

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月15日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01525

研究課題名(和文)慢性痛を防ぐ集学的治療の基盤開発 理学療法における精神薬物療法の併用法の検討

研究課題名(英文) Research for development of multidisciplinary treatment to prevent chronic pain: Examination of combination of psychopharmacology in physical therapy

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、CPCPラットで両側性に生じる急性期と慢性期の筋の機械痛覚過敏に対し、diclofenac, pregabalin, duloxetineの鎮痛効果を検証した。この機械痛覚増強に対して、慢性期では、3剤いずれも高い鎮痛効果を示さなかった。一方、急性期では、この機械痛覚増強に対して、duloxetineが弱い鎮痛効果を示した。さらなる鎮痛効果を期待して、ギプス除去直後からduloxetineの連続投与を試みた。対側に拡大する機械痛覚増強が有意に抑制された。また慢性痛発症前からランニングホイールを用い自発運動を継続的に行うことで、この機械痛覚増強を両側性に減弱することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動器不活動による慢性筋痛に対し、diclofenac, pregabalinとduloxetineのいずれも高い鎮痛効果は認められなかった。これら3剤中、duloxetineが急性期で弱い鎮痛効果を示したことから、さらなる鎮痛を期待し、ギプス除去直後からの連続投与を試みたところ、対側に拡大する筋痛を有意に抑制することができた。持続的な自発運動はCPCPラットの筋の機械痛覚過敏を抑制した。慢性痛に移行する前のできるだけ早い時期から薬物療法と理学療法の併用を進めることが運動器不活動による痛みの慢性化を防ぐ有効な手段となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the analgesic effects of diclofenac, pregabalin and duloxetine on bilateral mechanical hyperalgesia in the acute and chronic phases in CPCP rats. In the chronic phase, none of the three drugs showed high analgesic effect on the mechanical hyperalgesia. On the other hand, in the acute phase, duloxetine showed a weak analgesic effect on the mechanical hyperalgesia. We hoped for further analgesic effects, and tried continuous administration of duloxetine immediately after casting removal. Contralateral enlargement of the mechanical hyperalgesia was significantly suppressed. The hyperalgesia was able to be reduced bilaterally by continuing the spontaneous exercise using the running wheel before the onset of the chronic phase.

研究分野：疼痛学，理学療法学，解剖学

キーワード：慢性痛 身体不活動 精神薬物療法 ギプス固定 運動療法 ジクロフェナック プレガバリン デュロキセチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、リハビリテーション医学は、発展目覚ましく、理学療法、作業療法、装具療法、心理療法などに加え、ロボット工学に基づく新たな支援手段・機器も導入されている。リハビリテーションは早期開始が推奨され、早期に開始するほど患者の予後(Quality of life)が良くなることが知られている。しかし、事故による外傷や FBSS の痛みによる恐怖体験が引き金となり、運動恐怖症(kinesiophobia)を発症し、リハビリテーションを行うことが困難となるケースを多く経験する。そこで、精神症状を緩和する目的で、選択的セロトニン・ノルアドレナリン再取込阻害薬(SNRI) 選択的セロトニン再取込阻害薬(SSRI) や三環系抗うつ薬(TCA) などの精神薬物療法を併用しながら、早期からリハビリテーションを行うことが望ましいと考えられるが、その根拠となる基礎的基盤が乏しいのが現状である。外傷や術後に生じた疼痛の慢性化を防ぐには、救急医や整形外科医、脳外科医をはじめ、精神科医や内科医に加え、理学療法士や心理療法士など様々なコメディカルスタッフによる集学的チーム医療が欠かせない。本研究により「慢性痛リハビリテーションにおける精神薬物療法の併用効果について基礎的な検証を行うことができれば、より有効性の高い集学的医療の構築において大きな意義があると考えられる。

運動恐怖症は、文字通り、動かす事に恐怖を覚え、体を動かさない状態であり、骨格筋、関節など運動器の不活動を引き起こす。不活動は、複合性局所疼痛症候群 I 型(CRPS I) 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、その痛みは神経損傷による限局した痛みと異なり、時間とともに損傷部位を越えて広がる特徴をもつ。この痛みの広がりを再現したモデル動物は存在せず、世界的にその機序解明が遅れている現状を踏まえ、応募者はこのモデル動物の開発を試みた。片側後肢を 2 週間固定することで、固定除去後に臨床像に類似した広範囲機械痛覚過敏を再現できるギプス固定後慢性痛 Chronic post-cast pain (CPCP) モデルラット[2]およびモデルマウスの開発に成功した。この痛覚過敏は、固定部位からの出現に始まり、時間経過とともに固定部位から離れた反対側後肢、さらに離れた尾部へと広がっていく特徴をもつ。申請者は、このモデルで脊髄ニューロンに c-fos が発現し、機械痛覚過敏の拡がりに平行して、脊髄ミクログリアの活性化が両側性に遠位分節へと拡大することを明らかにした。さらに慢性期にかけては、アストロサイトへとその活性化が移行していく現象を捉えることに成功し、両グリア細胞の活性化が持続性の広範囲痛覚過敏の誘導および維持に関与していることを立証した[1]。また脳内でも、ペインマトリックス(PAG、視床下部、帯状回、扁桃体、海馬などにおける c-fos 発現) の変化を捉えた。以上、広範囲痛覚過敏の病態には脊髄グリア細胞の活性化や脳内のペインマトリックスの可塑的変容が大きく関与しており、早期からのリハビリテーションと薬物療法の複合的介入は、これらの因子を抑制し、広範囲痛覚過敏を緩和できる可能性が推測される。そこで申請者は、CPCP モデルラットを用いて、早期理学療法における種々の精神薬物療法の併用方法・効果を検証し、痛みの慢性化を防ぐ集学的治療の基盤開発を目指す。

### 2. 研究の目的

交通事故、労働災害などをはじめとした外傷や術後腰下肢痛 Failed Back Surgery Syndrome: FBSS による痛みの遷延は、難治性疼痛を生じさせ、患者の苦痛と莫大な医療費負担を強いる。現在、早期からの理学療法は、疼痛の慢性化を防ぐとされ、多くの施設が積極的に導入している。また、外傷時の恐怖体験を緩和する目的で行われる早期の精神薬物療法も、痛みの慢性化を予防する上で重要な役割を担うことが知られるようになった。しかし現在、痛みの理学療法において、どのような方法で精神薬物療法を行えばよいのか、またその併用効果について具体化した基盤研究はない。本研究は、独自に開発した慢性痛モデル動物を用いて「慢性痛の理学療法における精神薬物療法の併用方法、併用効果」に関する基礎的基盤を構築することを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### 動物

本実験は、愛知医科大学の動物実験倫理委員会の承認の元に、また国際疼痛学会の動物を用いた疼痛研究のガイドラインに従って行われた。9~10 週齢の SD 系雄ラット(300-400 g; 日本 SLC, 浜松, 日本) を購入し、室温  $23 \pm 2$  °C、湿度  $55\% \pm 10\%$  で、12 時間の明暗サイクルでコントロールされた環境下で飼育した。動物には餌や水に自由に提供された。二週間のギプス固定期間中、動物は両上肢とギプス固定されていない後肢を使用して自由に動き回ることが可能であり、行動量や飲食量は、ギプス固定前と同レベルに維持していた。筋圧痛、下腿幅を測定するため、ラットを頭部から骨盤部まで布靴下で一次的に保定した。実験が開始される前に、ラットを 3 日間で約 1 時間、ハンドリングや靴下による保定に順化させた。ラットは、一度、保定環境に順化すると、一旦靴下から自由に外に出たとしても、自ら靴下内に入り再び静かに保定され、ハンドリングに対して無抵抗となった。

#### 後肢のギプス固定

ギプス固定後慢性痛モデルラットは、我々の以前の研究に従い、2 週間、後肢をギプス固定したのち、解除することに作成された。ペントバルビタールナトリウム(64.8 mg/kg、腹腔内

注射)による麻酔下で、左後肢から骨盤部までを石膏ギプス(30~35グラム; Plasrun -Gyps E; Alcare, 東京, 日本)で固定した。固定された後肢に、循環障害(例えば鬱血, 虚血または圧迫潰瘍)や2週間の不動期間中に激しいギプスの損傷が観察されたラットは、行動実験から除外した。2週間の不動期間を完了した動物は、靴下で保定し、無麻酔下でギプスが手で取り除かれた。必要に応じてはさみを使用した。正常ラットを対照として使用した。

#### 筋圧痛閾値

腓腹筋部の筋圧痛閾値(MPPT)の測定は、Push-Pull Gauge(Aikoh Engineering, 大阪, 日本), 以下PPGを用いて行った。丸い先端(直径2.4mm)の円錐形のプローブを10g/sで直線的に増加する圧力で腓腹筋部に押し当て、足の引っ込め反応を誘発する最小圧力を測定した。腓腹筋部の圧刺激は4回行い、最後の3回の試行の中央値を筋圧痛閾値として定義した。各測定間には30秒以上のインターバルを設けた。ギプス固定を行う前に3セッションの測定を行い、これらの3日間の平均値をベースライン値として使用した。

#### 筋萎縮

後肢の腓腹筋部の筋萎縮を調べるために、ラットを頭部から骨盤まで靴下で保定し、仰臥位に置いた。必要であれば、吸入用イソフルラン(2%)を用いて動物を麻酔した。筋萎縮は、ノギスを使用し、評価した。後肢を最大の伸長位置に保持し、下腿幅の最大膨隆部を計測した。測定は、3回繰り返し行い、これらの値の中央値を測定値とした。

#### 骨格筋の組織学的分析

動物をペントバルビタールナトリウム(64.8mg/kg, 腹腔内注射)により麻酔し、その後に腓腹筋(GM)およびヒラメ筋(SM)を採集した。次いで、動物を麻酔薬の過剰摂取により安楽死させた。GMおよびSMを液体窒素冷却イソペンタン(Wako, Osaka, 日本)中で凍結した後、クライオスタットにて厚さ10 $\mu$ mの切片を切り出した。切片をスライド上に載せ、ヘマトキシリン-エオシン(Wako, Osaka, 日本)で染色した。次いで、切片を段階的にエタノール(70~100%)およびキシレン中で脱水し、Entellan New Rapid Mounting Medium(Merck Darmstadt, ドイツ)で封入した。デジタル画像をKeyence BIOREVO BZ-9000顕微鏡(Keyence, Osaka, 日本)で撮影し、画像解析ソフトウェア(Image J 1.15i, National Institutes of Health, Bethesda, MD)を用いて分析した。

#### 薬物投与

CPCPモデルの筋の痛覚増強に対するdiclofenac, pregabalinおよびduloxetineの効果を調べた。pregabalinおよびduloxetineを蒸留水に溶解した。diclofenacを0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁した。薬物は、diclofenac 1, 3および10mg/kgおよびpregabalinおよびduloxetine 3, 10および30mg/kgの投与量(遊離塩基形態として計算)で経口投与した。薬物の血中濃度が最大値を示す投与後1時間(diclofenac), 2時間(pregabalin)および3時間(duloxetine)で筋圧痛閾値を測定した。各測定点を、最大血漿濃度を示す時間として選択した。

#### 自動運動

自発運動を誘発するためにランニングホイール(ENV-046; Med Associates, St. Albans, VT, USA)を用いて行った。自発運動期間は、モデル作成前の2週間とし、その期間内の自発運動距離を測定した。

#### 統計解析

すべてのデータは、平均値 $\pm$ 標準誤差で表示した。統計分析は、GraphPad Prismバージョン5.04(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)およびStatFlexバージョン6.0(Artech Co., Ltd., Osaka, 日本)を用いて行った。データは、カイ二乗検定、スチューデントt検定、一元配置分散分析(ANOVA)、または反復測定の二元配置分散分析を行い、Dunnettあるいはボンフェローニの多重比較検定によって分析した。

## 4. 研究成果

### 二週間の後肢不動化により誘発される廃用性筋萎縮

無処置ラットでは、GMのピーク断面積は、4000~5000 $\mu$ m<sup>2</sup>の範囲であった。GMの平均断面積は345.5  $\pm$  3724 $\mu$ m<sup>2</sup>, 筋湿重量は2.67  $\pm$  0.107gであった。ギプス固定2週間後、GMの横断面積のピークは、2000から3000 $\mu$ m<sup>2</sup>の範囲にあった。平均断面積(2377  $\pm$  133.7 $\mu$ m<sup>2</sup>; P=0.0046)と筋質重量(1.55  $\pm$  0.225g; ; P=0.0011)は、無処置群と比較して有意に低下した。

無処置ラットにおけるSMのピーク断面積は、3000~4000 $\mu$ m<sup>2</sup>の範囲であった。SMの平均断面積は322.7  $\pm$  3567  $\mu$ m<sup>2</sup>, 筋湿重量は0.20  $\pm$  0.006gであった。ギプス固定2週間後、SMの横断面積のピークは、2000から3000 $\mu$ m<sup>2</sup>の範囲であった。平均断面積(2480  $\pm$  101.1 $\mu$ m<sup>2</sup>; P=0.0046)と筋質重量(0.13  $\pm$  0.018g; ; P=0.0033)は、無処置群と比較して有意に低下した。これらの結果から、2週間のギプス固定によって固定側のヒラメ筋および腓腹筋は、廃用性筋

萎縮を引き起こしたことが示唆された。

廃用による身体的変化の回復後も持続する両側性の筋の機械痛覚過敏

CPCP ラットの筋の機械痛覚過敏は、左後肢を2週間ギプス固定することによって誘発された。MPPT は、ギプス除去後に両側性に減少し、3週間持続した。一方、下腿幅は、ギプス固定により有意に減少していたが、ギプス除去後から3週間以内にベースラインレベルまで回復した。したがって、本研究では、ギプス固定による筋萎縮が残存しているギプス除去後1週間目を急性期、筋萎縮が回復した後も筋の機械痛覚過敏が継続している除去後3週間目を慢性期と定義した。

CPCP ラットの両側性の筋の機械痛覚過敏に対する diclofenac の効果

diclofenac の単回経口投与をギプス除去の1週間目と3週間目に行った。ギプス除去後1週間目と3週間目のいずれにおいても、固定側と対側で、vehicle 群と diclofenac 群の筋圧痛閾値に有意差はなかった。

CPCP ラットの両側性の筋の機械痛覚過敏に対する pregabalin の効果

diclofenac の単回経口投与をギプス除去の1週間目と3週間目に行った。ギプス除去後1週間目と3週間目のいずれにおいても、固定側と対側で、vehicle 群と diclofenac 群の筋圧痛閾値に有意差はなかった。

CPCP ラットの両側性の筋の機械痛覚過敏に対する duloxetine の効果

duloxetine の単回経口投与をギプス除去の1週間目と3週間目に行った。ギプス除去1週間目の投与は、両側性に MPPT を有意に回復させた。しかしながら、ギプス除去後3週間目での投与では、固定側と対側のいずれにおいても、vehicle 群と diclofenac 群で筋圧痛閾値に有意差は認められなかった。

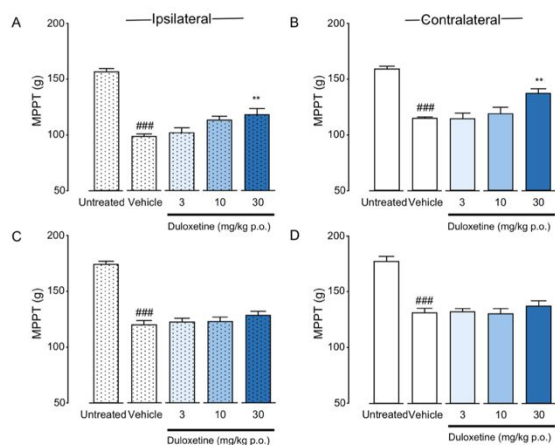


図 1 Analgesic effects of duloxetine on muscle pressure pain threshold (MPPT) in chronic post-cast pain rats. Duloxetine was orally administered before the muscle pressure test at 1 (A, B) and 3 (C, D) weeks after cast removal. Bars represent mean values ± standard error of the mean (n = 4-6). ###P < 0.001 relative to the untreated group (Student's t-test). \*\*P < 0.01 relative to the vehicle-treated group (Dunnett's multiple comparison test).

Duloxetine の繰り返し投与は、反対側の筋の機械痛覚過敏の抑制した。

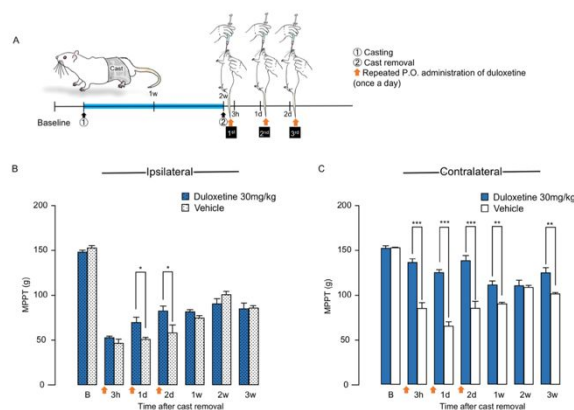


図 2. Continuous administration of duloxetine from immediately after cast removal suppressed mechanical muscle hyperalgesia in chronic post-cast pain rats. (A) Schematic time-line for oral administration and behavioural tests. (B) Ipsilateral muscle pressure pain threshold (MPPT) of CPCP rats after repeated administration of duloxetine (30mg/kg). (C) Contralateral muscle pressure pain threshold (MPPT) of CPCP rats after repeated administration of duloxetine (30mg/kg).

duloxetine (30mg/kg). Data are presented as mean values ± standard error of the mean (n = 5). Horizontal axes indicate the number of administrations (B: before cast application; 1: first time, 2: second time, 3: third time). \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 relative to vehicle (Student's t-test).

不動化前の持続的な自発運動は CPCP ラットの筋の機械痛覚過敏を抑制した。

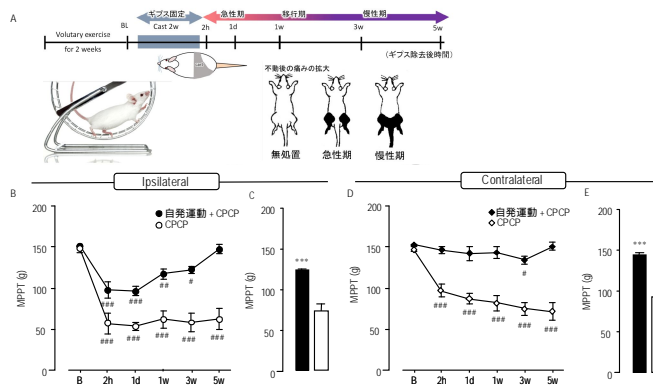


図3 Sustained voluntary exercise before chronic post-cast pain treatment suppressed mechanical muscle hyperalgesia.

(A) Schematic time-line for voluntary exercise and behavioural tests. (B) Ipsilateral muscle pressure pain threshold (MPPT) of CPCP rats after sustained voluntary exercise before chronic post-cast pain treatment. (C) Contralateral

MPPT of CPCP rats after sustained voluntary exercise before chronic post-cast pain treatment. Data are presented as mean values  $\pm$  standard error of the mean ( $n = 6$ ). Horizontal axes indicate measurement time points (B: before cast application; 2h: 2 hours; w: weeks). # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , and ### $P < 0.001$  relative to B (Dunnett's multiple comparison test). \*\*\* $P < 0.001$  relative to CPCP group (Student's t-test with [A] or without [B] Bonferroni correction).

本研究では、CPCP ラットで両側に生じる急性期と慢性期の筋の機械痛覚過敏に対し、diclofenac (シクロオキシゲナーゼ阻害剤)、pregabalin (2 Ca チャンネル阻害剤) と duloxetine (セロトニン・ノルエピネフリン取り込み阻害剤) の鎮痛効果を検証した。運動器不活動による慢性筋痛に対し、diclofenac、pregabalin と duloxetine のいずれも高い鎮痛効果は認められなかった。これら 3 剤中、duloxetine が急性期で弱い鎮痛効果を示したことから、さらなる鎮痛を期待し、ギプス除去直後からの連続投与に試みたところ、対側に拡大する筋痛を有意に抑制することができた。対側の痛み拡大は、下行性疼痛抑制系の機能低下が関与している可能性が示唆された。エコファーマの取り組みから duloxetine にミクログリアの活性化阻害作用が報告されている。CPCP ラットではギプス除去後急性期より脊髄ミクログリアの活性化が生じることが明らかとなっていることから、この対側の鎮痛効果は、ミクログリアが標的となった可能性も考えられる。慢性痛に移行する前のできるだけ早い時期から薬物療法を進めることが痛みの慢性化を防ぐ有効な手段となることが示唆される。また、慢性痛発症前に継続的な自発運動を行うことで、慢性筋痛の発症を大きく減弱することができた。自発運動によるフィットネスの増大において誘導される因子の中に慢性筋痛の発症にネガティブに作用する特異的因子が含まれる可能性が高い。よって、発症早期からの薬物療法の導入と急性期リハビリテーションによるフィットネスの改善を複合することでさらなる慢性痛の抑制効果が期待できることが予想される。

#### 引用文献

- [1] 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.
- [2] Ohmichi Y, Sato J, Ohmichi M, Sakurai H, Yoshimoto T, Morimoto A, Hashimoto T, Eguchi K, Nishihara M, Arai YC, Ohishi H, Asamoto K, Ushida T, Nakano T, Kumazawa T. Two-week cast immobilization induced chronic widespread hyperalgesia in rats. *Eur J Pain* 2012;16(3):338-348.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ohmichi Y, Ohmichi M, Murai N, Yasui M, Takeshita N, Oshibuchi H, Naito M, Nakano T, Sato J. Therapeutic effects of diclofenac, pregabalin, and duloxetine on disuse-induced chronic musculoskeletal pain in rats. *Sci Rep* 8, 3311, doi:10.1038/s41598-018-21429-3 (2018).

〔学会発表〕(計 6 件)

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 回日本

解剖学会中部支部学術集会，2016年10月，長野。  
 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全国学術集会 2017年03月，長崎。  
 大道 裕介，大道 美香，安井 正佐也，横田 紘季，内藤 宗和，中野 隆：ラットにおける後肢不動後の自発痛関連行動と脱毛は酸化ストレスに起因する。第123回日本解剖学会総会・全国学術集会，2018年3月，東京  
 Ohmichi Y, Ohmichi M, Murai N, Yasui M, Takeshita N, Oshibuchi H, Naito M, Nakano T, Sato J. Therapeutic effects of diclofenac, pregabalin, and duloxetine on disuse-induced chronic musculoskeletal pain in rats. 17th World congress on pain, 2018.9, Boston.  
 Ohmichi Y, Ohmichi M, Murai N, Yasui M, Takeshita N, Oshibuchi H, Naito M, Nakano T, Sato J. Therapeutic effects of diclofenac, pregabalin, and duloxetine on disuse-induced chronic musculoskeletal pain in rats. 第124回 日本解剖学会総会・全国学術集会，2019年3月，新潟。  
 大道美香，大道裕介，押淵英弘，内藤宗和，中野隆：身体不活動による自発痛関連行動と不快情動関連応答 扁桃体基底外側核の活性化と遊離ドパミンの変化。第124回 日本解剖学会総会・全国学術集会，2019年3月，新潟。

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：大道 美香

ローマ字氏名：Mika Ohmichi

所属研究機関名：愛知医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：30581079

研究分担者氏名：安井 正佐也

ローマ字氏名：Masaya Yasui

所属研究機関名：愛知医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：10723695

研究分担者氏名：内藤 宗和

ローマ字氏名：Munekazu Naito

所属研究機関名：愛知医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：10384984

研究分担者氏名：押淵 英弘

ローマ字氏名：Hidehiro Oshibuchi

所属研究機関名：東京女子医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：90568073

研究分担者氏名：矢倉 富子

ローマ字氏名：Tomiko Yakura

所属研究機関名：愛知医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：20722581

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。