

# 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

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

生田目 大介

(指導：飯沼利光教授，篠田雅路教授，浦田健太郎助教)

## 目 次

	ページ
概要	1 ~ 3
緒言	4 ~ 5
材料および方法	6 ~ 11
結果	12 ~ 14
考察	15 ~ 18
結論	19 ~ 20
謝辞	21
文献	22 ~ 30
図	31 ~ 45

本論文は *International Journal of Molecular Sciences* に掲載済みである，論文 “Ikutame D, Urata K, Oto T, Fujiwara S, Inuma T, Shibuta I, Hayashi Y, Hitomi S, Iwata K, Shinoda M (2020) Aging-related phenotypic conversion of medullary microglia enhances intraoral incisional pain sensitivity. *Int J Mol Sci* 21, 7871.” を基幹論文とし，新たに “Vc および C1/C2 領域における TNF- $\alpha$  のタンパク量の定量解析” のデータを追加して総括したものである。

## 概 要

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、末梢の組織損傷や神経障害後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は不明であり、さらに、このミクログリア性疼痛調節に対する老化の影響も不明な現状にある。そこで、本研究では、口蓋粘膜切開後の延髄中の活性化ミクログリア (Iba1) の発現変化、M1 や M2 への性質変化、および M1 や M2 から放出されるサイトカインの発現変化を、老化促進マウス (Senescence-accelerated mice prone 8 : SAMP8) および正常老化マウス (Senescence-accelerated mice resistant 1 : SAMR1) を用いて比較検討し、老化が口腔内の疼痛調節に及ぼす影響の解明を目的とした。

SAMP8 および SAMR1 の左側口蓋粘膜に規定した切開を施し incision モデルとした。機械アロディニアの発症を確認するために、デジタルフォンフライを用いて切開部に機械刺激を加え、マウスが頭部引っ込め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め反射閾値 (MHWT) とし、口蓋粘膜切開前日から切開後 21 日目まで測定した。免疫組織化学的解析では、切開後 3 日目および 11 日目の延髄における 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 (TNF) - $\alpha$  陽性かつ CD11c 陽性細胞 (TNF- $\alpha$ /M1), および Interleukin (IL) -10 陽性かつ CD163 陽性細胞 (IL-10/M2) の細胞数を解析した。また, 切開後 3 日目において, ウェスタンブロッティング法により, 延髄における TNF- $\alpha$  タンパク量の定量解析を行った。機械アロディニアに対する TNF- $\alpha$  および IL-10 の関与を解析するために, TNF- $\alpha$  中和抗体, IL-10 中和抗体あるいはリコンビナント IL-10 を, 切開後 21 日間大槽内持続投与し, 経日的に MHWT を測定した。

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。切開後 3 日目において, SAMP8 incision 群の延髄における Iba1 陽性細胞数, Iba1/M1 数, および TNF- $\alpha$ /M1 数は, SAMR1 incision 群と比較し有意な増加を認めたが, IL-10/M2 数は, SAMR1 incision 群と比較し増加量が有意に少なかった。また, SAMP8 incision 群の延髄における TNF- $\alpha$  タンパク量は, SAMP8 naive 群と比較し有意に増加した。切開後 11 日目において, SAMP8 incision 群の延髄における Iba1 陽性細胞数, Iba1/M1 数, および TNF- $\alpha$ /M1 数は, SAMR1 incision 群と比較し有意な増加を認めたが, 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。SAMP8 incision 群へ TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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。

以上より、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することが明らかとなり、延髄中の M1 数増加の増強に伴う TNF- $\alpha$  放出の増強および、M2 数増加の減弱に伴う IL-10 放出の減弱の関与が示唆された。

## 緒 言

老化は、神経機能障害を特徴とする進行性の生物学的変化であり<sup>1)</sup>、中枢神経系でのアミロイド沈着や神経変性、認知機能障害などの発症に関連している<sup>2)</sup>。また、老化は侵害受容ニューロンにも影響を及ぼすことが報告されており<sup>3)</sup>、老齡ラットを用いた研究では、老化により一次侵害受容ニューロンの興奮性が減弱し、脊髄後角の二次侵害受容ニューロンの興奮性は増強することが報告されている<sup>3,4)</sup>。このように、老化は末梢や中枢におけるニューロンの可塑的变化に関与し、疼痛調節機構にも影響を及ぼすことが考えられる。しかしながら、老化が口腔顔面領域の疼痛調節機構に及ぼす影響および、分子メカニズムはいまだ明らかではない。

近年、坐骨神経損傷などの末梢神経障害により中枢神経系の免疫担当細胞であるミクログリアが活性化し、脊髄後角の活性化ミクログリアは、二次侵害受容ニューロンの興奮性調節に影響を及ぼすことが明らかとなっている<sup>5-10)</sup>。また、活性化ミクログリアは、延髄の三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) および上部頸髄 (C1/C2) にも発現し、口腔顔面領域における異常疼痛の発症に関与することが明らかとなっている<sup>11-15)</sup>。さらに、延髄に発現するミクログリアは、末梢組織の病態に応じて活性化し、傷害性あるいは保護性への性質変化を引き起こすことが知られている<sup>16)</sup>。傷害性ミクログリア (M1) は、Interleukin (IL) -1 $\beta$ や Tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$ , IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を特徴とし、主に炎症促進に関与する<sup>17)</sup>。一方で、保護性ミクログリア (M2) は、IL-4 や IL-10 などの抗炎症性サイトカインの産生を特徴とし、主に炎症抑制に関与している<sup>18)</sup>。したがって、延髄におけるミク

ログリア活性化や性質変化およびそれらの変化に対する老化の影響が、口腔内組織損傷後の口腔内疼痛調節に関与する可能性がある。

よって本研究の目的は、老化促進マウスを用い、口蓋粘膜切開後における延髄のVc および C1/C2 領域での活性化ミクログリアの変化、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を解明することとした。

# 材料および方法

## 1. 実験動物

本研究では、20-30 g の雄性老化促進マウス (Senescence-accelerated mice prone 8 : SAMP8, 23 週齢, Japan SLC, n = 149) および雄性正常老化マウス (Senescence-accelerated mice resistant 1 : SAMR1, 23 週齢, Japan SLC, n = 128) を使用した。SAMP8 は、短寿命、促進老化を示し、加齢依存性の神経変性疾患モデルとして多くの研究で使用されている<sup>19-22)</sup>。一方、正常老化を示す SAMR1 は SAM 系統マウスのコントロール群として、多くの研究で使用されている<sup>23-26)</sup>。実験に使用したすべてのマウスは、12 時間毎に切り替わる明暗サイクル、23°C に維持された室温、および餌と水を自由に摂取できる環境下にて飼育した。なお、本研究は日本大学動物実験委員会の承認 (AP17D010 : 承認日 ; 2017 年 6 月 30 日) を受け、国際疼痛学会の指針に従い実施した<sup>27)</sup>。

## 2. 口蓋粘膜切開モデル

生理食塩水で希釈した三種混合麻酔薬 (酒石酸ブトルファノール 5.0 mg/kg, ミダゾラム 4.0 mg/kg, 塩酸メデトミジン 0.75 mg/kg) の腹腔内 (i.p.) 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。



### 3. 口蓋部機械刺激に対する頭部引っ込み反射閾値の測定

2%イソフルラン(Mylan)吸入による浅麻酔下にて, デジタルフォンフライ (Bioseb) 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<sup>28-31)</sup>。機械刺激は, 刺激強度を一定の割合で増加させ (10 g/s), 組織損傷を防ぐために上限値は 100 g とした。口蓋粘膜への機械刺激による MHWT の測定は, 3 分間隔で 3 回行い, その平均値を各マウスの MHWT とした。なお, MHWT 測定は, 切開前日から切開後 21 日目まで盲検条件下で実施した。

### 4. 大槽内 TNF- $\alpha$ 中和抗体, IL-10 中和抗体またはリコンビナント IL-10 投与による MHWT の変化

SAMP8 群に対し TNF- $\alpha$  中和抗体 (500  $\mu$ g/mL, 0.11  $\mu$ L/h, Sino Biological) あるいはリコンビナント IL-10 (0.1 mg/mL, 0.11  $\mu$ L/h, Abcam), SAMR1 群に対し IL-10 中和抗体 (500  $\mu$ g/mL, 0.11  $\mu$ L/h, R&D Systems) を, 口蓋粘膜切開後 21 日間浸透圧ミニポンプ (Alzet model 2002 ; 0.5  $\mu$ L/h, Durect Corporation) を用いて大槽内へ持続投与した。また, MHWT の測定を切開前日から切開後 21 日目まで盲検条件下で実施した。なお, 浸透圧ミニポンプは, 生理食塩水で希釈した三種混合麻酔薬の i.p.投与による深麻酔下にて後頭骨に小穴を開けた後, 大槽内に設置したポリエチレンチューブ (直径 0.8 mm, Natsume) に接続し, 使用した<sup>13)</sup>。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。

## 5. 免疫組織化学染色

生理食塩水で希釈した三種混合麻酔薬の i.p.投与による深麻酔下にて、0.9% 生理食塩水（50 mL）を用いて経心的に脱血し安楽死させた後、4%パラホルムアルデヒド固定液（PFA）による灌流固定を行い、延髄を摘出した後、PFA に 4°C で 24 時間浸漬し後固定を行った。後固定した延髄は、0.01 M phosphate buffer saline（PBS）に浸漬（6 時間）し、freezing microtome（Leica）を使用して水平断の切片（厚さ：30 μm）を製作した。1 マウスあたり 7 枚の切片（120 μm 毎）を免疫組織化学染色による解析に使用した。

### 1) 延髄における Iba1 陽性細胞数解析

口蓋粘膜切開後 3 日目および 11 日目における、Vc および C1/C2 領域のミクログリアのマーカーとしての Iba1 陽性細胞数の変化について解析を行った。正常ヤギ血清（10% NGS）に室温（23°C）で 1.5 時間浸漬することで、非特異的反応のブロッキングを行った。続いて、一次抗体として抗 Iba1 ウサギポリクローナル抗体（2,000 倍希釈，Wako）に 4°C で 72 時間反応させた後、切片を PBS により洗浄し、二次抗体としてビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（600 倍希釈，Vector Laboratories）に室温下で 2 時間反応させ、さらに PBS で洗浄した後に、アビジン-ビオチン複合体（100 倍希釈，Vector Laboratories）に室温で 1 時間反応させた。さらに、0.05 M Tris buffer（TB，pH 7.4）で洗浄した後、0.035% 3,3'-diaminobenzidine（DAB，Sigma-Aldrich）溶液で 5 分間反応させた。切片の封入後、オールインワン顕微鏡 BZ-9000（Keyence）を使用し、

背景に比べ2倍以上の染色強度を示す細胞を陽性とし、Image J (NIH) を使用して Iba1 陽性細胞数の計測および解析を行った。

## 2) 延髄における Iba1/M1 数, Iba1/M2 数, TNF- $\alpha$ /M1 数および IL-10/M2 数解析

口蓋粘膜切開後 3 日目および 11 日目における, Vc および C1/C2 領域の 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), TNF- $\alpha$  陽性かつ CD11c 陽性細胞 (TNF- $\alpha$ /M1) および IL-10 陽性かつ CD163 陽性細胞 (IL-10/M2) の細胞数の変化について解析を行った。切片は一次抗体として, 抗 Iba1 ウサギポリクローナル抗体 (2,000 倍希釈, Wako), 抗 CD11c ハムスターモノクローナル抗体 (1,000 倍希釈, Abcam), 抗 Iba1 ヤギポリクローナル抗体 (500 倍希釈, Abcam), 抗 CD163 ウサギモノクローナル抗体 (1,000 倍希釈, Abcam), 抗 TNF- $\alpha$  ウサギポリクローナル抗体 (200 倍希釈, Abcam) または 抗 IL-10 ラットモノクローナル抗体 (300 倍希釈, Abcam) に 4°C で 24 時間反応させた後, PBS にて洗浄した。続けて, 二次抗体として Alexa Fluor 568 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1,000 倍希釈, Life Technologies), Alexa Fluor 488 ヤギ抗アルメニアンハムスター IgG 抗体 (1,000 倍希釈, Abcam), DNA 特異的蛍光色素の DAPI (5,000 倍希釈, Sigma Aldrich), Alexa Fluor 568 ロバ抗ヤギ IgG 抗体 (1,000 倍希釈, Life Technologies), Alexa Fluor 488 ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (1,000 倍希釈, Invitrogen), Alexa Fluor 568 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1,000 倍希釈, Life Technologies), Alexa Fluor 568 ロバ抗ラット IgG 抗体 (1,000 倍希釈, Abcam) または Alexa Fluor 488 ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (1,000 倍希釈, Invitrogen) に室温で 2 時間反応させた。免疫陽性細胞の観察および細胞数の

計測は、延髄における Iba1 陽性細胞数の変化の解析と同様に行った。

## 6. Western blotting

口蓋粘膜切開後 3 日目における、Vc および C1/C2 領域の TNF- $\alpha$  タンパク量の変化について解析を行った。SAMP8 群より未固定のまま摘出した延髄を細胞溶解液（1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 137 mM NaCl）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。次に、サンプルを遠心分離（15,000  $\times$ g, 10 分間, 4°C）し、得られた上清のタンパク質濃度を protein assay kit（Bio-Rad）を用いてマイクロプレート吸光分光光度計（Bio-Rad）により定量した。さらに、定量したサンプル 30  $\mu$ g を SDS sample buffer と混和し、95°Cにて 5 分間反応させた後、10% SDS ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。泳動後ナイロン膜に転写し、3%ウシ血清アルブミン加リン酸緩衝液（3% bovine serum albumin phosphate buffferd saline ; 3 % BSA-PBS）に 1 時間浸漬することで、非特異的反応のブロッキングを行った。その後、一次抗体として抗 TNF- $\alpha$  ウサギモノクローナル抗体（200 倍希釈, Sino Biological）、二次抗体として HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（5,000 倍希釈, Cell Signaling Technology）を用いて反応させ、Western Lightning ELC Pro（PerkinElmer）により発光させ、ChemiDoc MP system（Bio-Rad）を用いて観察した。なお、TNF- $\alpha$  タンパクの発光強度を Image Jにて解析した。さらに、 $\beta$ -actin 量を内部標準とし、 $\beta$ -actin 量に対する TNF- $\alpha$  量の比を解析した。

## 6. 統計学的解析

各データは平均値±標準偏差 (SD) で表した。有意差検定には, one-way または two-way analysis of variance (ANOVA) を用い, Bonferroni's multiple comparison test にて多重比較した。免疫組織化学的解析には Student's *t*-test を用いた。有意差水準は  $\alpha = 0.05$  とした。

## 結 果

### 1. 口蓋粘膜切開後の MHWT の変化

SAMR1 incision 群では口蓋粘膜切開後 1 日目から 7 日目まで、SAMP8 incision 群では 1 日目から 21 日目まで、MHWT は naive 群と比較し有意な低下を認めた ( $P < 0.05$ )。切開後 3 日目に、SAMP8 incision 群および SAMR1 incision 群の MHWT は、naive 群と比較し有意な低下を認めた (SAMP8 incision :  $23.2 \pm 0.7$  g, SAMP8 naive :  $44.1 \pm 0.8$  g, SAMR1 incision :  $32.0 \pm 1.7$  g, SAMR1 naive :  $44.7 \pm 0.9$  g)。また、切開後 11 日目に、SAMR1 incision 群の MHWT は、SAMR1 naive 群と有意差を認めなかったが、SAMP8 incision 群の MHWT は、SAMP8 naive 群と比較し有意な低下を認めた (SAMP8 incision :  $35.0 \pm 1.7$  g, SAMP8 naive :  $44.0 \pm 0.8$  g, SAMR1 incision :  $45.5 \pm 1.0$  g, SAMR1 naive :  $46.0 \pm 0.9$  g) (第 1 図)。

### 2. Vc および C1/C2 領域における Iba1 陽性細胞数の変化

切開後 3 日目および 11 日目に、SAMP8 incision 群および SAMR1 incision 群の Iba1 陽性細胞数は、naive 群と比較し有意に増加し、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 日目 ; SAMP8 incision :  $3.7 \pm 1.1$ , SAMP8 naive :  $0.9 \pm 0.2$ , SAMR1 incision :  $2.3 \pm 0.6$ , SAMR1 naive :  $0.7 \pm 0.4$ ) (11 日目 ; SAMP8 incision :  $3.0 \pm 0.3$ , SAMP8 naive :  $0.8 \pm 0.1$ , SAMR1 incision :  $2.0 \pm 0.1$ , SAMR1 naive :  $0.8 \pm 0.1$ ) (第 2 図)。切開後 3 日目および 11 日目における SAMP8 naive 群の Iba1 陽性細胞数は、SAMR1 naive 群と比較し有意差を認めなかった。

### 3. Vc および C1/C2 領域における Iba1/M1 数および Iba1/M2 数の変化

切開後 3 日目に, SAMP8 incision 群における M1 および M2 の存在を確認した (第 3 図 a, d)。切開後 3 日目に, SAMP8 incision 群の Iba1/M1 数は, SAMP8 naive 群および SAMR1 incision 群と比較し有意な増加を認めた (SAMP8 incision:  $52.7 \pm 13.4$ , SAMP8 naive:  $26.7 \pm 2.7$ , SAMR1 incision:  $35.5 \pm 6.2$ , SAMR1 naive:  $27.2 \pm 6.6$ ) (第 3 図 b, c)。また, SAMR1 incision 群の Iba1/M2 数は, SAMR1 naive 群と比較し有意な増加を認めた (SAMP8 incision:  $60.3 \pm 5.8$ , SAMP8 naive:  $42 \pm 5.8$ , SAMR1 incision:  $49.5 \pm 20.4$ , SAMR1 naive:  $27.2 \pm 7.6$ ) (第 3 図 e, f)。

切開後 11 日目に, SAMP8 incision 群および SAMR1 incision 群の Iba1/M1 数は, naive 群と比較し有意な増加を認めた (SAMP8 incision:  $122.5 \pm 35.7$ , SAMP8 naive:  $27.8 \pm 8.6$ , SAMR1 incision:  $90.2 \pm 14.8$ , SAMR1 naive:  $19.5 \pm 6.4$ ) (第 4 図 a, b)。また, SAMP8 incision 群および SAMR1 incision 群の Iba1/M2 数は, naive 群と比較し有意な増加を認めた。しかし, SAMP8 incision 群の Iba1/M2 数は, SAMR1 incision 群と比較し増加量が有意に少なかった (SAMP8 incision:  $58.5 \pm 12.3$ , SAMP8 naive:  $31.2 \pm 7.5$ , SAMR1 incision:  $102.3 \pm 27.4$ , SAMR1 naive:  $33.2 \pm 11.6$ ) (第 4 図 c, d)。

### 4. Vc および C1/C2 領域における TNF- $\alpha$ /M1 数および IL-10/M2 数の変化

切開後 3 日目および 11 日目に, SAMP8 incision 群および SAMR1 incision 群の TNF- $\alpha$ /M1 数は, naive 群と比較し有意な増加を認め, SAMP8 incision 群の TNF- $\alpha$ /M1 数は, SAMR1 incision 群と比較し有意に多くの増加を認めた (3 日目; SAMP8 incision:  $117.6$

$\pm 13.5$ , SAMP8 naive :  $21.5 \pm 5.7$ , SAMR1 incision :  $74 \pm 16.7$ , SAMR1 naive :  $22.4 \pm 6.0$ )

(11 日目 ; SAMP8 incision :  $57.2 \pm 4.6$ , SAMP8 naive :  $22.8 \pm 2.5$ , SAMR1 incision :  $37.8 \pm 4.4$ , SAMR1 naive :  $20.4 \pm 1.8$ ) (第 5 図)。

切開後 3 日目および 11 日目に, SAMP8 incision 群および SAMR1 incision 群の IL-10/M2 数は, naive 群と比較し有意な増加を認めた。しかし, SAMP8 incision 群の IL-10/M2 数は, SAMR1 incision 群と比較し増加量が有意に少なかった (3 日目 ; SAMP8 incision :  $22 \pm 3.6$ , SAMP8 naive :  $8.5 \pm 3.1$ , SAMR1 incision :  $38.3 \pm 6.5$ , SAMR1 naive :  $9.8 \pm 2.1$ ) (11 日目 ; SAMP8 incision :  $37.5 \pm 4.4$ , SAMP8 naive :  $11.5 \pm 2.4$ , SAMR1 incision :  $65.3 \pm 4.6$ , SAMR1 naive :  $7.8 \pm 1.9$ ) (第 6 図)。

## 5. 口蓋粘膜切開後の MHWT の変化に対する TNF- $\alpha$ および IL-10 の関与

口蓋粘膜切開後 5 日目から 14 日目まで, TNF- $\alpha$  中和抗体の大槽内持続投与により, SAMP8 incision 群の MHWT は, vehicle 投与群と比較し有意な上昇を認めた (第 7 図)。また, 切開後 5 日目から 9 日目まで, IL-10 中和抗体の大槽内持続投与により, SAMR1 incision 群の MHWT は, vehicle 投与群と比較し有意な低下を認めた (第 8 図)。さらに, 切開後 1 日目から 14 日目まで, リコンビナント IL-10 の大槽内持続投与により, SAMP8 incision 群の MHWT は, vehicle 投与群と比較し有意な上昇を認めた (第 9 図)。

## 6. Vc および C1/C2 領域における TNF- $\alpha$ タンパク量の定量解析

切開後 3 日目に, SAMP8 incision 群の TNF- $\alpha$  タンパク量は, SAMP8 naive 群と比較し有意に増加した (SAMP8 incision :  $0.19 \pm 0.06$ , SAMP8 naive :  $0.07 \pm 0.03$ ) (第 10 図)。



## 考 察

### 1. ミクログリアの M1/M2 への性質変化による影響とそのメカニズム

本研究の結果より, SAMP8 および SAMR1 の両マウスにおいて, 口蓋粘膜切開により機械アロディニアが発症すること, SAMP8 は SAMR1 と比較して機械アロディニアが増強および持続することが明らかとなった。また, 切開後 3 日目および 11 日目における免疫組織化学的解析結果より, SAMP8 は SAMR1 と比較して, Vc および C1/C2 領域における M1 数増加の増強および M2 数増加の減弱が生じることが明らかとなった。末梢組織の慢性炎症に応じて発現する様々なサイトカインは, 二次侵害受容ニューロンの興奮性を増大させ, 神経障害性疼痛の発症に関与することが報告されている<sup>5,32,33</sup>)。また脊髄後角におけるミクログリアを始めとした免疫細胞の活性化および免疫細胞由来の様々なサイトカインの発現に対し, 老化が影響を及ぼすことが報告されている<sup>34</sup>)。さらに, 末梢の病態変化に伴い生じる中枢神経系のミクログリアの M1 や M2 への性質変化に対して老化が影響を及ぼし<sup>17,35-43</sup>)、老化に起因した神経変性疾患においては, M1 数増加の増強および M2 数増加の減弱を認めることが報告されている<sup>44-47</sup>)。しかしながら, 老化がミクログリアの性質変化に影響を及ぼすメカニズムについてはいまだ不明な点が多い。本研究で使用した SAMP8 は脳内に amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) の沈着が観察されることが明らかとなっているが<sup>48</sup>)、近年, アルツハイマー型認知症などの神経変性疾患の患者の脳実質における  $A\beta$  の沈着は, ATP-P2X<sub>7</sub> 受容体シグナルを介してミクログリアの性質変化を引き起こすことが報告されている<sup>45,49</sup>)。さらに, 脳の神経細胞外における  $A\beta$  の沈着は, 細胞外 ATP の放出を引き起こし, P2X<sub>7</sub>

受容体を介した自己分泌および傍分泌のループを活性化させ、ミクログリアの M1 への性質変化を誘発する<sup>50)</sup>。以上の報告と本研究より、老化による口蓋粘膜の機械アロディニアの増強および持続は、Vc および C1/C2 領域における P2X<sub>7</sub> シグナルを介したミクログリアの性質変化、すなわち M1 数増加の増強および M2 数増加の減弱が老化により引き起こされ、二次侵害受容ニューロンの興奮性が増大した結果、誘発されたと考えられる。

## 2. M1 由来の TNF- $\alpha$ および M2 由来の IL-10 による作用

口蓋粘膜切開後 3 日目および 11 日目に、Vc および C1/C2 領域において SAMP8 の TNF- $\alpha$ /M1 数は、SAMR1 と比較し有意に増加した。また、切開後 3 日目に、SAMP8 incision 群の TNF- $\alpha$  タンパク量は、SAMP8 naive 群と比較し有意に増加した。さらに、SAMP8 に対し口蓋粘膜切開後 5 日目から 14 日目まで、TNF- $\alpha$  中和抗体の大槽内持続投与を行ったところ、vehicle 投与群と比較し MHWT の有意な上昇を認めた。したがって、老化により口蓋粘膜切開後の TNF- $\alpha$ /M1 数および TNF- $\alpha$  タンパク量は増加し、TNF- $\alpha$  は切開痛の増強に関与することが明らかとなった。これまでの研究では、TNF- $\alpha$  シグナルは、侵害受容ニューロンの興奮性を増強するほか、さらにミクログリアからの TNF- $\alpha$  放出も増加させることが報告されている<sup>51)</sup>。ミクログリアから放出された TNF- $\alpha$  は、 $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoazolepropionic acid (AMPA) 受容体の膜上発現を増加させてニューロンの興奮性を増強させること<sup>52)</sup>、末梢神経損傷により脊髄後角における Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体の膜上発現が TNF- $\alpha$  依存性に誘発されることが報告されている<sup>53-55)</sup>。また、TNF- $\alpha$  は NMDA 受容体の膜上発現の惹起とシナプ

スの可塑的变化を引き起こすことが明らかとなっている<sup>56)</sup>。さらに、マウス後肢の炎症では、TNF- $\alpha$  が脊髄後角における lamina II ニューロンの *N-methyl-d-aspartate* (NMDA) 受容体の興奮性シナプス後電流を増加させるが、TNF- $\alpha$  の受容体である TNFR1 のノックアウトマウスでは、この増加が観察されないことが報告されている<sup>57)</sup>。したがって、これらの報告と本研究の結果から、老化に伴う M1 由来の TNF- $\alpha$  の増加が、口蓋粘膜切開後における Vc および C1/C2 領域の侵害受容ニューロンにおける AMPA や NMDA 受容体の膜上発現を引き起こし、侵害受容ニューロンの興奮性が増大することで、口蓋粘膜機械アロディニアの増強をもたらすことが考えられる。

口蓋粘膜切開後 11 日目に、Vc および C1/C2 領域における SAMP8 の IL-10/M2 数は、SAMR1 と比較し有意に少ない増加を認めた。また、SAMR1 に対し切開後 5 日目から 9 日目まで、IL-10 中和抗体の大槽内持続投与を行ったところ、vehicle 投与群と比較し MHWT の有意な低下を認めた。さらに、SAMP8 に対し切開後 1 日目から 14 日目まで、リコンビナント IL-10 の大槽内持続投与を行ったところ、vehicle 投与群と比較し MHWT の有意な上昇を認めた。よって本研究結果から、老化は口蓋粘膜切開後の Vc および C1/C2 領域における IL-10/M2 数増加の減弱を引き起こし、機械アロディニアの抑制には IL-10 が関与することが明らかとなった。マウスの足底切開や脊髄神経損傷によって生じる痛覚過敏の抑制に、IL-10 が関与することが報告されている<sup>58)</sup>。また、足底切開によって生じる痛覚過敏の抑制には、IL-10 シグナルを介した G protein-coupled receptor 40 (GPR40) の活性化が関与することが報告されており<sup>59)</sup>、GPR40 アゴニストの髄腔内投与は、炎症性および神経障害性疼痛モデルラットにおける機械アロディニアを抑制させることが報告されている<sup>60)</sup>。さらに、脊髄後角にお

る GPR40 受容体を介したシグナル伝達は、下行性疼痛抑制系の調節に関与するという報告もある<sup>61)</sup>。したがって、これらの報告と本研究の結果から、老化に伴う M2 由来の IL-10 放出の減少が、GPR40 シグナルの活性化を抑制することで、口蓋粘膜切開後における Vc および C1/C2 領域の侵害受容ニューロンの興奮性が増大し、機械アロディニアの増強をもたらしたと考えられる。

本研究では、M1 から放出される炎症性サイトカインとして TNF- $\alpha$ 、M2 から放出される抗炎症性サイトカインとして IL-10 に着目し口蓋粘膜切開痛に対する役割を解析した。しかしながら、M1 由来の炎症性サイトカイン、そして M2 由来の抗炎症性サイトカインは他にも多数存在する。そのため、これらのサイトカインがミクログリア性質変化に及ぼす影響も十分考えられるため、今後さらなる検討が必要と考える。

## 結 論

本研究では、SAMP8 および SAMR1 を用いて、老化が口蓋粘膜切開後の延髄における M1 や M2 への性質変化および、性質変化に伴う口腔内疼痛受容の変化に及ぼす影響を検討し、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- $\alpha$ /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- $\alpha$  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 日目に、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- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  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。

## 謝 辞

日本大学歯学部歯科補綴学第 I 講座の飯沼利光教授，日本大学歯学部生理学講座の篠田雅路教授，日本大学歯学部歯科補綴学第 I 講座の浦田健太郎助教に，多大なるご指導を賜りましたことに対し，この誌上を持ちまして深く感謝の意を申し上げます。

## 文 献

1. Niraula A, Sheridan JF, Godbout JP (2017) Microglia priming with aging and stress. *Neuropsychopharmacology* 42, 318-333.
2. Wyss-Coray T (2016) Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature* 539 (7628), 180-186.
3. Iwata K, Fukuoka T, Kondo E, Tsuboi Y, Tashiro A, Noguchi K, Masuda Y, Morimoto T, Kanda K (2002) Plastic changes in nociceptive transmission of the rat spinal cord with advancing age. *J Neurophysiol* 87 (2), 1086-1093.
4. Taguchi T, Ota H, Matsuda T, Murase S, Mizumura K (2010) Cutaneous C-fiber nociceptor responses and nociceptive behaviors in aged Sprague-Dawley rats. *Pain* 151 (3), 771-782.
5. Ledebner A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, Watkins LR (2005) Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* 115 (1-2), 71-83.
6. Svensson CI, Fitzsimmons B, Azizi S, Powell HC, Hua XY, Yaksh TL (2005) Spinal p38 $\beta$  isoform mediates tissue injury-induced hyperalgesia and spinal sensitization. *J Neurochem* 92 (6), 1508-1520.
7. Obata H, Eisenach JC, Hussain H, Bynum T, Vincler M (2006) Spinal glial activation contributes to postoperative mechanical hypersensitivity in the rat. *J Pain* 7 (11), 816-822.
8. Xiang Y, Liu T, Yang H, Gao F, Xiang H, Manyande A, Tian Y, Tian X (2015) NRG1-ErbB signalling promotes microglia activation contributing to incision-induced mechanical



- allodynia. *Eur J Pain* 19 (5), 686-694.
9. Peritore AF, Siracusa R, Fusco R, Gugliandolo E, D'Amico R, Cordaro M, Crupi R, Genovese T, Impellizzeri D, Cuzzocrea S, Paola RD (2020) Ultramicronized palmitoylethanolamide and paracetamol, a new association to relieve hyperalgesia and pain in a sciatic nerve injury model in rat. *Int J Mol Sci* 21 (10), 3509.
  10. D'Amico R, Impellizzeri D, Cuzzocrea S, Paola RD (2020) ALIAMides update: palmitoylethanolamide and its formulations on management of peripheral neuropathic pain. *Int J Mol Sci* 21 (15), 5330.
  11. Okada-Ogawa A, Suzuki I, Sessle BJ, Chiang CY, Salter MW, Dostrovsky JO, Tsuboi Y, Kondo M, Kitagawa J, Kobayashi A, Noma N, Imamura Y, Iwata K (2009) Astroglia in medullary dorsal horn (trigeminal spinal subnucleus caudalis) are involved in trigeminal neuropathic pain mechanisms. *J Neurosci* 29 (36), 11161-11171.
  12. Sago T, Ono K, Harano N, Furuta-Hidaka K, Hitomi S, Nunomaki M, Yoshida M, Shiiba S, Nakanishi O, Matsuo K, Inenaga K (2012) Distinct time courses of microglial and astrocytic hyperactivation and the glial contribution to pain hypersensitivity in a facial cancer model. *Brain Res* 1457, 70-80.
  13. Old EA, Clark AK, Malcangio M (2015) The role of glia in the spinal cord in neuropathic and inflammatory pain. *Handb Exp Pharmacol* 227, 145-170.
  14. Tamagawa T, Shinoda M, Honda K, Furukawa A, Kaji K, Nagashima H, Akasaka R, Chen J, Sessle BJ, Yonehara Y, Iwata K (2016) Involvement of microglial P2Y<sub>12</sub> signaling in tongue cancer pain. *J Dent Res* 95 (10), 1176-1182.

15. Shinoda M, Kubo A, Hayashi Y, Iwata K (2019) Peripheral and central mechanisms of persistent orofacial pain. *Front Neurosci* 13, 1227.
16. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ (2016) Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol* 173 (4), 649-665.
17. Kalkman HO, Feuerbach D (2016) Antidepressant therapies inhibit inflammation and microglial M1-polarization. *Pharmacol Ther* 163, 82-93.
18. Genovese T, Esposito E, Mazzon E, Paola RD, Caminiti R, Bramanti P, Cappelani A, Cuzzocrea S (2009) Absence of endogenous interleukin-10 enhances secondary inflammatory process after spinal cord compression injury in mice. *J Neurochem* 108 (6), 1360-1372.
19. Cheng XR, Zhou WX, Zhang YX, Zhou DS, Yang RF, Chen LF (2007) Differential gene expression profiles in the hippocampus of senescence-accelerated mouse. *Neurobiol Aging* 28 (4), 497-506.
20. Fernandez-Gomez FJ, Munoz-Delgado E, Montenegro MF, Campoy FJ, Vidal CJ, Jordan J (2010) Cholinesterase activity in brain of senescence-accelerated-resistant mouse SAMR1 and its variation in brain of senescence-accelerated-prone mouse SAMP8. *J Neurosci Res* 88 (1), 155-166.
21. Chen W, Liang T, Zuo W, Wu X, Shen Z, Wang F, Li C, Zheng Y, Peng G (2018) Neuroprotective effect of 1-Deoxynojirimycin on cognitive impairment,  $\beta$ -amyloid deposition, and neuroinflammation in the SAMP8 mice. *Biomed Pharmacother* 106, 92-97.
22. Jiang J, Liu G, Shi S, Li Y, Li Z (2019) Effects of manual acupuncture combined with

- donepezil in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acupunct Med* 37 (1), 64-71.
23. Miyamoto M, Kiyota Y, Yamazaki N, Nagaoka A, Matsuo T, Nagawa Y, Takeda T (1986) Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiol Behav* 38 (3), 399-406.
  24. Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K (1997) Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of senescence. *Exp Gerontol* 32 (1-2), 105-109.
  25. Butterfield DA, Poon HF (2005) The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 40 (10), 774-783.
  26. Takeda T (2009) Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochem Res* 34 (4), 639-659.
  27. Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16 (2), 109-110.
  28. Shimizu K, Asano M, Kitagawa J, Ogiso B, Ren K, Oki H, Matsumoto M, Iwata K (2006) Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in medullary and upper cervical cord neurons following noxious tooth pulp stimulation. *Brain Res* 1072 (1), 99-109.
  29. Urata K, Shinoda M, Honda K, Lee J, Maruno M, Ito R, Gionhaku N, Iwata K (2015) Involvement of TRPV1 and TRPA1 in incisional intraoral and extraoral pain. *J Dent Res* 94 (3), 446-454.
  30. Nagashima H, Shinoda M, Honda K, Kamio N, Hasuike A, Sugano N, Arai Y, Sato S, Iwata K (2017) CXCR4 signaling contributes to alveolar bone resorption in *Porphyromonas*

- gingivalis-induced periodontitis in mice. *J Oral Sci* 59 (4), 571-577.
31. Urata K, Shinoda M, Ikutame D, Iinuma T, Iwata K (2018) Involvement of transient receptor potential vanilloid 2 in intra-oral incisional pain. *Oral Dis* 24 (6), 1093-1100.
  32. Milligan ED, Watkins LR (2009) Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 10 (1), 23-36.
  33. Wilkerson JL, Milligan ED (2011) The central role of glia in pathological pain and the potential of targeting the cannabinoid 2 receptor for pain relief. *ISRN Anesthesiol* 2011 (2011), 593894.
  34. Rea IM, Gibson DS, McGilligan V, McNerlan SE, Alexander HD, Ross OA (2018) Age and age-related diseases: role of inflammation triggers and cytokines. *Front Immunol* 9, 586.
  35. Zhang Z, Zhang ZY, Schittenhelm J, Wu Y, Meyermann R, Schluesener HJ (2011) Parenchymal accumulation of CD163+ macrophages/microglia in multiple sclerosis brains. *J Neuroimmunol* 237 (1-2), 73-79.
  36. Xu Y, Qian L, Zong G, Ma K, Zhu X, Zhang H, Li N, Yang Q, Bai H, Ben J, Li X, Xu Y, Chen Q (2012) Class A scavenger receptor promotes cerebral ischemic injury by pivoting microglia/macrophage polarization. *Neuroscience* 218, 35-48.
  37. Norden DM, Godbout JP (2013) Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39 (1), 19-34.
  38. Paladini A, Fusco M, Coaccioli S, Skaper SD, Varrassi G (2015) Chronic pain in the elderly: the case for new therapeutic strategies. *Pain Physician* 18 (5), E863-E876.

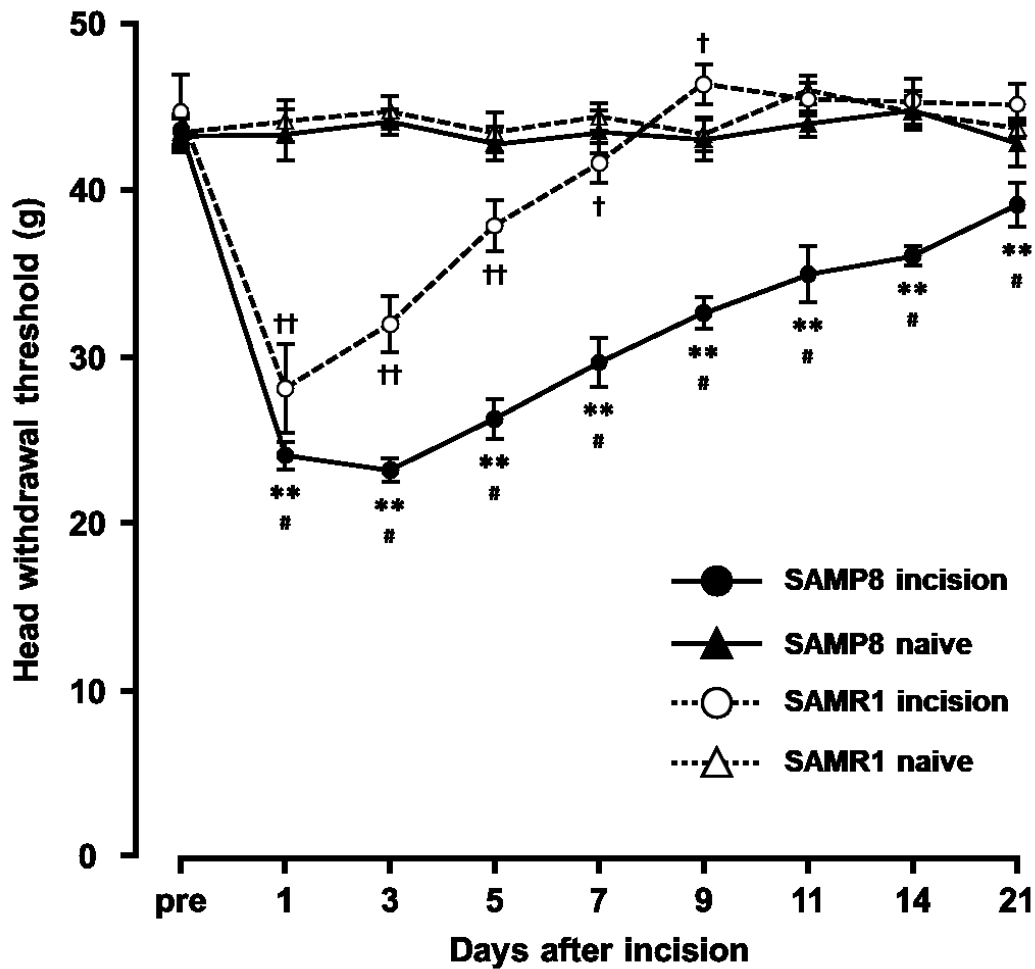
39. Zhang Q, Lu Y, Bian H, Guo L, Zhu H (2017) Activation of the  $\alpha 7$  nicotinic receptor promotes lipopolysaccharide-induced conversion of M1 microglia to M2. *Am J Transl Res* 9 (3), 971-985.
40. Ma Y, Wang J, Wang Y, Yang GY (2017) The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Prog Neurobiol* 157, 247-272.
41. Ono Y, Nagai M, Yoshino O, Koga K, Nawaz A, Hatta H, Nishizono H, Izumi G, Nakashima A, Imura J, Tobe K, Fujii T, Osuga Y, Saito S (2018) CD11c<sup>+</sup> M1-like macrophages (MΦs) but not CD206<sup>+</sup> M2-like MΦ are involved in folliculogenesis in mice ovary. *Sci Rep* 8, 8171.
42. Xu S, Zhu W, Shao M, Zhang F, Guo J, Xu H, Jiang J, Ma X, Xia X, Zhi X, Zhou P, Lu F (2018) Ecto-5'-nucleotidase (CD73) attenuates inflammation after spinal cord injury by promoting macrophages/microglia M2 polarization in mice. *J Neuroinflammation* 15 (1), 155.
43. Wang G, Zhou Y, Wang Y, Li D, Liu J, Zhang F (2019) Age-associated dopaminergic neuron loss and midbrain glia cell phenotypic polarization. *Neuroscience* 415, 89-96.
44. Li MD, Burns TC, Kumar S, Morgan AA, Sloan SA, Palmer TD (2015) Aging-like changes in the transcriptome of irradiated microglia. *Glia* 63 (5), 754-767.
45. Tang Y, Le W (2016) Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* 53 (2), 1181-1194.
46. Yao K, Zhao YF (2018) Aging modulates microglia phenotypes in neuroinflammation of MPTP-PD mice. *Exp Gerontol* 111, 86-93.

47. Huntula S, Saegusa H, Wang X, Zong S, Tanabe T (2019) Involvement of N-type Ca(2+) channel in microglial activation and its implications to aging-induced exaggerated cytokine response. *Cell Calcium* 82, 102059.
48. Valle JD, Duran-Vilaregut J, Manich G, Pallas M, Camins A, Vilaplana J, Pelegri C (2011) Cerebral amyloid angiopathy, blood-brain barrier disruption and amyloid accumulation in SAMP8 mice. *Neurodegener Dis* 8 (6), 421-429.
49. Silva CS, Eira J, Ribeiro CA, Oliveira A, Sousa MM, Cardoso I, Liz MA (2017) Transthyretin neuroprotection in Alzheimer's disease is dependent on proteolysis. *Neurobiol Aging* 59, 10-14.
50. Chiozzi P, Sarti AC, Sanz JM, Giuliani AL, Adinolfi E, Vultaggio-Poma V, Falzoni S, Virgilio FD (2019) Amyloid  $\beta$ -dependent mitochondrial toxicity in mouse microglia requires P2X7 receptor expression and is prevented by nimodipine. *Sci Rep* 9 (1), 6475.
51. Jin MM, Wang F, Qi D, Liu WW, Gu C, Mao CJ, Yang YP, Zhao Z, Hu LF, Liu CF (2018) A Critical role of autophagy in regulating microglia polarization in neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* 10, 378.
52. Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Zastrow MV, Beattie MS, Malenka RC (2002) Control of synaptic strength by glial TNF $\alpha$ . *Science* 295 (5563), 2282-2285.
53. Gary DS, Bruce-Keller AJ, Kindy MS, Mattson MP (1998) Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor. *J Cereb Blood Flow Metab* 18 (12), 1283-1287.

54. Choi JI, Svensson CI, Koehn FJ, Bhuskute A, Sorkin LS (2010) Peripheral inflammation induces tumor necrosis factor dependent AMPA receptor trafficking and Akt phosphorylation in spinal cord in addition to pain behavior. *Pain* 149 (2), 243-253.
55. Wigerblad G, Huie JR, Yin HZ, Leinders M, Pritchard RA, Koehn FJ, Xiao WH, Bennett GJ, Huganir RL, Ferguson AR, Weiss JH, Svensson CI, Sorkin LS (2017) Inflammation-induced GluA1 trafficking and membrane insertion of Ca(2+) permeable AMPA receptors in dorsal horn neurons is dependent on spinal tumor necrosis factor, PI3 kinase and protein kinase A. *Exp Neurol* 293, 144-158.
56. Wheeler D, Knapp E, Bandaru VVR, Wang Y, Knorr D, Poirier C, Mattson MP, Geiger JD, Haughey NJ (2009) Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced neutral sphingomyelinase-2 modulates synaptic plasticity by controlling the membrane insertion of NMDA receptors. *J Neurochem* 109 (5), 1237-1249.
57. Zhang L, Berta T, Xu ZZ, Liu T, Park JY, Ji RR (2011) TNF- $\alpha$  contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: Distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2. *Pain* 152 (2), 419-427.
58. Zhou T, Huang Z, Sun X, Zhu X, Zhou L, Li M, Cheng B, Liu X, He C (2017) Microglia polarization with M1/M2 phenotype changes in rd1 mouse model of retinal degeneration. *Front Neuroanat* 11, 77.
59. Dai WJ, Sun JL, Li C, Mao W, Huang YK, Zhao ZQ, Zhang YQ, Lu N (2019) Involvement of interleukin-10 in analgesia of electroacupuncture on incision pain. *Evid Based Complement Alternat Med* 2019, 8413576.

60. Mao XF, Wu HY, Tang XQ, Ali U, Liu H, Wang YX (2019) Activation of GPR40 produces mechanical antiallodynia via the spinal glial interleukin-10/ $\beta$ -endorphin pathway. *J Neuroinflammation* 16 (1), 84.
61. Karki P, Kurihara T, Nakamachi T, Watanabe J, Asada T, Oyoshi T, Shioda S, Yoshimura M, Arita K, Miyata A (2015) Attenuation of inflammatory and neuropathic pain behaviors in mice through activation of free fatty acid receptor GPR40. *Mol Pain* 11, 6.



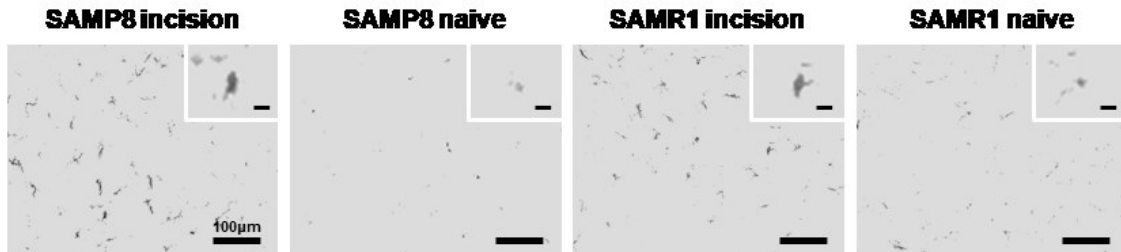


第 1 図 口蓋粘膜切開後の切開部への機械刺激に対する頭部引っ込め反射閾値の変化

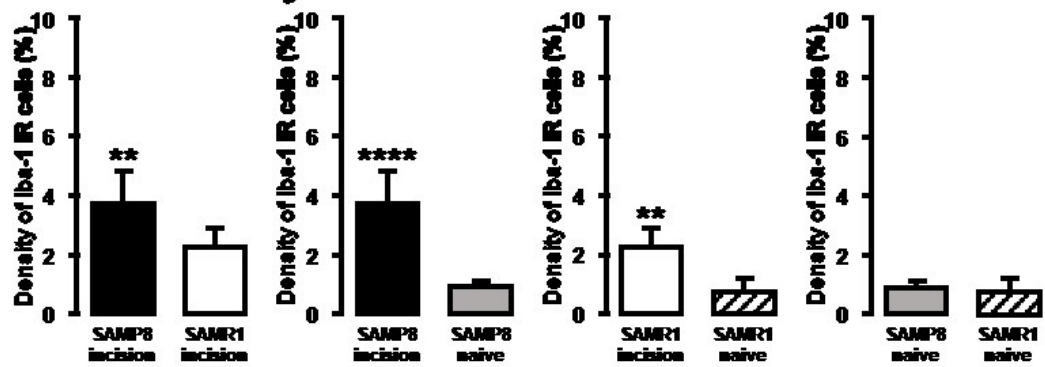
n = 6 for SAMP8 incision, SAMR1 incision, and SAMR1 naive, and n = 4 for SAMP8 naive

\*\*  $P < 0.01$ , SAMP8 incision vs. SAMP8 naive. †  $P < 0.05$ , ††  $P < 0.01$ , SAMR1 incision vs. SAMR1 naive. #  $P < 0.01$ , SAMP8 incision vs. SAMR1 incision.

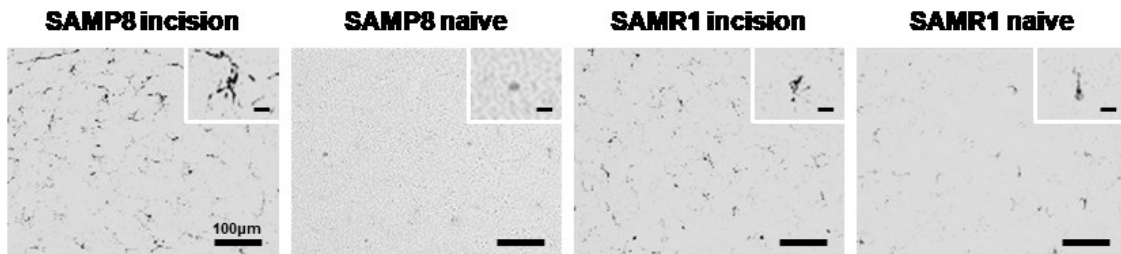
### a. day 3



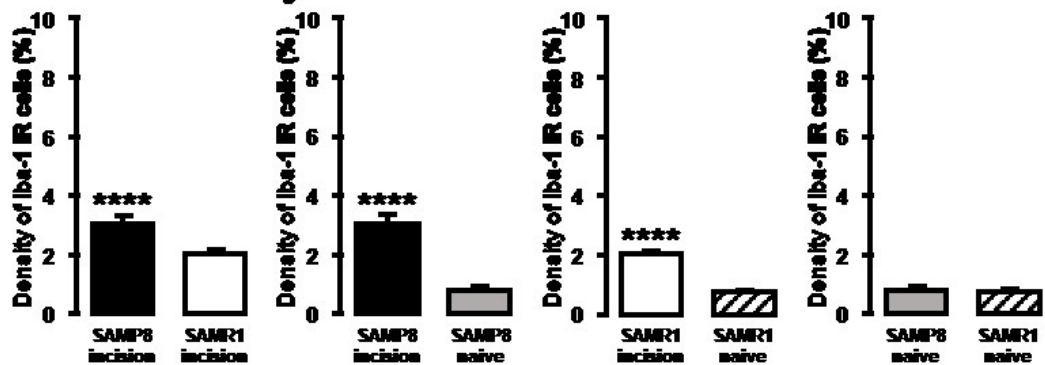
### b. Iba-1 IR cells day 3



### c. day 11



### d. Iba-1 IR cells day 11

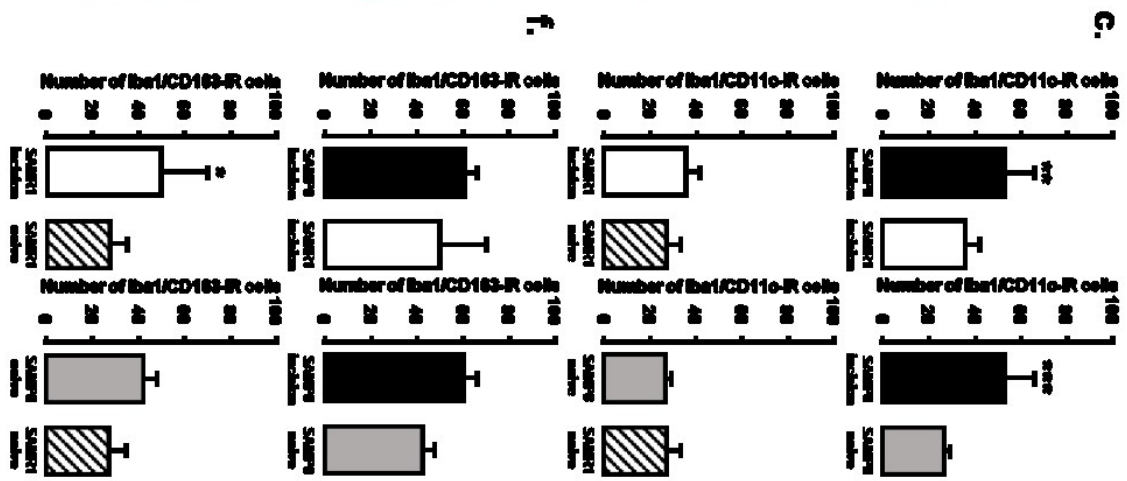
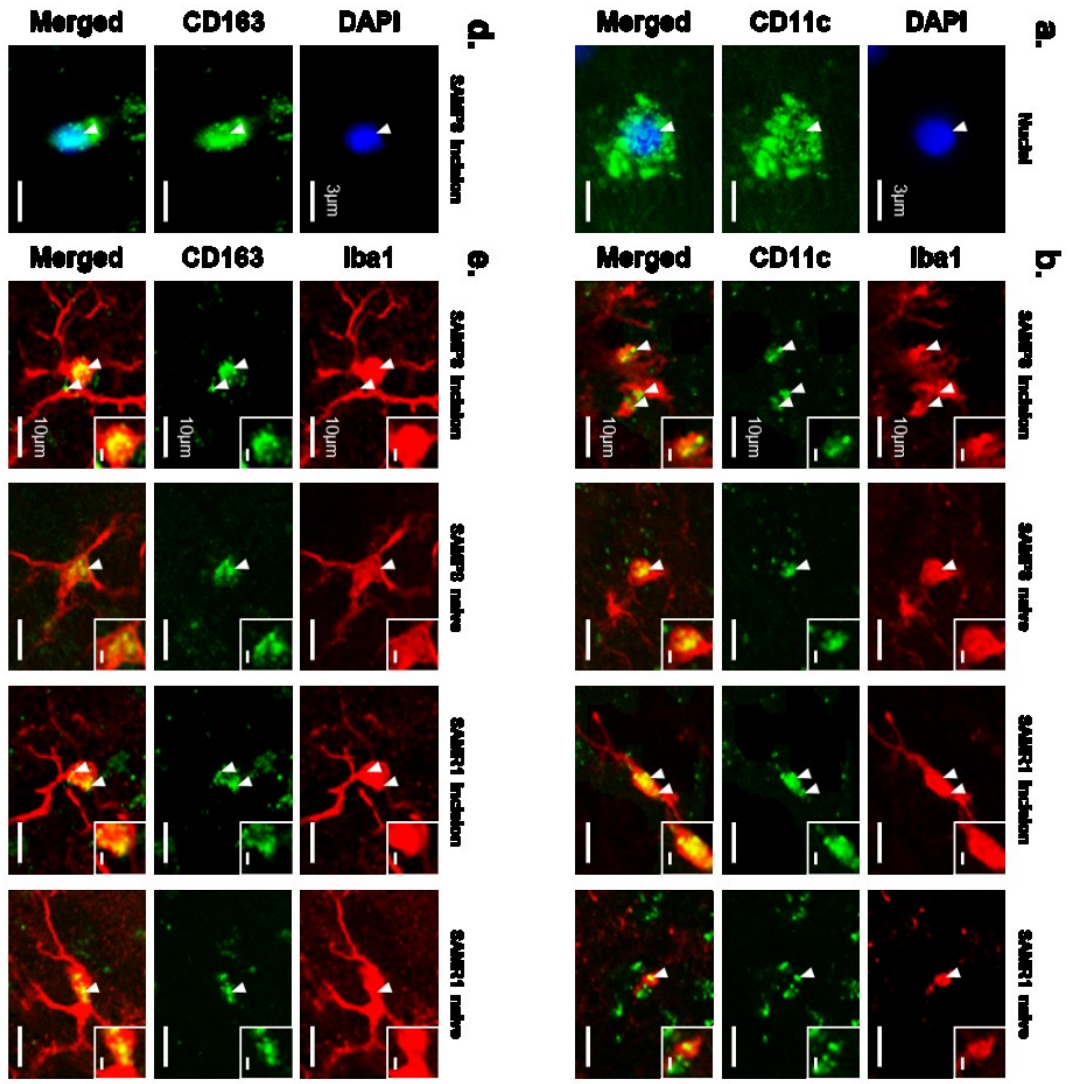


第2図 口蓋粘膜切開後の Vc および C1/C2 領域におけるミクログリアの活性化

切開後 3 日目, n = 6 for SAMP8 incision, SAMR1 incision, SAMP8 naive, and SAMR1 naive ; 切開後 11 日目, n = 5 for SAMP8 incision, SAMR1 incision, SAMR1 naive, and n = 4 for SAMP8 naive

スケールバー : 100  $\mu\text{m}$ . 挿入図のスケールバー : 15  $\mu\text{m}$ .

\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .



第3図 口蓋粘膜切開後3日目のM1およびM2

a : DAPI 陽性細胞 (青), CD11c 陽性細胞 (緑)

b : Iba1 陽性細胞 (赤), CD11c 陽性細胞 (緑), 矢頭 : Iba1/CD11c 共陽性細胞

c : Iba1/CD11c 共陽性細胞数

n = 6 for SAMP8 incision, SAMR1 incision, SAMP8 naive, and SAMR1 naive

\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

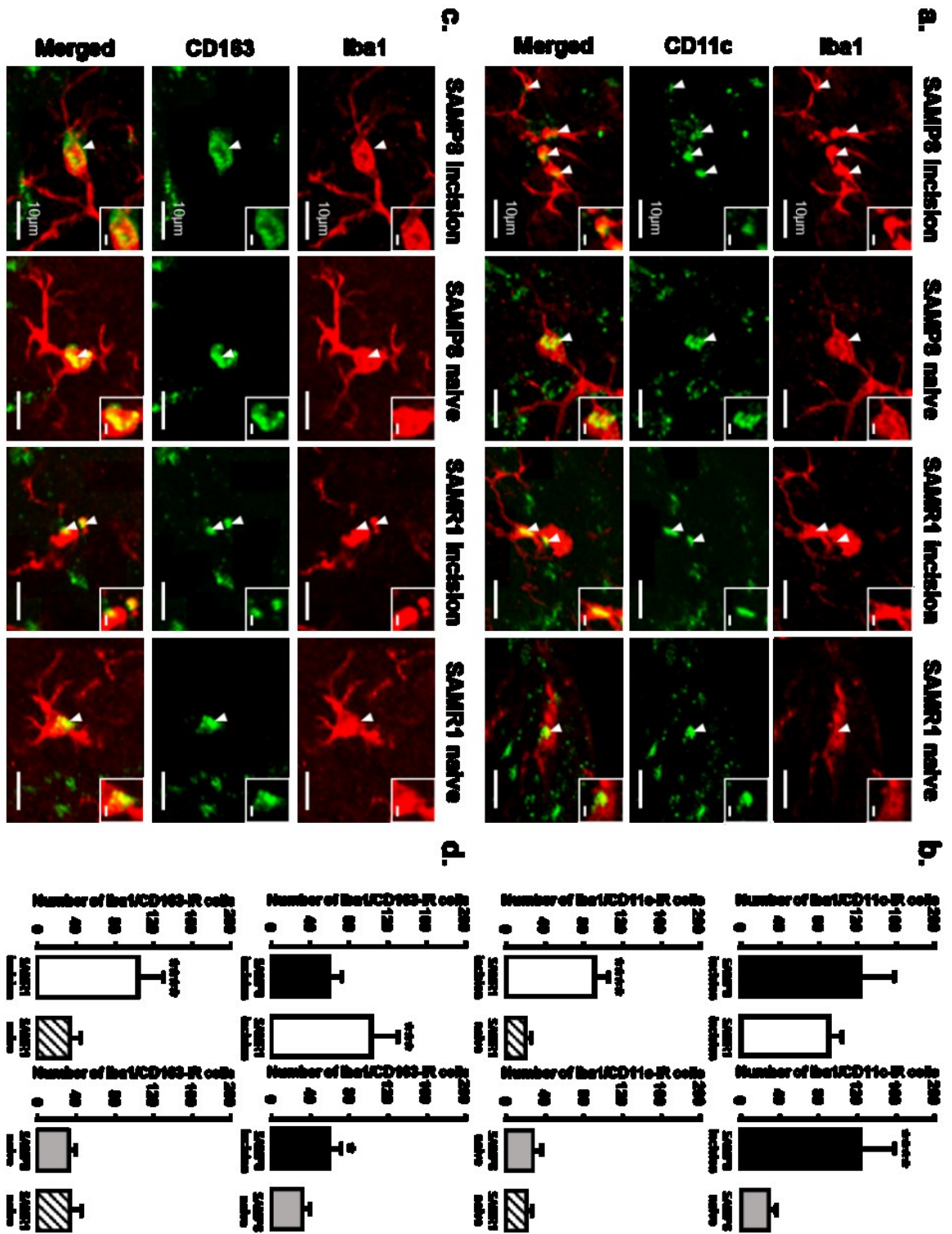
d : DAPI 陽性細胞 (青), CD163 陽性細胞 (緑)

e : Iba1 陽性細胞 (赤), CD163 陽性細胞 (緑), 矢頭 : Iba1/CD163 共陽性細胞

f : Iba1/CD163 共陽性細胞数

n = 6 for SAMP8 incision, SAMR1 incision, SAMP8 naive, and SAMR1 naive

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .



第4図 口蓋粘膜切開後11日目のM1およびM2

a : Iba1 陽性細胞 (赤), CD11c 陽性細胞 (緑), 矢頭 : Iba1/CD11c 共陽性細胞

b : Iba1/CD11c 共陽性細胞数

n = 6 for SAMP8 incision, SAMR1 incision, SAMP8 naive, and SAMR1 naive

\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

c : Iba1 陽性細胞 (赤), CD163 陽性細胞 (緑), 矢頭 : Iba1/CD163 共陽性細胞

d : Iba1/CD163 共陽性細胞数

n = 6 for SAMP8 incision, SAMR1 incision, SAMP8 naive, and SAMR1 naive

\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .







第 5 図 口蓋粘膜切開後 3 日目および 11 日目の TNF- $\alpha$  陽性 M1

a : 口蓋粘膜切開後 3 日目の Vc および C1/C2 領域における TNF- $\alpha$  陽性細胞 (赤), CD11c 陽性細胞 (緑), 矢頭 : TNF- $\alpha$ /CD11c 共陽性細胞

b : TNF- $\alpha$ /CD11c 共陽性細胞数

n = 5 for SAMP8 incision, SAMR1 incision, and SAMR1 naive, n = 4 for SAMP8

naive

\*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

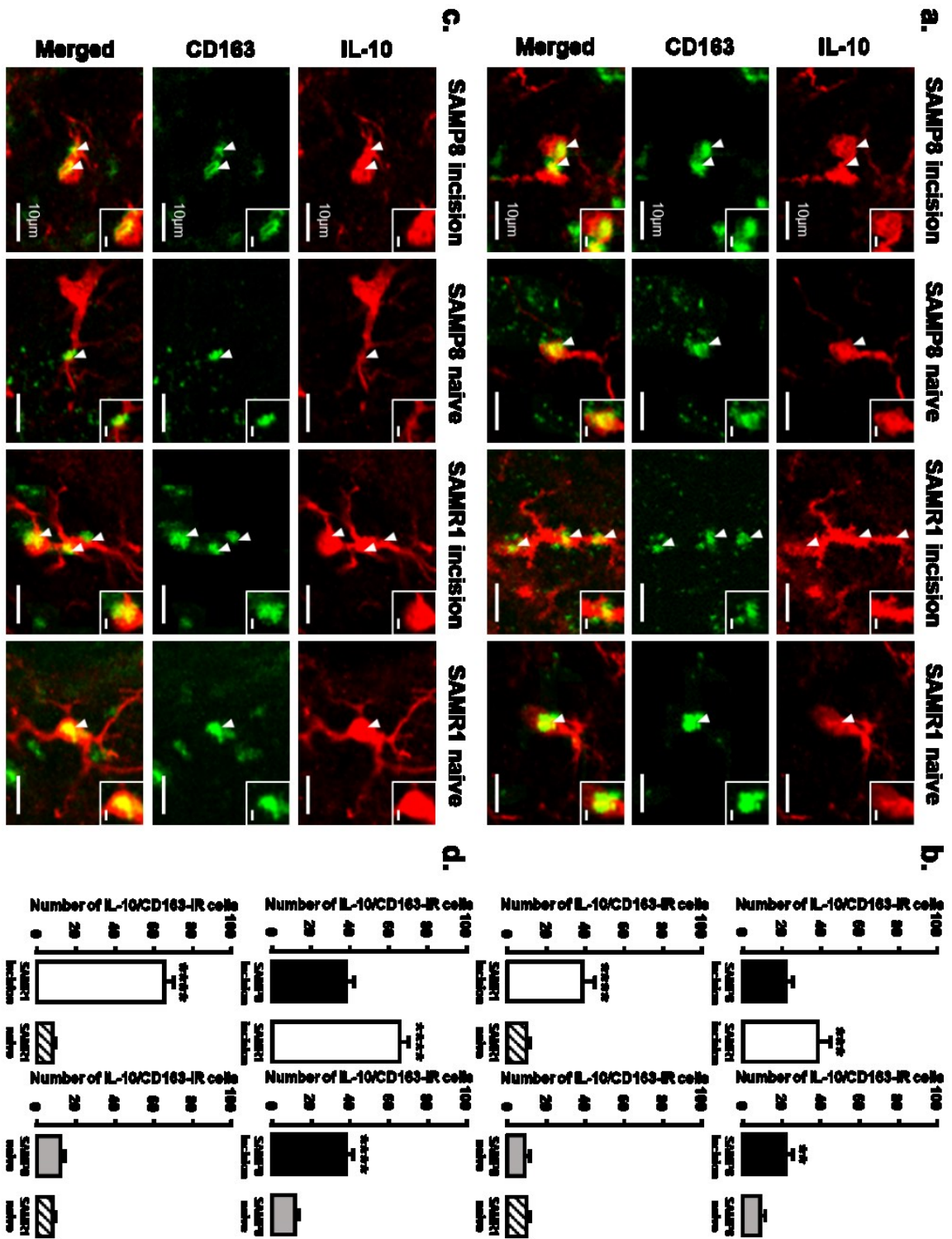
c : 口蓋粘膜切開後 11 日目の Vc および C1/C2 領域における TNF- $\alpha$  陽性細胞 (赤), CD163 陽性細胞 (緑), 矢頭 : TNF- $\alpha$ /CD163 共陽性細胞

d : TNF- $\alpha$ /CD163 共陽性細胞数

n = 5 for SAMP8 incision, SAMR1 incision, and SAMR1 naive, n = 4 for SAMP8

naive

\*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .



第6図 蓋粘膜切開後3日目および11日目のIL-10陽性M2

a : 口蓋粘膜切開後3日目のVcおよびC1/C2領域におけるIL-10陽性細胞(赤),  
CD11c陽性細胞(緑), 矢頭: IL-10/CD11c共陽性細胞

b : IL-10/CD11c共陽性細胞数

n = 4 for SAMP8 incision, SAMR1 incision, SAMP8 naive, and SAMR1 naive

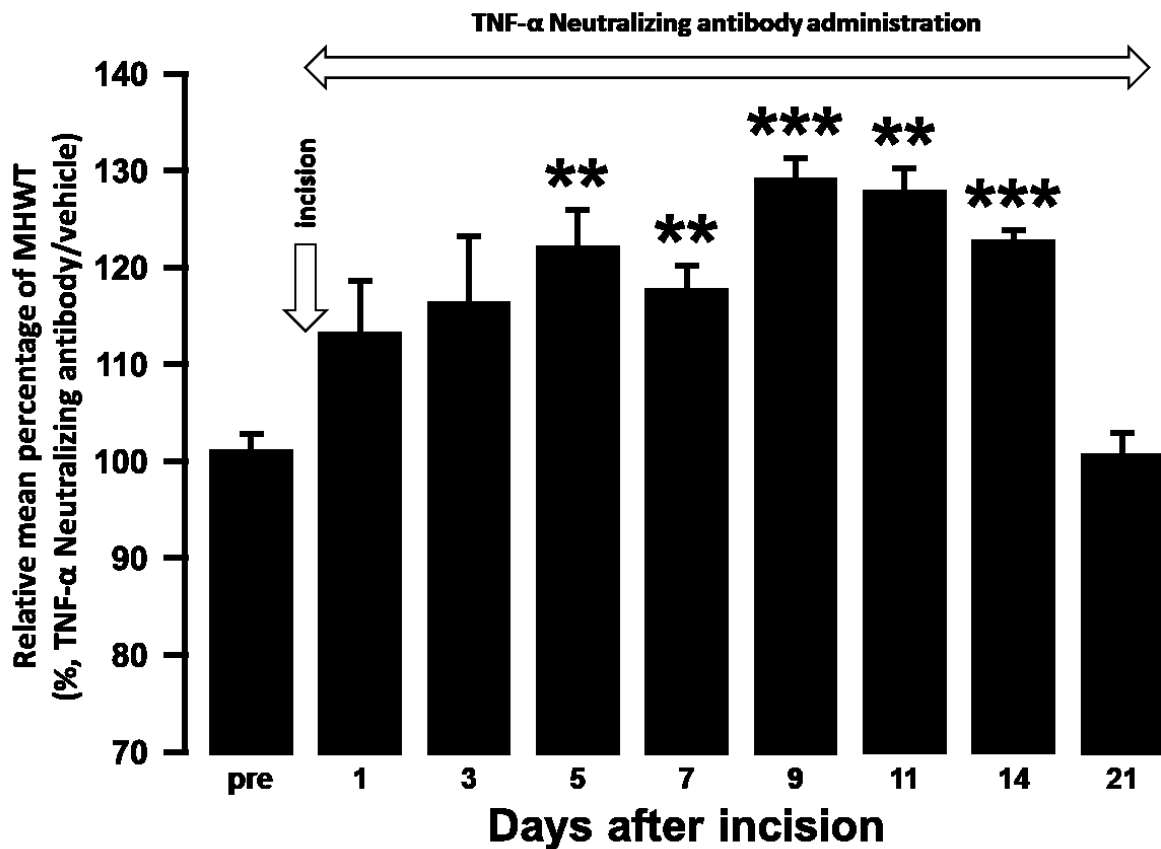
\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

c : 口蓋粘膜切開後11日目のVcおよびC1/C2領域におけるIL-10陽性細胞  
(赤), CD163陽性細胞(緑), 矢頭: IL-10/CD163共陽性細胞

d : IL-10/CD163共陽性細胞数

n = 4 for SAMP8 incision, SAMR1 incision, SAMP8 naive, and SAMR1 naive

\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

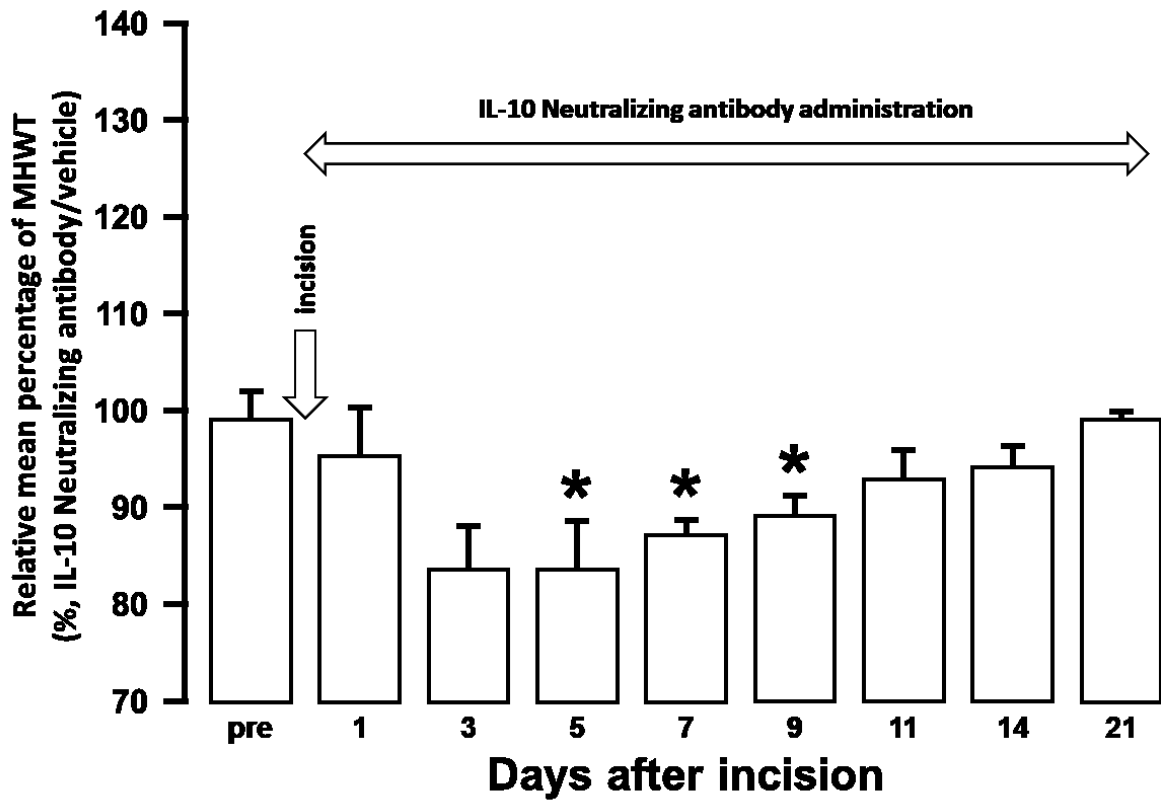


第7図 SAMP8 incision 群の口蓋粘膜切開後の TNF- $\alpha$  中和抗体大槽内継続投与による MHWT 変化

MHWT は、以下の式を用いて算出した (100 × MHWT in SAMP8 incision treated with TNF- $\alpha$  neutralizing antibody/MHWT in SAMP8 incision treated with vehicle)

n = 5 for SAMP8 incision treated with TNF- $\alpha$  neutralizing antibody, SAMP8 incision treated with vehicle

\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

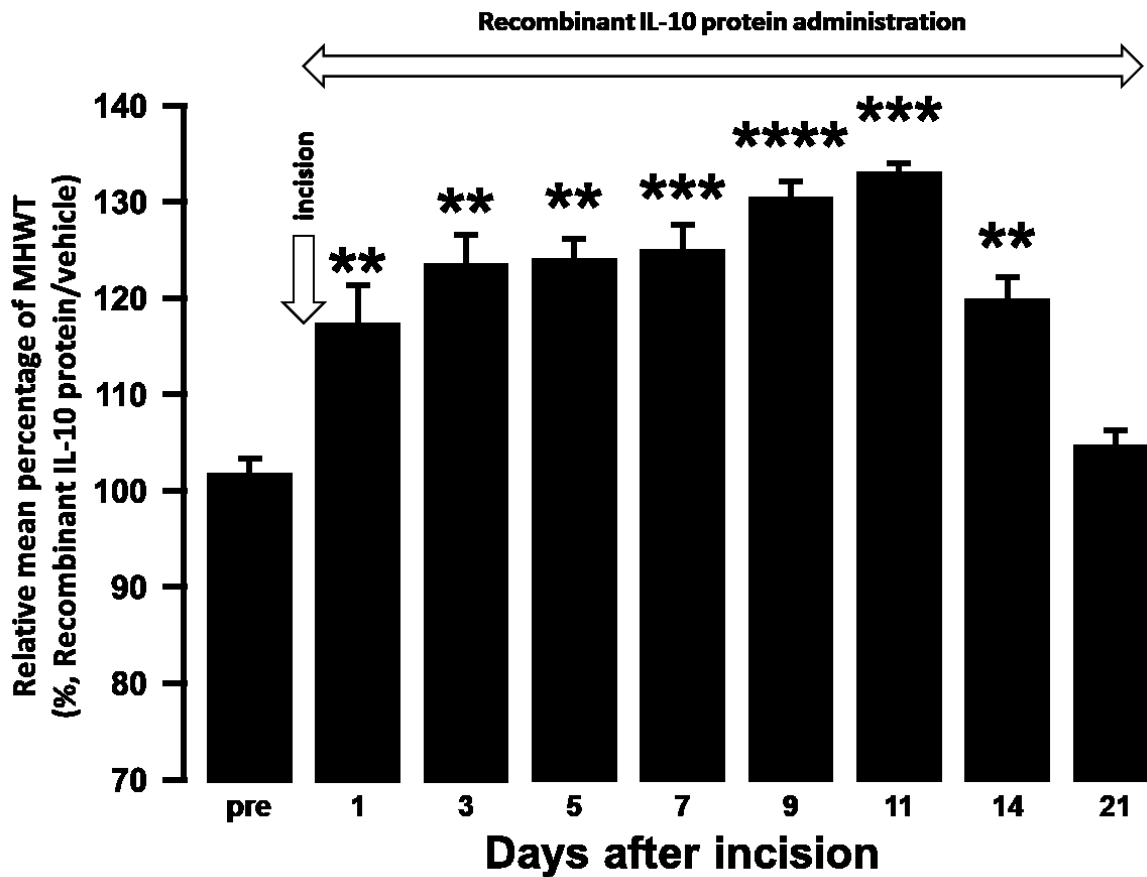


第 8 図 SAMR1 incision 群の口蓋粘膜切開後の IL-10 中和抗体大槽内継続投与による MHWT 変化

MHWT は、以下の式を用いて算出した (100 × MHWT in SAMR1 incision treated with IL-10 neutralizing antibody/MHWT in SAMR1 incision treated with vehicle)

n = 5 for SAMR1 incision treated with IL-10 neutralizing antibody, SAMR1 incision treated with vehicle

\*  $P < 0.05$ .

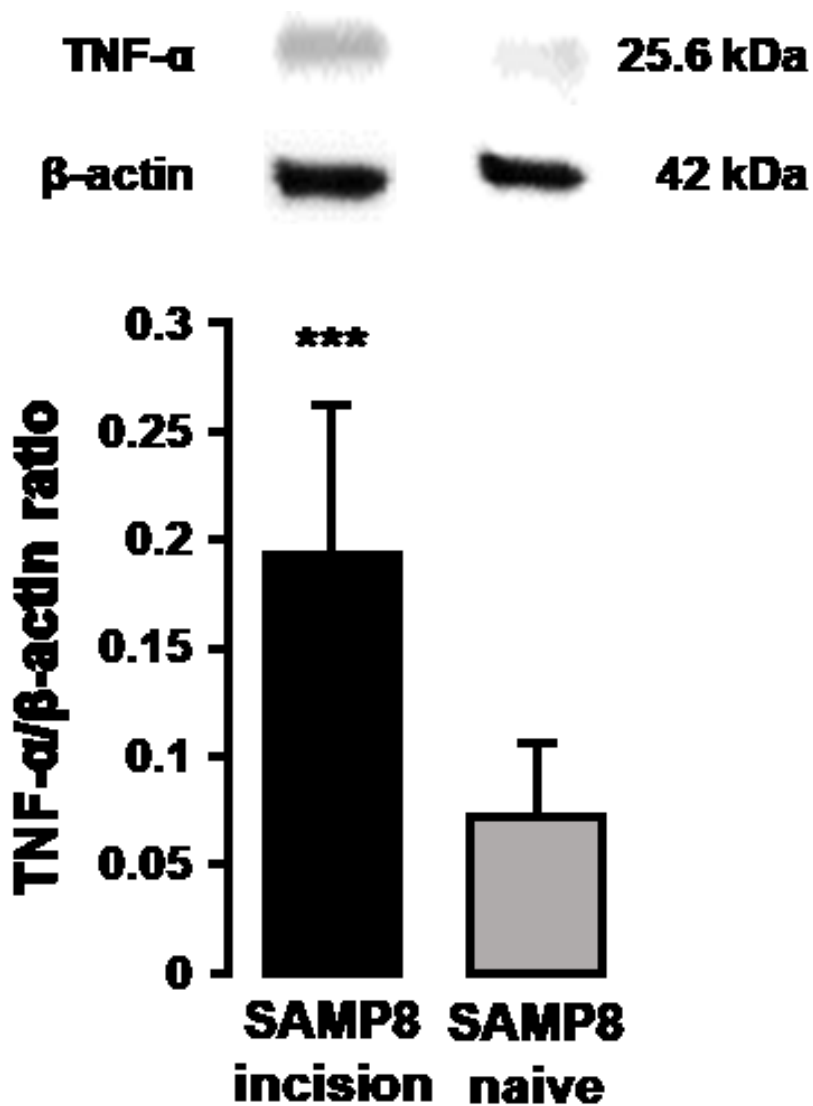


第9図 SAMP8 incision 群の口蓋粘膜切開後のリコンビナント IL-10 大槽内継続投与による MHWT の変化

MHWT は、以下の式を用いて算出した (100 × MHWT in SAMP8 incision treated with Recombinant IL-10 protein/MHWT in SAMP8 incision treated with vehicle)

n = 5 for SAMP8 incision treated with Recombinant IL-10 protein, SAMP8 incision treated with vehicle

\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .



第 10 図 口蓋粘膜切開後 3 日目の Vc および C1/C2 領域における TNF- $\alpha$  量の変化

n = 8 for SAMP8 incision, SAMP8 naive

\*\*\*  $P < 0.001$ .