

# 学 位 論 文

Pretreatment with high mobility group box-1 monoclonal antibody prevents the onset of trigeminal neuropathy in both female and male mice with distal infraorbital nerve chronic constriction injury

(High mobility group box-1 モノクローナル

中和抗体の前投与は雌雄マウス遠位眼窩下神経慢性絞扼による三叉神経ニューロパチーの発症を予防する)

河内 貴弘

広島大学大学院医歯薬保健学研究科  
博士課程 医歯薬学専攻

修了年度 (2020)

主指導教員：入舩 正浩教授  
(医系科学研究科 歯科麻酔学)

|   |       |
|---|-------|
| 緒論  | 2-3   |
| 第 1 章 雄性マウスを用いた外傷性三叉神経ニューロパチーモデルの確立と疼痛行動評価                              |       |
| 第 1 項 緒言  | 4     |
| 第 2 項 実験方法  | 4-6   |
| 第 3 項 結果  | 6     |
| 第 4 項 考察  | 6-7   |
| 第 2 章 三叉神経損傷時のマウス免疫細胞の量的・形態学的評価   |       |
| 第 1 項 緒言  | 8     |
| 第 2 項 実験方法  | 8-9   |
| 第 3 項 結果  | 9-10  |
| 第 4 項 考察  | 10    |
| 第 3 章 High mobility group box 1 に着目した<br>雌雄両マウスの外傷性三叉神経ニューロパチー予防法の確立と評価 |       |
| 第 1 項 緒言  | 11    |
| 第 2 項 実験方法  | 11-12 |
| 第 3 項 結果  | 12-13 |
| 第 4 項 考察  | 13-14 |
| 総括および結論   | 15    |
| 図表  | 16-24 |
| 引用文献  | 25-28 |
| 謝辞  | 29    |

## 緒論

疼痛は組織損傷につながる各種刺激から回避させる警告反応として生体の保護において重要な役割を担っている。しかし歯科治療を含めた外科的手術中および術後に生じる疼痛により発生する不快感覚、不快情動は治療の妨げになっている。歯科麻酔科学は歯学分野における全身麻酔、局所麻酔、疼痛に関する研究を行う分野であり患者に快適な歯科治療を提供するための全身管理および麻酔薬の使用を行う一方で口腔顎顔面領域にて発生した疼痛や麻痺等の知覚異常に対する治療を行う診療科学である。近年、器質的な異常がないにもかかわらず消失しない治療抵抗性を示す慢性疼痛が増加しており、それは口腔顎顔面領域にも頻発する。長期間持続する疼痛は患者に精神的負担をかけ日常生活の質を著しく低下させることから新規治療薬および治療戦略の開発は急務となっている<sup>1,2</sup>。また歯科学は外科に偏重しているため、内科的な治療法を開発を目的とした基礎研究が少ないことも課題となっている。

三叉神経は口腔顎顔面領域の運動および知覚を司る第 5 脳神経である。歯科領域で発生する慢性疼痛として外傷性三叉神経ニューロパチー (Posttraumatic trigeminal neuropathy; PTTN) が挙げられ、これは慢性的な口腔顔面領域の知覚鈍麻、痛覚過敏またはその両方を伴う疾患である。近年の報告から抜歯術、インプラント埋入術などの歯科手術または口腔顎顔面領域の外傷により三叉神経を損傷した患者の 3-7% が PTTN を発症すること<sup>1</sup>、男性と比較し女性に頻発することが知られている<sup>3</sup>。PTTN は一般的に使用される非ステロイド性鎮痛薬やオピオイド性鎮痛薬等が奏功しないため発症後の治療は困難である<sup>4</sup>。一方 PTTN の発症リスクは手術法や術前レントゲン検査等により予測できるとされ、発症原因および機序が複雑な他の慢性疼痛との決定的な違いとなっている<sup>5</sup>。そのため PTTN に対しては予防的戦略が有効となる可能性が予想されるが、未だに有効な予防法は確立されていない。また動物モデルを使用した基礎研究を行う上で、高い刺激過敏性を持つ顔面領域に関する疼痛評価が困難であるため、他部位と比較し研究が進んでいない。

慢性疼痛の発症原因は多岐にわたるが、その一説として免疫細胞が関与しているという報告がなされている<sup>6</sup>。末梢の免疫細胞であるマクロファージは白血球の一種で細菌、ウイルス、壊死細胞を除去する食作用を有する。また抗原提示作用を持ち T 細胞を活性化し各種炎症性サイトカインの放出を促進することで局所炎症を惹起する<sup>7</sup>。中枢神経系の免疫細胞であるミクログリアは中枢神経系の恒常性維持に重要な役割を持つが過剰な活性化は神経炎症を惹起する<sup>8</sup>。これら免疫細胞の活性化が PTTN を含む慢性疼痛の病理学的所見となって

おり、その抑制が疼痛抑制効果を示す可能性がある。

以上より、本研究は口腔顔面領域にて発生する慢性疼痛である PTTN の予防法を確立するために、動物モデルを用いてその発症及び病態メカニズムを明らかにすることを目的とする。その詳細として、顔面領域の知覚神経を損傷することで慢性疼痛モデル動物を作製し、疼痛を行動試験で評価した。また病理学的変化として、神経損傷により末梢および中枢神経系にて生じた免疫細胞の活性化を免疫組織化学染色により解析した。さらに過去の報告より神経損傷時に漏出し慢性疼痛の原因となることが報告されている分子に着目し、予防的にその分子を阻害した際の疼痛様行動および病理学的変化に及ぼす影響を検討した。

## 第 1 章 雄性マウスを用いた外傷性三叉神経ニューロパチーモデルの確立と疼痛行動評価

### 第 1 項 緒言

齧歯類の末梢知覚神経を損傷することでその支配領域に慢性疼痛が生じることは広く知られている。そこで本章では、三叉神経第2枝の一枝である眼窩下神経を損傷することでその支配領域である口吻 (whisker pad) において慢性疼痛を発症させる遠位眼窩下神経慢性絞扼 (distal infraorbital nerve chronic constriction injury (dIoN-CCI)) モデルマウスの作製方法を確立することを目的とした。また PTTN 患者の症状として顔面領域の疼痛および温度刺激に対する知覚過敏性が挙げられることから、dIoN-CCI モデルマウスが本病態モデルとして妥当かを各種疼痛試験により評価した。

### 第 2 項 実験方法

#### 実験動物

雄性 ddY 系マウス (RRID: MGI: 5652658) は 日本エス エル シー株式会社 (静岡、日本) から購入し 7 週齢 (33–38 g) で手術を行った。マウスは、フィルターで換気された衛生的なバリアルームで 5 匹ずつ飼育され室温は  $22 \pm 2$  °C を、湿度は  $60 \pm 5\%$  を維持した。12 時間ごとに照明を点灯/消灯し (点灯時間 8:00 AM/消灯時間 8:00 PM) 自由に固形飼料 (standard rodent chow: オリエンタル酵母工業、大阪、日本) および飲料水を摂取させた。すべての動物実験は広島大学の実験動物科学研究施設委員会 (承認番号: A16-94) によって承認された後に、日本薬理学会によって確立された「Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals」に則して行った。

#### dIoN-CCI 手術

dIoN-CCI 手術は過去の報告に則して行った<sup>10</sup>。2% isoflurane および sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) を用いて麻酔を行った。マウス皮膚の消毒には 10% povidone iodine を、手術器具の消毒は 0.5% chlorhexidine を用いた。まず左眼と口吻 (whisker pad) 間の皮膚を 3–4 mm 切開し表層筋膜を剥離することで左側遠位眼窩下神経 (distal infraorbital nerve: dIoN) を露出させた。3-0 絹糸を用いて dIoN を緩く 2 回絞扼し 6-0 絹糸を用いて閉創した。偽手術群では dIoN の露出のみを行い閉創した。

#### 顔面毛繕い時間測定

疼痛を含む顔面領域の知覚異常を呈するマウスは顔面毛繕い時間が延長することが知られている<sup>11</sup>。各マウスを透明なプラスチック容器 (6×9×18 cm) に 3 分間静置し馴化さ

せた。その後 10 分間顔面毛繕い時間の秒数を測定した。顔面毛繕い時間はマウスが前肢で左顔面に触れている時間と定義した。顔面毛繕い時間の測定は、手術前、術後 7 日、術後 14 日に行った。

#### 冷刺激に対する過敏性の評価 (アセトンテスト)

高い揮発性をもつアセトンは滴下した部位を急速に冷却することから冷刺激に対する反応性を検討する際に用いられる<sup>12</sup>。各マウスを透明なプラスチック容器 (12×12×20 cm) に 15 分間静置し馴化させた。ピペットを用いてアセトン (15  $\mu$ l) を左口吻に滴下後 1 分間の反応時間を測定した。反応時間はマウスが肢で左顔面に触れている時間と定義した。アセトンテストは、術後 13 日に行った。

#### 鎮痛薬に対する嗜好性の評価 (条件付け場所嗜好性テスト)

マウスは投与薬物の効果による感情の変化を投与された場所と関連付けて記憶する。そのため特定の場所における鎮痛薬の投与は疼痛マウスに対し一時的な疼痛緩和による快を生じるため投与場所への嗜好性が生じる<sup>13</sup>。そこで、本研究では条件付け場所嗜好性テスト (Conditioned place preference (CPP) test) を間接的な疼痛指標として使用した。鎮痛薬としては、臨床および齧歯類で発生するニューロパシーに対して治療効果を示すことが知られている mirogabalin を用いた<sup>14</sup>。黒色で床面が滑らかな容器と白色で床面が粗い容器の異なる 2 つの材質からなる容器を含む CPP 容器 (15 × 24 × 30 cm、有限会社大功商会、広島、日本) を使用した<sup>15</sup>。また、2 つの容器は着脱可能な遮蔽板によって仕切った。CPP テストは pre-condition test (Day 9), conditioning (Day 10-13), post-conditioned test (Day 14) の 3 工程で行った (図 2A)。まず pre-condition test では遮蔽板を撤去し 2 つの容器を自由に行き来できる CPP 容器に各マウスを 15 分間静置し、それぞれの容器への滞在時間を測定した。次に conditioning では各マウスに mirogabalin (2 mg/kg in saline, i.p.; 第一三共株式会社、東京、日本) を投与し pre-condition test で、より滞在時間の短かった容器に 45 分間静置した。もしくは生理食塩水を投与し、先ほどと異なる容器に静置した。以上の操作を各マウス 1 日に 2 回、8 時間間隔で行った。Post-conditioning test は pre-conditioning test と同様の操作を行った。Pre-conditioning test および post-conditioning test で計測されたそれぞれの mirogabalin 投与容器滞在時間を比較検討した。CPP score は (Post-conditioning test での mirogabalin 投与容器滞在時間 (秒) - pre-conditioning test での mirogabalin 投与容器滞在時間 (秒)) で算出した。Pre-conditioning test で片方の容器に 720 秒以上滞在したマウスは除外した。

## 統計解析

統計解析は Prism 7.0e (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を用いて行った。データは平均値±標準誤差で示した。外れ値検定として ROUT test (Q = 10%) を用いた。正規分布は D'Agostino & Pearson for experiments で検定した。dIoN-CCI 群および偽手術群の比較は unpaired *t* test で行った。CPP test の結果は two-way repeated measures (RM) analysis of variance (ANOVA) および one-sample *t* test<sup>16</sup> を用いて解析した。

## 第3項 結果

術後7日、14日における顔面毛繕い時間は、偽手術群と比較し dIoN-CCI 群において有意に増加した。一方で手術前は両群に差はなかった (図1A)。また術後13日におけるアセトン滴下に対する反応時間も偽手術群と比較し dIoN-CCI 群において有意に増加した (図1B)。マウス顔面へ室温の水を滴下してもアセトンで見られた反応は確認できなかった(図不記載)

dIoN-CCI モデルマウスにおいて mirogabalin 投与容器の滞在時間は薬物投与前の結果と比較し、薬物投与後の結果で有意に増加した。一方で偽手術群では変化しなかった (図2B)。CPP score は dIoN-CCI マウスにおいてベースラインと比較し有意に増加した。一方で偽手術群では変化しなかった (図2C)。

## 第4項 考察

口腔顔面領域における疼痛評価の困難さとして、元々の知覚過敏性の高さが挙げられる。器具を使用して顔面領域に機械的刺激を与える際はマウスの拘束や麻酔薬での鎮静を併用することもあり、それらは疼痛行動の正確な評価の妨げとなる可能性が考えられる。一方、顔面毛繕い時間の測定は器具を使用しない自発的な行動指標であるため、客観的な指標であるといえる<sup>11</sup>。また冷刺激は飲水、洗顔等の日常生活で頻繁に顔面領域に生じる刺激であり、PTTN患者のQOLの妨げになっていることを鑑みて、本研究ではアセトンテストを併用した。さらにマウス顔面への室温の水を滴下することではアセトン滴下時と同様の反応が見られなかったことから、アセトンテストは冷刺激に対する過敏性を測定できていると考えられる。本研究結果より、眼窩下神経を損傷することで感覚異常および温度過敏性を含む臨床と同様の PTTN 症状を模倣した動物モデルを作製できたと考えられる。以上の症状は術後14日以上継続していることから、急性痛とは異なる機序で疼痛が生じていると考えられる<sup>17,18</sup>。さらに、本研究では疼痛症状の有無を間接的に評価する行動試験として CPP テストを採用した。神経障害性疼痛モデル動物は gabapentinoid (pregabalin, mirogabalin など) に対して嗜好性を示すことが知られている<sup>13,19,20</sup>。本研究において dIoN-CCI マウスのみ mirogabalin に

対する嗜好性を示したことから、顔面感覚異常は疼痛を含んでいることが示唆された。以上の結果より、dIoN-CCI モデルマウスは PTTN モデル動物として妥当であり、さらに顔面毛繕い時間およびアセトンへの反応時間は PTTN による疼痛の評価に使用できると考えられる。

また本研究で用いた mirogabalin は臨床において有効であることが多いが、服用患者は傾眠や意識障害等の副作用により日常生活に支障が生じ、特に高齢者ではふらつきによる転倒骨折が問題となっている。また一時的な疼痛緩和効果しか得られないうえ、一日 3 回程度、長期にわたり服用する必要があるため経済的負担も大きい<sup>21</sup>。以上より現段階の治療戦略は十分といえず、新規治療薬および予防薬の開発が必要であると考ええる。



## 第 2 章 雄性マウスの免疫細胞に対する dIoN-CCI 手術による影響

### 第 1 項 緒言

慢性疼痛の発症および維持には、異常活性化した免疫細胞が関与していることが報告されている<sup>22</sup>。坐骨神経損傷モデル動物では損傷坐骨神経周囲にマクロファージが集積すること、その集積が疼痛行動に関与していることが示唆されている<sup>23</sup>。また三叉神経損傷モデル動物では、三叉神経の中枢投射部位の一つである三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Spinal trigeminal nucleus caudalis: Sp5C) において中枢の免疫細胞であるミクログリアが活性化していることも報告されている<sup>9,24</sup>。静止状態のミクログリアは小型の細胞体に多数の分枝を有した形態を呈する (ラミファイド型) が、神経損傷などの刺激により活性化することで数および細胞体積の増加、突起の収縮等形態的变化が生じる (アメボイド型)<sup>25</sup>。以上より、PTTN 発症原因としての損傷三叉神経周囲のマクロファージならびに Sp5C におけるミクログリアの病理学的変化が、病態の評価基準になり得ると考えた。そこで、dIoN-CCI マウスから眼窩下神経 (Infraorbital nerve: IoN) および Sp5C の組織切片を作製し、免疫組織化学染色法により IoN 周囲マクロファージの集積と Sp5C ミクログリアの細胞数および細胞体積変化を評価した。

### 第 2 項 実験材料及び方法

#### 実験動物

第 1 章に準じた。

#### 免疫組織化学染色

損傷神経である IoN の周囲におけるマクロファージ集積密度および三叉神経と知覚領域の中継点で延髄に存在する Sp5C におけるミクログリア数および細胞体積を免疫組織化学染色で検討した。マウスを 2% isoflurane および sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p) で麻酔し、saline (50 mL) および 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) に溶解した 4% (w/v) paraformaldehyde (25 mL) を左心室より灌流することにより、組織を固定化した。マウス IoN 及び Sp5C を含む脳組織を摘出し、2 日間 4 °C において上記の固定液により浸漬固定を行った後に、0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) に溶解した 30% (w/v) sucrose を用いて 2 日間 4 °C で脱水処理を行った。各組織は Shandon M-1 Embedding Matrix™ (Catalog # 1310TS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) にて包埋し、液体窒素で凍結させた後に、クリオスタットで 30 μm の厚さに組織切片を切削しスライドガラスに貼付した。作製した組織切片を phosphate-buffered saline により洗浄後、10% goat serum、3% bovine serum

albumin、0.1% Triton X、0.05% Tween-20を含む phosphate-buffered saline を用いて、2 時間室温でブロッキングおよび組織透過処理を行った。一次抗体には rabbit polyclonal anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1: マクロファージおよびミクログリアマーカー) antibody (Catalog # 019-19741; RRID: AB\_839504; 1:500; 富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本)もしくは goat polyclonal anti-Iba1 antibody (Catalog # 011-27991; RRID: AB\_10982846; 1:500; 富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本)と rabbit polyclonal anti-transmembrane protein 119 (TMEM119) antibody (Catalog #90840; 1:200; Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA) を使用し、4 °C において 2 日間の免疫反応を行なった。その後、Alexa Fluor® 555 (Catalog # A21429; 1:500; Thermo Fisher Scientific)および Alexa Fluor® 488 (Catalog # A11029; 1:500; Thermo Fisher Scientific)により標識した二次抗体) を用い、4 °C において 2 時間の免疫反応を行った。その後、phosphate-buffered saline で洗浄し、カバーガラスで包埋した。切片は、BZ-9000 Bioevo all-in-one fluorescence microscope (Keyence, Elmwood Park, NJ, USA)を用いて観察・解析した。ミクログリアの細胞体積は 3D morph スクリプトを使用して検討した<sup>26</sup>。簡潔に述べると、得られた RGB 画像をグレースケールに変換しその細胞体積を評価した。各群 3 匹のマウスを使用した。

#### 統計解析

統計解析は Prism 7.0e (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を用いて行った。データは平均値±標準誤差で示した。外れ値検定として ROUT test (Q = 10%) を用いた。正規分布は Shapiro–Wilk normality で検定した。dIoN-CCI 群および偽手術群の比較は unpaired *t* testで行った。

#### 第 3 項 結果

dIoN-CCI 手術後 3 日より IoN 周囲のマクロファージ集積が見られ術後 14 日まで継続したが、偽手術群では集積は見られなかった (図. 3A)。また術後 14 日においてマクロファージ集積の基準となる Iba1 蛍光強度は dIoN-CCI マウスでは偽手術群と比較して有意に増加した (図. 3B)。

dIoN-CCI 手術後 3 日より手術側 Sp5C ミクログリア体積増加が見られ、術後 14 日まで継続したが偽手術群では変化は見られなかった (図. 4A)。また術後 14 日において dIoNCCI マウスでは偽手術群と比較して Sp5C ミクログリア細胞数 (図 4B) および細胞体積 (図 4C) は有意に増加した。

また dIoN-CCI 手術 14 日後のマウス Sp5C および IoN を用いた免疫組織化学染色において、Sp5C では Iba1 陽性細胞および TMEM119 陽性細胞が確認されたが IoN におい

では Iba1 陽性細胞のみ確認され、TMEM119 陽性細胞は確認されなかった。(図. 5)

#### 第4項 考察

末梢神経傷害により増加したミクログリアが、慢性疼痛の発症および維持に重要な役割を果たしているという文献は多数存在する<sup>27</sup>。Gu 氏らは坐骨神経損傷により生じた脊髄ミクログリア数の増加を抑制することで、機械的および温度刺激に対する過敏性が減弱したことを報告している<sup>28</sup>。さらに活性化ミクログリアは、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 、interleukin (IL)-1 $\beta$ 、IL-6 等の炎症性サイトカインを放出することで中枢神経系の炎症を惹起する<sup>29</sup>。また三叉神経の枝である下歯槽神経損傷モデル動物で生じる疼痛様行動は、ミクログリア阻害薬 minocycline によって減弱することが報告されている<sup>24</sup>。疼痛行動を有する本モデルにおいても、損傷神経である IoN 周囲のマクロファージ集積および中枢の Sp5C におけるミクログリアの量的、形態学的変化が見られた。三叉神経の損傷により末梢のみならず中枢においても免疫細胞の活性化による炎症が生じたことが示唆された。一方末梢神経傷害による中枢ミクログリアの活性化機構については不明な点が多い。過去、末梢神経損傷により集積したマクロファージが神経炎症を惹起し、マクロファージ抑制剤である minocycline がその集積及び炎症性サイトカイン放出を抑制したと報告されている<sup>30</sup>。また末梢神経への持続的な刺激がミクログリアを活性化させ中枢の神経炎症に起因した疼痛を引き起こすことが報告されている<sup>31</sup>。以上より、PTTN 病態においても三叉神経傷害により集積したマクロファージが炎症性サイトカイン等を放出し、それらが神経を持続的に刺激することによりミクログリアが活性化される可能性が考えられる。さらにミクログリア特異的マーカーを使用した検討から Sp5C における Iba1 陽性細胞のみがミクログリアであると考えられる。今後はマクロファージ特異的なマーカーを使用した検討により末梢 Iba1 陽性細胞の細胞種を同定する必要がある。

以上より、PTTN 症状の発症および維持にマクロファージおよびミクログリアが関与していることに加え、これら免疫細胞の活性化が PTTN 発症の評価に使用できることを示唆している。

### 第 3 章 High mobility group box 1 に着目した

#### 雌雄両マウスの外傷性三叉神経ニューロパチー予防法の確立と評価

##### 第 1 項 緒言

High mobility group box-1 (HMGB1) は、ほとんどの細胞に発現する非ヒストン性タンパク質であり、核内において遺伝子の転写調節に関与する<sup>32</sup>。一方で、HMGB1 は傷害細胞から漏出、もしくは活性化した免疫細胞から放出されることにより、細胞外では炎症の増悪に関与するアラミン/ダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns; DAMPs) としても機能する<sup>33</sup>。過去の報告によると、HMGB1 は toll-like receptor 4 (TLR4)、receptor for advanced glycation end-products (RAGE)、C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) を介して神経炎症を惹起することで、アルツハイマー型認知症、パーキンソン病、脳卒中等の神経変性疾患の進行に寄与する<sup>34</sup>。一方、末梢神経系に着目すると、坐骨神経損傷モデル動物で発症する疼痛様行動に、神経損傷部位から漏出した HMGB1 が重要な役割を果たしていることが報告されている<sup>35,23</sup>。以上より、三叉神経の損傷が発症起因となる PTTN の発症においても、損傷した IoN 周囲から漏出した HMGB1 が関与している可能性が考えられる。そこで PTTN と HMGB1 の関与を明らかにするため dIoN-CCI マウスに対し HMGB1 機能を阻害する HMGB1 中和抗体 (HMGB1 nAb) を神経絞扼前および免疫細胞の活性化が認められた 2 日後に局所投与した。その後、偽手術群と比較して最も差が顕著であった術後 7 日における顔面毛繕い時間、術後 13 日の冷刺激に対する過敏性、術後 14 日における免疫細胞の活性化を評価することで HMGB1 中和抗体の PTTN 予防効果を検討した。

また、PTTN を含む慢性疼痛の患者数には性別差が存在し、男性と比較し女性に多いことが報告されている<sup>33,36,37,38</sup>。さらに動物実験において、疼痛発症および維持メカニズムに性別差が存在することも報告されている<sup>39</sup>。以上より、雌雄両マウスを用いて、本予防法の有効性を解析した。

##### 第 2 項 実験方法

###### 実験動物

雄性 ddY 系マウスおよび雌性 ddY 系マウス (25-32 g) を使用した。他の条件は第 1 章に準じた。

###### 顔面毛繕い時間測定

第一章に準じた

冷刺激に対する過敏性の評価

第一章に準じた

免疫組織化学染色

第二章に準じた

薬物投与

HMGB1 中和抗体<sup>40</sup> (antibody no. 10-22, subclass IgG2a; antibody no. 4-1, subclass IgG2a, 100 ng, 10  $\mu$ L, 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 西堀 正洋教授) または同量の control IgG (rat subclass IgG2a; anti-keyhole limpet hemocyanin, 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 西堀 正洋教授) を dIoN-CCI 手術中に直接 IoN にマイクロピペットを用いて投与した。さらに dIoN-CCI 手術 2 日後に 2% isoflurane を使用して麻酔し HMGB1 nAb (100 ng, 50  $\mu$ L) もしくは同量の control IgG を dIoN 周囲に 1 ml シリンジを用いて局所投与した。

統計解析

統計解析は Prism 7.0e (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を用いて行った。データは平均  $\pm$  標準誤差として示した。外れ値検定として ROUT test (Q = 10%) を用いた。正規分布は顔面毛繕い時間の測定および冷刺激に対する過敏性は D'Agostino & Pearson for experiments を Sp5C においてミクログリア細胞体積の検討では Shapiro-Wilk normality で検定した。各群の比較は two-way ANOVA を用いて解析した。統計的な有意差は P 値 0.05 以下として検出した。

第 3 項 結果

雄性マウスにおいて dIoN-CCI 手術によって増加した顔面毛繕い時間およびアセトンへの過敏性は HMGB1 nAb の予防的局所投与により有意に減弱した (図 6BC)。また dIoN-CCI 手術によって見られた Sp5C ミクログリア細胞数および体積の増加は HMGB1 中和抗体の予防的局所投与により有意に減弱した (図. 6D-F)。さらに dIoN-CCI 手術によって見られた IoN 周囲マクロファージの集積も HMGB1 中和抗体の予防的局所投与により有意に減弱した。(図 7AB)

雌性マウスにおいて dIoN-CCI 手術時に control IgG を投与した群は偽手術時に control IgG を投与した群と比較して顔面毛繕い時間およびアセトンへの過敏性は有意に増加した。

一方、HMGB1 中和抗体の予防的局所投与はアセトンへの過敏性を有意に減弱させたが顔面毛繕い時間を変化させなかった(図 8AB)。さらに dIloN-CCI 手術時に control IgG を投与した群は偽手術時に control IgG を投与した群と比較して Sp5C ミクログリア数および細胞体積も有意に増加した。さらに HMGB1 中和抗体の局所投与はミクログリア細胞体積を有意に減弱させたが細胞数は変化させなかった (Fig. 8C-E)。

#### 第 4 項 考察

HMGB1 機能を阻害する HMGB1 中和抗体の予防的局所投与が疼痛様行動および免疫細胞の活性化を減弱したことから、PTTN の発症に細胞外 HMGB1 が関与していることが示唆された。細胞外 HMGB1 が、化学療法誘発性疼痛や糖尿病性疼痛を含む神経障害性疼痛を惹起することは多数報告されている<sup>41</sup>。中枢 HMGB1 と顔面慢性疼痛の関与を示す報告として、近年 Hu 氏らは眼窩下神経切断モデルマウスの延髄において HMGB1 発現が増強しており、さらに HMGB1 中和抗体の脳室内投与が疼痛行動を減弱したことを示している<sup>9</sup>。一方、末梢 HMGB1 と顔面疼痛である PTTN の関与を示す報告は未だ存在しない。本研究では HMGB1 中和抗体の予防的局所投与が PTTN モデルマウスの疼痛様行動および免疫細胞の活性化を減弱させたことから、神経周囲組織の損傷により傷害細胞から漏出または活性化した免疫細胞から放出された末梢 HMGB1 も PTTN 発症に関与する可能性が示唆された。また HMGB1 中和抗体の局所投与により損傷三叉神経周囲へのマクロファージ集積が減弱していたことから、HMGB1 の疼痛促進効果は損傷神経周囲マクロファージを介している可能性がある。しかし PTTN 発症に関与する細胞外 HMGB1 がどの細胞に由来しているのかについては、いまだ不明である。過去の報告より脱髄が生じる多発性硬化症では慢性疼痛が発生することが知られている<sup>42</sup>。また神経髄鞘の構成要素であるシュワン細胞の破壊による細胞内分子の漏出が、慢性疼痛を惹起することも報告されている<sup>43</sup>。以上より本モデルマウスにおいても神経損傷に伴う脱髄、つまりシュワン細胞の傷害により漏出した HMGB1 が、PTTN 症状の発症に関与している可能性も考えられる。

雌性マウスに対する HMGB1 中和抗体の予防的局所投与は、アセトンへの過敏性のみ減弱し、顔面毛繕い時間は変化させなかった。雌性マウスと比較し、雄性マウスにおいては、特に末梢 HMGB1 が PTTN 発症に関与している可能性がある。一方で、顔面毛繕い時間はストレスや不安によっても増大することが知られているため、ストレス感受性の高い雌性マウスでは顔面毛繕い時間が増加しやすいため、HMGB1 中和抗体の効果が得られなかった可能性も考えられる<sup>44,45</sup>。また雌性マウスと比較し、ミクログリア数の増加は雄性マウスで顕著であった<sup>46</sup>。これらの結果は末梢神経傷害により生じるミクログリア数の増加および形態変化には性別差が認められるという過去の報告と矛盾しない<sup>47,48,49</sup>。また野生型の雌性マウスは雄

性と比較しミクログリア数が多く、雌性動物のミクログリア数を減弱しても疼痛行動が変化しないことが知られている<sup>46,39</sup>。本研究では、雌性マウスに対しても HMGB1 中和抗体の予防的局所投与が雄性マウスと比較して弱いながらも効果を示したことから、今後雌性マウスにおける PTTN 発症と HMGB1 の関与についてさらなる検討が必要である。

## 総括および結論

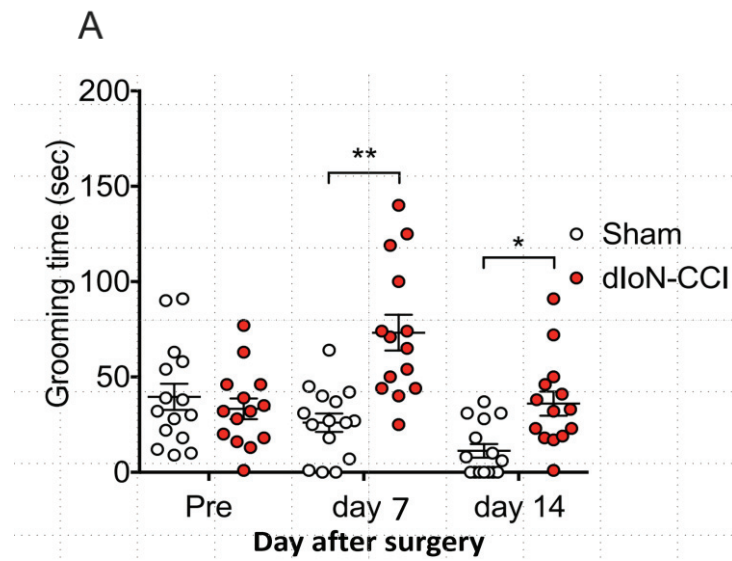
顔面疼痛研究の難点として疼痛評価の困難さが挙げられる。顔面領域は通常状態でも高い知覚過敏性を持つため、動物モデルの行動評価には器具による拘束や鎮静を併用する場合がある。本研究では過去の報告を参考にし、dIoN-CCI モデルマウスの顔面毛繕い時間、冷刺激に対する反応性、鎮痛薬に対する嗜好性をそれぞれ検討することで客観性の高い行動学的評価を行うことができた。また病理学的変化として IoN 周囲のマクロファージ集積および Sp5c におけるミクログリア活性化が認められたことは、過去の報告と矛盾しない。以上より PTTN モデル動物の作製および疼痛行動の評価系は確立できたといえる。今後はさらに詳細な PTTN 病態を検討するため、IoN 周囲および Sp5C における炎症性サイトカイン発現の変化や、神経損傷後の末梢および中枢の神経生理学的変化を電気生理学的手法などを用いて評価する必要がある。

また HMGB1 中和抗体の予防的局所投与が、これら疼痛様行動および免疫細胞の活性化を減弱したことから、PTTN 症状に対する HMGB1 の関与および HMGB1 を標的とした疼痛の予防という新規治療戦略の可能性が示唆された。しかしマクロファージおよびミクログリアの変化が、疼痛行動に直接関与しているかは不明である。今後は、マクロファージ枯渇薬 clodronate や、マクロファージおよびミクログリア阻害薬 minocycline を投与したモデルマウスを用いた検討が必要である。さらに細胞外 HMGB1 は、炎症および疼痛の惹起のみならず、遺伝子の転写調節など多機能を有することが知られているため、臨床応用を考慮した場合、HMGB1 の阻害は安全性の問題が生じる可能性がある。よって、今後は HMGB1 nAb が作用する細胞種、および HMGB1 が作用する責任受容体を同定し、より特異性の高い HMGB1 阻害薬を創製していく必要がある。また HMGB1 nAb の効果に若干の性別差が存在した。慢性疼痛は女性に頻発することが知られている。よって、HMGB1 の性ホルモンとの相互作用など、その関連性についてさらなる検討を行い、性別差が及ぼす疼痛伝達機序への影響を明らかにするとともに、両性別に対応した治療法を確立していく必要がある。

本研究において、PTTN を模倣した dIoN-CCI マウスで生じた疼痛様行動および免疫細胞の活性化は、IoN 周囲における HMGB1 機能の阻害により減弱したことから、PTTN 発症に損傷三叉神経周囲の HMGB1 が関与することが明らかとなった。また本研究結果により、PTTN 高リスク患者の神経損傷前に末梢 HMGB1 機能を阻害することが、予防的観点に基づいた新たな治療戦略になる可能性が示唆された。(図 9)



図表



B

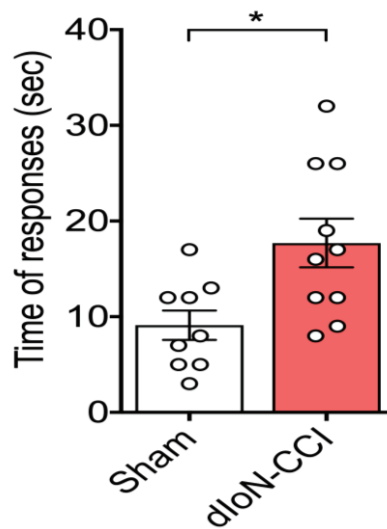


図1 雄性 dIoN-CCI モデルマウスの疼痛様行動

(A)顔面毛繕い秒数 (n = 9-10/group) はdIoN-CCI手術前、手術後 7,14日 および 13 日にそれぞれ測定した。

(B) アセトンへの反応秒数 (n = 9-10/group) はdIoN-CCI手術後13日にそれぞれ測定した。データは平均±標準誤差として示した。偽手術群と比較し\*p < 0.05 また\*\*p < 0.01 (unpaired t test)。

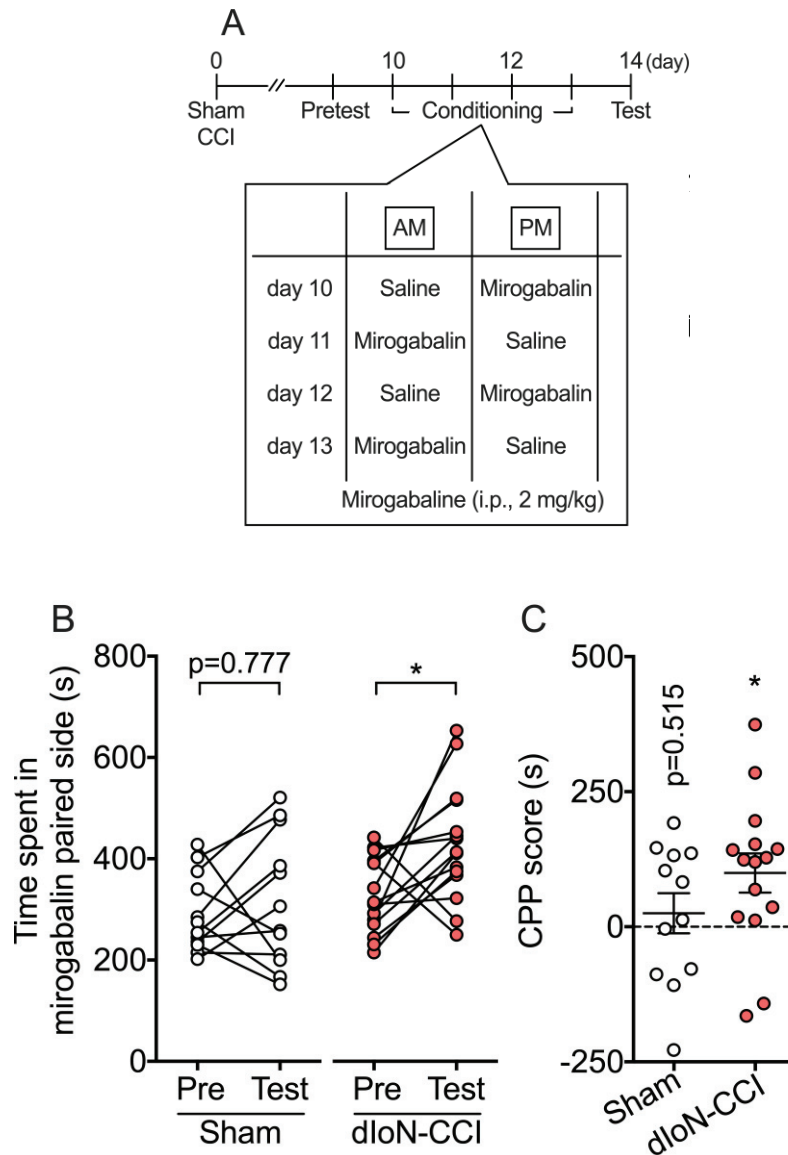


図2 雄性 dIoN-CCI マウスの鎮痛薬嗜好性

(A) 実験スケジュールを示した。

(B) 偽手術群(n = 12)および dIoN-CCI 群(n = 15)の pre-conditioning test 時 (pre) および post-conditioning test 時(test)における mirogabalin 投与容器滞在時間を測定した。データは平均±標準誤差として示した。Pre の結果と比較し\* $p < 0.05$  (two-way RM ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test)。

(C) 偽手術群(n = 12)および dIoN-CCI 群(n = 15)の CPP スコアを算出した。データは平均±標準誤差として示した。ベースライン(0)と比較し\* $p < 0.05$  (One sample *t*-test)。

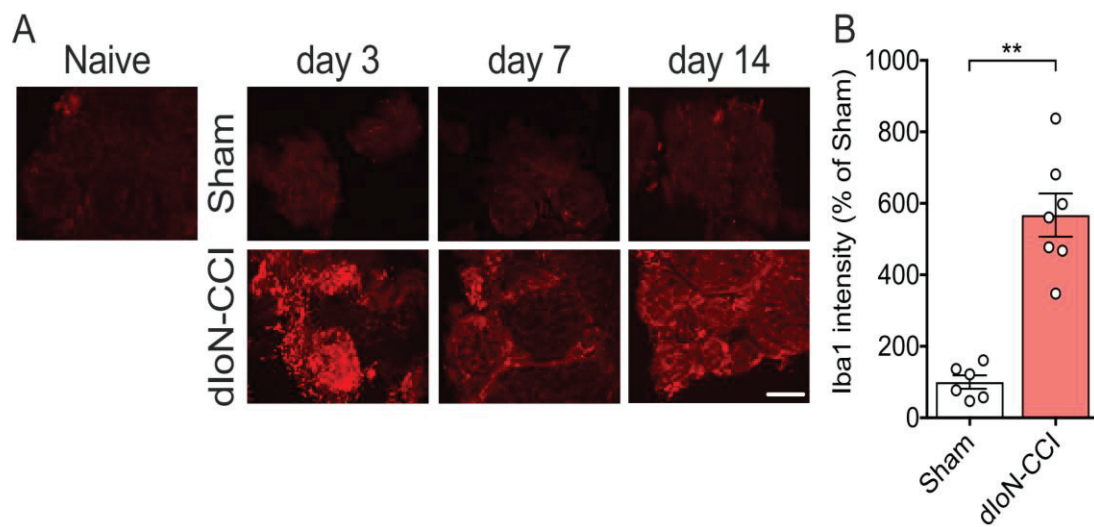


図3 雄性 dIloN-CCI マウスの IoN 周囲マクロファージ

(A) 健常マウス、偽手術マウス、dIloN-CCI マウスの手術側 IoN に対しマクロファージマーカーである抗 Iba1 抗体を用いて術後 3, 7, 14 日に免疫組織化学染色を行った。(スケールバー = 50 $\mu$ m)

(B) 術後 14 日における Iba1 蛍光強度を定量化した。データは平均 $\pm$ 標準誤差として示した。偽手術群と比較し\*\* $p < 0.01$  (unpaired  $t$  test)。

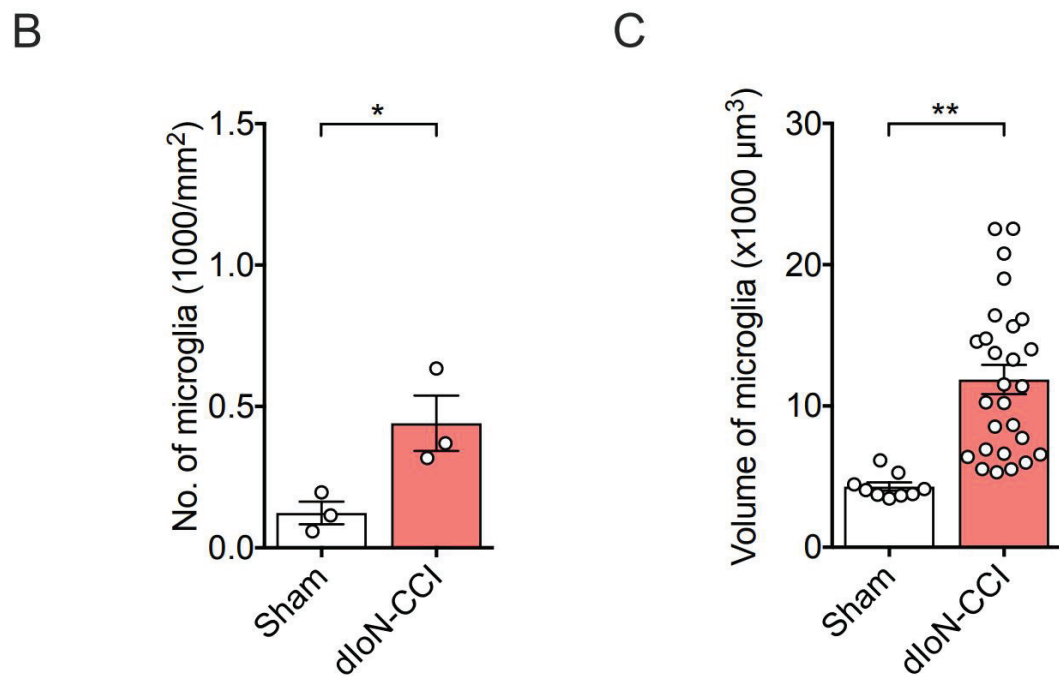
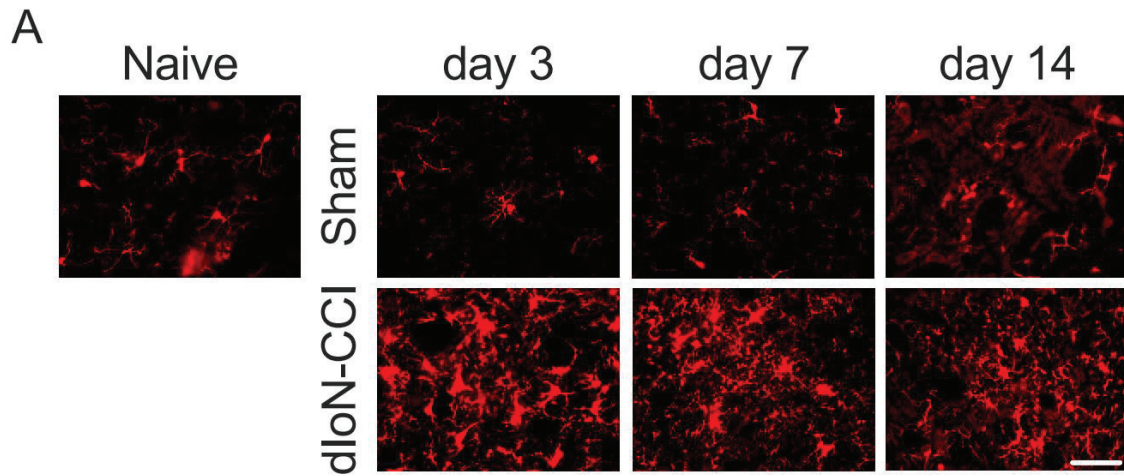
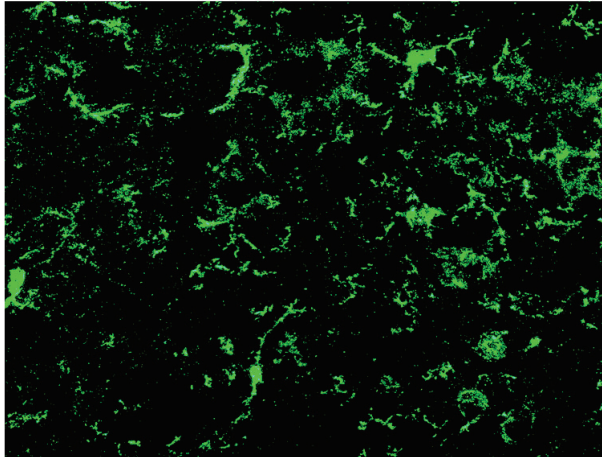


図 4 雄性 dIoN-CCI マウスの Sp5C ミクログリア

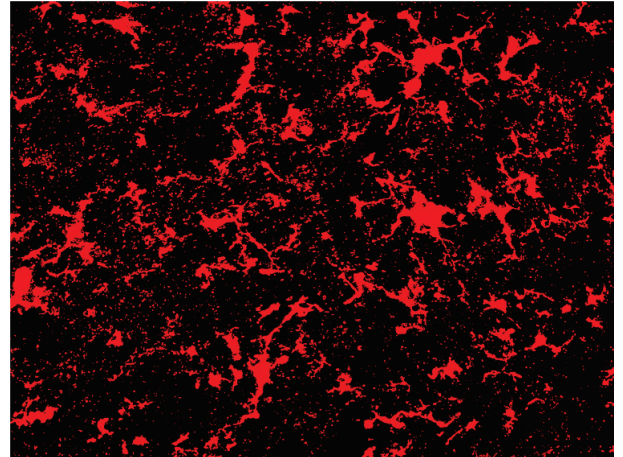
(A) 健常マウス、偽手術マウス、dIoN-CCI マウスの手術側 Sp5C に対しミクログリアマーカーである抗 Iba1 抗体を用いて術後 3, 7, 14 日に免疫組織化学染色を行った(スケールバー = 50 μm)。術後 14 日における Sp5C ミクログリアの平均密度 (number/mm<sup>2</sup>) (B) および細胞体積 (C) を定量化した。データは平均±標準誤差として示した。偽手術群と比較し\*\*p < 0.01 (unpaired *t* test)。

**Sp5C**

**Iba1**

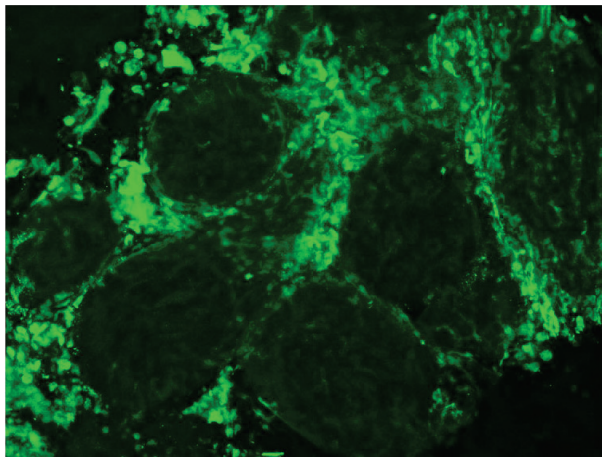


**TMEM119**



**IoN**

**Iba1**



**TMEM119**

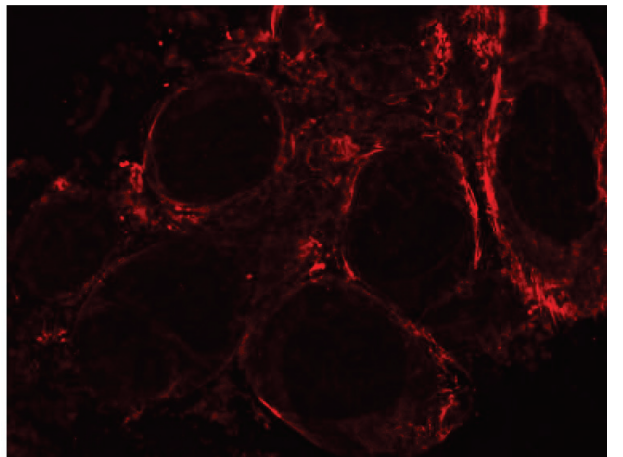


図 5 雄性 dIoN-CCI マウスの Sp5C および IoN の細胞種同定

dIoN-CCI マウスの手術側 Sp5C に対しマイクログリアおよびマクローフェージマーカーである抗 Iba1 抗体とマイクログリア特異的マーカーである TMEM119 を用いて術後 14 日に免疫組織化学染色を行った。(n=1 統計なし)

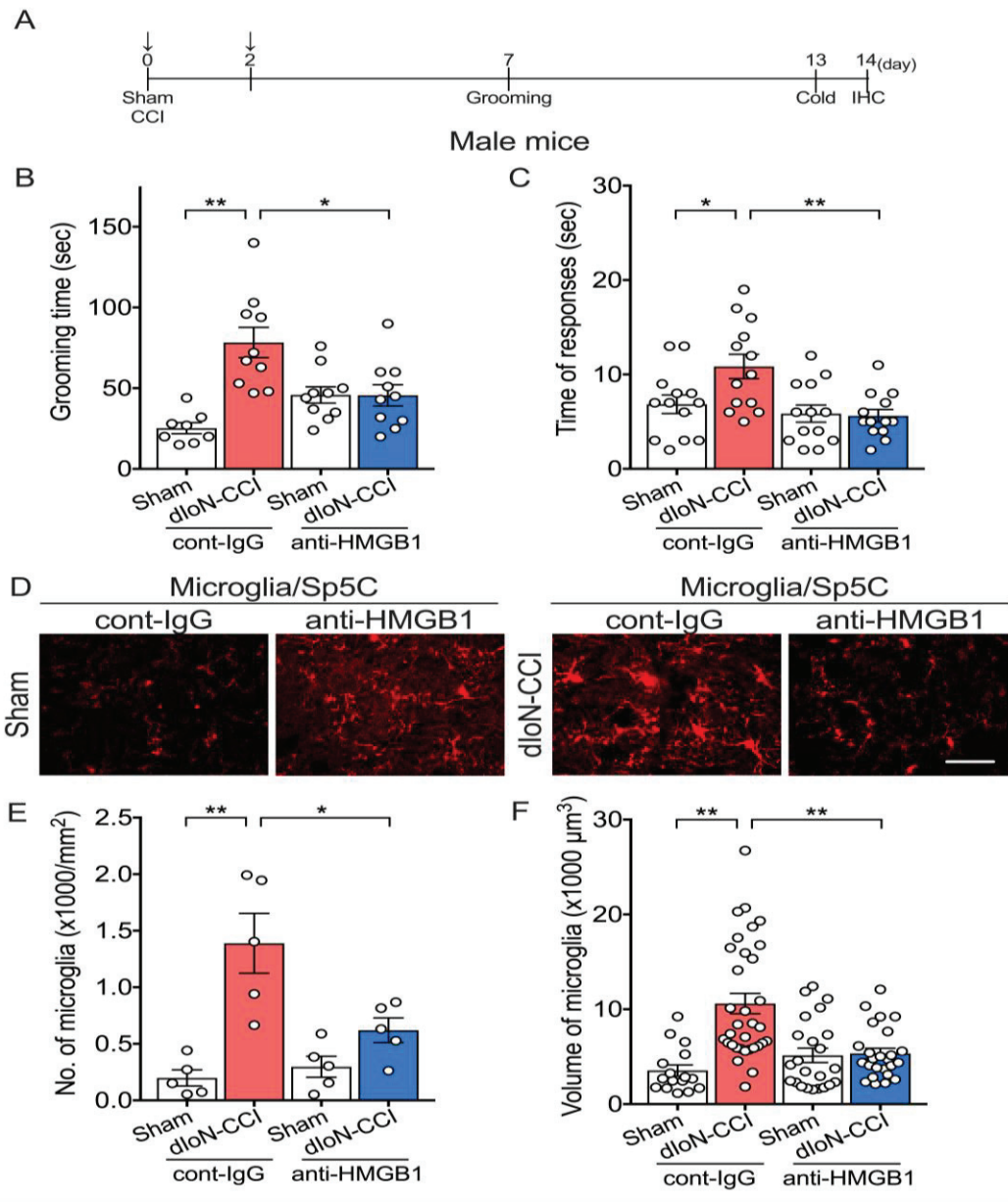


図 6 雄性 IoN-CCI マウスに対する HMGB1 中和抗体の予防的局所投与

(A)実験スケジュールを示した。抗体(100 ng)は神経損傷直後および手術後2日の2回投与した。矢印は control IgG もしくは HMGB1 中和抗体を投与した日数を示した。

(B) 顔面毛繕い時間(n = 8-10) および (C) アセトンへの反応時間(n = 13) は術後7日および13日にそれぞれ測定した。(D) 術後14日における Sp5C ミクログリアを示した(スケールバー = 50 μm)。(E) 密度(数/mm<sup>2</sup>) (n = 5 mice)および (F) 細胞体積 (n= 3 mice) を定量化した。データは平均±標準誤差として示した。各群と比較して\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test).

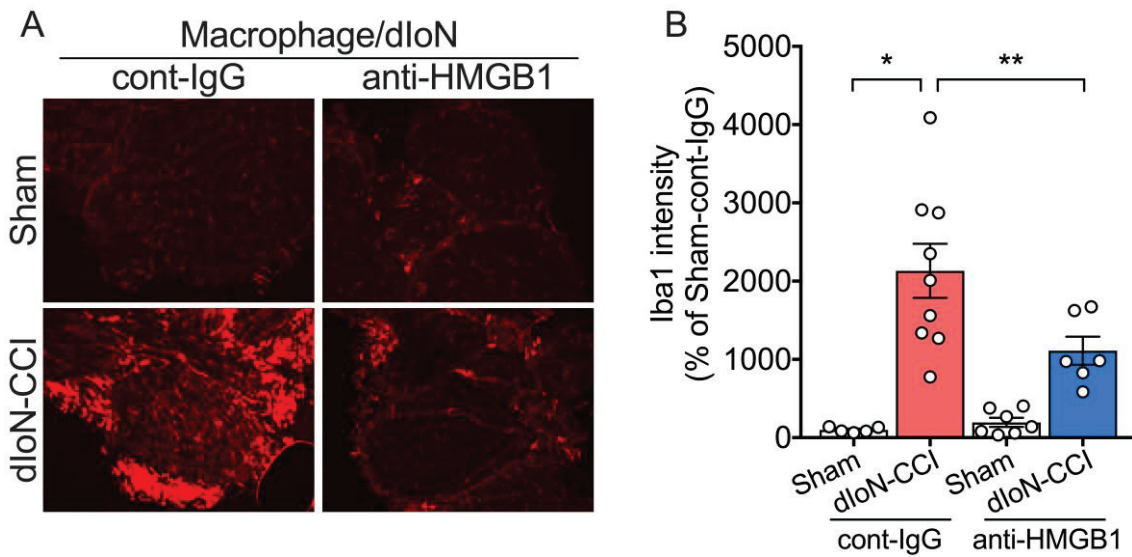


図7 雄性 dIoN-CCI マウス IoN 周囲マクロファージに対する HMGB1 中和抗体の効果

(A)偽手術マウス、dIoN-CCI マウスにそれぞれ Control IgG もしくは HMGB1 中和抗体を投与し、術後 14 日に手術側 IoN を採取した。その後マクロファージマーカーである抗 Iba1 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。

(B) 術後 14 日における Iba1 蛍光強度を定量化した。データは平均±標準誤差として示した。各群と比較して\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test).

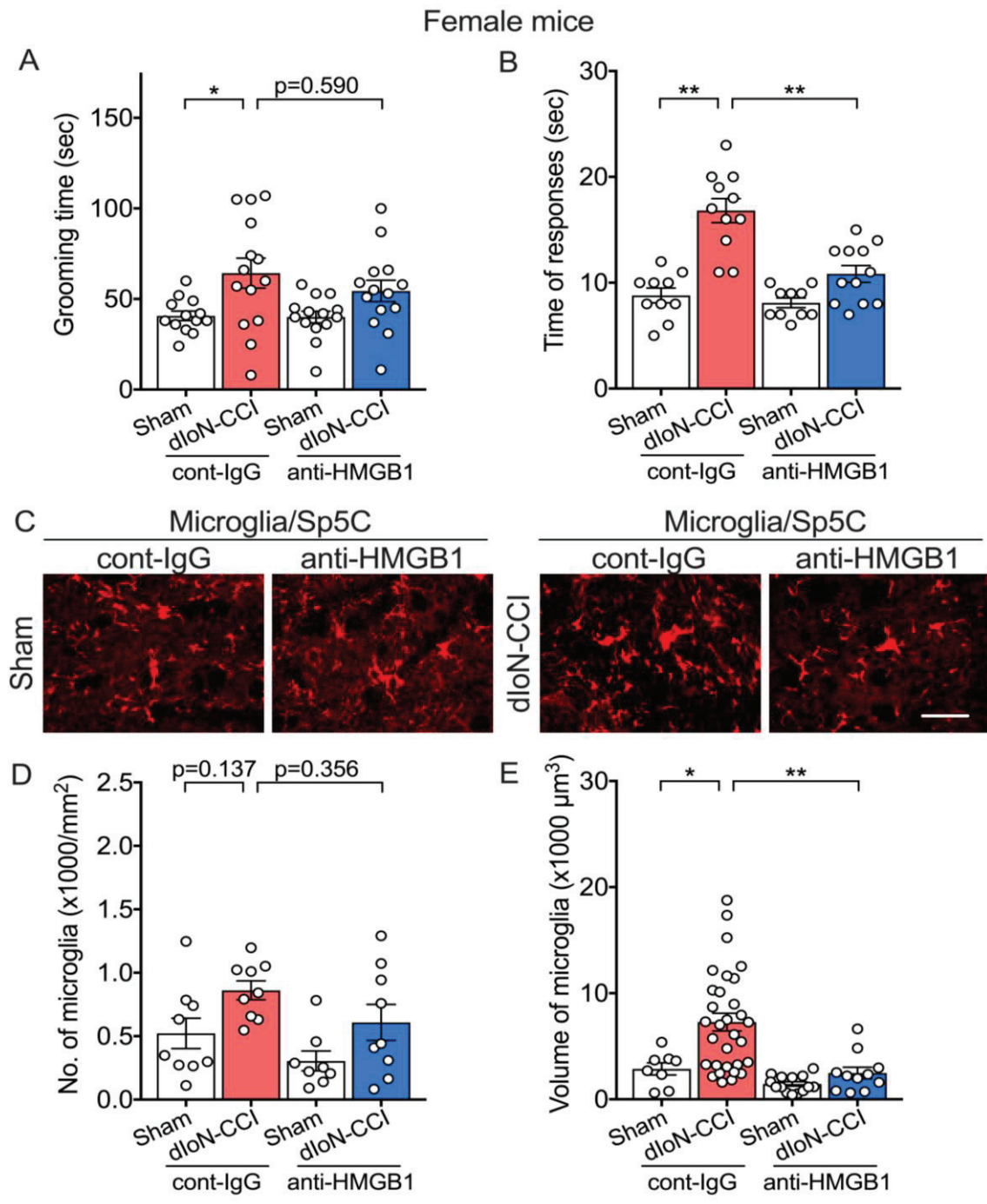


図 8. 雌性 dIOn-CCI マウスに対する HMGB1 中和抗体の予防的局所投与

(A) 顔面毛繕い時間(n = 13) および (B) アセトンへの反応時間(n = 10) は術後 7 日および 13 日にそれぞれ測定した。(C) 術後 14 日における Sp5C ミクログリアを示した(スケールバー = 50 μm)。(D) 密度(数/mm<sup>2</sup>) (n = 5 mice)および (E) 細胞体積 (n = 3 mice) を定量化した。データは平均 ± 標準誤差として示した。各群と比較して \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test).



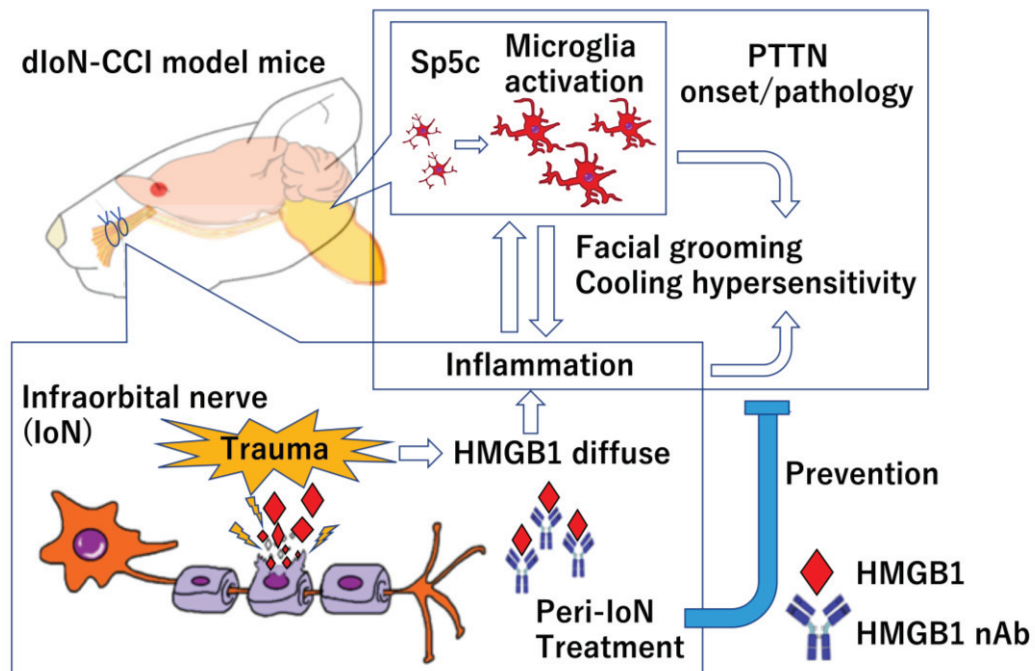


図 9. 三叉神経ニューロパチー発症の HMGB1 依存的メカニズム

マウス三叉神経末梢端の傷害は疼痛行動および損傷神経周囲へのマクロファージ集積および延髄 Sp5c におけるミクログリアの細胞数・細胞体積の増大を引き起こす。これら免疫細胞の異常活性化が長期間持続する疼痛を引き起こす可能性がある。

損傷神経周囲の HMGB1 機能を阻害することにより、疼痛行動が減弱することに加え、末梢マクロファージおよび中枢ミクログリアの病理学的変化を抑制する。

以上の結果は末梢 HMGB1 の阻害がマクロファージの集積およびそれに引き続く末梢神経活性化を減弱することで PTTN 予防効果を示す可能性を示唆している。

## 引用文献

1. Nasri-Heir, C. *et al.* Altered pain modulation in patients with persistent postendodontic pain. *Pain* **Oct**, 2032–41 (2015).
2. Yang, S. E., Park, Y. G., Han, K., Min, J. A. & Kim, S. Y. Dental pain related to quality of life and mental health in South Korean adults. *Psychol. Heal. Med.* **Dec**, 981–92 (2016).
3. De Poortere, A., Van der Cruyssen, F. & Politis, C. The benefit of surgical management in post-traumatic trigeminal neuropathy: a retrospective analysis. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **Jun 3**, S0901-5027(20)30173–9 (2020).
4. Mcnicol, E. D., Midbari, A. & Eisenberg, E. Opioids for neuropathic pain. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013(8):CD006146 (2013) doi:10.1002/14651858.CD006146.pub2.
5. Qi, W. *et al.* Evaluating the risk of post-extraction inferior alveolar nerve injury through the relative position of the lower third molar root and inferior alveolar canal. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **48(12)**, 1577–83 (2019).
6. Baral, P., Udit, S. & Chiu, I. M. Pain and immunity: implications for host defence. *Nature Reviews Immunology* 19(7): 433–447. (2019) doi:10.1038/s41577-019-0147-2.
7. Corliss, B. A., Azimi, M. S., Munson, J. M., Peirce, S. M. & Murfee, W. L. Macrophages: An Inflammatory Link Between Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Microcirculation* **23(2)**, 95–121 (2016).
8. Ji, R. R., Berta, T. & Nedergaard, M. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? in *Pain* (2013). doi:10.1016/j.pain.2013.06.022.
9. Hu, T. T. *et al.* A crucial role of HMGB1 in orofacial and widespread pain sensitization following partial infraorbital nerve transection. *Brain. Behav. Immun.* **88**, 114–124 (2020).
10. Ding, W. *et al.* An Improved Rodent Model of Trigeminal Neuropathic Pain by Unilateral Chronic Constriction Injury of Distal Infraorbital Nerve. *J. Pain* **Aug**, 899–907 (2017).
11. Romero-Reyes, M. *et al.* Spontaneous behavioral responses in the orofacial region: A model of trigeminal pain in mouse. *Headache* **53(1)**, 53(1):137-151 (2013).
12. Vuralli, D., Wattiez, A. S., Russo, A. F. & Bolay, H. Behavioral and cognitive animal models in headache research. *Journal of Headache and Pain* 20(1): 11 (2019) doi:10.1186/s10194-019-0963-6.

13. Asaoka, Y., Kato, T., Ide, S., Amano, T. & Minami, M. Pregabalin induces conditioned place preference in the rat during the early, but not late, stage of neuropathic pain. *Neurosci. Lett.* **668**, 133–137 (2018).
14. Domon, Y., Kitano, Y. & Makino, M. Analgesic effects of the novel  $\alpha\delta$  ligand mirogabalin in a rat model of spinal cord injury. *Pharmazie* (2018) doi:10.1691/ph.2018.8550.
15. Shinohara, F., Asaoka, Y., Kamii, H., Minami, M. & Kaneda, K. Stress augments the rewarding memory of cocaine via the activation of brainstem-reward circuitry. *Addict. Biol.* **May**, 509–521 (2019).
16. Navratilova, E. *et al.* Selective modulation of tonic aversive qualities of neuropathic pain by morphine in the central nucleus of the amygdala requires endogenous opioid signaling in the anterior cingulate cortex. *Pain* **161(3)**, 609–618 (2020).
17. Ma, F., Zhang, L., Lyons, D. & Westlund, K. N. Orofacial neuropathic pain mouse model induced by Trigeminal Inflammatory Compression (TIC) of the infraorbital nerve. *Mol. Brain* **Dec 28**, 44 (2012).
18. Pozza, D. H., Castro-Lopes, J. M., Neto, F. L. & Avelino, A. Spared nerve injury model to study orofacial pain. *Indian J. Med. Res.* **Mar**, 297–302 (2016).
19. Ganzberg, S. Pain management part II: pharmacologic management of chronic orofacial pain. *Anesth. Prog.* **57(3)**, 114–8 (2010).
20. Park, H. J. *et al.* The effect of gabapentin and ketorolac on allodynia and conditioned place preference in antibody-induced inflammation. *Eur. J. Pain (United Kingdom)* **Jul**, 917–25 (2016).
21. Wiffen, P. J. *et al.* Gabapentin for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017(6): CD007938 (2017) doi:10.1002/14651858.CD007938.pub4.
22. Linher-Melville, K., Shah, A. & Singh, G. Sex differences in neuro(auto)immunity and chronic sciatic nerve pain. *Biol. Sex Differ.* **11**, 26 (2020).
23. Zhang, F. F. *et al.* Perineural expression of high-mobility group box-1 contributes to long-lasting mechanical hypersensitivity via matrix metalloprotease-9 up-regulation in mice with painful peripheral neuropathy. *J. Neurochem.* **Feb**, 837–850 (2016).
24. Mostafaezur, R. M. *et al.* The effect of minocycline on the masticatory movements following the inferior alveolar nerve transection in freely moving rats. *Mol. Pain* **8**, 27 (2012).

25. Rotterman, T. M. *et al.* Spinal motor circuit synaptic plasticity after peripheral nerve injury depends on microglia activation and a CCR2 mechanism. *J. Neurosci.* **May 1**, 3412–3433 (2019).
26. York, E. M., Ledue, J. M., Bernier, L. P. & Macvicar, B. A. 3dmorph automatic analysis of microglial morphology in three dimensions from ex vivo and in vivo imaging. *eNeuro* (2018) doi:10.1523/ENEURO.0266-18.2018.
27. Inoue, K. & Tsuda, M. Microglia in neuropathic pain: Cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nature Reviews Neuroscience* 138–152 (2018) doi:10.1038/nrn.2018.2.
28. Gu, N. *et al.* Spinal Microgliosis Due to Resident Microglial Proliferation Is Required for Pain Hypersensitivity after Peripheral Nerve Injury. *Cell Rep.* **Jul 19**, 605–14 (2016).
29. Orihuela, R., McPherson, C. A. & Harry, G. J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British Journal of Pharmacology* Feb;173(4):649-65 (2016) doi:10.1111/bph.13139.
30. Kwon, M. J. *et al.* Contribution of macrophages to enhanced regenerative capacity of dorsal root ganglia sensory neurons by conditioning injury. *J. Neurosci.* **33(38)**, 15095–15108 (2013).
31. Zhou, L. J. *et al.* Microglia Are Indispensable for Synaptic Plasticity in the Spinal Dorsal Horn and Chronic Pain. *Cell Rep.* **27(13)**, 3844–3859 (2019).
32. Yang, H., Antoine, D. J., Andersson, U. & Tracey, K. J. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J. Leukoc. Biol.* **Jun**, 865–73. (2013).
33. Baad-Hansen, L. & Benoliel, R. Neuropathic orofacial pain: Facts and fiction. *Cephalalgia* 37(7) 670–679 (2017) doi:10.1177/0333102417706310.
34. Roh, J. S. & Sohn, D. H. Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. *Immune Network* Aug 13;18(4):e27 (2018) doi:10.4110/in.2018.18.e27.
35. Nakamura, Y. *et al.* Neuropathic Pain in Rats with a Partial Sciatic Nerve Ligation Is Alleviated by Intravenous Injection of Monoclonal Antibody to High Mobility Group Box-1. *PLoS One* **8(8)**, e73640 (2013).
36. Dahlhamer, J. *et al.* Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults — United States, 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **Sep 14**, 1001–1006 (2018).
37. Sacco, S., Ricci, S., Degan, D. & Carolei, A. Migraine in women: The role of hormones

- and their impact on vascular diseases. *Journal of Headache and Pain* Apr;13(3):177-89 (2012) doi:10.1007/s10194-012-0424-y.
38. Sorge, R. E. & Totsch, S. K. Sex Differences in Pain. *Journal of Neuroscience Research* Jun;95(6):1271-1281 (2017) doi:10.1002/jnr.23841.
  39. Sorge, R. E. *et al.* Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat. Neurosci.* **Aug**, 1081–3 (2015).
  40. Liu, K. *et al.* Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J.* (2007) doi:10.1096/fj.07-8770com.
  41. Feldman, P., Due, M. R., Ripsch, M. S., Khanna, R. & White, F. A. The persistent release of HMGB1 contributes to tactile hyperalgesia in a rodent model of neuropathic pain. *J. Neuroinflammation* **23**, 180 (2012).
  42. Urits, I. *et al.* Advances in the Understanding and Management of Chronic Pain in Multiple Sclerosis: a Comprehensive Review. *Current Pain and Headache Reports* 23(8):59 (2019) doi:10.1007/s11916-019-0800-2.
  43. Hu, Z. *et al.* CNTF-STAT3-IL-6 Axis Mediates Neuroinflammatory Cascade across Schwann Cell-Neuron-Microglia. *Cell Rep.* **31(7)**, 107657 (2020).
  44. Estanislau, C. *et al.* Rat self-grooming and its relationships with anxiety, deactivation and perseveration: Evidence for a self-grooming trait. *Physiol. Behav.* **Oct 1**, 112585 (2019).
  45. Tyrer, P. & Baldwin, D. Generalised anxiety disorder. *Lancet* Dec 16;368(9553):2156-66 (2006) doi:10.1016/S0140-6736(06)69865-6.
  46. Guneykaya, D. *et al.* Transcriptional and Translational Differences of Microglia from Male and Female Brains. *Cell Rep.* **24**, 2773–2783 (2018).
  47. Chen, G., Zhang, Y. Q., Qadri, Y. J., Serhan, C. N. & Ji, R. R. Microglia in Pain: Detrimental and Protective Roles in Pathogenesis and Resolution of Pain. *Neuron* 100(6):1292-1311 (2018) doi:10.1016/j.neuron.2018.11.009.
  48. Lenz, K. M. & McCarthy, M. M. A starring role for microglia in brain sex differences. *Neuroscientist* 306–21 (2015) doi:10.1177/1073858414536468.
  49. Villa, A. *et al.* Sex-Specific Features of Microglia from Adult Mice. *Cell Rep.* **23(12)**, 3501–3511 (2018).

## 謝辞

終わりに臨み、本研究を遂行するにあたり手厚いくださった先生方に心より感謝申し上げます。主指導教員である広島大学大学院 医系科学研究科 歯科麻酔学 入船正浩教授には臨床および基礎研究において 4 年間温かい激励とご鞭撻を賜りましたことを慎んで御礼申し上げます。

副指導教員である広島大学大学院 医系科学研究科 薬効解析科学 森岡徳光教授には基礎研究に必要な知識、心構えなどひとかたならぬご指導を賜りました。また実験方法の教示や研究結果の議論、文章の添削など多岐にわたってお世話になりました中村庸輝助教に深く感謝申し上げます。また多くの有益なご助言を頂きました中島一恵助教に対し厚く御礼申し上げます。

また本論文の審査におきまして貴重なご指導とご助言を賜りました広島大学院 医系科学研究科 津賀一弘教授、寺山隆司教授、吾郷由希夫教授に心より感謝いたします。

さらに本実験で使用した HMGB1 中和抗体を快く提供して下さった岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 西堀 正洋教授にも心より感謝申し上げます

そして本研究のために尊い命を捧げてくださった動物たちに感謝しご冥福をお祈りいたします。

最後にこのような勉学の機会を与えてくださった広島大学大学院に感謝申し上げます。

2021 年 3 月

広島大学大学院 医歯薬保健学研究科

歯科麻酔学専攻

河内貴弘