

〔研究ノート〕

不活動初期のラット脊髄後角におけるミクログリア活性

肥田 朋子¹, 中川 達貴²

要 旨

慢性痛の発症には種々の原因が考えられているが、その一つとしてミクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞を含む中枢神経系の活性化が関与していることが明らかにされてきている。我々は、慢性痛モデルの一つとしてラット後肢をギプス固定することで不活動状態を作製し、これまでに末梢組織の変化について検討を行ってきた。しかし、本モデルにおける中枢神経系の変化についてはまだ調べられていない。そこで、ラット不活動モデル動物を用いて、不活動1週目と2週目における脊髄後角でミクログリアの活性をその細胞数から検討した。その結果、不活動2週目には皮膚ならびに筋の機械痛覚閾値の低下が認められたが、ミクログリアの細胞数は健常群と同等であった。このことから、末梢でのイベントの方が痛覚閾値への影響が大きい可能性が示されたが、ミクログリアの活性の評価方法や、より詳細なタイミングでのさらなる検討が必要である。

キーワード：不活動, ミクログリア, ラット

はじめに

複合性局所疼痛症候群（以下CRPS）タイプIIと呼ばれる病態は、主に末梢神経損傷後に遷延する慢性痛を有する特徴があるが、その痛みの発生には、末梢神経の過活動や可塑的な機能変化だけでなく、ミクログリアなどグリア細胞を含む中枢神経系の可塑的な変化が影響していることが知られている [1, 2, 5, 14]。一方、明らかな神経損傷のない病態、例えば線維筋痛

症や慢性疲労症候群、ギプス固定などによって生じる痛みはCRPSタイプIとして分類され、原疾患に局限しない広い領域でのアロディニアや痛覚過敏を示す。また、明らかな組織損傷や炎症徴候を認めない長期臥床者においても体位変換などの体動時や関節運動時にアロディニアや痛覚過敏のような痛みが認められ、不活動によって痛みが生じることは臨床でも広く観察されている。これらのCRPSタイプIにおいても中枢神経系で免疫機能を担っているアストロ

1 名古屋学院大学 リハビリテーション学部

2 金沢大学大学院 医薬保健学総合研究科

Correspondence to: Tomoko Koeda

E-mail: tomokoed@ngu.ac.jp

Received 13 December, 2019

Accepted 19 December, 2019

サイトやミクログリアは、細胞肥大等の形態学的変化や脊髄後角において集積することが確認されており、このことが慢性痛を引き起こす一因となっている [12, 15]。

我々はこれまでに、ラット両後肢をギプス固定することで、このような不活動状態を模したモデル動物を作製し、皮膚ならびに筋機械痛覚閾値の低下を行動学的な評価から示した [7, 11]。また、このモデルで短縮位を強制保持させられる腓腹筋において、筋の壊死像や再生像はほとんど観察されず、明らかな損傷や炎症が認められない状態であることも客観的に示した [6]。さらに、末梢においては発痛因子である神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) が皮膚や筋で発現増加し、ホットパックは皮膚や筋の機械痛覚閾値低下を改善させ、NGF発現を抑制することも報告した [4, 10]。ミクログリアは、自身がNGFを産生したり、逆にNGFによって走化性を誘導されNGFを取り込むことが報告されており、末梢に限らず中枢神経系においても神経細胞の成長・維持に関与している [3]。このことから、本モデルにおいてもミクログリアが疼痛発生に関与している可能性が考えられるが、まだ明らかではない。そこで、今回の研究では、ラット両後肢をギプス固定した不活動モデルで不活動状態2週間におけるミクログリアの活性状況を明らかにすることを目的として実験を行った。

対象と方法

1) 対象

対象はWistar系雄性ラット (SLC社製) 11匹で、Normal群3匹、ギプスで両後肢を伸展位に固定する不活動群8匹とした。不活動群はその期間を1週間と2週間の2群 (それぞれ

1wk, 2wks群) 各4匹とした。不活動モデルの作製は、先の研究 [7] に準じた。簡潔に述べると、イソフルラン吸入麻酔下にて、足関節底屈位、膝伸展位で足趾基部から膝関節直上まで、ニトリートCBテープ (日東メディカル社製) を巻き、その上からプラスランギプス (ALCARE社製) を巻いた。ラットは両後肢の使用がある程度制限されるが、高這いで四足歩行あるいは前肢を主に使用した摺り這いで自由にケージ内を移動できた。ギプスは行動評価時に一時的に外すため、その都度巻き直した。飼育条件は温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、12時間の明暗サイクルとし、水と飼料は自由摂取とした。

2) 行動評価

皮膚ならびに筋の機械痛覚閾値は不活動前、不活動1週、2週目で週に5日間測定したものを平均した。また、1wk群の不活動前、2wks群の不活動前ならびに不活動1週目の測定値は各時期に含めた。そのほか、別の実験で影響のない範囲で同様に行動評価を行った動物も含めため、最終的な対象数はNormal群12匹、1wk群12匹、2wks群6匹であった。

皮膚の機械痛覚閾値は、先の研究 [9] に準じ、イソフルラン吸入麻酔下でギプスを除去した後に、両後肢を出した状態で保持できるネット上に吊り下げ、麻酔から十分覚醒したことを確認したのちに、8～34 gまで2 g間隔で自作した von Frey filaments を用いて up-down 法で測定した。

腓腹筋内側頭部の筋機械痛覚閾値は、先の研究 [11] に準じ、Randall-Selitto 装置 (Ugo Basile 社製) を用いて測定した。

3) ミクログリアの染色

1wk群と2wks群は各不活動期間終了時、Normal群は2wks群と同時期にイソフルラン吸入麻酔後ペントバルビタールナトリウム水溶液 (Somnolently, 共立製薬株式会社) 40 mg/kgを腹腔内投与し、0.1M Phosphate-Buffered Saline pH7.6 (PBS) と4%ゼンボン液で灌流固定後に脊髄を取り出した。脊髄は後固定ののち、30% Sucrose-PBS溶液で置換し、L4/5の脊髄を切り出し、OCTコンパウンド (Tissue Tek) に包埋し、クリオスタット (Leica) で10 μm厚に薄切しプレパラートを作成した後、免疫染色に供するまで-80°Cで保存した。切片は、0.05 M Tris-Buffered Saline pH7.6 (TBS) で洗浄後、0.3% Triton-TBS溶液にて非特異的反応のブロッキング処理を施した。その後、切片は、抗 ionized calcium-binding adapter molecule-1 (Iba1) 抗体 (Wako) を1000倍希釈した反応液に4°Cで48時間反応させた。TBS溶液での洗浄後、Biotin化二次抗体反応液に室温で2時間反応させた。TBS溶液で洗浄後、ABC-DAB法で発色させ、脱水・透徹処理後、切片を封入した。

4) 画像解析

染色した標本は、光学顕微鏡 (BX53,

Olympus) にて観察を行い、付帯したカメラシステム (DP72, Olympus) にて撮影し、デジタルデータとしてPCに取り込んだ。ミクログリアの数を確認するために撮影した画像は、画像解析ソフト Image Jを用いて、脊髄後角表層におけるIba1陽性細胞数を計測した。

5) 統計処理

統計には統計ソフト R2.8.1を使用し、繰り返しのある反復測定、1元配置分散分析法を用い、有意水準は5%未満とした。

なお、本実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従い、名古屋学院大学動物実験委員会の承認 (2007-004) を得て行った。

結果

1) 行動評価

皮膚痛覚閾値は、不活動前235.5 ± 4.8, 1週目222.4 ± 11.9, 2週目155.7 ± 30.9 mNで、2週目の皮膚痛覚閾値は他の時期と有意差を認めた (図1)。筋機械痛覚閾値は、順に1735.3 ± 53.0, 1644.7 ± 46.1, 1311.5 ± 107.9 mNであり、2週目の筋機械痛覚閾値も他の時期と有意差を認めた (図1)。

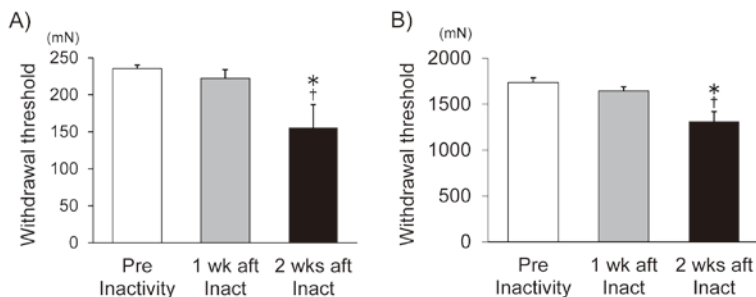


図1 A) 皮膚, B) 腓腹筋における機械痛覚閾値
白が不活動前, グレーが不活動1週目, 黒が不活動2週目の逃避閾値を示す。

* : p < 0.05 vs Normal, † : p < 0.05 vs 1wk

2) 脊髄後角における Iba1 陽性ミクログリア細胞数

免疫染色法にて各群の脊髄でミクログリアを観察された (図2)。脊髄後角におけるミクログリア細胞数は, Normal群が 45.8 ± 2.3 , 1wk群が 37.7 ± 3.1 , 2wks群が 45.8 ± 3.5 であり, 3群間に有意差を認めなかった (図2)。

考察

慢性痛が引き起こされる病態は末梢組織の機能変化によるものだけでなく, グリア細胞を含む中枢神経系の形態や機能変化の影響も大きく, 多岐にわたっている。慢性痛病態を探る目的で, 神経損傷を伴う慢性疼痛モデルや炎症性

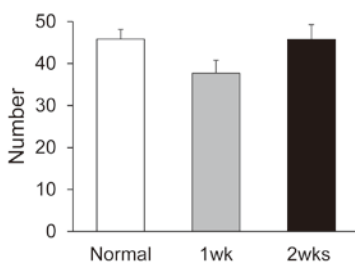
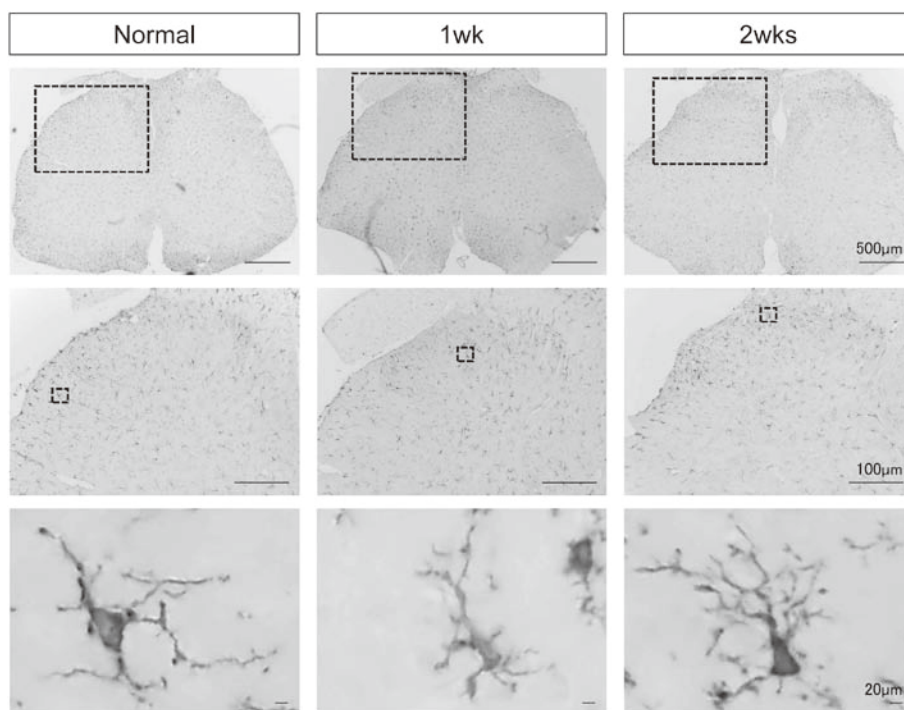


図2 脊髄における Iba1 陽性細胞

上図左から順に Normal 群, 1wk 群, 2wks 群の脊髄における Iba1 陽性細胞の染色例である。上段は, 低倍率像 (x4) で撮影した染色像を示す。中段は上段の点線枠部の高倍率像 (x10) を示す。下段は, 中段の点線枠線部の高倍率像 (x40) を示す。

グラフは, 上図のような Iba1 陽性細胞の数をカウントしたまとめである。白が Normal 群, グレーが 1wk 群, 黒が 2wks 群を示す。

疼痛, 不活動性疼痛モデルなど様々な慢性痛モデル動物で検討されているが, これら多くのモデルでミクログリアの細胞数の増加と活性化などといった中枢神経系の関与が知られている。すなわち生理的条件下のミクログリアは, 小さな細胞体と多数の突起を有する形態であるが, 組織損傷後のミクログリアは, 突起が退縮し細胞体が肥大化するとともに, 脊髄後角においてミクログリアの細胞数が増加する [8]。Freundの完全アジュバントを用いた持続炎症性の慢性疼痛モデル動物では起炎剤投与3~4日後以降にミクログリアの活性化が認められている [13]。ギプス固定解除後に発症する疼痛のモデル動物においては, 解除早期にミクログリアの, 5週後にはアストロサイトの細胞数増加が認められている [12]。また, 同じくCRPSタイプIに属する慢性疲労症候群のモデルにおいては, ストレス負荷5日後の脊髄でミクログリアの細胞集積と活性化が確認され, 筋の機械刺激に対するアロディニアや痛覚過敏がミクログリアの活性化を介して生じていることが報告されている [15]。今回, ギプス固定による不活動状態を作製した1週目と2週目において, ミクログリアの細胞増殖が認められるかどうか検討した。本モデルでは, 不活動1週目では皮膚や筋における機械痛覚閾値の低下は認めておらず, 不活動2週目に機械痛覚閾値の低下を認めた。しかし, 不活動1週目と2週目のミクログリア細胞数は健常群と差がなく, ミクログリアの細胞集積は認められなかった。すなわち, 行動学的に疼痛閾値低下を認めたタイミングであってもミクログリアの細胞増殖は認められなかった。このことは, 本モデルにおける疼痛発生には末梢で生じている種々の変化の影響が大きい可能性が示された。しかし, 本研究ではミクログリアの活性化に関して, 十分な

検討を行うことができなかった。今後は, 活性化型ミクログリアの特異的な細胞マーカーであるCD11b [16] 等を用いてさらに検討していく必要がある。

また, 種々の疼痛モデルによりミクログリアの活性化や細胞増殖するタイミングには差があることから, 本モデルにおける疼痛発生にミクログリアは影響しないと結論付けるためには, より細かなタイミングでの確認が必要であり, この点についても検討が必要である。

本研究は2018年度名古屋学院大学研究助成「不活動に伴う痛み発症におけるNGFを介した分子機構の解明」による成果である。

文献

- [1] Amir R, Devor M. (1993) Ongoing activity in neuroma afferents bearing retrograde sprouts. *Brain Res* 630(1-2): 283-8
- [2] Clark AK, Gentry C, Bradbury EJ, McMahon SB, Malcangio M. (2007) Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation. *Eur J Pain*. 11; 223-30.
- [3] Gilad GM, Gilad VH. (1995) Chemotaxis and accumulation of nerve growth factor by microglia and macrophages. *J Neurosci Res*. 41: 594-602.
- [4] Hiraga S, Koeda T, Hori K, Nakata H, Nakagawa T, Iseki S, Ozaki N. (2016) NGF increased in skeletal muscle has a role in muscular mechanical hyperalgesia in inactivity model. *The 16th World Congress on Pain*.
- [5] Inoue K, Tsuda M. (2018) Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat*

- Rev Neurosci. 19: 138-52.
- [6] 肥田朋子, 冲向雄也, 榊原拓哉, 堀田昌志, 野村達也, 中田智章, 井筒孝憲, 田崎洋光, 平賀慎一郎. (2016) 関節不動化による不活動モデルにおける疼痛発生ならびに筋萎縮に対するトレッドミル走の効果. 名古屋学院大学論集 医学・健康科学・スポーツ科学篇 4(2): 1-8.
- [7] 肥田朋子, 榊原拓哉, 冲向雄也, 堀田昌志, 野村達也, 中田智章, 井筒孝憲, 平賀慎一郎, 松原崇紀, 田崎洋光. (2013) 関節不動化による関節可動域制限と疼痛発生に対するストレッチングの効果. 名古屋学院大学論集 医学・健康科学・スポーツ科学篇. 1(2): 1-9
- [8] Kohno K, Kitano J, Kohro Y, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Tsuda M. (2018) Temporal Kinetics of microgliosis in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury in rodents. *Biol Pharm Bull.* 41: 1096-102
- [9] 松沢匠, 飯田圭紀, 谷口誠基, 松原早希, 川原有紀子, 肥田朋子. (2016) 不活動に伴う疼痛発生に対する自由運動の効果. 名古屋学院大学論集 医学・健康科学・スポーツ科学篇. 5(1): 15-22
- [10] Nakagawa T, Hiraga S, Mizumura K, Hori K, Ozaki N, Koeda T. (2018) Topical thermal therapy with hot packs suppresses physical inactivity-induced mechanical hyperalgesia and up-regulation of NGF. *J Physiol Sci* 68(5): 629-37
- [11] 中村浩輔, 酒井成輝, 水野奈緒, 肥田朋子. (2015) 不動化に陥る前の運動が疼痛発生に及ぼす影響—ラットを用いたトレッドミル走での検討—. 名古屋学院大学論集 医学・健康科学・スポーツ科学篇. 3(2): 9-16
- [12] Ohmichi M, Ohmichi Y, Ohishi H, Yoshimoto T, Morimoto A, Li Y, Sakurai H, Nakano T, Sato J. (2014) Activated spinal astrocytes are involved in the maintenance of chronic widespread mechanical hyperalgesia after cast immobilization. *Molecular pain.* 10: 6-18
- [13] Raghavendra V, Tanga FY, DeLeo JA. (2004) Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur J Neurosci.* 20: 467-73.
- [14] Tsuda M, Masuda T, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. (2013) Microglial regulation of neuropathic pain. *J Pharmacol Sci* 121: 89-94.
- [15] Yasui M, Yoshimura T, Takeuchi S, Tokizane K, Tsuda M, Inoue K, Kiyama H. (2014) A chronic fatigue syndrome model demonstrates mechanical allodynia and muscular hyperalgesia via spinal microglial activation. *Glia* 62(9): 1407-17.
- [16] Yasui m, Menjo Y, Tokizane K, Shiozawa A, Tsuda M, Inoue K, Kiyama H. (2019) Hyperactivation of proprioceptors induces microglia-mediated long-lasting pain in a rat model of chronic fatigue syndrome. *J Neuroinflammation.* 16(1): 67, doi: 10.1186/s12974-019-1456-x.

[Research Note]

Activation of microglia cells in spinal dorsal horn in rats at an early stage of inactivation

Tomoko Koeda¹, Tatsuki Nakagawa²

Abstract

Various causes are considered to the onset of chronic pain, and one of them has been identified with the involvement of glial cells such as microglia and astrocyte in the activation of the central nervous system. For a chronic pain models we have used inactive rats with immobilized hind limbs, and have examined the changes in mechanical pain threshold and substance induced pain in the dorsal root ganglia. However, we have not yet examined if this inactivity pain is involved in the central nervous systems. Therefore, we examined the number of microglia cells in the spinal dorsal horn at the first and second week of inactivity using inactive models. As a result, at the second week of inactivity, the skin and muscle mechanical pain threshold was decreased, however, the number of microglia cells was the same as that in the normal group. This suggests that peripheral events may have a greater effect on the pain threshold, however, further evaluation methods for microglia activity and more detailed timing are required.

Keywords: inactivity, microglia, rats

1 Department of Physical Therapy, Faculty of Rehabilitation Sciences, Nagoya Gakuin University

2 Department of Functional Anatomy, Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University