

原 著

術後痛ラットモデルにおける神経成長因子と ロイコトリエンB4の作用

獨協医科大学越谷病院 麻酔科

久野裕一郎

要 旨 術後痛における神経成長因子 (NGF) とロイコトリエンB4 (LTB4) の役割を調べるために, Brennanの術後痛ラットモデルを用いて, 足底部の皮膚切開部位にNGF, LTB4, 抗NGF抗体, LTB4受容体拮抗薬であるONO4057を投与して, その疼痛閾値に対する効果を von Frey testで検討した. 結果はNGFとLTB4投与で術後痛は変化しなかったが, 抗NGF抗体とONO4057投与により術後痛は有意に減少した. よって抗NGF抗体とONO4057は, 術後痛を抑制する可能性が示唆された.

Key Words : 神経成長因子, ロイコトリエンB4, 術後痛

緒 言

術後痛とは, 皮膚切開や手術侵襲による組織損傷により産生された炎症性メディエーターにより侵害受容器が活性化され痛みが生じるもので, 安静時痛と体動時痛, そして内臓痛などが複合した手術直後から数日間感じる痛みである¹⁾. 近年, 神経成長因子 (NGF) が疼痛伝達に関与しているとの報告があるが^{2~4)}, これまでに術後痛とNGFに関する報告⁵⁾は少ない. そこで今回はNGFに加えケミカルメディエーターのひとつであるロイコトリエンB4 (LTB4)⁶⁾が術後痛にどのような影響を与えるのかを術後痛の実験モデルとして確立されているBrennanのラットモデル⁷⁾を用いてNGF, LTB4, NGF活性を阻害する抗NGF抗体そしてLTB4に特異的に拮抗するONO4057を投与して各疼痛閾値の変化を比較検討した.

対象および方法

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を受けた後, 30匹の雄性Sprague-Dowleyラット250-300gを用い実験を施行した. 実験が終了したラットは, 吸入麻酔薬であるイソフルレンの高濃度投与により安楽死させた.

平成17年9月16日受付, 平成17年10月24日受理

別刷請求先: 久野裕一郎

〒343-8555 埼玉県越谷市南越谷2-1-50

獨協医科大学越谷病院 麻酔科

1. 術後痛モデル作製 (Brennanモデル⁷⁾)

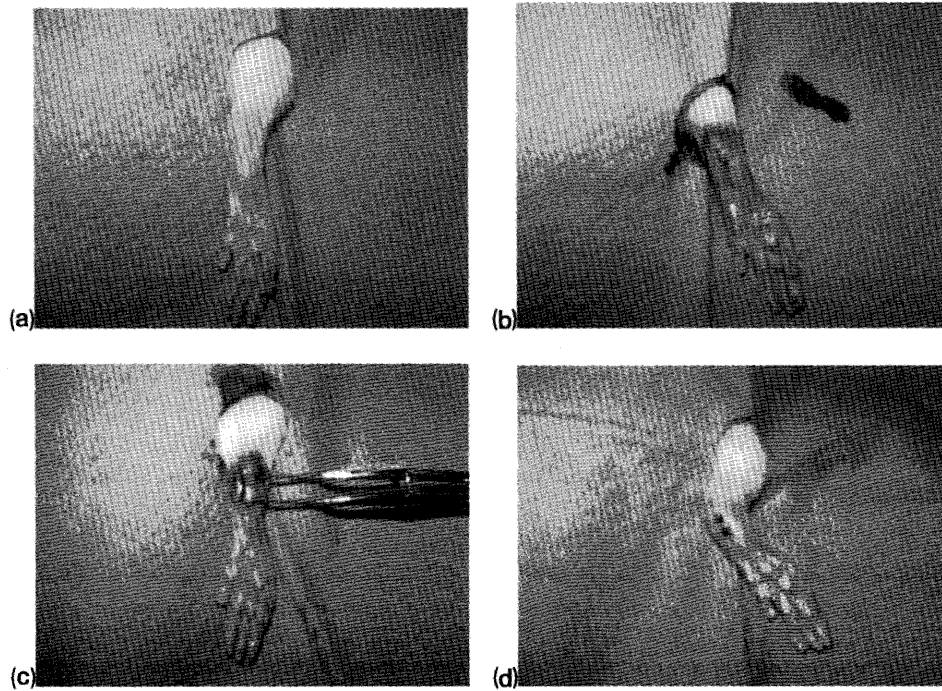
まず10×10×20 cmのプラスチックゲージにラットを入れ, 3%イソフルレンをゲージに流すことにより全身麻酔を導入し, その後鼻マスクにより麻酔を維持して手術を開始した. まず右後肢足底にポビドンヨード液にて消毒を行い, 右後肢踵より5 mmのところから10 mmの皮膚・筋膜をブレードNo.11のメスにて切開を加える. 続いて足底筋を持ち上げ, 筋線維に沿って切開を加えた後, その部位を5-0ナイロンにて2針マットレス縫合後麻酔から覚醒させた.

なお損傷部位と非損傷部位の比較検討のため, 各測定部位は, メスにより皮切を加えた部位より5 mm中枢側を切開近位部, 皮切部位中央を切開部, 皮切部位より10 mm末梢側を切開遠位部と分類して実験を施行した (図1, 測定部位). 実験期間中毎日ラットの観察を行い, 切開部位の感染が生じたラットは本研究から除外した.

2. 実験群

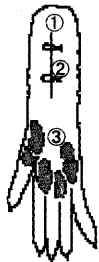
ラットは投与薬剤により無作為に5群 (N=6) に分け, 各薬剤投与量は同量 (100 μ l) とし, 縫合する際30ゲージ注射針を用いメスにより皮切を加えた部位に注入した.

- コントロール群: 生理食塩水単独.
- NGF投与群: NGF 5 μ g (SIGMA, USA) と生理食塩水.
- LTB4投与群: LTB4 10 μ g と生理食塩水.
- 抗NGF抗体投与群: anti-NGF100 μ l (4 mg/ml)



- (a) 手術部位 (SDラット右後肢)
 (b) かかとより5 mmの所から10 mmの皮膚切開と筋膜切開を行う
 (c) 足底筋をピンセットにより持ち上げ、筋線維に沿って切開を加える
 (d) 切開創はマットレス縫合にて2針縫合する

測定部位



- ① (切開近位部) : 切開部位より5mm 中枢側
 ② (切開部) : 切開部位中央
 ③ (切開遠位部) : 切開部位より10mm 末梢側

図1 Brennanモデルと測定部位

(SIGMA, USA).

E. ONO4057投与群: ONO4057 (ONO pharma.Co.)
 1 mgと生理食塩水.

3. 疼痛評価

疼痛評価として von Frey test⁸⁾ (決まった力を与えることができるいくつかのフィラメントを網の上においたラットの後肢足底にあてて、逃避反応を起こす閾値を測定する機械的刺激方法: 低下は疼痛閾値の低下を意味し、上昇は疼痛閾値の上昇を意味する) を術前と術後1, 2, 4, 24, 48, 72, 96時間後に施行した.

4. 統計処理

各群について、術前後の von Frey testの値に対して

は各測定部位で paired t-test を施行した。また各群間において、それぞれの術前値と術後値の変化率 (% MPE: percent of maximum possible effect) として以下の式にて算出し評価した⁹⁾.

$$\% \text{ MPE} = (\text{処置後測定値} - \text{処置前測定値}) \div (\text{cut off 値} - \text{処置前測定値}) \times 100 \%$$

各群はコントロール群に対して ANOVA test により比較検定を行った (cut off 値 = 60 g).

結 果

1. 各群内の比較

A: コントロール群

すべての部位において術前に比べ有意に疼痛閾値の低下を示した。疼痛閾値の低下は切開近位部では24時間

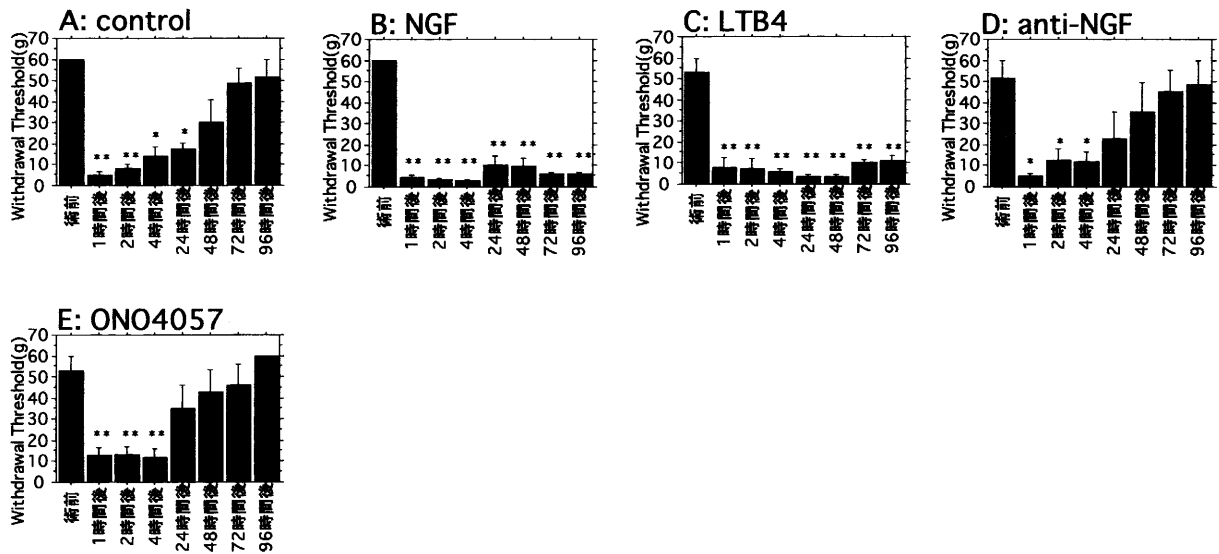


図2 切開近位部における von Frey test (grams)

切開近位部 (切開創より5 mm 中枢側) における各薬剤投与後の疼痛閾値の経時的変化を示す。
(対術前値) * : P < 0.05, ** : P < 0.01

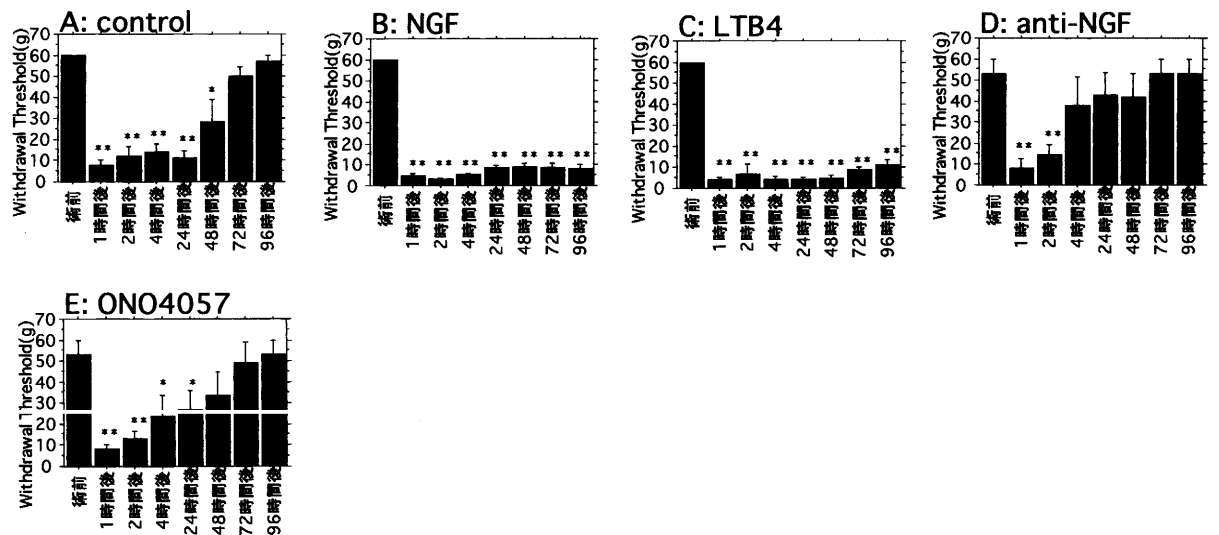


図3 切開部における von Frey test (grams)

切開部 (切開創中央部) における各薬剤投与後の疼痛閾値の経時的変化を示す。
(対術前値) * : P < 0.05, ** : P < 0.01

後まで、切開部では48時間後まで、切開遠位部では24時間後まで有意差を認めた (図2-A, 図3-A, 図4-A)。

B, C : NGF群, LTB4群

NGFとLTB4の投与は、すべての部位において有意に疼痛閾値の低下を示したが、特に切開部において著しく、96時間後になっても持続した。(図2-B・C, 図3-B・C, 図4-B・C)

D : 抗NGF抗体群

術前と比較して切開近位部においては4時間後まで、切開部では2時間後まで有意差が認められた。切開遠位

部では、全経過を通して有意差は認められなかった。(図2-D, 図3-D, 図4-D)

E : ONO4057群

切開近位部では4時間後まで術前と比較して有意差が認められた。切開部では24時間後まで有意差が認められた。切開遠位部においては術前値と比較して有意差は認められなかった。(図2-E, 図3-E, 図4-E)

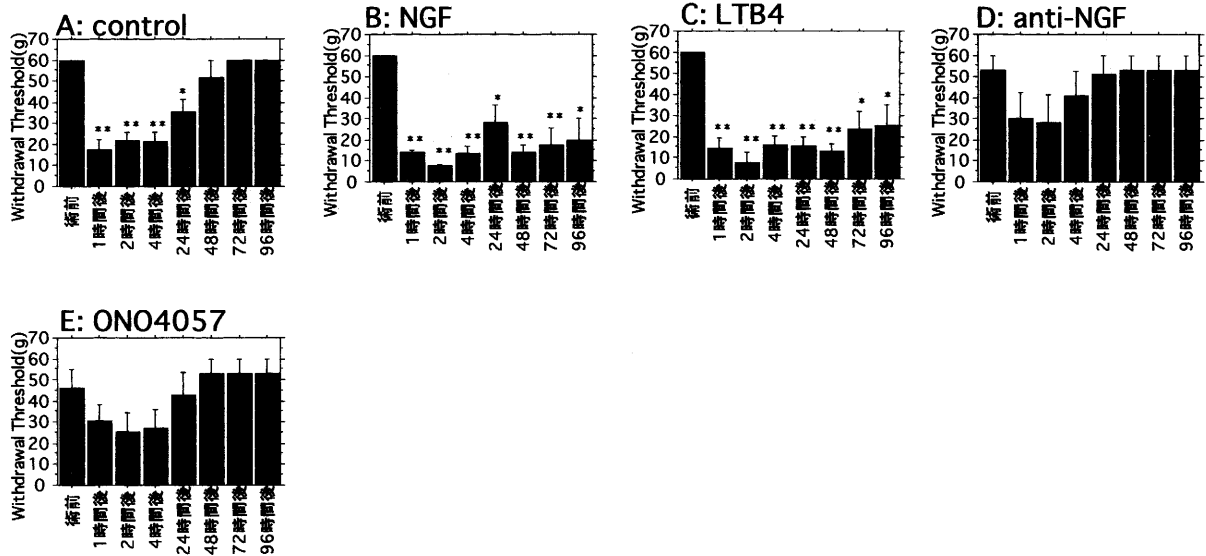


図4 切開遠位部における von Frey test (grams)

切開遠位部(切開創より10 mm末梢側)における各薬剤投与後の疼痛閾値の経時的変化を示す。

(対術前値) * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$

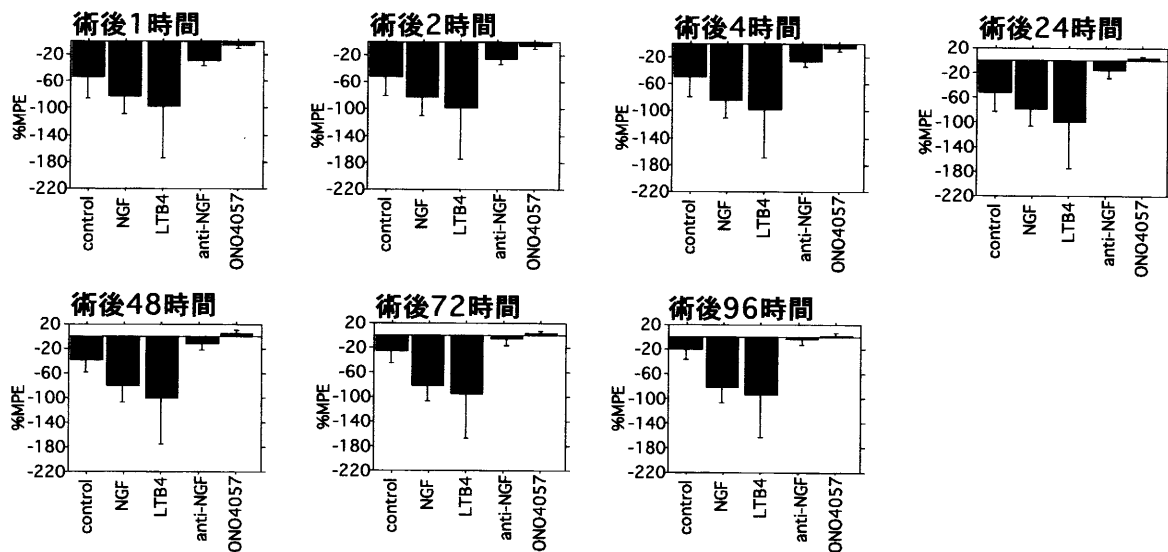


図5 切開近位部における各投与薬剤のコントロール群に対する比較 (%MPE)

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$

2. 各薬剤のコントロール(生理食塩水単独投与)群との比較

1) 切開近位部(図5)

全ての薬剤でいずれの経過においても有意差は認められなかった。

2) 切開部(図6)

NGF群: 有意差は認められなかった。

LTB4群: 有意差は認められなかった。

抗NGF抗体群: 全経過を通して%MPEは有意に小さかった($P < 0.05$)。この有意差は24時間後に最も大き

く($P < 0.0053$)。その後徐々にコントロール群に近づいた。

ONO4057群: 72時間後まで有意差が認められた。

3) 切開遠位部(図7)

NGF群: 96時間後には有意差が認められた。

LTB4群: 48時間以後は有意差が認められた。

抗NGF抗体群: 有意差は認められなかった。

ONO4057群: 有意差は認められなかった。

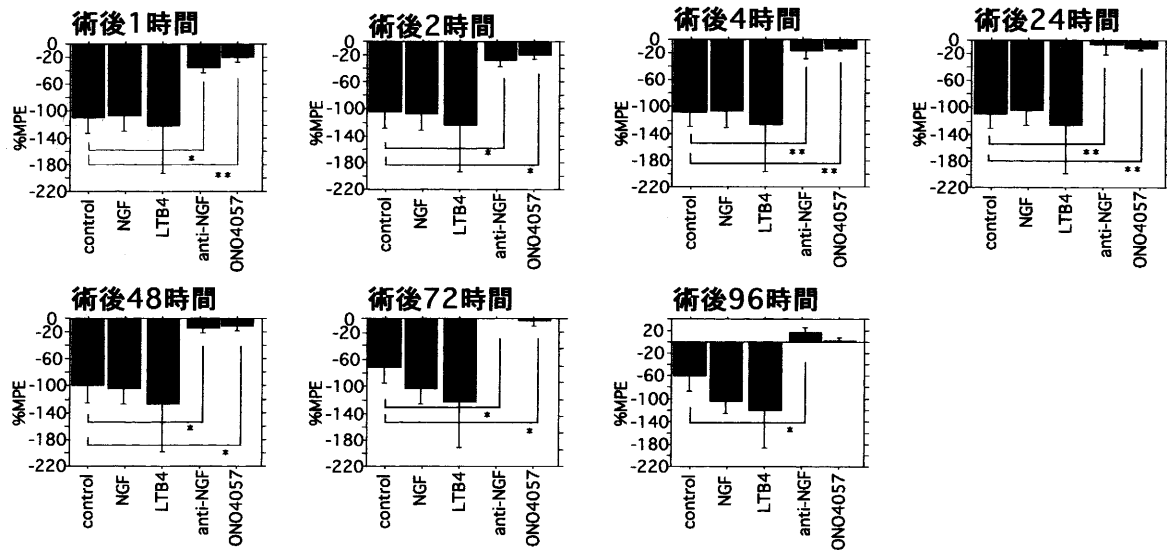


図 6 切開部における各投与薬剤のコントロール群に対する比較 (% MPE)
* : P < 0.05, ** : P < 0.01

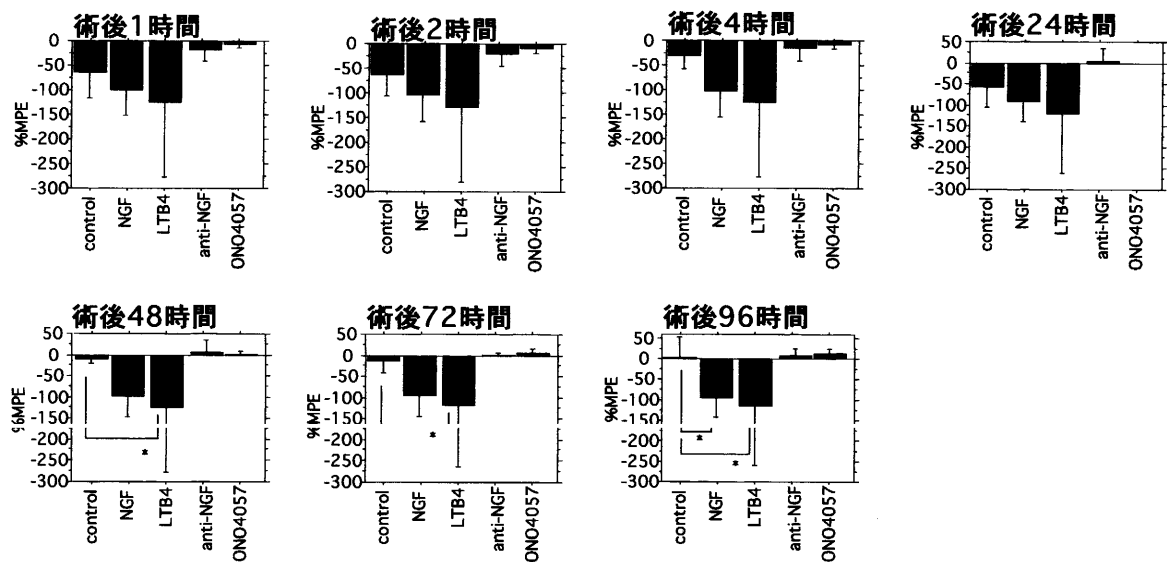


図 7 切開遠位部における各投与薬剤のコントロール群に対する比較 (% MPE)
* : P < 0.05, ** : P < 0.01

考 察

手術により組織が損傷されるとブラジキニンが産生され、発痛の原因となり、同時に細胞膜のホスホリパーゼ A2を活性化し、アラキドン酸を遊離する。アラキドン酸はシクロオキシゲナーゼの作用によりプロスタグランジン類を産生し、炎症や疼痛を生じることが知られており、現在術後痛治療としてシクロオキシゲナーゼ阻害作用を持つ非ステロイド性消炎鎮痛薬 (NSAID) を用いることが多い。また一方でアラキドン酸は5-リポキシ

ゲナーゼの作用によりLTB4を産生する。LTB4は白血球誘引作用を有し、局所に多形核白血球を集め、集まった多形核白血球はLTB4と反応し、(8R, 15S) diHETEを遊離する。これは侵害受容線維自由終末にあるG蛋白を介し発痛作用を増強する^{1, 10)}。また一方、NGFは胎生期の一次感覚神経や交感神経の発達に必須なものとして発見された。成熟後にはNGFの存在は必須ではないとされているが、近年、炎症組織においてNGFが増加し、痛覚過敏を引き起こすことが確認されている^{3, 4, 11)}。炎症が発生するとマクロファージから遊離されるインター

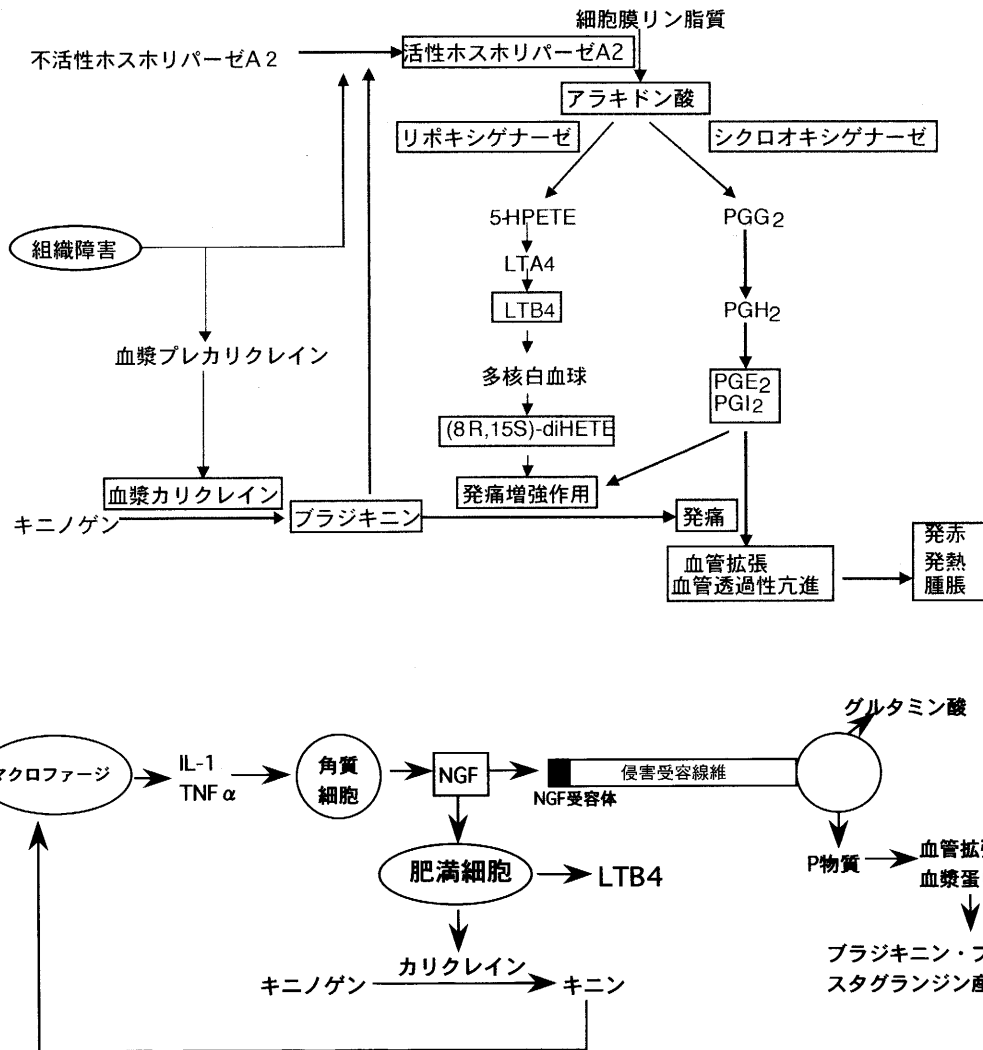


図8 LTB4とNGFの作用

ロイキン1, $TNF\alpha$ (腫瘍壊死因子) が角質細胞, 線維芽細胞, 肥満細胞, シュワン細胞などに作用してNGF産生を誘導する. さらにNGFは肥満細胞のNGF受容体である侵害受容線維自由終末に存在する高親和性受容体(TrkA)と結合し, その結果肥満細胞は増殖し, その顆粒に含まれるセロトニン, ヒスタミン, インターロイキン6, カリクレインなどと, 新たに産生されたプロスタグランジン, LTB4, NGFが遊離され^{12, 13)}, それらも痛覚過敏を引き起こす(図8). Brennanモデルはラットの足底を切開して炎症反応を引き起こし, その部位に温熱や機械刺激を加えて逃避反応の閾値を計測する incident painを評価するモデルであり, その特徴は臨床的術後痛に近いということである⁷⁾. Brennanらは本モデルで術後2時間から3日間機械刺激性痛覚過敏が認められ, 切開部には一次性痛覚過敏, 後肢足底中央部には二次性痛覚過敏が発生すると報告⁷⁾しているが, 今回作製したモデルでも, 切開部で術後1-48時間, 切開近位部

では1-24時間, 切開遠位部でも1-24時間認められた. 切開部だけでなく切開部から離れた部位においても術後痛は発生することが示唆されたが, 切開部から離れるほど有意差は少なくなり, 術後痛持続時間は短縮した. 皮膚表面の損傷が生じると数分後に傷害部位の侵害刺激に対する感受性が亢進し(一次性痛覚過敏), さらにこの痛覚過敏がその周囲の非刺激・非傷害部位に広がっていく. 直接刺激を受けないこの痛覚過敏の範囲は時間がつれ拡大する(二次性痛覚過敏)¹⁴⁾. 本モデルにて, 切開部の機械刺激で認められるニューロン発射活動が切開部遠位で認められないことから, 切開部近位における一次性痛覚過敏は切開損傷による侵害受容体の感作によるもので, 非損傷部である切開部遠位への二次性痛覚過敏の関与は少ないとの報告⁷⁾もあるが, これまで結論は出ていない.

切開部へのLTB4とNGFの投与は, コントロール群と比較して切開部, 切開近位部で差がなかったが, 切開

遠位部においてNGFで96時間後、LTB4で48時間後に有意差が認められたことは、二次性痛覚過敏への影響の可能性を示したかもしれない。非侵襲時の投与は疼痛を引き起こすが¹⁵⁾、侵襲(切開)後は、すでに内因性のLTB4やNGFの放出があり、その作用に対して、さらに外部からLTB4やNGFを投与しても、一次性痛覚過敏はそれ以上に増強していくことがないことを示唆するものである。そして、逆に抗NGF抗体、ONO4057の投与では術後痛持続時間が有意に短縮した。コントロール群に対して各投与薬剤との比較では、切開部において抗NGF抗体投与では96時間後まで、ONO4057投与では72時間後まで有意に%MPEを低下させた。これらの結果は、術後の痛覚過敏にNGFとLTB4が関与していることを示すものであるが、抗NGF抗体投与でより長時間痛覚過敏を減少させたことは、NGFが肥満細胞を刺激してLTB4の産生を増強するメカニズムから説明可能と考えられる¹⁶⁾。抗NGF抗体は、熱刺激に対する反応には影響を及ぼすが、機械的刺激には影響を及ぼさないと報告⁷⁾や、その両方に影響を及ぼすと報告^{11, 17, 18)}もあるが、いずれにしても、臨床的に術後痛は熱刺激で引き起こされることはなく、基本的に機械的刺激であるから熱刺激の結果はあまり意味がないと考えられる。

ロイコトリエンは構造および生理活性の違いからLTB4とペプチドロイコトリエンに分類され、さらにLTB4はBLT1とBLT2に分類される¹⁹⁾。これまで多くのLTB4阻害薬が開発され²⁰⁾、その阻害効果が報告され抗炎症薬として期待されたのに、生体において予測されたほどの薬理効果が得られていないのは、未知のLTB4受容体の存在が考えられる¹⁹⁾。本研究ではONO4057は有意に疼痛閾値の低下を抑制したが、更なる検討が必要と考えられた。

結 論

術後痛ラットモデルの皮膚切開により生じた機械的痛覚過敏はNGFとLTB4投与により増強されなかったが、抗NGF抗体とONO4057により抑制された。NGFとLTB4は術後痛に関与していることが考えられ、臨床的に術後痛対策に従来のオピオイド、NSAIDsや局所麻酔薬などに加え、新しい治療法として応用できる可能性が示唆された。

謝 辞 本研究を行うにあたり、終始ご教授賜りました奥田泰久教授(獨協医科大学越谷病院麻酔科)、高野義人先生(医療法人光仁会第一病院麻酔科)ならびに獨協医科大学実験動物センター越谷分室のスタッフの皆様に感謝致します。

文 献

- 1) 表 圭一: 手術後痛. 医学のあゆみ, **211**: 425-428, 2004.
- 2) Amann R, Schuligoi R, Lanz I, et al: Effect of 5-lipoxygenase inhibitor on nerve growth factor-induced thermal hyperalgesia in the rat. *Eur J Pharmacol*, **306**: 89-91, 1996.
- 3) Bennett G, Rashed S, Hoult JRS: Nerve growth factor induced hyperalgesia in the rat hind paw is dependent on circulation neurophils. *Pain*, **77**: 315-322, 1998.
- 4) Woolf CJ, Safieh-Garabedian B, Ma QP, et al: Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. *Neuroscience*, **62**: 327-331, 1994
- 5) Zahn PK, Subieta A, Park SS, et. al: Effect of blockade of nerve growth factor and tumor necrosis factor on pain behaviors after plantar incision. *J Pain*, **15**: 157-163, 2004.
- 6) O'Brien TP, Roszkowski MT, Wolff LF, et al: Effect of a nonSteroidal anti-inflammatory drug on tissue levels of immunoreactive prostaglandin E2, immunoreactive leukotriene, and pain after periodontol surgery. *J Periodontal*, **67**: 1307-1316, 1996.
- 7) Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF.: Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*, **64**: 493 - 501, 1996.
- 8) 山本達郎, 田口奈津子: 疼痛モデルと疼痛評価. 麻酔科医と基礎研究 疼痛と鎮痛. 並木昭義, 表圭一(編), 南江堂, 東京, pp 20-43, 2000.
- 9) 斉藤洋司: 薬剤投与. 麻酔科医と基礎研究 疼痛と鎮痛. 並木昭義, 表圭一(編), 南江堂, 東京, pp 44-69, 2000.
- 10) White DM, Basbaum AI, Goetzl EJ, et al: The 15-lipoxygenase product, 8R, 15S-diHETE, stereospecifically sensitizes C-fiber mechanoheat nociceptors in hairy skin of rat. *J Neurophysiol*, **63**: 966-970, 1990.
- 11) Ueda M, Hirose M, Takei N, et al: Nerve growth factor induces systemic hyperalgesia after thoracic burn injury in the rat. *Neurosci Lett*, **328**: 97-100, 2002.
- 12) Rueff A, Dawson AJLR, Mendell LM.: Characteristics of nerve growth factor induced hyperalgesia in adult rats: dependence on enhanced bradykinin-1 receptor activity but not neurokinin-1 receptor activation. *Pain*, **64**: 323-329, 1996.

- 13) Horigome K, Pryor JC, Bullock ED, et al : Mediator release from mast cells by nerve growth factor. *J Biol Chem*, **268** : 14881-14887, 1993.
- 14) Moiniche S, Dahl JB, Kehlet H, Time course of primary and secondary hyperalgesia after heat injury to the skin. *Brit J Anaesth*, **71** : 201-205, 1993.
- 15) Dyck PJ, Peroutka S, Rask C, et al : Intradermal recombinant human nerve growth factor induces pressure allodynia and lowered heat-pain threshold in humans. *Neurology*, **48** : 501-505, 1997.
- 16) Saade NE, Massaad CA, Ochoa-Chaar CI, et al : Up-regulation of proinflammatory cytokines and nerve growth factor by intraplantar injection of capsaicin in rats. *J Physiol*, **545**, **1** : 241-253, 2002.
- 17) Lewin GR, Ritter AM, Mendell LM. : Nerve growth factor induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat. *J Neurosci*, **13** : 2136-2148, 1993.
- 18) Martin HA, Basbaum AI, Goetzl EJ, et al : Leukotriene B4 decreases the mechanical and thermal thresholds of C-fiber nociceptors in the hairy skin of the rat. *J Neurophysiol*, **60** : 438-445, 1988.
- 19) 横溝岳彦 : ロイコトリエンの代謝と受容体. *細胞工学*, **17** : 722, 1998.
- 20) Suzuki S, Kuroda T, Kazama J, et al : The leukotriene B4 receptor antagonist ONO-4057 inhibits nephrotoxic serum nephritis in WKY rats. *J Am Soc Nephrol*, **10** : 264-270, 1999.

The Effect of Nerve Growth Factor and LeukotrieneB4 in a Rat Model of Postoperative Pain

Yuichiro Kuno

*Department of Anesthesiology, Koshigaya hospital, Dokkyo University School of Medicine,
Koshigaya Saitama, 343-8555, Japan*

To examine the role of nerve growth factor (NGF) and leukotrieneB4 (LTB4) in postoperative pain, we examined whether a Peripherally administered NGF, LTB4, anti-NGF and anti-LTB4 would be the effect for incision-induced mechanical hyperalgesia. We used a rat model of postoperative pain introduced by Brennan et al. Rats underwent a plantar incision, and responses to mechanical stimuli was measured using von Frey filaments. Rats were tested 1 and 96 H after the skin incision. Anti-NGF and anti-LTB4 signifi-

cantly decreased the response frequencies to mechanical stimulation, however, NGF and LTB4 did not evoke mechanical hyperalgesia. We conclude that anti-NGF and anti-LTB4 can inhibit the mechanical hyperalgesia induced by a surgical incision.

Key Words : Nerve growth factor (NGF), LeukotrieneB4 (LTB4), Postoperative pain