

2001 年度日中医学学術交流促進事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

平成14年 3 月 20 日

財団法人 日中医学協会

理事長 中 島 章 殿

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 吳 軍
研究機関 日本大学歯学部 研究指導者 角野 隆二 職名 教授
所在地 〒101-8310 千代田区神田駿河台 1-8-13 電話 03-3219-8122 内線

研究テーマ 三叉神経損傷時に発現する痛覚過敏発現の中枢機構の解明

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ (学会名・内容)

(2) 学会誌等に発表した論文 ・ 無 (雑誌名・論文名)

眼窩下神経 CCI モデルラットに対する gabapentin 投与の有効性に関する研究

日本歯科麻酔学会雑誌 第29巻第1号14-22 (2001年)


3. 今後の研究計画

今回報告書に記載した神経障害時の中枢神経内での神経回路網の可塑的变化については、その機構に不明な点が多く以下の説がある。1) 神経切断後、まず C 神経線維の萎縮、さらにシナプスの欠落が起り、その後に損傷を受けた C 神経線維が A β 神経線維の発芽を誘因すると考えられる。2) 神経切断後に、有髄神経線維のみならず無髄の神経線維も CTB を取り込むようになるため、無髄神経線維がより多く存在する II 層にも CTB 陽性神経線維およびその終末が認められるようになる可能性がある。これらの疑問に対し、C 神経線維の分布を IB4 などのトレーサーを用いて確かめていき、三叉神経節細胞体に、有髄神経に対する CTB と無髄神経に対するトレーサー (IB4) の二重染色を施し観察し調べていく予定である。

4. 指導責任者の意見

呉 軍君は、三叉神経系における神経障害時の疼痛発現機構の解明と言う大変な命題を、免疫組織学的方法を駆使し、三叉神経脊髄路核内での神経線維の発芽があることを証明した。さらには、c-Fos 蛋白質を指標にし、神経障害時に興奮性を高めている中枢神経細胞の分布を調べた。これらの研究は神経障害時の疼痛発現機構の解明の一翼をになっていると考えられる。今後は、研究を進展させ学位論文にまで仕上げてください。

指導責任者氏名

角野隆二 

5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

三叉神経損傷時に発現する痛覚過敏の中枢機構の解明

研究者氏名	呉 軍
中国所属機関	中国上海第二医科大学歯学部所属第九人民医院
日本研究機関	日本大学歯学部生理学教室
指導責任者	教授 角野 隆二
共同研究者名	坪井美行, 野村洋文

要旨

三叉神経領域では、下顎第三大臼歯抜歯後などの神経損傷時に発現する疼痛は、慢性化し、有効な治療薬もないために難治化することがあり、臨床上大きな問題となっている。その発現機構として、損傷を受けた神経の切断端に神経腫ができることなど末梢神経側に原因があるだけではなく、中枢神経の可塑的变化が関与していることが示唆されている。

そこで、ラットの下歯槽神経 (IAN) 切断後に、眼下窩神経 (ION) 支配領域に惹起される知覚過敏 (allodynia) 発現の機構としての中枢神経系内の神経回路網の変化を調べることを目的とし、IAN 切断後に IAN が投射している三叉神経感覚核群での一次求心性有髄神経線維・軸索の分布を調べた。その結果、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (SPVC) では、非切断動物の II 層には CTB 陽性神経線維・終末は認められなかったが、切断動物の SPVC の II 層には CTB 陽性神経線維・終末が多く認められた。SPVC の II 層は痛覚情報処理に関係している領域とされており、SPVC の II 層への有髄神経線維の発芽が、知覚過敏発現に関与している可能性が示唆された。

さらに、ION を拘扼し allodynia が惹起されたモデル動物を用い、中枢神経の興奮性を c-Fos 様蛋白発現を指標にし、神経損傷時の疼痛に対する新しい治療薬 gabapentin の有効性を調べた。その結果、SPVC の表層に発現する c-Fos 様蛋白陽性細胞が ION 拘扼モデル動物では増加したが、gabapentin 投与によりその数は有意に減少した。

これらのことより、神経損傷時の痛覚過敏発現に中枢神経の回路網の変化と中枢神経の興奮性の増加が関与することが示唆された。

Key Words

神経損傷, CTB, gabapentin, c-Fos, ラット

緒言:

末梢感覚神経が損傷を受けると、正常では痛みを引き起こさない触刺激に対しても痛みを感じるアロディニア (allodynia) と言われる知覚過敏を生じることが知られている。この知覚過敏の発現メカニズムとして、1) 神経切断端に神経腫ができること、2) 交感神経線維が発芽し神経節細胞体にシナプス

を形成すること、3) 損傷を受けた求心神経内で A 神経線維と C 神経線維間に活動電位の 'cross-talk' が生じること、さらに 4) 神経節細胞体で種々の物質の産生亢進や減退が起こることなどが考えられており、これらの変化によって、一次求心神経に不規則な自発活動の過興奮が生じると考えられている

一方、末梢神経（坐骨神経）切断を施した動物の脊髄後角において一次求心性神経の終末を含む領域に神経回路網の再構築が起り、これが知覚過敏発現の一因になっていると推察されている。それによると、正常動物では主に脊髄後角の III-VI 層に終末する A β 神経線維が、神経切断 2 週間後には軸索発芽 (sprouting) を起し、電気生理学的に痛覚情報の伝達に重要な役割を果たしていると考えられており、本来 A β 神経線維の終末が認められない II 層にまで延びる。さらに、後根をつけた脊髄のスライスパッチクランプ法を用いた研究により、正常動物の後角の II 層の細胞ではほとんどのものが A δ 神経線維由来のもので、A β 神経線維由来のものはごく少数であるが、坐骨神経が切断された動物の II 層の細胞ではほとんどが A β 神経線維由来のものであることを報告している。これらのことを考え併せると、神経が切断された動物では、A β 神経線維を伝導してきた触刺激により誘発された活動電位が脊髄で痛覚伝達に関与するニューロンを興奮させることによって、結果的に触刺激で疼痛すなわち allodynia が誘発されると推察される。

近年、野村はラットで三叉神経第 3 枝、すなわち下歯槽神経 (inferior alveolar nerve, 以下 IAN と略す) 切断後に、三叉神経第 2 枝すなわち眼下窩神経 (infraorbital nerve, 以下 ION と略す) 支配領域である口ひげ部の 1g 以下の触刺激に対して逃避行動を示す知覚過敏 (allodynia) が生じることを示し、この allodynia が神経切断のあと 2 日後より 15 日まで惹起されると報告している。この野村が報告した末梢神経切断後の知覚過敏 (allodynia) の発現のメカニズムとしての中樞神経系内での神経回路網の変化を調べることを目的とし、IAN 切断後に IAN が投射している三叉神経感覚核群での一次求心性有髄神経線維の軸索発芽の有無とその分布を調べた。

さらに、末梢神経の侵害刺激により中樞神経系内で活性化する細胞を標識する方法として c-Fos 様蛋白免疫組織化学染色法が確立された。その方法によって、中樞神経系内で刺激によって活性化された細胞の数と分布を調べることが可能となった。そこで、神経障害のモデルとして ION を拘扼し、chronic constriction injury (CCI) を施し、動物に allodynia を惹起させ、この動物の三叉神経脊髄路核尾側亜核で非侵害刺激によって発現する c-Fos 様蛋白陽性細胞の数と分布を調べ、さらに抗てんかん薬として使用され近年、神経損傷時の疼痛発現を抑制するとされる gabapentin の効果を行動学的、c-Fos 様蛋白発現細胞の数と分布を調べることによる免疫組織化学的に調べた。

これらの研究により、神経損傷時の疼痛発現機構の中樞神経系の役割を考察する。

研究対象と方法：

神経切断と軸索発芽の実験には 7 週齢の SD 系雄性ラット (180-200g) を 6 匹用い、切断動物として 5 匹、非切断動物として 4 匹を用いた。

1. 神経切断の方法 (切断動物)

ラットを pentobarbital sodium (ネンブタール、大日本製薬、40mg/kg) で麻酔後、左側顔面皮膚の毛を剃った。左側頬部皮膚を切開し、さらに咬筋の筋線維をできるだけ傷つけないように一部剥離し、

下顎突起の中央部で骨を露出した。下顎骨の表面を歯科用エンジンで切削除去し、左側下歯槽神経を約3mm露出した。その後、左下歯槽神経の近遠心側の2箇所を、6.0の絹糸で、2mmの間隔で結紮し、その間で神経を切断した。その後、切開部を6.0の絹糸で4糸縫合した。

2. コレラ毒サブユニットBの注入方法

神経切断1週間後に再度 pentobarbital sodium (ネンブタール, 大日本製薬, 40mg/kg, i.p.) で麻酔し、左側皮膚を切開し、咬筋をできるだけ傷つけないように下歯槽神経の中枢側の切断端を露出した。神経切断端より2~3mm中枢の神経束に、有髄神経に特異的に取り込まれ、逆行性に運ばれ、神経節を越えて中枢の神経線維およびその終末まで運ばれる0.5mgのコレラ毒Bサブユニット (cholera toxin B subunit, 以下CTBと略す, LIST BIOLOGICAL LABORATORIES) を1mlの注射用蒸留水 (大塚製薬) に溶解したものを60 μ l注入した。

3. 灌流および切片の作成法

CTB注入1週間後に、pentobarbital sodium (ネンブタール, 大日本製薬, 80mg/kg) で深く麻酔し、0.1M phosphate buffer (PB, pH=7.4) で緩衝した4% paraformaldehyde で灌流固定した。中脳と延髄を含む脳を取り出し、上記の固定液を用い、4 $^{\circ}$ Cで72時間後固定した。その後、30%シヨ糖含有0.01M phosphate buffer saline (PBS, pH=7.4) 内に48時間浸漬した。摘出した脳を厚さ20 μ mまたは50 μ mの前額断連続凍結切片を作成した。

4. CTBに対する免疫反応

標本は4切片おきに2組CTBに対する免疫反応を行い、残りは予備とした。免疫反応は、以下に示すように浮遊法にて行った。1) 切片を0.01MPBSで10分間洗浄し、0.3%のTriton-Xを加えた0.01MPBS 200mlに15mlのnormal rabbit serum (NRS) と0.2gのアジ化ナトリウム (NaN_3) を加えた緩衝液 (ブロッキング液) に4 $^{\circ}$ Cにて24時間浸漬した。2) 0.3%のTriton-Xを加えた0.01MPBS 200mlに10mlのNRSと0.5gの NaN_3 を加えた緩衝液 (1次抗体溶解液) で10000倍に希釈したpolyclonal goat anti-cholera toxin B subunit抗体 (LIST BIOLOGICAL LABORATORIES) に4 $^{\circ}$ Cで72時間浸漬した。3) 0.3%のTriton-Xを加えた0.01MPBSで5分間洗浄した後、0.01MPBSで5分間3回洗浄した。4) 0.01MPBS 200mlに3mlのNRSと0.2gの NaN_3 を加えた緩衝液 (2次抗体溶解液) で10000倍に希釈したビオチン化anti-goat IgG (H+L) (BA-5000, Vector Lab.) で37 $^{\circ}$ Cで1時間浸漬した。5) 0.3%のTriton-Xを加えた0.01MPBSで5分間洗浄した後、0.01MPBSで5分間3回洗浄した。6) 0.3%のTriton-Xを加えた0.01MPBSで100倍希釈したavidin-biotin peroxidase complex (Vector Lab.) で室温で2時間浸漬した。7) 0.01MPBSで5分間3回、0.05M Tris buffer (TB, pH=7.6) で洗浄した。8) 0.05MTB (pH=7.6) 200mlに0.08gの3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB, 東京化成) と4gのammonium nickel sulfateを加えた溶液に、hydrogen peroxide (H_2O_2) を30 μ l加えた液に室温で5分間浸漬し、CTB陽性神経線維および終末を黒く発色させた。

5. CTBの分布の検索

光学顕微鏡下で、標本をスワンソンの脳図譜を参考に核分けし、神経切断動物の三叉神経感覚核群内のCTB陽性神経線維およびその終末の分布を非切断動物のものと比較検討した。厚さ20 μ mに切った標本でCTB陽性神経線維およびその終末の密度について検索を行った。厚さ50 μ mに切った標本で三叉

神経の求心性感覚線維が直接投射する種々の感覚核群（上三叉神経核：supratrigeminal nucleus，以下 SUT と略す，三叉神経主知覚核，principal sensory nucleus of the trigeminal 以下 SPV と略す，三叉神経脊髄路核吻側亜核：oral part of the spinal nucleus of the trigeminal，以下 SPVO と略す，三叉神経中間亜核：interpol part of the spinal nucleus of the trigeminal，以下 SPVI と略す，三叉神経脊髄路核尾側亜核：caudal part of the spinal nucleus of the trigeminal，以下 SPVC と略す）での CTB 陽性神経線維およびその終末の分布範囲について調べた。

ION の CCI モデル動物の c-Fos の実験では，SD 系雄性ラット（200～250g）を使用した。4 1 匹の動物に CCI を施し，sham 手術群をとして 5 匹使用した。

1. 神経切断の方法（切断動物）と行動観察法

ラットを pentobarbital sodium（ネンブタール，大日本製薬，40mg/kg）で麻酔後，Imamura の方法により右側 ION に chromic gut(4-0)を用い CCI を施した。

ラットの行動観察として，すべてのラットに対し ION の CCI 施行当日までに，口髭部をケージの穴から突出させたままの状態，侵害機械刺激（von Frey hair 28.84g を使用）に対し，頭部の引っ込み行動を起こさないように訓練した。CCI を施した翌日より，ケージ穴から突出した状態の右側口髭部に von Frey hair で定量的機械刺激を与え，頭部の引っ込み行動誘発刺激値（head withdrawal threshold，

以下 HWT）を測定した。CCI 施行日より 10 日から 14 日目にかけて，HWT が非侵害機械刺激である 3.63g 以下の動物を CCI-ION ラットとみなした。

2. 刺激方法と灌流固定法

CCI-ION ラットを 1.saline 2.carbamazepine(17, 50mg/kg) 3. gabapentin(10, 30, 100mg/kg)投与する 6 群に分けた。urethan（SIGMA，1000mg/kg，i.p.）で麻酔し，各薬物を腹腔内に投与した後 3.63g の刺激を口髭部に 1Hz，15 分間与えた。刺激終了 2 時間後，再度麻酔し（urethan，80mg/kg），4%paraformaldehyde で灌流固定した。第一頸髄（first segment of the spinal cord: C1）および三叉神経脊髄路核尾側亜核（medullary dorsal horn: MDH）を含む脳を取り出し，上記の固定液で 48 時間後固定した後，30%ショ糖含有 0.01MPBS 内に 48 時間浸漬した。

3. Fos-LI cells の免疫染色法

摘出した脳から MDH および C1 を含む領域を切り出し，厚さ 50 μ m の連続前頭断切片を作製した。標本は 4 切片おきに浮遊法を用いた。0.01MPBS で洗浄後，1.5%normal goat serum (NGS)，0.1%bovine serum albumin (BSA，和光)に 0.3%Triton-X を加えた 0.01MPBS 液に 4 $^{\circ}$ C にて 24 時間浸漬した。10000 倍に希釈した affinity purified polyclonal rabbit anti human c-Fos antibody (Ab-5，Oncogene Science) に

4 $^{\circ}$ C，72 時間浸漬した。その後，洗浄後，200 倍に希釈した biotinylated goat anti-rabbit IgG(H+L) (BA-1000，Vector Lab.) に 37 $^{\circ}$ C 2 時間浸漬した。100 倍に希釈した avidin-biotin peroxidase complex (Vector Lab.) に室温で 2 時間浸漬した。その後，切片を 0.05M Tris buffer (TB，pH7.6) にて洗浄し，0.04%3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB，東京化成)，0.2%ammonium nickel sulfate に 0.03%hydrogen peroxide を加えた 0.05%MTB(pH7.6)緩衝液に，室温で 5～8 分浸漬することにより，Fos-LI cells を発色させた。

結果：

1. CTB 陽性神経線維および終末の分布範囲

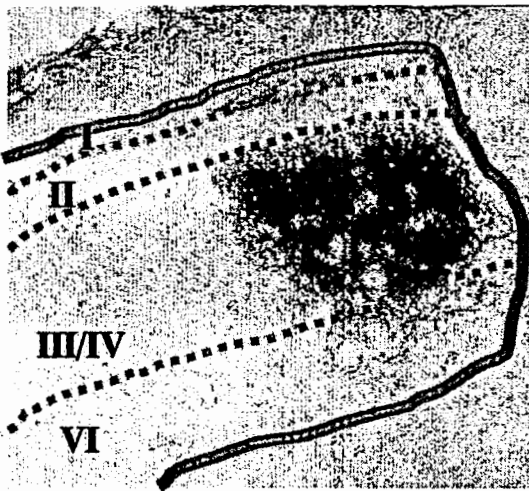
三叉神経の求心性感覚神経線維が直接投射する種々の感覚核群での CTB 陽性神経線維およびその終末

の分布について調べた。厚さ 50 μm の標本を用いて検索を行った。SUT, PSV, SPVO および SPVI での CTB 陽性神経線維および終末の分布範囲は、密度の高い部分の分布範囲は切断動物で縮小していた。しかし、密度の低い部分を含めた全体の CTB 陽性神経線維およびその終末の分布範囲には非切断動物および切断動物で分布範囲には大きな違いなく SPVI の背内側部に限られていた。

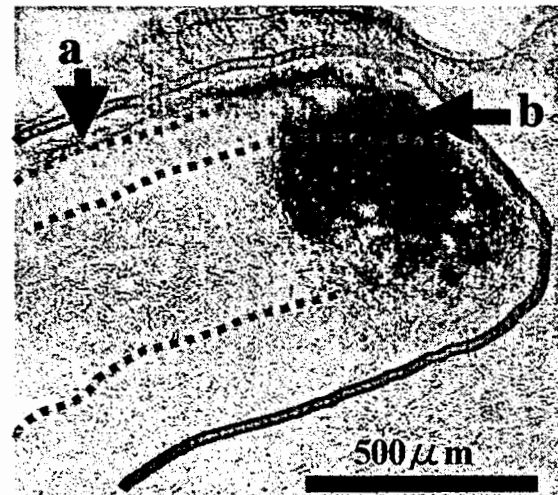
2. SPVC での CTB 陽性神経線維および終末の分布範囲

非切断および切断動物で SPVC の背内側部に CTB 陽性神経線維およびその終末が認められた。非切断動物において SPVC の内背側部の III 層, IV 層に多くの CTB 陽性神経線維およびその終末が多く認められた。さらに, I 層にも CTB 陽性神経線維およびその終末がわずかに認められた。一方, 切断動物では, SPVC の背内側部の III 層, IV 層だけではなく, I 層 (矢印 a), II 層 (矢印 b) にも多くの CTB 陽性神経線維およびその終末が認められた。さらに, I 層での CTB 陽性線維および終末は, 外側に広がっていた。

非切断動物の SPVC



切断動物の SPVC



4. CCI-ION ラットの allodynia の発生率

4 1 匹中 3 1 匹においてのラットにおいて右側の HWT が 3.63g 以下となった。sham 群では HWT が 28.84g に戻り, allodynia は認められなかった。

5. 薬物投与群の Fos-LI cells の分布

saline 投与群と各薬物投与群と Fos-LI cells 数を比較すると carbamazepine 50mg/kg 投与群と gabapentin 30, 100mg/kg 投与群では, CCI 同側の表層および深層の両層において有意な減少が認められた ($p < 0.01$) が, 特に表層においてその傾向は強く現れた。各群での CCI 反対側の, 表層および深層において発現した Fos-LI cells 数の投与量依存的な減少は観察できなかった。

考察:

四肢においては, sural nerve を切断後 1 週間から 9 週間の内に, CB-HRP の注入または単一軸索内染色を行い, 有髄の A β 神経線維および終末が正常動物では A β 神経線維の入力が無いといわれている脊髄後角 II 層と, 一部 I 層に認められると報告している。その要因として次のような可能性が考えらる。

1) 神経切断後, まず C 神経線維の萎縮, さらにシナプスの欠落が起り, その後に損傷を受けた C 神経線維が A β 神経線維の発芽を誘因すると考えられる。逆に, 切断後, C 神経線維が萎縮しないように神経

成長因子（以下 NGF と略す）を投与したときには、II 層に有髄神経線維およびその終末の発芽が起らないことが報告されている。2) 神経切断後に、有髄神経線維のみならず無髄の神経線維も CTB を取り込むようになるため、無髄神経線維がより多く存在する II 層にも CTB 陽性神経線維およびその終末が認められるようになる可能性がある。今回の研究でも、切断動物では、SPVC の背内側部の III 層、IV 層だけではなく、I 層（矢印 a）、II 層（矢印 b）にも多くの CTB 陽性神経線維およびその終末が認められた。この三叉神経系での I、II 層の CTB 陽性神経線維およびその終末の発現においても、sural nerve 切断時に考えられている上記のような要因が関与していると推察される。

近年、野村は IAN 切断後、ION 支配領域の口ひげ部皮膚に定量的機械刺激を与え、逃避行動を誘発する刺激閾値を経時的に測定した。その結果、神経切断側においてラットが逃避行動を起こす機械刺激の閾値は、手術前と比較すると、手術後 2 日目より対側の sham 手術側と比べ有意に低下し、15 日目まで 1g 以下の刺激で逃避行動が起る状態 (allodynia) が続いた。今回の研究では、I 層での CTB 陽性神経線維およびその終末は、外側に拡がっていた (矢印 a)。この拡がった領域は、上記に述べたように ION 支配領域からの入力が発射する部位である。今回の研究で、神経切断後に起る I 層での CTB 陽性神経線維およびその終末の外側への拡がり、切断神経の支配領域を越えた知覚過敏に重要な働きをしていると考えられる。

Gabapentin の抗侵害受容機構については不明な点があるが、作用部位として gabapentin 結合蛋白である電位依存性カルシウムチャネルのサブユニット ($\alpha 2\delta$) が考えられている。このサブユニットは脊髄後角表層に分布していることが明らかになっている。今回の実験で、allodynia を惹起した動物の三叉神経脊髄路核尾側亜核や C1 に認められた Fos-LI cells の数が増加し、さらには saline 投与群と gabapentin 30, 100mg/kg 投与群では、CCI 同側の表層および深層の両層において有意な減少が認められた ($p < 0.01$)。これらのことを考えあわせると、CCI を施すことにより、これら中枢神経細胞の細胞内カルシウムイオンの上昇により、各種の細胞内伝達系反応が起り、その結果として神経核内の Fos 蛋白が産生されることが推察できる。細胞内伝達系には、慢性疼痛モデルで脊髄表層に対側と比較して有意に発現する PKC γ などが知られている。

以上、神経切断時に中枢神経内での神経回路網の可塑的变化と神経拘扼時の中枢神経細胞の興奮性の増加を報告した。実際の臨床では、この二つのモデルの複雑な組み合わせで神経障害時の痛覚過敏が引き起こされていると考えられる。

参考文献：

1. 野村洋文: 下歯槽神経切断ラットの口ひげ部に対する機械刺激により誘発される逃避行動と Fos 様蛋白陽性細胞の発現との関係, 日大歯学 vol73, 541-550 (1999) .
2. Woolf, C. J., Shortland, P. & Coggeshall, R. E. : Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents, Nature vol 355, 75-78 (1992) .
3. 吉村 恵 : 神経因性疼痛と可塑性; (赤池紀夫, 東英穂, 藤原道弘編 : 脳機能の解明- 21 世紀に向けて-, 九州大学出版会, 福岡), 175-184 (1998) .

注：本研究の一部は、『日本歯科麻酔学会雑誌』(2001 年 VOL29 巻) に掲載。

作製日：2002 年 3 月 15 日