

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 801 号	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の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る。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。その後、これらすべての感覚情報は間脳の視床後内側腹核に収束し、大脳の一次体性感覚野へ投射される。Vsp には3つの亜核が存在し、それぞれ吻側亜核 (Vo)、中間亜核 (Vi)、尾側亜核 (Vc) とよばれる。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。さらに、侵害受容シグナルの調節および統合において重要な役割を果たしている内因性神経伝達経路から興奮性および抑制性入力を受ける。

Vc に発現する transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) チャネルは顎口腔侵害受容伝達に関与すると言われている。顎顔面領域を神経支配する TRPV1 陽性求心性神経細胞は、すべての三叉神経の感覚核、脊髄路核、主に Vc の SG 領域に投射する。また実験的な歯の動きは、Vc における TRPV1 チャネルの発現を増加させる。さらに、歯の動きによるシナプス前 TRPV1 チャネルの選択的活性化は Vc ニューロンにおける自発性興奮伝達を促進する。一般に、侵害受容性疼痛の伝達経路において TRPV1 チャネルは体性感覚線維に分布しており、それらの活性化は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 チャネルは、プロトン、熱および生物活性物質を含む物理・化学的侵害受容刺激によって活性化され、内因性プロテインキナーゼによるリン酸化を受け調整される。

また、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する。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。

実験において神経損傷を作り出した神経障害性疼痛モデルは、神経伝達物質と受容体の発現の長期的な変化を示し、いくつかの炎症性および疼痛メディエーターの放出に反応して中枢性感作を引き起こし、これにより損傷部位および中枢神経系における末梢感覚求心性神経の感度が高まることが報告されている。

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。
- 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。

## II. 実験材料および方法

本実験は愛知学院大学の動物実験指針に順次、日本薬理学会によって承認された実験動物の指導原則に従って実施した。実験は動物の苦痛を最小限にし、使用する動物の数をできる限り少なくして行った。

### 2.1 使用薬物

使用薬物は以下のとおりである。

- AMG9810

((2E)-N-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-3-[4-(1,1-dimethylethyl)phenyl]-2-propenamide; TRPV1 チャネル遮断薬, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)

- Capsaicin (TRPV1 チャネル作動薬, Sigma, St. Louis, MO, USA)

- Pregabalin (神経障害性疼痛治療薬, Toronto Research Chemicals, North York, Canada)

### 2.2 外科処置

本実験では、Wistar 系雄性ラット (SLC, Japan, 3~5 週齢, 50~100g) を用いた。12 時間の明暗サイクルで維持し、餌と水を自由に摂取させた。3 週齢のラットをペントバルビタール (50 mg /kg, i. p.) で麻酔し、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、オトガイ孔の約 1.0 mm 遠位で 8-0 絹縫合糸にて結紮した。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。さらに、若いラット (3 週間) で完全に神経系が発達していない可能性があるため、成体ラット (8 週間, 150~200 g, SLC, 静岡, 日本) も若いラット同様に外科処置を行い逃避閾値の変化の測定を行った。

### 2.3 PNL ラットの逃避閾値の変化の測定

#### 2.3.1 フォンフレイテスト

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

間後に測定した。測定は、フォンフレイテストを用いた。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た。測定前に、ラットを1時間環境に順応させた。フォンフレイフィラメント (0.02、0.07、0.16、0.4、1.0、2.0、4.0、および8.0 g の刺激、Semmes-Weinstein モノフィラメント; Stoelting、ウッドデール、イリノイ州) を圧刺激の弱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み反応が最初に見られたとき、圧刺激の弱い方を逃避閾値と見なした。

### 2.3.2 薬剤の投与方法

腹腔内投与方法では、プレガバリンを生理食塩水に溶解し、10mg/kg の用量で投与した。髄腔内投与方法では、プレガバリンを生理食塩水に溶解し、動物あたり 10、30、100  $\mu$ g/30  $\mu$ l の最終用量で投与した。AMG9810 は最初にエタノールに溶解し、1%エタノールを含む生理食塩水で希釈し、動物あたり 1.5 および 5.0  $\mu$ g/30  $\mu$ l の最終用量で投与した。これらの薬剤は、30G 注射針とマイクロシリンジを使用して、後頭骨と C1 椎骨の間の孔を通してくも膜下腔に注射した。実験の最後に、少量のクリスタルバイオレットを投与して注射部位の確認を行った。

## 2.4 脳幹スライス実験

### 2.4.1 スライス作成

実験は、先行研究を参照して実施した。手術後2週間の PNL および sham ラットをイソフルランの吸入で麻酔し、断頭した。三叉神経脊髄路核尾側亜核を含む脳幹部を摘出し、氷冷した低カルシウム人工脳脊髄液 (組成: 260mM sucrose; KCl, 3.0mM; CaCl<sub>2</sub>, 1.0mM; MgCl<sub>2</sub>, 3.0mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.25mM; D-glucose, 10mM; L-ascorbic acid, 0.4mM; NaHCO<sub>3</sub>, 26mM; 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> で通気し、pH を 7.4 に調節) に1分間浸した。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 (Linear Slicer Pro 7, Dosaka, Kyoto, Japan) を用いて、脳幹の背側から約 1.2mm の深さに位置する三叉神経脊髄路核を含む、厚さ 400  $\mu$ m 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 (NaCl, 125mM; KCl, 2.5mM; CaCl<sub>2</sub>, 2.0mM; MgCl<sub>2</sub>, 1.3mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.25mM; D-glucose, 12.5mM; L-ascorbic acid, 0.4mM; NaHCO<sub>3</sub>, 25mM; 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> で通気し、pH を 7.4 に調節) 中に、34°C で30~40分間保温した後、室温 (25 $\pm$ 2°C) で約1時間保管した。

### 2.4.2 膜電位固定法

Vc 領域の神経細胞からの膜電流の記録は Hamill らによって開発された whole-cell patch clamp 法を用いた。細胞膜にケイ酸ガラス毛細管 (Borosilicate Glass Capillaries, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) をギガオーム以上の高抵抗で密着させ、膜電位を -60mV に固定した後、電極内の細胞膜を破壊し、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 (25±2°C) で行った。

## 1) 実験装置について

### (1) 信号変換装置 (Power Lab 2/26,AD Instruments)

記録された電流をデジタル化し、コンピューター上に表示するために使用した。

### (2) オシロスコープ (SS-7804A,IWATHU)

ギガオーム・シール (1~10GΩ のシール抵抗) 完成時や whole-cell 完成時における

電流応答を確認するために使用した。

### (3) パッチクランプアンプ (AXOPATCH 200B,Axon Instruments)

高感度の電流-電圧変換装置で演算増幅器と共に搭載されており、ピコもしくはナノ

オーダーの微小電流を記録するために使用した。

### (4) 近赤外微分干渉顕微鏡 (BX-51WI,Olympus,Tokyo and C2741,Hamamatsu Photonics,Hamamatsu,Japan)

Vc ニューロンをモニター上に視覚化するために使用した。

### (5) マイクロマニピュレーター (MHW-3,NARISHIGE)

顕微鏡下で 1nm 程度の精度でパッチ電極を操作するために用いた。

### (6) パッチ電極作製装置 (FAMING/BROWN MICROPIPETTE

PULLER,P-97,Sutter

Instruments)

## 2) 細胞の選定方法

作成した脳幹スライスを顕微鏡下の記録用チャンパーにナイロンメッシュを張ったステンレスのアンカーで固定し、人工脳脊髄液 1~2ml/min で灌流した。近赤外微分顕微鏡下で、モニター上に膠様質 (SG:Substantia Gelatinosa、門から約 2mm 外側、長さ約 1mm、幅約 200μm) 領域を写し、直径約 10~15μm の細胞を選択した。

### (1)whole-cell の確立手順

- ① パッチ電極内に電極内液 (組成 : CsCl, 140mM; CaCl<sub>2</sub>, 2mM; MgATP, 2mM; EGTA, 10mM; HEPES, 5mM; pH 7.3 CsOH で調整) を、ミリポアフィルター (Millex-LG,Merck Millipore,Billerica,MA,USA) を通して充填し、電極ホルダー (CV203BUHEDSTAGE,Axon Instruments,Foster City,CA,USA) に装着した。
- ② Current-clamp モードにおいて、先端抵抗が 4~6MΩ のパッチ電極を陽圧にしながらか細胞の膜に付着させた。
- ③ パッチ電極内を陰圧にしてギガオーム・シールを完成させた。
- ④ Voltage-clamp モードに切り替えて膜電位を-60mV に固定し、zapping

(0.5~50ms の過分極パルス) により、パッチ膜を破り whole-cell を完成させた。

### 2.4.3 記録電流

自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) の記録は、GABA<sub>A</sub> 受容体遮断薬である picrotoxin (100 $\mu$ M) 及びグリシン受容体遮断薬である strychnine (strychnine nitrate, 1 $\mu$ M) の灌流下で行った。微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) は、TTX (1 $\mu$ M) を aCSF に追加して、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネルを遮断することにより活動電位の生成を停止し、記録した。さらに、電気刺激誘発性興奮性シナプス後電流 (eEPSC) を記録した。

カプサイシンはエタノールに溶解し、最後に aCSF で目的の濃度 (0.03、0.1、0.3 $\mu$ M) に希釈した。エタノールの最終濃度は 0.1%を超えず、膜電流に影響を与えなかった。AMG9810 (0.1 $\mu$ M) は aCSF に直接溶解した。picrotoxin (100 $\mu$ M) と strychnine (1 $\mu$ M) を適用して、すべての実験で抑制性シナプス伝達を薬理的にブロックした。また DNQX (10 $\mu$ M) を適用して、非 NMDA 受容体を介したグルタミン酸作動性興奮性伝達を確認した。

## 2.5 データ分析

### 2.5.1 逃避閾値の分析

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 $\pm$ SEM (n=動物の数) として表した。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、複数のサンプルでは、一元配置分散分析 (ANOVA) と Dunnett *post-hoc* test を用いた。  $p < 0.05$  を統計的有意差ありと判定した。

### 2.5.2 脳幹スライス実験の分析

膜電流のシグナルはパッチクランプ増幅器 (Axopatch200B, Axon Instruments, Foster City, CA, USA) を用い、4kHz で記録した (PowerLab, AD Instruments, Cattle Hill, Australia)。データ解析には Chart5 (AD Instruments, Foster City, CA, USA)、Origin ソフト (Origin Lab, Northampton, MA, USA) を用いた。記録電流には 5pA の電流雑音が混在するので、sEPSC の解析にはこれを超える電流を計測に用いた。sEPSC の振幅および発射頻度の測定の記録は測定時点において 1 分間行った。波形は、薬物適用前 (control)、薬物適用後 4~5 分 (薬物適用中)、薬物適用終了後約 10 分 (washout) を計測した。測定された数値は、平均 $\pm$ 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

#### 3.1 フォンフレイテストによる逃避閾値の測定

手術前の逃避閾値のベースラインは、PNL ラットと sham ラットの間で有意差はなかった。PNL ラットの逃避閾値は日数の経過とともに低下し、手術後約 1 週間で一定になった。手術の 1 週間後と 2 週間後に逃避閾値の低下が見られた。sham のラットでは逃避閾値の低下は起こらなかった。まず、手術後 2 週間の PNL ラットにおいて、神経障害性疼痛の代表的な治療薬であるプレガバリンの効果を調べた。腹腔内投与法にてプレガバリン (10 mg / kg) を PNL ラットに投与した結果、逃避閾値の上昇がみられた。その作用はプレガバリンの投与後 90 分でピークに達し、その後徐々に弱まった。

次に、髄腔内投与法にてプレガバリンの投与を行った。プレガバリン (30、100  $\mu$ g) は 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  $\mu$ g) では約 1 時間の効果がみられた。同量の溶媒 (30  $\mu$ l) 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。

神経障害性疼痛における中枢性 TRPV1 の関与を明らかにするために、TRPV1 拮抗薬である AMG9810 の効果を調べた。髄腔内投与法にて AMG9810 (1.5、5.0  $\mu$ g) を投与した結果、PNL ラットの逃避閾値の低下を軽減したが、sham ラットでは有意差は認められなかった。溶媒 (30  $\mu$ 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、髄腔内投与法にて AMG9810 (5.0  $\mu$ g) を投与した結果、逃避閾値の低下が軽減された。これらの結果は、若い PNL ラット (3 週齢) から得られた結果と一致した。

#### 3.2 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。

#### 3.3 脳幹スライス実験

##### 3.3.1 PNL ラットの $V_c$ ニューロンの sEPSC に対するカプサイシンと AMG9810 の効果

$V_c$  ニューロンにおける興奮性シナプス伝達に対するカプサイシン (0.03、0.1、0.3  $\mu$ M) の効果を調べた。PNL ラットでは、sEPSC の平均振幅と頻度はそれぞれ  $13.2 \pm 1.3$  pA と  $1.9 \pm 0.3$  Hz ( $n = 14$ ,  $N = 11$ ) であり、sham ラットと有意差は認められなかった (振幅:  $14.1 \pm 2.0$  pA および頻度:  $2.0 \pm 0.3$  Hz,  $n = 15$ ,  $N = 12$ )。PNL ラットでは、カプサイシン (0.1  $\mu$ M) が sEPSC の頻度を  $1.8 \pm 0.3$  Hz から  $6.3 \pm 0.4$  Hz (コントロールの  $349 \pm 37\%$ ) に大幅に増加させたが振幅には影響を及ぼさなかった。また、sEPSC はウォッシュアウト開始後 10 分間でコントロールレベルに戻った。最高

濃度のカプサイシン ( $0.3 \mu\text{M}$ ) は、振幅と頻度の両方に顕著な影響を及ぼした。sham ラットでは、カプサイシン ( $0.1 \mu\text{M}$ ) は sEPSC に明らかな影響を及ぼさなかった。この時の頻度は、コントロールでは  $2.0 \pm 0.4 \text{ Hz}$ 、カプサイシン適用時では  $2.3 \pm 0.4 \text{ Hz}$  (コントロールの  $113 \pm 10\%$ )、振幅はコントロールで  $14.1 \pm 2.2 \text{ pA}$ 、カプサイシン適用時は  $13.1 \pm 2.3 \text{ pA}$  (コントロールの  $93 \pm 4\%$ ) であった。最高濃度のカプサイシン ( $0.3 \mu\text{M}$ ) のみが sEPSC 頻度を増加させた。カプサイシン濃度が上がると sEPSC 頻度への影響が大きくなる。

カプサイシンが誘発する sEPSC の促進に対する AMG9810 による拮抗作用を調べた。PNL ラットでは、AMG9810 ( $0.1 \mu\text{M}$ ) は  $0.03 \mu\text{M}$  のカプサイシンの効果を完全にブロックしたが、 $0.1 \mu\text{M}$  で部分的にブロックし  $0.3 \mu\text{M}$  ではブロックされなかった。sham ラットでは、AMG9810 ( $0.1 \mu\text{M}$ ) はカプサイシン ( $0.3 \mu\text{M}$ ) の促進効果を減少させた。

### 3.3.2 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

カプサイシン誘発性の sEPSC の促進のメカニズムを決定するために、mEPSC に対するカプサイシンの効果を TTX ( $1.0 \mu\text{M}$ ) の存在下で調べた。PNL ラットの mEPSC の平均振幅と頻度はそれぞれ  $14.0 \pm 1.5 \text{ pA}$  と  $2.2 \pm 0.3 \text{ Hz}$  ( $n = 12$ ,  $N = 6$ ) であり、sham ラットの平均振幅と頻度は  $13.9 \pm 1.5 \text{ pA}$  と  $2.1 \pm 0.4 \text{ Hz}$  ( $n = 12$ ,  $N = 6$ ) であった。PNL ラットでは低濃度のカプサイシン ( $0.03$ ,  $0.1 \mu\text{M}$ ) において、振幅に影響を与えることなく ( $0.03 \mu\text{M}$ : コントロールの  $99 \pm 6\%$ ,  $n = 4$ ,  $N = 3$ ,  $P > 0.05$  および  $0.1 \mu\text{M}$ : コントロールの  $306 \pm 21\%$ ,  $n = 4$ ,  $N = 3$ ,  $P < 0.01$ )、mEPSC の頻度が増加した ( $0.03 \mu\text{M}$ : コントロールの  $195 \pm 28\%$ ,  $n = 4$ ,  $N = 3$ ,  $P < 0.01$  および  $0.1 \mu\text{M}$ :  $306 \pm$  コントロールの  $21\%$ ,  $n = 4$ ,  $N = 3$ ,  $P < 0.01$ )。最高濃度 ( $0.3 \mu\text{M}$ ) では、頻度 (コントロールの  $600 \pm 49\%$ ,  $n = 4$ ,  $N = 3$ ,  $P < 0.01$ ) と振幅 (コントロールの  $121 \pm 5\%$ ,  $n = 4$ ,  $N = 3$ ,  $P < 0.01$ ) の両方を増加させた。sham ラットでは、低濃度のカプサイシンは頻度 ( $0.03 \mu\text{M}$ : コントロールの  $99 \pm 4\%$ ,  $n = 4$ ,  $N = 3$ ,  $P > 0.05$  および  $0.1 \mu\text{M}$ : コントロールの  $108 \pm 6\%$ ,  $n = 4$ ,  $N = 3$ ,  $P > 0.05$ ) と振幅 ( $0.03 \mu\text{M}$ : コントロールの  $101 \pm 6\%$ ,  $n = 4$ ,  $N = 3$ ,  $P > 0.05$  および  $0.1 \mu\text{M}$ : コントロールの  $106 \pm 4\%$ ,  $n = 4$ ,  $N = 3$ ,  $P > 0.05$ ) に有意な影響を及ぼさなかった。最高濃度では頻度の促進がみられたが (コントロールの  $306 \pm 21\%$ ,  $n = 4$ ,  $N = 3$ ,  $P < 0.01$ )、振幅の促進はみられなかった (コントロールの  $115 \pm 6\%$ ,  $n = 4$ ,  $N = 3$ ,  $P > 0.05$ )。mEPSC に対するカプサイシンのこれらの促進効果は、sEPSC に対するものと同様の方法で AMG9810 ( $0.1 \mu\text{M}$ ) によって拮抗された。AMG9810 は、PNL ラットの低濃度 ( $0.03$ ,  $0.1 \mu\text{M}$ ) でのカプサイシンの有効性を抑制した。

### 3.3.3 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 (0.03、0.1、0.3  $\mu$ M) が eEPSC に及ぼす影響を調べた。潜時および振幅は、PNL ラットでそれぞれ  $9.5 \pm 5.1$  ms および  $186 \pm 31$  pA ( $n = 5$ ,  $N = 5$ )、sham のラットで  $8.9 \pm 5.1$  ms および  $201 \pm 29$  pA ( $n = 5$ ,  $N = 5$ ) であった。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

##### 4.1 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。神経結紮の影響は同側および反対側に広がるため、両側の神経結紮は脊髄三叉神経核の両側に変化を引き起こす可能性がある。今回の結果は、別の神経障害性疼痛モデルを使用した結果と一致している。プレガバリンの全身投与は、PNL ラットの痛覚過敏症を軽減するのに効果的であった。プレガバリンは、中枢性神経障害性疼痛、糖尿病性神経障害、帯状疱疹後神経痛および三叉神経痛に関連する疼痛の治療のための第一選択薬として使用されている。したがって、PNL ラットは、口腔顔面領域に起因する神経障害性疼痛を調査するための有用なモデルである。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。プレガバリンは電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルの  $\alpha 2 \delta$  サブユニットリガンドであり、 $Ca^{2+}$  流入を調節することが一般的に知られている。プレガバリンは、三叉神経求心性神経終末を含む中枢領域での  $Ca^{2+}$  流入を減少させ、Vc 領域での侵害受容伝達の阻害を引き起こす可能性がある。

部分坐骨神経結紮 (PSNL) モデルは、痛覚過敏や異痛症などの神経障害性疼痛を調査するためによく使用されてきた。PSNL モデルでは、TRPV1 は DRG ニューロンで合成され、軸索に沿って皮膚と内部組織および脊髄後角に輸送される。感覚ニューロンの TRPV1 は神経障害性疼痛に関与しており、熱侵害受容および炎症性痛覚過敏にも重要であることが示唆されている。TRPV1 の遮断は、カプサイシンによって引き起こされる急性の痛みを軽減し、炎症性および神経障害性の痛みを伴うモデルの痛覚過敏を軽減させた。したがって、三叉神経節ニューロンの TRPV1 は、PSNL モデルの DRG ニューロンと同様に PNL モデルの神経障害性疼痛に寄与する可能性がある。

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。

#### 4.2 PNL ラットにおける興奮性シナプス伝達の TRPV1 誘発性促進

口腔顔面領域から侵害受容求心性神経を受け取る Vc ニューロンにおける TRPV1 による興奮性シナプス伝達の変化を評価した。ここで、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。カプサイシンがベースラインの膜電流に効果がなかったという結果とともに、TRPV1 を介した Ca<sup>2+</sup> 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。これは、TRPV1 拮抗薬がラットの後角における C 線維入力 of グルタミン酸作動性伝達および小径求心性線維の軸索からのカプサイシン誘発性グルタミン酸放出を阻害したという以前の報告と一致している。PNL ラットにおける TRPV1 に起因するグルタミン酸作動性伝達の増強の根底にあるメカニズムには 2 つの可能性があり、1 つは TRPV1 の数の増加であり、もう 1 つは TRPV1 の感度の上昇である。前者の可能性は、以下の結果によって裏付けられている。DRG ニューロンにおける炎症性メディエーターによる持続的な刺激は、TRPV1 合成とその膜表面輸送を促進することにより、長期の感作を増強した。歯の矯正力は、三叉神経節および線維における TRPV1 の発現を増加させた。後者の可能性は、炎症性メディエーターによる短い刺激が TRPV1 リン酸化を増加させて即時感作を誘発したが、DRG ニューロンにおける TRPV1 の合成とその膜表面輸送の促進を誘発しなかったという結果によって説明される可能性がある。Vc ニューロンでは、プロスタグランジン E<sub>2</sub> が TRPV1 と相互作用することにより、sEPSC 頻度を促進した。まとめると、TRPV1 感度の上昇ではなく、TRPV1 の数の増加が、Vc ニューロンのシナプス伝達の持続的な促進を引き起こし、PNL ラットに神経障害性疼痛をもたらす可能性がある。

PNL ラットでは、カプサイシンの最高濃度 (0.3 μM) のみが、頻度の促進に加えて、sEPSC および mEPSC の振幅を増加させた。これは、カプサイシンのシナプス後への効果を示す結果の 1 つである可能性が高い。ただし、sEPSC と mEPSC には、複数のシナプス小胞からの伝達物質放出の同調によって生成されるより大きな振幅の変化が含まれているため、最高濃度のカプサイシンがシナプス前終末で作用し、複数のシナプ

ス小胞が同期し開口分泌の促進が起こり、振幅が増加したと考えられる。

さらに、カプサイシン (0.03、0.1  $\mu$ M) は、sham ラットの sEPSC および mEPSC に検出可能な影響を与えなかった。これは、カプサイシンが 0.3  $\mu$ M より高い濃度で sEPSC 頻度を増加させたが、低濃度 (0.1  $\mu$ M) では増加させなかったという以前の正常ラットの結果と一致している。したがって、これらの2つの濃度 (0.03、0.1  $\mu$ M) は、sham のラットにおける伝達物質の自発的放出を促進するには不十分である可能性がある。

Vc ニューロンの sEPSC および mEPSC とは異なり、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。プロスタグランジン E2 は sEPSC にも有効であるが、Vc ニューロンの eEPSC には有効ではないことを示した。三叉神経の求心性神経終末からの同期放出は、Ca<sup>2+</sup> 流入による活動電位誘発性の同時小胞開口分泌を表すと考えられている。シナプス前終末からの活動電位に依存しない自発的な放出は、プライミングされた小胞からの開口分泌を表す。したがって、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。

最後に、PNL ラットの sEPSC と mEPSC (振幅と周波数)、および eEPSC (振幅と開始潜時) のパラメーターは、sham ラットのものと同様であった。さらに、AMG9810 だけでは、sEPSC と mEPSC に影響はみられなかった。これらの結果は、PNL ラットの Vc ニューロンにおける興奮性シナプス伝達が、脳幹スライス標本に刺激が加えられていない場合の sham ラットと同様の方法で調節される可能性があることを示唆している。

## 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。