

論文の内容の要旨

氏名：松 井 智 行

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Involvement of medullary microglial activation in facial skin incision-induced mechanical allodynia following neonatal facial injury

（新生児期顔面部損傷後における顔面皮膚切開誘発機械アロディニアに対する延髄ミクログリア活性化の関与）

新生児期の組織損傷により、侵害情報伝達機構が変調することが知られている。例えば、新生仔ラットに末梢炎症が生じると、成熟期において侵害受容ニューロンの興奮性が増強し熱痛覚過敏が発症する。最近、新生仔ラットの顔面皮膚切開（facial skin incision in neonate: NFI）により、成熟期における同部切開（facial skin incision in adulthood: AFI）によって誘発される機械アロディニアが増悪することが報告された。この原因の一つとして、三叉神経節内サテライト細胞の活性化を介した三叉神経節ニューロン興奮性の増強が示唆されている。このように、新生児期の組織損傷による末梢神経系の機能変化については報告されているが、中枢神経系の機能変化については不明な点が多い。そこで、本研究では、新生児期の口腔顔面領域組織損傷に起因した中枢神経系での成熟期の口腔顔面痛増強メカニズムを解明することを目的とした。口腔顔面領域で受容された侵害情報は、三叉神経を介して三叉神経脊髄路核中間亜核および尾側亜核（Vi/Vc）に伝達されることから、本研究では Vi/Vc におけるグリア細胞の一つであるミクログリアに着目し、AFI 後に発症する機械アロディニアと Vi/Vc におけるミクログリアの活性化に対する NFI の影響を解析した。

本実験には、雄性 Sprague-Dawley ラット（新生仔ラット：生後 4 日目（PD4）、6-8 g；成熟ラット：7 週齢（PW7）、200-310 g）を合計 71 匹使用した。深麻酔下での、PD4 における左側口髭部の上唇と平行な切開（長さ 2.5 mm、深さ 0.5 mm）および縫合を NFI とし、PW7 における同部位の切開（長さ 10 mm、深さ 1 mm）および縫合を AFI とした。それぞれ切開を加えず縫合のみの処置を Sham とした。覚醒下にて、フォンフライ毛（4, 8, 15, 26, 30, 40, 50, 60, 100 g）を用いて切開部の 2 ミリ上方部に機械刺激を与え、5 回中 3 回以上頭部引っ込め行動を認めた最小機械刺激強度を機械逃避閾値（mechanical head withdrawal threshold: MHWT）とした。生後 6 週目より機械逃避閾値測定に馴化させて MHWT が安定した後、PW7 から隔日で 12 日間 MHWT を測定した。次に、口髭部を支配する二次ニューロンが存在する Vi/Vc の II 枝領域におけるミクログリアの活性化とサイトカインの一つである IL-1 β の発現を、活性化ミクログリアの指標となる Iba1 および IL-1 β の抗体を使用して免疫組織化学的手法を用いて解析した。さらに、AFI 前日から 5 日後まで 7 日間、イソフルレン吸入麻酔下にてミクログリアの活性化阻害薬であるミノサイクリン（30 mg/kg）または vehicle（生理食塩水）を、1 日 1 回腹腔内投与し、10 日目において MHWT および Vi/Vc における Iba1 陽性細胞数を測定した。統計学的解析は、Shapiro-Wilk の正規性検定の後、等分散性を Brown-Forsythe test を用いて評価した。正規性および等分散性が得られなかったため、ノンパラメトリック検定を行った。Kruskal-Wallis test 後に Dunn's multiple comparisons test または Mann-Whitney test を用いた。P < 0.05 をもって有意とした。

Sham in PD4 + AFI 群における MHWT は、Sham in PD4 + Sham in PW7 群と比較して AFI 後 2 日目から 4 日目まで有意に低下したことから、AFI による機械アロディニアの発症が認められた。この機械アロディニアは、NFI + AFI 群では 12 日目まで延長した。一方で、NFI のみでは、MHWT の低下は認められなかった。よって、NFI のみでは成熟期に機械アロディニアを発症させないが、NFI は AFI 後の機械アロディニアの発症期間を延長することが示された。次に、NFI + AFI 群で機械アロディニアが延長していた AFI 後 10 日目において Vi/Vc の II 枝領域における Iba1 陽性細胞数を測定した。その結果、AFI 単独で、活性化 Iba1 陽性細胞数の増加傾向が認められ、これは NFI によってさらに増加した。このことから、NFI は AFI 後のミクログリアの活性化を増強することが示された。また、活性化ミクログリアから放出され、二次侵害受容ニューロンの興奮性を増強させることが知られている Vi/Vc の II 枝領域における IL-1 β の発現を解析したところ、AFI 単独と比較して、NFI 後の AFI によって IL-1 β 発現が増加した。最後に、ミクログリアの活性化増強が機械アロディニアの発症期間延長に関与して

いるかを調べるために、AFI 後 10 日目においてミクログリアの活性化阻害薬であるミノサイクリン投与による活性化 Iba1 陽性細胞数と MHWT の変化を解析した。その結果、ミノサイクリン投与によって、NFI+AFI 群の活性化 Iba1 陽性細胞数の増加は vehicle 投与群と比較して有意に抑制された。また、MHWT の低下は AFI 前または Sham in PD4 + AFI 群 10 日目の MHWT と同程度まで回復した。

以上の結果から、NFI によって AFI 後の延髄ミクログリアの活性化期間が延長し、長期にわたる機械的アロディニアが引き起こされることが示唆された。したがって、活性化ミクログリアから放出された IL-1 β による Vi/Vc の侵害受容ニューロンの興奮性増強により、機械アロディニアが生じたと考えられる。また、今回使用した活性化ミクログリア阻害薬のミノサイクリンは、既に抗菌薬として臨床の場で使用されている薬物であることから、今後新生児期の外傷性ストレスに起因する口腔顔面痛に対して有効な鎮痛薬の一つとなるかもしれない。