

氏 名	藤野 圭太郎
(ふりがな)	(ふじの けいたろう)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第1213号
学位審査年月日	令和3年1月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Impairment and restoration of the blood-nerve barrier and its correlation with pain following gradual nerve elongation of the rat sciatic nerve (ラット末梢神経延長に伴う血液神経関門の破綻、修復と神経障害性疼痛との関連)
論文審査委員	(主) 教授 佐浦 隆一 教授 荒若 繁樹 教授 鰐淵 昌彦

学位論文内容の要旨

《目的》

末梢神経伸長損傷は比較的高頻度にみられるが、その病態についての知見は未だ十分ではない。我々のグループは本損傷の病態解明を目的に、ラット坐骨神経間接伸長モデルを用いて、変性に陥った神経は組織学的に再生し伝導遅延や遺伝子発現が回復してもその神経支配領域の痛覚過敏が遷延することを報告してきた。

血液神経関門 (Blood-Nerve Barrier、以下 BNB) は神経周膜内側および神経内膜内の微小血管内膜に存在している。そして、神経内部の恒常性を維持する役割を担い、血中可溶性因子および白血球の神経内への移動を制限している。

近年、他の神経損傷動物モデルにて BNB の破綻と神経障害性疼痛との関連を示す報告が散見されるため、伸長ストレスによる神経損傷における BNB の破綻の観点から、ラット坐骨神経間接伸長モデルを用いて伸長された神経での BNB の破綻の空間的、経時的変化の解明とその変化と神経障害性疼痛との関連を検討することを目的に研究を行った。

《方 法》

雄 SD ラットの右大腿骨に骨延長器を設置し、1日 1.5mm の延長を 10 日間行った（延長群）。延長終了翌日、10 日後、30 日後、50 日後の 4 群に分けて経時的に解析した。コントロールは未処置の左後肢とした（コントロール群）。痛覚閾値を評価するために、50 日群 6 匹には延長前から延長終了後 50 日まで定期的に von Frey 検査を行なった。伸長に伴う神経損傷の程度を検討するにあたり、過去の研究結果と比較する目的で、各群 6 匹ずつ、坐骨神経採取前に坐骨切痕部で坐骨神経を電気刺激し腓腹筋外側頭で複合筋活動電位（CMAP）を検出した。BNB の破綻の評価は、各群 2 匹ずつ、坐骨神経採取 30 分前にエバンスブルー（EB）を静脈内注射し、坐骨切痕遠位（PF）、大腿中央（MF、延長部）、大腿遠位（DF）で坐骨神経を採取して神経内の EB 漏出を評価した。また、各群 4 匹ずつ、前述の 3 カ所で採取した坐骨神経に抗 endothelial barrier antigen（EBA）抗体および抗 rat endothelial cell antigen-1（RECA-1）抗体を用いた多重蛍光染色を行い、抗 RECA-1 抗体で染色される血管数に対する抗 EBA 抗体で染色される血管数の割合を算出して BNB の破綻を定量化した。また、BNB の破綻に伴う神経内のマクロファージ数の変化を検討するために抗 CD68 抗体を用いて免疫染色を行なった。

《結 果》

延長群の痛覚閾値は延長前 (53.6 ± 4.6 g) と比較して延長開始 7 日目より有意に低下し、延長終了 5 日後には 11.8 ± 4.4 g まで低下した。しかし、25 日後から徐々に回復傾向を示し、45 日後以降は延長前と同等になった（45 日後: 38.1 ± 17.1 g, 50 日後: 46.4 ± 8.2 g）。また、延長群の CMAP は延長終了翌日には振幅がコントロールと比較して 50.7% と有意に減少し、潜時は 164.0% と有意に遅延したが、延長終了 10 日後には、振幅と潜時ともや

や回復傾向を示しはじめ、30日後、50日後では振幅と潜時ともにコントロール群と有意差はなかった。

延長群のBNBの評価では、延長終了翌日はEB漏出を認めなかった。そして、10日後、30日後では延長群の全ての部位でEBの血管外漏出を認めたが、50日後にはどの部位においてもEB漏出を確認できなかった。延長群の延長終了翌日の抗EBA/抗RECA-1値はコントロール群（コントロール群；PF: $96.8 \pm 3.8\%$, MF: $92.5 \pm 6.1\%$, DF: $95.0 \pm 6.6\%$ ）と有意差を認めなかったが、延長群10日後の抗EBA/抗RECA-1値はコントロール群あるいは延長終了翌日の延長群と比較して有意に低下していた（延長群10日後：PF: $63.0 \pm 17.6\%$, MF: $63.5 \pm 15.0\%$, DF: $65.0 \pm 15.5\%$ ）。また、延長群30日後の抗EBA/抗RECA-1値もコントロール群あるいは延長終了翌日の延長群と比較して有意に低かったが、延長群50日後の抗EBA/抗RECA-1値はコントロール群あるいは延長群の延長終了翌日と有意差はなかった。一方、CD68陽性細胞はコントロール群、延長群とも全ての検体で神経内に散発的に認められるものの延長後の増加はなかった。

《考 察》

本研究でのCMAPの変化は我々の過去の報告と相違なく、神経伸長に伴う神経損傷が少なくとも延長後翌日には出現し、30日後には回復していることを示唆するものであった。一方、BNBの破綻は延長後翌日ではなく、10日後に延長部の近位を含む広範囲に認められ、30日後もBNBの破綻は観察されたが、50日後には全部位で破綻したBNBは回復していた。

神経伸長モデルのBNB破綻は、BNB損傷が神経損傷部より末梢に局限し損傷部より末梢に向けて段階的に回復する他の損傷モデルと大きく異なっていたが、本研究でもBNB破綻部の回復過程と痛覚閾値の回復が連動していたことから、伸長損傷に伴う神経障害性疼痛とBNB破綻は関係していると推察される。そして、この神経障害性疼痛とBNB破綻の関係については、伸長が緩徐であったためBNB破綻が軽微でありBNBを通過するマクロファージは増加せず、神経内のマクロファージ数の明らかな変化を認めなかったが、破綻したBNBを通過した他の疼痛誘発因子が伸長損傷に伴う神経障害性疼痛の発症に関与

していると考えている。

《結 論》

本研究で用いた坐骨神経間接伸長モデルでは BNB の破綻は他の神経損傷モデルと比較して広範囲に発生していた。さらに、全ての部位で同時期に回復し、その回復過程は神経障害性疼痛の回復と並行していた。これらの結果から、我々のモデルは他のモデルと BNB 破綻の機序や疼痛の発生メカニズムが異なっており、今後、緩徐伸長モデルの BNB 破綻と疼痛メカニズムを研究することで、緩徐伸長モデルの疼痛メカニズムを明らかにするだけでなく、神経障害性疼痛全体の病態解明と治療法の開発につながる可能性が示された。

(様式 乙9)

論文審査結果の要旨

末梢神経損傷に関する基礎的研究では神経切断後の再生や圧迫障害に関する研究が多いが、臨床において比較的高頻度に認められる末梢神経伸長損傷に関する研究は少ない。

申請者は、末梢神経伸長損傷後に遷延する疼痛の原因が、伸長により広範囲に破綻した血液神経関門 (Blood-Nerve Barrier、以下 BNB) が原因ではないかと考え、ラットの右大腿骨に骨延長器を設置し 1 日 1.5 mm の延長を 10 日間行う坐骨神経間接伸長モデルを作製し、抗 endothelial barrier antigen (抗 EBA 抗体) および抗 rat endothelial cell antigen (抗 RECA 抗体) による多重蛍光染色を用いて、延長終了翌日、10 日後、30 日後、50 日後の末梢神経伸長損傷に伴う BNB の破綻を経時的かつ定量的に評価した。

申請者は、神経延長終了 30 日後に複合筋活動電位 (CMAP) は回復しても、BNB 破綻と痛覚閾値は 30 日後以降も回復せず遷延していたことを見出し、伸長損傷に伴う神経障害性疼痛の発症と BNB の破綻の関係を示した。また、坐骨神経間接伸長モデルは、BNB が広範囲に破綻しその全ての部位で同時に回復することや、神経障害性疼痛の重要な因子の一つであるマクロファージの集積を経過中に認めないことから、他の神経損傷モデルとは異なる病態を呈することを明らかにした。

すなわち本研究は、これまで有効な治療法のなかった末梢神経伸長損傷後に伴う慢性的な知覚障害や疼痛の病態解明や治療法の開発につながる可能性があり、さらに、神経障害性疼痛全体の原因究明にも寄与する可能性があると考えられた。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

International Journal of Neuroscience in press

2020 Mar. Online ahead of print.

doi: 10.1080/00207454.2020.1738430.