

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11905

研究課題名(和文)アルツハイマー病モデルラットにおける口腔領域の痛覚異常の解明

研究課題名(英文)The effects of Alzheimer's disease on pain sensation in oral region

研究代表者

丹羽 均(Niwa, Hitoshi)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：30218250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)が痛覚に対してどのような影響を及ぼすかを評価するため、海馬損傷によるADモデルラットを作製し、検討を行った。

ADモデルラットでは、化学的刺激に対する反応性(疼痛関連行動)が減少し、痛覚鈍麻の可能性が示唆された。一方、機械刺激や温熱刺激に対する反応性には影響がなかった。また、ADモデルラットでは、末梢の感覚神経の活動性に影響はなかったが、中枢の一次中継核である三叉神経脊髄路核尾側亜核の化学刺激に対する反応性の低下が認められた。これらの結果から、ADモデルラットでは、中枢における痛覚伝導路に何らかの変化が生じ、反応性の低下(痛覚鈍麻)が引き起こされたと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで認知症患者の痛覚に関する研究はあまり行われていない。痛みは主観的な感覚であり、痛みを適切に表現できない認知症患者ではその評価が困難である。歯科臨床において、認知症患者は、わずかな痛みにも我慢できない場合や、歯科治療や口腔ケアそのものを拒絶するケースが多い。今回の研究結果から、認知症患者は痛みに対する反応が減弱している可能性が示された。したがって、認知症患者の歯科的介入への拒否行動は、認知症の中核症状やBPSDに起因するものと推測される。このことは認知症患者の口腔管理を行う上で有益な情報となると考えられる。

研究成果の概要(英文)： We investigated the effects of Alzheimer's disease (AD) on pain sensation using AD model rats produced by hippocampal injury. AD model rats had decreased responsiveness (pain related behaviors) to chemical stimuli, suggesting possible hypoalgesia. On the other hand, there was no effect on the responsiveness to mechanical or thermal stimuli. In AD model rats, although the activity of peripheral sensory nerves was not affected, a decrease in C-Fos expression in the trigeminal nucleus caudalis and the upper cervical spinal cord was shown after chemical stimulation to the upper lip. These results indicate that in AD model rats, some changes occur in the pain pathway in the central nervous system, resulting in decreased reactivity (hypoalgesia).

研究分野： 歯科麻酔学

キーワード： Alzheimer's disease pain sensation trigeminal nerve rat pain related behavior

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

認知症は高齢者にみられる主要な神経変性疾患で、症状としては、神経細胞の脱落に伴う記憶障害などの中核症状と、それに付随して、うつ症状、徘徊、暴力性などの BPSD (周辺症状) が発生する。認知症が進行すると、認知症患者は自ら口腔の不調を訴えることは少なくなり、一方、口腔ケアや歯科治療などの歯科的介入を強く拒否することが多くなる。これらの行動の変化が認知症に伴う中核症状や BPSD の現れとも解釈できるが、認知症患者では痛覚、そのものに変化が生じている可能性も否定できない。

認知症患者における痛覚変化についての過去の報告によると、疼痛閾値に変化はない、低下、上昇など様々である。しかし、その評価方法は一様ではなく、認知症患者の自己評価の信頼性が低いことや、病態や背景疾患が様々であることを考慮すると、十分な検討がなされているとは言い難い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アルツハイマー病モデルラット (AD ラット) を作製し、AD の痛覚への影響を検討することである。

3. 研究の方法

(1) AD モデルラットの作製および評価

AD モデルラットの作製:

AD モデルラットは Ahmed らの方法 (Ahmed T et al., Curcuminoids Enhance Memory in an Amyloid-Infused Rat Model of Alzheimer's Disease. *Neuroscience*. 2010 Sep 1; 169(3):1296-306.) に従い、A₁₋₄₀ およびイボテン酸を両側海馬へ注入することで作製した。7 週齢の雄性 SD 系ラットをペントバルビタール麻酔下 (50mg/kg, i.p.) に脳定位固定装置に固定し、頭蓋骨を露出させ、両側海馬内に A₁₋₄₀ およびイボテン酸を注入した (AD 群)。同様に両側海馬に生理食塩水を投与した群を Control 群とした。

AD モデルラットの評価:

モデル作製から 2 週間後に、行動実験による評価を行った。行動実験では認知機能の評価として、空間認知および学習能力を評価するモリスの水迷路、および短期記憶を評価する Y 字迷路試験を行った。

モリスの水迷路では、獲得試行としてプラットフォームを水面下 10 mm に設定し、手術日から 15 日後より 1 日 2 試行、7 日間連続して行い、平均逃避時間を測定した。次に保持試行として最終獲得試行の 24 時間後にプラットフォームを除去し、プラットフォームを取り除いた状態でラットを 90 秒間泳がせた時のプラットフォームが存在した領域の通過回数で記憶の保持能力を評価した。また運動能力について、90 秒間で泳いだ総運動距離および平均水泳速度から評価した。最後にプラットフォームをラットから見えるように水面上に引き上げた状態で試験を行い、視認能力の検討を行った。

Y 字迷路ではラットを Y 字迷路のいずれかアームの先端に置き、8 分間迷路内を自由に探索させ、進入したアームの回数をカウントし、連続して異なる 3 本のアームに進入した組み合わせの数 (交替行動数) を調べ、交替行動率 (%) を算出し、短期記憶として評価した。

行動実験が終了後、ラットの脳を灌流固定し、Nissl 染色にて神経細胞の脱落を確認した。

(2) AD モデルラットにおける痛覚への影響の評価

化学刺激に対する反応性:

化学刺激に対する反応性の評価を行うために、モデル作製から 3 週間後に上口唇、および足底でホルマリンテストを実施した。左側口唇および足底に化学刺激として 4% ホルムアルデヒド、または生理食塩水を 0.05ml 皮下注射し、その際に認められる疼痛関連行動を 60 分間観察した。口唇部へのホルマリンテストでは顔面をこする rubbing 回数、足底部では足をなめる licking 時間で評価した。また、口唇部に対しては 1% ホルムアルデヒドでも評価した。

機械的刺激に対する反応性:

機械的刺激に対する反応性を評価するために、フォンフライテストを上口唇または足底部で行った。フォンフライフィラメント (1、2、4、8、15、26、35、50g) を使用し、5 回中 2 回以上の逃避行動を誘発する最小の値を逃避閾値とした。テストは脳内への薬剤の投与前、投与から 14 日後、21 日後の計 3 回行った。

温熱刺激に対する反応性:

温熱刺激に対する反応性を評価するために、ホットプレートテストを行った。51°C に設定したホットプレート上にラットを放ち、後肢をなめる licking が生じるまでの逃避時間を測定した。テストは脳内への薬剤の投与前、投与から 14 日後、21 日後の計 3 回行った。

(3) 口腔領域に認められた痛覚異常のメカニズムの検討:

三叉神経節の変化の検討:

作製した AD モデルラットをペントバルビタール麻酔下で頭部を離断し、三叉神経節を摘出した。摘出した組織から分離した単細胞を使用し、パッチクランプ法を用いて活動電位の波形分析を行い、神経活動性を Control 群と比較した。

三叉神経脊髄路核の変化の検討:

ホルマリンテストの 2 時間後、ラットの脳をペントバルビタール深麻酔下に灌流固定し、60 μ m ほどの凍結連続横断脳切片を作製した後に、免疫組織学的手法を用い、三叉神経の一次中継核である三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) および上部頸髄での c-Fos 発現陽性細胞数を計測した。

4. 研究成果

(1) 空間認知および学習能力の評価

A₁₄₀ およびイボテン酸注入を両側海馬に行った AD 群では、生理食塩水を投与した Control 群と比較して、7 日間連続して行った獲得試行でのゴール到達時間に有意な差が認められ、AD モデルラットの空間認知および学習能力の低下が示された (Fig.1)。また、保持試行においては、ゴール通過回数に有意差は認められなかったものの (Fig.2A)、ゴール周囲に設定した Zone 滞在時間に有意な低下が認められ (Fig.2B)、AD モデルラットの記憶保持能力の低下が示された。

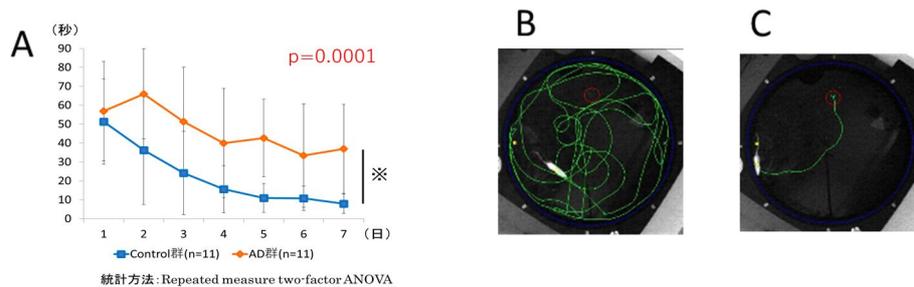


Fig.1 獲得試行の結果

A は獲得試行におけるゴール到達時間の推移 (mean ± SD)

B、C は 7 日目における tracking 像の代表例 (B: AD 群、C: Control 群)

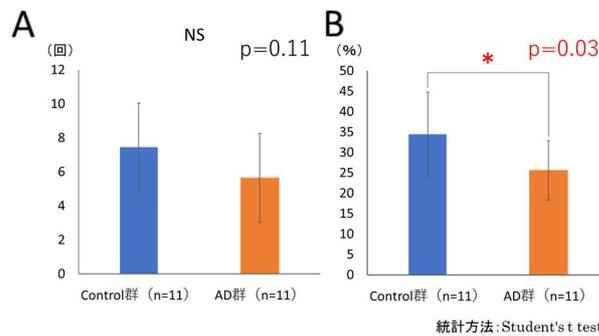


Fig.2 保持試行の結果

A はゴール通過回数の比較 (mean ± SD)、B は Zone 滞在時間の比較 (mean ± SD)

(2) 短期記憶の評価

Y 字迷路試験において両群間の交替行動率に有意差は認められず、短期記憶に差はないと考えられた (Fig.3)。

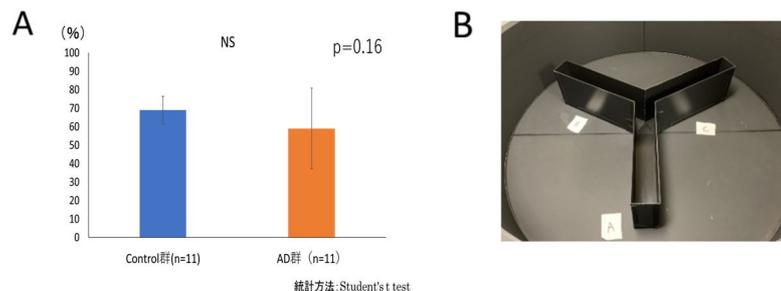


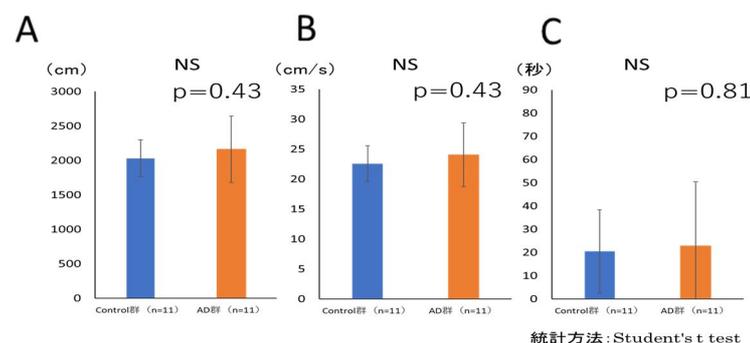
Fig.3 短期記憶の結果

A: Y 字迷路の結果 (mean ± SD)

B: 実験に用いた Y 字迷路

(3) 運動機能、視認能力の評価

保持試行の評価の際に 90 秒間で泳いだ総運動距離 (Fig.4A) および水泳速度 (Fig.4B) に差は認められず、運動能力に差はないとの結果となった。また視認能力にも差は認められなかった (Fig.4C)。



統計方法: Student's t test

Fig.4 A は総運動距離、B は平均水泳速度、C は視認能力の比較(mean ± SD)

(4) 海馬損傷の程度の検討

Control 群においても刺入点を中心に海馬の損傷が確認できたが、その損傷範囲は AD 群と比べ軽度であった (Fig.5A, B)。また海馬損傷の範囲を Image J を使用して測定したところ、両群に有意な差が認められた (Fig.5C)

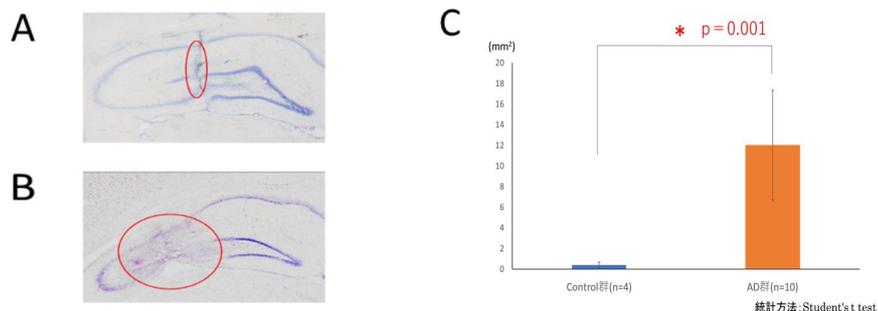


Fig.5 A 1-40 およびイボテン酸注入による海馬損傷
A、B は Nissl 染色による海馬像 (A:Control 群 B:AD 群)、C は損傷面積の比較(mean ± SD)

(5) ホルマリンテスト

左側上口唇部に 1%または 4%ホルムアルデヒドを注射すると、両群ともに 0-5 分の第 1 相と 10 分以降の第 2 相の 2 相性の疼痛関連行動が引き起こされた (Fig.6B, C)。また、Rubbing 回数を両群間で比較したところ、AD 群では control 群に比べ、ホルマリン刺激に対する有意な反応性の低下が認められた (Fig.6B, C)。

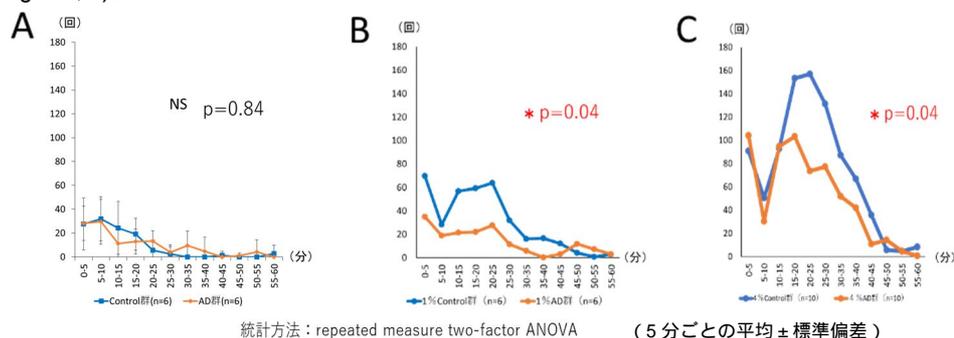


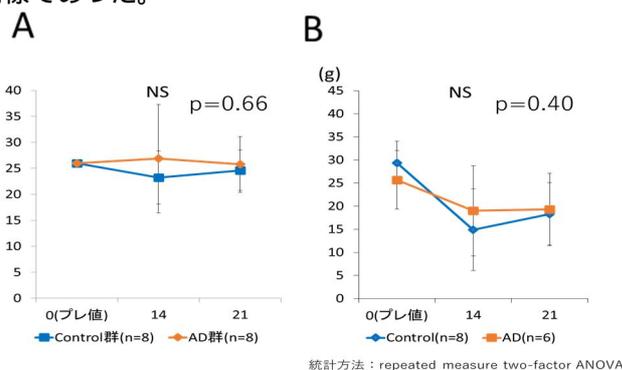
Fig.6 左側上口唇に対するホルマリンテストにおける疼痛関連行動の回数
A は生理食塩水、B は 1%ホルムアルデヒド、C は 4%ホルムアルデヒドを、それぞれ 0.05ml 左側上口唇に皮下注射した。

左側足底部に 4%ホルムアルデヒドを注射した場合も、両群ともに 2 相性の疼痛関連行動が引き起こされた。Licking 時間を両群比較したところ、AD 群のホルマリン刺激に対する有意な反応性の低下が認められた。

ホルマリンテストの Phase ごと (0-5 分、5-10 分、10-60 分) の結果を分析したところ、ホルマリンテストに対する反応性の低下は、主に第 2 相 (10-60 分) の低下に起因することが示された。

(6) フォンフライテスト

薬剤投与前、投与から 14 日後、21 日後のいずれの時点においても両群に有意な変化は認められず、機械的疼痛刺激に対する反応性に差はないとの結果となった (Fig.9)。また、この結果は足底部、口唇部いずれも同様であった。



統計方法: repeated measure two-factor ANOVA

Fig.7 フォンフライテストの結果 (A:口唇部 B:足底部)(平均 ± 標準偏差)

(7) ホットプレートテスト

薬剤投与前、投与から14日後、21日後のいずれの時点においても両群に有意な変化は認められず、温熱刺激に対する反応性に差はないとの結果となった (Fig.8)

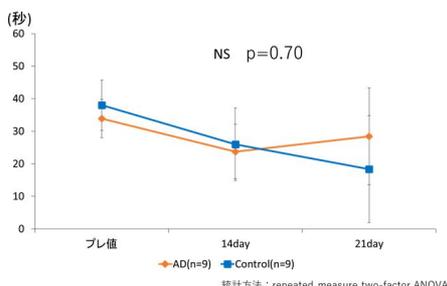


Fig.8 ホットプレートテストの結果 (平均 ± 標準偏差)

(8) 末梢神経における神経活動性の評価

三叉神経節神経細胞の Na⁺ Current に変化はなく神経興奮性に有意な差は認められなかった。活動電位の波形分析の結果、ADモデルラットでは、overshoot, amplitudeの低下(無処置群と比べ)が認められ、神経活動性の低下をもたらす傾向が示唆されたが、control群との差はなく、海馬損傷による明らかな神経活動性の変化はないとの結果となった。(Fig.9)

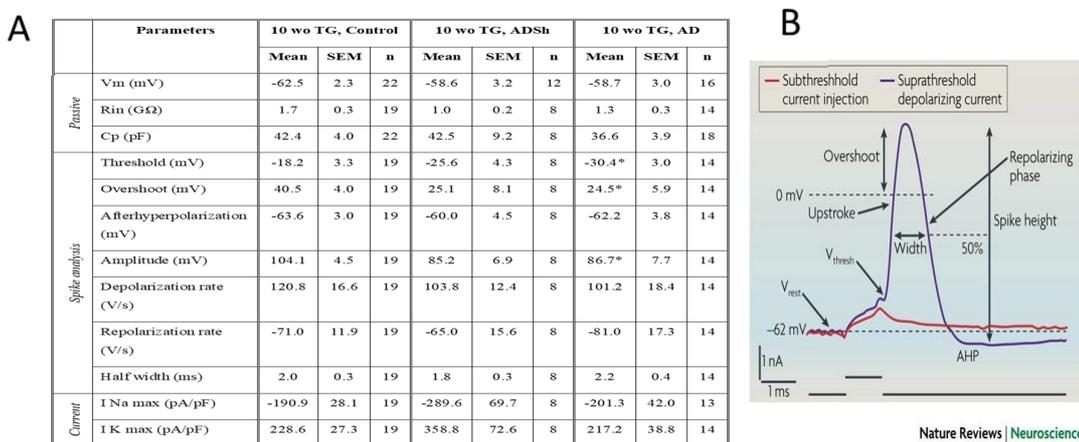


Fig.9 Aは patch clamp 法による三叉神経節神経細胞の活動電位波形分析 (A:左段が無処置群、中央が Control 群、右段が AD 群) Bは活動電位波形の例

(9) 三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) および上部頸髄における神経活動性の評価

ホルマリンテスト後の三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) および上部頸髄における c-Fos 発現陽性細胞数を比較したところ、AD 群で有意に少ない結果を示し (Fig.10)、行動実験と同様に反応性の低下を示唆する結果となった。

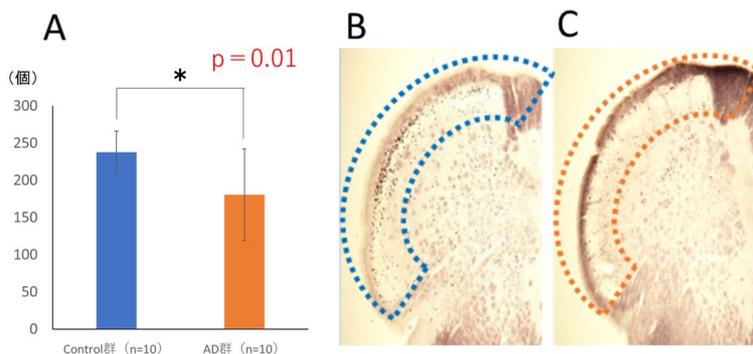


Fig.10 AはVcにおけるc-Fos発現陽性細胞数の比較(平均 ± 標準偏差) B,Cはホルマリン刺激側におけるVc代表像(B:Control群、C:AD群)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林正祐, 瀧邦高, 遠山緑, 小田若菜, 冠野千晴, 丹羽均
2. 発表標題 アルツハイマー病モデルラットにおける口腔領域の痛覚異常の解明
3. 学会等名 第 47回日本歯科麻酔学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	前川 博治 (Maegawa Hi roharu) (10711012)	大阪大学・歯学研究科・助教 (14401)	