

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6月12日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700559

研究課題名（和文）運動器不活動に伴う慢性痛の病態責任解明に基づく新しい理学療法戦略

研究課題名（英文）Development of a new approach of physical therapy based on pathophysiologic mechanisms for chronic pain associated with limb immobilization

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）：複雑局所性疼痛症候群Ⅰ型，線維筋痛症などに代表される難治性の慢性広範囲痛（CWP）の病態責任の解明は発展途上の段階で，決定的な治療法の開発には至っていない。そこで我々は，CWPの機序解明に基づく新たな理学療法戦略の構築を目指し，ギプス固定後慢性痛 chronic post-cast pain (CPCP)モデルラットを開発した。本研究ではCPCPモデルラットにおけるCWPの中枢要因として脊髄グリア細胞の活性化に，またその末梢要因として固定肢における虚血再灌流障害／酸化ストレスに着目した。CPCPモデルの機械痛覚増強の非固定側への拡大には脊髄ミクログリアの活性化が関与し，その維持には，脊髄アストロサイトの活性化が関与することが示された。ギプス固定肢に生じた虚血再灌流障害／酸化ストレスは，CPCPモデルラットにおける機械痛覚増強の発症ならびに脊髄グリア細胞活性化をトリガーすることが示唆された。今回得られた知見に基づくCPCPモデルのCWPの末梢および中枢機序のさらなる解明は，CWPに対する新たな理学療法の臨床応用に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：At the present, there is no successful therapy for certain types of refractory chronic widespread pain (CWP), such as complex regional pain syndrome I (CRPS I), and fibromyalgia. We developed the chronic post-cast pain (CPCP) model for the development of a new promising physiotherapy approach based on elucidating the pathology mechanisms for this CWP. We found that the spinal microglial activations play a role in the expansion of the mechanical hyperalgesia to the contralateral side, and that the spinal astrocyte activations are a factor in the maintenance of the mechanical hyperalgesia. It was suggested that the ischemic reperfusion injury/oxidative stress in the fixed hindlimb triggers the onset of the mechanical hyperalgesia and the spinal glial activations in CPCP rats. Further investigation based on this finding may lead to the creation of a basis for clinical application of physiotherapy for CWP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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，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

CRPS type I¹に代表される明らかな神経損傷なしに生じる慢性痛の特徴として、そのトリガーとなった外傷はもともと慢性痛に繋がる要因としては極めて理解し難い軽微な損傷^{1,2}であったり、本来痛みを起こすことは考えにくい運動器の不活動^{1,3-5}であったり、発症してしまった慢性痛の残酷な状態とは非常に不釣り合いな機転で痛みが出現している。

一方、明らかな神経損傷由来の慢性痛、すなわち神経障害性疼痛では、その診断基準にもあるように、神経損傷支配領域に局限した疼痛を呈することとされ⁶、それぞれの臨床症状に大きな違いを認める。それぞれの異なる慢性痛に介在するメカニズムはおそらく異なるであろうということが容易に想像できる。

しかしながら、これまでの世界的な研究の中心は神経損傷に起因するものであり⁷⁻¹⁰、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い¹¹⁻¹³。さらに臨床特徴を反映した CWP を呈するモデルは未だ存在せず、その病態解明は世界的に進んでいない。

そこで申請者は単なる 2 週間の後肢のギプス固定によって慢性的な痛覚増強を呈するギプス固定後慢性痛 (CPCP) モデルラットを開発した¹⁴。このラットはギプス除去後より機械痛覚増強が非固定側へ拡大し、さらには時間経過とともに尾部へと空間的拡大を示す特徴をもち、これらは固定後肢にギプス除去後に生じた虚血再灌流障害/酸化ストレスがトリガーである可能性が示唆された¹⁴。また CPCP モデルラットは慢性痛の各病期が観察可能であることが特徴で、熱痛覚増強やギプス固定部局所の筋萎縮、炎症様変化が大きく残存する“誘導期”，こられの変化が回復した後に機械痛覚閾値が再び低下し極大となる“維持期”，その後も慢性的に継続する除去後 10 週目以後を“慢性期”とし、各病期における変化を観察可能である¹⁴。

我々はこれまでに、各病期に合わせて、また疼痛行動の空間的広がり平行して誘導期に脊髄ミクログリア、維持期にアストロサイトの活性化が生じていることを明らかとし、CPCP モデルラットの CWP においてこれらグリア細胞の活性化が関与する可能性について推測してきた (12th world congress on pain)。

2. 研究の目的

本研究では、CPCP モデルラットにおける痛覚増強行動の発症と維持において、脊髄グリア細胞の活性化の拡大に着目し、CWP の誘発・維持機構の解明を進め、神経損傷以外に起因する慢性痛の機序に基づく、有効な理学療法戦略開発のための基盤を構築することを目指している。

3. 研究の方法

痛覚増強を引き起こす中枢神経系可塑的異常の一つとして多くの有益な情報が報告されている脊髄ミクログリア、アストロサイトの活性化に着目し 15-19、CPCP モデルラットにおけるこれらグリア細胞の変化を時間経過に伴って空間的拡大を示す機械痛覚増強の変化に合わせて、複数の時間点で複数関節を免疫組織学的に調査した。また、この変化が広範囲の機械痛覚増強の維持に関与しているのかをグリアの活性化抑制剤を用いて薬理行動学的に調査した。

3.1. CPCP モデルラットの作成

SD 系雄ラットを用い、2 週間の片側後肢ギプス固定を行い、ギプス除去することで作成した¹⁴。

3.2. 疼痛行動解析

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。足底部の熱痛覚潜時 (熱痛覚計) を測定した²⁰。

3.3. 薬理・行動学的解析

モデルラットの痛覚増強の病態責任の一つとして、各脊髄グリア細胞の活性化の関与を検証するために、CPCP モデルラットの各病期に対して、誘導期に minocycline (ミクログリア活性化阻害作用)、維持期に L- α -AA (アストロサイト活性化阻害作用) といった各種グリア抑制剤の髄腔内投与を行い、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、誘導期に酸化ストレス除去剤である Tempol を腹腔内投与し、その後の痛覚増強行動の変化を検証した。

3. 4. 免疫組織化学的解析

CWP の各病期における 2 種類の脊髄グリア細胞の活性化を指標として、各種薬剤による痛覚増強行動の抑制効果を免疫組織学的に検証するため、第 4 腰髄、尾髄の脊髄ミクログリア、アストロサイトについてそれぞれの特異的抗体である OX42, GFAP を用いて脊髄グリア細胞の活性化について免疫組織化学的な検証を行った。

4. 研究成果

今回 CPCP モデルラットにおける CWP について、機械痛覚閾値および熱痛覚潜時の時間的変化をギプス除去後長期にわたり計測した。これらの計測から後肢のギプス固定後に機械痛覚増強が固定肢を超えて拡大し、この拡大は固定部位から離れるほど時間的な遅れをもって出現することが明らかとなった。その一方で熱痛覚増強は固定側のみにしか生じず、非固定側へ拡大することなく、固定後肢の筋萎縮および炎症様変化^{14,21}に伴って回復した。CPCP モデルラットの CWP の維持期においては、少なくとも機械痛覚と熱痛覚が解離することが明らかとなった。なぜ維持期以降で機械痛覚のみが増強するのは、まだ不明であるが、このことは CPCP モデルラット維持期の CWP が生理的な痛覚受容機構では説明困難な痛みであると推測する上で重要な所見と考えている。Birklein F²² および Sieweke N²³ は、急性疼痛患者と CRPS Type I 患者を用いた実験的な疼痛計測の研究から、急性疼痛患者では熱痛覚増強も機械痛覚増強のどちらも認められ、一方 CRPS Type I 患者では熱痛覚増強の出現は認められず、機械痛覚増強のみが出現することを明らかにした^{22,23}。そして、この解離から、CRPS における痛みの要因が中枢神経系の可塑的变化に基づく可能性について考察している^{22,23}。この解離は CPCP モデルラットでも同様に認められた現象であり、CPCP モデルラットの機械痛覚増強の出現において中枢神経系の関与を伺わせる興味深い現象として注目した。また、これまでに我々は CPCP モデルラットの誘導期と維持期で固定肢の支配神経である坐骨神経に神経ブロックを行った際に、誘導期では固定肢を越えて拡大した非固定側の機械痛覚増強が完全に消失したのに対して、維持期ではその非固定側に拡大した痛覚増強は神経ブロックに影響されないことを報告した¹⁴。我々は、これらの結果より、CPCP モデルラット慢性期の機械痛覚増強の誘因として中枢神経系の可塑的異常の存在を推論した¹⁴。

そこで我々は中枢神経系の可塑的異常の一つである脊髄グリア細胞の活性化による

痛覚増強機序²⁴⁻²⁶とこれらグリアの活性化が両側性の痛覚増強の出現にも関与すること^{17,27-30}に着目した。そこでミクログリアおよびアストロサイトの活性化について、CPCP モデルラットの CWP の誘導期および維持期、慢性期の各時点について、また痛覚増強の広がりにあわせて腰髄および尾髄の複数髄節について両側性に免疫組織学的な検証を行った。OX42 および GFAP 免疫組織化学的解析により、CPCP モデルラットの CWP の誘導期に腰髄ミクログリアの活性化が認められ、維持期ではこのミクログリアの活性化は消滅し、腰髄アストロサイトの活性化に移行することが明らかとなった。さらにこれらのグリア細胞活性化の変遷は時間的な遅れをもって尾髄でも認められた。

そこで、誘導期にミクログリア抑制剤を髄腔内投与すると、非固定側のみ機械痛覚増強が有意に改善したことから、この時期の非固定側への疼痛行動の拡大は、脊髄ミクログリアを介して起こるものであると示唆された。さらに維持期にアストロサイトの活性化抑制剤 L- α -AA を髄腔内投与すると、測定したすべて部位の機械痛覚増強は減弱したが (図 3A-D)、尾部の痛覚増強の減弱の程度は他部位と比較して低値に留まり、同時期に生じた尾髄ミクログリアの活性化は、この L- α -AA 投与の影響を受けることなく活性化を維持していた。この結果から、遅れて出現する尾の痛覚増強は、尾髄ミクログリアの活性化によって誘導されている可能性が推測される。以上のことから、推測の域ではあるが、痛覚増強の誘導および拡大には脊髄ミクログリアの活性化が関与し、その維持に脊髄アストロサイトの活性化が関与することが示唆された。

また、ギプス除去 24 時間後の Tempol 腹腔内投与による痛覚増強行動の抑制効果をギプス除去 5 週間後まで経時的に検証した。下腿部皮膚、下腿部筋、足底部、尾部に出現する持続性機械痛覚増強はほぼ完全に抑制され、同時に脊髄アストロサイトの活性化も認められなかった。上述したように維持期の L- α -AA 投与によって、脊髄アストロサイトの活性化が減弱し、広範囲機械痛覚増強も一部減弱したことを併せて考えると、CPCP モデルラット CWP の維持に関与することが示唆されたアストロサイトの活性化は、ギプス固定肢に生じた虚血再灌流障害/酸化ストレスがトリガーとなることが分かった。

まとめ

CPCP model の機械痛覚増強の非固定側への拡大には脊髄ミクログリアの活性化が関与し、その維持には、脊髄アストロサイトの活性化が一部関与することが示された。ギプス固定肢に生じた虚血再灌流障害/酸化スト

レスは、CPCP モデルラットにおける機械痛覚増強の発症ならびに脊髄グリア細胞活性化をトリガーすることが示唆された。今回得られた知見に基づく CPCP モデルラットの CWP の末梢および中枢機序のさらなる解明は、CWP に対する新たな理学療法開発の基盤構築に繋がる可能性がある。

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 4 件)

- 1 Morimoto A, Winaga Handriadi, Sakurai H, Ohmichi M, Yoshimoto T, Ohmichi Y, Matsui T, Ushida T, Okada T, Sato J, Treadmill running and static stretching improve long-lasting hyperalgesia, joint limitation, and muscle atrophy induced by cast immobilization in rats Neuroscience letters, 査読有, 2013, 8, 534, 295-300
- 2 Ohmichi Y, Sato J, Ohmichi M, et al, Two-week cast immobilization induced chronic widespread hyperalgesia in rats Eur J Pain, 査読有, 16, 2012, 338-48
- 3 Yoshimoto T, Eguchi K, Sakurai H, Ohmichi Y, Hashimoto T, Ohmichi M, Morimoto A, Yamaguchi Y, Ushida T, Iwase S, Sugeno Y, Kumazawa T: Frequency components of systolic blood pressure variability reflect vasomotor and cardiac sympathetic functions in conscious rats. The journal of physiological sciences 査読有, 61, 2011, 373-83
- 4 Yamaguchi Y, Hashimoto T, Sakurai H, Yoshimoto T, Ohmichi Y, Morimoto A, Harimoto K, Ohmichi M, Eguchi K, Kumazawa T, Low rather than high dose lipopolysaccharide 'priming' of muscle provides an animal model of persistent elevated mechanical sensitivity for the study of chronic pain, Eur J Pain, 査読有, 15, 2011, 724-31

[学会発表] (計 15 件)

- 1 大道裕介ほか:脊髄アストロサイトの活性化はラット後肢のギプス固定後に出現する持続性の広範囲痛覚増強に関与する, 第 118 回日本解剖学総会・全国学術集会, 2013. 3. 30, 香川
- 2 Yusuke Ohmichi, Mika Ohmichi, Takashi Nakano, Ken Asamoto, Takahiro Ushida, Hitoshi Ohishi and Jun Sato:: Inhibitory effects of tempol, a free radical scavenger, on long-lasting widespread mechanical hyperalgesia in a rat model of cast

immobilization. 14th World Congress on Pain, 2012. 8. 31, Mirano (Italy)

- 3 Mika Ohmichi, Yusuke Ohmichi, Takashi Nakano, Ken Asamoto, Takahiro Ushida, Hitoshi Ohishi and Jun Sato: Inhibitory effects of minocycline, an inhibitor of spinal microglial activation, on widespread mechanical hyperalgesia in a rat model of cast immobilization. 14th World Congress on Pain, 2012. 8. 31, Mirano (Italy)
- 4 Atsuko Morimoto, Takahiko Yoshimoto, Hiroki Sakurai, Yusuke Ohmichi, Yoshinori Hasegawa, Yuji Yamada, Takahiro: Ushida, Physical therapy outcome and prognostic factors predicting such outcome in a multidisciplinary pain center in japan. 14th World Congress on Pain, 2012. 8. 31, Mirano (Italy)
- 5 大道裕介ほか:Tempol はギプス固定後慢性痛ラットの持続性の広範囲機械痛覚増強と脊髄アストロ サイトの活性化を抑制する, 第 34 回日本疼痛学会, 2012. 7. 20, 熊本
- 6 森本温子, Winaga Handriadi, 大道裕介, 牛田享宏, 岡田忠, 佐藤純:トレッドミル運動およびストレッチはラット後肢ギプス固定後の機械的痛覚増強を軽減した, 第 34 回日本疼痛学会, 2012. 7.20, 熊本
- 7 大石仁, 大道美香, 大迫洋治, 中野隆, 浅本憲, 大道裕介:ギプス固定後慢性痛モデルラットの脊髄後角における c-Fos の両側性発現,第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2012. 3. 28, 山梨
- 8 大道美香, 大道裕介, 大石仁, 大迫洋治, 中野隆, 浅本憲:ギプス固定後慢性痛モデルにおける機械的痛覚増強行動は Minocycline により減弱する, 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2012. 3.28, 山梨
- 9 大道裕介ほか: ラット後肢ギプス固定除去後に起こる血漿管外漏出は坐骨神経ブロックにより減弱する, 第 46 回日本理学療法学術大会, 2011. 5. 27, 宮崎
- 10 森本温子, 大道裕介, 櫻井博紀, 吉本隆彦, 大道美香, 橋本辰幸, 佐藤純, 牛田享宏, 岡田忠, 熊澤孝朗:ラット後肢のギプス固定により出現する長期の機械的痛覚増強に対して2週間のトレッドミル運動が及ぼす影響, 第 46 回日本理学療法学術大会, 2011. 5. 27, 宮崎
- 11 大道裕介ほか: 疼痛モデル動物の作成とその臨床的意義 不動化による CRPS の動物モデル, 第 33 回日本疼痛学会, 2011. 7. 23, 愛媛
- 12 森本温子, 大道裕介, 櫻井博紀, 吉本隆彦, 大道美香, 橋本辰幸, 山口佳子, 牛

田享宏, 岡田忠, 熊澤孝朗: トレッドミル運動がギプス固定により出現する長期の機械的痛覚増強に及ぼす影響, 日本生理学, 2011. 3. 28, 横浜

- 13 森本温子, 大道裕介, 櫻井博紀, 吉本隆彦, 大道美香, 橋本辰幸, 牛田享宏, 岡田忠, 熊澤孝朗, 佐藤純: ラット後肢ギプス固定後の機械的痛覚増強に対するトレッドミル運動効果についての検討. 第33回日本疼痛学会. 2011. 7. 27, 愛媛
- 14 Yusuke Ohmichi, Chronic mechanical hyperalgesia and local extravasation induced by two-week cast immobilization in rats. 13th World Congress on Pain, 2010. 9.01, Montreal (Canada)

[図書] (計2件)

- 1 大道裕介, 牛田享宏, 【慢性疼痛への包括的アプローチ】慢性疼痛への包括的アプローチ. 理学療法ジャーナル, 46(2): 101-109, 2012
- 2 大道裕介, 大道美香, 井上真輔, 牛田享宏, 中野隆 【腰椎・腰部の機能解剖】腰椎椎間板ヘルニアの機能解剖学的特性. 理学療法学, 28, 688-696, 2011

[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

1. 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

引用文献

1. Merskey, H. & Bogduk, N. *Classification of Chronic Pain*, (IASP Press, Seattle, WA, 1994).
2. Jänig, W. & Baron, R. Complex regional pain syndrome: mystery explained? *Lancet Neurol* **2**, 687-697 (2003).
3. Allen, G., Galer, B.S. & Schwartz, L. Epidemiology of complex regional pain syndrome: a retrospective chart review of 134 patients. *Pain* **80**, 539-544 (1999).
4. 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 (2000).
5. Schwartzman, R.J. & Kerrigan, J. The movement disorder of reflex sympathetic dystrophy. *Neurology* **40**, 57-61 (1990).
6. Treede, R.D., et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* **70**, 1630-1635 (2008).
7. Bennett, G.J. & Xie, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **33**, 87-107 (1988).
8. Kim, S.H. & Chung, J.M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* **50**, 355-363 (1992).
9. Seltzer, Z., Dubner, R. & Shir, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* **43**, 205-218 (1990).
10. Decosterd, I. & Woolf, C.J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* **87**, 149-158 (2000).
11. Coderre, T.J., Xanthos, D.N., Francis, L. & Bennett, G.J. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. *Pain* **112**, 94-105 (2004).
12. Sluka, K.A., Kalra, A. & Moore, S.A. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve* **24**, 37-46 (2001).
13. Sluka, K.A., et al. ASIC3 in muscle mediates mechanical, but not heat, hyperalgesia associated with muscle inflammation. *Pain* **129**, 102-112 (2007).
14. Ohmichi, Y., et al. Two-week cast immobilization induced chronic widespread

hyperalgesia in rats. *Eur J Pain* **16**, 338-348 (2012).

15. Tsuda, M., *et al.* JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation and neuropathic pain maintenance in rats. *Brain* **134**, 1127-1139 (2011).

16. Inoue, K. & Tsuda, M. Microglia and neuropathic pain. *Glia* **57**, 1469-1479 (2009).

17. Zhuang, Z.Y., *et al.* 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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**, 3551-3560 (2006).

18. Kawasaki, Y., *et al.* Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nature medicine* **14**, 331-336 (2008).

19. Milligan, E.D., *et al.* Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 1026-1040 (2003).

20. Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. & Joris, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* **32**, 77-88 (1988).

21. Morimoto, A., *et al.* Treadmill running and static stretching improve long-lasting hyperalgesia, joint limitation, and muscle atrophy induced by cast immobilization in rats. *Neuroscience letters* **534**, 295-300 (2013).

22. Birklein, F., Kunzel, W. & Sieweke, N. Despite clinical similarities there are significant differences between acute limb trauma and complex regional pain syndrome I (CRPS I). *Pain* **93**, 165-171 (2001).

23. Sieweke, N., Birklein, F., Riedl, B., Neundorfer, B. & Handwerker, H.O. Patterns of hyperalgesia in complex regional pain syndrome. *Pain* **80**, 171-177 (1999).

24. 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 (2010).

25. 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 (2001).

26. 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. *Journal of neurochemistry* **115**, 505-514 (2010).

27. Watkins, L.R., Milligan, E.D. & Maier, S.F. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci* **24**, 450-455 (2001).

28. Tsuda, M., *et al.* P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* **424**, 778-783 (2003).

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

30. Zhuang, Z.Y., Gerner, P., Woolf, C.J. & Ji, R.R. 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 (2005).