熱侵害刺激により惹起された炎症反応へのサブスタンス P の関与

米原典史^{*1)}, 渋谷 徹^{*2)}, 今井康夫^{*1)}, 松浦英夫^{*2)}, 猪木令三^{*1)}

Involvement of substance P in a thermal injury reaction To investigate a physiological function of substance P (SP) presenting in the peripheral ending of sensory neurons, we determined radioimmunoassayable SP (iSP) level in the subcutaneous perfusate and the volumes of edema evoked in rat paw by noxious heat stimulation simultaneously. Results obtained were as follows: Immersion of the rat paw into hot water (47°C) for 30 min led to a significant increase of iSP in the perfusate and about 50% increase in the paw volume. The increasing effects were abolished after neonatal pretreatment with capsaicin, acute and chronic denervation of the sciatic and saphenous nerves. Intraplantal injection of SP evoked an increase in the paw volume in dose-dependent manner. This increasing effect of SP on the paw volume was more remarkable than that of histamine. The increase in the heat-evoked iSP release and edema volume were significantly inhibited by pretreatment with stem bromelain and emorfasone, and by pretreatment with dexamethasone. A time lag was necessary for a manifestation of the inhibitory effect of dexamethasone, and this inhibitory effect of the steroid was abolished after the simultaneous application of actinomycin D.

These results suggest that (1) SP produced by noxious heat stimulation in the periphery may be released from the afferent fibers and (2) bradykinin and prostaglandins may intervene in this SP release, and (3) SP released in the periphery may be closely related to the edema formation of the thermal injury reaction.

Yonehara Norifumi • Shibutani Tooru • Imai Yasuo • Inoki Reizo^{*1)}, Matsuura Hideo^{*2)}

^{*1)}Department of Pharmacology, ^{*2)}Department of Anesthesiology,

Osaka University Faculty of Dentistry

key words: immunoreactive substance P, noxious heat stimulation, heat-induced edema

19世紀後半, Goltz¹⁾ および Stricker²⁾ らにより, 坐骨神経あるいは後根刺激が血管拡張を伴う炎症反応を惹き起こすことが見出された. Bayliss³⁾ は, この炎症反応が交感神経系を介するものではなく, 求心性神経の逆行性興奮によって惹き起こされる可能性を明らかにした. この神経性炎症様反応は, capsaicin(一次細径求心性線維を比較的特異的に変性させる化学物質)感受性神経の刺激によってのみ特異的に生じることより⁴⁾, 刺激に伴い一次細径求心性線維末端から血管拡張を惹き起こす物質が遊離される可能性が示唆された. そして, この現象に関与する物質として histamine (Hist), kinins, ATP などの炎症 chemical mediator が提唱されてきた.

1953年, Lembeck⁵⁾ により substance P (SP) が一次求心性線維の伝達物質であるとの仮説が提出されて以来, SP の神経性炎症様反応への関与が注目されはじめ, 1975年 Hökfelt らは⁶⁾, 免疫組織化学的手法を用い, SP が一次求心性線維中枢端のみならず, 末梢端にも存在し, 特に皮膚では毛細血管周囲に分布していることを明らかにした. 加えて合成 SP の動脈内投与により, 濃度に依存した血管透過性の亢進が生じることが明らかに

された⁷⁾. さらに, 最近, Moskowitz⁸⁾, Levine⁹⁾ らは, SP が種々の炎症性疾患(慢性関節リウマチなど)に直接関与していることを, 臨床・病理学的研究より見出している.

これらの事実は, 侵害刺激に応じた侵害受容器の興奮が, 一次求心性線維末梢端より SP 遊離を惹き起こし, この際遊離された SP は炎症反応の調節に重要な役割を果たしていることを示唆している.

本研究では, 一次求心性線維末梢端に存在する SP の炎症反応への関与をより明確にする目的で, ラット後肢同軸灌流法を用い, 熱侵害刺激時, 灌流液中での SP レベルの変動の有無および熱浮腫に対する SP の影響について検討を行った.

材料と方法

実験動物としてSD系雄性ラット(体重150g前後)を用い, urethane 麻酔(780mg/kg i.p)下, 実験を行った.

(1) ラット足蹠皮下灌流

Rochaes Silva らの方法¹⁰⁾に準じ, ラット後肢足蹠皮下灌流を行った. 外径 4mm, 長さ約 4cmのpolyethylene tube のなかに外径 1mm の細い polyethylene tube を挿入固定し, 先端を約 2mm 外側 tube より長くした

^{*1)}大阪大学歯学部薬理学教室

^{*2)}同, 麻酔学教室

図1 足蹠皮下灌流液中での SP レベルの経時変化および熱侵害刺激の効果
一つのカラムは10分間隔で採集された灌流液中での SP レベルの平均および SEM をあらわす。

二重同軸 tube を作製，大腿外側の切開口より足尖に向かって挿入，距腿関節の靱帯下を通し，その先端を足背皮下に到達させた。細径 tube より bestatin (3mg/100ml 生理食塩水)を含む生理食塩水を peristaltic pump を用い，1ml/10min の流速にて push し，外側太径 tube より滴下液を10分間隔で氷冷下採集した。得られた試料は凍結乾燥後，Yonehara らの方法¹¹⁾に従い SP の radioimmunoassay に使用した。

(2) capsaicin 前処置

capsaicin(50mg/kg)は，Jancsó¹²⁾らの方法に従って調製した後，新生ラット(生後1週間以内)頸部皮下に投与した。対照群として capsaicin を含まない溶媒のみを同部位に投与した。2ヵ月後，hot plate 法にて疼痛閾値が上昇していることを確認後実験に使用した。

(3) 後肢の第一次求心性線維の慢性神経支配除去

ether 麻酔下，灌流側の伏在神経および坐骨神経を結紮後切断，1週間後実験に使用した。対照群として皮膚の切開のみにとどめた偽手術群を作製した。

(4) 急性神経支配除去

熱侵害刺激10分前に灌流側の伏在および坐骨両神経を2% lidocaine でブロックした。

(5) 侵害刺激

侵害刺激として灌流開始1時間以上経過後，一定温度に調節した温湯中に灌流側足蹠を30分間浸漬した。また，SP の炎症惹起作用を検討する目的で，合成 SP (2, 10, 50 μ g)を含む生理食塩水 0.1ml を足蹠皮下に投与し，Hist (10, 100 μ g)浮腫と比較検討した。炎症

図2 刺激温度の SP 遊離(I)および浮腫(II)への影響

A, B, Cのカラムは，それぞれ刺激前，刺激中，刺激後の30分間，すなわち各状態で三つのフラクションに遊離された SP レベルの平均値をもとに，同様な実験を7回繰り返したときの SP レベルの平均および SEM をあらわす。

反応は，足蹠容積測定装置(Ugo Basile, Italy)を用い浮腫を経時的に測定し，刺激前あるいは起炎物質投与前の値から浮腫率を算出した。

(6) 熱侵害刺激に伴う SP 遊離に対する薬物の影響

① 高分子 kininogen の枯渇薬である stem bromelain (10mg/kg)ならびに bradykinin (BK) 遊離阻害薬 emorfazone(50mg/kg)を熱刺激1時間前に静脈内投与した。

② ステロイド性抗炎症薬である dexamethasone は，熱刺激1時間前(10mg/kg)静脈内投与，刺激3時間前(10mg/kg)静脈内投与，あるいは実験前日の午前と午後各1回 10mg/kg を腹腔内に投与し，さらに同量を刺激1時間前に静脈内投与する方法の3通りを用い検討を行った。

図3 capsaicin 前処置による SP 遊離 (a), 浮腫 (b) への影響

a : * $p < 0.05$ capsaicin 無処置の対照群と比較

b : * $p < 0.05$ 各測定時間での対照群と比較

結果

(1) SP 抗体の特異性

使用した SP 抗体に対する SP 類似タキキニン, すなわち neurokinin A および neurokinin B の交叉反応率は, いずれも 0.1% 以下であった。

(2) 灌流液中の SP レベルおよび浮腫の変動

図1に示すように, 灌流開始直後高い SP レベルが観察され, 以後急激に減少し30分後には, ほぼ一定値を示した。灌流開始60分後に, 熱侵害刺激 (47°C) を行った。刺激前および刺激中30分間, すなわち三つのフラクションに遊離された SP 量は, それぞれ 0.013 ± 0.002 pmole/10min ($n=17$), 0.049 ± 0.003 pmole/10min であった。この SP 遊離増加は, 25°C および 37°C の穏やかな刺激では観察されず痛み閾値以上の熱刺激でのみ観察された(図2a)。熱侵害刺激に伴う SP 遊離増加に対応して浮腫が生じた(図2b)。

図4 伏在神経および坐骨神経切断による SP 遊離 (a), 浮腫(b)への影響

a : * $p < 0.05$ 対照群と比較

b : * $p < 0.05$ 各測定時間での対照群と比較

(3) capsaicin 前処置による影響

新生ラットへの capsaicin 前処置により著明な熱疼痛閾値の上昇が観察された。capsaicin 処置ラットの後肢足蹠皮下灌流液中での SP レベルは, 刺激前(A), 刺激中(B), 刺激後(C)のいずれも対照群にくらべて著明に減少した(図3a)。一方, 熱刺激に伴う浮腫も対照群にくらべて著明に抑制された(図3b)。

(4) 伏在神経および坐骨神経の慢性 および 急性除神経の効果

後肢の一次求心性線維である伏在, 坐骨両神経の切断および lidocaine によるブロックは, 熱侵害刺激に伴う SP 遊離増加ならびに熱浮腫を対照群にくらべて著明に抑制した(図4, 5)。

(5) SP および Hist 浮腫

図6に示すように SP, Hist の足蹠皮下投与により, いずれも投与量に依存した浮腫の増加が観察されたが, SP の浮腫惹起作用は Hist のそれにくらべて強いものであった。

図5 局所麻酔薬による伏在，坐骨両神経ブロックの SP 遊離(a)，浮腫(b)への影響
a : * $p < 0.05$ 対照群と比較
b : * $p < 0.05$ 各測定時間での対照群と比較

(6) 薬物の影響

stem bromelain および emorfazone 前処置は，図7に示すように熱侵害刺激に伴う SP 遊離増加および浮腫を著明に抑制した。一方，ステロイド性抗炎症薬 dexamethasone の熱侵害刺激1時間前静脈内投与群では，刺激前，刺激中，刺激後のいずれの SP レベルも対照群にくらべ有意な変化が観察されなかった。刺激3時間前静脈内投与群，あるいは実験前日からの3回投与群では，熱侵害刺激に伴う SP 遊離増加は著明に抑制された(図8a)。刺激3時間前，dexamethasone 静脈内投与による SP 遊離抑制効果は，蛋白質合成阻害薬 actinomycin D (5mg/kg, s.c) の同時投与により有意に拮抗された(図8b)。

考 察

熱侵害刺激に相当する温度で SP 遊離の著明な増加

図6 SP(a)および histamine(b) 足趾皮下投与による浮腫率の経時変化

と平行して浮腫が観察された。これらの現象は，図3，4で示されるように，capsaicin 前処置あるいは後肢からの一次求心性線維を含む坐骨，伏在両神経の切断により著明に減少した。capsaicin は，特異的に一次細径求心性線維の変性を惹き起こし¹³⁾，その際，皮膚，脊髄後角などの SP レベルを著明に減少させ，その結果熱疼痛閾値の上昇を惹き起こすことが知られている¹⁴⁾。本研究において，capsaicin 前処置ラットで著明な熱疼痛閾値(hot plate 法)の上昇が観察されたことは，capsaicin 前処置により，一次求心性線維が十分変性を受けていることを示している。capsaicin ならびに除神経実験の結果は，熱侵害刺激に伴う足趾皮下灌流液中での SP レベルの増加が一次求心性線維を介する現象であることを示唆している。

Szolcsányi は¹⁵⁾，capsaicin が C 求心線維のうちポリモーダル受容器からのインパルスを伝える C₂ 線維の感受性低下をもたらす(desensitization)ことを報告している。熱刺激に対する反応は，ポリモーダル受容器の特徴的反応であり，その閾値は，皮膚の熱疼痛閾値である 45°C 前後であることが知られている¹⁶⁾。興味ぶかいこ

図7 bromelain および emorfazone 前処置による SP 遊離(a), 浮腫(b)への影響

a : * $p < 0.05$ 対照群と比較

b : * $p < 0.05$ 各測定時間での対照群と比較

とに、この温度は足蹠灌流液中で SP 遊離の増加、ならびに浮腫が観察された温度にほぼ一致するものであった。このことは、熱侵害刺激に伴う SP 遊離増加に、侵害受容器としてポリモーダル受容器が関与している可能性を示唆している。ポリモーダル受容器は、炎症 chemical mediator であり、発痛物質である BK に対し、強い親和性を有し、また、本ペプチドの炎症惹起作用の一部は C 求心線維の興奮を介することが知られている¹⁷⁾。さらに Rocha e Silva らは¹⁰⁾、47°C 前後の熱刺激では、serotonin, Hist ではなく BK が足蹠灌流液中で有意に増加することを明らかにしている。これらの事実を考慮すれば、図7において、bromelain および emorfazone 前処置により SP 遊離が著明に抑制されたことは、熱侵害刺激時、産生される BK がポリモーダル受容器の興奮を惹き起こし、それに伴い一次求心性線維の末梢端より SP 遊離が生じるものと推察される。BK の chemical mediator としての作用は、ある種の prostaglandins (PGs) によって増強されることが知られている。PGs には、このような炎症 chemical mediator の調節因子としての働き以外に、それ自身で強い血管拡張、血管透過性亢進などの炎症惹起作用を有するものがあり、BK と同様、重要な chemical mediator でもある。

図8 SP 遊離に対する dexamethasone 前処置(a)ならびに dexamethasone, actinomycin D の併用効果(b)

a : * $p < 0.05$ 対照群と比較

b : $p < 0.05$ 対照群と比較

Ferreira らは¹⁹⁾、BK が PGs 遊離を惹き起こすことを見出しており、BK, PGs 系は炎症時互いに影響しながら炎症反応の調節を行っているものと考えられている。

本研究において、蛋白質合成を介し、PGs 系の重要な合成酵素 phospholipase A₂ 活性を阻害することにより、抗炎症作用を発現することが知られているステロイド性抗炎症薬²⁰⁾ dexamethasone により熱侵害刺激に伴う SP 遊離増加が著明に抑制され、この薬物の効果発現に潜伏時間が必要であったこと、さらに蛋白質合成阻害薬により薬物の効果が著明に拮抗されたことなどの事実は、従来見出されているステロイド剤の抗炎症作用機序にはほぼ類似しており、BK のみならず PGs 系が SP 遊離機構に関与していることを強く示唆している。一次求心性線維末梢端より遊離された SP の生理作用に関し、最近の免疫組織化学的研究は²¹⁾、SP 陽性線維が中枢神経系のみならず、内臓組織、皮膚、歯髄組織などの末梢組織にも広範に分布し、特に皮膚では、毛細血管周囲に高密度分布することを明らかにしており、さらに薬理学的研究は²²⁾、SP の末梢局所投与(動脈内投与、皮下投与)により血管拡張、血管透過性亢進が生じることを見

出している。

これらの事実ならびに、本研究において SP 遊離の増減と浮腫の変動が平行したことは、SP 足齶皮下投与により濃度に依存した浮腫が観察されたことは、熱侵害刺激時、産生された BK, PGs などの chemical mediator による侵害受容器の興奮を介し、一次求心性線維末梢端より遊離された SP は、遊離部位(刺激部位周辺の組織)において、一種の防御機転である炎症反応の増強、促進に関与しているものと推察される。

文 献

- Goltz, F.: Über gefäßerweiternde Nerven. *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 9: 174-197, 1874.
- Stricker, S.: Untersuchung über die Gefässerwurzeln des Ischiadeus. *Sitz-Ber. Kaiserl. Acad. Wiss. (Wein)* 3: 173-185, 1876.
- Bayliss, W.M.: On the origin from the spinal cord of the vasodilator fibres of the hind limb, and the nature of these fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 26: 173-209, 1901.
- Lembeck, F., Donnerer, J.: Time course of capsaicin-induced functional impairments in comparison with changes in neuronal substance P content. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 316: 240-243, 1981.
- Lembeck, F.: Zur Frage der zentralen Übertragung afferenter Impulse. III. Mitteilung. Das Vorkommen und die Bedeutung der Substanz P in den dorsalen Wurzeln des Rückenmarks. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exper. Path. Pharmacol.* 219: 197-213, 1953.
- Hökfelt, T., Kellerth, J.O., Nilsson, G., Pernow, B.: Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neurons. *Brain Res.* 100: 235-252, 1975.
- Lembeck, F., Holzer, P.: Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 310: 175-183, 1979.
- Moskowitz, M.A., Barley, P.A.: The trigemino-vascular system and vascular head pain: a role for substance P. *Substance P Metabolism and Biological Actions* (eds. Jordan, C.C., Oehme, P.) Taylor & Francis, London and Philadelphia, 1985, p 153-163.
- Levine, J.D., Clark, R., Devor, M., Helms, C., Moskowitz, M.A., Basbaum, A.I.: Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science* 226: 547-549, 1984.
- Rocha e Silva, M., Antonio, A.: Release of bradykinin and mechanisms of production of a thermic edema (45°C) in rat paw. *Med. Exp.* 3: 371-382, 1960.
- Yonehara, N., Shibutani, T., Tsai, H.-Y., Inoki, R.: Effects of opioids and opioid peptide on the release of substance P-like material induced by tooth pulp stimulation in the trigeminal nucleus caudalis of the rabbit. *Europ. J. Pharmacol.* 129: 209-216, 1986.
- Jancsó, L.N., Jancsó-Gábor, A., Szolcsányi, J.: Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 31: 138-151, 1967.
- Jancsó, G., Király, E., Jancsó-Gábor, A.: Direct evidence for an axonal site of action of capsaicin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 313: 91-94, 1980.
- Nagy, J.I., Vincent, S.R., Staines, W.A., Fibiger, H.C., Reisine, T.D., Yamamura, H.I.: Neurotoxic action of capsaicin on spinal substance P neurons. *Brain Res.* 186: 435-444, 1980.
- Szolcsányi, J.: A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. *J. Physiol. Paris*, 73: 251-259, 1977.
- Fleischer, E., Handwerker, H.O., Joukhadar, S.: Unmyelinated nociceptive units in two skin areas of the rat. *Brain Res.* 267: 81-92, 1983.
- Jancsó, G., Király, E., Jancsó-Gábor, A.: Chemosensitive pain fibres and inflammation. *Int. J. Tiss. Reac.* 2(2): 57-66, 1980.
- Ikeda, K., Tanaka K., Katori, M.: Potentiation of bradykinin-induced vascular permeability increase by prostaglandin E₂ and arachidonic acid in rabbit skin. *Prostaglandins* 10: 747-758, 1975.
- Ferreira, S.H., Moncada, S., Vane, J.R.: Prostaglandin and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. *Br. J. Pharmacol.* 49: 86-97, 1973.
- Tsurufuji, S., Sugio, K., Takemasa, F.: The role of glucocorticoid receptor and gene expression in the anti-inflammatory action of dexamethasone. *Nature* 280: 408-410, 1979.