

## 【要約】

ラット腕神経叢引き抜き損傷モデルにおける  
抗 p75NTR 抗体濃度別投与の疼痛行動、後根神経節  
および脊髄グリア活性に対する効果

千葉大学大学院医学薬学府

先進医療科学専攻

(主任：高橋 和久 教授)

小林 倫子

## 【はじめに】

腕神経叢引き抜き損傷 (brachial plexus avulsion) は高率に重篤な神経因性疼痛を引き起こす。この痛みの特徴として、受傷後早期に発症し長時間すること、常に激しい痛みと間欠的な電撃痛を生じることが挙げられる。しかし、消炎鎮痛剤やオピオイドに治療抵抗性であり、しばしば治療に難渋する。

Nerve growth factor(NGF)は神経栄養因子の1つであり、疼痛を惹起する。NGFには tropomyosin-related kinase A receptor(TrkA)および p75 neurotrophin receptor(p75NTR)の2つの受容体がある。過去に抗 NGF 抗体の臨床試験が行われたが、重大な副作用を認めた。そこで本研究では NGF のもう一つの受容体 p75NTR の中和抗体である抗 p75NTR 抗体を投与することにより、疼痛を抑制できるのではないかと仮説を立て、実験を行った。

## 【方法】

一連の実験は千葉大学動物実験委員会の承認を得て行った。

### モデル作成

雄性 Wistar ラット 6 週令を用い、(a)sham 群、(b)BPA 群、(c)1.0 $\mu$ L anti-p75NTR 群、(d)50 $\mu$ L anti-p75NTR 群の 4 群 (各群 n=5) とした。

ラット BPA モデルの作成は Rodrigues-Filho によって報告された方法に準じて行った。BPA 群は全身麻酔下に右鎖骨上で鎖骨と平行に皮切をおき、大胸筋を切離し腕神経叢を展開。下神経幹を周囲組織と剥離し、鑷子で下神経幹を把持し脊髄から引き抜き抜き、閉創した。モデル作成 1 週間後に生理食塩水 1000 $\mu$ L を腹腔内に投与した。Sham 群は右下神経幹の展開のみを行い、1 週間後に生理食塩水 1000 $\mu$ L を腹腔内に投与した。anti-p75NTR 群 (1.0 $\mu$ L および 50 $\mu$ L) は BPA モデルを作成し、1 週間後にそれぞれ抗 p75NTR 抗体を 1.0 $\mu$ L、50 $\mu$ L を投与した。

### 行動学的評価

von Frey test による疼痛行動評価を術前、術後 3 日、生理食塩水あ

るいは抗 p75NTR 抗体投与後 1、6、12、48 時間、3、6、9、12、15 日目に行った。Von Frey フィラメントを用い細い方から太い方に順に患側前足足底 (C6、C7 領域) に機械刺激を与え、逃避反応を認めた最小値を疼痛閾値とし、1 匹につき 3 回行いそれぞれの平均値を算出した。

#### 免疫組織学的評価

生理食塩水あるいは抗 p75NTR 抗体投与後 3 日、15 日目に還流固定後、C7 脊髄を採取し、Immunofluorescence using antibodies against ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1、ミクログリアのマーカー) で免疫組織化学染色を行った。C7 脊髄後角における Iba1 陽性ミクログリア数を計測し、各群 5 切片の平均値を算出した。

#### 統計解析

行動学的評価および免疫組織学的評価の結果を Kruskal-Wallis test を行い、post hoc test として Mann-Whitney U test を用い 4 群間を比較した。p<0.05 を有意差ありとした。

### 【結果】

#### 行動学的評価

Sham 群に比べ BPA 群は術後から投与後 15 日まで疼痛閾値の低下を認めた。1.0 $\mu$ L anti-p75NTR 群は投与後 3、9、12 日目に BPA 群と比べ有意な改善を認めた。50 $\mu$ L anti-p75NTR 群は投与後 6 時間、48 時間、3 日、9 日、12 日目に有意な改善を認めた。

#### 免疫組織学的評価

Sham 群に比べ BPA 群では投与後 3、15 日目ともに有意に Iba1 陽性ミクログリア数が増加した。1.0 $\mu$ L および 50 $\mu$ L anti-p75NTR 群は抗 BPA 群と比べ投与後 15 日目のみ有意に減少していた。

### 【考察】

本研究ではラット BPA モデルに対して抗 p75NTR 抗体を腹腔内投

与し、行動学的評価では疼痛抑制効果、また免疫組織学的評価ではグリア活性の抑制を認めた。

脊髄グリア細胞に関して過去にマウス BPA モデルの脊髄でグリア細胞が上昇したという報告や、活性化ミクログリアをラット髄腔内に投与するとアロデニアを呈したという報告があり、神経障害性疼痛への脊髄グリア細胞の関与が示されている。また、Zhuang らは神経障害性疼痛の誘導期にミクログリアが活性化しその後アストロサイトが活性化すると報告した。本研究では投与後 3 日目でミクログリア活性は抑制されなかったが、これは早期には活性が強すぎたために抑制できなかった可能性が考えられた。

我々は以前にラット BPA モデルに対して、抗 p75NTR 抗体をモデル作成当日に損傷局所に投与し、その疼痛抑制効果を報告した。しかし、実際の臨床では抗 p75NTR 抗体を受傷当日に損傷局所に投与することは困難である。腕神経叢引き抜き損傷を治療可能な施設に患者が受診するのには少なくとも 1 週間を要すると思われ、本研究ではモデル作成 1 週間後に抗 p75NTR 抗体の腹腔内投与を行った。抗 p75NTR 抗体の腹腔内投与は疼痛およびグリア活性を抑制した。以上より p75NTR は BPA に起因する神経障害性疼痛治療の標的になる可能性があると考えられた。