

# 急性炎症下における脊髄後角表層の シクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) 陽性細胞について

川手 豊子<sup>1)</sup> 坂本 宏史<sup>1)</sup>  
山田 明香<sup>2)</sup> 熱海 佐保子<sup>3)</sup>

## Cyclooxygenase-2 (COX-2) immunoreactive-cells in the chicken superficial dorsal horn under the acute peripheral inflammation

Toyoko Kawate<sup>1)</sup>, Hiroshi Sakamoto<sup>1)</sup>,  
Sayaka Yamada<sup>2)</sup>, Saoko Atsumi<sup>3)</sup>

### 要 約

炎症性疼痛の鎮痛薬であるアスピリンの研究から、この薬の標的がプロスタグランジン (PGs) 合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害であることがわかってきた。その後 COX は細胞構築性の COX-1 と炎症誘導性の COX-2 とに分離された。薬理学的研究により PGs は痛覚情報を修飾し、痛覚過敏やアロディニア (異痛症) を起こすことが示された。我々は脊髄後角における痛覚修飾における COX-2 の役割を明らかにするため、片側足跡に急性炎症を起こしたニワトリの脊髄後角を用いて COX-2 陽性細胞と痛覚伝達 1 次ニューロン、後角固有ニューロンとの関係を形態学的に調べた。結果は後角の COX-2 陽性細胞数と痛覚情報伝達物質である P 物質 (SP) の増加を観察し、COX-2 陽性細胞は  $\gamma$  アミノ酪酸 (GABA) やエンケファリン (ENK) との共存が観察された。これらのことから、SP を持つ 1 次ニューロンが後角表層の GABA 或いは ENK を持つ COX-2 陽性細胞に影響を及ぼし PGs の産生を促して炎症時の痛覚情報を修飾していることが示唆された。

キーワード：脊髄後角

痛覚伝達 1 次ニューロン

後角固有ニューロン

シクロオキシゲナーゼ-2

P 物質 (サブスタンス P)

1) 健康科学大学 2) 元山梨大学医学部整形外科学講座大学院生  
3) 山梨大学名誉教授 (元医学部解剖学講座教授)

## 緒 言

紀元前から、痛み止め或は炎症を抑えるために柳の葉や樹皮が用いられてきた。19世紀になってこの薬効成分がサリチル酸であることが明らかになり、その後1897年バイエル社（ドイツ）のフェリックス・ホフマンによって副作用の少ないアセチルサリチル酸（商標アスピリン）が開発された。この葉の鎮痛、消炎作用の機序は永らく不明のままであったが、およそ70年後の1971年プロスタグランジン合成阻害薬（Vane, 1971; Ferreira, 1972; Ferreira et al., 1973）であることが証明された。この後プロスタグランジン（PGs）研究は飛躍的に進み、プロスタグランジン合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ（COX）については1991年に炎症誘発性のCOX-2（Xie et al., 1991; Kujubu et al., 1991）が見つかりCOX-1と分離された。COX-1はほとんどの細胞に存在する構築性タンパクであることがわかった。更に2002年にCOX-1のスプライスバリエントで脳に多くあるCOX-3（Chandrasekharan et al., 2002）が分離同定された（表：森田育男、2001）。

表

	COX-1	COX-2	COX-3
mRNAのサイズ	3 kb	4~4.5 kb	1.9 kb, 2.7 kb (犬)
タンパク質の性質	構築性タンパク質	誘導性タンパク質	
構成アミノ酸数	576個	603~604個	414個 (犬)
発現細胞	ほとんどすべての細胞	刺激後の炎症関連細胞 など炎症反応に関与する細胞	中枢神経に多い
選択的阻害剤	通常のNSAIDs (aspirin, indomethacin)	Meloxicam, celecoxib など	acetaminophen

(プロスタグランジン研究の新展開、2001改変/Chandrasekharan et al., 2002)

PGsは細胞膜を構成する脂質の一つであるアラキドン酸から合成される。この合成過程をアラキドン酸カスケードといいCOXはアラキドン酸からPGG<sub>2</sub>への反応を促す、次にPGG<sub>2</sub>はPGH<sub>2</sub>となり、ここからPGL<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、トロンボキサンA<sub>2</sub>へと各々の酵素によって合成されていく（図1）。PGsの合成の開始は①神経細胞の場合、情報伝達を受けた細胞膜下でCa<sup>2+</sup>イオンが増加することによってフォスホリパーゼA<sub>2</sub>が活性化され細胞膜からアラキドン酸が切り出される。この反応は容易におこる。②構築性タンパクのCOX-1は常時存在し、アラキドン酸量の増加に対して早い応答をしてPGsの合成を行う。一方、炎症誘発性のCOX-2は、末梢炎症で誘導されたインターロイキン1β（IL1β）が血行を介して細胞に到達し、細胞内のCOX-2 mRNA合成を活性化しCOX-2を増やすことによってPGsの合成を促進する。従って、炎症に伴ったPGs合成が促進されるためには①細胞膜下のCa<sup>2+</sup>イオンの増加と②IL1βの刺激が必要となる。COXはこの反応系（アラキドン酸カスケード）の中の律速酵素である



り、EP 2、EP 4は脊髄後角に発現している。EP 2、EP 3は痛覚過敏にEP 1はアロディニアに参与することが薬理的に示された (伊藤誠二、2004)。

我々は Samad et al. (2001) の論文から末梢炎症誘発の後に脊髄後角表層の細胞にCOX-2が発現してくることに注目し、これらCOX-2陽性細胞が既知の後角細胞のどの細胞に発現してくるのか、また、痛覚情報を伝達する1次ニューロン終末との関係について形態学的に明らかにすることを試みた。脊髄後角における痛覚制御と細胞構築については著者らが健康科学大学紀要 (2009) で報告している。

## 材料と方法

以下の動物実験はすべて山梨大学医学部解剖学講座で行われており、山梨大学が定める「山梨大学動物実験指針」(2002)に従っている。

実験動物はニワトリ (交配種) 雌約1,000g (成熟動物) を用いた。末梢炎症を形成するためニワトリの左足蹠に complete Freund's adjuvant (CFA; Sigma) 0.2 ml 注入し、経時的 (6-24時間) に深麻酔下 (ペントバルビタールナトリウム (70-80 mg/kg) 筋注) で、心臓から 4% paraformaldehyde (PFA) 単独または 4% PFA + 0.1% glutaraldehyde (GA) in phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) で灌流固定を行った。灌流固定の詳細は以前に記載している (Atsumi and Ohsato, 1984)。固定後直ちに腰膨大を取り出しマイクロスライサー (Dosaka, Kyoto) で50  $\mu$ m 切片を作り、この切片を用いて次の1次抗体で1晩インキュベートし、酵素抗体法 (ABC法: ABC kit, Vector Lab.) 並びに間接蛍光抗体法を行った (Sakamoto and Atsumi, 1989)。酵素抗体法を行った切片の観察は光学顕微鏡 (OLYMPUS BX 50) で、蛍光抗体法を行った切片はコンフォーカルレーザー顕微鏡 (TCS 4 D, Leica, Germany) で観察した。

1次抗体は抗COX-2抗体 (rabbit polyclonal, Santa Cruz)、痛覚伝達物質P物質(SP)を持つ1次ニューロンのマーカーとして抗SP抗体 (rat monoclonal, Biogenesis)、神経細胞体と樹状突起のマーカーとして抗microtubule-associated protein 2 (MAP 2) 抗体 (mouse monoclonal, Chemicon)、痛覚伝達1次ニューロンのマーカーとして抗CGRP抗体 (guinea pig polyclonal, Peninsula)、脊髄後角内介在ニューロンにある抑制性伝達物質である $\gamma$ アミノ酪酸 (GABA) とエンケファリン (ENK) のマーカーとして抗GABA抗体 (mouse monoclonal, Sigma)、抗L-ENK抗体 (mouse monoclonal, Chemicon) を用いた。これら1次抗体は異なる動物種の抗体を組み合わせることで細胞や神経線維を夫々に染色した。更にこれらは異なる励起波長を持つ蛍光色素で標識し、コンフォーカルレーザー顕微鏡で観察した。

1次抗体の組み合わせは以下の通りである。①抗COX-2抗体 (1:500) と抗SP抗体 (1:100)、②抗COX-2抗体 (1:500) と抗MAP 2抗体 (1:500)、③抗COX-2抗体 (1:500) と抗SP抗体 (1:100) と抗CGRP (1:2000)、④抗COX-2抗体 (1:500) と抗GABA抗体 (1:100)、⑤抗COX-2抗体 (1:500) と抗L-ENK抗体 (1:200)。

蛍光抗体は次の組み合わせで用いた。抗COX-2抗体は、2重標識の組み合わせの関

係で biotinylated anti-rabbit IgG (ABC kit, Vector Lab) で1時間インキュベートし FluoroLink Cy2- or Cy3-labelled streptavidin (Amersham) で標識した試料と Cy2-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson Immunoresearch) で標識した試料がある。抗 SP 抗体は Texas red-conjugated anti-rat IgG (Vector Lab)、抗 MAP 2 抗体を Cy2-conjugated anti-mouse IgG (Chemicon)、抗 CGRP 抗体は Cy5-conjugated goat anti-guinea pig IgG (Jackson Immunoresearch)、抗 GABA 抗体と抗 L-ENK 抗体は Cy2-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson Immunoresearch) で標識した。

1次抗体を除いて行なったコントロール実験並びに対照血清、蛍光抗体のみで処理した実験では、すべて非特異的な標識は観察されなかった。

COX-2 と GABA、ENK との関係を知るため正常な動物において、蛍光2重標識を行った切片27枚(ニワトリ4羽)について後角1・2層のGABA陽性、ENK陽性細胞で同時にCOX-2を発現する細胞数を計数した。

## 結果

### 非炎症状態と急性末梢炎症状態下における COX-2 陽性細胞

ニワトリ脊髄腰膨大におけるCOX-2陽性反応は炎症を誘発していない場合でも、灰白質全体の神経細胞とグリア細胞に観察された(図2 contra)。図3は抗COX-2抗体と抗MAP2抗体による2重染色であるが、矢印はCOX-2・MAP2が共存する神経細胞を示し、矢尻はMAP2単独陽性のグリア細胞を示している。神経細胞のすべてがCOX-2陽性というわけではなかった。痛覚情報の伝達や修飾に関与する細胞がある脊髄後角1層と2層におけるCOX-2陽性細胞について、炎症を末梢に誘発した側(炎症側)と炎症を誘発していない側(コントロール側)とで細胞数の比較を行った。後角1層では痛覚に関与するCOX-2陽性細胞数が少なかったため炎症側とコントロール側での比較はできなかった。後角2層のCOX-2陽性細胞は、炎症側では12時間後にコントロール側と比較して1.6倍となり、24時間後では1.4倍であった(図2)。炎症側にお

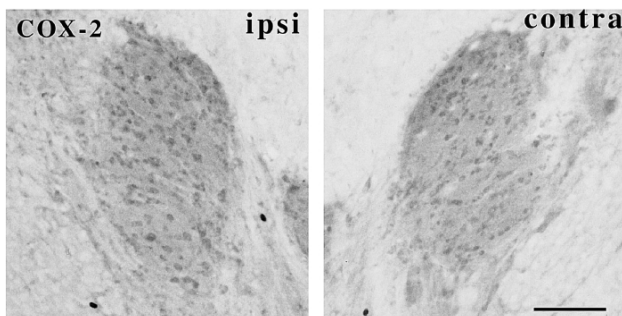


図2：COX-2陽性細胞(ABC法)

左足蹠にCFA注入24時間後。ipsiは炎症側(腰髄後角1・2層左側)を、contraは対照側(腰髄後角1・2層右側)である。後角1・2層全体にCOX-2陽性細胞が認められる。炎症側の2層でCOX-2陽性細胞数の増加がみられる。bar：100µm

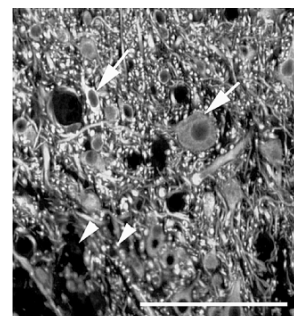


図3：COX-2/MAP2陽性細胞(蛍光2重標識)

CFA注入後3時間の対照側。矢印はCOX-2/MAP2陽性細胞、矢尻はグリア細胞を示している。bar：50µm。

る細胞数のピークはCFA 注入後12時間であった。この結果はラットで行われた Samad et al. (2001) の結果と類似するが反応時間のピークはニワトリの方が遅い傾向にあった。

#### 後角1・2層におけるCOX-2陽性細胞とSP線維

痛覚伝達1次ニューロンの神経伝達物質はグルタミン酸(早い伝達)とSP(遅い伝達)があるが、この実験ではグルタミン酸はアミノ酸1個であるため抗体が作りにくいこと、また痛覚伝達以外の1次ニューロンにも存在することから特異性の高い抗SP抗体を用いている。しかしながら、後角1層の投射ニューロンにSPを持つものがあるため、後根神経節からのSPを持つ1次ニューロンの線維と区別するため抗CGRP抗体で

確認をした。CGRPとSPを持つ線維が痛覚伝達の1次ニューロンである(図4矢尻)。図4矢印はCGRPを持たずSPのみを持つ線維である。

炎症誘発時のニワトリ腰髄後角ではコントロール側と比較して炎症側のSP線維が明瞭に増幅しているのが観察された。しかし、これは線維数が増加しているわけではなくバリコシティといわれる膨らみにSPが増加し活性化した状態を示すと考えられた。

SP・CGRP共存線維はCOX-2陽性細胞に近接しており、これらの線維がCOX-2陽性細胞に直接シナプスを形成していたことはYamada et al. (2006) が報告している。

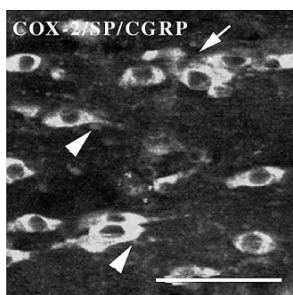


図4: COX-2陽性細胞、SP/CGRP陽性線維、SP陽性線維(蛍光3重標識)

CFA注入後12時間の炎症側。矢尻はSP、CGRPの共存終末を、矢印はSP単独終末を示している。bar: 50 μm。

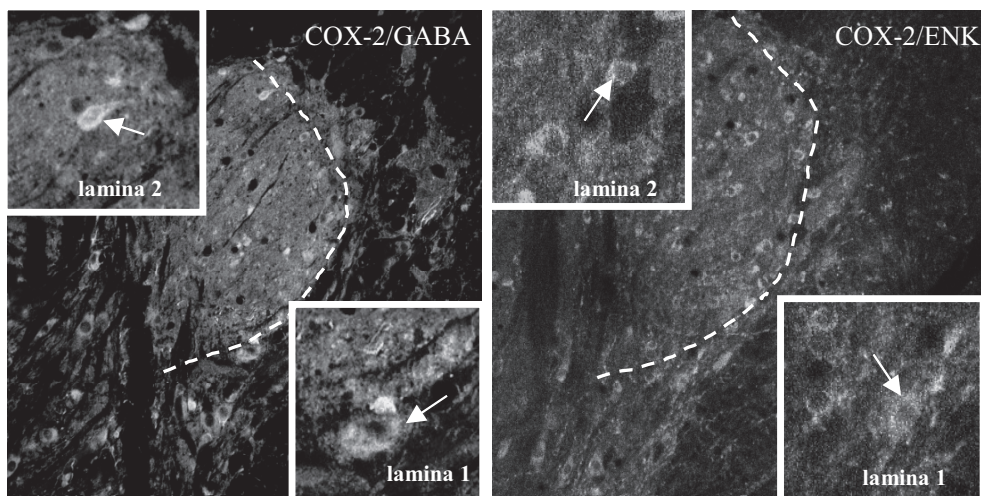


図5: COX-2/GABA陽性細胞(左図)、COX-2/ENK陽性細胞(右図)(蛍光2重標識)

小枠はそれぞれの陽性細胞を1層、2層の別に拡大して矢印で示している。

### 後角1・2層におけるCOX-2陽性細胞とGABA並びにENK陽性細胞

ニワトリ腰膨大後角1・2層共にCOX-2陽性細胞はGABA並びにENKを持つ神経細胞があった(図5)。COX-2陽性細胞のうちGABAを持つ細胞は28.9%(403/1420細胞数)、逆に、GABA陽性細胞でCOX-2を持つ細胞は62.5%(403/644細胞数)であった(ニワトリ4羽、腰膨大切片数27枚)。COX-2陽性細胞のうちENKを持つ細胞は5.7%(102/1804細胞数)、これらENK陽性細胞はすべてCOX-2を持っていた。

## まとめと考察

我々はニワトリ腰髄後角1・2層の細胞について、免疫組織化学的手法を用いてCOX-2陽性細胞を確認した。更に片側後肢足蹠にCFAを注入して炎症を誘発し、COX-2陽性細胞数を経時的に測定し、12時間後に最もCOX-2陽性細胞数が増加することを確認した。痛覚情報を伝達するSPを持つ線維(痛覚伝達1次ニューロンの終末)と、COX-2陽性細胞は近接していた。COX-2陽性細胞の中にはGABA並びにENKを持つ神経細胞があった。

### 非炎症状態脊髄後角1・2層におけるCOX-2陽性細胞について

COX-2陽性細胞は大型のものから小型のものまで、様々な大きさに腰髄全体に分布していた。神経細胞マーカーとしてMAP2を用いて蛍光2重標識を行ったところ、比較的大きなCOX-2陽性細胞はほとんどが神経細胞であり、小型のものはグリア細胞であった。後角表層のCOX-2陽性細胞の免疫組織化学的研究はラット(Willingale et al., 1997; Beiche et al., 1998 a; Samad et al., 2001)とマウス(Maihofner et al., 2000)で既に報告がある。非炎症状態(コントロール)においてニワトリはほぼラットと同様の結果を得た。非炎症状態下でのマウスは、ラットと比較して後角表層のCOX-2陽性細胞数はかなり少ないようである。ラットでの非炎症状態において、COX-2の特異的阻害剤を用いると脊髄におけるPGE<sub>2</sub>が減少することが確認されている(Goppelt-Struebe and Beiche, 1998)。最近では、構築型COX-1や非炎症状態で細胞内に存在するCOX-2は、ごく初期段階の炎症で誘導されるPGsの合成に関与し、引き続き誘導されて増加してくるCOX-2がPGsの合成を行うことがわかっている(Verdeh et al., 2009)。更に、神経細胞に存在するCOX-2<sup>+/+</sup>マウスの研究から誘導型COX-2はmechanical hyperalgesia(機械的刺激に依る痛覚過敏)に関与することが示唆されている(Verdeh et al., 2009)。

### 急性炎症状態下での後角1・2層におけるCOX-2陽性細胞数の変化

我々は片側足蹠にCFA注入後3-24時間後の腰髄1・2層におけるCOX-2陽性細胞数の変化を観察した。その結果12、24時間後のCFA注入後の後角2層において、コントロール側と比較して小型COX-2陽性細胞数の有意な増加を確認した。ラットの研究によるとCOX-2 mRNAは炎症側、コントロール側とも増加し始めるが炎症側で増加

率が高く、6時間で両側とも最大となり(炎症側16倍、コントロール側9倍)、その後減少傾向になり24時間後には炎症側(9倍)とコントロール側(約8倍)とでほとんど同じレベルになる(Samad et al., 2001)。別の研究者達は22日後まで経過を追いCOX-2 mRNAレベルが炎症側で若干高いもののコントロール側も高いレベルで推移することを示した(Beiche et al., 1998 b)。発現数が12時間で最も多かったのは誘導型COX-2タンパクがmRNAから遅れて発現したためと考えられる。これらのことからニワトリにおいてもラットと同様の経過をたどることが推測された。

#### 炎症状態下におけるCOX-2陽性細胞とSP陽性線維の関係

SPは後根神経節(DRG)ニューロン並びに後角1層投射ニューロンに存在し、痛覚伝達或いは調節に関与する神経伝達物質である(Otsuka and Yanagisawa, 1987; Cao et al., 1998; De Felipe et al., 1998)。更にSP並びにSPレセプター(NK1 receptor)が炎症誘発とともに脊髄後角表層で増加してくることも知られている(Mapp et al., 1993; Abbadie et al., 1996; Honoré et al., 1999)。我々もCFA注入後腰髄1・2層で、炎症側のSPの免疫染色性がコントロール側と比較して明らかに増加しているのを観察した。このSP終末の由来がDRGニューロンであるか後角ニューロンであるかを確認するためにCGRP(DRGニューロンマーカー; Gibson et al., 1984; Merighi et al., 1992)との2重標識を行なった。このSPとCGRPの蛍光2重標識の結果から、免疫染色性が増加しているSP終末のほとんどがDRGニューロン由来であることが確認された。

SP線維終末の入力部位は投射ニューロンである後角1層の特異的侵害受容ニューロン、4-6層の広作動域ニューロン、そして後角固有の2層の介在ニューロンである。急性炎症誘発後、後角1層並びに2層外側部のSP・CGRP終末の染色性の増加が観察されたが、この部位は上述の投射ニューロンとSP・CGRP終末がシナプスを形成する部位である。また後角2層の小型のCOX-2陽性細胞数が増加し、SP・CGRP終末と接しているのが観察された。これらをまとめると、末梢の炎症部位で産生されたIL-1 $\beta$ が血行性に神経細胞に作用しCOX-2 mRNAが発現しCOX-2が作られる。一方でSP・CGRP線維からSP放出が起るとNK1 receptorが活性化され細胞内カルシウムの上昇が起こり、細胞膜からアラキドン酸が遊離する。このアラキドン酸にCOX-2が酵素として働きPGE<sub>2</sub>が産生されると考えられる。最近の論文ではアラキドン酸遊離のための細胞内カルシウムの上昇にはグルタミン酸(SP線維に共存する神経伝達物質:痛覚伝達の主役的アミノ酸)のNMDA receptorの関与が示唆されている(伊藤誠二, 2004)。

#### 後角1・2層におけるCOX-2陽性細胞とGABA並びにENK陽性細胞

ニワトリ腰膨大後角1・2層共にCOX-2陽性細胞はGABA並びにENKを持つ神経細胞があった。これらの神経細胞は、IL-1 $\beta$  receptorと、NK1 receptor或はNMDA receptorまたはその両方を持つ細胞の可能性がある。これらの細胞はPGsの合成と放



出、GABA 或は ENK の放出を同時に行って痛覚修飾に関与していることが示唆されるが、この細胞内における相互作用の有無については明らかになっていない。因に PGs は基本的に痛覚亢進（痛覚過敏やアロディニア）に働き、GABA、ENK は抑制性の神経伝達物質で脱痛覚に働くことがわかっている。

## 参考文献

---

- Abbadie, C., Brown, JL., Mantyh, PW., Basbaum, AI. (1996) Spinal cord substance P receptor immunoreactivity increases in both inflammatory and nerve injury models of persistent pain. *Neuroscience* 70, 201-209.
- Atsumi, S., Ohsato, K. (1984) Synaptology of  $\alpha$ -motoneurons in the chicken spinal cord. *Neurosci Res.* 2, 77-96.
- Beiche, F., Klein, T., Nsing, R., Neuhuber, W., Goppelt-Struebe, M. (1998 a) Localization of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 receptor EP3 in the rat lumbar spinal cord. *J Neuroimmunology* 89, 26-34.
- Beiche, F., Brune, K., Geisslinger, G., Goppelt-Struebe, M. (1998 b) Expression of cyclooxygenase isoforms in the rat spinal cord and their regulation during adjuvant-induced arthritis. *Inflamm Res.* 47, 482-487.
- Cao, Y-Q., Mantyh, PW., Carlson, ET., Gillespie, A-M., Epstein, CJ., Basbaum, AI. (1998) Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature* 392, 390-394.
- Chandrasekharan NV., Dai, H., Roos KL., Evanson, NK., Tomsik J., Elton TS., Simmons DL. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99, 13926-31.
- De Felipe, C., Herrero, JF., O'Brien, JA., Palmer, JA., Doyle, CA., Smith, AJ., Laird, JM., Belmonte, C., Cervero, F., Hunt S.P. (1998) Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature* 392, 394-397.
- Ferreira, SH. (1972) Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol.* 240, 200-203.
- Ferreira, SH., Moncada, S., Vane, JR. (1973) Further experience to establish that the analgesic action of aspirin-like drugs depends on the inhibition of prostaglandin biosynthesis. *Br J Pharmacol.* 47, 629 P-630 P.
- Gibson, SJ., Polak, JM., Bloom, SR., Sabate, IM., Mulderry, PM., Ghatei, MA., McGregor, GP., Morrison, JF., Kelly, JS., Evans, RM. (1984) Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. *J Neurosci.* 4, 3101-3111.
- Goppelt-Struebe, M., Beiche, F., (1998) Cyclooxygenase-2 in the spinal cord: localization and regulation after a peripheral inflammatory stimulus. *Adv Exp Med Biol.* 433, 213-216.
- Honore, P., Menning, PM., Rogers, SD., Nichols, ML., Basbaum, AI., Besson, J-M., Mantyh, PW. (1999) Spinal substance P receptor expression and internalization in acute, short-term, and long-term inflammatory pain states. *J Neurosci.* 19, 7670-7678.
- 伊藤誠二、南敏明：プロスタノイドの痛覚における役割 *Molecular Medicine* 41(6): 685-693, 2004.

- 川手豊子、坂本宏史：痛覚の伝導と脊髄における痛覚調節 健康科学大学紀要 6:207-215, 2009.
- Kujubu DA., Fletcher, BS., Vamum, BC., Lim RW., Herschman, HR. (1991) TIS 10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem.* 226, 12866-72.
- Maihofner, C., Tegeder, I., Euchenhofer, C., Dewitt, D., Brune, K., Bang, R., Neuhuber, W., Geisslinger, G. (2000) Localization and regulation of cyclo-oxygenase-1 and -2 and neuronal nitric oxide synthase in mouse spinal cord. *Neuroscience* 101, 1093-1108.
- Mapp PL., Terenghi, G., Walsh, DA., Chen, ST., Cruwys, SC., Garrett, N., Kidd, BL., Polak, JM., Blake, DR. (1993) Monoarthritis in the rat knee induces bilateral and time-dependent changes in substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord. *Neuroscience* 57, 1091-1096.
- Merighi, A., Cruz, F., Coimbra, A. (1992) Immunocytochemical staining of neuropeptides in terminal arborization of primary afferent fibers anterogradely labeled and identified at light and electron microscopic levels. *J Neurosci Methods* 42, 106-113.
- 森田育男：シクロオキシゲナーゼ (COX) プロスタグランジン研究の新展開 現代科学増刊 38:111-117, 2001.
- Otsuka, M., Yanagisawa, M. (1987) Effect of a substance P antagonist on capsaicin-induced nociceptive reflex in the isolated spinal cord-tail preparation of the rat. *Acta Physiologica Hungarica* 69, 363-366.
- Samad, TA., Moore, KA., Sapirstein, A., Billet, S., Allchorne, A., Poole, S., Bonventre, JV., Woolf, CJ. (2001) Interleukin-1 $\beta$ -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* 410, 471-475.
- Vane, JR. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.* 231, 232-235.
- Verdeh D., Wang, D., Costigan, M., Lazarus, M., Saper, CB., Woolf, CJ., FitzGerald, GA., Samad, TA. (2009) COX-2 in CNS neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity in mice. *J Clin Invest.* 119, 287-294.
- Willingale, HL., Gardiner, NJ., McLymont, N., Giblett, S., Grubb, BD. (1997) Prostanoids synthesized by cyclooxygenase isoforms in rat spinal cord and their contribution to the development of neuronal hyperexcitability. *Br J Pharmacol.* 122, 1593-1604.
- Xie, WL., Chipman, JG., Robertson, DL., Erikson, RL., Simmons, DL. (1991) Expression of mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88, 2692-2696.
- Yamada, S., Kawate, T., Sakamoto, H., Aoki, K., Hamada, Y., Atsumi, S. (2006) Cyclo-oxygenase-2-immunoreactive neurons in the lumbar dorsal horn in a chicken acute inflammation model. *Anat Sci Int.* 81, 164-172.

## Abstract

Aspirin has been shown to block cyclooxygenase (COX), thus preventing the synthesis of prostaglandins (PGs). Pharmacological studies have proved that PGs modulate pain transmission and cause hyperalgesia and allodynia. More recently, an inflammatory inducible COX isozyme (COX-2) was found using cloning techniques. In this study, we elucidated the relationship among COX-2 expressing cells, nociceptive primary afferents (substance P containing primary afferent terminals) and spinal intrinsic neurons in the chicken spinal dorsal horn using morphological methods. We discovered increases in the number of COX-2 expressing cells and substance P containing terminals on the same side of the spinal dorsal horn as the hind paw on which acute inflammation was induced beforehand. We also found that some of the COX-2 expressing cells were neurons that co-localized  $\gamma$ aminobutyricacid (GABA) and/or enkephalin. These results indicate that nociceptive primary afferent terminals can modulate noxious information processing through affecting COX-2 expressing cells in the chicken dorsal horn.

Keywords : spinal dorsal horn  
nociceptive primary afferent neuron  
spinal intrinsic neuron  
cyclooxygenase-2  
substance P