

拘束性ストレスと卵巣摘出による口腔内灼熱症候群モデルマウス作製の試み

米本真実子^{1,2} 坪井美行^{1,2} 海津彰弘¹ 須永美希^{1,3} 篠田雅路^{1,2}¹ 日本大学歯学部生理学講座² 日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔構造機能学分野³ 日本歯科大学附属病院 総合診療科2

要旨

【目的】口腔内灼熱症候群（BMS）は舌に器質的な異常がないにもかかわらず、舌に異常疼痛が生じる疾患である。現在、適切なBMSモデル動物が存在せず、BMSの病態解明が進んでいないのが現状である。本研究では、BMS発症に関連があると考えられる女性ホルモン異常とストレス負荷によるBMSモデルマウス作製の可能性を検討することを目的とした。

【方法】実験にはICR系マウスを使用した。雄性マウスに対して6時間/日の体動制限を行う拘束ストレス負荷（RS群）または6時間/日の食餌飲水制限（nFnW群）を21日間行った。RS負荷および食餌飲水制限のない群をFree群とした。雌性マウスに対して卵巣摘出（OVX）または偽手術（Sham）を施行した後、RS負荷、nFnW処置またはFree処置を21日間行った。浅麻酔下で舌への機械刺激または温度刺激による頭部引込み反射が誘発された最小の刺激強度を頭部逃避反射閾値（HWRT）とし、各処置開始前と開始後21日目に測定した。各処置開始前から開始後21日目まで、体重は毎日測定した。各処置開始後21日目、血漿コルチコステロン濃度を測定した。

【結果】雄性マウスおよび雌性マウスにおいて、21日間のRS負荷は血漿コルチコステロン濃度を増加させ、舌への機械刺激または熱刺激に対するHWRTおよび体重を低下させた。OVXを施した雌性マウスでは、Free処置、nFnW処置およびRS負荷群において舌のHWRTが低下した。雌性マウスにおいて、RS負荷により生じる舌のHWRT低下はOVXの影響を受けなかった。

【結論】雄性マウスおよび雌性マウスに対するRS負荷および雌性マウスに対するOVXは舌に機械アロディニアおよび熱痛覚過敏を惹起させたことから、BMSモデルとして有用であることが示唆された。

キーワード：口腔内灼熱症候群、マウス、卵巣摘出、拘束ストレス

Experimental establishment of restraint stress and ovariectomy-induced mouse model for burning mouth syndrome

Mamiko Yonemoto^{1,2}, Yoshiyuki Tsuboi^{1,2}, Akihiro Kaizu¹,
Miki Sunaga^{1,3}, Masamichi Shinoda^{1,2}¹ Department of Physiology, Nihon University School of Dentistry² Division of Oral structural and Functional Biology, Nihon University Graduate School of Dentistry³ General Dentistry Department 2, Nippon Dental University Hospital

Abstract

【Purpose】 Burning mouth syndrome (BMS) is a condition characterized by abnormal pain in the tongue despite the absence of any structural abnormalities. Currently, no appropriate animal model for BMS exists, which has hindered progress in understanding its pathophysiology. This study aimed to investigate the possibility of developing a BMS mouse model induced by hormonal imbalance and stress exposure, which are presumed to be potential factors associated with BMS onset.

【Methods】 Institute of cancer research mice were used in the study. Male mice were subjected to restraint stress (RS group, 6 hours/day) or restricted access to food and water (nFnW group, 6 hours/day) for 21 days. A control group (Free group) was not subjected to RS or nFnW conditions. Female mice underwent either ovariectomy (OVX) or sham surgery, followed by exposure to RS, nFnW, or Free conditions for 21 days. The head withdrawal reflex threshold (HWRT) was defined as the minimum intensity of mechanical or thermal stimulation applied to the tongue that elicited a head withdrawal response. HWRT measurements were conducted under light anesthesia prior to the initiation of treatment and again on day 21 following the commencement of treatment. Body weights were measured daily from before each treatment initiation until day 21. Plasma corticosterone concentration (PCC) was assessed on day 21 after each treatment initiation.

【Results】 In both male and female mice, 21 days of RS led to an increase in PCC and a decrease in HWRT in response to mechanical and heat tongue stimulation, as well as a reduction in body weight. In OVX female mice, HWRTs were reduced in Free, nFnW, and RS groups. Furthermore, in female mice, the RS-induced reduction in HWRT was unaffected by OVX.

【Conclusion】 RS exposure in both male and female mice, as well as OVX in female mice, induced mechanical allodynia and heat hyperalgesia in the tongue, suggesting the potential utility of these models for studying BMS pathophysiology.

Keywords: burning mouth syndrome, mouse, ovariectomy, restraint stress

(受付：令和7年6月4日)

責任著者連絡先：坪井美行

日本大学歯学部生理学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

TEL：03-3219-8122

FAX：03-3219-8341

E-mail：tsuboi.yoshiyuki@nihon-u.ac.jp

緒 言

口腔内灼熱症候群 (BMS) 患者は舌に器質的な変化が認められないにもかかわらず、1 日に 2 時間以上、3 カ月以上続く舌痛またはピリピリした不快な舌異常感覚を訴え¹⁾、食事の際に香辛料や熱いものが痛いと感じることが知られている²⁾。BMS は全人口の 0.7-3% に発症するとされており、患者の男女比は 1:8-1:10 で、特に更年期の女性に多く発症する³⁻⁷⁾。また、過去の強い心理的ストレスは BMS の発症率を増加させる¹⁾。したがって、BMS の発症には閉経とストレスが深く関与すると考えられるが、その発症機構に関しては不明な点が多い。

閉経はエストロゲンの分泌を減少させ、骨密度の低下を惹き起こすことはよく知られている⁸⁾。興味深いことに、血漿または局所エストロゲンが痛覚感受性を調節していることが報告されている⁹⁻¹⁵⁾。例えば、卵巣摘出によるエストロゲンの枯渇は体性痛および内臓痛を惹き起こすが、その体性痛および内臓痛はエストラジオール (E2) 投与によって抑制される¹⁶⁻¹⁹⁾。したがって、閉経によるエストロゲンの分泌低下が BMS 発症の一因であることが示唆される。

ストレス反応は、恐怖や安全性に対する脅威を認識することによって惹き起こされる。ストレス刺激によって交感神経-副腎髄質系と視床下部-下垂体-副腎皮質 (HPA) 系が活性化される。この活性化によって、血中のエピネフリンやノルエピネフリンといったカテコールアミン濃度が上昇し²⁰⁾、副腎皮質より糖質コルチコイド (主にコルチゾール [ヒト] およびコルチコステロン [げっ歯類]) が分泌される²¹⁾。コルチゾールは糖新生、抗炎症、免疫抑制、タンパク質や脂肪の代謝など、生体維持に不可欠な作用をもつ²²⁻²⁴⁾。一方、ストレスによってコルチゾール分泌が亢進され、交感神経系を刺激することにより、自律神経失調症、頭痛、不眠、過敏性腸症候群などが発症すると報告されている^{22, 25, 26)}。

舌神経の圧迫による舌神経損傷後の舌への機械刺激および熱刺激による頭部逃避反射閾値 (HWRT) 低下の性差には、上行性痛覚伝達系の興奮性を調節する免疫細胞の相違が関与することが示唆されている²⁷⁾。しかしながら、閉経やストレスが誘因となって発症すると考えられている BMS における舌痛発現機構の性差については、不明な点が多い。その一因に閉経やストレスなどに起因した BMS モデル動物が確立されていないことが挙げられる。これまでも BMS モデル動物の作製を試みた報告は存在する²⁸⁾。しかし、多くの研究では雄性個体のみを用いている²⁹⁻³¹⁾、あるいは末梢神経損傷モデルを採用している点で³²⁾、BMS の疫学的特徴、特に女性の発症率が高いことや末梢神経損傷非依存性の疼痛様症状を十分に反映しているとは言いがたい。

そこで本研究では、雄性および雌性マウスを用いて、雄性および雌性マウスへの拘束によるストレス負荷³³⁾ および雌性マウスへの卵巣摘出が舌の侵害受容の変調にどのような影響を及ぼしているかを解明し、BMS のモデル動物を作製することを目的とした。

材料および方法

1. 実験動物

ICR 系マウス (雄性マウス: $n = 22$, 7-12 週齢; 雌性マウス: $n = 48$, 7-12 週齢, 日本エスエルシー, 浜松) を実験に用いた。明 (7 時 - 19 時) / 暗 (19 時 - 7 時) サイクルの環境下で、自由に水・餌が摂取できる状態で飼育されたマウスを使用した。雌性マウスにおいては、全身麻酔下 (導入: 4%, 維持: 2.5% イソフルラン吸入, ヴィアトリス製薬, 東京) でインピーダンスチェッカー (MK-11, 室町機械, 東京) のプローブを膣に挿入して測定したインピーダンスにより性周期を判断し、性周期に偏りがないように実験開始時期を設定した。本研究は、日本大学歯学部動物実験委員会による審査および学部長の承認を得て行われた (承認日: 2022 年 5 月 27 日, 最終承認番号: AP22DEN017-4)。日本大学動物実験実施規定に従って実験を行い、被験動物の苦痛軽減および使用動物数の低減に努めた。

2. 舌への機械刺激または熱刺激に対する HWRT の測定

マウスに十分な全身麻酔 (導入: 4%, 維持: 2%, イソフルラン吸入) を行った後、0.5% イソフルラン吸入を維持した。足底に対する 200 g 以下の Rodent pincher - Analgesia meter (BIOSEB, Vitrolles, France) によるピンチ刺激で足ひっこめ反射が起こり、呼吸数が毎分 180 ~ 200 回となる麻酔レベルに達したことを確認した後すぐに、舌尖より 3 mm の左側舌部を Rodent pincher - Analgesia meter を用いて漸増機械刺激 (0 - 110 g, 5 g/sec, cut off: 110 g) または接触型温度刺激装置 (刺激領域: 6×6 mm, インタークロス, 東京) を用いて漸増温度刺激 (30 - 52 °C, 1 °C /sec, cut off: 52 °C) した。舌への上記の機械刺激または温度刺激により頭部引っ込め反射が誘発された最小の刺激強度を HWRT とした。それぞれのマウスに対して HWRT を 2 回測定し、その平均値を各マウスの HWRT とした。各刺激間隔は 3 分以上とした。

3. 拘束ストレス負荷

拘束ストレスとして、十分な全身麻酔 (導入: 4%, 維持: 1%, イソフルラン吸入) を行った後、Mouse DecapiCone (MDC-200; Braintree Scientific, Braintree, MA, USA) にマウスを入れて拘束した。イソフルラン吸入を停止した後、1 日 6 時間 (9 時 - 15 時) 拘束を維持した (Restraint Stress 群, 以下 RS 群とする)³³⁾。RS 群では体動だけではなく食餌および飲水が制限される。したがって、

RS 群のコントロールとして1日6時間（9時 - 15時）食餌および飲水を制限する群を no-Food no-Water (nFnW) 群とした。また、自由に食餌および飲水が可能で、RS を受けないマウスを Free 群とした。

4. 卵巣摘出

全身麻酔（導入：4%，維持：2%，イソフルラン吸入）下にて、側腹部より腎臓の位置を確認後、腹臥位にして背面に約1cmの皮膚切開を加え、筋層を剥離し、卵管を脂肪組織とともに6-0絹糸で結紮した後、卵巣を両側とも卵管部から完全に摘出した（Ovariectomy 群、以下 OVX 群とする）。同様に全身麻酔下にて皮膚切開を加え筋層剥離し、卵管の明示のみ施行して皮膚を縫合した群を Sham 群とした。

5. 血漿コルチコステロン濃度の測定

RS, nFnW または Free 処置開始後21日目、全身麻酔（導入：4%，維持：2%，イソフルラン吸入）下にて、ヘパリン付きヘマトクリット管（HIRSCHMANN, Hirschmann Laborgerate GmbH & Co. KG, Eberstadt, Germany）を使用し、尾の根元から3分の1の部位を剃刀（PERSONNA, Shelton, CT, USA）にて1-2 mm 程度切開し、創出血を0.05 ml 採取した。採血した血液を4℃で3,000 rpm, 30 分で遠心分離し、上清のコルチコステロン濃度を AssayMax Corticosterone ELISA kit（AssayPro, St. Charles, MI, USA）を用いて定量した。Free 処置された雄性マウスから無作為に選んだ1頭の値を1として、血漿コルチコステロン濃度（Plasma corticosterone concentration：PCC）の相対値を解析した。

6. 実験タイムコース

1) 雄性マウス

RS, nFnW または Free 処置開始前 (Pre) に HWRT および体重測定を行い、その翌日 (Day 1) から各処置を開始し、各処置開始後21日目 (Day 21) に HWRT を測定した (図1 A)。体重は Pre から Day 21まで毎日測定した。

2) 雌性マウス

RS, nFnW または Free 処置開始前 (Pre) に HWRT および体重を測定した後、OVX または sham 処置を行った。OVX または sham 手術後5日目 (Day 1) より各処置を開始し、各処置開始後21日目 (Day 21) に HWRT を測定した (図1 B)。体重は Pre から Day 21まで毎日測定した。

7. 統計学的解析

各群の体重および HWRT 値は、正規性を持つことを Shapiro-Wilk test を用いて確認した。測定値は平均値 ± 標準誤差で表した。体重は、繰り返しのある二元配置分散

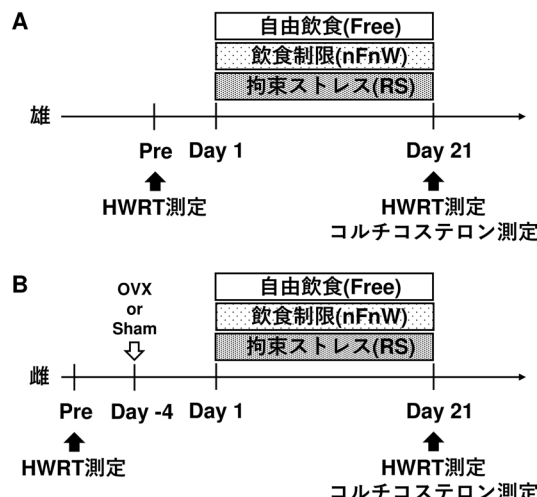


図1 実験タイムコース

A: 雄マウス実験タイムコース B: 雌マウスの実験タイムコース
OVX: 卵巣摘出, Sham: 卵巣摘出の sham 手術, HWRT: 頭部逃避反射閾値

分析を用いて検定した。HWRT 値は、paired *t*-test を用いて検定した。PCC の相対値は、正規性を持たなかったため、Kruskal-Wallis test を用いて検定を行った。統計学的解析には、SigmaPlot version 14.0 (Systat Software, Palo Alto, CA, USA) を使用した。有意水準は $\alpha = 0.05$ とした。

結 果

1. 体重および PCC の変化

雄性マウスにおいて、nFnW 群および RS 群の体重は Free 群と比較して減少した (図2 Aa)。RS 群では RS 開始後4日から13日間、Pre と比較して体重が減少した。nFnW 群の体重増加量は Free 群と比較して有意に減少した ($p < 0.01$)。図2 Ab に sham 手術された雌性マウスの、図2 Ac に OVX 手術されたマウスの体重増減を示す。sham 手術後、RS 群の体重は Free 群や nFnW 群と比較して有意に減少した ($p < 0.001$)。sham 手術された RS 群では、RS 開始2日目から21日目まで Pre と比較して体重が減少した。OVX 手術された RS 群の体重は Free 群や nFnW 群と比較して有意に減少した ($p < 0.001$)。OVX 手術された RS 群では、RS 開始後21日目まで Pre と比較して体重が減少した。さらに、OVX 手術した RS 群と sham 手術した RS 群の体重減少に差はなかった。

雄性マウスでは、RS 群の PCC が Free 群や nFnW 群と比較して高かった (図2 Ba)。sham 手術された雌性マウスでは、RS 群の PCC が Free 群と比較して高かった (図2 Bb)。OVX 手術された雌性マウスでは、Free 群、nFnW 群および RS 群間で PCC に差は見られなかった (図2 Bc)。

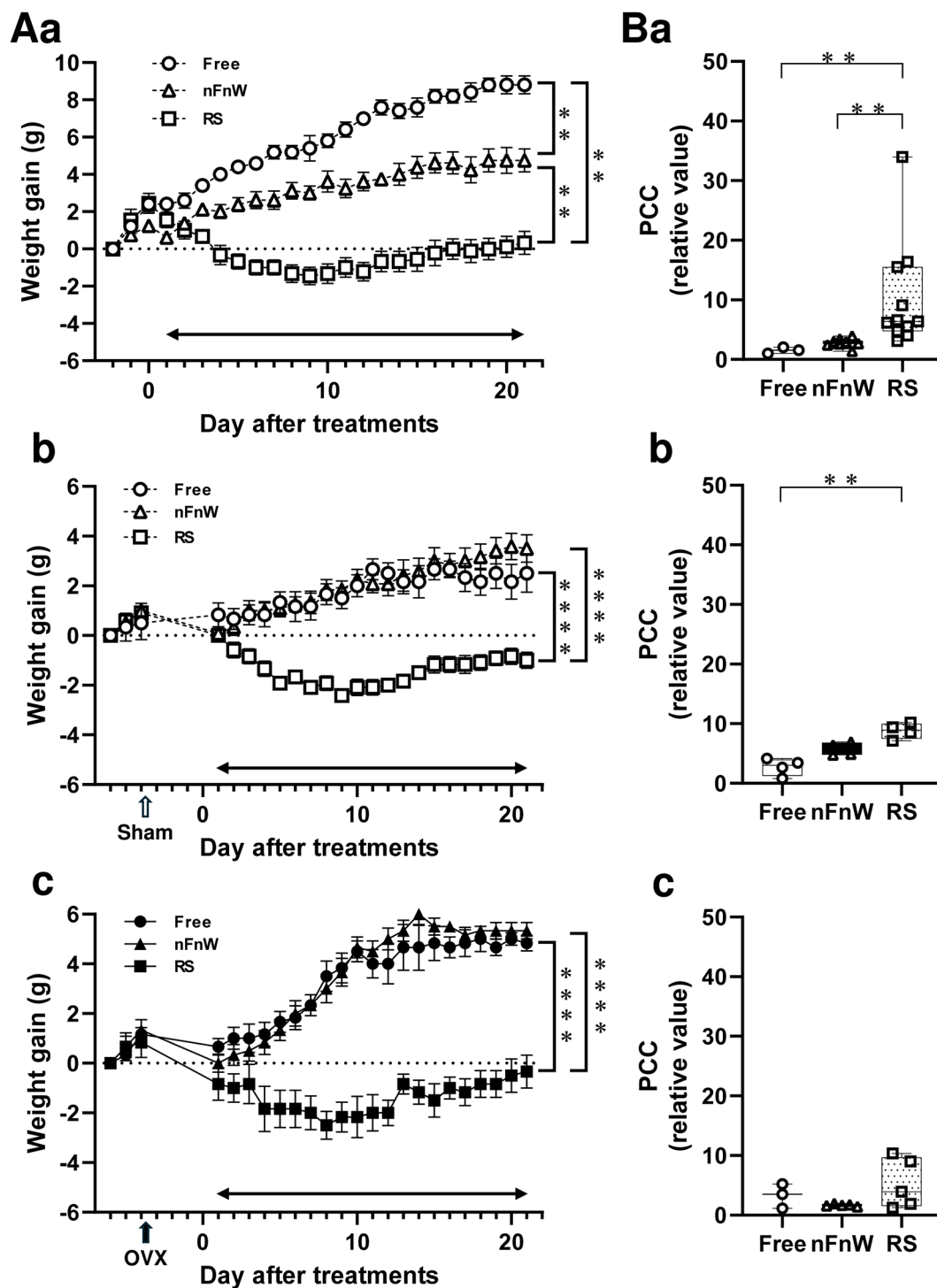


図2 体重と血漿コルチコステロン量の変化

A: 雄性 (Aa) および雌性 (Ab: Sham 群, Ac: OVX 群) マウスの体重変化。 B: 雄性 (Ba) および雌性 (Bb: Sham 群, Bc: OVX 群) マウスの血漿コルチコステロン濃度 (PCC: Plasma corticosterone concentration) の変化。両矢印は Free, nFnW または RS の期間を示す。

** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ 。

2. 雄性マウスへのストレス負荷による HWRT の変化

Pre と比較して Day 21 において, RS 群の舌への機械刺激または熱刺激に対する HWRT は有意に低下した (機械刺激, Pre: 109.4 ± 0.4 g, Day 21: 68.3 ± 6.2 g; 熱刺激,

Pre: 50.7 ± 0.4 °C, Day 21: 45.8 ± 0.8 °C, $n = 9$ in each) (図 3 A, B)。一方, Free 群および nFnW 群では, 舌への機械刺激または熱刺激に対する HWRT に変化は見られなかった (図 3 A, B)。

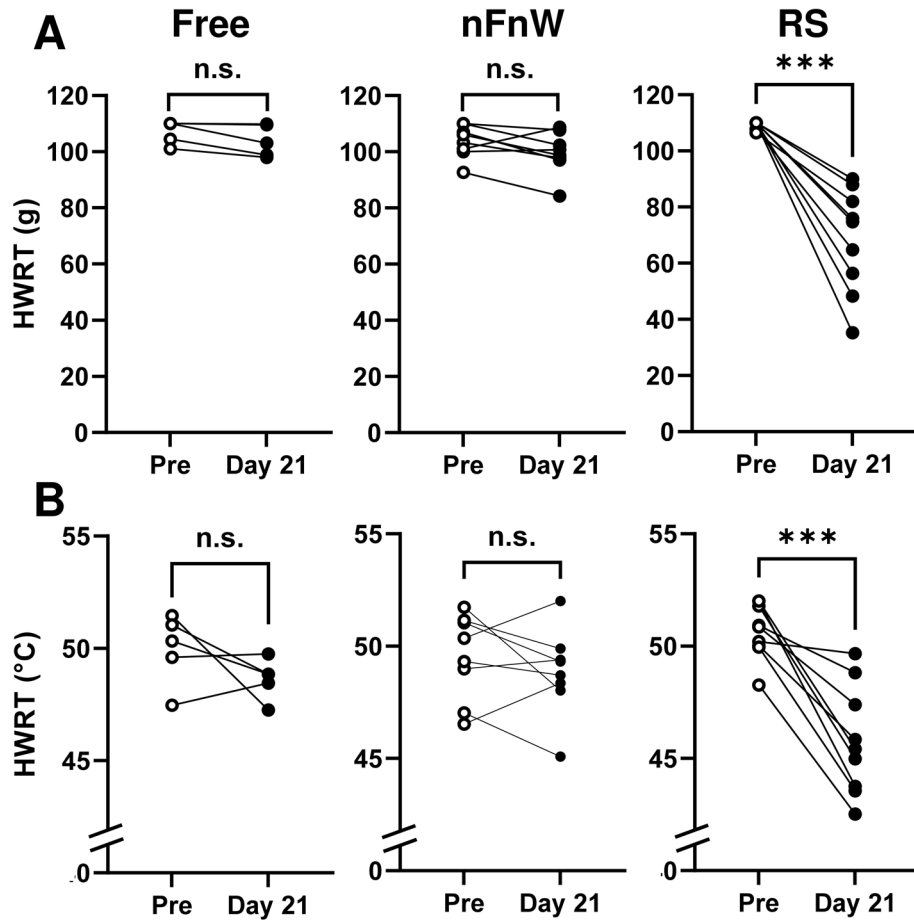


図3 雄性マウスへのRS負荷によるHWRT変化

PreおよびDay 21における舌への機械刺激 (A) または熱刺激 (B) に対するHWRT。n.s.: not significant. *** $p < 0.005$ 。

3. 雌性マウスへのストレス負荷によるHWRTの変化

Preと比較してDay 21において、sham手術されたRS群の舌への機械刺激または熱刺激に対するHWRTは有意に低下した (機械刺激, Pre: 108.1 ± 1.0 g, Day 21: 69.7 ± 5.0 g; 熱刺激: Pre: 50.0 ± 0.4 °C, Day 21: 46.3 ± 0.7 °C; $n = 12$ in each) (図4 A, B)。一方, sham手術されたFree群およびnFnW群では, 舌への機械刺激または熱刺激に対するHWRTに変化は見られなかった (図4 A, B)。

Preと比較してDay 21において, OVX手術されたFree群 (機械刺激, Pre: 103.7 ± 3.5 g, Day 21: 94.9 ± 4.5 g; 熱刺激, Pre: 50.9 ± 0.6 °C, Day 21: 48.4 ± 0.5 °C, $n = 6$ in each), nFnW群 (機械刺激, Pre: 107.8 ± 0.4 g, Day 21: 94.9 ± 4.0 g; 熱刺激, Pre: 40.4 ± 0.3 °C, Day 21: 47.3 ± 0.9 °C, $n = 6$ in each) およびRS群 (機械刺激, Pre: 107.0 ± 1.6 g, Day 21: 64.0 ± 5.2 g; 熱刺激, Pre: 50.4 ± 0.5 °C, Day 21: 45.4 ± 0.7 °C, $n = 6$ in each) の舌への機械刺激または熱刺激に対するHWRTは有意に低下した (図5 A, B)。

Sham手術またはOVX手術された各処置群において,

PreとDay 21での舌への機械刺激 (図6 A) および熱刺激 (図6 B) に対するHWRTの差を示す。Free群では, OVX手術された雌性マウスにおける舌への機械刺激および熱刺激に対するHWRTがsham手術されたものと比較して有意に低かった (機械刺激, Sham: 3.1 ± 4.0 g, OVX: -8.8 ± 2.6 g; 熱刺激, Sham: 0.3 ± 0.6 °C, OVX: -2.4 ± 0.8 °C, $n = 6$ in each)。nFnW群では, OVX手術された雌性マウスにおける舌への機械刺激に対するHWRTがsham手術されたものと比較して有意に低かったが (Sham: 2.2 ± 2.0 g, $n = 12$; OVX: -12.9 ± 4.2 g, $n = 6$), 舌への熱刺激に対するHWRTに有意な差は認められなかった (Sham: -0.7 ± 0.6 g, $n = 12$; OVX: -1.5 ± 0.5 g, $n = 6$, $p = 0.321$)。RS群では, Day 21におけるOVX手術された雌性マウスとsham手術された雌性マウスの舌への機械刺激および熱刺激に対するHWRTは低下傾向にあったが, 有意差は認められなかった (機械刺激, Sham: -38.4 ± 5.3 g, $n = 12$; OVX: -43.0 ± 6.3 g, $n = 6$, $p = 0.978$; 熱刺激, Sham: -3.7 ± 0.7 °C, $n = 12$, OVX: -5.0 ± 0.8 °C, $n = 6$, $p = 0.248$)。

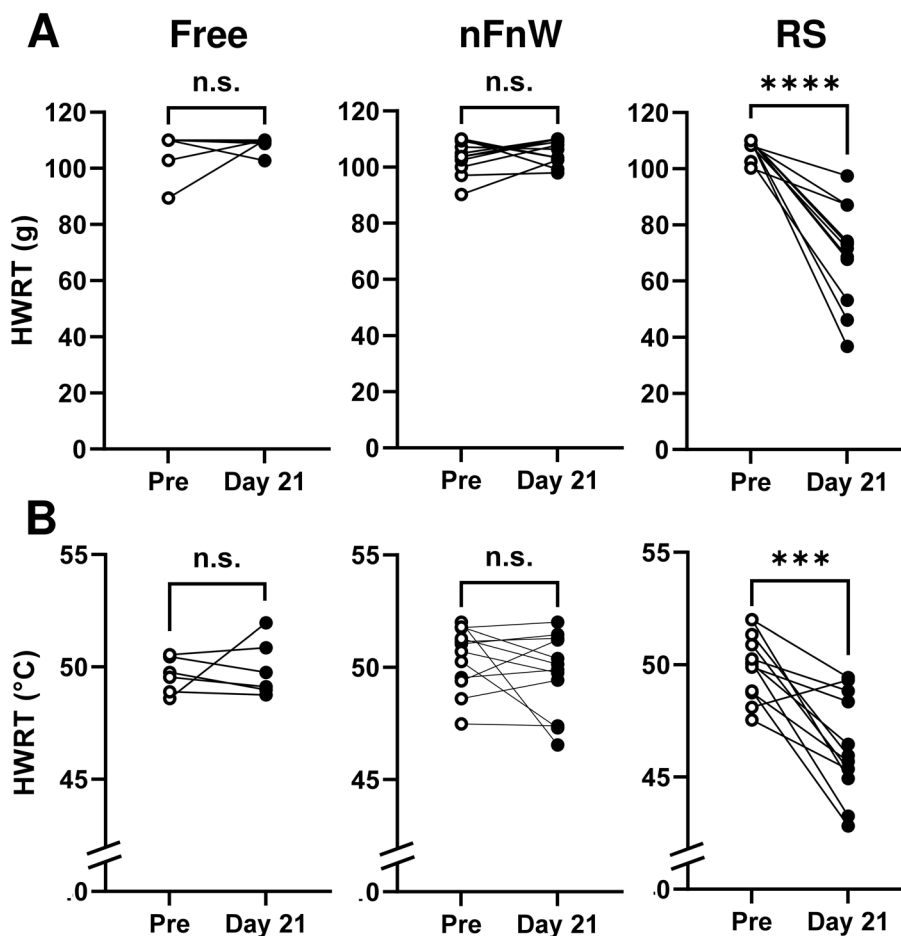


図4 Sham手術された雌性マウスへのPS負荷によるHWRT変化

Free群, nFnW群およびRS群の舌への機械刺激(A)または熱刺激(B)に対するHWRT。n.s.: not significant. *** $p < 0.005$. **** $p < 0.001$ 。

考 察

BMSモデル動物として, 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid 処置により舌に熱痛覚過敏が発症するモデル²⁹⁾や麻酔下で舌を乾燥させることで舌に機械アロディニアが発症するモデル^{30, 31)}が報告されている。しかし, それらの研究では雌は使用しておらず, また実際のBMS患者では観察されない舌の表層の萎縮などの器質的変化が観察されている。本研究では閉経には卵巣摘出, ストレスにはRSを用いて舌のHWRTの変化を解析したもので, BMSの疫学的特徴を反映したモデルと考えられる。

本研究で用いたRS負荷を行った他の研究においても, 体重の増加抑制が報告されている³³⁾。さらに, チューブを使った強い拘束ストレス負荷は著しい体重減少を惹き起こすことが知られている^{34, 35)}。おそらく, 拘束ストレス負荷の強度は体動制限程度に依存的であると考えられる。本研究では, 雄性マウスは未処置, 雌性マウスはshamまたはOVX処置後にRS負荷を行ったため, RS負荷による影響の性差を直接的に比較することはできない。しかしなが

ら, 雄性マウスと雌性マウスともにRS負荷後に体重が減少したことから, 本研究で用いたRS負荷により両性マウスにストレスが負荷されたことは間違いないと考えられる。

卵巣摘出は体重を増加させること³⁶⁾, エストロゲンまたはエストロゲンとプロゲステロンの投与によって卵巣摘出による体重増加が抑制されることが知られている^{37, 38)}。さらに, エストロゲン³⁹⁾やプロゲステロン⁴⁰⁾は脂肪細胞に作用して, 食欲抑制ホルモンであるレプチンの分泌を促進することから³⁹⁾, 卵巣摘出によるエストロゲンやプロゲステロンの分泌停止が体重増加を惹き起こすと考えられている。本研究では, 雄性マウスと比較して, 雌性マウスの方がRS負荷によって体重が減少した。これは雌性マウスの方がストレスの影響を受けやすいことを示唆している。さらに, OVX手術したRS群とsham手術したRS群の体重減少に差はなかった。したがって, RS負荷による体重減少にエストロゲンやプロゲステロンは関与しないことが示唆された。

ヒトではストレスが生体に負荷されると, 交感神経-副

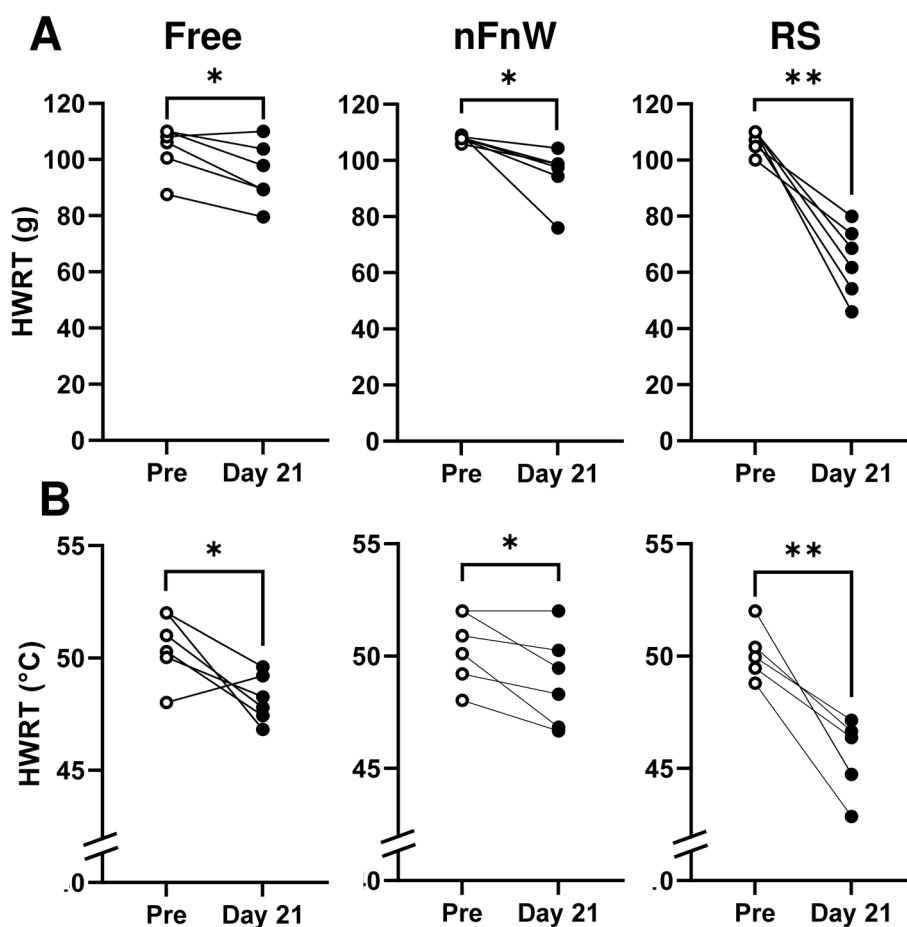


図5 OVX手術された雌性マウスへのRS負荷によるHWRT変化

Free群, nFnW群およびRS群それぞれの舌への機械刺激(A)または熱刺激(B)に対するHWRTの変化。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

腎髄質系やHPA系が活性化し、血中カテコールアミン(アドレナリンとノルアドレナリン)濃度の上昇や副腎皮質から糖質コルチコイド(主にコルチゾール)の分泌が起こり、全身性のストレス反応を惹き起こす⁴¹⁾。コルチコステロンはげっ歯類のコルチゾールに相当する。1時間の強い拘束による急性ストレスを負荷した雄性ラットでは、非ストレス群と比較して副腎皮質刺激ホルモン(adrenocorticotrophic hormone: ACTH)およびPCCが増加した⁴²⁾。一方、長期の拘束ストレス負荷後のACTHの血清濃度に差がなく、PCCは上昇したとの報告がある⁴³⁾。さらに、強制水泳ストレス、水回避ストレスや拘束ストレスといった異なる種類のストレスを交互に組み合わせ、21日間にわたりストレス負荷した場合、非ストレス群と比較してPCCは2倍以上増加していることが報告されている⁴⁴⁾。また、長期の拘束ストレス負荷はACTHの分泌量を減少させるとの報告もあり、この減少にはストレスに対する慣れが関与すると考えられている⁴⁵⁾。本研究では、RS負荷した雄性マウスと雌性マウスともに、Free群と比較してPCCが2倍以上に上昇した。この結果は、本研究で用いたRSにより十分なストレスが負荷されたことを示

唆している。PCCは拘束ストレス負荷により増加するが、OVX後の拘束ストレス負荷はPCCを変化させないことが報告されている⁴⁶⁾。一方で、OVX後のストレス負荷の有無によるPCCを比較したところ、ストレス負荷群においてPCCが低下したとの報告もある⁴⁷⁾。本研究では、OVX後のRS負荷の有無によるPCCに変化は認められなかった。この結果は、OVXによりHPA系の活性化に何らかの変調が生じた可能性を示唆しており、さらなる検討が必要である。

慢性的なストレスが痛覚異常を引き起こすメカニズムには、複数の因子が関与している可能性がある。例えば、長期にわたる寒冷ストレスによって誘発される痛覚過敏には、ペプチド含有一次求心性ニューロンが関与していることが報告されている⁴⁸⁾。また、強制水泳ストレス後に発症する痛覚過敏は、セロトニン作動性ニューロンの変調によって惹起される⁴⁹⁾。拘束ストレス負荷は、顎関節炎に起因した顎関節痛に対するモルヒネによる鎮痛効果を減弱し、延髄へのセロトニン選択的再取り込み阻害薬投与による鎮痛効果を増強した^{42, 43)}。これらの報告より、RS負荷は下行性疼痛抑制系を司るセロトニン作動性ニューロンや

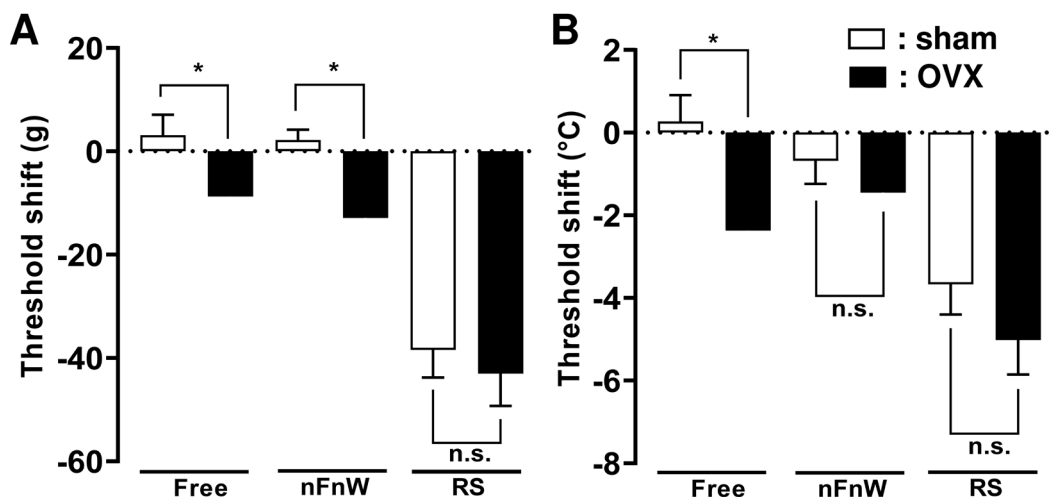


図6 Shams手術とOVX手術雌マウスのHWRTの変化の比較

舌への機械刺激 (A) および熱刺激 (B) に対する HWRT の変化 (Threshold shift) は, Day 21 の HWRT から Pre の HWRT を引いた値とした。n.s.: not significant. * $p < 0.05$ 。

内因性オピオイド系を変調させて疼痛強度を調節させることが示唆された。

一次ニューロンにおいてエストロゲン受容体は侵害受容に重要な Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) や Purinergic receptor 3 (P2X₃) と共存することから, エストロゲンのシグナルは侵害受容機構の調節に関与すると考えられる⁵⁰⁾。エストロゲンは, 神経成長因子 (NGF) やその受容体である Tropomyosin-related kinase A (TrkA) の機能を抑制するが, OVX によりエストロゲンの分泌が低下すると, この抑制が解除されて NGF-TrkA シグナル伝達が促進される。NGF-TrkA シグナルは TRPV1 の Ca²⁺透過性を上昇させ, 一次ニューロンの興奮性が増強すると考えられる⁵⁰⁾。また, OVX は口腔顔面領域に投射する一次ニューロンの P2X₃機能を増強させ, 顔面痛を惹起することが報告されている⁵¹⁾。通常, エストロゲンは P2X₃機能の増強を抑制しているが, OVX はエストロゲンの枯渇によって P2X₃機能を増強させ, 一次ニューロンの興奮性を上げると考えられる⁵²⁾。本研究では, OVX により顔面部への機械刺激や熱刺激に対する HWRT は低下した。したがって, OVX によるエストロゲンの分泌低下に起因した一次ニューロンに発現する TRPV1 や P2X₃の興奮性増強が, 舌の侵害受容の異常に関与することが示唆される。

結 論

末梢組織に器質的変化が見られないとされる BMS のモデルマウス作製を目指し, OVX による女性ホルモンの枯渇および 6 時間の体動制限による RS を行い, PCC および舌への機械刺激および熱刺激に対する HWRT 変化を解析した。その結果, 以下の結論を得た。

1. 雄性マウスおよび雌性マウスにおいて, 21 日間の RS

負荷は PCC を増加させ, 舌に機械アロディニアおよび熱痛覚過敏を惹起した。

2. OVX を施した雌性マウスでは, Free, nFnW および RS 処置群において舌に機械アロディニアおよび熱痛覚過敏が生じた。

3. 雌性マウスにおいて, RS 負荷により生じる舌の機械アロディニアおよび熱痛覚過敏は OVX の影響を受けなかった。

以上より, 雄性マウスおよび雌性マウスに対する RS 負荷および雌性マウスに対する OVX は舌に機械アロディニアおよび熱痛覚過敏を惹起させたことから, BMS モデルとして有用であると考えられた。

本論文作成にあたり, 的確な助言を頂いた日本大学歯学部生理学講座の皆様と丁寧な動物飼育管理を行っていただいた三協ラボサービスの方々に深く感謝いたします。

本研究は JSPS 科研費 (基盤研究 (C) 20K07746) の助成を受けて行われた。

本論文に関して, 開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 日本頭痛学会・国際頭痛分類委員会 (2018) 国際頭痛分類. 日本語版第 3 版, 医学書院, 東京, 181.
- 2) Coculescu EC, Radu A, Coculescu BI (2014) Burning mouth syndrome: a review on diagnosis and treatment. J Med Life 7, 512-515.
- 3) Bergdahl J, Anneroth G, Perris H (1995) Personality characteristics of patients with resistant burning mouth syndrome. Acta Odontol Scand 53, 7-11.
- 4) Scala A, Checchi L, Montevecchi M, Marini I, Giamberardino MA (2003) Update on burning mouth syndrome: overview and patient management. Crit Rev Oral Biol Med 14, 275-291.
- 5) Suarez P, Clark GT (2006) Burning mouth syndrome: an update on diagnosis and treatment methods. J Calif Dent

- Assoc 34, 611-622.
- 6) Netto FOG, Diniz IMA, Grossmann SMC, de Abreu MH, do Carmo MA, Aguiar MC (2011) Risk factors in burning mouth syndrome: a case-control study based on patient records. *Clin Oral Investig* 15, 571-575.
 - 7) Imamura Y, Shinozaki T, Okada-Ogawa A, Noma N, Shinoda M, Iwata K, Wada A, Abe O, Wang K, Svensson P (2019) An updated review on pathophysiology and management of burning mouth syndrome with endocrinological, psychological and neuropathic perspectives. *J Oral Rehabil* 46, 574-587.
 - 8) 坂井建雄, 宮本賢一, 小西真人, 工藤宏幸 (2017) カラー図解 人体の正常構造と機能. 第3版, 坂井建雄, 河原克雅, 日本医事新報社, 東京, 751.
 - 9) Kayser V, Berkley KJ, Keita H, Gautron M, Guilbaud G (1996) Estrous and sex variations in vocalization thresholds to hindpaw and tail pressure stimulation in the rat. *Brain Res* 742, 352-354.
 - 10) Bradshaw HB, Berkley KJ (2000) Estrous changes in responses of rat gracile nucleus neurons to stimulation of skin and pelvic viscera. *J Neurosci* 20, 7722-7727.
 - 11) Bereiter DA (2001) Sex differences in brainstem neural activation after injury to the TMJ region. *Cells Tissues Organs* 169, 226-237.
 - 12) Liu B, Eisenach JC, Tong C (2005) Chronic estrogen sensitizes a subset of mechanosensitive afferents innervating the uterine cervix. *J Neurophysiol* 93, 2167-2173.
 - 13) Allen AL, McCarson KE (2005) Estrogen increases nociception-evoked brain-derived neurotrophic factor gene expression in the female rat. *Neuroendocrinology* 81, 193-199.
 - 14) Bereiter DA, Okamoto K, Bereiter DF (2005) Effect of persistent monoarthritis of the temporomandibular joint region on acute mustard oil-induced excitation of trigeminal subnucleus caudalis neurons in male and female rats. *Pain* 117, 58-67.
 - 15) Evrard HC (2006) Estrogen synthesis in the spinal dorsal horn: a new central mechanism for the hormonal regulation of pain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291, R291-R299.
 - 16) Stoffel EC, Ulibarri CM, Craft RM (2003) Gonadal steroid hormone modulation of nociception, morphine antinociception and reproductive indices in male and female rats. *Pain* 103, 285-302.
 - 17) Sanoja R, Cervero F (2005) Estrogen-dependent abdominal hyperalgesia induced by ovariectomy in adult mice: A model of functional abdominal pain. *Pain* 118, 243-253.
 - 18) Mannino CA, South SM, Quinones-Jenab V, Inturrisi CE (2007) Estradiol replacement in ovariectomized rats is antihyperalgesic in the formalin test. *J Pain* 8, 334-342.
 - 19) Sanoja R, Cervero F (2008) Estrogen modulation of ovariectomy-induced hyperalgesia in adult mice. *Eur J Pain* 12, 573-581.
 - 20) Vinik AI, Maser RE, Ziegler D (2011) Autonomic imbalance: prophet of doom or scope for hope? *Diabet Med* 28, 643-651.
 - 21) Blackburn-Munro G, Blackburn-Munro R (2003) Pain in the brain: are hormones to blame? *Trends Endocrinol Metab* 14, 20-27.
 - 22) Heim C, Ehlert U, Hellhammer DH (2000) The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology* 25, 1-35.
 - 23) Ehlert U, Gaab J, Heinrichs M (2001) Psychoneuroendocrinological contributions to the etiology of depression, posttraumatic stress disorder, and stress-related bodily disorders: the role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Biol Psychol* 57, 141-152.
 - 24) Tsigos C, Chrousos GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53, 865-871.
 - 25) Jankord R, Herman JP (2008) Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Ann N Y Acad Sci* 1148, 64-73.
 - 26) McEwen BS (2008) Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol* 583, 174-185.
 - 27) 坂梨公亮 (2024) マウス舌神経損傷による舌神経障害性疼痛の性差に対する中枢神経系免疫細胞の役割. *日大歯学* 98, 10-17.
 - 28) Sangalli L, Prakapenka AV, Chaurasia A, Miller CS (2024) A review of animal models for burning mouth syndrome: Mechanistic insights and knowledge gaps. *Oral Dis* 30, 3761-3770.
 - 29) Shinoda M, Takeda M, Honda K, Maruno M, Katagiri A, Satoh-Kuriwada S, Shoji N, Tsuchiya M, Iwata K (2015) Involvement of peripheral artemin signaling in tongue pain: possible mechanism in burning mouth syndrome. *Pain* 156, 2528-2537.
 - 30) Nakaya Y, Tsuboi Y, Okada-Ogawa A, Shinoda M, Kubo A, Chen JY, Noma N, Batbold D, Imamura Y, Sessle BJ, Iwata K (2016) ERK-GluR1 phosphorylation in trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons is involved in pain associated with dry tongue. *Mol Pain* 12, 1744806916641680.
 - 31) Chen JY, Kubo A, Shinoda M, Okada-Ogawa A, Imamura Y, Iwata K (2020) Involvement of TRPV4 ionotropic channel in tongue mechanical hypersensitivity in dry-tongue rats. *J Oral Sci* 62, 13-17.
 - 32) Boucher Y, Simons CT, Carstens MI, Carstens E (2014) Effects of gustatory nerve transection and/or ovariectomy on oral capsaicin avoidance in rats. *Pain* 155, 814-820.
 - 33) Shoji H, Miyakawa T (2020) Differential effects of stress exposure via two types of restraint apparatuses on behavior and plasma corticosterone level in inbred male BALB/cAJcl mice. *Neuropsychopharmacol Rep* 40, 73-84.
 - 34) Christiansen SH, Olesen MV, Wörtwein G, Woldbye DP (2011) Fluoxetine reverses chronic restraint stress-induced depression-like behaviour and increases neuropeptide Y and galanin expression in mice. *Behav Brain Res* 216, 585-591.
 - 35) Sadler AM, Bailey SJ (2016) Repeated daily restraint stress induces adaptive behavioural changes in both adult and juvenile mice. *Physiol Behav* 167, 313-323.
 - 36) Wegorzewska IN, Walters K, Weiser MJ, Cruthirds DF, Ewell E, Larco DO, Handa RJ, Wu TJ (2008) Postovariectomy weight gain in female rats is reversed by estrogen receptor alpha agonist, propylpyrazoletriol. *Am J Obstet Gynecol* 199, e1-5.
 - 37) Roesch DM (2006) Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. *Physiol Behav* 87, 39-44.
 - 38) Ko SH, Jung Y (2021) Energy metabolism changes and dysregulated lipid metabolism in postmenopausal women.

- Nutrients 13, 4556.
- 39) Childs GV, Odle AK, MacNicol MC, MacNicol AM (2021) The importance of leptin to reproduction. *Endocrinology* 162, bqaa204.
 - 40) Uchishiba M, Yamamoto S, Takeda A, Arakaki R, Arata M, Noguchi H, Aoki H, Tamura K, Maeda T, Minato S, Nii M, Inui H, Kamada S, Kinouchi R, Yamamoto Y, Yoshida K, Yagi S, Kato T, Kaji T, Nishimura M, Ino K, Iwasa T (2024) Progesterone treatment reduces food intake and body weight in ovariectomized female rats. *Steroids* 203, 109367.
 - 41) 松村譲児, 多久和陽 (2017) カラー図解 人体の正常構造と機能. 第3版, 坂井建雄, 河原克雅, 日本医事新報社, 東京, 564-569.
 - 42) Gameiro GH, Gameiro PH, Andrade Ada S, Pereira LF, Arthuri MT, Marcondes FK, Veiga MC (2006) Nociception and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress. *Physiol Behav* 87, 643-649.
 - 43) Gameiro GH, Andrade Ada S, de Castro M, Pereira LF, Tambeli CH, Veiga MC (2005) The effects of restraint stress on nociceptive responses induced by formalin injected in rat's TMJ. *Pharmacol Biochem Behav* 82, 338-344.
 - 44) Li JH, Zhao SJ, Guo Y, Chen F, Traub RJ, Wei F, Cao DY (2024) Chronic stress induces wide-spread hyperalgesia: The involvement of spinal CCK1 receptors. *Neuropharmacology* 258, 110067.
 - 45) Martí O, Armario A (1998) Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int J Dev Neurosci* 16, 241-260.
 - 46) Ge F, Yang H, Lu W, Shi H, Chen Q, Luo Y, Liu L, Yan J (2020) Ovariectomy induces microglial cell activation and inflammatory response in rat prefrontal cortices to accelerate the chronic unpredictable stress-mediated anxiety and depression. *Biomed Res Int* 2020, 3609758.
 - 47) Larco DO, Cruthirds DF, Weiser MJ, Handa RJ, Wu TJ (2012) The effect of chronic immobilization stress on leptin signaling in the ovariectomized (OVX) rat. *Endocrine* 42, 717-725.
 - 48) Satoh M, Kuraishi Y, Kawamura M (1992) Effects of intrathecal antibodies to substance P, calcitonin gene-related peptide and galanin on repeated cold stress-induced hyperalgesia: comparison with carrageenan-induced hyperalgesia. *Pain* 49, 273-278.
 - 49) Quintero L, Moreno M, Avila C, Arcaya J, Maixner W, Suarez-Roca H (2000) Long-lasting delayed hyperalgesia after subchronic swim stress. *Pharmacol Biochem Behav* 67, 449-458.
 - 50) Seol SH, Chung G (2022) Estrogen-dependent regulation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and P2X purinoceptor 3 (P2X3): Implication in burning mouth syndrome. *J Dent Sci* 17, 8-13.
 - 51) Yu LH, Li N, Liu CY, Ma B (2011) Estrogen altered facial mechanical pain threshold and trigeminal P2X3 receptor expression. *Neuro Endocrinol Lett* 32, 811-815.
 - 52) Chaban VV, Mayer EA, Ennes HS, Micevych PE (2003) Estradiol inhibits atp-induced intracellular calcium concentration increase in dorsal root ganglia neurons. *Neuroscience* 118, 941-948.