

主論文

Prolonged-duration pulsed radiofrequency is associated with increased neuronal damage without further antiallodynic effects in neuropathic-pain-model rats

(パルス高周波療法の施行時間延長は神経障害性疼痛モデルラットにおいて鎮痛効果を増幅せず神経障害を引き起こしている)

【緒言】

神経障害性疼痛は長期間続く痛みであり、治療に難渋する。さまざまな薬が治療に使用されるが、その効果はいまだ十分ではなく、副作用の問題もある。パルス高周波療法(PRF)は神経障害性疼痛治療に対する非薬物治療として注目されている。従来からある高周波熱凝固療法と比べて、低温(42 度以下)のため非破壊的であり合併症が少ない。臨床報告ではすでに有効性が示されており、動物実験では鎮痛機序について研究はあるが、PRF の至適条件や鎮痛機序については未だ不明な点が多い。

本研究の目的は、神経障害性疼痛に対する PRF 治療において、施行時間延長がもたらす効果を検討することである。また、神経障害のマーカーである Activating Transcription Factor 3(ATF3)と神経障害性疼痛形成に関わる因子の一つである Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated cation channels(HCN)についても施行時間により比較検討した。

【対象と方法】

対象

雄性 Sprague-Dawley ラット (体重 160-220g) を用いた。ラットは餌、水を自由に摂取でき、12 時間毎の明暗管理をされたケージの中で、25 度に空調管理し、飼育した。

研究デザイン

ラットを PRF 施行時間により 3 群 {PRF 治療通電なし(sham)、PRF 治療 6 分(PRF6)、PRF 治療 12 分(PRF12)} に分けて行動評価により鎮痛効果を評価した。また、別のラットを 4 群 {処置なし(naive)、sham、PRF6、PRF12} に分けて、PRF 施行後 7 日目に後根神経節 (DRG) を採取し、ATF3 および HCN チャンネルの mRNA 量を測定した。

神経障害性疼痛モデル

イソフルラン吸入麻酔下に、左第 6 腰椎横突起を切離後に、左第 5 腰神経を 6-0 絹糸で結紮する Spinal nerve ligation (L5SNL) 手術を行った。

PRF 治療

イソフルラン吸入麻酔下で L5SNL 手術と同部位を切開し、結紮した L5 神経の中枢側である DRG を露出した。通電針を DRG に直視下で接触させ、通電治療した。通電には臨床使用されている装置 (Neuro Therm JK3) を用い、300kHz のパルスで 20ms で 2Hz の通電を施行した。

行動評価

疼痛行動は、処置前、処置後 7、14、21 日目に von Frey test を用いて評価した。von Frey フィラメントで後足底を刺激し、paw withdrawal threshold (PWT) を計測して、機械的アロディニアを評価した。von Frey フィラメントは 0.4、0.6、1.0、1.4、2.0、4.0、6.0、8.0、15.0 g の 9 本あり、この内の 1 本で 1・2 秒間、2 g の力で刺激した。その反応と刺激フィラメントの強さに基づいて、Dixon の up-down method と Chaplan らの数式を用いて 50 % PWT を決定した。

mRNA 発現量の解析

ラットは PRF 処置後 7 日目に、深麻酔下で断頭し、L5DRG を採取し RNAlater で保存した。Total RNA を QIAzol Lysis Reagent と RNeasy Lipid Tissue Mini Kit を用いて抽出した。cDNA は Total RNA1 μ g を鋳型にし、QuantiTect Reverse Transcription Kit を用いて合成した。Real-time reverse transcription PCR を StepOnePlus Real-Time PCR system を用いて行い、既知濃度サンプルによるスタンダード曲線から各サンプルの mRNA 濃度を計算した。また内部コントロールとして GAPDH を用いた。

統計分析

事前に施行した我々の実験からサンプルサイズを決定した。行動評価の 3 群間の比較には two-way repeated measures ANOVA と Bonferroni's post-hoc test を用い、mRNA 発現量の 4 群間の比較には one-way ANOVA と Bonferroni's post-hoc test を用いた。データは平均 \pm 標準誤差 (SEM) で表し、P 値 <0.05 を有意とみなした。

【結果】

行動評価

処置前の 3 群間に有意差はなかった。L5SNL モデル作成後 7、14 日目では処置前と比較し有意に 50%PWT 値が低下し、接触性アロディニアを認めたが、3 群間で有意差はなかった。PRF 治療を L5SNL 後 14 日目に施行したところ、L5SNL 後 21、28 日目では PRF6 と PRF12 の群で sham 群に比べて有意に接触性アロディニアの軽減を認めた。しかし、PRF6 と PRF12 の 2 群間には有意差を認めなかった。

ATF3 の mRNA 発現量

Naive 群では発現量が極めて少なく、L5SNL を施行した 3 群で ATF3 発現は有意に増加した。PRF 治療軍の中で、PRF12 群は sham 群に比べて有意に発現量が多かった。

HCN 1、HCN2 の mRNA 発現量

HCN1、2 とも L5SNL 施行した 3 群では naive 群に比べて有意に低下していた。PRF 治療の 3 群間では有意差はなかった。

【考察】

本研究では、L5SNL 神経障害性疼痛モデルラットにおいて PRF 施行時間延長による効果を検証した。PRF 治療は接触性アロディニアを改善したが、PRF 施行時間が 6 分と 12 分では効果に差はなかった。一方、神経障害のマーカーである ATF3 は有意に PRF 施行 12 分で増加しており、PRF 施行時間の延長は神経障害を引き起こしている可能性が示唆された。また、PRF の鎮痛メカニズムについては HCN チャンネルとの関係性は示されなかった。

動物モデルは L5SNL 神経障害性疼痛モデルと直視下 PRF 治療モデルを採用した。SNL モデルは長期に接触性アロディニアを引き起こし再現性が高く von Frey test での評価が可能である。また責任病変が明確であるため、PRF 治療介入時にも責任病変の DRG に施行することができた。直視下 PRF 治療モデルは臨床とは異なり侵襲的であるが、sham 群と比較することで PRF 通電の影響を比較することができた。

組織採取は PRF 治療介入後 7 日目に行った。ATF3 は転写因子であることから神経損傷では一過性に上昇すると考えられる。Tsuji no らは ATF3 のピークは神経切断後 3-7 日間と報告している。したがって、組織採取の時期は行動評価を行った PRF 治療介入後 7、14 日目のうち、7 日後とした。

現在 PRF 治療の至適施行時間は確立していない。Tanaka らは薬剤性神経障害性疼痛モデルラットを用いて経皮的 PRF を 2、4、6 分で比較し、PRF 施行時間が長いほど鎮痛効果があることを示しており、施行時間延長が鎮痛効果の増強を促す可能性を示唆した。本研究では PRF 施行を 6 分と 12 分で比較し、有意な差はなかった。今回の研究はラットの DRG に直視下で PRF を施行し、施行時間による影響を比較した初めての研究である。

PRF 治療は一般的に非破壊的な治療手段とされている。しかし、Er din らは PRF により DRG の細胞や神経に微細構造の変化をもたらすと報告している。今回の研究では ATF3 の mRNA 発現量が PRF 施行時間延長と共に増加していた。つまり、PRF 施行時間延長は神経障害を引き起こしている可能性がある。しかし、臨床的に問題となる副作用と言えるかはさらなる研究が必要である。

PRF による鎮痛機序は神経伝達の変化によるとされている。また、HCN チャンネルは過分極電流 (I_h) による異所性発火を引き起こし神経障害性疼痛に至る重要な因子と考えられている。Chaplan らは SNL モデルラットの DRG で HCN チャンネルが減少するにも関わらず、 I_h は増強されると報告している。この HCN チャンネルと I_h の矛盾の原理は解明されていない。本研究では、HCN チャンネルの発現

量に対する PRF の影響は有意なものではなかった。今後は鎮痛機序に関するさらなる研究が必要である。

【結論】

PRF 施行時間の延長による効果は限界があり、神経障害を引き起こしている可能性もある。PRF の鎮痛効果に関して、HCN チャネルの関与ははっきりしなかったが、鎮痛機序の解明が至適条件の解明にも繋がるため、さらなる研究が必要である。