

## 論文の内容の要旨

氏名：相馬 千 紘

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Neonatal maternal separation induces oxidative stress causing orofacial mechanical allodynia in adulthood

（新生児母子分離は成熟期において口腔顔面領域の機械アロディニアを誘発する酸化ストレスを惹起する）

新生児期に虐待や育児放棄などの精神的・身体的ストレスを受けると、その後の感覚神経系の発達に異常をきたし、成人期において慢性疼痛の発症や重症化を惹き起こす。幼少期ストレス負荷後の成熟期における異常疼痛発症メカニズムとして、下行性疼痛抑制系の機能変化やストレスホルモンとして知られる血中コルチコステロン (CORT) シグナルを介した末梢機械感受性受容体の増加の関与が報告されている。最近、幼少期ストレス負荷により活性酸素種 (ROS) を含む酸化ストレス関連因子が長期的に増強することが報告された。ROS は末梢神経に発現する ROS 感受性疼痛関連イオンチャネル transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) に作用して疼痛を惹き起こすことが知られていることから、幼少期ストレスによって増加した ROS が TRPA1 チャネルに作用して疼痛を惹き起こしている可能性が考えられる。そこで本研究では、幼少期ストレス負荷モデルラットを用いて、幼少期ストレス負荷後に発症する成熟期顔面領域の異常疼痛に酸化ストレスがどのように関与しているのかを明らかにすることを目的とした。

感覚神経系の発達に重要な乳児期に、母子分離を行ったラットを幼少期ストレス負荷モデルとして使用した。生後 2 日目から 14 日目まで、新生仔ラットを母ラットと毎日 3 時間別のケージに分離した群（母子分離群）と分離しない群（非分離群）を作製した。成熟期の疼痛評価のため、生後 7 週目に覚醒下にて両群の口ひげ部と後肢足底部に機械刺激を与え、機械逃避閾値を測定した。酸化ストレスの評価のため、生後 7 週目に DNA 酸化損傷マーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の口ひげ部皮膚組織における発現を免疫組織化学的に解析した。また、血中の代表的な抗酸化酵素の一つである superoxide dismutase (SOD) 活性と抗酸化力、および口ひげ部皮膚組織における ROS の主な産生部位であるミトコンドリア complex I の活性を測定した。さらに、生後 14 日目と 28 日目における血中 CORT 濃度を測定した。生後 7 週目、両群に活性酸素消去薬 N-tert-Butyl- $\alpha$ -phenylnitrone (PBN), TRPA1 拮抗薬 (HC-030031), または vehicle (10% DMSO) を腹腔内または口ひげ部皮下にそれぞれ投与し、30 分後に機械逃避閾値を測定した。口ひげ部皮膚組織における TRPA1 の局在と発現量は、それぞれ免疫組織化学染色およびウェスタンブロッティング法にて解析した。生後 2 日目から 14 日目の母子分離群において、CORT 受容体拮抗薬 mifepristone または vehicle (50% EtOH) を毎日皮下投与し、生後 7 週目に機械逃避閾値と抗酸化力を測定した。

母子分離は体重変化に影響を及ぼさなかった。母子分離群では、非分離群と比較して口ひげ部と後肢足底部の機械逃避閾値が有意に低下したことから、母子分離によって成熟期で全身性に機械アロディニアが惹き起こされたと考えられる。また、母子分離群の口ひげ部皮膚組織における 8-OHdG の発現は有意に増強していた。血中の抗酸化酵素である SOD 活性は両群で差は認められなかったが、血中抗酸化力は母子分離群で有意に低下していた。Complex I 活性は母子分離群で減少傾向を示したが有意差は認められなかった。つまり、母子分離群では SOD 以外の抗酸化酵素や抗酸化物質による抗酸化力が低下したことによって口ひげ部に ROS が増加したことで、DNA の損傷が惹き起こされた可能性がある。口ひげ部皮膚組織には TRPA1 が発現していたが、その量は両群で差は認められなかった。そこで、母子分離群に活性酸素消去薬または TRPA1 拮抗薬を投与したところ、機械アロディニアが有意に抑制された。また、血中 CORT 濃度は母子分離期間中でのみ上昇したが、母子分離期間中の CORT 受容体拮抗薬の投与により、抗酸化力が有意に上昇し、機械アロディニアが抑制された。このことから、母子分離群の抗酸化力の低下は、母子分離期における CORT 受容体の活性化によって惹き起こされた可能性があり、その成熟期の抗酸化力の低下が機械アロディニアを惹き起こしたと考えられる。

以上の結果より、母子分離による幼少期の CORT 過剰産生によって成熟期に抗酸化力が低下すると、

末梢組織で過剰な ROS が蓄積し酸化ストレス状態となる。この蓄積した過剰な ROS が侵害受容器に発現する ROS 感受性 TRPA1 を活性化することで、機械アロディニアを生じることが示唆された。