

視床下部—脳幹における
除痛メカニズムの実験的研究

(研究課題番号：03670669)

平成3年、4年度 科学研究費補助金
〔一般研究C〕研究成果報告書

平成6年3月

研究代表者 大神正一郎
(旭川医科大学医学部)

は し が き

文部省科学研究費補助金（一般研究C）の助成を平成3、4年度の2年間にわたり受け、その2年間の研究期間を終了したので、ここにその研究成果の報告書「視床下部－脳幹における除痛メカニズムの実験的研究」をまとめることになった。それ以前より痛みの発現機構に関して、特に下垂体－視床下部の役割りについて実験結果を報告しており、それをさらに発展させる形で研究を進めて来たつもりである。しかし、いま報告をまとめるにあたり、十分満足のゆくような結果が出せなかったことが悔やまれる。しかしその研究成果の報告は義務であり、また多少の新しい知見も得られたと考えられるので報告する。

研 究 組 織

研究代表者 大神正一郎（旭川医科大学医学部・助教授）

研究分担者

米増祐吉（旭川医科大学医学部・教授）

田中達也（旭川医科大学医学部・講師）

代田 剛（旭川医科大学医学部・講師）

藤田 力（旭川医科大学医学部・助手）

国本雅之（旭川医科大学医学部・助手）

研究協力者

磯部裕成（旭川医科大学医学部・文部技官）

研究経費	平成3年度	1,400千円
	平成4年度	900千円
	計	2,300千円

研究発表

1)学会誌等

(1)疼痛、痛み

大神正一郎

BRAIN NURSING p145-p151, 夏期増刊号, 1992

(2)隔壁を有し特異な経過を示した脊髓空洞症を伴ったMELASの一例

中井啓文、國本雅之、代田 剛、藤田 力、吉田 克成、

佐古和廣、大神正一郎、米増祐吉

脳神経外科 20(7): 793-798, 1992

(3)視床下部－脳幹における除痛メカニズムの実験的研究（投稿準備中）

2)口頭発表

(1)最近の脳神経外科のトピックス：

－機能的脳神経外科の過去、現在、未来－

旭川医科大学脳神経外科

○大神正一郎 1991年度夏期ゼミナール研修会

平成3年8月（札幌）

(2)脳神経外科のトピックス：機能的脳神経外科

旭川医科大学脳神経外科

○大神正一郎 1992年度夏期ゼミナール研修会

平成4年8月（札幌）

(3)機能的脳神経外科について

旭川医科大学脳神経外科

○大神正一郎 1993年度夏期ゼミナール研修会

平成5年8月（札幌）

(4)視床下部－脳幹における除痛メカニズムの実験的研究(予定)

旭川医科大学脳神経外科

○大神正一郎 第33回 日本定位脳手術研究会
1994.10. (徳島)

研 究 成 果

<視床下部－脳幹における除痛メカニズムの実験的研究>

【はじめに】

下垂体破壊による鎮痛手術は昔から行われ、その破壊術式の種類に拘わらず（下垂体柄切断術、下垂体高周波凝固、下垂体冷凍破壊、下垂体アルコール破壊など）鎮痛効果が存在し、また一方では下垂体を電気刺激しても鎮痛が得られる事実は、下垂体が鎮痛のメカニズムの一翼を担っていることを示している。我々は、以前からその除痛メカニズムの解明を目指し、下垂体に関連する液性ホルモンにその役割りの一端を求め、下垂体摘出ラットを作成し、その痛みとの関連を研究してきた。その後、下垂体の上位中枢にあたる前部視床下部の神経核群、中でも Corticotropin releasing factor（以後CRF）を産生する paraventricular nucleus(以後 PVN)核に着目し、ラットの PVNにモルフィンを微量注入し、ラットの疼痛におよぼす影響を検討し、PVNは微量のモルフィン注入で著明な鎮痛効果を示す部位であることを確かめ発表してきた。しかし、そのメカニズムについては、opiate system系を介しての鎮痛であるが、それがどう関与しているのか依然不明であり、また、これまで言われてきた中脳水道周囲灰白質（periaqueductal gray matter: 以後PAG）や延髄の大縫線核（Nucleus raphe magnus: NRM）などの下行性疼痛抑制経路と、何らかの関連があるのではないかと考えた。この疼痛抑制機構と視床下部PVN核での疼痛抑制が、opiate systemとどのような関係を有するのか、また同じhot plate法を使つての疼痛実験で同じ様な鎮痛効果を有するのかについて、ナロキソン投与による影響を含めて今回の実験をおこなった。

【実験動物および実験方法】

1)Morphine および生食水微量注入

実験動物には、260-360gのオス Sprague-Dawleyラットを用いた。全例、Sodium pentobarbital麻酔下に、定位脳手術装置に固定し、外径 0.6 mmのステンレス製 guide cannulaを、下記の目標部位の 1 mm上方に留置固定しておいた。そのguide cannulaが詰ま

らないように直径0.3mmの内套を挿入しておき、歯科用セメントで頭蓋骨に固定しておいた。術後1-2週間目に、生食またはmorphine hydrochlorideを、guide cannulaより0.5 mm長い内径0.3 mmの injection cannulaを挿入し、Hamilton syringeを使って0.7-1 μ lの morphine hydrochlorideを約60秒かけてゆっくり注入し、生食注入群のコントロールと比較した。また、無麻酔で注入針の挿入が困難な場合には、ハロセンと酸素による吸入麻酔後に、モルフィンや生食の注入を行い、麻酔から十分に覚めた状態を確認してから、痛みの評価の実験に入った。

a)視床下部PVN核への注入

Sprague-Dawleyラット19匹を用いた。目標部位の右 PVNは、Pellegrinoの図譜で (A +6.6mm,L +0.3mm, H -2.2mm) の位置である。深さは組織でcannulaの先端を確認した経験から図譜より1mm深く設定した。ラットを2群に分け、1群はコントロール群とし9匹に生食を、他の1群10匹にはmorphine hydrochlorideをゆっくり注入した。また、このモルフィン、生食注入群のデータは以前からのデータに今回新たなる実験ラットを加えたものである。

b)中脳水道周囲灰白質への注入

SDラット2匹に行った。目標部位の右 PAGは、Pellegrinoの図譜で同様に深さを1mm深くして (A +0.8mm,L +0.5mm, H -2.5mm) の位置に設定した。

2)痛みのレベルの評価方法

痛みの評価は、これら一連の実験では非常に重要な部分を占めるが、これらの実験ではすべて hot plate法(熱板式鎮痛効果測定装置：室町器械社製 MK-350) でラットの疼痛閾値を客観的に測定した。ホットプレートを52℃に設定し、ラットのPVN核に生食またはモルフィンを注入後15-30分毎に120分後まで、ホットプレート上に放り出されたラットが、足底部に痛みを感じて前肢または後肢をなめるまでの時間である paw lick latency (以下 PLL) を2分おきに4回測定し、平均値を算出し各群間で比較した。

3)ナロキソン前処置

a)視床下部PVN核への注入群

モルフィンをPVNに注入して、著明な鎮痛効果を示した同じラット5匹と別に2匹の計7匹をこの実験に使用した。Naloxoneで前処置する群は、PVNにモルフィンを微量注入する3分前にNaloxone 0.2 mgを腹腔内に投与し、モルフィン注入後15-30分毎に120分後まで同じように52℃の hot plate上で同様に paw lick latency (以後 PLL)を測定し、PLLを2分おきに4回測定し、ナロキソン非投与群 (すなわちモルフィン注入群) の場合と比較した。

無麻酔で注入針の挿入が困難な場合は、やはり実験1)と同様にハロセン麻酔を行なって施行した。また、Naloxoneの効果を確実に、長期にわたり観察するために、2匹のラットに一定流量で連続的に腹腔内にナロキソンを注入でき、皮下に埋め込み可能なインフュージョンシステム、ALZET 浸透圧ミニポンプ (室町機械株式会社製 モデル2ML1(10 ul/ hr, 7 days) リザーバー容量2.0 ml) を埋め込んで、ナロキシソンのデリバリーを行い同様の実験を行った。

b)中脳水道周囲灰白質への注入群

SD ラット2匹を用いた。また、視床下部PVN核群と同じ方法で腹腔内にNaloxoneを投与してPLLの測定を行った。

4)組織学的検討

腹腔内に多量のSodium pentobarbitalを注入しsacrifyした。挿入cannulaの脳内部位の確認には70 μ Aの直流を、30秒間通電してlesionを作成し、ラットの脳は8 μ mの厚さのcoronal sectionでカットし、H-E染色を行い先端を顕微鏡で確認した。

【結果】

1. PVNに生食および Morphineを微量注入した場合の PLL

1)Table 1は PVN生食注入群9匹のPLLで、それをグラフ化したものがFig 1である。生食注入30分後から30分毎に90分まで PLLを測定したが平均するとほぼ10秒以下である。

2)Table 2はモルフィンを視床下部PVN核に微量注入した群の10匹の PLLで、それをグラフ化したものがFig 2である。60秒以上のものは60秒で打切っている。PLLは60秒以上と著

明に延長し鎮痛効果が認められているが、90分後にはほぼその効果が失われている。モルフィン注入群と生食注入群の平均値を比較すると、両者間にはあきらかな差異が認められ、統計学的にも危険率1%で有意であった。2匹のPVNにNaloxoneを微量注入してみたが、生食注入とほとんど変化がない結果であった。

2. 中脳水道周囲灰白質へのモルフィンの微量注入した場合のPLL

2匹に行ったが、その結果をTable 3に示す。それをグラフ化したものがFig 3である。視床下部PVNにモルフィンを注入したラットと同じ程度の鎮痛を示し、90分後にはやはりその鎮痛効果の減弱が認められた。

3. 腹腔内にNaloxoneを投与しMorphineを微量注入した場合のPLL

a) 視床下部PVNにモルフィンを注入した群

モルフィンの antagonistである naloxoneを腹腔内に投与してその影響を検討した結果をTable 4とFig 4に示す。この実験の為に使用するラットはモルフィンで確実にPLLが延長したラットを選ぶ必要があり、モルフィン注入後30分で30秒以上のPLLを示した確実なラット5匹を再使用した。その両方の実験が可能であった7匹のラットを対象として、モルフィン注入と naloxone処置後モルフィン注入のPLLを別々に記してある。

両群の平均値をFig 4の中央部に図示してあるが、30分、60分値はモルフィン注入群に比べ、ナロキソン前処置群のPLLが明らかに短くなっている。また7匹のうち4匹はすでに注入後30分の段階で、ある程度の痛みを感知していると判断され、naloxone前処置の影響が初期の段階で認められた。3匹のラットには皮下にALZET浸透圧ミニポンプを埋め込みNaloxoneの長期かつ確実な効果を期待して、比較してみたが、データがバラバラで確実なことは言えない状況である。恐らくこのやり方ではNaloxoneの濃度が低く、その効果の判断が出来ないものと考えざるをえない結果で、別のやり方を考えねばならないと中止した。

b) 中脳水道周囲灰白質へのモルフィン注入群

SDラット2匹を用いて、視床下部PVN核群と同じ方法で腹腔内にNaloxoneを投与して行っ

た。その結果をTable 5とFig 5に示す。数が少ないが、視床下部PVN群と同様に著明な鎮痛を示し、かつ、Naloxoneによりその効果が著明に減弱している。

3. 組織学的検討

全例ラットの脳は8 μ mの厚さのcoronal sectionでカットし、injection cannulaの先端部を組織学的に検討したが、PVNは第3脳室にすぐ外側下部に存在しており、特にcannulaの先端が第3脳室を突き破り、脳室内に入っていないことを確認した。またCannulaの先端がPVNに認められるラットのみのものであつたのみしか採用していない。Fig 6にPVNに挿入されたinjection cannulaの先端を示す。

【考察】

この実験を始める以前から、我々は痛みの視床下部一下垂体系における役割りについて検討してきた。その実験の経過の中で、視床下部のCRF産生中枢であるparaventricular nucleusがモルフィンに著明に反応し、著明な鎮痛効果を示すことが示された。

今回の結果は、注入後60分までは確実に鎮痛効果を示した。また、PAGもPVNも同じようにモルフィンにより著明な鎮痛を示し、かつnaloxoneにより、その効果が減弱しており、両者とも内因性モルフィンが関与しているシステムと推測される。

脳幹の中脳水道周囲灰白質(periaqueductal gray matter)や延髄の傍巨大細胞網様核(Nucleus reticularis paragigantocellularis)大縫線核(Nucleus raphe magnus)では、電気刺激やモルフィンの微量注入により、opiate system系が関与していると考えられる鎮痛作用を示すことが判明し、それに関する多くの実験結果の発表が行われている。その作用のメカニズムとして脳幹、脊髄を下行し、脊髄後根の神経細胞を抑制的に作用する下行性疼痛抑制経路と呼ばれる新しい概念の疼痛抑制機構の存在が提唱され、ほぼ受け入れられている。しかし、この系のはじまりがどこであるのか、上位脳幹であることは漠然としているが、視床下部弓状核であるとの報告(佐藤、郭)もあるが、詳細は不明である。

このモルフィンが作用する部位は脳内のオピオイドレセプターであり、これらのレセプターが痛みを制御する機能と深く関連していると考えられている。このオピオイドレセプ

ターには数種のサブタイプが存在し、そのサブタイプにより疼痛制御における役割りが異なっているのではないかとの報告もある（佐藤）。Tyersは、動物の痛み刺激実験において、痛み刺激の種類、例えば機械的、温熱的、化学的、電氣的刺激により、その反応が異なる場合があると報告しており、他にも刺激の種類とこのオピオイドレセプターのサブタイプと関連づけた報告も存在する。そのサブタイプのうち μ サブタイプはいずれの鎮痛測定方法でも強力な鎮痛を示すのに対し、 κ サブタイプは熱刺激では弱い鎮痛しか示さないことが知られている。Yakshらの実験ではPAGをはじめとする下行性疼痛抑制系はモルフィンで鎮痛し、Naloxoneでその効果の減弱をみている。今回このようなレセプターのサブタイプによって抑制される痛み刺激の種類が異なる報告を利用して、二つの系が同一でないとの判断ができる可能性も探ってみた。しかし、少なくともPVN核注入も、PAG注入も同様な鎮痛効果をを示し、かつNaloxoneに対しても同様な反応を示した。この方法では少なくともPVN核が下行性疼痛抑制系とは異なるとも、非常に密接であるとも判断出来ない。しかし、少なくとも、両者は同様な反応を、モルフィンでもNaloxone前処置でも示しており、Opiate systemを介する鎮痛であるとは言える。

PVNにおけるモルフィン鎮痛は下垂体-視床下部系にそのメカニズムを求める考えもあるが、我々の以前の実験でははっきりした結論が出なかった。解剖学的に密接な関係があるのは勿論その大きな根拠であるが、ホルモンのにも、薬理的なレセプター面からも支持する所見をいろいろあげることは簡単である。内因性opiates (Rasmussen)が下垂体ホルモンのうちGonadotropin releasing-hormoneの放出の調節に重要な役割を担っていると報告しており、ラット視床下部にモルフィンの受容体 (μ -receptor) が多く存在すること、naloxoneはこの μ -receptorに対し、非常に強いaffinityを有することも分かっている。一方、臨床面で頭痛の治療面でも、Fairmanや真柳らは視床下部の破壊で鎮痛効果があることを、それぞれ臨床例で報告している。どちらとも決めかねる報告の一つに、Swansonの報告がある。彼はmedial hypothalamusのdorsal parvocellular partはspinal cordに、magnocellular partは下垂体後葉の両者に線維を送っており、前部視床下部と後部視床下部との接点であると述べており、劇的な鎮痛をしめすメカニズムとしては、電気刺激やモルフィンに著明に反応する、中脳水道周囲灰白質 (PAG) (NRGC)、延髄縫線核群などの下行性抑制系と

の関連も強いのではないかと推測される。それを示唆する所見として、 β endorphineは高濃度に視床下部の弓状核や正中隆起に集中し、この部位にはdopamine neuronも集まっているとの報告や、弓状核は下行性疼痛抑制系のはじまりとの報告もある（佐藤）。これらを考え合わせると、視床下部や下垂体での疼痛抑制の機構は下垂体から下垂体門脈方向に向かうものも存在するが、鎮痛のメカニズムとしては下行性疼痛抑制系のほうに向かい、鎮痛効果が現れている可能性のほうが高いのではなかろうか。それらの概略を模式化して、描いたものが、Fig 7である。この図のように、下垂体—視床下部系の除痛メカニズムは延髄縫線核群などの下行性抑制系と関連があり、その下行性抑制系のはじまりの部分にあたるのではないかと推測される。

しかし視床下部は、いくつかの神経機序に加えて液性機序が複雑にからんでおり、その鎮痛のメカニズムの解明はそう簡単ではないだろうと容易に推測され、今後の研究のさらなる積み重ねが必要である。。

【まとめ】

1. ラットの視床下部paraventricular nucleusにmorphineを微量注入し、著明な鎮痛効果を確認した。この効果は Naloxoneの腹腔内注入で有意に減弱した。
2. 脳幹のperiaqueductal gray matterにも微量注入法にてmorphineを注入したが、同様な鎮痛効果を認めた。この効果もNaloxoneの腹腔内注入で減弱した。
3. 両者の鎮痛メカニズムについて考察し、視床下部PVN核は下行性疼痛抑制系のはじまりである可能性が高いと推測される。

【文献】

1) Watson SJ, Barchas JD and Li CH

Beta-lipotropin: localization of cells and axons in rat brain by immunocytochemistry.

Proc. natn. Acad. Sci. USA, vol:74,5155-5158,1977

2) Baumeister AA, Hawkins MF, Anticich TG, Moore LL and Higgins TD

Bilateral intranigral microinjection of morphine and opioïdes produces antinociception in rats

Brain Reseach vol:411,183-186,1987

3)Kawajiri Shin-ichi,Satoh Masamichi

Analgesic effects of cyclazocine and morphine microinjected into the rat dorsomedial hypothalamus demonstrated by the bradykinin-induced flexor reflex test, European J of Pharmacol vol:111,117-120,1985

4)橋本政明,大神正一郎、米増祐吉

視床下部室傍核 (P V N) と下垂体と疼痛抑制機構—ラットにおける morphine 脳内微量注入法による検討—

第26回日本定位脳手術研究会講演集,83,1987

5)Masaaki HASHIMOTO, Shoichiro OHGAMI and Yukichi YONEMASU

The role of the paraventricular nucleus and pituitary gland in Morphine Analgesia
Neurol Med Chir(Tokyo) 31: 629-634, 1991

6)大神正一郎、橋本政明、橋爪 明、米増祐吉

視床下部—下垂体系と疼痛抑制機構

—Corticotrophin releasing factor(CRF)の役割について—

機能的脳神経外科 26:201-206, 1987

7)Swanson LW

Immunohistochemical evidence for a neurophysin-containing autonomic pathway arising in the paraventricular nucleus of the hypothalamus

Brain Research vol:128,346-353,1977

8)Buckingham JC,Cooper TA

Interrelationships of opioidergic and adrenergic mechanism controlling the secretion of corticotrophin releasing factor in the rat

Neuroendocrinol vol:46,199-206,1987

9)佐藤公道

オピオイドレセプターと疼痛

臨牀科学 vol 23(9) ,1074-1080. 1979

10)郭 試揄

視床下部弓状核における針麻酔鎮痛発現の求心路と遠心路

昭医学会誌 第48巻 第4号, 493-499, 1988

11)佐藤孝雄、他

昭医学会誌 第43巻, 619- ,1988

12)今北哲雄

NALOXONE少量投与による視床下部・下垂体系の反応について

お茶の水医学雑誌 Vol 35(4): 163-170, 1987

13)Meites, J., Bruni, J. F., Van Vugt, D. A.and Smith, A. F.

Minireview-relation of endogeneous opioides and morphin to neruroendocrine function.

Life Sci., 24: 1325, 1979

14)Rasmussen, D. D., Lin, J. H., Wolf, P. L. and Yen, S. C. C.

Endogenous opioid regulation of Gn-RH release from the human fetal hypothalamus in vitro.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 57: 881, 1983

15)Chang, K-J. and Cuatrecasas, P.

Multiple opiate receptors.

J. Biol. Chem., 254:2610, 1979

	30分後	60分後	90分後
S-1	10	7.7	8.8
S-2	5.3	7.1	3.5
S-3	4.2	6.2	7.1
S-4	6.9	5.4	5.1
S-5	8.2	14.8	9.2
S-6	14.9	6.8	4.4
S-7	12.6	5.8	5.7
S-8	5.8	9.6	8.6
S-9	7	4.8	8
平均 (秒)	8.32	7.58	6.71

Table 1

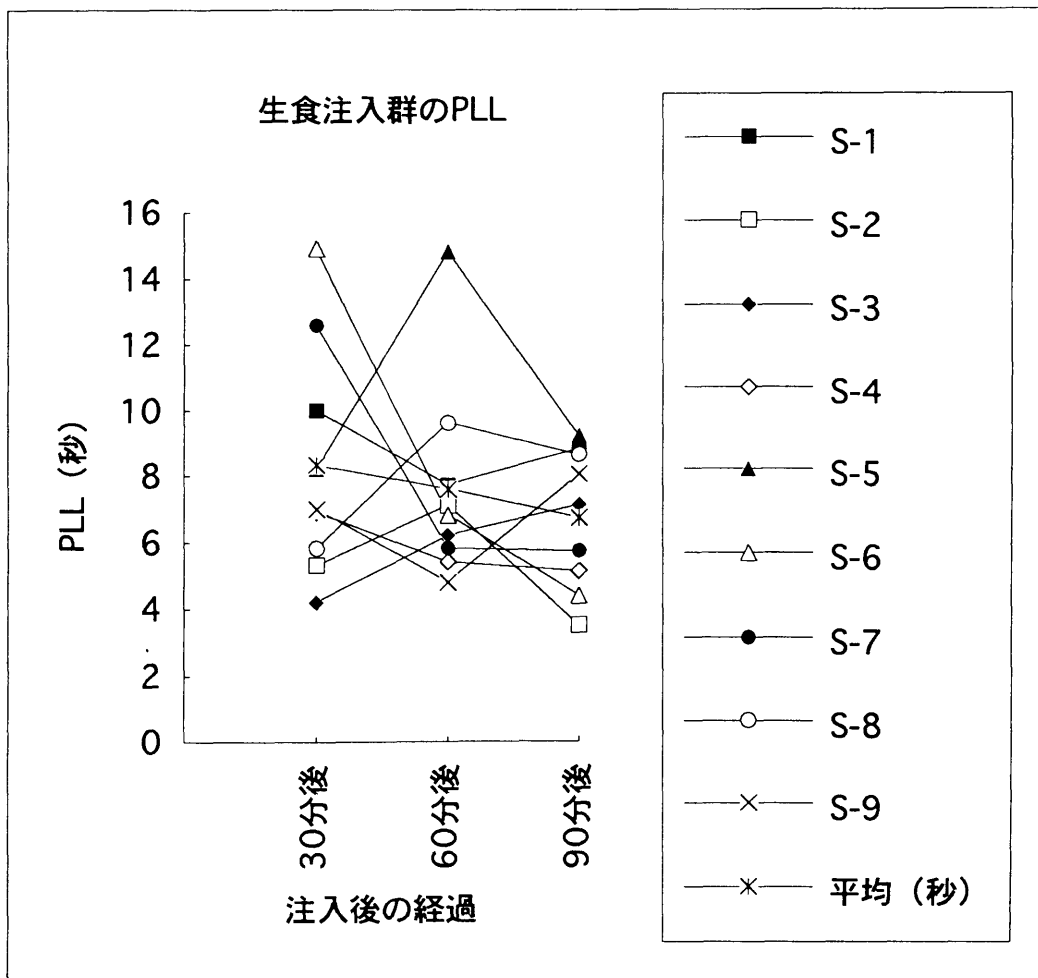


Fig 1

	30分後	60分後	90分後	120分後
M-1	60	60	11.6	3.8
M-2	20	5	15.6	9.7
M-3	13.8	23	14.9	9.4
M-4	60	60	4.7	5.3
M-5	60	60	6.3	5.9
M_6	60	60	19	4
M-7	60	60	60	60
M-8	60	60	8.8	5.7
M-9	60	60	24	20
M-10	60	60	17	15
平均 (秒)	51.38	50.8	18.19	13.88

Table 2

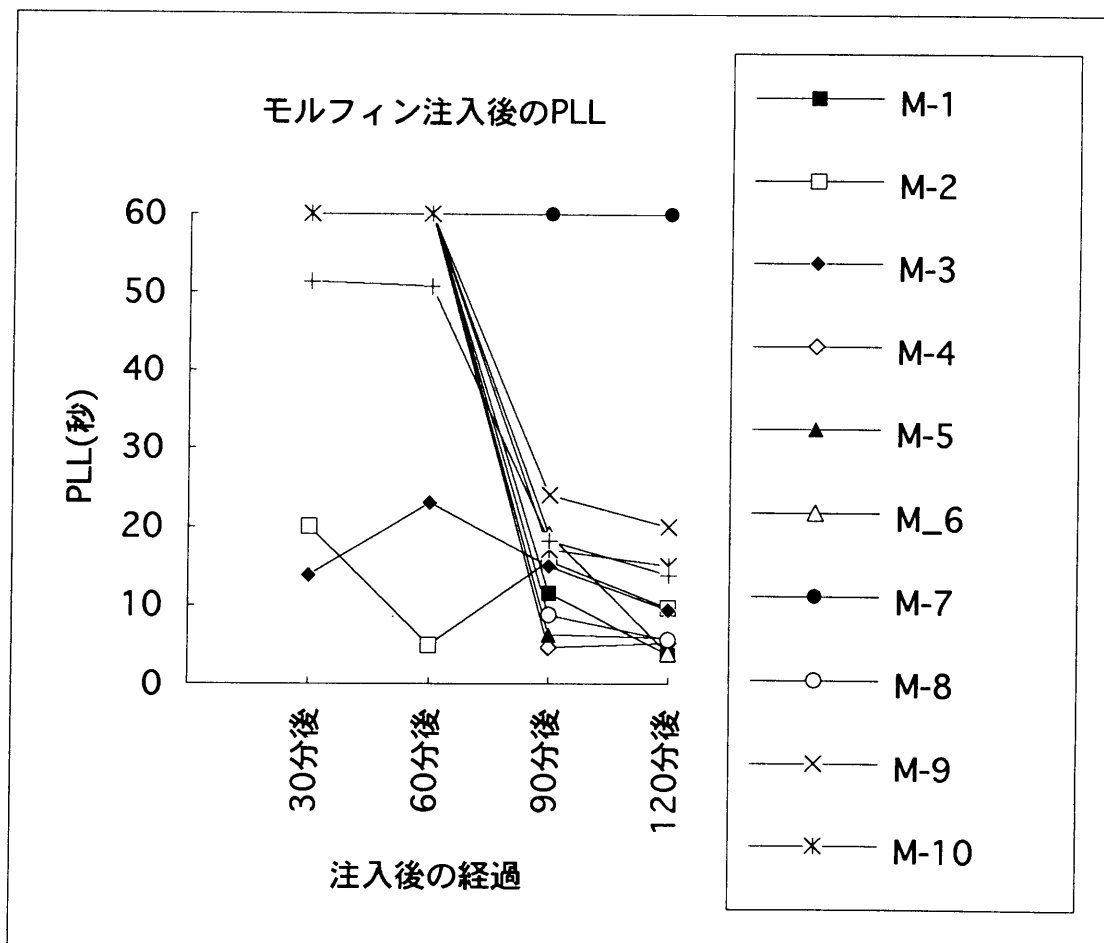


Fig 2

	30分後	60分後	90分後	120分後
PAG-1	60	60	24.6	13.6
PAG-2	60	60	18.9	11.2

Table 3

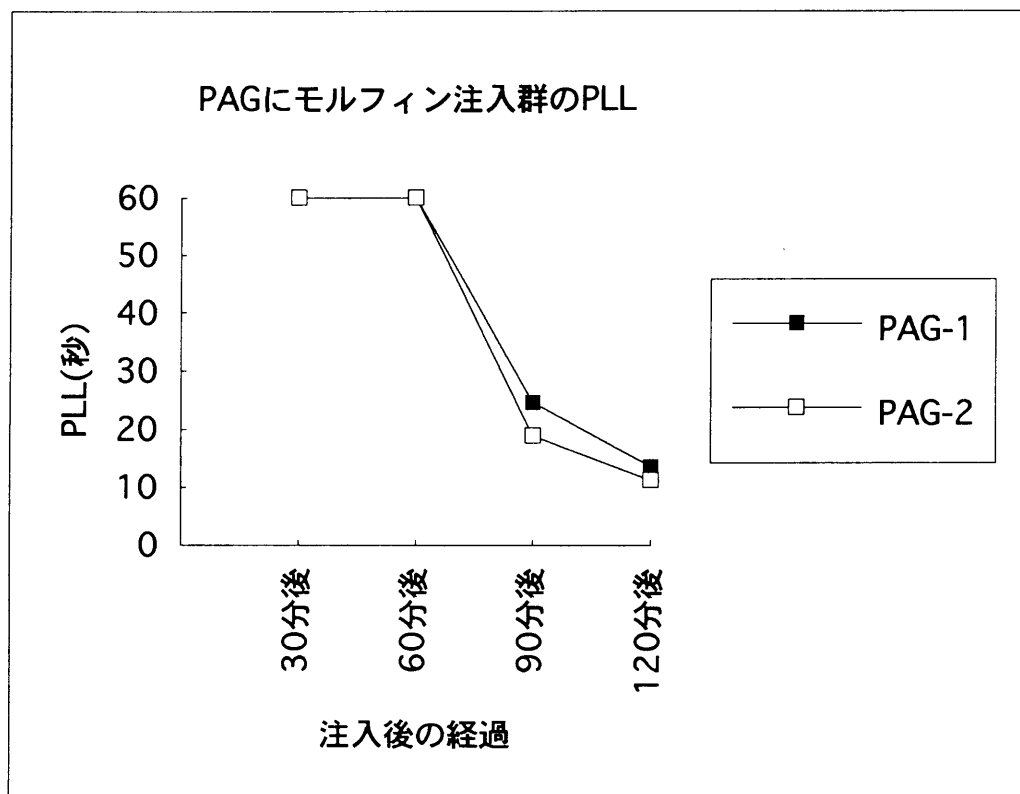


Fig 3

	15分後	30分後	60分後	90分後	120分後
M-1	60	60	60	11.6	3.8
M-2	36.3	30.6	20.5	11.4	19.2
M-4		60	60	14	7.8
M-6	60	60	60	19.5	4.8
M-8	60	60	60	8.8	5.7
M-9		60	60	24.6	20.7
M-10	60	60	60	17	15

average-M	55.26	55.80	54.36	15.27	11.00
average-NL	30.53	46.69	45.14	14.8	13.51

M-1-NL	7.9	60	60	14	11.8
M-2-NL	29.6	25	20.4	12.5	14.6
M-4-NL	32.6	45.6	36.8	13.5	18.5
M-6-NL	29.6	40.7	46.7	16.8	12.2
M-8-NL	30.6	40.5	44.3	12.8	10.5
M-9-NL	23.4	55	47.8	19	17
M-10-NL	60	60	60	15	10

Table 4

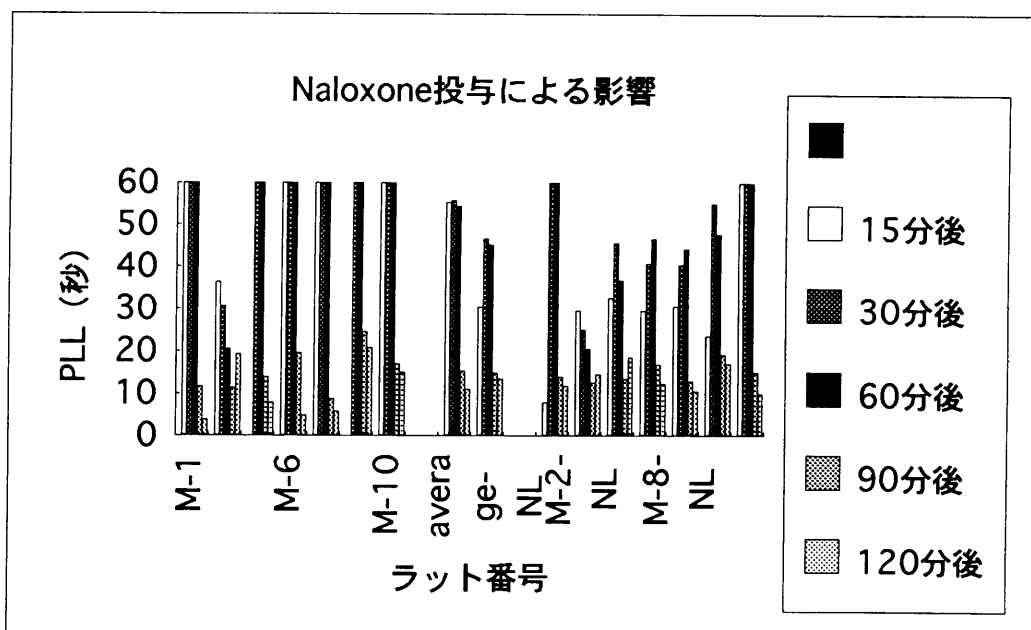


Fig 4

	30分後	60分後	90分後	120分後
PAG-1	60	60	24.6	13.6
PAG-2	60	60	18.9	11.2
PAG-1-NL	60	37.3	17.4	13.8
PAG-2-NL	60	48.5	12.7	14.5

Table 5

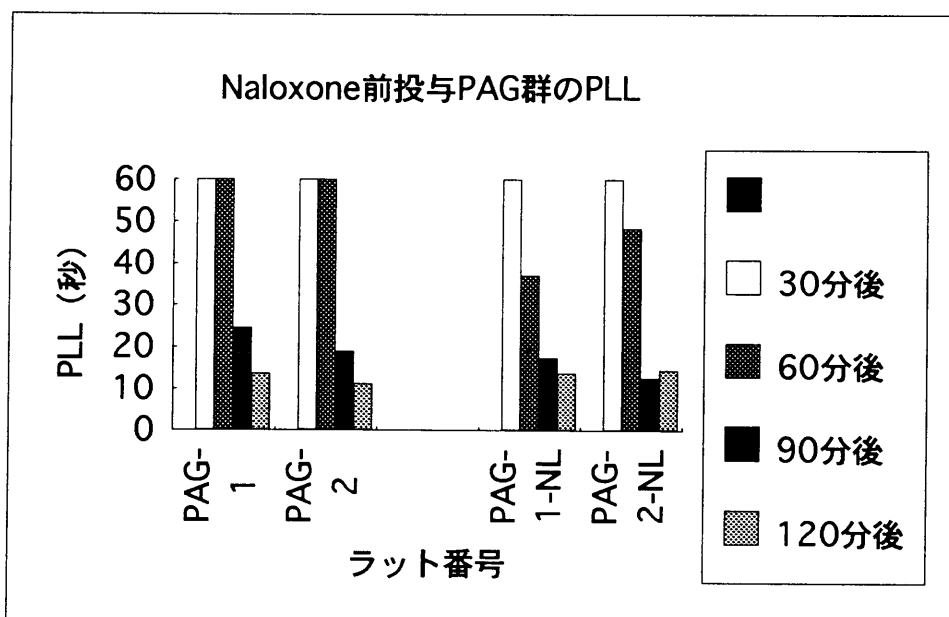


Fig 5

ラット番号	120分	60分	30分	15分
PAG-E	13.6	0.46	0.0	0.0
PAG-S	11.2	1.89	0.0	0.0
PAG-E-NL	13.8	0.74	3.78	0.0
PAG-S-NL	14.8	0.55	4.82	0.0
M-4	0.0	0.0	0.0	0.0
M-9	0.0	0.0	0.0	0.0
M-10	0.0	0.0	0.0	0.0

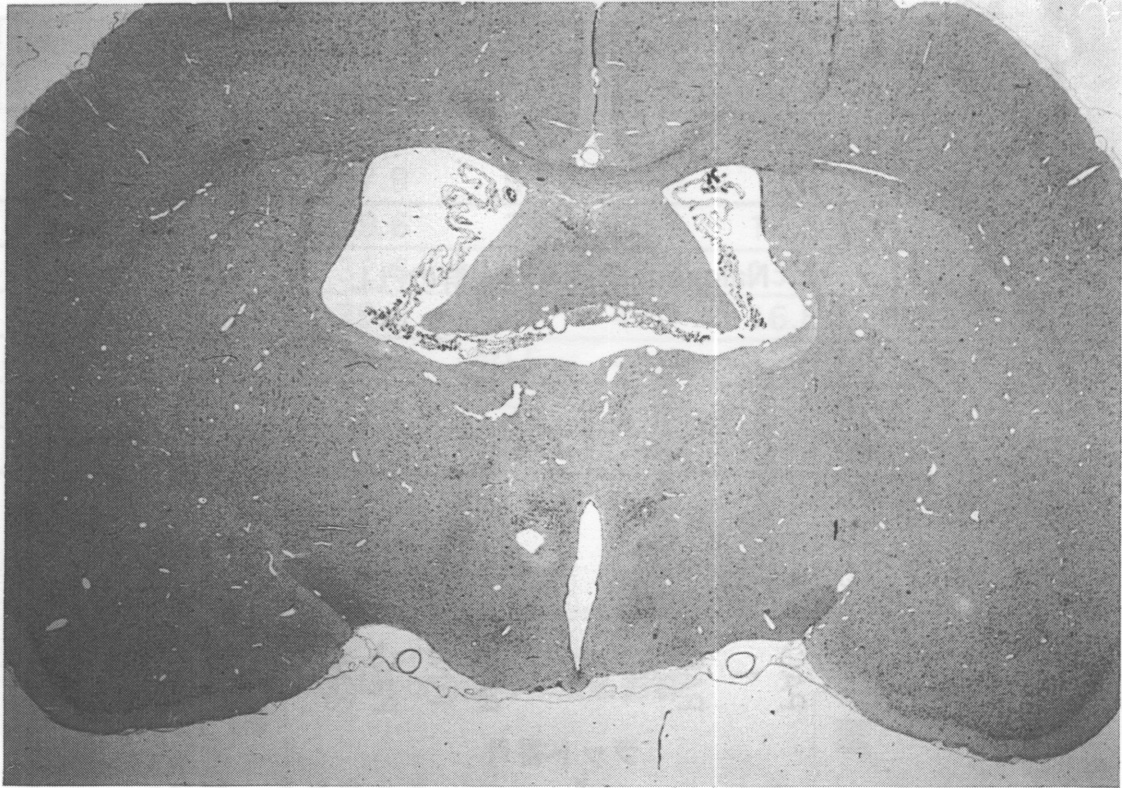


Fig 6

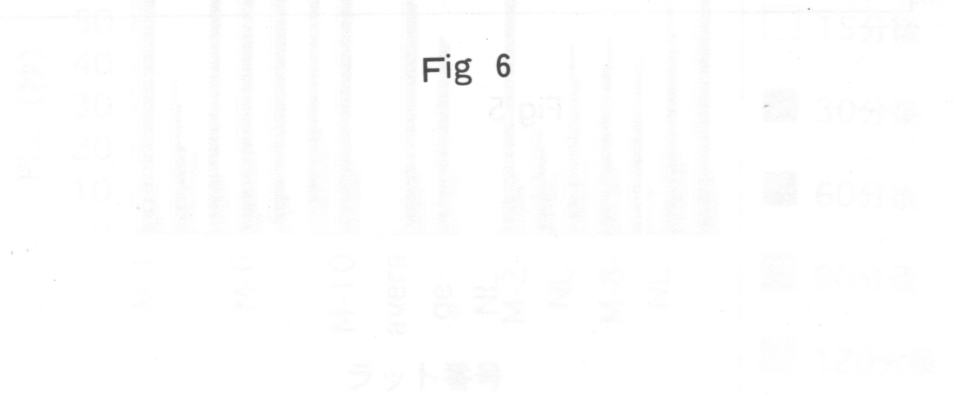


Fig 4

