Intracranial Self-stimulation and Stimulation Produced Analgesia of the Nucleus Submedius in Awake Rats

Kentaro Murase¹, Eiji Sumiya¹, Kaoru Okada¹,
Kazuko Kobayashi² and Kenji Kawakita¹

*Department of Physiology¹ and Biochemistry², Meiji University of Oriental Medicine,
Kyoto, Japan*

(Received 1 April 1997)

Abstract

Nucleus submedius (Sm) in medial thalamus has been proposed as a thalamic relay nucleus which may mediate motivational and affective aspects of pain, and recent studies have suggested that the Sm nucleus may also participate in the pain inhibitory systems. To examine the functional role of the Sm, relationship between intracranial self-stimulation (ICSS) and stimulation produced analgesia (SPA) of the Sm were investigated in conscious rats (n=15). The monopolar electrodes were implanted chronically, and the frequency of lever press-induced electrical stimulation (0.3 ms, 50 Hz, 200 μ A) was monitored and the effects of the conditioning electrical stimulation for 30 s on the tail flick test and formalin test were studied.

The ICSS positive sites (lever pressing over 5 times/min) were found in seven of 15 in the Sm and also distributed around the Sm. Three of seven ICSS positive sites in Sm were obviously prolonged the tail flick latency immediately after electrical stimulation. In formalin test, most of these ICSS positive sites decreased the licking duration during the stimulation and the effects continued after stimuli in four ICSS positive sites. On the other hand, ICSS neutral sites (lever pressing less than 5 times/min) had some analgesic effects on both tests but they were not so apparent.

These results suggest that the Sm nucleus is not a simple thalamic relay of nociceptive information to the cortex, and it also participates, at least in part, in pain inhibitory systems with rewarding property.

Key words: nucleus submedius, intracranial self-stimulation, stimulation produced analgesia, endogenous pain inhibitory systems, rat

視床内側下核における脳内自己刺激と刺激誘発鎮痛

村瀬健太郎¹ 角谷 英治¹ 岡田 薫¹ 小林 和子² 川喜田健司¹

¹明治鍼灸大学 生理学

²明治鍼灸大学 生化学

緒 言

視床内側核群の1つである内側下核 (nucleus submedius: Sm) は、数多くの神経解剖学的研究から、痛覚情報の中継核の1つとされており⁴⁾、ニューロンの受容野が非常に大きいこと^{7,15)} や、前頭前野の脳底側にある腹外側眼窩皮質 (ventrolateral orbital cortex: VLO) と相互投射していること¹⁷⁾ などから、痛みの弁別的な相よりもむしろ情動相に関係すると考えられてきた。近年、Sm 核の破壊で痛覚過敏が生じる¹³⁾、また Sm 核の通電刺激で tail flick 潜時の延長¹⁸⁾ や、脊髄後角ニューロンの抑制¹⁹⁾、直腸結腸の伸展刺激で誘発される外腹斜筋の筋電活動の抑制¹⁶⁾ などの報告があり、内因性鎮痛系に Sm 核が積極的に関与している可能性が示唆されている。

中枢神経系の特定部位の情動面での役割を知るための方法として、脳内自己刺激 (intracranial self-stimulation: ICSS) が挙げられる¹⁰⁾。ICSS はそれが positive とされる部位では情動としての快情報と関連していると考えられており、Sm 核における ICSS の検討は、その機能を知るうえで有用な情報を提供すると考えられる。しかし、視床の ICSS に関する研究はきわめて少なく、Sm 核の ICSS を調べた報告では neutral とされている³⁾ が、その例数はわずか1例のみであり結論的なものとはいえない。

そこで、本研究では Sm 核の機能的役割を知るために、Sm 核における ICSS の有無について調べた。次に tail flick test と formalin test を指標に、通電刺激による内因性鎮痛機構に対する役割を調べ、ICSS と刺激誘発鎮痛 (stimulation produced analgesia: SPA) との関連について検討した。

方 法

1. 電極埋め込み手術

実験には Wistar 系雄性ラット (手術時体重 290~380 g) 15 匹を用いた。手術はネンプタール (50 mg/kg, i.p.) 麻酔後、定位脳固定装置 (成茂, ST-7) に固定し、直腸温をモニターして、体温を約 37.5 °C に保った。実体顕微鏡下で頭蓋骨を露出

し、刺激電極刺入部位 (bregma より尾側 2.1~2.5 mm, 外側 0.6~0.8 mm) にデンタルドリルを用いて孔 (ϕ 0.8 mm) を開けた。刺激電極として金属微小電極 (東洋医療研究所製, 直径 180 μ m, インピーダンス 10 M Ω) を用い、油圧式マニピュレーター (成茂, PF5-1) により、Paxinos & Watson のラット脳地図¹²⁾ を参考に目的の深さまで刺入した。アース用ビス (直径 1 mm, 高さ 2 mm) を頭蓋骨に固定後、電極とソケットを接続し、デンタルセメントで固定した。麻酔が覚めた後、飼育用ケージに戻し、1 週間の回復期間をおいて実験を開始した。

2. 脳内自己刺激

オペラント行動観察にはアルミ製のレバーを取り付けたスキナーケージ (東洋産業株式会社, MSK-003) を用いた。手術回復期間の後、餌報酬学習でレバー押し訓練を開始し、規定数 (毎分 2 回) 以上になったところで、餌報酬を脳内通電刺激に変え、10 分間の ICSS のレバー押し回数を調べ、ペンレコーダーに記録した。脳内通電刺激は基準電流を 200 μ A とし、ラットがレバーを押すことをトリガーとして、定電流刺激装置 (日本光電, SEN-3201) からアイソレータを介して刺激が流れるようにした (interval 20 ms, duration 0.3 ms, train 50, 1 秒間)。このとき実際に流れた刺激強度は、100 K Ω の抵抗を介してオシロスコープ (KIKUSUI, COS5060-ST) でモニターした。

3. tail flick test

tail flick test には、輻射熱式鎮痛効果測定装置 (米国 IITC 社, model 33) を用い、ラットの尾部末端に輻射熱を照射し、ラットが尾を振り動かすまでの潜時を記録した。ベースライン潜時が 3.5~4.5 秒になるように熱源の強さを調節し、ラットの尾の組織損傷を防ぐために、反応に関係なく 10 秒間で自動的に切れるようにした。2 分間隔で 5 回の試行の後、脳内通電刺激 (0.3 ms, 50 Hz, 200 μ A) を 30 秒間行い、刺激終了直後から同じく 2 分間隔で 5 回の試行を行った。評価は刺激前 5 回試行の平均を 100% として変化率を算出し、20% 以上潜時が延長したものを鎮痛効果が認められたものとした。

4. formalin test

formalin test は、2.5% のホルマリン液 50 μ l を 26 G 針を用いてラットの右後肢足底部に皮下注射した後、床下に角度 45 度で鏡をとりつけたプラスチックゲージに入れ、疼痛関連行動を観察した。疼痛関連行動の指標として、注射された足を舐める (licking) 時間を計測した。Dubbisson らの方法に従い⁶⁾、ホルマリン注入後、30 分経過した第二相の licking 行動が安定したところで脳内通電刺激 (0.3 ms, 50 Hz, 200 μ A) を 30 秒間行なった。観察は刺激前 (pre)、刺激中 (stim)、刺激後 (after) のそれぞれ 30 秒ごとの licking をしている時間をペンレコーダーに記録した。

5. 刺激部位の組織学的検討

実験終了後、直流通電 (20 μ A, 10 秒) でマーキングを行い、灌流固定、染色は定法に従って行い、ラットの脳地図¹²⁾を用い組織学的に脳内刺激部位を同定した。

結 果

1. 脳内自己刺激

ICSS は、レバー押しによる餌報酬 (feeding) 期間から脳内通電刺激または無刺激の条件に切り替え、10 分間のレバー押し回数を計測し、1 分間あたりの回数で比較した。feeding 期間や脳内通電刺激がない条件下でのレバー押し回数は、それぞれ 2.9 ± 0.1 回/min, 2.8 ± 0.4 回/min (mean $\pm$ SE) であった (Fig. 1A)。そこで、評価基準を 5 回/min として、それよりも多いものを ICSS positive とし、5 回/min 以下は ICSS neutral とした。その典型例を Fig. 1B, C に示す。

最初の 1~2 回はレバー押しを行うものの、その後 ICSS を全く行わない ICSS negative の例は Sm 核内で 1 例、Sm 核周辺においては視床下部背側野で 1 例みられたのみであった。そこで今回は特に区別せず両者とも neutral として分類した。

2. 脳内自己刺激と刺激誘発鎮痛の関連

Sm 核内 15 例のうちで ICSS positive の例は 7 例認められ、ICSS neutral の例は 8 例であった (Fig.

Fig. 1 Examples of lever press recording of ICSS. When the rat pressed the lever, a pellet was given during feeding session, then intracranial stimulations were applied. **A**: no electrical stimulation to the brain; **B**: electrical stimulation applied to the sites of closed circle in the brain map (ICSS positive); **C**: closed triangle (ICSS neutral). Sm: submedialis nucleus

2A)。SPA の効果について比較してみると、ICSS positive の部位に関しては、tail flick 潜時の顕著な延長が 7 例中 2 例、延長が 1 例みられ、他の 4 例では変化は認められなかった。formalin test では stim 中に licking 期間が減少した例は 7 例中 6 例みられ、そのうち 5 例では after においても刺激効果が持続した (Fig. 2B, C 上のグラフ)。一方、ICSS neutral の部位に関しては、tail flick 潜時の延長は 8 例中 1 例認められ、他の 7 例では変化はなかった。formalin test では stim 中に licking 期間が減少した例は 8 例中 5 例みられたが、その効果は持続せず after においては pre に戻る傾向が観察された (Fig. 2B, C 下のグラフ)。Sm 核内においては、ICSS positive の部位が、tail flick test と formalin test において脳内通電刺激が効果的である傾向が認められた。

Sm 核周囲では、ICSS positive は 7 例、ICSS neutral は 8 例で散在して認められたが、視床下部背側野の 5 例では、ICSS positive は 1 例も認められなかった (Fig. 3A)。これらの部位での SPA の効果について比較してみると、ICSS positive の部位に関しては、tail flick 潜時の延長が 7 例中 2 例みられ、他の 5 例では変化は認められなかった。formalin test

Fig. 2 Relationship between ICSS and SPA in the Sm. **A**: closed circles in the brain map indicate the sites of ICSS positive and open circles indicate the ICSS neutral. **B**: effects of electrical stimulation on the tail flick test. Upper figure shows the results of ICSS positive sites ($n=7$) and lower figure shows that of ICSS neutral sites ($n=8$). **C**: effects of electrical stimulation on the licking duration in the formalin test. See text for more detailed explanation.

Fig. 3 Relationship between ICSS and SPA in the sites around the Sm. Details are the same in the Figure 2.

では stim 中は全例で licking 期間が減少し、そのうち 4 例では after においても抑制効果が持続した。一方、ICSS neutral の部位に関しては、tail flick 潜時の延長は 8 例中 2 例認められ、他の 6 例では変化はなかった。formalin test では stim 中に licking 期間が

減少した例は 8 例中 6 例みられ、この 6 例はすべて after も効果を持続した (**Fig. 3B, C**)。これら Sm 核周囲では、tail flick test と ICSS との関連は認められなかった。formalin test では stim 中は ICSS positive の方が抑制する例が多いが、after ではむしろ ICSS

neutral の部位で効果が持続する例が多く、ICSS と SPA との関連は認められなかった。

考 察

1. 脳内自己刺激

Olds らは、間脳とその隣接領域における報酬系および罰系の経路に関する詳細な検討を行い、報酬系は視床下部の外側に位置する内側前脳束の走行と一致することを明らかにし、視床内側核群では報酬系と嫌悪系が混在していると報告している¹¹⁾。その後、Clavier らは視床内に限局して ICSS の実験を行い、視床の腹内側核 (VM) や髄板内核群で positive な ICSS を認めたが、Sm 核での ICSS は 1 例で、neutral と分類していた³⁾。今回の実験の結果では Sm 核を含む視床内側核群において ICSS positive と neutral は混在していたが、Sm 核では約半数 (7/15) の部位で ICSS が認められ、ICSS negative は 1 例のみであった。このことは、Sm 核と痛みの情動面との密接な関連性を示唆する神経解剖学的な知見からは予想外の結果であるが、内因性鎮痛系との関連からは興味深いものである。また、これらの部位の中には、定型行動を伴いながらレバー押し行動をする例がみられた。自らレバーを押した後レバーから遠ざかる行動は、この部位の脳内通電刺激が単純な報酬的意味だけでないことを示唆しており、より複雑な反応が生じていると考えられた。

2. 刺激誘発鎮痛

tail flick test の結果では、Sm 核の 2 例で著明な潜時の延長が認められたが、全体としては顕著ではなかった。Zhang らは、麻酔下のラットの Sm 核腹側部の通電刺激により、tail flick 潜時の延長したことを報告している¹⁸⁾。しかし、Roberts らは、Sm 核を破壊した覚醒下のラットで、脊髄よりも上位の中枢が関与しているとされる vocalization を誘発させる通電刺激閾値は下がるが、tail flick の潜時は変化がなかったと報告している¹³⁾。両報告の結果が異なった理由としては、刺激実験と破壊実験という実験方法の違いや、麻酔下と覚醒下という実験条件の違いなどが考えられる。formalin test の結果では、脳内通電刺

激期間中はいずれの刺激部位でも licking 行動が抑制される傾向にあり、部位や効果に差は認められなかった。その理由として、通電刺激が licking 行動に直接影響を与えた可能性や、通電刺激強度を 200 μ A で 30 秒間の一定条件下で行ったことなどが考えられる。しかし、脳内通電刺激後も抑制効果が持続した部位においては、その刺激が鎮痛をもたらしたものと考えられた。Sm 核通電刺激の影響を formalin test を用いて調べた報告は本研究が最初であり、今回の結果は Sm 核と痛覚の情動面の関連から大変興味深いものである。

今回、SPA の指標として tail flick test と formalin test を用いた結果、後者で鎮痛を示す例が多く観察された。従来 SPA の研究で用いられてきた tail flick test のような脊髄反射²⁾と、より高次の中枢が関与するとされている formalin test では、鎮痛機序が異なることが指摘されており¹⁾、Sm 核がより高次の中枢に対して作用することを示唆している。

3. 視床内側下核における脳内自己刺激と刺激誘発鎮痛の関連

今回の実験で、Sm 核内の ICSS positive の部位と、neutral の部位では、刺激直後の tail flick 潜時と formalin test の after で通電刺激の効果に違いがみられ、ICSS positive の方が、より鎮痛効果が顕著な例が多かった。このことから、Sm 核における SPA と ICSS には何らかの関連のあることが示唆された。一方、Sm 核周囲では明らかな関連は認められなかった。ICSS positive 領域と SPA 領域の関係について、Mayer らは、ICSS と SPA は関連がなかったとしている⁸⁾。しかし、Dennis らは、PAG 腹側部において ICSS と formalin test を用いた SPA に対しては強い関連があると報告している⁵⁾。また、黒質 (substantia nigra) や青斑核 (locus coeruleus) においても ICSS と SPA の部位が一致する部位もあるという報告もみられ¹⁴⁾、見解は一致していない。一方、痛みの中継核として弁別相に関与するとされる視床腹側基底核群は、ICSS においても neutral であり⁸⁾、また、SPA を生じないという報告がある⁹⁾。Sumiya らも、直腸結腸の伸展刺激で誘発される外腹

斜筋の筋電活動に Sm 核の通電刺激では抑制が認められるが、腹側基底核群では抑制は認められなかったとしている¹⁶⁾。これらの結果は、痛覚の中継核が必ずしも鎮痛系や報酬系と関連していないことを示すものである。

今回の実験により Sm 核において ICSS と SPA が一致する部位が認められ、Sm 核における痛覚情報処理過程において鎮痛系および報酬系と関連した修飾が行われている可能性が示唆された。

文 献

- 1) Abbott, F. V. and Melzack, R., Dissociation of the mechanisms of stimulation-produced analgesia in tests of tonic and phasic pain, In: J. J. Bonica (Eds.), *Advances in Pain Research and Therapy*, Vol. 5, Raven Press, New York, 1983, pp. 401-409.
- 2) Bonnycastle, D. D., Cook, L. and Ipsen, J., The action of some analgesic drugs in intact and chronic spinal rats, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **9** (1953) 332-336.
- 3) Clavier, R. M. and Gerfen, C. R., Intracranial self-stimulation in the thalamus of the rat, *Brain Res. Bull.*, **8** (1982) 353-358.
- 4) Craig, A. D. and Burton, H., Spinal and medullary lamina I projection to nucleus submedialis in medial thalamus: a possible pain center, *J. Neurophysiol.*, **45** (1981) 443-466.
- 5) Dennis, S. G., Choiniere, M. and Melzack, R., Stimulation-produced analgesia in rats: assessment by two pain tests and correlation with self-stimulation, *Exp. Neurol.*, **68** (1980) 295-309.
- 6) Dubuisson, D. and Dennis, S. G., The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats, *Pain*, **4** (1977) 161-174.
- 7) Kawakita, K., Dostrovsky, J. O., Tang, J. S., and Chiang, C. Y., Responses of neurons in the rat thalamic nucleus submedialis to cutaneous, muscle, and visceral nociceptive stimuli, *Pain*, **55** (1993) 327-338.
- 8) Mayer, D. J. and Liebeskind, J. C., Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain: an anatomical and behavioral analysis, *Brain Res.*, **68** (1974) 73-93.
- 9) Morgan, M. J. and Franklin, K. B. J., Stimulation-produced analgesia (SPA) from brain-stem and diencephalic sites in the rat: relationships between analgesia, aversion, seizures and catalepsy, *Pain*, **33** (1988) 109-121.
- 10) Olds, J. and Milner, P., Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain, *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **47** (1954) 419-427.
- 11) Olds, M. E. and Olds, J., Approach-avoidance analysis of rat diencephalon, *J. Comp. Neurol.*, **120** (1963) 259-295.
- 12) Paxinos, G. and Watson, C., *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd edition, Academic Press, Inc., San Diego, 1986.
- 13) Roberts, V. J. and Dong, W. K., The effect of thalamic nucleus submedialis lesions on nociceptive responding in rats, *Pain*, **57** (1994) 341-349.
- 14) Sandberg, D. E. and Segal, M., Pharmacological analysis of analgesia and self-stimulation elicited by electrical stimulation of catecholamine nuclei in the rat brain, *Brain Res.*, **152** (1978) 529-542.
- 15) Sumiya, E., Response characteristics of the rat thalamic submedialis nucleus and effects of the conditioning stimulation of the ventrolateral orbital cortex, *Bull. Meiji Coll. Orient. Med.*, **14** (1994) 89-98.
- 16) Sumiya, E., Murase, K., Okada, K. and Kawakita, K., Role of the nucleus submedialis in the endogenous pain inhibitory mechanisms of the rat, *Pain Res.*, **12** (1997) 21-26.
- 17) Yoshida, A., Dostrovsky, J. O. and Chiang, C. Y., The afferent and efferent connections of the nucleus submedialis in the rat, *J. Comp. Neurol.*, **324** (1992) 115-133.
- 18) Zhang, Y. Q., Tang, J. S., Yuan, B. and Jia, H., Inhibitory effects of electrical stimulation of thalamic nucleus submedialis area on the rat tail flick reflex, *Brain Res.*, **696** (1995) 205-212.
- 19) Zhang, Y. Q., Tang, J. S. and Yuan, B., Inhibitory effects of electrical stimulation of thalamic nucleus submedialis of the nociceptive responses of spinal dorsal horn neurons in the rat, *Brain Res.*, **737** (1996) 16-24.

Address for correspondence: Kenji Kawakita, Ph.D., Department of Physiology, Meiji University of Oriental Medicine, Hiyoshi-cho, Funai-gun, Kyoto 629-03, Japan.

Tel : +81-771-72-1181 (ext. 275)

Fax : +81-771-72-0326