

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

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

藤原 慎太郎

(指導：飯沼利光教授，篠田雅路教授，浦田健太郎専任講師)

## 目 次

	ページ
概要	1～2
緒言	3～4
材料および方法	5～9
結果	10～12
考察	13～16
結論	17
謝辞	18
文献	19～26
図	27～33

本論文は *in vivo* に掲載済みである，論文 “Fujiwara S, Urata K, Oto T, Hayashi Y, Hitomi S, Iwata K, Iinuma T, Shinoda M (2023) Age-related changes in trigeminal ganglion macrophages enhance orofacial ectopic pain after inferior alveolar nerve injury. *in vivo* 37,132-142” を基幹論文とし，新たに “IANX 後の CD11c<sup>+</sup>/CCL2<sup>+</sup> の変化” のデータ (図 4) を追加して総括したものである。

## 概 要

下歯槽神経 (IAN) 損傷後に、損傷部とは異なる顎顔面領域に疼痛が生じることが知られており、この異所性疼痛の発症機構には、三叉神経節 (TG) におけるマクロファージの関与が近年報告されている。また、マクロファージは炎症性あるいは抗炎症性へ極性変化を生じ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報告されている。しかし、加齢による TG 内マクロファージの変化が異所性疼痛の発症機構に及ぼす影響については、不明である。そこで、本研究では、TG のマクロファージの様相および極性変化における加齢変化が、IAN 切除 (IANX) 後の異所性機械アロディニアに及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

本研究では、老化促進マウス (SAMP8) およびコントロールマウス (SAMR1) を使用し、IANX 処置を施した SAMP8 マウス (SAMP8-IANX) と IANX 処置を施した SAMR1 マウス (SAMR1-IANX) を作製し、各実験に使用した。まず IANX 後の異所性疼痛の発症を確認するために、浅麻酔下にて、IANX 後 21 日間、隔日的に左側口髭部皮膚への機械刺激に対する頭部引っ込め反射閾値 (MHWT) を測定した。次に、口髭部皮膚を支配する TG における、マクロファージのマーカーである Iba1 陽性細胞 (Iba1<sup>+</sup>)、Iba1 陽性かつ炎症性 M1 マクロファージのマーカーである CD11c 陽性細胞 (Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>)、Iba1 陽性かつ抗炎症性 M2 マクロファージのマーカーである CD206 陽性細胞 (Iba1<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>) および CD11c 陽性かつ CCL2 陽性細胞 (CD11c<sup>+</sup>/CCL2<sup>+</sup>) を免疫組織化学的に解析した。さらに、加齢による TG 内マクロファージの変化と IANX 後の口髭部異所性疼痛との関連を明らかにするために SAMP8-IANX に

マクロファージ枯渇剤である liposomal clodronate Clophosome-A (LCCA) を TG 内に持続投与した後、口髭部皮膚の MHWT を測定した。その結果、IANX 処置後 5 日目において、SAMP8-IANX は SAMR1-IANX と比較して MHWT の有意な低下を認めた。 $Iba1^+$ 、 $Iba1^+/CD11c^+$  および  $CD11c^+/CCL2^+$  は、IANX 処置後 5 日目に、SAMR1-IANX と比較して SAMP8-IANX で有意に多かった。また LCCA 投与により、LCCA のコントロール溶液 (control-LCCA) 投与群と比較して、SAMP8-IANX の MHWT の低下が有意に回復した。

以上の結果より、IANX 後に口髭部皮膚で生じる異所性機械アロディニアは、加齢により増強し、その増強は TG における炎症性マクロファージの増加が関与していることが明らかとなった。

## 緒 言

歯科臨床の場において、インプラントの誤埋入、智歯の抜歯時の事故あるいはその他の侵襲的歯科治療により、しばしば三叉神経の第三枝である下歯槽神経（IAN）の損傷が生じる<sup>1,2)</sup>。最近の研究では、IAN 損傷は下口唇の感覚異常だけでなく、IAN 支配領域から離れた口腔顔面領域に異常な痛みを引き起こす、いわゆる異所性疼痛を発症することが報告されている<sup>3,4)</sup>。末梢神経の損傷や炎症により一次ニューロンの過興奮が生じると、一次ニューロンだけでなく感覚神経節内のマクロファージなどの非神経細胞からもシグナル分子が放出されることが知られている<sup>5,6)</sup>。また、末梢神経の損傷は、損傷した神経に隣接する非損傷神経にも可塑的な変化を引き起こすことが知られているが<sup>7)</sup>、この変化には、ニューロン間の情報伝達だけでなく、ニューロン-グリア間、ニューロン-マクロファージ間の情報伝達も関与している<sup>8,9,10)</sup>。顎顔面領域の異所性疼痛は、三叉神経節（TG）ニューロンの興奮性の亢進によって引き起こされ、このニューロンの興奮性亢進は、P2Y<sub>12</sub> 受容体シグナルを介したサテライトグリアの活性化、あるいは TG 内で増殖および活性化したマクロファージから放出される tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) のシグナル増強によって引き起こされることが報告されている<sup>11,12)</sup>。神経損傷や炎症によって集積したマクロファージは、集積部位の微小環境に対応した機能的に相反する 2 つの極性に分化する<sup>13)</sup>。炎症性マクロファージ（M1）は、TNF- $\alpha$ 、interleukin-6 (IL-6)、C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2) などの炎症性のケミカルメディエーターを分泌することで、局所の炎症反応の促進に関与し<sup>14,15,16,17)</sup>、一方、抗炎症性マクロファージ（M2）は、IL-4、transforming growth factor-

$\beta$  (TGF- $\beta$ ), CCL4 などの抗炎症性のケミカルメディエーターを分泌することで、抗炎症反応や組織修復の促進に関与する<sup>18, 19, 20, 21)</sup>。この2つの表現型への極性変化は、疼痛感受性の増大または減弱に関与することが報告されているため、顎顔面領域の異所性疼痛の病態変化にも関与している可能性が十分に考えられる<sup>22, 23)</sup>。

神経障害性疼痛は、高齢者において増悪することが報告されており<sup>24, 25)</sup>、後根神経節におけるマクロファージの発現は加齢により変化する。そして高齢者では、坐骨神経損傷後に発症する神経障害性疼痛が増強することが報告されている<sup>26)</sup>。さらに、三叉神経脊髄路核尾側亜核において、加齢に伴うミクログリアの増加が、口腔粘膜の損傷によって起こる機械アロディニアを増強することが報告されている<sup>27)</sup>。このように、侵害受容のシグナル伝達経路における免疫細胞の変化は、加齢によって増悪する疼痛と関連している。しかし、高齢者の IAN 損傷後に生じる顎顔面領域の異所性疼痛の増強に対する TG 中の免疫細胞の役割は、不明な点が多い。近年の加齢の影響に関する研究では、senescence-accelerated mice prone-8 (SAMP8) および SAM resistant 1 (SAMR1) マウスを用いた、多くの検討がなされている<sup>28, 29, 30, 31, 32)</sup>。SAMP8 マウスは学習・記憶障害を伴う老化が急速に進行し、SAMR1 マウスは正常老化する対照系統のマウスである<sup>29, 33, 34)</sup>。本研究では、SAMP8 および SAMR1 マウスを用いて、IANX 後の TG 領域におけるマクロファージの様相および極性変化と、顎顔面領域の異所性機械アロディニアに対する加齢の影響について検討することを目的とした。

# 材料および方法

## 1. 実験動物

本研究では、老化促進マウスである SAMP8 雄性マウス (n=98, 体重 20-30 g, 23 週齢, Hamamatsu, Japan, SLC) および正常老化マウスである SAMR1 雄性マウス (n=56, 体重 20-30 g, 23 週齢, Japan, SLC) を使用した。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 (AP19DEN012) を受け、国際疼痛学会のガイドラインに従い実施した<sup>35)</sup>。

## 2. 下歯槽神経切除 (IANX) モデル

三種混合麻酔薬 (5.0 mg/kg 酒石酸ブトルファノール, 4.0 mg/kg ミダゾラム, 0.75 mg/kg 塩酸メドミジン) の腹腔内投与による深麻酔下にて、SAMP8 マウスあるいは SAMR1 マウスの左側頬部の皮膚に切開を加え、咬筋を剥離した後、下顎骨表面を露出させた。続いて、下顎骨表面を低速の歯科用切削バーで骨削し、IAN を露出させて 1 mm 切除した後に、露出した IAN を下顎管内に復位し、咬筋と皮膚の切開部を 6-0 の絹糸で縫合することで IANX 処置とした。対照として、IAN を切除せずに、皮膚切開と咬筋剥離および下顎骨骨削を行う手術を行い、切開した筋と皮膚切開を 6-0 の絹糸で縫合した (sham 処置)<sup>36)</sup>。なお、SAMP8 に IANX 処置を施したマウスを SAMP8-IANX, SAMP8 に sham 処置を施したマウスを SAMP8-sham, SAMR1 に IANX 処置を施したマウスを SAMR1-IANX, SAMR1 に sham 処置を施したマウスを SAMR1-sham

とした。

### 3. 機械刺激に対する頭部引っ込み反射閾値 (MHWT) の測定

2%イソフルラン (Mylan, Canonsburg, PA, USA) 吸入による浅麻酔下にて, SAMP8 マウスあるいは SAMR1 マウスの頭部をシリコンゴムで固定した状態で, 左側口髭部皮膚にデジタルフォンフライ (Bioseb, Chaville, France) あるいは左側下口唇にフラットチップフォーセップス (Panlab s.I, Barcelona, Spain) を用いた機械刺激を加えた。マウスが頭部引っ込み反射を誘発した際の最低強度値を MHWT とした。デジタルフォンフライによる機械刺激は 1 秒間に 10 g の割合で増加させ, 上限値を 100 g とし, フラットチップフォーセップスによる機械刺激は 1 秒間に 10 g の割合で増加させ, 上限値を 80 g とした。各刺激による測定は 3 分間隔で 3 回行い, その平均値を各マウスの MHWT とした。

### 4. TG へのマクロフェージ枯渇剤持続投与の MHWT への影響

三種混合麻酔薬の腹腔内投与による深麻酔下にて, SAMP8 マウスの頭蓋骨を露出させ, 左側 TG 直上部 (小泉門から 2.8 mm 前方, 矢状縫合の 1.2 mm 外側) を骨削し, 直径 1 mm の小孔を開けた。次に, ガイドカニューレを小孔から頭蓋骨表面より 6 mm 下方まで挿入した後, 歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。設置したカニューレの先端が TG に達した位置であることを確認するために, 記録用電極をカニューレに挿入し, 左側口髭部皮膚への機械刺激による TG ニューロンの活動電位の誘発を確認した<sup>37)</sup>。カニューレ位置の固定後, 26 ゲージ針, ポリエチレンチューブ (直径 0.8 mm; Natsume,



Tokyo, Japan) および浸透圧ミニポンプ (0.11  $\mu$ l/h, Alzet model 1004 ; Durect Corporation, Cupertino, CA, USA) を接続し, カニューレから TG 内に挿入した。liposomal clodronate Clophosome-A (LCCA, 13.2  $\mu$ l; F70101-CA, FormuMax Scientific, Sunnyvale, CA, USA), Plain control liposomes for Clophosome-A (Control-LCCA, 13.2  $\mu$ l, F70101-A, FormuMax Scientific), または vehicle を IANX 手術前から IANX 後 5 日目まで TG に持続的に投与した。左側口髭部皮膚および下口唇における MHWT の測定を, 盲検条件下で IANX 前日から IANX 後 5 日目まで隔日的に実施した。

## 5. 免疫組織化学的解析

### 1) TG 凍結切片の作製

試料作製に際し, まず口髭部皮膚を支配する TG ニューロンを標識するために, 生理食塩水で希釈した神経逆行性トレーサーである 4% Fluoro Gold (FG ; Fluorochrome, Denver, CO, USA) 5  $\mu$ L を, 30 ゲージの注射針で左側口髭部皮膚に注入した。FG 投与 7 日後に, 三種混合麻酔薬の腹腔内投与による深麻酔下にて, 0.9% 生理食塩水 (50 ml) を用い脱血安楽死させた後, 4% paraformaldehyde 固定液 (PFA) による灌流固定を行った。

TG を摘出し, PFA に 4°C で 24 時間浸漬した後固定を行った後, 0.01 M phosphate buffer saline (PBS) で希釈した 20% スクロースに 6 時間浸漬した。TG を Tissue Tek (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) で凍結包埋後, 10  $\mu$ m の厚さで TG の長軸に対して水平断にスライスし, Superfrost Plus microscope slides (Matsunami, Tokyo, Japan) に貼り付け, 23°C で 12 時間乾燥させた。

## 2) Iba1<sup>+</sup> の発現解析

TG 切片は一次抗体として 0.3% Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Germany) および 4% 正常ヤギ血清 (NGS, Merck) を含むウサギ抗マウス Iba1 ポリクローナル抗体 (1:500, 019-19741; Wako fuji film, Osaka, Japan) を 4°C で 24 時間反応させた。次に、二次抗体として Alexa Fluor 568 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:200, ab175471; Abcam, Cambridge, UK) に 23°C で 2 時間反応させた後、PBS で洗浄し、切片を PermaFluor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を使用して封入した。FG 標識 TG ニューロンが多く存在する領域の Iba1<sup>+</sup> を、蛍光顕微鏡 (BZ9000 system; Keyence, Osaka, Japan) にて観察した後、ImageJ (NIH) にて Iba1<sup>+</sup> が占める割合を計測した。データは (Iba1<sup>+</sup> が占める面積) / (倍率 20 倍の視野面積) × 100 で表した。

## 3) Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>, Iba1<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> の発現解析

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 を使用し、Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> と、Iba1<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> について解析を行った。

TG 切片は一次抗体として、ウサギ抗マウス Iba1 ポリクローナル抗体 (1:500) とハムスター抗マウス CD11c モノクローナル抗体 (1:250, ab33483; Abcam), あるいはヤギ抗マウス Iba1 ポリクローナル抗体 (1:500, ab5076; Abcam), ウサギ抗マウス CD206 モノクローナル抗体 (1:200, ab64693; Abcam) を 4°C で 72 時間反応させた。次に、二次抗体として Alexa Fluor 568 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:200, ab175471; Abcam) と Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗アルメニアンハムスター IgG 抗体 (1:200, ab17003; Abcam), あるいは Alexa Fluor 488 標識ロバ抗ウサギ IgG (1:200, A-21206; Thermo Fisher Scientific) と Alexa Fluor 568 標識ロバ抗ヤギ IgG (1:200, A-11057; Thermo Fisher

scientific) に 23°C で 2 時間反応させた後、PBS で洗浄し、切片を PermaFluor (Thermo Fisher Scientific) を使用して封入した。FG 標識 TG ニューロンが多く存在する領域の Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> と、Iba1<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> は、Iba1<sup>+</sup> と同様の方法で解析した。

#### 4) CD11c<sup>+</sup>/CCL2<sup>+</sup> の発現解析

TG 切片は一次抗体として、ヤギ抗マウス Iba1 ポリクローナル抗体 (1:500, ab5076; Abcam), ウサギ抗マウス CCL2 ポリクローナル抗体 (1:200, ab25124; Abcam) を 4°C で 72 時間反応させた。次に Alexa Fluor 568 標識ロバ抗ヤギ IgG (1:200, A-11057; Thermo Fisher scientific) と Alexa Fluor 488 標識ロバ抗ウサギ IgG (1:200, A-21206; Thermo Fisher Scientific) に 23°C で 2 時間反応させた後、PBS で洗浄し、切片を PermaFluor (Thermo Fisher Scientific) を使用して封入した。FG 標識 TG ニューロンが多く存在する領域の CD11c<sup>+</sup>/CCL2<sup>+</sup> は、Iba1<sup>+</sup>, Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> および、Iba1<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> と同様の方法で解析した。

## 6. 統計学的解析

各データは平均値±標準偏差 (SD) で表した。免疫組織化学的解析では、有意差検定に、one-way analysis of variance (ANOVA) を用いて Sidak's multiple comparison test にて多重比較を行った。MHWT の計測では、two-way repeated-measured ANOVA を用い、Sidak's multiple comparison test にて多重比較を行った。 $p < 0.05$  を有意とした。

# 結 果

## 1. IANX 後の MHWT の経日的変化

左側口髭部皮膚と左側下口唇の MHWT を IANX 前 (pre) と IANX 後 21 日目まで隔日的に測定した (図 1A)。左側口髭部皮膚では, SAMR1-IANX は SAMR1-sham 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, SAMP8-IANX 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。また, IANX 後 5 日目において, SAMP8-IANX は SAMR1-IANX と比較して MHWT の低下の有意な増強を認めた (SAMP8-IANX :  $65.3 \pm 3.0$  g, SAMP8-sham :  $82.6 \pm 1.9$  g, SAMR1-IANX :  $73.4 \pm 5.3$  g, SAMR1-sham :  $83.5 \pm 3.4$  g) (図 1B)。

左側下口唇では, SAMR1-IANX および SAMP8-IANX 共に, IANX 後 1 日目から 9 日目まで MHWT の有意な上昇を認めた (IANX 後 5 日目 ; SAMP8-IANX :  $79.9 \pm 0.1$  g, SAMP8-sham :  $64.2 \pm 0.6$  g, SAMR1-IANX :  $79.3 \pm 0.9$  g, SAMR1-sham :  $67.0 \pm 6.0$  g) (図 1B)。

## 2. IANX 後の Iba1<sup>+</sup> の変化

IANX 後 5 日目において, FG 標識 TG ニューロンが多く存在する領域における Iba1<sup>+</sup> の解析の結果, SAMP8-IANX は SAMP8-sham, SAMR1-IANX および SAMR1-sham と比較して有意な増加を認めた (SAMP8-IANX :  $1.5 \pm 0.3$  %, SAMP8-sham :  $0.5 \pm 0.2$  %, SAMR1-IANX :  $0.8 \pm 0.2$  %, SAMR1-sham :  $0.4 \pm 0.2$  %) (図 2A, B)。

### 3. IANX 後の Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>, Iba1<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> の変化

IANX 後 5 日目において, FG 標識 TG ニューロンが多く存在する領域における Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> の解析の結果, SAMP8-IANX は SAMP8-sham, SAMR1-IANX および SAMR1-sham と比較して有意な増加を認めた (SAMP8-IANX :  $6.6 \times 10^{-4} \pm 1.2 \times 10^{-4} \%$ , SAMP8-sham :  $2.2 \times 10^{-4} \pm 7.3 \times 10^{-5} \%$ , SAMR1-IANX :  $3.7 \times 10^{-4} \pm 1.2 \times 10^{-4} \%$ , SAMR1-sham :  $1.6 \times 10^{-4} \pm 4.2 \times 10^{-5} \%$ ) (図 3A, B)。

FG 標識 TG ニューロンが多く存在する領域における Iba1<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> の解析の結果, SAMR1-IANX は SAMR1-sham と比較して有意な増加を認めたが, SAMP8-IANX は SAMP8-sham と比較して有意な変化を認めなかった (SAMP8-IANX :  $2.1 \times 10^{-4} \pm 5.1 \times 10^{-5} \%$ , SAMP8-sham :  $1.9 \times 10^{-4} \pm 4.0 \times 10^{-5} \%$ , SAMR1-IANX :  $2.1 \times 10^{-4} \pm 2.8 \times 10^{-5} \%$ , SAMR1-sham :  $1.6 \times 10^{-4} \pm 2.8 \times 10^{-5} \%$ ) (図 3C, D)。

### 4. IANX 後の CD11c<sup>+</sup>/CCL2<sup>+</sup> の変化

IANX 後 5 日目において, FG 標識 TG ニューロンが多く存在する領域における CD11c<sup>+</sup>/CCL2<sup>+</sup> の解析の結果, SAMP8-IANX は SAMP8-sham, SAMR1-IANX および SAMR1-sham と比較して有意な増加を認めた (SAMP8-IANX :  $4.1 \times 10^{-4} \pm 1.4 \times 10^{-4} \%$ , SAMP8-sham :  $1.3 \times 10^{-4} \pm 5.1 \times 10^{-5} \%$ , SAMR1-IANX :  $3.0 \times 10^{-4} \pm 4.8 \times 10^{-5} \%$ , SAMR1-sham :  $1.2 \times 10^{-4} \pm 4.8 \times 10^{-5} \%$ ) (図 4A, B)。

### 5. LCCA の TG 内持続投与による MHWT と Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> の変化

SAMP8-IANX に, LCCA, control-LCCA あるいは vehicle を TG 内持続投与し, 左側

口髭部皮膚と左側下口唇の MHWT を IANX 後 5 日目まで隔日的に測定した(図 5A)。

LCCA 投与により, control-LCCA 投与あるいは vehicle 投与と比較して, SAMP8-IANX は IANX 後 3 日目以降において MHWT の低下の有意な回復を認めた (図 5B)。また LCCA, control-LCCA または vehicle の TG 内持続投与は, 下口唇の MHWT の上昇には影響しなかった (図 5C)。

IANX 後 5 日目において, SAMP8-IANX の TG における Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> 数に対する LCCA 投与の影響について検討した。その結果, LCCA を投与した SAMP8-IANX における Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> は, control-LCCA 投与あるいは vehicle 投与と比較して有意に減少した (LCCA 投与 :  $1.9 \times 10^{-4} \pm 3.9 \times 10^{-5} \%$ , control-LCCA 投与 :  $6.5 \times 10^{-4} \pm 9.3 \times 10^{-5} \%$ , vehicle 投与 :  $6.2 \times 10^{-4} \pm 9.7 \times 10^{-5} \%$ ) (図 5D, E)。

## 考 察

IANX モデルで口髭部皮膚に観察される長期持続性の機械アロディニアは、IAN に外傷歴のある患者に観察される異所性疼痛に類似している<sup>36,38)</sup>。SAMP8 マウスは、老化の促進、寿命の短縮および神経細胞の形態変化を示す系統であり、一方、SAMR1 マウスは正常老化を示し、SAMP8 マウスの対照系統である<sup>29,30,31,32,33,34)</sup>。また SAMP8 マウスは加齢に伴い、ヒトの脳で見られる、老化に伴う生理学的および形態学的変化に類似した特徴を示す<sup>39)</sup>。したがって、IANX 処置を施した SAMP8 マウスと SAMR1 マウスについて、処置後の同じ時点で、免疫組織化学的解析あるいは行動観察実験によって比較することは、加齢の影響を検討する上で適切であると考えられる<sup>27,30,40)</sup>。本研究の結果、SAMP8 マウスおよび SAMR1 マウスは共に IANX 後に口髭部皮膚に機械アロディニアを発症したが、興味深いことに SAMP8 マウスは SAMR1 マウスと比較して、IANX 後の機械アロディニアの増強を認めた。また、SAMP8 マウスと SAMR1 マウスは共に、IANX 後に下口唇の MHWT の上昇を認め、この結果は、ヒトの下歯槽神経損傷後に生じる下口唇の知覚異常と類似している。したがって、SAMP8 マウスへの IANX 処置の適用は、IAN 損傷後の異所性疼痛の発症機構に及ぼす加齢の影響を検討する上で有用であると考えられる。

末梢神経の損傷時に、感覚神経節に常在するマクロファージが増加することは、これまで多くの研究で報告されている<sup>41,42,43)</sup>。本研究の結果、SAMP8 マウスは、口髭部皮膚の機械アロディニアの増強が認められた IANX 後 5 日目に、Iba1<sup>+</sup> の有意な増加を認めたが、ラットを用いた過去の研究においても IANX 処置によって TG に

における Iba1<sup>+</sup> の増加が生じ、口髭部皮膚に機械アロディニアを発症することが報告されている<sup>35)</sup>。また坐骨神経損傷モデルラットでは、後肢の足底に機械アロディニアが発症することが報告されており<sup>44)</sup>、このモデルラットでは、加齢により感覚神経節における Iba1<sup>+</sup> が若齢ラットと比較して増加した<sup>45)</sup>。これらの報告と今回の結果から、加齢により IANX による口髭部皮膚における異所性機械アロディニアが増強し、TG において Iba1<sup>+</sup> が増加することが示唆された。

マクロファージは炎症性や抗炎症性に極性変化するが、その極性を解析するために、M1 マクロファージのマーカースとして CD11c、M2 マクロファージのマーカースとして CD206 が多くの研究で用いられている<sup>46,47,48)</sup>。本研究の結果、IANX 後 5 日目において、SAMP8-IANX と SAMR1-IANX はともに Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> の増加を認め、SAMP8-IANX では SAMR1-IANX と比較して有意に多くの Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> の有意な増加を認めた。また、SAMP8-IANX において、CD11c<sup>+</sup>/CCL2<sup>+</sup> は SAMR1-IANX と比較して有意に多かった。さらに SAMR1-IANX は SAMR1-sham と比較して、Iba1<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> が有意に増加したが、SAMP8-IANX は SAMR1-IANX と比較して有意な変化を認めなかった。マクロファージの極性変化に対する加齢研究において、加齢は、M2 マクロファージから M1 マクロファージへの極性変化を加速させることが多くの研究で報告されている<sup>49,50,51)</sup>。腸管神経系に存在するマクロファージにおいても、加齢に伴い M1 マクロファージへの極性変化が亢進し、その結果、炎症性シグナルに対する神経応答が亢進することが報告されている<sup>52)</sup>。これらの報告と今回の結果より、TG のマクロファージは、加齢に伴い M1 マクロファージへの極性変化が促進し、M1 マクロファージからの CCL2 などの炎症性ケミカルメディエーターの放



出が増加することで、IANX 後の口髭部皮膚における機械アロディニアが増強すると考えられる。

本研究の結果、マクロファージ枯渇剤である LCCA を SAMP8 マウスの TG に直接かつ持続的に投与すると、IANX 後の口髭部皮膚の機械アロディニアの発症が抑制されることが確認された。また LCCA 投与により、IANX 後 5 日目の TG における Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> 数が、control-LCCA 投与あるいは vehicle 投与時と比較して有意に減少した。電気生理学的手法を用いた過去の研究では、IANX により機械刺激に対する眼窩下神経の反応性が上昇し、その結果、同側の口髭部皮膚に異所性の機械アロディニアが発症することが報告されている<sup>34,53,54</sup>)。マクロファージ由来の様々な炎症性のケミカルメディエーターは、ニューロンの感作と過興奮を誘発することが知られているが<sup>55</sup>)、加齢変化に伴う炎症性シグナルに対する侵害受容ニューロンの反応性増強には、マクロファージの極性変化が抗炎症性 M2 から炎症性 M1 へシフトすることが関与していると報告されている<sup>52</sup>)。また、異所性疼痛に関するこれまでの研究では、大腸を支配する後根神経節ニューロンの損傷に伴い、後根神経節に集積した M1 マクロファージから放出される TNF- $\alpha$  や CCL2 などの炎症性ケミカルメディエーターがサテライトグリアを活性化する。その活性化により損傷した大腸投射一次ニューロンの興奮性が増強し、損傷していない膀胱投射一次ニューロンの興奮性も増強し、膀胱に疼痛を引き起こすことが報告されている<sup>56,57</sup>)。さらに、顎顔面領域での報告では、IL-1 受容体や transient receptor potential vanilloid-1 シグナルを介したニューロンとマクロファージの相互作用によって TG ニューロンの興奮性が増強し、歯髄炎後に舌痛症が発症することが示唆されている<sup>58</sup>)。以上の報告と今回の結

果より，TGのM1マクロファージ数の増加に伴う炎症性ケミカルメディエーターの放出が加齢によって亢進し，直接的あるいは間接的に損傷部位から離れた口髭部皮膚を支配するニューロンの興奮性を高めることが，IANX後の口髭部皮膚での異所性機械アロディニアの発症に極めて重要な役割を担うことが明らかとなった。

## 結 論

本研究では以下の結論を得た。

1. SAMP8 マウスあるいは SAMR1 マウスへの IANX 処置は、口髭部皮膚に異所性機械アロディニアを発症した。
2. 口髭部皮膚に発症する異所性機械アロディニアは、加齢の影響により増強した。
3. IANX 処置後の TG における Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> の増加は、加齢の影響により増強した。
4. IAN 処置後の TG における CD11c<sup>+</sup>/CCL2<sup>+</sup> の増加は、加齢の影響により増強した。
5. LCCA 投与により加齢によって増強した口髭部皮膚の異所性機械アロディニアは有意に回復した。

以上のことから、IANX 後に発症する異所性機械アロディニアは、加齢により増強し、その増強は TG における M1 マクロファージの増加に伴う CCL2 の増加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 講座の浦田健太郎専任講師に，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を申し上げます。

## 文 献

1. Khawaja N and Renton T: Case studies on implant removal influencing the resolution of inferior alveolar nerve injury. *Br Dent J* 206 (7): 365-370, 2009.
2. Meyer RA and Bagheri SC: Long-term outcome of trigeminal nerve injuries related to dental treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 69 (12): 2946, 2011.
3. Huang CL, Liu F, Zhang YY, Lin J, Fu M, Li YL, Zhou C, Li CJ and Shen JF: Activation of oxytocin receptor in the trigeminal ganglion attenuates orofacial ectopic pain attributed to inferior alveolar nerve injury. *J Neurophysiol* 125 (1): 223-231, 2021.
4. Yang J, Liu F, Zhang YY, Lin J, Li YL, Zhou C, Li CJ and Shen JF: C-X-C motif chemokine ligand 1 and its receptor C-X-C motif chemokine receptor 2 in trigeminal ganglion contribute to nerve injury-induced orofacial mechanical allodynia. *J Oral Rehabil* 49 (2): 195-206, 2022.
5. Bai L, Wang X, Li Z, Kong C, Zhao Y, Qian JL, Kan Q, Zhang W and Xu JT: Upregulation of chemokine CXCL12 in the dorsal root ganglia and spinal cord contributes to the development and maintenance of neuropathic pain following spared nerve injury in rats. *Neurosci Bull* 32 (1): 27-40, 2016.
6. Ji RR, Chamesian A and Zhang YQ: Pain regulation by nonneuronal cells and inflammation. *Science* 354 (6312): 572-577, 2016.
7. Gold MS, Weinreich D, Kim CS, Wang R, Treanor J, Porreca F and Lai J: Redistribution of NaV1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain. *J Neurosci* 23 (1): 158-166, 2003.

8. Cherkas PS, Huang TY, Pannicke T, Tal M, Reichenbach A and Hanani M: The effects of axotomy on neurons and satellite glial cells in mouse trigeminal ganglion. *Pain* 110 (1-2): 290-298, 2004.
9. Komiya H, Shimizu K, Noma N, Tsuboi Y, Honda K, Kanno K, Ohara K, Shinoda M, Ogiso B and Iwata K: Role of neuron-glia interaction mediated by IL-1 $\beta$  in ectopic tooth pain. *J Dent Res* 97 (4): 467-475, 2018.
10. Iwata K and Shinoda M: Role of neuron and non-neuronal cell communication in persistent orofacial pain. *J Dent Anesth Pain Med* 19 (2): 77-82, 2019.
11. Iwata K, Katagiri A and Shinoda M: Neuron-glia interaction is a key mechanism underlying persistent orofacial pain. *J Oral Sci* 59 (2): 173-175, 2017.
12. Shinoda M, Kubo A, Hayashi Y and Iwata K: Peripheral and central mechanisms of persistent orofacial pain. *Front Neurosci* 13: 1227, 2019.
13. Sprangers S, de Vries TJ and Everts V: Monocyte heterogeneity: Consequences for monocyte-derived immune cells. *J Immunol Res* 2016: 1475435, 2016.
14. Benoit M, Desnues B and Mege JL: Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 181 (6): 3733-3739, 2008.
15. Brown BN, Ratner BD, Goodman SB, Amar S and Badylak SF: Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine. *Biomaterials* 33 (15): 3792-3802, 2012.
16. Chen O, Donnelly CR and Ji RR: Regulation of pain by neuroimmune interactions between macrophages and nociceptor sensory neurons. *Curr Opin Neurobiol* 62: 17-25, 2020.

17. Zheng Q, Zhang J, Zuo X, Sun J, Liang Z, Hu X, Wang Z, Li K, Song J, Ding T, Shen X, Ma Y and Li P: Photobiomodulation promotes neuronal axon regeneration after oxidative stress and induces a change in polarization from M1 to M2 in macrophages via stimulation of CCL2 in neurons: relevance to spinal cord injury. *J Mol Neurosci* 71 (6): 1290-1300, 2021.
18. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P and Sica A: Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23 (11): 549-555, 2002.
19. Gordon S: Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3 (1): 23-35, 2003.
20. Franco R and Fernández-Suárez D: Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 131: 65-86, 2015.
21. Wu BM, Liu JD, Li YH and Li J: Margatoxin mitigates CCl4 induced hepatic fibrosis in mice via macrophage polarization, cytokine secretion and STAT signaling. *Int J Mol Med* 45 (1): 103-114, 2020.
22. Nadeau S, Filali M, Zhang J, Kerr BJ, Rivest S, Soulet D, Iwakura Y, de Rivero Vaccari JP, Keane RW and Lacroix S: Functional recovery after peripheral nerve injury is dependent on the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF: implications for neuropathic pain. *J Neurosci* 31 (35):12533-12542, 2011.
23. Sica A and Mantovani A: Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122 (3): 787-795, 2012.
24. Davis MP and Srivastava M: Demographics, assessment and management of pain in the

- elderly. *Drugs Aging* 20 (1): 23-57, 2003.
25. Ma W, Chabot JG, Vercauteren F and Quirion R: Injured nerve-derived COX2/PGE2 contributes to the maintenance of neuropathic pain in aged rats. *Neurobiol Aging* 31 (7): 1227-1237, 2010.
  26. Galbavy W, Kaczocha M, Puopolo M, Liu L and Rebecchi MJ: Neuroimmune and neuropathic responses of spinal cord and dorsal root ganglia in middle age. *PLoS One* 10 (8): e0134394, 2015.
  27. Ikutame D, Urata K, Oto T, Fujiwara S, Inuma T, Shibuta I, Hayashi Y, Hitomi S, Iwata K and Shinoda M: Aging-related phenotypic conversion of medullary microglia enhances intraoral incisional pain sensitivity. *Int J Mol Sci* 21 (21): 7871, 2020.
  28. Takeda T, Hosokawa M and Higuchi K: Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of accelerated senescence. *J Am Geriatr Soc* 39 (9): 911-919, 1991.
  29. Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K, Hosono M, Akiguchi I and Katoh H: A novel murine model of aging, senescence-accelerated mouse (SAM). *Arch Gerontol Geriatr* 19 (2): 185-192, 1994.
  30. Butterfield DA and Poon HF: 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, 2005.
  31. Takeda T: Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochem Res* 34 (4): 639-659, 2009.



32. Liu B, Liu J and Shi JS: SAMP8 mice as a model of age-related cognition decline with underlying mechanisms in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 75 (2): 385-395, 2020.
33. Miyamoto M, Kiyota Y, Yamazaki N, Nagaoka A, Matsuo T, Nagawa Y and Takeda T: Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiol Behav* 38 (3): 399-406, 1986.
34. Takeda T, Hosokawa M and Higuchi K: Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of senescence. *Exp Gerontol* 32 (1-2): 105-109, 1997.
35. Zimmermann M: Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16 (2): 109-110, 1983.
36. Iwata K, Imai T, Tsuboi Y, Tashiro A, Ogawa A, Morimoto T, Masuda Y, Tachibana Y and Hu J: Alteration of medullary dorsal horn neuronal activity following inferior alveolar nerve transection in rats. *J Neurophysiol* 86 (6): 2868-2877, 2001.
37. Batbold D, Shinoda M, Honda K, Furukawa A, Koizumi M, Akasaka R, Yamaguchi S and Iwata K: Macrophages in trigeminal ganglion contribute to ectopic mechanical hypersensitivity following inferior alveolar nerve injury in rats. *J Neuroinflammation* 14 (1): 249, 2017.
38. Kaji K, Shinoda M, Honda K, Unno S, Shimizu N and Iwata K: Connexin 43 contributes to ectopic orofacial pain following inferior alveolar nerve injury. *Mol Pain* 12: 1744806916633704, 2016.
39. Akiguchi I, Pallàs M, Budka H, Akiyama H, Ueno M, Han J, Yagi H, Nishikawa T, Chiba Y, Sugiyama H, Takahashi R, Unno K, Higuchi K and Hosokawa M: SAMP8 mice as a

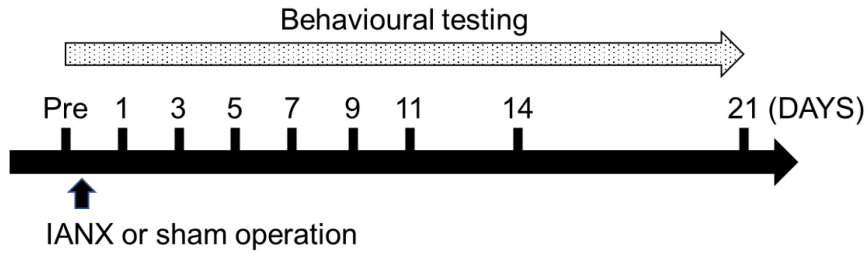
- neuropathological model of accelerated brain aging and dementia: Toshio Takeda's legacy and future directions. *Neuropathology* 37 (4): 293-305, 2017.
40. Kong D, Yan Y, He XY, Yang H, Liang B, Wang J, He Y, Ding Y and Yu H: Effects of resveratrol on the mechanisms of antioxidants and estrogen in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2019: 8983752, 2019.
  41. Kim D, You B, Lim H and Lee SJ: Toll-like receptor 2 contributes to chemokine gene expression and macrophage infiltration in the dorsal root ganglia after peripheral nerve injury. *Mol Pain* 7: 74, 2011.
  42. Kwon MJ, Kim J, Shin H, Jeong SR, Kang YM, Choi JY, Hwang DH and Kim BG: Contribution of macrophages to enhanced regenerative capacity of dorsal root ganglia sensory neurons by conditioning injury. *J Neurosci* 33 (38): 15095-15108, 2013.
  43. Yu X, Liu H, Hamel KA, Morvan MG, Yu S, Leff J, Guan Z, Braz JM and Basbaum AI: Dorsal root ganglion macrophages contribute to both the initiation and persistence of neuropathic pain. *Nat Commun* 11 (1): 264, 2020.
  44. Decosterd I and Woolf CJ: Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87 (2): 149-158, 2000.
  45. Vega-Avelaira D, Moss A and Fitzgerald M: Age-related changes in the spinal cord microglial and astrocytic response profile to nerve injury. *Brain Behav Immun* 21 (5): 617-623, 2007.
  46. Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ and Saltiel AR: Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage

- subtypes. *Diabetes* 57 (12): 3239-3246, 2008.
47. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ and Popovich PG: Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci* 29 (43): 13435-13444, 2009.
  48. Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolaro T and Castegna A: The metabolic signature of macrophage responses. *Front Immunol* 10: 1462, 2019.
  49. Takahashi R, Ishigami A, Kobayashi Y and Nagata K: Skewing of peritoneal resident macrophages toward M1-like is involved in enhancement of inflammatory responses induced by secondary necrotic neutrophils in aged mice. *Cell Immunol* 304-305: 44-48, 2016.
  50. Kang K, Park SH, Chen J, Qiao Y, Giannopoulou E, Berg K, Hanidu A, Li J, Nabozny G, Kang K, Park-Min KH and Ivashkiv LB: Interferon- $\gamma$  represses M2 gene expression in human macrophages by disassembling enhancers bound by the transcription factor MAF. *Immunity* 47 (2): 235-250.e4, 2017.
  51. Yamaguchi Y, Kaida K, Suenaga Y, Ishigami A, Kobayashi Y and Nagata K: Age-related dysfunction of p53-regulated phagocytic activity in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 529 (2): 462-466, 2020.
  52. Becker L, Nguyen L, Gill J, Kulkarni S, Pasricha PJ and Habtezion A: Age-dependent shift in macrophage polarisation causes inflammation-mediated degeneration of enteric nervous system. *Gut* 67 (5): 827-836, 2018.

53. Nomura H, Ogawa A, Tashiro A, Morimoto T, Hu JW and Iwata K: Induction of Fos protein-like immunoreactivity in the trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following noxious and non-noxious mechanical stimulation of the whisker pad of the rat with an inferior alveolar nerve transection. *Pain* 95 (3): 225-238, 2002.
54. Tsuboi Y, Takeda M, Tanimoto T, Ikeda M, Matsumoto S, Kitagawa J, Teramoto K, Simizu K, Yamazaki Y, Shima A, Ren K and Iwata K: Alteration of the second branch of the trigeminal nerve activity following inferior alveolar nerve transection in rats. *Pain* 111 (3): 323-334, 2004.
55. Domoto R, Sekiguchi F, Tsubota M and Kawabata A: Macrophage as a peripheral pain regulator. *Cells* 10 (8): 1881, 2021.
56. Panicker JN, Marcelissen T, von Gontard A, Vrijens D, Abrams P and Wyndaele M: Bladder-bowel interactions: Do we understand pelvic organ cross-sensitization? International Consultation on Incontinence Research Society (ICI-RS) 2018. *Neurourol Urodyn* 38 (Suppl 5): S25-S34, 2019.
57. Qiao LY and Tiwari N: Spinal neuron-glia-immune interaction in cross-organ sensitization. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 319 (6): G748-G760, 2020.
58. Kanno K, Shimizu K, Shinoda M, Hayashi M, Takeichi O and Iwata K: Role of macrophage-mediated Toll-like receptor 4- interleukin-1R signaling in ectopic tongue pain associated with tooth pulp inflammation. *J Neuroinflammation* 17 (1): 312, 2020.



A



B

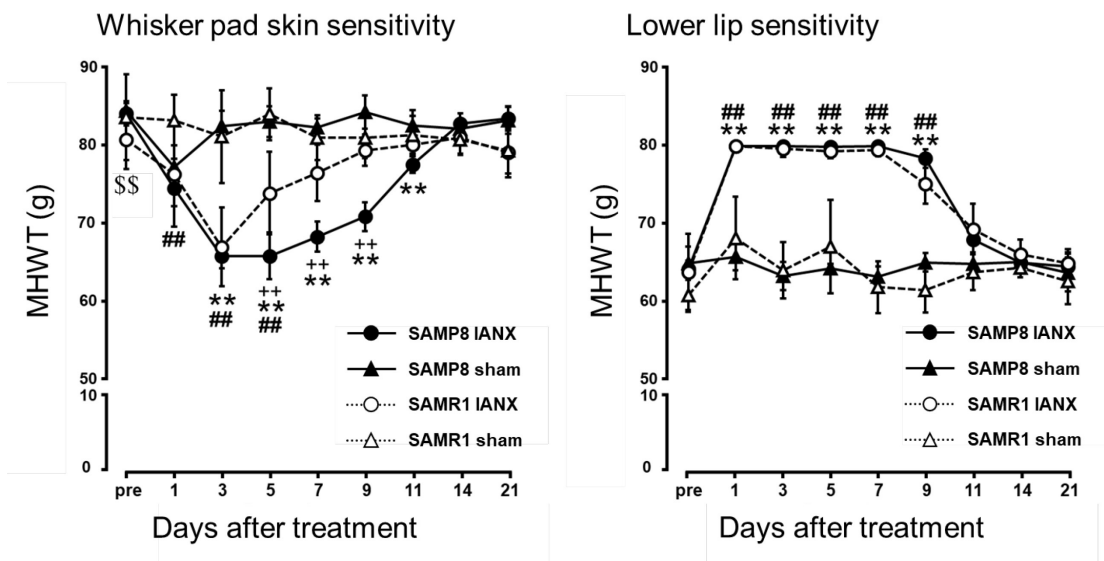


図 1 IANX 後の口髭部皮膚と下口唇部への機械刺激に対する頭部引っ込め反射閾値

A : 行動観察実験のタイムコース B : 機械刺激に対する頭部引っ込め反射閾値

(MHW) ( $n = 7$ , in each)  $**p < 0.01$ , SAMP8-IANX vs. SAMP8-sham.  $##p < 0.01$ ,

SAMR1-IANX vs. SAMR1-sham.  $+++p < 0.01$ , SAMP8-IANX vs. SAMR1-IANX.  $$$p < 0.01$ ,

SAMP8-sham vs. SAMR1-sham

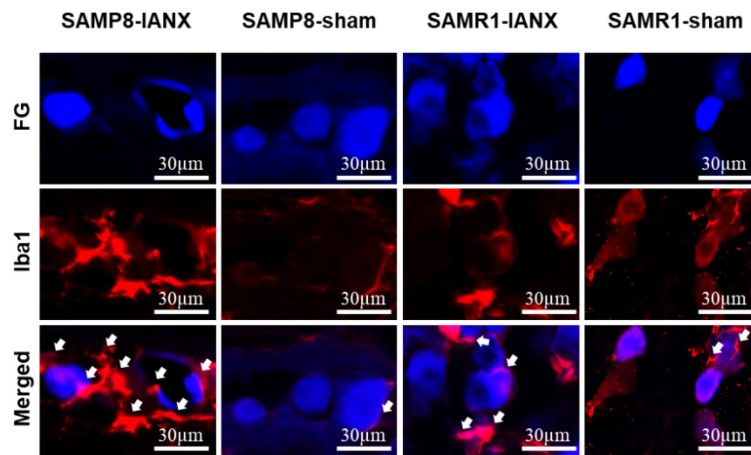
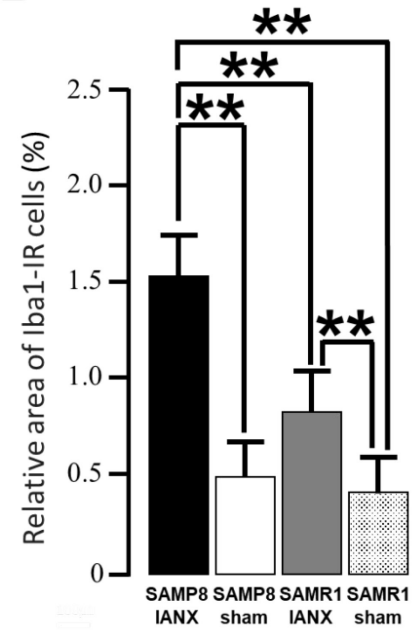
**A****B**

図 2 IANX 後 5 日目の TG における Iba1<sup>+</sup> の変化

A: FG 標識 TG ニューロン (青), Iba1<sup>+</sup> (赤), 矢印: FG 標識 TG ニューロンが多く存在する領域における Iba1<sup>+</sup> B: Iba1<sup>+</sup> が占める割合. (n = 7, in each) \*\**p* < 0.05 Scale bar :

30 μm. IR : 免疫反応性

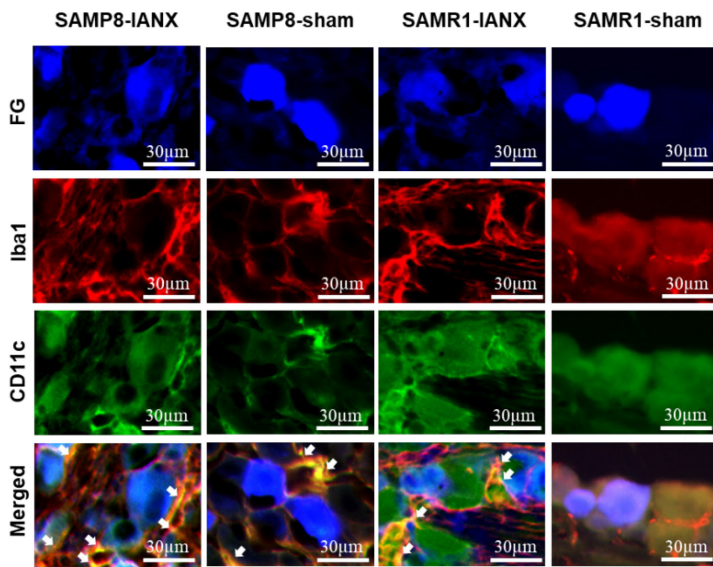
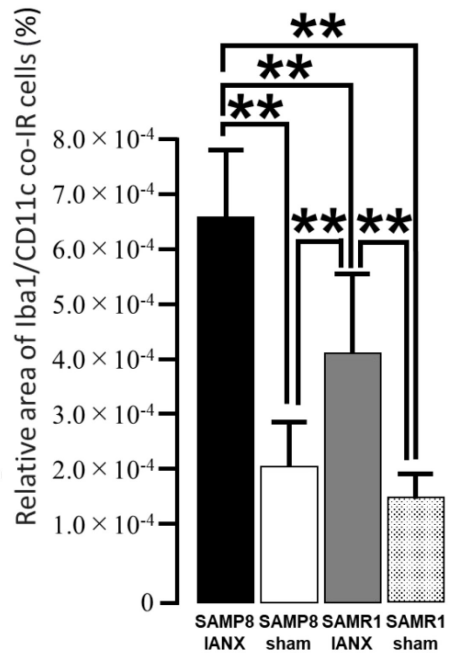
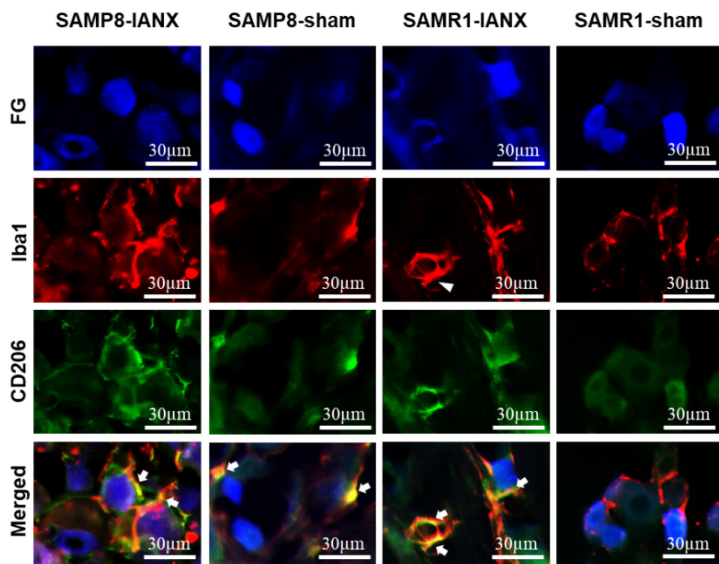
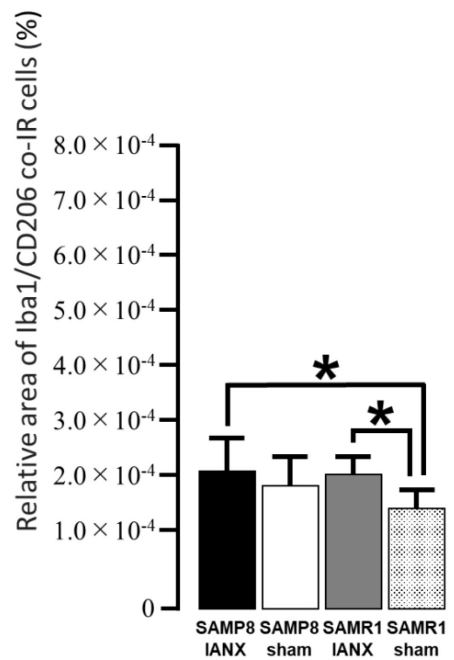
**A****B****C****D**

図 3 IANX 後 5 日目の TG における Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>, Iba1<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> の変化

A : FG 標識 TG ニューロン (青), Iba1<sup>+</sup> (赤), CD11c<sup>+</sup> (緑) 矢印 : FG 標識 TG ニューロンが多く存在する領域における Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> B : Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> の占める割合 C :

FG 標識 TG ニューロン (青), Iba1<sup>+</sup> (赤), CD206<sup>+</sup> (緑) 矢印 : FG 標識 TG ニューロンが多く存在する領域における Iba1<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> D : Iba1<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> の占める割合 (n = 7, in each) \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  Scale bar : 30  $\mu\text{m}$ . IR : 免疫反応性



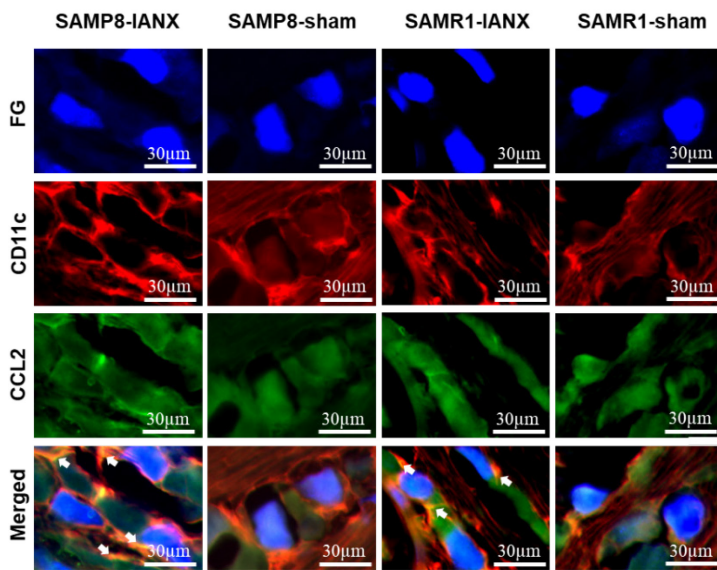
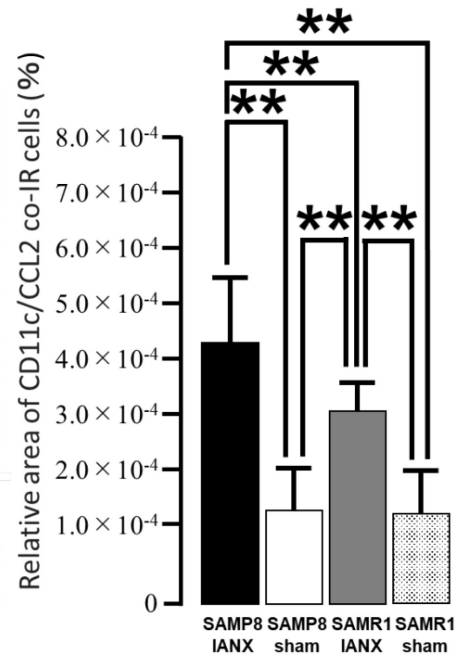
**A****B**

図 4 IANX 後 5 日目の TG における CD11c<sup>+</sup>/CCL2<sup>+</sup> の変化

A: FG 標識 TG ニューロン (青), CD11c<sup>+</sup> (赤), CCL2<sup>+</sup> (緑) 矢印: FG 標識 TG ニューロンが多く存在する領域における CD11c<sup>+</sup>/CCL2<sup>+</sup> B: CD11c<sup>+</sup>/CCL2<sup>+</sup> の占める割合.

(n = 7, in each) \*\**p* < 0.01 Scale bar : 30 μm. IR : 免疫反応性

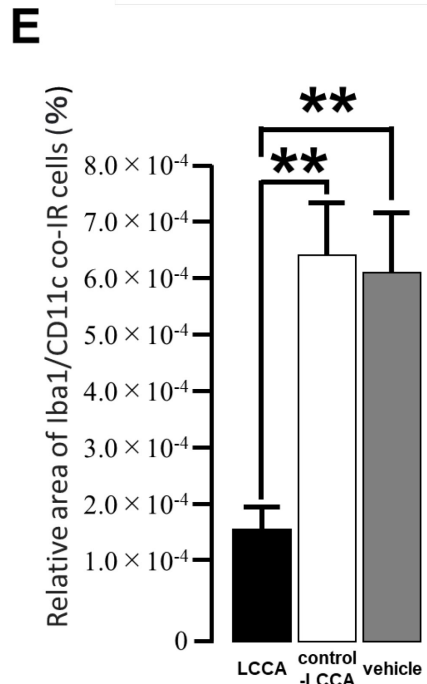
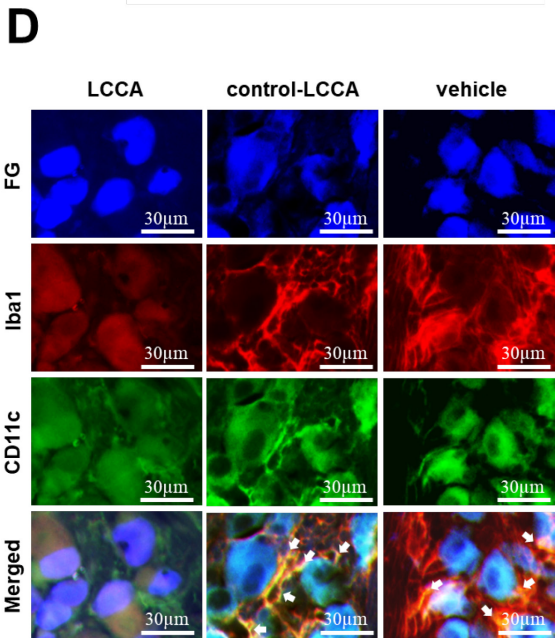
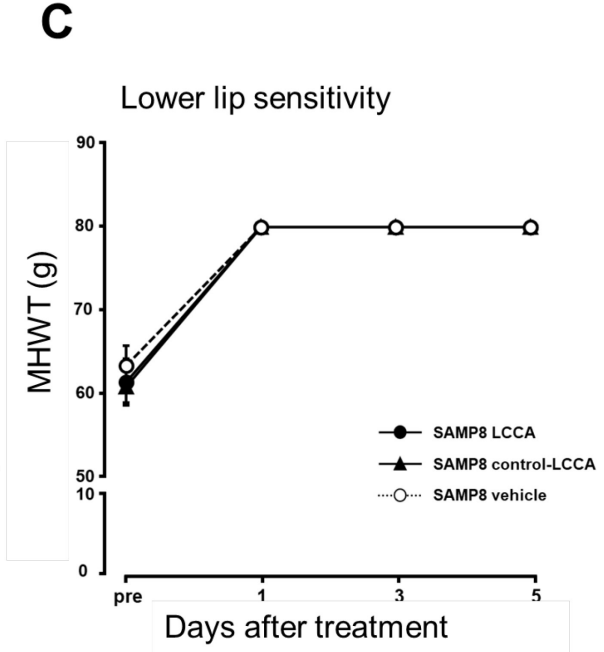
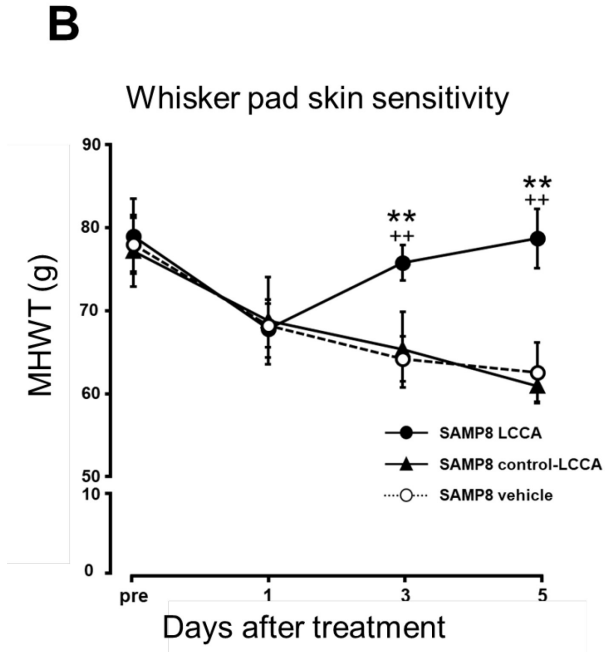
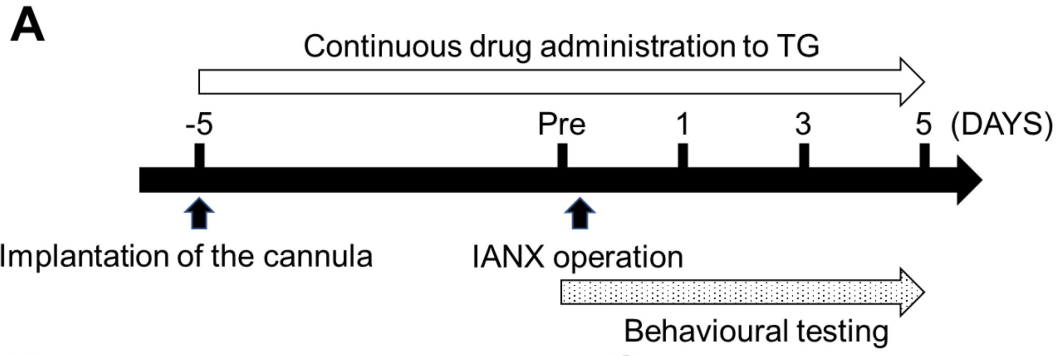


図 5 SAMP8-IANX への LCCA の TG 内投与後の MHWT の経日的変化, および Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> の変化

A : LCCA の TG 内投与と行動観察実験のタイムコース B : LCCA, control-LCCA, または vehicle の TG 内持続投与による口髭部皮膚 MHWT の経日的変化 C : LCCA, control-LCCA, または vehicle の TG 内持続投与による下口唇 MHWT の経日的変化

(n=7 in each) \*\* $p < 0.01$ , LCCA 投与 vs. control-LCCA 投与, ++ $p < 0.01$ , LCCA 投与 vs. vehicle 投与 D : FG 標識 TG ニューロン (青), Iba1<sup>+</sup> (赤), CD11c<sup>+</sup> (緑) 矢印 : FG 標識 TG ニューロンが多く存在する領域における Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> E : Iba1<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> の占める割合. (n = 7, in each) \*\* $p < 0.01$  Scale bar : 30  $\mu\text{m}$ . IR : 免疫反応性