

研 究

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？

坂東 三史, 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：2004年10月22日)

(受理：2004年11月9日)

Abstract We have shown that conditioning stimulation of the amygdaloid nucleus has an inhibitory effect on the nociceptive neurons in the trigeminal caudal nucleus and the medial reticular subnuclei of the rat. The purpose of this study is to investigate whether the opioid receptor is involved in the inhibitory effect of amygdaloid stimulation of the nociceptive neurons.

The animals were anesthetized with N_2O-O_2 (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 μA) delivered at 330 Hz. Fifty-six wide dynamic range (WDR) neurons and 15 nociceptive specific (NS) neurons were recorded. WDR neurons were distributed in the superficial layer of the caudal nucleus and diffusely throughout the reticular subnucleus, whereas most of the NS neurons were distributed in the dorsal part of the reticular subnucleus. The conditioning stimulation in the central nucleus, basomedial and basolateral nuclei markedly inhibited the activities in 8 of 8 nociceptive neurons (3 WDR and 5 NS neurons). The inhibitory effect was $73.6 \pm 12.8\%$ (mean \pm S.D.) at maximum. Naloxone (2 mg/kg, i.v.), opioid receptor antagonist, did not exert an influence on the amygdaloid inhibitory effect ($n = 4$). The present results suggest that the amygdaloid nucleus inhibits the ascending nociceptive information at the 2nd order neurons through a receptor other than the opioid receptor. It has been known that the amygdaloid nucleus is a key structure for mediating stress responses. Therefore, the amygdaloid antinociceptive effect may provide one of the neurophysiological bases for stress-induced analgesia (SIA), especially non-opioid type SIA.

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

Is the opioid receptor involved in the inhibitory effect of amygdaloid conditioning stimulation on the nociceptive neurons in the medullary dorsal horn of the rat?

Sanshi BANDO & Norio MATSUMOTO*

Department of Orthodontics, *Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Iwate Medical University, 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. 29 : 224-235, 2004

緒 言

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ことが行動学的実験によって示されてきた。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いる。その後、この現象はストレス誘発鎮痛（stress-induced analgesia: SIA）と呼ばれ、それには内因性オピオイド・ペプチドが関与するオピオイド型と伝達物質が未だ知られていない非オピオイド型のふたつの型があると報告されている^{1, 2)}。

一方、扁桃体の細胞は恐怖を誘発するような刺激によってあるいは拘束などのストレス体験中に興奮することから、扁桃体はストレスによって条件づけされた恐怖反応（驚愕反応、フリージング、自律神経系の反応）の発現に必須な部位として知られている^{3, 4)}。また、扁桃体中心核の電気刺激がストレス時に観察されると同様な胃潰瘍を引き起こすことがラットで観察されており⁵⁾、さらに扁桃体への neurotensin や enkephalinase 阻害薬の微量注入によって鎮痛効果が誘発されることも報告されている^{6, 7)}。これらの知見から、ストレス誘発鎮痛の発現に扁桃体が関与していることが想定された。

そこで、我々は先に扁桃体条件刺激による抗侵害受容（antinociception）効果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亜核（reticular subnucleus）で記録される顔面皮膚の侵害刺激に応じる侵害受容細胞に対して認められるかどうかを調査した。その結果、外側核を除く扁桃体核の条件刺激が広作動域（wide dynamic range: WDR）細胞および特異的侵害受容（nociceptive specific: NS）細胞の両方の侵害受容細胞を同程度に抑制することを観察した。これらの結果から、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⁸⁾。本研究は先に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を追試するとともに、オピオイド受容体の拮抗薬であるナロキソンを用いて、扁桃体がオピオイド型あるいは非オピオイド型のどちらのストレス誘発鎮痛に関わっているのかを調べることを目的とした。

方 法

(1) 実験動物

実験には7～11週齢のSprague-Dawley雄性ラット（日本クレア社製250～400g）83匹を用いた。動物はN₂O-O₂（2：1）混合ガスと2.0%ハロタンの深麻酔下で、人工呼吸のために気管切開が行われ、気管にチューブが挿入された。呼気終末CO₂濃度は呼気ガス・アナライザー（Dwyer, CAPSTAR-100）で持続的に観察し、一回換気量が3.8-4.5%になるように人工呼吸が施された（人工呼吸器：シナノ製作所SN480-7）。体温は循環式保温パッドで38℃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が腹腔内に投与（1.0mg/kg）された。大腿静脈がカニューレーションされ、そこから臭化パンクロニウム（初期投与0.24mg/kg、補助的投与0.16mg/kg/hr）が不動化のため投与された。動物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。動物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おこなった。

(2) 末梢試験刺激

延髄で記録される神経細胞の性質を調べるため、顔面の皮膚や毛あるいは口腔粘膜に対する機械的刺激が使用された。繰り返し筆でなでる触刺激（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段階の強度の刺激がそれぞれ20秒間末梢受容野に与えられた。これらの刺激に対する応答から細胞は3種に分類された。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低閾値機械受容 (low threshold mechanoreceptive: LTM) 細胞, このタイプの細胞については扁桃体との関連について検討しなかった。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。侵害受容細胞が記録された後, 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。その刺激強度は潜時の長い応答の閾値の 2-3 倍 (5-70 V) に設定された。

(3) 条件刺激

延髄後角の記録側に対して同側の扁桃体に条件刺激電極を刺入するため, Paxinos と Watson⁹⁾ 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 に歯科用エンジンを用い開頭術を施した。刺激用の同心円双極電極 (Unique Medical, S-121) は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 を 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, 心拍数や呼吸 CO_2 濃度に何ら影響を与えなかった。

(4) 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 1 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 7-15 M Ω) を用いた。その微小電極は油圧マニピュレーター (成茂 PC 5 N) によって 5 μ m づつ進められた。得られた神経活動は増幅器 (日本光電 VC-11) に導かれた後, peri-stimulus time (PST) ヒストグラ

ムを作成するため計算機 (ADInstruments, PowerLab/8 SP) で処理された。

(5) ナロキソン注入

オピオイド受容体拮抗薬であるナロキソン (Sigma Chemical Co., USA) 1 mg を 0.2 ml の蒸留水に溶かし, 2 mg/kg を約 1 分かけて大腿静脈から投与した。投与後 5, 10, 20, 30 分に扁桃体条件刺激下で末梢受容野の電気刺激に対する応答を計測した。また投与後 2, 15, 35 分に条件刺激を与えずに試験刺激のみに対する応答を記録した。

(6) 組織学的検索

三叉神経脊髄路核とその内側の網様垂核における侵害受容細胞の記録部位を同定するため微小電極側を陰極, 生体側を陽極とし 5 μ A の直流を 25 分間通電することによって電気泳動的に pontamine sky blue を注入した。扁桃体の条件刺激部位は電極に 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, 動物を 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。脳を摘出し, 2% フェロシアン化カリウム含有 10% フォルマリン溶液に 4 日以上浸漬した後, 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検索した。延髄の学術用語と解剖学的区分は Palkovits と Jacobowitz (1974)¹⁰⁾ に, また扁桃体のそれらは Paxinos と Watson⁹⁾ 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が調査された。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

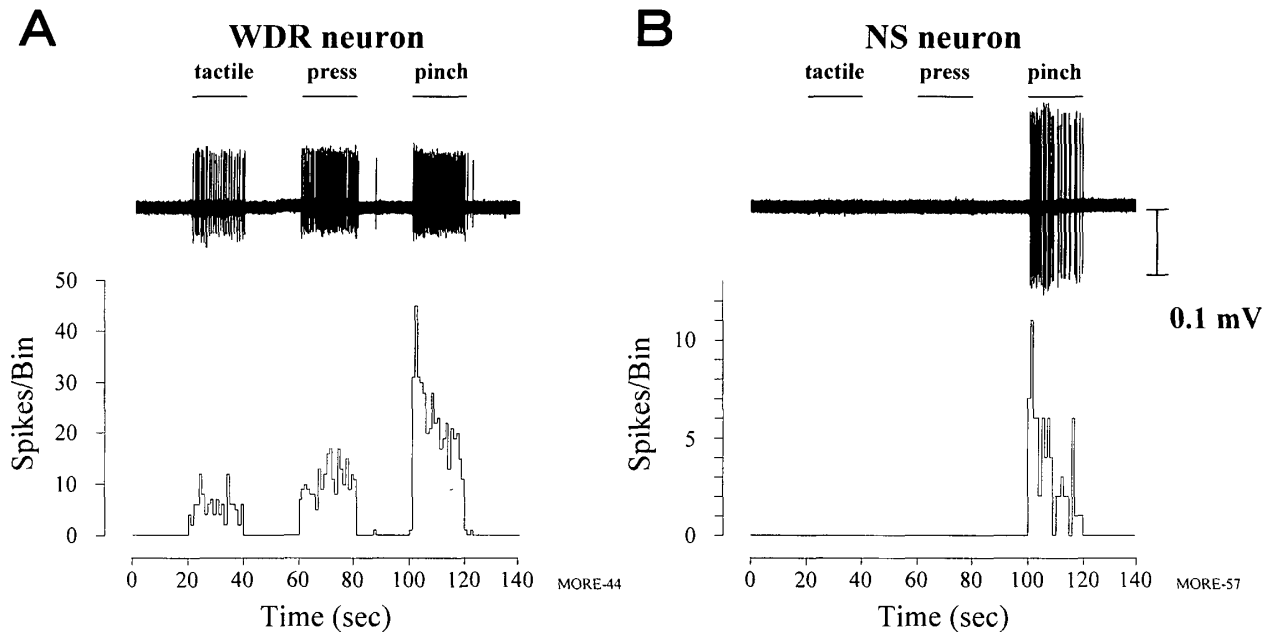


Fig 1 Responses of wide dynamic range (WDR) and nociceptive specific (NS) neurons to a series of graded mechanical stimuli, including brush, pressure and pinch stimuli, to the receptive field. Upper traces show raw extracellular recording of responses, and lower traces show peri-stimulus time histograms of corresponding responses shown in the upper traces. The bars on the upper traces indicate a 20 sec stimulus application.

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. 延髄の侵害受容細胞

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79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。

(1)WDR細胞

61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す性質を有していたのでWDR細胞と分類された。典型的なWDR細胞の例をFig. 1 Aに示した。尾側核浅層部で記録されたこの細胞は記録側と同側の上唇を受容野に持ち，侵害刺激であるピンチに最大発火頻度で応じた。このようなWDR細胞は通常侵害刺激の最中持続して発火し，刺激終了と同時に発火は止む

が，30個(49.2%)は侵害刺激終了後に10から200sec続く後発射(after-discharge)を伴っていた。また，WDR細胞の内，22個(34.4%)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じた。

(2)NS細胞

18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，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のでNS細胞と分類した。典型的なNS細胞の例をFig. 1 Bに示した。記録側と同側の上顎whisker部を受容野に持つこの細胞は網様垂核背側部で記録され，侵害刺激にのみ応答した。NS細胞の内，2個(13.3%)は侵害刺激終了後に15から60sec続く後発射(after-discharge)を伴っていた。また2個(11.1%)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79個の侵害受容細胞が記録され，この内38個の記録位置がマーキング・スポットの組織学的検索から決められた。これらの内27

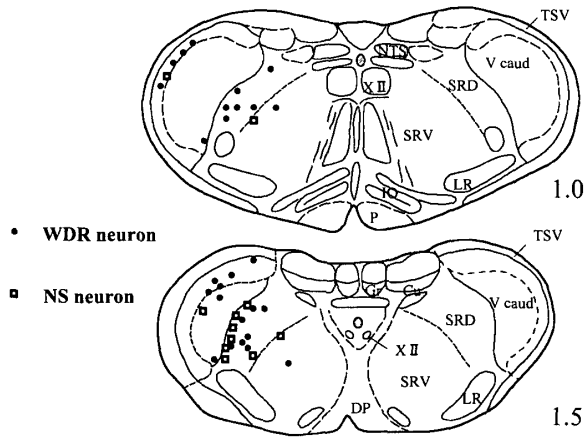


Fig 2 Frontal-section drawings showing recording sites of 27 WDR and 11 NS neurons. The recording points were reconstructed from histological sections of marking spots. Closed circles, WDR neurons, open squares, NS neurons. The sections are taken from the atlas of Palkovits and Jacobowitz (1974)¹⁰. The number in each section indicates the AP level (mm) 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; P, pyramidal tract; NTS, solitary tract nucleus; SRD, dorsal part of reticular subnucleus, SRV, ventral part of reticular subnucleus, TSV, spinal trigeminal tract; V caud, trigeminal caudal nucleus

個が WDR 細胞, 11個が NS 細胞の記録部位であった。

三叉神経尾側核浅層部で記録された12個の細胞の内10個が WDR 細胞で2個が NS 細胞であり, 他に網様垂核背側部で22個 (15個の WDR 細胞と7個の NS 細胞), 網様垂核腹側部で4個 (WDR 細胞と NS 細胞それぞれ2個) が記録された。これらの侵害受容細胞の分布を門 (obex) から尾側1.0mmと1.5mmの二つの前頭断図にプロットした (Fig. 2)。2種の侵害受容細胞の分布にはわずかな相違が認められ, WDR 細胞は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が, 大多数の NS 細胞は網様垂核背側部に分布していた。

尾側核浅層部で記録された WDR 細胞の受容野に体部位再現 (somatotopic

representation) が観察され, 三叉神経第一枝支配領域を受容野に持つ細胞は内側部に, 三枝領域を受容野に持つ細胞は外側部に分布していた。しかし網様垂核の腹側部および背側部における侵害受容細胞の分布と受容野との間には何ら規則性は認められなかった。また, 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る WDR 細胞は網様垂核の背側部のみで認められた。

3. 扁桃体条件刺激の抑制効果

3個の WDR 細胞において扁桃体条件刺激の効果か調査され, その内全例において抑制が観察された。1個の WDR 細胞の抑制例を Fig. 3に示した。末梢受容野 (鼻翼部) の電気刺激に毎回1から2発のスパイクで応答しているが (上段), 前もって扁桃体基底内側核を刺激 (条件刺激) するとその応答が抑制され (中段), 条件刺激を取り去ると再び試験刺激に対してコントロールと同様に応答した (下段)。試験刺激に対する応答の潜時や扁桃体による抑制の強さを正確に知るために, 侵害受容細胞の応答を PST-ヒストグラムとして観察した2種の侵害受容細胞に対する扁桃体条件刺激の抑制例を Fig. 4に示した。網様垂核背側部で記録された WDR 細胞は末梢受容野 (鼻翼部) の試験刺激に対して10msec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19.0% (抑制効果81.0%) に抑制された (Aの中段)。同様に, B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10msecの潜時の応答が扁桃体基底内側核の条件刺激によってコントロール応答の約17.9% (抑制効果82.1%) に抑制されたことを示す。WDR 細胞で認められた平均抑制効果 (\pm S.D.) は $78.5 \pm 12.4\%$ ($n=3$) であった。また, NS 細胞5例についての同条件刺激の効果を観察したところ, 全例において抑制が観察され, この平均抑制効果は $70.7 \pm 13.4\%$ であった。WDR 細胞と NS 細胞の抑制効果の間に有意差は認められなかった。

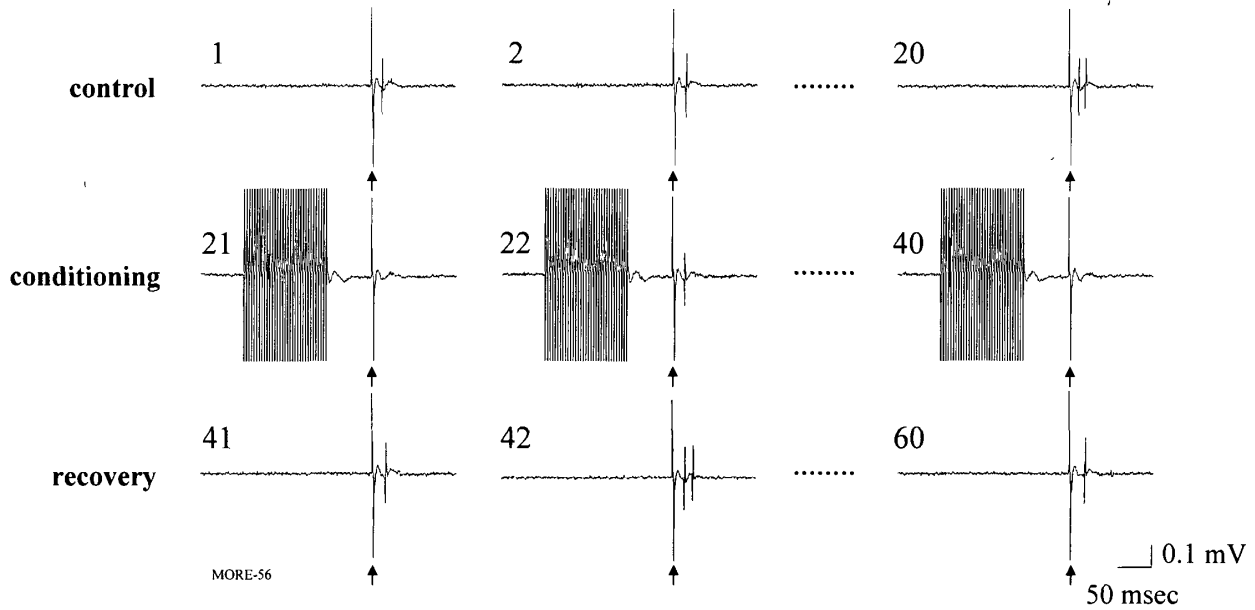


Fig 3 Effect of amygdaloid conditioning stimulation on a WDR neuron. Records in upper row show control responses to electrical skin stimulation of its receptive field. The inhibitory effect on these responses of conditioning stimulation (conditioning-test interval of 50 msec) is shown in the middle row. The bottom traces show the recovery of the neuron's responsiveness to control level after cessation of the amygdaloid conditioning stimulation. The arrows indicate the stimulus artifact and the trial number is shown in each trace.

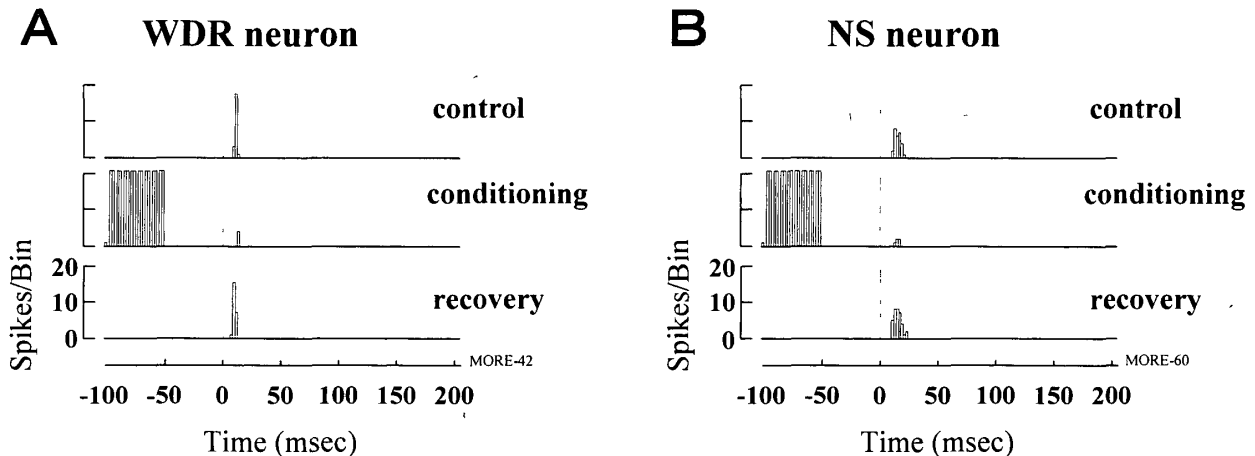


Fig 4 Effects of amygdaloid conditioning stimulation on a WDR neuron (A) and a NS neuron (B). In A, the short-latency-response to electrical stimulation of the receptive field was inhibited to 19% of control response by the conditioning stimulation of the basolateral amygdaloid nucleus (middle trace). In B, the conditioning stimulation of the basomedial nucleus inhibited to 17.9% of control response. In each PST histogram, the ordinate shows the number of spikes/bin and the abscissa shows the time course in ms (bin width 1 msec). The zero indicates the time when the stimulus was applied. Twenty trials were performed for construction of each histogram.

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%以上の抑制を示す8箇所条件刺激部位を Fig. 5 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2箇所、基底内側核 (basomedial nucleus) に4箇所および基底外側核 (basolateral nucleus) に2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

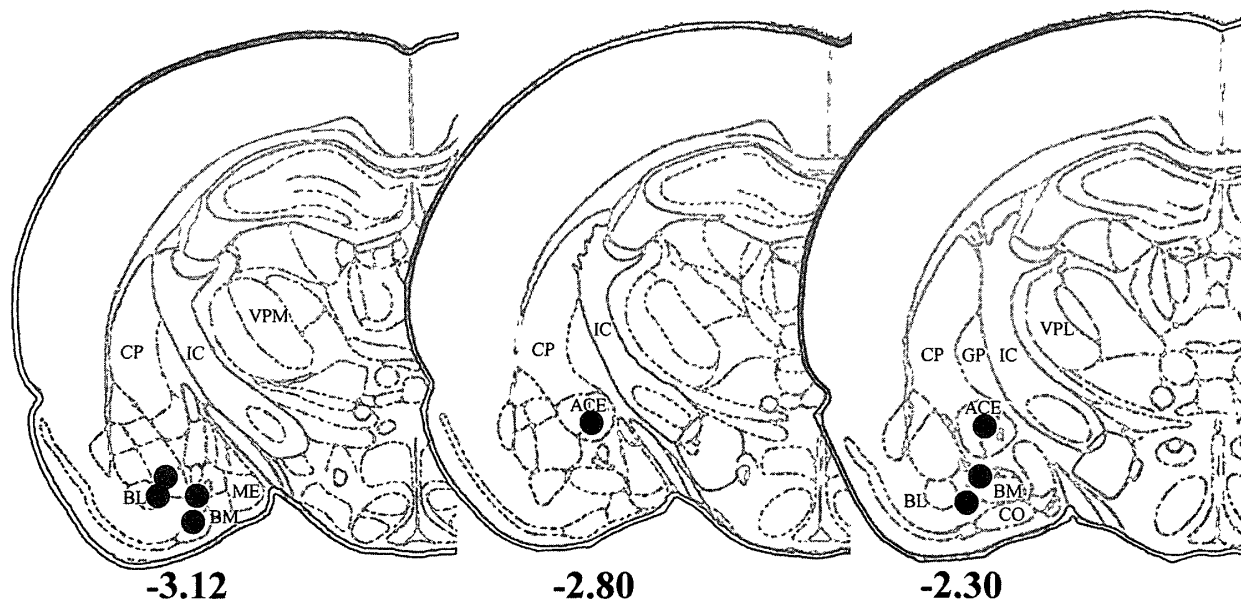


Fig 5 Histological locations of the tips of 8 stimulating electrodes in coronal sections Gray circles indicate stimulating sites that produced inhibition of the nociceptive response. Diagrams were adapted from the atlas of Paxinos and Watson (1986) The number in each section indicates the AP level (mm) from the bregma Abbreviations: ACE, central amygdaloid nucleus; BLA, basolateral amygdaloid nucleus; BMA, basomedial amygdaloid nucleus; CP, caudate putamen; CO, cortical amygdaloid nucleus; GP, globus pallidus; IC, internal capsule; GP, globus pallidus; ME, medial amygdaloid nucleus; VPL, nucleus ventralis posterolateralis, VPM, nucleus ventralis posteromedialis

は、中心核刺激で $67.3 \pm 15.3\%$ 、基底内側核刺激で $77.3 \pm 10.5\%$ 、基底外側核刺激で $72.6 \pm 23.8\%$ であった。一方、扁桃体外側核 (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。また、扁桃体およびその周辺の条件刺激が侵害受容細胞に促進効果を及ぼす例はまったく観察されなかった。

5. 扁桃体の痛覚抑制効果に対するナロキシンの作用

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に関わっているかどうかをナロキシンの静脈内投与 (2 mg/kg) によって観察した (Fig. 6)。1個のWDR細胞が尾側核浅層部で、また3個のNS細胞が尾側核浅層部と網様垂核背側部で記録された。これら4個の侵害受容細胞において、扁

桃体条件刺激 (中心核1箇所、基底内側核2箇所および基底外側核1箇所) による抑制効果は平均 $74.2 \pm 12.4\%$ であった。選択的オピオイド受容体拮抗薬であるナロキソンは、その扁桃体条件刺激による侵害受容細胞の抑制効果に投与後30分にわたってまったく影響を与えなかった。ナロキソン投与後5分でわずかに抑制率が減少しているが、その値は投与前および投与後10分の値と有意の差は認められなかった (Wilcoxon *t*-test)。同様に、ナロキソン投与によって侵害受容細胞の試験刺激に対する応答も変化しなかった。

考 察

1. 延髄後角の侵害受容細胞

今回の実験で多くの侵害受容細胞が記録された三叉神経脊髄路核尾側核とその内側の網様体は頸髄後角の延長であり、機能的および形態的類似性から両部位を合わせて延髄後角 (medullary dorsal horn) と呼んでいる¹¹⁾。尾

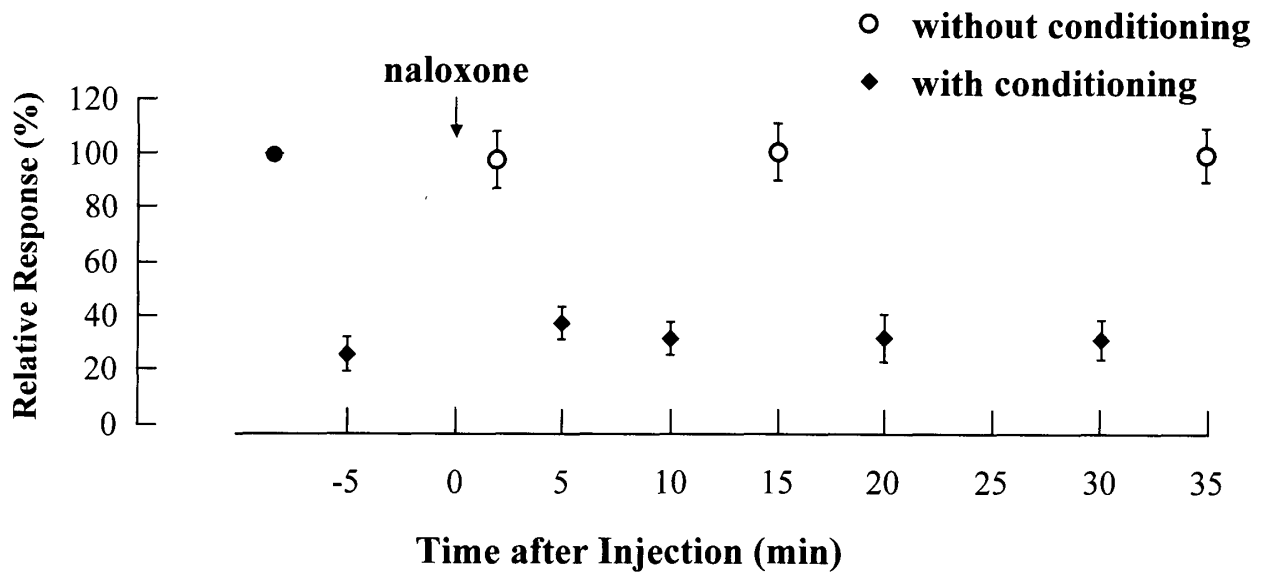


Fig 6 Effect of naloxone on the inhibition induced by amygdaloid conditioning stimulation. The inhibitory effect of the conditioning stimulation was not influenced by the opioid receptor antagonist naloxone (2 mg/kg, i.v.). The ordinate shows relative responses to control response, and the abscissa shows the time in minutes after naloxone injection. The vertical bar at each point indicates the SEM ($n=4$).

側核は辺縁層と膠様質から成る浅層部と大細胞層に分けられ、その内側は背側網様垂核と腹側網様垂核から成る延髄網様体と接している。延髄後角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) の逆行性刺激に応じることや、門レベルでの三叉神経脊髄路の切断によって顔面の痛覚と温度感覚を完全に消失することなどから、延髄後角は顔面皮膚の痛覚情報を視床に中継する部位と見なされている^{12,13)}。

延髄後角において2種類の侵害受容細胞は異なる分布を示すことが報告されている。NS細胞の大部分は尾側核浅層部に、少数が背側網様垂核に分布しているのに対し、WDR細胞の大部分が背側網様垂核に、少数が尾側核浅層部にも認められる^{14,15)}。また腹側網様垂核や尾側核大細胞層ではごく少数の侵害受容細胞しか認められていない¹⁶⁾。今回の結果はこれらの先人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腹側網様垂核では少数のみが認められた。しかし、本実験において多くのNS細胞が存在するとされる尾側核浅層部ではNS細胞が少数例しか記

録されなかった。著者らによる先の二つの報告でも同様の傾向が見られた^{8,17)}。この理由はNS細胞の自発放電頻度が低いため検出しにくい、あるいはNS細胞の絶対数が少ないかのどちらかと考えられる。なぜならWDR細胞は持続的な自発放電を示すがNS細胞はそれが非常に少ないことや¹⁸⁾、脊髄浅層部ではLTM細胞やNS細胞が少なく、約6割がWDR細胞であることが報告されている¹⁹⁾。また、相当数の侵害受容細胞、特にWDR細胞がピンチ刺激終了後に10秒以上続く後発射を伴っていた。この結果は、脊髄浅層部の侵害受容細胞がC線維由来の後発射を持つというPrice *et al.* (1978, 1979)の結果と一致する^{20,21)}。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^{16,22)}。

2. 扁桃体刺激による抗侵害受容作用

本実験は村田ら (2002)⁸⁾ が先に観察した扁桃体の興奮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、さらにその抑制にはオピオイド受容体が関わっていないことを電気生理学的に示した。

(1)WDR 細胞と NS 細胞に対する抑制作用

侵害刺激に対する刺激強度弁別タスク遂行中の覚醒サルの上三叉神経尾側核から単一ニューロン応答を記録・解析した Dubner のグループ (1984, 1989) は、2 種の侵害受容細胞の働きを次のように考えた: ある種の WDR 細胞は侵害刺激強度の増加に応じて発火頻度を増すことから刺激強度の弁別に関わっている。一方、NS 細胞は刺激強度を符号化できないが末梢受容野が WDR 細胞よりも小さいことから、NS 細胞が多く認められる尾側核第 I 層は視床下部や大脳辺縁系に線維を送る中脳に投射することから、NS 細胞は侵害刺激部位の弁別や痛み刺激によって誘発される情動反応の発現に関わる^{23, 24)}。

本実験および先の村田らの実験は、2 種の侵害受容細胞の短い潜時および長い潜時の応答が扁桃体の条件刺激によって抑制されることを示した⁸⁾。これらの知見は、扁桃体の興奮によって C 線維および A δ 線維に由来する延髄後角の WDR 細胞と NS 細胞の活動が抑制され、その結果として痛みの強さや痛み刺激による情動反応が制御され、また痛み刺激が加わった部位が不鮮明になる可能性を示唆する。

(2)扁桃体と抗侵害受容作用

扁桃体の種々の核への化学的刺激が脊髄レベルの侵害受容を抑制することを多くの行動学的実験が示している。例えば、morphine や μ -オピオイド作動薬の基底外側核への微量注入あるいは acetylcholine のアゴニストである carbachol の内側核への微量注入が脊髄内のみ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²⁵⁻²⁸⁾。脊髄と相同的関係にある延髄後角の侵害受容細胞が扁桃体の条件刺激によって抑制されるという本実験結果は、これらの観察結果を支持するものである。また、上記の扁桃体基底外側核、内側核のみならず中心核や皮質核への薬物注入による化学的刺

激が鎮痛効果を引き起こすという報告が多数なされている²⁷⁻³⁰⁾。これらの結果に一致して、本研究や村田らの研究⁸⁾では、扁桃体を構成するこれらの諸核の電気刺激がほぼ同程度の抗侵害受容効果を引き起こした。これらの実験結果は次の形態学的知見によって理解される。Ottersen (1981) は HRP の逆行性軸索輸送を利用した扁桃体内線維連絡の研究から扁桃体を構成する多くの核が中心核に軸索線維を送ることを示し³¹⁾、また、Price (1981) は³H でラベルしたロイシンを用いた研究によって扁桃体から脳幹や視床下部に投射するのは主に中心核であることを明確にした³²⁾。他方、今回の実験では扁桃体の条件刺激によって延髄後角で記録される侵害受容細胞の応答の促進が観察されることはなかった。この結果と一致して、行動学的実験でも薬物投与による扁桃体刺激は決して痛覚過敏 (hyperalgesia) を誘発しないことが報告されている^{33, 34)}。

(3)ストレスと扁桃体

扁桃体の化学的あるいは電氣的刺激は血圧、心拍数、呼吸数の増加または胃潰瘍の形成などのようなストレス様反応を引き起こし³⁻⁵⁾、さらにストレス体験中に扁桃体中心核の細胞の発火頻度が上昇することが確認されている³⁵⁾。また、ストレスによって誘発される自律神経系の変化や行動学的変化が扁桃体の損傷によって消失する³⁾。このような実験結果から、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。従って、本実験結果および先の村田らの結果が示した扁桃体による延髄後角の侵害受容細胞の抑制⁸⁾、すなわち扁桃体による鎮痛作用をストレス反応の一つとして捉えることができる。動物がストレス状態におかれた時、扁桃体は中枢神経系のあらゆるレベルから侵害性情報を含む感覚情報を受け、そしてそれらの情報を統合した結果、ストレス反応の一つとして二次ニューロン・レベルで抗侵害受容作用が現れると考えられる。これが運動、逃走あるいは恐怖時に観察される鎮痛、すなわちストレス誘発鎮痛と呼ばれる現象のメカ

ニズムと推察される。

(4) 2種類のストレス誘発鎮痛

ストレス誘発鎮痛は用いられる刺激の種類や強度によって2種類の型に分けられる^{1, 2)}。オピオイド拮抗薬によって減弱する型と影響を受けない型で、前者をオピオイド型、後者を非オピオイド型と言う。オピオイド型の鎮痛効果が中脳中心灰白質 (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^{36, 37)}。従って、オピオイド型ストレス誘発鎮痛の発現に関わる神経路は、内因性痛覚抑制系において主要な構成要素である中脳中心灰白質腹外側部 (PAGの ventrolateral part: PAGvl) から延髄腹内側野 (rostral ventromedial medulla: RVM) を介して延髄や脊髄の侵害受容性二次ニューロンに達する経路と考えられている³⁸⁾。

すでに記したように、扁桃体へのオピオイド注入による鎮痛は多数例が報告されている^{25, 26)}。しかし、扁桃体からの下行路にオピオイド受容体が関与しているかどうかは不明であった。今回観察された扁桃体刺激による延髄後角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かった。この結果から我々が観察した痛覚抑制系はオピオイド受容体の関与しない系、すなわち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推定される。先の PAGvl-RVM 系には内因性オピオイドが関与するので、これ以外の神経路がこの型のストレス誘発鎮痛に関わると考えられるが詳細は不明である。Mizuno *et al.* (1985) や Sandrew *et al.* (1986) は、逆行性色素標識法によって扁桃体中心核が脊髄後角に線維を送ることをサルとネコで確認していることから、扁桃体中心核—脊髄後角路が一つの可能性としてあげられる^{39, 40)}。

結 論

本研究は扁桃体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追試すること、およびその抑制にオピオイド受

容体が関わっているかどうかを調べることを目的とした。

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、三叉神経尾側核とその内側の網様垂核において侵害受容細胞の活動を記録した。これらの侵害受容細胞の末梢受容野への試験刺激に対する応答が同側の扁桃体の条件刺激によって影響を受けるかどうか観察した。
2. 79個の侵害受容細胞が記録され、その内61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、18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. WDR 細胞は尾側核浅層部と網様垂核背側および腹側部に散在して認められたが、NS 細胞は尾側核浅層部と背側網様垂核に分布していた。
4. 8個の侵害受容細胞 (3個の WDR 細胞と5個の NS 細胞) について扁桃体条件刺激の効果を観察したところ、すべての応答が抑制された。その平均抑制は73.6±12.8%であった。
5. 侵害受容を抑制する条件刺激部位は扁桃体中心核、基底外側核、基底内側核に分布していた。
6. 扁桃体条件刺激による侵害受容細胞の抑制効果はオピオイド受容体拮抗薬であるナロキソン (2 mg/kg) の静脈注射によって影響を受けなかった。
7. 扁桃体はストレス反応の発現に関わることから、観察された扁桃体条件刺激による侵害受容細胞の抑制は、行動学的に示されているストレス誘発鎮痛、特にオピオイド受容体が関与しない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63回日本矯正歯科学会(2004年11月18日, 福岡) および第46回歯科基礎医学会(2004年9月24日, 広島)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ハイテクリサーチセンター補助金による研究助成金を受けて行われた。

参 考 文 献

- 1) Amit, Z. and Galna, Z H: Stress-induced analgesia: adaptive pain suppression *Physiol. Rev.* 66 1091-1120, 1986.
- 2) 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
- 3) Davis, M.: The role of the amygdala in fear and anxiety *Annu Rev Neurosci* 15 : 353-375, 1992.
- 4) Henke P. G.. The amygdala and forced immobilization of rats *Behav Brain Res.* 6 : 19-24, 1985.
- 5) Henke, P. G.: Unit-activity in the central amygdalar nucleus of rats in response to immobilization-stress. *Brain Res. Bull* 10 : 833-837, 1983
- 6) 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
- 7) 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
- 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体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) Paxinos, G. and Watson, C The rat brain in stereotaxic coordinates 2nd ed, Academic Press, San Diego, 1986.
- 10) 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
- 11) Hayes, R L, Price, D. D and Dubner, R.: Behavioral and physiological studies of sensory coding and modulation of trigeminal nociceptive input. In: *Advances in Pain Research and Therapy*, Vol 3, eds. by Bonica, J. J., Liebeskind, J. C and Albe-Fessard, D. G, Raven Press, New York, pp. 219-243, 1979.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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
- 15) Dubner, R. and Bennett, G J Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annu. Rev. Neurosci* 6 . 381-418, 1983
- 16) 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
- 17) 福田大介, 松本範雄: ラットの延髄後角の侵害受容細胞に対する内包条件刺激の抑制効果. 岩医大歯誌, 28 192-204, 2003
- 18) 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.
- 19) 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
- 20) Price, D. D, Hayes, R L, Ruda, M. and Dubner, R.. Spatial and temporal transformations of input to spinothalamic tract neurons and their relation to somatic sensations. *J Neurophysiol* 41 : 933-947, 1978.
- 21) Price, D D, Hayashi, H., Dubner, R. and Ruda, M. A.: Functional relationships between neurons of marginal and substantia gelatinosa layers of primate dorsal horn. *J Neurophysiol.* 42 · 1590-1608, 1979.
- 22) 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 prop-

- erties and afferent connections *Neurosci Res* 11 · 1-17, 1991.
- 23) Bushnell, M C, Duncan, G H, Dubner, R and He, L. F. Activity of trigeminothalamic neurons in medullary dorsal horn of awake monkeys trained in a thermal discrimination task. *J Neurophysiol.* 52 170-187, 1984
- 24) Dubner, R, Kenshalo, D. R Jr., Maixner, W, Bushnell, M C and Oliveras, J-L: The correlations of monkey medullary dorsal horn neuronal activity and the perceived intensity of noxious heat stimuli. *J Neurophysiol* 62 450-457, 1989
- 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) 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.
- 28) 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.
- 29) Rodgers, R J Elevation of aversive threshold in rats by intra-amygdaloid injection of morphine sulphate *Pharmacol. Biochem. Behav* 6 · 385-390, 1977
- 30) Yaksh, T L, Al-Rodhan, N. R. F. and Jensen, T S: Sites of action of opiates in production of analgesia *Prog Brain Res.* 77 371-394, 1988
- 31) Ottersen, O P The afferent connections of the amygdala of the rat as studied with retrograde transport of horseradish peroxidase. In: The amygdaloid complex, ed. by Ben-Ari, Y., Elsevier, Amsterdam, pp 91-104, 1981.
- 32) Price, J. L.. The efferent projections of the amygdaloid complex in the rat, cat and monkey In: The amygdaloid complex, ed by Ben-Ari, Y, Elsevier, Amsterdam, pp. 121-132, 1981.
- 33) Watkins, L R., Wiertelak, E P and Maier, S. F.. The amygdala is necessary for the expression of conditioned but not unconditioned analgesia. *Behav Neurosci.* 107 . 402-405, 1993.
- 34) Helmstetter, F J The amygdala is essential for the expression of conditional hypoalgesia *Behav Neurosci.* 106 . 518-528, 1992
- 35) Henke, P G · Unit-activity in the central amygdalar nucleus of rats in response to immobilization-stress. *Brain Res. Bull.* 10 . 833-837, 1983
- 36) Helmstetter, F. J. and Landeira-Fernandez, J.. Conditional hypoalgesia is attenuated by naltrrexone applied to the periaqueductal gray. *Brain Res* 537 88-92, 1990.
- 37) 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
- 38) Fields, H. L and Basbaum, A. I. Central nervous system mechanisms of pain modulation In. Textbook of pain, 4 th ed, eds by Wall, P D and Melzack, R, Churchill Livingstone, Edinburgh, pp 309-329, 1999.
- 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