

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592988

研究課題名(和文)パーキンソン病モデルラットにおける疼痛感覚異常の解明

研究課題名(英文)Behavioral responses and Fos activation following orofacial formalin injection in a rodent model of Parkinson's disease

研究代表者

丹羽 均(Niwa, Hitoshi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30218250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：片側および両側パーキンソン病(PD)モデルラットにおける口腔領域の痛覚異常を検討した。片側または両側の内側前脳束に6-hydroxydopamineを注入し、PDラットを作製した。PDラットの左側上口唇にホルマリン溶液を注射し、疼痛関連行動と三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)に発現するc-Fos陽性細胞数を数えた。内側前脳束に生理食塩水を投与したコントロールラットと比較した。疼痛関連行動は、片側PDモデルラットではコントロールラットと比べ有意に増加したが、両側モデルでは差はなかった。しかし、Vcでのc-Fos陽性細胞数は、PDラットで増加した。PDモデルラットは痛覚過敏状態にあることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the modulation of the nociceptive stimuli from the orofacial region in Parkinson's disease (PD) model rats, which were produced by the unilateral or bilateral injection of 6-OHDA into the medial forebrain bundle. Behavioral responses to formalin injection into the upper lip and the expression of c-Fos and pERK in trigeminal spinal subnucleus caudalis (Vc) were explored. Unilateral PD rats showed increased nociceptive responses when formalin was injected ipsilaterally to the lesion. This hyperalgesic response was associated with increased c-Fos expression in Vc. When formalin was injected into contralateral side to 6-OHDA lesion, behavioral responses were reduced in 6-OHDA rats. However, the expression of pERK in Vc remained unchanged. Although the hyperalgesic response was not observed in bilateral PD rats, c-Fos expression in Vc increased. These results suggest that 6-OHDA lesion causes hyperalgesic response to nociceptive stimulation from the orofacial region.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：パーキンソン病 口腔顔面痛 疼痛関連行動 ホルマリンテスト 痛覚 c-Fos ラット

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は、高齢者における重要な疾患のひとつであり、黒質細胞で産生される神経伝達物質のドーパミンが減少し、運動の制御機構である黒質線条体系が正常に機能しなくなる疾患である。典型的な症例では振戦、固縮、無動、姿勢反射障害などの運動障害を呈する。一方、近年、PD 患者における非運動障害が注目され、その中でも PD 患者の 8 割以上が経験する「痛み」は、QOL に直接関係するため関心が高まっている。しかし、PD 患者の痛覚閾値に関しては議論があり、低下しているという報告 (Djaldeh, R. et al. *Neurology* 62, 2171-2175, 2004; Zambito MS. Et al. *J. Neurol.* 528, 627-633, 2011) もあれば、逆に高くなっているという報告 (Guieu, R et al. *Rev. Neurol.* 132, 70-74, 1973; Perrotta, A. et al. *Clin. Neurophysiol.* 116, 2091-2098, 2005) もあり、一致しない。

PD 患者の口腔領域の痛みについては、PD 患者の 25% が burning mouth を訴え、その頻度は、非 PD 患者の 5 倍に相当するといわれている。burning mouth は PD に関連した痛みの Ford (2010) の分類では central pain に分類されるが、その発生メカニズムは不明である。一方、PD 患者の口腔の健康状態に関する報告は多数あり、重症の PD 患者においては、①無動や筋固縮による不十分な口腔清掃、②嚥下障害による食物の口腔内での停滞、③抗パーキンソン病薬、特に抗コリン剤による唾液分泌の低下など口腔衛生状態を悪化させる要因にあふれている。さらに PD 患者における最大の死亡原因が誤嚥性肺炎であることから、PD 患者の口腔衛生管理は、直接、生命予後に関係する重大事項である。したがって、PD における口腔領域の痛覚の変化を知ることが、口腔衛生管理の面から重要と考えられる。

2. 研究の目的

われわれは歯科臨床における経験から、重症の PD 患者はあまり疼痛を訴えず、痛覚は低下しているとの印象を持っていた。これは歯科治療中、痛みを伴う処置に対しても反応が少ないこと、さらに PD 患者の多くが、口腔疾患が重症になって初めて歯科を受診することが多いという理由からである。このような臨床上の観察から得られた仮説「PD 患者は口腔領域の疼痛に対する反応性が低下しているか？」を検証するため、科学研究費 (基盤研究 (C) 20592371、2008-2010 年) を用い検討を行った。この研究では、6-OHDA を片側の内側前脳束に投与することにより黒質細胞を破壊し、作製した片側 PD モデルラットを用い、三叉神経領域に加えられた痛み刺激 (ホルマリンテスト) に対する疼痛関連行動 (PRB) と三叉神経脊髄路核 (Vc) での c-Fos の発現状況を検討した。その結果、ホルマリンテストに対する PRB および c-Fos 発現の増加が示され、PD モデルラットは痛覚過敏状態に

あることが判明した。つまり、われわれの予想とは逆の結果となった。そこで、実際の結果が仮説と逆となった理由や片側 PD モデルラットにおける痛覚異常の特徴、さらに両側 PD モデルにおける痛覚への影響を検討するため本研究を実施した。

3. 研究の方法

片側、および両側 PD モデルラットを作製し、上口唇でホルマリンテストを行い、PRB (顔面こすり行動) を観察する。また、ホルマリンテスト終了後にラットの灌流固定を行い、脳を取り出し凍結切片を作製する。三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) に発現する c-Fos 陽性細胞の数を計測して免疫組織化学的解析を行う。

(方法)

(1) PD モデルラットの作製: 7 週齢の雄性 Wistar ラットの左側 または両側の内側前脳束に 6-OHDA を投与することにより、黒質のドーパミン神経の細胞死を引き起こし、ドーパミンを枯渇させ PD の症状を誘発させる。
①ラットをペントバルビタール (50mg/kg) で麻酔し、脳定位固定装置に固定する。
②頭蓋骨を露出させプレグマとラムダの座標を測定する。電気ドリルで穴を開け、左側、あるいは両側の内側前脳束にマイクロシリッジを用い、6-OHDA を投与する (Deumens, R. et al. *Exp. Neurol.* 175, 303-317, 2002)。コントロールとして同部位に生理食塩水を注入したラットも作製する。
③黒質線条体系のドーパミンを枯渇の評価は、組織学的変化で確認する。ホルマリンテストの終了後、灌流固定を行い、脳を取り出す。脳の凍結切片を作製した後、tyrosinehydroxylase に対する免疫染色を行い、ドーパミン産生神経細胞が破壊されていることを確認する。

(2) ホルマリンテスト: ホルマリン注射による炎症性疼痛に対する反応性を検討する。
①PD モデルラットの上口唇 (眼窩下神経領域) に 2%ホルマリンを 0.05mL 注射し、炎症性疼痛を誘発する。
②注射後の顔面こすり行動などの PRB を観察し、その回数の計測を行う。特に片側性モデルの場合には、破壊側と同側にホルマリンを注射した場合と反対側に注射した場合での顔面こすり運動の違いに注目した。
③ホルマリン注射後、5 分毎に 90 分間、疼痛関連行動の回数を計測する。その後、深麻酔下にパラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行う。脳を取り出し、三叉神経脊髄路核尾側亜核の凍結切片を作製する。c-Fos に対する免疫染色を行い、三叉神経脊髄路核尾側亜核に発現した c-Fos 陽性細胞の数を計測し免疫組織化学的評価を行う。

4. 研究成果

(1)6-OHDA 注入の tyrosinehydroxylase 免疫反応性に対する効果
内側前脳束に 6-OHDA を注入したラットで

は、黒質と線条体において tyrosinehydroxylase 免疫反応性の著明な低下が認められた。図 1、2 には両側の内側前脳束に 6-OHDA を投与した両側 PD モデルの脳切片を示している。一方、両側に生理食塩水を注入したコントロール群のラットでは、黒質と線条体において tyrosinehydroxylase 免疫反応性の低下は認められなかった (図 3、4)。

なお、両側性 PD モデルラットは片側性に比べ破壊後に死亡する頻度が高く、ホルマリンテスト実施まで生存する確率は 20%以下であった。

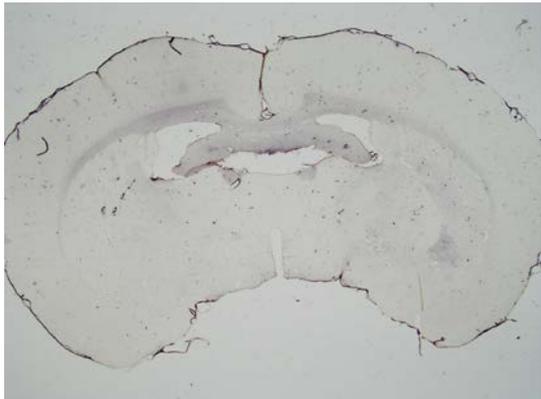


図 1. 6-OHDA 注入群の線条体の顕微鏡写真

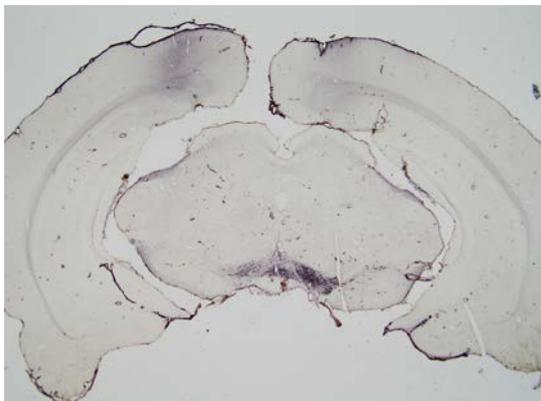


図 2. 6-OHDA 注入群の黒質の顕微鏡写真

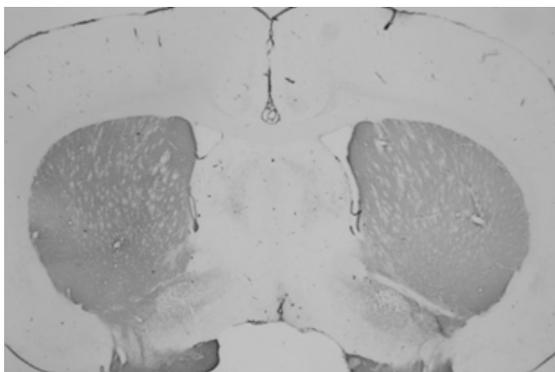


図 3. 生理食塩水注入群の線条体の顕微鏡写真

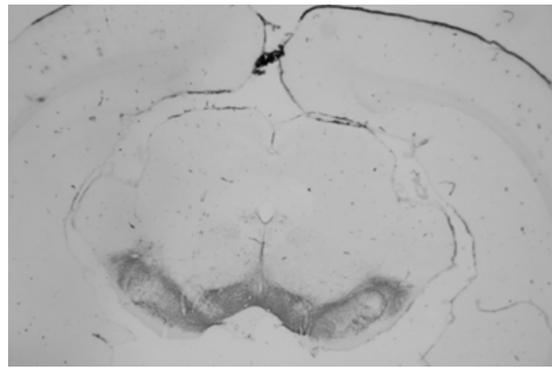


図 4. 生理食塩水注入群の黒質の顕微鏡写真

片側モデルにおいても 6-OHDA を注入した側の tyrosinehydroxylase 免疫反応性は著明に低下していた。

(2) 顔面こすり行動

上口唇へのホルマリン注射により顔面こすり行動が惹起され、この反応は二相性の経過を示した。ホルマリン注射から 5 間 (第 1 相) の顔面こすり行動の増加と、10 分以降 (第 2 相) で再度の増加が認められた。

図 5 には片側モデルにおける PRB の回数を示す。

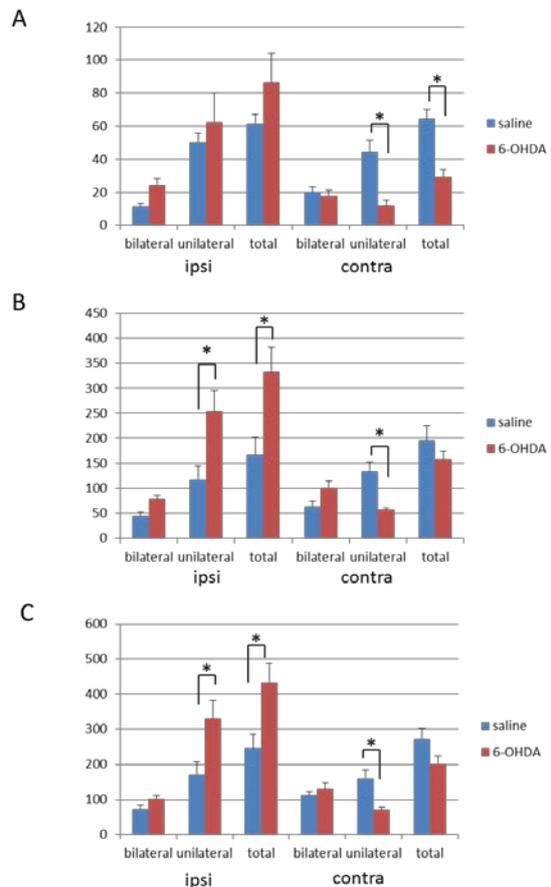


図 5. 顔面こすり行動における前肢の動作の特徴

A: 第 1 相 B: 第 2 相 C: 0-90 分

ipsi: 6-OHDA および生理食塩水投与側と同側にホル

マリン注射、contra: 6-OHDA および生食投与側と反対側にホルマリン注射
bilateral: 両側前肢を使って顔面をこすった回数、unilateral: ホルマリン注射側と同側の前肢のみを使って顔面をこすった回数、total: unilateral と bilateral の合計
* $p < 0.05$

第1相(A)では、6-OHDA-contra 群でホルマリン注射側と同側の前肢を使った顔面こすり運動の回数が有意に減少した。第2相(B)および0-90分(C)では、6-OHDA-ipsi 群のホルマリン注射側と同側の前肢を使った顔面こすり運動の回数が増加し、6-OHDA-contra 群のホルマリン注射側と同側の前肢のみを使った回数が減少した。

両側モデルにおいては、内側前脳束に6-OHDA を注入した群と生理食塩水を注入したコントロール群の間に、顔面こすり運動の回数に有意な差は認められなかった。

(3) 三叉神経脊髄路核尾側亜核におけるc-Fos 陽性細胞数

ラットの上口唇へのホルマリン注射の2時間後、三叉神経脊髄路核尾側亜核にc-Fos 免疫陽性反応を持つ細胞が標識された。標識細胞の多くは三叉神経脊髄路核尾側亜核の尾側に分布していた。

片側の内側前脳束に6-OHDA を注入した群は、生理食塩水を注入した群に比べて有意に多くのc-Fos 免疫陽性反応を持つ細胞が標識された。また両側モデルにおいては、コントロール群と有意差は認められなかったものの、c-Fos 免疫陽性細胞の増加傾向が認められた。

以上の結果から、PDモデルラットにおいて口腔顔面領は痛覚過敏状態にあることが確かめられた。しかし、その痛みに対する反応(痛覚関連行動)はPDにより引き起こされる運動障害により必ずしも増加しないことが明らかとなった。PDにおいては、痛みの評価を疼痛関連行動により行う際には、運動障害による影響を考慮しなければならない。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 均 (NIWA HITOSHI)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 30218250

(2) 研究分担者

杉村光隆 (SUGIMURA MITSUTAKA)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号: 90244954

正脇 綾 (MASAWAKI AYA)

大阪大学歯学部附属病院・医員
研究者番号: 50609659

前川博治 (MAEGAWA HIROHARU)
大阪大学歯学部附属病院・医員
研究者番号: 10711012