

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20800058

研究課題名（和文）下肢不動化に伴う慢性痛の神経可塑性機序解明と治療に関する基礎的検討

研究課題名（英文）Basic study on elucidating mechanism of neuronal plasticity of chronic pain induced by lower extremity immobilization and on its therapy

研究代表者 大道裕介（OHMICHI YUSUKE）

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：50506673

研究成果の概要（和文）：

複合性局所疼痛症候群Ⅰ型を代表とする難治性疼痛は、痛みが時間的増強を示し、またボディエリアが患肢を超えて空間的拡大を示す慢性広範囲痛を呈する。この病態機序解明のため、ギプス固定による下肢不活動後に慢性広範囲痛を生じるモデル動物を用い、機械的痛覚増強行動の拡大と慢性痛の中枢性病因の一つとして予測されている脊髄グリア細胞活性化との関連について検証を行った。本実験モデルにおける機械的痛覚増強行動の時間的増強と空間的拡大に、脊髄グリア細胞の活性化の広がりに関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We developed a type of chronic pain model caused by two-week cast-immobilization to reveal the mechanism of chronic pain without clear nerve injuries. In this model a long-lasting and widespread hyperalgesia was shown not only in the immobilized side, but also in the contralateral side and in the tail as well. These behavioral studies suggested the implication of central plasticity, therefore in this study we investigated changes in the immunohistochemistry of spinal glial cells after the cast-immobilization. A temporal and spatial association exists between the pain behaviors and spinal glial cells activation in this cast-immobilization chronic pain model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,090,000	327,000	1,417,000
2009 年度	820,000	246,000	1,066,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,910,000	573,000	2,483,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：慢性痛, 可塑性, 脊髄, ミクログリア, アストロサイト, 動物モデル, 不活動, ギプス固定

1. 研究開始当初の背景

我々は下肢不動化に伴って起こる慢性痛のメカニズム解明のため、2週間の片側下肢不動化（ギプス固定）による慢性痛モデルラットを開発した(Ohmichi et al., 2005). このモデルの痛み行動は、固定部位から非障害部である足底および尾部にまで拡大を示し、障害部からの感覚入力をブロックしても非障害側の痛みが残存し、脊髄の可塑的変容の可能性が薬理行動学的に示唆された。そこで脊髄可塑的変容機序の一つであるグリア細胞の関与(Tsuda et al., 2004; Zhuang et al., 2006)に着目し、組織学的な検討を行い、固定部局所より離れた足底部の痛み行動が出現するギプス除去後1日目に、第4腰髄においてミクログリアの活性化を示す所見が確認された(第29回日本疼痛学会)。

2. 研究の目的

線維性筋痛症, Complex regional pain syndrome-I:CRPS-I; 複雑局所性疼痛症候群I型(旧称; 反射性交感神経性ジストロフィー Reflex sympathetic dystrophy [RSD])などに代表される神経損傷以外の原因で発症する慢性痛は、発症起点より空間的・時間的拡大を示す Chronic Widespread Pain; CWP(以下、慢性広範囲痛)を呈し(Maleki et al., 2000), 社会的に大きな問題となっている(Gran, 2003). これまで世界的に研究が進められてきたのは神経損傷に起因するものであり(Bennett and Xie, 1988; Kim and Chung, 1992), 神経以外の何らかの組織障害に起因するモデル動物の研究は少なく(Sluka et al., 2001; Radhakrishnan and Sluka, 2003), 病態解明が世界的にも進んでいない。そこで我々は片側下肢不動化後に慢性痛を誘発するモデル動物の開発を試み、病態再現性の高いモデルを確立した。神経因性疼痛モデルでは、痛みの誘導および維持に脊髄グリア細胞の活性化が寄与しているとの報告がある(Zhuang et al., 2005; Zhuang et al., 2006). 本研究は、本実験モデルにおける痛み行動の時間的・空間的拡大における脊髄グリア細胞の関与について、行動学および免疫組織学的な検証を行い、下肢不動化により誘発される慢性痛のメカニズム解明、慢性痛リハビリテーションの基盤構築につなげる。

3. 研究の方法

本研究は国際疼痛学会の倫理委員会が定めたガイドラインに準拠し(Zimmermann, 1983), 愛知医科大学動物実験委員会承認のもと行われた。ラットは行動学的観察の期間内、食事と水分を自由に与えられ、一定の温湿度下($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $50\% \pm 15\%$)で12時間毎に明暗サイクルを繰り返す飼育室内のケージにて飼育された。

(1) 下肢不動化モデル動物の作製

Sprague-Dawley ラット(雄性 300~400 g)に、pentobarbital sodium 麻酔下(腹腔内投与: 50mg/kg)で、石膏ギプスを用いて行った。ギプス固定は体幹より左側の股・膝・足関節の屈曲位のスタンディングポジション(図1)で、中足骨近位までとし、遠位部については自由に動けるようにした。2週間の固定期間の後、覚醒化でギプスを除去した。

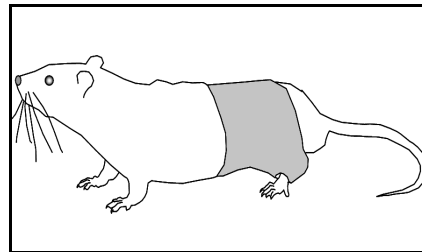


図 1. スタンディングポジションでギプス固定されたラット

(2) 機械痛覚増強行動の測定

以下に示す全ての測定は、ギプス固定前(bl: baseline), ギプス除去1日目(1d), 3日目(3d), 1週間後(1w)とし、それ以後は1週間毎に13週後(13w)まで計測した(n=8)。

① 足底部

ラットを 207×132×136cm のプラスチックケース内に置き、ステンレス製の金網($\phi 1.2 \times 6 \times 6\text{mm}$)の床下から両足底の無毛部に対し、直径 0.5mm の 2.6g の刺激強度の異なる2種類の von fray filament (以下 VFF) 用いて機械的刺激を行った。測定は、弱い強度の VFF より刺激を行い、それぞれ5回行った際の足引っ込み反応回数を記録した。刺激時間は1秒間、刺激間隔は1秒とした。

② 下腿内側皮膚および尾部

ラットの頭部から骨盤帯までを袋(靴下)内に保定した後、正常ラットにおいて痛み閾値以下の微弱刺激である強度として尾部に対しては 10g の VFF による5回刺激を行い、引っ込み反応回数を記録した。刺激時間は1秒間、刺激間隔は1秒とした。

(3) 標本採取

標本には無処置ラット (n=8), ギプス固定モデル (n=19) を使用. 標本採取時期としてギプス固定モデルにおいてギプス除去後 1 日目: 足底の痛み行動が亢進し始める時期 (n=7), 除去後 6 週目: 足底の痛み行動の亢進が極大を示す時期 (n=7), 除去後 13 週目: 足底の痛み行動が減弱傾向を示す時期 (n=5) において行う. 標本採取部位には足底の髄節レベルにあたる第 4 腰髄, 固定部髄節レベルから離れた尾髄, さらに中間部位の第 1 仙髄の標本採取を行った. ラットは pentobarbital sodium (150mg/kg i.p) で深麻酔し, 0.01MPBS (pH7.35) にて灌流を行い, 4%パラホルムアルデヒド溶液 (pH7.4) にて固定を行った. その後標本を摘出し, 4%パラホルムアルデヒド溶液に 4 時間後固定したあと 30%スクロースにて 24 時間浸漬・脱水を行った.

(4) 免疫組織化学

組織切片として第 4 腰髄, 第 1 仙髄と尾髄を摘出し, 厚さ 35 μ m の凍結連続切片を作製した. 一次抗体にミクログリアのマーカーである OX42 (anti-OX421:6000CHMICON) とアストロサイトのマーカーである GFAP (anti-GFAP1:10000CHMICON) を使用し ブロッキング剤にて 4 $^{\circ}$ C で 48 時間インキュベートした. 0.01MPBS で 5 分の洗浄を 2 回行った後, 二次抗体: anti-Mouse IgG (1:500 Jackson) にて室温で 2 時間インキュベートした. 次に 0.01MPBS で 5 分の洗浄 2 回行った後, avidin-biotin-complex(1:100 ABC Vector Labs) にて室温で 1 時間インキュベートした. 最後に 0.01MTBS に 3,3-diaminobenzidine-tetra (DAB Wako) と 0.06 %Hydrogen peroxide(Wako) を加え, 室温で 5~7 分間反応させた. 免疫反応後, 脱水, 封入を行った.

(5) OX42,GFAP 陽性細胞数の定量

脊髄後角において一定領域(6.1 \times 10 4 μ m 2)のミクログリアおよびアストロサイトの細胞総数および活性化細胞数を数えた. 活性化細胞の基準は, ミクログリアとアストロサイトともに細胞体が小さく細いものを休止型, 細胞体が楕円形, または丸型で肥大しているものを活性化型とした. 計測はブラインド下にて 3 回行い, 中央値を採用した.

4. 研究成果

(1) 機械痛覚増強行動

図 2 は, 2, 6g の VFF を用いて足底部に機械刺激を加えた際の足引っ込み反応率の変化を示す. それぞれのフィラメントに対する足引っ込み反応は, 有意な亢進を示し [2 g: treatment: F(16, 118) = 3.34, P<0.001, 6 g: treatment: F(16, 118) = 6.06, P<0.001], 機械痛覚増強行動が認められた. 反対側も同様に足引っ込み反応が亢進を示し, 機械痛覚増強行動が認められた [2 g: treatment: F(16, 118) = 2.67, P<0.01, 6 g: treatment: F(16, 118) = 3.55, P<0.001]. 痛覚増強は, 両側ともほぼ同じ時間経過を示し, ギプス除去 1 日目以降に出現し, 5 週目にかけて極大を示し, 13 週目にかけて減弱傾向を示した.

図 3 に, 10g の VFF を用いて足底部に機械刺激を加えた際の尾部振り反応率の変化を示す. フィラメントに対する尾部振り反応は, 有意な亢進を示し [F(16, 135) = 2.92, P<0.001], 機械痛覚増強行動の出現が認められた. 尾部の機械痛覚増強行動は, 足底部の増強行動よりも遅れて出現し, ギプス除去 3 週目より有意な出現を認め, その後 13 週目まで亢進を維持した.

足底部および尾部ともに大道らの報告 (Ohmichi et al., 2005) を再現した.

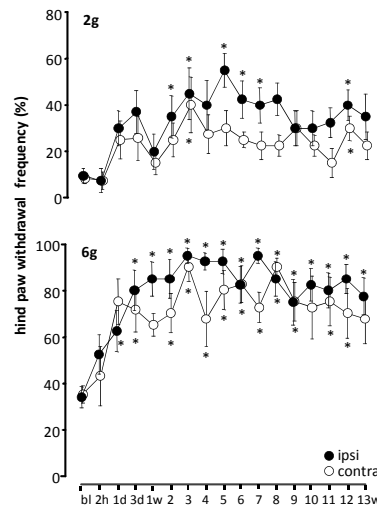


図 2. 足底部の機械痛覚増強行動の変化. Mean \pm SEM, *P < 0.05, compared with each bl value (Two way ANOVA, Dunnett's post-hoc test)

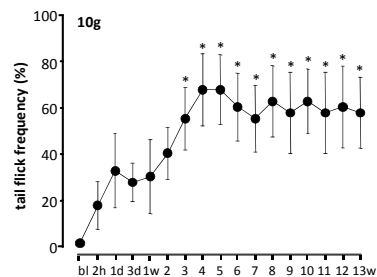


図 3. 尾部の機械痛覚増強行動の変化. Mean \pm SEM, *P < 0.05, compared with each bl value (Two way ANOVA, Dunnett's post-hoc test)

(2) 脊髄ミクログリアおよびアストロサイトの
変化

第4腰椎後角における無処置ラットとギブス固定モデルのミクログリア (図4) およびアストロサイト (図5) の組織写真を示す。ミクログリアの免疫活性化像はギブス除去後1日目において固定側に認められ、定量化の結果、細胞総数および活性化細胞数の増加が確認された (図6)。またアストロサイトの活性化像はギブス除去後6週目において両側に認められ、活性化細胞数の増加が確認された。しかしこの時期のアストロサイトの細胞総数の増加は確認されなかった。ギブス除去後1日目に確認されたミクログリアの活性化細胞とギブス除去後6週目に確認されたアストロサイトの活性化細胞はギブス除去後13週目にはともに減弱した。

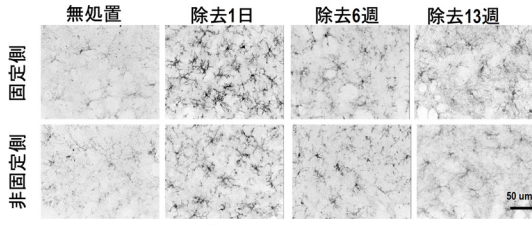


図4. 第4腰椎後角ミクログリアの経時的変化.

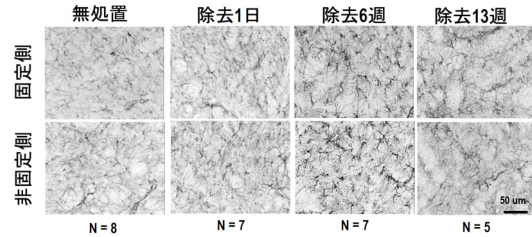


図5. 第4腰椎後角アストロサイトの経時的変化.

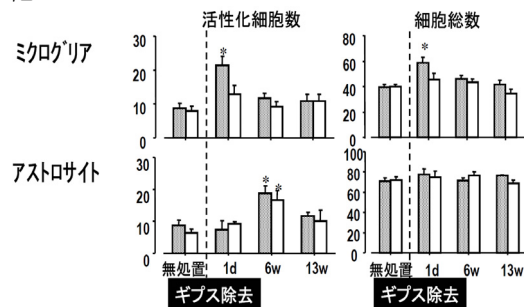


図6. 第4腰椎後角におけるグリア細胞の定量化. Mean \pm SEM, *P < 0.05, compared with each bl value (One way ANOVA, Dunnett's post-hoc test)

ギブス除去後6週目において、尾髄で、ミクログリアは活性化細胞数が両側に増加することを確認した (図7)。アストロサイトは、第4腰椎に両側に活性化細胞数の増加が確

認されたが、尾髄では確認されなかった。

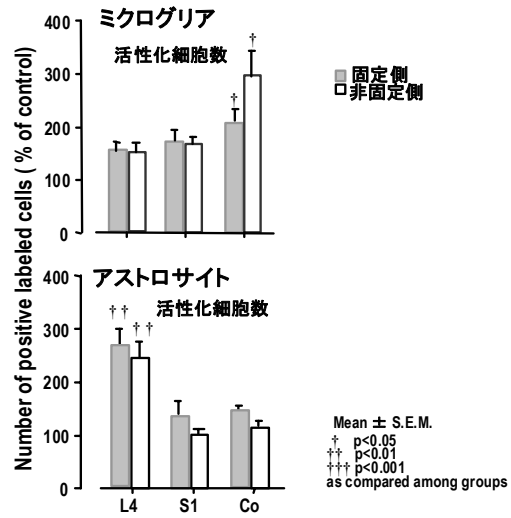


図7. ギブス除去後6週目の各髄節における脊髄グリア細胞の定量化. Mean \pm SEM, compared among groups (Two way ANOVA, Tukey's post-hoc test).

(3) 結論および課題

本実験モデルにおいて、固定部局所より離れた足底部の痛み行動が出現するギブス除去後1日目に、第4腰椎においてミクログリアの活性化を示す所見が確認された。さらに足底部の痛み行動が極大を示し、尾部まで拡大を示すギブス除去後6週目においては、第4腰椎においてアストロサイトの活性化を示す所見が認められ、さらに尾髄ではミクログリアの活性化を示す所見が確認された。痛み行動が減弱を示すギブス除去後13週目においては、これまでに活性化を示していたグリア細胞の所見は減弱傾向を示すことが分かった。以上により本実験モデルにおける痛み行動の空間的・時間的変化に脊髄グリア細胞の変化および広がりに関連している可能性が予測される。

今後は、モデル動物の各病態時期に対して、minomycin (ミクログリア阻害作用; 予備実験進行中), fluorocitrate ならびに astrotoxin (アストロサイト阻害作用) などの薬剤投与を行い、慢性期の痛み行動を抑制できる薬剤投与プロトコル (種類, 投与量, 投与時期) を検証し、脊髄グリア細胞の痛みへの関与について薬理・行動学的な裏づけを取る。さらにこのとき、グリア活性を指標として免疫組織学的に抑制効果を検証する。

(4) 引用文献

Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces

disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.

Gran JT (2003) The epidemiology of chronic generalized musculoskeletal pain. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 17:547-561.

Kim SH, Chung JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50:355-363.

Maleki J, LeBel AA, Bennett GJ, Schwartzman RJ (2000) Patterns of spread in complex regional pain syndrome, type I (reflex sympathetic dystrophy). *Pain* 88:259-266.

Ohmichi Y, Sakurai H, Hashimoto T, Harimoto K, Yoshimoto T, Eguchi K, Yamaguchi Y, Kumazawa T (2005) Two-week cast of the lower limb produced a long-lasting pain behavior in rats. *Abstracts of 11th World Congress on Pain*:421.

Radhakrishnan R, Sluka KA (2003) Spinal muscarinic receptors are activated during low or high frequency TENS-induced antihyperalgesia in rats. *Neuropharmacology* 45:1111-1119.

Sluka KA, Kalra A, Moore SA (2001) Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve* 24:37-46.

Tsuda M, Mizokoshi A, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Inoue K (2004) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia* 45:89-95.

Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, Ji RR (2005) ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain* 114:149-159.

Zhuang ZY, Wen YR, Zhang DR, Borsello T, Bonny C, Strichartz GR, Decosterd I, Ji RR (2006) A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. *J Neurosci* 26:3551-3560.

Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110.

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)

[学会発表] (計 13 件)

- ①. 大道裕介, 大道美香, 森本温子, 吉本隆彦, 櫻井博紀, 大石仁, 牛田享宏, 浅本憲, 中野隆, 熊澤孝朗: ギプス固定除去が誘発する痛覚増強と神経因性炎症ーギプス固定慢性痛症モデルによる検討ー. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2010.3.30 (盛岡).
- ②. 大道美香, 大道裕介, 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: ギプス固定慢性痛症モデルラットにおける脊髄グリア細胞活性化の変化. 第 44 回日本理学療法学会大会. 2009.5.29 (東京).
- ③. 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 回日本理学療法学会大会. 2009.5.28 (東京).
- ④. 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 回日本理学療法学会大会. 2009.5.28 (東京).
- ⑤. 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: ギプス固定慢性痛症モデルラットにおける神経因性炎症の変化. 第 44 回日本理学療法学会大会. 2009.5.28 (東京).
- 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, 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. 2009.3.30 (岡山).
- 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, 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 2008.10.23 京都
- ⑧. 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 2008.8.18 Glasgow

- ⑨. Ohmichi M, Ohmichi Y, Ohishi H, Sakurai H, Yoshimoto T, Morimoto A, Hashimoto T, Ushida 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 2008.8.20 Glasgow
- ⑩. 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 2008.7.19 Fukuoka
- ⑪. 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 2008.7.19 Fukuoka
- ⑫. 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 2008.7.19 福岡

6. 研究組織

(1)研究代表者

大道 裕介 (OHMICHI YUSUKE)
愛知医科大学・医学部・助教
研究者番号：50506673