The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	パーキンソン病モデルラットにおける痛覚過敏のメカニズムの検討
Author(s)	宇佐美, 奈由香
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76289
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（宇佐美　奈由香）	
論文題名	パーキンソン病モデルラットにおける痛覚過敏のメカニズムの検討

論文内容の要旨

【目的】

パーキンソン病（PD）における運動系や自律神経系の異常についてはよく知られているが，痛覚への影響については十分に解明されていない．また，PDモデルラットは痛覚過敏の状態となっている事が報告されているが，そのメカニズムについては不明である．そこで本研究では，まず研究1として片側の内側前脳束に6-OHDAを注入して作製したPDモデルラットにおいて，化学刺激（ホルマリン）に対する痛覚過敏の確認を行った後に，痛覚過敏のメカニズムを検討するために，下行性疼痛抑制系に関与する上位中枢神経核における神経活動性を免疫組織化学的に評価した．次に研究2では，研究1の結果から，PDモデルラットで見られた上位中枢の神経活動の変化に着目し，その痛覚への影響を検討した．

【方法】

当研究計画はNIHの実験動物の飼育と取扱いのガイドラインに沿ったものであり，大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の審査を受け承認を得た（No.30-001）．

研究1

7週齢の雄性Wistarラットを麻酔下に脳定位固定装置に固定し，左側内側前脳束に6-OHDA（6-hydroxydopamine）を投与した．投与の14日後にメタンフェタミンを腹腔内投与して誘発される回転運動を観察し，毎分あたりの平均回転数が7回以上のラットを片側性PDモデルラット（6-OHDA群）として使用した．同様に生理食塩水を投与したラットをSham群とした．その21日後に，ラットの左側口髭部に4%ホルマリン溶液を50 μl皮下注射し，45分間の顔面こすり行動の回数を計測し，　皮下注射の2時間後に脳の灌流固定を行った．対照群として生理食塩水を皮下注射した群と，皮下注射を行わない群を作製した．

ドパミン神経の破壊を確認するために，線条体と黒質を対象に，tyrosine hydroxylase（TH）に対する免疫組織化学的染色を行った．化学刺激に対する痛覚過敏性を検討するために，三叉神経脊髄路核尾側亜核（Vc）を対象に，c-Fosタンパクに対する免疫組織化学的染色を行い，陽性細胞数を計測した．また，痛覚過敏のメカニズムを検討するために，下行性疼痛抑制系に関与する視床下部室傍核（paraventricular nucleus; PVN），中脳水道周囲灰白質の腹外側部（ventrolateral periaqueductal grey; vlPAG），青斑核（locus coeruleus; LC），大縫線核（nucleus raphe magnus; NRM）を対象に，c-Fosタンパクに対する免疫組織化学的染色を行い，陽性細胞数を計測した．なお，PVNにおける計測は大細胞領域（mPVN; magnocellular part of PVN），小細胞領域背側部（dpPVN; dorsal parvocellular part of PVN），小細胞領域内側部（mpPVN; medial parvocellular part of PVN）に分けて行った．

結果は全て，平均値±標準誤差で表し，危険率は $p < 0.05$で有意差ありとした．統計解析として，Welchのt検定と，二元配置分散分析およびBonferroni補正による多重比較を用いた．

研究2

研究1の結果，ホルマリン刺激後にPVNで誘発されるc-Fos陽性細胞数の増加が，6-OHDA群の左側のmPVNおよびdpPVNで有意に抑制された．これらの領域には，鎮痛効果を有するホルモンであるoxytocin（OT）とvasopressin（VP）の産生細胞が存在し，これらは侵害刺激が加わった際に活動性が亢進し，OTやVPを分泌することが知られている．そこで研究2では，mPVNとdpPVNに存在するOT産生細胞やVP産生細胞でみられる侵害刺激誘発性の神経活動亢進が，6-OHDAの投与により抑制され，その結果これらのホルモンによる鎮痛効果が減弱して痛覚過敏を惹起したと仮説を立て，検討を行った．

mPVN，dpPVNにおける，OTあるいはVP産生細胞Pの神経活動を検討するために，ホルマリン刺激後ラットのPVNを対象に，OT抗体とc-Fos抗体，あるいはVP抗体とc-Fos抗体の蛍光二重免疫染色を行い，共発現した細胞数を計数した．

また，mPVNとdpPVNにおいてホルマリン刺激後にみられたc-Fos陽性細胞数の変化には，侵害刺激後にOTあるいはVP産生細胞の神経活動性を亢進させるノルアドレナリン（NA）神経のPVNへの投射の変化が関与したと仮定して検討を行った． PVNを対象にDBH（dopamine-β-hydroxylase）に対する免疫組織化学的染色を行い，mPVNとdpPVNにおけるDBH陽性の神経線維密度を測定した．

さらに，侵害刺激が加わると，OTの分泌が促進され，OTの血中濃度が増加することが知られているため，ホルマリン刺激による血中OT濃度に6-OHDA群ではどのような変化が生じるかを検討した． 6-OHDA群とSham群に対して,麻酔下にホルマリン刺激を行い，その15分後に採血を行い，対照群として無刺激下でも採血を行った． Oxytocin ELISA kitを用いて血中OT濃度を測定した．

最後に，6-OHDA群におけるホルマリン刺激後の痛覚過敏に対するOTの影響を評価するため，大槽内にOT投与を行い，痛覚過敏への影響を検討した． 麻酔下にカテーテルを先端がVc付近に達するように挿入し，カテーテルより生理食塩水，あるいはOT（0.025または0.1 μg/μl）を10 μl投与した後に左側口髭部にホルマリン刺激を与え，45分間の顔面こすり運動の回数とVcにおけるc-Fos陽性細胞数を計数した．

結果は全て，平均値±標準誤差で表し，危険率は $p < 0.05$で有意差ありとした．統計解析として，一元配置分散分析およびBonferroni補正あるいはTukey検定による多重比較，もしくは二元配置分散分析およびBonferroni補正による多重比較を使用した．

【結果】

研究1

6-OHDA群では，回転テストにおいて有意に多く回転し，線条体におけるTH陽性神経線維密度と，黒質緻密部におけるTH陽性細胞数が有意に減少したことから，片側PDモデルラットの確立を確認した．また，ホルマリン刺激後の顔面こすり行動の回数と，Vc表層に出現したc-Fos陽性細胞数が6-OHDA群で有意に増加したことから，化学刺激による6-OHDA群の痛覚過敏を確認した．ホルマリン刺激後に発現した下行性疼痛抑制系のc-Fos陽性細胞数に関しては，vlPAG，LC，NRMでは両群に有意差が認められなかった．しかし，PVNでは，6-OHDA群の左側mPVNに発現したc-Fos陽性細胞数は，皮下注射を行わなかった場合に比較してホルマリン刺激後に増加せず，6-OHDA群の左側mPVNとdpPVNに発現したc-Fos陽性細胞数はSham群に比べて有意に少ない数となった．

研究2

左側のmPVNとdpPVNにおけるOT陽性細胞に共発現したc-Fos陽性細胞数は，6-OHDA群で有意に減少した．一方，同領域においてVP陽性細胞に共発現したc-Fos陽性細胞数は，両群に有意な変化を認めなかった．

PVNにおけるDBH陽性神経線維密度は，左側のmPVNでは有意な変化ではないものの，Sham群に比較して6-OHDA群で減少傾向を示した．左側のdpPVNにおいては，Sham群に比較して6-OHDA群で有意に減少した．

また，血中OT濃度は，Sham群ではホルマリン刺激によって有意に増加したが，6-OHDA群では有意な変化は認められず，ホルマリン刺激後の血中OT濃度はSham群に比べて6-OHDA群で有意に少なかった．

OTを大槽内投与した結果，OT（0.1 μg/μl）投与によって，ホルマリン刺激による第2相（10-45分）における顔面こすり行動の増加が有意に抑制され，Vc表層におけるc-Fos陽性細胞数が有意に減少した．

【考察】

6-OHDA群は左側口髭部へのホルマリン刺激に対して痛覚過敏を示し，下行性疼痛抑制系の一つであるPVNのうち，左側のmPVNとdpPVNで侵害刺激誘発性の活動亢進が抑制された．さらに検討を行ったところ，6-OHDA群では，同領域のOT産生細胞に生じる侵害刺激誘発性の活動亢進が抑制されており，侵害刺激誘発性の血中OT濃度の上昇が認めらなかった．OT産生細胞の侵害刺激誘発性の活動亢進によって，dpPVNからOTがVcへ下行性に神経投射されるとともに，mPVNからOTが血中へ分泌され，その結果OTはVcにおいて鎮痛効果を示すことが報告されている．これらのことから，侵害刺激後の6-OHDA群では，OT産生細胞の活動亢進およびOTの分泌促進が抑制されたことによって，神経投射あるいは血液を介するVcでのOTによる鎮痛機構が減弱し，痛覚過敏を呈した可能性が示唆された．

6-OHDA群のPVNで，侵害刺激後のOT産生細胞の活動亢進が抑制された原因として，OT産生細胞の活動亢進に関与するNA作動性神経のPVNへの投射入力が減少したと仮説を立てて検討したところ，6-OHDA群のNA線維密度はSham群と比較して，左側dpPVNでは減少し，左側mPVNでは減少傾向がみられた．しかし，研究に使用した個体数が少なく，また，PVNにおけるNA神経の線維密度の低下が投射入力の低下を示すとは断定できないため，侵害刺激後のOT産生細胞の活動亢進が抑制された原因に関しては今後検討が必要である．

さらに,PDモデルラットの痛覚過敏がOT（0.1 μg/μl）大槽内投与によって改善したことから，PDの痛覚過敏にOTによる鎮痛効果の減弱が影響しており，これはOTの大槽内投与によって改善することが示唆された．これはPD患者の痛覚過敏に対する治療の発展に寄与するものと期待される．

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　宇佐美　奈由香　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	丹羽　均
	副 査	教授	吉田　篤
	副 査	准教授	豊田　博紀
	副 査	講師	西部　真理子

論文審査の結果の要旨

本研究は、パーキンソン病における痛覚過敏のメカニズムに関して、モデルラットを用いて検討したものである。

本研究の結果より、パーキンソン病モデルラットは化学刺激に対して痛覚過敏を示し、視床下部室傍核で合成、分泌されるオキシトシンによる三叉神経脊髄路核尾側亜核における鎮痛作用の減弱が痛覚過敏に関与した可能性が示唆された。

これらの結果は、パーキンソン病患者の痛覚過敏に対する治療の一助となるものであり、よって、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。