

## 論文の内容の要旨

氏名：尾 辻 盛

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Sex difference in the prolongation of mechanical allodynia by skin re-incision in adult rats with neonatal skin incision

（新生児期に皮膚切開を受けた成体ラットの再切開による機械アロディニア長期化メカニズムの性差）

幼少期にケガや手術を経験した場合、成人期に被る外傷により痛みが長期化することが知られており、中枢神経系において種々の変化が生じることが動物実験によって明らかにされている。これまでに、新生児期に口髭部損傷を受けたラットに対して、成体期に同部位に損傷を与えた際に生じる機械アロディニアの長期化に三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) のミクログリア活性化が関与していることを見出してきた。ところで、慢性痛の発症メカニズムには性差があり、雄ではミクログリア依存的、雌では T 細胞依存的であることが示唆されている。上述の Vc におけるミクログリアの変化は雄を用いた検討であるために、機械アロディニア長期化に対する性差における細胞依存性の有無は不明である。そこで本研究では、ミクログリア活性化阻害薬である minocycline および peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) アゴニストである pioglitazone を用いて、新生児期に皮膚切開を加えたラットに対して成体期に再度切開を加えた際に生じる機械アロディニアの長期化に性差があるのか検討した。

実験には雌雄の Sprague-Dawley ラットを用いた。イソフルランによる深麻酔下にて生後 4 日目（新生児期）に口髭部皮膚を切開し、さらに生後 7 週目（成体期）に同部位を再度切開した (Incision-Incision 群)。また、新生児期に口髭部を 1 針縫合し、成体期に同部位を切開した Sham-Incision 群および新生児期と成体期に同部位を 1 針縫合した Sham-Sham 群を作製した。成体期口髭部切開後、口髭部に von Frey フィラメントによる機械刺激を与えた際の head withdrawal threshold (HWT) を測定した。成体期口髭部切開後 8 日目と 10 日目において Incision-Incision 群の HWT は Sham-Incision 群と比較して雌雄ともに有意に低値を示した。抗 ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) 抗体を用いて免疫組織化学染色を行ない、成体期切開後 10 日目の Vc におけるミクログリア数、細胞体面積、および樹枝状部面積（突起先端を頂点とする多角形）を解析した。IBA1 陽性細胞数と細胞体面積は Sham-Incision 群と比較して Incision-Incision 群において雌雄ともに増加したが、樹枝状部面積に変化は認められなかった。雌雄における HWT 変化に対するミクログリアの寄与を解析するために Incision-Incision 群のラット大槽内へ minocycline を持続投与した。雄において minocycline 投与により成体期口髭部再切開後 10 日目において HWT に対する効果が抑制されたが、雌では minocycline による変化は認められなかった。また、minocycline 大槽内投与により成体期口髭部再切開によるミクログリアの細胞数および細胞体面積の増加は雄では抑制されたが、雌では変化が認められなかった。雌における神経障害性疼痛に対する T 細胞の関与が示唆されていることから、抗 CD3 抗体 (T 細胞のマーカー) を用いて T 細胞の関与を検討した。Vc における CD3 陽性細胞は Sham-Incision 群と比べて Incision-Incision 群の雌のみで増加したが、その増加はわずかであった。成体期再切開による機械アロディニア長期化に対する pioglitazone の影響を検討するために、Incision-Incision 群のラット大槽内へ持続投与を行った。雄では pioglitazone 大槽内投与 2 日目のみで HWT 低下は抑制されたが、雌では 2 日目から 10 日目において HWT に対する効果が抑制された。成体期口髭部再切開後 10 日目の Vc において、PPAR $\gamma$  に対する免疫蛍光シグナルは雌雄ともに neuronal nuclei (ニューロンのマーカー) に対する免疫蛍光シグナルと一致した。一方で、IBA1 あるいは glial fibrillary acidic protein (アストロサイトのマーカー) に対する免疫蛍光シグナルとの一致は認められなかった。Incision-Incision 群における雌の PPAR $\gamma$  陽性 Vc ニューロン数は Sham-Incision 群に比べて減少したが、pioglitazone 大槽内投与により有意に増加した。一方、これらの変化は雄では認められなかった。

PPAR $\gamma$  の主な役割はレドックス制御であることから、成体期口髭部再切開後の Vc における PPAR $\gamma$  陽性ニューロン数の減少が酸化ストレス発生に関与している可能性が考えられる。そこで、抗酸化酵

素である heme oxygenase-1 (HO-1) の Vc における発現量をウエスタンブロット法により解析した。Incision-Incision 群の Vc における HO-1 の発現量は pioglitazone 大槽内投与により雌のみで増加した。また、NMDA 受容体のサブユニットである NR1 の発現量を同様に解析したところ、Incision-Incision 群の Vc における NR1 サブユニットの発現量は pioglitazone 大槽内投与により雌のみで低下した。雌ラットにおける機械アロディニアに対する活性酸素の関与を検討するために、活性酸素除去薬である *N*-tert-Butyl- $\alpha$ -phenylnitron (PBN) を Incision-Incision 群に対して腹腔内投与した。HWT は PBN 投与 30 分後に上昇したが、vehicle 投与後に HWT の変化は認められなかった。

以上の結果より、新生児期皮膚切開による成体期再切開後の機械アロディニア長期化には、雄ではミクログリア数の増加、雌では PPAR $\gamma$ 陽性ニューロン数の低下が関与することが示唆された。