

機関番号：33920

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20602009

研究課題名（和文） 慢性痛の発症とその維持に関わる因子を探る

研究課題名（英文） Exploration for the factors implicated in pathogenesis and maintenance of chronic pain.

研究代表者

岩瀬 敏（IWASE SATOSHI）

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：90184879

研究成果の概要（和文）：免疫炎症刺激と侵害刺激によって作製する筋侵害性モデル動物では、炎症を強く起こさせた群や神経系が未発達な幼若群で慢性痛の発症が阻害され、その発症には傷の大きさではなく、免疫炎症性背景と侵害性神経入力との二つの要因が関係し合っていることが明らかになった。ギプス固定モデル動物では、痛みの拡がりにあわせた脊髄グリア活性の可能性があった。自律神経機能の記録解析では固定期に交感神経活動が亢進し、慢性痛を呈するギプス除去後には低下を維持することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）： In the chronic pain animal model caused by muscle insult with immuno-inflammatory and nociceptive stimuli, it was clarified that the delicate interaction between the immuno-inflammatory background and the nociceptive neural inputs may be essential to form long-persisting hypersensitivity, because pretreatment with larger-dose of immuno-inflammatory agent or treatment to immature animal prevented the development of long lasting hypersensitivity. In the cast immobilization model, it was observed that activation of spinal glial cells spread in response to spreading hypersensitivity. The sympathetic activity in this model was augmented during unilateral immobilizing, and then decreased below normal level while persisting pain behavior continued.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：疼痛学（時限付きのため分科無し）

キーワード：痛み、慢性痛、動物モデル、筋障害、免疫・炎症、自律神経、グリア

1. 研究開始当初の背景

神経損傷モデル動物（Bennett & Xie, 1998; Kim & Chung, 1992 など）の貢献により、この十数年間で慢性痛の理解と研究は大きく進展し、分子レベルの研究も深まっているが、未だ決定的な治療薬は開発されていない。この原因として、このモデルの発症機転

および病態経緯の変化などが臨床所見と分離している点が多いことがあげられる。そこで我々は、軽微な損傷によって発症すると言われている慢性痛（例えば CRPS type-I）などの発症起因に着眼し、神経を直接損傷することなく慢性痛を呈する運動器障害性慢性痛モデル動物を2種開発した（筋侵害刺激モ

デル：Hashimoto T et al. Abstract of 11th World Congress on Pain: 420, 2005、ギプス固定モデル：Ohmichi Y et al. Abstracts of 11th World Congress on Pain: 421, 2005)。

これらのモデル動物では、一側の筋障害負荷後、感覚過敏が亢進（急性期）するが、処置後 1~2 週で目一旦回復傾向を示す。しかし 2 週目以降に再び亢進が両側性に起こり（慢性期）、その亢進は 10 週以上にわたる。直接に神経を損傷させるモデルでは、急性期と慢性期を明確に判別できず、この点が慢性痛の発症機序の解明を複雑にさせていると考えられる。痛みの相が異なる急性期と慢性期を判別できるモデル動物は、これまでにないものであり、慢性痛の発症機序および維持機構を探る上で非常に有用なモデルである。

慢性痛における中枢の可塑的变化として脊髄グリア細胞の活性化（Zhuang ZY et al, 2005 など）が報告され、さらにグリアの活性に伴う細胞内外におけるシグナル経路（Spataro LE et al, 2004 など）も調べられてきている。また、治療面において、諸外国では経験的に慢性痛に対して運動療法が行われているが、運動によって産生される BDNF は機能回復に働く（Gomez-Pinilla F et al, 2001 など）が、神経損傷後に産生される BDNF は痛みを誘発する（Yajima Y et al, 2005 など）などの報告がある。このような相反作用をもつ物質（IL6 も同様）が鍵を握ると考えられる。

全身性の様相を呈する慢性痛では自律系に異常をきたすことが多く、臨床症状に則した我々のモデルはその面においても研究を深める価値をもつ。慢性痛と自律系は密接な関係にあり、モデル動物による実験からも関連現象が報告されている（Sato J et al, 1991 など）が、自律神経機能を生体の機能面から捉えた報告は数少なく、特に覚醒下で痛みとともに長期間にわたって自律系を解析した研究はこれまでにない。

2. 研究の目的

本研究では、我々が開発した 2 種のモデル動物（上述）を用い、長期間にわたって、痛みおよび自律系を評価するとともに、各病態時期における末梢および中枢変化を追跡する。モデル動物の特性を多角的に総合的に解析するとともに、薬物や運動による生体反応を調べ、慢性痛の発症・維持に関わる因子を同定し、病態メカニズムの解明に迫る。

(1) 2 種の運動器障害性慢性痛モデルラットにおいて、各病態移行時期の自律系動態の解析および筋・脊髄における形態・分子レベルからの解析（グリア細胞、BDNF, IL6 など）を行い、痛み行動との関連を検討し、モデル

の特性を明らかにする。

(2) 各種薬物投与（量、時期）と運動（強度、時期）を行ない、本モデルにおける慢性痛の発症を抑制・増悪する条件を見出し、その条件での筋および脊髄内変化を追跡する。

(3) (1) および (2) の解析結果を比較検討し、運動器障害による慢性痛の発症・維持に深く関わる要因を同定する。

3. 研究の方法

我々が開発した 2 種の運動器障害性慢性痛モデル動物（前述）を用いる。これらのモデルでは前述したように痛みの急性期と慢性期を呈する。慢性痛を起こす引き金となる要因は処置後 1~2 週目までに発生し、2 週目以降には痛みを維持する要因が存在すると仮定し、発症を阻害する要素を探る。行動学的、形態学的、分子生物学的視点から経時的変化を解析し、自律系機能変化とあわせて総合的に本モデルの特性を明らかにする。

SD 系雄ラット（9 週齢）を用いる。行動学的評価として、障害部の筋圧痛閾値（push-pull gauge, Aikoh Engineering Inc.）、足底部や尾部などの皮膚痛覚閾値（von Frey filaments: VFF, diameter 0.5 mm, bending force 2, 6 and 8 g）、下腿周囲径などを処置後 10 週以上にわたって経時的に記録し、解析する。

(1) 筋侵害性モデル：片側腓腹筋に免疫・炎症刺激として lipopolysaccharide: LPS ($2 \mu\text{g}/\text{kg}$: 2LPS) を投与し、その 24 時間後に侵害刺激として 6% 食塩水 ($100 \mu\text{l}$, 90 分間隔で 5 回: HS5) を投与して作製するモデル。

① モデル特性の精査を目的に、以下の群を作製し、発症阻害、または慢性期亢進を調査する。

- a) 2LPS 単体投与群
- b) HS5 単体投与群
- c) 2LPS+HS5 複合投与 (2LH) 群
- d) LPS ($20 \mu\text{g}/\text{kg}$: 20LPS) + HS5 複合投与 (20LH) 群
- e) 神経系が未発達の段階にある 3 週齢ラットへの処置群
- f) e) 群の age-matched control 群

② 各群の処置後、急性期初期、慢性期などの脊髄サンプルをとり、RT-PCR にて IL-6, BDNF, MMP9, TNF- α などの mRNA 発現を比較する。

(2) ギプス固定モデル

片側後肢を2週間ギプス固定して作製するモデル。

①脊髄グリア細胞の観察

ギプス固定除去直後、急性期、慢性期の脊髄を採取・固定し、ミクログリアおよびアストロサイトの活性を観察し、行動学的所見とあわせて検討する。また、病態各時期の脊髄のセグメントを追って観察する。

③自律神経動態の観察

モデル作製前に血圧プローベを埋め込み、テレメトリーシステムにより無麻酔・非拘束状態で血圧および心拍を記録する。交感神経活動を高める刺激として病態各時期（固定期、除去直後、3日目、1週毎）において低温曝露刺激（9°Cの環境下におく）を行なう。また、自律神経調節機能の裏づけをみるために自律神経薬（phentolamine, atenolol, atropine など）を腹腔投与し、且つ、低温曝露刺激を行なう。

血圧プローベを埋め込んだ age-matched control 群を作製し、低温曝露刺激および自律神経薬投与実験を同様に行なう。

得られた血圧・心拍データを周波数解析（フーリエ変換、ウェーブレット変換）する。

4. 研究成果

本研究を進める中で、筋侵害性モデルにおいて我々の想像と相反する興味深い事実が明らかになったため、当初の計画を少し変更して、その追及を行なった。また、本研究は1回の実験期間が長く、一事象に対して例数を増やして検討していくためにはかなりの時間と人力を要した。以下、モデルに分けて結果を報告する。

(1) 筋侵害性モデル（群については研究方法を参照）

2LPS+HS5 複合投与（2LH）群では、足底皮膚に対する VFF 反応の亢進が10週以上にわたって起こる。2LPS 単体投与群、および HS5 単体投与群では急性期にやや反応が高まるのみで終息する。処置局所は、全ての群で処置後3日目までに正常値に戻る。

3週齢ラットへの2LH 複合投与では、急性期の VFF 反応は大きかったが、慢性期には反応が亢進することはなかった（図1）。3週齢では機械刺激に対して敏感で、成長に従って感受性が変化し、3週齢の VFF3g の刺激が9週齢の VFF6g 刺激と同等の反応を示し、age-matched control 群を作製して比較する必要があった。成長に従って反応程度は低くなり、8週齢を越えるころから安定すること

が明らかになった。このことから、3週齢では神経系が未発達であることが推察され、免疫系は完成されているという報告があることから、慢性期の痛み行動を亢進させるためには免疫系と神経系の双方の関わりが重要であることが明らかになった。（3週齢の結果は Pain Research 2009 に発表）

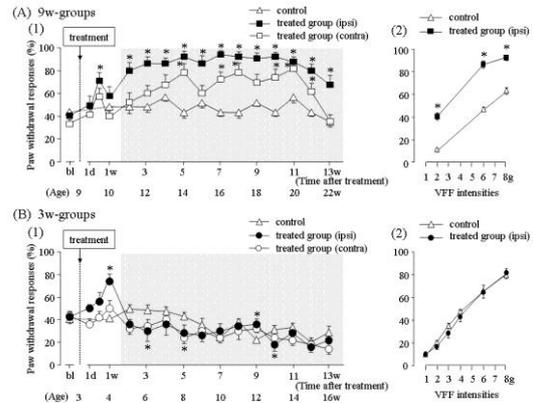


図1. 2LPS+HS5 処置に対する9週齢と3週齢ラットの反応の違い。(A)9週齢、(B)3週齢。VFFによる足底刺激の結果。(1)図は9週齢がVFF6g刺激、3週齢がVFF3g刺激。

次に、我々は慢性期の亢進を強めることを目的に、10倍濃度のLPSを用いた。ところが、この20LH群においては急性期のVFF反応が大きくなるが、処置後2週目以降に正常値に戻ってしまった。つまり、侵害入力が入る時点の炎症状態が強いほど慢性痛が起こらないというパラドックスが起こった（図2）。炎症によって産生される物質（サイトカインなど）が正常な修復を促すが、極軽微な炎症背景の場合には次なる刺激が加わった時にその修復過程に支障をきたすことが推察された。

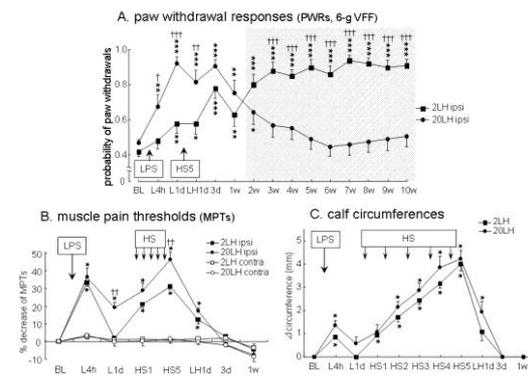


図2. 前投与LPSの増量が慢性痛への移行を阻害した。(A)足底へのVFF6g刺激に対する反応確率。2LH群は亢進を続けるが、20LHは2週目以降に正常値に戻る。(B)処置部位の筋圧痛閾値が減弱した割合。閾値減弱の程度に差はあるが、どちらの処置も処置後3日目までに正常値に戻る。(C)処置部位の周囲径変化。どちらの処置も処置後3日目までに正常値に戻る。

両側性にVFF反応の亢進をみせる2LH群では、処置後1週目頃に一旦回復傾向を示すが、2週目以降に再燃し、その後長く続く。2週目までを急性期、2週目以降を慢性期と定義し、これら二つの期間における痛み発生源を確認するため、傷害部からの入力を遮断する神経ブロックを行なった(図3)。

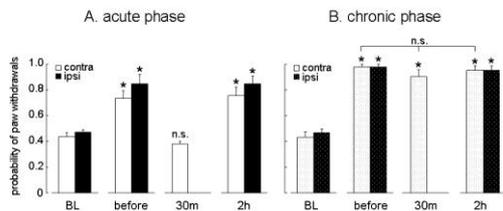


図3. 2LH群における傷害側神経ブロックの反対側への効果。(A)急性期のブロック効果。傷害側のブロック30分後に反対側の亢進が正常値に戻る。(B)慢性期のブロック効果。反対側の反応亢進は、傷害側のブロックでは鎮まらない。

急性期の神経ブロックでは、VFF反応の亢進をみせていた反対側の反応を下げた。慢性期のブロックでは、反対側の反応は下がらなかった。つまり、急性期の反対側の反応亢進は傷害部からの信号によって起こったものであり、慢性期のものは、傷害部とは関係なく反応が亢進しているものであることが明らかになった。慢性期には、中枢性に亢進が起こっていると考えられた。(2LHと20LHの結果はEuropean Journal of Pain 2011に発表 Faculty of 1000に選出される)

本モデルは、前投与のLPSを調節するのみで発症群と発症しない群を作製できるため、発症と維持に関わる物質検索に非常に適していると考えている。RT-PCRにてIL-6, BDNF, MMP9, TNF- α , TLR4などのmRNA発現を検索したが、マンパワーの問題もあり、本研究期間中に成果を出すことはできなかった。

(2) ギプス固定モデル

このモデルはギプス除去後にVFF刺激に対する反応が両側の足底で亢進するだけでなく、下腿部や尾部にも亢進がみられた(図4)。(モデルについての論文は現在投稿中)

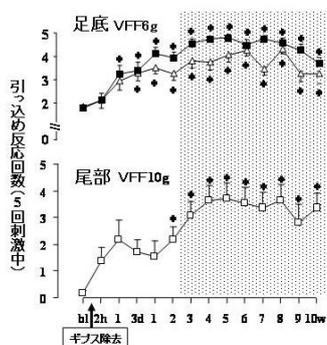


図4. ギプス固定モデルにおけるVFF刺激に対する反応の亢進は尾部まで拡がる。

脊髄グリア細胞の観察では、ギプス固定時に影響の大きいL5髄節において、ギプス除去後初期にはミクログリアの活性がみられ、その活性に遅れてアストロサイトの活性が観察された。さらに遅れた時期に尾髄における活性がみられ、脊髄の変化が移動していくことが推察されたが、試料採取の時期および例数を増やして検討する必要がある。

自律神経動態の観察では、安静状態では、血圧・心拍ともにギプス固定中に有意な上昇が見られ、ギプス除去後の痛み行動の亢進時には固定前よりも有意に低下した。血圧プローブを埋め込んだage-matched control群の観察から、この低下は老化によるものではなかった。各周波数成分のうち、末梢性 α 交感神経活動の指標とされるMF(middle frequency)成分は血圧と有意な相関を持って推移した。また、低温暴露刺激は血圧、MF成分、心拍ともに上昇させるが、この上昇反応はギプス固定中では固定前より有意に増大し、固定除去3-10週後では固定中ほど増大を示さなかった。本モデルにおいて、交感神経活動の亢進状態の後に、慢性的な痛み行動出現に伴って、交感神経活動が低下した。また、刺激に対する交感神経系の反応性は、固定中に増大し、痛み行動の亢進が見られる時期では固定中ほどの増大を認めなかった。(投稿準備中)

これら自律神経動態を観察・解析する中で、その反応を裏付ける目的から正常ラットにおいて、麻酔下または無麻酔下、自律神経薬投与、低温曝露刺激などを行なった。イソフルラン麻酔下では、自律神経の反応性が著しく低くなっていることが明らかになった。血圧周波数解析では、MFが α アドレノセプターを介した血管系機能をあらわし、HF(high-frequency)が β アドレノセプターを介した心臓交感系機能をあらわしていることが明らかになった。(正常ラットにおける結果はJournal of Physiological Science 2011に発表)

本モデルにおける運動の効果は、ギプス除去後3日目からのトレッドミルによる運動群で慢性期の痛み行動がやや低下する傾向を捉えたが、バラツキが多く、運動開始日や期間、運動強度を詳細に検討する必要がある、このテーマについては本研究期間中に成果を出すことはできなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① 橋本辰幸, 熊澤孝朗: 筋・骨・関節の痛み. 理学療法 25: 1095-1101, 2008. 査読無し
- ② 櫻井博紀, 山口佳子, 熊澤孝朗: 痛覚系の中枢経路と脳内鎮痛系. 理学療法 25: 1565-1571, 2008. 査読無し
- ③ 櫻井博紀, 山口佳子, 橋本辰幸, 大道裕介, 吉本隆彦, 菅屋潤壹, 熊澤孝朗: 筋侵害性モデルラットにおける長期痛み行動亢進への生後発達の関わり. Pain Research, 24: 37-44, 2009. 査読有
- ④ 橋本辰幸, 熊澤孝朗: 慢性痛症—各種の痛みモデル動物から. 理学療法 26: 765-771, 2009. 査読無し
- ⑤ 山口佳子, 熊澤孝朗: 痛みのアセスメントと学際的アプローチ. 理学療法 26: 1372-1380, 2009. 査読無し
- ⑥ Yamaguchi Y, Hashimoto T, Sakurai H, Yoshimoto T, Ohmichi Y, Morimoto A, Harimoto K, Ohmichi M, Eguchi K, Kumazawa T: Low rather than high dose lipopolysaccharide ‘priming’ of muscle provides an animal model of persistent elevated mechanical sensitivity for the study of chronic pain. European Journal of Pain, 2011 (in press). 査読有
- ⑦ Yoshimoto T, Eguchi K, Sakurai H, Ohmichi Y, Hashimoto T, Ohmichi M, Morimoto A, Yamaguchi Y, Ushida T, Iwase S, Sugeno J, Kumazawa T: Frequency components of systolic blood pressure variability reflect vasomotor and cardiac sympathetic functions in conscious rats. Journal of Physiological Science, (in press)

[学会発表] (計 13 件)

- ① Sakurai H, Hashimoto T, Ohmichi Y, Yoshimoto T, Morimoto A, Ohmichi M, Eguchi K, Ushida T, Yamaguchi Y, Kumazawa T: Developmental changes of the chronic pain behaviors in rats induced by myopathic treatment. The 3rd Asian Pain Symposium, 2008. 7. (Fukuoka)
- ② Ohmichi Y, Ohmichi M, Ohishi H, Sakurai H, Yoshimoto T, Morimoto A, Hashimoto T, Ushida T, Yamaguchi Y, Kumazawa T: Changes in pain behavior associated with the spinal glial activations in the chronic pain model by the plaster-immobilization. The 3rd Asian Pain Symposium, 2008. 7. (Fukuoka)
- ③ 吉本隆彦, 江口国博, 櫻井博紀, 大道裕介, 橋本辰幸, 大道美香, 森本温子, 山口

佳子, 熊澤孝朗: 慢性的な痛みを起こす下肢不動化モデルラットにおける自律神経機能の異常. 第30回日本疼痛学会, 2008. 7. (福岡)

- ④ Yoshimoto T, Eguchi K, Sakurai H, Ohmichi Y, Hashimoto T, Morimoto A, Ohmichi M, Yamaguchi Y, Kumazawa T: Sympathetic dysfunction in the cast-immobilization chronic pain model. 12th World Congress on Pain, 2008. 8. (Glasgow)
- ⑤ Ohmichi M, Ohmichi Y, Ohishi H, Sakurai H, Yoshimoto T, Morimoto A, Hashimoto T, Usida T, Yamaguchi Y, Kumazawa T: Temporal and spatial changes of spinal glial cells in chronic pain model induced by the cast-immobilization. 12th World Congress on Pain, 2008. 8. (Glasgow)
- ⑥ 大道裕介, 大道美香, 大石仁, 櫻井博紀, 吉本隆彦, 森本温子, 橋本辰幸, 江口国博, 牛田享宏, 山口佳子, 熊澤孝朗: 下肢ギプス固定後に発症する慢性的痛み行動における脊髄グリア細胞の関与. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会, 2008. 10. (京都)
- ⑦ 大道裕介, 大道美香, 大石仁, 櫻井博紀, 吉本隆彦, 森本温子, 橋本辰幸, 江口国博, 山口佳子, 中野隆, 熊澤孝朗: 下肢ギプス固定がもたらす慢性的痛み行動に伴う脊髄ミクログリア・アストロサイトの变化. 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2009. 3. (岡山)
- ⑧ 吉本隆彦, 江口国博, 櫻井博紀, 熊澤孝朗: 慢性痛の自律神経機能に関するトランスレーショナル研究～慢性痛の病態メカニズムの解明に向けて～. 第21回東洋医学に関する学術研究報告会, 2009. 4. (名古屋)
- ⑨ 吉本隆彦, 江口国博, 櫻井博紀, 大道裕介, 橋本辰幸, 森本温子, 大道美香, 山口佳子, 熊澤孝朗: ギプス固定慢性痛症モデルラットは交感神経系の異常を伴う. 第44回日本理学療法学術大会, 2009. 5. (東京)
- ⑩ 櫻井博紀, 橋本辰幸, 大道裕介, 吉本隆彦, 森本温子, 大道美香, 江口国博, 山口佳子, 熊澤孝朗: 筋侵害性モデルラットの若齢処置では慢性痛症を発症しなかった. 第44回日本理学療法学術大会, 2009. 5. (東京)
- ⑪ Hashimoto T, Yamaguchi Y, Sakurai H, Ohmichi Y, Yoshimoto T, Morimoto A, Ohmichi M, Harimoto H, Eguchi K, Kumazawa T: Intramuscular injections of low-dose immuno-inflammatory and nociceptive agents develop

long-persisting pain in the rats. XXXVI International Congress of Physiological Sciences, 2009. 7-8. (Kyoto)

- ⑫ 吉本隆彦, 江口国博, 櫻井博紀, 大道裕介, 橋本辰幸, 森本温子, 大道美香, 山口佳子, 熊澤孝朗: 運動器不働化による慢性痛モデル動物の自律神経機能異常～血圧・心拍の周波数解析による検討～. 第37回自律神経生理研究会. 2009 12 (東京)
- ⑬ Yoshimoto T, Eguchi K, Sakurai H, Ohmichi Y, Hashimoto T, Ohmichi M, Morimoto A, Yamaguchi Y, Ushida T, Iwase S, Sugeno J, Kumazawa T: Middle and high frequency components of blood pressure variability may reflect sympathetic vasomotor and cardiac functions in conscious rats. 第88回日本生理学会大会. 2011. 3. (東日本大震災のため誌上開催 J Physiol Sci 61(Suppl 1))

[図書] (計3件)

- ① 熊澤孝朗: 慢性痛の理解. 理学療法MOOK3 疼痛の理学療法第2版, 鈴木重行責任編集, 三輪書店, 東京, pp. 2-13, 2008.
- ② 山口佳子, 熊澤孝朗: 慢性疼痛治療における医療連携の現状. 慢性疼痛の理解と医療連携, 宮崎東洋 監修, 北出利勝 編集, 真興交易医書, 東京, pp. 280-287, 2008.
- ③ 熊澤孝朗: 「痛み」をどう捉えるか?. 医師50年: 研究と臨床の軌跡, 王木会編, 医歯薬出版, 東京, pp. 187-218, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩瀬 敏 (IWASE SATOSHI)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90184879
(2010年9月1日 分担者→代表者)
熊澤 孝朗 (KUMAZAWA TAKAO)
愛知医科大学・客員教授
研究者番号: 20022775
(2010年7月26日逝去のため交替)

(2) 研究分担者

大石 仁 (OHISHI HITOSHI)
愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00252461
(2010年度から連携研究者)

(3) 連携研究者

櫻井 博紀 (SAKURAI HIROKI)

浜松大学・保健医療学部・講師
研究者番号: 60454419
江口 国博 (EGUCHI KUNIHRO)
愛知学院大学・歯学部・非常勤講師
研究者番号: 30113062
牛田 享宏 (USHIDA TAKAHIRO)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60304680
小崎 康子 (KOZAKI YASUKO)
金城学院大学・薬学部・准教授
研究者番号: 20126882

(4) 研究協力者

吉本 隆彦 (YOSHIMOTO TAKAHIKO)
山口 佳子 (YAMAGUCHI YOSHIKO)
森本 温子 (MORIMOTO ATSUKO)
大道 裕介 (OHMACHI YUSUKE)
大道 美香 (OHMACHI MIKA)