

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25750237

研究課題名(和文) 運動器不活動後の広範囲慢性痛に対する新たな理学療法戦略構築のための基礎研究

研究課題名(英文) Fundamental research for constructing a new physical therapy strategy for widespread chronic pain after physical immobilization

研究代表者

大道 裕介 (Ohmichi, Yusuke)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：50506673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：運動器不活動後の広範囲慢性痛に対する新たな理学療法戦略構築するため、我々が開発したCPCPモデルを用いて、病態機序の解析を行った。二週間のギプス固定により、固定部後肢の広範囲(筋、筋紡錘など)に酸化障害が生じることが分かった。また、この酸化障害は、固定側の痛覚受容ニューロンの過剰興奮を引き起こし、不動肢に神経原性炎症を誘導することが示唆された。この神経原性炎症で生じた神経ペプチドシグナルは、脊髄後角ニューロンの過剰興奮を引き起こし、中枢性感作を引き起こすことが示唆された。また慢性期の痛覚増強行動に関与する脊髄アストロサイトの活性化は、固定肢の酸化障害から続発することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to construct a new physiotherapy strategy for widespread chronic pain after physical immobilization, we analyzed pathophysiological mechanism using our chronic post-cast pain (CPCP) model. We found that oxidative damage, caused by two weeks cast immobilization, occurred in a wide area (muscle, muscle spindle and the like) of the immobilized hind limb. Also, our findings suggested the following: the oxidative damage induced hyper excitability of nociceptive neurons and neurogenic inflammation in the immobile limb; the neuropeptide signal generated by this neurogenic inflammation causes hyper-excitation of spinal dorsal horn neurons and causes central sensitization; the behavior of mechanical hyperalgesia in the chronic phase is secondary to oxidative impairment in immobile limb.

研究分野：理学療法、慢性疼痛

キーワード：不動化 ミクログリア アストロサイト 酸化ストレス 神経原性炎症 不快情動

1. 研究開始当初の背景

骨格筋、関節など運動器の不活動は、CRPS I型に代表される神経損傷以外の原因で発症する慢性痛の本質的要因として重視されている。神経損傷由来の慢性痛（神経障害性痛）は、損傷した神経の支配領域に限局して出現する特徴をもつ¹。一方、CRPS type I²のように明らかな神経損傷を伴わずに生じる慢性痛は、発症からの時間経過とともに罹患部位が初期の傷害の範囲をはるかに超えて拡大することが報告されている（慢性広範囲痛あるいは chronic widespread pain: CWP と呼ぶ）³⁻⁵。非常に不可解なことに、CWP が引き起こされる原因は、極めて軽微な損傷や^{2,6} 肢体の不動化^{2,7-9} であり、CWP にみられる症状の重傷度とは明らかに不釣り合いなものである。これは神経障害性痛の臨床症状との大きな違いであり、CWP のメカニズムが神経障害痛と異なることを示唆する。しかしながら、慢性痛のメカニズム研究は、神経障害痛モデル動物を中心に行われ、筋損傷などの神経以外の組織障害に起因する慢性痛モデル動物を用いた研究はまだ始まったばかりである。

そこで我々は、神経損傷以外の要因で誘発される CWP の機序を解明するため、片側後肢をギプス固定する慢性痛モデルラットを開発した（chronic post-cast pain: CPCP モデル）¹⁰。このモデルに見られる痛覚過敏行動は、ギプス除去直後より固定側に出現し、遅れて反対側へも拡大し、さらに時間経過とともに固定部位から遠く離れた尾部へ拡大する¹⁰。さらに痛覚過敏が反対側や尾部に拡大する時期に不動後肢の坐骨神経をブロックしても拡大した痛覚過敏は全く影響を受けないことを明らかにした¹⁰。これらの結果から、この病期の疼痛のメカニズムには不動肢の末梢要素ではなく、中枢神経系の変化が重要であることが示唆された¹⁰。

種々の神経損傷モデル動物を用いた研究により、神経を損傷した同側にみられる痛覚過敏の発症メカニズムに脊髄ミクログリアの活性化が関与し、その維持メカニズムには脊髄アストロサイトの活性化が関与すると報告されている。また炎症モデル動物を用いた研究により、両側性にみられる疼痛のメカニズムにも脊髄グリア細胞の活性化が関与することが報告されている¹¹⁻¹³。以上の報告は、CPCP モデルラットにみられる広範囲の痛覚過敏にも脊髄グリア細胞の活性化が関与する可能性が高いことを示唆する。

脊髄グリア細胞活性化とそれに伴う広範囲機械痛覚増強行動の発現は、ギプス固定された末梢組織の何らかの変化に由来するものであることが推測される。また神経損傷由来の慢性痛（特徴：①損傷した神経の支配領域の痛み、②損傷神経支配分節での比較的限局した脊髄グリア細胞の活性化）とは、全く異なる病態基盤が存在する可能性が示唆される。そこで本研究では、骨格筋および筋膜・結合

組織、関節、皮膚といった臨床理学療法を中心標的となる末梢組織に着目し、広範囲慢性痛の末梢誘発因子を探索し、これら因子と脊髄グリア細胞活性化連関について検証を進めた。

2. 研究の目的

- CPCP モデルの脊髄ミクログリアおよびアストロサイトの活性化について検討した。
- これらグリア細胞の活性化と慢性的な痛覚過敏行動の関連について調査した。
- さらにこれらの活性化が神経損傷に起因するものかどうかを調査した。
- 後肢の不動により生じる疼痛誘発因子を探索し、グリアの活性化との関連を調査した。
- CPCP ラットの急性期と慢性期に生じる機械痛覚増強行動に不快情動反応が伴うかどうか調査した。

3. 研究の方法

① CPCP モデル動物の作成

SD 系雄ラット (300-400 g) を用い、骨盤から体幹まで片側後肢ギプス固定を 2 週間固定した後、ギプス除去することで作成した¹⁴。

② 機械痛覚増強行動

下腿部筋圧痛閾値 (push-pull gauge)、足底部、下腿、尾部の皮膚の機械痛覚閾値 (von Frey filaments) を経時的に計測した^{14, 20}。

③ 免疫組織

動物を 4% イソフルランで深麻酔し、4°C の 0.1 M PBS (pH 7.4) を心臓より灌流した。脱血が完了したことを確認した後、ice cold の Zamboni' s fixative [0.1 M phosphate buffer saline (PBS) containing 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid] で固定した。脊髄、後根神経節、後肢を採取し、4°C の Zamboni' s fixative に 24 時間浸漬し、後固定した。その後、10, 20, 30% Sucrose に 4°C でそれぞれ一日の計 3 日間浸漬した後、OCT コンパウンドに凍結包埋し、凍結切片を作成した。

ギプス固定 2 週間目。ギプス除去後 2 時間目、1 日目、3 日目、1 週目、3 週目、5 週目において、腰髄から尾髄に渡るミクログリアとアストロサイトの活性化の変化を、抗 Iba1・CD11b 抗体（ミクログリアマーカー）と抗 GFAP 抗体（アストロサイトマーカー）で免疫染色した。また、抗 pp38 抗体、抗 pERK 抗体、抗 pJNK 抗体を用いて免疫染色した。ギプス固定 2 週間目。ギプス除去後 2 時間目、1 日目、3 日目、1 週目、3 週目、5 週目において、固定後肢を抗 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 抗体で免疫染色した。

ギプス固定 2 週間目。ギプス除去後 2 時間

目, 1 日目において, 腰神経の後根神経節を抗 pp38 抗体, 抗 pERK 抗体, 抗サブスタンス P 抗体, 抗 CGRP 抗体, 抗 ATF3 抗体で免疫染色した.

④ 薬物投与

ギプス除去中から除去後 2 時間まで minocycline (ミクログリア活性化阻害作用) を髄腔内に連続投与した. ギプス除去後 5 週目に L- α -AA (アストロサイト活性化阻害作用) を髄腔内に投与した. それぞれの薬剤の投与後の CPCP モデルの機械痛覚増強行動の抑制効果を検証した.

ギプス固定除去における固定部後肢の再灌流障害/酸化ストレスの疼痛行動への影響を検証するため, ギプス除去直前に酸化ストレス除去剤である Tempol (250mg/kg) を腹腔内投与し, その後の痛覚増強行動の変化および固定肢の酸化障害を免疫組織学的に検証した.

⑤ 血管透過性亢進の測定

血管透過性の変化を調査するために, 固定前, 固定 2 週間目, 除去後 2 時間目, 1 日目, 1 週目目に頸静脈から Evans blue dye (EBD) を 50mg/kg 注入した. 注入 30 分後に PBS にて脱血を行った. 後肢の大腿骨中央で切断し, 60°C のホルムアミドに 36 時間浸漬した. ホルムアミド中に溶出した EBD を分光光度計で定量化した.

⑥ マクロダイアリシス

ギプス除去直後から 2 時間にかける観察される自発痛行動時に, 扁桃体の遊離ドバ

ミン (DA) を脳微小透析法と液体クロマトグラフィを用い測定した.

尾まで機械痛覚増強が拡大した慢性期(ギプス除去後 5 週目)の CPCP ラットに対し, 20g の von Frey filament (痛み行動誘発が CPCP ラットで可, 正常ラットで不可)を用い, 機械刺激を計 3 セッションの繰り返し(1セッション:1回/分 \times 20 分間の刺激後, 20 分休憩), この刺激に対する扁桃体 DA 動態を測定した.

⑦ 統計解析

各測定値は, 平均値 \pm 標準誤差で表記した. 統計解析は, 2 票本 t 検定, 一元配置分散分析または二元配置分散分析後に Dunnett' s の多重比較検定を用いた.

4. 研究成果

【成果 1】

ギプス固定中も除去後 1 日後も ATF3 陽性細胞数の増大は認められなかった (Figure 1).

一方 pERK, pp38 の免疫応答はギプス除去後 2 時間から 1 日目において, 固定側で増大し, 一部は substance P, CGRP と共染された (Figure 2).

以上により, CPCP モデルの広範囲機械痛覚増強行動は固定による神経損傷ではなく, ギプス除去後に生じた固定側の一次感覚神経の異常興奮に起因することが示唆された.

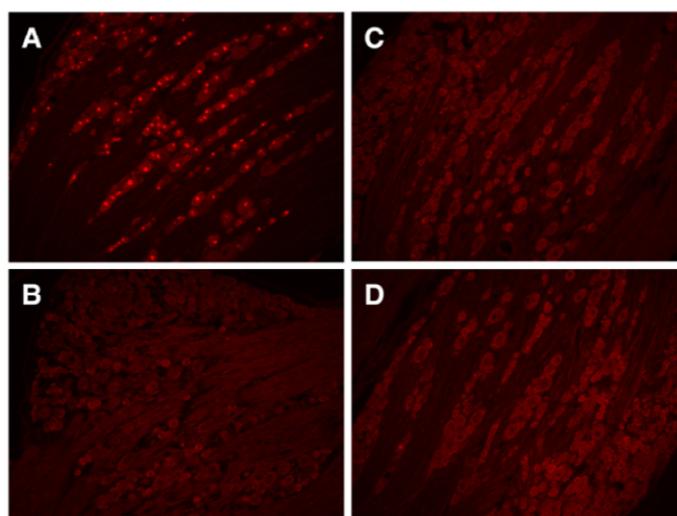


Figure 1 Clear neuronal injury exhibited by ATF3 immunoreactivity does not occur in the CPCP rat. These pictures show ATF3 immunoreactivity in the L4 dorsal root ganglion 3 days after complete sciatic nerve transection (A), in the intact (control) group (B), at the final day of cast immobilization (ipsilateral side) (C), and at the final day of cast immobilization (contralateral side) (D). A substantial number of stained cells were seen only in the sciatic nerve transected sample (A), but not in the intact (B) or CPCP groups (C, D). Scale bar = 200 μ m.

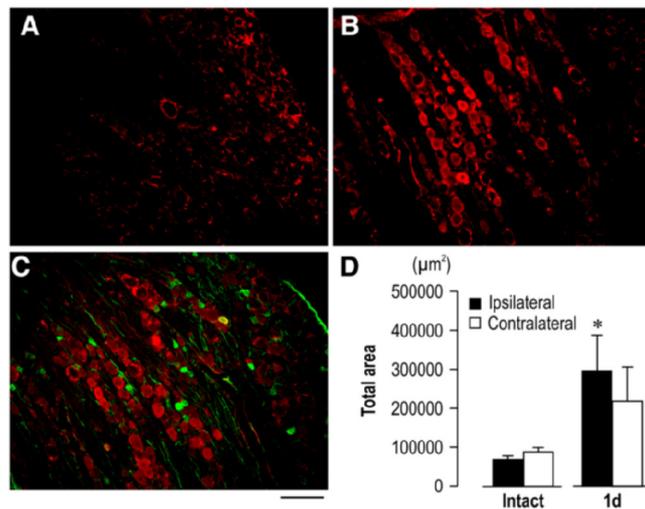


Figure 2 The number of pERK-positive cells in dorsal root ganglion (DRG) is increased after cast removal. (A, B) pERK immunoreactivity in L4 DRG of the intact group (A) and 1 day after cast removal (B). (C) Double staining of pERK and SP. (D) The quantification of the total area of pERK immunoreactivity in both L4 DRGs. 1 d: 1 day after cast removal. Values are the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ as compared with the intact group (unpaired t-test).

【成果 2】

ギプス固定 2 週間目. ギプス除去後 2 時間目, 1 日目, 3 日目, 1 週目, 3 週目, 5 週目において, Iba1 および CD11 b の免疫応答のピークはギプス除去後 1 日目であった. またミクログリアが活性化型を示すギプス除去後 1 日目において, 脊髄後角 1, 2 層の活性化型ミクログリアにおいて pp38 の免疫応答の増大が認められた.

ギプス固定 1 週間目から除去後 1 日目まで minocycline (ミクログリア抑制剤) を髄腔内投与したところ, OX42 および Iba1 免疫応答は, 抑制された. 機械痛覚増強行動は, 反対側は抑制されたが, 固定側は抑制されなかった.

ギプス除去後早期に生じる痛みの反対側への拡大は, 脊髄ミクログリアの活性化が関与する可能性が示唆された.

ギプス除去 5 週後に, L- α -AA (アストロサイト阻害剤) を髄腔内投与の投与したところ, 広範囲に認められる機械痛覚増強行動は, vehicle 投与群に比べ有意に減弱した (Figure 3).

GFAP 陽性細胞密度も同様に減弱を認めた (Figure 4).

ギプス除去 24 時間後の Tempol の腹腔内投与によって, ギプス除去後 5 週目の下腿部皮膚, 下腿部筋, 足底部, 尾部に出現する持続性の広範囲機械痛覚増強行動は, vehicle 投与群と比べ有意に抑制された. このときの GFAP 陽性細胞密度も vehicle 投与群に比べ有意に抑制された.

CPCP モデルにおける長期持続性の広範囲機械痛覚増強行動の維持には脊髄アストロサイトの活性化が一部関与していることが示された.

【成果 3】

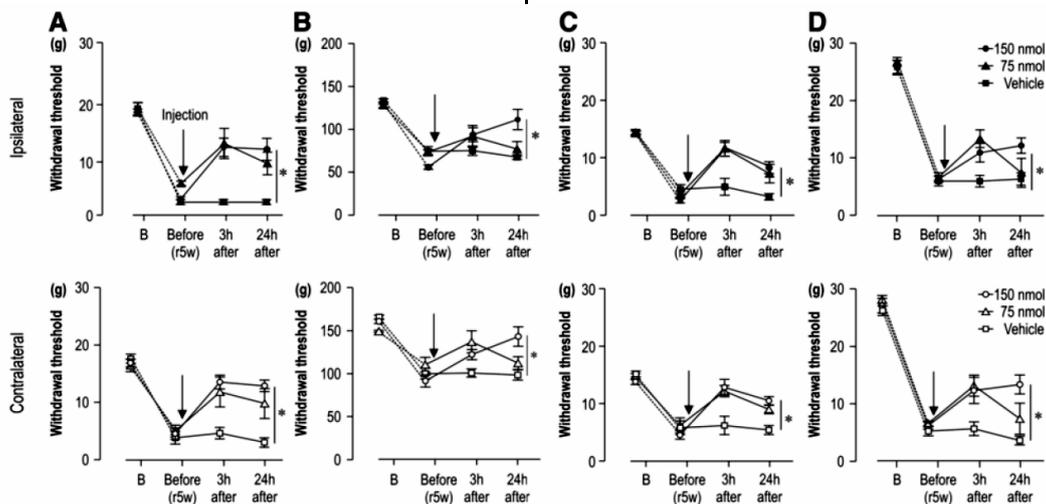


Figure 3 Intrathecal application of L- α -AA inhibits widespread mechanical hyperalgesia. Graphs show the time courses of the changes in bilateral mechanical hyperalgesia after two doses (75 and 150 nmol) of L- α -AA administration as compared to the vehicle (PBS) in the calf skin (A), calf muscle (B), hindpaw (C), and both sides of the tail (D) ($n = 5-6$, mean \pm SEM). L- α -AA (75 nmol, 150 nmol) or vehicle (PBS) was injected intrathecally (arrows) just after measurements of baseline mechanical threshold (Before) at 5 weeks after cast removal, and the measurements were repeated 3 h and 24 h later. * $p < 0.05$ as compared with each vehicle treatment group by a mixed-design two-way ANOVA.

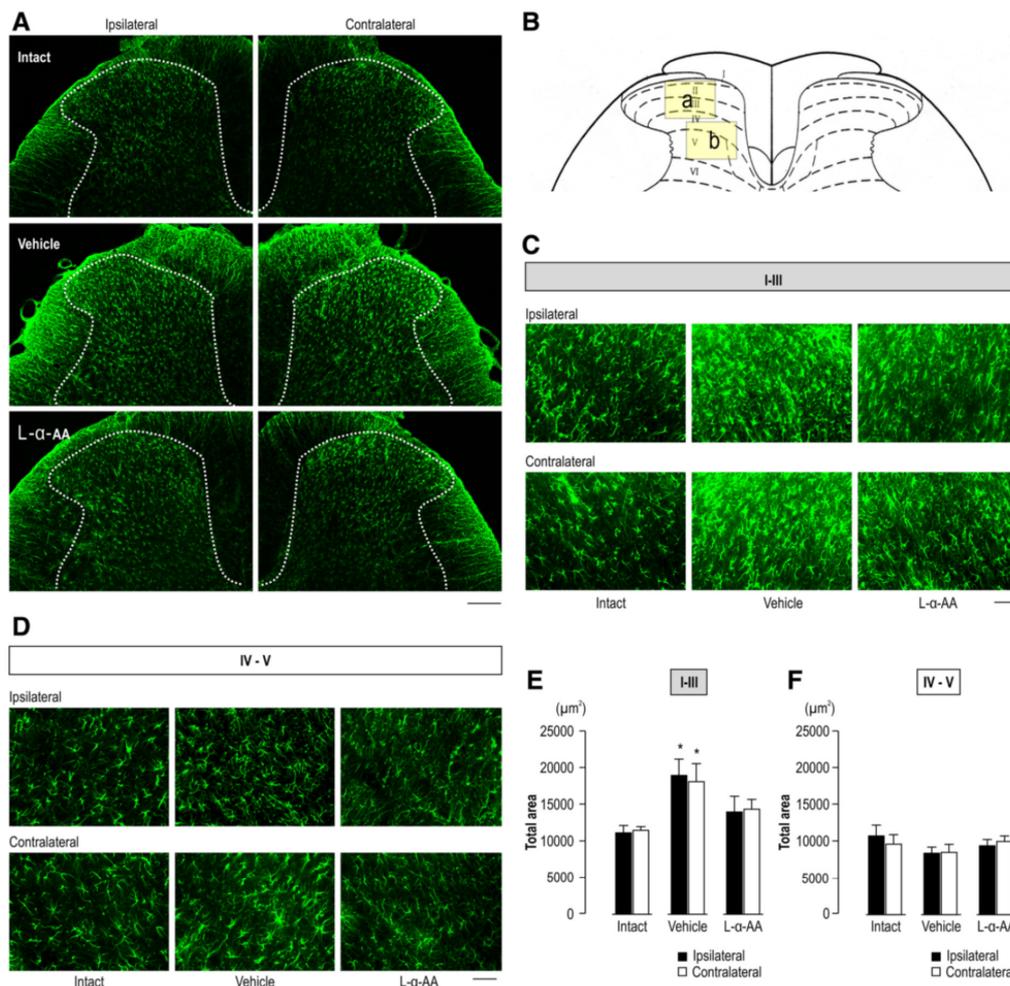


Figure 4 Intrathecal application of L- α -AA inhibits bilateral astrocyte activation in CPCP rats. (A) Low-magnification images of GFAP immunoreactivity in L4 spinal segments. Scale bar = 200 μ m. L- α -AA (150 nmol) or vehicle (PBS) was injected intrathecally 5 weeks after cast removal, and the former clearly decreased bilateral GFAP immunoreactivity. (B) Schematic illustration of L4. The predefined square area including the superficial dorsal horn (lamina I-III) (a) and deep dorsal horn (IV-V) (b) designates the area of quantitative analysis of GFAP astrocyte immunoreactivity. (C) High-magnification images of GFAP immunoreactivity in L4 lamina I-III. Scale bar = 50 μ m. (D) High-magnification images of GFAP immunoreactivity in L4 lamina IV-V. Scale bar = 50 μ m. (E) The total area of GFAP immunoreactivity in L4 lamina I-III (n = 5). (F) Total area of GFAP immunoreactivity in L4 lamina IV-V (n = 5-6). Values are the mean \pm SEM. *p < 0.05 as compared with the intact (without cast immobilization) group (unpaired t-test).

【成果 4】

8OHdG の免疫応答が、ギプス固定除去 2 時間後から 1 日後にかけて不動肢の全域（皮膚、筋膜、骨格筋、骨膜など）で漸増した。不動肢における EBD の管外漏出量、機械痛覚増強行動、腰髄後角のアストロサイトの活性化のいずれも Tempol の投与用量依存性に抑制された。

酸化ストレスは、不動肢において神経原性炎症を生じさせ、慢性的な広範囲機械痛覚増強を誘発することが示唆された。

【成果 5】

ギプス除去直後から 2 時間中に固定肢のなめ行動などの自発痛行動が出現した。この間、扁桃体 DA 濃度がギプス固定除去直前と比べ有意な上昇を示し、測定終了まで上昇を維持した。

尾への 20g の VFF による繰り返し機械刺激に対し、尾の引っ込み反応が誘発されるとともに、扁桃体 DA 濃度はセッション毎に漸増し、刺激終了後も上昇を維持した。

CPCP ラットにおける自発痛行動と尾の痛み行動に伴い扁桃体 DA 濃度の上昇が認められた。運動器の不動化は、生体に痛みと同時に不快情動を誘発し、これらは慢性化に伴い不動化部位を越えて拡大することが示唆された。

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 1 件）

- Ohmichi M, Ohmichi Y, Ohishi H, Yoshimoto T, Morimoto A, Li Y, Sakurai H, Nakano T, Sato J: Activated spinal astrocytes are involved in the maintenance of chronic widespread mechanical hyperalgesia after cast immobilization. *Mol Pain* 2014, 10:6.

【学会発表】（計 5 件）

- 大道裕介, 大道美香, 牛田享宏, 佐藤純,

中野隆：ギプス固定後慢性痛モデルラットの広範囲機械痛覚増強行動は明らかな神経損傷に起因しない。日本解剖学会第74回中部支部学術集会。2014. 10. (金沢).

2. ギプス固定後慢性痛モデルラットの広範囲機械痛覚増強行動は明らかな神経損傷に起因しない。第36回日本疼痛学会(大阪)。2014. 6
3. 大道裕介, 大道美香, 内藤宗和, 押淵英弘, 山田麻記子, 矢倉富子, 中野隆. 不動化が誘発する自発痛関連行動と広範囲機械痛覚増強における扁桃体ドーパミンの動態. 第121回全国解剖学会総会・学術集会(福島)。2016.3
4. 大道裕介, 安井正佐也, 大道美香, 内藤宗和, 中野隆. ラット後肢不動後に生じる広範囲機械痛覚増強の病態解明～酸化ストレスにより生じた神経原性炎症の関与. 第76回中部地方会(松本)。2016.10
5. 大道裕介, 大道美香, 安井正佐也, 内藤宗和, 中野隆. ラット後肢不動によって生じた酸化ストレスに起因する広範囲機械痛覚増強. 第122回全国解剖学会総会・学術集会(長崎)。2017.3

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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・講師

研究者番号：50506673

【引用文献】

- 1 Treede, R. D. *et al.* Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* **70**, 1630-1635, doi:01.wnl.0000282763.29778.59 [pii] 10.1212/01.wnl.0000282763.29778.59 (2008).
- 2 Merskey, H. & Bogduk, N. *Classification of Chronic Pain*. 2nd edn edn, (IASP Press, 1994).
- 3 Maleki, J., LeBel, A. A., Bennett, G. J. & Schwartzman, R. J. Patterns of spread in complex regional pain syndrome, type I (reflex sympathetic dystrophy). *Pain* **88**, 259-266, doi:S030439590003328 [pii] (2000).
- 4 Rommel, O. *et al.* Hemisensory impairment in patients with complex regional pain syndrome. *Pain* **80**, 95-101 (1999).
- 5 Rommel, O., Malin, J. P., Zenz, M. & Janig, W. Quantitative sensory testing, neurophysiological and psychological examination in patients with complex regional pain syndrome and hemisensory deficits. *Pain* **93**, 279-293, doi:S0304395901003323 [pii] (2001).
- 6 Jänig, W. & Baron, R. Complex regional pain syndrome: mystery explained? *Lancet Neurol* **2**, 687-697, doi:S147444220300557X [pii] (2003).
- 7 Allen, G., Galer, B. S. & Schwartz, L. Epidemiology of complex regional pain syndrome: a retrospective chart review of 134 patients. *Pain* **80**, 539-544, doi:S0304395998002462 [pii] (1999).
- 8 Galer, B. S., Henderson, J., Perander, J. & Jensen, M. P. Course of symptoms and quality of life measurement in Complex Regional Pain Syndrome: a pilot survey. *J Pain Symptom Manage* **20**, 286-292, doi:S0885-3924(00)00183-4 [pii] (2000).
- 9 Schwartzman, R. J. & Kerrigan, J. The movement disorder of reflex sympathetic dystrophy. *Neurology* **40**, 57-61 (1990).
- 10 Ohmichi, Y. *et al.* Two-week cast immobilization induced chronic widespread hyperalgesia in rats. *Eur J Pain* **16**, 338-348, doi:10.1002/j.1532-2149.2011.00026.x (2012).
- 11 Gao, Y. J. *et al.* The c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in spinal astrocytes is required for the maintenance of bilateral mechanical allodynia under a persistent inflammatory pain condition. *Pain* **148**, 309-319, doi:10.1016/j.pain.2009.11.017 (2010).
- 12 Chacur, M. *et al.* A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral peri-sciatic immune activation in rats. *Pain* **94**, 231-244, doi:S0304395901003542 [pii] (2001).
- 13 Gao, Y. J. & Ji, R. R. Light touch induces ERK activation in superficial dorsal horn neurons after inflammation: involvement of spinal astrocytes and JNK signaling in touch-evoked central sensitization and mechanical allodynia. *J Neurochem* **115**, 505-514, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06946.x (2010).