

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

一昨年、および昨年までの本厚生科学研究によって、老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、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。この結果は、下降性抑制系線維の機能低下の効果が、脊髄後角の層により異なって表現されたことになり、興味深い結果である。今年度は、この抑制系の低下を説明できる仮説の証明を試みた。つまり、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発現低下という仮説である。結果としては有意な変化は観察されず、遺伝子変化までの低下は生じていないと考えられた。

また、痛覚伝達における後索系の役割が、老齢ラットで増加している可能性があり、それを検証する実験を施行したが、明確な機能変化の結果は得られなかった。今後とも、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。

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。昨年までの本厚生科学研究によって、老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。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する事を本研究の目的としている。

B. 研究方法

1. 免疫組織科学

1) 末梢炎症モデル

若齢および老齢ラットの一侧足底皮下に、 $200\mu\text{l}$ 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。延髄部を摘出し、後固定した後20% sucroseに浸漬した。2-3日 sucroseに浸漬した後、 $30\mu\text{m}$ 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時間インキュベートし、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℃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℃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分づつ洗浄した。反応終了後、検鏡下c-fos陽性切片を計数した。

2) 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。動物に対しては、一侧の足を50℃の湯に浸し、熱疼痛刺激を与えた。その後、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。免疫組織化学法の手順は、上記に記述した。

2. in situ ハイブリダイゼーション法

若齢および老齢ラットのL4,5レベルの後根神経節(DRG)と脊髄を摘出し、切片作成までは免疫組織化学法と同様に行った。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、若齢ラットおよび老齢ラットにおける発現の差異を検討した。

以上の実験は、兵庫医科大学動物実験倫理委員会の認定を受けて施行した。

C. 研究結果

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pERK発現に差異を観察されなかった。つまり、熱刺激に対するpERK発現は、後索核では存在しない事になる。ところが、興味深いことに老齢ラット全般にわたって、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いた。これは、ほとんどの

老齡ラットで観察され、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、老齡ラット、および若齡ラットの間、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。老齡ラットと若齡ラットの間、差異は、観察されなかった。

D. 考察

一昨年、昨年の本研究により、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。また、脊髄後角特に深層のニューロンにおいて、老齡ラットが侵害刺激に対して Activity の増加が観察されるという結果になった。この結果は、下降性抑制系線維の機能低下の効果が、脊髄後角の層により異なって表現されたことになる。これらの結果は、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。これらの結果を説明できる一つの仮説は、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。これを証明するために、本年度の実験は、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 の発現を比較検討した。結果的には、若齡ラットと老齡ラットの間には、有意な差異が観察されず、仮説を証明することは出来なかった。

また、老齡ラットでは、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 の変化を調べた。c-fos や pERK 発現を用いた。刺激による activity の差は、老齡ラットでも若齡ラットと差が観察されなかったが、刺激なしの状態の老齡ラットで、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繊維の変性による変化である可能性があると考えられる。

E. 結論

本研究において、老齡ラットにおいて、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。老齡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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwata, K., Fukuoka, T., Kondo, E., Tsuboi, Y., Tashiro, A., Noguchi, K., Masuda, Y., Morimoto, T. and Kanda, K. (2001) Plastic changes in nociceptive transmission of the rat spinal cord with advancing age. *J Neurophysiol.* 87, 1086-1093.
- 2) Fukuoka, T., Kondo, E., Dai, Y., Hashimoto, N. and Noguchi, K. (2001) Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model. *J. Neurosci.*, 21, 4891-4900
- 3) Sakaue, G., Shimaoka, M., Fukuoka, T., Hiroi, T., Inoue, T., Hashimoto, N., Sakaguchi, T., Sawa, Y., Morishita, R., Kiyono, H., Noguchi,

- K. and Mashimo, T. (2001) NF- κ B “decoy” suppresses cytokine expression and thermal hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. *Neuroreport*, 12, 2079-2084,
- 4) Mohri, D., Satomi, F., Kondo, E., Fukuoka, T., Sakagami, M. and Noguchi, K. (2001) Change in gene expression in facial nerve nuclei and the effect of superoxide dismutase in a rat model of ischemic facial paralysis. *Brain Res.*, 893, 227-236
- 5) Hashimoto, N., Yamanaka, H., Fukuoka, T., Dai, Y., Obata, K., Mashimo, T. and Noguchi, K. (2001) Expression of HGF and cMet in the peripheral nervous system of adult rats following sciatic nerve injury. *Neuroreport*, 12, 1403-1407
- 6) Dai, Y., Kondo, E., Fukuoka, T., Tokunaga, A., Miki, K., and Noguchi, K., (2001) The effect of electroacupuncture on pain behaviors and noxious stimulus-evoked Fos expression in a rat model of neuropathic pain. *J. Pain*, 2, 151-159
- 7) Dai, Y., Iwata, K., Kondo, E., Morimoto, T. and Noguchi, K. (2001) A selective increase in Fos expression in spinal dorsal horn neurons following graded thermal stimulation in rats with experimental mononeuropathy, *Pain*, 90, 287-296
- 8) Hashimoto, N., Yamanaka, H., Fukuoka, T., Obata, K., Mashimo, T. and Noguchi, K. (2001) Expression of hepatocyte growth factor in primary sensory neurons of adult rats, *Mol. Brain Res.*, 97, 83-88

ciety ,4.19-22 U.S.A (20th Annual Scientific Meeting American Pain Society Program Book 39 2001)

2. 学会発表

- 1) **Noguchi, K.** (2001) Gene expression in neuropathic pain model. International advanced workshop on brain/pain research, 4.30-5.2, Xi'an, China
- 2) **Noguchi, K.** (2001) Gene expression in uninjured afferents in the rat neuropathic pain model. 20th Annual Scientific Meeting American Pain So-

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

末梢神経をC線維を活動させるに十分な強度で低頻度反復電気刺激を加えると、誘発される後角ニューロン活動や屈曲反射による神経筋の活動は次第に増強する（wind-upと呼ばれ、痛覚伝導路に起こる一種の可塑的变化による）。この変化を誘発する興奮促進効果が、C線維活動によって引き起こされた後にどのような時間経過で減衰するかを表す時定数を規定した。この促進効果減衰の時定数は従来のwind-upの強度を表す値とは相関せず、異なる背景機序を表していること、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延長していることなどを前年度までに明らかにしてきた。本年度は、ハロセン麻酔下にラット屈筋反射のwind-up現象に対するセロトニンシナプス、グルタミン酸シナプスの役割について検討した。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、促進効果減衰の時定数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。

一方、NMDA受容体の拮抗薬はwind-upに対して殆ど影響しないか、または、屈筋反射・相対wind-up値・時定数を非選択的に軽度抑制する傾向が認められ、wind-upに対するNMDA受容体の関与を疑問視する報告を支持するものであった。

A. 研究目的

末梢神経をC線維を活動させるに十分な強度で低頻度反復電気刺激を加えると、誘発される後角ニューロン活動や屈曲反射による神経筋の活動は次第に増強する。これはWind-up現象と呼ばれ、刺激の効果が後に残り、その効果が次第に蓄積される結果と考えられ、痛覚伝導路の神経系が示す一種の可塑性現象である。この活動増強は刺

激頻度依存性であり、刺激頻度が低くなるに従い反応増強の程度は指数関数的に小さくなる。減衰の程度を時定数で表すと、時定数が大きい程、刺激間隔が長くなっても反応増強が見られることを意味する。前年度までの研究で、刺激間隔拡大に伴う反応増強の程度の減衰の時定数を定義し、これが脊髄痛覚伝導路における可塑性変化の起こし易さの、これまでのものと異なる背景

機序を有していることを示唆した。また、高齢ラットではこの減衰時定数が成熟ラットに比べて有意に長く、可塑性変化を起こしやすいことを明かした。後角の侵害受容ニューロンの末梢皮膚受容野刺激に対する反応性や自発性発射が脊髄切断によって成熟ラットでは有意に増えるのに対して、高齢ラットではこの増強が見られない。下行性の抑制系として働いているとされるセロトニン作動性神経線維やノルアドレナリン作動性神経線維の後角内分布密度も低下していた。脊髄内のセロトニン濃度も高齢ラットで低下していることが報告されている。これらの所見は何れも下行性の痛覚抑制系の働きが高齢ラットでは低下していることを窺わせる。Wind-up 減衰の時定数も脊髄切断によって成熟ラットでは有意に延長するのに対して高齢ラットでは殆ど変化しなかった。従って、この下行性抑制系の障害に由来する侵害受容ニューロンの過活動が、wind-up 減衰時定数の高齢ラットにおける延長を引き起こしている可能性が示唆されるが、更に詳しく変化の背景を調べる必要がある。一方、Wind-up 現象として知られるこの可塑性変化には、AMPA と NMDA 受容体、P 物質、セロトニン、ノルアドレナリン、VIP など、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。また、非選択的陽イオンチャンネルが関与する plateau potential も働いている。下行性のセロトニン作動性神経系が脊髄に於ける痛覚抑制系の一つとして報告されている。また、近年、抗鬱薬としての選択的セロトニン再取り込み阻害薬に鎮痛効果があることが報告されている。そこで、本年度は Wind-up 減衰の時定数の決定にセロトニン作動神経系が関与しているのか、高齢ラットでセロトニン受容体の活性化が時定数の低下、即ち脊髄痛覚伝導路に於ける可塑性変化を起こり難くするのに有効に働くかどうかを調べ

るため、選択的セロトニン取り込み阻害剤であるフルボキサミン及びセロトニン前駆物質、5-HTP の投与の Wind-up 現象への影響を調べた。また、NMDA 受容体拮抗薬の影響についても調べて、比較検討した。

B. 研究方法

実験には S P F 環境下に当研究所実験動物開発施設で飼育された雄の Fischer 344/DuCrj を使用した。成熟群は 11-13ヶ月齢、高齢群は 29-32ヶ月齢であった。尚、平均寿命は約 28ヶ月である。ハロセン麻酔下（導入時 2.0%、手術中の維持 1.5-1.0%）に、気管、総頸動脈（血圧モニターのため）、外頸静脈（補液、薬物投与のため）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、腓腹神経を露出、周囲結合組織から剥離して、腓腹筋の筋腹レベルで切断した。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、屈筋反射による筋電活動を記録するため、直径 100 ミクロンのテフロン被覆ステンレス線（先端 2 ミリメートルを剥離した）2 本を半腱様筋に、約 5 ミリメートルの間隔を置いて刺入した。腓腹神経を刺激用双極電極に装着し、神経・筋の露出部は温めたミネラルオイルで被った。ハロセン濃度を 1.2 から 0.8% に下げて、1 時間後に観察を開始した。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。半腱様筋に出現した反射活動はコンピューターで数値化し、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。後者は本研究により初めて導入されたものである。詳しくは前年度報告書に述べられているが、以下に簡略に記す。1 回目から 5 回目までの反応の大きさの変化を直線回帰による勾配で表す。この勾配は刺激間隔が延長するに連れ指数関数的に減少することから、時定数で減衰の刺激頻度依存性を表す。即ち、時定数が大きい程刺激の効果が長期間残り、より長い間隔の刺激で Wind-up 現象を示すことになる。刺激のコントロール、筋電図活動の数値化および平均、勾配・時定数の計算などはコンピュータで行った。

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

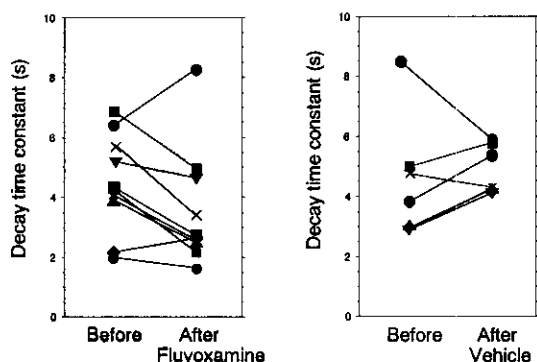


図1 Wind-up の減衰時定数に対するフルボキサミンの効果
フルボキサミンの 30 mg/kg の腹腔内投与により時定数は有意に低下 ($p < 0.05$, Wilcoxon 符号順位検定)。溶媒であるリンガー液投与では変化せず。

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。

C. 研究成果

1. フルボキサミンの影響

はじめにコントロール記録を行い、次いで、vehicle であるリンガー液を腹腔内に投与し、20 分後から記録を再開した。更に、フルボキサミン (2% 溶液) 30 mg/kg を投与した後 20 分から記録を行った。全ての刺激頻度での試行が 3 回終了するのに要する時間は 40 分間弱である。図 1 に示す如く、刺激頻度低下に伴う wind-up 減衰の時定数は、リンガー液のみの腹腔内投与では変化せず、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

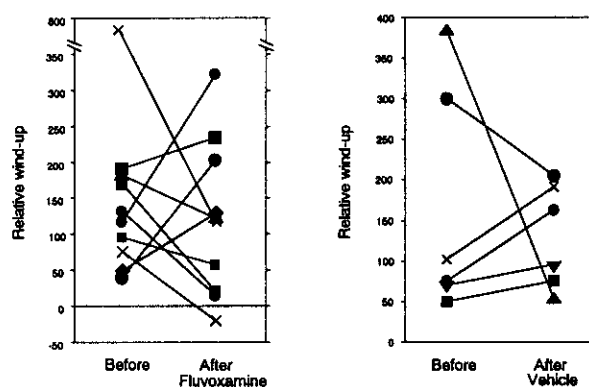


図2 相対 wind-up 値に対するフルボキサミンの効果
相対 wind-up 値：((1 回目から 5 回目までの反応の和) - (1 回目の反応の 5 倍値)) / (1 回目の反応の 5 倍値) はフルボキサミン (30 mg/kg, i.p.) および溶媒 (リンガー液) の投与で変化せず。

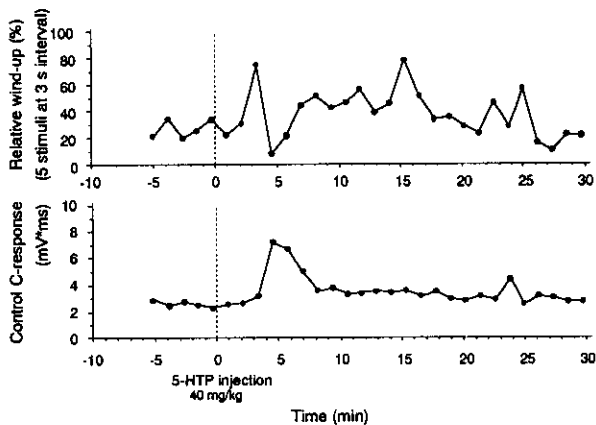


図3 5-HTP 投与後の減衰時定数および連発刺激の最初の刺激に対する屈筋反射の大きさの推移。
 高齢ラットの時定数 9.2 ± 3.2 秒は成熟ラットの値 6.4 ± 2.9 秒に比べて有意に長い。
 ($p < 0.05$, t-test)

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(図2)。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。図3 aは3秒間隔5連刺激を1分間隔で繰り返した時の誘発筋電図積分値を示しており、矢印時点で5-HTP 50mg/kg(2%溶液)を静脈内投与している。5-HTPの投与により反応は増強し、特に1回目の反応が著しく大きくなっている。計算された相対 Wind-up 値の推移は図3 bで示される。この反応は一過性で、測定に約40分かかる時定数は変化が統計学的に有意ではなかった(図4)。

3. MK-801の影響

まず、3秒間隔5連刺激を1分間隔で繰り返

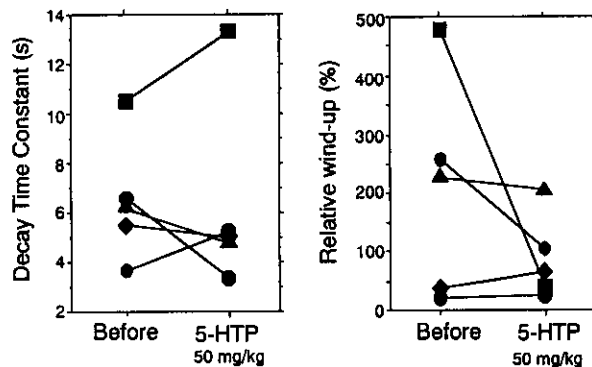


図4 減衰時定数および相対 wind-up 値に対する5-HTP 投与の影響。
 時定数は5-HTP 投与15分後より連発刺激の刺激間隔をランダムに変化させて求めた。詳しくは方法を参照。

返した時の屈曲反射に対するMK-801の影響を調べた。脊髄無傷状態では0.02-0.05 mg/kgの静脈内投与で反応が一過性に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。しかし、例数が少ないので、更に検討が必要である。

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。

D. 考察

前年度までの研究で wind-up 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、従来と異なる wind-up の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 減衰時定数は有意に低下し、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、即ち、 $((1 \text{ 回目から} 5 \text{ 回目までの反応の和}) - (1 \text{ 回目の反応の} 5 \text{ 倍})) / (1 \text{ 回目の反応の} 5 \text{ 倍})$ 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 wind-up 効果減衰に、即ち可塑性変化の抑制に大きく関与していることを示している。また、この機能が低下してより低頻度の刺激で wind-up 現象を引き起こすようになってき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、高齢者の痛覚治療薬として抗鬱薬としても用いられている選択的セロトニン再取り込み阻害剤が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、脊髄無傷ラットではセロトニン放出が主としてインパルスによるものであるのに対して、脊髄切断ラットでは小胞体のランダムな膜融合過程によるものであるという違い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。

E. 結論

ハロセン麻酔下にラット屈筋反射の wind-up 現象、特に我々が規定した時定数に対する選択的セロトニン再取り込み阻害薬、NMDA 受容体拮抗薬の影響を調べた。

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 という可塑性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、可塑性変化（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。

一方、NMDA 受容体の拮抗薬は wind-up

に対して殆ど影響しないか、または、屈筋反射・相対 wind-up 値・時定数を非選択的に軽度抑制する傾向が認められ、wind-up に対する NMDA 受容体の関与を疑問視する報告を支持するものであった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanda, K., Sato, H., Kemuriyama, T. and Iwata, K. Temporal facilitation of the flexor reflex induced by C-fiber activity: Comparison between adult and aged rats. *Neurosci. Lett.* 304: 49-52, 2001.
- 2) Iwata, K., Fukuda, T., Kondo, K., Tashiro, A., Tsuboi, 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.
- 3) Sato, H., Iwata, K. and Kanda, K. Age-related changes in spinal nociceptive transmission revealed by a novel appraisal method for wind-up phenomenon. in preparation.

2. 学会発表

- 1) 岩田幸一、田代晃正、小川明子、田村泰久、森本俊文、神田健郎 慢性炎症を有する老齢ラットの脊髄後角侵害受容ニューロンの活動変調 日本基礎老化学会第23回大会 大阪 2001, 6.13-15.
- 2) 神田健郎、佐藤斉、岩田幸一 Wind-up 現象誘発の刺激間隔時間要因についての検討 第23回日本神経科学大会 京都市 2001, 9.26-28.
- 3) Kanda, K., Sato, H., Iwata, K., T. Temporal facilitation of the flexor reflex induced by C-fiber activity in aged rats. Society for Neuroscience 31th Annual Meeting, San Diego, USA. 2001, 11,10-15.

- 4) 神田健郎、佐藤斉、岩田幸一 屈筋反射の時間的促進に関わるシナプス機構 第79回日本生理学会大会 2002, 3.28-30.

侵害性刺激による心拍数増加反応の加齢変化

分担研究者 鈴木敦子 東京都老人総合研究所 主任研究員

研究要旨

皮膚侵害刺激（ピンチ刺激）によって心臓交感神経を介して誘発される心拍数増加反応の加齢変化を検討した。成熟群（4-7ヶ月齢）、老齢群（24-27歳）、超老齢群（32-36ヶ月）の3群のWistar系ラットをウレタン麻酔し、人工呼吸下で実験を行った。昨年までに、中枢神経無傷時に胸部あるいは後肢ピンチ刺激によって誘発される心拍数増加反応は老齢群では成熟群と同様に保たれていたが、超老齢群では約1/2に減弱する一方、急性脊髄切断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は、超老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。本年度は中枢神経無傷時にピンチ刺激によって誘発される心拍数増加反応が超老齢ラットで減弱する原因として1) 神経性反射経路（特に上脊髄）が減弱している可能性と、2) 交感神経節後線維終末から心臓への伝達機能が減弱している可能性を考え、検討した。その結果、1) ピンチ刺激による心臓交感神経活動の増加反応は、超老齢群においても保たれていたことから、神経性反射経路は保たれていること、2) β 受容体作動薬（イソプロテレノール 100 μ g/kg i.v.）を投与したときの最大心拍数は、超老齢群では成熟群に比べて有意に減弱すること、を明らかにした。

以上の事実から、超老齢ラットでは後肢ピンチ刺激による心拍数増加反応における心臓交感神経までの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。

A. 研究目的

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。本研究は、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する。このために、上脊髄性と脊髄性の反射経路が明らかにされている体性心臓反射（Kimura et al., 1995）に着目し、加齢に伴い反射経路のどの部分が変化する

かを検討した。

昨年度までに、上脊髄性の心拍数増加反応が約3歳齢の超老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老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。この結果から、超老齢ラットにおける侵害性刺激による心拍数増加反応の減弱には、上脊髄における加齢変化が関与していると予想される。また、ヒトや実験動物において加齢に伴い心

臓のβ受容体機能が減弱することが報告されている (Yin et al., 1978; Abrass et al., 1982; Simpkins et al., 1983; Lakatta, et al., 1993)。

そこで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

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%に保った。直流ヒートパッドと赤外線ランプを用いて体温を約37.5℃に保った。実験中、血圧の変動、眼瞼反射などを指標とし、必要に応じて麻酔を頸静脈に留置したカテーテルから追加投与した。

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、切断中枢端を双極白金イリジウム電極にのせた。神経をパラフィンオイルで覆い、乾燥を防いだ。記録電極を増幅器につなぎ、神経活動を増幅し、オシロスコープで観察するとともに、ミニコンピューターで5秒毎のスパイクの数を数え、ポリグラフに連続記録した。

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。

脊髓切断：脊髓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-100μg/kg静脈内投与した。この際、イソプロテレノール投与により血圧が低下し、それに伴い圧受容器反射が起こることが知られているので、これらの影響を除外するため、脊髓を切断し、迷走神経も切断した動物で実験を行った。

検定：反応の有意差検定には対応のあるt検定(paired t-test)を、ラット群間の有意差検定には分散分析法(ANOVA)を用い、p<0.05を有意差があると判定した。

C. 研究結果

1. 中枢神経無傷時

1) 胸部刺激

胸部にピンチ刺激を20秒間加えると、心臓交感神経活動が増加し、心拍数が増加し

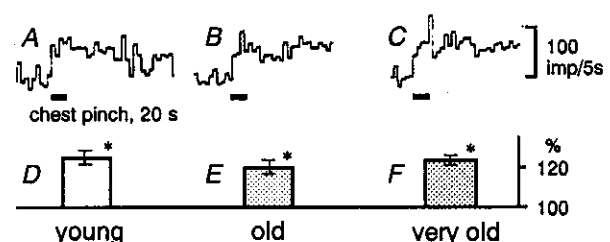


図1 胸部ピンチ刺激による心臓交感神経活動の反応の加齢変化(中枢神経無傷時)。

□ 下線部で胸部皮膚に20秒間ピンチ刺激をした。A、D：成熟ラット、B、E：老齢ラット、C、F：超老齢ラット。A-Fはそれぞれ別のラット。*p<0.05、それぞれの群において刺激前のコントロール値と比べた有意差。

た。心拍数は成熟群では最大約 22beats/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。

心臓交感神経の反応は成熟ラットでは約 125%、老齢ラットでは約 121%、超老齢ラットでは約 123%であり、いずれの群の間にも反応に有意な差は認められなかった (図 1)。

2) 後肢刺激

後肢にピンチ刺激を 20 秒間加えると、心臓交感神経活動が増加し、心拍数が増加した。心拍数は成熟群では最大約 41beats/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。

心臓交感神経の反応は、成熟ラットでは約 155%、老齢ラットでは約 162%、超老齢ラットでは約 148%であり、いずれの群の間にも反応に有意な差は認められなかった (図 2)。

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。切断後に安静時心拍数は約 80beats/min 低下した。

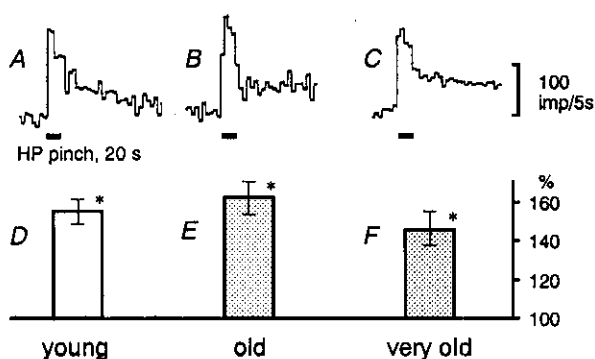


図 2 後肢ピンチ刺激による心臓交感神経活動の反応の加齢変化 (中枢神経無傷時)。詳細は図 1 を参照。

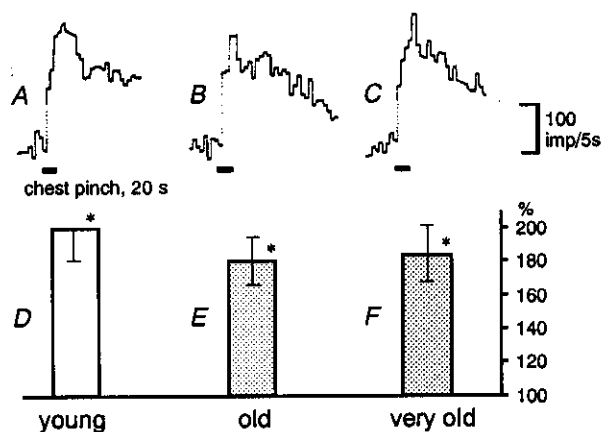


図 3 胸部ピンチ刺激による心臓交感神経活動の反応の加齢変化の典型例 (急性脊髄切断時)。詳細は図 1 を参照。

1) 胸部刺激

脊髄切断ラットにおいて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る。成熟群では最大約 60beats/min 増加し、この心拍数増加反応は老齢群でも超老齢群でも成熟群と同様であった。

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く、成熟群では約 200%、老齢群では約 180%、超老齢群では約 182%であった。いずれの群間においても反応に有意な差は認められなかった。(図 3)。

2) 後肢刺激

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心拍数、心臓交感神経とも有意な反応を誘発しなかった (図 4)。

3. 心臓β受容体機能の加齢変化

1の結果から、超老齢ラットでは中枢神経無傷時、ピンチ刺激による心拍数増加反



図4 後肢ピンチ刺激による心臓交感神経活動の反応の加齢変化（急性脊髄切断時）。詳細は図1を参照。

応における心臓交感神経までの神経性反射経路は保たれているにも関わらず心拍数増加反応が減弱することが明らかになった。この原因として、心臓の β 受容体機能が低下する可能性を考え、検討した。

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 μ g/kgではほぼ最大に達した（図5）。10ng/kg投与では心拍数が約70beats/min、1 μ g/kgでは約140beats/min増加した。老齢群でも成熟群とほぼ同様の反応が見られ、成熟群と老齢群の間には有意な差は認められなかった。超老齢群は100ng/kgで心拍数が約70beats/min増加し、ほぼ最大に達した。すなわち、成熟群、老齢群に比べて、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（図5）。

D. 考察

本研究により、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

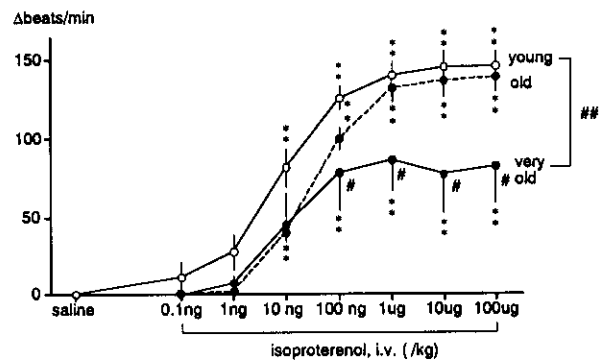


図5 イソプロテレノール静脈内投与による心拍数増加反応の加齢変化。

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

本研究により、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimura, M., Uchida, S., Suzuki, A., Nakajima, K. and Aikawa, Y.: Reflex choroidal blood flow responses of the eyeball following somatic sensory stimulation in rats. *Autonomic Neurosci.*, 2002 (in press)

2. 学会発表

- 1) 鈴木敦子, 内田さえ, 堀田晴美:皮膚侵害性刺激によって誘発される心拍数増加反応の加齢変化. 第54回日本自律神経学会総会, 東京, 2001.10.25-26.
- 2) 鈴木敦子, 堀田晴美, 内田さえ:皮膚侵害性刺激による心拍数増加反応の加齢変化.. 第79回日本生理学会大会, 広島, 2002.3.28-30.

III 研究成果の刊行に関する一覧表

- 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.
- 11) Fukuoka, T., Kondo, E., Dai, Y., Hashimoto, N. and Noguchi, K.: Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model. *J. Neurosci.*, 21, 4891-4900, 2001.
- 12) Sakaue, G., Shimaoka, M., Fukuoka, T.,

- Hiroi, T., Inoue, T., Hashimoto, N., Sakaguchi, T., Sawa, Y., Morishita, R., Kiyono, H., Noguchi, K. and Mashimo, T. NF-kB "decoy" suppresses cytokine expression and thermal hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. *Neuroreport*, 12, 2079-2084, 2001.
- 13) Mohri, D., Satomi, F., Kondo, E., Fukuoka, T., Sakagami, M. and Noguchi, K. Change in gene expression in facial nerve nuclei and the effect of superoxide dismutase in a rat model of ischemic facial paralysis. *Brain Res.*, 893, 227-236, 2001.
- 14) Hashimoto, N., Yamanaka, H., Fukuoka, T., Dai, Y., Obata, K., Mashimo, T. and Noguchi, K. Expression of HGF and cMet in the peripheral nervous system of adult rats following sciatic nerve injury. *Neuroreport*, 12, 1403-1407, 2001.
- 15) Dai, Y., Kondo, E., Fukuoka, T., Tokunaga, A., Miki, K., and Noguchi, K., The effect of electroacupuncture on pain behaviors and noxious stimulus-evoked Fos expression in a rat model of neuropathic pain. *J. Pain*, 2, 151-159, 2001.
- 16) Dai, Y., Iwata, K., Kondo, E., Morimoto, T. and Noguchi, K. A selective increase in Fos expression in spinal dorsal horn neurons following graded thermal stimulation in rats with experimental mononeuropathy, *Pain*, 90, 287-296, 2001
- 17) Hashimoto, N., Yamanaka, H., Fukuoka, T., Obata, K., Mashimo, T. and Noguchi, K. Expression of hepatocyte growth factor in primary sensory neurons of adult rats, *Mol. Brain Res.*, 97, 83-88, 2001.
- 18) Shimura, M., Uchida, S., Suzuki, A., Nakajima, K. and Aikawa, Y.: Reflex choroidal blood flow responses of the eyeball following somatic sensory stimulation in rats. *Autonomic Neurosci.*, 2002 (in press)

20010174

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。