

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

玉田 真誉

論文題目

オトガイ神経部分結紮による痛覚過敏における
TRPV1 チャンネルの関与

I. 緒言

顎顔面口腔領域における神経線維は硬組織内部や近接部を複雑に走行しており、歯科治療によって損傷を受けやすい。特に顎矯正手術を併用した矯正治療では術後に神経損傷を伴うことがあり、治療が終わっても痛みが治らないなど原因不明の訴えがみられることがある。このような神経損傷により起こる慢性的な痛みは痛覚伝導路の神経の変性によって生じると考えられており、神経障害性疼痛と呼ばれる。神経障害性疼痛では自発痛や痛覚過敏がみられるがこれらの発症メカニズムには不明な点が多い。口腔顔面領域からの体性感覚情報は、三叉神経求心路を通り延髄に伝達され、主に触覚・圧覚は主感覚核に、痛覚・温度覚は三叉神経脊髄路核 (Vsp) に伝達される。Vsp には吻側亜核 (Vo)、中間亜核 (Vi)、尾側亜核 (Vc) という3つが存在し、Vc は、顎顔面領域からの侵害受容情報を伝達する三叉神経の一次求心性入力を受ける。

また Vc に発現する transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) チャンネルも活性化することで神経末端や中枢端からの神経伝達物質または化学物質の放出を引き起こし、侵害受容シグナル伝達の増強をもたらす。TRPV1 は、後根神経節 (DRG) ニューロンの持続的な炎症性刺激によって増加、増加した TRPV1 は、Vc ニューロンのシナプス伝達に長期的な影響を及ぼし、持続的な痛みの主な原因であると仮定されている。

顎矯正手術を併用した矯正治療で起こる慢性的な痛みの発症メカニズム

を解明することで神経障害性疼痛の治療法の確立につながると考え研究を行なった。

本研究では、三叉神経の枝であるオトガイ神経を部分結紮(PNL)し、神経障害性疼痛モデルラットを作成し、下記項目について検討した。

1) PNL ラットの神経障害性疼痛に対する TRPV1 拮抗薬の効果をフォンフレイフィラメントによる下顎皮層への機械的刺激に対する逃避閾値で評価した。

2) Vc ニューロンの興奮性シナプス伝達に対する TRPV1 アゴニストまたはアンタゴニストの効果を脳幹スライス標本で評価した。

II. 実験材料および方法

1. 使用薬物

- AMG9810 ; TRPV1 チャネル遮断薬
- Capsaicin ; TRPV1 チャネル作動薬
- Pregabalin ; 神経障害性疼痛治療薬

2. 外科処置

本実験では、Wistar 系雄性ラット (3~5 週齢、50~100g) を用いた。3 週齢のラットの下唇を支配する三叉神経の感覚枝であるオトガイ神経をオトガイ孔の出口点から両側に露出させ、神経の腹側の 3 分の 1 から 2 分の 1 を結紮した。対照実験として、オトガイ神経の露出だけ行い結紮を行わなかった sham 手術を行った。

3. PNL ラットの逃避閾値の変化の測定

口腔顔面痛覚過敏の閾値を、PNL および sham ラットで手術の 1 週間後および 2 週間後にフォンフレイテストを用いて測定した。各ラットを、ワイヤーメッシュの底を備えた個々の透明な箱に配置し、フォンフレイフィラメントを軽いものから順番に下唇の皮膚に垂直にあてた。2 つの重さで連続して、フィラメントによる刺激により明らかな頭の引っ込め反応が最初に見られたとき、軽い方を逃避閾値と見なした。

4. 脳幹スライス実験

手術後 2 週間の PNL および sham ラットを吸入麻酔し、断頭し、三叉神経脊髄路核尾側亜核を含む脳幹部を摘出した。脳幹部から小脳を切除後、硬膜及び毛細血管を剥離し、延髄を摘出した。マイクロスライスカッターを用いて、厚さ 400 μm の水平断スライスを 2~3 枚作成した。脳幹スライスを人工脊髄液中に、34°C で 30~40 分間保温した後、室温で約 1 時間保管した。

Vc 領域の神経細胞からの膜電流の記録は whole-cell patch clamp 法を用いた。細胞膜にケイ酸ガラス毛細管を密着させ、細胞内環境とパッチ電極内を貫通させ、細胞膜を流れるイオン電流を記録した。実験はすべて室温で行った。

5. データ分析

機械的侵害受容に対する逃避反応は、手術前、および薬物注射の前 (-15)、

0、30、60、90、120 および 150 分後にフォンフレイ試験によって測定した。

グループ値は、平均±SEM (n =動物の数) として表した。

膜電流のシグナルはパッチクランプ増幅器を用い、4kHz で記録した。

データ解析には Chart5、Origin ソフトを用いた。測定された数値は、平均±標準誤差 (n=例数) で表示した。導出されたパラメーターは Student's *t*-test を用いて統計学的有意性を評価し、一元配置分散分析 (ANOVA) を用いた。 $p < 0.05$ を統計的有意差ありと判定した。

III. 結果

以下に本実験結果を示す。

1. フォンフレイテストによる逃避閾値の測定

PNL ラットは手術の 1 週間後と 2 週間後に逃避閾値の低下がみられた。sham のラットでは逃避閾値の低下は起こらなかった。手術後 2 週間の PNL ラットに髄腔内投与法にてプレガバリンの投与を行った。PNL ラットの逃避閾値を上昇させ、注射後 30 分にピークを示し、最低用量 ($10 \mu\text{g}$) では約 1 時間の効果がみられた。同量の溶媒の投与は効果がなかった。sham のラットでは、プレガバリン投与後の逃避反応に変化はみられなかった。

TRPV1 拮抗薬である AMG981 (1.5 、 $5.0 \mu\text{g}$) を髄腔内投与法にて投与した結果、PNL ラットの逃避閾値の低下を軽減したが、sham ラットでは有意な変化はみられなかった。溶媒 ($30 \mu\text{l}$) の投与は効果がなかった。

さらに、神経障害性疼痛は成体 PNL ラット (8 週齢) でも発症し、AMG9810

(5.0 μ g) を投与した結果、逃避閾値の低下が軽減された。

2. PNL ラットと Sham ラットの体重測定

また神経障害性疼痛が成長の過程の体重増加に影響を与えるか調べた。

今回 PNL ラットと Sham ラットの手術前, 1 週間後, 2 週間後の体重を測定した。PNL ラットと Sham ラットでは有意差は認められなかった。

3. 脳幹スライス実験

1) PNL ラットの Vc ニューロンの sEPSC に対するカプサイシンと AMG9810 の効果

PNL ラットでは、カプサイシンは sEPSC の頻度を有意に増加させたが、振幅は変化しなかった。カプサイシン濃度を上げると、sEPSC 頻度への影響が大きくなる。sham のラットでは、カプサイシンは sEPSC に明らかな影響を及ぼさなかった。

AMG9810 の存在下では、PNL ラットと sham ラットの間における低濃度でのカプサイシンの有効性の違いはなくなっていた。

2) PNL ラットの Vc ニューロンの mEPSC に対するカプサイシンと AMG9810 の効果

PNL ラットでは低濃度のカプサイシンにおいて、振幅に影響を与えることなく、mEPSC の頻度が増加した。sham ラットでは、低濃度のカプサイシンは頻度と振幅に有意な影響を及ぼさなかった。

AMG9810 は、PNL ラットの低濃度でのカプサイシンの有効性を抑制した。

3) PNL ラットの Vc ニューロンの eEPSC に対するカプサイシンの効果

カプサイシンの灌流は、PNL および sham ラットのすべての濃度で eEPSC に検出可能な影響を与えなかった。

IV. 考察

1. PNL モデルの神経障害性疼痛に対する中枢 TRPV1 の寄与

本研究では、下唇皮膚への機械的刺激に対する逃避閾値は、PNL ラットでは低下したが、sham ラットでは低下しなかった。これは、PNL モデルにおける神経障害性疼痛の発症を示唆している。またオトガイ神経損傷がラットの摂食量には明らかな影響は与えないと考えられる。さらに、プレガバリンの髄腔内投与は、PNL ラットの神経障害性疼痛を軽減し、プレガバリンが中枢領域で鎮痛作用を発揮することを示している。

本研究は、TRPV1 のアンタゴニストである AMG9810 の髄腔内投与が PNL ラットの機械的刺激に対する過敏症を軽減できることを初めて明らかにした。

TRPV1 は Vc 領域の感覚求心性線維に分布し、その活性化により神経伝達物質または化学物質が神経末端から放出され、侵害受容信号伝達が増強されることが実証されている。

2. PNL ラットにおける興奮性シナプス伝達の TRPV1 誘発性促進

カプサイシンは Vc ニューロンの sEPSC と mEPSC の両方を増加させ、PNL ラットでのその有効濃度は sham ラットよりも有意に低かった。さらに

AMG9810 は、カプサイシンの効果に拮抗した。これらの結果は、TRPV1 の増強が、PNL ラットにおける活動電位に依存しない伝達物質の放出に関連している可能性があることを示唆している。TRPV1 を介した Ca^{2+} の流入はシナプス前終末での濃度を上昇させ、グルタミン酸放出を増加させる可能性がある。また Vc ニューロンの eEPSC は PNL および sham ラットのカプサイシンに反応しなかった。

これらより、TRPV1 は活動電位に依存しないグルタミン酸の放出を促進し、Vc ニューロンの基礎活動の増加につながる可能性がある。これは、痛覚過敏および異痛症を示す神経障害性疼痛の症状、感覚異常として知られる異常な感覚、または通常は痛みを伴わない刺激による痛みに関連している可能性がある。

V. まとめ

本研究は、TRPV1 の遮断が、(1) 機械的刺激に対する逃避閾値の低下を軽減し、(2) Vc ニューロンにおける興奮性シナプス伝達のカプサイシン誘発性促進を軽減することを示した。これらの結果は、PNL モデルの神経障害性疼痛が Vc 領域の TRPV1 の増加に起因し、したがって三叉神経求心性神経からのグルタミン酸放出の促進に起因することを示唆している。したがって、Vc 領域の TRPV1 は、少なくとも部分的に慢性口腔顔面痛に寄与し、神経障害性疼痛の治療標的となると考えられる。