

カラゲニン炎症性痛覚過敏における鍼鎮痛機序 —末梢性鎮痛の関わりについて—

† 関戸 玲奈

明治鍼灸大学大学院 鍼灸臨床医学 I

要旨：カラゲニンにより引き起こされた痛覚過敏に対する鍼鎮痛に炎症部位の副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (CRF) 受容体とインターロイキン-1 (IL-1) 受容体が関与するか検討した。また、免疫抑制剤であるシクロスポリンA (CsA) 投与による免疫細胞の機能抑制が鍼鎮痛に及ぼす影響と鍼鎮痛における末梢神経の μ オピオイド受容体の関与についても検討した。実験にはSprague-Dawley系雄性ラットを用いた。痛覚閾値の測定には加圧式鎮痛効果測定装置を用いた (Randall Selitto Test)。起炎物質であるカラゲニンの皮下投与により投与3時間後に痛覚過敏を生じた。そこで、鍼通電を行ったところ鍼鎮痛効果が見られ、その効果はカラゲニン投与24時間後まで持続した。しかし、CRF、IL-1あるいは μ オピオイド受容体拮抗薬の炎症部位への投与により鍼鎮痛は消失し、CsA投与によっても鍼鎮痛は消失した。以上のことから、カラゲニンによる痛覚過敏に対する鍼鎮痛には、炎症部位に集積した免疫細胞に存在するCRF受容体とIL-1受容体が関与していることが示唆された。また、末梢神経の μ オピオイド受容体も鍼鎮痛に関与していることが示唆された。

I. はじめに

これまでに鍼鎮痛の作用機序に関する多くの研究が人や動物を対象として行われてきた。その結果、現在では鍼鎮痛効果は中枢神経系内の内因性オピオイドペプチドやその他の神経伝達物質を介した下行性疼痛抑制系の賦活により引き起こされることが知られている¹⁻³⁾。しかし一方、炎症性疾患や炎症部位の疼痛に対する鍼鎮痛効果やその作用機序については従来ほとんど研究されていない。近年、多くの動物実験や臨床研究により炎症組織内においても内因性オピオイドペプチドが免疫細胞から直接産生され、中枢神経系以外のこれらの末梢のオピオイドペプチドにより鎮痛効果がもたらされることが明らかとなってきた⁴⁻¹⁰⁾。

局所に炎症が起こると、オピオイド含有免疫細胞が炎症部位に遊走し、集積することが知られている⁴⁻⁹⁾。Steinらは人⁸⁾や動物^{6, 7, 10)}で炎症を持つ個体にある種の環境刺激を与えると炎症部位の免疫細胞からオピオイドペプチドが放出され、炎症部位での痛みが抑制されることを報告している。また、Schaferら¹¹⁾とCabotら^{4, 5)}はオピオイド含有免疫細胞には副腎皮質刺激ホルモン放出因子

(CRF) 受容体やインターロイキン-1 (IL-1) 受容体が存在し、外因性のCRFやIL-1 β によりこれらの受容体を活性化することで、オピオイドペプチドが放出されると報告している。このように、炎症性の疼痛のコントロールには免疫系と末梢神経のオピオイド受容体が関わっていると考えられている。

以前の研究で著者は、カラゲニンによる炎症性痛覚過敏に対する鍼鎮痛効果が炎症部位へのナロキソンの投与により消失したことから、炎症部位のオピオイド受容体が鍼鎮痛に関与する可能性を報告した¹²⁾。そこで本研究では鍼通電により引き起こされた末梢のCRF受容体やIL-1受容体の活性化が免疫細胞からのオピオイドペプチドの放出を引き起こしているのではないかと推測し、CRFあるいはIL-1受容体拮抗薬を用いて鍼鎮痛における炎症部位でのCRF受容体とIL-1受容体の関与を検討した。また、CRFやIL-1受容体は免疫細胞に存在することが明らかとなっており¹³⁻¹⁶⁾、これらの免疫細胞よりオピオイドペプチドが放出されると推測されていることから、免疫抑制剤であるシクロスポリンA (CsA) 投与による免疫細

平成14年10月30日受付、平成15年1月14日受理

Key Words : 鍼通電 electroacupuncture, 鍼鎮痛 acupuncture analgesia, カラゲニン carrageenan, 痛覚過敏 hyperalgesia, 免疫細胞 immune cell

† 連絡先 : 〒629-0392 京都府船井郡日吉町保野田ヒノ谷6 明治鍼灸大学大学院 鍼灸臨床医学 (外科学)
Tel.0771-72-1181 Fax.0771-72-0394 E-mail : r_sekido@muom.meiji-u.ac.jp

胞の機能抑制が鍼鎮痛にどのような影響を与えるのか検討した。さらに、末梢神経のオピオイド受容体には μ 、 δ 、 κ 受容体の三種類が存在することが分かっている^{7, 17, 18)}が、これらのオピオイド受容体の一つである μ オピオイド受容体の炎症部位での関与についても検討した。

II. 方法

1. 対象

実験にはSprague-Dawley系雄性ラットn=102(9~11週齢, 体重280~380g)を用い, クリーンラック内で室温 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, 湿度 $50\pm 5\%$, 明暗周期は12時間の条件下で飼育した。カラゲニン炎症性痛覚過敏モデルはエーテル麻酔下で26G注射針を用い, 起炎物質である2% λ カラゲニン (Sigma) をラットの左後肢足底に0.1ml皮下投与して作成した。なお, 本実験は本学術倫理委員会の承認を得て行った。

2. 実験プロトコール

実験1. カラゲニン炎症性痛覚過敏における鍼鎮痛効果に対するCRFとIL-1受容体拮抗薬の足底内投与の影響

鍼鎮痛における炎症部位のCRF受容体とIL-1受容体の関与を調べるために, CRF受容体拮抗薬である α -helical CRFとIL-1受容体拮抗薬であるIL-1raの足底内投与が鍼鎮痛に及ぼす影響を検討した。 α -helical CRF (2.5, 3.7, 5.0 ng/0.1 ml) またはIL-1ra (25, 50, 100 ng/0.1ml) は鍼通電の1時間前に炎症部位の足底内に投与した (各群n=6)。また, 中枢でのCRF受容体とIL-1受容体が鍼鎮痛に関与しないことを確認するために, 5.0 ng/0.1mlの α -helical CRF または100 ng/0.1mlのIL-1ra を鍼通電の1時間前に静脈内に投与した (各群n=6)。

実験2. カラゲニン炎症性痛覚過敏における鍼鎮痛効果に対するシクロスポリン投与の影響

免疫抑制剤であるCsA投与による免疫細胞の機能抑制が, 鍼鎮痛にどのような影響を与えるかを検討した。CsAはカラゲニンの投与48時間前, 24時間前にそれぞれ5mgずつ合計10mg腹腔内投与した (n=6)。

実験3. カラゲニン炎症性痛覚過敏における鍼鎮痛効果に対する μ オピオイド受容体拮抗薬の足底内投与の影響

鍼鎮痛における末梢の μ オピオイド受容体の関与を調べるために, μ オピオイド受容体拮抗薬であるD-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr amide (CTOP) の足底内投与が鍼鎮痛に及ぼす影響を検討した。CTOP (2.5, 5.0, 10.0 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$) は鍼通電の1時間前に炎症部位の足底内に投与した (各群n=6)。また, 中枢での μ オピオイド受容体が炎症部位での鍼鎮痛に関与しないことを確認するために, 10.0 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$ のCTOPを鍼通電の1時間前に静脈内に投与した (n=6)。

3. 痛覚閾値の測定

痛覚閾値の測定はラットの後肢のみが露出するように作製した布製のジャケットを静かに着用させ, 露出された左後肢の足背を加圧式鎮痛効果測定装置 (Ugo Basile社) により加圧し, 後肢の逃避反応を起こすまでに要した付加重量 (g) をpaw pressure threshold (PPT) とした (Randal Selitto Test)。なお, 足趾の組織損傷を避けるために250gをcut offの付加重量とした。

PPTの測定は, 上述のジャケット着用後15分間の安静の後に, 2分おきに2回行い, その平均値を読みとった。測定は左後肢で行い, カラゲニン投与15分前と投与直前, カラゲニン投与3時間後, 4時間後, 5時間後, 7時間後, 9時間後, さらに24時間後の計8回行った。

4. 鍼通電方法

鍼通電には直径0.2mm・長さ30mmのステンレス鍼を用い, 鍼を左後肢の前脛骨筋に2ヶ所 (足三里相当部位とその下約7mm), 深さ5mmまで刺入した。鍼通電はカラゲニン投与3時間後にPPTを測定後直ちに開始した。

鍼通電条件は, 持続時間が0.1msの双極波を用い (Trimix 101H 日本ディックス製), 頻度は3Hzとし1時間の通電を行った。なお電流量は随時オシロスコープでモニターし, 1mAから開始し, 20分毎に1mAずつ増加させ最終的に3mAとなるようにした。

また, 鍼通電は覚醒下で行うため, ラットに上述のジャケット着用させ, 吊り下げた。ラットに

は、PPTの測定時、鍼通電時のみ静かにジャケットを着用させ、それ以外ではケージに戻し自由に行動、摂食ができるようにした。

5. 使用薬物

α -helical CRF (Sigma), IL-1ra (R & D Systems), CTOP (Sigma) は蒸留水に溶解し0.1ml中に各々の投与量が含まれるように調整し、鍼通電の1時間前に炎症部位の足底内あるいは静脈内に投与した。また、CsA (和光純薬) は5mgを0.5mlのメタノールと0.5mlの蒸留水に溶解し、5mg/1mlでカラゲニン投与48時間前と24時間前に計2回、腹腔内投与した。すべての薬物投与は、エーテル麻酔下で行った。

6. 統計解析

統計解析は、統計解析用ソフト (Statistica for Macintosh Release 4.1J) を用い、Huynh Feldt補正下で二元配置分散分析を行った後、多重比較はTukey法を用いて検定した。有意水準は5%以下を図中に示し、すべてのデータは平均値±標準偏差 (mean±SD) で表した。

III. 結果

1. 鍼鎮痛効果に対する α -helical CRFの足底内投与の影響 (図1)

カラゲニンのみを投与したコントロール群ではカラゲニン投与直前には83.9±13.4 gであったPPTが、投与3時間後には54.1±14.2 gまで低下し痛覚過敏を生じた。また、カラゲニン投与24時間後においても、PPTは57.5±8.2 gと低下し痛覚過敏の持続が観察された。Vehicle + EA群においてもカラゲニン投与3時間後にPPTは52.5±7.4 gまで低下し痛覚過敏を生じた。しかし、鍼通電終了直後からPPTは上昇し (89.1±10.5g)、鍼通電終了20時間後においてもコントロール群に比べPPTは有意に上昇した (78.5±6.4g)。 α -helical CRF (2.5, 3.7あるいは5.0 ng) + EA群においてもカラゲニン投与3時間後にPPTはコントロール群とほぼ同程度まで低下した。しかし、カラゲニン投与3時間後に鍼通電を行ったところ、2.5 ng α -helical CRF + EA群では鍼通電終了後、PPTはvehicle + EA群と同程度まで上昇し、この両群で差は認められなかった。一方、3.7ng

α -helical CRF + EA群では、鍼通電終了直後からPPTはやや上昇したが、vehicle+EA群や2.5 ng α -helical CRF + EA群ほど上昇せず、コントロール群とvehicle + EA群の中間位であった。しかし、5.0ng α -helical CRF + EA群では、鍼通電終了直後、5時間後、20時間後においてもPPTは全く上昇せず (それぞれ55.0±6.1g, 53.7±2.6g, 48.7±4.1g)、コントロール群と同様の推移をたどりvehicle + EA群との間に各々有意差が認められた (図1A)。

さらに、鍼通電により生じたPPTの上昇は5.0 ngの α -helical CRFの静脈内投与では全く影響されず、カラゲニン投与24時間後においてもコントロール群に比べPPTは有意に上昇した (図1B)。

このように α -helical CRFの炎症部位の足底内

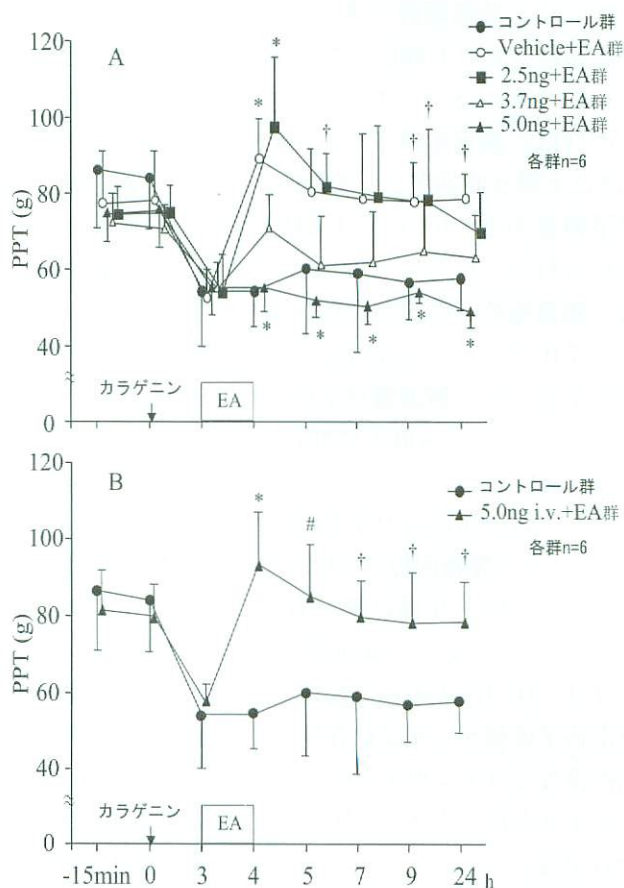


図1 鍼鎮痛効果に対する α -helical CRF投与の影響

(A) は足底内投与 (コントロール群 vs vehicle + EA群, コントロール群 vs 2.5 ng + EA群, vehicle + EA群 vs 3.7 ng + EA群, vehicle + EA群 vs 5.0 ng + EA群), (B) は静脈内投与 (コントロール群 vs 5.0 ng i. v. + EA群) の影響をそれぞれ示す。鍼通電はカラゲニンの皮下投与3時間後から4時間後の間に行った。データはすべて平均値±標準偏差 (各群n=6)。有意水準は*P<0.001, #P<0.01, †P<0.05とした。

投与により、鍼通電により生じたPPTの上昇は鍼通電終了直後から用量依存性に抑制されたが、静脈内投与では抑制されなかった。さらに、 α -helical CRFのみの足底内投与は、カラゲニンによる痛覚過敏に影響しなかった。

2. 鎮痛効果に対するIL-1raの足底内投与の影響 (図2)

鍼通電により生じたPPTの上昇に対するIL-1ra投与の影響を観察するために、鍼通電の1時間前にIL-1ra (25, 50あるいは100 ng) を炎症部位の足底内に投与した。IL-1ra (25, 50あるいは100 ng) + EA群においても、カラゲニン投与3時間後にPPTはコントロール群とほぼ同程度まで低下し、痛覚過敏を生じた。25 ng IL-1ra + EA群では、鍼通電終了後、PPTはvehicle + EA群と同程度まで上昇し、この両群では有意な差は見られなかった。一方、50 ng IL-1ra + EA群のPPTは、鍼通電終了後、vehicle + EA群のPPTほど上昇せず抑制される傾向が見られ、鍼通電終了直後のみvehicle + EA群との間に有意差が認められた。しかし、100 ng IL-1ra + EA群では、鍼通電終了直後からPPTは全く上昇せず (5.7.5±7.0 g)、その後においてもPPTは低下する傾向が見られ、鍼通電終了直後から5時間後にわたりvehicle + EA群との間に有意な差が認められた (図2A)。

また、鍼通電により生じたPPTの上昇は100 ngのIL-1raの静脈内投与では全く影響されず、PPTはコントロール群に比べ有意に上昇していた (図2B)。このように鍼通電により生じたPPTの上昇は、IL-1raの炎症部位の足底内投与により鍼通電終了直後から用量依存性に抑制されたが、静脈内投与では全く抑制されなかった。さらに、 α -helical CRFの場合と同様にIL-1raの足底内投与のみでは、カラゲニンによる炎症性痛覚過敏に影響はなかった。

3. 鎮痛効果に対するシクロスポリン投与の影響 (図3)

CsA + EA群とvehicle + EA群においても、カラゲニン投与3時間後にコントロール群とほぼ同程度までPPTは低下し痛覚過敏を生じた。Vehicle + EA群ではPPTは鍼通電終了直後に最も上

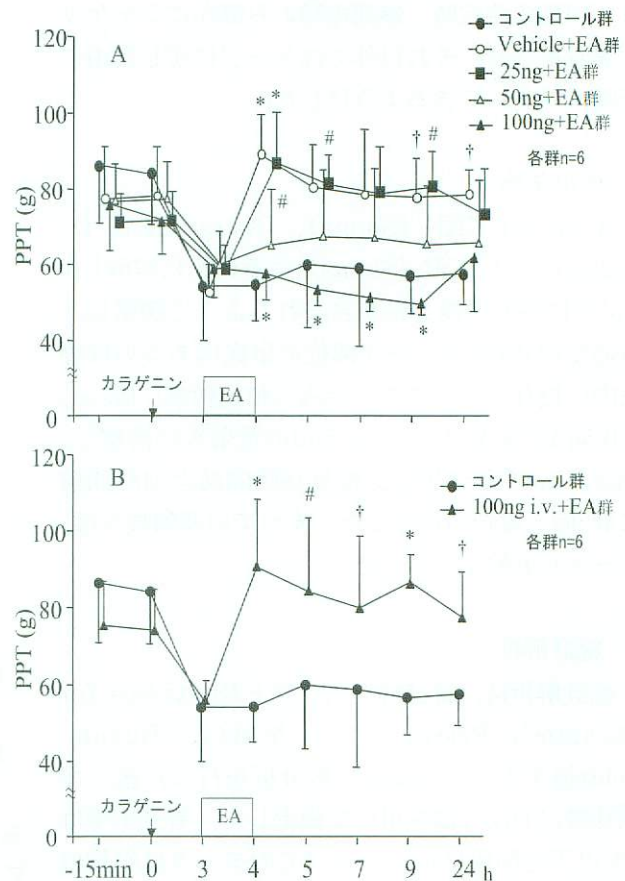


図2 鎮痛効果に対するIL-1ra投与の影響

(A) は足底内投与 (コントロール群 vs vehicle + EA群, コントロール群 vs 25 ng + EA群, vehicle + EA群 vs 50 ng + EA群, vehicle + EA群 vs 100 ng + EA群), (B) は静脈内投与 (コントロール群 vs 100 ng i. v. + EA群) の影響をそれぞれ示す。鍼通電はカラゲニンの皮下投与3時間後から4時間後の間に行った。データはすべて平均値±標準偏差 (各群n=6)。有意水準は* $P < 0.001$, # $P < 0.01$, † $P < 0.05$ とした。

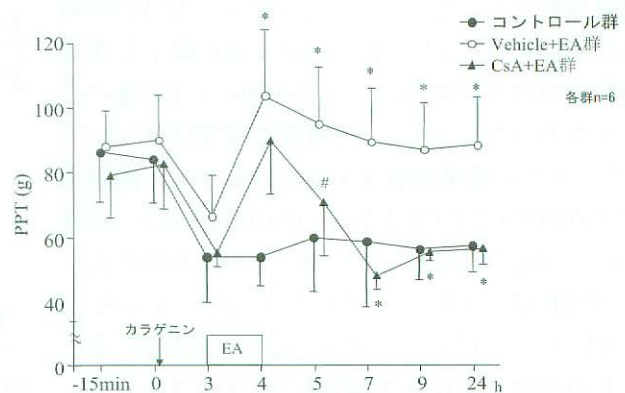


図3 鎮痛効果に対するシクロスポリン投与の影響

鍼通電はカラゲニンの皮下投与3時間後から4時間後の間に行った。データは平均値±標準偏差 (各群n=6)。有意水準は* $P < 0.001$, # $P < 0.01$ とした (コントロール群 vs vehicle + EA群, vehicle + EA群 vs CsA + EA群)。

昇し (103.7±20.3 g), 鍼通電終了20時間後においてもPPTはコントロール群に比べ有意に上昇していた (83.3±14.9 g). しかし, CsA + EA群では, 鍼通電終了直後にPPTは89.7±16.4 gと上昇するものの, 鍼通電終了1時間後, 3時間後にPPTは低下し (それぞれ70.6±16.1 g, 48.1±4.3 g), その後はコントロール群と同様の傾向を示し, vehicle + EA群との間に有意な差が認められた.

このようにCsA投与により, 鍼通電で生じたPPTの上昇は鍼通電終了1時間後から抑制された. なお, CsA投与のみでは, カラゲニンによる炎症性痛覚過敏に影響を及ぼさなかった.

4. 鍼鎮痛効果に対するCTOPの足底内投与の影響 (図4)

鍼通電により生じたPPTの上昇に対するCTOP投与の影響を観察するために, 鍼通電の1時間前にラットにCTOP (2.5, 5.0あるいは10.0 μg) を炎症部位の足底内に投与した. CTOP (2.5, 5.0あるいは10.0 μg) + EA群においても, カラゲニン投与3時間後にPPTはコントロール群とほぼ同程度まで低下し, 痛覚過敏を生じた. しかし, 2.5 μg CTOP + EA群では鍼通電終了後, PPTはvehicle + EA群と同程度まで上昇し, 鍼通電終了20時間後においてもPPTの上昇が観察された. 一方, 5.0 μg CTOP + EA群では鍼通電終了1時間後までPPTは上昇したが, 鍼通電終了3時間後からPPTは低下し (46.2±4.0 g), その後はコントロール群とほぼ同様の傾向を示した. また, 10.0 μg CTOP + EA群においても, PPTは5.0 μg CTOP + EA群とほぼ同様の経過を示し, 鍼通電終了3時間後からPPTは上昇しなくなり, それ以後においてvehicle + EA群との間に有意な差が見られた (図4A).

また, 鍼通電により生じたPPTの上昇は10.0 μgのCTOPの静脈内投与では全く影響されず, 鍼通電終了20時間後においてもPPTの上昇が観察された (図4B).

このようにCTOPの炎症部位の足底内投与により, 鍼通電で生じたPPTの上昇は鍼通電終了3時間後から用量依存性に抑制されたが, 静脈内投与では抑制されなかった. さらに, CTOPの足底内投与のみでは, カラゲニンによる痛覚過敏に影響

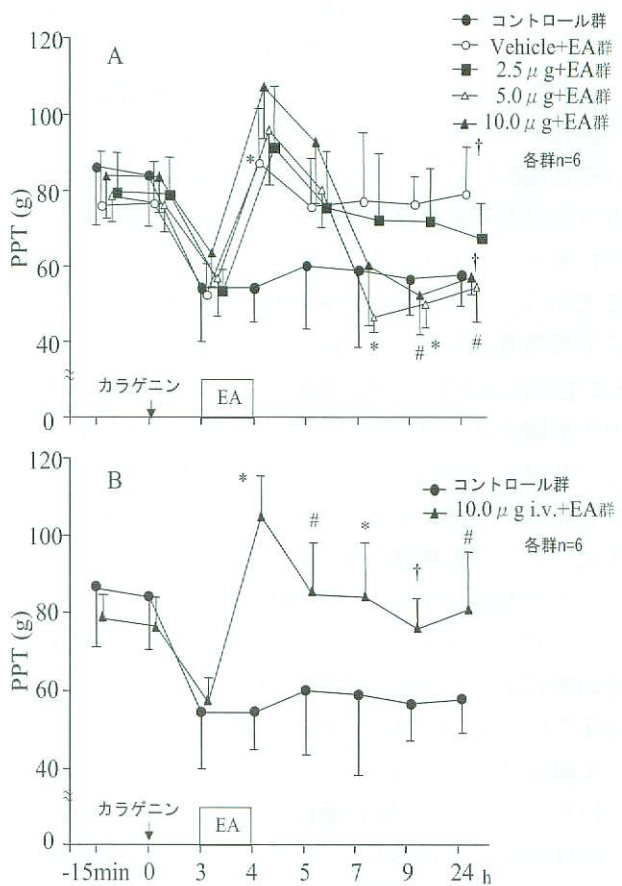


図4 鍼鎮痛効果に対するCTOP投与の影響 (A) は足底内投与 (コントロール群 vs vehicle + EA群, vehicle + EA群 vs 2.5 μg + EA群, vehicle + EA群 vs 5.0 μg + EA群, vehicle + EA群 vs 10.0 μg + EA群), (B) は静脈内投与 (コントロール群 vs 10.0 μg i.v. + EA群) の影響をそれぞれ示す. 鍼通電はカラゲニンの皮下投与3時間後から4時間後の間に行った. データはすべて平均値±標準偏差 (各群n=6). 有意水準は*P<0.001, #P<0.01, †P<0.05とした.

はなかった.

IV. 考察

カラゲニンの足底部への投与は, 投与側後肢の急性炎症と痛覚過敏のモデルとして広く用いられている¹⁹⁻²¹⁾. 本研究はこのカラゲニン炎症性痛覚過敏モデルを用い, 炎症性疼痛に対する鍼鎮痛効果の末梢性鎮痛機序の関わりについて検討した.

1. 鍼鎮痛効果に対する α-helical CRFあるいは IL-1raの足底内投与の影響について

Schaferら²²⁾ は, 炎症を持つラットにCold water swim (CWS) を与えると炎症肢で鎮痛効果を生じるが, その効果は炎症部位へのCRF受容体拮抗薬の投与で抑制されることから炎症部位

のCRFがCWSの効果に関わっていることを報告している。また同時に、このCWSにより引き起こされたCRFの放出が炎症部位で免疫細胞から内因性オピオイドペプチドの放出を引き起こしていると報告している。一方、以前の研究で著者は、カラゲニン炎症性痛覚過敏における鍼鎮痛効果がナロキソンの炎症部位への投与により拮抗されたことから、これらの鍼鎮痛効果には末梢のオピオイド受容体が関与する可能性を報告した¹²⁾。CWSで生じた炎症肢の鎮痛効果と著者の鍼鎮痛効果の作用機序は末梢のオピオイド受容体が関与する点で共通している。またCRF²³⁾と同様にIL-1 β も炎症部位で認められており¹⁰⁾、IL-1受容体の活性化によっても免疫細胞から内因性オピオイドペプチドが放出されることも明らかとなっている^{4, 5, 11)}。そこで本研究では、カラゲニン炎症性痛覚過敏に対する鍼鎮痛効果に炎症部位のCRF受容体やIL-1受容体が関与するかを検討した。

本研究においても、カラゲニンの皮下投与により投与3時間後から痛覚過敏を生じ、以前の報告と同様の結果が得られた¹²⁾。また、炎症性痛覚過敏に対する鍼鎮痛効果は、 α -helical CRFあるいはIL-1raの炎症部位への投与により鍼通電終了直後から用量依存性に抑制されることが分かった。この結果は、SchaferらのCWSによる鎮痛効果が α -helical CRFの炎症部位への投与により抑制されたという報告と一致している²²⁾。CRF受容体とIL-1受容体は、正常組織や末梢神経には存在せず、マクロファージ、Tリンパ球、Bリンパ球に存在し¹³⁻¹⁶⁾、これらの受容体は炎症組織で増加することが報告されている¹⁵⁾。また、CRF受容体とIL-1受容体は中枢神経系内にも存在することが明らかとなっている²⁴⁾。そこで本研究では、 α -helical CRFあるいはIL-1raの炎症部位への足底内投与で鍼鎮痛効果を完全に拮抗した量を静脈内投与したが、鍼鎮痛効果はブロックされなかった。従って、足底内に投与した拮抗薬は炎症部位に存在する免疫細胞の受容体に作用していると考えられる。

また、カラゲニン炎症性痛覚過敏に対し鍼通電を行わず α -helical CRFあるいはIL-1raのみを足底内に投与した場合のPPTはカラゲニンのみを投与したコントロール群とほぼ同様の経過をたどり、拮抗薬投与の影響は見られないことを予備実

験で確認している。このことから、カラゲニン投与のみでは末梢のCRF受容体とIL-1受容体を介した末梢性鎮痛機構は働いておらず、鍼通電によりその機構が賦活される可能性が考えられた。すなわち、カラゲニン炎症性痛覚過敏に対する鍼鎮痛効果には、炎症部位の免疫細胞に存在する末梢のCRF受容体とIL-1受容体が関与することが示唆された。

2. 鍼鎮痛効果に対するシクロスポリンの投与の影響について

実験1の結果より、免疫細胞に存在するCRF受容体とIL-1受容体が鍼鎮痛効果に関与する可能性が考えられた。そこで、免疫抑制剤であるCsA投与による免疫細胞の機能抑制が、鍼鎮痛効果にどのような影響を与えるのか検討した。

まず、予備実験においてカラゲニン炎症性痛覚過敏に対しCsAのみを投与した場合のPPTはコントロール群と同様の傾向を示し、CsA投与の影響はないことを確認した。このことはカラゲニン炎症性痛覚過敏に α -helical CRFあるいはIL-1raのみを足底内に投与した場合と類似しており、カラゲニンによる炎症状態のみでは鎮痛を引き起こすような免疫細胞の機能は働いていないことを示している。

また、CsA投与は鍼通電終了直後の鍼鎮痛効果には影響を及ぼさなかったが、鍼通電終了1時間後以降に持続していた鎮痛効果を消失させることが明らかとなった。Schaferら¹¹⁾もCWSにより生じた鎮痛効果がCsA投与により抑制されることを報告しており本研究と類似していた。

CsAは臓器移植の拒絶反応を抑制するのに用いられる免疫抑制剤で、細胞・分子レベルで広範な作用を持つことが知られている。特に、Tリンパ球の細胞質内にあるサイクロフィリンと名付けられる受容体を介して、IL-2を産生する遺伝子の転写を抑制することにより、Tリンパ球の反応を強く抑制する²⁵⁾。また、*in vitro*でBリンパ球、マクロファージ、肥満細胞の活性化や増殖を抑制し^{26, 27)}、*in vivo*でこれらの効果器の機能を抑制することも報告されている^{28, 29)}。従って、鍼鎮痛効果がCsA投与で拮抗されたという結果は、鍼鎮痛効果に免疫細胞の機能が関与していることを示唆している。

しかし、実験1の結果からCsA投与により鍼通電終了直後から鎮痛効果は抑制されることが予測されたが、鍼通電終了直後は抑制されず、終了1時間以後ではじめて抑制され予測とは異なる結果となった。本研究ではSchaferら¹¹⁾、Chisholmら²⁸⁾、Cumminsら²⁹⁾が用いた投与量を参考にカラゲニン投与の48時間前と24時間前にCsA投与を行ったが、今回投与したCsAによる免疫細胞の機能抑制の程度や時間的推移については不明である。また、鍼通電終了直後と終了1時間以降では炎症部位に集積する免疫細胞に相違があり、これらの細胞に対するCsAの機能抑制の違いからこのような現象が起こった可能性も考えられる。いずれにしてもCsA投与によりどの程度免疫細胞の機能が抑制されているのか、またどのような免疫細胞が鍼鎮痛効果に関与しているのか、現段階では明らかでなく今後詳細な検討が必要であろう。

3. 鍼鎮痛効果に対するCTOPの足底内投与の影響について

鍼鎮痛効果はCTOPの静脈投与ではなく、炎症部位への足底内投与で鍼通電終了3時間後から用量依存性に拮抗されることが分かった。このことは、鍼通電終了後に持続していた鍼鎮痛効果に中枢神経系の μ オピオイド受容体ではなく、末梢神経の μ オピオイド受容体に関与していることを示唆している。オピオイド受容体は中枢神経系に多く存在するが、末梢の一次感覚神経終末に三種類のオピオイド受容体(μ , δ , κ)が存在することも明らかとなっている^{7, 17, 18)}。また、Antonijevicら³⁰⁾は炎症の早期には神経周膜が破壊され、一次感覚神経終末に存在するオピオイド受容体にオピオイドペプチドが結合しやすい環境になると報告している。そして、活性化されたオピオイド受容体は、末梢での侵害入力の興奮性を減弱したり³¹⁾、興奮性伝達物質の放出を抑制し³²⁾、鎮痛効果を引き起こすと考えられている。本研究で鍼通電を開始したカラゲニン投与3時間後の時点は炎症の早期と考えられ、神経周膜の破壊が起こり、オピオイド受容体が活性化されやすい状態にあったと考えられる。

今回行ったCTOPの足底内投与では鍼通電終了3時間後から鎮痛効果が拮抗されたが、以前ナロキソンを炎症部位の足底内に投与した場合は鍼通

電終了1時間後から鎮痛効果が拮抗された。炎症組織内の免疫細胞において、オピオイド受容体の内因性リガンドである β エンドルフィン(受容体： μ)、エンケファリン(受容体： δ)、ダイノルフィン(受容体： κ)やそれぞれのmRNAも発見されている^{4, 5, 6, 9)}。ナロキソンは非選択性のオピオイド受容体拮抗薬であるので、CTOPの足底内投与で拮抗されなかった鍼通電終了直後と1時間後の鎮痛効果には、 μ オピオイド受容体以外のオピオイド受容体に関与している可能性も考えられる。今後、 μ オピオイド受容体以外のオピオイド受容体の関与についても検討する必要がある。

このように、鍼通電終了3時間以後ではオピオイド含有免疫細胞から β エンドルフィンが放出され、それらが末梢の μ オピオイド受容体を活性化させることにより鎮痛効果を引き起こしたと考えられるが、鍼通電終了1時間後までは他のオピオイドペプチドが優位である可能性が考えられた。

4. 鍼鎮痛効果とCWSで生じた鎮痛との相違点について

鍼鎮痛効果とStein, Schaferらが報告しているCWSで生じた鎮痛にはいくつかの相違点があった。第1点目は鎮痛効果の持続時間の違いである。CWSで生じた鎮痛はCWS終了後10~17分で消失するのに対し^{6, 7, 10, 22)}、鍼鎮痛効果は鍼通電終了20時間後でも持続した。第2点目は、CWSで生じた鎮痛はIL-1raの炎症局所への投与によりブロックされなかった²²⁾のに対して、鍼鎮痛効果は α -helical CRFあるいはIL-1raのそれぞれの炎症局所への投与によりブロックされた。通常、炎症状態で炎症局所にCRFを投与した時に生じる鎮痛効果はIL-1受容体拮抗薬ではなくCRF受容体拮抗薬で拮抗され、またIL-1を投与した時に生じる鎮痛効果はCRF受容体拮抗薬ではなくIL-1受容体拮抗薬で拮抗され、CRFとIL-1受容体は並列の関係にあると考えられている¹¹⁾。この両者の受容体が並列の関係にあるならば、CRF受容体がブロックされた時でも鍼通電によりIL-1受容体が活性化されオピオイドペプチドが放出されれば鎮痛効果は出現するはずで、逆にIL-1受容体がブロックされた時には鍼通電によりCRF受容体が活性化され鎮痛効果が出現するであろうと推測された。しかし、本研究では鍼鎮痛効果がCRF受

容体あるいはIL-1受容体拮抗薬の投与でそれぞれ拮抗される結果となった。この結果は鍼通電がCRF受容体を活性化しそれに引き続いてIL-1受容体が活性化されたり、あるいはIL-1受容体の活性化の後に引き続きCRF受容体が活性化されオピオイドペプチドが放出されるという直列の関係が存在する可能性を示している。仮に、カラゲニン炎症モデルにおいてもこのCRFとIL-1受容体の並列関係が成り立つとすれば、CRFとIL-1受容体の両者の活性化によりはじめて鍼鎮痛効果を示すのかもしれないとも考えられる。CRF受容体の活性化は免疫細胞から β エンドルフィン、メチオニンエンケファリン、ダイノルフィンの三種を放出させるが、IL-1受容体の活性化はメチオニンエンケファリンを放出せずに β エンドルフィンとダイノルフィンのみを放出させ、両者にはオピオイドペプチドの放出の種類に違いがあると報告されている^{4, 11)}。従って、鍼通電ではCRF受容体あるいはIL-1受容体のどちらか一方の受容体の活性化のみでは鎮痛効果を生じるのに十分なオピオイドペプチドが放出されていないことも考えられる。第3点目は鍼鎮痛を拮抗するのに必要であった拮抗薬の投与量である。CWSで生じた鎮痛は α -helical CRF 2ngの炎症局所への投与で最も拮抗されたがIL-1raを1 μ g投与してもブロックされなかった²²⁾としている。それに対し、本研究における鍼鎮痛は α -helical CRF 5ngつまりCWSで生じた鎮痛を拮抗した量の2.5倍で拮抗され、IL-1raに関しては100ngの炎症局所への投与で最も拮抗された。

以上のように、鍼鎮痛とCWSによる鎮痛との違いは用いた起炎物質と炎症反応の時期の違いによるものかもしれない。Stein, Schaferらは起炎物質としてFreund'sアジュバントを用い、CWSはFreund'sアジュバント投与の4日後に行っている^{6, 7, 10, 22)}。一方、著者はカラゲニンを用い、鍼通電はカラゲニン投与3時間後に行った。Rittnerら³³⁾は主なオピオイド含有細胞は炎症早期(2, 6時間)では顆粒球で、炎症遅期(96時間)では単球、マクロファージであるとしている。このような炎症局所に浸潤している細胞の違いから鎮痛効果の相違が生じた可能性も考えられた。

また、鍼鎮痛効果がCWSで生じた鎮痛と異なる他の可能性は、それらの作用機序の違いである。

正常動物にCWSを行った場合の鎮痛はCWSを加える温度や持続時間によってその機序は様々であるが³⁴⁻³⁶⁾、Stein, Schaferらは炎症動物にCWSを加えた場合の鎮痛効果には中枢神経系は関与しないと報告している³⁴⁻³⁶⁾。一方、これまでの研究により、鍼鎮痛は中枢神経系内で内因性オピオイドペプチドやセロトニン、ノルエピネフリンを含む他の神経伝達物質により引き起こされることが知られている¹⁻³⁾。しかし、以前の研究で著者は、カラゲニンによる炎症性痛覚過敏に対する鍼鎮痛がナロキソンの腹腔内投与で完全に拮抗されなかったので、中枢神経系に存在するオピオイド受容体は部分的にしか関与していないことを報告した¹²⁾。一方、セロトニン、ノルエピネフリンを含む他の神経伝達物質の関与については検討を行っていないので、炎症動物の鍼鎮痛における内因性オピオイドペプチド以外の神経伝達物質の関与を完全に除外することはできない。このように鍼通電による鍼鎮痛効果は中枢神経系内の鎮痛系と末梢性鎮痛系の賦活により引き起こされると考えられるが、両者の鎮痛系がどの部分でどの程度関わっているのかは未だ明らかでなく、CWSで生じる鎮痛と鍼鎮痛の異なる点については今後詳細に検討する必要がある。

以上のことから、鍼通電によりオピオイド含有免疫細胞に存在するCRF受容体とIL-1受容体が活性化され、これらの細胞から β エンドルフィンが放出され、 β エンドルフィンの放出が一次感覚神経終末に存在する μ オピオイド受容体を活性化させることにより鎮痛効果がもたらされた可能性が考えられた。鍼通電で炎症部位のCRF受容体とIL-1受容体が活性化されたということは鍼通電により内因性のCRFとIL-1 β が放出されたことが予想される。CRFは末梢組織では胸腺や脾臓³⁸⁾、白血球、Tリンパ球、Bリンパ球のようなリンパ組織の他、免疫細胞、繊維芽細胞、血管内皮細胞^{22, 23)}で産生され、これらの細胞から放出されるCRFが痛みの調節に関わっていると考えられている²²⁾。また、IL-1 β は主に単球、マクロファージから産生される¹⁴⁾。このように鍼通電で様々な細胞からCRFとIL-1 β が放出される可能性が考えられるが、現段階ではどのような細胞から放出されるのかは明らかでない。また、鍼通電が中枢を介して免疫細胞に存在するCRF受容体とIL-1受

容体を活性化させたのか、あるいは鍼通電によりCRF受容体とIL-1受容体が直接活性化されたのかなど、どのような経路を介して鍼通電がCRF受容体とIL-1受容体を活性化させたのか不明であり今後詳細に検討する必要がある。

V. 結 語

カラゲニン炎症性痛覚過敏に対する鍼鎮痛における末梢性の鎮痛機序の関わりについて検討した。起炎物質であるカラゲニンの皮下投与により投与3時間後に痛覚過敏を生じ、鍼通電により鍼鎮痛効果が認められた。しかし、CRF、IL-1あるいは μ オピオイド受容体拮抗薬の炎症部位への投与により鍼鎮痛は消失した。また、免疫抑制剤であるCsA投与によっても鍼鎮痛は消失した。以上のことから、カラゲニンによる痛覚過敏に対する鍼鎮痛効果には、炎症部位の各種免疫細胞に存在するCRF受容体とIL-1受容体が関与することが示唆された。また、一次感覚神経終末に存在する末梢の μ オピオイド受容体も鍼鎮痛効果に関与することが示唆された。すなわち、鍼通電により炎症部位でオピオイド含有免疫細胞に存在するCRF受容体とIL-1受容体が活性化され、これにより β エンドルフィンが放出され、放出された β エンドルフィンが一次感覚神経終末に存在する μ オピオイド受容体に作用することにより鎮痛効果をもたらされた可能性が考えられた。このように、炎症性の疼痛に対する鍼鎮痛効果には炎症局所の免疫系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、本研究の遂行に際し、終始御指導と御高閲を賜りました明治鍼灸大学外科学教室 咲田雅一教授に深謝いたします。また、多大なる御助言を頂いた明治東洋医学院専門学校 石丸圭荘博士、明治鍼灸大学鍼灸臨床医学研究科 田口辰樹氏に深謝いたします。

引用文献

- 1) Han JS, Trenius L : Neurochemical basis acupuncture analgesia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 22 : 193-220, 1982.
- 2) He LF : Involvement of endogenous opioid peptides in acupuncture analgesia. *Pain*, 31 : 99-121, 1987.
- 3) Chen XH, Geller EB, Adler MW : Electrical stimulation at traditional acupuncture sites in periphery produces brain opioid-receptor-mediated antinociception in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 277(2) : 654-660, 1996.
- 4) Cabot PJ, Carter L, Schafer M, et al : Methionine-enkephalin-and dynorphin A-release from immune cells and control of inflammatory pain. *Pain*, 93 : 207-212, 2001.
- 5) Cabot PJ, Carter L, Gaiddon C, et al : Immune cell-derived β -endorphin: Production, release and control of inflammatory pain in rats. *J Clin Invest*, 100 : 142-148, 1997.
- 6) Przewlocki R, Hassan AHS, Lason W, et al : Gene expression and localization of opioid peptides in immune cells of inflamed tissue: Functional role in antinociception. *Neuroscience*, 48 : 491-500, 1992.
- 7) Stein C, Hassan AHS, Przewlocki R, et al : Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87 : 5935-5939, 1990.
- 8) Stein C, Hassan AHS, Lehrberger K, et al : Local analgesic effect of endogenous opioid peptides. *Lancet*, 342 : 321-324, 1993.
- 9) Stein C : The control of pain in peripheral tissue by opioids. *N Engl J Med*, 332 : 1685-1690, 1995.
- 10) Stein C, Gramsch C, Herz A : Intrinsic mechanisms of antinociception inflammation: local opioid receptors and beta-endorphin. *J Neurosci*, 10 : 1292-1298, 1990.
- 11) Schafer M, Carter L, Stein C : Interleukin 1 β and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91 : 4219-4223, 1994.
- 12) 関戸玲奈, 石丸圭荘, 咲田雅一 : カラゲニン炎症性痛覚過敏に対する鍼通電刺激の影響について. *明治鍼灸医学*, 26 : 33-41, 2000.
- 13) Crofford LJ, Sano H, Karalis K, et al : Local secretion of corticotropin-releasing hormone in the joints of Lewis rats with inflammatory arthritis. *J Clin Invest*, 90 : 2555-2564, 1992.
- 14) Dinarello CA, Thompson RC : Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunol Today*, 12 : 404-410, 1991.
- 15) Mousa SA, Schafer M, Mitchell WM, et al : Local upregulation of corticotropin-releasing hormone and interleukin-1 receptors in

- rats with painful hindlimb inflammation. *Eur J Pharmacol*, 311 : 221-231, 1996.
- 16) Webster EL, Trancey DE, Jutila MA, et al : Corticotropin-releasing factor receptors in mouse spleen: Identification of receptors-bearing cells as resident macrophages. *Endocrinology*, 127 : 440-452, 1990.
 - 17) Stein C, Millan MJ, Shippenberg TS, et al : Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 248(3) : 1269-1275, 1989.
 - 18) Coggeshall RE, Zhou S, Carlton SM : Opioid receptors on peripheral sensory axons. *Brain Res*, 764 : 126-132, 1997.
 - 19) Hargreaves K, Dubner R, Brown F, et al : A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 32 : 77-88, 1988.
 - 20) Kissin I, Lee SS, Bradley EL : Effects of prolonged nerve block on inflammatory hyperalgesia in rats-prevention of late hyperalgesia. *Anesthesiology*, 88 : 224-232, 1998.
 - 21) Fletcher D, Kayser V, Guilbaud G : Influence of timing of administration on the analgesic effect of bupivacaine infiltration in carrageenin-injected rats. *Anesthesiology*, 81 : 1129-1137, 1996.
 - 22) Schafer M, Mousa SA, Zhang Q, et al : Expression of corticotropin-releasing factor in inflamed tissue is required for intrinsic peripheral opioid analgesia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93 : 6096-6100, 1996.
 - 23) Karalis K, Sano H, Redwine J, et al : Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science*, 254 : 421-423, 1991.
 - 24) Heijnen CJ, Kavelaars A, Ballieux RE : β -endorphin: Cytokine and neuropeptide. *Immunol Rev*, 119 : 41-63, 1991.
 - 25) Schreiber SL, Crabtree GR : The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today*, 13 : 136-142, 1992.
 - 26) Herold KC, Lancki DW, Moldwin RL, et al : Immunosuppressive effects of cyclosporin A on cloned T cells. *J Immunol*, 136 : 1315-1321, 1986.
 - 27) Palay DA, Cluff CW, Wentworth PA, et al : Cyclosporine inhibits macrophage-mediated antigen presentation. *J Immunol*, 136 : 4348-4353, 1986.
 - 28) Chisholm PM, Bevan DJ : T cell activation in the presence of cyclosporine in three in vivo allograft models. *Transplantation*, 46 : 80S-85S, 1988.
 - 29) Cummins AG, Munro GH, Ferguson A : Effect of cyclosporin A on rat mucosal mast cells and the associated protease RMCP II. *Clin Exp Immunol*, 72 : 136-140, 1988.
 - 30) Antonijevic I, Mousa SA, Schafer M, et al : Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. *J Neurosci*, 15 : 165-172, 1995.
 - 31) Russell NJW, Schaible HG, Schmidt RF : Opiates inhibit the discharges of fine afferent units from inflamed knee joint of the cat. *Neurosci Lett*, 76 : 107-112, 1987.
 - 32) Yaksh TL : Substance P release from knee joint afferent terminals: Modulation by opioids. *Brain Res*, 458 : 319-324, 1988.
 - 33) Rittner HL, Brack A, Machelska H, et al : Opioid peptide-expressing leukocytes : Identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiology*, 95 : 500-508, 2001.
 - 34) Bodnar RJ, Glusman M, Brutus M, et al : Analgesia induced by cold-water stress: attenuation following hypophysectomy. *Physiol Behav*, 23(1) : 53-62, 1979.
 - 35) Kiefel JM, Paul D, Bodnar RJ : Reduction in opioid and non-opioid forms of swim analgesia by 5-HT₂ receptor antagonists. *Brain Res*, 500 : 231-240, 1989.
 - 36) Truesdell LS, Bodnar RJ : Reduction in cold-water swim analgesia following hypothalamic paraventricular nucleus lesions. *Physiol Behav*, 39(6) : 727-731, 1987.
 - 37) Parsons CG, Czlonkowski A, Stein C, et al : Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Activation by endogenous opioids and role of the pituitary-adrenal axis. *Pain*, 41 : 81-93, 1990.
 - 38) Aird F, Clevenger CV, Prystowsky MB, et al : Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90 : 7104-7108, 1993.

Acupuncture analgesia in carrageenan-induced hyperalgesic rats: the involvement of peripheral analgesic mechanisms

†SEKIDO Reina

*Department of Surgery, Graduate School of Acupuncture and
Moxibustion, Meiji University of Oriental Medicine*

Abstract

Purpose : To determine whether the corticotropin-releasing factor (CRF), interleukin-1 (IL-1) receptors and μ opioid receptors in peripheral tissues participate in electroacupuncture analgesia (EAA) during hyperalgesia elicited by carrageenan-induced inflammation.

Methods : Male Sprague-Dawley rats were used. Carrageenan was subcutaneously administered by intraplantar (i.pl.) injection to the left hind paw. Nociceptive thresholds were measured using the paw pressure threshold (PPT) (Randall Sellito Test). Rats received 3 Hz EA in the left anterior tibial muscles for 1 h after carrageenan injection. One hour before EA, α -helical CRF (a selective CRF antagonist), IL-1ra (a recombinant IL-1 receptor antagonist) or CTOP (a selective μ opioid receptor antagonist) were administered by i.pl. injection of the inflamed paw or by intravenous (i.v.) injection. To confirm the functional involvement of immune cells in EAA, the animals were pretreated with an injection of the immunosuppressant cyclosporin A (CsA).

Results : A marked ipsilateral inflammatory response appeared, and PPT decreased significantly 3 h after carrageenan injection and persisted at least 24 h. EA resulted in a significant increase in PPT and lasted for 24 h after carrageenan injection. PPT elevations produced by EA were antagonized dose-dependently by local i.pl. injection of α -helical CRF, IL-1ra or CTOP. The i.v. injections had no effect. Systemic pretreatment of CsA blocked the EAA from 1 h after cessation of EA.

Conclusions : These findings suggest that CRF or IL-1 receptors and μ opioid receptors in the peripheral tissues participate in EAA during hyperalgesia elicited by carrageenan injection. The release of CRF or IL-1 elicited by EA may trigger the release of opioid peptides from immune cells in the inflamed tissues, which may activate peripheral opioid receptors and inhibit pain. The immune system in the peripheral tissues may be involved in EAA under hyperalgesic conditions.

Received on October 30, 2002 ; Accepted on January 14, 2003

† To whom correspondence should be addressed.

Meiji University of Oriental Medicine, Hiyoshi-cho, Funaigun, Kyoto 629-0392, Japan