

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390294

研究課題名（和文） 病的疼痛行動を示す関節拘縮モデル動物の疼痛情報処理神経ネットワークの解析

研究課題名（英文） Central Nociceptive Pathway in Joint contracture associated Chronic Painful Model Animal.

## 研究代表者

牛田 享宏 (USHIDA TAKAHIRO)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：60304680

## 研究成果の概要（和文）：

関節拘縮モデル動物を作成し、脊髄および脳におけるミクログリア、アストロサイト、C-Fos 活性を調査した。これらの活性は経時的に変化しており、本動物モデルにおいて中枢神経系の機能変化が引き起こされていることがわかった。更に、関節拘縮の治療としてトレッドミル運動および麻酔下関節ストレッチングを行った。両治療法で行動学的に疼痛行動の改善が見られ、本動物モデルにおける痛みの治療にこれらの治療の有効性が示された。

## 研究成果の概要（英文）：

Animal models of joint contracture after immobilization (casting) are known to develop long lasting painful behavior after cast removal. In this study, we obtained up-regulations of brain and spinal microglia, astrocyte, C-Fos activities in this model animal. Present results suggest that functional changes of pain pathway occurred in brain and spinal cord level. Also we conducted treadmill exercise and passive stretching for therapeutic approach. Animals showed the improvement of painful behavior after both approaches.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2012年度	2,100,000	630,000	2,730,000
総計	9,100,000	2,730,000	11,830,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：神経科学・疼痛・痛みモデル・関節拘縮・CRPS

## 1. 研究開始当初の背景

骨折、捻挫、打撲などの運動器疾患の治療に際し、整形外科領域では、安静療法として局所のギプス固定がよく用いられる。このよ

うな固定（不動）は、患部の安静を保障する一方で、複合性局所疼痛症候群（CRPS）のような難治性の慢性痛の発症寄与因子として注目されている。我々は関節の長期不動が及ぼ

す神経系への影響を調査するために、独自の  
手関節不動モデル動物を5週間ギプス固定す  
ることで作成し、末梢から脊髄にいたって統  
合的解析を行ってきた。これまでの主な結果  
は以下の通りである。

- ①モデル動物は、不動肢をADLにほとんど  
用いず、不動肢における手関節の拘縮、炎症  
所見、筋萎縮、骨密度の低下が認められた。
- ②機械的アロディニア、熱性アロディニア、  
コールドアロディニアを示した。
- ③脊髄後根神経節 (DRG) において、カルシト  
ニン遺伝子関連ペプチド (CGRP)、カプサイシ  
ン受容体 TRPV1、神経成長因子 (NGF)、ASIC  
といった疼痛関連分子の発現が変化した。
- ④不動側の脊髄後角ニューロンにおいて、  
cFos 発現の上昇およびグルタミン酸受容体の  
リン酸化が認められた。
- ⑤脊髄後角深層において、CGRP 発現の上昇お  
よび広作動域ニューロン (WDR ニューロン)  
の活性化が認められた。

これらのことは、このモデル動物がヒトにお  
ける CRPS の臨床所見を忠実に再現しており  
(上記①、②)、その病態の基盤に末梢性感作  
(上記③) と脊髄レベルにおける中枢性感作  
(上記④、⑤) が存在することを示唆してい  
る。このモデル動物のように、ヒトにおける  
CRPS の病態として末梢性因子と中枢性因子が  
相互に絡み合っており悪循環を形成しているこ  
とが考えられている。

## 2. 研究の目的

CRPS 患者の脳では形態学的変化が生じて  
おり、神経系の変化が生じているとの報告  
がなされている。我々が作成してきている  
モデル動物においてもヒトにおけるこのよ  
うな変化が生じているのか? などについて  
精査する。

一方で、慢性痛に対しては心理教育とと  
もに運動療法が痛みの改善やマネージメン  
トに有用であることがわかってきている。  
そこで、運動療法を行った際に不活化モデ  
ル動物の疼痛行動がどのように変化するか  
について検証する。

## 3. 研究の方法

### ①モデル動物における中枢神経系の変化

#### A: 脊髄における変化

関節拘縮モデル動物(Chronic Post  
Contracture Pain: CPCP)はSDラットの前肢  
(図1)もしくは後肢を4週もしくは2週間  
ギプス固定し、ギプス除去後のアストロサイ  
トの活性について調査した。

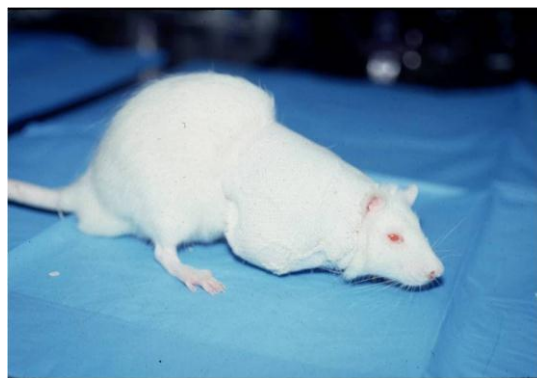


図1 右前肢を手関節屈曲位で体幹まで固定  
したSDラット(4週間の固定を行う)

ラットはpentobarbital sodiumで深麻酔し、  
0.01MPBS (pH7.35)にて灌流後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、さらに4%パラホルムア  
ルデヒド溶液に固定の後30%スクロースにて  
24時間浸漬・脱水を行った。  
前肢モデルにおいては免疫組織化学組織切片  
として頸髄を摘出し、厚さ35 $\mu$ mの凍結連続  
切片を作製した。一次抗体ミクログリアのマ  
ーカーであるCD11、OX42とアストロサイトの  
マーカーであるGFAPを用いた染色を行った。  
OX42, GFAP陽性細胞数およびDensityの調査  
を行った。

#### B: 脳における機能変化について

不活化動物におけるcFos蛋白陽性細胞の  
分布についての調査をおこなった。また、動  
物用MRIスキャナを用いて、関節炎動物の脳  
内の神経伝達物質の変化をMRスペクトロ  
スコーピーで用いて調査した。

#### cFos蛋白陽性細胞の分布調査

ギプス固定1日後と5週間後に、脳を4%パ  
ラホルムアルデヒド灌流固定後に採取し、  
cFos蛋白の抗体により免疫組織化学的染色を  
行った。痛み関連領域(ペインマトリックス)  
である扁桃核、島、帯状回、中脳水道周囲灰  
白質において、単位面積あたりの陽性細胞数  
をカウントした。

#### MRスペクトロスコピー

モノヨード酢酸(MIA)誘発変形性膝関節  
炎マウスを作成し、のペインマトリックスに  
おける核磁気共鳴スペクトロスコピー(MRS)  
による神経機能評価を行った。

### ②運動療法の検証

非運動群(CPCP群、n=8)、トレッドミ  
ル運動群(CPCP+TR群、n=9)、スタティ  
ックストレッチング群(CPCP+SS群、n=8)

に振り分け、CPCP+TR および SS 群にはギブス固定解放後（以下 pc）3 日目から週 3 回の頻度で 2 週間の運動負荷を実施した。

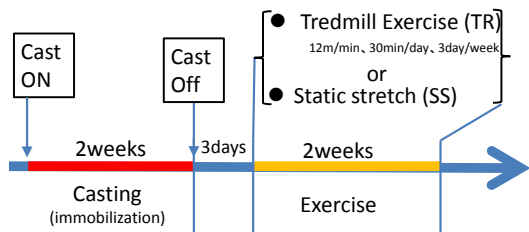
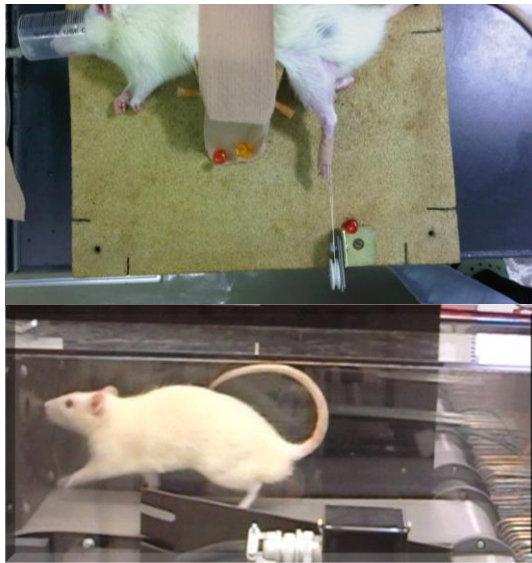


図 1 上段：麻酔下のストレッチ、中段：トレッドミル訓練、下段：それぞれの訓練のタイミング

CPCP+TR 群には小動物用トレッドミルを用いて、速度 12 m/分、1 日あたり 30 分間トレッドミル運動を負荷した。CPCP+SS 群には滑車付き牽引装置を用い、25g 荷重にて後肢を 1 日あたり 10 分間牽引した。

#### 4. 研究成果

①モデル動物における中枢神経系の変化  
 A：脊髄における変化  
 前肢固定モデルにおいて、ギブスから解放した後に CD11 でミクログリアの免疫組織染色を行った群では、不動化していた (Ipsilateral) 側において、ミクログリアの Density の増加が観察された (図 2、3)。

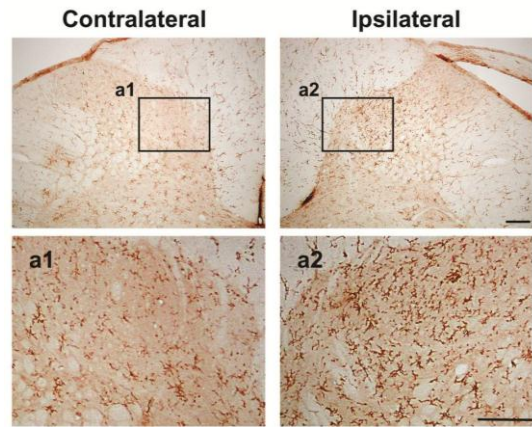


図 2 CD11 で染色を行った不動化 SD ラットの脊髄後角像

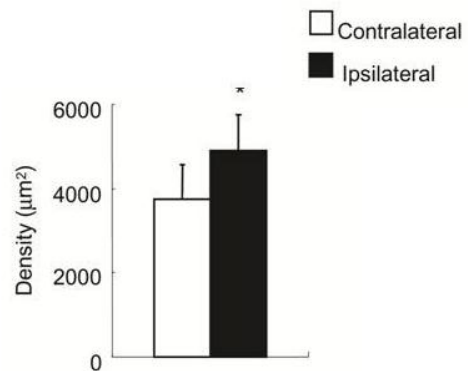


図 3 CD11 で染色を行った脊髄後角の Density

4 週間の不動化後に GFAP で脊髄後角を免疫組織染色したものでは、不動化側において染色性の亢進がみられ、Density の増加が観察された。

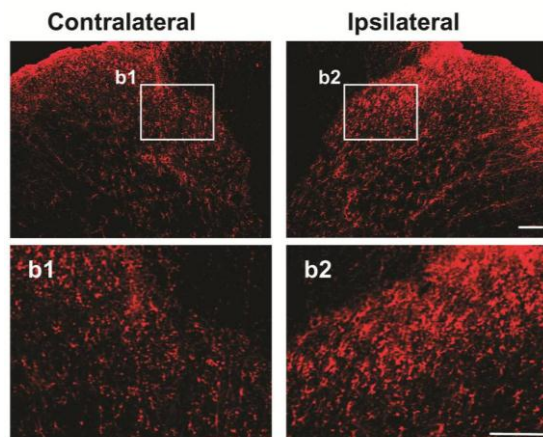


図 4 CPCP ラットの GFAP 染色脊髄後角像



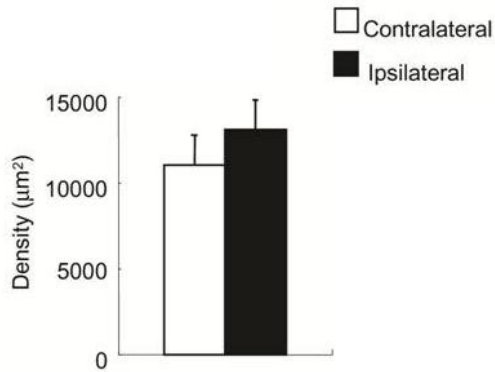


図5 GFAPで染色を行ったC57BL/6Jラットの脊髄後角のDensity

B:脳における機能変化について  
cFos 蛋白陽性細胞の分布調査

帯状回以外の全ての領域において、固定5週間後は1日後より陽性細胞数が有意に少なかった。特に、情動関与領域である扁桃核と島で著明な低下が検出された(図6)。また、ギプス固定側および反対側とも同様の結果であった。この結果から、長期間のギプス固定により、ペインマトリックスとりわけ情動関与領域のニューロンが変調をきたしている可能性が示唆された。

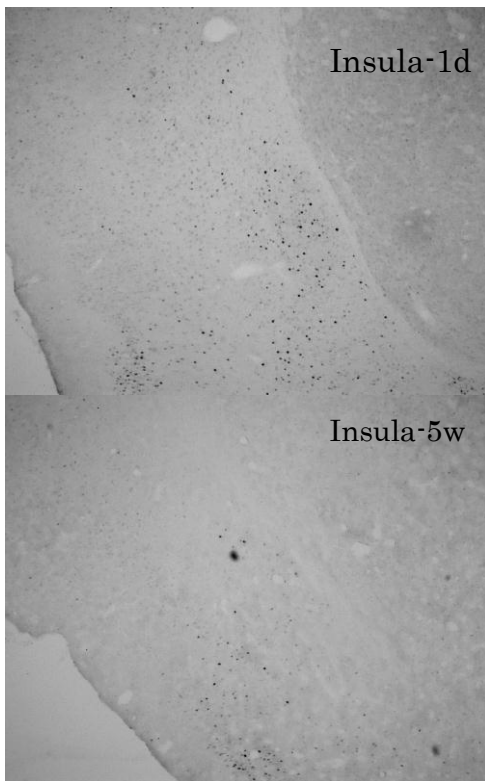


図6 島 (Insula) における c FOS 陽性細胞の分布

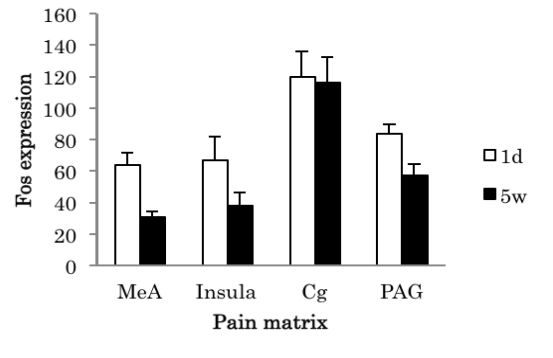


図7 ギプス固定1日後(1d)と固定5週間後(5w)における痛み関連脳領域(ペインマトリックス)のcFosタンパク発現

MR スペクトロスコピー

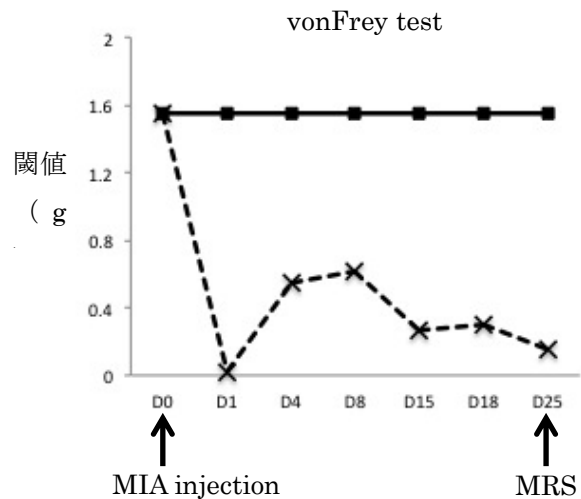


図8:モノヨード酢酸(MIA)誘発変形膝関節炎マウスの機械的刺激閾値の低下

2%Varian NMR System 400wide bore 9.4T (アジレント社製)にて、MR画像を撮影後、その画像上で左前帯状回領域を関心領域(ROI)に決定し、<sup>1</sup>Hスペクトルを測定・解析した。

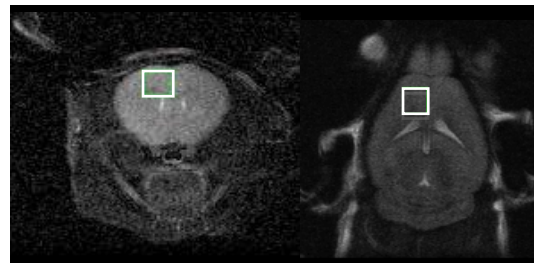


図9: MRSにおける関心領域(ROI) ROIサイズ: 2.0 mm×1.6 mm×2 mm

②運動療法の検証

CPCP 群は全ての計測部位で pc7 週まで継続する明らかな痛覚過敏を呈した。一方、CPCP+TR 群および CPCP+SS 群では、CPCP 群と比し有意に痛覚過敏の発症が抑制された。また、CPCP 群では pc7 週まで有意な関節可動域制限を呈したが、CPCP+TR および CPCP+SS 群では有意な改善を示した。さらに、CPCP 群では pc3 週目まで有意な下腿筋幅の減少を認めたが、CPCP+TR および CPCP+SS 群では CPCP 群より 1~2 週間早く元の値に回復した。

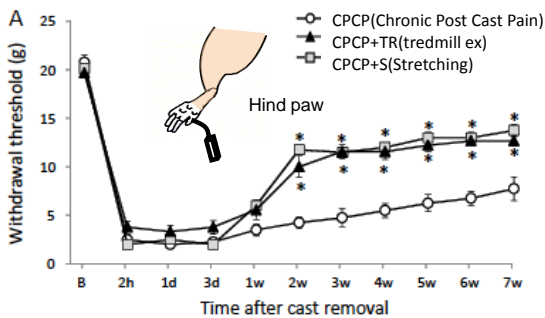


図 10：足底の機械刺激に対する閾値変化

足関節の固定後 CPCP モデルでは足底の機械刺激に対する閾値低下が見られていたが、トレッドミル訓練、麻酔下のストレッチングの何れの治療によっても、閾値の上昇（治療効果）が認められた。

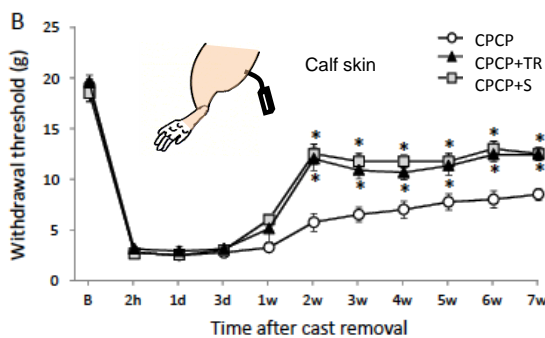
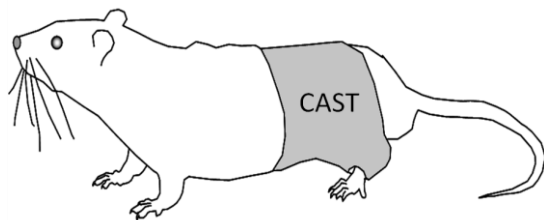


図 11：下腿皮膚の機械刺激に対する閾値変化  
足関節の固定後 CPCP モデルでは下腿皮膚の機械刺激に対する閾値低下が見られていた



が、トレッドミル訓練、麻酔下のストレッチ

ングの何れの治療によっても、閾値の上昇（治療効果）が認められた。

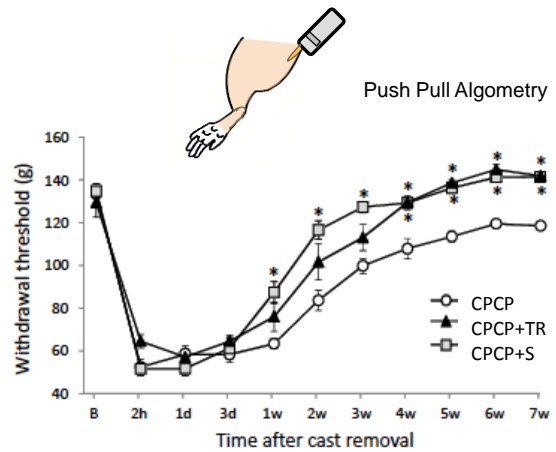


図 11：下腿筋の機械刺激に対する閾値変化

足関節の固定後 CPCP モデルでは下腿筋の機械刺激に対する閾値低下が見られていたが、トレッドミル訓練、麻酔下のストレッチングの何れの治療によっても、閾値の上昇（治療効果）が認められた。

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）

1. Nishigami T, Osako Y, Ikeuchi M, Yuri K, Ushida T. Development of heat hyperalgesia and changes of TRPV1 and NGF expression in rat dorsal root ganglion following joint immobilization. *Physiol Res*. 2013 Apr 16;62(2):215-9.
2. Morimoto A, Winaga H, Sakurai H, Ohmichi M, Yoshimoto T, Ohmichi Y, Ushida T et al. Treadmill running and static stretching improve long-lasting hyperalgesia, joint limitation, and muscle atrophy induced by cast immobilization in rats. *Neurosci Lett*. 2013 Feb 8;534:295-300.
3. Inoue S, Ikeuchi M, Okumura K, Nakamura M, Kawakami C, Ushida T, et

- al. Health survey of numbness/pain and its associated factors in kotohira, Japan. *PLoS One*. 2013;8(4):e60079.
4. 櫻井博紀, 牛田享宏. 慢性疼痛への理学療法: 筋機能 (特集 慢性疼痛への包括的アプローチ). *理学療法ジャーナル*. 2012;46(2):117-22.
5. 林和寛, 牛田享宏. 緩和医療 神経障害性疼痛の保存的治療. *難病と在宅ケア*. 2012;18(6):49-52.
6. 矢吹省司, 牛田享宏, 竹下克志. 日本における慢性疼痛保有者の実態調査: Pain in Japan 2010 より. *臨床整形外科*. 2012;47(2):127-34.
7. 中村雅也, 西脇祐司, 牛田享宏. 運動器の慢性疼痛に関する疫学調査. *Journal of musculoskeletal pain research: 日本運動器疼痛学会誌*. 2012;4(1):46-50.
8. 大道裕介, 牛田享宏. 慢性疼痛への包括的アプローチ. *理学療法ジャーナル*. 2012;46(2):101-9.
9. 川崎元敬, 牛田享宏, 南場寛文, 加藤友也, 谷俊一. 椎間関節由来の慢性腰痛に対するMRガイド下集束超音波治療の治療経験. *中部日本整形外科災害外科学会雑誌 中部日本整形外科災害外科学会抄録*. 2012;55(1):121-2.
10. 牛田享宏, 下和弘, 池本竜則. 整形外科疼痛の脊髄・脳機能イメージング法による評価 (シンポジウム 疼痛評価の進歩). *日本整形外科学会雑誌*. 2012;86(11):1009-14.
11. 井上真輔, 牛田享宏, 井上雅之. 運動器慢性痛の病態と学際的治療 (特集 痛みの神経学: 末梢神経から脳まで). *Brain and nerve: 神経研究の進歩*. 2012;64(11):1287-97.
12. Shiro Y, Arai YC, Matsubara T, Isogai S, Ushida T. Effect of muscle load tasks with maximal isometric contractions on oxygenation of the trapezius muscle and sympathetic nervous activity in females with chronic neck and shoulder pain. *BMC Musculoskelet Disord*. 2012;13:146.
13. Ohmichi Y, Sato J, Ohmichi M, Sakurai H, Yoshimoto T, Morimoto A, Ushida T et al. Two-week cast immobilization induced chronic widespread hyperalgesia in rats. *Eur J Pain*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Mar;16(3):338-48.
14. Nishigami T, Ikeuchi M, Okanoue Y, Wakamatsu S, Matsuya A, Ishida K, Ushida T et al. A pilot feasibility study for immediate relief of referred knee pain by hip traction in hip osteoarthritis. *J Orthop Sci*. 2012 May;17(3):328-30.
15. Inoue S, Ushida T, Inoue M. [Clinical characteristics and multidisciplinary management of chronic musculoskeletal pain]. *Brain Nerve*. [Review]. 2012 Nov;64(11):1287-97.
16. 櫻井博紀, 佐藤純, 吉本隆彦, 大道裕介, 森本温子, 新井健一, 牛田享宏 et al. 寒さを感じなくなった慢性痛患者に対する環境温曝露試験. *Pain research: the journal of the Japanese Society for the Study of Pain= 日本疼痛学会誌*. 2011;26(1):11-8.
17. 西原真理, 牛田享宏. 慢性の痛みとその課題 (特集 医師から学ぶ慢性の痛み). *調剤と情報*. 2011;17(2):153-5.
18. 牛田享宏. 運動器慢性痛と学際的アプローチ (物理療法研究部会). *理学療法学*. 2011;38(8):649-52.
19. Yoshimoto T, Eguchi K, Sakurai H, Ohmichi Y, Hashimoto T, Ohmichi M, Ushida T et al. Frequency components of systolic blood pressure variability reflect vasomotor and cardiac sympathetic

functions in conscious rats. J Physiol Sci. 2011 Sep;61(5):373-83.

20. Shimo K, Ueno T, Younger J, Nishihara M, Inoue S, Ikemoto T, Ushida T et al. Visualization of painful experiences believed to trigger the activation of affective and emotional brain regions in subjects with low back pain. PLoS One. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011;6(11):e26681.

21. Nakamura M, Nishiwaki Y, Ushida T, Toyama Y. Prevalence and characteristics of chronic musculoskeletal pain in Japan. J Orthop Sci. 2011 Jul;16(4):424-32.

22. Matsubara T, Arai YC, Shiro Y, Shimo K, Nishihara M, Sato J, Ushida T et al. Comparative effects of acupuncture at local and distal acupuncture points on pain conditions and autonomic function in females with chronic neck pain. Evid Based Complement Alternat Med. 2011;2011.

23. Ikeuchi M, Ushida T, Izumi M, Tani T. Percutaneous radiofrequency treatment for refractory anteromedial pain of osteoarthritic knees. Pain Med. [Clinical Trial]. 2011 Apr;12(4):546-51.

24. 櫻井博紀, 牛田享宏. 脳波・筋電図の臨床 脊髄・一次求心性線維の機能変化と痛み. 臨床脳波. 2010;52(7):385-91.

25. 池本竜則, 牛田享宏, 谷俊一. 脳波・筋電図の臨床 脊髄での機能的 MRI 画像の試み. 臨床脳波. 2010;52(4):207-12.

26. 西上智彦, 池本竜則, 牛田享宏. 痛み刺激による前頭前野の即時的な脳血流量変化. Pain research: the journal of the Japanese Society for the Study of Pain= 日本疼痛学会誌. 2010;25(3):127-34.

27. 神谷光広, 牛田享宏. 頸椎手術後の頸部軸性疼痛--軸性疼痛のメカニズムと対処法 (特集 項頸部痛の病態と治療--最近の知見). 整形・災害外科. 2010;53(1):31-7.

28. 牛田享宏, 池本竜則, 下和弘. 神経障害性疼痛の痛覚認知機構 (神経因性疼痛). 臨床脳波. 2010;52(10):556-63.

29. 牛田享宏. 運動器の痛みのメカニズムと課題. 現代医学. 2010;58(2):213-9.

30. Ushida T, Fukumoto M, Binti C, Ikemoto T, Taniguchi S, Ikeuchi M, et al. Alterations of contralateral thalamic perfusion in neuropathic pain. Open Neuroimag J. 2010;4:182-6.

31. Arai YC, Matsubara T, Shimo K, Suetomi K, Nishihara M, Ushida T, et al. Low-dose gabapentin as useful adjuvant to opioids for neuropathic cancer pain when combined with low-dose imipramine. J Anesth. 2010 Jun;24(3):407-10.

[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]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

牛田 享宏 (USHIDA TAKAHIRO)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60304680

### (2) 研究分担者

大迫 洋治 (OHSAKO YHOJI)  
高知大学・医歯学系・准教授  
研究者番号：40335922

西上 智彦 (NISHIGAMI TOMOHIKO)  
甲南女子大学・看護リハビリテーション  
学部・准教授  
研究者番号：60515691

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

大道 美香 (OHMICHI MIKA)  
愛知医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30581079