

## 髄核の末梢神経に対する侵害刺激作用

### — 脊髄後角における c-fos 陽性細胞の免疫組織化学的検討 —

門 知 生

腰椎椎間板ヘルニアに発生する根性坐骨神経痛の病因の一つとして、椎間板を構成する髄核自体が神経根へ組織学的変化、炎症反応を引き起こすことが報告されている。今回、髄核が後根神経節より遠位の末梢神経に及ぼす影響を検討した。実験はラットを用い、末梢神経の坐骨神経上膜周囲に他のラット尾部から採取した椎間板成分の同種髄核を注入し、中枢神経の脊髄後角に痛みとして認知されるか否かを評価した。動物実験上で捉えにくい痛みを客観的に評価するために、疼痛受容の指標として用いられている c-fos 陽性細胞の発現を免疫組織化学染色した。その結果、超音波破碎機でゲル状にした髄核を注入したものは、坐骨神経上膜周囲に炎症細胞の浸潤がみられ、また L4 髄核レベル後角の内側Ⅲ、Ⅳ層に c-fos 陽性細胞の発現が観察された。c-fos 陽性細胞の発現は、中枢神経細胞の活動性の亢進を示しており、疼痛との関連性を示唆した。

(平成12年10月27日受理)

## Noxious Stimulation on the Peripheral Nerve by the Nucleus Pulposus — Expression of c-fos in the Lumbar Spinal Cord ; Immunohistochemical Study —

Tomoo KADO

It is generally accepted that the nucleus pulposus (NP) can induce adverse neurophysiologic, inflammatory and neurotoxic changes in the nerve roots. The purpose of this study was to investigate the effect of noxious stimulation by allogenous NP on the peripheral nerve using c-fos as a neural marker of pain in a rat model. The present findings demonstrated that irritants from the allogenous homogenized NP fragment could induce local inflammation, and c-fos expression was observed in the medial regions of laminae III and IV at the L4 cord level. c-fos expression shows the neuronal activity of spinal cord neurons. It is suggested to be related to pain. (Accepted on October 27, 2000) *Kawasaki Igakkaishi 27(1): 59-65, 2001*

**Key Words** ① Nucleus pulposus ② Pain ③ c-fos

### はじめに

日常診療で遭遇する根性坐骨神経痛の一因に腰椎椎間板ヘルニアがあるが、患者の症状は非

常に多彩で、一概に脱出椎間板による神経根圧迫だけでは根性疼痛の発生を明確に説明することはできず、機械的圧迫因子以外に化学的因子の作用が考えられている。近年、脱出椎間板ヘルニア周囲の炎症反応が注目されており<sup>1)~3)</sup>、

椎間板成分である髓核が、炎症反応を引き起こしやすいといわれる<sup>4)</sup>。また Macnab<sup>5)</sup>は、正常の神経根では神経根部にバルーンを留置した人工的椎間板ヘルニアモデルでは、痛みは誘発されなかったが、ヘルニアを起こした神経根では痛みが誘発されたと報告している。Robertら<sup>6)</sup>は、ホモジネイトされた髓核は、神経根に化学的、免疫学的な刺激を及ぼし、腰痛の原因となりうる可能性を報告した。髓核による炎症反応の誘導は、神経根への化学的刺激や後根神経節で産生される神経伝達物質を放出すると考えられ、中枢神経細胞に作用し、痛みに関与すると思われる<sup>7)</sup>。しかしながら、腰椎の外側型ヘルニアの場合のような末梢神経の神経生理学的変化については、過去報告されていない。

今回の実験では、髓核によって誘発される侵害刺激が神経根に対すると同様に、末梢神経にも侵害刺激として作用し、中枢神経に痛みとして認知されうるといふ仮説を立てた。この実験の目的は、同種髓核による末梢の侵害刺激効果を明確にすることである。本実験では、痛みのマーカーとして用いられる c-fos 陽性細胞を免疫組織化学染色し脊髄後角での発現を確認した。

### 実験材料および実験方法

Wistar 系雌ラット (270~300 g) に、ジエチルエーテルの吸入麻酔を行い、ラット大腿部に小切開を加え右坐骨神経を露出し、以下の3群を作成した。また同種髓核として他のラットの尾部椎間板から髓核を摘出した。1) control 群 (n = 5) : 右坐骨神経露出のみの群、2) Nucleus pulposus (NP) 群 (n = 5) : 尾部から同種髓核を3椎間分摘出し、同量の生理食塩水を加え2倍希釈し超音波破砕機 (Sonifier II model 250, BRANSON) により攪拌したものを、坐骨神経上膜周囲に30 G 針にて0.05 ml 注入した群、3) sham 群 (n = 5) : 生理食塩水を坐骨神経上膜周囲に30 G 針にて0.05 ml 注入した群。

それぞれ処置2時間後に深麻酔下で4℃の4

% paraformaldehyde - 0.1 M phosphate buffer (PBS) 溶液を用いて灌流固定し、L4, L5 髓節レベルの脊髄を一塊として摘出した。摘出した脊髄は同液中で24時間浸漬し、続いて20% sucrose-PBS 液に24時間浸漬した後、microtome を用いて30  $\mu$ m の凍結切片を作成した。その凍結切片を0.1 M PBS に浮遊切片として集め、5000 倍に希釈した抗 c-fos 抗体 (anti c-fos 456 ; medac) 中で3日間、次に、Biotin 化抗 IgG 抗体 (Vector) 中で24時間、洗浄後、更に preformed Avidin-Biotin Complex (Vector) 中で2時間反応させた後に、次いで diaminobenzidine 及び過酸化水素を用いて発色させた。切片はスライドガラスに貼り付け、顕微鏡下で脊髄後角の c-fos 陽性細胞の確認を行った。c-fos 陽性細胞の発現数の評価は、Molander らのラット脊髄図譜に基づき、脊髄後角外側では I, II 及び III 層における範囲、また脊髄内側部では III, IV 層における範囲の c-fos 陽性細胞数を観察した。

また坐骨神経の組織学的変化を調べるため、各々のモデル群に対して坐骨神経を摘出しホルマリン固定後、Hemtoxylin-eosin 染色を行い、組織学的に検討した。

なお、本研究は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (承認番号96-080, 98-001, 99-013)、川崎医科大学の動物実験指針に基づき実施された。

### 結 果

#### 1. c-fos 発現

全てのグループにおいて、L4 髓節レベル脊髄後角外側の I, II 及び III 層に c-fos 陽性細胞がみられた (Fig. 1,2)。脊髄後角外側に発現した c-fos 陽性細胞の1切片あたりの平均個数は、control 群 :  $16.1 \pm 3.9$  個, sham 群 :  $16.2 \pm 5.3$  個, NP 群 :  $16.1 \pm 3.6$  個であった。しかし、NP 群では更に、L4 髓節レベル後角の内側 III, IV 層に c-fos 陽性細胞がみられた。1切片あたりの平均個数は、 $10.9 \pm 4.1$  個であった (Fig. 3,4)。なおこの内側発現レベルは外側にみられ



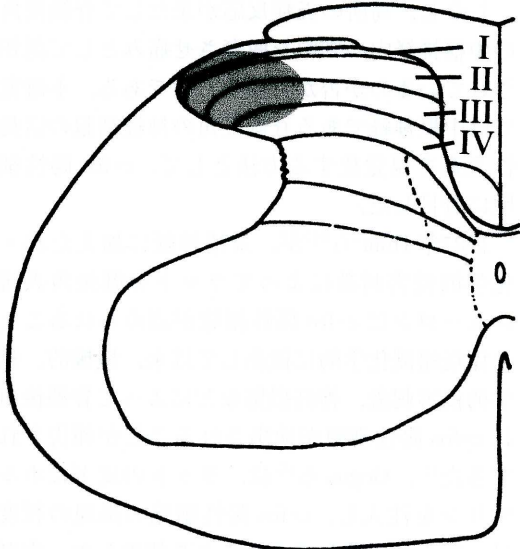


Fig. 1. The region of c-fos expression is the lateral portion of the dorsal horn laminae.

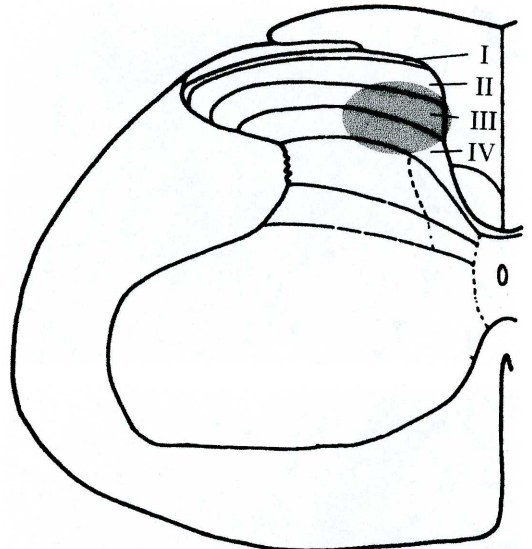


Fig. 3. The region of c-fos expression is the medial portion of the dorsal horn laminae.

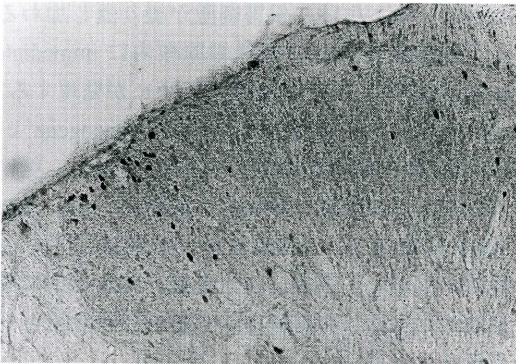


Fig. 2. Photomicrograph illustrating the distribution of c-fos expression in the L4 segment of the lumbar spinal cord. In the control group, c-fos expression was observed in the dorsal horn laminae I, II and III. (Immunohistochemical stain, x200)

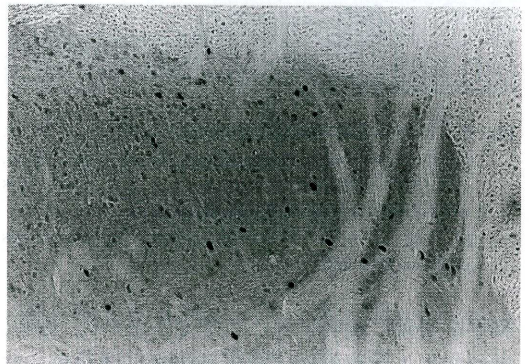


Fig. 4. Photomicrograph illustrating the distribution of c-fos expression in the L4 segment of the lumbar spinal cord. In the NP group, c-fos expression was observed in the dorsal horn laminae III and IV. (Immunohistochemical stain, x200)

た発現レベルよりわずかに尾側であった。

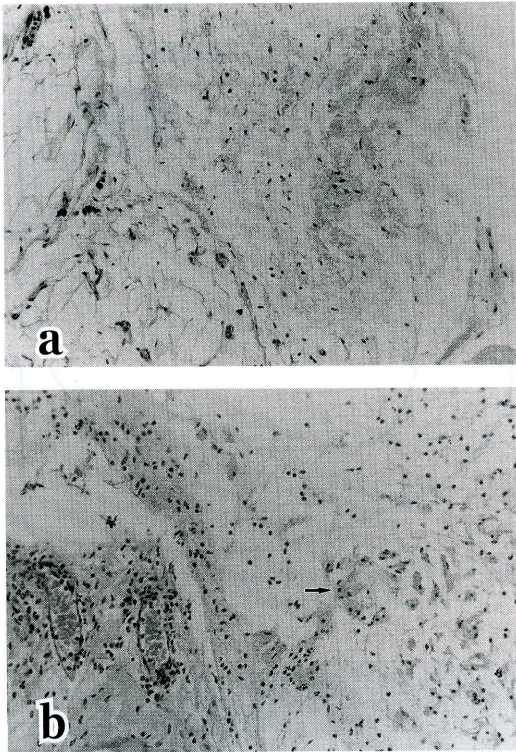
## 2. 坐骨神経の組織学的変化

control 群, sham 群では, 坐骨神経上膜周囲に軽度の好中球, リンパ球の浸潤がみられたのに対して, NP 群では, 坐骨神経上膜周囲に好中球, リンパ球の著明な浸潤が観察された (Fig. 5a,5b).

## 考 察

腰椎椎間板ヘルニアに伴う根性坐骨神経痛の発生には, 椎間板の神経根に対する機械的圧迫因子が関与している。しかし画像診断上神経根に圧迫所見がみられても, 坐骨神経痛を訴えない場合もある。また, 正常な神経根に急性の圧迫を行っても必ずしも疼痛が発生しないので, 機械的圧迫因子のみではこの坐骨神経痛の発生





**Fig. 5.** Histological findings in epineurium of sciatic nerve. (Hematoxylin-eosin stain, x200). In the NP group, intensive infiltration of lymphocytes and neutrophils were observed compared with those in the other groups. a) sham group, b) NP group (arrow; cells of nucleus pulposus injected)

機序を明確に説明することはできない<sup>5)</sup>。近年、椎間板による機械的圧迫因子以外に髓核成分による化学的因子の関与が実験的に報告され、髓核自体が神経の局所に炎症を引き起こすことが明らかにされている<sup>1)~3), 7)</sup>。無血管組織の椎間板から髓核が血流の豊富な硬膜外腔に脱出すると髓核は異物とみなされ、自己免疫反応による炎症が発生すると考えられている。川上ら<sup>8)</sup>は、ラットを用いた実験で髓核と痛覚過敏の関連性を報告し、phospholipase A<sub>2</sub><sup>9), 10)</sup>は移植後の髓核、線維輪に存在し、一酸化窒素<sup>11), 12)</sup>は線維輪周辺の肉芽組織内にみられ根性疼痛との関連性を示唆した。更に髓核による化学的作用がもたらす発痛物質として、prostaglandins, bradykinin, histamine, leukotrienes, substance P, norepinephrineなどが報告されている<sup>13)</sup>。

しかし、局所の炎症反応が果たして脊髄後角の中樞神経内の細胞を興奮させ痛みとして認知されているのか否かは未だ不明である。本研究では中枢神経である脊髄後角の神経細胞の活動性亢進を視覚化する方法として、c-fos 陽性細胞に着目した。

1987年 Hunt ら<sup>14)</sup>が、末梢神経に加えた熱・化学的侵害刺激によってラット脊髄後角表層ニューロンに c-fos 陽性細胞が認められることを免疫組織化学的に検出して以来、機械的、化学的侵害刺激、神経損傷などによって脊髄後角に c-fos 陽性細胞が検出されることが報告されてきた<sup>15)</sup>。Gogas ら<sup>16)</sup>は、ラットの皮下にホルマリンを注入し、c-fos 陽性細胞の出現の程度は、痛みと関連していることを報告した。脊髄後角における c-fos 陽性細胞の数や局在位置は、侵害刺激の程度や侵害部位に対応していると言われている。生体に侵害刺激が繰り返し加わると、脊髄後角などの神経細胞核内に immediate early gene<sup>17)</sup>、IEG (最初期遺伝子) が発現する。immediate early gene の一つ proto-oncogene c-fos は、侵害刺激の強さに応じて発現し、更に下流遺伝子の転写を制御し、delayed early gene (後初期遺伝子) や late gene (後期遺伝子) の発現を誘導し、刺激に対する短い細胞性応答を長期の生体応答に変換させる際の信号物質として働いている。

今回の実験にあたっては、意図しない余計な刺激が加わらないモデルを作製することが必要であった。そのため自家髓核を摘出する際の侵害刺激を除外するため、髓核は他のラットから摘出した。また髓核注入部位は、展開が容易で手術侵襲が少ない坐骨神経を選択した。更に髓核成分による影響を検討するため、坐骨神経に機械的刺激が加わらないように配慮し、神経上膜周囲の注入は30 G 針を使用した。細い30 G 針で注入するためには、生理食塩水と攪拌しゲル状にする必要があり、超音波破砕機を用いた。処置2時間後に灌流固定を行ったのは、脊髄後角における c-fos 陽性細胞の発現が、末梢に侵害刺激が加えられて後、約2時間をピークにし

て減少してくるという特性があるためである<sup>18)</sup>。刺激後2時間という急性期の反応をみているが、同種髄核を使用したことによる拒絶反応などの影響は完全に否定することはできない。

侵害刺激が末梢に加えられその情報が中枢に入力されると、脊髄後角細胞の神経活動性が亢進しc-fos陽性細胞が発現してくるが、刺激部位により脊髄後角での発現部位も異なってくる<sup>19)</sup>。Rexed<sup>20)</sup>は、脊髄後角を細胞構築、線維網に基づき背側より腹側へ6層に分類した。脊髄後角のlaminaは、種々の神経線維を通じ直接の入力を末梢より受ける。また、同時にそれよりも後方のlaminaからの入力をも受け取っている。更に末梢からの刺激の種類によってもlaminaの反応は異なり、低閾値の機械受容器は、Ⅲ、Ⅳ層に終末し、また高閾値侵害受容器は、Ⅰ、Ⅱ、Ⅴ層に終末すると報告されている<sup>21)~24)</sup>。

本実験において、全ての群にみられた脊髄後角外側Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ層のc-fos陽性細胞の発現は、大腿部切開など<sup>25)</sup>手術操作による高閾値侵害受容器の関与した侵害刺激であり、侵害情報は主に細い求心線維である有髄A- $\delta$ 線維と無髄C線維を介して脊髄後角の侵害受容細胞に入力したと思われる。またNP群では、他の群では、他の群と比較して坐骨神経上膜周囲に炎症細胞浸潤が著明に観察され、脊髄後角の内側Ⅲ、Ⅳ層にc-fos陽性細胞の発現がみられた。なおこの内側発現レベルは外側発現レベルよりわずかに尾側よりであった。この脊髄高位レベルの違いは、大腿部皮膚切開部と坐骨神経との部位の違いから起きていると考える。Wen Huangら<sup>26)</sup>は、坐骨神経をchromic gutで緩く結紮した神経因性疼痛モデルでc-fos発現は後角内側にみられ、c-fos antisense oligodeoxynucleotideの投与によりc-fos発現が抑制されることを示した。

脊髄後角Ⅲ、Ⅳ層は、主として太い求心A $\beta$ 線維による非侵害情報である触覚や圧覚を伝導し、低閾値の機械受容器細胞とシナプスを形成している部位である。しかし、末梢からの刺激が慢性に経過した場合は、Ⅲ層に入力するA $\beta$

線維から侵害受容細胞の存在するⅡ層に軸索を伸張しシナプス入力するようになり、低閾値の機械刺激が侵害刺激として疼痛発生に関与している可能性が考えられている<sup>27)</sup>。一方で、A $\beta$ 線維を通じて脊髄内に入る非侵害情報は膠様質(substantia gelatinosa)中の細胞の働きで抑制性の働きをする。中枢神経内での侵害刺激の伝達状態は、侵害刺激の強さや時期によっても異なり、刺激閾値が低下したり、抑制機構が関係して簡単に説明できないのも現状である。本実験で脊髄後角の内側Ⅲ、Ⅳ層にc-fos陽性細胞の発現がみられたことは、髄核が及ぼす急性炎症作用は低閾値機械受容器細胞の活動性を亢進させている。椎間板ヘルニアから髄核成分が長期にわたり漏出し、炎症反応が慢性化する病的な状態になると、Ⅲ、Ⅳ層に入力する低閾値機械刺激が侵害受容細胞の存在するⅡ層へ伝達され、通常は触覚や圧覚とを感じるものが、痛みとして感じられる可能性が考えられるが、今後の研究課題である。

髄核を末梢神経である坐骨神経神経上膜周囲に注入すると、炎症細胞の浸潤が観察され、脊髄後角内側Ⅲ、Ⅳ層にc-fos陽性細胞が発現することが観察された。このことは、髄核による急性炎症反応が脊髄後角の低閾値機械受容神経細胞の活動性を亢進させていることを示しており、椎間板ヘルニアの疼痛との関連性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました川崎医科大学整形外科科学教室三河義弘教授、ならびに川崎医科大学名誉教授渡辺 良先生に深甚な謝意を表します。また、本研究を直接御指導頂いた川崎医科大学整形外科科学教室長谷川徹助教授に深謝致します。なお本研究の一部は本学プロジェクト研究費(9-103)、大学院重点特別経費(平成9年)の援助によって行われた。

本研究の要旨は、第27回 International Society for the Study of the Lumbar Spine(2000年4月11日、アデレード)、第15回日本整形外科学会基礎学術集会(2000年9



月28日, 京都) において発表した.

## 文 献

- 1) Akeson WH, Woo SL, Taylor TK, Gosch P, Bushell GR : Biomechanics and biochemistry of the intervertebral disks. *Clin Orthop* 129 : 133-140, 1977
- 2) Gertzbein SD, Tile M, Gross A, Falk R : Autoimmunity in degenerative disc disease of the lumbar spine. *Orthop Clin North Am* 6 : 67-73, 1975
- 3) Marshall LL, Trethewie ER : Chemical irritation of nerve-root in disc prolapse. *Lancet* 2 : 320, 1973
- 4) Hasegawa T, An HS, Inufusa A, Fuse K, Mikawa Y, Watanabe R : Compositional influences for regression of the sequestered lumbar disc hernia in dogs. *Neuro-Orthopedics* 22 : 69-75, 1998
- 5) Macnab I : The mechanism of spondylogenic pain, Cervical Pain. Edited by C Hirsch, Y Zotterman. New York, Pergamon Press. 1972, pp 89-95
- 6) McCarron RF, Wimpee MW, Hudkins PG, Laros GS : The inflammatory effect of nucleus pulposus. A possible element in pathogenesis of low back pain. *Spine* 12 : 760-764, 1987
- 7) Olmarker K, Rydevik B, Nordborg C : Autologous nucleus pulposus induces neurophysiologic and histologic changes in porcine cauda equina nerve roots. *Spine* 18 : 1425-1432, 1993
- 8) Kawakami M, Tamaki T, Hashizume H : Disc materials produce pain-related behavior in the rat. *Trans ORS* : 20, 1995
- 9) O'Donnell JL, O'Donnell AL : Prostaglandin E2 content in herniated lumbar disc disease. *Spine* 21 : 1653-1656, 1996
- 10) Saal JS, Franson RC, Dobrow R, Saal JA, White AH, Goldthwaite N : High levels of inflammatory phospholipase A2 activity in lumbar disc herniations. *Spine* 15 : 674-678, 1990
- 11) Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, Stefanovic-Racic M, Donaldson WF 3rd, Evans CH : Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. *Spine* 21 : 271-277, 1996
- 12) Kawakami M, Tamaki T, Hashizume H, Weinstein JN, Meller ST : The role of phospholipase A2 and nitric oxide in pain-related behavior produced by an allograft of intervertebral disc material to the sciatic nerve of the rat. *Spine* 22 : 1074-1079, 1997
- 13) Boulu P, Benoist M : Recent data on the pathophysiology of nerve root compression and pain. *Rev Rhum Engl Ed* 63 (5) : 358-363, 1996
- 14) Hunt SP, Pini A, Evan G : Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 328 : 632-634, 1987
- 15) Swett JE, Woolf CJ : 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, 1985
- 16) Gogas KR, Presley RW, Levine JD, Basbaum AI : The antinociceptive action of supraspinal opioids results from an increase in descending inhibitory control : Correlation of nociceptive behavior and c-fos expression. *Neuroscience* 42 : 617-628, 1991
- 17) Sheng M, Greenberg ME : The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4 : 477-485, 1990
- 18) Draisci G, Iadarola MJ : Temporal analysis of increases in c-fos, preprodynorphin and preproenkephalin mRNAs in rat spinal cord. *Brain Res Mol Brain Res* 6 : 31-37, 1989
- 19) Lima D, Avelino A, Coimbra A : Differential activation of c-fos in spinal neurones by distinct classes of noxious stimuli. *Neuroreport* 4 : 747-750, 1993
- 20) Rexed B : The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96 : 415-496, 1954

- 21) Brown AG, Rose PK, Snow PJ : The morphology of hair follicle afferent fibre collaterals in the spinal cord of the cat. *J Physiol* 272 : 779-797, 1977
- 22) Light AR, Perl ER : Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *J Comp Neurol* 186 : 133-150, 1979
- 23) Shortland P, Woolf CJ, Fitzgerald M : Morphology and somatotopic organization of the central terminals of hindlimb hair follicle afferents in the rat lumbar spinal cord. *J comp Neurol* 289 : 416-433, 1989
- 24) Sugiura Y, Lee CL, Perl ER : Central projections of identified, unmyelinated(C) afferent fibers innervating mammalian skin. *Science* 234 : 358-361, 1986
- 25) Devor M, Claman D : Mapping and plasticity of acid phosphatase afferents in the rat dorsal horn. *Brain Res* 190 : 17-28, 1980
- 26) Huang W, Simpson RK Jr : Antisense of c-fos gene attenuates Fos expression in the spinal cord induced by unilateral constriction of the sciatic nerve in the rat. *Neurosci Lett* 263 : 61-64, 1999
- 27) Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE : Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355 : 75-78, 1992