

〔原著〕

不活動に伴う疼痛発生に対する自由運動の効果

松 沢 匠¹, 飯 田 圭 紀², 谷 口 誠 基³
松 原 早 希⁴, 川 原 有 紀 子⁵, 肥 田 朋 子⁶

要 旨

不活動状態によって皮膚や筋の痛覚閾値が低下するが、それを改善する目的でトレッドミル走を用いた運動療法を実施したところ、疼痛を助長させる結果となった。そこで本研究では不活動によって生じる疼痛に対し、自由運動の効果について検討した。Wistar系雄性ラット6匹の両後肢をギプス固定し、4週間不活動状態にした。不活動期間中、通常飼育を行った不活動群と週5日、15分/日の頻度で自由運動をする自由運動群に振り分けた。不活動前から不活動期間中の足底皮膚と腓腹筋の痛覚閾値を週ごとに調べた。不活動終了後に後根神経節を取り出しカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) の発現を免疫組織化学的に検討した。その結果、自由運動群において筋痛覚閾値が有意に高値を示し、小型・中型の後根神経節細胞におけるCGRP陽性細胞率は有意に低値を示した ($p < 0.05$)。自由運動によって不活動による疼痛発生が部分的に抑制され、CGRPの関与が考えられた。

キーワード：不活動 自由運動 皮膚痛覚閾値 筋痛覚閾値 CGRP

-
- 1 豊田厚生病院 リハビリテーション技術科
 - 2 国立研究開発法人 国立長寿医療研究センター
機能回復診療部
 - 3 老人保健施設やすらぎ リハビリテーション科
 - 4 名古屋市総合リハビリテーションセンター附属
病院 第一リハビリテーション部理学療法科
 - 5 富山県リハビリテーション病院・こども支援セ
ンター リハビリテーション療法部 成人療法
課 理学療法科
 - 6 名古屋学院大学 リハビリテーション学部

Received 19 July, 2016

Revised 24 August, 2016

Accepted 29 August, 2016

Correspondence to: Tomoko Koeda

E-mail: tomokoed@ngu.ac.jp

はじめに

平成25年度の国民生活基礎調査によると65歳以上の高齢者では約47%が何かしらの自覚症状を抱えており、その中で腰痛や肩こり等、痛みに関連する症状が上位を占めている。入院患者の中には外傷や骨折などの急性疼痛を訴える患者以外に、長期臥床により不活動となることで身体のさまざまな部位に痛みを訴える慢性疼痛患者も多く存在する。

筆者らは、これまでに不活動に伴う皮膚痛覚過敏の発生や筋痛覚閾値の低下を報告してきた[6-8, 15]。それらによるとラット両後肢の不活動化と一側後肢の不活動化では、ともに活動量の低下が認められたが、特に両後肢の不活動化で活動量が低下し、皮膚アロディニアや皮膚痛覚過敏の発生も早かった[15]。また両後肢を不活動化した不活動モデルラットでは、不活動状態1週目以降、経過とともに、皮膚だけでなく筋においても痛覚閾値の低下が認められたが、このような不活動に伴う疼痛発生は、不活動状態に陥る前の活動性の影響を受けることが確認できた[8]。不活動状態では廃用性筋萎縮が生じ、ラットの後肢をギプス固定した後に再荷重を行うと筋線維損傷が引き起こされることが知られているため[12, 14]、不活動状態に陥ってからも活動性を維持させることが、疼痛発生の予防に効果的と考え、不活動期間中の初期からトレッドミル走を課し、疼痛発生を予防できないか検討した[6]。その結果皮膚痛覚閾値の低下を抑制することができないだけでなく、むしろ皮膚痛覚閾値の低下を助長し、筋では壊死線維の出現割合が増加する傾向がみられた。トレッドミル走の速度は、先の研究[2, 8]を参考にしたが、ラットにおける有酸素運動と無酸素運動の境界値に近い運動強度であり[11]、過

負荷であった可能性が考えられた。つまり、不活動状態を継続することで脆弱化した骨格筋に対して過度な運動が負荷されることによって筋線維が損傷し、変性・壊死を呈し、疼痛を助長した可能性が推察された。そこで今回はトレッドミル走のような強制運動ではなく、低強度で、疼痛自制内で行える自由運動を不活動期間中に行わせることで痛覚過敏が抑制できるか検討した。

また、不活動による疼痛発生と運動による疼痛抑制メカニズムの解析を目的として、先行研究では後根神経節細胞（以下DRG）におけるサブスタンスP（以下SP）の陽性細胞割合を指標に検討したが、不活動モデルでSPは増加傾向を示したのみで、統計学的な有意差は認められなかった[8]。そのため、別の因子で検討する必要があった。骨折させたラット後肢を固定した実験では、アロディニアが認められ、SPやカルシトニン遺伝子関連ペプチド（以下CGRP）を介した神経性炎症の関与が示されている[3]。またCGRPは、ラットの四肢を4週間固定した後のDRGで増加したという報告[9]や、足関節不活動化によって脊髄後角やDRGで増加したという報告がある[4]。そこで今回は、不活動期間終了後のDRGにおけるCGRP陽性細胞割合を疼痛抑制メカニズムの指標として検討した。

方法

〈実験動物〉

本研究の対象は8週齢のWistar系雄性ラット6匹で、両後肢にギプス固定を行い、4週間不活動状態にした。6匹は、不活動期間中に通常飼育のみを行った群（以下不活動群、3匹左右6肢；n=6）と、不活動期間中に一時的にギプ

スを解除して自由運動する群(以下自由運動群, 3匹左右6肢; n = 6) に無作為に振り分けた。

飼育室の照明は, 12時間ごとに明暗をコントロールし, 一定条件下 (23 ± 1°C) の室温で飼育した。また, 餌と水は自由に摂取させた。

ギプス固定は先の研究に準じ [7], 以下の手順で行った。イソフルラン吸入麻酔下で, ニトリートCBテープ (日東メディカル社製) を用い足関節底屈位で足趾基部から膝関節まで巻き, その上にプラスランギプス (ALCARE) を巻いて不活動モデルを作製した。この不活動モデルは, 後肢にあまり荷重をかけなかったが, 主に前肢を使用してケージ内を自由に移動できた。皮膚ならびに筋痛覚閾値を測定した後, 自由運動群はギプスを除去したままの状態で別ケージに移して15分間自由に運動させた。自由運動は不活動期間中の週5日行った。自由運動の基準は, 歩行だけでなく後肢での立ち上がり動作なども含めた。設定した自由運動時間の中で, 四肢のすべてが床に接地している時間を除いた実運動時間は別途ストップウォッチで計測した。また, 実運動時間は不活動前にも計測した。

〈皮膚痛覚閾値ならびに筋痛覚閾値検査〉

皮膚痛覚閾値の測定は, 先行の研究 [7] に準じ, 自作の von Frey hair 棒 (以下, VFH 棒) を40gまで用いた。まずイソフルラン吸入麻酔下でギプスを除去した後に, ラットの両後肢を穴の空いたタオルに通して吊りさげ, 四肢の動きや立ち直り反応の出現をみて充分覚醒したことを確認してから測定を開始した。ラットの足部を把持し, その足底部を刺激し, 逃避反応を示した値を記録した。測定は週5日, 不活動期間前1週間と不活動期間中の計5週間継続して行い, 各肢で1週間ごとのデータを平均し, その値を各期間の各肢の代表値とした。

筋痛覚閾値の測定は先行研究 [8] に準じて以下の様に実施した。Randall-Selitto装置 (圧刺激鎮痛効果測定装置, Ugo-Basile社製) を用いて腓腹筋内側部を加圧し, 逃避反応時の刺激量を記録した。これも週5日, 不活動期間前1週間から不活動期間中の計5週間継続して測定し, 各肢で1週間ごとのデータを平均し, その値を各期間の各肢の代表値とした。

〈神経の組織学的解析〉

不活動期間4週間終了後, イソフルラン吸入麻酔後, ペントバルビタールナトリウム (50mg/kg, i.p.) 麻酔下で, 0.1Mリン酸緩衝液およびザンボン液で灌流固定後, 第12胸髄以下の脊髄と第4から第6腰髄神経 (以下L4-6) のDRGを両側摘出した。同固定液で後固定を行った後30% Sucrose-リン酸緩衝液で置き換え, L4-6のDRGをOCTコンパウンド (Tissue Tek) 内に包埋し, 分析まで-80°Cで保存した。標本はCryostat (Leica CM1850) を用いて縦断方向に10 μm厚に薄切した。切片は, トリス塩酸緩衝液で洗浄し, 内因性ペロオキシダーゼ除去後, 抗CGRP抗体 (Sigma C8198) で反応させた。さらにビオチン化二次抗体で反応後, ABC-DAB法を用いて免疫染色した。染色後の細胞画像は先行研究 [6] に準じ, 顕微鏡解析ソフト (Olympus DP71) を用い, 対物レンズ20倍でPCへ取り込んだ。画像解析ソフト Image J (Ver 1.45) を用い, 全細胞数ならびにCGRP陽性細胞数をカウントした。またCGRP陽性細胞は, 面積を測定し, 大きき別に600 μm² 未満, 600 μm² 以上1200 μm² 未満, 1200 μm² 以上に分類し, 全細胞数に対するそれぞれのCGRP陽性細胞率を算出した。

統計処理

各群における皮膚痛覚閾値、筋痛覚閾値ならびにCGRP陽性細胞率は、平均と標準誤差で示した。統計処理にはSPSS ver. 22を用い、皮膚痛覚閾値の週ごとの変化にはFriedman検定を、実運動時間および筋痛覚閾値の各週間の変化には反復測定の一元配置分散分析法を用い、各検定後にBonferroni法を用いた。不活動4週目における皮膚痛覚閾値の比較にはMann-WhitneyのU検定を、筋痛覚閾値およびCGRPの分布の比較には、対応のないt-検定を用いた。すべての統計手法の有意水準は5%未満とした。なお本研究は、本学の動物実験委員会の承認(2007-004)を受けて行った。

結果

1. 運動時間

不活動前の実運動時間は平均 708.5 ± 25.9 秒だった。自由運動群における不活動1週目から4週目までの各週の実運動時間は順に 604.1 ± 38.4 秒、 553.9 ± 16.3 秒、 654.3 ± 7.8 秒、 655.4 ± 21.0 秒であり、不活動前と不活動2週目との間でのみ有意差を認めた ($p < 0.05$)。

2. 皮膚痛覚閾値 (図1)

不活動群の不活動前から不活動4週目までの各週の皮膚痛覚閾値は、 28.1 ± 0.6 g、 27.7 ± 2.5 g、 22.4 ± 1.9 g、 21.1 ± 1.2 g、 21.7 ± 1.9 gであり、不活動前に比べ不活動2週目以降で有意に低値を示した。しかし、その他の期間には差を認めなかった。一方、自由運動群におけるそれは順に 31.8 ± 1.1 g、 29.4 ± 2.4 g、 25.3 ± 1.0 g、 24.7 ± 0.6 g、 25.6 ± 1.1 gであり、不活動前に比べ不活動2週目以降で有意に低値を示

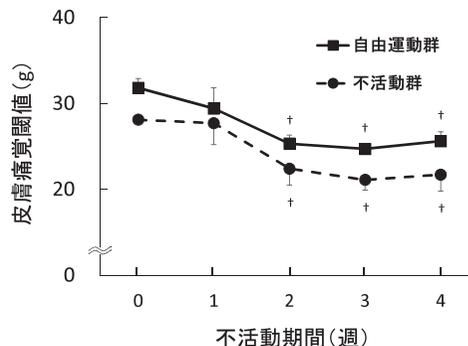


図1 足底皮膚痛覚閾値の経時の変化

縦軸は皮膚痛覚閾値を示し、横軸は不活動期間を、実線は自由運動群、点線は不活動群を示す。

† : 各群の不活動前との比較 ($p < 0.05$)。

した。しかし、その他の期間には差を認めなかった。また、不活動4週目における両群にも有意差は認められなかった。

3. 筋痛覚閾値 (図2)

不活動群の不活動前から不活動4週目までの各週の筋痛覚閾値は順に、 226.6 ± 3.7 g、 186.4 ± 5.2 g、 173.0 ± 4.9 g、 141.7 ± 7.2 g、 132.7 ± 7.2 gであり、不活動前に比べ不活動1週目以降すべての週で有意に低値を示した。また不活動1-2週目の筋痛覚閾値はそれぞれ3週目以降に有意差を認めた。一方、自由運動群におけるそれは順に 224.0 ± 4.3 g、 197.9 ± 1.3 g、 176.2 ± 3.0 g、 154.0 ± 2.1 g、 150.7 ± 4.2 gであり、不活動前に比べ1週目以降、1週目に比べ2週目以降すべての週で有意に低値を示した。しかし2週目以降は4週目まで差を認めなかった。不活動4週目における自由運動群の筋痛覚閾値は、不活動群に比べて有意に高値を示した。

4. CGRP陽性細胞率 (図3)

免疫染色の結果から得られたDRGにおける横断面積別CGRP陽性細胞率の分布は、不活動

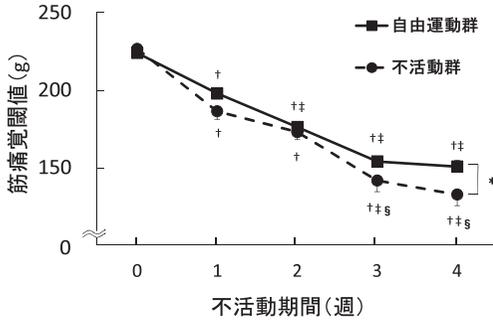


図2 腓腹筋における筋痛覚閾値の経時的变化
縦軸は筋痛覚閾値を示し、横軸は不活動期間を、実線は自由運動群、点線は不活動群を示す。
†：各群の不活動前との比較、‡：各群の1週目との比較、§：各群の2週目との比較、*：不活動群と自由運動群との比較、いずれも $p < 0.05$ 。

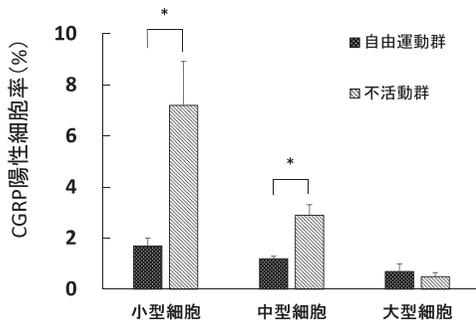


図3 DRGにおけるCGRP陽性細胞率

縦軸は全細胞数に対するCGRP陽性細胞数を百分率で表した。自由運動群では $600 \mu\text{m}^2$ 未満の小型細胞と $600 \mu\text{m}^2$ 以上 $1200 \mu\text{m}^2$ 未満の中型細胞において有意に低値を示した (* : $p < 0.05$)。

群では横断面積の $600 \mu\text{m}^2$ 未満が $7.2 \pm 1.7\%$ 、 $600 \mu\text{m}^2$ 以上 $1200 \mu\text{m}^2$ 未満が $2.9 \pm 0.4\%$ 、 $1200 \mu\text{m}^2$ 以上が $0.5 \pm 0.2\%$ であった。自由運動群のそれは $600 \mu\text{m}^2$ 未満が $1.7 \pm 0.3\%$ 、 $600 \mu\text{m}^2$ 以上 $1200 \mu\text{m}^2$ 未満が $1.2 \pm 0.1\%$ 、 $1200 \mu\text{m}^2$ 以上が $0.7 \pm 0.3\%$ であった。不活動群に比べ自由運動群では $600 \mu\text{m}^2$ 未満の小型細胞と $600 \mu\text{m}^2$ 以上 $1200 \mu\text{m}^2$ 未満の中型細胞において有意に低値を示した。

考察

これまでに不活動により皮膚および筋痛覚閾値が低下することを報告してきた[6-8, 15]が、今回も同様の結果が得られた。さらに本研究では不活動期間中の自由運動によって皮膚ならびに筋痛覚閾値の低下を抑制できるかについて検討した。その結果、皮膚痛覚閾値は自由運動の影響を受けず、不活動期間とともに徐々に閾値は低下し、不活動群との差は認められなかった。本研究では自由運動時間を15分間と設定したが、実質的に動いていた時間は10分程度であった。実運動時間は不活動前と比較すると不活動2週目との間で有意差を認めており、その他の週でも不活動前と比べると低下傾向を示した。自由運動時間中は常に荷重されており、皮膚や筋に対し機械的な刺激は与えられていたものの、皮膚痛覚閾値の低下に影響を与えることはなく、刺激としては不十分だった可能性がある。神経損傷による疼痛や切開痛に対する運動の影響を皮膚で調べた研究[1, 5]などでは、運動時間は15分から30分で設定されており、また自由運動よりも高速の強制運動であった。これらのことから今回実施した15分の自由運動は刺激強度としては低く、刺激時間としても短かったと考えられた。しかし、以前に行った不活動期間中にトレッドミル走を行った研究[6]では、皮膚痛覚閾値は運動を実施していない不活動群よりもさらに低下したのに対し、本研究では皮膚痛覚閾値は不活動群と比べて増悪はみられず、悪影響を及ぼす刺激ではなかった。

一方、自由運動によって不活動2週目以降の筋痛覚閾値は低下が鈍化し、筋痛覚閾値の低下をわずかに抑制することができた。不活動状態では、筋活動の低下によって末梢循環の低下や栄養および酸素供給の低下などがわずかながら

生じていると考えられる。健常成人を被験者とした前腕部の4週間の固定では、皮膚の冷・熱および機械的な痛覚閾値の低下が認められ、皮膚温に左右差が認められたことから自律神経系を介した皮膚の循環障害の可能性が報告されている [13]。また、2週間のギプス固定とその除去によって作製される慢性痛モデルでは、ギプス固定により生じる虚血やその後の再灌流障害が痛みの原因の一つであると報告されている [10]。本研究では4週間の不活動状態を設定したが、1週間のうち5日は一時的に不活動状態を解除し、自由運動を行うものであった。この運動時間は短縮位に留め置かれたヒラメ筋や腓腹筋、逆に伸張位に留め置かれた長指伸筋や前脛骨筋などが一時的ではあるものの自由に筋収縮することが可能なため、それらによって虚血状態が緩解され、このことが筋痛覚閾値の低下抑制に影響を与えた可能性が考えられる。しかし、本研究では足部の循環動態までは検討していなかったため、今後の検討課題である。また、自由運動は先に実施したトレッドミル走に比べ低負荷な運動であり、疼痛自制内で行われる能動的な運動が筋痛覚閾値の抑制に効果的であったのではないかと考えられた。

さらに本研究では、不活動による疼痛発生に影響する因子としてCGRPの可能性をDRGで調べた。Nishigamiらはギプス固定によって生じる痛みに対してCGRPが関与し、特に中型のCGRP陽性細胞の割合が増加すると報告している [9]。本研究においては不活動群と比べて自由運動群で小型～中型のCGRP陽性細胞率が有意に低値を示しており、これらのことから自由運動によって小型から中型細胞でのCGRPの発現増加を抑制できる可能性が示唆された。しかし、今回は不活動状態にある2群での比較であり、健常群との比較が行っていない。過去

の研究による行動評価の結果から、不活動開始前の状態が健常群の状態を示すものとして用いることができると判断し、今回は健常群を設定しなかった。しかし、DRGにおけるCGRPの発現に関しては、今までに検討しておらず、不活動状態によってCGRP陽性の中型細胞の割合が増加しているかどうかは明らかではなく、今後明らかにしていく必要がある。

謝辞

本研究はJSPS科研費JP23500624ならびにJSPS科研費JP26350638の助成を受けて行った研究の一部である。

文献

- [1] Chen YW, Tzeng JI, Lin MF, Hung CH, Wang JJ. Forced treadmill running suppresses postincisional pain and inhibits upregulation of substance P and cytokines in rat dorsal root ganglion. (2014) *J Pain*. 15(8) : 827-834
- [2] 藤野英己, 上月久治, 武田 功, 田崎洋光, 近藤浩代, 石田寅夫, 梶谷文彦. (2005) ラット尾部懸垂前のプレコンディショニング運動が廃用性筋萎縮に及ぼす予防効果. *理学療法学*. 32 (7) : 400-405
- [3] Guo TZ, Wei T, Li WW, Li XQ, Clark JD, Kingery WS. (2014) Immobilization contributes to exaggerated neuropeptide signaling, inflammatory change, and nociceptive sensitization after fracture in rats. *J Pain*. 15(10) : 1033-1045
- [4] Hamaue Y, Nakano J, Sekino Y, Chuganji S, Sakamoto J, Yoshimura T, Okita M, Origuchi T. (2015) Effects of vibration therapy on immobilization-induced hypersensitivity in rats. *Phys Thera*. 95(7) : 1015-1026
- [5] Kim YJ, Byun JH, Choi IS. Effect of exercise

- on μ -opioid receptor expression in the rostral ventromedial medulla in neuropathic pain rat model. (2015) *Ann Rehabil Med.* 39(3) : 331-339
- [6] 肥田朋子, 沖向雄也, 榊原拓也, 堀田昌志, 野村達也, 中田智章, 井筒孝徳, 田崎洋光, 平賀慎一郎. (2016) 関節不動化による不活動モデルにお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
- [7] 肥田朋子, 榊原拓也, 沖向雄也, 堀田昌志, 野村達也, 中田智章, 井筒孝徳, 平賀慎一郎, 松原崇紀, 田崎洋光. (2013) 関節不動化による関節可動域制限と疼痛発生に対するストレッチングの効果. *名古屋学院大学論集 医学・健康科学・スポーツ科学篇.* 1 (2) : 1-9
- [8] 中村浩輔, 酒井成輝, 水野奈緒, 肥田朋子. (2015) 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
- [9] Nishigami T, Osako Y, Tanaka K, Yuri K, Kawasaki M, Ikemoto T, McLaughlin M, Ishida K, Tani T, Ushida T. (2009) Change in calcitonin gene-related peptide expression following joint immobilization in rats. *Neurosci Lett.* 454: 97-100
- [10] Ohmichi Y, Sto J, Ohmichi M, Sakurai H, Yoshimoto T, Morimoto A, Hashimoto T, Eguchi K, Nishihara M, Arai YC, Ohishi H, Asamoto K, Ushida T, Nakano T, Kumazawa T. (2012) Two-week cast immobilization induced chronic widespread hyperalgesia in rat. *Eur J Pain.* 16: 338-348
- [11] Pilis W, Zarzeczny R, Lahgfort J, Kaciuba-Uściłko H, Nazar K, Wojtyna J. (1993) Anaerobic threshold in rats. *Comp Biochem Physiol.* 106(2): 285-289
- [12] St Pierre BA, Tidball JG. (1994) Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. *J Appl Physiol.* 77(1) : 290-297
- [13] Terkelsen AJ, Bach FW, Jensen TS. Experimental forearm immobilization in humans induces cold mechanical hyperalgesia. (2008) *Anesthesiology.* 109: 297-307
- [14] Wanek LJ, Snow MH. (2000) Activity-induced fiber regeneration in rat soleus muscle. *Anat Rec.* 258(2) : 176-185
- [15] 山本 綾, 古島泰子, 長谷川多美子, 肥田朋子. (2009) ラット足関節不動化による活動制限は痛みを促進する. *理学療法学.* 36 (6) : 305-311

[Original Article]

Effect of Free Mobility on the Inactivity-induced Hyperalgesia in Rats

Takumi Matsuzawa¹, Yoshinori Iida², Masaki Taniguchi³
Saki Matsubara⁴, Yukiko Kawahara⁵, Tomoko Koeda⁶

Abstract

It is known that physical inactivity induces hyperalgesia in the skin and muscles. Although we have examined the effectiveness of treadmill running exercise for reducing this hyperalgesia, we found it got worse. The aim of this study was to investigate the effect of free mobility for inactivity-induced hyperalgesia. All male Wistar rats were in inactive states using casts in both lower limbs. Three of these rats could move freely in 15 minutes a day, 5 days a week for 4 weeks. Three other rats were kept in an inactive state without test time. Plantar cutaneous and calf muscle withdrawal thresholds were tested by mechanical stimuli before and during inactivity periods. Calcitonin gene related peptide (CGRP) was immunostained in dorsal root ganglia (DRG) after the inactivity periods.

As a result, the cutaneous withdrawal threshold was not changed between the two groups, but the muscle withdrawal threshold in the free mobility group was significantly increased compared to the inactivity group in the 4th week of the inactivity periods. The number of CGRP-positive neurons in the small and medium sizes of DRG neurons significantly decreased in the free mobility group compared with the inactivity group.

These results suggest that this free mobility during the inactivity period suppressed somewhat in inactivity-induced hyperalgesia in muscle, and CGRP in DRG may contribute to inactivity-induced hyperalgesia.

Keywords: inactivity, free mobility, cutaneous withdrawal threshold, muscle withdrawal threshold, CGRP

-
- 1 Department of Rehabilitation Technology, Toyota Kosei Hospital
 - 2 Department of Rehabilitation Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology
 - 3 Department of Rehabilitation, Geriatric Health Services Facilities YASURAGI
 - 4 Department of Physical Therapy, Division of the 1st Rehabilitation, Nagoya city Rehabilitation Agency
 - 5 Department of Physical Therapy, Toyama Prefectural Hospital & Support Center for Children with Disabilities
 - 6 Faculty of Rehabilitation Sciences, Nagoya Gakuin University