

修士論文

炎症性疼痛ラットの腰髄後角における TNF- α 誘導性 ASK1-JNK1 経路の活性化

平成 24 年 1 月 16 日提出

領域	理学療法・作業療法学
分野	理学療法学
指導教員	米 和徳
学籍番号	4710820141
氏名	用皆 正文

緒言

変形性関節症、関節リウマチ、肩関節周囲炎等の炎症性疾患は、関節や筋肉、腱等の末梢組織の持続性炎症により疼痛を惹起する。これら炎症性疼痛は、通常では疼痛を感じない程度の刺激によって生じる疼痛であるアロディニア (Allodynia) と、疼痛増強反応である痛覚過敏 (Hyperalgesia) を来すことがある。特にアロディニアは痛覚過敏と比較して、進行性かつ持続性である為¹⁾²⁾、罹病者の日常・社会生活の支障や Quality of life (QOL) の低下をもたらすだけでなく、理学療法を実施、進行する際の阻害因子となる。

近年、運動器炎症性疾患に伴うアロディニアの原因の一つに、脊髄内反応性アストロサイトにおける細胞内シグナル伝達物質である Mitogen-activated protein kinase (MAPK; 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ) の一つ、c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1; c-Jun N 末端キナーゼ 1) の関与が示唆されている¹⁾。しかし、脊髄内反応性アストロサイトにおける JNK1 の上流に位置するシグナル伝達物質とその誘導物質は、特定されておらず、本経路を解明することは、持続性の炎症性疼痛に対する理学療法の生体内効果を科学的に検証、証明し、そのメカニズムを理解、説明する上で、一つの指標となりうると考えられる。

そこで、今回、JNK1 の上流に位置するシグナル伝達物質である Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) の一つ、Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1; アポトーシスシグナル調節キナーゼ 1) とその強力な誘導物質である Tumor necrosis factor- α (TNF- α ; 腫瘍壊死因子- α) に着目し、炎症性疼痛ラットモデルを使用して、末梢炎症後の腰髄後角内での TNF- α 誘導性 ASK1-JNK1 経路の活性化を明らかにする為に、TNF- α 、Phospho ASK1 (pASK1; 活性型 ASK1)、Phospho JNK1 (pJNK1; 活性型 JNK1)、反応性アストロサイト (Glial fibrillary acidic protein、GFAP; グリア線維性酸性タンパク質) の発現と pASK1、pJNK1 の反応性アストロサイトでの発現の有無を観察した。

実験動物

実験動物は、雄性 Wistar 系統ラットを 18 匹（9 週齢，体重 280～330g，九動株式会社，佐賀）を使用した（図 1）。15 匹に Complete Freund's Adjuvant (CFA；完全フロイントアジュバント) を右側後肢足底に注入した。CFA 注入後 7 日後と 17 日後、28 日後に各 5 匹を屠殺し、それぞれ CFA7 日群、CFA17 日群、CFA28 日群とした。また、3 匹には何ら処置を加えず対照群とした。



図 1. Wistar 系統ラット

全ラット群は、照明が午前 7 時点灯、午後 7 時消灯（12：12 時間の明暗サイクル）にセットされ、一定の温度（23℃）、湿度（55±10%）、換気回数（10 回/時）に保持された環境下で、ラット飼育用ケージ（縦×横×高さ：33.0×38.0×18.0 cm，日本クレア株式会社，東京）内に 2～3 匹ずつ飼育した。固形飼料と水分（給水瓶使用）は、自由に摂取可能とした。

尚、本実験は鹿児島大学医学部動物実験委員会の承認（承認番号：第 M11005 号）を得て、実施された研究である。

方法

1. 片側後肢足部への局所炎症誘発

起炎剤は、CFA を使用した。今回使用した CFA (F 5881, Sigma-Aldrich, USA) は、加熱殺菌及び乾燥させたヒト型結核死菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, 1mg, H37Ra) をパラフィンオイル (0.85mL) とモノオレイン酸マンニド (0.15mL) に加えて作製されている。CFA 誘発炎症性疼痛モデルとして、皮下に投与すると、ヒト関節リウマチ様の特徴を示した多発性関節炎を誘発し、疾病原因と治療薬開発の為に国際的に、長年使用されている³⁾⁴⁾⁵⁾。関節炎の重症度は、CFA 含有ヒト型結核菌の用量に依存的であり、中等度用量 (0.15mg) にて、片側局所炎症とアロディニアを処置後 30 日間、誘発可能である⁶⁾⁷⁾。

ラットの腹腔内に 21G 注射針付シリンジ (テルモ株式会社, 東京) にてペントバルビタールナトリウム (4mg/ラット体重 100g, 大日本製薬株式会社, 大阪) の投与による麻酔を行った後、27G 注射針付シリンジ (テルモ株式会社, 東京) を右側後肢足底の足横幅中央部、足底遠位 1/3 部より刺入し、皮下部 (足横幅中央部、足底近位 1/3 部) に CFA を 0.15mL 注入した (図 2)。



図 2. 後肢足底皮下部への CFA 注入

2. 形態学的検査

2-1. 平均摂水・摂餌量、体重

給水・給餌量、残水・残餌量は、各群に対し、電子天秤 (L 2200 S, ザルトリウス株式会社, Germany) 上のプラスチックケース (縦×横×高さ: 17.0×24.0×12.0 cm, 日本クレア株式会社, 東京) に、給水瓶、または固形飼料を載せて、CFA 処置前から処置後 28 日まで、毎日、定時間帯 (午前 9 時～午後 3 時) に測定した。

平均摂水・摂餌量は、1 日の総摂水・摂餌量 (前日の給水・給餌量－当日の残水・残餌量) をラット匹数と摂水・摂餌期間で除算し、ラット 1 匹当たりの 1 日の平均残水・残餌量 (g/日) を算出した。摂水・摂餌期間は、対照群が残水・残餌量測定開始日から屠殺日までの 7 日間、そして、CFA7 日群、CFA17 日群、CFA28 日群が CFA 注入後 1 日目から屠殺日までの日数、各々、7 日間、17 日間、28 日間とした。

体重測定は、電子天秤上のプラスチックケースにラットを入れて、無麻酔下にて測定した。

2-2. 両後肢足部厚

両後肢足部厚は、各群に対し、無麻酔下にて、足底近位 1/3 部をノギス（シンワ測定株式会社，新潟）を使用して、CFA 注入前、注入後 7，17，28 日の定時間帯（午前 9 時～午後 3 時）に測定した（図 3）。



図 3. ノギスによる後肢足部厚の測定

2-3. 運動学的評価

運動学的評価は、各群に対し、無麻酔下にステンレス製の台（縦×横：45.0×75.0cm）上にて、CFA 注入前から注入後 28 日まで、毎日、定時間帯（午前 9 時～6 時）に実施した。

ラットは、Nagakura ら²⁾の運動学的評価法を使用して、移動時の四肢の足底接触程度により評価した。

- 6 点：正常移動（CFA 注入側後肢の中足底を床に完全に接触して移動）（図 4）。
- 5 点：同側後肢足底を保護して移動（CFA 注入側後肢の中足底を床に不十分に接触して移動）（図 5）。
- 4 点：同側後肢足底を保護して移動（CFA 注入側後肢の足趾のみを床に接触して移動）。
- 3 点：両側後肢足底を保護して移動（CFA 非注入側後肢の中足底を床に不十分に接触して移動）。
- 2 点：両側後肢足底を保護して移動（CFA 非注入側後肢の足趾のみを床に接触して移動）。
- 1 点：前肢使用にて、這う。
- 0 点：動かない。



図 4. CFA 注入前の後肢足部
Nagakura らの運動学的評価法の 6 点を示す。



図 5. CFA 注入後の後肢足部
Nagakura らの運動学的評価法の 5 点を示す。

2-4. 両後肢疼痛反応閾値検査

無麻酔下に von Fley フィラメント (NC12775-99, Stoelting, USA) を使用して、CFA 注入前から注入後 28 日まで、毎日、定時間帯 (午前 9 時～午後 3 時) に両後肢疼痛反応閾値を測定した。

検査前に、ラットをプラスチック製スタンド (縦×横×高さ : 24.0×39.0×17.5cm, 大創産業株式会社, 広島) に敷いた金網 (縦×横 : 22.5×22.5cm, 網の厚さ : 1.0mm, 網の間隔 11.0mm, 大創産業株式会社, 広島) 上のプラスチック製ケース (縦×横×高さ : 13.3×23.0×13.4cm, 大創産業株式会社, 広島) 内に入れ、探索活動や毛繕いの終了する 15 分間順応させた (図 6)。



図 6. プラスチック製ケース内に順応させたラット

Von Fley フィラメント (図 7) は、異なる刺激強度 (0.4g、0.7g、1.2g、1.5g、2.0g、3.6g、5.5g、8.5g、11.7g、15.1g、28.8g) を 11 本準備し、プラスチック製スタンドの底部より、ラット後肢後足底表面 (中足底～踵部) に垂直に 6 秒間、フィラメントが屈曲するまで押し付け (図 8)、逃避反応 (Withdrawal response) の有無を観察した。逃避反応は、刺激した足部を引っ込める反応を陽性反応と判定した。その際のラットの移動は、不明瞭な反応とみなし、再検査した。検査方法は、国際的に多用されている up-down 方法⁸⁾を使用して、準備した 11 本の von Fley フィラメントの中から、最初に中間刺激強度の von Fley フィラメント (刺激強度 3.6g) から開始し、逃避反応陽性時、次に弱い von Fley フィラメントで刺激し、逃避反応陰性時、次に強い von Fley フィラメントで刺激した。そして、最初に閾値を越えた時点、すなわち、逃避反応陽性から逃避反応陰性、あるいは逃避反応陰性から逃避反応陽性へと変化した前後の 2 反応を最初の 2 回の反応とし、その後 4 回、合計 6 回、反復刺激した。



図 7. Von Fley フィラメント



図 8. 足底刺激の様子

疼痛反応閾値 (逃避反応 50%g 閾値) は、最終使用時の von Fley フィラメントの刺激強度 (対数値 ; X_f)、6 回の陽性・陰性反応パターンに関する表値 (k)⁹⁾、準備した 11 本の von Fley フィラメント間の刺激強度 (対数値 ; δ) の差の平均値から、以下の計算式にて挿入して算出した。計算式は、疼痛反応閾値 (逃避反応 50%g 閾値) = $(10^{[X_f + k \delta]}) / 10000$ である⁹⁾。

3. 試料採取と切片作製

ラットは、ペントバルビタールナトリウム（大日本製薬株式会社，大阪）を腹腔内過剰投与により安楽死させ、左心室を通じて、ヘパリンナトリウム（味の素株式会社，東京）加生理食塩水（ヘパリン 5 単位/mL）にて脱血灌流後、4%パラホルムアルデヒド（和光純薬工業株式会社，大阪）/0.1M リン酸緩衝液（pH7.4）にて灌流固定した。次に胸腰髄移行部、両後肢足部（両脛距関節より遠位）を摘出し、4%パラホルムアルデヒド/0.1M リン酸緩衝液（pH7.4，4℃）に 1 日間、浸漬固定した。

腰髄膨大部の最大部（第 3 腰髄部）から尾側 5mm の部位を後肢足底部の髄節レベルである第 5 腰髄部として摘出した¹⁰⁾（図 9）。摘出した標本は、自動包埋機器（サクラ ロータリーRH-12DM，株式会社千代田製作所，長野）にてパラフィン包埋し、パラフィン包埋ブロック作製装置（ティシュー・テック ディスペンシング・コンソールIV，株式会社千代田製作所社，長野）にて包埋ブロックを作製後、マイクローム（TU-213 大型滑走式マイクローム，大和光機工業株式会社，埼玉）にて厚さ 5 μ m の連続横断切片を作製した。

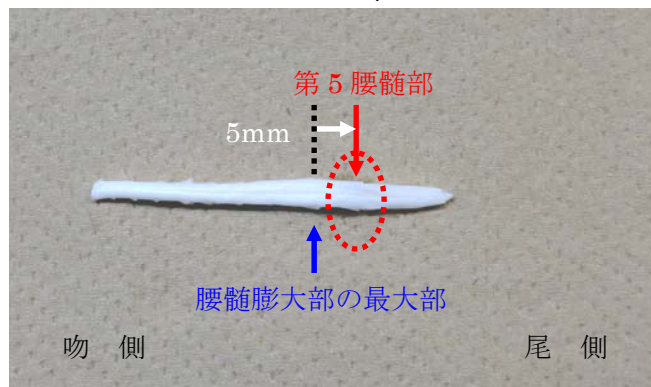


図 9. 第 5 腰髄部摘出部位

両後肢足部は、蒸留水洗浄後、脱灰液カルキトックス（和光純薬工業株式会社，大阪）に 3 週間浸漬（3 日毎に新鮮液交換）した。その後、5%硫酸ナトリウム溶液（和光純薬工業株式会社，大阪）に 1 日間浸漬し、蒸留水にて洗浄した。これらの標本を自動包埋機器にてパラフィン包埋し、パラフィン包埋ブロック作製装置にて包埋ブロックを作製後、マイクロームにて、足底部に平行な厚さ 5 μ m の連続横断切片を作製した。

4. 組織学的・免疫学的観察

4-1. ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色)

腰髄後角部の感覚神経細胞形態観察と処置側（右側）後肢足底部（皮下組織）の炎症性免疫細胞浸潤、観察の為、HE 染色を実施した。

HE 染色は、脱パラフィン後、蒸留水洗浄、マイヤーヘマトキシリン溶液（和光純薬工業株式会社，大阪）に 10 分間、浸漬、流水洗浄、1%エオシナルコール液（武藤化学株式会社，東京）に 30 秒間、浸漬、脱水、封入した。

4-2. Nissl 染色

腰髄後角部の感覚神経細胞形態観察の為、Nissl 染色を実施した。

Nissl 染色は、脱パラフィン後、乾熱滅菌器（MOV-112S，三洋電機バイオメディカ株式会社，大阪）にて 37℃に維持し、70%エタノール（和光純薬工業株式会社，大阪）に 1 日間浸漬した。翌日、乾熱滅菌器にて 37℃に維持し、クレシールバイオレット液（武藤化学社，東京）に 10 分間浸漬し、蒸留水にて洗浄した。さらに、70%エタノールと 0.3%酢酸（和光純薬工業株式会社，大阪）エタノールに浸漬した後、脱水、封入を実施した。

4-3. クリューバー・バレラ染色 (KB 染色)

腰髄部の有髄神経線維髄鞘の形態観察の為、KB 染色を実施した。

KB 染色は、脱パラフィン、流水洗浄、95%エタノール浸漬後、乾熱滅菌器にて 56℃に維持し、ルクソール・ファストブルー染色液（武藤化学株式会社，東京）に 1 日間浸漬した。翌日、室温冷却後、95%エタノール浸漬し蒸留水にて洗浄した。さらに、0.05%炭酸リチウム（和光純薬工業株式会社，大阪）水溶液と 70%エタノールに浸漬した後、蒸留水にて洗浄し、脱水、封入を実施した。

4-4. 免疫染色

腰髄部のサイトカイン、リン酸化タンパク質、アストロサイトの発現、形態観察の為、免疫染色を実施した。

切片は、脱パラフィン後、メタノール（和光純薬工業株式会社，大阪）含有 3% H_2O_2 （和光純薬工業株式会社，大阪）で内因性酵素（ペルオキシダーゼ）を不活性化し、10%スキムミルク（ビーンスターク・スノー株式会社，群馬）{一次抗体が抗 pASK1 抗体、抗 pJNK1 抗体の場合、非働化（乾熱滅菌器にて 56℃、30 分間インキュベート）後の 10%ヤギ血清（Dako, USA）} にてブロッキングした。その後、一次抗体の抗 TNF- α 抗体（1 : 100, Rabbit Polyclonal, Hycult biotech, Netherlands）、抗 pASK1 抗体（1 : 50, Rabbit Polyclonal, EnoGene Biotech, USA）、抗 pJNK1 抗体（1 : 10, Rabbit Polyclonal, アブカム株式会社，東京）、抗 GFAP 抗体（1 : 40000, Rabbit Polyclonal, Dako, USA）を

1 日間反応させた。その後、切片は抗体希釈液 (Dako, USA) で 2 倍希釈した二次抗体 (Dako EnVision+System-HRP Labelled Polymer, Dako, USA) を反応させ、Stable Peroxide Substrate Buffer (1×) (Thermo SCIENTIFIC, USA) で 10 倍希釈した DAB/Metal Concentrate (10×) (Thermo SCIENTIFIC, USA) で発色、蒸留水洗浄、脱水・透徹、封入を実施した。

4-5. 二重免疫蛍光染色

腰髄部のアストロサイト、オリゴデンドロサイト内の pASK1、pJNK1 発現を確認する為、蛍光二重免疫染色を実施した。

切片は、脱パラフィン後、非働化 (乾熱滅菌器にて 56°C、30 分間インキュベート) 後の 10% ヤギ血清 (Dako, USA) にてブロッキング後に、抗 pASK1 抗体 (1 : 50, Rabbit Polyclonal, EnoGene Biotech, USA)、抗 pJNK1 抗体 (1 : 10, Rabbit Polyclonal, アブカム株式会社, 東京)、0.01% TritonX-100 (ナカライテスク株式会社, 京都) リン酸緩衝液 (PBS, 1 : 10)、抗体希釈液に抗 GFAP 抗体 (1 : 300, mouse monoclonal, Thermo SCIENTIFIC, USA)、抗 OLIGODENDROCYTES 抗体 (1 : 50, mouse monoclonal, Chemicon, USA) をそれぞれ加え、一次抗体を作製し、1 日間反応させた。その後、切片は PBS 洗浄、暗室にて、Alexa fluor 568 Goat Anti-Rabbit IgG Antibodies (1 : 200, Molecular Probes, USA) と Alexa fluor 488 Labeled Dnnkey Anti-mouse IgG Antibodies (1 : 200, Molecular Probes, USA) を PBS で 200 倍希釈した二次抗体を反応させ、0.01% TritonX-100 リン酸緩衝液 (PBST) で洗浄、DAPI (1 : 500, 株式会社同仁化学研究所, 熊本) を加え、PBS 洗浄、風乾して水溶性封入剤 (Thermo ELECTRON CORPORATION, USA) で封入した。切片は、暗室にて共焦点レーザー顕微鏡 FV500 (オリンパス光学工業株式会社, 東京) で観察した。

4-6. 免疫染色 (pASK1、pJNK1) と Nissl 染色による二重染色

腰髄部の神経細胞内の pASK1 と pJNK1 発現を確認する為に、免疫染色 (pASK1、pJNK1) と Nissl 染色による二重染色を実施した。

切片は、脱パラフィン後、メタノール含有 3% H₂O₂ で内因性酵素 (ペルオキシダーゼ) を不活性化し、10% ヤギ血清にてブロッキング後に、抗 pASK1 抗体 (1 : 50, Rabbit Polyclonal, EnoGene Biotech, USA)、抗 pJNK1 抗体 (1 : 10, Rabbit Polyclonal, アブカム株式会社, 東京) を 1 日間反応させた。その後、切片は抗体希釈液で 2 倍希釈した二次抗体を反応させ、Stable Peroxide Substrate Buffer (1×) で 10 倍希釈した DAB/Metal Concentrate (×10) で発色、蒸留水洗浄後、乾熱滅菌器にて 60°C、1 日間、クレシールバイオレット液に浸漬した。翌日、70% エタノール浸漬後、脱水、封入を実施した。

5. 画像解析

第5腰髄の抗 TNF- α 抗体, 抗 pJNK1 抗体, 抗 pASK1 抗体, 抗 GFAP 抗体免疫染色切片は、生物顕微鏡 BX51TF・顕微鏡デジタルカメラ DP12 (オリンパス光学工業株式会社, 東京) を使用して写真撮影し、画像を Image J (Version 1.44p, National Institutes of Health, USA) にて、2 値化処理 (白黒画像転換) し、腰脊髄部の灰白質を前正中裂と後正中溝の中央線と中心管との直交線にて分画した腰髄片側後角 (Rexed 第 I ~ VI 層, 図 10) に対する各抗体陽性領域割合を算出した。

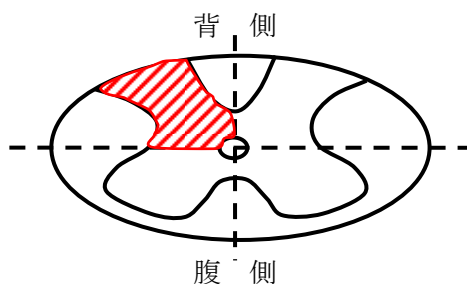


図 10. 腰髄横断面の計測箇所

図の赤色の斜線部分を腰髄片側後角として計測を実施した。

6. 統計処理

摂水・摂餌量、体重、両後肢足部厚、運動学的評価、両後肢疼痛反応閾値、抗体免疫反応陽性領域割合 (抗 TNF- α 抗体、抗 pASK1 抗体、抗 pJNK1 抗体、抗 GFAP 抗体) は、各群間比較の為に、正規性 (Shapiro-Wilk) 検定にて、正規分布に従う場合、等分散 (Levene) 検定を、正規分布に従わない場合、Kruskal-Wallis 検定を実施した。等分散 (Levene) 検定にて等分散を認めなかった場合、一元配置分散分析後、多重比較 (Tukey) 法を、等分散を認めなかった場合、Welch 検定後、多重比較 (Games-Howell) 法を実施した。また、足部厚、疼痛反応閾値、抗体免疫反応陽性領域割合 (抗 TNF- α 抗体、抗 pASK1 抗体、抗 pJNK1 抗体、抗 GFAP 抗体) は、各群内比較の為に、正規性 (Shapiro-Wilk) 検定にて、正規分布に従う場合、対応のある二標本 t 検定を、正規分布に従わない場合、Wilcoxon の符号付順位検定を実施した。さらに、In vivo における TNF- α 陽性領域割合と pASK1 陽性領域割合、pASK1 陽性領域割合と pJNK1 陽性領域割合、pJNK1 陽性領域割合と GFAP 陽性領域割合、GFAP 陽性領域割合と疼痛反応閾値との関連性を検証する為に、対照群と CFA7, 17, 28 日群 (両側) の全ラット後角において、正規性 (Shapiro-Wilk) 検定にて、正規分布に従う場合、Pearson の相関係数を、正規分布に従わない場合、Spearman の順位相関係数を算出した。

統計処理ソフトは、SPSS (Version 20.0, IBM, USA) を使用し、Kruskal-Wallis 検定にて、有意差を認めなかった場合、多重比較 (Steel-Dwass) 法を R コマンダー (Version 1.4-8) にて実施した。

尚、全ての統計手法の有意水準は、5%未満とした。

結果

1. 形態学的検査

1-1. 平均摂水量

対照群と CFA7, 17, 28 日群の平均摂水量 (g/日) の結果を図 11 に示す。

平均摂水量は、対照群 (n=3) 44.9 ± 11.3 g/日 (平均±標準偏差、摂水期間: 7 日間)、CFA7 日群 (n=5) 34.5 ± 3.0 g/日 (摂水期間: 7 日間)、CFA17 日群 (n=5) 50.8 ± 14.7 g/日 (摂水期間: 17 日間)、CFA28 日群 (n=5) 41.0 ± 7.4 g/日 (摂水期間: 28 日間) であった。

統計処理は、全群が正規性 (Shapiro-Wilk) 検定にて、正規分布に従わなかった為、Kruskal-Wallis 検定を実施し、有意差を認めた為、多重比較検定 (Steel-Dwass 法) を実施した。

平均摂水量は、対照群と比較して、CFA7, 17, 28 日群に有意な差を認めなかった。

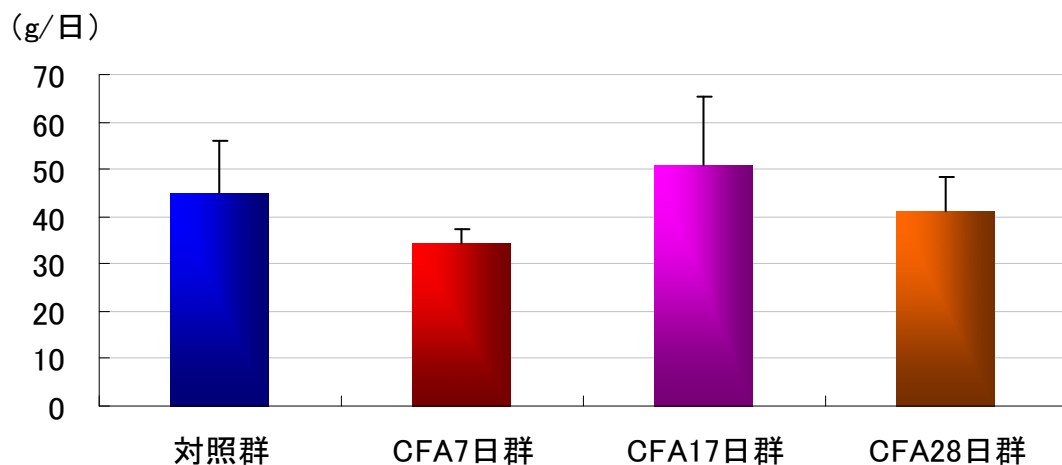


図 11. 対照群と CFA7, 17, 28 日群の平均摂水量 (g/日)

図は、各群の平均摂水量 (g/日) の平均と標準偏差を示している。

平均摂水量は、対照群と比較して、CFA7, 17, 28 日群に有意な差を認めなかった。

1-2. 平均摂餌量

対照群と CFA7, 17, 28 日群の平均摂餌量 (g/日) の結果を図 12 に示す。

平均摂餌量は、対照群 24.9 ± 3.6 g/日 (平均 \pm 標準偏差、摂餌期間: 7 日間)、CFA7 日群 22.4 ± 2.6 g/日 (摂餌期間: 7 日間)、CFA17 日群 23.4 ± 2.7 g/日 (摂餌期間: 17 日間)、CFA28 日群 21.3 ± 2.2 g/日 (摂餌期間: 28 日間) であった。

統計処理は、全群が正規性 (Shapiro-Wilk) 検定にて、正規分布に従わなかった為、Kruskal-Wallis 検定を実施し、有意差を認めた為、多重比較検定 (Steel-Dwass 法) を実施した。

平均摂餌量は、対照群と比較して、CFA28 日群に有意な減少を認めた ($P < 0.05$)。

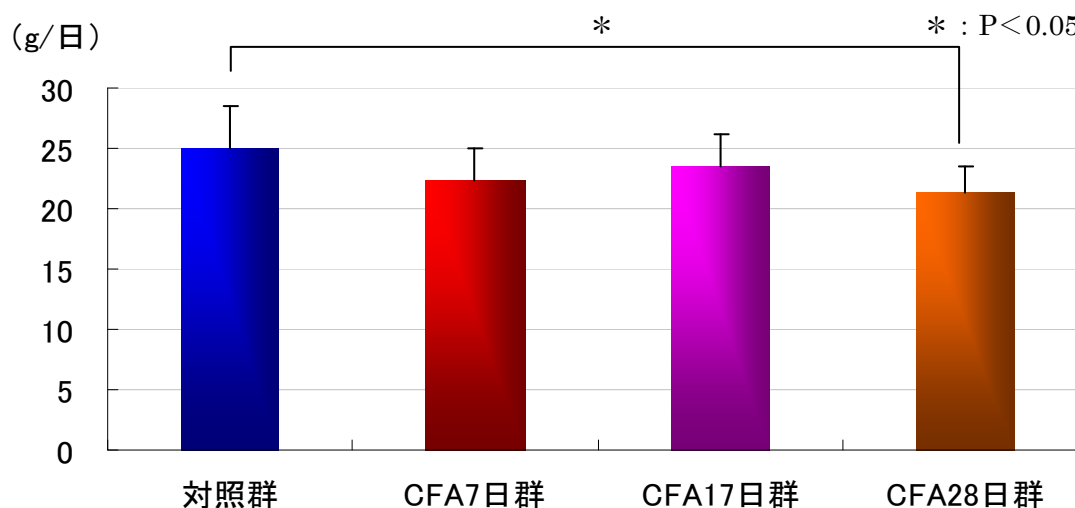


図 12. 対照群と CFA7, 17, 28 日群の平均摂餌量 (g/日)

図は、各群の平均摂餌量 (g/日) の平均と標準偏差を示している。

平均摂餌量は、対照群と比較して、CFA28 日群に有意な減少を認めた ($P < 0.05$)。対照群と CFA28 日群間の比較 ; $p = 0.01578$ 。

1-3. 体重

対照群と CFA7, 17, 28 日群の体重 (g) の結果を図 13 に示す。

体重は、対照群 $313.8 \pm 4.8\text{g}$ (平均 \pm 標準偏差)、CFA7 日群 $336.6 \pm 23.1\text{g}$ 、CFA17 日群 $389.6 \pm 23.7\text{g}$ 、CFA28 日群 $398.3 \pm 15.0\text{g}$ であった。

統計処理は、全群が正規性 (Shapiro-Wilk) 検定にて、正規分布に従った為、等分散 (Levene) 検定を実施し、等分散を認めた為、一元配置分散分析後、多重比較 (Tukey) 法を実施した。

体重は、対照群と比較して、CFA17, 28 日群に有意な増加を認めた (対照群と CFA17 日群間、対照群と CFA28 日群間 : 各々、 $P < 0.01$) 。

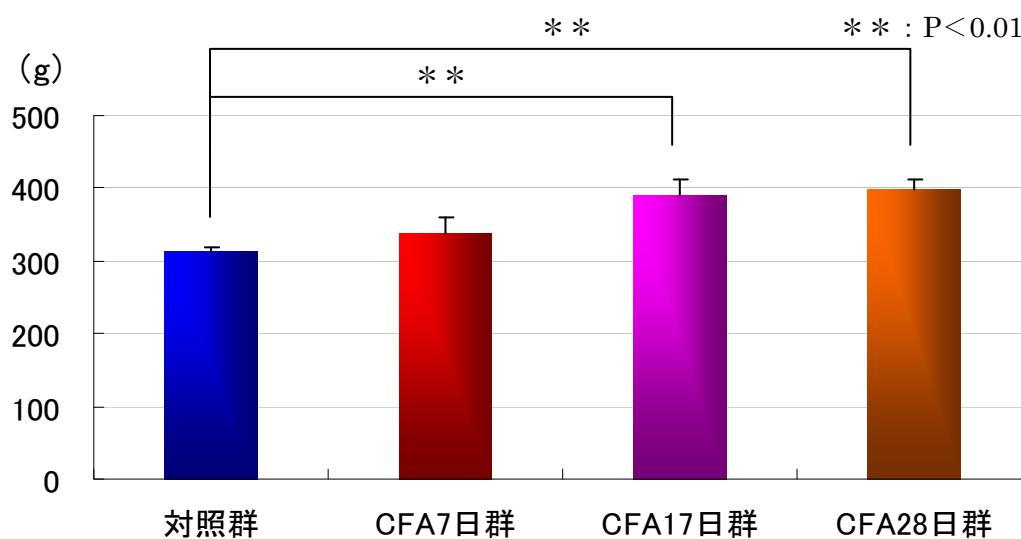


図 13. 対照群と CFA7, 17, 28 日群の体重 (g)

図は、各群の体重 (g) の平均と標準偏差を示している。

体重は、対照群と比較して、CFA17, 28 日群に有意な増加を認めた (対照群と CFA17 日群間、対照群と CFA28 日群間 : 各々、 $P < 0.01$)。対照群と CFA17 日群間の比較 : $p = 0.000545$ 、対照群と CFA28 日群間の比較 : $p = 0.000188$ 。

1-4. 両後肢足部厚

対照群と CFA7, 17, 28 日群の両後肢足部厚 (mm) の結果を図 14 に示す。

両後肢足部厚は、処置側が対照群 $6.1 \pm 0.1\text{mm}$ (平均 \pm 標準偏差)、CFA7 日群 $7.7 \pm 0.3\text{mm}$ 、CFA17 日群 $7.6 \pm 0.5\text{mm}$ 、CFA28 日群 $7.7 \pm 0.4\text{mm}$ 、非処置側が対照群 $6.2 \pm 0.4\text{mm}$ 、CFA7 日群 $6.2 \pm 0.3\text{mm}$ 、CFA17 日群 $6.3 \pm 0.2\text{mm}$ 、CFA28 日群 $6.2 \pm 0.2\text{mm}$ であった。

統計処理は、各群間比較において、両側とも全群が正規性 (Shapiro-Wilk) 検定にて、正規分布に従わなかった為、Kruskal-Wallis 検定を実施した。また、各群内比較において、対照群、CFA28 日群は、正規性 (Shapiro-Wilk) 検定にて、正規分布に従わなかった為、Wilcoxon の符号付順位検定を、CFA7, 17 日群は、正規分布に従った為、対応のある二標本 t 検定を実施した。

両後肢足部厚は、対照群と比較して、CFA7, 17, 28 日群に有意な増加を認めなかった。しかし、CFA7, 17, 28 日群内において、非処置側と比較して、処置側に有意な増加を認めた (CFA7 日群内、17 日群内：各々、 $P < 0.01$ 、CFA28 日群内： $P < 0.05$)。

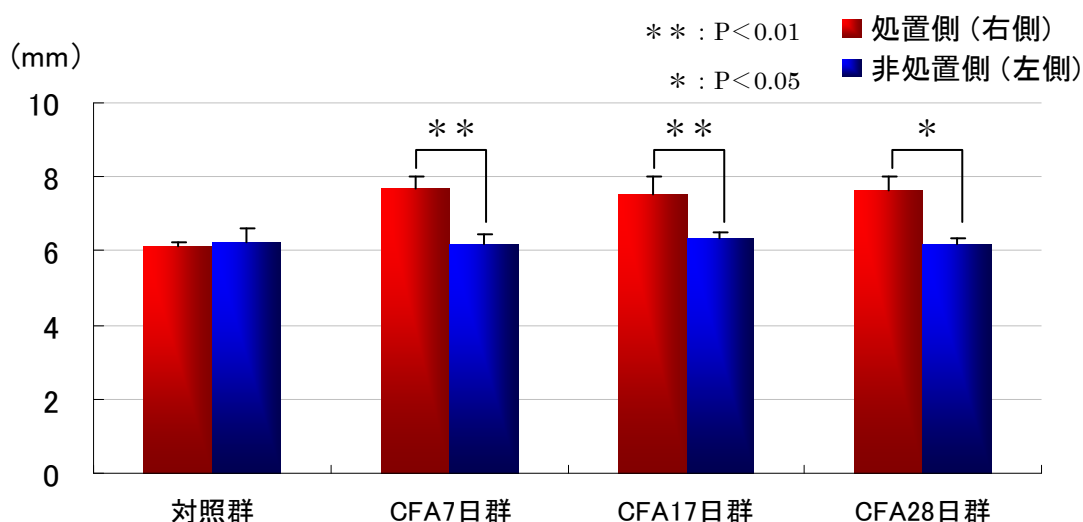


図 14. 対照群と CFA7, 17, 28 日群の両後肢足部厚 (mm)

図は、各群の両後肢足部厚 (mm) の平均と標準偏差を示している。

両後肢足部厚は、対照群と比較して、CFA7, 17, 28 日群に有意な増加を認めなかった。しかし、CFA7, 17, 28 日群内において、非処置側と比較して、処置側に有意な増加を認めた (CFA7 日群内、17 日群内：各々、 $P < 0.01$ 、CFA28 日群内： $P < 0.05$)。CFA7 日群内の処置側と非処置側の比較： $p = 0.003$ 、CFA17 日群内の処置側と非処置側の比較： $p = 0.004$ 、CFA28 日群内の処置側と非処置側の比較： $p = 0.042$ 。

1-5. 運動学的評価

対照群と CFA7, 17, 28 日群の運動学的評価 (点) の結果を図 15 に示す。

Nagakura らの運動学的評価における点数は、対照群 6.0 ± 0.0 点 (平均 \pm 標準偏差)、CFA7 日群 5.0 ± 0.0 点、CFA17 日群 5.0 ± 0.0 点、CFA28 日群 5.0 ± 0.0 点であった。

統計処理は、全群が正規性 (Shapiro-Wilk) 検定にて、正規分布に従わなかった為、Kruskal-Wallis 検定を実施し、有意差を認めた為、多重比較 (Steel-Dwass) 法を実施した。

運動学的評価における点数は、対照群と比較して、CFA7, 17, 28 日群に有意な増加を認めた (対照群と CFA7 日群間、対照群と CFA17 日群間、対照群と CFA28 日群間: 各々、 $P < 0.01$)。

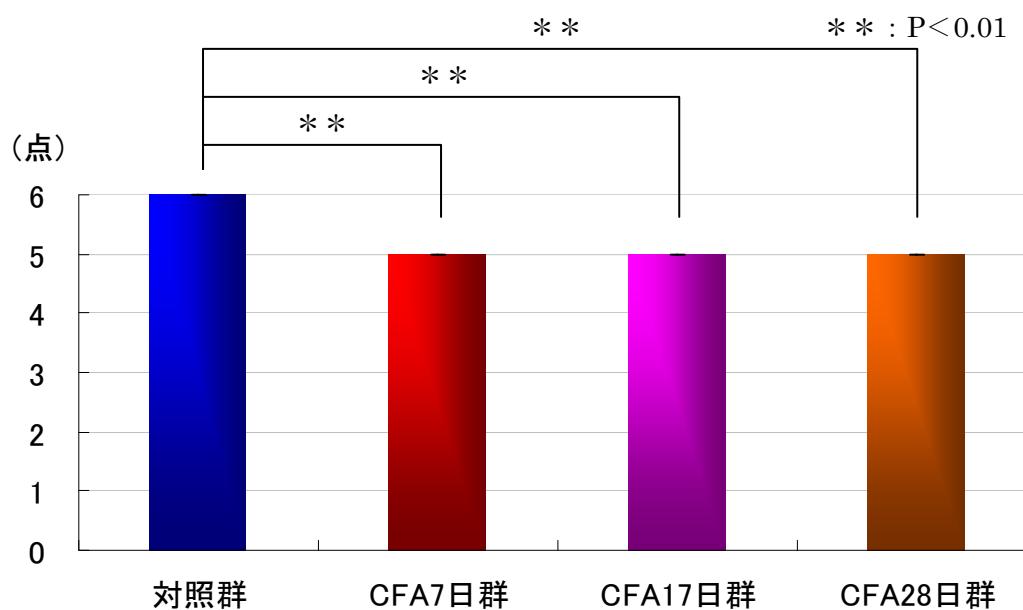


図 15. 対照群と CFA7, 17, 28 日群の運動学的評価 (点)

図は、各群の運動学的評価における点数の平均と標準偏差を示している。

運動学的評価の点数は、対照群と比較して、CFA7, 17, 28 日群に有意な増加を認めた (対照群と CFA7 日群間、対照群と CFA17 日群間、対照群と CFA28 日群間: 各々、 $P < 0.01$)。対照群と CFA7 日群間、対照群と CFA17 日群間、対照群と CFA28 日群間の比較: 各々、 $p = 0.000707$ 。

1-6. 両後肢疼痛反応閾値

対照群と CFA7, 17, 28 日群の両後肢疼痛反応閾値 (g) の結果を図 16 に示す。

両後肢疼痛反応閾値は、処置側が対照群 $28.8 \pm 0.0\text{g}$ (平均 \pm 標準偏差)、CFA7 日群 $16.5 \pm 8.3\text{g}$ 、CFA17 日群 $11.9 \pm 4.2\text{g}$ 、CFA28 日群 $9.8 \pm 5.6\text{g}$ 、非処置側が対照群 $28.8 \pm 0.2\text{g}$ 、CFA7 日群 $20.6 \pm 11.2\text{g}$ 、CFA17 日群 $12.7 \pm 10.9\text{g}$ 、CFA28 日群 $17.9 \pm 7.9\text{g}$ であった。

統計処理は、各群間比較において、処置側の全群が正規性 (Shapiro-Wilk) 検定にて、正規分布に従わなかった為、Kruskal-Wallis 検定を実施し、有意差を認められた為、多重比較 (Steel-Dwass) 法を実施した。また、非処置側の全群が正規性 (Shapiro-Wilk) 検定にて、正規分布に従わなかった為、Kruskal-Wallis 検定を実施し、有意差を認めなかった。各群内比較において、対照群、CFA7 日群は、正規性 (Shapiro-Wilk) 検定にて、正規分布に従わなかった為、Wilcoxon の符号付順位検定を、CFA17, 28 日群は、正規分布に従った為、対応のある二標本 t 検定を実施した。

両後肢疼痛反応閾値は、対照群と比較して、CFA7, 17, 28 日群に有意な低下は認めなかった。また、各群内において、非処置側と処置側間に有意な差を認めなかった。

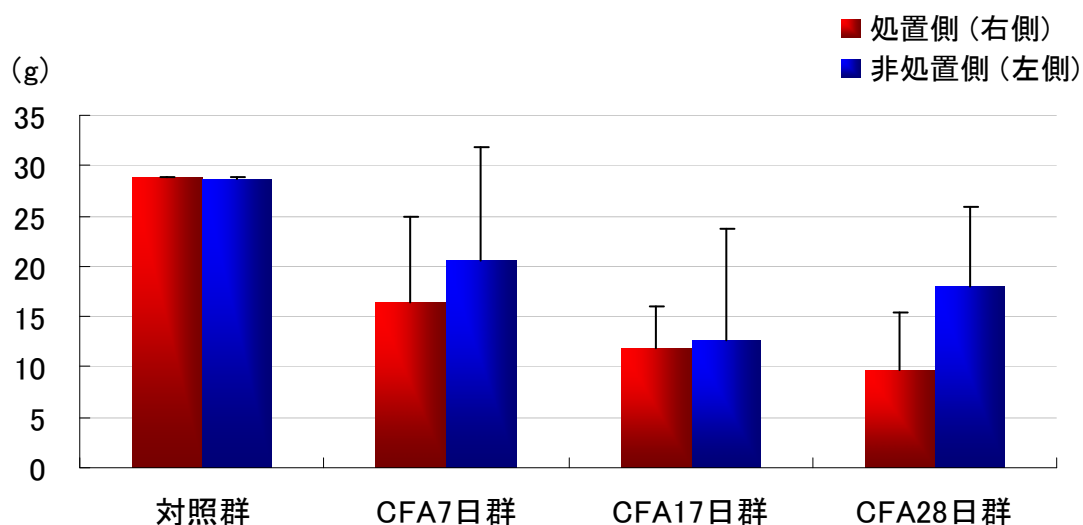


図 16. 対照群と CFA7, 17, 28 日群の両後肢疼痛反応閾値 (g)

図は、各群の両後肢疼痛反応閾値の平均 \pm 標準偏差を示す。

両後肢疼痛反応閾値は、対照群と比較して、CFA7, 17, 28 日群に有意な低下を認めなかった。また、各群内において、非処置側と処置側間に有意な差を認めなかった。

結果

2. 組織学的検査

2-1. HE 染色

2-1-1. 腰髄後角部の HE 染色

腰髄後角部（処置側）における対照群、CFA7, 17, 28 日群の写真を図 17 に示す。

腰髄後角部（両側）において、対照群、CFA7, 17, 28 日群間に神経細胞の形態学的な相違は、観察されなかった。

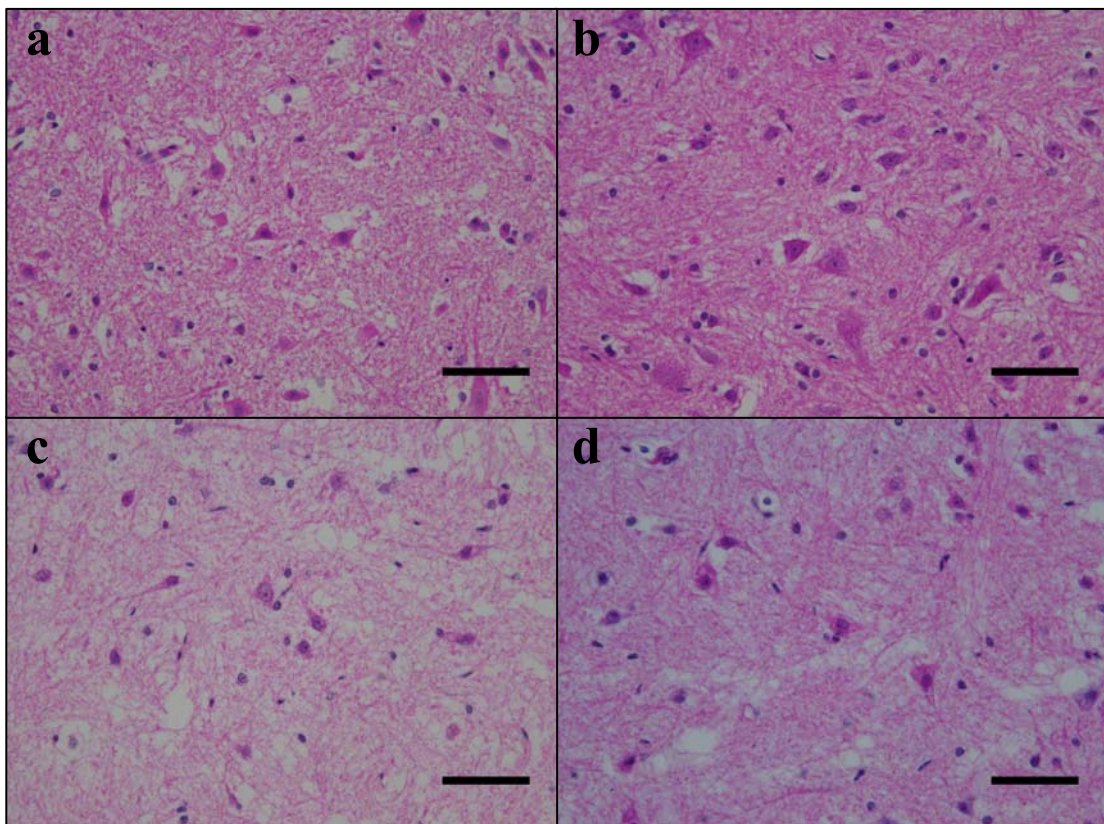


図 17. 腰髄後角横断面（処置側）の HE 染色写真

a : 対照群、b : CFA7 日群、c : CFA17 日群、d : CFA28 日群、Scale bars : 50 μ m
HE 染色により、腰髄後角の神経細胞（核：紫色、細胞質：赤色）が染色されている。

2-1-2. 後肢足底部の HE 染色

後肢足底部（処置側）における対照群、CFA7, 17, 28 日群の写真を図 18 に示す。

対照群の後肢足底部（皮下組織）において、炎症細胞浸潤は、観察されなかった。しかし、CFA7, 17, 28 日群の CFA 注入側に、顕著な炎症細胞浸潤が観察された。

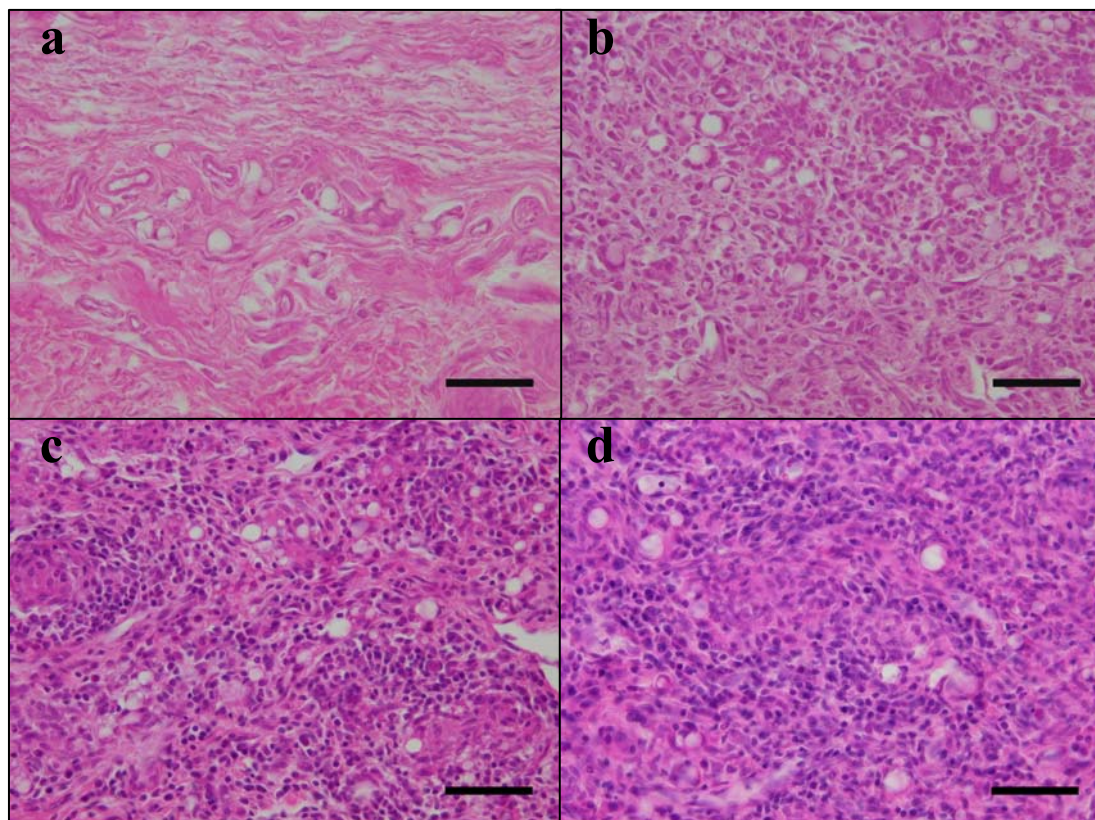


図 18. 後肢足部横断面（処置側）の HE 染色写真

a : 対照群、b : CFA7 日群、c : CFA17 日群、d : CFA28 日群、Scale bars : 50 μ m
HE 染色により、CFA7, 17, 28 日群の後肢足底部の炎症細胞（核：紫色、細胞質：赤色）が染色されている。

2-2. Nissl 染色

腰髄後角部（処置側）における対照群、CFA7, 17, 28 日群の写真を図 19 に示す。

腰髄後角部（両側）において、対照群、CFA7, 17, 28 日群間に神経細胞の形態学的な相違は、観察されなかった。

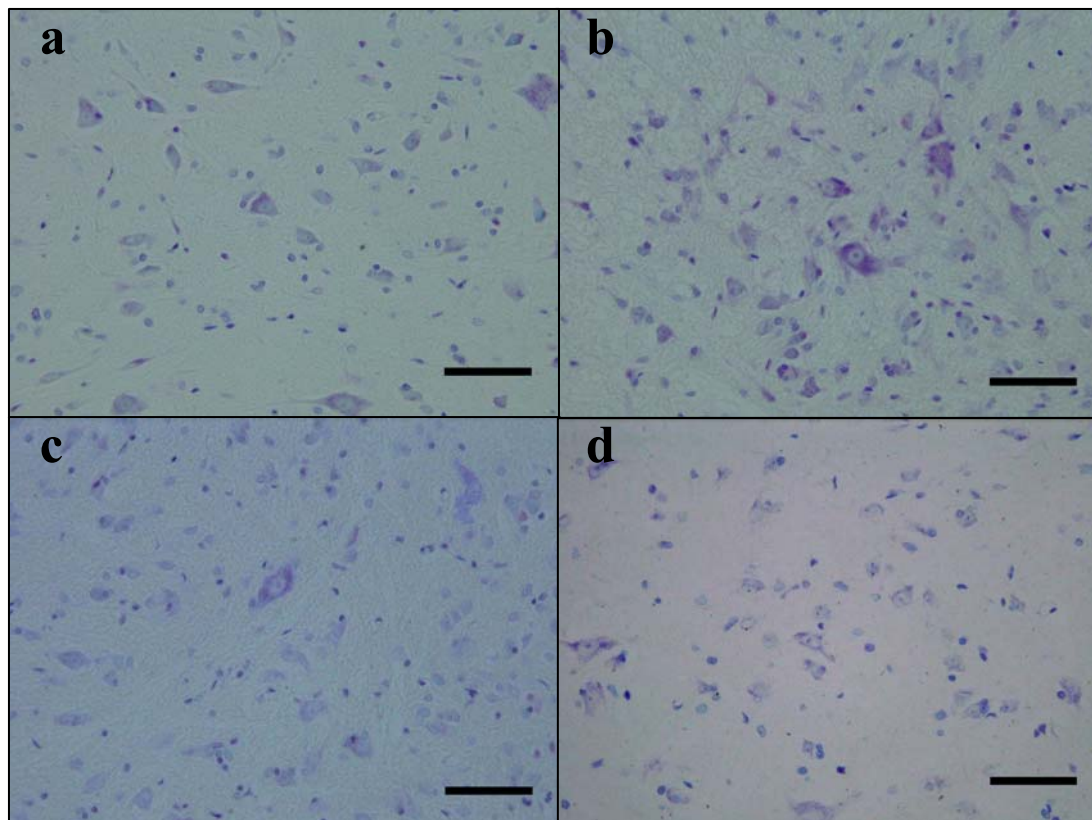


図 19. 腰髄後角横断面（処置側）の Nissl 染色写真

a : 対照群、b : CFA7 日群、c : CFA17 日群、d : CFA28 日群、Scale bars : 50 μ m

Nissl 染色により、腰髄後角の神経細胞（核小体と粗面小胞体：紫色）が染色されている。

2-3. KB 染色

腰髄後角部（処置側）における対照群、CFA7, 17, 28 日群の写真を図 20 に示す。

腰髄後角部（両側）において、対照群、CFA7, 17, 28 日群間に顕著な後側索の髄鞘の欠損は、観察されなかった。

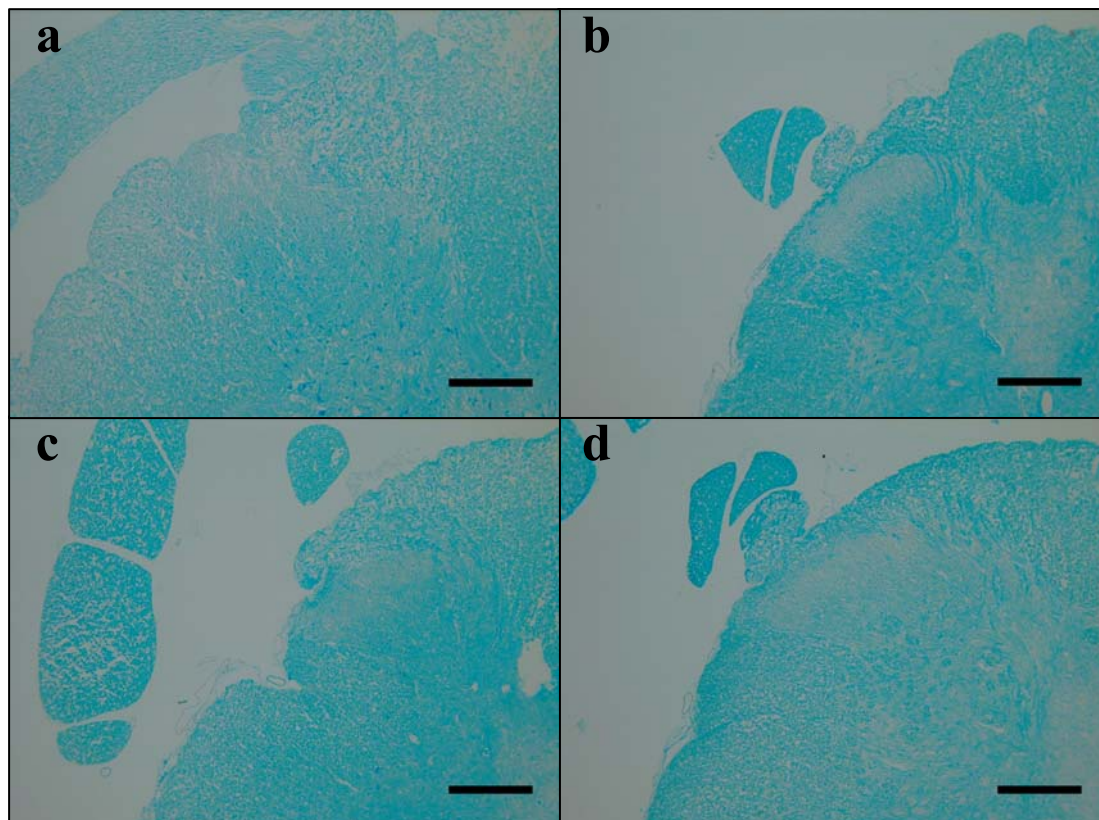


図 20. 腰髄後角横断面（処置側）の KB 染色写真

a : 対照群、b : CFA7 日群、c : CFA17 日群、d : CFA28 日群、Scale bars : 200 μ m
KB 染色により、腰髄の後側索（髄鞘：青色）が染色されている。

2-4. 抗 TNF- α 抗体免疫染色

腰髄後角（両側）における対照群と CFA7, 17, 28 日群の写真を図 21 に示す。

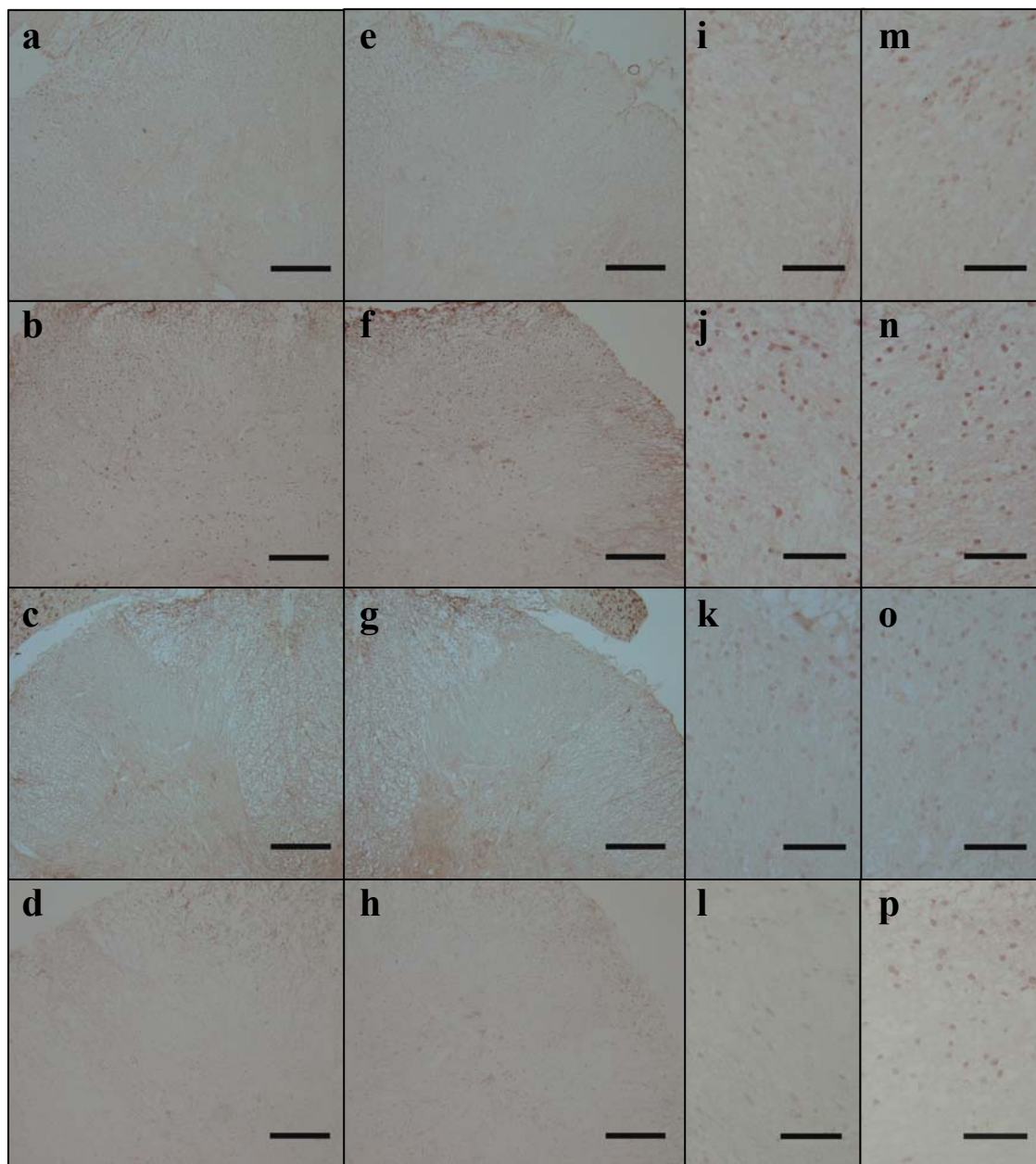


図 21. 腰髄後角（両側）横断面の抗 TNF- α 抗体免疫染色写真

図の a~h は片側後角全体、i~p は片側後角表層の拡大写真を示す。

処置側 a, i : 対照群、b, j : CFA7 日群、c, k : CFA17 日群、d, l : CFA28 日群

非処置側 e, m : 対照群、f, n : CFA7 日群、g, o : CFA17 日群、h, p : CFA28 日群

Scale bars : 200 μ m (a~h) 、50 μ m (i~p)

腰髄後角（両側）における対照群と CFA7, 17, 28 日群の TNF- α 陽性領域割合（%）の結果を図 22 に示す。

TNF- α 陽性領域割合は、処置側が対照群 $1.2 \pm 0.5\%$ （平均 \pm 標準偏差）、CFA7 日群 $4.8 \pm 1.8\%$ 、CFA17 日群 $2.9 \pm 1.3\%$ 、CFA28 日群 $2.2 \pm 0.9\%$ 、非処置側が対照群 $1.3 \pm 0.3\%$ 、CFA7 日群 $4.8 \pm 1.5\%$ 、CFA17 日群 $2.9 \pm 1.6\%$ 、CFA28 日群 $2.2 \pm 1.0\%$ であった。

統計処理は、全群が正規性（Shapiro-Wilk）検定にて、正規分布に従った為、等分散（Levene）検定を実施し、等分散を認めた為、一元配置分散分析後、多重比較（Tukey）法を実施した。各群内比較において、全群は、正規分布に従った為、対応のある二標本 t 検定を実施した。

TNF- α 陽性領域割合は、対照群と比較して、CFA7 日群の両側が有意に増加していた（処置側： $p < 0.01$ 、非処置側： $p < 0.05$ ）。

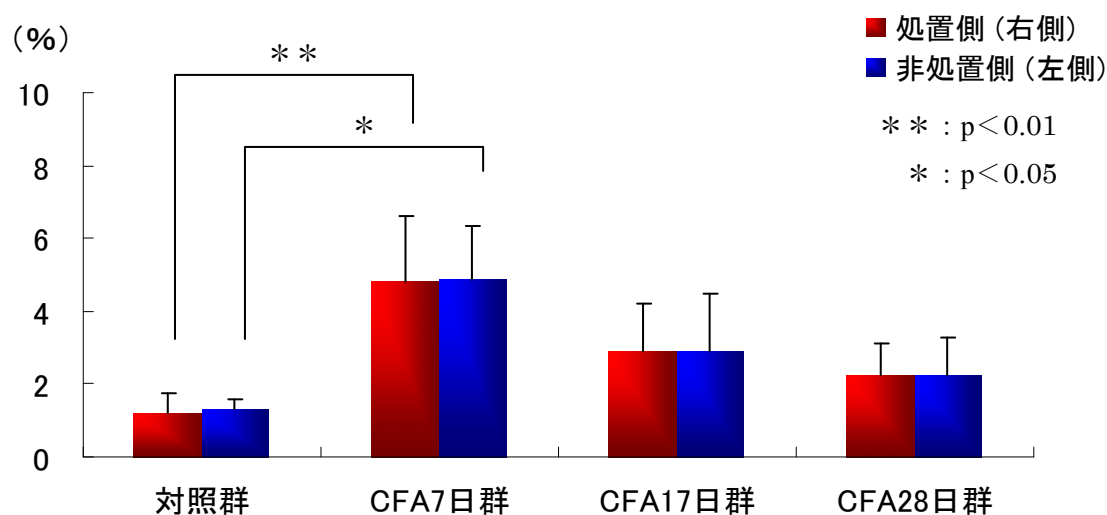


図 22. 対照群と CFA7, 17, 28 日群の TNF- α 陽性領域割合 (%)

図は、各群の TNF- α 陽性領域割合の平均と標準偏差を示している。

TNF- α 陽性領域割合は、対照群と比較して、CFA7 日群の両側が有意に増加していたが（処置側： $p < 0.01$ 、非処置側： $p < 0.05$ ）、対照群と CFA17, 28 日群間に有意差は認められなかった。対照群と CFA7 日群間の比較：処置側 $p = 0.0098$ 、非処置側 $p = 0.010902$ 。

各群内において、非処置側と処置側間に有意な差を認めなかった。

2-5. 抗 pASK1 抗体免疫染色

腰髄後角（両側）における対照群と CFA7, 17, 28 日群の写真を図 23 に示す。

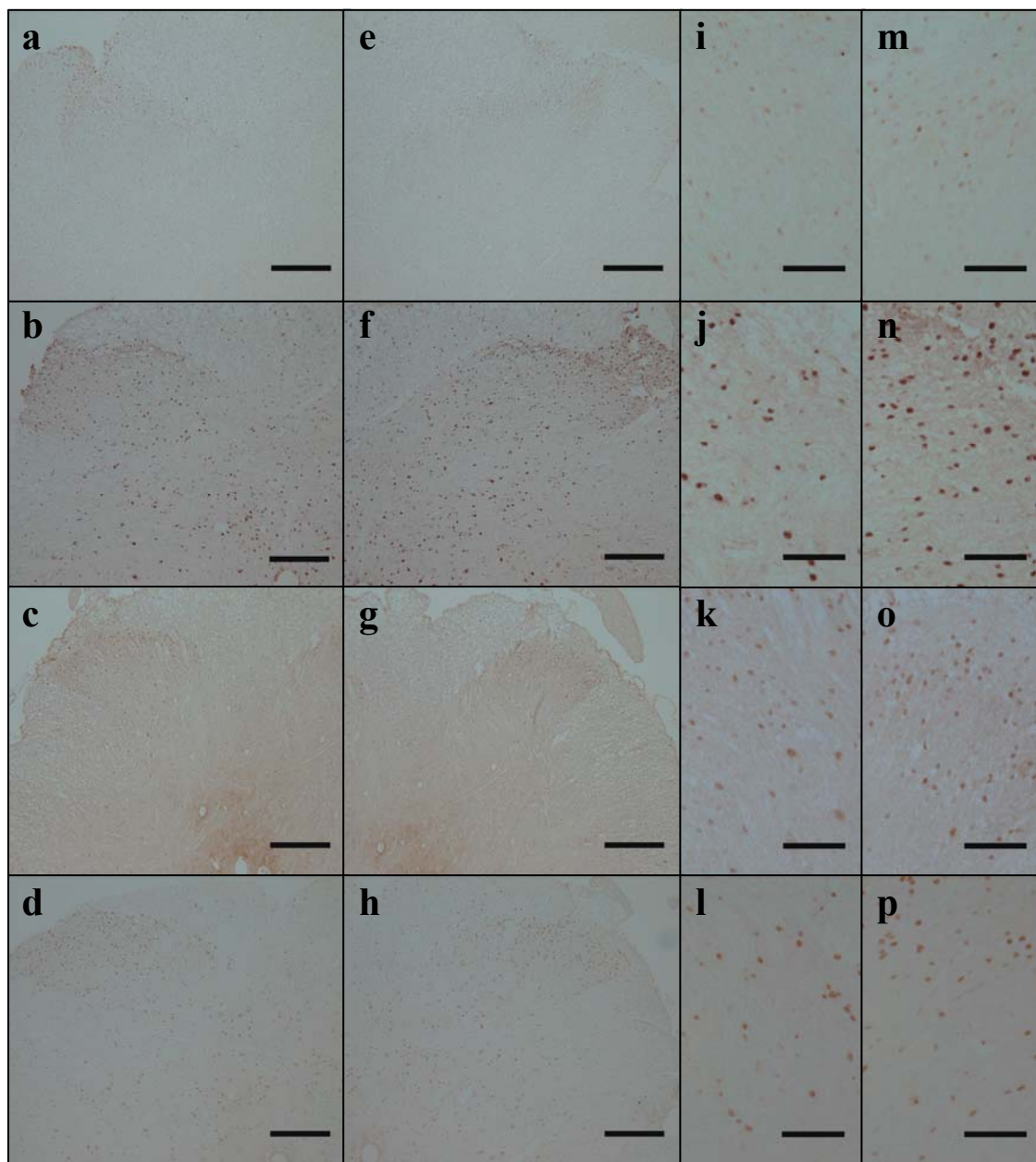


図 23. 腰髄後角（両側）横断面の抗 pASK1 抗体免疫染色写真

図の a~h は片側後角全体、i~p は片側後角表層の拡大写真を示す。

処置側 a, i : 対照群、b, j : CFA7 日群、c, k : CFA17 日群、d, l : CFA28 日群

非処置側 e, m : 対照群、f, n : CFA7 日群、g, o : CFA17 日群、h, p : CFA28 日群

Scale bars : 200 μ m (a~h) 、 50 μ m (i~p)

腰髄後角（両側）における対照群と CFA7, 17, 28 日群の pASK1 陽性領域割合（%）の結果を図 24 に示す。

pASK1 陽性領域割合は、処置側が対照群 $1.1 \pm 0.3\%$ （平均 \pm 標準偏差）、CFA7 日群 $3.6 \pm 0.7\%$ 、CFA17 日群 $2.4 \pm 0.7\%$ 、CFA28 日群 $2.3 \pm 0.4\%$ 、非処置側が対照群 $1.2 \pm 0.4\%$ 、CFA7 日群 $3.9 \pm 0.9\%$ 、CFA17 日群 $2.8 \pm 1.5\%$ 、CFA28 日群 $2.6 \pm 1.0\%$ であった。

統計処理は、全群が正規性（Shapiro-Wilk）検定にて、正規分布に従った為、等分散（Levene）検定を実施し、等分散を認めた為、一元配置分散分析後、多重比較（Tukey）法を実施した。各群内比較において、全群は、正規分布に従った為、対応のある二標本 t 検定を実施した。

pASK1 陽性領域割合は、対照群と比較して、CFA7 日群の両側が有意に増加していた（処置側： $p < 0.01$ 、非処置側： $p < 0.05$ ）。

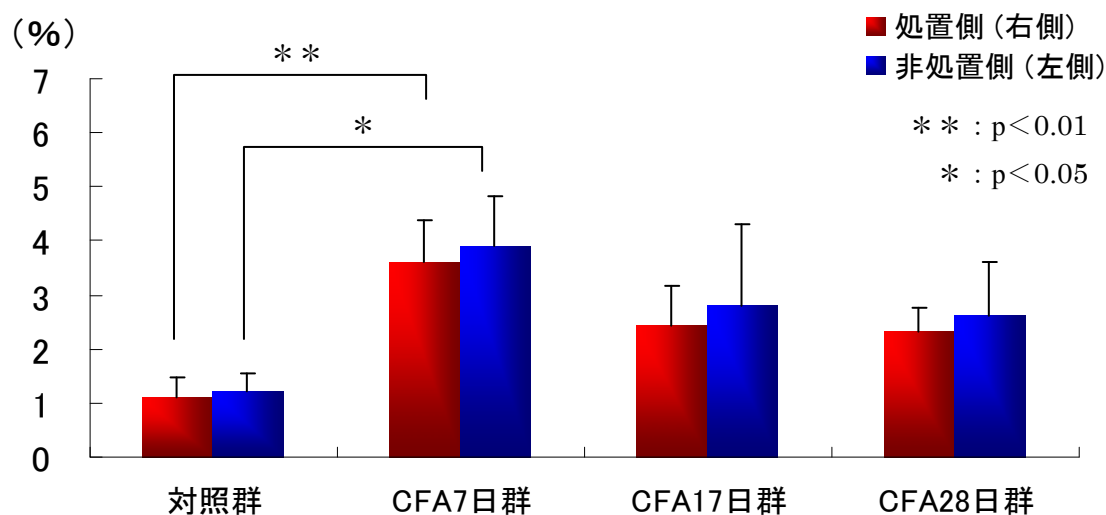


図 24. 対照群と CFA7, 17, 28 日群の pASK1 陽性領域割合（%）

図は、各群の pASK1 陽性領域割合の平均と標準偏差を示している。

pASK1 陽性領域割合は、対照群と比較して、CFA7 日群の両側は、有意に増加していたが（処置側： $p < 0.01$ 、非処置側： $p < 0.05$ ）、対照群と CFA17, 28 日群間に有意差は認められなかった。対照群と CFA7 日群間の比較：処置側 $p = 0.000389$ 、非処置側 $p = 0.021151$ 。

各群内において、非処置側と処置側間に有意な差を認めなかった。

2-6. 抗 pJNK1 抗体免疫染色

腰髄後角（両側）における対照群と CFA7, 17, 28 日群の写真を図 25 に示す。

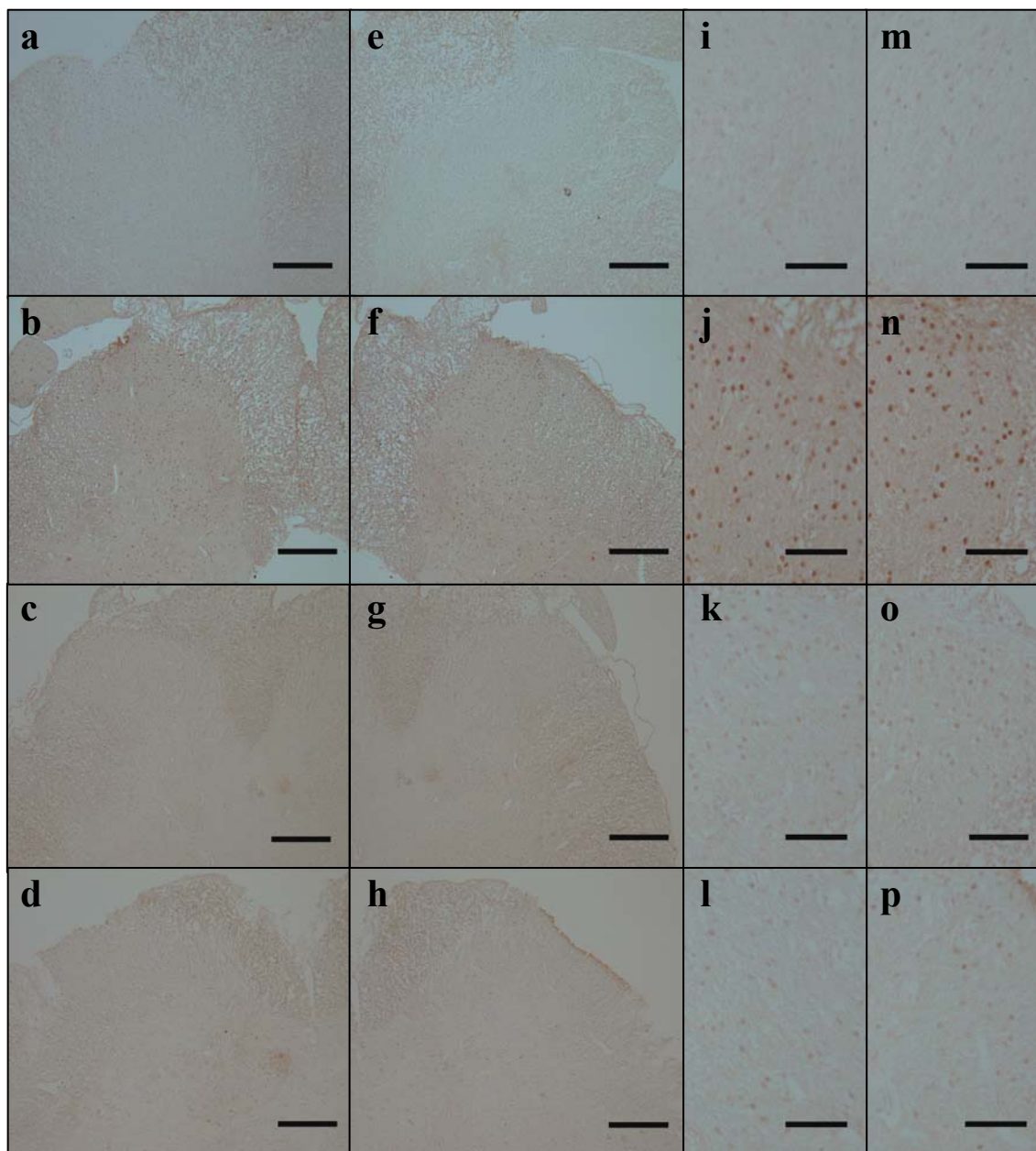


図 25. 腰髄後角（両側）横断面の抗 pJNK1 抗体免疫染色写真

図の a~h は片側後角全体、i~p は片側後角表層の拡大写真を示す。

処置側 a, i : 対照群、b, j : CFA7 日群、c, k : CFA17 日群、d, l : CFA28 日群

非処置側 e, m : 対照群、f, n : CFA7 日群、g, o : CFA17 日群、h, p : CFA28 日群

Scale bars : 200 μ m (a~h) 、50 μ m (i~p)

腰髄後角（両側）における対照群と CFA7, 17, 28 日群の pJNK1 陽性領域割合（%）の結果を図 26 に示す。

pJNK1 陽性領域割合は、処置側が対照群 $1.3 \pm 0.3\%$ （平均 \pm 標準偏差）、CFA7 日群 $2.8 \pm 0.4\%$ 、CFA17 日群 $2.3 \pm 0.7\%$ 、CFA28 日群 $2.0 \pm 0.6\%$ 、非処置側が対照群 $1.5 \pm 0.5\%$ 、CFA7 日群 $3.0 \pm 0.4\%$ 、CFA17 日群 $2.9 \pm 0.7\%$ 、CFA28 日群 $2.4 \pm 0.9\%$ であった。

統計処理は、全群が正規性（Shapiro-Wilk）検定にて、正規分布に従った為、等分散（Levene）検定を実施し、等分散を認めた為、一元配置分散分析後、多重比較（Tukey）法を実施した。各群内比較において、全群は、正規分布に従った為、対応のある二標本 t 検定を実施した。

pJNK1 陽性領域割合は、対照群と比較して、CFA7 日群の両側が有意に増加していた（ $p < 0.05$ ）。

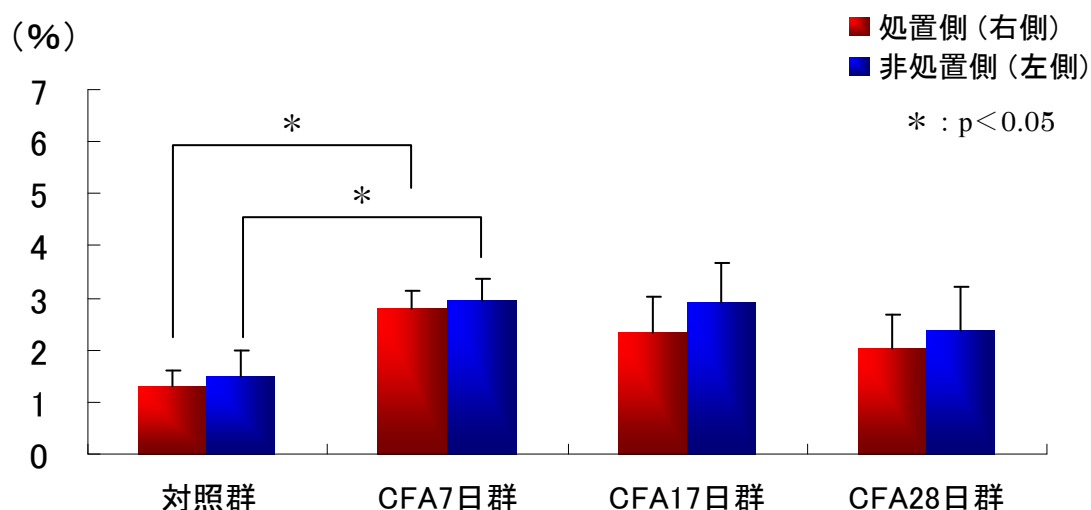


図 26. 対照群と CFA7, 17, 28 日群の pJNK1 陽性領域割合（%）

図は、各群の pJNK1 陽性領域割合の平均と標準偏差を示している。

pJNK1 陽性領域割合は、対照群と比較して、CFA7 日群の両側、CFA17 日群の非処置側は有意に増加していたが（ $p < 0.05$ ）、対照群と CFA17 日群、CFA28 日群間に有意差は認められなかった。対照群と CFA7 日群間の比較：処置側 $p = 0.010803$ 、非処置側 $p = 0.042586$ 。

各群内において、非処置側と処置側間に有意な差を認めなかった。

2-7. 抗 GFAP 抗体免疫染色

腰髄後角（両側）における対照群と CFA7, 17, 28 日群の写真を図 27 に示す。

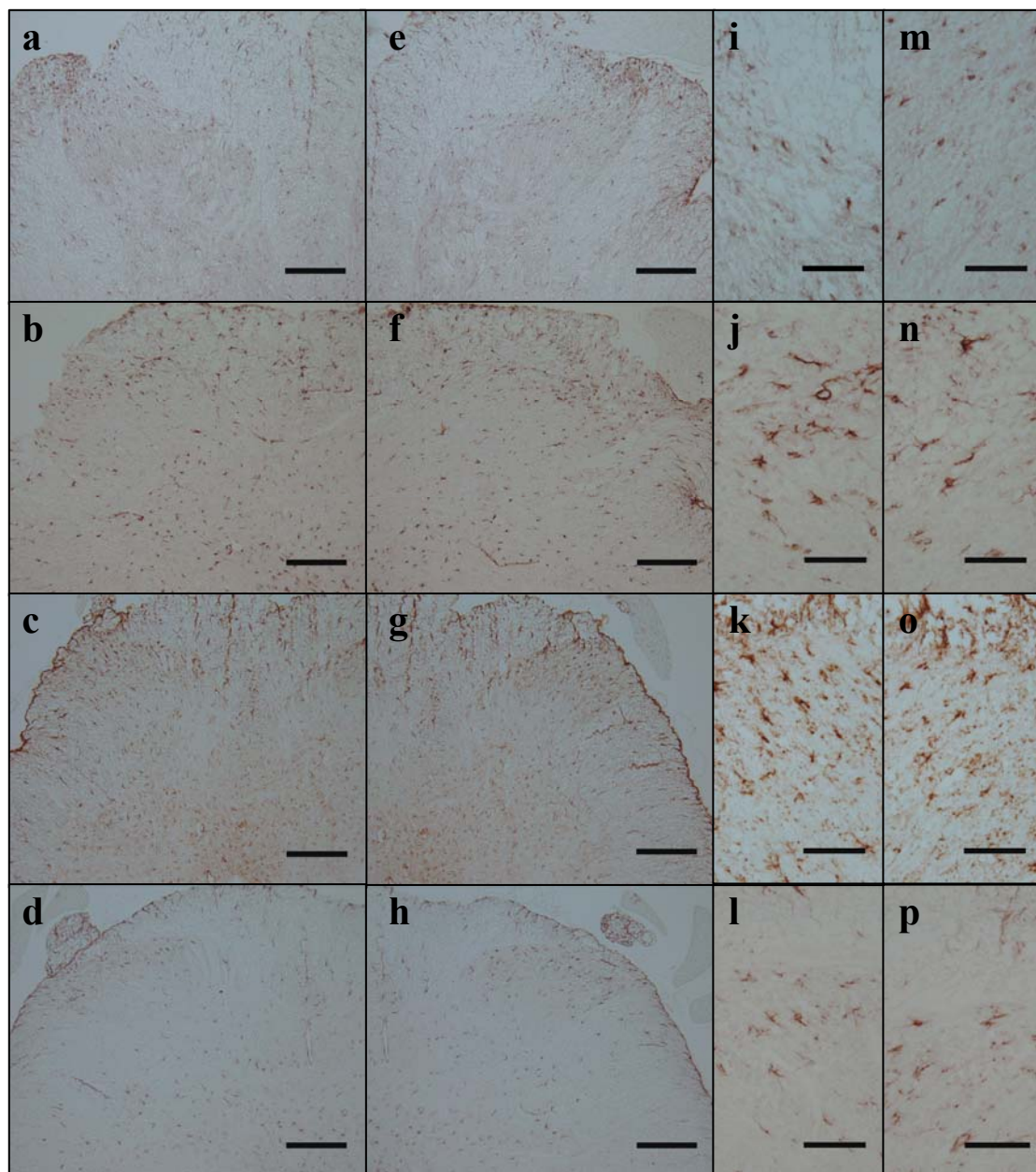


図 27. 腰髄後角横断面（両側）の抗 GFAP 免疫染色写真

図の a~h は片側後角全体、i~p は片側後角表層の拡大写真を示す。

処置側 a, i : 対照群、b, j : CFA7 日群、c, k : CFA17 日群、d, l : CFA28 日群

非処置側 e, m : 対照群、f, n : CFA7 日群、g, o : CFA17 日群、h, p : CFA28 日群

Scale bars : 200 μ m (a~h) 、50 μ m (i~p)

腰髄後角（両側）における対照群と CFA7, 17, 28 日群の GFAP 陽性領域割合（%）の結果を図 28 に示す。

GFAP 陽性領域割合は、処置側が対照群 $0.8 \pm 0.4\%$ （平均 \pm 標準偏差）、CFA7 日群 $3.0 \pm 0.1\%$ 、CFA17 日群 $3.3 \pm 0.7\%$ 、CFA28 日群 $2.7 \pm 0.4\%$ 、非処置側が対照群 $0.9 \pm 0.6\%$ 、CFA7 日群 $2.8 \pm 0.5\%$ 、CFA17 日群 $3.3 \pm 0.8\%$ 、CFA28 日群 $2.7 \pm 0.6\%$ であった。

統計処理は、全群が正規性（Shapiro-Wilk）検定にて、正規分布に従った為、等分散（Levene）検定を実施し、等分散を認めた為、一元配置分散分析後、多重比較（Tukey）法を実施した。各群内比較において、全群は、正規分布に従った為、対応のある二標本 t 検定を実施した。

GFAP 陽性領域割合は、対照群と比較して、CFA7, 17, 28 日群の処置側が有意に増加していた（CFA7, 17, 28 日群の処置側：各々、 $p < 0.01$ ）。また、CFA7, 17, 28 日群の非処置側も有意に増加していた（CFA7, 17 日群の非処置側：各々、 $p < 0.01$ 、CFA28 日群の非処置側）。

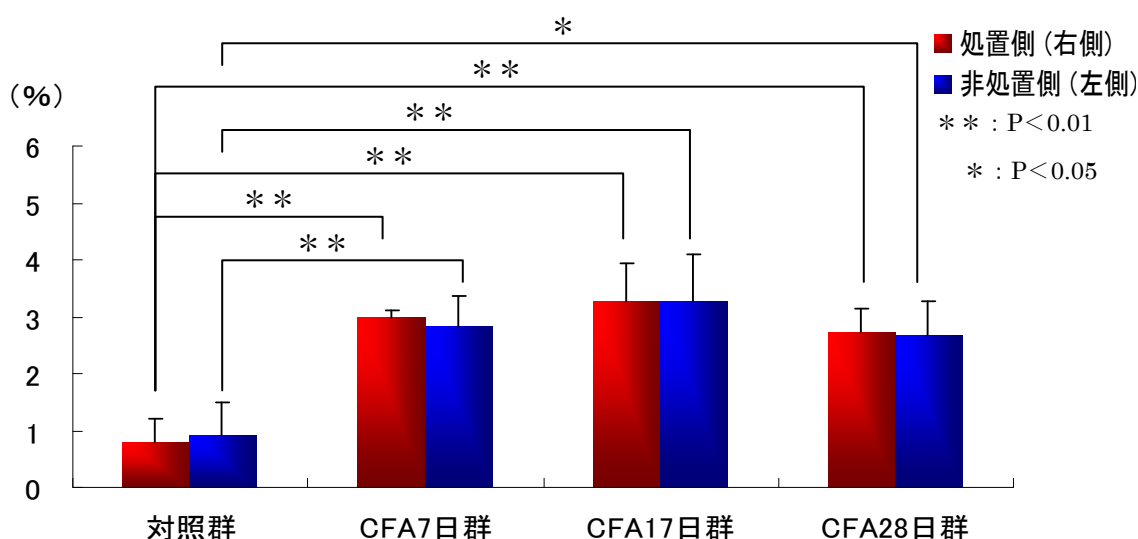


図 28. 対照群と CFA7, 17, 28 日群の GFAP 陽性領域割合 (%)

図は、各群の GFAP 陽性領域割合の平均と標準偏差を示している。

GFAP 陽性領域割合は、対照群と比較して、処置側の CFA7, 17, 28 日群が有意に増加していた（CFA7, 17, 28 日群の処置側：各々、 $p < 0.01$ ）。また、CFA7, 17, 28 日群の非処置側も有意に増加していた（CFA7, 17 日群の非処置側：各々、 $p < 0.01$ 、CFA28 日群の非処置側： $p < 0.05$ ）。

対照群と CFA7 日群間の比較：処置側 $p = 0.000054$ 、非処置側 $p = 0.006732$ 、

対照群と CFA17 日群間の比較：処置側 $p = 0.000013$ 、非処置側 $p = 0.001173$ 、

対照群と CFA28 日群間の比較：処置側 $p = 0.000171$ 、非処置側 $p = 0.012934$ 。

各群内において、非処置側と処置側間に有意な差を認めなかった。

2-8. pASK1、pJNK1 と GFAP との二重免疫蛍光染色

2-8-1. pASK1 と GFAP との二重免疫蛍光染色

腰髄後角（右側、または処置側）における対照群と CFA7 日群の写真を図 29 に示す。

対照群と CFA7 日群において、pASK1 は、GFAP と共染色していた。また、pASK1 は、対照群と比較して、CFA7 日群では共染色した細胞数が多く観察された。

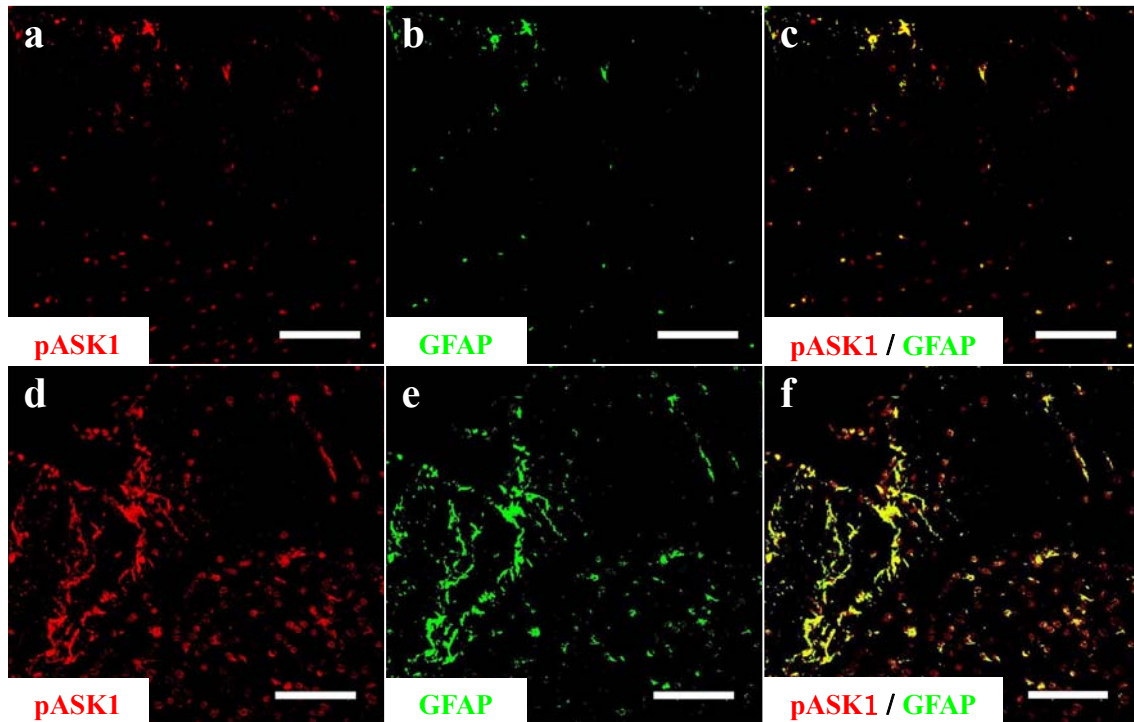


図 29. 腰髄横断面（右側、または処置側）の後角表層の抗 pASK1 と抗 GFAP 抗体二重免疫蛍光染色

pASK1 が赤色、GFAP が緑色、共染色が黄色で示されている。

対照群（右側） a：抗 pASK1 抗体免疫蛍光染色、b：抗 GFAP 抗体免疫蛍光染色、c：抗 pASK1 と抗 GFAP 抗体免疫蛍光染色の共染色

CFA7 日群（処置側） d：抗 pASK1 抗体免疫蛍光染色、e：抗 GFAP 抗体免疫蛍光染色、f：抗 pASK1 と抗 GFAP 抗体免疫蛍光染色の共染色

Scale bars : 100 μ m

2-8-2. pJNK1 と GFAP との二重免疫蛍光染色

腰髄後角（右側、または処置側）における対照群と CFA7 日群の写真を図 30 に示す。

対照群、CFA7 日群において、pJNK1 は、GFAP と共染色していた。また、pJNK1 は、対照群と比較して、CFA7 日群では共染色した細胞数が多く観察された。

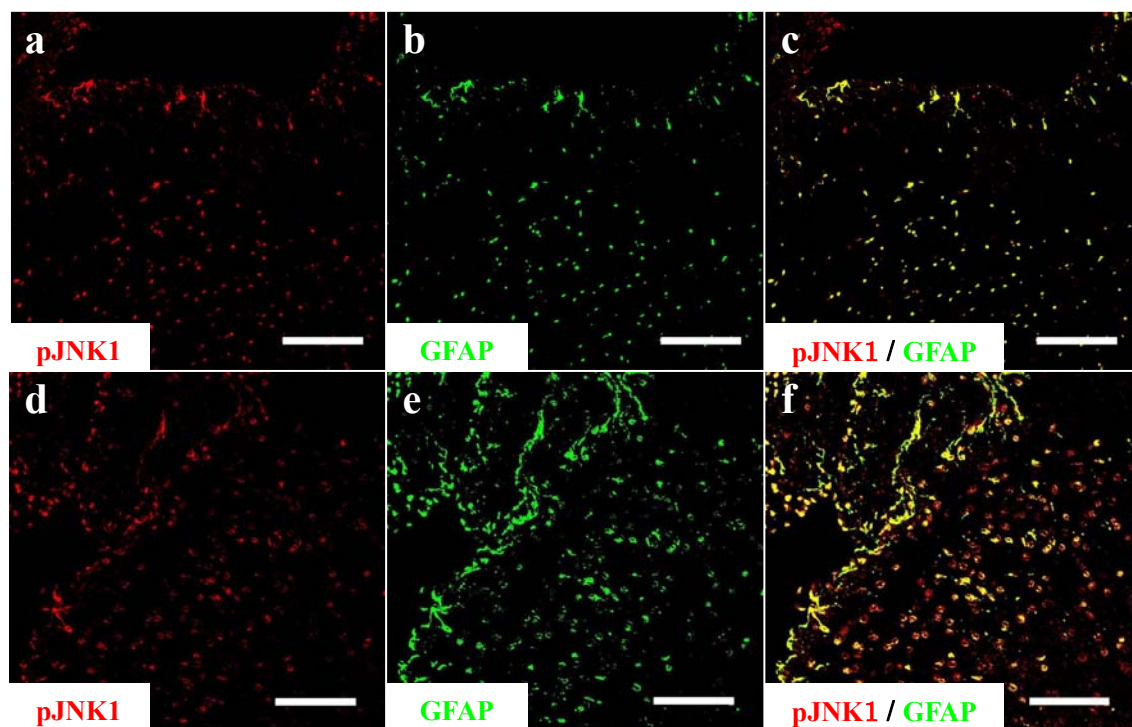


図 30. 腰髄横断面（右側、または処置側）の後角表層の抗 pJNK1 と抗 GFAP 抗体二重免疫蛍光染色

pJNK1 が赤色、GFAP が緑色、共染色が黄色で示されている。

対照群（右側） a：抗 pJNK1 抗体免疫蛍光染色、b：抗 GFAP 抗体免疫蛍光染色、c：抗 pJNK1 と抗 GFAP 抗体免疫蛍光染色の共染色

CFA7 日群（処置側） d：抗 pJNK1 抗体免疫蛍光染色、e：抗 GFAP 抗体免疫蛍光染色、f：抗 pJNK1 と抗 GFAP 抗体免疫蛍光染色の共染色

Scale bars : 100 μ m

2-9. pASK1、pJNK1 と OLIGODENDROCYTE との二重免疫蛍光染色

2-9-1. pASK1 と OLIGODENDROCYTE との二重免疫蛍光染色

腰髄後角（右側、または処置側）における対照群と CFA7 日群の写真を図 31 に示す。

対照群、CFA7 日群において、pASK1 は、OLIGODENDROCYTE (OLIGO) と共染色していた。

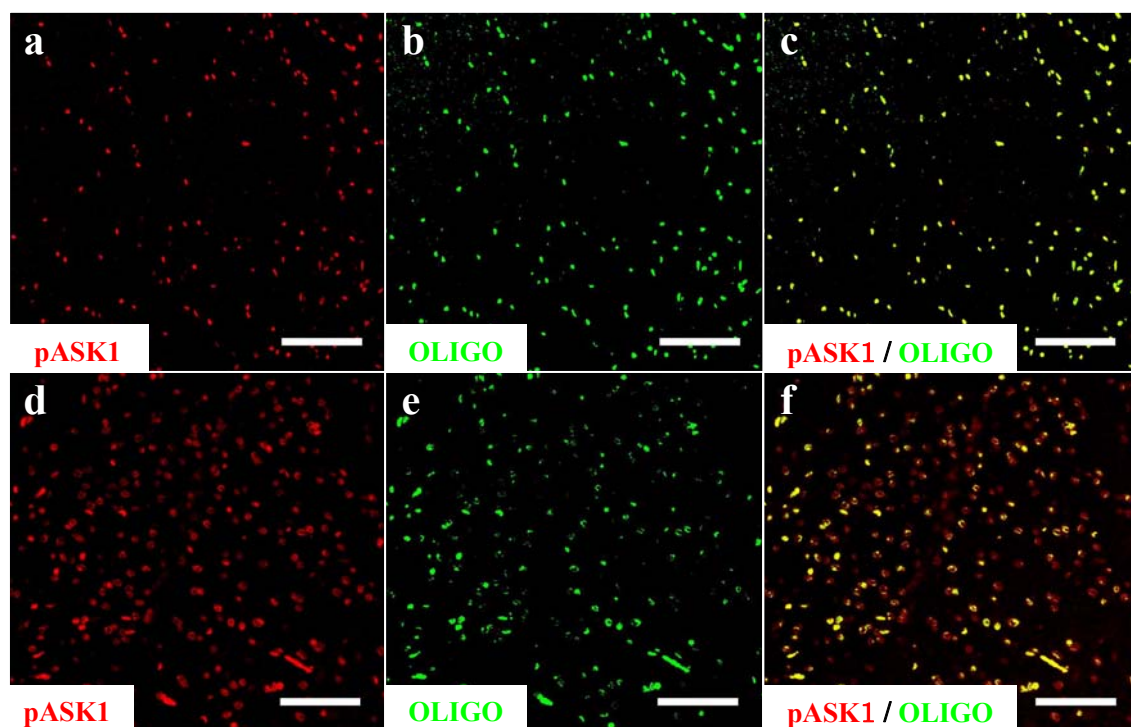


図 31. 腰髄横断面（右側、または処置側）の後角表層の抗 pASK1 と抗 OLIGO 抗体二重免疫蛍光染色

pASK1 が赤色、OLIGO が緑色、共染色が黄色で示されている。

対照群（右側） a：抗 pASK1 抗体免疫蛍光染色、b：抗 OLIGO 抗体免疫蛍光染色、c：抗 pASK1 と抗 OLIGO 抗体免疫蛍光染色の共染色

CFA7 日群（処置側） d：抗 pASK1 抗体免疫蛍光染色、e：抗 OLIGO 抗体免疫蛍光染色、f：抗 pASK1 と抗 OLIGO 抗体免疫蛍光染色の共染色

Scale bars : 100 μ m

2-9-2. pJNK1 と OLIGODENDROCYTE との二重免疫蛍光染色

腰髄後角（右側、または処置側）における対照群と CFA7 日群の写真を図 32 に示す。

対照群、CFA7 日群において、pJNK1 は、OLIGODENDROCYTE (OLIGO) と共染色していた。

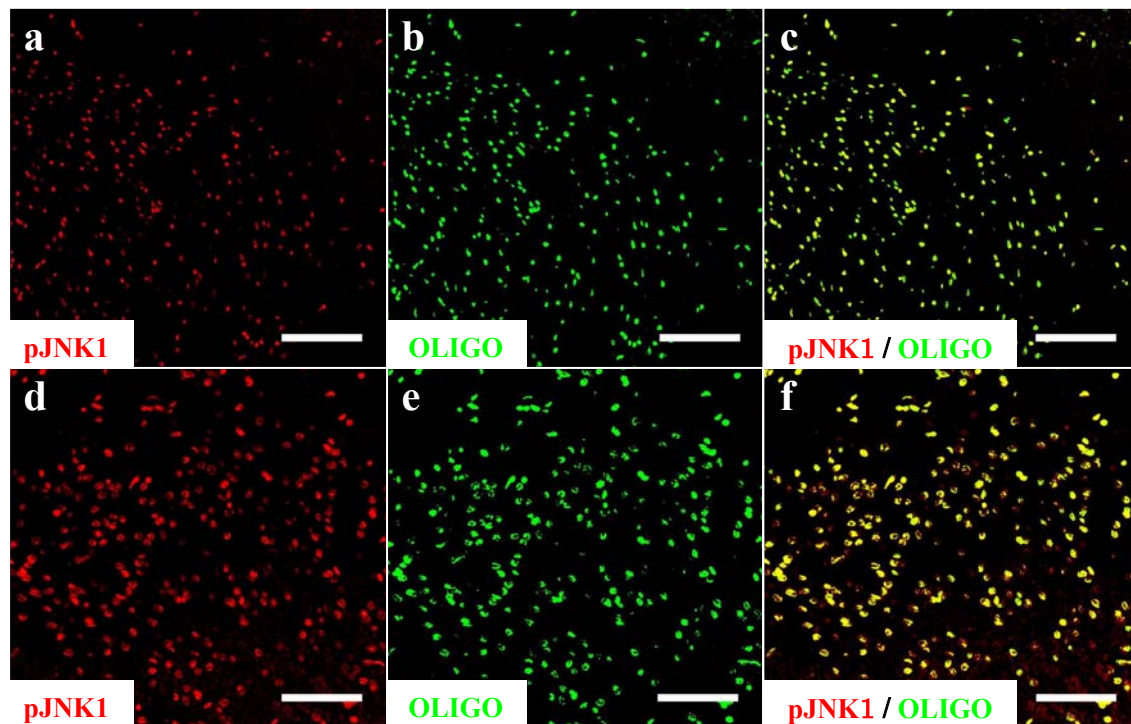


図 32. 腰髄横断面（右側、または処置側）の後角表層の抗 pJNK1 と抗 OLIGO 抗体二重免疫蛍光染色

pJNK1 が赤色、OLIGO が緑色、共染色が黄色示されている。

対照群（右側） a：抗 pJNK1 抗体免疫蛍光染色、b：抗 OLIGO 抗体免疫蛍光染色、c：抗 pJNK1 と抗 OLIGO 抗体免疫蛍光染色の共染色

CFA7 日群（処置側） d：抗 pJNK1 抗体免疫蛍光染色、e：抗 OLIGO 抗体免疫蛍光染色、f：抗 pJNK1 と抗 OLIGO 抗体免疫蛍光染色の共染色

Scale bars : 100 μ m

2-14. 免疫染色 (pASK1、pJNK1) と Nissl 染色との二重染色

腰髄後角 (右側、または処置側) における対照群と CFA7 日群の写真を図 33 に示す。
対照群、CFA7 日群において、pASK1 と pJNK1 は、Nissl 染色と共染色していた。

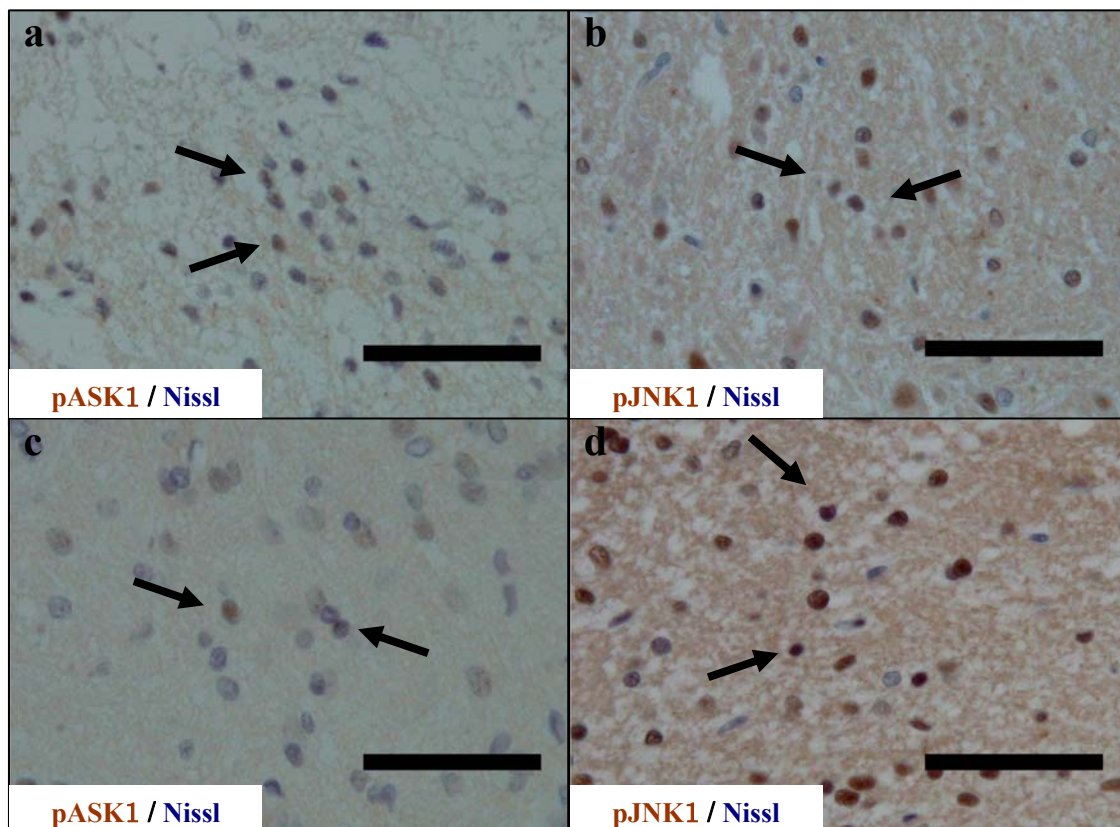


図 33. 腰髄横断面 (右側、または処置側) の後角表層の抗 pASK1、pJNK1 と Nissl 染色との二重染色写真

pASK1 と pJNK1 が茶色、Nissl 染色が青色、共染色が黒矢印で示されている。

a : 対照群 (右側) の pASK1 と Nissl 染色の共染色、b : 対照群 (右側) の pJNK1 と Nissl 染色の共染色、c : CFA7 日群 (処置側) の pASK1 と Nissl 染色の共染色、d : CFA7 日群 (処置側) の pJNK1 と Nissl 染色の共染色 Scale bars : 50 μ m

3. 相関関係

3-1. TNF- α 陽性領域割合と pASK1 陽性領域割合との相関関係

対照群と CFA7, 17, 28 日群 (両側) の全ラット後角における TNF- α 陽性領域割合 (%) と pASK1 陽性領域 (%) との散布図と回帰直線を図 34 に示す。

全ラット後角において、正規性 (Shapiro-Wilk) 検定にて、正規分布に従った為、Pearson の相関係数を算出した。

TNF- α 陽性領域割合と pASK1 陽性領域割合との間に、有意な正の相関を認めた ($r = 0.65 ; p < 0.01$) 。

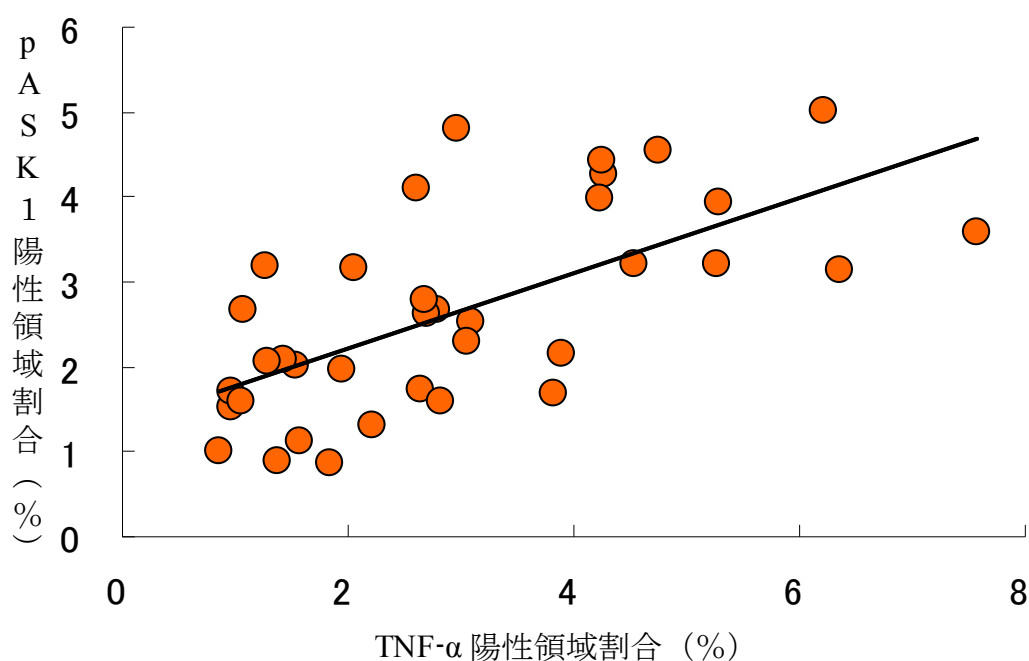


図 34. TNF- α 陽性領域割合と pASK1 陽性領域割合との散布図と回帰曲線

図は、TNF- α 陽性領域割合と pASK1 陽性領域割合の散布図と回帰直線を示している。

線形回帰式は、 $\text{pASK1 陽性領域割合} = 1.3241 + 0.4461 \times \text{TNF-}\alpha \text{ 陽性領域割合}$ 、決定係数 (R^2) は、0.4257 であった。

TNF- α 陽性領域割合と pASK1 陽性領域割合との間に、有意な正の相関を認めた ($r = 0.65 ; p = 0.000016$)。

3-2. pASK1 陽性領域割合と pJNK1 陽性領域割合との相関関係

対照群と CFA7, 17, 28 日群 (両側) の全ラット後角における pASK1 陽性領域割合 (%) と pJNK1 陽性領域 (%) との散布図と回帰直線を図 35 に示す。

全ラット後角において、正規性 (Shapiro-Wilk) 検定にて、正規分布に従った為、Pearson の相関係数を算出した。

pASK1 陽性領域割合と pJNK1 陽性領域割合との間に、有意な正の相関を認めた ($r = 0.63$; $p < 0.01$ 、図 35)。

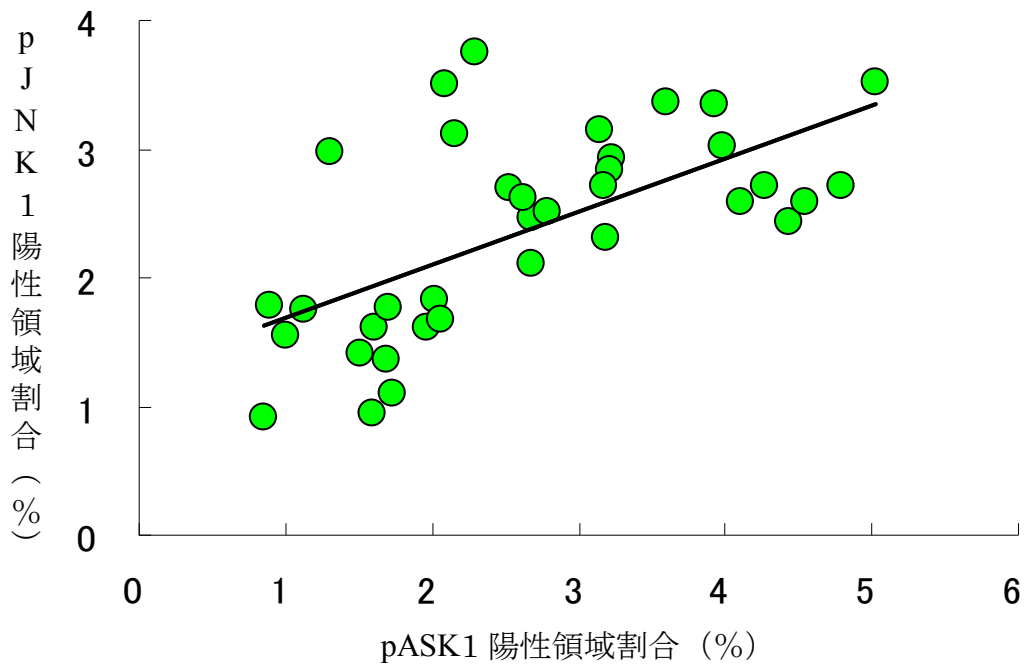


図 35. pASK1 陽性領域割合と pJNK1 陽性領域割合との散布図と回帰曲線
図は、pJNK1 陽性領域割合と GFAP 陽性領域割合の散布図と回帰直線を示している。

線形回帰式は、 $\text{pJNK1 陽性領域割合} = 1.2793 + 0.4114 \times \text{pASK1 陽性領域割合}$ 、
決定係数 (R^2) は、0.3915 であった。

pASK1 陽性領域割合と pJNK1 陽性領域割合との間に、有意な正の相関を認めた
($r = 0.63$; $p = 0.000045$)

3-3. pJNK1 陽性領域割合と GFAP 陽性領域割合との相関関係

対照群と CFA7, 17, 28 日群 (両側) の全ラット後角における pJNK1 陽性領域割合 (%) と GFAP 陽性領域 (%) との散布図と回帰直線を図 36 に示す。

全ラット後角において、正規性 (Shapiro-Wilk) 検定にて、正規分布に従った為、Pearson の相関係数を算出した。

pJNK1 陽性領域割合と GFAP 陽性領域割合との間に、有意な正の相関を認めた ($r = 0.45$; $p < 0.01$)。

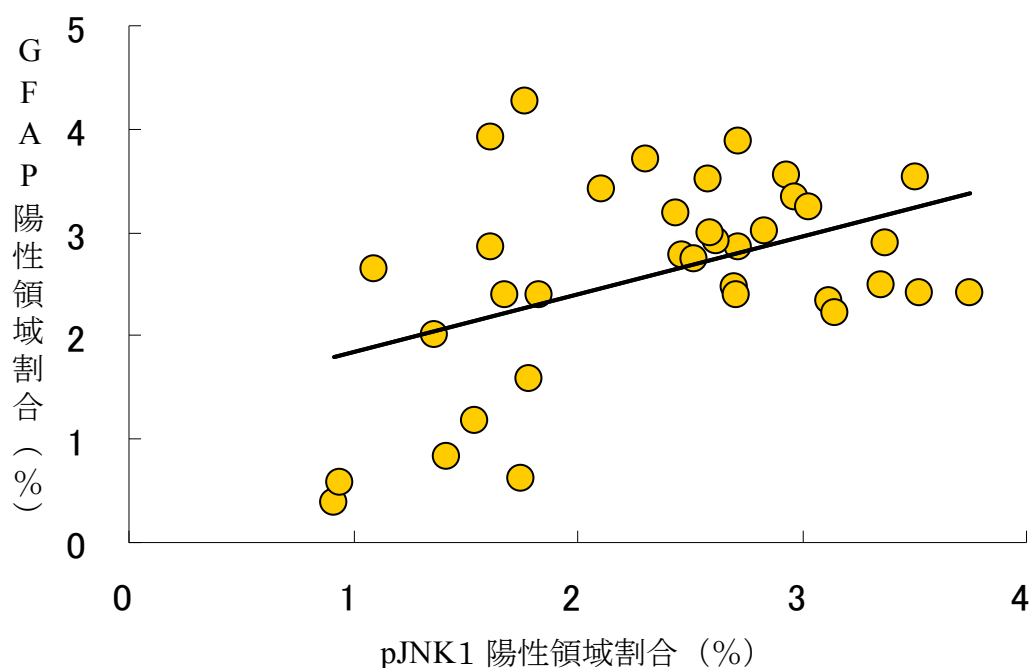


図 36. pJNK1 陽性領域割合と GFAP 陽性領域割合との散布図と回帰曲線
図は、pJNK1 陽性領域割合と GFAP 陽性領域割合の散布図と回帰直線を示している。

線形回帰式は、GFAP 陽性領域割合 = $1.2778 + 0.562 \times$ pJNK1 陽性領域割合、
決定係数 (R^2) は、0.2048 であった。

pJNK1 陽性領域割合と GFAP 陽性領域割合との間に、有意な正の相関を認めた
($r = 0.45$; $p = 0.005646$)。

3-4. GFAP 陽性領域割合と疼痛反応閾値との相関関係

対照群と CFA7, 17, 28 日群 (両側) の全ラット後角における GFAP 陽性領域割合 (%) と疼痛反応閾値 (g) との散布図と回帰直線を図 37 に示す。

全ラット後角において、正規性 (Shapiro-Wilk) 検定にて、正規分布に従った為、Pearson の相関係数を算出した。

GFAP 陽性領域割合と疼痛反応閾値の間に、有意な負の相関を認めた ($r = -0.51 ; p < 0.01$) 。

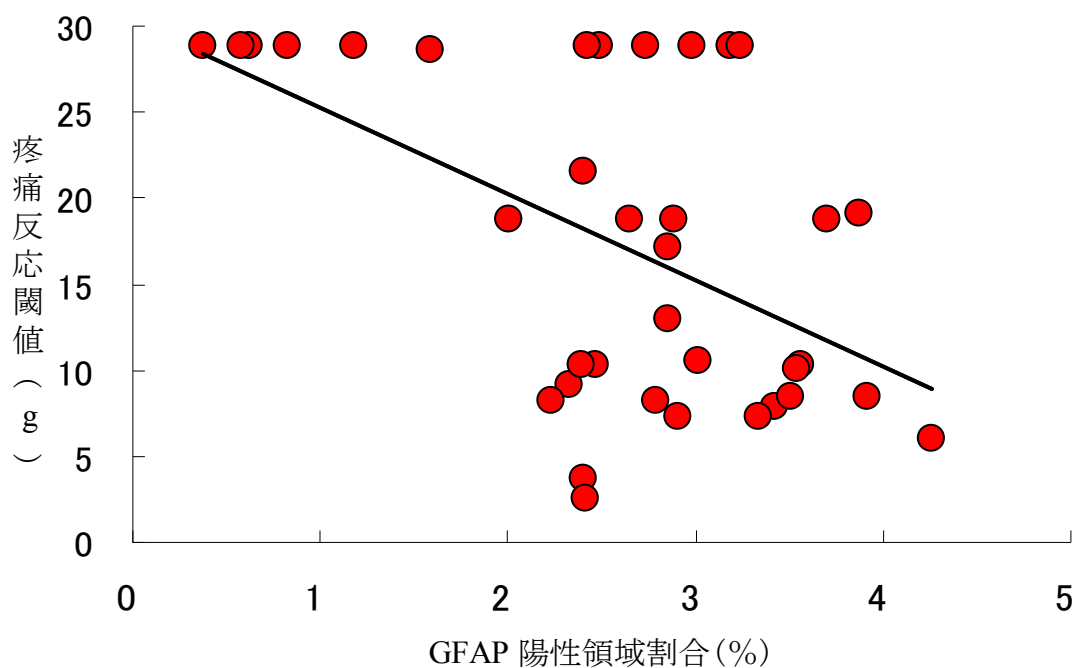


図 37. GFAP 陽性領域割合と疼痛反応閾値との散布図と回帰曲線

図は、GFAP 陽性領域割合と疼痛反応閾値の散布図と回帰直線を示している。線形回帰式は、疼痛反応閾値 = $30.317 - 5.0146 \times \text{GFAP 陽性領域割合}$ 、決定係数 (R^2) は、0.2645 であった。

GFAP 陽性領域割合と疼痛反応閾値の間に、有意な負の相関を認めた ($r = -0.51 ; p = 0.001325$)。

考察

1. 平均摂水・摂餌量、体重に関して

本研究において、平均摂水量は、対照群と比較して、CFA7, 17, 28 日群とも有意な減少を認めなかった。しかし、平均摂餌量は、対照群と比較して、CFA28 日群に有意な減少を認めた。Stein ら⁶⁾は、対照（無処置）群と比較して、CFA 群の平均摂餌量が平均摂水量より、早期から長期的に、有意に減少することを観察しており、今回の研究と同様な結果であった。ラットの体重は、通常、無処置群において、週齢増加に伴い一定の割合で増加するが⁶⁾、本研究において、対照群と比較して、CFA7 日群に有意な増加を認めなかった。Stein ら⁶⁾は、対照（対照）群と比較して、CFA 注入後 3 日目に有意な体重増加率の減少、CFA 注入後 5 日目に有意な体重減少を観察しており、今回の研究と同様な結果であった。

これらの主要な原因として、疼痛回避による摂餌活動量低下⁶⁾や CFA 注入後の疼痛ストレスにより、内因性神経ペプチドのコルチコトロピン放出因子（Corticotropin releasing factor ; CRF）や β -エンドルフィン（ β -endorphin）が増加し¹¹⁾¹²⁾、摂餌抑制に作用し、平均摂餌量や体重に影響を及ぼしていることが推測された。

2. 両後肢足部厚に関して

本研究において、両後肢足部厚は、対照群と比較して、CFA7, 17, 28 日群の処置側、非処置側に有意な増加を認めなかった。しかし、CFA7, 17, 28 日群において、非処置側と比較して、処置側が有意に増加していた。

Oliveira ら¹³⁾は、CFA 注入後 4, 15 日目の足底皮下組織に炎症性細胞である巨細胞（マクロファージの集合体）、好中球、マクロファージ、リンパ球、形質細胞が発現し、処置後 4 日目以降、線維化も伴うことを観察している。本研究の HE 染色においても、CFA7, 17, 28 日群の処置側後肢足底部皮下組織内に、炎症細胞が顕著に浸潤しており、これらの病理学的、形態学的所見から、後肢足部の処置側に炎症細胞浸潤を伴い、足部厚の有意な増加をもたらす程度の炎症が誘発されていると考えられた。

3. 両後肢疼痛反応閾値、運動学的評価に関して

本研究において、両後肢疼痛反応閾値は、対照群と比較して、CFA7, 17, 28 日群に有意な低下を認めなかった。しかし、先行研究では、対照（無処置）群と比較して CFA 注入後の処置側の疼痛反応閾値が有意に低下し、遅延して非処置側の疼痛反応閾値も有意に低下することが多数、報告されている¹⁾²⁾。今回の研究では、対象動物種、疼痛反応閾値検査の道具、手法、手順は、先行研究と同様であったが¹⁾¹⁴⁾¹⁵⁾、対象動物の匹数が少数で、標準偏差が大きくなり、有意差を認めなかったと考えられた。

運動学的評価の点数は、対照群と比較して CFA7, 17, 28 日群が有意に減少しており、疼痛反応閾値が非処置側に対し、処置側において相対的に低下していることを考えると、処置側足底部の疼痛反応閾値低下により、体重を完全に支持出来ずに、処置側足底を十分に接地出来ていないことが考えられた。

4. CFA 誘発末梢炎症に伴うアロディニア発現に関して

炎症性疼痛は、痛覚閾値が低下し、通常では疼痛を感じない刺激を疼痛として感じるアロディニアや疼痛をより強く感じる痛覚過敏を生じる。アロディニアは、痛覚過敏と比較して、持続性があり、炎症側にて範囲が拡張するだけでなく、遅延して反対側にも発現することが特徴的である¹⁾²⁾¹⁵⁾。アロディニアの原因として、主に中枢組織での疼痛に対する感受性が高まる現象が考えられており、中枢感作 (Central sensitization) と呼ばれている¹⁶⁾。中枢感作は、持続する疼痛により、誘発され、脊髄内のミクログリア¹⁷⁾¹⁸⁾やアストロサイト¹⁾¹⁹⁾の関与が示唆されている。

本研究では、疼痛反応閾値検査において、von Frey フィラメントの圧刺激に対する痛覚閾値が対照群と比較して、CFA7, 17, 28 日群の両側に有意な低下を認めなかったが、CFA群の処置側だけでなく、非処置側においても、痛覚反応閾値低下を長期的に示す症例を多く認めた。これは、先行研究¹⁾²⁾¹⁵⁾と同様に持続性、両側性発現のアロディニアの特徴と類似していた。

5. 末梢炎症による腰髄内の TNF- α 増加に関して

末梢炎症により、炎症誘発性サイトカインである TNF- α のタンパク質量や陽性細胞数の有意な増加が腰髄内にて観察されている²⁰⁾²¹⁾。また、腰髄内 TNF- α 陽性領域割合が末梢炎症後 6 日群の処置側だけでなく、非処置側においても有意に増加し、TNF- α は腰髄後角内のアストロサイト、ミクログリア、神経細胞と共発現することが観察されている¹⁵⁾。

本研究においても、対照群と比較して、CFA7 日群の腰髄後角内 TNF- α 陽性領域割合が、処置側と非処置側、共に有意に増加していた。腰髄内 TNF- α の主要な早期産生源は、末梢炎症後、腰髄内ミクログリア活性がアストログリア活性より先行し、腰髄内 TNF- α の mRNA 量とタンパク質量の発現がミクログリア活性と並行すること²¹⁾、*in vitro* にてアストロサイトより、ミクログリアが TNF- α 産生量が多いこと²²⁾、腰髄内活性ミクログリアの抑制により、腰髄内 TNF- α mRNA 量が有意に減少することから²³⁾、活性化ミクログリアであることが推測される。アストロサイトとオリゴデンドロサイト、神経細胞、ミクログリアは、TNF- α 受容体を発現することから²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾、活性化ミクログリアから早期に産生された TNF- α は、パラクリンのアストロサイトと神経細胞、オリゴデンドロサイトに、オートクリンの活性化ミクログリアに影響を及ぼすものと考えられる。

TNF- α 増加は、アストロサイト、ミクログリアに対して、増殖作用、炎症性サイトカイ

ン (Interleukin-1 β ; IL-1 β , TNF- α) やケモカイン (Monocyte chemoattractant protein-1, 単球走化性タンパク質 ; MCP-1) 等を産生し¹⁸⁾²²⁾²³⁾²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾、神経細胞に対して、Nuclear factor- κ B (NF- κ B) 経路活性を通じて、炎症性サイトカイン (TNF- α) 産生を促進し¹⁵⁾、オリゴデンドロサイトに対して、細胞毒性であり²⁹⁾、遅発性壊死を生じる可能性が考えられる。

6. アストロサイト内の TNF- α 誘導 MAPK 活性化に関して

Mitogen-activated protein kinase (分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ ; MAPK) が、疼痛発生や中枢・末梢感作において重要な役割を果たすことが数多く示されている³¹⁾³²⁾³³⁾³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾。MAPK は、真核細胞において保存された細胞内シグナル伝達経路であり、細胞外からの様々な刺激により、MAP kinase kinase kinase (MAPKKK ; MAP3K) 、MAP kinase kinase (MAPKK ; MAP2K) 、MAP kinase (MAPK) の順にリン酸化されて活性し、上流から下流へと情報を伝達し、細胞増殖、分化、形態形成、細胞死等、多くの細胞応答において、重要な働きを担う。哺乳類において、MAPK には、Extracellular signal-regulated kinases 1/2 (細胞外シグナル調節キナーゼ 1/2 ; ERK 1/2) 、p38、c-Jun N-terminal kinases (c-Jun N 末端キナーゼ ; JNK) 、ERK 5 の4つのサブファミリー分子が存在する³⁷⁾。炎症性疼痛に関しても、MAPK の同定が進められているが、神経障害性疼痛と比較して、損傷程度が少ない為に該当脊髄レベルでの変化が捉えられにくく、解明が進んでいないのが現状である。

近年、炎症性疼痛モデルを使用して、腰髄後角における反応性アストロサイト内の pJNK が増加し、JNK 阻害薬 (SP600125, D-JNKI-1) や JNK1 KO マウスにて、両側性のアロディニアを顕著に抑制することが報告された¹⁾。アストロサイト内の JNK 活性化は、c-Jun (転写因子) をリン酸化して、標的遺伝子の転写を誘導する³⁶⁾³⁸⁾。その結果、アストロサイトは、自身の増殖、サイトカイン (IL-1 β , TNF- α) 、ケモカイン (MCP-1) の産生、放出を来し¹⁸⁾²²⁾²³⁾²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾、脊髄内の二次感覚ニューロンの α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) 受容体発現増加³⁹⁾や N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体のリン酸化により、シナプス伝達効率を増強、維持させ⁴⁰⁾⁴¹⁾⁴²⁾、中枢感作に寄与していると考えられている⁴³⁾。

本研究では、MAPK の JNK 上流シグナルの1つ、ASK1に着目した。ASK1 は、1997年に一条ら⁴⁴⁾により、哺乳類細胞群において、JNK 経路と p38 経路を活性化し、ASK1 の過剰発現により、Apoptosis (アポトーシス) を誘導する MAPKKK (MAP3K) として、発見された。ASK1 は、広範な組織に分布し、細胞内で 2000kDa にも達する巨大なシグナルソーム (細胞内情報伝達複合体) を形成⁴⁵⁾、ASK1 結合タンパク質である Thioredoxin (Trx ; チオレドキシン) が ASK1 の N 末端領域に結合することで、活性が抑制されている⁴⁶⁾。しかし、TNF- α により、Reactive oxygen species (ROS ; 活性酸素種) が産生されると、ASK1 から Trx が解離され⁴⁷⁾、アダプター因子である TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) が ASK1 の

C 末端領域に結合することで、活性化される⁴⁸⁾。さらに、ASK1 は、TNF- α により、JNK 経路と p38 経路を持続活性することが報告されている⁴⁹⁾。しかし、末梢炎症においては、アストロサイト内の p38 経路の活性化は観察されていないことから⁵⁰⁾、主に JNK 経路のみが活性化されることが推測されている。

TNF- α 受容体のアダプター因子 TRAF2 により活性化された ASK1 は、JNK1 を活性する⁴⁸⁾ことや TNF- α で処理したアストロサイト群より、pJNK1 が抽出²⁹⁾されていることから、In vitro において、TNF- α により、pASK1-pJNK1 が活性化されることが示されている。

本研究にて、pASK1 と pJNK1 の陽性領域割合は、対照群と比較して、共に CFA7 日群で有意に増加していたことや TNF- α と pASK1、pASK1 と pJNK1、pJNK1 と GFAP の陽性領域割合が有意に相関関係を認めたこと、pASK1、pJNK1 と反応性アストロサイトとの共染色が観察されたことから、末梢炎症により、腰髄後角において反応性アストロサイト内の TNF- α 誘導 ASK1-JNK1 経路が活性化されたことが示唆された。

7. アストロサイトがアロディニアに及ぼす影響

末梢炎症により、脊髄内のアストロサイトが活性化され²¹⁾⁵¹⁾、アロディニアに関与することが報告されている¹⁾³⁶⁾⁵²⁾⁵³⁾。さらに、脊髄内のアストロサイトは、ギャップ結合を介して、カルシウムイオン等の移動を行い、興奮を広範囲に伝導することで⁵⁴⁾、両側性のアロディニアにも関与している⁵⁵⁾⁵⁶⁾。

本研究においても、GFAP 陽性領域割合は、対照群と比較して、CFA7, 17, 28 日 (両側) に有意に増加し、疼痛反応閾値と有意に相関していたことから、両側性のアロディニアに関与している可能性が示唆された。

8. まとめ

片側足部 CFA 誘発炎症性疼痛モデルの腰髄両側後角内の TNF- α と pASK1、pJNK1 の陽性領域割合が CFA 注入 7 日後に有意に増加していた。また、TNF- α と pASK1、pASK1 と pJNK1、pJNK1 と GFAP との陽性領域割合が有意に相関すること、pASK1 と pJNK1 が反応性アストロサイト内に共発現していたことから、末梢炎症に伴い、反応性アストロサイト内の TNF- α 誘導性 ASK1-JNK1 経路が活性化されていることが示唆された。

GFAP の陽性領域割合と疼痛反応閾値も有意に相関していることから、TNF- α 誘導性 ASK1-JNK1 経路がアロディニアに関連していることが示唆された。

しかし、TNF- α 誘導性 ASK1-JNK1 経路の活性は、神経細胞やオリゴデンドロサイトにも発現しており、今後、アストロサイト内の TNF- α 誘導性 ASK1-JNK1 経路がどの程度、アロディニアに関与しているのか、神経細胞やオリゴデンドロサイト内の TNF- α 誘導性 ASK1-JNK1 経路がアロディニアに関与していないか、ASK1 阻害剤投与によるシグナル伝達経路遮断や ASK1 遺伝子欠損マウスを用いた研究にて確認する必要がある。

結語

- ・片側足部 CFA 誘発炎症性疼痛モデルの腰髄両側後角内の TNF- α と pASK1、pJNK1 の陽性領域割合が CFA 注入 7 日後に有意に増加することを明らかにした。

- ・ pASK1、pJNK1 は、反応性アストロサイト、神経細胞、オリゴデンドロサイト内に共発現していたことから、反応性アストロサイト、神経細胞、オリゴデンドロサイト内の pASK1-pJNK1 経路が活性化されることが示唆された。

- ・ GFAP 陽性領域割合と疼痛反応閾値も相関していることから、TNF- α 誘導性 ASK1-JNK1 経路がアロディニアに関連している可能性が示唆された。

謝辞

本研究及び、論文作成に際し、多岐に渡り、御指導頂いた鹿児島大学院保健学研究科の米和徳教授、吉田義弘教授、榊間春利准教授、松田史代助教、大渡昭彦助教、木山良二助教に深く感謝致します。

引用文献

- 1) Gao YJ, Xu ZZ, Liu YC, et al : The c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in spinal astrocytes is required for the maintenance of bilateral mechanical allodynia under a persistent inflammatory pain condition. *PAIN* 148 : 309-319, 2010.
- 2) Nagakura Y, Okada M, Kohara A, et al : Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: Time course of progression and efficacy of analgesics . *THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS* 306 : 490-497, 2003.
- 3) Pearson CM : Experimental joint disease observations on adjuvant-induced arthritis. *Journal of chronic diseases* 16 : 863-874, 1962.
- 4) Newbould BB : Role of lymph nodes in adjuvant-induced arthritis in rats. *Annals of the rheumatic disease* 23 : 392-396, 1964.
- 5) Zahiri H, Gagnon J, Ayotte R, et al : Adjuvant experimental polyarthritis. *Canadian Medical Association Journal* 101 : 269-278, 1969.
- 6) 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 . *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 31 : 445-451, 1988.
- 7) Donaldson LF, Seckl JR, McQueen DS : A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: effects of adjuvant dose. *Journal of Neuroscience Methods* 46 : 5-10, 1993.
- 8) Dixon WJ : Efficient analysis of experimental observations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 20 : 441-462, 1980.
- 9) Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al : Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods* 53 : 55-63, 1994.
- 10) Shortland P, Woolf CJ : Morphology and somatotopy of the central arborizations of rapidly adapting glabrous skin afferents in the rat lumbar spinal cord. *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY* 329 : 491-511, 1993.
- 11) Höllt V, Przewlocki R, Haarmann I, et al : Stress-induced alterations in the levels of messenger RNA coding for proopiomelanocortin and prolactin in rat pituitary. *Neuroendocrinology* 43 : 277-282, 1986.
- 12) Millan MJ, Czonkowski A, Pilcher CWT, et al : A model of chronic pain in the rat: Functional correlates of alterations in the activity of opioid systems. *The Journal of Neuroscience* 7 (1) : 77-87, 1987.
- 13) Oliveira PG, Brenol CV, Edelweiss MI, et al : Subcutaneous inflammation (panniculitis) in tibio-tarsal joint of rats inoculated with complete Freund's adjuvant. *Clinical and Experimental Medicine* 7 : 184-187, 2007.

- 14) Möller KÄ, Johansson B, Berge OG, Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. *Journal of Neuroscience Methods* 84 : 41-47, 1998.
- 15) Wei XH, Zang Y, Wu CY, et al : Peri-sciatic administration of recombinant rat TNF- α induces mechanical allodynia via upregulation of TNF- α in dorsal root ganglia and in spinal dorsal horn : The role of NF-kappa B pathway. *Experimental Neurology* 205 : 471-484, 2007.
- 16) Ji RR, Kohno T, Moore KA, et al : Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *TRENDS in Neurosciences* 26 (12) : 696-706, 2003.
- 17) Fu KY, Light AR, Matsushima GK, et al : Microglial reactions after subcutaneous formalin injection into the rat hind paw. *Brain Research* 825 : 59-67, 1999.
- 18) Sweitzer SM, Colburn RW, Rutkowski M, et al : Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1beta expression that correlates with pain behavior in the rat. *Brain Research* 829 : 209-221, 1999.
- 19) Zhuang ZY, Wen YR, Zhang DR, et al : A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: Respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. *The Journal of Neuroscience* 26 (13) : 3551-3560, 2006.
- 20) Bao L, Zhu Y, Elhassan AM, et al : Adjuvant-induced arthritis : IL-1 β , IL-6 and TNF- α are up-regulated in the spinal cord. *NEUROIMMUNOLOGY* 18 (12) : 3905-3908, 2001.
- 21) Raghavendra V, Tanga FY, DeLeo JA : Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *European Journal of Neuroscience* 20 : 467-473, 2004.
- 22) Sawada M, Kondo N, Suzumura A, et al : Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Research* 491 : 394-397, 1989.
- 23) Ledebor A, Sloane EM, Milligan ED, et al : Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* 115 : 71-83, 2005.
- 24) Boka G, Anglade P, Wallach D, et al : Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in parkinson's disease. *Neuroscience Letters* 172 : 151-154, 1994.
- 25) Dopp JM, Mackenzie-Graham A, Otero GC, et al : Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *Journal of Neuroimmunology* 75 : 104-112, 1997.
- 26) Holmes GM, Hebert SL, Rogers RC, et al : Immunocytochemical localization of TNF type 1 and type 2 receptors in the rat spinal cord. *Brain Research* 1025 : 210-219, 2004.
- 27) Barna BP, Estes ML, Jacobs BS, et al : Human astrocytes proliferate in response to tumor necrosis factor alpha. *Journal of Neuroimmunology* 30 : 239-243, 1990.
- 28) Selmaj KW, Farooq M, Norton WT, et al : Proliferation of astrocytes in vitro in response to

- cytokines a primary role for tumor necrosis factor. *THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY* 144 : 129-135, 1990.
- 29) Zhang P , Miller BS , Rosenzweig SA , et al : Activation of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase in primary glial cultures. *Journal of Neuroscience Research* 46 : 114-121, 1996.
 - 30) Gao YJ, Zhang Ling, Ji RR : Spinal injection of TNF- α -activated astrocytes produces persistent pain symptom mechanical allodynia by releasing monocyte chemoattractant protein-1. *GLIA* 58 : 1871-1880, 2010.
 - 31) Ma W, Quirion R : Partial sciatic nerve ligation induces increase in the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in astrocytes in the lumbar spinal dorsal horn and the gracile nucleus. *Pain* 99 : 175-184, 2002.
 - 32) Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, et al : ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain* 114 : 149-159, 2005.
 - 33) Xiao C, Zhang L, Cheng QP, et al : The activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 in spinal cord and dorsal root ganglia contributes to inflammatory pain. *Brain Research* 1215 : 76-86, 2008.
 - 34) Xu Q, Garraway SM, Weyerbacher AR, et al : Activation of the neuronal extracellular signal-regulated kinase 2 in the spinal cord dorsal horn is required for complete Freund's adjuvant-induced pain hypersensitivity. *The Journal of Neuroscience* 28 (52) : 14087-14096, 2008.
 - 35) Katsura H, Obata K, Miyoshi K, et al : Transforming growth factor-activated kinase 1 induced in spinal astrocytes contributes to mechanical hypersensitivity after nerve injury. *GLIA* 56 : 723-733, 2008.
 - 36) Zhuang ZY, Wen YR, Zhang DR, et al : A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: Respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. *The Journal of Neuroscience* 26 (13) : 3551-3560, 2006.
 - 37) 小畑浩一, 三好敏, 野口浩一 : MAPK の活性と疼痛. *Clinical Neuroscience* 27 (5) , 中外医学社, 東京, pp497-499, 2009.
 - 38) Gao YJ, Ji RR : Activation of JNK pathway in persistent pain. *Neuroscience Letters* 437 : 180-183, 2008.
 - 39) Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, et al : Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science* 295 : 2282-2285, 2002.
 - 40) Zhang RX, Li A, Liu B, et al : IL-1ra alleviates inflammatory hyperalgesia through preventing

- phosphorylation of NMDA receptor NR-1 subunit in rats. *Pain* 135 : 232-239, 2008.
- 41) Zhang L, Berta T, Xu ZZ, et al : TNF-alpha contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: Distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2. *Pain* 152: 419-427, 2011.
 - 42) Gao YJ, Zhang L, Samad OA, et al : JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *The Journal of Neuroscience* 29 (13) : 4096-4108, 2009.
 - 43) 柴田護 : 痛み (片頭痛) とアストロサイト. *Clinical Neuroscience* 29 (11) , 中外医学社, 東京, pp1292-1294, 2011.
 - 44) Ichijo H, Nishida E, Irie K, et al. : Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275 : 90-94, 1997.
 - 45) Noguchi T, Takeda K, Matsuzawa A, et al : Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 280 (44) : 37033-37040, 2005.
 - 46) Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, et al. : Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *The EMBO Journal* 17 (9) : 2596-2606, 1998.
 - 47) Liu H, Nishitoh H, Ichjo H, et al. : Action of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 20 (6) : 2198-2208, 2000.
 - 48) Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, et al : ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Molecular Cell* 2 : 389-395, 1998.
 - 49) Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, et al. : ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO reports* 2 (3) : 222-228, 2001.
 - 50) Cui XY, Dai Y, Wang SL, et al. : Differential activation of p38 and extracellular signal-regulated kinase in spinal cord in a model of bee venom-induced inflammation and hyperalgesia. *Molecular Pain* 4 (17) : 1-11, 2008.
 - 51) Cao H, Zhang YQ : Spinal glial activation contributes to pathological pain states. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 32 : 972-983, 2008.
 - 52) Hofstetter CP, Holmstrom NA, Lilja JA, et al : Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts ; directed differentiation improves outcome . *NATURE NEUROSCIENCE* 8 : 346-353, 2005.
 - 53) Davices JE, Proschel C, Zhang N, et al : Transplanted astrocytes derived from BMP- or CNTF-treated glial-restricted precursors have opposite effects on recovery and allodynia after spinal cord injury. *Journal of Biology* 7 (24) : 1-20, 2008.
 - 54) Parri HR, Gould TM, Crunelli V : Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive

- NMDAR-mediated neuronal excitation. *nature neuroscience* 4 (8) : 803-812, 2001.
- 55) Milligan ED, Twining C, Chacur M, et al : Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *The Journal of Neuroscience* 23 (3) : 1026-1040, 2003.
- 56) Spataro LE, Sloane EM, Milligan ED, et al : Spinal gap junctions: potential involvement in pain facilitation. *The Journal of Pain* 5 (7) : 392-405, 2004.