A trial to develop an experimental model for chronic myopathic pain

Tatsuyuki Hashimoto¹, Hiroki Sakurai¹, Yusuke Ohmichi¹
Takahiko Yoshimoto¹, Kunihiro Eguchi^{1,2}
Yoshiko Yamaguchi¹ and Takao Kumazawa¹

¹Department of Algesiology, Aichi Medical University

²Department of Physiology, School of Dentistry, Aichi Gakuin University

[Received 20 December 2004, Accepted 18 January 2005]

Abstract

Chronic pain animal models with nerve injuries have contributed much to understand the mechanisms underlying neuropathic pain. However, understandings of chronic pain originated in a soft tissue lesion have been remaining unclear. Certain animal models with the muscle lesion have been reported so far, but they were mostly developed on the basis of inflammatory pain.

Besides inflammation, we consider that nociceptive inputs may be also important to induce chronic pain states. In the present study, we tested the effects of 2 µg/kg of lipopolysaccharide (LPS) and 6% hypertonic saline (HS) given consecutively five times at 90-minute intervals, which were injected into the unilateral gastrocnemius muscle of the rat. Animals were received a combined treatment of LPS and HS and divided into three groups depending on intervals of injections of these agents (24, 48 and 96 hours). The number of paw elevations per five applications of three different von Frey filaments (VFFs; 980, 2940 and 3920 hPa) was examined in ascending order until 6 weeks after treatments. In addition, measurements of muscle pain thresholds and circumferences at injected sites were followed up to 1 week, when both returned to normal.

Different intervals of LPS and HS injection in combined treatment made no differences in terms of inductions of pain behaviors. Animals showed increased responses to VFFs lasting over 6 weeks after the disappearance of local changes. Long-lasting responses were induced bilaterally, but these of ipsilateral side were certainly predominant. This experimental animal model is suggested to be useful for the studies of chronic pain driven by a soft tissue injury.

Key words: Animal model; Chronic pain; Lipopolysaccharide; Hypertonic saline

筋傷害による慢性痛症モデル動物開発の試み

橋本 辰幸¹／櫻井 博紀¹／大道 裕介¹／吉本 隆彦¹
江口 国博^{1,2}／山口 佳子¹／熊澤 孝朗¹

¹愛知医科大学医学部痛み学(ファイザー)寄附講座

²愛知学院大学歯学部生理学講座

はじめに

慢性痛の中でも、末梢組織の損傷治癒後も持続的な疼痛が継続する疾患群を慢性痛症として分類している。1988年の神経因性疼痛モデル開発の報告以来¹⁾、種々のモデル動物が開発され^{6,14)}、神経損傷に伴って神経系に生じる可塑的变化が¹⁹⁾、生理学的な痛みのメカニズムでは説明できない新たな病気としての慢性痛症を生み出すという、痛みの概念の変革をもたらした。しかし、末梢神経への傷害が病態発生のための重要な因子ではあるが、Complex Regional Pain Syndrome (CRPS) type I¹⁶⁾のように、打撲などの軽微な原因により発生した軟部組織損傷により発症する慢性痛症も多い。CRPS type I患者からの筋生検による所見では、筋細線維の崩壊やZ帯に不規則な配列が認められ¹⁷⁾、また、患者の訴える疼痛と深部組織由来の痛みとの間に高い類似性が認められるなど²⁾、軟部組織の異常が病態と関連していることを示唆する報告も多い。しかし、軟部組織損傷をトリガーとした慢性痛症のモデル動物に関する情報は少なく、神経因性疼痛に関する研究と比較すると遅れているのが現状である。

これまでに、カラゲニン¹¹⁾、TNF- α ¹³⁾、低pH液¹⁵⁾などの筋内投与をトリガーとした炎症関連モデルはいくつか報告されているが、これらのモデルでは、炎症とこれに付随する痛みとを分離して考えることが難しいため、慢性痛症の発症に関わる誘引について詳細な検討をするためには適当ではなかった。炎症性疾患と慢性痛症との間に症状の類似性が指摘されているが³⁾、慢性痛症患者の多くが発症時に痛みを経験していることから、病態の誘引として、炎症に加えて侵害性入力も重要であると考えられる。そこで我々は、軟部組織の中でも筋に着目し、腓腹筋への少量のlipopolysaccharide (LPS) 先行投与に続く高張食塩水の複合的な投与により筋傷害を作製した。これによるラットの痛み行動への影響を検討し、軟部組織傷害性慢性痛症モデル動物の開発を試験的に試みた。

方 法

本実験は、国際疼痛学会の倫理委員会が定めたガイドラインに準拠し²⁰⁾、愛知医科大学動物実験委員会の承認のもとに行った。

1. 筋傷害の作成および実験群

305～385gのSD系雄ラットの左腓腹筋に、炎症性要因としてLPS (SIGMA, E. Coli, 0111: B4) を、侵害性要因として6%の高張食塩水 (HS) をエーテル麻酔下で投与した。LPS 2 μ g/kg を100 μ l 先行投与し、HS 100 μ l を90分間隔で5回連続投与した。LPSとHSの複合投与間隔を、それぞれ24 (LH 24群, n=6)、48 (LH 48群, n=6)、96 (LH 96群, n=6) 時間とした複合刺激群と、筋への処置を行っていないコントロール群 (n=6) を用いた。

2. 痛み行動ならびに下腿周径の測定

筋傷害を加えた筋の変化を観察するために、ラットを靴下内で保持し、左右の腓腹筋内側頭の皮膚上から、鈍先端のプロブ (ϕ 約2mm) を取り付け、push-pull gaugeを手動でゆっくりと押しつけ、逃避行動などの痛み行動が出現した時点のグラム数を記録した。計測をそれぞれ3回行い、中央値を圧痛閾値とした。圧痛閾値の測定は、LPS投与前、LPS投与後4時間、1日、HS 5回投与後30分、1日、3日、1週の時点で行った。また、下腿周径の測定は腓腹筋最大膨隆部を計測した。

筋傷害部位より遠位にある足底部の痛み行動を評価するために、足底へのvon Frey test (VFT) を行った。980, 2940, 3920 hPa (ϕ 0.5mm) の3種類のvon Frey filament (VFF) を使用し、左右の足底に強度の弱い順に行い、それぞれ5回の刺激中に引っ込め反射が何回出現したかを記録した。刺激時間とインターバルはそれぞれ1秒間とした。なお、測定の安定性を高める目的で、大道路が報告した方法に従い、測定開始前に足底を柔らかい絵筆でラットの体動がなくなるまでstrokingした¹⁰⁾。測定は、LPS投与前、複合刺激後1日、3日、1週間とし、それ以降は1週毎に6週まで行った。コントロールにおいては、複合刺激群のスケジュールと平行して同様の項目について測定した。

3. 統計処理

VFTにより誘発される痛み行動の群間比較にはKruskal-Wallis検定を行い、続いてMann-Whitney U検定を行った。また、痛み行動の経時的変化は、Friedman検定を行い、続いてWilcoxon (Bonferroni補正) 検定による多重比較を行った。下腿周径の変化については、投与側と反対側との間でpaired t-

Fig. 1 Comparison of nociceptive responses to three different VFFs among animals given a combined treatment with LPS and HS at intervals of 24, 48 and 96 hours.

Cumulative average of nociceptive responses of the ipsilateral paw to three different VFFs (980, 2940 and 3920 hPa) was compared among the control (n=6), LH 24 (n=6), LH 48 (n=6) and LH 96 (n=6) groups between 2 and 6 weeks after a combined treatment. These LH groups were given LPS and HS at intervals of 24, 48 and 96 hours, respectively. The cumulative responses of each LH group are significantly stronger than those of the control. But there are no statistical significances between these three LH groups. Asterisks denote * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ when compared between control group and LH groups. Values represent the mean $\pm$ SEM.

testを行った。全てのデータは平均値とSEMで表わした。

結 果

1. LH 24, LH 48, LH 96 各群における足底の痛み行動の比較

VFTに対する痛み行動は、直後は個体によるばらつきがみられたが、どの群も2週目から安定した亢進を示した。痛み行動の出現回数を、VFFの強度別に投与側と反対側でそれぞれ積算し、群間比較を行った。Fig. 1に各群の投与側における、複合刺激後2～6週の反応回数の平均値を示した。コントロールに対しては、全てのLH群とも有意な痛み行動の増加が認められたが、それぞれのLH群の間では有意な差はみられなかった。また、同じ測定時期の反対側およびLPS投与後から複合刺激後1週までの投与側、反対側における痛み行動の亢進に関しても同様で、有意な差はみられなかった (data was not shown)。

2. LH 群における VFF に対する痛み行動の経時的変化

LH 24, LH 48, LH 96 群の間で、足底の痛み行

動の出現回数は群差が認められなかったため、各強度のVFFに対する3群をまとめ (n=18)、その平均値を1～6週まで経時的にプロットした (Fig. 2)。最も弱い強度のVFF (980 hPa, A) による反応は、投与側では2週から6週に至る全ての測定時において痛み行動の亢進がみられたものの、反対側の亢進の程度は弱かった。中間の強度 (2940 hPa, B) ならびに最も強い強度 (3920 hPa, C) のVFFに対する痛み行動は、2～6週の測定時において両側性の亢進がみられたが、1週の時点では反対側には顕著な亢進が認められず、投与側において痛み行動の出現回数の増加が強く、また、より早い時期に出現する傾向にあった。

3. 筋圧痛閾値・下腿周径の変化

LPSとHSの投与による筋傷害の程度を確認するために、投与部位における筋圧痛閾値と下腿周径の変化を測定した。なお、両者は、LH 24, LH 48, LH 96 群とも同様の傾向を示したので、以下の結果は3群全ての値の平均とSEMで示した。

筋圧痛閾値は、LH 24, LH 48, LH 96 全ての群の投与側において、LPS投与前の値 (213.3 ± 5.2 g) に対してLPS投与後4時間で筋圧痛閾値が有意に

Fig. 2 The time course of changes of nociceptive responses of the hind paws for a period of 1–6 weeks following a combined treatment with LPS and HS.

The time course of the average number of paw elevations in the ipsilateral (■) and contralateral (●) hind paws induced by VFFs of a weak (980 hPa) in A, a medium (2940 hPa) in B and a strong (3920 hPa) in C ($n=18$). Asterisks denote * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ when compare to PRE treatment values. Values represent the mean $\pm$ SEM.

低下 (133.8 ± 7.0 g) を示したが、投与後 1 日には回復した (207.3 ± 8.5 g)。また、HS の 5 回連続投与 30 分後に有意に低下 (141.0 ± 9.52 g) したが、複合刺激後 3 日目までには LPS 投与前の値のレベルまで戻った (213.0 ± 5.6 g)。

下腿周径についても 3 群は同様な傾向を示した。なお、動物の成長による周径の増加を考慮し、反対側と投与側を比較した。LPS 投与後 4 時間で反対側に対して投与側の周径が微増 (55.4 ± 0.2 mm: 投与側, 54.2 ± 0.1 mm: 反対側) したが、投与後 1 日には回復した (54.7 ± 0.2 mm, 54.5 ± 0.1 mm)。その後の HS 連続投与により投与側が有意に増加 ($58.6 \pm$

0.2 mm, 54.7 ± 0.2 mm) したが、複合刺激後 3 日目には反対側と投与側の周径に差がなくなった (55.4 ± 0.3 mm, 55.4 ± 0.3 mm)。

考 察

LPS と HS のラット腓腹筋への複合刺激により、筋傷害部位の痛み行動ならびに下腿周径の増加は投与後 3 日で LPS 投与前の値まで回復したが、足底の痛み行動の亢進は 1 週後に出現し、6 週間にも及んだ。これらの反応は 2 週後より両側性となったが、投与側は反対側と比較すると、痛み行動の出現回数の増加が強く、また、より早い時期に出現する傾向にあった。

本研究では筋傷害を作製するための炎症性要因として LPS ($2 \mu\text{g/kg}$) を投与した。Kanaan らは、 $0.6 \sim 40 \mu\text{g}$ の LPS を足底に投与し、投与部位への機械刺激に対する痛み行動の亢進を示す急性炎症モデルを報告しているが、この痛み行動は 24 時間以内に消失している⁴⁾。LPS を腓腹筋に投与した本研究では、投与した量と部位の差はあるが、Kanaan らと同様に投与部位における一過性の痛み行動の発現を確認した。また、LPS 投与後にラットの行動に変化は認められなかったことより、LPS による全身性の影響は少なかったと考えられる。また、われわれが行った予備試験では、本研究と同量の LPS の単体投与では VFF に対する反応性の亢進は短期間で消失した (unpublished data)。

HS の連続刺激により侵害刺激を与えたが、ヒトの筋組織に対して HS を投与した場合、投与直後に最大の痛みを経験するものの、3～5 分間の間に徐々に消失し、痛みを残さないことが報告されている⁵⁾。また、筋からの細径線維受容器の大部分を占める、ポリモーダル受容器からの単一放電を指標とした動物実験でも、HS による刺激は投与後より急激なインパルス数増加を示し、また、ブラディキニンにみられるようなタキフラスキスを起こさないことが確認されている^{7,8)}。これらのことより、本研究において HS は筋のポリモーダル受容器に対して確実に再現性のよい侵害刺激を与えたものと考えられる。また、LPS 投与後に同量の生理食塩水を投与した動物の下腿周径の変化は、LH 群の増加と比較してわずかな増加にとどまっていた (unpublished data)。これは HS を投与した場合には単に投与量に

依存して周径が増加するのではなく、投与部位周囲の浸透圧の変化に加えて、侵害刺激によりポリマー受容器末端から神経ペプチドが末梢組織に放出される神経因性炎症の機序が一部関与している可能性が考えられる⁹⁾。以上のことより、筋傷害をトリガーとした慢性的な痛み行動の発現に筋のポリマー受容器の関与が示唆される。

侵害性入力が中枢神経系の可塑的变化を引き起こすことが報告されているが^{12,18)}、われわれは予備試験で、今回と同一の筋へのHSの連続刺激のみでは長期の痛み行動が惹起されないことを観察している(unpublished data)。また、先に述べたように、LPS単体投与による結果も同様であった。これらの結果を考え合わせ、LPSとHSによる筋への複合刺激を試み、6週に及ぶ痛み行動の亢進がみられた。両者の投与間隔を変えた場合でも、誘発される痛み行動の亢進は同じ傾向にあった。これは、LPSによる影響が最低でも4日間は持続していたことになるが、これに関与している因子については現在検討中である。慢性痛症にみられるような長期にわたる疼痛を引き起こす機序として、炎症によるバックグラウンドの形成が重要な役割を演じていることが示唆される。

炎症性要因と侵害性要因の筋内投与により、筋傷害部位の痛み行動消失後に足底の痛み行動が長期にわたり亢進した。これは、末梢組織の外傷が治癒した後に、疼痛などの感覚障害を主とした病態を呈する慢性痛症の発症経過と類似しており、この開発したモデルは、これまで開発が遅れていた軟部組織傷害性の慢性痛症のモデル動物として有用であると考えられる。

謝 辞

この研究の一部は、平成15年大幸財団学術研究助成ならびに東洋医学研究財団平成16年度研究・調査助成により行われた。

文 献

- 1) Bennett, G.J. and Xie, Y.-K., A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man, *Pain*, 33 (1988) 87-107.
- 2) Birklein, F., Weber, M., Ernst, M., Riedl, B., Neundorfer, B. and Handwerker, H.O., Experimental tissue acidosis leads to increased pain in complex regional pain syndrome (CRPS), *Pain*, 87 (2000) 227-234.
- 3) Goris, R.J., Reflex sympathetic dystrophy: model of a severe regional inflammatory response syndrome, *World J. Surg.*, 22 (1998) 197-202.
- 4) Kanaan, S.A., Saadé, N.E., Haddad, J.J., Abdelnoor, A.M., Atweh, S.F., Jabbur, S.J. and Safeih-Garabedian, B., Endotoxin-induced local inflammation and hyperalgesia in rats and mice: a new model for inflammatory pain, *Pain*, 66 (1996) 373-379.
- 5) Kellgren, J.H., Observations on referred pain arising from muscle, *Clin. Sci.*, 3 (1938) 175-190.
- 6) Kim, S.H. and Chung, J.M., An experimental model of peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat, *Pain*, 50 (1992) 355-363.
- 7) Kumazawa, T. and Mizumura, K., The polymodal C-fiber receptor in the muscle of the dog, *Brain Res.*, 101 (1976) 589-593.
- 8) Kumazawa, T. and Mizumura, K., Chemical responses of polymodal receptor of the scrotal contents in dogs, *J. Physiol.*, 299 (1980) 219-231.
- 9) Kumazawa, T., Primitivism and plasticity of pain — implication of polymodal receptors, *Neurosci. Res.*, 32 (1988) 9-31.
- 10) 大道祐介, 張本浩平, 橋本辰幸, 櫻井博紀, 江口国博, 山口佳子, 熊澤孝朗, 筆による先行刺激が von Frey test の再現性に及ぼす影響, 東海実験動物研究会, 2004, 名古屋.
- 11) Radhakrishnan, R., Moore, S.A. and Sluka, K.A., Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats, *Pain*, 104 (2003) 567-577.
- 12) Randic, M., Jiang, M.C. and Cerne, R., Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord, *J. Neurosci.*, 13 (1993) 5228-5241.
- 13) Sachafers, M., Sorkin, L.S. and Sommer, C., Intramuscular injection of tumor necrosis factor- α induces muscle hyperalgesia in rat, *Pain*, 104 (2003) 579-588.
- 14) Seltzer, Z., Dubner, R. and Shir, Y., A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury, *Pain*, 43 (1990) 205-218.
- 15) Sluka, K.A., Kalra, A. and Moore, S.A., Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia, *Muscle Nerve*, 24 (2001) 37-46.
- 16) Task Force on Taxonomy of the International Association for the Study of Pain, Complex regional pain syndrome (CRPS). In: Merskey, H., Bogduk, N. (eds.), *Classification of chronic pain*, 2nd ed., IASP Press, Seattle, (1994) 40-42.
- 17) Tilman, P.B., Standhouders, A.M., Jap, P.H.K. and Goris, R.J.A., Histopathological findings in skeletal muscle tissue of patients suffering from reflex sympathetic dystrophy, *Micron Microsc. Acta*, 21 (1990)

- 271-272.
- 18) Woolf, C.J., Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity, *Nature*, 306 (1983) 686-688.
- 19) Woolf, C.J., Shortland, P. and Coggesheall, R.E., Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents, *Nature*, 355 (1992) 75-78.
- 20) Zimmermann, M., Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals, *Pain*, 16 (1983) 109-110.

Address for correspondence: Takao Kumazawa, M.D., Ph.D.
Department of Algesiology, Aichi Medical University
Nagakute, Aichi 480-1195, Japan
Tel/Fax: 0561-63-1148; E-mail: kum@aich-med-u.ac.jp