

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
杉本 朋貞 印	研究結果の総括
寺山 隆司 印	研究の方法と分析
飯田 征二 印	研究計画に関わる全般的な指導

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 顎口腔再建外科学	身分 大学院生	氏名 山本 祐也
<p>論文題名 Activated microglia contribute to convergent nociceptive inputs to spinal dorsal horn neurons and the development of neuropathic pain (神経障害性疼痛の発症メカニズム:末梢神経損傷後の脊髄後角におけるミクログリアの活性化と収斂性侵害情報伝達)</p>		
<p>論文内容の要旨 (2000字程度)</p> <p>末梢神経の損傷は、しばしば痛覚過敏やアロディニアなどの神経障害性疼痛を引き起こし、組織学的には末梢組織の侵害刺激による c-Fos(脊髄および延髄後角における侵害受容 2 次ニューロンの活動のマーカー)の誘発を増強する。また近年我々は末梢神経損傷が、脊髄後角内の侵害情報伝達の様式に重大な変化を惹起し、2 次ニューロンに対する過剰な侵害情報の収斂が発生することを報告した。一方、末梢神経損傷は脊髄後角内のグリア細胞にも影響を持つことが知られており、ミクログリアの病的活性化が神経障害性疼痛の発症に関与することが示唆されている。本研究ではラットの脛骨神経を切断し、これによって惹起される神経障害性疼痛と侵害情報の病的収斂に対するミクログリアの活性化阻害の効果を検証した。</p> <p><u>神経損傷とミクログリア活性化阻害薬投与:</u> 成熟雄性 S.D.系ラットを用い、麻酔下で一側の坐骨神経の枝である脛骨神経を露出、7-0 絹糸にて 2 か所結紮し、その間を切断した。ミノサイクリン (30mg/kg,ip) を 24 時間間隔で 8 回投与した。投与時期は神経損傷手術の 1 時間前に開始するもの (ミノサイクリン 0-7 日) と損傷 7 日後に開始するもの (7-14 日) に分け、さらにそれぞれの対照実験 (生食群) を行った。</p> <p><u>行動実験:</u> 機械的刺激、熱刺激による 2 種類の行動実験を術前の薬剤投与直前、術後 3、7、14 日後に行った。機械的刺激に対し逃避行動をとった値 (PWT) および、熱刺激に対し逃避行動をとるまでの時間 (PWL) を記録した。</p> <p>術前の PWT は 8~12g であった。損傷側は、術後 3 日で生食またはミノサイクリン投与に関わらず術前と比較し 15~18g と有意な上昇が起こったが、生食群では術後 14 日に 4g まで低下した。これに対し、ミノサイクリン (0-7 日) 群では術後 14 日で 10g と損傷前と同様の値を示した。ミノサイクリン (7-14 日) 群は 14 日後で 5g と有意に低下し、生食群との間に有意差は認められなかった。</p> <p>PWL は術前で 9-11 秒であった。損傷側は、術後 3 日で生食またはミノサイクリン投与に関わらず 13 秒と PWL の有意な延長が起こったが、生食群およびミノサイクリン (7-14 日) 群では術後 14 日で 7 秒と損傷前より有意に短縮した。一方、ミノサイクリン (0-7 日) 群は術後 14 日でも損傷前と同様の値を維持した。</p>		

論文内容の要旨（2000字程度）

ミクログリアの免疫組織染色：術後 14 日の行動実験終了後にラットを灌流固定し、脊髄の第 4、5 腰髄節（L4/5）を摘出し、ミクログリアのマーカである OX-42 を用いた間接蛍光抗体法による組織染色を行った。OX-42 の免疫反応は神経交織にびまん性に広がり、個々の細胞の形態を識別できなかったため、画像解析では免疫反応の蛍光強度を測定し、L4/5 の I/II 層の単位面積当たりの強度を算出した。偽手術（上記と同様の方法で手術はしたが、結紮、切断は省略した）を行ったラット（偽手術群）の反対側（非手術側）と生食群の反対側に差が認められなかったため、すべての実験群の損傷側のデータを生食群の反対側の平均蛍光密度と比較した。

OX-42 の免疫反応は、生食群の損傷側で反対側の 3.5 倍の反応強度を示し、有意差を認めた。ミノサイクリン（7-14 日）群の損傷側は生食群の損傷側と同様の免疫反応を示したが、ミノサイクリン（0-7 日）群の損傷側においては生食群の反対側と比較して有意差が認められなかった。

2 次ニューロンの活動マーカー：行動実験とは別のラットに神経損傷とミノサイクリン投与を実施し、神経損傷の 14 日後に刺激を行った後、組織化学的検索のため灌流固定を行った。固定 2 時間前に熱刺激として損傷側の後足に 10 秒間熱水（55℃）に浸し、固定 15 分前に露出した脛骨神経の近位断端に 5mA、5 ミリ秒、5Hz の矩形波で 10 分間電気刺激を行った。灌流固定後、L4/5 の 10 μm の切片を作製し、免疫組織染色を行い、c-Fos 陽性細胞数、p-ERK 陽性細胞数および二重陽性細胞数を比較した。c-Fos、リン酸化 ERK（p-ERK）はともに侵害受容 2 次ニューロンの興奮を標識するマーカーであり、c-Fos の免疫活性の誘発には興奮から 15 分以上の時間を要し、2 時間後に最大になる。一方、ERK の免疫活性は 15 分までに最大となり、2 時間後には消失する。

生食を投与した場合、c-Fos 陽性細胞は L4/5 の I/II 層で多数認められたが、p-ERK 陽性細胞及び二重陽性細胞は I/II 層の内側部（脛骨神経領域）に集中していた。

ミノサイクリン（0-7 日）群では c-Fos 細胞は生食群と比較して有意に少なく I/II 層の内側部ではほとんど認められず、外側部（総腓骨神経領域）に集中していた。p-ERK 細胞は内側部で多数認められ、陽性細胞数は生食群と有意差を認めなかった。二重染色細胞数は生食群と比較して有意に少なかった。ミノサイクリン（7-14 日）群ではそれぞれの陽性細胞の空間的分布は生食群と類似しており、陽性細胞数は生食群と比較し有意差を認めなかった。

上記の結果から、神経損傷後の早期に誘発される脊髄後角内のミクログリアの活性化を阻害することにより、本来の末梢受容野から隔離された脊髄後角内侵害受容 2 次ニューロンに対する周囲受容野からの侵害情報の収斂投射が阻止され、神経障害性疼痛の発症が抑制されたものと考えられる。