

ラットを用いた高周波熱凝固法による Neuropathic Pain Model に関する研究

奈良県立医科大学麻酔科学教室

横山 忠 司

AN EXPERIMENTAL MODEL OF NEUROPATHIC PAIN PRODUCED BY RADIOFREQUENCY NEUROLYSIS IN RATS

TADATSUKA YOKOYAMA

Department of Anesthesiology, Nara Medical University

Received September 30, 1994

Abstract: Background: The mechanisms of neuropathic pain are not clearly understood which are characterized by various different kinds abnormal sensation; hence the author attempted to elucidate a novel pain model that is produced by radiofrequency neurolysis in rats.

Methods: Bilateral sciatic nerves of 30 wister rats (7-8 weeks) were exposed and blocked with heat (neurolysis) under pentobarbital anesthesia. Right sciatic nerves were treated at 50°C for 45 sec. (N=10), 60°C for 45 sec. (N=10), 70°C for 45 sec. (N=10) respectively; left sciatic nerves were not treated as a sham. Rats were placed in plastic cages for behavioral testing; posture of neurolyzed extremity, responses to spontaneous nociceptive pain and radiant heat impinged on plantar surface of hind paw. To examine neuropathologic change in sciatic nerves that were harvested after neurolysis, light microscopic sections were stained with toluidine blue.

Results: Average autotomy scores were remarked during nerve reconstruction in 60°C and 70°C neurolysis but no significant difference was found between sham and operated paws in 50°C neurolysis. In micrographs of nerves removed 7 days after neurolysis, endoneural edema was prominent and the destruction of myelinated fibers could be seen.

Conclusion: It was demonstrated that this model of neuropathic pain with radiofrequency neurolysis revealed partially similar, partially different results compared with previous models, and suggested that an optimal radiofrequency neurolysis in rats was 60°C for 45 sec. that developed in recovery course of nerve injury.

Index Terms

radiofrequency neurolysis, animal pain model, autotomy, neuropathic pain

緒 言

神経損傷に原因する neuropathic pain は、オピオイド鎮痛薬や非ステロイド性消炎鎮痛薬に抵抗し治療しにくいもので、この痛みには糖尿病性ニューロパシー、

deafferentation pain(求心路遮断痛)、帯状疱疹後神経痛、幻肢痛などが含まれる。これらの痛みの発症メカニズムについては、確実な動物モデルがなかったために今まで十分に研究されなかったのが現状である。末梢神経を切断してつくる神経切除モデル¹⁾は求心路遮断痛と思

われる行動を作り出したが、この病態は実際の診療で見られることはあまりないため、これらのうち神経伝達の一部が完全に残ったものが、hyperalgesia, allodynia と関連したモデルとして研究されている²⁾³⁾⁴⁾。

最近、ヒトで見られる neuropathic pain とより近い三つの違った実験動物モデルが報告され、代表的なものとして(1)ラットの坐骨神経を大腿部で 4-0 chromic cut gut で 4 回軽く結紮することで作成できるとする、末梢神経絞扼モデル²⁾。(2)ラット坐骨神経の一部だけを強く結紮する末梢神経部分結紮モデル³⁾。(3)ラットで L₅ 脊髄神経を強く結紮する脊髄神経結紮モデル⁴⁾が知られている。

高周波熱凝固法(RFN: Radiofrequency Neurolysis)は高周波のエネルギーを熱エネルギーに変換し、特殊なブロック針の先端の温度を上昇させ組織を凝固する方法⁵⁾で、先端約 2-3 mm が神経周辺の蛋白を変性することによって、侵害受容の伝達を一時的にブロックする。ペインクリニックでは主に三叉神経痛に対するガッセル神経節ブロック⁶⁾、腰痛症特に椎間関節症の脊髄神経後枝のブロックに適用されている⁷⁾⁸⁾。また最近は一パージャー病や閉塞性動脈硬化症などの閉塞性の血管炎に対して、胸部や腰部の交感神経節ブロックにも応用されている⁹⁾¹⁰⁾。しかしその効果は恒久的でなく 2-3 カ月で消失することがある。これは 2-3 mm という限られた範囲内の神経構造破壊のために、神経の一部再生が原因と考えられる。著者はこの再生する過程をラット坐骨神経でおこさせることで、ヒトにみられる neuropathic pain に似た行動を示すことを予測し、RFN を用いて neuropathic pain model を作成し既報の実験モデルとの比較検討をおこなった。

方法及び材料

1. 実験動物

本学総合研究棟動物室で 2-3 週間予備飼育をした 7-8 週令の Wister 系ラット 30 匹(体重 250-300 g)を 10 匹づつ 3 群に分けた。

2. 高周波熱凝固装置

高周波熱凝固用のブロック針は図のごとく先端 4 mm が非絶縁部である Type SMK Sluijter-Mehta cannula を用い、(Fig. 1)Radionics 社製の Model RFG-3 B Lesion Generator System に接続する。この装置はブロック針先端の温度をモニターすることで先端の組織温度を一定にコントロールでき、また凝固時間は 5-180 秒まで調節可能である。

3. プランターテスト(PLANTAR TEST 7303)

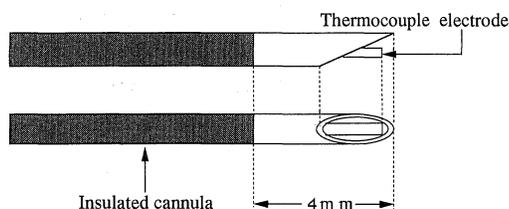


Fig. 1. Sluijter-Mehta cannula.
(Thermocouple temperature sensor in the side-outlet tip)

ラットを無拘束の状態、Hargreaves らの方法¹¹⁾により熱刺激に対する反応を測定する検査法で、ラットをガラス板の上に置いた 3 つに区切られた 85×35×40 cm のプラスチックチャンパーに 1 匹づつ入れ、5 分間の慣らし期間の後ガラス板の下からラット後肢の中央外側の足底表面に、ハロゲンランプを光源とする放射熱を 2×4 mm の範囲に当てる。刺激開始からタイマーが作動し、ラットが後肢を上げると自動的にタイマーが切れ、時間を 0.1 秒刻みで記録する。また組織損傷をさけるため 20.7 秒以上は刺激が停止するようになっている。

4. 手術およびブロック手技

ラットをベントバルビタール麻酔(40 mg/kg, i. p.)後、腹臥位として大腿部二頭筋を鈍的に分け右坐骨神経を露出し神経が分岐する部位より約 7 mm 中極側でブロック針の非絶縁部が坐骨神経に接するように置き、1%リドカイン 0.05 ml を神経に滴下することで局所麻酔した後、50℃-45 秒(N=10)、60℃-45 秒(N=10)、70℃-45 秒(N=10)で凝固した(Fig. 2)。Sham-operation 側として左坐骨神経を右と同様に露出し 1%リドカイン 0.05 ml を滴下したのみでそのまま創を閉じた。

5. 観察項目

観察はブロック後 1 週間までは 1 日おきに、それ以後は 1 週ごとに 4 週間までおこなった。

(1)行動の観察

歩行と姿勢

ラットをプラスチックケージに入れ 5 分間慣らしのため放置し、その後 5 分間歩行の様子、ブロックした後肢の姿勢、状態を注意深く観察した。

自発侵害受容(spontaneous nociceptive)行動

Hayes らの方法¹²⁾に準じてプラスチックケージ内で慣らしの後、ブロックした後足の中央内側、中央外側または踵だけを床に着ける、後足を上げる、後足をなめたりひっかいたりする行為を 5 分間観察した。

(2)Autotomy(自傷行為)

Autotomy は Wall's scale¹⁾を用い記録した。すわち爪

を噛み出血しているものは1点、さらに指骨の遠位まで噛み損傷していれば1点、近位まで損傷していればさらに1点を与えたすなわちすべての指骨が損傷していれば11点になる。

(3)侵害熱刺激

両足の足底にプランターテストをおこない、熱刺激により後肢を上げるまでの時間(PWL: Paw withdrawal latency)と足を上げたまま保持している時間を測定した。刺激の強さはブロックしていない足が約10秒で上るぐらいに調節し、測定は5分間隔で3回おこない平均した。ブロック前のPWLを測定し熱閾値の左右差の変化を観察した。(左右ともに正常に反応していればほぼ0秒となる。)

(4)運動機能(Motor function)の測定

4-point scal 変法¹³⁾¹⁴⁾を用い坐骨神経の運動機能を評価した。ラットをプランターテストで用いたガラス板に置き、ガラス板の傾きを増減して、その時に抵抗したりまたは物をつかもうとする足底の屈曲、重力に対する背屈、5趾の外転、1趾の外転を各1点とし運動機能を評価した。

(5)凝固1週間後の組織学的変化

術後1週間に坐骨神経を取り出し、顕微鏡的観察を行った。顕微標本の固定には phosphate buffered formalin を用し、染色は toluidine blue でおこなった。

(6)統計学的分析

統計学的処置には Willcoxon t 検定を用い、危険率5%以下を有意差ありとした。

結 果

(1)行動の観察

歩行と姿勢

50℃群は観察中全期間を通して左右差がなかった。60℃、70℃群では、麻酔覚醒後よりブロック側の後足は開かず屈曲し、両足とも床に着いていた。歩行は引きずるような跛行を示した。足上げ歩行が70℃群で1週間後から多くなり跛行するものはなかった。

自発侵害受容行動

侵害受容行動を思わせる足底をなめたり、足底を床に着けず上げたままの姿勢をとるものが、60℃群で5日後よりみられ14日ピークとしその行動は減少した。70℃群では60℃群より遅れ、2週後からみられ暫時増加した(Fig. 3)。

(2) Autotomy(自傷行動)(Fig. 4)

50℃でブロックをおこなった群には認められなかった。観察中の autotomy は爪を噛む行為が最初にみられ、そ

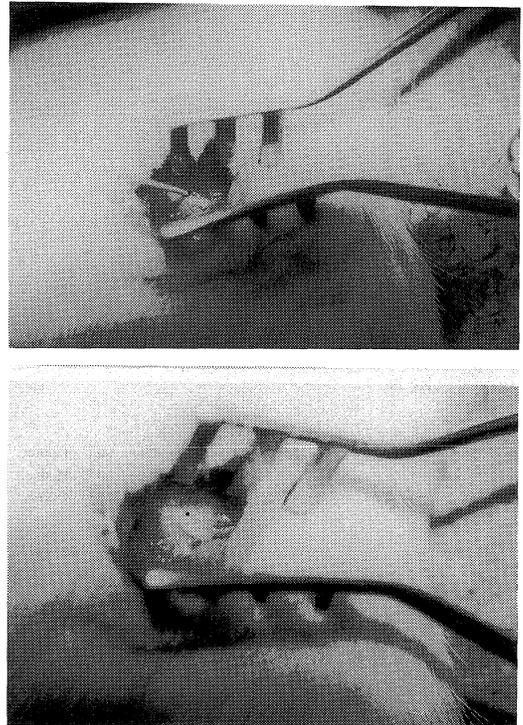


Fig. 2. Surgical procedure of RFN using a Sluifjter-Mehta cannula. The lower panel shows protein-coagulation following the RFN.

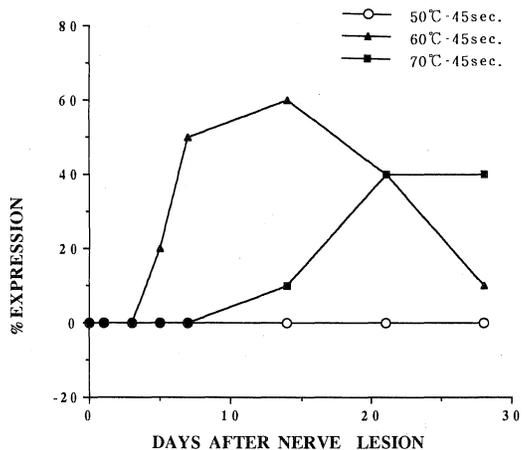


Fig. 3. Time course of spontaneous nociceptive behavior (% expression) following RFN.

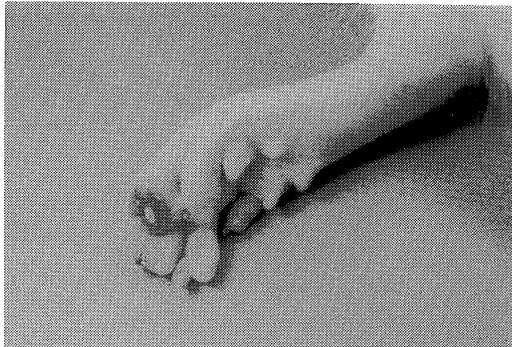


Fig. 4. Demonstration of digit autotomy following RFN.

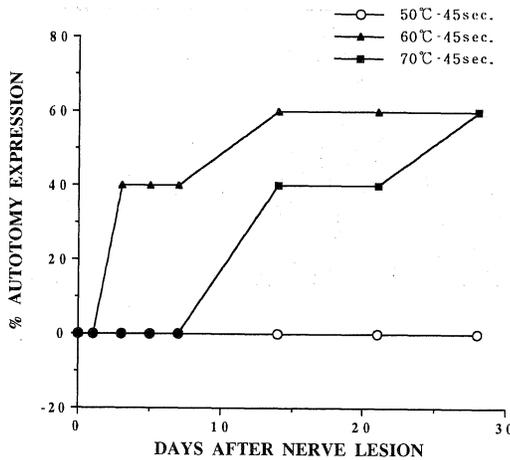


Fig. 5. Autotomy expression (%) following RFN.

の範囲は3-5趾におよんだ。これは坐骨神経の支配領域に一致した。Autotomyの出現は60°C群で3日後から始まり、3週で新たな損傷は認められなくなった。70°C群ではそれより遅れ2週後から始まり損傷の程度も日数とともに増加し autotomy scoreは4週間後60°C群で平均1.75±1.75, 70°C群で1.70±1.49になった(Fig. 6)。観察期間中最も著明な autotomyは70°C群の5点が1匹に認められた。

(3)侵害熱刺激(プランター・テスト)

ブロック側と無処置側とのPWLの差を痛覚過敏の指標とする場合、差がマイナスになれば痛覚過敏状態になっていると判断する¹³⁾が、60°C, 70°C群で明らかに痛覚過敏と思われるものは数匹に認められたのみであった。しかし熱刺激によって後肢を上げたまま保持する防御姿勢をとるものが、60°C群で1週後からみられ2週後7/10にみられた。70°C群では2週後からみられ、さらに3週後

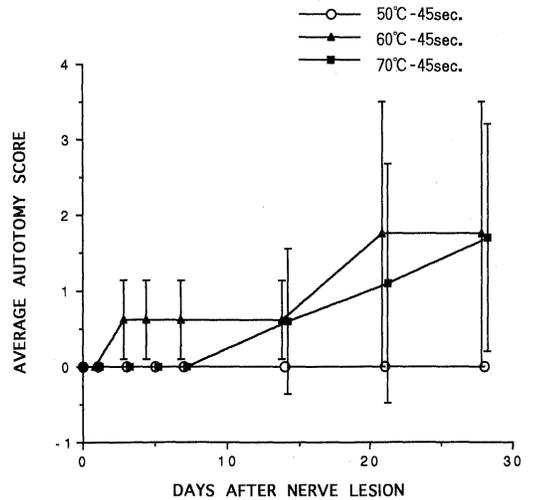


Fig. 6. Autotomy scores following RFN according to the wall's scale.

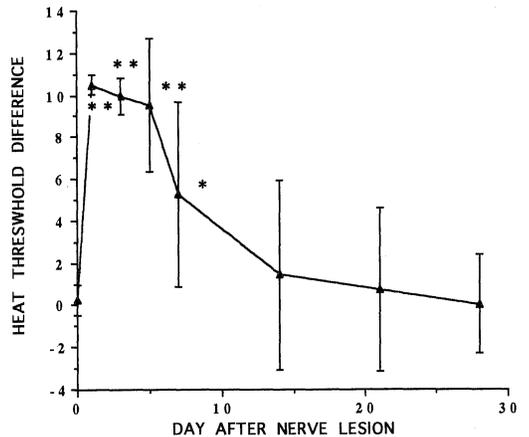


Fig. 7. Recovery of plantar withdrawal threshold to RFN with 60°C-45 sec.

*p<0.05 vs. control,
**P<0.01 vs. control

4/10にみられた。熱刺激に対する反応は50°C群では観察期間中左右差なく、60°C群ではブロック後1週より回復し、熱閾値差は2週で左右差はなくなった(Fig. 7)。70°C群ではブロック後1週間まではブロック側は全く反応しなかったが、2週より回復し3週後左右差が消失した(Fig. 8)。60°C群と70°C群ではブロック後1週で60°C群がより早く回復した(Fig. 9)。

(4) Motor function

50°C群では運動機能の障害は認められず、60°C群でプ

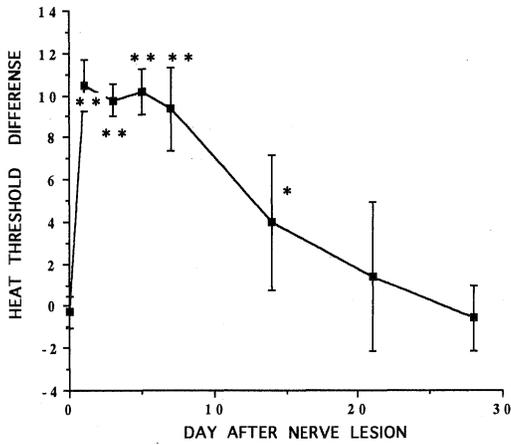


Fig. 8. Recovery of plantar withdrawal thresholds to RFN with 70°C-45 sec.
* P<0.05 vs. control,
** P<0.01 vs. control

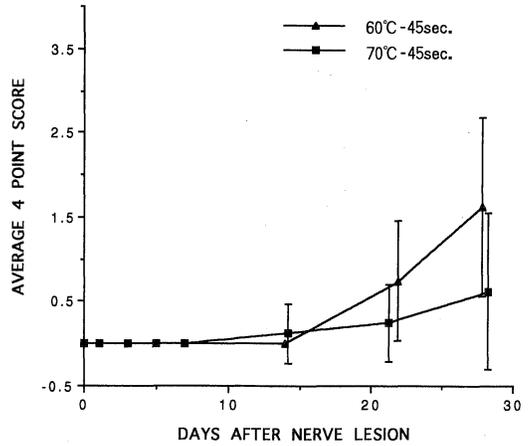


Fig. 10. Recovery of motor function.

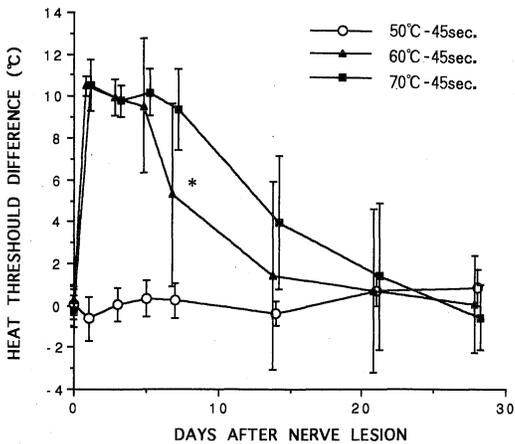


Fig. 9. Recovery of plantar withdrawal thresholds to RFN. Plantar withdrawal response gradually returned over days 7-28.
* P<0.05 60°C-45 sec. vs. 75°C-45 sec

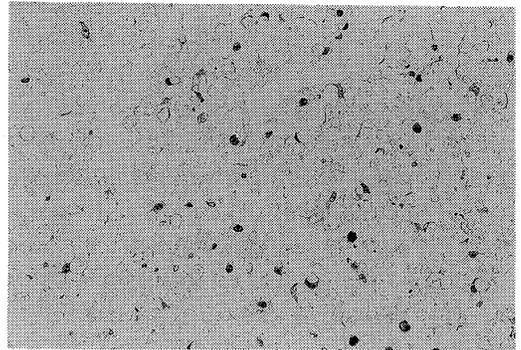


Fig. 11. Photomicrograph of sciatic nerve of 70°C lesion showing myelin sheath breakdown, and endoneurium edema. Toluidine blue stain, ×400.

考 察

本研究はRFNをラット坐骨神経に作用させることで、mononeuropathyモデルを作成しその特性を調べることが目的とした。本モデルは最近開発された動物モデル²⁾⁻⁴⁾と異なり、神経を結紮するための処置による必要以上の損傷がなく、再現性も備えている。本モデルは末梢神経部分結紮モデル³⁾や脊髄神経結紮モデル⁴⁾とは異なり autotomyが見られる点で違い、末梢神経絞扼モデル²⁾により近い病態と思われる。Neuropathic painは、その神経損傷の形式から完全に神経伝達が障害されているものと、一部神経伝達が残っているものに分けられるが、本研究のRFNでは、感覚、運動が回復することから一部神経伝達の残存するモデルといえる。

ロック3週間後から機能回復がみられたが、28日後になっても完全には回復しなかった。70°C群では1匹が1週間より回復したが、群全体としては60°C群に比べ回復速度が遅く、ほとんどのラットが完全に傷害されたままであった(Fig. 10)。

(5)組織学的検索(Fig. 11)

ブロック後1週間で50°C群の組織は明らかな変化は認められなかった。60°C、70°Cでミエリン鞘の破壊と神経内膜の浮腫が見られたが、血管系に病的変化は認められなかった。破壊の程度は70°C群でより著明であった。

RFNは神経ブロックの目的で用いるとき、その非絶縁部の神経への接し方でその神経破壊の強さが異なる。これはRFNで破壊される範囲は、針の非絶縁部を長軸とした紡錘形で、針の先端を越えることは少ないことによる¹⁵⁾。そのため本研究では凝固の時に体動で針先がずれるのを防ぐ目的で、凝固前に1%リドカインで坐骨神経を局所麻酔してから熱凝固した。神経切除モデルで神経切断前に坐骨神経に局所麻酔薬を投与すると、autotomyが抑制されるという報告がある¹⁶⁾¹⁷⁾が、本モデルにおいてこの抑制はみられなかった。また同じように局所麻酔薬の前処置で、絞扼モデルでは異常感覚の発症が抑えられ¹⁸⁾¹⁹⁾部分結紮モデルでは異常感覚の発症は抑えられない¹⁹⁾。これらの事実は同じような神経障害モデルであっても、そのメカニズムは単純でないことを示唆している。

熱凝固の効果に影響を及ぼす重要な因子として、凝固温度、時間があり凝固温が高く時間が長いほど作用は強いが、時間を長くしても凝固される範囲は限局されている¹⁵⁾。50℃群は全ての観察項目でsham側との差はなかった。60℃以上のRFNでは熱刺激に対する反応、運動機能の回復の経過から凝固温が高いほどより強い神経障害を起こす事が考えられる。このことからRNFの効果は蛋白変性による可逆的神経損傷が作用機序と考えられる。姿勢、行動から見ると60℃以上で凝固した場合、70℃は60℃に比べ神経破壊の程度が強く、ブロック後7日までには侵害熱刺激で反応なく、侵害受容行動も見られずhypoesthesiaになっていると考えられた。またこの時期にはautotomyはみられず、脱神経した足とautotomyの発現には直接関連がないと考えられる。60℃ではその直後は完全なhypoesthesiaであると考えられるが、経過とともに熱刺激に対する反応や、運動機能の回復から神経損傷が一部回復していることが考えられる。またブロック側の足底を床に着かないように上げたままであったり、なめたりの日発侵害受容の行動が60℃群で14日後にピークとなり、21日以降新たなautotomyの発現もなくなっている。このことは神経損傷回復の過程でhyperalgesiaを呈していることを示唆した。また70℃の場合60℃に比べ神経破壊の程度が強く、そのため回復速度が遅れ日発侵害受容行動とautotomyの発現が遅れると推察される。

Autotomyは神経切断などの完全神経損傷の場合に多く見られ、約2カ月にわたって増悪していくが、その機序は現在不明である。RFNと同じ物理的ブロックに冷凍ブロック(cryoneurolysis)があるが、cryoneurolysisを同じくラット坐骨神経に対しておこなった場合も

autotomyが報告²⁰⁾されている。その場合autotomyは14日後より出現し増加していったが、本研究では60℃群で3日後より、70℃群で14日後より認められた。

神経損傷モデルとしては、Bennettら²¹⁾による末梢神経絞扼モデルが現在のneuropathic pain研究の原点で、この方法による研究が最も多く用いられている。このモデルは、ラット坐骨神経を大腿部で4-0 chromic cut gutで4回軽く結紮作成する。それによって神経損傷後3日頃より熱刺激、寒冷刺激、機械刺激などに対して過敏な状態、すなわち通常では侵害刺激とならない程度の弱い刺激に対して逃避反応を示すようになる。

このモデルの発症のメカニズムとして機械的な神経の圧迫による神経への直接作用と血流障害が考えられる。RFNによる神経損傷も熱による神経そのものへの障害および、周辺組織の熱による蛋白変性をもたらす虚血状態の関与も考えられるが、1週間後の組織では血管系は正常であり虚血による障害は否定できる。組織学的には末梢神経絞扼モデルでは、ほとんど全てのA β 線維とかなりの部分のA δ とC線維が障害されている²¹⁾²²⁾。高周波熱凝固の場合は85℃で全ての線維が破壊されるが、同様に45℃、55℃、65℃、75℃でも同じように全ての線維が可逆的破壊を示す²³⁾。しかし低い温度の場合は損傷の程度が軽く早期に修復される。電気生理学的には、末梢神経絞扼モデルではA β 、A δ 線維の損傷部位での伝導は障害されているが、C線維の伝導は正常である²⁴⁾。RFNは温度を上げていくにつれA β 線維より先にA δ 、C線維が障害され、つぎにA δ 線維がC線維より先に障害される。本研究において温痛覚は運動機能に先立って回復していることより、A δ 、C線維の伝導が正常に戻りそれ以外の線維が障害されていることがhyperalgesiaに関係していると考えられる。またこの回復の過程は一般の局所麻酔薬の神経遮断と異なるところで、物理的熱刺激は全ての線維を損傷するが、より太い線維ほど回復が遅れると推論できる。

結論としてRENを用い蛋白変性の起こる60~70℃の混度で凝固すると、すべての神経線維が損傷され直後は完全な神経麻痺がおこるが、時間経過とともに回復しC線維、A δ 線維の伝導が正常化する。その過程に日発侵害受容行動やautotomyなどのneuropathic painの関与すると考えられる行動がみられる。

以上のことより、本研究における動物モデルはneuropathic painに関する研究に有用なモデルであると考えられる。

結 語

(1)高周波熱凝固法(RFN)をラット坐骨神経に作用させることでneuropathic painのモデルを作成した。

(2)RFNによるペインモデルは、自発侵害受容行動とautotomyの発現から特徴あるペインモデルと考えられる。

(3)RFNを動物に作用させneuropathic painを作成する適下条件は60℃-45秒と考えられた。

稿を終えるにあたり、懇切なるご指導とご校閲を賜りました恩師奥田孝雄教授に対し心より感謝いたします。

文 献

- 1) Wall, P. D., Devor, M., Inbal, R., Scadding, J. W., Schonfeld, D., Seltzer, Z. and Tomkiewicz, M. M. : Autotomy following peripheral nerve lesion : experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 33 : 103-113, 1979.
- 2) Bennett, G. J. and Xie, Y. K. : A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like these seen in man. *Pain* 33 : 87-107, 1988.
- 3) Seltzer, Z., Dubner, R. and Shir, Y. : A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43 : 205-218, 1990.
- 4) Kim, S. H. and Chung, J. M. : An experimental model for peripheral neuropathy produce by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50 : 355-363, 1992.
- 5) Organ, L. W. : Electrophysiologic principle of radiofrequency lesion making. *Appl. Neurophysiol.* 39 : 69-76, 1976.
- 6) Turnbull, I. M. : Percutaneous rhizotomy for trigeminal neuralgia. *Surg. Neurol.* 2 : 385-389, 1974.
- 7) Shealy, C. N. : Facet denervation in the management of back and sciatic pain. *Clin. Ortho.* 115 : 157-164, 1976.
- 8) Bogduk, N. and Long, D. M. : Percutaneous lumbar medial branch neurotomy : A modification of facet denervation. *Spine* 5 : 193-200, 1980.
- 9) Wilkinson, H. A. : Percutaneous radiofrequency upper thoracic sympathectomy : A new technique. *Neurosurgery* 15 : 811-814, 1984.
- 10) Haynsworth, R. F. and Noe, C. E. : Percutaneous lumbar sympathectomy : A comparison of radiofrequency denervation versus phenol neurolysis. *Anesthesiology* 74 : 459-463, 1991.
- 11) Hargreaves, K., Dubner, R., Flores, C. and Joris, J. : A new method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32 : 77-88, 1988.
- 12) Hayes, R. L., Mao, J., Price, D. D., Germano, A., d'Avella, D., Fiori, M. and Mayer, D. J. : Permanent with gangliosides reduces abnormal nociceptive response associated with a rodent peripheral mononeuropathy. *Pain* 48 : 391-396, 1992.
- 13) Berenberg, R. A., Forman, D. S., Wood, D. K., Desilva, A. and Demaree, J. : Recovery of peripheral nerve function after axotomy : effect of triiodothyronine. *Exp. Neurol.* 57 : 349-363, 1977.
- 14) Kalichman, M. W. and Myers, R. R. : Behavioral and electrophysiological recovery following cryogenic nerve injury. *Exp. Neurol.* 96 : 692-702, 1987.
- 15) Bogduk, N., Macintosh, J. and Marland, A. : Technical limitation to the efficiency of radiofrequency neurotomy for spinal pain. *Neurosurgery* 20 : 529-535, 1987.
- 16) Seltzer, Z., Bellin, B. Z., Ginzburg, R., Paren, Y. and Shimko, T. : The role of injury discharge in the induction of neuropathic pain behavior in rats. *Pain* 46 : 327-336, 1991.
- 17) Gonzalez-Darder, J. M., Darbera, J. and Abellan, M. E. : Effects of prior anesthesia of autotomy following sciatic transection in rats. *Pain* 24 : 87-91, 1986.
- 18) Yamamoto, T., Shimoyama, N. and Mizuguchi, T. : Role of the injury discharge in the development of thermal hyperesthesia following sciatic nerve constriction in rats. *Anesthesiology* 79 : 993-1002, 1993.
- 19) Dougherty, P. M., Garriso, C. J. and Carlton, S. M. : Differential influence of local anesthetic upon two models of experimentally induced peripheral mononeuropathy in the rat. *Brain*

- Res. 570 : 109-115, 1992.
- 20) **DeLeo, J. A., Coombs, D. W., Willenbring, S., Colburn, R. W., Fromm, C. and Wagner, B. B.** : Characterization of a neuropathic pain model: sciatic cryoneurolysis in the rat. *Pain* 56 : 9-16, 1994.
- 21) **Coggeshall, R. E., Dougherty, R. M., Pover, C. M. and Carlton, S. M.** : Is large myelinated fiber loss associated with hyperalgesia in a model of experimental peripheral neuropathy in the rat? *Pain* 52 : 233-242, 1993.
- 22) **Basbraum, A. I., Gautron, M., Jazat, F., Mayes, M. and Guilbamd, G.** : The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study. *Pain* 47 : 359-367, 1991.
- 23) **Smith, H. P., Mcwhorter, J. M. and Challa, R. V.** : Radiofrequency neurolysis in a clinical model. Neuropathological correlation. *J. Neurosurg.* 55 : 246-253, 1981.
- 24) **Kajander, K. C. and Bennett, G. J.** : Onset of a painful peripheral neuropathy in the rat: a partial and differential deafferentation and spontaneous discharge in A β and A δ primary afferent neurons. *J. Neurophysiol.* 68 : 734-744, 1992.
- 25) **Frank, S. L. and Sidney, G.** : The effect of radiofrequency current and heat on peripheral nerve action potential in the cat. *J. Neurosurg.* 29 : 42-47, 1968.