

氏名	山口 大輔		
学位	博士		
専門分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第4512号		
学位授与の日付	平成24年3月23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(文部省令)第4条第1項該当)		
学位論文題目	末梢神経損傷後の脊髄後角ニューロンの過剰興奮に対するアデノシン A1 レセプターアゴニストの効果 Effect of Adenosine A1 receptor agonist on the enhanced excitability of spinal dorsal horn neurons after peripheral nerve injury		
学位論文審査委員	教授 北山 滋雄	教授 杉本 朋貞	
	教授 松尾 龍二		

学位論文内容の要旨

外傷などによる末梢神経損傷が神経傷害性疼痛を誘発することが知られている。神経傷害性疼痛は、身体に加わった侵襲の部位や程度を認識するための生体防御システムとしての痛覚の本来の目的を逸脱するものであり、QOLを著しく低下させるものである。

神経機能の調節には多様な調節因子が関与しているが、アデノシンの類似体は神経傷害性疼痛を含む様々な実験的疼痛モデルにおいて鎮痛効果を示すことが知られており、末梢神経損傷後の痛み関連行動の抑制にアデノシン A1 受容体が深く関与していることが示唆されている。本研究の目的は脛骨神経損傷による c-Fos 過剰応答モデルラットを用いアデノシン A1 受容体アゴニスト 2-chloro-M(6)-cyclopentyladenosine (CCPA)の腓骨頭前下部への皮下投与の効果を検討することである。

雄性 Sprague-Dawley ラット (6週齢、体重 200~250g) を用いた。ペントバルビタールナトリウム麻酔下 (40 mg/kg, i.p.) で、ラットの両側の脛骨神経を結紮切断した。3日1週間または2週間後、ペントバルビタール麻酔下で右側の腓骨頭前下部皮下に 0.1 mM CCPA を 200 μ l 注射し、10分後両側の後肢を 55 $^{\circ}$ Cの水に10秒間浸漬した。2時間後に10%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、脊髄を20%蔗糖溶液中で2日間保存の後、50 μ m の凍結切片を作成し、免疫組織学的染色にて c-Fos の染色を行った。神経切断の対照として切断をおこなわないラットを、CCPA 投与の対照として同量の生理食塩水を注射したラットを用いた。

第4~6腰髄後角表層の多数のニューロンの核内に c-Fos 陽性反応がみられた。c-Fos 陽性細胞の計数は陽性細胞が最も多くみられた第5腰髄吻側の後角 I/II 層で行い、個体ごとに1切片あたりの陽性細胞数を記録した。

神経切断を行わないラットに侵害刺激を加えた場合、CCPA 投与の有無にかかわらず、片側1切片あたり約60個の陽性細胞が誘発され、投与側と反対側の間にも有意差はみられなかった。

神経切断後、生理食塩水を投与した後に刺激を行った場合、切断3日後では投与側約29個、反対側約27個、切断1週間後では両側とも約37個で、非切断群と比較して有意の減少を示したが、2週間後では約60個で有意差はみられなくなった。

神経切断後に CCPA を投与した場合、切断 3 日では投与側約 30 個、反対側約 29 個、切断 1 週間では投与側約 39 個、反対側約 46 個と、投与側にやや減少傾向がみられ、2 週間では投与側（約 45 個）と反対側（約 65 個）の間に有意差がみられた。

第 4～5 腰髄は脛骨神経及び総腓骨神経に含まれる 1 次ニューロンが最も多量に投射する部位であり、刺激によって発現した c-Fos 陽性細胞の空間的分布は坐骨神経 1 次ニューロンの中枢内終末の空間的分布と一致した。また脛骨神経切断 3 日後に行った刺激では、坐骨神経 1 次ニューロンの終末域の外側半にのみ c-Fos 陽性細胞が誘発され、内側半での c-Fos 陽性細胞の誘発が阻止された。第 4～5 腰髄にかけての坐骨神経領域の外側半は総腓骨神経を含む坐骨神経以外の 1 次ニューロンの投射領域であり、内側半が脛骨神経 1 次ニューロンの領域であることから、切断 3 日後の c-Fos 陽性細胞の減少は、総腓骨神経を介しての侵害情報によって同神経の 1 次ニューロンに接続する脊髄後角の侵害受容性 2 次ニューロンにのみ c-Fos 陽性細胞が誘発された結果と考えられる。

脛骨神経切断後、1 週間では c-Fos 陽性細胞数が回復傾向を示し、2 週間後では非切断の場合と同レベルまで c-Fos 陽性細胞数が回復した。脛骨神経の切断端は結紮によって再生が阻止されているため、c-Fos 陽性細胞数の回復は見かけ上のものに過ぎず、むしろ切断を免れた総腓骨神経からの侵害情報に対する脊髄内 2 次ニューロンの過剰応答と考えるべきである。

脛骨神経切断 2 週間後にみられた c-Fos の過剰応答に対して CCPA 投与は強い抑制効果を示した。この効果が生理食塩水投与によって得られなかったものであることから、CCPA はその生理活性によって c-Fos の過剰応答を抑制したと考えられる。またこの効果は CCPA 投与側にみられたものであり、血行を介しての全身的な拡散によるものではなく、CCPA 投与部位付近の局所的な作用によるものと考えられる。本研究で CCPA の皮下注射を行った腓骨頭の前下方は、後肢足部皮膚を支配領域に含む総腓骨神経が皮下の浅層を通過する部位に相当するため、CCPA は総腓骨神経に含まれる 1 次侵害受容ニューロンの興奮性を低下させることによって、侵害性熱刺激に対する応答を抑制したものと推測される。

学位論文審査結果の要旨

アデノシン A1 受容体に対する選択的アゴニストは、末梢投与において、神経障害性疼痛及び炎症性疼痛に対する鎮痛効果を示すことが知られている。本研究は、脊髄後角ニューロンの c-Fos 応答を指標に、ラット脛骨神経切断後の末梢侵害刺激に対する脊髄後角侵害受容 2 次ニューロンの過剰応答に対するアデノシン A1 受容体アゴニスト 2-chloro-N(6)-cyclopentyladenosine (CCPA) の末梢投与の効果調べたものである。

脛骨神経切断により、ラット後肢足部の部分的除神経を行った。3 日後に足部に侵害性熱刺激を加え、2 時間後に第 5 腰髄の組織切片に c-Fos タンパクの免疫組織化学染色を施すと、正常ラットの刺激と比較して後角表層に誘発される c-Fos 陽性ニューロンの数が減少した。切断 2 週間後に同様の刺激を行うと、3 日後と比較して c-Fos 陽性ニューロンの数が大幅に増加したことから、この時期には脊髄後角の侵害受容 2 次ニューロンが、総腓骨神経を経由する侵害情報に対し、c-Fos の過剰応答を現すことが示された。切断 2 週間後、刺激の直前に腓骨頭付近の皮下に CCPA 溶液を投与した場合、後角 2 次ニューロンにおける c-Fos の誘発が有意に抑制された。この効果が生理食塩水投与によって得られなかったことから、CCPA はその生理活性によって c-Fos の過剰応答を抑制したと考えられる。またこの効果は CCPA 投与側にみられたものであり、血行を介しての全身的な拡散によるものではなく、CCPA 投与部位付近の局所的な作用によるものと考えられる。本研究で CCPA の皮下注射を行った腓骨頭の前下方は、後肢足部皮膚を支配領域に含む総腓骨神経が皮下の浅層を通過する部位に相当するため、CCPA は総腓骨神経に含まれる 1 次侵害受容ニューロンの興奮性を低下させることによって、侵害性熱刺激に対する応答を抑制したものと推測された。

以上の結果は、神経切断後、切断神経の末梢感覚受容の隣接領域を支配する神経からの熱刺激に対応する侵害性入力に対し、脊髄後角内 2 次ニューロンが過剰な c-Fos 応答を示すこと、および隣接領域の支配神経に対する CCPA 投与が、この過剰応答を抑制することを示した。すなわち本研究は、神経障害性疼痛の治療に関する重要な基礎知識を追加するものである。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。