

ラット扁桃体へのグルタミン酸微量注入による延髄後角の 侵害受容細胞に対する抑制効果

山田 裕之, 松本 範雄*

岩手医科大学歯学部歯科矯正学講座

(主任: 三浦 廣行 教授)

岩手医科大学歯学部口腔生理学講座*

(主任: 北田 泰之 教授)

(受付: 2006年10月25日)

(受理: 2006年11月16日)

Abstract : We have shown that conditioning electrical stimulation of the amygdala has an inhibitory effect on the nociceptive neurons in the medullary dorsal horn of the rat. The purpose of this study is to investigate whether the inhibitory effect depends on the activation of cell bodies or passing fibers by the glutamate microinjection into the amygdala.

The animals were anesthetized with N₂O-O₂ (2:1) and 0.5%-halothane, and immobilized with pancuronium bromide. The peripheral test stimulus (a single rectangular pulse of 2.0 msec in duration) was applied to the facial skin in the receptive field of nociceptive neurons, and the ipsilateral amygdaloid conditioning stimuli to the recording site were trains of 33 pulses (0.5 msec in duration, 100-300 μ A) delivered at 330 Hz. Thirty-five wide dynamic range (WDR) neurons and 11 nociceptive specific (NS) neurons were recorded. Both neurons were distributed in the superficial layers of the caudal nucleus and diffusely throughout the dorsal part of the reticular subnucleus. The conditioning stimulation in the central nucleus, basomedial and basolateral nuclei markedly inhibited the activities in 13 of 17 nociceptive neurons (10 WDR and 3 NS neurons). The inhibitory effect was $68.0 \pm 15.3\%$ (mean \pm S.D.) at maximum. Microinjection of 0.5 M monosodium glutamate (5 μ l) into the amygdala resulted in inhibition of medullary nociceptive neurons (5 WDR and 2 NS neurons). These findings suggest that the excitation of cell bodies in the amygdala contribute to the inhibitory effects on the 2nd order nociceptive neurons. Because it has been known that the amygdala is a key structure for mediating stress responses, the antinociceptive effect may provide one of the neurophysiological basis for the stress-induced analgesia (SIA).

Key words : amygdala, antinociception, glutamate injection, conditioning stimulation, caudal nucleus, reticular subnuclei, stress-induced analgesia

Inhibition of nociceptive neurons in the medullary dorsal horn by glutamate microinjection into the amygdala of the rat

Hiroyuki YAMADA & Norio MATSUMOTO*

Department of Orthodontics, School of Dentistry, Iwate Medical University

(Chief: Prof. Hiroyuki MIURA)

*Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Iwate Medical University

(Chief: Prof. Yasuyuki KITADA)

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020-8505)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 31 : 164-176, 2006

緒 言

大脳辺縁系に属する扁桃体 (amygdala) は側頭葉の内側面, すなわち側脳室下角前端部の前に存在し, 約10個の神経核から成る^{1,2)}。これら扁桃体を構成する核への種々の薬物の微量注入によって抗侵害受容作用 (antinociception) が誘発されることが行動学的実験によって確かめられている。例えば, 中心核への enkephalinase 阻害薬あるいは neurotensin の注入, 基底外側核や内側核への carbachol の注入による鎮痛効果がホットプレートテストやテイルフリックテストで観察されている³⁻⁶⁾。

行動学的実験によって確かめられている扁桃体の抗侵害受容作用 (antinociception) の神経生理学的機序を調べるために, 我々は先にネコ大脳皮質第1体性感覚野 (SI) の歯髄駆動細胞に対する扁桃体条件刺激の効果を観察した。その結果, 扁桃体中心核の条件刺激が歯髄の電気刺激に長い潜時で応じる歯髄駆動細胞を抑制することが観察された⁷⁾。この扁桃体による抑制が二次ニューロンのレベルで起こっているかどうかをラットを用いて調査したところ, 扁桃体の条件刺激が三叉神経系からの痛覚情報を受け, 視床に出力を送る延髄後角, すなわち三叉神経脊髄路核尾側核 (caudal nucleus) およびその内側の網様垂核 (reticular subnucleus) で記録される侵害受容細胞を抑制することが認められた^{8,9)}。扁桃体の細胞は拘束などのストレス体験中に興奮し, さらに扁桃体は驚愕反応, フリージング, 自律神経系などのストレス反応の発現に関与する^{10,11)} ことから, 観察された扁桃体条件刺激による侵害受容細胞の抑制作用はストレス時に観察される鎮痛, すなわちストレス誘発鎮痛 (stress-induced analgesia: SIA) の神経生理学的基礎の一つと考えられた^{8,9)}。

扁桃体の条件刺激による侵害受容細胞の抑制において, 電気刺激は扁桃体内の細胞体と通過線維のどちらを興奮させるのかを決定することは扁桃体の役割を知る上で重要である。グルタ

ミン酸ナトリウム (グルタメイト) は細胞体に受容体があるので細胞体を興奮させるが, 受容体のない神経線維には興奮を起こさない。そこで, 本研究はこれまでの扁桃体の電气的条件刺激による侵害受容細胞の抑制を確認するとともに, 扁桃体へグルタメイトを微量注入し, 侵害受容細胞の抑制が扁桃体内の細胞体の興奮によるのかどうか明らかにすることを目的とする。

方 法

(1) 実験動物

7~11週齢の Sprague-Dawley 雄性ラット (日本クレア社製250~400 g) 75匹を実験に用いた。ラットを笑気と酸素の混合ガス (2:1) と2.0%ハロタンの深麻酔下で, 人工呼吸のために気管切開し, 気管カニューレを挿入した。呼吸ガス・アナライザー (Dwyer, CAPSTAR-100) を用いて呼吸終末 CO₂ 濃度を観察し, その値が3.8-4.5%になるように人工呼吸器 (シナノ製作所 SN480-7) の一回換気量を調節した。体温は循環式保温パッドで38°Cに維持した。気管からの分泌物を押しやるため硫酸アトロピンを腹腔内に投与 (1.0 mg/kg) した。大腿静脈にカニューレ挿入し, そこから臭化パンクロニウム (初期投与0.24 mg/kg, 補助的投与0.16 mg/kg/hr) を不動化のため投与した。ラットを定位脳固定台に装着し, ユニット活動の記録中はハロタンのレベルを0.5%に維持した。実験中, ラットの状態が生理的であることを確認するため心電図, 心拍数, 呼吸終末 CO₂ 濃度を持続的に監視した。これらすべての実験は International Association for the Study of Pain の倫理ガイドラインに従っておこなった。

(2) 顎顔面領域の末梢試験刺激

顔面の皮膚や毛あるいは口腔粘膜に対する機械的刺激を使用して延髄後角で記録される神経細胞の性質を調べた。繰り返し毛筆でなでる触刺激 (tactile), 無鉤ピンセットでつまむ圧刺激 (pressure), 有鉤ピンセットでつまむ侵害刺激 (pinch) の3段階の強度の刺激をそれぞれ10秒間末梢受容野に与えた。これらの刺激に対する

応答から細胞を次の3種に分類した。①触刺激や圧刺激に最大応答を示し、侵害刺激には応答を示さないかあるいはその応答が非侵害刺激に対する応答より小さい低閾値機械受容 (low threshold mechanoreceptive: LTM) 細胞, ②3種の刺激すべてに応じ、なおかつ刺激強度に比例して発火頻度を増す広作動域 (wide dynamic range: WDR) 細胞, ③触刺激や圧刺激のような非侵害刺激には応じず、侵害刺激にのみ応答する特異的侵害受容 (nociceptive specific: NS) 細胞である。侵害受容細胞を記録した後、その末梢受容野に針電極 (電極間距離: 2 mm) を介して双極性に試験電気刺激 (持続時間: 2.0 msec) を与えた。その刺激強度は応答の閾値の2-3倍 (5-70 V) に設定した。

(3) 扁桃体の条件刺激

延髄後角の記録側と同側の扁桃体に条件刺激電極を刺入するため、歯科用エンジンを用い Paxinos と Watson¹²⁾ のアトラスを参照にブレグマ (bregma) より尾側2.5 mm, 外側4.1-4.3 mm に開頭術を施した。電気刺激と薬液注入の両方可可能な同心円双極電極 (ユニークメディカル TOG205-070: 内径0.12 mm, 外径0.6 mm, 突出部0.5 mm) を大脳皮質表面から深さ6.5-8.5 mm に刺入した。条件刺激は強度100-300 μ A, 持続時間0.2 msec の矩形波パルスで100 msecの間, 330 Hzの頻度で与えた。扁桃体の条件刺激と末梢受容野への試験刺激 (C-T) の間隔は通常50 msecとした。これらの扁桃体への条件刺激は心電図波形, 心拍数や呼気CO₂濃度に何ら影響を与えなかった。

(4) 延髄後角でのユニット放電記録

延髄を露出後、延髄後角すなわち門 (obex) より尾側0.5-3.0 mm, 外側2.0-4.5 mmの範囲で顎顔面皮膚および口腔内粘膜の機械的刺激に応じる侵害受容細胞を記録した。単一ユニット放電の記録は0.5 Mの酢酸ナトリウム中に2%の pontamine sky blue を含む溶液を充填したガラス微小電極 (電極抵抗7-20 M Ω) を用いた。その微小電極を油圧マニピュレーター (成茂 PC5N) によって5 μ mづつ進めた。得られた

神経活動は増幅器 (日本光電 VC-11) に導いた後、peri-stimulus time (PST) ヒストグラムを作成するため計算機 (ADInstruments, PowerLab/8 SP) で処理した。

(5) 扁桃体へのグルタメイト微量注入

扁桃体の電気刺激による侵害受容細胞の抑制効果が通過線維あるいは細胞体どちらの興奮によるのかを調べるため、細胞体のみを興奮させることが知られているグルタミン酸ナトリウム (グルタメイト: 500 mM, 蒸留水に溶解) を扁桃体に注入した。注入には条件刺激に用いた電極に連結した Hamilton のマイクロシリンジにて2分間かけて微量注入 (5 μ l) した。電気的 condition 刺激による抑制効果を確認した後、試験刺激に対する応答 (コントロール) を記録した。グルタメイト注入後5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50分の試験刺激に対する応答を観察した。

(6) 組織学的検索

延髄後角における侵害受容細胞の記録部位をマーキングするため記録用の微小電極から電気泳動的に pontamine sky blue を注入した (電極側を陰極, 生体側を陽極とし5 μ Aの直流を25分間通電)。また、扁桃体の条件刺激部位には3 μ Aの陽極電流を20秒間通電して鉄イオンを沈着させた。実験終了後、ラットを3 M-KCl の静脈投与により殺し、心臓から500 mlの生理食塩水, 続いて750 mlの2%フェロシアン化カリウム含有生理食塩水で灌流し鉄イオン沈着部位を Prussian blue 法によってマーキングした。摘出した脳を10%ホルマリン溶液に4日間以上浸漬した後、さらに20%ショ糖含有10%ホルマリン溶液に1日以上浸漬した。厚さ50 μ mの凍結切片を作成した。Camera lucida を用いてマーキング部位をスケッチした後、cresyl violet にて Nissl 染色を施して組織標本を作製した。延髄後角の記録部位および扁桃体の条件刺激部位におけるマーキング・スポットの位置を光学顕微鏡にて組織学的に検索した。延髄の学術用語と解剖学的区分は Palkovits と Jacobowitz (1974)¹³⁾ に、また扁桃体のそれら

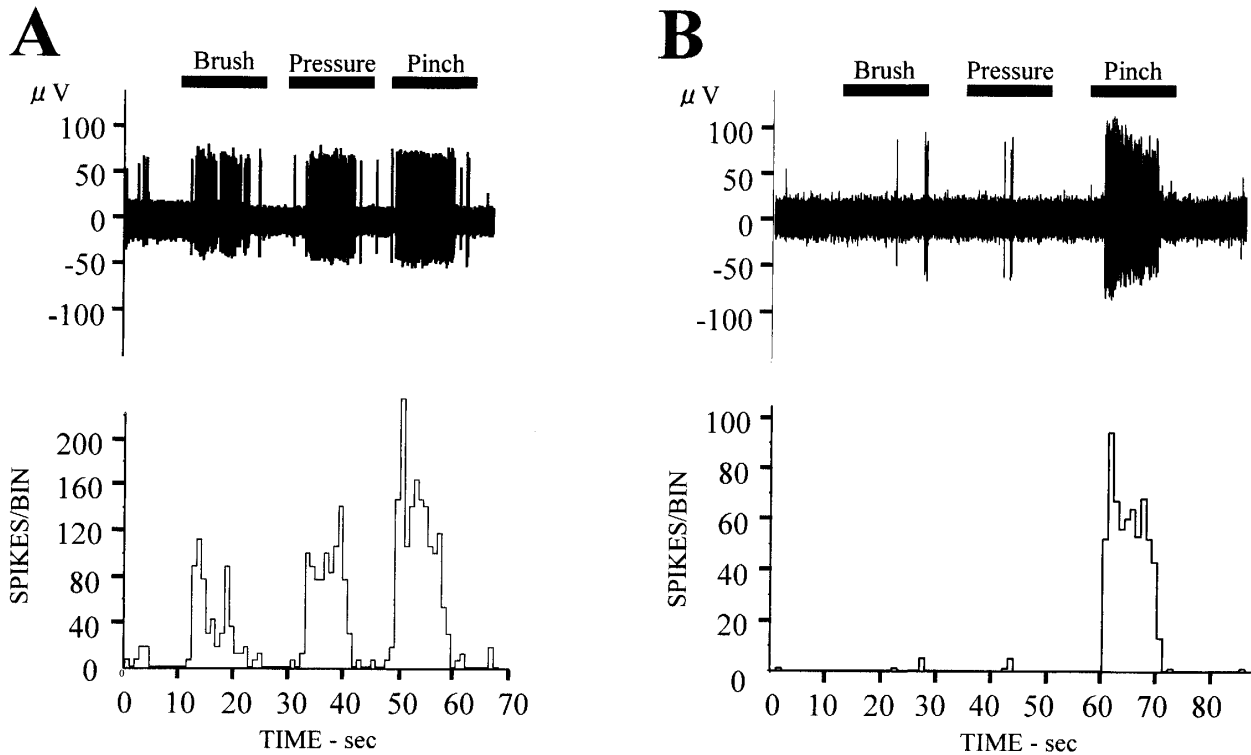


Fig. 1. Responses of wide dynamic range (A) and nociceptive specific (B) neurons to a series of graded mechanical stimuli, including brush, pressure and pinch stimuli, to the receptive field. Upper traces show raw extracellular recording of responses, and lower traces show peri-stimulus time histograms of corresponding responses shown in the upper traces. bin width; 1 sec. The bars on the upper traces indicate a 10 sec stimulus application.

は Paxinos と Watson¹²⁾ に従った。

(7) データ解析

侵害受容細胞の末梢試験刺激に対する応答が扁桃体条件刺激によって影響を受けるか否かを調査した。すなわち、条件刺激前後の試験刺激に対する応答のスパイク数が PST ヒストグラムから計測され、条件刺激後の応答が条件刺激前の応答（コントロール）の%として表された。条件刺激によってコントロールのスパイク数の20%以上減少したものを“抑制”，増加したものを“促進”と見なした。有意差検定は Mann-Whitney U- 検定を用い、危険率 (p) が 0.05未満を有意差ありと見なした。

結 果

1. 延髄後角の侵害受容細胞

三叉神経尾側核とその内側の網様垂核から成る延髄後角で記録された46個の侵害受容細胞は、その末梢受容野への機械的刺激に対する応

答から、WDR 細胞と NS 細胞の2種類に分類された。

35個の細胞が WDR 細胞に分類された。これらの細胞は触刺激、圧刺激、侵害刺激のすべてに応答し、しかも刺激強度に比例して発火頻度を増した。Fig. 1 A に典型的な WDR 細胞の例を示した。この細胞は網様垂核背部で記録され、記録側と同側の鼻翼外側部を受容野に持ち、侵害刺激であるピンチに最大の発火頻度で応じた。このような WDR 細胞は通常侵害刺激を与えている間持続して発火し、刺激終了と同時に発火は止むが、7個(20%)は侵害刺激終了後に10から80 sec 続く後発射(after-discharge)を伴っていた。また、WDR 細胞の内、12個(34.3%)が顎顔面部への侵害刺激のみならず角膜への触刺激あるいは耳介へのピンチにも応答を示した。

11個の細胞が NS 細胞と分類された。これらの細胞は触刺激や圧刺激などの非侵害刺激には

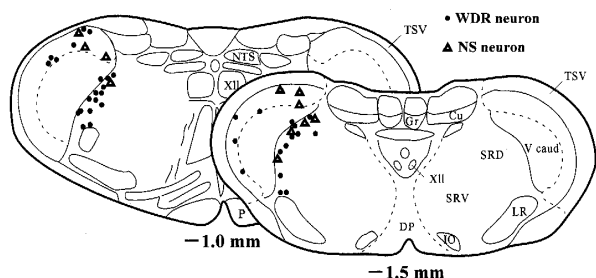


Fig. 2. Frontal-section drawings showing recording sites of 35 WDR and 11 NS neurons. The recording points were reconstructed from histological sections of marking spots. Closed circles represent WDR neurons and open triangles represent NS neurons. The sections are taken from the atlas of Palkovits and Jacobowitz (1974)¹³⁾. The number in each section indicates the AP level from the obex. Abbreviations: XII, hypoglossal nucleus; Cu, cuneate nucleus; DP, decussation of pyramidal tract; Gr, gracil nucleus; IO, inferior olive; LR, lateral reticular nucleus; NTS, solitary tract nucleus; P, pyramidal tract; SRD, dorsal part of reticular subnucleus; SRV, ventral part of reticular subnucleus; TSV, spinal trigeminal tract; V caud, trigeminal caudal nucleus.

応じず、有鉤ピンセットでのピンチのような侵害刺激にのみ応答を示した。Fig. 1 B に典型的な NS 細胞の例を示した。三叉神経尾側核浅層部で記録されたこの細胞は記録側と同側の鼻翼外側部を受容野に持ち、侵害刺激にのみ応答した。NS 細胞の内、2 個 (18.2%) は侵害刺激終了後に 20 から 40 sec 続く後発射 (after-discharge) を伴っていた。また 1 個 (9.1%) が両側角膜への触刺激と両側耳介へのピンチにも応じた。

2. 延髄後角における侵害受容細胞の分布

延髄後角で 35 個の WDR 細胞と 11 個の NS 細胞の計 46 個の侵害受容細胞の記録部位がマーキング・スポットの組織学的検索から同定された。三叉神経尾側核浅層部では 10 個の WDR 細胞と 6 個の NS 細胞の計 16 個の細胞が記録され、網様垂核背側部では 25 個の WDR 細胞と 5 個の NS 細胞の計 30 個が記録された。Fig. 2 はこれらの侵害受容細胞の記録部位を門 (obex)

から尾側 1.0 mm と 1.5 mm の二つの前頭断図にプロットしたものである。2 種の侵害受容細胞の分布には大きな相違は認められず、両細胞ともに尾側核浅層部および網様垂核背側部の全般に散在していた。

体部位再現 (somatotopic representation) が尾側核浅層部で記録された WDR 細胞の受容野に観察された。すなわち、三叉神経第一枝支配領域を受容野に持つ細胞は外側部に、三枝領域を受容野に持つ細胞は内側部に、二枝領域を受容野に持つものはそれらの中間に分布していた。これに対して、網様垂核の背側部において侵害受容細胞の分布と受容野との間には規則性を認めることはできなかった。また、同部位で記録された侵害受容細胞のうち 13 個は顔面や口腔内への侵害刺激に加えて角膜への触刺激あるいは耳介への侵害刺激に応じた。

3. 扁桃体条件刺激の抑制効果

延髄後角で記録される侵害受容細胞の応答に対する扁桃体条件刺激の効果を観察した。網様垂核背側部で記録された 1 個の WDR 細胞に対する扁桃体条件刺激による抑制例を Fig. 3 A (左) に示した。この細胞は上唇を末梢受容野として持ち、この部位の試験刺激に対して 9 msec の潜時で応答した (A の上段)。この応答は扁桃体基底外側核の条件刺激によってコントロール応答の約 25.9% (抑制効果 74.1%) まで抑制されたが (A の中段)、条件刺激を取り去るとほぼコントロール応答まで回復した (A の下段)。WDR 細胞 14 個について扁桃体条件刺激の抑制効果を調べたところ 10 個の応答が抑制され、その抑制効果は平均 $68.1 \pm 15.6\%$ であった (A の右図)。

同様に、Fig. 3 B (左) は網様垂核背側部で記録された NS 細胞の例で、鼻翼外側部の試験刺激に対する 10 msec の潜時の応答が扁桃体基底外側核の条件刺激によってコントロール応答の約 20.5% (抑制効果 79.5%) まで抑制された。NS 細胞 3 個について観察したところ、そのすべてにおいて抑制が観察され、この抑制効果は

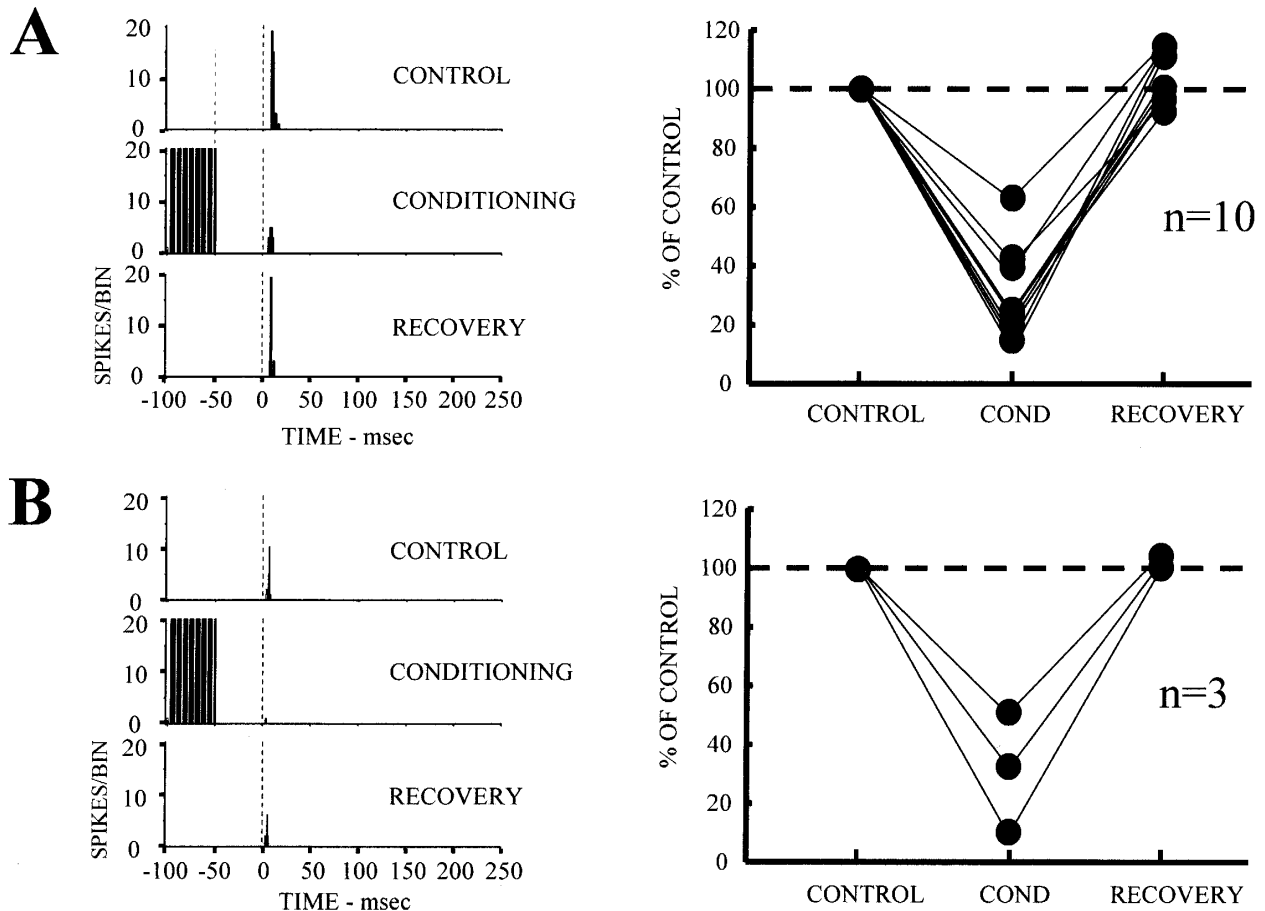


Fig. 3. Inhibitory effect of amygdaloid conditioning stimulation on the WDR neurons (A) and the NS neurons (B). Right: effect of the responses to test stimulation of a representative WDR neuron or NS neuron. Records in upper row show control responses to electrical skin stimulation of its receptive field. The inhibitory effect on these responses of amygdaloid conditioning stimulation (conditioning-test interval of 50 msec) is shown in the middle row. The bottom traces show the recovery of the neuron's responsiveness to control level after cessation of the conditioning stimulation. Time 0 indicates the time when the test stimulus was applied. Twenty trials were performed for construction of each histogram. The ordinates show the number of spikes/bin and the abscissa shows the time course in msec (bin width: 1 msec). Left: inhibitory effect of conditioning stimulation was expressed as the percentage of the control value. Each symbol represents the result from an individual neuron.

平均 $67.4 \pm 17.8\%$ であった (Bの右図)。これら WDR 細胞と NS 細胞に対する抑制効果の間に有意差は認められなかった。

4. 扁桃体条件刺激によって抑制効果を及ぼす部位

延髄後角で記録された侵害受容細胞の応答に対して20%以上の抑制を示した13箇所条件刺激部位を Fig. 4 に示す。これらのすべての位置が Prussian blue 法によって染め出されたマーキング・スポットの組織学的検索から決め

られた。抑制効果を示す部位は扁桃体中心核 (central nucleus) に5箇所、基底内側核 (basomedial nucleus) に4箇所、基底外側核 (basolateral nucleus) に3箇所および内側核 (medial nucleus) に1箇所認められた。それぞれの侵害受容細胞に対する抑制効果は、中心核刺激で平均 $68.8 \pm 11.0\%$ 、基底内側核刺激で $56.3 \pm 19.8\%$ 、基底外側核刺激で $81.3 \pm 6.3\%$ 、内側核で 70.8% であった。これらの抑制部位は扁桃体の吻尾側方向全般にわたって分布し、かたよりは見られなかった。一方、扁桃体外側核

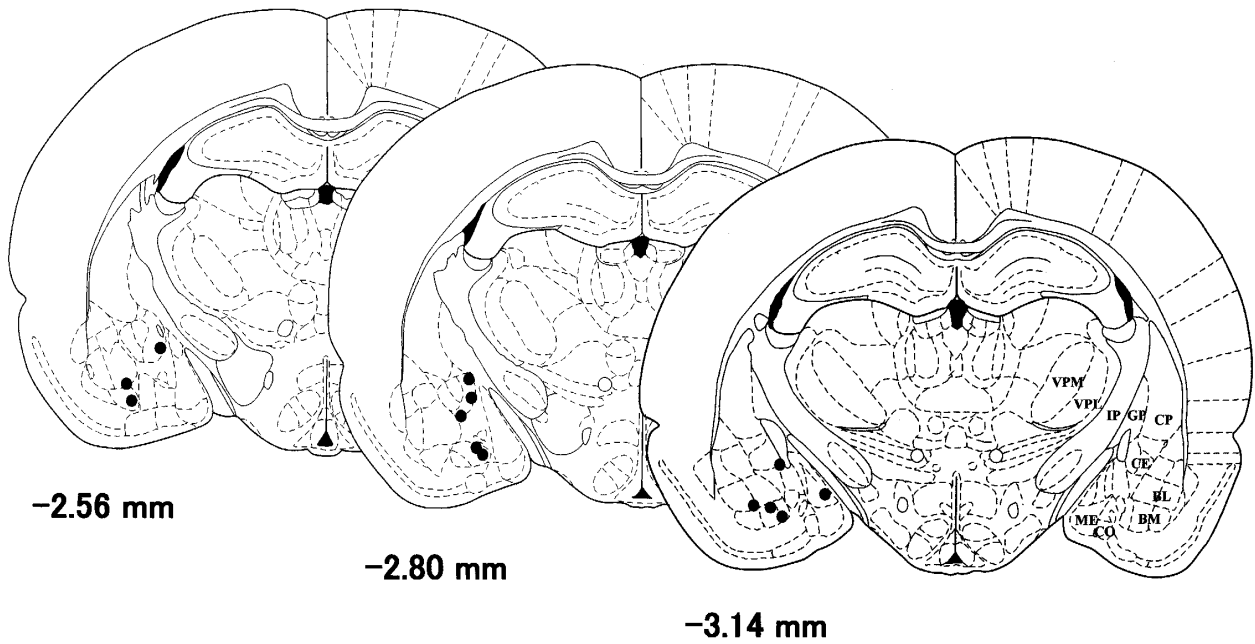


Fig. 4. Histological locations of the tips of 12 stimulating electrodes in coronal sections. Closed circles indicate stimulating sites that produced inhibition of the nociceptive response. Diagrams were adapted from the atlas of Paxinos and Watson (1986)¹²⁾. The number in each section indicates the AP level (mm) from the bregma. Abbreviations: BL, basolateral amygdaloid nucleus; BM, basomedial amygdaloid nucleus; CE, central amygdaloid nucleus; CO, cortical amygdaloid nucleus; CP, caudate putamen; GP, globus pallidus; IC, internal capsule; ME, medial amygdaloid nucleus; VPL, nucleus ventralis posterolateralis; VPM, nucleus ventralis posteromedialis.

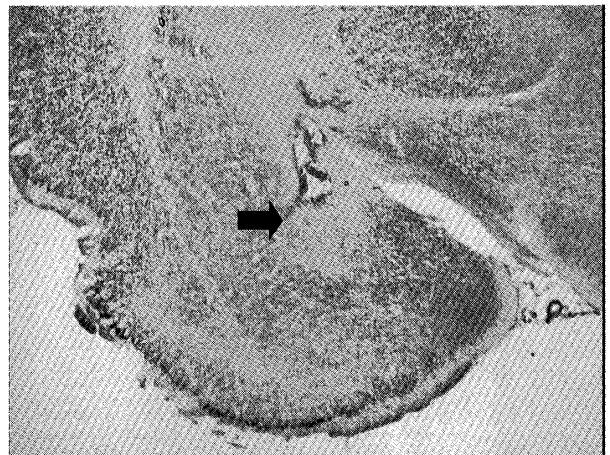
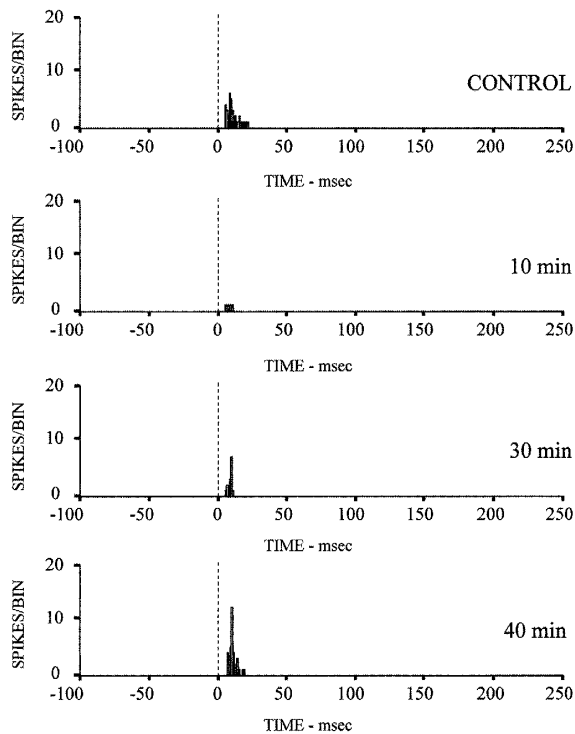


Fig. 5. Effect of glutamate microinjection into the amygdala on the responses of nociceptive neurons. Left: The responses of a WDR neuron (latency: 10 msec) was almost completely inhibited at 10 min after start of injection. The photomicrograph indicates the injection site (arrow) in the central amygdaloid nucleus.

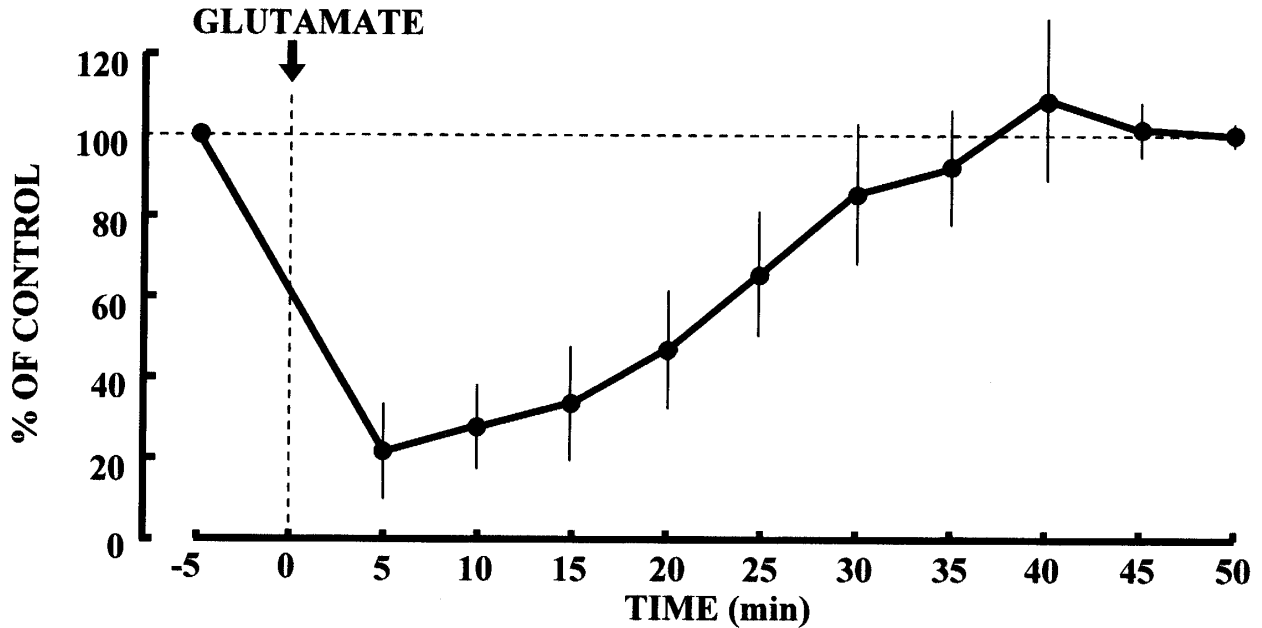


Fig. 6. Inhibitory effect of 0.5 M glutamate microinjection ($5 \mu\text{l}$) into the amygdala on 7 nociceptive neurons. Filled circles represent the modulation of responses of 5 WDR neurons and 2 NS neurons by injection into the amygdala. Note that the most potent inhibition occurred at 5 min after start of injection, and the recovery of inhibition to 50% took place around 25 min. The ordinate shows relative responses to control response, and the abscissa shows the time in minutes after glutamate injection. Time 0 indicates the start of glutamate injection.

(lateral nucleus), および扁桃体の背側部に位置する尾状被殻 (caudate putamen) や腹側に位置する梨状皮質 (piriform cortex) の条件刺激は侵害受容細胞の活動に影響を与えなかった。

5. 扁桃体へのグルタメイト微量注入による抑制効果

延髄後角の侵害受容細胞に対する扁桃体電氣的条件刺激の抑制効果が通過線維 (passing fiber) の興奮によるのかあるいは細胞体の興奮によるのかを, グルタメイトの微量注入によって7匹のラットの扁桃体7箇所を調べた。尾側核浅層部と網様垂核背側部で記録された5個のWDR細胞と2個のNS細胞について調査した。これら7個の侵害受容細胞において, 扁桃体の電氣的条件刺激 (中心核3箇所, 基底内側核2箇所, 基底外側核1箇所および内側核1箇所) による抑制効果は平均 $68.3 \pm 10.9\%$ であった。電氣的条件刺激を与えた部位へ細胞体のみを選択的に興奮させるグルタメイトを微量注入

($5 \mu\text{l}$) した。組織標本から変性像を指標にグルタメイトの広がりを測定したところ, 注入部位から半径 $0.6-0.9 \text{ mm}$ の範囲であった。グルタメイトは電氣的条件刺激の抑制効果を模倣し侵害受容細胞の応答を平均 $77.2 \pm 15.5\%$ 抑制した。Fig. 5にグルタメイト注入による抑制の1例と扁桃体内の注入部位を組織像で示した。網様垂核背側部で記録されたこのWDR細胞の末梢受容野刺激に対する応答は扁桃体中心核へのグルタメイト $5 \mu\text{l}$ の注入後10分にコントロール応答の 12.5% (抑制効果 87.5%) まで抑制され, 40分で回復した。また, 7個の侵害受容細胞 (5個のWDR細胞と2個のNS細胞) に対する扁桃体内へのグルタメイト注入の効果をFig. 6に示した。WDR細胞とNS細胞においてグルタメイトの効果に相違は見られず, 注入後約5分で抑制効果は最大となり, 約25分でコントロールの 50% に回復, 40分ではほぼ完全に回復した。また, 3個のニューロンにおいて自発発火が抑制された。扁桃体へのグルタメイトの微量注入が心電図や心拍数に影響を及ぼすこと

はなかった。

考 察

1. 条件刺激およびグルタミン酸微量注入の技術的考察

電気刺激によって侵害受容細胞の活動を抑制する部位が扁桃体の吻尾方向全体の様々な核に分布するという今回の実験結果は、行動学的に調べた neurotensin や carbachol 注入による鎮痛効果についての Kalivas et al. (1982) や Klamt & Prado (1991) の報告と一致する^{4, 5)}。彼らはこれらの薬物を扁桃体中心核、基底外側核や内側核に微量注入するとテイルフリック・テストやホットプレート・テストの潜時が延長することを報告した。また、これらの報告ではそれぞれの核間において鎮痛効果の強さに相違が見られた。しかし、今回の結果は村田ら (2002)⁸⁾ や坂東ら (2004)⁹⁾ の実験結果と同様に、刺激した扁桃体の核によって痛覚抑制の大きさが異なることはなくほぼ一定であった。このような実験結果の不一致は、扁桃体による痛覚受容の抑制が二次ニューロン・レベルのみならずより上位中枢にも作用しているか、あるいは薬物注入と電気刺激による扁桃体細胞への作用が異なることを示唆している。

扁桃体の条件刺激による電流滑走 (current spread) を最小限にするために同心円電極を用い、さらに刺激電流を最大で300 μ Aに制限した。電気的條件刺激による侵害受容細胞の抑制において最も効果的な部位を決めるときに、刺激電極を300 μ m間隔で背腹方向に移動した。実験終了後の組織学的検索から、刺激電極が扁桃核から600 μ m離れると抑制効果が突然減少したので、今回実験に用いた脳内電気刺激の電流滑走はこの範囲内と考えられた。

先人達による多くの報告は扁桃体の刺激によって顕著な自律神経系の変調を誘発することを示している。例えば、ラット扁桃体中心核の電気的あるいは化学的刺激によって心拍数の減少や血圧の降下¹⁴⁻¹⁶⁾、基底外側核の刺激によって血圧や心拍数の上昇あるいは筋肉血管の拡張

などが観察されている^{17, 18)}。しかし今回の実験で、扁桃体の電気的あるいはグルタミン酸による化学的刺激によって持続的に観察された心電図に変化を認めることはできなかった。矛盾する結果の原因は、先の実験の多くでは覚醒した動物を使用し、我々の今回の実験では笑気とハロタンによって麻酔した動物を用いていることによると考えられる。

脳内の電気刺激は神経細胞の細胞体と同時に必ず通過線維をも興奮させるので、電気刺激によって起こった現象がどちらの興奮によって誘発されたのか区別できなく、扁桃体の電気刺激によって誘発された痛覚抑制効果についても同様である。グルタミン酸受容体は神経線維にはなく細胞体のみが存在することが知られているので、グルタミン酸は特異的に細胞体を興奮させる道具として利用されている^{19, 20)}。そこで、細胞体のみを興奮させるためにグルタミン酸を扁桃体の局所に微量注入したところ、電気刺激によって観察された抑制と同程度の抑制効果が認められた。また、電気刺激やグルタミン酸の注入において侵害受容細胞の抑制に効果的な部位は類似していた。これらの知見は扁桃体刺激によって誘発される侵害受容抑制効果 (抗侵害受容効果) は扁桃体を通過する線維の興奮ではなく扁桃体内の神経細胞の興奮によって生じ、扁桃体内のこれらの細胞から発する神経路が延髄後角の侵害受容細胞の抑制効果に関与することを示唆している。

2. 延髄後角の侵害受容細胞

延髄後角 (medullary dorsal horn) は三叉神経尾側核とその内側の延髄網様体から構成される。この部位に存在する侵害受容細胞は一次求心性線維の投射を受け、そして視床後内側腹側核 (VPM) へ痛覚情報を中継する^{21, 22)}。先人の報告は延髄後角において、NS細胞の大多数は尾側核浅層部に少数が背側網様体核に分布しているのに対し、WDR細胞の多くが背側網様体核に少数が尾側核浅層部にも分布していることを示している^{23, 24)}。今回の結果はこれらの報

告にほぼ一致し、大部分の侵害受容細胞は主に尾側核浅層部と背側網様垂核で記録された。しかし、本実験において尾側核浅層部で多く認められるべきNS細胞が少数例しか記録されなかった。先の論文でも考察したように、この理由はNS細胞の自発放電頻度が非常に少ないことや²⁵⁾、脊髄浅層部で記録される細胞の約6割がWDR細胞でありLTM細胞やNS細胞の絶対数が少ないか²⁶⁾のどちらかと考えられる。さらに、今回の実験で角膜や耳介からの侵害入力を受けるWDR細胞が背側網様垂核で認められた。同様な性質を持つ侵害受容細胞がラットやネコでも報告されている^{27, 28)}。

3. 扁桃体刺激による抗侵害受容作用

本実験は村田ら(2002)⁸⁾や坂東ら(2004)⁹⁾が先に観察した扁桃体の電気的條件刺激によって三叉神経系の二次ニューロン・レベルで侵害情報の上行が抑制されることを再確認し⁸⁾、さらにグルタメイトの微量注入実験によって電気刺激による痛覚抑制効果は扁桃体を通過する線維の興奮ではなく扁桃体内の神経細胞の興奮によって生じることを電気生理学的に示した。

扁桃体基底外側核へのmorphineあるいは μ -オピオイド作動薬の微量注入、また中心核、内側核あるいは基底外側核へのacetylcholineのアゴニストであるcarbacholの微量注入によって脊髄レベルで起こるテイルフリック反応の潜時を延長することが報告されている^{5, 6, 29, 30)}。本実験の記録部位である延髄後角が脊髄後角と相同的関係にあることから、この部位の侵害受容細胞が種々の扁桃体核の電気的および化学的條件刺激によって抑制されるという本実験結果は、これらの行動学的実験結果を説明する神経生理学的基礎の一部をなすと考えられる。また、グルタメイトは受容体を介して細胞を脱分極することから上記のオピオイドやコリン作動薬による扁桃体の神経細胞への作用も興奮性であることを示唆する。一方、本実験で中心核へのグルタメイト微量注入は鎮痛効果を誘発したが、Rodgers(1978)やAl-Rodhan et

al.(1990)は扁桃体中心核へのmorphine投与やenkephalinase inhibitor投与はテイルフリック潜時に影響しないことを報告している^{3, 31)}。抗体を使用した組織化学的検索から中心核には豊富なオピオイド受容体の存在が知られていることから、これらの知見は中心核の細胞がオピオイドに対して過分極応答を示すと推測される。なぜなら、オピオイドが中心核の細胞を興奮させるならば、本実験と同様に鎮痛効果が観察されるであろう。

4. 扁桃体による鎮痛作用の機能的意義

ヒトを含む動物はストレスに曝されると次のような特有なストレス反応が表出する。自律神経系では血圧、心拍数、呼吸数の増加、行動学的変化としてすみ反応や驚愕反応、内分泌系の変化として視床下部からのコルチコトロピン放出ホルモン(CRH)や下垂体前葉からの副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)の分泌増加である。このようなストレス反応が扁桃体の電気的あるいは化学的刺激によって起こり^{10, 11, 32)}、扁桃体の損傷によって消失する¹⁰⁾ことから、扁桃体はストレス反応の形成や表出において中心的役割を担っていると考えられる。さらに、行動学的観察からストレスを負荷された動物は痛覚刺激に対する閾値が上昇することが明らかにされてきた。例えば、四肢への電気刺激(フットショック)、冷水中での水泳、恐怖などのストレスが鎮痛を引き起こすことが知られており、この現象はストレス誘発鎮痛と呼ばれている^{33, 34)}。前もって扁桃体を損傷しておいた動物ではこのストレス誘発鎮痛が認められないことから、この鎮痛において扁桃体が重要な役目を果たしていると想定されている。このような知見から、我々は観察した扁桃体細胞の興奮による延髄後角の侵害受容細胞の抑制作用はストレス誘発鎮痛の神経生理学的基礎の一つと考えた⁸⁾。

ストレス時には様々な脳領域からあらゆる種類の感覚情報が扁桃体に収斂し、ここで処理され、その結果として中心核からの扁桃体出力線維(amygdalofugal fiber)を通して上記のよ

うな様々のストレス反応が現れる。このようなストレス反応の多くは個体の維持あるいは種の保存の目的に適応したものである。ストレス反応の一つであるストレス誘発鎮痛は、捕食行動時の異種動物（被食者—捕食者）間の闘争により生じた傷の痛みを減少させ、被食者である動物が捕食者から逃走できる確率を増加することによって生存率を高めるのに有利に働くと考えられる。反対に繁殖期やなわばり維持の際に見られる同種動物間の闘争においてストレス誘発鎮痛は弱者の服従行動の発現を遅らせるであろう。それは負う傷の程度を増すことによって生存確率を減少させ、強者の生存および生殖行動に有利に働くと考えられる。さらに、生体が危害に曝されていることを意味する侵害情報が脳に入力すると、この情報を処理するために脳の神経細胞が総動員される。ストレス誘発鎮痛による二次ニューロンレベルにおける侵害情報の上行の抑制は、三次ニューロンや大脳皮質レベルでの抑制に比較して侵害情報の処理に当たる神経細胞の数が少なく済み、他の機能に関わる神経細胞の数をより増加させると考えられる。このような鎮痛機構は生存の確率をさらに上昇させると推定される。

扁桃体の興奮による鎮痛作用にどのような神経路が関わるのかは不明である。扁桃体による鎮痛作用はオピオイド拮抗剤ナロキサン[®]の静注によって影響されなかったので、内因性オピオイドが関与する中脳中心灰白質腹外側部（PAGvl）—延髄腹内側野（RVM）系以外の神経路が考えられるべきであろう。候補としてノルアドレナリンやセロトニンの関与が知られている青斑核（Locus coeruleus）や外側網様核（lateral reticular nucleus）の介在も考えられる³⁵⁻³⁸。また、逆行性色素標識法を用いたサルやネコでの解剖学的検索によって扁桃体脊髄路、すなわち扁桃体中心核から脊髄後角への投射が確認されていることから、扁桃体の興奮が直接延髄や脊髄の二次ニューロンに抑制的に作用する可能性もある^{39, 40}。扁桃体からこれらの二次ニューロンへの投射経路を明らかにするに

は新たな研究が必要とされる。

結 論

本研究の目的は扁桃体電気刺激による痛覚抑制が延髄後角の二次ニューロン・レベルで認められるかどうか確認すること、およびその抑制は扁桃体内の神経細胞体あるいは通過線維どちらの興奮に起因するのかを調べることである。

1. 笑気と酸素の混合ガスとハロタンで麻酔し、臭化パンクロニウムで不動化したSD系ラットを用い、顎顔面領域の痛覚刺激に応じる侵害受容細胞を三叉神経尾側核とその内側の網様垂核において記録した。
2. 46個の侵害受容細胞が記録され、その内35個は触刺激から侵害刺激に至る種々の刺激強度に比例して段階的に応じる広作動域（WDR）細胞、11個が侵害刺激のみに応じる特異的侵害受容（NS）細胞であった。
3. 17個の侵害受容細胞（14個のWDR細胞と3個のNS細胞）の内、13個（10個のWDR細胞と3個のNS細胞）の細胞が扁桃体の電气的条件刺激により抑制された。抑制効果を示す条件刺激部位は扁桃体中心核、基底外側核、基底内側核、内側核に分布しており、その平均抑制は $68.0 \pm 15.3\%$ であった。
4. 扁桃体の電気刺激による侵害受容細胞の抑制効果を確認した後、同部位へ細胞体のみを興奮させるグルタメイトを微量注入（ $5 \mu\text{l}$ ）したところ、電気刺激と同様の抑制効果が観察された。これらの結果は扁桃体刺激によって誘発される抗侵害受容効果は扁桃体内の神経細胞の興奮によって生じ、扁桃体内のこれらの細胞から発する神経路が延髄後角の侵害受容細胞の抑制効果に関与することを示唆する。
5. ストレス反応の発現に扁桃体が必須であることから、観察された扁桃体の神経細胞の興奮による侵害受容細胞の抑制効果は、行動学的に示されているストレス誘発鎮痛の神経生理学的基礎の一つと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤な指導、校閲を賜りました三浦廣行教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究の遂行に際しご助言およびご指導を賜りました口腔生理学講座の北田泰之教授および歯科薬理学講座の加藤裕久教授に心から感謝の意を表します。最後に様々な面にてご協力をいただきました歯科矯正学講座医局員、口腔生理学講座各位に深く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、第83回日本生理学会（2006年3月29日、前橋）および第48回歯科基礎医学会（2006年9月23日、鶴見）において発表した。

なお、本研究の一部は岩手医科大学圭陵会学術基金および文部科学省ハイテクリサーチプロジェクト（平成17年度－平成21年度）の補助を受けて実施した。

参 考 文 献

- 1) Pitkänen, A.: Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: The amygdala, a functional analysis. 2nd ed., ed. by Aggleton, J. P., Oxford University Press, Oxford, pp 31-115, 2000.
- 2) Amaral, D. G., Price, J. L., Pitkänen, A. and Carmichael, S. T.: Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. In: The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction. ed. by Aggleton, J. P., Wiley-Liss, New York, pp 1-66, 1992.
- 3) Al-Rodhan, N., Chipkin, R. and Yaksh, T. L.: The antinociceptive effects of SCH-32615, a neutral endopeptidase (enkephalinase) inhibitor, microinjected into the periaqueductal, ventral medulla and amygdala. *Brain Res.* 520 : 123-130, 1990.
- 4) Kalivas, P. W., Gau, B. A., Nemeroff, C. B. and Prange, A. J. Jr.: Antinociception after microinjection of neurotensin into the central amygdaloid nucleus of the rat. *Brain Res.* 243 : 279-286, 1982.
- 5) Klamt, J. G. and Prado, W. A.: Antinociception and behavioral changes induced by carbachol microinjected into identified sites of the rat brain. *Brain Res.* 549 : 9-18, 1991.
- 6) Oliveira, M. A. and Prado, W. A.: Antinociception and behavioral manifestations induced by intracerebroventricular or intra-amygdaloid administration of cholinergic agonists in the rat. *Pain* 57 : 383-391, 1994.
- 7) Kawarada, K., Kamata, K. and Matsumoto, N.: Effects of conditioning stimulation of the central amygdaloid nucleus on tooth pulp-driven neurons in the cat somatosensory cortex (SI). *Jpn. J. Physiol.* 49 : 485-497, 1999.
- 8) 村田純一郎, 松本範雄: ラットの三叉神経脊髄路核および網様亜核の侵害受容細胞に対する扁桃体条件刺激の抑制効果. 岩医大歯誌, 27 : 246-260, 2002.
- 9) 坂東三史, 松本範雄: ラット延髄後角の侵害受容細胞に対する扁桃体条件刺激の抑制効果にオピオイド受容体が関与するか? 岩医大歯誌, 29 : 224-235, 2004.
- 10) Davis, M.: The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu. Rev. Neurosci.* 15 : 353-375, 1992
- 11) Henke P. G.: The amygdala and forced immobilization of rats. *Behav. Brain Res.* 6 : 19-24, 1985.
- 12) Paxinos, G. and Watson, C.: The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed., Academic Press, San Diego, 1986.
- 13) Palkovits, M. and Jacobowitz, D. M.: Topographic atlas of catecholamine and acetylcholinesterase-containing neurons in the rat brain. II. Hindbrain (mesencephalon, rhombencephalon). *J. Comp. Neurol.* 157 : 29-42, 1974.
- 14) Cox, G. E., Jordan, D., Moruzzi, P., Schwaber, J. S., Spyer, K. M. and Turner, S. A.: Amygdaloid influences on brain-stem neurons in the rabbit. *J. Physiol (Lond.)*. 381 : 135-148, 1986.
- 15) Cox, G., Jordan, D., Paton, J. F. R., Spyer, K. M. and Wood, L. M.: Cardiovascular and phrenic nerve responses to stimulation of the amygdala central nucleus in the anesthetized rabbit. *J. Physiol (Lond.)*. 389 : 541-556, 1987.
- 16) Ciriello, J. and Rodger, S.: GABAergic effects on the depressor responses elicited by stimulation of central nucleus of the amygdala. *Am. J. Physiol.* 276 : H242-247, 1999.
- 17) Maskati, H. A. and Zbrozyna, A. W.: Cardiovascular and motor components of the defence reaction elicited in rats by electrical and chemical stimulation in amygdala. *J. Auton. Nerv. System.* 28 : 127-131, 1989.
- 18) Sajdyk, T. J. and Shekhar, A.: Excitatory amino acid receptor antagonists block the cardiovascular and anxiety responses elicited by γ -aminobutyric acid_A receptor blockade in the basolateral amygdala of rats. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 283 : 969-977, 1997.
- 19) Johnson, J. L.: Glutamic acid as a synaptic transmitter in the nervous system. A review. *Brain Res.* 37 : 1-19, 1972.
- 20) Goodchild, A. K., Dampney, R. A. L. and Ban-

- dlar, R.: A method for evoking physiological responses by stimulation of cell bodies, but not axons of passage, within localized regions of the central nervous system. *J. Neurosci. Methods* 6 : 351-363, 1982
- 21) Yokota, T.: Neural mechanisms of trigeminal pain. In: *Advances in Pain Research and Therapy*, Vol. 9, eds. by Fields, H. L., Dubner, R. and Cervero, F., Raven Press, New York, pp 211-232, 1985.
- 22) Young, R. F. and Perryman, K. M.: Neuronal responses in rostral trigeminal brain-stem nuclei of macaque monkeys after chronic trigeminal tractotomy. *J. Neurosurg.* 65 : 508-516, 1986.
- 23) Dallel, R., Raboisson, P., Auroy, P. and Woda, A.: The rostral part of the trigeminal sensory complex is involved in orofacial nociception. *Brain Res.* 448 : 7-19, 1988.
- 24) Dubner, R. and Bennett, G. J.: Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annu. Rev. Neurosci.* 6 : 381-418, 1983.
- 25) Woolf, C. J. and Fitzgerald, M.: The properties of neurons recorded in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 221 : 313-328, 1983.
- 26) Cervero, F., Iggo, A. and Ogawa, H.: Nociceptor-driven dorsal horn neurons in the lumbar spinal cord of the cat. *Pain*, 2 : 5-24, 1976.
- 27) Villanueva, L., Bouhassira, D., Bing, Z. and Le Bars, D.: Convergence of heterotopic nociceptive information onto subnucleus reticularis dorsalis neurons in the rat medulla. *J. Neurophysiol.* 60 : 980-1009, 1988.
- 28) Yokota, T., Koyama, N., Nishikawa, Y., Nishikawa, N., Nishida, Y., Hasegawa, A. and Fujino, Y.: Trigeminal nociceptive neurons in the subnucleus reticularis ventralis. I. Response properties and afferent connections. *Neurosci. Res.* 11 : 1-17, 1991.
- 29) Helmstetter, F. J., Bellgowan, S. F. and Poore, L. H.: Microinfusion of mu but not delta or kappa opioid agonists into the basolateral amygdala results in inhibition of the tail flick reflex in pentobarbital-anesthetized rats. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 275 : 381-388, 1995.
- 30) Helmstetter, F. J., Bellgowan, P. S. and Tershner, S. A.: Inhibition of the tail flick reflex following microinjection of morphine into the amygdala. *NeuroReport* 4 : 471-474, 1993.
- 31) Rodgers, R. J.: Elevation of aversive threshold in rats by intra-amygdaloid injection of morphine sulphate. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 6 : 385-390, 1977.
- 32) Henke, P. G.: Unit-activity in the central amygdalar nucleus of rats in response to immobilization-stress. *Brain Res. Bull.* 10 : 833-837, 1983.
- 33) Amit, Z. and Galina, Z. H.: Stress-induced analgesia: adaptive pain suppression. *Physiol. Rev.* 66 : 1091-1120, 1986.
- 34) Terman, G. W., Shavit, Y., Lewis, J. W., Cannon, J. T. and Liebeskind, J. C.: Intrinsic mechanisms of pain inhibition: activation by stress. *Science* 226 : 1270-1277, 1984.
- 35) Hodge, C. J., Jr., Apkarian, A. V., Stevens, R., Vogelsang, G. and Wisnicki, H. J.: Locus coeruleus modulations of dorsal horn unit responses to cutaneous stimulation. *Brain Res.* 204 : 415-420, 1981.
- 36) Mokha, S. S., McMillan, J. A. and Iggo, A.: Pathways mediating descending control of spinal nociceptive transmission from the nuclei locus coeruleus (LC) and raphe magnus (NRM) in the cat. *Exp. Brain Res.* 61 : 597-606, 1986.
- 37) Janss, A. J. and Gebhart, G. F.: Spinal monoaminergic receptors mediate the antinociception produced by glutamate in the medullary lateral reticular nucleus. *J. Neurosci.* 7 : 2862-2873, 1987.
- 38) Gebhart, G. F. and Ossipov, M. H.: Characterization of inhibition of the spinal nociceptive tail-flick reflex in the rat from the medullary lateral reticular nucleus. *J. Neurosci.* 16 : 701-713, 1986.
- 39) Mizuno, N., Takahashi, O., Satoda, T. and Matsushima, R.: Amygdalospinal projections in the macaque monkey. *Neurosci. Lett.* 53 : 327-330, 1985.
- 40) Sandrew, B. B., Edwards, D. L., Poletti, C. E. and Foote, W. E.: Amygdalospinal projections in the cat. *Brain Res.* 373 : 235-239, 1986.