

原 著

歯髄電気刺激によるネコ前脳内 *Fos* 発現部位

八幡 文和

岩手医科大学歯学部口腔生理学講座

(指導: 鈴木 隆 教授)

〔受付: 1993年4月9日〕

〔受理: 1993年7月26日〕

Abstract : C-fos expression was used to determine areas at which neurons were excited by electrical stimulation of the tooth pulp in the cat forebrain. Tooth pulp stimulation (0.2msec duration, twin pulse) was delivered at 1 Hz under pentobarbital sodium anesthesia (35mg/kg) and the intensity was maintained at 3 times the threshold for the jaw-opening reflex (200-600 μ A). With a survival time of 1.5 hrs following the start of stimulation, cats were perfused with buffered paraformaldehyde. Brain slices were incubated with polyclonal rabbit antibody against the Fos protein that originated in c-fos and was processed according to the peroxidase-antiperoxidase (PAP) method. In the pentobarbital sodium-injected (35mg/0.7ml/kg, 2 hrs before sacrifice) group, Fos-positive neurons were found bilaterally in the prelimbic, infralimbic, prepiriform, perirhinal, periamygdaloid and entorhinal cortices, lateral habenular (HbL), thalamic and hypothalamic paraventricular nuclei, supraoptic nucleus (SON), infundibular nucleus and anterior preoptic area. Furthermore, tooth pulp stimulation resulted bilaterally in Fos expression in the granular insula and increased the number of Fos-positive neurons to 368% in SON and 280% in HbL. In addition, the increases were inhibited by morphine administration (2mg/kg, i.p.). These findings suggest that SON and HbL are involved in defensive mechanisms to noxious stimulation through the release of vasopressin and antinociception.

Key words : c-fos expression, tooth pulp stimulation, supraoptic nucleus, lateral habenular nucleus, cat

諸 言

前脳は痛覚受容において重要な役割を担っており, そのうちの様々な核あるいは領域が感覚-弁別的 (sensory-discriminative) あるいは

動機-情緒的 (motivational-affective) 応答に関与している¹⁻³⁾。しかしながら, 大脳皮質体性感覚野 (SI, SII)^{2,4)} および視床腹側基底核群⁵⁾, 髄板内核群⁶⁾や内側下核⁷⁾以外の前脳において痛覚受容に関わるか, あるいは侵害性入力を受け

Expression of Fos protein in the cat forebrain induced by the electrical stimulation of tooth pulp.
Fumikazu YAHATA
(Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka,
020 Japan)

る部位についての報告は非常に少ない。近年、磁気共鳴映像法 (MRI) と positron emission tomography (PET) を併用したヒトでの研究から痛覚受容への前帯状皮質の関与が示唆された⁸⁾。しかし、この方法では脳溝の bank に当たる大脳皮質や深部の間脳において活性化部位を正確に同定することは難しい。

c-fos は細胞性癌遺伝子 (proto-oncogene) の一種で神経細胞の興奮によって一過性に誘導される。*c-fos* の発現によって細胞質で合成され、すぐに核内に取り込まれるタンパク質 Fos は細胞の興奮後 1.5 ~ 3 時間後に免疫組織化学的方法で検出することができる⁹⁾。しかも Fos 蛋白はグリア細胞、上皮細胞そして内皮細胞では合成されないことが電顕レベルで確かめられている¹⁰⁾。従って、Fos は一個の神経細胞レベルで興奮部位を調査する場合に特に有用なマーカーになり得る。Hunt *et al.*¹¹⁾ は皮膚への侵害性熱刺激や mustard oil の塗布や筋注が脊髄後角の I・II 層において Fos の発現を引き起こすことを報告した。その後、侵害刺激のみならず種々の非侵害刺激、例えば触刺激、聴覚刺激および視覚刺激あるいはストレスによっても脳のさまざまな部位で Fos 発現が起こることが明らかになった^{9,12)}。Bullitt¹³⁾ はこのことを考慮して種々の刺激による影響を緻密なコントロール実験によって排除し、純粋に侵害性機械および温度刺激による脳幹での *c-fos* の発現をラットで観察している。

そこで本研究では、興奮している脳の部位を神経細胞一個のレベルで観察できる *c-fos* の発現を利用して、侵害刺激とされる歯髄の電気刺激によってどの部位が活性化されるかを神経生理学の実験に広く使用されているネコで調査した。検索部位は今まで侵害刺激と *c-fos* の発現とを関連づけた報告が見あたらない大脳や侵害情報を伝える脊髄視床路の終止部位が動物種によって異なることが知られている視床^{14,15)} および侵害情報入力を受ける部位が未だ明確でない視床下部に限定した。

材料および方法

1. 実験グループ

体重 2.1 ~ 3.2 kg のネコ 24 匹を実験に用いた。

(1) 無処置群 (n = 4) : 意識下で顕著な刺激を与えない状態での Fos の発現を調べるため、動物は pentobarbital sodium (ネプタール) 深麻酔 (60 mg/kg, i.p.) 下で心臓からの灌流固定がなされた。

(2) 等張食塩水投与群 (n = 4) : 注射時のストレスあるいは注射液による温度刺激効果による Fos 発現を調べるため、動物は 0.9% の食塩水を 0.7 ml/kg 腹腔投与され、2 時間後にネプタールによる深麻酔下で灌流固定された。

(3) ネプタール投与群 (n = 4) : ネプタール (35 mg/kg, i.p.) 腹腔投与による Fos 発現への影響を観察するため、動物は投与 2 時間後にネプタールによる深麻酔下で灌流固定された。

(4) 歯髄刺激群 (n = 7) : 歯髄刺激による Fos 発現部位を観察するためのグループである。動物はネプタール麻酔下 (35 mg/kg, i.p.) で歯髄刺激用電極を装着され、歯髄刺激開始 1.5 時間後にネプタール深麻酔下で心臓からの灌流固定がなされた。最初のネプタール投与から固定開始までの時間は 2 時間である。

(5) モルヒネ投与群 (n = 5) : 歯髄の電気刺激による Fos 発現に及ぼすモルヒネの効果を調べるためのグループである。動物は歯髄刺激群と同様に電極を装着され、歯髄刺激開始 5 分前にモルヒネ (2 mg/kg) を腹腔投与され、刺激開始 1.5 時間後にネプタール深麻酔下で心臓からの灌流固定がなされた。

2. 歯髄刺激

ネプタール (35 mg/kg, i.p.) 麻酔した後、歯髄刺激用電極を左側下顎後臼歯に埋め込んだ。この刺激用電極にはエナメル銅線を巻き付けた一対のステンレス・スチール製の時計用ネジ (セイコー, No. 0120662) を用い、これを歯牙の頬側面に作った二つの小窩洞に装着した。

その小窩洞の形成時には露髄しないように注意した。唾液などによる電流滑走を防ぐために電極周辺を polycarboxylate cement (松風, ハイボンド) で被い, 更にその上を acrylic resin (松風, クイックレジン) で被覆絶縁した。刺激として刺激装置 (日本光電, SEN-7203) からアイソレーター (日本光電, SS-102J) を介して供給された持続時間 0.2 msec, 間隔 0.5 msec の twin pulse を 1 Hz の頻度で与えた。その強度は触診にて測定した開口反射の閾値の 3 倍にあたる 200 - 600 μ A とした。

3. 免疫組織染色

動物をネンプタル (60 mg/kg, i. p.) で深麻酔し, 500 ml の 0.1 M リン酸塩緩衝塩化ナトリウム液 (PBS) および固定液である 4% paraformaldehyde を含有する 0.1 M リン酸緩衝液 (PB) 2 リットルで心臓から灌流した。取り出した前脳を 4 時間同固定液にて後固定し, そして組織の水結を防止するため 3% sucrose 含有 PB に一晩浸漬した。前頭断方向の厚さ 50 μ m の連続凍結切片を作製し, それらのうち二枚置き切片を Fos 染色標本とするため PBS で洗浄した。内因性 peroxidase 活性を阻止するため, これらの切片を室温で 60 分間 1% H_2O_2 を含む PBS に反応させ, それから PBS で 3 回洗浄した。つぎに Fos 染色のため 3% normal goat serum (NGS) で 60 分間反応させた後, Fos に対するウサギ一次抗血清 (Oncogene Science 社, Cat. #PC 05) で 24 - 72 時間 4°C で反応させた。それらの切片を PBS で 3 回洗浄し, そして 3% NGS で 60 分間反応させた。その後, 0.3% goat antirabbit serum (GAR) および 0.75% トリトン X-100 を含む 1% NGS で 60 分間反応させた後, PBS で 3 回洗浄した。さらに 3% NGS で 60 分間反応させた後, ウサギ peroxidase-antiperoxidase complex (PAP) および 0.75% トリトン X-100 を含有する 1% NGS で 60 分間反応させた。次いで PBS および 0.05 M Tris-HC 1 緩衝液 (TBS) でそれぞれ 2 回洗浄した後, 発色のため 0.04% ジアミノベンチジン (DAB) と 0.08% 硫酸ニッケルアンモ

ニウム (NAS) を含む TBS で 20 分間, それから 0.04% DAB, 0.08% NAS および 0.5% H_2O_2 を含む TBS で 20 分間反応させた。その後 TBS および PBS でそれぞれ 2 回洗浄し, 最後は蒸留水で 2 回水洗した。これらの切片を卵白アルブミンでスライドガラスに張り付け, それから上昇系エチルアルコールで順次脱水した後, キシレンで透徹し Entellan にて封入した。以上の免疫染色法は Noguchi *et al.*¹⁰⁾ の方法に準じた。

4. Fos 陽性細胞の算定

免疫染色のみを施した標本を 40 倍あるいは 100 倍で鏡検し Fos 陽性細胞を検索した。陽性細胞が検出された標本は, その細胞が存在する核の名称や層を明確にするために, camera lucida を用いてスケッチし, 写真撮影した後, キシレンで封入材を溶解し, cresyl violet にてニッスル染色を施した。これらの標本のすべての陽性細胞が 100 倍あるいは 200 倍の顕微鏡下で数えられた。それぞれの領域で最も陽性細胞を多く含む標本の陽性細胞の総数をそれぞれの領域での Fos 陽性細胞数とした。5 つのグループの各々の動物においてそれぞれの領域の陽性細胞を数え, 平均値と標準偏差を算出した。これらの数値についての有意差検定は危険率 1% あるいは 5% で Student の t 検定を行った。脳の各部位の名称は Berman and Jones¹⁷⁾ のアトラスおよび Musil and Olson¹⁸⁾ の分類に従った。

実験結果

各動物群で出現する Fos 陽性細胞は, 各部位において両側性に観察された。また, それらの陽性細胞数には左右において有意差は認められなかった。

1. 無処置群

通常の状態, つまり明らかな刺激が存在しない状態での前脳における *c-fos* の発現を調べるために, 無処置のネコ 4 匹が使用された。それらの動物では, 極めて少数の Fos 陽性細胞が視床下部の室傍核 (paraventricular nucleus;

PVN) のみに両側性に散在性に認められ, その数は片側で最大でも7個を越すことはなかった (Fig.1A)。また, 大脳, 視床, 室傍核以外の視床下部および延髄では陽性細胞を観察することはできなかった (Table 1)。

2. 生理食塩水投与群

この動物群は *c-fos* の発現に対して注射によるストレスあるいは投与した注射液による温度刺激効果がどのような影響を与えるかを調べるために使用された。等張液である生理食塩水投

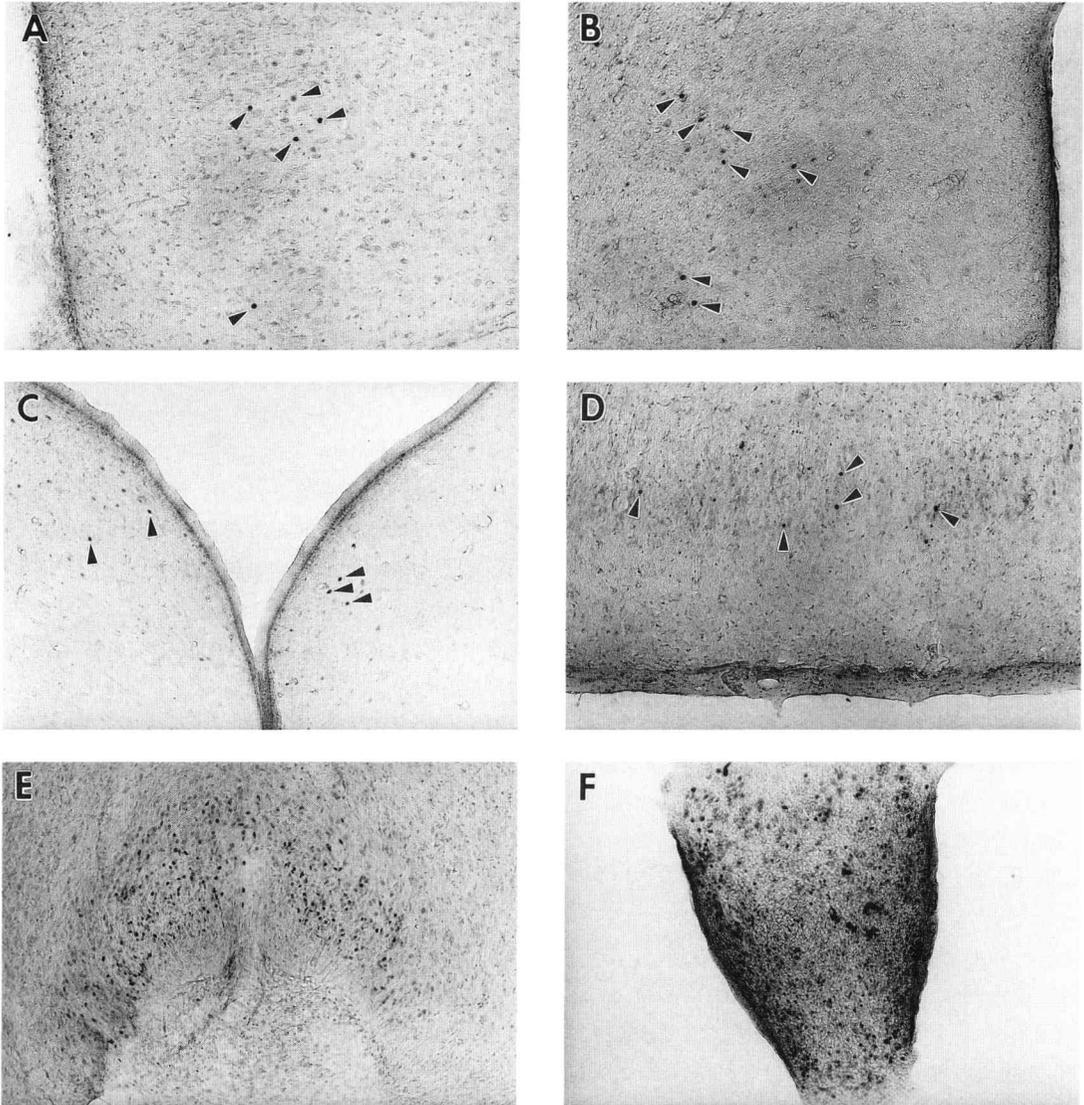


Fig.1 Distribution of Fos-positive neurons in the prelimbic cortex (A), the entorhinal cortex (B), the thalamic paraventricular nucleus (C), the periamygdaloid cortex (D), the anterior preoptic nucleus (E), and the subfornical organ (F). Animals were perfused 2.0 hrs after the intraperitoneal injection of Nembutal (35mg/kg). Arrowheads indicate the Fos-positive neurons. In all figures except for B the lower is the ventral side and in B the right is the ventral side.

与によって内側前頭皮質の前辺縁皮質 (prelimbic cortex) の第Ⅲ層 (Fig.1B) とその腹側に位置する下辺縁皮質 (infralimbic cortex) の第Ⅲ層, 梨状前皮質 (prepiriform cortex), 嗅周囲皮質 (perirhinal cortex), 嗅内皮質 (entorhinal cortex) (Fig.1C), 視床下部の視索上核 (supraoptic nucleus: SON) および PVN, そして視床の室傍核に少数の陽性細胞を認めた。これらの陽性細胞はそれぞれの領域内において限局して分布することなく散在していた。

3. 麻酔薬投与群

この群は歯髄刺激用電極の装着する際に使用する麻酔薬であるペントバルビタール・Na (Nembutal) が *c-fos* 発現に及ぼす効果を調べるために使用された。この群では生理食塩水投

与群で陽性細胞が認められた部位に加えて扁桃周囲皮質 (periamygdaloid cortex) の第Ⅲ層 (Fig.1D), 視床下部の前視索前核 (anterior preoptic nucleus) (Fig.1E) および漏斗核 (infundibular nucleus) (別名: 弓状核), 視床の外側手綱核 (lateral habenular nucleus: HbL), そして脳弓下器官 (subfornical organ) (Fig.1F) に Fos 陽性細胞が出現した。更に延髄の最後野 (area postrema) と孤束核内側部にも陽性細胞が見られた。これらの領域の内特に前視索前核および脳弓下器官に出現する陽性細胞は数も多く, また他の領域の陽性細胞に比して濃染される傾向にあった。また, SON に認められる陽性細胞の数は生理食塩水投与群のその約6倍にも増加した。

4. 歯髄刺激群

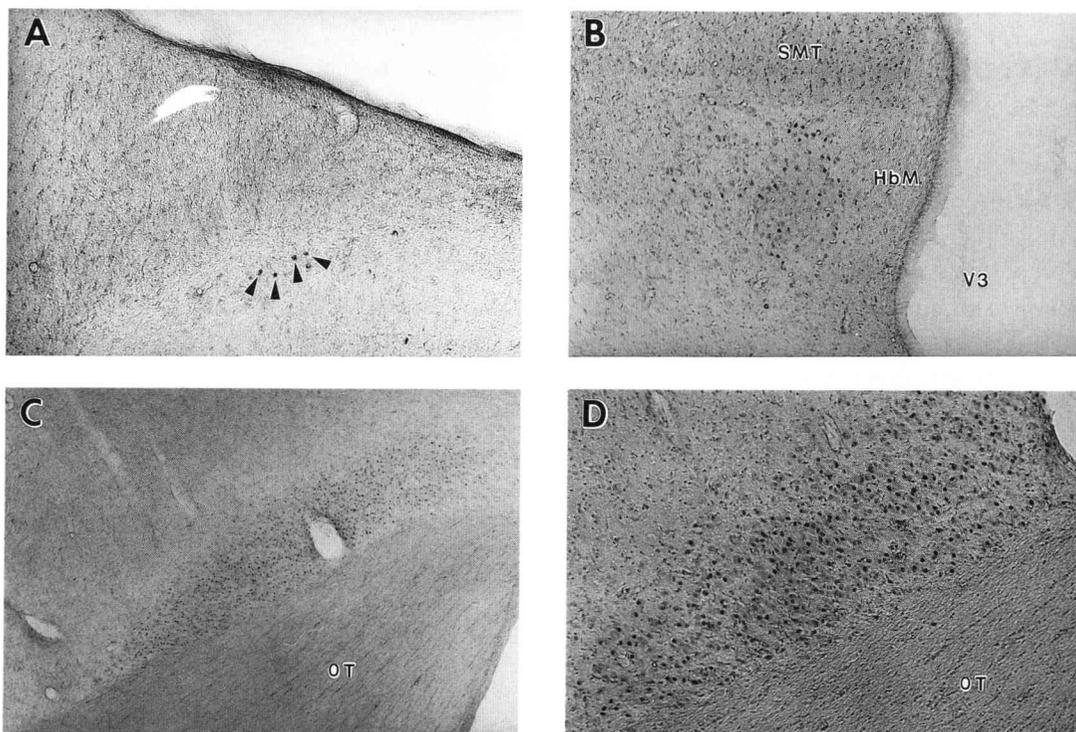


Fig. 2 Distribution of Fos-positive neurons in the marginal layer of the trigeminal caudal nucleus (A), the lateral habenular nucleus (B) and the supraoptic nucleus (C). D is higher magnification of C. Animals were perfused 1.5 hrs after beginning of the electrical stimulation of tooth pulp. Arrowheads indicate the Fos-positive neurons. Abbreviations: HbM, medial habenular nucleus; OT, optic tract; SMT, stria medullaris thalami; V3, third ventricle.

Table 1 Number of Fos-positive neurons in various areas of the cat forebrain

	Normal (n = 4)	Saline (n = 4)	Anesthetic (n = 4)	TP stim. (n = 4)
Cortex				
prelimbic	0	7.3±4.6	7.3±5.3	11.8±5.6
infralimbic	0	2.8±2.0	3.3±2.9	3.5±2.9
agranular insula	0	0	0	5.1±2.9
prepiriform	0	3.1±2.1	2.9±2.6	2.4±2.1
perirhinal	0	4.7±3.9	4.5±4.0	5.1±4.1
entorhinal	0	4.6±4.0	1.8±1.2	13.2±6.6
periamygdaloid	0	0	2.2±1.2	3.4±2.7
Hypothalamus				
supraoptic	0	8.0±4.2	50.1±38.8	184.5±45.3
ant. preoptic	0	0	100.9±42.8	86.9±41.1
infundibular	0	0	2.3±1.6	3.1±1.8
paraventricular	2.1±1.6	1.9±1.4	3.7±1.4	3.0±1.7
Thalamus				
paraventricular	0	4.8±4.1	5.2±3.5	5.6±5.0
lat. habenlar	0	0	13.5±4.5	37.8±9.1
Subfornical Organ	0	0	167.5±72.9	149.6±88.6

Means and standard deviations of Fos-positive neurons. Normal = normal control (intact group), Saline = Saline-injected group, Anesthetic = anesthetic (Nembutal)-injected group, TP stim. = tooth pulp-stimulated group.

開口反射の閾値の3倍の強度の歯髄刺激は刺激側と同側の三叉神経脊髄路核尾側亜核の辺縁層 (marginal layer) (Fig. 2A) および結合腕傍核 (parabrachial nucleus) の背外側部の細胞で *c-fos* の発現を引き起こした。しかしながら、歯髄性痛覚情報が入力することが確認されている視床の後内側腹側核 (VPM) の被殻部 (shell region)¹⁹⁾ や大脳皮質の第一および第二体性感覚視野 (SI と SII)^{2,4)} において陽性細胞はまったく検出されなかった。この刺激群では麻酔薬投与群で認められた部位以外に無顆粒島皮質 (agranular insular cortex) の第Ⅲ層とV層に散在的に少数の陽性細胞が観察された。また、特筆すべきことに嗅内皮質やSON およびHbL に出現する陽性細胞の数は麻酔薬投与群に比較してそれぞれ約7倍, 4倍, 3倍と著明に増加していた (Table 1)。しかしながらSONと同様な生理的性質を有するとされる視床下部の室傍核や手綱 (habenula: Hb) 複合核の一つである内側手綱核では有意な陽性細胞の増加

は認められなかった。

上記の歯髄刺激によって著しく陽性細胞の数が増加し、またその絶対数が特に多いSONとHbLで観察されるそれらの細胞の分布の仕方を麻酔薬投与群と歯髄刺激群について比較検討した (Fig. 3 & 4)。視索上核においては両群とも陽性細胞は核の吻尾側全体にわたって均一に分布しており、従って麻酔薬投与群に比べて歯髄刺激群では陽性細胞の密度が核全体において増加していた。また外側手綱核では両群ともに陽性細胞は吻側部では内側に、尾側部では背側に分布しており、歯髄刺激群では麻酔薬投与群に比較して吻側部においてより背外側部に分布する傾向にあった。

5. 視索上核および外側手綱核における *c-fos* 発現に対するモルヒネの効果

歯髄の電気刺激が痛覚以外の感覚を生じる可能性が指摘されているので^{20, 21)}、痛覚を抑制することが知られているモルヒネ²²⁾の投与によって歯髄の電気刺激によるFos陽性細胞の増加

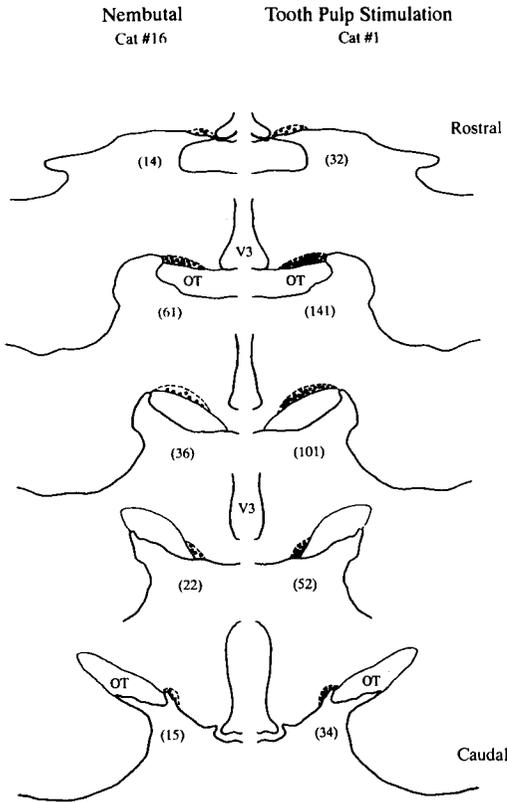


Fig. 3 Camera lucida drawing of the rostrocaudal distribution of Fos-positive neurons in the supraoptic nucleus (SON) for coronal planes of the cat hypothalamus after the tooth pulp stimulation (right) and 2.0 hrs after Nembutal injection (left). Each dot represents 5 Fos-positive neurons. The number in parentheses indicate the actual number of Fos-positive neurons. Note that the positive neurons are distributed throughout the nucleus in a rostrocaudal direction. Abbreviations : same as Fig. 2.

が抑制されるかどうかを調べた。SON と HbL における歯髄の電気刺激による Fos 陽性細胞の増加が、歯髄刺激開始 5 分前のモルヒネ腹腔投与によって完全に抑制された (Fig. 5)。モルヒネ投与群の陽性細胞数は両核において麻酔薬投与群よりもやや少ない値をとり、特に HbL ではモルヒネ投与群は麻酔投与群に比べて 5% 以下の危険率を持って有意に低い値を示した。

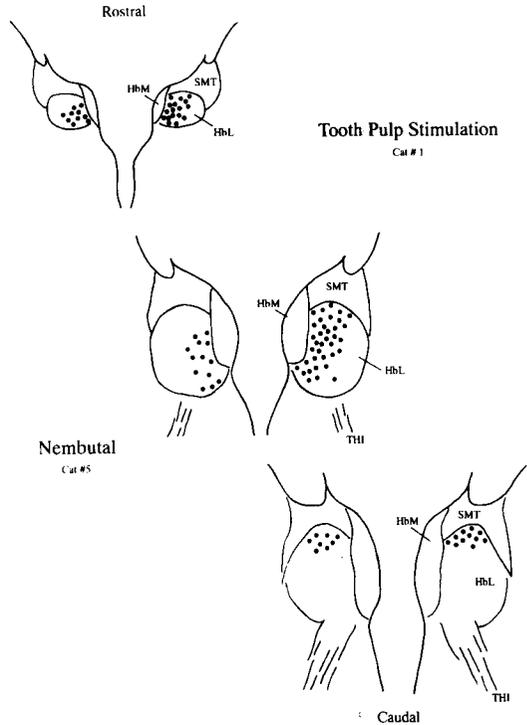


Fig. 4 Camera lucida drawing of the rostrocaudal distribution of Fos-positive neurons in the lateral habenular nucleus (LHb) for coronal planes of the cat thalamus, 1.5 hrs after the tooth pulp stimulation (right) and 2.0 hrs after Nembutal injection (left). Each dot represents one Fos-positive neuron. Abbreviations: same as Fig. 2.

考 察

今回の実験では、歯髄の電気刺激に応じる歯髄駆動細胞が記録されている大脳皮質第一および第二体性感覚領 (SI および SII)^{2,4)} や視床の後内側腹側核 (VPM)¹⁹⁾ では Fos 陽性細胞を観察することができなかった。この原因は不明であるが仙場⁹⁾が述べているようにこれらの細胞群では新しいタンパク質やペプチドの合成を必要としないか、あるいは *c-fos* 以外の遺伝子を介した調節が行われているのかも知れない。

無処置群において視床下部の室傍核にわずかの Fos 陽性細胞が観察された。Ceccatelli *et al.*²³⁾

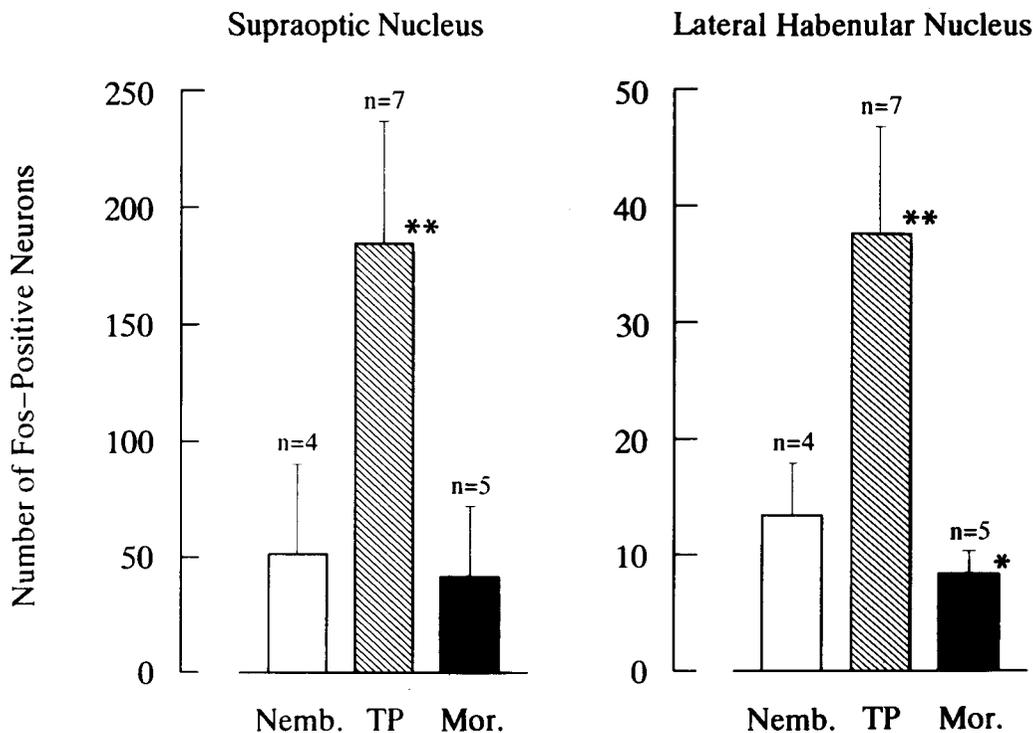


Fig. 5 Number of Fos-positive neurons in the supraoptic nucleus (left) and the lateral habenular nucleus (right) of the cat following Nembutal injection (white columns), electrical stimulation of the tooth pulp (shaded columns) and morphine 5 min before the tooth pulp stimulation (black columns). Values are mean \pm S.D. Marks of * and ** represent the significant difference from the Nembutal-injection group at $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively.

や Kononen *et al.*²⁴⁾ はラットで拘束ストレスが視床下部 PVN での Fos 陽性細胞の増加を引き起こすことを報告しており、また、同ストレスが PVN においてバゾプレシン合成を増強することがラットで確かめられている²⁵⁾。従って我々が観察した視床下部 PVN の *c-fos* 発現はネコを飼育ケージから運搬用ケージへの移動による拘束ストレスの結果である可能性が強い。

等張液である生理食塩水の腹腔投与は様々な部位で *c-fos* の発現を誘導した。しかし陽性細胞の数は前辺縁皮質や SON を除いては少ない値であった。この発現の原因は Sharp *et al.*²⁶⁾ が指摘しているように動物のハンドリングや注射による不快感がストレスを引き起こした結果と思われる。

麻酔薬投与群では、生理食塩水投与群では見られなかった扁桃周囲皮質、前視索前核、漏斗核（弓状核）および HbL で Fos 陽性細胞が新たに観察された。この群では同時に浸透圧受容に関わり、しかも体液浸透圧の調節に重要な働きをしている脳弓下器官や最後野²⁷⁾にも陽性細胞が認められた。更に、SON 内で認められる陽性細胞の数は生理食塩水投与群のその約 8 倍に増加していた。バルビツール酸誘導体が脳血流量や脳内圧を減少すること²⁸⁾、および脳内圧の減少が SON 内の細胞の発火頻度を高めること²⁹⁾が確かめられている。これらのことを考え合わせると、麻酔薬投与群で観察された *c-fos* 発現は脳内圧の変化によるものと考えることが妥当であろう。

ネコの歯髄を構成する神経線維には痛覚情報を伝える A δ や C 線維以外に触圧覚情報を伝える A β 線維が観察され²¹⁾, また, ヒト歯髄の電気刺激が痛覚以外の感覚 (pre-pain) を引き起こすこと^{20,30)}が報告されている。故に, 今回用いた歯髄の電気刺激が痛覚ではなくこれ以外の感覚を誘発している可能性がある。しかし, 今回用いた電気刺激は特異的侵害受容細胞が多く存在することが知られている延髄の三叉神経尾側亜核の辺縁層³¹⁾や結合腕傍核³²⁾において *c-fos* 発現を引き起こすことから, この可能性は否定される。従って, 今回の実験結果は侵害刺激がネコの SON や HbL において *c-fos* 発現を誘導することを示している。Bullitt¹³⁾ はラットで侵害機械刺激あるいは侵害熱刺激による *c-fos* の発現をラットの脳において調べた。その結果, SON における陽性細胞のわずかな増加と Hb 複合核では変化が認められなかったことを報告している。SON 内のバゾプレシン分泌細胞の割合には動物種差があり³³⁾, また脊髄の後角では侵害的機械刺激と熱刺激では異なる伝達物質を放出することが報告されている³⁴⁾。従って, 今回の我々の結果と Bullitt の結果との相違は SON や Hb 複合核が有している機能的役割における動物種差ないしは用いた侵害刺激の種類の違いによると思われる。

歯髄の電気刺激が SON や HbL で Fos 陽性細胞を増加させるという今回の知見は, 侵害刺激がネコの SON 内のバゾプレシン分泌細胞を興奮させ³⁵⁾, また血漿バゾプレシン値を上昇させる³⁶⁾という報告を支持するものである。バゾプレシンは抗利尿作用や血管平滑筋に対する作用によって血圧を調節する²⁹⁾。故に, 侵害刺激による SON 内細胞の興奮性の増加は Yagi & Onaka³⁷⁾ が示した様に傷害による失血に対してその動物個体の生命維持に有利に働くと考えられる。

HbL で得られた今回の結果は, HbL あるいは Hb 複合核が高閾値体性感覚入力, すなわち侵害性入力を受けるとラットでの結果³⁸⁾と一致する。この Hb 複合核の電気刺激が鎮痛作

用をすることが知られている³⁹⁾。また, HbL は大脳辺縁系を含む前脳の様々な部位からの投射を受け, そして痛覚受容を修飾することが確認されている部位, 例えば中脳中心灰白質, 背側および中心縫線核, そして腹側被蓋野などに投射する (Sutherland の総説⁴⁰⁾)。以上の事柄は, Hb は Wang & Aghajanian⁴¹⁾ が示したように前脳からの情報を中脳へ集中させる仲介機能を持ち, そして前脳から HbL へ伝えられた侵害情報がこの系を通して通覚抑制作用を引き起こすことが推察される。

歯髄刺激による Fos 陽性細胞数の増加がネコで麻酔効果を観察するのに十分であり⁴²⁾また大脳皮質第一体性感覚領の歯髄駆動細胞の興奮を抑制すること⁴³⁾が確かめられている 2 mg/kg (腹腔投与) のモルヒネ投与によって抑制され, 更にモルヒネ投与群で観察される陽性細胞の数は麻酔薬投与群のそれよりもわずかであるが少ない値を示した。オピオイド全身投与がラットで血漿バゾプレシン値を減少させ⁴⁴⁾, そしてスライス標本で SON 細胞の活動性を低下させる⁴⁵⁾ことが報告されている。またモルヒネ脳室投与によってバゾプレシン放出が抑制される⁴⁶⁾こと, 更に Hb 複合核はその内側核と外側核との境界領域に豊富なオピエイト受容体を含んでおり⁴⁷⁾, Hb 複合核へのモルヒネ微量注入が除痛を起こすことが証明されている⁴⁸⁾。従って, 麻酔薬投与群よりもモルヒネ投与群において Fos 陽性細胞が少ないという今回の結果は, モルヒネの痛覚情報の上行系に対する抑制作用に加えて SON や HbL 内の細胞への直接の作用が考えられる。

歯髄の電気刺激が SON や HbL 内の神経細胞において *c-fos* 発現を誘導するという今回の実験結果は, これらの核がバゾプレシン分泌や痛覚抑制作用によって侵害刺激に対する生体防衛機構に関与している可能性を示唆している。

結 論

細胞性癌遺伝子の一種である *c-fos* に由来するタンパク質 Fos の発現を利用して, 痛覚のみ

を引き起こす歯髄の電気刺激によって興奮する前脳の部位をネブタール (35 mg/kg, i. p.) で麻酔したネコを用いて免疫組織学的に検索し以下の結論を得た。

1) ネブタール投与によっても様々な部位に Fos 陽性細胞が出現したが、歯髄の電気刺激は視索上核、手綱外側核および無顆粒島皮質の陽性細胞数を更に増加させた。

2) 視索上核と外側手綱核における歯髄刺激による Fos 陽性細胞数の増加は、歯髄刺激開始5分前のモルヒネ (2 mg/kg, i. g.) 投与によって完全に抑制された。

3) 以上の結果は侵害刺激によって視索上核および外側手綱核の神経細胞が興奮することを明らかにした。これらの興奮はバゾプレシン分泌や痛覚抑制を引き起こすことによって侵害刺激に対する生体防御機構に関与していると考察される。

謝 辞

稿を終るに当たり、本研究推進において始終ご指導頂いた本学口腔生理学講座鈴木隆教授および Fos 免疫組織染色法を御教示頂いた大阪大学人間工学部行動生理学講座山本隆教授に深甚なる感謝の意を表します。また本研究にあたって直接御指導頂きました松本範雄講師および御協力頂きました口腔生理学講座教室員の各位に心から感謝を申し上げます。

本論文の要旨は第16回神経科学会 (1992年12月9日, 大阪) および岩手医科大学歯学会第35会例会 (1993年2月27日) において発表しました。

参 考 文 献

- 1) Willis, W.: Nociceptive transmission to thalamus and cerebral cortex, In: *The Pain System*, ed. Willis, W. D. Jr., Karger, Basel and New York, pp 213 - 263, 1985.
- 2) Kenshalo, D. R. Jr. and Willis, W. D. Jr.: The role of the cerebral cortex in pain sensation, In: *Cerebral Cortex*, ed. Peters, A., Plenum, New York, pp 153 - 212, 1991.
- 3) Melzack, R. and Casey, K. L.: Sensory, motiva-

- tional, and central control determinants of pain. A new conceptual model, In: *The Skin Senses*, ed. Kenshalo, D., Thomas, Springfield, pp 423 - 443, 1967.
- 4) Matsumoto, N., Sato, T., Yahata, F. and Suzuki, T. A.: Physiological properties of tooth pulp-driven neurons in the first somatosensory cortex (SI) of the cat. *Pain* 31: 249 - 262, 1987.
- 5) Yokota, T., Koyama, N. and Matsumoto, N.: Somatotopic distribution of trigeminal nociceptive neurons in ventrobasal complex of cat thalamus. *J. Neurophysiol.* 53: 1387 - 1400, 1985.
- 6) Dong, W. K., Ryu, H. and Wagman, I. H.: Nociceptive responses of neurons in medial thalamus and their relationship to spinothalamic pathways. *J. Neurophysiol.* 41: 1592 - 1613, 1978.
- 7) Craig, A. D. Jr. and Burton, H.: Spinal and medullary lamina I projection to nucleus submedialis in medial thalamus: a possible pain center. *J. Neurophysiol.* 45: 443 - 466, 1981.
- 8) Talbot, J. D., Marret, S., Evans, A. C., Meyer, E., Bushnell, M. C. and Duncan, G. H.: Multiple representations of pain human cerebral cortex. *Science* 251: 1355 - 1358, 1991.
- 9) 仙波恵美子: 痛みの分子生物学—ペプチド発現と細胞性癌遺伝子—, *ペインクリニック*, 12: 17 - 24, 1991.
- 10) Mugnaini, E., Berrebi A. S., Morgan, J. I. and Curran, T.: Fos-like immunoreactivity induced by seizure in mice is specifically associated with euchromatin in neurons. *Eur. J. Neurosci.* 1: 46 - 52, 1989.
- 11) Hunt, S. P., Pini A. and Evan, G.: Induction of *c-fos*-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 328: 632 - 634, 1987.
- 12) Morgan, J. I., Curran, T.: Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes Fos and Jun. *An. Rev. Neurosci.* 14: 421 - 451, 1991.
- 13) Bullitt, E.: Expression of *c-fos*-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 296: 517 - 530, 1990.
- 14) Jones, E. G. and Burton, H.: Cytoarchitecture and somatic sensory connectivity of thalamic nuclei other than the ventrobasal complex in the cat. *J. Comp. Neurol.* 154: 395 - 432, 1974.
- 15) Boivie, J.: An anatomical reinvestigation of the termination of the spinothalamic tract in the monkey. *J. Comp. Neurol.* 186: 343 - 370, 1979.
- 16) Noguchi, K., Dubner, R. and Ruda, M. A.: Preproenkephalin mRNA in spinal dorsal horn neu-

- rons is induced by peripheral inflammation and is co-localized with Fos and Fos-related proteins. *Neuroscience*, 46 : 561 - 570, 1992
- 17) Bermann A. L. and Jones, E. G. : The Thalamus and Basal Forebrain of the Cat. A Cytoarchitectonic Atlas with Stereotaxic Coordinates, The University of Wisconsin Press, Madison, 1982.
 - 18) Musil, S. Y. and Olson, C. R. : Organization of cortical and subcortical projections to medial prefrontal cortex in the cat. *J. Comp. Neurol.* 272 : 219 - 241, 1988.
 - 19) Yokota, T., Nishikawa, Y. and Koyama, N. : Tooth pulp input to the shell region of nucleus ventralis posteromedialis of the cat thalamus. *J. Neurophysiol.* 56 : 80 - 98, 1986.
 - 20) Chatrian, G. E., Fernandes de Lima, V. M., Lettich, E., Canfield, R. C., Miller, R. C. and Soso, M. J. : Electrical stimulation of tooth pulp in humans. II. Qualities of sensation, *Pain* 14 : 233 - 246, 1982.
 - 21) Dong, W. K., Chudler, E. H. and Martin, R. F. : Physiological properties of intradental mechanoreceptors. *Brain Res.* 334 : 389 - 395, 1985.
 - 22) Jaffe, J. H. and Martin, W. R. : Narcotic analgesics and antagonists, In : The Pharmacological Basis of Therapeutics, 5th Ed. ed. Goodman, L. S. and Gilman, A., Macmillan, New York, pp 245 - 283, 1975.
 - 23) Ceccatelli, S., Villar, M. J., Goldstein, M. and Hokfelt, T. : Expression of *c-fos* immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 9569 - 9573, 1989.
 - 24) Kononen, J., Honkaniemi, J., Alho, H., Koistinaho, J., Iadorola, M. and Pletto-Huikko, M. : Fos-like immunoreactivity in the rat hypothalamic-pituitary axis after immobilization stress. *Endocrinology*, 130 : 3041 - 3047, 1992.
 - 25) De Goeij, D. C. E., Jezova, D. and Tilders, F. J. H. : Repeated stress enhances vasopressin synthesis in corticotropin releasing factor neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Res.* 577 : 165 - 168, 1992.
 - 26) Sharp, F. R., Sagar, S. M., Hicks, K., Lowenstein, D. and Hisanaga, K. : *c-fos* mRNA, Fos, and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress. *J. Neurosci.* 11 : 2321 - 2331, 1991.
 - 27) Dorsa, D. M. : Neurohypophyseal hormones. In : Textbook of Physiology, 21st Ed., Vol. 2, ed. Patton, H. D., Fuchs, A. F., Hille, B., Scher, A. M. and Steiner, R., W. B. Saunders, Philadelphia, pp 1173 - 1183, 1989.
 - 28) Marshall, B. E. and Longnecker, D. E. : General anesthetics, In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Ed. ed. Gilman, A. G., Rall, T. W., Nies, A. S. and Taylor, P., Pergamon, New York, pp 285 - 310, 1990.
 - 29) Yamashita, H. : Effect of baro- and chemoreceptor activation on supraoptic nuclei neurons in the hypothalamus. *Brain Res.* 126 : 551 - 556, 1977.
 - 30) Shimizu, T. : Tooth pre-pain sensation elicited by electrical stimulation. *J. Dent. Res.* 43 : 467 - 475, 1964.
 - 31) Yokota, T. and Nishikawa, N. : Somatotopic organisation of trigeminal neurons within caudal medulla oblongata. In : Pain in the Trigeminal Region, ed. Anderson, D. J. and Matthews, B., Elsevier, Amsterdam, pp 243 - 257, 1977.
 - 32) Bernard, J. F. and Besson, J. M. : The spino (trigemino) pontoamygdaloid pathway : electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J. Neurophysiol.* 63 : 473 - 490, 1990.
 - 33) Sofroniew, M. V., Weindl, A., Shinko, I. and Wetzstein, R. : The distribution of vasopressin-, oxytocin-, and neurophysin-producing neurons in the guinea pig brain. I. The classical hypothalamo-neurohypophyseal system. *Cell Tissue Res.* 196 : 367 - 384, 1979.
 - 34) Kuraishi, Y., Hirota, N., Sato, Y., Hino, Y., Satoh, M. and Takagi, H. : Evidence that substance P and somatostatin transmit separate information related to pain in the spinal dorsal horn. *Brain Res.* 325 : 294 - 298, 1985.
 - 35) Suda, I., Koizumi, K., and Brooks, C. M. : Study of unitary activity in the supraoptic nucleus of the hypothalamus. *Jpn. J. Physiol.* 13 : 374 - 385, 1963.
 - 36) Mirsky, I. A., Stein, M. and Paulisch, G. : The secretion of an antidiuretic substance into the circulation of rats exposed to noxious stimuli. *Endocrinology*, 54 : 491 - 505, 1954.
 - 37) Yagi, K. and Onaka, T. : Stress and nociceptive inputs to VP neurons. In : Vasopressin, Colloque INSERM, Vol. 208, ed. Jard, S. and Jamison, R., John Libbey Eurotext, pp 245 - 255, 1991.
 - 38) Benabid, A. L. and Jeaugey, L. : Cells of the rat lateral habenula respond to high-threshold somatosensory inputs. *Neurosci. Lett.* 96 : 289 - 294, 1989.
 - 39) Mahieux, G. and Benabid, A. L. : Naloxone-reversible analgesia induced by electrical stimulation of the habenula in the rat. *Brain Res.* 406 : 118 - 129, 1987.
 - 40) Sutherland, R. J. : The dorsal diencephalic conduction system : a review of the anatomy and functions of the habenular complex. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 6 : 1 - 13, 1982.

- 41) Wang, R. Y. and Aghajanian, G. K. : Physiological evidence for habenula as major link between forebrain and midbrain raphe. *Science* 197 : 89 - 91, 1977.
- 42) Mitchell, C. L.: A comparison of drug effects upon the jaw jerk response to electrical stimulation of the tooth pulp in dogs and cats. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 146 : 1 - 6, 1964.
- 43) Matsumoto, N., Gotoh, H., Sato, T. and Suzuki, T. A.: Morphine selectively suppresses the slow response of tooth pulp-driven neurons in first somatosensory cortex (SI) of the cat. *Neurosci. Lett.* 75 : 55 - 59, 1987.
- 44) Van Wimmersa Greidanus, T. B., Thody, T. J., Verspaget, H., De Rotte, G. A., Goedemans, H. J. H., Croiset, G. and Van Ree, J. M.: Effects of morphine and β -endorphin on basal and elevated plasma levels of α -MSH and vasopressin. *Life Sci.* 24 : 579 - 586, 1979.
- 45) Wakerley, J. B., Noble, R. and Clarke, G.: Effects of morphine and D-ala, D-leu enkephalin on the electrical activity of supraoptic neurosecretory cells *in vitro*. *Neuroscience*, 10 : 73 - 81, 1983.
- 46) Aziz, L. A., Forsling, M. L. and Woolf, C. J.: The effect of intracerebro-ventricular injections of morphine on vasopressin release in the rat. *J. Physiol. (Lond)*, 311 : 401 - 409, 1981.
- 47) Atweh, S. F. and Kuhar, M. J.: Autoradiographic localization of opiate receptors in the rat brain. II. The brain stem. *Brain Res.* 129 : 1 - 12, 1977.
- 48) Cohen, S. R. and Melzack, R.: Morphine injected into the habenula and dorsal postero-medial thalamus produces analgesia in the formalin test. *Brain Res.* 359 : 131 - 139, 1985.