

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 番場 景子
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 969 号
学位授与の日付 令和2年9月23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 In vivo フラビンタンパク自家蛍光イメージング法を用いた末梢神経損傷後のマウスにおける大脳皮質一次体性感覚野と脊髄後角の経時的な神経活動の違い

論文審査委員 主査 教授 長谷川 功
副査 教授 上野 将紀
副査 准教授 大石 誠

博士論文の要旨

背景と目的

神経障害性疼痛は非常に難治性で、患者の生活に重度の社会的障害をもたらすことが知られ、有効な治療法は確立されていない。

Spared Nerve Injury (SNI)モデルなどの神経障害性疼痛モデル動物では後肢の機械的刺激による逃避閾値が低下する。これまで、電気生理学的研究により末梢神経損傷後の脊髄後角や大脳皮質一次体性感覚野 (S1) に可塑性変化が生じ、その興奮性が増強し、結果として機械的刺激による逃避閾値の低下が生じると信じられてきたが、それらの因果関係には確固たる証拠はない。

また、神経細胞の興奮を評価する方法として行われてきたパッチクランプなどの電気生理学的手法は非常に限られた領域の神経興奮性を評価しており、空間的分布に関する情報はほとんど得られない。本研究で用いたフラビン蛋白蛍光イメージング (flavoprotein autofluorescence imaging: FAI) は、神経組織の表層における代謝活動を簡便かつ低侵襲に測定できるイメージング方法で、外因性色素を必要とせず、神経活動の二次元的な空間変化を観察し、定量することが可能である。

本研究はFAIを用いて、マウスの坐骨神経損傷後の後肢足底刺激に対する脊髄後角やS1の神経興奮性を経時的に調べ、機械的逃避閾値の変化と比較し、神経障害性疼痛の発症に対する脊髄後角やS1の可塑性変化の役割を検討した。

方法

1. Spared Nerve Injury (SNI) モデルマウス

6週齢の雄のC57BL/6マウスを用いた。イソフルランの全身麻酔下に、左坐骨神経の分枝である腓腹神経を温存し、総腓骨神経、脛骨神経を結紮、切離したSNIモデルマウスを作成した。

2. 後肢逃避反応の機械的閾値の評価

von Frey filamentを用いて後肢足底外側 (腓腹神経領域) を刺激し、逃避反応の機械的閾値を測定し、機械的アロディニアを評価した。SNI手術の2日前から術後3週間まで施行した。

3. 大脳皮質一次体性感覚野 (S1) 及び脊髄のフラビン蛋白蛍光イメージング

マウスはウレタンで麻酔した。S1 の測定では、頭蓋骨を露出後に固定したマウスを暗視下に置き、経頭蓋的に青色励起光を照射し、後肢足底第 5 趾に非侵害刺激を加えた際の脳表より放射される緑色自家蛍光を対側の S1 より撮影した。刺激後の局所神経活動領域内の平均蛍光強度変化率と応答領域の大きさの積を面積強度と定義した。FAI は SNI 手術の 4、7、14、21 日後に実施した。脊髄は L1、L2 の椎弓を切除後に同様の手順で同側の脊髄より撮影した。

4. 統計情報

統計解析は、EZR を用いた。行動実験には Wilcoxon 順位和検定、Friedman の検定を使用し、FAI の応答の評価には Steel の多重比較検定を使用した。連続データは平均値±標準偏差として表記した。統計学的有意差は $P < 0.05$ と定義した。

結果

1. SNI 術後の後肢逃避反応の機械的閾値の低下

SNI の逃避閾値は術後 4 日目に低下し、機械的刺激に対する痛覚過敏は、その後 3 週間安定して持続した。

2. SNI モデルマウスの S1 領域の神経活動は亢進した

SNI 手術後の左第 5 趾の非侵害機械的刺激によって誘発された右 S1 領域の応答領域、応答領域の信号強度変化率の平均値、面積強度は術後 4 日目から増加傾向を示したが、統計学的には有意な変化ではなく、術後 21 日目に初めて有意な増強となった。

3. SNI 術後の背側脊髄の神経活動は増加しない

S1 領域の測定と同様に、SNI 手術後 4、7、14、21 日目のマウスの脊髄の蛍光強度を測定した。S1 の測定結果とは異なり、神経損傷後の後肢刺激に反応する脊髄後角の神経活動の面積および強度は、いずれも経時的な増強変化は認めず、統計学的な有意差はないものの、むしろ減少傾向を示した。

考察

1. 末梢神経損傷後、S1 領域の神経活動は経時的に漸増する

申請者は、痛みによる行動と S1 領域の神経興奮は並行していると考えていたが、本研究では、SNI 手術後 4 日目から機械的逃避閾値の低下が一定に維持されていたにも関わらず、対側の S1 領域の神経活動は 21 日目まで経時的に増強した。また、神経細胞の興奮性だけでなく、応答領域の面積の増加が明らかとなった。臨床現場においても、神経損傷後に末梢の痛覚過敏領域あるいはアロディニア領域が拡大することがあり、この現象を反映している可能性がある。しかし、動物の疼痛行動と S1 領域の興奮性の変化は同様の経時的変化を示さなかったことから、S1 領域の興奮性の増強だけでは痛みの増強を判断できないといえる。

2. 末梢神経損傷後、脊髄後角の神経活動は時間経過とともに増強せず、むしろ減弱する

本研究では、刺激に反応して神経細胞の興奮性を示す FAI の応答領域は末梢神経損傷後の脊髄では変化せず、むしろ時間の経過とともに減少する傾向にあった。この現象の説明として、FAI が抑制性ニューロンの活動性を反映している可能性が考えられるが、脊髄後角浅層部の大多数は興奮性介在ニューロンであり、抑制性ニューロンの喪失の影響はほとんどないと考えられる。

3. 動物の疼痛行動と S1 及び脊髄後角細胞の興奮性について

術後痛などの侵害受容性疼痛では脊髄後角の侵害受容ニューロンの興奮が疼痛の原因になっている。一方、神経障害性疼痛では、脊髄後角細胞の興奮性増加を伴わずに、疼痛行動が発生する。しかも、その疼痛行動の経時的変化は S1 領域の興奮性とも時間経過が一致しないことが明らかになった。本研究ではこれまで信じられていた脊髄後角細胞や S1 領域の興奮性増強が必ずしも神経障害性疼痛を直接反映するものではなく、他の機序が存在することを示唆するものである。

審査結果の要旨

神経障害性疼痛は難治性で患者の生活に重度の社会的障害をもたらすが有効な治療法は確立されておらず、その病態機序には不明な点が多い。申請者はマウスの坐骨神経損傷による神経障害性疼痛の動物モデルを作成し、フラビン蛋白蛍光イメージングにより大脳一次体性感覚野 (S1) や脊髄後角の神経興奮性増強の経時的変化を調べ、逃避閾値の経時変化と比較して因果関係を検証した。その結果、後肢の刺激に対する行動学的な逃避閾値は神経損傷術後 4 日目に有意に低下し、その後 3 週間安定して持続した一方、非侵害刺激に対する右 S1 の神経応答の強度や面積は、いずれも術後 21 日目まで有意な変化は認められなかった。脊髄後角の神経活動の面積および強度には有意な増強は認められず、むしろ減少傾向を示した。従って、神経障害性疼痛の経時変化は S1 の興奮性増強とは時間経過が一致せず、また脊髄後角細胞の興奮性増加を伴うものでもないことが明らかになった。本研究は、これまで信じられていた脊髄後角細胞や S1 領域の興奮性増強が必ずしも神経障害性疼痛の直接の原因ではなく、他の機序が関与することを示唆する点において、学位論文としての価値を認める。