

ラット血管痛モデルにおける循環器パラメーター変動のパワースペクトル解析

安藤隆一郎, 渡辺千寿子, 小島 修樹

Power spectrum analysis of the cardiovascular parameter variability in rat vascular pain model

Ryuichiro ANDO*, Chizuko WATANABE, and Syuki OJIMA

(Received November 21, 2006)

We investigated the dynamics of cardiovascular system in order to search for the characteristic of vascular pain model using power spectrum analysis. The animals were anesthetized with urethane (1.3g/kg, i.p.) and arterial cannula was inserted into a bifurcation of femoral artery. The recording of heartbeats was carried out by chest bipolar lead. Systolic blood pressure went through a transducer from femoral artery and measured it invasively. In the power spectrum density (PSD) of R-R intervals, it was almost the same as that of un-stimulating state at very low frequency (VLF, <0.08Hz) and low frequency (LF, 0.08-0.3Hz) and high frequency (HF, 0.3-4.0Hz). However, the arterial capsaicin (CAP, 0.2 μ g) evoked the increment of total PSD values, particularly at LF and VLF, were markedly different from those of pinching. Furthermore, the increase of PSD by CAP was inhibited by morphine (5mg/kg, s.c.). These results indicate that the useful possibility to observation of the autonomic nervous system dynamics induced by vascular pain as a characteristic of this model.

Key words — capsaicin, heart rate, blood pressure, autonomic nervous system dynamics, power spectrum analysis, wavelet transform

緒 言

痛みは、生体の保持に最も重要な感覚のひとつであり、種々の生体機能において神経系を介して防御的变化を引き起こし、四肢への外来性有害刺激による屈曲運動反射はその典型例としてよく知られており¹⁾、この反応を応用して tail-flick test²⁾、flexor reflex test^{3,4)} などの痛み動物モデルが提唱されている。さらに、痛みは心拍数や血圧の著明な変動を惹起し、自律神経系に強く影響を与えることから、運動系反応と同様に自律系反射モデルも痛み実験に多く用いられてきた^{5,6)}。また、自律神経系の活動は情動反応とも強く関連しており、ストレス、不安など高次的な情動の変容がおよぼす循環器系疾患と自律神経系の関わりを心拍や血

圧などのパラメーターの分析により明らかにされつつある⁷⁾。ところで、従来痛み実験で用いられてきた自律系反射モデルは、心拍数や血圧の単なる侵害刺激前後の差異による判定が行われたきたが、単位時間あたりの心拍数や血圧の実際値など客観的数値として観察しているものの^{5,6)}、痛みに伴う自律神経系の詳細な変化は捉えられていない。近年、循環器パラメーターのパワースペクトル密度 (PSD) の時系列分析により詳細な自律神経系の活動を記録・観察する手法が開発されている⁸⁾。

そこで本研究では、われわれが開発した血管痛モデル⁹⁾ 用いてカプサイシン動脈内注入時における心拍と血圧の変化を詳細に検討するため、両者の変動を経時的に記録するとともに、PSDの手法を

用いて解析を試みた。

実験材料および方法

1. 実験動物

実験には、体重が280～340gのSD系雄性ラット(日本SLC)を使用した。動物の飼育は2～3匹ずつブラケット型金属ケージ(30.0×40.0×20.0cm)に入れ、明暗サイクルが12時間(明期:7時～19時)の一定環境下(温度:23±1℃,湿度:53±2%)で行い、飼料(CE-2,日本クレア)と水は自由に摂取させた。

2. 使用薬物

ウレタン(シグマ), 塩酸リドカイン(5%, アストラゼネカ), 塩酸ブピバカイン(0.5%, アストラゼネカ), 塩酸モルヒネ(三共), ヘパリンナトリウム注射液(1000U/ml, ノボ)およびカプサイシン(CAP, メルク)を使用した。ウレタンは注射用蒸留水に溶解(1.3g/10ml)し, 塩酸モルヒネは0.9%生理食塩液に溶解(5mg/ml)して用いた。ヘパリンナトリウム注射液はリンゲル液で希釈した(100U/ml)。カプサイシンは水に不溶なため, 0.05mlのエタノール添加後, tween 80・エタノール・リンゲル液(5:5:90)混液に溶解(5mg/ml)し, さらに用時リンゲル液で希釈(50μg/ml)して使用した。

3. 血管痛モデル動物の作成

血管痛モデルの作成は, すでにわれわれが報告した方法により行った⁹⁾。すなわち, CAP投与用動脈カニューレの挿入は, ウレタン麻酔下(1.3g/kg, i.p.)で右鼠径大腿部を約1cm切開し, 浅後腹壁動脈に適切な太さに加工し, リンゲル液を満たしたポリエチレンカニューレを大腿動脈吻合部まで逆行性に挿入した。また, 血圧測定用カニューレは反対側の後肢大腿動脈へヘパリンナトリウム希釈液を満たしたテフロンカニューレを逆行性に挿入した。心電図記録用銀板電極は右鎖骨部と左胸部に植え込んだ。なお, 皮膚の切開はすべて塩酸リドカインによる局部麻酔後実施し, 縫合部は塩酸ブピバカインを適量塗布した。発痛物質である

CAP(0.2μg)は0.8ml/minの速度でリンゲル液を用いて注入し, 比較対象として同一後肢皮膚への侵害性機械刺激(ピンチング)を行った。

4. 心拍および血圧の記録方法

実験は術後1時間経過してから, 飼育室と同一環境下で保温(37±1℃)しながら13時から17時の時間帯に実施した。心電図(ECG)は, 胸部双極誘導により導出し, 血圧は圧トランスジューサー(P23 ID, NEC)を介して観血的に行った。両者の信号はポリグラフ(System 360, NEC)により増幅後, 侵害刺激開始1分前から刺激5分後までDATデータレコーダー(RD-135T, TEAC)に記録した。

5. データの解析方法

記録したECGと血圧波形は500Hzのサンプリングでパソコン(NT-5000, エプソン)に取り込み, オフラインで処理を行った。今回われわれがパラメーターとしたのは, ECGではR波とR波の間隔時間(RRI, msec), 血圧では収縮期圧(SBP, mmHg)とした。パワースペクトル密度(PSD)の観察は, 侵害刺激によるRRIおよびSBPの変化が起きる1分前(Pre), 変化開始直後(Stim), 変化開始から1分後(Post)の各20秒間実施し, 超低周波数帯域(VLF, ~0.08Hz), 低周波数帯域(LF, 0.08~0.3Hz), 高周波数帯域(HF, 0.3~4.0Hz)の3帯域で行った。PSDの解析は, 高速フーリエ変換(FFT)より低周波数帯域の解析に優れ, 短時間のサンプリングに対応するウェーブレット変換(WT)を用いた¹⁰⁾。なお, マザーウェーブレットはMorletら¹¹⁾が提唱したモデルを使用した。

6. 統計処理

データは平均値±標準偏差で表し, one-way ANOVAまたはrepeated measure ANOVAで検定後, Fisher's PLSD testでP<0.05を有意差有りと判定した。

実験結果

1. RRIおよびSBPのPSDに対するCAPの影響

CAPを動脈内へ注入すると3秒前後で約10msecの緩徐かつ持続的なRRIの減少が経時的に観察された(図1, A). 一方, SBPはRRIとほぼ同じ潜時で約20mmHgの急激かつ一過性の低下が認められた(図1, B). このようにCAPによるRRIとSBPの変化は同一時期に始まるが, 両者の変化様式は異なっていた. さらにRRIとSBPのPre, StimおよびPostの各20秒間のパワースペクトル(PS)を比較してみると, RRIではVLFとLF帯域においてPostのパワー値が特に増加しており, SBPではほぼ全帯域においてStimのパワー値が著しく増加した(図1, C, D). 各周波数帯域におけるPSD値をまとめてみると, RRIはトータルパワーとLF帯域においてPost群がPreおよびStim群より有意なパワー値の増大が観察され, VLF帯域ではPost群がPre群より有意なパワー値の増大が認められた. しかしながら, SBPにおいてはStim群がPreおよびPost群より有意にパワー値の増大がトータルパワー, HF帯域, LF帯域認められ, VLF帯域ではStim群とPre群の間により有意な差が観察された(図2).

2. RRIおよびSBPのPSDに対するピンチング刺激の影響

後肢皮膚へピンチング刺激を加えると直後にRRIの減少とSBPの一時的低下が誘発され, CAPと類似の変化が観察されたが, その程度は微弱であった(図3, A, B). また, Pre, PostおよびStim各群のPSは, 図3のC, Dに示すようにCAP投与群と比較してHF領域にパワー値の増大が若干認められたが, 各周波数帯域間のPSD値に有意の差は認められなかった(図4).

3. CAP誘発RRIおよびSBPの変動に対するモルヒネの影響

塩酸モルヒネ(5mg/kg, s.c.)投与30分後にCAPを動脈内へ注入すると, CAPによるRRIおよびSBPの経時的変動が強く抑制された(図5, A, B). 図5のCおよびDに示すようにPSにおいてもパワー値が減少していることが認められた. さらに, 各周波数帯域におけるPre, StimおよびPost群間のPSD値をモルヒネ非投与群と比較すると, RRIではトータルパワー値とVLF帯域のPost群, SBPではトータルパワー値のStim群とPost群, HF帯

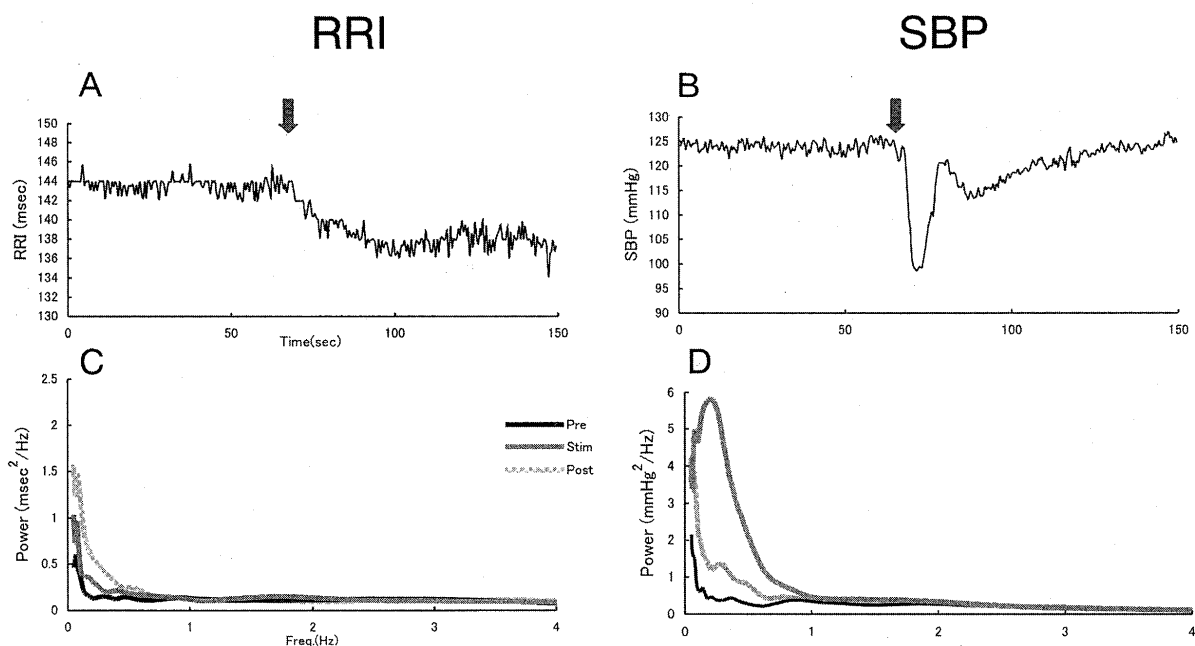


Fig. 1. Typical tracings of RRI, SBP (upper: A, B) and each PSD (lower: C, D, average of 6 samples) obtained by intra-arterial capsaicin in untreated rats. Arrows indicate injection timings of capsaicin.

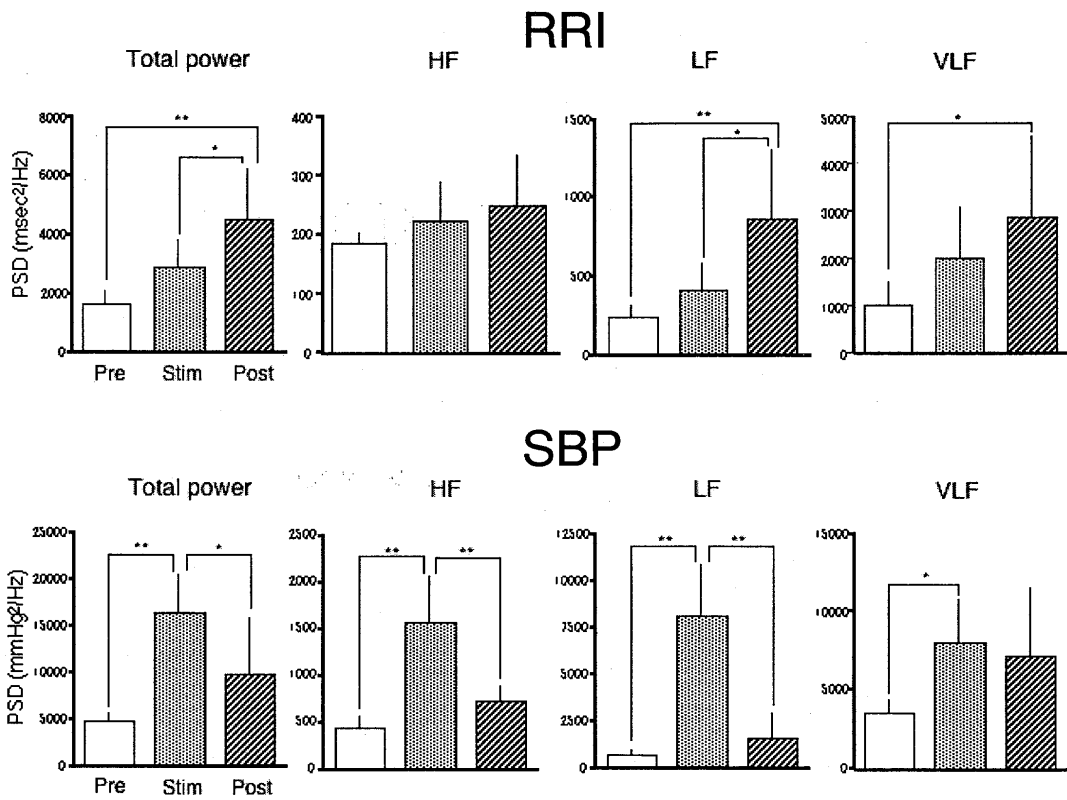


Fig.2. Comparison of PSD values of each frequency band of RRI (upper) and SBP (lower) in capsaicin-injected group (n=6) . *P<0.05, **P<0.01 (Fisher's PLSD test) .

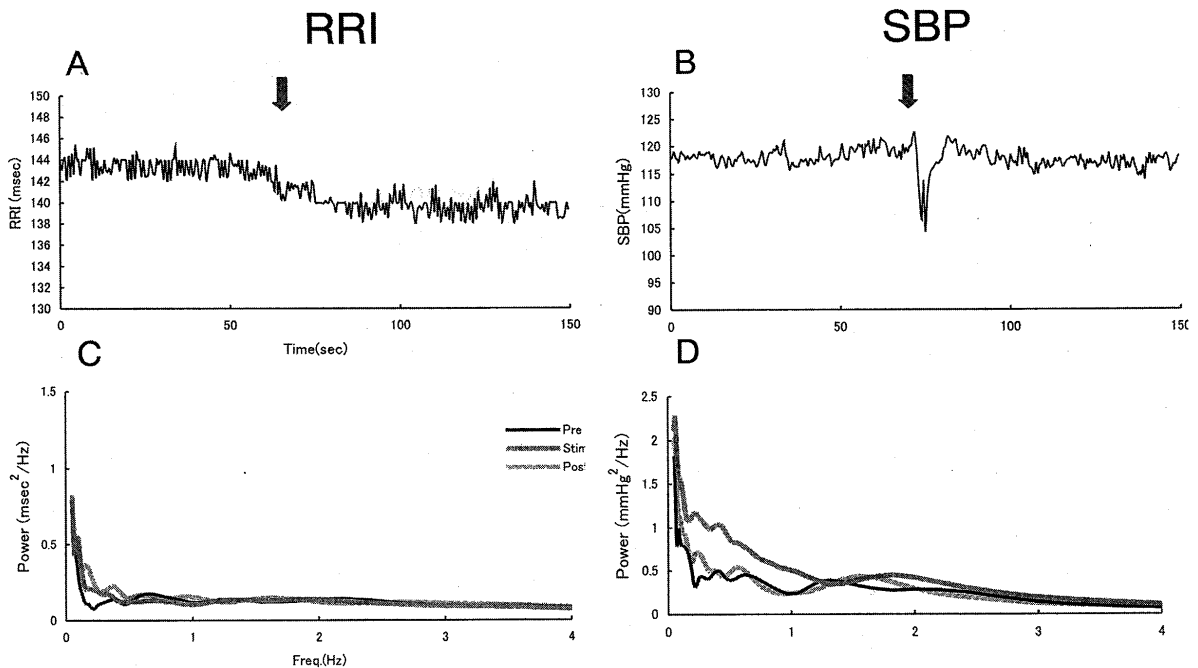


Fig. 3. Typical tracings of RRI, SBP (upper: A, B,) and each PSD (lower: C, D, average of 6 samples) obtained by pinching stimuli in untreated rats. Arrows indicate stimulating timings of pinching.

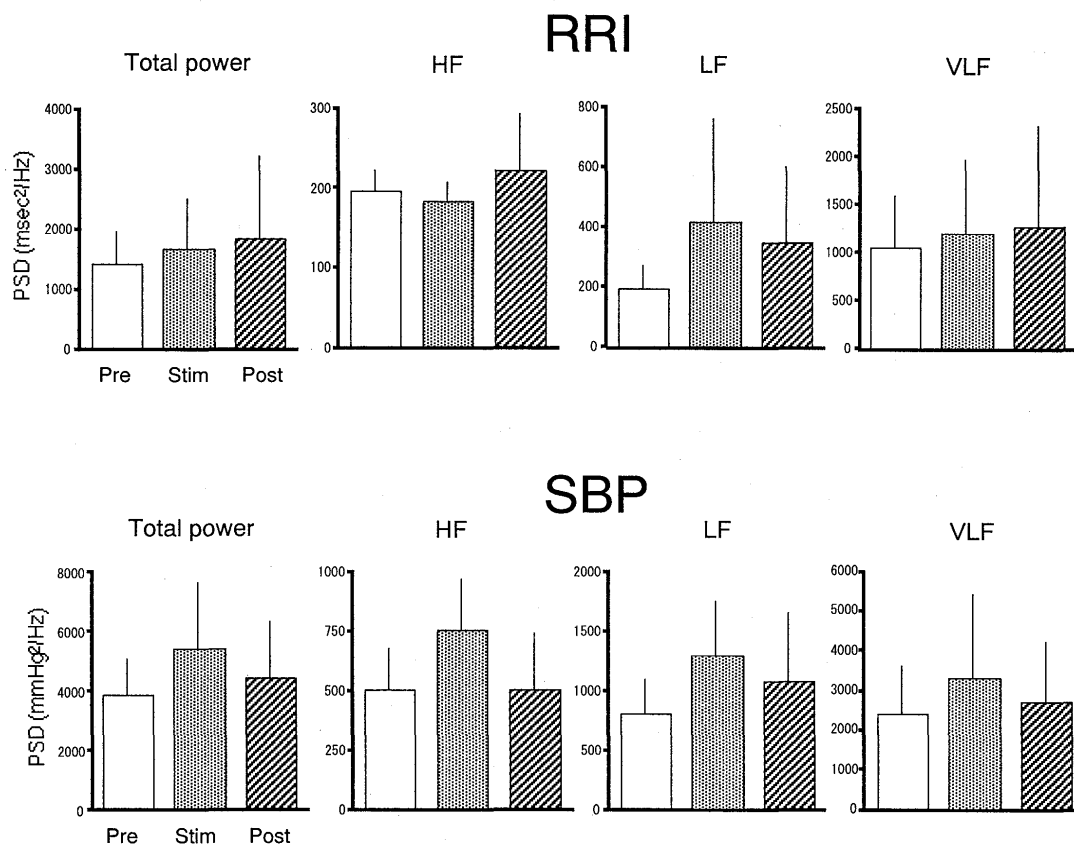


Fig.4. Comparison of PSD values of each frequency band of RRI (upper) and SBP (lower) in pinching-stimulated group (n=6) .

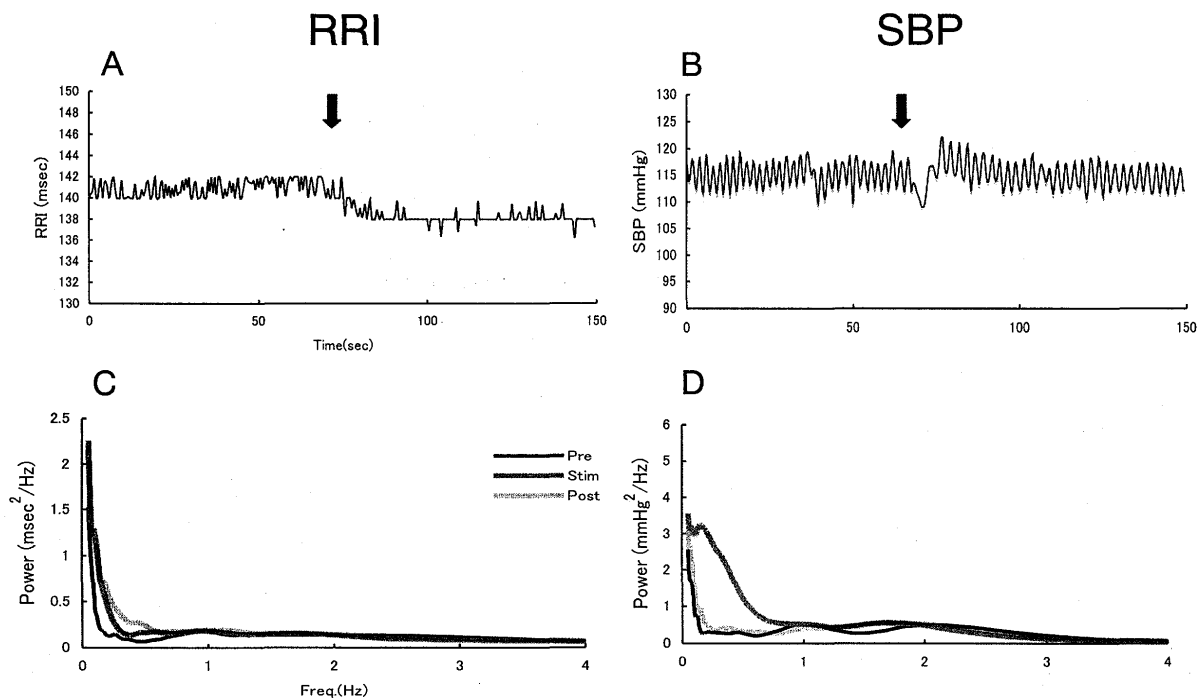


Fig. 5. Typical tracings of RR intervals, SBP (upper; A, B) and each PSD (lower: C, D, average of 6 samples) obtained by intra-arterial capsaicin in morphine (5mg/kg, s.c.) -treated rats. Arrows indicate injection timings of capsaicin.

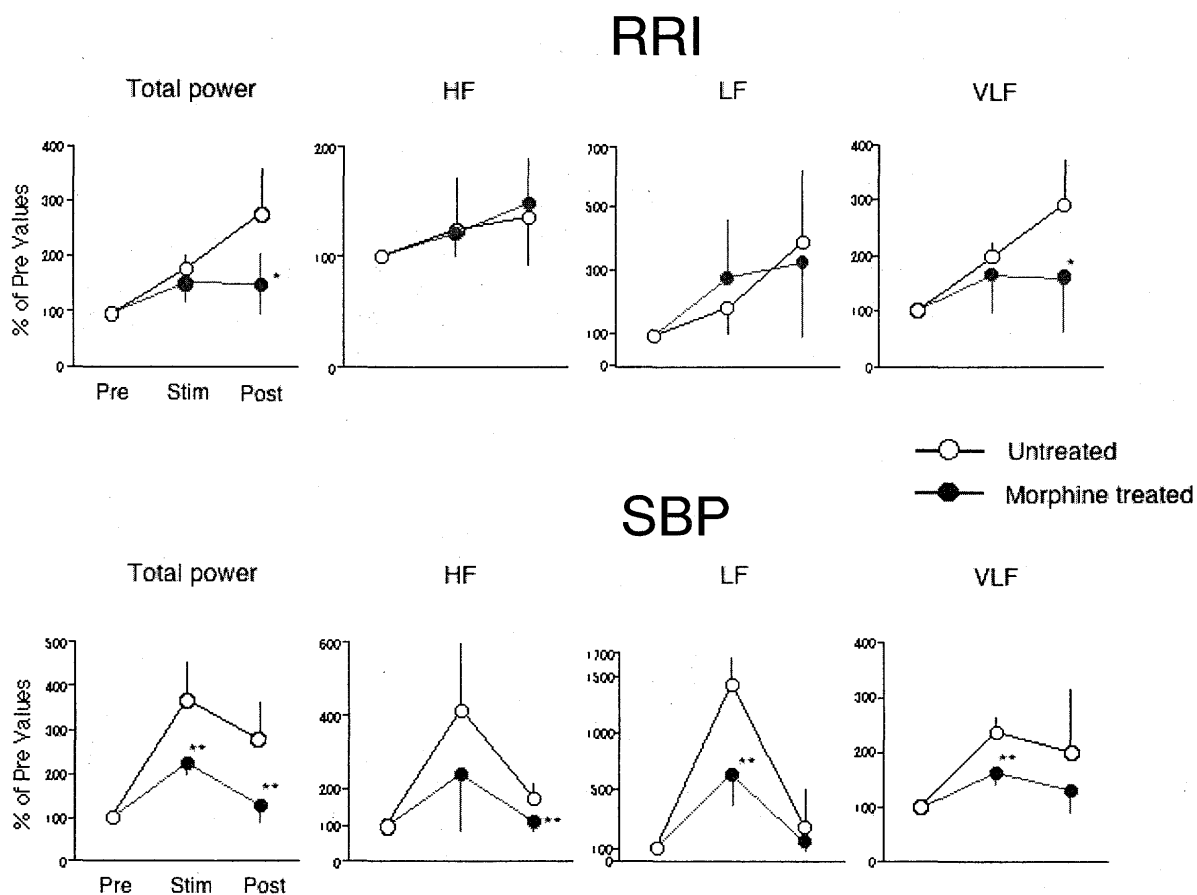


Fig.6. Effects of morphine (5mg/kg, s.c.) for PSD values of each frequency band of RRI, SBP in capsaicin-injected group. (n=6) . *P<0.05, **P<0.01 (Fisher's PLSD test) .

域ではPost群, LF帯域ではStim群ならびにVLF帯域のStim群においてPSD値の有意な減少が観察された(図6).

考 察

従来CAPは, 投与経路により心拍と血圧に与える影響が異なることが報告されてきた¹²⁾. 麻酔下の動物の末梢静脈内への投与では血圧の低下と除脈を引き起こし, 頸動脈内への投与では血圧の上昇と頻脈が惹起され, 経口投与では頻脈を誘発することが報告されている¹³⁾. 本研究では血管痛モデルにおいて, CAPの大腿動脈内注入により持続的な心電図RRIの短縮, すなわち頻脈と一時的なSBPの低下が発現することが明らかとなった. 一般的に麻酔下の動物に知覚神経への電気刺激などの強い侵害刺激を加えると心拍数の一時的減少直

後の増加と血圧の低下が観察されることはすでに周知の事実である¹⁴⁾. このような反応は迷走神経切除により心拍数は増加のみを示し, 血圧は上昇する. この事から, 強い侵害刺激は交感・副交感両神経を賦活させることが分かる. また, これらの反応は延髄レベルでの除脳動物でも観察されることから, 上位脳を介さないものであることが確認されている¹⁵⁾. さらに電気生理学的な検討から, 強い侵害刺激が心拍や血圧に与える変化は, モルヒネにより抑制されると同時にA繊維群誘発性延髄および脊髄の活動電位にはほとんど影響を与えず, C繊維群誘発活動電位のみ消失する事から, 循環器系の諸反応は末梢C繊維群が担っている事も報告されている¹⁶⁾. ところで, CAPは末梢知覚神経系のポリモーダルC繊維群に選択的に作用することが知られている¹⁷⁾. したがって, 本研究の結果も動脈内C繊維群に作用してRRIとSBPの変

化をもたらしたものと推察される。また、機械的侵害刺激のピンチングは、RRIとSBPに変化を与えたもののその程度は図4に示す通りCAPと比較して微弱であった。機械的侵害刺激の情報は主に末梢A繊維群を介して伝えられる事から¹⁸⁾、本研究の結果はその性質を反映したものと考えられる。

本研究のRRI時系列データで示すように、心拍動のリズムは一定ではなく、ゆらいでいる。心拍動は自律神経系活動の調節を受けている事から、このゆらぎは自律神経系の交感神経と副交感神経活動のゆらぎを表していることになる。通常ゆらぎ現象の観察にはゆらぎの周波数の密度、すなわち、PSDが用いられ、VLF帯域、LF帯域およびHF帯域にPSDの三相性ピークを有する連続した曲線が得られる¹⁹⁾。ヒトにおけるHF帯域は呼吸性のゆらぎで副交感神経由来であり、LF帯域は交感神経調節性圧受容器のゆらぎである。なお、VLF帯域については腎レニン-アンジオテンシン系由来のゆらぎと考えられているが²⁰⁾、未だ明確な答えは出ていない。ところで、Nagai and Nagata¹⁰⁾は覚醒ラットにおけるRRIとSBPのPSDに対する各種自律神経遮断薬の影響を検討した結果、RRIのHF帯域は副交感神経性であり、LF帯域は交感および副交感両神経性の影響を受けている事を示した。一方、SBPでは、LF帯域が交感神経活動の影響を反映している事を示唆している。本研究のウレタン麻酔ラットで得られたCAP誘発性RRIの変化では、LF帯域とVLF帯域で特に刺激1分後のPost群で刺激1分前のPre群より有意なPSD値の増大が認められたが、その要因として交感および副交感両神経活動が高まった結果発現したものと考えられる。また、本実験のSBPにおいては、HF、LFおよびVLF帯域全てにおいて刺激直後のStim群がPreもしくはPost群と比較して有意なPSD値の増大が観察されたが、この結果は明らかに交感神経活動の賦活によってもたらされた結果と推察される。しかしながら、RRIおよびSBPのVLF、HF帯域の変化についてはNagai and Nagata¹⁰⁾の結果と一致しなかった。その一因として動物の意識レベルあるいは麻酔薬の影響が想定されるが、現時点では断定できずCAP誘発の痛みによる特性も考慮に入れ、今後の課題としたい。

ところで、さらにCAPのPSD値の増大効果がモルヒネの投与によりほぼ完全に抑制された。CAPによるRRIおよびSBPのPSDの増大効果とそれに対するモルヒネの抑制作用は、CAPの末梢C繊維群に対する選択性¹⁷⁾を考慮すれば、CAP誘発性疼痛時の自律神経活動が痛みのモデルの指標として利用出来る可能性を示唆している。しかしながら、RRIとSBPのPSDの増大がトータルパワー値も含めて、前者はCAP注入後に、また後者は注入直後に増大する変化の様式が異なる事も判明した。この相違は、SBPは痛みに対して即時的な反応に、またRRIは痛みが続く持続的な情動反応に対応している事も考えられるが、前述したようにRRIは他の臓器の影響を受けている可能性もある事²⁰⁾から、VLF帯域の性質および前述した課題も含めて今後さらに痛みモデルとしての有用性について検討するつもりである。

REFERENCES

- 1) Scherrington, C.S., "The Integrative Action of the Nervous System" Yale Univ. Press, New Haven, 1906
- 2) Sherman A.D., Gebhart G.F., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **213**, 195-199 (1975)
- 3) Sato, M., Kawajiri, S., Shishido, K., Yamamoto, M., Takagi, H., *Japn. J. Pharmacol.*, **31**, 184-186 (1979)
- 4) Sato, M., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **257**, 200-212 (1982)
- 5) Donnerr, J., Lembeck, F., *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **320**, 54-57 (1982)
- 6) Lembeck, F., Donnerr, J., *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **322**, 286-289 (1983)
- 7) Cohen, H., Benjamin, J., *Auto. Neurosci.*, **128**, 1-8 (2006)
- 8) Linds, V., Wiklund, U., Sandman, P-O., Hakansson, S., *Earl. Human Develop.*, **48**, 131-142 (1997)
- 9) Ando, R., Yonezawa, A., Watanabe, C., Kawamura, S., *Method. Find.*, **26**, 109-115 (2004)
- 10) Nagai R., Nagata, S., *Jpn. J. Pharmacol.*, **72**, 355-364 (1996)
- 11) Morlet, D., Couderc, J.Ph., Touboul, P., Rubel, P., *Int. J. Bio-Med. Comput.*, **39**, 311-325 (1995)

- 12) Virus, R.R., Gebhart, G.F., *Life Sci.*, **25**, 1273-1283 (1979)
- 13) Ohnuki, K., Moritani, T., Ishihara, K., Fushiki, T., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **65**, 638-643 (2001)
- 14) Sato, A., Sato, Y., Schmidt, R.F., *J. Auto. Nerv. Syst.*, **4**, 231-247 (1981)
- 15) Sato, A., Sato, Y., Swenson, R.S., *J. Auto. Nerv. Syst.*, **12**, 175-184 (1985)
- 16) Ito, K., Nakamura, H., Sato, A. Sato, Y., *Neurosci. Lett.*, **39**, 169-173 (1983)
- 17) Kenins, P., *Neurosci. Lett.*, **29**, 83-86 (1982)
- 18) Beck, P.W., Handwerker, H.O., *Pflugers. Arch.*, **347**, 209-215 (1974)
- 19) Task, F., *Eur. Heart J.*, **17**, 354-381 (1996)
- 20) Akselrod, S., Gordon, D., Ubel, F., Shannon, D., Barger, A., Cohen, R., *Science.*, **213**, 220-222 (1981)