

〔原著〕

マクロファージは神経成長因子を介した ラット不活動性疼痛に影響を与えない

肥田 朋子¹, 萩原 光²
小柳 リサ³, 福井 那奈⁴
渡邊 晶規¹, 伊東 佑太¹

要 旨

ギプス固定解除後や日常の不活動によって、筋などに損傷が認められないにも関わらず疼痛が出現することが明らかになっている。この疼痛には神経成長因子(NGF)の関与が認められているものの、どこから産生されているか明らかではない。また、マクロファージも疼痛への関与が報告されており、マクロファージはNGFを産生することから、マクロファージがNGF産生ならびに疼痛発生に与える影響について調べた。ギプス固定3日前から固定期間中に繰り返しマクロファージ枯渇剤を投与し、その間の皮膚ならびに筋の機械痛覚閾値の変化と、筋におけるNGFタンパク量や後根神経節のNGF陽性細胞数を調べた。その結果、マクロファージ枯渇剤を投与した動物でも皮膚・筋機械痛覚閾値の低下が認められ、筋におけるNGFタンパク量や後根神経節のNGF陽性細胞数に差は認められなかった。これらのことから不活動による疼痛発生にマクロファージは影響を及ぼしていないと結論した。

キーワード：不活動性疼痛，マクロファージ，クロドロン酸，神経成長因子，ラット

序文

骨折の修復には、保存療法として一定期間ギプスで患部を固定して骨癒合を進めることがある。ギプス解除後は、骨癒合が進んでおり骨折による疼痛は消失していると考えられるもの

の、関節運動を行うと痛みが生じることがある。一方、骨折していない健常ボランティアに対してもギプス固定を施した後においても、冷痛覚過敏や機械アロディニアが生じることが報告されている [26]。また、外傷以外の疾患において臥床状態を余儀なくされた患者が、体位変換な

1 名古屋学院大学 リハビリテーション学部

2 自宅

3 済衆館病院 リハビリテーション科

4 株式会社東京リハビリテーションサービス

筆頭著者連絡先：052-678-4078（内5710）

Correspondence to: Tomoko Koeda

Email: tomokoed@ngu.ac.jp

Received 24 August, 2022

Accepted 16 September, 2022

どの動作時に痛みを訴えることが経験されている。さらには、3か月以上持続する運動器疼痛を有する人の職業分布をみると、必ずしも肉体労働者に多いのではなく、むしろ専門職などデスクワークの方に多く、また大都市圏ほど慢性疼痛患者が多い傾向にあった [17]。この時の調査に回答した人々を対象としたその後の調査では、慢性運動器疼痛のリスク因子として専門職、管理職、事務職などの職業、配偶者の有無などが報告されている [18]。このように不活動による疼痛発生が慢性疼痛の一因として注目され、このような疼痛は不活動性疼痛と呼ばれるようになってきている [21]。

不活動性疼痛の発症メカニズムを調べるために、筆者らはラットを用いて両後肢を膝から足趾基部までギプスで伸展位に固定する不活動モデルを作製して実験を行ってきた。このモデルは当初関節拘縮モデルとして作製されており [20]、関節可動域制限や筋萎縮などの廃用症候群を呈することが明らかとなっている [7, 8, 20, 29]。その検証の結果、皮膚の機械感受性の亢進だけでなく、固定期間の延長に伴い筋機械痛覚閾値が低下することも確認し [16]、運動器慢性疼痛のメカニズム解明に有用なモデルとして種々の理学療法効果についても検討してきた [8, 11, 15, 16]。

この痛覚閾値低下に影響を及ぼす因子として神経成長因子 (nerve growth factor; NGF) やインターロイキン 1β の関与などが報告されている [15, 19]。NGFは名前の通り神経の成長に欠かせない物質であるが、発痛物質としても注目されており [9]、健常ボランティアを被験者としたNGFの静脈内注射、皮下注射、筋肉内注射で筋痛や圧痛閾値の低下などが生じたことが報告されている [22, 25]。NGFは特に炎症下においては肥満細胞、マクロファージ、

シュワン細胞など多くの細胞から産生されていることが報告されている [23] が、筋細胞から分泌されることも報告されている [1]。しかし、我々の用いている不活動性疼痛モデル動物において、NGFがどこから分泌されているかは明らかではない。不活動状態にさらされると廃用性の筋萎縮が生じるとの報告 [2] や、筋萎縮にはマクロファージが関与しているとの報告 [5] がある。また、マクロファージが痛みを引き起こしているという報告もある [4]。不活動性疼痛に対するマクロファージの直接関与あるいはNGFの発現にマクロファージが関与しているかなどのメカニズムを明らかにすることは、不活動性疼痛の予防や緩和に役立つと考えられる。そこで、我々はマクロファージの枯渇剤を用いて、マクロファージの活性を抑制した状況での疼痛発生とNGF分泌状況への影響について調べることを目的に実験を行った。

対象と方法

本研究は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。

1) 対象

対象は8週齢のWistar系雄性ラット8匹とし、1週間自由飼育した後、それらを実験動物として3週間ギプス固定する群 (Immobi群, 3匹)、ギプス固定開始3日前からマクロファージ枯渇剤を投与しながら3週間固定する群 (Immobi 3w+Clod群, 3匹)、同様にマクロファージ枯渇剤を投与しながら2週間固定する群 (Immobi 2w+Clod群, 2匹) の3群に振り分けた。全期間を通じ明暗12時間サイクルの飼育室で給水と餌は自由に摂取できる環境で飼育した。

2) マクロファージ枯渇剤

マクロファージ枯渇剤には先行研究 [28] を参考に、クロドロン酸をリボソーム化した試薬、Clophosome-N (F70101C-N, FormuMax Scientific Inc.) を用いた。リボソームは細胞膜への透過性を高めるため、リボソーム化したクロドロン酸はマクロファージに貪食されやすくなる。貪食されたクロドロン酸はATP代謝を阻害し、結果的にマクロファージを死滅させる。Immobi群を除く2群に対し、ギプス固定開始3日前にマクロファージ枯渇剤70 mg/kgを腹腔内投与し、初回投与4日（ギプス固定開始翌日）以降は2日おきに17.5 mg/kgを腹腔投与し続けた。投与後は、しばらく観察し異常行動が認められないことを確認した。マクロファージ枯渇剤の効果は、後述する腓腹筋の組織学的解析により確認した。

3) ギプス固定

ギプス固定は、以前の報告 [16] に倣い両後肢の膝関節から足部までを伸展位にギプス固定したが、疼痛行動評価時あるいは固定が不十分な状況が見受けられた際には適宜ギプスをまき直した。

4) 痛覚閾値測定

全対象に対して皮膚機械痛覚閾値と筋機械痛覚閾値を固定期間中5日/週測定した。両測定方法は先の研究 [11] に準じ、麻酔下でギプスを解除した後、十分な覚醒を確認してから実施した。全対象の測定を行ったが、比較はImmobi群とImmobi 3w+Clod群とし、固定前から固定後3週間調べた。Immobi2w+Clod群は参考値とした。

5) 筋採取ならびに後根神経節細胞採取

腓腹筋採取はペントバルビタールナトリウム水溶液（40 mg/kg, ソムノベンチル, 共立製薬）を腹腔内投与した深麻酔下でギプス固定2ないし3週間後に行った。腓腹筋の起始部に近い筋腹から60 mg前後を採取し、マイクロチューブ内に入れた状態のまま液化窒素内で急速凍結させた。残りの腓腹筋は以前の報告 [6] の方法に準じてコルク台に腓腹筋を垂直に立てた状態の凍結筋を作製した。腓腹筋採取後は以前の報告 [11] の方法に準じて灌流固定を行い、固定液のスクロース溶液置換後、第4～6腰髄後根神経節（L4～L6 DRG）の凍結ブロックを作製した。

6) 筋の組織学的解析ならびに生化学的解析

腓腹筋の組織学的解析は凍結筋の横断薄切片の免疫組織化学染色法により行った。凍結筋は-20℃に設定したクライオスタット (CM1860, Leica) で筋腹最大周径部辺りまで切り出した後10 μ m厚に筋腹の長軸を横断する方向に薄切した。その凍結切片を用いてマクロファージに特異的な抗CD-68抗体の免疫組織化学染色を行った。その際、核染色には4',6'-ジァミジノ-2-フェニルインドール（以下DAPI, D9564, Sigma-Aldrich）を用いた。具体的な染色方法は以前の報告 [6] に準じて行い、封入後、蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus) に付帯したカメラシステム (DP21, Olympus) で各励起による染色像を400倍で観察、撮影し、デジタルデータとしてPCに取り込んだ。励起を変えて取り込んだ同一視野の画像は画像ソフトphotoshop (CS4, Adobe) にて重ね合わせ (以下, merge), CD-68陽性かつDAPI染色による核が認められる細胞をマクロファージと判断し、画像解析ソフト (ImageJ) を用いて、その集

積数をカウントし、単位面積当たりの陽性細胞数を算出し、中央値を求めて3群間で比較した。

生化学的解析は Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で行った。急速凍結させた腓腹筋は、PIPA Lysis Buffer System (sc-24948, Santa Cruz) を用いてマイクロチューブ内で破碎処理を行い、タンパク質を抽出した。破碎処理溶液は5000回転の遠心機 (5810R, Eppendorf) を用いて4℃で30分間遠心し、上清を測定試料とした。各試料はマイクロプレートのウェルに入れ、BCA Protein Assay Kit (23225/23227, Thermo Scientific) を用いて反応させ、吸光度をプレートリーダー (Varioskan LUX, Thermo Scientific) で読み取り、既知のアルブミン量から作成された検量線を基に、各試料に含まれる総タンパク量を算出した。またNGFタンパク量の測定にはNGF ELISA kit (KA0401, Abnova) を用いた。マイクロプレートのウェルに標準量のNGFと各試料を入れ37℃で90分間ブロッキング処理させた後、ビオチン化抗NGF抗体をウェルに入れ、37℃で60分反応させた。PBSで洗浄後アビジン-ビオチン複合体をウェルに入れ、37℃で30分反応させたものを3,3',5,5'-tetramethylbenzidine base (TMB) で発色させた。色止め溶液を追加した後、それらの吸光度を先述したプレートリーダーで測定した。既知のNGFタンパク量の吸光度から検量線を作成し、各試料のNGFタンパク量を算出した。得られたNGFタンパク量から、試料の総タンパク質1 mg中に含まれるNGFタンパク量を算出し、中央値を求めて3群間で比較した。

7) DRGの組織学的解析

DRGの組織学的解析はL4～L6凍結DRGブ

ロックを先述したクライオスタットで10 μ m厚の薄切片にしたうえで免疫組織化学染色法により行った。薄切片は、0.1 Mリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.6) で洗浄後、3%ウシ血清アルブミン (BSA) /PBSで40分間ブロッキング処理した後、一次抗体であるウサギ抗NGFポリクロナール抗体 (1:200, M20/sc-549, Santa Cruz) をのせ、37℃で60分反応させた。1% BSA/PBSで洗浄後、二次抗体であるAlexa fluor 568® ヤギ抗ウサギIgG抗体 (1:200, A11011, Thermo Fisher) およびDAPI (1:10000, Sigma) の混合液をのせ、遮光して37℃で45分間反応させた。洗浄、封入後、蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus) に付帯したカメラシステム (DP71, Olympus) で観察、撮影し、デジタルデータとしてPCに取り込んだ。これらの画像から、画像解析ソフト (ImageJ, National Institute of Health) を用いてNGF陽性細胞の数を測定し、DRG中の全細胞に占めるNGF陽性細胞の割合を算出し、中央値を求めて3群間で比較した。

8) 統計処理

統計処理には解析ソフト R4.0.2を用い、有意水準を5%とした。皮膚ならびに筋機械痛覚閾値のImmobi群とImmobi3w+Clod群間の比較には分割プロット分析を、Immobi2w+Clod群の経時的変化には繰り返しのあ一元配置分散分析を行った。また、腓腹筋におけるCD68陽性細胞数、NGFタンパク量ならびにDRGにおけるNGF陽性細胞率の全3群間比較にはKruskal-Wallis検定とSteel-Dwass検定を行った。

マクロファージは神経成長因子を介したラット不活動性疼痛に影響を与えない

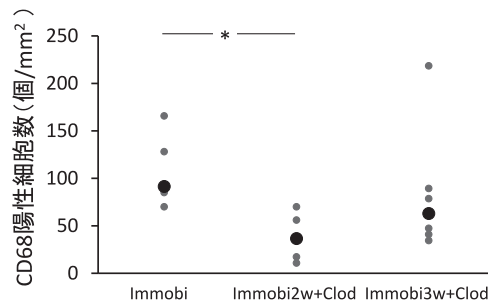


図1 腓腹筋におけるマクロファージ数

縦軸は単位面積当たりのマクロファージの数を、横軸は各群を示し、それぞれのドットが個体の結果を示している。ドットの大きいものは各群の中央値を示す。Immobi群とImmobi2w+Clod群間に有意差を認めた ($p < 0.05$)。

結果

1) 腓腹筋におけるマクロファージ発現状況

腓腹筋における単位面積 (mm^2) 当たりのCD68陽性細胞数の中央値と四分位数はImmobi群 90.9 [86.3-118.9]、Immobi2w+Clod群 36.6 [15.6-59.4]、Immobi3w+Clod群は62.9 [42.5-86.6]であり、Clophosome-N投与2週後に有意な減少が認められた (図1, $p < 0.05$)。

2) 痛覚閾値測定

Immobi群の固定前の皮膚痛覚閾値は 20.0 ± 2.3 g、固定1週後は 23.5 ± 1.4 g、固定2週後は 21.5 ± 2.5 g、固定3週後は 14.7 ± 3.6 gで、Immobi3w+Clod群の皮膚痛覚閾値は順に 21.9 ± 0.4 g、 22.2 ± 0.7 g、 17.6 ± 1.2 g、 12.1 ± 1.4 gであった。Immobi群とImmobi3w+Clod群の皮膚痛覚閾値の経時的変化は図2Aに示したように交互作用を認め ($p < 0.001$)、2週目には両群間に有意差を認めた ($p < 0.01$)。Immobi群の皮膚痛覚閾値は固定1週目に固定前や2週目以降と比較して有意に高値を示した ($p < 0.05$)

が、2週目以降は低値を示し3週目には他のすべての時期と有意差を認めた ($p < 0.01$)。一方、Immobi3w+Clod群の皮膚痛覚閾値は1週目の閾値上昇が認められず2週目以降は低値を示し、他の時期すべてと有意差を認めた ($p < 0.01$)。

Immobi2w+Clod群の固定前の皮膚痛覚閾値は 22.4 ± 0.3 g、固定1週後は 18.7 ± 0.4 g、固定2週後は 11.0 ± 1.2 gであり、すべての期間で有意差を示した ($p < 0.01$)。

Immobi群の固定前の筋痛覚閾値は 142.5 ± 7.6 g、固定1週後は 181.2 ± 22.0 g、固定2週後は 176.5 ± 20.3 g、固定3週後は 116.4 ± 11.7 gで、Immobi3w+Clod群の筋痛覚閾値は順に 157.0 ± 17.3 g、 170.8 ± 15.8 g、 143.4 ± 14.5 g、 112.6 ± 9.8 gであった。Immobi群とImmobi3w+Clod群の筋痛覚閾値の経時的変化は図2Bに示したが、交互作用を認め ($p < 0.001$)、2週目には両群間に有意差を認めた ($p < 0.01$)。Immobi群の筋機械痛覚閾値は固定1～2週目に固定前より有意に高値を示した ($p < 0.01$) が、3週目には低値を示し他の全期間と有意差を認めた ($p < 0.001$)。一方、Immobi3w+Clod群の固定1週目の筋機械痛覚

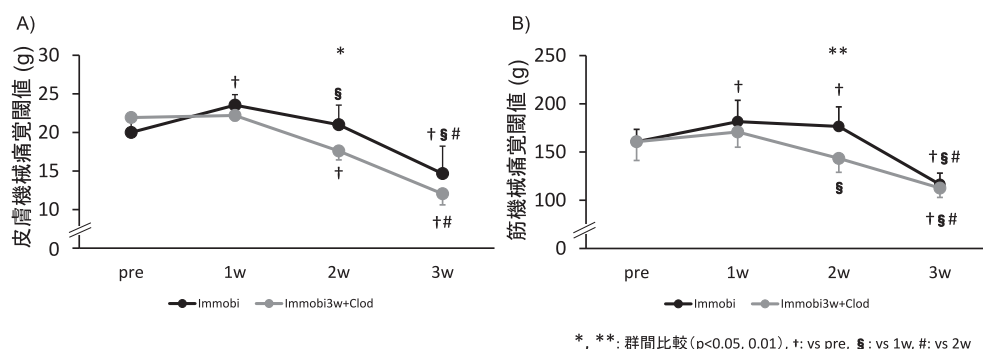


図2 皮膚ならびに筋機械痛覚閾値の経時的変化

縦軸は皮膚 (A), 筋 (B) の機械痛覚閾値, 横軸は時間。黒線はImmobi群, グレー線はImmobi3w+Clod群で各群の平均値と標準偏差を示している。皮膚・筋機械痛覚閾値は共に2群間で交互作用を認め, 特に固定2週で群間に有意差を認めた (順に $p<0.05$, $p<0.01$)。

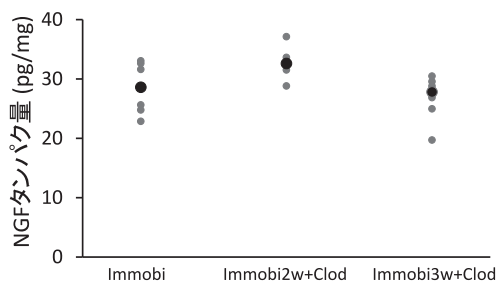


図3 腓腹筋におけるNGFタンパク量

縦軸は採取した腓腹筋の総タンパク質1 mg中に含まれるNGFタンパク量を, 横軸は各群を示し, それぞれのドットが個体の結果を示している。ドットの大きいものは各群の中央値を示す。3群間に差はなかった。

閾値は固定前と差がなく, 2週目以降はすべての時期と有意差を認めた ($p<0.001$)。

Immobi2w+Clod群の筋機械痛覚閾値の経時的変化は, 固定前が 160.8 ± 5.3 g, 固定1週後 166.3 ± 32.3 g, 固定2週後 125.6 ± 4.9 gであり, 固定前に比べ固定2週後に有意差を認めた ($p<0.01$)。

3) 腓腹筋におけるNGFタンパク量

採取した腓腹筋の総タンパク質1 mg中に含まれるNGFタンパク量の平均はImmobi群

$28.6 [25.0-32.4]$ pg, Immobi2w+Clod群 $32.6 [30.8-34.5]$ pg, Immobi3w+Clod群は $27.8 [25.4-29.3]$ pgであり, 3群間に有意な差はなかった (図3)。

4) 後根神経節におけるNGF陽性細胞

Immobi群のNGF陽性細胞率は $29.5 [20.1-35.5]$ %, Immobi2w+Clod群は $17.4 [15.4-23.1]$ %, Immobi3w+Clod群は $19.8 [13.82-4.3]$ %であり, 3群間に有意な差はなかった (図4)。

マクロファージは神経成長因子を介したラット不活動性疼痛に影響を与えない

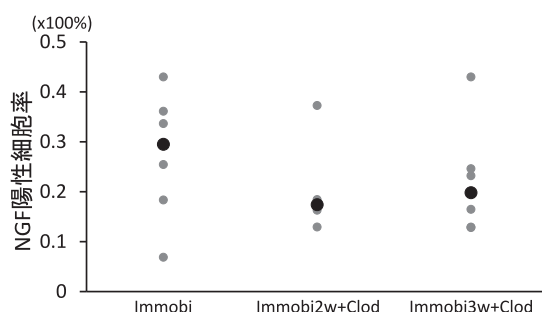


図4 L4～L6後根神経節におけるNGF陽性細胞率
縦軸はDRGにおけるNGF陽性細胞率を、横軸は各群を示し、それぞれのドットが個体の結果を示している。ドットの大きいものは各群の中央値を示す。3群間に差はなかった。

考察

マクロファージ枯渇剤が筋に発現するマクロファージをどの程度抑制していたかについて、腓腹筋におけるCD68陽性細胞数を基に調べたところ、マクロファージの枯渇剤を投与して2週間はマクロファージの活性をある程度抑制し、3週目にはその抑制効果が十分ではなくなるような推移を示した。マクロファージの影響を限定的ながら抑制していた固定3週目までの痛覚閾値の変化と3週目の腓腹筋ならびに後根神経節細胞におけるNGFタンパク量からマクロファージの疼痛発生やNGF産生への影響について検討した。

皮膚ならびに筋機械痛覚閾値は、Immob群とImmob3w+Clod群の間で2週目に有意差を認め、Immob3w+Clod群が低値を示した。これはImmob群の閾値低下が3週目に認められたのに対し、Immob3w+Clod群では2週目に認められたからである。しかし、先に報告した自験例[11, 16]では、痛覚閾値低下が1週目ないし2週目から認められており、Immob3w+Clod群の変化は従来変化と差がなかった。またImmob2w+Clod群も同様に2週目には固

定前と有意差を認めていた。そのため、マクロファージ枯渇剤が疼痛閾値をむしろ低下させた可能性が残るものの、少なくともマクロファージは機械痛覚閾値低下に関与しないと考えられた。なぜ今回のImmob群では疼痛発現が遅れたかについては説明がつきにくいところであるが、先の自験例報告[11]では、固定開始前の筋機械痛覚閾値の平均が約225 gであったのに対し、今回の結果は160 gと低値を示していた点を考慮すると、①固定開始前のハンドリング期間が十分ではなく、ベースラインが低めに取れてしまった、②実験のタイミングによる個体群の差、の二つの可能性が考えられる。しかし、本研究における他の2群の初期値も同程度であったことを考慮すると①だけでなく②の可能性についても考えにくく、再度実験するなどの検討が必要である。しかしながら、今回の3群に限れば、すべて同じ実験者がモデルを作製しているため、今回の実験内での比較は可能だと考えられ、マクロファージが痛覚閾値の低下に関与しないことを示すことができたと判断した。

腓腹筋におけるNGFタンパク量はImmob群、Immob2w+Clod群、Immob3w+Clod群

でほとんど差がなく、マクロファージがNGF産生に影響を及ぼしているとは考えにくい結果であった。NGFはreceptor tyrosine kinase A (TrkA) に結合してtyrosine kinaseの活性化・細胞内情報伝達系の駆動を経て、神経終末の感受性を変化させる [12]。また、NGFが結合したTrkAは神経細胞内に取り込まれ軸索内を細胞体まで輸送される [12]。そのため産生されたNGFがTrkA受容体と結合し速やかに感覚神経の細胞体まで輸送されたと仮定すると、3群の筋に残存するNGFタンパク量に差がなかったとも考えられた。一方、感覚神経に取り込まれたNGF量を反映していると考えられるDRGにおけるNGFタンパク量も3群間に有意差を認めなかった。そのため、この結果からもマクロファージがNGF産生に影響を与えたとは考えにくかった。Ogaら [19] は、我々と同様にラット足関節を2ないし4週間ギプス固定し、腓腹筋におけるマクロファージの発現量を調べたところ、健常ラットと比較して有意に増加し、それによってNGFが増加することでインターロイキン1 β が増加して疼痛発生を引き起こしていると結論しているが、その推論を支持することができなかった。マクロファージは筋の膜修復と再生を促進することが報告されている [27] が、このモデルでは筋損傷が生じていないことを報告している [29]。Ogaらは横断的な研究からの結論であり、生じている現象から推論した仮説である。それに対し、我々はマクロファージの影響をより直接的に検討した。マクロファージの枯渇の影響は2週間後までであったが、痛覚閾値変化や腓腹筋におけるNGFタンパク量、ならびにDRGにおけるNGF発現量、すべてにおいてマクロファージ枯渇剤は影響を与えておらず、これらのことからマクロファージが直接発痛に影響を及ぼしていた

り、NGFを産生していると考えるよりは別組織からのNGF産生の影響が考えられた。NGFは遅発性筋痛の原因発痛物質としても報告されている [13] が、筋細胞ないし筋衛星細胞からの産生の可能性が示唆 [14] されており、今後はその点においての検討が必要である。

マクロファージの枯渇剤を用いた本研究の限界は、① マクロファージ枯渇剤の薬物循環についての確認ができていないこと、② 固定3週目におけるマクロファージ枯渇剤の効果が固定2週目よりも薄れていたことが挙げられる。クロドロン酸の投与量や投与のタイミングなどは先行研究 [3, 10, 24] やデータシートを参考に実施したが、腹腔内投与における薬物循環の確認までは実施できておらず、今後の研究で確認していく必要がある。また、クロドロン酸を用いて筋損傷からの回復、筋肥大や感染症に対するマクロファージの影響を調べた報告などでは損傷や感染5日後まで、長くても12日後までしか調べられておらず、3週間の変化を調べた報告は見当たらなかった [3, 10, 24]。不活動性疼痛モデルにおける疼痛発生は不活動期間を長くするに従い疼痛が顕著に認められることから、本研究では不活動期間を3週間と設定して研究した。しかし、今回の腓腹筋におけるCD68マーカーによる結果から、マクロファージ枯渇剤を用いてマクロファージの活性を抑制しても、生体での新たなマクロファージの分化を十分に抑制し続けることは難しく、枯渇剤の効果は、2週間ぐらいまでが限界だと考えられた。そのため、今後はImmobi群の固定期間を2週とし、さらに健常群も加えた検討が必要だと考えている。

まとめ

不活動性疼痛の発生メカニズムを検討するうえで、マクロファージがNGF発現に影響しているかどうかマクロファージ枯渇剤を用いて調べた。マクロファージの枯渇は限定的ではあったが、NGF発現に影響を及ぼしていないと結論した。

謝辞

本研究は名古屋学院大学研究助成（2020年度～2022年度）を受けたものである。

文献

- [1] Amano T, Yamakuni T, Okabe N, Sakimura K, Takahashi Y (1991) Production of nerve growth factor in rat skeletal muscle. *Neurosci Lett*. 132: 5-7
- [2] Booth FW (1977) Time course of muscular atrophy during immobilization of hindlimbs in rats. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 43(4): 656-661
- [3] DiPasquale DM, Cheng M, Billich W, Huang SA, van Rooijen N, Hornberger TA, Koh TJ (2007) Urokinase-type plasminogen activator and macrophages are required for skeletal muscle hypertrophy in mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C1278-C1285
- [4] Gong WY, Abdelhamid RE, Carvalho CS, Sluka KA (2016) Resident macrophages in muscle contribute to development of hyperalgesia in a mouse model of noninflammatory muscle pain. *J Pain* 17(10): 1081-1094
- [5] Kawanishi N, Funakoshi T, Machida S (2018) Time-course study of macrophage

infiltration and inflammation in cast immobilization-induced atrophied muscle of mice. *Muscle Nerve* 57(6): 1006-1013

- [6] 肥田朋子, 古田大輔, 真境名佑輝, 渡邊晶規, 伊東佑太 (2022) カラゲニン誘発性筋炎による筋損傷モデル作製の試み. 名古屋学院大学論集 医学・健康科学・スポーツ科学篇. 10(2): 1-9
- [7] 肥田朋子, 冲向雄也, 榊原拓也, 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: 1-8
- [8] 肥田朋子, 榊原拓也, 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
- [9] Lewin GR, Ritter AM, Mendell LM (1993) Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat. *J Neurosci* 13(5): 2136-2148
- [10] Lidbury BA, Rulli NE, Suhrbier A, Smith PN, McColl SR, Cunningham AL, Takowski A, van Rooijen N, Fraser RJ, Mahalingam S (2008) Macrophage-derived proinflammatory factors contribute to the development of arthritis and myositis after infection with an arthrogenic alphavirus. *J Infect Dis* 197: 1585-1593
- [11] 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
- [12] 水村和枝, 久保亜沙子 (2022) 神経成長因子(NGF)とその受容体TrkA—疼痛との関連において—. *Pain Research* 37(1): 7-15

- [13] Murase S, Terazawa E, Queme F, Ota H, Matsuda T, Hirate K, Kozaki Y, Katanosaka K, Taguchi T, Urai H, Mizumura K (2010) Bradikinin and nerve growth factor play pivotal roles in muscular mechanical hyperalgesia after exercise (delayed-onset muscle soreness). *J Neurosci.* 30(10): 3752-3761
- [14] 村瀬詩織, 山中博樹, 神田浩里, 水村和枝 (2014) 骨格筋は持続性の機械痛覚過敏を引き起こす神経栄養因子を産生する. *日本運動器疼痛学会誌.* 6 : 132-135
- [15] 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): 629-637
- [16] 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は制に及ぼす影響—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
- [17] Nakamura M, Nishikawa Y, Ushida T, Toyama Y. (2011) Prevalence and characteristics of chronic musculoskeletal pain in Japan. *J Orthop Sci.* 16(4): 424-432
- [18] Nakamura M, Toyama Y, Nishiwaki Y, Ushida T (2014) Prevalence and characteristics of chronic musculoskeletal pain in Japan: a second survey of people with or without chronic pain. *J Orthop Sci.* 19(2): 339-350
- [19] Oga S, Goto K, Sakamoto J, Honda Y, Sasaki R, Ishikawa K, Kataoka H, Nakano J, Origuchi T, Okita M (2020) Mechanisms underlying immobilization-induced muscle pain in rats. *Muscle Nerve.* 61(5): 662-670
- [20] Okita M, Yoshimura T, Nakano J, Saeki A, Uehara A, Mineshita A, Eguchi K (2001) *Jpn Phys Ther Assoc.* 4(1): 1-5
- [21] 沖田実 (2019) 3痛みの発生メカニズム. 沖田実・松原貴子. *ペインリハビリテーション入門.* 三輪書店. 東京. pp23-35
- [22] Petty BG, Cornblath DR, Adornato BT, Chaudhry V, Flexner C, Wachsmann M, Sinicropi D, Burton LE, Peroutka SJ (1994) The effect of systemically administered recombinant human nerve growth factor in healthy human subjects. *Annu Neurol.* 36(2): 244-246
- [23] Pezet S and McMahon SB (2006) Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci.* 29: 507-538
- [24] Shen W, Li Y, Zho J, Schwendener R, Huard J (2008) Interaction between macrophages, TGF- β 1, and the COX-2 pathway during the inflammatory phase of skeletal muscle healing after injury. *J Cell Physiol.* 214: 405-412
- [25] Svensson P, Cairns BE, Wang K, Arendt-Nielsen L (2003) Injection of nerve growth factor into human masseter muscle evokes long-lasting mechanical allodynia and hyperalgesia. *Pain* 104: 241-247
- [26] Terkelsen AJ, Bach FW, Jensen TS. (2008) Experimental forearm immobilization in human induces cold and mechanical hyperalgesia. *Anesthesiol.* 109(2): 297-307
- [27] Tidball JG, Wehling-Henricks M (2007) Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *J Physiol.* 578(Pt 1): 327-336
- [28] Van Rooijen N and Sanders A (1994) Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods.* 174: 83-93
- [29] 山本綾, 古島泰子, 長谷川多美子, 肥田朋子 (2009) ラット足関節不動化による活動制限は痛みを促進する. *理学療法学.* 36(6) : 305-311

[Original Article]

Macrophages are uninvolved in NGF-mediated immobilization-induced muscle pain in rats.

Tomoko Koeda¹, Hikaru Hagiwara²

Risa Koyanagi³, Nana Fukui⁴

Masanori Watanabe¹, Yuta Itoh¹

Abstract

It has been shown that pain materializes regardless of lack of observed damage due to cast immobilization or inactivity. Nerve growth factor (NGF) is recognized to be involved in this pain, however, it is not clear where it is produced. In addition, the involvement of macrophages has also been reported, and since macrophages produce NGF, the effects of macrophages on NGF and immobilization-induced muscle pain were investigated in this study. We intraperitoneally administered the macrophage-depleting agent repeatedly to rats before and during the immobilization period. The changes in the mechanical withdrawal thresholds of the skin and muscles during that period, the amount of NGF protein in the gastrocnemius muscles, and the number of NGF-positive cells in the dorsal root ganglion were examined. As a result, decreases in the skin/muscle mechanical withdrawal threshold were observed even in animals using the macrophage-depleting agent, and there was no difference in the amount of NGF protein in the gastrocnemius muscle and the number of NGF-positive cells in the dorsal root ganglion. We concluded that macrophages are uninvolved in NGF-mediated immobilization-induced pain.

Keywords: inactive pain, nerve growth factor, Clodronate, immobilization, rats

1 Nagoya Gakuin University

2 Home office

3 Saisyukan Hospital

4 Tokyo Rehabilitation Service Cooperation