

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者の慢性痛と痛覚伝導路の可塑性に関する研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 神田 健郎

平成13（2001）年3月

目 次

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	神田 健郎	2
-------------------------	---------------	---

II. 分担研究報告

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解析- 炎症による変化 -	岩田 幸一	10
--	---------------	----

2. 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	野口 光一	16
------------------------------------	---------------	----

3. 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	神田 健郎	21
-------------------------------	---------------	----

4. 侵害性刺激による心拍数増加反応の加齢変化	鈴木 敦子	27
-------------------------	---------------	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	31
---------------------	---------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 (別添)

I 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）
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

高齢者痛覚の特性を理解するための基礎研究として、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・分子生物学的に検索した。前年度研究で明らかにした脊髄後角侵害受容ニューロンの過活動を、最初期遺伝子の一つである c-fos 蛋白発現を老若ラット間で比較検討することで確認した。侵害刺激を繰り返すことで起こる反応の増強 (wind-up 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も起こること、およびその原因にも下行性抑制系の機能不全が関与していることが示された。更に、慢性炎症モデルに於ける研究から、広作動域侵害受容ニューロンが加齢により最も強く影響を受け、その末梢刺激に対する応答特性を変化させてマルチモーダル化する傾向が明らかになった。何れも脊髄内侵害情報伝達系にかなりの変化が起こってくることを示している。また、痛みの自律機能への影響を検討する研究では、後肢侵害刺激によって誘発される上脊髄性の心拍数増加反応は、超高齢ラットにおいて減弱し、この減弱には上脊髄における加齢変化が関与していることが示唆された。

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

高齢者の痛覚機構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。慢性的な痛みを悩まされる高齢者は多い。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極めて有用である。本研究は高齢者の慢性痛を予防し、痛みに対する適切な治療法を策定するために不可欠な基礎

的研究である。

我々は前年度の研究に於いて、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、その原因に下行性抑制系の機能不全があることを初めて示した。痛覚伝導路の加齢に伴う変化を更に詳しく検討するため、本年度は以下の研究を行った。(研究1) 炎症による脊髄後角ニューロンの活動変化が加齢によってどの様な影響を受けるかを調べる。(研究2) 脊髄後角の侵害受容ニューロンの過活動を遺伝子発現の観点から調べる。(研究3) 侵害刺激を短時間に繰り返すことで起こる反応の増強 (wind-up 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る原因に、下行性抑制系の機能不全の観点から検討する。更に、(研究4) 侵害刺激の自律機能

への影響の加齢変化を明らかにするため、体性-心臓交感神経反射の機構を成熟ラット・高齢ラットで比較検討する。

B. 研究方法

実験は Fischer 系（一部 Wistar 系）のラットを用いて行い、成熟群・高齢群から得られたデータを比較検討した。（研究1）実験には Fischer 系雄ラット（若齢群：9-12ヶ月齢、高齢群：28-32ヶ月齢）を用いた。ネンブタール（sodium pentobarbital：50mg/kg）で麻酔し、左側足底皮下に 0.05ml の Complete Freund's Adjuvant（CFA）を注入した。CFA 注入 24 時間後に再びラットを同様の方法で麻酔し、気管カニューレを挿管し、大腿静脈にカテーテルを留置した。ラットを固定装置に装着し、ラミネクトミーを行い腰髄（L4-L6）を露出した。臭化パンクロニウムで動物を非道化し、両側人工気胸を施し、呼吸は人工呼吸器で管理した。硬膜を除去し、実体顕微鏡で刺入部位を確認しながらタングステン微小電極を L5 を中心とした領域に刺入した。探査刺激には足底皮膚に対する機械刺激を用いた。記録されたニューロンは機械刺激に対する応答性から広作動域侵害受容（WDR）ニューロンと特異的侵害受容（NS）ニューロンに分類した。ニューロン活動を直接マイクロコンピューター（Spike 2）に導き、オンラインでデータ処理を行った。記録中は、心拍数が一定になるように sodium pentobarbital を適宜追加投与し、また、体温を 37-38°C に保った。ニューロン活動記録後、電流により微小破壊した（ランダム選択による一部のみ）。実験終了後、連続組織切片を作成し、ニューロン活動記録部位を同定した。（研究2）末梢炎症モデル：若齢および高齢ラットの左側足底皮下に、200 μ l CFA (complete freund's adjuvant) を注射した（注射後 1 - 2 時間後からの腫脹、痛覚過敏反応等を確認）。24 時間後ラットを pento-

barbital 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。後固定した後 20% sucrose に浸漬し、30 μ m の前額断切片を作成した。作成した切片は c-fos 蛋白に対するポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を施行した。L4 レベルの切片を観察し、脊髄後角 I ~ II 層、III ~ IV 層、V ~ VI 層に分けて、c-fos 陽性ニューロン数を計数した。関節炎モデル：一側膝関節内に CFA (complete Freund adjuvant) 200 μ l 注射し作成した。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（L2 レベル）における c-fos 発現を観察した。（研究3）実験には SPF 環境下で飼育された雄の Fischer 344/DuCjcr (成熟群：11ヶ月齢、高齢群：29ヶ月齢) を使用した。ハロセン麻酔下（導入時 2.0%、手術中の維持 1.5%、記録中は 0.8 - 1.2%）に、気管、総頸動脈、外頸静脈にそれぞれカニューレを挿入した。以後、呼吸は人工呼吸器に接続して管理した。左下腿背面皮膚に小切開を加え、腓腹神経を剥離して、腓腹筋の筋腹レベルで切断した。中枢端を電気刺激し（定電流パルス、幅 2 ms、強度 0.5 - 5.0 mA、通常 0.5 mA）、半腱様筋に誘発された屈筋反射活動を双極ワイヤー電極によって記録した。5 回の連発刺激を 1 分の間隔を置いて 5 回繰り返し、反応の増強を観察した。5 分後に、連発刺激の間隔を変え、同様の刺激を加えた。連発刺激の間隔は 3,5,8,10,12,15,20 s であった。反射筋電活動は数値化し、刺激後 100 から 600 ms の間の反応を積分して、C 線維により誘発された反応の大きさとした。連発刺激の順番ごとに 5 回（または 3 回）の反応を平均し、連発刺激による反応の増強を調べた。実験最後に坐骨神経から腓腹神経刺激により誘発された C 線維の活動電位を記録した。（研究4）成熟群（4-6ヶ月齢）、高齢群（23-24ヶ月齢）、超高齢群（32-36ヶ月齢）の 3 群の Wistar 系ラット（190g ~ 300g）を用いた。ウレタンで麻酔し

(0.9-1.1g/kg, i.p.)、人工呼吸下に実験を行った。心拍数の測定：頸動脈に挿入したカテーテルを圧トランスデューサーに接続してを介して血圧を記録し、血圧の脈派から心拍タコメータで心拍数を連続記録した。侵害刺激：上脊髄性反射を誘発する部位として後肢足麻、脊髄反射を誘発する部位として胸部を選び、皮膚を外科鉗子で約1cm²、3kgでつまむピンチ刺激を20秒間行った。脊髄切断：脊髄を第二頸髄のレベルで切断した。実験中の呼気中炭酸ガス濃度を約3%に、体温は約37.5°Cに、平均血圧を40～60mmHgに維持した。

C. 研究結果

(研究1) <温度刺激に対する反応> 熱および冷の両方の刺激に応答する侵害受容ニューロンの検出率は老齢ラットの方が若齢ラットに比べ遥かに高かった。これに対し、熱刺激のみに応答するニューロンは逆に若齢群においてやや高く、一方、冷刺激にのみ反応するニューロンは両群ともほぼ同じ割合であった。炎症群では老齢群が若齢群に比べ有意に高い反応性の増強を示した。この様に、炎症が起こると温度刺激に対しては熱刺激、冷刺激ともに老齢群において、より高い反応性の増強が認められた。しかし、両刺激に対する老化の影響を比較すると、冷刺激に対する影響の方がより強かった。 <機械刺激に対する反応> 機械刺激に対する反応は、Naiveおよび炎症群共に老齢群の方が高い反応性を示したが、両者間に有意差は認められなかった。また、naive群と炎症群間においても明かな応答性の差は認められなかった。 <自発放電および後発射> 自発放電は、naive群では老齢群より若齢群の方が非常に高い値を示していたが、炎症を起こさせた群では若齢群と老齢群との間に明かな差は認められなかった。 <受容野特性> 受容野は刺激閾値の低い中心部付近ではnaive群と炎症群との間で、ほとんど違いは認められなかった。

これに対し、閾値の高い周辺部領域では若齢群および老齢群共に炎症群において若干の拡大を認めたが、その変化に有意差は認められなかった。

(研究2)末梢炎症モデル作成24時間後の脊髄後角(L4)におけるc-fos発現ニューロン数を比較検討すると、脊髄後角V-VI層においては、老齢ラットの方が若齢ラットに比べc-fos発現数が有意に多い傾向が観察された。III-IV層においても同様の傾向が観察された。一方、脊髄後角浅層(I-II)層では、逆に老齢ラットの方が発現数が少ない傾向が観察されたが、これは統計学的に有意にはならなかった。慢性炎症としての時間経過がゆつくりである関節炎モデルにおけるc-Fos発現に関しても、老齢ラットでは脊髄後角深層(III-IV層)で、有意なc-fos発現ニューロン数の増加が観察された。

(研究3)C線維の活動により誘発される屈筋反射は刺激の回を重ねるごとに直線的に増加する。回帰直線の勾配をwind-up率として、反応増強の程度を表した。連発刺激の間隔を長くしていくとwind-up率は指数関数的に低下することが解った。このwind-up率の低下を時定数で表した。時定数が短い程、刺激間隔を延ばすにつれ急速に反復刺激による反射増強効果が弱まることを意味する。この時定数と従来の表現によるwind-upの大きさとの間に有意の相関は認められなかった。刺激強度は時定数に影響を与えなかったが、ハロセンの濃度が低い方が時定数が長かった。高齢ラットでは9.273.2秒(平均7標準偏差)で、成熟群の6.472.9秒より有意に($p < 0.01$, t-test)長かった。脊髄切断後により成熟ラットでは6.4秒から14.3秒へと時定数は有意に延長したが、高齢ラットでは、脊髄切断前9.2秒、切断後8.1秒と差が無かった。更に、NMDA受容体の拮抗薬であるケタミンの時定数への影響を調べたが、明かな変化は認められなかった。

(研究4) 中枢神経無傷時の安静時の心拍数は群間で有意差は認められなかった。但し、成熟群に比べて超老齢群では個体差が大きい傾向があった。後肢にピンチ刺激を20秒間加えると、刺激開始直後から心拍数が増加し始め、刺激開始20秒～60秒にかけて最大に達し、その後徐々に元の値に戻った。この心拍数増加は、成熟群で最大 $33 + 5$ beats/min、老齢群で $38 + 5$ beats/minであったのに対し、超老齢群では $7 + 3$ beats/minしか増加せず、成熟群に比べて著しく減弱していた ($p < 0.01$)。同様の後肢ピンチ刺激は血圧上昇反応をも誘発したが、反応の大きさには、群間で有意差は認められなかった。胸部にピンチ刺激でも同様の傾向の反応が見られた。次に第二頸髄で急性に脊髄を切断したラットを用いて、同様の実験を行った。脊髄切断ラットでは、後肢のピンチ刺激はいずれの群においても有意な反応を誘発しなかった。胸部にピンチ刺激を加えると、中枢神経無傷ラットに比べて大きな心拍数増加反応が誘発された。成熟群では $64 + 5$ 、老齢群では $43 + 6$ 、超老齢群では $49 + 14$ beats/minであった。いずれの群間においても有意差は認められなかった。同様の胸部ピンチ刺激により血圧は、成熟群では $19 + 2$ 、老齢群では $15 + 2$ 、超老齢群では $9 + 2$ mmHg上昇し、これらの反応は群間に有意差は認められなかった。

D. 考察

脊髄内侵害情報伝達系の亢進が、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。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。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前年度の研究で確認された下行性抑制系の2つのマーカーの明らかな減少からすると、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体の機能亢進よりも、中枢神経系におけるメカニズムであり、その要因となっているのが下行性抑制系の減弱と考えられる。

後角侵害受容ニューロンの活動を記録した電気生理学的実験に於いても、高齡ラットの活動亢進が確認された。Complete Freund's Adjuvant (CFA) の微量注入で炎症を起こした動物においても、老齢群の方が足底部皮膚の機械あるいは温度刺激に対して高い反応性を示した。

脊髄内侵害情報伝達系の亢進は、wind-up という別の観点からも示された。今回 wind-up 現象の特性を表す新奇のパラメーターとして減衰時定数を定義した。高齡ラットはこの減衰時定数が成熟ラットに比べて有意に長く、C線維活動が脊髄内侵害情報伝達系に及ぼす影響がより長い期間持続していることを示している。wind-up 現象には多くの神経伝達物質やその受容体の関与が報告されている。その中には、AMPAとNMDA受容体、P物質、セロトニン、ノルアドレナリン、VIPが含まれる。その他、非選択的陽イオンチャンネルの関与も示唆されている。これらの伝達物質やその受容体が、wind-up 減衰時定数の高齡ラットでの延長にどの様に関わっているかを論じるのは現時点ではまだ情報が乏しく困難である。しかし、wind-up 現象が下行路の働きにより影響されることはこれまでの多くの研究によって明らかにされている。また、我々の前年度までの下行性の抑制系の働きが高齡ラットでは傷害されていることが示唆されている。

従って、wind-up 減衰時定数の高齢ラットにおける延長も下行性抑制系の機能不全に起因していることが考えられる。

一方、加齢に伴う脊髄侵害情報伝達系の変化を単純に下行性抑制系の機能不全のみに帰すこともできないという複雑な面も明らかになってきた。従来の報告からすると、下行性抑制系の働きは脊髄後角の機械受容性および温度受容性に関係なく、侵害受容ニューロンに対して同じように作用していると考えられる。しかし、本研究で機械刺激や熱刺激に対する反応性の増強は比較的弱く、冷刺激に対する反応の増強が著しいことが明かとなった。炎症が起こった場合に、冷覚情報伝達経路と機械受容あるいは温熱感覚受容経路とに対する加齢の影響には、異なるメカニズムが関与している可能性がある。

最近、熱刺激および冷刺激の両方に反応する脊髄後角侵害受容ニューロン（熱・冷感受性ニューロン）の存在が報告されているが、出現頻度は低く、機能については殆ど解っていない。今回の炎症群に於ける熱・冷感受性ニューロンの検出率は高く、広作動域侵害受容ニューロンが加齢により最も強く影響を受け、その生理学的性質を変化させ、マルチモーダル化している可能性がある。このような変化は、受容感覚のモダリティーの弁別能の低下を引き起こし、高齢者に発症する感覚異常の原因の一つになるものと想像される。

これまで wind-up を誘発する刺激間隔は比較的狭い範囲に限られるとされ、反応の増強の程度に主な興味向けられて来た。本実験で刺激間隔が wind-up 現象にどの様に影響するかを定量的に表すため、新奇のパラメータである減衰時定数を規定した。本実験で用いた最も短い刺激間隔である 3 秒での刺激で見られた wind-up による反射増強の程度と刺激間隔を種々に変化させて求めた wind-up 減衰時定数との間に相関は認められなかった。従って、wind-up 現象の基本的性質について、

反応増強の程度を規定する要因と刺激間隔という時間を規定している機構とが互いに独立に存在している可能性が示唆される。

wind-up 現象には複数の過程が含まれており、多くの神経伝達物質やその受容体の関与が報告されている。今回新たなパラメータが導入されたことで、機序の解明が進む可能性がある。

本研究により、中枢神経無傷時に後肢ピンチ刺激によって誘発される心拍数増加反応が約 3 年齢の超高齢ラットにおいて減弱することが明らかになった。このとき、同じ後肢ピンチ刺激によって誘発される血圧上昇反応は超高齢ラットでもよく保たれていたため、後肢皮膚の侵害受容器からの入力、超高齢ラットでも良く保たれていると考えられる。また、急性脊髄ラットを用いて実験を行った結果、胸部のピンチ刺激によって誘発される脊髄性の心拍数増加反応は、超高齢ラットでも保たれていた。したがって、皮膚ピンチ刺激によって誘発される心拍数増加反応が超高齢ラットで減弱するメカニズムには、上脊髄性における加齢変化が関与していることが示唆された。中枢神経無傷時に胸部ピンチ刺激によって誘発される心拍数増加反応が、加齢によって有意な影響を受けないのは、この反応には上脊髄性反射と脊髄反射が混じっているためと考えられる。

心臓には交感神経と副交感神経（迷走神経）が分布している。本研究で調べた、侵害性刺激によって誘発される心拍数増加反応には、主に交感神経が関与しており、このとき心臓の β 受容体が働くと考えられる。心臓の β 受容体機能は加齢によって減弱することがヒトで報告されている (Lakatta, et al., 1993)。本研究でも、予備実験として β 受容体刺激薬 (プロプラノロール 10ug/kg i.v.) を投与して β 受容体機能を薬理的に検討した結果、 β 受容体刺激薬投与による心拍数増加反応はラットにおいても加齢と共に減弱していることが

明らかになった。しかし、中枢無傷時および脊髄切断時に胸部刺激による心拍数増加反応が超老齢ラットにおいても成熟ラットと有意な差が認められないことから、侵害刺激によって誘発される生理的な心拍数増加反応の際には、 β 受容体機能の加齢による低下は、あまり関係しないと考えられる。

E. 結論

末梢炎症モデルラットにおける c-fos 発現ニューロン数の増加、冷刺激に対する後角ニューロンの発射応答の亢進、wind-up 減衰時定数の延長が示され、脊髄侵害情報伝達系の高齢ラットでの活動亢進が、電気生理学的にも、遺伝子発現レベルでも確かめられた。この変化は脊髄下行性抑制系の機能不全に起因する。一方、脊髄後角の広作動域侵害受容ニューロンがマルチモダールな性質を有するよう変化している可能性も示唆されるなど、加齢に伴う変化の複雑さも明らかになってきた。また、自律神経系への影響では、後肢ピンチ刺激による心拍数増加反応が、約3年齢の超老齢ラットでは有意に減弱し、その機序には上脊髄が関与していることが明らかになった。

Ⅱ 分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）
分担研究報告書

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解析
- 炎症による変化 -

分担研究者 岩田幸一 大阪大学歯学部 助教授

研究要旨

ラットの足底部皮下に起炎物質である Complete Freund's Adjuvant (CFA) を微量注入して慢性炎症モデルを作成し、その影響を老若間で比較した。若齡 (9 - 12ヶ月齡) および老齡群 (28 - 32ヶ月齡) とともに CFA 注入群において明かな反応性の増強を認めた。熱刺激に対する反応は炎症群において、48℃ および 50℃ 刺激で老齡群の方が若齡群に比べ高い反応を示した。また、冷刺激に対する反応は炎症を起こすことにより老齡群の方が有意に高い反応を示した。一方、機械刺激に対しては老齡群の方がやや高い傾向を示したものの有意差は認められなかった。自発放電は老齡群の方が常に高い傾向を示したが、両者間に有意な差は認められなかった。これに対し、後発射は老齡群で炎症による高い反応性の増強を認めた。また、受容野の大きさは若齡群において炎症によりやや拡大傾向を認めたが、老齡群では炎症による拡大は明かではなかった。以上、炎症による反応性の増強は老齡群の方がより強い傾向を認めた。しかし、温度刺激と機械刺激に対する反応性において老齡群と若齡群で異なる変化を示した。広作動域侵害受容ニューロンが加齡により最も強く影響を受け、その生理学的性質を変化させてマルチモーダル化している可能性が示された。

A. 研究目的

昨年度まで、我々は脊髄後角に分布する侵害受容ニューロン活動に対する加齡の影響について検索してきた。老齡ラットの脊髄後角から検出される侵害受容ニューロンは若齡動物において検出されるものと同様に、広作動域侵害受容 (WDR) ニューロンと特異的侵害受容 (NS) ニューロンであった。WDR および NS ニューロンとも、正常動物では老齡群の方が有意に高い活動性を示した。また、ラットの侵害的熱刺激に対する逃避行動観察の結果も老齡ラットの脊髄後角の侵害受容ニューロン活動の増強をサポートした。すなわち、老

齡動物における侵害的熱刺激に対する逃避潜時は若齡動物に比べ有意に短い値を示していた。老齡群の方が若齡群に比べ熱刺激に対する反応が強いことを窺わせた。免疫組織学的検索により、老齡動物の脊髄後角に分布するセロトニンおよびノルアドレナリン含有軸索終末の減少が観察された。また、脊髄後角から侵害受容ニューロン活動記録中に胸髄レベルで脊髄を麻酔ブロックすると、若齡群では侵害受容ニューロンの活動性増加が誘導されるのに対し、老齡群では活動性に明かな変化が認められなかった。以上の結果から老齡

ラットにおいては脊髄後角ニューロン活動が増強していること、およびその原因に下行性抑制系の機能不全があることが判明した。

本年度はさらに、臨床的により重要であると考えられる慢性炎症時の痛覚受容に対する老化の影響を明らかにすることを目的とし、慢性炎症モデル動物の脊髄後角侵害受容ニューロン活動に対する加齢の影響について検索した。

B. 研究方法

実験にはFischer系雄ラットを用いた。動物を年齢によって若齢群（9-12ヶ月齢）と老齢群（28-32ヶ月齢）に分けて電気生理学実験を行った。ネンプタル（sodium pentobarbital: 50mg/kg）で麻酔し、左側足底皮下に0.05mlのComplete Freund's Adjuvant (CFA)を注入した。CFA注入24時間後に再びラットを同様の方法で麻酔し、気管カニューレを挿管し、大腿静脈にカテーテルを留置した。ラットを脳定位固定装置に装着し胸椎および仙椎を固定装置で保持し、ラミネクトミーを行い腰髄（L4-L6）のレベルで脊髄を露出した。心電図をモニターし、心拍数が手術中を通して一定になるようにsodium pentobarbitalを適宜追加投与した。また、体温をモニターし、温熱パッドにより体温を37-38℃に保った。上記手術が終了した後に、露出した脊髄を覆うようにミネラルオイルプールを背側部皮膚にて作成した。硬膜を除去し脊髄表面の実体顕微鏡写真を撮影し、電極刺入の手がかりとした。動物のセットが全て終了した後に、静脈カテーテルを介して臭化パンクロニウムを静注し、動物を非道化した。同時に気管カニューレを人工呼吸器に接続し、呼気ガス中の炭酸ガス濃度を3.0-4.0%に保った。ニューロン活動記録中脊髄の動揺を防ぐため、両側の胸腔に人工的気胸を施した。また、ミネラルオイルプールの温度は、温水を還流させたポリエチレンチューブをプー

ル内に浸漬することによって保った。

実体顕微鏡で刺入部位を確認しなからタングステン微小電極をL5を中心とした領域に刺入した。探査刺激には足底皮膚に対する機械刺激を用いた。ニューロン活動を直接マイクロコンピューター（Spike 2）に導き、オンラインでデータ処理を行った。記録されたニューロンは機械刺激に対する応答性から広作動域侵害受容（WDR）ニューロンと特異的侵害受容（NS）ニューロンに分類した。WDRニューロンは侵害刺激および非侵害刺激の両方に反応し、刺激強度増加に伴ってスパイク頻度を増加するものとした。また、NSニューロンは侵害刺激のみに反応するものとした。ニューロン活動記録後、ランダムに記録部位を選択し、電極先端から10μA 10秒間陰性直流電流を通流し、記録部位を微小破壊した。実験終了後、動物を再び深く麻酔し、10%パラフォルムアルデヒド液にて灌流固定した。脊髄を取り出し、10%パラフォルムアルデヒド液にさらに48時間浸漬した後、30%シヨ糖液に48時間浸漬し、50μmの連続組織切片を作成し、ニューロン活動記録部位を同定した。

C. 研究結果

本研究では若齢および老齢ラットの脊髄後角から記録された92個の侵害受容ニューロン（老齢群、naive: n=24、炎症: n=24、若齢群、naive: n=30、炎症: n=13）について解析した。

1. 温度刺激に対する反応

老齢ラットと若齢ラットにおいて記録されるニューロンの性質を比較すると、熱および冷の両方の刺激に応答する侵害受容ニューロンの検出率は老齢ラット（naive: 40%、炎症: 33%）の方が若齢ラット（naive: 10%、炎症: 8%）に比べ遙かに高い値を示した。これに対し、熱刺激のみに応答するニューロンは若齢群においてやや高い検出率を認めた（若齢群、naive: 26%、炎症: 23% 老齢群、naive: 8

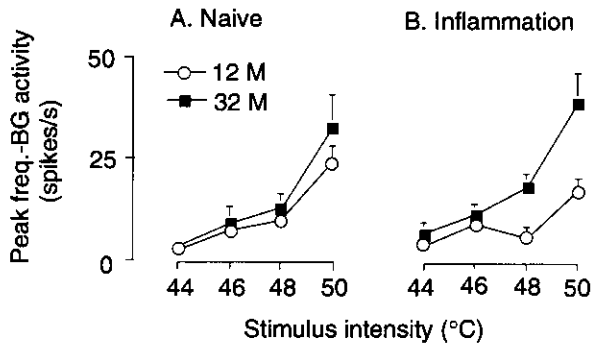


図1 受容野の中心部への定量的熱刺激に対する広作動域侵害受容ニューロンの刺激強度-反応曲線、A: naive群、B: 炎症群における結果

%、炎症: 21%)。一方、冷刺激にのみ反応するニューロンは両群ともほぼ同じ割合を示した。

侵害受容ニューロンの熱刺激に対する刺激強度-反応曲線を図1示した。若齢・老齢に拘わらず炎症群およびnaive群共、刺激強度増加に従ってスパイク頻度を増していた。炎症を起こしていないnaive群ではこれまで我々が報告した結果と同様で、老齢群の方が若齢群に比べやや高いスパイク応答を示していた。若齢群は炎症を起こした群と比べて大きな反応性の増強を示さなかったが、老齢群においてはより強いスパイク頻度の増加を示した。特に強いスパイク頻度の増強は48°Cから50°C刺激の時であった。一方、冷刺激に対する反応を見ると、naive群では若齢群と老齢群との間に有意な差は認められなかった(図2)。これに対し、炎症群では老齢群が若齢群に比べ有意に高い反応性の増強を示した。また、この反応性の増強は熱刺激の時に観察されたように、強い刺激に対してより強いという刺激強度の違いによる反応性増強の差は認められなかった。この様に、炎症が起こると温度刺激に対しては熱刺激、冷刺激ともに老齢群において、より高い反応性の増強が認められた。しかし、両刺激に対する老化の影響を比較すると、冷刺激に対する影響の方がより強かった。

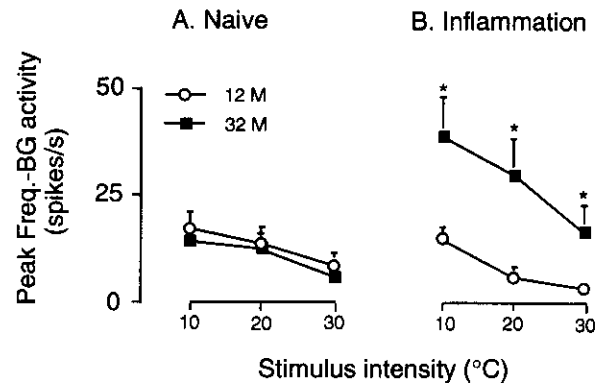


図2 受容野の中心部への定量的冷刺激に対する広作動域侵害受容ニューロンの刺激強度-反応曲線、A: naive群、B: 炎症群における結果

2. 機械刺激に対する反応

機械刺激に対する反応を図3に示した。Naiveおよび炎症群共に老齢群の方が高い反応性を示したが、両者間に有意差は認められなかった。また、naive群と炎症群間においても明かな応答性の差は認められなかった。

3. 自発放電および後発射

図4に示すように、自発放電はnaive群では老齢群において若齢群よりも非常に高い値を示していた。しかし、炎症を与えた群には若齢群および老齢群間に明らかな差は認められなかった。すなわち、炎症に対する自発放電の増加率は若齢群において顕著であるのに対し老齢群ではその変化が軽微であった。

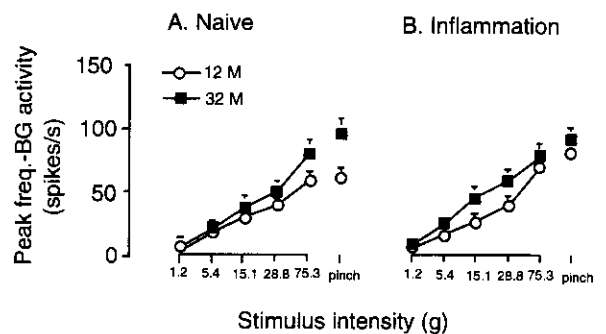


図3 受容野の中心部への定量的機械刺激に対する広作動域侵害受容ニューロンの刺激強度-反応曲線、A: naive群、B: 炎症群における結果

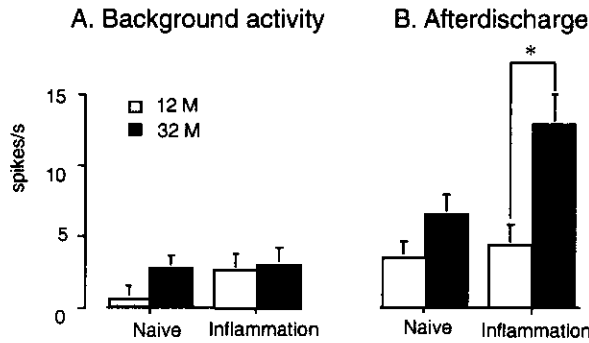


図4 平均自発放電 (A) と平均後発射 (B) を示したグラフ

これに対し、後発射はnaiveおよび炎症群ともに大きな増加を示したが、老齢群の方がその増加率は大きく有意差を認めた。

4. 受容野特性

受容野は刺激閾値の低い中心部付近ではnaive群と炎症群との間で、ほとんど違いは認められなかった (図5 A)。これに対し、閾値の高い周辺部領域では若齢群および老齢群共に炎症群において若干の拡大を認めたが、その変化に有意差は認められなかった (図5 B)。

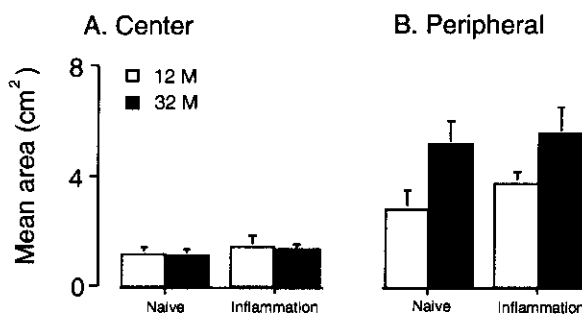


図5 広作動域侵害受容ニューロンの受容野特性、受容野の中心部 (A) と周辺部 (B) の受容野の大きさの平均値を示したグラフ

D. 考察

本研究では老齢ラットの足底部皮下に起炎物質である Complete Freund's Adjuvant (CFA)

を微量注入し、24時間後に脊髄後角表層から足底部皮膚の機械あるいは温度刺激に反応する侵害受容ニューロン活動を記録した。各ニューロンの反応特性を見ると、これまでに我々がnaiveの動物について報告してきた結果と同様、炎症を起こした動物においても老齢群の方が高い反応性を示していた。しかし、本研究の結果で特に注目される点は、炎症時における老齢動物の機械刺激と温度刺激に対する反応性の違いである。従来の報告からすると、若齢動物における下行性抑制系の働きは脊髄後角の機械受容性および温度受容性に関係なく、侵害受容ニューロンに対して同じように作用していると考えられる。もし、侵害入力に対する抑制作用が機械および温度感覚の両方に対し同様に作用するものと仮定すると、老齢動物における機械刺激に対する反応も温度刺激に対する反応も同じように増強するはずである。しかし、本研究で示したように機械刺激や熱刺激に対する反応性の増強は比較的弱く、冷刺激に対する反応の増強が著しいという結果が得られた。この結果から、おそらく炎症が起こった場合に、冷覚情報伝達経路と機械受容あるいは温熱感覚受容経路とに対する加齢の影響には、異なるメカニズムが関与していると想像される。しかしながら、現時点に於いてはこれら異なる働きが起こってくる機序については全く不明である。温度刺激と機械刺激に対する反応性の違いがいかなる神経メカニズムによって発生するかについて今後研究を進めていく予定である。

最近、脊髄後角侵害受容ニューロンのあるものは熱刺激および冷刺激の両方に反応する (熱・冷感受性ニューロン) と報告され、脊髄後角に分布する侵害受容ニューロンが痛覚情報処理に対してより複雑な機能を有する可能性が示された。しかし、このタイプのニューロンの出現頻度は少なく、機能的役割については全く明らかにされていない。我々のこれまでの研究で、加齢に伴って熱・冷感受性広

作動域侵害受容ニューロンが多数検出されるようになることが明らかになっていた。本研究でも、naive群において比較的多くの熱・冷感受性ニューロンが検出されたが、炎症群において熱・冷感受性ニューロンの検出率はより高く増加した。このようなマルチモダールな侵害受容ニューロンは機械刺激に対する反応性から全て広作動域侵害受容ニューロンに分類された。これらの結果から、広作動域侵害受容ニューロンが加齢により最も強く影響を受け、その生理学的性質を変化させる可能性が示された。

ここに示したような広作動域侵害受容ニューロンの加齢に伴うマルチモダールな変化は受容感覚のモダリテーの弁別能の低下を引き起こす可能性があると考えられる。このような加齢に伴う中枢神経系の可塑的变化は、おそらく高齢者に発症する感覚異常の原因の一つになるものと想像される。

E. 結論

老齢ラットの足底皮下にCFAを注入し炎症モデルラットを作成した。同ラットのL4-L6脊髄後角から単一侵害受容ニューロン活動を記録し、ニューロン活動に対する加齢の影響について検索した。老齢ラットでは、熱および冷刺激の両方に反応する広作動域侵害受容ニューロンが多数検出された。冷刺激に対する反応は老齢ラットの炎症群で有意に高い値を示した。機械刺激および熱刺激に対する反応は老齢ラットにおいて高い反応を示したが、両群に有意差は認められなかった。以上の結果から、高齢者において脊髄後角の広作動域侵害受容ニューロンはマルチモダールな性質を有するようになるため、より高い活動性を示すにもかかわらず弁別能が低下する可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 85: 263-271, 2000.
2. Kenshalo, R.D., Iwata, K., Sholas, M. and Thomas, D. A., Response properties and organization of nociceptive neurons in area 1 of monkey primary somatosensory cortex. *J. Neurophysiol.* 84: 719-729, 2000.
3. Masuda, Kato, T., Hidaka, O., Matwuo, R., Inoue, T., Iwata, K. and Morimoto, T., Neuronal activity in the putamen and the globus pallidus of rabbit during mastication., *Neurosci. Res.* 39: 11-19, 2001.
4. Akira Komuro, Yuji Masuda, Koichi Iwata, Masayuki Kobayashi, Takafumi Kato, Osamu Hidaka and Toshifumi Morimoto, Influence of food thickness and hardness on possible feed-forward control of the masseteric muscle activity in the anesthetized rabbit. *Neurosci. Res.* 39: 21-29, 2001.
5. Dai, Y., Iwata K., Kondo, E. and Noguchi, K., A selective increase in Fos expression in the spinal dorsal horn neurons following quantitative thermal stimulation in rats with experimental mononeuropathy. *Pain* 90: 287-296 2001.
6. Hirofumi Nomura, Akiko Ogawa, Akimasa Tashiro, Toshifumi Morimoto, James W. Hu and Koichi Iwata, Induction of Fos protein-like immunoreactivity in the trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following noxious and non-noxious mechanical stimulation of the whisker pad of the rat with an inferior alveolar nerve transection. *Pain (in press)* 2001.

7. Akira Komuro, Toshifumi Morimoto, Koichi Iwata, Tomio Inoue, Yuji Masuda, Takafumi Kato, and Osamu Hidaka, Possible feed-forward control of jaw-closing muscle activity during rhythmic jaw movements in the anesthetized rabbit. *J Neurophysiol.* (in press) 2001.
 8. Eiji Kondo, Koichi Iwata, Akimasa Tashiro, Yoshiyuki Tsuboi, Tetsuo Fukuoka, Toshifumi Morimoto and Koichi Noguchi. Involvement of glutamate receptors on hyperexcitability of wide dynamic range neurons in the gracile nucleus of the rats with experimental mononeuropathy. *Pain* (in press) 2001.
 9. Koichi Iwata, Takao Imai, Yoshiyuki Tsuboi, Akimasa Tashiro, Akiko Ogawa, Toshifumi Morimoto and James Hu. Alteration of Medullary Dorsal Horn neuronal activity following inferior alveolar nerve transection in rats. *J Neurophysiol.* (in press) 2001.
2. 学会発表
1. 岩田幸一 侵害受容の中枢機序【シンポジウム 痛みの臨床生理学】 第30回臨床神経生理学会学術大会 2000.12.13-15.
 2. Iwata, K., Nomura, H., Ogawa, A., Tamura, Y., Tashiro, A., Morimoto, T. Central mechanism of mechanical hyperalgesia in the whisker pad region of the rat with an inferior alveolar nerve transection *Asian Pain Symposium* 2000.11.30-12.1.
 3. Masuda, Y., Kuroda, S., Tsuji, H., Nagase, Y., Iwata, K. and Morimoto, T. Inhibitory effect of focal brainstem region on mastication in rabbits. 30th Annual Meeting Society for Neuroscience 2000.11. 4-9.
 4. Tashiro, A., Tamura, Y., Morimoto, T., Iwata, K. Modulation of primary somatosensory cortical neuronal activity during monkey's detection of perceived change in thermal stimulus intensity. 30th Annual Meeting Society for Neuroscience 2000. 11. 4-9.
 5. Dai, Y., Iwata, K., Kondo, E., Morimoto, T., Noguchi, K. A selective increase in fos expression in spinal dorsal horn neurons following graded thermal stimulation in rats with experimental mononeuropathy. 30th Annual Meeting Society for Neuroscience 2000. 11. 4-9.
 6. 岩田幸一 下歯槽神経切断により発現する知覚過敏の中枢機構 (シンポジウム) 歯科基礎医学会 2000.12.9.30-10.1.
 7. 岩田幸一、田代晃正、小川明子、田村泰久、森本俊文、神田健郎 皮膚炎により誘導される老齡ラット脊髄後角侵害受容ニューロン活動の変調 第23回日本神経科学大会・第10回日本神経回路学会大会合同大会 2000.9.4-6.
 8. 神田健郎、佐藤斉、岩田幸一、野口光一 老齡ラット脊髄後角侵害受容ニューロンの活動亢進 第23回日本基礎老化学会 200.6.28-30.
 9. Iwata, K., Tashiro, A., Tamura, Y., Noguchi, K., Morimoto, T. Modulation of primary somatosensory cortical neurons following thermal stimulation of the face in awake behaving monkeys *SPRING PAIN RESEARCH CONFERENCE Grand Cayman* 2000.5.6-13.
 10. 坂元麻弥、野村洋文、京田直人、見崎徹、坪井見行、岩田幸一 下歯槽神経切断ラットの口髭部に対する温刺激により発現する Fos 様蛋白陽性細胞の検討 日本麻酔学会第47回大会 2000.4.6.

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）
分担研究報告書

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

昨年までの本厚生科学研究によって、老齡ラットにおいては下降性抑制系のセロトニンおよびノルアドレナリン陽性線維が減少していることが明らかとなり、老化に伴う下降性抑制系の機能低下が示唆された。末梢からの侵害受容に対して、脊髄内や下降性ニューロン等の総合的な影響の結果として、老齡ラットが若齡ラットに比べて、どのような反応の違いを示すか解明することを本研究の目的としている。

本年度は、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、老齡ラットと若齡ラットにおいて、炎症後1日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ことで、侵害情報の入力によるニューロンの活性化の程度の変化、及びその部位的差を検討した。その結果、末梢炎症モデルラットの脊髄深層において、老齡ラットにおいて多数のc-fos蛋白の発現が観察され、脊髄内及び下降性の抑制系の機能低下による遺伝子発現レベルの細胞活動性の亢進が確認された。

A. 研究目的

従来の研究から高齢者は若齡者に比べ、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、老齡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。昨年までの本厚生科学研究によって、老齡ラットにおいては下降性抑制系のセロトニンおよびノルアドレナリン陽性線維が減少していることが明らかとなり、老化に伴う下降性

抑制系の機能低下が示唆された。しかしながら、侵害伝達系は一次知覚ニューロン、脊髄内の内因性ニューロン、下降性ニューロン等、多数の神経単位の複雑なネットワークを形成している。末梢からの侵害受容に対して、これらの総合的な反応として、老齡ラットが若齡ラットに比べて、どのような相違を示すかを本研究の目的としている。

B. 研究方法

免疫組織科学：

末梢炎症モデル 若齡および老齡ラットの一側足底皮下に、 $200\mu\text{l}$ CFA (complete freund's adjuvant) を注射し、注射後1-2時間後からの腫脹、痛覚過敏反応等を

確認した。24時間後ラットを 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 μ 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c-fos蛋白に対するポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を施行した。まず、切片を1.5% normal goat serum (NGS)に4℃で24時間インキューベ-

トし、次いで anti-c-fos polyclonal antiserum (1:15000; AB-5, Oncogene Science, USA)、4℃で48時間インキューベートした。1次抗体にインキューベートした後、切片を biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin G (1:200; Vector Labs, Burlingame, CA, USA)に37℃下で1時間インキューベートした。その後、peroxidase-conjugated avidin-biotin complex (1:200; ABC, Vector Labs)に4℃下で2時間インキューベートし、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

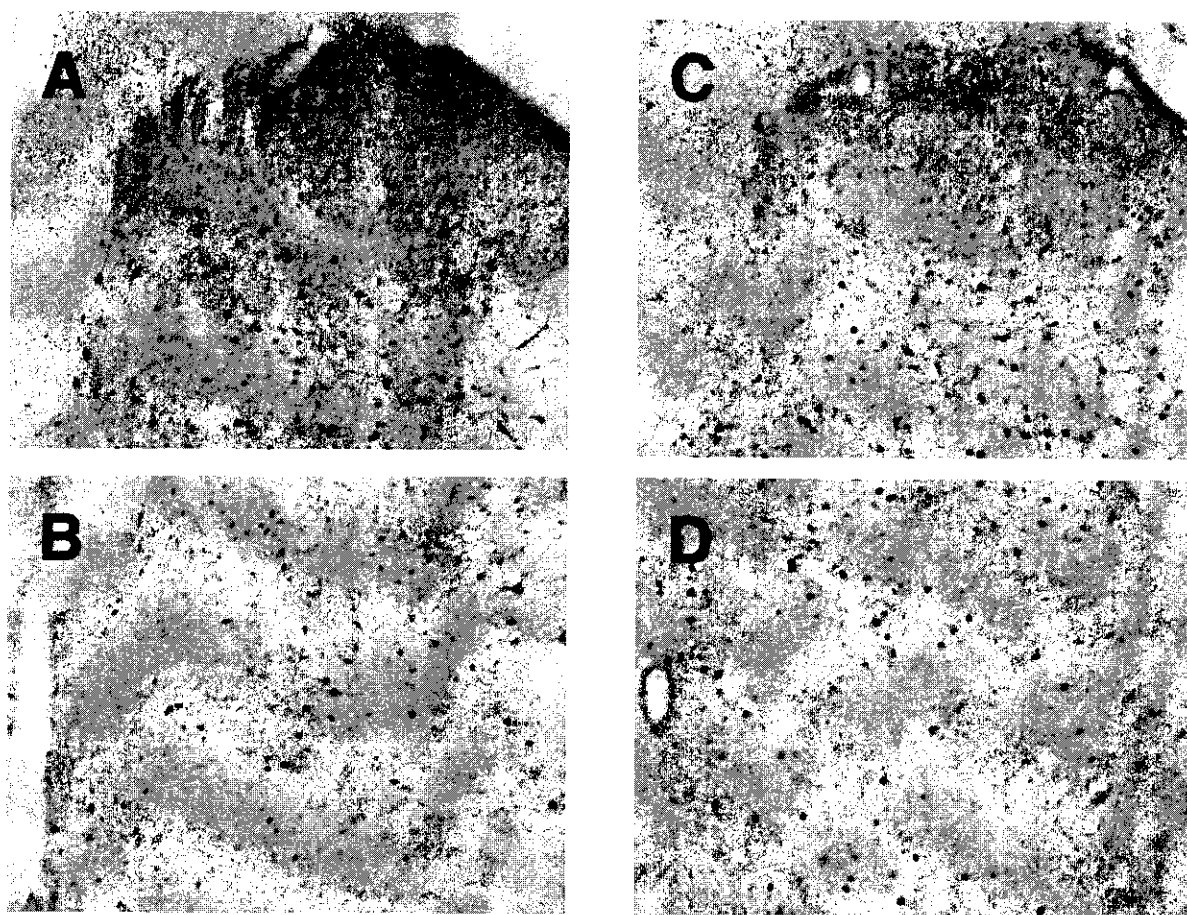


図1 末梢炎症モデルラットの脊髄後角 (L4)

A: 8月齢ラット脊髄後角浅層 (I-II層) のc-fos陽性神経ニューロン; B: 8月齢ラット脊髄後角深層 (IV-VI層) のc-fos陽性神経ニューロン; C: 36月齢ラット脊髄後角浅層 (I-II層) のc-fos陽性神経ニューロン; D: 36月齢ラット脊髄後角深層 (IV-VI層) のc-fos陽性神経ニューロン Aと比較してc-fos陽性ニューロンの増加が観察される。

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。

L4レベルの切片を観察し、脊髄後角I~II層、III~IV層、V~VI層に分けて、c-fos陽性ニューロン数を計数した。

関節炎モデル 一側膝関節内にCFA (complete Freund adjuvant) 200 μ l注射し作成した。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(L2レベル)におけるc-fos発現を観察した。

以上の実験結果は、兵庫医科大学動物実験倫理委員会の規定に準拠して施行した。

C. 研究結果

末梢炎症モデル作成24時間後の脊髄後角(L4)におけるc-fos発現ニューロン数を比較検討すると、脊髄後角V-VI層においては、老齢ラットの方が若齢ラットに比べc-fos発現数が有意に多い傾向が観察された(Fig. 1及びFig. 3A)。III-IV層においても同様の傾向が観察された(Fig. 3A)。一方、脊髄後角浅層(I-II)層では、逆に老齢ラットの方が発現数が少ない傾向が観察されたが、これは統計学的に有意にはならなかった(Fig. 1及びFig. 3A)。一方、慢性炎症としての時間経過がゆっくりである関節炎モデルにおけるc-Fos発現に関し

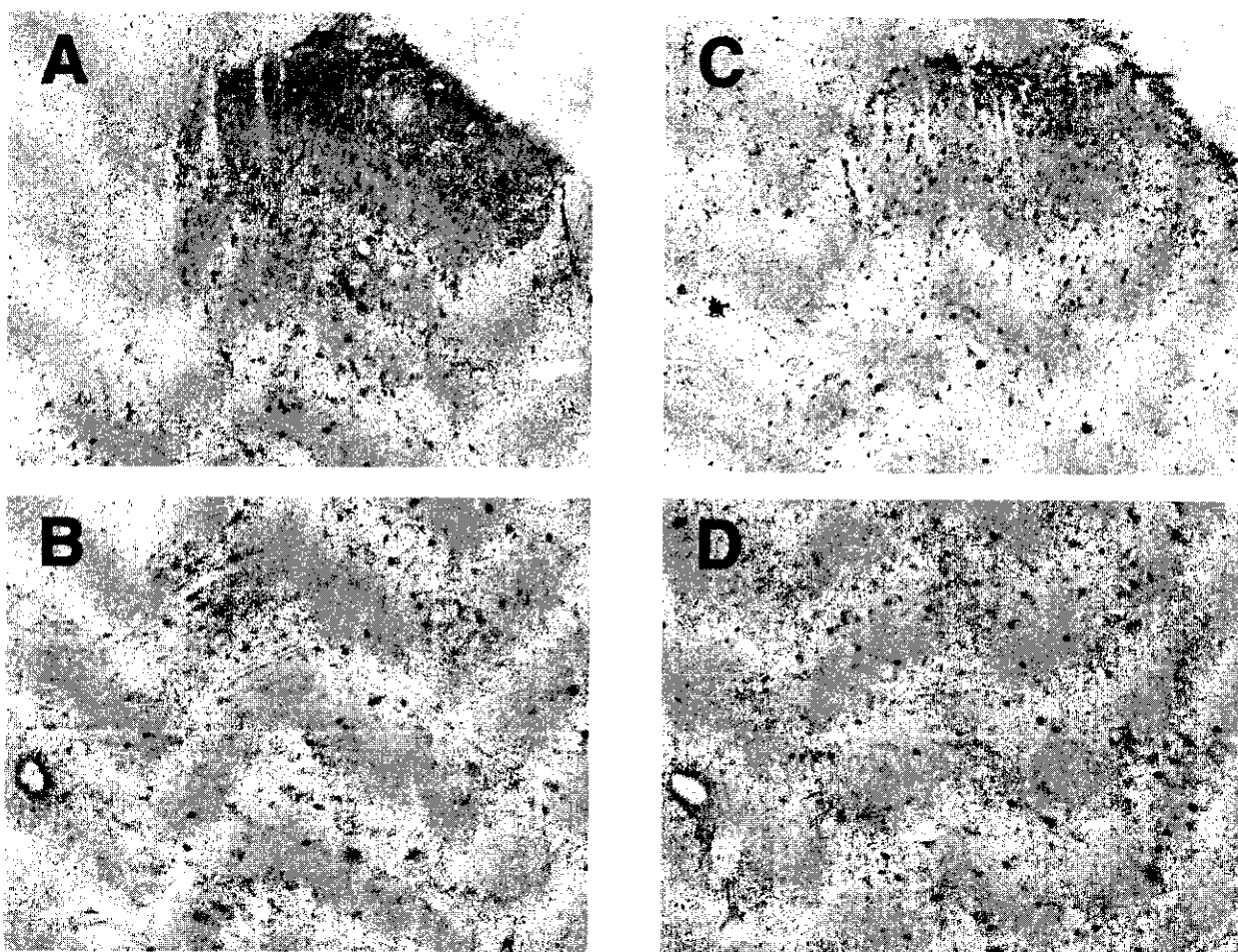


図2 関節炎モデルラットの脊髄後角(L2)

A: 8月齢ラット脊髄後角浅層(I-II層)のc-fos陽性神経ニューロン; B: 8月齢ラット脊髄後角深層(IV-VI層)のc-fos陽性神経ニューロン; C: 36月齢ラット脊髄後角浅層(I-II層)のc-fos陽性神経ニューロン; D: 36月齢ラット脊髄後角深層(IV-VI層)のc-fos陽性神経ニューロン。Aと比較してc-fos陽性ニューロンの増加が観察される。

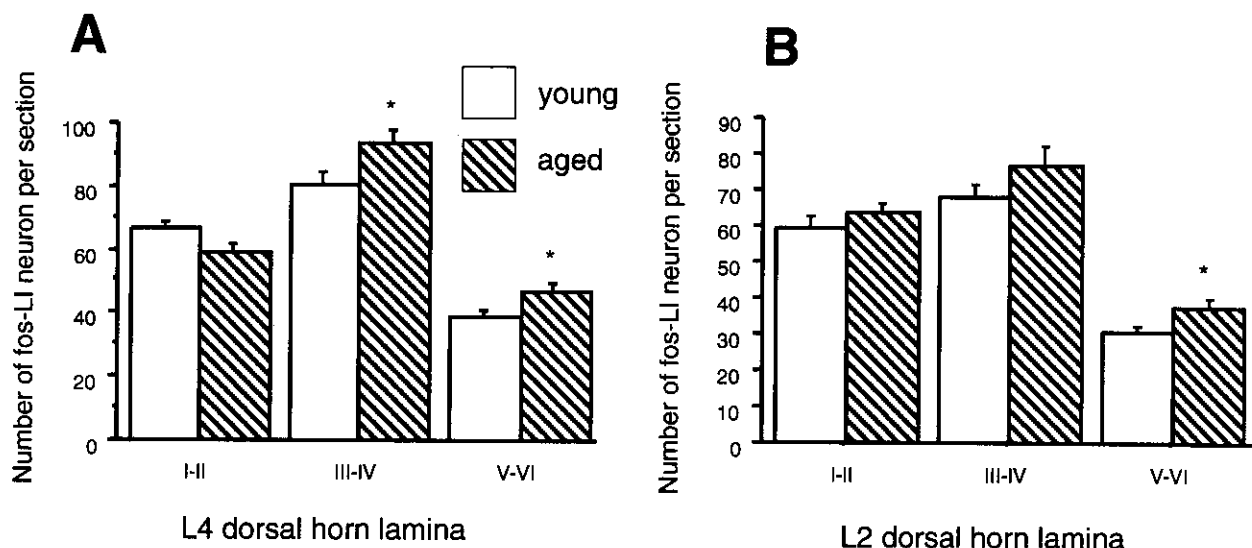


図3 1切片あたりのc-fos陽性ニューロン数の変化
A: 末梢炎症モデルラット; B: 関節炎モデル

でも、老齢ラットでは脊髄後角深層(III-IV層)で、有意なc-fos発現ニューロン数の増加が観察された (Fig. 2 及び Fig.3B)。

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、老齢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

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。