

氏名	岸本 宜子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5324号
学位授与の日付	平成28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 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	末梢神経損傷後の侵害受容1次ニューロンの収斂投射
論文審査委員	松尾 龍二 教授 池亀 美華 准教授 杉本 朋貞 教授

学位論文内容の要旨

神経切断により部分的に神経支配から解放された皮膚に侵害刺激を加えると、切断後の急性期には侵害刺激の伝達が除神経領域に隣接する健常な神経を介するものみに制限され、後角の2次侵害受容ニューロンにみられるc-Fosの免疫活性上昇が抑制されるが、慢性期には損傷神経の再生を伴わない場合でもc-Fosの誘発が回復する。従って、神経切断の慢性期には後角内2次ニューロンの侵害入力に対する過剰応答が生じている可能性が示唆される。また、神経切断の急性期から慢性期にかけてのc-Fos誘発の増加が顕著な領域は損傷1次ニューロンの後角内終末域とその周囲に限られることから、部分的な除神経を受けた皮膚からの侵害情報は、切断を免れた神経の1次ニューロンによって、それら1次ニューロンの本来の終末域に存在する2次ニューロンのみならず、末梢受容野から隔離された2次ニューロンにまで過剰に伝達されている可能性が示唆される。一方、受傷1次ニューロンは細胞死に陥ることなく、その多くが長期間にわたって生存し、軸索中枢枝とそのシナプス結合を維持することが知られている。また、神経腫に対する機械的な刺激が痛みを誘発することも周知の事実であり、脊髄や延髄の後角に存在する2次ニューロンは末梢受容野を失ってはいるものの、潜在的には損傷1次ニューロンからの情報伝達を受け、感覚情報を処理する能力を維持していると考えられる。事実、切断を受けた神経の近位切断端にC-線維を興奮させるに十分な強い電気刺激(ES)を加えると、後角内では慢性期でも急性期と同程度のc-Fos応答がみられる。

本研究の目的は、末梢神経切断後に受傷1次ニューロンからの侵害情報の伝達を受けて興奮する後角内2次ニューロンと、近隣の領域を支配する切断を免れた神経に含まれる1次ニューロンからの侵害情報の伝達を受けて興奮する2次ニューロンを組織化学的に観察し、その関係を分析することである。このため、ラット後足を支配領域とする3つの神経のいずれかを切断し、1)部分的除神経を受けた後足の侵害熱刺激によるc-Fosの誘発、2)切断神経の近位断端のESによるERKのリン酸化を免疫組織化学的に可視化した。ラットの灌流固定時にc-Fosとp-ERKの免疫活性がピークに達するよう、時間差を設定して刺激を行い、2種の蛍光標識2次抗体により二重染色を行った。

材料と方法：実験には神経切断手術時に体重180-200gの雄性Sprague-Dawleyラットを用いた。坐骨神経および伏在神経から侵害情報伝達を受ける2次ニューロンの分布を調べるために、全身麻酔下で、一側の坐骨神経あるいは伏在神経を露出し、C-線維を興奮させるに十分な強度の電気刺激を加え(各神経3匹ずつ)、2時間後に脊髄後角ニューロンにおけるc-Fosの免疫活性を組織化学的に検出した。対照としてシャム刺激(0mA)を行った(各神経3匹ずつ)。上記とは別に3匹のラットを用い、坐骨神経と伏在神経の両方の支配を受ける後足全体に侵害熱刺激(一側の後足を55℃の熱水に10秒間浸漬し、侵害熱刺激とした)を加え、2時間後に脊髄後角ニューロンにおけるc-Fosの免疫活性を組織化学的に検出した。

末梢神経切断の効果を調べるために、電気刺激と同様の要領で、一側の脛骨神経あるいは伏在神経を露出し、神経を結紮切断、軟組織を縫合した。シャム切断では同様の術式で、結紮および切断を省略した。神経切断あるいはシャム切断の3, 7あるいは14日後(各群5匹ずつ)に、全身麻酔下で手術側の後足に侵害熱刺激を加え、次いで神経を再露出し、近位断端(あるいはシャム切断を行った神経)に電気刺激を加えた。熱刺激の開始および電気刺激の開始は灌流固定の2時間前および15分前とした。脛骨神経切断(およびシャム切断)では、L4,5を、伏在神経切断(およびシャム切断)では、L1-5を採取した。

結果と考察：伏在神経および坐骨神経に含まれるC-線維あるいは侵害受容1次ニューロンからの興奮伝達を受ける2次ニューロンの空間分布はそれぞれの神経に含まれる1次求心ニューロンの終末域の分布(Swett&Woolf)と類似性の高い局在パターンを示すことがわかった。脛骨神経切断、伏在神経切断により後足への侵害熱刺激で誘発されるc-Fos発現は神経の投射部位において神経損傷後3日後で減少したが、7及び14日後では3日後と比較して漸増した。一方、脛骨神経および伏在神経への電気刺激によるERKのリン酸化には神経損傷後に変化は認められなかった。c-Fosおよびp-ERKの二重陽性細胞は、神経損傷後3日後で減少し、14日後では3日後のものと比較して有意に増加した。今回の結果から、脛骨神経および伏在神経損傷後14日で脊髄後角におけるc-Fosの過剰応答が認められたが、その少なくとも一部は、神経切断によって末梢受容野を失った2次ニューロンへの収斂投射が関与している可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

神経障害性疼痛は末梢神経損傷に起因し、痛覚過敏やアロディニアなど、末梢組織への刺激強度に対応しない異常な痛みを特徴とする知覚障害である。損傷神経の再生を伴わない神経切断の場合、損傷神経と末梢受容野が近接する非損傷神経を介した侵害情報が脊髄後角内2次ニューロンに過剰に伝達されることが神経障害性疼痛の発症メカニズムのひとつとして提唱されているが、どのような2次ニューロンが過剰な興奮を起こすかは知られていなかった。本研究はラットの後足皮膚を支配領域とする複数の末梢神経の一部を切断し、その慢性期に後足に侵害刺激を加えることによって興奮する2次ニューロンと、切断を受けた神経の近位断端の強い電気刺激によって興奮する2次ニューロンとを2種類の神経活動マーカーを用いて組織学的に可視化し、比較検討することを目的としたものである。

脊髄後角の侵害受容2次ニューロンが末梢受容野の侵害刺激に応答するとき、定常的な発現のみられないc-Fosが誘発されることから、本研究ではc-Fosの免疫活性が侵害受容2次ニューロンの活動マーカーとして利用された。また、これに類似した侵害受容2次ニューロンの活動マーカーとして、**extracellular signal-regulated kinase (ERK)** のリン酸化が知られているため、第二の侵害受容2次ニューロンの活動マーカーとしてリン酸化**ERK**が用いられた。さらに、これらのマーカーを同一組織切片上で検出するため、侵害刺激とそれを想定した電気刺激のタイミングをずらすことによって二重染色を行う方法を考案した。

伏在神経および坐骨神経に含まれるC-線維あるいは侵害受容1次ニューロンからの興奮伝達を受ける2次ニューロンの空間分布は、過去に報告されているそれぞれの神経に含まれる1次求心ニューロンの終末域の分布と類似性の高い局在パターンを示した。脛骨神経切断、伏在神経切断により後足への侵害熱刺激によるc-Fos誘発は神経損傷3日後で減少したが、7及び14日後では3日後と比較して漸増した。一方、切断を受けた脛骨神経あるいは伏在神経の電気刺激によるERKのリン酸化には神経損傷後に変化は認められなかった。しかしc-Fosおよびp-ERKの二重陽性細胞は神経損傷3日後で減少し、14日後では3日後のものと比較して有意に増加した。

以上の結果から、神経切断後14日で脊髄後角におけるc-Fosの過剰応答が認められたが、その少なくとも一部は、神経切断によって末梢受容野を失った2次ニューロンに対する隣接受容野からの侵害情報の収斂投射が関与している可能性が示唆された。

本学位論文の内容は、末梢神経損傷によって惹起される過剰応答の発症機序を理解するうえで重要な知識を追加した。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。