

中枢ニコチン性アセチルコリン受容体を介する  
振戦発現に関する薬理研究

2022

加藤 将貴

## 目次

緒言	1
第1章 ニコチン誘発振戦の薬理学的特性評価	3
1 緒言	
2 実験方法	
2-1 使用動物	
2-2 ニコチン誘発振戦の行動評価	
2-3 振戦治療薬および抗てんかん薬の作用評価	
2-4 使用薬物	
2-5 統計学的処理	
3 結果	
3-1 ニコチン誘発振戦に対する本態性振戦治療薬の作用	
3-2 ニコチン誘発振戦に対するパーキンソン病治療薬の作用	
3-3 ニコチン誘発振戦に対する抗てんかん薬の作用	
4 考察	
5 結語	
第2章 ドパミン神経系によるニコチン誘発振戦の調節メカニズム解析	10
1 緒言	
2 実験方法	

2-1 使用動物

2-2 脳内ドパミンおよびその代謝物レベルの測定

2-3 マウスにおけるニコチン誘発振戦に対するドパミン受容体作用薬の影響評価

2-4 ラットにおけるドパミン受容体拮抗薬の脳内局所投与実験

2-5 使用薬物

2-6 統計学的処理

3 結果

3-1 ニコチンによる脳内ドパミン代謝への影響

3-2 ニコチン誘発振戦に対するドパミン受容体作動薬の作用

3-3 ニコチン誘発振戦に対するドパミン受容体拮抗薬の作用

3-4 ニコチン誘発振戦に対するドパミン受容体拮抗薬の脳内局所投与による影響

4 考察

5 結語

第3章 コリンエステラーゼ阻害薬によるアセチルコリン神経賦活化が惹起する振戦発現のメカニズム解析 .....	19
--	----

1 緒言

2 実験方法

2-1 使用動物

2-2 パラオキソン誘発振戦の行動評価

2-3 脳内神経興奮部位の探索

2-4 アセチルコリン受容体拮抗薬の作用評価

2-5 下オリーブ核の電気破壊実験

2-6 使用薬物

2-7 統計学的処理

3 結果

3-1 コリンエステラーゼ阻害薬パラオキシソンの振戦誘発作用

3-2 パラオキシソンによる脳内神経興奮部位の探索

3-3 パラオキシソン誘発振戦に対するアセチルコリン受容体拮抗薬の作用

3-4 パラオキシソン誘発振戦に対する下オリーブ核の関与

4 考察

5 結語

総括.....27

論文目録.....29

謝辞.....30

参考文献.....31

図表

## 緒言

中枢アセチルコリン (ACh) 神経は前脳基底部のマイネルト基底核や内側中隔に多く分布しており、主として大脳皮質や海馬などに神経線維を投射して、認知機能の調節において重要な役割を果たしている<sup>1, 2)</sup>。また、大脳基底核の線条体にも介在性 ACh 神経が分布しており、錐体外路系運動機能の調節やパーキンソン病症状の発症に深く関与している<sup>3, 4)</sup>。この他にも、ACh 神経系は精神機能や運動機能の制御に関与しており、統合失調症、てんかん、うつ病などの発症や治療における役割が世界的に注目されている。

中枢 ACh 神経系の生理機能は脳内に広く分布する ACh 受容体によって仲介されており、ACh 受容体はムスカリン感受性のムスカリン性アセチルコリン (mACh) 受容体と、ニコチン感受性のニコチン性アセチルコリン (nACh) 受容体に大別される。mACh 受容体は G タンパク質共役型受容体であり、アデニル酸シクラーゼやホスホリパーゼ C などの活性を調節することで細胞内シグナリングを制御している。一方、nACh 受容体はイオンチャネル内蔵型受容体であり、Na<sup>+</sup>などのカチオンを選択的に細胞内に流入させることで活動電位を発生させ、神経興奮を引き起こす。

nACh 受容体は、 $\alpha$  (1-10)、 $\beta$  (1-4)、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  サブユニットを組み合わせた 5 量体で構成され、特に中枢神経系においては  $\alpha 7$  nACh 受容体と  $\alpha 4\beta 2$  nACh 受容体が多く発現している。タバコの主成分であるニコチンは中枢 nACh 受容体を刺激して、依存形成作用<sup>5-7)</sup>、抗うつ作用<sup>8-10)</sup>、認知機能促進作用<sup>11, 12)</sup>、抗パーキンソン病作用<sup>13, 14)</sup>、振戦やけいれん発現といった運動興奮作用<sup>15-20)</sup>を示す。所属研究室では以前にニコチンによる運動興奮症状の発現機序について研究を行い、ニコチンが  $\alpha 7$  nACh 受容体を介して延髄の下オリーブ核神経を過剰興奮させることで、動作時振戦を誘発すること<sup>21)</sup>、また、高用量においては扁桃体の  $\alpha 7$  nACh 受容体を刺激してけいれん発作を惹起することを見出してきた<sup>22)</sup>。しかし、中枢 nACh 受容体を介する運動興奮症状の発現制御メカニズムやヒト疾患との関連性などに関しては、依然として不明な点が多い。特に、 $\alpha 7$  nACh 受容体を介する振戦発現は比較的低用量のニコチン投与によっても惹起され、喫煙による振戦の発症や本態性振戦の悪

化などにも深く関連していることから<sup>15-19,23)</sup>、中枢 nACh 受容体を介して発現する動作時振戦に対する薬理的検討は新たな振戦治療法を探る上でも重要な研究テーマであると考えられる。

振戦は、四肢や頭部、体幹の一部が律動的にふるえる不随意性運動障害であり、パーキンソン病や本態性振戦などにおいて頻繁に認められる<sup>24)</sup>。このうち、パーキンソン病は黒質－線条体ドパミン神経の変性や脱落に伴う錐体外路系運動障害であり、患者は主として静止時振戦を発症する<sup>24,25)</sup>。これに対し、本態性振戦では主として動作時振戦や姿勢時振戦が現れ、その発症機序には下オリーブ核－小脳系神経路の機能異常が深く関与すると考えられている<sup>26-29)</sup>。一方、所属研究室では、下オリーブ核はニコチン誘発振戦の原因核であることを見出しており<sup>21)</sup>、本態性振戦とニコチン誘発振戦は、振戦の発現メカニズムにおける神経学的基盤が類似していると考えられる。しかし、ニコチン誘発振戦の薬理的な特性や、その本態性振戦との類似性などについては未だ検討がなされていない。また、ニコチンはドパミン神経終末に存在する前シナプス性  $\alpha 4\beta 2$  nACh 受容体や  $\alpha 6\beta 2$  nACh 受容体を介して、ドパミンのシナプス遊離を促進することが知られているが<sup>30-35)</sup>、ニコチンによるドパミン神経系の活性化が振戦の発現に及ぼす影響についても未だ不明である。

そこで本研究では、第 1 章「ニコチン誘発振戦の薬理的な特性評価」において、nACh 受容体を介する動作時振戦の薬理的な特性を明らかにすることを目的に、ニコチン誘発振戦の各種薬物(振戦治療薬、抗てんかん薬など)に対する反応性を解析した。次に、第 2 章「ドパミン神経系によるニコチン誘発振戦の調節メカニズム解析」において、ニコチン投与により賦活化されるドパミン神経系の振戦調節メカニズムを明らかにするため、各種ドパミン受容体作動薬および拮抗薬のニコチン誘発振戦に対する作用を解析した。さらに、第 3 章「コリンエステラーゼ阻害薬によるアセチルコリン神経賦活化が惹起する振戦発現のメカニズム解析」においては、有機リン系農薬パラチオンの活性代謝物パラオキソンが惹起する振戦発現のメカニズムを解析し、環境上あるいは医療上で起こり得る振戦発現における nACh 受容体の関与について検討した。

## 第1章 ニコチン誘発振戦の薬理学的特性評価

### 1 緒言

ニコチンは中枢 nACh 受容体を介して、依存形成作用、抗うつ作用、認知機能促進作用など多彩な薬理作用を示す一方で、振戦やけいれん発作といった運動興奮症状を誘発する<sup>5-20)</sup>。このうち振戦の症状は、静止時振戦、動作時振戦、姿勢時振戦などに分類されており、パーキンソン病では主として静止時振戦が発症し、本態性振戦では動作時振戦や姿勢時振戦が頻繁に現れることが知られている<sup>24-29)</sup>。

所属研究室ではこれまでに、ニコチンが  $\alpha 7$  nACh 受容体を介して下オリーブ核神経を興奮させることで、動作時振戦を引き起こすことを明らかにしている<sup>21)</sup>。一方、本態性振戦の発症においても、下オリーブ核の神経興奮が関与することが知られており<sup>26-29)</sup>、本態性振戦とニコチン誘発振戦の発症には共通して、下オリーブ-小脳系神経路の機能異常が関与していると考えられる。しかし、ニコチン誘発振戦の薬理学的な特性(振戦治療薬に対する反応性など)については未だ検討されていない。

そこで本研究では、ニコチン誘発振戦と本態性振戦との薬理的類似性を探る目的で、ニコチン誘発振戦に対する各種振戦治療薬の作用を行動薬理的に検討した。さらに、本態性振戦の薬物治療に一部の抗てんかん薬が有効であることが示唆されているため<sup>36, 37)</sup>、ニコチン誘発振戦に対する抗てんかん薬の作用についても評価した。

## 2 実験方法

### 2-1 使用動物

実験には、6-8 週齢の ddY 系雄性マウス(日本エスエルシー、静岡)を使用した。動物は、一定の照明サイクル(明期:8:00 より 12 時間)、恒温(24±1°C)、恒湿(55±10%)の飼育室において、標準固

形飼料(オリエンタル酵母工業、東京)およびフィルターで濾過した水道水を自由に摂取させ、約 1 週間の予備飼育をした後、実験に供した。なお、全ての動物実験ならびに使用動物の飼養管理は、大阪医科薬科大学薬学部動物実験規程(旧大阪薬科大学動物実験規程)に準拠し、本学薬学部動物実験専門部会(旧大阪薬科大学動物実験委員会)による試験計画書の承認のもとで実施した。

## 2-2 ニコチン誘発振戦の行動評価

過去に報告されたマウスにおけるニコチン誘発振戦の用量反応試験の結果に基づいて<sup>21)</sup>、振戦評価のためのニコチン投与量を 1 mg/kg (i.p.) に設定した。振戦行動は観察ケージ(25×42×20 cm) 内で 10 分間観察し、ニコチン投与から 1、3、5、7、9 分の時点で、振戦強度および振戦持続時間を 1 分間評価した。振戦強度の評価には、4 段階振戦スコア(0:振戦なし、1:頭部や尾部の軽度な振戦および挙尾、2:上幹の中程度の振戦、3:全身性の顕著な振戦)を用いた<sup>21)</sup>。各ポイントにおける振戦スコアまたは振戦持続時間の合計値を算出し、各動物群間で比較した。

## 2-3 振戦治療薬および抗てんかん薬の作用評価

ニコチン誘発振戦に対する振戦治療薬の作用を評価する目的で、本態性振戦治療薬のプロプラノロール(10, 30 mg/kg, i.p.)、ジアゼパム(1, 3 mg/kg, i.p.)、フェノバルビタール(40 mg/kg, i.p.)、およびパーキンソン病治療薬の L-DOPA(100, 300 mg/kg, i.p.)、トリヘキシフェニジル(3, 10 mg/kg, i.p.) を、ニコチン(1 mg/kg, i.p.) 投与の 15 分前に処置した。同様に、ニコチン誘発振戦に対する抗てんかん薬の作用を評価する目的で、バルプロ酸 Na(100, 300 mg/kg, i.p.)、カルバマゼピン(10, 30 mg/kg, i.p.)、エトスクシミド(30, 100 mg/kg, i.p.)、ガバペンチン(10, 30 mg/kg, i.p.)、トピラマート(30, 100 mg/kg, i.p.)、ゾニサミド(10, 30 mg/kg, i.p.)、レベチラセタム(100, 300 mg/kg, i.p.) を、ニコチン投与の 15 分前に処置した。また、ニコチン振戦の調節における T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルの関与を検討する目的で、選択的 T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬の TTA-A2(0.3, 1 mg/kg, i.p.) の作用も評価した。



## 2-4 使用薬物

(-)-ニコチン、(±)-プロプラノロール塩酸塩、L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニンメチルエステル塩酸塩(L-DOPA)、トリヘキシフェニジル塩酸塩、バルプロ酸ナトリウム塩、エトスクシミドは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より、フェノバルビタール(フェノバル®)は第一三共(東京)より、ジアゼパム(セルシン®)は武田薬品工業(大阪)より、カルバマゼピン、ガバペンチン、トピラマート、レベチラセタム、ゾニサミドは東京化成工業(東京)より、TTA-A2 は Alomone Labs (Jerusalem, Israel) より購入した。プロプラノロールは始めに 1%乳酸溶液に溶解させ、生理食塩水で希釈した。フェノバルビタール、ジアゼパムおよびカルバマゼピンは始めに 100%ポリエチレングリコール 400 に溶解させ、蒸留水で希釈した。トピラマート、ゾニサミドおよび TTA-A2 は始めにジメチルスルホキシドに溶解させ、蒸留水で希釈した。その他の薬物は、生理食塩水に溶解させた。

## 2-5 統計学的処理

実験結果は、平均値±標準誤差で示した。2 群間における検定では Mann-Whitney's *U*-test を、3 群間の有意差検定では、まず Kruskal-Wallis test を行い、有意差が認められた場合には Steel-Dwass 多重比較検定を行った。以上の検定において、 $p < 0.05$  の場合、有意差ありと判定した。

## 3 結果

### 3-1 ニコチン誘発振戦に対する本態性振戦治療薬の作用

はじめに、本態性振戦治療薬であるプロプラノロール(非選択的  $\beta$  受容体拮抗薬)、ジアゼパム(ベンゾジアゼピン系 GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬)、フェノバルビタール(バルビツール酸系 GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬)のニコチン誘発振戦に対する作用を評価した。ニコチン(1 mg/kg)の腹腔内投与によって誘発される振戦は、プロプラノロール(10, 30 mg/kg, i.p.)の前処置によって用量依存的に改善され、30 mg/kg のプロプラノロールは合計振戦スコアおよび合計振戦持続時間を有意に抑制した(Fig.

1A)。同様に、ジアゼパム(1, 3 mg/kg, i.p.)およびフェノバルビタール(40 mg/kg, i.p.)も、ニコチン誘発振戦を有意に改善させた(Fig. 1B および 1C)。

### 3-2 ニコチン誘発振戦に対するパーキンソン病治療薬の作用

次に、パーキンソン病治療薬である L-DOPA (ドパミン前駆物質)ならびにトリヘキシフェニジル (mACh 受容体拮抗薬)のニコチン誘発振戦に対する作用を評価した。L-DOPA (100 mg/kg, i.p.)、トリヘキシフェニジル (3, 10 mg/kg, i.p.)はニコチン誘発振戦の強度および持続時間に有意な影響を及ぼさなかった(Fig. 2)。一方、高用量(300 mg/kg)の L-DOPA は、統計学的有意差は認められなかったものの、ニコチン誘発振戦を増強する傾向を示した。

### 3-3 ニコチン誘発振戦に対する抗てんかん薬の作用

本態性振戦治療において、一部の抗てんかん薬が有効であることが示唆されているため<sup>36, 37)</sup>、ニコチン誘発振戦に対する第 1 世代抗てんかん薬(バルプロ酸 Na、カルバマゼピン、エトスクシミド)、および第 2 世代抗てんかん薬(ガバペンチン、トピラマート、ゾニサミド、レベチラセタム)の作用を評価した。ニコチンによる振戦は、バルプロ酸 Na (300 mg/kg, i.p.) およびカルバマゼピン (10, 30 mg/kg, i.p.)の前処置によって有意に抑制された(Fig. 3A および 3B)。T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬のエトスクシミド (100 mg/kg, i.p.)は、ニコチン振戦の強度を有意に改善したが、持続時間に関しては有意な改善に至らなかった(Fig. 3C)。そこで、より選択性が高い T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬である TTA-A2 (1 mg/kg, i.p.)を投与したところ、ニコチン誘発振戦の強度および持続時間は有意に改善された(Fig. 3D)。

一方、ガバペンチン、トピラマート、ゾニサミドならびにレベチラセタムはいずれも、ニコチン誘発振戦に有意な改善作用を示さなかった(Fig. 4)。ただし、レベチラセタムは統計学的に有意な差ではなかったものの、ニコチン誘発振戦を抑制する傾向が確認された(Fig. 4D)。

## 4 考察

所属研究室ではこれまでに、ニコチンが  $\alpha 7$  nACh 受容体を介して脳部位特異的に下オリーブ核神経を興奮させることで、動作時振戦を誘発することを明らかにしている<sup>21)</sup>。一方、下オリーブ核はヒトにおける本態性振戦の発現に関与することが知られている<sup>26-29)</sup>。従って、ニコチンによって誘発される動作時振戦の発症メカニズムは、ヒト本態性振戦と類似していると考えられる。本研究では、ニコチン誘発振戦が、本態性振戦治療薬(プロプラノロール、ジアゼパム、フェノバルビタール)によって改善される一方で、パーキンソン病治療薬(L-DOPA、トリヘキシフェニジル)では改善されないことが明らかとなった。このことから、ニコチン誘発振戦は、その発症メカニズムの神経学的基盤だけでなく、本態性振戦治療薬に対する反応性といった薬理学的特性においても、ヒト本態性振戦に類似していることが示された。従って、ニコチン誘発振戦は、本態性振戦の動物モデルとして有用であることが示唆される。

ジアゼパムおよびフェノバルビタールはヒト本態性振戦を抑制するほか、抗てんかん薬としても使用されている。また、その他一部の抗てんかん薬も、臨床におけるエビデンスは確立されていないものの、本態性振戦治療に有効であることが示唆されている<sup>36, 37)</sup>。本研究では、第1世代抗てんかん薬のバルプロ酸 Na、カルバマゼピン、エトスクシミドがニコチン誘発振戦を改善することが示された。バルプロ酸 Na は、GABA 代謝酵素である GABA トランスアミナーゼを阻害することでシナプスにおける GABA レベルを増加させる薬物であり、また、GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬であるジアゼパムやフェノバルビタールがニコチン誘発振戦を抑制したことから、GABA 作動性神経の活性化によって、本態性振戦と同様にニコチン誘発振戦も改善されたと考えられる。さらに、バルプロ酸 Na とカルバマゼピンは、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャンネルを阻害することで神経興奮を抑える薬物であるため、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャンネルの阻害も、本態性振戦の治療に有効である可能性が考えられる。以前の報告においても、バルプロ酸 Na とカルバマゼピンが、古典的な本態性振戦モデルであるハルマリン誘発振戦を抑制することが示されており<sup>38)</sup>、今回の結果と一致している。

エトスクシミドとバルプロ酸 Na は電位依存性 T 型 (低閾値型)  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの阻害薬であるが、その阻害作用は比較的弱く、選択性も高くない。そこで本研究では、T 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの阻害がニコチン誘発振戦の抑制に有効であるかを確かめる目的で、チャネル阻害作用が強く、サブタイプ選択性の高い TTA-A2 の作用を評価した。その結果、TTA-A2 はニコチン誘発振戦を効果的に抑制したため、T 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの阻害も本態性振戦の治療に有用である可能性が示された。過去の報告でも、ハルマリン誘発振戦などの本態性振戦モデルにおける T 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害薬の有効性が示されており<sup>39)</sup>、今回の結果とよく一致する。

一方、第 1 世代抗てんかん薬とは対照的に、第 2 世代抗てんかん薬のニコチン誘発振戦に対する作用は比較的弱かった。ガバペンチンは、高閾値型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの  $\alpha 2\delta$  サブユニットを阻害することで、シナプスにおける興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の遊離を減少させる<sup>40, 41)</sup>。ガバペンチンはニコチン誘発振戦に作用を示さなかったため、本態性振戦発現の主な原因における、グルタミン酸シグナリングの関与は低いと考えられる。トピラマートは複数の薬理作用を有しており、電位依存性  $\text{Na}^{+}$ チャネル、高閾値型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル、および AMPA/カイニン酸型グルタミン酸受容体を阻害する<sup>42, 43)</sup>。しかし、トピラマートによる電位依存性  $\text{Na}^{+}$ チャネル阻害作用は、他の抗てんかん薬と比較して弱いことが報告されている<sup>44)</sup>。同様に、ゾニサミドも、電位依存性  $\text{Na}^{+}$ チャネルや電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの阻害作用だけでなく、チロシンヒドロキシラーゼの誘導やモノアミンオキシダーゼの阻害によるドーパミン神経賦活化作用も有している<sup>45, 46)</sup>。このような複雑な作用様式のために、ニコチン誘発振戦に対するトピラマートおよびゾニサミドの明確な作用が確認できなかった可能性がある。実際の臨床現場においても、本態性振戦に対するトピラマートやゾニサミドの有効性は確認されていない。他方、レベチラセタムは、わずかながらニコチン誘発振戦を抑制する傾向を示した。レベチラセタムは、従来の抗てんかん薬治療ターゲット (電位依存性チャネル、GABA 受容体、グルタミン酸受容体) には作用せず、シナプス小胞タンパク質 2A (synaptic vesicle protein 2A; SV2A) に特異的に作用する。本態性振戦の制御における SV2A の関与については、更なる検討が必要である。

## 5 結語

本研究より、ニコチン誘発振戦は、振戦発現メカニズムの神経学的基盤だけでなく、振戦治療薬に対する反応性においてもヒトの本態性振戦と類似していることが明らかとなり、ニコチン誘発振戦が本態性振戦モデルとして有用であることが示唆された。さらに、GABA 神経の賦活化作用、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャンネルおよび電位依存性 T 型 (低閾値型) Ca<sup>2+</sup>チャンネルの阻害作用を持つ抗てんかん薬が、本態性振戦を改善する可能性が示された。以上の結果は、本態性振戦の新たな治療薬として、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャンネルおよび電位依存性 T 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネルの阻害薬が有用であることを示唆する。

## 第2章 ドパミン神経系によるニコチン誘発振戦の調節メカニズム解析

### 1 緒言

タバコの主成分であるニコチンは中枢 nACh 受容体を介して、依存形成作用、抗うつ作用、運動興奮作用などの多様な薬理作用を示す。これらのニコチンによる薬理作用は、脳内に豊富に発現する  $\alpha 7$  nACh 受容体と  $\alpha 4\beta 2$  nACh 受容体を介して発現すると考えられている。一方、中枢ドパミン神経の神経終末には前シナプス性  $\alpha 4\beta 2$  nACh 受容体や  $\alpha 6\beta 2$  nACh 受容体が分布しており、ニコチンはこれらの受容体を介して、ドパミンの遊離を促進させることが知られている<sup>30-35)</sup>。さらに、モノアミンオキシダーゼ阻害薬であるハルマリンが動物において動作時振戦を誘発することから、振戦の発現調節にドパミン神経系が関与することが示唆されている<sup>47, 48)</sup>。しかし、ニコチン誘発振戦の発現に対してドパミン神経系がどのような調節機能を有するかについては未だ不明である。

一般に、ドパミン受容体には  $D_1$  から  $D_5$  の 5 種類のサブタイプが存在する。このうち、 $D_1$  および  $D_5$  受容体は  $G_s$  タンパク質と共役してアデニル酸シクラーゼ-cAMP-PKA 系を促進し、 $D_1$  受容体ファミリーに分類される<sup>28, 49, 50)</sup>。他方、 $D_2$ 、 $D_3$  および  $D_4$  受容体はいずれも  $G_i/o$  タンパク質と共役してアデニル酸シクラーゼ-cAMP-PKA 系を抑制することから、 $D_2$  受容体ファミリーに分類されている<sup>28, 49, 50)</sup>。これら  $D_1$  から  $D_5$  のドパミン受容体サブタイプには、それぞれサブタイプ選択的に作用する作動薬および拮抗薬が開発されてきており、各受容体の機能探索ツールとして広く利用、研究されている。

そこで本研究では、ドパミン神経系によるニコチン誘発振戦の調節メカニズムを明らかにする目的で、ニコチンの脳内ドパミン代謝に対する作用ならびにニコチン誘発振戦に対する各種ドパミン受容体作用薬の効果について、神経化学的および行動薬理的検討を加えた。

## 2 実験方法

### 2-1 使用動物

実験には、6-8 週齢の ddY 系雄性マウス、または 7-11 週齢の SD 系雄性ラット(日本エスエルシー、静岡)を使用した。動物は、一定の照明サイクル(明期:8:00 より 12 時間)、恒温(24±1°C)、恒湿(55±10%)の飼育室において、標準固形飼料(オリエンタル酵母工業、東京)およびフィルターで濾過した水道水を自由に摂取させ、約 1 週間の予備飼育をした後、実験に供した。なお、全ての動物実験ならびに使用動物の飼養管理は、大阪医科薬科大学薬学部動物実験規程(旧大阪薬科大学動物実験規程)に準拠し、本学薬学部動物実験専門部会(旧大阪薬科大学動物実験委員会)による試験計画書の承認のもとで実施した。

### 2-2 脳内ドパミンおよびその代謝物レベルの測定

第 1 章と同様に、過去に報告されたマウスにおけるニコチン誘発振戦の用量反応試験の結果に基づいて<sup>21)</sup>、振戦発現用量のニコチン(1 mg/kg, i.p.)をマウスに投与し、15 分後にペントバルビタール麻酔下(80 mg/kg, i.p.)で脳を摘出した。摘出脳を直ちに氷冷した生理食塩水で洗い、氷冷したペトリ皿の上で 8 つの脳部位(大脳皮質、海馬、線条体、視床、視床下部、中脳、橋・延髄、小脳)を分取した。各組織の湿重量を量った後、内標準物質としての 1 ng/μL イソプロテレノールを含んだ 0.1 M 過塩素酸溶液で 20%(w/v)に懸濁し、ホモジナイズした(1,500 rpm × 10 stroke)。その後、サンプルを 0°C で遠心し(20,000 g × 15 min)、上清をフィルター濾過し、濾液 200 μL に対し 35 μL の割合で 1 M 酢酸ナトリウム溶液を加えた。抽出液に含まれるドパミンおよびその代謝物である 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸(DOPAC)、ホモバニリン酸(HVA)は、HPLC-ECD システム(エイコム、京都)を用いて測定した。すなわち、各サンプル 1 μL を 99 μL の 0.02 M 酢酸溶液で希釈し、その内 10 μL をオートインジェクター(M-500、エイコム)を用いて注入した。ドパミン、DOPAC、HVA は 3.0 φ × 150 mm の逆相カラム(EICOMPAK SC-5ODS、エイコム)によって分離した。カラム温度はカラムオープン(ATC-300、エイコム)で 25°C に保った。移動相(0.1 M 酢酸-クエン酸緩衝液、190 mg/L 1-オクタン

スルホン酸ナトリウム、5 mg/L EDTA、pH 3.5、17% メタノール)は、レシプロカルデュアルピストンポンプ(EP-700、エイコム)を用いて 500  $\mu$ L/min の流速で流した。電気化学検出器(ECD-700A、エイコム)の印加電圧は+750 mV(vs. Ag/AgCl)に設定した。得られたデータの解析には、データプロセッサー(EPC-500、エイコム)および PowerChrom ソフトウェア(eDAQ、Denistone East、NSW、Australia)を使用した。ドパミン、DOPAC、HVA は保持時間に基づいて同定した。

### 2-3 マウスにおけるニコチン誘発振戦に対するドパミン受容体作用薬の影響評価

マウスにおけるニコチン誘発振戦の行動評価は第 1 章 2-2 項と同様の手順で行った。すなわち、ニコチン誘発振戦の発現に関連するドパミン受容体サブタイプを明らかにする目的で、各種ドパミン受容体作動薬および拮抗薬をニコチン投与の 15 分前に投与した。ドパミン受容体作動薬としては、D<sub>1/5</sub>受容体作動薬 SKF-38393 (3, 10 mg/kg, i.p.)、選択的 D<sub>2</sub>受容体作動薬スマニロール(1, 3 mg/kg, i.p.)、選択的 D<sub>3</sub>受容体作動薬 PD-128,907(1, 3 mg/kg, i.p.)を使用した。ドパミン受容体拮抗薬としては、D<sub>1/5</sub>受容体拮抗薬 SCH-23390(1, 3 mg/kg, i.p.)、選択的 D<sub>2</sub>受容体拮抗薬 L-741,626(3, 10 mg/kg, i.p.)、選択的 D<sub>3</sub>受容体拮抗薬 U-99194(30 mg/kg, i.p.)、選択的 D<sub>4</sub>受容体拮抗薬 L-745,870 (0.3, 1 mg/kg, i.p.)を使用した。なお、各ドパミン受容体作用薬の投与量は、過去の論文で各受容体に十分作用すると報告されている用量を設定した<sup>51-56)</sup>。

### 2-4 ラットにおけるドパミン受容体拮抗薬の脳内局所投与実験

ラットにおける脳内局所投与実験は、過去に報告された手法に倣って実施した<sup>57, 58)</sup>。ラットにペントバルビタール(45 mg/kg, i.p.)およびイソフルラン吸入による麻酔を施し、頭部を脳定位固定装置(成茂科学器械研究所、東京)で固定した。下オリーブ核内または線条体内局所投与では、頭蓋骨に 2 つの小穴を空け、2 本のステンレスガイドカニューレを下オリーブ核の 1 mm 上部(AP:-12.4 mm、LM:±0.5 mm、DV:+6.8 mm)、または線条体の 1 mm 上部(AP:+1.0 mm、LM:±3.5 mm、DV:+2.5 mm)にそれぞれ留置した<sup>59)</sup>。その後、ガイドカニューレは歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。小脳



内局所投与では、1本のガイドカニューレを小脳第9小葉の1mm上部(AP:−13.1 mm、LM:±0.0 mm、DV:+3.0 mm)に留置した<sup>59)</sup>。

約1週間の回復期間の後、ガイドカニューレを慢性的に埋め込んだラットを用い、ドパミン受容体拮抗薬の微量注入試験を行った。無麻酔、無拘束の条件下で、SCH-23390 溶液(3 µg/µL)、U-99194 溶液(30 µg/µL)または生理食塩水を満たした注入カニューレを、ガイドカニューレを介して下オリーブ核、線条体または小脳に挿入し、微量注入ポンプ(KDS220、KD scientific、Holliston、MA、USA)を用いて、薬物溶液1 µL/injection siteを0.25 µL/minの流速で4分間かけて徐々に注入した。微量注入完了から15分後、ラットにニコチン(1 mg/kg, i.p.)を投与し、ニコチン投与から5-16分の間でニコチン誘発振戦の行動評価を行った。振戦発現の評価法は、第1章2-2項に準じる。

## 2-5 使用薬物

(−)-ニコチン、R(+)-SCH-23390 塩酸塩はSigma-Aldrich(St. Louis、MO、USA)より、L-741,626、L-745,870 三塩酸塩、(±)-SKF-38393 塩酸塩はAbcam(Cambridge、UK)より、U-99194 マレイン酸塩、スマニロールマレイン酸塩、(+)-PD-128,907 塩酸塩はTocris Bioscience(Bristol、UK)より購入した。L-741,626 およびL-745,870 は、始めに1%乳酸溶液に溶解させ、蒸留水で希釈した。その他の薬物は生理食塩水に溶解させた。

## 2-6 統計学的処理

実験結果は、平均値±標準誤差で示した。2群間比較の有意差は、Student's *t*-test(パラメトリック)、またはMann-Whitney's *U*-test(ノンパラメトリック)によって検出した。3群間の有意差検定では、まずKruskal-Wallis testを行い、有意差が認められた場合にはSteel-Dwass 多重比較検定を行った。以上の検定において、 $p < 0.05$ の場合、有意差ありと判定した。

### 3 結果

#### 3-1 ニコチンによる脳内ドパミン代謝への影響

ニコチンによる脳内ドパミンおよびドパミン代謝物レベルの変化を探る目的で、マウスに振戦発現用量(1 mg/kg, i.p.)のニコチンを投与し、その 15 分後の脳 8 部位(大脳皮質、海馬、線条体、視床、視床下部、中脳、橋・延髄、小脳)におけるドパミン、DOPAC、HVA レベルを測定した。ニコチンを投与された動物では、生理食塩水を投与された対照動物と比較して、橋・延髄におけるドパミンレベルが有意に増加していた(Table 1)。また、ニコチン投与によって線条体および海馬におけるドパミンレベルも増加傾向がみられた。DOPAC レベルにおいては、海馬および橋・延髄で有意な上昇が認められた(Table 1)。さらに、線条体では HVA レベルの有意な増加が確認された(Table 1)。

#### 3-2 ニコチン誘発振戦に対するドパミン受容体作動薬の作用

ニコチン誘発振戦の発現を調節するドパミン受容体サブタイプの機能を探る目的で、ニコチン誘発振戦に対する各種ドパミン受容体作動薬の作用を評価した。マウスに  $D_{1/5}$  受容体作動薬 SKF-38393 (3, 10 mg/kg, i.p.) を処置したところ、ニコチン(1 mg/kg, i.p.)による振戦は用量依存的に抑制され、10 mg/kg の SKF-38393 によってニコチン誘発振戦の合計持続時間が顕著に抑制された(Fig. 5A)。対称的に、選択的  $D_3$  受容体作動薬 PD-128,907 (3 mg/kg, i.p.) は、ニコチン誘発振戦の強度および持続時間を有意に増強させた(Fig. 5B)。一方、選択的  $D_2$  受容体作動薬スマニロール(1, 3 mg/kg, i.p.) は、ニコチン誘発振戦の発現に影響を及ぼさなかった(Fig. 5C)。

#### 3-3 ニコチン誘発振戦に対するドパミン受容体拮抗薬の作用

次に、ニコチン誘発振戦の発現に内因性のドパミンが関与しているかを確かめるため、各種ドパミン受容体拮抗薬のニコチン誘発振戦に対する作用を検討した。 $D_{1/5}$  受容体拮抗薬 SCH-23390 (3 mg/kg, i.p.) の前処置により、ニコチン誘発振戦は有意に増強された(Fig. 6A)。それとは対称的に、選択的  $D_3$  受容体拮抗薬 U-99194 (30 mg/kg, i.p.) はニコチン誘発振戦を有意に改善した(Fig. 6B)。

一方、選択的 D<sub>2</sub> 受容体拮抗薬 L-741,626 (3, 10 mg/kg, i.p.) および選択的 D<sub>4</sub> 受容体拮抗薬 L-745,870 (0.3, 1 mg/kg, i.p.) はいずれも、ニコチン誘発振戦に有意な作用を示さなかった (Fig. 7)。

### 3-4 ニコチン誘発振戦に対するドパミン受容体拮抗薬の脳内局所投与による影響

ドパミン神経系によるニコチン誘発振戦の調節に、どの脳部位のドパミン受容体が関与しているのかを探る目的で、D<sub>1/5</sub> 受容体拮抗薬 (SCH-23390) および D<sub>3</sub> 受容体拮抗薬 (U-99194) を用いて、ラットにおける脳内局所投与実験を行った。3-1 項の結果より、ニコチンが下オリーブ核を含む橋・延髄および線条体でドパミンやその代謝物レベルを増加させたこと (Table 1)、また以前の報告で、ニコチン誘発振戦およびパーキンソン病振戦の発現には、それぞれ下オリーブ核と線条体が関与していることが示唆されているため<sup>21, 60, 61</sup>、これらの 2 部位に SCH-23390 あるいは U-99194 を微量注入した。加えて、D<sub>3</sub> 受容体は小脳に高発現しており、自発運動量や錐体外路系運動機能を制御していることから<sup>58, 62-64</sup>、U-99194 は小脳内にも投与した。

下オリーブ核への SCH-23390 (3 µg/injection site) 微量注入は、統計学的有意性は認められなかったものの、ニコチン誘発振戦を増強させる傾向を示した (振戦スコア:  $z = 1.7400$ ,  $p = 0.0819$ 、振戦持続時間:  $z = 1.6963$ ,  $p = 0.0898$ ) (Fig. 8A)。一方、線条体への SCH-23390 投与はニコチン誘発振戦の発現に有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 8B)。また、U-99194 (30 µg/injection site) の下オリーブ核内投与ならびに線条体内投与はニコチン誘発振戦に何ら作用を示さなかったが、小脳への U-99194 投与ではニコチン誘発振戦が有意に抑制された (Fig. 9)。

## 4 考察

ニコチンは、線条体、側坐核、腹側被蓋野などにおけるドパミンの遊離を増加させ、ドパミン神経活動を賦活化することが知られている<sup>7, 30-33</sup>。このニコチンによるドパミン神経系の賦活化には、主として  $\alpha 4\beta 2$  および  $\alpha 6\beta 2$  nACh 受容体が関与していることが報告されており、一部には  $\alpha 7$  nACh 受容

体も関与していることが示唆されている<sup>6, 32-35)</sup>。本研究において、振戦発現用量のニコチンが、線条体、海馬、橋・延髄におけるドーパミン量およびその代謝物量を増加させることが明らかとなり、ニコチンはこれらの脳部位におけるドーパミン神経系を活性化することが確認された。本態性振戦の発現に関与する下オリーブ核は非常に微小な脳部位であるため、今回の検討では部位特異的なドーパミンレベルの測定は行っていないが、ニコチンが下オリーブ核を含む橋・延髄においてドーパミン神経系を賦活化したことから、振戦の発現調節にドーパミン神経系が関与することが推察された。

選択的なドーパミン受容体作用薬を用いた検討より、ドーパミン D<sub>3</sub> 受容体の作動薬がニコチン誘発振戦を増強する一方で、D<sub>1/5</sub> 受容体作動薬によってニコチン振戦が改善されることが示された。D<sub>3</sub> 受容体は D<sub>2</sub> ファミリー受容体に属しているが<sup>28, 49, 50)</sup>、スマニロールによる D<sub>2</sub> 受容体の選択的な刺激はニコチン振戦に影響を及ぼさなかった。さらに、D<sub>1/5</sub> 受容体拮抗薬はニコチン誘発振戦を増強し、D<sub>3</sub> 受容体拮抗薬は抑制したことから、内在性ドーパミンがこれらの受容体を刺激することでニコチン誘発振戦を調節していると推察された。D<sub>2</sub> および D<sub>4</sub> 受容体の選択的拮抗薬はニコチン振戦の発現に影響しなかったため、D<sub>2</sub> ファミリー受容体の中でも D<sub>3</sub> 受容体のみが動作時振戦の発現調節に関与していることが示された。これらの結果より、D<sub>1/5</sub> 受容体は抑制的に、D<sub>3</sub> 受容体は促進的にニコチン誘発振戦を調節すると考えられる。

以前の報告において、下オリーブ核の電気破壊によって nACh 受容体を介して発現する振戦が抑制されることが示されており、下オリーブ-小脳系がニコチン誘発振戦の発現において重要な役割を果たしていることが示唆されている<sup>21)</sup>。下オリーブ核は腹側被蓋野や赤核前野-視床束傍核領域からドーパミン神経支配を受けているため<sup>65-67)</sup>、振戦発現の調節において下オリーブ核のドーパミン神経が関与している可能性がある。下オリーブ核への D<sub>3</sub> 受容体拮抗薬の微量注入はニコチン誘発振戦に有意な作用を示さなかったが、D<sub>1/5</sub> 受容体拮抗薬の微量注入ではニコチン振戦の強度および持続時間が増強される傾向がみられた。従って、下オリーブ核の D<sub>1/5</sub> 受容体がニコチン振戦の発現抑制に一部関与していることが示唆された。

大脳基底核の線条体に分布するドーパミン受容体は、錐体外路系運動障害や静止時振戦を含むパ

一キンソン病様症状の発症制御に重要な役割を果たしている<sup>60, 61)</sup>。しかし本研究では、選択的 D<sub>2</sub> 受容体作動薬のスマニロールはニコチン誘発動作時振戦の発現に影響を及ぼさず、線条体への D<sub>1/5</sub> および D<sub>3</sub> 受容体拮抗薬の微量注入もニコチン振戦に作用を示さなかった。従って、線条体のドパミン受容体は、パーキンソン病様症状の静止時振戦とは異なり、ニコチン誘発動作時振戦の制御には関与していないと考えられる。

D<sub>2</sub> ファミリー受容体である D<sub>3</sub> 受容体は、大脳皮質や辺縁系領域、線条体の他に、小脳において高密度に発現しており<sup>68-72)</sup>、小脳は、赤核や黒質、腹側被蓋野からドパミン神経投射を受けていることが報告されている<sup>28, 73)</sup>。また以前の報告から、小脳 D<sub>3</sub> 受容体が自発運動量や錐体外路系運動機能を調節していることが示されている<sup>58, 62-64)</sup>。本研究では、小脳への D<sub>3</sub> 受容体拮抗薬 U-99194 微量注入がニコチン誘発振戦の発現を抑制することが明らかとなった。よって、小脳の D<sub>3</sub> 受容体は、下オリブー小脳系神経路を介してニコチン振戦の発現を促進的に調節していると推察される。

第 1 章の結果より、ニコチン誘発振戦は本態性振戦の有用な動物モデルであることが示された。本態性振戦は主要な神経疾患であり、世界における罹患率はおおよそ 1%と言われている<sup>27, 28)</sup>。本態性振戦の治療にはいくつかの薬物が使用されているが、本態性振戦に特異的な治療薬は存在せず、おおよそ 30%の本態性振戦患者が治療抵抗性であることが知られている。本研究結果より、ドパミン D<sub>3</sub> 受容体の選択的拮抗薬や D<sub>1/5</sub> 受容体の作動薬が、本態性振戦の治療薬として有用であることが示唆された。一方、これまでに検討された本態性振戦に関する遺伝子連鎖解析では、3q13 (*ETM1*)<sup>74)</sup>、2p22-25 (*ETM2*)<sup>75)</sup>、6p23 (*ETM3*)<sup>76)</sup>、5q35<sup>77)</sup>など、複数の遺伝子座が本態性振戦の発症に関与することが報告されている。その中でも *ETM1* 遺伝子座には、D<sub>3</sub> 受容体をコードする *DRD3* 遺伝子が含まれている<sup>74)</sup>。さらに、本態性振戦患者の一部で *DRD3* 遺伝子バリエントが確認されており、この遺伝子バリエントによって変異した D<sub>3</sub> 受容体 (Ser9Gly) では、ドパミンに対する親和性が増強されることが報告されている<sup>78)</sup>。本研究の結果はこれらの知見とよく一致し、D<sub>3</sub> 受容体が本態性振戦の制御に重要な役割を果たしていることを示唆しており、D<sub>3</sub> 受容体拮抗薬が新しい本態性振戦治療薬になり得ると期待される。

## 5 結語

本研究より、ニコチン投与時における中枢ドパミン神経の賦活化が振戦発現の調節に関与していることが示された。さらに、ドパミン  $D_{1/5}$  受容体は抑制的に、 $D_3$  受容体は促進的にニコチン誘発振戦の発現を制御していることが示唆された。特に、小脳の  $D_3$  受容体は、下オリーブ-小脳系神経路を介したニコチン誘発振戦の発現調節において重要な役割を果たしており、 $D_3$  受容体の拮抗薬が新たな振戦治療薬になる可能性が示された。

### 第3章 コリンエステラーゼ阻害薬によるアセチルコリン神経賦活化が惹起する振戦発現のメカニズム解析

#### 1 緒言

神経伝達物質である ACh は神経終末においてコリンアセチルトランスフェラーゼにより生合成され、シナプス間隙に遊離されて受容体に作用した後、アセチルコリンエステラーゼにより代謝、分解される。従って、アセチルコリンエステラーゼを阻害するコリンエステラーゼ阻害薬は、末梢および中枢において ACh の分解を抑制し ACh 神経系を賦活化させる。

コリンエステラーゼ阻害薬は可逆的阻害薬と非可逆的阻害薬に分類され、ドネペジルやガランタミンなどの可逆的阻害薬はアルツハイマー型認知症の治療薬として、パラチオンやマラチオンなどの非可逆的阻害薬は殺虫剤などの農薬として利用されている。いずれのコリンエステラーゼ阻害薬についても、唾液分泌亢進、下痢などの消化器症状、徐脈・血圧低下などの循環器症状をはじめとする、多様な ACh 神経賦活化症状を惹起することが知られている。また、線条体 ACh 神経の過剰興奮によって、パーキンソン病様症状(振戦、動作緩慢、筋固縮など)が引き起こされることが知られており、これらの症状は mACh 受容体拮抗薬によって改善される<sup>3,4,61)</sup>。さらに、所属研究室では、ニコチンが  $\alpha 7$  nACh 受容体を介して下オリーブ核神経や扁桃体神経を過剰興奮させることで、振戦やけいれん発作を誘発することを明らかにしている<sup>21, 22)</sup>。実際に、有機リン系農薬パラチオンの活性代謝物であるパラオキシソンは、コリンエステラーゼを非可逆的に阻害することで、振戦やけいれんなどの運動興奮症状を引き起こすことが報告されている<sup>79, 80)</sup>。従って、コリンエステラーゼ阻害薬などによって ACh 神経を賦活化させることで、mACh 受容体または nACh 受容体を介して振戦などの錐体外路系運動障害が惹起されると考えられる。しかし、コリンエステラーゼ阻害薬によって ACh 神経を賦活化させた際に惹起される運動興奮症状の発現メカニズムについては、未だほとんど検討されていない。

そこで本研究では、コリンエステラーゼ阻害薬であるパラオキシソンによって誘発される振戦発現のメカニズムを解析し、コリンエステラーゼ阻害薬による振戦発現における nACh 受容体の関与について

検討した。

## 2 実験方法

### 2-1 使用動物

実験には、ddY 系雄性マウス、または SD 系雄性ラット(日本エスエルシー、静岡)を使用した。動物は、一定の照明サイクル(明期:8:00 より 12 時間)、恒温(24±1°C)、恒湿(55±10%)の飼育室において、標準固形飼料(オリエンタル酵母工業、東京)およびフィルターで濾過した水道水を自由に摂取させ、約 1 週間の予備飼育をした後、実験に供した。なお、全ての動物実験ならびに使用動物の飼養管理は、大阪医科薬科大学薬学部動物実験規程(旧大阪薬科大学動物実験規程)に準拠し、本学薬学部動物実験専門部会(旧大阪薬科大学動物実験委員会)による試験計画書の承認のもとで実施した。

### 2-2 パラオキソン誘発振戦の行動評価

動物にパラオキソン(0.15, 0.3, 0.6 mg/kg)を腹腔内投与し、観察ケージ(25×42×20 cm)内でパラオキソン投与後 10 分から 21 分における振戦行動を、振戦強度については毎分、振戦持続時間については隔分ごとに 1 分間評価した。振戦強度の評価には、4 段階振戦スコア(0:振戦なし、1:頭部や尾部の軽度な振戦および挙尾、2:上幹の中程度の振戦、3:全身性の顕著な振戦)を用いた。各ポイントにおける振戦スコアまたは振戦持続時間の合計値を算出し、各動物群間で比較した。

### 2-3 脳内神経興奮部位の探索

Fos タンパク質の免疫組織染色は、過去の報告に従って実施した<sup>81-83)</sup>。マウスにパラオキソン(0.6 mg/kg, i.p.)または vehicle を投与した 2 時間後に、ペントバルビタール深麻酔下(80 mg/kg, i.p.)で 10%ホルマリン溶液を灌流し、脳を摘出した。摘出した脳は 10%ホルマリン溶液中で 24-48 時間固定



し、マイクロスライサー (DTK-1000、堂阪イーエム、京都)を用いて厚さ 30  $\mu\text{m}$  の冠状切片を作製した。スライスした切片に 2%正常ウサギ血清を添加して室温で 2 時間のブロッキング処理を行った後、ヤギ抗 c-Fos 抗体を添加して 4°C で一晩インキュベートした。翌日に、ビオチン化抗ヤギ IgG 抗体を添加して室温で 2 時間インキュベートした後、内因性ペルオキシダーゼを不活化するため、30 分間の 0.3%過酸化水素溶液処理を行った。その後、アビジン-ビオチン-HRP 複合体を添加して室温で 2 時間インキュベートし、ジアミノベンジジン発色法によって Fos 陽性細胞を検出した。

Fos 陽性細胞数は、(1) 大脳皮質領域:内側前頭前皮質 (mPFC)、帯状回皮質 (CgC)、運動皮質 (MC1-4)、体性感覚皮質 (SC1-4)、無顆粒島皮質 (AIC)、梨状葉皮質 (PirC1-4)、扁桃体-梨状葉移行野 (Apir)、聴覚皮質 (AuC)、嗅周-嗅外皮質 (PRh-Ect)、背外側嗅内皮質 (DLEnt)、(2) 辺縁系および基底核領域:側坐核コア領域 (AcC)、側坐核シェル領域 (AcS)、扁桃体外側基底核 (BLP)、扁桃体内側基底核 (BMP)、扁桃体後内側皮質野 (PMCo)、扁桃体内側後腹側核 (MePV)、扁桃体内側後背側核 (MePD)、海馬アンモン角 (CA1, 3)、海馬歯状回 (DG)、背外側線条体 (dlST)、背内側線条体 (dmST)、淡蒼球 (GP)、外側中隔 (LS)、(3) 間脳および脳幹領域:内側手綱核 (MHb)、外側手綱核 (LHb)、視床紐傍核 (PT)、視床室傍核 (PV)、視床前内側核 (AM)、視床中央内側核 (CM)、視床腹内側核 (VM)、視床下部前野 (AH)、視床下部後核 (PH)、視床下部背内側核 (DM)、赤核小細胞部 (RPC)、黒質網様部 (SNr)、黒質緻密部 (SNc)、孤束核 (Sol)、下オリーブ核 (IO) の脳 48 部位において解析した (Fig. 10)<sup>84)</sup>。

#### 2-4 アセチルコリン受容体拮抗薬の作用評価

マウスにパラオキソン (0.6 mg/kg, i.p.) を投与する 15 分前に、nACh 受容体拮抗薬メカミラミン (1 mg/kg, i.p.)、mACh 受容体拮抗薬トリヘキシフェニジル (10 mg/kg, i.p.) または vehicle を処置し、2-2 項と同様の方法でパラオキソン誘発振戦の行動評価を行った。さらに、パラオキソン投与から 2 時間後に脳を摘出し、2-3 項と同様の手順で下オリーブ核における Fos タンパク質の免疫組織染色を実施した。

## 2-5 下オリーブ核の電気破壊実験

ラットにペントバルビタール(45 mg/kg, i.p.)およびイソフルラン吸入による麻酔を施し、頭部を脳定位固定装置(成茂科学器械研究所、東京)で固定した。その後、双極同心電極を下オリーブ核(AP: -13.4 mm、LM:±0.5 mm、DV:+7.8 mm)<sup>59)</sup>に挿入し、直流電流(1 mA、15 秒間)によって両側下オリーブ核を電気破壊した。対照の動物には同様の手術を施したが、電気破壊は行わなかった。回復期間の後、2-2 項に示した方法で、パラオキソン誘発振戦の強度および持続時間を評価した。

## 2-6 使用薬物

パラオキソンは Toronto Research Chemical (Ontario, CA) より、メカミラミン塩酸塩、トリヘキシフェニジル塩酸塩、3,3'-ジアミノベンジジン は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。ヤギ抗 c-Fos 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)、正常ウサギ血清、ビオチン化抗ヤギ IgG 抗体、VECTASTAIN *Elite* ABC standard Kit は Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) より購入した。パラオキソンは始めに 100%ポリエチレングリコール 400 に溶解させ、蒸留水で希釈した。メカミラミンは始めに 1%乳酸溶液に溶解させ、蒸留水で希釈した。トリヘキシフェニジルは生理食塩水に溶解させた。

## 2-7 統計学的処理

実験結果は、平均値±標準誤差で示した。2 群間比較の有意差は、Mann-Whitney's *U*-test によって検出した。多群間の有意差検定では、Kruskal-Wallis test と Steel-Dwass 多重比較検定(振戦行動評価)、または one-way ANOVA と Tukey 多重比較検定(Fos 発現に対する ACh 受容体拮抗薬の作用評価)を行った。脳内神経興奮部位の探索では、two-way ANOVA と Tukey 多重比較検定を行った。以上の検定において、 $p < 0.05$  の場合、有意差ありと判定した。

### 3 結果

#### 3-1 コリンエステラーゼ阻害薬パラオキシソンの振戦誘発作用

パラオキシソン(0.15, 0.3, 0.6 mg/kg, i.p.)をマウスに投与したところ、用量依存的に強い振戦が誘発された(Fig. 11)。また、パラオキシソン誘発振戦は時に挙尾反応を伴い、主として動作時に振戦が現れることから、動作時振戦としての特徴を有していることが分かった。0.3、0.6 mg/kg(i.p.)のパラオキシソンを投与された動物では、vehicle を投与した対照群と比較して、合計振戦スコアおよび合計振戦持続時間が 10 倍程度まで有意に増加した(Fig. 11)。

#### 3-2 パラオキシソンによる脳内神経興奮部位の探索

パラオキシソン誘発振戦の発現に関与する脳部位を探る目的で、神経興奮マーカーである Fos タンパク質発現を解析した。振戦発現用量(0.6 mg/kg, i.p.)のパラオキシソンを投与された動物では、中枢 ACh 神経の主要な投射先である、大脳皮質(SC2、SC3)、海馬(CA1)、淡蒼球(GP)、内側手綱核(MHb)における Fos 発現が有意に増加していた(Fig. 12-14)。加えて、ニコチンによって誘発される振戦の原因核と考えられる下オリーブ核(IO)においても、Fos 発現の有意な増加が認められた(Fig. 14)。

#### 3-3 パラオキシソン誘発振戦に対するアセチルコリン受容体拮抗薬の作用

パラオキシソン誘発振戦の発現に mACh 受容体または nACh 受容体のいずれが関与しているのかを確かめる目的で、mACh 受容体拮抗薬トリヘキシフェニジルおよび nACh 受容体拮抗薬メカミラミンの作用を評価した。マウスにメカミラミン(MEC; 1 mg/kg, i.p.)を前処置したところ、パラオキシソン(0.6 mg/kg, i.p.)による振戦は顕著に抑制された(Fig. 15)。一方、トリヘキシフェニジル(THP; 10 mg/kg, i.p.)はパラオキシソン誘発振戦にほとんど作用を示さなかった(Fig. 15)。

### 3-4 パラオキソン誘発振戦に対する下オリーブ核の関与

パラオキソン誘発振戦における下オリーブ核の関与を探るため、下オリーブ核におけるパラオキソン誘発 Fos 発現に対するメカミラミンおよびトリヘキシフェニジルの作用を評価し、さらに、ラットにおける下オリーブ核電気破壊実験も行った。メカミラミン(1 mg/kg, i.p.)を前処置されたマウスでは、パラオキソン(0.6 mg/kg, i.p.)による下オリーブ核の Fos 発現が顕著に抑制されたが、トリヘキシフェニジル(10 mg/kg, i.p.)では有意な変化は認められなかった(Fig. 16A)。さらに、パラオキソン誘発振戦に対する下オリーブ核の電気破壊の影響を評価したところ、振戦強度および振戦持続時間は有意に抑制された(Fig. 16B)。

## 4 考察

パラオキソンなどの有機リン化合物への急性曝露によって、一過性の振戦やパーキンソン病様症状など、様々な錐体外路系運動障害が引き起こされることが知られている<sup>85-89)</sup>。しかし、これらの有機リン化合物による運動障害の発現メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。パラオキソンを含む有機リン化合物は、非可逆的なコリンエステラーゼ阻害薬であり、アセチルコリンエステラーゼおよびブチリルコリンエステラーゼの両方を阻害する。特に、アセチルコリンエステラーゼ阻害による脳内アセチルコリン神経系の活性化は、振戦の発現において重要であると考えられる。本研究では、0.15-0.6 mg/kg のパラオキソンが用量依存的に強い振戦を惹起することを確認した。パラオキソン誘発振戦は、ニコチン誘発振戦と同様に主として動作時に認められたが<sup>21)</sup>、ニコチン誘発振戦と比較して振戦強度が強く、振戦症状は投与 2 時間後でも持続していた。さらに、ACh 受容体拮抗薬を用いた検討より、パラオキソン誘発振戦は主に nACh 受容体によって仲介され、mACh 受容体の寄与は小さいことが示された。この結果は、nACh 受容体の活性化が動作時振戦を誘発するという所属研究室の報告と一致していた<sup>21)</sup>。一方、mACh 受容体は静止時振戦(パーキンソン病に特徴的な振戦)の発現に関与することが知られているが<sup>61)</sup>、コリンエステラーゼ阻害薬による振戦発現には関

与しないと考えられる。実際に、mACh 受容体拮抗薬アトロピンは、有機リン化合物による心毒性を回復させるが、振戦は抑制しないことが報告されている<sup>90-92)</sup>。従って、有機リン化合物は主に nACh 受容体を活性化させることで動作時振戦を誘発すると考えられる。

有機リン化合物の脳内作用部位に関する研究では、これまで古典的に脳内グルコース利用率のマッピングを通して解析されていた。非けいれん誘発用量以下の有機リン化合物は脳内グルコース利用率に影響しないか、もしくはいくつかの脳部位で減少させることが示され<sup>93, 94)</sup>、けいれん誘発用量の有機リン化合物を曝露された動物では、前頭皮質、線条体、視床、海馬、黒質などにおけるグルコース利用率が増加することが報告されている<sup>93)</sup>。しかし、有機リン化合物による振戦発現と関連する脳内グルコース利用率についてのデータは報告されていない。

一方、Fos タンパク質の発現を解析することで、本態性振戦やけいれん発作などの病態下における、脳内神経興奮性の部位特異的な変化についての情報を得ることが出来る<sup>81, 83, 96-102)</sup>。本研究では、振戦発現用量のパラオキソンが、大脳皮質、海馬、淡蒼球、内側手綱核および下オリーブ核における Fos タンパク質発現を有意に増加させることが明らかとなった。この結果は、有機リン化合物による振戦の誘発においてこれらの脳部位が重要であることを示唆する。特に、振戦発現用量のニコチンを投与した場合にも、下オリーブ核において部位特異的な Fos 発現の増加が認められた<sup>21)</sup>。さらに、パラオキソンによる振戦発現および下オリーブ核における Fos 発現の増加は、nACh 受容体拮抗薬メカミラミンによって共に抑制され、かつ、下オリーブ核の電気破壊によってパラオキソン誘発振戦は顕著に抑制された。以上の結果から、ニコチン振戦と同様に、コリンエステラーゼ阻害薬による動作時振戦も下オリーブ核の nACh 受容体を介して発現すると考えられる。

## 5 結語

本研究より、コリンエステラーゼ阻害薬のパラオキソンが用量依存的に動作時振戦を誘発することが確認された。また、Fos タンパク質の発現解析より、振戦発現用量のパラオキソンは大脳皮質、海

馬、淡蒼球、内側手綱核、および下オリーブ核における神経興奮を引き起こすことが明らかとなった。さらに、パラオキソンによる振戦および下オリーブ核における Fos 発現は、nACh 受容体拮抗薬メカミラミンによって抑制された一方で、mACh 受容体拮抗薬トリヘキシフェニジルでは抑制されなかった。加えて、下オリーブ核の電気破壊により、パラオキソン誘発振戦は顕著に抑制された。以上の結果から、コリンエステラーゼ阻害薬による ACh 神経賦活化が惹起する動作時振戦は、nACh 受容体を介した下オリーブ核神経の興奮を通して発現することが明らかとなった。

## 総括

中枢 ACh 神経は前脳基底部や大脳基底核の線条体に多く分布し、認知機能、精神機能ならびに運動機能の調節において非常に重要な役割を果たしている<sup>1-4)</sup>。本研究では、 $\alpha 7$  nACh 受容体の刺激により発現する動作時振戦に着目し、ニコチン誘発振戦の中枢神経系薬物に対する反応性を評価するとともに、振戦発現調節におけるドーパミン神経系の役割とメカニズムを解析した。さらに、コリンエステラーゼ阻害薬による ACh 神経の賦活化によって惹起される振戦についても、その発現メカニズムを解析した。

第 1 章において、nACh 受容体を介する動作時振戦の薬理学的特性を明らかにすることを目的に、ニコチン誘発振戦に対する各種振戦治療薬の反応性ならびに各種抗てんかん薬の作用を評価した。その結果、ニコチン誘発振戦は本態性振戦治療薬であるプロプラノロール、ジアゼパム、フェノバルビタールによって特異的に抑制され、L-DOPA、トリヘキシフェニジルといったパーキンソン病治療薬は反応性を示さなかった。このことから、ニコチン誘発振戦の薬物反応性が、ヒトの本態性振戦と類似することが明らかとなった。ニコチン誘発振戦はヒト本態性振戦と類似して、下オリーブ核神経の興奮を介して発現することを考え合わせると<sup>21)</sup>、ニコチン誘発振戦が本態性振戦の新たな動物モデルとなり得ることが示唆された。さらに、第 1 世代および第 2 世代抗てんかん薬のニコチン誘発振戦改善作用を評価した結果、電位依存性  $\text{Na}^+$ チャネル阻害作用や電位依存性 T 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害作用を持つ薬物が有意な振戦抑制作用を示すことが明らかとなった。

第 2 章においては、ニコチン投与により賦活化されるドーパミン神経系の振戦調節メカニズムを明らかにするため、各種ドーパミン受容体作動薬および拮抗薬のニコチン誘発振戦に対する作用を解析した。本研究結果より、ニコチン投与時における中枢ドーパミン神経の賦活化が振戦発現の調節に深く関与していることが確認され、特に、ドーパミン  $\text{D}_{1/5}$  受容体の活性化が振戦発現を抑制し、 $\text{D}_3$  受容体の活性化が振戦発現を促進することが明らかとなった。一方、 $\text{D}_2$  受容体および  $\text{D}_4$  受容体の振戦発現調節における役割はほとんどないものと考えられた。さらに、 $\text{D}_3$  受容体および  $\text{D}_{1/5}$  受容体拮抗薬の

脳内局所投与を行った結果、D<sub>3</sub> 受容体による促進的制御には小脳が、D<sub>1/5</sub> 受容体による抑制的制御には下オリーブ核が関与していることが示唆された。

さらに、第3章では、コリンエステラーゼ阻害薬による ACh 神経賦活化が惹起する振戦発現のメカニズムを解析した。コリンエステラーゼ阻害薬パラオキソンによって誘発される振戦行動の評価および脳内神経興奮部位の探索を行った結果、パラオキソンは用量依存的に動作時振戦を誘発し、大脳皮質、海馬、淡蒼球、内側手綱核および下オリーブ核における神経興奮を惹起した。さらに、パラオキソン誘発振戦は mACh 受容体拮抗薬には反応せず、nACh 受容体拮抗薬によって振戦発現および下オリーブ核の神経興奮が共に抑制された。これらの結果より、コリンエステラーゼ阻害薬による振戦発現も、nACh 受容体を介して下オリーブ核神経を過剰興奮させることで誘発されることが確認された。

本研究結果から、中枢 ACh 神経系の賦活化が、下オリーブ核 nACh 受容体の活性化を介して動作時振戦を惹起することが確認され、この nACh 受容体を介する振戦がヒト本態性振戦の新たな動物モデルになりうることが示された。さらに、ドパミン受容体作用薬を含む各種中枢神経作用薬の薬効解析から、ドパミン D<sub>3</sub> 受容体拮抗薬、D<sub>1/5</sub> 受容体作動薬、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネル阻害薬、電位依存性 T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬などが、新たな本態性振戦治療薬となることが示唆された。特に、小脳 D<sub>3</sub> 受容体の振戦制御に関する知見は世界初の報告であり、錐体外路系運動調節における小脳 D<sub>3</sub> 受容体の役割が注目される。



## 論文目録

本研究の報告論文を以下に記載する。

- 1) Pharmacological characterization of nicotine-induced tremor: Responses to anti-tremor and anti-epileptic agents.

Kunisawa N., Shimizu S., Kato M., Iha HA., Iwai C., Hashimura M., Ogawa M., Kawaji S., Kawakita K., Abe K., Ohno Y.

J. Pharmacol. Sci., 137, 162-169 (2018).

- 2) Mechanism Underlying Organophosphate Paraoxon-Induced Kinetic Tremor.

Iha HA., Kunisawa N., Shimizu S., Onishi M., Nomura Y., Matsubara N., Iwai C., Ogawa M., Hashimura M., Sato K., Kato M., Ohno Y.

Neurotox. Res., 35, 575-583 (2019).

- 3) Mechanisms Underlying Dopaminergic Regulation of Nicotine-Induced Kinetic Tremor.

Kato M., Kunisawa N., Shimizu S., Iha HA., Ohno Y.

Front. Pharmacol., 13, 938175 (2022).

以上

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました、大野行弘 教授に心より深謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、懇切なご助言、ご助力を頂きました清水佐紀 准教授ならびに國澤直史 助教に感謝の意を表します。最後に、本研究に多大なるご協力を頂戴しました、大阪医科薬科大学 薬学部 薬品作用解析学研究室員の皆様に感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Ladner CJ, Lee JM. Pharmacological drug treatment of Alzheimer disease: the cholinergic hypothesis revisited. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57(8), 719-731 (1998).
- 2) Pákási M, Kálmán J. Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.*, 53(5), 103-111 (2008).
- 3) Schrag A, Schelosky L, Scholz U, Poewe W. Reduction of Parkinsonian signs in patients with Parkinson's disease by dopaminergic versus anticholinergic single-dose challenges. *Mov. Disord.*, 14(2), 252-255 (1999).
- 4) Shimizu S, Mizuguchi Y, Sobue A, Fujiwara M, Morimoto T, Ohno Y. Interaction between anti-Alzheimer and antipsychotic drugs in modulating extrapyramidal motor disorders in mice. *J. Pharm. Sci.*, 127(4), 439-445 (2015).
- 5) Le Foll B, Goldberg SR. Effects of nicotine in experimental animals and humans: an update on addictive properties. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 192, 335-367 (2009).
- 6) Besson M, David V, Baudonnat M, Cazala P, Guilloux JP, Reperant C, Cloez-Tayarani I, Changeux JP, Gardier AM, Granon S. Alpha7-nicotinic receptors modulate nicotine-induced reinforcement and extracellular dopamine outflow in the mesolimbic system in mice. *Psychopharmacology (Berl.)*, 220(1), 1-14 (2012).
- 7) Harrington L, Viñals X, Herrera-Solís A, Flores A, Morel C, Tolu S, Faure P, Maldonado R, Maskos U, Robledo P. Role of  $\beta 4^*$  Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Habenulo-Interpeduncular Pathway in Nicotine Reinforcement in Mice. *Neuropsychopharmacology*, 41(7), 1790-1802 (2016).
- 8) Vieyra-Reyes P, Mineur YS, Picciotto MR, Túnez I, Vidaltamayo R, Drucker-Colín R. Antidepressant-like effects of nicotine and transcranial magnetic stimulation in the olfactory bulbectomy rat model of depression. *Brain Res. Bull.*, 77(1), 13-18 (2008).

- 9) Mineur YS, Picciotto MR. Nicotine receptors and depression: revisiting and revising the cholinergic hypothesis. *Trends Pharmacol. Sci.*, 31(12), 580-586 (2010).
- 10) Haj-Mirzaian A, Kordjazy N, Haj-Mirzaian A, Ostadhadi S, Ghasemi M, Amiri S, Faizi M, Dehpour A. Evidence for the involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like effect of nicotine in mouse forced swimming and tail suspension tests. *Psychopharmacology (Berl.)*, 232(19), 3551-3561 (2015).
- 11) Swan GE, Lessov-Schlaggar CN. The effects of tobacco smoke and nicotine on cognition and the brain. *Neuropsychol. Rev.*, 17(3), 259-273 (2007).
- 12) Wood C, Kohli S, Malcolm E, Allison C, Shoaib M. Subtype-selective nicotinic acetylcholine receptor agonists can improve cognitive flexibility in an attentional set shifting task. *Neuropharmacology*, 105, 106-113 (2016).
- 13) Kawamata J, Suzuki S, Shimohama S.  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor mediated neuroprotection in Parkinson's disease. *Curr. Drug Targets.*, 13(5), 623-630 (2012).
- 14) Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol.*, 15(12), 1257-1272 (2016).
- 15) Lippold OC, Williams EJ, Wilson CG. Finger tremor and cigarette smoking. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 10(1), 83-86 (1980).
- 16) Shiffman SM, Gritz ER, Maltese J, Lee MA, Schneider NG, Jarvik ME. Effects of cigarette smoking and oral nicotine on hand tremor. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 33(6), 800-805 (1983).
- 17) Miner LL, Marks MJ, Collins AC. Relationship between nicotine-induced seizures and hippocampal nicotinic receptors. *Life Sci.*, 37(1), 75-83 (1985).
- 18) Louis ED. Kinetic tremor: differences between smokers and non-smokers. *Neurotoxicology*, 28(3), 569-575 (2007).
- 19) Lin CY, Yeh CH, Chang TT, Kao CH, Tsai SY. Smoking, dopamine transporter, and hand tremor.

Clin. Nucl. Med., 37(1), 35-38 (2012).

- 20) Gilley M, Beno S. Vaping implications for children and youth. *Curr. Opin. Pediatr.*, 32(3), 343-348 (2020).
- 21) Kunisawa N, Iha HA, Shimizu S, Tokudome K, Mukai T, Kinboshi M, Serikawa T, Ohno Y. Nicotine evoked kinetic tremor by activating the inferior olive via  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors. *Behav. Brain Res.*, 314, 173-180 (2016).
- 22) Iha HA, Kunisawa N, Shimizu S, Tokudome K, Mukai T, Kinboshi M, Ikeda A, Ito H, Serikawa T, Ohno Y. Nicotine Elicits Convulsive Seizures by Activating Amygdalar Neurons. *Front. Pharmacol.*, 8, 57 (2017).
- 23) Marshall J, Schnieden H. Effect of adrenaline, noradrenaline, atropine, and nicotine on some types of human tremor. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 29(3), 214-218 (1966).
- 24) Elias WJ, Shah BB. Tremor. *JAMA*, 311(9), 948-954 (2014).
- 25) Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet*, 386(9996), 896-912 (2015).
- 26) Deuschl G, Elble RJ. The pathophysiology of essential tremor. *Neurology*, 54(11), 14-20 (2000).
- 27) Puschmann A, Wszolek ZK. Diagnosis and treatment of common forms of tremor. *Semin. Neurol.*, 31(1), 65-77 (2011).
- 28) Kosmowska B, Wardas J. The Pathophysiology and Treatment of Essential Tremor: The Role of Adenosine and Dopamine Receptors in Animal Models. *Biomolecules*, 11(12), 1813 (2021).
- 29) Welton T, Cardoso F, Carr JA, Chan LL, Deuschl G, Jankovic J, Tan EK. Essential tremor. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 7(1), 83 (2021).
- 30) Damsma G, Westerink BH, de Vries JB, Horn AS. The effect of systemically applied cholinergic drugs on the striatal release of dopamine and its metabolites, as determined by automated brain dialysis in conscious rats. *Neurosci. Lett.*, 89(3), 349-354 (1988).
- 31) Haikala H, Ahtee L. Antagonism of the nicotine-induced changes of the striatal dopamine

metabolism in mice by mecamylamine and pempidine. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 338(2), 169-173 (1988).

- 32) Wonnacott S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.*, 20(2), 92-98 (1997).
- 33) Wonnacott S, Kaiser S, Mogg A, Soliakov L, Jones IW. Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.*, 393(1-3), 51-58 (2000).
- 34) Exley R, Clements MA, Hartung H, McIntosh JM, Cragg SJ. Alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptors dominate the nicotine control of dopamine neurotransmission in nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology*, 33(9), 2158-2166 (2008).
- 35) Quik M, Perez XA, Grady SR. Role of  $\alpha 6$  nicotinic receptors in CNS dopaminergic function: relevance to addiction and neurological disorders. *Biochem. Pharmacol.*, 82(8), 873-882 (2011).
- 36) Ferreira JJ, Sampaio C. Essential tremor. *BMJ Clin. Evid.*, 2007, 1206 (2007).
- 37) Johannessen Landmark C. Antiepileptic drugs in non-epilepsy disorders: relations between mechanisms of action and clinical efficacy. *CNS Drugs*, 22(1), 27-47 (2008).
- 38) Paterson NE, Malekiani SA, Foreman MM, Olivier B, Hanania T. Pharmacological characterization of harmaline-induced tremor activity in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 616(1-3), 73-80 (2009).
- 39) Handforth A, Homanics GE, Covey DF, Krishnan K, Lee JY, Sakimura K, Martin FC, Quesada A. T-type calcium channel antagonists suppress tremor in two mouse models of essential tremor. *Neuropharmacology*, 59(6), 380-387 (2010).
- 40) Rogawski MA, Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5(7), 553-564 (2004).
- 41) Quintero JE, Dooley DJ, Pomerleau F, Huettl P, Gerhardt GA. Amperometric measurement of glutamate release modulation by gabapentin and pregabalin in rat neocortical slices: role of voltage-sensitive  $Ca^{2+}$   $\alpha 2\delta$ -1 subunit. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 338(1), 240-245 (2011).

- 42) Shank RP, Maryanoff BE. Molecular pharmacodynamics, clinical therapeutics, and pharmacokinetics of topiramate. *CNS Neurosci. Ther.*, 14(2), 120-142 (2008).
- 43) Leppik IE, Kelly KM, deToledo-Morrell L, Patrylo PR, DeLorenzo RJ, Mathern GW, White HS. Basic research in epilepsy and aging. *Epilepsy Res.*, 68 Suppl. 1, S21-37 (2006).
- 44) McLean MJ, Bukhari AA, Wamil AW. Effects of topiramate on sodium-dependent action-potential firing by mouse spinal cord neurons in cell culture. *Epilepsia*, 41(S1), 21-24 (2000).
- 45) Okada M, Kaneko S, Hirano T, Mizuno K, Kondo T, Otani K, Fukushima Y. Effects of zonisamide on dopaminergic system. *Epilepsy Res.*, 22(3), 193-205 (1995).
- 46) Okada M, Zhu G, Yoshida S, Kanai K, Hirose S, Kaneko S. Exocytosis mechanism as a new targeting site for mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Life Sci.*, 72(4-5), 465-473 (2002).
- 47) Mehta H, Saravanan KS, Mohanakumar KP. Serotonin synthesis inhibition in olivo-cerebellar system attenuates harmaline-induced tremor in Swiss albino mice. *Behav. Brain Res.*, 145(1-2), 31-36 (2003).
- 48) Kolasiewicz W, Kuter K, Nowak P, Pastuszka A, Ossowska K. Lesion of the cerebellar noradrenergic innervation enhances the harmaline-induced tremor in rats. *Cerebellum*, 10(2), (2011).
- 49) Niznik HB, Van Tol HH. Dopamine receptor genes: new tools for molecular psychiatry. *J. Psychiatry Neurosci.*, 17(4), 158-180 (1992).
- 50) Prieto GA. Abnormalities of Dopamine D<sub>3</sub> Receptor Signaling in the Diseased Brain. *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.*, 9, 1179573517726335 (2017).
- 51) Ohno Y, Ishida-Tokuda K, Ishibashi T, Nakamura M. Effects of perospirone (SM-9018), a potential atypical neuroleptic, on dopamine D<sub>1</sub> receptor-mediated vacuous chewing movement in rats: a role of 5-HT<sub>2</sub> receptor blocking activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 57(4), 889-895 (1997).
- 52) Crans RAJ, Wouters E, Valle-León M, Taura J, Massari CM, Fernández-Dueñas V, Stove CP,

Ciruela F. Striatal Dopamine D<sub>2</sub>-Muscarinic Acetylcholine M<sub>1</sub> Receptor-Receptor Interaction in a Model of Movement Disorders. *Front. Pharmacol.*, 11, 194 (2020).

- 53) Boulay D, Depoortere R, Rostene W, Perrault G, Sanger DJ. Dopamine D<sub>3</sub> receptor agonists produce similar decreases in body temperature and locomotor activity in D<sub>3</sub> knock-out and wild-type mice. *Neuropharmacology*, 38(4), 555-565 (1999).
- 54) Manvich DF, Petko AK, Branco RC, Foster SL, Porter-Stransky KA, Stout KA, Newman AH, Miller GW, Paladini CA, Weinshenker D. Selective D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> receptor antagonists oppositely modulate cocaine responses in mice via distinct postsynaptic mechanisms in nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology*, 44(8), 1445-1455 (2019).
- 55) Barth V, Need AB, Tzavara ET, Giros B, Overshiner C, Gleason SD, Wade M, Johansson AM, Perry K, Nomikos GG, Witkin JM. In vivo occupancy of dopamine D<sub>3</sub> receptors by antagonists produces neurochemical and behavioral effects of potential relevance to attention-deficit-hyperactivity disorder. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 344(2), 501-510 (2013).
- 56) Bernaerts P, Tirelli E. Facilitatory effect of the dopamine D<sub>4</sub> receptor agonist PD168,077 on memory consolidation of an inhibitory avoidance learned response in C57BL/6J mice. *Behav. Brain Res.*, 142(1-2), 41-52 (2003).
- 57) Shimizu S, Mizuguchi Y, Tatara A, Kizu T, Andatsu S, Sobue A, Fujiwara M, Morimoto T, Ohno Y. 5-HT<sub>1A</sub> agonist alleviates serotonergic potentiation of extrapyramidal disorders via postsynaptic mechanisms. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 46, 86-91 (2013).
- 58) Shimizu S, Tatara A, Sato M, Sugiuchi T, Miyoshi S, Andatsu S, Kizu T, Ohno Y. Role of cerebellar dopamine D<sub>3</sub> receptors in modulating exploratory locomotion and cataleptogenicity in rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 50, 157-162 (2014).
- 59) Paxinos G, and Watson C. "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates," 7th ed., Academic Press, Cambridge (2013).



- 60) Ohno Y, Shimizu S, Tokudome K. Pathophysiological roles of serotonergic system in regulating extrapyramidal motor functions. *Biol. Pharm. Bull.*, 36(9), 1396-1400 (2013).
- 61) Ohno Y, Shimizu S, Tokudome K, Kunisawa N, Sasa M. New insight into the therapeutic role of the serotonergic system in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.*, 134, 104-121 (2015).
- 62) Barik S, de Beaurepaire R. Evidence for a functional role of the dopamine D3 receptors in the cerebellum. *Brain Res.*, 737(1-2), 347-350 (1996).
- 63) Barik S, de Beaurepaire R. Dopamine D3 modulation of locomotor activity and sleep in the nucleus accumbens and in lobules 9 and 10 of the cerebellum in the rat. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 29(5), 718-726 (2005).
- 64) Kolasiewicz W, Maj J, Ossowska K. The involvement of cerebellar dopamine D3 receptors in locomotor activity of rats. *J. Neural Transm. (Vienna)*, 115(5), 677-681 (2008).
- 65) Fallon JH, Schmued LC, Wang C, Miller R, Banales G. Neurons in the ventral tegmentum have separate populations projecting to telencephalon and inferior olive, are histochemically different, and may receive direct visual input. *Brain Res.*, 321(2), 332-336 (1984).
- 66) Toonen M, van Dijken H, Holstege JC, Ruigrok TJ, Koekkoek SK, Hawkins RK, Teune TM, vd Burg J, De Zeeuw CI. Light microscopic and ultrastructural investigation of the dopaminergic innervation of the ventrolateral outgrowth of the rat inferior olive. *Brain Res.*, 802(1-2), 267-273 (1998).
- 67) Kitahama K, Nagatsu I, Geffard M, Maeda T. Distribution of dopamine-immunoreactive fibers in the rat brainstem. *J. Chem. Neuroanat.*, 18(1-2), 1-9 (2000).
- 68) Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D<sub>3</sub>) as a target for neuroleptics. *Nature*, 347(6289), 146-151 (1990).
- 69) Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC. Localization of dopamine

D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res.*, 564(2), 203-219 (1991).

- 70) Lévesque D, Diaz J, Pilon C, Martres MP, Giros B, Souil E, Schott D, Morgat JL, Schwartz JC, Sokoloff P. Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7-[3H]hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 89(17), 8155-8159 (1992).
- 71) Diaz J, Pilon C, Le Foll B, Gros C, Triller A, Schwartz JC, Sokoloff P. Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *J. Neurosci.*, 20(23), 8677-8684 (2000).
- 72) Kim YS, Shin JH, Hall FS, Linden DJ. Dopamine signaling is required for depolarization-induced slow current in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.*, 29(26), 8530-8538 (2009).
- 73) Kizer JS, Palkovits M, Brownstein MJ. The projections of the A8, A9 and A10 dopaminergic cell bodies: evidence for a nigral-hypothalamic-median eminence dopaminergic pathway. *Brain Res.*, 108(2), 363-370 (1976).
- 74) Gulcher JR, Jónsson P, Kong A, Kristjánsson K, Frigge ML, Kárason A, Einarsdóttir IE, Stefánsson H, Einarsdóttir AS, Sigurthorardóttir S, Baldursson S, Björnsdóttir S, Hrafnkelsdóttir SM, Jakobsson F, Benedickz J, Stefánsson K. Mapping of a familial essential tremor gene, FET1, to chromosome 3q13. *Nat. Genet.*, 17(1), 84-87 (1997).
- 75) Higgins JJ, Pho LT, Nee LE. A gene (ETM) for essential tremor maps to chromosome 2p22-p25. *Mov. Disord.*, 12(6), 859-864 (1997).
- 76) Shatunov A, Sambuughin N, Jankovic J, Elble R, Lee HS, Singleton AB, Dagvadorj A, Ji J, Zhang Y, Kimonis VE, Hardy J, Hallett M, Goldfarb LG. Genomewide scans in North American families reveal genetic linkage of essential tremor to a region on chromosome 6p23. *Brain*, 129(Pt 9), 2318-2331 (2006).
- 77) Hicks JE, Konidari I, Scott BL, Stajich JM, Ashley-Koch AE, Gilbert JR, Scott WK. Linkage of

familial essential tremor to chromosome 5q35. *Mov. Disord.*, 31(7), 1059-1062 (2016).

- 78) Jeanneteau F, Funalot B, Jankovic J, Deng H, Lagarde JP, Lucotte G, Sokoloff P. A functional variant of the dopamine D<sub>3</sub> receptor is associated with risk and age-at-onset of essential tremor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103(28), 10753-10758 (2006).
- 79) Abrams HK, Leonard AR. Toxicology of organic phosphate insecticides. *Calif. Med.*, 73(2), 183-186 (1950).
- 80) Liu J, Parsons L, Pope C. Comparative effects of parathion and chlorpyrifos on endocannabinoid and endocannabinoid-like lipid metabolites in rat striatum. *Neurotoxicology*, 50, 20-27 (2015).
- 81) Ohno Y, Ishihara S, Mashimo T, Sofue N, Shimizu S, Imaoku T, Tsurumi T, Sasa M, Serikawa T. Scn1a missense mutation causes limbic hyperexcitability and vulnerability to experimental febrile seizures. *Neurobiol. Dis.*, 41(2), 261-269 (2011).
- 82) Ohno Y, Okano M, Masui A, Imaki J, Egawa M, Yoshihara C, Tataru A, Mizuguchi Y, Sasa M, Shimizu S. Region-specific elevation of D<sub>1</sub> receptor-mediated neurotransmission in the nucleus accumbens of SHR, a rat model of attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropharmacology*, 63(4), 547-554 (2012).
- 83) Iha HA, Kunisawa N, Tokudome K, Mukai T, Kinboshi M, Shimizu S, Ohno Y. Immunohistochemical analysis of Fos protein expression for exploring brain regions (foci) related to central nervous system (CNS) disorders and drug actions. "In vivo neuropharmacology and neurophysiology," ed. by Philippu A, Springer, New York, pp. 389-408 (2016).
- 84) Franklin K, and Paxinos G. "The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates," 3rd ed., Academic Press, Cambridge (2007).
- 85) Yélamos F, Díez F, Martín C, Blanco JL, García MJ, Lardelli A, Peña JF. Intoxicaciones agudas por insecticidas organofosforados en la provincia de Almería. Estudio de 187 casos [Acute organophosphate insecticide poisonings in the province of Almería. A study of 187 cases]. *Med.*

Clin. (Barc), 98(18), 681-684 (1992).

- 86) Bhatt MH, Elias MA, Mankodi AK. Acute and reversible parkinsonism due to organophosphate pesticide intoxication: five cases. *Neurology*, 52(7), 1467-1471 (1999).
- 87) Arima H, Sobue K, So M, Morishima T, Ando H, Katsuya H. Transient and reversible parkinsonism after acute organophosphate poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 41(1), 67-70 (2003).
- 88) Kwon OD, Kim HK. Parkinsonism as late sequela of organophosphate intoxication. *J. Emerg. Trauma Shock*, 7(2), 124-125 (2014).
- 89) Reji KK, Mathew V, Zachariah A, Patil AK, Hansdak SG, Ralph R, Peter JV. Extraparamidal effects of acute organophosphate poisoning. *Clin. Toxicol. (Phila)*, 54(3), 259-265 (2016).
- 90) Wess J, Lambrecht G, Moser U, Mutschler E. A comparison of the antimuscarinic effects of pirenzepine and N-methylatropine on ganglionic and vascular muscarinic receptors in the rat. *Life Sci.*, 35(5), 553-560 (1984).
- 91) Brown DA, Forward A, Marsh S. Antagonist discrimination between ganglionic and ileal muscarinic receptors. 1980. *Br. J. Pharmacol.*, 120(4 Suppl), 447-449 (1997).
- 92) Shrot S, Ramaty E, Biala Y, Bar-Klein G, Daninos M, Kamintsky L, Makarovsky I, Statlender L, Rosman Y, Krivoy A, Lavon O, Kassirer M, Friedman A, Yaari Y. Prevention of organophosphate-induced chronic epilepsy by early benzodiazepine treatment. *Toxicology*, 323, 19-25 (2014).
- 93) Miller AL, Medina MA. Cerebral metabolic effects of organophosphorus anticholinesterase compounds. *Metab. Brain Dis.*, 1(2), 147-156, (1986).
- 94) Nelson SR, Doull J, Tockman BA, Cristiano PJ, Samson FE. Regional brain metabolism changes induced by acetylcholinesterase inhibitors. *Brain Res.*, 157(1), 186-190 (1978).
- 95) Samson FE, Pazdernik TL, Cross RS, Giesler MP, Mewes K, Nelson SR, McDonough JH. Soman induced changes in brain regional glucose use. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 4(2 Pt 2), S173-183 (1984).
- 96) Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T. Mapping patterns of c-fos expression in the central

nervous system after seizure. *Science*, 237(4811), 192-197 (1987).

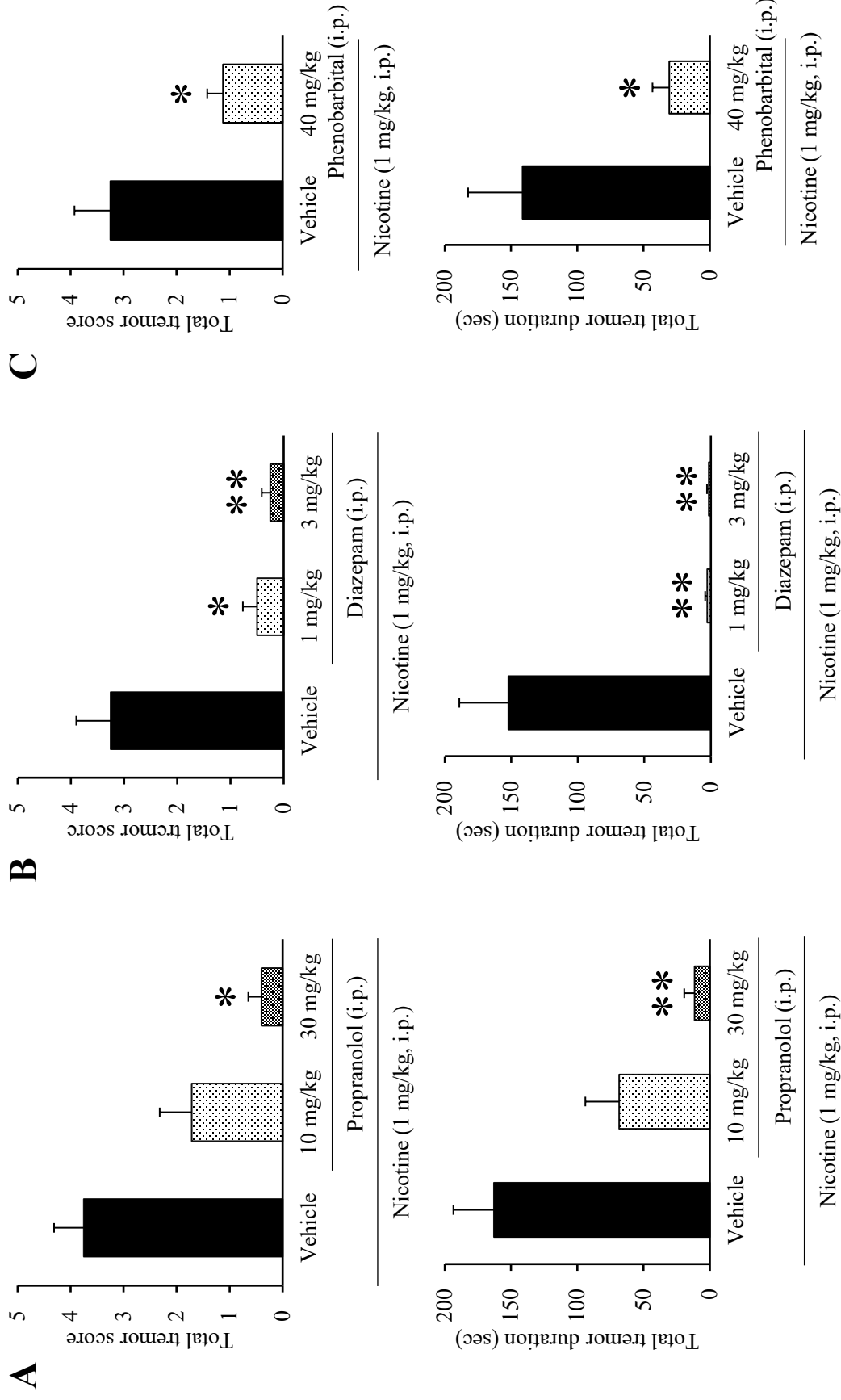
- 97) Kovács KJ. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem. Int.*, 33(4), 287-297 (1998).
- 98) Hoffman GE, Lyo D. Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'? *J. Neuroendocrinol.*, 14(4), 259-268 (2002).
- 99) Ohno Y, Shimizu S, Imaki J, Ishihara S, Sofue N, Sasa M, Kawai Y. Anticatalytic 8-OH-DPAT preferentially counteracts with haloperidol-induced Fos expression in the dorsolateral striatum and the core region of the nucleus accumbens. *Neuropharmacology.*, 55(5), 717-723 (2008).
- 100) Ohno Y, Shimizu S, Harada Y, Morishita M, Ishihara S, Kumafuji K, Sasa M, Serikawa T. Regional expression of Fos-like immunoreactivity following seizures in Noda epileptic rat (NER). *Epilepsy Res.*, 87(1), 70-76 (2009).
- 101) Okuno H. Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neurosci. Res.*, 69(3), 175-186 (2011).
- 102) Tatara A, Shimizu S, Masui A, Tamura M, Minamimoto S, Mizuguchi Y, Ochiai M, Mizobe Y, Ohno Y. Atypical antipsychotic properties of AD-6048, a primary metabolite of blonanserin. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 138, 14-19 (2015).



**Table 1 Changes in brain dopamine and its metabolite levels by a tremorogenic dose of nicotine in mice.**

Brain regions		Level (ng/g tissue)		
		DA	DOPAC	HVA
Cerebral cortex	Saline	1150.2±198.2	144.4±18.5	186.1±23.8
	Nicotine	824.6±83.6	151.2±8.0	166.7±14.6
Hippocampus	Saline	18.6±3.2	9.4±1.1	9.2±1.8
	Nicotine	27.9±7.8	18.1±1.9**	12.5±1.6
Striatum	Saline	7467.0±656.4	649.4±54.5	745.9±59.9
	Nicotine	8404.6±505.2	769.1±58.8	1137.8±84.2**
Thalamus	Saline	58.8±14.1	59.7±8.9	129.2±9.6
	Nicotine	91.8±19.4	90.8±11.6	134.7±11.7
Hypothalamus	Saline	336.6±45.6	159.9±22.4	156.7±9.5
	Nicotine	377.7±25.2	193.7±15.9	149.1±7.9
Midbrain	Saline	112.6±32.2	64.6±7.5	94.3±8.2
	Nicotine	114.0±13.8	80.0±8.9	87.4±6.8
Pons & medulla oblongata	Saline	19.8±1.6	34.0±4.0	9.3±1.9
	Nicotine	30.7±1.4**	47.6±4.3*	9.6±1.7
Cerebellum	Saline	5.8±0.3	7.7±1.0	2.5±0.2
	Nicotine	5.3±0.3	7.8±0.6	2.8±0.3

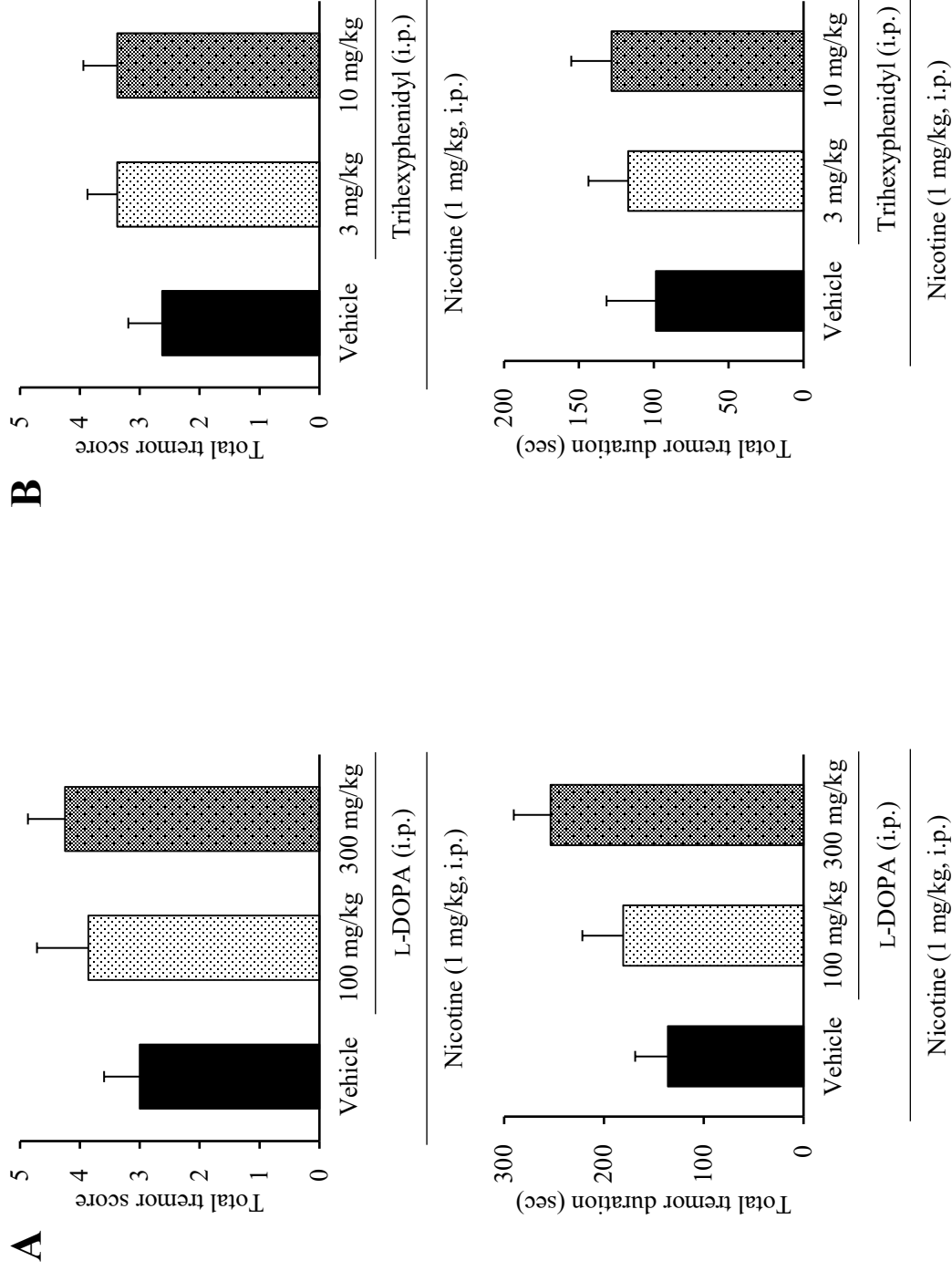
Brain samples were obtained 15 min after the injection of nicotine (1 mg/kg, i.p.) or saline. Dopamine (DA), DOPAC, and HVA levels were measured by HPLC-ECD systems. Each value represents the mean ± S.E.M. of 7 mice. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : Significantly different from control (saline treated) animals.



**Fig. 1 Effects of anti-essential tremor agents on nicotine-induced tremor in mice.**

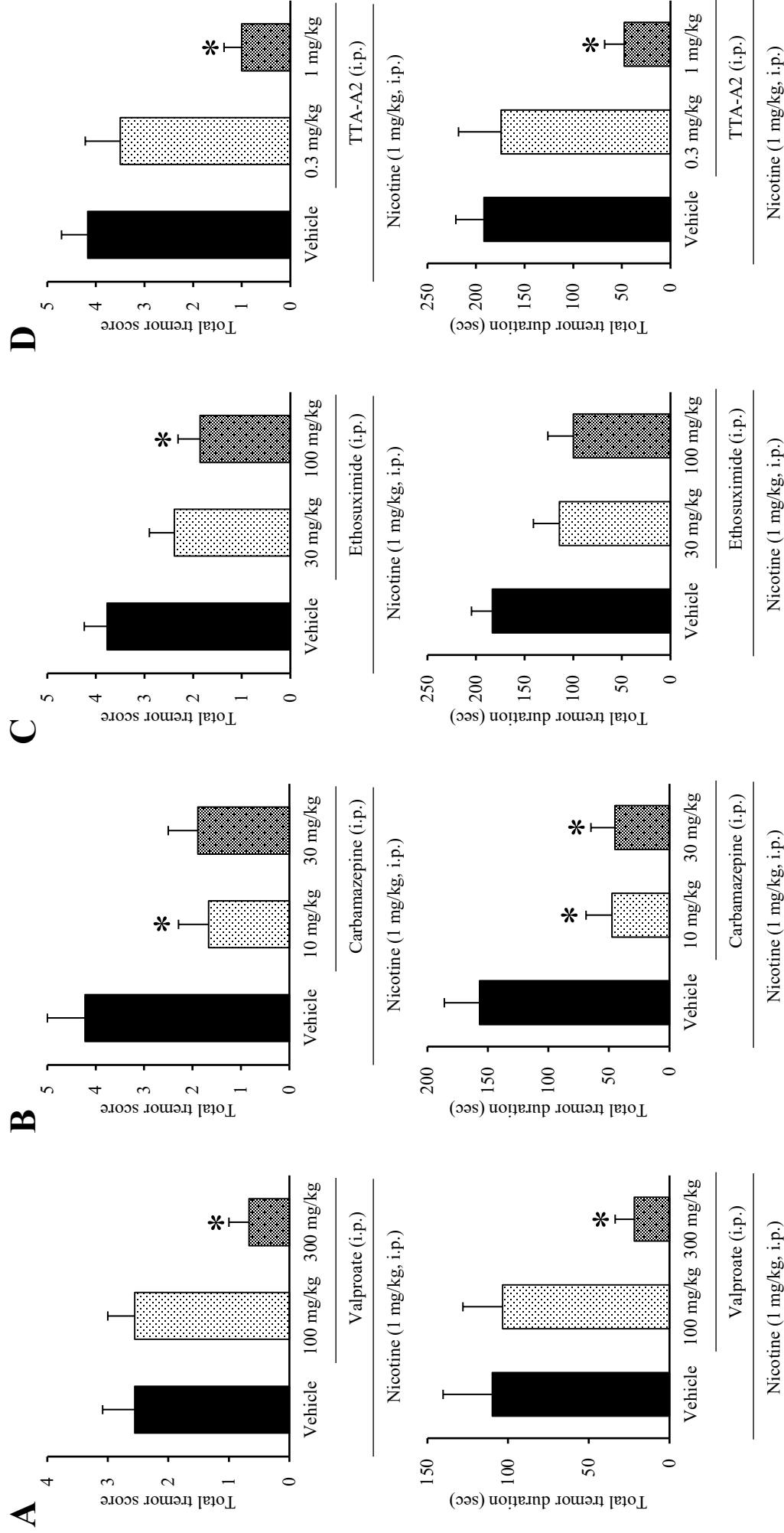
Data describe the effects of (A) propranolol, (B) diazepam, and (C) phenobarbital on the total score and duration of nicotine-induced tremor over 10 min observation period. Propranolol (10, 30 mg/kg, i.p.), diazepam (1, 3 mg/kg, i.p.), phenobarbital (40 mg/kg, i.p.), or vehicle was given 15 min before the nicotine (1 mg/kg, i.p.) injection. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 5-8 mice. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : Significantly different from control animals treated with vehicle + nicotine.





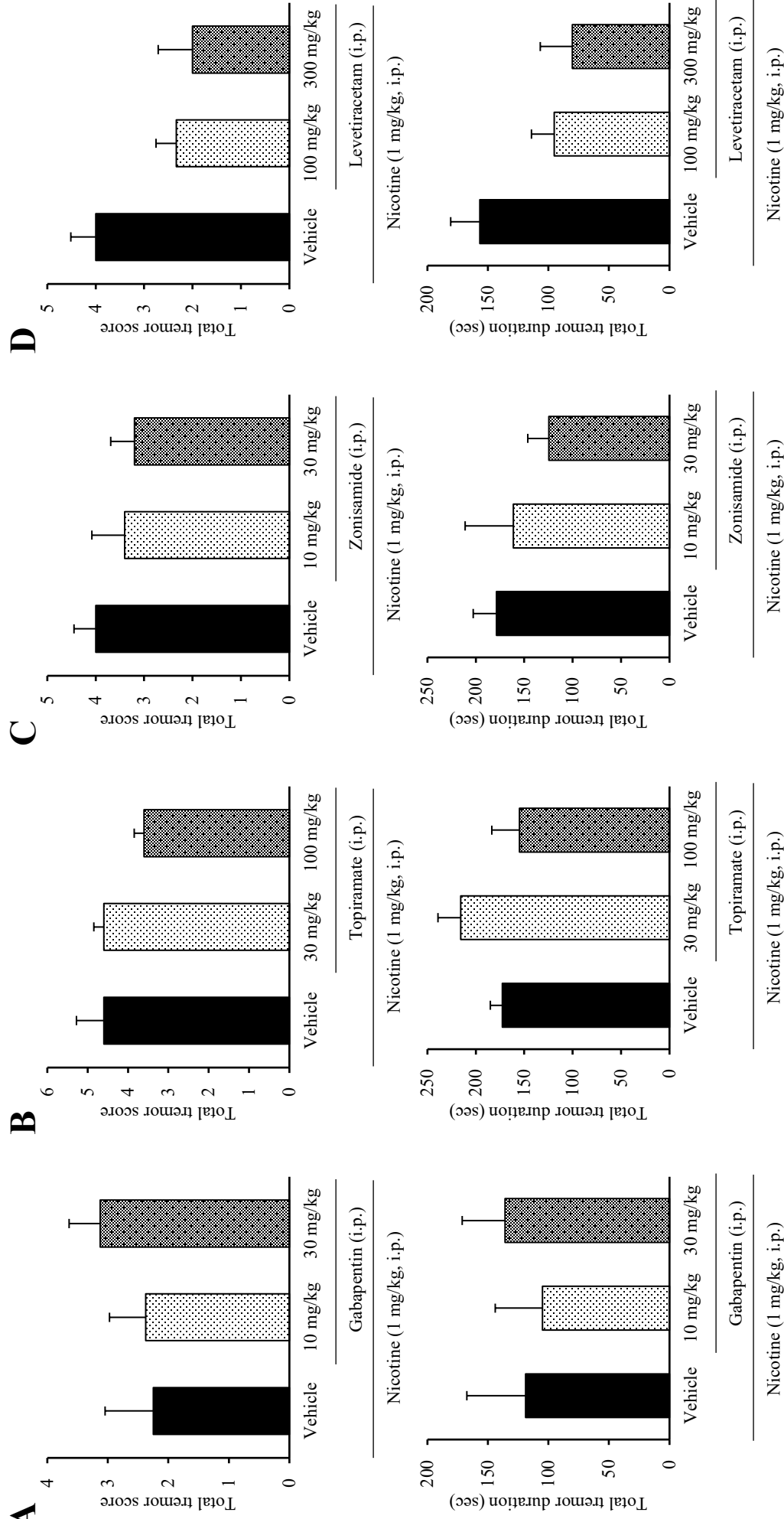
**Fig. 2 Effects of anti-parkinsonian agents on nicotine-induced tremor in mice.**

Data describe the effects of (A) L-DOPA, and (B) trihexyphenidyl on the total score and duration of nicotine-induced tremor over 10 min observation period. L-DOPA (100, 300 mg/kg, i.p.), trihexyphenidyl (3, 10 mg/kg, i.p.), or vehicle was given 15 min before the nicotine (1 mg/kg, i.p.) injection. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 7-8 mice.



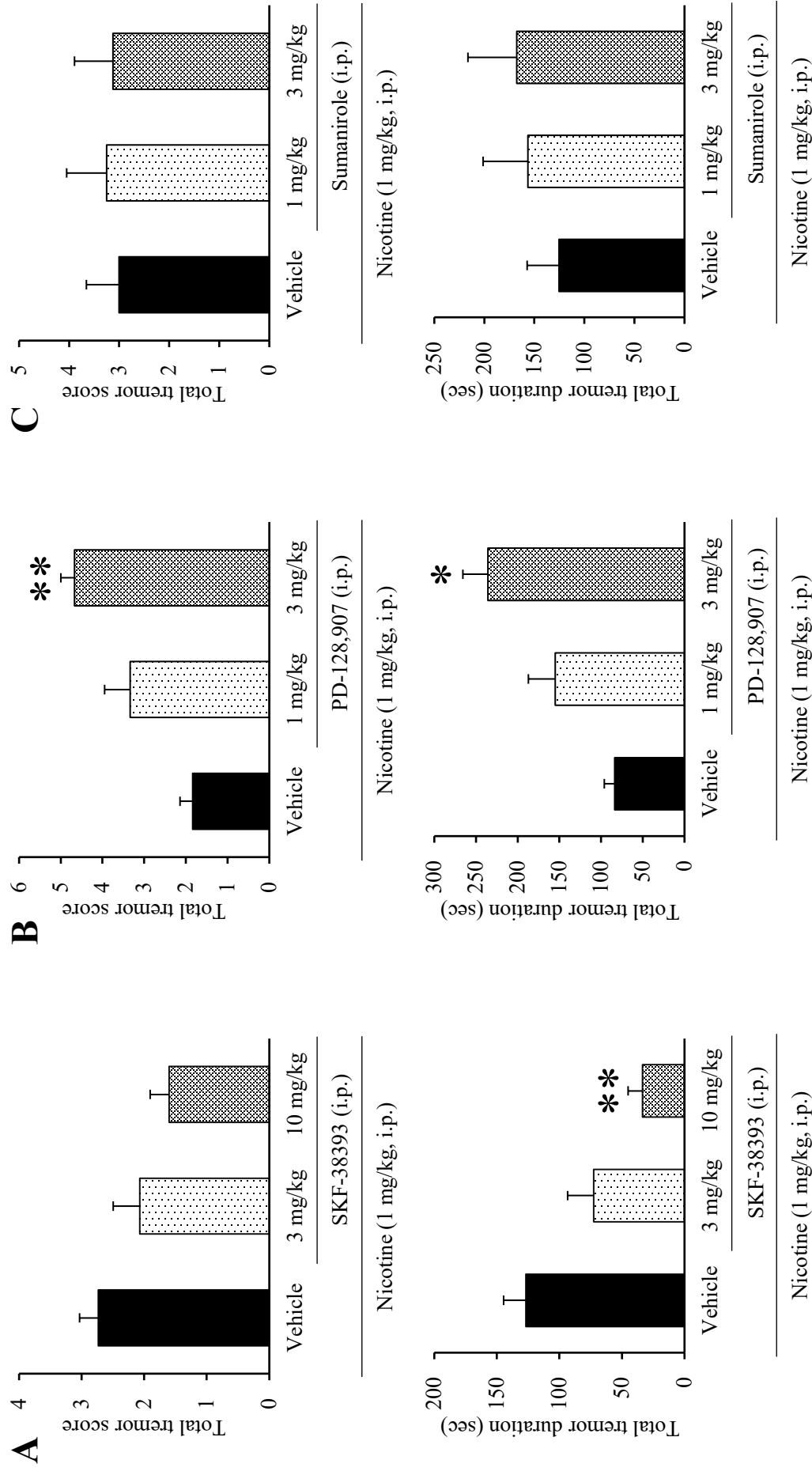
**Fig. 3 Effects of anti-epileptic agents (1st generation) and TTA-A2 on nicotine-induced tremor in mice.**

Data describe the effects of (A) valproate, (B) carbamazepine, (C) ethosuximide, and (D) TTA-A2 on the total score and duration of nicotine-induced tremor over 10 min observation period. Valproate (100, 300 mg/kg, i.p.), carbamazepine (10, 30 mg/kg, i.p.), ethosuximide (30, 100 mg/kg, i.p.), TTA-A2 (0.3, 1 mg/kg, i.p.), or vehicle was given 15 min before the nicotine (1 mg/kg, i.p.) injection. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6-14 mice. \* $p < 0.05$ : Significantly different from control animals treated with vehicle + nicotine.



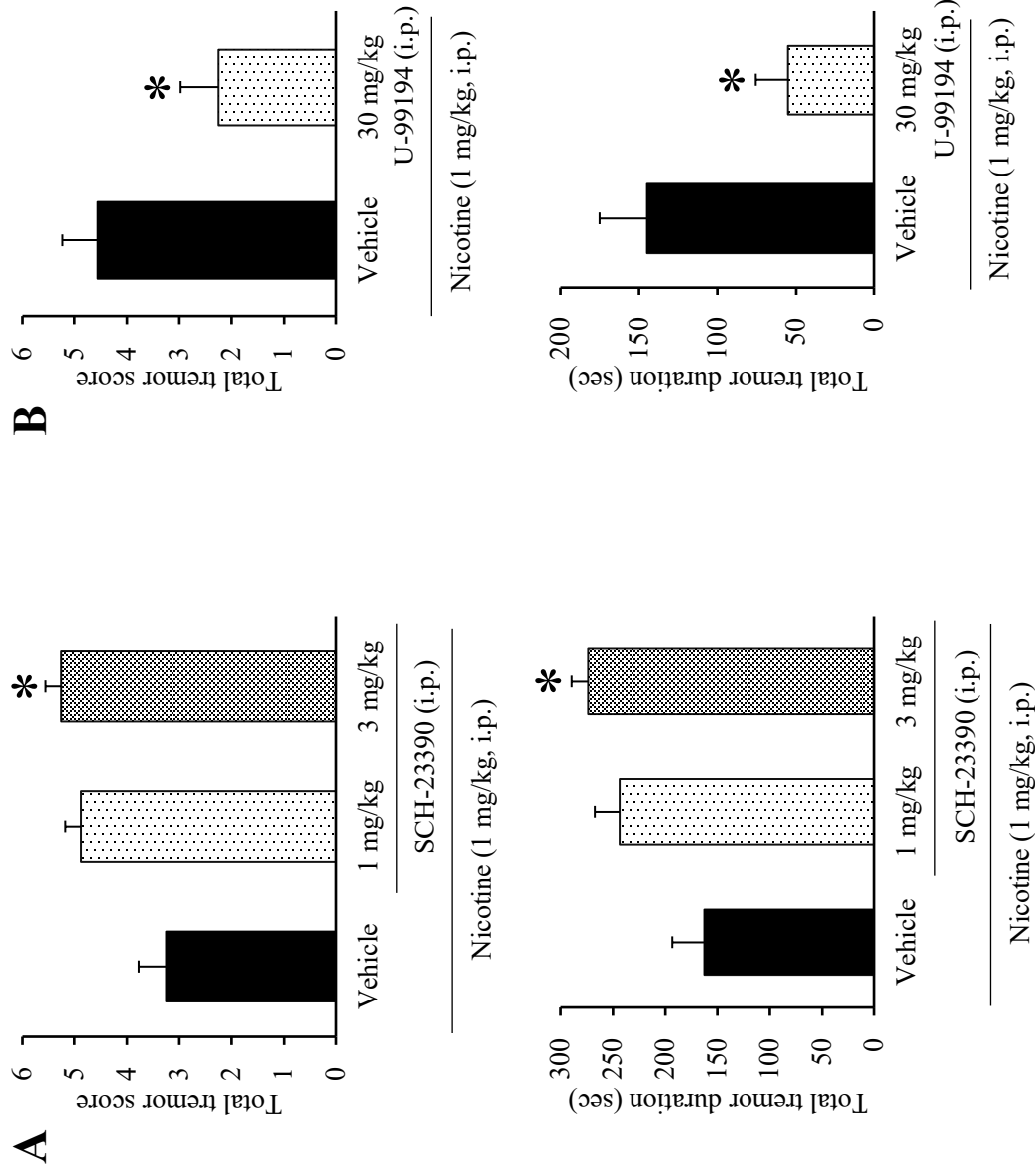
**Fig. 4 Effects of anti-epileptic agents (2nd generation) on nicotine-induced tremor in mice.**

Data describe the effects of (A) gabapentin, (B) topiramate, (C) zonisamide, and (D) levetiracetam on the total score and duration of nicotine-induced tremor over 10 min observation period. Gabapentin (10, 30 mg/kg, i.p.), topiramate (30, 100 mg/kg, i.p.), zonisamide (10, 30 mg/kg, i.p.), levetiracetam (100, 300 mg/kg, i.p.), or vehicle were given 15 min before the nicotine (1 mg/kg, i.p.) injection. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 5-8 mice.



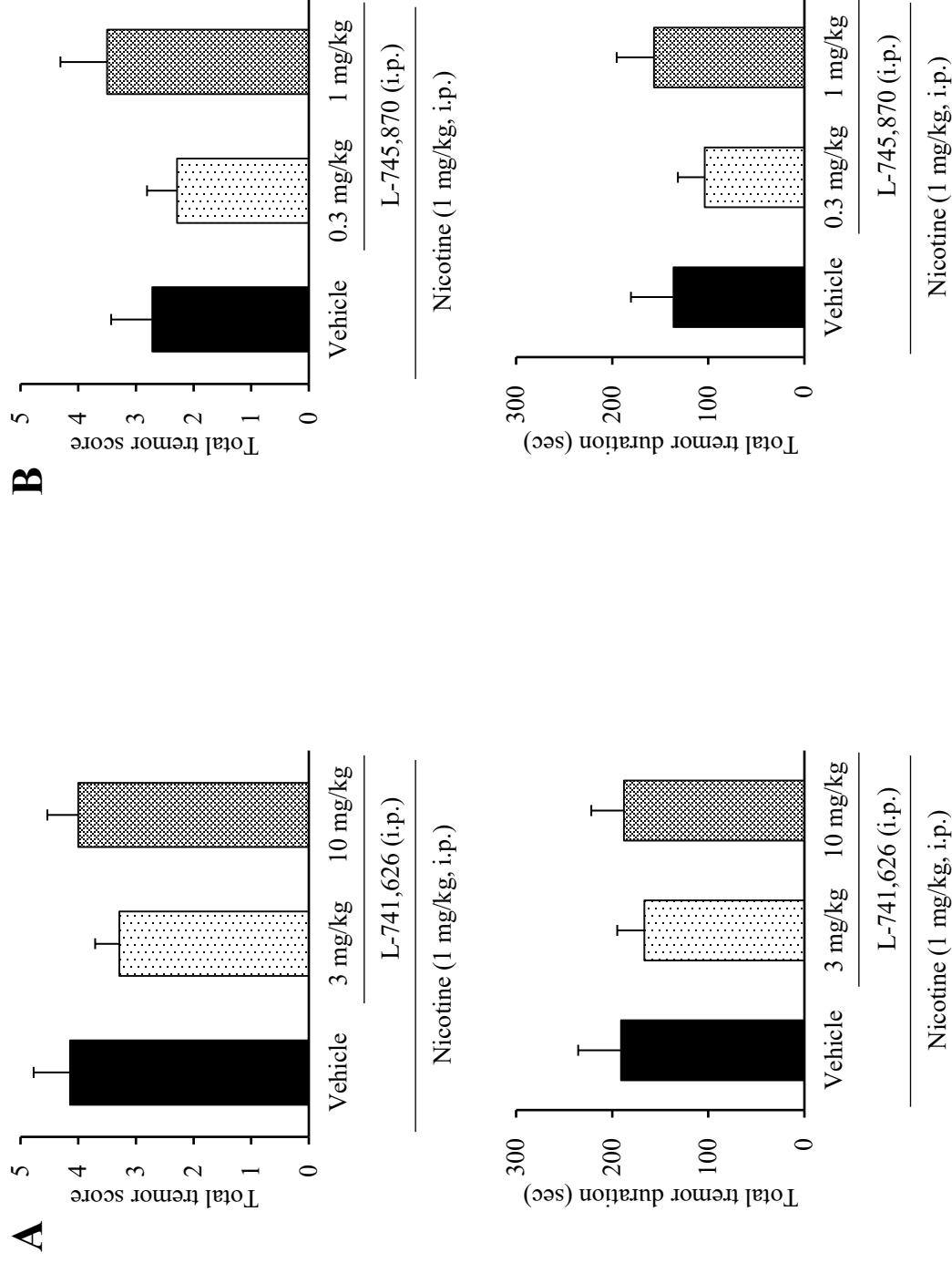
**Fig. 5 Effects of dopamine receptor agonists on nicotine-induced tremor in mice.**

Mice were treated with; (A) the  $D_{1/5}$  receptor agonist SKF-38393 (3, 10 mg/kg, i.p.), (B) the  $D_3$  receptor agonist PD-128,907 (1, 3 mg/kg, i.p.), (C) the  $D_2$  receptor agonist sumanirole (1, 3 mg/kg, i.p.), or vehicle 15 min before the nicotine (1 mg/kg, i.p.) injection. Data show the total tremor score (intensity) and duration of nicotine-induced tremor over 10 min observation period. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6-16 mice. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : Significantly different from control animals treated with vehicle + nicotine.



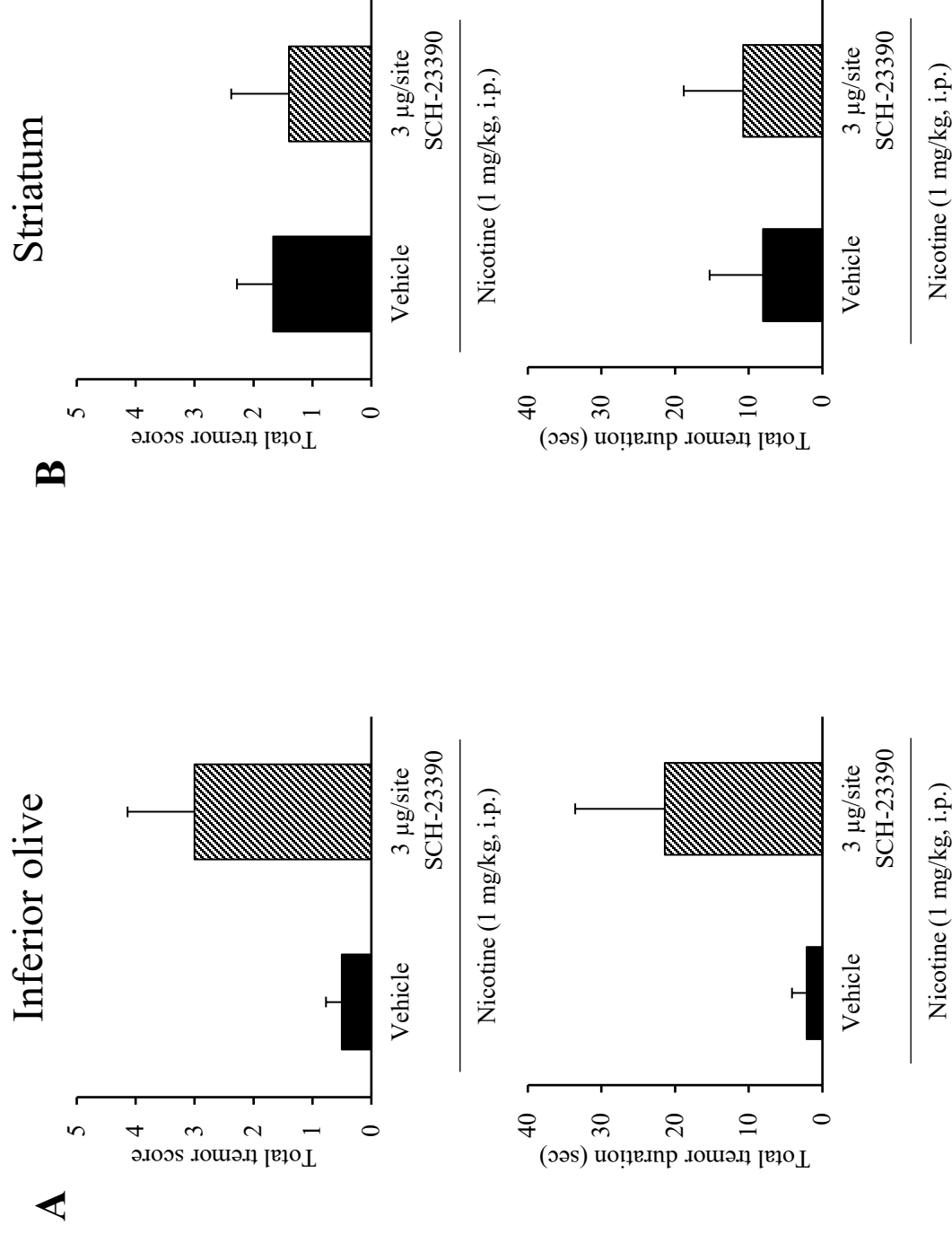
**Fig. 6 Effects of  $D_{1/5}$  or  $D_3$  receptor antagonists on nicotine-induced tremor in mice.**

Mice were treated with; (A) the  $D_{1/5}$  receptor antagonist SCH-23390 (1, 3 mg/kg, i.p.), (B) the  $D_3$  receptor antagonist U-99194 (30 mg/kg, i.p.), or vehicle 15 min before the nicotine (1 mg/kg, i.p.) injection. Data show the total tremor score (intensity) and duration of nicotine-induced tremor over 10 min observation period. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 8-9 mice. \* $p < 0.05$ : Significantly different from control animals treated with vehicle + nicotine.



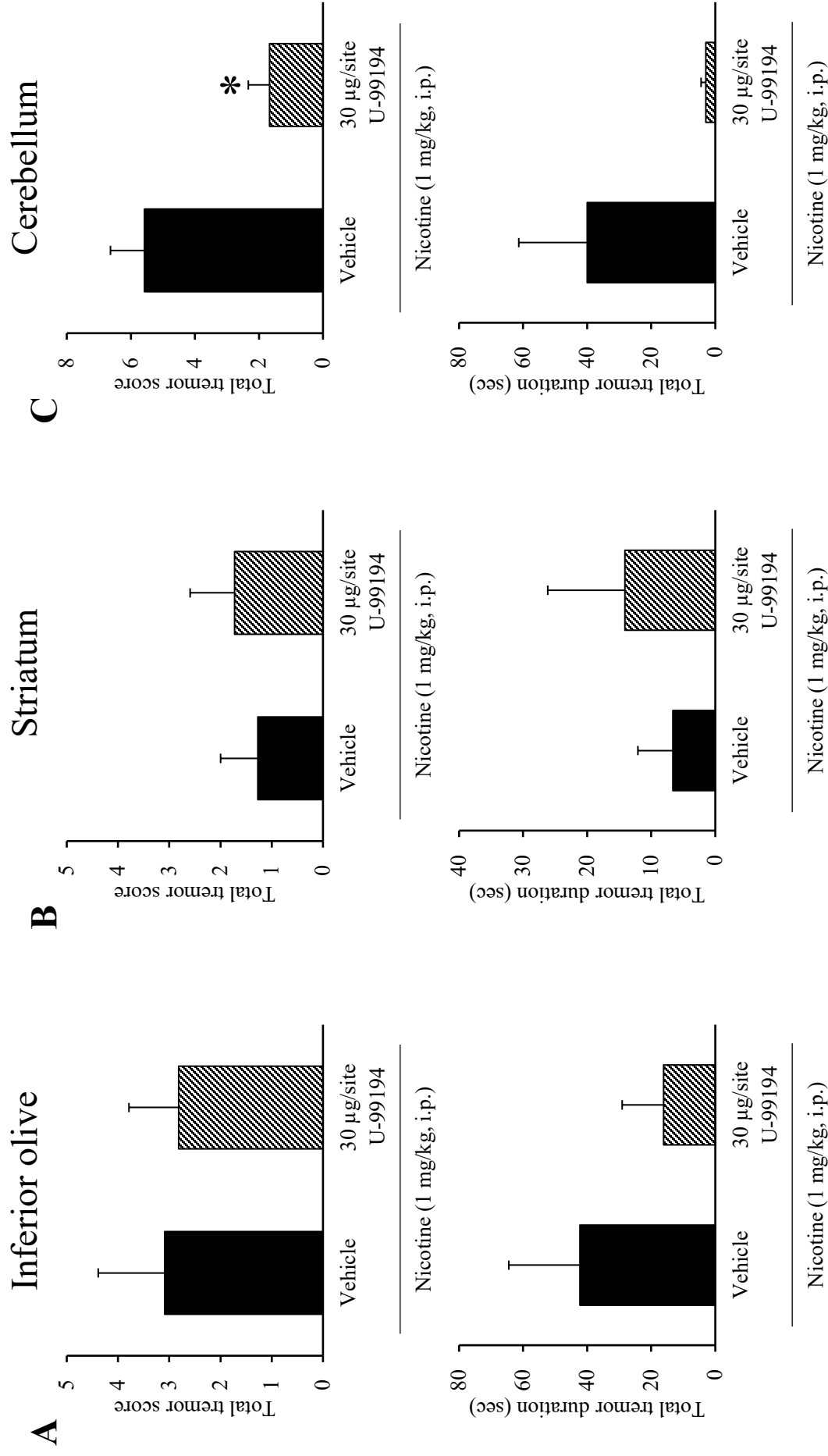
**Fig. 7 Effects of D<sub>2</sub> or D<sub>4</sub> receptor antagonists on nicotine-induced tremor in mice.**

Mice were treated with; (A) the D<sub>2</sub> receptor antagonist L-741,626 (3, 10 mg/kg, i.p.), (B) the D<sub>4</sub> receptor antagonist L-745,870 (0.3, 1 mg/kg, i.p.), or vehicle 15 min before the nicotine (1 mg/kg, i.p.) injection. Data show the total tremor score (intensity) and duration of nicotine-induced tremor over 10 min observation period. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6-7 mice.



**Fig. 8 Effects of microinjection of SCH-23390 on nicotine-induced tremor in rats.**

The  $D_{1/5}$  receptor antagonist SCH-23390 (3 µg/injection site) or vehicle was injected into: (A) the inferior olive or (B) the striatum in rats 15 min before the nicotine (1 mg/kg, i.p.) injection. Data show the total tremor score (intensity) and duration of nicotine-induced tremor during the 5-16 min observation period. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 5-10 rats.

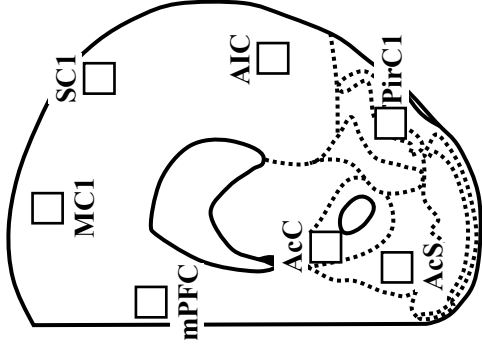


**Fig. 9 Effects of microinjection of U-99194 on nicotine-induced tremor in rats.**

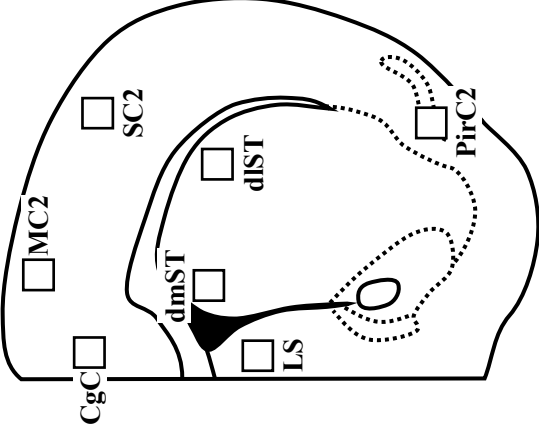
The  $D_3$  receptor antagonist U-99194 (30 µg/injection site) or vehicle was injected into: (A) the inferior olive, (B) the striatum, or (C) cerebellum lobe IX in rats 15 min before the nicotine (1 mg/kg, i.p.) injection. Data show the total tremor score (intensity) and duration of nicotine-induced tremor during the 5-16 min observation period. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6-11 rats. \* $p < 0.05$ : Significantly different from control animals treated with vehicle + nicotine.



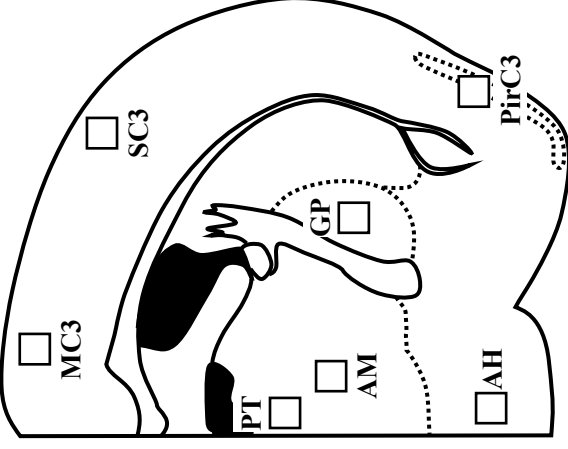
Bregma 1.70 mm



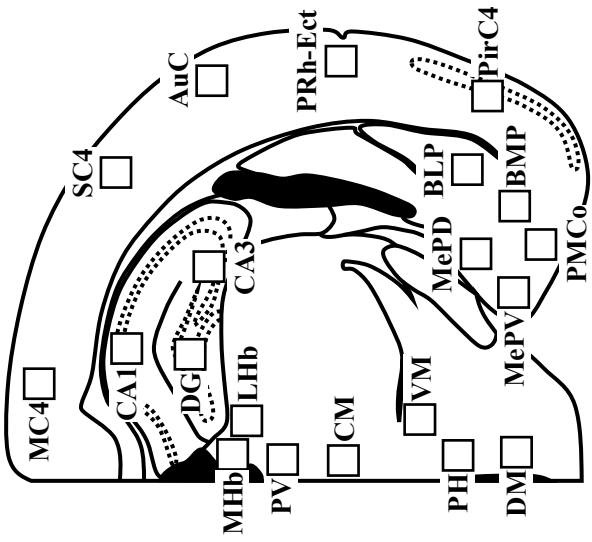
Bregma 0.74 mm



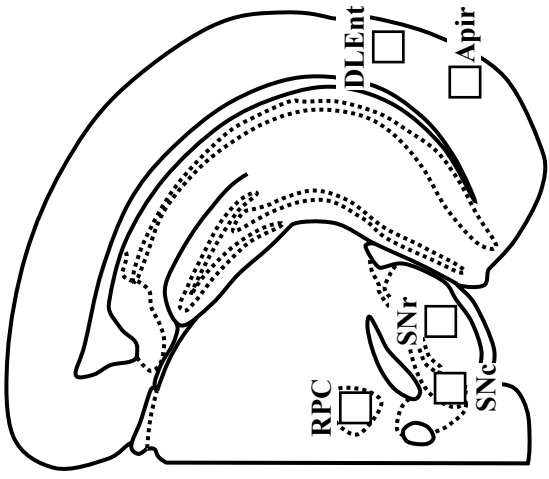
Bregma -0.82 mm



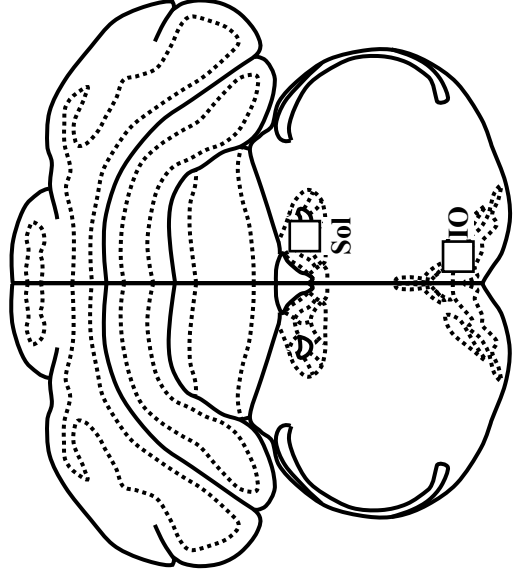
Bregma -2.06 mm



Bregma -3.08 mm

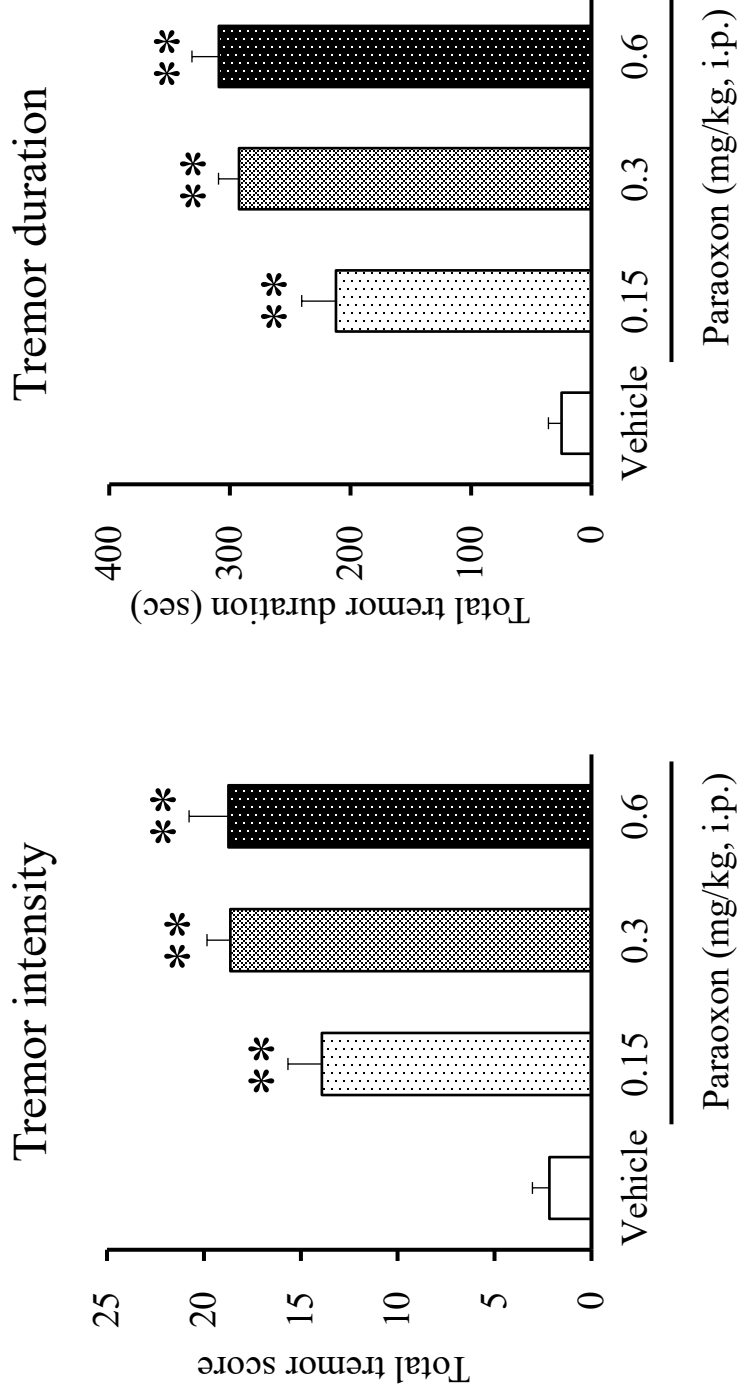


Bregma -7.56 mm



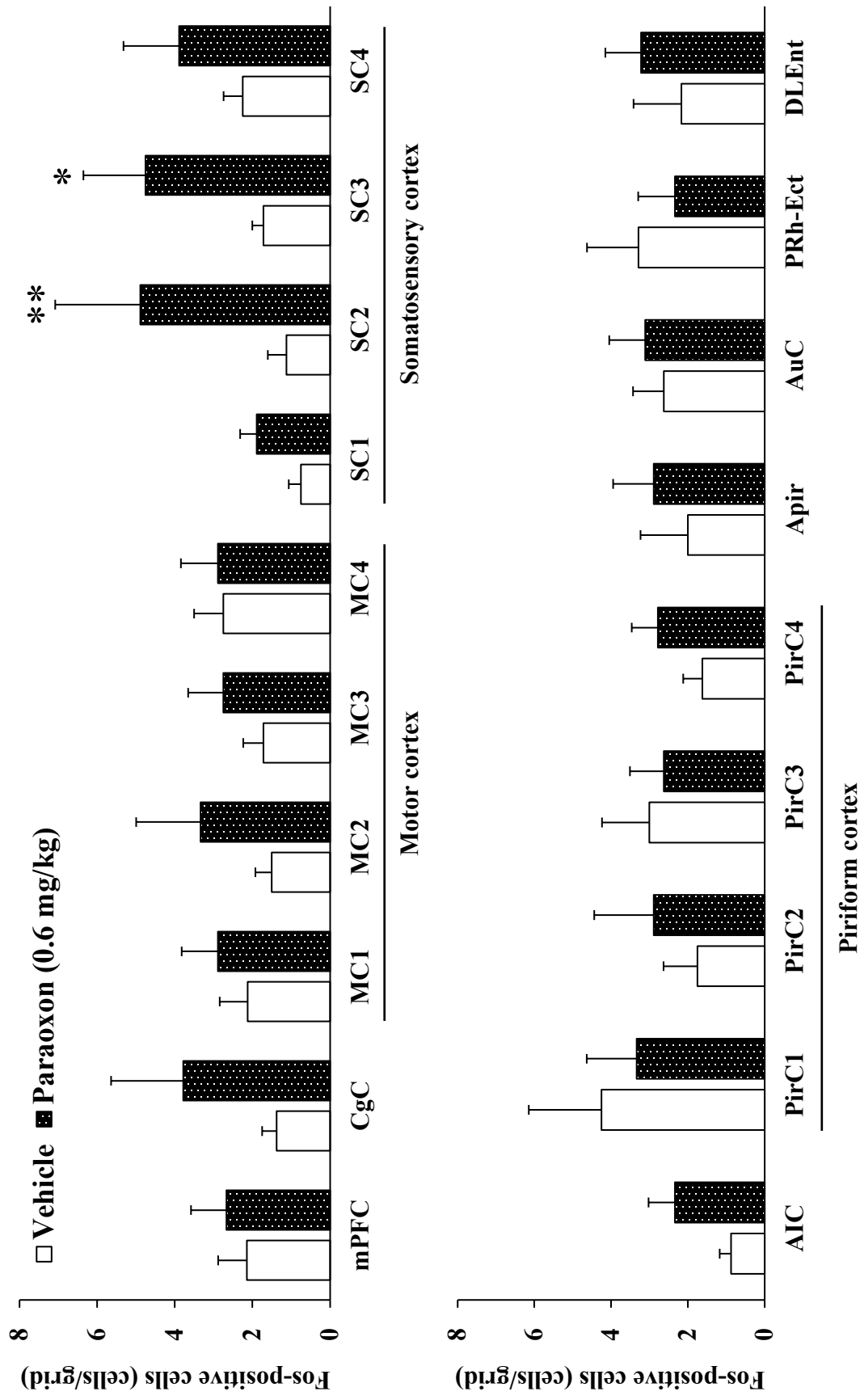
**Fig. 10 Brain regions for Fos expression analysis in mice.**

Schematic illustrations of mice brain sections showing paraoxon (0.6 mg/kg, i.p.)-induced Fos protein expression. Squares in each section indicate sampled area analyzed. Anteroposterior coordinates (distance from the bregma) are shown above each section. Cerebral cortex: mPFC, medial prefrontal cortex; CgC, cingulate cortex; MC, motor cortex; SC, somatosensory cortex; AIC, agranular insular cortex; PirC, piriform cortex; Apir, amygdalopiriform transition area; AuC, auditory cortex; PRh-Ect, perirhinal-ectothalamic cortex; DLEnt, dorsolateral entorhinal cortex. Limbic region: AcC, core region of accumbens nucleus; AcS, shell region of accumbens nucleus; BLP, basolateral amygdaloid nucleus; BMP, basomedial amygdaloid nucleus; PMCo, posteromedial cortical amygdaloid area; MePV, medial posteroventral amygdaloid nucleus; MePD, medial posterodorsal amygdaloid nucleus; CA, cornu ammonis field of hippocampus; DG, dentate gyrus. Basal ganglia: dlST, dorsolateral striatum; dmST, dorsomedial striatum; GP, globus pallidus; LS, lateral septum. Diencephalon: MHb, medial habenular nucleus; LHb, lateral habenular nucleus; PT, paratenial thalamic nucleus; PV, paraventricular thalamic nucleus; AM, anteromedial thalamic nucleus; CM, central medial thalamic nucleus; VM, ventromedial thalamic nucleus; AH, anterior hypothalamic area; PH, posterior hypothalamic nucleus; DM, dorsomedial hypothalamic nucleus. Brainstem: RPC, parvocellular part of red nucleus; SNr, reticular part of substance nigra; SNC, compact part of substance nigra; Sol, solitary nucleus; IO, inferior olive.



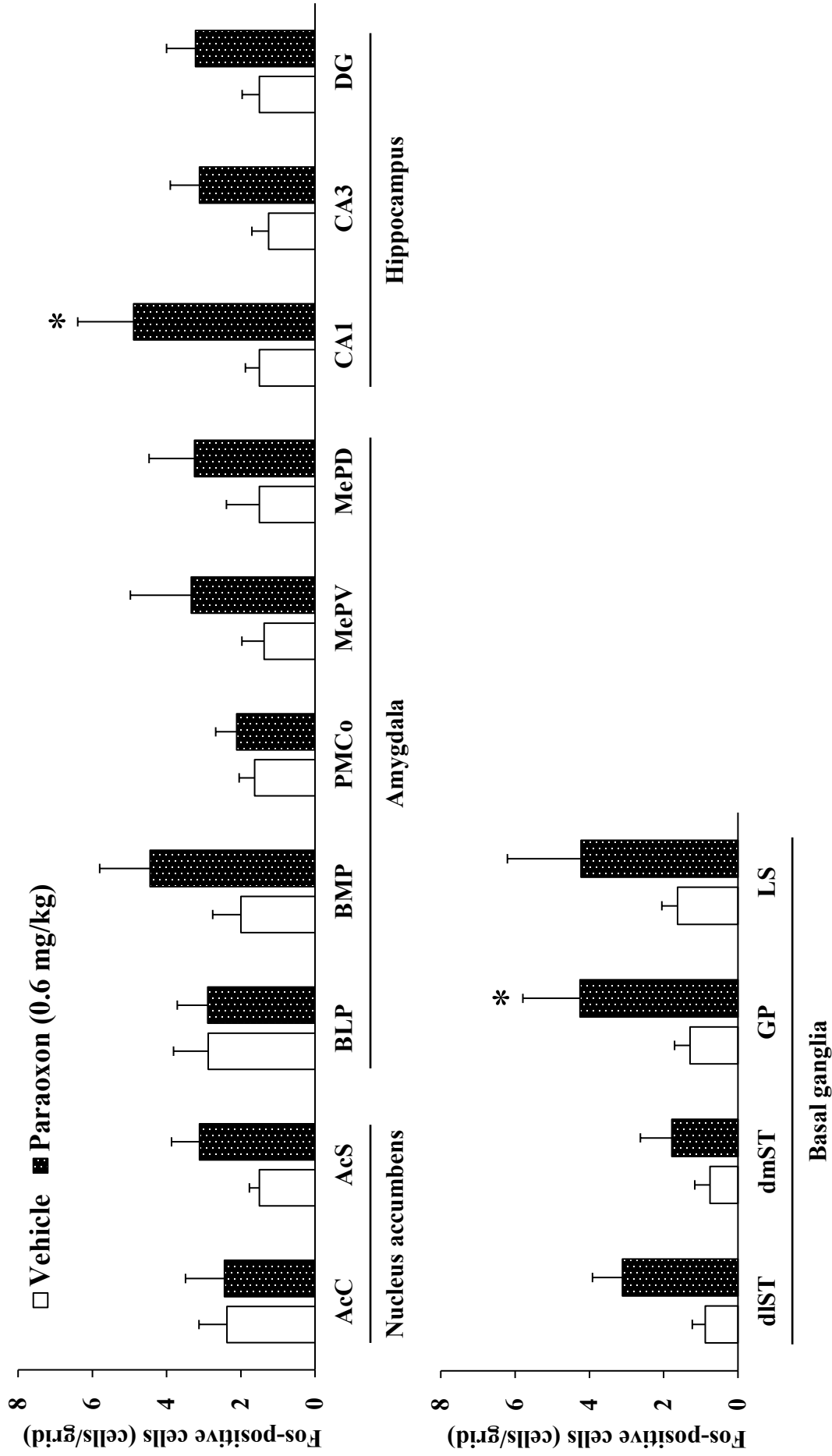
**Fig. 11 Tremorogenic action of paraoxon in mice.**

Tremorogenic action was evaluated by measuring tremor score (intensity) and tremor duration during the 10-21 min observation after the administration of paraoxon (0.15, 0.3, 0.6 mg/kg, i.p.) or vehicle. Behavior scores and tremor durations are represented as the mean  $\pm$  S.E.M. of 6-9 mice.  $**p < 0.01$ : Significantly different from animals treated with vehicle.



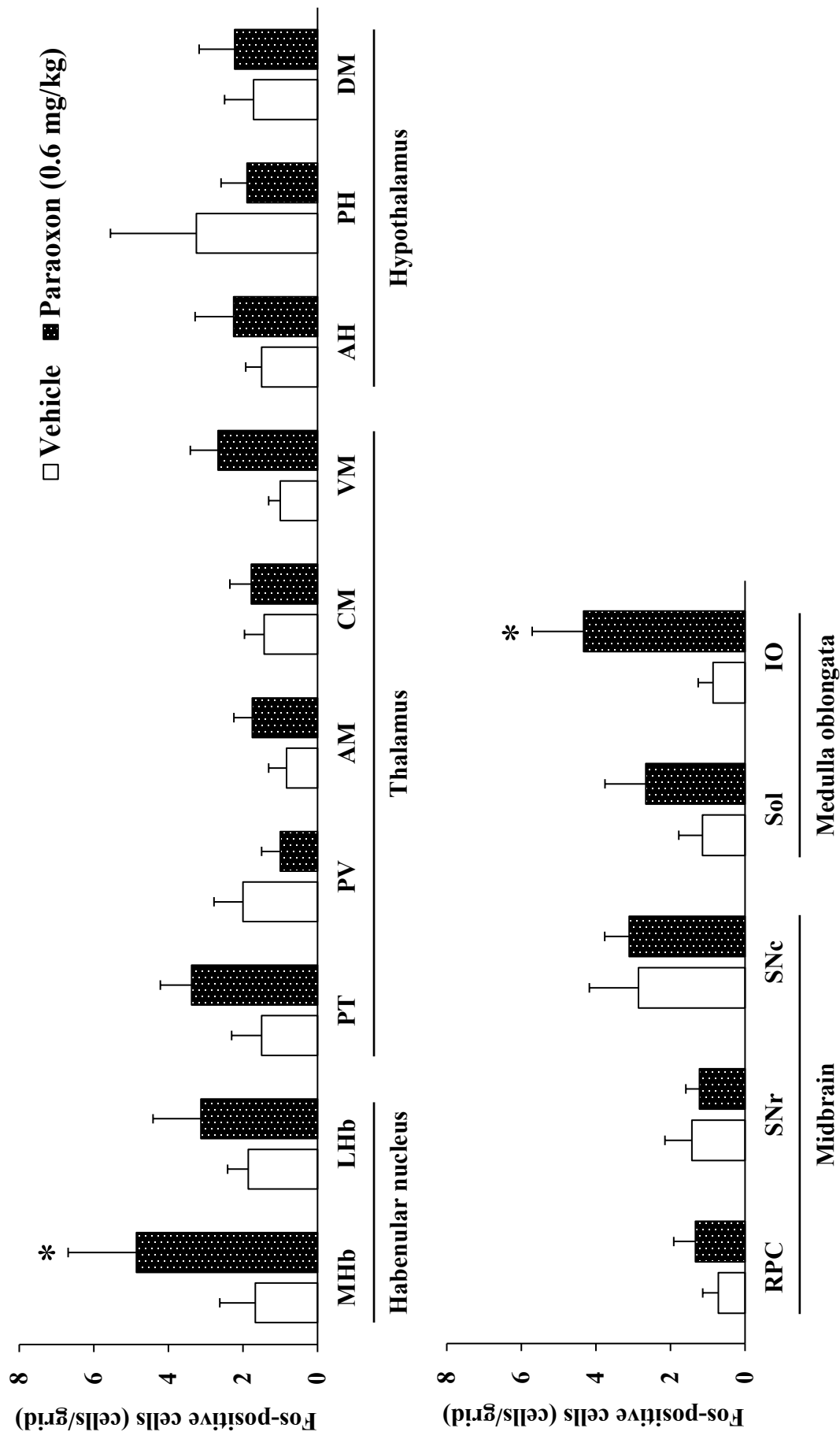
**Fig. 12 Fos expression analysis following paraoxon treatment in cortical brain regions of mice.**

Brains were removed 2 hr after the paraoxon (0.6 mg/kg, i.p.) or vehicle administration and subjected to Fos-immunochemical staining. Bar graphic represents Fos-IR-positive cell counting on cortical brain regions. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6-9 mice. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : Significantly different from the control animals treated with vehicle.



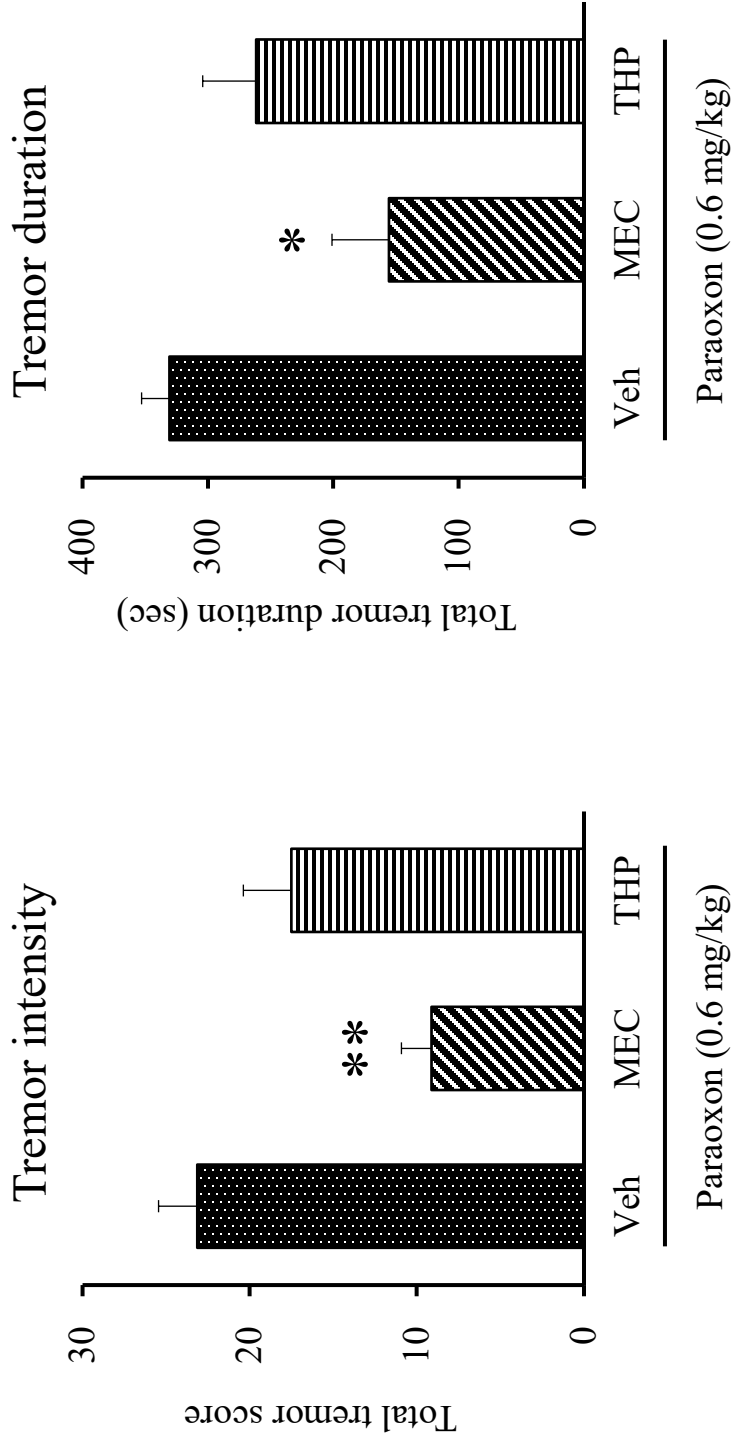
**Fig. 13 Fos expression analysis following paraoxon treatment in limbic and basal ganglia regions of mice.**

Brains were removed 2 hr after the paraoxon (0.6 mg/kg, i.p.) or vehicle administration and subjected to Fos-immunochemical staining. Bar graphic represents Fos-IR-positive cell counting on limbic and basal ganglia regions. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6-9 mice. \* $p < 0.05$ : Significantly different from the control animals treated with vehicle.



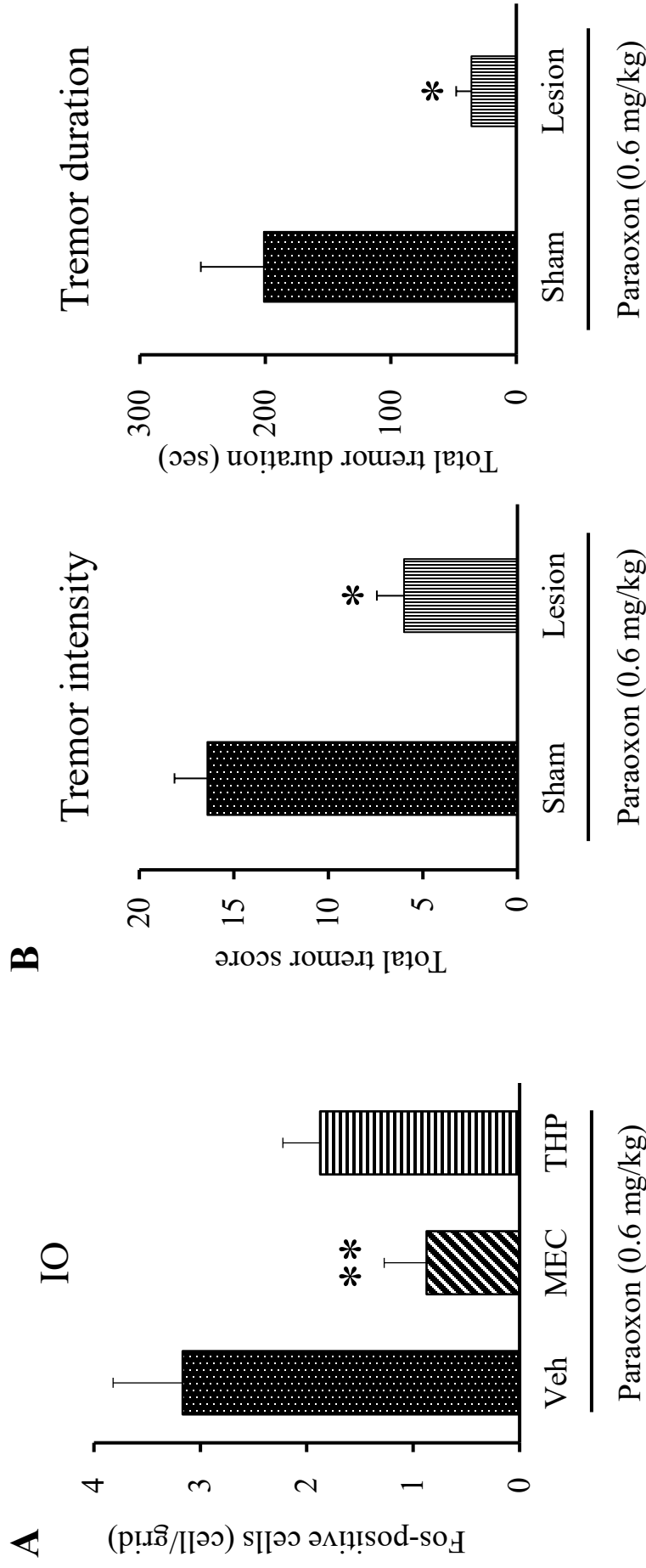
**Fig. 14 Fos expression analysis following paraoxon treatment in brainstem regions of mice.**

Brains were removed 2 hr after the paraoxon (0.6 mg/kg, i.p.) or vehicle administration and subjected to Fos-immunochemical staining. Bar graphic represents Fos-IR-positive cell counting on brainstem regions. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6-9 mice. \* $p < 0.05$ : Significantly different from the control animals treated with vehicle.



**Fig. 15 Effects of anticholinergic agents on the tremorigenic dose of paraoxon in mice.**

Mice were treated with mecamlamine (MEC, a non-selective nACh receptor antagonist) at 1 mg/kg, i.p., trihexyphenidyl (THP, a non-selective mACh receptor antagonist) at 10 mg/kg, i.p., or vehicle 15 min before paraoxon administration at the tremorigenic dose of 0.6 mg/kg, i.p. and evaluated for 11 min for total tremor score (intensity) and duration. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6-9 mice. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : Significantly different from the control animals treated with vehicle + paraoxon.



**Fig. 16 Involvement of IO in paraoxon-induced tremor.**

A: Effects of anticholinergic agents treatment on paraoxon-induced Fos expression in mice IO. Mice were pretreated with mecamlamine (MEC, 1 mg/kg, i.p.), trihexyphenidyl (THP, 10 mg/kg, i.p.), or vehicle 15 min before the paraoxon injection (0.6 mg/kg, i.p.). Brain sampling for Fos-immunostaining took place 2 hr after the paraoxon administration. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6-9 mice.  $**p < 0.01$ : Significantly different from the control animals treated with vehicle + paraoxon. B: Effect of electrical IO lesioning on paraoxon-induced tremor in rats. A direct current (1 mA) was delivered to the bilateral IO for 15 sec. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 5-6 rats.  $*p < 0.05$ : Significantly different from the control animals with sham operation.