

原著

疼痛疾患の新たな診断および治療への応用研究
—線維筋痛症モデルマウスの特徴付—

第一薬科大学薬剤設計学分野
西依倫子, 三嶋基弘

Characterization of stress-induced fibromyalgia-like pain in mouse models

Michiko NISHIYORI and Motohiro MISHIMA

*Laboratory of Industrial Pharmacy, Daiichi University of Pharmacy, 22-1
Tamagawa-cho, Minami-ku, Fukuoka, 815-8511, Japan*

1. 諸言

痛みは通常身体を守るための生理的防御機構として備わるが、ときに警告機能としての意義を逸脱し痛み自身が難治化して疾患となる。この難治性疼痛と称される疾患は大きく分けて末梢性疼痛と中枢性疼痛に分類されるが、現在行われている発症機構の解明や治療開発は圧倒的に末梢性疼痛に偏っている。特に線維筋痛症に代表されるような中枢性疼痛は所見や血液などのバイオマーカーにおいて異常を示さないために、疾患であることの位置づけさえも困難とされてきた。近年、国内においても線維筋痛症ガイドラインが定められ厚生省研究班の立ち上げがなされるなど大変注目されているが、未だ原因解明には至っておらず、臨床だけでなく基礎研究からの科学的根拠に基づくアプローチが求められている。そこで、本研究では動物モデルを用いた中枢性疼痛の解明を目的とした研究基盤を報告する。

線筋痛症とは、日本における認知度は低い世界的にも決して少なくない疾患で人口の約2% (日本では1.66%の約200万人) であると報告されている¹⁻⁴⁾。突如発症し、三ヶ月以上継続的あるいは断続的な全身性の激しい疼痛疾患が主症状である。機械刺激、熱刺激、冷刺激、電気刺激、化学刺激など様々な外部刺激に対する感受性が高まっており⁵⁻⁸⁾、わずかな刺激に対しても全身性に激しい痛み症状を示す。重度に至っては仕事や日常生活に支障をきたすなど著しいQOLの低下が問題となるが血液、レントゲン、筋電図などの検査による異常が

認められないため診断の客観性において困難を極めている。アメリカリウマチ学会（ACR）で提唱されている線維筋痛症の診断基準『全身の18カ所のトリガーポイントを4 g/cm²の圧でゆっくりと指圧した時に痛みを感じる箇所が11カ所以上ある事』を基盤に、問診（FIQ; Fibromyalgia Impact Questionnaire など）や近年では電気刺激による Pain vision を用いた疼痛評価で総合的に診断がなされている。また特徴の一つとして、線維筋痛症は閉経後の約40歳から60歳代の中老年女性に圧倒的に多く好発する事が知られているが、自律神経失調症や更年期障害、不定愁訴などの他の疾患と誤診されやすいため、疾患の判別が重要となる。日本では疾患の認知度が低いため特に誤診や間違った治療がなされている事が多い。生活環境や社会環境において周囲に痛みを理解してもらえずストレスを溜め込み、さらに医療機関においても診断名がつかずにドクターショッピングを繰り返しているうちに、重度が悪化している症例が少なくない。この事は大変問題とされており、近年確立された線維筋痛症学会では新たな見直しがなされている。国内独自の線維筋痛症ガイドラインでは、大きく分けて筋肉緊張亢進型（Ⅰ型）、筋附着部炎型（Ⅱ型）、うつ状態身体性症状型（Ⅲ型）およびそれらの重複型に分類されている⁹⁾。特に難解とされているのがⅢ型で、Ⅰ・Ⅱ型に特徴的な筋肥大や炎症などの生体知見異常を認めない。線維筋痛症患者の多くは幼少時の虐待や両親の離婚、死別など大きな精神的ストレスのトラウマを抱えているケースが多く報告されており、性格的に真面目で、周囲への期待に応えるために自身を犠牲にして頑張る努力型が多い事も特徴的である。成人後の生活環境で繰り返しストレスを感じやすい事も多く、このⅢ型の大きなリスクファクターとしてストレスが大変注目されている。ストレスは従来、急性ストレスによる鎮痛効果が一般的とされていたが、慢性ストレスとして繰り返し暴露したストレスで痛みが生じる事が報告されている¹⁰⁾。その病態は線維筋痛症と類似するものであることから新たな動物モデルとして提唱される一方で、末梢性疼痛モデルと異なる点はあまり明確にされていなかった。そこで、本研究では繰り返しストレスモデルを用いた病態の特徴付けを行う目的で、末梢性疼痛モデルと比較した。

2. 方法

2.1 実験動物

実験には6~7週齢 C57BL/6J 雄性マウス（テクサムおよび日本クレア）およ

び、ddY 雄性マウス (九動) を用いた。恒温 (22±2°C)、恒湿 (55±5%)、明期 (午前 8 時から午後 8 時まで) の部屋で昼夜自然管理下において飼育し、一般実験用の固形飼料 (MF, オリエントアル酵母, 東京) および、水道水を自由に摂取させた。末梢モデルとしてマウス後肢足蹠内にホルマリン投与したものおよび酢酸投与による内臓痛モデルを用いた。これらの対照群には生理食塩水を投与した。線維筋痛症モデルは、繰り返し低温ストレスを曝露する ICS (Intermittent Cold Stress) にて作製した。また、対照としてストレス期間中を常に常温環境下においた Control 群と冷温環境下においた CCS (Constant Cold Stress) を温度環境以外を同様の条件化として作成した。それぞれのモデルマウスの疼痛閾値は ABL 試験、および von Frey test、digital paw pressure test、Plantar test を用いた機械刺激、熱刺激誘発性疼痛試験法にて評価した。すべての実験結果は平均値と標準誤差で表した。有意差検定に関しては、Student t 試験、または ANOVA 処理後、scheffe F 試験を行った。なお、全ての検定法において危険率 5%以下を有意差ありと判定した。

2.2 免疫染色

2% formalin 投与 (20µl, i.pl.) 20 分後および ICSP1 のマウスを対象として、ペントバルビタール麻酔下で開腹し、左心室より PBS 次いで 4% パラホルムアルデヒドを灌流し脊髄を摘出した。脊髄は凍結させクリオスタットにて 20 ミクロン厚の浮遊切片とし、抗 c-fos 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1:1000) を一次抗体として ABC 法にて免疫染色をおこなった。

3. 結果

3.1 末梢性刺激誘発性モデルにおける過敏閾値評価

末梢モデルとしてのホルマリンモデルは、足蹠内に 2% formalin を 20µl 投与し、5 分毎に 30 分間 licking/biting 行動時間 (秒) を測定した。Figure 1.A に示すように投与後 5 分間で第 I 相反応が認められ、一度沈静化した後 15-20 分をピークに第 II 相反応が認められた。それぞれの総反応時間を Figure 1.B に示す。また、1% 酢酸を腹腔内投与した内臓痛モデルでは、過敏反応としての writhing 行動が 2 分後以降から認められ、20 分間の計測で 41.3±2.9 回 (n=9) 認められた。ICS モデルは室温 (24 度) と冷温 (4 度) の環境条件を 30 分毎に繰り返し変化させる繰り返しの数日行い曝露した。ストレス前の von Frey filament による静的機械刺激誘発性閾値は、右脚肢において 1.1 ± 0.1 g (n = 6) であった。同マウスに ICS を与えたのち同様の試験を行うと ICS 終了 1 日後 (P1; Post stress day 1) は 0.5 ± 0.4 g と有意に低下しており、触覚過敏のアロディニア症状が認められた (Figure 1.C)。また、刺激プローブの先端が直径 1.8 – 2 mm の paw pressure 試験では正常閾値 9.45 ± 0.2 g に対して ICS P1 では 5.42 ± 0.2 g と低下していた

(Figure1.D)。プローブの直径は深部への刺激に比例する事が知られており¹²⁾、アロディニアに加え軽度の筋刺激に対しても顕著な過敏応答を示すモデルである事を示唆する。この時、ストレス期間中の体温および体重変化、また自発行動量、探索行動を測定したが、Control と ICS 群に差はほとんど認められなかった (Data are not shown)。次に、ICS 後経日的な閾値の変化の観察を行ったが、ICS では P1 に認められた閾値の低下はほぼ P12 以降も認める慢性痛であったが、対照群として ICS と同様の時間を冷温のみで飼育した CCS (Constant Cold Stress) ではストレス直後の P1 には有機な閾値の低下を認めるが P5 には正常レベルまで回復する急性痛であった (Figure1.E,F)。ICS と CCS のストレスの指標として血中コルチコステロン濃度を測定した結果、ICS の P1 でのみ有意に上昇しているのに対して CCS では正常レベルであり、繰り返して低温ストレスを与える事が痛みには何等かの影響を与えている可能性が考えられる。

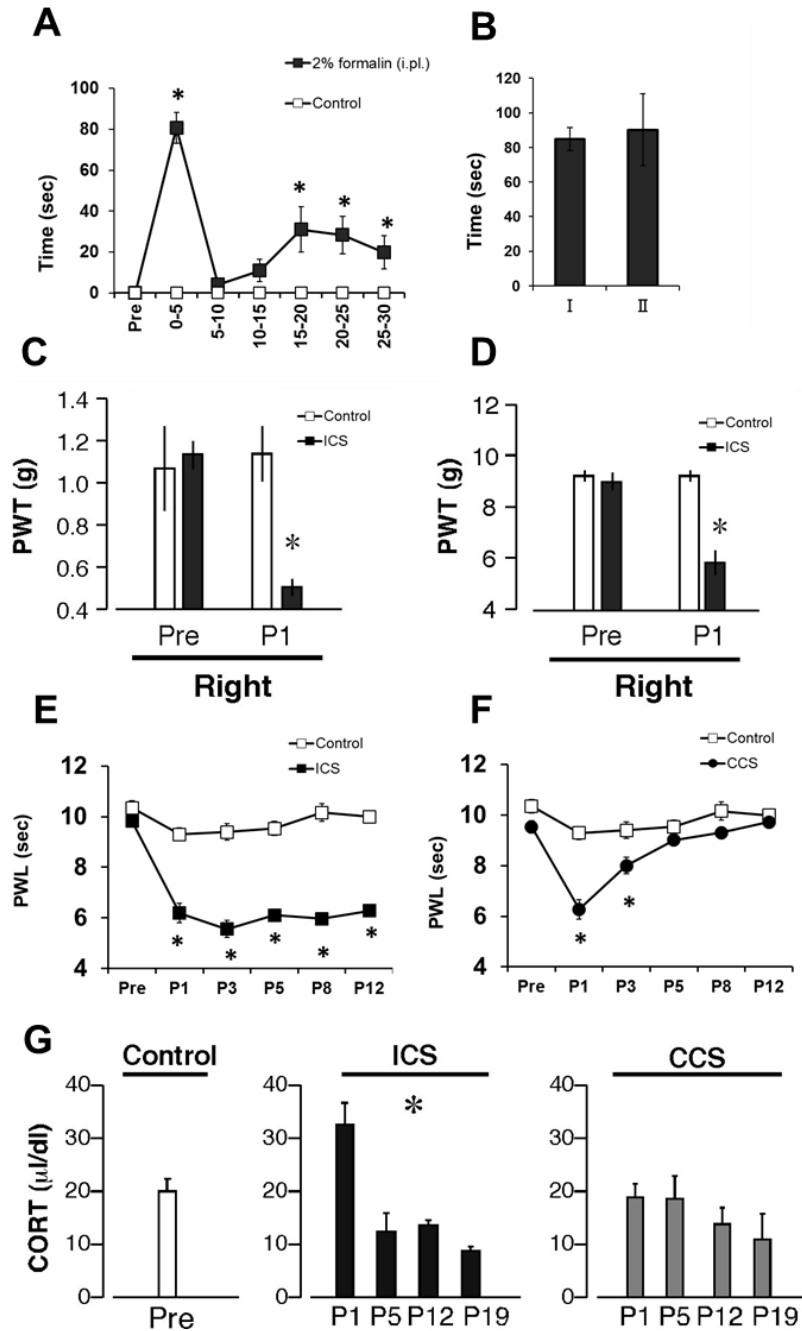


Figure 1. Pain behavior analysis with formalin and stress exposed mice

Formalin induced licking and biting behavior are measured during 30min after the 2% formalin injection (A,B). Stress induced mechanical threshold detected by von Frey (C) and digital paw pressure test (D). ICS or CCS induced hyperalgesia detected from P1 to P12 (E,F). The concentration of the corticosterone in ICS or CCS mice was detected after stress(G). (* $p < 0.05$ as compared with control groups. Data are the mean S.E.M. from experiments using at least 6-10 mice.)

3.2 脊髄後角および脳内 c-fos 発現の比較

ホルマリンモデルでは、過去の報告で脊髄後角において有意に c-fos の発現上昇が知られている。これに対して ICS モデル P1 では、脊髄後角 c-fos 発現はホルマリン投与群に比べ顕著な差は認められなかった (Figure.2)。

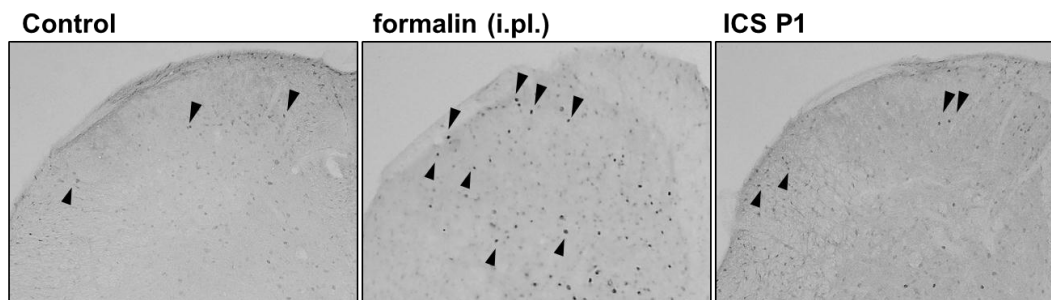


Figure 2. Expression of c-fos proteins detected by ABC staining

4. 考察

本研究では、末梢性疼痛モデルと中枢性疼痛モデルの比較としてそれぞれホルマリン投与マウスと繰り返し低温ストレスマウスを用いた検討を行った。ホルマリンモデルは薬物投与後 30 分間を指標として測定するが、過敏反応自体は数時間断続的に観察される。しかしながら翌日 24 時間後には Control 群と同程度まで回復している急性痛である。一方で、ICS モデルではストレスを中止しても少なくとも 2 週間以上は持続する慢性痛であるように長期性に差が認められる。また、この長期性は低温ストレスを断続的に繰り返さずに連続した CCS では認められない事が明らかとなった。またコルチコステロン濃度を比較した結果からも明らかのように ICS の長期持続性疼痛には繰り返しストレス負荷が大きく関与していると考えられる。またこの時、ICS ではうつ様症状を認めない事からうつに起因する疼痛悪化ではなく、ストレスが直接疼痛機構に影響している可能性が考えられるため、今後の課題として脳内機構を評価する必要がある。今回の結果では、脊髄では末梢由来のホルマリンモデルで c-fos 発現を強く認めるが、ICS では差はあまり認められなかった。過去の報告で、ICS モデルでは過去にモルヒネの鎮痛効果が減弱するが、その原因が末梢のオピオイド機構ではなく中枢に由来する事を報告している¹³⁾。その一因として下降性抑制系に関わるセロトニン神経の代謝活性低下が考えられており、今後のターゲット領域として注目している。近年ホルマリンを後肢足蹠内投与すると脊髄だけでなく延髄や海馬など脳内領域においても c-fos の発現が報告されている^{14,15)}。難治性疼痛の解明には末梢性、中枢性ともに脳内機構が重要であるが、これらのモデルを比較する事で関連領域の差別化をはかることで、診断や適切な治療のバイオマーカーとなりうる事が期待される。

5. 参考文献

1. Cassisi G, Sarzi-Puttini P, Alciati A, Casale R, Bazzichi L, Carignola R, Gracely RH, Salaffi F, Marinangeli F, Torta R. Symptoms and signs in fibromyalgia syndrome. *Reumatismo* 2008, 60 Suppl 1:15-24.
2. Gore M, Sadosky AB, Zlateva G, Clauw DJ: Clinical Characteristics, Pharmacotherapy and Healthcare Resource Use among Patients with Fibromyalgia Newly Prescribed Gabapentin or Pregabalin. *Pain Pract* 2009.
3. Staud R: Biology and therapy of fibromyalgia: pain in fibromyalgia syndrome. *Arthritis Res Ther* 2006, 8(3):208.
4. Sumpton JE, Moulin DE: Fibromyalgia: presentation and management with a focus on pharmacological treatment. *Pain Res Manag* 2008, 13(6):477-483.
5. Lautenbacher S, Rollman GB, McCain GA: Multi-method assessment of experimental and clinical pain in patients with fibromyalgia. *Pain* 1994, 59(1):45-53.
6. Petzke F, Clauw DJ, Ambrose K, Khine A, Gracely RH: Increased pain sensitivity in fibromyalgia: effects of stimulus type and mode of presentation. *Pain* 2003, 105(3):403-413.
7. Graven-Nielsen T, Aspegren Kendall S, Henriksson KG, Bengtsson M, Sorensen J, Johnson A, Gerdle B, Arendt-Nielsen L: Ketamine reduces muscle pain, temporal summation, and referred pain in fibromyalgia patients. *Pain* 2000, 85(3):483-491.
8. Arroyo JF, Cohen ML: Abnormal responses to electrocutaneous stimulation in fibromyalgia. *J Rheumatol* 1993, 20(11):1925-1931.
9. 西岡久寿樹: 治療総論. 日本線維筋痛症学会編, 線維筋痛症診療ガイドライン 2011. 日本医事新報, 東京, 2011; 82-92.
10. Hata T, Itoh E, Nishikawa H: Behavioral characteristics of SART-stressed mice in the forced swim test and drug action. *Pharmacol Biochem Behav* 1995, 51(4):849-853.
11. Nishiyori M, Ueda H: Prolonged gabapentin analgesia in an experimental mouse model of fibromyalgia. *Mol Pain* 2008, 4:52.
12. Nasu T, Taguchi T, Mizumura K: Persistent deep mechanical hyperalgesia induced by repeated cold stress in rats. *Eur J Pain*, 14(3):236-244.
13. Barr GA., Formalin-induced c-fos expression in the brain of infant rats. *J Pain*. 2011 Feb;12(2):263-71
14. Ceccarelli I, Scaramuzzino A, Aloisi AM. Effects of formalin pain on hippocampal c-Fos expression in male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1999 Dec;64(4):797-802.

15. Nishiyori M, Nagai J, Nakazawa T, Ueda H: Absence of morphine analgesia and its underlying descending serotonergic activation in an experimental mouse model of fibromyalgia. *Neurosci Lett*, 472(3):184-187.