

膜電位イメージング法による三叉神経脊髄路核興奮の 空間的・時間的解析

－ 新生マウスの単離脳幹標本を用いた研究 －

桑名俊一^[1] 植草学園大学保健医療学部

角友起^[2] 植草学園大学保健医療学部

齋藤基一郎^[3] 植草学園大学保健医療学部

小池和子^[4] 植草学園大学保健医療学部

Optical Imaging of Excitation Propagation in the Trigeminal Subnucleus Caudalis － Studies in *in vitro* Neonatal Mouse Trigeminal-Brainstem Preparations －

Shun-ichi KUWANA Faculty of Health Sciences, Uekusa Gakuen University

Yuki KAKU Faculty of Health Sciences, Uekusa Gakuen University

Kiichiro SAITO Faculty of Health Sciences, Uekusa Gakuen University

Kazuko A. KOIKE Faculty of Health Sciences, Uekusa Gakuen University

三叉神経脊髄路核は三叉神経支配領域に出現する疼痛の中継核だけでなく偏頭痛の発生源とも考えられている。この部位における求心性神経情報の処理様式を解明することは、慢性疼痛の予防・治療法を開発する上で必須である。本研究では、膜電位イメージング法を新生マウス脳幹標本に適用し、三叉神経根の電気刺激に対する延髄三叉神経脊髄路核における神経興奮伝播様式を動画像として解析し、さらに三叉神経痛治療薬カルバマゼピンの神経興奮伝播に対する抑制効果を検討した。三叉神経付き脳幹ブロックおよびスライス標本を膜電位感受性色素で染色した後、標本からの赤色蛍光を特殊高速高感度光計測システムで計測・記録した。三叉神経根の電気刺激後 10ms で三叉神経脊髄路尾側亜核に強い蛍光、すなわち興奮が認められ、その後数百 ms 持続した。興奮が長期間持続する状態は central sensitization (中枢神経における痛覚増強) と考えられた。電気刺激によって誘発される尾側亜核の興奮は 100 μ M カルバマゼピンの投与で著しく抑制された。以上の結果から、本研究では膜電位イメージング法を用いて central sensitization とカルバマゼピンの痛覚抑制効果が三叉神経脊髄路尾側亜核のレベルで惹起されることを明らかにした。

[1] 著者連絡先：桑名俊一

[2] 角友起

[3] 齋藤基一郎

[4] 小池和子

キーワード：三叉神経，三叉神経脊髄路尾側亜核，膜電位イメージング法，単離脳幹標本，新生マウス

Nociceptive afferent signals from the orofacial area are transmitted to the trigeminal nucleus in the brainstem. Plasticity of neurons in the spinal trigeminal nucleus is considered to cause the transition from acute to chronic pain. In the present study, spatial and temporal expansion of nociceptive afferent activity was examined in the mouse brainstems using an optical imaging technique. The propagation of neuronal excitation was measured by changes in fluorescent intensity evoked by electrical stimulation to the trigeminal nerve rootlet in the isolated trigeminal nerve-attached brainstem preparation of neonatal mice. Repetitive electric stimulation evoked excitation propagation in the dorsolateral medulla of which the area extended 200 μ m rostrally and 2mm caudally to the obex level. This area corresponded anatomically with the trigeminal subnucleus caudalis (Sp5c). The excitation was started with a 10ms delay and continued after more than 200ms of nerve stimulation. This long-lasting excitation was considered to be the central sensitization. The excitation propagation area and duration were significantly suppressed by application of 100 μ M carbamazepine (CBZ) which is an anticonvulsant and traditionally used in the treatment of neuropathic pain, especially trigeminal neuralgia. Thus, the present results from the optical imaging show that repetitive electric stimulation of the trigeminal nerve induces the long-lasting excitation of secondary neurons in the Sp5c, and that an analgesic action of CBZ results from large suppression of the excitation of the Sp5c.

Keywords : Trigeminal nerve, Trigeminal subnucleus caudalis, Optical imaging technique, Isolated brainstem, Neonatal mouse

1. はじめに

三叉神経は顔面の知覚を司る神経であるが，その領域に出現する頑固な疼痛は，特発性三叉神経痛，頭蓋内腫瘍，帯状疱疹後神経痛，歯科口腔外科疾患などでも見られ，慢性疼痛疾患の中でも比較的頻度の高い疾患である。また，最近では，片頭痛なども三叉神経系を介して引き起こされることが示唆されている¹⁾。これらの痛みの原因として，痛みを受容する中枢性二次ニューロンの可塑性が考えられている。三叉神経支配領域からの痛覚情報は，三叉神経半月神経節の細胞体を介して脳幹内へ入り，橋から延髄尾側部へ伸びる三叉神経脊髄路核の主に尾側亜核において処理される。三叉神経を頻回刺激すると尾側亜核ニューロンの興奮性の増大（wind-up 現象），興奮性シナプス後電位の長期増強（LTP）と長期抑制（LTD）が生ずることが報告されている^{2,3)}。すなわち，三叉神経脊髄路核の可塑性が慢性疼痛の原因と考えられている。

一方，脳内神経回路網における神経興奮伝播過程の空間的動態を解析するために，膜電位感受性色素を用いた神経興奮のイメージング解析法が近年用いられるようになってきた。膜電位イメージング法は

ラット脳幹スライス⁴⁾に応用され，脳幹内の三叉神経投射領域神経回路網解析に有用であることが報告されている⁴⁻⁶⁾。本研究でも膜電位イメージング法を用い，マウス脳幹内神経回路網における三叉神経からの求心性情報伝播過程を空間的・時間的に解明すると同時に，三叉神経痛の薬物療法として現在臨床的に使用されている薬剤カルバマゼピンの効果について検討する。

2. 方法

2.1 標本

新生マウス（4-7日齢18匹，C57/BL6）をエーテルで麻酔し，尾のピンチ反応が消失したことを確認した後，脳幹・脊髄を摘出した（図1A）⁷⁾。標本は橋，延髄，上位胸髄，両側三叉神経根を含めて摘出し，酸素化人工脳脊髄液（aCSF）を満たしたチェンバー内で維持した。延髄の門（obex）から尾側100 μ mのレベルで横切断した橋延髄ブロック標本（図1B），あるいは脳幹の長軸方向の矢状面に沿って切断した橋延髄スライス標本（図1C）を製作した。

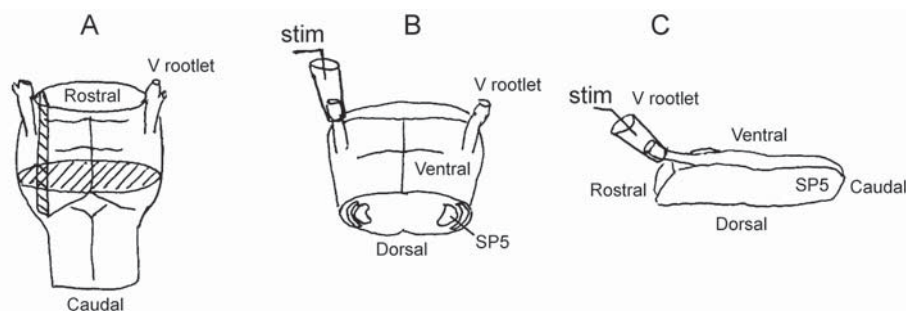


図1. 膜電位イメージング法に用いた標本。A. 摘出脳幹三叉神経標本。腹側面を手前に、横断面および矢状断面を斜線で示す。この標本での測定は背側面より行った。B. 三叉神経付き脳幹ブロック標本。この標本での測定は尾側切断面を上にして行った。C. 三叉神経付き脳幹矢状断スライス標本。この標本での測定は歯状断面を上にして行った。いずれの標本においても三叉神経根を吸引電極で吸引し、電気刺激を行った。

2.2 膜電位イメージング法

各標本を膜電位感受性色素 (di-4-ANEPPS 0.25mg/ml) で30分染色した後、計測面を上にして蛍光顕微鏡下の記録用チャンバー内に標本を固定し、酸素化人工脳脊髄液 ($O_2=95\%$, $CO_2=5\%$, $pH=7.4$) により $26^\circ C$ で連続的に灌流・維持した。三叉神経根をガラス吸引電極で吸引した後、刺激強度 0.5-1.0 mA, 持続時間 $200\mu s$, 1.0Hzの電気刺激を20秒与えた。タングステンハロゲンランプを光源とする緑色励起光 (530nm) により計測表面を照射し、標本からの赤色蛍光 (620nm) を特殊高速高感度光計測システム (BrainVision社製 MiCAM01) で計測・記録した⁸⁾。このシステムでは1回の刺激に対して1回の測定が可能であるが、蛍光が弱いため、本研究での記録は20回の刺激を加算したもので現した。

2.3 カルバマゼピンの影響

てんかん発作および三叉神経痛の治療に使用されるカルバマゼピンの濃度を $100\mu M$ に調整した人工脳脊髄液で10分間の灌流を行い、薬剤が神経興奮伝播過程に及ぼす観察面での影響を空間的、時間的に解析した。

3. 結果

3.1 ブロック標本における測定

三叉神経根の電気刺激により三叉神経脊髄路核の興奮が引き起こされることをブロック標本を用いて確認した。図 2A はブロック標本を用い、延髄背側部から興奮部位を観察したものである。神経刺激後約 10ms 後に延髄背外側部に興奮部位が認められた。その部位は obex の位置を基準に吻側 $200\mu m$ から尾側 2mm の範囲であった。obex より尾側 $100\mu m$ の横断面の観察でも、背外側部に興奮が認められた (図 2B)。これらの興奮部位は、解剖学的に三叉神経脊髄路尾側亜核に相当した。また、この部位の興奮は数 100ms にわたって持続することが分かった。以上のことから、ブロック標本の三叉神経根を電気刺激することによって、三叉神経脊髄路尾側亜核の二次ニューロン群が興奮することが確認できた。

3.2 スライス標本における測定

図 1C に示す歯状面で切断したスライス標本を用い、三叉神経根電気刺激による興奮部位を空間的・時間的に観察した。図 3 は切断面を観察したものでありパネル A は時間的経過を示した。最大興奮の後、興奮は減少するものの、長時間 (200ms 以上) にわたって持続した。パネル B は三叉神経電気刺激後 5ms から 24ms まで 1ms 毎の興奮の広がりを示す。約 7ms の潜時で三叉神経脊髄路核に興奮が到達し刺激後 15~20ms で最大となった。

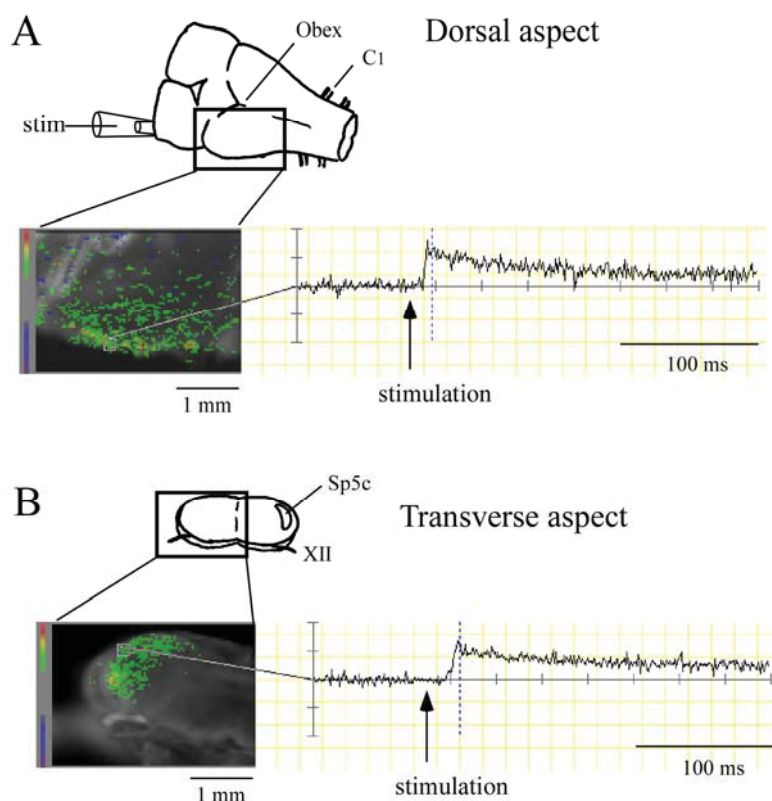


図2. ブロック標本による三叉神経根の電気刺激による興奮部位の広がりや時間経過。A. 背側面からの記録。B. 延髄横断面からの記録。いずれも模式図の四角で囲った部分から記録を行った。

3.3 カルバマゼピンの影響

スライス標本を用いてカルバマゼピンの影響を観察した (図 3)。三叉神経根電気刺激による三叉神経脊髄路吻側亜核の興奮は、 $100\mu\text{M}$ カルバマゼピン灌流中に興奮領域の減少、興奮の最大値の減少および興奮の短縮が認められた。約 10 分の Washout により回復が認められた。

4. 考察

新生マウスの単離脳幹標本に膜電位イメージング法を用い、三叉神経電気刺激による三叉神経脊髄路尾側亜核の興奮が、時間的・空間的に可視化できた。また、本研究では核内二次ニューロンの興奮が長期間持続すること、カルバマゼピンがその興奮を抑え

ることを明らかにした。

本研究の膜電位感受性色素を用いたイメージング法は、脱分極だけでなく過分極も検出できる。また、神経脊髄路尾側亜核においては抑制性神経伝達物質を産生する GABA 性ニューロンが多数存在していることが報告されている^{7,9)}。本研究の結果は、この部位の興奮性ニューロンだけでなく抑制性ニューロンも興奮していることを示している。このことから、この部位の抑制性ニューロンは他の核群のニューロンの興奮を抑制すると考えられた。

繰り返し三叉神経を電気刺激すると三叉神経脊髄路尾側亜核のニューロン群の興奮が長期間持続する状態は central sensitization (中枢神経における痛覚増強)^{10,11)} と呼ばれている。本研究で用いた記録は 20 回の繰り返し刺激の加算を表示したものであるため、刺激後蛍光が長期に持続する現象はこの

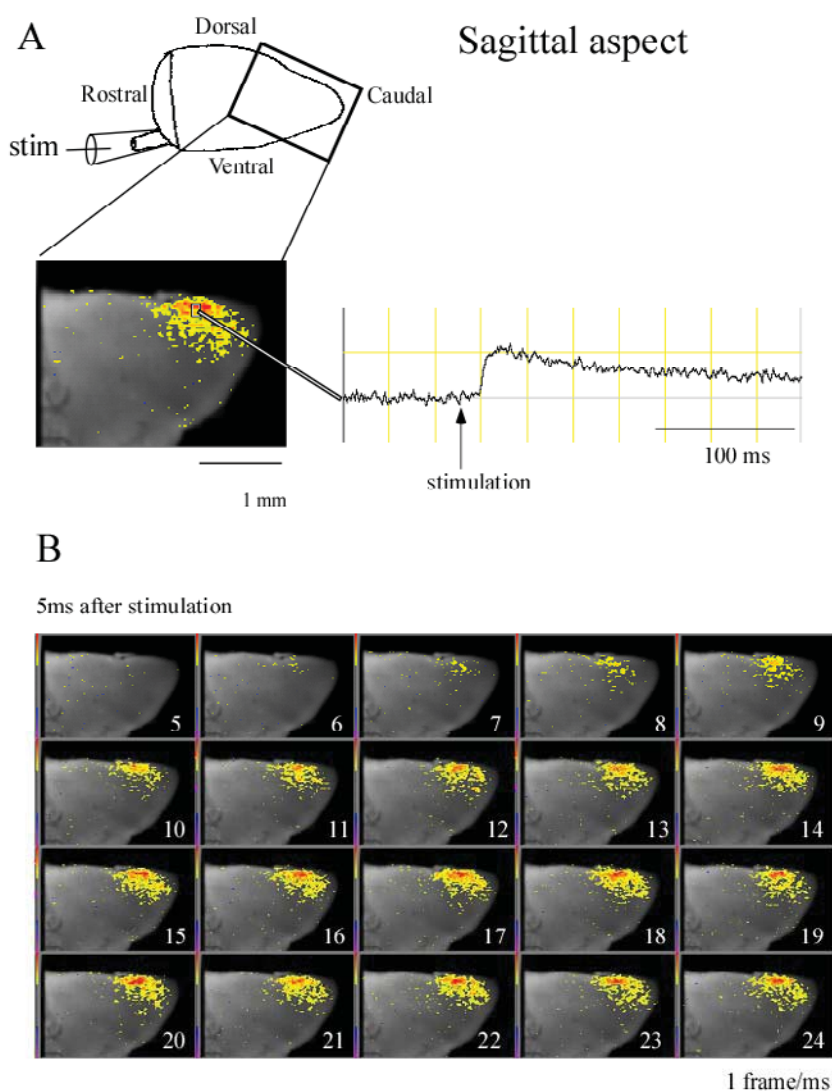


図3. スライス標本による三叉神経根の電気刺激による興奮部位の広がりや時間経過。A. 歯状面からの記録。右のパネルは時間経過を示す。B. 電気刺激後5msから24msまでの1ms毎の興奮の様子。

central sensitization を示している可能性が高い。分子レベルでは、尾側亜核ニューロンには、グルタミン酸 (Glu) 受容体、サブスタンス P のニューロキニン (NK) 受容体あるいはカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 受容体が存在し、頻回刺激によりこれらの受容体が活性化される。その後、細胞内 Ca 濃度の上昇、プロテインキナーゼ (PKA, PKC) の活性化、セカンドメッセンジャーの産生、膜タンパクのリン酸化という細胞内カスケード反応が惹起され、興奮が長期にわたって増強持続する。すなわち、細胞内伝達系の活性化とその変化によって慢性疼痛に移行すると思われる。

カルバマゼピンは三叉神経痛やてんかんの治療薬

として用いられている。本研究では、カルバマゼピンによって三叉神経脊髄路尾側亜核の二次ニューロンの興奮が強く抑制されることを明らかにした。カルバマゼピンの神経系に対する薬理作用としては TTX 耐性の Na チャネルを閉鎖させることで活動電位の発生を抑えることが報告されている¹²⁾。このことから、カルバマゼピンは三叉神経痛の伝導経路の中で尾側亜核二次ニューロンの Na チャネルに作用すると考えられた¹³⁾。

本研究では三叉神経付き脳幹スライス標本を用い膜電位イメージング法によって興奮の伝導を検討した。膜電位イメージング法は空間解析には有効であるが、蛍光色素のブリーチング等のため時間的経過

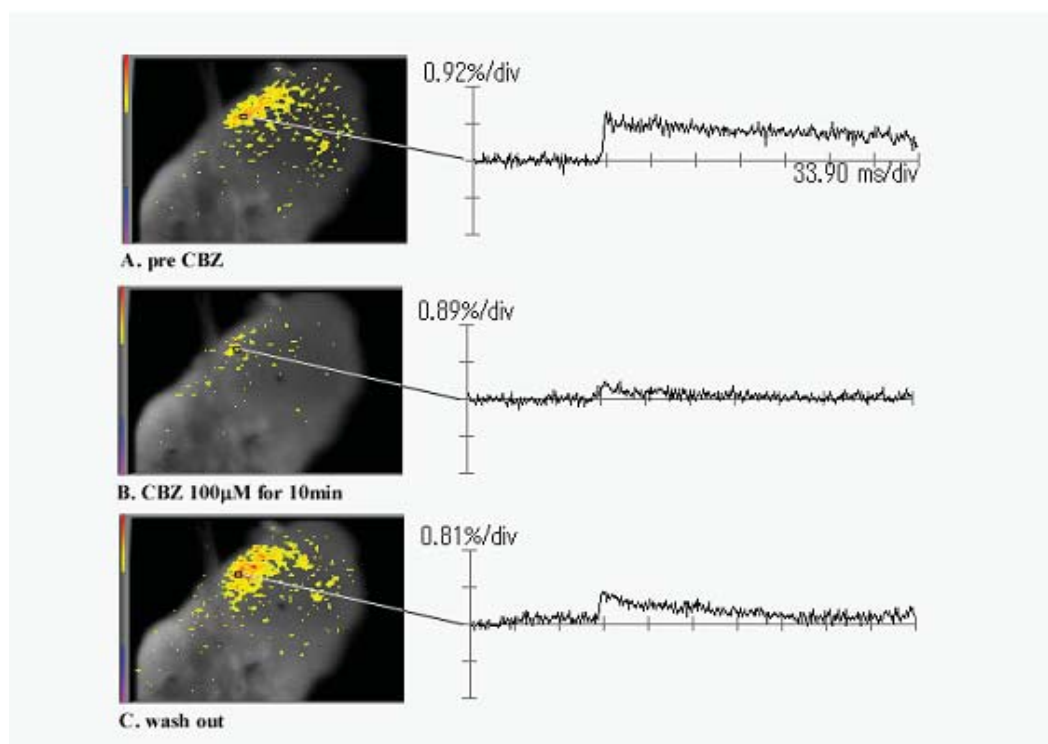


図4. スライス標本によるカルバマゼピン (CBZ) の効果。100 μ M CBZ の灌流中 (B パネル) , 三叉神経電気刺激によって誘発される三叉神経脊髄路尾側亜核の興奮は空間的・時間的にも小さくなった。

を解析するには注意が必要である。この欠点を補うため、今後はスライスパッチ法等の電気生理学的手法を加えて、個々のニューロンレベルの解析が必要と考えられた。

5. 倫理的配慮

実験動物の取り扱いに関しては、「生理学領域による動物実験に関する基本的指針」(日本生理学会平成15年改訂)に従った。また、本研究は、植草学園大学保健医療学部動物実験委員会の承認 (URAC08-01) を得たものである。

6. 謝辞

本研究は、文部科学省の科学研究費 (平成19~21年度 19603015) および植草学園大学共同研究費 (平成21年度) の助成を得たものである。

7. 文献

- 1) Goadsby PJ. Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and therapeutics. *Trend in Molecular Medicine*. 2007;13:39-44,
- 2) Hamba M, Onodera K, Takahashi T. Long-term potentiation of primary afferent neurotransmission at trigeminal synapses of juvenile rats. *Eur J Neurosci*. 2000;12:1128-34
- 3) Onodera K, Hamba M, Takahashi T. Primary afferent synaptic responses recorded from trigeminal caudal neurons in a mandibular nerve-brainstem preparation of neonatal rats. *J Physiol*. 2000;524:503-512
- 4) Seo K, Fujiwara N, Takeuchi K, Maeda T, Someya G. Optical imaging of excitation propagation evoked by stimulation to the trigeminal caudalis. *Neuro Report*. 2001;12(18):3985-8,
- 5) Seo K, Fujiwara N, Takeuchi K, Maeda T, Someya G. Repetitive afferent stimulation propagates excitation in the trigeminal caudalis. *Neuro Report*. 2003;14(10): 1321-1325

- 6) Takuma S. Effect of neonatal capsaicin treatment on neural activity in the medullary dorsal horn of neonatal rats evoked by electrical stimulation to the trigeminal afferents: an optical, electrophysiological, and quantitative study. *Brain Research* 2001;906:1-12
- 7) Kuwana S, Tsunekawa N, Yanagawa Y, Okada Y, Kuribayashi J, Obata K. Electrophysiological and morphological characteristics of GABAergic respiratory neurons in the mouse pre-Bötzinger complex. *Eur J Neurosci*. 2006;23:667-674
- 8) Okada Y, Chen Z, Yoshida H, Kuwana S, Jiang W, Maruiwa H. Optical recording of the neuronal activity in the brainstem-spinal cord: application of a voltage-sensitive dye. *Adv Exp Med Biol*. 2001;499:113-8
- 9) Viggiano A, Monda M, Viggiano A, Chiefari M, Aurilio C, De Luca B. Evidence that GABAergic neurons in the spinal trigeminal nucleus are involved in the transmission of inflammatory pain in the rat: a microdialysis and pharmacological study. *Eur J Pharmacol*. 2004;496:87-92
- 10) Dubner R, Ruda MA. Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci*. 1992 Mar;15(3):96-103.
- 11) Woolf CJ, Thompson SW. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain*. 1991 Mar;44(3):293-9.
- 12) Ambrósio AF, Soares-Da-Silva P, Carvalho CM, Carvalho AP. Mechanisms of action of carbamazepine and its derivatives, oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. *Neurochem Res*. 2002 Feb;27(1-2):121-30
- 13) Satoh M, Foong FW. A mechanism of carbamazepine-analgesia as shown by bradykinin-induced trigeminal pain. *Brain Res Bull*. 1983 Mar;10(3):407-9