

ラットの末梢自然刺激による延髄後角の侵害受容細胞の応答に及ぼす扁桃体刺激の抑制効果

關山 浩子, 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: 2008年10月27日)

(受理: 2008年11月28日)

Abstract : We have reported that conditioning electrical stimulation of the amygdala has an inhibitory effect on responses of nociceptive neurons of the rat medullary dorsal horn to electrical stimulation of the receptive field. However, it is not clear if amygdala stimulation has influences on the non-noxious response. The purpose of the present study is to determine using natural stimulation whether amygdala stimulation induces inhibition of noxious and non-noxious responses of wide-dynamic range (WDR) neurons. Rats were anesthetized with N₂O-O₂ and 0.5% halothane and immobilized with pancuronium bromide. Peripheral natural stimulus was applied continuously to the facial area, and ipsilateral amygdala stimulations (trains of 33 pulses, 0.5 msec in duration, 300 μ A) to the recording site were delivered at a stimulus interval of 5-6 sec. In 7 WDR neurons, noxious responses were inhibited by amygdala (central, cortical basomedial or basolateral nuclei) stimulation. Effects of amygdala stimulation on the responses to 3 kinds of stimuli (brushing, pressure and pinching) was tested in 4 neurons. In 3 of those neurons, both noxious and non-noxious responses were inhibited and the mean inhibitory effect were nearly equivalent (58.7-38.7%) for those responses. Amygdala stimulation inhibited noxious responses without affecting non-noxious responses in the remaining neuron. These inhibitory effects lasted for 200-300 msec. In addition, responses of low-threshold mechanoreceptive (LTM) neurons were not affected by amygdala stimulation of the same site at which stimulation inhibited responses of nociceptive neurons. These findings suggest that excitation of neurons in the amygdala induce postsynaptic inhibition on the most of nociceptive neurons but not on non-nociceptive neurons in the medullary dorsal horn.

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

Inhibitory effects of amygdala stimulation on the responses of nociceptive neurons in the rat medullary dorsal horn to peripheral natural stimulation

Hiroko SEKIYAMA and Norio MATSUMOTO*

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

1-3-27 Chuodori, 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. 33 : 123-136, 2008

緒 言

三叉神経脊髄路核尾側核とその内側に位置する網様核は細胞構築学的に脊髄後角に似ていることから延髄後角 (medullary dorsal horn) と呼ばれている¹⁾。この部位では多くの侵害受容細胞が記録されている^{1,2)}。これらの細胞は三叉神経の支配領域である顎顔面口腔領域からの侵害性入力を受け、その情報を直接的にあるいは脳幹網様体を経て間接的に視床の様々な核に送っている³⁾。視床を経由したこれらの侵害情報を受ける大脳皮質の第一体性感覚野や前帯状回あるいは大脳辺縁系は、痛覚の弁別的側面や情動的側面に関わっている³⁾。従って、延髄後角の侵害受容細胞の応答の変化を痛覚受容の変化と見なすことができる。延髄後角の侵害受容細胞は2種類に大別される。すなわち、侵害刺激のみに応答する特異的侵害受容 (nociceptive specific: NS) 細胞と侵害刺激のみならず触刺激や圧刺激などの非侵害刺激にも応じる広作動域 (wide-dynamic range: WDR) 細胞である⁴⁾。WDR 細胞は別名 multi-convergent neuron と呼ばれ、これらの細胞には侵害情報を伝える細い一次求心性線維と非侵害情報を伝える太い一次求心性線維が収斂している⁵⁾。

一方、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ている。動物はストレスに曝されると、血圧、心拍数、呼吸数の増加などのような自律神経系の変化および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) の分泌増加などの内分泌系の変化、すなわち、ストレス反応が表出する。扁桃体の電気的あるいは化学的刺激によって、このようなストレス反応が起こり⁶⁻⁸⁾、扁桃体の損傷によって消失することが知られている⁹⁾。このような知見から、我々は、四肢への電気刺激、冷水中での水泳あるいは恐怖などのストレスによって起こる鎮痛、すなわち、ストレス誘発鎮痛 (stress-induced analgesia: SIA)^{9,10)} の神経生理学的メカニズムの一つとして扁桃体

の興奮を考えてきた。

我々は先の実験で、延髄後角で記録される NS 細胞および WDR 細胞の末梢受容野の電気刺激に対する応答が、扁桃体の電気的條件刺激あるいは化学的刺激によって抑制されることを示してきた¹¹⁻¹³⁾。しかし、末梢組織の電気刺激は痛覚受容器だけでなく触圧覚受容器をも興奮させるので、扁桃体刺激による WDR 細胞の電気刺激応答の抑制はどちらの入力に作用するか定かでない。そこで本研究の目的は、延髄後角の侵害受容細胞、特に WDR 細胞の触覚、圧覚、痛覚の3種類の自然刺激応答が扁桃体の電気刺激によってどのような影響を受けるか、また扁桃体刺激が非侵害刺激のみに応答する低閾値機械受容 (low threshold mechanoreceptive: LTM) 細胞に影響を及ぼすかどうかを調査することである。

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 200~420 g) 73 匹を実験に用いた。手術は笑気と酸素の混合ガス (2:1) と 1.5-2.0% ハロタン麻酔下で行った。人工呼吸のために気管切開術を行ない、気管カニューレを挿入した。また不動化のため大腿静脈にカニューレを挿入し、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) を投与した。人工呼吸を施し、呼気ガス・アナライザー (Dwyer, CAPSTAR-100) を用いて観察した呼気終末 CO₂ 濃度が 3.8-4.5% になるように、人工呼吸器 (シナノ製作所 SN480-7) の一回換気量あるいは換気回数を調節した。体温は循環式保温パッドで 38°C に維持し、気管からの分泌物を押さえるため硫酸アトロピンを腹腔内に投与 (1.0 mg/kg) した。ラットを定位脳固定台に装着した後、ラットの状態が生理的であることを確認するため、心電図と呼気終末 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行った。

(2) 顎顔面領域への末梢刺激

顔面の皮膚や毛に対する自然（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（brush）、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秒間細胞の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（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（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、侵害刺激のみに応答する特異的侵害受容（NS）細胞である。延髄後角の細胞をこれらの細胞に分類した後、その末梢受容野を連続的に刺激し、その応答に対する扁桃体刺激の効果を観察した。末梢受容野の電気刺激には針電極（電極間距離2mm）を用いて、双極性に持続時間2.0 msecの矩形波を与えた。

(3) 扁桃体刺激

延髄の記録側と同側の扁桃体に刺激電極を刺入するため、歯科用エンジンを用いてブレグマ（bregma）より尾側2.5 mm、外側4.0-4.5 mmの位置を中心に直径約3 mmの穴を開けた。この位置はPaxinos & Watson⁸⁾のアトラスを参照にした。硬膜上から扁桃体電気刺激用の同心円双極電極（Unique Medical, No. 46）を深さ6.5-8.5 mmに刺入し、5あるいは6 secの刺激間隔で刺激強度100-300 μ A、持続時間0.2 msecの矩形波パルスで330 Hzの頻度で100 msecの間与えた。これらの扁桃体刺激は持続的に記録している心電図波形、心拍数や呼気CO₂濃度に何ら影響を及ぼすことはなかった。

(4) 延髄後角でのユニット放電記録

延髄を露出後、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の機械的

刺激に応じる侵害受容細胞あるいはLTM細胞を記録した。ユニット活動の記録中はハロタンの濃度を0.5%に維持した。1 Mの酢酸ナトリウム中に2%のPontamine Sky Blue（PSB）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 ）を単一ユニット放電の記録に用いた。その微小電極を油圧マニピュレーター（成茂PC5N）によって2 μ mずつ進めた。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/8SP）で処理した。

(5) 組織学的検索

記録用の微小電極から電気泳動的（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）にPSBを注入し、延髄後角における細胞の記録部位をマーキングした。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の静脈投与により無痛的に屠殺し、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、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 & Jacobowitz（1974）¹⁴⁾に、また扁桃体のそれらはPaxinos & Watson¹⁵⁾に従った。

(6) データ解析

細胞の末梢受容野の自然刺激に対する応答が扁桃体刺激によって影響を受けるか否かを調査した。すなわち、連続的な末梢自然刺激に対する応答のスパイク数が扁桃体電気刺激前500

msec と刺激終了後 1,000 msec の PST ヒストグラムから計測された。扁桃体刺激終了後 250~300 msec から 1,000 msec 間の 1 bin 当たりの平均スパイク数をコントロールとし、扁桃体刺激直後から 250~300 msec 間のそれと比較し%として表された。扁桃体刺激によってコントロールのスパイク数の 20%以上減少あるいは増加したものをそれぞれ“抑制”あるいは“促進”と判断した。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とそれらの分布

73 個の侵害受容細胞が三叉神経尾側核とその内側の網様亜核から成る延髄後角で記録された。それらの細胞は末梢受容野への自然(機械)刺激に対する応答から、WDR 細胞と NS 細胞

に分類された。

68 個の細胞が触刺激, 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。これらの細胞は WDR 細胞と分類された。Fig. 1A は典型的な WDR 細胞の例を示す。この細胞は記録側と同側の上唇を受容野に持ち, 三叉神経尾側核浅層部の外側で記録された。侵害刺激であるピンチ刺激に最大の発火頻度で応じ, 刺激の最中持続して発火している。またこれらの WDR 細胞で, 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刺激にも応答を示すものは認められなかった。

5 個の細胞が触刺激や圧刺激などの非侵害刺激には応じず, ピンチのような侵害刺激のみに応答を示した。これらの細胞は NS 細胞と分類された。Fig. 1B に典型的な NS 細胞の例を示した。振幅の異なる 2 個の細胞が記録されてい

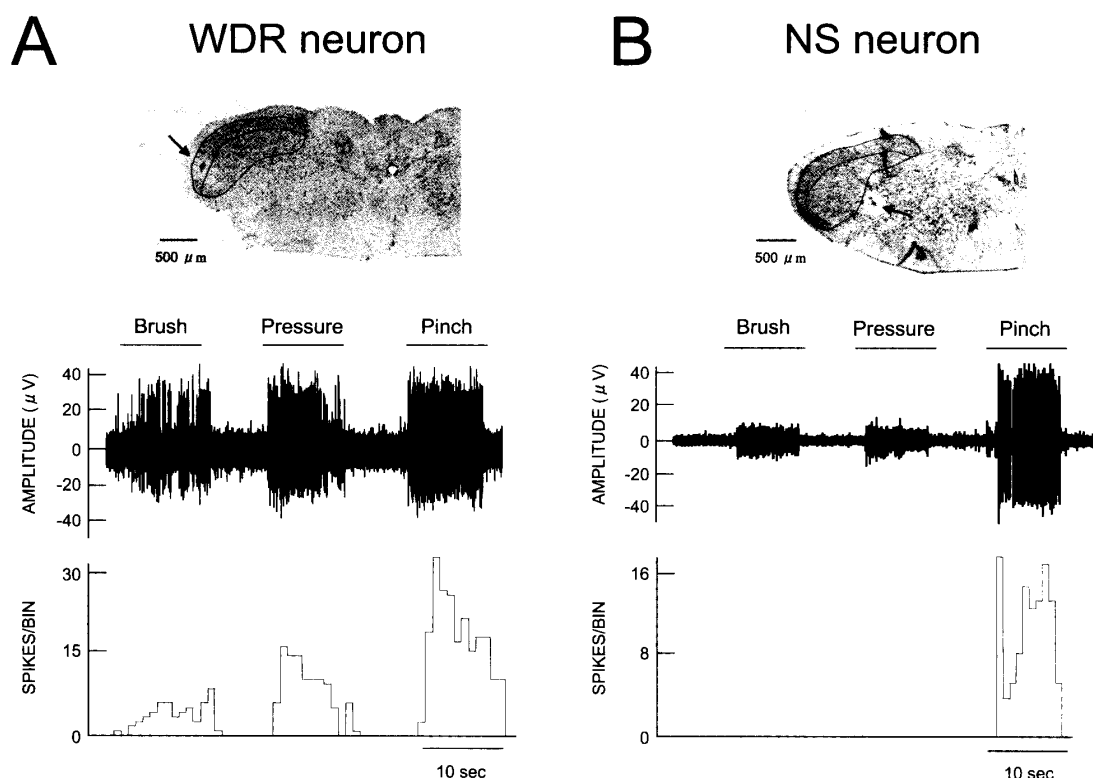


Fig. 1. Responses of wide-dynamic range (WDR) and nociceptive specific (NS) neurons to a series of graded mechanical stimuli, including brush, pressure and pinch stimuli, to the receptive field. Arrows in the photomicrographs indicate the recording sites. Upper traces show raw extracellular recording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

る。振幅の小さい細胞は3種の刺激すべてに応じているが、振幅の大きい細胞は非侵害刺激には応答を示さず、記録側と同側の上顎 whisker 部の侵害（ピンチ）刺激のみに応答する NS 細胞である。この細胞は網様垂核背側部で記録された。WDR 細胞と同様に、両側角膜への触刺激と両側耳介へのピンチに応じる NS 細胞は記録されなかった。

38 個の WDR 細胞と 4 個の NS 細胞の計 42 個の侵害受容細胞が延髄後角で記録され、それら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。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。大多数の侵害受容細胞は尾側 1.5 mm 付近の三叉神経尾側核浅層部と網様垂核

背側部で記録された。三叉神経尾側核浅層部では 8 個の WDR 細胞と 1 個の NS 細胞の計 9 個の細胞が記録され、網様垂核背側部では 30 個の WDR 細胞と 3 個の NS 細胞の計 33 個が記録された。網様垂核腹側部では記録されなかった。また、2 種の侵害受容細胞の分布には大きな差異は認められなかった。

2. 末梢受容野の電気刺激応答に対する扁桃体条件刺激の効果

延髄後角の三叉神経尾側核浅層部の外側で記録された 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 に示した。この細胞は鼻翼部を末梢受容野として持ち、この部位の電気刺激に対して 7 msec の潜時で応答した (Fig. 3C の上段)。この応答は前もって与えた

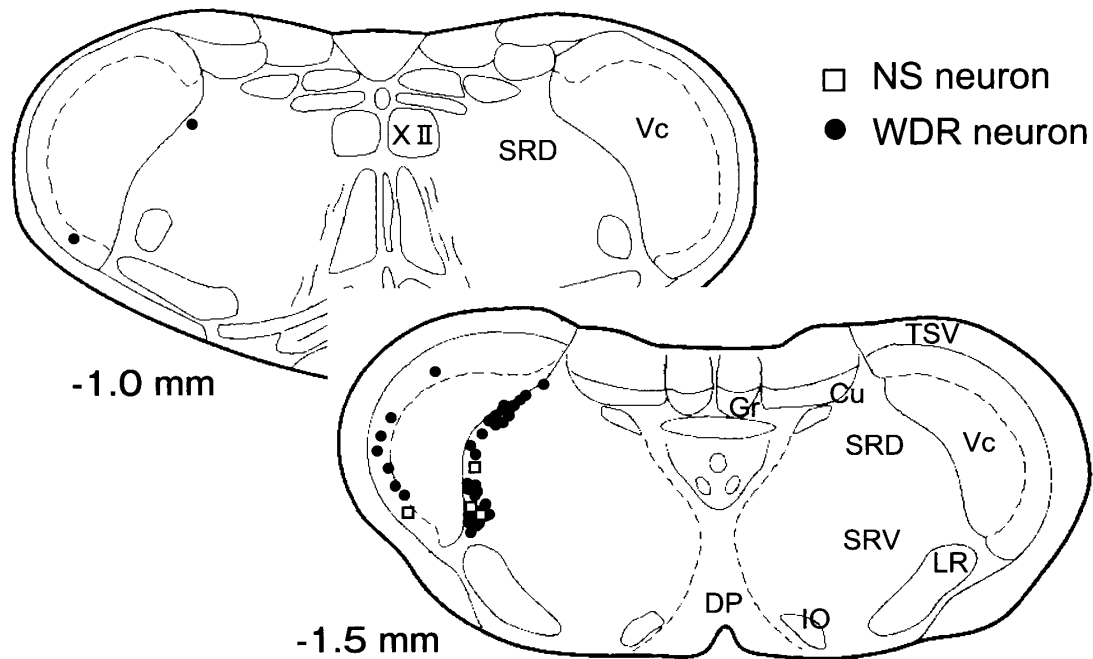


Fig. 2. Frontal-section drawings showing recording sites of 68 WDR and 5 NS neurons. The recording points were reconstructed from histological sections of marking spots. Closed circles, WDR neurons; open squares, NS neurons. The sections are taken from the atlas of Palkovits and Jacobowitz (1974)¹⁴⁾. 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; SRD, dorsal part of reticular subnucleus; SRV, ventral part of reticular subnucleus; TSV, spinal trigeminal tract; Vc, trigeminal caudal nucleus.

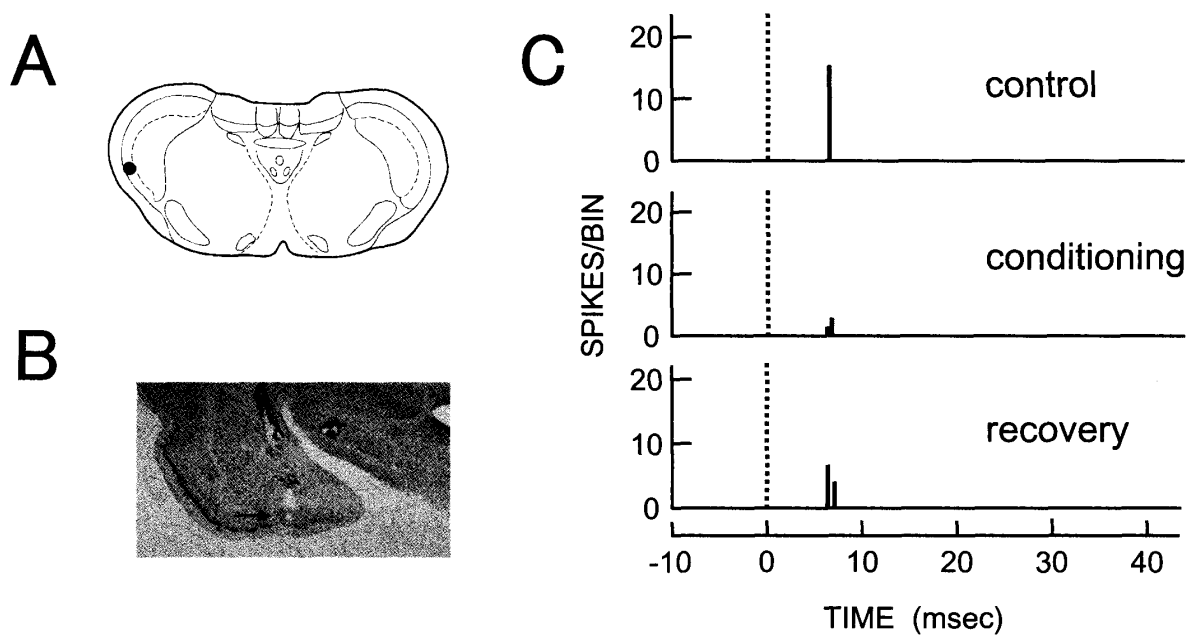


Fig. 3. Effect of conditioning stimulation of the amygdala on a WDR neuron. (A) Recording site of this WDR neuron in the superficial layers of the trigeminal caudal nucleus. (B) Site of stimulation in the cortical nucleus of the amygdala. (C) Example of amygdala inhibitory modulation. In each PST histogram, the ordinate shows the number of spikes/bin and the abscissa shows the time course in msec (bin width: 1.0 msec). Zero indicates the time when the stimulus was applied. Twenty trials were performed for construction of each histogram.

扁桃体皮質核の条件刺激によってコントロール応答の約 28.5% (抑制効果 71.5%) まで減少したが (Fig. 3C 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 (Fig. 3C の下段)。このように WDR 細胞の末梢電気刺激応答が扁桃体条件刺激によって抑制されることが再確認された。しかし, 末梢受容野への電気刺激実験では扁桃体によるこの抑制効果が WDR 細胞に入力する侵害情報と非侵害情報のどちらに作用したのかは明らかではない。そこで, 次に侵害応答と非侵害応答を明確に区別できる自然刺激を用いて, それらの刺激応答に対する扁桃体刺激の効果を観察した。

3. 末梢受容野の自然刺激応答に対する扁桃体刺激の効果

7 個の WDR 細胞において, 末梢の自然刺激応答に対する扁桃体刺激による抑制効果が観察された。それらの細胞のうち 3 個では侵害刺激 (ピンチ) 応答に対する効果のみが調べられ, 残

りの 4 個においては 3 種類の自然刺激 (触刺激, 圧刺激, 侵害刺激) 応答に対する扁桃体刺激の効果が調べられた。後者の WDR 細胞は自然刺激応答に対する扁桃体の抑制効果の相違から, 1) 侵害刺激応答および非侵害刺激応答が扁桃体刺激によって抑制される細胞と 2) 侵害刺激応答のみが抑制される細胞が観察された。

1) 侵害および非侵害刺激応答が扁桃体刺激によって抑制された細胞

4 個中 3 個の WDR 細胞において, 扁桃体刺激は 3 種類の自然刺激応答すべてを抑制した。網様垂核背側部で記録された上唇部を受容野に持つ細胞の例を Fig. 4 に示す。扁桃体基底外側核の刺激は刺激終了後から 250 msec の間の受容野のピンチ刺激に対する応答を抑制した (Fig. 4C 上段)。扁桃体刺激前 150 msec の間と刺激終了後 250~1,000 msec の間の 1 bin 当たりの平均スパイク数に有意な差は認められなかった。扁桃体刺激終了直後から 250 msec 間

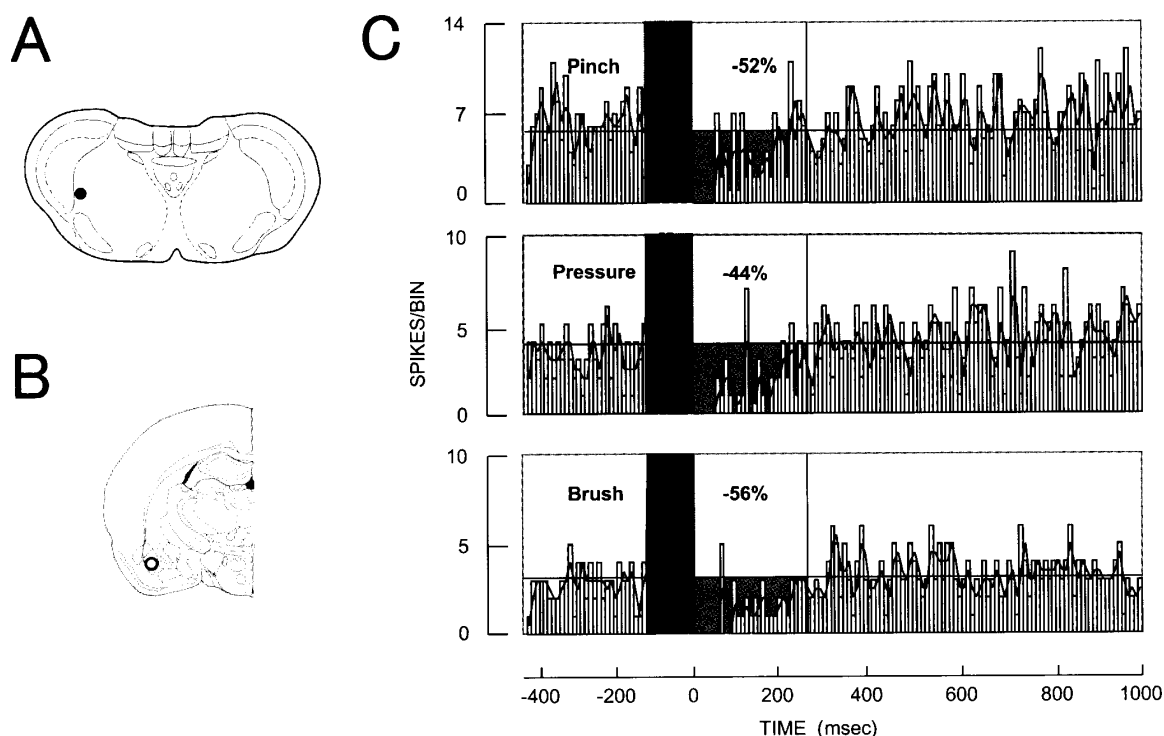


Fig. 4. Effect of amygdala stimulation on responses to natural stimulation. (A) Recording site of this WDR neuron in the dorsal part of the subnucleus reticularis. (B) Site of stimulation in the basolateral nucleus of the amygdala. (C) Inhibitory effect of amygdala stimulation. Continuous lines in each histogram indicate the simple moving average (5 bins) and horizontal thin lines indicate the average of the spikes/bin between 250 and 1,000 msec after the cessation of amygdala stimulation. The thin vertical line represents time (250 msec) when the response recovered to the control level. These histograms show that amygdala stimulation inhibited responses not only to pinching but also to pressure and brushing. In each PST histogram, the ordinate shows the number of spikes/bin and the abscissa shows the time course in msec (bin width: 10 msec). The black area indicates an artifact by amygdala stimulation. Zero indicates the time when the amygdala stimulation was ceased. Thirty-five trials for pinching and twenty trials for pressure and brushing were performed for construction of each histogram.

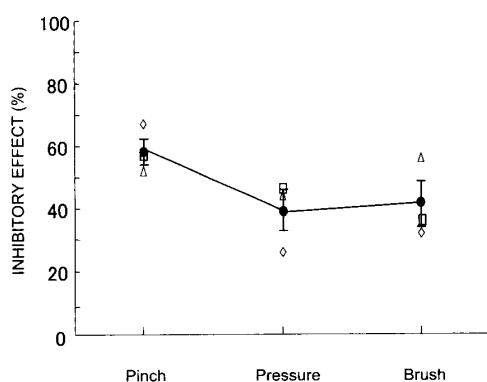


Fig. 5. Inhibitory effects of amygdala stimulation on responses of 3 WDR neurons to pinching, pressure and brushing. The ordinate shows the percent change in the number of spikes in response to amygdala stimulation vs. control. Each WDR neuron is presented by a different symbol, and closed circles and bars indicate the mean \pm S. E.

の1 bin 当たりの平均スパイク数は刺激終了後250~1,000 msecの間の平均スパイク数の48%であった。すなわち、扁桃体刺激は刺激終了直後から250 msecの間のピンチ刺激に対する応答が52%抑制したことを示す。同様に、このWDR細胞の受容野の圧刺激や触刺激に対する応答も同部位の扁桃体刺激によってそれぞれ44%、56%抑制された (Fig. 4C 中段と下段)。

3種類の自然刺激応答のいずれもが扁桃体刺激によって抑制されたWDR細胞について、それぞれの応答に対する抑制率をFig. 5に示した。平均抑制率はピンチ刺激応答 $58.7 \pm 4.4\%$ (平均 \pm S.E.), 圧刺激応答 $38.7 \pm 6.4\%$, 触刺激応答 $41.3 \pm 7.4\%$ であり、それぞれの自然刺激

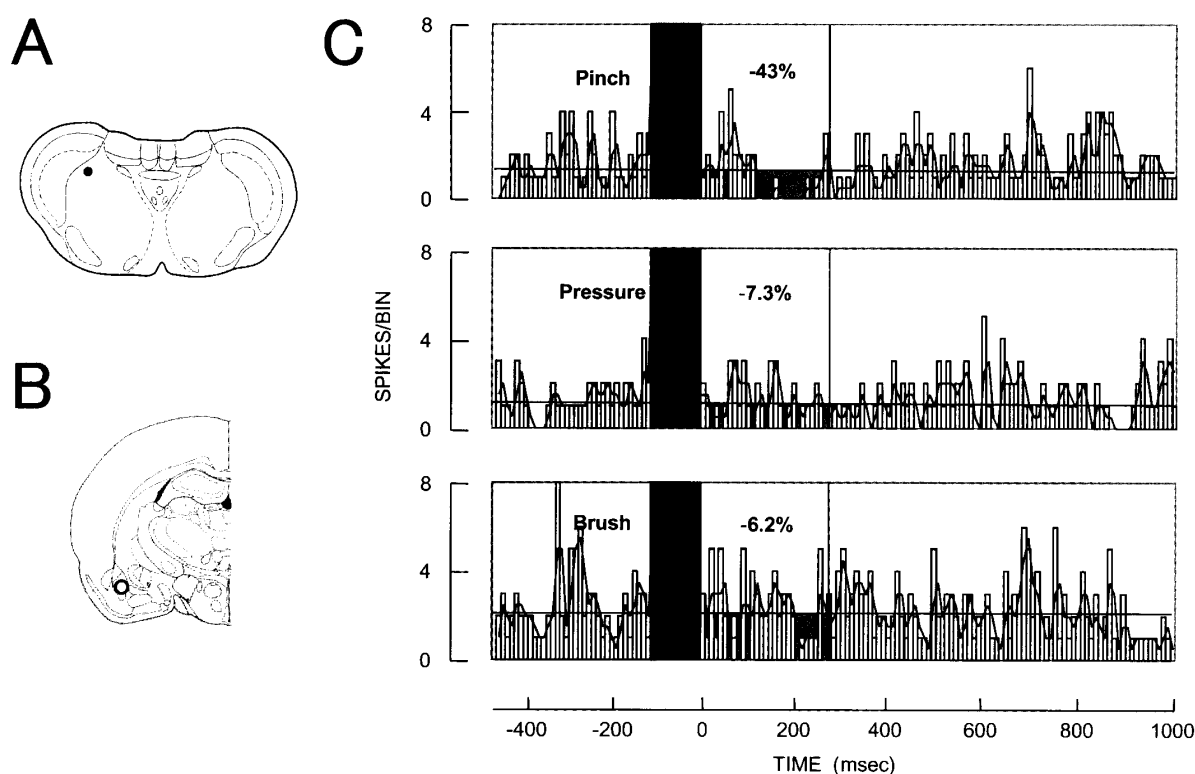


Fig. 6. Effect of amygdala stimulation on responses to natural stimulation. (A) Recording site of a WDR neuron in the dorsal part of the subnucleus reticularis. (B) Site of stimulation in the basolateral nucleus of the amygdala. (C) Inhibitory effect of amygdala stimulation. Conventions are the same as those in Fig. 4. These histograms show that amygdala stimulation inhibited responses to pinching but not to pressure and brushing. Twenty trials for pinching and pressure and forty trials for brushing were performed for construction of each histogram.

応答に対する扁桃体の抑制効果は同程度であり、それらの間に有意差は認められなかった。

2) 侵害刺激応答のみが扁桃体刺激によって抑制された細胞

4個中1個のWDR細胞は扁桃体刺激によって、侵害刺激であるピンチ刺激に対する応答のみが抑制され、非侵害刺激である圧刺激や触刺激による応答はまったく抑制されなかった。Fig. 6に示した例は網様垂核背側部で記録された上唇部を受容野に持つWDR細胞である。この細胞ではピンチ刺激に対する応答が扁桃体基底外側核の刺激によって刺激終了直後から250 msecの間のスパイク応答が43%抑制された(Fig. 6C上段)。しかし、同部位の非侵害刺激に対する応答は扁桃体による抑制作用を受けず、圧刺激応答および触刺激応答はそれぞれ

−7.3%と−6.2%の影響を受けるのみであった(Fig. 6C中段と下段)。

4. LTM細胞に対する扁桃体刺激の効果

WDR細胞の侵害刺激応答を抑制することが確かめられた部位の扁桃体(中心核, 基底外側核)の刺激が、触刺激あるいは圧刺激などのような非侵害刺激のみに応答するLTM細胞に対して影響を及ぼすかどうかを観察した。網様垂核背側部で記録されたWDR細胞を代表例としてFig. 7に示す。扁桃体基底外側核の刺激は鼻翼部のピンチ刺激に対するスパイク応答を扁桃体刺激終了直後から250 msecの間57%抑制した(Fig. 7C)。しかし、扁桃体同一部位の刺激は三叉神経尾側核大細胞層で記録されたLTM細胞の非侵害刺激(触刺激)応答には抑制効果を示さなかった(Fig. 7)。扁桃体刺激によって

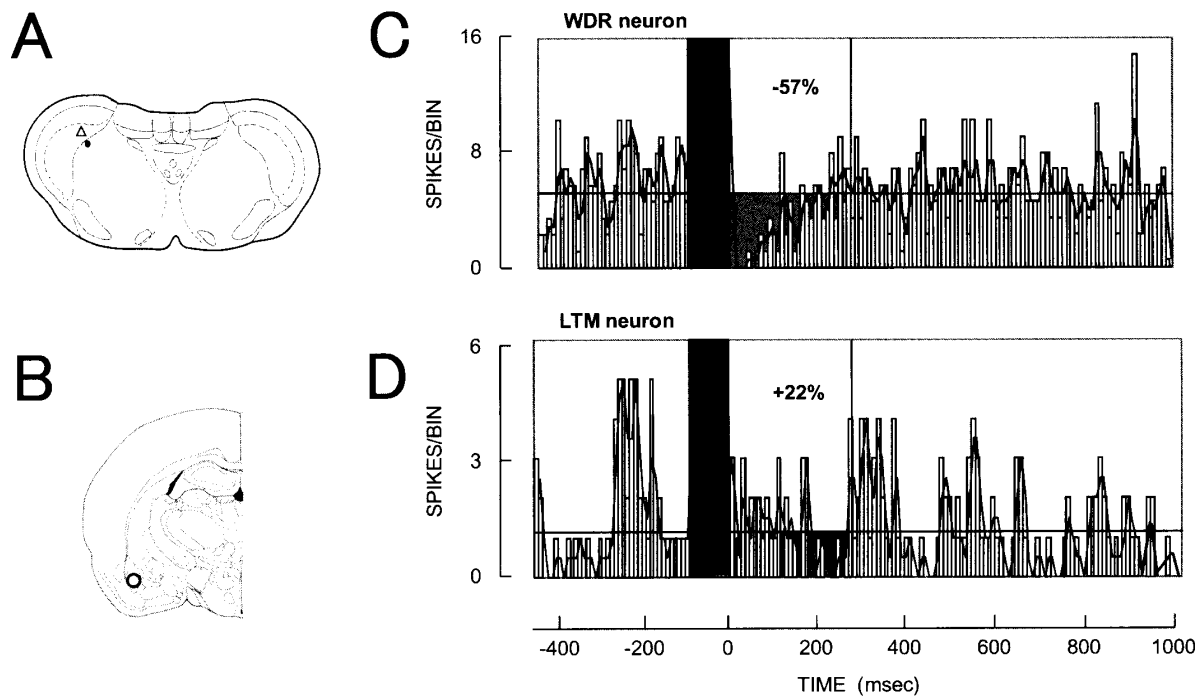


Fig. 7. Effect of amygdala stimulation on a WDR neuron and an LTM neuron. (A) Recording sites of this WDR neuron(○) in the dorsal part of the subnucleus reticularis and LTM neuron(△) in the magnocellular division of the trigeminal caudal nucleus. (B) Site of stimulation in the basolateral nucleus of the amygdala. (C) Amygdala stimulation inhibited responses of a WDR neuron to noxious stimulation (pinching). (D) Non-nociceptive response of an LTM neuron was not affected by the same amygdala stimulation. Twenty trials for pinching and brushing were performed for construction of each histogram.

+22%という促進効果を示す数値が得られているが、扁桃体刺激後250から1,000 msecのコントロール応答にバラツキが大きいため効果なしと判定した。他の1個のLTM細胞において、同様の方法で非侵害刺激応答に対する扁桃体刺激の効果が試された。触刺激を与えるごとにバースト状の神経応答が出現するが、通常は抑制が観察される扁桃体刺激直後から200 msecの間に抑制は認められなかった。このことは扁桃体条件刺激の抑制効果は侵害受容細胞に選択的であることを示した。

考 察

本実験はWDR細胞について末梢受容野への連続的自然刺激に対する応答が扁桃体(中心核, 皮質核, 基底内側核, 基底外側核)の電氣的条件刺激によって影響を受けるかどうかを観察し、次のことを明らかにした。扁桃体刺激はほ

とんどのWDR細胞において、侵害刺激および非侵害刺激応答を同程度に抑制し、それらの抑制効果は200~300 msec持続した。一方、WDR細胞を抑制した部位の扁桃体刺激は低閾値機械受容(LTM)細胞の応答にはまったく影響を与えなかった。

1. 延髄後角の侵害受容細胞

本実験で侵害受容細胞は延髄後角, すなわち三叉神経尾側核とその内側の網様垂核で記録された。網様垂核は背側部と腹側部に分けられ、腹側部の侵害受容細胞の多くは角膜への触刺激あるいは耳介へのピンチ刺激に応じることが報告されている^{2,4)}。本実験ではこのような侵害受容細胞は記録されなかったことから、網様垂核での記録部位は背側部と考えられる。これらの領域の侵害受容細胞は三叉神経支配領域からの痛覚情報を受け、その情報を後内側腹側核

(VPM) や後核群 (PO group) などの視床特殊核および髄板内核群や内側下核 (SM) などの非特殊核に投射している¹⁰⁻¹²⁾。この内、視床特殊核は大脳皮質第一体性感覚野 (SI) に投射し痛覚刺激の部位、強度、時間経過などの判別、すなわち痛覚の弁別的側面に参与すると考えられている¹⁹⁾。また覚醒サルを用いた Dubner *et al.* (1989) の実験で、WDR 細胞は侵害刺激強度の上昇に応じて発火頻度を増すことから痛覚刺激強度の弁別に関わっていると想定されている²⁰⁾。従って、延髄後角で記録される WDR 細胞の興奮性の変化が痛覚刺激の弁別、特に刺激強度の弁別に大きく影響すると推定された。

2. 扁桃体と鎮痛効果

扁桃体は自律神経系や内分泌系の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⁶⁻⁸⁾。一方、ストレスを負荷された動物で痛覚刺激に対する閾値が上昇するというストレス誘発鎮痛 (SIA) はストレス反応の一つと考えられる。したがって、SIA の発生メカニズムに扁桃体が関わっていると推測された。SIA は実験に用いられる刺激の種類や強度によって、オピオイド拮抗薬によって減弱するオピオイド型と影響を受けない非オピオイド型に分けられている^{22, 23)}。オピオイド型の鎮痛効果は、中脳中心灰白質 (periaqueductal gray: PAG) へのオピオイド阻害薬投与によってブロックされる^{21, 22)}。しかし、我々は先の実験で、扁桃体刺激による延髄後角の侵害受容細胞の抑制作用はオピオイド受容体拮抗薬であるナロキソンによって減弱しないことを観察した¹²⁾。これらの結果を考え合わせると、本実験で観察された扁桃体による侵害受容細胞の抑制効果は非オピオイド型ストレス誘発鎮痛の神経生理学的基礎の一つとなると考えられた。

扁桃体による痛覚抑制についての報告は行動学的実験によるものが大半を占める。Prado のグループ (1991, 1994) は扁桃体中心核、内側核あるいは基底外側核へのアセチルコリンのアゴニストであるカルバコールの微量注入によって

テイルフリック反応の潜時が延長することを^{23, 24)}、また Helmstetter *et al.* (1993, 1995) は扁桃体基底外側核へのモルヒネあるいは μ -オピオイド作動薬の微量注入によって同様の現象が起こることを観察した^{25, 26)}。これらの扁桃体による脊髄レベルでの鎮痛効果に、本実験で記録した延髄後角の侵害受容細胞が関わっている可能性が存在する。なぜなら、網様垂核背側部の侵害受容細胞が脊髄後角の侵害受容細胞に促進的影響を与えることが報告された^{27, 28)}。したがって、網様垂核背側部の侵害受容細胞が扁桃体によって抑制され、その結果、脊髄レベルの侵害受容が修飾されることが推測された。

3. 扁桃体による鎮痛作用に関わる神経機序および神経路

脊髄後角や延髄後角の二次ニューロンに対する下行性痛覚抑制系の作用様式として2種類が考えられる。シナプス後抑制とシナプス前抑制である²⁹⁾。本実験は、扁桃体刺激は WDR 細胞の侵害刺激応答と非侵害刺激応答を同程度に抑制し、LTM 細胞の非侵害応答には影響を及ぼさないことを示した。一個の細胞へ収斂する3種類の入力 (触覚、圧覚および侵害入力) が同程度に抑制されることから、扁桃体による抑制機構は侵害受容細胞を過分極するシナプス後抑制が考えられる。今回観察された扁桃体による抑制の持続時間が 200~300 msec とシナプス後抑制にしては長いが、Yoshimura *et al.* (1995) はラット脊髄後角の膠様質の介在ニューロンにおいて、グリシンや γ -アミノ酪酸 (GABA) による持続時間が 3 sec にも及ぶ抑制性シナプス後電位 (inhibitory postsynaptic potential: IPSP) を記録している³⁰⁾。しかし、シナプス前抑制の可能性を完全には否定できない。なぜなら、内因性下行性痛覚抑制系に関わる中脳や延髄の条件刺激によって、延髄後角に入力する痛覚線維と同じく低閾値機械受容求心性線維でもシナプス前抑制の指標となる一次求心性線維脱分極 (primary afferent depolarization: PAD) が観察されている^{31, 32)}。このように、侵害受容細胞に

入力する痛覚線維に選択的ではなく、触・圧覚情報を伝える神経線維末端にも作用するシナプス前抑制が存在することが知られている。また、例数は少ないものの、扁桃体刺激によって侵害刺激応答のみが抑制される WDR 細胞が観察された。非侵害応答には影響を与えず、侵害応答に選択的であることから、扁桃体のこれらの細胞に対する抑制機構はシナプス前抑制と考えられる。

扁桃体から延髄後角や脊髄後角への直接投射を確認した報告は少ない。脊髄や延髄の後角における侵害情報の伝達を修飾する内因性下行性痛覚抑制系は、脳幹部あるいはそれよりも上位中枢の様々な部位から発している。その内のどの核が扁桃体内の神経細胞の興奮によって誘発される延髄後角での侵害受容細胞の抑制作用に関わっているかは不明である。先に述べたように、扁桃体による痛覚抑制作用にナロキソンの静注は影響を与えない¹²⁾。従って、内因性オピオイドが関係する中脳中心灰白質腹外側部 (ventrolateral part of periaqueductal gray: PAGvl) から吻側延髄腹内側野 (rostral ventromedial medulla: RVM) を経ての神経路は、扁桃体の痛覚抑制に関わる神経路から除外できるであろう。RVM を除外するさらなる理由として、これまでに扁桃体条件刺激によって延髄後角の侵害受容細胞が促進効果を受ける例は観察されていないことが挙げられる。なぜなら、RVM には侵害受容を抑制する系のみならず促進する系が存在することが知られている^{33,34)}。なおかつ、PAG や RVM の条件刺激は、本実験結果とは異なって、延髄後角の LTM 細胞にまで影響を与えることが報告されている³⁵⁾。これらの神経核以外の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) の介在が考えられる³⁶⁻³⁹⁾。事実、Travaglie のグループはこれらの伝達物質が延髄後角で K^+ コンダクタンスを増加することによって膜電位を過分極させる、すなわちシナプス後抑制を引き起こすことがスライス標本

の実験から示された⁴⁰⁾。また同報告はこれらの伝達物質が GABA やグリシン含有介在細胞を興奮させて、後角細胞に抑制性シナプス後電位 (IPSP) を発生させることをも示した³⁸⁾。さらに、これらの伝達物質がシナプス前抑制を引き起こすことも報告されている。これらの伝達物質が、痛覚を伝える一次求心性線維の末端からのグルタメイト放出を減少させて抗侵害受容効果を発揮することが延髄後角で報告されている⁴¹⁾。またノルアドレナリンは脊髄後角で一次求心性線維からのサブスタンス P の放出を減少することも知られている^{42,43)}。いずれにしても、扁桃体からこれらの二次ニューロンへの投射経路に関わる伝達物質や抑制機構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、扁桃体電気刺激が延髄後角の WDR 細胞の自然刺激 (侵害刺激あるいは非侵害刺激) に対する応答にどのような影響を及ぼすかを調べることである。非侵害刺激として触刺激および圧刺激、侵害刺激としてピンチ刺激の 3 種を用いた。

1. 笑気と酸素の混合ガスとハロタンで麻醉し、臭化パンクロニウムで不動化したラットを用い、顎顔面領域の痛覚刺激に応じる侵害受容細胞を延髄後角において記録した。
2. 73 個の侵害受容細胞が記録され、その内 68 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 WDR 細胞、5 個が侵害刺激のみに応じる NS 細胞であった。
3. 7 個の WDR 細胞において、末梢受容野への連続的ピンチ刺激に対する応答が扁桃体の電気刺激によって抑制された。その内、4 個の細胞で 3 種類の自然刺激応答に対する扁桃体刺激の効果が観察された。3 個の細胞は扁桃体刺激によって非侵害応答と侵害応答が同程度 (58.7-38.7%) 抑制された。残りの 1 個では侵害刺激応答のみが抑制された。それらの抑制効果は 200~300 msec 持続した。
4. WDR 細胞を抑制した部位の扁桃体刺激は

低閾値機械受容 (LTM) 細胞には影響を与えなかった。

5. 延髄後角の WDR 細胞の多くが非侵害応答と侵害応答の両方とも扁桃体刺激で同程度抑制されるという本実験結果から, WDR 細胞が扁桃体内の神経細胞の興奮によって後シナプス抑制を受けることが示唆された。

6. 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 50 回歯科基礎医学会 (2008 年 9 月 23 日, 東京) において発表した。

なお, 本研究の一部は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) の補助を受けて行われた。

参 考 文 献

- 1) Hu, J. W., Dostrovsky, J. O. and Sessle, B. J.: Functional properties of neurons in cat trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn). I. Responses to oral-facial noxious and nonnoxious stimuli and projections to thalamus and subnucleus oralis. *J. Neurophysiol.* 45: 173-192, 1981.
- 2) 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.
- 3) 松本範雄: 三叉神経系からの痛覚伝導路とそれらの機能. 岩医大歯誌, 21: 117-135, 1996.
- 4) 横田敏勝: 脊髄と三叉神経脊髄路核の侵害受容ニューロン. 神経進歩, 26: 843-856, 1982.
- 5) Willis, W. D.: Overview and future directions. In: *The Pain System, The neural basis of nociceptive transmission in the mammalian nervous system. Pain and Headache*, Vol. 8, eds. by Gildenberg, P. L., Karger, Basel, pp. 264-281, 1985.
- 6) Davis, M.: The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu. Rev. Neurosci.* 15: 353-375, 1992
- 7) Henke P. G.: The amygdala and forced immobilization of rats. *Behav. Brain Res.* 6: 19-24, 1985.
- 8) Henke, P. G.: Unit-activity in the central amygdalar nucleus of rats in response to immobilization-stress. *Brain Res. Bull.* 10: 833-837, 1983.
- 9) Amit, Z. and Galina, Z. H.: Stress-induced analgesia: adaptive pain suppression. *Physiol. Rev.* 66: 1091-1120, 1986.
- 10) 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.
- 11) 村田純一郎, 松本範雄: ラットの三叉神経脊髄路核尾側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.
- 12) 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.
- 13) 山田裕之: ラット扁桃体へのグルタメイト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. 岩医大歯誌, 31: 164-176, 2006.
- 14) 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.
- 15) Paxinos, G. and Watson, C.: *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2nd ed., Academic Press, San Diego, 1986.
- 16) Shigenaga, Y., Nakatani, Z., Nishimori, T., Suenune, S., Kuroda, R. and Matano, S.: The cells of origin of cat trigeminothalamic projections: especially in the caudal medulla. *Brain Res.* 277: 201-222, 1983.
- 17) Yoshida, A., Dostrovsky, J. O., Sessle, B. J. and Chiang, C. Y.: Trigeminal projections to the nucleus submedius of the thalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 307: 609-625, 1991.
- 18) Albe-Fessard, D. and Kruger, L.: Duality of unit discharges from cat centrum medianum in response to natural and electrical stimulation. *J. Neurophysiol.* 25: 3-20, 1962.
- 19) Craig, A. D. and Dostrovsky, J. O.: Medulla to thalamus. In: *Textbook of Pain*, 4th ed., eds. by Wall, P. D. and Melzack, R., Churchill Livingstone,

- Edinburgh, pp. 183-214, 1999.
- 20) Dubner, R., Kenshalo, Jr. D. R., Maixner, W., Bushnell, M. C. and Oliveras, J. L.: The correlation of monkey medullary dorsal horn neuronal activity and the perceived intensity of noxious heat stimuli. *J. Neurophysiol.* 62: 450-457, 1989.
- 21) Helmstetter, F. J. and Landeira-Fernandez, J.: Conditional hypoalgesia is attenuated by naltrexone applied to the periaqueductal gray. *Brain Res.* 537: 88-92, 1990.
- 22) Pavlovic, Z. W. and Bodnar, R. J.: Opioid supraspinal analgesic synergy between the amygdala and periaqueductal gray in rats. *Brain Res.* 779: 158-169, 1998.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) Almeida, A., Tjolsen, A., Lima, D., Coimbra, A. and Hole, K.: The medullary dorsal reticular nucleus facilitates acute nociception in the rat. *Brain Res. Bull.* 39: 7-15, 1996.
- 28) Villanueva, L., Bouhassira, D. and Le Bars, D.: The medullary subnucleus reticularis dorsalis (SRD) as a key link in both the transmission and modulation of pain signals. *Pain* 67: 231-40, 1996.
- 29) Kandel, E. R.: Factors controlling transmitter release. In: Principles of Neural Science. 2nd ed., eds. by Kandel, E. R. and Schwartz, J. H., Elsevier, New York, pp. 120-131, 1985.
- 30) Yoshimura, M. and Nishi, S.: Primary afferent-evoked glycine- and GABA-mediated IPSPs in substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord *in vitro*. *J. Physiol.* 482: 29-38, 1995.
- 31) Hu, J. W. and Sessle, B. J.: Properties of functionally identified nociceptive and nonnociceptive facial primary afferents and presynaptic excitability changes induced in their brain stem endings by raphe and orofacial stimuli in cats. *Exp. Neurol.* 101: 385-399, 1988.
- 32) Martin, R. F., Haber, L. H. and Willis, W. D.: Primary afferent depolarization of identified cutaneous fibers following stimulation in medial brain stem. *J. Neurophysiol.* 42: 779-790, 1979.
- 33) Fields, H. L. and Basbaum, A. I.: Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: Textbook of Pain, 4th ed., eds. by Wall, P. D. and Melzack, R., Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 309-329, 1999.
- 34) Bederson, J. B., Fields, H. L. and Barbaro, N. M.: Hyperalgesia during naloxone-precipitated withdrawal from morphine is associated with increased on-cell activity in the rostral ventromedial medulla. *Somatosens. Mot. Res.* 7: 185-203, 1990.
- 35) Sessle, B. J., Hu, J. W., Dubner, R. and Lucier, G. E.: Functional properties of neurons in cat trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn). II. Modulation of responses to noxious and nonnoxious stimuli by periaqueductal gray, nucleus raphe magnus, cerebral cortex, and afferent influences, and effect of naloxone. *J. Neurophysiol.* 45: 193-207, 1981.
- 36) 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.
- 37) Mohka, 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.
- 38) 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.
- 39) 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.
- 40) Grudt, T. J., Williams, J. T. and Travagli, R. A.: Inhibition by 5-hydroxytryptamine and noradrenaline in substantia gelatinosa of the guinea-pig spinal trigeminal nucleus. *J. Physiol.* 485: 113-120, 1995.
- 41) Travagli, R. A. and Williams, J. T.: Endogenous monoamines inhibit glutamate transmission in the spinal trigeminal nucleus of guinea-pig. *J. Physiol.* 491: 177-185, 1996.
- 42) Pang, I. H. and Vasko, M. R.: Morphine and norepinephrine but not 5-hydroxytryptamine and gamma-aminobutyric acid inhibit the potassium-stimulated release of substance P from rat spinal cord slices. *Brain Res.* 376: 268-279, 1986

- 43) Holz, G. G. IV, Kram, R. M., Spiegel, A. and Dunlap, K.: G-protein couple α -adrenergic and GABA_b receptors to inhibition of peptide secretion from peripheral sensory neurons. *J. Neurosci.* 9: 657-666, 1989.