

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22500455

研究課題名（和文）

不活動に由来する疼痛の病態解明と治療法の開発に関する実験的研究

研究課題名（英文）

Experimental research to elucidate the pathogenesis and develop treatment for pain due to inactivity

研究代表者

鈴木 重行 (Shigeyuki Suzuki)

名古屋大学・医学系研究科（保健）・教授

研究者番号：60179215

研究成果の概要（和文）：

不活動に由来する疼痛の病態解明と治療法の開発に関する実験的研究として、ラット後肢に対するギプス固定により、モデルを作成し、疼痛関連の評価とともに機械的刺激の影響について検討した。不活動に由来する疼痛として、以下の評価を行なった。行動学的評価は、腓腹筋に対する逃避反応閾値測定、足底に対する逃避反応回数測定を、病理組織学的評価は、腓腹筋の壊死線維数測定を、分子生物学的評価は、第4～6腰髄の後根神経節および脊髄後角を標本とし、RNA抽出およびReal-time PCR法を施行した。その結果、逃避反応閾値の低下および逃避反応回数の増加が固定終了直後より観察されたが、機械的刺激による介入群ではこれらの指標が早期に回復する傾向が見られた。また、組織学的所見では、固定群は介入群に比較し、著明な筋損傷が認められた。さらに、分子生物学的評価では脊髄後角におけるBDNF mRNA発現量が固定群において高値を示した。これらのことから、不活動に由来する疼痛は筋および皮膚の両者に発現し、その病態にBDNF mRNA発現の関与が推察された。

研究成果の概要（英文）：

As experimental research with the goal of elucidating the pathogenesis and developing treatments for pain due to inactivity, we created a rat model using cast immobilization of the hindlimbs to evaluate the relationship to pain and the influence of mechanical stimulation.

Pain due to inactivity was evaluated as follows. Behavioral evaluation included measurement of pain thresholds using the gastrocnemius muscle and measurement of the number of escape responses of hind foot pad. Histopathological evaluation included measuring the number of necrotic fibers in the gastrocnemius muscle. Molecular biological evaluation included RNA extraction and real-time polymerase chain reaction using specimens of the dorsal root ganglion and dorsal horn of the L4-6 spinal cord.

Results: A decreased pain threshold of gastrocnemius and increased number of escape responses of hind foot pad were observed immediately after immobilization, but these parameters tended to normalize early in the intervention group with mechanical stimulation. Histopathological evaluation showed marked muscle injury in the immobilization group compared to the intervention group. In addition, molecular biological evaluation showed higher expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the dorsal horn in the immobilization group.

These findings show that the development of pain is due to inactivity in both muscle and skin, and that BDNF mRNA expression plays a role in the pathogenesis of this pain.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 総計     | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：疼痛、骨格筋、ギプス固定

## 1. 背景

高齢者の疾病構造の特徴として、疾病自体から起こる一次障害に加え、臥床や身体活動の減少により二次的な廃用症候群を来し、障害が重度化することが挙げられる。そのため、リハビリテーション医療では、廃用症候群を如何にして予防・治療していくかが、対象者の障害度を大きく左右する。そして、廃用症候群の典型的な症状として挙げられるのが筋萎縮であり、これはすべての対象者に認められるといっても過言ではない。そのため、理学療法では早期から積極的に介入を図り、不活動状態からの脱却を促す必要がある。

しかし、このような患者では、数週間から数ヶ月にわたる慢性的な骨格筋の圧痛や伸張痛を訴え、それらに起因する筋力の低下や関節可動域の制限によって、日常生活活動や理学療法の介入が困難なものが少なくない。また、介入後には、骨格筋に熱感や腫脹を伴う筋痛を訴え、理学療法の継続を困難とし、さらなる不活動状態を招き、回復を遅延させる場合もある。

動物実験の知見では、10日間の後肢懸垂によってラットヒラメ筋に廃用性筋萎縮を惹起させた後に、再荷重を行うだけで筋傷害が発生するとした報告があり、我々が行った実験でもラット後肢の4週間のギプス固定後に再荷重を行うと、ヒラメ筋に筋細胞壊死や筋線維の膨化、間質の拡大と間質における単核細胞の増加など、筋傷害による炎症所見を疑わせる結果を得ている。

このことから、前述した骨格筋における慢性的な疼痛や、理学療法介入によって引き起こされる筋痛は、不活動によって退行性に脆弱化した骨格筋で、繰り返し筋傷害が生じていることが原因の1つである可能性が高い。しかし、このような筋傷害と筋痛の関連性については不明であり、効果的な治療方法についても確立されていない。

## 2. 目的

臨床患者では、不活動によって廃用性筋萎縮を呈した骨格筋に、圧痛や伸張痛、収縮時痛などの筋痛が惹起される。そのため、積極的な身体活動を伴うようなりハビリテーションを行うのが困難であり、現在、臨床で広く行われている理学療法では、負荷量や実施回数を過度に設定すると筋痛を増悪させ、積極的な理学療法の継続を困難としたり、逆に負荷量や実施回数設定が少なすぎると身体活動能力の向上につながらなかったりする。

そこで、本研究課題では骨格筋の退行性変化に着目し、病態の解明を行うとともに間歇的伸張刺激がギプス固定後の筋痛を軽減し、その後の回復過程において有効に作用するのではないかと仮説について実験動物を用いて検証することを目的とした。

## 3. 方法

### 1) 対象動物と飼育環境

実験動物は Wistar 系雄性ラット (8 週齢) を用いた。各ラットを無処置の対照群 (n = 5) と実験群 (n = 12) に無作為に振り分け、実験群は後述する方法で両側足関節を最大底屈位にて 4 週間ギプス固定した。そして、実験群は固定終了後にギプスを除去し、通常飼育を 2 週間実施する固定群 (n = 6) と、通常飼育に加えてギプス除去直後からストレッチを 2 週間実施する固定+介入群 (n = 6) に無作為に振り分けた。

### 2) モデルラットの作製 (図 1)

モデルラットの作成では、まず、ペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg) の腹腔内投与によって麻酔を行った。次に、両側足関節を最大底屈位の状態とし、前足部から膝関節上部までギプス包帯にて固定し、足趾は浮腫の発生を確認するために露出させた。



図1 ギプス固定

ギプスの緩みや浮腫の発生を確認した際には適宜巻き換えを行い、4週間継続してギプス固定を行った。4週間の固定の後は、ジエチルエーテルによる吸入麻酔を行い、ギプスを除去した。なお、ギプス固定を施された後もラットは前肢にて飼育ゲージ内を自由に移動することができ、餌と水は自由に摂取させた。

### 3) 間歇的伸張刺激の方法 (図2)

固定+介入群は、固定終了後にペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg) の腹腔内投与によって麻酔を行い、他動運動装置を用いて、腓腹筋に間歇的伸張刺激を与えた。他動運動装置はモーター (CRK543APB, Oriental Moter Co. Ltd., Japan) の回転軸にシャフトホルダ (CSHS-6-R, Nabeya Bi-tech Co. Ltd., Japan) と自作したアタッチメントを取り付けて作製した。

間歇的伸張刺激の具体的な方法は、ラットを側臥位にし、膝・股関節が伸展位になるよう保持した上で足部をアタッチメントに固定した。そして、同肢位における足関節最大背屈角度から底屈方向へ  $40^\circ$  を可動範囲とした。なお、足関節最大背屈角度は各ストレッチを開始する前に毎回測定した。この  $40^\circ$  の可動範囲で足関節の底背屈運動を角速度  $20^\circ/\text{sec}$  で行い、腓腹筋を4秒に1回のサイクルで間歇的に伸張した (図2)。なお、間歇

的伸張刺激中は常にラットの状態を監視し、腓腹筋が伸張されていることを確認しながら実施した。

間歇的伸張刺激の実施時間は1日30分とし、ギプス固定を除去した直後から週6回の頻度で実施した。また、固定+介入群のラットは間歇的伸張刺激を実施する時間以外は通常飼育とした。一方、固定群はギプス固定を除去した後は通常飼育とした。さらに、固定群にも同期間、同頻度でペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg) の腹腔内投与による麻酔を行い、足関節背屈角度を測定し、間歇的伸張刺激以外の飼育条件は同一とした。

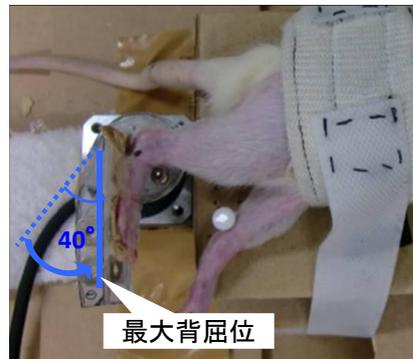


図2. 他動運動装置による間歇的伸張刺激

### 4) 足関節背屈可動域の測定

足関節背屈可動域の測定は、ギプス固定前 (BL1, BL2)、固定除去直後 (0日目)、固定終了後1、3、5、7、10、14日目に行い、関節可動域制限の改善状況を比較した。測定はペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg) の腹腔内投与によって麻酔したラットを側臥位にし、徒手にて股・膝関節を  $90^\circ$  屈曲位に固定して行った。

### 5) 行動学的評価

疼痛の行動学的評価として、機械的刺激に対する逃避反応の変化を検討した。逃避反応の測定は、ギプス固定前 (BL1, BL2)、固定除去直後 (0日目)、固定終了後1、3、5、7、10、14日目に行った。ギプス固定除去直後の

測定は、再荷重の影響を除くためにラットの足部が接地する前に行った。

#### 5-1) 腓腹筋に対する逃避反応閾値測定

Randall-Selitto 装置 (Ugo Basile, Italy) を用いて腓腹筋における逃避反応閾値を測定した。ラットを側臥位にした状態で、先端径 2.6 mm のプローブを皮膚を介して右腓腹筋外側の筋腹に当てた。そして、一定の速度 (約 45 g/sec) で重さを漸増させていき、逃避反応が出現した時点で目盛りが示した値を記録した。

#### 5-2) 足底に対する逃避反応回数測定

von Frey hair を用いて足底の逃避反応回数を測定した。台の上でラットを腹臥位にし、両下肢を地面に触れない状態で先端径 0.5 mm のフィラメントを足底に当て、一定の重さを加えて逃避反応が出現した回数を記録した

#### 6) 病理組織学的評価

実験期間終了後、ペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg) の腹腔内投与によってラットを麻酔し、右側腓腹筋外側を摘出した。摘出した腓腹筋外側頭はその中央部で2分割し、トラガントゴムに包埋した後、液体窒素で冷却したイソペンタン液内で急速凍結した。凍結した筋試料は、Cryostat (CM1510-11, Leica, Japan) を用いて 7・m 厚の横断切片を作製した。その横断切片を病理組織学的観察のために Hematoxylin-Eosin (以下、HE) 染色に供し、光学顕微鏡 (OLMPUS 社) にて壊死線維数を計測した。なお、本実験においては単核細胞が筋細胞内に 2 つ以上浸潤しているものを壊死線維とした。

次に各群の一横断面積あたりの全筋線維数を求めた。始めに HE 染色像を 40 倍の拡大像で蛍光顕微鏡 (BIOREVO, BZ-9000, KEYENCE, Japan) に取り込んだ後、画像処理ソフトウェア (Image J-Win, LISIT) を用いて一横断切片あたりの面積を計測した。その後 HE 染

色像を 400 倍の拡大像で蛍光顕微鏡に取り込み、その一視野に含まれる筋線維数と視野の面積を、Image J を用いて計測した。そして、一視野に含まれる筋線維数を一横断切片あたりに含まれる筋線維数に換算し、全筋線維数とした。これにより全筋線維に対する壊死線維の割合を算出した。

#### 7) 分子生物学的評価

##### 7-1) 試料採取

ギプス固定 2 週間後のラット (実験群) と対照群を用い、第 4 ~ 6 腰髄の後根神経節および脊髄後角を標本とし、痛みに関連する分子生物学的評価を行なった。各ラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) を投与して麻酔を行った後、標本を採取した。そして、ただちに標本を液体窒素にて凍結し、-80℃にて保存した。なお、対照群と実験群の検体数は、後根神経節においては各 7 検体、脊髄後角においては各 6 検体を供した。

##### 7-2) RNA 抽出および Real-time PCR 法

採取した組織から Trizol (Invitrogen, USA) を用いて全 RNA を抽出した。抽出した全 RNA を鋳型に逆転写反応を行い、相補的 DNA を合成した。その後、Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) を用いて Real-time PCR 法を実施した。実施プロトコルとしては、相補的 DNA を 95 °C で 20 秒インキュベートした後、(1) 95 °C で 1 秒、(2) 60 °C で 20 秒加熱するという一連のサイクルを 40 サイクル行った。検出には TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems, USA) を用いた。

#### 4. 研究成果

##### 1) 足関節背屈可動域

固定群および固定+介入群の足関節背屈可動域は対照群と比較して固定除去直後 (0 日目) に有意に低値を示した。その後、固定

+介入群は固定群と比較して固定終了後5日目以降に有意に高値を示した。

2) ギプス固定を用いたラット後肢の不動化による疼痛の発生について (図3)

固定群および固定+介入群の逃避反応閾値は対照群と比較して固定除去直後(0日目)に有意に低値を示した。その後、固定+介入群では固定群と比較して固定終了後1日目以降に有意に高値を示したが、10日目には固定前(BL2)と比較して有意な差は認められなかった。一方、固定群では固定終了後14日目においても固定前と比べて逃避反応閾値が低値を示していた。

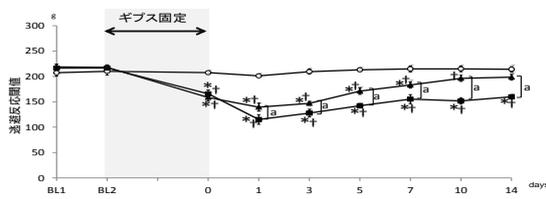


図3 腓腹筋の逃避反応閾値

3) 足底における逃避反応回数 (図4)

2gの刺激強度では、全ての群において固定前では逃避反応が生じなかったが、固定除去直後では固定群の逃避反応回数は増加する傾向を示し、固定終了後5日目において固定前と比較して有意に高値を示した。一方、固定+介入群の逃避反応回数は固定終了後1日目まで増加する傾向が、固定終了後3日目以降は減少する傾向を示した。

7gの刺激強度では、固定群の逃避反応回数は固定終了後に増加する傾向を示し、固定終了後1日目以降において固定前と比較して有意に高値を示した。一方、固定+介入群の逃避反応回数は、固定除去直後に増加する傾向を示したが、固定群と比較して固定終了後5日目以降において有意に低値を示した。

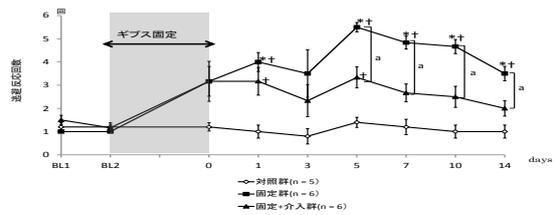


図4 足底の逃避反応回数 (7g)

4) 病理組織学的検討 (図5)

固定群の腓腹筋壊死線維数は、対照群と比較して壊死線維の割合が有意に高値を示した。一方、固定+介入群の壊死線維の割合は固定群と比較して有意に低値を示し、対照群との間に有意な差は認められなかった。

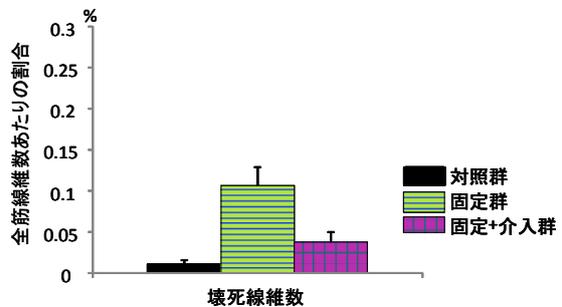


図5 腓腹筋の腓腹筋壊死線維数

5) 分子生物学的評価について

5-1) 後根神経節における遺伝子発現

神経ペプチドである CGRP, BDNF, GDNF, および、イオンチャネルである TRPV1, P2X<sub>3</sub>, ASIC3 受容体の mRNA 発現量は、実験群と対照群の間に有意な差が認められなかった。

5-2) 脊髄後角における遺伝子発現 (図6)

BDNF mRNA 発現量は、実験群が対照群と比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に高値を示したが、GDNF, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , P2X<sub>4</sub> 受容体の mRNA 発現量は群間に有意な差が認められなかった。

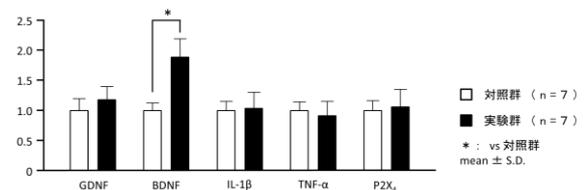


図6 脊髄後角における遺伝子発現

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ①鈴木重行：慢性疼痛症候群と理学療法. 理学療法, 28: 776-781, 2011 (査読なし)
- ②下和広, 鈴木重行, 牛田享宏：熱流速、総熱量測定による痛覚評価の検討. PAIN RESEARCH, 27: 17-26, 2012(査読有り)
- ③岩田全広, 鈴木重行, 他：背部痛の理学療法 - 評価と治療 -. 理学療法学, 38: 631-632, 2011 (査読なし)

[学会発表] (計8件)

- ①井上貴行, 鈴木重行, 他5名：ギプス固定モデルラットの腓腹筋における筋圧痛閾値の変化の検討. 第46回日本理学療法学会, 平成23年5月(宮崎)
- ②林和寛, 鈴木重行, 他3名：酸性食塩水投与によって作製される痛みモデル動物に対する運動介入の影響. 第46回日本理学療法学会, 平成23年5月(宮崎)
- ③渡辺裕之, 鈴木重行, 他3名：骨格筋経皮的電気刺激がラットのインスリン感受性に及ぼす影響. 第46回日本理学療法学会, 平成23年5月(宮崎)
- ④下和弘, 鈴木重行：熱流速および総熱量を指標とした冷覚および痛覚の定量的感覚検査の試み. 第46回日本理学療法学会, 平成23年5月(宮崎)
- ⑤Banno Y, Suzuki S, et al: Relationship between gait and delayed onset muscle soreness following eccentric contraction of triceps surae muscle. 16<sup>th</sup> World Congress for Physical Therapy. 2011.6 (Amsterdam)
- ⑥Watanabe H, Suzuki S, et al: Effect of transcutaneous electrical muscle stimulation on glucose tolerance and

insulin sensitivity in rats. 16<sup>th</sup> World Congress for Physical Therapy. 2011.6 (Amsterdam)

- ⑦下和弘, 鈴木重行, 他3名：熱流速、総熱量測定による痛覚評価の検討. 第33回日本疼痛学会, 平成23年7月(松山)
- ⑧岩田全広, 鈴木重行, 他3名：熱刺激によるデキサメタゾン誘導性筋萎縮の進行抑制効果と heat shock protein 27 の発現状況. 第66回日本体力医学会, 平成23年9月(下関)

[図書] (計1件)

鈴木重行, 坂野裕洋, 他：理学療法診療ガイドライン第1版(2011). (社)日本理学療法士協会, 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木重行 (名古屋大学医学系研究科・教授)  
研究者番号：60179215

### (2) 研究分担者

坂野裕洋 (日本福祉大学・健康科学部・准教授)  
研究者番号：00351205

### (3) 連携研究者

岩田全広 (日本福祉大学・健康科学部・准教授)  
研究者番号：60448264