（ 様式D－２ ）
（ 別　　紙 ）

令和　５年度　海外派遣研究員研究報告書

令和 6 年 3 月 19 日

日本大学理事長　　殿
日 本 大 学 学 長　　殿

所　　属　　歯学部（総合歯学研究所）
資格・氏名　　准教授・林　良憲
■本報告書の内容を公表することは了承しております。
（公表可の場合，チェック■すること）

令和５年度海外派遣研究員（　長期　）の研究実績を，下記のとおり報告いたします。

記

１　区　　分　　長期

２　研 究 課 題

皮膚の触覚受容器に着目した新たな神経障害性疼痛のメカニズム解明に関する研究

３　派 遣 期 間　　西暦 2023 年 5 月 26 日　～　2024 年 2 月 8 日

４　派　遣　先　　米国

５　研 究 目 的

末梢神経が損傷を受けた後、器質的な障害が治癒したにもかかわらず、長期的に痛みが持続することがある。これは神経障害性疼痛と呼ばれ、適切な治療に苦慮する病態である。既存の治療薬が奏功しないために新たな治療方法の確立が必要である。末梢皮膚で受容した情報が一次感覚神経、脊髄を介して脳へと伝達されることで我々は痛みを認識する。動物実験によって、神経障害性疼痛時の中枢神経系（脳および脊髄）における変化に関して多くの情報が蓄積されてきている一方で、中枢神経系の機能抑制だけでは神経障害性疼痛の改善が不十分である。そのため、末梢神経系における変化も神経障害性疼痛の理解に重要であることが考えられるが、情報が非常に限られている。そこで本研究では、神経障害性疼痛時に末梢神経系でどのような変化が生じているのか解析を行うことを目的とした。末梢神経の軸索からの電気生理学的解析は構造的に微小であるために一般的な技術では不可能である。また、損傷を受けた軸索は非常に脆い。本解析を可能にするためには軸索機能解析の第一人者である Dr. Gu のもとで既存の技術を修得し、さらにこの技術を発展させる必要があった。以上の理由で、アラバマ大学バーミングハム校で研究を行った。

（ 様式D－２ ）

6　研 究 概 要

末梢神経はミエリンを持つ有髄神経とミエリンを持たない無髄神経に分類される。一般的に有髄神経の Aδ と無髄神経の C 線維が痛覚を伝導する神経として知られている。しかし、神経障害性疼痛は触覚を痛覚として誤認識することから触覚を担う Aβ 線維も神経障害性疼痛に関与していると考えられている。神経障害性疼痛時において末梢神経でどのような変化が生じているのかこれまでに情報がない。末梢神経の軸索からのパッチクランプ法は特殊な技術が必要であるため、軸索からのパッチクランプ法を確立している Dr. Gu のもとで pressure-patch-clamp 法を修得し、神経障害性疼痛時における Aβ 線維の電気生理学的特性を解析し、Aβ 線維で生じる変化の基礎的な情報の蓄積を行うことを目的とした。

実験には 3 カ月齢の Sprague-Dawley 雄性ラットを用いた。2%イソフルランによる麻酔下で坐骨神経を剖出して 5-0 絹糸で結紮を行うことで、神経障害性疼痛モデルである Chronic construction injury (CCI)モデルを作製した。Sham モデルは坐骨神経を剖出し、結紮を行わずに患部を閉創した。術後 2 週間後に坐骨神経を摘出し、坐骨神経周囲の結合組織を除去した後に、パッチクランプ記録チャンバーに設置した。顕微鏡下でミエリンとミエリンの隙間に位置するランビエ絞輪に対してパッチ電極を挿入し、whole-cell モードを形成した。記録は voltage-clamp モードおよび current-clamp モードにて電流解析および電気生理学的性質の解析を行った。また、摘出した坐骨神経の一方に吸引型刺激電極を設置し、刺激誘発活動電位をランビエ絞輪から記録することで伝導速度を計測した。電気生理学的記録後に電位依存性 K^+ チャネル阻害薬である 4 アミノピリジン (4-AP) とテトラエチルアンモニウム (TEA) を処置し、再度記録を行った。

7　研究結果・成果

Aβ 線維および Aδ 線維のランビエ絞輪の間隔は CCI 後に拡大した（Figure 1A-C and Figure 2A-C）。この時に Aβ 線維では CCI 後に伝導速度がほとんど観察されなかった（Figure 1D,E）。一方で、Aδ 線維では CCI 後に伝導速度が観察されないものが一部認められたが、有意に伝導速度が低下した（Figure 2D,E）。

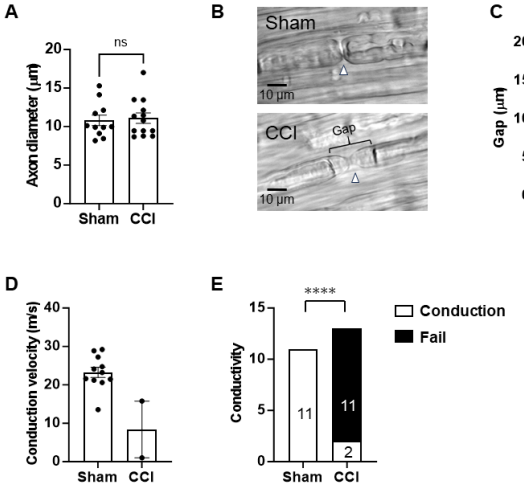


Figure 1. CCI による Aβ 線維のランビエ絞輪の構造変化 **A**, 記録した軸索の直径。ns: not significant (unpaired *t*-test)。 **B**, Sham ラットおよび CCI ラットのランビエ絞輪。矢頭：ランビエ絞輪。**C**, Sham ラットと CCI ラットのランビエ絞輪の間隔。****$p < 0.0001$ (unpaired *t*-test). **D**, 伝導速度。**E**, 伝導率 ****$p < 0.0001$ (Chi-square test).

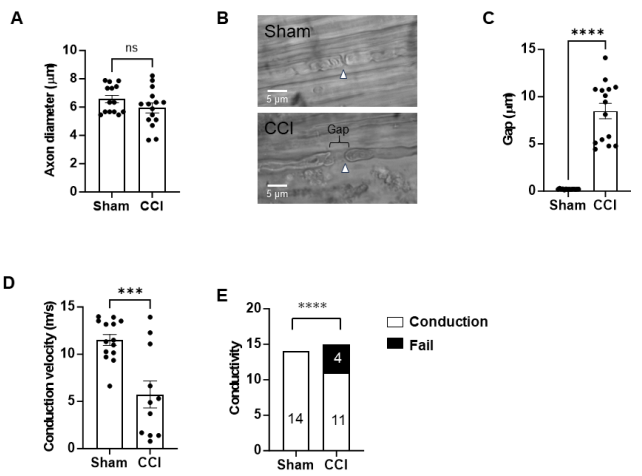


Figure 2. CCI による A δ 線維のランビエ絞輪の構造変化 **A**, 記録した軸索の直径。ns: not significant (unpaired *t*-test)。 **B**, Sham ラットおよび CCI ラットのランビエ絞輪。矢頭：ランビエ絞輪。**C**, Sham ラットと CCI ラットのランビエ絞輪の間隔。****$p < 0.0001$ (unpaired *t*-test). **D** 伝導速度 ***$p < 0.001$ (unpaired *t*-test)。**E**, 伝導率 ****$p < 0.0001$ (Chi-square test)。

Aβ 線維および Aδ 線維のランビエ絞輪において CCI 後には外向き電流が増加した（Figure 3A-C and Figure 4A-C）。いずれの場合もランビエ絞輪の間隔拡大と外向き電流の大きさに正の相関が認められた（Figure 3D and Figure 4D）。Sham ラットにおいて Aβ 線維および Aδ 線維のランビエ絞輪で認められる外向き電流は電位依存性 K チャネル阻害薬である TEA および 4-AP に対する感受性は非常に低かったが（Figure 3E,F and Figure 4E,F）、CCI ラットにおける外向き電流は TEA および 4-AP によって顕著に抑制された（Figure 3G,H and Figure 4G,H）。

〔7　研究結果・成果（つづき）〕

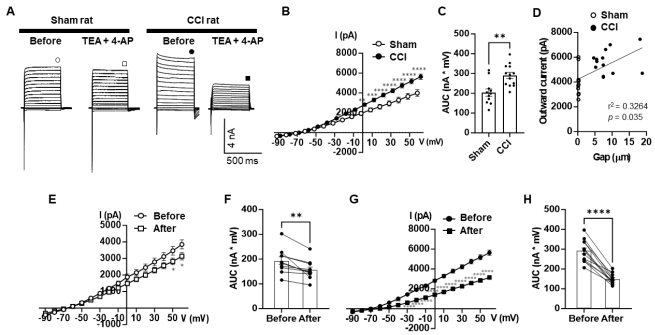


Figure 3. Aβ 線維のランビエ絞輪における CCI 後の外向き電流の増大 **A**, ランビエ絞輪における外向き電流のトレース。**B**, Sham ラットおよび CCI ラットの電流電圧曲線。$^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, $^{****}p < 0.0001$ (two-way ANOVA)。**C**, 電流電圧曲線の曲線下面積。$^{**}p < 0.01$ (unpaired *t*-test)。**D**, 外向き電流とランビエ絞輪間隔の相関関係。**E**, Sham ラットの外向き電流の電流電圧曲線。Before: TEA+4-AP 処置前; After: TEA+4-AP 処置前。$^{*}p < 0.05$ (two-way ANOVA)。**F**, E の曲線下面積。$^{**}p < 0.01$ (paired *t*-test)。**G**, CCI ラットの外向き電流の電流電圧曲線。Before: TEA+4-AP 処置前; After: TEA+4-AP 処置前。$^{**}p < 0.01$, $^{****}p < 0.0001$ (two-way ANOVA)。**H**, G の曲線下面積。$^{****}p < 0.0001$ (paired *t*-test)。

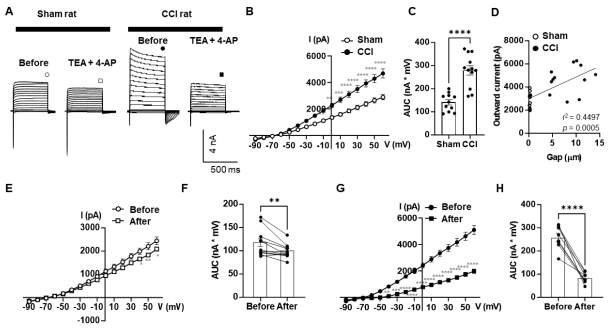


Figure 4. Aδ 線維のランビエ絞輪における CCI 後の外向き電流の増大 **A**, ランビエ絞輪における外向き電流のトレース。**B**, Sham ラットおよび CCI ラットの電流電圧曲線。$^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, $^{****}p < 0.0001$ (two-way ANOVA)。**C**, 電流電圧曲線の曲線下面積。$^{**}p < 0.01$ (unpaired *t*-test)。**D**, 外向き電流とランビエ絞輪間隔の相関関係。**E**, Sham ラットの外向き電流の電流電圧曲線。Before: TEA+4-AP 処置前; After: TEA+4-AP 処置前。$^{*}p < 0.05$ (two-way ANOVA)。**F**, E の曲線下面積。$^{**}p < 0.01$ (paired *t*-test)。**G**, CCI ラットの外向き電流の電流電圧曲線。Before: TEA+4-AP 処置前; After: TEA+4-AP 処置前。$^{**}p < 0.01$, $^{****}p < 0.0001$ (two-way ANOVA)。**H**, G の曲線下面積。$^{****}p < 0.0001$ (paired *t*-test)。

Aβ 線維および Aδ 線維のランビエ絞輪において Na^+チャネルを介した電流が CCI 後に低下した（Figure 5A,B and Figure 6A,B）。また、CCI 後の Na^+電流の低下はランビエ絞輪の間隔拡大に比例していた（Figure 5C and Figure 6C）。Aβ 線維および Aδ 線維のランビエ絞輪の Na^+電流は TEA および 4-AP により影響を受けなかった（Figure 5D-G and Figure 6D-G）。

〔７　研究結果・成果（つづき）〕

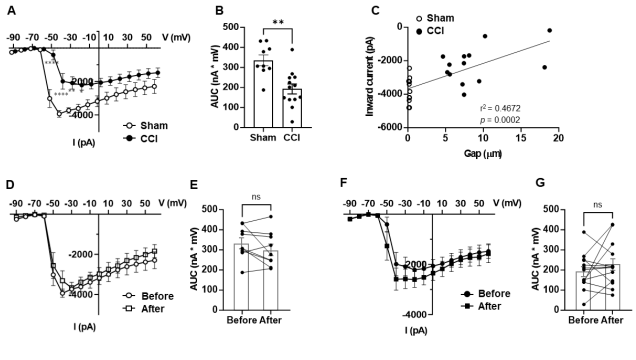


Figure 5. Aβ 線維のランビエ絞輪における CCI 後の Na^+電流の減少。**A**, Sham ラットおよび CCI ラットにおける Na^+電流の電流電圧曲線。**B**, 電流電圧曲線の曲線下面積。$^{**}p < 0.01$ (unpaired *t*-test)。**C**, Na^+電流とランビエ絞輪間隔の相関関係。**D**, Sham ラットの Na^+電流の電流電圧曲線。Before: TEA+4-AP 処置前; After: TEA+4-AP 処置前。**E**, D の曲線下面積。ns: not significant。**F**, CCI ラットの Na^+電流の電流電圧曲線。Before: TEA+4-AP 処置前; After: TEA+4-AP 処置前。**G**, F の曲線下面積。ns: not significant。

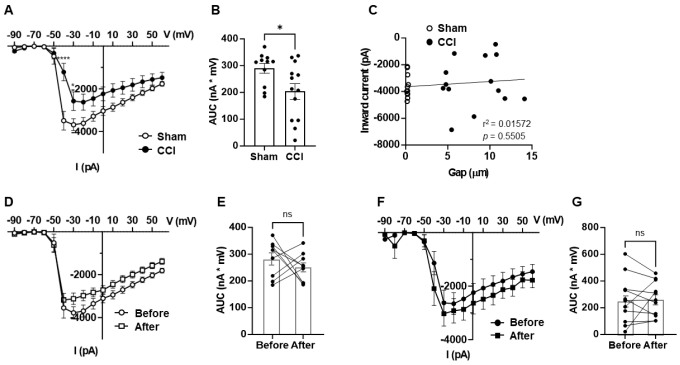


Figure 6. Aδ 線維のランビエ絞輪における CCI 後の Na^+電流の減少。**A**, Sham ラットおよび CCI ラットにおける Na^+電流の電流電圧曲線。**B**, 電流電圧曲線の曲線下面積。$^{*}p < 0.01$ (unpaired *t*-test)。**C**, Na^+電流とランビエ絞輪間隔の相関関係。**D**, Sham ラットの Na^+電流の電流電圧曲線。Before: TEA+4-AP 処置前; After: TEA+4-AP 処置前。**E**, D の曲線下面積。ns: not significant。**F**, CCI ラットの Na^+電流の電流電圧曲線。Before: TEA+4-AP 処置前; After: TEA+4-AP 処置前。**G**, F の曲線下面積。ns: not significant。

Aβ 線維および Aδ 線維のランビエ絞輪において電流パルス誘発性の活動電位を測定した。Aβ 線維のランビエ絞輪において CCI 後に活動電位の基電流の増大、活動電の振幅の低下そして膜抵抗の低下が認められた（Figure 7）。また、TEA および 4-AP によって活動電位の幅の拡大、基電流の低下、膜抵抗の増加が認められた（Figure 7）。Aδ 線維のランビエ絞輪における活動電位は CCI 後に閾値の上昇、既電流の増加が認められた（Figure 8）。また、TEA および 4-AP によって活動電位の幅の増大、基電流の低下、膜抵抗の増加が認められた（Figure 8）。

〔７　研究結果・成果（つづき）〕

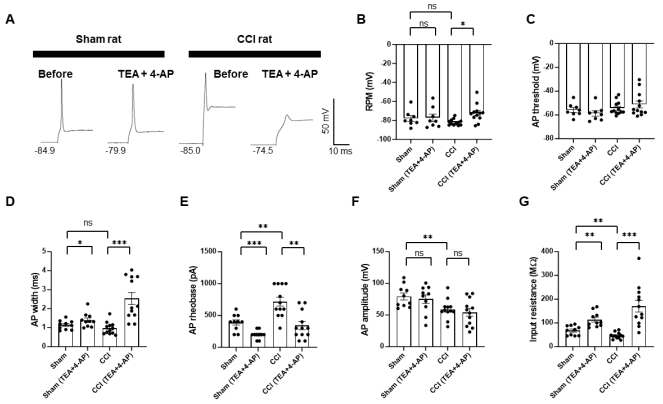


Figure 7. Aβ 線維のランビエ絞輪における CCI 後の電気生理学的特性。**A**, Sham ラットおよび CCI ラットにおける活動電位のトレース。**B**, 静止膜電位。**C**, 活動電位の閾値。**D**, 活動電位の幅。**E**, 活動電位の基電流。**F**, 活動電位の振幅。**G**, 膜抵抗。*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$, ns: not significant (one-way ANOVA)。

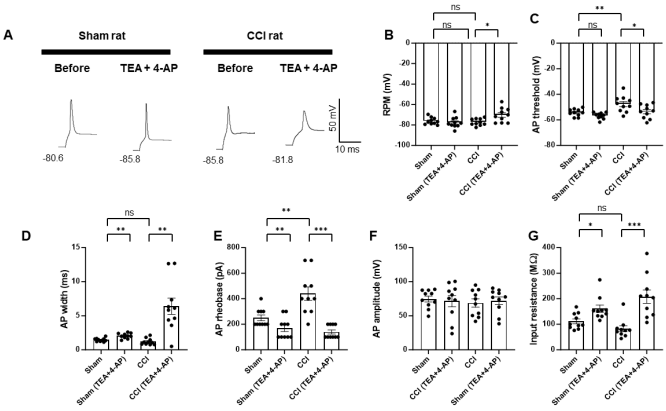


Figure 8. Aδ 線維のランビエ絞輪における CCI 後の電気生理学的特性。**A**, Sham ラットおよび CCI ラットにおける活動電位のトレース。**B**, 静止膜電位。**C**, 活動電位の閾値。**D**, 活動電位の幅。**E**, 活動電位の基電流。**F**, 活動電位の振幅。**G**, 膜抵抗。*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$, ns: not significant (one-way ANOVA)。

Aβ 線維および Aδ 線維の伝導速度に対する TEA および 4-AP の作用を検討した。損傷部位より末梢側を刺激して得られる活動電位を損傷部位より中枢側のランビエ絞輪から記録し、伝導速度を計算した。Aβ 線維において Sham では TEA および 4-AP の有無により伝導速度に変化は認められなかったが（Figure 9A-D）、CCI 後には TEA および 4-AP 存在下で伝導速度は有意に速くなった（Figure 9E-G）。Sham ラットの Aδ 線維では伝導速度は TEA および 4-AP の有無により伝導速度に変化は認められなかったが（Figure 10A-C）、CCI 後では TEA および 4-AP 存在下で伝導速度は有意に速くなった（Figure 10D-F）。

以上の結果より、坐骨神経が損傷した際にはランビエ絞輪の間隔が広がることによって伝導に異常が生じることが明らかになった。また、神経が損傷を被ると特にＡβ線維に異常が生じることも分かった。触覚を担うＡβ線維は脊髄において痛覚を担う神経回路に対して抑制的に働くことが知られている。神経が損傷した場合、Ａβ線維の脊髄への入力が消失することで内在的な痛覚の抑制回路の消失へとつながり、結果として痛みの神経回路が増幅されている可能性が考えられる。現時点では、ランビエ絞輪で生じる異常が神経障害性疼痛にどのように関与しているかは不明であるため、さらなる検討が必要である。しかしながら、神経障害性疼痛の病態を理解する上で基礎的な情報を得ることができ、今後の研究の礎となると考える

本研究内容は論文投稿準備中であるため、準備が完了し次第、科学雑誌へと投稿する予定である。

以　上