

バーニングマウス症候群モデル動物確立のための基礎研究

－ラットの舌における疼痛関連行動の解析－

松 本 勝 洋

明海大学大学院歯学研究科

歯学専攻

(指導：小長谷 光 教授)

Basic study for the establishment of an animal model of

burning mouth syndrome

－Analysis of the pain-related behaviors on the tongue in rats－

Katsuhiro MATSUMOTO

Meikai University Graduate School of Dentistry

(Mentor: Prof. Hikaru KOHASE)

1 要旨

バーニングマウス症候群（BMS）は口腔粘膜，特に舌に生じる原因不明の慢性疼痛疾患である．閉経後の女性に多くみられ，女性ホルモンの減少が本病態と関連がある可能性があるが，発症機構の解明には至っていない．われわれは，BMS 患者でみられる舌の神経成長因子（NGF）増加と女性ホルモン減少に着目し，これらの因子と舌における疼痛発現の関係を疼痛関連行動の観察により分析した．

卵巣を摘出した（OVX）群と sham 群の各ラットの舌尖部に 5%ホルマリン溶液の 1 回投与または NGF（1000 ng/10 μ L），リン酸緩衝生理食塩水を 1 週間毎日投与し（計 54 匹），薬液投与前後の行動変化とコンデンスミルクの飲水量変化を分析した．

ホルマリン投与により口を動かす，舌突出などの顔面領域の行動が増加した．NGF 投与でも同様の行動変化がみられた．さらに OVX 群では NGF の繰り返し投与によりこれらの行動量が大きく増加した．また NGF を投与した OVX 群で投与開始 1 日後飲水量が有意に減少し，それ以降も他の群と比較し飲水量は低値を示した．

以上から女性ホルモン減少と NGF 増加は口腔内の疼痛関連行動を変化させる可能性が示唆された．

索引用語：バーニングマウス症候群，女性ホルモン，神経成長因子

1 Abstract

Burning mouth syndrome (BMS) is a chronic intraoral pain disorder of unknown cause. Because BMS primarily affects postmenopausal women, it is considered that female hormone deficiency is involved in the pathophysiology of BMS. However, the etiology of BMS remains obscure. Our study focused on an upregulation of nerve growth factor (NGF) that has been demonstrated in the subepithelial nerve fibers of tongue biopsies from BMS patients and the decrease in female hormones. We examined whether exogenously NGF administrated into the tongue of ovariectomized (OVX) rats would induce pain-related behaviors.

OVX and sham rats ($n = 54$) received chemical administration ($10 \mu\text{L}$) to the tongue tip before the behavioral tests. Formalin (5%) was administrated once only, whereas NGF (1000 ng) or phosphate-buffered saline was administrated repetitively for 7 days. The behavioral alterations and changes in condensed milk drink consumption were analyzed before and after administration of these chemicals.

Administration of formalin increased the orofacial behaviors such as vacuous chewing and tongue protrusions. The increases of these behaviors were also observed in the rats after administration of NGF. Furthermore, repeated administration of NGF significantly increased these orofacial movements in the OVX group. The amount of condensed milk intake decreased significantly in the OVX group one day after the administration of NGF started, and the consumption was lower than that of the other groups thereafter.

Our findings suggest that a decrease in female hormones combined with an increase in tongue NGF might alter pain-related behaviors on the rat tongue.

Key words: burning mouth syndrome, female hormone, nerve growth factor

2 緒言

国際疼痛学会（International Association for the Study of Pain : IASP, 2020 年）は痛みを「組織損傷が実際に起こった時あるいは起こりそうな時に付随する不快な感覚および情動体験, あるいはそれに似た不快な感覚および情動体験」と定義している¹⁾. 痛みは個人的な経験に基づく主観的な症状であり, 各個人は人生での経験を通じて, 生物学的, 心理的, 社会的要因の影響を受けながら痛みの概念を学んでいくとされている¹⁾. そのため臨床では患者の疼痛の程度を測定する際, 視覚的アナログスケール（visual analogue scale : VAS）等を用いて, 患者がこれまでの経験を元に主観的かつ相対的に痛みの強さを数値化する方法が広く一般的に使用されている²⁾.

疼痛に関する基礎研究はラットやマウスなどの動物を用いた疼痛モデルの作製や鎮痛薬の創薬実験などが行われている. 動物実験での疼痛の評価方法は, 外界からの機械的, 熱的刺激を動物の体表に与え, 刺激に対する回避反応の閾値を疼痛指標として用いることが主流となっている³⁾. すなわち, 動物実験では主に刺激誘発痛を評価する方法が広く用いられているのに対し, 患者を対象とした臨床では主に自発痛を評価している. これにより動物モデルで優位性が示された治療法が, 実際の患者において再現されない事例が生じることにつながる. この二つの乖離を無くするためには, 動物実験においても自発痛を指標とする疼痛評価法を適応する必要がある. しかし動物は言葉を発することができないため自発痛を評価する方法としては, 疼痛を反映すると考えられる行動変化を指標として疼痛を評価する必要がある. 実験動物に痛みが生じている可能性のある行動

として、患部を気にかける行動（庇う、舐める、振るなど）の増加や探索行動などの減少、摂餌量の低下などが挙げられる⁴⁾。実験対象部位としては実験動物の後肢に疼痛を発現させたものが多いが、口腔周囲の疼痛関連行動を観察した研究も散見される^{5,6)}。

口腔内に痛みを生じる疾患は様々なものがあるが、その一つにバーニングマウス症候群（burning mouth syndrome : BMS）がある。BMS は傷や炎症などがみられないにもかかわらず、口腔粘膜、とりわけ舌に慢性的な痛みを生じる疾患である⁷⁾。BMS は日本では以前から舌痛症として対症的に扱われてきたが、その発症メカニズムは解明されておらず完治が難しい疾患である。BMS の診断基準の一つに患者が「口腔粘膜に灼熱感などの疼痛を毎日感じ、その疼痛が一日の中で持続している」があり⁸⁾、BMS においても患者の自発痛が重要な評価項目となる。

これまで BMS に関する基礎研究は病因が不明なため、病態モデル動物が作製されておらず、研究数は多くない。BMS の病態に即した疼痛モデルとしては、口腔内に「自発痛」が生じていることが望ましいが、現時点では主に誘発痛を用いた検討が行われている。例えば、舌神経に物理的な損傷を加えてラットの舌に神経障害性疼痛を生じさせた研究では機械的刺激や温度刺激に対する反応を観察する実験が行われている^{9, 10)}。またマウスの舌に trinitrobenzene sulfonate を投与した研究では舌に炎症的な変化を伴わずに、舌の温度刺激に対するアロディニアを観察している¹¹⁾。このように BMS に関する研究は断片的で、発症機構の解明には至っていない。疼痛に関しても機械的刺激や温度刺激に対する反応閾値を測定するものが多く、口腔内の疼痛発現による行動変化を観察した研究は調べた範囲ではみられなかった。

一方，BMS 患者を対象とした臨床研究では，患者の舌生検の結果，粘膜上皮内の細径神経線維の変性・減少，神経成長因子（nerve growth factor：NGF）発現神経線維の増加，TRPV1（transient receptor potential vanilloid 1）・P2X₃受容体発現神経線維の増加が確認され¹²⁻¹⁴⁾，神経障害性疼痛がBMSの病態である可能性が報告された¹²⁾．TRPV1はカプサイシンや熱に対する痛みに関与しており，P2X₃受容体はアデノシン三リン酸を介して痛みの発生と関連がある．またNGFは神経の成長や分化に必要な物質であるが，疼痛発現にも関与し，神経線維上でTRPV1やP2X₃受容体の発現を増加させることがわかっている¹⁵⁻¹⁷⁾．神経障害性疼痛の動物モデルでは，神経線維の減少，NGFの増加，TRPV1・P2X₃受容体発現神経線維の増加が観察されており，これら4つの所見はBMSの病態が神経障害性疼痛であることを示唆している．またBMSは更年期以降の女性に多いことから⁷⁾，女性ホルモンの減少がBMSの発症に関与していることが疑われる．卵巣摘出（ovariectomy：OVX）ラットの口腔粘膜上皮の萎縮が観察されており¹⁸⁾，女性ホルモンの減少が口腔内の組織に影響を与えることが示唆されている．

そこで本研究では，女性ホルモンとNGFに着目し，OVXラットの舌にNGFを投与した後，疼痛関連行動を観察することでラットの口腔内における疼痛発現の有無を検証した．またこれにより作製された動物モデルがBMSモデルとして適正かどうかその妥当性を検討した．

3 実験材料および実験方法

本研究は明海大学歯学部動物実験倫理委員会の承認を受け，ガイドラインの規定に従って行った（承認番号：A2029）。

3.1 女性ホルモンと NGF によるラットの行動変容実験

はじめにラットの舌にホルマリンを投与した時のラットの行動観察を行った。ホルマリンは動物実験において疼痛発現の指標となる行動変化を引き起こす刺激物質として使用されている¹⁹⁾。その後，OVX ラットへの NGF 投与による行動変化を観察した。

3.1-1 実験動物および飼育方法

Sprague-Dawley 系雌ラット（10 週齢，54 匹，三協ラボサービス，東京，日本）を用いた。ラットは恒温恒湿（室温 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ，湿度 $50 \pm 10\%$ ）に保たれた飼育室にて飼育し，普通食の市販固形飼料（MF，オリエンタル酵母工業株式会社，東京，日本）および飲料水を自由に摂取させた。12 時間の明暗サイクル（8:00 点灯，20:00 消灯）の環境下にて，感染のない状況で飼育した。

3.1-2 OVX ラットの作成

卵巣摘出術および sham 手術は以前に報告された方法²⁰⁾と同様の手技で行った。以下簡単に記す。三種混合麻酔薬（塩酸メデトミジン [メデトミン注，フジタ製薬株式会社，東京，日本，0.15 mg/kg]，ミダゾラム [ドルミカム注射液，アステラス製薬株式会社，東京，日本，2 mg/kg]，酒石酸ブトルファノール [ベトルファール，Meiji Seika ファルマ株式会社，東京，日本，2.5 mg/kg]）を腹腔内投与（0.1 mL/体重 10 g）後，背部より両

側の卵巢を摘出し OVX ラットを作製した (OVX 群, $n = 27$) . 卵巢を摘出せず剖出のみ行い縫合したものを sham ラットとした (sham 群, $n = 27$) .

両群ともに同様の環境下で 9 週間飼育し, 手術後から毎週同時刻に体重測定を行い, 経時的な体重変化を比較した.

3.1-3 溶液投与

ホルマリン溶液は実験で使用する毎に, ホルマリン液 (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を超純水で希釈し, 5%ホルマリン溶液を作成した. NGF 溶液は NGF- β from rat (Sigma-Aldrich, 東京, 日本) の粉末を 0.1%牛血清アルブミン溶液 (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) に濃度が 100 ng/ μ L になるように溶解し, 使用するまで-20°C 以下で冷凍保存した.

薬液投与は卵巢摘出術または sham 手術から 8 週間後, イソフルラン (エスカイン, ファイザー, NY, USA) の浅麻酔下で各ラットの舌尖部粘膜下に 26s ゲージ針のハミルトンシリンジを用いて行った. 5%ホルマリン溶液の投与は 1 度だけ行い, NGF (1000 ng/10 μ L) またはリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline : PBS) (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) (10 μ L) の投与は観察期間の 1 週間毎日 1 回行った. ホルマリン溶液と NGF 溶液の濃度は以前の報告に基づいた^{6, 21)}.

3.1-4 行動観察 (ホルマリン投与) (Fig. 1A, B)

OVX ラット ($n = 3$) , sham ラット ($n = 3$) に対してホルマリン溶液投与前後の行動変化を分析した.

観察環境は透明な観察ケージ (24 × 35 × 18 cm) を暗くした部屋のテーブルの上に設置し、ケージ上からライトを照らした。ケージの奥に鏡を設置し、その反対側にデジタルビデオカメラを置きラットの行動を撮影した⁵⁾。実験は全て 8:00-15:00 の間に実施した。卵巣摘出術または sham 手術から 7 週間後、薬液投与までの 1 週間、毎日ラットを観察環境に 30 分間置き、環境に馴化させるトレーニングを行った。ビデオカメラによる撮影は 1 匹ずつラットを観察環境に移し行った。撮影した時期は、ホルマリン溶液投与前日と投与から 10 分後のそれぞれ 10 分間とした。

3.1-5 行動観察 (NGF/PBS 投与) (Fig. 1A, C)

OVX ラットに NGF を投与した群 (OVX + NGF 群, n = 6) , OVX ラットに PBS を投与した群 (OVX + PBS 群, n = 6) , sham ラットに NGF を投与した群 (sham + NGF 群, n = 6) および sham ラットに PBS を投与した群 (sham + PBS 群, n = 6) で行動変化の比較を行った。

ホルマリン投与実験と同様の観察環境で実験を行った。撮影した時期は、薬液投与前日、投与開始から 10 分後、30 分後、60 分後、120 分後、180 分後、1 日後、3 日後、5 日後および 7 日後のそれぞれ 10 分間とした。対象とした観察項目を以下に示す。観察時間の 10 分間にそれぞれの観察項目が観察された総時間 (秒) を測定した。

・行動観察項目 (Table 1A)

探索行動：歩き回る、匂いをかぐ、後ろ足で立つなどの動作

不動：動かず背中を丸めじっとしている状態

休止：不動とは異なり、上肢の上に頭を乗せた状態、または目を閉じ眠っている状態

体毛づくろい：上下肢，舌，口が顔面部以外の体の部分に接触する動作

顔面毛づくろい：上下肢が顔面部に接触する動作（体毛づくろいを伴わないもの）

両前肢を振る：両前肢を合わせた状態で縦に急速に振る動作

首を横に振る：首を横に振る動作

口を動かす：食餌を含んでいないが，何かを食べているように口を動かす動作

舌突出：口腔内より舌を前方に突き出す動作

歯軋り：口を動かす動作に加え，歯を擦り合わせる音が聞き取れる動作

顔面毛づくろいと体毛づくろいは一連の動作としてしばしば観察される⁵⁾．そこで顔面毛づくろいはさらに体毛づくろいが付随されていた場合とされていない場合に分けてさらなる測定を行った（Table 1B）．これを元に観察された顔面部毛づくろいの総時間の中で顔面部単独の毛づくろいが占める割合を次式の通りに算出した．

$$\begin{aligned} & \text{（顔面部単独の毛づくろいの割合）} = \left(\text{観察された顔面部単独の毛づくろいの総時間} \right) \\ & \div \left(\text{観察された顔面部単独の毛づくろいの総時間} + \text{体毛づくろいが付随した顔面毛づくろいの総時間} \right) \times 100 \end{aligned}$$

また，OVX + NGF 群，sham + NGF 群における薬液投与前，投与から 10 分後の行動変化の結果とホルマリン投与群の行動変化の結果を比較した．

3.1-6 飲水量測定（Fig. 1C, D）

OVX + NGF 群（n = 6），OVX + PBS 群（n = 6），sham + NGF 群（n = 6）および sham + PBS 群（n = 6）で飲水量の比較を行った．

飲水量測定には市販のコンデンスミルク（森永乳業株式会社，東京，日本）を蒸留水で30%に希釈したものを使用した²²⁾．微量飲水測定用給水瓶（DT-1，株式会社シンファクトリー，福岡，日本）内に希釈したコンデンスミルクを入れ，実験前後の給水瓶の重さを量り，減少量をラットの飲水量とした．実験環境は通常の明るさの部屋の中，テーブル上に透明な容器を置き容器の上から給水瓶を設置して，実験時間中自由に飲水させた．実験時間は7分間とし実験は1匹ずつ行った．実験開始12時間前から絶食させ，飲水は継続させた．行動観察実験と同様に，手術から7週間後，薬液（NGFまたはPBS）投与までの1週間，毎日ラットを実験環境に慣れさせるトレーニングを行った．飲水量測定は，薬液投与開始前日（Day -1），投与直後（Day 0），1日後（Day 1），3日後（Day 3），5日後（Day 5）および7日後（Day 7）に行った．得られた飲水量を個々の体重（g）で割った値を分析に用いた．

3.1-7 血清中 17 β -エストラジオール（17 β -estradiol : E₂）濃度測定および子宮観察

1週間の実験後，ラットを灌流固定する際に心臓より5 mLの採血を行った．採取した血液を3,000 rpm，4°Cで20分間遠心分離後，血清のみを抽出し冷蔵保存した．その後，株式会社 BML（東京，日本）に血清中 E₂ 濃度の測定を委託した．なお，本研究で用いた SD 雌系ラットの性周期は4-5日と推察されるが，本研究では sham 群の採血を行う際，性周期を考慮することなく採血および屠殺を行った．また，採血後ラットの腹部を開き，子宮の萎縮の程度，卵巣の有無を観察した．

3.2 統計学的解析

実験データは平均値 \pm 標準誤差 (standard error of the mean : S.E.M) で示した。統計的有意差の検定は、2 群間の比較には Student's t-test を、繰り返し測定された値に対しては対応のある t-test もしくは二元配置反復測定分散分析 (two-way Repeated measures analysis of variance: ANOVA) 後に Tukey's multiple comparison test を用いた。P 値が 0.05 未満の場合を統計的有意とした。すべての統計解析には EZR version 1.41 (URL: <http://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmed.html>) を使用した²³⁾。

4 実験結果

4.1 経時的な体重変化

Sham 群, OVX 群における sham 手術および卵巣摘出術当日から行動実験が終了する 9 週間経過後までの体重の経時的变化の測定結果を Fig. 2 に示す.

手術当日における両群の体重に有意な差は認めなかった (sham 群 : 221.8 ± 4.1 g, OVX 群 : 224.8 ± 4.3 g, $p = 0.894$) . 手術 1 週間後から OVX 群は sham 群と比較し有意に体重が増加し (sham 群 : 235.2 ± 5.1 g, OVX 群 : 254.0 ± 6.0 g, $p = 0.034$) , 9 週間後まで体重増加量は OVX 群が sham 群に比べ有意に大きかった.

4.2 血清中 E₂ 濃度測定および子宮観察

行動実験後の sham 群と OVX 群における屠殺時の血清中 E₂ 濃度測定結果と子宮の状態を Fig. 3 に示す.

sham 群の血清中 E₂ 濃度は 28.2 ± 1.6 pg/mL であり, OVX 群は 17.2 ± 0.8 pg/mL と有意に低い値を示した ($p < 0.001$, Fig. 3A) .

卵巣を摘出した OVX 群では, 屠殺時子宮の萎縮が観察され, sham 群では子宮の萎縮はみられず, 卵巣も確認できた (Fig. 3B) .

4.3 ホルマリン投与実験

ホルマリン投与前日および投与 10 分後に観察された行動の結果を Fig. 4 に示す.

OVX 群, sham 群ともに同じような傾向を示し, ホルマリン投与前と比較し探索行動 (OVX 群 : $p = 0.008$, sham 群 : $p = 0.350$) は OVX 群で有意に減少し, 不動 (OVX 群 : $p = 0.010$, sham 群 : $p = 0.012$) , 口を動かす (OVX 群 : $p = 0.026$, sham 群 : $p = 0.019$) , 舌突出 (OVX 群 : $p = 0.044$, sham 群 : $p = 0.004$) , 歯軋り (OVX 群 : $p = 0.014$, sham 群 : $p = 0.047$) は OVX 群, sham 群ともに有意に増加していた. 休止行動 (OVX 群 : $p = 0.070$, sham 群 : $p = 0.129$) は減少, 顔面毛づくろい (OVX 群 : $p = 0.258$, sham 群 : $p = 0.060$) と両前肢を振る (OVX 群 : $p = 0.386$, sham 群 : $p = 0.141$) の行動は OVX 群, sham 群ともに投与後の行動量は増加したが投与前と比較し有意な差はなかった. 体毛づくろいは OVX 群では投与前後で変わりはなく, sham 群でやや減少, 首を横に振る動きは OVX 群で変化はなく, sham 群でやや増加していた.

観察された顔面毛づくろい行動の総時間に占める顔面部単独の毛づくろいの割合におけるホルマリン投与による変化を Fig. 4B に示す. ホルマリンを投与することで投与前と比較し, OVX 群, sham 群とも顔面部単独の毛づくろいの割合が高くなった (OVX 群 : $p = 0.037$, sham 群 : $p = 0.022$) .

4.4 NGF または PBS 投与実験

NGF または PBS 投与前日, および投与開始 10 分後, 30 分後, 60 分後, 120 分後, 180 分後, 1 日後, 3 日後, 5 日後, 7 日後に観察された行動の結果を Fig. 5 に示す.

不動行動は薬液投与 10 分後において OVX + NGF 群と sham + NGF 群で一時的に増加し, その後一旦低下するが, 投与開始から 1 日後, 2 度目の NGF 投与後より再び増加し,

OVX+NGF 群では 7 日後まで高い値を示し 7 日後は他の群と比較し有意に行動時間が長かった (473.0 ± 15.4 秒, $p = 0.002$) .

舌突出, 口を動かす, 歯軋りの行動は OVX + NGF 群において薬液投与 10 分後から増加するが, 薬液投与開始から 1 日後よりさらに行動量が増し, 7 日後まで高い値を示した. 舌突出は 3 日後 (9.8 ± 0.9 秒, $p < 0.001$) と 5 日後 (7.5 ± 1.3 秒, $p < 0.001$) , 口を動かす動きは 3 日後 (130.7 ± 14.8 秒, $p < 0.001$) , 5 日後 (90.0 ± 16.8 秒, $p < 0.001$) , 7 日後 (114.0 ± 23.0 秒, $p < 0.001$) に, 歯軋りは 5 日後 (38.8 ± 5.1 秒, $p < 0.001$) と 7 日後 (62.5 ± 9.8 秒, $p < 0.001$) に OVX + NGF 群が他の群と比較し有意に行動時間が長かった.

また, NGF または PBS 投与前後の顔面部単独の毛づくろいの割合を Fig. 5B に示す. 薬液投与前の顔面部単独の毛づくろいの割合は全ての群で差はなかった (OVX + NGF 群 : $10.3 \pm 7.5\%$, sham + NGF 群 : $8.2 \pm 6.2\%$, OVX + PBS 群 : $15.0 \pm 8.7\%$, sham + PBS 群 : $27.7 \pm 24.2\%$, $p = 0.751$) . 薬液投与後は 10 分後に OVX+NGF 群 ($40.8 \pm 21.3\%$) , OVX + PBS 群 ($35.2 \pm 23.0\%$) , sham + PBS 群 ($30.5 \pm 23.3\%$) , 60 分後に sham + PBS 群 ($50.0 \pm 28.9\%$) , 3 日後に OVX + NGF 群 ($32.0 \pm 5.3\%$) , OVX + PBS 群 ($25.9 \pm 24.7\%$) と他の群と比較し, 顔面部単独の毛づくろいの割合が高い値を示したが, 有意な差はみられなかった.

4.5 ホルマリンと NGF 投与による行動変化の比較

ホルマリンまたは NGF 投与前日および投与 10 分後に観察された行動の変化を比較した結果を Fig. 6 に示す.

探索行動，不動，休止，口を動かす，舌突出，歯軋りの観察項目に関してホルマリン投与群と NGF 投与群で同様の行動変化を示した．この中で，探索行動，不動，休止，舌突出に関しては OVX + ホルマリン群と同様に OVX + NGF 群で薬液投与前と比較し，薬液投与 10 分後において行動量が有意に増加または減少していた（探索行動： $p = 0.008$ ，不動： $p = 0.014$ ，休止： $p = 0.004$ ，舌突出： $p = 0.018$ ）．

また顔面部単独の毛づくろいの割合は薬液投与 10 分後で OVX + ホルマリン群 ($90.1 \pm 9.9\%$) が sham + ホルマリン群 ($23.3 \pm 1.7\%$, $p = 0.035$)，sham + NGF 群 ($1.5 \pm 1.0\%$, $p = 0.004$) と比較し有意に増加していた．

4.6 飲水量測定

NGF または PBS 投与前日，および投与開始直後，1 日後，3 日後，5 日後，7 日後のコンデンスミルクの飲水量変化の結果を Fig. 7 に示す．

コンデンスミルクの飲水量は個体差があり，薬液投与前の測定量でばらつきが大きかったため，薬液投与前の飲水量を 100% として減少または増加の割合で結果を示した．

薬液投与直後，全ての群で薬液投与前と比較し飲水量が減少した．OVX + NGF 群 ($58.0 \pm 13.0\%$)，sham + NGF 群 ($47.9 \pm 16.0\%$)，sham + PBS 群 ($55.0 \pm 11.5\%$) では大きく減少し，sham + NGF 群 ($p = 0.026$) と sham + PBS 群 ($p = 0.033$) は薬液投与前と比較し有意に減少していた．薬液投与開始から 1 日後，2 度目の薬液投与後では OVX + NGF 群の飲水量はさらに減少し ($43.8 \pm 9.5\%$)，他の群と比較し有意に減少していた ($p < 0.05$)．それ以降も 7 日後までの観察期間中，OVX + NGF 群は他の群と比較し飲水量は低値を示した．

5 考察

本研究では BMS モデル動物作製に焦点を当て、臨床的に BMS との関連が指摘されている女性ホルモンの減少と NGF の増加によりラットの舌に疼痛を生じさせられるかどうかを疼痛関連行動の測定により検証した。

5.1 卵巣摘出術の評価

卵巣摘出術，sham 手術後両群のラットは手術後 9 週間まで体重増加を示した。OVX 群は特に高い体重の増加傾向を示し，卵巣摘出後 1 週目から sham 群との間に有意な差を認めるようになった。この結果は，OVX 群が sham 群よりも体重増加量が多いことを示す過去の報告とも一致している^{24, 25)}。また，OVX 群，sham 群の屠殺時の血清中 E₂濃度測定結果では，OVX 群の値が sham 群と比較して有意に低い値を示していた。これらのことから今回の実験で行った卵巣摘出術は適切に行われており，行動実験の結果は女性ホルモンの影響を反映していると考えられた。

またラットの性周期の測定には膣垢スメア検査法が主に用いられているが，この検査法はスメア採取時にラットにストレス負荷をかける可能性がある。急性ストレス負荷の多くは鎮痛に働き，慢性ストレス負荷では痛覚過敏を来す²⁶⁾ことから余計なストレス負荷は本実験結果に影響を及ぼす可能性がある。そのためラットに対するストレスを極力抑えるため，本実験では sham 群の膣垢スメア検査を行わなかった。

5.2 女性ホルモンの影響

BMS の病因は不明であるが、疫学的な特徴から閉経に伴う女性ホルモンの減少が本病態の根底にあるのではないかと推測は古くからなされてきた²⁷⁾。女性ホルモンはステロイドホルモンであり、閉経により卵巣からのホルモン分泌が減少すると、副腎ステロイドホルモンも減少し、ステロイドによる神経保護作用が減弱する。これにより口腔粘膜の神経が影響を受け BMS が発症する可能性があることが示されている²⁸⁾。女性ホルモンの影響をみるために OVX 動物を用いた研究が行われているが、OVX ラットの膣では BMS 患者の舌でみられたような、粘膜上皮の神経線維が減少することが明らかになっている²⁹⁾。また卵巣摘出による女性ホルモンの減少により舌上皮、特に舌尖部の上皮が菲薄化していることが観察されている¹⁸⁾。膣粘膜と口腔粘膜はいくつかの点において類似性が示されており、膣粘膜でみられた神経線維の減少などの女性ホルモン減少の影響が、口腔粘膜でみられる可能性が指摘されている¹⁸⁾。

これまで OVX 動物における痛覚過敏の発症に関しては様々な報告がなされている。卵巣摘出後のラットやマウスの後肢足底における機械的刺激に対して、足の逃避反応閾値が低下したとの報告^{30,31)}がある一方で、閾値が上昇したとの報告もみられる^{32,33)}。また、温度刺激に対する痛覚過敏が生じたとする報告もあれば、生じなかったとの報告もある。これらの違いは、動物種や疼痛モデルの違いにより生じている可能性もあるが、卵巣摘出の時期も要因として挙げられる。例えば卵巣摘出術 3 週間後から 5 週間後までの観察では、機械的痛覚過敏は認められたが、熱刺激に対する痛覚過敏は生じなかったとする報告がある³³⁾。一方、卵巣摘出術 5 週間後から 7 週間後までの間では機械的痛覚過敏と熱性痛覚過敏の両方が生じたと報告されている²⁹⁾。本研究では、卵巣摘出術から 8 週間後

に行動実験を行った。ラットの行動に対する手術の影響を極力避けるため十分な回復を待って実験を行ったが、前述の痛覚過敏に関する報告を参考にする限りでは、疼痛関連行動を観察する上で、手術から実験開始までの期間としては適切であったと考えられた。

5.3 NGF の影響

BMS 患者の舌組織を調べた結果、粘膜上皮下の NGF 発現神経線維の増加が観察されている¹³⁾。NGF は α , β , γ の 3 種のサブユニット複合体として産生され、このうち分子量の小さな β -NGF が神経の成長、維持に重要な役割を担っている³⁴⁾。 β -NGF は高親和性の tropomyosin receptor kinase A (trkA) と低親和性の p75^{NTR} の 2 種類の受容体を介して生理的機能を発現し、末梢神経などにこれらの受容体が発現している³⁵⁾。感覚神経終末に発現する trkA 受容体に β -NGF が結合し、一次求心性神経節へ逆行輸送されることにより、TRPV1 や P2X₃ 受容体などの発現を増強し、疼痛発現に関与することが報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾。BMS 患者の口腔粘膜でなぜ NGF が増加しているのか明らかではないが、BMS 患者の舌において TRPV1 や P2X₃ 受容体の発現増加も観察されており^{13,14)}、増加した NGF がこれらの発現に関与している可能性もある。しかし、BMS 研究では BMS 患者の症状に対する NGF の作用に関してほとんど調べられていない。これまでラットへの NGF 投与の研究では、皮下投与により温痛覚過敏³⁶⁾、咬筋への投与により機械的感覚過敏³⁷⁾などが報告されているが、自発痛は生じないとする報告が多い³⁸⁻⁴⁰⁾。NGF はほとんどの研究で単回投与されているが、本研究では BMS 患者の舌では長期間 NGF の発現量が増加していると考え、実験期間の 1 週間毎日 NGF をラットの舌に投与した。その結果 OVX + NGF 群において不動、口を動かす、舌突出、歯軋りの行動が投与開始直後増加

し、その後 180 分後まで時間経過とともに減少した。しかし、投与開始 1 日後、2 度目の NGF 投与後から急激にこれらの行動量が増加した。この増加は OVX + NGF 群程ではないが sham + NGF 群でもみられた。以前の研究で NGF をラットの脊髄神経に 2 度、5 日の間隔をおいて投与した実験では、1 度目の投与で感作された神経は 5 日間で元の状態に戻るが、2 度目の NGF 投与により 1 度目より容易に感作されることが報告されている⁴¹⁾。このように NGF を繰り返し投与することで神経が感作されやすくなり、本研究で観察されたような行動量の大きな変化につながったと考えられた。

また NGF と女性ホルモンの疼痛に対する相互作用に関しては、NGF 誘発性の機械的痛覚過敏の程度と血清中のエストロゲン濃度との間に有意な相関はなかった³⁷⁾など、その関係性は否定的な報告がみられる。しかし本研究では NGF を投与されたラットで観察された行動変化量は OVX 群が sham 群より大きかった。前述の報告と測定項目が異なるため、一概には言えないが、NGF と女性ホルモンには疼痛発現に関する何らかの相互作用があると考えられるため、さらなる研究が求められる。

5.4 味覚と疼痛：飲水量測定

以前に報告された、眼窩下神経慢性絞扼性神経損傷（chronic constriction nerve injury : CCI）モデルラットを用いて報酬（コンデンスミルク）を得る度に疼痛誘発刺激が与えられるオペラント実験²²⁾を参考に、本研究では薬液投与によるコンデンスミルクの飲水量変化を測定した。舌に疼痛が生じた場合、ラットは舌が給水瓶の先管に触れることを回避するようになり、これにより飲水量が減少すると考えた。薬液投与開始直後に OVX + NGF 群、sham + NGF 群と sham + PBS 群の 3 つの群で飲水量が減少した。飲水量

の比較は、被観察動物の体重を用いて飲水量の標準化を試みたが、sham + PBS 群でも飲水量の減少がみられた。飲水量を測定する研究では行動観察前に絶水することが一般的だが⁴²⁾、本研究では体重変動などを確認するために自由飲水下での評価を行ったことが一因とも考えられた。しかしながら、OVX + PBS 群ではそのような減少が認められなかったことから実験手技の不均一性が考えられる。薬液投与はなるべく舌粘膜下に投与するようにしたが、注射針が深く筋層にまで入り込み舌に機械的刺激を与えてしまい、飲水量が減少した可能性が考えられる。薬液投与開始から1日後からは、OVX + NGF 群以外では飲水量がほぼ薬液投与前のレベルに戻ることから、影響は一過性であったと考えられる。また、OVX + NGF 群では薬液投与開始から1日後にさらに飲水量が減少し、それ以降 OVX + NGF 群の飲水量はやや増加するが、観察期間中に NGF 投与前の飲水量までは戻らなかった。このことは、女性ホルモンの減少と NGF の増加がラットの舌に疼痛を持続的に惹起していることに起因していると思われ、また、長期的な実験的安定性を示しているとも考えられる。

一方、BMS 患者は食事中に痛みの緩解を自覚することが多いことがよく知られている²⁷⁾。これは延髄孤束核において鼓索神経からの味覚情報が三叉神経からの侵害刺激の情報を抑制することで疼痛が減少することにより生じると考えられている⁴³⁾。味覚情報が疼痛を軽減させることを示す研究はヒトや幼齢ラットでいくつか報告があり、特にスクロースなどの甘味成分は疼痛を強く抑制する^{44, 45)}。本実験では測定時間短縮のため、希釈したコンデンスミルクを使用した。これらの報告に沿うのであれば、コンデンスミルクの甘味が NGF の疼痛発現作用を減弱させ飲水量減少が抑えられると推測されたが、

OVX + NGF 群の飲水量は減少した．これには以下の二つの要因が考えられた．一つは本実験で対象としたラットが成熟ラットだったことである．機序は明らかでないが，幼齢ラットでみられた甘味成分の疼痛抑制は成熟ラットでは観察されなかったとの報告がある⁴⁶⁾．二つ目は舌に発現した疼痛が強かったため，飲水行動自体が減少し，それにより飲水量が減少した可能性が考えられた．今回は飲水量のみの測定であったが，飲水行動回数をカウントするために飲水時のラットの様子を撮影するなどさらなる精査が必要と考えられた．

このように飲水量測定の結果は BMS 患者でみられる食事時の症状とは異なる結果となったが，飲水量が減少した理由は疼痛発現によるものと考えられた．また本実験系におけるコンデンスミルクの甘味作用による影響は小さいと考えられた．

5.5 口腔内の疼痛関連行動指標としての有用性

BMS 患者は舌前方特に舌尖部に最も症状がみられる²⁷⁾ため，本研究では舌尖部に薬液を投与して行動観察の実験を行った．動物を用いた口腔周囲の疼痛関連行動としては，眼窩下神経 CCI モデルラット⁵⁾やホルマリンを舌や口唇に投与したラット⁶⁾での報告がある．これらを元にわれわれは，探索行動，不動，休止，毛づくろい（体/顔面），両前肢を振る，首を横に振る，口を動かす，舌突出を口腔内の疼痛関連行動を示す観察対象とした．また，ホルマリン投与実験において，ホルマリン投与後のラットで口を動かすとともに上下の歯をすり合わせる音が生じた．この行動は投与前のラットではほとんど観察されなかったため，ホルマリン投与により惹起された行動と考え，歯軋りも観察対象とした．この歯軋りの行動は舌突出行動や口を動かす行動とともに OVX ラットに

NGF を投与した場合にも増加していた。ホルマリンは舌粘膜組織の変性を起こすため、本研究では単回投与のみ行ったが、ホルマリン投与前後の行動変化と NGF 投与前後の行動変化を比較すると、探索行動や不動、口を動かす、舌突出、歯軋りなど多くの観察項目で同様の傾向を示した。口を動かす、舌突出、歯軋りは NGF の繰り返し投与開始から 3 日後、行動量の増加がピークに達し、ホルマリン単回投与による行動変化量よりも大きな増加量を示した。ホルマリンは疼痛発現物質として動物実験で広く使用されているため¹⁹⁾、これらの結果から繰り返し NGF を投与することで舌に疼痛を惹起させた可能性が示された。ただ、今回の結果は繰り返し投与の手技などによる誘発痛を観察しただけの可能性もある。NGF 単回投与により投与後 7 日間で同様の行動変化がみられた場合は自発痛が生じたと考えることもできるため、NGF によりラットの口腔内に自発痛を生じさせることができるかどうかは今後さらなる検討が必要である。

今回使用した行動観察項目の中で探索行動、不動、口を動かす、舌突出、歯軋りは、OVX + NGF 群とその他の群で行動量に有意な差があり、口腔内の疼痛関連行動の指標となり得ることが示唆された。一方体毛づくろいを伴わない顔面部単独の毛づくろい行動は、ホルマリンを投与されたラットでは行動量が増加していたが、OVX ラットに NGF を投与した場合は増加傾向がみられなかった。舌へのホルマリン投与後に顔面部毛づくろい行動が増加することは以前にも報告されているが⁹⁾、NGF 投与による疼痛関連行動として顔面部毛づくろいは指標とならないと考えられた。

5.6 BMS モデルとしての妥当性

動物モデルの妥当性を評価する上で以下の 3 点に着目し，作製した動物モデルがその疾患のモデルとして適正かどうかを判断する^{47, 48)}．1. 表面妥当性 (face validity : ヒトと動物で観察される行動上認められる症状の類似性) ．2. 構成妥当性 (construct validity : 症状を誘発する因子の類似性) ．3. 予測妥当性 (predictive validity : 症状を緩和する薬物効果の類似性) ．本研究において OVX ラットに繰り返し NGF を投与することで，探索行動や不動，口を動かす，舌突出，歯軋りなどの疼痛関連行動の変化がみられたことは，BMS 患者で閉経後の女性が多いことと，舌粘膜の NGF 発現神経線維の増加が BMS 症状の発現に関与している可能性から，構成妥当性の一部を反映していると考えられる．しかし NGF の繰り返し投与により生じた疼痛を自発痛と判断することは難しく，飲水量測定実験では BMS 患者でみられる食事時の疼痛緩和とは異なる結果が出ており，本研究で作製された動物モデルが表面妥当性を満たすかどうかは限定的であると考えられた．今後，BMS 患者の治療で使用されているクロナゼパムや神経障害性疼痛に対して使用されているプレガバリン，ガバペンチンなどを投与することで，今回観察された疼痛関連行動の変化が抑えられた場合，本研究の動物モデルの予測妥当性を検証できる可能性がある．

6 結論

実験的に女性ホルモンを減少させた OVX ラットの舌に NGF を投与することにより、舌突出、口を動かす、歯軋りなど口腔内に疼痛が発現したと思われる行動変化が観察された。女性ホルモンの減少と NGF の増加は舌痛発症において何らかの影響を及ぼす可能性が示された。

7 参考文献

- 1) Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, Keefe FJ, Mogil JS, Ringkamp M, Sluka KA, Song XJ, Stevens B, Sullivan MD, Tutelman PR, Ushida T, Vader K: The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain* **161**, 1976-1982, 2020
- 2) Breivik H: Fifty years on the Visual Analogue Scale (VAS) for pain-intensity is still good for acute pain. But multidimensional assessment is needed for chronic pain. *Scand J Pain* **11**, 150-152, 2016
- 3) Mogil JS, Crager SE: What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain* **112**, 12-15, 2004
- 4) Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I: Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci* **10**, 284, 2017
- 5) Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ: Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci* **14**, 2708-2723, 1994
- 6) Sugiyo S, Uehashi D, Satoh F, Abe T, Yonehara N, Kobayashi M, Takemura M: Effects of systemic bicuculline or morphine on formalin-evoked pain-related behaviour and c-Fos expression in trigeminal nuclei after formalin injection into the lip or tongue in rats. *Exp Brain Res* **196**, 229-237, 2009
- 7) Torgerson RR: Burning mouth syndrome. *Dermatol Ther* **23**, 291-298, 2010
- 8) Kamala KA, Sankethguddad S, Sujith SG, Tantradi P: Burning Mouth Syndrome. *Indian J Palliat Care* **22**, 74-79, 2016

- 9) Katagiri A, Shinoda M, Honda K, Toyofuku A, Sessle BJ, Iwata K: Satellite glial cell P2Y₁₂ receptor in the trigeminal ganglion is involved in lingual neuropathic pain mechanisms in rats. *Mol Pain* **8**, 23, 2012
- 10) Boucher Y, Carstens MI, Sawyer CM, Zanutto KL, Merrill AW, Carstens E: Capsaicin avoidance as a measure of chemical hyperalgesia in orofacial nerve injury models. *Neurosci Lett* **543**, 37-41, 2013
- 11) Shinoda M, Takeda M, Honda K, Maruno M, Katagiri A, Satoh-Kuriwada S, Shoji N, Tsuchiya M, Iwata K: Involvement of peripheral artemin signaling in tongue pain: possible mechanism in burning mouth syndrome. *Pain* **156**, 2528-2537, 2015
- 12) Lauria G, Majorana A, Borgna M, Lombardi R, Penza P, Padovani A, Sapelli P: Trigeminal small-fiber sensory neuropathy causes burning mouth syndrome. *Pain* **115**, 332-337, 2005
- 13) Yilmaz Z, Renton T, Yiangou Y, Zakrzewska J, Chessell IP, Bountra C, Anand P: Burning mouth syndrome as a trigeminal small fibre neuropathy: Increased heat and capsaicin receptor TRPV1 in nerve fibres correlates with pain score. *J Clin Neurosci* **14**, 864-871, 2007
- 14) Beneng K, Yilmaz Z, Yiangou Y, McParland H, Anand P, Renton T: Sensory purinergic receptor P2X₃ is elevated in burning mouth syndrome. *Int J Oral Maxillofac Surg* **39**, 815-819, 2010
- 15) Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ: p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* **36**, 57-68, 2002

- 16) Giniatullin R, Nistri A, Fabbretti E: Molecular mechanisms of sensitization of pain-transducing P2X₃ receptors by the migraine mediators CGRP and NGF. *Mol Neurobiol* **37**, 83-90, 2008
- 17) Pezet S, McMahon SB: Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci* **29**, 507-538, 2006
- 18) Seko K, Kagami H, Senga K, Ozeki K, Mizutani H, Ueda M: Effects of ovariectomy and estrogen replacement on rat oral mucosa. *Maturitas* **50**, 44-51, 2005
- 19) Ceccarelli I, Fiorenzani P, Massafra C, Aloisi AM: Long-term ovariectomy changes formalin-induced licking in female rats: the role of estrogens. *Reprod Biol Endocrinol* **1**, 24, 2003
- 20) Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW: The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology* **124**, 7-16, 1989
- 21) Farquhar-Smith WP, Rice AS: A novel neuroimmune mechanism in cannabinoid-mediated attenuation of nerve growth factor-induced hyperalgesia. *Anesthesiology* **99**, 1391-1401, 2003
- 22) Cha M, Kohan KJ, Zuo X, Ling JX, Gu JG: Assessment of chronic trigeminal neuropathic pain by the orofacial operant test in rats. *Behav Brain Res* **234**, 82-90, 2012
- 23) Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* **48**, 452-458, 2013
- 24) Wronski TJ, Schenck PA, Cintrón M, Walsh CC: Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* **40**, 155-159, 1987
- 25) Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA: Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* **7**, 119-123, 1986

- 26) Imbe H, Iwai-Liao Y, Senba E: Stress-induced hyperalgesia: animal models and putative mechanisms. *Front Biosci* **11**, 2179-2192, 2006
- 27) Imamura Y, Shinozaki T, Okada-Ogawa A, Noma N, Shinoda M, Iwata K, Wada A, Abe O, Wang K, Svensson P: An updated review on pathophysiology and management of burning mouth syndrome with endocrinological, psychological and neuropathic perspectives. *J Oral Rehabil* **46**, 574-587, 2019
- 28) Woda A, Dao T, Gremeau-Richard C: Steroid dysregulation and stomatodynia (burning mouth syndrome). *J Orofac Pain* **23**, 202-210, 2009
- 29) Li T, Ma Y, Zhang H, Yan P, Huo L, Hu Y, Chen X, Li T, Zhang M, Liu Z: Estrogen replacement regulates vaginal innervations in ovariectomized adult virgin rats: A histological study. *Biomed Res Int* **2017**, 7456853, 2017
- 30) Dohke T, Iba K, Hanaka M, Kanaya K, Okazaki S, Yamashita T: Teriparatide rapidly improves pain-like behavior in ovariectomized mice in association with the downregulation of inflammatory cytokine expression. *J Bone Miner Metab* **36**, 499-507, 2018
- 31) Wright DM, Small KM, Nag S, Mokha SS: Activation of membrane estrogen receptors attenuates NOP-mediated tactile antihypersensitivity in a rodent model of neuropathic pain. *Brain Sci* **9**, 2019
- 32) Payrits M, SÁghy É, Cseko K, Pohóczky K, Bölcskei K, Ernst D, Barabás K, Szolcsányi J, Ábrahám IM, Helyes Z, Szoke É: Estradiol sensitizes the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in pain responses. *Endocrinology* **158**, 3249-3258, 2017

- 33) Chang JH, Tsai SY, Zeng YJ, Liu YC, Li CY, Chen KB, Wen YR: Ovarian hormone-dependent and spinal ERK activation-regulated nociceptive hypersensitivity in female rats with acid injection-induced chronic widespread muscle pain. *Sci Rep* **9**, 3077, 2019
- 34) Levi-Montalcini R: The nerve growth factor 35 years later. *Science* **237**, 1154-1162, 1987
- 35) Muragaki Y, Timothy N, Leight S, Hempstead BL, Chao MV, Trojanowski JQ, Lee VM: Expression of trk receptors in the developing and adult human central and peripheral nervous system. *J Comp Neurol* **356**, 387-397, 1995
- 36) Andreev NY, Dimitrieva N, Koltzenburg M, McMahon SB: Peripheral administration of nerve growth factor in the adult rat produces a thermal hyperalgesia that requires the presence of sympathetic post-ganglionic neurones. *Pain* **63**, 109-115, 1995
- 37) Svensson P, Wang MW, Dong XD, Kumar U, Cairns BE: Human nerve growth factor sensitizes masseter muscle nociceptors in female rats. *Pain* **148**, 473-480, 2010
- 38) Svensson P, Cairns BE, Wang K, Arendt-Nielsen L: Injection of nerve growth factor into human masseter muscle evokes long-lasting mechanical allodynia and hyperalgesia. *Pain* **104**, 241-247, 2003
- 39) Svensson P, Castrillon E, Cairns BE: Nerve growth factor-evoked masseter muscle sensitization and perturbation of jaw motor function in healthy women. *J Orofac Pain* **22**, 340-348, 2008
- 40) Svensson P, Wang K, Arendt-Nielsen L, Cairns BE: Effects of NGF-induced muscle sensitization on proprioception and nociception. *Exp Brain Res* **189**, 1-10, 2008
- 41) Hoheisel U, Reuter R, de Freitas MF, Treede RD, Mense S: Injection of nerve growth factor into a low back muscle induces long-lasting latent hypersensitivity in rat dorsal horn neurons. *Pain* **154**, 1953-1960, 2013

- 42) Reinagel P: Training Rats Using Water Rewards Without Water Restriction. *Front Behav Neurosci* **12**, 84, 2018
- 43) Boucher Y, Simons CT, Faurion A, Azérad J, Carstens E: Trigeminal modulation of gustatory neurons in the nucleus of the solitary tract. *Brain Res* **973**, 265-274, 2003
- 44) Anseloni VC, Weng HR, Terayama R, Letizia D, Davis BJ, Ren K, Dubner R, Ennis M: Age-dependency of analgesia elicited by intraoral sucrose in acute and persistent pain models. *Pain* **97**, 93-103, 2002
- 45) Schöbel N, Kyereme J, Minovi A, Dazert S, Bartoshuk L, Hatt H: Sweet taste and chorda tympani transection alter capsaicin-induced lingual pain perception in adult human subjects. *Physiol Behav* **107**, 368-373, 2012
- 46) Foo H, Mason P: Sensory suppression during feeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16865-16869, 2005
- 47) Ellenbroek BA, Cools AR: Animal models with construct validity for schizophrenia. *Behav Pharmacol* **1**, 469-490, 1990
- 48) Sasaki A, Hasegawa N, Adachi K, Sakagami H, Suda N: Orthodontic treatment-induced temporal alteration of jaw-opening reflex excitability. *J Neurophysiol* **118**, 2289-2295, 2017

謝辞

稿を終えるにあたり，終始ご懇切なるご指導とご高閲を賜りました明海大学歯学部病態診断治療学講座歯科麻酔学分野 小長谷 光教授に深謝いたします．さらに，ご指導とご高閲を賜りました，明海大学歯学部病態診断治療学講座口腔顎顔面外科学Ⅱ 坂下 英明教授，明海大学歯学部形態機能成育学講座解剖学 天野 修教授ならびに明海大学歯学部病態診断治療学講座薬理学 安達 一典教授に深甚なる謝意を表します．また本研究に対してご協力いただいた明海大学歯学部病態診断治療学講座歯科麻酔学分野の諸先生に御礼申し上げます．

図の説明

Fig. 1 Settings of behavioral tests (A), (D) and protocols for behavioral tests (B), (C).

(A) Observation of free behavior: Rats were placed in a transparent plastic cage with a mirrored back in a dark room. Light was 1 m above the center of the cage and a video camera was placed in front of the cage. (B) Protocol for formalin-administrated experiment. Behavioral tests were performed at 1 day before (Day -1) and 10 min after formalin administration of Day 0. (C) Protocol for NGF- or PBS-administrated experiments. Behavioral tests were performed at 1 day before (Day -1) and 10 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min of Day 0, and 1 (Day 1), 3 (Day 3), 5 (Day 5) and 7 (Day 7) days after administration of NGF or PBS. (D) Drink test: Rats were placed in a plastic cage. They were allowed drinking sweetened condensed milk diluted with deionized water to 30% from cylindrical plastic container with metal nipple drinker.

Fig. 2 Body weight changes.

Temporal changes in weight of sham and OVX were monitored from the day of surgery and thereafter for 9 weeks. There was a significant difference between sham and OVX groups. Data are expressed as the means \pm S.E.M. $*p<0.05$ vs sham group.

Fig. 3 17β -estradiol (E_2) level (A) and uterus atrophy (B) after sham or OVX operation.

The E_2 level in the blood was measured at week 9 when the rat was sacrificed (A). The OVX group showed significant decrease in serum E_2 level. Data are expressed as the means \pm S.E.M.

$**p<0.001$ vs sham group. Representative photo of atrophied uterus in OVX rat (B: bottom).

Arrows indicate uterus. Scale bar = 10 mm.

Fig. 4 Duration of observed behavioral activity episodes (A) and face grooming rate (B) in formalin-administrated rats.

(A) Duration of behavioral activity episodes: Line graphs indicated the mean number of seconds that sham (circles) or OVX (squares) rats expressed 10 behavioral activities for 10 min before and after administration of formalin.

(B) Face grooming rate: Line graphs indicated the mean percentage of spontaneous face grooming episodes in the total face grooming episodes that were observed during the observational periods before and after administration of formalin. Pre: One day before administration. Post: Ten min after administration. Data are expressed as the means \pm S.E.M.

* $p < 0.05$ vs sham group. $^{\dagger}p < 0.05$ vs Pre.

Fig. 5 Duration of observed behavioral activity episodes (A) and face grooming rate (B) in NGF- or PBS-administrated rats.

(A) Duration of behavioral activity episodes: Line graphs indicated the mean number of seconds that sham or OVX rats expressed 10 behavioral activities for 10 min at 1 day before and 10 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 1 day, 3 days, 5 days and 7 days after administration of NGF or PBS.

(B) Face grooming rate: Line graphs indicated the mean percentage of spontaneous face grooming episodes in the total face grooming episodes that were observed during the observational periods before and after administration of NGF or PBS. Pre: One day before administration. Data are expressed as the means \pm S.E.M. * $p < 0.05$ vs other groups.

Fig. 6 Comparisons of observed behavioral activity episodes (A) and face grooming rate (B) in formalin- or NGF-administrated rats.

(A) Duration of behavioral activity episodes: Line graphs indicated the mean number of seconds that sham or OVX rats expressed 10 behavioral activities for 10 min before and after administration of formalin or NGF.

(B) Face grooming rate: Line graphs indicated the mean percentage of spontaneous face grooming episodes in the total face grooming episodes that were observed during the observational periods before and after administration of formalin or NGF.

Pre: One day before administration. Post: Ten min after administration. F: Formalin. Data are expressed as the means \pm S.E.M. * $p < 0.05$ vs sham-NGF and sham-F groups. † $p < 0.05$ vs Pre.

Fig. 7 Drink consumption.

Line graphs indicated changes in drink consumption of sham and OVX rats that were measured 1 day before and 10 min, 1 day, 3 days, 5 days and 7 days after administration of the chemicals.

OVX-NGF group showed a decrease in drink consumption significantly at 1 day after administration and low consumption compared with other groups thereafter during the observation period. Pre: One day before administration. Data are expressed as the means \pm S.E.M. * $p < 0.05$ vs other groups. † $p < 0.05$ vs Pre.

Table 1 Behavioral activities for observation

A	
Behavioral activity	Description
Exploratory behavior	▪ Walking, rearing and sniffing
Freezing-like behavior	▪ Freezing and immobile posture
Resting or sleeping	▪ Head resting on flexed forepaws with eyes open/closed
Body grooming	▪ Paws, tongue or mouth contact body areas other than the face
Face grooming	▪ Movements in which paws contact facial areas
Head shakes	▪ Lateral motions of the head
Forelimb flails	▪ Rapid shaking movements of the forepaw and limb
Vacuous chewing	▪ Mouth movements without any foods or fluid
Tongue protrusions	▪ Tongue exists from the mouth
Bruxism	▪ Mouth movements with teeth grinding sounds
B	
Face grooming	Description
Spontaneous	▪ Face-grooming actions was neither preceded nor followed by body grooming
During body grooming	
▪ Body grooming is present before or after a sequence of face grooming	
Behavioral activity categories (A) and sequence of face and body grooming actions (B)	
The total time spent in each of the behavioral categories is determined for each 10 min observation period.	

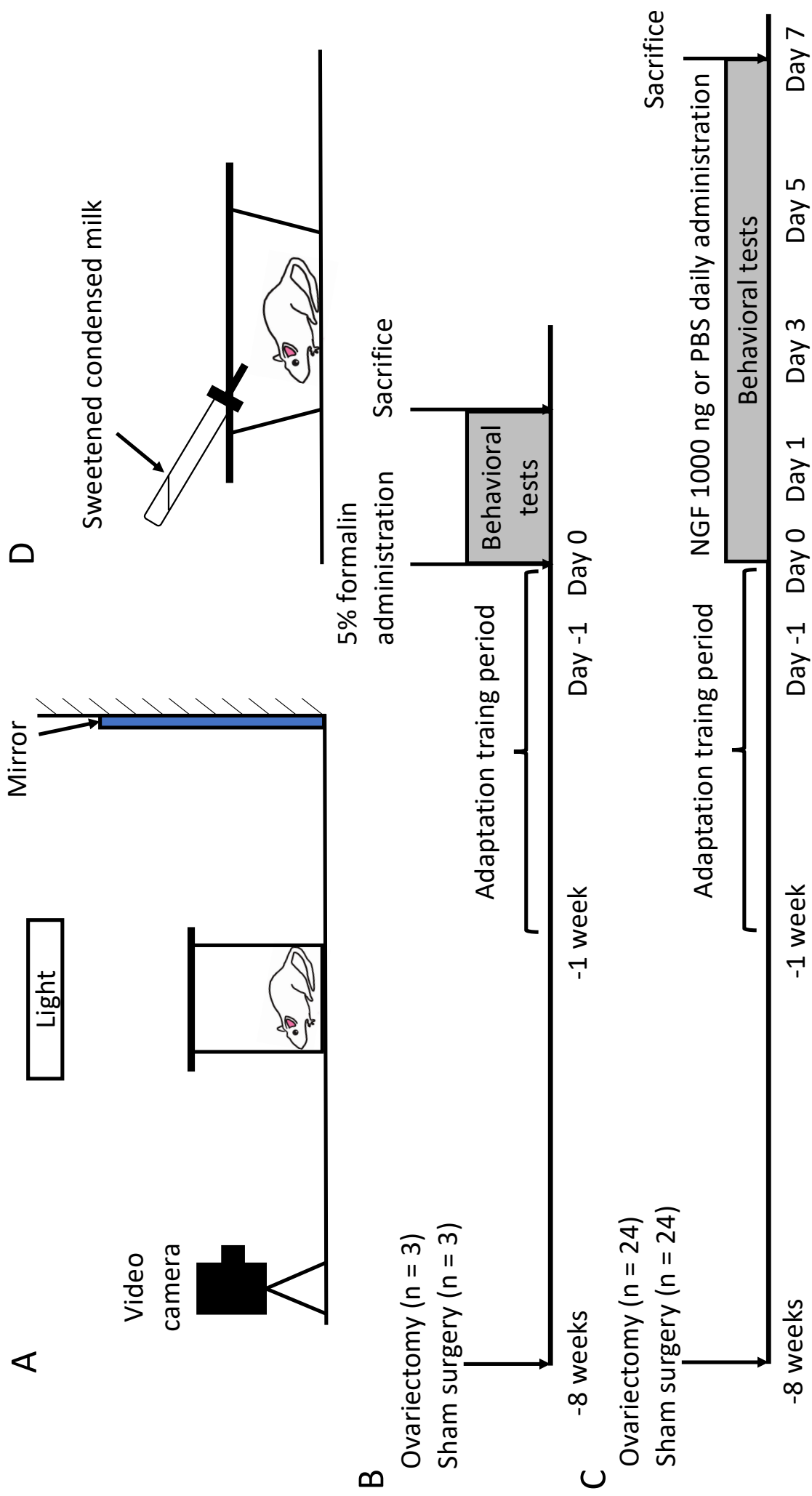


Fig. 1

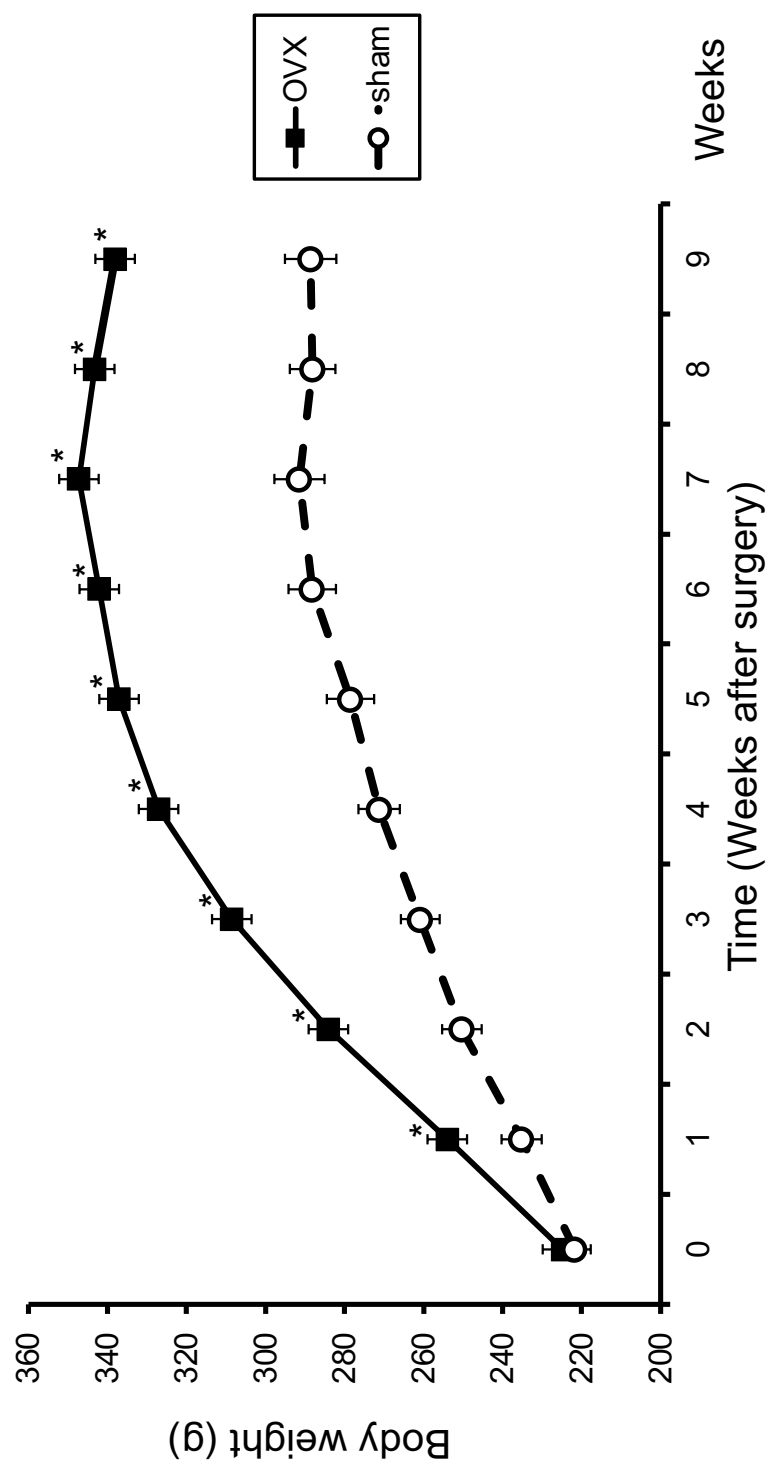


Fig. 2

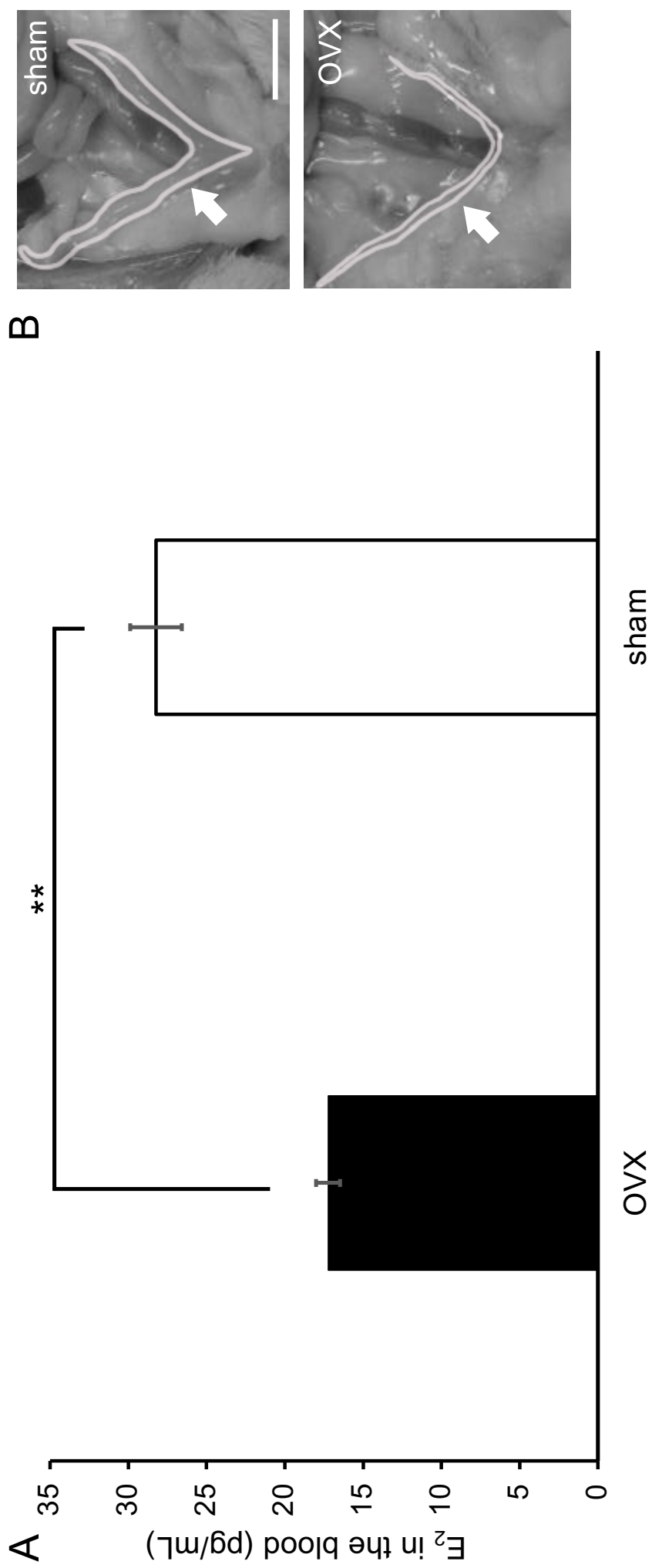


Fig. 3

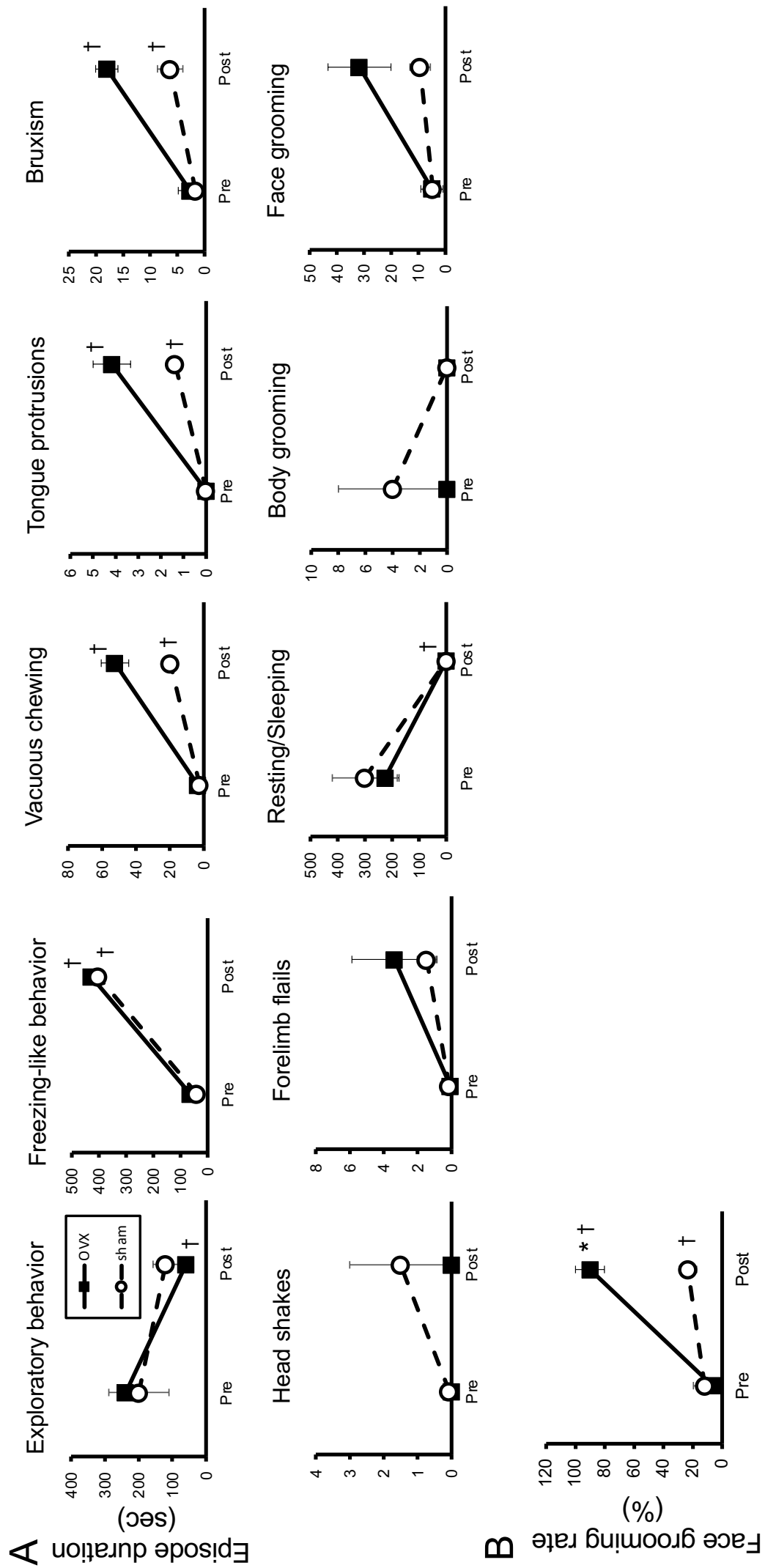


Fig. 4

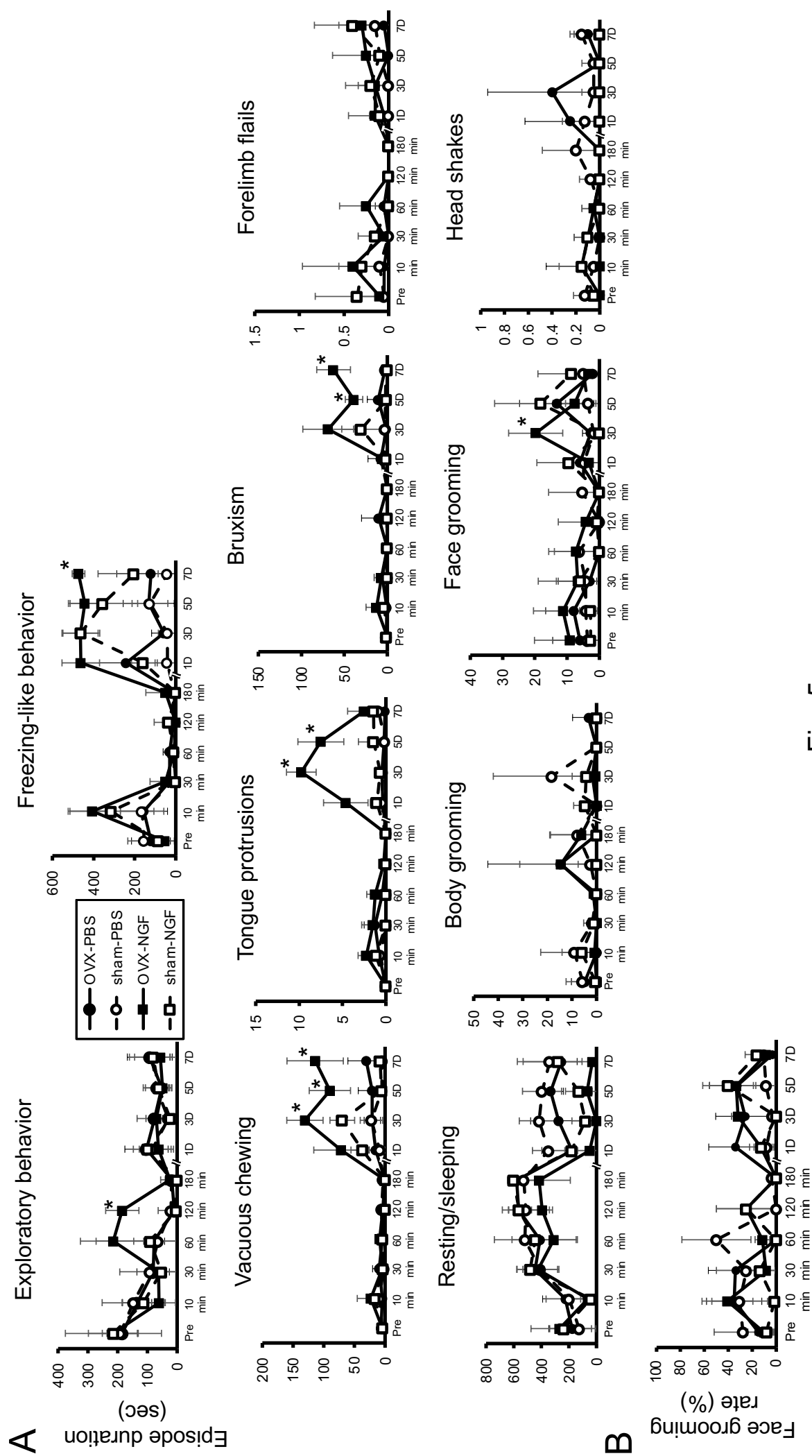


Fig. 5

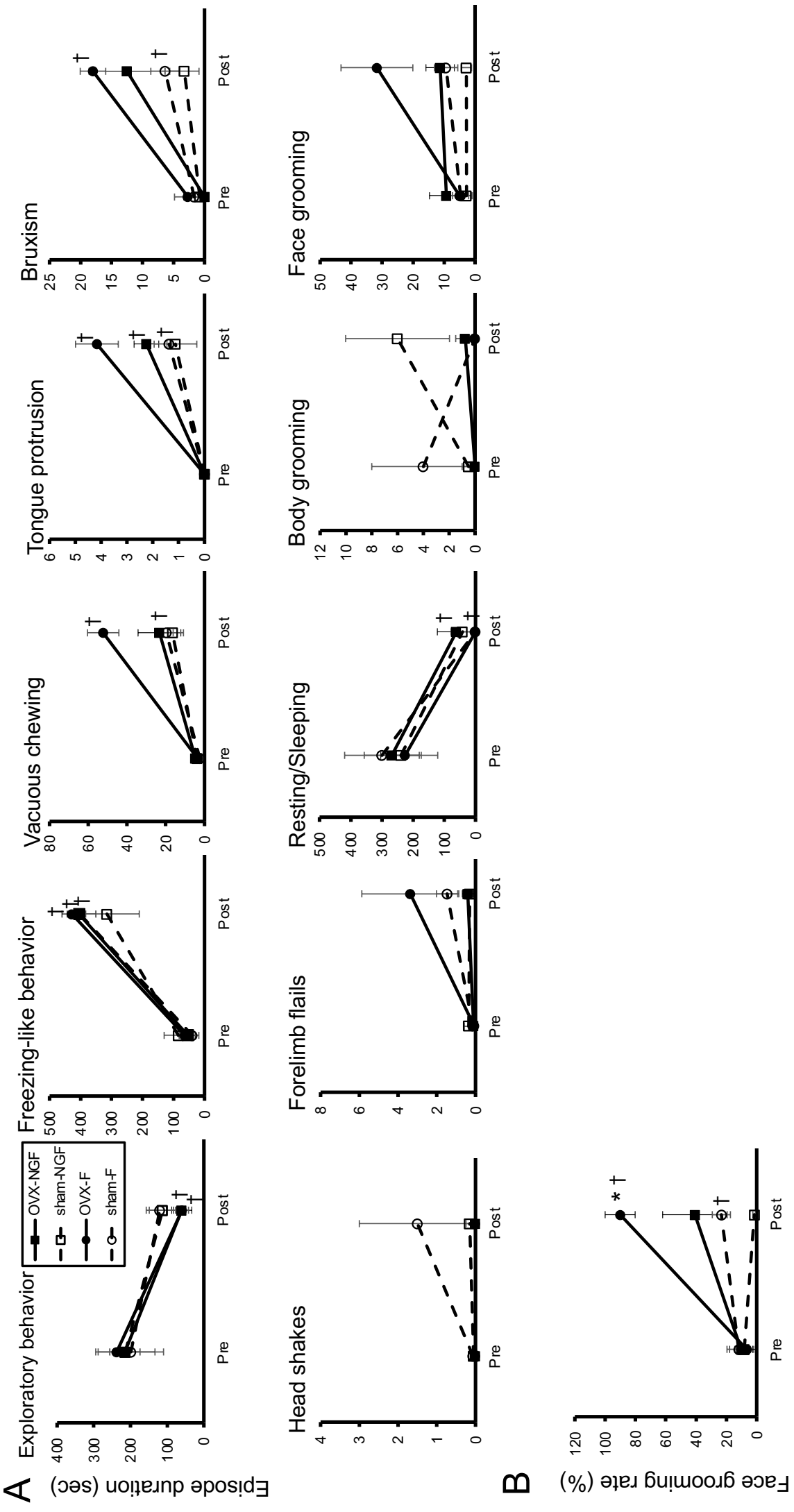
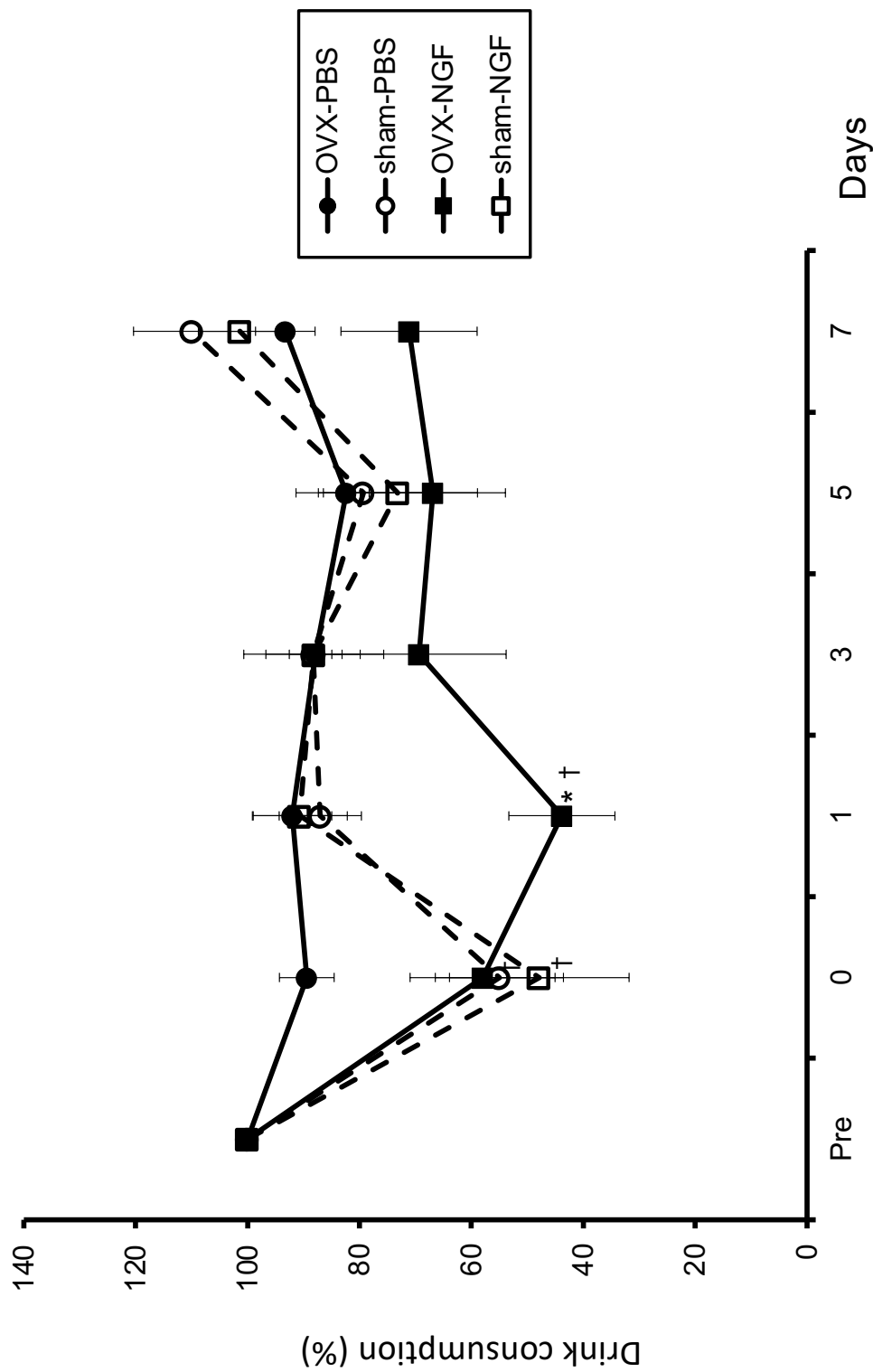


Fig. 6



Time (Days after the solution administration)

Fig. 7