

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500587

研究課題名(和文) 不動に伴う慢性痛の発生メカニズムを末梢組織の変化から探る

研究課題名(英文) Mechanism of immobilization-induced hypersensitivity associated with changes in peripheral tissues

研究代表者

中野 治郎 (NAKANO, Jiro)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：20380834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は不動に伴う痛みの発生メカニズムを明らかにすることである。足関節不動化ラットモデルの足底痛覚閾値を解析した結果、不動に伴う痛みは不動2週目から出現し、不動期間が8週間におよぶと中枢神経系の感作を引き起こして慢性化すると考えられた。次に、同モデルの皮膚に対して組織学的解析を行った結果、表皮厚は菲薄化し、真皮上層に分布する末梢神経が増加することが明らかとなり、これらの変化は末梢循環障害の影響ではないと思われた。そこで、表皮(ケラチノサイト)におけるTRPV1, P2X3, NGFの発現を解析した結果、不動期間に準拠して増加することが示され、これが不動に伴う痛みの発生要因である推測された。

研究成果の概要(英文)：This study examined mechanism of mechanical and thermal hypersensitivity in the rat hind paw during ankle cast immobilization of the hind limbs using rats. Two weeks post immobilization, mechanical and thermal sensitivities increased significantly in all rats. CGRP expression in the spinal dorsal horn increased in the rats immobilized for 8 weeks but not in those immobilized for 4 weeks. These results also highlight the possibility that prolonged immobilization induces central sensitization in the spinal cord. In the plantar skin of immobilized rats, peripheral nerve profiles were increased. NGF, TRPV1 and P2X3 expression levels in the epidermis (keratinocyte) were also increased. The time course of the increase in peripheral nerve fibers and in the expression of TRPV1 and P2X3 paralleled the development of hypersensitivity, which suggests that histological changes of the skin following cast immobilization may have some relation to the resulting hypersensitivity.

研究分野：総合領域

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 不動 痛み関連行動 NGF TRPV1 P2X3 感作 ケラチノサイト

1. 研究開始当初の背景

現在、多くの国民が運動器由来の慢性痛に苦しんでいる現状がある。そして、これら運動器由来の慢性痛の発生要因としては、これまで関節や骨格筋などの末梢組織の炎症を起因とした過剰な刺激入力によって中枢神経系の可塑的变化が招来されたことが関与していると考えられてきた。しかし近年では、運動器由来の慢性痛の発生要因には不動といった末梢組織からの刺激の減弱・消失によって中枢神経系が可塑的变化を起こすことも関与しているのではないかと考えられている。このことを裏付ける実験結果として、健康なヒトや小動物の四肢を不動化することで痛覚閾値の低下が生じることが報告されている。しかし、どの程度の不動期間で痛覚閾値の低下が生じはじめるのか、また、慢性痛に移行するのはどの程度の不動期間なのかはこれまで明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、不動が原因で生じる痛みについて、まず(1)経時的な変化および慢性化する時期を明らかとし、次に(2)、皮膚を中心とした末梢組織の変化から、当該痛みの発生メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1)実験1: 不動に伴う痛覚閾値の経時的変化について

対象と方法

実験動物には、8週齢のWistar系雄性ラット80匹を用いた。動物は専門業者より購入後、長崎大学先端生命科学支援センター・動物実験施設で飼育し、実験期間中は水と餌を自由に与えた。なお、本実験は長崎大学動物倫理委員会の承認を得ている(承認番号1107040938)

不動モデルの作製方法

不動モデルは、研究代表者がこれまで行ってきた方法で作製する。具体的には、ラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)を投与した後、麻酔下にて右足関節を最大底屈位で中足趾節関節(MP関節)から膝蓋骨上縁より近位2cmまでの範囲をギプス固定した。固定期間中は浮腫の発生やギプスの緩みを防ぐ目的で2~3日毎にギプスを巻き替えた。実験期間は4および8週間とした(各不動期間30匹、計60匹)(不動群)。そして不動期間終了後、一部のラット(4週, 8週, 各20匹)はギプスを解除してさらに通常飼育し、痛覚閾値が正常化するまで継続した。通常飼育は残りのラットは不動期間終了時の時点で材料採取に供した。

一方、無処置のラットを対照群として用い、各不動期間のラットと週齢を合わせるため、12, 16週齢時まで通常飼育した(各10匹、

計20匹)。

痛みの行動学的評価

実験前および不動処置から実験終了までの各週にすべてのラットに対して痛みの行動学的評価を実施した。機械的刺激に対する痛み反応の評価として、両側足底部に von Frey filament (VFF) 刺激を10回加えた際に出現する逃避反応の回数をカウントした。VFF15gのものを用い、VFF刺激に対する逃避反応回数を機械的アロディニアおよび機械的痛覚過敏の指標とした。加えて、熱刺激に対する痛み反応の指標として、熱痛覚閾値温度を測定した。具体的には、42 から毎秒0.25 ずつ上昇するように設定された熱源プローブをそれぞれ左右の足背にあて、逃避反応が出現した時点の温度を3回記録し、3回の測定値の平均値を熱痛覚閾値温度とした。

材料採取

実験期間終了後はすべてのラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)を投与し麻酔を行った後、生理食塩水および4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定し、脊髄(L4-5)を採取した。採取した試料は4%PFA, 10%および20%スクロース溶液にそれぞれ24時間浸漬した後、-80 に冷却したイソペンタン内で急速凍結した。そして、10μm厚の凍結切片を作製し、免疫組織化学的解析に供した。

免疫組織化学的解析

脊髄組織の凍結切片には、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(calcitonin gene-related peptide: CGRP)に対する蛍光免疫染色を施した。CGRPは一次神経細胞から末梢と脊髄に向かって分泌される神経ペプチドで、脊髄後角に分泌されたCGRPはサブスタンスPを介して神経細胞の感度を上昇させ、中枢神経性感作を引き起こす。本研究では、脊髄における中枢神経性感作の程度を、痛みの慢性化の指標とした。染色は通法の蛍光標識をも用いた間接法で行い、蛍光顕微鏡で撮影した染色像をパーソナルコンピューターに取り込んだ。そして、解析ソフトを用いて両側の脊髄後角を浅層(Laminae I-II)と深層(Laminae III-VI)をフリーハンドで囲み、Fluorescence Intensityを算出した。なお、CGRPの解析は1試料あたり5切片、1切片あたり3視野の染色像を用いて行った。

(2)実験2: 不動に伴う皮膚の変化と痛覚閾値の低下との関連性について

対象と方法

実験動物には、8週齢のWistar系雄性ラット120匹を用いた。動物の購入元、飼育方法等は実験1と同様である。

不動モデルの作製方法

不動モデルは、実験1と同様な方法で作製し、不動期間を1, 2, 4週(各20匹、計60匹)とした(不動群)。また、無処置のラットを対照群として用い、各不動期間のラット

と週齢を合わせるため、9, 10, 12 週齢時まで通常飼育した(各 20 匹, 計 60 匹)。

皮膚循環の評価

痛みと循環障害の関係を検索する目的に、不動期間を 4 週間とした不動群およびその対照群のラットの一部を用いて、皮膚の表面温度、足幅、血流量、血液 pH、血中乳酸濃度を測定した。具体的には、実験終了の直前に、ラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)を投与した後、ギプスを装着したままの状態とし、足底表面の温度を赤外線温度センサで 3 回測定し、その平均を算出した。次に、レーザードップラー血流量測定器のプロブを足底中央に貼付し、血流量を 10 分間測定した。最後に、ニードルを用いて足底から血液を少量採取し、血液の pH をニードル型 pH メーターを用いて測定し、続いて乳酸測定器を用いて血中乳酸値を測定した。

材料採取

実験期間終了後はすべてのラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウム(40 mg/kg)を投与し麻酔を行った後、生理食塩水および 4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定し、足底皮膚を採取した。採取した試料は実験 1 と同様な方法で処理し、凍結切片を作製して、それぞれを組織学的解析(HE 染色)および免疫組織化学的解析に供した。

組織学的解析

凍結切片に対してヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施し、光学顕微鏡を用いて検鏡した。また、その染色像($\times 100$)をパーソナルコンピュータに取り込み、画像解析ソフト Image J を用いて表皮厚(顆粒層~基底層)をランダムに 7 箇所、計測した。表皮厚の計測は 1 試料あたり 5 切片、1 切片あたり 5 視野の染色像を用いて行った。

免疫組織化学的解析

皮膚の末梢神経を可視化するため、有髄 A 線維に対する抗 Neurofilament 200 抗体、無髄 C 線維に対する抗 Peripherin 抗体を一次抗体とした免疫組織化学的染色を 30 μm 厚の凍結切片に対して行った。染色は通法に従い、増感法として ABC 法を適用し、光学顕微鏡で観察した。そして、1 切片から 5 視野の染色像($\times 200$)をパーソナルコンピュータに取り込み、各画像において表皮の基底層から 50 μm 以深の真皮上層に分布する陽性線維をカウントし、その値を解析した皮膚領域の距離で除した。

また、表皮に発現する侵害受容体の発現と Nerve growth factor (NGF) を半定量化するため、10 μm 厚の凍結切片に対して TRPV1, P2X3, NGF に対する蛍光免疫染色を施し、蛍光顕微鏡で撮影した染色像をパーソナルコンピュータに取り込んだ。そして、実験 1 と同様な方法でそれぞれの Fluorescence Intensity を算出した。なお、すべての解析は 1 試料あたり 5 切片、1 切片あたり 3 視野の染色像を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 実験 1: 不動に伴う痛みの経時的変化について

機械的刺激に対する痛覚閾値の推移

不動群の不動側(右側)において、VFF 刺激に対する逃避反応の出現回数は 4g の刺激では不動 2 週目から、15g の刺激では不動 1 週目から、対照群に比べ有意に増加した。これらの変化は、不動 8 週目までの不動期間に準拠して顕著になった。また不動期間 4 週間のラットでは、逃避反応の出現回数の増加は、不動解除 4 週間後に対照群と変わらないまで回復した。しかし、不動期間 8 週間のラットでは、不動解除 4 週間後でも逃避反応の出現回数は対照群より有意に高値を示した(図 1)。最終的に、不動期間 8 週間のラットの逃避反応の出現回数が正常化したのは不動解除 16 週間後であった。一方、非不動側(左側)においては両群とも変化は認められなかった。熱痛覚閾値温度は、不動初期から低下し始め、不動期間に準拠して著明となった。解除後は、不動期間 4 週間のラットは数日後に正常化した。不動期間 8 週間のラットでは不動解除 3 週間後まで有意に低下した状態が続いた(図 2)。

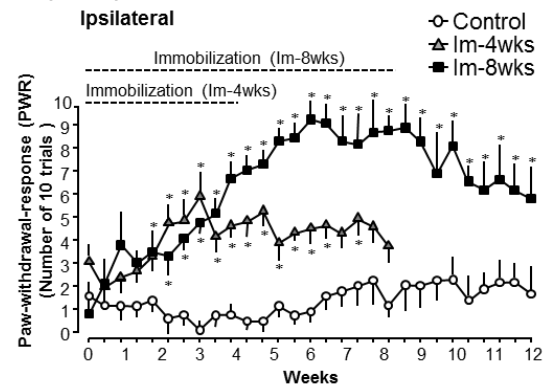


図 1 機械的刺激に対する痛覚閾値の変化
図は不動側足底に VFF 刺激(15g)を与えた場合の逃避反応の出現回数を示す。逃避反応が増えるほど、痛覚閾値が低下したことを意味する。* : 対照群との比較 ($P < 0.05$)。

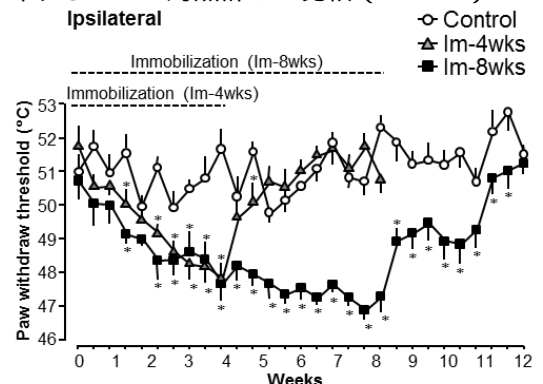


図 2 熱刺激に対する痛覚閾値の変化
図は不動側足背部の熱痛覚閾値の温度を示す。* : 対照群との比較 ($P < 0.05$)。

脊髄後角における CGRP 発現量

不動期間 4 週間とした不動群のラット脊髄後角では、不動側の Laminae I-II のみで CGRP の有意な発現増加が認められた。また、不動期間 8 週間とした不動群のラットでは、不動側の Laminae I-II と III-VI のいずれにおいても有意な発現増加が認められた(図 3)。一方、非不動側においてはいずれとも変化は認められなかった。

考察

足関節不動により逃避反応の出現回数が増加し、これは痛覚閾値の低下、すなわち痛みの発生を意味する。データは記載していないが、皮膚組織や骨格筋組織に炎症は認められていない。また非不動側では痛覚閾値の低下は認められなかったことから、ストレス性の痛覚閾値の低下ではないと断言できる。つまり、末梢組織が不動に曝されること自体がこの状況を引き起こしたと考えられる。そして、その不動に伴う痛みの発生時期は、不動 2 週間と予想よりも早期であった。

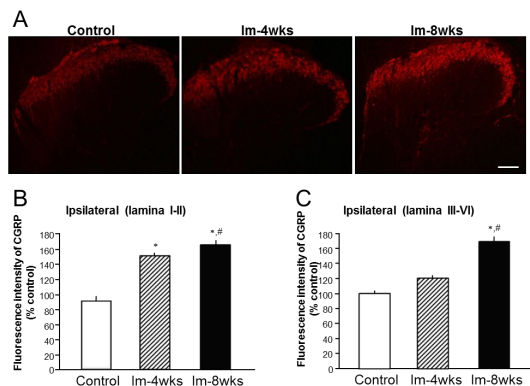


図 3 脊髄後角における CGRP 発現量

A: 不動側後角の免疫染色像 (抗 CGRP), B: 後角浅層 (Laminae I-II), C: 後角深層 (Laminae III-VI). CGRP の増加は中枢神経系の感作の発生を示唆する。Bar=100 μ m。*: 対照群との比較 ($P < 0.05$), #: 不動期間 4 週間 (Im-4Wks) との比較 ($P < 0.05$)。

次に、不動解除後の痛覚閾値の推移を見ると不動期間 4 週間としたラットでは 4 週間で正常状態に回復した。これに対して、不動期間 8 週間としたラットは回復しなかった。この違いは、脊髄後角の CGRP 発現量から説明される。すなわち、不動期間 8 週間となると脊髄後角全体に CGRP 発現量の有意な増加が認められ、重度な中枢神経系感作が発生していると思われる。そして、この状態となると、回復に時間を要し、痛覚閾値の低下の状態が慢性化すると推測される。したがって、短期の不動に伴う痛みは回復可能であるが、不動状態が長期に及ぶと痛みが慢性化する恐れがあると言える。なお、本実験では不動群の不動期間終了時にホルマリンテストを実施しており、その結果は上記の見解を支持するものであった。詳細は紙面上の都合によりここでは割愛する。

(2) 実験 2: 不動に伴う皮膚の変化と痛みと関連性について

皮膚循環の評価

不動群の不動側の血流量、表面温度、足幅に経時的な変化は認められなかった。また不動期間終了時に足底から採取した血液の pH および血中乳酸値を測定した結果、対照群のそれと有意差はなかった(図 4)。

足底の組織学的変化

不動群の不動側の足底皮膚では、角質の乱れや表皮の菲薄が認められた(図 5)。また組織学的変化を定量解析した結果、不動群の表皮厚は対照群のそれと比べて有意に減少し、末梢神経密度は有意に増加しており(図 6)、その程度は不動期間に準拠した。

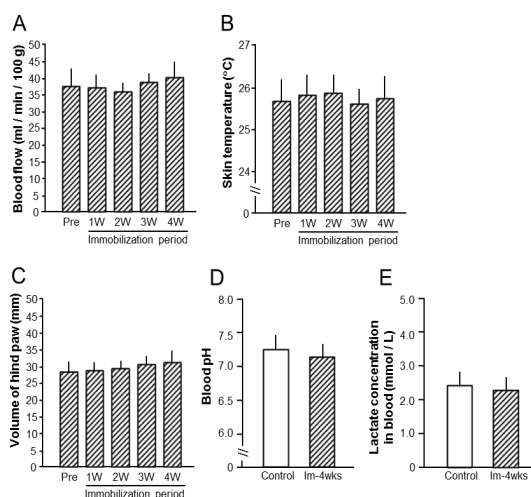


図 4 不動群不動側の循環の評価

A: 血流量, B: 表面温度, C: 足幅, D: 血液 pH, E: 血中乳酸値の変化

ケラチノサイトにおける侵害受容体ならびに NGF の発現

ケラチノサイトにおける侵害受容体 (TRPV1, P2X3) は、不動群において発現の増加が認められ、その程度は不動期間に準拠した。NGF に関しても、不動群において発現の増加が認められたが、その増加の程度は不動期間通して一定であった(図 7, 8)。

考察

これまでに明らかとなっている末梢組織における痛みの発生要因としては、炎症、循環障害とそれに伴うアシドーシス、神経損傷などがあげられる。今回の結果、不動群の皮膚において炎症所見は認められていない。また、循環障害やアシドーシスが生じている可能性も否定された。また、不動群の下肢には意図的な損傷は一切与えておらず、末梢神経が損傷した可能性は極めて低い。そこで、表皮の組織学的解析を実施した結果、表皮の菲薄化と末梢神経密度の増加が認められ、これが痛覚閾値の低下に繋がった可能性は考えられる。ただ、これまでに表皮厚と痛覚閾値との関係を明示した報告は見当たらず、表皮の菲薄化が原因であるかどうかは断定できていない。また、末梢神経密度の増加は外部

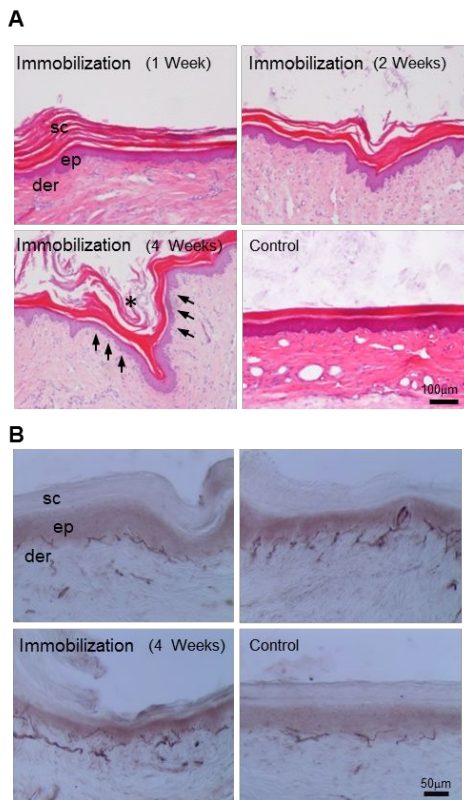


図5 足底皮膚の組織学的変化
A:HE 染色像 . B:末梢神経に対する免疫染色 (抗 PGP9.5). sc:角質, ep:表皮, der:真皮, 矢印:表皮の非薄化, *:角質の乱れ.

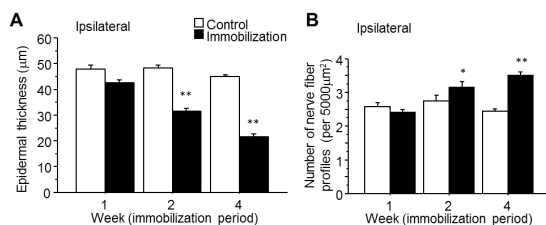


図6 足底皮膚の表皮厚と末梢神経密度
A:表皮厚, B:末梢神経密度
対照群との比較 (* $P<0.05$; ** $P<0.01$).

からの刺激に対して反応する自由神経終末の数が増加することを意味する. 炎症性疼痛モデルや神経障害性疼痛モデルの皮膚においても一次知覚神経や自律神経の増加・側枝発芽を認め,これが疼痛関連行動や異常感覚の発生に寄与するとの報告がある.つまり,皮膚に分布する末梢神経の増加は痛覚閾値に影響を及ぼす可能性は高く,不動群に認められた痛覚閾値の低下の一要因であったと考えられる.そして末梢神経の増加が生じた原因としてはケラチノサイトにおける NGF の発現量が増加したことに基くと推察される.一方,ケラチノサイトの侵害受容体を解析したところ,不動群において有意な増加が認められた.近年の研究では,ケラチノサイトは感覚神経線維と直接には接続していないが,炎症性サイトカインや ATP などの物質を介して,末梢組織における痛覚の伝導

メカニズムに深く関与していることが示されている.また,TRPV1 は主に熱刺激,P2X3 は主に機械的刺激に反応するとされており,実験1の不動群において機械的刺激および熱刺激のいずれに対する痛覚閾値も低下した結果と実験2の結果は一致する.

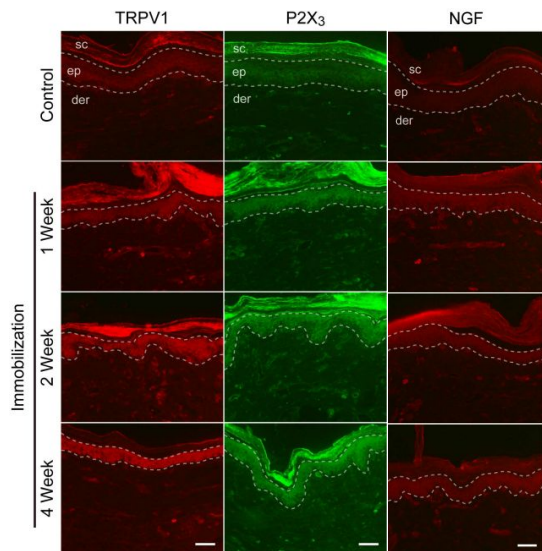


図7 足底皮膚における TRPV1 ,P2X3 ,NGF の分布

点線で囲まれた領域は,ケラチノサイトが存在する表皮の基底層~顆粒層を示す. SC:角質, ep:表皮, der:真皮. Bar=100µm.

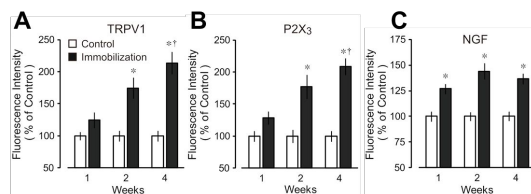


図8 ケラチノサイトにおける TRPV1 , P2X3 , NGF の発現量

*:対照群との比較 ($P<0.05$), †:不動期間1週間との比較 ($P<0.05$).

したがって,不動群において侵害受容体の増加は痛覚閾値の低下を引き起こす可能性は高い.加えて,NGF は炎症エディエーターとしての機能を持ち,近年の研究では,NGF はそれ自体が痛みを直接発生させるとされている.したがって,不動群の表皮で認められた NGF 産生増加が直接的に痛覚閾値の低下に関与している可能性も十分考えられ,この点については今後検討を加える必要がある.

以上の結果を総括すると,末梢組織が不動化されると痛覚閾値が低下することはほぼ間違いな事象であり,研究開始当初の我々の仮説は支持された.その発生メカニズムには,末梢神経密度の増加といった組織学的変化,NGF の発現増加,侵害受容体の発現増加が深く関与していると推測される.そして,その状態が長期間(8週間)持続すると,中枢神経系に感作が生じ,痛みが慢性化してい

く可能性が示唆された。ただ、上記の変化のトリガーや、NGF 増加の由来を明らかにすることはできておらず、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Sekino Y, Nakano J, Hamaue Y, Chuganji S, Sakamoto J, Yoshimura T, Origuchi T, Okita M: Sensory hyperinnervation and increase in NGF, TRPV1 and P2X3 expression in the epidermis following cast immobilization in rats. Eur J Pain, 査読有, 18(5):639-648, 2013.

Hamaue Y, Nakano J, Sekino Y, Chuganji S, Sakamoto J, Yoshimura T, Origuchi T, Okita M: Immobilization-induced hypersensitivity associated with spinal cord sensitization during cast immobilization and after cast removal in rats. J Physiol Sci, 査読有, 63(6): 401-408, 2013.

沖田 実, 中野治郎, 関野有紀, 濱上陽平: ペイン・リハビリテーション: 不活動と痛み. Practice of Pain Management 査読無, 4(2): 18-22, 2013.

Tanaka Y, Nakano J, Hamaue Y, Sekino Y, Sakamoto J, Kataoka H, Okita M: Hindlimb suspension does not influence mechanical sensitivity, epidermal thickness, and peripheral nerve density in the glabrous skin of the rat hind paw. Physiol Res, 査読有, 62(1): 119-123, 2013.

Nakano J, Sekino Y, Hamaue Y, Sakamoto J, Yoshimura T, Origuchi T, Okita M: Changes in hind paw epidermal thickness, peripheral nerve distribution and mechanical sensitivity after immobilization in rats. Physiol Res, 査読有, 61(6): 643-647, 2012.

関野有紀, 濱上陽平, 中野治郎, 沖田 実: ラット足関節不動モデルの痛みと皮膚における組織学的変化. 日本運動器疼痛学会, 査読有, 14(1): 20-27, 2012.

沖田 実, 中野治郎, 坂本淳哉, 森本陽介, 近藤康隆, 濱上陽平: 慢性痛の末梢機構. 日本基礎理学療法学雑誌, 査読無, 14(2): 7-13, 2011.

〔学会発表〕(計 25 件)

中野治郎: 痛みの末梢機構. 第18回日本ペインリハビリテーション学会, 2013年8月31日~2013年9月1日, 福岡.

Sekino Y, Nakano J, Hamaue Y, Chuganji S, Sakamoto J, Yoshimura T, Okita M: Changes in skin tissue modulate immobilization-induced hypersensitivity. XXI WORLD CONGRESS

OF NEUROLOGY 2013年9月21日~2013年9月26, Austria.

大賀智史, 片岡英樹, 関野有紀, 濱上陽平, 中願寺風香, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田 実: 足関節不動モデルラットにおける骨格筋の痛みと神経成長因子の発現変化. 第18回日本ペインリハビリテーション学会, 2013年8月31日~2013年9月1日, 福岡.

Nakano J, Sekino Y, Hamaue Y, Okita M: Change of sensitivity and calcitonin gene-related peptide expression in short- and long-term joint immobilization in rats. 14th World Congress on pain. 2012年8月27日~2013年8月31日, Italy.

Sekino Y, Hamaue Y, Nakano J, Sakamoto J, Honda Y, Okita M: Immobilization induces pain and histological change of cutaneous tissue in the rat. 14th World Congress on pain, 2012年8月27日~2013年8月31日, Italy.

(他 20 件)

〔図書〕(計 1 件)

沖田 実・坂本淳哉・本田祐一郎・中野治郎・片岡英樹・近藤康隆. 関節包に由来した拘縮. In: 関節可動域制限 病態の理解と治療の考え方 - 第2版, 三輪書店, 2013, pp.79-92; pp.150-165.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

http://www.am.nagasaki-u.ac.jp/pt/basic_pt/research_2.html (ホームページで紹介)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 治郎 (NAKANO, Jiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 20380834

(2)研究分担者

沖田 実 (OKITA, Minoru)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 50244091

坂本 淳哉 (SAKAMOTO Junya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 20584080

(3)連携研究者

なし