



Title	アルツハイマー型認知症が口腔領域の痛覚へ及ぼす影響の検討
Author(s)	林, 正祐
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82155
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

アルツハイマー型認知症が口腔領域の痛覚へ及ぼす影響の検討

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（歯科麻酔学教室）

林 正祐

緒言

認知症は高齢者に認められる主要な疾患で、精神障害の診断と統計マニュアル第 5 版 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition ; DSM-5) によると、神経認知領域で複雑性注意、遂行機能、学習および記憶、言語、知覚-運動、社会的認知のうち、1 つ以上が障害され、障害によって日常の社会生活や対人関係に支障をきたし、他の精神疾患が除外されれば認知症と診断される (American Psychiatric Association, 2013)。症状としては、失認、失行、記憶障害などの中核症状と、それに付随して認められる、うつ症状、徘徊、暴力性などの多様な行動・心理症状 (Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia ; BPSD) がある (Kazui H et al., 2016)。

認知症には、様々な原因疾患や病態が含まれ、アルツハイマー型認知症 (AD)、脳血管性認知症、Levy 小体型認知症などに分類される (World Health Organization, 1993)。AD は認知症の病型として最多を占め、わが国においても認知症のおよそ 6 割を占めている。AD 患者の脳内では、神経細胞死に伴う組織の萎縮に加えて、神経病理学的変化として、神経原線維変化や老人斑と呼ばれるアミロイド β ($A\beta$) の蓄積が認められ、これら病理学的変化は、海馬を初発として広がっていく (Braak H et al., 1991)。AD の病因として、アセチルコリン神経の障害とするコリン仮説 (Kadir A et al., 2006; Nordberg A, 2001)、過剰なグルタミン酸受容体の発現によるグルタミン酸仮説 (Masliah E et al., 1996)、 $A\beta$ の沈着による $A\beta$ 仮説 (Hardy J, 2006; Mattson MP, 2004) などが神経細胞の脱落を引き起こす主な原因と考えられているが、いまだに解明されていない。

認知症患者の歯科診療における問題点としては、認知症が進行すると自身の口腔衛生の管理能力が低下し (Zenthöfer A et al., 2014)、齲蝕や歯周病の罹患率が高くなる (Wu B et al., 2008., Lee KH et al., 2013) が、自ら口腔の不調を訴えることが少なくなり、疾患の発見の遅れや重症化を招きやすい。一方、治療や口腔ケアなどの介入を強く拒否し、場合によ

っては攻撃的行動に出ることも多い（日本神経学会, 2017, Friedlander AH et al., 1987）。このような認知症患者の臨床上の問題点は、認知症に伴う中核症状や BPSD の現れとも解釈できるが、脳内の痛覚認知機能に変調が生じている可能性も否定できない。つまり、症状の訴えの減少は痛覚鈍麻の結果であり、治療やケアなどへの抵抗は、口腔領域の痛覚過敏の結果とも考えられる。

認知症患者における痛覚に関する過去の報告によると、痛覚閾値には変化がない（Benedetti F et al., 1999; Benedetti F et al., 2004; Lints-Martindale AC et al., 2007; Jensen-Dahm C et al., 2014）、あるいは、疼痛閾値が上昇している（Benedetti F et al., 1999; Cole LJ et al., 2006, Cole LJ et al., 2011）など、痛覚鈍麻を示唆する報告が多い。しかし、一方では、痛覚過敏を示唆する報告も散見される（Kunz M et al., 2007, Kunz M et al., 2009）。このように、臨床研究における AD 患者の痛覚に関して見解は一致していない。その理由として、評価方法が大きく異なっていること、認知症患者の自己評価の信憑性が低いこと（Defrin R et al., 2015）、病態や背景疾患が様々であることが挙げられる。fMRI を用いて、疼痛刺激時の脳の活動性を評価する方法や（Cole LJ et al., 2006）、表情から痛みを客観的に評価しようとする試みもされているが（Kunz M et al., 2007）、十分な検討がなされているとは言い難い。

この問題を解決するために、背景や病態を統一した認知症モデル動物を用い、痛覚への影響を検討することは重要である。しかし、これまで、認知症モデル動物として痛覚の検討を行った報告はない。そこで、本研究では、AD モデル動物を作製して、痛覚の検討を行うこととした。

AD モデル動物には、遺伝子改変モデル（Hsiao K et al., 1996）、老化モデル（Takeda T et al., 1981; Nakayama T et al., 1996, Davies HA et al., 2003）、神経障害モデル（Nabeshima T et al., 1994; Morimoto K et al., 1998; Nakamura S et al., 2006; Ahemed T et al., 2010; Zhang J et al., 2013）があるが、いずれも完全には AD の病態を再現できていない。本研究では、

ADの初発部位である海馬に着目し、神経障害モデルの一つである、海馬障害ADモデルラットを用いて研究を行った。

海馬の機能は記憶形成が中心であり、ADの発症に強く関与していることは明らかであるが (Scoville WB et al., 1957)、痛みの認知にも関与することが報告されている.. Ploghausらは、視覚信号の後に強い痛み刺激を与えるといった条件付けを行うと、痛みに対する不安が誘発され、不安が大きくなるほど、感じる痛みが増強されることを明らかにした。そして、嗅内皮質のような海馬周囲組織が、不安関連の痛みの増強に関与していることを、fMRIを用いて証明した (Ploghaus A et al., 2001)。また、一方で、海馬が痛みの制御を担うとする報告もある (Vachon-Preseu E et al., 2013)。Vachon-Preseuらは、慢性腰痛患者における、海馬体積と疼痛強度の関係を比較しており、海馬の体積が小さいほど、ストレスホルモンであるコルチゾールの値が増加し、結果、疼痛強度が増大していることを報告した。

このように、結果は異なるが、海馬と痛覚の関連についての報告が散見される。そのため、海馬障害ADモデルラットにおいても、痛覚に何らかの変調が生じている可能性が考えられる。

まず、研究Iでは、両側海馬への薬物投与により、ADモデルラットの作製を行い、AD類似の記憶障害が認められることを確認した。次に、研究IIでは、作製したADモデルラットに疼痛刺激を与えることで、その反応性を評価した。ラットに用いられる疼痛試験には様々な方法があり、刺激の種類としては、機械刺激、温熱・冷刺激、化学刺激などに分類されているが (Barrot M.,2012)、本研究では、機械刺激として von Frey テストを、温熱刺激として hot plate テストを、化学刺激として formalin テストを行った。最後に、研究IIIでは、海馬と口腔領域の痛覚伝導との関連性を明らかにするために、ADモデルラットの痛覚伝導に関する部位の神経活動性について、免疫組織学的手法を用いて検討を行った。

試料ならびに方法

本研究は実験動物に対する苦痛および使用動物数を最小限に留めるよう努力した。当研究計画は NIH の実験動物の飼育と取扱いのガイドラインに沿った倫理的なものであり、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の審査を受け承認を得た（動歯-29-015-0）。

研究 I. AD モデルラットの作製および評価

1. 使用動物

6~7 週齢の雄性 SD 系ラット（日本動物株式会社，大阪，日本）180~240g を使用した。実験動物は，室温 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，12 時間毎の明暗サイクル下で 1 ケージ最大 4 匹までで飼育され，水と固形飼料は自由摂食させた。

2. 薬物

アミロイド β タンパクフラグメント 1-40 ($A\beta$ 1-40) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)，イボテン酸 (Sigma-Aldrich)，塩酸(HCl) (Sigma-Aldrich)，生理食塩水 (saline) (0.9% w/v, 大塚製薬株式会社，東京，日本)，リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を使用した。

薬物の溶解は以下のように行った。 $A\beta$ 1-40 を $2 \mu\text{M}$ HCl/Saline に $7.14 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で，イボテン酸は PBS に $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で溶解した。実験ではさらに $A\beta$ 1-40 溶液およびイボテン酸溶液を等量混和して，注入薬として使用した。

3. AD モデルラットの作製

動物をランダムに 2 群に分け，AD モデルラットは Ahmed らの方法 (Ahmed T et al., 2010) に従い，上記の方法で調整した注入薬を両側海馬へ注入することで作製した。ラットをペントバルビタール（ソムノペンチル®，共立製薬株式会社，東京，日本）50 mg/kg の腹腔内投与によって全身麻酔を行い，頭頂部を剃毛後，1/100,000 アドレナリン含有 1% リドカイ

ン (Aspen Japan Co. Ltd, 東京, 日本) を用いて局所麻酔を行った。ラットを脳定位固定装置 (NARISHIGE, 東京, 日本) に固定し, 頭頂部をメスで切開して頭蓋骨を露出させ, ブレグマ縫合点から後方に 4.2 mm, 左右側にそれぞれ 3.0 mm にラウンドバーで 2 ヶ所穴をあけた。脳表から 3.6 mm の位置に 2.0 μ l ずつ注入薬を持続注入した。注入はハミルトンシリンジとマイクロシリンジポンプ (LMS 株式会社, 東京, 日本) を用いて 15 μ l/h の速度で行った。このようにして作製したラットを AD 群とし, 以降の実験に使用した。同様に saline を投与したラットを sham 群とした。

4. 空間認知・学習能力, 記憶保持能力の評価

1) 実験装置

本実験では深さ 45 cm, 直径 150 cm のモリス水迷路 (株式会社ニューロサイエンス, 東京, 日本) (Figure 1A) を使用した。ゴールとなるプラットフォームは直径 12 cm であった。動物への負荷を考慮し, 水温は 20 °C 以上になるように調整した。実験中のラットの行動は, 装置上方に設置された CCD カメラ (株式会社ニューロサイエンス, 東京, 日本) にて撮影し, 実験中の行動を専用コンピューター上で確認するとともに, 専用ソフト (WaterMaze5 AM1-WM05, 株式会社ニューロサイエンス, 東京, 日本) により分析した。また, 実験期間を通して装置を同じ場所に固定し, 円形・長方形など, 形態の異なる目印を装置周囲の同一箇所に配置した。

2) 評価方法

モデル作製の 14 日後から, 獲得試行を開始した。獲得試行では, スタートとゴールの位置は固定し, ゴールは水面下 10 mm とラットからは見えない位置に設定した上で試験を行った。獲得試行の最大計測時間は 90 秒で, ゴールに到達した後は, 20 秒間ゴールの位置を記憶させた。90 秒でゴールに到達しなかった場合は, 強制的にプラットフォーム上へ移動させ, 20 秒間ゴールの位置を記憶させた。これを 1 日 2 試行, 7 日間連続して実験を行い, ゴールに到達するまでの 1 日の平均逃避時間から sham 群と AD 群間の空間認知・学習能力

を比較した。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取り除いた状態で試験を行い、ラットを90秒間泳がせた。この際、プラットフォームがあった位置周囲に設定したゾーン (Figure 1B) 内の滞在時間 (%) から、sham 群と AD 群間の記憶保持能力を評価した。また、保持試行では、運動能力を90秒で泳いだ平均水泳速度と総運動距離から評価した。最後に、保持試行終了後に、視認能力比較試験として、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、試験を行い、ゴールに達するまでの時間から、sham 群と AD 群間の視認能力の検討を行った。なお、有意差検定には Repeated measures two-factor ANOVA 検定または Student's t-test を用い、危険率5%未満を有意差ありと判定した。

5. 海馬の損傷程度の評価

1) 連続横断凍結切片の作製

すべての行動実験が終了した後、ラットをペントバルビタール腹腔内過量投与下に 150 ml の 0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) で瀉血し、その後 500 ml の 4% パラホルムアルデヒド (和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) を含む PBS を用いて灌流固定を行った。灌流固定終了後に脳を取り出し、4°C の同固定液で 1 晩浸漬して固定した後、30% スクロースを含む PBS (4°C) に移して浸漬させた。その後、凍結ミクロトーム (大和光機工業株式会社, 埼玉, 日本) を用いて、海馬を含む部位 (厚さ 60 μm) の連続横断凍結切片を作製した。

2) 免疫組織学的染色

通法にしたがい、Nissl 染色を行った。クレシルバイオレット (和光純薬工業) を純水に溶解して、0.1% クレシルバイオレット溶液を作製した。染色液 30 ml につき 10% 酢酸を 5 滴の割合で加えた。切片を前処理として十分に水洗した後に、染色液に 10 分間浸漬し、エタノール (70%, 80%, 95%, 100%) を使用して分別・脱水した。封入操作を行った後、sham 群と AD 群の海馬損傷程度を光学顕微鏡 (OLYMPUS) により観察した。

研究Ⅱ. AD モデルラットにおける各種刺激に対する反応性の評価

1. 化学刺激に対する反応性の評価 (formalin テスト)

モデル作製から 21 日後に formalin テストを行い, sham 群と AD 群間の化学刺激に対する反応性の比較を行った (柴田ら, 1986; Takeda R et al., 2005; Luccarini P et al., 2006; Maegawa H et al., 2015; Cazanga V et al., 2018). 実験は 9 時から 17 時までの間に行った. ラットをプレキシガラスの観察箱 (25 x 25 x 25 cm) に入れ, 1 時間放置して順応させた後, ラットの左側上口唇部, または足底部に, 50 μ l の 4%ホルムアルデヒド生理食塩水溶液 (formalin)あるいは生理食塩水 (saline) を皮下注射した. 皮下注射には 26 G 針に接続した 1ml シリンジを用いた. ビデオカメラで皮下注射後のラットの行動を 60 分間撮影し, 疼痛関連行動 (pain related behavior ; PRB) として口唇部では顔面をこする Rubbing 回数を, 足底部では足をなめる Licking 時間を皮下注射から 5 分ごとに計数し, さらに, 5 分後までの第 1 相と, 5~10 分後までの PRB 休止時間, 10 分以降の第 2 相に分けて, 時間帯ごとの比較を行った. また, 口唇刺激では 1% formalin での刺激も行った. なお, 有意差判定には Student's t-test を用い, 危険率 5%未満を有意差ありと判定した.

2. 機械的刺激に対する反応性の評価 (von Frey テスト)

上口唇と足底部に対して von Frey テストにより機械的刺激に対する反応性を評価した. von Frey フィラメント (酒井医療株式会社, 東京, 日本) を使用し, 口唇に対する刺激では, 顔面を引っ込める Head-withdrawal を, 足底に対する刺激では, 足を上げる Paw-withdrawal を逃避行動に設定し, 5 回の刺激のうち 3 回以上の逃避行動が生じた最小の値を逃避閾値として, sham 群と AD 群間の反応性を比較した (Nomura H et al., 2002; Suzuki I et al., 2013). テストは海馬への薬剤投与前日, 投与から 14 日後, 21 日後の計 3 回行った. なお, 有意差検定には Repeated measures two-factor ANOVA 検定または Student's t-test を用い, 危険率 5%未満を有意差ありと判定した.

3. 温熱刺激に対する反応性の評価 (hot plate テスト)

実験には直径 30 cm の正方形のプレート(日伸理化, 埼玉, 日本)を使用した。プレートの温度を 51°C に設定し, プレキシガラスの観察箱 (25 x 25 x 25 cm) で囲いをしたのちに, ラットを放ち, 後肢をなめる Paw-licking を逃避行動に設定し, 逃避行動が生じるまでの時間を測定し, sham 群と AD 群間の温熱刺激に対する反応性を比較した(Elmer G.I et al., 1998; Yamamoto T et al., 2002; Gunn A et al., 2011)。観察時間は組織の損傷を防ぐために最大 60 秒に設定し, 逃避行動が生じるとすぐに, または 60 秒以内に逃避行動が生じなかった場合, ラットをプレートから取り除いた。テストは海馬への薬剤投与前日, 投与から 14 日後, 21 日後の計 3 回行った。なお, 有意差検定には Repeated measures two-factor ANOVA 検定または Student's t-test を用い, 危険率 5% 未満を有意差ありと判定した。

研究Ⅲ. 海馬損傷に伴う口腔領域の痛覚伝導路への影響についての検討

1. 三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) における神経活動性の評価

1) 灌流固定, 連続横断凍結切片の作製

研究Ⅱ-1 で 1% formalin あるいは 4% formalin 刺激を行ったラットでは, formalin 刺激からそれぞれ 2 時間後に, ラットをペントバルビタール腹腔内過量投与下に 150 ml の 0.01 M リン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH 7.4) で瀉血し, その後 500 ml の 4%パラホルムアルデヒド(和光純薬工業)を含む PBS を用いて灌流固定を行った。灌流固定終了後に脳を取り出し, 4°C の固定液で 1 晩浸漬した後, 30%スクロースを含む PBS (4°C) に移して浸漬させた。その後, 凍結マイクロトーム(大和光機工業株式会社, 埼玉, 日本)を用いて, 三叉神経脊髄路核尾側亜核(trigeminal spinal subnucleus caudalis; Vc)を含む部位(厚さ 60 μ m)の連続横断凍結切片を作製した。

2) 免疫組織学的染色

Vc 表層(I/II層)における化学刺激に対する痛覚過敏性を検討するために, Vc を対象

に神経細胞活動性の指標である c-Fos タンパクに対して、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (avidin - biotin-peroxidase complex, ABC)を用いる ABC 法による DAB 染色を行った。まず、切片を 0.3%過酸化水素水含有メタノール溶液に 20 分間反応させて内因性ペルオキシダーゼを不活性化した後、PBS で洗浄してからブロッキング液として 1%正常ウマ血清 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を作製し、30 分処理した。ブロッキング液に 1%正常ヤギ血清 (Vector Laboratories)、一次抗体にウサギ抗 c-Fos 抗体 (1:6400, Cell Signaling Technology, MA, USA)、二次抗体としてビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories) を使用した。なお、抗体の特異性は、一次抗体による処理を行う際に、一次抗体と同じ動物種の正常血清を加えた場合や、一次抗体を加えない場合には標識が陰性であることにより確認した。光学顕微鏡 (OLYMPUS) で観察を行い、obex から尾側 2160 μm までを 360 μm 間隔に 5 枚抽出し、sham 群、AD 群間における Vc の表層部 (I / II 層) に発現した c-Fos 陽性細胞数の平均値を計測し、比較した (Abe T et al., 2005; Maegawa H et al., 2015)。なお、神経核の位置に関しては、Rat brain atlas (Paxinos and Watson, 2007) を参考にし、有意差検定には Student's t-test を用い、危険率 5%未満を有意差ありと判定した。

3. 中脳水道周囲灰白質 (PAG) における神経活動性の評価

研究 II-1 で 1% formalin 刺激を行ったラットでは、Vc 表層での神経活動性の評価に加えて、過去の報告 (Ikeda H et al., 2014; Borysovykh Bogdanov V et al., 2015; Maegawa H et al., 2015) を参考にし、中脳水道周囲灰白質腹外側部 (ventrolateral periaqueductal grey : vlPAG) を対象に、c-Fos タンパクに対する免疫組織学的染色を行った。灌流固定および染色方法については、研究 III-1, 2 と同様の手法を用いた。Bregma 縫合点から後方に 6.5 mm~8.0 mm の間で、AD 群および対照群それぞれ 6 枚を抽出し、光学顕微鏡 (OLYMPUS) で観察を行い、vlPAG に発現した c-Fos 陽性細胞数の平均値を計測し、比較した (Maegawa H et al., 2015)。なお、神経核の位置に関しては Rat brain atlas (Paxinos and Watson, 2007)

を参考にし、有意差検定には Student's t-test を用い、危険率 5%未満を有意差ありと判定した。

結果

I. AD モデルラットの作製および評価

1. 空間認知・学習能力, 記憶保持能力の評価

A β 1-40 およびイボテン酸を両側海馬に注入した AD 群では, saline を投与した sham 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・学習能力の低下が示された (Figure 2A,B,C). また, 保持試行においては, ゴール周囲に設定したゾーン滞在時間に有意な低下が認められ, AD モデルラットの記憶保持能力の低下が示された (Figure 3A,B,C).

2. 運動能力, 視認能力の評価

モリス水迷路試験の保持試行時に 90 秒間で泳いだ水泳速度 (Figure 4A) および総運動距離 (Figure 4B) に差は認められず, また視認能力比較試験でも差は認められなかった (Figure 4C). 以上の結果から, AD 群と sham 群で運動能力と視認能力に差はないとの結果となった.

3. 海馬損傷の検討

sham 群においては, 刺入点を中心に海馬損傷が生じたのみで, その損傷範囲は軽度であった (Figure 5A). 一方, AD 群では広範囲の損傷を確認できた (Figure 5B).

II. AD モデルラットにおける各種刺激に対する反応性の評価

1. 化学刺激に対する反応性の評価 (formalin テスト)

左側上口唇部に対する試験では, saline 刺激では刺激直後を除くと, PRB (Face Rubbing) はほとんど認められなかった (Figure 6A). しかし, 1% formalin 刺激と 4% formalin 刺激で

は両群ともに、0-5分と10-60分の2相性にPRBが引き起こされた(Figure 6B,C). PRBの回数を両群間で比較したところ、4% formalin 刺激後20-25分では、sham群で 148.2 ± 65 、AD群で 68.7 ± 57.8 、また、4% formalin 刺激後25-30分では、sham群で 126 ± 63.6 、AD群で 72.6 ± 44.2 と、AD群ではformalin刺激に対する反応性の有意な低下が認められ、ADモデルラットの痛覚鈍麻が示唆された(Figure 6C). さらに時間帯ごと(0-5分, 5-10分, 10-60分)に結果を分析したところ、10-60分の第2相で、1% formalin 刺激では、AD群で 113.8 ± 55.94 、sham群で 264.3 ± 153 、4% formalin 刺激では、sham群で 695 ± 249.1 、AD群で 435.4 ± 264.8 と、いずれもAD群ではPRB回数が減少していた(Figure 7A,B). この結果から、AD群のformalin刺激に対する反応性の低下は、主に第2相(10-60分)における減少が原因であることが示された.

左側足底部に対しても、saline刺激ではPRB(Pow Licking)はほとんど認められなかったが(Figure 8A), 4% formalin 刺激では両群ともに0-5分の第1相と10-60分の第2相の2相性にPRBが引き起こされた(Figure 8B). また、PRB時間を両群間で比較したところ、5分ごとの比較では有意差は認められなかった(Figure 8B)が、時間帯ごと(0-5分, 5-10分, 10-60分)に結果を分析したところ、第2相(10-60分)において、sham群では 660 ± 252.5 、AD群で 333.9 ± 169.7 と、AD群での有意な反応性の低下が示された(Figure 9).

2. 機械的刺激に対する反応性の評価 (von Frey テスト)

上口唇部と足底部に対する von Frey テストにおいて、海馬への薬剤投与前日、投与から14日後、21日後のいずれの時点においても、sham群とAD群との間に有意な変化は認められなかった(Figure 10A,B). 機械的刺激に対する反応性に影響は認められなかった.

3. 温熱刺激に対する反応性の評価 (hot plate テスト)

海馬への薬剤投与前日、投与から14日後、21日後のいずれの時点においても、両群ともに有意な変化は認められなかった(Figure 11). 温熱刺激に対する反応性に影響は認められなかった.

Ⅲ. 海馬損傷に伴う口腔領域の痛覚伝導路への影響についての検討

1. 三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)における神経活動性の評価

formalin テスト後は、1% formalin 刺激、4% formalin 刺激、いずれにおいても刺激側の Vc 表層(I/II層)において、sham 群、AD 群ともに c-Fos タンパクの発現が認められていた。obex から 1440 μ m 尾側を代表像として示した (Figure 12A,C)。さらに、c-Fos 発現陽性細胞数を比較したところ、1% formalin 刺激では、sham 群で 115.2 ± 39.1 、AD 群で 61.2 ± 42.8 (Figure 12B)、また、4% formalin 刺激では、sham 群で 237.5 ± 28.6 、AD 群で 180.4 ± 61.7 (Figure 12D)と、AD 群では sham 群と比較して、c-Fos 発現陽性細胞数が有意に減少しており、行動実験と同様に痛覚鈍麻を示唆する結果となった。なお、1% formalin 刺激、4% formalin 刺激いずれにおいても同様の変化が認められたため、刺激の強度による差はないとの結果となった。

2. 中脳水道周囲灰白質(PAG)における神経活動性の評価

1% formalin 刺激後は、sham 群、AD 群いずれにおいても、vlPAG では、刺激側(ipsilateral)、非刺激側(contralateral)ともに c-Fos タンパクの発現が認められていた。Bregma 縫合点から後方 7.92 mm を代表像として示した (Figure 13A,B)。陽性細胞数を両群比較したが、刺激側(ipsilateral)、非刺激側(contralateral)に関わらず、両群間に有意な差は認められなかった (Figure 13C)。

考察

I. AD モデルラットの作製およびその妥当性の評価

本研究では過去の報告 (Ahmed T et al., 2010) に基づき, $A\beta$ 1-40, およびイボテン酸を両側海馬へ注入することにより, AD モデルラットを作製した. いずれの物質も神経毒性を持ち, 神経細胞の損傷を引き起こすが, $A\beta$ とイボテン酸を併用することで, 単独使用よりも顕著な神経細胞損傷が生じ, 相乗効果が得られる (Morimoto K et al., 1998). 本研究でも, 海馬の著しい損傷が組織学的に観察された.

動物モデルにおける記憶・学習能力を評価する指標としては, 多くの方法が報告されている (田熊ら, 2007; Webster S.J et al., 2014). 中でも, モリス水迷路試験は, 海馬依存的な記憶能力が評価でき (Morris R.G.M et al., 1986), 認知症動物モデルの行動評価では広く用いられている (Nabeshima T et al., 1994; Hsiao K et al., 1996; Nakamura S et al., 2006; Ahemed T et al., 2010; Zhang J et al., 2013). 本研究では, モリス水迷路試験において, AD 群ではゴール到達時間の延長とゴール周囲ゾーン滞在時間の短縮が示され, 空間認知・学習能力, および記憶保持能力の低下が認められた. これらの結果は, 過去の報告 (Ahemed T et al., 2010) とも一致する. したがって, 本研究で作製したモデルラットを海馬損傷 AD ラットとして使用することの妥当性が確認された.

II. AD モデルラットにおける各種刺激に対する反応性の評価

上口唇部, および足底部への formalin テストにより, AD ラットは sham 群と比較して PRB の減少が観察され, formalin による化学刺激への反応性の低下が示された. この変化は, 上口唇部と足底部で同様の変化が認められたことから, 刺激部位による差はないことが示された. 一方で, von Frey フィラメントによる機械的刺激や hot plate テストでの温熱刺激に対する反応性には両群に差異は認められなかった. この違いは, 加えられた刺激の

種類、強度、持続時間に関係すると考えられる。von Frey フィラメントによる刺激は、機械的非侵害刺激であり、刺激強度は弱く、持続性もない。von Frey テストは、本来、神経障害性疼痛モデルにおいて、皮膚への非侵害刺激に対するアロディニアの検出に用いられる検査である (Suzuki I et al., 2013)。hot plate テストではプレートの温度は 51°C に設定しており、熱性刺激としては十分な強度を持つが、その曝露時間は熱による組織の損傷を防ぐため最大で 60 秒までとされており、持続性の侵害刺激とはならない。

一方、formalin 注射は炎症性の強い刺激強度を持つうえに、その痛みは持続する (Raboisson et al., 2006)。本研究でも、上口唇への 1% formalin、および 4% formalin 注射により 60 分間にわたり PRB が観察され、ラットは長時間、疼痛性侵害刺激に曝されている。formalin テストでは、2 相性の PRB が認められることが示されており (Raboisson P et al., 2006; Luccarini P et al., 2006)、本研究では、第 1 相では sham 群との差は認められなかったが、第 2 相での AD 群での反応性の低下が特徴として示された。第 1 相は、formalin 注射からの 5 分間に相当し、formalin による知覚神経終末への直接的刺激によるものと考えられ、主に A δ 線維が関与する即時痛である (Tjølsen A et al., 1992)。一方、第 2 相は注射後 10~60 分間の反応で、formalin による組織障害の結果、炎症反応が起こり、遊離された炎症性ケミカルメディエーターが知覚神経を刺激し引き起こされる遅延痛で、主に C 線維が関与する (Li J et al., 1999)。

本研究では、formalin テストの第 1 相と、von Frey テスト、hot plate テストでは差は認められなかった。これは、認知症患者の疼痛閾値に差はないとする過去の報告 (Benedetti F et al., 1999; Benedetti F et al., 2004; Lints-Martindale AC et al., 2007; Jensen-Dahm C et al., 2014) を支持する結果となった。しかし、一方で、AD モデルラットでは、formalin テストの第 2 相での反応性の低下が認められた。AD モデルラットでは海馬が損傷されているため、この結果からは、海馬が記憶の形成のみならず、痛みの認知形成にも何らかの役割を果たしている可能性が考えられた。

III. 海馬損傷に伴う口腔領域における痛覚伝導路への影響についての検討

これまでの研究結果から、口腔領域の痛覚認知への海馬の関与が示唆された。そこで、研究Ⅲでは、海馬損傷に伴う、口腔領域における痛覚伝導路への影響について検討するため、formalin テストを行った AD モデルラットを用いて、痛覚伝導に関与している神経の活動性について免疫組織学的に検討し、対照群との比較を行った。その結果、二次ニューロンである Vc において、c-Fos 発現陽性細胞数が AD 群では有意に減少しており、神経活動性の低下が示された。この結果は、formalin テストの行動観察での結果を裏付けるもので、口腔領域の痛覚伝導への海馬の関与を示す結果となった。そして、AD モデルラットでは、formalin のような持続する疼痛刺激が加わった際に、何らかの理由で、疼痛の低下が生じていることが示唆された。

そこで、次に、疼痛抑制系に関与するとされる vIPAG で (Ikeda H et al., 2014)、Vc と同様の手法を用いて、神経活動性を比較した。しかし、両群間に有意な差は認められなかった。そのため、AD モデルラットにおいて formalin 刺激に対する反応性が低下したのは、疼痛の抑制系の亢進からではなく、sham 群では海馬の働きによって formalin 刺激に対する痛み反応が強化・増幅されている可能性が推測された。したがって、本研究結果は、海馬が不安関連の痛みの増強に関与しているとする過去の報告 (Ploghaus A et al., 2001) を支持するものとなった。

ラットが formalin 刺激時に不安を感じていることを示唆する報告がある。Hasani らは、抗不安薬であるミダゾラムを formalin 刺激の前に先行投与することで、PRB の発現が抑制されたと報告している (Hasani A et al., 2011)。この結果は、formalin 刺激で長時間疼痛反応が持続する理由が、Li ら (Li J et al., 1999) が述べるような炎症反応の結果だけではなく、不安や恐怖などのストレスが、ラットが感じる痛みを増強した結果であるとの可能性も示唆している。

また、海馬以外にも、海馬との相互作用がある扁桃体では、慢性痛への関与が指摘されており、ストレス刺激に応答して Corticotopin-releasing factor(CRF)ニューロンが活性化し、下行性疼痛抑制系に関与している青斑核の機能を低下させることが報告されている (Andreoli M et al., 2017)。このように、海馬および海馬と関わりの強い組織の多くが、痛みを強化・増幅する役割を担っている。

本研究結果からは、海馬の口腔領域の痛覚認知への関与が明らかとなった。そのメカニズムとしては、formalin 刺激時に、ラットが感じる不安やストレスから、海馬や扁桃体などの海馬周囲組織が痛みを増強させている可能性が考えられたが、これらについての検討は不十分である。この仮説を実証するためには、今後、AD モデルラットに対して、formalin 刺激時のラットが感じている不安やストレスについての評価や、疼痛刺激時の脳内の他の疼痛抑制系の活動性についての検討、あるいは、疼痛を増強する役割があるとされる、扁桃体などの海馬周囲組織の活動性についての検討など、さらなる研究が必要と考えられる。

結語

本研究を通じて、海馬損傷に伴う AD モデルラットでは、持続する疼痛刺激への反応性が低下し、痛覚鈍麻が生じることが明らかとなった。この結果から、海馬が痛みの認知や増強に関与している可能性が示唆されたが、そのメカニズムについては、不明な点が多く、今後のさらなる研究が必要と考えている。

本論文の内容の一部は、第 47 回日本歯科麻酔学会学術集会（2019 年，岡山）および、第 48 回日本歯科麻酔学会学術集会（2020 年，オンライン開催）にて発表した。

謝辞

原稿を終えるに臨み，本研究を行う機会を与えていただき，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口腔科学専攻高次脳口腔機能学講座（歯科麻酔学教室）の丹羽均教授に謹んで感謝の意を表します。

また，本研究の円滑な進展のためご理解，ご協力頂きました歯科麻酔学教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

Abe T, Ohshita N, Sugiyo S, Moritani M, Kobayashi M, Takemura M. Elimination of neurokinin-1 receptor neurons in caudal nucleus reverses the effects of systemic bicuculline on c-Fos expression in rat trigeminal sensory nucleus: I. High intensity electrical stimulation of the trigeminal ganglion. *Neuroscience*. 2005;133(3):739-47.

Ahmed T, Enam SA, Gilani AH. Curcuminoids enhance memory in an amyloid-infused rat model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2010;169(3):1296-306.

American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5th Edition. 2013.

Andreoli M, Marketkar T, Dimitrov E. Contribution of amygdala CRF neurons to chronic pain. *Exp Neurol*. 2017;298(Pt A):1-12.

Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*. 2012;211:39-50.

Benedetti F, Arduino C, Vighetti S, Asteggiano G, Tarenzi L, Rainero I. Pain reactivity in Alzheimer patients with different degrees of cognitive impairment and brain electrical activity deterioration. *Pain*. 2004;111(1-2):22-9.

Benedetti F, Vighetti S, Ricco C, Lagna E, Bergamasco B, Pinessi L, et al. Pain threshold

and tolerance in Alzheimer's disease. *Pain*. 1999;80(1-2):377-82.

Borysovyh Bogdanov V, Bogdanova OV, Lombard A, Chauvel V, Multon S, Kot LI, et al. Cortical spreading depression decreases Fos expression in rat periaqueductal gray matter. *Neurosci Lett*. 2015;585:138-43.

Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82(4):239-59.

Cazanga V, Hernandez A, Morales B, Pelissier T, Constandil L. Antinociception Induced by Copper Salt Revisited: Interaction with Ketamine in Formalin-Induced Intraplantar and Orofacial Pain in Mice. *J Oral Facial Pain Headache*. 2018;32(3):247–57.

Cole LJ, Farrell MJ, Duff EP, Barber JB, Egan GF, Gibson SJ. Pain sensitivity and fMRI pain-related brain activity in Alzheimer's disease. *Brain*. 2006;129(Pt 11):2957-65.

Cole LJ, Gavrilesco M, Johnston LA, Gibson SJ, Farrell MJ, Egan GF. The impact of Alzheimer's disease on the functional connectivity between brain regions underlying pain perception. *Eur J Pain*. 2011;15(6):568.e1-11.

Davies HA, Kelly A, Dhanrajan TM, Lynch MA, Rodríguez JJ, Stewart MG. Synaptophysin immunogold labelling of synapses decreases in dentate gyrus of the hippocampus of aged rats. *Brain Res*. 2003;986(1-2):191-5.

Defrin R, Amanzio M, de Tommaso M, Dimova V, Filipovic S, Finn DP, et al. Experimental pain processing in individuals with cognitive impairment: current state of the science. *Pain*. 2015;156(8):1396-408.

Elmer GI, Pieper JO, Negus SS, Woods JH. Genetic variance in nociception and its relationship to the potency of morphine-induced analgesia in thermal and chemical tests. *Pain*. 1998;75(1):129-40.

Friedlander AH, Jarvik LF. The dental management of the patient with dementia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1987;64(5):549-53.

Gunn A, Bobeck EN, Weber C, Morgan MM. The influence of non-nociceptive factors on hot-plate latency in rats. *J Pain*. 2011;12(2):222-7.

Hardy J. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal. *J Alzheimers Dis*. 2006;9(3 Suppl):151-3.

Hasani A, Soljakova M, Jakupi M, Ustalar-Ozgen S. Preemptive analgesic effects of midazolam and diclofenac in rat model. *Bosn J Basic Med Sci*. 2011;11(2):113-8.

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 1996;274(5284):99-102.

Ikeda H, Takasu S, Murase K. Contribution of anterior cingulate cortex and descending pain inhibitory system to analgesic effect of lemon odor in mice. *Mol Pain*. 2014;10:14.

Jensen-Dahm C, Werner MU, Dahl JB, Jensen TS, Ballegaard M, Hejl AM, et al. Quantitative sensory testing and pain tolerance in patients with mild to moderate Alzheimer disease compared to healthy control subjects. *Pain*. 2014;155(8):1439-45.

Kadir A, Almkvist O, Wall A, Långström B, Nordberg A. PET imaging of cortical 11C-nicotine binding correlates with the cognitive function of attention in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006;188(4):509-20.

Kazui H, Yoshiyama K, Kanemoto H, Suzuki Y, Sato S, Hashimoto M, et al. Differences of Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia in Disease Severity in Four Major Dementias. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161092.

Kunz M, Mylius V, Scharmann S, Schepelman K, Lautenbacher S. Influence of dementia on multiple components of pain. *Eur J Pain*. 2009;13(3):317-25.

Kunz M, Scharmann S, Hemmeter U, Schepelmann K, Lautenbacher S. The facial expression of pain in patients with dementia. *Pain*. 2007;133(1-3):221-8.

Lee KH, Wu B, Plassman BL. Cognitive function and oral health-related quality of life in older adults. *J Am Geriatr Soc*. 2013;61(9):1602-7.

Li J, Simone DA, Larson AA. Windup leads to characteristics of central sensitization. *Pain*. 1999;79(1):75-82.

Lints-Martindale AC, Hadjistavropoulos T, Barber B, Gibson SJ. A psychophysical investigation of the facial action coding system as an index of pain variability among older adults with and without Alzheimer's disease. *Pain Med*. 2007;8(8):678-89.

Luccarini P, Childeric A, Gaydier AM, Voisin D, Dallel R. The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. *J Pain*. 2006;7(12):908-14.

Maegawa H, Morimoto Y, Kudo C, Hanamoto H, Boku A, Sugimura M, et al. Neural mechanism underlying hyperalgesic response to orofacial pain in Parkinson's disease model rats. *Neurosci Res*. 2015;96:59-68.

Masliah E, Alford M, DeTeresa R, Mallory M, Hansen L. Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1996;40(5):759-66.

Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*. 2004;430(7000):631-9.

Morimoto K, Yoshimi K, Tonohiro T, Yamada N, Oda T, Kaneko I. Co-injection of beta-amyloid with ibotenic acid induces synergistic loss of rat hippocampal neurons. *Neuroscience*. 1998;84(2):479-87.

Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*. 1986;319(6056):774-6.

Nabeshima T, Nitta A. Memory impairment and neuronal dysfunction induced by beta-amyloid protein in rats. *Tohoku J Exp Med*. 1994;174(3):241-9.

Nakamura S, Murayama N, Noshita T, Katsuragi R, Ohno T. Cognitive dysfunction induced by sequential injection of amyloid-beta and ibotenate into the bilateral hippocampus; protection by memantine and MK-801. *Eur J Pharmacol*. 2006;548(1-3):115-22.

Nakayama T, Takahashi H, Miyamoto M, Goto G, Nagai Y. Effect of TAK-147, a novel AChE inhibitor, on cerebral energy metabolism. *Neurobiol Aging*. 1996;17(6):849-57.

日本神経学会. 認知症疾患診療ガイドライン 2017. 医学書院, 2017.

Nomura H, Ogawa A, Tashiro A, Morimoto T, Hu JW, Iwata K. Induction of Fos protein-like immunoreactivity in the trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following noxious and non-noxious mechanical stimulation of the whisker pad of the rat with an inferior alveolar nerve transection. *Pain*. 2002;95(3):225-38.

Nordberg A. Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Biol Psychiatry*. 2001;49(3):200-10.

Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates 6th Edition. 2007.

Ploghaus A, Narain C, Beckmann CF, Clare S, Bantick S, Wise R, et al. Exacerbation of pain by anxiety is associated with activity in a hippocampal network. *J Neurosci*. 2001;21(24):9896-903.

Raboisson P, Dallel R. The orofacial formalin test. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004;28(2):219-26. doi: 10.1016/j.neubiorev.2003.12.003.

Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957;20(1):11-21.

柴田学, 大久保つや子, 高橋宏, 工藤照夫, 猪木令三. 炎症性疼痛モデルと関連する体内活性物質の検討. *日薬理誌 (Folia Pharmacol.Jpn.)* . 1986, 87, p.405-415.

Suzuki I, Tsuboi Y, Shinoda M, Shibuta K, Honda K, Katagiri A, et al. Involvement of ERK phosphorylation of trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons in thermal hypersensitivity in rats with infraorbital nerve injury. *PLoS One*. 2013;8(2):e57278.

Takeda R, Ikeda T, Tsuda F, Abe H, Hashiguchi H, Ishida Y, et al. Unilateral lesions of mesostriatal dopaminergic pathway alters the withdrawal response of the rat hindpaw to mechanical stimulation. *Neurosci Res*. 2005;52(1):31-6.

Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, et al. A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev.* 1981;17(2):183-94.

田熊一徹, 永井拓, 山田清文. 学習・記憶行動の評価法. *日薬理誌 (Folia Pharmacol.Jpn.)* . 2007, 130, p.112-116.

Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain.* 1992;51(1):5-17.

Vachon-Presseau E, Roy M, Martel MO, Caron E, Marin MF, Chen J, et al. The stress model of chronic pain: evidence from basal cortisol and hippocampal structure and function in humans. *Brain.* 2013;136(Pt 3):815-27.

Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik LJ. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet.* 2014;5:88.

World Health Organization. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. 10th Revision.* 1993.

Wu B, Plassman BL, Crout RJ, Liang J. Cognitive function and oral health among community-dwelling older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2008;63(5):495-500.

Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N, Chiba T. Analgesic effect of intrathecally administered

orexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test. *Br J Pharmacol.* 2002;137(2):170-6.

Zenthöfer A, Schröder J, Cabrera T, Rammelsberg P, Hassel AJ. Comparison of oral health among older people with and without dementia. *Community Dent Health.* 2014;31(1):27-31.

Zhang J, Li P, Wang Y, Liu J, Zhang Z, Cheng W. Ameliorative effects of a combination of baicalin, jasminoidin and cholic acid on ibotenic acid-induced dementia model in rats. *PLoS One.* 2013;8(2):e56658.

A



B

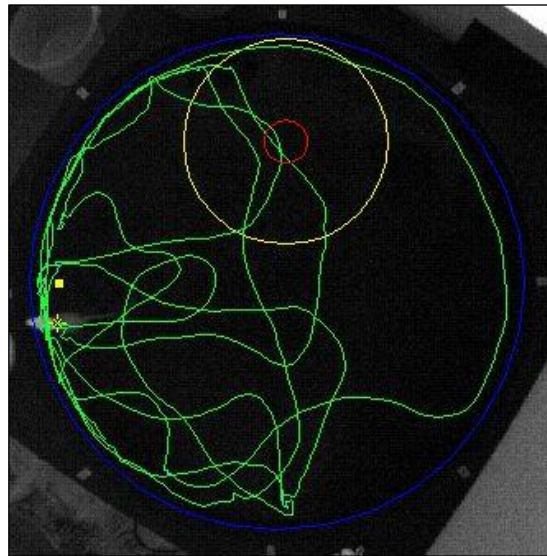


Figure 1.モリス水迷路試験

A：実験に用いたモリス水迷路

B：実験結果の例 ラットの行動がトラッキングされ、緑の線で表示されている。また、ゴール（赤い円で表示）周囲に設定したゾーンが黄色の円で表示されている。

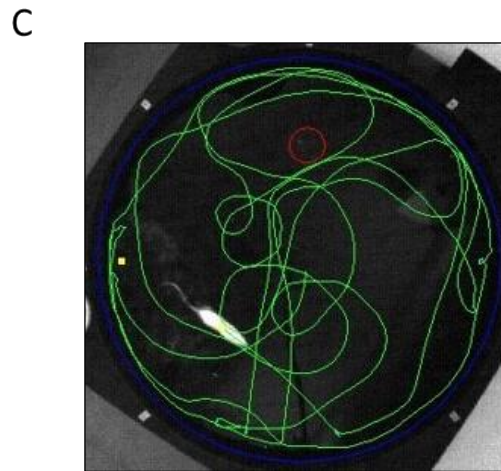
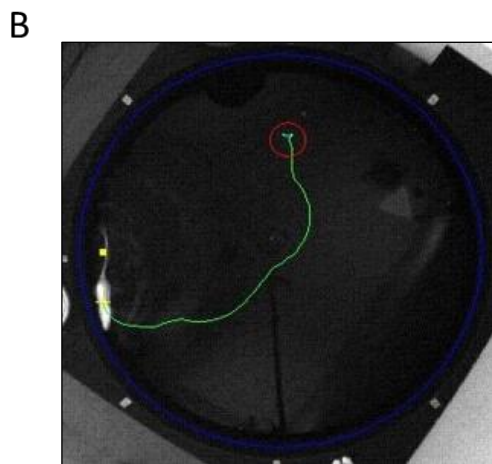
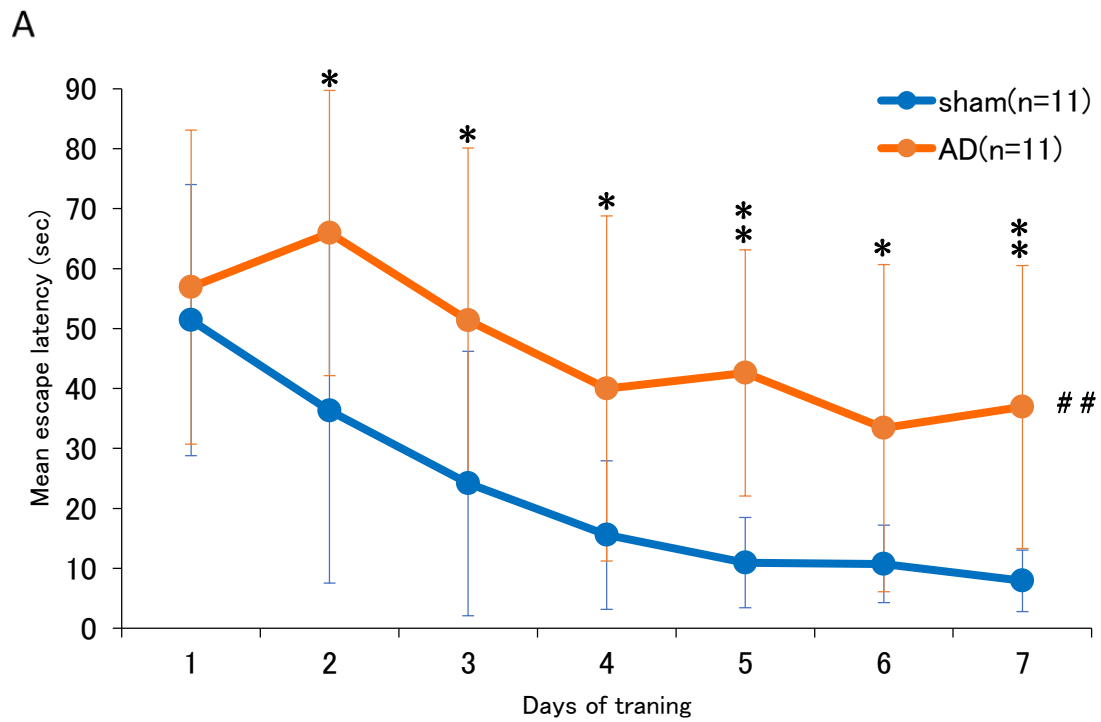


Figure 2. モリス水迷路試験での獲得試行への影響

A：獲得試行におけるゴール到達時間の推移(1日の平均±標準偏差)

##P<0.01 vs sham 群. 統計方法: Repeated measures two-factor ANOVA 検定

**P<0.01 vs sham 群. 統計方法: Student's t test

B：7日目における sham 群の実験結果の代表像

C：7日目における AD 群の実験結果の代表像

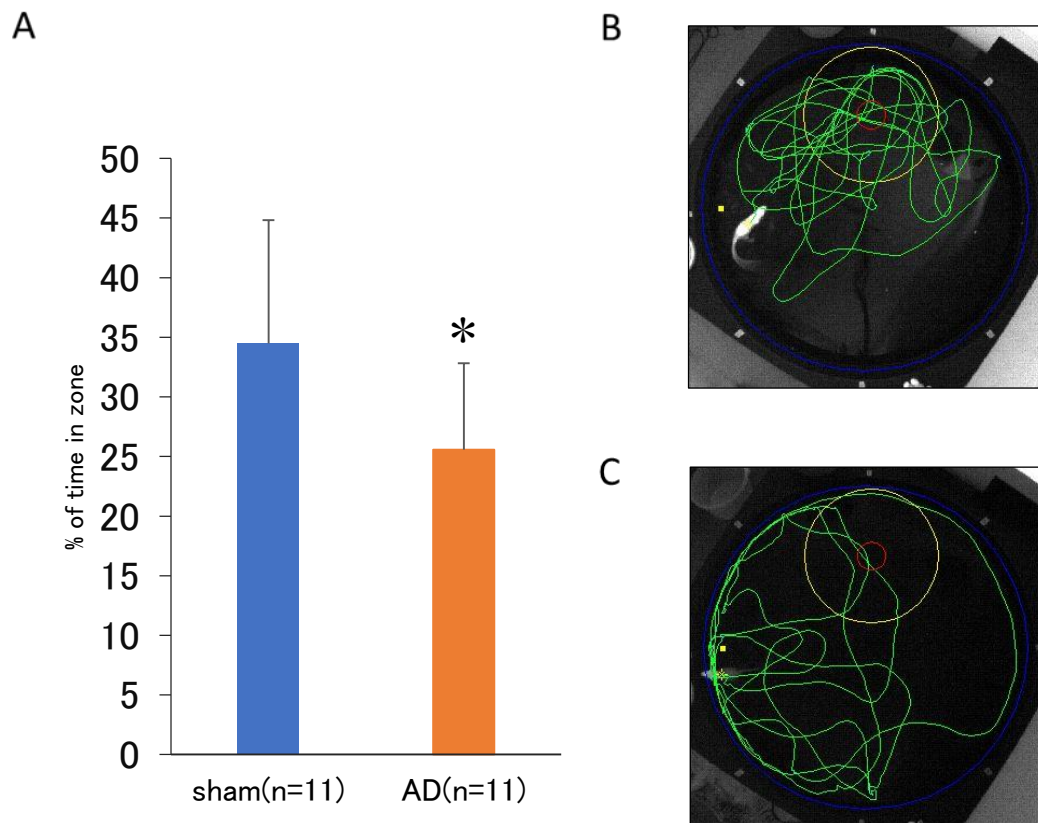


Figure 3. モリス水迷路試験での保持試行への影響

A : 保持試行時のゾーン滞在時間 (%) の比較(平均±標準偏差)

* $P < 0.05$ vs sham 群. 統計方法 : Student's t test

AD 群ではゾーン滞在時間の割合が有意に減少していた.

B : 保持試行時の sham 群の実験結果の代表像

C : 保持試行時の AD 群の実験結果の代表像

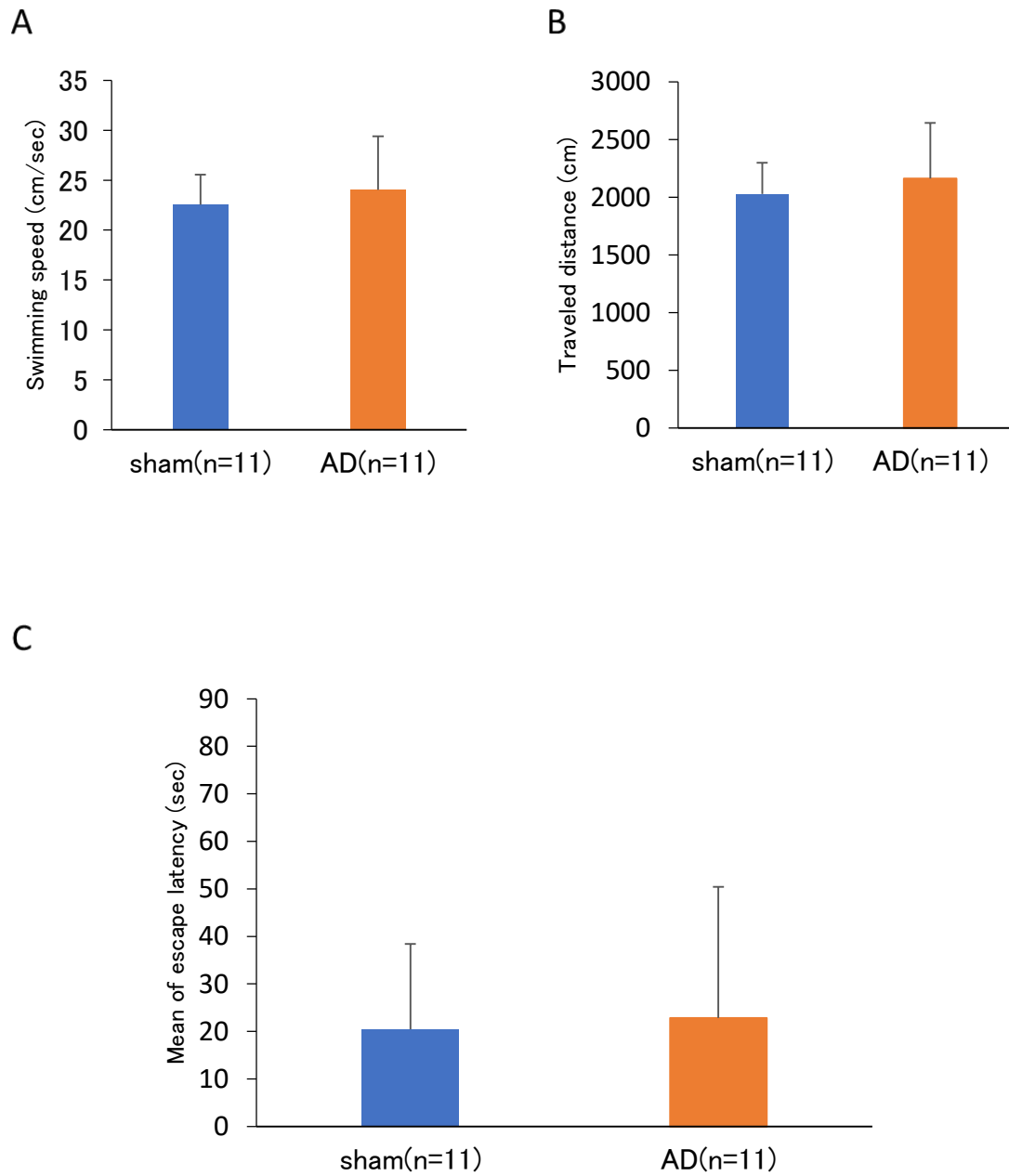


Figure 4. モリス水迷路試験での運動能力、視認能力への影響

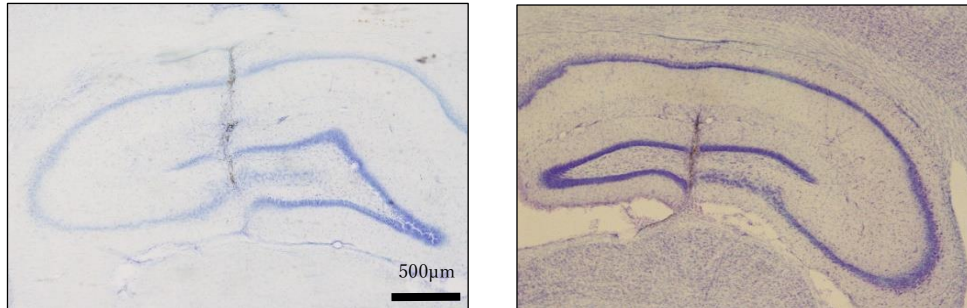
統計方法：Student's t test

A：平均水泳速度(平均±標準偏差)

B：総運動距離(平均±標準偏差)

C：視認能力の比較(平均±標準偏差)

A



B

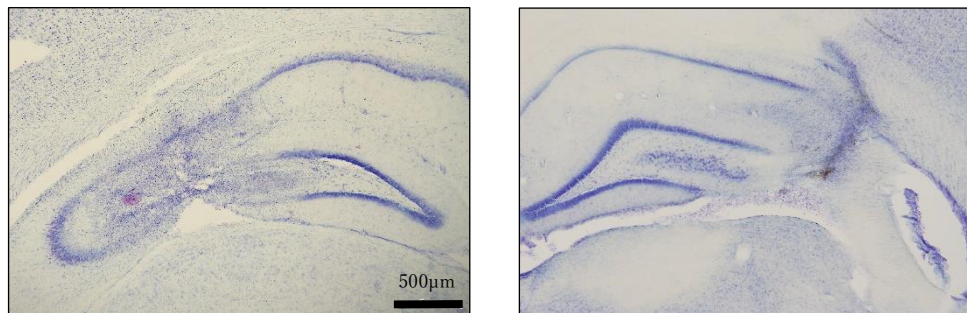


Figure 5. 薬剤投与による海馬の損傷組織像 (Nissl 染色)

A : sham 群の海馬代表像

左が左側海馬, 右が右側海馬, それぞれ Bregma 縫合点から後方 4.2mm を示した.

錐体細胞が密に配列し, 連続した細胞層を形成していることが確認できた.

B : AD 群の海馬代表像

左が左側海馬, 右が右側海馬, それぞれ Bregma 縫合点から後方 4.2mm を示した.

錐体細胞は疎で, 広範囲に及ぶ組織損傷が確認できた.

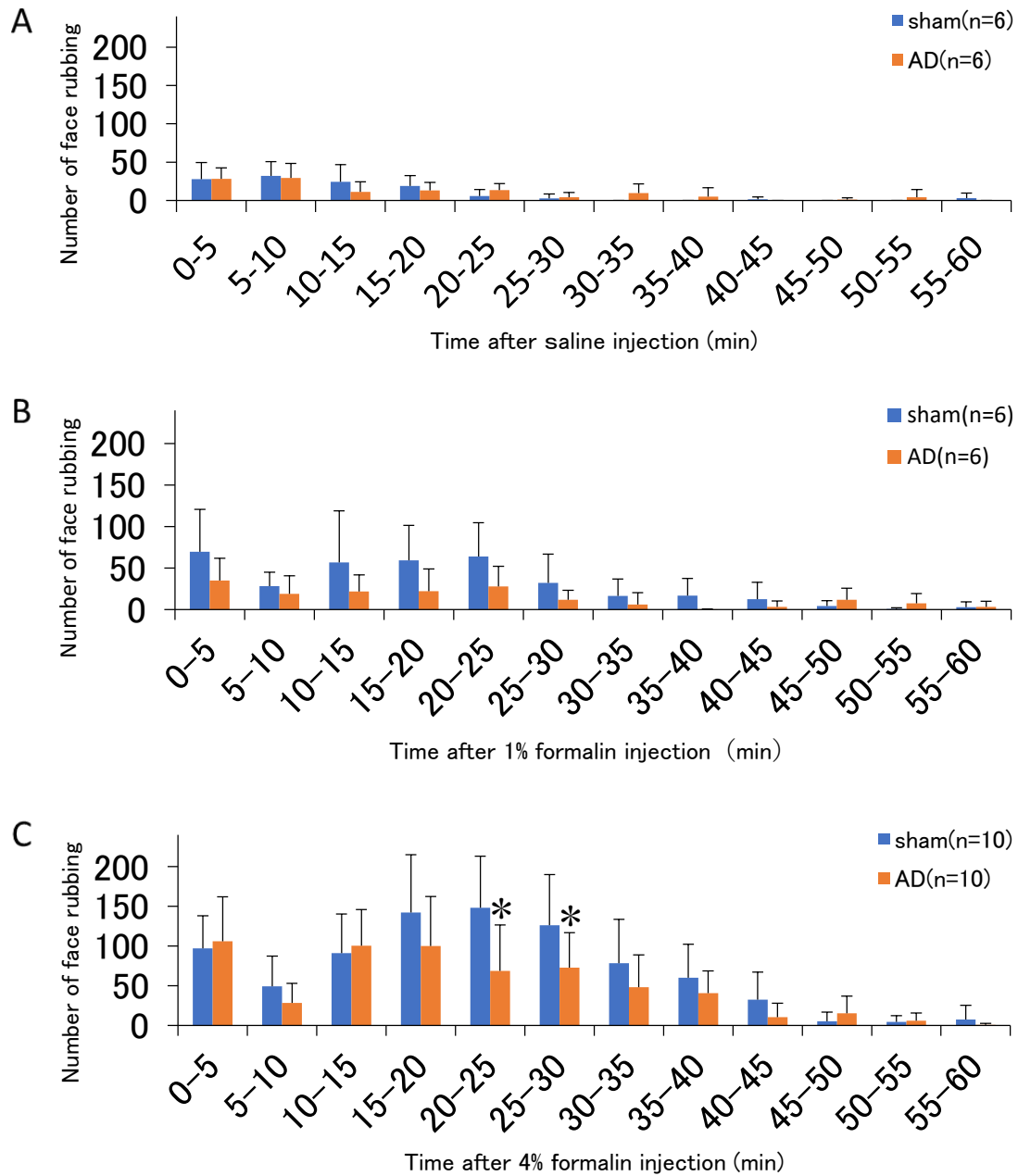


Figure 6. 左側上口唇に対する formalin テスト時の 5 分ごとの PRB 回数

*P<0.05 vs sham 群. 統計方法: Student's t test

A: saline 刺激 (平均±標準偏差)

B: 1% formalin 刺激時の PRB (平均±標準偏差)

C: 4% formalin 刺激時の PRB (平均±標準偏差)

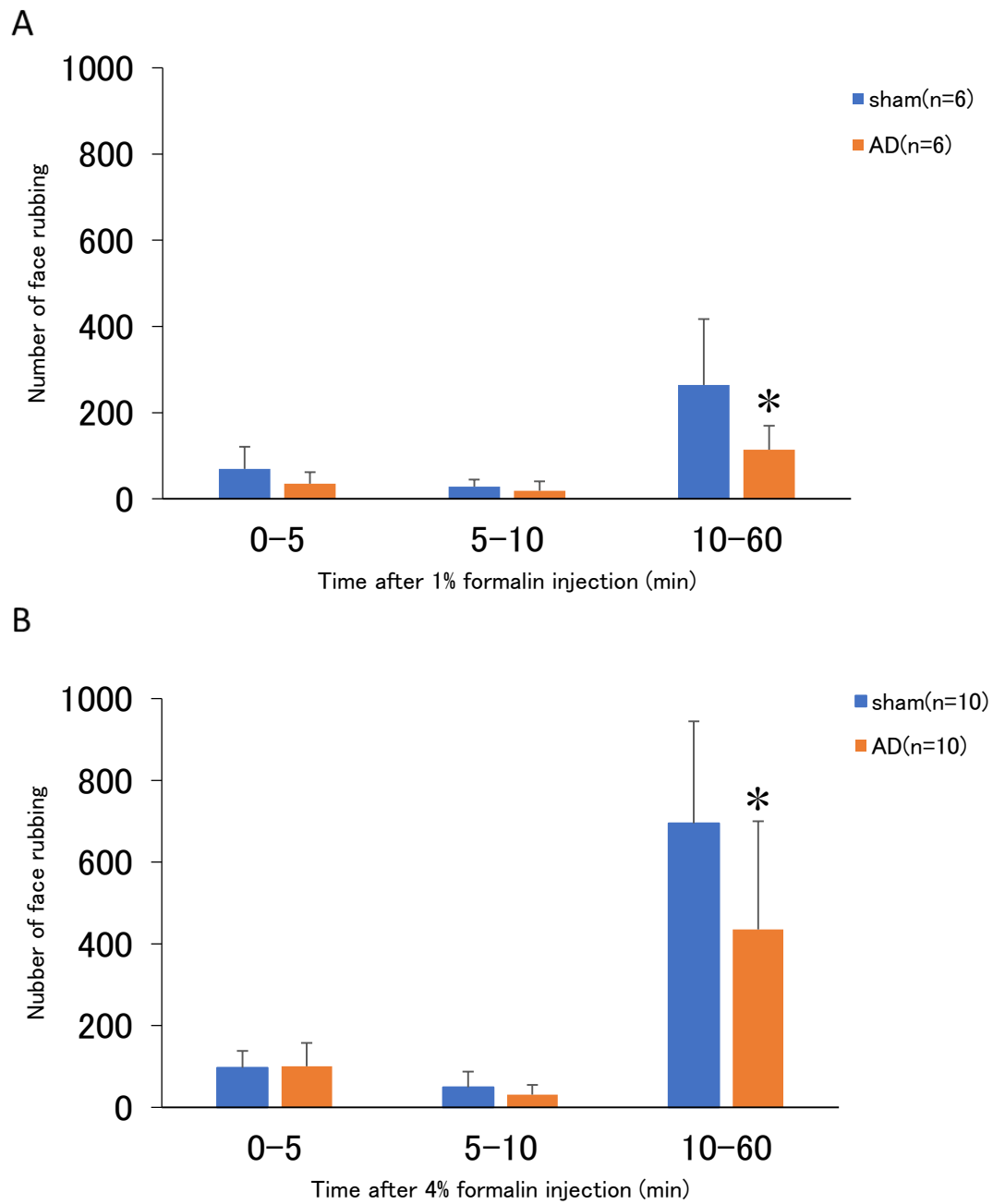


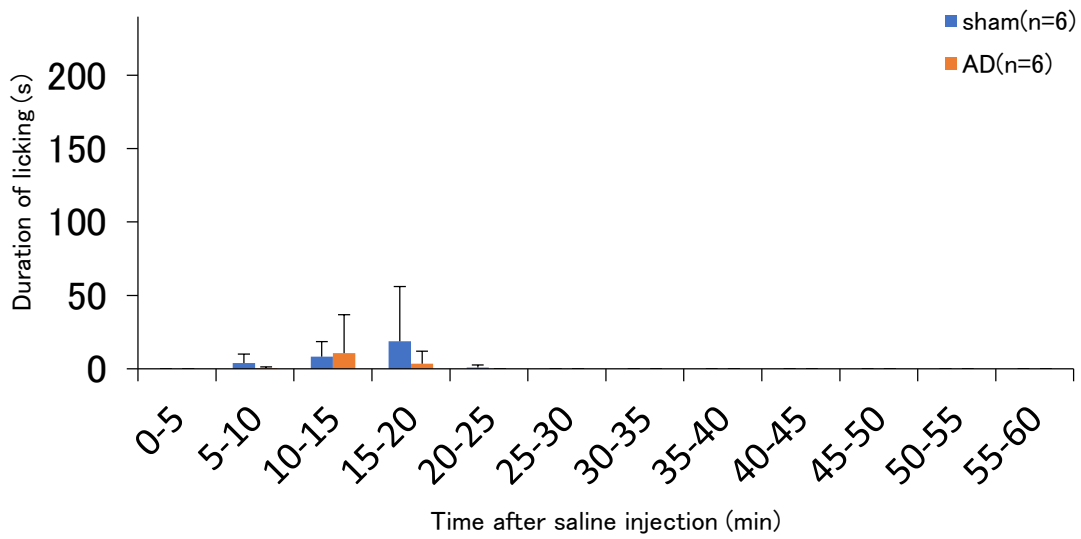
Figure 7. 上口唇への formalin テスト時の第 1 相(0-5 分), 第 2 相(10-60 分)の PRB 回数

* $P < 0.05$ vs sham 群. 統計方法: Student's t test

A: 1% formalin 刺激時の PRB (平均±標準偏差)

B: 4% formalin 刺激時の PRB (平均±標準偏差)

A



B

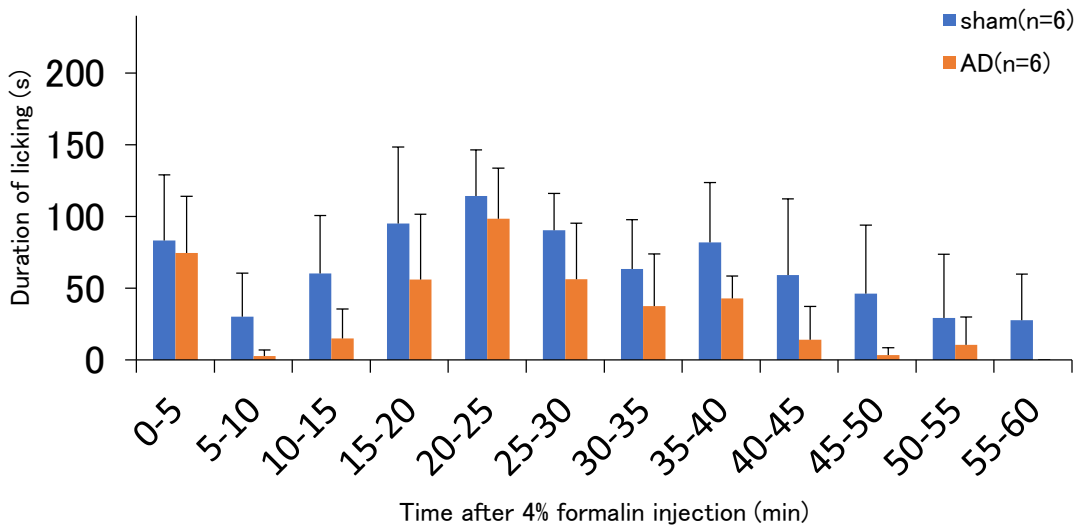


Figure 8. 足底部に対する formalin テスト時の 5 分ごとの PRB 時間

* $P < 0.05$ vs sham 群. 統計方法: Student's t test

A: saline 刺激時の PRB (平均±標準偏差)

B: 4% formalin 刺激時の PRB (平均±標準偏差)

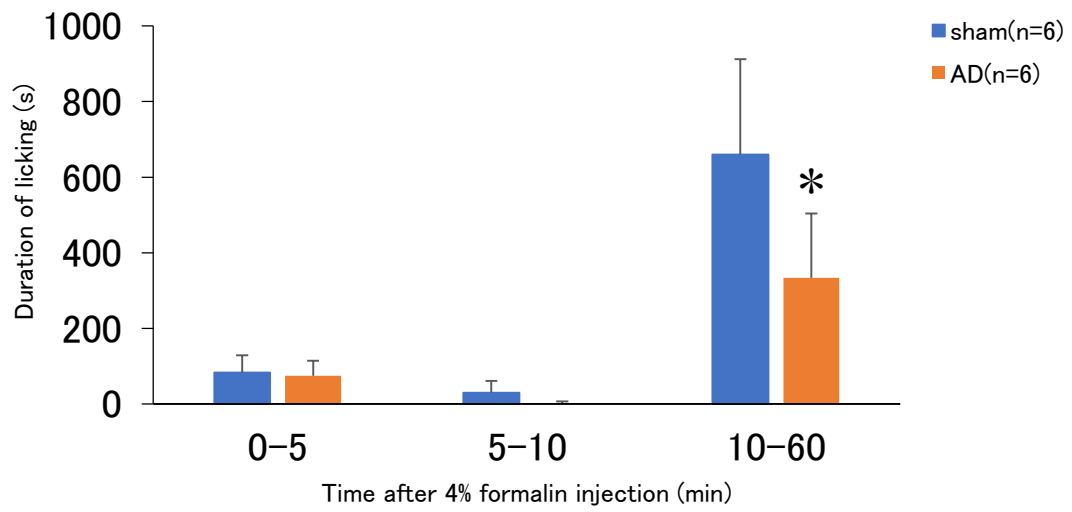


Figure 9. 足底部への formalin テスト時の第 1 相(0-5 分), 第 2 相(10-60 分)の PRB 時間

* $P < 0.05$ vs sham 群. 統計方法: Student's t test

4% formalin 刺激時の PRB (平均±標準偏差)

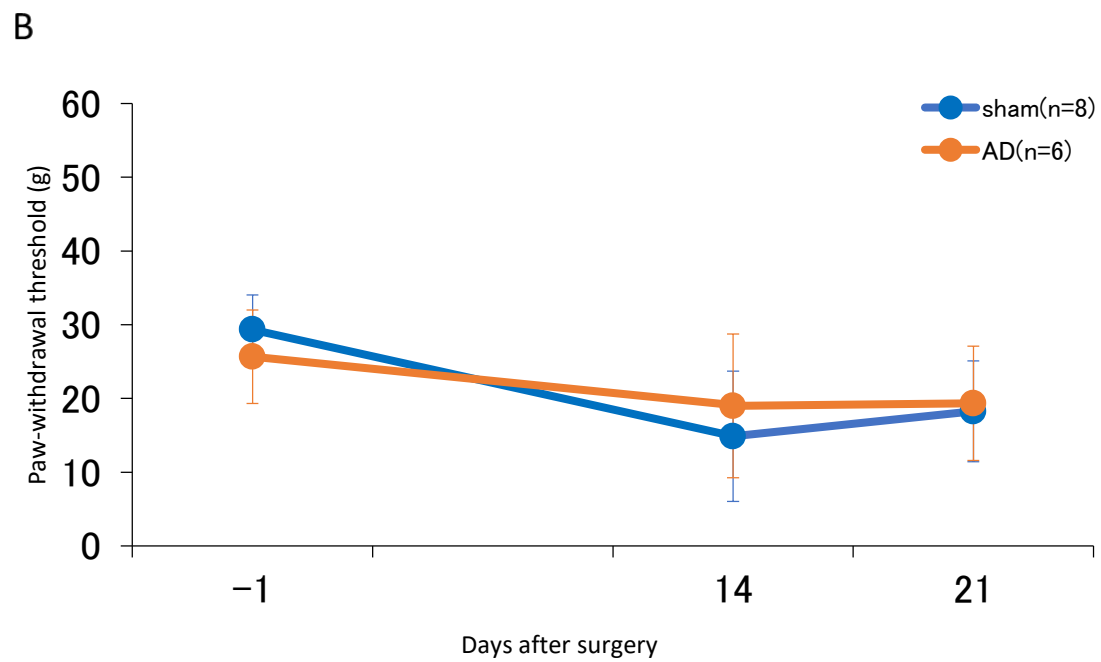
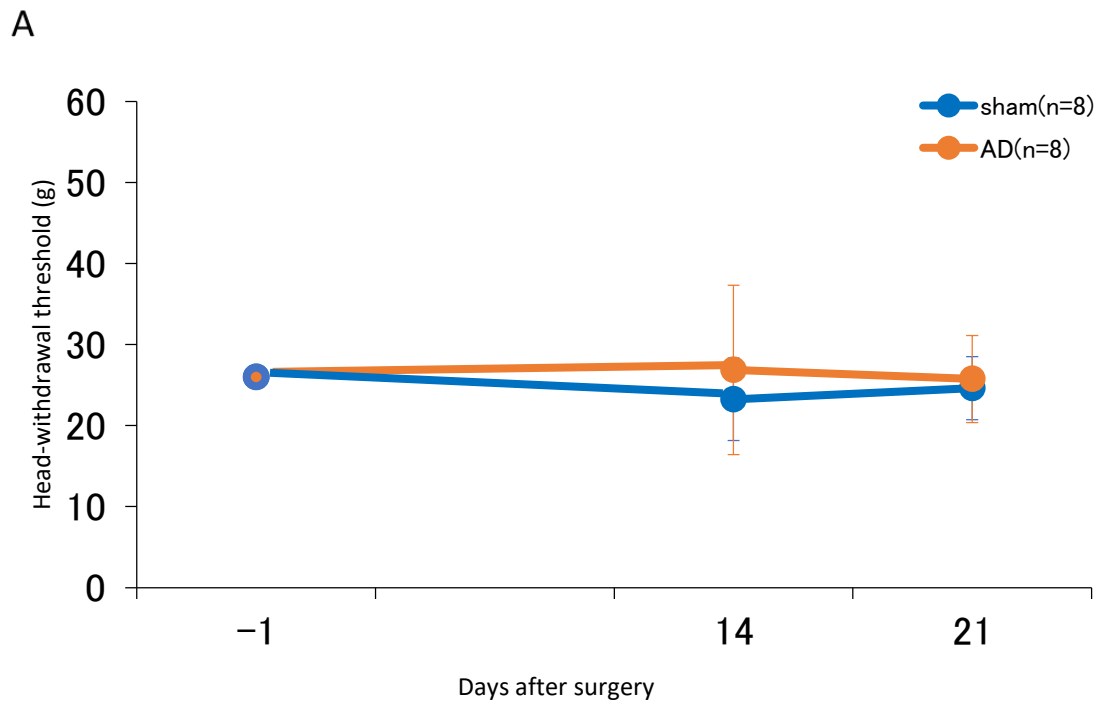


Figure 10. von Frey テストによる逃避反応閾値

統計方法：Repeated measures two-factor ANOVA 検定または Student's t test

A：口唇部への von Frey テスト（平均±標準偏差）

B：足底部への von Frey テスト（平均±標準偏差）

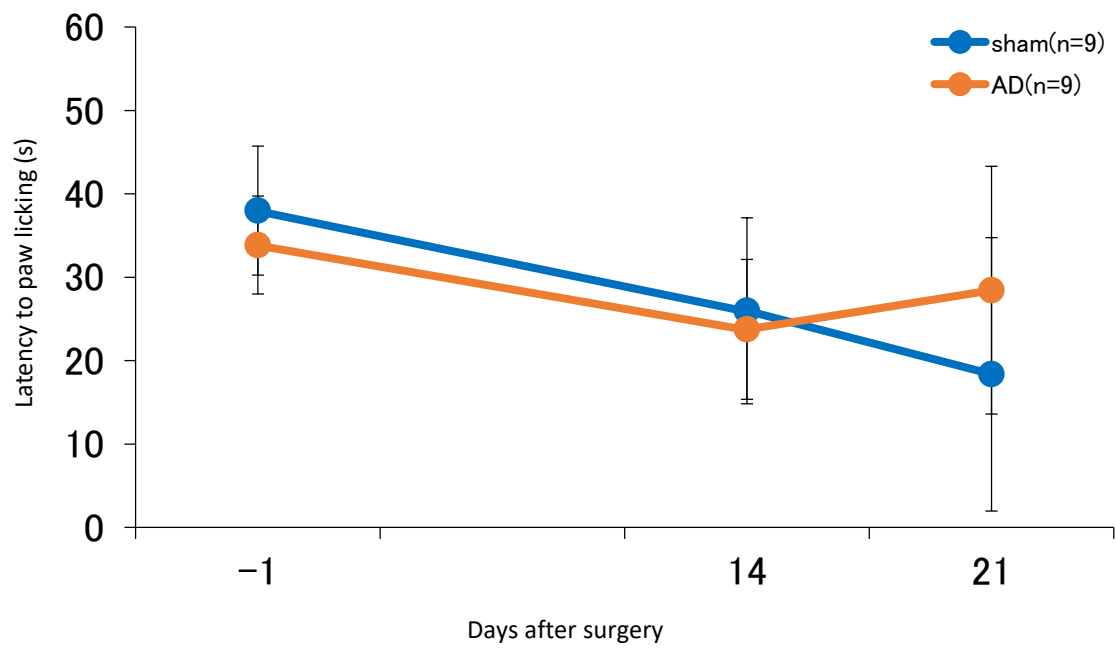


Figure 11. hot plate テストにおける逃避反応の潜時（平均±標準偏差）

統計方法：Repeated measures two-factor ANOVA 検定または Student's t test

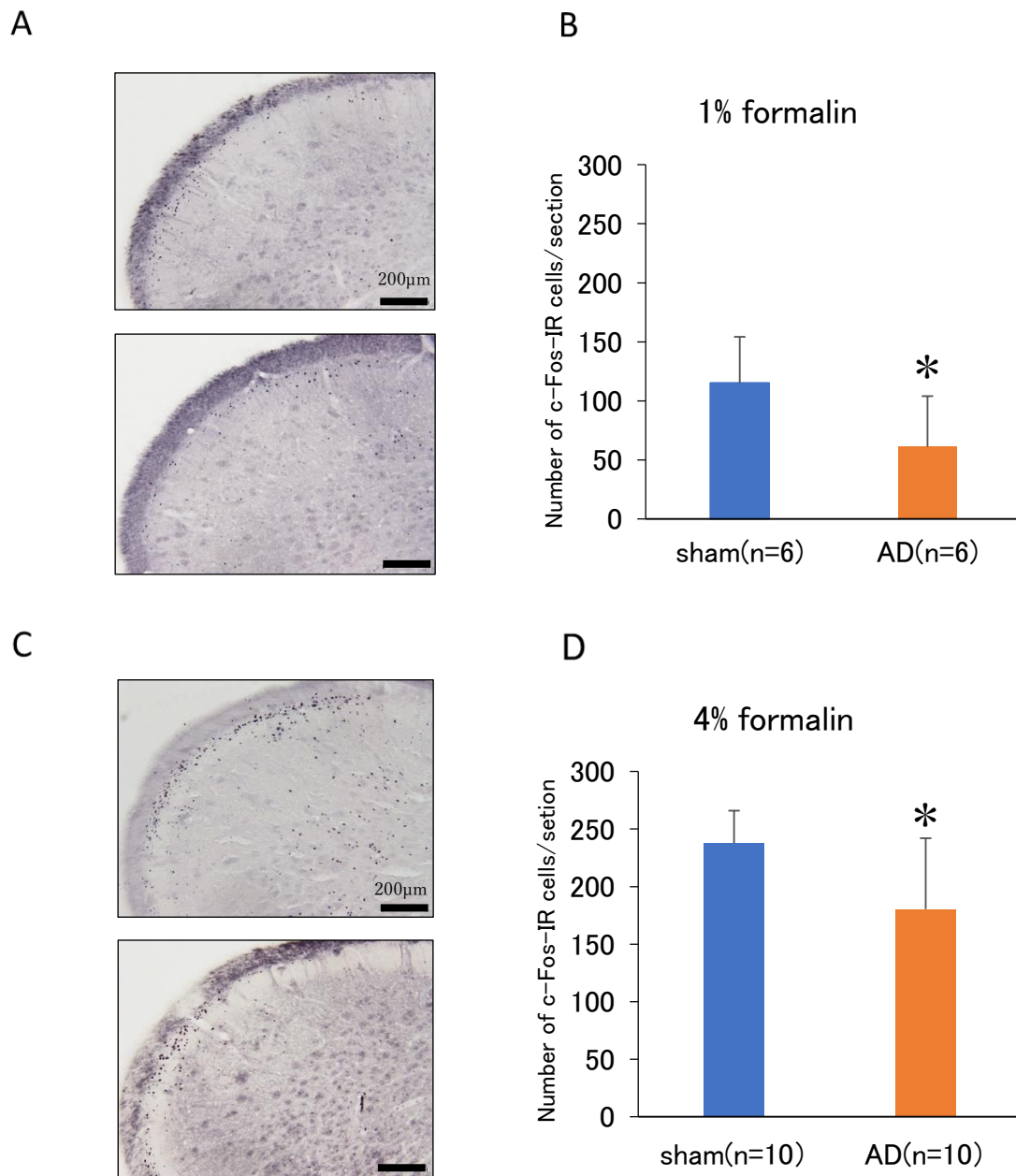


Figure 12. formalin テスト時の刺激側の Vc 表層における c-Fos 発現陽性細胞数

* $P < 0.05$ vs sham 群. 統計方法: Student's t test. A: 1% formalin 刺激側の Vc 代表像 (上段が sham 群, 下段が AD 群で, それぞれ obex から 1440 μ m 尾側を示した) B: 1% formalin 刺激側の c-Fos 発現陽性細胞数の比較 (平均 \pm 標準偏差) C: 4% formalin 刺激側 Vc 代表像 (上段が sham 群, 下段が AD 群で, それぞれ obex から 1440 μ m 尾側を示した) D: 4% formalin 刺激側の c-Fos 発現陽性細胞数の比較 (平均 \pm 標準偏差)

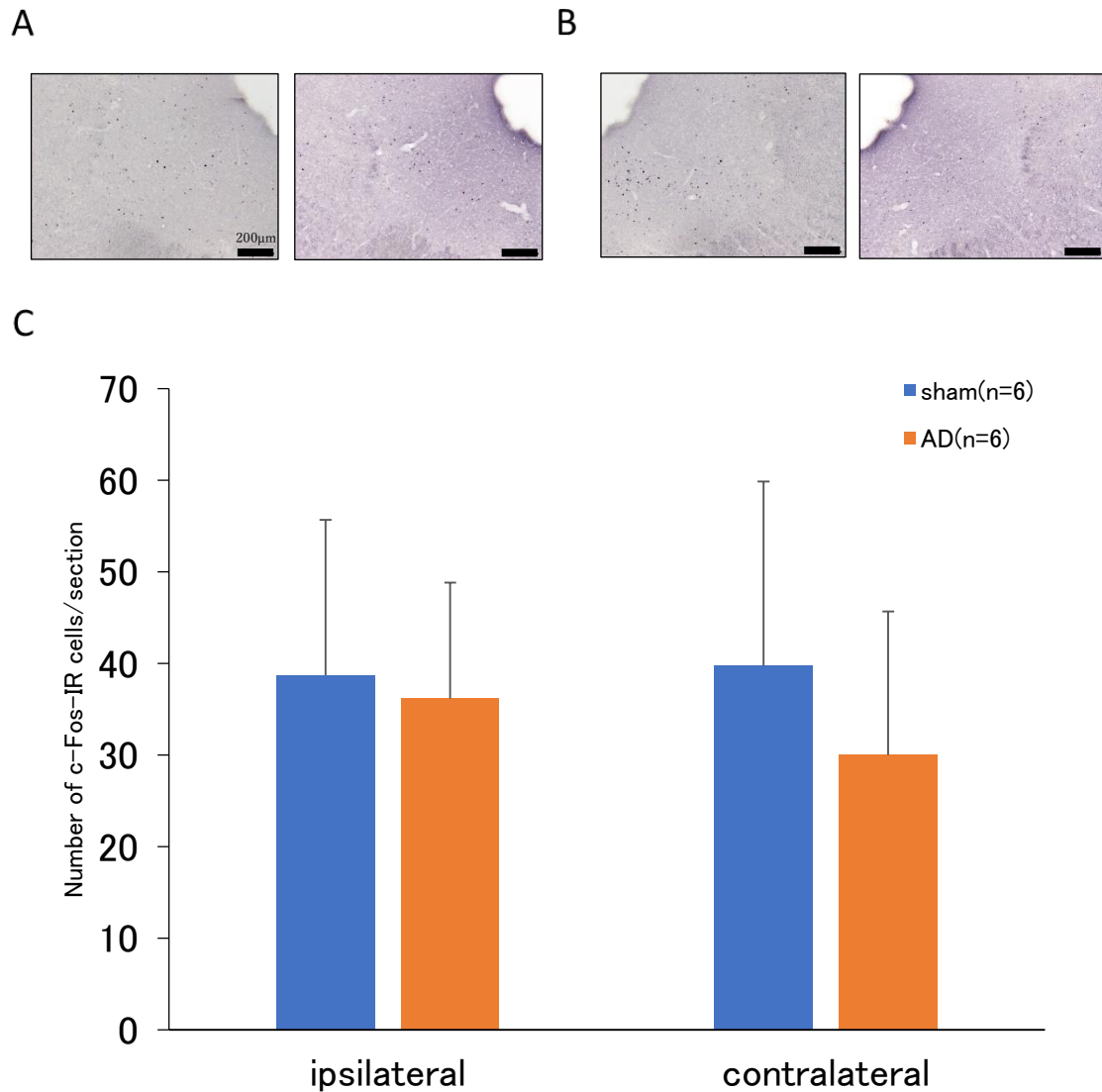


Figure 13. formalin テスト時の vIPAG における c-Fos 発現陽性細胞数の比較

統計方法：Student's t test.

A：1% formalin 刺激側 (ipsilateral) の vIPAG 代表像 (左：sham 群, 右：AD 群, それぞれ Bregma 縫合点から後方 7.92 mm を示した) B：非刺激側 (contralateral) の vIPAG 代表像 (左：sham 群, 右：AD 群, それぞれ Bregma 縫合点から後方 7.92 mm を示した) C：1% formalin 刺激側 (ipsilateral), 非刺激側 (contralateral) の vIPAG における c-Fos 発現陽性細胞数の比較 (平均±標準偏差). 両群間に有意差は認められなかった.