

フロイント完全アジュバントにより引き起こされた 炎症性痛覚過敏に対する鍼通電の効果について

† 村上晋介¹⁾，関戸 玲奈²⁾，石丸圭荘³⁾，咲田雅一⁴⁾

¹⁾ 明治鍼灸大学大学院 鍼灸臨床医学

²⁾ 明治鍼灸大学 臨床鍼灸医学Ⅱ教室

³⁾ 明治東洋医学院専門学校

⁴⁾ 明治鍼灸大学 外科学教室

要旨：フロイント完全アジュバント (FCA) により炎症性痛覚過敏を引き起こしたラットへの鍼通電刺激 (EA) による鎮痛効果を調べ、FCA誘因性炎症に対するEAの効果をおピオイド受容体拮抗薬ナロキソン (NAL) と μ オピオイド受容体拮抗薬 (CTOP) を用いて検討した。雄性ウィスターラット (n=74) の右後肢足底へのFCA投与により痛覚過敏を引き起こさせ、痛覚閾値 (PPT) の測定には加圧式鎮痛効果測定装置 (Randall Selitto Test) を用いた。実験は先ずFCA投与後のPPTの経時的変化を観察し、続いてEAがPPTに如何なる影響を与えるかを検討した。またNAL、CTOPを腹腔内あるいは炎症局所の足底内に投与してEAにより上昇したPPTに及ぼす影響を観察した。FCA投与後48時間においてPPTは最も低下したが、EA群においては、EA直後からPPTは上昇し、EA後24時間においても、PPTはコントロール群に比べ有意に上昇した。

また、EAによるPPTの上昇はNALの腹腔内投与では、部分的にしか抑制されなかったが、炎症局所に投与したNALとCTOPはEAによるPPTの上昇を完全に抑制した。以上のことから、EAはFCA誘因性炎症による痛覚過敏を緩和させる事が明らかとなった。またその鎮痛機序には下行性疼痛抑制系のみならず、末梢神経に存在する μ オピオイド受容体により引き起こされる末梢性のオピオイド鎮痛機構も関与する可能性が考えられた。

I. はじめに

1973年に脊椎動物の脳、脊髄においてオピオイド受容体が発見され¹⁾、その後1975年にオピオイド受容体のリガンドである内因性オピオイドペプチドがHughesらにより発見された²⁾。1950年代後半から主に中国において鎮痛目的で鍼灸治療が広まり、1972年には鍼麻酔手術が行われて世界的に注目された。また、その機序について多くの研究が行われ、鍼鎮痛の機序には下行性疼痛抑制系の賦活が関与している事が明らかとなった。そして現在では、鍼刺激は皮膚に存在するポリモーダル受容器からの求心神経を介して脳または脊髄に伝えられ、脊髄において内因性モルヒネ様物質や抑制性の神経伝達物質を産生させることにより痛みの入力遮断を起こす機構と、上位中枢に伝えられた情報が、視床下部、中脳灰白質のエンドルフィンや大縫線核からのセロトニン作動性の下行性疼痛抑制系を介して脊髄において痛みの遮断を行う2つの機構が考えられている^{3, 4)}。

一方、1988年に末梢の炎症組織における鎮痛機構にもオピオイド受容体の関与が示唆され⁵⁾、古くから考えられてきた中枢神経系が関係するオピオイド鎮痛に加え、末梢神経上に存在するオピオイド受容体により引き起こされる末梢性の鎮痛機序が明らかとなってきた。この末梢性の鎮痛機序は、Steinらが炎症を有するラットに冷水水泳刺激 (cold water swim: CWS) を与えると炎症による局所の痛覚過敏が消失する事を示した研究により明らかにされた。炎症を有するラットにおいては、その炎症部位にオピオイドを含有する免疫系の細胞 (T細胞、単球、マクロファージ、顆粒球など) が集積する⁶⁾。この時にCWSを負荷すると免疫細胞から内因性オピオイドペプチドの放出が促され、その内因性オピオイドペプチドが炎症部位の感覚神経上に存在するオピオイド受容体に作用して、痛み刺激の入力を抑制して鎮痛が引き起こされると考えられている^{7, 8, 9)}。

関戸らはカラゲニン誘因性炎症痛に対し、鍼通

平成15年7月9日受付，平成15年9月24日受理

Key Words：鍼通電 electroacupuncture, 鍼鎮痛 acupuncture analgesia,

フロイントアジュバント Freund's complete adjuvant, 炎症 inflammation, 痛覚過敏 hyperalgesia

† 連絡先：〒020-0151 岩手郡滝沢村大釜字風林42-185 北東北東洋医療専門学校

Tel：019-686-2466 Fax：019-691-9033

電刺激を行ったところ、長時間持続する鍼鎮痛効果を生じたが、これには炎症局所での末梢性鎮痛効果の関与の可能性があると報告している¹⁰⁾。本研究ではカラゲニンによる炎症性痛覚過敏モデルの代わりにFCAを投与した炎症性痛覚過敏モデルを用いて¹¹⁾、その痛覚閾値の経時的変化とFCA誘因性炎症下のラットへの鍼通電刺激が痛覚閾値に如何なる影響を与えるかを検討し、カラゲニン誘因性炎症の場合との違いを比較検討した。更に、オピオイド受容体拮抗薬であるナロキソン (NAL) 及び μ オピオイド受容体拮抗薬を用いて、鍼鎮痛におけるオピオイド受容体の関与についても併せて検討した。

II. 方法

1. 実験動物及び実験群

Wistar系雄性ラット (8~9週齢, 体重250~290g, n=74) を用いた。ラットの飼育環境は、摂食が自由にできるようにケージにて個々に飼育し、室温25°C, 明暗サイクル12時間 / 12時間 (AM. 7:00 / PM. 19:00) の条件で飼育した。

実験1: FCA投与による痛覚閾値の経時的変化を検討する目的で、FCAを右後肢足底に皮下投与した群を作成した (n=6)。

実験2: FCAにより引き起こされた炎症性痛覚過敏ラットにおける鍼通電刺激の影響を検討する目的で 1) FCAを右後肢足底に皮下投与したコントロール群 (cont群), 2) FCA投与後に右後肢に鍼通電刺激を行った鍼通電群 (EA群) に分けた (各群n=6)。cont群は、実験2以降においては同じデータを用いている。

実験3: 鍼鎮痛効果における中枢でのオピオイド受容体の関与を検討するために、NALの腹腔内投与 (i.p.) の影響を観察した。実験群として 1) cont群, 2) FCA投与後、鍼通電刺激を行う10分前にNALを腹腔内投与した群を作成し、NALの投与量により (a) NAL (125 μ g) i.p.+ EA群, (b) NAL (250 μ g) i.p. + EA群, (c) NAL (500 μ g) i.p. + EA群, 及びNALの代わりに生理食塩水(生食)を腹腔内に投与した (d) 生食 i.p. + EA群 (各群n=6) に分けた。

実験4: 鍼鎮痛効果に対するNALの炎症部位への足底内投与 (i.pl.) の影響を検討する目的で、1) cont群, 2) FCA投与後、鍼通電刺激を行う1

0分前に0.1mlのNALを炎症部位の右後肢足底に局所投与した群を作成し、NALの局所投与量により (a) NAL (1.25 μ g) i.pl. + EA群, (b) NAL (2.5 μ g) i.pl. + EA群, (c) NAL (10 μ g) i.pl. + EA群, (d) 生食 i.pl. + EA群 (各群n=6) に分けた。

実験5: 鍼鎮痛効果に対する μ オピオイド受容体拮抗薬 D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr amide (CTOP) の炎症部位の足底内投与 (i.pl.) の影響を検討する目的で 1) cont群 (n=6), 2) FCA投与後、鍼通電刺激を行う10分前に0.1mlのCTOPを炎症部位の右後肢足底に投与 (i.pl.) した群を作成し、(a) CTOP (10 μ g) i.pl. + EA群 (n=4), CTOPの代わりに蒸留水を投与した (b) 蒸留水 i.pl. + EA群 (n=4) に分けた。

2. FCA投与によるモデルの作製

エーテル麻酔下にて起炎物質であるFCA (0.1%加熱結核菌, 85%Drakeol 5NF, 15%Arlacel A, mannide monooleate emulsifier) (CALB IOCHEM製) をツベルクリン用26G注射針を用いラットの右後肢足底に0.15ml皮下投与した。

3. 痛覚閾値の測定

後肢の痛覚閾値の測定には、ラットに両後肢が露出するように作製した布製のジャケットを着用させ、露出された両後肢足背に加圧式鎮痛効果測定装置 (Ugo Basile社) を用いて左右交互に加圧し、後肢の逃避反応を起こすまでに要した付加重量 (g) を痛覚閾値 (paw pressure threshold: PPT) とした (Randall Selitto Test)。ラットの後肢足背の組織損傷を避ける為に付加重量250gをcut off値とした。FCA投与前に上述のジャケット着用後20分間の安静後、PPTの測定を2分おきに3回行ない、その後、15分間の安静後、同様に再度測定しその平均値が安定しているラットのみを実験に用いた。

PPTの測定は両後肢で行ない、FCA投与前、FCA投与後48時間、その測定直後より鍼通電刺激を開始し、鍼通電刺激終了直後、鍼通電刺激終了後20, 40分, 1, 2, 4, 6, 24時間の計10回測定した。

4. 鍼通電方法

鍼通電刺激(electroacupuncture：EA)はFCA投与後48時間のPPT測定直後から行った。鍼通電刺激には直径0.2mm、長さ30mmのステンレス鍼(SEIRIN製)を用い、右後肢の前脛骨筋の2ヶ所(足三里相当部位とその下約7mm)に、深さ7mmまで刺入して刺激を行った。刺激装置には、ISOLATOR(型名:DPS-122D)、STIMULATOR(型名:DPS-1300D)(DIA MEDICAL SYSTEM CO.)を用い、鍼通電刺激の条件はdurationが0.3msの矩形波を用い、通電頻度は3Hzとし1時間連続して行なった。なお、電流量は1mAから開始し、20分毎に1mAずつ増加させ最終的には3mAとなるようにした。また、実験に使用するラットは覚醒下の状態において鍼通電刺激を行なう為、ラットを安静状態に保つ目的で上述のジャケットを着用させて吊り下げた。ラットには、PPTの測定時と鍼通電刺激時においてのみジャケットを着用させ、それ以外はラットを個々のケージに戻し自由に摂食ができるようにした。

5. 使用薬物

ナロキソン(USP)は生理食塩水に溶解し、鍼通電刺激の10分前に腹腔内あるいは足底内に投

与した。CTOP(Sigma)は蒸留水に溶解し鍼通電刺激10分前に足底内に投与した。全ての薬物投与は、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補正下にて二元配置分散分析を行った後、多重比較はTukey法(実験1~4)、シェッフェ法(実験5)を用いて検定した。P<0.05を有意水準とした。また、すべてのデータは平均値±標準偏差(mean±SD)で表示した。

なお、本実験は本学研究倫理委員会の承認を得て行った。

III. 結果

1. FCA投与による痛覚閾値(PPT)の経時的変化(図1)

FCA投与前(0min)には左後肢79.9±8.2g、右後肢80.3±3.9gであったPPTが、右後肢足底へのFCAの皮下投与により、FCA投与側(右後肢)においてPPTは徐々に低下した。FCA投与側のPPTの低下はFCA投与後12時間から始まり、FCA投与後24時間(60.7±5.7g)、FCA投与後36時間(60.1±4.3g)、FCA投与後48時間(58.9±4.7

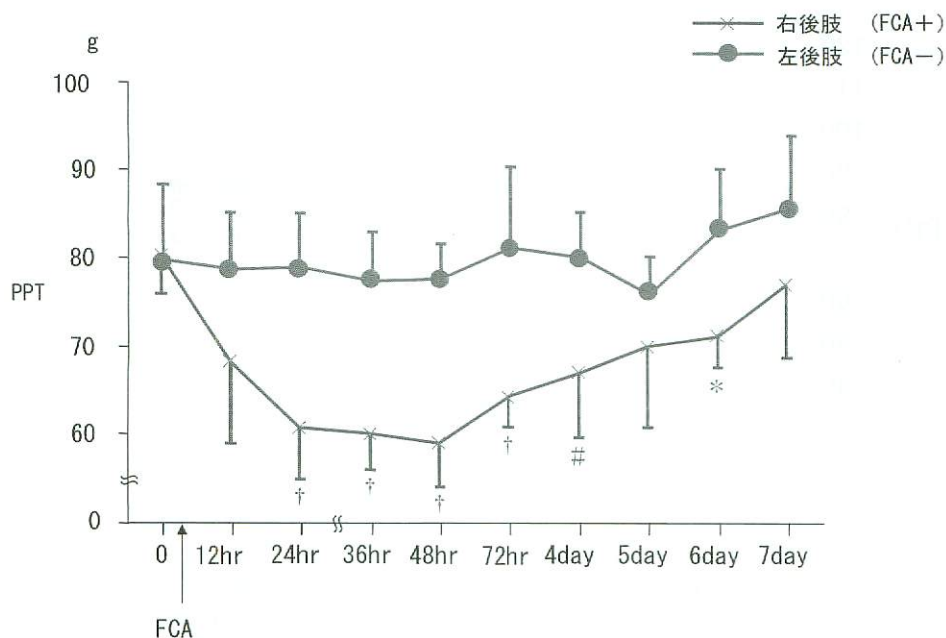


図1. FCA投与による痛覚閾値の経時的変化

×は右後肢(FCA投与側)、●は左後肢(FCA非投与側)の経時的変化をそれぞれ示す。FCAは右後肢に0.15ml皮下投与した。データはすべて平均値±標準偏差。有意水準は、†P<0.001、#P<0.01、*P<0.05(vs左後肢)とした。

g) においては、FCA非投与側（左後肢）のPPTと比較すると有意な低下（ $\dagger P < 0.001$ ）を示した。このPPTの低下はFCA投与後48時間以降から徐々に回復する傾向を示し、FCA投与後7日目においてはFCA投与側のPPTは $76.9 \pm 8.4g$ となり、ほぼFCA投与前のPPT値に回復するのが観察された。このPPTの低下はFCA投与側においてのみ見られ、FCA非投与側においてはPPTの低下は見られなかった。また、FCA投与側においては浮腫と発赤が確認されたが、FCA非投与側には出現

しなかった。

2. FCAにより引き起こされた炎症性痛覚過敏ラットに対する鍼通電刺激の影響（図2）

FCA投与後、FCA投与側においてのみPPTは低下し、FCA投与後48時間において最もPPTは低下した。そこで、FCA投与後48時間目のPPT測定直後にEAを開始しその効果を検討した。FCA投与側のPPTは、FCA投与前 $84.2 \pm 5.2g$ であったが、FCA投与後48時間には $50.1 \pm 6.4g$ と有

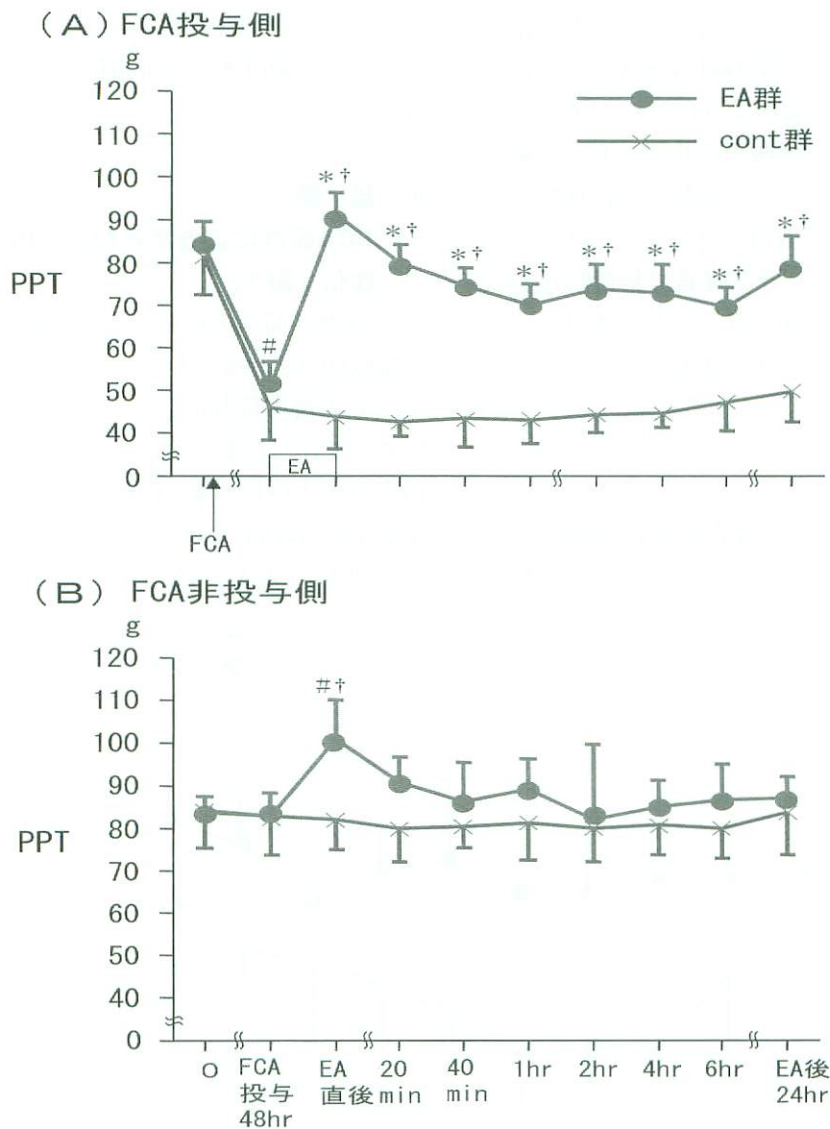


図2. FCAにより引き起こされた炎症性痛覚過敏ラットにおける鍼通電刺激の影響

(A)はFCA投与側、(B)はFCA非投与側の経時的変化をそれぞれ示す。EAはFCA投与後48時間に開始した。×はcont群、●はEA群をそれぞれ示す。データはすべて平均値±標準偏差。(A)における有意水準は、# $P < 0.001$ (vs 0minEA群)、* $P < 0.001$ (vs FCA投与後48hrEA群)、 $\dagger P < 0.001$ (vs cont群)とした。(B)における有意水準は、 $\dagger P < 0.001$ (vs cont群)、# $P < 0.001$ (vs FCA投与後48hrEA群)とした。

意 ($\#P<0.001$) に低下した。しかし、EA終了直後には $91.1\pm 5.0\text{g}$ と有意に ($*P<0.001$) 上昇し、その後、経時的に徐々に低下していく傾向が見られたが、EA終了後6時間 ($69.6\pm 4.6\text{g}$) においてもcont群と比べて有意に ($\dagger P<0.001$) 高かった。そして、EA後24時間には、FCA投与前のPPT値とほぼ同等にまで回復した ($78.6\pm 7.6\text{g}$) (図2A)。

一方、FCA非投与側においては、EA群では、EA直前 (FCA投与後48時間) に $82.6\pm 5.5\text{g}$ であつ

たPPTが、EA終了直後においては一過性に $100.6\pm 9.4\text{g}$ と有意 ($\#P<0.001$) に上昇し、cont群と比較しても有意差 ($\dagger P<0.001$) が認められた。しかし、EA終了後20分からEA後24時間までの経過においては、cont群と比較して有意な差は認められなかった (図2B)。また、FCA処置動物にEAを加えても、FCA投与側の浮腫や発赤には変化はなかった。

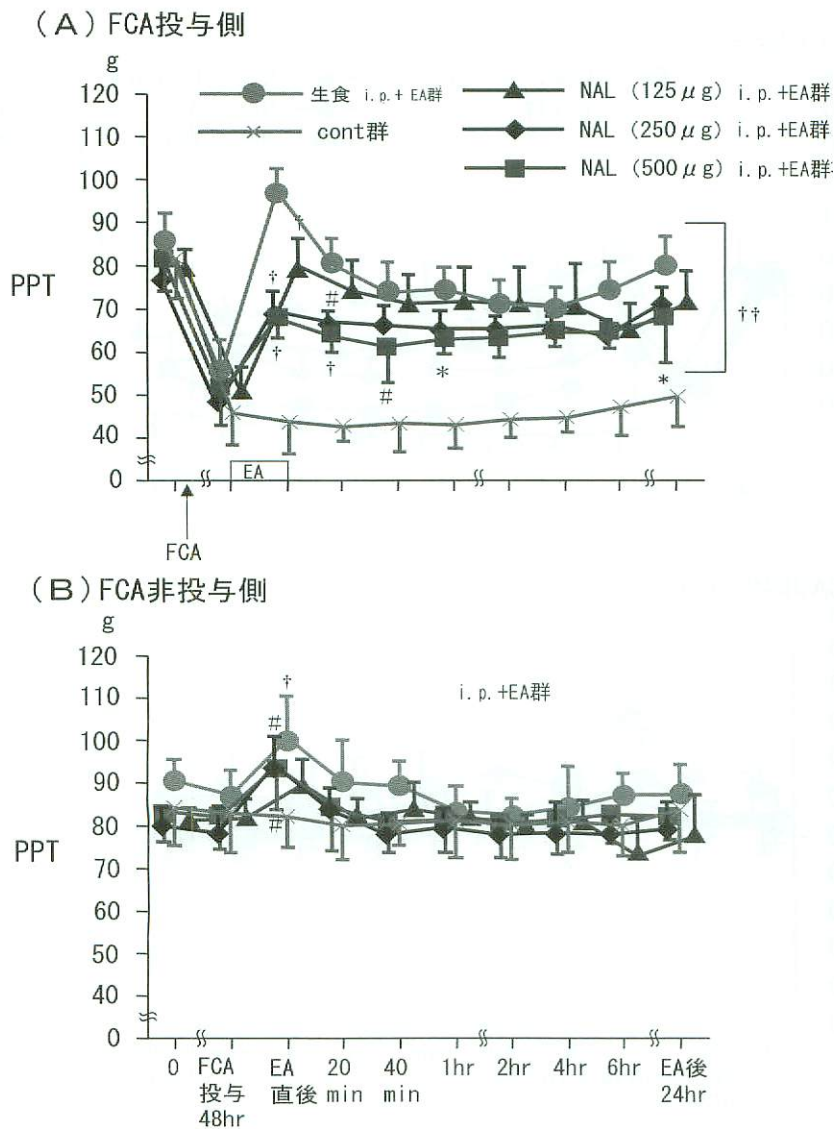


図3. 鎮痛効果に対するナロキソン (NAL) の腹腔内投与 (i. p.) の影響

(A)はFCA投与側、(B)はFCA非投与側の経時的变化をそれぞれ示す。EA開始10分前に各々の量のNALを腹腔内に投与した。×はcont群、●は生食i. p. + EA群、▲はNAL (125 μg) i. p. + EA群、◆はNAL (250 μg) i. p. + EA群、■はNAL (500 μg) i. p. + EA群をそれぞれ示す。データはすべて平均値±標準偏差。(A)における有意水準は、 $\dagger\dagger P<0.001$ (vs cont群)、 $\dagger P<0.001$ 、 $\#P<0.01$ 、 $*P<0.05$ (vs 生食i. p. + EA群)とした。(B)における有意水準は、 $\dagger P<0.001$ 、 $\#\#\#P<0.01$ (vs cont群)とした。

3. 鍼鎮痛効果に対するナロキソン (NAL) の腹腔内投与 (i.p.) の影響 (図3)

FCA投与48時間後にEAを行うと、EA終了直後には、ラットのPPTは両側共に上昇した。EAにより生じたPPTの上昇における中枢でのオピオイド受容体の関与を検討するために、EAの10分前にNAL投与量を変えて (125 μg, 250 μg, 500 μg) で腹腔内投与してその効果を検討した。FCA投与側においては、生食 i.p.+ EA群, NAL i.p.+ EA群の全てで、cont群と比較してEA終

了直後からEA後24時間においてPPTは有意 († † P<0.001) に上昇した。しかし、EA終了直後においては、NAL i.p.+ EA群のPPTは生食 i.p.+ EA群と比較しNALの投与量に依存して抑制され、各投与量において有意差 († P<0.001) が認められた。しかし、500 μgのNALの腹腔内投与を行ってもEAによるPPTの上昇を完全に抑制する事が出来なかった (図3A)。

一方、FCA非投与側のPPTは、EA終了直後に生食 i.p.+ EA群 († † P<0.001), NAL

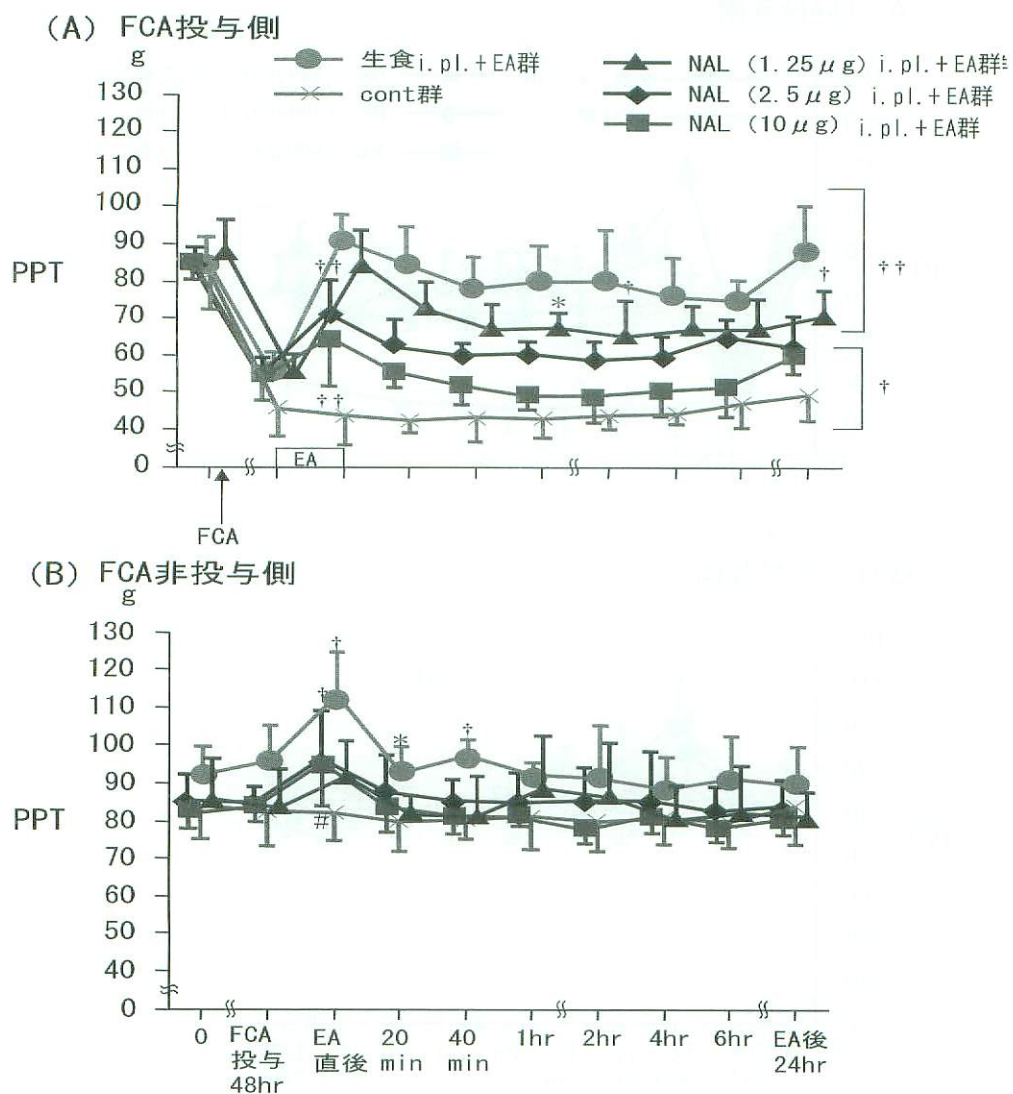


図4. 鍼鎮痛効果に対するNALの炎症部位への足底内投与(i. pl.)の影響 (A)はFCA投与側、(B)はFCA非投与側の経時的变化をそれぞれ示す。EA開始10分前に各々の量のNALを0.1ml右後肢に足底内投与した。×はcont群、●は生食i. pl.+ EA群、▲はNAL(1.25 μg) i. pl.+ EA群、◆はNAL(2.5 μg) i. pl.+ EA群、■はNAL(10 μg) i. pl.+ EA群をそれぞれ示す。データはすべて平均値±標準偏差。(A)における有意水準は、† † P<0.001 (vs cont群), † P<0.001, * P<0.05 (vs 生食 i. pl.+ EA群)とした。(B)における有意水準は、† P<0.001, # P<0.01, * P<0.05 (vs cont群)とした。

(250 μ g) i.p.+ EA群 (##P<0.01), NAL (500 μ g) i.p.+ EA群 (##P<0.01) ではcont群と比較して有意に上昇した. しかし, EA終了後20分以降においては, cont群, 生食 i.p.+ EA群, NAL i.p.+ EA群全て, ほぼ同様の経過をたどり各群の間で差は認められなかった (図3B). このように, NALの腹腔内投与はFCA投与側においてEAにより生じたPPTの上昇を完全には抑制できなかった.

4. 鎮痛効果に対するNALの炎症部位への足底内投与 (i.pl.) の影響 (図4)

NALの腹腔内投与では, EAによるPPTの上昇を完全には抑制する事ができなかった. そこで, 末梢神経に存在するオピオイド受容体を阻害する目的でNALをEAの10分前に右後肢の足底内 (FCA投与側) に投与してその効果を検討した.

FCA投与側では, FCAにより低下したPPTは生食 i.pl.+ EA群でEA終了直後に91.1 \pm 5.0gとなり, FCA投与前のPPT (86.0 \pm 5.8g) 以上に上

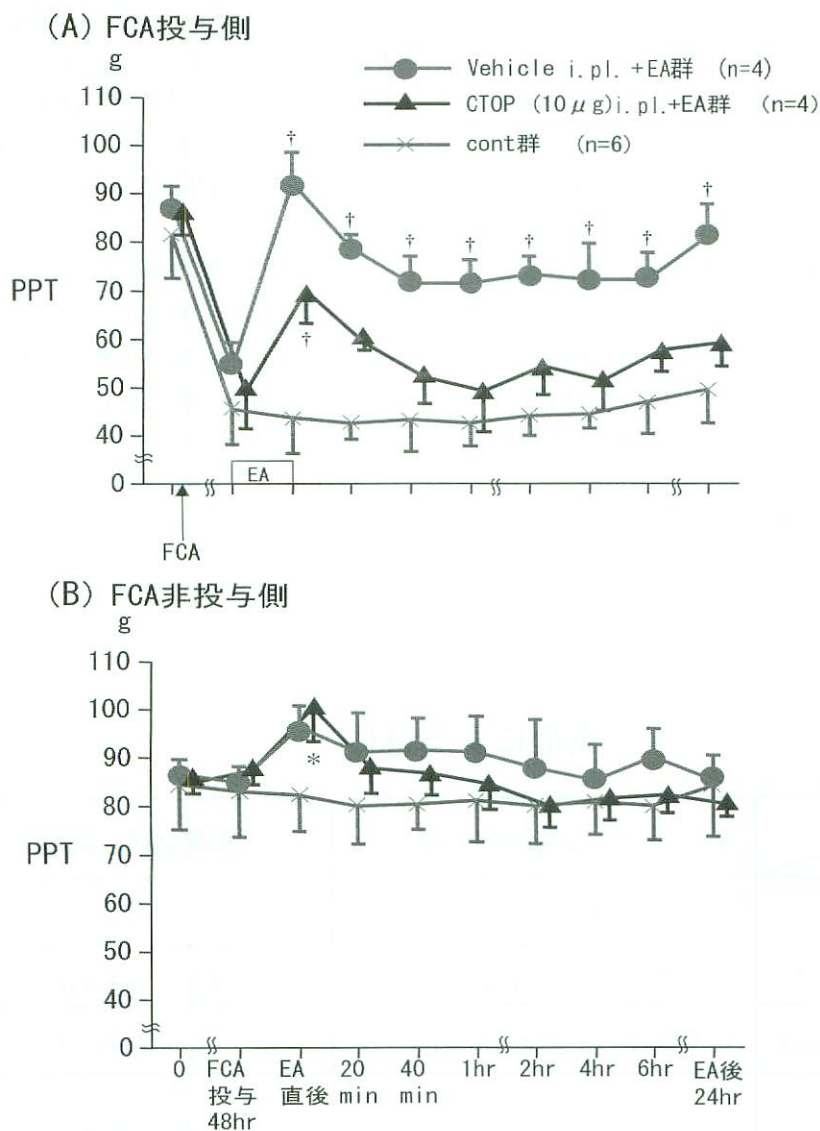


図5. 鎮痛効果に対するCTOPの炎症部位への足底内投与 (i.pl.) の影響

(A)はFCA投与側, (B)はFCA非投与側の経時的変化をそれぞれ示す. EA開始10分前にCTOPを0.1ml 右後肢に足底内投与した. \times はcont群, \bullet は蒸留水 i.pl.+ EA群, \blacktriangle はCTOP (10 μ g) i.pl.+ EA群をそれぞれ示す. データはすべて平均値 \pm 標準偏差. (A)における有意水準は, \dagger P<0.001 (vs cont群)とした. (B)における有意水準は, $*$ P<0.05 (vs cont群)とした.

昇し、その後やや低下したが、EA終了後6時間まで80g 前後のPPTであった。しかし、NAL i.pl.+ EA群では、NALの投与量に依存してEA終了直後のPPTの上昇が抑制された。特に、NAL (10 μ g) i.pl.+ EA群のPPTはEA終了直後でcont群に比しやや高値であったが、EA終了後20分以降では、cont群とほとんど差はなかった。また、NAL (1.25 μ g) i.pl.+ EA群のPPTはcont群に比しEA終了後からEA後24時間において有意に上昇し、生食 i.pl.+ EA群に比し、EA終了直後、EA終了後20分では有意な差は認められなかったが、EA終了後1時間 (*P<0.05)、EA終了後2時間 (†P<0.001)、EA後24時間 (†P<0.001) で有意に抑制された (図4A)。

一方、FCA非投与側において、生食 i.pl.+ EA群はcont群と比較して、EA終了直後 (††P<0.001)、EA終了後20分 (**P<0.05)、EA終了後40分 (††P<0.001) と有意なPPTの上昇を認めた。また、NAL (2.5 μ g) i.pl.+ EA群、NAL (10 μ g) i.pl.+ EA群では、生食 i.pl.+ EA群ほどではないがEA終了直後に有意なPPTの上昇を認めた。しかし、その後はEA後24時間までcont群とほとんど差はなかった (図4B)。このように、EAにより生じたFCA投与側のPPTの上昇は、NALの炎症部位への足底内投与によって用量依存性に抑制された。

5. 鍼鎮痛効果に対するCTOPの炎症部位への足底内投与 (i.pl.) の影響 (図5)

EAによるPPTの上昇がNALのFCA投与側への足底内投与により用量依存性に抑制された。そこで、この現象に関与する末梢のオピオイド受容体のサブタイプを検討する目的で、 μ オピオイド受容体拮抗薬であるCTOPをEAの10分前に炎症部位の足底に投与した。

FCA投与側において、蒸留水 i.pl.+ EA群ではcont群と比較して、EA終了直後においてPPTは有意 (†P<0.001) に上昇し、その後、徐々に低下していくもののEA後24時間においても有意 (†P<0.001) に高かった。他方、CTOP i.pl.+ EA群においては、EA終了直後は蒸留水 i.pl.+ EA群に比しPPTは抑制され、EA終了後40分以降からEA後24時間までcont群と有意な差はなかった (図5A)。

一方、FCA非投与側においては、EA終了直後にCTOP i.pl.+ EA群のPPTはcont群と比較すると有意に上昇したが (*P<0.05)、その後はcont群とほぼ同様な経過を示した (図5B)。このように、EAにより生じたFCA投与側のPPTの上昇は、CTOPの炎症部位への足底内投与によって抑制された。

炎症による違い

	カラゲニン誘因性炎症	FCA誘因性炎症
起炎物質	λ カラゲニン	FCA
痛覚過敏出現時間	カラゲニン投与後3時間	FCA投与後48時間
痛覚過敏持続時間	約24時間 (その後のdataなし)	約96時間以上
痛覚過敏	カラゲニン投与側 カラゲニン非投与側	FCA投与側のみ
鎮痛持続時間	24時間 (dataなし)	24時間以上
オピオイド含有免疫系細胞	主に、好中球 (dataなし)	単球、マクロファージ、リンパ球 (dataなし)

IV. 考 察

近年鍼鎮痛に関する研究は数多くなされてきたが、主に正常動物を対象とした研究が多く、病態下の動物を対象とした研究はほとんど行われていない。しかし、EAを臨床に応用していくためには、正常状態下ではなく病的状態下の動物を用いてEAの効果を観察する必要がある。この目的のために、関戸ら¹⁰⁾はカラゲニン誘因性炎症ラットを用いてEAの鎮痛効果を検討しているが、我々は今回FCAを用いて、FCA誘因性炎症ラットを作成し、炎症により引き起こされた痛覚過敏に対してEAがどのような影響を及ぼすかを検討した。

FCAを足底の局所に投与して作成した炎症性痛覚過敏ラットを用いた研究は数多く報告されている^{5, 7, 9, 11)}。本研究においても、ラットの右後肢足底へのFCA投与後、FCA投与側（右後肢）において徐々に痛覚閾値の低下が認められ、痛覚過敏の出現が観察されたが、FCA非投与側（左後肢）においては、痛覚閾値の低下や炎症反応は観察されなかった（図1）。FCAにより引き起こされた痛覚閾値の低下には、電気生理学的な実験で脊髄後角第1層における侵害受容ニューロンの入力増加¹²⁾が報告されており、本研究においても脊髄での侵害受容線維からの入力の増大と末梢感覚受容器の感作により痛覚閾値の低下が起きたと考えられる。

次に、FCAにより引き起こされた炎症性痛覚過敏ラットに対するEAの影響を検討したところ、

EA終了直後ではFCA投与側のみならず、FCA非投与側においても痛覚閾値の上昇が見られた。Hanらは正常動物にEAを与え、その痛覚閾値の変動をtail flickにより測定しているが、低頻度EAでは刺激を与えると徐々に痛覚閾値が上昇し、刺激終了後も痛覚閾値の上昇は持続するが、やがて徐々に閾値は低下しその効果はほぼ1時間以内に消失すると報告している³⁾。しかし、本研究のFCA投与側におけるEAによる痛覚閾値の上昇効果は、EA終了直後からほぼ24時間以上にわたり持続し、正常動物での鍼鎮痛とは異なる結果となった（図2A）。しかし、関戸ら¹⁰⁾は炎症動物にEAを行うと長時間の鎮痛効果を示すと報告しており、今回と同様の結果となった。このことから、正常動物と炎症動物に対してのEAによる痛覚閾値の上昇効果は異なる機序により起きているのでは

ないかと推測された。また、炎症動物を使った関戸らの実験では、カラゲニン非投与側においても低頻度EAによる鎮痛効果が通電後に確認されているが、今回のFCAを使った実験では確認されなかった。これは起炎物質として使用した薬物の違いではないかと推測される。

FCA処置動物に対するEAにより両後肢で痛覚閾値が上昇したことから、全身的に痛覚閾値が上昇したと考えられ、この効果が中枢でのオピオイド受容体を介して引き起こされているのか否かを検討した。NALは正常動物の鍼鎮痛効果を抑制すると報告されている1 mg/kg (250 μg) の量をあらかじめ予備実験で確認した上でそれぞれの量で腹腔内に投与した。その結果、FCA処置動物に対してのNALの腹腔内投与はEAによる痛覚閾値の上昇を部分的に抑制しただけで（図3A）、正常動物に対するNALの腹腔内投与時と同様の結果は得られなかった。EAによる全身性の痛覚閾値の上昇は、オピオイド系の他に、セロトニン系、ノルアドレナリン系¹³⁾などの様々な鎮痛系が関与していることが明らかとなっている。これらのことから、本研究におけるEAによる痛覚閾値の上昇は中枢での内因性オピオイド系以外の鎮痛機序の関与が考えられた。

近年、Steinらは、炎症を有する動物にCWS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、放出されたオピオイドペプチドが一次性感覚神経終末上のオピオイド受容体に結合して、痛み刺激の入力を抑制する事を報告している^{8, 14, 15, 16)}。また、関戸らはカラゲニン誘因性痛覚過敏に対し、EAを行ったところ、長時間持続する鍼鎮痛効果を生じたが、この効果には炎症局所でのオピオイド受容体が関与する可能性を報告している¹⁰⁾。本研究においても炎症動物を用いていることからEAにより、炎症組織でSteinらの報告している末梢性鎮痛が引き起こされていることが予測されたのでこの可能性を検討した。

EA開始前に、NALをFCA投与側の足底に皮下投与した。その結果、FCA投与側においては、NALの皮下投与により、鍼通電刺激終了直後から痛覚閾値の上昇が用量依存性に抑制され、10 μg 投与では鍼通電刺激終了後20分以降からは完全に拮抗された（図4A）。一方、FCA非投与側に

おいては、EAによる痛覚閾値の上昇が部分的に認められ、NAL投与の影響はほとんどなかった(図4B)。即ち、FCA投与側ではNALの炎症局所投与により鍼通電刺激による閾値の上昇が完全に拮抗されたことから、末梢神経に存在するオピオイド受容体が関与している可能性が示唆された。

また、Steinらは末梢の炎症組織に存在する主要なオピオイドペプチドは β -エンドルフィンと報告しており^{7, 17, 18)}、 β -エンドルフィンと親和性の高いオピオイド受容体は μ オピオイド受容体であることが知られている¹⁹⁾。そこで、EAで生じた痛覚閾値の上昇に末梢の μ オピオイド受容体が関与するのかを検討するためにEA開始前に μ オピオイド受容体拮抗薬をFCA投与側の足底に投与し、これにより痛覚閾値の上昇が抑制されるか否かを検討した。その結果、FCA投与側において、CTOPのFCA投与側の足底内投与により、

EAで生じた痛覚閾値の上昇が明らかに抑制されたが(図5A)、FCA非投与側においては著明な変化は観察されなかった(図5B)。このことからFCA投与側ではEAにより放出された β -エンドルフィンが末梢の μ オピオイド受容体を介して痛覚閾値を上昇させた可能性が示唆された。

関戸らが用いたカラゲニンでは投与後3時間で痛覚閾値が最も低下したが¹⁰⁾、今回我々がFCAを用いて行った実験においては、FCA投与後3時間ではなく、投与後48時間で痛覚閾値が最も低下した。また、痛覚過敏の持続時間はカラゲニン投与時では約24時間であったが、FCA投与時では96時間以上となり痛覚過敏の持続時間に違いが見られた。また、カラゲニンではカラゲニン投与側及び対側の後肢にも痛覚過敏が出現したが、FCA投与ではFCA投与側のみ痛覚過敏が出現した。これらの炎症を有する動物にEAを行うと、同様に痛覚閾値の上昇がみられたが、FCA処置動物において痛覚閾値の上昇は長時間持続した。これまでに、カラゲニン誘因性炎症の場合、炎症組織に浸潤する免疫系の細胞は、好中球が主体であると言われている⁶⁾。一方、FCA誘因性炎症においては、炎症組織に浸潤する細胞は、単球、マクロファージ、リンパ球が主体であると報告されている⁶⁾(表1)。Steinらによると、炎症組織内に浸潤する好中球、単球、リンパ球は、細胞内にオピオイドペプチドを含有しており、これらの細

胞がCWS等の刺激を受けるとオピオイドペプチドを遊離すると報告している^{5, 9)}。今回、関戸らがカラゲニンを用いて行った実験と我々が行った実験の結果の違いは、炎症組織内に浸潤する免疫細胞の違いの可能性が考えられた。

今回の実験において、FCAにより引き起こされた痛覚過敏を緩和するために3HzのEAは有効であり、その鎮痛機序は中枢と炎症組織からの内因性オピオイドペプチド、特に β -エンドルフィンが関与している可能性が示唆された。

V. 結 語

炎症状態下での鍼鎮痛機序の検討を目的に、FCA誘因性炎症痛覚過敏モデルを作成し、EAが痛覚過敏に及ぼす影響を加圧式鎮痛効果測定装置(Randall Selitto Test)を用いて検討した。FCAをラットの右後肢足底に投与したところ、FCA投与側(右後肢)において、痛覚過敏が出現し痛覚閾値の低下が観察された。また、FCA投与側へのEAにより両側後肢において痛覚閾値が上昇し、FCA非投与側(左後肢)では一過性であったが、FCA投与側では持続的な痛覚閾値の上昇が観察された。オピオイド受容体拮抗薬であるNALの腹腔内投与により、EAによるFCA投与側の痛覚閾値の上昇は部分的には抑制されたが、完全には抑制されなかった。しかし、NALのFCA投与側の足底内投与によって、FCA投与側の痛覚閾値の上昇は用量依存性に抑制され、 μ オピオイド受容体拮抗薬であるCTOPのFCA投与側の足底内投与により痛覚閾値の上昇は抑制された。これらのことから、EAによる痛覚閾値の上昇には、末梢神経に存在する μ オピオイド受容体を介した炎症局所での末梢性鎮痛が関与している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Kuhar MJ, Pert CB, Snyder SH: Regional distribution of opiate binding in monkey and human brain. *Nature*, 245: 447 - 450, 1973.
- 2) Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, et al: Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 258: 577 - 579, 1975.
- 3) Han JS, Xie GX: Dynorphin Important mediator for electroacupuncture analgesia in

- the spinal cord of the rabbit. *Pain*, 18:367 - 376, 1984.
- 4) 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.
 - 5) Stein C, Millan MJ, Shippenberg TS, et al : Peripheral effect of fentanyl upon nociception in inflamed tissue of the rat. *Neurosci Lett*, 84 : 225 - 228, 1988.
 - 6) Heike LR, Alexander B, Halina M, et al : Opioid peptide expressing leukocytes. *Anesthesiol*, 95 : 500 - 508, 2001.
 - 7) Stein C, Gramsch C, Herz A : Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation : local opioid receptors and β -endorphin. *Neurosci*, 10 : 1292 - 1298, 1990.
 - 8) Stein C, Yassouridis A : Peripheral morphine analgesia. *Pain*, 71 : 119 - 121, 1997.
 - 9) Stein C, Lehrberger K, Giefing J, et al : Local analgesic effect of endogenous opioid peptides. *Lancet*, 342 : 321 - 325, 1993.
 - 10) 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*, 第26号 : 33 - 41, 2000.
 - 11) Stein C, Millan MJ, Herz A : Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation : alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmac Biochemi & Behav*, 31 : 445 - 451, 1988.
 - 12) Hylden J, Nahin R, Dubner R : Physiological characterization of nociceptive lamina I projection neurons in hyperalgesic rats. *Soc. Neurosci Abstr*, 13 : 114, 1987.
 - 13) Han JS, Trenius L : Neurochemical basis of acupuncture analgesia. *Ann Revi of Pharmacology and Toxicology*, 22 : 193 - 220, 1982.
 - 14) Antonijevic I, Mousa SA, Schafer M, et al : Perineurial defect and Peripheral opioid analgesia in inflammation. *Neurosci*, 15 : 165 - 172, 1995.
 - 15) Stein C, Hassan A, Gramsch C, 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.
 - 16) Cabot PJ : Immune-derived opioids and peripheral antinociception. *J Clin Invest*, 100 : 142 - 148, 1997.
 - 17) Cabot PJ, Carter L, Gaiddon C, et al : Immune cell-derived β -endorphin. *J Clin Invest*, 100 : 142 - 148, 1997.
 - 18) Mousa S, Zhang Q, Sitte N, et al : β -endorphin-containing memory-cells and μ -opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. *J Neuroimmunol*, 115 : 71 - 78, 2001.
 - 19) 植田 弘師 : オピオイドレセプター機構の分子薬理学 *日薬理誌*, 94 : 339 - 349, 1989.

Effect of electroacupuncture stimulation on inflammatory pain induced by Freund's complete adjuvant.

†MURAKAMI Shinsuke¹⁾, SEKIDO Reina²⁾,
ISHIMARU Keisou³⁾, SAKITA Masakazu⁴⁾,

¹⁾ *Department of Surgery, Graduate School of Acupuncture and Moxibustion, Meiji University of Oriental Medicine*

²⁾ *Department of Clinical Acupuncture and Moxibustion II, Meiji University of Oriental Medicine*

³⁾ *Meiji School of Oriental Medicine*

⁴⁾ *Department of Surgery, Meiji University of Oriental Medicine*

Abstract

Purpose This study was designed to investigate the effect of electroacupuncture (EA) on inflammatory pain by Freund's complete adjuvant (FCA). It was also investigated whether opioid receptors in the central nerve system (CNS) and peripheral opioid receptors were involved in analgesic effects produced by EA.

Materials and Methods Male Wistar rats (n=74) were used. FCA was subcutaneously injected intraplantar (i.pl.) in the right hind paw to induce inflammation. Nociceptive threshold was evaluated by the paw pressure threshold (PPT) (Randall Sellito Test).

To assess the antinociceptive effect of EA on hyperalgesia by FCA, rats received EA in the right anterior tibial muscles for one hour. EA was given 48h after FCA injection. NAL (opioid receptor antagonist) or CTOP (a selective μ opioid receptor antagonist) was administered i.p. or local i.pl. 10 min before EA.

Results PPT in the inflamed paw maximally decreased on 48 h after FCA injection. The analgesic effects were induced immediately after EA, and prolonged for over one day. The analgesic effects induced by EA were partially antagonized by NAL i.p. injection, but were almost completely antagonized by i.pl. injection of NAL or CTOP.

Conclusions These findings suggest that EA reduced the hyperalgesia elicited by FCA. Moreover, the analgesic effects produced by EA may be partly mediated by opioid receptors in the CNS, and also μ opioid receptors in the peripheral tissues.

Received on July 9, 2003 : Accepted on September 24, 2003

† To whom correspondence should be addressed.

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