

学位研究紹介

ラット坐骨神経CCI刺激による脊髄後角におけるFosタンパクの経時的及び空間的分布

Temporal and spatial distribution of Fos protein in the lumbar spinal dorsal horn neurons in the rat with chronic constriction injury to the sciatic nerve

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻  
顎顔面再建学講座 歯科侵襲管理学分野

山崎由美子

Division of Dental Anesthesiology, Department of Tissue Regeneration and Reconstruction, Niigata university Graduate School of Medical and Dental Sciences  
Yumiko Yamazaki

【目 的】

BennetとXieらが神経因性疼痛の動物モデルとして、chronic constriction injury (CCI) モデルを考案して以来、CCIモデルを用いて神経因性疼痛に関する様々な研究がなされてきた。CCI施行後の動物には自発的な疼痛関連行動が認められ、温熱及び機械的刺激に対しアロディニアあるいは痛覚過敏を示すと言われている。また、CCI動物の脊髄後角及び脊髄神経節には様々な神経化学的な変化が生じることが知られている。

これまで神経活動のマーカーとしては即時応答遺伝子がいられ、坐骨神経損傷後、その脊髄後角に即時応答遺伝子産物であるFosタンパクが発現することが知られている。しかしCCI施行後の脊髄後角におけるFosタンパクの発現には不明な点が多い。そこで本研究では、免疫組織学的手法を用いて、坐骨神経CCIモデルの脊髄後角における長期的なFosタンパクの分布を検討した。

【方 法】

材料としてWistar系雄性ラット（体重200～250g）を用い、CCI群、sham群、無処置群の3群に分けた。CCI群はBennet及びXieらの方法に準じてハローセンによる吸入麻酔後4%抱水クロラル腹腔内注射による麻酔下で左側坐骨神経を剖出後、神経周囲を4ヶ所緩く結紮した。Sham群は同様に麻酔後、左側坐骨神経を露出するのみとした。

両群ともに右側は処置を行わず対照側とした。その後いずれも、術後1、3、5、10、15、20、30日目にハローセンによる吸入麻酔後4%抱水クロラル腹腔内注射による深麻酔下で、アルデヒド系固定液にて灌流固定を行った。

固定後、脊髄の第2腰椎から第6腰椎を一塊として取り出し、50μの凍結連続切片を作成した。免疫染色は、抗c-fos抗体を用いてABC法にて行った。

作成した切片はRexedらの分類に基づき、実験側、対照側それぞれ第1～2層、第3～4層、第5～6層及びその他に分けてFos陽性ニューロン数をカウントし、第1層から第6層については脊髄後角として合計を求め統計処理を行った。同一切片の実験側対対照側については、paired student's t-test、群間内の比較についてはone-way ANOVAを用い、危険率5%をもって有為差ありと判定した。

【結 果】

無処置群の脊髄後角においては、Fos陽性ニューロンはほとんど認められなかった。

CCI群では、多数のFos陽性ニューロンが脊髄後角に認められ、その数は術後1日で最大となり、以後緩やかに減少したが、術後15日で再び上昇を認め、その後暫減した。一方sham群もCCI群同様、脊髄後角に多数のFos陽性ニューロンの出現が認められ、その数は術後1日で最大となるが、術後3日以降はCCI群に比べ顕著に減少した。無処置群の脊髄後角においては、Fos陽性ニューロンはほとんど認められなかった。(Fig.1.)

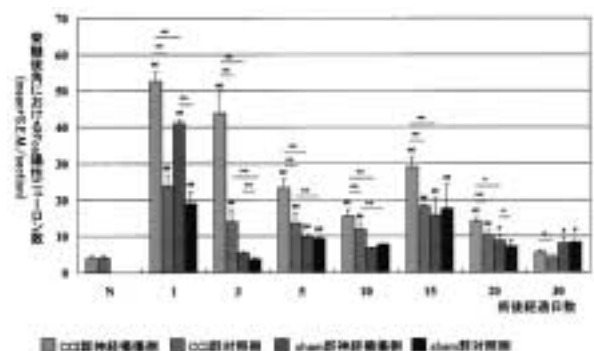


Fig. 1. CCI群及びsham群脊髄後角におけるFos陽性ニューロン数の経時的変化  
Significant differences between groups as determined by paired Student's T-test by sharps (###P<0.01, #P<0.05)  
Significant differences between groups as determined by one-way ANOVA by asterisks (\*\*P<0.01, \*P<0.05)

脊髄後角における各層のFos陽性ニューロンの発現状況については、CCI施行後の神経損傷側において、第5～6層に発現するFos陽性ニューロンの経時的な増加が認められた。( Fig. 2.)

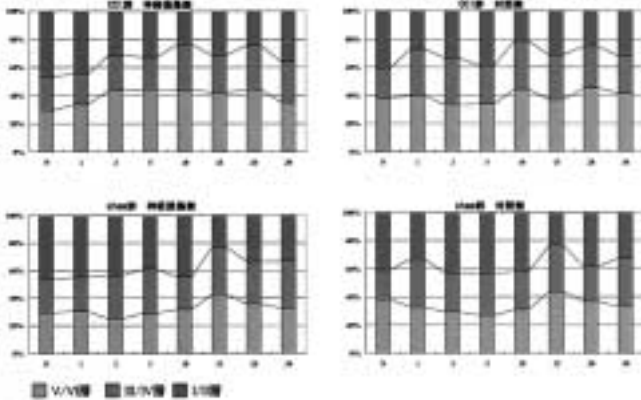


Fig. 2. 脊髄後角における各層のFos陽性ニューロンの発現状況 (横軸はいずれも術後経過日数を示す。)

対照側と神経損傷側におけるFos陽性ニューロン数の相対的变化については、sham群が術後1日で最大となったのに対し、CCI群では術後3日で最大となった。( Fig. 3.)

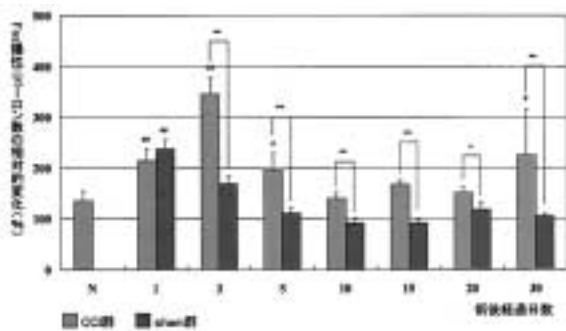


Fig. 3. 神経損傷側に出現するFos陽性ニューロン数の相対的变化  
Significant differences between groups as determined by paired Student's T-test by sharps( ##P<0.01, #P<0.05 )  
Significant differences between groups as determined by one-way ANOVA by asterisks( \*P<0.01, \* \*P<0.05 )

【考 察】

CCIは神経損傷側の脊髄後角に、持続的なFos陽性ニューロンの出現を引き起こす。その出現パターンは二相性となり、痛覚過敏の開始期に相当する術後3日では、神経損傷側に出現するFos陽性ニューロン数が、対照側に比較して最大となることが示された。これまでCCI施行後3日以降、動物には自発的な疼痛関連行動が認められたという報告があるが、これらのことから、痛覚過敏の発現が、CCI施行後3日以降生じ、その程度は疼痛関連行動と相関があるものと考えられた。

また術後1日で出現するFos陽性ニューロンの多くは、皮膚や筋肉を切開することにより生じた炎症によるものと考えられた。

しかしながら、術後15日でFos陽性ニューロンの出現が一過性に増加する理由については不明である。

CCI施行後に脊髄後角に出現するFos陽性ニューロンは、脊髄後角深部で出現するFos陽性ニューロン数が増加することに起因するものと考えられた。

また、CCI対照側においても長期にわたりFos陽性ニューロンの出現が認められた。このことは片側のCCI刺激により、刺激を受けない対照側にも痛み等の異常感覚が生じている可能性が示唆され、対照側におけるFosタンパクの発現機序は、神経損傷側とは異なっていることが考えられた。

【参考文献】

1) Yamazaki Y., Maeda T., Someya G. and Wakisaka S. : Temporal and spatial distribution of Fos protein in the lumbar spinal dorsal horn neurons in the rat with chronic constriction injury to the sciatic nerve. Brain Res., 914(1-2): 106-114, 2001.