

ギプスによる関節の不動化の痒み感覚および痛み関連情動への影響

野田 和子¹, 緒形 雅則^{1,2}, 秋田 久直^{1,2}, 坂本 美喜³, 石橋 仁^{1,2}

¹北里大学医療衛生学部基礎医学部門生理学

²北里大学大学院医療系研究科

³北里大学医療衛生学部リハビリテーション学科理学療法学専攻

背景: ギプスによる関節の不動化は通常、傷害を受けた関節を休息させるために用いられるが、しばしば、機械的刺激に対する閾値の低下をもたらすことが報告されている。さらに、ギプス固定をしている患者にとって突然襲われる痒みは大きなストレスになっているものの、痒み関連反応におよぼすギプス固定の影響についてはほとんど知られていない。本研究では、実験動物を用いてギプスによる関節の不動化の痒み関連行動と痛みの情動的側面への影響について検討した。

方法: ラットの後肢足関節を最大底屈位にて片側後肢に金網を巻き付け、14日間関節を不動化するギプス固定を行った。機械刺激に対する痛み感覚閾値はvon Frey filamentを用い、固定の前後に計測した。また、行動観察はギプスの除去から14日目に行った。痒みの誘発にはセロトニンの皮下投与、化学的発痛物質に対する反応はホルマリンテスト、痛みの情動的側面は条件付場所嫌悪反応(CPA)により評価した。

結果: ギプスによる関節の不動化は痛覚過敏を誘発し、これはギプス除去後も約14日間持続した。また、セロトニン皮下注射により誘発される痒み関連行動は、ギプス固定をしなかったラットに比較して増強した。さらに、ギプス固定ラットではホルマリンによるCPAが消失した。

結論: ギプスによる関節の不動化は機械刺激に対する痛み感覚閾値の低下のみならず痒み感覚を増強させ、痛みの情動的側面にも影響を与えることが明らかになった。

Key words: ギプス固定, 痛覚過敏, 痒み感覚, 痛み関連情動

序 論

ギプスによる関節の不動化は通常、傷害を受けた関節を休息させるために用いられるが、ギプス固定後に、しばしば痛覚過敏をもたらすことが報告されている¹⁻⁵。

我々はすでに臨床的に抗腫瘍化学治療薬パクリタキセルのラットへの腹腔内投与により誘発される痛覚過敏状態下では、痛みとそれを与えられた場所との関連学習の形成が障害されることを報告している⁶。しかしながら、同じように痛覚過敏を誘発するギプスによる関節の不動化が痛み関連情動に影響するかはいまだに不明である。また、ギプス固定をしている患者にとっては、それだけでもストレスとなっているが、さらに突然襲われる痒みは大きなストレスであるとともに患者の生活の質(QOL)に影響を与えている。痒みは掻きたいという欲求を起こさせる不快な感覚であり、しかも、ギプス固定をしていると直接掻くことが出来ないというストレスを患者に与える。しかし、実験動物において痒み関連反応におよぼすギプス固定の影響につ

いてはほとんど知られていない。痒みに伴う不快感や不安などの情動は痛みほどには強くないが、原因を除去するための行動を積極的・衝動的に起こさせようとする感覚であるために、コントロールできない痒みは、痛み以上に耐えがたい苦痛を引き起こす⁷。

本研究では、ギプスによる関節の不動化が痒み感覚を変容させるか、また、痛みの情動的側面に影響を与えるかを検討した。実験動物における情動的側面は条件付場所嫌悪反応(conditioned place aversion: CPA)により評価した。ギプス固定による関節の不動化がラットの痛み関連情動に影響を与えたことを示した最初の研究である。

方 法

1. 動物

本研究は世界疼痛学会のガイドラインに従い、また北里大学実験動物委員会の承認を得て行われた(承認番号: 衛・研14-40, 衛・研15-34)。実験動物として体重230 g~280 gのWistar rat(日本クレア, 東京)の雄76匹

Received 10 March 2016, accepted 25 April 2016

連絡先: 野田和子(北里大学医療衛生学部基礎医学部門生理学)

〒252-0373 神奈川県相模原市南区北里1-15-1

E-mail: nodal219@ahs.kitasato-u.ac.jp

を用い、一定室温 (22 ± 1°C), 12時間の明暗サイクル (明期: 8時~20時) の環境で飼育され、餌および水は自由摂取とした。行動実験を行う前に十分にハンドリングを行い、動物を実験者の取り扱いに慣れさせた。なお、発痛物質あるいは痒み誘発物質を用いた行動実験ではそれぞれの処置は各動物に対して一回限りとし、動物へのストレスを軽減するように努めた。

2. 試薬

1%セロトニン: serotonin hydrochloride (5-hydroxytryptamine: 5-HT, SIGMA, USA) を生理食塩水 (大塚製薬, 徳島) で希釈し、1%溶液とした。

5%ホルマリン: ホルムアルデヒド (和光純薬, 大阪) を生理食塩水で希釈し、5%溶液とした。

3. ギプス固定

金網を用いたギプスを作成し、イソフルラン(ファイザー, 東京) ガス麻酔下で左後肢足関節を最大底屈位にて固定したラットをギプス固定 (Gips) 群とし、ギプス固定しなかったラットはコントロール (Cont) 群とした。

4. 行動実験

(1) von Frey filament test

機械的刺激に対するひっこめ反応閾値を評価するために、von Frey filament testを行った。ラットをプラスチックの箱 (21 × 13 × 15 cm) で覆った金網の上に置き、測定環境に15分間馴化させた。0.6, 1, 2, 4, 6, 10, 15, 26 gのフィラメント (touch-test: ニューロサイエンス, 東京) を金網の下方から左後肢 (ギプス固定側) の足底中央部表面に15秒間隔で5回ずつフィラメントが曲がる程度に押し付けて刺激し、50%以上ひっこめ反応が誘発される最小の刺激強度を50%閾値 (g) とした。ギプス固定前の閾値を計測し、固定の解除後、7日間に2回、実験期間を通して閾値を計測した (Cont群 $n = 10$, Gips群 $n = 16$)。

14日間のギプス固定の後に麻酔下にてギプスを除去し、その後von Frey filament testにより痛覚過敏状態を確認した。行動実験は解除後14日目に行った。

(2) セロトニン誘発痒み関連行動

ラットの痒み感覚は1%セロトニン (5-HT) を後肢へ皮下注射することにより誘発した⁸⁻¹³。ラットを観察用透明プラスチック箱 (33 × 22 × 14 cm) に入れ、箱の床下に鏡を置き、ラットの足底を観察できるようにした。15分間馴化させた後、左後肢足底中央部に1% 5-HTを50 μ l皮下注射し、ただちに観察箱に戻し、特徴的な行動である5-HT注入側の肢を舐める (licking)、高速で噛む (biting) 行動を80分間ビデオ記録・観察した (Cont群 $n = 11$, Gips群 $n = 14$)。なお、5-HT皮下注射により誘発される痒み関連行動であるlickingとbiting行動

は区別することが困難であるため、これらを合わせてbiting行動とした。

(3) ホルマリンテスト

ギプス固定がラットの化学的刺激に対する感受性に影響するかを調べる目的でホルマリンテストを行った (Cont群 $n = 6$, Gips群 $n = 6$)。

動物を5-HT皮下注射により誘発される痒み関連行動の観察と同一の観察箱に入れ、15分間順応させた。発痛物質である5%ホルマリン溶液50 μ lを右後肢足底中央部に皮下注射し、直ちに観察箱に戻し、注入側の後肢に特徴的に誘発される行動である、肢を振る (flinching) 行動を80分間ビデオ記録し、観察・評価した。

(4) 条件付場所嫌悪反応 (conditioned place aversion test: CPA)

CPA試験は以前の報告を参考に、修正して行った^{6,14-17}。CPA装置 (CPP実験システム・SUPERMEX: 室町機械, 東京) は仕切りのついた箱 (30 × 30 × 60 cm) で、同じ大きさの2つの区画に分けられている。各区画は異なった材質と色で構成され、一方の黒い区画は床が滑らか、他方の白い区画の床はカーペット地である。2つの区画を区切っている仕切りにはラットが自由に移動できるだけの隙間がある。15分間の実験時間内の各区画内滞在時間を計測した (Cont群 $n = 6$, Gips群 $n = 7$)。

1日目 (habituation): ラットに2区画を自由に15分間探索させ、装置に慣れさせた。

2日目 (preconditioning session): 1日目と同じ試行を行わせた。総観察時間の50%以上滞在する区画をラットの嗜好区画とした。1日目に80%以上を一方の区画に滞在し、2日目には反対の区画に10分以上滞在した個体は除外した。

3日目 (conditioning session): 条件付けを行った。10時~12時のあいだにラットの左後肢に生理食塩水 (50 μ l) を注射して、ただちに嗜好区画と反対側の区画 (non-pain-paired compartment) に60分間閉じ込めた。生理食塩水注射4時間後に、条件付けを行った。ラットの右後肢足底に5%ホルマリン50 μ lを皮下注射して、痛みを誘発し、直ちに嗜好区画 (pain-paired compartment) に60分間閉じ込めた。

4日目 (test session): ラットには何も注射しないで2区画を自由に探索させた。15分間に各区画に滞在する時間を計測した。

CPAスコアは4日目 (test session) において前日に痛みを与えたときに閉じ込めた区画 (pain-paired compartment) の滞在時間から2日目 (preconditioning session) での同じ区画への滞在時間を差し引いた値とした。

5. 統計処理

データは平均±標準誤差で表した。経時的変動の解析は重複測定分散分析 (repeated ANOVA) を行い、そ

の後、多重比較検定 (Dunnett's test) を行った。2群の差の検定にはt検定 (paired, unpaired *t* test) を用いた。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結 果

1. ギプス固定の影響

14日間のギプス固定により、ラットの体重の減少は認められなかった。また、ギプス固定を解除した直後にはギプス固定側の後肢に体重をかけないようにする行動がみられたものの、翌日にはラットの動きはCont群と比較して変化は認められなかった。

2. 機械刺激に対する痛覚過敏の検出

ギプスによる14日間の関節の不動化では、固定解除後のGips群で固定前に比較して約2週間持続する痛覚閾値の有意な低下が観察された (Figure 1, Gips群 $n = 16$)。

一方、Cont群では実験期間を通して閾値には有意な変動は認められなかった (Cont群 $n = 10$)。

3. 5-HT皮下注射により誘発される痒み関連行動

後肢足底への1% 5-HT皮下注射により誘発される痒み感覚に対する関節不動化の影響を観察した (Cont群 $n = 11$, Gips群 $n = 14$)。

Figure 2は5-HT皮下注射により誘発されたbiting行動の経時的推移を示したものである。Figure 2A, B, Cはbiting行動の出現している時間 (秒) を示し、biting行動

は5-HT注入直後から出現し、その後次第に減少する傾向がみられた。Gips群では10分、30分、45分および55分と周期的にbiting行動が出現する傾向がみられた (Figure 2A)。また、20分間のbiting行動出現時間はいずれの経過時間においてもGips群の方が長く、両群の間には有意差が認められた (Figure 2B, $P < 0.05$)。Figure 2Cは観察した80分間のbiting行動の総出現時間を示しているが、Cont群で 233.5 ± 42.8 秒、Gips群で 543.3 ± 61.6 秒とGips群の方が長く出現しており、両群の間には有意差が認められた ($P < 0.01$)。

Figure 2D, E, Fは誘発されたbiting行動の回数を示したものである。Cont群、Gips群はともに5-HT注入直後からbiting行動が出現し、5~10分までの間にCont群では8.1回、Gips群では9.1回と、全観察期間を通して最も多くのbiting行動が出現した。その後、両群ともに徐々に減少している (Figure 2D, E)。5-HT注入直後にはGips群の方が多くのbiting行動を示したものの、20分後以降は両群ともに同じような経過をとって減少している。また、80分間に出現したbiting行動の総回数は、Cont群では 36.0 ± 6.9 回、Gips群では 45.7 ± 4.5 回と両群におけるbiting行動の回数には有意な差は見られなかった (Figure 2F)。

4. 条件付場所嫌悪反応 (conditioned place aversion test: CPA)

ギプス固定による関節の不動化が情動に影響している可能性がある。そこで、14日間のギプス固定がラッ

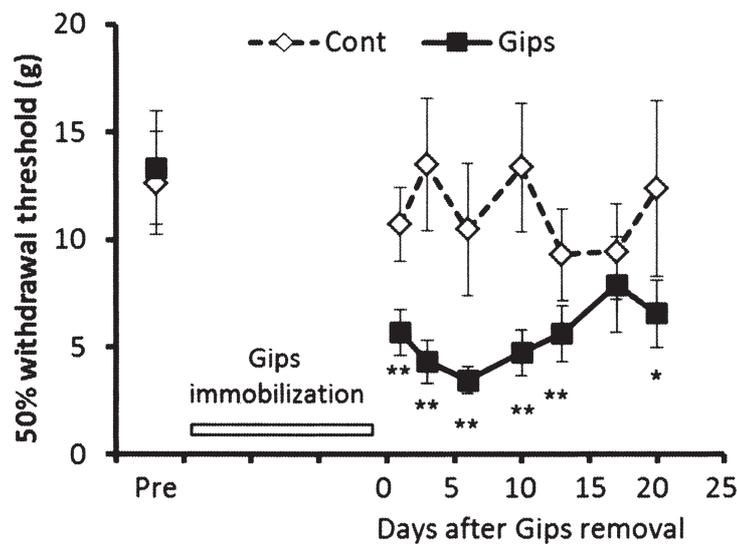


Figure 1. Effect of Gips immobilization on 50% withdrawal threshold to the mechanical stimulation applied to the plantar surface of the ipsilateral hind paws to the Gips treatment using calibrated von Frey filaments. The filament in the series that evoked more than 50% trials was designated as the threshold. White horizontal bar indicates the immobilized period for 14 days using the wire mesh Gips. Data are represented as mean \pm SEM. Cont ($n = 10$), Gips ($n = 16$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the 50% threshold before immobilization by Dunnett's post hoc test.

トの情動に影響するかどうかを調べるために発痛物質であるホルマリンを用いて痛み誘発によるCPAテストを行った。足底への5%ホルマリンの皮下注射はラットに強い痛みを与え、その経験が嫌悪として記憶され、この嫌悪刺激が与えられた場所 (place) と痛みとを結び付ける関連学習の形成が正常に行われるかどうかを検討した。CPAテストはギプス固定解除後14日目に条件付けが行われるように計画した。

Figure 3に示すように、Cont群ではCPA 3日目にホルマリン投与後に閉じ込めた区画への4日目の滞在時間は、ホルマリン皮下投与前の2日目の滞在時間と比較して有意に短縮していた (Figure 3A, $P < 0.05$)。一方、

Gips群ではホルマリン投与後に閉じ込められた区画への4日目の滞在時間がわずかではあるが延長しており (Figure 3A), 強い痛みとそれを与えられた場所との関連学習の形成が不十分であることが示唆された。その結果CPAスコアは延長し (Figure 3B), Cont群との間に有意差が認められた ($P < 0.01$, Cont群 $n = 6$, Gips群 $n = 7$)。

5. 化学的発痛物質に対する反応

後肢足底へのホルマリンテストを行い、化学的刺激による痛み関連行動に対する関節の不動化の影響を観察した。ホルマリンの右後肢足底への皮下注射により

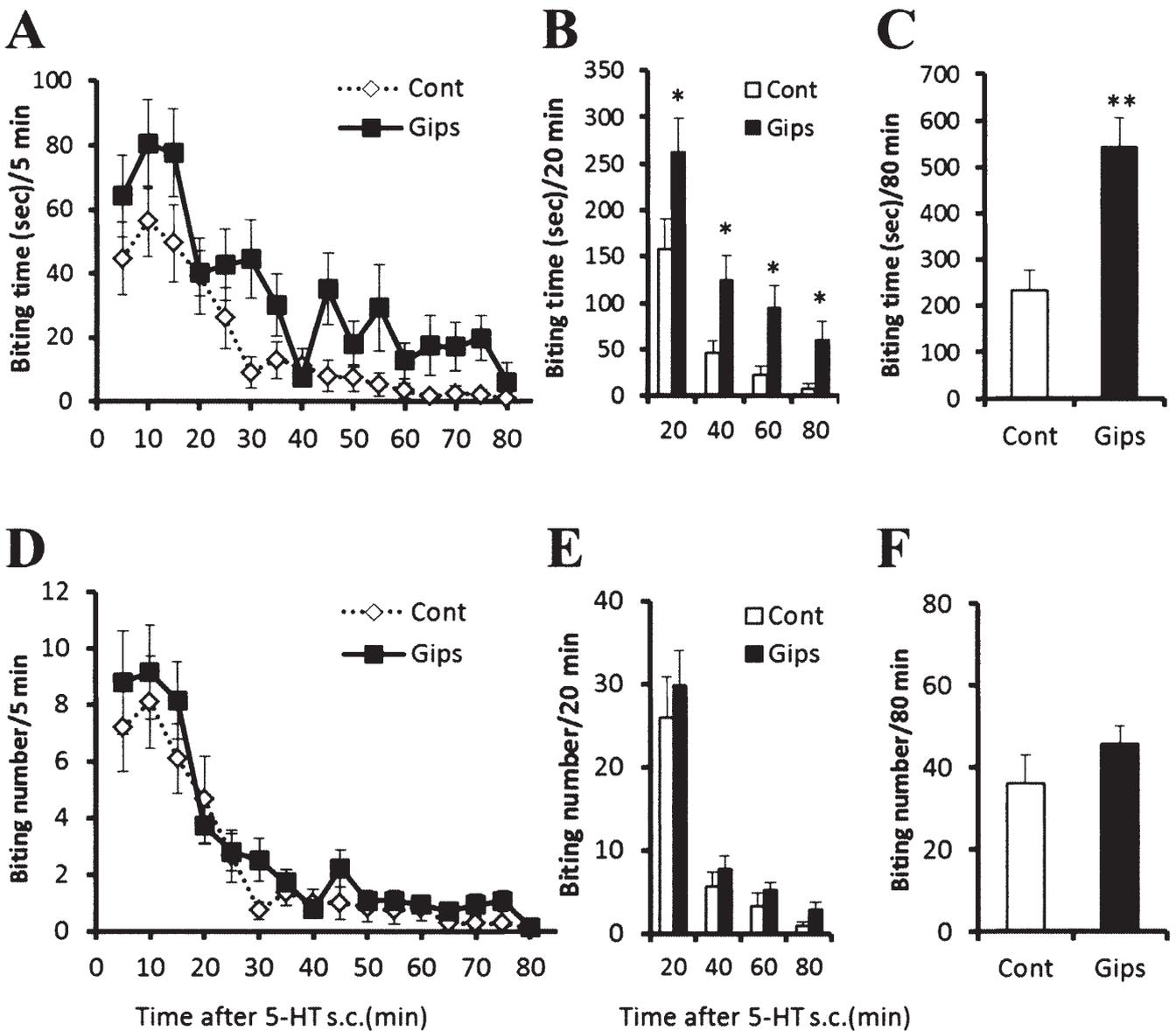


Figure 2. 5-HT induced itch related behavior as biting. Effect of joint immobilization by Gips treatment on itch associated behavior induced by subcutaneous injection of serotonin (5-HT). Time course of biting response after intraplantar injection of $50 \mu\text{l}$ of 1% 5-HT. (A-C) Biting time after 5-HT s.c. (D-F) Biting number after 5-HT s.c. 5-HT s.c. was conducted during the mechano-hypersensitivity period observed after Gips removal. The mean time of biting behavior was significantly elevated in Gips immobilization rat. Data are expressed as mean \pm SEM. Cont ($n = 11$), Gips ($n = 14$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group (unpaired t test).

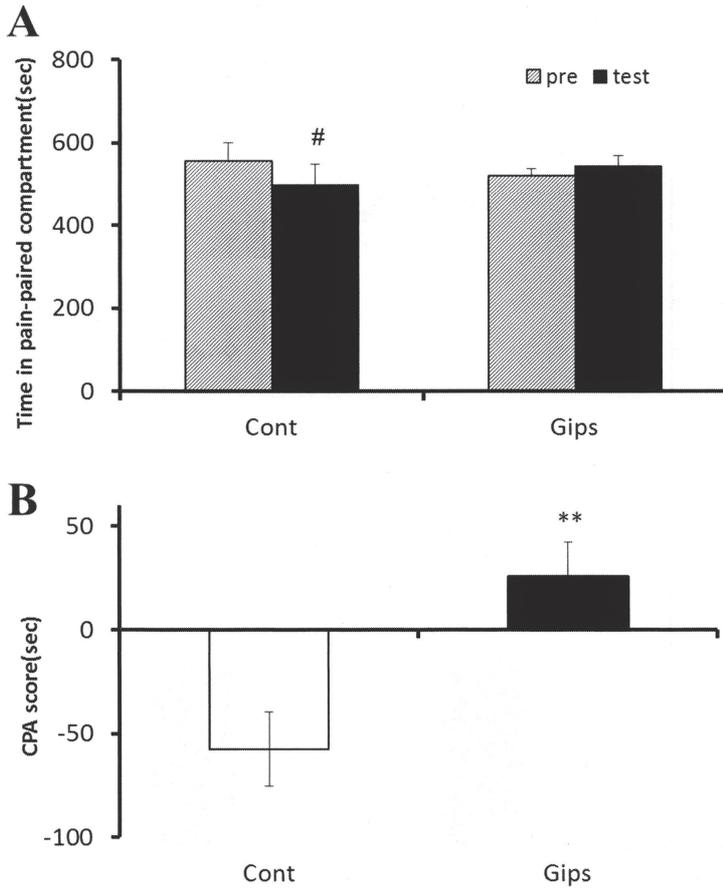


Figure 3. Effect of joint immobilization by Gips treatment on the Formalin-CPA. The CPA score measurement was conducted 14 days after Gips removal. The joint immobilization by Gips altered CPA scores. The columns show the time spent in the pain-paired compartment in the preconditioning (pre) or test session (test) (A) and the CPA scores (B) of the Cont ($n = 6$) and the Gips treated rats ($n = 7$). Data are expressed as mean \pm SEM. [#] $P < 0.05$ compared with the preconditioning session (paired t test), ^{**} $P < 0.01$ compared with the Cont (unpaired t test).

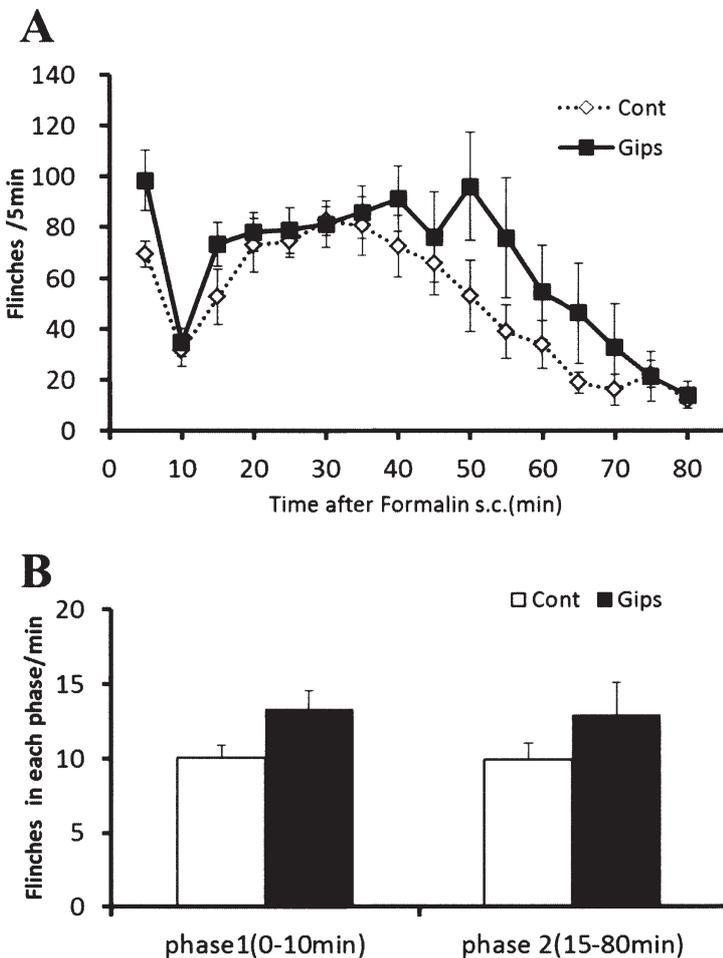


Figure 4. The effect of joint immobilization by Gips treatment on the behavioral response for chemical stimuli to the hind paw in the formalin test. Formalin test was conducted 14 days after Gips removal. (A) Time course of nociceptive behavior such as flinching induced by formalin was counted in every 5 min block during 80 min period after formalin s.c. The nociceptive behavior as flinching at 5 min after Formalin s.c. was increased in the Gips treated rat. (B) Effect of Gips immobilization on total nociceptive behavior such as flinching at each phase of formalin test; phase 1, 0-10 min post formalin injection; phase 2, 15-80 min post formalin injection¹⁹. $n = 6$ for each group. Data are represent mean \pm SEM.

誘発される特徴的な肢のflinching行動をホルマリン皮下注射後5分ごとに80分間観察・計数した。

ホルマリンにより誘発される強い痛みの特徴的なflinching行動は、ホルマリン注射後の5分間に多く出現し、その後10分にかけて痛み関連行動が一時的に減少する第1相と、15~80分にかけて痛み関連行動が増加した後に減少する持続の長い第2相が観察される (Figure 4A)¹⁸⁻²⁰。Flinching行動はGips群で多い傾向はあるもののGips群とCont群の間に有意差は認められなかった (Figure 4A, B, $P > 0.05$, Cont群 $n = 6$, Gips群 $n = 6$)。

考 察

本研究では、ギプスによる足関節の固定は、機械刺激に対する痛覚過敏のみならず痒み感覚の増大も引き起こすことを証明し、ギプス固定にともない痛みの情動的側面にも影響が認められることを初めて明らかにした。

本研究によって、14日間にわたる関節の不動化を行うとギプス固定解除後約2週間持続する痛覚閾値の低下が観察され、ギプス固定が痛覚過敏を誘発することが明らかになった。ギプス固定による関節の不動化により誘発される痛覚過敏については以前から報告があるが、4週間の固定を行ったGuoら¹によれば、固定の解除直後から2週間は痛覚閾値の低下を観察している。また、関野ら⁴はラットの足関節を4週間固定すると痛覚過敏は1週目から観察され、末梢の皮膚組織の観察から固定期間に依存する末梢神経の分布増加を認め、これが痛覚過敏の要因になる可能性を示唆している。一方、Ohmichiら³は2週間の関節の不動化を行い、ギプス固定解除後1~3週間は痛覚過敏が観察されたと報告し、免疫組織的解析により脊髄におけるグリア細胞の活性化の関与を示唆している²¹。本研究においても14日間ギプス固定を行い、固定解除後から約2週間持続する痛覚過敏を観察している。痛覚過敏発現の原因として侵害受容性チャネルのTRPV1の発現増加²²や、脊髄後角におけるCGRP (calcitonin gene-related peptide) の放出による脊髄感作の可能性⁵などが示唆されている。

5-HT皮下注射により誘発される痒み関連行動には注入側の肢を舐めたり (licking) 噛んだり (biting) する行動がある。今回はこの2つの行動を区別するのは困難であったため合わせてbitingとした。Biting行動の出現時間を回数とともにCont群とGips群について比較すると、回数は両群に有意差は認められないものの、出現時間はGips群の方が有意に長く、biting行動の1回あたりの持続が延長している傾向がみられた (Figure 2)。5-HTの皮下注射により誘発される痒み関連行動はギプス固定により変調を受け、増強することが明らかになった。

今回、ラットの足関節のギプス固定・不動化により

誘発される痛覚過敏状態下の化学的刺激に対する痛み関連行動についてホルマリンテストにより検討した。ホルマリンによる痛み関連行動は、ホルマリンにより直接知覚神経が刺激されることにより誘発される末梢性の第1相と、ホルマリンにより遊離した炎症性メディエーターや脊髄後角での感作が関与している持続の長い第2相に分けられる²⁰。今回の結果では、14日間のギプス固定にともなう機械的刺激に対する痛覚過敏状態下では、第1相ではホルマリン刺激に対する痛み関連行動の増加傾向が観察されるもののCont群との間に有意な差は認められなかった。また、第2相には影響がみられなかったことより、14日間のギプス固定による神経系への影響は、主に末梢性で一過性のものと考えられ脊髄上位への影響は少ないと考えられる。松原ら¹⁸は、ラットの足関節の4週間のギプス固定では、ホルマリンテストの第1相のみで痛覚過敏が観察され、8週間のギプス固定では、第2相にも影響がみられたことを報告している。これらの結果は、ギプス固定の期間延長が中枢神経系の侵害受容機構を変調させることを示唆している。

痛みは感覚としての側面と情動としての側面の2面性を持っている。今回、痛みの情動的側面の評価としてホルマリンによる条件付場所嫌悪反応 (CPA) 試験を行った。本研究で用いたギプス固定ラットはホルマリン刺激に対して一過性の痛覚過敏傾向を示したことから、ホルマリンによる嫌悪条件付の増強が期待された。しかし結果に示したごとく、ギプス固定にともない痛みと場所の関連学習の形成障害が観察された (Figure 3)。野田ら⁶は、抗腫瘍化学療法薬誘発性末梢神経障害モデルラットにおいて機械刺激に対する痛覚過敏を確認するとともに、その痛覚過敏ラットは本研究のギプス固定誘発性痛覚過敏ラットと同様に、痛みと場所との関連学習が障害されていることを報告している。よってこれらの結果は強い痛みは嫌悪感情と結びつく一方で、慢性痛を持つ場合は情動的障害を引き起こす可能性のあることを示している²³。一方、本研究で用いたギプス固定はラットに対して不動化ストレスを与えており、そのストレスにより痛みと場所の関連学習が障害された可能性は否定できない。

以上のように14日間のギプス固定による足関節の不動化は、機械的刺激に対する痛覚過敏を誘発するのみならず、5-HT皮下注射により誘発される痒み感覚に変調をもたらした。さらに、ホルマリンによる痛み関連情動反応に影響を及ぼすことが明らかになった。しかし、これらの作用に中枢神経系のどのレベルが関与しているかは今回の実験では明らかにすることが出来なかった。Sunら²⁴は、痒み特異的な受容体の1つであるGRPR (gastrin-releasing peptide receptor) を発現している脊髄のニューロンを除去すると、痒み誘発物質に対する痒み関連行動は減少するが痛み関連行動には変化

がないことから痒みと痛みの感覚情報は脊髄レベルでは異なる神経路を介すると報告している。今後、さらに組織学的、電気生理学的解析を行うことが必要である。

結 論

14日間のギプス固定による足関節の不動化は、ラットの機械的刺激に対する痛覚過敏を誘発するとともに、痒み感覚の増大を引き起こした。さらに、ギプス固定に伴い痛みの情動的側面にも影響が認められることが明らかになった。

謝辞: 本研究の実施に際しては北里大学医療衛生学部千葉優希氏の協力によって行われた。ここに感謝の意を表す。

文 献

- Guo TZ, Offley SC, Boyd EA, et al. Substance P signaling contributes to the vascular and nociceptive abnormalities observed in a tibial fracture rat model of complex regional pain syndrome type I. *Pain* 2004; 108: 95-107.
- 山本 綾, 古島泰子, 長谷川多美子, 他. 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* 2009; 36: 305-11.
- Ohmichi Y, Sato J, Ohmichi M, et al. Two-week cast immobilization induced chronic widespread hyperalgesia in rats. *Eur J Pain* 2012; 16: 338-48.
- 関野有紀, 濱上陽平, 中野治郎, 他. ラット足関節不動モデルの痛みと皮膚における組織学的変化. *日本運動器疼痛学会誌* 2012; 4: 20-7.
- Hamaue Y, Nakano J, Sekino Y, et al. Immobilization-induced hypersensitivity associated with spinal cord sensitization during cast immobilization and after cast removal in rats. *J Physiol Sci* 2013; 63: 401-8.
- Noda K1, Akita H, Ogata M, et al. Paclitaxel-induced hyperalgesia modulates negative affective component of pain and NR1 receptor expression in the frontal cortex in rats. *Neurosci Res* 2014; 80: 32-7.
- 倉石 泰. 痒みの発生機序と鎮痒薬の薬理. *日薬理誌* 2012; 139: 160-4.
- Hagiwara K, Nojima H, Kuraishi Y, et al. Serotonin-induced Biting of the Hind Paw is Itch-related Response in Mice. *Pain Res* 1999; 14: 53-9.
- Akiyama T, Merrill AW, Carstens MI, et al. Activation of superficial dorsal horn neurons in the mouse by a PAR-2 agonist and 5-HT: potential role in itch. *J Neurosci* 2009; 29: 6691-9.
- Carstens E. Responses of rat spinal dorsal horn neurons to intracutaneous microinjection of histamine, capsaicin, and other irritants. *J Neurophysiol* 1997; 77: 2499-514.
- Spradley JM, Davoodi A, Carstens MI, et al. Effects of acute stressors on itch- and pain-related behaviors in rats. *Pain* 2012; 153: 1890-7.
- Yamaguchi T, Nagasawa T, Satoh M, et al. Itch-associated response induced by intradermal serotonin through 5-HT2 receptors in mice. *Neurosci Res* 1999; 35: 77-83.
- Hachisuka J, Furue H, Furue M, et al. Responsiveness of C neurons in rat dorsal root ganglion to 5-hydroxytryptamine-induced pruritic stimuli in vivo. *J Neurophysiol* 2010; 104: 271-9.
- Li TT, Ren WH, Xiao X, et al. NMDA NR2A and NR2B receptors in the rostral anterior cingulate cortex contribute to pain-related aversion in male rats. *Pain* 2009; 146: 183-93.
- Tanimoto S, Nakagawa T, Yamauchi Y, et al. Differential contributions of the basolateral and central nuclei of the amygdala in the negative affective component of chemical somatic and visceral pains in rats. *Eur J Neurosci* 2003; 18: 2343-50.
- Watanabe T, Yamamoto R, Maeda A, et al. Effects of excitotoxic lesions of the central or basolateral nucleus of the amygdala on naloxone-precipitated withdrawal-induced conditioned place aversion in morphine-dependent rats. *Brain Res* 2002; 958: 423-8.
- Watanabe T, Nakagawa T, Yamamoto R, et al. Involvement of noradrenergic system within the central nucleus of the amygdala in naloxone-precipitated morphine withdrawal-induced conditioned place aversion in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2003; 170: 80-8.
- 松原貴子, 沖田 実, 森岡 周. ペインリハビリテーション, 三輪書店, 東京, 2011, p.153.
- Castaneda-Corral G, Rocha-González HI, Araiza-Saldaña CI, et al. Role of peripheral and spinal 5-HT6 receptors according to the rat formalin test. *Neuroscience* 2009; 162: 444-52.
- 本多健治, 高野行夫. 疼痛試験法の実際. *日薬理誌* 2007; 130: 39-44.
- Ohmichi M, Ohmichi Y, Ohishi H, et al. Activated spinal astrocytes are involved in the maintenance of chronic widespread mechanical hyperalgesia after cast immobilization. *Mol Pain* 2014; 10: 6.
- Sekino Y, Nakano J, Hamaue Y, et al. Sensory hyperinnervation and increase in NGF, TRPV1 and P2X3 expression in the epidermis following cast immobilization in rats. *Eur J Pain* 2014; 18: 639-48.
- Ikeda R, Takahashi Y, Inoue K, et al. NMDA receptor-independent synaptic plasticity in the central amygdala in the rat model of neuropathic pain. *Pain* 2007; 127: 161-72.
- Sun YG, Zhao ZQ, Meng XL, et al. Cellular basis of itch sensation. *Science* 2009; 325: 1531-4.

Effects of joint immobilization by cast on the itch sensation and the negative affective component of pain

Kazuko Noda,¹ Masanori Ogata,^{1,2} Hisanao Akita,^{1,2} Miki Sakamoto,³ Hitoshi Ishibashi^{1,2}

¹Department of Physiology, Kitasato University School of Allied Health Sciences

²Division of Brain Science, Graduate School of Medical Sciences, Kitasato University

³Department of Physical Therapy, Kitasato University School of Allied Health Sciences

Background: Immobilization of joint by cast is commonly used for resting the injured joint, but it often causes the reduction of the pain threshold for mechanical stimuli. We have reported that the hyperalgesia induced by intraperitoneal injection of paclitaxel, one of the chemotherapeutic agents clinically used to treat several types of cancer, reduced the negative affective component of pain using a conditioned place aversion (CPA) test. However, it remains unclear whether the cast-immobilization affects the emotional component of pain. Furthermore, although itching is a frustrating problem for a person with a cast, little is known about the effect of cast-immobilization on itch-associated response in experimental animals. In this study using rats, therefore, we examined whether the cast-immobilization modulates itch sensation and alters the pain-induced place aversion.

Methods: To examine the effects of cast immobilization on pain- and itching-behaviors in rats, one hind limb was wrapped with a wire mesh to keep the ankle joint at maximum plantar flexion for 14 days and observation of behavior was conducted after cast removal for over 14 days. The pain perception thresholds to mechanical stimulation were measured by using calibrated von Frey filament before and after cast immobilization. The pain-induced emotional component was evaluated using the CPA test.

Results: The joint immobilization elicited the reduction of the paw withdrawal threshold which continued larger than 14 days after cast removal. The serotonin-induced itch-associated responses including licking and biting behavior were elevated when compared with sham-operated control rats. Furthermore, the formalin-induced CPA was abolished in the rats with the cast treatment.

Conclusions: The joint-immobilization by the cast not only reduces the mechanical pain threshold but also facilitates itch sensation. On the other hand, the cast-immobilization may disturb the paired-associated learning between the painful stimulation-induced aversive emotion and the pain-conditioned environment.

Key words: cast immobilization, itch sensation, hypersensitivity, emotional component of pain