

200/0174

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 神田 健郎

平成14（2002）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 . . . 3
II. 分担研究報告	
1. 慢性炎症モデル老齢ラットにおける脊髄後角侵害受容ニューロンおよび延髄薄束核ニューロンの電気生理学および免疫組織学的解析	岩田 幸一 . . . 14
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 . . . 20
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 . . . 24
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 . . . 30
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	. . . 35
IV. 研究成果の刊行物・別刷 (別添)	

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

前年度までの研究で高齢ラットの脊髄後角の侵害受容ニューロンの活動性が高まっていることが明らかとなった。変化の拡がり、痛覚情報伝達路全体のシステムとしての変化を検討するため、同じ一次求心性神経の入力を受ける延髄後索核のニューロンについて調べた。脊髄後角同様、後索核侵害受容ニューロンの自発放電、刺激後発射は高齢群で若齢群より有意に高く、また、温度刺激に対する反応性も高齢群で高かった。若齢群の後索核ではP物質免疫陽性軸索は少数認められるのみであるのに対し、高齢群では多数検出された。老化動物においては後索系が痛覚情報伝達に対し、より重要な働きを担うように変化している可能性がある。しかし、後索核ニューロンの細胞内情報伝達系に明確な機能変化を示す結果は見いだせなかった。

高齢ラットでは下行性の痛覚抑制系の機能が低下し、後角侵害受容ニューロンの活動が亢進し、可塑的变化（wind-up）も起こり易くなっていると考えられたので、選択的セロトニン再取り込み阻害薬の効果を調べたところ、C線維活動後の促進効果が減衰する時定数が有意に低下し、wind-upを起こり難くする事が分かった。高齢者の特性に適合した鎮痛薬として一層の臨床的調査・研究を促す結果である。但し、脊髄、一次知覚ニューロンにおける抑制性アミノ酸受容体およびオピオイドペプチドmRNA発現から検討した結果では、有意な変化は観察されず、抑制系の低下は遺伝子変化までには至っていないと考えられた。

侵害刺激の交感神経系への影響についての検討では、皮膚侵害刺激による心臓交感神経活動の増加反応は、超高齢群においても保たれており、 β 受容体作動薬投与による最大心拍数は、超高齢群では成熟群に比べて有意に減弱することから、神経性反射経路は保たれているが、心臓の β 受容体機能が低下するために、心拍数増加反応が減弱することが示唆された。侵害刺激の自律神経機能への影響が高齢になっても良く保たれていることは、高齢者の痛みのケアで留意すべき点となろう。

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も言われている。他の神経系同様、老化は痛覚情報伝達系に対しても様々な変化を誘導していると想像される。本研究はこのような老化に伴う痛覚情報伝達系の変化を明らかにし、高齢者の特性を考慮した慢性痛の予防や治療法の開発につながる基礎知識を得ることを目的としている。前年度までの研究に於いて、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等を明らかにしてきた。本年度は以下の4つの研究から上記目的にアプローチした。

(研究1)これまでの無傷および慢性炎症モデルラットの研究から、老化に伴って脊髄後角に起こってくる様々な可塑的变化は脊髄後角の侵害受容ニューロン活動の変調を招くことが判明した。この変化には、下行性痛覚抑制系の変化が含まれていることが示唆された。一方、後角侵害受容ニューロンでその軸索を視床に投射しているのが確認できたものが高齢ラットでは見いだされず、下行性経路の機能不全だけでなく、侵害情報を上位中枢へ伝える上行性経路の機能不全も同時に起こって

いるものと考えられる。侵害情報を上位中枢に伝える経路は主に脊髄視床路、脊髄網様体視床路および後索路であることが知られている。高齢ラットにおいて、脊髄視床路以外の機能不全が考える上から、本年度は後索系に注目し、薄束核に投射する一次求心神経線維のP物質発現性、および末梢炎症に伴うFos様タンパク発現の有無、およびこの核に分布する侵害受容ニューロンの電気生理学的反応特性について検索した。

(研究2) 昨年までの研究によって、高齢ラットにおいては下行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、老化に伴う下行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、下行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、高齢ラットが若齢ラットに比べて、どのような相違を示すか、またその相違を生じる原因は何かを検索した。

(研究3) 侵害情報伝達路の可塑的变化の一つとしてのwind-upの背景機序を反映する新たな指標として減衰時定数を定義した。高齢ラットではこの時定数が成熟ラットに比べて有意に長く、可塑的变化が起こりやすくなっていること、更にこの変化には下行性の痛覚抑制系の機能低下が関与していることを示してきた。下行性抑制系の一つにセロトニン作動性神経系が報告されている。そこで、高齢者の特性に合致した治療法を探ることも視野に入れ、主に選択的セロトニン再取り込

み阻害薬の時定数等 wind-up への影響を調べた。また、NMDA 受容体の関与についても検討した。

(研究4) 痛みを起こす侵害性刺激は、自律機能にも様々な反射性反応を引き起こす。侵害刺激が自律機能に及ぼす反射性効果とその反射経路の加齢変化について明らかにし、高齢者の痛みの治療に役立てることを目的としてこれまで研究を進めてきた。昨年度までに、上脊髄性の心拍数増加反応が約3年齢の超高齢ラットで成熟ラットに比べて減弱するが、脊髄性の心拍数増加反応は超高齢ラットにおいても良く保たれていることを明らかにした。今年度は反射経路のどの部分が加齢により変化するかを明らかにするため、第一に心臓交感神経活動を直接記録し、侵害性刺激による心臓交感神経活動増加反応の加齢変化を検討し、次に β 受容体機能の加齢変化についても検討した。

B. 研究方法

実験はFischer系(一部Wister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) 実験はFischer系(一部Wister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。実験は全て、各研究施設における動物実験倫理委員会の認定を受けて施行した。

(研究1) 若齢群(9-12ヶ月齢)と高齢群(28-32ヶ月齢)に分けて実験を行った。1) P物質陽性軸索の検出: Pentobarbital Na (80mg/kg/ip)で麻酔し4% paraformaldehydeにて灌流固定し

た。摘出した脳から薄束核を含む領域を切り出し、厚さ50 μ mの前額断連続凍結切片を作成した。P物質様免疫陽性線維(SP-LI fiber)の免疫染色には0.1% BSAで20,000倍に希釈した affinity purified polyclonal rabbit antiserum SP antibody (Genosys)を用いた。DABで発色させ、切片を光学顕微鏡にて検索し、NIH imageを用いてSP-LI fibersの分布密度を定量化した。

2) Fos陽性細胞の検出: 足低部皮下にCFAを0.05ml注入し、2日後にラットをPentobarbital Na (80mg/kg/ip)で深く麻酔し4% paraformaldehydeにて灌流固定した。摘出した脳から薄束核を含む領域を切り出し、厚さ50 μ mの前額断連続凍結切片を作成した。Fos-LI cellsの免疫染色には0.1% BSAで10,000倍に希釈した affinity purified polyclonal rabbit anti human c-fos antibody (Ab-5, Oncogene Science)を用いた。DABで発色させ、neuroLucida (Neuroscience)を用いて切片の外形およびFos-LI cellsを描画し、Fos-LI cellsの分布を検索した。

3) 後索核侵害受容ニューロン応答の検索: ネンプタール麻酔下に、臭化パンクロニウム(5mg/kg, i.v.)にて非動化し人工呼吸を施して記録を行った。実験中、呼気CO₂濃度を3.0-4.0%に、体温を37-38℃に保った。エナメルコートしたタングステン微小電極(電気抵抗: 10-12M Ω)を後索核に刺入し、単一ニューロン活動を捕らえた後、下肢皮膚に機械刺激を与え、広作動域侵害受容ニューロン(WDRニューロン)を同定した。定量的な機械刺激には von Frey filament を、ピンチ刺激には

動脈クレンメを用いた。温度刺激（冷刺激：10℃-30℃、熱刺激44-50℃）には直径10mmのコンタクトサーマルプローブを用い、受容野内の最も機械刺激閾値の低い場所を刺激した。刺激時間は10秒間とし、各刺激間隔には3分間に設定した。

神経活動記録部位に直流電流（10 μ A、15秒）を流してlesionを作り、10%ホルマリン固定後、チオニン染色を施してニューロン活動記録部位を同定した。

（研究2）1）免疫組織科学 i）末梢炎症モデル：ラットの一側足底皮下に、200 μ l CFA (complete freund's adjuvant) を注射し（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 pentobarbital Na（80mg/kg, i.p.）で麻酔し4%paraformaldehydeにて灌流固定し、L4-L6のレベルで脊髄を取り出した。30 μ mの前額断切片を作成し、c-fos蛋白に対するポリクローナル抗体（1: 15000; AB-5, Oncogene Science, USA）を用いて免疫組織染色を施行した。DAB（Sigma）で発色後、検鏡下c-fos陽性切片を計数した。ii）熱刺激と後索核のpERK発現：痛覚刺激に反応する細胞内情報伝達系分子であるERK (extracellular-signal regulated kinase) のリン酸化抗体を用いて、若齢ラット、高齢ラットの後索核におけるpERK発現に関しての差も検討した。一側の足を50℃の湯に浸し、熱疼痛刺激を与えた後、すぐに動物を灌流固定し、切片は上記の方法で作成し、延髄後索核のクリオスタット切片に対して、pERK抗体を用いた免疫組織化学法を用いた。

2）in situ ハイブリダイゼーション法：若

齢および高齢ラットのL4,5レベルの後根神経節(DRG)と脊髄を摘出し、切片を作成。オリゴヌクレオチドプローブで、GABAA-g2-R, GABAB-R, GlyB-R, ENK, DYN の in situ ハイブリダイゼーション法を施行した。プローブの標識は、35S-dATPでおこない、標準のプロトコールで組織切片を処理、RI標識したプローブで、オーバーナイト incubation した後、washingを行った。RIの可視化は、オートラジオグラフィーを行った。DRGおよび脊髄における上記のmRNA発現を検討し、若齢ラットおよび高齢ラットにおける発現の差異を検討した。

（研究3）若齢群6-7ヶ月齢、成熟群11-13ヶ月齢、高齢群29-32ヶ月齢を用いた。ハロセン麻酔下に実験を行った（導入時：2.0%、手術中：1.0-1.5%、記録時：0.8-1.2%）。ラットを金属フレームにピン（腰部）とクランプ（足）で固定し、腓腹神経刺激による屈筋反射の筋電活動を半腱様筋から記録した。実験により胸髄下部で脊髄を切断した。腓腹神経の刺激は定電流パルスにより行い、幅2ミリ秒、強さは0.5から5.0ミリアンペア（通常0.5ミリアンペア）であった。5回の連発刺激を1セットとして加え、この間の反応の増強を観察した。連発刺激の刺激間隔（3, 5, 8, 10, 12, 15, 20秒）を変えて（順序はランダム）、1分の間隔を置いて繰り返し、各刺激間隔による試行が3回になるようにした。刺激後100から600ミリ秒の間の反応を積分して、3回の平均をC線維により誘発された反応の大きさとした。反応の増強（Wind-up）は従来の絶対値：（1回から5回目までの反応の和）-（1回目の

反応の5倍値) および相対値: (絶対値) / (1回目の反応の5倍値) による他、刺激間隔延長に伴うwind-up低下の程度で評価した。薬物投与: 選択的セロトニン再取り込み阻害薬であるフルボキサミンを腹腔内に、セロトニン前駆物質の5-ハイドロキシトリプトファン(5-HTP)・グルタミン酸受容体阻害剤のMK-801・ケタミンは静脈内投与した。

一部の実験では、最後に坐骨神経を切断し、腓腹神経刺激によるC線維の活動を記録・確認した。

(研究4) 成熟群として4-6ヶ月齢、老齢群として23-24ヶ月齢、超老齢群として32-36ヶ月齢の3群のWistar系ラット(190g-300g)を用いた。ラットをウレタンで麻酔し(0.9-1.1g/kg, i.p.) 気管挿管して人工呼吸にし、呼気中炭酸ガス濃度を約3%に、体温を約37.5℃に保った。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。心臓交感神経活動の記録: 交感神経活動に迷走神経活動が混入するのを防ぐために、迷走神経を頸部で両側性に切断した。ラットを背臥位にし、第二肋骨を部分的に切除し、実体顕微鏡下で星状神経節から出て心臓に向かう交感神経を周囲の組織から分離し、なるべく心臓の近くで切断し、切断中枢端から神経活動を記録、ミニコンピューターで5秒毎のスパイク数を数えた。

侵害刺激: 胸部あるいは後肢足趾の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。血圧低下を緩和する目的で血漿増量剤(4%Ficoll, Pharmacia, Sweden)を必要に応じて投与し、平均血圧を40~60mmHgに維持した。 β 受容体刺激薬の投与: β 受容体刺激薬としてイソプロテレノールを0.1ng-100 μ g/kg静脈内投与した。血圧低下に伴う圧受容器反射の影響を除外するため、脊髄を切断し、迷走神経も切断した動物で実験を行った。

C. 研究結果

(研究1) 1) P物質様免疫陽性軸索およびFos様陽性細胞の分布: 老齢群後索核では若齢群に比べより多くのP物質陽性軸索が発現していた。また、同領域において老齢群では足低部皮下にCFA注入により多数のFos様タンパク陽性細胞(Fos-LI cells)が発現した。これらは後索核の周辺部を中心に分布していた。2) 薄束核ニューロンの自発放電および侵害刺激後の後発射: 全部で32個の広作動域侵害受容ニューロン(老齢群: 20個、若齢群: 12個)を記録した。老齢群の薄束核に分布する侵害受容ニューロンは若齢群に比較して高い自発放電をしており、また、侵害刺激後に長く続く後発射を示すものが多く観察された。3) 機械および熱刺激に対する応答: 解析の対象とした全てのニューロンは筆による機械刺激に反応した。老齢群および若齢群とも機械刺激強度増加に伴ってスパイク頻度を増していたが、老齢群と若齢群を比較すると侵害レベル刺激で老齢群の方がより高い発射応答を示した。熱刺激に対する反応は、いずれの刺激温度に対しても老齢ラットの方が若齢

ラットのそれよりもより高い傾向を認めた。

(研究2) 1) 後索核の c-fos 発現: 末梢炎症モデル作成24時間後の延髄後索核における c-fos 発現は、散在性に c-fos 陽性ニューロンが炎症側の薄束核に観察された。老齢ラット、若齢ラットの間には、有意な発現の差異を観察されなかった。2) 後索核における熱刺激に対する pERK 発現: 老齢ラットにおいて、薄束核の刺激側と非刺激側の間に pERK 発現の差異を認めなかった。しかし、両側の後索核の pERK 免疫反応性が明らかに、若齢ラットと比較して増加しており、しかも、延髄の中で、後索核特有の変化であった。3) DRG、脊髄における抑制性アミノ酸受容体およびオピオイドペプチド mRNA 発現: GABAA-g2-R, GABAB-R, GlyB-R mRNA 発現は、L4/5 DRG にて、ENK と DYN mRNA 発現は L4/5 脊髄で観察した。3つの抑制性アミノ酸受容体は、DRGの大型細胞中心に発現が観察された。しかしながら、老齢ラット、および若齢ラットの間には、明瞭な差異は観察されなかった。脊髄におけるオピオイドペプチド mRNA 発現は従来の報告と同様に多くの後角ニューロンで観察されたが、老齢ラットと若齢ラットの間には、観察されなかった。

(研究3) 1) フルボキサミンの影響: フルボキサミン 30 mg/kg の投与により有意に短縮した ($p < 0.05$, Wilcoxon の符号順位検定)。絶対 Wind-up 値および相対 Wind-up 値は共にフルボキサミン投与により低下したが、その変化は統計学的には有意ではなかった。脊髄を胸髄下部 (Th10 レベル) で横断すると、時定数は著しく長くなった。2) 5-ハイドロ

キシトリプトファン (5-HTP) の影響: 5-HTP の影響は、胸髄下部で脊髄を切断したラットで調べた。5-HTP の投与により反応は一過性に増強したが、時定数の測定では統計学的に有意の差は得られなかった。3) MK-801 の影響: 屈曲反射に対する MK-801 の影響では、脊髄無傷状態で 0.02-0.05 mg/kg の静脈内投与により反応が一過性に 5 ~ 20 分間増強した後、低下する傾向が見られた。一方、脊髄切断後はこの増強反応は見られず、抑制のみが出現した。Wind-up 減衰時定数および相対 Wind-up 値は共に低下する傾向が認められたが有意の差ではなかった。4) ケタミンの影響: ケタミン投与により反射活動の大きさ自体が低下すると共に、相対 Wind-up 値および Wind-up 減衰の時定数も低下する傾向が見られたが、その変化は有意ではなかった。特に、脊髄切断後のテストではケタミン投与 (2.5 - 7.5 mg/kg) の影響が殆ど見られなかった。

(研究4) 1) 中枢神経無傷時: 胸部のピンチ刺激で、心臓交感神経活動は増加し、心拍数が増加した。この心拍数増加反応は老齢群では成熟群と同様であったが、超老齢群では成熟群に比べて有意に減弱した。心臓交感神経の反応はいずれの群の間にも有意な差は認められなかった。後肢のピンチ刺激でも、心臓交感神経活動、心拍数が増加した。心拍数は成熟群では最大約 41 beats/min 増加し、この心拍数増加反応は老齢群では成熟群と同様であったが、超老齢群では成熟群に比べて有意に減弱した。2) 急性脊髄切断時: 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。胸部のピンチ刺激で、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。心臓交感神経活動の増加反応も中枢神経無傷ラットに比べて大きかった。いずれの反応とも各月齢間で有意の差が認められなかった。一方、後肢のピンチ刺激はいずれの群においても心拍数、心臓交感神経とも有意な反応を誘発しなかった。3) 心臓β受容体機能の加齢変化：β受容体刺激薬としてイソプロテレノールを0.1ng-100 μg/kg 静脈内投与したところ、成熟ラットでは10ng/kg から有意な心拍数増加反応が見られ、1 μg/kg でほぼ最大に達した。成熟群と老齢群の間には有意な差は認められなかったが、超老齢群では少ない用量で最大に達し、さらに最大心拍数が、有意に減弱していた。

D. 考察

脊髄後角に分布する侵害受容ニューロンの自発活動および皮膚受容野刺激に対する反応性が高齢ラットで却って強まっていることが昨年までの研究で明らかになっていた。本年度の研究結果から、高齢ラット薄束核の侵害受容ニューロンも同様に活動性を増していることが明らかになった。また、老齢ラットの脊髄後角には視床の電気刺激に逆方向性応答を示すニューロンは一つも見出されなかったが、薄束核ではほとんどのニューロンが視床に投射軸索を送る投射ニューロンであった。さらに、老齢ラットの薄束核ニューロンの多くは機械刺激だけでなく、熱刺激にも応答するマルチモーダルな性質を有していた。これまでの多くの研究により、後索系は主に内臓

感覚や触覚などの非侵害情報伝達に重要な領域であると報告され、少数のニューロンが侵害情報伝達に関与すると言われていたが、高齢ラットにおいては薄束核が侵害情報伝達により大きな役割を果たすように変化しているように見受けられる。

また、老齢ラットでは薄束核内に分布するSP様陽性軸索の著しい増加が認められた。薄束核内のSP陽性軸索はほとんどが一次求心神経由来であることから、老化に伴ったSP陽性軸索の増加は薄束核に投射する有髄神経軸索がSPを合成するように変化した可能性がある。また、老齢ラットでは、一次知覚ニューロン大型細胞、後索核、視床の非侵害情報伝達系路の異常が報告されており、今回は末梢炎症や痛覚刺激後の後索核でのactivityの変化をc-fosやpERK発現で見た。刺激によるactivityに、老齢、若齢ラット間で差が観察されなかったが、刺激なしの状態の老齢ラットで、pERKの染色が増加していることは興味深い。これは刺激により短時間の誘導ではなく、長期間の後索系の長い有髄線維の変性による変化である可能性があると考えられる。今後さらに、薬理学的手法や分子生物学的手法を駆使して、生理活性物質の合成機構や細胞内情報伝達系に対する老化の影響について研究を進める必要がある。

前年度までのwind-upに関する研究で新たに定義した減衰時定数は、C線維活動により誘発される反射反応自体の大きさや、絶対・相対wind-up値との間に相関が認められず、wind-upについて従来とは異なる側面を評価しているものと考えられた。誘発される反応が

大きければそれだけ、興奮性の残存効果が長く続くというわけではなく、効果の持続時間を規定しているものが他に存在する可能性を示していた。本実験で、選択的セロトニン再取り込み阻害薬フルボキサミンの投与により高齢ラットの wind-up 減衰時定数が有意に低下し、一方、C-線維活動により誘発される反射反応自体の大きさや、相対wind-up値は同様に低下の傾向が見られたもののその変化は有意なものではないことが明らかとなった。これは、セロトニン作動性痛覚抑制系が興奮性の残存効果の減衰を速め、即ち可塑性変化の抑制に大きく関与していることを示唆している。また、この機能が低下して、より低頻度の刺激でwind-up現象（可塑的変化）を引き起こすようになっている高齢ラットが、選択的セロトニン再取り込み阻害薬フルボキサミンの投与により成熟ラットの状態に近づくことが明らかになったことは、この薬品が特に高齢者に対する鎮痛薬として有効であることを示している。

脳幹に起始細胞がある下行性のセロトニン作動性神経系には主として運動ニューロンに終わるものと後角細胞に終止するものが存在することが知られている。更に、後角ニューロンには抑制性の効果を持つものに対して、運動系には興奮性に働くと報告されている。本実験で成熟脊髄ラットに対する5-HTP投与の効果が一過性の興奮増強に現れたのは、この運動ニューロンへの興奮作用がより強く現れたためと考えられる。高齢脊髄無傷ラットへのセロトニン取り込み阻害薬投与の結果と、成熟脊髄切断ラットへのセロトニン前駆

物質投与による結果との差は、脊髄無傷ラットと脊髄切断ラットとではセロトニン放出が異なっていることに由来するのかもしれない。

Wind-upにNMDA受容体の働きが関与していることが従来いわれてきた。しかし、最近になり、これに対して否定的な報告もなされている。本研究に於いても、非競合的NMDA受容体拮抗薬であるMK-801、ケタミンの静脈内投与によってWind-up減衰時定数および相対Wind-up値は共に低下する傾向が認められたものの、その変化は有意でなく、NMDA受容体のwind-upへの関与はあったとしてもその貢献は大きくないものと思われる。

一昨年、昨年の本研究により、高齢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。また、脊髄後角特に深層のニューロンにおいて、高齢ラットが侵害刺激に対してActivityの亢進が、c-fos発現細胞数の増加から観察され、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が物質面からも示されていた。これらの結果を更に裏付ける一つの仮説は、脊髄や一次知覚ニューロンにおける抑制性ニューロンの機能低下による痛覚抑制系の低下であるが、脊髄や一次知覚ニューロンの抑制性アミノ酸の受容体mRNAや、オピオイドmRNAの発現を見ると、若齢ラットと高齢ラットの間には、有意な差異が観察されず、上記仮説を証明するには至らなかった。

侵害刺激の自律神経機能への影響についての研究では、中枢神経無傷時に胸部および後

肢の皮膚ピンチ刺激によって誘発される心拍数増加反応は、約3年齢の超老齢ラットにおいて減弱するが、反応の遠心路である心臓交感神経の反応は、超老齢ラットでも成熟ラットと同様に保たれていることから、上脊髄性の反射性神経経路は超老齢ラットでも良く保たれていることが今回初めて明らかになった。

胸部刺激による心拍数増加反応の経路には、上脊髄性経路の他に脊髄性の経路も存在し、中枢神経無傷時には、この脊髄性反射経路が脳から抑制されている (Kimura et al., 1995)。本研究の中枢神経無傷時と急性脊髄切断時の胸部ピンチ刺激による心拍数増加反応の結果から、脊髄性反射経路も、脊髄反射を抑制する脳からの経路も超老齢ラットにおいて、良く保たれていることが明らかになった。すなわち、侵害性刺激によって誘発される体性-心臓反射の経路はいずれも加齢によってほとんど影響を受けないことが明らかになった。

超老齢ラットにおいて、反射経路が保たれているにも関わらず、侵害性刺激による心拍数増加反応が減弱する原因は、心臓の β 受容体機能が低下したためと考えられる。これまでに、心臓 β 受容体機能が加齢に伴い減弱することが報告されており (Yin et al., 1978; Abrass et al., 1982; Simpkins et al., 1983; Lakatta, et al., 1993)、本研究でも、 β 受容体刺激薬であるイソプロテレノール静脈内投与による心拍数増加反応が超老齢ラットで減弱することを確認した。

急性脊髄切断後に、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、

超老齢ラットでも保たれていた。すなわち β 受容体機能低下の影響が、中枢神経無傷時にはみられ、脊髄切断後にはみられなくなった。この原因として、脊髄切断後には中枢神経無傷時に比べて安静時心拍数が著しく低下するため、ピンチ刺激に対する心拍数増加反応が、 β 受容体が最大に働いた最大心拍数よりも小さいため、十分に反応できると考えられる。

E. 結論

老齢ラットの薄束核に分布する侵害受容ニューロンは活動性の増強を示した。さらに、薄束核に分布するほとんどのニューロンは視床に軸索を送る投射ニューロンであったことから、老齢ラットにおいては後索系が痛覚情報伝達に対して重要な働きを有する様に変化している可能性が示された。また、この様な変化には一次求心神経線維の可塑的変化を伴っているものと考えられる。

老齢ラットにおいて、抑制性アミノ酸受容体およびオピオイドペプチドmRNA発現が特に減弱しているという結果は得られなかった。しかし、後索系の軸索変性の結果と考えられる後索核における細胞情報伝達系の分子の変化が観察された。老齢ラットの痛覚伝達系さらに抑制系の変化については、さらに詳細な分子組織化学的検討が必要であると思われる。

高齢ラットへのフルボキサミン (選択的セロトニン再取り込み阻害薬) 投与で、wind-up減衰時定数 (wind-upという可塑的変化を誘発する効果が、C線維活動によって引き起こされた後にどの様な時間経過で減衰するかを表

す)は有意に低下したが、屈筋反射自体およびその相対wind-up値は低下するものの、統計学的には有意の変化ではなかった。高齢者では下行性の痛覚抑制系の機能が低下し、後角侵害受容ニューロンの活動が亢進し、可塑的变化(wind-up)も起こり易くなっていると考えられ、これが選択的セロトニン再取り込み阻害薬の投与によって改善されることが分かり、高齢者の特徴を考慮した鎮痛薬として注目される。

中枢神経無傷時には胸部および後肢ピンチ刺激による心拍数増加反応は、約2年齢の老齢ラットでは良く保たれているが、約3年齢の超老齢ラットでは有意に減弱することが明らかになった。このメカニズムとして、(1)反射経路は、上脊髄性、脊髄性、脳から脊髄反射を抑制する経路はいずれも超老齢ラットでも良く保たれていること、(2)心臓 β 受容体機能が超老齢ラットで減弱するために、最大心拍数が減少し、ピンチ刺激の反応も減弱すること、が明らかになった。侵害刺激の自律神経機能への影響が高齢になっても良く保たれていることは、高齢者の痛みのケアで留意すべき点であろう。

Ⅱ 分担研究報告書

慢性炎症モデル老齢ラットにおける脊髄後角侵害受容ニューロンおよび延髄薄束核ニューロンの電気生理学および免疫組織学的解析

分担研究者 岩田幸一

大阪大学大学院歯学研究科高次脳口腔機能学講座助教授

研究要旨

ラット延髄後索から単一侵害受容ニューロン活動を記録し、下肢皮膚への侵害刺激に対する反応性を老若間で比較した。動物を若齢群(9-12ヶ月齢)および老齢群(28-32ヶ月齢)に分け、後索核に分布する侵害受容ニューロンに関して、電気生理学および免疫組織学的検索を行った。電気生理学的研究結果から、老齢群の後索核侵害受容ニューロンは若齢群よりも高い自発放電を示し、侵害刺激後に観察される後発射は有意に高い値を示していた。さらに、温度刺激に対する反応性は老齢群において若齢群よりもより高い値を示した。しかし、機械刺激に対しては老齢群と若齢群間において有意差を認めなかった。また、若齢群において、後索核にP物質免疫陽性軸索が少数認められたのに対し、老齢群においては多数検出された。さらに、足低部皮下にCFAを注入すると、老齢群では若齢群に比べ有意に多数のFos陽性細胞の発現を認めた。本研究結果およびこれまでの我々の研究結果から、老化動物においては脊髄視床路だけでなく後索系が痛覚情報伝達に対し、より重要な働きを担うように変化することが示された。

A. 研究目的

これまで、我々は脊髄後角に分布する侵害受容ニューロンに注目して研究を進めてきた。その結果、脊髄後角の侵害受容ニューロンは老化と共に、反応性を増強することが明らかになった。この脊髄後角侵害受容ニューロンの反応性の増強には下行性抑制系の機能不全が関与する可能性を示した。また、下肢にCFAを注入して作成した慢性炎症モデル老齢ラットは若齢ラットに比べ、冷刺激に対する反応が有意に増強することが明らかになった。このように、老化に伴って脊髄後角に誘導される様々な可塑的变化は脊髄後角の侵害受容ニューロン活動の変調を招くことが判明した。

しかし、老齢ラットの疼痛行動を観察した結果、侵害的熱刺激に対する逃避閾値は低下しているのに対し、逃避行動後に引き起こされるリッキング行動の発現率が低下していた。これは老齢ラットでは、逃避反射の亢進がそのままラットの痛覚増強に反映しているのではなく、脊髄レベルで起こる侵害反射の亢進と、より上位中枢における痛覚認知が別々のメカニズムで達成される可能性を示している。おそらく、老齢ラットにおいては下行性経路の機能不全だけでなく、侵害情報を上位中枢へ伝える上行性経路の機能不全も同時に起こっているものと考えられる。これまでの多くの研究により、侵害情報を上位中枢に伝え

る経路は主に脊髄視床路、脊髄網様体視床路および後索路であることが知られている。老齢ラットにおいて、脊髄視床路の機能不全が考えられることから、老化と共にこれ以外の経路の活動性に変化が起こっているものと予想される。

そこで、本年度は後索系に注目し、薄束核に投射する一次求心神経線維のP物質発現性、および末梢炎症に伴うFos様タンパク発現の有無、およびこの核に分布する侵害受容ニューロンの電気生理学的反応特性について検索した。

B. 研究方法

実験にはFischer系雄ラットを用いた。ラットを年齢別に若齢群（9-12ヶ月齢）と老齢群（28-32ヶ月齢）に分けて実験を行った。

1. P物質陽性軸索の検出

若齢および老齢ラットをPentobarbital Na (80mg/kg/ip)で麻酔し0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4)で緩衝した4% paraformaldehydeにて灌流固定した。全脳を取り出し、同様の固定液を用いて4℃環境下で72時間後固定した。その後0.01 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)で緩衝した30% ショ糖含有0.01 M PBSに48時間浸漬した。

摘出した脳から薄束核を含む領域を切り出し、厚さ50 μmの前額断連続凍結切片を作成した。標本は4切片おきに1切片ずつを取り出し浮遊法を用い、P物質様免疫陽性線維(SP-LI fiber)の免疫染色を以下の方法に従って行った。まず、切片を0.01 M PBSで30分間洗浄し、1.5% normal goat serum (NGS、SIGMA)に0.3% Triton-Xを加えた0.01 M PBS緩衝液に4℃環境下にて24時間 incubateした。ついで0.3% Triton-X加0.01 M PBSで緩衝した1.0% NGS、0.1% BSAで20,000倍に希釈した affinity purified polyclonal rabbit antiserum SP antibody (Genosys)に4で72時間

incubateした。さらに、0.01 M PBSで洗浄後、0.1 M PBSで緩衝した0.1% NGSで200倍に希釈した biotinylated goat anti-rabbit IgG (H+L) (BA-1000, Vector Lab.)に37℃で2時間 incubateした。次に0.01 M PBSで洗浄し、0.3% Triton-X加0.01 M PBS緩衝液で100倍に希釈した avidin-biotin peroxidase complex (Vector Lab.)に室温環境下で1時間 incubateした。その後、切片を0.05 M Tris buffer (TB, pH 7.6)にて洗浄し、0.04% 3,3-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB, 東京化成), 0.2% ammonium nickel sulfateに0.03% hydrogen peroxideを加えた0.05 M TB (pH 7.6)緩衝液に、室温で5~8分間 incubateし SP-LI fibersを発色させた。

免疫反応を施した切片について光学顕微鏡にて検索し、NIH imageを用いてSP-LI fibersの分布密度を定量化した。

2. Fos陽性細胞の検出

足低部皮下にCFAを0.05ml注入し、2日後にラットをPentobarbital Na (80mg/kg/ip)で深く麻酔し0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4)で緩衝した4% paraformaldehydeにて灌流固定した。全脳を取り出し、同様の固定液を用いて4℃環境下で72時間後固定した。その後0.01 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)で緩衝した30% ショ糖含有0.01 M PBSに48時間浸漬した。

摘出した脳から薄束核を含む領域を切り出し、厚さ50 μmの前額断連続凍結切片を作成した。標本は2切片おきに1切片ずつを取り出し浮遊法を用い、Fos-LI cellsの免疫染色を以下の方法に従って行った。まず、切片を0.01 M PBSで30分間洗浄し、1.5% normal goat serum (NGS、SIGMA)に0.3% Triton-Xを加えた0.01 M PBS緩衝液に4℃環境下にて24時間 incubateした。ついで0.3% Triton-X加0.01 M PBSで緩衝した1.0% NGS、0.1% BSAで10,000倍に希釈した affinity purified

polyclonal rabbit anti human c-fos antibody (Ab-5, Oncogene Science) に4で72時間 incubate した。さらに、0.01 M PBS で洗浄後、0.1 M PBS で緩衝した 0.1 % NGS で200倍に希釈した biotinylated goat anti - rabbit IgG (H+L) (BA-1000, Vector Lab.) に37℃で2時間 incubate した。次に0.01 M PBS で洗浄し、0.3 % Triton-X 加0.01 M PBS 緩衝液で100倍に希釈した avidin - biotin peroxidase complex (Vector Lab.) に室温環境下で1時間 incubate した。その後、切片を0.05 M Tris buffer (TB, pH7.6) にて洗浄し、0.04 % 3,3 - diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB, 東京化成), 0.2 % ammonium nickel sulfate に0.03 % hydrogen peroxide を加えた0.05 M TB (pH 7.6) 緩衝液に、室温で5~8分間 incubate し Fos - LI cells を発色させた。

免疫反応を施した切片について光学顕微鏡にて検索し、neurolucida (Neuroscience) を用いて切片の外形および Fos-LI cells を描画し、Fos - LI cells の分布を検索した。

3. 後索核侵害受容ニューロン応答の検索

若齢群および老齢群のラットをネンプターラット sodium pentobarbital (ネンプターラット; 大日本製薬, 50 mg/kg i.p.) で麻酔をし、大腿静脈に静脈カニューレおよび気管カニューレを留置した。術中の麻酔には主にハロタン(0.2~0.3%)を用いた。ラットを脳定位固定装置に固定後、延髄を露出し、頸部皮膚を用いてミネラルオイルプールを作った。上記手術が終了した後に、動物の頭部をステンレスネジとアクリルレジンにて固定し、イアーバーおよびノーズホルダーを取り外した。神経活動記録に先立って、延髄表面を写真撮影し電極刺入部位(トラック)の同定に用いた。神経活動記録中は動物を臭化パンクロニウム(5 mg/kg, i.v.)にて非動化し人工呼吸を施した。実験中、呼気CO₂濃度をモニターし、3.0~4.0%に保った。また温熱マットを用い

て体温を37.3~38℃に保った。エナメルコートしたタンゲステン微少電極(電気抵抗: 10~12 MΩ)を後索核に刺入し、単一ニューロン活動を記録した。単一ニューロン活動を記録後、下肢皮膚に機械刺激を与え、広作動域侵害受容ニューロン(WDRニューロン)を同定した。定量的な機械刺激には von Frey filament (1:1.2, 2:5.4, 3:15.1, 4:28.8, 5:75.8g)を用い、またピンチ刺激には動脈クレンメを用いた。

温度刺激(冷刺激: 10℃~30℃、熱刺激 44~50℃)には直系10mmのコンタクトサーマルプローブを用い、受容野内の最も機械刺激閾値の低い場所を刺激した。刺激時間は10秒間とし、各刺激間隔には3分間に設定した。

神経活動記録終了後、電極刺入部位に直流電流(10 μA, 15秒)を通流し、ニューロン活動記録部位にlesionを作った。実験終了後、動物をネンプターラット(80mg/kg, i.v.)にて深く麻酔し動物を安楽死させた。脳の一部を取り出し、10%ホルマリンで数日間固定後、30%スクロース phosphate buffer 液に48時間浸漬した。その後電極刺入方向に沿って50 μmの連続組織標本を作成し、チオニン染色を施し、ニューロン活動記録部位を同定した。

4. 有意差検定

データの統計処理にはANOVA(Analysis of Variance)を用いた。各データは等分散性を検定した後にANOVAにて検定した。検定結果の判定は危険率が5%以下(p<0.05)の場合に有意とした。

C. 研究結果

1. P物質様免疫陽性軸索および Fos 様陽性細胞の分布

図1AにP物質様免疫陽性軸索(SP-LI fibers)が後索核内において占める領域を示した。ここに示したように、老齢群では若齢群に比べより多くのP物質陽性軸索が発現していた。

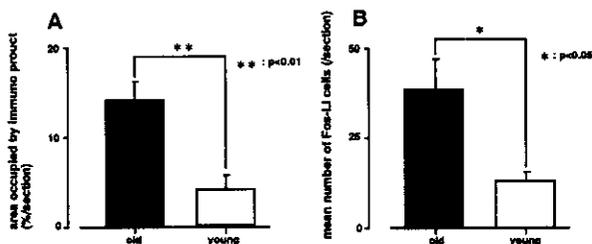


図1 A: 薄束核におけるSP-LI fibersの分布密度。B: 薄束核におけるFos-LI cellsの分布。

また、同領域において老齢群では足低部皮下にCFA注入により多数のFos様タンパク陽性細胞(Fos-LI cells)が発現した(図1B)。本論には示していないが、SP-LI fibersおよびFos-LI cellsは後索核の周辺部を中心に分布していた。

2. 薄束核ニューロンの自発放電および侵害刺激後の後発射

本研究では全部で32個の広作動域侵害受容ニューロン(老齢群:20個、若齢群:12個)を記録した。老齢群の薄束核に分布する侵害受容ニューロンは若齢群に比較して高い自発発火を有していた(図2A)。また、老齢ラットでは侵害刺激後に長く続く後発射を示すものが多く観察された(図2B)。この様に老齢ラットの薄束核ニューロンは活動性が非常に増加

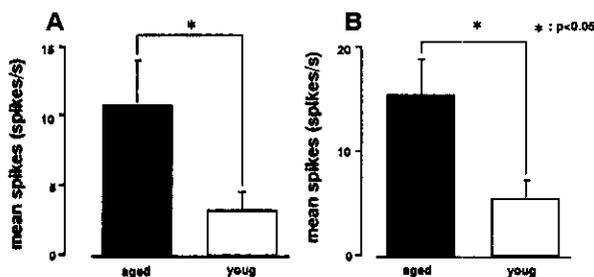


図2 A: 老齢および若齢群の薄束核に分布する侵害受容ニューロンの平均自発発射。B: 平均後発射。

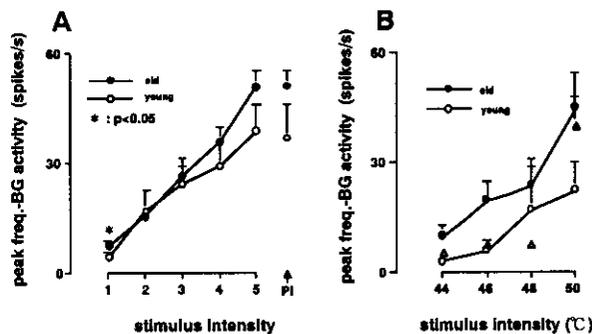


図3 A: 定量的機械刺激に対する薄束核広作動域侵害受容ニューロンの反応様式。B: 熱刺激に対する薄束核広作動域侵害受容ニューロンの反応様式。

していることが示された。

3. 機械および熱刺激に対する応答

本研究では探査刺激として筆による機械刺激を用いたので、解析の対象とした全てのニューロンは機械刺激に反応した。機械刺激に対する反応を図3Aに、熱刺激に対する反応を図3Bに示した。図3Aに示したように記録されたニューロンは老齢群および若齢群とも機械刺激強度増加に伴ってスパイク頻度を増していた。老齢群と若齢群を比較すると侵害刺激レベルで老齢群の方がより高いスパイク応答を示した。熱刺激に対する反応は、いずれの刺激温度に対しても老齢ラットの方が若齢ラットのそれよりもより高い傾向を認めた(図3B)。

D. 考察

老化と共に、末梢神経系および中枢神経系のニューロンは様々な変化を示すことが知られている。末梢神経系においては有髄神経線維の数の減少、中枢神経系においてはシナプス伝達効率の低下、あるいは神経細胞数の減少など種々の変化が報告されている。このような変化は脊髄、延髄を含む脳全体に及ぶ変化

であるとされている。本研究では老化に伴って神経系に誘導される様々な変化の内、特に痛覚伝導路に対する影響に注目して解析を行った。

我々の昨年度までの研究により、脊髄後角に分布する侵害受容ニューロンは活動性を増すことが明らかになった。さらに、この活動性の増加には下行性抑制系の機能不全が原因となることも判明した。本年度の研究結果から、薄束核の侵害受容ニューロンも脊髄後角の侵害受容ニューロンと同様に活動性を増すことが明らかになった。また、老齢ラットの脊髄後角には視床の電気刺激に逆方向性応答を示すニューロンは一つも見出されなかったが、薄束核ではほとんどのニューロンが視床に投射軸索を送る投射ニューロンであった。さらに、老齢ラットの薄束核ニューロンの多くは機械刺激だけでなく、熱刺激にも応答するマルチモーダルな性質を有していた。これまでの多くの研究により、後索系は主に内臓感覚や触覚などの非侵害情報伝達に重要な領域であると報告され、少数のニューロンが侵害情報伝達に関与すると言われていたが、老齢ラットにおいて薄束核は、侵害情報伝達に対しより重要な役割を果たすように変化することが明らかになった。

また、本研究結果から老齢ラットでは薄束核内に分布するSP様陽性軸索の著しい増加が認められた。薄束核内のSP陽性軸索はほとんどが一次求心神経由来であることから、老化に伴ったSP陽性軸索の増加は薄束核に投射する有髄神経軸索がSPを合成するように変化した可能性がある。老化に伴ってどのようなメカニズムで有髄神経線維がP物質を合成するように変化するについては全く不明である。今後はさらに、薬理学的手法や分子生物学的手法を導入して、SP等の生理活性物質の合成機構に対する老化の影響についても研究を進めていきたい。

E. 結論

本研究結果から老齢ラットの薄束核に分布する侵害受容ニューロンは活動性の増強を示した。さらに、薄束核に分布するほとんどのニューロンは視床に軸索を送る投射ニューロンであったことから、老齢ラットにおいては後索系が痛覚情報伝達に対して重要な働きを有する様に変化する可能性が示された。また、この様な変化には一次求心神経線維の可塑的变化が関与するものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masuda, Y., Kato, T., Hidaka, O., Matsuo, 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.
- 2) Komuro, A., Masuda, Y., Iwata, K., Kobayashi, M., Kato, T., Hidaka, O. and Morimoto, T.: 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.
- 3) 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.
- 4) Kanda, K., Sato, H., Kemuriyama, T. and Iwata, K.: Temporal facilitation of the flexor reflex: Comparison between young and aged rats. *Neurosci. Lett.* 304, 49-52 2001.
- 5) Imbe, H., Iwata, K., Zhou, Q., Zou, S., Dubner, R. and Ren, K.: Orofacial deep and cutaneous tissue inflammation and trigeminal neuronal activation. *Cells Tissue Org.*, 169, 238-247, 2001.
- 6) Komuro, A., Morimoto, T., Iwata, K., Inoue,

- T., Masuda, Y., Kato, T. and Hidaka, O.: Possible feed-forward control of jaw-closing muscle activity during rhythmic jaw movements in the anesthetized rabbit. *J Neurophysiol.* 86, 2834-2884, 2001.
- 7) Iwata, K., Imai, T., Tsuboi, Y., Tashiro, A., Ogawa, A., Morimoto, T., Masuda, Y., Tachibana, Y. and Hu, J.W.: Alteration of Medullary Dorsal Horn neuronal activity following inferior alveolar nerve transection in rats. *J Neurophysiol.* 86, 2868-2877, 2001.
- 8) Kondo, E., Iwata, K., Tashiro, A., Tsuboi, Y., Fukuoka, T., Morimoto, T. and Noguchi, K.: Involvement of glutamate receptors on hyperexcitability of wide dynamic range neurons in the gracile nucleus of the rats with experimental mononeuropathy. *Pain*, 95, 153-163, 2002.
- 9) Iwata, K., Fukuoka, T., Kondo, E., Tsuboi, Y., Tashiro, A., Noguchi, K., Masuda, Y., Morimoto, T. and Kanda, K.: Plastic changes in nociceptive transmission of the rat spinal cord with advancing age. *J Neurophysiol.* 87, 1086-1093, 2002.
- 10) Nomura, H., Ogawa, A., Tashiro, A., Morimoto, T., Hu, J.W. and Iwata, K.: 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* 95, 225-238, 2002.
- ## 2. 学会発表
- 1) 増田裕次, 岩田幸一, 森本俊文: 咀嚼運動制御に対する大脳基底核の役割, 第78回日本生理学会(京都), 2001.
- 2) 小川明子, 岩田幸一, 田代晃正, 田村泰久, 丹羽均, 森本俊文: 慢性耳下腺炎モデルラットにおけるC-Fos発現, 第78回日本生理学会(京都), 2001.
- 3) 増田裕次, 松原聡, 橘吉寿, 岩田幸一, 森本俊文: ウサギ大脳皮質咀嚼野から被殻への投射, 第78回日本生理学会(京都), 2001.
- 4) 田代晃正, 岩田幸一, 田村泰久, 小川明子, 森本俊文, 角野隆二: 顎関節炎発症課程における三叉神経脊髄路核侵害受容ニューロン活動の経時変化, 第78回日本生理学会(京都), 2001.
- 5) 長江麻帆, 平賀徹, 岩田幸一, 丹羽均, 森本俊文, 米田俊之: 慢性炎症性疼痛に対する骨吸収抑制剤 Bisphosphonate の鎮痛作用, 第78回日本生理学会(京都), 2001.
- 6) Ogawa, A., Tamura, Y., Morimoto, T. and Iwata, K.: Nociception and Fos expression in the rat with artificial parotitis. 36th International congress of Physiological Science (New Zealand), 2001.