研 究

ラットを用いた新しい持続痛測定法
—ホルマリン誘発性後肢屈曲反応を指標として—

上智大学 山 崎 重 明
酒 井 三木夫
山 中 祥 男

A New Rat Model for Tonic Pain Using Formalin-
induced Hind Paw Flexion Responses

SHIGEAKI YAMAZAKI, MIKIO SAKAI and YOSHIO YAMANAKA

Sophia University

ABSTRACT

It is abundantly clear that there are major differences between acute and chronic pain. However, many animal studies for pain and nociception employ short-lasting noxious stimuli which may have limited relevance to prolonged or chronic pain states.

In this study, we provide a new rat tonic pain model developed in our laboratory which is characterized by recording rats hind paw flexion responses with the passage of time after dilute formalin injection. The response burst, 15 responses and more per minute, were constantly induced for at least 45 minutes, i. e., from 25 to 70 minutes after formalin injection, and were considered to be due to tonic nociception of the animal because of their high sensitivity to morphine.

A few animals showed poor responses (5 responses or less per minute) consistently. The inhibition of formalin-induced flexion responses observed in these animals was estimated to be mediated by endogenous opioid systems, for those inhibitions were antagonized by naloxone, an opioid antagonist.

痛みのメカニズムを理解するため、あるいは有効な除痛法を開発するためには、動物を用いた痛みテストが不可欠である。

これまでも数多くのテストが考案され、痛みの実験モデルとして、あるいは鎮痛活性評価法として広く使用されているが、そのほとんどは痛み刺激として一過性の侵害刺激を採用して

いる。熱や圧、あるいは電氣的刺激を動物が逃避行動を示すまで（すなわち痛覚閾まで）呈示するこれらの方法では、痛みの受容はせいぜい数秒以内である。

こうしたテストは、急性痛のモデルとしては十分にその役目を果たすが、別のタイプの痛み、すなわち組織損傷やその他の病理的原因に基づ

く、相対的に時間経過の長い痛み（持続痛）の実験モデルとしては適切ではない。事実、急性の痛み刺激を用いて評価された鎮痛薬の効果は、臨床場面のそれと必ずしも一致しない。加えて、最近の多くは証拠は、持続痛が急性痛の時間的継続に起因するものではなく、両者はそれぞれ別個の信号系により伝達され、その抑制にはそれぞれに異なる鎮痛系が関与することを示唆している（Dennis & Melzack 1979）。

痛みの持つ多様な側面にアプローチするためには、急性痛モデルだけでは不十分であり、持続的な侵害刺激を動物に呈示し、その反応を継続的に評価する方法を開発することが必要である。

近年、いくつかの持続痛動物モデルが報告され始めた（DeCastro-Costa *et al.* 1981, Sugimoto *et al.* 1986, Wall *et al.* 1979）。その中でも Dubuisson & Dennis (1977) によって提唱された“formalin test”は、処置の簡便さとともに、組織損傷（炎症）に起因する自発的痛み反応を継続的に測定するという点において優れた持続痛モデルであり、ラットやネコだけでなく、最近では霊長類にも適用されている（Alreja *et al.* 1984）。しかしながら、複数（4種類）の反応カテゴリーそれぞれの出現時間から痛み得点を算出するという従来の方法は、行動観察によって痛みの程度を評価するので、判定に際し主観の入り込む危険性があること、注入肢（前肢）に対して動物が示す複雑な応答変化を正確に弁別することが極めて困難であることなどの問題点がある。また、痛み得点の基になる各反応カテゴリーについて個別にその出現時間の変化をみると、時間経過に伴って各反応のトポグラフィックな分布にかたよりが生じる（山中他 1981）。このことは、“formalin test”における痛み得点が、必ずしも同質の痛み成分を反映する指標ではないという可能性を示唆する。反応カテゴリーのうちの一つだけを指標とする研究も行われてはいるが（Abbott *et al.* 1981, Sugimoto *et al.* 1986）、これらの個々の

反応は集中的に出現する時間が短い。

我々は、ホルマリン注入後の行動変化を分析する過程で、ラットの後肢皮下にホルマリンを注入すると、他の痛み反応に混入して注入肢の小さな屈曲が高頻度で出現することを観察した。

本研究は、これまで全く観察の対象外であったこの屈曲反応を指標としてホルマリン痛を客観的に定量化し、ラットを対象とする持続痛測定の一手段を提供するものである。

方 法

被験体：体重 280 g から 340 g までの雄性ウィスター系アルビノラット（埼玉実験動物供給所）を 32 匹使用した。動物は室温 25°C, 12 hr./12 hr. の明暗環境下（明期：午前 8 時～午後 8 時）で個別飼育され、餌・水ともに随時与えられた。なお、馴化訓練およびテストは、各々、明期の同一時間帯（午前 9 時～午後 6 時）に施行された。

馴化訓練：本研究では、ラットの後肢屈曲反応を測定するため、空中保定の手法を採用した。同様の手法は他の痛みテストでも行われているが（Otsuki *et al.* 1986, 佐藤 1981）、空中保定に限らず、一般に強制的な不動状態は動物にとって極めてストレスフルであり、痛みの生理的メカニズムに重大な影響を及ぼすとともに、行動面では強い鎮痛効果（いわゆるストレス鎮痛）を生じさせる（Porro & Carli 1988）。しかしながら、後肢屈曲反応を指標とする本法の場合、空中保定は、他の痛み反応や動物の姿勢変化に影響されることなく屈曲反応のみを誘発させ、後述の方法により反応量を客観的かつ具体的に記録することを可能にするという点において重要な手続である。

拘束ストレスの鎮痛作用は、動物がその拘束状態を繰り返し経験することにより徐々に減弱、消失する（Amir & Amit 1979）。そこで今回の実験テストでは、ラットを、テスト場面とほぼ同様に頭部と四肢を出した状態で布製の拘

束衣に包み、宙ぶりに120分間保定するセッションを連続12日間行い、テスト時の拘束状態に対する馴化訓練とした。

テスト手続：12日間の馴化訓練終了の翌日、屈曲反応の測定を行った。被験体を3群に分け、生理食塩水群($n=9$)に生理食塩水を、また2%ホルマリン群($n=11$)および4%ホルマリン群($n=12$)には生食ホルマリン(2%または4% Formaldehyde 溶液)を $40\mu\text{l}$ 注入した。注入には 100μ 注射筒、27 G 注射針を用い、可能な限り速やかに注入した。なお、“formalin test”では、5%、 $50\mu\text{l}$ のホルマリン溶液を使用しているが、本研究では、屈曲反応を選択的に生じさせ易い低濃度、低容量を使用した。ただし、それでもホルマリン注入直後は注入部位への licking 反応が鎮繁に生じ、これが屈曲反応測定の妨げとなるため、注入直後の5分間はラットをホームケージに戻した。

次に、馴化訓練と同様にラットを空中保定し、注入肢の足首に約30 cmの糸を結びつけた。糸の先端は張力トランスデューサーに接続し、注入肢の上下動(屈曲反応)を電圧に変換、増幅してペンオシログラフに記録した。記録装置は2台を同時に使用し、このうち1台は紙送り速

度 $5\text{cm}/\text{min}$. として個別の波形の検証ならびに反応回数の計測に用い、他の1台は $20\text{cm}/\text{hr}$. で記録し、全反応パターンのモニターとした。測定は、注入後10分から120分まで行った。

なお、測定は各被験体につき1回を原則としたが、例外的な反応パターンを示したラットに対しては、更に12日間の馴化訓練を行った後、反対側の後肢(前回の非注入肢)に前回と同濃度のホルマリンを注入し、再度測定した。また、麻薬性鎮痛薬に対する屈曲反応の感受性を検討するため、4%ホルマリン群の2匹を同様の手続で再テストし、モルヒネ(morphine hydrochloride) $1, 5\text{mg}/\text{kg}$ と、その特異的拮抗薬であるナロキソン(naloxone hydrochloride) $1\text{mg}/\text{kg}$ を、注入後それぞれ30分と50分の時点で皮下投与した。

結 果

希釈ホルマリン溶液をラットの後肢背側皮下に注入すると、その後肢に連続的な屈曲反応が生じる。Fig.1は、生理食塩水と4%ホルマリン溶液をそれぞれ $40\mu\text{l}$ 注入したときの注入肢の動きをペンオシログラフ(紙送り速度 $5\text{cm}/\text{min}$.)に記録したものである。今回の実験では、

Fig. 1 Records of hind paw flexion responses induced by $40\mu\text{l}$ of saline (upper) and $40\mu\text{l}$ of 4% formalin (lower).

この記録をもとに1分間当たりの屈曲反応数を計測し、痛み強度の指標とした。ただし、非注入肢にも微細な上下動が生じるので、立ち上がり速く、1 cm以上の振幅が記録されたものを屈曲反応とした。

Fig.2は、ホルマリン溶液を注入されたラットの代表的な反応パターンの例であり、その全体記録(紙送り速度20 cm/hr.)と、1分間当たりの反応数を示した。この例では、ホルマリン注入後20分から75分にかけて屈曲反応が高頻度で出現し、その後急速に消失している。一般的に、反応増加の開始、終了時は個体によりわずかに異なるが(前後5分から10分)、ホルマリン濃度に関係なく少なくとも45分間の反応群発が観察された。この間の反応数は数分ごとに増減を繰り返すが、この傾向は2%ホルマリン溶液注入群で更に顕著であった。

ホルマリン溶液を注入された被験体のうち、3匹は1分間当たりの反応数が常に5回以下と、他のラットとは著しく異なるため、そのデータは除外した(2%—2例、4%—1例)。これらの低反応ラットに対しては再テストを行った

が、1回目と同程度の反応が出現するのみであった。しかしながら、このうち2匹(2%、4%各1例)にナロキソン1 mg/kgを皮下投与したところ、約30分間にわたって活発な屈曲反応が観察された(Fig.3)。

Fig.4には、生理食塩水、2%、4%ホルマリン各群の、1分間当たりの平均反応数を示した。生食群($n=9$)が全体を通じほとんど無反応(1分間平均1.1回)なのに対し、ホルマリン群は両群とも注入後25分から70分かけて高い反応数を示したが、この間の平均反応数は2%群($n=9$)で13.8、4%群($n=11$)で19.2と、ホルマリン濃度間に有意な差がみられた($t(18)=10.14$, $p<.001$)。70分以降、反応数は急速に減少し、その平均反応数は2%群で3.3、4%群で4.9と接近した(ただし有意差あり、 $t(18)=2.87$, $p<.01$)。

4%ホルマリン群の2匹は、モルヒネの鎮痛効果を検証するため再テストした。馴化訓練の後、反対側後肢に4%ホルマリンを注入し、反応が最も安定して出現する30分の時点でモルヒネ1 mg/kgまたは5 mg/kgを、さらにその20分

Fig.2 Record of flexion responses by 40 μ l of 4% formalin (lower) and response rate per minute (upper).

Fig. 3 Records of flexion responses by 2% formalin (upper) and 4% formalin (lower). These rats showed poor responses constantly, but a phasic response burst was observed after naloxone administration.

Fig. 4 Mean response rate per minute in each group.

後にナロキソン 1 mg/kg を皮下投与した。モルヒネ 1 mg/kg は、その投与から 5 分後以降の反応数を 75% にまで抑制し、モルヒネ 5 mg/kg は完全な鎮痛効果をもたらした。また、これらのモルヒネの効果はナロキソンにより逆転され、反応数はモルヒネ投与前のレベルまで速やかに回復した (Fig.5)。

考 察

侵害刺激からの逃避行動としての下肢屈曲反応は、ヒトを含めた多くの動物にみられるが、そのほとんどは急性の刺激に対する一過性の脊髓反射である (Willer *et al.* 1979)。今回の実験では、ラット後肢皮下へのホルマリン溶液注入後、屈曲反応の群発が一定時間観察された。この反応は、麻薬性鎮痛薬によって抑制を受けることから、明らかに痛み由来する反応と思われるが、持続的かつ逃避不可能な刺激によって連続的に惹起されるという点において、脊髓で媒介される他の一般的な屈曲反応とは異なる。

ホルマリン誘発性後肢屈曲反応は、ラットが痛みを一時的に軽減するために行う随意的な対処行動であろうと推察される。

Dubuisson & Dennis (1977) によれば、“formalin test”における痛み得点は 2 相性の継続的变化を示す。すなわち注入直後約 5 分間の第 1 期と、約 20 分後以降の第 2 期とである。このうち前者は侵害受容器の直接的刺激による急性痛を、後者は皮下組織の炎症に起因する持続痛を反映すると考えられている (Sugimoto *et al.* 1986)。本研究では、ホルマリン注入後 25 分から 70 分にかけて高頻度の屈曲反応が観察されたが、こちらは“formalin test”における第 2 期の痛み (持続痛) に対応する。ただし、“formalin test”における痛み得点が注入後約 30 分を頂点としてゆるやかな増加、減少カーブを描くのに対し、屈曲反応数は比較的急速に増加、消失し、またその間若干の増減を繰り返す。屈曲反応のこうした特徴は、我々が日常経験する持続的な痛みの特徴によく類似すると思われる。

Fig. 5 Records of flexion responses by 4% formalin. These responses were inhibited moderately by 1mg/kg of morphine (upper), and perfectly by 5mg/kg of morphine perfectly (lower). Furthermore, these inhibitory effects of morphine were immediately antagonized by 1mg/kg of naloxone.

る。

最近, Dickenson & Sillivan(1987)は, ラットの後肢皮下にホルマリン溶液を注入して脊髄後角細胞の単一発射活動を記録し, 注入直後(第1期)と, 20分後から少なくとも65分後まで(第2期)の活発なニューロン活動を報告している。脊髄後角細胞は, 痛覚求心路系の中継核の一つであり, 中脳や延髄などの上位中枢から種々の制御を受け, 痛みの統合に重要な役割を果たしていることが生理学的に明らかになっている。このような細胞の侵害受容性応答の時間経過と, 屈曲反応数のそれが極めてよく符合するという事実は, ホルマリン誘発性後肢屈曲反応が, 少なくとも脊髄レベルでの持続性侵害受容の行動的指標として適切であることを示唆する。

今回の実験では, ホルマリンを注入されたラットのうち3匹が極端に低い反応数を示した。これらのラットは, ナロキソン投与により反応を一時的に回復することが確かめられたが, このことは反応抑制が単に運動障害によるものではないことを意味するとともに, そこには内因性モルヒネ様物質が強く関与することを示唆する。内因性モルヒネ様物質の自発的活性化には種々の要因が考えられるが(Rogers & Randall 1988, 山中他 1981), 今回の実験場面では拘束ストレスの影響がまず想定される。拘束ストレスによる鎮痛効果の特徴の一つに, ナロキソンによる可逆的作用が挙げられるが(Dubuisson & Dennis 1977), 今回の低反応ラットもこの点は一致する。しかしながら, 前述のとおりストレス鎮痛は動物がそのストレス状況を繰り返して経験することにより最終的に消失するが, 本実験の低反応例は更に12日間の馴化訓練を経験した後も反応数は前回と同様に極めて少数であった。

なぜ特定のラット(約10%強)に低反応例が出現するかは現時点では不明であるが, 内因性痛み抑制系, 特にその自発的発現機序という点に関して興味深い事例であり, 更なる検討が必要である。

要である。

以上, 本法は, (1)痛み反応を具体的な記録として測定するため, 判定に際し客観性および確実性が保たれる, (2)単一反応を指標とするため, 同一の痛み成分の継時的変化が観察される, (3)ホルマリン誘発性屈曲反応は, ホルマリンにより誘発される他の痛み反応に比べ, より長時間, 一定レベルの反応量が得られるため鎮痛効力試験法として有用である, などの特徴をもつと考えられる。

テストまでの馴化訓練に時間を要すること, 再現性に関して約10%強のラットに低反応が出現し, しかもその原因が不明であることなどの問題点があるが, 馴化訓練に関しては, 測定時間の短縮により, 訓練日数も短縮することが可能である(我々の経験では, 測定時間を, 高頻度の反応が出現する60分間とした場合, 馴化訓練は4~6日間で充分であろう)。

近年, 動物に持続的な痛みを経験させる手段として, ホルマリン溶液の注入が広く行われるようになった(佐藤 1986, Yaksh *et al.* 1979)。痛みの程度や, その継時的変化の様相を行動的に正しく把握することが必要であり, 本法はそのための有効な動物モデルであろうと思われる。

REFERENCES

- Abbott, F. V., Franklin, K. B. J., Ludwick, R. J. and Melzack, R. Apparent lack of tolerance in the formalin test suggests different mechanisms for morphine analgesia in different types of pain. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 1981, **15**, 637-640.
- Alreja, M., Motalik, P. G., Nayar, U. and Manchanda, S. K. The formalin test: a tonic pain model in the primate. *Pain*, 1984, **20**, 97-105.
- Amur, S. and Amit, Z. The pituitary gland

- mediates acute and chronic pain responsiveness in stressed and non-stressed rats. *Life Sci.*, 1979, **24**, 439-448.
- De Castro-Costa, M., De Sutter, P., Gybels, J. and van Hees, J. Adjuvant induced arthritis in rats, as a possible model of chronic pain. *Pain*, 1981, **10**, 173-186.
- Dennis, G. S. and Melzack, R. Comparison of phasic and tonic pain in animals. In Bonica et al. (Eds.) *Advances in Pain Research and Therapy*, vol. 3. Raven Press, 1979, 747-759.
- Dickenson, R. J. and Sullivan, A. F. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain*, 1987, **30**, 349-360.
- Dubuisson, D. D. and Dennis, G. S. The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stimulation in rats and cats. *Pain*, 1977, **4**, 161-174.
- Otsuki, T., Nakahama, H., Niizuma, H. and Suzuki, J. Evaluation of the analgesic effects of capsaicin using a new rat model for tonic pain. *Brain Research*, 1986, **365**, 235-240.
- Porro, C. A. and Carli, G. Immobilization and restraint effects on pain reactions in animals. *Pain*, 1988, **32**, 289-307.
- Rogiers, R. J. and Randall, J. I. Environmentally induced analgesia: Situational factors, mechanisms and significance. In Rodgers and Cooper (Eds) *Endorphines, Opiates and Behavioral Processes*. JOHN WILEY & SONS, 1988, 107-142.
- 佐藤 公道 鎮痛活性の評価法. 藤村・高木(編) エンケファリンとエンドルフィン—痛みの制御をめぐる. 講談社, 1981, 204-223.
- 佐藤 公道 痛覚の伝達と制御に関するペプチド. 高木他(編) 脳の生体警告系—痛みを中心にして. 東京大学出版会, 1986, 203-221.
- Sugimoto, M., Kuraishi, Y., Satoh, M. and Takagi, H. Involvement of medullary opioid-peptidergic and spinal noradrenergic systems in the regulation of formalin-induced persistent pain. *Neuropharmacology*, 1986, **25**, 481-485.
- Wall, P. D., Devor, M., Inbal, R., Scadding, J. W., Schonfeld, D., Sertzer, Z. and Tomkiewicz, M. M. Autonomy following peripheral nerve lesions: Experimental anaesthesia dolorosa. *Pain*, 1979, **7**, 97-105.
- Willer, J. C., Boureau, F. and Berny, J. Nociceptive flexion reflexes elicited by noxious laser radiant heat in man. *Pain*, 1979, **7**, 15-20.
- Yaksh, T. L., Farb, P. H., Leeman, S. E. and Tessell, T. M. Intrathecal capsaicin depletes substance P in the rat spinal cord and produces prolonged thermal analgesia. *Science*, 1979, **206**, 481-483.
- 山中祥男・山崎重明・鈴木牧彦 ホルマリンテストによる痛みの評定. 上智大学心理学年報, 1981, **6**, 55-67.