

〈一般研究課題〉 寒冷環境の繰り返し暴露に伴う慢性ストレスが身体運動時の
血圧応答を過剰亢進させるメカノバイオロジー機構の解明
助成研究者 中部大学 堀田 典生



寒冷環境の繰り返し暴露に伴う慢性ストレスが身体運動時の 血圧応答を過剰亢進させるメカノバイオロジー機構の解明

堀田 典生
(中部大学)

Mechanobiological mechanisms by which chronic stress associated with repeated exposure to cold environments exaggerates the blood pressure response to exercise

Norio Hotta
(Chubu University)

Abstract :

Repeated cold stress (RCS) has been reported to enhance the response to mechanical stimulus in thin-fiber muscle afferents. We hypothesized that RCS elicits muscle acidification, thereby amplifying the mechanical component of the exercise pressor reflex (the muscle mechanoreflex) through sensitizing acid-sensing ion channel 3 (ASIC3). The aim of this study was to test our hypothesis in unanesthetized decerebrated Sprague-Dawley rats. The rats were alternately exposed to cold (4 °C) and room temperatures (22 °C) for 5 days. Mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), and renal sympathetic nerve activity (RSNA) responses to passive muscle stretch were significantly greater in the RCS group compared to the control group. RCS also significantly augmented the MAP, HR, and RSNA responses to arterial injection of lactic acid, an ASIC3 agonist. Importantly, administration of APETx2, an ASIC3 inhibitor, significantly suppressed the RCS-induced augmentation in the muscle mechanoreflex. These findings suggest that sensitization of ASIC3 contributes to the RCS-induced exaggeration of the muscle mechanoreflex.

1. はじめに

ヒトは春先や初秋の気温差、夏や冬の冷暖房した室内外の移動に伴う大きな温度差などによる環境ストレスを受ける。近年、日本においては、寒暖差疲労などと知られ、自律神経異常などを含め

た慢性ストレス状態となると信じられている。

運動は薬という言葉があるように、ストレス改善に習慣的な身体運動は効果的である¹。先の自律神経異常にも効果があると考えられている²。一方で運動は諸刃の剣と揶揄されることもある。運動時は酸素需要の増加に伴い安静時と比して循環応答が増大するが、この循環応答の過剰亢進は心血管イベントの発生リスクとなるからである³⁻⁶。しかし、温度差ストレスによる自律神経異常が運動時の循環応答に影響を及ぼす影響については不明であり、温度差ストレス状態時の運動処方は慎重になるべきであろう。

間欠的に寒冷刺激を暴露する繰り返し寒冷ストレス (Repeated cold stress: RCS) は、温度差ストレスのモデルとなり得る⁷。このRCSでは、骨格筋のpH低下を引き起こし、筋機械痛覚過敏を起こすことが報告されている⁸。そこでRCSにより機械刺激に起因する骨格筋反射性循環応答(筋機械受容器反射)(図1)が亢進し、その亢進機序に、酸に感受性を持つイオンチャネルであるacid-sensing ion channel (ASIC)3が関与するとの仮説を立てた(図2)。本研究はその仮説を検証することを目的とした。

2. 試料および実験方法

2.1 動物

10から15週齢の雄性Sprague-Dawleyラット(体重305-500g)を用いた。中部大学実験動物教育研究センターの規則に従い動物を飼育した。動物は餌と清潔な水を自由に摂取できた。動物は、12時間の明暗サイクルのもと、空調の効いた部屋(22-24℃)において、1-4匹/ケージにて、実験に必要な時まで飼育された。実験終了後は、飽和塩化カリウム(4M, 2mL/kg)の静脈内注射により、人道的に安楽死させた。本研究は、中部大学実験動物教育研究センターの承認を得た動物実験計画書に基づき実施された。

2.2 実験の概要

まず、除脳動物を対象として、対照群(RCSの暴露なし)とRCS群で比較を行い、RCSによる筋機

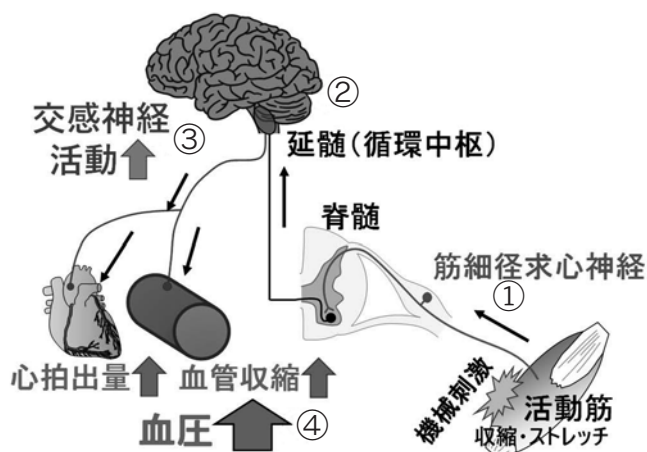


図1. 筋機械受容器反射. ①骨格筋での機械刺激が筋細径求心神経を刺激する(入力), ②中枢で統合, ③交感神経活動亢進(出力), ④血圧増加(反射の結果)

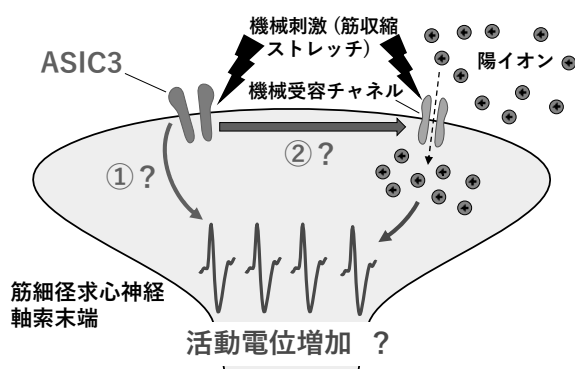


図2. RCSによる筋機械受容器反射増強の機序の仮説. RCSによるアシドーシスで①ASIC3が閾値を下げて、機械感受性を獲得する?②ASIC3が機械受容チャネルの感作に関わる? ことで1次求心神経の活動が増加し、筋機械受容器反射を増強する。

械受容器反射の増強を検討した(実験1). 次に, その機序として, RCSによるASIC3の増強を疑い, ASIC3の作動薬かつ代謝産物でもある乳酸の下肢への投与に対する昇圧応答は, RCS群が対照群に比較して増強していることを検討した(実験2). 最後にRCS群を対象に, RCSによる筋機械受容器反射の増強がASIC3の拮抗薬にて抑制されるか検討した(実験3). 別で, 除脳を施さない麻酔下の動物を対象に骨格筋組織pHを測定した(実験4).

2.3 RCS

RSCは, 先行研究⁹に従い実施された. 日中5日間, 30分毎, 室温と4℃の部屋を往復移動することで動物は寒冷環境に繰り返し暴露された(図3). 深部組織における機械痛覚過敏は, 3週間程度続くとの報告⁹に基づき, 本研究では, RCS終了日から3週までの動物をRCS群とした.

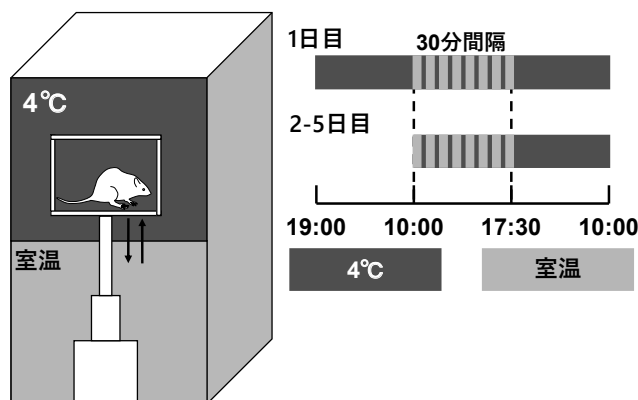


図3. 繰り返し寒冷ストレス(RCS). 動物は4℃の冷蔵庫と室温の部屋を, 日中(10:00 AMから17:30 PMまで)30分毎自動で行き来する. それ以外の時間帯は4℃の環境で過ごす. これを5日間実施した.

2.4 実験動物の外科的処置

およそ全ての外科的処置は先行研究^{10,11}に従った. 動物を1~4% イソフルラン(100%酸素中)で麻酔をかけた. 動物は挿管の後, 実験動物人工呼吸器を用いて機械的に換気した. 体液バランスの安定化とベースライン動脈血圧(Arterial blood pressure: ABP)の維持を目的に, 炭酸水素ナトリウム溶液を頸静脈から連続注入した. 以下に示す除脳を施すまで, 動物の尾をつまむことで麻酔の深度が適切か否かを常に確認した.

圧力トランスデューサーに接続した左総頸動脈カテーテルを用いてABPの測定をした(図4). 針電極を使用して心電図を記録した(図4). 腎交感神経活動(Renal sympathetic nerve activity: RSNA)を記録するために, 左腎神経を双極電極に取り付けた(図4). 神経と電極はシリコン接着剤で覆うことで絶縁と固定を行った. RSNAの測定手技はABPや心拍数のそれよりも困難であり, ラットの体動などにより電極が外れることもあるため, RSNAが測定できなかった場合は, ABPと心電図の測定のみ行うこととした. 注射した薬物を後肢に閉じ込めることを目的に, 開閉操作可能なオクルーダーを大動脈分岐部直上の腹部大動脈と下大静脈の周囲に設置した(図4).

除脳の目的は, 自律神経系に影響する麻酔を使わずに実験を行うためであった. 脳出血を最小限に抑えるため, ABP測定とは反対側の総頸動脈を縫合糸にて結紮した. 動物を脳定位固定装置に乗せ, 除脳した. イソフルラン麻酔は除脳後すぐに停止した. 脳浮腫を抑えるため, デキサメタゾン(0.2mg)を静脈内投与した. 除脳後少なくとも1時間の回復期間の後に, 動物の尾をつまむことで感覚を失っていることを確認して実験を実施した.

2.5 実験プロトコル

筋機械受容器反射の評価のために, 腓腹筋のストレッチを実施した(図4). ベースラインの安静時張力を70~100gに設定した. 事前に, 脛骨神経を30秒間電気刺激して最大筋収縮させて張力曲

線を記録した。そして、その最大張力曲線と同様の機械的刺激を与えるように30秒間のストレッチを実施した(図4)。この操作は、実験3においては、ASIC3拮抗薬(APETx2)の動注前後に行われた。

実験2と3の作動薬(24mM乳酸)と拮抗薬(100 μ g/kg APETx2)の動注は、シリンジにて0.1mLを10秒間かけて行った(図4)。動注直前に腹部の血管を閉鎖し、薬剤が下肢に留まるように努めた。

すべての実験を行った後、臭化ヘキサメトニウム(60 mg/kg)を静脈内投与し、RSNA信号が減弱することを確認することで、節後性腎交感神経線維から記録の証拠とした。飽和塩化カリウム(4M, 2mL/kg)の静脈内注射により、人道的に安楽死させた後、30分間にわたりRSNAバックグラウンドノイズを測定した。

実験4の腓腹筋組織pHの測定は、除脳をせず、イソフルラン麻酔下にて針型pH電極を利用して行った。動物の尾をつまむことで麻酔の深度が適切か否かを常に確認した。pHが安定するまで最低30分は電極を組織に固定した。実験4終了後は、炭酸ガスにて人道的に安楽死させた。

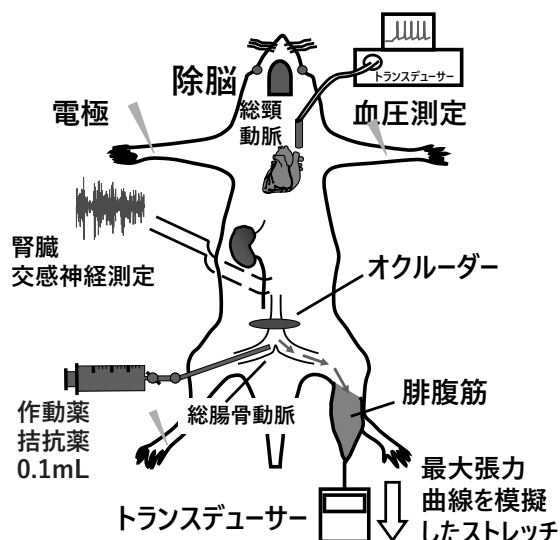


図4. プレパレーション.

2.6 統計

シャピローウィルク検定でデータの分布を評価した。正規分布が仮定された場合、対応のあるt検定、あるいは、対応のないt検定(等分散を仮定しない)を用いた。正規分布が仮定されない場合、ウィルコクソン符号付順位和検定、あるいは、マンホイットニU検定を用いて解析した。すべての値は平均値と標準偏差で示した。

3. 実験結果

3.1 筋機械受容器反射 (対照群 vs RCS群)

図5は対照群とRCS群における典型的な応答を示している。昇圧応答はRCSにより高まっている

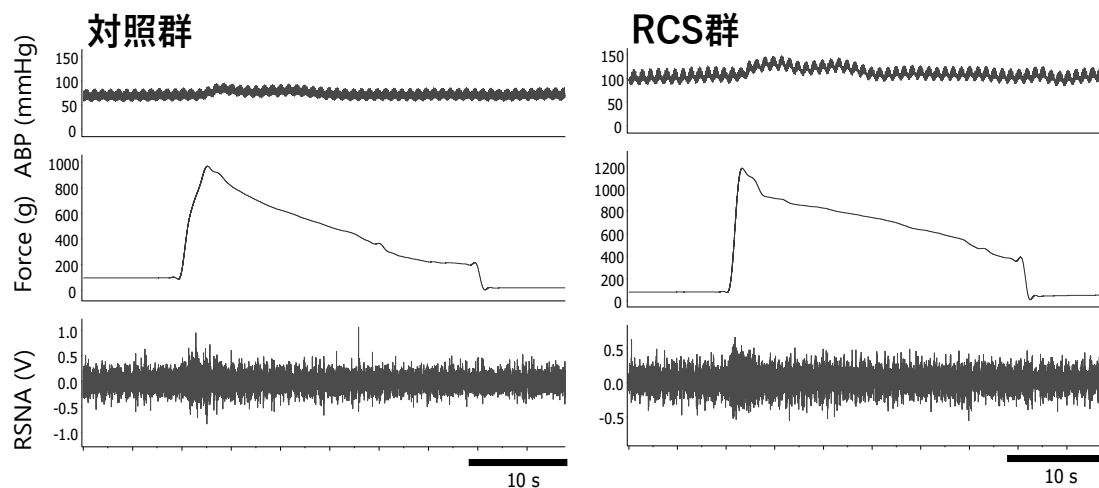
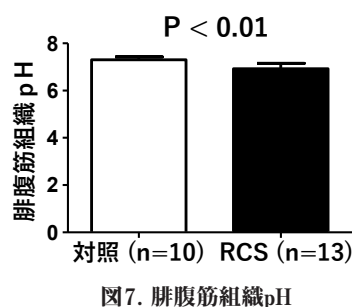


図5. 典型的な応答. ABP; 動脈圧, Force; ストレッチによる張力, RSNA; 腎臓交感神経活動, RCS; 繰り返し寒冷ストレス.

ことが分かる。実際、心拍数(Heart rate: HR), 平均血圧(Mean blood pressure: MBP), RSNA応答はRCS群にて有意に高値を示した(図6)。ストレッチを生じさせるための張力には群間差は認められなかった(図6)。以上より、RCSにより筋機械受容器反射が増強されることが示唆された。

3.2 腓腹筋組織pH

酸により筋細径求心神経は機械感作されることの報告がある¹²。そこで、RCSにより骨格筋組織のpH低下を疑い、組織pHを両群間にて比較した。その結果、RCS群の方が対照群と比較して有意に低値を示したことから(図7)、RCSにより骨格筋がアシドーシスになっていることが示唆された。



3.3 乳酸動脈内投与に対する昇圧応答(対照群 vs RCS群)

筋細径求心神経上のチャンネルにおいて、酸に感受性をもつ代表的な分子はASIC3である。そこでRCSが引き起こしたアシドーシスにより、ASIC3が感作していると予想した。そこでASIC3の作動薬である乳酸を下肢動脈に投与した際の昇圧応答を観察した。HR, MBP, RSNA応答は、対照群と比べてRCS群が有意に高値を示したことから(図8)、RCSによりASIC3が感作されていることが示唆された。

3.4 RCS群に対するAPETx2動脈内投与前後の筋機械受容器反射(投与前 vs 投与後)

ASIC3の感作が、RCSによる筋機械受容器反射増強に関わっているとすれば、ASIC3の拮抗薬によりRCSによる筋機械受容器反射増強は抑制されるはずである。そこで、RCS群を対象に、APETx2動脈内投与前後の筋機械受容器反射を評価した。その結果、ストレッチの張力はAPETx2動脈内投与前後にて有意な差は認めれないにも関わらず、HR, MBP, RSNA応答は有意に低下した(図9)。この結果から、RCSによる筋機械受容器反射増強の機序に、少なくともASIC3の感作が関与していることが示唆された。

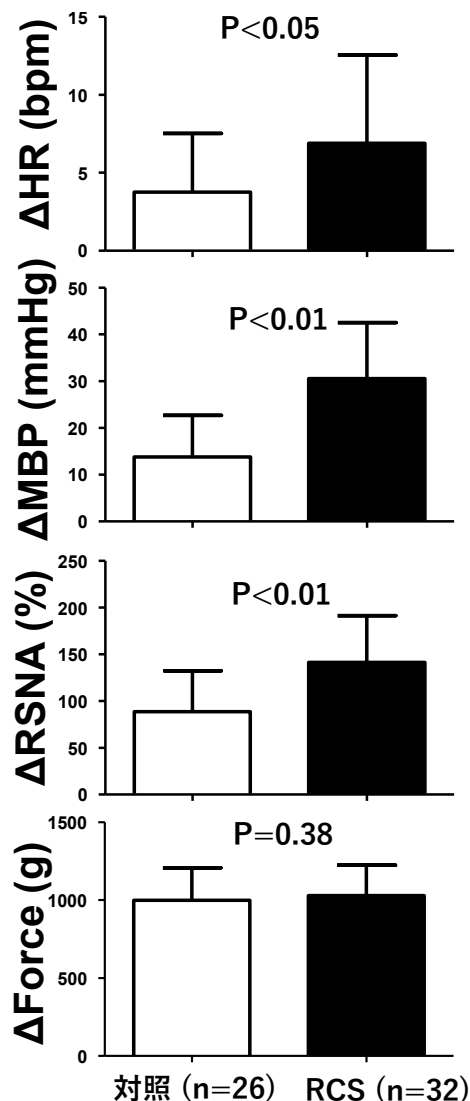


図6. 筋機械受容器反射の群間比較。値はベースラインからの差分。HR; 心拍数, MBP; 平均血圧, RSNA; 腎臓交感神経活動(対照群では16例, RCS群では20例の測定に成功), Force; ストレッチによる張力, RCS; 繰り返し寒冷ストレス。

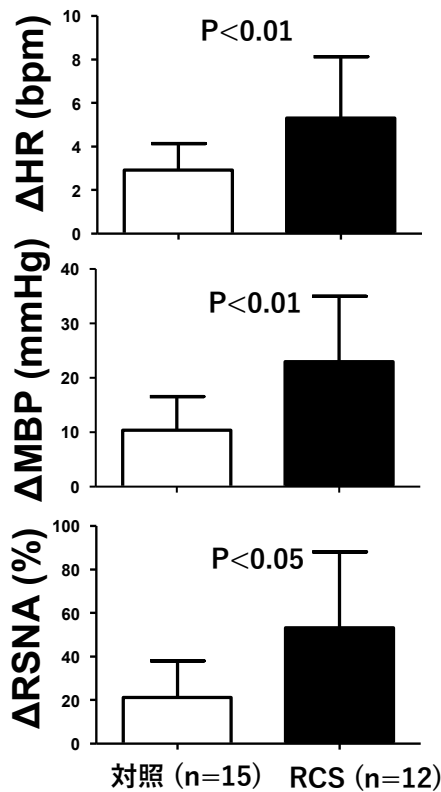


図8. 乳酸動脈内投与に対する昇圧応答の群間比較. 値はベースラインからの差分. HR; 心拍数, MBP; 平均血圧, RSNA; 腎臓交感神経活動(対照群では13例, RCS群では10例の測定に成功), RCS; 繰り返し寒冷ストレス.

4. まとめ

RCSにより筋機械受容器反射は増強する. その機序として, 少なくとも骨格筋アシドーシスやそれに起因するであろうASIC3の感作が少なくとも関与している.

参考文献

- Greaney JL, Darling AM, Saunders EFH, Almeida DM. Daily Stress and Microvascular Dysfunction: The Buffering Effect of Physical Activity. *Exerc Sport Sci Rev.* 2023;51.
- de Paula T, Neves MF, da Silva Itaborahy A, Monteiro W, Farinatti P, Cunha FA. Acute Effect of Aerobic and Strength Exercise on Heart Rate Variability and Baroreflex Sensitivity in Men With Autonomic Dysfunction. *J strength Cond Res.* 2019;33:2743–2752.
- Mittleman MA, Maclure M, Tofler GH, Sherwood JB, Goldberg RJ, Muller JE. Triggering of acute myocardial infarction by heavy physical exertion. Protection against triggering by regular exertion. Determinants of Myocardial Infarction Onset Study Investigators. *N Engl J*

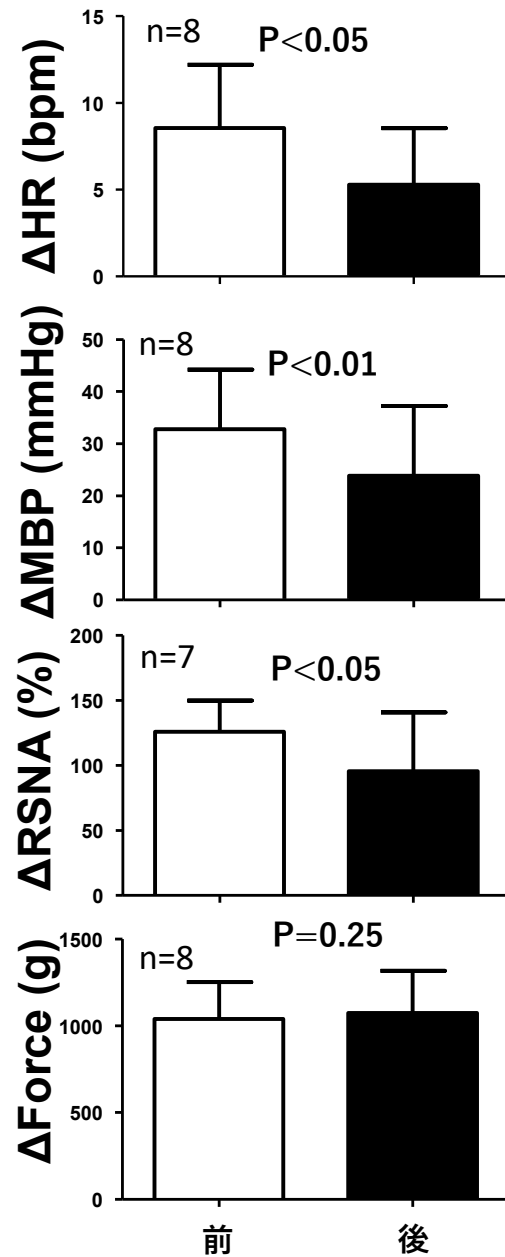


図9. RCS群におけるASIC3拮抗薬の動脈内投与前後の運動昇圧反射比較. 値はベースラインからの差分. HR; 心拍数, MBP; 平均血圧, RSNA; 腎臓交感神経活動(1例測定できなかった), Force; ストレッチによる張力, RCS; 繰り返し寒冷ストレス.

Med. 1993;329:1677–1683.

4. Hoberg E, Schuler G, Kunze B, Obermoser A-L, Hauer K, Mautner H-P, Schlierf G, Kübler W. Silent myocardial ischemia as a potential link between lack of premonitoring symptoms and increased risk of cardiac arrest during physical stress. *Am J Cardiol.* 1990;65:583–589.
5. SA W, RS B, AR S, RF R, S M. Exercise blood pressure and future cardiovascular death in asymptomatic individuals. *Circulation.* 2010;121:2109–2116.
6. Kario K. Morning surge in blood pressure and cardiovascular risk: Evidence and perspectives. *Hypertension.* 2010;56:765–773.
7. Yoneda R, Hata T, Kita T, Kvetňanský R, McCarty R, Axelrod J. SART stress-induced pathophysiological functions and effects of neurotrophin. In: *Stress: Neuroendocrine and molecular approaches, Vols. 1 & 2.* Gordon & Breach Science Publishers; 1992. p. 767–789.
8. Wakatsuki K, T.-Uchimura Y, Matsubara T, Nasu T, Mizumura K, Taguchi T. Peripheral nociceptive mechanisms in an experimental rat model of fibromyalgia induced by repeated cold stress. *Neurosci Res.* 2021;162:22–30.
9. Nasu T, Taguchi T, Mizumura K. Persistent deep mechanical hyperalgesia induced by repeated cold stress in rats. *Eur J Pain.* 2010;14:236–244.
10. Smith SA, Mitchell JH, Garry MG. Electrically induced static exercise elicits a pressor response in the decerebrate rat. *J Physiol.* 2001;537:961–70.
11. Mizuno M, Mitchell JH, Crawford S, Huang C-L, Maalouf N, Hu M-C, Moe OW, Smith SA, Vongpatanasin W. High dietary phosphate intake induces hypertension and augments exercise pressor reflex function in rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2016;311:R39–R48.
12. Hotta N, Kubo A, Mizumura K. Chondroitin sulfate attenuates acid-induced augmentation of the mechanical response in rat thin-fiber muscle afferents in vitro. *J Appl Physiol.* 2019;126:1160–1170.