

20020209

厚生労働科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者の筋・骨格系の痛みに対する鍼灸及び徒手的治疗法の

除痛効果に関する基礎的および臨床的研究

(H14-長寿-029)

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 水村和枝

平成15(2003)年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 高齢者の筋・骨格系の痛みに対する鍼灸及び徒手的治疗法の除痛効果に  
関する基礎的および臨床的研究 ----- 1  
水村和枝

### II. 分担研究報告

1. 筋・骨格系の痛みモデル動物における侵害受容器反応の解析----- 10  
水村和枝

2. 筋および筋細径求心線維脊髄投射の形態学的研究----- 22  
杉浦康夫

3. 高齢者の筋・骨格系の痛みに対する徒手的治疗法の除痛効果の評価  
およびモデル動物における筋・骨格系の痛みに対する各種徒手  
治療法の除痛機構の解析 -----29  
猪田邦雄, 肥田朋子

4. モデル動物における筋・骨格系の痛みに対する鍼灸の除痛機構の解析  
----- 36  
川喜田健司

5. 高齢者の筋・骨格系の痛みに対する鍼灸の除痛効果の評価----- 44  
勝見泰和

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----51

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----53

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
総括研究報告書

高齢者の筋・骨格系の痛みに対する鍼灸及び徒手的治疗法の除痛効果に関する  
基礎的および臨床的研究

主任研究者 水村和枝 名古屋大学環境医学研究所神経性調節分野 教授

**研究要旨：**高齢者はしばしば腰痛・下肢痛を始めとした筋・骨格系の痛みを有し、それは高齢者の活動を制限し、QOLに大きな影響を与えている。これらの痛みの発生機構を科学的に解明し、適切な治療法を提示することは、高齢化社会を迎えている現在、大きな課題である。そこで本研究では、若年および老齢ラットに筋肉痛・関節痛のモデルを作成し、このモデルを用いてその痛みの神経機構および鍼灸・徒手的治疗法の除痛機構を解明する。また、最も有効性の高い方法について臨床的に明らかにすることを目的とする。1年度目に当たる今年度は、伸張性筋収縮によりラットに筋肉の圧痛覚過敏が生じることを、疼痛行動、逃避反射筋電図活動、脊髄後角のC-Fos発現を指標にして明らかにした。また、遅発性筋痛の程度、持続時間が阻血（ウサギ）または繰り返し寒冷ストレス（ラット）により延長することを認めた。ラット腓腹筋を支配する単一C線維受容器が数分節にわたり脊髄後角I, II, III層に終末を作っていることを明らかにした。またラット腓腹筋に分布するペプチド陽性神経は血管に沿って分布するもの、血管とは無関係に分布するものが見られた。さらに、カラゲニン筋注により筋痛を起こしたラットの脊髄後角WDRニューロンの受容野が拡大し、新しい受容野が出現することを認めた。ヒトにおいては、実験的筋痛を作成し、バイブレーション治療（運動直後または運動2日後に実施）の効果の評価を若年層を対象に行い、いずれの時期に実施した場合も疼痛や重だるさ感および関節可動域制限を軽減させ、皮膚厚や深部血流量を増大させることを明らかにした。勝見らは高齢の腰痛患者で圧痛点・トリガーポイントを検索し、一般的な経穴に対する置針とトリガーポイント部への置針とでは後者がより有効であることを明らかにした。

分担研究者氏名・所属機関名  
及び所属機関における職名

杉浦康夫	名古屋大学大学院 医学研究科・教授
猪田邦雄	名古屋大学医学部 保健学科・教授
肥田朋子	名古屋大学医学部 保健学科・助手
川喜田健司	明治鍼灸大学・教授
勝見泰和	明治鍼灸大学・教授

A. 研究目的

高齢者はしばしば腰痛・下肢痛を始めとした筋・骨格系の痛みを有し、それは高齢者の活動を制限し、QOLに大きな影響を与えている。これらの痛みの発生機構を科学的に解明し、適切な治療法を提示することは、高齢化社会を迎えている現在、大きな課題である。そこで本研究で

は、若年および加齢ラットに筋肉痛・関節痛のモデルを作成し、このモデルを用いてその痛みの神経機構および鍼灸・徒手治療法の除痛機構を解明する。およびトリガーポイントの臨床的意義を明らかにすることにある。

本年度は、動物実験では若年動物に実験的に筋痛モデルを作成して筋痛を評価すること、筋痛を慢性化させる方法を探ること、筋求心神経のペプチド含有、脊髄内投射様式、脊髄ニューロンの反応性等を解析する。また、関節炎症における寒冷痛覚過敏の機構の1つの可能性として、冷感受性イオンチャネルの発現の変化を解析する。また健康成人に実験的筋痛を作成しバイブレーション治療を実施して、各種検査により効果を定量的に評価し、治療効果の判定における各種検査方法の有用性、限界等を明らかにする、臨床的には高齢腰痛患者を対象として、トリガーポイント及び経穴へ置針し、その効果を比較する。

## B. 研究方法

### 1. ラット伸張性収縮による筋痛モデルにおける痛みの評価

ラットの神経の電気刺激により長趾伸筋を収縮させると同時に伸展を加えて伸張性収縮させ、その前後で圧痛の評価をRandall Selitto法による疼痛試験と脊髄後角におけるcFos発現、筋電図を指標としておこなった。

### 2. 伸張性運動負荷による筋痛モデルに対する阻血及び繰り返し寒冷ストレスの影響—筋痛慢性化の試み

筋痛モデルとして家兎に伸張性収縮による遅発性筋痛(DOMS)を作成し、その評価を反射性EMG(川喜田)を用いておこない、大腿動・静脈結紮により後肢を虚血状態にすることにより逃避反射の増強が遅延するか調べた。ラットモデルに対しては繰り返し寒冷ストレス(22℃から4℃へ30分ごとに暴露, 2日間)を与えて、圧痛覚過敏状態が遅延するかどうか調べた。

### 3. 寒冷痛覚過敏状態にあるラット単関節炎モデルにおける冷感受性イオンチャネルの発現

関節痛モデルとしては足根関節内へのアジュバント注入による単関節炎モデルを使用し、アジュバント投与後2週間のラットのL4-6後根神経節からmRNAを抽出し、CMR1及びTREK1の発現をRT-PCRにより半定量的に調べた。

### 4. 単一筋求心神経の脊髄内投射様式

モルモット後根神経節内の電気生理学的に機能を同定した単一神経細胞にトレーサー(PHAL)を注入し、3-5日後に灌流固定し、免疫組織化学により腓腹筋からの無髄一次求心性神経終末の脊髄内分布を調べた。

### 5. 筋に分布するペプチド陽性神経の形態学的解析

筋の知覚受容の末梢におけるメカニズムを明らかにするため、筋に分布するペプチド陽性神経線維、VR1発現神経線維の形態を免疫組織化学的に調べた。

### 6. ラット脊髄後角ニューロンの反応特性の筋炎症による変化

筋炎症モデルとしてカラゲニンの筋内投与を行い、細胞外記録により脊髄後角ニューロンの反応特性の変化を調べた。

### 7. ヒト実験的筋痛に対するバイブレーション刺激の影響の評価

健康若年者上腕に伸張性収縮によるDOMSを作成し、バイブレーション治療法を実施し、その前後の筋硬度、圧痛閾値、電気刺激に対する深部痛覚閾値、血流、関節角度を継続的に測定し、その効果を評価した。

### 8. 高齢者の腰痛に対するトリガーポイント及び経穴への置針の効果

対象は6ヶ月以上慢性的に腰下肢痛が存在し、退行変性以外の基礎疾患が認められない65歳以上の高齢者とした。治療

は週1回の頻度で3回行い、その後3週間の無治療期間をもうけるというAB法を用いた。治療効果の評価には腰下肢の主観的な痛みを捉える目的でvisual analog scale (VAS)と、QOLを把握する目的でpain disability assessment scale (PDAS)とRoland Morris Questionnaire (RMQ)をそれぞれ記録した。

(倫理面への配慮) 動物実験は各研究者の所属する施設(名古屋大学、明治鍼灸大学)の動物実験指針にのっとり実施し、またそれぞれの動物実験委員会の承認の下におこなった。臨床実験は、ヘルシンキ宣言を遵守し、各施設の「ヒトを対象とする実験」の実験指針に沿って行い、かつ倫理委員会の承認を受けて実施した。

### C. 研究結果

本年度には2回の研究会を実施し、研究発表と情報交換もおこなって、より有用な筋痛モデル作成法、筋痛評価法、筋痛治療法を検討した。

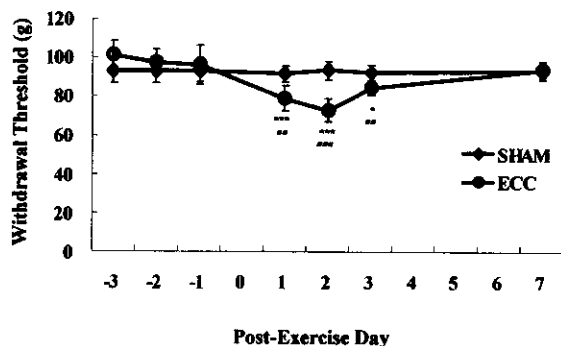


図1. 伸張性収縮運動負荷後の圧痛閾値の変化 SHAM: 伸張のみを負荷, ECC: 伸張性収縮負荷。ECC群では運動負荷2日目ピークとする圧痛閾値の低下がみられる。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ は運動負荷直前日の値を基準とした。## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ は各測定日における群間の有意差を示す。

#### 1. ラット伸張性収縮による筋痛モデルにおける圧痛

伸張性収縮負荷後1日からRandall-Sellito法で測定した圧痛閾値は低下し、2日後に最低値を示し、3日後もまだ低

下した状態を保った。しかし7日後には圧痛閾値は刺激前の状態に戻った(図1)。一方、皮膚を主として刺激するvon Frey Hairによる逃避反応閾値は伸張性筋収縮負荷により変化しなかった。これらの結果を考え合わせると、筋の圧痛閾値が低下していたことが推定された。筋電図により測定した逃避反射でも同様な結果が得られた。

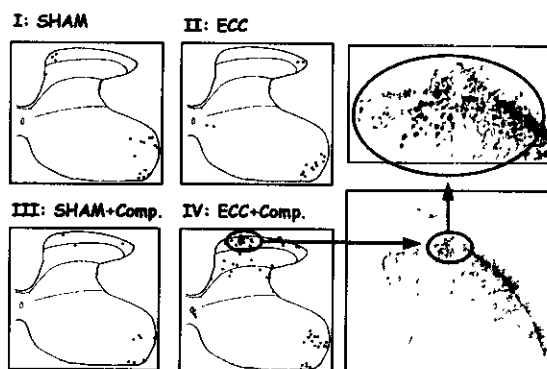


図2. L4におけるc-Fos陽性細胞の分布

各群の代表的切片から camera lucida により描いた c-Fos の分布図。1 個の黒丸は 1 個の c-Fos 陽性細胞を示す。SHAM、ECC、SHAM+Comp. 群では脊髄灰白質表層において c-Fos 陽性細胞はほとんどみられないのに対し、ECC+Comp. 群では明らかな c-Fos 陽性細胞数の増加がみられる。右下の写真は ECC+Comp. 群のもので camera lucida により描かれている c-Fos の分布図と同じ切片を撮影したもの。右上の写真はその拡大。黒色に染色された c-Fos 陽性細胞が認められる。

脊髄におけるc-Fos発現は、伸張性収縮のみ(ECC群)では増大せず、また、筋の圧迫刺激(SHAM+COMP群)だけでも増大しなかった。伸張性収縮をおこなった2日後に筋に同じ強さの圧迫刺激を加えた場合には(ECC+COMP群)、後角におけるc-Fos発現が増大し、とくに後角表層でその変化は顕著であった(図2, 3)。これらの結果は、伸張性収縮を負荷された筋に圧痛覚過敏が生じていることを示していると考えられる。対側にはわずかな変化が見られたのみであった。

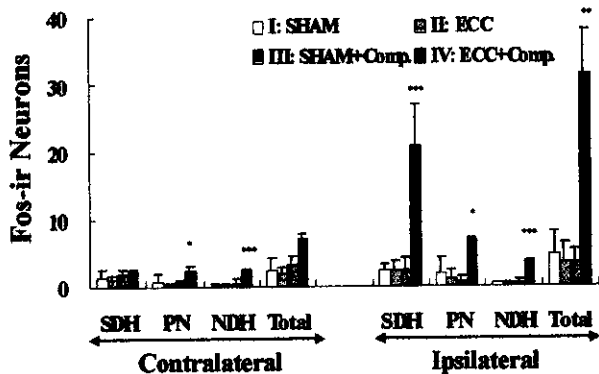


図3. L4におけるc-Fos陽性細胞数  
 横軸の左半分は運動負荷または/および圧迫刺激を与えた側の反対側のデータを、右半分は同側のデータを示す。SDH: 表層、PN: 固有核、NDH: 灰白質頸部、Total: SDH+PN+NDH。ECC+Comp. 群の同側のSDHでは、他の3群に比べてc-Fos陽性細胞数の有意な増加がみられる。  
 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ は各脊椎部位のSHAM群を基準とした比較による。

## 2. 伸張性運動負荷による筋痛モデルに対する阻血及び繰り返し寒冷ストレスの影響—筋痛慢性化の試み

伸張性収縮運動を行うと運動負荷群では運動負荷直後から腓腹筋の伸展刺激より屈曲反射(EMG)が出現し、その振幅は運動負荷2日後に最も大きくなり、7日後には消失した。これに対して阻血運動負荷群では、運動負荷2日後に振幅が最も大きくなるがその振幅は運動負荷7日以降も存在していた(図4)。

一方、阻血を行ったのみでは屈曲反射は殆ど出現しなかった。振幅が最も大きくなる運動負荷2日後に運動負荷を行った腓腹筋を触知すると、運動負荷群・阻血運動負荷群とも筋腱移行部付近を中心に索状硬結を全例で確認することが出来た。索状硬結は運動負荷14日後まで触知可能であり、それに伴い閾値低下部位も14日後まで出現した。

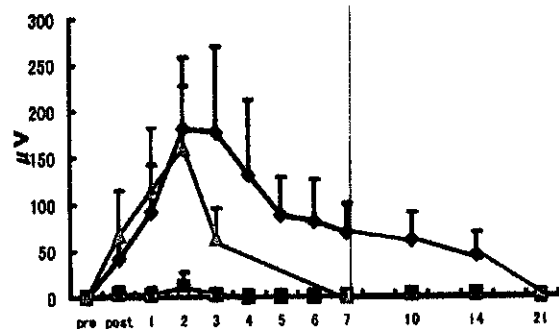


図4. 阻血による逃避反射の経時的変化  
 グラフは腓腹筋を伸展刺激時に大腿二頭筋から記録される逃避反射に対する阻血の影響を示し、◆は阻血+運動負荷群、■は阻血群、▲は運動負荷群の振幅( $n=6$ , mean  $\pm$  S.D.)をそれぞれ示す。なお、縦軸は逃避反射の振幅( $\mu V$ )を、横軸は時間変化(day)を示す。  
 pre: 運動負荷前、post: 運動負荷直後

## 3. 寒冷痛覚過敏状態にあるラット単関節炎モデルにおける冷感受性イオンチャネルの発現

CMR1, TREK1いずれも無処置群に比べ有意な変化が観られなかった。しかし、炎症群内で炎症側と非炎症側とを比べると、CMR1は炎症側が有意に低下していた。

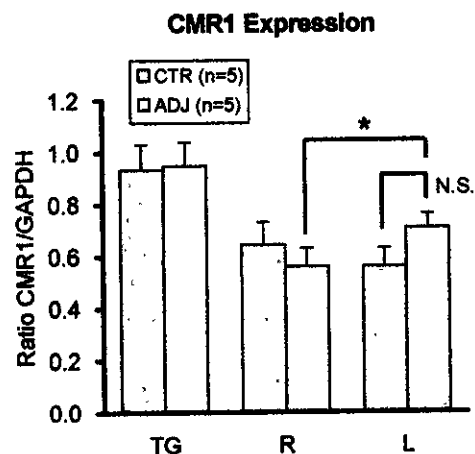


図5. CMR1 mRNA 発現量の比較。  
 CTR: 健常群, ADJ: 炎症群. \*:  $P < 0.01$ , N.S.:  $P > 0.05$ .

#### 4. 単一筋求心神経の脊髄内終末の追跡

筋からの無髄知覚神経は神経終末が後索表層を吻尾方向に数百マイクロンから数分節にわたって走行するものがあった。また神経終末は主にI, II, III層に終末しており、終末膨大の密度がそれほど高くない神経叢を形成していた。筋に分布する無髄の求心性神経は、形態的には皮膚に分布する神経と内臓に分布する神経の中間の特徴を持っていることがわかった。

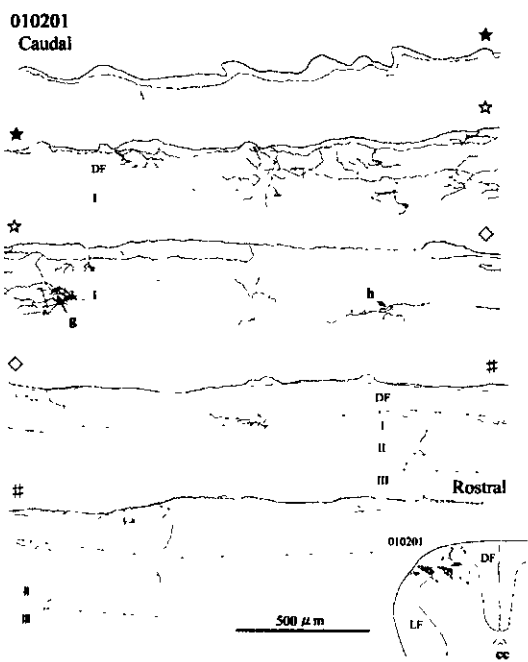


図6. 筋に分布する無髄知覚神経の脊髄投射の例

#### 5. 筋に分布するペプチド陽性神経の形態学的解析の実験

筋に分布する神経線維は、横紋筋線維に神経筋終板を形成しているもの、血管に沿って分布しているもの、血管とは無関係に分布しているものが見られた。知覚神経と思われるCGRP陽性神経線維は血管に沿ったり、血管とは無関係に分布しており、これらの神経は横紋筋やその周囲の組織からさまざまな情報を感受し、痛みなど筋に由来する感覚の受容に関与していると思われる。



図7. 筋に分布するCGRP陽性神経線維血管に沿って分布しているもの。

#### 6. ラット脊髄後角ニューロンの反応特性の筋炎症による変化

筋へのカラゲニン注入後、LTMニューロンは4例とも受容野の面積変化が認められず、WDRニューロンでは面積の拡大が認められたものが6例中4例、変化がなかったもの、または受容野の縮小が認められたものがそれぞれ1例であった。

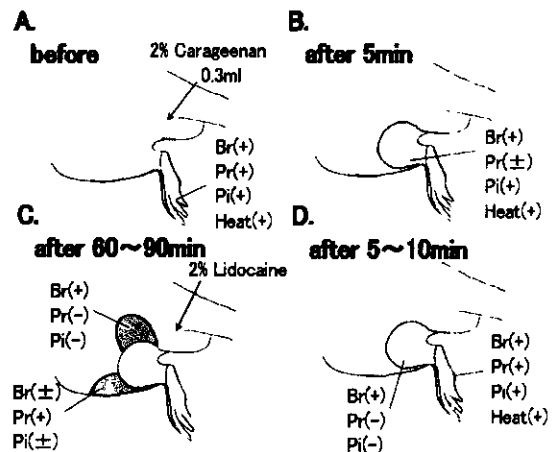


図8 カラゲニン筋注による受容野の変化とリドカインによる抑制効果

カラゲニンを筋肉内に注入して受容野の拡大がみられたのち、局所麻酔薬であるリドカインを同じ部位に注入した。新しく拡大した受容野は縮小し、反応性も抑制された。しかし、元の受容野の面積および刺激に対する反応性は変化しなかった。受容野を刺激した際、応じた刺激には(+)、応じなかった刺激は(-)で示している。Br: brush, Pr: pressure, Pi: pinch。

カラゲニン注入部位にリドカインを注入した例では、2ニューロンのうち1例では拡大した受容野の縮小が認められ、残りの1例は変化がなかった(図8)。

### 7. ヒト実験的筋痛に対するバイブレーション刺激の影響の評価

遅発性筋痛は運動1日後に生じた。まだ疼痛の残存している運動2日後において、肘関節伸展制限、筋厚増大が観察された。また、筋硬度、深部血流量、圧痛閾値には影響がありそうだったがはっきりしなかった。バイブレーション治療は、運動直後に行う群と運動2日後に行う群を設定したが、両群とも疼痛や重だるさ感および関節可動域を軽減させ(図9)、皮下の厚みを含む皮膚厚や深部血流量を増大させた。

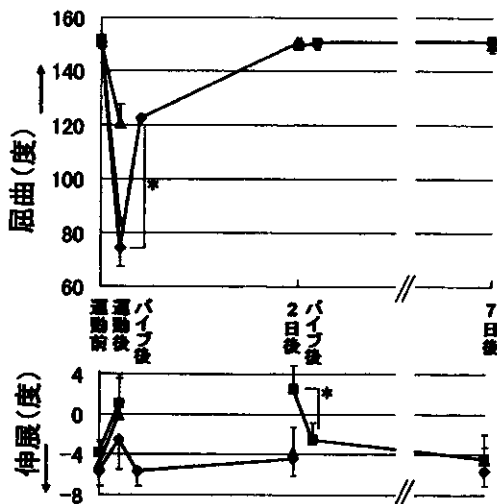


図9 肘関節可動域の経時的変化

上図が屈曲角度で下図が伸展角度(マイナス表示)。運動により全群で可動域が大きく制限され、特に屈曲が大きく制限された。運動2日後には戻る。治療時期に関係なく、バイブレーター治療により可動域は改善した(\*,  $p < 0.05$ )。

### 8. 高齢者の腰痛に対するトリガーポイント及び経穴への置針の効果

治療3回後にはトリガーポイント治療群でVASで表した痛みの程度は大幅に低下し、それに伴いQOLの改善も見られた。一方、

経穴治療群ではQOLに多少の改善は見られたものの、VASに殆ど変化は見られなかった。(図10)

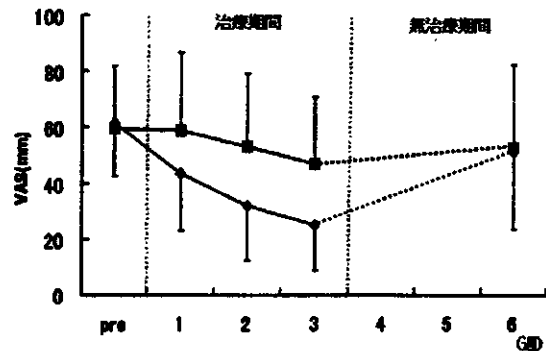


図10 鍼治療による腰下肢痛の変化

図は腰下肢痛の変化を示し、縦軸はVAS、横軸は週を、また◆はトリガーポイント治療群、■は経穴治療群の変化をそれぞれ示している。

### D. 考察

本年度の実験により、動物における筋痛の存在を逃避反射筋電図及びRandall-Selitto法とvon Frey Hair法の併用により示すことができることが明らかになった。これは今後、筋痛に有用な薬物の開発などに有用であると考えられる。また、まだ不十分ではあるとはいえ虚血または寒冷ストレスにより実験的に筋痛を慢性化させる可能性があることが示され、慢性筋痛の機構の解析に有用な手段となると考えられる。また筋求心C線維の投射様式、筋内における求心神経の支配様式などの基礎的なデータが得られ、今後加齢動物、慢性筋痛動物などでも同様な実験を実施することにより、筋求心神経の支配様式の変化を知ることができると考えられる。急性の炎症状態で脊髄ニューロンの受容野の変化が生じることが明らかにされた。これは筋痛に特徴的な関連痛の機構を解明する上で重要であると思われる。こちらも今後慢性的筋痛モデル動物、加齢動物で解析することにより、新しい知見が得られるものと思われる。



ヒトでの実験的筋痛では筋痛に関連した各種パラメーターが測定され、測定上の問題点が明らかになった。臨床的には経穴治療よりもトリガーポイント治療がより有効であることがVASやQOLに関するアンケート調査で明らかになった。今後は各種パラメーターの測定法等にさらに検討を加え、臨床的な筋痛の治療効果の判定にこれらの各種パラメーターを使い、より客観的な判定をする努力が必要であると考えられる。

## B. 結論

本研究により、筋痛に関する基礎的な研究と、臨床治療とを結ぶ橋が生まれつつある。今後さらに両者の連携を深めることにより、より有効な治療法を探ることが可能になると考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Takahashi K., Sato J., and Mizumura K. Responses of primary afferent C-fibers to cold were facilitated in adjuvant-monoarthritic rats hypersensitive to cold. Pain.(submitted)
- Taguchi T., Sato J. and Mizumura, K. A combination of eccentric muscle exercise and repeated cold stress (RCS) induced prolonged hyperalgesia - an effort for developing an animal model of chronic muscle pain, *Environ. Med.*, 46 (2002) 74-76.
- Banik RK, Kasai M, Mizumura K. Reexamination of the difference in susceptibility to adjuvant-induced arthritis among LEW/Crj, Std:Wistar/ST and Slc:SD rats. *Exp.Anim.* 51 (2):197-201, 2002.
- Suzuki Y, Sato J, Kawanishi K, Mizumura K. Tissue glucose level modulate the mechanical responses of cutaneous nociceptors in streptozotocin-diabetic rats but not normal rats in vitro. *Pain* 99 (3):475-484, 2002.
- 水村和枝, 杉浦健之, 富永真琴 プラジキニンによるバニロイド受容体 1(VR1)の修飾-プラジキニンによる侵害受容体の興奮とその熱に対する感作の1機

構一, 脳機能の解明-生命科学の主潮流 赤池紀扶, 東秀穂, 阿部康二, 久保千春 編集, ガイア出版会, 福岡 477-482, 2002

- 水村和枝 侵害受容器における受容変換と感作の機構 別冊・医学のあゆみ“痛みとその制御機構-分子メカニズムと治療の最前線” 土肥修司編集 医歯薬出版, 東京, 7-12, 2002
- 水村和枝 炎症による痛みとプラジキニン 整形・災害外科 45(12): 1216-1217, 2002
- 水村和枝 痛み受容器(侵害受容器)の生理学-痛み受容器における受容変換・感作の機構- 日本ペインクリニック学会誌 9(4): 400-406, 2002
- 尾崎紀之, 杉浦康夫, 総説: 内臓痛と体性痛のメカニズム、ペインクリニック、24(6), 2003 (in press)
- Ling L-J, Honda T, Ozaki N, Shiraishi Y, Shimada Y, Sugiura Y, The central projection of unmyelinated (C) primary afferent fibers from gastrocnemius muscle in the guinea pig. *J Comp Neurol* (in press).
- Ling L-J, Honda T, Ozaki N, Shimada Y, Sugiura Y, The central projection of unmyelinated (C) primary afferent fibers from gastrocnemius muscle in the guinea pig in comparison with cutaneous and visceral afferents. In *Progress in Pain Research and Management*, Vol.24, edited by Jonathan O. Dostrovsky, Daniel B. Carr, and Martin Koltzenburg, IASP Press, Seattle, (in press)
- Sugiura Y, Terminal organization of C-fiber afferents related with nociception or non-nociception. *Pain research* 17(1): 1-13, 2002.
- 猪田邦雄, 加藤智香子, 河村守雄, 高齢者の転倒予防、現代医学(投稿中)
- 猪田邦雄: 骨・関節疾患のリハビリテーション-早期運動療法におけるCPM-(特集: 整形外科領域での最近の話題(1)), *医学と薬学* 48: 793-801, 2002
- Koeda T, Sato J., Kumazawa T., Tsujii Y., and Mizumura K.. Effects of adrenoceptor antagonists on the cutaneous blood flow increase response to sympathetic nerve stimulation in rats with persistent inflammation. *Jpn. J. Physiol.* 52(2002)521-530.
- Itoh K., Kawakita K. Effect of indomethacin on the development of eccentric exer-

- cise-induced localized sensitive region in the fascia of the rabbit. *Jpn. J. Physiol.*, 52, 173-180, 2002.
- Kawakita K., Itoh K., Okada K. The polymodal receptor hypothesis of acupuncture and moxibustion, and its rational explanation of acupuncture points. *International Congress Series 1238*, 63-68, 2002.
- 伊藤和憲、岡田 薫、川喜田健司、実験的トリガーポイントモデルから記録された電気活動に対する検討、*全日本鍼灸学会雑誌*、52 (1)、24-31、2002
- 川喜田健司、岡田薫、伊藤和憲、トリガーポイントに関する研究の現状と諸問題、*日本歯科東洋医学会誌*、21 (1)、24-31、2002
- 川喜田健司、鍼灸刺激による鎮痛発現の機序-ポリモーダル受容器から脳内オピオイドまで-、*医学の歩み*、203 (6)、455-458、2002
- 井上基浩、北條達也、片山憲史、矢野忠、勝見泰和。根性坐骨神経痛に対する神経根鍼通電療法の開発とその有効性。*明治鍼灸医学*。30:1-8, 2002.
- 2. 学会発表**
- 青山盛彦、佐藤純、高橋賢、水村和枝。リウマチ様単関節炎ラットの痛覚過敏に対する気象要因変化(低気圧・低温曝露)の影響(第2報) *日本生気象学会誌* 39(3):65, 2002
- 高橋賢、佐藤純、水村和枝。慢性炎症における冷痛覚過敏には、末梢神経活動の変化が関与する。第48回日本宇宙航空環境医学総会プログラム予稿集 p.57, 2002
- 高橋賢、佐藤純、水村和枝。慢性炎症時における冷アロディニアの末梢機構の解析。 *Pain Research* 17(3):34, 2002
- 高橋賢、片野坂公明、小崎康子、佐藤純、水村和。TREK-1とCMR1の mRNA発現量は、アジュバント単関節炎ラットにおけるC-線維の冷応答増強時に増加していない。*Japanese Journal of Physiology*, 2003 (in press).
- 田口 徹、田村良子、佐藤 純、水村和枝。ラットにおける伸張性筋収縮後の圧痛 *Japanese Journal of Physiology*, 2003 (in press).
- Takahashi K., Sato J., Mizumura K. Responses of primary afferent C-fibers to cold were facilitated in the adjuvant-monoarthritic rats hyperalgesic to cold. *International Symposium on Plasticity of Pain System (ISPPS) 2002*.
- Ushida T, Ozaki N, Ling L-J, Sugiura Y, Peptidergic innervation of gastrocnemius muscle in the rat. *Neuroscience Research* 27(Suppl), 2003.(in press)
- Ling L-J, Sugiura Y, Honda T, The Central projection of unmyelinated afferent Fibers from the gastrocnemius muscle in guinea pigs. Abstracts, 10th world congress on pain, IASP Press, Seattle, 2002. p159.
- Ling L-J, Honda T, Sugiura Y, A comparative study of central projections from somatic, visceral and muscle C-afferent fibers. *Acta Anatomica Nipponica* 2002; 77(Suppl), p51.
- Ling L-J, Honda T, Sugiura Y,. The central projection of unmyelinated afferent fibers from gastrocnemius muscle in guinea pigs. *Neuroscience Research* 2001; 25(Suppl): S64.
- 凌 麗君、本多たかし、杉浦康夫、腓腹筋からの単一無髄神経の脊髄内終末の解析。*日本疼痛学会誌* 2001; 16: p105
- Itoh K., Okada K., Kawakita K. Effect of indomethacin on the electrical activity recorded at experimentally -induced trigger points in rabbits. 10th world congress on pain, San Diego, USA, 2002.8.17-22.
- Itoh K., Okada K., Kawakita K. The changes of pain thresholds on exercise-induced delayed onset muscle soreness during acupuncture stimulation, The 5th Asian Federation of Sports Medicine Congress, Seoul, Korea, 2002.9.24-27.
- 伊藤和憲、岡田 薫、川喜田健司、伸張性収縮運動後に生じた閾値低下部位に対するインドメタシンの影響、第79回日本生理学会大会、広島、2002.3.28-30.
- 伊藤和憲、萩原裕子、桑野素子、金本貴行、岡田 薫、川喜田健司、ウサギの実験的トリガーポイントから記録され

た電気活動の成因、第 51 回全日本鍼灸学会、筑波、2002.6.7-9

川喜田健司、基礎医学の研究成果と臨床医学のエビデンス（シンポジウム）、第 5 回補完代替医療学会、金沢、2002.11.9.

Inoue M, Katayama K, Hojo T, Yano T, Katsumi Y. The Effects of electrical acupuncture to regional blood flow of achilles tendon in Rat. The 5th Asian Federation of Sports Medicine Congress, Seoul, Korea, 2002.9.24-27.

Hojo T, Katsumi Y, Itoh Y, Nakazawa H, Takamine S, Hirasawa Y. Deep pain threshold at the tender points with delayed-onset muscle soreness. Korean-Japanese Joint Conference on Rehabilitation Medicine. Seoul, Korea 2002.9.24-27.

井上基浩, 北條達也, 片山憲史, 矢野忠, 勝見泰和. 根性坐骨神経痛に対する神経根鍼通電治療の試み. 第 51 回全日本鍼灸学会. 2002.6.7-9.

越智秀樹, 池内隆治, 矢野忠, 勝見泰和, 北條達也. 脛骨内側顆骨壊死症の臨床検討 -鍼灸師としての病態把握法-. 第 51 回全日本鍼灸学会学術大会, 茨城, 2002.6.7-9.

井上基浩, 片山憲史, 北條達也, 矢野忠, 勝見泰和. ラットのアキレス腱血流に及ぼすアキレス腱部鍼通電刺激の影響. 第 57 回日本体力医学会, 高知. 2002.9.28.

大野崇子, 勝見泰和, 北條達也, 小嶋晃義, 越智秀樹, 伊藤和憲, 北小路博司. 頸椎椎間板ヘルニアに対する鍼治療の 1 症例. 第 22 回近畿学術集会, 滋賀. 2002.12.1.

鷹峰澄子, 勝見泰和, 北條達也, 小嶋晃義, 北小路博司, 越智秀樹, 伊藤和憲. 関節リウマチ患者の頸部痛に対する鍼灸治療について. 第 22 回全日本鍼灸学会近畿学術集会, 滋賀, 2002.12.1.

竹澤敦, 勝見泰和, 北條達也, 小嶋晃義, 越智秀樹, 伊藤和憲. 鍼の刺入寸度による健康成人での電流知覚閾値の変化について. 第 22 回近畿学術集会, 滋賀. 2002.12.1.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

筋・骨格系の痛みモデル動物における侵害受容器反応の解析

分担研究者 水村和枝 名古屋大学環境医学研究所神経性調節分野 教授

**研究要旨** 高齢者はしばしば腰痛・下肢痛を始めとした筋・骨格系の痛みを有し、それは高齢者の活動を制限し、QOLに大きな影響を与えている。また、関節リウマチなどの慢性炎症患者は寒冷時にしばしば痛みの増悪を訴え、これもまたQOLを悪くしている。しかし、筋痛の神経機構、寒冷痛覚過敏の機構は不明である。本研究では、ラットに伸張性筋収縮を負荷し、これにより1日後から3日後まで圧痛閾値の低下が生じることをRandall-Selitto法による逃避行動閾値、脊髄後角におけるc-Fos発現を指標にして明らかにした。また、この動物に繰り返し寒冷ストレスを与えると、この圧痛閾値が低下している期間が延長することを明らかにし、より慢性的な筋痛モデルを作成できる可能性を示唆した。また、寒冷痛覚過敏状態にあるアジュバント単関節炎モデルラットの後根神経節において、冷感受性のあるイオンチャンネル（CMR1とTREK1）のmRNAの発現量を半定量的RT-PCRにより測定したが、これらのチャンネルの発現量に有意な増加を検出できなかった。このことより、冷感受性のあるイオンチャンネルの発現量の変化以外の機構が冷痛覚過敏に関っていると推定された。

#### A. 研究目的

肩凝り、腰痛などの筋骨格系に起因する痛みは極めて一般的であり、筋力低下や関節可動域の制限をとめない、日常生活動作や社会的活動を困難にしまう。高齢者になるほどその影響は深刻であり、医療費を高騰させ、社会に大きな負担を与えていると思われる<sup>1,2)</sup>。よって、筋骨格系に起因する痛みのメカニズムを解明し、治療法を確立することは医学的、社会的に意義が大きい。

本実験では筋骨格系のうち筋に起因する痛み（以下、筋痛という）および関節リウマチにおける寒冷痛覚過敏に焦点を当てている。これまでこの分野に関する研究は少なく、そのメカニズムはほとんどわかっていない。その理由としては、筋痛については1) 筋は皮膚や脂肪層に覆われているので、筋だけをターゲットにして痛みを調べることが困難であった、2) 痛みのメカニズム解明に必要な信頼できる動物モデルが存在しなかったこと、一方、寒冷痛覚過敏においては、痛覚過敏の研究がもっぱら熱と機械刺激に対

する痛覚過敏に向けられていた、などの点が挙げられる。

臨床的に、筋痛は急性の筋痛（打撲、外傷、運動後の筋痛）と慢性の筋痛（筋筋膜性疼痛症候群、線維性筋痛症候群など）の2つに大別できる<sup>3)</sup>。急性の筋痛は炎症過程の消退とともに、あるいは一定期間を経た後、速やかに消失する。一方、慢性の筋痛はその原因を特定することが難しく治療が困難であるため、急性の筋痛より臨床的に問題となる。そのため我々は最終的な研究の目標として、慢性筋痛の動物モデルを作製し、その痛みのメカニズムを解明しようとするものである。筋に限らず、慢性の疼痛状態は基礎病変の治療の遅延などにより痛みがある程度持続することや基礎病変そのものにより痛み伝達系に可塑的な変化が生じる結果起こるものと考えられる。そこで我々はまず急性筋痛のモデル動物を作製し、それにストレスを負荷することによって慢性筋痛モデル動物の作製を試みた。

これまでに存在する急性筋痛のモデルは、起炎物質（カラゲニンなど）を筋に注入して作製されている<sup>9)</sup>。これらの方法による筋痛は持続が短く臨床的だと言い難い。そこで我々は、より日常的に見られる運動誘発性の筋痛（遅発性筋痛、以下DOMSという）を急性筋痛モデルとして作製しようと試みた。DOMSは筋の圧痛を主な特徴とし、強度で不慣れな運動を行ってから24-72時間後にピークとなるが、安静時の痛みはほとんどない。そのメカニズムは不明だが、等張性収縮や等尺性収縮よりも、伸張性収縮（Eccentric Contraction、以下ECCという）によってより生じやすいことがわかっている<sup>10)</sup>。DOMSに関してヒトでは様々な報告がなされているが、動物での報告はほとんどなく、また、DOMSに特徴的な圧痛の存在を調べた報告はない。そこで我々はラットにECCを負荷し、圧痛の存在を指標に、行動学的、免疫組織化学的実験を行い、DOMSモデル動物を作製した。行動学的実験による筋の圧痛の確認はRandall-Selitto式鎮痛効果測定装置を用いて行い、さらに圧痛が筋に起因するものであることを確かめるため、von Frey Hairテストを行って運動負荷筋表層にある皮膚の痛覚閾値を測定し比較した。また、さらに行動実験で観察されたECC後の圧痛を、痛みの指標である脊髄後角表層細胞におけるc-Fos蛋白発現から免疫組織化学的に調べた。

圧痛の存在を確認した後、引続きこのモデルに繰り返し寒冷ストレス（Repeated Cold Stress、以下RCSという）を組合せて負荷し、筋痛をより遷延化しようと試みた。RCSは自律神経系や動物の行動などに様々な影響を与え、とりわけ、全身性の持続的な痛覚過敏を引き起こすストレスとして知られている<sup>11)</sup>。

また、ヒトのリウマチを模倣する病態モデルとして広く用いられているラットのアジュバント単関節炎を用い、寒冷痛覚過敏が存在すること、C-線維受容器のうち、2種類の一次求心神経の冷感受性が増大していることを見出した。一つはC-低閾値機械受容器であり、この受容器の冷刺激に対する放電頻度は健常群の約1.8倍に増加して

いた。もう一つはC-侵害受容器であり、冷刺激に応じるこの受容器の割合は健常群の約7.0倍に増加していた。近年冷感受性を持つイオンチャンネルが数種類報告されている。CMR1は冷刺激およびメントールの投与により細胞の脱分極を誘発する非選択的陽イオンチャンネルで、三叉神経節や後根神経節などにおいて存在が確認されている<sup>12)</sup>。TREK-1は機械感受性および温度感受性を持つバックグラウンドK<sup>+</sup>チャンネルで、三叉神経節、後根神経節および平滑筋などにおいて発現している<sup>13)</sup>。アジュバント単関節炎動物に見られた一次求心神経の冷応答増強が冷感受性イオンチャンネルCMR1および/あるいはTREK-1の発現量増加によるかどうか、半定量的RT-PCR法を用いて両イオンチャンネルのmRNA発現量を解析した。

## I. ラットにおける伸張性収縮運動負荷後の圧痛

### B. 方法

#### 1. 実験動物と群分け

Sprague-Dawleyラット（オス、7週齢、実験開始時体重：200g）を56匹使用した。昼夜サイクル（昼：07.00-19.00）と室温（22-24°C）を一定にした部屋で、2匹/1ケージで飼育した。実験期間中、エサと水は自由に摂取させた。実験行程はすべて名古屋大学環境医学研究所の動物実験倫理規定に従った。

行動実験①（Randall-Selittoテスト）では、ラットを筋の繰り返し伸張だけを行ったSHAM群（n=6）と筋を伸張性収縮させたECC群（n=6）の2群に分けた。同様に、行動実験②（von Frey Hair test）では、ラットをSHAM群（n=7）とECC群（n=7）に分けた。c-Fos発現の免疫組織化学的研究では、SHAM群（n=3）、ECC群（n=3）、筋の繰り返し伸張刺激後2日目に同筋に圧迫刺激を加えたSHAM+Comp.群（n=3）、筋を伸張性収縮させた2日後に同筋に圧迫刺激を加えたECC+Comp.

群 (n=3) の 4 群に分けた。行動実験③では SHAM 群 (n=3) と ECC 群 (n=3) の 2 群に分け、伸張性収縮後のラットの行動量を測定した。さらに RCS の効果を調べた行動実験④では Randall-Selitto テストを行い、SHAM+RCS 群 (n=6) と ECC+RCS 群 (n=6) の 2 群にラットを分けた。

## 2. 運動負荷プロトコル

ラットをベントバルビタールナトリウム (50 mg/kg、腹腔内投与) で麻酔した。2 本の絶縁鍼電極を長趾伸筋 (EDL、右) を支配する坐骨神経とその分枝である総腓骨神経の近傍にそれぞれプラス極とマイナス極となるよう経皮的に刺入した (図 1)。電気刺激には電気刺激装置 (SEN-7203, Nihon Kohden Corp., Japan) およびアイソレータ (SS-202J, Nihon Kohden Corp., Japan) を用いた。運動負荷を行う直前に EDL が単収縮を起こす電流強度を測定し、100  $\mu$ A を超えた場合には電極位置を換えて、 $\leq 100 \mu$ A を満たすようにした。運動負荷には単収縮誘発閾値の 3 倍の電流強度を用い、刺激周波数を 50 Hz、矩形波電流持続時間を 1 msec とした。1 秒間の収縮と 3 秒間の休止のサイクルを 500 回反復した。運動負荷期間中直腸温をモニターし、ヒートパッドを用いて体温を生理的範囲 (37-38°C) に保った。

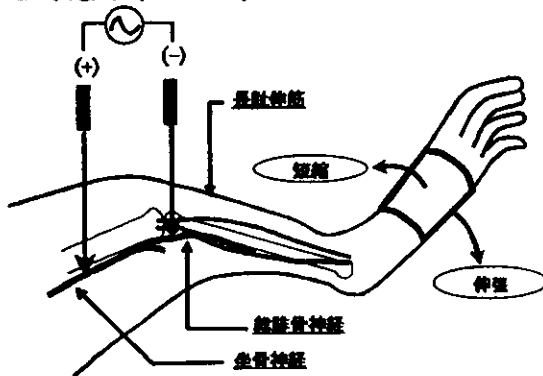


図 1. 伸張性収縮運動負荷の模式図

絶縁鍼電極 (+極: 坐骨神経、-極: 総腓骨神経) を経皮的に神経近傍に刺入し、電気刺激を与えて長趾伸筋 (EDL) を収縮させた。収縮と同期して足関節を底屈させ、EDL を伸張した (伸張性収縮)。

ECC 群のラットには、繰り返し電気刺激を与えて EDL を収縮させる間、同筋を伸張させた (伸張性収縮)。一方、SHAM 群のラットには、ECC 群と同様に絶縁鍼電極を刺入するが、電気刺激は与えず (EDL は収縮させず)、繰り返し伸張刺激のみ (SHAM 運動) を行い、コントロールとした。EDL の伸張には電気刺激に同期させたサーボモータ (CPL28T08B-06C2T, Oriental Motor Co. Ltd., Japan) を用い、ラットの足関節を 1 秒間かけて底屈約 30° から底屈約 90° まで動かし (EDL を伸張し)、3 秒間かけてもとの関節角度に戻して、これを繰り返した。

## 3. Randall-Selitto テストと von Frey Hair テスト

Randall-Selitto テストには Randall-Selitto 式鎮痛効果測定装置 (Ugo Basile, Italy) を用いた。まず、ラットの体幹をタオルで保定した。円錐形で先端が球状の圧迫子を毛剃りした皮膚の上から EDL に置き、16 g/sec のスピードで加圧し、ラットが後肢を引込めたときの加重を記録した。1 個体につき 1 日あたり 10 回測定し、後半 5 回の測定値の平均を圧痛閾値とした。

von Frey Hair テストでは 11 種類のフィラメント (19.5-813.9 g/mm<sup>2</sup>、直径: 0.5 mm) を用いた。各フィラメントを運動負荷した EDL 上の皮膚に当て、後肢を引込める反応を観察し、ビデオテープに録画した。閾値は極限法により決定した。

いずれのテストも測定は 1 日のうちの同時時間帯に行い、4 日間の訓練期間を経た後、運動負荷 1、2、3、7 日後に行った。また、測定を行う験者にはラットが SHAM 群か ECC 群のどちらに属するかがわからないようにブラインドをかけた。

## 4. 免疫組織化学的研究

SHAM、および ECC 群のラットは SHAM または ECC 運動負荷後 2 日目に、EDL に圧迫刺激を加えず、灌流固定した。SHAM+Comp.、および ECC+Comp. 群のラットは SHAM または ECC 運動負荷後 2 日目に EDL に圧迫刺激を加え、その 2 時間後に灌流固定した。運動負荷 2 日

目における EDL の圧迫刺激には Randall-Selitto 鎮痛効果測定装置の圧迫子を用い、剃毛した皮膚の上から行った。圧迫力は 160 g とし、10 秒圧迫、20 秒休止のサイクルを 30 分間行った。圧迫刺激終了から 2 時間後、灌流した。

灌流固定は、ラットを深麻酔 (50 mg/kg、腹腔内投与) し、0.1 M リン酸緩衝液と同緩衝液に溶かした 4% パラホルムアルデヒドを用いて行った。脊髄を素早く取出して髄節ごとに分け、同固定液で後固定した。凍結標本をクリオスタットにて 40  $\mu$ m 厚に切り、遊離法にて処理した。切片は内因性のペルオキシダーゼ活性を抑えるため 0.3%  $H_2O_2$  に浸し、バックグラウンドの染色を抑えるため 5% 正常ヤギ血清と反応させた。その後、5000 倍に希釈した一次抗体 (polyclonal rabbit anti c-Fos antibody, sc-52, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) に 3 日間、500 倍に希釈した 2 次抗体 (Biotinylated goat anti-rabbit IgG, BA-1000, Vector Laboratories, Inc.) に 90 分間、アビジン・ビオチン複合体 (Vectastain Elite ABC kit, pK-6100, Vector Laboratories, Inc.) に 90 分間、と順次反応させ、最後に DAB 反応により c-Fos 陽性細胞を可視化した。

脊髄灰白質を後角表層 (SDH, I-II 層)、固有核 (PN, III-IV 層)、灰白質頸部 (NDH, V-VI 層)、前角 (VH, VII-X 層) に分け<sup>10)</sup>、L4 における c-Fos 陽性細胞数をカウントした。カウントする際、切片がどの実験群に属しているかがわからないようにブラインドをかけた。

## 5. 行動量測定

行動量測定装置 (Animex Auto, MK-110, Muromachi Kikai Co., Ltd, Japan) を用い、SHAM または ECC 運動負荷前後 7 日間の行動量を測定した。データは 100Hz でサンプリングし、パソコンに取り込んだ。各日の昼夜 12 時間ごとの平均行動量を求めた。

## 6. RCS プロトコル (図 2)

SHAM、または ECC 運動を負荷した日の 19:00 から翌日の 9:30 まで低温環境 (4°C) に

暴露し、その後、9:30 から 19:00 まで 30 分間隔で、室温 (22°C) と低温環境との間を行き来させ、これを 2 日間繰り返した<sup>10)</sup>。低温環境暴露中もエサと水は自由に摂取させた。

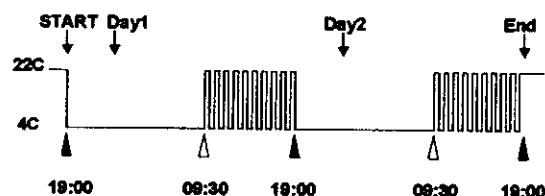


図 2. 繰り返し寒冷ストレス負荷のプロトコル

SHAM または ECC 運動を負荷した日の 19:00 (Day0, START) から翌日 (Day1) の 9:30 まで低温環境 (4°C) に暴露し、その後、9:30 から 19:00 まで 30 分間隔で、室温 (22°C) と低温環境にラットを移し変え、これを 2 日間繰り返した。

## 7. 統計処理

データは全て平均±標準偏差で示している。行動実験① (Randall-Selitto テスト) と④ (RCS 後の Randall-Selitto テスト) のデータに関しては、各群内の運動負荷後の日数による影響を一元配置分散分析にて調べ、post-hoc test として Bonferroni の多重比較テストを行った。運動負荷後の各日における群間差は Unpaired-t test を用いて分析した。行動実験② (von Frey Hair test) のデータに関しては、各 4 群内の運動負荷後の日数による影響と、運動負荷後の各日における群間差を、それぞれ一元配置分散分析を用いて調べ、post-hoc test として Bonferroni の多重比較テストを行った。行動実験③ (行動量測定) のデータは、昼と夜の行動量について、二元配置分散分析を用い、群間比較と運動負荷後の日数による影響をそれぞれ調べた。c-Fos 陽性細胞をカウントしたデータに関しては、灰白質の 4 領域のデータに対してそれぞれ一元配置分散分析を行い、post-hoc test として Bonferroni の多重比較テストを行った。第 I 群 (SHAM 群) を基準として有意性を検討した。危険率 5% 未満を統計学的に有意とみなした。

## C. 結果

### 1. 伸張性収縮負荷による疼痛反応、c-Fos 発現の変化

#### 行動実験①: Randall-Selitto テスト (図 3)

SHAM 群の圧痛閾値は SHAM 運動負荷後、変化せずに一定であった。これに対し、ECC 群の圧痛閾値は運動負荷直前日 ( $96.6 \pm 9.2$  g) に比べ、運動負荷後 1 日目から有意な低下 ( $79.1 \pm 6.2$  g,  $P < 0.001$ ) を示し、2 日目に最低値 ( $72.9 \pm 5.8$  g,  $P < 0.001$ ) となった。有意な低下は 3 日目まで ( $84.3 \pm 3.8$  g,  $P < 0.05$ ) 続いていたが、7 日目には運動負荷前のレベルに戻っていた。

また、SHAM 群と ECC 群の群間差は運動負荷後 1 日目 ( $P < 0.01$ )、2 日目 ( $P < 0.001$ )、3 日目 ( $P < 0.01$ ) において有意であった。

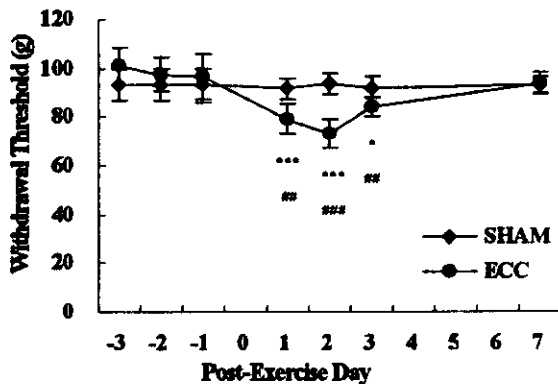


図 3. 伸張性収縮運動負荷後の圧痛閾値の変化横軸は運動負荷後の日数を、縦軸は圧痛閾値を示す。ECC 群では運動負荷 2 日目をピークとする圧痛閾値の低下がみられた。 $^*P < 0.05$ ,  $^{***}P < 0.001$  は運動負荷直前日の値を基準とした。 $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$  は各測定日における群間の有意差を示す。

#### 行動実験②: von Frey Hair テスト (図 4)

SHAM 群の非運動負荷側 (Lt.)、SHAM 群の運動負荷側 (Rt.)、ECC 群の非運動負荷側 (Lt.)、ECC 群の運動負荷側 (Rt.) のいずれ

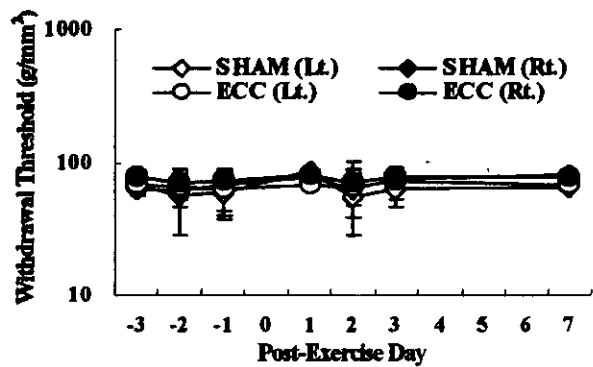


図 4. von Frey Hair テストによる伸張性収縮運動負荷後の皮膚の痛み閾値の変化

横軸は運動負荷後の日数を、縦軸は皮膚の痛み閾値 ( $g/mm^2$ ) を対数で示す。いずれの群内においても、また各測定日におけるいずれの群間においても有意差は認められなかった。

においても運動負荷後に閾値の変化は認められなかった。同様に、運動負荷後のすべての日における群間差もなかった。

#### 実験③: c-Fos 発現の変化 (図 5, 6)

無処置の SHAM 群では c-Fos 陽性細胞は痛みの入力に関係した領域 (SDH, NDH) にほとんどみられなかった。同様に、伸張性収縮を負荷して 2 日目に灌流固定した ECC 群や、反復伸張刺激を行って 2 日目に筋に圧迫刺激を加えた SHAM+Comp. 群においても後角に c-Fos 陽性細胞はほとんどみられなかった。これに対し、ECC+Comp. 群における伸張性運動負荷側の SDH ( $P < 0.001$ )、PN ( $P < 0.05$ )、NDH ( $P < 0.001$ ) において c-Fos 陽性細胞数の有意な増加がみられ、とりわけ SDH での変化が顕著であった。伸張性運動負荷側の後角全体 (SDH+PN+NDH) でも、ECC+Comp. 群において c-Fos 陽性細胞数の有意な増加がみられた ( $P < 0.01$ )。また、ECC+Comp. 群では反対側の PN ( $P < 0.05$ )、NDH ( $P < 0.001$ ) においても、同側に比べれば細胞数は少ないが c-Fos 陽性細胞数の有意な増加がみられた。



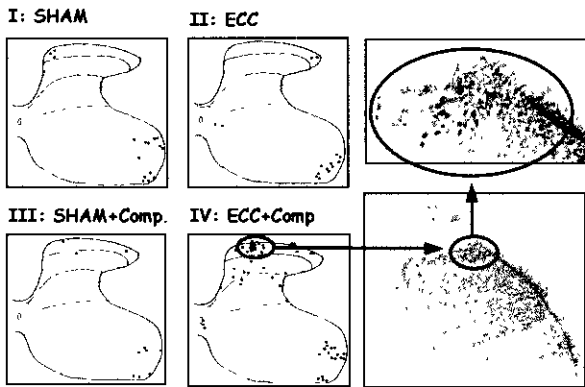


図5. L4におけるc-Fos陽性細胞の分布

各群の代表的切片から camera lucida により描いた c-Fos の分布図。1 個の黒丸は 1 個の c-Fos 陽性細胞を示す。SHAM、ECC、SHAM+Comp. 群では脊髄灰白質表層において c-Fos 陽性細胞はほとんどみられないのに対し、ECC+Comp. 群では明らかな c-Fos 陽性細胞数の増加がみられる。右下の写真は ECC+Comp. 群のもので camera lucida により描かれている c-Fos の分布図と同じ切片を撮影したもの。右上の写真は同切片の後角表層部を拡大したもの。黒色に染色された c-Fos 陽性細胞が認められる。

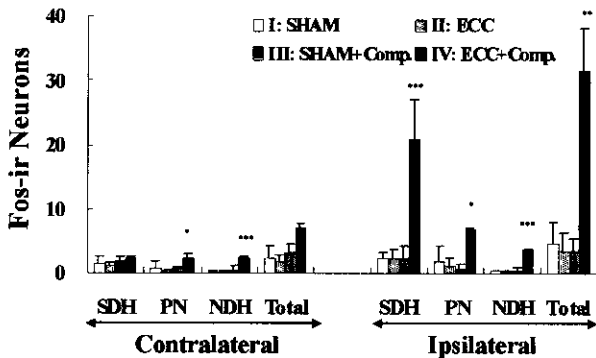


図6. L4におけるc-Fos陽性細胞数

横軸の左半分は運動負荷または/および圧迫刺激を与えた側の反対側のデータを、右半分は同側のデータを示す。SDH: 表層、PN: 固有核、NDH: 灰白質頸部、Total: SDH+PN+NDH。ECC+Comp. 群の同側の SDH では、他の 3 群に比べて c-Fos 陽性細胞数の有意な増加がみられる。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$  は各脊髄部位の SHAM 群を基準とした比較による。

#### 行動実験④: 行動量の変化 (図7)

SHAM 群では運動負荷日の夜の行動量が低下傾向ではあったが、昼、夜ともに運動負荷後の日数による行動量の有意な変化はみられなかった。同様に ECC においても、昼、夜ともに運動負荷後の日数による行動量の変化はなかった。また、SHAM 群と ECC 群間における行動量にも昼、夜ともに有意差はみられず、ラットの行動量は伸張性収縮運動負荷により変化しなかった。

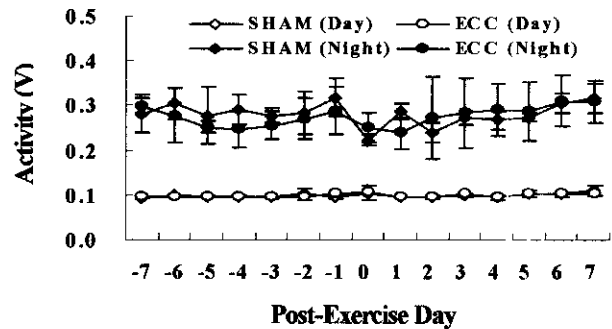


図7. 伸張性収縮後の行動量測定

横軸は運動負荷後の日数を、縦軸は行動量を示す。昼、夜の行動量とも SHAM 群と ECC 群間に差はみられなかった。また、両群における運動負荷後の日数による行動量の変化もなかった。

#### 2. 伸張性収縮による筋痛に対する繰り返し寒冷ストレスの影響: Randall-Selitto テスト (図8)

SHAM+RCS 群の圧痛閾値は前報告と同様に、RCS 負荷直前日 ( $98.3 \pm 2.7$  g) に比べ、RCS 負荷 1 日目から有意な低下 ( $87.9 \pm 6.6$  g,  $P<0.05$ ) を示し、2 日目に最低値 ( $78.1 \pm 8.5$  g,  $P<0.001$ ) となり、3 日目まで有意な低下 ( $84.2 \pm 4.6$  g,  $P<0.001$ ) を示した。その後 7 日目には運動負荷前のレベルに戻っていた。一方、ECC+RCS 群の圧痛閾値も運動負荷直前日 ( $96.8 \pm 2.6$  g) に比べ、運動負荷後 1 日目から有意な低下 ( $85.1 \pm 6.5$  g,  $P<0.001$ ) を示し、2 日目に最低値 ( $74.8 \pm 3.9$  g,  $P<0.001$ ) となり、3 日目 ( $78.3 \pm 2.5$  g,  $P<0.001$ ) にも低下していた点は SHAM+RCS 群と同じであったが、この低下は 7 日目 ( $86.2 \pm 3.4$  g,  $P<0.01$ ) にも持続していた。しかし、10 日目には運動負荷前のレベルに戻った。

また、SHAM+RCS 群と ECC+RCS 群の間には運動負荷後 3 日目 ( $P < 0.05$ ) と 7 日目 ( $P < 0.01$ ) において有意差がみられ、ECC+RCS 群では、SHAM+RCS 群に比べ、圧痛閾値の低下期間が延長した。

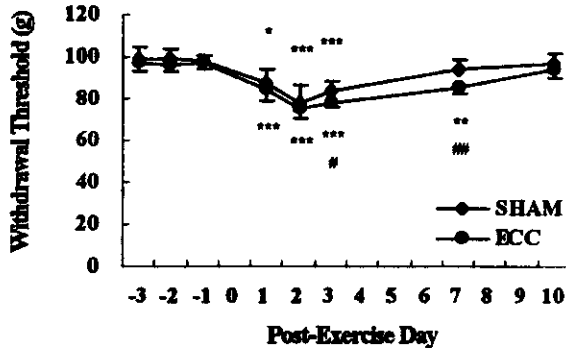


図 8. 伸張性収縮運動と繰り返し寒冷ストレスとを組合せて負荷したときの圧痛閾値の変化

測定は Randall-Selitto テストによる。両群とも RCS の暴露により圧痛閾値が低下した。圧痛閾値低下期間は SHAM+RCS 群に比べ、ECC 群で有意に長かった。 $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$  は RCS 負荷直前日との群内比較。 $^{\dagger}P < 0.05$ ,  $^{\#}P < 0.01$  は群間比較による。

#### D. 考察、および今後の展望

Randall-Selitto 法によって測定した圧痛閾値は、ECC 後の 1 日目から低下し、2 日目に最低値となり 7 日目には ECC 前のレベルに戻った (図 3)。一方、von Frey Hair テストでは、ECC 後、機械刺激に対する痛覚閾値には変化がなかった (図 4)。Von Frey Hair テストに用いた Hair は細く、それによって生じる皮膚の陥凹はわずかで、刺激は皮膚を介することによってかなり減衰していることが推定された。したがって、von Frey Hair テストによっては皮膚のみの痛覚閾値が測定されていると考えられる。これらの結果より、ECC により皮膚ではなく運動負荷部位の筋肉に圧痛閾値の低下が生じたと考えられ、その時間経過はヒトにおける DOMS の時間経過と類似していた。

ECC 後 2 日目に EDL に圧迫刺激を加えた群では同側の LA の SDH において、c-Fos 陽性細胞数の有意な増加がみられた (図 5, 6)。同じ圧迫刺激単独でも (SHAM+Comp 群)、ECC 単独でも c-Fos 陽性細胞の増加は見られなかった。これらの結果は ECC により運動負荷を行った筋で圧痛 (圧痛閾値の低下) が生じていることを免疫組織化学的に示しており、行動実験による結果が裏付けられたと考えられる。

また、c-Fos 陽性細胞の数は SHAM 群と ECC 群との間で差がなかったことは、DOMS において自発痛がほとんどみられないという臨床所見と一致する。さらに圧刺激として用いた 160 g は、覚醒動物では逃避反射を引起すにも関わらず、SHAM 群と SHAM+Comp. 群との間に c-Fos 陽性細胞数に差はなかった。麻酔下では EDL のこの強さの圧刺激は痛みの経路を活性化しないことを示している。

以上をまとめると、ラットに伸張性収縮運動を負荷して DOMS に特徴的な圧痛の存在を、行動実験と免疫組織化学的研究から証明した。今回のモデルは DOMS の痛みのメカニズム解明に有用であると考えられる。

ラットにおける DOMS モデル作製後、ECC とストレス RCS を組合せて負荷し、慢性筋痛のモデル動物を作製しようと試みた。ECC 負荷の有無に関わらず、RCS により Randall-Selitto テストによる圧痛閾値は低下したが、以前の報告と同様その効果は 7 日目には消失することがわかった。一方、ECC+RCS 群では 7 日目まで閾値の低下は有意であった。これはおそらく筋の圧痛閾値低下を示していると考えられる。これらと行動実験①の結果より、1) RCS は圧痛閾値を低下させる、2) ECC と RCS を組合せて負荷すると、ECC 単独の負荷と比較して、圧痛閾値の低下期間が数日間延長した、といえる。このとき Randall-Selitto テストで測定している圧痛閾値は、筋のものか、皮膚のものか明らかでないで、今後 von Frey Hair テストも併用して調べる必要がある。また、圧痛閾値の低下期間は 7 日間程度なので、ECC と RCS とを組合せて負荷しても慢性筋痛モデルラットの完成には至らなかったと考えられる。今後

の作製と、その病態メカニズムの解明に取り組む。

## II. 持続的炎症状態における冷感受性イオンチャネルの発現量変化

### B. 方法

実験動物としてSD系成熟雄のラットを用いた。炎症誘発処置はラットの痛覚系が完成するとされている9~10週齢の時点で行った。ペントバルビタール麻酔下にてラットの左側足根関節にフロイントの完全アジュバント溶液を0.05 ml注射して持続的炎症を誘発した。炎症処置群と週齢の等しい無処置ラットを対照群とした。

注射処置の2週間後にCO<sub>2</sub>ガスを用いてラットを安楽死し、L4~L6の後根神経節(DRG)および三叉神経節(TG)を直ちに摘出し-80°C以下で保存した。後のデータ解析のため、DRGは左側(炎症側)と右側(健常側)とに分けた。次にフェノール・クロロホルム抽出を行い組織サンプルよりトータルRNAを抽出した。このトータルRNAを1 µg取り、oligo(dT)プライマーとM-MLV逆転写酵素(Promega, WI)を用いてcDNAを合成した。このcDNAの1/20を1回のPCR反応に使用した。

次の成分を加え反応液50 µlを作成し、PCR反応を行った:滅菌MilliQ水30.75 µl, 10X-PCRバッファー(Tris-HCl 100 mM (pH8.3), KCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM) 5.00 µl, dNTP (2.5 mM of each) 4.00 µl, センスプライマー(10 µM) 2.50 µl, アンチセンスプライマー(10 µM) 2.50 µl, Taq DNAポリメラーゼ(5 units/µl; Takara, Japan) 0.25 µl, cDNA 5.00 µl。各々の遺伝子に対するプライマーは以下の通りである(5'-3', センス/アンチセンス)。CMR1: GTCCCGGCTGCCTGAAGAGGAGATTGAGAG/GATCTGCAGGTTCCGGTACA CTAGGGTGCT, TREK-1:ATCCCAAGTCTGCTGCTCAGAA/CCCTGCATTTA TGGCCGTCA, GAPDH: GTGAAGGTCGGTGTCAACGGATTT/CACAGTCTCTGAG TGGCAGTGAT。

PCR反応はサーマルサイクラー(GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer)を用い、次の条件で行った。初期熱変性95°C 3 minの後、サイクリングプロトコールとして熱変性94°C 30 sec, アニリング30 sec (CMR1: 63°C, TREK-1: 50°C, GAPDH: 55°C), 伸長72°C 30 secの3ステップをあらかじめ設定した回数(CMR1: 32回, TREK-1: 35回, GAPDH: 22回)を行い、最後に伸長反応72°C 5 minを行った。

次にPCR産物10 µlをエチジウム・ブロマイド含有1%-アガロースゲル上で電気泳動した。得られたバンドをUVトランスイルミネーター付きの8bit-CCDカメラ(Atto AE-6911CX, Japan)で記録・保存した。バンドの蛍光の強さをNIH imageを用いて定量的に解析し、integrated optical density (arbitrary unit)で表した。CMR1およびTREK-1のバンド蛍光強度を内部標準であるGAPDHの蛍光強度で標準化しmRNA発現量とした。データは平均値 ± 標準誤差で表し、統計学的解析にはt検定を用い有意水準をP<0.05とした。

### C. 結果

CMR1, TREK-1 および GAPDH の RT-PCR 産物に対する典型的なエチジウム・ブロマイド染色ゲルを図1に示す。各々のPCR産物は予想される塩基長の位置に認められた(CMR1: 436 bp, TREK-1: 317 bp, GAPDH: 555 bp, データ省略)。また制限酵素による切断実験によって、各々のPCR産物は予想される塩基長のフラグメントに分割された(データ省略)。

CMR1に関しては、炎症群・対照群共にTGにおいて比較的強い蛍光が観察された。TREK-1に関してはTG, 右側DRGおよび左側DRGにおいてPCR産物の蛍光強度はほぼ同じであった。GAPDHに関しても各々の組織において蛍光強度の偏った傾向は認められなかった。

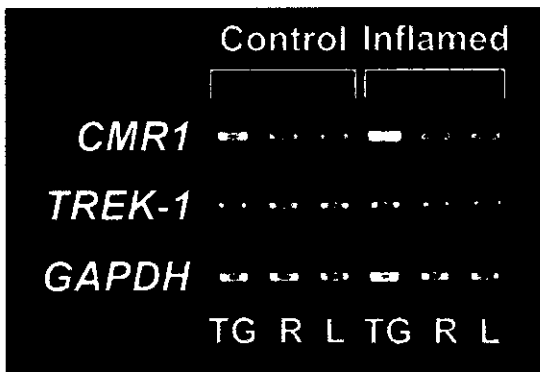


図1. 冷感受性イオンチャネルの mRNA 発現の解析。

Control: 健常群, Inflamed: 炎症群, TG: 三叉神経節, R: 右側 (健常側) DRG, L: 左側 (炎症側) DRG.

内部標準である GAPDH の蛍光強度で標準化した CMR1 および TREK-1 の mRNA 発現量を図 2 に示す。CMR1 の発現量を健常群と炎症群とで比較した結果、TG (健常群:  $0.93 \pm 0.1$ , 炎症群:  $0.05 \pm 0.09$ ), 右側 DRG (健常群:  $0.65 \pm 0.09$ , 炎症群:  $0.56 \pm 0.07$ ) および左側 DRG (健常群:  $0.56 \pm 0.07$ , 炎症群:  $0.71 \pm 0.05$ ) の全ての組織において有意な差は認められなかった。また同一群内における CMR1 の発現量を右側 DRG と左側 DRG とで比較したところ、健常群ラットにおいては有意差は認められなかったが (それぞれ  $0.65 \pm 0.09$  および  $0.56 \pm 0.07$ ), 炎症群ラットにおいては右側における発現量は左側と比べ有意に低値であった (それぞれ  $0.56 \pm 0.07$  および  $0.71 \pm 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

TREK-1 の発現量を健常群と炎症群とで比較した結果、TG (健常群:  $1.18 \pm 0.10$ , 炎症群:  $1.12 \pm 0.08$ ), 右側 DRG (健常群:  $1.08 \pm 0.07$ , 炎症群:  $1.02 \pm 0.09$ ) および左側 DRG (健常群:  $1.13 \pm 0.13$ , 炎症群:  $1.13 \pm 0.07$ ) の全ての組織において有意な差は認められなかった。また同一群内における TREK-1 の発現量を右側 DRG と左側

DRG とで比較したところ、健常群ラット (それぞれ  $1.08 \pm 0.07$  および  $1.13 \pm 0.13$ ) および炎症群ラット (それぞれ  $1.02 \pm 0.09$  および  $1.13 \pm 0.07$ ) 共に有意な変化は認められなかった。

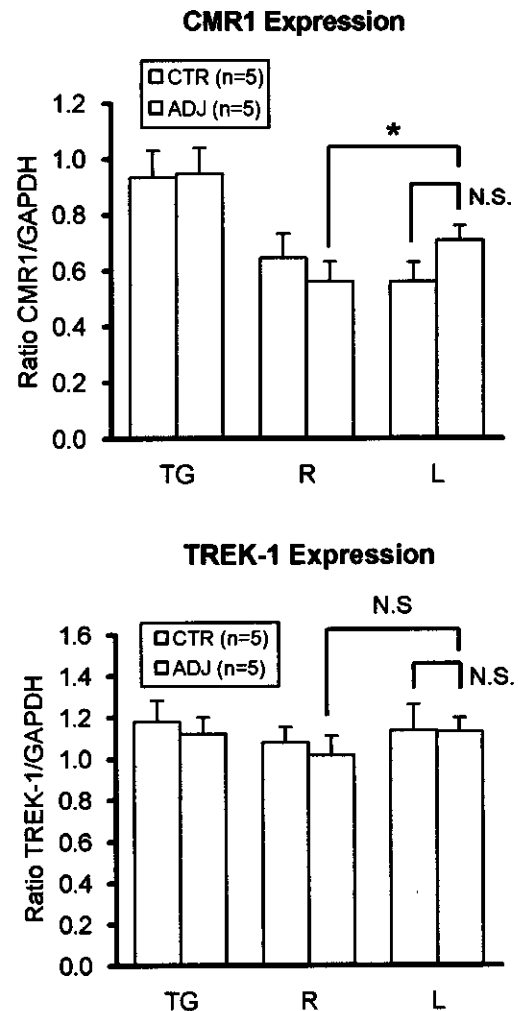


図2. 冷感受性イオンチャネルの mRNA 発現量の比較。

CTR: 健常群, ADJ: 炎症群. \*:  $P < 0.01$ , N.S.:  $P > 0.05$ .