

原 著

大縫線核セロトニン神経による 疼痛抑制の光遺伝学的解析

¹⁾ 昭和大学医学部生理学講座 (生体調節機能学部門)

²⁾ 慶應義塾大学医学部精神・神経科学教室

³⁾ 昭和大学医学部整形外科学講座

⁴⁾ 昭和大学医学部生理学講座 (生体制御学部門)

三橋 学*^{1,3)} 金丸みつ子¹⁾ 田中 謙二²⁾

吉川 輝¹⁾ 稲垣 克記³⁾ 久光 正⁴⁾

砂川 正隆⁴⁾ 泉崎 雅彦¹⁾

抄録：延髄大縫線核のセロトニン (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 神経は、下行性疼痛抑制系として鎮痛作用を発揮する。一方で、痛みを増強させるという報告もあり、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬の鎮痛薬としての使用が広まるなか、5-HTの疼痛制御に関する検討が必要である。近年、光遺伝学的手法によって大縫線核の5-HT神経を選択的に刺激することが可能になった。本研究では、5-HT系下行性疼痛抑制系の障害が示唆されている間欠的寒冷ストレス (intermittent cold stress, ICS) モデルのマウスを用い、光遺伝学的手法による大縫線核の5-HT神経の選択的的刺激が鎮痛作用を発揮するか検討した。青色光照射で大縫線核の5-HT神経を刺激するため、光感受性チャンネルを5-HT神経細胞に発現させた遺伝子改変マウス (Tph2-tTA::tetO-ChR2 (C128S)) に対し、大縫線核直上に光ファイバーを刺入、留置した。このマウスにICSを与えてICS群とし、青色光照射による大縫線核5-HT神経への刺激が疼痛閾値へ与える効果を行動的な手法で評価した。機械刺激性疼痛試験として von Frey test, 熱刺激性疼痛試験として Hot plate test を用いた。対照群には Sham ICS 処置を行った。ICS群と Sham ICS 処置によるマウス群を比較検討したところ、ICS処置は von Frey test による疼痛閾値を低下させた。しかし、遺伝子改変マウスに青色光照射で刺激をしても、von Frey test による疼痛閾値の変化は認めなかった。一方、Hot plate test で疼痛閾値を評価すると、Sham ICS 処置による疼痛閾値の変化と ICS 処置による疼痛閾値の変化に有意な差はなかった。しかし、曝露処置 (ICS 処置か、Sham ICS 処置か) と時期 (処置前か、処置後か) に関わらず、青色光照射で疼痛閾値が上昇した。つまり、ICS 処置は、von Frey test による疼痛閾値を低下させたが、Hot plate test による疼痛閾値を変化させなかった。一方、青色光照射による大縫線核5-HT神経への刺激は、Hot plate test による疼痛閾値を上昇させたが、von Frey test による疼痛閾値を変化させなかった。以上より、大縫線核の5-HT神経への刺激は、熱刺激性疼痛に対する鎮痛作用を発揮した。一方、ICS 処置で機械刺激性疼痛に対する疼痛閾値は低下したが、その機序に大縫線核の5-HT神経の積極的な関与は示唆されなかった。

キーワード：光遺伝学、大縫線核、セロトニン、疼痛、下行性疼痛抑制系

緒 言

生体において機械的な刺激や熱による刺激は疼痛閾値を超えると痛みとして認知・体験される。痛み

を認知・体験し、それに対し逃避行動をとることは生体の存続に必須であるが、必要以上に痛みが続くと痛みは中枢に作用し、不安や抑うつ、恐怖などの負の情動体験を引き起こす。痛みの伝達を抑制し、

*責任著者

過剰な痛みの認知・体験を軽減させる生体機構が下行性疼痛抑制系である。

侵害受容器からの痛みの情報は、活動電位として末梢神経を経て脊髄後角へ伝達される。脊髄後角で一次ニューロンから二次ニューロンあるいは介在ニューロンを介して二次ニューロンへ伝達され、脊髄内を上行する。さらに脳幹や視床を経由して大脳皮質感覚野や大脳辺縁系に到達する。下行性疼痛抑制系には、橋の青斑核から起こるノルアドレナリン系と、延髄の大縫線核から起こるセロトニン(5-hydroxytryptamine, 5-HT)系があり、それぞれ脊髄後角で活動電位、すなわち痛みの伝達を抑制するとされる¹⁻³⁾。

5-HT神経は中脳の背側縫線核や延髄の大縫線核などにある。背側縫線核の5-HT神経はおもに上行性に投射し、大縫線核の5-HT神経は脊髄を下行して脊髄後角に投射し、下行性疼痛抑制系として鎮痛作用を発揮する。一方で大縫線核の5-HT神経が痛みを増強させるという報告もあり¹⁾、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬の鎮痛薬としての使用が広まるなか、5-HTの疼痛制御に関する検討が求められている。

そこで本研究の目的は、自由運動下のマウスを用い、大縫線核の5-HT神経に鎮痛作用があるかどうかを示すことである。光遺伝学的手法の進歩により、以前よりも選択的な神経刺激が可能となった⁴⁾。5-HT神経の研究においては、光感受性チャンネルを5-HT神経細胞に発現させ、光照射によって5-HT神経を選択的に刺激できる遺伝子改変マウスがある^{5,6)}。一方、一般に間欠的寒冷ストレス(ICS)モデルのマウスは、5-HT系下行性疼痛抑制系の機能低下による痛覚過敏が推測されており、線維筋痛症モデル動物とされる⁷⁾。5-HT神経を選択的に刺激できる遺伝子改変マウスを用い、ICSへの曝露による線維筋痛症モデルを作成した。この遺伝子改変マウスで作成したICSモデルにおいて、青色光照射で大縫線核の5-HT神経を選択的に刺激し、その刺激が鎮痛作用を発揮するか行動学的手法で検討した。

研究方法

1. 研究承認

本研究は、昭和大学動物実験委員会において「動物実験計画書」の承認を得て実施した(平成27年

度)。

2. マウス

セロトニン神経を光遺伝学的に操作するために、チャンネルロドプシン(ChR2)変異体(C128S)を中枢セロトニン神経特異的に発現するマウスを用いた。ChR2の発現にはテトラサイクリン遺伝子発現誘導システムを用いた^{5,6)}。具体的には、トリプトファンヒドロキシラーゼ2(Tph2)遺伝子のプロモーター制御下でtTA(テトラサイクリン制御性トランス活性化因子)を発現するマウスB6.Cg-Tg(Tph2-tTA)1Ahkyマウスと、tetO-ChR2(C128S)EYFPカセットを β -actin遺伝子の下流にノックインしたマウスB6;129B6(Cg)-Actb<tml(tetO-ChR2*C128S/EYFP)Kftnk>マウスの2種類を交配させて得られるダブルトランスジェニックマウス(Tph2-tTA::tetO-ChR2(C128S)EYFP)を用いた。両系統のマウスは、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して、理研BRCから提供された。PCR法にてそれらを判別し、脳5-HT神経細胞に光感受性チャンネルを持つヘテロ型のTph2-tTA::tetO-ChR2[C128S]-EYFPダブルトランスジェニックマウスをBigenic群、それ以外の光感受性チャンネルを発現していないマウスをControl群とした。実験はBigenic群22匹、Control群18匹で計40匹のマウスを用いた。

3. 光ファイバーの刺入

実験対象となるすべてのマウスに光ファイバーの刺入を麻酔下に行った。光ファイバーを含め青色光の照射に用いる機器はワイヤレスで照射を操作できるテレオプト(バイオリサーチセンター株式会社、名古屋)を使用した。

三種混合麻酔薬(medetomidine/midazolam/butorphanol:0.3/4/5 mg/kg)をマウスの腹腔内に注射し、麻酔が効いた段階で脳定位固定装置にマウス頭部を固定し、皮膚切開・頭蓋骨に骨孔を作成し、光ファイバーを三次元的に脳内に刺入し頭蓋骨にセメントで固定した。光ファイバーの刺入位置は、延髄大縫線核の直上となるようブレグマから尾側へ5.88 mmの正中で、脳の背側表面から4.25 mm腹側へ刺入した。

4. 実験

1) 実験1 ICS処置前(Fig. 1A)

光ファイバーの刺入後に1週間のリカバリー期間

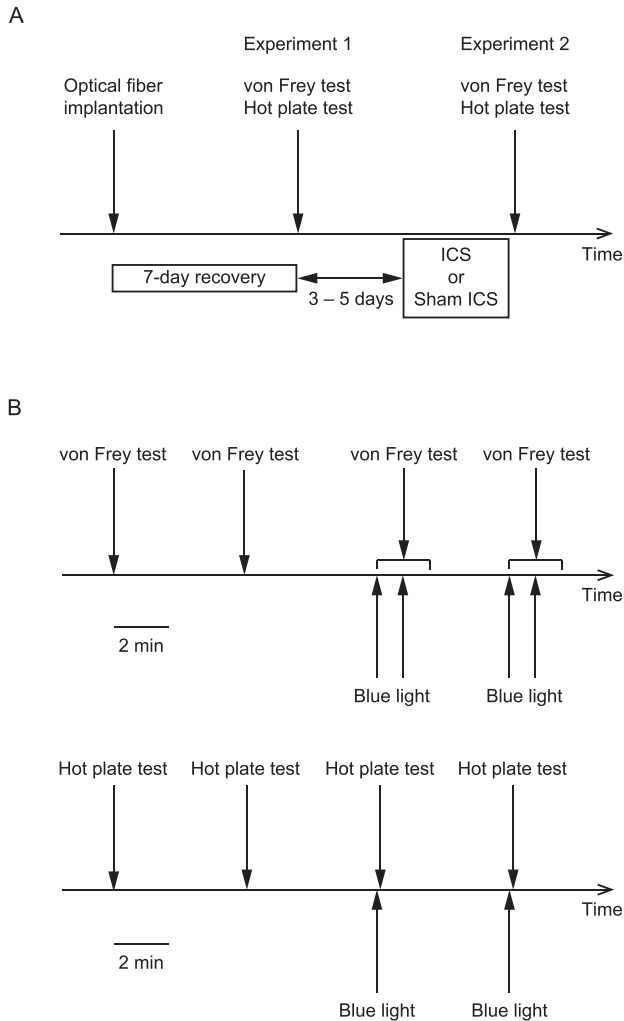


Fig. 1 (A) Study protocol. (B) The von Frey test was performed twice before blue light illumination was given and then twice again after the illumination (upper panel). Following the von Frey test, the hot plate test was performed twice before blue light illumination was given and then twice again after that (lower panel).

を設け、ICS 負荷実施前に実験1を行った。Bigenic 群と Control 群において、光ファイバーからの青色光パルス（波長 470nm, 時間 500ms）で大縫線核の 5-HT 神経を刺激し、その後に疼痛閾値が変化するか評価した。

疼痛閾値は von Frey test と Hot plate test で評価した。von Frey test では、マウスの足底に対し垂直にナイロン製のフィラメントを押し当て、足を上げて逃避行動を示すフィラメントの太さを計測

し、機械刺激性疼痛に対する疼痛閾値を測定した。Hot plate test では、52.5℃ に熱せられた金属製のプレートの上にマウスを置き、足底を舐めるもしくは飛び跳ねるといった逃避行動が出現するまでの潜時を計測し、熱刺激性疼痛に対する疼痛閾値を測定した。Hot plate test では組織障害は起こさないとされる 60 秒をカットオフ値とした。

von Frey test と Hot plate test は、青色光の照射前と照射後でそれぞれ 2 回ずつ測定し、その平均値をその個体の疼痛閾値とした (Fig. 1B)。最初に von Frey test から実施した。青色光を照射前では、マウスの動きが落ち着いた時点で最初の von Frey test を実施した (照射前 1 回目)。この最初の von Frey test 終了後から 5 分以上の間隔を確保して、2 回目の von Frey test を行った (照射前 2 回目)。次に青色光照射後の von Frey test を実施した。まず青色光を 1 回照射し、その照射から 1 分後に追加照射を実施した。最初の照射から 2 分以内で、マウスの動きが落ち着いた時点で von Frey test を実施した (照射後 1 回目)。照射後 1 回目の von Frey test 終了後から 5 分以上の間隔を確保して、同様に 2 回目の von Frey test を行った (照射後 2 回目)。von Frey test と次の Hot plate test との間には 30 分以上の間隔を確保した。

続く Hot plate test では、青色光を照射前にマウスをプレートへ移して 1 回目の測定を行った (照射前 1 回目)。この最初の Hot plate test 終了後から 5 分以上の間隔を確保して、2 回目の Hot plate test を行った (照射前 2 回目)。次に青色光照射後の Hot plate test を実施した。青色光を 1 回照射してすぐにマウスをプレートへ移して 1 回目の測定を行った (照射後 1 回目)。最初の Hot plate test が終了してから 5 分以上の間隔を確保し、再度 1 回照射してすぐにマウスをプレートへ移し、2 回目の測定を行った (照射後 2 回目)。

2) 実験 2 ICS 処置後 (Fig. 1A)

実験 1 から 3 日から 5 日後に ICS 処置または Sham ICS 処置を開始した。マウスは Bigenic 群、Control 群を、それぞれ ICS 処置をする群 (ICS 群) と Sham ICS 処置をする群 (Sham ICS 群) に分けた。ICS 処置は 4 日間かけて行った。1 日目は PM4:30 から 4℃ (±2℃) の冷温室に一晩曝露させた。2 日目の AM10:00 に冷温室から 24℃ (±2℃)

の常温室へ移して30分間曝露させ、その後再度冷温室に30分間曝露させた。PM4:30まで冷温室と常温室へ交互に30分間ずつ曝露させる作業を繰り返し、PM4:30に冷温室に戻しもう一晚曝露させた。3日目のAM10:00からも2日目と同様の作業を行い、PM4:30に冷温室に戻しさらに一晚冷温室に曝露させた。4日目のAM10:00に冷温室から取り出してICS処置完了とした。それに対しSham ICS群は4日間を常温室のみに曝露した。部屋の移動やケージの大きさなど温度以外の条件は等しくした。

実験1と同様に、von Frey testとHot plate testにおける青色光パルス照射前後での疼痛閾値を測定した (Fig. 1B)。なお、この実験はICS処置またはSham ICS処置が終了してから、1時間経過後に開始した。

5. 統計

疼痛閾値の変化は、Bigenic群、Control群それぞれにおいて、三元配置分散分析で解析し (IBM SPSS statistics, 日本IBM, 東京), 主効果および交互作用を検討した。独立要因として、曝露処置 (Exposure: Sham ICS処置とICS処置の2水準) の1要因、被験者内の繰り返し要因として、時期 (Time: 曝露処置前と曝露処置後の2水準) と青色光照射 (Blue light: 照射前と照射後の2水準) の2要因を設定した。 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結 果

実験1と実験2で得られたvon Frey testの結果をFig. 2, Hot plate testの結果をFig. 3に示す。図中 (Fig. 2, 3) で△ Before sham ICSまたは○ Before ICSとあるのは、実験1で得られたデータである。▲ After sham ICSまたは● After ICSとあるのは、実験2で得られたデータである。

Control群でSham ICS処置を受けたマウスは8匹、ICS処置を受けたマウスは10匹であった。Bigenic群でSham ICS処置を受けたマウスは7匹、ICS処置を受けたマウスは15匹であった。その15匹のうち、2匹がICS処置中に死亡した。この2匹のデータはすべて採用しなかった。さらに、残りの13匹のうち、1匹でvon Frey test中に光ファイバーが外れ、ICS処置後のvon Frey testのデータ1匹分が欠測となった。このマウスのICS処置前のvon

Frey test データも採用しなかったため、Bigenic群でICS処置を受けたマウスでは12匹のデータを採用した (Fig. 2, 右下パネル, ● After ICS, $n=12$)。Hot plate testは死亡した2匹を除く13匹で実施できた (Fig. 3の右下パネル, ● After ICS, $n=13$)。

1. von Frey test (Fig. 2)

Figure 2の上段にControl群でのvon Frey testの結果を示す。三元配置分散分析の結果、Control群において、交互作用の「時期 (Time) × 曝露処置 (Exposure)」および「曝露処置 (Exposure) × 青色光照射 (Blue light)」がそれぞれ有意であった (Table 1, 順に $P < 0.001$, $P = 0.019$)。有意な交互作用「時期 (Time) × 曝露処置 (Exposure)」が示唆するのは、時期の違い (Time: 曝露処置前と曝露処置後) による疼痛閾値の変化度は、曝露処置の種類 (Exposure: Sham ICS処置とICS処置) によって異なるということである。Figure 2の上段のパネルを左右で比較すると、Sham ICSの後に疼痛閾値は上昇したが (青色光照射前のデータでは4.14から4.19へ上昇, 青色光照射後のデータでは4.15から4.20へ上昇, 左上パネル), ICS処置の後に疼痛閾値が低下していた (青色光照射前のデータでは4.18から4.12へ低下, 青色光照射後のデータでは4.16から4.10へ低下, 右上パネル)。一方、有意な交互作用「曝露処置 (Exposure) × 青色光照射 (Blue light)」が示唆するのは、青色光照射 (Blue light: 照射前と照射後) による疼痛閾値の変化度は、曝露処置の種類 (Exposure: Sham ICS処置とICS処置) によって異なるということである。青色光照射の前後で疼痛閾値を比較すると、Sham ICS群でわずかに増加し (Sham ICS処置曝露前で4.14から4.15へ増加, Sham ICS処置曝露後で4.19から4.20へ増加), ICS群でわずかに低下した (ICS処置曝露前で4.18から4.16へ低下, ICS処置曝露後で4.12から4.10へ低下)。

Figure 2の下段にBigenic群でのvon Frey testの結果を示す。Bigenic群では、「曝露処置 (Exposure)」, 「時期 (Time) × 曝露処置 (Exposure)」, 「曝露処置 (Exposure) × 青色光照射 (Blue light)」がそれぞれ有意であった (Table 1, 順に $P = 0.048$, $P = 0.011$, $P = 0.044$)。有意な交互作用「時期 (Time) × 曝露処置 (Exposure)」が示唆するのは、時期の違い (Time: 曝露処置前と曝露処置後) による疼痛閾値

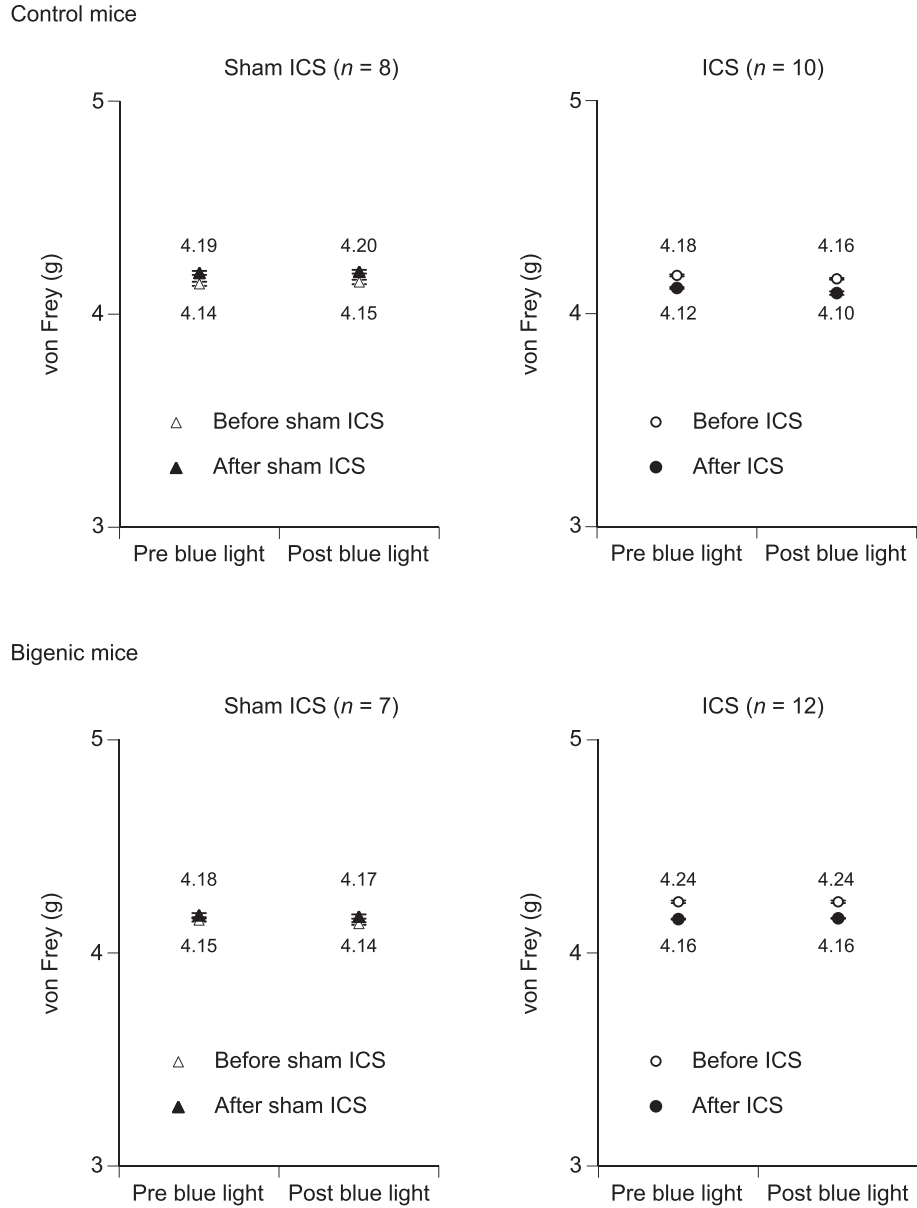


Fig. 2 Effects of blue light pulses on mechanical pain thresholds in the von Frey test. Pooled data from 18 control mice (upper panels) and 19 bigenic mice (lower panels) before (\triangle) and after (\blacktriangle) sham ICS (left panels) and before (\circ) and after (\bullet) ICS (right panels). Values are means \pm standard error of the mean.

の変化度は、曝露処置の種類 (Exposure: Sham ICS 処置と ICS 処置) によって異なるということである。つまり、Sham ICS 処置の後では疼痛閾値が上昇したが (左下パネル、青色光照射前で 4.15 から 4.18 へ上昇、青色光照射後で 4.14 から 4.17 へ上昇)、ICS 処置の後では疼痛閾値が低下した (右下パネル、青色光照射前で 4.24 から 4.16 へ低下、青

色光照射後で 4.24 から 4.16 へ低下)。有意な交互作用「曝露処置 (Exposure) \times 青色光照射 (Blue light)」が示唆するのは、青色光照射 (Blue light: 照射前と照射後) による疼痛閾値の変化度は、曝露処置の種類 (Exposure: Sham ICS 処置と ICS 処置) によって異なるということである。青色光照射による疼痛閾値を照射の前後で比較すると、Sham

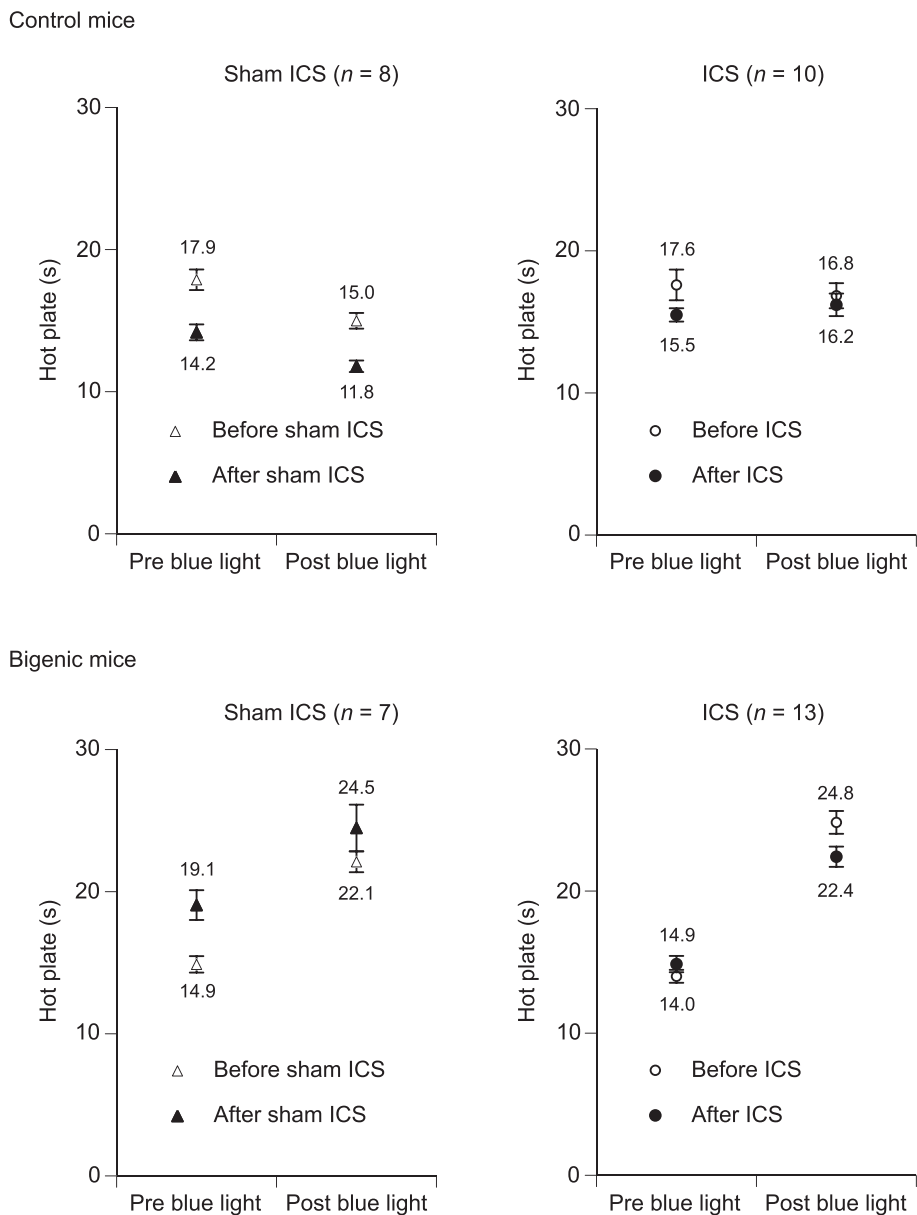


Fig. 3 Effects of blue light pulses on thermal pain thresholds in the hot plate test. Pooled data from 18 control mice (upper panels) and 20 bigenic mice (lower panels) before (\triangle) and after (\blacktriangle) sham ICS (left panels) and before (\circ) and after (\bullet) ICS (right panels). Values are means \pm standard error of the mean.

ICS群でわずかに低下し (Sham ICS 処置曝露前で 4.15 から 4.14 へ低下, Sham ICS 処置曝露後で 4.18 から 4.17 へ低下), ICS 群では変化しなかった (ICS 処置曝露前で 4.24 のまま, ICS 処置曝露後で 4.16 のまま).

以上をまとめると, Control 群と Bigenic 群の両群において, ICS 処置にて von Frey test での疼痛

閾値が低下した. Control 群で青色光照射による極めて小さい疼痛閾値の低下を認めたが, Bigenic 群では青色光照射による疼痛閾値の変化は認めなかった.

2. Hot plate test (Fig. 3)

三元配置分散分析の結果, Control 群では主効果, 交互作用のいずれも有意ではなかった. 一方,

Table 1 *P* values in three-way ANOVA for Figs. 2 and 3

| | Control mice | | Bigenic mice | |
|------------------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | von Frey test | Hot plate test | von Frey test | Hot plate test |
| Time | 0.578 | 0.108 | 0.186 | 0.552 |
| Exposure | 0.269 | 0.496 | 0.048* | 0.651 |
| Blue light | 0.238 | 0.298 | 0.136 | < 0.001* |
| Time × Exposure | < 0.001* | 0.475 | 0.011* | 0.339 |
| Time × Blue light | 0.697 | 0.499 | 0.144 | 0.513 |
| Exposure × Blue light | 0.019* | 0.307 | 0.044 | 0.171 |
| Time × Exposure × Blue light | 0.864 | 0.738 | 0.496 | 0.846 |

**P* < 0.05

Bigenic 群では「青色光照射 (Blue light)」が有意であった (Table 1, *P* < 0.001). 有意な交互作用は認めなかった. このことは, 曝露処置 (Exposure: Sham ICS 処置と ICS 処置) と時期 (Time: 曝露処置前と曝露処置後) に関わらず, 青色光照射 (Blue light) の照射前と照射後では Hot plate test での疼痛閾値が異なることを示唆する. Figure 3 の下段の左右のパネルから, 曝露処置と時期に関わらず, Bigenic 群では青色光照射 (Blue light) で疼痛閾値が上昇したことがわかる.

考 察

本研究では, 光遺伝学的手法を用いて, 青色光照射でマウスの大縫線核にある 5-HT 神経を刺激し, その刺激が鎮痛作用を持つかどうか, von Frey test と Hot plate test の 2 つの行動学的手法による疼痛閾値の変化で評価した. ICS 処置による線維筋痛症モデルを作成し, Sham ICS 処置によるマウス群と比較検討したところ, ICS 処置は von Frey test による疼痛閾値を低下させた. しかし, Bigenic 群に青色光照射で刺激をしても, von Frey test による疼痛閾値の変化を認めなかった. 一方, Hot plate test で疼痛閾値を評価すると, Sham ICS 処置による疼痛閾値の変化と ICS 処置による疼痛閾値の変化に有意な差はなかった. しかし, 曝露処置 (ICS 処置か, Sham ICS 処置か) と時期 (処置前か, 処置後か) に関わらず, Bigenic 群では青色光照射 (Blue light) で疼痛閾値が上昇した. これらをまとめると, ICS 処置は, von Frey test による疼痛閾値を低下させたが, Hot plate test による疼痛閾値

を変化させなかった. 一方, 青色光照射による大縫線核 5-HT 神経の刺激は, Hot plate test による疼痛閾値を上昇させたが, von Frey test による疼痛閾値を変化させなかった. したがって, 大縫線核 5-HT 神経は, Hot plate test での熱刺激性疼痛に鎮痛効果を発揮したが, ICS 処置による「機械刺激性疼痛の疼痛閾値低下」の機序への積極的な関与は示唆されなかった.

痛み刺激は大きく機械刺激性疼痛, 熱刺激性疼痛, 化学刺激性疼痛の 3 つに分けられ, これらの刺激は C 線維終末や A δ 線維終末の侵害受容器を刺激し, 受容器に活動電位を発生させる⁸⁾. この活動電位は線維を伝わり, 脊髄後角で二次ニューロンへ伝達される. ポリモーダル受容器と呼ばれる C 線維終末の侵害受容器は, 機械刺激, 熱刺激, 化学刺激のいずれも感知することが知られ, 熱刺激性疼痛は主に C 線維を介して二次ニューロンへ伝達されると考えられている. 一方, 機械刺激性疼痛は主に A δ 線維終末の侵害受容器に感知され, この線維を介して二次ニューロンへ伝達されると考えられている⁹⁾. さらに, それぞれの神経線維においても機械刺激や熱刺激に対する応答性や伝導速度でさまざまなタイプが存在することが報告されている⁸⁾. 本研究において, 青色光照射による大縫線核の 5-HT 神経への刺激が Hot plate test での熱刺激性疼痛に鎮痛効果を発揮したことから, 大縫線核の 5-HT 神経は, C 線維を経由する痛みを軽減することが示唆される. 一方, von Frey test の結果から, 大縫線核の 5-HT 神経は, A δ 線維を経由する痛みへ積極的には関与しないことが示唆された.

ICS マウスに代表される線維筋痛症モデル動物では、脊髄、視床において5-HTとノルアドレナリン量の減少が報告され、下行性疼痛抑制系の機能低下による痛覚過敏が推測されている¹⁰⁾。西依らはICS処置において線維筋痛症モデルマウスを作製し、Paw pressure testとPaw flick testを用いて、機械刺激と熱刺激に対する痛覚過敏が生じることを報告している¹¹⁾。また寒冷ストレス負荷時に脊髄において5-HTの合成促進と5-HT代謝回転亢進を伴う5-HT神経の活性亢進が生じるという報告もある^{7,12)}。しかしながら、本研究でのICS処置は、von Frey testによる疼痛閾値を低下させたが、Hot plate testでの疼痛閾値を変化させなかった。一方、青色光照射はvon Frey testによる疼痛閾値を変化させなかった。このことから、本研究では、ICS処置は疼痛閾値を低下させるものの、大縫線核の5-HT神経の関わる下行性疼痛抑制系の機能低下によるものではないと示唆された。

西依らの研究結果との相違は、疼痛評価方法の相違に起因するかもしれない。西依らは、機械刺激に対する疼痛閾値をPaw pressure testで評価し、熱刺激に対する疼痛閾値をPaw flick testで評価している¹¹⁾。山本によると、Hot plate testは熱刺激に対して過敏な状態は観察しにくく、Paw flick testは安定したデータを得るのは難しいとされる¹³⁾。本研究では熱刺激に対する疼痛閾値の評価にHot plate testを用いた。ICS処置による熱刺激への疼痛閾値の低下がはっきりしなかったのは、Hot plate testの特性を考慮する必要がある。

選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)やセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬(SNRI)は下行性疼痛抑制系として働く内因性のセロトニンやノルアドレナリンの再取り込みを阻害することにより、そのシナプス間隙での濃度を上昇させ鎮痛効果を発揮することが報告されている³⁾。ワクシニアウイルス接種家兎炎症皮膚抽出液は大縫線核の5-HT神経の活動電位の発生頻度を増加させ、5-HT系下行性疼痛抑制系を賦活化することで鎮痛作用を発揮することが報告されている¹⁴⁾。これら下行性疼痛抑制系に作用する鎮痛薬が臨床の現場で広まるなかで、侵害受容や下行性疼痛抑制のメカニズムに関しては、いまだ確立した見解は得られていない。本研究で用いた光遺伝学的手法は5-HT神経の

活動を選択的にコントロールでき、原因と結果を特定することに優れている。今後のさらなる研究により5-HT神経の作用機序の解明とその臨床応用が期待される。

自由運動下のマウスにおいて、光遺伝学的手法を用いて大縫線核の5-HT神経を選択的に興奮させ、機械刺激と熱刺激に対する疼痛閾値を評価した。大縫線核の5-HT神経への刺激は、熱刺激性疼痛に対する鎮痛作用を発揮した。一方、ICS処置で機械刺激性疼痛に対する疼痛閾値は低下したが、その機序に大縫線核5-HT神経の積極的な関与は示唆されなかった。

謝辞 マウスの提供をご承諾いただいた名古屋大学の山中章弘先生に深謝いたします。また、マウスの体外受精による系統の立ち上げにご尽力いただいた昭和大学動物実験施設の細野知彦先生に深謝いたします。本研究はJSPS科研費JP16K08529の助成を受けたものです。

利益相反

本研究に関し開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol.* 2002;66:355-474.
- 2) 石川敏三, 松本吉洋, 仲西 修, ほか. 痛みの分子機構 脊髄の神経可塑性と脊髄上位下行性抑制系. *日歯麻会誌.* 2010;38:249-255.
- 3) 川崎康彦, 河野達郎. 脊髄における下行性抑制系の役割. *Brain Med.* 2009;21:251-256.
- 4) Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, *et al.* Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci.* 2005;8:1263-1268.
- 5) Tanaka K, Matsui K, Sasaki T, *et al.* Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. *Cell Rep.* 2012;2:397-406.
- 6) Ohmura Y, Tanaka KF, Tsunematsu T, *et al.* Optogenetic activation of serotonergic neurons enhances anxiety-like behavior in mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014;17:1777-1783.
- 7) Nishiyori M, Nagai J, Nakazawa T, *et al.* Absence of morphine analgesia and its underlying descending serotonergic activation in an experimental mouse model of fibromyalgia. *Neurosci Lett.* 2010;472:184-187.
- 8) 乾 幸二. 痛みの伝導路. *Brain Nerve.* 2012; 64:1215-1224.

- 9) 大島秀規. 疼痛に関与する伝導路と下行性疼痛抑制系. 日大医誌. 2010;69:159-163.
- 10) 歌 大輔, 田口 徹. 線維筋痛症モデルラットにおける末梢および脊髄での侵害情報伝達機構. *PAIN RES.* 2017;32:280-287.
- 11) Nishiyori M, Ueda H. Prolonged gabapentin analgesia in an experimental mouse model of fibromyalgia. *Mol Pain.* 2008;4:52. (accessed 2008 Nov 6)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2596100/pdf/1744-8069-4-52.pdf>
- 12) 長谷川仁美, 藤田晃生, 小口勝司, ほか. 寒冷ストレス誘発鎮痛の発現における中枢モノアミン作動性神経系の役割. 昭和医会誌. 2003;63:314-322.
- 13) 山本達郎. 急性痛みモデル: ホルマリンテスト・Hot plate テスト・Tail flick テストの実験法と意義. 河谷正仁編. 痛み研究のアプローチ. 東京: 真興交易医書出版部; 2006. pp20-26.
- 14) 岡井 恒, 古江秀昌, 吉村 恵. ノイロトロピンによるセロトニン下行性疼痛抑制系の賦活化と鎮痛作用. *PAIN RES.* 2008;23:11-18.

OPTOGENETIC ANALYSIS OF THE DESCENDING PAIN INHIBITORY SYSTEM VIA 5-HT NEURONS IN THE NUCLEUS RAPHE MAGNUS

Manabu MITSUHASHI^{1,3)}, Mitsuko KANAMARU¹⁾, Kenji TANAKA²⁾,
Akira YOSHIKAWA¹⁾, Katsunori INAGAKI³⁾, Tadashi HISAMITSU¹⁾,
Masataka SUNAGAWA¹⁾ and Masahiko IZUMIZAKI¹⁾

¹⁾ Department of Physiology, Showa University School of Medicine

²⁾ Department of Neuropsychiatry, Keio University School of Medicine

³⁾ Department of Orthopedic Surgery, Showa University School of Medicine

Abstract — The descending serotonergic pathways originate from the nucleus raphe magnus (NRM) in the rostroventromedial medulla. These pathways mediate pronociceptive action in addition to antinociceptive action. Pain controlled by manipulating serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) neurons has not yet been evaluated in free-moving animals. In the present study, we used optogenetics to examine how the excitation of intrinsic 5-HT neurons in the NRM affects pain thresholds in free-moving mice exposed to intermittent cold stress (ICS group). The mice (Tph2-tTA::tetO-ChR2[C128S]-EYFP) were anesthetized, and an optical fiber was implanted just above the NRM. After a recovery period of three to five days, the mice in the ICS group were housed at 4°C for three nights, and exposed to room temperatures alternating between 24°C and 4°C every 30 minutes for two days, to induce neurodegeneration. Pain was evaluated before and after blue light illumination to optogenetically stimulate 5-HT neurons in the NRM. The von Frey and hot plate tests were performed as mechanical- and thermal-pain tests, respectively. Blue light illumination increased the pain thresholds of mice in the sham ICS and ICS groups in the hot plate test, but did not affect their pain thresholds in the von Frey test. These findings suggest that 5-HT neurons in the NRM mediating the descending pain inhibitory system increased the thermal-nociceptive threshold.

Key words: optogenetics, nucleus raphe magnus, serotonin, pain, descending pain inhibitory system

〔受付: 12月27日, 2018, 受理: 1月10日, 2019〕