

#### D. 考察

CMR1およびTREK-1のmRNA発現量は、炎症誘発処置によって増加しなかった。このことから、アジュバント単関節炎ラットの一次求心神経における冷感受性増大の分子機構に関し、次の3つの可能性が考えられる。1) 今回実験対象としなかった他の冷感受性イオンチャンネル(DRASIC等)の発現量が増大している。2) 冷感受性イオンチャンネルのmRNA発現量は変化しないが、蛋白レベルでの発現量が増加している。3) 冷感受性イオンチャンネルの活動が促進している。1)に関しては、17.5°C以下で活性化する非選択的陽イオンチャンネルが最近発見されている<sup>16)</sup>など、現在知られているもの以外にも冷感受性のイオンチャンネルが存在する可能性がある。目下のところ炎症誘発処置によるDRASICの発現量変化について解析を行っており、その他の冷感受性チャンネルに関しては今後の研究課題である。2)に関しては、炎症誘発処置によりmRNAレベルは変化しないものの蛋白発現量は増加することが熱感受性イオンチャンネルTRPV1で知られており<sup>17)</sup>、同様のメカニズムが冷感受性イオンチャンネルにも存在する可能性がある。3)は、炎症時に分泌されるプロスタグランジンなどの炎症メディエータがイオンチャンネルの冷感受性を促進するという仮説である。この現象は熱刺激においては多くの報告がある。これらのうちのどの因子が持続的炎症状態のラットに見られる行動レベルおよび一次求心神経レベルでの冷感受性の増大に寄与するかは、今後の研究課題である。

今回の実験では、炎症群の健常側DRGにおけるCMR1-mRNAの発現量が、炎症側のものとは低下していた。この生理学的意義も、今後の研究によって解明されねばならない。

#### E. 結論

伸張性収縮によりラットにおいても遅発性筋痛が生じる(圧痛閾値の低下が生じる)ことが明らかになり、また繰り返し寒冷ストレスによりその持続期間が延長することが

明らかになった。このモデルは筋痛の神経機構を解析する上で、有用であると考えられるが、さらに筋痛持続期間を延長させるなどモデルとして発展させる必要がある。また寒冷痛覚過敏についての分子機構については緒についたところで、今後さらに解析をする必要がある。

#### 【参考文献】(本文中の番号に対応)

- 1) Magni G, Caldieron C, Rigatti-Luchini S, Merskey H. Chronic musculoskeletal pain and depressive symptoms in the general population. An analysis of the 1st National Health and Nutrition Examination Survey data. *Pain*. 43(3): 299-307. 1990
- 2) Yelin E, Herndorf A, Trupin L, Sonneborn D. A national study of medical care expenditures for musculoskeletal conditions: The impact of health insurance and managed care. *Arthritis Rheum*. 44(5): 1160-1169. 2001
- 3) Yelin E, Callahan LF. The economic cost and social and psychological impact of musculoskeletal conditions. *Arthritis Rheum*. 38(10): 1351-1362, 1995
- 4) Mense S, Simons DG. *Muscle pain: Understanding its nature, diagnosis, and treatment*. pp1-19. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001
- 5) Berberich P, Hoheisel U, Mense S. Effects of a carrageenan-induced myositis on the discharge properties of group III and IV muscle receptors in the cat. *J Neurophysiol*. 59: 1395-1409, 1988
- 6) Pyne DB. Exercise-induced muscle damage and inflammation: A review. *Aust J Sci Med Sport*. 26: 49-58, 1994
- 7) Armstrong RB. Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: A brief review. *Med Sci Sports Exerc*. 16: 529-538, 1984.
- 8) Smith LL. Acute inflammation: The underlying mechanism in delayed onset muscle soreness? *Med Sci Sports Exerc*. 23: 542-551, 1991
- 9) Tiidus PM. Manual massage and recovery of muscle function following exercise: A literature

- review. *J Orthop Sports Phys Ther.* 25: 107-112, 1997
- 10) Hata T, Kita T, Itoh E, et al. The relationship of hyperalgesia in SART (repeated cold)-stressed animals to the autonomic nervous system. *J Auton Pharmac.* 8: 45-52, 1988
  - 11) Kita T, Hata T, Iida J, Yoneda R, Isida S. Decrease in pain threshold in SART stressed mice. *Japan J Pharmacol.* 29: 479-482, 1979
  - 12) McKemy DD., Neuhausser WM et al. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermo-sensation. *Nature* 416:52-58, 2002.
  - 13) Maingret F, Lauritzen I, Patel AJ, et al. TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel. *EMBO J.* 19 (11):2483-2491, 2000.
  - 14) Presley RW, Menétry D, Levine JD, Basbaum AI. Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 10(1): 323-335, 1990
  - 15) Sato M, Kurashiki Y, Kawamura M. Effects of intrathecal antibodies to substance P, calcitonin gene-related peptide and galanin on repeated cold stress-induced hyperalgesia: Comparison with carrageenan-induced hyperalgesia. *Pain.* 49: 273-278, 1992
  - 16) Story GM, Peier AM, Reeve AJ, et al. ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell* 112 (6):819-829, 2003.
  - 17) Ji R, Samad T, Jin S, et al. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* 36 (1):57, 2002.

## 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, 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 ブラジキニンによるバニロイド受容体 1(VR1)の修飾—ブラジキニンによる侵害受容器の興奮とその熱に対する感作の1機構—, 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 炎症による痛みとブラジキニン 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

### 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, 水村和枝. 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.*

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

筋および筋細径求心線維脊髄投射の形態学的研究

分担研究者 杉浦 康夫 名古屋大学大学院医学系研究科 教授

**研究要旨** 電気生理学的に機能を同定した後根神経節内の単一神経細胞にトレーサーを注入し、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。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。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の形態を免疫組織化学的に調べた。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受容し、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。

**A. 研究目的**

筋に分布する知覚神経の多くは、細い有髄(A $\delta$ )または無髄(C)の神経線維からなり(Mense, 1993)、これらは筋の触覚や痛みなどを受容していると考えられている。しかし、これらの細い知覚神経線維がどのように脊髄に投射しているのか良くわかっていなかった。これまで筋に分布する知覚神経の脊髄内投射は、筋にHRP等のトレーサーを注入することで調べられてきた。Abraham and Swett (1986)は、頸部および上肢の筋からの知覚神経が脊髄の I 層および V 層に終止することを明らかにした。しかし、腓腹筋についてみると、Brushart et al., (1981)は、II 層に終止すると報告しているし、Kalia et al., (1981)は、I 層から V 層まで広く分布していると報告している。また Mense and Craig, (1988)は、I 層と V 層に分布していたと報告し、筋に分布する知覚神経の脊髄内投射については一定の見解が得られていない。トレーサーの種類や動物の種類、調べられた筋の種類

の違いも影響していると思われる。一方、後索内におけるトレーサーの軸索内注入により知覚神経の脊髄内投射を調べることも試みられているが、Mense et al., (1981)や Hoheisel et al., (1989)は、筋や深部組織からの神経線維は I 層のみまたは I, IV, V 層に分布しているとしている。しかし深部組織の非固有知覚を伝える知覚神経は、II 層および IV から VI 層に分布すると報告され、固有知覚を伝えている神経線維と、痛みなどの非固有知覚を伝えている神経線維の脊髄内投射は異なることが予想される。そこで我々は、筋の痛みを受容するメカニズムを明らかにするため、痛みを伝えていると思われる無髄の知覚神経線維の脊髄内の投射様式を調べた。

また、筋に加わる侵害刺激や、機械刺激、化学刺激、温度刺激を受容していると考えられている神経線維の筋における分布や形態は良くわかっていない。SP や CGRP 陽性神経線維が筋の血管周囲に存在することが報告されている

(Forsgren et al., 1992, Öhlen et al., 1987)。そこで、末梢における筋の痛みを受容するメカニズムを探るため、筋に分布する神経線維を免疫組織学的に染色しその分布様式や形態を調べた。

#### [参考文献]

Mense S, Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. *Pain* 54: 241-289, 1993.

Abraham VC, Swett JE, The pattern of spinal and medullary projections from cutaneous nerve and muscle nerve of the forelimb of the cat: a study of using the transganglionic transport of HRP. *J Comp Neurol* 246: 70-84, 1986.

Brushart TM, Henry EW, Mesulum M-M, Reorganization of muscle afferent projection accompanies peripheral nerve regeneration. *Neuroscience* 6: 2053-2061, 1981.

Kalia M, Mei SS, Kao FF, Central projections from ergoreceptors (C-fibers) in muscle involved in cardiopulmonary responses to static exercise. *Circ Res* 48: 48-62, 1981.

Mense S, Craig AD, Spinal and supraspinal terminations of primary afferent fibers from the gastrocnemius-soleus muscle in the cat. *Neuroscience* 26: 1023-1035, 1988.

Mense S, Light AR, Perl ER, 1981, Spinal terminations of subcutaneous high-threshold mechanoreceptors. In: Brown AG, Réthelyi M, editors. *Spinal cord sensation*. Edinburgh: Scottish Academic Press. p79-86.

Hoheisel U, Lehmann-Willenbroch E, Mense S, Termination patterns of identified group II and III afferent fibres from deep tissues in the spinal cord of the cat. *Neuroscience* 28: 495-507, 1989.

Forsgren S, Bergh A, Carlson E, Thornell LE, Studies on the distribution of calcitonin gene-related peptide-like and substance P-like immunoreactivities in rat hind limb muscles. *Histochem J* 24: 345-353, 1992.

Öhlén A, Lindbom L, Staines W, Hökfelt T, Cuello AC, Fischer JA, Hedqvist P, Substance P calcitonin gene-related peptide: Immunohistochemical localization and microvascular effects in the rabbit skeletal muscle. *N-S Arch Pharmacol* 336: 87-93, 1987.

#### B. 研究方法

##### 1. 筋に分布する知覚神経の脊髄投射の実験(図 1)

体重 200 から 300 g のハートレー系モルモット 40 匹を使用した。ペントバルビタール深麻酔下にて、気管および外頸静脈にカニューレを留置した後、suxamethonium chloride により筋弛緩後、人工呼吸器に接続した。麻酔薬および筋弛緩薬は実験中適宜追加した。ヒーティングパッドにより体温は 38°C に維持し、血圧をモニターした。動物を定位固定装置に腹臥位に固定し、腓腹筋筋の外側頭とそれに入る脛骨神経の筋枝を剖出し、刺激電極を留置した。また、知覚神経の活動電位を記録するため第 5 腰髄後根神経節を剖出した。後根神経節ニューロンの活動を記録するために、微小電極用アンプに接続した微小ガラス管電極を用い、2.5%の PHA-L を含んだ 0.1M の KCl で満たした。腓腹筋外側頭に分布する脛骨神経の筋枝を C-線維を刺激できる強さの電流 (0.05-0.1 msec, 6-10 V また

は5mA)で電気刺激し、刺激に応じるニューロンを後根神経節内で検索した。刺激電極から記録電極までの距離と、刺激してから反応するまでの潜時から伝導速度を測定し、1 m/s 以下のものを無髄のC線維とした。電気刺激に応じるC線維のニューロンを同定した後、陽電位を加え、電気泳動にて微小ガラス管内のPHA-Lを細胞内に注入した。一個体につき一個のニューロンにPHA-Lを注入し、手術部位を縫合し抗生剤を投与した。手術後3-5日間、動物を生存させた後、再びペントバルビタールによる深麻酔下にて2%パラホルムアルデヒドと10%のピクリン酸を含む固定液で灌流固定した。脊髄腰膨大部と第5腰髄後根神経節を取り出し、後固定を一晩行い20%シュクロースにて処理した後に、OCT compoundに凍結包埋した。第5腰髄後根神経節はクライオスタットにて20 $\mu$ mの厚みの連続切片とし、脊髄腰膨大部は、凍結用マイクロトームにて50 $\mu$ mの厚みの矢状段連続切片を作製した。切片に含まれるPHA-Lを注入された細胞体や神経線維は、抗PHA-L抗体を用いた免疫組織化学にて可視化した。切片はヤギ抗PHA-L抗体液に3日間浸漬し、ビオチン化抗ヤギIgG抗体にて処理し、ABC-DAB法にて可視化した。脊髄の連続切片内に見られたPHA-Lにて標識された神経線維は、カメラルシダにてトレースし、おのおののトレースは合成し、一個のニューロンに由来する標識神経線維の脊髄内の全走行を明らかにした。神経線維の終末膨大部の数と大きさを測定した。

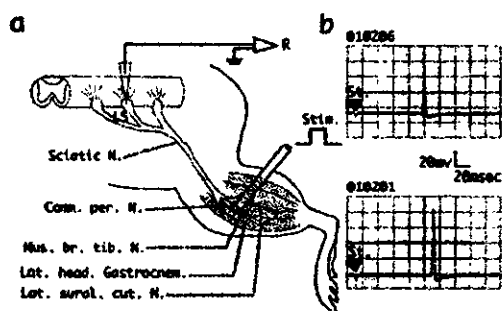


図1. 実験の模式図

## 2. 筋に分布するペプチド陽性神経の形態学的解析の実験

材料として、生後10週令前後のハートレー系モルモット、ウイスター系ラット、SD系ラット、それから15か月齢のロングエバンス系ラットを用いた。ペントバルビタール深麻酔下にて、4%パラホルムアルデヒドを含む固定液で動物を灌流固定した。動物から腓腹筋を取り出し、同じ固定液で一晩、後固定した。その後20%シュクロースを含む緩衝液で処理し、OCT compoundに凍結包埋した。凍結マイクロトームにて100 $\mu$ mの厚みの切片を作製した。筋に分布する神経線維を免疫組織化学的に染色した。神経線維全体を染めるためにprotein gene product-9.5(PGP9.5)に対する抗体を用い、知覚神経を染めるためにcalcitonin gene-related peptide(CGRP)に対する抗体を用い、交感神経系を染めるためにtyrosine hydroxylase(TH)に対する抗体を用い、また侵害受容器を染める試みとして、皮膚の侵害受容器に存在するカプサイシンレセプター(VR-1)に対する抗体を用い、ABC-DAB法にて可視化した。

## 3. (倫理面への配慮)

実験は、動物の愛護および管理に関する法律に準じ、名古屋大学医学部動物実験指針に従い、名古屋大学医学部動物実験委員会の許可のもとに行われた。

## C. 研究結果

### 1. 筋に分布する知覚神経の脊髄投射の実験(図2.3.4)

腓腹筋外側頭に分布する脛骨神経の筋枝を電気刺激することにより同定された筋に分布する無髄神経の平均伝導速度は、およそ0.5 m/secであった。これらの神経は我々が調べた限り、皮膚、筋、腱やその他の深部組織に触刺激やピンセットで挟む刺激を加えても反応しなかった。

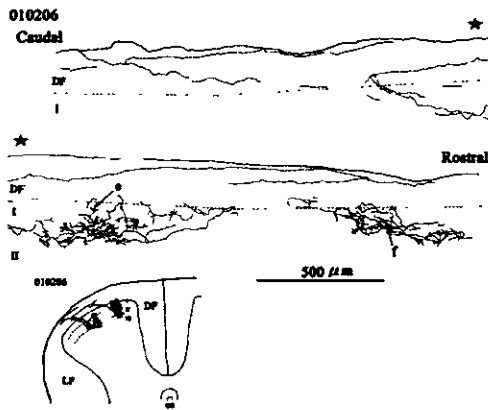


図 2. 筋に分布する無髄知覚神経の脊髄投射の例

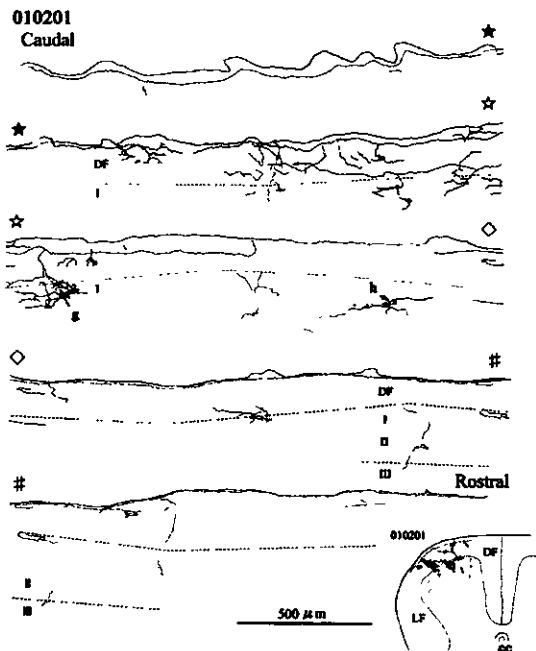


図 3. 筋に分布する無髄知覚神経の脊髄投射の例

筋に分布する無髄神経の脊髄への投射は、神経終末が尾側から吻側に数百ミクロンの狭い領域に分布するものから、後索表層を数分節にわたり走行するものまでさまざまであった。神経終末は主に脊髄の後索、I、II、III層に終末し、終末膨大は1500~3000個見られ、神経叢は2-3

領域見られたので、終末膨大の数は一領域あたり、500~1000個くらいで、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。神経叢の領域の広がりは吻尾方向に200~600μm、内外側に200~300μmであった。終末膨大は比較的小さく、大きさは最大2~3μmであった。

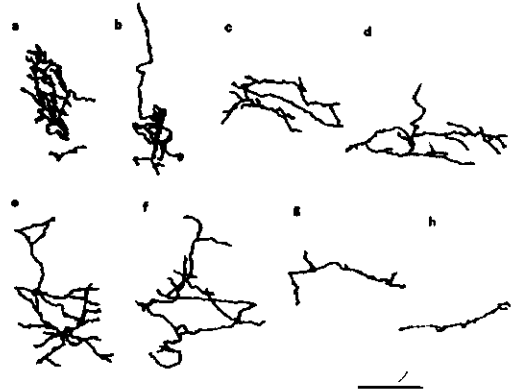


図 4. 筋に分布する無髄知覚神経の脊髄投射の例。  
終末部を拡大したもの。

## 2. 筋に分布するペプチド陽性神経の形態学的解析の実験

PGP9.5 に対する抗体によって標識された筋に分布する神経線維には、1. 横紋筋線維に神経筋終板を形成しているもの(図5)、2. 血管に沿って分布しているもの、3. 血管とは無関係に分布しているもの、の3種類が見られた。CGRP陽性の神経線維は、血管に沿ってまたは血管とは無関係に特殊な構造は作らず筋組織に分布していた(図6,7)。TH陽性神経線維はほぼ全て、血管に沿って分布していた。また、カプサイシンレセプターであるVR-1に対する抗体で、一部、太い神経線維が染まった。

筋に分布する神経線維の形態は、モルモットおよび複数の系統のラット、週令の異なるラットで調べたが、今回調べた範囲では動物種、週令による違いは見られなかった。

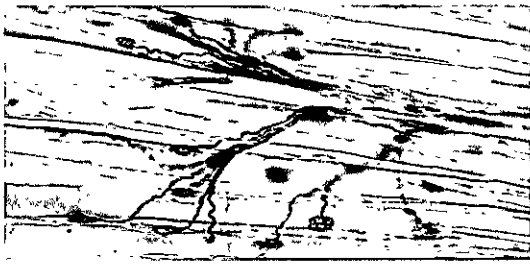


図 5. 筋に分布する PGP9.5 陽性神経線維。  
横紋筋線維に神経筋終板を形成するもの。

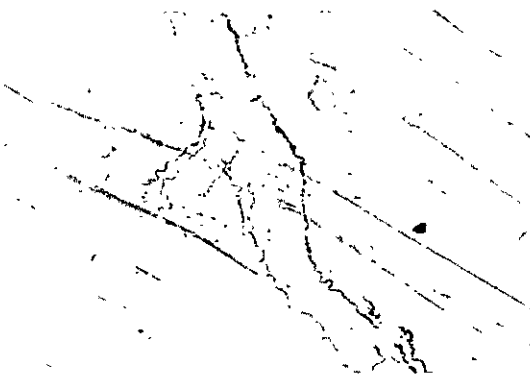


図 6. 筋に分布する CGRP 陽性神経線維。  
血管に沿って分布しているもの。

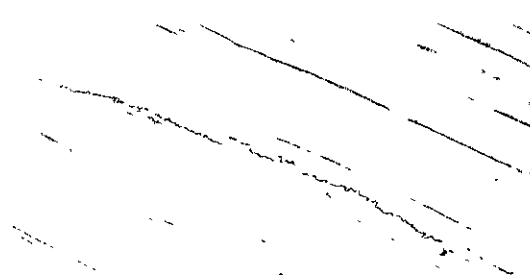


図 7. 筋に分布する CGRP 陽性神経線維。  
血管とは無関係に分布しているもの。

#### D. 考察

##### 1. 筋に分布する知覚神経の脊髄投射の実験

筋に分布する無髄求心性神経の脊髄内投射について調べた仕事は、我々の知りうる限りこれまで無く、今回の我々の報告が初めてと思われる。

腓腹筋に分布する筋 C 線維(group IV)の腰髄での分節の広がり、これまでのHRPなどの注入による無髄有髄を含めた筋の求心性神経の脊髄投射を調べた実験の結果と同じであったが、(Mense and Craing 1988, Ritz et al., 1991)、脊髄後角における分布は明らかに異なり表層 I, II, III 層に限られていた。

筋に分布する無髄知覚神経の特徴をこれまでに明らかにされてきた皮膚や内臓に分布するものとを比較すると、終末分布領域にある終末膨大の数で比較してみると、皮膚からの神経は主に I, II 層に神経叢を形成し、1 終末領域に 700~1500 個の終末膨大を数えた。一方内臓からの神経は I, II 層に皮膚からの神経の約 3 倍の 2500~4000 個の終末膨大を数えるが、終末分枝の数が多く、1 神経終末領域には 200~300 個の終末膨大を持つに過ぎない。これらの神経に比べ筋からの神経は、I, II 層にある終末膨大は 1500~3000 個の終末膨大を数えるが、神経叢の数が、内臓ほどは多くなく、2~3 領域なので、1 神経終末領域あたりの終末膨大は 500~1000 個に相当する。また、吻尾方向の領域の広がりを見ると、皮膚からの神経はほとんど数百ミクロンの狭い領域に展開するのみであるが、内臓からの神経は数分節、20mm にも及ぶ。一方筋からの無髄神経は数百ミクロンから数分節にわたるものまで様々であった。腓腹筋の C 線維(Group IV)の分節の広がり、と脊髄後角における分布の多様性は、C-線維の伝えている感覚、あるいは末梢受容器の存在する組織の違いを表しているのかもしれない(図 8)。



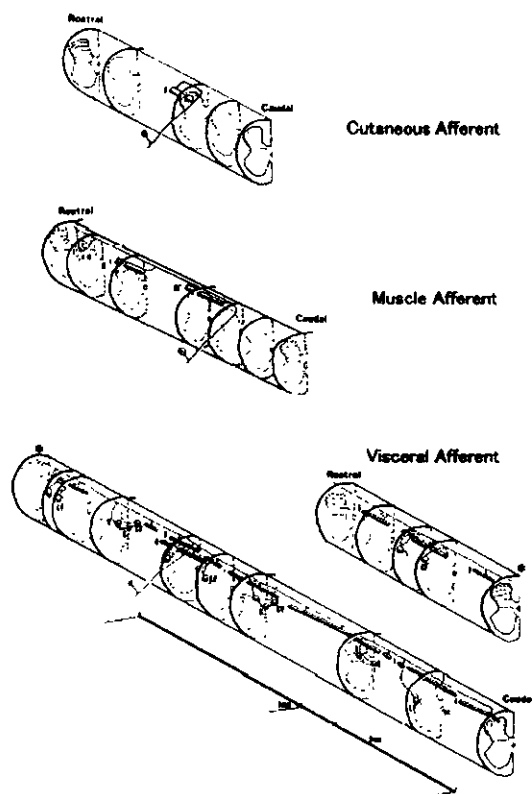


図 8. 皮膚、筋、内臓に分布する無髄知覚神経線維の脊髄内投射様式。

## 2. 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には、1. 横紋筋線維に神経筋終板を形成しているもの、2. 血管に沿って分布しているもの、3. 血管とは無関係に分布しているもの、が見られ、2および3には CGRP で標識されるものがあるので、筋の知覚神経には、血管に沿って分布するもの他、血管とは無関係に分布しているものがあることがわかった。また TH 陽性神経線維は、血管に沿って分布しており、交感神経性の神経線維が血管に沿って分布していることがわかった。VR-1 陽性と思われる太い神経線維がみられたが、その意義については今後例数を重ねて検討して行く予定である。

### [参考文献]

Ritz LA, Bailey SM, Carter EL, Sparkes

ML, Masson RL, Rohoton EL, Crossed and uncrossed projections to cat sacrocaudal spinal cord: II, Axons from muscle spindles primary endings, *J Comp Neurol* 304(1991)316-332.

## E. 結論

筋の痛みの受容に重要な役割を果たしていると思われる筋に分布する無髄の知覚神経線維の脊髄への投射様式を、はじめて明らかにすることができた。筋に分布する無髄知覚神経線維は、その投射様式や終末膨大部の大きさや密度において、皮膚に分布する無髄知覚神経線維や内臓に分布するものの中間の特徴をもつことがわかった。これは、筋の痛みが、内臓の痛みに比べると、局在性がはっきりしているものの、皮膚の痛みに比べるとシャープではないことに関係しているものと考えられる。

また筋の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の情報を受容し、痛みなどの筋に由来する感覚に重要な役割を果たしていると思われる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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.

## 2. 学会発表

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: p10

厚生労働省科学研究費補助金（長寿科学研究事業）  
分担研究報告書

高齢者の筋・骨格系の痛みに対する徒手的治疗方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と種的方法の除痛機構の解析

分担研究者 猪田邦雄、肥田朋子 名古屋大学医学部

**研究要旨** 高齢者の筋痛に対する治療法として徒手的治疗方法の効果を明らかにする。その前段階として本年度は、若年者を対象に肘関節屈伸運動を行わせ遅発性筋痛を作成し、バイブレーション治療を施した。遅発性筋痛状態および治療効果を評価するために、上腕周径、肘関節可動域、疼痛および重だるさ感、深部血流量、上腕横断画像、筋硬度、圧痛閾値を測定した。その結果遅発性筋痛は運動1日後から生じ、7日には消失していた。また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、圧痛閾値に対する影響は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制限を軽減させ、皮下の厚みを含む皮膚厚や深部血流量を増大させた。ヒトの個体差を考慮して被験者数を増やすこと、感覚評価のための事前学習など測定精度の向上が課題である。

**A. 研究目的**

高齢者の筋痛に対する治療法として徒手的治疗方法の効果を明らかにする。その前段階として、若年者に実験的に遅発性筋痛 (DOMS) を作成し、DOMS 作成前後の異なる時点で治療 (バイブレーション) を実施し、治療の効果を経時的かつ多角的に評価することを目的とした。

**B. 研究方法**

**対象:** 健康成人男女 24 名 (平均年齢 20.8 歳) を対象とした。対象は、運動直後にバイブレーション治療を施す直後パイプ群、運動 2 日後すなわち DOMS 発生時に

治療する 2 日後パイプ群、何も施さないコントロール群に 8 名 (男女各 4 名) ずつ無作為に分けた。

**運動負荷:** 対象は非利き手の手関節部に重錘を固定し、背臥位、前腕回外位にて肘関節 20~60 度範囲内の屈伸運動を、不可能になるまで行なった。重錘の重さは男性 3Kg、女性は 2Kg とした。これを 1 セットとし、3 セット行なった。各セット間には 5 分の休憩を入れた。また、2 セット以降は、必要に応じて屈曲運動のみ介助した。上肢の状態の評価には、上腕周径、肘関節可動域、疼痛、重だるさ感、深部血流、上腕横断画像、筋硬度、圧痛

閾値を指標とした。

**周径の計測：**上腕長の30%遠位部の上腕二頭筋筋腹上に印をつけ、その周径を3回計測し、平均値をデータとした。

**肘関節可動域の計測：**被験者に肘関節最大屈曲および最大伸展させ、それぞれその角度を3回計測し、その平均値をデータとした。

**疼痛および重だるさ感：**重錘を負荷した能動運動時と他動的な最大屈曲時および他動的な最大伸展時の感覚を表現させた。重錘負荷は男性1Kg、女性0.5Kgとした。表現方法は numerical rating scale (NRS) で、何も感じない時を0、今まで経験した中で最も強い痛みもしくは重だるさ感を10として、11段階の数字で表現させた。

**深部血流の推定：**組織血流測定装置（バイオサイエンス社製）を用い、前述の上腕二頭筋筋腹上の印をつけた部位にプローブを貼り付け、血中ヘモグロビン量（血液量）を測定し深部血流の指標とした。隔日の測定誤差をできるだけ少なくするため、プローブの貼付位置には印をつけ、その部位で毎回測定をおこなった。また複数回貼り直して繰り返し測定し、その平均値をデータとした。

**皮膚厚、筋厚の推定：**超音波画像診断装置（東芝メディカル社製）を用いて上腕横断画像を取得し、皮膚表面から筋までの距離を計測し皮膚の厚みとした。また、上腕骨から筋組織表面までの距離を測定し筋の厚みとした。計測は各3回行い、その平均値をデータとした。

**筋硬度：**機械刺激装置（ダイヤモンド社製）を用いた。プローブを2.5mm/secで体表から10mm押し込んだ時の圧変位

曲線を描かせ、2相目の傾きを筋硬度として算出した。5回測定を行い、最大と最小値を除いた3回分の平均値をデータとした。

**圧痛閾値：**把持したプッシュプルゲージを体表からゆっくり押し込み、被験者が痛みを感じた圧を読み取った。5回測定し、その平均をデータとした。

**治療法：**マッサージを機械的に変換させたバイブレーター（振幅8mm、30Hz）を用い、体表面から痛みを与えない程度の圧迫を与えつつ、上腕二頭筋筋腹上に20分間振動刺激を施行した。

以上の測定・評価は運動前後、運動2日および一週間後におこなった。治療を行なった群ではさらに治療後にも測定を行なった。最終日には、1週間の疼痛変化をNRSで表現したグラフを作成させた。

被験者からはあらかじめインフォームドコンセントをとり、実験を行なった。各項目測定者および治療者はそれぞれ別の験者があつた。また作為が入らないよう、測定者には被験者の所属群がわからないように工夫した。なお、一連の評価項目を測定するのに1時間を要した。**統計処理：**一元配置分散分析法を用いて各群の変動を分析し、多重比較を行なった。また、振動刺激前後の比較には対応のあるt検定を、3群の比較にはKruskal-Wallis検定を用い、有意水準は5%以下とした。

### C. 研究結果

**自覚された筋痛：**DOMSは24名全員に生じた。自覚された筋痛（安静時痛および運動時痛を含む）は、運動1日後が各群平均7.5~8.8、2日後は5.4~5.5であ

り、運動 1 日後に最大筋痛が生じたことがわかった。また筋痛消失は 3~7 日後だった。運動後の NRS や筋痛消失日は 3 群間で有意な差はなかった。

**周径 (図 1) :** 周径は運動後にコントロール群以外で有意に増加したが、2 日後には戻った。また、振動刺激は運動直後に与えた場合も、2 日後に与えた場合も、周径に影響を与えなかった。

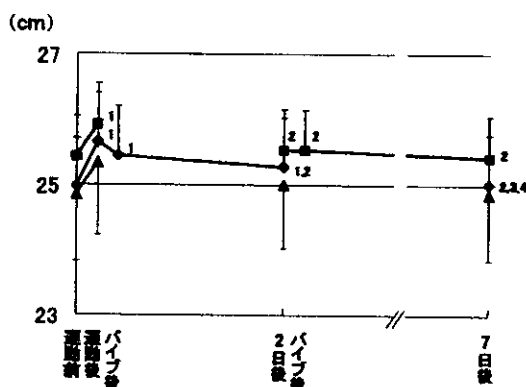


図 1 上腕周径の経時的変化

縦軸は上腕長の遠位 30% 部の上腕周径を、横軸は運動前および運動後の経時の変化を示す (以下の図においても同様)。▲がコントロール群、◆が直後バイブ群、■が 2 日後バイブ群である (以下の図においても同様)。治療群の周径は運動後有意に増加したが、運動 2 日後には元に戻った。

**肘関節可動域 (図 2) :** 運動後全群で屈曲が有意に制限された。運動直後の振動刺激治療群では、振動刺激後これは有意に改善し、そのままの状態を保った。他の 2 群は運動 2 日後に回復した。一方、伸展も運動後に全群で制限されていた。運動直後の振動刺激群ではこの制限もまた振動刺激後に改善した。他の群と異なり、2 日後バイブ群では運動 2 日後にも伸展が有意に制限されていたが、振動刺激によって有意に改善された。コントロール群は運動後にもあまり大きな変化がなかつ

た。

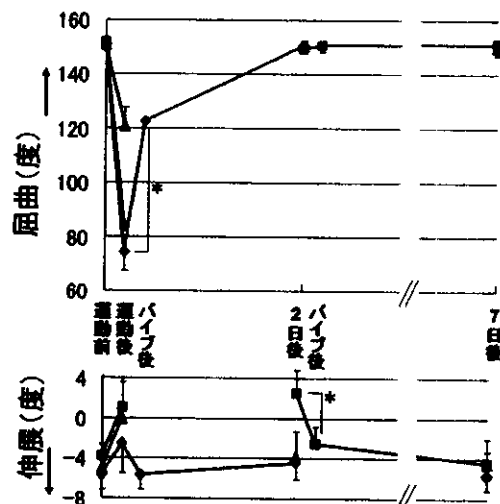


図 2 肘関節可動域の経時的変化

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 日後には回復した。治療時期に関係なく、バイブレーション治療により可動域は改善した (\*,  $p < 0.05$ )。

**疼痛 :** 能動運動時、他動的最大屈曲および伸展時の NRS は、全群において運動 2 日後に有意に高い値を示した。能動運動時の NRS に運動直後の振動刺激も運動 2 日後の振動刺激も影響を与えなかった (図 3 左)。しかし、他動的最大屈曲および伸展時の NRS は直後の振動刺激により低下傾向を示し (直後バイブ群)、2 日後の振動刺激では有意に低下した (2 日後バイブ群) (図 3 中および右)。

**重だるさ感 :** 全群とも、運動後に能動運動および他動最大屈曲位で有意に高値を示した。しかし、運動直後の振動刺激により能動運動時の重だるさ感が有意に低下し (直後バイブ群)、2 日後の振動刺激後でも他動最大屈曲時の重だるさ感が有意に低下した (2 日後バイブ群)。

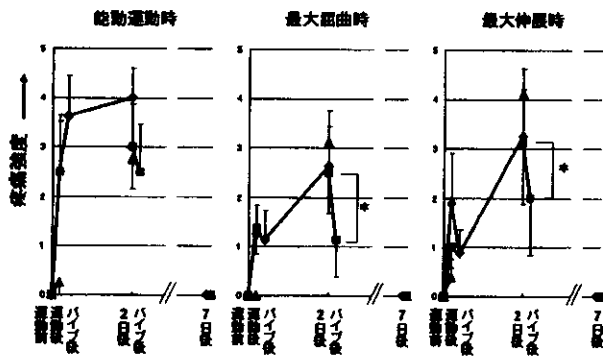


図3 疼痛感覚の経時的変化

縦軸は、能動的に肘屈伸運動したときの疼痛(左図)、最大屈曲時の疼痛(中央図)、最大伸展時の疼痛(右図)の各群の平均。すべての状態で、疼痛は運動2日後に最大を示した。2日後バイブ群において、バイブレーション治療により疼痛は有意に低下した。

**深部血流 (図4):** 深部血流の指標となる血液量は全群で運動により有意に減少した。しかし、直後バイブ群における運動後の振動刺激と2日後バイブ群における振動刺激によって血液量は有意に増加した。また血液量は、運動2日後に直後バイブ群のみ運動前に比べ有意に増加していた。

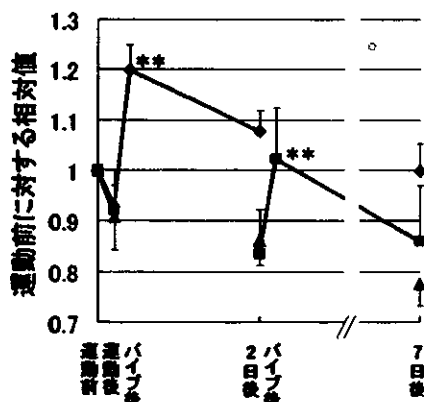


図4 血中ヘモグロビン量の経時的変化

縦軸は運動前の血中ヘモグロビン量を1とした相対値。血中ヘモグロビン量はバイブレーション治療により有意に増加した(\*\*,  $p < 0.01$ )。

**皮膚厚、筋厚 (図5):** 皮膚厚は運動による影響を受けなかったが、直後バイブ群、2日後バイブ群ともに振動刺激により有意に増加した。筋厚は運動により全群で有意に増加したが、直後バイブ群で振動刺激後有意に回復した。また、運動2日後には2日後バイブ群でまだ高値を示していたが、振動刺激による変化は明らかではなかった。

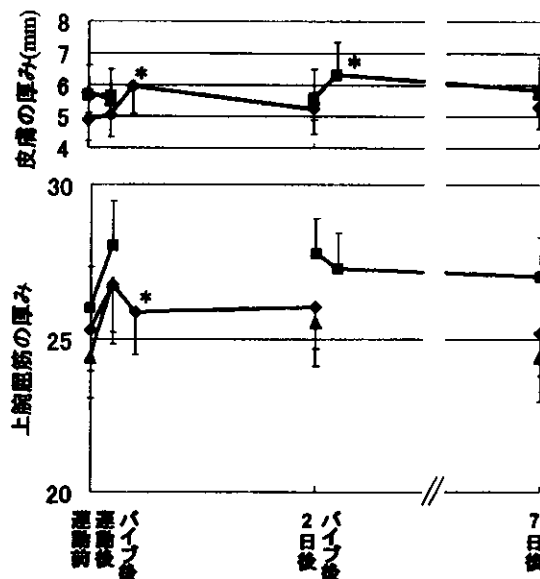


図5 上腕横断画像の経時的変化

上図は皮膚(皮膚表面から筋表面までを含む)の厚みを、下図は筋の厚み。運動により筋厚は有意に増加し、直後のバイブレーション治療により有意に減少した。皮膚厚はバイブレーション治療により有意に増加した。

**筋硬度:** 運動後、2日後バイブ群で有意に高値を示したが、他群では影響を受けなかった。運動2日後は運動前に比べ、硬化傾向にあった。振動刺激は運動後も運動2日後にも筋硬度に影響を与えなかった。

**圧痛閾値：**運動後一定の変化を示さなかった。直後パイプ群では、振動刺激により有意に閾値が低下し、2日後パイプ群では逆に振動刺激で閾値は有意に上昇した。

**バイブレーション治療：**バイブレーターによる圧迫程度は300~950gで、圧迫による皮膚の変位は体表から0.5~1.5cmだった。バイブレーター本体の重さである950gまで圧迫可能だったのは、直後パイプ群で1例、2日後パイプ群で2例のみだった。しかし、直後パイプ群も2日後パイプ群も振動刺激を加えて約10分後には、施術者の触診による筋緊張感の低下とともに被験者の主観的な感覚も改善傾向を示した。しかし、これは機械刺激装置によって測った筋硬度に反映されなかった。

#### D. 考察

DOMSは若年者では運動1日後にすでに生じていた。2日後には痛みは残存していたが、最大疼痛時をすでに過ぎていた。DOMSを評価するためには、対象により測定時期をずらす必要があることがわかった。また、被験者の割付をランダムにおこなったにもかかわらず、コントロール群と治療群で運動後の肘関節可動域や疼痛感覚などに差があった。これは個体間のばらつきが大きいためと考えられ、被験者数を増やす必要があることがわかった。

運動2日後には上腕周径がやや太く、肘関節の可動域は伸展がやや制限され、筋の厚みはやや増加した状態であり、筋硬度は上昇傾向であった。以上のことから筋緊張が高い状態であることが推定さ

れる。Menseによれば、筋収縮だけでなく虚血状態が加わって痛覚神経が興奮する。痛み感覚のNRSは3群とも運動2日後に有意な高値を示したが、筋硬度は上昇傾向であったものの、血液量は直後パイプ群においてのみ有意に高く、虚血状態であったとは考え難く、痛みとの関係が明確にできなかった。能動運動時のNRSに運動直後の振動刺激も運動2日後の振動刺激も影響を与えなかったにも関わらず、他動的な最大屈曲および伸展時のNRSは直後または2日後の振動刺激により有意に低下または低下傾向を示した。これは興味ある所見である。能動運動の場合には重錘による伸張刺激と筋収縮とが重なるので、筋内に発生する張力はより大きい。治療に用いた振動刺激は、運動後の筋の緊張をある程度弱める結果（後述）、他動的な屈曲・伸展に生じる張力を弱めて痛みを軽減できるが、能動的な屈曲・伸展による張力を弱めるまでにはいかならないのか、いずれにせよ発生する張力の差が振動刺激の効果の差と関係があると考えられるが、目下不明である。

DOMS時の上腕周径増大に振動刺激は影響を与えなかったが、これは皮膚の厚みが増加したのに対し筋の厚みが減少したことで相殺されたと考えられる。皮膚の厚みの増加は浮腫状態と考えられる。浮腫を起こす要因としては毛細血管圧亢進、透過性亢進、膠質浸透圧低下が挙げられる。このいずれが何によって変化したのか、目下不明である。

肘関節可動域制限は振動刺激により改善された。振動刺激は50~70Hzを境に低周波刺激では筋緊張を抑制し、高周波刺激では筋緊張を亢進することが知られ

ている。今回使用したバイブレーターは 30Hz で低周波であることから、筋緊張を抑制していると考えられる。筋緊張が抑制され、筋弛緩することで筋収縮はスムーズに行なえ、筋伸張も可能となり、結果として可動域が改善したと考えられる。

筋緊張状態を反映するものとして筋硬度を測定した。被験者の主観的にもバイブレーション施術者の触診上でも（バイブレーターを握る手と反対手で実施）筋緊張の低下が感じられたが、筋硬度にははっきりした影響は示されなかった。これにはまず、硬度計の測定再現性の問題が考えられる。同一日内で測定の再現性を確認したところ変動係数は 3~4% だったが、隔日測定の場合は皮下脂肪の厚い被験者の場合の再現性に問題があった。次には皮膚（皮下組織を含む）の状態が変化したことによる影響の可能性が考えられる。本実験で用いた筋硬度測定法は、体表面からプローブを押し込むため、皮膚や皮下組織の状態の影響を受ける。また、被験者の皮下組織の厚みには個体差があることから、一定距離の変位で反映される筋の深さや状態は一様ではない。押し込み時だけでなく、押し戻し時の圧変化や、左右差を指標にするなど、硬度測定の精度を上げていく必要があると考える。

運動時痛と圧痛閾値は、直後バイブ群で振動刺激治療後悪化、2 日後バイブ群で振動刺激治療後改善する傾向にあった。直後バイブ群では、振動刺激時に触診するだけで疼痛を訴える被験者もあり、刺激を与えることでより感受性が増した可能性が考えられた。しかし、振動刺激中に被験者の口頭による訴えは改善してい

たこと、最大屈曲位や最大伸展位での痛みは直後バイブ群で改善傾向を示し 2 日後バイブ群では最大屈曲位や伸展位での疼痛感が有意に改善したこと、両バイブ群で治療後に肘関節可動域が改善したことなどの結果から伸張性収縮時以外の疼痛に対しての鎮痛効果は期待できると考えられた。しかし、その持続は長くないことが推定された。また、圧痛閾値でそれを反映することはできなかった。その理由としては、圧痛閾値の測定が評価項目中最後であったため、刺激による影響がすでに消失していた可能性が考えられた。運動条件は各群とも同じであるにも関わらず運動後の圧痛閾値は群間でばらつき一定の方向を示さなかった。圧痛閾値の検出は難しく、トレーニングが必要であることが如実に反映したものと考えられる。運動負荷前に数回トレーニングを実施し、被験者に閾値測定を学習させる必要があると考えられた。また、多角的に評価することと測定時間との兼ね合いを検討する必要がある。

#### E. まとめ

若年者の上腕二頭筋に DOMS を作成し、多角的に評価した。DOMS は運動 1 日後が最大だった。まだ自覚される疼痛が残存していた運動 2 日後には、肘関節の伸展制限、筋厚の増加、筋硬度上昇傾向が観察された。周波数 30Hz で振幅 8mm のバイブレーター治療により自覚される疼痛および肘関節可動域は一次的に改善し、血液量と皮膚厚が増加した。個体差が大きく、各測定の精度向上は、筋痛評価には必須である。また、被験者数を増やして検討する必要がある。



## F. 結論

実験的筋痛を多角的に評価したところ、疼痛、関節可動域の制限、筋の厚みの増大が認められた。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せず、測定精度を上げ、被験者を増やして再検討する必要がある。筋痛部に対するバイブレーション治療は、一時的に筋痛、関節可動域を改善させた。

## G. 研究発表

### 1. 論文

Tomoko KOEDA, et al.: Effects of adrenoceptor antagonists on the cutaneous blood flow increase response to sympathetic nerve stimulation in rats with persistent inflammation. *Jpn. J. Physiol.* 52: 521-530, 2002

肥田朋子、鈴木重行: 疼痛の検査・測定. *理学療法*. 20(1): 143-152, 2003

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

### 2. 学会発表

肥田朋子、他: 坐骨神経絞扼ラットの腰部交感神経刺激による皮膚血流増加反応. 第 79 回日本生理学会大会, 2002

渡部真志、肥田朋子、他: 圧迫に対する反発力から見る筋の深さと、圧迫速度が筋硬度へ与える影響. 第 7 回理学療法の医学的基礎研究会学術集会, 2002

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学研究事業）  
分担研究報告書

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

分担研究者 川喜田健司 明治鍼灸大学 教授

**研究要旨** 臨床におけるトリガーポイントが原因の筋筋膜痛に対する鍼灸の除痛効果を検討するために、各種の実験モデルを作成した。関連痛の検討のためにカラゲニン筋炎ラットを作成し、脊髄後角の侵害受容性ニューロンの活動を記録した結果、その受容野が拡大したり、新しい受容野の出現することが確認できた。また、ウサギにおいて伸張性収縮運動負荷による遅発性筋痛を作成し、運動負荷筋での索状硬結、圧痛部位、局所単収縮反応等のトリガーポイント様部位の発現を確認した。同様の運動負荷によってラットにおいても類似した痛覚閾値の低下が生じることも確認できた。さらに、ウサギのモデルにおいて阻血下で運動負荷を加えることにより、出現したトリガーポイント様部位の痛覚閾値の低下が時間的に延長したほか、空間的にも拡大することが観察された。これらの結果から、今回検討した実験モデルが筋筋膜痛に対する鍼灸刺激の除痛効果を検討する上で有用なものと考えられた。

**A. 研究目的**

鍼灸の除痛効果に関しては、鍼麻酔として内因性の各種オピオイドの関与する痛覚抑制系の賦括が広く知られている。しかし、これまで鍼麻酔として明らかにされてきた鎮痛機序は、正常動物に対して比較的強い鍼通電刺激を加えたときに生じる鎮痛であり、電気ショックや冷水下での強制水泳などのストレス様刺激で生じる鎮痛に類似したものと考えられている。一方、実際の鍼灸臨床においては、何らかの痛みを訴えている患者に対し、その症状を緩解させるために鍼灸刺激が用いられているのであり、その機序を鍼麻酔の機序と同一視することは適当ではない。

本研究では、臨床的に鍼灸が用いられることの多い筋筋膜痛を対象とした、鍼灸の除痛機序の研究を計画した。筋筋膜痛の原因には、組織損傷による比較的単純な侵害受容器の興奮によるものばかりではなく、筋筋膜に形成されたトリガー

ポイントと呼ばれる部位の活性化によって生じる関連痛が関与することも知られている。後者に関しては、患者の痛みを訴える部位とは離れてトリガーポイントが存在するため、その正確な原因が見つけられないまま心因性と診断されることも多く、適切な治療を受けられない可能性が指摘されている。

高齢者に多く見られる筋筋膜痛は、このトリガーポイントを原因とするものが多く含まれており、より臨床的に意味のある筋筋膜痛モデルを実験的に作成することが不可欠であると考えた。

今年度は、筋筋膜痛が筋の損傷による関連痛であることを実験的に確認するために、筋炎ラットを用いて脊髄ニューロンにおける反応性の変化、特にその受容野の変化について検討した。さらに、筋筋膜痛の原因であるトリガーポイントの成因、さらにはその活性化ならびに各種の治療法（鍼灸を含む）による不活性化の機序を解明するために、ウサギおよび

ラットを用いて、実験的な遅発性筋痛を利用した筋損傷モデルを作成し、その痛覚閾値の定量的な測定法について検討を加えた。

## I. カラゲニン筋炎ラットの脊髄後角ニューロンの反応性

### B-1. 研究方法

実験には Wistar 系および SD 系ラット (雄 10 匹、雌 1 匹、9~12 週齢) を用いた。ウレタン (1.1 g/kg) を腹腔内投与で麻酔し、気管、頸動・静脈にカテーテルを挿入後、脳定位固定装置に動物を装着した。直腸温をモニターし、ヒーティングパッドで体温を 37.5°C に維持した。胸椎と仙椎を脊髄固定装置で保持し、T11~L2 の椎弓を切除したのち硬膜を除去した。露出した脊髄を覆うように、背部皮膚にてパラフィンオイルプールを作成した。実体顕微鏡で確認しながら、2% ポンタミンスカイプルー (0.5M 酢酸ナトリウム) を充填したガラス管微小電極にて L3~L5 脊髄後角からニューロン活動を細胞外記録した。ニューロン活動は前置増幅器 (DAM-80、WPI) で増幅 (フィルタ: 300-10kHz) を行い、オシロスコープ (VC-11、日本光電) で観察したのちデータレコーダ (RD-135T、TEAC) に記録し、オフラインにて解析を行った。

探査刺激には機械刺激を用い、筆で触る brush 刺激に応じるものを皮膚に受容野を有するもの、木の棒で押す pressure 刺激に応じるものを筋や深部組織に受容野を有するものとした。記録されたニューロンは受容野をスケッチしたのち、機械 (brush, pressure, pinch) 刺激および熱 (heat) 刺激に対する応答性から低閾値機械受容 (LTM) ニューロンと広作動域侵害受容 (WDR) ニューロンに分類した。起炎剤は 2% カラゲニンを用い、注入直前によく攪拌後、受容野から 1 関節離れた筋内に 0.3 ml 注入した。カラゲニン注入後、5 分おきに受容野の反応性および新たな受容野の探査を行った。一部のラッ

トでは、カラゲニンを注入したのち同じ部位に局所麻酔薬 (2% キシロカイン) を注入した。

ニューロン活動の記録後、記録部位にて通電 (2 $\mu$ A、30min、陰性直流電流) を行い、電気泳動的にポンタミンスカイプルーにてマーキングを行った。実験終了後、心臓から生理食塩水、続いて 10% ホルマリン緩衝液を注入し灌流固定したのち脊髄を取り出し 20% ホルマリン緩衝液に 24 時間浸漬した。100 $\mu$ m の連続組織切片を作成し、ニューロン活動記録部位を同定した。

### C-1. 研究結果

今回記録したニューロンは 11 個で、LTM ニューロンが 4、WDR ニューロンが 6、皮膚や深部組織に受容野を持たず足関節の背屈のみに応じるニューロンが 1 個であった。最後のニューロンに関しては、今回の解析からはずした。

受容野におけるそれぞれの刺激に対する反応を、受容野から離れた筋へのカラゲニン注入前後で比較したのが図 1 である。LTM、WDR ニューロンともにすべての刺激において刺激中の反応インパルス数はほとんど影響を受けなかった (表 1)。

また、自発発火が認められた 2 ニューロンにおいて、カラゲニン注入による自発活動への影響もほとんど認められなかった (pre $\rightarrow$ 60 分後: 6 $\rightarrow$ 8.5Hz、6.2 $\rightarrow$ 3.9Hz)。

表 1. 刺激中のインパルス数の比較

	LTM	WDR
brush	18.53 $\pm$ 8.84 $\rightarrow$ 17.70 $\pm$ 10.81	17.23 $\pm$ 26.95 $\rightarrow$ 18.23 $\pm$ 21.41
pressure	9.15 $\pm$ 4.71 $\rightarrow$ 10.58 $\pm$ 8.58	11.3 $\pm$ 14.98 $\rightarrow$ 13.9 $\pm$ 12.64
pinch	13.7 $\pm$ 7.48 $\rightarrow$ 15.98 $\pm$ 8.62	31.85 $\pm$ 34.51 $\rightarrow$ 29.37 $\pm$ 21.44
heat	0.93 $\pm$ 0.83 $\rightarrow$ 0 $\pm$ 0	9.03 $\pm$ 3.76 $\rightarrow$ 11.97 $\pm$ 2.96

pre $\rightarrow$ after (imp/s, mean  $\pm$  SD)

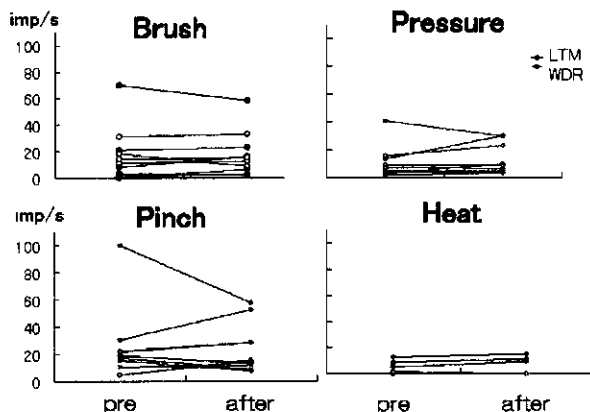


図1 受容野のカラゲニン筋注前後の反応性

pre: カラゲニン注入直前の各刺激に対する1秒間あたりの平均スパイク数  
 after: カラゲニン注入60~90分後の各刺激に対する反応スパイク数

図2、3はカラゲニンを離れた筋に注入したのちの受容野の変化について示したものである。図2はWDRニューロンで、元の受容野は後肢足底であった。足関節をはさみ腓腹筋筋腹にカラゲニンを0.3ml注入したところ、注入5分後には膝付近にpressure刺激に応じる受容野が新たに出現した。この新たな受容野は時間経過とともに拡大し、注入40~60分後に

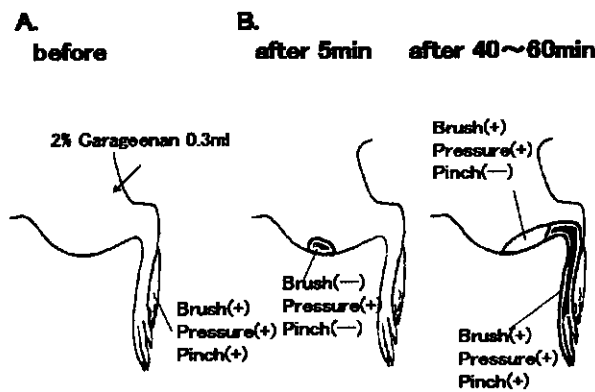


図2 カラゲニン筋注による受容野の変化

後肢足底に受容野を持つWDRニューロン。A: カラゲニン注入前、B: カラゲニン注入後のそれぞれの受容野。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。

は元の受容野とつながる広い範囲にまで拡大した。図3は、カラゲニン注入後の受容野拡大時に局所麻酔薬であるリドカインを注入してその影響を見た結果である。足蹠に受容野を持つWDRニューロンに対して、尾の付け根の筋にカラゲニンを注入したところ、図3B、Cのような受容野の拡大が認められた。その状態でカラゲニン注入と同じ部位にリドカイン0.5mlを筋肉内に注入したところ、受容野の縮小、反応性の低下が認められた。しかし、元の受容野の反応性や面積には変化は認められなかった。

カラゲニン筋注による受容野面積の変化を図4に示す。カラゲニン注入前の受容野の面積を100%として、その変化率を時間経過でまとめたものである。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。リドカインの影響をみた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。

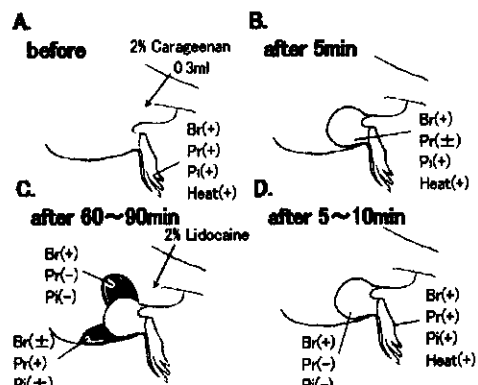


図3 カラゲニン筋注による受容野の変化とリドカインによる抑制効果

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。表記は図2と同じ。