

る反応閾値が低下し、反応の大きさが増大していた (図 5A,B)。個々の受容器の機械刺激に対する反応を詳細に調べたところ、熱に対する感受性のある群の受容器の反応性が増大している傾向が見られた。そこで、記録した細径求心線維を熱による感受性によって2群に分け、それぞれの機械刺激に対する反応性を比較した。熱に対して感受性のない群では、ECC 負荷後にも有意な閾値の低下、反応性の増大はみられなかった。これに対し、熱感受性のある群では、ECC 負荷後にも有意な閾値の低下 (図 5C)、反応性の増大がみられた (図 5D)。

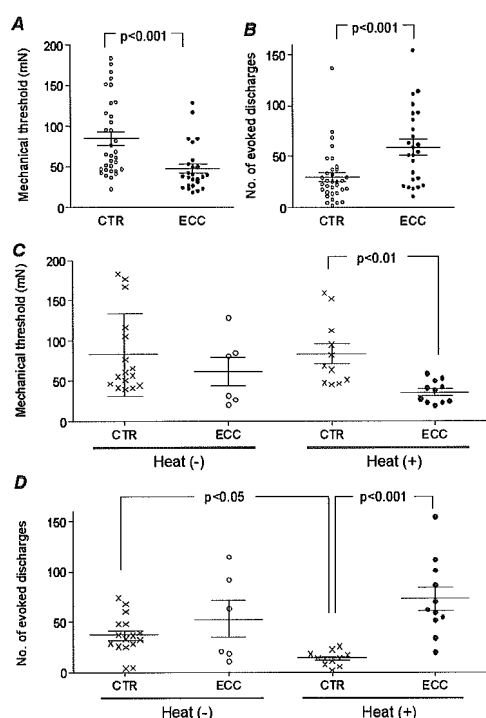


図5. 筋から記録した細径線維受容器の機械刺激に対する反応性

A, B: 記録した細径線維受容器全体の機械刺激 (20g/10 秒) に対する反応 (A は反応閾値、B は平均放電頻度の増大)。C, D: 熱感受性の有無でグループ化した細径線維受容器の機械反応 C: 閾値、D: 平均放電頻度の増大。CTR: 対照筋 (未処置)、ECC: ECC 負荷後 2 日目の筋。

#### D. 考察

今年度の実験より、80 週齢のラットでは若年ラットと ECC 後の圧痛閾値低下の時間経過にほとんど差が無いものの、130 週齢の加齢ラットでは遅発性筋痛の持続時間が延長していることが明らかになった。Clarkson ら[3]は若年 (平均 23 歳程度) と高齢女性 (平均 67 歳程度) を対象とした研究において、肘屈筋に伸張性収縮を負荷し、安静時肘関節角度の縮小 **contracture** の存在を示す) が長引くことを示しているが、筋伸張時の痛み (VAS) の時間経過には差を認めていない。より高齢になれば 130 週齢ラットと同様に痛みの時間経過にも差が出る可能性があることを本研究結果は示唆していると考えられる。

抗コリンエステラーゼ投与後には痛覚過敏が観察されなかった。もし報告されているよう [1] にこの処置により **contraction knot** ができていれば、**contraction knot** だけでは痛みが生じないことを示唆する。しかし、今回、投与方法は前記報告に則って実施したが、組織切片を作成して **contraction knot** を確認していない。今後組織標本を作製して確認する予定である。しかし、Mense 達の所見によっても **contracture knot** の出現密度は低いので、疼痛行動に変化を与えるにはいたっていない可能性もある。

ECC 後に繰り返し寒冷負荷を 5 日間繰り返すことにより全身性痛覚過敏 (対側肢にまで波及、かつ皮膚にも痛覚過敏あり) が生じたが、その消褪後にも Randall-Selitto 法で測定した EDL 部の圧痛閾値は低下しており、ECC を負荷した EDL の筋痛覚過敏は約 1 週間も長く続くことが示された。つまり筋痛の慢性化を起こすこ

とができた。1年度目には2日間の繰り返し寒冷ストレス負荷を行った[4]。今回はまだ3例のデータでしかないが、5日間負荷後の圧痛閾値低下は2日間負荷後の圧痛閾値低下と比べると、はるかに程度が強く、持続も長いものであった。ECC だけの場合に比べて、ECC 後に SART 負荷した場合に、筋における変化、筋圧迫後の脊髄の c-Fos 発現変化のパターン等にどんな違いがあるか、解析を続ける必要がある。

1年度目の研究で、ECC 負荷後の筋圧迫により脊髄後角に c-Fos 発現が増大することを明らかにした[5]。今回、この発現がモルヒネ投与によりほぼ消失することが示され、この c-Fos 発現が痛みによるものであることがさらに確かなものとなった。

昨年度実施した筋細径線維受容器記録の結果を再解析したところ、機械感受性を増大させた受容器は、機械刺激ばかりでなく熱にも感受性があるポリモーダル受容器[6]であることが明らかになった。熱感受性と機械感受性がどのような機構でつながっているか、例えば熱感受性イオンチャネルである TRPV1[7]の関与があるか、など、今後解析すべき点である。

#### 参考文献（文中の番号に対応）

- [1] Mense S, Simons DG, Hoheisel U, and Quenzer B. Lesions of rat skeletal muscle following local block of acetylcholinesterase and neuromuscular stimulation. *Journal of Applied Physiology*, 94: 2494-2501, 2003.
- [2] Satoh M, Kuraishi Y, and 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.

- [3] Clarkson PM and Dedrick ME. Exercise-induced muscle damage, repair, and adaptation in old and young subjects. *J.Gerontol.* 43:91-96, 1988.
- [4] Taguchi T, Sato J, and Mizumura K. A combination of eccentric muscle exercise and repeated cold stress (RCS) induced prolonged hyperalgesia - an attempt to develop an animal model of chronic muscle pain. *Environmental Medicine* 46:74-76, 2002.
- [5] Taguchi T, Matsuda T, Tamura R, Sato J, and Mizumura K. Muscular mechanical hyperalgesia revealed by behavioural pain test and c-Fos expression in the spinal dorsal horn after eccentric contraction in rats. *Journal of Physiology (London)* 2005.(In Press)
- [6] Kumazawa T and Mizumura K. Thin-fibre receptors responding to mechanical, chemical, and thermal stimulation in the skeletal muscle of the dog. *Journal of Physiology (London)* 273:179-194, 1977.
- [7] Tominaga M, Numazaki M, Iida T, Moriyama T, Sugiura T, Togashi K, Higashi T, Murayama M, Tominaga T, and Mizumura K. Molecular mechanisms of TRPV1-mediated thermal hypersensitivity. In: *Hyperalgesia: Molecular mechanisms and clinical implications*, edited by K. Brune and H. O. Handwerker, Seattle:IASP Press, 2004, p. 37-47.

## II. ヒトにおける実験

### 実験 II-1. 圧痛閾値に対する皮膚表面麻酔の影響

#### A. 目的

臨床で圧痛を測定するとき用いられる経皮的圧刺激は、筋だけでなく皮膚にも痛みを誘発すると考えられる。数種類の形状の圧刺激プローブを用い、皮膚痛が起こりにくい形状を探す。その際に、皮膚を麻酔して皮膚痛覚を消失させても痛覚閾値に変化が起こりにくいことを指標とする。

#### B. 方法

22~57歳の健常成人34名(女13名, 男21名)を被験者とし、皮膚に局所麻酔剤を投与する前後で皮膚の痛覚・熱痛覚、筋の圧痛および電気刺激による深部痛覚閾値を測定した。局所麻酔にはキシロカインパッチを用い、腕橈骨筋上の皮膚に貼付し1時間放置した。反対側の腕にはプラセボパッチを貼付した。パッチの貼付を行う者を実験者・被験者と別に設け、ダブルブラインドで行った。

皮膚痛覚の測定には針(直径0.18 mm)を10回押し当て、そのうち被験者が痛みを訴える回数を数える pin-prick テストを行った。皮膚の熱痛覚の測定には Peltier 式熱刺激装置を用いて熱痛閾値を測定し、3回の平均値を取った。筋の圧痛の測定には先端直径φ1 mm、φ1.6 mm、φ15 mmの3種類のプローブを用いた。測定は被験者が痛みを訴えるまで約150 g/secの速度で圧刺激を加え、3回の平均値を取って圧痛閾値を求めた。

深部痛覚の測定にはφ0.18 mmの絶縁針を皮膚表面より垂直に1~9 mm刺入し、被験者が痛みを訴えるまで電流を上昇させ、閾値を測定した。電気刺激のパルス幅は1 msec、刺激頻度500 Hz、1回の電気刺激につき3発とした。

本研究は長寿科学振興財団リサーチレジデントの高橋 賢、明治鍼灸大学の川喜田健司、岡田薫、伊藤和憲、西村展幸、森定真、木村美保、柏田亜弥子、田中克伸、中井裕子、中村暢俊、名古屋大学医学研究科の尾崎紀之、および名古屋大学環境医学研究所大学院生の田口 徹の諸氏の協力の下に行われた。

#### C. 結果

麻酔処置を行った側において pin-prick 刺激に対し被験者が痛みを訴えた回数は処置前  $7.3 \pm 0.4$  回、処置後  $3.4 \pm 0.6$  回であり表面麻酔により有意に減少した(図6左)。一方プラセボ処置を行った側では処置前  $8.2 \pm 0.4$ 、処置後  $7.0 \pm 0.6$  回であり有意な変化は見られなかった。

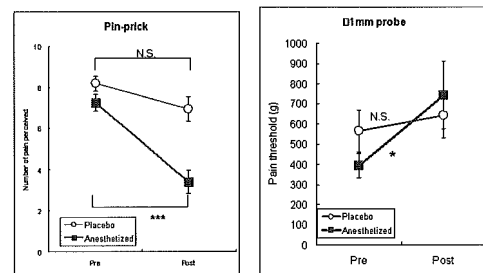


図6 : pin-prick テスト (上)、φ1 mm プローブ (下) をもちいた経皮的圧刺激に対する圧痛閾値。

○: プラセボ群、■: 麻酔群。\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; \*:  $P < 0.05$  (paired  $t$ -test).

φ 1 mm プローブを用いた実験では、麻酔側において圧痛閾値は処置前の  $393 \pm 63$  g 重（以下省略して g とする）から処置後の  $742 \pm 167$  g へと 1.89 倍に増加した（図 6 右）。一方コントロール側においては処置前  $565 \pm 105$  g、処置後  $462 \pm 112$  g であり両群間に有意な差は認められなかった。φ 1.6 mm および 15 mm プローブを用いた実験では、麻酔側・対照側の両方において、麻酔・プラセボ処置による圧痛閾値の有意な変化は認められなかった（図 7）。

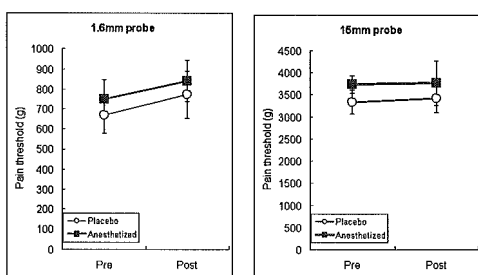


図 7：経皮的圧刺激に対する圧痛閾値。  
（左）φ 1.6 mm プローブ、（右）φ 15 mm プローブ。○：プラセボ群、■：麻酔群。

熱痛覚の閾値は麻酔側において処置前  $45.4 \pm 0.4$  °C、処置後  $44.6 \pm 0.6$  °C であり両群間に有意差は認められなかった（図 8 左）。またコントロール側における熱痛覚閾値は処置前  $44.8 \pm 0.5$  °C、処置後  $45.2 \pm 0.5$  °C であり、両群間に有意差は認められなかった。

電気刺激による深部痛覚に関しては、皮下組織の厚さの個人差が大きいため刺激針を刺入する深度を標準化した後に解析を行った。具体的には、刺激針の先端が筋の内部にあるときに比較的弱い電気刺激によって筋が収縮することを利用し、筋収縮を起こさない最も深い針の刺入距離を補正深度 0 mm とした。その結果、針の刺入深度による痛み閾値の変化は有

意であったが、麻酔要因による閾値の変化は見られなかった（図 8 右）。

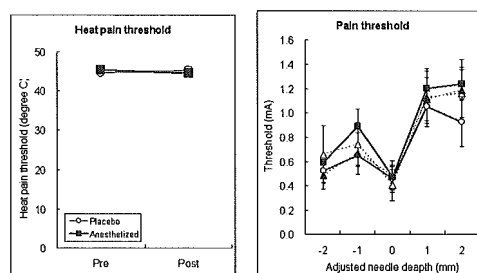


図 8：ペルチエ熱刺激装置による熱痛覚閾値の測定（左）と電気刺激針による深部痛覚閾値の測定（右）。上図：○：プラセボ群、■：麻酔群。下図：△：プラセボ処置前、▲：プラセボ処置後、□：麻酔処置前、■：麻酔処置後。

#### D. 考察

麻酔処置によって pin-prick 刺激に対し痛みを感じる回数が増加したことから、キシロカインパッチによる麻酔は皮膚表面に効果を及ぼしたと考えられる。一方電気刺激による深部痛覚の測定において、キシロカインパッチは筋付近の組織における痛覚閾値に変化を及ぼさなかったことから、キシロカインパッチによる麻酔作用は皮膚表面に特異的であったことが示唆される。

圧刺激プローブにより圧痛閾値を測定した実験では、φ 1 mm プローブではキシロカイン麻酔の効果が見られたものの、φ 1.6 および φ 15 mm プローブではこの効果は見られなかった。このことから、経皮的圧刺激を用いて筋痛の程度を測定する場合、プローブの直径は少なくとも 1.6 mm 以上にすることが望ましいことが示唆された。今回実験に参加した被験者で前腕部の MRI 撮像により皮下組織の厚さを測定した者のうち、最も厚い値

は約 9 mm であった。被験者の皮下組織がさらに厚い場合、皮膚から与えられた圧刺激が筋組織まで伝達する効率が低下することが予想されるため、プローブの径はより大きいものを用いる必要があると予想される。この点に関しさらに定量的な解析が必要である。

表面麻酔によって熱痛覚閾値が変化しなかったことは予想外であったが、麻酔を経皮的に[8]あるいは皮下に[9]与えた場合機械痛覚閾値は低下するものの熱痛覚閾値は変化しないという報告がある。このことから、機械痛覚と熱痛覚を伝達する機構が異なることが考えられる。

## 実験 II-2. 経皮的圧刺激によって皮膚・筋に生じる応力の 3次元有限要素解析

### A. 目的

ヒトを対象とした実験によって求めることが不可能な、経皮的圧刺激によって生じる皮膚・皮下組織および筋における応力分布を、3次元有限要素法(finite element method, FEM)を用いたシミュレーション解析によって求める。

### B. 方法

核磁気共鳴画像法(MRI)によって撮影したヒト(31歳、男性)前腕部の断層画像(図9左)を用い、生体組織の3次元モデルを構築した(図9右)。モデルは皮膚、皮下組織、筋、骨の4層から成る25,431個のソリッド要素より構成した。圧刺激プローブとの接触面における解析精度を上げるため、接触面付近の要素メッシュの分割を細かくした。組織の材料物性は等方弾性体とし、文献に基づいて

物性値を入力した[1][2][3]:皮膚、皮下組織、筋、骨それぞれのYoung率 $E$ を0.1、0.025、0.04 および 12400 MPa とし、Poisson比はすべて0.49とした。用いた物性値によって実際のヒトの組織の挙動を近似できるかどうかを調べるため、ヒトの皮膚に吸引刺激を与えて組織の変位量を観察した報告[7]の結果と本研究で用いた物性値を代入したFEMモデルの解析結果が概ね一致することを確認した。

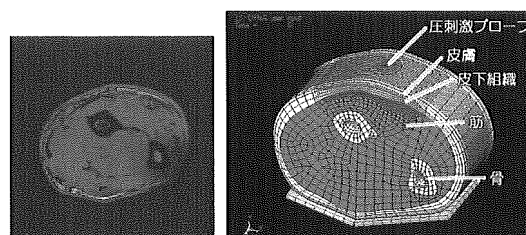


図9 ヒト前腕部のMRI断層画像図(左)とこのMRI画像より作成した前腕部の3次元モデル(右)

右図上より圧刺激プローブ、皮膚、皮下組織、筋、骨。

次に剛体ソリッド要素より成る円柱形圧刺激プローブを作成した。プローブの先端直径は、0.5、1、3、5、10 および 15 mm の6種類を用いた。それぞれのプローブに4.44、26.6、150.8、444.4、1778 および 4000 g の荷重を加えて、皮膚との接触面における圧力が222.1 kPaとなる条件で圧刺激をシミュレートした。プローブの運動方向は皮膚面に対し垂直方向(y軸)のみに制限した。

有限要素解析は非線形構造解析ソフトウェアLS-DYNA3D version: 950e (Livermore Software Technology Corporation, CA)を用いて行った。数値計算には名古屋大学情報連携基盤センターのスーパーコンピュータ VPP5000/64 および GRIDを用いた。

### C. 結果

経皮的圧刺激によって皮膚・皮下組織および筋に生じた応力 (von Mises) の最大値の時間経過を、6種類のプローブを使用した条件でシミュレートした。圧刺激開始 100 msec 後のプローブ断面付近における主圧縮応力の分布を図 10 に示す。0.5 mm プローブにおいては応力が皮膚に集中しているのに対し (図 10 左)、

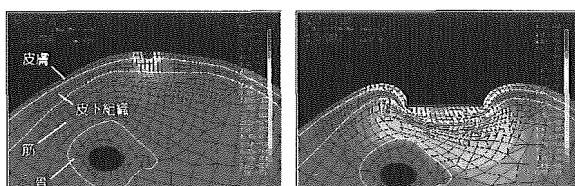


図 10 : 圧刺激開始 100 msec 後におけるプローブ断面付近での von Mises 応力の分布。

青 : 応力 0、赤 : 最大応力の約 10%。(左) 0.5 mm プローブ、(右) : 15 mm プローブ。

15 mm プローブでは比較的深部の組織にまで応力が及んでいることが観察された (図 10 右)。次に皮膚・皮下組織および筋における主圧縮応力の最大値の時間経過を解析した結果を図 11 に示す。0.5 mm プローブによる圧刺激によって生じた主圧縮応力は、皮膚・皮下組織および筋それぞれにおいて圧刺激開始後約 20 msec の間上昇し、わずかに振動した後プラトーに達した。圧刺激開始 100 msec 後における von Mises 応力の筋組織/皮膚組織の比は 0.5 mm プローブの場合 0.106 であり、この値はプローブの直径増加に伴い増大し 15 mm プローブの場合 0.561 となった。0.5 mm のプローブでは筋へはほとんど圧が及ばないという結果であった (図 12)。

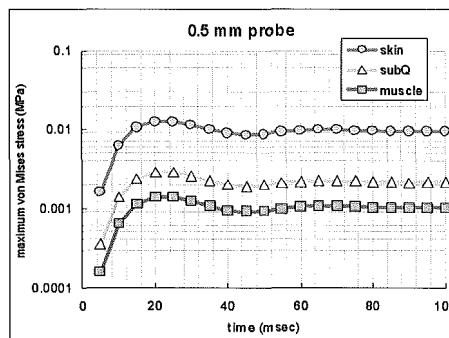


図 11 : 経皮的圧刺激に対する皮膚 (●)・皮下組織 (△) および筋 (■) における von Mises 応力の最大値の時間経過。

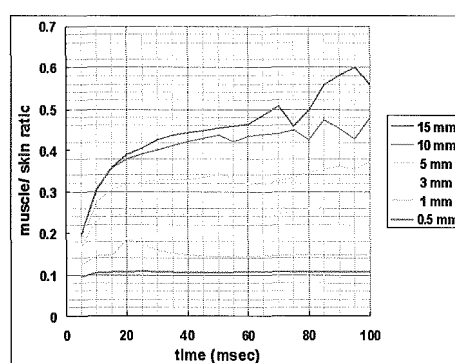


図 12 : 6 種の大きさのプローブで経皮的圧刺激に対し組織内で発生した最大応力の筋/皮膚比。

### D. 考察

本研究の結果により、経皮的圧刺激を用いて筋の圧痛を測定する際、比較的径の大きいプローブを用いる方が皮膚に対する応力を相対的に小さくし、筋に対する応力を大きくできることが示唆された。皮膚や筋などの生体組織は、変形の程度が大きくなると応力-ひずみ関係が線形性を示さない材料非線形の性質を持つことが知られている [4][5][6][7]。今回のシミュレーションでは全ての組織を線形等方弾性体と仮定しているため、次のステップとしては材料非線形性も考慮したモデルで解析を行う必要がある。我々はヒト前腕部に様々な圧縮加重を加えて組織の変形を MRI にて撮影し、材料物性を非

線形材料である Ogden rubber としてシミュレーションを行ってより生体組織に近いシミュレーションに発展させる予定である。

今後の課題として組織の解剖学的配置の違い（例えば脂肪層の厚さ）やプローブを動かす速度などにより経皮的圧刺激を与えたときの応力分布のシミュレーション解析が考えられる。

## II-3 筋の痛みの脳内投射

### A. 目的

皮膚感覚刺激に対し応答する脳部位は知られているものの、筋の痛みに対して応答する脳部位はまだ良く分かっていない。本研究では、皮膚痛でなく筋痛に特異的に応答する脳部位を fMRI を用いて特定することを目的とした。

### B. 方法

被験者として健常成人 2 名（年齢：28 歳および 32 歳）を用いた。皮膚および筋に対する痛み刺激として、左前脛骨筋部位の皮膚および筋に長さ 48 mm、直径 0.05 mm の針電極を刺入して電気刺激を行った。電極の刺入深度は皮膚で 1.5 mm、筋で 20 mm とした。刺激針より 30 mm 離れた部位に直径 8 mm の皮膚表面電極を貼付して陽極とし、両電極間に 1 ms の矩形波刺激を与えた。刺激強度は実験前に被験者ごとに「刺激を感じるが、痛くない」（皮膚：0.4 mA、筋：0.6 mA）ものと「適度に痛い」（皮膚：1.9 mA、筋：3.1 mA、共に VAS 5 程度）の 2 種類を決定した。fMRI スキャンは皮膚刺激実験と筋刺激実験の 2 つに分け、

各々の実験において非痛み刺激および痛み刺激をそれぞれ 30 回ランダムに与えた。TR(1 scan に要する時間)を 2 秒とし、刺激間のインターバルは 16 秒とした。

### C. 結果

筋への電気刺激を行ったときに脳血流量が有意に応答を示した部位は、両側の前頭葉の下前頭回 (Brodmann area (以下 BA) 10)、両側の頭頂葉の下前頭小葉 (BA 40) および楔前部 (BA 7)、両側の辺縁葉の帯状回 (BA 32, 23)、左側の島 (BA 13) および右側の視床であった (図 8)。

皮膚への電気刺激を行ったときに脳血流量が有意に応答を示した部位は、右側の前頭葉の下前頭回 (BA 47)、左側の後頭葉の楔状葉 (BA 18)、両側の辺縁葉の帯状回 (BA 32, 23) および右側の視床であった。

皮膚痛に応答した脳部位を排他的にマスクした後に筋痛に応答した部位を解析した結果、左側の頭頂葉の下頭頂小葉 (BA 40) および縁上回 (BA 40) にわずかな部位の応答が見られた。

### D. 考察

皮膚および筋への電気刺激で活動が見られた両側の辺縁葉の帯状回 (BA 32)、前頭葉の下前頭回 (BA 10) および島は痛み関連部位として知られており [10]、痛み刺激に対してこの部位に応答が見られたことから実験のプロトコールおよびデータ解析の方法が妥当であることが示唆された。筋痛のみに特異的に応答する脳部位は、痛み刺激の同側（左側）においてわずかに認められた。しかし今回は 2 例の被験者からのデータのみを解析してい

るため、データ数を増やすことによりこの部位は変わる可能性がある。現在被験者数を増やして筋痛特異的に応答する部位をより詳細に解析中である。

#### 参考文献（文中の番号に対応）

- [1] Dandekar K, Raju BI, Srinivasan MA. 3-D finite-element models of human and monkey fingertips to investigate the mechanics of tactile sense. *J Biomech Eng* 125(5), p.682–691, 2003.
- [2] Behr M, Arnoux PJ, Serre T, Bidal S, Kang HS, Thollon L, Cavallero C, Kayvantash K, Brunet C. A human model for road safety: from geometrical acquisition to model validation with radios. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 6(4), p.263–273, 2003.
- [3] 佐藤 正明. 生体組織の力学特性. 医用電子と生体工学 第24巻4号, p.213–219, 1986.
- [4] Reihnsner R, Balogh B, Menzel EJ. Two-dimensional elastic properties of human skin in terms of an incremental model at the in vivo configuration. *Med Eng Phys* 17, p.304–313, 1995.
- [5] Tong P, Fung YC. The stress-strain relationship for the skin. *J Biomech* 9, p.649–657, 1976.
- [6] Hendriks FM, Brokken D, van Eemeren JT, Oomens CW, Baaijens FP, Horsten JB. A numerical-experimental method to characterize the non-linear mechanical behaviour of human skin. *Skin Res Technol* 9(3), p.274–283, 2003.
- [7] Bischoff JE, Arruda EM, Grosh K. Finite element modeling of human skin using an isotropic, nonlinear elastic constitutive model, *J Biomech* 33, p.645–652, 2000.
- [8] Wallace MS, Ridgeway B, Schulteis G, Rabussay D, Zhang L. Topical delivery of lidocaine in healthy volunteers by electroporation, electroincorporation, or

iontophoresis: an evaluation of skin anesthesia. *Reg Anesth Pain Med* 2001;26:229-238.

- [9] Graven-Nielsen T, Mense S, Arendt-Nielsen L. Painful and non-painful pressure sensations from human skeletal muscle. *Exp Brain Res* 2004;159:273-83.
- [10] Ingvar M, Hsieh JC. The image of pain. In: Wall PD., Melzack R., eds. *Textbook of Pain* (4<sup>th</sup> edition). Churchill Livingstone, 1999. pp. 215-233.

#### E. 結論

動物実験より、伸張性収縮負荷後の筋痛覚過敏（遅発性筋痛）が130週齢という加齢ラットでは長く持続することが明らかにされた。このことは高齢者に筋痛が多いことと関連しているのではないかと考えられる。また、繰り返し寒冷ストレス5日間負荷により、強く長く続く広汎な痛覚過敏が生じ、中でもECCを負荷した筋の痛覚過敏が他の部位の痛覚過敏が長引くことが示唆され、日常におけるストレスと筋障害との合併により持続性の筋痛覚過敏状態が生じる可能性が示された。

一方、ヒトの皮膚表面麻酔実験と三次元有限要素法によるコンピューターシミュレーションにより、筋圧痛閾値の測定には少なくとも直径2mm以上のプローブを使わなければならないことが示唆された。これらの結果は、筋圧痛閾値の評価法について初めて実験的根拠を与えたものである。臨床において筋圧痛評価をする上で重要な所見であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし。



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Taguchi T, Matsuda T, Tamura R, Sato J, & Mizumura K. Muscular mechanical hyperalgesia revealed by behavioural pain test and c-Fos expression in the spinal dorsal horn after eccentric contraction in rats. *Journal of Physiology (London)*. 2005 (In Press).
2. Yajima, H., Sato, J., Giron, R., Nakamura, R., & Mizumura, K. Inhibitory, facilitatory, and excitatory effects of ATP and purinergic receptor agonists on the activity of rat cutaneous nociceptors in vitro. *Neuroscience Research*. 51, 405-416, 2005.
3. Banik RK, Sato J, Giron R, Yajima H, & Mizumura K. Interactions of bradykinin and norepinephrine on rat cutaneous nociceptors in both normal and inflamed conditions *in vitro*. *Neuroscience Research* 49, 421-425, 2004.
4. Sato J, Aoyama M, Yamazaki M, Okumura S, Takahashi K, Funakubo M, & Mizumura K. Artificially produced meteorological changes aggravate pain in adjuvant-induced arthritic rats. *Neuroscience Letters* 354, 46-49, 2004.

### 2. 学会発表

- 1) 久保恵美, 佐藤 純, 余 錦, 小畑光央, 水村和枝: 緩徐な気圧低下による神経因性疼痛ラットの痛覚過敏の増強. 第81回日本生理学会大会, 2004.6 (札幌)
- 2) 余錦, 佐藤 純, 舟久保恵美, 小畑光央, 水村和枝: 気圧低下による覚醒ラットの自律神経パラメータの変化. 第81回日本生理学会大会, 2004.6 (札幌)
- 3) 肥田朋子, 井上貴行, 塚本晋也, 土利川崇洋, 山崎 允, 猪田邦雄, 水村和枝: 若年被験者における遅発性筋痛に対するバイブレーション刺激の効果. 第81回日本生理学会大会, 2004.6 (札幌)
- 4) 田口 徹, 田村良子, 佐藤 純, 水村和枝: *in vitro* ラット神経 - 筋標本から記録した C 線維受容器の機械刺激に対する反応性は伸張性収縮後に増大する. 第81回日本生理学会大会, 2004.6 (札幌)
- 5) 高橋 賢, 水村和枝: 経皮的圧刺激によって皮膚・筋に生じる応力の3次元有限要素解析. 第81回日本生理学会大会, 2004.6 (札幌)
- 6) 高橋 賢, 田口 徹, 伊藤和憲, 西村展幸, 森定 真, 岡田 薫, 川喜田健司, 水村和枝: 皮膚表面麻酔下における圧痛閾値変化の解析 - 経皮的筋痛測定法の開発に向けて -. 第26回日本疼痛学会, 2004.7 (東京)
- 7) 高橋 賢, 水村和枝: 経皮的に圧刺激を与えたときの組織内応力分布の3次元有限要素報を用いた推定 - 経皮的筋痛測定法の開発に向けて -. 第26回日本疼痛学会 2004.7 (東京)
- 8) Taguchi T, Tamura R, Sato J, Mizumura K: Muscular mechanical hyperalgesia revealed by behavioral pain test and c-Fos expression after eccentric contraction in rats. Sixth World Congress on Myofascial Pain and Fibro-

- myalgia, 2004.7 (Munich, Germany)
- 9) Taguchi T., Tamura R, Sato J, Mizumura K: Increased mechanical response and decreased mechanical threshold of muscle C-fiber sensory receptors recorded from rat muscle- nerve preparation in vitro after eccentric contraction. Sixth World Congress on Myofascial Pain and Fibromyalgia. 2004.7(Munich, Germany)
  - 10) 田口 徹, 佐藤 純, 水村和枝: 伸張性収縮後に in vitro ラット神経-筋標本から記録した筋 C 線維受容器の反応. 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学大会合同大会, 2004.9 (大阪)
  - 11) 舟久保恵美, 佐藤 純, 余 錦, 妹尾詩織, 小畑光央, 水村和枝: 小型気圧調節措置を用いた微小気圧変動への曝露が慢性痛ラットの疼痛行動に及ぼす影響. 第 43 回日本生気象学会大会, 2004.10 (山梨県)
  - 12) Taguchi T, Sato J, Mizumura K: Response to mechanical, chemical, and thermal stimulations of the muscle C-fiber sensory receptors after eccentric contraction in rats. 34th. Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2004. 10. (San Diego, U.S.A.)
  - 13) Takahashi K, Taguchi T, Itoh K, Nishimura N, Morisada M, Okada K, Kawakita K, Mizumura K: Measurement of the muscle pain by a transcutaneous pressure: theoretical and experimental analyses. 34th. Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2004.10 (San Diego, U.S.A.)
  - 14) Taguchi T, Tamura R, Sato J, Mizumura K: Muscular tenderness revealed by behavioral pain test and c-Fos protein expression in the spinal dorsal horn following eccentric contraction in rats. International Workshop on the Neural Mechanism of Musculoskeletal Pain, 2004.12. (Nagoya)
  - 15) Taguchi T, Sato J, Mizumura K: Mechanical, chemical, and thermal responses of the C-fiber sensory receptors recorded from rat muscle- nerve preparations in vitro after eccentric contraction. International Workshop on the Neural Mechanism of Musculoskeletal Pain, 2004.12. (Nagoya)
  - 16) Takahashi K, Taguchi T, Itoh K, Nishimura N, Morisada M, Okada K, Kawakita K, Mizumura K: Measuring the muscle pain using a transcutaneous pressure: simulation and experimental studies. International Workshop on the Neural Mechanism of Musculoskeletal Pain, 2004.12. (Nagoya)
3. 著書、総説
- 1) 水村和枝: 炎症と痛み. リウマチ科 31: 186-192, 2004.
  - 2) 水村和枝: 痛み受容器の神経生理と炎症時の変化. 痛みシグナルの制御機構と最新治療エビデンス. 医学のあゆみ 211: 355-358, 2004.
  - 3) 水村和枝, 田口徹: 痛み受容器をめぐる最近の話題 - 痛み受容器における受容変換機構と筋肉痛モデルにおける痛み受容器活動の変化- 特集「筋・骨格系の痛み研究の最近の話題,

運動・物理療法 15: 176-182, 2004.

- 4) Mizumura K, Takahashi K, Sato J:  
Hyperalgesia to cold in persistently  
inflamed rats- changes in C-fiber receptor  
activities and cold-sensitive ion channel  
expression. In: Hyperalgesia:  
Molecular mechanisms and clinical  
implications. eds. Brune K, Handwerker  
HO. Progress in Pain Research and  
Management 30: 71-86, 2004.
- 5) 水村和枝, 佐藤 純: 交感神経活動と  
痛み - 神経損傷モデルの教えたもの.  
末梢神経 15: 1-9, 2004.

筋および筋細径求心線維脊髄投射の形態学的研究：筋骨格系の痛みにかかわる分子、受容体の発現の変化

（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 筋骨格系の痛みのメカニズムを解析するため、各種動物モデルを用いた痛覚の解析と知覚神経における分子、受容体の解析を行った。

慢性顎関節炎モデルラットを作成し、顎関節部の圧痛における P2X3 受容体 (P2X3R) の役割を検討した。ラットの片側顎関節に complete Freund's adjuvant (CFA) を投与し顎関節炎を作成し、顎関節部に機械的圧刺激を与え、逃避反応が観察される閾値を測定した。顎関節部に ATP 受容体作働薬および拮抗薬を投与し閾値の変化を観察した。また三叉神経節における P2X3R 陽性細胞の変化を免疫組織化学的手法により検察した。CFA 投与後、顎関節炎を発症した顎関節において機械的圧刺激に対する閾値が低下した。 $\alpha$ ,  $\beta$  me-ATP (P2X1,3,2/3 作働薬) 投与群ではさらに閾値が低下したが、 $\beta$ ,  $\gamma$ -me-L-ATP (P2X1 作働薬) 投与群では閾値に変化を認めなかった。TNP-ATP (P2X1,3,2/3,1/5 拮抗薬) および PPADS (P2X1,2,3,5,4/5,1/5 拮抗薬) の投与により、閾値が上昇した。また関節炎側の三叉神経節で小型の P2X3R 陽性細胞が増加した。アジュバント顎関節炎により発症する圧痛には P2X3R の関与が示唆された。

神経因性疼痛のモデルの一つである抗腫瘍薬シスプラチン投与ラットを作成し、痛覚の変化を行動実験的に調べ、知覚神経において痛覚に関わるイオンチャンネルの変化を調べた。皮膚の痛覚の検討に加え、筋の痛覚についても検討した。ラットにシスプラチンを 5 週間、反復投与した。シスプラチン投与群に皮膚の機械的痛覚過敏が見られたが、侵害性熱刺激に対しては痛覚鈍麻となる傾向が確認された。腓腹筋の圧痛テストでは、シスプラチン投与群で閾値の有意な低下を認め、握力も低下し、筋における痛覚過敏の存在が示唆された。シスプラチン投与群の後根神経節 (DRG) においては TRPV2、P2X3、ASIC3 陽性細胞数が有意に増加し、P2X3 と ASIC3 は筋由来の DRG 細胞でも有意に増加していた。これらの結果よりシスプラチン投与により皮膚の機械的痛覚過敏に加え、筋の痛覚過敏も示唆された。DRG において TRPV2、P2X3、ASIC3 陽性細胞が増加していたことから、シスプラチンにおける痛覚過敏にはこれらのイオンチャンネルが関与していると考えられた。また筋由来の DRG 細胞においても P2X3、ASIC3 陽性細胞が増加したことから、シスプラチン投与はこれらイオンチャンネルの変化に伴い筋の痛覚にも変化をもたらしていることが示唆された。

carrageenan 投与による筋痛モデルを作成し、筋痛の発生に関与する遺伝子及び、その産物の発現を検討した。4% carrageenan をラットの腓腹筋に投与し、腓腹筋の圧刺激に対する閾値を測定した。L4~L5 の後根神経節において real-time PCR を用いて mRNA の発現の変化を調べ、免疫組織化学的にタンパク発現を調べた。carrageenan 投与後 12 時間で腓腹筋の圧刺激に対する閾値が最も低下し、筋の痛覚過敏が確認された。ASIC1a, 1b, 2a, 2b, 3、TRPV1, P2X3, P2Y1 の遺伝子発現量に変化は見られなかったが、DRG において ASIC3, TRPV1, TRPV2 陽性細胞が増加し P2X3 については減少した。これらイオンチャンネルの発現の変化が、carrageenan 筋炎による筋痛の発現に関与していると思われた。

#### A. 研究目的

筋骨格系の痛みは、皮膚の場合と同様にそこに分布する侵害受容器が興奮するため

に生じると考えられる。筋および筋膜の痛みについてみると、生理的にその反応性は詳しく調べられ、機械、熱、化学刺激に反

応するポリモーダル受容器であることが報告されている(Kumazawa and Mizumura 1977)。生化学的には、侵害受容に関連する神経の分布密度が皮膚に比べて低いことなどが推測され(McMahon et al., 1984)、形態学的には、筋の知覚神経は脊髄における投射領域が広いことが報告され(Mense and Craig, 1988)、これらのことが、筋痛の局在性、判別性の悪さを特徴付けていると考えられている。我々はこれまでに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、筋に由来する無髄の知覚神経は脊髄後索表層を数分節にわたって走行するものがあり、終末部の形態や脊髄への投射様式は、皮膚の知覚神経と内臓の知覚神経の中間の性格をもつことを明らかにした(Ling et al., 2003)。また昨年度の本研究事業で、腓腹筋に分布する神経線維の分布を調べ、その分布密度が低く、終末部は特殊な構造を持たない自由終末であることを確認した。しかし、筋・筋膜の痛みに関わる受容体、イオンチャンネルとその発現の変化を調べた仕事は少ない。

そこで、我々は、末梢における筋・骨格系の痛覚受容のメカニズムを明らかにするため、種々の痛みの動物モデルを用い、筋骨格系の痛覚の変化を解析し、さらに筋骨格系の知覚にかかわる神経に発現する受容体やイオンチャンネルの遺伝子やタンパクの発現を real time PCR や免疫組織学によって調べた。

## B. 研究方法

### B-1. アジュバント顎関節炎に見られる圧痛における P2X<sub>3</sub> 受容体の役割

材料として Lewis 系雄性ラット (200-300 g) を使用した。ラットの片側顎

関節の上関節腔に complete Freund's adjuvant (CFA, 6 mg/ml) を投与しアジュバント顎関節炎を作成した。反対側の顎関節には生理食塩水を投与した。両側顎関節部に機械的圧刺激を与え、逃避反応が観察された時点での圧力を圧痛の閾値とし、CFA 投与後 15 日間両側顎関節の閾値の変化を調べた。顎関節への圧刺激は、バネばかりに装着された先端の直径が 5 mm の円錐形のチューブを顎関節に徐々に強くおしあてることで加えた。CFA 投与 15 日後、実験群として、両側顎関節部に ATP 受容体作動薬および拮抗薬を投与し閾値の変化を観察した。対照群には、同量の生理食塩水を投与した。CFA を投与したときの顎関節炎の病理所見を明らかにするため、CFA 投与後 15 日後のラットを、ペントバルビタール深麻酔下にて灌流固定し、顎関節を取り出し、脱灰操作の後、クライオスタットにて 20  $\mu$ m の矢状断切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色にて染色し、光学顕微鏡にて観察した。また三叉神経節における P2X<sub>3</sub> 受容体(P2X<sub>3</sub>R)陽性細胞の変化を免疫組織化学的に調べるため、CFA 投与 15 日後のラットを灌流固定した後、三叉神経節を取り出し、クライオスタットにて 15  $\mu$ m の切片を作成し、P2X<sub>3</sub> に対する抗体を用いて免疫組織化学を行い ABC-DAB 法にて可視化した。また顎関節に分布する知覚神経における P2X<sub>3</sub>R の発現を調べるため、無処置のラットの片側顎関節の上関節腔に逆行性トレーサーである

Fluorogold(FG)を注入し、1 週間の生存期間の後、動物を灌流固定した。三叉神経節を取り出し、クライオスタットにて切片を作成し、P2X<sub>3</sub>R に対する抗体を用い免疫組織化学を行い、FITC で標識された二次抗

体を用いて可視化した。蛍光顕微鏡にて、FG で標識された顎関節由来の知覚神経を確認し、P2X3R の共発現を調べた。本実験は、篠田雅路、尾崎紀之、浅井英明、長嶺健一郎、杉浦康夫が担当した。

## B-2. シスプラチンによって引き起こされる痛覚過敏のメカニズムの解析

Sprague-Dawley 雄性ラットにシスプラチンを5週間、反復投与した(3 mg/kg/週、5回、全投与量 15 mg/kg、腹腔内投与)。コントロール群には生理食塩水を投与した。初回投与前ならびに投与後7日ごと35日後まで、体重測定、痛覚テストを行った。

皮膚の痛覚試験として足底皮膚に対する von Frey テスト、pin-prick テスト、Hot plate テストを行なった。筋痛の評価のため、腓腹筋表面の皮膚に対する von Frey テスト、腓腹筋に圧刺激を加え逃避行動を引き起こす閾値を調べる圧痛テスト、筋炎による筋痛に伴い低下することが報告されている握力の測定を行なった。

腓腹筋表面の皮膚に対する von Frey テストを行うためには、あらかじめテストの1週間前に動物の後肢腓腹筋表面を剃毛して皮膚を表出した。動物にハンカチ大の布を用いて軽く体幹を拘束し、尾部を床につけて開排位を取らせ、そのまま動物が十分に落ち着くまで10分以上静置した。動物が落ち着き後肢の緊張が解けた状態で von Frey フィラメントを動物の腓腹筋背面中央部に対して垂直にフィラメントが曲がるまで押しつけ刺激を加えられた後肢が屈曲反射を呈して逃避行動を示したときのフィラメントの値を測定した。

腓腹筋への圧刺激は、Randall-Selitto テストを応用した Schäfers らの報告に従って行った。動物にハンカチ大の布を用いて軽く体

幹を拘束し、動物が落ち着き後肢の緊張が解けた状態で動物の後肢の腓腹筋に Ugo Basile Analgesy Meter 37215 (Stoelting, Chicago, IL, USA, Ugo Basile, Italy) を用いて連続的にかつ漸増する圧力(最大 250 g)を与えた。動物が圧力を加えられている後肢を屈曲する逃避行動を起こしたときの圧力値を測定した。

Kehl らの報告によると、ラットの前肢および後肢の握力は、カラゲニン筋炎による痛覚過敏に伴って低下し、モルヒネや NSAID によって回復することから、筋痛を反映すると考えられている。シスプラチンが筋の痛覚過敏を引き起こすか調べるため、Kehl らの報告に従って前肢及び後肢の握力の測定を行った。プッシュプルゲージ(MODEL-RX-100, アイコーエンジニアリング, 名古屋, 日本)を水平に固定し、トランスデューサー先端に金網を接続した装置を作成した。前肢の握力の測定時には、動物の前肢を金網の上のせて握らせ、動物を尾側方向に引っ張り、動物が握っていた金網から手を離すまでの力の最大値を測定値とした。後肢の測定時は動物の後肢を金網の上のせて握らせ、動物を引っ張り、前肢の時と同様に金網から趾を離すまでの力の最大値を測定値とした。

皮膚の侵害受容への関与が明らかにされているイオンチャンネル、TRPV1、TRPV2、P2X<sub>3</sub>、ASIC3 と、シスプラチン投与ラットで見られる痛覚の変化との関連を調べるため、シスプラチン投与ラットの後根神経節(DRG)でのこれらイオンチャンネルの発現を免疫組織化学的に検索した。5回のシスプラチン投与後、腓腹筋に逆行性トレーサーである

Fluoro-Gord(FG)を注入し、筋由来の DRG 細胞を標識した。一週間の生存期間の後、灌流固定し、L5 レベルの後根神経節を取り出し、

クライオスタットによって 10  $\mu\text{m}$  の切片を作成し、TRPV1、TRPV2、P2X<sub>3</sub>、ASIC3 に対する抗体を 1 次抗体として使用した免疫組織化学を行い蛍光抗体法によって可視化した。蛍光顕微鏡下で、全 DRG 細胞ならびに FG で標識された腓腹筋由来の知覚神経細胞における TRPV1、TRPV2、P2X<sub>3</sub>、ASIC3 の発現を調べた。この実験は堀紀代美、尾崎紀之、杉浦康夫が担当した。

### B-3. Carrageenan 筋炎によって知覚神経に発現するメディエーターの解析

ペントバルビタール深麻酔下にて、Sprague-Dawley 雄性ラットの左側腓腹筋に 4% carrageenan を 100  $\mu\text{l}$  注入し炎症を誘発した。carrageenan の代わりに PBS を 100  $\mu\text{l}$  注入した動物を対照とした。

carrageenan 注入後 5 週間にわたって Randall-Selitto 式鎮痛効果測定装置を用いて、腓腹筋の圧刺激に対する閾値を測定し、von Frey Hair を用いて、後肢下腿後面の皮膚痛覚閾値を測定した。

carrageenan 注入 24 時間後にペントバルビタール麻酔下で L4-L6 の後根神経節を採取し、 $-80^{\circ}\text{C}$  以下で保存した。組織サンプルよりトータル RNA を抽出し、RT-PCR (reverse transcriptase PCR) を行い cDNA を合成し、ASIC (acid sensing ion channels) 1a, 1b, 2a, 2b, 3, TRPV-1, P2X3 に対するプライマーを用い PCR を行い、遺伝子発現を調べた。次に、同じ primer を用いて real time PCR を行い、遺伝子発現を定量した。内部標準として glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) の mRNA の発現を基準に、痛覚関連受容体の mRNA 発現量を相対的に定量した。primer の有効性を確認するた

めに、GAPDH に対する primer を 2 種類作成し、その結果を比較した。

筋の知覚神経におけるイオンチャネルの発現を調べるため、ペントバルビタール深麻酔下にて、ラットの左側腓腹筋に逆行性蛍光神経標識物質 Fluorogold(4%) を注入した。7 日間の生存期間の後、ペントバルビタール深麻酔下にて、ラットの左側腓腹筋に 4% carrageenan を 100  $\mu\text{l}$  注入し炎症を誘発した。carrageenan の代わりに PBS を 100  $\mu\text{l}$  注入した動物を対照とした。carrageenan 注入 24 時間後にペントバルビタール深麻酔下にて、4% パラフォルムアルデヒドを含む固定液で動物を灌流固定し、後根神経節 (L4-6) を取り出し、クライオスタットにて 10  $\mu\text{m}$  の厚みの切片を作製した。ASIC3, TRPV1, TRPV2, または P2X3 に対する抗体を用い、免疫組織化学を行い、蛍光抗体法にて可視化した。Fluorogold で標識された腓腹筋に由来する知覚神経における ASIC3, TRPV1, TRPV2, または P2X3 の発現を調べた。本実験は、藤井優子、尾崎紀之、杉浦康夫が担当した。

### B-4. (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

### C-1. アジュバント顎関節炎に見られる圧痛における P2X3 受容体の役割

CFA 注入側の顎関節に顎関節炎が発症し関節の滑膜には炎症性細胞浸潤が見られ密な膠原線維が観察された (図 1)。

CFA 投与後 14 日間、顎関節炎を発症し

た顎関節において機械的圧刺激に対する閾値が低下した。生理食塩水注入側では閾値の変化は見られなかった(図2)。

$\alpha$ ,  $\beta$  me-ATP (P2X<sub>1,3,2/3</sub> 作働薬) を投与すると、炎症側の顎関節でも、対照側の顎関節でもさらに閾値が低下したが、 $\beta$ ,  $\gamma$ -me-L-ATP (P2X<sub>1</sub> 作働薬) 投与群では閾値に変化を認めなかった。TNP-ATP (P2X<sub>1,3,2/3,1/5</sub> 拮抗薬) および PPADS (P2X<sub>1,2,3,5,4/5,1/5</sub> 拮抗薬) の投与により、CFA 注入による炎症側の顎関節で低下していた閾値が上昇したが、対照側の顎関節では閾値の変化は見られなかった(図3)。

関節炎側の三叉神経節で小型の P2X<sub>3</sub>R 陽性細胞が増加した(図4)。また FG で標識された顎関節由来の知覚神経に P2X<sub>3</sub>R 陽性のものが確認された。

以上よりアジュバント顎関節炎により発症する圧痛には P2X<sub>3</sub>R の関与が示唆された。

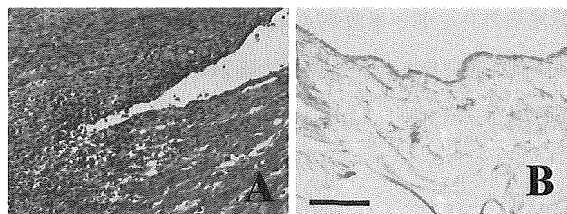


図1. CFA 注入側(A)と対照側 (B) の顎関節の滑膜。ヘマトキシリンエオジン染色。CFA 注入側の滑膜には炎症性細胞浸潤と膠原線維の増生が見られる。スケールは 500  $\mu$ m.

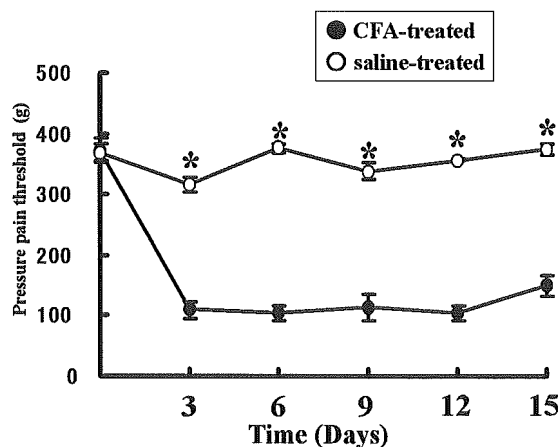


図2. CFA または生理食塩水注入後の、顎関節の圧痛閾値の変化。\*対照群に比較して  $p < 0.05$ 。

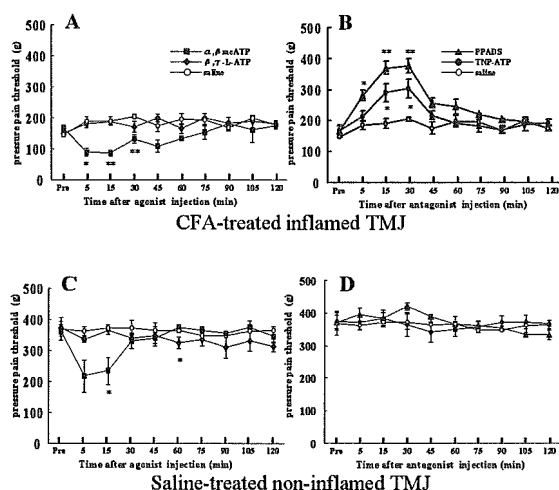


図3. CFA(A, B)または生理食塩水(C, D)注入側の顎関節における圧痛閾値に対する ATP 受容体作働薬(A, C)と拮抗薬(B, D)の効果。圧痛閾値は受容体作働薬  $\alpha, \beta$  me-ATP によって低下するが、 $\beta, \gamma$ -me-L-ATP では変化がなかった(A, C)。一方圧痛閾値は炎症側の顎関節において (B)、受容体拮抗薬である PPADS でも TNP-ATP でも低下したが、対照側 (D) の顎関節では変化が見られなかった。



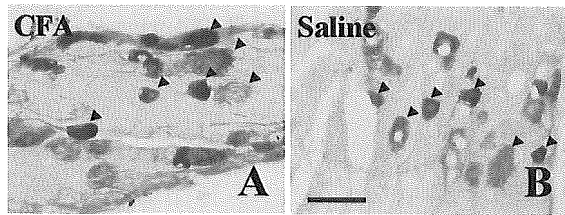


図4. CFA 注入側と生理食塩水注入側 (B) の三叉神経節における P2X3 陽性細胞(矢頭)。スケールは 100  $\mu$  m.

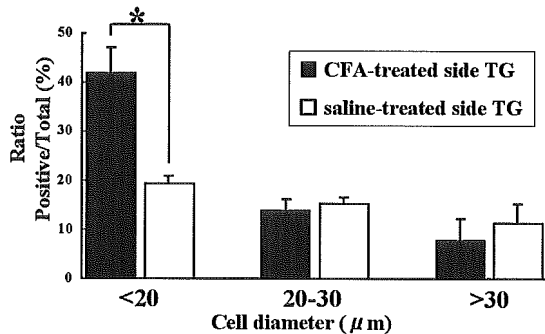


図5. 三叉神経節における P2X3R 陽性細胞数。CFA 注入側の三叉神経節において P2X3 陽性の小型細胞の数が増加した。

## C-2. シスプラチンによって引き起こされる痛覚過敏のメカニズムの解析

シスプラチン投与群は投与された用量に依存して有意に体重が減少したが、通常の観察では明らかな行動異常は認めなかった。

足底部の von Frey テストでは、シスプラチンを投与された動物では対照群に比べて閾値が低下していた(図 6A)。pin-prick テストではシスプラチンを投与された動物では後肢の挙上時間が延長した(図 6B)。腓腹筋表面皮膚の von Frey テストでも、シスプラチン投与群で閾値の低下が見られ(図 7A)、シスプラチン投与動物では皮膚の機械的痛覚過敏が確認された。

hot plate テストにより、侵害性熱刺激に対してシスプラチンを投与された動物では、逃避

行動を示すまでの潜時が遅延する傾向が見られ、痛覚鈍麻となる傾向が確認された(図 8)。

腓腹筋の圧痛テストでは、シスプラチン投与群で対照群に比べて閾値の有意な低下を認めた(図 7B)。また握力も低下し(図 9)、筋における痛覚過敏の存在が示唆された。

シスプラチン投与群の DRG においてはコントロール群と比べ、TRPV2(図 11B)、P2X<sub>3</sub>(図 11C)、ASIC3(図 11D)陽性細胞数が有意に増加し、P2X<sub>3</sub>(図 11C)と ASIC3(図 11D)は FG で標識された筋由来の DRG 細胞でも有意に増加していた(図 10)。

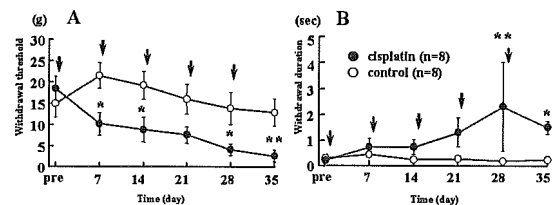


図6. A: 足底部の von Frey テスト。シスプラチン投与ラットでは対照群に比べ有意に閾値の低下が見られた。B: 足底部の pin prick テスト。シスプラチンを投与された動物では後肢の挙上時間が延長した。

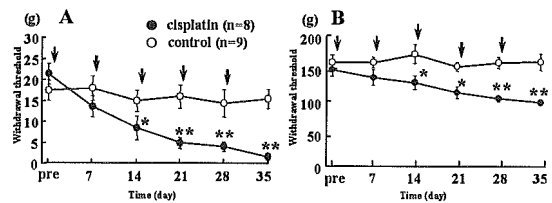


図7. A: 腓腹筋表面の皮膚の von Frey テスト。シスプラチン投与ラットでは対照群に比べ有意に閾値の低下が見られた。B: 腓腹筋の圧痛テスト。シスプラチンを投与された動物で有意に閾値の低下が見られた。

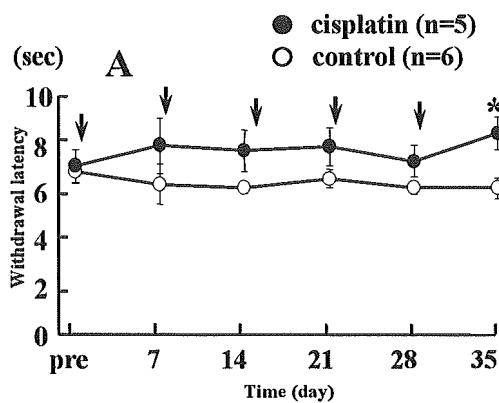


図 8. Hot plate テスト。シスプラチン投与ラットでは対照群に比べ有意に潜時の遅延が見られた。

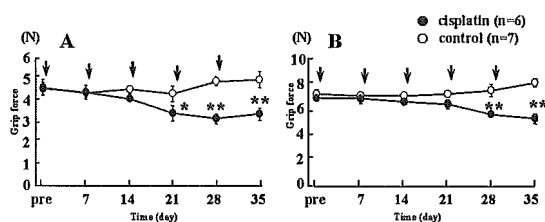


図 9. 握力テスト。シスプラチン投与ラットでは対照群に比べ有意に前肢 (A) および後肢 (B) の握力の低下が見られた。

### C-3. Carrageenan 筋炎によって知覚神経に発現するメディエーターの解析

Randall-Selitto test でヒフク筋に機械的圧刺激を加え、逃避行動を示す閾値を調べると、Carrageenan 投与群と saline 投与群ともに、投与 12 時間後で閾値の低下が見られ痛覚過敏を示したが、Carrageenan 投与群は saline 投与群に比べさらに有意に低下していた。しかし、24 時間後では、Carrageenan、saline 両投与群で 閾値の回復が見られ、以後 5 週にわたって観察したが、閾値の有意な変化は見られなかった(図 12)。

後根神経節における遺伝子発現については、今回調べた ASIC (acid sensing ion channels) 1a, 1b, 2a, 2b, 3, TRPV-1, P2X3

においては発現量が変化した遺伝子は同定できなかった(図 13)。

しかし FG で逆行性に標識した筋由来の知覚神経細胞についてみると、ASIC3, TRPV1, TRPV2 陽性細胞が増加し、P2X3 陽性細胞は減少していた。

carrageenan 筋炎における腓腹筋の痛覚過敏にはイオンチャンネルの発現の変化が関わっていると考えられた。

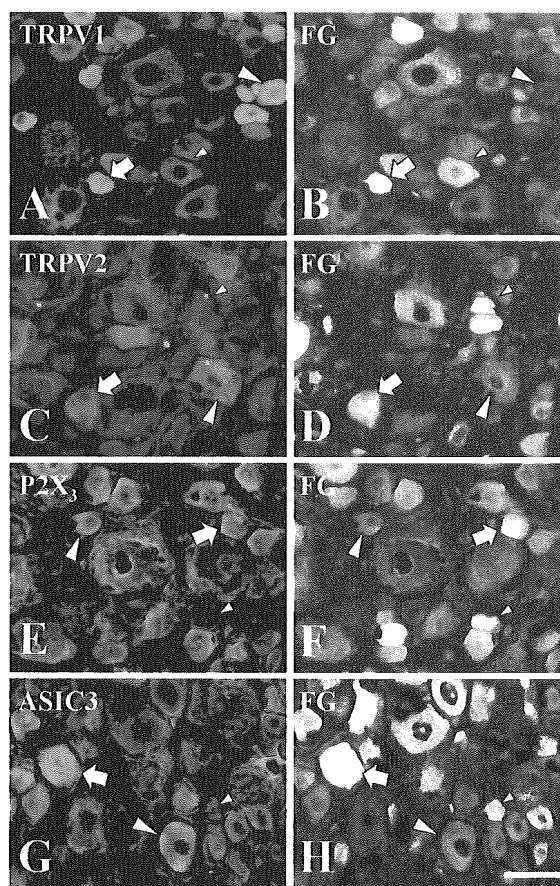


図 10. 後根神経節におけるイオンチャンネルの発現。4 組の写真はそれぞれ TRPV1 (A), TRPV2 (C), P2X3 (E), ASIC3 (G), 陽性細胞と FG で標識された腓腹筋由来の知覚神経細胞を示す (B, D, F, H)。スケールは 50  $\mu$ m。

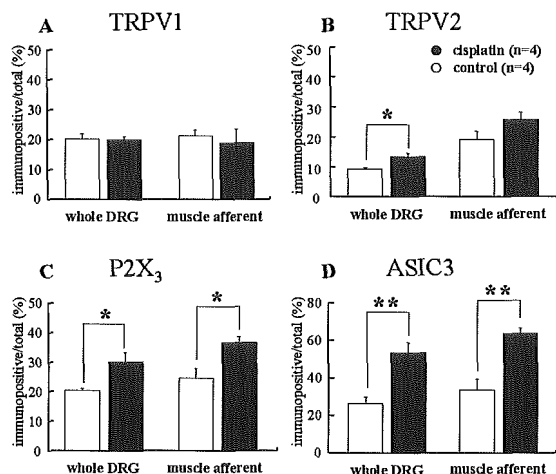


図 11. 後根神経節の全細胞と、FG で標識された腓腹筋由来の知覚神経細胞におけるイオンチャンネル陽性細胞の割合。TRPV1 (A), TRPV2 (B), P2X3 (C), ASIC3 (D) 陽性細胞の割合を示す。

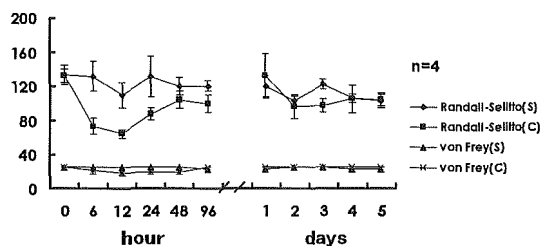


図 12. 腓腹筋の圧痛閾値と腓腹筋表面の皮膚の von Frey test.

Carrageenan 投与群(Randall-Selitto(C))では saline 投与群(Randall-Selitto(S))に比べ圧痛閾値が有意に低下していた。

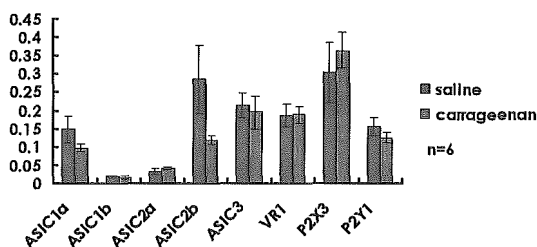


図 13. 後根神経節における遺伝子発現。Real time PCR. 今回調べた ASIC1a, 1b, 2a, 2b, 3, TRPV-1, P2X3 においては発現量の変化した遺伝子は同定できなかった。

## D. 考察

### D-1. アジュバント顎関節炎に見られる圧痛における P2X3 受容体の役割

筋骨格系の痛みを伴う疾患にはさまざまなものがある。そのなかで顎関節症は北米では成人の 10%に見られこれに伴う顎関節の痛みを苦しんでいるヒトが多い (Fricton, 2004) が、そのメカニズムには不明な点が多い。本研究では顎関節症のモデルであるアジュバントによる慢性顎関節炎モデルラットを作成し、顎関節部の圧痛における P2X<sub>3</sub> 受容体 (P2X<sub>3</sub>R) の役割を検討した。顎関節は三叉神経第二枝の枝の支配を受けるが、顎関節表面の皮膚は三叉神経第二枝と第三枝両方の支配を受ける。そこで通常の皮膚の痛覚の感受性を調べる von Frey テストや、輻射熱によるテストでは皮膚より深部にある顎関節の痛みを正確に把握することは困難と考えられる。我々は圧刺激により皮膚より深部にある顎関節の組織に機械的的刺激を加え、関節炎における圧痛覚過敏を明らかにすることができた。顎関節痛の解析に本研究で用いた圧刺激は有効と思われる。

近年皮膚の侵害受容において ATP 受容体である P2X<sub>3</sub>R が関わっていることが報告されている (Burnstock, 2000)。本研究では、ATP 受容体作働薬が圧痛閾値を低下させることから、ATP が侵害受容器を感作しうることを示した。また ATP 受容体拮抗薬が顎関節炎において圧痛閾値を増大させることから顎関節炎の圧痛覚過敏には ATP とその受容体の関与が示唆された。また顎関節炎を作成すると、三叉神経節において P2X<sub>3</sub> 陽性細胞が増加することから、P2X<sub>3</sub>R の増加が顎関節炎における圧痛覚過敏に関与していることが示唆された。

## D-2. シスプラチンによって引き起こされる痛覚過敏のメカニズムの解析

種々の検査を行なっても特別な異常所見は認められないのに、筋に慢性的な痛みを訴えつづける症候群である線維筋痛症候群や筋・筋膜性疼痛症候群は近年大きな問題となっている(Rudin, 2003)。筋・筋膜性疼痛症候群についてはそのメカニズムの仮説として神経因性疼痛で見られるような、筋の侵害受容器の感作も提唱されている(Itoh and Kawakita, 2002)。神経因性疼痛を呈する患者においては筋などの軟部組織の圧痛を訴えることも多い(Wasner et al., 2002)。そこで本研究は慢性の筋痛との関連をふまえながら、神経因性疼痛のメカニズムを明らかにするために、その動物モデルの一つであるシスプラチン投与ラットにみられる痛覚過敏の検討を行った。その際皮膚の痛覚に加え、筋の痛覚についても検討した。

シスプラチンの反復投与により、用量依存的に皮膚に機械的痛覚過敏を観察することが出来た。筋については、腓腹筋に対する圧痛テストで閾値の低下が見られた。近年、カラゲニン筋炎のモデルにおいて見られる握力の低下は $\mu$ -opioid agonist や臨床筋痛の治療に用いられる indomethacin などの投与により回復することから、握力の低下は筋炎による筋の痛みを反映していると考えられている(Kehlet et al., 2000)。そこで、筋の痛覚過敏が存在するか調べるため、本研究ではシスプラチン投与ラットで前後肢両方の握力測定を行った、シスプラチン投与によって握力低下の結果を得たことから、前述の圧痛テストの結果とあわせて、筋の痛覚過敏の存在が示唆された。

シスプラチンを投与されたラットの後根神経節で TRPV2、P2X<sub>3</sub> および ASIC3 の受容体

が増加していたことからシスプラチンによって引き起こされた機械的痛覚過敏には TRPV2、P2X<sub>3</sub> や ASIC3 が関与していると考えられた。また筋由来の後根神経節細胞においても P2X<sub>3</sub> および ASIC3 の受容体が増加していたことからシスプラチン投与はこれらのイオンチャンネルの変化に伴い、筋の知覚にも変化をもたらしていることが示唆された。

シスプラチンによる神経因性疼痛のメカニズムについては不明な点が多い。DRG に選択的に apoptosis が起こることが報告されている(McDonald and Windebank, 2002)。今回侵害受容に関わるイオンチャンネルの変化がシスプラチンを投与された動物の知覚神経で見られることがあきらかになったので、今後シスプラチンの神経因性疼痛のメカニズムについてさらに解明が進むものと思われる。

## D-3. Carrageenan 筋炎によって知覚神経に発現するメディエーターの解析

Carrageenan 投与の 12 時間後ならびに 24 時間後に筋の機械的圧刺激に対する閾値の低下が見られ、筋の痛覚過敏が示唆されたが、その後 5 週にわたって観察しても閾値の変化は見られず、Carrageenan による痛覚過敏は急性で一過性なものと考えられた。

今回作成したプライマーによって、ラットの後根神経節には ASIC(1a, 1b, 2a, 2b, 3), TRPV-1, P2X3 の mRNA の発現が確認され、プライマーや実験方法の有効性が確認された。しかしカラゲニン筋炎動物モデルラットでは今回調べた範囲では mRNA の変化は見られなかった。Carrageenan による痛覚過敏は一過性であるので、mRNA の変化は関与していないのかも知れないが、