

論文要旨等報告書

氏	北村 洋一
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3 8 3 2 号
学位授与の日付	平成 2 1 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	眼窩下神経結紮モデルにおける三叉神経節細胞からの神経伝達物質遊離亢進と末梢疼痛閾値の低下に対する改良A型ボツリヌス毒素(150kDa)の抑制効果
論文審査委員	教授 杉本 朋貞 准教授 小橋 基 教授 窪木 拓男

学位論文内容の要旨

【緒言】

三叉神経因性疼痛は神経障害性疼痛の一つであり、治療には抗てんかん薬や抗うつ薬などが用いられるが、中枢性副作用のため、薬剤の服用が困難であることも多い。また、これらの中でも非定型性三叉神経痛はその病態が十分理解されておらず、有効な治療法が未だないのが現状である。そのため、三叉神経因性疼痛の症状を軽減させる、効果的で副作用の少ない薬剤の開発が切望されている。

一方、末梢神経が障害を受けると、神経節細胞から神経伝達物質が遊離され、近傍の細胞間での情報伝達(cross-excitation)が生じることが明らかになっている。近年、三叉神経因性疼痛モデルにおいてもこのような知覚神経節での侵害受容ニューロンの興奮が生じていることが明らかになった。したがって、侵害受容ニューロンならびに神経節における侵害受容ニューロンの興奮による伝達増強作用を軽減できれば、中枢性副作用の少ない新規鎮痛薬を開発することができる可能性がある。

そこで、我々はボツリヌス毒素(BoNT)を用いてこの伝達増強作用を軽減することに着目した。BoNTは小胞性の神経伝達物質遊離を抑制する作用を有しておりサブスタンスP、カルシトニン遺伝子関連タンパク質(CGRP)、グルタミン酸などの遊離を減少させることが過去に報告されている。この機能は炎症性や神経障害性の疼痛ならびに片頭痛の症状軽減に対してBoNTが有効であることを示している。しかし、BoNTがそれらの神経伝達物質の遊離を減少させることによって神経障害性疼痛を軽減させるといった報告はみられない。

そこで、本研究ではラット眼窩下神経結紮モデルを作製し、その際三叉神経節細胞からの小胞性遊離の変化を観察した後、三叉神経支配領域末梢皮内に改良A型BoNTを投与することによって神経障害性疼痛が軽減されるかどうか、さらには三叉神経節細胞からの小胞性遊離が抑制されるかどうかを検討した。

【方法および結果】

1. 三叉神経因性疼痛モデルの作製

以下の実験は、岡山大学動物実験施設倫理委員会(#0KU2007-137)承認のもと行った。ラット(Sprague-Dawley系、6週齢)眼窩下神経(IoN)を剖出し、約2mmの間隔で2本、4-0絹糸にて緩く結紮した。反対側は神経の剖出のみを行う疑似手術を行った。

2. IoN結紮ラットの疼痛行動に対する改良A型BoNT末梢皮内投与の効果

機械的刺激に対する知覚閾値の測定は電氣的“von Frey hair”測定装置 (Model 1601C, IITC Instruments, Woodland Hills, CA, USA) を用いて行った。IoN支配領域である頬髭部中央に圧を加え、ラットが頭部を逃避させプローブから離れた最大圧を記録した。その結果、IoN結紮3日後には疼痛逃避反応閾値の有意な低下を認め、改良A型BoNT (150 kDa, 100 pg/100 μ l, 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病原細菌学分野小熊恵二先生より供与) 投与11日後 (結紮14日後) には、閾値の回復が観察された。改良A型BoNTとは、神経毒素と無毒成分を含むprogenitor毒素をラクトースカラムに通すことにより赤血球凝集素成分などの無毒成分を除去し神経毒素成分のみに高度に精製したものである。

3. 改良A型BoNT直接投与による培養三叉神経節細胞からのFM4-64遊離の抑制

原形質膜に結合することにより、神経伝達物質を含有する小胞を染色するFM4-64 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) の蛍光輝度を共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) にて観察した。三叉神経節細胞を分離し、改良A型BoNTを添加して培養すると、FM4-64蛍光輝度率の低下が観察され、改良A型BoNT投与により小胞性の遊離が抑制されることが観察された。

4. IoN結紮ラット三叉神経節細胞からのFM4-64遊離の早期化

IoN結紮側三叉神経節細胞からのFM4-64遊離開始は早期化し、さらに、神経ペプチドを含有していないことが多いイソレクチンB4 (IB4) (－) 細胞においてはIoN結紮側三叉神経節細胞からの遊離の増加が持続することが観察された。これは、結紮モデルにおける三叉神経節細胞の興奮、ならびに神経ペプチドの持続的な遊離の増加を示している。

5. 改良A型BoNT末梢皮内投与を行ったIoN結紮ラット三叉神経節細胞からのFM4-64遊離の減少

IoN結紮モデル作製3日後に改良A型BoNT (100 pg/100 μ l) 末梢皮内投与を行った神経節細胞からのFM4-64遊離の輝度率を、IoN結紮モデル作製14日後 (改良A型BoNT投与11日後) に検討したところ、生理食塩水 (0.1 ml) を投与した群に比べてIB4 (＋) 細胞ならびにIB4 (－) 細胞のどちらにおいても有意な減少を認めた。このことにより、改良A型BoNTの末梢皮内投与により、知覚神経節細胞における小胞性遊離が減少することがわかった。

【まとめ】

IoN結紮によりラット三叉神経領域に神経障害を慢性的に引き起こすと、三叉神経節細胞からの神経伝達物質遊離が亢進することが明らかとなった。また、改良A型ボツリヌス毒素を末梢皮内投与することによりIoN結紮による疼痛閾値の低下や神経伝達物質遊離の亢進を抑制できることが証明された。

以上から、改良型A型ボツリヌス毒素を末梢皮内に投与することにより、神経因性疼痛を軽減しうる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

三叉神経因性疼痛は、神経障害性疼痛の一つであり、治療には抗てんかん薬や抗うつ薬が用いられるが中枢性副作用のため継続困難になることも多い。なかでも非定型性三叉神経痛はその病態が十分に理解されておらず有効な治療法が存在しないのが現状である。そのため、三叉神経因性疼痛の症状を軽減させる、効果的で副作用の少ない薬剤の開発が切望されている。

本研究では、ラット眼窩下神経 (IoN) 結紮モデルを作製し、小胞性神経伝達物質遊離の抑制作用を持つボツリヌス毒素 (BoNT) の毒素成分のみを高度に精製した改良A型BoNTを眼窩下神経支配領域末梢皮内に投与することによって三叉神経節細胞からの小胞性遊離ならびに神経障害性疼痛が抑制されるかどうかを *in vitro*, *in vivo* で検討したものである。

その結果、1) 改良A型BoNT添加培養により三叉神経節細胞からの小胞の遊離が抑制されたこと、2) IoN結紮により頭部疼痛逃避反応閾値の低下を認めたこと、ならびに眼窩下神経支配領域末梢皮内への改良A型BoNT投与により閾値の回復が認められたこと、3) IoN結紮により三叉神経節細胞からの小胞の遊離が早期化すること、ならびに改良A型BoNT末梢皮内投与により三叉神経節細胞からの小胞の遊離が抑制されることが示唆された。

これらの知見は、今後の神経因性疼痛治療法の開発において、きわめて重要であると考えられる。よって本論文は博士 (歯学) の学位授与に十分値するものと判断した。