

**三叉神経脊髄路核尾側亜核および上部頸髄における視床または橋
投射ニューロンの分布様式**

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

齋藤 弘人

(指導：飯沼利光教授，岩田幸一教授)

目次

	ページ
概要	1
緒言	3
材料および方法	5
結果	9
考察	14
結論	21
文献	23
図および表	

尚、本博士論文は *Experimental Neurology* vol. 293, 124-136 に掲載された論文” Ascending projections of nociceptive neurons from trigeminal subnucleus caudalis: A population approach”を基幹論文とし、それに新たなデータ (Fig.9) を加えてまとめた総括論文である。

概 要

三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) および上部頸髄 (C1) の二次ニューロンは、口腔顔面領域の痛み制御において重要な働きを有し、これらの領域からの侵害情報は、視床後内側腹側核 (VPM)、視床内側核群 (MTN) および橋結合腕傍核 (PBN) に投射することが知られている。しかし、その詳細な制御機構については不明な点が多い。そこで著者は、口腔顔面から上位中枢への侵害情報伝達機構の一端を解明するため、三叉神経支配領域から侵害入力を受け、上記三部位へ軸索を送る投射ニューロンの分布および機能的役割を、phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK) と、substance P の受容体である Neurokinin 1 receptor (NK1) の発現様式を指標に解析した。さらに、神経障害性疼痛発症に対して、重要な働きを有すると考えられている孤束核 (NTS) の役割を明らかにすることを目的に、三叉神経損傷モデルラットの NTS 投射ニューロンについても解析を行った。

雄性ラットを用い、神経逆行性トレーサーである Fluorogold (FG) を、右側 VPM, MTN, PBN に注入し、7 日後に左側上口唇部にカプサイシン注入を加えた。pERK 陽性ニューロンのほぼすべてが、Vc-C1 領域の刺激側表層に認められた。右側 VPM, MTN への FG 注入により、FG 標識ニューロンは主に左側の Vc-C1 領域で認められた。一方、右側 PBN への FG 注入では、FG 標識ニューロンは両側性に認められた。FG で標識された PBN 投射ニューロンにおける pERK-NK1 陽性ニューロンの割合は、VPM, MTN 投射ニューロンに比べて有意に大きかった。pERK-NK1 陽性 VPM 投射ニューロンは、主に Vc の中央

部（中央 Vc 領域）に認められた。一方、pERK-NK1 陽性 MTN および PBN 投射ニューロンは、中央 Vc 領域と Vc-C1 の尾側部（尾側 Vc-C1 領域）に認められた。これらの結果は、Vc-C1 の表層にあるカプサイシン反応ニューロンの多くは直接 PBN に投射しているが、VPM, MTN に投射するニューロンは、介在ニューロンによって調整を受けている可能性を示している。さらに、これら投射ニューロンの分布の違いは、病態下における口腔顔面領域の侵害情報処理に対して、機能的な違いを反映している可能性がある。そこで著者は、眼窩下神経慢性絞扼（ION-CCI）モデルラットを用いて、神経障害性疼痛発症における孤束核（NTS）の pERK 陽性投射ニューロンについて解析を行った。その結果、NTS から VPM および MTN への投射は認められなかった。一方、PBN から NTS、特に同側への強い投射が確認された。左側上口唇にカプサイシン注入した際の NTS における pERK 陽性 PBN 投射ニューロンは、naïve ラットにカプサイシン注入した場合と比べて、カプサイシン注入の反対側（FG 注入側）で FG 標識ニューロン、pERK 陽性ニューロンおよび pERK 陽性 PBN 投射ニューロンが有意に増加していた。このことから、神経障害性疼痛発症時には、この領域への侵害入力が増進し、これが疼痛の慢性化および増悪因子となるのではないかと推測された。

緒 言

口腔顔面領域を支配する侵害受容器からの情報は、一次ニューロンの細胞体が存在する三叉神経節を介して、主に三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc)、および上部頸髄 (C1) に送られている^{1,2)}。さらに、電気生理学的研究や解剖学的研究により、侵害受容性の Vc-C1 ニューロンは、中脳中心灰白質 (PAG)、橋結合腕傍核 (PBN)、視床や視床下部などの上位中枢に投射していることが報告されている³⁻⁹⁾。侵害受容には求心性入力と同様に、脊髄後角の二次ニューロンの投射先が重要な役割を持っているといわれている¹⁰⁾。しかし、三叉神経領域でこの問題を扱った研究は少ない。本研究では、Vc 領域の侵害受容ニューロンの投射様式を調べるために、視床および PBN に注入した Fluorogold (FG) により標識されたニューロンに対し、extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化を指標に、解剖学的なアプローチを試みた。ERK は、分裂促進因子活性化タンパクキナーゼ (MAPK) の一つであり、リン酸化することにより活性化する。また、慢性疼痛の情報伝達経路のニューロンにおいても、重要な変換酵素の一つであるといわれている¹¹⁾。痛覚過敏が発症すると、上位中枢への情報伝達過程で、侵害刺激により一次求心性ニューロンや Vc ニューロンにおいて、速やかに ERK のリン酸化が起こる¹²⁻¹⁵⁾。また、transient receptor potential vanilloid receptor-1 (TRPV1) はカプサイシンを含め、様々な侵害刺激に対する細胞の反応を仲介し、細い有髄神経と無髄神経を選択的に活性化する^{16,17)}。三叉神経節ニューロンの約 50% が TRPV1 を発現しており、これらはカプサイシンによって活性化される¹⁸⁾。カプサイシン感受性ニューロンは、ヒトにおける神経系の長期増強と、炎症性痛覚過敏発症において重要な働きを有するとされている^{19,20)}。本研究では、侵害受容性の Vc

投射ニューロンを同定するため、ラットの上口唇部にカプサイシンを注入し、それによる pERK 発現と、それに引き続く substance P 受容体発現を検索した。上口唇を刺激部位とした科学的根拠は、口唇の感覚を支配する神経の密度が顔面の他の領域よりも高い²¹⁾というところ、さらに上口唇部に対する化学的刺激による反応が動物の口腔顔面痛の行動学的実験により、古くから確立されているということに基づいている²²⁾。substance P は三叉神経節ニューロンで産生され、それらのニューロンの多くは TRPV1 を共発現している²³⁾。三叉神経領域の侵害受容器の活性化は、substance P の放出を誘導し²⁴⁾、substance P は脊髄および延髄後角の表層ニューロンに存在する Neurokinin 1 receptor (NK1) 受容体に結合する^{25,26)}。また、脊髄と Vc-C1 にある後角投射ニューロンの多くに、NK1 が発現していることが知られている^{5,27-30)}。さらに、substance P の放出と NK1 陽性投射ニューロンの活性化は、持続性の痛覚過敏において重要な役割を果たしていると考えられている³¹⁻³⁵⁾。

本研究は、VPM, MTN, PBN に投射する Vc-C1 の侵害性投射ニューロンが、三叉神経侵害受容において機能的に異なる側面を持っており、pERK および NK1 の発現を指標に、これら投射ニューロンの機能的な違いを識別するという前提に基づいて行った。免疫組織学的染色法を用いて、投射先により Vc における pERK, NK1 陽性投射ニューロンの分布が異なるという仮説を証明した。また、本研究では、口腔顔面の侵害情報処理に対して重要な働きを有すると考えられている孤束核 (NTS) に存在する投射ニューロンについても、神経障害性疼痛発症時にどのような機能変化を生じるかについて解析を行った。

材料および方法

1. 実験動物

本研究は、日本大学歯学部動物実験委員会の許可（AP14D019, AP16D044）を得て、国際疼痛学会の指針に従って行った。実験には、Sprague-Dawley 系雄性ラット 35 匹（200-350 g）を使用し、そのうち FG が想定部位に注入された 24 匹（カプサイシン注入群 VPM n = 5, MTN n = 5, PBN n = 5 ; vehicle 群 VPM n = 3, MTN n = 3, PBN n = 3）のデータを解析に用いた。動物は、自由に水およびエサを摂取することができる環境下で、12 時間ごとに明暗が変化するように設定された恒温（23 °C）の部屋で、少なくとも 5 日間飼育した後、実験に用いた。

2. FG 注入

生理食塩水で希釈した三種混合麻酔薬（2.5 mg/kg butorphanol, 0.375 mg/kg medetomidine, 2.0 mg/kg midazolam）をラットの腹腔内に投与し、脳定位固定装置に装着した。頭頂骨を露出し、右側の VPM, MTN, PBN の直上に、ドリルを用いて直径 3 mm の穴を開けた。硬膜を剥離し、生理食塩水で希釈した 3% FG を満たしたマイクロピペット（先端径 50 μ m）を用いて、FG を 50 nl/min の速度で注入した。注入から 10 分後マイクロピペットを引き抜き、洗浄の後、縫合した。術後に penicillin G potassium（20,000 単位）を皮下投与した。FG の注入位置は以下のように設定した³⁶⁾。VPM: bregma から尾側 3.5 mm, 側方 2.5 mm, 深さ 6 mm および、側方 3.0 mm, 深さ 5.7 mm の計 2 ヶ所、

MTN: bregma から尾側 4.0 - 4.2 mm, 側方 0.9 mm, 深さ 6 mm の 1 ヶ所, PBN: bregma から尾側 9.2 mm, 側方 1.5 mm, 深さ 6 mm の 1 ヶ所に設定した。なお FG の注入量は, VPM: 160 nl (80 nl × 2 ヶ所), MTN: 100 nl, PBN: 100 nl とした。各注入位置は, 上唇部からの侵害刺激に反応することを細胞外記録によって確認した。

3. カプサイシンによる上口唇刺激

FG 注入から 7 日後, ラットに pentobarbital sodium (80 mg/kg, ip) で深麻酔を施し, 左側 (FG 注入の反対側) の上口唇部に, 30-gauge の針を用いてカプサイシン (300 μ M, 10 μ l) を注入した。カプサイシンに対する vehicle は, 生理食塩水, Tween80 および ethanol の混合溶液を用いた。灌流固定はカプサイシンもしくは vehicle 注入から 5 分後に 0.1 M phosphate buffer にて希釈した 1% paraformaldehyde, 続いて 4% paraformaldehyde を用いて行った。その後延髄および上部頸髄を含む脳を取り出し 4% paraformaldehyde で, 後固定 (4 $^{\circ}$ C, 24 時間) を行った。

4. FG 注入位置および免疫組織学的染色

摘出した標本は, 後固定の後 20%スクロースに 24 時間浸漬した。脳は厚さ 50 μ m の連続切片を作製し, FG 注入位置を蛍光顕微鏡 (BZ-9000, Keyence) で確認した。延髄および上部頸髄は, 厚さ 40 μ m の連続切片を 4 つのウェルに分割し, そのうち 1 つを使用し 160 μ m 毎の切片を実験に用いた。切片を 3% 正常ヤギ血清に室温で一時間浸漬し, 一次抗体に mouse anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) monoclonal antibody (1:300, #

9101, lot #36, Cell Signaling Technology) および, rabbit anti-NK1 polyclonal antibody (1:1000, BMLNA4300-0025, lot #11051431, ENZO Life Science) を用いて, 4 °Cで 72 時間反応させた。その後 0.01 M PBS で 10 分間 3 回洗浄し, Alexa Fluor 568 anti-mouse IgG (1:200, A11004, lot #1698376, Invitrogen) および, Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (1:200, A11008, lot #1735088, Invitrogen) を室温で 2 時間反応させた。さらに, 0.01 M PBS で 10 分間 3 回洗浄し, 切片をスライドガラスにマウントしたのち, 蛍光顕微鏡で観察した。

5. 眼窩下神経慢性絞扼モデルにおける NTS 投射ニューロンと pERK の発現

Sprague-Dawley 系雄性ラット 8 匹 (200-350 g) を使用した。生理食塩水で希釈した, 三種混合麻酔薬 (2.5 mg/kg butorphanol, 0.375 mg/kg medetomidine, 2.0 mg/kg midazolam) をラットの腹腔内に投与し, 仰臥位で開口させ, 左側の眼窩下神経を露出した。眼窩下神経を 4-0 の chromic guts で結紮し, 閉創した。右側 PBN に FG を注入した 7 日後, 左側上口唇部に 30-gauge の針を用いて, カプサイシン (300 μ M, 10 μ l) 刺激を行った。カプサイシン注入の 5 分後に灌流固定し, その後延髄と上部頸髄を含む脳を摘出し, 上記と同様に FG 注入位置の確認, および免疫組織学的染色を行い, NTS における FG で標識されたニューロン, および pERK 陽性ニューロンを観察した。

6. 解析

pERK 陽性ニューロンが, obex から吻側 0.5 mm ~ 尾側 6.0 mm の範囲で観察された

ため、この範囲を中心に詳細な解析を行った。Obex の位置は第 4 脳室の尾側終末部であり、三叉神経脊髄路核中間亜核 (Vi) の尾側下端より約 500 μm 吻側の位置とされている³⁷⁾。延髄および上部頸髄の吻尾側的な位置は、ラットの脳幹の構造的ランドマークによって判断した^{38,39)}。FG で標識されたニューロンおよび、pERK-NK1 陽性ニューロンは、以下の領域ごとに分けて統計処理を行った。Vi (+2.0 ~ 1.0 mm), Vi-Vc 移行部 (+0.5 ~ -0.5 mm), Vc の中央部 (中央 Vc 領域) (-1.0 ~ -4.0 mm), Vc-C1 の尾側部 (尾側 Vc-C1 領域) (-4.5 ~ -6.0 mm) とした。加えて、NTS, 背側傍三叉神経核 (dPa5) の細胞数をカウントした。なお、Vc-C1 領域は細胞構築学的ランドマークに従い、表層 (lamina I-II), 深層 (lamina III-V) に分けて、細胞数は 0.5 mm ごとに解析を行った³⁸⁾。

結果は VPM, MTN および PBN 各注入グループに対し、FG で標識されたニューロン、pERK 陽性ニューロン、NK1 陽性ニューロン、および pERK-NK1 陽性 FG 標識ニューロンの各レベルにおける平均値を算出し、統計解析には Bonferroni 検定、または Newman-Keuls 検定を用いた。Vi-Vc, 中央 Vc 領域, 尾側 Vc-C1 間の pERK-NK1 陽性ニューロンの割合の比較には、Kruskal-Wallis 検定を用いた。なお、データは平均値 \pm 標準誤差で表し、有意水準は $p < 0.05$ とした。

結 果

1. Vc における pERK の分布

左側上口唇部へのカプサイシン注入により、注入側の Vc 表層に限局的な pERK 陽性ニューロン発現が認められた (Fig. 1A-C)。pERK 陽性ニューロンが最も多く認められたのは、中央 Vc 領域であった (obex から -1.0 ~ -3.0 mm, Fig. 1C)。Obex から吻側に認められた pERK 陽性ニューロンは僅かであった (表 1-3)。また、FG の注入部位による pERK 陽性ニューロンの分布に違いは認められなかった。Vehicle の上口唇部への注入による pERK 陽性ニューロン発現は僅かであった (Fig. 1D)。

2. FG 注入位置

右側の VPM に注入された FG は、VPM と視床後核群 (Po) の一部を含む領域に広がっていた (Fig. 2A)。MTN に注入された FG は、視床背内側核 (MD)、束傍核 (PF)、視床内側中心核 (CM)、および外側中心核 (CL) を含む領域に広がっていた (Fig. 2B)。また、PBN に注入された FG は、外側および内側 PBN を含み Kölliker-Fuse 核 (KF) の一部にまで広がっていた (Fig. 2C)。

3. Vc における FG 標識ニューロンの分布

VPM への FG 注入により、同側の Vc に少数の標識ニューロンが検出された (Fig. 3A, B)。一方で、反対側の Vc には、注入側と比較し、多くの FG 標識ニューロンが存在していた (表 1, Fig. 3C, F, $F_{13,52} = 127$, $p < 0.001$)。中央 Vc 領域において、FG 標識ニューロンは、

主に lamina I-II で観察されたが、lamina III-V にも少数ではあるが認められた。また、FG 注入に対する反対側の dPa5, 楔状束核 (Cu), 薄束核 (Gr) においても、FG 標識ニューロンが散在していた (表 1, Fig. 3C)。

MTN への注入では、FG 標識ニューロンが、FG 注入の反対側に限局して分布しており ($F_{13,52} = 15.9, p < 0.001, \text{ipsilateral versus contralateral}$), その数は VPM への投射ニューロンより少数であった (表 2, Fig. 3D, G)。また、FG 標識ニューロンは、主に Vc の lamina I-II に認められ、lamina III-V にも散在していた (表 2, Fig. 3D)。FG 標識ニューロンは、Vc の吻側部で確認されたが、obex から尾側 2 mm 以降ではほとんど認められなかった (表 2, Fig. 3D, G)。また、Cu や Gr において FG 標識ニューロンは認められなかった。

VPM, MTN への FG 注入とは対照的に、PBN への注入では、Vc-C1 で両側性にニューロンが標識され (表 3, Fig. 3A, B, E, H), Vc の吻尾的な全領域において、反対側と比較し、FG 注入側に多くの FG 標識ニューロンが観察された ($F_{13,52} = 8.8, p < 0.05, \text{Fig. 3H}$)。FG 標識ニューロンは、中央 Vc 領域の lamina I-II で (Fig. 3A, B, E), また、dPa5, NTS や、脊髓中心管を囲むように両側性に認められた (表 3, Fig. 3E)。

4. pERK および NK1 陽性投射ニューロン

FG 標識 pERK 陽性ニューロンは、FG の注入位置にかかわらずカプサイシン注入と同側の lamina I-II に限局していた (表 1-3, Fig. 4A-F)。pERK-NK1 陽性 VPM 投射ニューロンが、カプサイシン注入側の中央 Vc 領域の lamina I-II を中心に認められた。カプサイシン注入を行った反対側には、pERK または NK1 陽性 VPM 投射ニューロンを認めな

った (表 1, Fig. 4G)。一方, obex から 1.5 mm 尾側で最も多くの pERK または NK1 陽性 VPM 投射ニューロンが認められた (Fig. 5A)。pERK または NK1 陽性 MTN 投射ニューロンは, カプサイシン注入側の中央 Vc 領域と, Vc-C1 の尾側領域に分布していた。一方, VPM, PBN 投射ニューロンに比較して, pERK または NK1 陽性 MTN 投射ニューロン数は少なかった (表 2, Fig. 4H, Fig. 5B)。また, 多くの PBN 投射ニューロンが, NK1 を発現していた (表 3)。pERK-NK1 陽性 PBN 投射ニューロンは, カプサイシン注入側の中央 Vc 領域と Vc-C1 の尾側領域において, lamina I-II で認められた (表 3, Fig. 4I, Fig. 5C)。視床投射ニューロンと比較して, PBN 投射ニューロンの多くは pERK 陽性であった (表 1-3, Fig. 4G-I, Fig. 5A-D)。

5. Vi-Vc, 中央 Vc 領域, 尾側 Vc-C1 における pERK または NK1 陽性投射ニューロン数の比率

上口唇部へのカプサイシン注入により観察された FG 標識 pERK 陽性ニューロン数の割合は, VPM または MTN への投射ニューロンと比較し, PBN への投射ニューロンの方が有意に大きかった (Fig. 6A; $F_{3,16} = 11.8, p < 0.001$)。同様に FG 標識 pERK-NK1 陽性ニューロン数の割合も, VPM, MTN 投射ニューロンと比較して, PBN 投射ニューロンの方が有意に大きかった (Fig. 6A; $F_{3,16} = 9.6, p < 0.001$)。さらに, FG 標識 NK1 陽性ニューロン数の割合は, VPM あるいは MTN への投射ニューロンと比較して, PBN 投射ニューロンの方が有意に大きかった (Fig. 6A; $F_{3,16} = 20.1, p < 0.001$)。PBN へ投射している FG 標識ニューロンの約 11%が, pERK-NK1 陽性であった。一方, VPM または MTN へ

投射している FG 標識 pERK-NK1 陽性ニューロン数の割合は、3%以下であった。

投射先の違いによる pERK-NK1 陽性投射ニューロンの吻尾側的な分布の違いを解析すると、VPM 投射ニューロンにおいては、Vi-Vc あるいは尾側 Vc-C1 領域に比較して、中央Vc領域でより多くの FG 標識 pERK-NK1 陽性ニューロンを認めた (Fig. 6B, $p < 0.01$)。一方、MTN 投射ニューロンでは、カプサイシン注入側で投射ニューロンの吻尾側的な分布の違いは認められなかった (Fig. 6C)。

PBN 投射ニューロンでは、カプサイシン注入側の FG で標識された pERK-NK1 陽性 PBN 投射ニューロン数の割合は、Vi-Vc と比較し中央 Vc 領域と尾側 Vc-C1 の方が有意に大きかった (Fig. 6D, $p < 0.05$)。カプサイシン注入反対側では、pERK-NK1 陽性 PBN 投射ニューロンはほとんど認められなかった (Fig. 6E)。以上の pERK-NK1 陽性 PBN 投射ニューロンの割合を Fig. 8 に示した。

6. 上口唇部へのカプサイシンまたは vehicle 注入により検出された pERK 陽性 PBN 投射ニューロン数の比較

カプサイシン注入後に検出された FG 標識 pERK 陽性ニューロン数の割合は、vehicle 注入と比較し、VPM, MTN または、PBN 投射ニューロンでいずれも有意に大きかった (Fig. 7D, VPM: $p < 0.05$, MTN: $p < 0.05$, PBN: $p < 0.001$)。さらに、カプサイシン注入後に検出された FG 標識 pERK 陽性ニューロン数の割合は、VPM および MTN 投射ニューロンと比較し、PBN 投射ニューロンで有意に大きかった (Fig. 6A, Fig. 7D, $p < 0.01$)。一方、上口唇部へ vehicle を注入した群では、各グループ間に違いは認められなかった (Fig.

7D)。

7. 眼窩下神経絞扼モデルの NTS における PBN 投射ニューロンと pERK 発現

Naïve ラットに FG を注入した場合は、NTS における VPM および MTN 投射ニューロンは、ほとんど観察されなかったが、PBN 投射ニューロンは両側性に認められ、かつ FG 注入側で顕著であった (表 1-3)。眼窩下神経慢性絞扼モデルラットの上口唇に、カプサイシン注入すると、注入の反対側において、FG 標識ニューロン、pERK 陽性ニューロン、さらに FG 標識 pERK 陽性ニューロン数は、naïve ラットと比較して有意に大きかった。

(Fig. 9H-J, FG labeled neurons: $p < 0.01$, pERK-IR neurons: $p < 0.05$, FG labeled pERK-IR neurons: $p < 0.05$)。

考 察

本研究では、視床の VPM, MTN および橋の PBN に投射している侵害受容性 Vc ニューロンの、分布領域における機能の違いを調べるために、神経解剖学的なアプローチを行った。侵害受容ニューロンは、上口唇へのカプサイシン注入により惹起される、ERK のリン酸化を指標に、免疫組織学的染色によって特定した。カプサイシンを上口唇部に注入すると、多くの pERK 陽性ニューロンが、同側の Vc lamina I-II に限局的に認められた。pERK 陽性 PBN 投射ニューロンおよび、pERK-NK1 陽性 PBN 投射ニューロン数の割合は、pERK 陽性および pERK-NK1 陽性 VPM, MTN 投射ニューロンの 2 倍以上であった。pERK-NK1 陽性 VPM 投射ニューロンは中央 Vc 領域に、また、MTN 投射ニューロンは主に尾側 Vc-C1 に分布していた。さらに、PBN 投射ニューロンは、主に中央 Vc 領域と尾側 Vc-C1 に分布していた。これらの結果は、lamina I の侵害受容ニューロンが、PBN により強く直接投射している可能性を示している。一方、視床へ投射するカプサイシン応答性ニューロンは、Vc 介在ニューロンの変調により強く影響されることが推測され、本研究で明らかになった投射ニューロンの投射部位による吻尾側的な分布の相違は、痛覚受容における役割の違いを反映している可能性を示している。さらに、NTS の侵害受容ニューロンは、VPM および MTN には投射が無く、PBN に特異的な投射が認められた。また、NTS の侵害受容ニューロン活動が、神経損傷により増強することが確認され、NTS-PBN 神経回路が、疼痛の慢性化や増悪に関与する可能性が明らかとなった。

1. カプサイシン応答性 Vc-C1 ニューロンと NK1 発現

カプサイシン注入により，刺激側の中央 Vc 領域と尾側 Vc-C1 の lamina I-II から，多くの pERK 陽性ニューロンが検出された。Vc の pERK 陽性ニューロンの分布様式と発現数は，今回使用したカプサイシンより高濃度のカプサイシン（10 mM）を，ラットの上唇部に注入した過去の実験結果とほぼ同様であった¹³⁾。従って，今回用いた 300 μ M のカプサイシンを上口唇に注入することにより，ほぼ最大数の pERK 陽性ニューロンが発現したと考えられる。カプサイシンが，選択的に高い親和性をもって TRPV1 受容体に結合し，他の TRP 受容体に結合しないことから⁴⁰⁾，本研究で検出されたカプサイシン応答性 Vc ニューロンは，侵害受容性であると考えられる。また，それらのニューロンは，主に小型から中型であった^{23,41)}。カプサイシンは，三叉神経節ニューロンの約 50% でカルシウムの流入を引き起こし¹⁸⁾，三叉神経節ニューロンの約 20% から 60% が，抗 TRPV1 抗体陽性であることが形態学的に報告されている^{23,42-44)}。これらの結果と一致するように，電気生理学的な研究において，カプサイシン注入は舌に投射する Vc-C1 の lamina I-II ニューロンの約 50% を興奮させ⁴⁵⁾，また角膜ではその約 70% を興奮させることが報告されている⁴⁶⁾。また，様々な部位の侵害刺激により，延髄の侵害受容ニューロンの ERK はリン酸化される¹⁴⁾。しかし，今回の研究結果は，上口唇へのカプサイシン注入により発現した Vc-C1 投射ニューロンに注目したものであり，この領域に限定された結果であることは否定できない。

pERK 陽性投射ニューロンの侵害受容性に関しては，pERK に加えて NK1 の発現により評価を行った。過去の研究では，カプサイシンによる ERK のリン酸化は，単に TRPV1 チャンネルだけが関わっているのではなく⁴⁷⁾，NK1 を介したメカニズムも関与していること

が報告されている⁴⁸⁾。また、NK1は中央Vc領域のlamina I-IIに強く発現していると報告されている^{25,26)}。さらに、脊髄のNK1受容体を持つ細胞を選択的に破壊すると、顕著に痛覚過敏と投射先の神経活動が抑制されることから³¹⁻³⁴⁾、NK1陽性ニューロンは、侵害受容において重要な役割を担っていると推察される。今回、脊髄後角とVc-C1の投射ニューロンの大部分もNK1を発現していたことから、これらのニューロンは、侵害受容において重要な役割を果たしていると考えられる^{27,29,30,49,50)}。

2. 三叉神経 - 視床投射ニューロン

脊髄とVc-C1のlamina Iニューロンの投射軸索は、視床と腕傍核に終止する^{6,51)}。順行性神経トレーサーを用いた研究により、視床に投射するVc-C1ニューロンは、主に注入側とは反対側のVPM、Poおよびposterior triangular area (PoT)の領域に終止することが報告されている^{6,52-55)}。VPM、PoへのFG注入により標識されたニューロンは、ほとんどが反対側のVcに限局しており、過去の研究結果⁵⁶⁾と同様に、主にlamina Iで認められた。さらに今回の研究では、その一部は深層にも認められた。しかしながら、これらのニューロンにpERKの発現は認められなかった。過去の報告では、三叉神経視床路ニューロンの多くはNK1を発現していたが²⁷⁾、今回の研究結果では、NK1陽性VPM投射ニューロンは20%以下であり、pERK陽性のものは3%以下であった。このことからpERK陽性ニューロンの多くは、投射ニューロンではなく、介在ニューロンであることが推察される。実際、今回の実験でも過去の研究と同様に、pERKはカプサイシンによってlamina I-IIに誘導された^{15,35)}。また、多くのNK1陽性投射ニューロンは、カプサイシン感受性三叉

神経節ニューロンから入力を受けない可能性が示された。

MTN への FG 注入は、主に視床背内側核中間部 (IMD)、視床室傍核 (PVP) を含んでいる (Fig. 2)。MTN への投射は、これらの領域で記録された侵害受容ニューロンが、両側性の受容野を持つことから⁵⁷⁾、痛みの情動的側面に関与していると考えられる⁵⁸⁾。VPM への FG 注入の結果と同様に、MTN への FG 注入により、FG で標識されたニューロンのほぼすべてが、反対側の中央 Vc 領域 lamina I-II に認められた。しかしながら、これらは pERK を発現していなかった。MTN lamina I-II 投射ニューロンで NK1 陽性のものは 14%以下であった。一方、FG 標識 NK1 陽性ニューロン、かつ pERK 陽性のものは 2%以下であった。このことから MTN 投射ニューロンが、侵害情報を直接的に伝える割合は少ないと推察される。

3. 三叉神経結合腕傍核投射ニューロン

PBN への FG 注入によって標識された Vc-C1 ニューロンの分布は、視床への注入結果と大きく異なっていた。過去の報告と同様に、Vc-C1 の lamina I から注入側優位に、多くの両側性投射ニューロンが検出された^{56,59-61)} (Fig. 3E, H)。また、少数ではあるが、FG 標識ニューロンが、Vc-C1 の深層および中心灰白質周辺で認められた。しかしながら、これらのニューロンの中で、pERK を発現しているものは僅かであった。カプサイシン注入を行ったラットの中央 Vc において、対側に少数の pERK 陽性ニューロンが認められたが、そのうち FG で標識されたものは僅かであった。これはカプサイシンによって刺激の反対側に発現した pERK 陽性ニューロンの入力、多シナプス性である可能性が高いことを示

している。実際、両側の PBN に投射し、顔面皮膚へのカプサイシン注入により活性化された Vc-C1 ニューロンの割合は、逆行性刺激と神経活動記録によって得られた結果と同様の割合であった⁹⁾。しかし、両側性投射を示す三叉神経結合腕傍核の経路は、lamina I 投射ニューロンの多くが、対側に投射する視床とは異なっている^{60,62-64)}。Vc-PBN 投射ニューロンのうち、FG 注入と同側および対側を合わせた全体の 40%以上が、NK1 を発現していた。また、pERK 陽性 PBN 投射ニューロンのうち 10%以下が、NK1 陽性ニューロンであり、これは pERK-NK1 陽性視床投射ニューロンの割合と比較し有意に多かった。このことは PBN が視床と比較し、より多くの直接的な投射を受けている可能性を示している。

4. 眼窩下神経慢性絞扼モデルラットにおける PBN-NTS 投射ニューロンと pERK 発現

過去の研究と同様に、naïve ラットにおいては、PBN への FG 注入により dPa5 と NTS において、多くのニューロンが逆行性に標識された。一方、dPa5 と NTS の投射ニューロンは、pERK をほとんど発現していなかった⁶⁵⁻⁶⁷⁾。これは、naïve ラットにおいては上口唇部からこれらの領域への侵害入力直接的ではなく、他の領域を経由するか、あるいは介在ニューロンを介する多シナプス経路である可能性を示している。しかしながら、眼窩下神経の慢性絞扼モデルラットにおいて、カプサイシン注入によって NTS で検出された pERK 陽性ニューロン、および pERK 陽性 FG 標識ニューロンは、ともに有意な増加を示した。このことは眼窩下神経慢性絞扼によって、NTS から PBN へ情報伝達が強化された可能性を示している。PBN は、広く多数のターゲットを持った投射をしており、自律機能

の調整を含む侵害受容の多様な側面と関係していると考えられる^{57,68-72}。また、NTSは痛み、味覚、反射など口腔顔面領域において様々な機能の中継核であり、神経障害によるNTSでの侵害受容ニューロンの活動性の増強が、これらの機能の変調に重要な役割を果たす可能性がある。

過去の研究においても、Vc-C1と脊髄 lamina Iのニューロンが、PBNや視床へ投射するとの報告が認められるが^{50,62,73}、これらの投射ニューロンが、侵害入力にも反応しうるか否かに関する評価は行われてこなかった。また、中脳や視床に投射するニューロンのほとんどが、侵害受容ニューロンに分類されるという報告がある^{74,75}。一方、三叉神経-視床下部ニューロンの20%は、非侵害刺激にのみ反応するという電気生理学的研究による報告がある⁴。今回の結果は、延髄の lamina I-IIと脊髄後角の神経の間に大きな違いがあることを示唆している⁷⁶。さらに、脊髄の lamina Iニューロンとカプサイシン応答性 Vc-C1投射ニューロンの違いは、Vc-C1ニューロンが侵害受容以外の機能にも関与するためと考えられる。

今回の研究から、NK1陽性投射ニューロンのうち、カプサイシン注入により pERKを発現するものの割合は、少ないことが明らかとなった (Fig. 8)。この結果は lamina Iに存在する三叉神経-視床ニューロンの多くが、カプサイシン応答性の介在ニューロンから、間接的な入力を受けていることを意味している。これは、顎関節に反応する Vcニューロンが、視床に直接投射している割合は少ないという報告と一致している⁸。同様に、視床の3倍近くの pERK-NK1陽性 PBN投射ニューロンが認められたが、これは PBNに投射している pERK-NK1陽性ニューロンの10%以下にすぎない。これらの結果は、侵害受容

器が脊髄後角の投射ニューロンよりも興奮性介在二次ニューロンに連絡しているという報告と一致する⁷⁷⁾。

さらに、pERK 陽性投射ニューロンは、異なった経路を介して急性の侵害情報を伝えるが、Vc 内では吻尾側的に異なる部位に分布するニューロンが、同一のターゲットに侵害情報を送っている可能性が考えられる。中央 Vc 領域の pERK 陽性投射ニューロンは、主として VPM や PBN に投射するのに対し、尾側 Vc-C1 投射ニューロンは、主として MTN や PBN に投射していた (Fig. 8)。これに関して各領域のニューロンは、侵害情報の伝達において異なった機能を担っている可能性がある。これは、吻側の三叉神経脊髄路核ニューロンよりも、尾側の三叉神経脊髄路核ニューロンの方が、刺激強度情報処理に強く関与するという報告からも理解できる⁷⁶⁾。

結 論

Naïve および眼窩下神経慢性絞扼モデルラットの VPM, MTN および PBN に神経逆行性トレーサーである FG を注入し、標識された三叉神経脊髄路核尾側亜核および上部頸髄ニューロンの NK1 および pERK 発現様式を解析することによって以下の結論を得た。

1. pERK 陽性ニューロンのほぼすべてが、Vc-C1 領域の刺激側表層に認められた。
2. 右側 VPM, MTN への FG 注入により、FG 標識ニューロンは主に左側の Vc-C1 領域で認められた。一方、右側 PBN への FG 注入では、FG 標識ニューロンは両側性に認められた。
3. FG で標識された PBN 投射ニューロンにおける pERK-NK1 陽性ニューロンの割合は、VPM, MTN 投射ニューロンに比べて有意に大きかった。
4. pERK-NK1 陽性 VPM 投射ニューロンは、主に中央 Vc 領域に認められた。一方、pERK-NK1 陽性 MTN および PBN 投射ニューロンは、中央 Vc 領域と尾側 Vc-C1 領域に認められた。
5. 眼窩下神経慢性絞扼モデルラットにおいて、PBN から NTS, 特に同側への強い投射が確認された。左側上口唇にカプサイシン注入した際の NTS における pERK 陽性 PBN 投射ニューロンは、naïve ラットにカプサイシン注入した場合と比べて、カプサイシン注入の反対側で FG 標識ニューロン, pERK 陽性ニューロンおよび pERK 陽性 PBN 投射ニューロンが有意に増加していた。

以上の結果から、VPM, MTN, PBN に投射する Vc の pERK-NK1 陽性ニューロンの吻尾側的な分布の違いは、疼痛制御における機能的な違いを反映している可能性を示している。さらに、神経障害性疼痛発症時の疼痛制御には、NTS における pERK の発現変化が強く関与している可能性が示された。

文 献

1. Sessle BJ (2000) Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 11, 57–91.
2. Bereiter D, Hargreaves K, Hu J (2009) Trigeminal mechanisms of nociception: peripheral and brainstem organization. In: Basbaum, A.I, Bushnell, M.C. (Eds.), *Science of Pain*. Elsevier, New York.
3. Hirata H, Takeshita S, Hu JW, Bereiter DA (2000) Cornea-responsive medullary dorsal horn neurons: modulation by local opioids and projections to thalamus and brain stem. *J. Neurophysiol.* 84, 1050–1061.
4. Malick A, Strassman RM, Burstein R (2000) Trigeminothalamic and reticulohypothalamic tract neurons in the upper cervical spinal cord and caudal medulla of the rat. *J. Neurophysiol.* 84, 2078–2112.
5. Ikeda T, Terayama R, Jue SS, Sugiyo S, Dubner R, Ren K (2003) Differential rostral projections of caudal brainstem neurons receiving trigeminal input after masseter inflammation. *J. Comp. Neurol.* 465, 220–233.
6. Gauriau C, Bernard JF (2004) A comparative reappraisal of projections from the superficial laminae of the dorsal horn in the rat: the forebrain. *J. Comp. Neurol.* 468, 24–56.
7. Sugiyo S, Takemura M, Dubner R, Ren K (2005) Trigeminal transition zone/rostral

- ventromedial medulla connections and facilitation of orofacial hyperalgesia after masseter inflammation in rats. *J. Comp. Neurol.* 493, 510–523.
8. Chang Z, Okamoto K, Bereiter DA (2012) Differential ascending projections of temporomandibular joint-responsive brainstem neurons to periaqueductal gray and posterior thalamus of male and female rats. *Neuroscience* 203, 230–243.
 9. Jansen NA, Giesler Jr GJ (2015) Response characteristics of pruriceptive and nociceptive trigeminoparabrachial tract neurons in the rat. *J. Neurophysiol.* 113, 58–70.
 10. Laird JM, Cervero F (1991) Signalling of a step-like intensity change of noxiousmechanical stimuli by dorsal horn neurones in the rat spinal cord. *J. Physiol.* 434, 561–575.
 11. Ji RR, Gereau 4th RW, Malcangio M, Strichartz GR (2009) MAP kinase and pain. *Brain Res. Rev.* 60, 135–148.
 12. Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ (1999) Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat. Neurosci.* 2, 1114–1119.
 13. Dai Y, Iwata K, Fukuoka T, Kondo E, Tokunaga A, Yamanaka H, Tachibana T, Liu Y, Noguchi K (2002) Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. *J. Neurosci.* 22, 7737–7745.
 14. Zhuang ZY, Xu H, Clapham DE, Ji RR (2004) Phosphatidylinositol 3-kinase

- activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization. *J. Neurosci.* 24, 8300–8309.
15. Noma N, Tsuboi Y, Kondo M, Matsumoto M, Sessle BJ, Kitagawa J, Saito K, Iwata K (2008) Organization of pERK-immunoreactive cells in trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following capsaicin injection into oral and craniofacial regions in rats. *J. Comp. Neurol.* 507, 1428–1440.
 16. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824.
 17. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531–543.
 18. Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID, Julius D (2004) Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427, 260–265.
 19. LaMotte RH, Lundberg LE, Torebjork HE (1992) Pain, hyperalgesia and activity in nociceptive C units in humans after intradermal injection of capsaicin. *J. Physiol.* 448, 749–764.
 20. Henrich F, Magerl W, Klein T, Greffrath W, Treede RD (2015) Capsaicin-sensitive C and A-fibre nociceptors control long-term potentiation-like pain amplification in

- humans. *Brain* 138, 2505–2520.
21. Nolano M, Provitera V, Caporaso G, Stancanelli A, Leandri M, Biasiotta A, Cruccu G, Santoro L, Truini A (2013) Cutaneous innervation of the human face as assessed by skin biopsy. *J. Anat.* 222, 161–169.
 22. Luccarini P, Childeric A, Gaydier A, Voisin D, Dallel R (2006) The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. *J. Pain* 7, 908–914.
 23. Price TJ, Flores CM (2007) Critical evaluation of the colocalization between calcitonin gene-related peptide, substance P, transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 immunoreactivities, and isolectin B4 binding in primary afferent neurons of the rat and mouse. *J. Pain* 8, 263–272.
 24. Schaible HG, Ebersberger A, Peppel P, Beck U, Messlinger K (1997) Release of immunoreactive substance P in the trigeminal brain stem nuclear complex evoked by chemical stimulation of the nasal mucosa and the dura mater encephalia study with antibody microprobes. *Neuroscience* 76, 273–284.
 25. Nakaya Y, Kaneko T, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1994) Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 347, 249–274.
 26. Brown JL, Liu H, Maggio JE, Vigna SR, Mantyh PW, Basbaum AI (1995) Morphological characterization of substance P receptor-immunoreactive neurons

- in the rat spinal cord and trigeminal nucleus caudalis. *J. Comp. Neurol.* 356, 327–344.
27. Li JL, Ding YQ, Shigemoto R, Mizuno N (1996) Distribution of trigeminothalamic and spinothalamic-tract neurons showing substance P receptor-like immunoreactivity in the rat. *Brain Res.* 719, 207–212.
28. Li JL, Ding YQ, Xiong KH, Li JS, Shigemoto R, Mizuno N (1998) Substance P receptor (NK1)-immunoreactive neurons projecting to the periaqueductal gray: distribution in the spinal trigeminal nucleus and the spinal cord of the rat. *Neurosci. Res.* 30, 219–225.
29. Todd AJ, McGill MM, Shehab SA (2000) Neurokinin 1 receptor expression by neurons in laminae I, III and IV of the rat spinal dorsal horn that project to the brainstem. *Eur. J. Neurosci.* 12, 689–700.
30. Lapirot O, Chebbi R, Monconduit L, Artola A, Dallel R, Luccarini P (2009) NK1 receptor-expressing spinoparabrachial neurons trigger diffuse noxious inhibitory controls through lateral parabrachial activation in the male rat. *Pain* 142, 245–254.
31. Mantyh PW, Rogers SD, Honore P, Allen BJ, Ghilardi JR, Li J, Daughters RS, Lappi DA, Wiley RG, Simone DA (1997) Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 278, 275–279.

32. Khasabov SG, Rogers SD, Ghilardi JR, Peters CM, Mantyh PW, Simone DA (2002) Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization. *J. Neurosci.* 22, 9086–9098.
33. Suzuki R, Morcuende S, Webber M, Hunt SP, Dickenson AH (2002) Superficial NK1- expressing neurons control spinal excitability through activation of descending pathways. *Nat. Neurosci.* 5, 1319–1326.
34. Simons CT, Gogineni AG, Iodi Carstens M, Carstens E (2002) Reduced aversion to oral capsaicin following neurotoxic destruction of superficial medullary neurons expressing NK-1 receptors. *Brain Res.* 945, 139-143.
35. Coste J, Voisin DL, Miraucourt LS, Dallel R, Luccarini P (2008) Dorsal horn NK1-expressing neurons control windup of downstream trigeminal nociceptive neurons. *Pain* 137, 340–351.
36. Paxinos G, Watson C (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th edition. Academic Press.
37. Yoshida A, Dostrovsky JO, Sessle BJ, Chiang CY (1991) Trigeminal projections to the nucleus submedius of the thalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 307, 609–625.
38. Molander C, Xu Q, Rivero-Melian C, Grant G (1989) Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat: II. The cervical and upper thoracic cord. *J. Comp. Neurol.* 289, 375–385.
39. Strassman AM, Vos BP (1993) Somatotopic and laminar organization of fos-like

- immunoreactivity in the medullary and upper cervical dorsal horn induced by noxious facial stimulation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 331, 495–516.
40. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398, 436–441.
41. Bae YC, Oh JM, Hwang SJ, Shigenaga Y, Valtschanoff JG (2004) Expression of vanilloid receptor TRPV1 in the rat trigeminal sensory nuclei. *J. Comp. Neurol.* 478,62–71.
42. Ichikawa H, Sugimoto T (2001) VR1-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal ganglion. *Brain Res.* 890, 184–188.
43. Simonetti M, Fabbro A, D'Arco M, Zweyer M, Nistri A, Giniatullin R, Fabbretti E (2006) Comparison of P2X and TRPV1 receptors in ganglia or primary culture of trigeminal neurons and their modulation by NGF or serotonin. *Mol. Pain* 2, 11.
44. Patwardhan AM, Vela J, Farugia J, Vela K, Hargreaves KM (2008) Trigeminal nociceptors express prostaglandin receptors. *J. Dent. Res.* 87, 262–266.
45. Carstens E, Kuenzler N, Handwerker HO (1998) Activation of neurons in rat trigeminal subnucleus caudalis by different irritant chemicals applied to oral or ocular mucosa. *J. Neurophysiol.* 80, 465–492.
46. Largent-Milnes TM, Hegarty DM, Aicher SA, Andresen MC (2014) Physiological temperatures drive glutamate release onto trigeminal superficial dorsal horn

- neurons. *J. Neurophysiol.* 111, 2222–2231.
47. Chen Y, Geis C, Sommer C (2008) Activation of TRPV1 contributes to morphine tolerance: involvement of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J. Neurosci.* 28, 5836–5845.
48. Donnerer J, Liebmann I, Schuligoi R (2009) Capsaicin- and mustard oil-induced extracellular signal-regulated protein kinase phosphorylation in sensory neurons in vivo: effects of neurokinins 1 and 2 receptor antagonists and of a nitric oxide synthase inhibitor. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 104, 11–16.
49. Marshall GE, Shehab SA, Spike RC, Todd AJ (1996) Neurokinin-1 receptors on lumbar spinothalamic neurons in the rat. *Neuroscience* 72, 255–263.
50. Spike RC, Puskar Z, Andrew D, Todd AJ (2003) A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2433–2448.
51. Gauriau C, Bernard JF (2002) Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp. Physiol.* 87, 251–258.
52. Iwata K, Kenshalo Jr DR, Dubner R, Nahin RL (1992) Diencephalic projections from the superficial and deep laminae of the medullary dorsal horn in the rat. *J. Comp. Neurol.* 321, 404–420.
53. Craig AD (2003) Distribution of trigeminothalamic and spinothalamic lamina I terminations in the cat. *Somatosens. Mot. Res.* 20, 209–222.

54. Craig AD (2004) Distribution of trigeminothalamic and spinothalamic lamina I terminations in the macaque monkey. *J. Comp. Neurol.* 477, 119–148.
55. Nosedá R, Monconduit L, Constandil L, Chalus M, Villanueva L (2008) Central nervous system networks involved in the processing of meningeal and cutaneous inputs from the ophthalmic branch of the trigeminal nerve in the rat. *Cephalalgia* 28, 813–824.
56. Akiyama T, Curtis E, Nguyen T, Carstens MI, Carstens E (2016) Anatomical evidence of pruriceptive trigeminothalamic and trigeminoparabrachial projection neurons in mice. *J. Comp. Neurol.* 524, 244–256.
57. Krout KE, Belzer RE, Loewy AD (2002) Brainstem projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.* 448, 53–101.
58. Giesler Jr GJ, Yeziarski RP, Gerhart KD, Willis WD (1981) Spinothalamic tract neurons that project to medial and/or lateral thalamic nuclei: evidence for a physiologically novel population of spinal cord neurons. *J. Neurophysiol.* 46, 1285–1308.
59. Cechetto DF, Standaert DG, Saper CB (1985) Spinal and trigeminal dorsal horn projections to the parabrachial nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 240, 153–160.
60. Slugg RM, Light AR (1994) Spinal cord and trigeminal projections to the pontine parabrachial region in the rat as demonstrated with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J. Comp. Neurol.* 339, 49–61.

61. Feil K, Herbert H (1995) Topographic organization of spinal and trigeminal somatosensory pathways to the rat parabrachial and Kolliker-Fuse nuclei. *J. Comp. Neurol.* 353, 506–528.
62. Hylden JL, Anton F, Nahin RL (1989) Spinal lamina I projection neurons in the rat: collateral innervation of parabrachial area and thalamus. *Neuroscience* 28, 27–37.
63. Ding YQ, Takada M, Shigemoto R, Mizuno N (1995) Trigemino-parabrachial projection neurons showing substance P receptor-like immunoreactivity in the rat. *Neurosci. Res.* 23, 415–418.
64. Bester H, Chapman V, Besson JM, Bernard JF (2000) Physiological properties of the lamina I spinoparabrachial neurons in the rat. *J. Neurophysiol.* 83, 2239–2259.
65. Herbert H, Moga MM, Saper CB (1990) Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 293, 540–580.
66. Saxon DW, Hopkins DA (1998) Efferent and collateral organization of paratrigeminal nucleus projections: an anterograde and retrograde fluorescent tracer study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 402, 93–110.
67. Caous CA, de Sousa Buck H, Lindsey CJ (2001) Neuronal connections of the paratrigeminal nucleus: a topographic analysis of neurons projecting to bulbar, pontine and thalamic nuclei related to cardiovascular, respiratory and sensory

- functions. *Auton. Neurosci.* 94, 14–24.
68. Bester H, Menendez L, Besson JM, Bernard JF (1995) Spino (trigemino) parabrachiohypothalamic pathway: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J. Neurophysiol.* 73, 568–585.
69. Allen GV, Barbrick B, Esser MJ (1996) Trigeminal-parabrachial connections: possible pathway for nociception-induced cardiovascular reflex responses. *Brain Res.* 715,125–135.
70. Jasmin L, Burkey AR, Card JP, Basbaum AI (1997) Transneuronal labeling of a nociceptive pathway, the spino-(trigemino-)parabrachio-amygdaloid, in the rat. *J. Neurosci.* 17, 3751–3765.
71. Taylor EW, Jordan D, Coote JH (1999) Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. *Physiol. Rev.* 79, 855–916.
72. Roeder Z, Chen Q, Davis S, Carlson JD, Tupone D, Heinricher MM (2016) Parabrachial complex links pain transmission to descending pain modulation. *Pain* 157, 2697–2708.
73. Al-Khater KM, Todd AJ (2009) Collateral projections of neurons in laminae I, III, and IV of rat spinal cord to thalamus, periaqueductal gray matter, and lateral parabrachial area. *J. Comp. Neurol.* 515, 629–646.
74. Dado RJ, Katter JT, Giesler Jr GJ (1994) Spinothalamic and spinohypothalamic

- tract neurons in the cervical enlargement of rats. II. Responses to innocuous and noxious mechanical and thermal stimuli. *J. Neurophysiol.* 71, 981–1002.
75. Kostarczyk E, Zhang X, Giesler Jr GJ (1997) Spinothalamic tract neurons in the cervical enlargement of rats: locations of antidromically identified ascending axons and their collateral branches in the contralateral brain. *J. Neurophysiol.* 77, 435–451.
76. Bereiter DA, Hirata H, Hu JW (2000) Trigeminal subnucleus caudalis: beyond homologies with the spinal dorsal horn. *Pain* 88, 221–224.
77. Todd AJ (2010) Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 823–836.

図および表

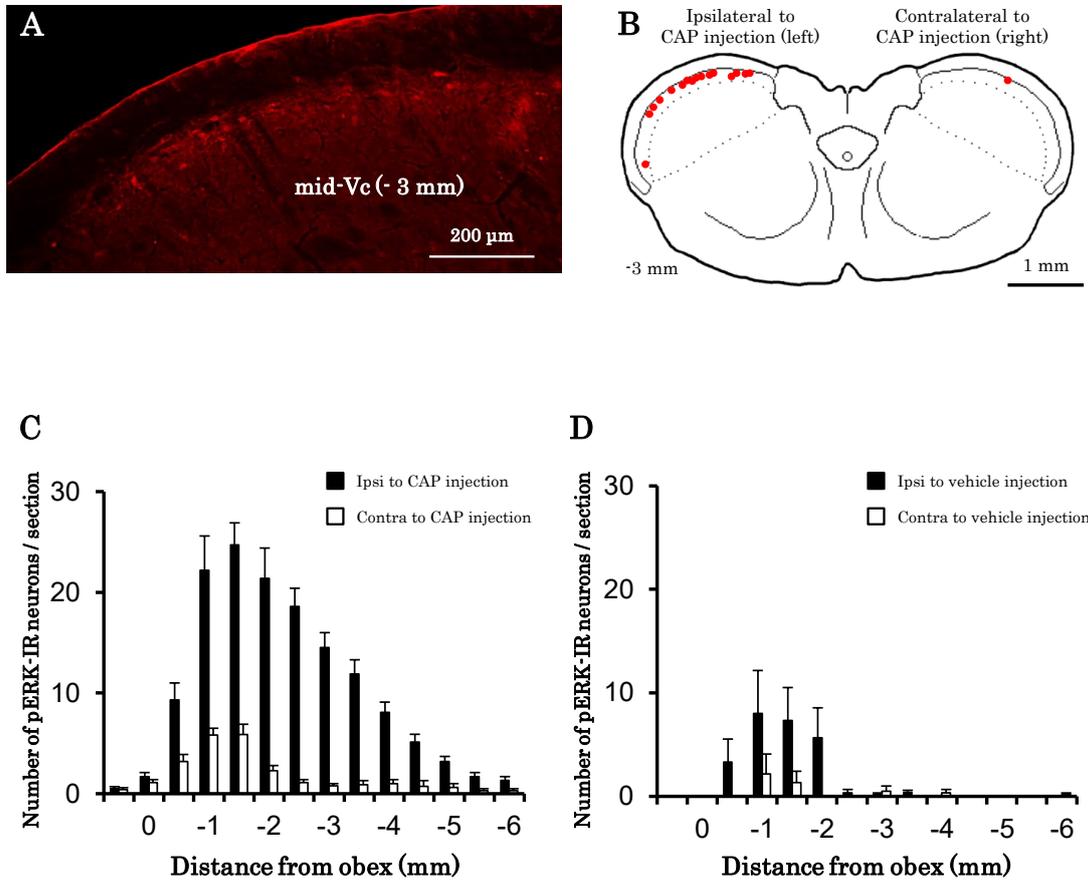


Fig. 1 VcにおけるpERK陽性ニューロンの分布
 A: pERK陽性ニューロンの写真(カプサイシン注入側Vc中間部; obexから3 mm 尾側)
 B: pERK陽性ニューロンの分布例
 C, D: 0.5 mm ごとのpERK陽性ニューロン数の平均値
 C: カプサイシン注入群, D: vehicle注入群

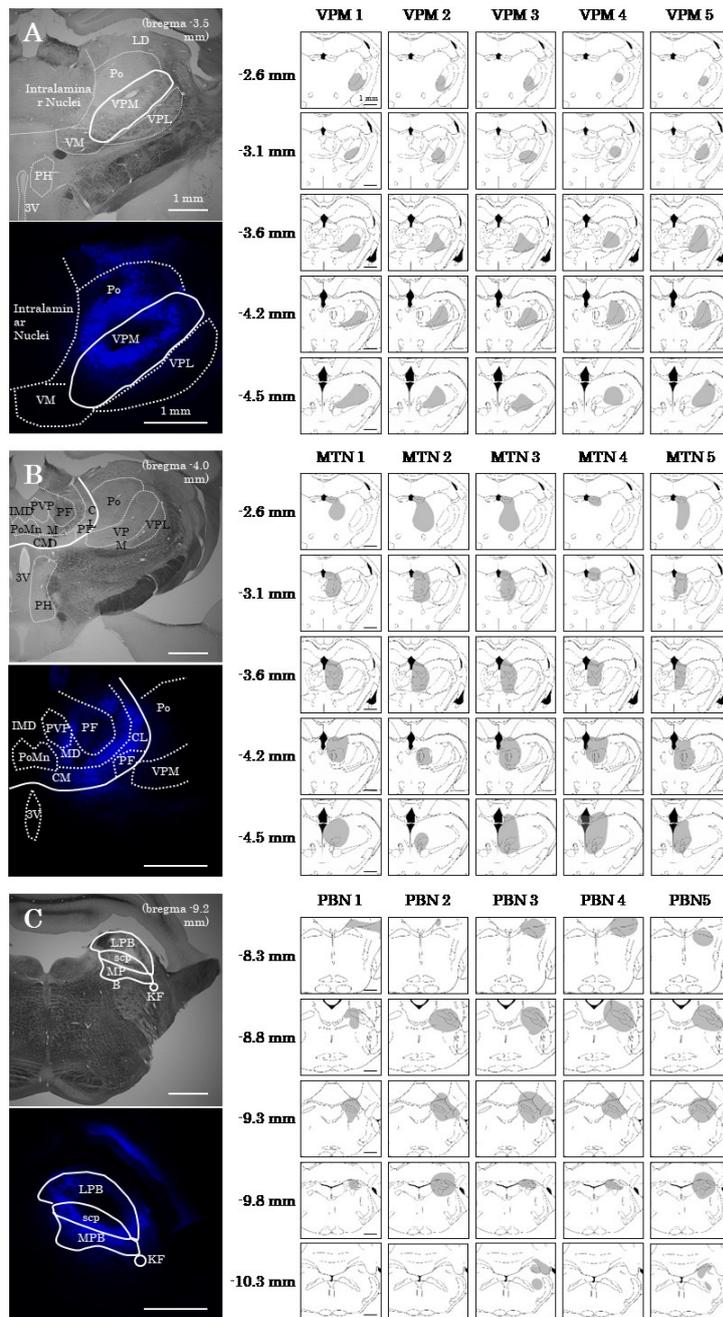


Fig. 2 FG注入部位

A: VPM, B: MTN, C: PBN, 右図の数値はbregmaからの距離³⁶⁾を示す

LD: 視床背外側核, VPM: 視床腹側内側核, VPL: 視床後外側腹側核, 3V: 第3脳室

PH: 視床下部後部, PVP: 視床室傍核, IMD: 視床背内側核中間部, PoMn: 視床後内側核

LPB: 外側結合腕傍核, MPB: 内側結合腕傍核, scp: 上小脳脚, KF: Kölliker-Fuse核

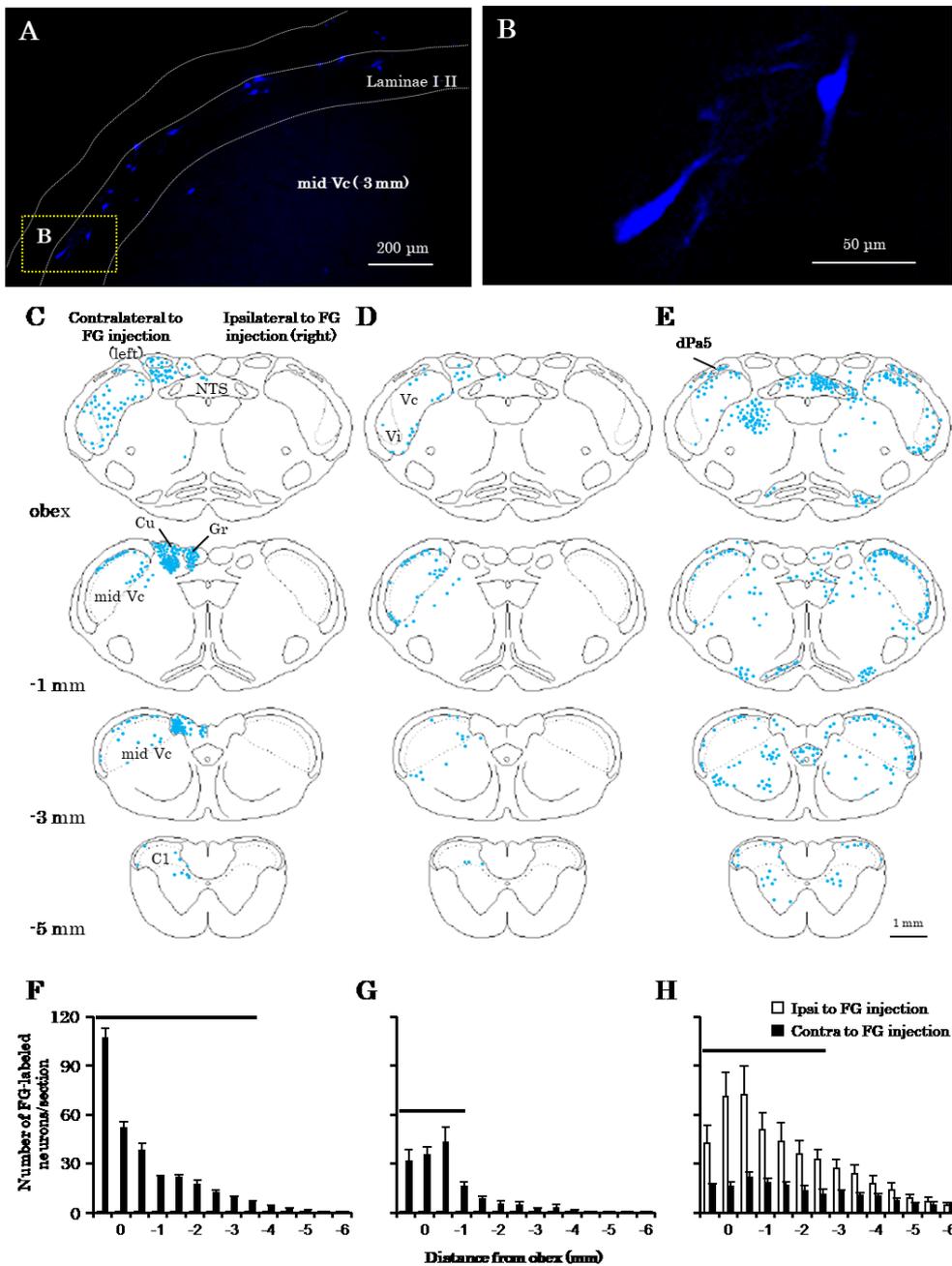


Fig. 3 Vcおよび上部頸髄におけるFG標識ニューロンの分布

A: FG標識PBN投射ニューロンの写真, B: 拡大図, C: VPM投射ニューロンの分布図例

D: MTN投射ニューロンの分布図例, E: PBN投射ニューロンの分布図例

図左側にobexからの吻尾側的な距離を示す

F-H: obexから0.5 mm ごとのFG標識ニューロン数の平均値, F: VPM投射ニューロン数

G: MTN投射ニューロン数, H: PBN投射ニューロン数

グラフ上部Solid barは有意差を示す ($p < 0.01$, FG注入側 vs 対側)

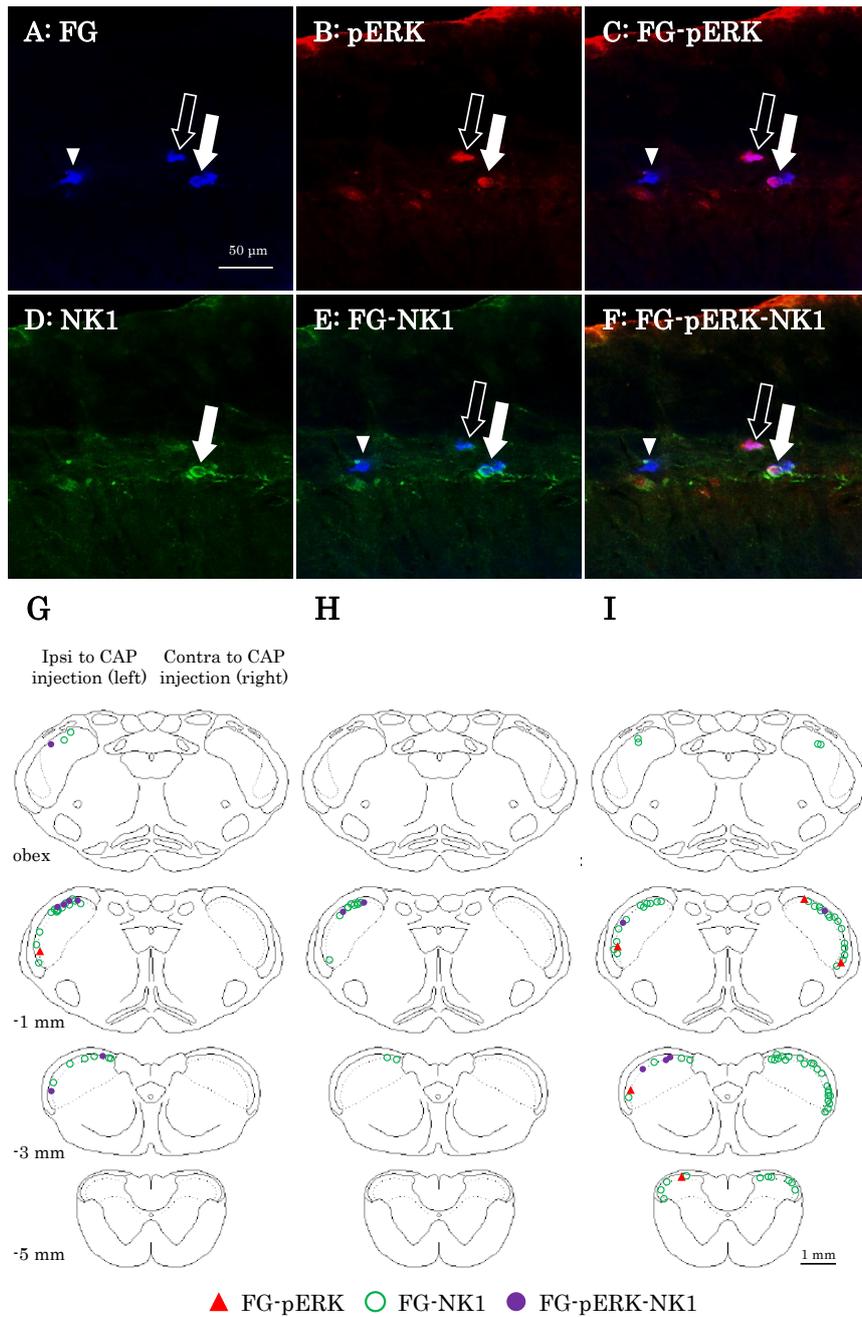


Fig. 4 FG標識pERKまたはNK1陽性ニューロンの写真および分布図
A: FG標識ニューロン写真, B: pERK陽性ニューロン写真, C: FGとpERKのmerge写真
D: NK1陽性ニューロン写真, E: FGとNK1のmerge写真, F: FG, NK1, pERKのmerge写真
矢頭: FG標識ニューロン, 白抜き矢印: FG標識pERK陽性ニューロン
白矢印: FG標識pERK-NK1陽性ニューロン
G-I: Vc-C1における物尾側的なFG標識pERK, またはNK1陽性ニューロンの分布図
G: VPM, H: MTN, I: PBN

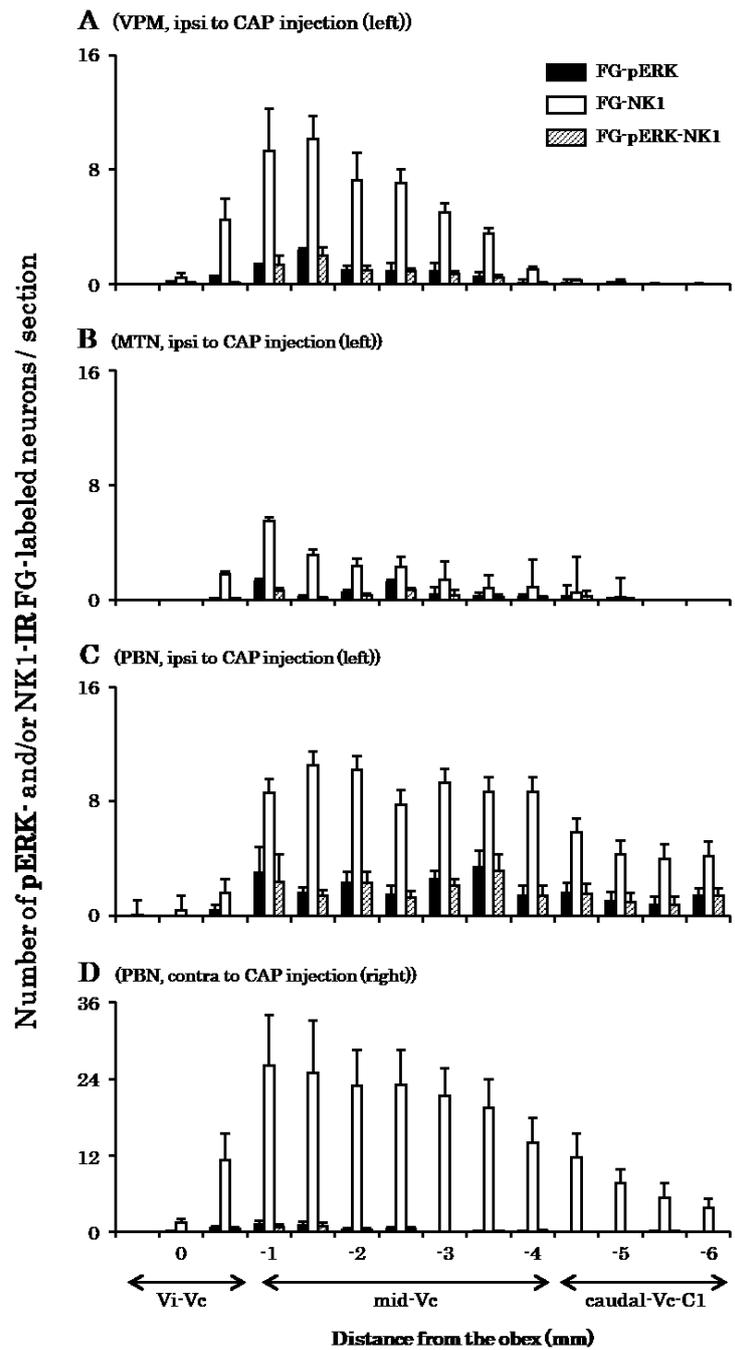


Fig. 5 FG標識pERKまたはNK1陽性ニューロンの吻尾側的分布
 0.5 mm ごとのFG標識pERK, またはNK1陽性ニューロン数の平均値を示す
 A: VPM投射ニューロンカプサイシン刺激側
 B: MTN投射ニューロンカプサイシン刺激側
 C: PBN投射ニューロンカプサイシン刺激側
 D: PBN投射ニューロン対側

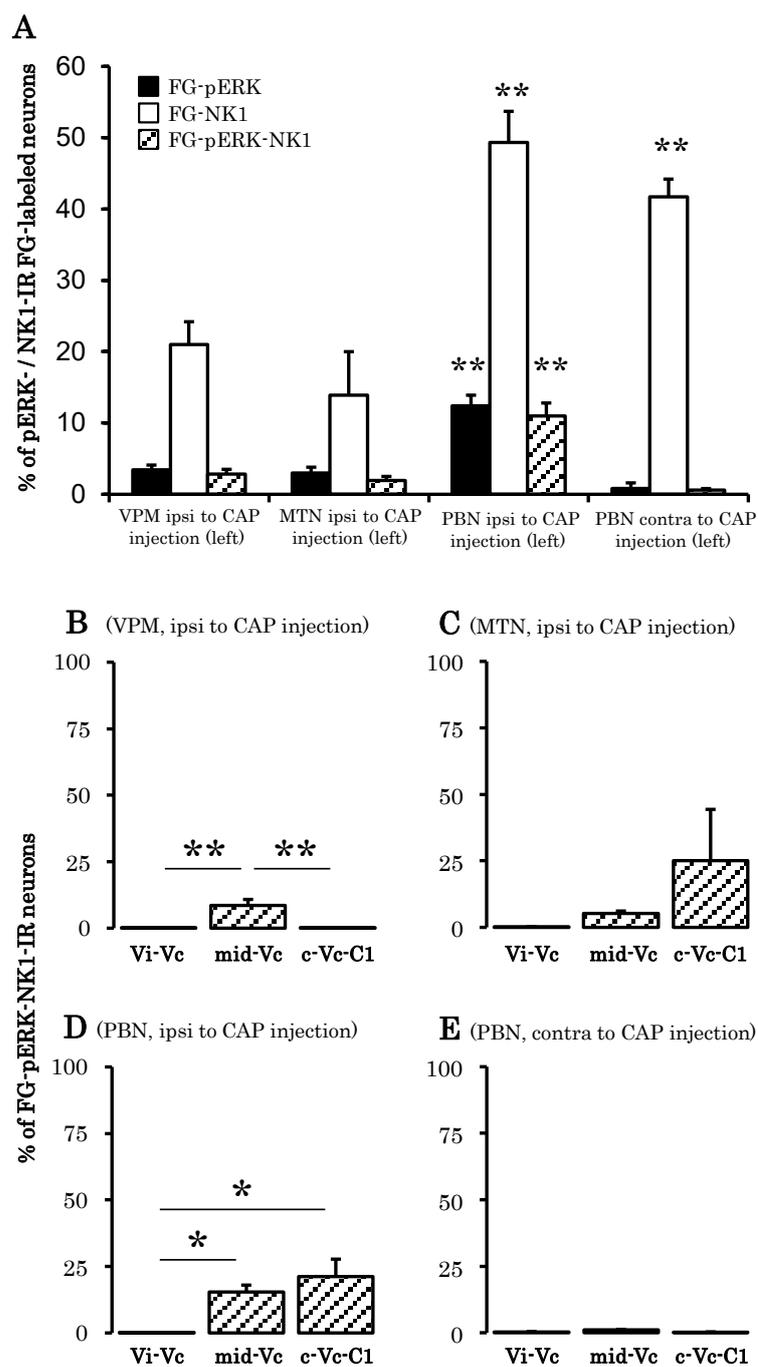


Fig. 6 投射領域ごとのFG標識ニューロンに対する割合

A: 各投射領域ごとのFGで標識されたニューロンに対するpERKおよびNK1陽性ニューロンの割合

B: VPM, C: MTN, D: PBN(ipsi), E: PBN(contra), *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

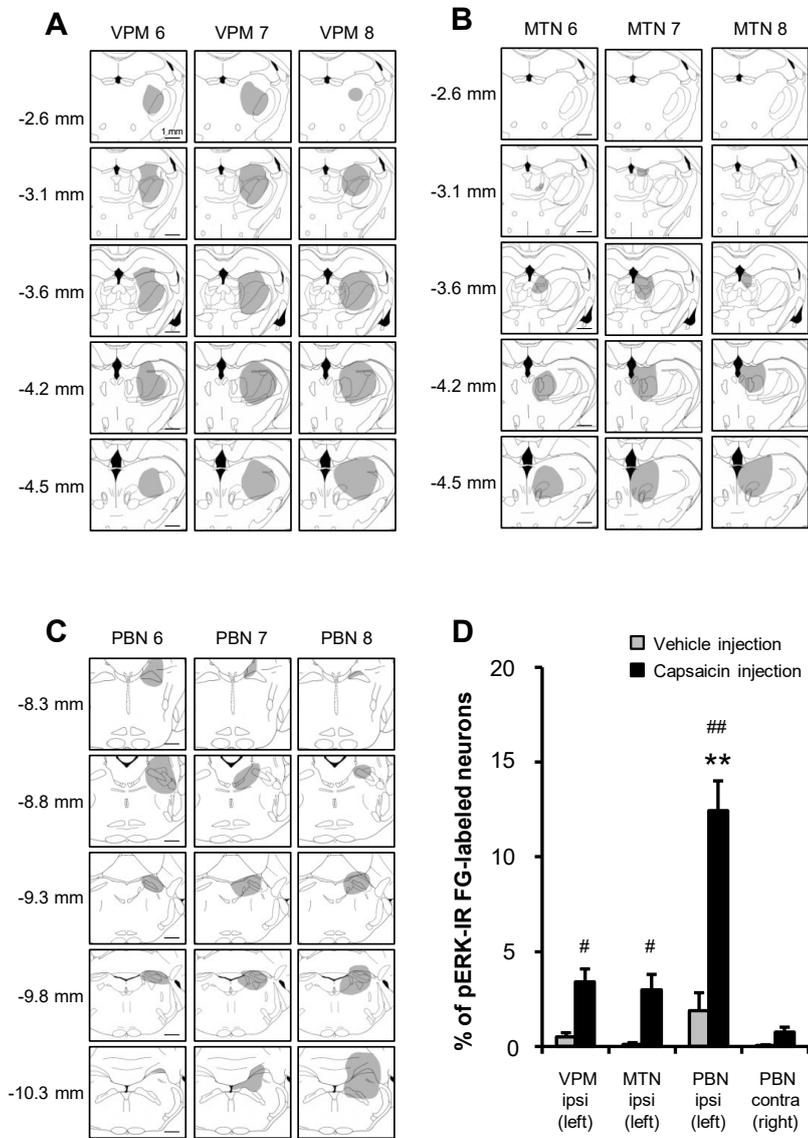


Fig. 7 FG注入部位 (vehicle群)

A: VPM, B: MTN, C: PBN, 左側はbregmaからの尾側方向の距離³⁶⁾

D: FG標識ニューロンに対するFG標識pERK陽性ニューロンの割合

** : $p < 0.01$ vs VPM and MTN, # : $p < 0.05$, ## : $p < 0.01$ vs vehicle

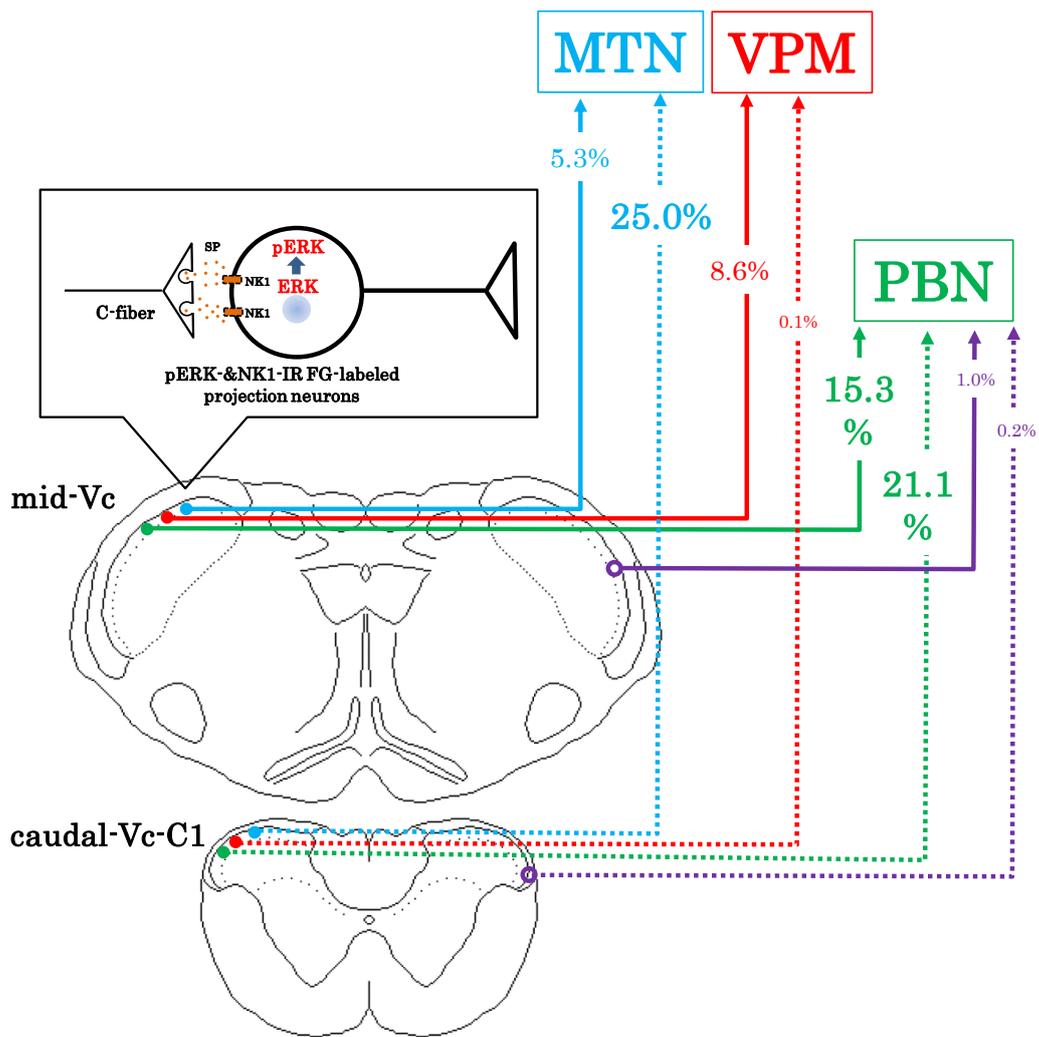


Fig. 8 pERK-NK1陽性視床および結合腕傍核投射ニューロンの割合

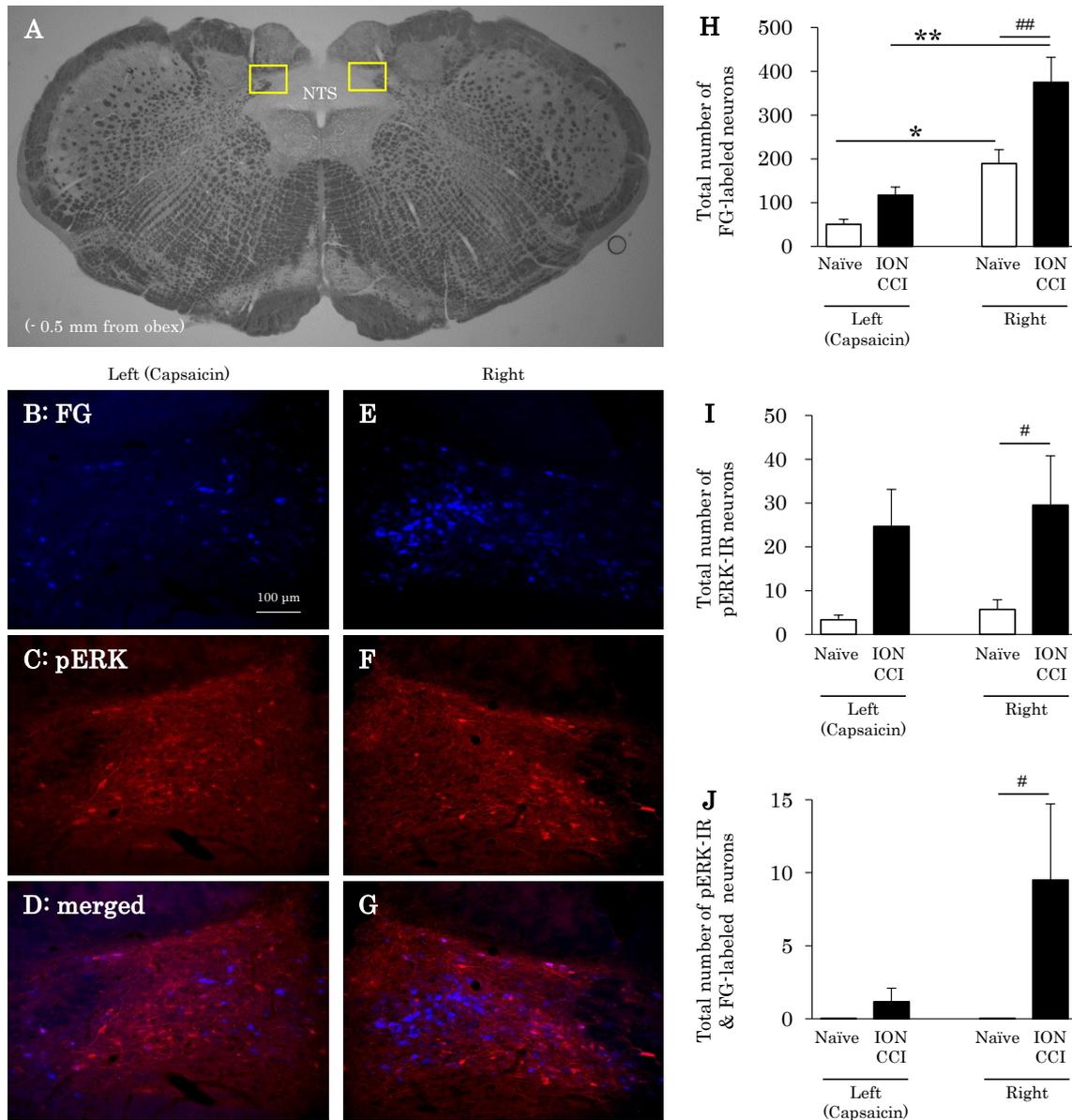


Fig. 9 眼窩下神経絞扼モデルのNTSにおけるPBN投射ニューロンとpERK発現
 A: 明視野 B,E: FG標識ニューロン C,F: pERK陽性ニューロン D,G: FGとpERKのmerge
 H: NTSにおけるFG標識ニューロン総数, I: pERK標識ニューロン総数, J: FG標識pERK陽性ニューロン総数, #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ vs naïve

表1 右側(ipsi)VPMへのFG注入および左側(contra)上口唇部へのカプサイシン注入ラットにおけるFG標識ニューロン, pERKおよびNK1陽性ニューロン総数

Neurons in the side contralateral to FG injection	Vi (2.0 - 1.0 mm)	Vi/Vc (0.5 - - 0.5)	mid-Vc I-II (- 1.0 - - 4.0)	mid-Vc III-V (- 1.0 - - 4.0)	Vc/C1 I-II (- 4.5 - - 6.0)	Vc/C1 III-V (- 4.5 - - 6.0)	dPa5 (0.5 - - 0.5)	NTS (0.5 - - 0.5)
FG-labeled	309.30 ± 30.36	196.57 ± 9.88	92.97 ± 2.95	62.12 ± 6.31	3.73 ± 1.23	4.52 ± 1.75	2.60 ± 0.73	0.00
pERK-IR	0.00	9.33 ± 2.40	109.73 ± 10.07	-----	8.42 ± 1.99	-----	1.67 ± 0.30	5.30 ± 0.70
FG+pERK-IR	0.00	0.9 ± 0.56	8.92 ± 1.77	-----	0.07 ± 0.07	-----	0.00	0.00
FG+NK1-IR	0.00	6.20 ± 2.18	54.15 ± 7.14	-----	0.48 ± 0.31	-----	0.00	0.00
FG+pERK+NK1-IR	0.00	0.17 ± 0.17	8.03 ± 1.98	-----	0.00	-----	0.00	0.00
Neurons in the side ipsilateral to FG injection								
FG labeled	0.40 ± 0.40	0.10 ± 0.10	0.70 ± 0.12	0.20 ± 0.20	0.10 ± 0.10	0.00	0.00	0.00
pERK-IR	0.80 ± 0.58	4.40 ± 1.38	20.20 ± 3.37	-----	0.07 ± 0.07	-----	0.10 ± 0.10	3.70 ± 0.77
FG+pERK-IR	0.00	0.00	0.00	-----	0.00	-----	0.00	0.00
FG+NK1-IR	0.00	0.00	0.00	-----	0.00	-----	0.00	0.00
FG+pERK+NK1-IR	0.00	0.00	0.00	-----	0.00	-----	0.00	0.00

表2 右側(ipsi)MTNへのFG注入および左側(contra)上口唇部へのカプサイシン注入
ラットにおけるFG標識ニューロン, pERKおよびNK1陽性ニューロン総数

Neurons in the side contralateral to FG injection	Vi (2.0 - 1.0 mm)	Vi/Vc (0.5 - - 0.5)	mid-Vc I-II (- 1.0 - - 4.0)	mid-Vc III-V (- 1.0 - - 4.0)	Vc/C1 I-II (- 4.5 - - 6.0)	Vc/C1 III-V (- 4.5 - - 6.0)	dPa5 (0.5 - - 0.5)	NTS (0.5 - - 0.5)
FG-labeled	149.70 ± 24.59	110.00 ± 18.33	41.18 ± 8.94	68.32 ± 9.71	1.43 ± 0.75	4.12 ± 2.09	1.60 ± 0.62	0.40 ± 0.29
pERK-IR	0.30 ± 0.30	14.80 ± 4.60	127.37 ± 15.68	-----	11.86 ± 5.23	-----	0.70 ± 0.34	4.70 ± 1.12
FG+pERK-IR	0.10 ± 0.10	0.10 ± 0.10	3.98 ± 1.13	-----	0.24 ± 0.19	-----	0.00	0.00
FG+NK1-IR	0.10 ± 0.10	1.80 ± 1.33	16.37 ± 6.49	-----	0.71 ± 0.45	-----	0.10 ± 0.10	0.00
FG+pERK+NK1-IR	0.10 ± 0.10	0.10 ± 0.10	2.23 ± 0.65	-----	0.24 ± 0.19	-----	0.00	0.00
Neurons in the side ipsilateral to FG injection								
FG-labeled	5.50 ± 2.39	0.90 ± 0.37	0.57 ± 0.57	0.83 ± 0.37	0.00	0.00	0.00	2.40 ± 1.09
pERK-IR	0.60 ± 0.40	6.90 ± 1.54	18.57 ± 3.11	-----	3.90 ± 3.90	-----	0.00	4.10 ± 1.17
FG+pERK-IR	0.00	0.10 ± 0.10	0.00	-----	0.00	-----	0.00	0.20 ± 0.20
FG+NK1-IR	0.00	0.00	0.00	-----	0.00	-----	0.00	0.00
FG+pERK+NK1-IR	0.00	0.00	0.00	-----	0.00	-----	0.00	0.00

表3 右側(ipsi)PBNへのFG注入および左側(contra)上口唇部へのカプサイシン注入ラットにおけるFG標識ニューロン, pERKおよびNK1陽性ニューロン総数

Neurons in the side contralateral to FG injection	Vi (2.0 - 1.0 mm)	Vi/Vc (0.5 - - 0.5)	mid-Vc I-II (- 1.0 - - 4.0)	mid-Vc III-V (- 1.0 - - 4.0)	Vc/C1 I-II (- 4.5 - - 6.0)	Vc/C1 III-V (- 4.5 - - 6.0)	dPa5 (0.5 - - 0.5)	NTS (0.5 - - 0.5)
FG-labeled	75.09 ± 11.36	54.09 ± 6.16	92.83 ± 12.98	12.23 ± 3.80	22.25 ± 5.68	2.37 ± 0.92	23.10 ± 3.29	50.50 ± 11.49
pERK-IR	0.00	9.90 ± 1.96	126.97 ± 27.31	-----	13.47 ± 1.94	-----	0.20 ± 0.12	3.33 ± 1.07
FG+pERK-IR	0.00	0.40 ± 0.40	15.83 ± 2.23	-----	4.88 ± 2.28	-----	0.10 ± 0.10	0.00
FG+NK1-IR	0.00	2.10 ± 1.73	63.77 ± 9.13	-----	18.32 ± 5.16	-----	0.20 ± 0.20	2.50 ± 0.65
FG+pERK+NK1-IR	0.00	0.00	14.03 ± 2.60	-----	4.73 ± 2.34	-----	0.00	0.00
Neurons in the side ipsilateral to FG injection								
FG-labeled	115.50 ± 21.64	185.50 ± 44.84	231.83 ± 51.29	22.37 ± 9.66	33.73 ± 10.90	2.27 ± 1.32	71.10 ± 14.35	189.27 ± 31.80
pERK-IR	0.30 ± 0.20	2.60 ± 1.51	14.27 ± 4.69	-----	1.07 ± 0.51	-----	0.00	5.70 ± 2.21
FG+pERK-IR	0.00	0.60 ± 0.29	3.07 ± 1.22	-----	0.10 ± 0.10	-----	0.00	0.00
FG+NK1-IR	0.00	12.70 ± 4.14	151.93 ± 38.45	-----	28.20 ± 9.06	-----	0.00	6.20 ± 2.26
FG+pERK+NK1-IR	0.00	0.40 ± 0.24	2.47 ± 0.91	-----	0.10 ± 0.10	-----	0.00	0.00