

厚生科学研究費補助金  
(長寿科学総合研究事業)

研究報告書

高齢者の慢性痛と痛覚伝導路の  
可塑性に関する研究  
(H11-長寿-006)

主任研究者 神田 健郎

(財) 東京都老人総合研究所 中枢神経部門

# I 総括研究報告書

## 高齢者の慢性痛と痛覚伝導路の可塑性に関する研究

主任研究者 神田健郎 東京都老人総合研究所 研究部長

### 研究要旨

ラットを用いて痛覚伝導路の老化に伴う変化を電気生理学的・組織学的に検索した。脊髄後角の侵害受容ニューロンの活動は、自発発射および末梢への侵害刺激に対する応答共に高齢ラットで亢進していることが明らかになった。この原因に下行性抑制系の機能不全があることを示した。侵害刺激を繰り返すことで起こる反応の増強現象が高齢ラットでは成熟ラットに比べて低頻度刺激で起こり、痛覚伝導路の可塑性変化が起こり易くなっていることが示唆された。また、痛みの自律機能への影響を検討するため体性-心臓交感神経反射の機構を調べ、脊髄成分はモルヒネによって抑制され、上脊髄性成分は逆に促進されることを明らかにした。

### 分担研究者

野口光一 兵庫医科大学 教授  
岩田幸一 大阪大学 助教授  
鈴木敦子 東京都老人総合研究所 主任  
研究員

### A. 研究目的

高齢者の慢性痛の特性をニューロンおよびニューロン回路の活動から究明すると共に、その自律機能・運動機能への影響についても明らかにすることによって、高齢者の痛みに対する治療に資することを目的としている。痛みは精神的にも肉体的にも人を疲弊させる。痛みを適当にコントロールすることが出来れば、生活の質を高め、病気からの回復を早める上でも極めて有用である。

高齢者では関節痛・ヘルペス後神経痛など慢性的な痛みを訴える者が多いが、これまでの研究は、精神物理学的方法を用いた急性痛についてのものが殆どである。痛覚に対する感受性は高齢者でも殆ど変わらないかやや低

下しているとするの報告が多く、その為か、痛覚伝導路の加齢に伴う変化についての研究はこれまで殆どなされてこなかった。我々は脊髄侵害受容ニューロンの活動が高齢ラットで亢進していることを見だし、痛覚伝導路も個体の老化に伴って変化していることを示した。本年度は研究初年度であり、先ずこの予備実験段階で示された脊髄後角の侵害受容ニューロンの活動特性の変化を確認すると共にその原因の解明を電気生理学的（1）および組織学的（2）アプローチで試みた。また、侵害受容ニューロンの過活動から予想される痛覚伝導路の可塑性変化が高齢ラットでは起こり易くなっている可能性について検討した（3）。更に、侵害刺激の自律機能への影響の加齢変化を検討するため、体性-心臓交感神経反射の機構を成熟ラットで調べた（4）。

### B. 研究方法

実験にはフィッシャー系またはウイスター系の雄ラットを用い、成熟群・老齢群から得

られたデータを比較検討した。(1) 脊髄後角侵害受容ニューロンの電気生理学的研究では、成熟群(7-9ヶ月齢)と老齢群(30-34ヶ月齢)の2群を用いた。ペントバルビタール麻酔下に腰髄を露出し、後角表層から単一ニューロン活動を細胞外記録した。末梢皮膚に機械および温度刺激を加え、受容野・発射特性調べた。更に、後角ニューロン活動への上位中枢の影響を調べるため、第一胸髄レベルで脊髄表層からリドカインを投与し、下行路のブロックを行った。(2) 脊髄後角侵害受容ニューロンの活動の老化に伴う変化の原因を組織学的に検索するためには、成熟および老齢ラットをペントバルビタールで深く麻酔し、4%パラホルム溶液にて灌流固定した。L4-L6のレベルで脊髄を取り出して後固定した後、30  $\mu$ mの前額断切片を作成した。切片は5-HT(serotonin)およびDBH(dopamine-hydroxylase)の免疫組織染色した。100 x 200  $\mu$ mの範囲を脊髄後角の表層(I-II層)および深層(III-IV層)から抽出し、NIH imageを用いて免疫陽性線維の占める面積を求めた。また、膝関節内または足底皮下にCFA(complete Freund adjuvant) 0.05 ml注射し、炎症モデルを作成した。24時間後、灌流固定し上記の免疫組織化学法にて腰髄後角におけるc-fos発現を観察した。(3) 侵害刺激の反復による反射増強に関する実験では、成熟群:12~15ヶ月齢と高齢群:29~30ヶ月齢の群を用い、ハロセン麻酔下に実験を行った。腓腹神経、足蹠神経を末梢で切断し、中枢端を電気刺激した。誘発された屈曲反射による大腿屈筋の筋活動をワイヤー電極で導出・記録した。反復刺激による反射増強の有無・程度を5連発刺激における刺激間隔を3、5、8、10、12、15または20秒に変化させて調べた。(4) 侵害刺激の自律機能への影響については、Wistar系雄性ラットを用い、ウレタンで麻酔、人工呼吸下に実験を行った。後肢脛骨神経(非分節性の求心性神経)および第3-4肋間神経(分節性

の求心性神経)を末梢で切断し、中枢端を電気刺激した。心臓交感神経は、第二肋骨を部分切除し、星状神経節から出て心臓に向かう枝をできるだけ心臓の近傍で切断し、中枢端から活動を導出した。脊髄切断の影響についても調べた。

### C. 研究結果

(1) 全部で104個の侵害受容ニューロン活動を若齢群(WDR: 25, NS: 13)および老齢群(WDR: 47, NS: 19)の脊髄後角から記録した。熱刺激に対する応答性は老齢群の方が若齢群よりも有意に高かった。また、老齢ラットから記録された多くの侵害受容ニューロンは熱刺激だけでなく冷刺激にも反応した(老齢群: 28%、若齢群: 12%)。WDRニューロンの受容野高閾値領域は老齢群の方が有意に広いのに対し、低閾値領域は逆に若齢群の方が広い値を示した。また、NSニューロンは老齢群の方が有意に広い受容野を有していた。自発発射頻度も老齢ラットの方が有意に高かった。脊髄ブロックにより、若齢群では熱および機械刺激に対する応答、自発発射が有意に増加したのに対し、老齢群ではブロックの影響はほとんど認められなかった。(2) 脊髄後角で検出された5-HTおよびDBH陽性線維の分布密度は脊髄表層および深層で、老齢群の方が若齢群よりも統計学的に有意に低下していた。特に5-HT線維の減少が著しかった。また、老齢ラットでは5-HT及びDBH陽性の異常神経終末が観察された。末梢炎症モデルで脊髄後角表層ニューロンにおけるc-fos発現数が、明らかに老齢ラットにおいて若齢ラットに比較して増加していた。(3) 1 ms, 200  $\mu$ A以上の刺激でC線維由来の活動電位および反射性の筋活動が記録出来ることを確認した。刺激間隔が短いと5連発の1発目から回を追う毎にほぼ直線的に反応の大きさが増大した。直線回帰し、その勾配をWind-upの強さとした。

刺激間隔が長くなるに従い Wind-up 強度は小さくなるので、この刺激間隔と Wind-up 強度との関係から回帰直線を求め、その X 軸との交点を Wind-up 現象を起こし得る最大の刺激間隔と考え、これを Wind-up の刺激間隔閾値と定義した。刺激間隔閾値は高齢ラットで  $26.5 \pm 4.6$  s と若齢ラットの  $16.1 \pm 2.0$  s に比べて有意に長かった。一方、Wind-up 強度には老若間で差は認めなかった。(4) 脛骨神経を A  $\delta$  線維の閾上および C 線維の閾上の強度での刺激で心拍数は増加し、心臓交感神経にも反射性の電位が出現した。急性脊髄ラットではこの反応は見られないので上脊髄性と考えられ、モルヒネの静脈内投与によって著しく増強し、ナロキソンで拮抗された。一方、第 3-4 肋間神経の C 線維閾上の強度での心拍数は増加し、心臓交感神経には 3 つのコンポーネントの反射電位 (脊髄性の A (A1) 反射、上脊髄性の A (A2) 反射と脊髄性の C (C1) 反射が重なったもの、上脊髄性の C (C2) 反射) が誘発された。最初の 2 つのコンポーネントはモルヒネにより有意に抑制されたが、潜時の長い上脊髄性の C 反射には明らかな影響は認められなかった。この抑制効果はナロキソンにより拮抗された。

#### D. 考察

ヒトに於ける痛覚についての従来の研究では、高齢者でも痛覚閾値には殆ど変化が無いが、やや低下する程度で、大きな変化は無いとされてきた。また、SP および CGRP 含有神経線維の脊髄内分布を免疫組織学的にラットで調べた研究では、これらの免疫陽性神経ターミナルは高齢動物に於いてやや減少する傾向があると報告されている。末梢神経に於いても無髄線維は有髄線維と異なり、老化に伴う数の減少の程度は小さく、また、伝導速度も良く維持されていることが報告されている。本研究に於ける結果はこれら従来の報告から予測されるものと異なり、高齢ラットの脊髄後

角侵害受容ニューロンの活動は自発発射も末梢の侵害刺激に対する反応も共に亢進していた。この脊髄後角に於ける侵害受容ニューロン活動に見られる脊髄内侵害情報伝達系の亢進は、慢性炎症モデルに於ける最初期遺伝子発現に於いても観察・確認された。脊髄侵害受容ニューロンの活動亢進は、既に述べたこれまでの研究から末梢由来とは考え難い。本研究で下行性抑制系として知られるセロトニンおよびノルアドレナリン陽性線維の脊髄後角内分布が高齢ラットに於いて成熟ラットに比べて有意に減少していることが明らかになった。従って、下行性抑制系の機能不全が高齢ラットに於ける脊髄侵害受容ニューロンの活動亢進の主要な原因になっている可能性が高い。高齢ラットに於ける下行性抑制系の機能不全は、下行路の働きを麻酔薬でブロックした時の侵害受容ニューロンの活動への影響からも支持された。

末梢の C 線維を刺激して誘発される脊髄後角のニューロン活動や屈曲反射は、刺激が短時間の内に繰り返されると次第に増強する。この現象は wind-up として知られており、慢性的な痛みの発症に関係しているとされる痛覚伝導路の可塑性変化を起こす機序と共通のものを含んでいると考えられている。本研究で、高齢ラットではより低い頻度の刺激で wind-up が引き起こされることが明らかになり、高齢者では痛覚伝導路の可塑性変化が起こり易くなっていることが示唆された。今後、下行性抑制系の機能不全とそれによってもたらされているであろう脊髄後角侵害受容ニューロンの活動亢進が wind-up が起こり易くなっている事とどの様に係わっているかを明らかにしている必要がある。更に、wind-up には NMDA 受容体が関与していることが報告されているので、伝達物質や受容体の面からも検討する事が重要となろう。

末梢の A  $\delta$  および C 線維刺激によって引き起こされる心拍数の増加には交感神経の反

射性活動亢進が関与している。この体性-心臓反射を引き起こすニューロン回路は複雑で、脊髄性と上脊髄性とが存在し、モルヒネは体性感覚の入力部位に依存して体性-心臓反射を増強したり抑制することを明らかにした。脊髄のレベルでは抑制するが、上脊髄のレベルでは増強する。後者は脳幹、おそらくは延髄の孤束核や吻側腹外側部に作用して、体性-心臓交感神経反射の抑制性経路を抑制して、増強作用を起こしていると考えられる。このため、モルヒネの体性-心臓交感神経反射に対する効果は、特に中枢神経無傷時にみられる第3-4肋間神経刺激によって誘発される心拍数増加反応のように、脊髄性のコンポーネントと上脊髄性のコンポーネントが混じった場合には、複雑である。本実験ではモルヒネを

投与したが、中枢神経系で内因性のオピオイドが分泌されて鎮痛効果を持つことが知られている。後肢の感覚入力の際に、内因性オピオイドが分泌され、心臓交感神経活動が反射性に増強されて、循環機能の維持に役立つ可能性が考えられる。

## E. 結論

個体の老化に伴って脊髄の痛覚伝導路にも大きな変化が起こってくる。特に、下行性抑制系の機能低下により脊髄後角侵害受容ニューロンの活動が高まっていることが注目される。更に、高齢者で慢性痛が増える背景に、高齢者の脊髄では痛覚伝導路に於ける可塑性変化が起こり易い状態になっている可能性がある。

## Ⅱ 分担研究報告書

## 目 次

- |                                       |                 |    |
|---------------------------------------|-----------------|----|
| 1. 老齡ラットにおける脊髄後角侵害受容ニューロンの電気生理学的性質の研究 | 岩田 幸一 . . . . . | 1  |
| 2. 高齡者の痛覚伝導路における可塑性変化についての分子生物学的研究    | 野口 光一 . . . . . | 7  |
| 3. 脊髄侵害受容ニューロンの活動と防御反射機構の加齡変化         | 神田 健郎 . . . . . | 11 |
| 4. 侵害性刺激による心拍数増加反応の加齡変化               | 鈴木 敦子 . . . . . | 15 |



## 老齢ラットにおける脊髄後角侵害受容ニューロンの電気生理学的性質の解析

分担研究者 岩田幸一 大阪大学歯学部 助教授

### 研究要旨

従来の多くの研究により若齢者に比べ、高齢者では慢性痛を有する患者が多いことが明らかにされている。さらに、高齢者は若齢者に比べて、痛覚に対する耐性が弱いとされ、老化が痛覚受容に関与する神経回路網に対し、何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆されている。本研究では若齢および老齢ラットの腰髄後角から単一ニューロン活動を記録し、その電気生理学的性質を詳細に調べた。その結果、老齢ラットの腰髄後角に分布する侵害受容ニューロンは若齢ラットに比べ熱刺激に対する応答性および自発活動が有意に高い値を示していた。また、侵害刺激に対する逃避反射を検索した結果、老齢ラットの逃避反射の潜時は若齢ラットに比べて有意に短いという結果が得られた。このような老齢ラットの逃避反射の亢進にはおそらく脊髄後角ニューロン活動性の増強が関与すると考えられる。脊髄の局所麻酔により下行路を遮断すると、若齢ラットにおいては脊髄後角侵害受容ニューロンの活動性が増加する。これに対し老齢ラットにおいては脊髄ブロックの効果は明らかではなく、下行路遮断による侵害受容ニューロン活動の変化は僅かであった。このような結果から、老化に伴う脊髄後角の侵害受容ニューロンの興奮性増加には中枢神経系における下行路の機能低下が重要な働きを有する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

従来の研究から高齢者は若齢者に比べ、慢性痛を発現する頻度が高いことが知られている。また、高齢者では痛覚に対する耐性が弱く痛みを強く感じると言われている。これに対し、動物を用いた実験において、老齢ラットでは痛覚閾値の低下が認められるという報告や、侵害情報の伝達において重要な働きを有する無髄線維は老化に伴って形態および数の変化が認められるなどと報告されている。このようなことから、老化は痛覚情報伝達系に対し様々な変化を誘導すると想像される。しかし、中枢神経系において、痛覚伝達系に

いかなる変化が起こるかについては全く不明である。そこで、我々はまず脊髄後角に分布する侵害受容ニューロン活動に対する老化の影響について検索することを計画した。さらに、老齢ラットの脊髄後角ニューロン活動を変調する中枢メカニズムを明らかにするため、下降性抑制系をブロックし後角ニューロン活動がいかなる影響を受けるかについて検索を行った。さらに、これらの神経機構の変化が実際の痛覚逃避行動に与える影響を調べるために、熱刺激に対する逃避反射に対する老化の影響についても調べた。

## B. 研究方法

実験には Fischer 系雄性ラットを用いた。ラットを年齢に従って、若齢群：7-9 カ月齢、老齢群：30-34 カ月齢の 2 つのグループに分け実験に用いた。本研究は大阪大学歯学部実験動物委員会の許可を得て、国際疼痛学会のガイドラインに従って行われた。

行動テスト：ラットの後足に対する侵害的熱刺激により誘発される逃避反射の潜時を計測した。本実験では逃避反射を測定する前に、動物を 2 週間ハンドリングし、逃避行動測定用ケージの環境に慣れさせた。ガラス板の上に動物が静かに座ってられるように訓練した後、ガラス板を介してラットの足底皮膚上に放射熱を与えた。放射熱による刺激は 15 分おきに左右の足に 3 回ずつ与えた。また、刺激温度を一定にするために、室温を常に 25°C に保った。

脊髄後角ニューロン活動記録：ラットを pentobarbital Na (35-50mg/kg,i.p.) で麻酔し、脳定位固定装置に装着した。腰髄を露出し後角表層から単一侵害受容ニューロン活動を記録した。ニューロン活動記録中動物を臭化パンクロニウム(2mg/kg/h,i.v.) で非動化し人工呼吸を施した。実験中は心電図および呼気 CO<sub>2</sub> 濃

度を持続的にモニターし、必要に応じて麻酔薬を追加した。さらに直腸温度をモニターし、動物の体温をヒートパッドにて一定に保た。末梢皮膚に対する機械刺激および温度刺激により脊髄後角ニューロンの受容野および電気生理学的性質を同定した。ニューロン活動記録終了後、20  $\mu$  A の直流電流を 10 秒間、電極先端より通流し、記録部位にリージョンを作った。実験終了後、動物を灌流固定し記録部位を組織学的に同定した。

脊髄ブロック：脊髄後角に分布する侵害受容ニューロンの電気生理学的性質を同定した後、第一胸髄 (Th 1) レベルで脊髄表層に 10 % リドカインを投与し下行路をブロックした。麻酔作用の程度をモニターするために、rostroventral medulla (RVM) の電気刺激により第五腰髄 (L5) 表層から記録される集合電位を記録した。延髄脊髄路ニューロンの活動状態を集合電位の振幅の変化から算出し、集合電位がほとんど消失した時点を脊髄がブロックされたものと判定した。麻酔薬を投与してから 30 分後に末梢受容野に機械および温度刺激を与え、侵害受容ニューロンの反応性の変化を検索した。

## C. 研究結果

侵害刺激に対する逃避行動の計測：ラットの足底皮膚上に放射熱刺激を与え、その時に誘発される逃避反射の潜時を計測した (Fig.1)。その結果、老齢群 (Mean  $\pm$  S.D.: 6.40  $\pm$  0.17 s, n=20) の方が若齢群 (7.31  $\pm$  0.19 s, n=20) に比較して、有意に短い値を示した (p<0.05)。また、若齢ラットでは熱刺激により多くの liking behavior が誘発されたが、老齢ラットにおいて liking behavior の出現率は約 50 % であった。

脊髄後角侵害受容ニューロンの活動様式：全部で、104 個の侵害受容ニューロン活動を若齢群 (WDR: 25, NS: 13) および老齢群

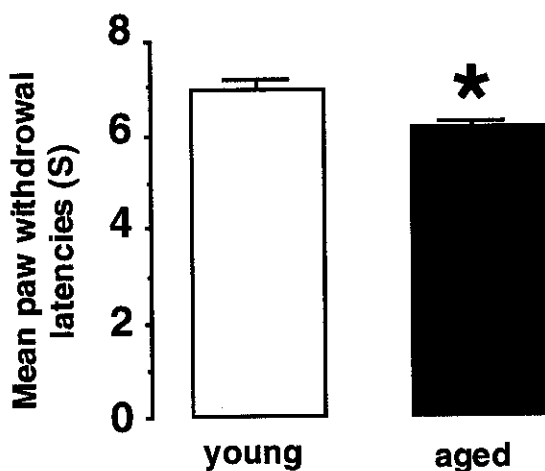


図 1. 若齢および老齢ラットの足底皮膚に与えた熱刺激により誘発された逃避反射の潜時 \* : p < 0.05

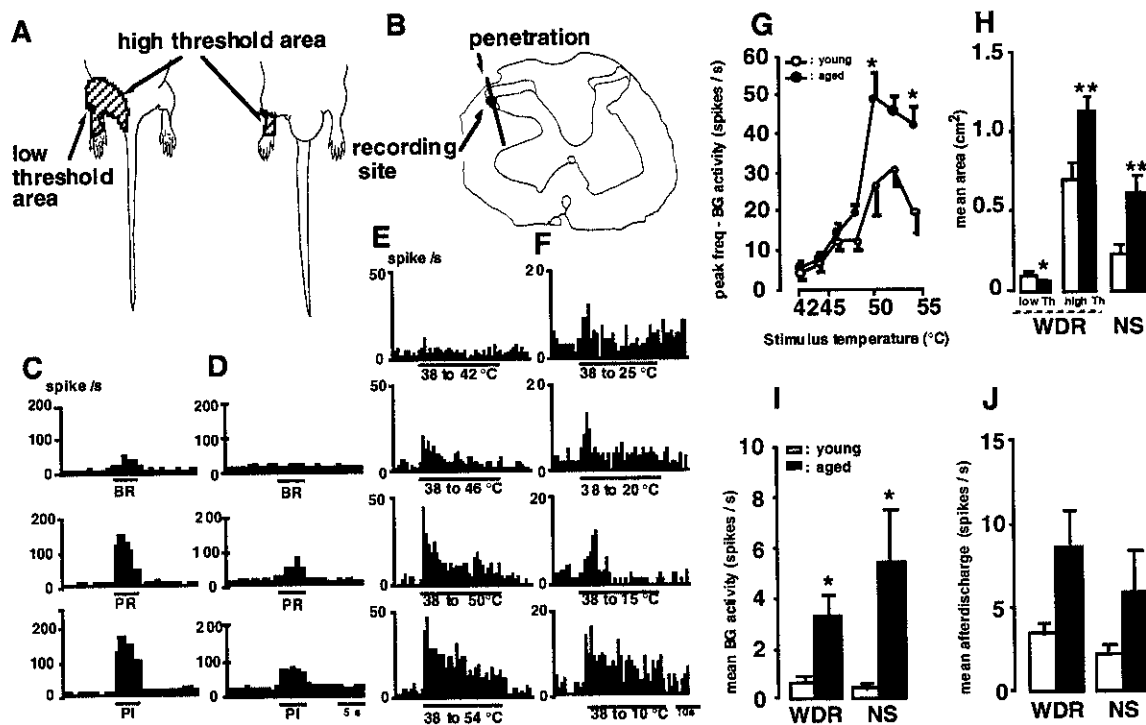


図2. 32カ月齢ラットの腰髄後角表層から記録されたWDRニューロンの記録例。A: 受容野の模式図、B: 記録部位のトレース、CおよびD: 受容野への機械刺激に対するニューロン活動のPSTヒストグラム、EおよびF: 受容野に対する熱および冷刺激に対する反応、G: 熱刺激に対する刺激強度と反応曲線、H: 受容野の広さを示したヒストグラム、I: background activityを示したヒストグラム、J: afterdischargeを示したヒストグラム。

(WDR: 47, NS: 19) の脊髄後角から記録した。Fig.2のA-Fに32カ月齢ラットの腰髄後角表層から記録されたWDRニューロンの記録例を示した (Fig. 2B)。通常、WDRニューロンの受容野はここに示したように、低閾値領域と高閾値領域に分類される。この例では、高閾値領域は後肢から腰部に至る広い領域に及んでいた (Fig.2 A)。一方、低閾値領域は膝の周辺部に位置し、非常に狭く限局していた。

さらに、このニューロンは受容野に対する段階的な刺激に対し、機械および熱のどちらの刺激に対しても刺激強度の増加に従って、徐々にスパイク頻度を増していた (Fig. 2C, D, EおよびG)。図2Gには熱刺激に対する侵害受容ニューロンの刺激強度と反応曲線を示した。このように老齢群の方が若齢群よりも熱刺激に対する応答性が有意に高かった (Fisher's PLSD,  $p < 0.05$ )。また、老齢ラットから記録

された多くの侵害受容ニューロンは熱刺激だけでなく冷刺激にも反応した (老齢群: 28%、若齢群: 12%)。冷刺激に対しては、熱刺激の場合と異なり、刺激温度強度に依存した応答性の増加は認められなかった。図2Hに受容野の広さを比較したグラフを示した。WDRニューロンの高閾値領域は老齢群の方が有意に広いのに対し、低閾値領域は高閾値領域とは逆に若齢群の方が広い値を示した。また、NSニューロンは老齢群の方が有意に広い受容野を有していた。background activity および afterdischarge を比較すると、両方とも老齢ラットの方が有意に高い値を示していた。

脊髄ブロックが後角侵害受容ニューロン活動に及ぼす影響: 老齢ラットにおいて、下行性抑制系の侵害受容ニューロン活動に対する影響を明らかにするために、第一胸髄 (Th 1) のレベルで脊髄ブロックを施した。若齢

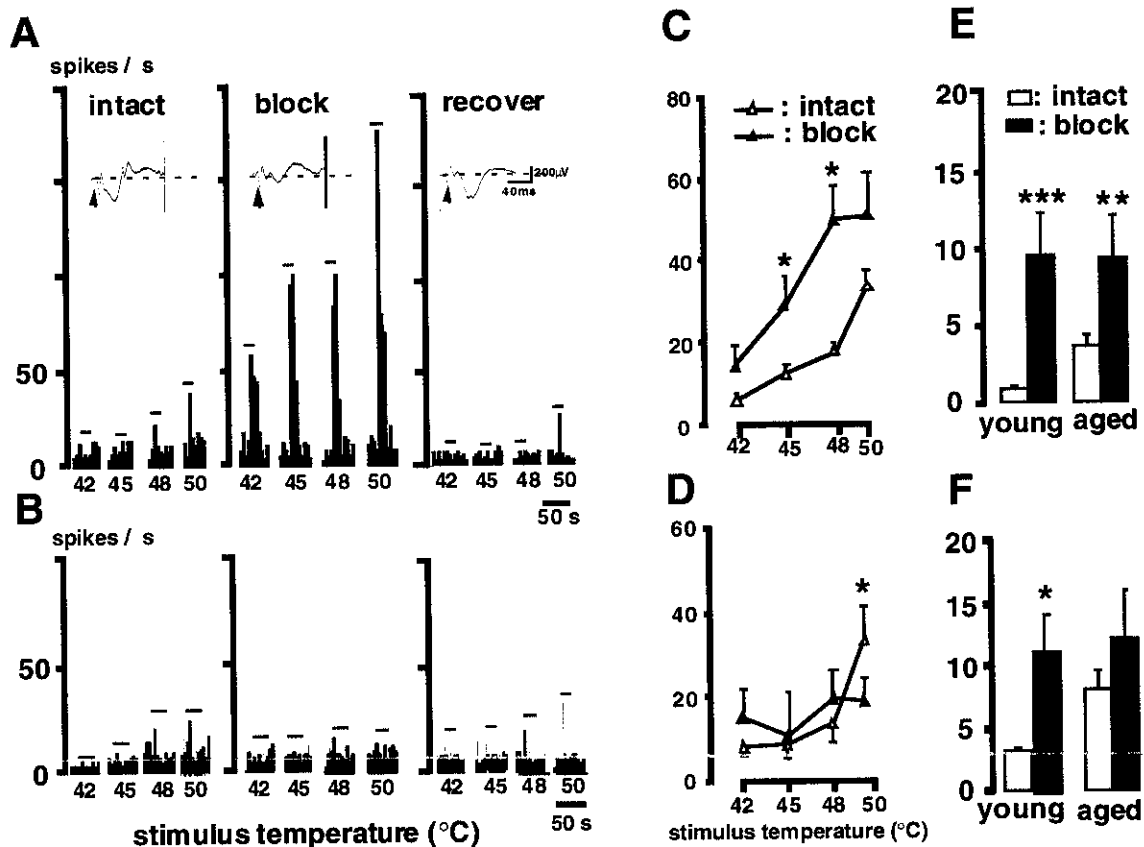


図3、老齢および若齢ラットの後角から記録された侵害受容ニューロン活動に対する胸髄ブロックの影響 A: 若齢ラットにおけるWDRニューロンの熱刺激応答に対する脊髄ブロックの効果、B: 老齢ラットにおけるWDRニューロンの熱刺激応答に対する脊髄ブロックの効果、C: 若齢ラットにおける脊髄ブロック前後の熱刺激強度と反応曲線、D: 老齢ラットにおける脊髄ブロック前後の熱刺激強度と反応曲線、E: 若齢および老齢ラットのBackground activity に対する脊髄ブロックの影響、F: 若齢および老齢ラットのAfterdischarge に対する脊髄ブロックの影響

群では脊髄ブロックにより、熱および機械刺激に対する応答、また、background activity およびafterdischarge が有意に増加したのに対し、老齢群ではブロックの影響はほとんど観察されなかった(図3 A-F)。このような結果は若齢群では下行性抑制系の作用により持続的に脊髄後角の侵害受容ニューロン活動が押さえられていることを意味している。これに対し、老齢群では下行性抑制系の機能が低下していることを示している。

#### D. 考察

本研究は脊髄における侵害情報伝達機能が老化により強く影響されることを示した。脊髄後角に分布する侵害受容ニューロンの侵害

刺激に対する応答性の増強、自発放電および後発射の増加など、老齢動物の脊髄後角では侵害情報伝達機能の強い亢進が認められた。これら、老齢ラットにおける脊髄後角侵害受容ニューロンの活動性亢進は老齢ラットの侵害的熱刺激に対する逃避反射の亢進につながるものと考えられる。

これまでの末梢神経系に対する老化の影響を調べた研究により、C線維の伝導速度は若齢ラットおよび老齢ラットにおいて有意な違いがないと報告されている。これに対し、SPおよびCGRP含有神経線維の脊髄内分布を免疫組織学的に調べた研究では、これらの免疫陽性神経ターミナルは老齢動物において、やや減少している傾向を認めたと報告されてい

る。これらの研究結果および本研究結果からすると、本研究で観察された脊髄後角における侵害受容ニューロン活動の亢進には、末梢神経あるいは末梢侵害受容器の機能亢進よりも、中枢神経系におけるメカニズムを考えるべきであろう。

一方、WDRニューロンの受容野において観察された高閾値および低閾値領域に関する本研究結果は中枢神経の変化だけでなく、末梢神経系の変化を強く反映したものであると考えられる。すなわち、WDRニューロンの低閾値受容野には末梢の太い神経線維が投射するのに対し、高閾値受容野にはC線維を代表とする細い神経線維が投射することが知られている。先にも述べたが、末梢神経系においてC線維が老化によってほとんど影響を受けないのに対し、太い有髄神経線維は有意に減少するという研究結果からすると、太い神経線維が投射する低閾値領域は縮小、細い神経線維が投射する高閾値領域は末梢入力の影響を受けずに変化がないはずである。しかし、実際には高閾値領域は有意に受容野が拡大していた。これはおそらく、末梢神経系だけで解決される問題ではなく、中枢性に何らかの変化が起こりその結果として発現したものと想像せざるを得ない。

中枢性変化の一つとして考えられるのが下行性抑制系の機能低下である。本研究では下行性抑制系に対する老化の影響を調べるため、脊髄後角の侵害受容ニューロン活動を同定後、胸髄レベルで脊髄を麻酔ブロックし、下行性経路遮断前後におけるニューロン活動を比較した。本研究では脊髄ブロックにより若齢群において誘発応答を初めとする全ての活動の増加を認めたのに対し、老齢群では多少反応性の増強を認めたものの、若齢群に比べブロックの影響が非常に弱かった。これらの結果は、いずれも老齢ラットにおいて、下行性抑制系の機能が低下している可能性を強く示唆している。

## E. 結論

本研究結果およびこれまでの研究結果からすると、老齢ラットの末梢神経系においては、侵害情報伝達系に大きな機能低下は起こっていないと考えられる。しかし、若齢動物に比べ老齢動物では強い下行性抑制系の機能低下があるために脊髄後角内に存在する侵害受容ニューロン活動が亢進したものと考えられる。おそらく、このような脊髄内の侵害受容ニューロン活動性の増加がラットの侵害的熱刺激に対する逃避反射の亢進を引き起こしたものと想像される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Iwata, K. Role of cerebral cortex in pain perception. *J. Neuroscience for Pain Res.* 7-13, 1999
2. Iwata, K., Tashiro, A., Tsuboi, Y., Imai, T., Sumino, R., Morimoto, T., Dubner, R. and Ren, K. Medullary Dorsal Horn Neuronal Activity in Rats with Persistent Temporomandibular Joint and Perioral Inflammation. *J. Neurophysiol.* 82: 1244-1253, 1999.
3. Iwata, K., Tsuboi, Y., Tashiro, A., Sakamoto, M. and Sumino, R. Integration of tooth-pulp pain at the level of cerebral cortex. In: *Neurobiol. Mastication from Molecular to system approach* edited by Nakamura, Y. and Sessle, B.J. Elsevier, Amsterdam, 471-481, 1999.
4. Miki, K., Iwata, K., Tsuboi, Y., Morimoto, T., Kondo, E., Dai, Y., Ren, K. and Noguchi, K. Dorsal column-thalamic pathway is involved in thalamic hyperexcitability following peripheral nerve injury: A lesion study in rats with experimental mononeuropathy. *Pain* (in press) 2000.

### 2. 学会発表

1. 坪井美行、岩田幸一、田代晃正、今井高雄、森本俊文、角野隆二、下歯槽神経切断後に発

- 現する痛覚過敏の中樞機構と切断側および対側三叉神経脊髄路核ニューロンの応答特性と。第22回日本生理学会、p333、1999。
2. 金銅英二、坪井美行、岩田幸一、森本俊文、角野隆二、野口光一。ニューロパチックペインにおけるグルタミン酸受容体の関与とラット薄束核ニューロン活動に対する影響と。第22回日本生理学会、p334、1999。
  3. Y. Tsuboi, K. Iwata, A. Tashiro, T. Imai, T. Morimoto and R. Sumino, CNS mechanism of hyperalgesia following inferior alveolar nerve transection - Effect on ipsilateral and contralateral MDH neuronal activities-. Neuroscience Res. Suppl. 23 308, 1999.
  4. E, Kondo, Y. Tsuboi, K. Iwata, T. Morimoto, R. Sumino and K. Noguchi. Involvement of glutamate receptors on neuropathic pain - Modulation of neuronal activity in the rat gracile nucleus- Neuroscience Res. Suppl. 23 309, 1999.
  5. E, Kondo, Y. Tsuboi, K. Iwata, A. Tashiro, T. Morimoto and K. Noguchi. Effect of glutamate receptor antagonists on gracile nucleus neuronal activity in the rats with experimental mononeuropathy. Soc. Neurosci. Abstr. 23 1679, 1999.
  6. E, Kondo, K. Miki, K. Iwata, Y. Tsuboi, and K. Noguchi. Involvement of dorsal column (DC) thalamic pathway in neuropathic pain. 9th IASP meeting Abstr. 140, 1999.
  7. R. Sumino, Y. Tsuboi, A. Tashiro, T. Imai and K. Iwata. Modulation of MDH neuronal activity following inferior alveolar nerve transection. 9th IASP meeting Abstr. 143, 1999.
  8. Y. Tsuboi, A. Tashiro, T. Imai, R. Sumino and K. Iwata. Modulation of ACCX neuronal activity during thermal detection task in monkeys. 9th IASP meeting Abstr. 152, 1999.
  9. K. Iwata., Y. Tsuboi, E. Nomoto, A. Tashiro, T. Imai, R. Sumino and K. Kanda. Modulation of ACCX neuronal activity during thermal detection task in monkeys. 9th IASP meeting Abstr. 414, 1999.
  10. 戴 毅、岩田幸一、金銅英二、野口光一。CCIモデルラットに対する定量的温度刺激により脊髄後角ニューロンに発現するFos様蛋白、Pain Res. 14 (3), 40, 1999.

## 高齢者の痛覚伝導路における可塑性変化についての分子生物学的研究

分担研究者 野口光一 兵庫医科大学医学部 教授

### 研究要旨

高齢者は若齢者に比べて、痛覚に対する耐性が弱いとされ、老化が痛覚受容に関与する神経回路網に対し、何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆されている。その大きな原因と考えられるのは、下行性抑制系の機能低下である。そこで本研究において免疫組織化学法を用いて、下行性抑制系として知られているセロトニンおよびノルアドレナリン陽性線維の分布状況を比較検討した。その結果、老齢ラットにおいては若齢ラットに比べ、有意な減少が観察された。さらに、膝関節に炎症を生じさせる関節炎モデル及び、足底に炎症を生じさせる末梢炎症モデルを作成した。そして1日後の腰髄後角ニューロンにおける最初期遺伝子の一つであるc-fos蛋白発現を比較検討すると、老齢ラットの方が若齢ラットに比べc-fos発現数が多い傾向が観察された。このような結果から、老化に伴う脊髄後角の侵害受容ニューロンの興奮性増加には、中枢神経系における下行性経路の機能低下が存在し、その結果最初期遺伝子発現から見た慢性疼痛モデルにおける脊髄後角ニューロンの活動性が亢進している、という事が明らかとなった。

### A. 研究目的

従来の研究から高齢者は若齢者に比べ、慢性痛を発現する頻度が高いことが知られている。また、高齢者では痛覚に対する耐性が弱く痛みを強く感じると言われている。これに対し、動物を用いた実験において、老齢ラットでは痛覚閾値の低下が認められるという報告や、侵害情報の伝達において重要な働きを有する無髄線維は老化に伴って形態および数の変化が認められるなどと報告されている。このようなことから、老化は痛覚情報伝達系に対し様々な変化を誘導すると想像される。しかし、中枢神経系において、痛覚伝達系にいかなる変化が起こるかについては全く不明である。

そこで本研究の目的は、侵害情報伝達の変

化の一つの原因として、老齢ラットにおける脊髄下行性抑制系の変化を観察すること、さらに慢性疼痛モデルにおいてニューロン活動のマーカーとして広く使われている最初期遺伝子c-fosの老齢ラットにおける発現パターンを検討することにある。

### B. 研究方法

免疫組織科学：若齢および老齢ラットをpentobarbital Na (80mg/kg, i.p.) で深く麻酔し4% paraformaldehyde(0.1M phosphate buffer) にて灌流固定し、L4-L6のレベルで脊髄を取り出した。脊髄をセグメントごとに分割し、後固定した後20% sucroseに浸漬した。2-3日sucroseに浸漬した後、30  $\mu$  mの前額断切片を作成した。老齢および若齢ラットから作成した切片

を以下の方法により 5-HT(serotonin)および DBH(dopamine b-hydroxylase)免疫組織染色した。まず、切片を 1.5% normal goat serum (NGS) に 4°C で 24 時間インキュベートし、次いで anti-5-HT polyclonal antiserum (1: 50000; DiaSorin, USA) あるいは anti-DBH polyclonal antiserum (1: 1000; Eugene Tech International Inc., USA) にそれぞれ、4°C 下で 48 時間インキュベートした。1 次抗体にインキュベートした後、切片を biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin G (1:200; Vector Labs, Burlingame, CA, USA) に 37°C 下で 1 時間インキュベートした。その後、peroxidase-conjugated avidin-biotin complex (1:200; ABC, Vector Labs) に 4°C 下で 2 時間インキュベートし、さらに、ABC reaction product を合成するため、0.035% 3,3'-diaminobenzidine-tetra HCl (DAB; Sigma), 0.2% nickel ammonium sulfate および 0.05% peroxide にインキュベートした。各インキュベーション間には切片を 0.01M PBS で 15 分ずつ洗浄した。

脊髄後角内における 5-HT および DBH 陽性線維の面積を計測するために、100 x 200  $\mu$  m の範囲を脊髄後角の表層 (I-II 層) および深層 (III-IV 層) から抽出した。抽出された範囲をマイクロコンピューター (NIH image ver. 1.61) で処理し、免疫陽性線維の占める面積を求めた。

関節炎モデルは、一側膝関節内に C F A (complete Freund adjuvant) 0.05 ml 注射し作成した。末梢炎症モデルは一側足底皮下に同量の C F A を注射することによって作成した。24 時間後、灌流固定し上記の免疫組織化学法にて腰髄後角における c-fos 発現を観察した。

## C. 研究結果

1. 脊髄後角内に分布する 5-HT および DBH 陽性軸索に対する老化の影響 (図 1)

5-HT (Serotonine) および NE

(Norepinephrine) は脊髄後角における下降性抑制系を賦活する主な神経伝達物質であると言われている。老齡ラット及び若齡ラットにおける 5-HT 及びノルエピネフリンの合成酵素の一つである DBH の免疫組織化学法による検索を行った。その結果、脊髄後角で検出された 5-HT および DBH 陽性線維の分布密度は脊髄表層および深層で、老齡群の方が若齡群よりも統計学的に有意に低下していた。特に 5-HT の変化が老齡ラットの減少で著しかった。また、老齡ラットでは 5-HT 及び DBH 陽性の異常神経終末が観察された。

2. 関節炎モデル及び末梢炎症モデルの脊髄後角における c-fos 発現

c-fos 発現は刺激に対するニューロンの反応性・興奮性のマーカーとして評価されている。本研究で用いた両モデルにおいて、脊髄後角表層ニューロンにおける c-fos 発現数が、明らかに老齡ラットにおいて若齡ラットに比較して増加していた。本研究は統計学的解析のため、さらに実験続行中である。

## D. 考察

本研究は脊髄における侵害情報伝達機能が老化により強く影響されることを示した。下行性抑制系の 2 つのマーカーの明らかな減少が確認されたことは、老齡ラットにおける下行性抑制系の機能不全を強く示唆していると考えられる。

これまでの末梢神経系に対する老化の影響を調べた研究により、C 線維の伝導速度は若齡ラットおよび老齡ラットにおいて有意な違いがないと報告されている。これに対し、SP および CGRP 含有神経線維の脊髄内分布を免疫組織学的に調べた研究では、これらの免疫陽性神経ターミナルは老齡動物において、やや減少している傾向を認めたと報告されている。これらの研究結果および本研究結果からすると、本研究で観察された脊髄後角におけ



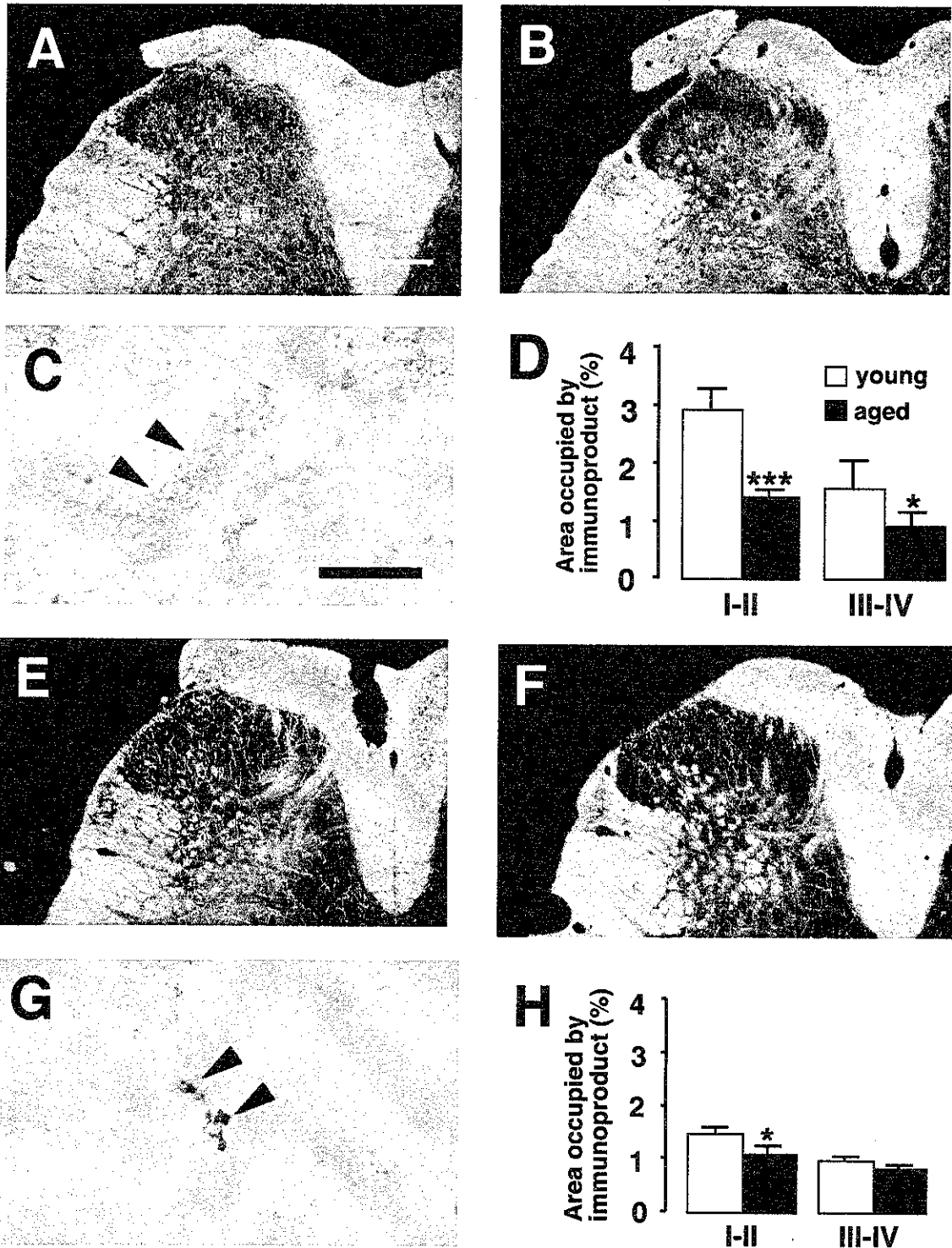


図1. A:3月齢ラット脊髄後角のserotonin(5-HT)陽性神経線維、B:32月齢ラット脊髄後角の5-HT陽性神経線維、C:32月齢ラット脊髄後角で見られた5-HT陽性神経線維の変性像(矢印)、D:脊髄後角における5-HT陽性線維は、浅層、深層のいずれにおいても、32月齢ラットの方が3月齢ラットに比べ有意に減少していた、E:3月齢ラット脊髄後角のdopamine beta-hydroxylase(DBH)陽性神経線維、F:32月齢ラット脊髄後角のDBH陽性神経線維、G:32月齢ラット脊髄後角で見られたDBH陽性神経線維の変性像(矢印)、H:脊髄後角におけるDBH陽性線維は、浅層でのみ、32月齢ラットの方が3月齢ラットに比べ有意に減少していた。

る侵害受容ニューロン活動の亢進には、末梢神経あるいは末梢侵害受容器の機能亢進よりも、中枢神経系におけるメカニズムを考えるべきであろう。

また、こうした下行性抑制系の減弱に起因する脊髄内侵害情報伝達系の亢進は、慢性炎症モデルにおける最初期遺伝子発現においても観察できることが明らかとなった。遺伝子発現レベルにおいても、脊髄後角ニューロンの興奮性の亢進が老齢ラットにおいて存在することが考えられる。

## E. 結論

本研究において、若齢動物に比べ老齢動物では強い下行性抑制系の機能低下があることが示唆された。そしてその結果、遺伝子レベルにおいても、侵害受容ニューロンの興奮性の増加をもたらしたと考えられる。おそらく、このような脊髄内の侵害受容ニューロン活動性の増加がラットの侵害的熱刺激に対する逃避反射の亢進を引き起こしたものと想像される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1、Fukuoka, T., Tokunaga, A., Kondo, E., Miki, K., Tachibana, T. and Noguchi, K., Differential regulation of alpha- and beta-CGRP mRNAs within oculomotor, trochlear, abducens, and trigeminal motoneurons in response to axotomy, *Mol. Brain Res.*, 63, 304-315, 1999
- 2、Yasuda T., Iwamoto T., Ohara M., Sato S., Kohri H., Noguchi K. and Senba E., The novel analgesic compound OT-7100 (5-n-Butyl-7-(3,4,5-trimethoxybenzoylaminopyrazolo[1,5-a]pyrimidine) attenuates mechanical nociceptive responses in animal models of acute and peripheral neuropathic hyperalgesia, *Jpn. J. Pharmacol.* 79, 65-73, 1999

- 3、Dai Y., Miki, K., Fukuoka, T., Tokunaga A., Tachibana T., Kondo E. and Noguchi, K., Suppression of neuropeptides' expression by herbal medicines in a rat model of peripheral inflammation, *Life Sciences*, 66, 19-29, 1999
- 4、Atushi Tokunaga, Eiji Kondo, Tetsuo Fukuoka, Kenji Miki, Yi Dai, Hiroaki Tsujino & Koichi Noguchi, Excitability of spinal cord and gracile nucleus neurons in rats with chronically-injured sciatic nerve examined by c-fos expression, *Brain Res.*, 847, 321-331, 1999
- 5、Hiroaki Tsujino, Eiji Kondo, Tetsuo Fukuoka, Yi Dai, Atsushi Tokunaga, Kenji Miki, Kazuo Yonenobu, Takahiro Ochi & Koichi Noguchi, Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: a novel neuronal marker of nerve injury, *Mol. Cel. Neurosci.*, 15, 170-182, 2000
- 6、Kenji Miki, Koichi Iwata, Yoshiyuki Tsuboi, Toshifumi Morimoto, Eiji Kondo, Yi Dai, Ke Ren & Koichi Noguchi, Dorsal column-thalamic pathway is involved in thalamic hyperexcitability following peripheral nerve injury: A lesion study in rats with experimental mononeuropathy, *Pain*, 85, 263-271, 2000
- 7、Kenji Miki, Tetsuo Fukuoka, Atsushi Tokunaga, Eiji Kondo, Yi Dai & Koichi Noguchi, Differential effect of brain-derived neurotrophic factor on high-threshold mechanosensitivity in a rat neuropathic pain model, *Neurosci. Lett.*, 278, 85-88, 2000.

## 脊髄侵害受容ニューロンの活動と防御反射機構の加齢変化

分担研究者 神田健郎 東京都老人総合研究所 研究部長

### 研究要旨

侵害刺激を反復して加えた際に見られる屈筋反射（防御反射）の増強現象を成熟・老齢ラットで比較した。増強の程度に老若間で差を認めなかったものの、成熟ラットに比較して老齢ラットではより低い頻度の反復刺激で反射の増強現象が現れた。これらの所見は高齢ラット脊髄の侵害情報伝導系は可塑性変化を起こし易い状態にあることを示唆している。

### A. 研究目的

慢性の関節炎、腰痛、ヘルペス後神経痛などの慢性痛に悩まされる高齢者は少なくない。これには、退行性的変化が進行し、また、基になる疾患に罹る頻度が増える等の原因が考えられる。一方、痛覚伝導路の可塑性変化自体が高齢者で起こり易くなっている可能性もある。Rudaらは神経原性疼痛モデルに於いてダイノルフィン遺伝子発現が高齢ラットで強いことを示している。また、一般に神経活動の強度が可塑性変化を引き起こす要因になっているが、我々は脊髄後角の痛覚受容ニューロンの自発活動および末梢の侵害刺激に対する反応性が共に高齢ラットで亢進していることを見いだしている。

Wind-upは末梢のC線維を短い間隔で反復刺激すると誘発される脊髄後角のニューロン活動や屈筋反射（防御反射）が次第に増強する現象で、可塑性変化の基礎過程を示すものと考えられている。本研究では、末梢神経の刺激によって屈筋に引き起こされる反射性活動（屈筋反射）に見られるWind-up現象に付いて、老若ラット間の異同を

種々の面から検討した。

### B. 研究方法

フィッシャー系の雄ラット（成熟群：12～15ヶ月齢、高齢群：29～30ヶ月齢）を用いた。ハロセン麻酔下（1.5-2.0% in 笑気+酸素2：1）に気管、動脈および静脈にカニューレを挿入。麻酔をハロセン1.2 - 1.5%（酸素のみ）に下げ、炭酸ガス濃度をモニターしながら人工呼吸器を用いて強制的に呼吸を管理した。左下腿の皮膚を切開して腓腹神経を露出した。周囲組織から剝離した後末梢で切断し、中枢端を双極刺激電極にセットした。筋電図を記録するために、先端部約2mmを露出した直径100 $\mu$ のテフロン被覆ステンレス線を大腿屈筋に約5mmの間隔を開けて、直視下に刺入した。腰部および脚部を固定した後、ハロセン濃度を0.8 - 1.0%に下げて維持した。露出部は流動パラフィンで覆った。尚、実験中は放射熱線及びパッドにより体温を37.5度に保った。

神経刺激は低電流、矩形波で幅2ms（1ms幅で極性反転）、強度は100、200、500 $\mu$ A、1、2、5mAであった。C線維の活動状

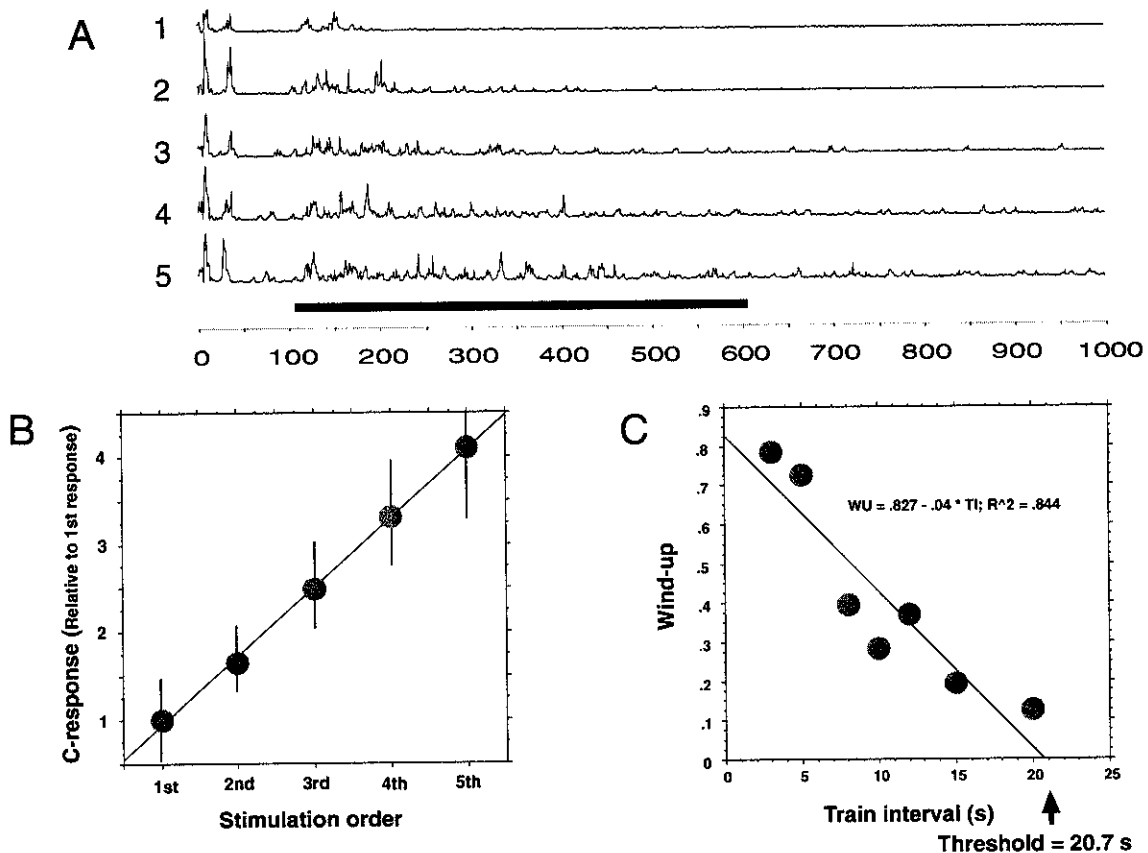


図1 A: 整流した筋電図。刺激を繰り返すと反応が増大している。 B: 刺激後 100-600 ms 間の筋電図を積分した値で、刺激を繰り返すとほぼ直線的に増大する。回帰直線の勾配を wind-up の強度とした。 C: 縦軸は wind-up の強度、横軸は刺激の間隔。回帰直線の横軸との交点を 閾値刺激間隔とした。

況を知るため、坐骨神経で活動電位を記録した。200  $\mu$ A の刺激強度で潜時約 60 ms のゆっくりした C 線維由来の活動電位が記録できるようになり、更に刺激強度を上げるに依りその振幅は増した。一方、筋電活動は、刺激強度 100  $\mu$ A では 7-8 ms の短潜時のもの (A  $\delta$  線維による反応) のみであった。C 線維が刺激される強度である 200  $\mu$ A になると、潜時 150 から 200 ms の活動が現れた (C 線維により惹起された反応)。成熟ラットを用いた予備実験に於いて、刺激間隔が 60 秒では殆どの例で反応の増強が見られなかった。そこで、5 連発刺激を一組とし、これを 60 秒間において 5 回繰り返し、一試行とした。連発刺激の間隔は各試行毎に 3、5、

8、10、12、15 または 20 秒とした。刺激後 100 から 600 ms 間の筋電図を整流・積分し、C 線維による反応の大きさとした。5 連発刺激の 1 発目から 5 発目までの反応、各 5 つを平均し、その増強の割合によって、連発刺激間隔毎の Wind-up の程度を判定した。

### C. 研究成果

図 1A に C 線維の反復刺激により屈曲反射による筋活動が次第に増強する典型例を示す。回を追う毎にほぼ直線的に反応の大きさが増強されるので直線回帰し (図 1B)、その勾配を Wind-up の強さとした。図 1C は刺激間隔と Wind-up の強度との関係である。刺激間隔が長くなるに依り Wind-up 強度は