

## 覚醒ラットの視床内側下核における 脳内自己刺激と刺激誘発鎮痛の関連

†村瀬健太郎<sup>1</sup>, 角谷英治<sup>1\*</sup>, 岡田 薫<sup>2</sup>, 川喜田健司<sup>2</sup>, 小林和子<sup>3</sup>

<sup>1)</sup> 明治鍼灸大学大学院 鍼灸基礎医学 <sup>2)</sup> 明治鍼灸大学 生理学教室

<sup>3)</sup> 明治鍼灸大学 化学教室 \*現所属 : 明治鍼灸大学 経絡経穴学教室

**要旨 :** 視床内側下核 (Sm) の機能的役割を明らかにするために, 無麻酔覚醒下のラットを用い, 脳内自己刺激 (ICSS) と刺激誘発鎮痛 (SPA) の関連を調べた. Sm 核に刺激電極を慢性留置し, 通電刺激 (0.3 ms, 50 Hz, 200  $\mu$  A, train 50) を行ない, レバー押しにより自分の脳を刺激する ICSS の頻度および, tail flick test, formalin test による SPA の有無を調べた. また, ICSS の誘発部位として内側前脳束 (mfb), SPA の効果の指標として中脳中心灰白質 (PAG) を対照部位として同様の実験を行った. Sm 核では, 11 例中 5 例で ICSS が見られた. その 5 例中 2 例で tail flick の潜時の延長が認められ, formalin test による licking 行動の抑制は 5 例中 4 例で認められた. 以上の結果から, Sm 核は単に痛みの中継核としてだけでなく, ICSS や SPA が生じる部位のあることから, 内因性痛覚抑制系としても機能している可能性が考えられた.

### I. 緒 言

1954 年に Olds と Milner<sup>1)</sup> はラットの脳内に刺激電極を埋め込み, レバー押しにより自分の脳を刺激する脳内自己刺激 (intracranial self-stimulation : ICSS) 行動を報告した. この ICSS は, 快・不快情動や動機づけなどの行動発現に重要な役割を果たすと考えられている. それ以後, 脳の広範な部位で ICSS を起こす報酬系 (reward system) が見いだされ<sup>2)</sup>, ヒトでも ICSS が成立することが報告された<sup>3)</sup>. その結果, 中脳の腹側被蓋野 (ventral tegmental area) や黒質 (substantia nigra) などから前頭前野などに線維連絡をするドーパミン作動性神経が ICSS に深く関与していることが分かった<sup>4)</sup>. そして, この線維束のうち, 視床下部の外側に位置する内側前脳束 (medial forebrain bundle : mfb) は ICSS を起こしやすい部位としてよく知られている.

一方, 1969 年に Reynolds<sup>5)</sup> は, 中脳中心灰白質 (periaqueductal grey : PAG) の電気刺激により鎮痛効果が得られることを見つけ, 麻酔薬

を使うことなく脳内の電気刺激だけでラットの開腹手術を成功させた. 脳内の電気刺激中, ラットは完全に覚醒しており, 他の刺激には正常に反応するが, 痛覚刺激には全く反応を示さなかった. この現象は刺激誘発鎮痛 (stimulation produced analgesia : SPA) と呼ばれ, この研究を契機として, 中枢における内因性痛覚抑制系に関して多くの研究が行われるようになった<sup>6-8)</sup>.

この SPA と ICSS との関連については, ICSS と SPA を惹起させる脳刺激部位が一致する場合も認められている<sup>9-11)</sup>. Mayer と Liebeskind<sup>12)</sup> は, 脳内各部位の通電刺激による鎮痛効果を, 機械的ピンチ刺激による逃避反応 (withdrawal response) や, 熱刺激による tail flick test, 床の電気刺激による jump test などを用いて調べると共に, それらの部位の ICSS との関連について報告している. その結果, PAG と間脳の第三脳室周囲灰白質 (periventricular grey) の通電刺激により鎮痛効果が生じるが, ICSS の頻度が高いからといって, 鎮痛効果があるとは限らない

平成 9 年 6 月 6 日受付, 平成 9 年 10 月 27 日受理

**Key Words :** 視床内側下核 Nucleus submedialis, 脳内自己刺激 Intracranial self-stimulation, 刺激誘発鎮痛 Stimulation produced analgesia, 内因性痛覚抑制系 Endogenous pain inhibitory system, ラット rat

†連絡先 : 〒629-0392 京都府船井郡日吉町 明治鍼灸大学 生理学教室



と報告している。

このPAGは脊髄後角(I, V層)からの投射があり、通電刺激をするとヒトにおいて不快な感覚や恐怖感をもたらすことが報告されており、痛みの情動面に深く関わっているとされている<sup>13)</sup>。また、動物実験においても、皮膚に痛みを与えたときと同じような叫び声をあげ(vocalization)、激しい逃走行動(escape-seeking behavior)を起こす。これらの結果から、恐れと痛覚はいずれも嫌悪性(aversive)を持ち、回避学習(avoidance task learning)が成立するとされている<sup>14)</sup>。

痛覚の伝導路として、前述のPAGを上行する経路や、脊髄視床路(spino-thalamic tract: STT)を上行する経路などがある。STTは新脊髄視床路(neo-spinothalamic tract: neo-STT)と旧脊髄視床路(paleo-spinothalamic tract: paleo-STT)に分けられ、neo-STTでは痛覚の弁別的側面、例えば痛みの強度や刺激の局在部位の認識に必要な情報を中継する視床腹側基底核群(ventrobasal complex: VB)が知られている。paleo-STTは痛覚の情動的側面を中継するとされており、視床髄板内核群(intralaminar nuclei)が知られている。

一方、視床内側核群のひとつである内側下核(nucleus submedius: Sm)は、神経解剖学的研究により、脊髄後角や三叉神経核辺縁層からの線維投射が認められており、痛覚情報の中継核のひとつとされている<sup>15)</sup>。また、Sm核は前頭前野の脳底側にある腹外側眼窩皮質(ventrolateral orbital cortex: VLO)と相互投射していることが知られており<sup>16)</sup>、VLOを含む眼窩皮質の多くの領域は、大脳辺縁系(limbic system)や大脳基底核(basal ganglia)と連絡している。Sm核のニューロンの多くは全身性に受容野を持ち、体性痛覚や、内臓痛覚刺激などに反応する特異的侵害受容ニューロンとされ<sup>17-19)</sup>、VLOとの関連で痛みの情動相と関係するとされてきた。近年、Sm核の通電刺激によりtail flick潜時の延長や<sup>20)</sup>、Sm核の破壊で痛覚過敏が生じる<sup>21)</sup>などの報告があり、内因性鎮痛系を介した痛覚抑制にSm核が積極的に関与している可能性が示唆されている。

そこで、本研究ではSm核の機能的役割を明らかにするために、意識下ラットのSm核において、

まずICSSについて調べ、次に通電刺激による鎮痛効果を脊髄反射性急性痛モデルとしてtail flick testを、持続的疼痛モデルとしてformalin testを指標に、Sm核の内因性鎮痛機構における役割を調べ、ICSSとSPAとの関連について検討した。また、ICSSの誘発部位としてmfb、SPAの効果の指標としてPAGを対照部位として同様の実験を行った。

## II. 方 法

### 1 電極埋め込み手術

実験にはWistar系雄性ラット(手術時体重290-380g)12匹を用いた。手術は、ペントバルビタールナトリウム(腹腔内投与、50 mg/kg)で麻酔し、気管内分泌物を抑制するために硫酸アトロピン(1 mg/kg)を皮下に投与した。サーミスタ温度計で直腸温をモニターして、ヒーティングパッド(室町機械, MK-900)で体温を約37.5℃に保ち、心電図をモニターした。脳定位固定装置(成茂, ST-7)に固定して実体顕微鏡下で頭蓋骨を露出し、刺激電極刺入部位(Sm: bregmaより尾側2.1-2.5mm, 外側0.6-0.8mm, mfb: 尾側2.1-2.5mm, 外側2.0mm, PAG: 尾側7.0-7.5mm, 外側0.5-0.8mm)にデンタルドリルを用いて孔(直径0.8mm)を開けた。刺激電極として金属微小電極(絶縁鍼, 東洋医療研究所製, 直径0.18mm, 先端直径約1  $\mu$ m, インピーダンス約10M $\Omega$ )を用いた。電極は油圧式マニピュレーター(成茂, PF5-1)を用いて、Paxinos & Watsonのラット脳地図<sup>22)</sup>を参考に目的の深さ(Sm: 脳表面より6.2-6.8mm, mfb: 7.5-8.5mm, PAG: 4.0-5.5mm)まで刺入した。ラット1個体につき、刺激電極を2-4本同時に刺入し、固定した。アース用ビス(直径1mm, 高さ2mm)、固定用ビス(直径1mm, 高さ6mm)を頭蓋骨に固定後、電極とソケットを接続し、デンタルセメントで固定した。術野を縫合後、イソジンで消毒し、オキシテラシンを筋注した。麻酔が覚めた後、飼育用ケージに戻し、1週間の回復期間をおいて実験を開始した。一つの通電刺激部位につき、脳内自己刺激, tail flick test, formalin testの実験を一連で行った。また、全ての実験終了後、ソケットと刺激電極の抵抗を測り、断線していた部位は結果から削除した。



## 2 脳内自己刺激

オペラント行動観察用実験箱はスキナーケージ (東洋産業株式会社, MSK-003, 正面 330mm, 奥行き 270mm, 高さ 280mm) を用い, アルミ製のレバーを取り付けた。手術回復期間の後, 餌報酬学習でレバー押し訓練を開始し, 規定数 (毎分 2 回) 以上になったところで, 餌報酬を脳通電刺激報酬に置き換えて ICSS のレバー押し訓練を開始した。脳内通電刺激はラットがレバーを押すことをトリガーとして, 定電流刺激装置 (日本光電, SEN-3201) からアイソレータを介して刺激 (interval 20ms, duration 0.3ms, train 50, 陰極矩形波, 1 秒間) が流れるようにした。このとき実際に流れた刺激強度は, 100K $\Omega$  の抵抗を通してオシロスコープ (KIKUSUI, COS5060-ST) でモニターし, 刺激強度を徐々に上げ (0-400  $\mu$ A), 刺激誘発行動 (嫌悪行動や定型行動) を観察した後, 基準電流を 200  $\mu$ A として, ICSS の回数を調べた。ICSS の計測は約 10 分間行い, ICSS の回数はペンレコーダー (NEC, RT3300) に記録し, 1 分間あたりの回数をスパイクカウンター (DIA MEDICAL, DSE-325P) に記録した。同

様の試行を各部位で行った (図 1)。

## 3 Tail flick test

tail flick test には, 輻射熱式鎮痛効果測定装置 (米国 IITC 社, model 33) を用いた。ラットの尾部末端から 2 cm までをマジックで黒く塗り, 尾部先端に輻射熱を照射し, ラットが尾を振り動かすまでの反応潜時を記録した。輻射熱は, ベースライン潜時が 3.5-4.5 秒になるように熱源の強さを調節し, ラットの尾の組織損傷を防ぐために, 反応に関係なく 10 秒で自動的に切れるようにした。ラットは黒い布で覆った保定器に入れて安静を保った。照射光の当たる溝に沿って尾部をセットしてから実験を開始した。2 分間隔で 5 回の試行 (10 分間) の後, 脳内通電刺激 (0.3ms, 50Hz, 200  $\mu$ A) を 30 秒間行い, 刺激終了直後から同じく 2 分間隔で 5 回の試行 (10 分間) を行った。刺激前 5 回試行の平均を 100% として, 刺激直後の変化率を算出し, 20% 以上潜時が増加したものを鎮痛効果が認められたものとした。

## 4 Formalin test

formalin test は, 2.5% のホルマリン液 50  $\mu$ l を 26G 針を用いてラットの右後肢足底部に皮下注

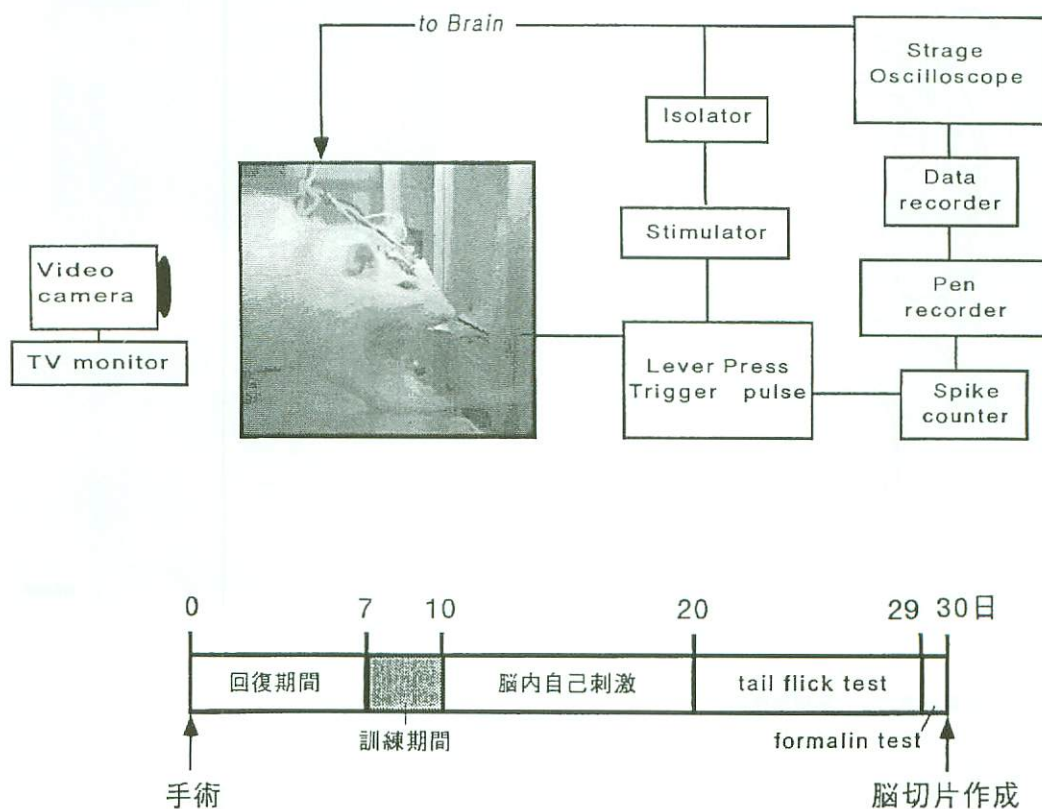


図 1 脳内自己刺激の実験方法

射した後、床下に角度45度で鏡をとりつけたプラスチックケースに入れ、60分間ビデオカメラで録画し、疼痛関連行動を観察した。疼痛関連行動としては、注射された後肢を舐める (licking) 時間を計測した。ホルマリン注入後、30分経過した第二相の licking 行動が安定したところで脳内通電刺激 (0.3ms, 50Hz, 200  $\mu$ A) を30秒間行った。観察は刺激前、刺激中、刺激後のそれぞれ30秒間ごとに、注入された後肢の licking 行動の時間をペンレコーダーに記録した。

### 5 刺激部位の組織学的検討

実験終了後、各脳内刺激部位の位置を同定するため、陰極通電 (直流, 20  $\mu$ A, 10秒) で組織損傷させることによりマーキングを行った。心臓に生理的食塩水、10%ホルマリン緩衝液を注入してラットを灌流固定し、脳を分離した。脳はマイクロスライサー (堂阪EM, DTK-1000) で厚さ50-100  $\mu$ m の冠状切片とし、Cresyl Violet でニッ

スル染色をして標本を作製した。切片標本は顕微鏡 (Nikon, profile projector V-10) で拡大し、ラットの脳地図<sup>22)</sup>を用いて組織学的に刺激部位を同定した。

図2に今回の実験で通電刺激を行った全例の脳内部位と、実際の脳組織標本を示す。

### 6 結果の表記および統計検定の方法

tail flick test および formalin test における脳内各部位の通電刺激効果を比較するために、統計には Stat Soft 社製 Visual Stat ver 4.5J を用い、経時データとして一元配置の分散分析を行い、Huynh-Feldt の補正をした。多重比較検定には、Turkey 法を用いた。また、結果は平均値  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  S.E.M.) で表した。

## Ⅲ. 結 果

### 1 脳内自己刺激

ICSS はレバー押しの回数を計測時間で割り、

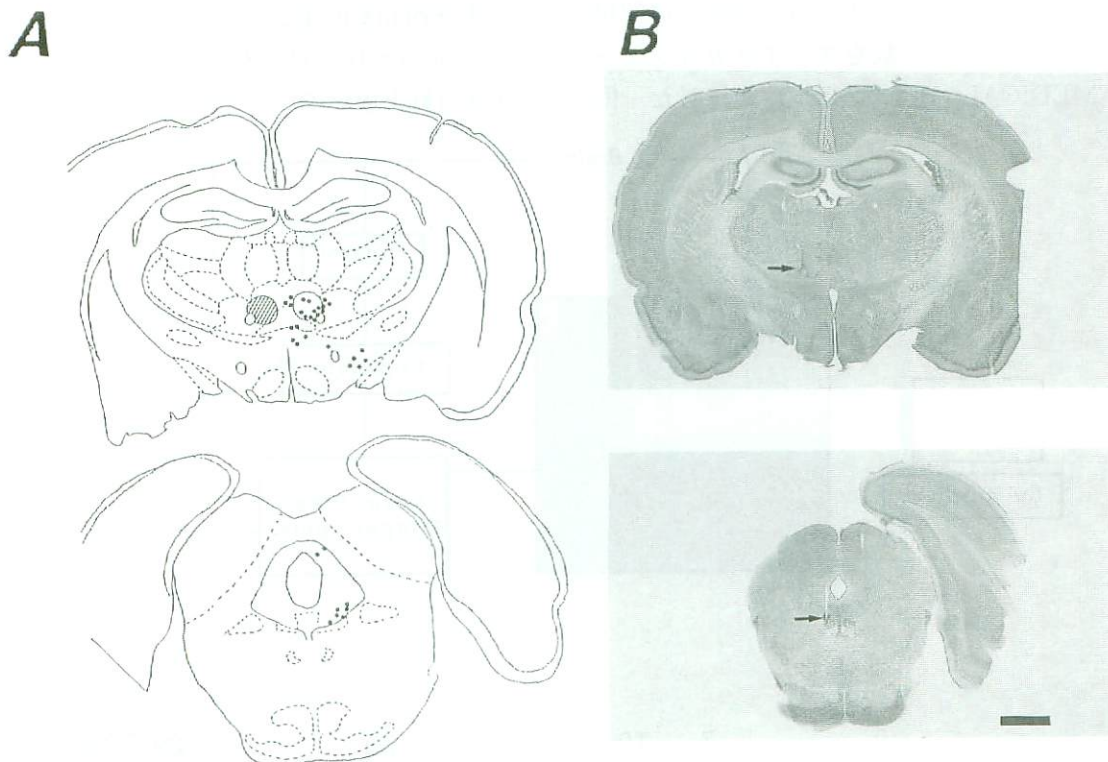


図2 脳内通電刺激部位と脳組織標本

- A: 冠状断面図中の・印は今回通電刺激を行った全例を示し、斜線の部位が視床内側下核の位置を示している。作図上、刺激部位はすべて右側にまとめて示した。  
 B: 脳組織標本写真は視床内側下核 (上段) および中脳中心灰白質 (下段) における通電刺激部位のマーキングの1例を示す (矢印)。右下のスケールバーは2.0mmを示す。ニッスル染色。



単位時間あたりの回数で比較検討した。脳内通電刺激がない場合でもレバー押し行動が見られ、平均  $2.8 \pm 0.4$  回/min であった。そこで、評価基準を 5 回/min とし、それよりも多いものを ICSS positive とし、5 回/min 以下は ICSS neutral とした。

刺激電極が Sm 核内にあった11例では、1分間の平均レバー押し数は 6.7 回 (0.5-16.6 回/min) の頻度であった。ICSS positive は 5 例 (16.6, 12.5, 11.5, 10.5, 8.2 回/min) で認められた。これらの部位の刺激では防御姿勢 (defensive behavior) をとったり、横を向いたりする定型行動 (stereotyped behavior) を示す例も認められた。

mfb の 5 例では、1分間の平均レバー押し数は 13.1 回 (3.0-38.9 回/min) の頻度で、ICSS positive は 4 例 (38.9, 9.5, 7.5, 6.5 回/min) 認められた。mfb 部位では1分間の平均頻度が 38.9

回と安定して非常に高いレバー押しが認められた部位もあった。

PAG 腹側部の 6 例では、1分間の平均レバー押し数は 11.9 回 (2.3-27.8 回/min) の頻度で、ICSS positive は 3 例 (27.8, 21.1, 15.0 回/min) 認められ、レバーを押した後に後ずさりして伏せるなどの定型行動を伴う例も観察された。PAG 背側部の 2 例では、1分間の平均レバー押し数は 2.6 回 (1.8-3.4 回/min) の頻度で、ICSS は認められなかった。この部位では、飛び上がった (jumping)、逃げ出そうとする逃走行動が観察された。

Sm 核の周囲の 11 例では、菱形核 (rhomboid nucleus : Rh) の 3 例は、3.1-14.6 回/min の頻度で平均頻度は 8.6 回/min で ICSS positive は 2 例 (14.6, 8.0 回/min) 認められた。結合核 (reuniens nucleus : Re) の 2 例はそれぞれ 1.2, 6.1 回/min の頻度で、平均頻度は 3.7 回/min で

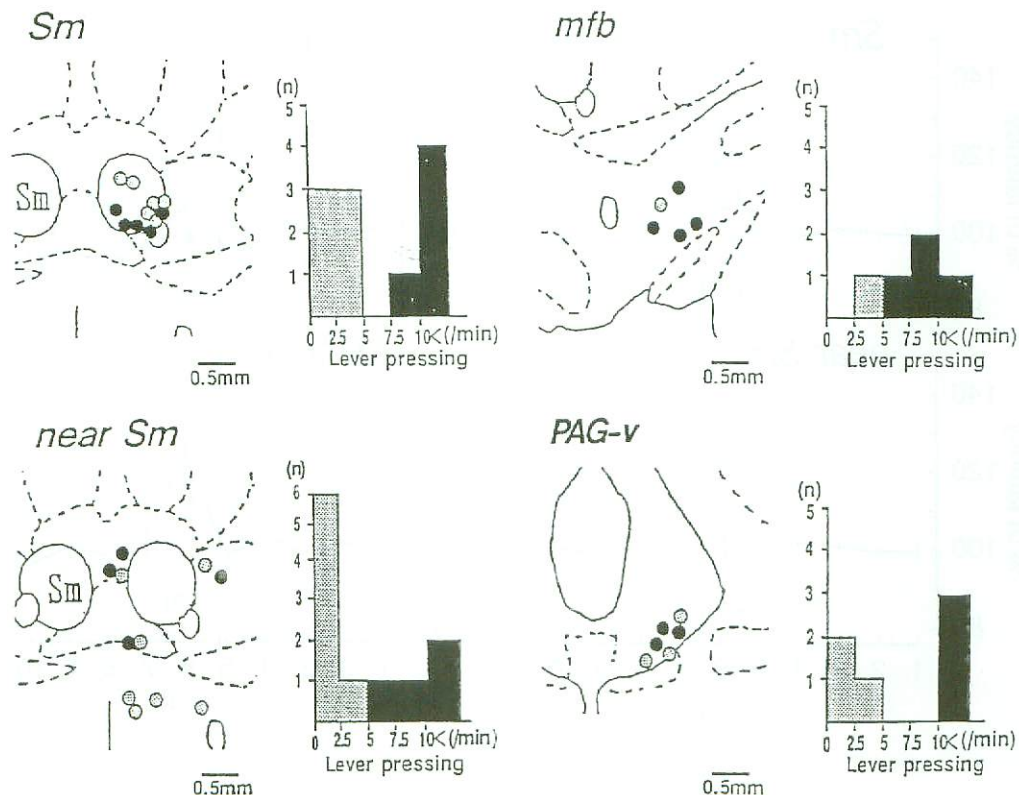


図3 脳内自己刺激部位とレバー押しの平均回数

それぞれのグラフの横軸は1分間のレバー押し行動の平均回数を、縦軸はその例数を示す。脳地図は毎分平均5回を基準として、グラフと対応させてある。

● : 脳内自己刺激を1分間に5回以上行った部位

○ : 脳内自己刺激が1分間に5回未満だった部位

〈略号〉 Sm : 視床内側下核 (nucleus submedialis), mfb : 内側前脳束 (medial forebrain bundle), near Sm : Sm核の周辺部, PAG-v : 中脳中心灰白質腹側部 (periaqueductal grey ventral part)  
n = 通電刺激部位数

あった。視床腹内側核 (ventromedial nucleus : VM) の2例はそれぞれ2.3, 14.0回/minの頻度で、平均頻度は8.1回/minであった。視床下部背側野 (hypothalamus dorsal area : DA) の4例は0.2-1.2回/minの頻度で、平均頻度は0.8回/minであった(図3)。

## 2 Tail flick test

今回の実験では尾を振るまでのベースラインの潜時は安定していた。脳内通電刺激前5回試行したベースラインの平均を100%とし、変化率で表した。

Sm核で通電刺激を行った11例の潜時の変化率は平均119.9%であった。個々の例ごとに見ると、顕著に延長した例が2例(186.0%, 176.0%), 延長傾向の例が1例(126.0%)であった。他の8例ではほとんど潜時の延長は見られず、Sm核全体としては潜時が著明に延長する例数は少なかった。しかし、統計検定の結果からはベースライン

の5回目と脳内通電刺激直後の6回目の試行において有意な差が認められた ( $P < 0.01$ ,  $\epsilon = 0.18$ , 自由度=9.00, 90.00, 補正自由度=1.60, 15.97)。

mfbの5例では潜時の変化率は平均108.2%であり、潜時の延長したものは1例(124.1%)のみで、通電刺激による影響は少なかった。統計検定の結果からも有意な差は認められなかった ( $P = 0.37$ ,  $\epsilon = 0.68$ , 自由度=9.00, 36.00, 補正自由度=6.08, 24.33)。

PAG腹側部の6例では潜時の変化率は平均125.9%であり、顕著に延長した例が2例(160.2%, 141.9%)で、延長傾向の例は2例(128.6%, 124.0%)あり、潜時の延長する例の割合が多かった。統計検定の結果からもベースラインの5回目と脳内通電刺激直後の6回目の試行において有意な差が認められた ( $P < 0.01$ ,  $\epsilon = 0.22$ , 自由度=9.00, 45.00, 補正自由度=2.01, 10.04)。PAG背側部の2例では潜時の変化率は平均101.7%であ

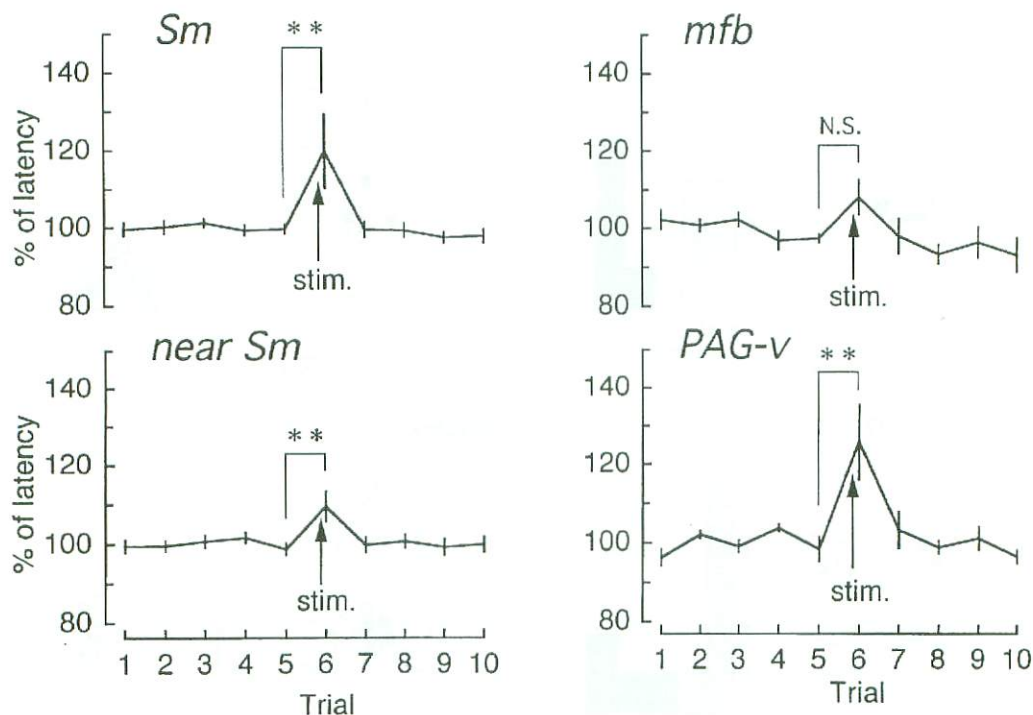


図4 Tail flick 潜時に対する脳内通電刺激の効果

グラフの横軸は試行を表し、縦軸は刺激前5回の平均を100%としたときの变化率を表す (mean  $\pm$  S.E.M.). 矢印はそれぞれ30秒間の脳内通電刺激期間を表す。グラフ上部の\*\*はTurkeyの多重比較検定の結果を示す (\*\* :  $P < 0.01$ , N.S. = Not Significant)。

Sm:  $F = 3.86$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 11$

mfb:  $F = 2.05$ ,  $P = 0.06$ ,  $n = 5$

near Sm:  $F = 2.42$ ,  $P < 0.05$ ,  $n = 11$

PAG-v:  $F = 5.13$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 6$

F, P はそれぞれ一元配置の分散分析の結果を示す。 n = 通電刺激部位数



り、潜時が延長する例は観察されなかった。

Sm 核の周囲の11例では、Re 核の2例 (126.3%, 132.5%) と DA の1例 (123.6%) が延長傾向を示した。Rh 核や VM 核では潜時の延長は見られなかった。これら各部位をまとめて比較すると、統計検定の結果はベースラインの5回目と脳内通電刺激直後の6回目の試行において有意な差が認められた ( $P < 0.01$ ,  $\varepsilon = 0.74$ , 自由度=9.00, 90.00, 補正自由度=6.65, 66.47) (図4)。

### 3 Formalin test

formalin test により誘発された licking 行動は、全てのラットにおいて二相性の経時的推移が観察された。第一相は注入直後から約10分間、第二相は注入後約15-60分間に licking 行動の増加が出現した。脳内通電刺激は licking 行動が安

定して観察された約30-50分の間に行った。脳内通電刺激開始前の30秒間を pre., 刺激期間中30秒間を stim., 刺激終了直後から30秒間を after として、それぞれの licking している時間を計測した。

Sm 核全体の11例の平均 licking 期間は、pre. で  $11.5 \pm 1.8$  秒, stim. は  $0.6 \pm 0.4$  秒, after は  $4.6 \pm 2.0$  秒であった。通電刺激期間中 licking 行動の抑制が見られた例は11例中9例であった。また、刺激後も効果が持続した例は7例見られた。統計検定の結果、licking 合計時間は pre. に対して stim. ( $P < 0.01$ ,  $\varepsilon = 1.00$ , 自由度=2.00, 20.00, 補正自由度=2.00, 20.00) で有意な差が認められ、after ( $P < 0.05$ ) も有意な差が認められた。

mfb 全体の5例の平均 licking 期間は、pre. で

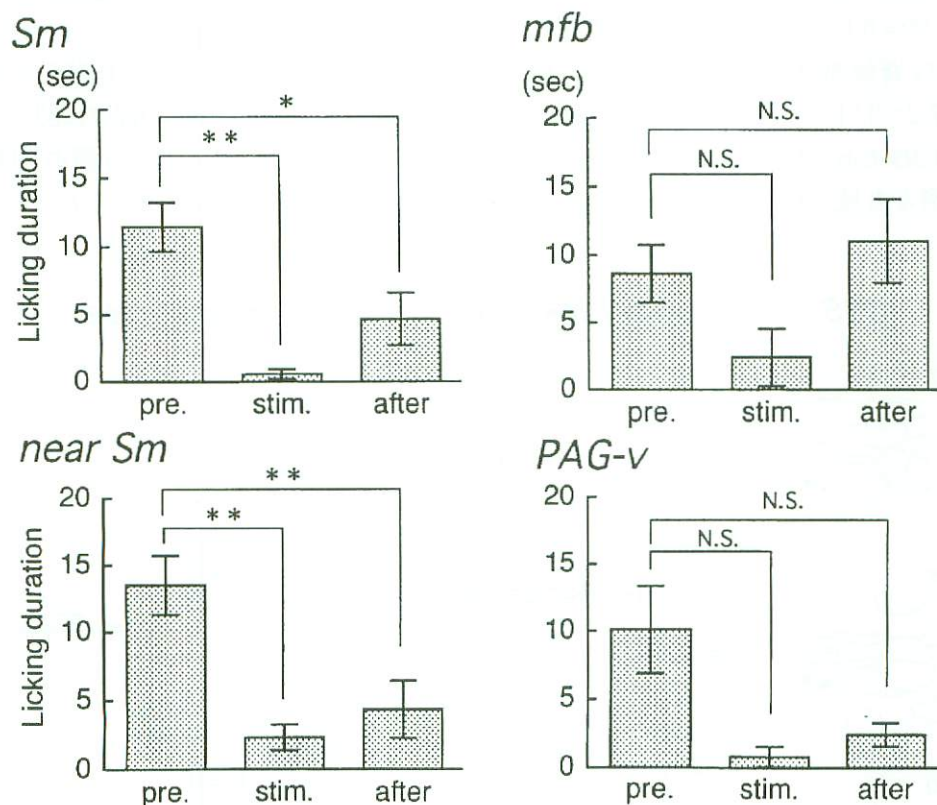


図5 Formalin testのlickingに対する脳内通電刺激の効果

グラフはそれぞれ脳内通電刺激開始30秒前を pre., 刺激期間中の30秒間を stim., 刺激終了直後から30秒間を after として示し、縦軸は licking 行動の合計時間を示す (mean  $\pm$  S.E.M.). グラフ上部の \*\*, \* は Turkey の多重比較検定の結果を示す (\*\* :  $P < 0.01$ , \* :  $P < 0.05$ , N.S.=Not Significant).

Sm:  $F=12.62$ ,  $P < 0.01$ ,  $n=11$

mfb:  $F=2.53$ ,  $P=0.14$ ,  $n=5$

near Sm:  $F=13.33$ ,  $P < 0.01$ ,  $n=11$

PAG-v:  $F=5.13$ ,  $P < 0.01$ ,  $n=6$

F, P はそれぞれ一元配置の分散分析の結果を示す。 n=通電刺激部位数

8.6±2.1秒, stim.は2.4±2.1秒, afterは11.0±3.1秒であった. 通電刺激期間中licking行動の抑制が見られた例は5例中4例あったが, afterも効果を持続した例は1例しか認められず,むしろafterはpre.よりも増加する傾向が見られた. 統計検定の結果はlicking合計時間はpre.に対してstim. ( $P=0.31$ ,  $\epsilon=0.60$ , 自由度=2.00, 8.00 補正自由度=1.19, 4.78)とafter ( $P=0.82$ )で有意な差は認められなかった.

PAG腹側部の6例の平均licking期間は, pre.で10.1±3.3秒, stim.は0.8±0.7秒, afterは2.4±0.9秒であった. stim.中licking行動の抑制が見られた例は6例中5例あり, afterも効果を持続した例は4例見られた. 統計検定の結果はlicking合計時間はpre.に対してstim. ( $P=0.052$ ,  $\epsilon=0.51$ , 自由度=2.00, 10.00, 補正自由度=1.03, 5.14)とafter ( $P=0.11$ )で有意な差は認められなかった. PAG背側部の2例の平均licking期間は, pre.で7.2±3.3秒, stim.は0.6±0.7秒, afterは3.6±0.9秒であった. stim.中licking行動の抑制は2例とも見られ, そのうち1例では

afterも効果を持続した.

Sm核の周囲の11例では, Rh核の3例の平均はpre.が7.2秒, stim. 2.0秒, after 4.0秒であった. Re核の2例の平均はpre. 19.2秒, stim. 4.8秒, after 4.2秒であった. VM核の2例の平均はpre. 19.2秒, stim. 0秒, after 12.6秒であった. DAの4例の平均はpre. 12.6秒, stim. 2.4秒, after 0.5秒であった. いずれの部位においても, 平均のlicking期間はstim.中はpre.よりも減少し, afterも効果を持続した. これらのSm核周囲の刺激部位における統計検定の結果, licking合計時間は, pre.に対してstim. ( $P<0.01$ ,  $\epsilon=1.00$ , 自由度=2.00, 20.00, 補正自由度=2.00, 20.00)とafter ( $P<0.01$ )で有意な差が認められた(図5).

#### 4 脳内自己刺激と刺激誘発鎮痛との関連

Sm核でICSS positiveの例とICSS neutralの例でSPAの効果について比較したものを図6に示す. ICSS positiveの部位に関しては, tail flickの潜時の顕著な延長が5例中2例で見られ, 他の3例では変化は認められなかった. formalin

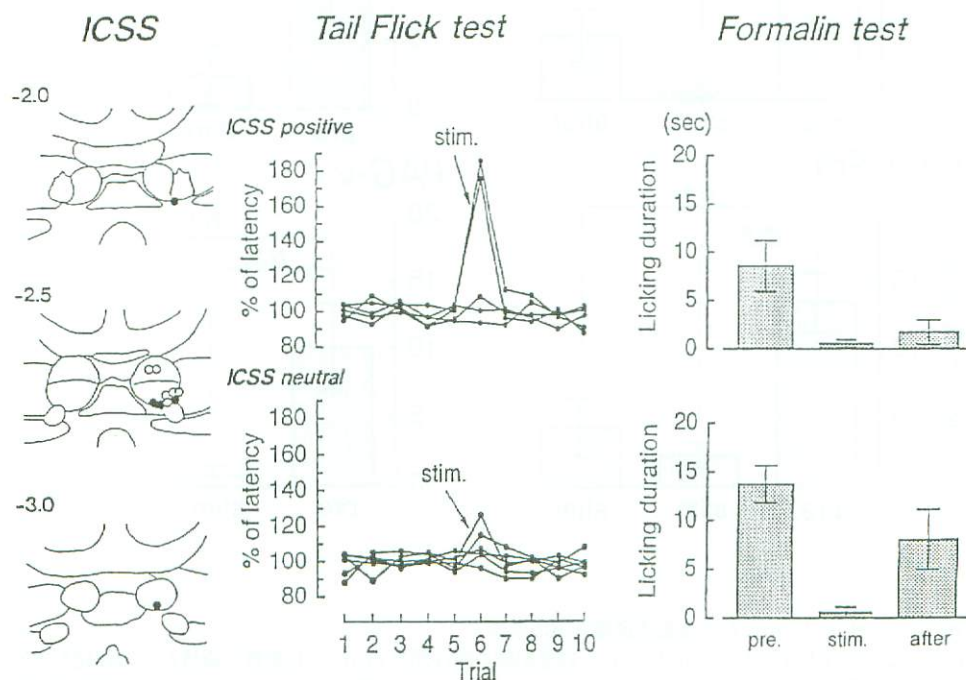


図6 Sm核における脳内自己刺激と刺激誘発鎮痛の関連

脳地図はSm核を上から吻側部, 中間部, 尾側部に分けたものである. 数字はbregmaからの距離(mm)を示す.

●: ICSS positive, ○: ICSS neutral

Tail flick testおよびFormalin testはそれぞれ上段がICSS positive, 下段がICSS neutralに分けて表示してある.



test による licking 期間においては stim. 中は減少した例が5例中4例見られ、その4例では after においても刺激効果が持続した。一方、ICSS neutral の部位に関しては、tail flick の潜時の延長は6例中1例認められ、他の5例では変化はなかった。formalin test による licking 期間においては stim. 中は減少した例が6例中5例見られたが、after においては licking 期間は pre. に戻る傾向が観察された(図6)。

#### 5 脳内自己刺激にともなう行動の観察

通電刺激で誘発された行動は、脳内の各部位によってさまざまな行動が起こった。ICSS をする部位には、定型行動をとともなう例も認められた。定型行動の中には、通電刺激に同期して横を向く例や、顔の回りに前肢を持っていく(grooming)、口を動かしたり、鼻を挙げにおいを嗅ぐような行動や、ヒゲを動かす例も観察された。また、横を向く6例の中では、5例が脳内通電刺激部位とは対側の方へ向いた。部位別にみると、Sm核では、これら定型行動の他、後ろに下がり防御姿勢をとったり、体を低くしてうずくまり、すくんだ姿勢(freezing)になる例も観察された。mfbでは著明な定型行動は見られなく、レバーから逃避するような行動も認められなかった。PAG背側部においては通電刺激によって、飛び上がったたり、立ち上がったたり(rearing)、逃走行動が見られた。PAG腹側部では、回転行動(circling)などの定型行動が観察された。通電刺激で前肢を口に持っていき、口唇傾向(oral tendency)が見られる部位もあった。

### IV. 考 察

#### 1 脳内自己刺激

Oldsら<sup>2)</sup>は、間脳とその隣接領域における報酬系および嫌悪系の経路に関する最初の詳細な報告を発表した。この実験から、報酬系は視床内ではあまり見られず、視床下部の外側に位置するmfbの走行と一致することを明らかにした。その後、Cravnerら<sup>23)</sup>は視床内に局限してICSSの実験を行い、視床内でもVM核や髄板内核群ではICSSが認められたと報告した。また、Sm核でのICSSも1例ではあるが検討されており、彼らはneutralと分類していた。今回の実験では、Sm核でもICSSが認められる例があり、通電刺激部位

を見てみるとSm核の中心部ではあまりレバー押しが顕著ではなく、ICSS positiveはSm核の外側部や腹側部に局限していた。また、背側部はICSS neutralだったが、例数も少なくICSSのSm核内の局在については、まだ検討の余地が残っている。

mfbではICSSが認められ、Oldsら<sup>2)</sup>の結果と基本的には一致した。しかし、レバー押しの頻度としては1分間に100回以上のレバー押しを報告しているが、今回の実験ではそのような高頻度のICSSは見られなかった。この差異は、通電刺激条件の違いから起こるものであると考えられる。今回の実験では、レバー押し1回につき50発のトレインパルス(1秒間)の通電刺激が流れるようになっており、1分間のレバー押しが60回を越えることはなかった。mfbは、中脳の腹側被蓋野から、視床下部外側野を尾側から吻側に走行する多シナプス性線維経路で、上行性および下行性経路からなる線維束である。mfbは脳内通電刺激で誘発される行動はあまり見られず、レバーから遠ざかることもなかった。また、今回の実験で刺激電流強度200 $\mu$ Aの陰極性単極刺激を用いた理由として、200 $\mu$ A以上の強い刺激がより高いICSSが生じることは確認されたが、200 $\mu$ Aでは約0.5 - 1.0mmの電流の広がり(current spread)があるとされており<sup>24)</sup>、部位差を検討するうえでは限界強度と考えられた。

PAGでは、背側部と腹側部とでは明らかにレバー押し頻度に違いが見られた。PAGの背側部は、旧脊髓視床痛覚系より側副枝をうけ、痛覚経路の一部をなし、原始性痛覚(protopathic pain)と、それに関連した感情や自律神経反応とを統合する部位であると考えられている<sup>14, 25)</sup>。今回、背側の2例においてICSSの頻度が低かったのは、これらの系を賦活化させていた可能性が考えられる。一方、PAG腹側部は以前からICSSを起こす部位として知られており<sup>9)</sup>、今回の実験においてもICSSが認められた。しかしこの部位のICSSは、定型行動をとともないながらレバー押し行動をする例が見られ、レバーを押した後レバーから遠ざかる行動は、この部位の脳内通電刺激が単純な報酬的意味だけでなく、より複雑な反応を生じている可能性が考えられた。



## 2 Tail flick潜時に対する脳内通電刺激の効果

今回の実験で用いた tail flick test は、鎮痛効果を測定するために広く汎用されているテストである。今回の実験において、Sm 核で tail flick 潜時の延長が見られたものは、11例中わずか3例で全体としては顕著ではなかった。Zhang ら<sup>20)</sup>によると、麻酔下のラットの Sm 核腹側部の通電刺激により、tail flick 潜時の延長が見られたという報告がある。しかし、Roberts ら<sup>21)</sup>は、Sm 核を破壊した覚醒下のラットで、vocalization を誘発させる通電刺激閾値は下がるが、tail flick の潜時は変化がなかったと報告している。そして、その理由として tail flick は脊髄反射であり<sup>26, 27)</sup>、vocalization は脊髄よりも上位の中核が関与しているためとしている。両報告とも tail flick test を用いて、Sm 核における内因性鎮痛系に及ぼす影響を検討していたが、結果が異なっていた。これは、刺激実験と破壊実験という実験系の違いや、麻酔下と覚醒下という実験条件の違いが考えられる。今回の実験の結果は、Roberts ら<sup>21)</sup>の結果を支持するものとなった。

mfb では tail flick 潜時の延長はほとんど見られなかった。この結果は Mayer ら<sup>12)</sup>の結果と一致しており、mfb は下行性抑制系には直接的な影響を与えていないことが示唆された。一方、PAG 腹側部では tail flick 潜時の延長が顕著に見られた。PAG 腹側部は大縫線核 (nucleus raphe magnus : NRM) と密接な線維連絡があることが知られており、この NRM からのセロトニン作動性神経が脊髄後角に作用しているものと考えられている。この経路は下行性痛覚抑制系といわれ、脊髄後側索を通り侵害性求心性線維に抑制をかけているとされている<sup>9, 12, 28)</sup>。

## 3 脳内通電刺激がFormalin test のlicking行動に及ぼす影響

今回用いた formalin test は、持続性の疼痛モデルとして広く用いられ、ラットの足底部皮下にホルマリンを注入することによって、その後肢を震わせて引く行動 (flinching)、その後肢を床から浮かす行動 (lifting)、その後肢を舐める行動 (licking) などの疼痛関連行動 (pain-related behaviors) が誘発されることが報告されており、これらすべての疼痛関連行動を score として表記する場合もある<sup>29, 30)</sup>。しかし、今回の実験にお

いては、一番安定した検出が可能であった licking 行動のみを用いて解析をおこなった。ホルマリン注入による疼痛行動は、ラットでは二相性に出現し、第一相に見られる行動は、ホルマリンの直接的な侵害刺激による侵害受容性疼痛に対応する行動であり、第二相の行動は侵害刺激によって二次的に中枢が感作され、そのために発生した疼痛行動とされている<sup>31)</sup>。また、第二相で生じる痛覚過敏は NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体の関与が考えられており、中枢神経系への可塑的な変化の影響も考えられている<sup>32)</sup>。

今回の結果では、脳内通電刺激期間中はいずれの部位においても licking 行動が抑制される傾向にあった。このことは通電刺激が licking 行動自体に直接影響を与えた可能性も残されており、単純に鎮痛効果とすることには問題があるとも考えられる。しかし、脳内通電刺激後も効果が持続した部位においては、その刺激が鎮痛系に何らかの影響を与えたものと考えられた。

今回は、脳内通電刺激部位による効果の違いは顕著には見られなかった。その理由として、通電刺激強度を200  $\mu$ Aの一定条件下で行ったことが考えられる。しかしながら、mfb では通電刺激後の licking 行動はかえって増加する傾向にあり、他の部位に比較すると特異的な反応が現れた。この結果からも、mfb に関しては痛覚の抑制には関与していないと考えられる。

Sm 核通電刺激の影響を formalin test を用いて調べた報告は本研究が最初のものであり、今回の結果は Sm 核と痛覚の情動面の関連からみると大変興味深いものである。

## 4 視床内側下核における脳内自己刺激と刺激誘発鎮痛との関連

Sm 核は内側視床核群に属し、この部位周辺の ICSS は、報酬効果と嫌悪効果が混在している部位とされてきた<sup>2)</sup>。今回の結果もこの結果を裏付けるものと考えられる。また、Sm 核内で ICSS が認められた部位と、認められなかった部位とでは、tail flick 潜時と formalin test の after で通電刺激の効果に違いが見られた。このことから、Sm 核における SPA と ICSS には何らかの関連のあることが示唆された。これら ICSS 陽性強化領域と SPA 領域の関係については以前から議論されている。Mayer と Liebeskind<sup>12)</sup>は、間脳と



中脳において、ICSS とラットの四肢や尾にピンチ刺激を与え逃避行動を観察したり、tail flick test や jump test を行った結果、ICSS と SPA は関連がなかったとしている。ところが、Dennis<sup>9)</sup> らによると、PAG 腹側部において ICSS と formalin test を用いた SPA に対しては強い関連があると報告している。また、黒質や青斑核 (locus coeruleus) においても ICSS と SPA の部位が一致する部位もあるという報告も見られ<sup>10)</sup>、見解は一致していない。このことは通電刺激条件や、部位差、さらには評価する鎮痛テストによって結果が異なる可能性があるためと考えられる<sup>33)</sup>。

今回 SPA の指標として tail flick test と formalin test を用いた結果、tail flick test よりも formalin test で抑制する例が多く観察された。従来 SPA の研究で用いられてきた tail flick test のような脊髄反射と、より高次の中樞が関与するとされている formalin test では、鎮痛機序が異なる可能性が考えられている。しかし、このような反射経路の違いだけでなく、急性痛と慢性痛という痛みの質の違いもあり、単純に比較するのは難しいと考えられる。一方、以前から慢性痛は痛みの情動面と密接に関連があるとされており、今回用いた formalin test のような持続的な疼痛を用いることによって、情動などの高次中枢機能への関与が検出できる可能性が考えられる。臨床上問題となる痛みは、このような持続的な慢性痛であることが多く、その意味からも今回の結果は興味深いものである。

また、痛みの中継核として弁別相に関与するとされる VB は、SPA を生じないという報告がある<sup>12, 34)</sup>。角谷ら<sup>35)</sup>の報告においても、Sm 核の通電刺激では急激な直腸伸展刺激による外腹斜筋の筋電図に抑制が認められたが、VB の通電刺激では抑制は認められなかったとしている。このことは、痛覚の異なる経路によって抑制機序が異なる可能性を示唆している。今回の実験結果から Sm 核において ICSS と SPA が一致する部位が認められたことによって、Sm 核での痛覚情報処理過程において、鎮痛系および報酬系に関連した修飾が行われている可能性が示唆された。

#### 5 脳内通電刺激で誘発される行動とその評価法

ICSS で誘発される行動は stereotype, circling,

freezing などの多様な行動を示し、視床下部や視床内の核よりも、PAG 部位での通電刺激による行動が顕著であった。PAG では、背側部と腹側部では機能が異なるという報告もされている<sup>25)</sup>。今回の実験からも、背側部の2例で痛みを感じているような激しい逃避行動が見られたが、腹側部ではそのような行動は見られず、行動学的見地からも PAG の背側部と腹側部では機能が異なる可能性が考えられた。また、今回用いた通電刺激強度の  $200 \mu A$  では vocalization のような典型的な忌避行動はいずれの部位でも見られなかった。一方、mfb においては、顕著な行動は見られなかったが、5例中4例の割合で ICSS が観察され、典型的な報酬系領域と考えられる。Sm 核の通電刺激による行動は、通電刺激のトリガーとなるレバーを押した後に、すぐに遠ざかる行動を示したが、その後間もなく自らレバーに近づき ICSS が成立した。このことは、Sm 核は単純に報酬系、嫌悪系とは分類し難いことを意味しており、他の条件を加えた別の角度からの解析の必要性を示唆するものと考えられる。

今回の実験では、従来のように解剖学的に分類された同一部位でも、結果が異なった例も見られ、機能的にすべてを同一なものとしてみなすには困難な場合も見られた。したがって、今回のような脳内の通電刺激で得られる実験結果に対しては、個々のデータの記述が十分にされることが必要であり、統計的な検定を行うことによって妥当な結論を得ることは極めて困難と考えられる。統計的処理の方法については今後さらに検討の余地があるものと考えられる。

#### V. 結 語

Sm 核に ICSS を行う部位が見られ、ICSS を行った部位では、より持続的な疼痛行動の抑制が観察された。Sm 核の通電刺激により SPA も見られたことから、Sm 核は単なる痛みの中継核だけではなく痛覚抑制系にも関与している可能性が考えられた。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、多大なるご助言、ご協力をいただいた明治鍼灸大学第三生理学教室の伊藤和憲氏、山中博樹氏に深謝いたします。



## 引用文献

- 1) Olds J, Milner P : Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol*, 47 : 419-427, 1954.
- 2) Olds M E, Olds J : Approach-avoidance analysis of rat diencephalon. *J Comp Neurol*, 120 : 259-295, 1963.
- 3) Bishop M P, Elder S T and Heath R G : Intracranial self-stimulation in man. *Science*, 140 : 394-396, 1963.
- 4) Gallistel C R, Karras D : Pimozide and amphetamine have opposing effects on the reward summation function. *Pharmacol Biochem Behav*, 20 : 73-77, 1984.
- 5) Reynolds D V : Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science*, 164 : 444-445, 1969.
- 6) Liebeskind J C, Guilbaud G, Besson J M, et al : Analgesia from electrical stimulation of the periaqueductal gray matter in the cat : behavioral observations and inhibitory effects on spinal cord interneurons. *Brain Res*, 50 : 441-446, 1973.
- 7) Mayer D J, Price D D : Central nervous system mechanisms of analgesia. *Pain*, 2 : 379-404, 1976.
- 8) Melzack R, Melnikoff D F : Analgesia produced by brain stimulation : evidence of a prolonged onset period. *Exp Neurol*, 43 : 369-374, 1974.
- 9) Dennis S G, Choiniere M, Melzack R : Stimulation-produced analgesia in rats : assessment by two pain tests and correlation with self-stimulation. *Exp Neurol*, 68 : 295-309, 1980.
- 10) Sandberg D E, Segal M : Pharmacological analysis of analgesia and self-stimulation elicited by electrical stimulation of catecholamine nuclei in the rat brain. *Brain Res*, 152 : 529-542, 1978.
- 11) Anderson R, Diotte M, Miliaressis E : The bidirectional interaction between ventral tegmental rewarding and hindbrain aversive stimulation effects in the rat. *Brain Res*, 688 : 15-20, 1995.
- 12) Mayer D J, Liebeskind J C : Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain : an anatomical and behavioral analysis. *Brain Res*, 68 : 73-93, 1974.
- 13) Nashold Jr B S, Wilson W P, Slaughter D G : Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg*, 30 : 14-24, 1969.
- 14) Kiser R S, Lebovitz R M, German D C : Anatomic and pharmacologic differences between two types of aversive midbrain stimulation. *Brain Res*, 155 : 331-342, 1978.
- 15) Craig A D, Burton H : Spinal and medullary lamina I projection to nucleus submedialis in medial thalamus : a possible pain center. *J Neurophysiol*, 45 : 443-466, 1981.
- 16) Yoshida A, Dostrovsky J O, Chiang C Y : The afferent and efferent connections of the nucleus submedialis in the rat. *J Comp Neurol*, 324 : 115-133, 1992.
- 17) Kawakita K, Dostrovsky J O, Tang J S, et al : Responses of neurons in the rat thalamic nucleus submedialis to cutaneous, muscle and visceral nociceptive stimuli. *Pain*, 55 : 327-338, 1993.
- 18) 川喜田健司, 金盛聖三, 中園義孝ら : 視床内側核群の侵害受容ニューロン. *明治鍼灸医学*, 5 : 35-41, 1989.
- 19) 角谷英治 : ラット視床内側下核ニューロンの反応特性と腹外側眼窩皮質の電気刺激による抑制効果について. *明治鍼灸医学*, 14 : 89-98, 1994.
- 20) Zhang Y Q, Tang J S, Yuan B, et al : Inhibitory effects of electrical stimulation of thalamic nucleus submedialis area on the rat tail flick reflex. *Brain Res*, 696 : 205-212, 1995.
- 21) Roberts V J, Dong W K : The effect of thalamic nucleus submedialis lesions on nociceptive responding in rats. *Pain*, 57 : 341-349, 1994.
- 22) Paxinos G, Watson C : The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd edition. Academic Press, Inc San Diego, 1986.
- 23) Clavier R M, Gerfen C R : Intracranial self-stimulation in the thalamus of the rat. *Brain Res Bull*, 8 : 353-358, 1982.
- 24) Ranck Jr J B : Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system : a review. *Brain Res*, 98 : 417-440, 1975.
- 25) Carrière P : The periaqueductal gray and defensive behavior : functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res*, 58 : 27-47, 1993.
- 26) Kawakita K, Funakoshi M : A quantitative study on the tail flick test in the rat. *Physiol Behav*, 39 : 235-240, 1987.
- 27) Bonnycastle D D, Cook L, Ipsen J : The action of some analgesic drugs in intact and chronic spinal rats. *Acta Pharmacol Toxicol*, 9 : 332-336, 1953.
- 28) Abbott F V, Hong Y, Franklin K B J : The effect of lesions of the dorsolateral funiculus on formalin pain and morphine analgesia : a



- dose-response analysis. *Pain*, 65 : 17-23, 1996.
- 29) Dubuisson D, Dennis S G : The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4 : 161-174, 1977.
- 30) Cohen S R, Melzack R: The habenula and pain : repeated electrical stimulation produces prolonged analgesia but lesions have no effect on formalin pain or morphine analgesia. *Behav Brain Res*, 54 : 171-178, 1993.
- 31) Cadet R, Aigouy L, Woda A : Sustained hyperalgesia can be induced in the rat by a single formalin injection and depends on the initial nociceptive inputs. *Neurosci Lett*, 156 : 43-46, 1993.
- 32) Vaccarino A L, Marek P, Kest B, et al : NM DA receptor antagonists, MK-801 and ACEA-1011, prevent the development of tonic pain following subcutaneous formalin. *Brain Res*, 615 : 331-334, 1993.
- 33) Abbott F V, Melzack R : Dissociation of the mechanisms of stimulation-produced analgesia in tests of tonic and phasic pain. *Adv Pain Res Ther*, 5 : 401-409, 1983.
- 34) Morgan M J, Franklin K B J : Stimulation-produced analgesia (SPA) from brain-stem and diencephalic sites in the rat : relationships between analgesia, aversion, seizures and catalepsy. *Pain*, 33 : 109-121, 1988.
- 35) Sumiya E, Murase K, Okada K, et al : Role of the nucleus submedialis in the endogenous pain inhibitory mechanisms of the rat. *Pain Res*, 12 : 21-26, 1997.



## Relationship Between Intracranial Self-Stimulation and Stimulation Produced Analgesia of Nucleus Submedius in Conscious Rats

†MURASE Kentaro<sup>1</sup>, SUMIYA Eiji<sup>1\*</sup>, OKADA Kaoru<sup>2</sup>, KAWAKITA Kenji<sup>2</sup>  
and KOBAYASHI Kazuko<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Department of Physiology, Graduate School of Acupuncture and Moxibustion,  
Meiji University of Oriental Medicine*

<sup>2</sup>*Department of Physiology, Meiji University of Oriental Medicine*

<sup>3</sup>*Department of Chemistry, Meiji University of Oriental Medicine*

*\*Present address: Department of Meridian and acupoint, Meiji  
University of Oriental Medicine*

**Summary:** The nucleus submedius (Sm) in the medial thalamus has been proposed as a thalamic relay for nociceptive information, which may mediate motivational and affective aspects of pain. However, recent studies have suggested that the Sm may also participate in pain inhibitory systems. In this study, to examine functional role of the Sm, we investigated the relationship between intracranial self-stimulation (ICSS) and stimulation produced analgesia (SPA) in conscious rats. Monopolar needle electrodes (180  $\mu$ m in diameter) were implanted chronically in the Sm, and the effects of focal electrical stimulation (0.3 ms, 50 Hz, 200  $\mu$ A) on lever press response, tail flick test and formalin test were examined. In addition, medial forebrain bundle (mfb) and periaqueductal grey (PAG) areas were used as the control sites for ICSS and SPA. ICSS-positive sites (lever press over 5 times/min) were found in five of 11 sites in the Sm. Two of five ICSS-positive sites clearly elongated the tail flick latency and four of these sites reduced the licking duration in the formalin test. Most ICSS-positive sites tended to induce analgesic effects.

These results suggest that the Sm is not a pure relay of nociceptive information to the cortex, and may participate, at least in part, in the reward system and pain inhibitory system.