

原著

神経因性疼痛モデルにおける疼痛関連行動と 神経損傷の相関に関する検討

塔依尔 阿不都哈德尔

日本医科大学大学院神経情報科学

Neuropathic Pain Intensity Depends on the Degree of Peripheral Nerve Injury in the Rat

Tayier Abuduhadeer

Neuropharmacology, Nippon Medical School, Graduate School of Medicine

Abstract

Partial peripheral nerve injury produces a persistent neuropathic pain which is difficult to relieve. In order to determine whether different degrees of peripheral nerve injury are related with the severity of neuropathic pain, we examined pain-related behaviors, histological changes and NGF in the skin in rats treated with different types of spinal nerve injury: tight ligation of the left L5 spinal nerve, incomplete ligation of the left L4 and L5 spinal nerves and incomplete crush of the left L4 and L5 spinal nerves.

In all model rats, the thresholds of paw withdrawal in response to mechanical and heat stimuli began to decrease on the injured side 1 day after the operation, and the decreases in the thresholds persisted for more than 1 month. Incomplete ligation and incomplete crush of the left L4 and L5 spinal nerves caused more severe allodynia and hyperalgesia than tight ligation of the left L5 spinal nerve on the injured side. In rats treated with incomplete crush, the threshold of withdrawal response to mechanical or heat stimuli was improved on day 32 after the operation as compared with that on day 15.

Histological analysis revealed that about 80% of the fibers in the sciatic nerve were injured after incomplete ligation and incomplete crush of the left L4 and L5 spinal nerves on day 15, while about 50% of the fibers were damaged by tight ligation of the left L5 spinal nerve. In accordance with pain-relieving, the sciatic nerve fibers regenerated to about 50% of the number of the intact sciatic nerve fibers on day 32 in the crush model.

Nerve growth factor (NGF) in the skin of the hindpaw on the injured side was accumulated after incomplete ligation and incomplete crush of the left L4 and L5 spinal nerves, but not tight ligation of the left L5 spinal nerve, on day 15 after the operation, possibly due to impairment of transport via unmyelinated primary afferents. Regeneration of the sciatic nerve alleviated the accumulation of NGF in the injured side hindpaw skin on day 32.

The present results suggested that the severity of neuropathic pain was related with the degrees of both degeneration and/or regeneration of myelinated fibers and of functional damage of unmyelinated fibers.

(J Nippon Med Sch 2004; 71 : 399-407)

Key words: nerve degeneration, nerve growth factor, neuropathic pain, nerve regeneration, spinal nerve injury

Correspondence to Tayier Abuduhadeer, Department of Pharmacology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8603, Japan

E-mail: tayier@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jnms/>)

緒言

日常臨床において、部分的な末梢神経障害を受けた後に持続する疼痛を訴える患者にしばしば遭遇する。痛覚伝達に関わる神経回路が損傷をうけて生じるこのような痛みを神経因性疼痛と総称するが、現在までさまざまな治療法が試みられているものの、満足のいく薬物治療法が未だ見つかっていないのが現状である¹。近年、神経因性疼痛の発症、維持に関わる神経機構について精力的に研究が行われ、多様な分子レベルおよび機能上の変化が明らかになってきたものの²、未だ十分にその機構は解明されていない。

神経因性疼痛の発症機構をより詳細に解明するために、いくつかのモデル動物が開発されてきた。KimとChungは脊髄神経を結紮する(以下SNLモデル)³、Seltzerらは坐骨神経を部分的に結紮する⁴、Bennettらは坐骨神経を緩く数カ所にわたって結紮する(以下CCIモデル)⁵、あるいはDecosterdとWoolfは腓腹神経を残し脛骨神経と総腓腹神経を結紮切断することによって、ヒトの慢性神経因性疼痛に近い病態を作り出している。これらのモデル動物を用いることにより、病態に関わる多くの有益な情報を知ることができる。なかでもKimとChungによる脊髄神経結紮モデル(以下SNL)は、障害される神経群と非障害群が明確に区別されている点と手技的な変動が少ない利点を持つ³ことから汎用されている。このモデルでは脊柱へ入る直前の第5,6腰椎(以下L5, L6)あるいはL5脊髄神経の結紮が通常行われている。これは下肢足底の侵害受容情報が坐骨神経を経て主にL4, L5, 1部L3, L6レベルの脊髄に伝達されるためである。L4脊髄神経の下肢足底における侵害受容への関与は大きいもののL4脊髄神経の完全結紮は近位筋の運動麻痺を惹き起こすため³、L4結紮は行われてこなかった。

多くの神経因性疼痛を持つ患者は部分的な神経損傷によって疼痛が発症するが、神経の完全切断では幻肢痛などの異なる症状が出現する。また神経損傷の回復に伴って疼痛が緩和する症例も見られる。すなわち神経の損傷の程度と疼痛の出現強度はある範囲において相関すると推測されるが、モデル動物を用いて系統的に調べた報告は少ない。GuilbaudらはCCIモデルを用いて坐骨神経の形態の時間的経過を検討し、疼痛関連行動がA- δ 径の線維群の変性および再生変化と相関していることを報告しているが⁷、モデル間の神経損傷の程度と疼痛の相関の検討は行われていない。

SNLモデルの神経損傷はL5あるいはL5, 6に制限されたものであるため、前述のCCIモデルで行われたような実験報告はない。著者は予備実験においてL4を不完全に結紮することで、従来より損傷の強いSNLタイプの疼痛モデルを作製することに成功した。このモデルは同系の疼痛モデルにおいて坐骨神経の損傷の程度と疼痛の関連を解明する良い実験系になると考えられた。さらに神経因性疼痛において、損傷を受けた線維群が残存した無傷の線維群に対し作用し、その結果、無傷の神経群が疼痛の発症維持に重要な役割を果たすとする仮説がある⁸。この仮説を支持する結果としてSNLモデルにおいて第5脊髄神経の損傷によって惹き起こされた疼痛閾値の低下がL4後根神経の切断で回復することが報告されている⁹。しかしながら、どのくらいの割合のどのタイプの神経線維が初期疼痛発現に必要なのかは不明である。Liuらは電気生理学的に異所性発火を観察する限り、C線維の関与無しに神経因性疼痛が起こるとして¹⁰、A線維の役割を重視しているが、この点は議論が分かれるところである⁸。この問題解決に当たっては、さまざまな角度からC線維機能の損傷程度を併せて知ることが重要である。侵害受容は無髄一次求心性神経によって伝達されるが、一次求心性神経はその生存因子依存性によって大きく2群に分けられる。神経栄養因子の1つである神経成長因子(NGF)は侵害受容に関わる無髄一次求心性線維の約半分の線維群の生存を維持する神経栄養因子である¹¹。NGFは皮膚で産生され一次求心性線維の神経終末から取り込まれ、逆行性に輸送されることが知られているので¹²、皮膚におけるNGF含有量は無髄神経線維の機能指標の1つとなりうると思われる。

本研究では、部分神経損傷の程度および機能障害と疼痛関連行動との相関を明らかにする目的で、複数の部分神経損傷モデルラットを作成し、経時的な行動学的指標の変化を、組織学および生化学的指標と対比し検討した。

研究材料および方法

本研究は日本医科大学動物実験倫理委員会の承認の下に(承認番号15-10)、International Association for the Study of Painのガイドライン¹³に従って行われた。

1 神経因性疼痛モデルの作製

5週齢、雄性のSprague-Dawleyラット(体重120~

140 g) を 4 群に無作為に分けた。各群に対し以下のような処置を行った。(I 群)左 L5 脊髄神経完全結紮, (II 群)左 L4, 5 脊髄神経不完全結紮, (III 群)左 L4, 5 脊髄神経不完全挫滅, およびコントロール。ラットは手術前後とも個別に柔らかい床敷きのケージに入れ, 12 時間毎の明暗周期環境で飼育した。すべての手術はペントバルビタール (50 mg/Kg) の腹腔内投与による深麻酔下において行った。左傍脊柱筋を剝離し, L6 脊椎横突起を切除することによって脊髄神経を露出した。4-0 絹糸を用いて当該神経を 1 カ所で結紮した。不完全結紮は絹糸をピンセットで操作することで緩く結紮を行った。神経挫滅はニードルホルダーを用いて, 20 秒間当該神経を圧迫挫滅した。コントロール群は同様の手順で脊髄神経を露出した後, 再び皮膚を縫合した。すべての群において右側下肢は未処置とした。

2 疼痛関連行動実験

疼痛の指標として, 後肢足底に機械的刺激および熱刺激を行い, その刺激に対する回避行動を疼痛反応として観察した。術前日と術後 1, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 18, 20, 22, 25, 27, 29, 32 日に検査を行った。機械的刺激は異なった屈曲圧 (0.0023 ~ 28.84 g) を持つ von Frey フィラメント (室町機械, 東京) を用いて弱い圧刺激から順次検査し, 足底を 1~2 秒間刺激した時に, 回避行動 (足を引っ込める) を 5 回示した最小の力を疼痛閾値とした。また熱刺激は Plantar Test (Ugo Basile, イタリア) を用いて行い, 熱輻射開始後, 回避行動までの時間を片足ずつ交互に 5 分間隔で 3 回測定し, 平均値を閾値とした。

3 組織学的検討

末梢神経線維の染色は Guilbaud らの論文⁷ に従った。

手術後 15 日あるいは 32 日後にラットを深麻酔下において, 左坐骨神経を L6 脊髄神経が合流した部位から遠位にかけて約 8 mm 採取し, 直ちに 4% の 2.5% glutaraldehyde (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) に浸し 24 時間処理した。その後 1% osmium tetroxide で 1.5 時間後固定し, アルコールで脱水後, エポキシ包埋した。1 μ m の薄切横断標本を作製し toluidine blue で染色した。標本は光学顕微鏡下で観察し, Photoshop (Adobe, アメリカ) で画像を取り込み, 全有髄神経軸索数を算定した。

4 NGF エンザイムイムノアッセイ (EIA)

two-site EIA により NGF 蛋白量を測定した¹⁴。両下肢足皮膚を切除し, ただちに液体窒素で急速凍結した後, 測定まで -80℃ で保存した。1 cm² の皮膚を 450 μ l のプロテアーゼ阻害薬 (Complete Mini EDTA-free; Roche, アメリカ) を含むホモジナイズバッファー (50 mM Tris, 0.5 M NaCl, 0.3% Triton X-100, pH 7.5) 中でホモジナイズし, 15,000 rpm, 4℃ で 20 分間遠心して得られた上清を NGF の測定に用いた。96 穴プレートは 1 穴あたり 20 ng の抗 NGF ポリクローナル抗体 (Promega, アメリカ) で 1 晩 4℃ でコーティングした後, EIA バッファー (50 mM Tris, 0.5 M NaCl, 0.3% Triton X-100, 1% BSA, 1% gelatin, pH 7.5) で 4~3 時間以上ブロッキングした。この 96 穴プレートに皮膚抽出液あるいは NGF 標準液 (1~1,000 pg) 100 μ l を入れ室温で 8 時間インキュベートした後, Wash バッファー (BSA なしの EIA バッファー) で 3 回洗浄し, 100 μ l β -ガラクトシダーゼ結合抗 NGF モノクローナル抗体 (5 μ g/ml, Roche, ドイツ) を加えて室温で 12~18 時間反応させた。 β -galactosidase 活性を測定するために 200 mM 4-methylumbelliferyl- β -galactoside, 50 mM sodium phosphate, 10 mM MgCl₂, pH 7.3) を基質として室温で 3~5 時間, 遮光状態で酵素反応を行い, 反応産物の蛍光を励起波長 360 nm, 蛍光波長 465 nm で測定した (Spectraflour Plus, Tecan, オーストリア)。実験毎に標準曲線を描き, これに従って NGF 量を測定した。

5 統計処理

実験データは平均値 \pm 標準誤差で表した。多重比較においては Tukey-Kramer test を用いて統計処理を行った。P < 0.05 を統計的有意差ありとした。

結果

1 疼痛関連行動実験

コントロール群のラットは術前の 5 週齢の時点で Von Frey フィラメントによる機械的刺激に対する疼痛閾値の平均値が両肢ともに 28.8 \pm 0 g であった。その閾値は術後 4~6 日目に左下肢で軽度低下を示したが, その後回復し, 1 カ月間変化がなかった (Fig. 1A, n=6)。また熱刺激に対する反応時間は左肢が 12.8 \pm 0.2 秒, 右肢が 12.7 \pm 0.4 秒であったが, この値はその後 1 カ月間有意に変化しなかった (Fig. 1B)。左 L4, 5 脊髄神経完全結紮では過去の L4 脊髄神経完全結紮の報告³ と同様に, 下肢の麻痺が見られたため, 実験

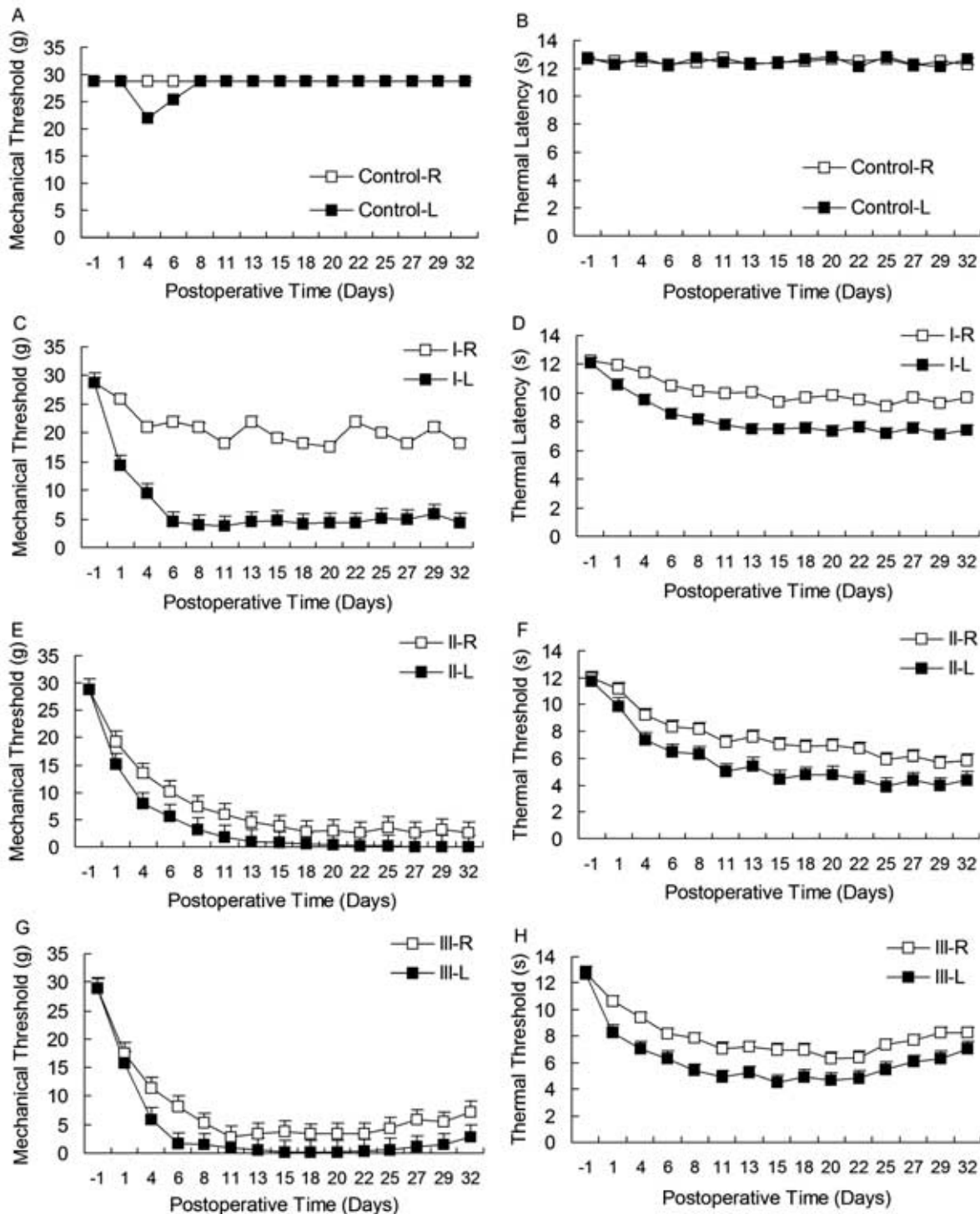


Fig. 1 Time courses of pain-related behaviors in the rats with nerve injuries.

Foot withdrawal was examined on the operated left side (closed squares) or intact right side (open squares) in response to mechanical (A, C, E, G) or thermal (B, D, F, H) stimuli applied to the corresponding hindpaw pad in the rats treated with sham operation (A, B, n=6), tight ligation of left L5 spinal nerve (group I, C, D, n=14), incomplete ligation of the left L4, L5 spinal nerves (group II, E, F, n=10) or incomplete crush of the left L4, L5 spinal nerves (group III, G, H, n=10). Mechanical stimulus was applied with von Frey filaments and thermal stimulus was with a radiant heat equipment. Values are expressed as mean \pm s.e. mean. R, the right side, L, the left side.

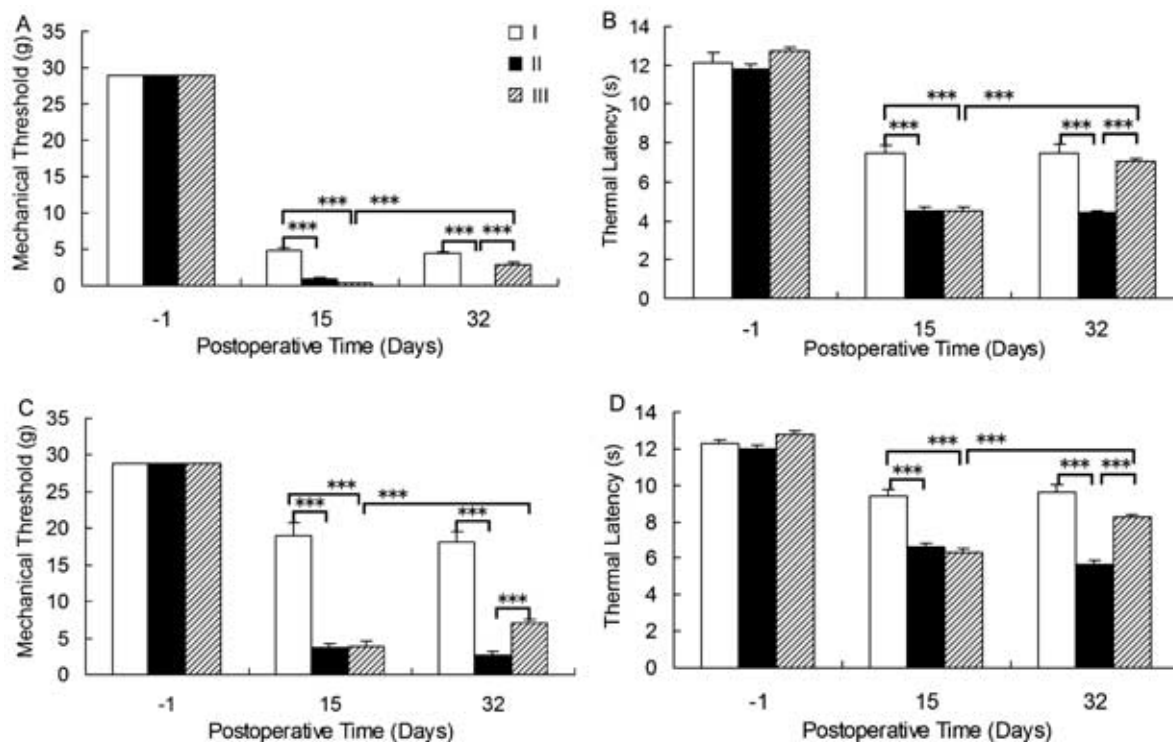


Fig. 2 Comparisons of pain-related behaviors between the rats with nerve injuries.

Foot withdrawal was examined on the operated left side (A, B) or intact right side (C, D) in response to mechanical (A, C) or thermal (B, D) stimuli applied to the corresponding hindpaw pad in the rats treated with tight ligation of left L5 spinal nerve (group I, open column, $n = 14$), incomplete ligation of the left L4, L5 spinal nerves (group II, closed column, $n = 10$) or incomplete crush of the left L4, L5 spinal nerves (group III, hatched column, $n = 10$) before, 15 days or 32 days after the operation. Mechanical and thermal stimuli were applied with von Frey filaments and a radiant heat equipment, respectively. Values are expressed as mean \pm s.e. mean. *** $P < 0.001$ compared with values of each group by Tukey-Kramer multiple comparisons.

を継続しなかった (結果未発表).

左 L5 脊髄神経完全結紮 (Fig. 1C, $n = 14$), 左 L4, 5 脊髄神経不完全結紮 (Fig. 1E, $n = 10$), 左 L4, 5 脊髄神経不完全挫滅 (Fig. 1G, $n = 10$) では術後 1 日目より機械的刺激に対する疼痛閾値の低下が左下肢で出現し, 1 カ月間続いた. しかしながら, 不完全挫滅では閾値の回復傾向が認められた (Fig. 1G). 左 L4, 5 脊髄神経不完全結紮および不完全挫滅 (Fig. 1E と G) では, 非手術側である右下肢も同様に疼痛閾値の減少が認められ, 熱刺激に対する過敏性についても同様の傾向が認められた. すなわち, 左 L5 脊髄神経完全結紮 (Fig. 1D), 左 L4, 5 脊髄神経不完全結紮 (Fig. 1F), 左 L4, 5 脊髄神経不完全挫滅 (Fig. 1H) のすべての神経損傷モデルで熱刺激に対する反応時間の短縮が見られ, 左 L4, 5 脊髄神経不完全結紮 (Fig. 1F) および不完全挫滅 (Fig. 1H) では対側の痛覚過敏も認められた.

組織学的および生化学的検討を行った術後 15 日と 32 日目について, 各神経損傷モデル間の疼痛行動の

変化を比較した (Fig. 2). 損傷側の機械刺激に対する閾値は, 左 L5 脊髄神経完全結紮 (15 日, 4.8 ± 0.4 g, 32 日, 4.4 ± 0.3 g) に比べ, 左 L4, 5 脊髄神経不完全結紮 (15 日, 0.7 ± 0.2 g, 32 日, 0.04 ± 0.02 g) および不完全挫滅 (15 日, 0.3 ± 0.2 g, 32 日, 2.9 ± 0.3 g) では 15 日と 32 日目ともに有意に低下していた (Fig. 2A, $p < 0.001$). さらに左 L4, 5 脊髄神経不完全挫滅では 32 日目では 15 日に比べ疼痛行動の回復が観察され ($p < 0.001$), L4, 5 脊髄神経不完全結紮との比較でも 15 日では差が見られなかったものの, 32 日目では有意に疼痛が軽減していた ($p < 0.001$). 損傷側の熱刺激に対する過敏性 (15 日, 左 L5 脊髄神経完全結紮, 7.5 ± 0.1 秒, 左 L4, 5 脊髄神経不完全結紮, 4.5 ± 0.2 秒, 左 L4, 5 脊髄神経不完全挫滅, 4.5 ± 0.2 秒, 32 日, 左 L5 脊髄神経完全結紮, 7.4 ± 0.1 秒, 左 L4, 5 脊髄神経不完全結紮, 4.4 ± 0.1 秒, 左 L4, 5 脊髄神経不完全挫滅, 7.1 ± 0.1 秒) も同様の結果であった (Fig. 2B, $p < 0.001$). また左 L4, 5 脊髄神経不完全挫滅では, 対側の機械刺激に対する閾値および熱過

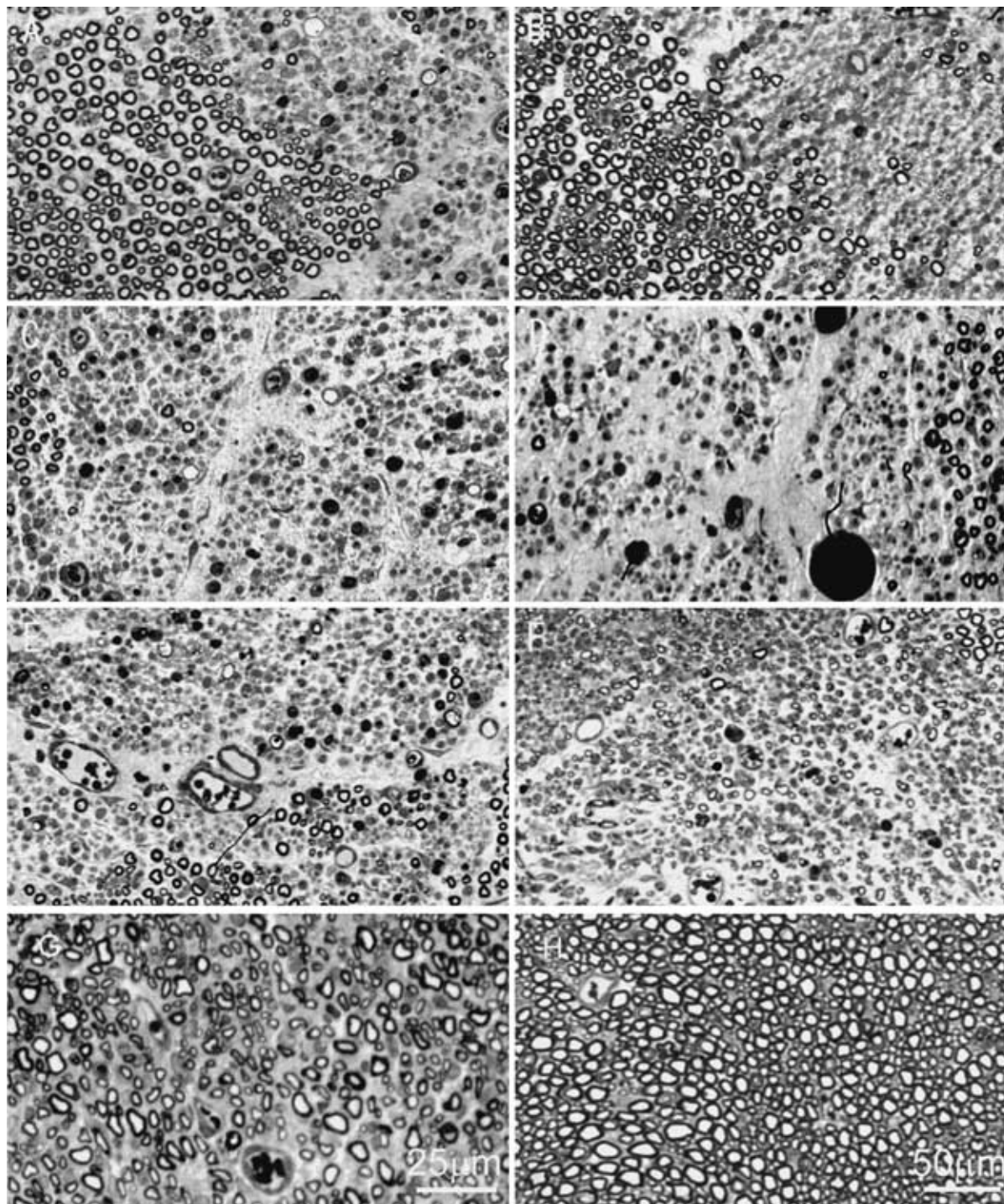


Fig. 3 Histological analysis of the sciatic nerve in the rats with nerve injuries.

Transverse sections of sciatic nerve in rats treated with tight ligation of left L5 spinal nerve (A, B, n = 3 for each group) incomplete ligation of the left L4, L5 spinal nerves (C, D, n = 3 for each group) or incomplete crush of the left L4, L5 spinal nerves (E, F, G, n = 3 for each group) on the day 15 (A, C, E) and 32 (B, D, F, G) and in sham-operated rats (H, n = 3) Epoxy resin sections of the sciatic nerve in 1 μm -thickness were stained with toluidine blue. Scale bar, 50 μm except 25 μm in G.

敏性も 15 日から 32 日目にかけて回復した (Fig. 2C , D , $p < 0.001$).

2 組織学的検討

坐骨神経は主に脊髄神経 L4 および 5 , 一部 L3 および 6 から構成されているので , 末梢神経の損傷の程度

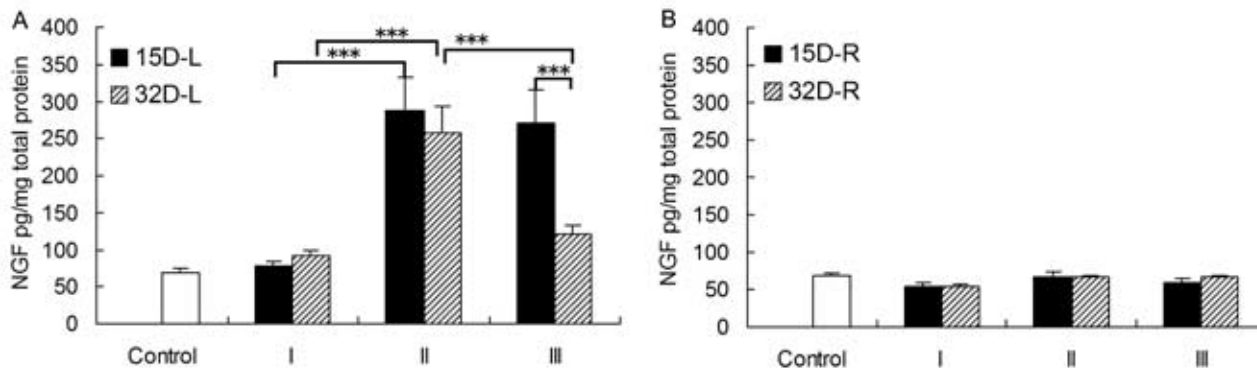


Fig. 4 NGF in the skin in the rats with nerve injuries.

Expression of NGF content was examined in the skin of left (A) and right (B) hind feet in the rats treated with tight ligation of left L5 spinal nerve(group I), incomplete ligation of the left L4, L5 spinal nerves(group II) or incomplete crush of the left L4, L5 spinal nerves(group III) 15 days(closed column, n = 5 for each model) or 32 days(hatched column, n = 12, 8, 10) after the operations. NGF content in the skin of left (A) or right (B) hind feet of sham-operated 7- and 9-week-old rats was expressed as control (open column, n = 11) NGF protein was assayed using two-site EIA, and values are expressed as mean \pm s.e. mean. ***P < 0.001 compared with values of each group by Tukey-Kramer multiple comparisons.

を左坐骨神経横断面の toluidine blue 染色で検討した。

脊髄神経損傷によって Waller 型の変性が坐骨神経で観察された。左 L5 脊髄神経完全結紮では、術後 15 日の時点で、変性した神経群が坐骨神経の中に局在しており、正常な神経が変性神経に一部混在しているのが観察された (Fig. 3A)。全視野を通して、約 50% の神経線維が 15 日目までに変性していたが、この比率は 32 日でも変化がなかった (Fig. 3B)。左 L4, 5 脊髄神経不完全結紮では約 80% の神経線維が 15 日目までに変性し、32 日まで続いた (Fig. 3C, D)。左 L4, 5 脊髄神経不完全挫滅では 15 日目に不完全結紮と同程度の変性が起きたが (Fig. 3E), 32 日目には正常神経線維数の約 50% の髄鞘形成された神経線維が変性神経の中に散在してみられるようになった (Fig. 3F)。しかし、強拡大で観察すると、神経線維径は不揃いで、小から中径線維 (4~6 μ m) が半数を占めていた (Fig. 3G)。コントロール群では有髄線維が環状に染色され、神経変性像は見られなかった (Fig. 3H)。

3 皮膚組織の NGF 蛋白質量の検討

NGF は皮膚で産生され無髄一次求心性線維の神経終末から取り込まれ、逆行性に輸送されるので、皮膚組織の NGF 含有量を無髄神経線維の機能指標とした (Fig. 4A, B)。

7 および 9 週齢コントロールラットの左下肢足 NGF は、 68.3 ± 6.9 pg/mg 組織総蛋白 (n = 11) であった。左 L5 脊髄神経完全結紮では、損傷側 NGF は

術後 15, 32 日目ではそれぞれ 77.9 ± 7.0 (n = 5), 90.7 ± 7.9 (n = 12) pg/mg 組織総蛋白で、コントロール値と比べ変化はなかった。左 L4, 5 脊髄神経不完全結紮では、術後 15 日で損傷側 NGF は 287.6 ± 44.5 pg/mg 組織総蛋白 (n = 5) と有意に上昇し (p < 0.001), 32 日でも 258.6 ± 34.6 pg/mg 組織総蛋白 (n = 8) で 15 日の値と変化がなく高値を維持した。一方、左 L4, 5 脊髄神経不完全挫滅では術後 15 日で NGF は 271.8 ± 44.0 pg/mg 組織総蛋白 (n = 5) と不完全結紮と同程度に有意に上昇したが (p < 0.001), 32 日では 120.9 ± 12.4 pg/mg 組織総蛋白 (n = 10) へと、15 日目に比べ有意に低下した (p < 0.001)。対側の右下肢足皮膚 NGF 含量は 15 日と 32 日ともにコントロール値と比べ変化しなかった (Fig. 4B)。

考 察

本研究において、Kim と Chung が開発した SNL モデル³ を基礎として、複数の部分神経障害モデルラットを作製し、神経損傷の程度および機能障害と疼痛行動との相関について検討し、いくつかの新しい知見を得た。

L4, 5 脊髄神経を不完全に結紮することで、神経損傷の程度が異なる SNL が新たに導入できた。結果で述べたように著者の実験でも完全結紮では近位筋の麻痺がおき、Kim と Chung の結果³ を追試できたことから、不完全結紮によって損傷の異なる SNL 亜型モデルを作り出したと考えられる。

本研究で用いた組織化学は主に有髄線維の変化を観察するのに適している。L4, 5 脊髄神経の不完全結紮および神経挫滅では、約 80% の有髄神経が損傷を受け、L5 脊髄神経完全結紮の約 50% の損傷に比べ、多くの神経線維が傷害されたため、これに伴って疼痛も増強したと考えられる。神経損傷によっておきる Waller 変性は、マクロファージやサイトカインの集積をもたらす^{15,16}、結果として近接する正常の神経線維に異所性発火を起こし、痛覚過敏を発症する^{17,20}と考えられる。これらの実験から神経因性疼痛の発症や維持に損傷神経の果たす役割が重要であることが推察されるが、今回の結果を考え合わせると、少なくとも 50 から 80% の神経障害の範囲においては、有髄神経損傷の程度と疼痛の強度が相関していると考えられた。一方皮膚における NGF の含有量も概ね疼痛の程度と相関した。特に L4, 5 脊髄神経の不完全結紮で高値を示した。皮膚に含まれる NGF 量は皮膚における産生と無髄神経からの取り込みによって規定される。異所性発火の増加は一次求心性神経線維末梢端からサブスタンス P 等の神経伝達物質の放出を促し、NGF の発現を増加させている可能性も考えられるが、NGF が蓄積していることは無髄神経の機能障害が少なくとも存在することを示唆している。さらに、皮膚に NGF を過剰に発現させると、痛覚過敏が起きることが知られている²¹ ので、皮膚の NGF の増加は、2 次的に疼痛を増悪させ疼痛維持に関与している可能性もある。すなわち有髄神経損傷のみならず、疼痛と無髄神経線維の機能障害も相関していると考えられる。このことは挫滅モデルで神経線維の再生に伴って皮膚 NGF 量が減少している結果からも示唆される。また、SNL モデルにおいて第 5 脊髄神経の傷害によって惹き起こされた疼痛閾値の低下は L4 後根神経の切断で回復する⁹。すなわち L4 に入力する一次求心性神経線維で疼痛伝達が行われていたことになるが、今回の結果からはより少ない神経線維数でも疼痛維持が可能であると推測される。

興味深いことに、特に傷害が強いモデル系において、非手術側の下肢にも疼痛関連行動が見られた。この時、皮膚 NGF に変化は見られていない。この対側での疼痛の発症の理由については未だ説明できていないが、いくつかの神経因性疼痛モデルにおいて、脊髄でミクログリアとアストロサイトの活性化が見られたという報告がある^{22,25}。これらの結果から、サイトカインやマクロファージの集積が、脊髄レベルで対側の 2 次ニューロンの活動を修飾し、いわゆる「ミラーイメージ」を作り出しているかもしれない。

L4, 5 脊髄神経不完全挫傷モデルにおいては、軽度ながら有意に疼痛の回復が見られ、併せて大小不同の有髄神経線維数の回復が見られた。ここにおいても神経損傷と疼痛行動の相関が見られたことになる。しかしながら、痛覚は改善傾向にあるがその程度は少なく、他方で NGF の発現はかなり回復している。すなわち、無髄神経の機能回復だけでは、疼痛の消失にはつながらないかもしれない。

本実験では、汎用されている SNL モデルを工夫し、損傷の程度と時間経過の異なる 1 群の神経因性疼痛モデルを作製し検討した。今後この実験系を用いて詳細な形態的検討と対比させながら、分子生物学的あるいは電気生理学的検討を進めることで、神経因性疼痛の発症維持機構の解明に貢献できるのではないかと考えられた。

結 論

複数の部分神経損傷モデルラットを作製し、神経損傷の程度および機能障害と疼痛行動との相関について検討した。その結果、疼痛の程度が有髄神経線維の損傷の程度および無髄神経の機能障害とよく相関することが明らかになった。

謝辞：研究に当たり、ご助言ご指導いただきました日本医科大学白井康正名誉教授、杉崎祐一教授、廣畑泰久先生、鈴木秀典教授、東京大学黒川高秀名誉教授に深謝いたします。また、奨学金を戴きました平和中島財団およびロータリー米山記念奨学会にも深謝いたします。

文 献

1. Kingery WS: A critical review controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. *Pain* 1997; 73: 123-139.
2. Woolf CJ, Salter MW: Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. *Science* 2000; 288: 1765-1768.
3. Kim SH, Chung JM: An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992; 50: 355-363.
4. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y: A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990; 43: 205-218.
5. Bennett GJ, Xie Y-K: A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988; 33: 87-107.
6. Decosterd I, Woolf CJ: Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 2000; 87: 149-158.
7. Guilbaud G, Gautron M, Jazat F, Ratinahirana H, Hassig R, Hauw JJ: Time course of degeneration and

- regeneration of myelinated nerve fibres following chronic loose ligatures of the rat sciatic nerve: can nerve lesions be linked to the abnormal pain-related behaviours? *Pain* 1993; 53: 147-158.
8. Gold MS: Spinal nerve ligation: what to blame for the pain and why. *Pain* 2000; 84: 117-120.
 9. Li Y, Dorsi MJ, Meyer RA, Belzberg AJ: Mechanical hyperalgesia after an L5 spinal nerve lesion in the rat is not dependent on input from injured nerve fibers. *Pain* 2000; 85: 493-502.
 10. Liu C-N, Wall PD, Ben-Dor E, Michaelis M, Amir R, Devor M: Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. *Pain* 2000; 85: 503-521.
 11. Snider WD, McMahon SB: Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 1998; 20: 629-632.
 12. Barde Y-A: Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 1989; 2: 1525-1534.
 13. Covino BG, Dubner R, Gybels J, Kosterlitz HW, Liebeskind JC, Sternbach RA, Vyklicky L, Yamamura H, Zimmermann M: Ethical standards for investigations of experimental pain in animals. *Pain* 1980; 9: 141-143.
 14. Takahashi N, Nagano M, Suzuki H, Umino M: Expression changes of glial cell line-derived neurotrophic factor in a rat model of neuropathic pain. *J Med Dent Sci* 2003; 50: 87-92.
 15. Sommer C, Lalonde A, Heckman HM, Rodriguez M, Myers RR: Quantitative neuropathology of a focal nerve injury causing hyperalgesia. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54: 635-643.
 16. Sommer C, Schafers M: Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. *Brain Res* 1998; 784: 154-162.
 17. Schafers M, Lee DH, Brors D, Yaksh TL, Sorkin LS: Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat peripheral sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor- α after spinal nerve ligation. *J Neurosci* 2003; 23: 3028-3038.
 18. Omana-Zapata I, Bley KR: A stable prostacyclin analog enhances ectopic activity in rat sensory neurons following neuropathic injury. *Brain Res* 2001; 904: 85-92.
 19. Sorkin LS, Xiao W-H, Wagner R, Myers RR: Tumor necrosis factor- α induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. *Neurosci* 1997; 81: 255-262.
 20. Wu G, Ringkamp M, Murinson BB, Pogatzki EM, Hartke TV, Weerahandi HM, Campbell JN, Griffin JW, Meyer RA: Degeneration of myelinated efferent fibers induces spontaneous activity in uninjured C-fiber afferents. *J Neurosci* 2002; 22: 7746-7753.
 21. McLeod AL, Ritchie J, Cuello AC, Julien J-P, Ribeiro-Da-Silva A, Henry JL: Transgenic mice over-expressing substance P exhibit allodynia and hyperalgesia which are reversed by substance P and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Neurosci* 1999; 89: 891-899.
 22. Winkelstein BA, Rutkowski MD, Sweitzer SM, Pahl JL, DeLeo JA: Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment. *J Comp Neurol* 2001; 439: 127-139.
 23. Colburn RW, DeLeo JA, Rickman AJ, Yeager MP, Kwon P, Hickey WF: Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroimmunol* 1997; 79: 163-175.
 24. Colburn RW, Rickman AJ, DeLeo JA: The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Exp Neurol* 1999; 157: 289-304.
 25. Coyle DE: Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallel the development of allodynia behavior. *Glia* 1998; 23: 75-83.

(受付 : 2004年 5月 31日)

(受理 : 2004年 6月 16日)