



Title	パーキンソン病における痛覚過敏に関する基礎研究
Author(s)	成清, 綾
Citation	大阪大学歯学雑誌. 2020, 64(2), p. 15-23
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/78308
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

パーキンソン病における痛覚過敏に関する基礎研究

成清 綾*

(令和元年 12 月 30 日受付)

緒 言

Parkinson 病 (PD) は、中脳黒質から線条体に投射するドパミン (DA) 作動性神経細胞の選択的な変性・脱落により、安静時振戦、筋強剛、動作緩慢、姿勢反射障害の運動機能障害を発現する神経変性疾患である。PD の罹患率は 0.18% とされ、発症年齢は 50 ~ 65 歳に多いが、高齢になるほど発症率が増加し、70 歳以上では約 100 人に 1 人の頻度で発症していると言われて¹⁾。一方、PD 患者では、運動機能障害に加えて、痛覚異常、認知機能障害、気分障害などの非運動機能障害がしばしば認められる²⁾。なかでも、40% 以上の PD 患者において認められる痛覚過敏³⁾は、QOL を低下させる大きな一要因と考えられている。また近年、PD 患者の痛覚過敏は、PD 発症の早期より診られることが示されている^{4), 5)}。

一方、基礎研究で用いられる PD モデル齧歯動物として、これまで幾つかのモデルが確立されている⁶⁾。DA 神経毒を用いたモデルとして、6-ヒドロキシドーパミン臭化水素酸塩 (6-OHDA)^{7), 8)}あるいはロテノン⁹⁾の脳局所注入や、1-メチル-4-フェニル-1, 2, 3, 6-テトラヒドロピリジン (MPTP)¹⁰⁾あるいはリボポリサッカライド¹¹⁾の全身投与を施したマウスおよびラットなどが用いられている。また、遺伝子工学の技術を応用したモデルとして、家族性 PD でミスセンス変異が見いだされた α -シヌクレインを過剰発現するトランスジェニックマウス¹²⁾やアデノ随伴ウイルスベクター投与マウス¹³⁾などが用いられている。このような背景のもと、最近、

MPTP マウスの痛覚過敏に対して L-DOPA が部分的に改善効果を示すこと¹⁴⁾や 6-OHDA 局所注入により片側線条体を破壊したラットの痛覚過敏に対してセロトニン (5-HT)・ノルアドレナリン (NA) 再取り込み阻害薬であるデュロキセチンと深部脳刺激が抑制効果を示すこと¹⁵⁾が報告されたが、いずれの報告ともに運動機能障害が認められており、PD 発症の早期から診られる痛覚過敏に関わる神経科学基盤は未だ明らかとされていない。

そこで本研究は、自発運動障害を伴わない症状が軽い PD モデル動物を用いて痛覚過敏の発現に関わる神経科学基盤を明らかとした。まず、6-OHDA の脳局所注入により片側線条体を破壊したマウス (6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウス) を用いて、運動機能障害の程度を確認し、痛覚過敏の発現を行動学的に評価した。次に、痛覚伝達系および疼痛制御系に関わる脳部位を主対象として、線条体の DA 神経破壊に伴う痛み刺激に対する神経活動変化を免疫組織学的手法により検討した。

材料と方法

1. 実験動物

実験には、7 あるいは 8 週齢の C57BL/6J 系雄性マウス (日本エスエルシー株式会社、浜松) を使用した。実験動物は、室温 22±1℃、明暗サイクル 8:00~20:00、プラスチックケージ (28 cm×17 cm×12 cm) に 1 ケージ 4~5 匹にて飼育し、水と固形飼料は自由に摂取さ

* 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

せた。1週間環境に馴化させた後、実験に用いた。なお、動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会（動歯 27-024-0）ならびに大阪大学大学院薬学研究科動物実験委員会（動薬 27-13）の承認を受け、両委員会の実験規定に従って倫理的に行った。

2. 薬物

L-アスコルビン酸ナトリウム（ナカライテスク株式会社、京都）、デシプラミン塩酸塩（Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA）、6-ヒドロキシドーパミン臭化水素酸塩（6-OHDA）（Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA）、(R)-(-)-アボモルフィン塩酸塩0.5水和物（アボモルヒネ）（和光純薬工業株式会社、大阪）、カプサイシン（和光純薬工業株式会社、大阪）を使用した。

薬物の溶解は以下のように行った。デシプラミン塩酸塩は生理食塩水（0.9% w/v, 大塚製薬株式会社、東京）に、6-OHDAは0.1%アスコルビン酸ナトリウム含有溶液に2.0 mg/mLの濃度で、アボモルヒネは生理食塩水に、カプサイシンは1%エタノール含有生理食塩水に80 µg/mLの濃度で溶解した。

3. 6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスの作製

動物をランダムに2群に分けた。6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスはCoulombらの方法⁷⁾に従って作製した。6-OHDA 注入30分前にNA神経保護のためにデシプラミン塩酸塩（25 mg/kg）を腹腔内投与した^{16), 17)}。ペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg, i.p.）麻酔下、左側線条体（ブレグマを基準としてAP: +1.0 mm, ML: +1.7 mm, DV: -3.0 mm）¹⁸⁾に4分間かけて6-OHDA 溶液を（2.0 mg/mL）を2.0 µL 注入した（流速: 0.5 µL/min）。注入後5分間針を静置した。対照とした偽手術（Sham）群は、0.1%アスコルビン酸ナトリウム含有液を注入した。

6-OHDA 注入1週間後にマウスをプラスチックケージ（28 cm×17 cm×12 cm）に入れて、10分間馴化させた後、アボモルヒネ（0.5 mg/kg）を皮下投与して、線条体非破壊側への回転運動を60分間計測した。Iancuらの基準⁸⁾に従い、1分間あたり4回以上回転運動したマウスを6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスとして使用した。行動解析後、一部の6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスでは、免疫組織化学染色により、ドーパミン神経の破壊を確認した。

4. 自発運動量測定試験

マウスの自発運動量はHasebeらの方法¹⁹⁾に従って、自発運動量測定システム（Supermex[®]; 室町機械株式会社、東京）を用いて測定した。マウスをプラスチックケージ（28 cm×17 cm×12 cm）に入れ、90分馴化させた。その後、自動的に5分間隔で赤外線センサー（Supermex[®] センサー PYS-001; 室町機械株式会社）の下を横切った回数を測定して、開始から120分後に終了とした。スーパーメックスセンサーから得られたデータはCompACT AMS Ver. 3（室町機械株式会社）を用いて解析した。

5. ホットプレート試験

ホットプレート試験はHoriguchiらの方法²⁰⁾に準じて行った。マウスを49℃（±0.5℃）もしくは55℃（±0.5℃）に設定したプレート（Model 35100; Ugo Basile）の上に置き、肢底をなめるリッキング（licking）をするまでもしくは熱刺激から逃避するためにジャンプするまでの時間を測定した。全てのマウスは痛み刺激に対するストレスを取り除くために、ハンドリングを行った。肢の組織の損傷を避ける為に、カットオフ値は低温（49±0.5℃）の場合30秒、高温（55℃±0.5℃）の場合15秒と設定し、全てのマウスの使用は1回とした。

6. プランター試験

プランター試験はHoriguchiらの方法²¹⁾に準じて行った。プランター式鎮痛効果測定装置（Ugo Basile）を用いて熱光源を後肢にあて、逃避反応を起こすまでの時間を測定した。対照群のマウスが逃避反応を起こすまでの時間が8～11秒となるように刺激値を設定し、15秒をカットオフ値とした。

7. カプサイシン誘発疼痛試験

カプサイシン誘発疼痛試験はHoriguchiらの方法²¹⁾に従って行った。マウスをプラスチックケージ（10 cm×18 cm×10 cm）に入れ、90分テスト環境に馴化させた。30ゲージのBD ロードーズ（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、福島）を用いてカプサイシン溶液（0.08 µg/µl）を20 µL 後肢足底に投与した。対照群には溶剤である1%エタノール含有生理食塩水（vehicle）を20 µL 注射した。注射後の5分間のlickingおよび後肢を持ち上げるリフティング（lifting）をする時間を測定した。

8. von Frey 試験

von Frey 試験は Horiguchi らの方法²⁰⁾に準じて、Touch Test™ Sensory Evaluators (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) を用いて測定した。マウスを網の上に置き、その上から透明なプラスチックゲージ (10 cm × 18 cm × 10 cm) をかぶせ、60 分馴化させた。機械刺激値は加圧力が 0.008, 0.02, 0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 0.6, 1.0, 1.4, 2.0 g のフィラメントを用いて up-down 法²²⁾で測定した。フィラメントが曲がるまで後肢に負荷をかけ、最大 3 秒間逃避反応を観察した。刺激は加圧力が 0.16 g のフィラメントから開始し、逃避反応を認めると 1 段階加圧力が小さいフィラメントに変更し、逃避反応が認められなくなるまで繰り返した。逃避反応の消失が認められた後、1 段階加圧力が大きいフィラメントでの刺激に対する逃避反応と再度 1 段階加圧力が小さいフィラメントでの逃避反応の消失を確認し、逃避反応を引き起こしたフィラメントの最少機械刺激値を逃避反応閾値とした。

9. 免疫組織化学的解析

c-Fos 免疫染色は、既報の方法^{21), 23), 24)}に準じて行った。マウスの右後肢足底部表面にカプサイシン溶液 (0.08 µg/µL) または vehicle を 20 µL 注射した 2 時間後に、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i.p.) で麻酔し、左心室より、生理食塩水を全身に灌流させ脱血後、4% パラホルムアルデヒド (PFA)/0.1 M リン酸緩衝液 (PB) を灌流させ組織を固定した。全脳を摘出し、4% PFA/0.1 M PB 中で 4℃, 24 時間浸潤固定を行った後、20%スクロース溶液に置換し、2 日間洗浄処置を行った。

マウス脳アトラス¹⁸⁾を参考として、クリオスタット (CM1520; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) を用いて、前部帯状回皮質 (ACC; プレグマを基準に +0.1 mm ~ +0.5 mm), 体性感覚野 (SSC; プレグマを基準に -0.7 mm ~ -1.0 mm), 扁桃体基底外側核 (BLA; プレグマを基準に -1.3 mm ~ -1.5 mm), 中脳水道周囲灰白質 (PAG; プレグマを基準に -3.5 mm ~ -4.2 mm), 青斑核 (LC; プレグマを基準に -5.3 mm ~ -5.5 mm) および延髄吻側腹内側部 (RVM; プレグマを基準に -5.8 mm ~ -6.1 mm) の脳各領域を含む厚さ 20 µm の冠状切片を作製した。得られた切片を MAS コートスライドガラス (松浪硝子工業株式会社) に貼付し、風乾後、クエン酸バッファー (pH 7.0) 中

で 10 分間マイクロウェーブを照射した。0.3% H₂O₂ に 5 分間浸し、内因性ペルオキシダーゼを不活性化させた後、室温で 5% ヤギ血清 (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、ウサギ抗 c-Fos 抗体 (1,000 倍希釈; sc-253, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) で 12 時間、4℃でインキュベートした。つづいて、ビオチン化ヤギ抗ウサギ抗体 (100 倍希釈; Vectastain ABC kit) で 1 時間、室温でインキュベートし、アビジン・ビオチン標識酵素複合体液 (50 倍希釈; Vectastain ABC kit) を 1 時間室温で反応させた。さらに、0.05% ジアミノベンチジントラハイドロクロライド (DAB) / 1 M Tris-HCl (pH 7.4) および 30% H₂O₂ 水で処置して発色させた。その後、100% エタノールで脱水、キシレンで透徹処理して、Mount Quick (コスモ・バイオ株式会社) を用いて封入した。

c-Fos 陽性細胞数の計数は冷却 CCD デジタルカメラシステムを装備した正立顕微鏡 (AXIO Imager, M2/ AxioCam MRc5; Carl Zeiss, Jena, Germany) より取得したデジタル画像を用いて行った。同一動物から得られた各脳領域を含む 5 枚の連続切片像において単位面積あたりあるいは領域全体の c-Fos 陽性細胞数を計数し、その平均値を 1 例とし、さらに各グループ 8 匹の平均値として表した。SSC, BLA と ACC では左脳での 1 × 1 mm² あたりの c-Fos 陽性細胞数を、LC では左脳の領域全体での c-Fos 陽性細胞数を、RVM では左右脳での 1 × 1 mm² あたりの c-Fos 陽性細胞数を、PAG では左右脳を合わせた領域全体での c-Fos 陽性細胞数をそれぞれ計数した。

チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 免疫染色は既報の方法^{25), 26)}に準じて行った。行動解析後、一部のマウスで行った。ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i.p.) で麻酔し、左心室より、生理食塩水を全身に灌流させ脱血後、4% PFA/0.1 M PB を灌流させ組織を固定した。全脳を摘出し、4% PFA/0.1 M PB 中で 4℃, 24 時間浸潤固定を行った後、20%スクロース溶液に置換し、2 日間洗浄処置を行った。組織をティッシュ・テック OCT コンパウンド (サクラファインテックジャパン株式会社, 東京) に包埋し、凍結させた後、クライオスタット (CM1520) を用いて、線条体を含む厚さ 20 µm の冠状切片を作製した。得られた切片を MAS コートスライドガラス (松浪硝子工業株式会社, 大阪) に貼付し、風乾後、クエン酸バッファー (pH 6.0) 中で 10 分間マイクロウェーブを照射した。室温

中5%ウマ血清 (Vectastain ABC kit) で1時間ブロッキングした。ブロッキング後、マウス抗TH抗体 (1000倍希釈; clone LNC1, MAB318, Chemicon; EMD Millipore, Billerica, MA, USA) で12時間、4℃でインキュベートした。つづいて、抗マウスIgG抗体 (50倍希釈; Vectastain ABC kit) で1時間、室温でインキュベートし、アビジン・ビオチン標識酵素複合体液 (25倍希釈; Vectastain ABC kit) を1時間室温で反応させた。さらに、0.05% DAB/ 1 M Tris-HCl (pH 7.4) および30% H₂O₂ 水で処置して発色された。その後、100%エタノールで脱水、キシレンで透徹処理して、Mount Quickを用いて封入し、顕微鏡で観察した。

10. 統計解析

全てのデータは平均値±標準誤差で示した。統計解析は解析ソフト エクセル統計 (社会情報サービス, 東京) を用いて行い、有意水準は $P<0.05$ とした。自発運動量の経時変化は two-way repeated measures ANOVAにて、痛覚感受性変化 (2群比較) および c-Fos 発現変化は unpaired *t*-test にて行った。

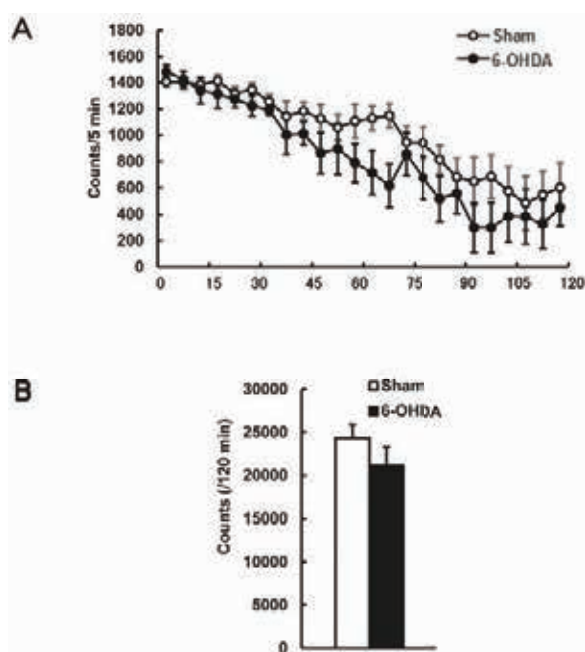


Fig. 1. 6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスの運動機能の評価

マウスの左側線条体に生理食塩水もしくは6-OHDAを局所注入し、その14日後に行動解析を行った。(A) (B) 自発運動量測定試験: マウスが赤外線センサーの下を通過する回数を測定した。データは平均値±標準誤差で示す ($n=8$)。

結果

1. 6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスの運動機能の評価

6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスの運動機能変化を自発運動量測定試験で評価した (Fig. 1)。Sham 群と6-OHDA群の自発運動量の経時変化 (operation: $F_{1,7}=1.605$, $P=0.2458$; time: $F_{23,161}=25.50$, $P<0.0001$; interaction: $F_{23,161}=0.7097$, $P=0.8312$ by two-way repeated measures ANOVA) (Fig. 1A) および120分間の総運動量 ($P=0.1319$ by unpaired *t*-test) (Fig. 1B) の間に有意な差は認められなかった。

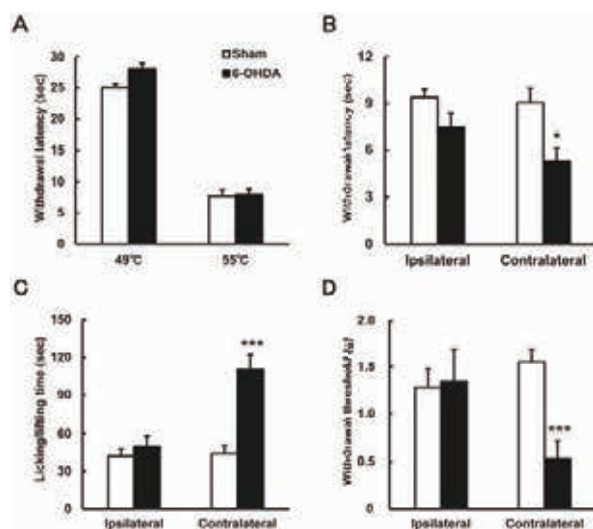


Fig. 2. 6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスの痛み感受性の変化

マウスの左側線条体に生理食塩水もしくは6-OHDAを局所注入し、その14日後に行動解析を行った。なお、B-Dのデータにおいては、痛み刺激を左後肢に与えたマウスを ipsilateral 群、右後肢に与えたマウスを contralateral 群とした。(A) ホットプレート試験: マウスを49℃あるいは55℃としたプレート上に置き、逃避反応を起こすまでの時間を測定した。(B) プランター試験: マウスの後肢に熱光源を当て、逃避反応を起こすまでの時間を測定した。(C) カプサイシン誘発疼痛試験: マウスの後肢足底にカプサイシン (1.6 μ g/20 μ l) を投与し、その直後5分間の licking および lifting 時間を測定した。(D) von Frey 試験: マウスの後肢に von Frey フィラメントを用いて強度の異なる刺激を与え、逃避反応を起こす反応閾値を測定した。データは平均値±標準偏差で示す ($n=10$)。* $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs. Sham 群 (unpaired *t*-test)

2. 6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスの熱刺激, 化学刺激, 機械刺激に対する痛み感受性の変化

片側線条体破壊マウスにおける痛み感受性変化を 6-OHDA 注入 2 週間後に評価した (Fig. 2)。ホットプレート試験の 49℃ および 55℃ の両試行において, Sham 群と 6-OHDA 群の逃避潜時の間に有意な差は認められなかった (operation: $F_{1,36}=2.205$, $P=0.1463$; temperature: $F_{1,36}=279.1$, $P<0.0001$; interaction: $F_{1,36}=1.531$, $P=0.2239$ by two-way ANOVA) (Fig. 2A)。つぎに, 破壊線条体と同側後肢 (左後肢) に痛み刺激を負荷する群を ipsilateral 群, 反対側後肢 (右後肢) に痛み刺激を負荷する群を contralateral 群とし, 片側線条体破壊マウスにおける熱刺激 (Fig. 2B), 化学刺激 (Fig.

2C) および機械刺激 (Fig. 2D) に対する痛み感受性変化を検討した。Ipsilateral 群での検討では, プランター試験での逃避潜時 ($P=0.0791$ by unpaired t -test) (Fig. 2B, left), カプサイシン誘発疼痛試験での licking および lifting 時間 ($P=0.4496$ by unpaired t -test) (Fig. 2C, left) ならびに von Frey 試験での逃避閾値 ($P=0.8838$ by unpaired t -test) (Fig. 2D, left) のいずれにおいても, Sham 群と 6-OHDA 群の間に有意な差は認められなかった。一方, contralateral 群での検討では, 6-OHDA 群は Sham 群と比べて, プランター試験での逃避潜時の短縮 ($P<0.01$ by unpaired t -test) (Fig. 2B, right), カプサイシン誘発疼痛試験での licking および lifting 時間の増大 ($P<0.001$ by unpaired t -test) (Fig. 2C, right) および von Frey 試験での逃避閾値の低下 ($P<0.001$ by unpaired t -test) (Fig. 2D, right) が認められた。

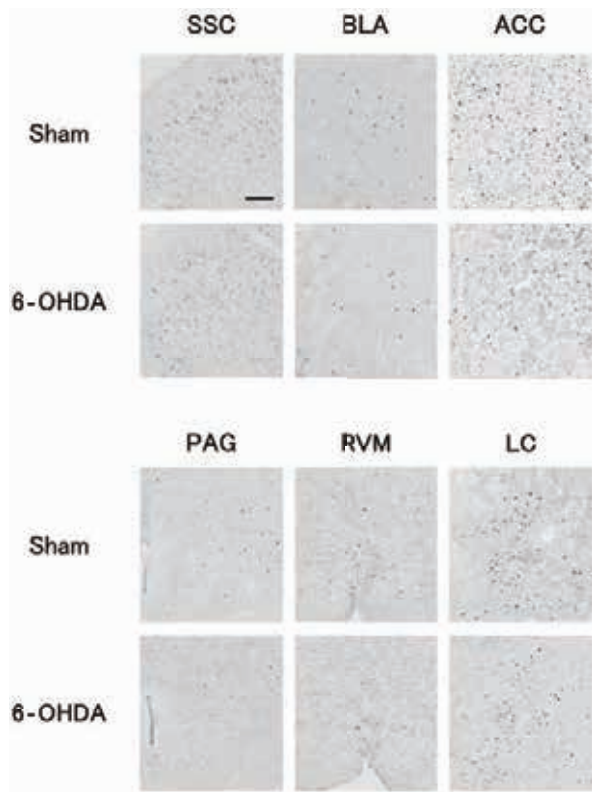


Fig. 3. マウスの後肢足底へのカプサイシン投与による脳内 c-Fos 発現を示す典型的な顕微鏡像

マウスの左側線条体に生理食塩水もしくは 6-OHDA を局所注入し, その 14 日後に右後肢足底へカプサイシン (1.6 μ g) を投与した。投与 2 時間後に組織を固定して脳薄切片を作製し, 免疫染色法により体性感覚野 (SSC), 扁桃体基底外側核 (BLA), 前部帯状回皮質 (ACC), 中脳水道周囲灰白質 (PAG), 延髄吻側腹内側部 (RVM) および青斑核 (LC) を含む切片の c-Fos 発現細胞を可視化した。Bar は 100 μ m。

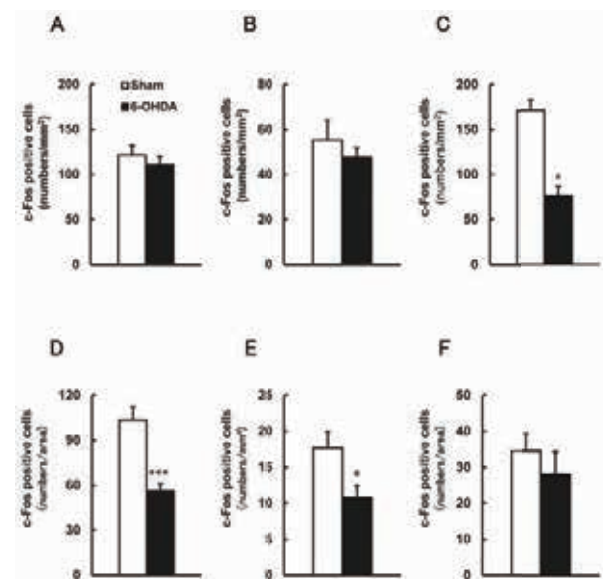


Fig. 4. 6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスの後肢足底へのカプサイシン投与による脳内 c-Fos 発現変化

マウスの左側線条体に生理食塩水もしくは 6-OHDA を局所注入し, その 14 日後に右後肢足底へカプサイシン (1.6 μ g) を投与した。投与 2 時間後に組織をホルマリン灌流により固定し, 脳薄切片を作製した。痛覚関連部位を含む切片における c-Fos 発現細胞を免疫染色法により可視化して計数した。(A) 体性感覚野 (SSC), (B) 扁桃体基底外側核 (BLA), (C) 前部帯状回皮質 (ACC), (D) 中脳水道周囲灰白質 (PAG), (E) 延髄吻側腹内側部 (RVM), (F) 青斑核 (LC) データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示す ($n=8$)。* $P<0.05$, *** $P<0.001$, vs. Sham 群 (unpaired t -test)

3. 6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスの痛覚関連部位におけるカプサイシン誘発 c-Fos 発現の変化

破壊線条体と反対側後肢足底（右後肢足底）へカプサイシン溶液（0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）を 20 μL 投与した後の脳内 c-Fos 発現を指標として、片側線条体破壊マウスの痛覚関連部位における神経応答変化を解析した（Fig. 3, 4）。SSC（ $P=0.2565$ by unpaired t -test）（Fig. 4A）、BLA（ $P=0.4929$ by unpaired t -test）（Fig. 4B）および LC（ $P=0.1592$ by unpaired t -test）（Fig. 4F）における c-Fos 陽性細胞数において、Sham 群と 6-OHDA 群の間に有意な差は認められなかった。一方、ACC（ $P<0.01$ by unpaired t -test）（Fig. 4C）、PAG（ $P<0.001$ by unpaired t -test）（Fig. 4D）、RVM（ $P<0.01$ by unpaired t -test）（Fig. 4E）においては、6-OHDA 群は Sham 群と比べて c-Fos 陽性細胞数が有意に減少していた。

考 察

本研究では、6-OHDA により片側線条体を破壊したマウスにおいて、破壊線条体と反対側後肢で熱刺激、化学刺激および機械刺激に対する痛覚過敏が生じていることを認め、また、この痛覚過敏に 5-HT 作動性下等痛覚抑制系の機能低下が関与する可能性を示した。

6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスのスクリーニングは Iancu らの基準⁸⁾をもとに行い、0.5 mg/kg のアポモルヒネ投与により毎分 4 回以上回転運動を示すマウスを PD モデルマウスとして選別し、以降の実験に用いた。アポモルヒネ誘発回転運動は、片側線条体破壊マウスにおいてアポモルヒネにより惹起される DA 神経破壊の反対側への回転運動で、黒質－線条体の DA 神経系の破壊を反映する表現型と考えられている。本研究においても、基準以上のアポモルヒネ誘発回転運動を示した動物の一部を抽出して、線条体の DA 神経脱落を DA 生合成酵素である TH を指標に免疫染色法により確認したところ、TH の染色シグナルが著明に減少していること、すなわち、DA 神経系が変成・脱落していることが認められた。

自発運動量試験において、6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスにおける運動障害を認めなかった。これにより、本実験に使用したマウスは、重篤な運動障害を示さない軽度のヘミ PD モデル動物であるものと考えられた。

6-OHDA 誘発片側線条体破壊動物における全身の痛覚変化については、これまでラットを用いた報告がなされており、Cao らは、プランターでの逃避潜時の短縮、ならびにホルマリン試験での第 I 相および第 II 相における finching および licking 時間の増大²⁷⁾を、また、da Rocha らは、ホットプレート試験での逃避潜時の短縮²⁸⁾を見いだしている。すなわち、6-OHDA 誘発片側線条体破壊ラットが全身性に痛覚過敏を示すことが示されている。一方で、マウスモデルを用いた本研究では、ホットプレート試験において 6-OHDA 群の痛覚過敏を認めなかった。これらの知見より、単純に PD モデルの熱刺激に対する痛覚過敏の発現に種差が存在することが示唆されているが、種の違いに加えて PD モデルとしての病状ステージが研究グループ間で異なっており、そのことが本研究の成績と既報の知見との差異として認められた可能性が考えられる。

本研究では、6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスにおける熱刺激に対する全身性の痛覚感受性変化を認めなかったため、つぎに線条体破壊側半身と非破壊側半身を区別して痛覚感受性の変化を解析した。これまでの研究においても、同様の手法により 6-OHDA 誘発片側線条体破壊ラットの痛覚感受性変化が検討されているが、von Frey 試験において、contralateral の逃避閾値の上昇²⁸⁾と ipsilateral の逃避閾値の低下²⁹⁾、ホルマリン試験でのグルーミング行動において、contralateral の第 I 相での増加と、ipsilateral の第 I 相での低下と第 II 相での増加²⁶⁾が示されるなど、contralateral/ipsilateral で痛覚鈍麻と痛覚過敏が混在して検出されており、一定の見解は得られていない。本研究では、6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスの線条体非破壊側（contralateral）の後肢において、プランター試験での逃避潜時の短縮、カプサイシン誘発疼痛試験での licking および lifting 時間の増大、von Frey 試験での逃避閾値の低下、すなわち、DA 神経非破壊側半身で熱刺激、化学刺激および機械刺激に対する痛み感受性が増大していることを認めた。また本研究では、ipsilateral においては認めなかった。本研究の成績より、6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスでは黒質－線条体のドパミン神経細胞の脱落により痛覚過敏が惹起されることが示唆された。

末梢で受容した痛み刺激は、上行性痛覚伝達系と呼ばれる神経経路を介して伝達されて脳で認識される³⁰⁾。すなわち、末梢での侵害刺激に起因する情報は脊髄後角を経由して視床に伝わり、さらに情報は SSC へと伝

達されて痛みとして認識されている。また、視床からの情報は BLA へも伝達され、痛みに対する不快感を惹起すると考えられている³¹⁾。一方、上行性痛覚伝達系は脊髄後角において下行性痛覚抑制系により制御を受けること³⁰⁾が知られている。下行性痛覚抑制系の神経経路は視床を起点とし、ACC, PAG を経由して脊髄後角へと投射³²⁾されており、さらに PAG から脊髄後角へは (1) RVM を経由する 5-HT 作動性神経経路と (2) LC を経由する NA 作動性神経経路の 2 つの経路の存在が示されている³³⁾。したがって、本研究では、6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスの痛覚過敏発現に関わる神経基盤の探索として、SSC, BLA, ACC, PAG, RVM および LC の 6 つの脳部位に着目して解析を行った。

核タンパクである c-Fos は、神経活動依存的に一過性に発現誘導される³⁴⁾ことより、その免疫組織学的検出によって複数の脳部位における神経活動状況を視覚的に捉えることができる。末梢での痛み刺激受容を伝達する神経活動については、後肢足底へのカプサイシン投与による痛み関連脳部位での c-Fos 発現誘導が示されており²⁰⁾、また、Horiguchi らはカプサイシン誘発痛み関連行動と c-Fos 発現誘導との関連性²⁰⁾を報告している。本研究では、まず予備検討として、正常マウスの後肢足底へのカプサイシン誘発痛み刺激により SSC, BLA, ACC, PAG, RVM および LC で c-Fos が発現誘導されることを確認し (data not shown)、さらに、6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスの痛覚過敏発現に関わる神経基盤の解析に応用した。その解析により、片側線条体破壊マウスでは、線条体非破壊側 (contralateral) 後肢へのカプサイシン刺激による線条体破壊側 (ipsilateral) 脳内での c-Fos 発現が、ACC, PAG および RVM の 3 部位で減少していること、一方で、SSC, BLA および LC の 3 部位では差異が認められないことを明らかとした。上述した上行性痛覚伝達経路ならびに下行性痛覚抑制経路における解析対象脳部位の関わりを考え合わせると、6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスでは、5-HT 作動性下行性痛覚抑制系による制御が減弱していることが示唆された。現時点において、線条体の DA 神経の変性・脱落が 5-HT 神経系の神経活動を低下させる機序については全く不明であるが、進行性の PD 患者において、DA 神経系のみならず 5-HT 神経系が変性・脱落することが報告されており³⁵⁾、痛覚過敏を含む PD の新たな薬物療法の開発へ向けて今後のその詳細の解明が待たれるところである。また今後の詳細な分子機序の解明に向けては、脊髄の神経活動変化

についても解析対象に加えることが重要であろう。なお、PAG および RVM の 2 部位については、左脳/右脳の領域を明確に区別できなかったため、本研究では両側を合わせて c-Fos 発現細胞を計数することにした。ヘミ PD モデルにおける痛覚刺激と神経活動の関係について、Reyes らは、6-OHDA 誘発片側線条体破壊ラットを用いた検討において、破壊側 (ipsilateral) 後肢への機械刺激による PAG での c-Fos 発現が対照動物と差異がないことを報告している³⁶⁾。マウスを用いた本研究とは動物種や痛み刺激の種類が異なるが、PAG および RVM における c-Fos 発現細胞の計数結果において、非破壊側 (contralateral) 領域を合わせたことの影響は極めて小さいものと思われる。

以上、本研究では、6-OHDA の脳局所微量注入により片側線条体を破壊した PD モデルマウスが、破壊線条体と反対側身体で熱刺激、化学刺激および機械刺激に対して痛覚過敏を発現することを示し、その発現機序として 5-HT 作動性下行性痛覚抑制系の機能低下が関与する可能性を見いだした。さらに興味深いことに、本研究で用いた PD モデルマウスの運動機能障害は、自発運動では見られなかった。近年、PD 患者の非運動機能障害のなかでも、痛覚過敏は疾患発症の早期より発現することが報告されており^{4), 5)}、本研究で見出した知見が、PD 発症早期の痛覚過敏を反映することが強く示唆された。すなわち、6-OHDA 誘発片側線条体破壊マウスは PD の痛覚過敏の病態解析に非常に有用であり、今後の新規薬物療法の開発への応用が期待される。

結 論

本研究では、6-OHDA の脳局所微量注入により片側線条体を破壊した PD モデルマウスでは、破壊線条体と反対側身体で熱刺激、化学刺激および機械刺激に対して痛覚過敏が発現することを、さらに、その発現機序として 5-HT 作動性下行性痛覚抑制系の機能低下が関与している可能性を見出した。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、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顎口腔病因病態制御学講座 (薬理学教室) ならびに口腔科学専攻高次脳口腔機能学講座 (麻酔学教室) 教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Yamawaki, M., Kusumi, M., Kowa, H. and Nakashima, K. (2009): Changes in prevalence and incidence of Parkinson's disease in Japan during a quarter of a century. *Neuroepidemiology*, **32**, 263-269.
- 2) Rana, A.Q., Ahmed, U.S., Chaudry, Z.M. and Vasan, S. (2015): Parkinson's disease: a review of non-motor symptoms. *Expert Rev Neurother*, **15**, 549-562.
- 3) Broen, M.P., Braaksma, M.M., Patijn, J. and Weber, W.E. (2012): Prevalence of pain in Parkinson's disease: a systematic review using the modified QUADAS tool. *Mov Disord*, **27**, 480-484.
- 4) Yoritaka, A., Shimo, Y., Takanashi, M., Fukae, J., Hatano, T., Nakahara, T., Miyamoto, N., Urabe T., Mori, H. and Hattori, N. (2013): Motor and non-motor symptoms of 1453 patients with Parkinson's disease: prevalence and risks. *Parkinsonism Relat Disord*. **19**, 725-731.
- 5) Schapira, A.H.V., Chaudhuri, K.R. and Jenner, P. (2017): Non-motor features of Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci*, **18**, 435-450.
- 6) Blandini, F. and Armentero, M.T. (2012): Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J*, **279**, 1156-1166.
- 7) Coulombe, K., Saint-Pierre, M., Cisbani, G., St-Amour, I., Gibrat, C., Giguère-Rancourt, A., Calon, F. and Cicchetti, F. (2016): Partial neurorescue effects of DHA following a 6-OHDA lesion of the mouse dopaminergic system. *J Nutr Biochem*, **30**, 133-142.
- 8) Iancu, R., Mohapel, P., Brundin, P. and Paul, G. (2005): Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav Brain Res*, **162**, 1-10.
- 9) Johnson, M.E. and Bobrovskaya, L. (2015): An update on the rotenone models of Parkinson's disease: their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene-environment interactions. *Neurotoxicology*, **46**, 101-116.
- 10) Meredith, G.E. and Rademacher, D.J. (2011): MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update. *J Parkinsons Dis*, **1**, 19-33.
- 11) Iranavi, M.M., Leung, C.C., Sadeghian, M., Haddon, C.O., Rose, S. and Jenner, P. (2005): The acute and the long-term effects of nigral lipopolysaccharide administration on dopaminergic dysfunction and glial cell activation. *Eur J Neurosci*, **22**, 317-330.
- 12) Masliah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Mallory, M., Hashimoto, M., Takeda, A., Sagara, Y., Sisk, A. and Mucke, L. (2000): Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science*, **287**, 1265-1269.
- 13) Van der Perren, A., Toelen, J., Gasteels, C., Macchi, F., Van Rompuy, A.S., Sarre, S., Casadei, N., Nuber, S., Himmelreich, U., Osorio Garcia, M.I., Michotte, Y., D'Hooge, R., Bormans, G., Van Laere, K., Gijsbers, R., Van den Haute, C., Debyser, Z. and Baekelandt, V. (2015): Longitudinal follow-up and characterization of a robust rat model for Parkinson's disease based on overexpression of alpha-synuclein with adeno-associated viral vectors. *Neurobiol Aging*, **36**, 1543-1558.
- 14) Park, J., Lim, G.S., Soe, H., Park, G.A., Zhuo, M., Kaang, B.K. and Less, K. (2015): Pain perception in acute model mice of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Mol Pain*, **17**, 11-28.
- 15) Kaszuba, B.C., Walling, I., Gee, L.E., Shin, D.S. and Pilitsis, J.G. (2017): Effects of subthalamic deep brain stimulation with duloxetine on mechanical and thermal thresholds in 6OHDA lesioned rats. *Brain Res*, **15**, 233-241.
- 16) Tanaka, T., Ago, Y., Umehara, C., Imoto, E., Hasebe, S., Hashimoto, H., Takuma, K. and Matsuda, T. (2017): Role of prefrontal serotonergic and dopaminergic systems in encounter-induced hyperactivity in methamphetamine-sensitized mice. *Int J Neuropsychopharmacol*, **20**, 410-421.
- 17) Parikh, V., Naughton, S.X., Yegla, B. and Guzman, D.M. (2016): Impact of partial dopamine depletion on cognitive flexibility in BDNF heterozygous mice. *Psychopharmacology (Berl)*, **233**, 1361-1375.
- 18) Paxinos, G. and Franklin, K.B.J. (2004): *The mouse brain in stereotaxic coordinate*, Ed. 2, Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- 19) Hasebe, S., Ago, Y., Watabe, Y., Oka, S., Hiramatsu, N., Tanaka, T., Umehara, C., Hashimoto, H., Takuma, K. and Matsuda, T. (2017): Anti-anhedonic effect of selective serotonin reuptake inhibitors with affinity for sigma-1 receptors in picrotoxin-treated mice. *Br J Pharmacol*, **174**, 314-327.
- 20) Horiguchi, N., Ago, Y., Asada, K., Kita, Y., Hiramatsu, N., Takuma, K. and Matsuda, T. (2013): Involvement of spinal 5-HT1A receptors in isolation rearing-induced hypoalgesia in mice. *Psychopharmacology*, **227**, 251-261.
- 21) Horiguchi, N., Ago, Y., Hasebe, S., Higashino, K., Asada, K., Kita, Y., Takuma, K. and Matsuda, T. (2013): Isolation rearing reduces mechanical allodynia in a mouse model of chronic inflammatory pain. *Pharmacol Biochem Behav*, **113**, 46-52.
- 22) Bonin, R.P., Bories, C. and De Koninck, Y. (2014): A simplified up-down method (SUDO) for measuring mechanical nociception in rodents using von Frey filaments. *Mol Pain*, **10**, 26. doi: 10.1186/1744-8069-10-26.
- 23) Hara, Y., Takuma, K., Takano, E., Katashiba, K., Taruta,

- A., Higashino, K., Hashimoto, H., Ago, Y. and Matsuda, T. (2015): Reduced prefrontal dopaminergic activity in valproic acid-treated mouse autism model, *Behav Brain Res*, **289**, 39–47.
- 24) Hara, Y., Ago, Y., Taruta, A., Hasebe, S., Kawase, H., Tanabe, W., Tsukada, S., Nakazawa, T., Hashimoto, H., Matsuda, T. and Takuma, K. (2017): Risperidone and aripiprazole alleviate prenatal valproic acid-induced abnormalities in behaviors and dendritic spine density in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, **234**, 3217–3228.
- 25) Ago, Y., Kawasaki, T., Nashida, T., Ota, Y., Cong, Y., Kitamoto, M., Takahashi, T., Takuma, K. and Matsuda, T. (2011): SEA0400, a specific $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitor, prevents dopaminergic neurotoxicity in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, **61**, 1441–1451.
- 26) Maegawa, H., Morimoto, Y., Kudo, C., Hanamoto, H., Boku, A., Sugimura, M., Kato, T., Yoshida, A. and Niwa, H. (2015): Neural mechanism underlying hyperalgesic response to orofacial pain in Parkinson's disease model rats. *Neurosci Res*, **96**, 59–68.
- 27) Cao, L. F., Peng, X. Y., Huang, Y., Wang, B., Zhou, F. M., Cheng, R. X., Chen, L. H., Luo, W. F. and Liu, T. (2016): Restoring spinal noradrenergic inhibitory tone attenuates pain hyper-sensitivity in a rat model of parkinson's disease. *Neural Plast*, ArticleID: 6383240. doi: 10.1155/6383240.
- 28) da Rocha, J. T., Pinton, S., Gai, B. M. and Nogueira, C. W. (2013): Diphenyl diselenide reduces mechanical and thermal nociceptive behavioral responses after unilateral intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine in rats. *Biol Trace Elem Res*, **154**, 372–378.
- 29) Takeda, R., Ishida, Y., Ebihara, K., Abe, H., Matsuo, H., Ikeda, T., Koganemaru, G., Kuramashi, A., Funahashi, H., Magata, Y., Kawai, K. and Nishimori, T. (2014): Intrastriatal grafts of fetal ventral mesencephalon improve allodynia-like withdrawal response to mechanical stimulation in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, **573**, 19–23.
- 30) Perl, E. R. (2011): Pain mechanisms: a commentary on concepts and issues. *Prog Neurobiol*, **94**, 20–38.
- 31) Yoshino, A., Okamoto, Y., Onoda, K., Yoshimura, S., Kunisato, Y., Demoto, Y., Okada, G. and Yamawaki, S. (2010): Sadness enhances the experience of pain via neural activation in the anterior cingulate cortex and amygdala: an fMRI study. *Neuroimage*, **50**, 1194–1201.
- 32) Xie, Y. F., Huo, F. Q. and Tang, J. S. (2009): Cerebral cortex modulation of pain. *Acta Pharmacol Sin*, **30**, 31–41.
- 33) Millan, M. J. (2002): Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, **66**, 355–474.
- 34) Coggeshall, R. E. (2005): Fos, nociception and the dorsal horn. *Prog Neurobiol*, **77**, 299–352.
- 35) Miguez, C., Morera-Herreras, T., Torrecilla, M., Ruiz-Ortega, J. A. and Ugedo, L. (2014): Interaction between the 5-HT system and the basal ganglia: functional implication and therapeutic perspective in Parkinson's disease. *Front Neural Circuits*, Article 21, doi: 10.3389/fncir.00021.
- 36) Reyes, S. and Mitrofanis, J. (2008): Patterns of FOS expression in the spinal cord and periaqueductal grey matter of 6OHDA-lesioned rats. *Int J Neurosci*, **118**, 1053–1079.