

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：33912

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350638

研究課題名(和文) 関節不動化によって生じる筋性疼痛の発生メカニズムと理学療法効果の解析

研究課題名(英文) Study on the mechanism for inactivity induced muscular pain and effects of physical therapy

研究代表者

肥田 朋子 (Koeda, Tomoko)

名古屋学院大学・リハビリテーション学部・教授

研究者番号：20223050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：長期臥床などの不活動状態は骨格筋に痛みを誘発することが報告されている。われわれは実験的にラット両後肢を4週間ギプス固定することで不活動状態を作り出した不活動モデルで皮膚ならびに筋機械痛覚閾値低下を行動学的に確認した。またこの痛覚過敏の発生メカニズムとともにホットパック、トレッドミル走、マッサージの効果について解析した。その結果、神経成長因子(NGF)が筋痛覚過敏に大きく関与すること、ホットパックやマッサージなどの理学療法は筋痛覚過敏をある程度抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Inactivity such as bed rest and casting is reported to induce musculoskeletal pain. We made a physically inactive model in rats by putting both hind limbs in cast in full plantar flexed position for 4 weeks, and measured change in cutaneous and muscular nociceptive sensitivity. Furthermore, we examined whether nerve growth factor contributes to the change in mechanical withdrawal threshold and whether a hot pack, treadmill running or massage can reverse the change. After 4 weeks cast immobilization, the muscular mechanical withdrawal threshold significantly decreased (mechanical hyperalgesia), and cutaneous pain sensitivity increased. NGF content of the gastrocnemius muscle significantly increased in the physically inactive model. Both mechanical hyperalgesia and upregulation of muscle NGF were reversed by application of a hot pack. Massage also showed a similar trend.

研究分野：理学療法学

キーワード：不活動 機械痛覚閾値 神経成長因子 ホットパック トレッドミル走 マッサージ

## 1. 研究開始当初の背景

長期臥床やギプス固定あるいは事務作業のような長時間の姿勢保持による不活動状態は、動作時痛や腰痛など種々の痛み発生に影響を与える。われわれは実験的にラット両後肢をギプスで関節を固定することで不活動状態を作り出した不活動モデルラットを作製し、痛み行動について調べ、皮膚性ならびに筋性に疼痛が生じることを明らかにしてきている。特に臨床においては動作時に痛みが生じることが多いことから、筋性疼痛に着目している。この筋性疼痛の発生メカニズムに関しては不明な点が多く、それらを解明することは疼痛発生の予防や改善の方策を検討するうえで重要である。また、不活動により生じる疼痛は運動や温熱療法などの理学療法により改善することが期待され、その効果ならびにメカニズムについても解明していくことが重要である。われわれはこれまでに運動を中心に効果を探ってきており、不活動に陥る前の運動や、不活動時においてもある程度運動することが疼痛を緩和することを確認してきた。筋性疼痛の発生メカニズムの解析では、サブスタンスPやカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)の影響を探ってきたものの、発生メカニズムの解明には至っていない。そのためCGRPについて継続的に検討するだけでなく他の疼痛因子についても検討する必要がある。特に遅発性筋痛に神経成長因子(nerve growth factor; NGF)の関与が示されており、本モデルにおいても新たな疼痛因子としてNGFに着目した。またNGFの産生には炎症性サイトカインの影響も考えられるため、これらについても検討することとした。

## 2. 研究の目的

本研究課題の目的は、関節を不動化した不活動モデルにおける筋性疼痛の発生メカニズムの解明ならびに理学療法効果の解析であった。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

対象はWistar系雄性ラットを用い、両後肢にギプスを巻き関節を不動化した不活動群と何も制限しない健常群に分け、不活動群にはホットパック、トレッドミル走、マッサージを施す群を設けた。不活動群は両膝関節伸展位、足関節底屈位にギプスを巻き、理学療法と疼痛行動評価時を除き4週間固定位を保持した。飼育室の照明は12時間ごとに明暗をコントロールし、室温は一定条件下(24±1)給餌・給水は自由とした。

### (2) 皮膚性ならびに筋性疼痛行動評価

#### 皮膚性疼痛行動評価

後肢のみを出した腹臥位でラットをつりさげ、ラットの足底部にvon Frey Filament(以下、vFF)を用いて機械刺激を与え逃避

反応が生じる刺激強度閾値を調べた。測定は週5回、不活動開始前から不活動4週目まで継続して行い、各週の代表値を算出した。

#### 筋性疼痛行動評価

筋機械痛覚閾値は圧刺激鎮痛効果測定装置(Ugo-Basile)を用いて測定した。ラット下腿内側面の腓腹筋筋腹を加圧し逃避反応を示した時の刺激量を閾値とした。測定日などは皮膚性疼痛行動評価と同様とした。

### (3) NGFの影響について

筋性疼痛へのNGFの影響を探るため、不活動4週目に筋機械痛覚閾値が低下していることを確認した後、一側の腓腹筋に抗NGF抗体を、対側にはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を対側の腓腹筋に投与し、投与3時間後に筋機械痛覚閾値を再度測定した。

### (4) 神経ならびに筋の組織学的解析

不活動4週経過後、ペントバルビタールナトリウム深麻酔下にて腓腹筋、ヒラメ筋を採取した。その後、灌流固定を行い、第4~6腰髄の後根神経節(DRG)を取り出し、ブロックを作製した。なお、一部の実験においては不活動開始前に腓腹筋に4% Fluoro-gold(Fluorochrome)を注入し、腓腹筋由来のDRG細胞を標識した。

### (5) 筋の生化学的検討

取り出した腓腹筋、ヒラメ筋は、ホモジナイズしてタンパク質を抽出し、目的とするタンパク質量を測定した。

### (6) その他の疼痛関連因子の影響について

#### 筋における疼痛関連因子の検索

予備的な実験として不活動2、4週目のラット(各n=2)の腓腹筋を用い、ELISA法にてインターロイキン(IL)や腫瘍壊死因子(TNF)などの炎症性サイトカインのタンパク質発現について検索した。同様に不活動4週目の腓腹筋とヒラメ筋を用い、western blotting法にてHeat shock protein 70(HSP70)のタンパク質量を測定した。さらに不活動1、2週目のヒラメ筋と腓腹筋で抗酸化物質であるカタラーゼと活性酸素分解酵素であるsuperoxide dismutase(SOD)のタンパク質量をWestern Blotting法で測定した。

#### 血中フリーラジカルの測定

予備的な実験として不活動2、4週目に健常ラット(各n=3)とともに採血を行い、フリーラジカル定性測定装置(Luoxis社製)を用いてフリーラジカルを測定した。

### (7) 理学療法効果の検討について

#### 温熱療法の検討

温熱療法の効果を検証するため、不活動開始時から50度の温水で加温したホットパックをラットの両後肢に20分施すhotpack群(n=10)ならびに加温していないホットパ

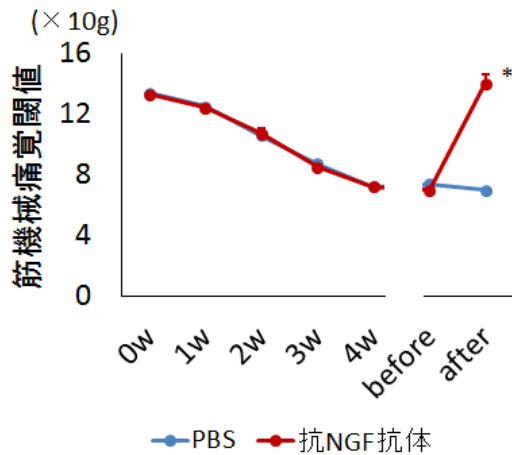


図1 抗NGF抗体投与による筋機械痛覚閾値の変化

ックをラットの両後肢に施すホットパック sham群(n=8)何も施さない不活動群(n=10)健常群(n=10)を作製し、不活動前から不活動4週目までの疼痛行動を評価した。不活動4週間経過後に採取した腓腹筋、ヒラメ筋ならびに長指伸筋でNGFタンパク質量を測定した。また灌流固定後に取り出したDRGは抗CGRP抗体を用いて免疫染色し、陽性細胞割合を不活動群とhotpack群で比較した。

#### 運動療法の検討

運動療法の効果を検証するため、不活動状態開始時から12 m/minのトレッドミル走(室町機械)を20分施す運動群を不活動群、健常群とともに作製し(各n=8)不活動前から不活動状態4週間の疼痛行動を評価した。不活動状態4週間経過後に採取した腓腹筋およびヒラメ筋の一部はELISA法にてNGFのタンパク質量を測定した。残りの筋はヘマトキシリン-エオジン染色を施し、筋横断面積を測定するとともに再生線維や壊死線維の有無を確認した。DRGは抗CGRP抗体、抗ASIC3抗体、抗TRPV1抗体を用いて免疫染色し、各陽性細胞割合を不活動群とトレッドミル群で比較した。また灌流固定後にDRGを取り出し、CGRP陽性細胞を解析した。

#### マッサージの検討

マッサージの効果を検証するため、不活動状態開始時から毎日両下腿を20分間マッサージする群(毎日マッサージ群、n=3)、一日おきに両下腿をマッサージする群(一日おきマッサージ群、n=3)、マッサージせず抱くだけの不活動群(不活動群、n=3)を作製し、不活動前から不活動4週目までの疼痛行動を評価した。その後抗NGF抗体を用いて腓腹筋とDRGにおけるNGFの免疫染色を行い、陽性細胞を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 不活動による疼痛発生メカニズムの解明

##### 疼痛行動評価による解析

腓腹筋筋腹に抗NGF抗体を投与した側の筋機械痛覚閾値は、投与前のそれと比較して有

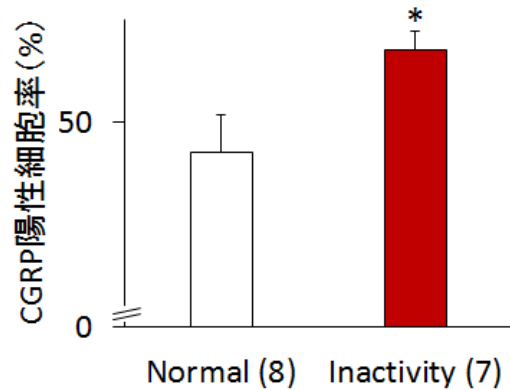


図2 DRGにおけるCGRP陽性細胞率

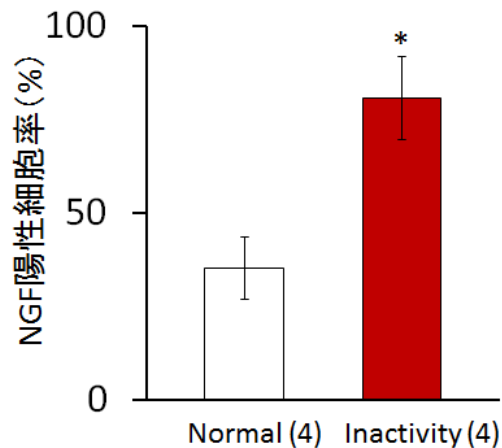


図3 DRGにおけるNGF陽性細胞率

意差を認め、不活動開始前と同様の閾値まで回復した(図1)。対側のPBS投与は筋機械痛覚閾値に影響を与えなかった。

#### DRGにおける免疫組織学的解析

CGRP陽性細胞の全細胞数に対する割合は不活動群で有意に高値を示した(図2、 $p < 0.05$ , t-test)。一方ASIC3やTRPV1のそれらは有意差を認めなかった。Fluorogoldで標識された腓腹筋由来のDRG細胞におけるNGF陽性細胞の割合は、不活動群で有意に高値を示した(図3、 $p < 0.05$ , t-test)。

#### その他の因子の解析

不活動2週目の腓腹筋でIL-10、IL-13、TNFの増加が、不活動4週目のラットでIL-13の増加が一部で確認された。HSP70は、サンプル採取方法に問題があり、一貫したデータを得ることができなかった。ヒラメ筋におけるカタラーゼの割合は、健常群と比較して不活動群で増加傾向であったが有意差を認めず、その他にも影響はなかった。

血中のフリーラジカルについて、不活動2週目における酸化還元電位が健常群より高い傾向であった。

#### (2) 理学療法効果

##### (2)-1 温熱療法

##### 行動学的評価

不活動群ならびにホットパックsham群における筋機械痛覚閾値は、1週目以降すべて

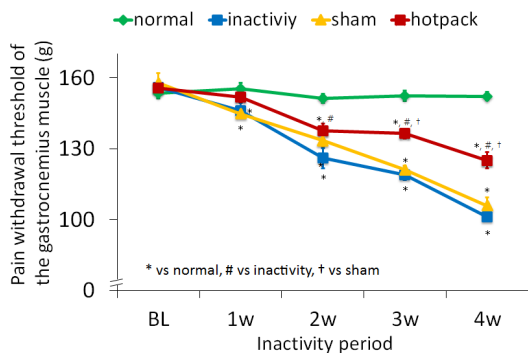


図 4 ホットパックによる筋機械痛覚閾値の変化

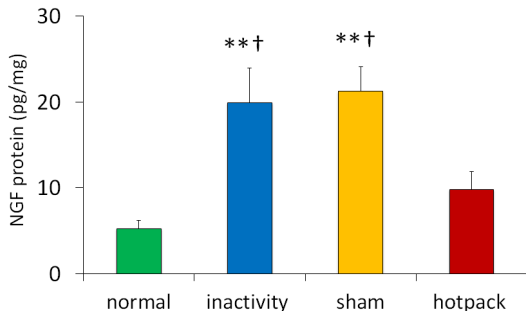


図 5 腓腹筋における NGF タンパク量

の期間で健常群と比較し有意差を認めた (図 4,  $p < 0.05$ , two way repeated measures ANOVA)。一方、ホットパック群は 2 週目以降健常群と有意差を認めたが、不活動群とは 2 週目以降、ホットパック sham 群とも 3 週目以降に有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。

#### 筋の生化学的解析

ELISA 法により定量した腓腹筋における NGF タンパク質量は、健常群に比べ不活動群とホットパック sham 群で有意に高値を示した (図 5,  $p < 0.01$ , ANOVA)。一方、ホットパック群は健常群とは有意差を認めず、不活動群やホットパック sham 群と有意差を認めた ( $p < 0.05$ , ANOVA)。

#### DRG における組織学的解析

DRG における総細胞数に対する CGRP 陽性細胞の割合は、不活動群に比べホットパック群で有意に低値だった ( $p < 0.05$ , t-test)。

#### (2)-2 運動療法

##### 行動学的評価

不活動開始前の皮膚機械痛覚閾値を基準とした不活動 4 週目における不活動群の皮膚痛覚閾値の変化の割合は、健常群やトレッドミル群と比較して有意に低値を示した ( $p < 0.05$ , ANOVA)。しかし、トレッドミル群のそれも健常群と有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。不活動開始前の筋機械痛覚閾値を基準とした不活動 4 週目における筋機械痛覚閾値の変化の割合は、健常群と比較して不活動群とトレッドミル群に有意差を認め、これら 2 群間には有意差を認めなかった。

##### 筋における生化学的解析

腓腹筋における NGF タンパク量は、個体によるばらつきが大きく、有意差は認められな

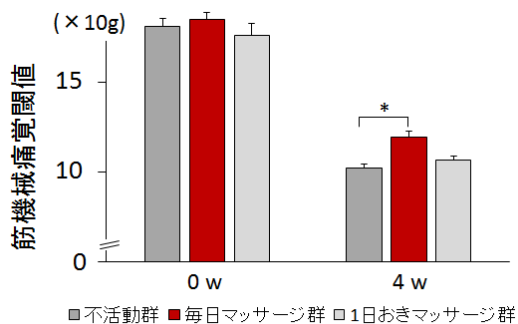


図 6 マッサージによる筋機械痛覚閾値の変化

かった。

#### DRG における組織学的解析

CGRP、ASIC3 および TRPV1 について不活動群とトレッドミル群間に有意差は認められなかった。

#### (2)-3 マッサージ

##### 行動学的評価

不活動前の皮膚痛覚閾値は不活動群、毎日マッサージ群、一日おきマッサージ群間に有意差を認めなかったが、不活動 4 週目には不活動群に比べマッサージを施した 2 群は有意に高値を示し、痛覚閾値の低下を抑制した ( $p < 0.05$ , ANOVA)。また不活動前の筋痛覚閾値は不活動群、毎日マッサージ群、一日おきマッサージ群間に有意差を認めなかった。不活動 4 週目の毎日マッサージ群の筋機械痛覚閾値は、不活動群より有意に高値を示したが一日おきマッサージ群には影響がなかった (図 6,  $p < 0.05$ , ANOVA)。

#### 筋および DRG における組織学的解析

腓腹筋ならびに DRG における NGF 陽性細胞割合は不活動群に比べ両マッサージ群で減少している傾向であった。

#### (3)まとめ

不活動モデルラットを作製し、4 週間における筋ならびに DRG における疼痛関連因子の影響を探った。また、不活動期間にホットパック、中等度負荷のトレッドミル走、マッサージなどの理学療法を実施し、痛覚閾値低下に対する理学療法の影響を確認し不活動による疼痛発生のメカニズムを解析した。その結果、TRPV1 や ASIC の機械痛覚閾値低下への関与は否定的で、NGF の関与は確実となった。理学療法としてホットパック、トレッドミル走ならびにマッサージを選択し実施したところ、ホットパックは筋の機械痛覚閾値の低下を抑制し、そのメカニズムに NGF の産生抑制が関与している可能性を示した。

#### 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 16 件)

1. Teruaki Nasu, Shiori Murase, Yoshiko Uchimura and Kazue Mizumura: Intramuscularly injected Neurotrophin reduced muscular mechanical hyperalgesia induced by repeated cold stress in rats. Behavioral Pharmacology, Accepted on March 29, 2017、査読あり

2. Koei HAYASHI, Kimiaki KATANOSAKA, Masahiro ABE, Akihiro YAMANAKA, Kazunori NOSAKA, Kazue MIZUMURA, Toru TAGUCHI. Muscular mechanical hyperalgesia after lengthening contractions in rats depends on stretch velocity and range of motion. European Journal of Pain 21: 125-139, 2017、査読あり

3. Yuta Itoh, Taro Murakami, Nobuhide Agata, 他 7 名: Training at non-damaging intensities facilitates recovery from muscle atrophy. Muscle and Nerve. 55(2): 243-253, 2017、査読あり DOI: 10.1002/mus.25218

4. 松沢匠、飯田圭紀、谷口誠基、松原早希、川原有紀子、肥田朋子: 不活動に伴う疼痛発生に対する自由運動の効果。名古屋学院大学論集(医学・健康科学・スポーツ科学篇)5(1): 15-22, 2016、査読あり、DOI: 10.15012/00000780

5. 平賀慎一郎、肥田朋子: 疼痛の病態生理学の理解のポイント。理学療法 33(5): 401-408, 2016、査読なし

6. 肥田朋子、沖向雄也、榊原拓哉、堀田昌志、野村達也、中田智章、井筒孝憲、田崎洋光、平賀慎一郎: 関節不動化による不活動モデルに開ける疼痛発生ならびに筋萎縮に対するトレッドミル走の効果。名古屋学院大学論集(医学・健康科学・スポーツ科学篇)4(2): 1-8, 2016、査読あり、DOI: 10.15012/00000670

7. Teru Matsuda, Asako Kubo, Toru Taguchi, and Kazue Mizumura: ATP decreases

mechanical sensitivity of muscle thin-fiber afferents in rats. Neuroscience Research 97: 36-44, 2015、査読あり DOI: 10.1016/j.neures.2015.04.001

8. 中村浩輔、酒井成輝、水野奈緒、肥田朋子: 不動化に陥る前の運動が疼痛発生に及ぼす影響 - ラットを用いたトレッドミル走での検討 - .名古屋学院大学論集(医学・健康科学・スポーツ科学篇)3(2): 9-16, 2015 査読あり、DOI: 10.15012/00000562

9. Yuta Itoh, Kimihide Hayakawa, Tomohiro Mori, Nobuhide Agata, Masumi Inoue-Miyazu, Taro Murakami, Masahiro Sokabe, Keisuke Kawakami.: Stand-up exercise training facilitates muscle recovery from disuse atrophy by stimulating myogenic satellite cell proliferation in mice. Physiological Report Nov 3; 2(11). pii: e12185, 2014

[学会発表](計 21件)

1. Saho Morishita, Kazuya Hokamura, Akira Yoshikawa, Nobuhide Agata, Kazuo Umemura, Yoshihiro Tsutsui, Tatsuro Kumada. Effect of different exercises on neurogenesis and motor recovery in rats with motor cortex infraction. 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (浜松アクロシティコングレンスセンター、静岡県、浜松市) 2017.3.28-30

2. Tomoko Koeda, Tatsuki Nakagawa, Shinichiro Hiraga, Ayako Fukazawa, Aya Watanabe, Ryo Kitagawa, Norio Ozaki, Kazue Mizumura. Effects of hotpack on inactivity-induced hyperalgesia in rats. 16th World Congress on Pain (パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市) 2016.9.26-30.

3. Tatsuki Nakagawa, Tomoko Koeda, Shinichiro Hiraga, Kiyomi Hori, Noriyuki Ozaki. TRPV4 with NGF and PAR2 contributes to cutaneous tactile allodynia and

muscular mechanical hyperalgesia in a new rat model of physical inactivity. 16th World Congress on Pain (パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市) 2016.9.26-30.

4. Shinichiro Hiraga, Tomoko Koeda, Kiyomi Hori, Hiroki Nakata, Tatsuki Nakagawa, Shoichiro Iseki, Noriyuki Ozaki. NGF increased in skeletal muscle has a role in muscular hyperalgesia in inactivity model. 16th World Congress on Pain (パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市) 2016.9.26-30.

5. Kazue Mizumura, Shiori Murase, Chiaki Kihara, Teruaki Nasu. Interaction of nerve growth factor (NGF) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in inducing muscular mechanical hyperalgesia in rats. 16th World Congress on Pain (パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市) 2016.9.26-30

〔図書〕(計 4 件)

1. 肥田 朋子: 高齢者理学療法学 第 6 章 10. 痛みに対する理学療法. 島田裕之総編集、医歯薬出版株式会社、2017、613(461-468)

2. 水村和枝、松田 輝: コメディカル専門基礎科目シリーズ生理学 第 4 章 感覚の生理. 桑名俊一、荒田晶子編著、理工図書、2016、400(65-99)

3. Kazue Mizumura and Shiori Murase. Chapter 4. Role of nerve growth factor in pain. In: H.-G. Schaible (ed.), Pain Control, Handbook of Experimental Pharmacology 227, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2015, 309(57-77), DOI: 10.1007/978-3-662-46450-2\_4

〔その他〕

ホームページ

<http://www.ngu-kenkyu-db.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

肥田 朋子 (KOEDA, Tomoko)

名古屋学院大学・リハビリテーション学部・教授

研究者番号: 20223050

### (2) 研究分担者

水村 和枝 (MIZUMURA, Kazue)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号: 00109349

縣 信秀 (AGATA, Nobuhide)  
常葉大学・保健医療学部・講師  
研究者番号: 00549313