

侵害刺激がcortical spreading depression発生に及ぼす影響

研究分担者 清水利彦 柴田 護 鳥海春樹 慶應義塾大学 医学部 神経内科

研究要旨

Cortical Spreading Depression (CSD) は、片頭痛発作における前兆に関与するとともに三叉神経血管系に影響をおよぼすことが知られている。我々は、TRPV1を介する三叉神経領域への侵害刺激がCSD発生閾値を低下させることを報告している。今回、三叉神経以外の体性感覚神経に侵害刺激を加えCSD発生に関与する可能性を検討した。Sprague-Dawley の両側足底部に10mM capsaicin を4~6日間連日投与し2群(各5匹)に分けた(4日投与群(feet-d4群), 6日投与群(feet-d6群))。また両側頬部に10mM capsaicin を4~6日間連日投与した群(4日投与群(face-d4群), 6日投与群(face-d6群))ならびにコントロール群(C群; 左右頬部にvehicleを4日間)を作成した。各群のラット脳表に、デンタルセメントを用いてDC電極を設置し、濃度調整したKCl (0.1M、0.3M、0.6M、1.0M)を10 μ l毎注入し、CSDの発生回数と持続時間を記録した。1.0M KCl 投与におけるCSDの発生回数は、C群 6.7 \pm 1.5 回、feet-d4群 6.2 \pm 2.0 回、feet-d6群 5.2 \pm 2.2 回と有意な差を認めなかったが、face-d4群12.8 \pm 5.4 回face-d6群 17.8 \pm 5.0 回と有意な増加を示した(p < 0.05)。CSD持続時間は、1.0M KCl 投与でC群 35.8 \pm 12.5 分、feet-d4群 36.2 \pm 7.5分feet-d6群38.0 \pm 6.9分と有意な差を認めなかったが、face-d4群 89.5 \pm 30.3 分、face-d6群 133.5 \pm 73分と有意な延長を示した(p < 0.05)。本研究から、CSDの発生閾値の変化には、三叉神経が重要な役割を担う可能性が示唆された。

研究分担者

清水利彦 慶應義塾大学医学部神経内科 専任講師
柴田 護 慶應義塾大学医学部神経内科 専任講師
鳥海春樹 慶應義塾大学大学院政策メディア研究科
特任准教授

A. 研究の目的

皮質拡延性抑制 (cortical spreading depression; CSD)は、片頭痛発作における前兆に関与していると考えられている。すでに我々は、三叉神経節および脳硬膜に侵害刺激の受容体であるtransient receptor potential vanilloid subfamily, member 1 (TRPV1) 受容体が存在することを示し、さらにTRPV1受容体アゴニストのcapsaicinを投

与すると三叉神経節においてextracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化が生じることを明らかにした。さらに三叉神経末梢のTRPV1を介した侵害刺激がCSDを三叉神経血管系の活性化に働き片頭痛における頭痛の発生にも重要な役割を果たしている可能性も明らかにした。そこで今回、三叉神経以外の体性感覚神経に侵害刺激を加えた際CSD発生に関与する可能性を検討した。

B. 研究方法

雄性Sprague-Dawley ラット12匹を使用した(コントロール群(C群; 左右頬部にvehicleを4日間)、両側足底部に10mM capsaicinを4~6日間連日

投与し2群（各5匹）に分けた（4日投与群（feet-d4群）、6日投与群（feet-d6群））、両側頬部に10mM capsaicinを4～6日間連日投与した群（4日投与群（face-d4群）、6日投与群（face-d6群））。試薬として6%エタノールにcapsaicinを溶解させ、tween80を使用して生理食塩水に混合し、10mMのcapsaicin溶液を調整した。コントロール群（C群）には、6%エタノール、tween80および生理食塩水の混合液をvehicleとして、左右頬部に50 μ lを2日間皮下注射により投与した。4日投与群（d4群）および6日投与群（d6群）には、調整した10mM capsaicin溶液をそれぞれ、4日間および6日間連続皮下注射した。

各群において、投与期間終了後、イソフルラン吸入麻酔下（2%、400ml/min/air、UNIVENTOR 400, Malta）ステレオタキシク固定器に固定し、バイタルモニター下（MLT0670 and ML117, ADInstruments, Australia）、頭頂部の頭皮を切除して頭頂骨を露出させた。露出させた頭頂骨に、デンタルドリルを使用し、Bregmaより外方4mm、尾側4mmの位置に直径2mmの骨孔を作成し、ここにCSD検出用白金電極（NBR, Japan）をデンタルセメント（LuxaFlow, DMG, USA）を使用して固定した。頸部皮膚を切開し、同部位に塩化銀不感電極を刺入した。これらの電極をプリアンプ（4002, DAGAN, USA）に接続し、Power Lab（PowerLab 8/30, ADInstruments, Australia）に入力してモニター記録した。同様にデンタルドリルを使用し、Bregmaより外方4mm、尾側8mmの位置に直径2mmの骨孔を作成し、骨孔底部の脳硬膜を除去して脳軟膜を露出した。この骨孔を囲むように、デンタルセメントを使用して内容量10 μ lのcup状に形成し、CSDを発生させるためのKCl溶液の投与ルートを作成した。作成後、脳表の乾燥を避けるため、ただちに生理食塩水でcupを満たした。CSD発生用KCl溶液は、電解質計測器にて、1.0MのKCl標準溶液を作成し、これを濃度調整して、0.1M、0.3M、0.6M、1.0Mの4種類の溶液を作成した。

CSD発生および計測については、計測電位の安定を10分間確認した後、ラット頭頂部に作成したKCl投与ルートに満たした乾燥防止用の生理食塩水を払拭し、濃度調整したKCl溶液を低濃度（0.1M）より、ピペットで10 μ l計量し、ルートに投与した。CSD発生の有無を10分間観察し、発生しない場合は順次、高濃度のKClに置換し、CSDが発生したKCl濃度を、そのラットのCSD発生閾値とした。発生回数はCSD発生後、自然収束するまでの出現回数を測定した。CSD持続時間については、全ての群に0.6MのKCl溶液によるCSD誘発を行い、その自然収束にいたるまでの時間を測定した。

さらに三叉神経領域へのTRPV1刺激が熱疼痛閾値に与える影響を検討した。TRPV1刺激は、麻酔下でC57BL/6マウスの右顔面（whisker pad）に10 mM capsaicinを浸透させた綿球に30分間作用させることで行った。疼痛閾値測定は、処置後2日目に施行した。定量的な熱疼痛閾値の測定にはOrofacial Pain Assessment Device（OPAD, 米国 Stoelting社製）を用いた。本装置は、表面温度を変化させることのできるバーにwhisker padを押し付けて、その奥のボトルに貯められたミルクを吸い口から単位時間に吸い付く頻度を定量化することで、熱疼痛閾値の変化を測定する装置である。なお、対照実験として、無処置のC57BL/6マウスのwhisker padに20、32、45の刺激を与えた際のミルクの吸い付き頻度を測定した。

（倫理面への配慮）本研究は慶應義塾大学動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

1. CSD発生閾値と発生回数

C群において、KCl濃度0.1Mおよび0.3MではCSDの誘発が観察されず、0.6M群よりCSDが誘発された。これに対し、feet-d4群およびfeet-d6群ではKCl濃度0.3Mから、face-d4群およびface-d6群ではKCl濃度0.1MからCSDの発生が認められた。feet-d

4群d4群およびfeet-d6群ではKCl 濃度0.1MからCS Dの発生が認められた。

KCl溶液各濃度において誘発されたCSD発生回数は、C群で0.1M(0回)、0.3M(0回)、0.6M(0.25 ± 0.50回, mean ± SD)、1.0M(6.75 ± 1.70回, mean ± SD)であった。

またfeet-d4群では、0.1M(0回)、0.3M(0.6 ± 0.5回, mean ± SD)、0.6M(3.6 ± 3.0回, mean ± SD)、1.0M(6.2 ± 1.9回, mean ± SD)であり、feet-d6群では、0.1M(0回)、0.3M(2.4 ± 2.6回, mean ± SD)、0.6M(5.2 ± 2.8回, mean ± SD)、1.0M(5.2 ± 2.2回, mean ± SD)であった。

これに対しface-d4群では、0.1M(1.25 ± 0.9回, mean ± SD)、0.3M(5.00 ± 1.41回, mean ± SD)、0.6M(12.5 ± 2.10回, mean ± SD)、1.0M(12.75 ± 3.30回, mean ± SD)であり、face-d6群では、0.1M(1.25 ± 0.50回, mean ± SD)、0.3M(12.25 ± 2.50回, mean ± SD)、0.6M(15.75 ± 4.79回, mean ± SD)、1.0M(18.50 ± 4.43回, mean ± SD)であった。1.0MのKCL濃度で誘発されるCSDの回数は、face-d4群およびface-d6群では、C群とfeet-d4群およびfeet-d6群に対し有意な差を呈した(P < 0.05 ; 図1)。

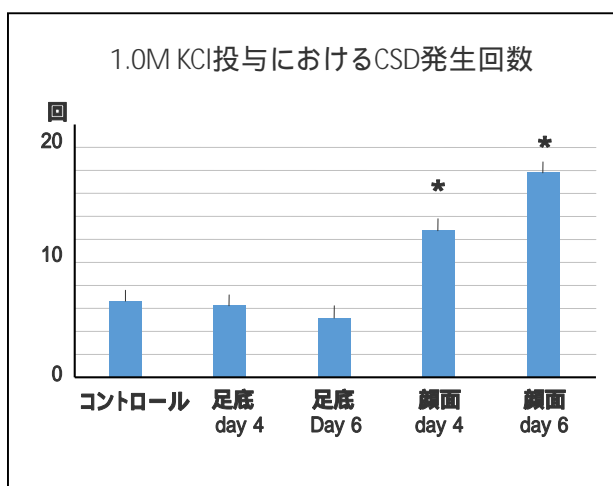


図 1 : 1.0M KCl投与におけるCSD発生回数 .

2 . CSD持続時間

1.0MのKCl溶液により誘発されたCSDの持続時間は、C群(35.8 ± 12.5分, mean ± SD)、feet-d4群(3

6.2 ± 7.5分, mean ± SD)、feet-d6群(38.0 ± 6.8分, mean ± SD)、face-d4群(89.5 ± 30.3分, mean ± SD)、face-d6群(133.5 ± 73分, mean ± SD)で、C群、feet-d4およびfeet-d6群に対しface-d4群およびface-d6群において有意な延長を示した(P < 0.05 ; ; 図2) .

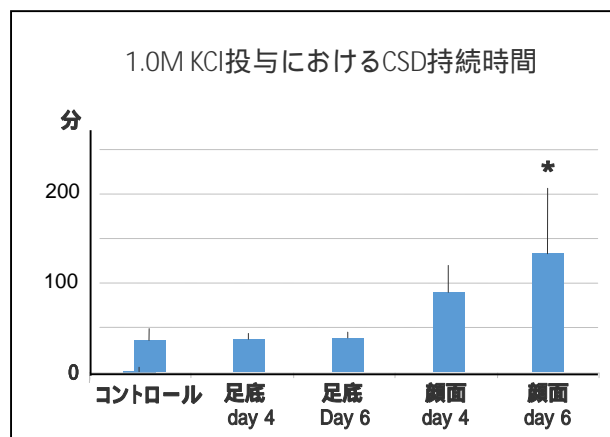


図 2 : 1.0M KCl投与におけるCSD持続時間

3. TRPV1刺激が顔面の熱疼痛閾値に与える影響

無処置のマウスでは、訓練による条件付けによって単位時間のミルク吸い付き回数は33 において205回/分となった。その状態で、バーの表面温度を45 まで上昇させると、90回/分まで吸い付き回数は減少した (図3)。これは熱疼痛による影響と考えられた。一方、あらかじめwhisker padに10 mM capsaicin でTRPV1刺激を行ったマウスでは、33 の状態でも有効な吸い付き行動は著明に減少 (2回/分)しており、熱疼痛閾値の低下が観察された (図4)。



図3. 無処置マウスの温度変化による吸い付き行動の変化

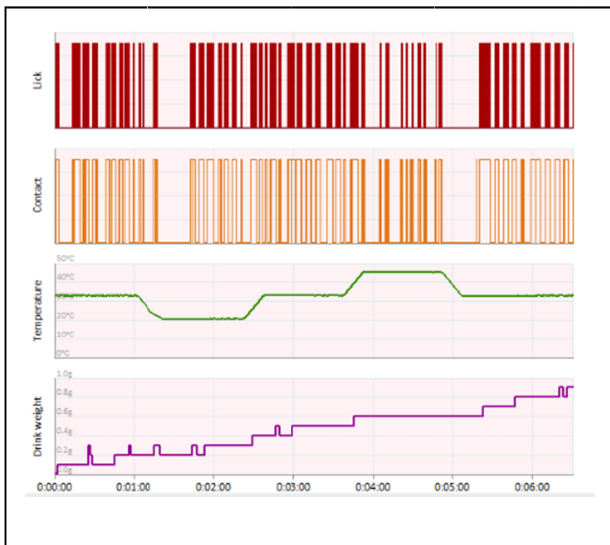


図4. TRPV1刺激による熱疼痛閾値の低下

D. 考察

本研究は、TRPV1受容体を介した末梢の感覚神経の侵害刺激がKCl 投与により誘発されるCSDの出現頻度と持続時間の増加を来たす際、三叉神経が重要な役割を担っていることを明らかにしたものである。これまで三叉神経とCSDの関係について、特にCSDが三叉神経血管系におよぼす影響に着目されさまざまな知見が示されてきた。我々もすでにCSDが三叉神経節においてERKのリン酸化

を認めることを報告した。

このような知見のある中で、我々の結果はCSDと三叉神経血管系の関係についてあらたな見解を与える重要なデータであると考えられる。三叉神経からの刺激がCSDに影響を及ぼす解剖学的経路についてこれまで明らかにされていなかった。しかし、近年、片頭痛発生に強い関連性を示すと考えられる硬膜からの刺激を感受する三叉神経線維が視床ニューロンを介し、体性感覚や辺縁系のみならず、視覚野や膨大後部皮質など多彩な大脳皮質に広範に投射していることが示されており、本研究の結果もこれらの解剖学的経路が関与している可能性が推察される。

本研究結果は臨床的に片頭痛治療に対する統合医療、特に“鍼灸”の作用機序を考える上でも重要な示唆を与えるものではないかと考えられる。これまで片頭痛において、三叉神経支配領域の筋に形成されたTrigger Point(筋硬結)を治療すると片頭痛発作の頻度が低下することが知られていたがその機序については明らかにされていなかった。しかし、本研究の結果より、末梢の感覚神経、その中でも三叉神経を活性化させる可能性のあるTrigger Pointを鍼灸治療により改善させることで、CSDの発生を抑制し、片頭痛発作頻度を低下させる可能性が考えられる。

このように我々の結果は片頭痛の病態に新しい検討の切り口を与えるとともに、統合医療、特に“鍼灸”の片頭痛治療に対する作用機序のエビデンスとして重要な知見を提供するものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 清水利彦．国際頭痛分類改訂版 のポイント．日本頭痛学会誌，2014; 41：21-25．

2. 清水利彦 .片頭痛を分類する .日本頭痛学会誌 , 2014; 41 : 121-125 .
3. 柴田 護. 片頭痛のメカニズム . 日本頭痛学会誌2014; 41 : 26-29.

2. 学会発表

- 1 . Tsubasa Takizawa, Mamoru Shibata, Yohei Kayama, Toshihiko Shimizu, Haruki Toriumi, Taeko Ebine, Anri Koh, Norihiro Suzuki. Expression of high-mobility group box-1 in the cerebral cortex after cortical spreading depression. European Headache and Migraine Trust International Congress 2014; September 2014; Copenhhegen, Denmark.
- 2 . 海老根妙子、鳥海春樹、滝沢 翼、萱間洋平、黄 杏里、柴田 護、清水利彦、鈴木則宏 . 脳硬膜および顔面に分布する感覚神経線維の三叉神経節における局在について .2014年11月14日 下関 .日本頭痛学会誌 41:255, 2014.
- 3 . 滝沢 翼、柴田 護、萱間洋平、海老根妙子、清水利彦、鳥海春樹、黄 杏里、清水利彦、鈴木則宏 . 皮質拡延性抑制後の大脳皮質における HMGB1 発現誘導 . 2014年11月14日下関 . 日本頭痛学会誌 41:257, 2014.
- 4 . 萱間洋平、柴田 護、滝沢 翼、清水利彦、鳥海春樹、海老根妙子、黄 杏里、鈴木則宏 . 炎症性メディエーター存在下における TRPM 8 発現調節 . 2014年11月14日下関 . 日本頭痛学会誌 41:255, 2014.
- 5 . 鳥海春樹、一次性頭痛の病態と鍼治療の可能性 . (シンポジウム：神経内科領域の鍼灸治療) .第 67 回日本自律神経学会総会、2014年10月30日大宮。
- 6 . 鳥海春樹、鍼灸への期待 脳を賦活し、地域のセーフティネットたる 頭痛 病態を

鍼灸から考察する . 第 15 回日本早期認知症学会、2014年9月14日佐倉。

- 7 . 滝沢 翼、柴田 護、萱間洋平、海老根妙子、佐藤 仁、黄杏里、鳥海春樹、清水利彦、鈴木則宏 . 皮質性拡延性抑制後の大脳皮質における HMGB1 発現誘導第 55 回日本神経学会総会 . 2014年5月23日福岡 .

H . 知的所有権の取得

特許取得 なし,実用新案登録 なし,その他 なし