

主論文の要旨

**ATP decreases mechanical sensitivity of muscle
thin-fiber afferents in rats**

〔 ATP はラットの筋細径求心性神経の機械的感受性を低下させる 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
器官系機能調節学講座 神経性調節学分野

(指導：山中 章弘 教授)

松田 輝

【緒言】

ATP は、mM のオーダーで細胞に含まれるエネルギー物質で、細胞が損傷した時や筋が圧迫された時、あるいは収縮した時に放出される。ATP をラットの皮下に注入すると、痛み関連の行動と機械刺激と熱刺激に対する痛覚過敏を誘発することが報告されている。しかし、筋での ATP の影響は調べられていない。そこで、本研究では、筋 C 線維の単一神経記録と行動実験から筋痛覚における ATP の影響を評価した。

【方法】

Sprague Dawley ラット (雄、9-13 週齢) を 143 匹使用した。実験は名古屋大学動物実験指針に則り、名古屋大学動物実験委員会の承認の元に実施した。

(1) 単一神経記録

ペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下で長指伸筋-総腓骨神経標本を取り出し、*in vitro* で C 線維の単一神経記録を行った。次の基準を充たした神経のみを実験に使用した。①ガラス棒で筋に与えた機械刺激に感受性がある、②筋の伸張に対し強度依存的な放電数増加がない、③受容野に電気刺激を行って測定した伝導速度が 2.0 m/s 以下である。

長指伸筋の受容野に、定量的機械刺激 (10 秒間で 0~196 mN の鋸歯状刺激) を、10 分間隔で 4 回行い、反応閾値、放電数を測定した。ATP 1、100 μ M、1 mM あるいは Krebs 液 (コントロール) を 2 回目の機械刺激の 5 分前から投与した (図 1A)。また、ATP アンタゴニストの PPADS (100 μ M) あるいは、suramin (300 μ M) を ATP (100 μ M) 投与の 1 分前より 6 分間投与して反応閾値、放電数を測定した (図 1B)。

記録した線維の特性を調べるために、化学刺激 (ATP 10 mM、BK 10 μ M、capsaicin 1 μ M) と熱刺激 (加温 Krebs 液により 30 秒間で約 34 から 50°C へ加温) に対する反応についても調べた。

(2) 行動実験

筋の機械逃避閾値を調べるためには先端を鈍にしたプローブを装着した Randall-Selitto 式鎮痛効果測定装置を、皮膚の機械逃避反応を調べるためには 10 g の von Frey hair (直径 0.5 mm) を使用した。

a) 前脛骨筋に ATP 0.01、0.1、1、10 mM (10 μ l)、あるいは Krebs 液を筋注した。筋注前日、筋注直前、筋注 5、30、60 分後に筋の機械逃避閾値を測定した。

b) ATP 1 mM (10 μ l) を前脛骨筋に筋注する 30 分前に naloxone (5 mg/kg) を腹腔内投与し、naloxone 注射前、注射 25 分後、ATP 注射直後、5、30、60 分後に筋の機械逃避閾値を測定した。

c) 足底の皮下に ATP 1、10 mM (10 μ l)、あるいは Krebs 液を注射し、5~10 分後に 10 g の von Frey hair を足底に 10 回あて、足を引き上げる回数を数えた。

【結果】

(1) 単一神経記録

全部で 104 本の C 線維を記録した。ATP 1 μ M では 4/17 (24%)、100 μ M では 4/19 (21%)、1 mM では 10/16 (63%) の線維が、ATP に反応した (表 1)。図 2 示した例では ATP 1mM に対する反応の有無に関わらず、その後の機械刺激に対する反応は抑制される傾向が見られた。ATP 1 mM による機械反応パターンの変化を見るために、1 秒毎のスパイク (放電数) の平均を調べた。ATP 1 mM の抑制効果は平均の反応パターンでも認められた (図 3B)。

機械閾値は、ATP 100 μ M と 1 mM 投与で有意に上昇した ($P < 0.05$ 、 $p < 0.01$)。この抑制効果は、ATP 1 mM では投与 10 分後まで続いた ($p < 0.05$ 、図 4A)。また、放電数は ATP 1 mM 投与でのみ有意に減少し ($p < 0.05$)、効果は投与 20 分後まで続いた (図 4B)。

この抑制効果に関係している ATP 受容体サブタイプを知るために、ATP アンタゴニストの PPADS と suramin を、ATP 100 μ M 投与の 1 分前から ATP 投与中 5 分間の計 6 分間投与した。これにより ATP による機械閾値の有意な上昇が抑制された (図 5A)。

記録した線維の化学刺激に対する反応割合、熱刺激に対する反応割合と閾値には、グループ間で有意な差はなかった (表 2)。

(2) 行動実験

ATP による C 線維の機械反応抑制効果が、筋の逃避反応を変化させるかどうかを調べるために、前脛骨筋に ATP (0.01, 0.1, 1, 10 mM) を筋注した。いずれの濃度の ATP も明白な痛み関連の行動を誘発しなかった (図 6A)。

中枢の痛覚過敏状態で ATP 筋注の効果を確認するため、ナロキソンの腹腔内注射を行い、有意な逃避閾値の低下により中枢性過敏状態が起こっていることを確認した ($p < 0.05$)。この状態で前脛骨筋に ATP 1mM あるいは Krebs 液を筋注したところ、どちらも逃避閾値が上昇し、両群間に差はなかった。つまり、ATP 1 mM は有意な変化を引き起こさなかった (図 6B)。

次に、ATP が皮膚で機械痛覚過敏を誘発するかどうか調べた。ATP 10 mM 投与後の、10 g の von Frey hair に対する逃避反応回数は、Krebs 液投与後の反応に比べて有意に多かった ($p < 0.05$) (図 6C)。

【考察】

ATP は 100 μ M 以上の濃度で、それ自身で興奮を生じたか否かに関わらず、筋の C 線維受容体の機械反応を抑制した。この結果から、ATP 筋注後の機械逃避閾値の上昇を予想したが、明白な効果は見られなかった。これは ATP の抑制効果があまりにも弱すぎたためか、あるいは逃避閾値の測定法が閾値の微妙な変化を検出できる十分な感度がなかったためであろう。

今回使用したよりも高濃度の ATP を筋に注射した後、痛みと軽い圧痛が出現した

との報告がある。同様の高濃度で実験を行えば筋で機械刺激に対する C 線維の感作効果を観察できたかもしれない。

ATP の濃度によって促進あるいは抑制がおこり、それらは P2X 受容体または P2Y 受容体を介するとの報告があるが、今回観察された ATP 100 μ M の抑制効果は、P2X4 以外の P2X 受容体のアンタゴニストである suramin と PPADS で無効化された。従って、C 線維の機械的反応に対する抑制効果は、P2X 受容体を介して生じたと考えられる。加えて、本研究では ATP は受容野に連続的に灌流されているので、ATP の分解で生産されるアデノシンの効果ではないと考えられる。

筋の圧迫で ATP が放出されたとの報告がある。今回の結果は、放出された ATP が機械的に誘発した痛みを軽減できる可能性を示唆する。筋から放出された ATP の効果は、マッサージの効果と関係があるかもしれない。

【結論】

以上より、ラットの筋 C 線維の単一神経記録から、ATP は機械的感受性を低下させることを明らかにした。しかし、行動実験では同様の結果を観察することができなかった。これらの結果の違いを明らかにするために今後の研究が必要である。