

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	吉 山 勇 樹
論文審査担当者	主 査 高 橋 淳 副 査 関 島 良 樹・福 島 菜 奈 恵・山 崎 光 章
論文題目	Plantar incision with severe muscle injury can be a cause of long-lasting postsurgical pain in the skin (重度の筋損傷を伴う足底切開は、皮膚の術後痛が遷延する原因となりうる)
(論文の内容の要旨)	<p>【背景】術後の痛みは、皮膚、筋膜、筋肉、末梢神経などの組織損傷に起因する。足底切開による術後痛動物モデルでの痛みの機序は、組織損傷を誘発する物質を投与した動物モデルでの痛みの機序と異なることが報告されている。しかし、足底切開モデルは痛みの期間が短いなど、術後痛が遷延するヒトの特徴を完全には反映していない。近年、皮膚切開よりも筋肉切開が痛覚過敏の要因であることや、筋肉と神経の局所的な炎症が、慢性化する術後痛の原因の1つである可能性が示された。筋肉の強い損傷とその後の炎症は、皮膚の創治癒後も持続する可能性があり、術後痛の慢性化をもたらすかもしれない。本研究では、重度の筋損傷が長期にわたる局所炎症を引き起こし、足底切開治癒後の皮膚の痛みを遷延させるかどうかを調査した。</p> <p>【方法】250–300 gの雄のSprague Dawley ラットを使用した。セボフルラン麻酔下で足底に皮膚切開を加え、足底筋切開(Plantar incision)群(以下P群)では、足底筋に1 cmの切開を加え閉創した。筋損傷(Muscle injury)群(以下M群)では同様に皮膚切開を行い、液体窒素(-190°C)で冷却した直径2mmのスチールバーを足底筋に3分あてて凍結筋損傷を引き起こし、閉創した。Sham群は麻酔だけを施行した。行動学的解析として、後肢の自発痛関連行動、機械性痛覚過敏(フォンフライフィラメント刺激に対する逃避閾値)、熱性痛覚過敏(放射熱刺激による逃避潜時)を評価した。筋切開や筋損傷による浮腫や炎症の評価のため、術後4および7日目の足底筋を採取し、湿乾重量比(wet/dry ratio)やヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)による白血球数の計測、フローサイトメトリー分析による炎症細胞の分離を行った。筋切開や筋損傷が脊髄に及ぼす影響を解析するため、脊髄のL4/L5を採取して免疫組織化学的分析を行った。脊髄後角における侵害受容ニューロンの活性化マーカーとしてc-Fosを用い、神経炎症の評価として活性化ミクログリアのマーカーであるIonized calcium binding adapter protein 1(以下Iba-1)を用いて染色した。</p> <p>【結果】自発痛関連行動は、P群、M群ともSham群より増加し、術後3~7日目においては、M群の方がP群よりも有意に多かった。機械性刺激に対する逃避閾値はP群、M群ともに低下したが、特に術後5~8日目においてはM群の方がP群よりも有意に逃避閾値が低かった。熱刺激に対する逃避潜時は、P群とM群の群間差はなかった。足底筋のwet/dry ratioは、術後4日目で両群において有意に増加し、特にM群でより強い浮腫がみられ、その浮腫はM群でのみ術後7日目まで遷延した。HE染色では、両群で術後4日目に足底筋への炎症細胞浸潤がみられたが、M群の方がP群よりも浸潤細胞数は有意に多かった。7日目になると、M群の浸潤細胞数は大幅に減少し、両群間に有意差はなかった。</p> <p>フローサイトメトリーの分析で、足底筋への浸潤細胞のほとんどは好中球やマクロファージなどの骨髄系細胞(CD45+, CD11+細胞)であることが示された。術後4日目の骨髄系細胞および非骨髄系細胞の数はM群の方がP群よりも多かったが、7日目では骨髄系細胞と非骨髄系細胞の数が減少し、両群間に有意差はなかった。脊髄後角浅層および深層におけるc-Fos陽性ニューロンの数は、術後6時間で両群において増加した。術後24時間では、c-Fos陽性ニューロンは浅層においてほぼ消失したが、深層では両群ともSham群よりも多かった。しかし、術後6時間および24時間いずれにおいてもP群とM群の差はみられなかった。脊髄後角におけるIba-1の発現は、P群において術後4日目に増加し、7日目にSham群と同等に減少した。</p>

M群では、P群よりも、術後4日目ならびに7日目のいずれにおいてもIba-1の発現が有意に増加し、術後7日目までミクログリアが活性化していた。

【考察】術後4日目に、炎症性の機械性痛覚過敏に強く関与する骨髄系細胞がP群よりもM群で多く浸潤したが、術後7日目の骨髄系細胞の数はP群とM群で同等であったことから、M群の持続的な痛み行動は、炎症の持続だけでは説明できないことが明らかとなった。一方で脊髄でのIba-1の発現は、M群の方がP群よりも有意に強く長く増加しており、自発痛関連行動および機械性痛覚過敏の推移と一致した。このことから、筋損傷後の持続的な痛みは、損傷部位の炎症の遷延ではなく、脊髄におけるミクログリアの活性化に起因することが示唆された。筋損傷による局所の強い炎症が末梢神経の障害をもたらし、そこから分泌された炎症性メディエーターが末梢性感作を招き、脊髄神経の興奮性シナプス伝達が亢進し続けた結果、ミクログリアの活性化が長期化したと考えられた。マクロファージなどの骨髄系細胞や炎症性メディエーターを薬理的に阻害することは、術後痛の新たな治療戦略となりうると考えられるが、これらの細胞は創傷治癒に重要な役割を果たすために注意が必要である。本研究は、さまざまな組織が損傷して術後痛が遷延するという臨床に即した動物モデル開発の第一段階であったため、末梢組織の損傷や脊髄における検討は単純化されていた。今後は、より臨床に即した動物モデルの開発を行い、術後痛における末梢の局所炎症と中枢の神経炎症の関係をより深く検討する必要がある。