

氏名	大村 晋司	
学位	博士	
専門分野の名称	歯学	
学位授与番号	博甲第4718号	
学位授与の日付	平成25年3月25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	末梢神経損傷後の中枢神経における1次ニューロンの収斂投射の研究	
学位論文審査委員	松尾 龍二 教授	宮脇 卓也 教授
	杉本 朋貞 教授	

### 学位論文内容の要旨

末梢神経損傷は痛覚過敏やアロディニアなど、様々な痛覚異常が誘発される。組織損傷の直接の結果として発生する痛みに加えて、損傷を受けた神経の末梢受容野に痛みを感じる場合もあれば、受容野以外の領域にも痛みを感じる場合もある。脊髄後角においては、知覚性の2次ニューロンの体性局在配列が破壊され、本来の受容野から隔離されたニューロンが本来の受容野以外の領域の皮膚の刺激に応答することが報告されている。また Sugimoto ら (1993) は、末梢神経切断後により、損傷を受けていない侵害受容1次ニューロンの刺激による脊髄後角でのc-Fosの誘発が増強されることを報告している。これに類似したc-Fosの過剰誘発は延髄後角においても報告されている。さらに、我々は、末梢神経を損傷後の三叉神経に無髄神経線維を興奮させ得る強度の電気刺激を加える実験を行い、損傷を受けていない神経を刺激した場合にc-Fosの過剰応答が観察されることを発見した。これらの結果は、末梢神経損傷が損傷を受けていない侵害受容1次ニューロンの興奮伝達を促進することを示唆しており、神経損傷後に損傷神経の支配領域の周囲に散放する痛覚過敏を反映するものかもしれない。また、この現象が誘発されるメカニズムは正確には解明されていないものの、神経損傷後に中枢神経系内での1次ニューロンの体性局在配列の再編が起こっている可能性が考えられる。

本研究では、延髄後角の2次ニューロンに対し、異なる末梢受容野を持つ複数の1次侵害受容ニューロンが収斂投射するか否かを組織切片上で分析し、そのような収斂投射が神経傷害性疼痛やc-Fosの過剰誘発に関与する可能性を検討することを目的に設定した。今回使用する実験系では、舌に5%ホルマリンを注射することによって舌神経に含まれる1次ニューロンからの侵害情報伝達を誘発し、これとは別に下歯槽神経に電気刺激を加えることによって下歯槽神経に含まれる1次ニューロンからの侵害情報伝達を誘発する。1匹のラットに2種の刺激を時間をかえて行い、その後、延髄の組織切片にc-Fosとp-ERKの免疫二重染色を施すことにより、それぞれの刺激による興奮伝達の様相を同時に観察する。この系に対し予め下歯槽神経の切断を加えることで、収斂投射のパターンに対する神経切断の効果を検討することが可能になる。なお、神経傷害性疼痛との関連をみるためには、舌背にカプサイシン溶液を塗布することによって誘発される痛覚関連行動に対する下歯槽神経切断の効果を分析した。

実験に使用した動物は神経切断手術時に体重 180-200 g の雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。腹腔内投与による全身麻酔下で、下歯槽神経切断や舌神経切断を結紮切断した。下歯槽神経切断術、シャム手術のラットに対し、2 種類の侵害刺激を施した後、灌流固定し、門から第 1 頸髄までの組織から厚さ 50  $\mu$ m の 1 枚おきの前頭凍結切片を作成し、c-Fos 単染色、c-Fos・p-ERK の 2 重染色を行った。行動分析は下歯槽神経切断群、舌神経切断群、シャム手術群に対してラットの舌背に 0.01% カプサイシン溶液を滴下し、リッキングが開始されるまでの潜時と、リッキングの持続時間の 2 項目を計測した。

延髄後角ニューロンへの侵害受容 1 次ニューロンの収斂投射を検出するため、ホルマリン刺激と電気刺激の後に c-Fos と p-ERK の二重免疫染色を行った。Fos の誘発は舌のホルマリン刺激により、ERK のリン酸化の誘発は下歯槽神経の電気刺激によって行った。

舌のホルマリン刺激によって誘発される Fos 陽性ニューロン数はシャム手術群と比較して下歯槽神経切断の 14 日後に有意に増加した (切断群: シャム手術群 =  $47.4 \pm 4.80$ :  $26.7 \pm 2.21$ )。深層の Fos 陽性ニューロン数も下歯槽神経切断の 14 日後に有意に増加した (切断群: シャム手術群 =  $17.4 \pm 2.07$ :  $7.16 \pm 1.37$ )。下歯槽神経の電気刺激により、大量の p-ERK 陽性ニューロンが観察されたが、下歯槽神経切断による増加は認められなかった。p-ERK 陽性ニューロンは刺激の反対側にはほとんどみられず、下歯槽神経切断による変化も認められなかった。Fos と p-ERK の二重標識ニューロンは主として刺激側の延髄後角表層にみられた。二重標識ニューロンは下歯槽神経切断の 14 日後に著しく増加した (切断群: シャム手術群 =  $15.2 \pm 0.98$ :  $4.64 \pm 0.63$ )。二重標識ニューロンは延髄後角の深層においても、下歯槽神経切断の 14 日後に有意の増加を示した (切断群: シャム手術群 =  $3.08 \pm 0.29$ :  $0.96 \pm 0.13$ )。二重標識ニューロンは刺激の反対側にはほとんどみられず、下歯槽神経切断による変化も認められなかった。

痛覚関連行動では行動観察に用いたすべてのラットが 0.01% カプサイシン処置に対して痛覚関連行動を示した。シャム手術群と比較して下歯槽神経切断群ではリッキングの潜時が有意に短縮して  $2.15 \pm 0.36$  秒となり、持続時間も有意に延長した ( $153 \pm 10.3$  秒)。

ラット下歯槽神経の切断は、舌のホルマリン刺激による延髄後角での c-Fos の誘発を増強し、口腔内へのカプサイシン処置によって誘発される痛覚関連行動を増強し、舌のホルマリン刺激と下歯槽神経の電気刺激の両者に応答する延髄後角ニューロンの数を増加させた。実験結果は、複数の侵害受容 1 次ニューロンからの収斂投射が三叉神経末梢枝の部分的損傷後にみられる神経傷害性疼痛に関与することを示唆するものである。

## 学位論文審査結果の要旨

本研究は末梢神経損傷後に見られる中枢内2次ニューロンの興奮性の変化の様態を究明することを目的とし、ラットの下歯槽神経を切断した後、切断された下歯槽神経及び同側の舌神経からの侵害情報の伝達により興奮する三叉神経2次知覚ニューロンを免疫染色によって組織化学的に同定したものである。ホルマリン注射による舌への侵害刺激により興奮する2次ニューロンは刺激2時間後のc-Fosの免疫染色、下歯槽神経の強い電気刺激によるものは刺激5分後のリン酸化ERKの免疫染色により検出された。c-Fosとリン酸化ERKの免疫活性を示すニューロンはいずれも刺激側三叉神経脊髄路核の尾側亜核吻側部の背内側部に分布し、リン酸化ERK陽性ニューロン数は下歯槽神経切断による影響を受けなかったが、c-Fos陽性ニューロン数は下歯槽神経切断の7日後に増加の傾向を示し、14日後には対照と比較して有意の増加を示した。またc-Fosとリン酸化ERKの両者の免疫活性を示すニューロンは7日後に増加の傾向を示し、14日後には有意差を示した。下歯槽神経切断の14日後に舌にカプサイシン溶液を塗布したところ、対照と比較して有意な痛覚関連行動の潜時の短縮と持続時間の延長が見られた。

以上の結果は末梢神経損傷により本来の末梢受容野から隔離された中枢内2次ニューロンが新たな末梢受容野を獲得することを示すものであり、本研究は神経障害性疼痛の発症機序を理解する上で重要な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。