

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	小野寺 美子
<p>学位論文題目</p> <p>Pregnancy suppresses neuropathic pain induced by chronic constriction injury in rats through the inhibition of TNF-α</p> <p>(妊娠はTNF-αの抑制を介して、絞扼性神経損傷モデルラットの神経障害性疼痛を抑制する)</p> <p>共著者名</p> <p>Megumi Kanao-Kanda, Hirotsugu Kanda, Tomoki Sasakawa, Hiroshi Iwasaki, Takayuki Kunisawa</p> <p>Journal of Pain Research</p> <p>平成29年 掲載予定</p> <p>研究目的</p> <p>神経障害性疼痛は末梢神経や中枢神経系の機能不全によって引き起こされ、全人口の7-8%が苦しんでいるとされている。オピオイドや非ステロイド性抗炎症薬といった現在の鎮痛薬では部分的な効果しか得ることができず、難治性の痛みとして、また社会的な問題として治療法の確立が急がれている。</p> <p>妊娠後期に痛み閾値が上昇する機構は、Pregnancy induced analgesia:PIAとよばれ様々な動物実験によって、侵害受容刺激または内臓刺激に対して示されてきていた。しかし神経障害性疼痛への影響については明らかになっていない。</p> <p>そこで、坐骨神経絞扼により神経障害性疼痛モデルラットを作成し、PIAによる効果を行動学的に調査した。</p> <p>またTNF-αは神経周囲への投与で神経障害を引き起こすことや、HIV関連の神経障害性疼痛において脊髄後角で発現量が上昇していることが明らかとなっている。しかしPIAにより脊髄後角でTNF-αがどのように変化するかはわかっていない。そのためTNF-αの分泌に深くかかわるアストロサイトとミクログリアの発現も含めて検討した。</p> <p>さらに坐骨神経を絞扼することで脊髄後角にシグナルが伝達され、神経細胞が興奮するが、その興奮に対して妊娠がどのように作用するか検討するために、c-Fosの動態についても調査を行った。</p>			

材 料 ・ 方 法

生後11週未満200-250gのメスラットを対象とした。膺のスミアを確認し適切な時期にオスと同じケージに入れmateさせ、翌朝膺栓を確認できたラットを妊娠群とした。

ペントバルビタールによる全身麻酔下で左坐骨神経を4-0シルクでゆるく結紮した群を、chronic constriction injury(CCI)群とし、Sham群は坐骨神経の露出のみを施行した。妊娠群は妊娠成立日をday0、非妊娠群は任意の日をday0と設定し、day3にCCI手術を施行した。妊娠-CCI群、非妊娠-CCI群、妊娠-sham群、非妊娠sham群の4群に分け、Von-Freyフィラメントを用いて、pre(Day-4)、day0、day7、day14、day21、day28にそれぞれ機械的疼痛閾値の測定を行った。

行動学的検討で用いたラットとは別にまた同様の4群のモデルを作成しそれぞれday21のラットから深麻酔下で脊髄を取り出し、L4-5レベルの左側の脊髄後角を切除し、ドライアイスによって凍結させ、ウエスタンブロット用の検体とした。一次抗体はTNF- α 、GFAP、Iba-1、c-Fosを用いて β actinで標準化を行った。

またTNF- α の変化が全身性のものであるかを確認するためにラットの尾静脈から採血をpre(day-4)とDay21に行い、ELISA法にてTNF- α の血中濃度を測定した。

成 績

CCIにより神経障害性疼痛モデルを作成し、手術後7日後から疼痛閾値の低下を確認した。妊娠-CCI群において妊娠成立後21日目(分娩直前)でこの低下していた疼痛閾値が有意に上昇し、分娩後は再度低下した。非妊娠-CCIでは疼痛が継続し、妊娠および非妊娠Sham群ではsurgery前後および妊娠の経過中に疼痛閾値の変化は認めなかった。

CCIモデルでは脊髄後角におけるTNF- α の発現は上昇した。しかし妊娠-CCI群では分娩直前にこのTNF- α の発現が抑制されていた。またアストロサイトのマーカーであるGFAP、ミクログリアのマーカーであるIba-1についても同様の結果であった。さらにc-Fosにおいても同様の結果を認めた。TNF- α の血中濃度は4群すべてにおいてpre、Day21ともに検出限界以下であった。

考 案

我々は以下を明らかにした。1) 分娩直前(妊娠から21日目)には神経障害性疼痛モデルラットの疼痛閾値が上昇する。2) その時の脊髄後角で起きている変化は、CCIによって上昇したTNF- α 発現の抑制、GFAP、Iba-1、c-Fos発現の抑制である。3) CCIモデルにおいて脊髄後角ではTNF- α の発現量が増加し、妊娠によって抑制されるが、TNF- α 血中濃度はCCIによっても妊娠によっても変化しなかった。

神経障害性疼痛において脊髄後角でTNF- α 、GFAP、Iba-1、c-Fosの発現が上昇し、神経障害性疼痛の成立、維持においてアストロサイト、ミクログリアが関与していることは明らかにされている。

今回はこの上昇したTNF- α 、GFAP、Iba-1、c-Fosが妊娠によって抑制されることが明らかになった。これまでの報告では、PIAはオピオイドレセプターのアンタゴニストであるナロキソンによって拮抗される鎮痛機序であり、分娩直前になると内因性のオピオイドが体内で産生され、この効果により鎮痛効果を得ることができるとされている。また近年エストロゲンやプロゲステロンというホルモンの効果により鎮痛効果が示されるという報告もある。そのため妊娠経過によってプロゲステロンやエストロゲンの血中濃度が上昇し、これらの効果によって鎮痛効果がもたらされると主張しているものもある。しかし、妊娠経過に伴いこれらのホルモンは徐々に血中濃度が上昇していくにもかかわらずPIAは分娩直前に強く発現する。そのため我々はエストロゲンやプロゲステロンといったホルモンと内因性のオピオイドの相互作用が重要であると考えている。

さらに神経活動の指標であるc-Fosが抑制されていることは興味深い結果であった。坐骨神経絞扼で慢性的にもたらされてきた神経活動の興奮がPIAによって抑制されると考えられる。今後PIAの機序の解明がさらに進み、同様の状態をヒトで形成することができた場合は、神経障害性疼痛の脊髄への伝達を抑制できる可能性を含んでいる。

今回の結果だけではPIAの機序が明らかになるものではないが、PIAにおいて脊髄後角でのTNF- α の抑制は重要な機序であり、それはTNF- α を分泌しているミクログリアやアストロサイトの発現が抑制されるためであると考えている。TNF- α の抑制は全身性のものではなく、神経障害性疼痛の形成に大きく関わる脊髄後角で起こっていることも興味深い。

結 論

妊娠による鎮痛機構はCCIによって発現された神経障害性疼痛を抑制し、脊髄後角においてTNF- α の発現を減少させた。また妊娠は脊髄後角において神経障害性疼痛によって亢進していたアストロサイトとミクログリアの活性を抑制した。さらに神経活動の興奮自体が抑制されていることが示された。以上のことより分娩直前には神経活動の興奮を抑え、アストロサイトやミクログリアを抑制することでTNF- α の発現も抑制される。これらのことにより鎮痛効果が発現されることが明らかになった。




引 用 文 献

1. Gintzler AR.
Endorphin-mediated increases in pain threshold during pregnancy.
Science. 1980; 210, 193-195.
2. Bennett GJ, Xie YK.
A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man.
Pain. 1988; 33, 87-107.
3. Bridges RS.
A quantitative analysis of the roles of dosage, sequence, and duration of estradiol and progesterone exposure in the regulation of maternal behavior in the rat.
Endocrinology. 1984; 114, 930-940.

参 考 论 文

1. Iwasaki H, Collins JG, Saito Y, Kerman-Hinds A.
Naloxone-sensitive, pregnancy-induced changes in behavioral responses to colorectal distention: pregnancy-induced analgesia to visceral stimulation.
Anesthesiology. 1991; 74, 927-33
2. Kanda H, Liu S, Iida T, Yi H, Huang W, Levitt RC, Lubarsky D.A, Candiotti K.A, Hao S.
Inhibition of Mitochondrial Fission Protein Reduced Mechanical Allodynia and Suppressed Spinal Mitochondrial Superoxide Induced by Perineural Human Immunodeficiency Virus gp120 in Rats.
Anesth Analg. 2016; 122, 264-272.
3. Kanao M, Kanda H, Huang W, Liu S, Yi H, Candiotti K.A, Lubarsky D.A, Levitt R.C, Hao S.
Gene Transfer of Glutamic Acid Decarboxylase 67 by Herpes Simplex Virus Vectors Suppresses Neuropathic Pain Induced by Human Immunodeficiency Virus gp120 Combined with ddC in Rats.
Anesth Analg. 2015; 120: 1394-1404.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	小野寺 美子
<p>審査委員長 <u>吉田 成孝</u> </p> <p>審査委員 <u>千石 一雄</u> </p> <p>審査委員 <u>伊藤 浩</u> </p>			
<p>学位論文題目</p> <p>Pregnancy suppresses neuropathic pain induced by chronic constriction injury in rats through the inhibition of TNF-α</p> <p>(妊娠は TNF-αの抑制を介して、絞扼性神経損傷モデルラットの神経障害性疼痛を抑制する)</p>			
<p>妊娠後期には疼痛抑制が生じることは知られているが、神経因性疼痛に対しても抑制が生じるかは明らかでなかった。この論文では神経絞扼性疼痛モデルラットに対し、妊娠により疼痛閾値が上昇することを示したものである。</p> <p>実験方法はすべて通常の動物実験および、生化学的実験であり問題はない。また、実験動物に関する申請も適切に行われている。</p> <p>この研究により、神経絞扼性モデルに対し妊娠前期と中期においては非妊娠ラットと同じ疼痛閾値を示していたが、妊娠後期において疼痛抑制を生じていることが明らかになった。さらに、妊娠後期には脊髄において神経因性疼痛においてみられる tumor necrosis factor-α (TNF-α)の上昇が抑制され、神経因性疼痛に大きな役割を持つアストロサイトとミクログリアの増加も抑制されていることを示した。また、神経活動も妊娠後期に抑制されていることが c-fos 発現から示された。</p>			

神経因性疼痛は大きな問題であり、有効な治療法がないことも多い。妊娠と疼痛抑制の関係は、今後の研究の進展により新たな疼痛対策につながることも予想され、医学的な意義も大きい。

論文は適切に構成され、十分な考察も行われている。また、**Journal of Pain Research** 誌へ掲載済みである。

学位申請者は審査委員の試問にも適切に回答し、十分な学力があることが示された。

以上より、この論文は博士（医学）の学位論文として認めるに値すると判断した。