

学 位 論 文 題 名

ラット腹腔内侵害刺激に対する脊髄での  
プレプロダイノルフィン mRNA 発現に関する研究

学位論文内容の要旨

緒 言

侵害刺激に反応し脊髄後角では、種々のニューロペプチドが増減することが報告されている。なかでも、ダイノルフィンの増加は、この物質がモルヒネ様の鎮痛効果をもたらすことから、鎮痛機構との関わりで注目されている。さらには、そのダイノルフィンとの産生変化を引き起こす媒介となる最初期遺伝子 *c-fos* の発現が報告されてきている。これらの所見は、体性痛によって得られた所見であり、内臓痛に関してはいまだ報告がない。そこで、本研究では腹腔内侵害刺激に対する脊髄および腹腔神経節でのプレプロダイノルフィン mRNA と *c-fos* mRNA の発現を検討した。

材料と方法

(1)実験動物とモデル

10～14週令の Fisher 系ラット・雄の腹腔内に、0.6%カラゲニンを 2 cc 投与し、腹腔内侵害刺激モデルを作成した。投与から30分後、1時間後、2時間後、4時間後、8時間後、12時間後、24時間後、及び48時間後に脊髄と腹腔神経節を採取した。脊髄については、頸髄、胸髄及び腰髄によりプレプロダイノルフィン mRNA と *c-fos* mRNA の発現を検討した。腹腔神経節については、頸髄、胸髄及び腰髄に分割して ribonuclease protection assay と *in situ* hybridization で検討した。なお、各時間について実験数が4頭以上になるようにし、合計73匹を使用した。

(2)RNA の抽出

脊髄を頸髄、胸髄及び腰髄に分割後、acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction 法にて RNA の抽出を行った。

(3)RNA プローブに用いたプラスミド

1.7kb ラット・プロダイノルフィン cDNA 断片が挿入されているアンチセンス鎖のプラス

ミド pSP64D1.7 とラット *c-fos* の cDNA が pSP65 ベクターに組み込まれたアンチセンス鎖のラット *c-fos* la 及びセンス鎖のラット *c-fos* 1 b を使用した。

#### (4) RNA プローブの作製

pSP64D1.7 を制限酵素 *Sty* I を用い、またラット *c-fos* la 及びラット *c-fos* 1 b を制限酵素 *Pvu* II で消化してテンプレート DNA を作製した。次いで、 $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP と SP6 RNA ポリメラーゼを用い、*in vitro* transcription を行い、 $\alpha^{32}\text{P}$  で標識した大きさ 344bp のダイノルフィン cRNA アンチセンスプローブと 405bp の *c-fos* 1 a cRNA アンチセンスプローブ及び *c-fos* 1 b cRNA センスプローブを作製した。放射活性はいずれも  $1 \sim 5 \times 10^7$  cpm/ $\mu\text{g}$  であった。また、*in situ* hybridization 用には、 $\alpha^{35}\text{S}$ -UTP と SP6 RNA ポリメラーゼを用い、同様に作製した。放射活性は  $3 \sim 5 \times 10^7$  cpm/ $\mu\text{g}$  であった。

#### (5) Ribonuclease protection assay (RPA)

抽出した  $10 \mu\text{g}$  の RNA に対し  $1 \sim 5 \times 10^5$  cpm の cRNA プローブを用い  $43^\circ\text{C}$  で 16 時間以上ハイブリダイズさせた。次いで、RNase A/T1 mixture で処理した後、3.5% ポリアクリルアミドゲル/8 M 尿素ゲルで電気泳動し、 $-70^\circ\text{C}$  で、感光させた後、現像した。

#### (6) *in situ* hybridization

4% パラホルムアルデヒド/0.1M 磷酸緩衝液 (pH7.4) にて還流固定された脊髄および腹腔神経節を、OCT コンパウンドにて包埋、凍結した。次いで、 $10 \mu$  に薄切した標本に対し、 $^{35}\text{S}$  で標識された  $1 \times 10^6$  cpm の cRNA プローブを反応させ、 $50^\circ\text{C}$  にて 16 時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション終了後、50% ホルムアミド、 $2 \times \text{SSC}$ 、 $50^\circ\text{C}$ 、30 分間洗浄した。RNase で処理した後、 $2 \times \text{SSC}$ 、 $50^\circ\text{C}$ 、20 分間、2 回、 $0.2 \times \text{SSC}$ 、 $50^\circ\text{C}$ 、20 分間、2 回洗浄した。オートラジオグラフィーは、 $4^\circ\text{C}$  で行い、約 2 週間の露光期間の後、現像した。

## 結 果

### (1) 実験モデルの状態

腹膜や腸間膜及び脾被膜に広範囲の好中球を主体にした炎症細胞浸潤を認めた。また、炎症は腹腔動脈や腹腔神経節の周囲にも波及し、腹膜炎の病理組織学的所見であった。

### (2) Ribonuclease protection assay の結果

#### (a) プレプロダイノルフィン mRNA の成績

全サンプルに、大きさ 344bp 付近のバンドが認められ、それぞれにプレプロダイノルフィン mRNA が発現していることが示された。その発現は、胸髄で強く発現し、30 分後より始まり、

経過時間中増加したままであった。

#### (b)c-fos mRNA の成績

c-fos1 a cRNA アンチセンスプローブにて、30分及び1時間経過後のサンプルに、大きさ405bp 付近のバンドが認められた。このバンドは、30分後より認められ1時間後をピークに発現量がしだいに減少して、12時間後にはほとんど発現は認められなくなった。

#### (3)in situ hybridization の成績

脊髄後角の第I層、第II層の神経細胞において、核内を中心に銀粒子の集積したプレプロダイノルフィン mRNA を多数認めた。腹腔神経節においてはプレプロダイノルフィン mRNA および c-fos mRNA 発現のは、共に認めることができなかった。

## 考 察

ダイノルフィンとは神経ペプチドのひとつで、モルヒネ様鎮痛作用を有し疼痛発現時に産生が増加すると考えられる。このダイノルフィンの増加は、その前駆体蛋白であるプロダイノルフィンの増加によって示され、プロダイノルフィンの増加は、プレプロダイノルフィン mRNA の増加によって示される。侵害刺激に反応するダイノルフィンについては、ラットの片足に Freund's adjuvant やカラゲニンを注入し、体性痛覚線維を痛覚過敏状態にした片足の炎症モデルで検討されている。Draisci らは、プレプロダイノルフィン mRNA の発現量が4時間後に増加しはじめ、2日目から5日目にかけコントロールの8倍もの発現量を示し2週間でコントロールのレベルに戻っていることを示した。このように、体表の侵害刺激に対してプレプロダイノルフィン mRNA は増加するが、本実験では、腹腔内侵害刺激に対する反応を検討した。そして、プレプロダイノルフィン mRNA の増加が30分後の早い時期から急激に増加しそのまま維持されることが示された。この増加は、腹腔内臓器および腹膜の侵害受容ニューロンの分布している脊髄領域で起こっていることから、ホルモンやストレスなどの全身的なものによるのではなく、腹腔内侵害刺激によるものと考えられる。このことは、腹腔内侵害刺激に対しても、ダイノルフィンによる痛覚抑制が働いていることを示している。また、in situ hybridization での結果もこれを指示し、脊髄後角のI層とII層でプレプロダイノルフィン mRNA の発現が認められた。

また、Draisci らは c-fos mRNA の増加がプレプロダイノルフィン mRNA の増加に先んじて、30分後より認められ、2時間でピークを示し、以後急激に減少することを報告した。そして、in situ hybridization でプレプロダイノルフィン mRNA と Fos が共存していることを示す報告も見られる。本実験でも c-fos mRNA の発現形式は Draisci らと類似しており、腹腔

内侵害刺激に対しても Fos がダイノルフィンの調節に関与していると考えられた。

以上より、腹腔内侵害刺激によっても最初期遺伝子である *c-fos* を介したダイノルフィンの発現が示されたが、その時間的・量的経過が体性痛における諸家の報告経過に比べやや異なっていた。これは侵害刺激の強さや範囲の違いから生じたと考えられる。すなわち、侵害刺激の程度・疼痛の程度によってダイノルフィンの発現の経過が異なってくることを示しており、ダイノルフィンが痛みという主観的な知覚刺激を客観的にとらえる一つの指標となりえることを示している。

しかし、侵害刺激で活性化されるすべての神経細胞において、*c-fos* を介したプロダイノルフィンの発現が認められるわけではない。腹腔内侵害刺激によっては腹腔神経節において、*in situ hybridization* でプレプロダイノルフィン mRNA および *c-fos* mRNA は共に検出できなかった。侵害刺激による疼痛を伝える一次知覚ニューロンでは、ダイノルフィンは発現量が少ないか、もしくは発現していないことも考えられる。

## 結 語

ラットに腹腔内侵害刺激を誘発させ、脊髄および腹腔神経節におけるプレプロダイノルフィン mRNA の経時的発現変化を検討し、以下の結果を得た。

- (1)腹腔内侵害刺激によって侵害受容ニューロンが分布している脊髄領域でプレプロダイノルフィン mRNA の経時的変化が認められた。
- (2)プレプロダイノルフィン mRNA の変化に先立って、*c-fos* mRNA の増加が認められ、Fos が調節因子になっていることが示唆された。
- (3)*in situ hybridization* にて脊椎後角の第 I 層、第 II 層にプレプロダイノルフィン mRNA の発現を認めた。
- (4)腹腔神経節においては、プレプロダイノルフィン mRNA および *c-fos* mRNA の発現は認められなかった。

ダイノルフィンは、体性侵害刺激におけるのと同様に内蔵侵害刺激でも発現し、その時間的・量的経過は侵害刺激の程度によって影響をうけるとみられ、内蔵痛を客観的に捉えるひとつの手段となると考えられた。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 邊 達 三  
副 査 教 授 本 間 研 一  
副 査 教 授 劔 物 修

ダイノルフィンとは、モルヒネ様の鎮痛効果をもたらすことから、鎮痛機構との関わりで注目されている。体性侵害刺激によって引き起こされるダイノルフィン遺伝子の発現については、これまでいくつかの報告がみられるが、内蔵侵害刺激に対するダイノルフィン遺伝子の発現に関する報告はない。そこで本研究では、カラゲニンによって腹腔内に炎症を引き起こしたラットを用いて、内蔵侵害刺激におけるダイノルフィンの発現を検討した。すなわち、投与後30分から24時間にわたって断続的に脊髄と腹腔神経節を採取し、ribonuclease protection assay と *in situ* hybridization によってプレプロダイノルフィン mRNA と *c-fos* mRNA の発現を検討した。その結果、ラットに炎症を起こすと胸髄で急激に *c-fos* mRNA が増加した。この *c-fos* mRNA はカラゲニンの注入30分後から増加し1時間後にピークに達し12時間後にはほとんど認められなくなった。これに対しプレプロダイノルフィン mRNA は、炎症を起こしてから30分であがりはじめ少なくとも2日間はその上昇を維持した。<sup>35</sup>S で標識した RNA プローブを用いた *in situ* hybridization では、下部胸髄後角の第 I 層と第 II 層にプレプロダイノルフィン mRNA の発現を認めた。腹腔神経節ではプレプロダイノルフィン mRNA と *c-fos* mRNA はともに認めることはできなかった。これらの所見から腹部組織の炎症後において、胸髄で *c-fos* によって調節を受けるダイノルフィン生合成の活性化が起こることが示された。ダイノルフィンは、体性侵害刺激におけるのと同様に内蔵侵害刺激でも発現したが、その時間的・量的経過は体性侵害刺激と少し異なっていた。これ、腹膜炎は高度であり、ダイノルフィンが侵害刺激の程度によって発現されるためであると考察された。以上のごとくダイノルフィンは体性侵害刺激と同様に内蔵侵害刺激でも発現し、侵害刺激の程度に影響を受けるものとみられ、プレプロダイノルフィンの発現が疼痛のひとつの指標となるものと考えられた。

口頭発表において、本間教授よりダイノルフィンの鎮痛作用点、炎症程度と dose response、*c-fos* 発現の抑制法、劔物教授よりプレプロダイノルフィン mRNA の測定法、受容体サブタイプの種類、拮抗薬の有無、金田教授より副交感神経の関与、藤本教授より *c-fos* 増加とダイノルフィンの産生、加藤教授より秒単位における疼痛との関係、安田教授より疼痛の慣れと

ダイノルフィンの変動などについて質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答を行った。また、本間、劔物両教授には個別に審査を受け合格と判定された。

本研究は、内蔵痛についてダイノルフィンの産生を中心に分子生物学的検討を加えた新しい研究であり、学位授与に値すると考える。