

軽い機械的な皮膚刺激は、無髄 C-求心性線維の興奮によって引き起こされる体性心臓交感神経性 C - 反射を抑制する

堀田 晴美<sup>1</sup>, ロバート・シュミット<sup>2</sup>, 内田 さえ<sup>1</sup>, 渡辺 信博<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京都健康長寿医療センター研究所 (東京都老人総合研究所) 自律神経機能研究室

<sup>2</sup> ドイツ ヴェルツブルグ大学 生理学

## 要約

軽い機械的な皮膚刺激が、体性求心性刺激によって誘発される心臓交感神経反射放電に及ぼす影響を、麻酔ラットで調べた。心臓交感神経の遠心性神経から多神経活動を記録し、脛骨神経の有髄 A - 及び無髄 C-求心性線維の単発電気刺激によって体性心臓交感神経性 A - 及び C - 反射を誘発した。ソフトなエラストマー「ブラシ」(直径 1.1 cm で 417 本の微小突起を持つ) によって、0.12 N の力で 10 分間、内側大腿皮膚に連続的タッチを与えた。刺激された脛骨神経の同側にタッチを与えた場合、C - 反射は、タッチ前の振幅の 40%まで抑制され、一方 A - 反射は影響を受けなかった。C - 反射の抑制は、タッチ期間中に始まり、タッチ終了後 15 分間持続した。対側性のタッチは、C - 反射を抑制しなかった。オピオイド受容体拮抗薬ナロキソンは C - 反射の抑制を減弱させたが、消失はさせなかった。C - 反射抑制は、内側大腿を支配する皮神経の切断後に消失した。我々は伏在神経の大腿枝から単一の求心性活動を記録し、タッチで興奮する線維は、急速あるいはゆっくりと順応する性質を持つ低閾値機械受容性 A $\beta$ 、A $\delta$ 、及び C 線維であることを見出した。調べた全ての単一線維において、タッチ期間中の平均発火頻度は、4 Hz 未満であった。これらの結果は、タッチによって誘発された低閾値皮膚機械受容性線維の興奮が、オピオイド及び非オピオイドの抑制性メディエータの放出を介して、一次求心性 C 線維によって運ばれる侵害伝達を抑制することを示唆する。

## 1. 序

体性感覚受容器の刺激は、意識的感覚ばかりでなく生理反応をも生み出すことは、日常生活上の経験から明らかである。我々の研究室では、麻酔動物を使って体性-自律反射のメカニズムを広く研究してきた(e.g. Sato et al., 1997; Uchida et al., 1999, 2008; Hotta et al., 2005)。伝統医学や現代医学において、様々なタイプの体性刺激は、そのような処置がどうやって効果をもたらすのかの生理学的また解剖学的詳細不明のまま、内臓その他の身体症状や機能障害の治療に用いられてきた(Sato et al., 2002)。しかしながら、体性-自律反射は

その背景にあるメカニズムの中心的要素であると考えられる。

心拍数を変えるなどの自律機能反射反応を引き起こすのに加えて、体性求心性神経刺激は中枢神経系において内因性オピオイドの放出をもたらすことによって鎮痛効果を引き起こすことが知られている(Yaksh and Elde, 1981; Han et al., 1991; Wang et al., 2005)。求心性神経線維の電気刺激が鎮痛効果につながるメカニズムについては調べられてきた(Woolf and Wall, 1982; Chung et al., 1984ab)が、非侵害性の機械的な皮膚刺激に伴う鎮痛のメカニズムは、ほとんど調べられていない。

後肢神経の有髄(A)および無髄(C)求心性線維の電气的パルス刺激は、麻酔動物の交感神経遠心性神経において明白な交感神経性の A 及び C 反射放電を各々誘発することが見出されている(Fedina et al., 1966; Schmidt and Weller, 1970)。C - 反射成分が選択的にモルヒネ投与によって減少し得る(Ito et al., 1983; Sato et al., 1986)ことから、麻酔動物において様々な操作の鎮痛効果をテストするために、体性-交感神経性 C 反射が有用な指標になり得ることが示唆されている。本研究は、非侵害性の機械的皮膚刺激が下心臓交感神経の遠心性神経から記録された交感神経性 A 及び C 反射に及ぼす影響を調べることを目的とした。本結果の一部は、要約の形で公表された(Hotta et al., 2009a,b)。

## 2. 方法

本実験は、東京都老人総合研究所で飼育されたウイスター系雄ラット( n=35 ) を用いて行われた。動物の体重は、340-450 g の範囲であった。この研究は、我々の研究所の実験動物管理委員会によって承認された。

動物をウレタンで麻酔した。ウレタンの初回量は、1.1 g/kg i.p であった。追加麻酔や、他の薬剤の静脈内投与のために頸静脈にカテーテルを挿入した。動脈血圧と心拍数を記録するために、総頸動脈にカテーテルを挿入した。安定した全身動脈血圧と心拍数(連続的にモニター)及び動物の非動化前には逃避反射の欠如によって証明される麻酔レベルを維持するために、追加量のウレタンを投与した(0.1-0.36 g/kg,i.p. あるいは i.v.)。動物を、気管カニューレを介して人工的に換気した。換気をガス分析計(Microcap, Oridion Medical, Jerusalem, Israel) によってモニターし、呼吸終末の CO<sub>2</sub> レベルを約 3.0% に維持するよう、調整した。体温は、自動制御加熱パッドとランプ (ATB-1100, Nihon Kohden, Tokyo) を使って 37-38°C に維持した。

### 2.1. 体性心臓交感神経反射放電

ラットを仰臥位にし、右第 2 肋骨を除去した。右の下心臓交感神経を胸膜外で分離し、できる限り心臓の近くで切断し、温かいパラフィン油で覆った。心臓交感神経の遠心性神

経活動を、AC増幅器(MEG-2100, Nihon Kohden, 時定数を 0.33 s に設定)を使って白金 - イリジウム線電極で心臓交感神経の中樞部分から記録した。記録した交感神経活動に迷走神経が混入するのを防ぐため、頸部のレベルで迷走神経を両側性に切断した。

右の脛骨神経を、周囲の組織から分離し足首の近くで切断した。神経の中樞切断端部分を、電気刺激用の双極白金 - イリジウム線電極上に置いた。デジタル電気刺激装置 (SEN-7203, Nihon Kohden) と刺激アイソレータ・ユニット(SS-202J, Nihon Kohden)により、持続時間 0.5 ms の単発矩形波刺激を 3 s 毎に与えた。準備の最終段階に、非動化のために gallamine triethiodide (20 mg/kg, i.v.)を投与した。

心臓交感神経の反射性反応を、脛骨神経の電気刺激によって誘発し、コンピュータ (Unique Aquisition software, Unique Medical, Tokyo) で平均化した(50 試行)。平均された反応は、デジタル信号として保存した。反射性反応のサイズは、刺激開始後 30-200 ms (A-反射) 及び 200-435 ms (C-反射)の誘発反応の面積として測定し、タッチ前に誘発された応答面積の% で表した。

## 2.2. タッチ刺激

普通の毛刈りで内側大腿と下腹部から毛を刈った後、417本のエラストマー製微小突起を持つ直径 11 mm のソフトなエラストマー「ブラシ」(SOMARESON type I, Toyoresin Co., Shizuoka)によって、大腿内側(あるいは腹部)の皮膚、右あるいは左のいずれかに、タッチを与えた(図 1A)。微小突起は、0.4 mm の間隔で規則正しく配列されていた。個々の微小突起の先端直径は 0.037 mm であり、各々の高さは 0.3 mm であった。その「ブラシ」は最近、鎮痛のデバイスとして開発された。慢性痛の緩和のためのこのデバイスの有効性(Y. Mukaino 博士、個人的連絡)と、触刺激に対する生理的反応についての我々自身の経験との潜在的な類似が、我々はその性質を探究する動機となった。一部の例において、比較のために、微小突起なしの同じサイズ(直径 11 mm)の平らなエラストマーの円盤を用いた。位置決めロボット (miniSCARA, Dynax Co., Tokyo) とブラシに接合された柱の上に付けられた重り(図 1B)を用い、連続的なタッチ刺激を 0.12 N の一定の力で、あるいは重りを交換することにより 0.01 N あるいは 1.1 N で、皮膚に 10 分間与えた。我々の前腕に与えられたとき、これらの力の刺激はいずれも、痛みを引き起こさなかった。デジタル・ビデオ顕微鏡(DS-500, Science-eye, Saitama, Japan)を用いて 300×の倍率で観察したところ、エラストマー微小突起は、1.1 N の力では曲がるが、0.01 N あるいは 0.12 N の力では曲がらなかった。いくらかの例では、タッピング・タッチを約 2 Hz の頻度で手動で与えた。

## 2.3. 内側大腿皮膚を支配する神経

後肢の内側大腿領域は、ラットにおいて主に伏在神経大腿枝と後大腿皮神経に支配される (Swett and Woolf, 1985)。右の後大腿皮神経を、腹臥位で第三転子の約 1 cm 尾側の位置で切断し、右の伏在神経を仰臥位で鼠径靭帯の尾側で切断した(4 匹の動物で)。

#### 2.4. 単一求心性神経活動

予備的研究において我々は、内側大腿皮膚のタッチが伏在神経の大腿枝の全神経束から求心性の多放電を引き起こすことを観察した。その反応は、後大腿皮神経の反応より一貫して大きかった。従って我々は、伏在神経の大腿枝から単一求心性神経活動を記録した。腹部の皮膚を切断した後、伏在神経の大腿枝を鼠径靭帯の近くで分離し切断した。これらの神経を、温かいパラフィン油で覆い、切断末梢部を双極白金 - イリジウム線記録電極上に置いた。以前に記述されたように (Kagitani et al., 2005)、2 本のピンセットと拡大倍率 25-40×の双眼顕微鏡を用いて、単一線維活動を記録するまで神経の分離を行った。単一活動電位を増幅し(MEG-2100, Nihon Kohden)、スピーカーに接続して聴覚的にモニターし、デジタルオシロスコープ(TS-8500, IWATSU, Tokyo)で視覚的に表示し、後の処理(Spike 2 software, Cambridge Electronic Design, UK)のためにデジタル化した(micro 1401, Cambridge Electronic Design, UK)。各線維の受容野内の機械的閾値を、フォン・フレイのフィラメント(0.03 mN-6 mN)で測定した。

#### 2.5. 単一神経線維の伝導速度の測定

微小突起による皮膚タッチが分離した伏在神経線維に単一活動電位を誘発したら、一对の針電極(直径 0.2 mm; Seirin Kasei Co., Shizuoka)を、同線維の受容野の中心近くの皮膚に 1-2 mm 離して刺入した。単独の矩形波パルス(持続時間 0.5 ms)を、これら 2 本の針の間に様々な刺激電流強度で通した。皮膚の電気刺激が分離した伏在神経線維に単一活動電位を誘発したとき、電気刺激あるいはタッチによって誘発された活動電位を、活動電位の形を比較することによって 1 つのユニットから生じることが確認できた。単一神経線維の伝導速度を、刺激および記録用電極間の神経の長さ(53-80 mm)と、分離した神経線維において誘発された活動電位の潜時、の両方を測定することによって計算した。伝導速度  $\leq 2$  m/s の神経線維を無髄の C 線維として分類した。3 匹のラットにおいて内側大腿への伏在神経の全束から複合活動電位を記録することによって、有髄 A 及び A 求心性線維の最大伝導速度を各々 55.8 m/s (平均; 範囲: 51.4-62 m/s) 及び 15.6 m/s (13.3-19.4 m/s) と見積った。これらの結果に基づき、伝導速度  $> 15.6$  m/s を A、 $\leq 15.6$  m/s を A 線維として神経線維を分類した。

#### 2.6. ナロキソン

5 匹の動物において、2 mg/kg 塩酸ナロキソン(Sigma, USA) を、i.v 投与した。この投与量は、以前の研究(Adachi et al., 1992; Uchida et al., 1999)において、大量のモルヒネ(20 mg/kg, i.v.)による 体性心臓交感神経性 C - 反射の変化を打ち消すために効果的であることが示された。

## 2.7. データ分析

値は、平均 + SEM として表される。統計的分析は、one-way repeated-measures ANOVA とそれに続くダネットの多重比較試験、あるいは two-way repeated-measures ANOVA とそれに続く Bonferroni correction を用いて行われた。統計的有意性は、5% レベルに設定した。

## 3. 結果

### 3.1. タッチによる C - 反射の低下

脛骨神経の A 及び C 求心性線維の単発電気刺激(0.5 ms のパルス持続時間で 15 V では、A 及び C 求心性線維に対応する 2 種類の心臓交感神経反射放電—以前に報告された(Adachi et al., 1992; Uchida et al., 1999)ように、潜時の短い(約 40 ms) A - 交感神経反射及び、潜時の長い(約 210 ms) C - 交感神経反射 (図 2A)—を引き起こした。いずれの反射反応も、通常の実験の持続時間、すなわち数時間にわたって、安定していることがわかった。A 及び C 反射が少なくとも 10 分安定していたとき、我々はタッチ刺激を与え始めた。

右側 ( 刺激された脛骨神経と同じ側)の内側大腿皮膚への、0.12 N の一定の力でのエラストマー微小突起による 10 分の連続的なタッチは、C - 反射を著しく低下させたが、A - 反射は影響されなかった(図 2A)。心拍数も血圧も、タッチによって影響を受けなかった。タッチの効果の時間経過を、図 2B にまとめる。タッチによって誘発された C - 反射の低下は、タッチ開始 5 分後に始まり、刺激終了後 5-10 分に C - 反射のサイズがタッチ前振幅の 40 + 12%まで減少した(図 2B の下のグラフ)。C - 反射は、通常刺激終了 0-10 分後にその最小に達し、タッチ期間の終わりから 20-30 分後に徐々に刺激前のレベルに戻った。一方、A - 反射のサイズは、タッチ中もタッチ後も変化しなかった(図 2B の上のグラフ)。この反応は、同じ動物での連続する試行において再現された。

タッチの力の違いや様式が C - 反射に与える影響を、7 匹のラットでテストした。10 分の 1 (0.01 N, n=4)の一定の力でのタッチは、0.12 N の力でのタッチと同様に、C - 反射を

低下させた(タッチ開始 5-10 分後に最大 27+9%まで)。10 倍(1.1 N, n=4)の一定の力でのタッチは、C - 反射を僅かに低下させたが、その効果は統計的に有意ではなかった。同様の効果は、微小突起なしの平らなエラストマーディスク(n=3)で与えた 0.12 N の力でのタッチ中に観察された。また、C - 反射は、2 Hz (0.01 N, n=1; 0.12 N, n=3)でのタッピング・タッチによって影響を受けなかった。

### 3.2. 様々な皮膚領域のタッチが C 反射に及ぼす影響

3 つの異なる皮膚領域へのタッチの C - 反射への影響を、8 匹のラットで調べた。刺激した領域—右腹部、右大腿部、左大腿部—を、図 3B における塗りつぶした円あるいは十字で示す。図 3A の C - 反射サイズのグラフは、C-反射の低下(a) と、効果なし (b) の両方を示す。これらのグラフは、矢印で示す B の領域に対応する皮膚領域へのタッチ刺激によって得られた。C - 反射は、右側の大腿と腹部(刺激された脛骨神経と同側。図 3B において塗りつぶした円で示される)に位置する 2 つの領域への刺激によって低下した。左側の大腿(刺激された脛骨神経と反対側。図 3B において十字で示される)に位置する、試したもう一つの領域は、C - 反射 抑制の効果がなかった。タッチを右の腹部に与えたとき、C - 反射の低下は、タッチ前振幅の最大 19 + 5%だった(図 3Aa)。抑制効果の大きさは、右大腿へのタッチのおよそ半分だった。

### 3.3. ナロキソン投与

タッチによって誘発された C - 反射の低下における、内因性オピオイドの役割を明らかにするため、5 匹のラットにおいて、オピオイド受容体拮抗物質ナロキソン (2 mg/kg) の静脈内投与後に、タッチが C - 反射に及ぼす影響を調べた。ナロキソン注射の 10 分後、タッチ前の C - 反射の基準レベルは変わらなかった。タッチ刺激による C - 反射低下は残った(図 4 の白丸)が、C - 反射低下の程度は、ナロキシンのない時のタッチ刺激による低下(図 4 の黒丸)のおよそ半分であった。C - 反射は、タッチ開始 5-10 分後にタッチ前振幅のわずか 23 + 5% 低下し、この低下は、タッチ刺激の終了後 5 分間続いた。ナロキソンは、タッチ刺激の低下効果を有意に減少させ( $p < 0.01$ , two-way ANOVA でテストした)、ポストホック ボンフェローニ修正は、刺激期間が終わった後で、そのような減少が有意であることを明らかにした。

### 3.4. 求心性神経の切断

内側大腿皮膚を支配する求心性神経の切断は、大腿へのタッチ刺激によって引き起こされた C - 反射低下を消失させた。我々は 4 匹のラットにおいて、タッチ刺激される大腿皮膚

と同側（右側）の伏在神経と後皮神経を切断することによって調べた。タッチ前の C - 反射の基線レベルは影響を受けなかったものの、タッチ刺激による C - 反射低下は、全ての例で完全に防がれた（図 5）。同側腹部の刺激による C - 反射低下は、維持された（2 匹のラットでテストした）。

### 3.5. 伏在神経の単一活動

内側大腿皮膚を支配する伏在神経枝の単一求心性神経活動を、10 匹のラットにおいて神経枝の切断末梢側から記録した。0.12 N の力での 10 分間の内側大腿皮膚への連続的なタッチは、伏在神経における A、A 及び C 単一ユニット求心性線維を活性化した。

タッチに反応した全 32 のユニットを、分離して記録した。これらの 32 のユニットの伝導速度は、0.7 から 42.3 m/s の範囲で、従って A、A、及び C 線維に属していた。A、A、及び C 線維に属すると分類された求心性線維から記録した平均伝導速度は、各々  $28.3 + 1.8$  m/s (n = 18)、 $11.0 + 0.7$  m/s (n = 8) 及び  $0.9 + 0.04$  m/s (n = 6) であった。機械的な刺激（フォン・フレイ フィラメント）閾値は、26 ユニットにおいて明らかにし、0.03 mN から 4 mN までの範囲、すなわち非侵害性範囲であった。各ユニットにおいて、タッチ刺激中の平均放電量の増加は様々だったが、常に 4 Hz より低かった。

図 6 は、タッチに反応した A (A, B) 及び C (C) 線維からの単一求心性記録の例を示す。Aa、Ba、及び Ca のパネルは、異なる個々の線維から記録された、タッチ刺激中（左）及び受容野の電気刺激によって誘発された（右）活動電位を示す。タッチと、電気刺激によって引き起こされた活動電位の形は、いずれも同じであった。従って、両方の活動電位は、同じユニットから生ずると考えられた。図 6 の Ab、Bb、及び Cb パネルは、10 分間のタッチ刺激中のそれらユニットにおける活動電位とヒストグラムを示す。

ユニットの動的応答は、様々であった。図 6Ab に示されたユニットは、タッチ開始時に高い動的応答を示すと同時にタッチ期間中ずっと興奮し続けた（遅順応性 SAI ユニット）。最初の高頻度発火の期間はタッチ開始後 30 秒以内に終了したが、タッチ期間の終わりまで徐々に発火量が増加する放電を続けた。12 のユニット（8 つのユニットが A 線維、4 つのユニットが A 線維であると確認された）が、この様式でタッチ刺激に反応し、10 分のタッチ期間中の平均放電量は  $1.59 + 0.37$  Hz であった (n=12; 図 7A)。図 6Bb に示されたユニットは、タッチによって興奮したが、開始時の動的応答がなかった。活動電位量は、タッチ期間中に徐々に増加した（遅順応性 SAII ユニット）。5 つのユニット（A: n=3; A: n=2）は、タッチに対してこのタイプの反応を示した。5 つのユニットにおけるタッチ期間中の活動電位の平均放電量は、 $0.22 + 0.16$  Hz であった（図 7B）。

図 6Cb に示されたユニットでは、タッチは上述の SAI ユニットと類似した反応を引き起こした。但し、タッチの開始時と同様にタッチの終了時にも高い動的応答があった。より遅い伝導速度により、これらのユニットが C - 線維であると確認された。我々は、そのよ

うな 6 つのユニットを記録し、タッチ刺激中の平均放電量は、 $0.33 + 0.10 \text{ Hz}$  であった ( $n=6$ ; 図 7C)。

これらの遅順応性ユニットの中には、タッチ前に低いレベルの自発的活動を持つものがあった(例えば、図 6Cb)。タッチを中止すると、多くの場合、ユニットの放電量が減少した。しかし、タッチ刺激終了後に、タッチ前レベルに比べ増加した発火量が 10 分間以上続いたユニットもあった(例えば、図 6Ab)。

もう一つ別のタイプの単一求心性応答があった。そのユニットグループは、自発的には放電せず、タッチの開始時と終了時に一時的に活性化された(速順応性 RA ユニット) ( $A : n=7 ; A : n=2$ )。これらのユニットの大多数は、 $100\text{-}200\text{Hz}$  の高い瞬時放電を示した。

?

#### 4. 考察

##### 4.1. C - 反射の選択的抑制

本研究において我々は、皮膚のタッチが体性心臓交感神経性 C - 反射を( A - 反射ではなく ) 低下させることを初めて示した。麻酔ラットにおいて、同様の体性心臓交感神経性 C - 反射の選択的な抑制が、モルヒネ ( Adachi et al. , 1992 ) や  $\mu$  - あるいは  $\delta$  - オピオイド受容体作動薬 ( Sato et al. , 1995 ) のようなオピオイドの腰髄へのクモ膜下注射によって見出されていた。

後肢からの基本的な体性心臓交感神経反射弓は、脛骨神経中を走行する求心性線維、反射中枢は脳幹にあり ( Sato et al. , 1997 )、遠心路はラットでは脊髄の第 1 ~ 第 6 胸部分節 ( T1-6 ) から出る心臓交感神経、から成る ( Strack et al. , 1988 )。C - 反射は、一次求心性 C - 線維によって媒介され、そのタッチ刺激による低下は、C - 求心性入力に対する分節性抑制であると推測される。なぜなら、( 1 ) これらの迷走神経切断ラットにおいて心拍数はタッチによって影響を受けなかった、( 2 ) A - 反射も影響を受けなかった、( 3 ) 腹部 ( 遠心性出力により近い ) へのタッチは、大腿 ( 求心性入力により近い ) へのタッチより効果が少なかった、( 4 ) 対側性のタッチは効果がなかった、からである。

##### 4.2. 低閾値 A - 及び C-求心性線維の活性化

本研究は、皮膚求心性線維の 3 つの集団全て(伝導速度に基づいて A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、または C 線維と分類された)が、タッチ期間中に活性化されたことを示し、様々なグループの求心性線維が C - 反射抑制に寄与する可能性を示唆した。線維の異なるグループの選択的電気刺激によって得られたデータに基づき、鎮痛効果に寄与する求心性線維について取り組んだ研究がいくつかあった。電気刺激技術によって、A<sub>1</sub> 求心性線維の活性化による鎮痛効果が示さ



れており(Pomeranz and Paley, 1979; Woolf and Wall, 1982)、末梢神経刺激によって誘発された鎮痛効果に A や C 求心性線維が寄与することも示唆されている(Chung et al., 1984b; Ikeda et al., 1999)。しかしながら、低閾値機械受容線維のみではなく高閾値侵害受容線維 (>40 mN) をも活性化する電気刺激を用いたこれらの以前の研究とは対照的に、本研究におけるタッチによって活性化された A<sub>β</sub>、A<sub>δ</sub>、及び C 線維は、低閾値(<4 mN) の機械受容線維のみであった。ラット(Lynn and Carpenter, 1982; Fang et al., 2005) やヒト(Vallbo et al., 1999; Wessberg et al., 2003)において低閾値機械受容性 C 線維は、無毛部皮膚にはないが、タッチを与えた有毛部皮膚では豊富にあると言われている。タッチによって誘発された求心性線維の 3 つの全ての集団 (A<sub>β</sub>、A<sub>δ</sub>、及び C) の低閾値機械受容性線維の興奮が、C - 反射抑制に貢献すると思われる。

#### 4.3. 感覚受容器のタイプ

有毛皮膚を支配する求心性線維は、段階的窪み及び毛の屈曲に対する反応に基づいて、一般に急速に順応するものとゆっくりと順応するものに分けられる(Sato et al., 1997)。急速に順応する (RA) ユニットとゆっくりと順応する (SA) ユニットはいずれも、タッチによって興奮した。高い動的感受性のあるもの(SAI)とないもの(SAII)、いずれのサブタイプの SA ユニットも、タッチによって興奮した。これらの反応のうち、SAI 及び SAII ユニットの、ゆっくりと生じる持続的な興奮は、C - 反射抑制にとって重要であるかもしれない。なぜなら、C - 反射の抑制もゆっくりと現れるからである。ソフトな微小突起での皮膚タッチ刺激が C - 反射を抑制する一方、同じ力で同じ素材の平らな表面での刺激では抑制効果を生じないことは、興味深い。これは、動物のごくわずかな動き (動脈の脈動や呼吸によって) が、皮膚を横断してこれらの微小突起を振動させ得るためかもしれない。そのようなわずかな動きは、C - 反射抑制に重要と思われる求心性線維のより長く続く放電につながるのかもしれない。

タッチ期間中に、皮膚の低閾値機械受容線維において低頻度放電が観察されたという本研究の発見は、皮膚の低閾値機械受容線維の比較的低い頻度での興奮が C - 反射抑制に十分であることを示す。低頻度活動の効果は、体性求心性線維の低頻度刺激 (0.5-5 Hz)が、1) ラットにおける膠様質ニューロンとの一次求心性シナプスの長期抑圧(Sandkuhler et al., 1997; Ikeda et al., 1999)、2) 麻酔ネコにおける胆嚢へのブラジキニン投与によって誘発される循環系の反射性賦活の長く続く抑制 (Li et al., 1998)及び3) ヒトにおける痛みの感覚の長期の減少(Klein et al., 2004)を引き起こすこと、また、綿棒を用いて低頻度 (約 0.2 Hz) で皮膚を撫でると、神経障害性の痛みを持つ患者において長期間、アロデニア領域のサイズを減少させ得る (Love-Jones et al., 2009)、という以前の報告と一致する。これは、RA 及び SAI ユニットの高頻度活動をもたらすと推定されるタッピング・タッチが C - 反射抑制に効果がなかった、という我々の結果によって支持される。

#### 4.4. オピオイド及び非オピオイド受容体の関与

ナロキソンの投与により、タッチ刺激によって引き起こされた C - 反射の低下は、減少したが、消失はしなかった。この結果は、内因性オピオイドが重要な役割を果たすかもしれない一方、ナロキソン抵抗性の、すなわち GABA、グルタミン酸など(Tjen-A-Looi et al., 2007; Sandkuhler et al., 1997; Ikeda et al., 1999)の、非オピオイド受容体による抑制性メカニズムも関与する可能性を示唆する。内因性オピオイドは、体性求心性神経の電気刺激中に中枢神経系で放出される(Yaksh and Elde, 1981; Han et al., 1991; Wang et al., 2005)。我々の知見は、タッチが中枢神経で内因性オピオイドの放出を促進し得ることを示唆する。麻酔された動物においてオピオイドは、脊髄部位で作用することによって、ラット(Adachi et al., 1992; Sato et al., 1995; Uchida et al., 1999)でもネコ(Sato et al., 1985; 1986)でも C - 反射を抑制する。一方、オピオイドは、脳幹部で作用することによって、ラットでは C - 反射を促進し(Adachi et al., 1992; Sato et al., 1995; Li et al., 1996)、ネコでは A - 反射と C - 反射の両方を抑制する(Kato et al., 1992)。そのような知見は、タッチによって誘発された C - 反射の抑制が、脊髄レベルで生ずる、という我々の推測と一致する。しかし、ナロキソンを静脈内投与したため、オピオイドが脳や末梢神経のような他の部位に作用した可能性を除外することはできない。タッチ効果に寄与するオピオイドの作用部位を明らかにするためには、更なる研究、例えばナロキソンのクモ膜下腔投与など、が必要である。

#### 4.5. 触覚のための皮膚求心性線維

大腿内側のタッチ刺激による C - 反射の低下は、タッチ部位の皮膚を支配する同側の伏在神経と後皮神経を切断した後に完全に消失した。神経活動の局所的薬理的遮断は、神経切断に替わる一つの手段である。神経の完全な切断では、誘発反応の変化が実際に無反応状態となる神経線維自体が原因である可能性を明らかにし難いか、できないこともある。C - 反射の低下が切断後の全期間にわたって神経切断によって遮断された一方、神経無傷の腹部の刺激による C - 反射低下は保持されたことは、非特異的な障害と混同したわけではないことを示す。従って我々は、皮膚求心性神経が本研究で示された抑制効果に不可欠であると結論する。

神経線維を分離する技術を使って、我々はタッチに反応する個々の求心性線維の特性を調べ、皮膚求心性線維がタッチ刺激中に活性化され、通常刺激終了の数秒以内に発火が中止あるいは減少することが分かった。驚いたことに、タッチによって引き起こされた C - 反射の抑制は、刺激終了後 10 分間持続した。ナロキソンが C - 反射低下の期間を減少させたので、オピオイド受容体は長く持続する低下に貢献する。しかし、C - 反射低下が求心性

線維活動における変化よりも分単位で長く続くため、求心性入力がない状態で低下を維持する中枢性の要素が必要である。

#### 4.6. 結論

本結果はラットにおける軽い機械的な皮膚刺激が、体性心臓交感神経の反射経路において、C 求心性線維の一斉放電の脊髄でのシナプス伝達を抑制し得ることを示す。C - 反射の抑制は、オピオイド系及び非オピオイド系によって媒介され、脊髄分節神経経路での抑制の可能性が最も高く、有髄および無髄の線維を持つ低閾値皮膚機械受容器から生じる低頻度入力によって誘発される。一次求心性 C 線維の多くは、遅い痛みを伝達する侵害求心性線維である。したがって、本結果は、軽い機械的な皮膚刺激が鎮痛をもたらし得るメカニズムと関係があるかもしれない。ここで示されたメカニズムは、理学療法の臨床効果の一部を説明する可能性があり、また社会的条件づけ、すなわち、他者との皮膚接触がいかに有益であるかを学ぶため、の役割もあるかもしれない。更に、我々の研究結果は、最近開発されたマイクロスパイクを持つデバイスの、痛みの治療における使用を支持するかもしれない。ただし、将来の正常なヒトを対象とした研究が、次のステップとして重要である。

#### 謝辞

本研究は、東洋レヂンからの研究費によって支えられた。著者は、長谷川智也氏の優れた技術的支援、マーク・スチュワート博士の原稿へのコメント、佐藤優子博士のこの研究の遂行に対する励まし、に感謝している。著者は利益相反のないことを宣言する。

#### References

- Adachi T, Sato A, Sato Y, Schmidt RF. Depending on the mode of application morphine enhances or depresses somatocardiac sympathetic A- and C-reflexes in anesthetized rats. *Neurosci Res* 1992;15:281-8.
- Chung JM, Fang ZR, Hori Y, Lee KH, Willis WD. Prolonged inhibition of primate spinothalamic tract cells by peripheral nerve stimulation. *Pain* 1984a;19:259-75.
- Chung JM, Lee KH, Hori Y, Endo K, Willis WD. Factors influencing peripheral nerve stimulation produced inhibition of primate spinothalamic tract cells. *Pain* 1984b;19:277-93.
- Fang X, McMullan S, Lawson SN, Djouhri L. Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the rat in vivo. *J Physiol* 2005; 565:927-43.
- Fedina L, Katunskii AY, Khayutin VM, Mits'nyi A. Responses of renal sympathetic

nerves to stimulation of afferent A and C fibres of tibial and mesenteric nerves. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 1966;29:157-75.

Han JS, Chen XH, Sun SL, Xu XJ, Yuan Y, Yan SC, Hao JX, Terenius L. Effect of low- and high-frequency TENS on Met-enkephalin-Arg-Phe and dynorphin A immunoreactivity in human lumbar CSF. *Pain* 1991;47:295-8.

Hotta H, Sato A, Schmidt RF, Suzuki A. Cerebral regional cortical blood flow response during joint stimulation in cats. *Neuroreport* 2005;16:1693-5.

Hotta H, Schmidt RF, Uchida S, Watanabe N. Gentle mechanical skin stimulation inhibits the somatocardiac sympathetic C-reflex elicited by excitation of unmyelinated C-afferent fibers. *J Physiol Sci* 2009a; 159:473.

Hotta H, Schmidt RF, Uchida S, Watanabe N. The cutaneous afferents contributing to inhibitions of the sympathetic reflex elicited by excitation of unmyelinated C-afferent fibers in anesthetized rats. *Neurosci Res* 2009b, in press

Ikeda H, Asai T, Randi? M, Murase K. Robust suppression of afferent-induced excitation in the rat spinal dorsal horn after conditioning low-frequency stimulation. *J Neurophysiol* 1999;82:1957-64.

Ito K, Nakamura H, Sato A, Sato Y. Depressive effect of morphine on the sympathetic reflex elicited by stimulation of unmyelinated hindlimb afferent nerve fibers in anesthetized cats. *Neurosci Lett* 1983;39:169-73.

Kagitani F, Uchida S, Hotta H, Aikawa Y. Manual acupuncture needle stimulation of the rat hindlimb activates groups I, II, III and IV single afferent nerve fibers in the dorsal spinal roots. *Jpn J Physiol* 2005;55:149-55.

Kato J, Meguro K, Sato A, Sato Y. The effects of morphine administered into the vertebral artery on the somatosympathetic A- and C-reflexes in anesthetized cats. *Neurosci Lett* 1992;138:207-10.

Klein T, Magerl W, Hopf HC, Sandk?hler J, Treede RD. Perceptual correlates of nociceptive long-term potentiation and long-term depression in humans. *J Neurosci* 2004;24:964-71.

Li P, Pitsillides KF, Rendig SV, Pan HL, Longhurst JC. Reversal of reflex-induced myocardial ischemia by median nerve stimulation: a feline model of electroacupuncture. *Circulation* 1998;97:1186-94.

Li WM, Sato A, Sato Y, Schmidt RF. Morphine microinjected into the nucleus tractus solitarius and rostral ventrolateral medullary nucleus enhances somatosympathetic A- and C- reflexes in anesthetized rats. *Neurosci Lett* 1996;221:53-6.

Love-Jones SJ, Besson M, Steeds CE, Brook P, Chizh BA, Pickering AE. Homotopic stimulation can reduce the area of allodynia in patients with neuropathic pain. *Eur J*

Pain. 2009;13:942-8.

Lynn B and Carpenter SE. Primary afferent units from the hairy skin of the rat hind limb. *Brain Res* 1982;238:29-43.

Pomeranz B and Paley D. Electroacupuncture hypalgesia is mediated by afferent nerve impulses: an electrophysiological study in mice. *Exp Neurol* 1979;66:398-402.

Sandkühler J, Chen JG, Cheng G, Randi M. Low-frequency stimulation of afferent A-delta-fibers induces long-term depression at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurons in the rat. *J Neurosci* 1997;17:6483-91.

Sato A, Li P, Campbell JL eds. *Acupuncture: Is there a physiological basis?* Excerpta Medica International Congress Series 2002;1238:1-182.

Sato A, Sato Y, Schmidt RF. Modulation of somatocardiac sympathetic reflexes mediated by opioid receptors at the spinal and brainstem level. *Exp Brain Res* 1995;105:1-6.

Sato A., Sato Y, Schmidt RF. The impact of somatosensory input on autonomic functions. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1997;130:1-328.

Sato A, Sato Y, Suzuki A, Swenson RS. The effects of morphine administered intrathecally on the somatosympathetic reflex discharges in anesthetized cats. *Neurosci Lett* 1986;71:345-50.

Sato A, Sato Y, Suzuki A, Swenson RS. The effects of morphine administered intrathecally on the somatosympathetic reflex discharges in anesthetized cats. *Neurosci Lett* 1986;71:345-50.

Sato A, Sato Y, Swenson RS. Effects of morphine on somatocardiac sympathetic reflexes in spinalized cats. *J Auton Nerv Syst* 1985;12:175-84.

Schmidt RF and Weller E. Reflex activity in the cervical and lumbar sympathetic trunk induced by unmyelinated somatic afferents. *Brain Res* 1970;24:207-18.

Strack AM, Sawyer WB, Marubio LM, Loewy AD. Spinal origin of sympathetic preganglionic neurons in the rat. *Brain Res* 1988;455:187-91.

Swett JE and Woolf CJ. The somatotopic organization of primary afferent terminals in the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 1985;231:66-77.

Tjen-A-Looi SC, Li P, Longhurst JC. Role of medullary GABA, opioids, and nociceptin in prolonged inhibition of cardiovascular sympathoexcitatory reflexes during electroacupuncture in cats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H3627-35.

Uchida S, Kagitani F, Hotta H. Mechanism of the reflex inhibition of heart rate elicited by acupuncture-like stimulation in anesthetized rats. *Auton Neurosci* 2008;143:12-9.

Uchida S, Suzuki A, Hotta H, Sato A. The effects of morphine on supraspinal and propriospinal somatocardiac reflexes in anesthetized rats. *Neurosci Lett*

1999;269:161-4.

Vallbo AB, Olausson H, Wessberg J. Unmyelinated afferents constitute a second system coding tactile stimuli of the human hairy skin. *J Neurophysiol* 1999; 81:2753-63.

Wang Y, Zhang Y, Wang W, Cao Y, Han JS. Effects of synchronous or asynchronous electroacupuncture stimulation with low versus high frequency on spinal opioid release and tail flick nociception. *Exp Neurol* 2005;192:156-62.

Wessberg J, Olausson H, Fernström KW, Vallbo AB. Receptive field properties of unmyelinated tactile afferents in the human skin. *J Neurophysiol* 2003; 89:1567-75.

Woolf CJ and Wall PD. Chronic peripheral nerve section diminishes the primary afferent A-fibre mediated inhibition of rat dorsal horn neurones. *Brain Res* 1982;242:77-85.

Yaksh TL and Elde RP. Factors governing release of methionine enkephalin-like immunoreactivity from mesencephalon and spinal cord of the cat in vivo. *J Neurophysiol* 1981;46:1056-75.

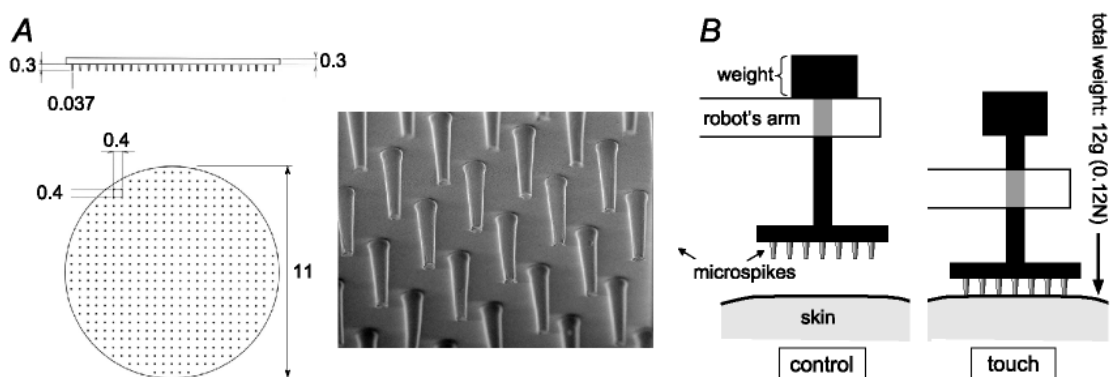


図 1. 皮膚の軽い機械的な刺激の方法。

軽い機械的的刺激は、直径 11mm のシート上に規則正しく配列された 417 本の微小突起を持つ、ソフトなエラストマー" ブラシ" を用いて行った。各微小突起の高さは、0.3 mm であり、その先端は、平ら(直径 0.037 mm)である。エラストマー" ブラシ" を、0.12 N の力で 10 分間、大腿内側あるいは腹部に与えた(図 1B)。

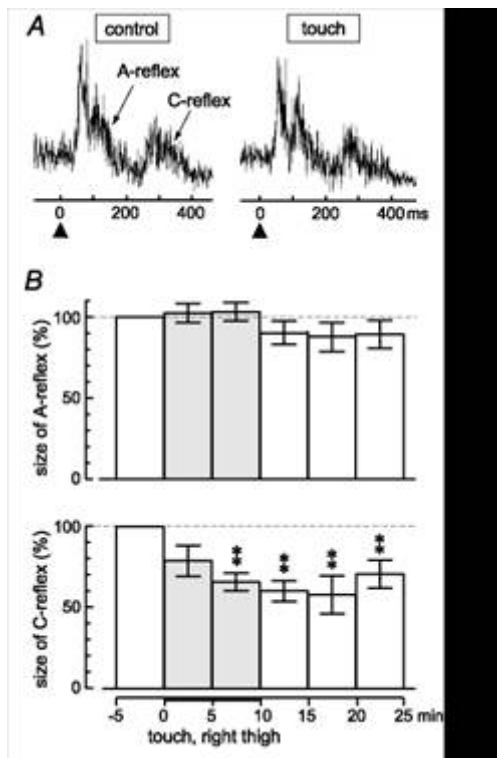


図2. タッチが 体性心臓交感神経反射に及ぼす影響。

同側の大腿へのタッチの前後に脛骨神経の単発電気刺激によって引き起こされた A - 及び C - 反射 ( 50 試行の平均 ) の記録。A - 及び C - 反射の大きさを、刺激開始後各々 30-200 ms 及び 200-435 ms 以内の対応する反射反応の曲線下面積として測定した。B: A - 及び C - 反射のサイズの変化を 5 分毎に平均し、タッチ前値の%として表してまとめたグラフ。図 2B における灰色のカラムと横軸の下の水平線は、タッチの期間を示す。各カラムと垂直のバーは、誘発された反射性反応の振幅 ( 面積 ) の平均的变化を平均値 + 標準誤差 ( n=5 ) で表す。C 反応の大きさは、タッチ前レベルと比べ、タッチ中に減少した。 \*\*p < 0.01; 刺激前値と有意に異なる ( one-way repeated-measures ANOVA とダネットの多重比較試験による ) 。

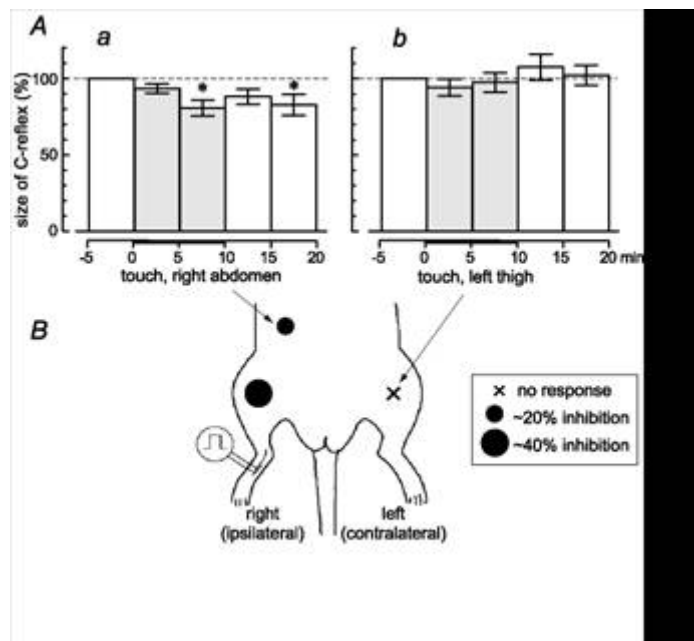


図3. 同側の腹部 (Aa) と対側の大腿 (Ab) に与えたタッチが、体性心臓交感神経性 C - 反射に及ぼす効果。

A: グラフは、5 分毎に平均した C - 反射のサイズの変化を、タッチ前値の%として表し、まとめる (n=5)。更なる詳細は、図 2 参照。\*p < 0.05. B: 刺激された領域を、塗りつぶした丸あるいは十字で示す。比較のために、同側の大腿刺激の結果も含む。丸のサイズは、刺激領域のサイズではなく、C - 反射抑制の程度を示す。

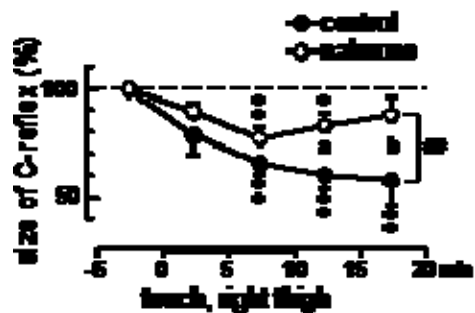


図4. 同側の大腿に与えたタッチによる C - 反射の抑制に及ぼす、ナロキソン (2 mg/kg, i.v) の影響 (n=5)。

タッチがナロキシンの前 (黒丸) とナロキソン後 (白丸) の体性心臓交感神経 C - 反射に



及ぼす影響。各点と垂直のバーは、平均値 + 標準誤差 (n=5) を表す。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  ; 刺激前値と有意に異なる。##  $p < 0.01$  ; 双方向性繰返し ANOVA とボンフェローニ修正によるコントロールとナロキソン後の間の有意差 (a  $p < 0.05$  , b  $p < 0.01$ )。

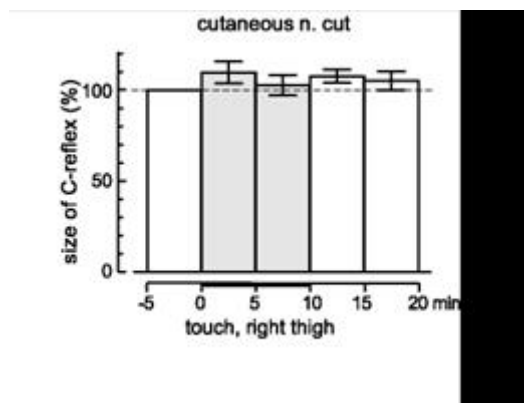


図 5 . 同側の大腿皮膚を支配する神経の切断は、C - 反射に対する大腿タッチの抑制作用を消失させた (n=4)。

更なる詳細は、図 2 を見よ。

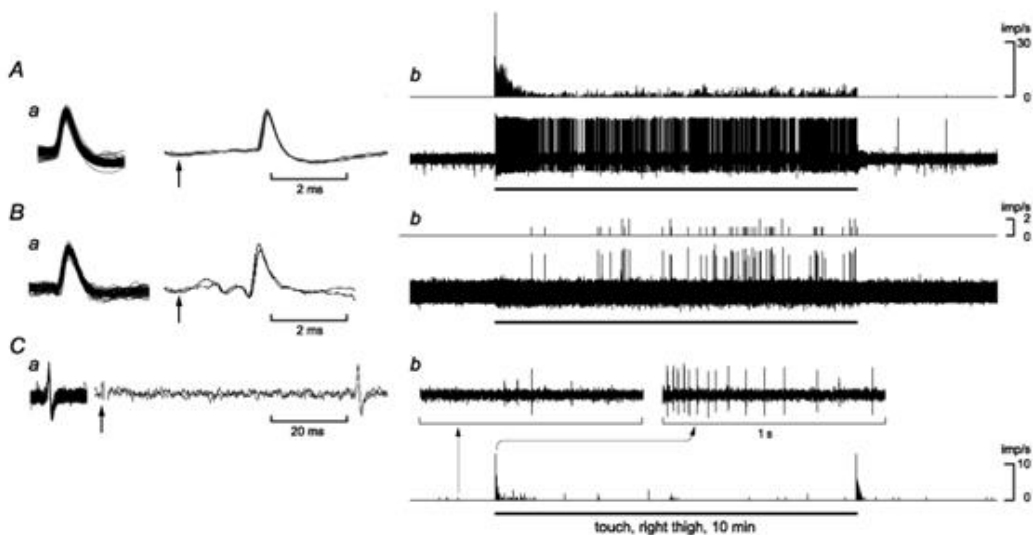


図6. 伏在神経における単一求心性線維記録の例。

A, B: 動的感受性を持つ (SAI; A)、及び持たない (SAII; B) 遅順応性 A 線維。C: C 線維。Aa, Ba, Ca: タッチ刺激中に重ね表示した活動電位(左)と、受容野の電気刺激によって誘発された活動電位(右)。電氣的に誘発された活動電位の潜時、記録電極と刺激電極の間の距離、及び算出された伝導速度は、A では 2.7 ms, 75 mm, 27.8 m/s (A 線維)、B では 2.2 ms, 65 mm, 29.5 m/s (A 線維)、C では 67.7 ms, 60 mm, 0.9 m/s (C 線維)。Ab, Bb, Cb: 各々の単一求心性ユニットのタッチに対する反応(グラフはスパイクヒストグラムを示す)。水平線は、タッチ刺激の期間を示す。

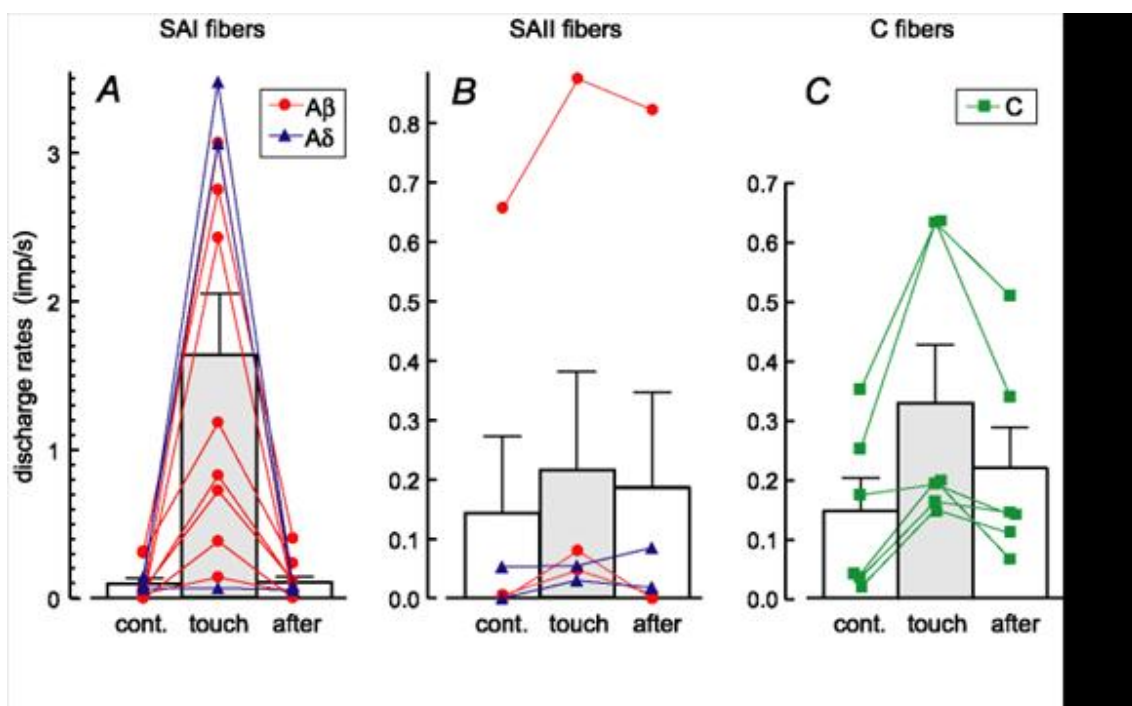


図7. タッチ刺激前(5分間)、タッチ刺激中(10分間)、タッチ刺激後(10分間)の、遅順応性単一線維活動のまとめ。

A: 動的感受性を持つ A 線維(SAI)。B: 動的感受性を持たない A 線維(SAII)。●: A 線維, ▲: A 線維。C: C 線維(■)。各カラムと垂直のバーは、平均値 + SEM を表す。