

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25871216

研究課題名(和文) 深部痛覚に対するタッチの効果とその神経性機序

研究課題名(英文) Neural mechanisms for the effect of touch on deep tissue pain

研究代表者

渡邊 信博(Watanabe, Nobuhiro)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：00540311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円

研究成果の概要(和文)：麻酔動物の下腿に押圧刺激を与えると心拍数の変化が認められる。本研究課題では、骨格筋刺激で生じる心機能変化を指標に、麻酔動物で筋痛を評価する方法を確立することを目的とした。麻酔下ラットの心拍数、動脈圧および心臓交感神経活動を記録して実験を行った。下腿筋押圧刺激により生じる心拍数の変化(増加・減少)は、心臓交感神経を遮断することによりほぼ消失した。さらに心臓交感神経活動を記録すると、押圧刺激で生じる心拍数の変化は、神経活動の変化に同期して生じることが分かった。下腿筋に起炎物質を投与して炎症を誘発すると、押圧刺激により生じる心臓交感神経活動および心拍数の増加反応が増強することが示された。

研究成果の概要(英文)：Mechanical pressure stimulation applied to the calf alters heart rate in anesthetized animals. The aim of the present study was to establish an assessment method for muscle pain in anesthetized animals by using cardiac function changes in response to muscle stimulation. Heart rate, arterial pressure and cardiac sympathetic nerve activity were recorded during experiments. Heart rate changes (increase and decrease) in response to pressure stimulation of the calf muscles were almost abolished by blocking cardiac sympathetic nerve activity. Additionally, experiments that cardiac sympathetic nerve activity were recorded revealed that nerve activity changes occurred in parallel with heart rate changes. In the calf inflamed by inflammatory substance administration, pressure stimulation-induced increases in cardiac sympathetic nerve activity and heart rate exaggerated.

研究分野：自律神経生理学

キーワード：骨格筋 疼痛 心臓 交感神経 押圧刺激 炎症

1. 研究開始当初の背景

看護や介護、代替医療などの臨床現場において頻繁に用いられる医療技術の一つに、皮膚への軽微な機械刺激(タッチ)がある。タッチは簡便で、多くの人に用いることの出来る、比較的禁忌の少ない手技である。しかし、その有効性については、個人の経験や理論に依存しており、基礎研究による実証はほとんどされていないという問題点がある。

研究代表者らはこれまでに、タッチが生体に及ぼす効果とその神経性機序を麻酔動物で調べてきた(Hotta et al. 2010, Watanabe et al. 2011, Watanabe et al. 2015)。具体的には、皮膚の感覚情報を受容・伝導する神経を刺激することにより生じる心臓交感神経遠心性神経活動や循環機能の変化(反射性自律応答)を指標に、タッチの効果を検討した。タッチは、ヒトの指紋と類似の間隔で微小円錐を配置した、エラストマー製の柔らかいブラシを用いて行った。その結果、鈍痛を伝えられるとされている無髄C線維の刺激により惹起される自律応答は、タッチにより抑制されることを見出した(Hotta et al. 2010, Watanabe et al. 2011, Watanabe et al. 2015)。研究代表者らはさらに、タッチの効果の神経性機序として、モルヒネ様物質(オピオイド)の関与に着目した。オピオイドの作用を遮断する薬剤を全身投与することで、タッチの効果は著しく減弱あるいは消失した(Hotta et al. 2010, Watanabe et al. 2011)。さらに、自律応答に対するタッチの抑制効果は、脊髄の μ オピオイド受容体を遮断することにより消失することを見出した(Watanabe et al. 2015)。したがって、タッチは、内因性オピオイドを脊髄内で放出させ、 μ オピオイド受容体を介して、無髄C線維による侵害(痛み)情報の伝達を抑制し、自律応答を抑えられられる。

これまでの研究では、特に皮膚への侵害刺激で生じる自律応答を指標にして、タッチの効果とその作用機序を明らかにしてきた。しかし痛みは、皮膚ばかりでなく、骨格筋や骨などの深部組織も発生源となりうる。特に腰痛や肩こりなど、深部組織に由来する痛みを抱える人は非常に多い。そのため、深部痛覚に対するタッチの効果についても検証したいと考えた。

タッチや痛みなどの体性感覚刺激は、感覚や情動を惹起させることから、これまでの研究と同様に、麻酔動物を用いた実験が有用であると考えた。麻酔動物の骨格筋や骨への侵害刺激は、自律応答を生じさせると報告されている(Sato et al. 1997, Suzuki and Shimura 2010)一方、皮膚への侵害刺激で生じる自律応答と比して、骨格筋や骨への侵害刺激で生じる自律応答についての仕組みは明らかにされていない点が多い。そのため、タッチの効果を検証する以前に、深部組織への侵害刺激で生じる自律応答の機序を明らかにした上で、麻酔動物で深部痛覚を評価する方法を確立する必要があると思われる。

2. 研究の目的

本研究課題の全体の目的は、心拍数を指標にして、麻酔動物で骨格筋の痛みを評価する方法を確立することである。

これまでの研究では、麻酔動物の下腿筋に押圧刺激を加えると心拍数の変化が生じることが報告されている。しかし、心拍数変化に寄与する心臓自律神経は明らかにされていない。そこで本研究課題では第一に、麻酔ラットの下腿への押圧刺激で生じる心拍数変化に寄与する心臓自律神経を明らかにすることとした。

骨格筋を収縮または伸張させることで、心拍数が変わることが報告されている。すなわち、骨格筋への刺激がかならずしも侵害性でなくても循環機能に影響を及ぼしうる。また、骨格筋は通常痛みを起しにくい組織である。しかしながら、肉離れや筋挫傷の筋組織が損傷し、炎症が生じると軽度の刺激でも痛みを生じるようになる。そこで本研究課題では、下腿筋に実験的に炎症を誘発し、下腿への押圧刺激で生じる心拍数変化への炎症の影響についても調べることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題では、雄性 Wistar 系ラット(4-7ヶ月齢)を用いてイソフルラン麻酔下で実験を行った。4%イソフルランをラットに吸入させて初期麻酔した後、適宜麻酔濃度を調節し、十分に麻酔が効いた状態で手術・実験を行った。深麻酔下であることは、角膜反射および逃避反応が消失していることで判断した。

ラットの気管に挿管し、人工呼吸した。1回換気量および呼吸回数を調節し、終末呼気中の CO_2 濃度を約3%に維持した。ラットの直腸にサーミスタを挿入し、赤外線ランプと保温パッドによるフィードバック式体温調節装置を用いることで、深部温を37.0-37.5に維持した。

ラットの頸動脈にカテーテルを留置し、接続された圧トランスデューサーを介して動脈圧を連続測定した。得られた血压波形より瞬時心拍数を算出した(図1)。頸静脈に留置したカテーテルより補液や薬物を投与した。

心臓交感神経遠心性活動を記録する実験では、心臓交感神経の多放電活動を双極フック電極で電気生理的に記録した。具体的には、剖出した右側の下心臓交感神経をできる限り心臓に近い箇所切断し、切断中枢端を双極フック電極に載せた。迷走神経活動の混入を防ぐため、迷走神経を頸部で外科的に切断した。さらに、筋収縮によるノイズの混入を防ぐため、gallamine (20 mg/kg) を静脈内投与し、ラットを非動化した。

骨格筋への刺激として、ラットの下腿内側に押圧刺激を与えた。刺激は、接触面が広い(6 mm)の刺激棒を用い、 $10\text{N}/\text{cm}^2$ の強度で30秒間与えた(図1)。皮膚への刺激として、ラットの後肢足蹠にピンチ刺激を与えた。刺激は、鉗子の先端5mmでラットの趾間を

30 秒間つまんだ。

ラットの下腿筋に炎症を誘発するため、実験前日に 3% λ -カラギーナン溶液 (100 μ L) を一側下腿に注入した。対照として、溶媒である生理食塩水を対側下腿に 100 μ L 注入した。

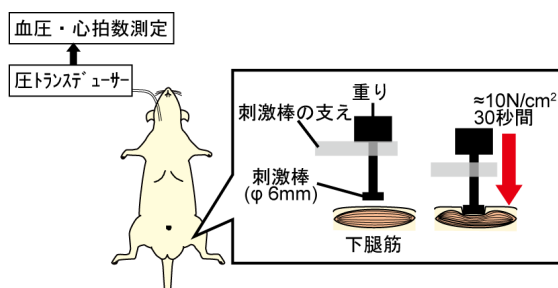


図 1 実験のセッティング

4. 研究成果

(1) 下腿押圧刺激による心拍数の変化

実験中のラットの安静時心拍数は、259 拍/分から 459 拍/分の範囲にあった。

心拍数が少なくとも 1 分間以上安定であることを確認した後、下腿に押圧刺激を 30 秒間与えたところ、心拍数が増加する例と減少する例とがあった。心拍数の変化は、刺激終了後 1 分以内に最大になる例が大部分であった。そこで、9 匹のラットから 22 例の反応を得た。約半数の例 (22 例中 9 例) で心拍数が増加し、約半数の例 (22 例中 12 例) で心拍数が減少した。心拍数の変化が認められなかったのは、1 例のみであった。

刺激前 1 分間の平均心拍数と心拍数の最大変化の差を計算したところ、押圧刺激による心拍数変化 (Δ HR) は、-56 拍/分から +10 拍/分の範囲にあることが分かった。さらに、刺激前の平均心拍数と Δ HR の関係を調べたところ、負の相関関係にあることが分かった (スピアマンの順位相関係数; $r = -0.65$, $p = 0.001$, 図 2A)。

下腿押圧刺激による心拍数の変化に対し、皮膚求心性情報の関与を調べる目的で、皮膚を剥離した下腿に押圧刺激を与えた。その結果、心拍数の増加・減少いずれも認められ、皮膚剥離の状態でも上述の刺激前の平均心拍数と Δ HR の関係は維持されていることが分かった。ゆえに、押圧刺激により生じる心拍数の変化は、主に下腿筋からの求心性情報により生じることが明らかになった。

(2) 自律神経遮断の影響

下腿押圧刺激により生じる心拍数の変化に対して寄与する心臓自律神経を明らかにする目的で、自律神経遮断の影響を調べた。

心臓支配の交感神経を遮断するために、頸部交感神経および星状神経節を両側外科的に切除した。その結果、心拍数は押圧刺激を与えてもほとんど変化せず (Δ HR の範囲: -9 拍/分から +3 拍/分, 図 2B)、自律神経無傷時

と比較して、有意に反応が小さいことが分かった (F 検定; $p < 0.0001$)。さらに、安静時心拍数の範囲 (317 拍/分から 360 拍/分) も有意に狭いことが分かった (F 検定; $p < 0.0001$)。

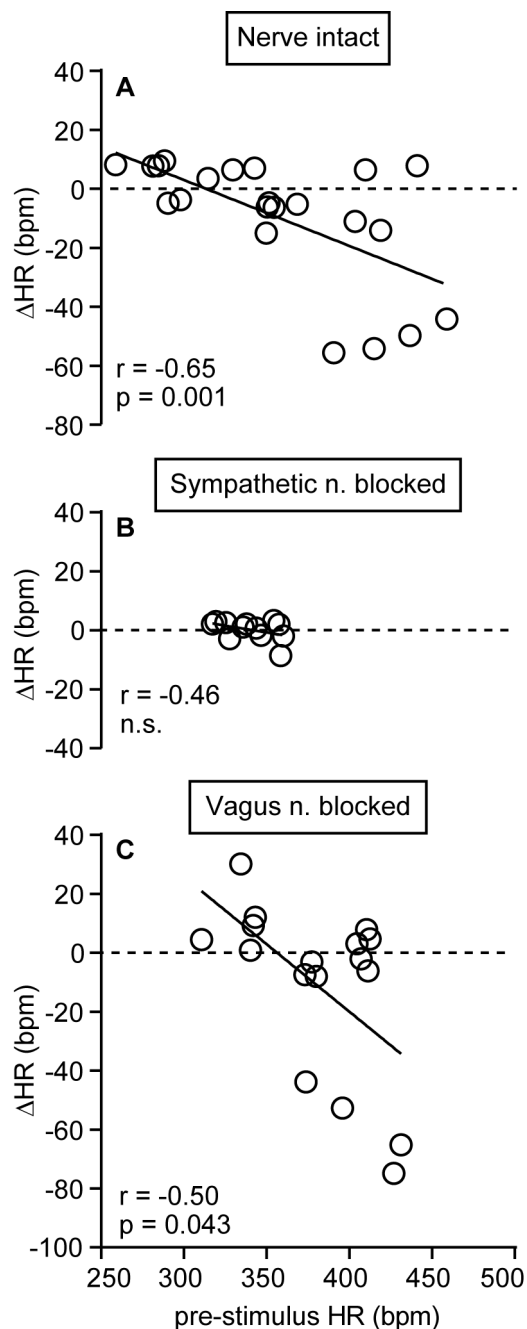


図 2 下腿押圧刺激により生じる心拍数の変化 (Δ HR) と刺激前の心拍数の関係および自律神経遮断の影響

迷走神経を遮断するために、頸部で神経を両側切断または血液脳関門不透過性のムスカリン性アセチルコリン受容体遮断薬 (atropine methyl nitrate, 2 mg/kg) を静脈内投与した。その結果、下腿押圧刺激により心拍数の増加・減少が認められ (Δ HR の範囲: -75 拍/分から +30 拍/分) 反応の大きさは自律神経無傷時と違いはなかった (F 検定; $p = 0.17$)。安静時心拍数の範囲 (311 拍/分から 431 拍/

分)は狭かったが、刺激前の平均心拍数と ΔHR との間に有意な負の相関関係が認められた(スピアマンの順位相関係数; $r = -0.50$, $p = 0.043$, 図 2C)。

ゆえに、下腿押圧刺激による心拍数の変化に、心臓交感神経が寄与することが示唆された。

(3) 下腿押圧刺激による心臓交感神経活動の変化

下腿押圧刺激で生じる心拍数の変化に対して心臓交感神経が寄与することを実証する目的で、心臓交感神経遠心性活動を記録した。

上述の心拍数変化の結果と同様に、下腿押圧刺激により心臓交感神経活動は増加または減少した。さらに実験中に記録した心拍数は、心臓交感神経活動と同様の変化を示すことが分かった。そこで押圧刺激により生じる、心臓交感神経活動の変化($\Delta CSNA$)と心拍数変化(ΔHR)の関係を解析したところ、有意な正の相関が認められた(スピアマンの順位相関係数; $r = 0.77$, $p = 0.0004$, 図 3)。ゆえに、下腿押圧刺激で生じる心拍数の変化に対して心臓交感神経が寄与することが明らかとなった。

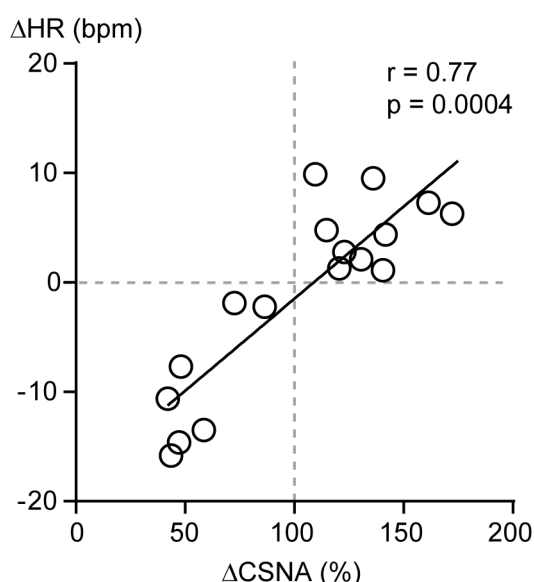


図 3 下腿押圧刺激により生じる心臓交感神経活動($\Delta CSNA$)と心拍数の変化(ΔHR)の関係

さらに、下腿刺激で生じる心臓交感神経活動および心拍数の変化の方向性(増加または減少)に影響を及ぼす要因を明らかにする目的で、刺激前の心臓交感神経活動レベルと $\Delta CSNA$ および ΔHR の関係を解析した。各ラットのデータをひとまとめにするため、刺激前の心臓交感神経活動を標準化した。その結果、標準化した刺激前の心臓交感神経活動レベルと $\Delta CSNA$ および ΔHR はそれぞれ負の相関があることが分かった(スピアマンの順位相関係数; $r = -0.62$, $p = 0.0066$, 図 4A; $r = -0.62$,

$p = 0.0062$, 図 4B)。よって、下腿刺激で生じる心臓交感神経活動および心拍数の増加および減少は、刺激前の心臓交感神経活動のトーンレベルに依存することが明らかとなった。

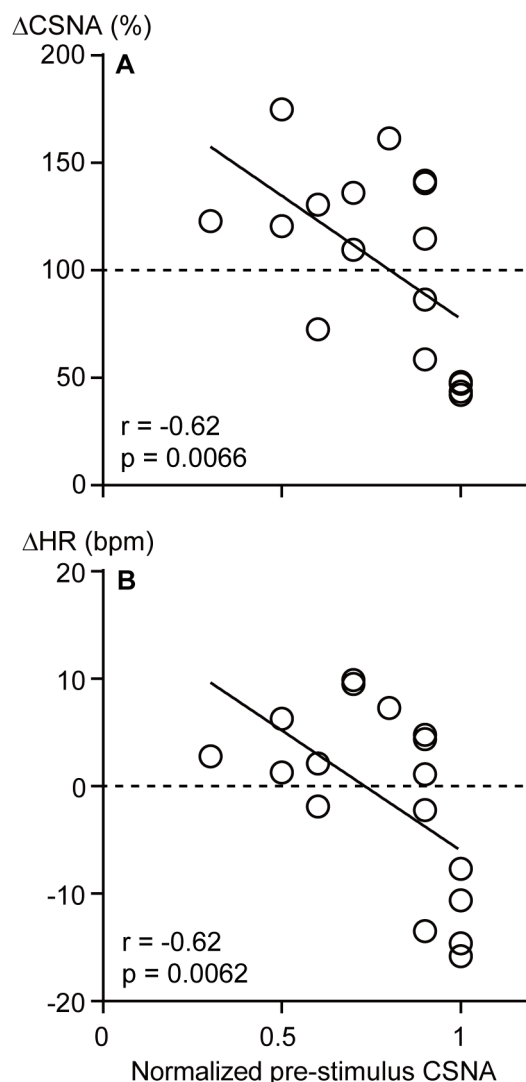


図 4 下腿押圧刺激により生じる心臓交感神経活動($\Delta CSNA$)および心拍数の変化(ΔHR)と刺激前の心臓交感神経活動の関係

(4) 下腿押圧刺激により生じる心臓交感神経活動変化に対する炎症の影響

下腿押圧刺激で生じる心臓交感神経活動および心拍数の変化に対し、炎症の影響を調べるために、実験前日にラットの下腿にカラギーナンまたは生理食塩水を投与した。

カラギーナン投与(炎症)側の下腿に押圧刺激を 30 秒間与えたところ、心臓交感神経活動・心拍数ともに増加または減少した。さらに、刺激前の心臓交感神経活動レベルと心臓交感神経活動の変化($\Delta CSNA$)および心拍数変化(ΔHR)の関係を解析したところ、いずれも負の相関が認められた(スピアマンの順位相関係数; $r = -0.67$, $p = 0.0016$; $r = -0.54$, $p = 0.016$)。

生理食塩水投与（非炎症）側の下腿への刺激でも、心臓交感神経活動・心拍数ともに増加または減少し、いずれも刺激前の心臓交感神経活動レベルと負の相関関係にあった（スピアマンの順位相関係数； $r = -0.56$, $p = 0.012$ ； $r = -0.56$, $p = 0.012$ ）。この結果は、カラギーナンを投与していない個体の結果と酷似していた。ゆえに、生理食塩水投与側刺激の反応は、カラギーナン非投与個体の反応と同等と考えられる。

押圧刺激による反応の大きさが炎症により変化するか調べる目的で、炎症側と非炎症側のデータを比較した。データを、刺激前の神経活動レベルが低い時と高い時とに、中央値で二分した。刺激前の神経活動レベルが低い時、炎症側の下腿への押圧刺激では、一貫して心臓交感神経活動が増加し、非炎症側下腿への刺激で生じる変化よりも大きかった（Mann-Whitney 検定； $p = 0.026$ ）。心拍数の変化についても同様の結果だった（Mann-Whitney 検定； $p = 0.027$ ）。一方、刺激前の神経活動レベルが高い時の押圧刺激による、心臓交感神経活動および心拍数の変化は、炎症・非炎症側の違いは認められなかった。

よって、下腿押圧刺激で生じる心臓交感神経活動および心拍数の増加反応は、炎症により増大すると考えられる。

（５）足趾ピンチ刺激による心拍数の変化

カラギーナンを投与していないラットの後肢足趾にピンチ刺激を 30 秒間与えた。6 匹のラットから 14 例の反応を得たところ、ほぼ全例（14 例中 13 例）で心拍数が増加した。残りの 1 例についても、ピンチ刺激中に心拍数が増加したが、刺激終了後に心拍数が顕著に減少した。

刺激前の平均心拍数と ΔHR の関係を調べたところ、下腿押圧刺激と同様に、負の相関関係にあることが分かった（スピアマンの順位相関係数； $r = -0.75$, $p = 0.0029$, 図 5）。

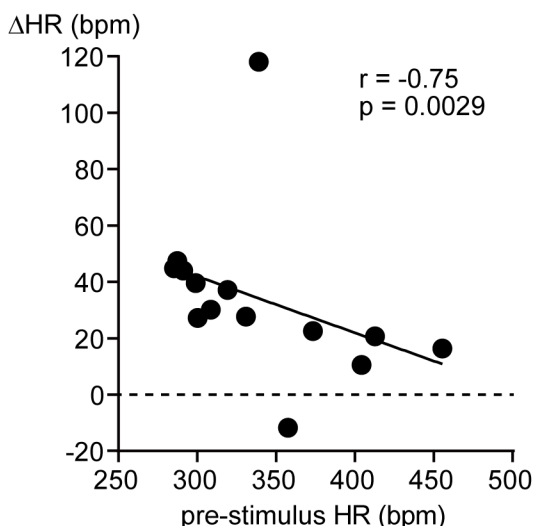


図 5 後肢足趾ピンチ圧刺激により生じる心拍数の変化（ ΔHR ）と刺激前の心拍数の関係

（６）成果のまとめ

以上の結果から、麻酔ラットの下腿押圧刺激で生じる心拍数の変化は、心臓交感神経活動により調節されること、心拍数変化の増加・減少は、刺激前の心臓交感神経活動レベルに依存すること、下腿筋に誘発した急性炎症は、心臓交感神経活動および心拍数の増加反応を増強することが明らかとなった（図 6）。

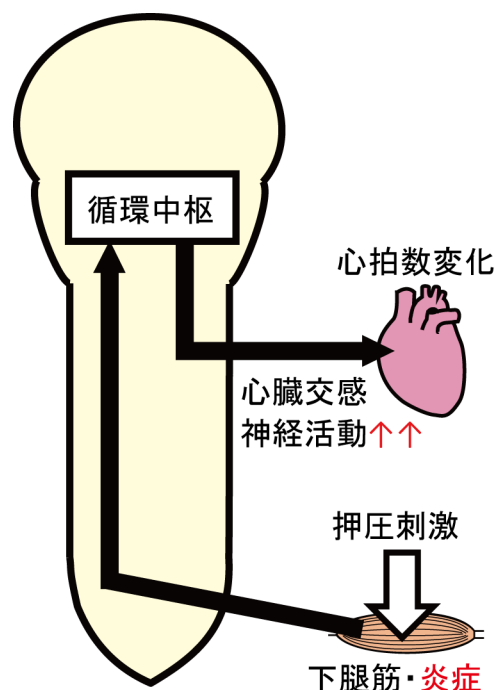


図 6 本研究課題の成果のまとめ

本研究課題において炎症の影響を検討した実験では、カラギーナン投与翌日に下腿に押圧刺激を与えたことより、心拍数変化に対して急性炎症の影響（Radhakrishnan et al. 2003）を明らかにした。今後、慢性炎症モデルや非炎症性の痛覚過敏モデルなど、より臨床像に近い実験モデルでも研究を進めていく必要があると思われる。

〔引用文献〕

1. Sato A, Sato Y, Schmid RF (1997) The impact of somatosensory input on autonomic functions. Rev Physiol Biochem Pharmacol 130, 1-328.
2. Radhakrishnan R, Moore SA, Sluka KA (2003) Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. Pain 104, 567-577.
3. Hotta H, Schmidt RF, Uchida S, Watanabe N (2010) Gentle mechanical skin stimulation inhibits the somatocardiac sympathetic C-reflex elicited by excitation of unmyelinated C-afferent fibers, Eur J Pain, 14(8): 806-813.
4. Suzuki A, Shimura M (2010) Changes in blood pressure induced by electrical stimulation of the femur in anesthetized rats. Auton Neurosci, 158(1-2): 39-43.

5. Watanabe N, Uchida S, Hotta H (2011) Age-related changes in the effect of gentle mechanical cutaneous stimulation on the somato-cardiac sympathetic C-reflex. J Physiol Sci, 61, 287-291.

6. Watanabe, N., Piché, M., and Hotta, H. (2015). Types of skin afferent fibers and spinal opioid receptors that contribute to touch-induced inhibition of heart rate changes evoked by noxious cutaneous heat stimulation. Mol Pain 11, 4.

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 1 件)

Watanabe N, Hotta H. Heart Rate Changes in Response to Mechanical Pressure Stimulation of Skeletal Muscles Are Mediated by Cardiac Sympathetic Nerve Activity. Front Neurosci, 10:614, 2017 [査読あり]

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 渡辺信博, 堀田晴美. 下腿筋に誘発した急性炎症は機械的圧刺激による心拍上昇反応を増強する. 第12回環境生理学プレコンgres, サラシティ浜松(静岡県・浜松市), 2017年3月27日

2. Watanabe, N., Hotta, H. Mechanical pressure stimulation of the hindlimb muscles induces sympathetically -regulated heart rate responses in anesthetized rats. 16th World Congress on Pain, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2016年9月26-30日

3. 渡辺信博, 堀田晴美. Heart rate response to skeletal muscle mechanical pressure stimulation are sympathetically regulated in rats. 第39回日本神経科学大会, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2016年7月20-22日

4. 渡辺信博, 堀田晴美 “筋への機械的圧刺激による心拍反応に対する心臓交感神経遠心性活動の関与” 第93回日本生理学会大会, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市), 2016年3月22-24日

5. 渡辺信博, 堀田晴美 “骨格筋圧刺激により誘発される心拍反応に対する心臓交感神経の関与” 第43回自律神経生理研究会, 日本光電株式会社本社研修センター, (東京都・新宿区), 2015年12月5日

6. 渡辺信博, 堀田晴美 “下腿筋への機械刺激による循環機能への影響” 第42回自律神経生理研究会, 日本光電株式会社本社研修センター, (東京都・新宿区, 2014年12月6日

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 信博 (WATANABE NOBUHIRO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ

ンター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号: 00540311