

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

# 学位論文

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

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻 高次脳口腔機能学講座(歯科麻酔学教室)

宇佐美 奈由香

緒 言

パーキンソン病 (Parkinson's disease; PD) はアルツハイマー病の次に多い神経変性疾患であり, その有病率は日本では人口 10万人あたり 100~180 人と報告されている (Yamawaki et al., 2009; Osaki et al., 2011). PD は年齢とともに発症率が増加するため,高齢化の進む日本において PD は 重要な疾患の一つと言える (Wirdefeldt et al., 2011; Pringsheim et al., 2014). PD では,黒質の ドパミン (DA) 作動性神経細胞が変性,脱落することによって,黒質線条体系の機能が低下し,主 症状である運動症状 (安静時振戦,動作緩慢,筋固縮,姿勢反射障害) が生じるといわれている. また, PD 患者では運動症状の発症前から非運動症状がみられることが知られており, DA 作動性神 経だけでなくノルアドレナリン (NA) 作動性神経,セロトニン作動性神経などの神経変性も関与し ている可能性が指摘されている (Pearce et al., 1995; Del Tredici et al., 2002; Braak et al., 2003; Pertovaara et al., 2004; Braak et al., 2006; Gaig et al., 2009; Lim et al., 2009; Conte et al., 2013; Kamińska et al., 2017).

非運動障害の1つである痛みを訴える PD 患者は 30~85%に及ぶと言われており(Wasner and Deuschl, 2012; ; Valkovic et al., 2015), Ford は PD による痛みを①筋・関節に関連した疼痛, ②末 梢神経,神経根病変による疼痛, ③ジストニアに関連した疼痛, ④中枢性疼痛, ⑤アカシジアに関連 した疼痛に分類し, PD 患者の痛みを管理することの重要性に言及している(Ford, 2010). また, PD 患者の痛覚閾値に関する研究が散見され(Ayla et al., 2012; Conte et al., 2013), 冷温刺激や機械 刺激に対して PD 患者では痛覚閾値が低下し痛覚過敏を示したとの報告が多い(Gerdelat et al., 2007; Mylius et al., 2009; Nandhagopal et al., 2010; Marsala et al., 2011; Perrotta et al., 2011). 痛みはうつ状態や QOL の低下に関与することからも,痛みは PD 患者にとって特に悩ましい症状 の一つと言える(Fishbain et al., 1997; Valkovic et al., 2015). その一方で, PD 患者の痛覚閾値に は変化が無かったとの報告も見られ,臨床研究における PD 患者の痛覚に関して見解は一致してい ない(Massetani et al., 1989; Dialdetti et al., 2004; Vela et al., 2007).

PD モデル動物を用いて, PD が痛覚に及ぼす影響について検討されている. PD モデル動物とし ては, 6-hydroxydopamine (以下, 6-OHDA) や 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (以 下, MPTP), ロテノンなどの薬剤を投与する方法が用いられる. このうち, MPTP の腹腔内投与に よるモデルでは、後足への熱刺激や機械刺激に対して痛覚過敏を示したとの報告がある (Rosland et al., 1992; Park et al., 2015). また, 6-OHDA に関しては線条体や黒質, あるいは内側前脳束に 注入するモデルが存在し, いずれにおいても痛覚過敏を示したとの報告が散見され, 片側の内側前 脳束や線条体に 6-OHDA を注入した場合, 後足への機械刺激や化学刺激に対しての痛覚過敏が注 入側で見られたとの報告がある (Takeda et al., 2005; Tassorelli et al., 2007; Domenici et al., 2019). さらに、非注入側においても化学刺激や熱刺激、機械刺激に痛覚過敏を示したとの報告も ある (Chudler et al., 2008). 顔面口腔領域の痛覚に関しては、両側の内側前脳束や黒質緻密部に 6-OHDA を注入したモデルにおいて、口髭部への機械刺激に対してアロデニアを示したと報告され ており (Dieb et al., 2014; Dieb et al., 2016), これは PD 患者における高い口腔内灼熱症候群の罹 患率との関連を示唆するものである(Clifford et al., 1998; Coon and Laughlin, 2012). また, 先 行研究において, 6-OHDA を左側内側前脳束に注入した片側 PD モデルラットの左右の上口唇にホ ルマリンテストを行ったところ, 左側の上口唇にホルマリンテストを行った場合にのみ, 疼痛関連 行動として測定した顔面こすり行動の回数と三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) 表層に発現した c-Fos 陽性細胞数が増加した (Maegawa et al., 2015). 以上の報告より, PD モデルラットは種々の刺 激に対して痛覚過敏を示すことがわかった.

下行性疼痛抑制系は,脊髄後角や Vc における痛覚の興奮性神経伝達を調節することが知られて いる(Ren et al., 1999; Millan, 2002, Sugiyo et al., 2005). PD にみられる痛覚過敏のメカニズム として,黒質線条体系の機能低下に伴う下行性疼痛抑制系の変化が,脊髄後角や Vc における興奮性 神経伝達を促進し,痛覚過敏を惹起するとの説があるものの,未だ明らかとなっていない(Conte et al., 2013; Fil et al., 2013; Cao et al., 2016; Martinez-Martin et al., 2018). 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,

03

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.

なお、本研究は実験動物に対する苦痛および使用動物数を最小限に留めるよう努力した. 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

#### 目的

先行研究と同様に,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. その後,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.

#### 方法

1. 使用動物

実験には、7週齢の雄性 Wistar 系ラット(日本動物株式会,大阪,日本)を使用した. ラットは 12時間毎の明暗サイクル下で飼育され,自由摂食とした.

2. 片側 PD モデルラットの作製

2-1. 片側内側前脳束への 6-OHDA 注入

ペントバルビタール (ソムノペンチル<sup>®</sup>, 共立製薬株式会社, 東京, 日本) 50 mg/kg の腹腔内投与 によって全身麻酔を行い, 頭頂部を剃毛後, 1/100,000 アドレナリン含有 1 %リドカイン (Aspen Japan Co. Ltd., 東京, 日本)を用いて局所麻酔を行った. ラットの左側内側前脳束に 6-OHDA (Sigma, St Louis, MO, USA)を注入するために, 脳定位固定装置 (NARISHIGE, 東京, 日本)に 固定し, 頭頂部をメスで切開して頭蓋骨を露出させ, ラムダ縫合点から前方に 3.0 mm, 左側に 1.3 mm の位置にラウンドバーで穴をあけた. 0.01%アスコルビン酸 (東京化成工業株式会社, 東京, 日本)含有生理食塩水に溶解した 6-OHDA 溶液 (3 mg/ml)を作製し, 脳表から 6.8 mm と 6.4 mm の位置に 2.5 μl ずつ注入した. 注入はハミルトンシリンジとマイクロシリンジポンプ (LMS 株式 会社,東京,日本)を用いて 1 μl/分の速度で行った. 同様に生理食塩水を投与したラットを Sham 群とした. なお, 6-OHDA あるいは生理食塩水の注入側 (左側)を ipsilateral, 非注入側 (右側)を contralateral と以後表記する.

#### 2-2. 回転テスト

6-OHDA 注入の 14 日後に, ラットを直径 30 cm の円筒容器に入れて 30 分間放置し, 環境に馴 化させた. その後, メタンフェタミン (大日本住友製薬株式会社, 大阪, 日本) 3 mg/kg を腹腔内投 与し, 誘発される回転運動をビデオカメラで 60 分間撮影した. ラットが反時計方向へ 360 度回転 した回数を計測し, 平均回転数が 7 回/分以上のラットを 6-OHDA 群として使用し, 6 回/分以下のも のは除外した (Ishida et al., 1998; Maegawa et al., 2015; Zhuang et al., 2016). Sham 群に対し ても同様にメタンフェタミンの腹腔内投与を行った.

### 3. 化学刺激に対する痛覚過敏性の検討

回転テストの7日後, すなわち 6-OHDA 注入の 21日後に化学刺激に対する痛覚過敏性の検討を 行った (Takeda et al., 2005; Maegawa et al., 2015). 実験は 9-17時までの間に行った. ラット をプレキシグラスの観察箱 (25 x 25 x 25 cm) に入れ, 1時間放置して順応させた後, ラットの左 側口髭部に対して, 50 µl の 4%ホルムアルデヒド生理食塩水溶液 (Formalin) あるいは生理食塩水 (Saline)を皮下注射した (n = 9). 皮下注射には 26 G 針に接続した 1 ml シリンジを用いた. ビ デオカメラで皮下注射後のラットの行動を 45 分間撮影し, 疼痛関連行動顔面である顔面こすり行 動の回数を, 皮下注射から 10 分後までの第 1 相と, その後の第 2 相に分けて計数した (Luccarini et al., 2006; Maegawa et al., 2015; Cazanga et al., 2018). 皮下注射の 2 時間後に灌流固定を行っ た. また, 6-OHDA 注入の 21 日目に皮下注射を行わず, 灌流固定を行ったものを対照群とした (Untreated. n = 8).

#### 4. 灌流固定, 連続横断凍結切片の製作

ラットをペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, i.p.) に 150 ml の 0.01 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) で瀉血し, その後 500 ml の 4%パラホルムアルデヒドを含む PBS を用いて灌流固 定を行った. 灌流固定終了後に脳を取り出し, 4℃の同固定液で1 晩浸漬して後固定した後, 30%ス クロースを含む PBS (4℃) に移して浸漬させた.

その後, 凍結ミクロトーム (大和光機工業株式会社, 埼玉, 日本) を用いて, 線条体, 視床下部室 傍核 (paraventricular nucleus; PVN) を含む部位 (厚さ 40 μm) と黒質, 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), Vc を含む部位 (厚さ 60 μm) の連続横断凍結切片を作製した.

## 5. 免疫組織学的染色

抗体の特異性は、一次抗体による処理を行う際に、一次抗体と同じ動物種の正常血清を加えた場合や、一次抗体を加えない場合には標識が陰性であることにより確認した.

#### 5-1. tyrosine hydroxylase (TH) タンパクに対する免疫組織化学的染色

PD モデルの確立を確認するために、ドパミン神経細胞の破壊を確認した. 灌流した全てのラットの線条体と黒質を対象に、ドパミン神経に含まれる TH タンパクに対して、アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体 (avidin - biotin - peroxidase complex, ABC) を用いる ABC 法による染色を行った. まず、切片を 0.3%過酸化水素水含有メタノール溶液に 20 分間反応させて内因性ペルオキシダーゼを不活性化した後、PBS で洗浄してからブロッキング液として 1%正常ウマ血清 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を作製し、30 分処理した. その後、一次抗体であるマウス抗 TH 抗体 (1:8000, Sigma, St. Louis, MO, USA) による 4℃, 12 時間のインキュベートを行った. 切片を PBS で洗浄後、二次抗体であるビオチン化ウマ抗マウス IgG 抗体 (Vector Laboratories) で

1 時間インキュベートした. PBS で洗浄後, ABC 液 (Vector Laboratories) で 1 時間インキュベー トし, PBS で洗浄した. ペルオキシダーゼ活性を可視化するため, 切片を 0.05%ジアミノベンチジ ンテトラハイドロクロライド (DAB), 0.1%硫酸ニッケルアンモニウムおよび 0.01%過酸化水素水 を含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) (Vector Laboratories) で処理し, PBS で洗浄した. そ の後, 切片をゼラチン被覆スライドにマウントし, アルコール脱水後にパーマウント (株式会社フ ァルマ, 東京, 日本) で封入した.

光学顕微鏡 (OLYMPUS BX 51, OLYMPUS, 東京, 日本) で観察を行い, 全ての 6-OHDA 群の 線条体と黒質における TH 陽性反応が左側 (ipsilateral) で低下していることを確認した. また, Untreated の 6-OHDA 群と Sham 群に関しては, 線条体 (n = 4) における TH 陽性の神経線維密 度を image J (National Institutes of Health, MD, USA) を用いて計測し, 黒質緻密部 (n = 8) に おける 0.5 mm<sup>2</sup> (0.5 mm x 1.0 mm) あたりの TH 陽性細胞数を計測した (Baier et al., 2014).

5-2. Vc 表層における c-Fos タンパクに対する免疫組織化学的染色

化学刺激に対する痛覚過敏性を検討するために、Vc を対象に神経細胞活動性の指標である c-Fos タンパクに対して、ABC 法による DAB 染色を行った. 処理時間や PBS 洗浄は上記と同様に行い、 ブロッキング液に 1%正常ヤギ血清 (Vector Laboratories)、一次抗体にウサギ抗 c-Fos 抗体 (1:6400、Cell Signaling Technology, MA, USA)、二次抗体としてビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories) を使用した.

光学顕微鏡 (OLYMPUS) で観察を行い, obex から尾側 2160 µm までを 360 µm 間隔に 7 枚抽出 し, Vc の浅層部 (I/II層) に発現した c-Fos 陽性細胞数の平均値を計測した (Abe et al., 2005; Noma et al., 2008; Paxinos and Watson, 2007).

5-3. 下行性疼痛抑制系における c-Fos タンパクに対する免疫組織化学的染色 痛覚過敏のメカニズムを検討するために,過去の報告(Ikeda H et al., 2014)を参考にして,下 行性疼痛抑制系に関与する PVN, vlPAG, LC, NRM を対象に, c-Fos タンパクに対する免疫組織化 学的染色を行った. 染色対象は, Formalin の皮下注射後あるいは Untreated の 6-OHDA 群と Sham 群とし, 各神経核において ipsilateral と contralateral に分けて c-Fos 陽性細胞数を計数し た (NRM については分けなかった). 光学顕微鏡 (OLYMPUS) で観察を行い, PVN における計測 に関しては, 2 枚を抽出して大細胞領域 (mPVN; magnocellular part of PVN)と小細胞領域背側部 (dpPVN; dorsal parvocellular part of PVN), 小細胞領域内側部 (mpPVN; medial parvocellular part of PVN) を区別した (Martínez et al., 2006; Abdallah et al., 2013; Matsuura et al., 2016; Maruyama et al., 2019). PVN 以外に関する計測に関しては, 3 枚を抽出して計測した. なお, 各 神経核の位置に関しては rat brain atlas (Paxinos and Watson, 2007) を参考にした.

6. 統計学的解析

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、Sham群と6-OHDA群の2群間比較にはWelchのt検定を用い、PVNにおけるc-Fos陽性細胞数の比較には、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.

#### 結 果

1. 回転テスト

Untreatedの6-OHDA群とSham群において、メタンフェタミンを腹腔内投与してから60分間の回転数を計測したところ、1分間毎の平均回転数は6-OHDA群で有意に増加した(Fig. 1A).

2. 線条体および黒質におけるTH陽性反応

6-OHDA群では、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(Fig. 1B, C).

#### 3. 化学刺激による痛覚過敏の検討

Saline皮下注射後では両群に有意差は認められなかった. Formalin皮下注射後では,両群とも に2相性の反応を示し,6-OHDA群において0-10分の第1相と10-45分の第2相で有意に増加した (Fig. 2A). また,Vcの表層に発現したc-Fos陽性細胞数に関しては,UntreatedやSaline皮下注射後 では両群に有意差を認めなかったが,Formalin皮下注射後においては6-OHDA群で有意に増加した (Fig. 2B).

# 4. 化学刺激後の下行性疼痛抑制系におけるc-Fos陽性細胞数の比較

vlPAG, LC, NRM では ipsilateral, contralateral ともに c-Fos 陽性細胞数に両群間で有意差を認 めなかった(Fig. 3). PVN は Fig.4A のように mPVN, dpPVN, mpPVN に分けられる. Sham (ipsilateral) と 6-OHDA 群 (contralateral) では, いずれの領域においても Untreated に比較して Formalin 皮下注射後に c-Fos 陽性細胞数の有意な増加がみられた. しかし, 6-OHDA (ipsilateral) において Formalin 皮下注射後に発現した c-Fos 陽性細胞数は, mPVN では Untreated に比べて有 意に増加せず, mPVN と dpPVN では Formalin 皮下注射後の Sham (ipsilateral) に比べて有意に 少ない数となった. mpPVN では Sham (ipsilateral)や 6-OHDA (contralateral) と同様に Formalin 皮下注射により c-Fos 陽性細胞数の有意な増加がみられた (Fig. 4B).

# 研究2

#### 目的

研究1の結果, Formalin皮下注射後にPVNで誘発されるc-Fos陽性細胞数の増加が, 6-OHDA (ipsilateral)のmPVNと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 モンであるオキシトシン (oxytocin; OT) とバソプレシン (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 (Onaka, 2000; Suzuki et al., 2009). 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.

#### 方法

1. Formalin皮下注射後のPVNにおけるOTおよびVP産生細胞の神経活動性に関する免疫組織学 的検討

Formalin皮下注射後の6-OHDA群とSham群のPVNを対象に,抗OT抗体と抗c-Fos抗体,あるい は抗VP抗体と抗c-Fos抗体の蛍光二重染色を行った(各群n = 9). PVNを含む切片に対して,10%正 常ヤギ血清(Vector Laboratories)でブロッキングを行い,その後一抗体による4℃,12時間のイン キュベートを行った. 一次抗体として,ウサギ抗c-Fos抗体(1:1000, Cell Signaling Technology) とマウス抗OT抗体(1:1000, Millipore, CA, USA)あるいは,マウス抗c-Fos抗体(1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, USA)とウサギ抗VP抗体(1:1000, Millipore)を使用した. 切片を PBSで洗浄後,二次抗体であるAlexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgGとAlexa Fluor 568 goat antimouse IgG(1:200, Invitrogen)にて2時間インキュベートし, PBS洗浄後, ProLong<sup>™</sup> Gold 退色防 止剤(Invitrogen)を用いて封入した. 蛍光免疫染色を行った切片に関しては共焦点レーザー顕微 鏡(LSM700, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany)で観察を行った. mPVN, dpPVN におけるOT陽性細胞あるいはVP陽性細胞に共発現したc-Fos陽性細胞の数を計測した.

#### 2. NA神経線維のPVNへの投射に関する検討

侵害刺激後に生じる NA 神経の PVN への興奮性の入力が, OT あるいは VP 産生細胞の神経活動 性を亢進させ, OT や VP の分泌を促進することが知られている(Onaka et al., 2001). そこで次 に, mPVN と dpPVN において Formalin 皮下注射後にみられた c-Fos 陽性細胞数の変化には, PVN への NA 神経線維の投射の変化が関与したと仮定して検討を行った.

Formalin皮下注射後の6-OHDA群とSham群のPVNを対象に、抗dopamine-6-hydroxylase (DBH) 抗体と抗OT抗体を用いて蛍光二重染色を行った (n = 3). 10%正常ヤギ血清 (Vector Laboratories) でブロッキングを行った. その後、一次抗体としてウサギ抗DBH抗体 (1:1000, abcam, Cambridge, UK) とマウス抗OT抗体 (1:1000, Millipore) を使用し、4℃で12時間インキュ ベートした. その後の処理に関しては、研究2-1の蛍光免疫染色と同様に行った. PVNへのNA神 経線維の投射に関しては、DBH陽性の神経線維密度をimage Jを用いて測定した.

3. 血中OT濃度に関する検討

侵害刺激が加わった場合, 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 (Onaka et al., 2001; Matsuura et al., 2016). そこで, Formalin皮下注射によって6-OHDA群では 血中OT濃度にどのような変化が生じるかを検討した.

血中OT濃度は概日リズムの影響を受けるため、実験は9-17時までの間に行った(Devarajan et al., 2004). 研究1と同様に、6-OHDAあるいは生理食塩水の左側内側前脳束への注入から21日目の6-OHDA群とSham群を対象とした. ペントバルビタール麻酔下(50 mg/kg, i.p.)にFormalinを左側 口髭部に皮下注射し、その15分後に開胸下に心臓より採血し、EDTA(10 mg/ml)含有の冷凍したチ

12

ューブに回収した (Martínez-Lorenzana et al., 2008; Matsuura et al., 2016). 対照群として無 刺激下 (Untreated) でも採血した (各群, n = 7). 回収された血液を遠心分離にかけ (1400 xg, 4℃, 15分間), 上澄み液を血漿として冷凍保存 (-80℃)した (Devarajan et al., 2004). その後, 測 定する際に血漿を常温で解凍し, Oxytocin ELISA kit (Enzo Life Science Inc., NY, USA) を用いて xMark<sup>™</sup> マイクロプレート吸光分光光度計 (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) によって血中 OT濃度を測定した.

#### 4. 6-OHDA群の痛覚過敏に対するOTの鎮痛効果に関する検討

6-OHDA群におけるFormalin皮下注射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.

研究1と同様に6・OHDA注入の14日後に回転テストを行い,片側PDモデルラットの確立を確認し た後、ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, i.p.) に頭頂部から後頭部にかけて剃毛し、1/100,000 アドレナリン含有1%リドカイン (Aspen Japan Co. Ltd.)を用いて局所麻酔を行った. 脳定位固 定装置 (NARISHIGE) に固定し、頭頂部から後頭部にかけてメスで切開して頭蓋骨を露出させ、後 頭骨にラウンドバーで小穴を空け、5 cm のカテーテル (マイクロシリコンチューブ, eastsidemed Inc.,東京、日本)(内径0.5 mm,外径0.7 mm)を先端がVe付近に達するように挿入した. 頭蓋骨に 2カ所にマイクロネジを埋入し、カテーテルをネジに沿わして歯科用レジンで固定し、縫合した. その後、23 G針を介してカテーテルと20 µlハミルトンシリンジを接続し、生理食塩水10 µlを緩徐に 注入してカテーテル内を満たし、カテーテル末端を直径0.5 mmの樹脂性フィラメント (Eska<sup>™</sup>, Mitsubishi Rayon Co. Ltd.) で蓋をした (Sarna et al., 1983; Yu et al., 2003; Terayama et al., 2008). カテーテル植立の2日後に、カテーテル内で血液が凝固しないように生理食塩水10 µlをカ テーテル内に注入した. カテーテル植立手術からの体力の回復を待ち,6・OHDA注入の21日後に、 カテーテルより生理食塩水 (Saline),あるいはOT (0.025または0.1 µg/µl)(Bachem Holding AG, Bubendorf, Switzerland)を10 µl役与し、その後生理食塩水10 µlをカテーテル内に注入した(各濃 度, n = 5) (Yu et al., 2003; Yang et al., 2007). その後, 左側口髭部にFormalinを皮下注射し, 顔面 こすり行動を45分間ビデオカメラで撮影し, 皮下注射の2時間後に灌流固定を行った. その後, 研 究1と同様の方法で, Vcを対象にc-Fosタンパクに対する免疫染色を行い, 顔面こすり行動の回数と Vc表層に発現したc-Fos陽性細胞数を計数した.

## 5. 統計学的解析

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、Formalin皮下注射後のPVNにおけるOTおよびVP産生細胞の神経活動性に関する免疫組織学的 検討と、6-OHDA群の痛覚過敏に対するOTの鎮痛効果に関する検討に関しては、一元配置分散分析 およびBonferroni補正による多重比較を使用した. DBH陽性線維密度に関しては一元配置分散分析 およびTukey検定による多重比較を使用した. また、血中OT濃度に関して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

1. Formalin皮下注射後のPVNにおけるOTおよびVP産生細胞の神経活動性に関する免疫組織学 的検討

mPVN と dpPVN の OT 陽性細胞に共発現した c·Fos 陽性細胞数は, Sham (ipsilateral) に比べ て 6-OHDA (ipsilateral) で有意に減少した (Fig. 5). 一方, 同領域において VP 陽性細胞上に発現 した c·Fos 陽性細胞数に関しては, 有意な変化を認めなかった (Fig. 6). これらの結果から, 6-OHDA 群では侵害刺激に対する PVN (ipsilateral) での OT を介する鎮痛機構が減弱している可能 性が示唆された.

#### 2. PVNへのNA神経線維の投射に関する検討

PVNにおけるDBH陽性神経線維密度は, mPVNでは有意な変化ではないものの, 6-OHDA (ipsilateral) でSham (ipsilateral) に比較して減少傾向を示した. dpPVNにおいては, Sham (ipsilateral) に比較して6-OHDA (ipsilateral) で有意に減少した (Fig. 7).

# 3. 血中OT濃度に関する検討

Sham群ではFormalin皮下注射により血中OT濃度が有意に増加したが、6-OHDA群では Formalin皮下注射によって血中OT濃度に有意な変化を認めなかった. また、Formalin皮下注射後 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 (Fig. 8).

### 4. 6-OHDA群の痛覚過敏に対するOTの鎮痛効果に関する検討

OTを大槽内投与した場合のFormalin皮下注射後に誘発される顔面こすり行動を検討した結果, 第2相 (10-45分) における顔面こすり行動の増加が, OT (0.1 μg/μl) 投与によって有意に抑制された (Fig. 9A). また, Formalin皮下注射後にVcの表層に発現した-Fos陽性細胞数も, OT (0.1 μg/μl) 投 与で有意に減少した (Fig. 9B). 考察

研究1の結果から、6-OHDA群はFormalin皮下注射による化学刺激に対して痛覚過敏を示し、これ は過去の報告と一致した (Carey, 1986; Takeda et al., 2005; Tassorelli et al., 2007; Chudler et al., 2008; Maegawa et al., 2015; Domenici et al., 2019). また, 下行性疼痛抑制系に関わる神経核とし て, PVN, vlPAG, LC, NRMにおけるFormalin皮下注射後のc-Fos陽性細胞数を6-OHDA群とSham 群で比較したところ,PVNにおいてのみ有意な変化がみられた. PVNは間脳視床下部に位置する神 経核であり,侵害刺激に反応して神経活動が亢進し,片側の後足へのFormalin皮下注射によってc-Fos陽性細胞数が両側性に増加することが知られている (Palkovits et al., 1999; Onaka et al., 2000; Itoi et al., 2004; Motojima et al., 2017). PVNはFig. 4AのようにmPVN, dpPVN, mpPVN の領域に分けられ、Sham群ではいずれの領域においても、過去の報告と同様にFormalin皮下注射 後にc-Fos陽性細胞数が有意に増加した.一方,このPVNにおける化学刺激誘発性のc-Fos陽性細胞 数の増加は, 6-OHDA (ipsilateral) のmPVNではみられず, mPVNとdpPVNではSham (ipsilateral) に比べて有意に少なかった. Tassorelli等は、片側PDラットの後足にFormalinの皮下注射を行った ところ, 痛覚過敏を示し, PVNのc-Fos 陽性細胞数が対照群に比べて減少したと報告しており (Tassorelli et al., 2007), 今回の結果と類似している. したがって, 6-OHDA群で化学刺激に対する 痛覚過敏が生じた原因の1つとして, ipsilateralのmPVNとdpPVNにおける侵害刺激誘発性の神経 活動亢進が抑制され,これらの領域を介した疼痛抑制機構が減弱した可能性が推測された.

PVN はストレスに対して副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (corticotropin-releasing hormone; CRH), OT および VP を分泌することが知られている. CRH は副腎皮質刺激ホルモンと  $\beta$ エンドルフィンの分泌に関わることが知られているが,本研究においては, CRH 産生細胞が局在 する mpPVN で侵害刺激誘発性の神経活動亢進の抑制が生じなかったため, CRH に関しての検討は 行わなかった (Antoni, 1986; Tsigos et al., 2002; Herman et al., 2008). mPVN, dpPVN に局在す るホルモンとして OT と VP が知られており, いずれも鎮痛効果を有することが報告されている (Lutinger et al., 1984; Matsuura et al., 2016; Motojima et al., 2017). また, OT 産生細胞や VP 産生細胞は侵害刺激により活動性が亢進し, OT や VP を分泌することが知られている (Onaka, 2000; Suzuki et al., 2009). 研究 1 より, 6-OHDA (ipsilateral) の mPVN と dpPVN で侵害刺激誘 発性の神経活動亢進が抑制されたことから, 研究 2 では, これらの領域における OT 産生細胞ある いは VP 産生細胞での侵害刺激誘発性の神経活動亢進が抑制され, それが痛覚過敏に関与したと仮 説を立て, 検討を行った. その結果, 6-OHDA 群では, ipsilateral の mPVN と dpPVN における OT 産生細胞の侵害刺激誘発性の神経活動亢進が抑制されていたが, VP 産生細胞の神経活動に変化 はなかった. このことから, 6-OHDA 群では侵害刺激誘発性の PVN の OT 産生細胞にみられる活 動性亢進が抑制されることによって, OT を介す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.

OT は、Vc や脊髄後角の表層に存在する OT 受容体に結合し、GABA 作動性神経を活性化するこ とや、三叉神経節 (TG) や脊髄後根神経節の OT 受容体に結合し、過分極を誘発することが報告さ れており、これらの作用により鎮痛効果を有するとされている (Breton et al., 2008; Jiang et al., 2014; Gong et al., 2015; García-Boll et al., 2018; Sun et al., 2018). OT の作用経路は PVN の領 域によって異なり、dpPVN からは OT が Vc へ下行性に神経投射されて鎮痛効果を示し、投射は同 側優位であることが知られている (Cliffer et al., 1991; Nylén et al., 2001; Abdallah et al., 2013). このことから、6・OHDA 群では、dpPVN (ipsilateral) の OT 産生細胞において侵害刺激誘発性の活 動亢進が抑制され、Vc (ipsilateral) への OT の下行性投射を介する鎮痛作用が減弱したために、痛 覚過敏を呈したと考えられた. 一方、OT は mPVN から下垂体後葉を介して血中へと分泌され、Ve や TG に作用して鎮痛効果を示すことが報告されている (Kiss et al., 2005; Eliava et al., 2016; Kubo et al., 2017; Tzabazis et al., 2017). OT の分泌は侵害刺激誘発性の OT 産生細胞の活動亢進 によって促進されることから (Onaka et al., 2001; Matsuura et al, 2016), 6・OHDA 群では OT 産 生細胞の侵害刺激誘発性の神経活動亢進の抑制に伴い、OT の分泌も抑制されているかを検討した. その結果、Formalin 皮下注射による侵害刺激により Sham 群で認められた血中 OT 濃度の上昇が

17

6-OHDA 群では認めらず, Formalin 皮下注射後の血中 OT 濃度は Sham 群に比べて 6-OHDA 群で 少なかった. このことから, 6-OHDA 群では, 侵害刺激後の PVN における OT 産生細胞の活動亢 進の抑制に伴い, mPVN からの OT 分泌も抑制され, 血中の OT を介する Vc や TG での鎮痛機構も 減弱したため, 左側口髭部への Formalin 皮下注射後に痛覚過敏を呈した可能性が示唆された.

侵害刺激によって PVN で誘発される OT 産生細胞の活動亢進や, OT 分泌に関与する神経投射と して, A1, A2 細胞群から同側 PVN への NA 作動性神経の上行性投射が挙げられる (Palkovits et al., 1999; Onaka et al., 2004). 研究 2 において, NA 神経線維の PVN への投射を検討したところ, 6-OHDA 群で低下していた. PD 患者では, DA 神経細胞だけでなく, NA 神経細胞の変性が高頻度 にみられ(Bertrand et al., 1997; Fornai et al., 2007; Delaville et al., 2011), NA 神経線維の PVN への入力が減少しているとの報告があり(Jellinger et al., 1991)、今回の結果と一致した. A1, A2 細胞群の上行性投射は内側前脳束を経由しており(Olson et al., 1972; Niewenhuys et al., 1982; Sawchenko et al., 1982; Cunningham et al., 1988), 投射先の DA および NA の量が内側前脳束へ の 6-OHDA 投与によって減少することが報告されている (Kamińska et al., 2017; Vieira et al., 2019). また,侵害刺激後に分泌される OT 量は PVN の NA 量と比例関係にあると報告されてい る (Onaka et al., 1996). 一方, 黒質から PVN への投射が存在し, DA が OT の分泌を促進するこ とが知られている (Melis et al., 1990; Shahrokh et al., 2010; Wang et al., 2014). しかし, 侵害刺 激によってこの投射が賦活化されるかどうかは明らかでない(Buijs et al., 1984; Lindvall et al., 1984; Sanna et al., 2012; Gamal-Eltrabily et al., 2018). これらのことから, 6-OHDA 群における 侵害刺激による OT 産生細胞の活動亢進の抑制に、黒質線条体系の DA の枯渇が関与した可能性は 低く, A1, A2 細胞群から PVN への NA 作動性神経の投射入力の減少が関与した可能性が示唆され た. しかし, 本検討に使用した個体数は少なく (n = 3), また, PVN における NA 線維密度の低下が 直接的に NA 量の低下に影響したとは断定できないため, 今後さらなる検討が必要である.

OT の鎮痛効果に関する動物を用いた多くの研究が OT の鎮痛効果を報告している. OT の投与 方法には,三叉神経節投与,鼻腔内投与,脊髄内投与など様々である (Yang, 1994; Yu et al., 2003;

18

Yang et al., 2007; Torre et al., 2009; Kubo et al., 2017; Tzabazis et al., 2017; Sun et al., 2018). PD モデルに対して, OT の連続腹腔内投与によって PD が改善したとの報告 (Erbas et al., 2012; Erbas et al., 2013) があるが, PD の痛覚過敏に対して OT の鎮痛効果を評価した研究は今のところ 存在しない. 研究 2 において PD モデルラットに対して OT 大槽内投与による痛覚過敏への影響に ついて検討を行ったところ, 0.1 µg/µl の OT により鎮痛効果が得られた. このことから, 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. しかし, ラットにおける OT 脊髄内投与では, 副作用として高濃度の OT 投与では 運動障害 (ED50 = 17.92 µg/kg) や死亡 (LD50 = 27.22 µg/kg) を誘発すると報告されている (Yang, 1994). 一方, 臨床研究においては, OT の投与によって鎮痛効果が認められたとの報告があ る (Yang, 1994; Louvel et al., 1996; Rash and Campbell, 2014). 頭痛に対して, OT の鼻腔内投与 が鎮痛効果を示したとの報告 (Wang et al., 2013; Tzabazis et al., 2017) もあり, 頭頸部の疼痛に 対する鎮痛効果が期待されている. しかし, OT の投与によって鎮痛効果が得られなかったとの報 告もある (Yang, 1994; Mameli et al., 2014; Eisenach et al., 2015; Zunhammer et al., 2016) こと から, OT の臨床における鎮痛効果に関しては未だ明確でない. これらのことから, 鎮痛作用を目 的とする OT の投与方法に関する研究が今後必要である. PD モデルラットは化学刺激に対して痛覚過敏を示し、PVN で合成、分泌される OT による Vc における鎮痛作用の減弱が痛覚過敏に関与し、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.

#### 謝 辞

原稿を終えるに臨み、本研究を行う機会を与えていただき、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜り ました大阪大学大学院歯学研究科ロ腔科学専攻高次脳ロ腔機能学講座(歯科麻酔学教室)の丹羽均 教授に謹んで感謝の意を表します.

また,本研究の進行に際し御助言,御指導を戴いた大阪大学大学院歯学研究科ロ腔科学専攻高次 脳ロ腔機能学講座における,前川博治助教(歯科麻酔学教室),吉田篤教授(ロ腔解剖第二教室), 片桐綾乃助教(ロ腔生理学教室)に深甚なる謝意を表します。

# 引用文献

- Abdallah K, Artola A, Monconduit L, Dallel R, Luccarini P (2013) Bilateral descending hypothalamic projections to the spinal trigeminal nucleus caudalis in rats. PLoS One 8:8.
- Abe T, Ohshita N, Sugiyo S, Moritani M, Kobayashi M, Takemura M (2005) Elimination of neurokinin-1 receptor neurons in caudal nucleus reverses the effects of systemic bicuculline on c-Fos expression in rat trigeminal sensory nucleus: I. High intensity electrical stimulation of the trigeminal ganglion. Neuroscience.133:739-747.
- Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, Dreetz Gjerstad M, Larsen JP (2008) Epidemiology of Parkinson's disease. J Neurol 255:18-32.
- Antoni FA (1986) Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. Endocr Rev 7:351-378.
- Baier CJ, Pallarés ME, Adrover E, Katunar MR, Raisman-Vozari R, Antonelli MC (2014) Intrastriatal 6-OHDA lesion differentially affects dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of prenatally stressed rats. Neurotox Res 26:274-284.
- Bertrand E, Lechowicz W, Szpak GM, Dymecki J (1997) Qualitative and quantitative analysis of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease. Folia Neuropathol 35:80-86.
- Breton JD, Veinante P, Uhl-Bronner S, Vergnano AM, Freund-Mercier MJ, Schlichter R, Poisbeau P (2008) Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lamina I-II which amplify GABAergic inhibition. Mol Pain 4:19.
- Buijs RM, Geffard M, Pool CW, Hoorneman EM (1984) The dopaminergic innervation of the supraoptic and paraventricular nucleus. A light and electron microscopical study. Brain Res 323:65-72.

- Cao LF, Peng XY, Huang Y, Wang B, Zhou FM, Cheng RX, Chen LH, Luo WF, Liu T (2016) Restoring spinal noradrenergic inhibitory tone attenuates pain hypersensitivity in a rat model of Parkinson's disease. Neural Plast 2016:6383240.
- Carey RJ (1986) Acute ipsilateral hyperalgesia and chronic contralateral hypoalgesia after unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the substantia nigra. Exp Neurol 91:277-284.
- Cazanga V, Hernandez A, Morales B, Pelissier T, Constandil L (2018) Antinociception induced by copper salt revisited: Interaction with ketamine in formalin-induced intraplantar and orofacial pain in mice. J Oral Facial Pain Headache. 32:247-257.
- Chudler EH, Lu Y (2008) Nociceptive behavioral responses to chemical, thermal and mechanical stimulation after unilateral, intrastriatal administration of 6hydroxydopamine. Brain Res 1213:41-47.
- Cliffer KD, Burstein R, Giesler GJ Jr (1991) Distributions of spinothalamic, spinohypothalamic, and spinotelencephalic fibers revealed by anterograde transport of PHA-L in rats. J Neurosci 11:852-868.
- Clifford TJ, Warsi MJ, Burnett CA, Lamey PJ (1998) Burning mouth in Parkinson's disease sufferers. Gerodontology 15:73-78.
- Conte A, Khan N, Defazio G, Rothwell JC, Berardelli A (2013) Pathophysiology of somatosensory abnormalities in Parkinson disease. Nat Rev Neurol 9:687-697.
- Coon EA, Laughlin RS (2012) Burning mouth syndrome in Parkinson's disease: dopamine as cure or cause? J Headache Pain 13:255-257.
- Cunningham ET Jr, Sawchenko PE (1988) Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. J Comp Neurol 274:60-76.
- Delaville C, Deurwaerdère PD, Benazzouz A (2011) Noradrenaline and Parkinson's disease.

Front Syst Neurosci 5:31.

- Devarajan K, Rusak B (2004) Oxytocin levels in the plasma and cerebrospinal fluid of male rats: effects of circadian phase, light and stress. Neurosci Lett 367:144-147.
- Dieb W, Ouachikh O, Alves S, Boucher Y, Durif F, Hafidi A (2016) Nigrostriatal dopaminergic depletion increases static orofacial allodynia. J Headache Pain 17:11.
- Dieb W, Ouachikh O, Durif F, Hafidi A (2014) Lesion of the dopaminergic nigrostriatal pathway induces trigeminal dynamic mechanical allodynia. Brain Behav 4:368-380.
- Djaldetti R, Shifrin A, Rogowski Z, Sprecher E, Melamed E, Yarnitsky D (2004)
   Quantitative measurement of pain sensation in patients with Parkinson disease.
   Neurology 62:2171-2175.
- Domenici RA, Campos ACP, Maciel ST, Berzuino MB, Hernandes MS, Fonoff ET, Pagano RL (2019) Parkinson's disease and pain: Modulation of nociceptive circuitry in a rat model of nigrostriatal lesion. Exp Neurol 315:72-81.
- Eisenach JC, Tong C, Curry R (2015) Phase 1 safety assessment of intrathecal oxytocin.
   Anesthesiology 122:407-413.
- Eliava M, Melchior M, Knobloch-Bollmann HS, Wahis J, da Silva Gouveia M, Tang Y, Ciobanu AC, Triana Del Rio R, Roth LC, Althammer F, Chavant V, Goumon Y, Gruber T, Petit-Demoulière N, Busnelli M, Chini B, Tan LL, Mitre M, Froemke RC, Chao MV, Giese G, Sprengel R, Kuner R, Poisbeau P, Seeburg PH, Stoop R, Charlet A, Grinevich V (2016) A new population of parvocellular oxytocin neurons controlling magnocellular neuron activity and inflammatory pain processing. Neuron 89:1291-1304.
- Erbaş O, Oltulu F, Taşkiran D (2012) Amelioration of rotenone-induced dopaminergic cell death in the striatum by oxytocin treatment. Peptides 38:312-317.
- Erbas O, Oltulu F, Taskiran D (2013) Suppression of exaggerated neuronal oscillation by

oxytocin in rat model of Parkinson's disease. Gen Physiol Biophys 32:517-525.

- Fil A, Cano-de-la-Cuerda R, Muñoz-Hellín E, Vela L, Ramiro-González M, Fernández-de-Las-Peñas C (2013) Pain in Parkinson disease: a review of the literature. Parkinsonism Relat Disord 19:285-294.
- Fishbain DA, Cutler R, Rosomoff HL, Rosomoff RS (1997) Chronic pain-associated depression: antecedent or consequence of chronic pain? A review. Clin J Pain 13:116-137.
- Fishbain DA, Cutler R, Rosomoff HL, Rosomoff RS (1997) Chronic pain-associated depression: antecedent or consequence of chronic pain? A review. Clin J Pain 13:116-137.
- Ford B (2010) Pain in Parkinson's disease. Mov Disord 25:98-103.
- Fornai F, di Poggio AB, Pellegrini A, Ruggieri S, Paparelli A (2007) Noradrenaline in Parkinson's disease: from disease progression to current therapeutics. Curr Med Chem 14:2330-2334.
- Gamal-Eltrabily M, Manzano-García A (2018) Role of central oxytocin and dopamine systems in nociception and their possible interactions: suggested hypotheses. Rev Neurosci 29:377-386.
- García-Boll E, Martínez-Lorenzana G, Condés-Lara M, González-Hernández A (2018)
   Oxytocin inhibits the rat medullary dorsal horn Sp5c/C1 nociceptive transmission through
   OT but not V1A receptors. Neuropharmacology. 129:109-117.
- Gerdelat-Mas A, Simonetta-Moreau M, Thalamas C, Ory-Magne F, Slaoui T, Rascol O, Brefel-Courbon C (2007) Levodopa raises objective pain threshold in Parkinson's disease: a RIII reflex study. J Neurol Neurosurg Psychiatry 78:1140-1142.
- Herman JP, Flak J, Jankord R (2008) Chronic stress plasticity in the hypothalamic paraventricular nucleus. Prog Brain Res 170:353-364.
- Ikeda H, Takasu S, Murase K (2014) Contribution of anterior cingulate cortex and

descending pain inhibitory system to analgesic effect of lemon odor in mice. Mol Pain 10:14.

- Ishida Y, Hashiguchi H, Todaka K, Kuwahara I, Ishizuka Y, Nakane H, Uchimura D, Nishimori T, Mitsuyama Y (1998) Serotonergic activity in the rat striatum after intrastriatal transplantation of fetal nigra as measured by microdialysis. Brain Res 788:207-214.
- Itoi K, Jiang YQ, Iwasaki Y, Watson SJ (2004) Regulatory mechanisms of corticotropinreleasing hormone and vasopressin gene expression in the hypothalamus. J Neuroendocrinol. 16:348-355.
- Jellinger KA (1991) Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. Mol Chem Neuropathol 14:153-197.
- Jiang CY, Fujita T, Kumamoto E (2014) Synaptic modulation and inward current produced by oxytocin in substantia gelatinosa neurons of adult rat spinal cord slices. J Neurophysiol 111:991-1007.
- Kamińska K, Lenda T, Konieczny J, Czarnecka A, Lorenc-Koci E (2017) Depressive-like neurochemical and behavioral markers of Parkinson's disease after 6-OHDA administered unilaterally to the rat medial forebrain bundle. Pharmacol Rep 69:985-994.
- Kiss A, Mikkelsen JD (2005) Oxytocin-anatomy and functional assignments: a minireview.
   Endocr Regul 39:97-105.
- Kubo A, Shinoda M, Katagiri A, Takeda M, Suzuki T, Asaka J, Yeomans DC, Iwata K (2017)
   Oxytocin alleviates orofacial mechanical hypersensitivity associated with infraorbital nerve injury through vasopressin-1A receptors of the rat trigeminal ganglia. Pain 158:649-659.
- Lim SY, Fox SH, Lang AE (2009) Overview of the extranigral aspects of Parkinson disease.
   Arch Neurol 66:167-172.

- Lindvall O, Björklund A, Skagerberg G (1984) Selective histochemical demonstration of dopamine terminal systems in rat di- and telencephalon: new evidence for dopaminergic innervation of hypothalamic neurosecretory nuclei. Brain Res 306:19-30.
- Louvel D, Delvaux M, Felez A, Fioramonti J, Bueno L, Lazorthes Y, Frexinos J (1996)
   Oxytocin increases thresholds of colonic visceral perception in patients with irritable bowel syndrome. Gut 39:741-747.
- Luccarini P, Childeric A, Gaydier AM, Voisin D, Dallel R (2006) The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. J Pain 7:908-914.
- Luttinger D, Hernandez DE, Nemeroff CB, Prange AJ Jr (1984) Peptides and nociception.
   Int Rev Neurobiol 25:185-241.
- Maegawa H, Morimoto Y, Kudo C, Hanamoto H, Boku A, Sugimura M, Kato T, Yoshida A, Niwa H (2015) Neural mechanism underlying hyperalgesic response to orofacial pain in Parkinson's disease model rats. Neurosci Res 96:59-68.
- Mameli S, Pisanu GM, Sardo S, Marchi A, Pili A, Carboni M, Minerba L, Trincas G, Carta MG, Melis MR, Agabio R (2014) Oxytocin nasal spray in fibromyalgic patients. Rheumatol Int 34:1047-1052.
- Marsala SZ, Tinazzi M, Vitaliani R, Recchia S, Fabris F, Marchini C, Fiaschi A, Moretto G, Giometto B, Macerollo A, Defazio G (2011) Spontaneous pain, pain threshold, and pain tolerance in Parkinson's disease. J Neurol 258:627-633.
- Martínez V, Wang L, Taché Y (2006) Proximal colon distension induces Fos expression in the brain and inhibits gastric emptying through capsaicin-sensitive pathways in conscious rats. Brain Res 1086:168-180.
- Martínez-Lorenzana G, Espinosa-López L, Carranza M, Aramburo C, Paz-Tres C, Rojas-

Piloni G, Condés-Lara M (2008) PVN electrical stimulation prolongs withdrawal latencies and releases oxytocin in cerebrospinal fluid, plasma, and spinal cord tissue in intact and neuropathic rats. Pain 140:265-273.

- Maruyama NO, Mitchell NC, Truong TT, Toney GM (2019) Activation of the hypothalamic paraventricular nucleus by acute intermittent hypoxia: Implications for sympathetic longterm facilitation neuroplasticity. Exp Neurol 314:1-8.
- Massetani R, Lucchetti R, Vignocchi G, Siciliano G, Rossi B (1989) Pain threshold and polysynaptic components of the blink reflex in Parkinson's disease. Funct Neurol 4:199-202.
- Matsuura T, Kawasaki M, Hashimoto H, Yoshimura M, Motojima Y, Saito R, Ueno H, Maruyama T, Ishikura T, Sabanai K, Mori T, Ohnishi H, Onaka T, Sakai A, Ueta Y (2016)
   Possible involvement of the rat hypothalamo-neurohypophysial/-spinal oxytocinergic pathways in acute nociceptive responses. J Neuroendocrinol 28:6.
- Melis MR, Argiolas A, Stancampiano R, Gessa GL (1990) Effect of apomorphine on oxytocin concentrations in different brain areas and plasma of male rats. Eur J Pharmacol 182:101-107.
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. Prog Neurobiol 66:355-474.
- Motojima Y, Matsuura T, Yoshimura M, Hashimoto H, Saito R, Ueno H, Maruyama T, Sonoda S, Suzuki H, Kawasaki M, Ohnishi H, Sakai A, Ueta Y (2017) Comparison of the induction of c-fos-eGFP and Fos protein in the rat spinal cord and hypothalamus resulting from subcutaneous capsaicin or formalin injection. Neuroscience 356:64-77.
- Mylius V, Engau I, Teepker M, Stiasny-Kolster K, Schepelmann K, Oertel WH, Lautenbacher S, Möller JC (2009) Pain sensitivity and descending inhibition of pain in Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry 80:24-28.

- Nandhagopal R, Troiano AR, Mak E, Schulzer M, Bushnell MC, Stoessl AJ (2010) Response to heat pain stimulation in idiopathic Parkinson's disease. Pain Med 11:834-840.
- Nieuwenhuys R, Geeraedts LM, Veening JG (1982) The medial forebrain bundle of the rat.
   I. General introduction. J Comp Neurol 206:49-81.
- Noma N, Tsuboi Y, Kondo M, Matsumoto M, Sessle BJ, Kitagawa J, Saito K, Iwata K (2008) Organization of pERK-immunoreactive cells in trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following capsaicin injection into oral and craniofacial regions in rats. J Comp Neurol. 507:1428-1440.
- Nylén A, Skagerberg G, Alm P, Larsson B, Holmqvist B, Andersson KE (2001) Nitric oxide synthase in the hypothalamic paraventricular nucleus of the female rat; organization of spinal projections and coexistence with oxytocin or vasopressin. Brain Res 908:10-24.
- Olson L, Fuxe K (1972) Further mapping out of central noradrenaline neuron systems: projections of the "subcoeruleus" area. Brain Res 43:289-295.
- Onaka T (2000) Catecholaminergic mechanisms underlying neurohypophysial hormone responses to unconditioned or conditioned aversive stimuli in rats. Exp Physiol 85:101-110.
- Onaka T (2004) Neural pathways controlling central and peripheral oxytocin release during stress. J Neuroendocrinol 16:308-312.
- Onaka T, Palmer JR, Yagi K (1996) A selective role of brainstem noradrenergic neurons in oxytocin release from the neurohypophysis following noxious stimuli in the rat. Neurosci Res 25:67-75.
- Onaka T, Yamashita T, Liu X, Honda K, Saito T, Yagi K (2001) Medullary A1 noradrenergic neurones may mediate oxytocin release after noxious stimuli. Neuroreport 12:2499-2502.
- Palkovits M, Baffi JS, Pacak K (1999) The role of ascending neuronal pathways in stressinduced release of noradrenaline in the hypothalamic paraventricular nucleus of rats. J

Neuroendocrinol 11:529-539.

- Paxinos G and Watson C (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates, 6th ed. San Diego, Elsevier Academic Press.
- Perrotta A, Sandrini G, Serrao M, Buscone S, Tassorelli C, Tinazzi M, Zangaglia R,
   Pacchetti C, Bartolo M, Pierelli F, Martignoni E (2011) Facilitated temporal summation of
   pain at spinal level in Parkinson's disease. Mov Disord 26:442-448.
- Pertovaara A, Martikainen IK, Hagelberg N, Mansikka H, Någren K, Hietala J, Scheinin H (2004) Striatal dopamine D2/D3 receptor availability correlates with individual response characteristics to pain. Eur J Neurosci 20:1587-1592.
- Rash JA, Campbell TS (2014) The effect of intranasal oxytocin administration on acute cold pressor pain: a placebo-controlled, double-blind, within-participants crossover investigation. Psychosom Med 76:422-429.
- Ren K, Dubner R (1999) Central nervous system plasticity and persistent pain. J Orofac Pain 13:155-163.
- Rosland JH, Hunskaar S, Broch OJ, Hole K (1992) Acute and long term effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in tests of nociception in mice. Pharmacol Toxicol 70:31-37.
- Sanna F, Succu S, Melis MR, Argiolas A (2012) Dopamine agonist-induced penile erection and yawning: differential role of D<sub>2</sub>-like receptor subtypes and correlation with nitric oxide production in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats. Behav Brain Res 230:355-364.
- Sarna GS, Hutson PH, Tricklebank MD, Curzon G (1983) Determination of brain 5hydroxytryptamine turnover in freely moving rats using repeated sampling of cerebrovascular fluid. J Neurochem. 40:383-388.

- Sawchenko PE, Swanson LW (1982) The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. Brain Res 257:275-325.
- Shahrokh DK, Zhang TY, Diorio J, Gratton A, Meaney MJ (2010) Oxytocin-dopamine interactions mediate variations in maternal behavior in the rat. Endocrinology 151:2276-286.
- Sugiyo S, Takemura M, Dubner R, Ren K (2005) Trigeminal transition zone/rostral ventromedial medulla connections and facilitation of orofacial hyperalgesia after masseter inflammation in rats. J Comp Neurol 493:510-523.
- Sun W, Zhou Q, Ba X, Feng X, Hu X, Cheng X, Liu T, Guo J, Xiao L, Jiang J, Xiong D, Hao Y, Chen Z, Jiang C (2018) Oxytocin Relieves Neuropathic Pain Through GABA Release and Presynaptic TRPV1 Inhibition in Spinal Cord. Front Mol Neurosci 11:248.
- Suzuki H, Kawasaki M, Ohnishi H, Otsubo H, Ohbuchi T, Katoh A, Hashimoto H, Yokoyama T, Fujihara H, Dayanithi G, Murphy D, Nakamura T, Ueta Y (2009)
   Exaggerated response of a vasopressin-enhanced green fluorescent protein transgene to nociceptive stimulation in the rat. J Neurosci 29:13182-13189.
- Takeda R, Ikeda T, Tsuda F, Abe H, Hashiguchi H, Ishida Y, Nishimori T (2005) Unilateral lesions of mesostriatal dopaminergic pathway alters the withdrawal response of the rat hindpaw to mechanical stimulation. Neurosci Res 52:31-36.
- Tassorelli C, Armentero MT, Greco R, Fancellu R, Sandrini G, Nappi G, Blandini F (2007) Behavioral responses and Fos activation following painful stimuli in a rodent model of Parkinson's disease. Brain Res 1176:53-61.
- Terayama R, Omura S, Fujisawa N, Yamaai T, Ichikawa H, Sugimoto T (2008) Activation of microglia and p38 mitogen-activated protein kinase in the dorsal column nucleus contributes to tactile allodynia following peripheral nerve injury. Neuroscience. 153:1245-

1255.

- Tsigos C, Chrousos GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. J Psychosom Res 53:865-871.
- Tzabazis A, Kori S, Mechanic J, Miller J, Pascual C, Manering N, Carson D, Klukinov M, Spierings E, Jacobs D, Cuellar J, Frey WH 2nd, Hanson L, Angst M, Yeomans DC (2017)
   Oxytocin and Migraine Headache. Headache 57:64-75.
- Valkovic P, Minar M, Singliarova H, Harsany J, Hanakova M, Martinkova J, Benetin J (2015) Pain in Parkinson's disease: A cross-sectional study of its prevalence, types, and relationship to depression and quality of life. PLoS One 10:e0136541.
- Vela L, Lyons KE, Singer C, Lieberman AN (2007) Pain-pressure threshold in patients with Parkinson's disease with and without dyskinesia. Parkinsonism Relat Disord 13:189-192.
- Vieira JCF, Bassani TB, Santiago RM, de O Guaita G, Zanoveli JM, da Cunha C, Vital MABF (2019) Anxiety-like behavior induced by 6-OHDA animal model of Parkinson's disease may be related to a dysregulation of neurotransmitter systems in brain areas related to anxiety. Behav Brain Res 371:111981.
- Wang YL, Yuan Y, Yang J, Wang CH, Pan YJ, Lu L, Wu YQ, Wang DX, Lv LX, Li RR, Xue L, Wang XH, Bi JW, Liu XF, Qian YN, Deng ZK, Zhang ZJ, Zhai XH, Zhou XJ, Wang GL, Zhai JX, Liu WY (2013) The interaction between the oxytocin and pain modulation in headache patients. Neuropeptides 47:93-97.
- Wang ZY, Lian H, Cai QQ, Song HY, Zhang XL, Zhou L, Zhang YM, Zheng LF, Zhu JX (2014) No direct projection is observed from the substantia nigra to the dorsal vagus complex in the rat. J Parkinsons Dis 4:375-383.
- Wasner G, Deuschl G (2012) Pains in Parkinson disease--many syndromes under one umbrella. Nat Rev Neurol 8:284-294.

- Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J (2011) Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. Eur J Epidemiol 26:S1-S58.
- Yamawaki M, Kusumi M, Kowa H, Nakashima K (2009) Changes in prevalence and incidence of Parkinson's disease in Japan during a quarter of a century. Neuroepidemiology 32:263-269.
- Yang J (1994) Intrathecal administration of oxytocin induces analgesia in low back pain involving the endogenous opiate peptide system. Spine 19:867-871.
- Yang J, Yang Y, Chen JM, Liu WY, Wang CH, Lin BC (2007) Central oxytocin enhances antinociception in the rat. Peptides 28:1113-1119.
- Yu SQ, Lundeberg T, Yu LC (2003) Involvement of oxytocin in spinal antinociception in rats with inflammation. Brain Res 983:13-22.
- Zhuang X, Chen Y, Zhuang X, Chen T, Xing T, Wang W, Yang X (2016) Contribution of Proinflammatory Cytokine Signaling within Midbrain Periaqueductal Gray to Pain Sensitivity in Parkinson's Disease via GABAergic Pathway. Front Neurol 7:104.
- Zunhammer M, Geis S, Busch V, Eichhammer P, Greenlee MW (2016) Pain modulation by intranasal oxytocin and emotional picture viewing - a randomized double-blind fMRI study. Sci Rep 6:31606.



Fig.1回転テストとTHタンパクに対する免疫染色

(A) 回転テストにおける回転数. n = 8. (B) 線条体におけるTH陽性神経線維密度 (%).
 n = 4. (C) 黒質緻密部のTH陽性細胞数/0.5 mm<sup>2</sup>. n = 8. (D) 線条体および黒質の抗TH抗体による免疫染色の顕微鏡写真. 線条体はbregmaから180 μm尾側, 黒質はbregmaから5400 μm尾側を示す. SNpc; substantia nigra pars compact (黒質緻密部) データは平均値±標準誤差で示す. \*P < 0.001 vs. Sham群. 統計方法: Welch's *t*-test.



Fig.2 Formalin皮下注射による化学刺激に対する痛覚過敏性の検討

(A) SalineあるいはFormalin皮下注射後の顔面こすり行動の回数. (B) Formalin皮下注射 後にVc (ipsilateral) に発現した,抗c-Fos抗体による免疫染色の顕微鏡写真. Obexから 1440 µm尾側を示す. (C) UntreatedあるいはSaline, Formalin皮下注射後にVc表層に発現 したc-Fos陽性細胞数. データは平均値±標準誤差で示す. Untreated; n = 8, Saline; n = 9, Formalin; n = 9. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. Sham群. 統計方法: Welch's *t*-test.



# NRM



LC



Fig. 3 vIPAG, LC, NRMにおけるc-Fos陽性細胞数の比較

(A) Formalin皮下注射後のSham群におけるPAG (a, d), LC (b, e), NRM (c, f) の抗c-Fos抗体による免疫染色の顕微鏡写真. d-f) 写真 a-clこ示す領域の拡大像. Aq; midbrain aqueduct, 4V; fourth ventricle (B) vIPAG, LC, NRMにおけるFormalin皮下注射後のc-Fos陽性細胞数.
データは平均値±標準誤差で示す. n = 9. 統計方法: Welch's *t*-test.



Fig.4 PVNにおけるc-Fos陽性細胞数の比較

(A) PVN (ipsilateral) における,抗c-Fos抗体による免疫染色と,クレシルバイオレット染色の 顕微鏡写真.a,b) 抗c-Fos抗体による免疫染色,c) 抗c-Fos抗体による免疫染色とクレシルバ イオレット染色による対比染色. Bregmaから1800 µm尾側を示す.mPVN; magnocellular part of PVN (PVN大細胞領域), dpPVN; dorsal parvocellular part of PVN (PVN小細胞領域背側部), mpPVN; medial parvocellular part of PVN (PVN小細胞領域内側部), 3V; third ventricle. (B) mPVN, dpPVN, mpPVNにおけるFormalin皮下注射後とUntreatedのc-Fos陽性細胞数.データ は平均値±標準誤差で示す.n=7-9.<sup>+</sup>P<0.01 vs Untreated + Sham (ipsilateral). \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs Untreated + 6-OHDA (ipsilateral). <sup>§</sup>P<0.01 vs Untreated + 6-OHDA (contralateral). \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs Formalin + Sham (ipsilateral). 統計方法: two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test.









Fig.5 OT細胞におけるc-Fos陽性細胞数の検討

(A) PVN (ipsilateral) における a,b) 抗OT抗体による免疫染色, c,d) 抗c-Fos抗体による免疫染 色, e-g) 抗OT抗体と抗c-Fos抗体による蛍光二重免疫染色の顕微鏡写真.g) 写真 eに示す領 域の拡大像. 3V; third ventricle. Scale bar = 100 µm (a-f), 20 µm (g) (B) 大細胞領域 (mPVN) と小細胞領域背側部 (dpPVN) においてOT陽性細胞上に発現したc-Fos陽性細胞数. データ は平均値±標準誤差で示す. n = 9.\*P < 0.05 vs Sham-ipsi. 統計方法: one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test.







Fig.6 VP細胞におけるc-Fos陽性細胞数の検討

(A) PVN (ipsilateral) における a,b) 抗VP抗体による免疫染色, c,d) 抗c-Fos抗体による免疫染色, e-g) 抗VP抗体と抗c-Fos抗体による蛍光二重免疫染色の顕微鏡写真.g) 画像e に示す領域の拡大像.3V; third ventricle. Scale bar = 100 µm (a-f), 20 µm (g). (B) 大細胞 領域 (mPVN) と小細胞領域背側部 (dpPVN) においてVP陽性細胞上に発現したc-Fos陽 性細胞数.データは平均値±標準誤差で示す.n = 9. 統計方法: one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test.



Fig.7 PVNおけるDBH陽性神経線維密度の検討

(A) PVN (ipsilateral) における抗OT抗体と抗DBH抗体による蛍光二重免疫染色の顕微鏡 写真. 3V; third ventricle. (B) 大細胞領域 (mPVN) と小細胞領域背側部 (dpPVN) に発現し たDBH陽性神経線維の密度. データは平均値±標準誤差で示す. n = 3. \*P < 0.05 vs Sham-ipsi. 統計方法: one-way ANOVA with Tukey's test.



Fig.8 血中OT濃度の比較

Sham群と6-OHDA群における, UntreatedあるいはFormalin皮下注射後の血中OT濃度の 比較. データは平均値±標準誤差で示す. n = 7. <sup>†</sup>P < 0.01 vs Untreated + Sham, \*P < 0.05 vs Formalin + Sham. 統計方法: two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test.







Fig.9 OT大槽内投与後の化学刺激による痛覚過敏性の検討

(A) OT大槽内投与後の, Formalin皮下注射による顔面こすり行動の回数.(B) Formalin皮 下注射後の抗c-Fos抗体による免疫染色のVc (ipsilateral) 表層における顕微鏡写真.Obex から1440µm尾側を示す.(C) FM刺激後にVc表層に発現したc-Fos陽性細胞数.データは 平均値±標準誤差で示す.n=5.\*P<0.05 vs NS.統計方法:one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test.