

【17】

氏 名	ねもと こうへい 根 本 興 平
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第634号
学位授与の日付	平成26年3月5日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 （麻酔・疼痛学）
学位論文題目	A型ボツリヌス毒素は神経障害性疼痛による脊髄興奮性シナプスの増強を抑制する
論文審査委員	（主査）教授 平 田 幸 一 （副査）教授 堀 雄 一 教授 下 田 和 孝

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

A型ボツリヌス毒素（Botulinum Neurotoxin A：BoNT/A）は医療用薬物として世界中で広く臨床使用されており、本邦でも眼瞼痙攣をはじめとして様々な疾患に対する有用な治療手段として認められている。一方でBoNT/Aは神経障害性疼痛に対する鎮痛効果を有することが臨床研究や動物実験において多く報告されているにもかかわらず、その詳細な鎮痛機序についてはいまだに解明されていない。

【目 的】

本研究ではBoNT/Aの神経障害性疼痛に対する作用機序を明らかにする目的で、Seltzer法による坐骨神経部分結紮を行ったマウスの髄腔内にBoNT/Aを投与し、BoNT/Aのアロディニアに対する鎮痛効果を調べるとともに、脊髄後角表層ニューロンの興奮性シナプス伝達に対する作用をパッチクランプ・ホールセル記録法によって評価した。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

生後6－8週のICR雄性マウスを用い、全身麻酔下にSeltzer法に従った左坐骨神経部分結紮モデルを作製した。坐骨神経結紮から2日後のマウスにBoNT/A 0.15Uとリドカイン110 μ gの髄腔内投与（BoNT/A群）を行い、対照として坐骨神経結紮マウスに髄腔内投与量が等量となるようにリドカイ

ン260 μ gを投与（対照群）した。これらの薬剤が髄腔内に確実に投与されていることの確認は、リドカインによる下肢の運動麻痺を指標とした。

1. von Frey試験

坐骨神経結紮の2日前から結紮後10日目までの間、von Frey試験による機械的刺激に対する逃避行動の回数を測定し、その結果についてBoNT/A群と対照群の比較を行った。

2. パッチクランプ・ホールセル記録

BoNT/A髄腔内投与から7日後に全身麻酔下に脊髄を摘出しスライサーを用いて厚さ350-450 μ mの脊髄スライス標本を作製した。そして近赤外線微分干渉顕微鏡下に、脊髄後角表層に分布するニューロンを直視してパッチクランプ・ホールセル記録を行い、微小興奮性シナプス後電流（miniature excitatory postsynaptic currents：mEPSCs）の振幅（pA）および発生頻度（Hz）についてBoNT/A群と対照群を比較した。また単刺激誘発性興奮性シナプス後電流（evoked excitatory postsynaptic currents：eEPSCs）は、ピククリン、ストリキニン存在下に記録されているニューロンの近傍に存在するニューロンを刺激して記録した。加える刺激を徐々に増強させ、記録が可能な最小閾値を測定し、この閾値の5倍、15倍および25倍の刺激に対するニューロンの反応を記録し、BoNT/A群と対照群を比較した。

統計処理

全ての結果は平均値 \pm 標準誤差で示し、BoNT/A群と対照群間のmEPSCsの頻度、振幅、eEPSCsの振幅の比較には t 検定を用いた。またvon Frey試験の解析には一元配置分散分析法を用い、事後検定はTukeyの多重比較検定を行った。統計処理は統計ソフトPrism 5（Graph Pad, U.S.A.）を使用し、統計学的有意水準は $p<0.05$ とした。

【結 果】

1. von Frey試験

坐骨神経部分結紮前の機械的刺激に対する逃避行動を示す回数は両群間で有意差はみられなかった。そして結紮の翌日以後から、BoNT/A群と対照群の両群において刺激に対する逃避行動を示す回数の有意な増加を認め（ $p<0.05$ ）、坐骨神経部分結紮によるアロディニアが発症していることを確認した。しかし、BoNT/A群は対照群と比較して結紮後4-8日目の間で、逃避行動を示す回数の有意な減少を示した（ $p<0.05$ ）。

2. パッチクランプ・ホールセル記録

mEPSCsの発生頻度および振幅についてBoNT/A群と対照群の2群間で比較した結果、mEPSCsの発生頻度はBoNT/A群で有意に減少していたが（ $p<0.05$ ）、振幅については両群間で有意差はみられなかった。また、BoNT/A群と対照群の脊髄後角表層ニューロンから記録されたeEPSCsの振幅は、刺激に反応する最小閾値、すなわち最小刺激閾値の15倍と25倍の刺激において、BoNT/A群は対照群と比較してeEPSCs振幅の有意な抑制を示した（ $p<0.05$ ）。

【考 察】

BoNT/Aは末梢での発痛物質放出を抑制し、末梢性感作を抑制することで鎮痛効果を発現すると

いわれているが、中枢神経系における神経伝達物質放出も抑制し、中枢性感作を抑制することで鎮痛効果を発現しているとも考えられる。さらに、脊髄レベルでのmicroglia P2X3やTRPV1受容体などを介した鎮痛作用や、内因性オピオイドが関与していることを指摘する報告などが存在する。以上の報告に基づくと、BoNT/Aは脊髄レベルにおいてはシナプス伝達に作用している可能性がその鎮痛機序として考えられ、神経障害性疼痛で生じる脊髄後角の興奮性シナプス伝達に対してBoNT/Aは抑制的に作用すると推測された。本研究では坐骨神経部分結紮によって惹起された神経障害性疼痛がBoNT/Aの髄腔内投与によって減弱することが確認された。さらにパッチクランプ・ホールセル記録による脊髄後角表層の興奮性シナプスの観察において、mEPSCsの発生頻度が減少したことから、BoNT/Aは神経障害性疼痛における自発的な脊髄後角表層の求心性線維からの興奮性神経伝達物質放出をシナプス前性に抑制することが示された。一方でmEPSCsの振幅に対照群との有意差がなかったことから、明らかなシナプス後性抑制は認められなかった。さらにBoNT/Aは単刺激誘発による興奮性シナプス活動を表すeEPSCs振幅の増強を抑制したことから、BoNT/Aはアセチルコリンのみならず、グルタミン酸などの刺激誘発性興奮性神経伝達物質の放出抑制にも関与している可能性が推察された。

【結 論】

本研究ではBoNT/Aが神経障害性疼痛による脊髄後角表層ニューロン興奮性シナプス伝達へ与える影響を行動学および電気生理学的に評価し、BoNT/Aの髄腔内投与は神経障害性疼痛を有意に減弱させ、その鎮痛機序として明らかなシナプス後性抑制は認められなかったが、少なくともシナプス前性に興奮性神経伝達物質の放出を抑制することが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

神経障害性疼痛の有病率は先進国で3-7%といわれており、様々な薬物療法が行われているものの、多くの患者が難治性の神経障害性疼痛に悩まされている。この神経障害性疼痛を緩和する治療薬として、食中毒の原因菌として知られるボツリヌス毒素が有効であるという報告が動物実験で散見されているが、その詳細な鎮痛機序に関しては明らかにされていない。そこで、本研究ではA型ボツリヌス毒素 (Botulinum Neurotoxin A: BoNT/A) の神経障害性疼痛に対する鎮痛機序を明らかにするために、マウスの坐骨神経部分結紮モデルの髄腔内にBoNT/Aを投与し、BoNT/Aの鎮痛機序を行動生理学的及び電気生理学的に解明することをを行った。von-Frey試験による痛み回避行動への作用とパッチクランプ・ホールセル記録法による脊髄後角興奮性シナプス伝達に及ぼす作用を評価した結果、BoNT/Aはアロディニアによる痛み回避行動を減少させた。また、BoNT/A投与7日後に脊髄スライス標本のパッチクランプ・ホールセル記録法で微小興奮性シナプス後電流 (miniature excitatory postsynaptic currents: mEPSCs) を観察した結果、BoNT/Aは対照と比較してmEPSCsの振幅に変化を生じずに発生頻度を減少させ、単刺激による刺激誘発性興奮性シナプス後電流 (evoked excitatory postsynaptic currents: eEPSCs) の振幅も抑制した。これらの結果から、

BoNT/Aの髄腔内投与は脊髄後角興奮性シナプス伝達の増強をシナプス前性に抑制することが示唆された。

【研究方法の妥当性】

ICRマウスにSeltzer法を用いて神経障害性疼痛モデルを作製し各種薬物の効果を検討する方法は多くの研究で行われており、アロディニアに対する各種薬物の効果を検討する方法としてvon Frey testは確立された方法である。また、脊髄スライス標本における脊髄後角表層の微小興奮性シナプス後電流及び単刺激誘発性興奮性シナプス後電流を測定するという電気生理学的手法は各種薬物の興奮性シナプス伝達に対する作用を検討する方法として確立された方法である。以上のことにより、本研究の手法は、BoNT/Aの脊髄後角における作用機序を解明するために妥当であると判断した。

【研究結果の新奇性・独創性】

BoNT/Aの運動神経終末における作用機序は解明されている。またBoNT/Aの神経障害性疼痛に対する有効性も動物実験の段階ではいくつか報告がなされているが、BoNT/Aの詳細な作用部位は解明されていない。本研究では、BoNT/Aの神経障害性疼痛減弱作用の少なくとも一つが、感覚神経終末において興奮性シナプス伝達を抑制することが示された点で新奇性・独創性があると判断した。

【結論の妥当性】

Von Frey testという確立された行動評価において、BoNT/Aを投与されたマウス群と非投与マウス群における逃避行動を起こす割合を評価し、両群間に有意な差を見出している。また、本研究ではパッチクランプ・ホールセル記録という電気生理学的な手法を用いてシナプス前神経細胞へのBoNT/Aの影響も行っている。BoNT/Aの髄腔内投与によって、神経細胞の微小興奮性シナプス後電流の発生頻度は減少し、単刺激誘発性興奮性シナプス後電流の振幅も減少した。これらの結果から、BoNT/Aは興奮性神経伝達物質の放出抑制がアロディニアの発症を減弱させる機序に関与しているという結論は妥当であると判断した。

【当該分野における位置付け】

神経障害性疼痛は非常に治療困難な疾患である。申請論文においてBoNT/Aが感覚神経においても神経伝達物質の放出を抑制するという結果は、今後の神経障害性疼痛の薬物療法において有益な報告であると考えられる。

【申請者の研究能力】

申請者は、日々、臨床の麻酔・疼痛学について研鑽を重ねながら、なおかつ、ホールセル・パッチクランプ法などの電気生理学的手法を用いた基礎研究を行ってきた。これらの経験を通して研究遂行に必要な知識や能力は十分に獲得していると判断する。

【学位授与の可否】

本申請論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該研究分野への貢献度も高いと評価できる。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Dokkyo Journal of Medical Sciences

41 : 71-78, 2014