

主論文の要旨

**Pathological mechanism of musculoskeletal
manifestations associated with CRPS type II
: An animal study**

〔 複合性局所疼痛症候群 **type II** における
運動機能障害発生機序についての動物実験による検討 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
運動・形態外科学講座 手の外科学分野

(指導：平田 仁 教授)

太田 英之

【緒言】

複合性局所疼痛症候群(Complex regional pain syndrome : CRPS) type IIは, ジストニアや関節拘縮などの関節可動域の制限を含めた運動機能障害を発生させる. いまだ解明に至っていない CRPS における運動機能障害の発生機序に関しては, 末梢神経のみならず中枢神経の関与も示唆されるが, 最近では CRPS の難治性疼痛に対する不動化の関与が注目され始めている. 本研究の目的は 動物モデルを用いて, 機能的, 病理組織学的な評価や, 炎症性サイトカインの発現などを確認することで, CRPS における運動機能障害発生機序解明のための一助とすることである.

【対象及び方法】

1. 動物モデル

生後 10 週, 平均体重 350g のオスの成獣 Wister rat を用いた.

2. 動物モデルの群分け

健常ラットの N 群 (NG), 皮膚切開と, L5 神経根, 大腿骨, 及び脛骨の露出のみを行った Sham 手術群 (ShG), 膝関節屈曲位内固定 (Fig. 1) を行った I 群 (IG), 神経障害性疼痛 model として, SNL を行った S 群 (SG), SNL と拘縮を併施した, S+I 群 (S+IG) に分けた.

3. 痛覚評価

疼痛逃避行動評価として, モノフィラメントを用いた von Frey hair test を行い, 手術側の後肢の皮膚痛覚閾値を計測した.

4. 膝関節拘縮の評価

ラットを, 専用の膝関節角度測定器に固定し, レントゲンを撮影したうえで, そのレントゲン画像を画像解析ソフト (ImageJ) で解析し, 膝関節角度測定を行った. (Fig. 2)

5. 組織学的評価

パラフィン包埋して切片を作成した. マッソントリクローム染色を行ったラット大腿部の病理標本で, 画像解析を行い, 筋組織と線維組織の面積を測定した.

6. 免疫組織学的評価

免疫染色で NGF 発現の局在を確認した.

7. ELISA を用いたタンパク定量

ELISA による炎症性サイトカイン (NGF, TGF- β 1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, CGRP, サブスタンス P) の発現量測定を行った.

8. NGF 中和抗体投与下での Real-time PCR による mRNA 発現状況の確認

NGF の影響を確認するために, 中和抗体を使用後疼痛閾値の評価と Real-time PCR による mRNA 発現状況の確認を行った.

【結果】

1. 神経障害による異常痛は, 拘縮が合併することで悪化する

von Frey test では、SG と S+IG は 2 週目以降疼痛閾値が有意に低かった。S+IG では、2 週目以降も疼痛閾値の低下が遷延していた。(Fig. 3)

2. 関節の不動化は筋性拘縮を誘発するが、神経損傷が合併することで、さらに悪化する

膝関節角度の比較においては S+IG が有意に拘縮となっていた。S 群に関節拘縮は存在しなかった。すなわち、神経障害単独では関節拘縮が一切起きていなかった。拘縮の原因鑑別のために、生存下、股関節離断後、関節包のみにした条件下で角度測定を行った結果、関節包のみの条件下では拘縮角度に有意差はなく、大腿周囲筋が存在するときのみ拘縮が存在した。このことから、筋性拘縮が主因であると考えられた。(Fig. 4)

3. CRPS における筋性拘縮は、筋線維の変性と線維化が原因である

マッソントリクローム染色を行ったラット大腿部の病理標本で画像解析を行い、筋組織と線維組織の面積を測定した。S+IG で、線維組織面積は有意に増加していた。これらの結果から、不動化が関節拘縮の発生要因であり、筋性拘縮の原因は筋線維間や、筋膜組織の線維化が招く筋の弾性低下であると考えられた。(Fig. 5)

4. 免疫組織学的評価

免疫染色で NGF 発現の局在を確認した。膝関節周囲組織において NG では、NGF 発現が確認できる筋組織はほとんど存在しなかったが SG では皮下に近い部位、骨に近い部位や筋萎縮のある部位で NGF 発現を認めた。S+IG でも同様に発現を認めたが、全体的に発現が強い印象で、また、大腿部に強い発現がみられる傾向にあった。(Fig. 6)

5. NGF と炎症性サイトカインの発現変化について

ELISA の結果を示す。NGF においては、NG, SG, S+IG の順に発現量の増加を認めた。特筆すべき点として、L5 神経根の支配領域外である、大腿四頭筋でも発現量の増加を認めた。また、健側の大腿四頭筋においても発現量の増加を認めた。NGF のほか、pro-inflammatory cytokine の調査も行った。TNF- α においても同様に、発現量の増加を認めたが、健側での上昇は認めなかった。CGRP, サブスタンス P, IL-1 β , IL-6 においても TNF- α と同様の結果であった。組織形態学評価において、組織の線維化が進んでいたことから、TGF- β 1 の発現量も調査した。これも、他のサイトカインと同様の発現量増加を認めた。(Fig. 7)

6. NGF 中和抗体は、CRPS における異常痛を緩和する

NGF の影響を確認するために、中和抗体を使用後疼痛閾値の評価を行った。中和抗体を投与すると、投与後 1 週間程度は、疼痛が軽減することが判明した。(Fig. 8)

【考察】

国際疼痛学会 (International Association for the Study of Pain:IASP) は、神経損傷の有無で CRPS を二つのカテゴリーに分けているが、この分類の正当性

を支持するエビデンスは少なく、最近では CRPS type I も神経損傷の要素を含むのではないかとする報告もある。我々の研究は、CRPS における運動機能障害の発生機序を動物実験にて検証した。また、不動化ストレスが CRPS に与える影響についても調査した。我々の研究結果も踏まえると神経障害に関節の不動化を追加した動物モデル (S+IG) においては、有意に疼痛閾値が低下し、さらに関節拘縮も生じていることから、不動化ストレスは痛みと運動障害の双方に影響していることが証明された。加えて、SG に関節拘縮は存在せず、S+IG も SG と同様に疼痛反応が有意に強いことから、神経損傷と拘縮は個々に生じたのちに疼痛反応に関与していると考えられる。また、病理組織学的な所見からは、CRPS における運動障害において筋組織の変化は非常に重要な部分を占めていると考えられる。疼痛逃避行動や、病理組織学的評価以外にも我々は今回、NGF をはじめとする neuro-peptide や炎症性サイトカインが神経支配領域外の骨格筋に過剰発現していることを突き止めることができた。炎症性サイトカイン以外に、TGF- β 1 の発現も S+IG が有意差をもって上昇していることから、不動化の影響は、痛覚過敏の加速や、異常痛の拡散のみならず、線維化の亢進ももたらすことが判明した。

【結論】

CRPS における運動障害発生のメカニズムについて調査した。神経損傷と拘縮は個々に発生したうえで疼痛反応に関与しており、不動化ストレスは疼痛と拘縮の双方に影響を及ぼしているものと考えられた。