

痛みの動物モデル — 血管痛モデルについて —

安藤隆一郎

Animal Model for Pain — Vascular Pain Model —

Ryuichiro ANDO

(Received November 20, 2010)

1. 緒言

“痛み”は、誰でも経験する不快な普遍的感觉であり、また、生体の異常を知らせる警告信号であることを周知している。われわれは、この不要かつ不快極まりない感觉を取り除くために、古くから外科的手法やアヘンに代表される植物成分の使用、あるいは呪術などさまざまな方法を用いてきた。医療の発達はこの“痛み”をいかに制御、制圧するかにより多くの努力が払われてきた歴史といっても過言ではない。その中でも動物を用いた多くの解剖学的、生理学的、薬理学的実験において種々の痛みモデル動物が開発され、痛みの発生機序、伝達伝導神経経路ならびに鎮痛薬の作用機序等の解明に貢献してきた。本論文では、先人らの手法を基に著者らが作成、使用した血管痛動物モデルについて概説する。

2. 痛み感觉の特殊性

“痛み”は、体表面、皮膚下組織、四肢血管、筋肉および関節を含む骨に起こる体性痛 (somatic pain) と胸腔および腹腔内にある臓器で起こる内

臓痛 (visceral pain) に分類され、体性痛は主に知覚神経を介して、また、内臓痛は求心性自律神経を介して中枢神経へ伝えられる。¹⁾ いずれの痛みも前述したように痛いという感觉とともに不快感を伴い、同時に不安や苦しみなどのネガティブな情動変化を引き起こす特殊な感觉である。特に一時的な痛み (急性痛 acute pain) よりも持続的な痛み (慢性痛 chronic pain) はその程度が強い。国際疼痛学会の用語分類小委員会は、「実際のあるいは潜在的な組織損傷 (侵害) と関連ある不快な感觉および情動的体験、もしくはそのような傷害を、言葉をもって言い表すことのできる同様の体験」と定義付けている。²⁾ この定義の背景には痛みを伝える神経系の解剖学的、生理学的特徴がある。Fig. 1 に示すように哺乳動物の痛みを伝える神経経路には、要約すると二経路が存在する。一つは、痛みを受容し伝える末梢神経の $A\beta$ 、 $A\delta$ および C 繊維群が脊髄後角に終末し、視床外側核群を經由して最終的に大脳皮質体性感覚野へ投射する外側系 (新脊髄視床路 neospinothalamic tract) と視床

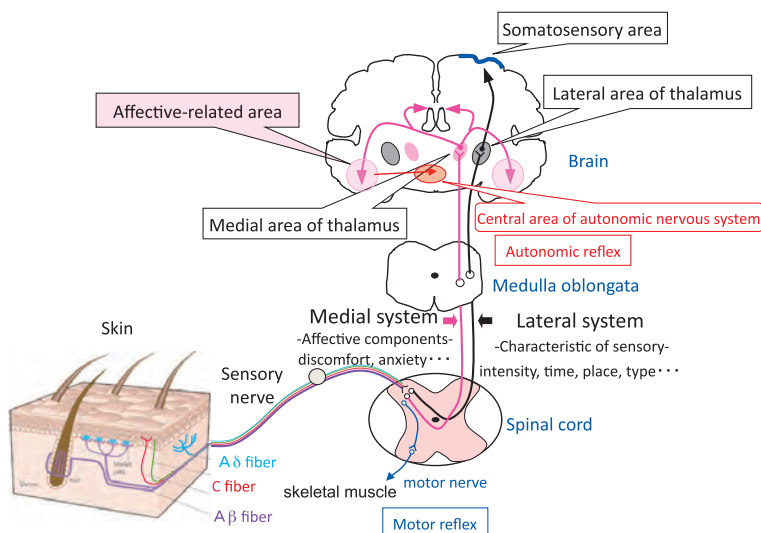


Fig. 1. Summarized figure of main ascending pathways for the information of pain.

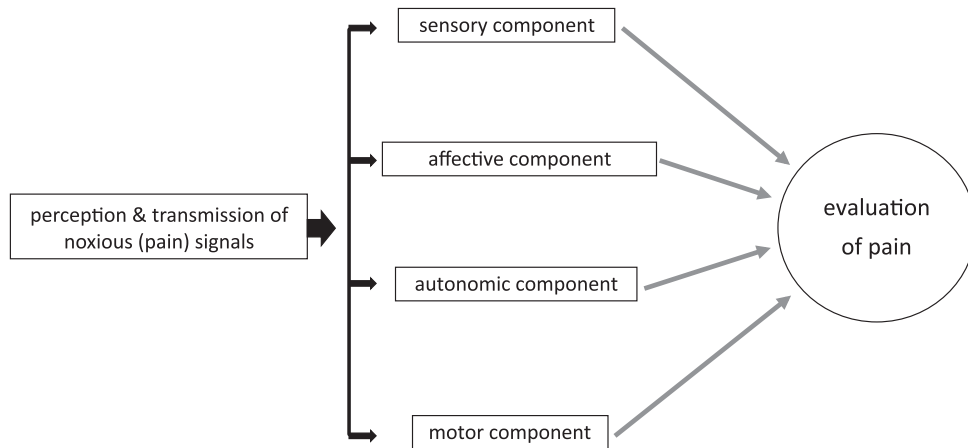


Fig. 2. Four components of pain.

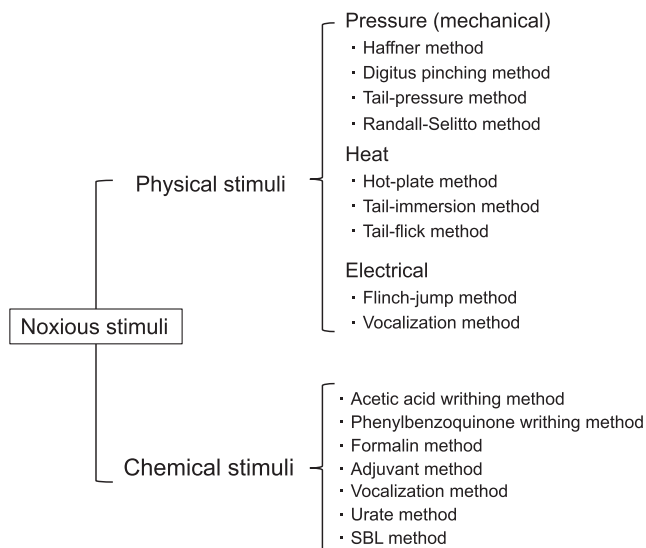


Fig. 3. Representative pain (noxious) stimuli and testing methods.

内側核群を經由して辺縁系および自律神経系高位中枢の視床下部など両側性かつ広域に投射している内側系（旧脊髓視床路 paleospinothalamic tract）である。³⁻⁵ 前者は、主に痛みの客観的側面である強さ、種類およびその時空的特徴などを識別・認識する役割を担っている。一方後者は、痛みに伴う不快感や苦痛など主観的な情動変化や自律神経が関与する種々の生体反応を引き起こす。さらに、痛みは時として運動系も強く駆動させる。⁶ これらのことから Schmidt ら⁷ は、実際の痛みによる生体の反応を観察すると痛みは、感覚性 (sensory component)、情動性 (affective component)、自律性 (autonomic component) および運動性要素 (motor component) の四要素 (four components) から成り立つことを示している (Fig. 2)。すなわ

ち、感覚性要素とは、個々の経験に基づく痛み感覚の解釈、つまり認識をつかさどることを、情動性要素は感情的変化を表している。また、自律性要素は痛みによる心拍、血圧および発汗などの自律神経を介した二次的の反応であり、運動性要素は屈筋による屈曲反射に代表される痛み刺激から身を守る防御運動である。もし動物実験においてこれら四要素すべてを表現するモデルができれば“痛みの動物モデル”の一つの理想型になると考えられる。

3. 痛みの動物モデル

痛みの研究において多くの痛みの動物モデルが考案されてきたが、基本的には動物に痛み（侵害noxious, nociceptive）刺激を加えてその生体反応を観察記録するのが一般的である。侵害刺激には、大きく物理的の刺激と化学的の刺激がある。Fig. 3にその代表的な方法を示す。物理的の侵害刺激には、動物の躯体（局所）や皮膚に急性的に圧力、^{8,9} 熱、^{10,11} 電気刺激¹²を加える手法があり、共に刺激後における動物の防御あるいは逃避・回避反応などを観察する比較的簡便な方法である。化学的の侵害刺激は、体内の特定部位に多種の化学物質¹³⁻¹⁵を急性的に注入して同様に観察記録を行う方法であるが、一部の手法はやや熟練を要する。なお、ホルマリン法¹³と尿酸塩法¹⁴は、慢性痛のモデルとして非常に有効な手法である。

以上の動物モデルは、Schmidt ら⁷の提唱した四要素を直接的に満たす表現型は存在せず、いずれかの要素を観察するに過ぎない。しかしながら、間接的あるいは部分的に四要素を観察できる方法が以下に述べる血管痛モデルである。

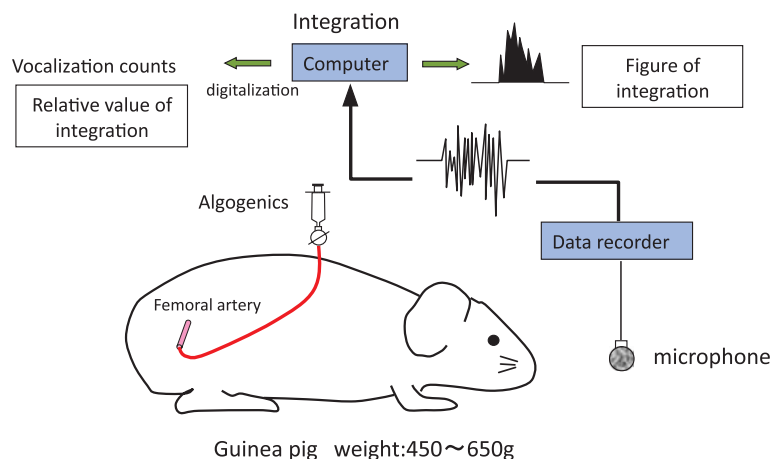


Fig. 4. Diagrammatic illustration of the measurement of algogenics-evoked vocalization responses.

4. 血管痛モデル

血管痛は、動脈あるいは静脈内に化学物質を注入して発現させる急性痛の一つであり、いわゆる化学的刺激による観察方法である。通常、用いられる血管は四肢の動脈である。血管の外膜やその周囲組織に知覚神経終末が存在し、¹⁶⁾ 動脈は特に神経繊維網が発達している。¹⁷⁾ Kunts¹⁸⁾ は交感神経切除により血管の神経網が消失することを観察し、Christensenら¹⁹⁾ は、知覚神経が通過する脊髄後根切断により外膜とその周囲組織のみの神経繊維の逆行性変性を認めており、血管痛は自律神経求心路の知覚神経を介して中枢神経に伝えられていると考えられている。従って、血管痛は解剖学的に内臓痛の分類に入ると思われるが、前述したとおり、一般的に四肢の血管痛は体性痛に包含される。^{1,20)}

4-1. 啼声反応モデル

侵害刺激を覚醒動物に与えると逃避行動とともに啼声（鳴き声）を発する。言葉を持たない動物の非言語的情動表現として、この啼声反応（vocalization response）はイヌを用いて古くから利用されている。²¹⁻²⁴⁾ 同様の理由でヒト乳幼児の診断でも痛みの強さの指標として使われる。²⁵⁾ なお、先人らの覚醒したイヌを用いた啼声反応が、研究の発展に大きく貢献したモデルではあるが、動物愛護の観点からすれば、現在推奨される方法ではない。そこで著者らは、小型哺乳動物であるモルモットが鳴きやすい特性を利用して、Adachi and Ishiiの手法²⁶⁾ を改良した血管痛による啼声反応モデルを作成した。^{27,28)} 本モデルの概要を Fig. 4 に示す。このモデルの特徴は、啼声反応を客観的に評価できることである。あらかじめ麻酔下で注入用ポリエチ

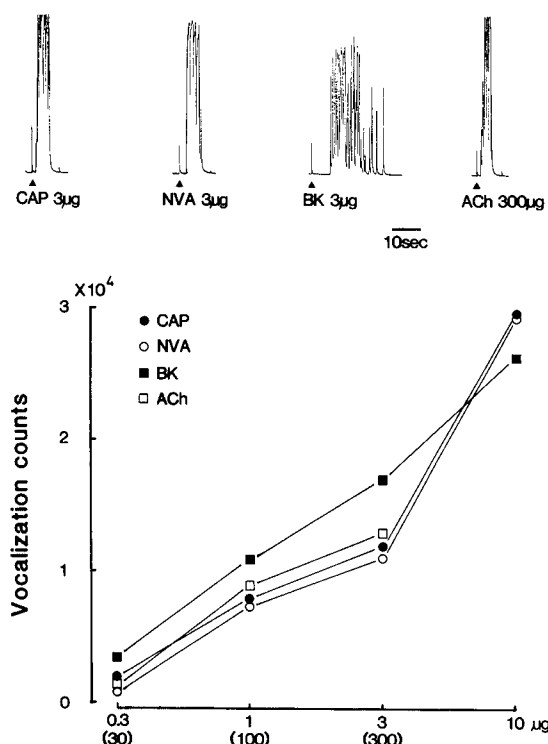


Fig. 5. Typical tracing of vocalization responses to intra-arterial injection of capsaicin (CAP), nonanoyl vanillylamide (NVA), bradykinin (BK) and ACh (upper). Lower figure shows vocalization counts for each increasing doses of algogenics. Value in parentheses are doses (μg) of ACh.

レン製カテーテルを、後肢伏在動脈（saphenous artery）を経由して大腿動脈（femoral artery）内へ留置し、術後7日以上経過してから実験に供する。実験時は反応の再現性を確保するため、ボールマージン内に入れ半拘束状態で実施する。反応の定性的観察には、啼声の録音後、off-lineでシグナルプロセッサ（コンピューター）にて啼声

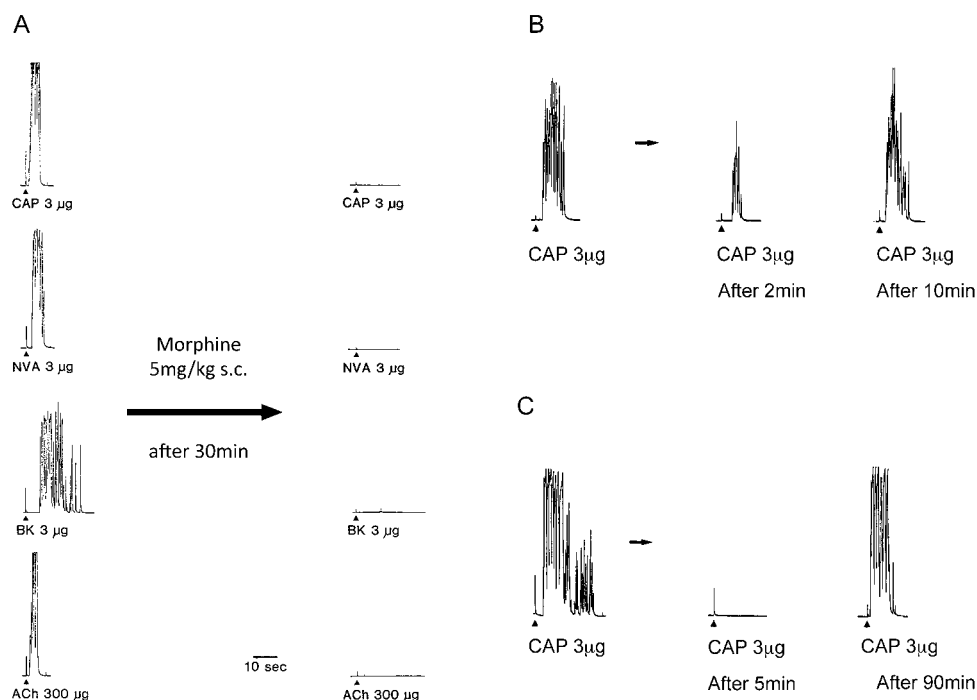


Fig. 6. Left panel (A) shows the effect of morphine on vocalization responses to intra-arterial injection of capsaicin (CAP, 3 μg), nonanoyl vanillylamide (NVA, 3 μg), bradykinin (BK, 3 μg) and ACh (300 μg). Right panel shows the effect of intra-arterial pre-infusion (B) and intra-thecal pre-injection with lidocaine (500 μg) on vocalization responses to intra-arterial injection of capsaicin (CAP, 3 μg).

の周波数を積分した積分図を用いる。また、定量的観察には、その積分値として数値化し、VC値 (Vocalization counts) とした。動脈内に種々の発痛物質を注入すると用量依存的に啼声反応 (積分図) と VC 値の増加が観察された (Fig. 5)。なお、鎮痛薬の morphine (Fig. 6A) によりすべての反応が消失し、さらに、capsaicin (CAP) の反応は、局所麻酔薬である lidocaine の動脈内 (Fig. 6B) および脊髄クモ膜下腔内 (Fig. 6C) への前投与により減弱もしくは消失したことから、本モデルが血管痛モデルとしての有用であることが確認された。

4-2. 屈筋反射モデル

屈筋による屈筋反射 (flexor reflex) モデルは以前より用いられている血管痛モデルである。Doiら²⁹⁾ および Akitaら³⁰⁾ は、除脳ウサギあるいは非麻酔下のラットを使って、後肢大腿動脈内への発痛物質投与誘発の後肢屈筋運動を観察し、種々の鎮痛薬の鎮痛効力について比較検討している。しかし、後肢の動きをキモグラフィオン上にヘーベルで記録する方法であり、定性的観察が可能でも定量的観察を行うには客観性に乏しい。また、除脳という非生理的条件および無麻酔状態での手法であり、動物の状態および結果の再現性に疑問が残る。著者ら

は、これらの点を考慮し、麻酔下で屈曲反応を定量化できる手法を編み出した。³¹⁾ それを urethane 麻酔ラットを用いた急性実験である (Fig. 7)。ラット左後肢の浅後腹壁動脈 (superficial caudal epigastric artery) から注入用ポリエチレン製カテーテルを大腿動脈との吻合部まで逆行性に挿入する。よって、発痛物質は大腿動脈内へ注入される。屈筋反射反応は、麻酔下での観察なので微細な屈筋の動きを捉えるため左後肢の屈筋である半腱様筋 (semitendinous muscle) もしくは大腿二頭筋 (biceps femoris muscle) から電極を用いて、単一もしくは複数の筋繊維の活動電位を導出する。導出した活動電位はアンプで増幅後、デジタルデータレコーダーに記録した。記録した活動電位は、啼声反応モデルと同様に off-line でシグナルプロセッサにて積分し、積分図と積分値を求める。なお、実験は直腸にサーミスターを挿入し、体温を一定に保つようにした。このモデルでの特徴は、Fig. 8 に示すように啼声反応モデルより CAP の用量が 1/20~1/10 に抑えられることである。すなわち、血管痛に関しては感受性が高いモデルであるということが分かる。実際に著者らが行ったある市販静脈麻酔薬の副作用の一つである血管痛の再

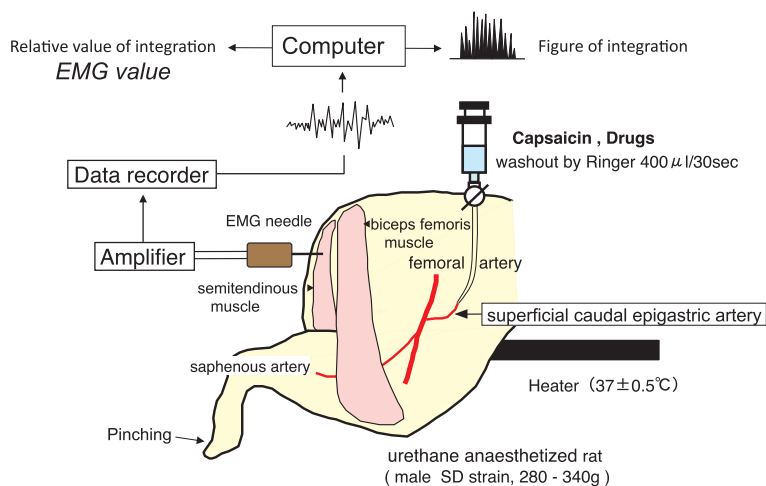


Fig. 7. Diagrammatic illustration of the measurement of algogenics-evoked hind limb flexor reflex.

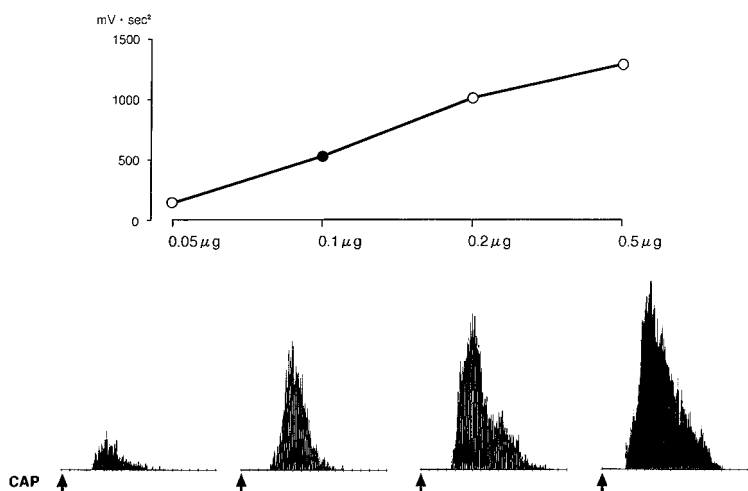


Fig. 8. Typical tracing of integrated EMG by flexor reflex to intra-arterial injection with increasing doses of capsaicin (CAP, lower figure). Upper figure shows EMG values for each increasing doses of capsaicin.

現ならびにその発痛機序の一端を明らかにすることができた。³²⁾

4-3. 循環器 parameter のゆらぎモデル

痛み反応の一つに自律神経系を介した種々の臓器レベルの反応を観察することができる。最も顕著に反応するのは心拍数と血圧の変化である。³³⁻³⁶⁾ 痛みが自律系を賦活させる大きな理由は、Fig. 1 に示すとおり解剖学的に痛みの情報は、情動系を経由して自律神経高位中枢へも伝えられており、両者間で痛み情報を共有していることによる。従って、自律系の反応は間接的に情動系の変化を表していることになる。ただし、従来の観察法は一時的な心拍数や血圧の変化を捉えるのみであり、ヒトが経験するような持続的な不快感を反映していない可能性がある。著者らは、通常持続的变化を

起こす情動成分を観察するため、屈筋反射モデルを發展させ、痛み四要素の自律系要素である心拍と血圧の“ゆらぎ (fluctuation)”を指標とする方法を作出したので紹介する。

一般的に心拍と血圧はそれぞれ循環器系の操作量および作業量として脳を介し互いの機能を反射的にフィードバック制御しており、定常状態 (steady state) ではその制御はゆっくり行われる。しかし、脳に痛み情報が伝わると外乱要因としてどちらか一方の作業量に変化が起こる。その結果、他の作業量にも変化が起こるが、その反応は素早く行われる (Fig. 9)。本モデルは、痛みによる心拍と血圧の作業量の周期的変動をゆらぎとして観察する手法である。動物モデルは屈筋反射モデルとほぼ同様であるが、血圧は発痛物質投与側と反

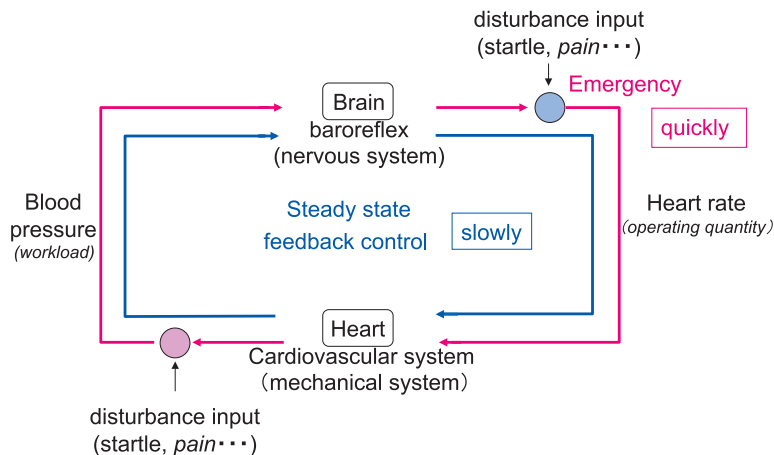


Fig. 9. A simple control model in association between heart rate and the blood pressure.

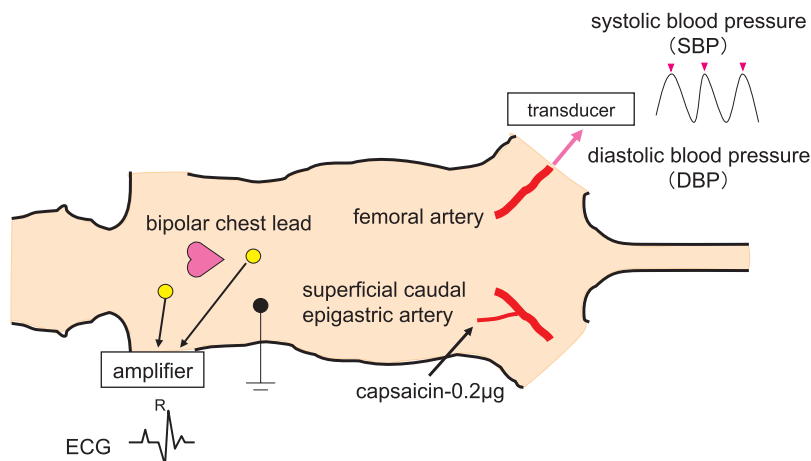


Fig. 10. A measurement diagram of heart rate and blood pressure in urethane anaesthetized rat.

対側の大腿動脈内にテフロン製カテーテルを直接挿入し、その末端を圧トランスジューサーに接続して観血的に測定する。心拍は、ラット胸部へ電極を植込み、双極誘導で導出する (Fig. 10)。血圧波形と心電図 (ECG) はデジタルデータレコーダーに記録させ、両者のゆらぎの解析は、off-line で personal computer で実施する。解析方法は、心拍間隔 (R 波と R 波の間隔; RRI) と血圧の収縮期圧 (systolic blood pressure; SBP) のゆらぎをウェーブレット法により、ゆらぎを構成する種々の周波数のパワー密度を時系列的に算出した。なお、マザーウェーブレットとして Morlet ら³⁷⁾ が提唱したモデルを使用した。

Fig. 11 に CAP 投与による心拍の RRI (msec) と SBP (mmHg) の実測値の変化 (上図) と投与前 (pre), 投与中 (stim), 投与後 (post) 30 秒間の個々のゆらぎのパワースペクトル密度 (PSD) を図の下に示す。CAP は RRI の短縮すなわち心拍数を

上昇させ、SBP を低下させるのが分かる。また、両者における測定値の揺らいでいる周期が 4 Hz 未満の帯域における PSD は、CAP 投与前よりも投与中および投与後のほうが増大することが観察され、痛みによる循環器系 parameter の変動が持続性を有していることが明確となった。これらのゆらぎ量をトータル PSD として求めてみるとその傾向が投与前と比較して有意な変化であることが示された (Fig. 12)。さらに、増大した投与中および投与後の PSD は、morphine により RRI 短縮および SBP 低下現象ともども著しく減少することも観察された (Fig. 13)。これらの観察結果から、本モデルが痛み成分の自律系要素のみならず、間接的に情動系要素も評価できる可能性を示唆するものと考えられる。

5. 結語

痛みは、時として堪え難い苦痛や不快感あるいは不安を引き起こし、QOL (quality of life) に重大な

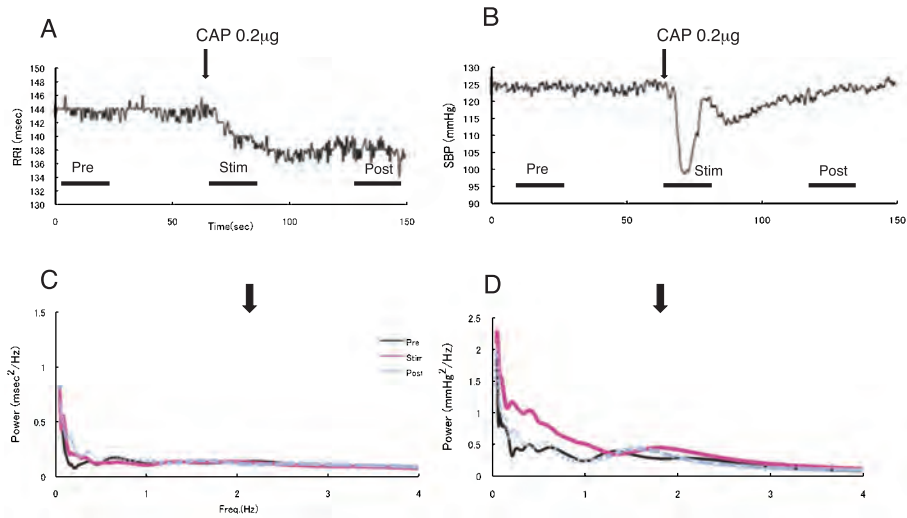


Fig. 11. Typical tracings of R-R interval (RRI), SBP (upper: A, B) and each PSD (power spectrum density, lower: C, D, average of 6 samples) obtained by intra-arterial capsaicin in rats. Arrows indicate injection timings of capsaicin.

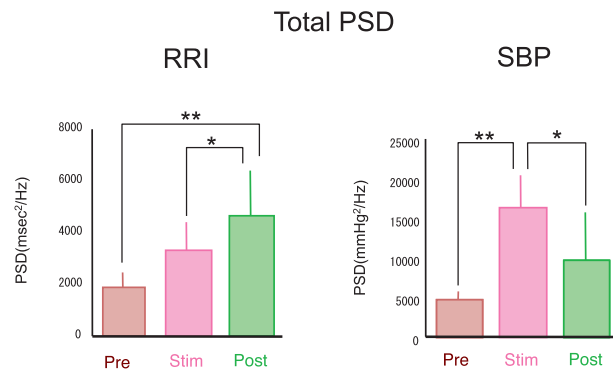


Fig. 12. Comparison of total PSD values of each period of RRI and SBP in capsaicin-injected group. (n=6). *P<0.05, **P<0.01 (Fisher's PLSD test).

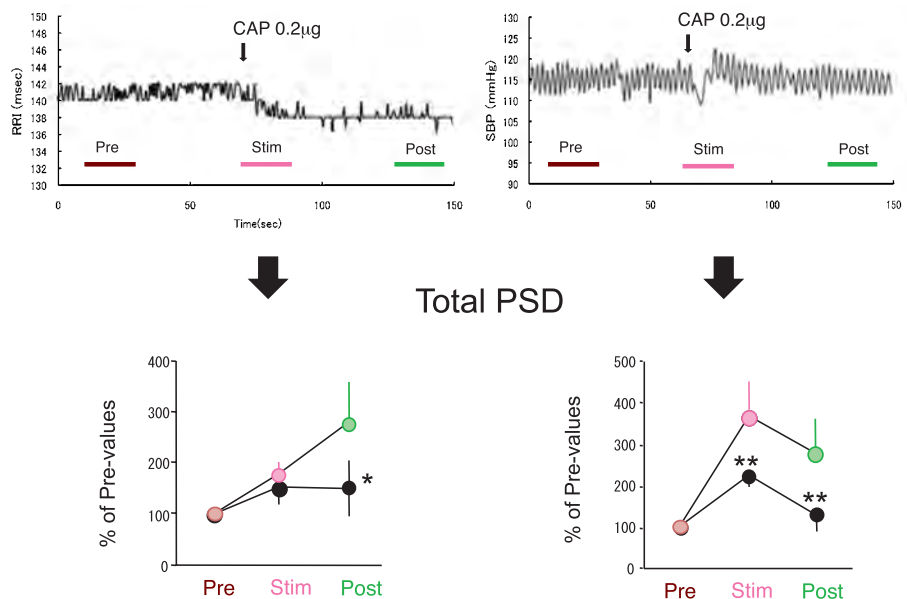


Fig. 13. Effects of morphine (●, 5mg/kg, s.c.) on RRI and SBP (upper), and total PSD values (lower) of each period of RRI, SBP in capsaicin-injected group. (n=6). *P<0.05, **P<0.01 (Fisher's PLSD test).

影響を与える場合がある。痛みを取り除く術は、痛み感覚の持つ特殊性によりいまだ完全ではなく、新規鎮痛薬の開発、除痛技術の開発等が精力的に世界中で続けられている。そのためにもよりヒトの痛みに近似し、かつ客観性に富む生理的条件下で実施できる動物モデルが早急に考案されることが望まれる。

REFERENCES

- 1) Taira N., "Pain-basis and clinics," ed. by Ichioka M., Nakahama H., Yamamura H., Asakura Publishing Co. Ltd., Tokyo, 1980, pp. 39–44.
- 2) The Subcommittee on Taxonomy of International Association for the Study of Pain, *Pain*, **6**, 247–253 (1979).
- 3) Kenshalo D. R., Giesler G. J., Leonard R. B., Willis W. G., *J. Neurophysiol.*, **43**, 1594–1614 (1980).
- 4) Mehler W. R., *Anat. Record*, **113**, 421–425 (1952).
- 5) Andoh R., Shima K., Miyagawa T., Sakurada S., Kisara K., Ohsawa K., Takahashi M., *Jpn. J. Pharmacol.*, **30**, 599–605 (1980).
- 6) Scherrington, C. S., *J. Physiol.*, **34**, 1–50 (1906).
- 7) Schmidt R. F., "Fundamentals of Sensory Physiology," ed. by Schmidt R. F., Springer-Verlag, Berlin, 1980, pp. 120–122.
- 8) Haffner F., *Deut. Med. Wochenscher*, **55**, 731–733 (1929).
- 9) Randall L. O., Sellitto J. J., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **111**, 409–419 (1957).
- 10) van Erick A. J., Bock J., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **189**, 384–387 (1971).
- 11) D'Amour F. E., Smith D. L., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **72**, 74–79 (1941).
- 12) Molinengo L., *Psychopharmacologia*, **6**, 347–367 (1964).
- 13) Dubuisson D., Deniss S. G., *Pain*, **4**, 161–174 (1977).
- 14) Inase M., Nakahama H., Otsuki T., Fang J. Z., *Brain Res.*, **426**, 205–211 (1987).
- 15) Seybold V. S., Hylden J. L., Wilcox G. L., *Peptides*, **3**, 49–54 (1982).
- 16) Woollard H. H., Weddell G., *J. Anat.*, **69**, 165–176 (1935).
- 17) Mitchell J. R., Adams J. H., *Atherosclerosis*, **27**, 437–446 (1977).
- 18) Kuntz A., *South Med. J.*, **48**, 338–344 (1955).
- 19) Christensen K., Polley E. H., Lewis E., *J. Comp. Neurol.*, **96**, 71–91 (1952).
- 20) Beck P. W., Handwerker H. O., *Pflugers Arch.*, **11**, 209–222 (1974).
- 21) Carroll M. N., Lim R. K., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **125**, 383–403 (1960).
- 22) Guzman F., Braun C., Lim R. K., Potter G. D., Rodgers D. W., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **149**, 571–588 (1964).
- 23) Hirata M., Tanaka S., Taira N., Hashimoto K., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **162**, 150–161 (1966).
- 24) Taira N., Nakano T., *Eur. J. Pharmacol.*, **25**, 113–116 (1974).
- 25) Bieri D., Reeve R. A., Champion G. D., Addicoat L., Ziegler J. B., *Pain*, **41**, 139–150 (1990).
- 26) Adachi K., Ishii Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **209**, 117–124 (1979).
- 27) Andoh R., Sakurada S., Kisara K., Takahashi M., Ohsawa K., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **79**, 275–283 (1982).
- 28) Ando R., Watanabe C., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **112**, 363–370 (1998).
- 29) Doi T., Akaike A., Ohashi M., Satoh M., Takagi H., *Jpn. J. Pharmacol.*, **26**, 634–637 (1976).
- 30) Akita S., Satoh M., Takagi H., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **86**, 257–260 (1985).
- 31) Ando R., Yonezawa A., Watanabe C., Kawamura S., *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **26**, 109–115 (2004).
- 32) Ando R., Watanabe C., *Br. J. Anaesth.*, **95**, 384–392 (2005).
- 33) Sato A., Sato Y., Shimada F., Torigata Y., *Brain Res.*, **110**, 301–311 (1976).
- 34) Kaufman A., Sato A., Sato Y., Sugimoto H., *Neuroscience*, **2**, 103–109 (1977).
- 35) Kametani H., Sato A., Sato Y., Simpson A., *J. Physiol.*, **294**, 407–418 (1979).
- 36) Krauthamer G., Mcguinness C., Gottesman L., *Brain Res. Bull.*, **2**, 299–306 (1977).
- 37) Morlet D., Peyrin F., Desseigne P., Touboul P., Rubel P., *J. Electrocardiol.*, **26**, 311–320 (1993).