

原 著

物理療法は神経障害性疼痛発症を予防できるか？ — ラット神経障害性疼痛モデルに寒冷療法を用いて —

川口浩太郎¹⁾、猪俣陽一²⁾、藤岡宏幸¹⁾、坂口顕¹⁾、
山本悟史³⁾、小暮洋子³⁾、王勝蘭^{3, 4)}、戴毅^{3, 4)}

1) 兵庫医療大学リハビリテーション学部、2) 立場整形外科、
3) 兵庫医療大学薬学部、4) 学校法人兵庫医科大学中医薬孔子学院

Can the Physical agents prevent the neuropathic pain onset?
— the study using cryotherapy for rat neuropathic pain model —

Kotaro KAWAGUCHI¹⁾, Youichi INOMATA²⁾, Hiroyuki FUJIOKA¹⁾,
Akira SAKAGUCHI¹⁾, Satoshi YAMAMOTO³⁾, Yoko KOGURE³⁾,
Shenglan WANG^{3, 4)}, Yi DAI^{3, 4)}

1) School of Rehabilitation, Hyogo University of Health Sciences
2) Tateba Orthopedic Clinic
3) School of Pharmacy, Hyogo University of Health Sciences
4) Traditional Medicine Research Center, Chinese Medicine Confucius Institute at Hyogo College of Medicine

要 旨

はじめに：神経障害性疼痛患者では、痛覚過敏やアロディニアなどの症状を呈するため発痛部分に直接触れることは困難な場合が多く、理学療法（リハビリテーション）実施に難渋する。神経障害性疼痛の治療では「神経障害性疼痛を発症しないことが最大の治療である」とさえ考えられている。理学療法場面で炎症や疼痛に対して物理療法（寒冷療法）を用い、特に寒冷療法は炎症に対する治療の第一選択として用いられる。寒冷療法は抗炎症作用が期待できるため、神経障害性疼痛発症の可能性がある場合に、予防的に用いることはできないかと考えた。本研究では神経因性疼痛モデルである spared nerve injury (SNI) モデルラットに対して、アイシングを実施し神経障害性疼痛の発症を予防できるかどうかを検討した。

方法-対象：SD系雄性ラットをシャム群（n=12）、SNI群（n=12）とアイシング群（n=12；術直後、術後1日目にアイシングを行う）、に分けた。

SNIモデルの作製：SNI作成はDecsterdの方法に準じて行った。

行動観察：各群に対して、術前および術後1、3、7、14日の時点で逃避反応閾値（PWT；Paw withdrawal threshold）を測定した。

mRNAの検出：術後3日にPCR法により炎症性サイトカインであるIL-1 β とIL-6のmRNAの発現を測定した。

結果-PWT：アイシング群において、術前に対して全ての時点でPWTは有意に低下しなかった。また、

術後3日までアイシング群、シャム群に対しSNI群は有意に低い値を示した。

PCR法：IL-1 β において、各群の発現率に有意な差は認められなかった。IL-6の発現において、シャム群とアイシング群の間に有意差は認められなかったが、シャム群に対しSNI群は有意に高い値を示した。

考察ならびに結論：アイシング群において、PWTは術後3日までSNI群に対し有意に高い値を示し機械刺激による逃避反応は認められなかった。また、IL-6の発現でシャム群と差が認められなかったことから、末梢神経損傷直後にアイシングを行うことによって、炎症反応が軽減され、機械刺激に対する過敏性やアロディニアの発症を予防できる可能性が示唆された。

キーワード：神経障害性疼痛、アロディニア、アイシング

Abstract

The purpose of this study was to clarify whether the physical therapy (icing) can prevent the onset of neuropathic pain using the spared nerve injury (SNI) rat model.

Methods : Thirty-six Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups, SHAM ,SNI and Icing (SNI + icing) . The SNI model was carried out according to the Decsterd's method. Rats in the icing group were treated with ice immediately, and 1 day following the operation of SNI. In behavior analysis, paw withdrawal threshold (PWT) was measured using an automated dynamic plantar aesthesiometer on the following timecourse; the pre-operated day, the 1st, 3rd, 7th and 14th post-operated days. mRNA expression of inflammatory cytokines in each group was measured using PCR on the post-operated 3rd day.

Results : SNI rats showed a significant decrease of PWT (mechanical hyperalgesia) from the 1st post-operated day. In contrast, icing treatment prevented the development of mechanical hyperalgesia following SNI, there were no significant differences of PWT between the pre-operated day and the 1st post-operated day as well as the 3rd post-operated day in the icing group. We also observed that the expression of IL-6 increased significantly in the SNI group, but not in the icing group compared to the SHAM group. There were no significant differences of IL-1 β among 3 groups.

Conclusion : The data indicates that the icing treatment may reduce the mechanical hyperalgesia in SNI rats in the early phase. The mechanism of this reduction might be induced through suppressed cytokine such as IL-6. Accordingly, we suggest that the icing treatment might serve as a useful physical therapy for preventing the onset of neuropathic pain.

Key words : Neuropathic pain, Allodynia, Icing

I. はじめに

神経障害性疼痛患者では非常に強い痛みのために日常生活は大きな制限を受け、患者のQOL (Quality of Life : 生活の質) の低下も引き起こす¹⁾。神経障害性疼痛に対する理学療法 (リハビリテーション) は重要であると指摘されているものの、痛覚過敏やアロディニアなどの症状を呈するため発痛部分に直接接触することは困難な場合が多く、理学療法実施に難渋する^{2,3)}。また、オピオイド系鎮痛剤を用いても痛みをコントロールすることが難しく、「神経障害性疼痛を発症させな

いことが最大の治療である」とさえ考えられている⁴⁾。

理学療法の現場では、炎症や疼痛に対して物理療法が用いられる。特に、急性の外傷後の治療としてアイシングなどの寒冷療法が一般的に用いられ、寒冷療法の効果として、疼痛閾値の上昇、組織温低下による代謝の抑制、血管収縮による腫脹の軽減などが期待でき、炎症に対する治療の第一選択として用いられる⁵⁾。このように寒冷療法は抗炎症作用が期待できるため、神経障害性疼痛発症の可能性がある場合に、予防的に用いることはできないかと考えた。

そこで、本研究では、Decosterdら⁶⁾が開発し

た神経障害性疼痛動物モデルである spared nerve injury (以下; SNI) モデルを用いて、モデル作製直後(末梢神経損傷直後)から寒冷療法(アイシング)を行うことにより神経障害性疼痛発症を予防することができるかどうかを、機械刺激に対する逃避反応閾値および炎症性サイトカイン mRNA 発現の変化を指標に検討した。

II. 方法

1. 実験動物

SD系雄性ラット(体重200-220g)を用いた。アイシングの効果を検討するために、シャム群(n=12)、SNI群(n=12)とアイシング群(n=12; SNI作製術直後、術後1日目にアイシングを行う)の3群に分け、それぞれの群で6匹を行動観察に、6匹をPCR法による mRNA の測定に用いた。

なお、本研究は兵庫医療大学動物実験委員会の承認(2011-15-0)の下に行った。

2. SNIモデルの作製

Decosterdら⁶⁾の方法に従ってSNIモデル作製術を行った。ペントバルビタールナトリウム(50mg/kg)をラットに腹腔内注射し、麻酔下にて左殿部の皮膚を約2cm切開した。その後、その直下の筋膜を切開後、大腿二頭筋を介して鈍的に坐骨神経の3本の枝を露出した。そのうち、総腓骨神経と脛骨神経を5.0 silk糸(ジョンソン・エンド・ジョンソン株式会社)にて強結紮し、その遠位を切離した。また、腓腹神経は損傷しないように温存した。その後、術部の筋膜と皮膚を縫合しケージに戻した。シャム群は麻酔下で坐骨神経を露出し、その後、そのまま閉創した。

なお、水および飼料の摂取は自由とした。



図1 アイシングを実施している様子

3. 物理療法介入

SNI作製術直後、麻酔下で創部直上にビニール袋に氷約10gを入れたアイスバッグを置き、20分間アイシングを行った。さらに術後1日目の行動観察後にも同様の方法で麻酔下にてアイシングを行った(図1)。

4. 機械刺激による逃避反応閾値の測定

シャム群(n=6)、SNI群(n=6)、アイシング群(n=6)に対して、機械刺激に対する逃避反応閾値(PWT; Paw withdrawal threshold)の測定を行った。

測定は室温26℃の一定環境下で行った。測定のタイミングは、術前および術後1、3、7、14日とした。Ramakrishnanら⁷⁾の方法に従い、メッシュテーブルの上に14cm×8cm×18cmのプラスチックケースを置き、その中にラットを静置させ測定を行った(図2)。また、ラットは測定の2-3日前にメッシュテーブルのプラスチックケース内に1時間静置して測定環境と測定時間に慣れさせた。測定時にもラットを測定環境に慣れさせるためにメッシュテーブルのプラスチックケース内に15分間静置させた後に測定を開始した。メッシュテーブルの下から自動機械刺激装置(Dynamic planter aesthesiometer (UGO BASILE))を用いてPWTを測定した。機械刺激は、メッシュテーブルの下から患側の後肢足底面(腓腹神経領域)に漸増する0gから50gの刺激(2.5g/秒)を20秒かけて直径0.5mmの針によって下方から後肢足底を突き上げた。ラットが後肢を上げると機械刺激は自動的に止まり、その時点における値をPWT(g)とし、力量は0.1g前後まで記録した。各試行間でラットは5分以上静置させ、4回測定を行った。

測定した4回のPWTのうち、最初の1回を除いた3回分のデータを使用した。全対象において術前および術後1、3、7、14日におけるPWTの平均値を代表値

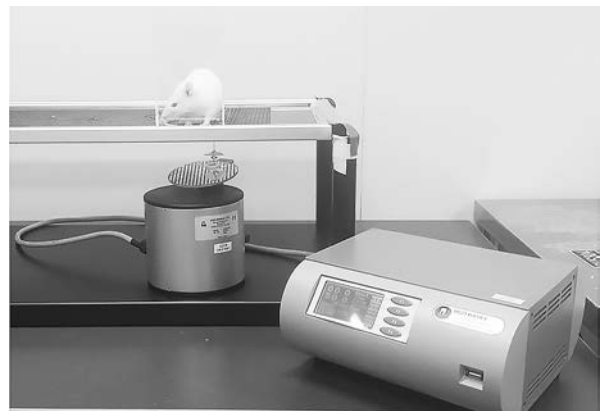


図2 逃避反応閾値(PWT)の測定

として1個体の逃避反応閾値として採用した。

5. RT-PCR法によるmRNAの検出

術後3日目にシャム群(n=6)、SNI群(n=6)、アイシング群(n=6)に対してRT-PCR(Reverse Transcription PCR)法による炎症性サイトカインであるIL-1β(8)やIL-6(8,9)のmRNAの検出を行った。対象遺伝子としては、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素(Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; 以下GAPDH)を用いた。

ISOGEN kit (ニッポンジーン)を用いて、ラットのL4、L5後根神経節(DRG)細胞からRNAを抽出し、塩基配列を無作為化したOligo dT (PROMEGA)と逆転写酵素を用いてmRNAからcDNAを得たのち。以下のプロトコールに従って、サーマルサイクラー(Applied Biosystems)中でPCRを実施した。

IL-1βでは、94℃で5分間の熱変性に引き続いて、熱変性94℃:30秒、アニーリング58℃:30秒、伸長反応72℃:60秒を1サイクルとして32サイクル反応させた。GAPDHも同様の操作を行った。

IL-6では、94℃で5分間の熱変性に引き続いて、熱変性94℃:30秒、アニーリング54℃:30秒、伸長反応72℃:60秒を1サイクルとして30サイクル反応させた。GAPDHも同様の操作を行った。

それぞれ最後の伸長反応は72℃で10分間行った。RT-PCRによって得られた遺伝子転写産物は、1.5%アガロースゲル中を電気泳動し、20~25分間臭化エチジウム(0.5μg/ml)含有TAEバッファー中でハイブリダイズさせた後、写真撮影した。

RT-PCRに用いたプライマー対の塩基配列は以下の通りである。(5'端から3'端に向かってセンス、アンチセンスの配列を示す):

IL-1β: CCAGGATGAGGACCCAAGCA/
TCCCGACCATGCTGTTTCC

IL-6: TACCACCCACAACAGACCAG/
AGGAGAGCATTGGAAGTTGG

GAPDH: CCAGGGCTGCCTTCTCTTGT/
CCAGCCTTCTCCATGGTGGT

スキャナー(GT-X 770 (EPSON))を使用してアガロースゲルの写真をパーソナルコンピューター(vaio VGN-G2, (Sony Marketing Inc.))に画像として取り込んだ。その後、画像処理ソフトPhotoshop CS (Adobe Systems)を使用して、目的とするバンド列のみを切り出し、画像解析ソフトImage J 1.45 (National Institutes of Health)を用いて、それぞれ

のバンド部分の輝度を求めた。IL-1βとIL-6の発現量はGAPDHの輝度に対する相対値として算出した。

6. 統計処理

1) PWT

各群間の比較として、術前および術後1、3、7、14日におけるPWTに関して二元配置分散分析を行い、交互作用が有意であった場合、さらに単純主効果の検定を行った。各群の各時点の単純効果、各時点の各群の単純効果の検定として一元配置分散分析を行い、多重比較検定としてTurkey法を行った。

また交互作用が有意ではなかった場合、主効果に有意な差が認められた場合も単純主効果の検定として、各群の各時点の単純効果、各時点の各群の単純効果の検定として一元配置分散分析を行い、多重比較検定としてTurkey法を行った。

主効果も有意でなかった場合、群間に有意な差が認められなかったと判断した。

2) mRNA

術後3日目の各群の比較として各mRNAの相対値に一元配置分散分析を行い、多重比較検定としてTukey法を使用した。

なお、各データは、平均値±標準偏差で表し、統計処理には統計処理ソフトウェア(R version 2.8.1)を用いて、有意水準は5%とした。

Ⅲ. 結果

1. PWT

各群におけるPWTの経時的变化を図3に示した。二元配置分散分析の結果、各群の間に交互作用は認

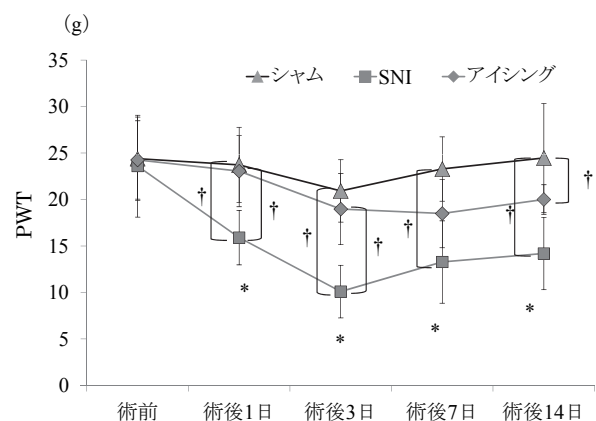


図3 PWTの経時的变化
各群n=6、*:vs術前(p<0.05)、†:vs各群(p<0.05)

められなかったが、各群各時点において共に主効果に有意差が認められたため、単純主効果の検定として各群の各時点に対して一元配置分散分析を行った。シャム群、アイシング群では術前に対して術後1、3、7、14日のPWTは低下していなかった。SNI群では術前に対して術後1、3、7、14日においてPWTが有意に低下した。同様に単純主効果の検定により、アイシング群とSNI群、シャム群の比較のため各時点で各群に対して一元配置分散分析を行った結果、術後1日、3日のPWTではシャム群、アイシング群に対しSNI群は有意に低い値を示したが、シャム群とアイシング群の間には有意差は認められなかった。術後7日のPWTではシャム群とSNI群の間に有意な差が認められたが、SNI群とアイシング群、シャム群とアイシング群には有意差は認められなかった。また、術後14日のPWTでは、シャム群とアイシング群、シャム群

とSNI群で有意差が認められ、SNI群とアイシング群では有意差は認められなかった。

2. mRNA発現相対値

各群におけるIL-1 β 、IL-6およびGAPDHのmRNAの発現を図4に示した。

SNI群でIL-6の発現の増加が観察された。

各群のmRNA発現の相対値を検討した結果、IL-1 β では有意差は認められなかった。IL-6では、SNI群とアイシング群、シャム群とアイシング群の間に有意差は認められなかったが、SNI群はシャム群に対して有意に高い値を示した(図5)。

IV. 考察

本研究は、「神経障害性疼痛を発症させないことが

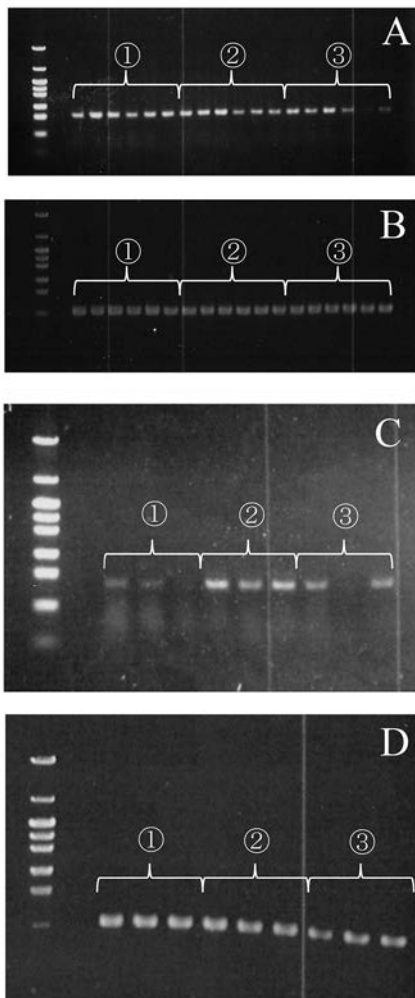


図4 mRNAの発現
A:IL-1 β 、B:GADPH(Aの対照)(n=6)、C:IL-6、
D:GADPH(Cの対照)(n=3)
①シャム群、②SNI群、③アイシング群

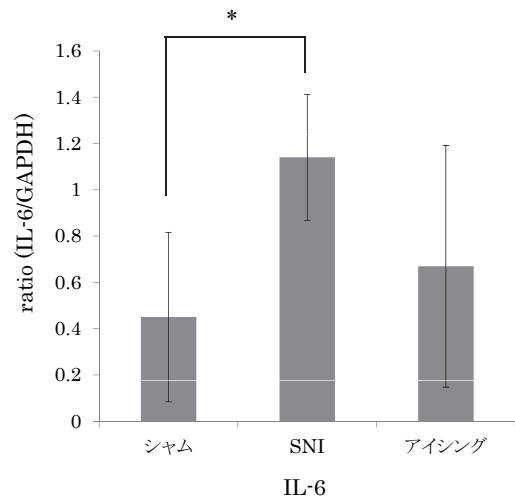
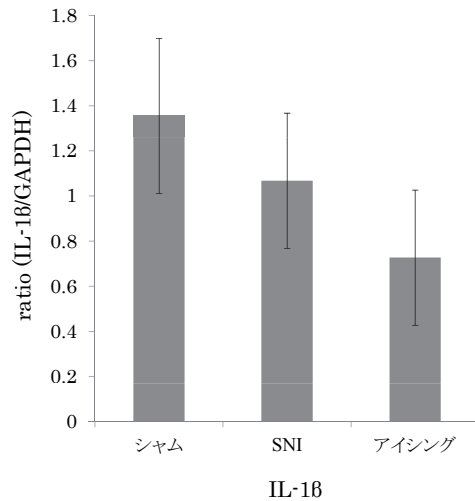


図5 mRNAの発現量(相対値)各群n=6、*:vs各群(p<0.05)

最大の治療である」とされる神経障害性疼痛に対し、神経障害性疼痛モデルラットを用いて物理療法の中でも炎症に対して一般的に用いられる寒冷療法（アイシング）によってその発症を予防できるかどうか検討した。

PWTの経時的変化についてみると、SNIモデル作製直後、術後1日にアイシングを行ったアイシング群、シャム群では有意な変化は認められなかったものの、SNI群では術前と比較し術後1日から14日まで有意に低下した。PWTの低下は、通常、触覚として感じられる程度の触刺激を痛み刺激として感じてしまうアロディニアの状態を示していると考えられ⁶⁾、PWTが有意に低下したSNI群では神経障害性疼痛の特徴であるアロディニアを発症していたと考えられる。また、術後1日、3日でアイシング群はSNI群に対してPWTが有意に高かったことから、アイシングによりアロディニアの発症を予防できたと考えられる。

術後3日のmRNAの発現をみると、IL-1 β では有意な差は認められなかったが、IL-6においてSNI群がシャム群に対して有意に高い値を示した。Xu-Hong Weiら⁹⁾は、神経障害性疼痛モデルであるlumber 5 ventral root transection (L5-VRT) モデルラットのDRGにおいて、IL-6の発現量が増加していたと報告しており、実験に使用した神経障害性疼痛モデルは異なるものの、本研究でも同様の結果を得た。一方、アイシング群ではIL-6の発現量はシャム群と差は認められず、また、PWTも低下していなかったことから、アイシングにより炎症がある程度抑えられ、IL-6発現量が増加しなかったことでアロディニア発症を予防した可能性が考えられる。

しかし、14日ではシャム群に対してアイシング群のPWTは有意に低い値を示した。今回、術後14日はPWTの測定のみであり炎症性サイトカインの発現との関係は不明であるが、術後2日目以降はアイシングを行わなかったため、術後3日まで発症を予防できていたアロディニアが発症した可能性もある。

今回の結果より、損傷直後にアイシングを行うことで、神経障害性疼痛への移行を予防できる可能性が示唆された。今後、アイシング継続期間、頻度、炎症性サイトカインの発現との関係についてさらに検討する必要がある。

なお、本研究の一部は、兵庫医療大学平成25年度共同研究推進助成金の交付を受けて行った。

謝辞

本研究を進めるにあたり、データの解析で数々のご助言をいただいた兵庫医療大学リハビリテーション学部日高正巳教授に深謝いたします。

文献

- 1) 弓削孟文. ニューロパシックペインの今 —正しく基礎知識を整理して治療戦略をたてる—. 東京, 文光堂, 2002, p.240
- 2) 川口浩太郎, 佐伯昇, 森脇克行 他. 複合性局所疼痛症候群を併用した理学療法経験(会議録). 理学療法学. 2002, Vol. 29 Supple, p.361.
- 3) 宇野武司. 対応に難渋する痛み 神経因疼痛. 総合リハビリテーション. 1998, Vol.26, p.747-751.
- 4) 増田豊. ニューロパシックペインに対する神経ブロック療法. ペインクリニック. 1996, Vol.17, p.917-923.
- 5) Swenson C, Swärd L, Karlsson J; Cryotherapy in sports medicine. *Scand J Med Sci Sports*. 1996, Vol.6, p.193-200.
- 6) Decosterd I, Woolf Clifford J; Spared nerve injury : an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*. 2000, Vol.87, No.2, p.149-158.
- 7) Ramakrishana N, Venkatesh G, Dhanalakshmi S; Comparison of manual and automated filaments for evaluation of neuropathic pain behavior in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2012, Vol.66, p.8-13.
- 8) del Rey A, Yau HJ, Randolf A, et al; Chronic neuropathic pain-like behavior correlates with IL-1 β expression and disrupts cytokine interactions in the hippocampus. *Pain*. 2011, Vol.152, p.2827-2835.
- 9) Wei XH, Na XD, Liao GJ, et al; The up-regulation of IL-6 in DRG and spinal dorsal horn contributes to neuropathic pain following L5 ventral root transection. *Exp Neurol*. 2012, Vol.21, p.1-10.