

論文の内容の要旨

氏名：生田目 大 介

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：老化による口腔粘膜切開痛感受性変化に対する延髄ミクログリア性質変化の役割

中枢神経系の免疫担当細胞であるミクログリアは、活性化に伴い炎症性サイトカインを放出する傷害性ミクログリア（M1）と、抗炎症性サイトカインを放出する保護性ミクログリア（M2）という機能的に相反する2つの性質に変化し、この性質変化は、末梢の組織損傷時や神経炎症時の疼痛調節に関与する事が報告されている。また、顎顔面領域の疼痛調節に、延髄中に発現する活性化ミクログリアが関与する事が報告されている。しかしながら、口腔粘膜損傷後の疼痛調節に対する、活性化ミクログリアの M1 や M2 への性質変化が及ぼす影響、およびミクログリア性疼痛調節に対する老化の影響は不明である。そこで、本研究では、老化促進マウス（Senescence-accelerated mice prone 8 : SAMP8）を用い、口蓋粘膜切開後における延髄中での活性化ミクログリア（Iba1）の変化、M1 や M2 への性質変化、および M1 や M2 から放出される各種サイトカインの変化を正常老化マウス（Senescence-accelerated mice resistant 1 : SAMR1）と比較検討し、老化がミクログリア活性化に依存した口腔内切開痛調節機構に及ぼす影響の解明を目的とした。

三種混合麻酔薬の腹腔内投与による深麻酔下にて、SAMP8 および SAMR1 の左側口蓋粘膜に深さ 1 mm、長さ 5 mm の切開を加え、それぞれ SAMP8 incision 群および SAMR1 incision 群とした。対照群として、三種混合麻酔薬の i.p.投与のみを行い、口蓋粘膜切開は行わなかった群をそれぞれ SAMP8 naive 群および SAMR1 naive 群とした。まず、2% イソフルラン吸入による浅麻酔下にて、切開前日から切開後 21 日目までデジタルフォンプライを用いて、切開線中央から 1 mm 内側の口蓋粘膜に機械刺激を加え、マウスが頭部引っ込み反射を誘発した機械刺激の最低強度を機械的頭部引っ込み反射閾値（MHWT）とした。次に、切開後 3 日目および 11 日目に、深麻酔下にて脱血安楽死させた後、4% パラホルムアルデヒド固定液（PFA）にて灌流固定を行い、延髄を摘出し 4% PFA に 4°C で 24 時間浸漬して後固定を行った。20%スクロースを含む 0.01 M phosphate buffer saline（PBS）に浸漬後、freezing microtome を使用して水平断の切片（厚さ：30 μ m）を作製した。Iba1 陽性細胞、Iba1 陽性かつ M1 のマーカーとしての CD11c 陽性細胞（Iba1/M1）、Iba1 陽性かつ M2 のマーカーとしての CD163 陽性細胞（Iba1/M2）、Tumor necrosis factor alpha（TNF- α ）陽性かつ CD11c 陽性細胞（TNF- α /M1）、および Interleukin（IL）-10 陽性かつ CD163 陽性細胞（IL-10/M2）の細胞数を免疫組織化学的手法にて解析した。また、口蓋粘膜切開後 21 日間、SAMP8 群に対し TNF- α 中和抗体あるいはリコンビナント IL-10 を、SAMR1 群に対し IL-10 中和抗体を、浸透圧ミニポンプを用いた大槽内への持続投与を行い、MHWT の測定を切開前日から切開後 21 日目まで実施した。対照群とした vehicle 投与群は、薬剤投与群と同様の方法にて、生理食塩水を大槽内に持続投与した。また、切開後 3 日目に、SAMP8 群より未固定のまま摘出した延髄を細胞溶解液に浸漬し、ハサミにより細切した後、ホモゲナイザーによりさらに細胞破碎処理を行った。サンプル 30 μ g を SDS sample buffer と混和し、95°C にて 5 分間反応させた後、電気泳動した。泳動後ナイロン膜に転写し、抗 TNF- α 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。TNF- α タンパクの発光強度を Image J にて解析した。さらに、 β -actin 量を内部標準とし、 β -actin 量に対する TNF- α 量の比を解析した。

以下に示す結論を得た。

1. 口蓋粘膜切開後 1 日目から 21 日目まで、SAMP8 incision 群の MHWT は、SAMR1 incision 群と比較し有意な低下を認めた。
2. 口蓋粘膜切開後 3 日目および 11 日目に、SAMP8 incision 群の Iba1 陽性細胞数は、SAMR1 incision 群と比較し有意に増加が増強した。
3. 口蓋粘膜切開後 3 日目に、SAMP8 incision 群の延髄における Iba1/M1 数および TNF- α /M1 数は、SAMR1 incision 群と比較し有意な増加を認めた。また、western blotting により、SAMP8 incision 群の TNF- α タンパク量は、SAMP8 naive 群と比較し有意に増加した。
4. 口蓋粘膜切開後 11 日目、SAMP8 incision 群の延髄における Iba1/M2 数および IL-10/M2 数は、SAMR1

incision 群と比較し増加量が有意に少なかった。

5. SAMP8 incision 群へ TNF- α 中和抗体あるいはリコンビナント IL-10 を大槽内持続投与したところ vehicle 投与群と比較して, TNF- α 中和抗体投与により 5 日目から 14 日目まで MHWT の有意な上昇を認め, リコンビナント IL-10 投与により 1 日目から 14 日目まで MHWT の有意な上昇を認めた。また, SAMR1 incision 群へ IL-10 中和抗体を大槽内持続投与したところ vehicle 投与群と比較して, 5 日目から 9 日目まで MHWT の有意な低下を認めた。

以上のことから, 口蓋粘膜切開後に発症する機械アロディニアは, 老化により増強および持続し, 延髄における M1 数増加の増強に伴う TNF- α 放出増加, および M2 数増加の減弱に伴う IL-10 放出減少が関与することが示唆された。