

## 論文の内容の要旨

氏名：藤原 慎太郎

博士の専攻分野の名称：博士 (歯学)

論文題名：加齢による三叉神経節内マクロファージの変化が下歯槽神経損傷後に発症する異所性機械アロディニアに及ぼす影響

下歯槽神経 (IAN) 損傷後に発症する異所性疼痛に対し、三叉神経節 (TG) におけるマクロファージの関与が報告されている。マクロファージは炎症性マクロファージ (M1) あるいは抗炎症性マクロファージ (M2) へ極性変化することが知られており、この極性変化は加齢の影響を受けることが知られている。しかし、このマクロファージによる異所性疼痛発症機構に対する加齢の影響は不明である。本研究では、IAN 切除 (IANX) 後の TG におけるマクロファージの様相と極性変化に着目し、異所性機械アロディニアに及ぼす加齢の影響の解明を目的とした。

実験には老化促進マウス (SAMP8) とコントロールマウス (SAMR1) を用いた。IANX は、三種混合麻酔薬の腹腔内投与による深麻酔下にて、左側頬部の皮膚に切開を加え、咬筋を剥離し、下顎骨表面を露出させた。下顎骨の表面を歯科用切削バーで骨削し、IAN を露出させ 1mm 切除した後、咬筋と皮膚の切開部を 6-0 絹糸で縫合することで IANX 処置とした (SAMP8-IANX, SAMR1-IANX)。それぞれのマウスで、IAN を切除せずに同様に手術したマウスを sham 処置とした (SAMP8-sham, SAMR1-sham)。2% イソフルラン吸入による浅麻酔下にて、左側口髭部皮膚と下口唇に機械刺激を加え、IANX 後 21 日目まで隔日的に機械刺激に対する頭部引っ込み反射閾値 (MHWT) を測定した。口髭部皮膚を神経支配する TG ニューロンを標識するために、神経逆行性トレーサーである 4% Fluoro Gold (FG) を、左側口髭部皮膚に 5  $\mu$ L 注入した。IANX 後 5 日目に、深麻酔下にて、4% パラホルムアルデヒドによる灌流固定を行い、TG を摘出し、凍結切片を作製した。免疫組織化学的解析には、マクロファージマーカーである Iba1, M1 マクロファージのマーカーとして CD11c, M2 マクロファージのマーカーとして CD206 を用いた。また、M1 マクロファージから放出される炎症性ケモカインである C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2) の発現についても免疫組織化学的に解析した。さらに、マクロファージと口髭部異所性機械アロディニアとの関与を明らかにするために、IANX 処置を行った SAMP8 マウスに、マクロファージ枯渇材である liposomal clodronate Clophosome - A (LCCA) を TG 内に持続的に投与した後、口髭部皮膚および下口唇における機械刺激に対する MHWT を測定した。

その結果、SAMP8-IANX では SAMR1-IANX と比較して、IANX 後 1 日目から 5 日目まで MHWT の有意な低下を認めた。また、SAMP8-IANX では、SAMP8-sham と比較して、IANX 後 3 日目から 11 日目まで MHWT の有意な低下を認めた。IANX5 日目においては、SAMP8-IANX で SAMR1-IANX と比較して、MHWT 低下の有意な増強を認めた。左側下口唇では、SAMP8-IANX および SAMR1-IANX で、IANX 後 1 日目から 9 日目まで MHWT の有意な上昇が観察された。FG 標識 TG ニューロンが多く存在する領域の Iba1 陽性細胞 (Iba1<sup>+</sup>) 数は、SAMP8-IANX で、他のマウスと比較して有意に増加していた。次に、M1 および M2 マクロファージについて解析したところ、SAMP8-IANX および SAMR1-IANX において、M1 マクロファージである Iba1 陽性かつ CD11c 陽性細胞 (Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>) 数の有意な増加を認め、SAMP8 マウスでは SAMR1 マウスと比較して有意に多くの Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> を認めた。一方、M2 マクロファージである Iba1 陽性かつ CD206 陽性細胞 (Iba1<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>) 数は、SAMR1-IANX においては SAMR1-sham と比較して有意に増加したが、SAMP8-IANX においては SAMP8-sham と比較して変化は認められなかった。さらに、M1 マクロファージが産生する CCL2 について解析したところ、CD11c 陽性かつ CCL2 陽性細胞 (CD11c<sup>+</sup>/CCL2<sup>+</sup>) 数は、SAMP8-IANX において、他のマウスと比較して有意な増加が認められた。SAMP8-IANX に対する LCCA の投与について観察したところ、SAMP8 マウスでは IANX 後 3 日目から 5 日目において口髭部皮膚の MHWT の低下の有意な回復を認めたが、下口唇の MHWT は有意な変化を認めなかった。また IANX 後 5 日目において、TG 領域における Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> 数は、有意な減少を認めた。

以上の結果から、IANX 後の口髭部皮膚の異所性機械アロディニアは、加齢により増強し、TG 領域における M1 マクロファージの増加が関与することが明らかとなった。