

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
大野克記	主査教授 窪田 隆裕 副査教授 南 敏明 副査教授 黒岩 敏彦 副査教授 佐浦 隆一
<p>主論文題名</p> <p>Altered Expression of Sodium Channel Distribution in the Dorsal Root Ganglion after Gradual Elongation of Rat Sciatic Nerves</p> <p>(ラット坐骨神経緩徐延長による後根神経節ナトリウムチャネルの発現変化)</p>	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>脚長差や四肢先天異常の治療に脚延長手術が広く行われているが、脚延長に伴い神経も伸長されるため、術後合併症として末梢神経障害が問題となっている。この初発症状の多くは、支配神経領域の疼痛や痛覚過敏である。疼痛発現には、後根神経節(DRG)における電位依存性ナトリウムチャネル(Na チャネル)の発現変化が密接に関与すると考えられている。</p> <p>DRG に発現する電位依存性 Na チャネルは、テトロドトキシン抵抗性(TTX-R)を持つチャネルとテトロドトキシン感受性(TTX-S)を持つチャネルに大別される。前者は電位依存的に活性化しやすく、後者は活性化しにくい。また、TTX-R サブユニットは無髄神経 C 線維に特異的に発現し、痛みの情報伝播に深く関与する。神経絞扼モデルや神経切断モデルを用いた研究では、TTX-R サブユニット(Nav1.8 及び Nav1.9)の発現のみが減少する場合、TTX-S サブユニット(特に Nav1.3)の発現のみが増加する場合、両方とも認められる場合があると報告されている。しかし、神経伸長時における Na チャネルの発現変化</p>	

については明らかにされていない。

本研究では脚延長時における疼痛の発現機序を解明するために、ラット坐骨神経を緩徐に伸長させ、神経障害の程度と疼痛閾値の変化について検討した。

#### 《対象と方法》

10週齢雄の Sprague-Dawley ラットを用いた。

##### ① 延長群(L群, n=13)

骨延長器(Orthofix M103)を右大腿に設置し、大腿骨中央で骨切りを行った。手術翌日から延長を開始し、0.5mm/day で30日間、合計15mmの脚延長を行った。

##### ② Sham群(S群, n=10)

骨延長器の設置と骨切りのみ行ったもの。

##### ③ 健常群(N群, n=8)

以上3群に対し下記評価を行った。

#### 1.電気生理学的評価

延長終了後、麻酔下に右坐骨神経を坐骨切痕部で刺激し、腓腹筋外側頭での複合筋活動電位(CMAPs)を測定し、最大振幅と潜時を調べた。

#### 2.mRNA発現量の評価

麻酔下に右第4,5腰神経のDRGを採取し、リアルタイムRT-PCRを用いてNav1.8, Nav1.9, Nav1.3のmRNA発現量を測定した。

#### 3.組織学的評価

L群は延長終了後、N群と共に灌流固定を行い、坐骨神経をエポキシ樹脂に包埋後、縦断切片をトルイジンブルー染色し光学顕微鏡で観察した。さらに横断切片を電子顕微鏡で観察した。

#### 4.免疫組織化学評価

L群は延長終了後、N群と共に灌流固定を行い、右第4腰神経のDRGを採取し、パラフィン切片を作成した。Nav1.8を免疫組織化学染色し、光学顕微鏡で観察した。

## 5.行動評価

L群とS群に対し、右足底を von Frey モノフィラメントで刺激し疼痛閾値を測定した。測定は、骨延長器設置前と設置後3日毎に延長終了時までに行った。

### 《結果》

- 1.CMAPsの振幅及び潜時について、いずれもL群は対照群(S及びN群)に比べ約23%統計学的有意に減少及び遅延した。対照群間では有意差を認めなかった。
- 2.DRGにおけるNav1.8のmRNA発現量について、L群は対照群と比べ有意に減少していた。Nav1.9について、L群はS群と比べ有意な発現減少を認めたが、N群と比較した場合、有意ではないが発現減少の傾向を認めた。Nav1.8及びNav1.9ともに、対照群間では有意差を認めなかった。Nav1.3については各群間に有意差を認めなかった。
- 3.坐骨神経縦断切片について、L群はN群と比べ神経線維の直線化を認めたが、ランビエ絞輪の開大は認めなかった。横断切片についてN群に変性所見を認めなかったが、L群無髄神経軸索は膨化していた。
- 4.DRGにおけるNav1.8の蛋白発現について、L群はN群に比べ有意に発現が減少していた。
- 5.疼痛閾値について、S群の閾値は変化しなかった。L群は延長開始後18日目から徐々に疼痛閾値が低下し、21日目以降はS群と比べ有意に低下した。

### 《考察》

末梢神経伸長時の損傷機序に関する過去の研究では、伸長条件について速い伸長速度や長い伸長距離で行ったものが多く、評価についても伸長神経の電気生理学的変化や組織学的変化のみを調べた研究に限られる。そのため、臨床上問題となる神経障害の病態を適切に再現していない。

本研究では緩徐に延長を行った結果、電気生理学的及び組織学的に神経障害の程度が軽く、行動評価でも脚延長開始後 18 日目以降から徐々に疼痛閾値が低下しており、臨床上の病態と比較的類似するといえる。

今回 L 群の DRG における Nav1.8 発現量は、mRNA 及び蛋白発現上有意に減少した。また組織学的には、有髄神経では明らかな変性を認めず、無髄神経では軸索の膨化を認めた。これらのことから、無髄神経 C 線維に特異的に発現する Nav1.8 発現量が減少した結果、疼痛閾値が低下した可能性がある。従って、坐骨神経を緩徐に伸長すると、電気生理学的かつ組織学的に神経障害の程度が軽くても、DRG では Nav1.8 発現量が減少し、痛覚過敏反応を生じたのであろう。

以上の結果から、緩徐脚延長時の疼痛発現の機序は、延長早期より Nav1.8 の発現量が減少したことが一因と考えられる。今後、Nav1.8 の発現減少を選択的に抑制する治療法が確立すれば、神経障害性疼痛治療の一助になると考えられる。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲第	号	氏名	大野克記
論文審査担当者			主査教授 窪田 隆裕	
			副査教授 南 敏明	
			副査教授 黒岩 敏彦	
			副査教授 佐浦 隆一	
主論文題名				
<p>Altered Expression of Sodium Channel Distribution in the Dorsal Root Ganglion after Gradual Elongation of Rat Sciatic Nerves</p> <p>(ラット坐骨神経緩徐延長による後根神経節ナトリウムチャネルの発現変化)</p>				
論文審査結果の要旨				
<p>脚長差や四肢先天異常の治療に脚延長手術が広く行われているが、術後合併症として末梢神経障害が問題となっている。この初発症状の多くは、支配神経領域の疼痛や痛覚過敏である。疼痛発現には、後根神経節(DRG)における電位依存性ナトリウムチャネル(Na チャネル)の発現変化が密接に関与すると考えられている。</p> <p>DRG に発現する電位依存性 Na チャネルは、テトロドトキシン抵抗性(TTX-R)チャネル(Nav1.8, Nav1.9)とテトロドトキシン感受性(TTX-S)チャネル(主に Nav1.3)に大別される。また、TTX-R サブユニットは無髄神経 C 線維に特異的に発現し、痛みの情報伝播に深く関与する。</p> <p>申請者は脚延長時における疼痛の発現機序を解明するために、ラット右大腿部に骨延長器を設置後、坐骨神経を緩徐に伸長させた群(延長群)と延長を行わない群(対照群)に対して神経障害の程度と疼痛閾値の変化を検討し、以下の結果が得られている。</p> <p>右坐骨神経の複合筋活動電位について、振幅と潜時はいずれも約 23%統計学的有意</p>				

に減少及び遅延した。右第 4, 5 腰神経の DRG における Nav1.8, Nav1.9, Nav1.3 の mRNA 発現量について、延長群の Nav1.8 は対照群と比べ有意に減少していた。Nav1.9 は有意ではないが発現減少の傾向を認め、Nav1.3 については有意差を認めなかった。組織学的には、延長群の有髄神経に明らかな変性はなく、無髄神経軸索の膨化のみ認めた。DRG における Nav1.8 の蛋白発現について、延長群は対照群に比べ免疫組織化学的に有意に減少していた。行動評価では、延長群の疼痛閾値が延長開始 21 日目から有意に低下していた。

以上の結果から、坐骨神経を緩徐に延長すると、電気生理学的かつ組織学的に神経障害の程度が軽くても、DRG における Nav1.8 発現量が減少することがわかった。Nav1.8 は無髄神経 C 線維に特異的に発現するため、緩徐脚延長時の疼痛発現の機序は、延長早期より Nav1.8 の発現量が減少したことが一因と考えられる。今後、Nav1.8 の発現減少を選択的に抑制する治療法が確立すれば、神経障害性疼痛治療の一助になると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条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)

Journal of Orthopaedic Research 28(4): 481-486, 2010