Biochemical and physical treatment in rat neuropathic pain and nerve growth factor

Mitsuharu Nishi^{1,3}, Toshizo Ishikawa¹, Yoshihiro Matsumoto^{1,2}, Nobuo Katsube⁴,
Naruto Tateishi⁴, Haruno Yonamine¹, Tomohiro Matsui¹, Kozue Okano¹,
Hidenori Suzuki^{1,5}, Hideo Kataoka^{1,5}, and Osamu Nakanishi²

¹Department of Laboratory Sciences, Yamaguchi University School of Medicine

²Department of Dental Anesthesiology, Kyusyu Dental College

³Medical Appliance Co. Ltd.

⁴Minase Res. Inst., Ono Pharmaceutical Co., Ltd.

⁵Department of Orthopedic Surgeries, Yamaguchi University, School of Medicine

[Received 21 June 2004, Accepted 22 July 2004]

Abstract

The mechanisms of neuropathic pain following peripheral nerve injury have not been fully understood. Although it has recently reported that nerve growth factor (NGF) is possibly involved in regeneration of injured peripheral sensory neurons, there are only few evidences to confirm it in neuropathic pain. Therefore, we characterized the role of NGF in neuropathic pain after nerve injury by different action of treatments.

Sprague-Dawley rats were subjected and the left sciatic nerve was loosely ligated (CCI model). To quantify the pain sensation the paw withdrawal latency (PWL) against thermal stimulation was periodically measured after CCI. Either day 5 or 14, the rats were subjected for microdialysis and perfused fixation for immunohistochemistry (c-fos). The modulatory effect of anti-NGF either with N-type Ca^{2+} channels blocker (ONO-2921) or magnetic field stimulation (MF) was considered.

The PWL were increased with time from day 3 to day 14 after CCI. On day 5 to 14, the c-fos positive cells at Rexed 1–2 and 5–6 were seen accompanied with slight damage of Rexed 3–4 neurons (HE). 4-methyl catechol, as an inducer of NGF, attenuated neuropathic pain and this effect was moderately antagonized by anti-NGF. These behavioral and cell functional changes were significantly attenuated by ONO-2921 or MF treatments. However, the attenuating effect of MF was antagonized by anti-NGF while effects of ONO-2921 did not affect any.

It is concluded that the neuropathic pain may result in excessive spinal glutamate release followed by an early gene expression at input region of c-fiber as “neuronal plasticity”. Further more, we suggest that insufficient of NGF may possibly be developing neuropathic pain and that magnetic field stimulation has beneficial effect through mechanisms by acceleration of neuronal regeneration induced by NGF. However, beneficial effect of N-type Ca^{2+} channels blocker may not involved by synthesis of NGF.

Key words: neuropathic pain, neuroplasticity, CSF-glutamate, c-fos expression
magnetic field stimulation, N-type Ca^{2+} channel blocker

神経因性疼痛に対する物理学および神経化学的治療法と神経成長因子

西 光晴^{1,3} / 石川 敏三¹ / 松本 吉洋^{1,2} / 勝部 伸夫⁴ / 立石 成人⁴

与那嶺 春乃¹ / 松井 智浩¹ / 岡野 こずえ¹

鈴木 秀典^{1,5} / 片岡 秀雄^{1,5} / 仲西 修²

¹ 山口大学医学部基礎検査学講座

² 九州歯科大学歯科麻酔学講座

³ (株)メディカル・アプライアンス研究開発部

⁴ 小野薬品工業(株)水無瀬総合研究所

⁵ 山口大学医学部整形外科科学講座

緒 言

神経因性疼痛は、外傷、感染、糖尿病、悪性腫瘍などによる末梢神経損傷後にしばしば遭遇するが、発生要因の複雑さやその進展過程が極めて多様で未だ適切な治療法は十分に確立されていない。今までに、神経因性疼痛の発現は末梢神経損傷後の交感神経系の活動亢進と併せ、反復した末梢からの求心性侵害刺激情報に起因した脊髄後角シナプス伝達の亢進が深く関与すると考えられている。すなわち、末梢神経損傷後、興奮性アミノ酸 Glutamate (Glu) の放出増加が引き金となり、N-methyl D-aspartate (NMDA) 受容体の持続的活性化、続く細胞内シグナル伝達の変調がカスケード的に起き、いわゆる、“神経可塑性”状態になること¹⁾が主たる機序とされている。さらに、脊髄後角表層に c-fos 蛋白の発現がみられることもわかり²⁾、すなわち神経因性疼痛は末梢神経の損傷に起因して知覚神経が炎症を起こし、持続的 C 線維の興奮が引き金となり、脊髄入力部位における Glu 神経系の活動亢進と、それに連鎖する NMDA 活性化、細胞内 Ca²⁺ 増加、C キナーゼの活性化が、このような脊髄の特定細胞で細胞内一核内プロセスを発動して初期痛遺伝子 c-fos, c-jun 蛋白の誘導を伴い痛覚過敏症が発現するものと考えられる。中でも c-fos 蛋白は、虚血や急性痛では易傷害性小型細胞群で障害過程の初期に発現がみられ、その後の機能変化に密接に関与することから重要なマーカーといえる³⁾。

神経成長因子 (NGF) は、脊髄後根神経節と交感神経細胞に豊富に局在し、分化誘導、神経突起伸張、生存維持作用に関与する。神経細胞が傷害されると、再生修復過程にも重要な役割を果たす。末梢性侵害

刺激後、substance P, calcitonin gene-related peptide (CGRP) 含有求心性細線維と一次知覚ニューロンには高親和性 NGF 受容体 (trk-A) が発現し、局所 NGF 増加が起きることから、神経ペプチド合成過程における遺伝子発現にも NGF が関与すると考えられる。さらに、神経傷害後に末梢側で栄養因子合成が高まり、中枢側で受容体が検出されることから、細胞が損傷されることに起因し刺激されたマクロファージから分泌された IL-1 が細胞内 NGF 合成過程に作用する可能性も報告されている。また、痛みにおける NGF の関与では、糖尿病性神経因性疼痛において NGF の欠乏と同時に substance P, CGRP の欠乏がみられ、血管性神経因性疼痛においても NGF, GDNF, IL-6 やそれらのレセプターの発現が疼痛に関与していることが報告されている^{4,5)}。したがって、栄養因子は末梢神経傷害後の神経系—サイトカイン系回路網において、細胞再生による脊髄過敏をもたらすとともに、その後の細胞消退に対し修復過程を促進するという二面性の調節機構を有し、難治性慢性疼痛の病態の解明と治療法の確立に意義があると考えられる。

旧来より、磁気刺激が生体の磁気エネルギー過程において細胞膜の電荷移送により細胞機能を活性化し、末梢知覚神経の再生・修復をもたらす可能性が期待され、治療応用されてきたが、未だ科学的根拠を示す研究報告はない。最近の散見される報告では、交番磁界と低周波の組み合わせで刺激する装置が注目され、臨床で頭痛の他、関節炎などの慢性疼痛を緩和することが示された⁶⁾。しかし、頭皮への磁気刺激により c-fos 発現が著しく増加した⁷⁾との報告もあり、その詳細な機構については全く知られていない。本研究の電磁気治療装置は、50 MHz ~ 2 GHz

を搬送波とし、その波を pulse-pause することで 0.8 ~ 4 kHz および 3 ~ 10 Hz の混合周波数の刺激となるように開発した。少なくとも、その治療効果および、上述した痛みの発症機構における求心性入力および細胞内シグナル情報のマーカーの面から明らかにしたものはない。

合成薬による化学的治療はその作用機構が明らかにされつつあり、病態に応じた臨床使用が進んでいる。中でも、N 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬は末梢からの侵害刺激に対し有効とされており、今までに多くの報告がある。末梢神経損傷後、求心性入力の脊髄後角でのシナプス伝達にはシナプス前終末細胞内への Ca^{2+} 流入が重要な役割を果たしている。故に、治療を考える上で、痛覚過敏抑制には細胞内 Ca^{2+} の増加を抑制することが重要と考えられ、N 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬は他の L, N, P および Q 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬に比べ最も研究が進み有用性が期待されている。N 型 Ca^{2+} チャネルは脊髄後角の求心性知覚神経線維終末に豊富に局在し⁸⁾、脊髄レベルでの痛覚情報を制御する重要な役割を果たすと考えられている。今までに、C 線維神経終末からの神経伝達物質放出を調節すること⁹⁾、 ω -conotoxin (ω -CgTx) のクモ膜下 (IT) 投与がホルマリン皮下投与後の炎症性疼痛を抑制し¹⁰⁾、また ω -conopeptide (SNX-111) 皮下投与が坐骨神経結紮後の神経因性疼痛を抑制すること¹¹⁾ が報告されている。新規 N 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬 ONO-2921 は、今までに後根神経節の脱分極を選択的に抑えたと共に、フォルマリン誘発痛覚反応を抑制する作用が明らかにされつつある。したがって、 ω -conotoxin (ω -CgTx) と同様に神経因性疼痛における鎮痛作用が期待される。

しかし、これらの磁気刺激および N 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬が末梢感覚器における NGF の誘導を介する効果を発揮するのかは明らかでない。そこで、本研究では anti-NGF の併用がこれらの治療をどのように修飾するのかを、痛み行動とあわせ脊髄シナプス伝達機構の面より検討した。

実験方法

本実験は、山口大学動物実験委員会の実験指針、倫理基準ならびに日本国の法律第 105 号、第 6 条を遵守して行われた。

1. 実験動物および神経因性疼痛モデル作成

雄性 Sprague-Dawley ラット (体重 300 ~ 350 g, 九州動物 (株)) を用いた。明/暗 12 時間 (明 7:00 ~ 19:00)、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 条件の下で飼育し、固形飼料および飲用水は自由に与えた。偽手術 (麻酔と開創術のみ) 群では、予備実験から痛み行動には全く異常は認められなかった。

ラット神経因性疼痛モデルは、酸素 + ハロタン麻酔 (2 ~ 3%) 下にラットの頭部を脳定位装置に固定して大槽を切開し、薬物投与のための脊髄クモ膜下 (IT) カテーテル (ポリエチレンチューブ: 内径 0.28 mm, 外径 0.61 mm, 長さ 9 cm: PE-10, イントラメデック社製) および微小透析のためのループ型マイクロダイアリシス (MD 特製) プローブを先端が腰髄 1 ~ 3 レベルの IT に位置するよう挿入留置した^{12,13)}。MD プローブは Marsala ら¹³⁾ の方法に準じ、長さ 18 cm (透析範囲 $2 + 2$ cm, 内径 200 μm , 外径 300 μm , cut off 分子量 45 kDa) のキュプロファン膜ホローファイバーに透析部位以外をエポキシ樹脂でコーティングして作製した。予備実験から、本プローブのデキストロース溶液 (100 mg 含有) による回収は 37°C 下で約 40% であった。留置 3 日後に 20% 以上の体重減少、排尿障害、アロディニア、運動機能障害、ストレス症状のないラットを実験に用い、坐骨神経を絞扼 (chronic constriction injury: CCI) した。この CCI モデルは Bennett ら¹⁴⁾ の方法に準じて行った。IT カテーテル留置後 3 ~ 5 日後に再度ネンプタール麻酔 (30 mg/kg) 腹腔内投与下に左側坐骨神経を露出させ、4-0 腸線縫合糸 (クロミック) を用いて 1 mm 間隔で 4 ヲ所を不完全に絞扼した。

2. 熱刺激に対する疼痛反応 (プランターテスト) の検討

CCI モデル作成後、ラットを、プランターテスト装置 (UGO BASILE, エルエムエス 7370S, 7371) に入れ、安静状態を確認した後、左右後肢底部に熱刺激を与え、下肢を上げて、逃避行動を起こすまでの時間を自動的測定した。プランターテスト装置の熱源の強さは、I.R. Intensity 1.0 で一定とした。測定は左右交互に 5 分以上の間隔をおき 5 回ずつ行った。痛覚は左右後肢の反応潜時 (paw withdrawal latency time; PWL, 秒) の差が短縮することで評価した。

3. 脊髄マイクロダイアリシス

まず、ラットをマスクで酸素+ハロタン (4%) を吸入させ麻酔導入した。その後、ホットプレート (室町機械製) 上に置き、予めプレート温度は $23 \pm 2^\circ\text{C}$ (室温) にした。吸入ハロタン濃度を $1.0 \sim 1.5\%$ とし、鎮静状態 (触刺激で体動がない状態) を保った。前述の MD プローブの一方にポリエチレンチューブ (内径 0.58 mm, 外径 0.965 mm, 長さ 30 cm: PE50, イントラメディック製) を接続し、マイクロインフュージョンポンプを用いて人工脳脊髄液 (aCSF) を $10 \mu\text{l}/\text{min}$ で灌流し、得られた透析液を回収し分析まで凍結保存した (-40°C)。aCSF の組成は、 Na^+ 151.1, K^+ 2.6, Mg^{2+} 0.9, Ca^{2+} 1.3, Cl^- 122.7, HCO_3^- 21.0, HPO_4^{2-} 2.5 (mEq/L) とした。安静状態で、MD プローブ内の洗い出しとして 30 分間 aCSF 液を灌流させた。各測定において、得られた透析液を 10 分間毎に 2 回採取した。この 2 回の透析液中アミノ酸濃度の平均値を基準値 (baseline) とし、以後のサンプル濃度は % 基準値で表わした。その後、ホットプレートの温度を 43°C に上げ、約 1 分後 43°C となりラットが安静状態であることを確認し、10 分間毎に 20 分まで (2 回) 透析液を採取した。採取された透析液は分析まで -40°C で冷凍保存した。分析は、まず試料を o-phthalaldehyde (OPA) 誘導体化し、その液を、電気化学検出器 (ECD) を付けた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に注入し、CSF 中の Glu および serine 濃度を定量分析した。結果は base line (2 回) 値に対する変化、% base line で評価した。

4. 免疫組織化学的検討

術後 5 日目および 14 日目にラットをペントバルビタール深麻酔下に生理食塩水を全身灌流し、4% パラホルムアルデヒド+リン酸緩衝液により灌流固定した。摘出した脊髄は 10% ホルマリンで固定したのち包埋し、 $10 \mu\text{m}$ 厚さの腰髄レベルの組織標本を作成した。c-fos 蛋白は Lin Ch. Yang ら¹⁵⁾ の方法に準じて免疫組織化学染色を行った。DAB により発色させた細胞を評価した。光顕の評価では、腰髄 (L3-5) レベルの Rexed I-II, V-VI 層について、隣接する標本 3 枚を組にし、40, 400 倍のもとで DAB による黒褐色を呈した細胞を陽性細胞としてカウントし評価した。

5. 実験群

ラットを以下の群に任意に分けた。各治療は CCI 後 3 日より測定日の午前中に連投あるいは連続刺激し、午後に測定を行った。

- 1) 非治療群：生理食塩水, ip (n=9)
- 2) 4MC 単独群：NGF 合成誘導剤, $1 \mu\text{g}$, ip (n=6)
- 3) 4MC + anti-NGF 群：NGF 合成誘導剤 + 抗 NGF 併用 (n=4)
- 4) MF 群：磁気刺激 (50 MHz $\sim$ 2 GHz 搬送波 + peak 周波数数 KHz + 3 $\sim$ 10 Hz) を患部に 10 分間/日照射 (n=5)
- 5) MF + anti-NGF 群：磁気刺激 + 抗 NGF 併用 (n=5)
- 6) ONO-2921 群：N-type Ca^{2+} channel blocker, 100 mg/kg, po (n=6)
- 7) ONO + anti-NGF 群：100 mg/kg, ip + 抗 NGF 併用 (n=5)

6. 統計

PWL の左右差の経時的変化およびその群間の差については、一元配置分散分析法と PLSD による多重比較を行った。また、c-fos 陽性細胞数の群間の差については Mann-Whitney 法で評価判定した。p<0.05 を有意とした。

結 果

1. 熱刺激に対する疼痛反応

Fig. 1-A, B, C に結果を示す。CCI 後にラットは、NGF 誘導剤 4MC で PWL の低下 (PWL 左右差：3 $\sim$ 5 秒) が軽減され、その作用は anti-NGF で中等度に拮抗された (**Fig. 1-A**)。これに対し、MF 群では CCI 後 5 日目より 14 日にかけて経時的な熱刺激に対する反応潜時の短縮が抑制された。この MF の作用は、anti-NGF 投与でほぼ拮抗された (**Fig. 1-B**)。しかし、ONO-2921 はほぼ同様で、10, 14 日に PWL 短縮を有意に抑制したが、anti-NGF 併用で変化がなく、その関与は明らかでなかった (**Fig. 1-C**)。

2. CSF-glutamate 濃度変化

CSF-Glu 濃度の変化を **Fig. 2-A, B** に示す。CCI 後 5 日目では、熱刺激後全ての群において有意な変化はみられなかった。14 日目において、非治療群では熱刺激後 10 分で %baseline は 22%, 20 分で 15% と有意に増加した。MF 群では刺激後 10 分でその増加を抑制し、また ONO 群では 10 分および

Fig. 1 The thermal hyperalgesia assessed by Plantar testing following sciatic nerve ligation.

■: Indicates 4-methyl cathechol (4MC: Fig. 1-A), magnetic field stimulation (MF: Fig. 1-B), and ONO-2921 (Fig. 1-C), respectively. □: Indicates combination with anti-NGF in each treatment. Statistical significances are marked with that; *: compared with sham operated group, #: compared with non-treated group, \$: compared with treatment alone. Following CCI rats showed decrease of paw withdrawal latency (PWL) with time. With either magnetic field stimulation (Fig. 1B) or ONO-2921 (Fig. 1C), this pain sensation was equally attenuated. However, the effects of MF were antagonized by combination with anti-NGF while effects of ONO2921 did not affect by anti-NGF.

20 分共に強く抑制した。

3. 脊髄細胞の c-fos 発現

坐骨神経結紮後 14 日における脊髄表層部における c-fos 陽性細胞の染色例を **Fig. 3** に示す。CCI 後の c-fos 発現の結果を **Fig. 4-A, B** に示す。CCI 後 5 日で平均 18 細胞、また 14 日には 23 細胞であった。これらは脊髄表層に密に発現した。CCI 後 5 ないし 14 日ともに、MF 群では脊髄表層細胞での c-fos 発現を抑制し (平均 8), また、一方で ONO-2921 はほぼ同様で c-fos 発現を軽減した (平均 7 細胞)。

Fig. 2 The CSF-glutamate level after sciatic nerve ligation.

Number of animals in each group was 4 to 7. To evaluate csf-glutamate we characterized glutamate release by giving thermal stimulation to rat paw as indicated with dashed column. On day 14, csf-glutamate gradually increased by thermal stimulation. This increase of glutamate was apparently attenuated with ONO-2921 and mildly attenuated with MF.

考 察

本研究から、神経因性疼痛の発生に脊髄 glutamate 神経系の興奮や介在ニューロンの脱抑制が細胞内遺伝情報を変調させ脊髄神経の可塑性に伸展することが主たる機構として再確認できた。さらに、重要な所見は Ca 拮抗薬では明らかでなかったが、磁気刺激治療の鎮痛効果が NGF 抗体併用投与で減弱したことから、損傷された末梢神経への磁気刺激は末梢知覚神経系、交感神経節に局在する神経成長因子を活性化させ知覚神経系の機能再建に関与した

Fig. 3 Representative photograph for positive cell of c-fos immunohistochemistry on day 14 following sciatic nerve ligation. Dark cells were counted as positive and we calculated averages from three consecutive sections.

可能性が示唆される。

1. 痛み発症と NGF

今までに多くの研究から、神経因性疼痛の発生機構には脊髄神経系の可塑性が最も有力とされている。すなわち、求心性刺激が繰り返し脊髄に入力されると脊髄シナプスにおける glutamate 放出の亢進に加え、細胞の c-fos 発現、介在神経の障害が関与するという考えである。さらに、末梢知覚神経系が何らかの損傷を受けると、炎症を引き起こしサイトカインなどのメディエーターは栄養因子を合成誘導する。しかし、急性痛ではその痛覚伝達の促進作用としての NGF が重要であるが、一方末梢神経の損傷では NGF 不足から Schwann 細胞 (glia) のアポトーシスが起こり、感覚受容器の障害をきたしていることがわかり、このように NGF は痛覚において二面性の働きを有する。後者についてはほとんど報告がなく、本研究では神経可塑性をもたらす要因を治療マーカーとして、化学治療法とは作用の異なる電

Fig. 4 Quantitative analysis of c-fos expression following sciatic nerve ligation.

*Indicates statistical significance compared with non-treated group ($p < 0.05$). Most dense location was superficial layer of spinal cord and both treatments were attenuated for developing c-fos expression associated with analgesic effect as described before.

磁波治療について、その治療効果の一部に神経栄養因子の誘導を介するものかどうか検討したものである。

本研究の結果、磁気刺激で熱性痛覚過敏が軽減され、その作用は anti-NGF 併用で拮抗されたことから、磁気刺激の鎮痛効果の一部には NGF の合成誘導の促進作用が考えられる。患部に連日照射したもので、今までの予備実験から、磁気刺激は末梢循環の改善作用の可能性をサーモグラフィーによる体表温度の増加作用から認めた。また、ウシ脳由来 glia 細胞への in vitro の刺激で細胞内 Ca^{2+} 上昇が認められ (未発表)、これらのことから末梢感覚受容器の賦活作用を介し、また一部では血管拡張作用もわかり、したがって傷害された可逆の状態にある痛覚受容器の機能回復をする可能性が示唆される。このことは、最近の報告でも NGF の神経因性疼痛における関連を示唆するいくつかの事実が散見され興味深い。Chattopadhyay らは、後根神経節に herpes

simplex virus (HSV) -based vectors を注入すると NGF が誘導され、neuropathy が軽減されること¹⁶⁾を、また Lelkes らは、PC12 細胞を用いた糖尿病性神経因性モデルで反応性酸素ラジカル、アポトーシス、NGF 関連情報伝達、MAPK の関連が判明したこと等を報告した¹⁷⁾。したがって、これらのことから NGF が知覚神経系の傷害状態において明らかに関与すること、そしてアポトーシスに陥った感覚神経では神経因性疼痛が発現しうることが伺われ、本研究と密接に関連する事実と思われ、今後 glia 細胞へのこの磁気刺激の影響をより明確にする検討が必要と考えられる。

2. 磁気刺激と神経因性疼痛

本研究結果から、磁気刺激は神経損傷でもたらされる神経因性疼痛に対し抑制しうることがわかった。したがって、C 神経あるいは A β 神経線維を介する求心性非侵害受容に効果を発揮したものと考えられる。電気、電磁波、磁界刺激がさまざまな人体へ及ぼす影響については古くより多くの試みがある。感覚器については、臨床で静磁場や低周波刺激とならび検討され、いくつかの報告では神経因性疼痛で有用とする報告もあるがその根拠は明らかでない。我々の予備実験で、PC12 細胞に同様な刺激を与えると細胞内への Ca²⁺ 流入が上昇し細胞の賦活作用の可能性がある（未発表）。また、ヒトで下肢の表面温度が上昇したこと、血管拡張作用を有する可能性もある（未発表）。さらに今回の研究から、坐骨神経の障害された部位に連日照射を繰り返すことで熱性痛覚過敏が軽減され、その作用は anti-NGF の局所投与で部分的に拮抗された。これらのことを考え合わせると、磁気刺激は末梢知覚神経系の障害を賦活して NGF 合成誘導を関与したと思える細胞活性化（修復作用）をもたらし痛みを抑えた可能性が示唆される。また、特に末梢炎症反応に起因した知覚神経細胞の障害過程における神経栄養因子の修飾作用もその関与が考えられた。また、NGF 合成誘導を引き起こす 4 methyl catechol 併用で再び作用が発現することから、本装置の末梢神経への作用に glia などサテライトへの刺激を介し、NGF 合成を促進し神経系の分化誘導をもたらす可能性も否定できない。Pleger らは、ヒトで頭部の知覚運動領域への磁気刺激が頭痛を軽減することを最近報告した⁶⁾。しかし、依然としてその作用機構は不明の

ままで、我々の脊髄レベルの検討も含め、今後の検討が急務である。たとえば、磁気刺激が in vitro での単純化した系で glia 細胞における栄養因子の分泌や細胞再生しうるのかなど、基礎的解析の検討が強く望まれる。

3. 化学療法（N 型 Ca²⁺ チャネル阻害薬）と神経因性疼痛

本研究から、脊髄シナプスで前細胞に局在し、伝達物質の放出を制御する N 型 Ca²⁺ チャネルは熱性痛覚過敏を抑え、その作用に脊髄 glutamate 放出の亢進を著しく抑制することがわかり、Nakanishi らの報告¹⁸⁾に良く符合した。しかし、この作用は、anti-NGF で影響されなかったことから、栄養因子を介する作用は否定された。作用部位が脊髄の細胞膜上であることからそのことは良く理解できる。

末梢神経損傷後、求心性刺激情報が繰り返し脊髄後角に入力されると、神経終末から Glu や sP などの神経伝達物質の放出が亢進し、続いて後細胞では NMDA 受容体が活性化され Ca²⁺ 細胞内流入が促進し、それにより NO やアラキドン酸などが逆行性にシナプス前細胞を刺激し、さらに神経伝達物質放出を亢進させるという“positive feed back”が考えられている^{14,15)}。また、NMDA 受容体の活性化は PKC の活性化、さらに核内 c-fos 蛋白発現へと連鎖する。したがって、求心性神経の興奮伝導とそれに続く興奮性神経伝達物質の放出を抑制すれば、それ以後の神経伝達の変調や細胞変性などを抑制することができ痛覚過敏の発現を抑制すると考えられる。本研究から、ONO-2921 の投与で熱性痛覚過敏が経日的に改善されることがわかった。その作用は予備実験において nimodipine の鎮痛効果を拮抗しうる用量の L 型 Ca²⁺ チャネル作動薬 BayK8644 の併用投与によっても拮抗されなかった。したがって、ONO-2921 の鎮痛効果は L 型よりも主に N 型 Ca²⁺ チャネル阻害作用によるものと考えられる。また、ONO-2921 の投与により熱刺激時の脊髄 Glu の放出抑制も確認された。これは、従来から報告されている N 型 Ca²⁺ チャネル阻害の効果に良く符号する。

神経因性疼痛は末梢神経が何らかの傷害を受けた後に持続的求心性入力、つまり脊髄グルタミン酸放出の増加が引き金となり後角ニューロンの細胞内 Ca²⁺ 増加、連鎖する細胞内情報伝達、さらに今回明らかとなった遺伝情報の変調が、いわゆる神経可

塑性をもたらし発症するものと考えられる。また、抑制性介在ニューロンの易傷害性が脱抑制をもたらし、すなわち脊髄知覚神経系の調節機構の破綻が起きていることが密接に関与することが判明した。したがって、痛みの急性期に傷害部位の興奮を緩和し、求心性入力をいかに抑えるか、さらに脊髄細胞の再生をもたらし治療法が臨床応用可能と考えられる。

今後、末梢神経損傷モデルにおける症状発現時（手術後3日目以降）の末梢 NGF 含量と mRNA の変化を行動観察の結果と考え合わせ、神経因性疼痛の病態のさらなる理解、および、それに対する電磁波照射の作用機構を明らかにしたい。

結 論

本研究から、末梢神経損傷後の神経因性疼痛は、1) 脊髄後角の興奮性伝達物質 Glu の増加が、2) 脊髄表層細胞の遺伝情報の誘導を起こすこと、とりわけ脊髄 Glu 放出亢進を引き金とする連鎖する細胞内ー核内プロセス過程の変調、さらに脊髄腹側のネクローシスが加わり脊髄知覚神経系の調節機構の破綻（脱抑制）、すなわち脊髄神経の可塑的状态が密接に関与することがわかった。このことは、電磁波刺激が、熱刺激に対する痛覚過敏を軽減し、その作用に脊髄 Glu 放出の抑制に加え、脊髄表層のアポトーシス発現を軽減した。磁気刺激治療では NGF 抗体でその鎮痛作用が減弱し、また合成誘導（4MC）で増強がみられたことから、損傷された末梢神経への磁気刺激は末梢知覚神経系、交感神経節に局在する神経成長因子を活性化させ、知覚神経系の機能再建に関与した可能性が示唆される。

文 献

- 1) Coderre, T. J., Katz, J., Vaccarino, A.L. and Melzack, R., Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence, *Pain*, 52 (1993) 259-285.
- 2) Ishikawa, T. and Nakanishi, O., Development of apoptosis of spinal cord neurons in rat neuropathic pain, *Pain Res.*, 14 (1999) 81-87.
- 3) Yang, L.C., Marsala, M., Orendacova, J. and Yaksh, T.L., Knee joint inflammation attenuates spinal FOS expression after unilateral paw formalin injection in rat. *Neurosci. Lett.*, 225 (1997) 98-92.
- 4) Yamamoto, M., Ito, Y., Mitsuma, N., Hattori, N. and Sobue, G., Pain-related differential expression of NGF, GDNF, IL-6, and their receptors in human vasculitic neuropathies, *Intern. Med.*, 42 (2003) 1100-1103.
- 5) Pittenger, G. and Vinik, A., Nerve growth factor and diabetic neuropathy, *Exp. Diabetes Res.*, 4 (2003) 271-285.
- 6) Pleger, B., Janssen, F., Schwenkreis, P., Volker, B., Maier, C. and Tegenthoff, M., Repetitive transcranial magnetic stimulation of the motor cortex attenuates pain perception in complex regional pain syndrome type I, *Neurosci. Lett.*, 356 (2) (2004) Feb 12; 87-90.
- 7) Hausmann, A., Weis, C., Marksteiner, J., Hinterhuber, H. and Humpel, C., Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation enhances c-fos in the parietal cortex and hippocampus, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 76 (2) (2000) Mar 29; 355-362.
- 8) Takemura, M., Kiyama, H., Fukui, M., Tohyama, M. and Wada, H., Distribution of the ω -conotoxin receptor in rat brain, An autoradiographic mapping, *Neuroscience*, 32 (1989) 405-416.
- 9) Maggi, C.A., Tramontana, M., Cecconi, R. and Santicoli, P., Neurochemical evidence for the involvement of N-type calcium channels in transmitter secretion from peripheral endings of sensory in guinea pigs, *Neurosci. Lett.*, 114 (1990) 203-206.
- 10) Melmberg, A.B. and Yaksh, T.L., Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: blockade of N-and P-type channels inhibits formalin-induced nociception, *J. Neurosci.*, 14 (1994) 4882-4890.
- 11) Melmberg, A.B. and Yaksh, T.L., Pharmacology of the spinal action of kitorolac, morphine, ST-91, U50488H, and L-PIA on the formalin test and in isobolographic analysis of the NSAID interaction, *Anesthesiology*, 79 (1993) 270-281.
- 12) Yaksh, T.L. and Rudy, T.A., Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space, *Physiol. Behav.*, 17 (1976) 1031-1036.
- 13) Marsala, M., Malmberg, A.B. and Yaksh, T.L., The spinal loop dialysis catheter: characterization of use in the unanesthetized rat, *J. Neurosci. Methods*, 62 (1995) 43-45.
- 14) Bennett, G.J. and Xie, Y.K., A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man, *Pain*, 33 (1988) 87-107.
- 15) Lin Ch, Yang, Judita, O., Victor, W., Ishikawa, T. and Marsala, M., Transient spinal cord ischemia in rat: the time course of spinal FOS protein expression and the effect of intraischemic hypothermia (27°C), *Cell. Mol. Neurobiol.*, 20 (3) (2000) 382-394.
- 16) Chattopadhyay, M., Goss, J., Wolfe, D., Goins, W.C., Huang, S., Glorioso, J.C., Mata, M. and Fink, D.J., Protective effect of herpes simplex virus-mediated neurotrophin gene transfer in cisplatin neuropathy, *Brain*, 4 (2004) 929-939.

- 17) Lelkes, E., Unsworth, B.R. and Lelkes, P.I., Reactive oxygen species, apoptosis and altered NGF-induced signaling in PC12 pheochromocytoma cells cultured in elevated glucose: an in vitro cellular model for diabetic neuropathy, *Neurotox. Res.*, 3 (2) (2001) 189-203.
- 18) Nakanishi, O., Ishikawa, T. and Imamura, Y., Modulation of formal in-evoked hyperalgesia by intrathecal N-type Ca channel and protein kinase C inhibitor in the rat, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 19 (2) (1999) 191-197.

Address for correspondence: Toshizo Ishikawa, M.D.

Department of Laboratory Sciences, Yamaguchi University School of Medicine

1-1-1 Minami-kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8554, Japan

Tel / Fax: 0836-22-2888 E-mail: medlibn@yamaguchi-u.ac.jp