The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ロテノン鼻腔内投与マウスにおける苦味感受性の変化の検討
Author(s)	尹, 東旭
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72244
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　尹　東旭　　）	
論文題名	ロテノン鼻腔内投与マウスにおける苦味感受性の変化の検討

［研究目的］

パーキンソン病 (PD) は、ドパミンの不足によって起こる運動障害のほか、様々な非運動障害を併発する進行性の全身疾患である。PDの非運動障害の1つである味覚障害は、健常者と比較して高頻度に発症している可能性が高く、PDの前駆症状としてPDの早期診断の一助となる可能性が示唆されている。PDでは5基本味の中で、特に、苦味に対する認知が低下することが報告されているが、PDにおける苦味に対する味覚障害の神経機構は不明である。したがって、PDにおける味覚障害の発生機序を明らかにするためには、味覚障害を呈するPDモデル動物の作製が必須である。

現在まで遺伝子変異や薬物投与による様々なPDモデル動物が開発されているが、農薬として使用されるロテノンを投与したPDモデル動物は、嗅覚障害や運動障害の発生、黒質や線条体ドパミンニューロンの変性など、ヒトPDと類似の病態を示すことが報告されている。そこで、本研究では、ロテノン鼻腔内投与マウスがPDの前駆症状として味覚障害を呈するモデルになりうる可能性を明らかにするため、マウスに低濃度のロテノンを鼻腔内投与して苦味感受性の変化を行動学的方法を用いて調べ、同時に中枢神経系に生じるTH陽性細胞の免疫組織学的変化を検討した。

［実験方法］

1.　鼻腔内薬物投与マウスの作製

実験動物には、20-25週齢の野生型C57BL/6J系マウスを用いた。イソフルランを用いて吸入麻酔を行ったマウスの右側鼻腔内に、ロテノン (0.35 mg/kg) を1日1回 (約20 µl) 1週間、ペリスタポンプおよびポリエチレン製マイクロチューブを用いて反復投与し、ロテノン鼻腔内投与マウス (ロテノン群) を作製した。一方、対照群として、マウス右側鼻腔内に1% DMSO を1日1回 (約20 µl) 1週間反復投与したDMSO鼻腔内投与マウス (Sham群) を作製した。

2.　行動実験

2-1. 嗅覚機能の評価

Y字形迷路装置を利用した匂いの忌避行動をもとに嗅覚機能を評価した。Y字形迷路装置は2つのショートアームと1つのロングアームからなる。蒸留水あるいは100% 酪酸 20 µlを浸透させた濾紙を一方のショートアーム末端外側に留置した後、ロングアーム末端へマウスを置いた。その後、4分間、マウスの行動を暗視下でビデオ撮影した。ビデオ解析から、マウス重心座標の全軌跡を求め、各ショートアームにおける滞在時間を調べた。滞在率 (%) [(匂い付き濾紙を置いたショートアームでの滞在時間）/ (2つのショートアームでの総滞在時間) × 100] を算出し、鼻腔内投与前後で比較した。また、滞在率の変化量 (蒸留水に対する滞在率 － 酪酸に対する滞在率) を求め、2群間で比較した。

2-2. 味覚機能の評価

1ビンリッキングテスト装置を用いたブリーフアクセステストによって味覚機能を評価した。23時間絶水させたマウスに、順に蒸留水を3回、7種類の濃度 (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 mM) のキニーネ溶液を低濃度から順番に提示し、最後に蒸留水を1回提示した。マウスの飲水開始から10秒間のリック数をカウントし、リック率 (%) [(各キニーネ濃度でのリック数 / 初めの蒸留水3回の平均リック数) × 100] を算出した。投与終了後7～9日目の平均リック率を求め、鼻腔内投与前後間の比較を行なった。さらに、平均リック率の変化量 (投与後のリック率 - 投与前のリック率) を求め、2群間で比較した。

3.　免疫組織化学実験

行動実験が終了した動物に、灌流固定を行い、抗tyrosine hydroxylase (TH) 抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。嗅球、吻側孤束核、黒質、腹側被蓋野におけるTH陽性細胞数の変化と島皮質におけるTH陽性細胞の神経線維が占める割合を定量的に評価し、2群間の比較を行った。

4.　統計解析

鼻腔内投与前後間および2群間の有意差検定には、two-way repeated measures factional ANOVAおよびtwo-way factional ANOVAをそれぞれ用いた。*post hoc test*には、Tukey-Kramer法を用いた。また、投与前後の体重の変化はpaired Student's t-testを行い、2群間の体重の変化および免疫組織化学実験のTH陽性細胞数及びTH陽性線維占有率の変化はunpaired Student's t-testを行った。有意水準はすべて$p < 0.05$とした。

［結果］

1.　体重の変化

Sham群およびロテノン群のいずれも鼻腔内投与7日目の体重 (Sham群: 30.4 ± 0.38 g, ロテノン群: 30.1 ± 0.50 g) は、鼻腔内投与前の体重 (Sham群: 30.2 ± 0.43 g, ロテノン群: 29.7 ± 0.53g) と比べて有意差を認めなかった。

2.　嗅覚機能の変化

ロテノン投与後の100% 酪酸に対する滞在率 (52 ± 4.1%) は、投与前の100% 酪酸に対する滞在率 (29 ± 2.3%) に比べて有意に上昇した ($p < 0.01$)。また、ロテノン投与後の滞在率の変化量 (-1.6 ± 4.1 %,) は、投与前の変化量 (18.7 ± 3.5 %) に比べて有意に減少した($p < 0.01$)。

3.　苦味感受性の変化

Sham群では、0.1~0.5 mMの範囲の濃度で平均リック率が低下する逆シグモイド様の曲線を描く濃度-リック率の関係を示した。しかし、DMSO投与前後で各濃度に対する平均リック率に有意差を認めなかった。一方、ロテノン群では、投与後に濃度-リック率の関係が右方へ移動し、0.1 mM、0.3 mM、0.5 mM、1.0 mM のキニーネ濃度に対する平均リック率が投与前の平均リック率に比べて有意に上昇した ($p < 0.01$)。また、0.3 mM、0.5 mM および1.0 mM のキニーネ濃度では平均リック率の変化量がロテノン群ではSham群に比べて有意に高かった ($p < 0.001$)。一方、テスト最後に提示した蒸留水のリック率は、鼻腔内投与前後で有意差を認めなかった。

4.　免疫組織化学

嗅球糸球体層のTH陽性細胞数は、Sham群 (2265 ± 94個) と比較してロテノン群 (1198 ± 100個) で有意に減少した ($p < 0.001$)。また、孤束核吻側部のTH陽性細胞数 (14.8 ± 1.5個) は、Sham群と比べてロテノン群(5.8 ± 0.8個)では有意に減少した ($p < 0.001$)。さらに、不全顆粒性島皮質におけるTH陽性線維の占有率は、 Sham群 (3.5 ± 0.1%) と比較して、ロテノン群 (2.3 ± 0.2%) で有意に減少した ($p < 0.01$)。しかし、黒質や腹側被蓋野のTH陽性細胞数に有意な差は認められなかった。

［まとめと考察］

低濃度のロテノンをマウスの鼻腔内に1週間投与すると、リック率が低下するキニーネの濃度の範囲は、投与前と比べて高い濃度範囲に移行した。また、これらの範囲より低濃度もしくは高濃度のキニーネに対する平均リック率には変化を認めなかった。したがって、低濃度のロテノン鼻腔内投与マウスでは、苦味感受性が低下することが明らかとなった。免疫組織学的には、黒質や腹側被蓋野のTH陽性細胞数に著明な変化を認めなかったが、島皮質におけるTH陽性線維の減少および孤束核吻側部のTH陽性細胞数の減少を認めた。また、本研究ではロテノン鼻腔内投与によって、先行研究と同様に、嗅覚障害を呈し、嗅球のTH陽性細胞数の減少を認めた。以上の結果から、本実験条件でロテノンを投与されたマウスは、黒質や腹側被蓋野でドパミン系の神経変性が生じる前の状態で、味覚障害を有すると考えられる。したがって、低濃度ロテノン鼻腔内投与マウスは、PD患者の味覚障害の神経機構を明らかにするうえで有用である可能性が示唆された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（尹　東　旭　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	加 藤 隆 史
	副 査　教 授	脇 坂 聡
	副 査　准教授	工 藤 千 穂
	副 査　講 師	古 田 貴 寛

論文審査の結果の要旨

本研究では、低濃度のロテノンを鼻腔内に連続投与するパーキンソン病 (PD) モデルマウスが、PD 前駆症状として発生する味覚障害の実験モデルとなりうるかを調べた。その結果、このモデルマウスでは、中脳のドパミン産生細胞の著明な消失がない状態で苦味感受性の低下を生じることが明らかとなった。

本研究の結果は、ロテノン鼻腔内投与マウスが PD 患者の味覚障害の神経機構の解明に有用であることを示す重要な知見と考えられる。よって、本論文は、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。