

| | |
|---------|---|
| 氏名 | おう けんぐん 王 顕軍 |
| 学位 | 博士 (医学) |
| 学位記番号 | 新大院博(医)第136号 |
| 学位授与の日付 | 平成18年 9月21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 | NO in CSF and local inducible NO synthase after cauda equina compression in rats (ラット馬尾神経圧迫後の髄液内一酸化窒素と局所の誘導型一酸化窒素合成酵素) |
| 論文審査委員 | 主査 教授 柴田 実 副査 教授 遠藤 直人 副査 教授 馬場 洋 |

博士論文の要旨

背景：一酸化窒素 (NO) は NO 合成酵素 (NOS) より産生され、生体内で重要な生理的活性物質として認識されている。現在まで、NOS は構造型と誘導型 (iNOS) の存在が知られている。脳脊髄液 (CSF) 内の NO 酸化物 (亜硝酸イオンと硝酸イオン) 濃度 (以下 NO 量) の測定は臨床的、実験的研究に用いられており、病態の解明に寄与している。

最近、Takenobu らはシリコンラバーの挿入による馬尾神経圧迫モデルを開発し、腰部脊柱管狭窄症の病態解明に重要な情報を提供している。我々は慢性疼痛を有する腰部脊柱管狭窄症の髄液内 NO 量が疼痛のないコントロールに比して有意に増加していること、さらに術前の NO 量が術後の痛み・しびれの改善率を推察できる定量的指標になり得ることを報告してきた。しかし、上昇した NO の発生源は不明である。本研究の目的はシリコンラバー挿入によるラット馬尾神経圧迫モデルを用いて、髄液内 NO 量の経時的な変化を観察し、また、髄液内に上昇した NO がどの細胞に発現した iNOS 由来かを免疫組織化学的手法を用いて検討することである。

動物と方法：モデルの作成は Takenobu らの方法を準じ、2 個のシリコンラバーを硬膜外に挿入した。麻酔と髄液採取は我々が過去に報告した方法を用いた。16 匹の雄ラットを用い、圧迫群とコントロール群に分け、髄液内 NO 量の経時的変化を観察した。髄液採取時期は両群とも圧迫前、圧迫後 12 時間、1, 2, 3, 7, 14 日目である。病理学的実験には 19 匹の雄ラットを用いた。Sham 群で 4 匹、圧迫群で 1 日目、3 日目、7 日目にそれぞれ 5 匹ずつ、灌流固定後、L3～S1 の馬尾神経と神経根を摘出した。シリコンラバーによる神経圧迫部位のみをパラフィン包埋し、切片を作成した。anti-iNOS, anti-ED-1

(macrophage のマーカー), anti-S-100 (Schwann 細胞のマーカー) 抗体を用い、ABC 法による免疫染色を行った。また、蛍光法二重染色も行った。

結果：NO量の経時的変化として Sham群ではいずれの時期にも有意な上昇はみられなかった。一方、圧迫群では術前に比して術後12時間で有意に上昇し、1日目にピークになり、2-3日目は徐々に低下した。7日目には圧迫前のレベルに戻り、統計学的に有意差がなくなった。病理学的検討の圧迫1日目では、硬膜周囲にmacrophageの多数の浸潤がみられ、それらの大半はiNOS陽性であった。さらに二重染色でiNOSとED-1の陽性細胞が多くみられたことから、iNOS発現細胞は主にmacrophageと考えられた。硬膜内の馬尾神経には、少数のiNOS陽性細胞がみられた。iNOSとS-100の二重染色で同じ細胞が染まったことから、馬尾神経に発現したiNOS陽性細胞は一部Schwann細胞と考えられた。圧迫3日目の硬膜周囲にはiNOS陽性macrophageの浸潤がみられたが、1日目より減少していた。一方、馬尾神経内には多数のED-1陽性細胞が見られたが、それらのiNOS陽性率は低かった。圧迫7日目の硬膜周囲にはiNOS及びED-1陽性細胞がほとんど見られなかった。馬尾神経内にはED-1陽性細胞が3日目よりやや増加したが、それらの細胞はほとんどiNOS陰性であった。

考察：炎症反応によってiNOSは主にmacrophageに発現し、多量のNOを産生することが知られている。多発性硬化症など中枢神経系炎症性疾患の髄液内NO量はコントロールに比して有意に高く、その病変部位にiNOSが発現する。本研究の結果でNO量は1日目にピークになり、さらに硬膜圧迫部位に数多くのiNOS陽性macrophageが浸潤していた。そこで、上昇した髄液内NOは圧迫部位の急性炎症により誘導されたmacrophageに発現したiNOSから由来すると考えられる。免疫組織化学的検討で急性期のmacrophageにiNOSが発現していたものの、7日目には発現せず、これらはNO量と経時的変化と一致していた。さらに、圧迫された馬尾神経のSchwann細胞にもiNOSが発現したことは他の末梢神経損傷モデルでも証明されておるが、馬尾神経損傷では本研究が最初の報告である。臨床応用として、人の腰部脊柱管狭窄症では術前にNO量が高値の場合、術後の痛み・しびれの改善が不良であることより、iNOSの阻害剤が今後新しい治療薬として使用される可能性が期待され、さらなる研究が必要になる。

(論文審査の要旨)

これまで、研究者らは腰部脊柱管狭窄症の髄液内一酸化窒素(NO)量がコントロールに比して有意に増加することを報告したが、上昇したNOの発生源は不明である。本研究の目的はラット馬尾神経圧迫モデルを用いて、髄液内NO量の経時的な変化を観察し、また、髄液内に上昇したNOがどの細胞に発現した誘導型NO合成酵素(iNOS)由来かを免疫組織化学的手法を用いて検討することである。

髄液内NO量の測定はGriess法を用い、その経時的変化を圧迫群とコントロール群で比較した。病理学的実験では、anti-iNOS抗体を用い、ABC法による免疫染色と蛍光法二重染色を行った。

本研究の結果でNO量は1日目にピークになり、さらに硬膜圧迫部位に数多くのiNOS陽性macrophageが浸潤していた。そこで、上昇した髄液内NOは急性炎症により誘導されたmacrophageに発現したiNOS由来と考えられる。また、急性期のmacrophageにiNOSが発現していたものの、7日目には発現せず、これらはNO量の経時的変化と一致していた。

髄液内に上昇したNO量は馬尾神経周囲に集積したmacrophageに発現したiNOS由来と考えられる。

本論文は、臨床上、これまで不明であった、腰部脊柱管狭窄症での上昇した髄液内NOの発生源を検討した点において、学位論文としての価値を認める。