

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏 名	松田 敬一郎
学 位	博士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博 (医) 第 1088 号
学位授与の日付	令和4年9月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名	Neuronal Nitric Oxide Synthase Suppression Confers the Prolonged Analgesic Effect of Sciatic Nerve Block with Perineural Dexamethasone in Postoperative Pain Model Mice. (術後疼痛モデルマウスにおけるデキサメタゾン添加坐骨神経ブロックの鎮痛効果の延長は神経型一酸化窒素合成酵素の抑制によりもたらされる)
論文審査委員	主査 教授 川島 寛之 副査 教授 上野 将紀 副査 教授 竹林 浩秀

博士論文の要旨

1. 本研究の背景と目的

神経ブロックを行う際に、長時間作用型ステロイドであるデキサメタゾンを局所麻酔薬に添加すると局所麻酔薬の鎮痛効果が延長することが知られている。しかし、ステロイドの鎮痛作用と局所麻酔薬の神経遮断効果との関連性は解明されておらず、局所麻酔薬の鎮痛効果延長についてのメカニズムは未だに明らかになっていない。本研究ではマウス術後痛モデルを用いて、坐骨神経ブロック時のデキサメタゾン添加による鎮痛効果の延長作用を、行動学的および組織学的に検討することを目的としている。

2. 研究の方法

・行動実験

6-8 週齢の C57BL/6 マウスを 2%イソフルラン麻酔下に腹臥位とし、左大腿後面を 5mm 切開し坐骨神経ブロックを行った。坐骨神経ブロックはハミルトンシリンジと 30G 針を用いて行い、閉創は 5-0 ナイロン糸で行った。坐骨神経ブロックから 10 分後にブロック側の後肢足底に 5mm の切開を加え、足底筋腱を剥離後に 5-0 ナイロン糸で閉創した。イソフルラン麻酔から覚醒後に熱刺激法である Hargreaves 法を用いた疼痛閾値評価を行った。ブロック施行から 30、60、120、240、360 分後の時点において熱刺激を行い、坐骨神経ブロックの効果を検討した。

・実験グループ

ブロック時に投与する薬液の種類別に以下の様に実験群を設定した。

(1) control group (Paw incision) ; 生理食塩液、(2) R group ; Ropivacaine (15mg/kg)、(3) RSD group ; Ropivacaine (15mg/kg) + Dexamethasone (1.5mg/kg、右大腿に筋注)、(4) RPD group ; Ropivacaine (15mg/kg) + Dexamethasone (1.5mg/kg)、(5) PD group ; Dexamethasone (1.5mg/kg)。

局所麻酔薬の延長効果が glucocorticoid receptor を介しているかどうかを検証するために、そのアンタ

ゴニストである mifepristone (50mg/kg、ブロック 30 分前に腹腔内投与) を用いた実験群も設定した。

(6) MIF-control group ; 生理食塩液、(7) MIF-R group ; Ropivacaine (15mg/kg)、(8) MIF-RPD ; Ropivacaine (15mg/kg) + Dexamethasone (1.5mg/kg)。

続いて、後の免疫組織学的な検討から一酸化窒素合成酵素 (NOS) の抑制が延長効果に関わることが示唆されたため、NOS の inhibitor である L-NAME を用いた行動実験を行った。L-NAME を神経周囲に投与した時に鎮痛効果のない最大濃度を検証するために 3.125-50mg/kg の範囲で L-NAME の投与を行い、行動実験に適正な濃度を確定後に RPD group との比較を行った。

・免疫組織学的実験

上記の行動実験の結果から、坐骨神経ブロックから 30、240 分後の時点での組織採取を行った。各時点において、深麻酔下にマウスを安楽死させ、パラホルムアルデヒドによる灌流固定後にブロック側の後根神経節 (DRG) を採取した。採取した DRG 組織から 5 μ m の薄切切片を作成し各々の免疫染色を行った。

免疫染色は phospho-p38 MAPK に対する蛍光免疫染色と neuronal NOS (nNOS)、endothelial NOS (eNOS)、inducible NOS (iNOS) に対する Diaminobenzidine (DAB) 染色を行い染色陽性細胞のカウントを行った。

4. 研究成果

・行動実験結果

生理食塩液でブロックを行った群と Dexamethasone を神経周囲に単独投与した群では 30~360 分に渡り疼痛閾値の低下を認め局所麻酔作用は認めなかった。Ropivacaine 単独でブロックした群では 120 分後まで疼痛閾値の上昇を認めた。一方、Dexamethasone を添加した群では 360 分後まで局所麻酔作用の延長を認めた。全身性に Dexamethasone を投与した群では延長作用が見られなかった。

Mifepristone を神経ブロック前に投与すると RPD group で見られていた局所麻酔作用の延長効果が見られなくなったため、これらの現象は glucocorticoid receptor を介した作用であることが示唆された。

・免疫組織染色結果

(phospho-p38 MAPK に対する免疫染色結果)

神経ブロックから 240 分後の時点で、p-p38 MAPK の発現は生理食塩液でブロックした群と Dexamethasone 単独でブロックした群で有意に上昇していた。一方、Ropivacaine を用いて神経ブロックを行った群では Dexamethasone の添加、非添加に関わらず両群ともに p-p38 MAPK の発現を抑えることができた。

(NOS subtype に対する免疫染色結果)

nNOS と eNOS はナীবマウスでも発現しており、足底切開から 30 分後の組織ではともに発現数の上昇を認めた。一方、240 分後の組織では nNOS、eNOS とともに発現数が減少していた。また、iNOS の発現はどちらの時間帯においても発現数が非常に少なかった。

(各群における nNOS、eNOS 発現数の比較)

nNOS の発現は足底切開を行うと迅速に増えることがわかった。Ropivacaine 単独で神経ブロックを行うとその発現量を減少させることができ、Dexamethasone 添加によりさらに発現量を抑えることができた。またその nNOS 発現減少作用は Mifepristone 投与により拮抗されることがわかった。神経ブロックから 240 分後の時点ではどの群においてもナীবマウスと同様の発現数まで低下していた。

eNOS の発現は nNOS と同様にナীবマウスでも見られたが、足底切開に伴う発現数の上昇は認めなかった。Ropivacaine 単独投与群でも発現数に差異はなかったが、Dexamethasone 添加群では有意な発現数低下を認めた。240 分後の時点では nNOS 同様にナীবマウスと同等の発現数まで減少していた。

・L-NAME 投与後の行動実験結果

L-NAME の神経周囲への投与量の検討から、6.25mg/kg 未満の投与であればナীবマウスに近い行動実験結果が得られることがわかった。Dexamethasone 添加と同様に L-NAME を Ropivacaine に添加して神経ブロッ

クを行ったところ、Ropivacaine+Dexamethasone で神経ブロックを行った時と同様の延長効果を得ることができた。

以上の実験結果から、Dexamethasone を局所麻酔薬に添加して神経ブロックを行うと glucocorticoid receptor を介してブロック効果を延長させることができ、さらに足底切開直後の nNOS 発現上昇を抑制することが鎮痛効果の延長に寄与すると申請者らは考えた。

審査結果の要旨

GLP-1 受容体作動薬は、インスリン療法中の 2 型糖尿病患者に対して低血糖のリスクを増やさずに血糖コントロールが改善するうえに、インスリン使用量が減少し、QOL も改善したとの報告があるが、維持血液透析患者における有用性は不明である。そこで申請者らはインスリン使用中の 2 型糖尿病を合併した維持血液透析患者 14 名において、GLP-1 受容体作動薬であるデュラグルチドを併用し、使用開始後 6 か月の CGM による血糖の推移や DTSQ、DTR-QOL による治療満足度および QOL の変化を検討した。12 名が試験を完遂した。糖化アルブミン値は有意な改善、HbA1c 値は改善傾向を示し、インスリン使用量は有意に減少し、4 名がインスリンの使用を中止することができた。CGM では平均血糖、MAGE、SD に改善傾向を認めたが、AOC < 70 は有意な変化を認めなかった。body mass index (BMI)、体脂肪率、体脂肪量は有意に減少した。一方で、骨格筋量や骨格筋量指数に有意な変化は見られなかった。治療満足度では DTS、QDTR-QOL 共に有意な上昇を認めた。

以上、本研究は小規模ではあるが、週一回投与の GLP-1 受容体作動薬がインスリンを使用中の 2 型糖尿病合併維持血液透析患者の低血糖リスクを高めることなく、血糖コントロール、体組成、および QOL の改善に有用である可能性を示した点に本論文の博士論文としての価値を認める。