et al., 2006; Ulmann et al., 2008)神経傷害後に星状膠細胞と小膠細胞の活性化が認められたが、IL-1beta は炎症モデルと同様に星状膠細胞にのみ発現していた。すなわち、神経切断後、星状膠細胞からのみ IL-1beta が分泌されたと考えられる。

IL-1beta は細胞膜表面の IL-1 受容体を介して作用することが知られている(Subramaniam et al., 2004)。IL-1 受容体にはタイプ I (IL-1R I)及びタイプ II (IL-1R II)の2つのサブタイプが存在する。これらの受容体は細胞膜を1回貫通する構造をとり、細胞外ドメインと細胞内ドメインに大きく分けられる。細胞外ドメインは免疫グロブリン様構造を有する一方、細胞内ドメインの構造は Toll 様受容体 (Toll-like Receptor) と相同性が高く、Toll/IL-1 受容体相同領域 (TIR ドメイン) と呼ばれる (Martin and Wesche, 2002)。IL-1R II は細胞内ドメインをほぼ欠損しているためシグナル伝達には関与しないが、IL-1R I はシグナル伝達に関与することが知られている (Subramaniam et al., 2004)。リガンドの結合による細胞内シグナル伝達経路は TLR と同様であり、以下のように考えられている。まず、IL-1 受容体の TLR にアダプタータンパク質であるミエロイド系分化因子 88 (Myeloid Differentiation Protein-88) を介してセリン/スレオニンキナーゼである IL-1 受容体関連キナーゼ (IL-1 Receptor Associating Kinase) を活性化する。次いで、IRAK の下流にあるアダプタータンパク質 TRAF-6 (TNF Receptor-associated Factor-6) を介して炎症反応に関与する NF κ

B(Nuclear Factor κ B)や MAP キナーゼ等の活性化を引き起こし、転写活性を示す (Li and Qin, 2005)。本研究では、三叉神経脊髄路核において同一のニューロンに、IL-1RI と c-Fos 免疫陽性反応が認められた。また、IL-1ra を投与するとオトガイ神経切断後 whisker pad への非侵害刺激によって誘発された c-Fos 免疫陽性細胞数の増加が抑制され、疼痛逃避閾値が上昇したことから、IL-1beta が侵害受容二次ニューロンの受容体に結合し細胞内伝達経路を駆動したことが示唆される。この実験結果は、IL-1beta 投与後、C 線維を低頻度で電気刺激すると、脊髄後角のニューロンのスパイク発射が増強し、刺激中止後も長期に渡ってスパイク発射が持続する wind-up 現象が引き起こされるという報告(Reeve et al., 2000)によっても支持される。

下歯槽神経切断後に、下歯槽神経の自発発火が上昇することが示されている (Bonghenhielm and Robinson, 1998)。また、オトガイ神経絞扼により星状膠細胞に発現した IL-1beta が Gap-junction ブロッカーによって抑制されること、侵害性一次神経終末が Gap-junction を介して星状膠細胞と接していることが明らかとなっている (末川, 2008)。逆行性トレーサーである HRP を用いた実験でオトガイ神経は尾側核と中位核尾側核移行域の背内側部に投射していることが明らかにされているが (Takemura et al., 1987)、本研究ではオトガイ神経切断後、尾側核と中位核尾側核移行域の背内側部の星状膠細胞に IL-1beta が強発現していた。以上の結果より、オトガイ神経切断によって生じた異常入力 Gap-junction を介して星状膠細胞に伝達され IL-1beta が誘発されたと考えられる。また、Strassmans と Vos(1993)は whisker pad に機械的侵害刺激を加えると尾側核の背側と腹側の中間部浅層に c-Fos 免疫陽性細胞が多数発現したと報告しているが、本研究においてオトガイ神経切断モデルの whisker pad に非侵害刺激を加えた後に発現した c-Fos 免疫陽性細胞の分布とほぼ同じであった。IL-1beta の強発現部位と c-Fos 免疫陽性細胞発現部位が近接していること、IL-1ra 投与により c-Fos 免疫陽性細胞数と痛覚過敏が抑制されること、

c-Fos と IL-1R I 免疫陽性細胞が同一のニューロンに発現していることなどを考慮すると、オトガイ神経切断によって産生された IL-1beta が、眼窩下神経が終末する部位の二次ニューロンに中枢性感作を誘発して機械的刺激に対する閾値を低下させることにより痛覚過敏を引き起こしたと考えられる。

6. 神経因性疼痛と NMDA 受容体との関連性について

オトガイ神経切断によって生じる神経因性疼痛が、MK-801 によって抑制されたこと、IL-1ra を投与すると痛覚過敏が抑制され、非侵害刺激によって誘発される c-Fos 免疫陽性細胞数が抑制されたことから、本研究モデルにおいて侵害刺激の上位中枢への伝達には、NMDA 受容体と IL-1beta の両方が必要不可欠であることが示唆された。炎症によって誘発される痛覚過敏が MK-801 投与により抑制されること(Hama et al., 2003; Ren et al., 1992)、IL-1beta は NMDA 受容体による細胞内の内向き整流を増加させ(Yang et al., 2005)細胞内カルシウム濃度を増加させること(Viviani et al., 2003)から、慢性疼痛発生機序として IL-1beta と NMDA 受容体の関連性が示されている。また、IL-1beta が NMDA 受容体のサブユニットである NR1 をリン酸化すること(Guo et al., 2007; Zhang et al., 2008)、そして慢性疼痛時に二次ニューロンにおける NR1 のリン酸化が促進され(Gao et al., 2005; Ultenius et al., 2006)、リン酸化を阻害すると痛覚過敏が抑制されることが報告されている(Gao et al., 2005)。これらの報告は、IL-1beta は NR1 のリン酸化により痛覚過敏を引き起こすことを示唆しており、本研究結果を支持するものと考えられる。

7. 神経因性疼痛と TNF-alpha との関連性について

本研究では、三叉神経第二枝は無傷害なのでオトガイ神経切断後の三叉神経節では末梢線維を傷害された神経細胞と無傷害の細胞が混在していることになる。嘔

乳動物の感覚神経の一次神経細胞体は衛星細胞がこれを取り囲むことによってシナプスを介した伝達機構が遮断され、一次神経細胞体同士でパラクライン的な情報の伝達は行われないと考えられてきた。すなわち、一次神経細胞体は独立して感覚情報を伝達するとされていた(Amir and Devor, 1996)。しかし、最近の電気生理学的動物実験では、脊髄後根神経節において有髄神経の興奮が無髄神経の興奮も促すことが報告され、後根神経節内の一次神経細胞体同士で化学情報伝達が起きていることが示唆されている(Amir and Devor, 2000)。さらに、ラット第五腰髄神経節への TNF-alpha 投与が、後肢に痛覚過敏を発生させたとの報告がある(Liu et al., 2002; Ozaktay et al., 2006)。本研究において、オトガイ神経切断後に抗 TNF-alpha 抗体を髄膜下投与すると痛覚過敏が抑制され、TNF-alpha を髄膜下投与すると痛覚過敏が誘発された。また、TNF-alpha 免疫陽性細胞体が三叉神経節において確認された。髄膜下に投与した薬品は脊髄後根に影響を与えないという説もあるが、Zhuang ら (2006)は、髄膜下に投与した薬品が脊髄後根の細胞体に取りこまれたと報告している。したがって、本研究で髄膜下投与した抗 TNF-alpha 抗体と Recombinant TNF-alpha は、三叉神経節に作用していると考えられる。これらの報告と本研究結果を併せ考えると、オトガイ神経傷害後に whisker pad に発生する機械的痛覚過敏に、三叉神経節内の TNF-alpha が重要な役割を果たしていると考えられる。

最近の報告によると、下歯槽神経又はオトガイ神経切断によって誘発される機械的痛覚過敏の発生と維持に三叉神経脊髄路核の神経膠細胞が関与しているとされている(Piao et al., 2006)。本研究では TNF-alpha 免疫陽性反応は三叉神経脊髄路核では確認できなかったが、この結果はこれまでに報告された実験結果と一致(Guo et al., 2007)し、オトガイ神経切断モデルでは中枢神経における TNF-alpha が痛覚過敏の発生に関与していないことが示唆される。Sacerdote ら (2008)によると坐骨神経絞扼モデルにおいて温度・機械的痛覚過敏は、3 から 7 日目に最も閾値が低下し、

14 日目においても温度・機械的痛覚過敏が維持されると報告している。さらに、後根神経節における TNF-alpha の mRNA は絞扼後 1 から 3 日目に最大に達し、7 日目には基準値まで回復すると報告している。さらに、TNF-alpha 拮抗薬である TNF-alpha receptor (p75) fusion protein の術前投与は鎮痛効果を示すが、術後投与では認められないとしている。これらの研究結果は、TNF-alpha は神経因性疼痛の発生に関与しているものの、維持には関係していないことを示唆する(Schafers et al., 2003b; Svensson et al., 2005)。一方、本研究ではオトガイ神経切断後 7 日目に抗 TNF-alpha 抗体を投与すると痛覚過敏が抑制され、Recombinant TNF-alpha を投与すると、投与後 24 時間から 7 日目まで痛覚過敏が確認された。このことから、三叉神経節においては TNF-alpha は神経因性疼痛の発生と維持に関与していることが示唆される。また、TNF-alpha と神経因性疼痛について直接的な関連性は明らかにされなかったものの、神経因性疼痛の発生と維持に TNF-alpha が関与していると考えられるので、TNF-alpha は神経因性疼痛発現機序解明と治療薬開発のターゲットとなると考えられる。

総括

本研究ではラットオトガイ神経切断モデルを用いて三叉神経脊髄路核の星状膠細胞と小膠細胞に着目し、神経因性慢性疼痛の発現機序について検索した。その結果、以下の所見が明らかとなった。

1. オトガイ神経切断・挫滅モデルは関連疼痛モデルとして有効であることが示された。
2. オトガイ神経切断モデルの三叉神経脊髄路核において、星状膠細胞と小膠細胞の活性化が確認され、星状膠細胞に IL-1beta が発現していた。
3. IL-1beta 拮抗薬髄膜下投与により、神経因性疼痛と二次ニューロンの活性化が抑制された。また、IL-1beta の受容体は、二次ニューロンに発現していた。
4. NMDA 受容体拮抗薬髄膜下投与により、神経因性疼痛が抑制された。
5. TNF-alpha は三叉神経節の神経細胞で発現していたものの、三叉神経脊髄路核では認められなかった。
6. TNF-alpha 拮抗薬髄膜下投与により神経因性疼痛が抑制され、Recombinant TNF-alpha 髄膜下投与により痛覚過敏が発現した。

以上の結果から、オトガイ神経切断によって誘発される関連疼痛の発生機序として、三叉神経脊髄路核における星状膠細胞が分泌する IL-1beta によって誘発される二次ニューロンの感作が示された。また、末梢に加えられた非侵害刺激の伝達には、IL-1beta による中枢性の感作のみではなく、NMDA 受容体も必要であることが示された。さらに、三叉神経節においても TNF-alpha が、関連疼痛の発現に関与していることが判明した。したがって、IL-1beta と TNF-alpha は、三叉神経系における神経因性疼痛の新たな治療薬開発のターゲットとなると考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行および論文の作成上終始懇篤なるご指導ならびに御校閲を賜りました本学大学院医歯薬学総合研究科顎口腔頸部医科学講座(歯科矯正学)丹根一夫教授に心から感謝いたします。

また、御校閲を賜りました同研究科探索医科学講座(口腔細胞生物学)内田 隆教授、顎口腔頸部医科学講座(小児歯科学)香西克之教授、先進医療開発科学講座(口腔顎顔面病理病態学)高田 隆教授、病態制御医科学講座(口腔成長・発達生物学)吉子裕二准教授に深謝いたします。

また、多大なご指導、ご協力をいただきました探索医科学講座(口腔細胞生物学)渡邊峰朗助教、ならびに顎口腔頸部医科学講座(歯科矯正学)の教室員各位に感謝いたします。

文献

Amir R, Devor M (1996). Chemically mediated cross-excitation in rat dorsal root ganglia. *J Neurosci* 16(15):4733-41.

Amir R, Devor M (2000). Functional cross-excitation between afferent A- and C-neurons in dorsal root ganglia. *Neuroscience* 95(1):189-95.

Bennett GJ, Xie YK (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33(1): 87-107.

Black JA, Liu S, Waxman SG (2008). Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia. *Glia* in press.

Blackbeard J, O'Dea KP, Wallace VC, Segerdahl A, Pheby T, Takata M, et al. (2007). Quantification of the rat spinal microglial response to peripheral nerve injury as revealed by immunohistochemical image analysis and flow cytometry. *J Neurosci Methods* 164(2):207-17.

Bonghenhielm U, Robinson PP (1998). Afferent activity from myelinated inferior alveolar nerve fibers in ferrets after constriction or section and regeneration. *Pain* 74(2-3):123-32.

Detloff MR, Fisher LC, McGaughy V, Longbrake EE, Popovich PG, Basso DM (2008). Remote activation of microglia and pro-inflammatory cytokines predict the onset and severity of below-level neuropathic pain after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 212(2):337-47.

Flanary BE, Streit WJ (2006). Alpha-tocopherol (vitamin E) induces rapid, nonsustained proliferation in cultured rat microglia. *Glia* 53(6): 669-74.

Fu KY, Light AR, Matsushima GK, Maixner W (1999). Microglial reactions after subcutaneous formalin injection into the rat hind paw. *Brain Res* 825(1-2):59-67.

Gao X, Kim HK, Chung JM, Chung K (2005). Enhancement of NMDA receptor phosphorylation of the spinal dorsal horn and nucleus gracilis neurons in neuropathic rats.

Pain 116(1-2):62-72.

Garrison CJ, Dougherty PM, Carlton SM (1994). GFAP expression in lumbar spinal cord of naive and neuropathic rats treated with MK-801. *Exp Neurol* 129(2):237-43.

Guo W, Zou S, Guan Y, Ikeda T, Tal M, Dubner R, et al. (2002). Tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the spinal cord during the development and maintenance of inflammatory hyperalgesia. *J Neurosci* 22(14):6208-17.

Guo W, Wang H, Watanabe M, Shimizu K, Zou S, LaGraize SC, et al. (2007). Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. *J Neurosci* 27(22):6006-18.

Hama A, Woon Lee J, Sagen J (2003). Differential efficacy of intrathecal NMDA receptor antagonists on inflammatory mechanical and thermal hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol* 459(1):49-58.

Hanisch UK (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40(2):140-55.

平沢 興, 岡本道雄 (1992). 分担解剖学 2, 第 11 版, 金原出版, 東京, pp.402-4.

Ikeda T, Terayama R, Jue SS, Sugiyo S, Dubner R, Ren K (2003). Differential rostral projections of caudal brainstem neurons receiving trigeminal input after masseter inflammation. *J Comp Neurol* 465(2):220-33.

Inoue K (2002). Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia* 40(2):156-63.

Iwata K, Takahashi O, Tsuboi Y, Ochiai H, Hibiya J, Sakaki T, et al. (1998). Fos protein induction in the medullary dorsal horn and first segment of the spinal cord by tooth-pulp stimulation in cats. *Pain* 75(1):27-36.

Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, Ji RR (2003). p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J Neurosci* 23(10):4017-22.

Koyess E, Fares M (2006). Referred pain: a confusing case of differential diagnosis between

two teeth presenting with endo-perio problems. *Int Endod J* 39(9):724-9.

Lee JW, Siegel SM, Oaklander AL (2008). Effects of distal nerve injuries on dorsal-horn neurons and glia: Relationships between lesion size and mechanical hyperalgesia. *Neuroscience* in press.

Li X, Qin J (2005). Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *J Mol Med* 83(4):258-66.

Liu B, Li H, Brull SJ, Zhang JM (2002). Increased sensitivity of sensory neurons to tumor necrosis factor alpha in rats with chronic compression of the lumbar ganglia. *J Neurophysiol* 88(3):1393-9.

Marchand F, Perretti M, McMahon SB (2005). Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 6(7):521-32.

Martin MU, Wesche H (2002). Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta* 1592(3):265-80.

Meller ST, Dykstra C, Grzybycki D, Murphy S, Gebhart GF (1994). The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology* 33(11):1471-8.

Milligan ED, Mehmert KK, Hinde JL, Harvey LO, Martin D, Tracey KJ, et al. (2000). Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. *Brain Res* 861(1):105-16.

Milligan ED, O'Connor KA, Nguyen KT, Armstrong CB, Twining C, Gaykema RP, et al. (2001). Intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120 induces enhanced pain states mediated by spinal cord proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 21(8):2808-19.

Milligan ED, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, et al. (2003). Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 23(3):1026-40.

Nomura H, Ogawa A, Tashiro A, Morimoto T, Hu JW, Iwata K (2002). Induction of Fos protein-like immunoreactivity in the trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following noxious and non-noxious mechanical stimulation of the whisker pad of the rat with an inferior alveolar nerve transection. *Pain* 95(3):225-38.

Obata K, Noguchi K (2008). [Contribution of primary sensory neurons and spinal glial cells to pathomechanisms of neuropathic pain]. *Brain Nerve* 60(5):483-92.

Ozaktay AC, Kallakuri S, Takebayashi T, Cavanaugh JM, Asik I, DeLeo JA, et al. (2006). Effects of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor on sensitivity of dorsal root ganglion and peripheral receptive fields in rats. *Eur Spine J* 15(10):1529-37.

Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, Shimoji K (2003). The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. *Anesth Analg* 97(4):1108-16.

Piao ZG, Cho IH, Park CK, Hong JP, Choi SY, Lee SJ, et al. (2006). Activation of glia and microglial p38 MAPK in medullary dorsal horn contributes to tactile hypersensitivity following trigeminal sensory nerve injury. *Pain* 121(3):219-31.

Qin M, Wang JJ, Cao R, Zhang H, Duan L, Gao B, et al. (2006). The lumbar spinal cord glial cells actively modulate subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Neurosci Res* 55(4):442-50.

Raghavendra V, Tanga F, DeLeo JA (2003). Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 306(2):624-30.

Raghavendra V, Tanga FY, DeLeo JA (2004). Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur J Neurosci* 20(2):467-73.

Reeve AJ, Patel S, Fox A, Walker K, Urban L (2000). Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia, hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal responses to nociceptive stimuli in the rat. *Eur J Pain* 4(3):247-57.

Ren K, Hylden JL, Williams GM, Ruda MA, Dubner R (1992). The effects of a

non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia and dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation. *Pain* 50(3):331-44.

Sacerdote P, Franchi S, Trovato AE, Valsecchi AE, Panerai AE, Colleoni M (2008). Transient early expression of TNF- α in sciatic nerve and dorsal root ganglia in a mouse model of painful peripheral neuropathy. *Neurosci Lett* 436(2):210-3.

Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, et al. (2001). Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* 410(6827):471-5.

Schafers M, Lee DH, Brors D, Yaksh TL, Sorkin LS (2003a). Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor- α after spinal nerve ligation. *J Neurosci* 23(7):3028-38.

Schafers M, Svensson CI, Sommer C, Sorkin LS (2003b). Tumor necrosis factor- α induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. *J Neurosci* 23(7):2517-21.

Sommer C, Schmidt C, George A (1998). Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Exp Neurol* 151(1):138-42.

Strassman AM, Vos BP (1993). Somatotopic and laminar organization of fos-like immunoreactivity in the medullary and upper cervical dorsal horn induced by noxious facial stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 331(4):495-516.

Strassman AM, Vos BP, Mineta Y, Naderi S, Borsook D, Burstein R (1993). Fos-like immunoreactivity in the superficial medullary dorsal horn induced by noxious and innocuous thermal stimulation of facial skin in the rat. *J Neurophysiol* 70(5):1811-21.

Subramaniam S, Stansberg C, Cunningham C (2004). The interleukin 1 receptor family. *Dev Comp Immunol* 28(5):415-28.

末川洋平 (2008).ラット眼窩下神経絞扼モデルを用いた神経因性疼痛における三叉神経脊髄路核神経膠細胞の役割.学位論文(広島大学):1-54.

Sugimoto T, He YF, Funahashi M, Ichikawa H (1998a). Induction of immediate-early genes c-fos and zif268 in the subnucleus oralis by noxious tooth pulp stimulation. *Brain Res* 794(2):353-8.

Sugimoto T, He YF, Xiao C, Ichikawa H (1998b). c-fos induction in the subnucleus oralis following trigeminal nerve stimulation. *Brain Res* 783(1):158-62.

Svensson CI, Schafers M, Jones TL, Powell H, Sorkin LS (2005). Spinal blockade of TNF blocks spinal nerve ligation-induced increases in spinal P-p38. *Neurosci Lett* 379(3):209-13.

Sweet WH (1984). Deafferentation pain after posterior rhizotomy, trauma to a limb, and herpes zoster. *Neurosurg* 15(6):928-32.

Takemura M, Sugimoto T, Sakai A (1987). Topographic organization of central terminal region of different sensory branches of the rat mandibular nerve. *Exp Neurol* 96(3):540-57.

津田 誠, 井上和秀 (2007). 神経因性疼痛と脊髄ミクログリアの ATP 受容体. *Brain and Nerve* 59:953-9.

Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, et al. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424(6950):778-83.

Ulmann L, Hatcher JP, Hughes JP, Chaumont S, Green PJ, Conquet F, et al. (2008). Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J Neurosci* 28(44):11263-8.

Ulfenius C, Linderöth B, Meyerson BA, Wallin J (2006). Spinal NMDA receptor phosphorylation correlates with the presence of neuropathic signs following peripheral nerve injury in the rat. *Neurosci Lett* 399(1-2):85-90.

Viviani B, Bartsaghi S, Gardoni F, Vezzani A, Behrens MM, Bartfai T, et al. (2003). Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci* 23(25):8692-700.

Watanabe M, Tanaka E, Suemune S, Satoda T, Maeda N, Uchida T, et al. (2003). Expression

of c-Fos protein in the trigeminal nuclear complex resulting from quantified force application to the rat molar. *J Oral Rehabil* 30(11):1128-37.

Watkins LR, Maier SF (1999). Implications of immune-to-brain communication for sickness and pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(14):7710-3.

Watkins LR, Milligan ED, Maier SF (2003). Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. *Adv Exp Med Biol* 521(1):1-21.

Winkelstein BA, Rutkowski MD, Sweitzer SM, Pahl JL, DeLeo JA (2001). Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment. *J Comp Neurol* 439(2):127-39.

Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE (1992). Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355(6355):75-8.

Woolf CJ, Shortland P, Reynolds M, Ridings J, Doubell T, Coggeshall RE (1995). Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. *J Comp Neurol* 360(1):121-34.

Woolf CJ, Salter MW (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288(5472):1765-9.

Yang S, Liu ZW, Wen L, Qiao HF, Zhou WX, Zhang YX (2005). Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated current but inhibits excitatory synaptic transmission. *Brain Res* 1034(1-2):172-9.

Ying B, Lu N, Zhang YQ, Zhao ZQ (2006). Involvement of spinal glia in tetanically sciatic stimulation-induced bilateral mechanical allodynia in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 340(4):1264-72.

横田敏勝 (2001). 臨床医のための痛みのメカニズム. 第2版, 南江堂, 東京, pp.131-7.

Zhang RX, Li A, Liu B, Wang L, Ren K, Zhang H, et al. (2008). IL-1ra alleviates inflammatory hyperalgesia through preventing phosphorylation of NMDA receptor NR-1