

末梢神経損傷後の侵害受容 1 次ニューロンの収斂投射

岸本宜子

## 抄録

末梢神経切断後に、除神経領域に近接する受容野の侵害刺激に応答する後角内 2 次ニューロン数が増加することが知られている。この増加は損傷神経に含まれる 1 次ニューロンの後角内終末域とその周囲にみられることから、その付近の興奮伝達の効率が上昇し、結果的に 2 次ニューロンの興奮性が上昇したものと考えられる。本研究では、受傷 1 次ニューロンからの侵害情報伝達を受けて興奮する 2 次ニューロンと損傷を免れた 1 次ニューロンからの侵害情報伝達を受けて興奮する 2 次ニューロンをそれぞれ extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化および c-Fos の誘発を指標に免疫二重染色し、その関係を分析した。末梢神経切断後、ラットの後足を熱湯で刺激したところ、切断神経の投射を受ける腰髄後角の領域（切断神経領域）に誘発される Fos 陽性細胞数は未切断と比べて切断 3 日後に大幅に減少したのち増加し、14 日後に対照と同等にまで回復した。熱刺激の 1 時間 45 分後に神経断端に強い電気刺激を 10 分間加えて切断神経領域に誘発されるリン酸化 ERK (p-ERK) 陽性ニューロン数は神経切断の影響を受けなかった。c-Fos/p-ERK 二重陽性ニューロンは切断 3 日後に大幅に減少したのち 7 日後から 14 日後にかけて大幅に増加した。このことから、神経切断後の侵害受容 2 次ニューロンの過剰興奮は末梢から隔離された 2 次ニューロンに対する近隣の 1 次ニューロンからの収斂投射によるものと考えられる。

## 1. 緒言

神経切断により末梢組織からの感覚情報の入力遮断されると、除神経を受けた末梢受容野に痛覚を含む感覚の脱失がおこることが予測される。しかし臨床においては、患者が無感覚以外の感覚異常を訴える症例がみられ、特に痛みを主体とする感覚異常が生じる場合には神経障害性疼痛として区別される。近年、基礎研究の分野では、末梢に加わった侵害刺激によって脊髄や延髄後角侵害受容 2 次ニューロンの活動マーカーで

ある c-Fos の免疫活性を組織化学的に染色する方法により、神経損傷モデルラットの中  
枢神経系に種々の異常が惹起されることが報告されている。神経切断により部分的に神  
経支配から解放された皮膚に侵害刺激を加えると、切断後の急性期には侵害刺激の伝達  
が除神経領域に隣接する健全な神経を介するものみに制限され、後角の 2 次侵害受容  
ニューロンにみられる c-Fos の免疫活性上昇が抑制されるが、慢性期には損傷神経の再  
生を伴わない場合でも c-Fos の誘発が回復する (Sugimoto et al. 1993; Sugimoto 1994a;  
Nomura et al. 2002)。従って、神経切断の慢性期には後角内 2 次ニューロンの侵害入  
力に対する過剰応答が生じている可能性が示唆される。また、神経切断の急性期から慢  
性期にかけての c-Fos 誘発の増加が顕著な領域は損傷 1 次ニューロンの後角内終末域  
とその周囲に限られることから、部分的な除神経を受けた皮膚からの侵害情報は、切断  
を免れた神経の 1 次ニューロンによって、それら 1 次ニューロンの本来の終末域に存在  
する 2 次ニューロンのみならず、末梢受容野から隔離された 2 次ニューロンにまで過剰  
に伝達されている可能性が示唆される (Devor and Wall 1978; Lisney 1983; Markus et  
al. 1984; Hylden et al. 1987)。一方、受傷 1 次ニューロンは細胞死に陥ることなく、  
その多くが長期間にわたって生存し、軸索中枢枝とそのシナプス結合を維持することが  
知られている (Sugimoto and Gobel 1984)。また、神経腫に対する機械的な刺激が痛み  
を誘発することも周知の事実であり、脊髄や延髄の後角に存在する 2 次ニューロンは末  
梢受容野を失ってはいるものの、潜在的には損傷 1 次ニューロンからの情報伝達を受け、  
感覚情報を処理する潜在的能力を維持していると考えられる。事実、切断を受けた神経  
の近位切断端に C-線維を興奮させるに十分な強い電気刺激 (ES) を加えると、後角内  
では慢性期でも急性期と同程度の c-Fos 応答がみられる (Fujisawa et al. 2012;  
Molander et al. 1992)。

c-Fos は種々の刺激によって誘発される転写因子で、脊髄では恒常的な発現はほとん  
ど見られず、末梢からの侵害情報の伝達によってニューロンに誘発され、免疫組織化学

的に検出される (Hunt et al. 1987; Fujisawa et al. 2012)。免疫活性の発現に要する潜時は 60 分程度であり、刺激後約 2 時間をピークに変動する。このため、c-Fos の免疫活性は侵害受容 2 次ニューロンの活動マーカーとして利用される (Hunt et al. 1987)。一方、extracellular signal-regulated kinase (ERK) は mitogen-activated protein kinase ファミリーの一員で、後角では侵害情報の伝達によって急激にリン酸化される (Ji et al. 1999; Ji et al. 2001; Ji et al. 2003; Noma et al. 2008)。このため、リン酸化 ERK (p-ERK) の免疫活性は侵害受容 2 次ニューロンの活動マーカーとして利用されるが、c-Fos と大きく異なる点はその免疫活性の発現潜時と持続時間が極めて短いことで、侵害刺激後 60 分以内に完全に消滅する (Ji et al. 1999; Shimizu et al. 2006)。

本研究の目的は、末梢神経切断後に受傷 1 次ニューロンからの侵害情報の伝達を受けて興奮する後角内 2 次ニューロンと、近隣の領域を支配する切断を免れた神経に含まれる 1 次ニューロンからの侵害情報の伝達を受けて興奮する 2 次ニューロンとを組織化学的に観察し、その関係を分析することである。このため、ラット後足を支配領域とする 3 つの神経のいずれかを切断し、1) 部分的除神経を受けた後足の侵害熱刺激による c-Fos の誘発及び 2) 切断神経の近位断端の ES による ERK のリン酸化を免疫組織化学的に可視化した。ラットの灌流固定時に c-Fos と p-ERK の免疫活性がピークに達するよう、時間差を設定して刺激を行い、2 種の蛍光標識 2 次抗体により二重染色を行った。

## 2. 材料ならびに方法

### 2-1. 実験動物

神経切断手術時に体重 180-200 g の雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。飼育室温は 20 °C に保ち、日照時間は 12 時間、食事と飲水は自由とした。本研究で行った動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)、「実験動物の飼養及び保管などに関する基準」(昭和 55 年総理府告示第 6 号)、米国「実験動

物の管理と使用に関する指針」(1996年改訂 NIH Publications No. 80-23)、および「動物実験指針」(平成15年、岡山大学自然生命科学研究支援センター)、に定められた事項を遵守して行った。特に使用する動物数を可及的に少なくし、すべての実験過程で動物に対する苦痛を最小限にとどめるよう配慮した。

## 2-2. 坐骨神経および伏在神経から侵害情報伝達を受ける2次ニューロンの分布

一側の坐骨神経あるいは伏在神経にC-線維を興奮させるに十分な強度の電気刺激を加え、2時間後に脊髄後角ニューロンにおけるc-Fosの免疫活性を組織化学的に検出した。ペントバルビタールナトリウム麻酔下(50 mg/kg, i. p.)で大腿の中央から膝窩の間で皮膚を切開し、大腿二頭筋を鈍的に剥離し、坐骨神経を露出した(6匹)。伏在神経は、大腿内側面の皮膚を切開し、露出した(6匹)。それぞれ露出した神経に双極電極を設置し、5 mA、5 msの矩形波(5 Hz)で10分間刺激(ES)を行ない(各神経3匹ずつ)、対照として各神経3匹ずつにシャム刺激(0 mA)を行った。なお、この刺激条件は神経束内のC-線維を興奮させるに十分なものとされている(Devor et al. 1983; Molander et al. 1992; Shortland et al. 1998; Tokunaga et al. 1999; Hughes et al. 2008; Fujisawa et al. 2012)。

上記とは別に3匹のラットを用い、坐骨神経と伏在神経の両方の支配を受ける後足全体に侵害熱刺激を加え、2時間後に脊髄後角ニューロンにおけるc-Fosの免疫活性を組織化学的に検出した。なお、侵害熱刺激にもペントバルビタールナトリウム麻酔(50 mg/kg, i. p.)を用いたが、意図的な外科的侵襲を全て省略し、一側の後足を55℃の熱水に10秒間浸漬し、侵害熱刺激とした。刺激の2時間後に左心室より生理食塩液、次いで4%パラホルムアルデヒドを含む0.1 Mリン酸緩衝液(PB、pH 7.4)を灌流した。

第1から第5腰髄（L1-5）を含む脊髄を摘出し、24時間浸漬固定後、20%ショ糖を含むリン酸緩衝生理食塩液（PBS、pH 7.4）に48時間浸漬した。各髄節の境界は、後根が進入している部位をみることにより確認し、L1-L5の吻側尾側の長さを測定した。L1からL5までの組織から厚さ50  $\mu$ m、1枚おきの連続凍結切片を作製し、浮遊切片としてL1からL5髄節の各々を吻側 - 尾側軸に沿った4つのブロックに細分した合計20ブロックのうちの1つに割り当てた。L1からL5の長さは約10.0 mmであったため、1つのブロックに4または5枚の連続切片を含んでいた。切片には、c-Fosタンパクの特異的抗体を用いたperoxidase-anti-peroxidase（PAP）法による免疫組織化学染色を行った。内因性ペルオキシダーゼの除去のため、切片を80%メタノールと0.3%過酸化水素水を含む溶液に1時間浸漬し、次いで3%正常ヤギ血清で1時間処理した後、ウサギ抗c-Fos抗体（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1:8,000）と3日間4  $^{\circ}$ Cで反応させた。その後、切片をヤギ抗ウサギIgG（Cappel West Chester, PA, USA; 1:300）、さらにPAP（Cappel; 1:3,000）と反応させた後、硫酸ニッケルアンモニウム増感ジアミノベンチジン（DAB）法により免疫反応産物の可視化を行った。切片をスライドガラス上にマウントし、空気乾燥後、上昇アルコール系列で脱水し、キシレンで透徹し、封入した。

c-Fos様免疫活性はニューロンの核内に限局していたため、c-Fos様免疫活性を示す顕微鏡像を以後c-Fos様免疫活性陽性ニューロン、略してFos陽性ニューロンと呼ぶ。分析のため、カメラルシダ描画管を使用して、暗視野照明で脊髄の構造を白紙上にトレースし、明視野照明でFos陽性ニューロンをプロットした。3枚の切片をそれぞれのブロックから無作為に選び、Fos陽性ニューロンの数を計測し、3枚の切片の平均値をラットごとに記録した。

### 2-3. 末梢神経切断の効果

ペントバルビタールナトリウム麻酔下に、電極設置と同様の要領で、一側の脛骨神経あるいは伏在神経を露出し、7-0 絹糸で神経を2箇所結紮し、その中間部を切断後、軟組織を縫合した。シャム切断では同様の術式で、結紮および切断を省略した。神経切断あるいはシャム切断の3,7あるいは14日後(各群5匹ずつ)に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で手術側の後足に侵害熱刺激を加え、次いで神経を再露出し、近位断端(あるいはシャム切断を行った神経)に電気刺激を加えた。熱および電気刺激の条件は前述と同様とし、熱刺激の開始および電気刺激の開始は灌流固定の2時間前および15分前とした(図1)。脛骨神経切断(およびシャム切断)では、L4,5を、伏在神経切断(およびシャム切断)では、L1-5を採取した。伏在神経切断(およびシャム切断)では、各髄節を吻尾的に2ブロックに分割し、前述のように後固定および凍結保護を行った後、10  $\mu$ mの凍結切片を作成し、シランコートスライドに貼付して乾燥させた。切片を、ウサギ抗c-Fos抗体(Santa Cruz Biotechnology; 1:8,000;)およびマウスモノクローナル抗リン酸化p44/42 MAPキナーゼ抗体(Cell Signaling, Beverly, MA, USA; 1:2,000)の混合物と室温で48時間反応させ、Alexa-488標識抗ウサギIgG抗体およびAlexa-568標識抗マウスIgG抗体(Molecular Probes, Eugene, OR, USA; 1:1,000)によって可視化した。陰性コントロールでは一次抗体との反応を省略した。反応後の切片は、蛍光観察用封入剤(DAKO Fluorescent Mounting Medium, DAKO, Carpinteria, CA, USA)を用いて封入し、ニコン(日本、東京)蛍光顕微鏡に装着したCCDスポットカメラで撮影を行った。脛骨神経、総腓骨神経および伏在神経からの興奮伝達によってc-Fosあるいはp-ERKを誘発されたと考えられるニューロンの大部分は後角第I,II層に見られ、その位置は吻尾的および内外側的に特徴的な偏りを示した(後述)。このため、脛骨神経切断およびその対照実験ではL4,5境界から吻尾的1mm以内の切片を各個体から無作為に5枚抽出し、I,II層に見られるc-Fos陽性、p-ERK陽性および二重陽性細胞数を内外側的な位

置情報とあわせて記録した。伏在神経切断に関してはL1-5の各髄節をそれぞれ2分した合計10の吻尾的レベルごとに3枚の切片を無作為に抽出し、それらに含まれる陽性細胞数の平均値を個体毎に記録した。

## 2-4. 統計学的分析

データは平均値±標準偏差で表し、統計学的分析には一元配置分散分析(ANOVA)の後、Tukey-KramerテストまたはStudent's *t*検定を用い、有意水準は、0.05とした。

## 3. 結果

### 3-1. 坐骨神経および伏在神経に対応する後角ニューロンの体部性局在

坐骨神経のシャムESでは、同側の後角I/II層に少数のFos陽性細胞(境界明瞭な楕円形を示し、直径5-8  $\mu$ m)が観察された。陽性細胞は、吻尾的にはL1からL5にみられ、L4/5の境界部に集中する傾向がみられたものの、1切片あたりの陽性細胞数は最大でも10個程度であった(図2A, B; 図4)。伏在神経のシャムESでは、L2からL3を中心とするI/II層に、やはり最大でも10個程度の陽性細胞がみられたに過ぎない(図2C, D; 図4)。シャムESの反対側では、いずれの神経についても陽性細胞はほとんどみられないことから、同側のc-Fosは電極設置のための手術の侵襲に対する反応であると考えられる。一方、ESではいずれの神経でも対応するシャムESと比較して極めて多くのFos陽性細胞が観察され、刺激を受けた神経に含まれるC-線維の興奮が2次ニューロンに興奮を伝達した結果であると判断した。

坐骨神経のESでは同側の後角I/II層にFos陽性細胞がみられたが、吻側部(L2, 3)では後角の内側半に限局し、外側半にはほとんど観察されなかった。さらに、内側半の



分布領域内でも陽性細胞は内側部と外側部の2箇所集中し、その中間部には陽性細胞のみ見られない空白部分が存在した(図3 A)。尾側部(L4, 5)では、陽性細胞はI/II層の内側2/3の領域に連続的に分布し、吻側部で見られたような空白は観察されなかった(図3 B)。坐骨神経のESに反応した陽性細胞はL1-5の全域に見られたが、L4/5境界部に最も多かった(図4)。一方、伏在神経のESに反応するFos陽性細胞は同側の後角I/II層に分布し、L2, 3に集中した(図3 C, D; 図4)。この領域は坐骨神経のESに反応するFos陽性細胞の同レベルでの分布領域(内側半)内の空白部分とほぼ一致した。

後足の熱刺激では、刺激側の後角I/II層にFos陽性細胞が観察され(図4)、吻側(L2, 3)ではI/II層の内側半に、尾側(L4, 5)では内側2/3に分布し、これらの領域内に空白部分はみられなかった(図3 E, F)。分析のため、神経のESおよび後足の熱刺激による実験結果を後角の吻尾方向および内外側方向を含む平面上に投影した結果、伏在神経および坐骨神経に含まれるC-線維あるいは侵害受容1次ニューロンからの興奮伝達を受ける2次ニューロンの空間分布はそれぞれの神経に含まれる1次求心ニューロンの終末域の分布(Swett and Woolf 1985)と類似性の高い局在パターンを示すことがわかった(図5)。以後、本論文では、ここに示されたそれぞれの神経のESに反応するFos陽性細胞の分布領域をそれぞれ坐骨神経領域および伏在神経領域と呼ぶこととする。

### 3-2. 二重標識の概要

神経切断の有無に関わらず、後足の熱刺激および神経のESによって刺激側の後角I/II層に多数のFos陽性細胞、p-ERK陽性細胞および二重陽性細胞が誘発された。二重染色によって標識されるc-Fosの免疫反応はニューロンの核内に限局し、濃い赤色の蛍光として観察された(図6 A)。一方p-ERKはニューロンの細胞質にみられ、核周部に広がる緑色の蛍光として観察された(図6 B)。二重陽性細胞では緑色の標識の中に濃い赤

色または黄色に標識された核がみられた(図 6 C)。確認のため、一部のラットで熱刺激または ES を省略して二重染色を行ったところ、二重標識は 1 切片あたり平均 1 個未満でほとんどみられず、熱刺激に対しては Fos の免疫活性を示す核の赤色蛍光のみ(図 6 D-F)、ES では p-ERK を示す核周部の緑色蛍光のみが観察された(図 6 G-I)。このことから Fos 陽性細胞は熱刺激に応答したニューロンを、p-ERK 陽性細胞は ES に反応したニューロンを、二重陽性細胞は 2 種類の刺激の両方に応答したニューロンを示すと言える。

神経切断の有無や手術後の経過日数に関わらず、いずれか一方または両方の抗体によって標識される陽性細胞は検索した全ての髄節で、刺激側の後角 I/II 層の内側部にみられた(図 7, 8)。この領域は本研究で確認された坐骨神経あるいは伏在神経の ES によって c-Fos の誘発を受ける 2 次ニューロンの分布域に含まれ、それら神経を構成する 1 次ニューロンの中枢内終末域(Swett and Woolf 1985)にも完全に包含される。一方、後大腿皮神経の投射領域(Swett and Woolf 1985)に相当する後角の最外側部には 1 切片あたり平均 1 個未満でほとんど標識はみられなかった。

## ・ 伏在神経切断の効果

伏在神経の切断の効果は伏在神経領域で顕著であり、L1 や L4, 5 では大きな影響がみられなかった。一切片あたりの Fos 陽性細胞数はシャム切断で  $11.9 \pm 1.24$  ( $n = 5$ ; 3 日後に 1 匹、7 日後に 2 匹、14 日後に 2 匹刺激を行ったが切断後の時間経過に関わらず有意差はなかった)であったものが切断 3 ( $4.68 \pm 0.41$ ,  $n = 6$ ) および 7 日後 ( $9.52 \pm 2.22$ ,  $n = 6$ ) で有意な減少を示した。14 日後では Fos 陽性細胞 ( $10.7 \pm 1.48$ ,  $n = 6$ ) は増加し、3 日後との間に有意差が検出された。一方、p-ERK 陽性細胞数に対する神経切断の影響は僅少で、切断後の経過時間に関わらず、シャム切断の場合 ( $16.9 \pm 1.77$ ,  $n = 6$ ) と比較して有意差はみられなかった。二重陽性細胞はシャム切断で  $4.59 \pm 0.21$  ( $n = 6$ ) で

あったものが3 ( $1.49 \pm 0.50$ ,  $n = 6$ )および7日後 ( $2.29 \pm 0.45$ ,  $n = 6$ )で有意な減少を示し、14日後には3日後と比較して有意に増加して  $4.06 \pm 0.58$  ( $n = 6$ )となった(図7, 9)。なお、刺激の種類に関わらず何らかの標識を受けた細胞の総数はシャム切断で  $24.2 \pm 1.68$  ( $n = 6$ )であった。3日後に有意な減少 ( $20.0 \pm 0.83$ ,  $n = 6$ )を示したが、7 ( $23.0 \pm 41.4$ ,  $n = 6$ )および14日後 ( $23.9 \pm 1.78$ ,  $n = 6$ )ではシャムとほぼ同様の値を示した。

### ・ 脛骨神経切断の効果

本研究では、後角の坐骨神経領域のうち伏在神経を内包しない部分の内外側径はL4からL5 吻側部にかけて最大となることが示された。この髄節では坐骨神経領域が内側部の脛骨神経領域と腓骨神経領域にほぼ2等分されることが先行研究によって示されている(Swett and Woolf 1985; Sugimoto 1994b)。これらのデータを参考に、脛骨神経切断の効果を標識細胞の内外側分布に関する位置情報と併せて分析するため、L4/5 移行部において、後角 I/II 層を最内側 1/3 (以後、脛骨神経領域と呼ぶ)、最外側 1/4 (後大腿皮神経領域) およびその間に介在する領域 (腓骨神経領域) に区分し、それぞれの領域に分布する標識細胞の数を切片ごとに計数した。

脛骨神経領域において、一切片あたりの Fos 陽性細胞数はシャム切断で  $20.6 \pm 1.38$  ( $n = 5$ ; 3日後に1匹、7日後に2匹、14日後に2匹刺激を行ったが切断後の時間経過に関わらず有意差はなかった)であったものが切断3 ( $5.64 \pm 0.91$ ,  $n = 6$ )および7日後 ( $8.03 \pm 1.52$ ,  $n = 6$ )で有意な減少を示した。14日後では Fos 陽性細胞 ( $15.0 \pm 2.14$ ,  $n = 6$ )は増加し、3日後との間に有意差が検出された。一方、p-ERK 陽性細胞数に対する神経切断の影響は僅少で、切断後の経過時間に関わらず、シャム切断の場合 ( $24.8 \pm 2.71$ ,  $n = 5$ )と比較して有意差はみられなかった。二重陽性細胞はシャム切断で  $11.7$

$\pm 1.07$  ( $n = 5$ )であったものが3 ( $3.19 \pm 0.57$ ,  $n = 6$ )および7日後 ( $5.19 \pm 0.78$ ,  $n = 6$ )で有意な減少を示し、14日後には3日後と比較して有意に増加して  $8.36 \pm 1.43$  ( $n = 6$ )となった(図10)。なお、刺激の種類に関わらず何らかの標識を受けた細胞の総数はシャム切断で  $33.8 \pm 4.80$  ( $n = 5$ )であった。3 ( $26.8 \pm 3.85$ ,  $n = 6$ )および7日後 ( $25.7 \pm 3.79$ ,  $n = 6$ )に若干の減少傾向を示したが、14日後 ( $30.1 \pm 1.56$ ,  $n = 6$ )では3および7日後に比べ増加傾向を示した。

腓骨神経領域において、一切片あたりのFos陽性細胞数はシャム切断で  $13.0 \pm 2.32$  ( $n = 5$ )、3 ( $11.7 \pm 2.00$ ,  $n = 6$ )および7日後 ( $12.2 \pm 1.91$ ,  $n = 6$ )、14日後 ( $13.4 \pm 2.49$ ,  $n = 6$ )においてFos陽性細胞数に有意差はなかった。p-ERK陽性細胞数に対する神経切断の影響も僅少で、切断後の経過時間に関わらず、シャム切断の場合 ( $8.43 \pm 1.03$ ,  $n = 5$ )と比較して有意差はみられなかった。二重陽性細胞に関しても同様にシャム切断の場合 ( $3.13 \pm 0.65$ ,  $n = 5$ )と比較して有意差はみられなかった(図10)。なお、刺激の種類に関わらず何らかの標識を受けた細胞の総数はシャム切断で  $18.3 \pm 19.0$  ( $n = 5$ )、3 ( $17.3 \pm 1.90$ ,  $n = 6$ )および7日後 ( $17.3 \pm 2.65$ ,  $n = 6$ )、14日後 ( $18.4 \pm 2.88$ ,  $n = 6$ )において有意差はなかった。

## 4. 考察

### 4-1. 侵害受容2次ニューロンの活動マーカー

c-Fosの免疫活性は、末梢組織に対する侵害刺激によって特異的に誘発されることから、脊髄後角および延髄後角の侵害受容2次ニューロンの活動マーカーとして多用されてきた(Sugimoto et al. 1993; Nomura et al. 2002)。このため、本研究ではc-Fosをマーカーとして末梢神経損傷による侵害情報伝達の様式を分析したが、二重染色のため、新たにERKのリン酸化をc-Fosと同様のニューロン活動のマーカーとして利用した。

c-Fos の新規合成とは異なり p-ERK は既存の ERK のリン酸化によって生じるため、両者の免疫活性の発現潜時と持続時間およびニューロンの細胞体内での分布領域は大きく異なるが、後角においてはいずれも末梢組織からの侵害情報の伝達を反映するものと考えられている。本研究でも、ES によって誘発された p-ERK 陽性細胞と Fos 陽性細胞の空間的分布パターンはよく一致しており、免疫組織化学的な検出感度に考慮する必要はあるものの、定性的および半定量的な分析においては十分な信頼性があったと考えられる。

#### 4-2. 侵害受容 2 次ニューロンの体部位局在

皮膚の侵害刺激は、脊髄後角および延髄後角の侵害受容ニューロンに、刺激強度依存性に c-Fos を誘発することが知られている。刺激後比較的短い潜時(2 時間以内)で c-Fos の誘発を受けるニューロンの細胞体は後角 I/II 層に集中し、刺激部位に応じた体部位局在性の空間的分布を示す(Hunt et al. 1987; Bullitt 1990; Strassman and Vos 1993; Strassman et al. 1993; Terayama et al. 1997; Nomura et al. 2002)。今回の研究では、切断後の末梢神経に含まれる侵害受容 1 次ニューロンを興奮させる必要から、侵害刺激に替えて C-線維を興奮させるに十分とされる条件で電気刺激 (ES) を行ったが、坐骨神経の ES に応答した Fos 陽性細胞は L1 から L5 尾側部の間の後角内側部に分布し、そのうち L2, 3 の分布領域内には Fos 陽性細胞の欠落する空白領域がみられた。伏在神経の ES では、この空白領域とほぼ一致して、Fos 陽性細胞および p-ERK 陽性細胞が多数誘発された。また後足全体に侵害性熱刺激を加えた場合、Fos 陽性細胞の分布範囲は上記ふたつの神経の電気刺激に応答する領域をあわせたものと一致した。従って、今回用いた ES は特定の神経に含まれる侵害受容 1 次ニューロンを興奮させる手段として適切と考えられ、その刺激によって誘発される Fos 陽性ニューロンの空間的分布は

WGA-HRP などの外因性化学物質をトレーサーとして標識された当該 1 次ニューロンの中  
枢内終末の体部位局在パターンとよく一致している (Swett and Woolf 1985)。なお脛骨  
神経の領域の同定については、L4, 5 において脛骨神経切断の 3 日後にみられる Fos 陽  
性細胞の欠落領域や脛骨神経の ES によって誘発される p-ERK 陽性細胞の分布領域が同  
神経の 1 次ニューロンの中枢内終末域と一致している。

#### 4-3. 神経切断後の侵害刺激に対する後角侵害受容 2 次ニューロンの過剰 応答

伏在神経の切断により後足の熱刺激による c-Fos の誘発は有意に抑制された。この  
抑制は伏在神経領域を含む L2, 3 に見られたが、同領域を含まない L4, 5 では変化は見  
られなかった。L2, 3 での Fos 陽性細胞数の減少は切断 3 日後に著しく、以後回復傾向  
がみられ、14 日後にはシャム切断と同様の水準まで回復した。後足は伏在神経と坐骨  
神経の二者のみによって支配されているため、切断によって後足からの侵害情報の伝達  
は坐骨神経を介するものみに制限されている。したがって切断 3 日後の Fos 陽性細胞  
数は坐骨神経からの侵害情報入力による c-Fos 誘発の基準値であると推定されるが、14  
日後までに起こった Fos 陽性細胞数の回復は、切断神経は軸索の再生を防ぐために結紮  
されているため、見かけ上のものに過ぎない。つまり 3 日後から 14 日後の間の Fos 陽  
性細胞数の増分は坐骨神経からの侵害入力に対する後角ニューロンの過剰応答を反映  
したものと考えられる。脛骨神経切断においても同様に、後角ニューロンの過剰応答が  
検出された。すなわち脛骨神経切断により、脛骨神経と総腓骨神経の両者を介して後足  
からの侵害情報の伝達を受ける L4, 5 において後足の熱刺激による c-Fos の誘発が一旦  
有意に抑制された後、見かけ上の回復を示した。この場合、後角ニューロンは損傷を免  
れた総腓骨神経からの侵害入力に対する過剰応答を示したと考えられる。上記の過剰応

答は切断神経の支配領域に隣接する領域の支配神経からの侵害情報に対するものであったが、損傷神経の電気刺激によって誘発される p-ERK 陽性細胞数は常に一定の値を維持し、神経切断の影響は検出されなかった。従って、神経切断後の後角ニューロンの過剰応答は損傷を受けていない侵害受容 1 次ニューロンからの侵害情報に対するものに限られると考えられる。

#### 4-4. 収斂投射

シヤム切断後に熱刺激を行ない、続いてシヤム切断を行った神経に ES を加えた場合、c-Fos 陽性細胞、p-ERK 陽性細胞及び二重陽性細胞の数は手術後の経過日数に拘らず大きな変動が見られなかったことから、シヤム切断の手術による神経損傷は実験結果に大きな影響を与えなかったものと考えられる。一方、切断による神経損傷は刺激による c-Fos 陽性細胞だけでなく二重陽性細胞の数にも大きく影響し、切断 3 日後に大きく減少した後、14 日後までに再び増加してシヤム切断において見られたのとほぼ同様のレベルに戻った。しかし、シヤム切断後の刺激では、シヤム切断を受けた神経の 1 次ニューロンが熱刺激の侵害情報を伝達することによって接続する後角ニューロンに c-Fos を誘発し、それに加えて ES によって ERK のリン酸化を誘発したはずであり、二重陽性細胞の多くは単一の神経からの侵害情報の伝達を受けたに過ぎないと考えるのが妥当であろう。これに対し、神経切断後に見られた二重標識細胞では、ES による興奮を伝達するのと同じの 1 次ニューロンが熱刺激による侵害情報を伝達することは有り得ない。従って、神経切断後にみられる二重標識細胞は、皮膚からの侵害情報に加えて切断された神経の断端からの情報をうけたと解釈されるべきである。

刺激の種類に拘らず何らかの標識を受けた細胞の総数は、切断後に若干の一過性の減少を示すが 14 日目ではシヤム切断のレベルに回復している。従って、後足からの侵害

情報を受けて興奮する2次ニューロンの総数は神経損傷によって大きく影響されることはないと考えられる。一方 c-Fos 細胞の数は切断3日後と比較して14日後で大きく増加している。これに伴って二重標識細胞にも増加がみられ、特に脛骨神経切断では二重標識細胞が後角の主に脛骨神経領域にみられたことから、二重標識細胞は本来の受容野から隔離された2次ニューロンが近隣の受容野を支配する1次ニューロンの興奮伝達を受けるように変化した結果であると考えられる。

#### 4-5. 過剰興奮のメカニズムと神経障害性疼痛

神経切断後に脊髄後角内で光学顕微鏡的に観察可能な軸索の出芽が起こることが知られているが (McMahon and Kett-White 1991; Woolf et al. 1992)、それは損傷神経の脊髄内投射領域内に限られるきわめて微細な変化であり、本研究で観察されたように脊髄後角内の体性局在の配列を変更するような規模のものではない。一方、Markusら (Markus and Pomeranz 1987; Markus et al. 1984) は伏在神経の末梢受容野に加えられた自然刺激にまったく応答しないが、伏在神経の電気刺激には反応するような脊髄後角ニューロンが坐骨神経の領域に存在することを報告している。本研究でみられた神経切断後の異常な収斂投射は、このように従来から存在した伝達能力の低い収斂性のシナプス回路が末梢神経損傷の結果増強され、シナプス後膜に過剰な脱分極を引き起こしたことを反映するのかもしれない。神経切断によって惹起される2次ニューロンの樹状突起の萎縮 (Sugimoto and Gobel 1984) は、理論的にはシナプス後膜を通過する電流密度を上昇させる効果を持つはずであり、シナプスの伝達効率の上昇に寄与する可能性がある。あるいは損傷神経からの入力を受ける抑制性の介在ニューロンに越シナプス性の変化が起こり、その結果として効率の低かったシナプスの脱抑制が生じた可能性も否定できない。



神経切断の動物実験においてみられるアロディニアや痛覚過敏を含む行動異常 (Yamaguchi et al. 2014; Yamamoto et al. 2015) は臨床において観察される神経障害性疼痛と類似点が多く、本研究で示された神経損傷後の2次ニューロンの収斂投射などの過剰興奮を反映するものと考えられる。本研究は2次ニューロンの過剰興奮の詳細を記述したに過ぎないが、その詳細な発現機序を解明することにより、臨床的に問題となる神経障害性疼痛の治療に向けた研究の進展が期待される。

## 5. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う貴重な機会を与えていただき、終始御懇篤なる御指導と御助言をいただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔機能解剖学分野 杉本朋貞教授に心からの謝意を表します。また、本研究の遂行に際し、終始懇切なる御指導御鞭撻をいただきました口腔機能解剖学分野 寺山隆司准教授に深く感謝致します。最後にさまざまな面で御協力御援助いただきました口腔機能解剖学分野の諸先生方に深く御礼申し上げます。

## 文献

Sugimoto T, Ichikawa H, Hijiya H, Mitani S, Nakago T (1993) c-Fos expression by dorsal horn neurons chronically deafferented by peripheral nerve section in response to spared, somatotopically inappropriate nociceptive primary input. *Brain Res* 621:161–166

Sugimoto T, Hara T, Shirai H, Abe T, Ichikawa H, Sato T (1994a) c-fos induction in the subnucleus caudalis following noxious mechanical stimulation of the oral mucous membrane. *Exp Neurol* 129:251–256

Nomura H, Ogawa A, Tashiro A, Morimoto T, Hu JW, Iwata K (2002) Induction of Fos protein-like immunoreactivity in the trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following noxious and non-noxious mechanical stimulation of the whisker pad of the rat with an inferior alveolar nerve transection. *Pain* 95:225–238

Devor M, Wall PD (1978) Reorganisation of spinal cord sensory map after peripheral nerve injury. *Nature* 276:75–76

Lisney SJ (1983) Changes in the somatotopic organization of the cat lumbar spinal cord following peripheral nerve transection and regeneration. *Brain Res* 259:31–39

Markus H, Pomeranz B, Krushelnycky D (1984) Spread of saphenous somatotopic projection map in spinal cord and hypersensitivity of the foot after chronic sciatic denervation in adult rat. *Brain Res* 296:27–39

Hylden JL, Nahin RL, Dubner R (1987) Altered responses of nociceptive cat lamina I spinal dorsal horn neurons after chronic sciatic neuroma formation. *Brain Res* 411:341–350

Sugimoto T, Gobel S (1984) Dendritic changes in the spinal dorsal horn following transection of a peripheral nerve. *Brain Res* 321:199–208.

Fujisawa N, Terayama R, Yamaguchi D, Omura S, Yamashiro T, Sugimoto T (2012) Fos protein-like immunoreactive neurons induced by electrical stimulation in the trigeminal sensory nuclear complex of rats with chronically injured peripheral nerve. *Exp Brain Res* 219:191–201. doi:10.1007/s00221-012-3078-8

Molander C, Hongpaisan J, Grant G (1992) Changing pattern of c-FOS expression in spinal cord neurons after electrical stimulation of the chronically injured sciatic nerve in the rat. *Neuroscience* 50:223–236

Hunt SP, Pini A, Evan G (1987) Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 328:632–634

Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ (1999) Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci* 2:1114–1119. doi:10.1038/16040

Ji RR, Woolf CJ (2001) Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis* 8:1–10. doi:10.1006/nbdi.2000.0360

Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ (2003) Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci* 26:696–705

Noma N, Tsuboi Y, Kondo M, Matsumoto M, Sessle BJ, Kitagawa J, Saito K, Iwata K (2008) Organization of pERK- immunoreactive cells in trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following capsaicin injection into oral and craniofacial regions in rats. *J Comp Neurol* 507:1428–1440. doi:10.1002/cne.21620

Shimizu K, Asano M, Kitagawa J, Ogiso B, Ren K, Oki H, Matsumoto M, Iwata K (2006) Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in medullary and upper cervical cord neurons following noxious tooth pulp stimulation. *Brain Res* 1072:99–109. doi:10.1016/j.brainres.2005.12.040

Devor M, Govrin-Lippmann R (1983) Axoplasmic transport block reduces ectopic impulse generation in injured peripheral nerves. *Pain* 16:73–85

Shortland P, Molander C (1998) The time-course of abeta-evoked c-fos expression in neurons of the dorsal horn and gracile nucleus after peripheral nerve injury. *Brain Res* 810:288–293

Tokunaga A, Kondo E, Fukuoka T, Miki K, Dai Y, Tsujino H, Noguchi K (1999) Excitability of spinal cord and gracile nucleus neurons in rats with chronically chronically injured sciatic nerve examined by c-fos expression. *Brain Res* 847:321–331

Hughes AS, Averill S, King VR, Molander C, Shortland PJ (2008) Neurochemical characterization of neuronal populations expressing protein kinase C gamma isoform in the spinal cord and gracile nucleus of the rat. *Neuroscience* 153:507–517. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.082

Swett JE, Woolf CJ (1985) The somatotopic organization of primary afferent terminals in the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 231:66–77. doi:10.1002/cne.902310106

Sugimoto T, Ichikawa H, Mitani S, Hitsu A, Nakago T (1994b) Changes in c-fos induction in dorsal horn neurons by hindpaw formalin stimulation following tibial neurotomy. *Brain Res* 642:348-5

Hunt SP, Pini A, Evan G (1987) Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 328(6131):632-634

Bullitt E (1990) Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 296(4):517-530

Strassman AM, Vos BP (1993) Somatotopic and laminar organization of fos-like immunoreactivity in the medullary and upper cervical dorsal horn induced by noxious facial stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 331(4):495-516

Strassman AM, Vos BP, Mineta Y, Naderi S, Borsook D, Burstein R (1993) Fos-like immunoreactivity in the superficial medullary dorsal horn induced by noxious and innocuous thermal stimulation of facial skin in the rat. *J Neurophysiol* 70(5):1811-21

Terayama R, Nagamatsu N, Ikeda T, Nakamura T, Rahman OI, Sakoda S, Shiba R, Nishimori T (1997) Differential expression of Fos protein after transection of the rat infraorbital nerve in the trigeminal nucleus caudalis *Brain Res* 768(1-2):135-46

McMahon SB, Kett-White R (1991) Sprouting of peripherally regenerating primary sensory neurones in the adult central nervous system. *J Comp Neurol* 304:307-315

Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE (1992) Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355:75-78

Markus H, Pomeranz B (1987) Saphenous has weak ineffective synapses in sciatic territory of rat spinal cord: electrical stimulation of the saphenous or application of drugs reveal these somatotopically inappropriate synapses. *Brain Res* 416:315-321

Markus H, Pomeranz B, Krushelnycky D (1984) Spread of saphenous somatotopic projection map in spinal cord and hypersensitivity of the foot after chronic sciatic denervation in adult rat. *Brain Res* 296:27-39

Yamaguchi D1, Terayama R, Omura S, Tsuchiya H, Sato T, Ichikawa H, Sugimoto T (2014) Effect of adenosine A1 receptor agonist on the enhanced excitability of spinal dorsal horn neurons after peripheral nerve injury. *Int J Neurosci* 124(3):213-22. doi: 10.3109/00207454.2013.842566.

Yamamoto Y, Terayama R, Kishimoto N, Maruhama K, Mizutani M, Iida S, Sugimoto T (2015) Activated microglia contribute to convergent nociceptive inputs to spinal dorsal horn neurons and the development of neuropathic pain. *Neurochem Res* 40(5): 1000-1012. doi: 10.1007/s11064-015-1555-8.

## 附図説明

### 図 1

手術、侵害熱刺激、脛骨神経への電気刺激、二重標識のための灌流固定の時間経過

### 図 2

坐骨神経 (A, B) あるいは伏在神経 (C, D) のシャム電気刺激 (0 mA) 後、L3 (A, C) および L5 (B, D) の後角における Fos 陽性細胞を示す。坐骨神経あるいは伏在神経のシャム電気刺激により、後角 I / II 層に少数の Fos 陽性細胞が観察された。

D, L, M, V はそれぞれ D; 背側, L; 外側, M; 内側, V; 腹側を示している。なお、スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

### 図 3

坐骨神経 (A, B) あるいは伏在神経 (C, D) の ES (5 mA)、または後足の侵害熱刺激 (E, F) 後の L3 (A, C, E) と L5 (B, D, F) の後角における Fos 陽性細胞を示す。坐骨神経の ES は吻側および尾側の両方で Fos 陽性細胞が観察された、一方、伏在神経の ES は吻側のみで Fos 陽性細胞が観察された。後足の侵害熱刺激においても吻側および尾側の両方において Fos 陽性細胞が観察された。D, L, M, V はそれぞれ D; 背側, L; 外側, M; 内側, V; 腹側を示している。なお、スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

### 図 4

坐骨神経 (上) あるいは伏在神経 (中央) の ES、後足の侵害熱刺激 (下) 後

の各吻側-尾側レベルでの脊髄後角 I / II 層における Fos 陽性細胞の数。坐骨神経の ES では L1 から L5 に観察され、L4 の尾側と L5 の吻側部分に集中した。伏在神経の電気刺激では L1 から L5 に観察され、L2 から L3 部分に集中した。侵害熱刺激でも L1 から L5 に観察された、それぞれの吻側尾側における陽性細胞の数は坐骨あるいは伏在神経の ES と同等であった。各バーは 3 つの実験個々の平均値 ± SEM 値を表す。

#### 図 5

脊髄後角における坐骨神経および伏在神経の 1 次求心ニューロンの終末域を吻尾方向および内外側方向を含む平面状に投影した略図 (Swett and Woolf 1985)。坐骨神経および伏在神経の ES によって興奮伝達を受ける 2 次ニューロンの空間分布は 1 次求心ニューロンの終末域の分布 (Swett and Woolf 1985) と類似性の高い局在パターンを示していた。

#### 図 6

c-Fos 陽性像、p-ERK 陽性像、二重陽性細胞の例。シヤム手術群における伏在神経の電気刺激と後足の侵害熱刺激後の L3 後角を示す。c-Fos 陽性像 (A; 赤)、p-ERK 陽性像 (B; 緑)、それらを重ね合わせたもの (C)。矢じりは c-Fos 陽性像、矢印は p-ERK 陽性像、二重矢じりは二重陽性細胞を示す。D, E, F は後足への侵害熱刺激後の c-Fos あるいは p-ERK の反応を示し、G, H, I は伏在神経への電気刺激後の反応を示す。なお、スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

#### 図 7

伏在神経損傷およびシヤム手術の 3, 7, 14 日後、後足への侵害熱刺激および伏

在神経へのESを行い、L3後角におけるc-Fos陽性像（赤色）およびp-ERK陽性像（緑色）を重ね合わせた画像。各群一匹の動物からの代表的データを示す。矢じりは後角における二重陽性細胞を示している。c-Fos陽性細胞および二重陽性細胞は、損傷3日後と7日後に減少した。しかし、c-Fos陽性細胞および二重陽性細胞は損傷14日後に増加した。SNI；伏在神経損傷、D、L、M、Vはそれぞれdorsal（背側）、lateral（外側）、medial（内側）ventral（腹側）を示している。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ を示す。

#### 図 8

伏在神経損傷およびシャム手術の3, 7, 14日後、後足への侵害熱刺激および伏在神経へのESを行い、L5後角におけるc-Fos陽性像（赤色）およびp-ERK陽性像（緑色）を重ね合わせた画像。各群一匹の動物からの代表的データを示す。c-Fos陽性細胞の多くは内側2/3に観察されたが、神経損傷後数に変化は認めなかった。p-ERK陽性細胞、二重陽性細胞はほとんど認められなかった。D、L、M、Vはそれぞれdorsal（背側）、lateral（外側）、medial（内側）ventral（腹側）を示している。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ を示す。

#### 図 9

伏在神経損傷およびシャム手術の3, 7, 14日後、後足への侵害熱刺激および伏在神経への電気刺激を行い、各吻側-尾側レベルで後角I/II層におけるc-Fos陽性細胞（上）、p-ERK陽性細胞（中央）および二重標識細胞（下）の1切片当たりの数を示す。c-Fos陽性細胞では、L2, 3において損傷3日後に減少し、二重陽性細胞では損傷3, 7日後に減少した。損傷14日後にc-Fos陽性細胞および二重陽性細胞は増加した。各バーは、個々の実験の平均値 $\pm$ SEM値を表す。

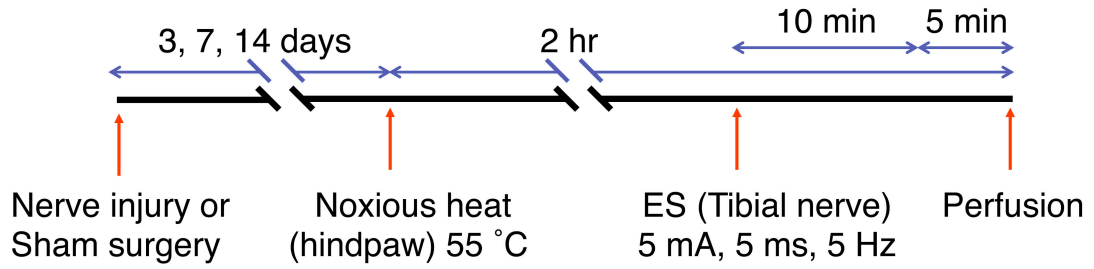


\* $P < 0.05$  (vs sham 手術群)、# $p < 0.05$  (3 日後 vs14 日後)、R;吻側、C;尾側

## 図 10

脛骨神経損傷およびシャム手術の 3, 7, 14 日後、後足への侵害熱刺激および脛骨神経への電気刺激を行い、後角 I / II 層の脛骨神経領域 (左の列) と総腓骨神経領域 (右の列) における c-Fos 陽性細胞 (上)、p-ERK 陽性細胞 (中央) および二重標識細胞 (下) の 1 切片当たりの数を示す。c-Fos 陽性細胞および二重陽性細胞は、損傷 3, 7 日後に減少した。しかし、損傷 14 日後に c-Fos 陽性細胞および二重陽性細胞は増加した。各バーは、個々の実験の平均値  $\pm$  SEM 値を表す。各バーでの\*は、シャム手術群からの有意差を示す。\*\*\* $p < 0.001$ 、## $p < 0.01$  (3 日後 vs14 日後)

☒ 1



☒ 2

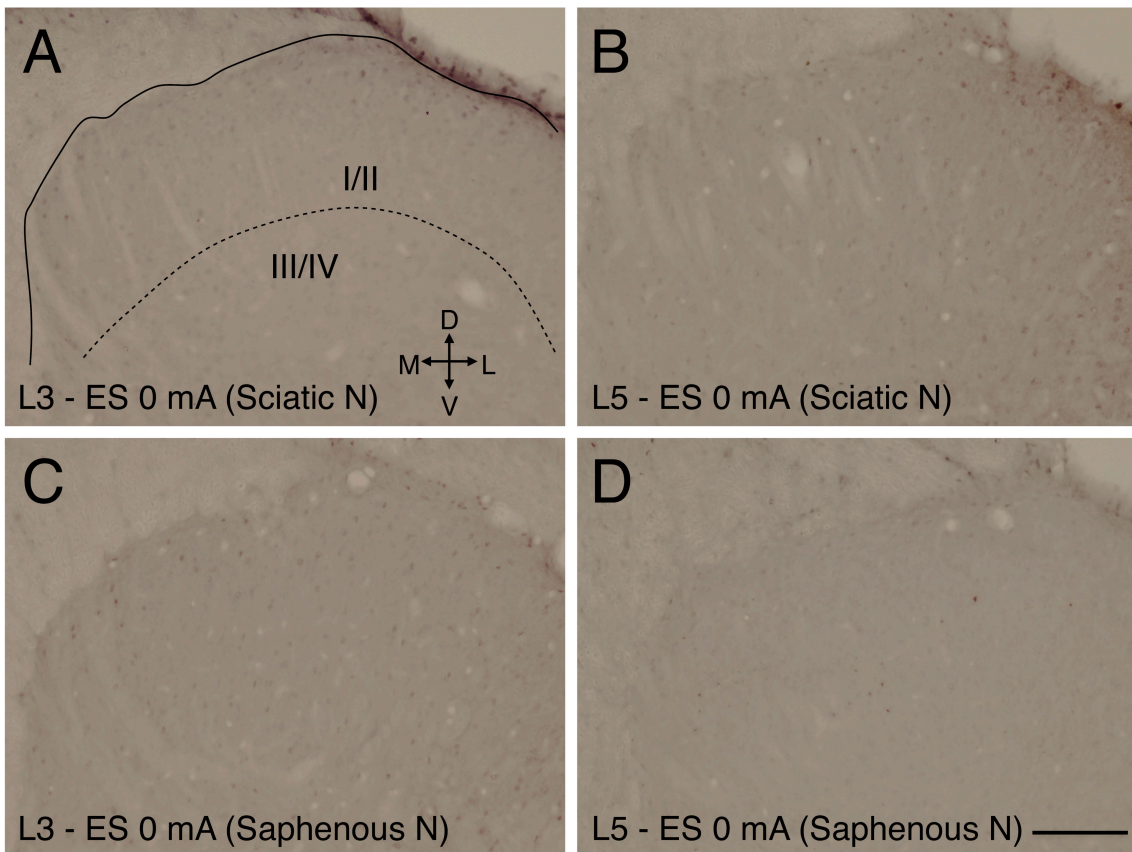


图 3

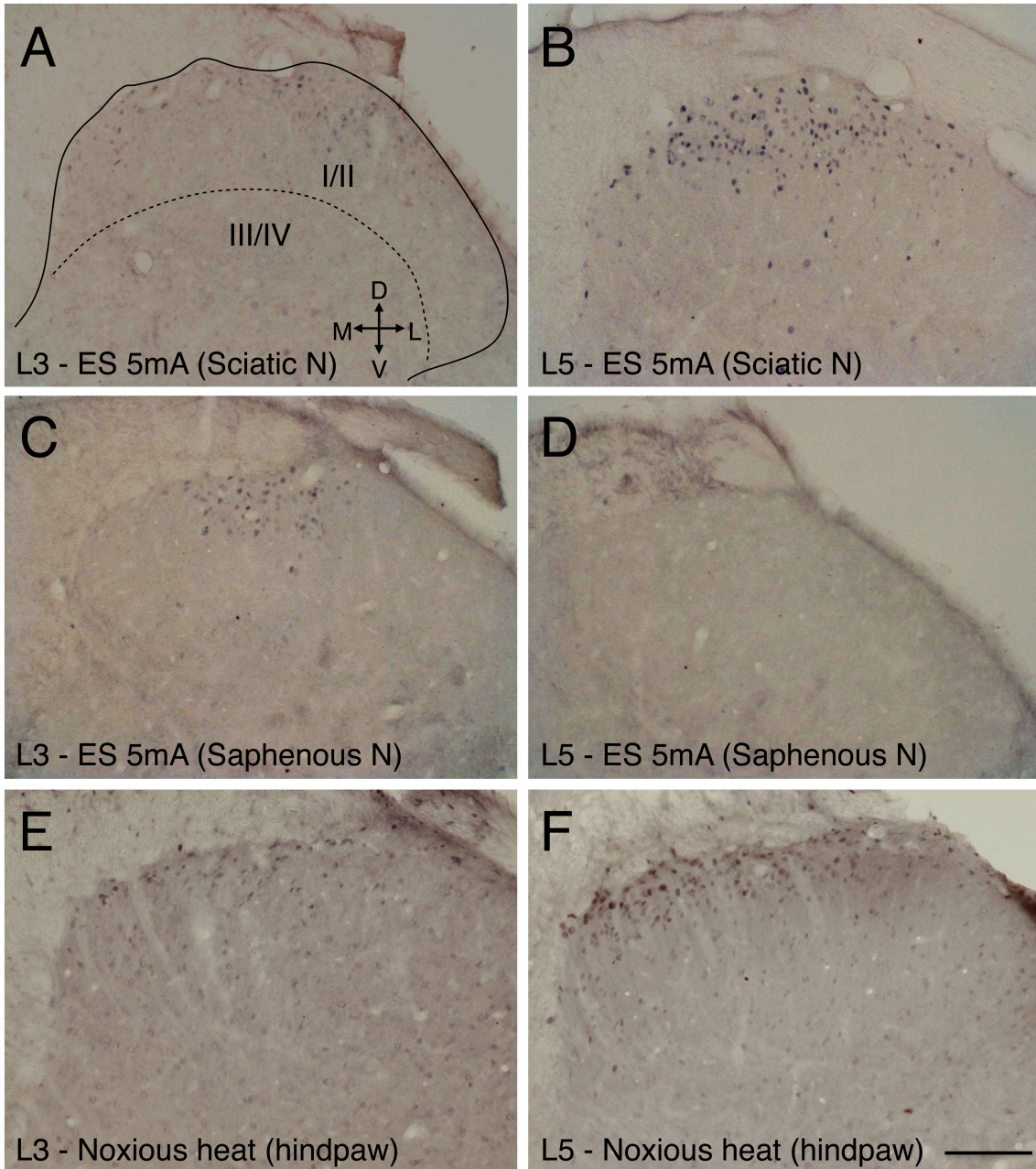


图 4

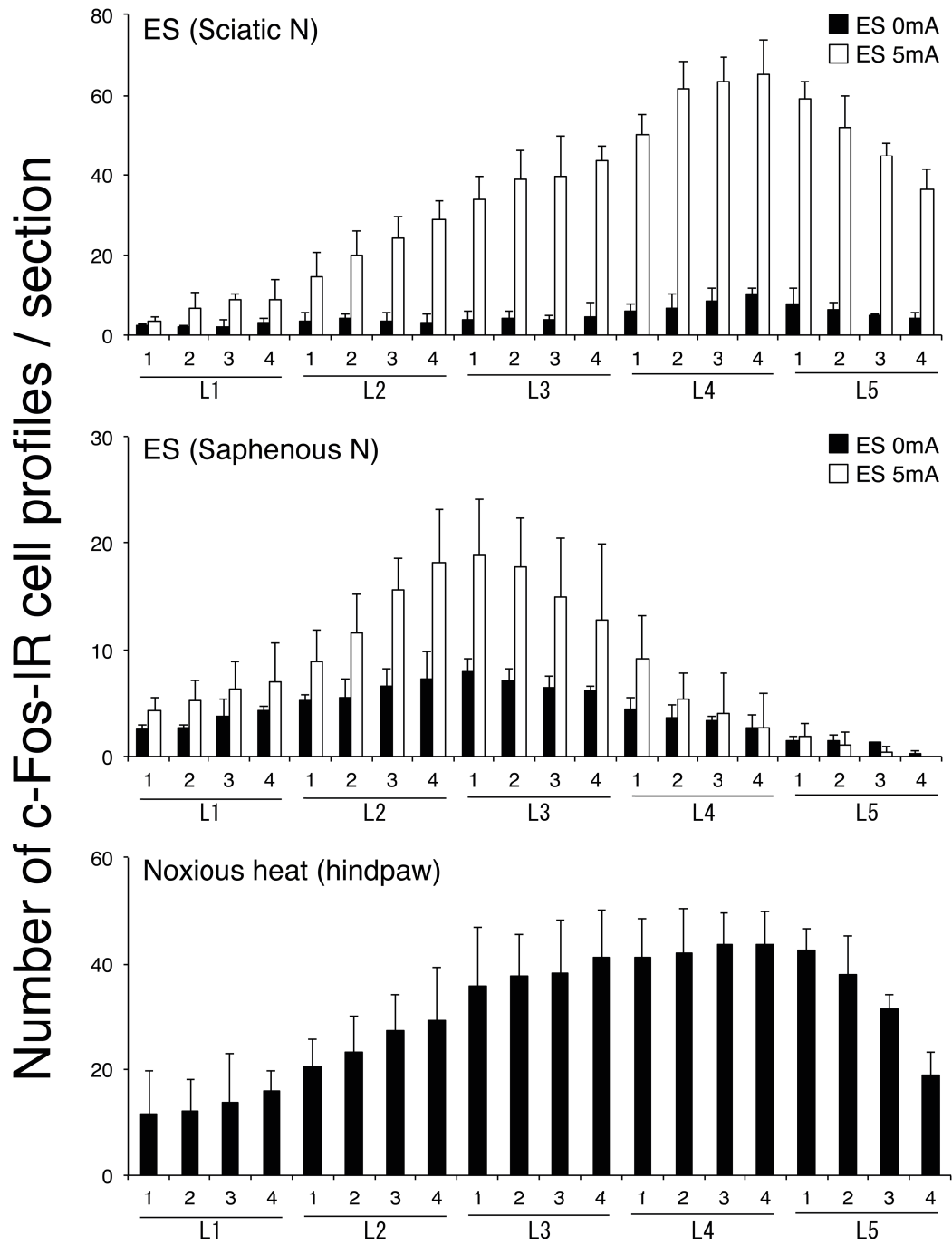


图 5

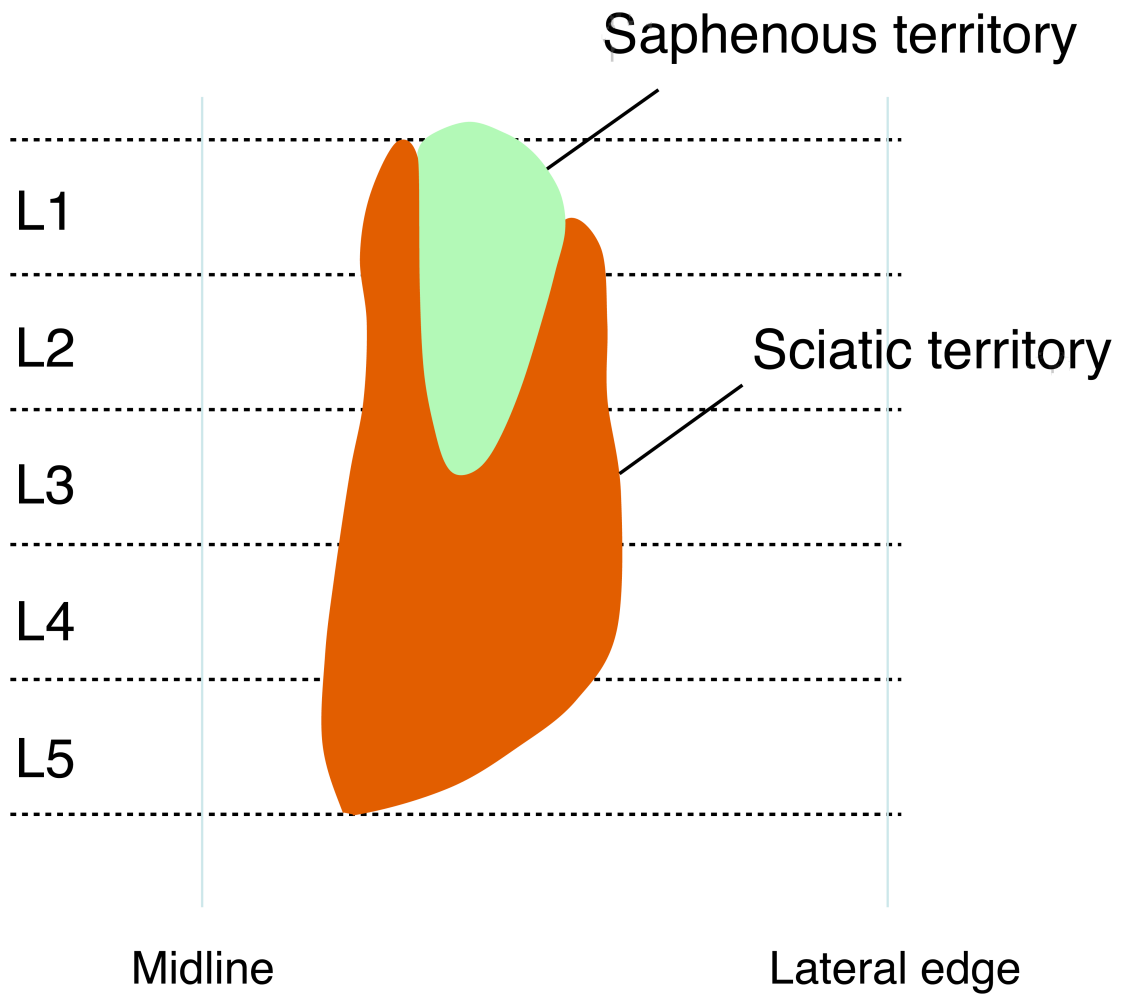


图 6

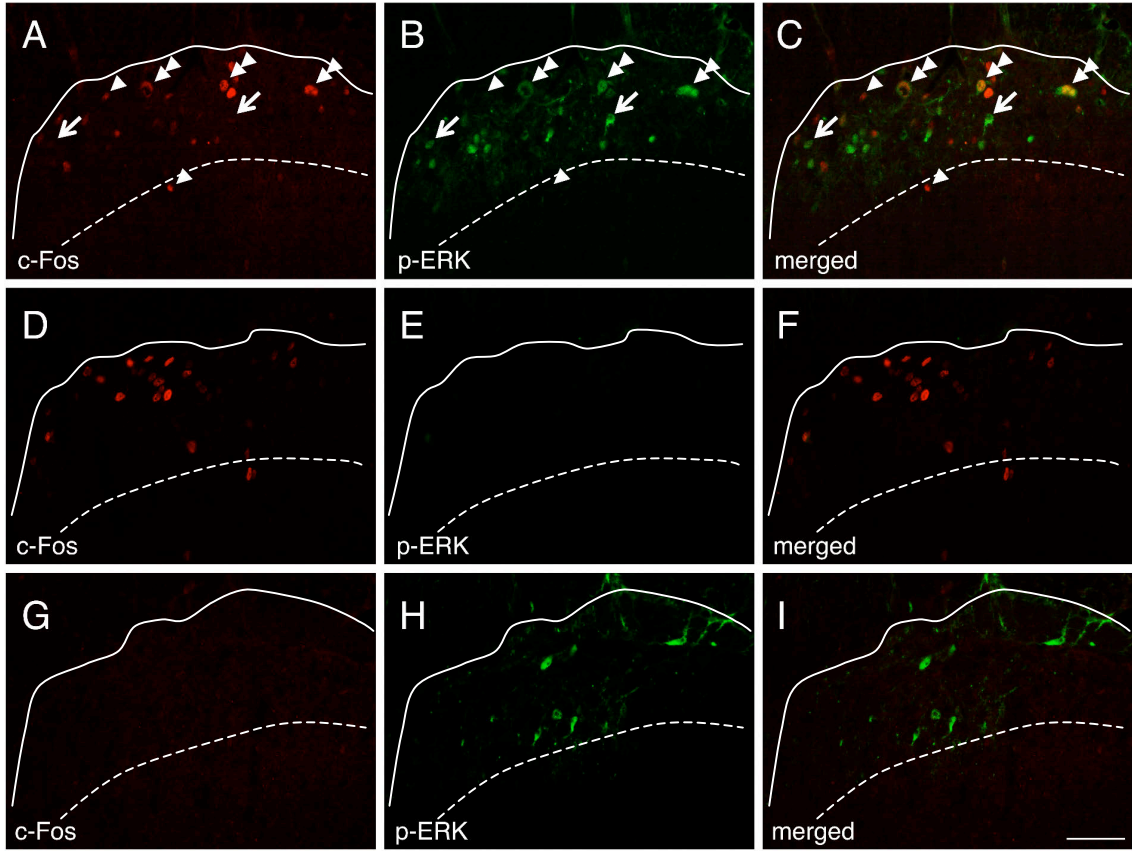


图 7

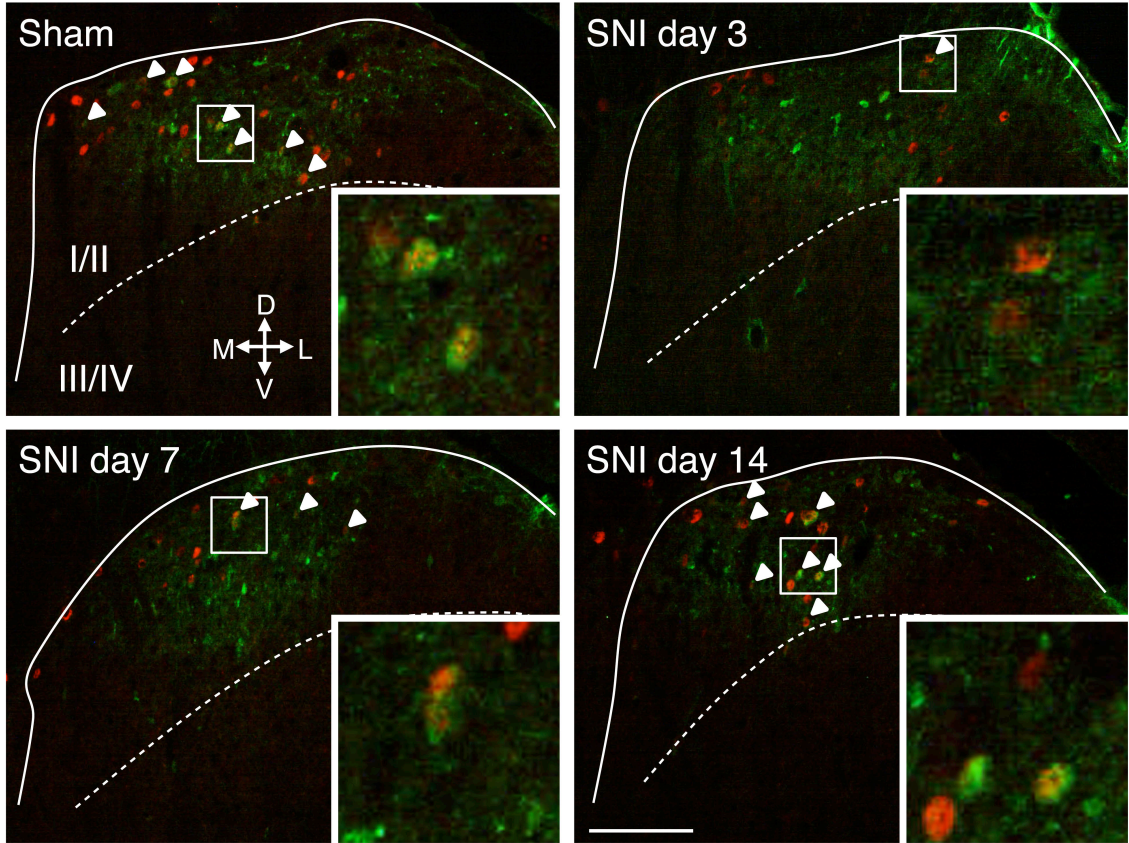


图 8

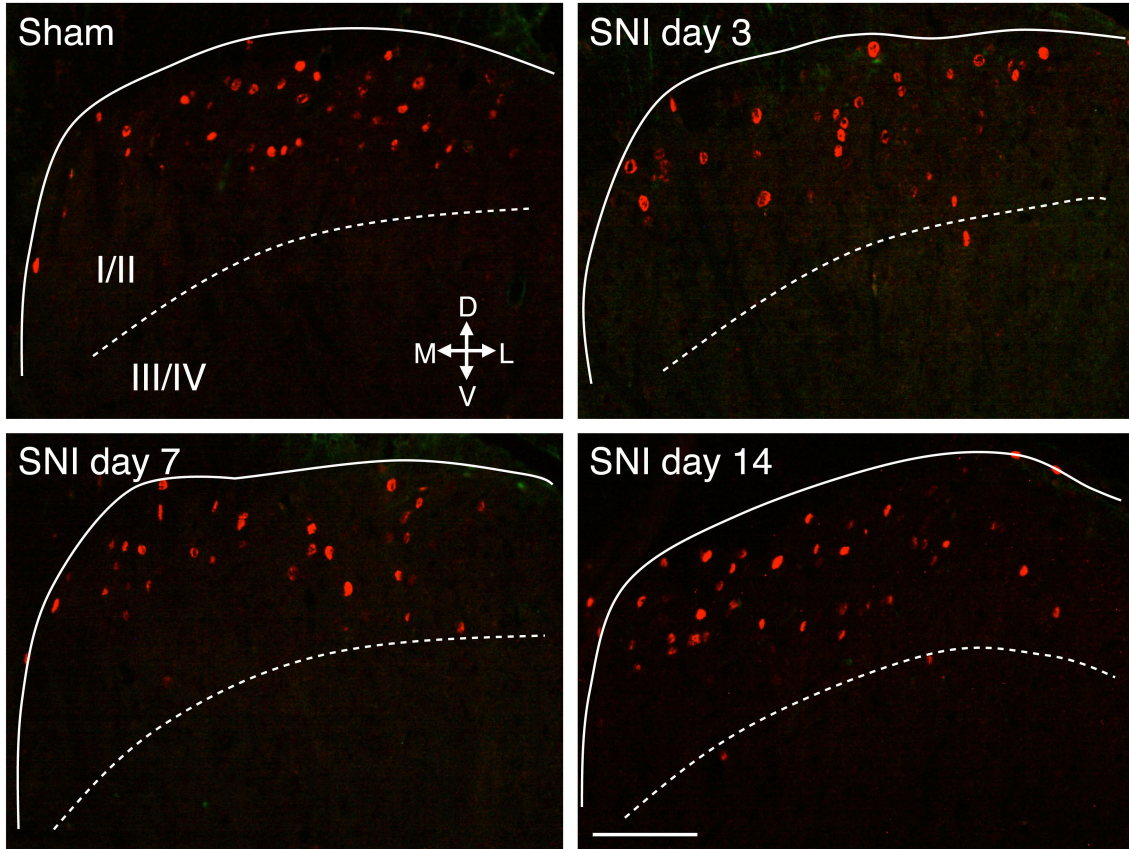




图 9

