The validation of pin-evoked hyperalgesia-like behavior as a measure of neuropathic pain in rats

Takashi Kawano and Masataka Yokoyama

Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Kochi Medical School

Abstract

The validity of animal pain assessment still remains a matter of debate. In the present study, we hypothesized that pin-evoked a complex hyperalgesic-type response is a more clinically relevant indicator for analgesic effect than simple withdrawal from von Frey tactile stimulation in rats after peripheral nerve injury. To test this hypothesis, we investigated the effects of pregabalin and NK₁ antagonist CP-99994, as an example of a standard neuropathic pain treatment and an analgesic active in animal models but not in neuropathic pain patients, respectively. Administration of pregabalin (30 mg/kg, p.o.) resulted in analgesic effects in both von Frey and pin test with similar potency. On the other hand, CP-99994 (100 mg/kg, p.o.) showed analgesic effects in von Frey test, but not any effects in pin test. Our results indicated that pin-evoked a complex hyperalgesia-type response is one of translational and appropriate analgesic measurements in rats after peripheral nerve injury.

Keywords

Pain behavior; Pain measurement; Neuropathic pain; Analgesics

Received: 28 July 2011

Accepted: 8 August 2011

**神経障害性疼痛モデルラットにおけるピン刺激による痛覚過敏様行動を指標とした
疼痛評価の有用性**

河野 崇／横山 正尚

高知大学 教育研究部 医療学系 医学部門 麻酔科学講座

はじめに

動物での疼痛評価は、機械的刺激に対する逃避行動を指標とすることが多い。しかし、単純な逃避行動は脊髓反射の要素が強く、痛みに特異的な行動かどうかの根拠に乏しい²⁾。一方、後肢足趾の侵害刺激に対して後肢を長く挙上する、振り回す、舐めるといった行動はより上位中枢を介した疼痛関連行動と考えられているが、現在汎用されている逃避閾値を指標とした疼痛刺激試験(熱、von Frey 刺激等)では誘発されることは稀である。近年、Hogan らは⁶⁾、ラット後肢足趾に対するピン刺激は、単純で反射的な逃避行動かあるいは複雑な疼痛関連行動(以下、「痛覚過敏様行動」とする)のいずれか一方の反応を誘発することを見出した。特にピン刺激による痛覚過敏様行動は、神経障害性疼痛ラットの障害側に極めて特異的な行動であり、その発生頻度を解析することで神経障害性疼痛を鋭敏に検出できるとしている⁶⁾。したがって、ピン刺激による痛覚過敏様行動の経時的な発生頻度解析は、薬物の鎮痛効果の判定試験としても有用である可能性が考えられるが、現時点でその評価はなされていない。今回我々は、神経障害性疼痛モデルラットに対するプレガバリンと NK1 受容体拮抗薬の効果を痛覚過敏様行動の発生頻度を指標としたピン刺激試験で評価するとともに、その有効性を単純な逃避行動の閾値を指標とした von Frey 刺激試験と比較検討した。

方 法

本実験は高知大学動物実験委員会の承認を得て行った。

(1) 神経障害性疼痛モデルラットの作製

対象動物として Sprague-Dawley 系雌性ラット(6 週齢、体重 125~160 g)を用いた。すべてのラットで、イソフルラン麻酔下に右側 L6 横突起を除去し、右側 L5-6 脊髓神経を 6-0 絹糸で強く結紮しその後切断することにより脊髓神経切断モデルを作製した。

(2) 行動的疼痛評価

von Frey 刺激試験は up-down 法¹⁾を用いて後肢を挙上する 50% 反応閾値(g)を求めて疼痛の指標とした。一方、ピン刺激試験は、Hogan らの報告⁶⁾に基づき、22G のスパイナル針(Quincke タイプ)で右後肢足趾を刺激(30 秒間隔で計 10 回)した。正常ラットでは反射的で単純な逃避行動を示すが、神経障害性疼痛ラットでは痛覚過敏様行動(後肢を 2 秒以上挙げ、振り回した後、舐める)が認められる。刺激回数に対する痛覚過敏様行動の出現頻度(%)を疼痛指標とした。鎮痛薬は、プレガバリンと NK1 受容体拮抗薬である CP-99994 を使用し、それぞれ術後 14 日目に経口投与した。行動的疼痛評価は手術前、各鎮痛薬投与前、投与後 1, 2, 3, 4 時間に行った。

(3) 統計解析

すべての結果は平均 ± 標準誤差で示した。各疼痛指標の経時的变化を分散分析による検定後、Scheffe 法により比較し、有意水準は 5% とした。

Fig.1 Effect of pregabalin (left) and CP-99994 (right) on paw withdrawal thresholds to von Frey stimulation in rats after peripheral nerve injury.

Pre-surgical (Pre) and baseline (BL) were determined before surgery and drug administration, respectively. All compounds were administered p.o., and paw withdrawal thresholds were reexamined up to 4 h post drug.

* represent $p < 0.05$ vs. BL.

結 果

von Frey 刺激試験では、プレガバリン (1~30 mg/kg, 各濃度 $n=6$) および CP-99994 (10~100 mg/kg, 各濃度 $n=6$) 共に、用量依存性に逃避反応閾値の増加が認められた (Fig.1)。一方、ピン刺激試験では、プレガバリン (30 mg/kg, $n=8$) で痛覚過敏様行動の出現頻度が低下したが、CP-99994 (100 mg/kg, $n=8$) では有意な変化が認められなかった (Fig.2)。

考 察

モデル動物の開発とその評価を行う疼痛試験の応用は、神経障害性疼痛の病態機序の解明を飛躍的に進展させ、これまでに多くの新しい機序に基づく疼痛関連物質の発見に貢献してきた⁸⁾。しかしその一方で、動物モデルを用いた研究結果から有力とされた鎮痛薬候補が臨床治験段階で期待を裏切ることもしばしばあることが報告されている^{2,7)}。この要因には、動物を用いた研究固有の様々な制限が関与していると考えられるが、その研究方法自体への再評価の必要性も指摘されている^{2,7)}。その中で、現在行われている動物の疼痛評価法がヒトでの臨床像

Fig.2 Effect of pregabalin (left) and CP-99994 (right) on probabilities of hyperalgesia-type response to pin stimulation in rats after peripheral nerve injury.

Pre-surgical (Pre) and baseline (BL) were determined before surgery and drug administration, respectively. All compounds were administered p.o., and probabilities of hyperalgesia-type response were reexamined up to 4 h post drug.

*represent $p < 0.05$ vs. BL.

を正確に反映しているかどうかについては、長年にわたり議論され続けている^{2,7)}。

von Frey 刺激や熱刺激に対する単純な逃避行動を指標とした疼痛評価は、現在汎用されているが、① 基準値のばらつきが大きい、② 神経障害性疼痛モデルラットだけでなく、その反対側でも同様な変化が生じる場合がある、といった共通の問題点が指摘されている⁶⁾。一方、ピン刺激による痛覚過敏様行動は、神経障害性疼痛モデルの障害側のみに特異的に約40~50%の頻度で出現することから、ラットの神経障害性疼痛を安定的で正確に検出する簡便な方法と考えられている⁶⁾。

今回の研究結果では、過去の報告と同様にプレガバリ³⁾と CP-99994⁴⁾は von Frey 刺激試験

で鎮痛効果 (Fig.1, 逃避行動閾値の増加) が認められた。一方、ピン刺激試験では、プレガバリンに対しては von Frey 刺激試験と同様な鎮痛効果 (疼痛関連行動出現率の低下) が認められたが、CP-99994 では有意な変化は認められなかった (Fig.2)。最近の報告では、プレガバリンは動物実験とヒト臨床試験の両方で鎮痛効果が認められているが、NK1 拮抗薬は多くの動物研究で鎮痛効果が認めたにもかかわらずヒトでは鎮痛効果が認められていない^{2,5)}。これらの結果は、ピン刺激による痛覚過敏様行動を指標とした試験は、von Frey 刺激に代表される単純逃避行動を指標とした試験と比較して、よりヒトでの臨床を反映する可能性を示唆している。

結 語

ピン刺激により誘発される痛覚過敏様行動の解析は、神経障害性疼痛モデルラットの疼痛試験として有用であると考えられた。

文 献

- 1) Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L., Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw, *J. Neurosci. Methods*, 53(1994) 55–63.
- 2) Dolgin, E., Animalgesic effects, *Nat. Med.*, 16(2010) 1237–1240.
- 3) Field, M.J., Bramwell, S., Hughes, J., Singh, L., Detection of static and dynamic components of mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain: are they signalled by distinct primary sensory neurones? *Pain*, 83(1999) 303–311.
- 4) Field, M.J., Gonzalez, M.I., Tallarida, R.J., Singh, L., Gabapentin and the neurokinin₁ receptor antagonist CI-1021 act synergistically in two rat models of neuropathic pain, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 303(2002) 730–735.
- 5) Hill, R., NK₁ (substance P) receptor antagonists —why are they not analgesic in humans? *Trends Pharmacol. Sci.*, 21(2000) 244–246.
- 6) Hogan, Q., Sapunar, D., Modric-Jednacak, K., McCallum, J.B., Detection of neuropathic pain in a rat model of peripheral nerve injury, *Anesthesiology*, 101(2004) 476–487.
- 7) Mogil, J.S., Davis, K.D., Derbyshire, S.W., The necessity of animal models in pain research, *Pain*, 151(2010) 12–17.
- 8) Woolf, C.J., Overcoming obstacles to developing new analgesics, *Nat. Med.* 16(2010) 1241–1247.

Address for correspondence: Takashi Kawano
 Department of Anesthesiology and Critical Care
 Medicine, Kochi Medical School
 Kohasu, Oko-cho, Nankoku, Kochi 783-8505, Japan
 Tel: 088-880-2471 / Fax: 088-880-2475
 E-mail: takashika@kochi-u.ac.jp