

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19791477

研究課題名 (和文) 自家神経移植の新たなドナーの追求・検討 -歯髄神経を用いて-

研究課題名 (英文) Examination and pursuit of autologous nerve transplantation using dental pulp

研究代表者

松下 和裕 (MATSUSHITA KAZUHIRO)

北海道大学 大学院歯学研究科・助教

研究者番号：10399933

研究成果の概要 (和文)：

歯髄が神経移植のドナー候補になるか否かについて、異種移植モデルで検討した。ヒト歯髄は矯正治療のために抜歯した歯牙から採取し、抗原性は凍結融解法で低下させた。その歯髄をキトサンチューブ内に填入し、ラットの坐骨神経切断部に移植した。8週後、新生した神経が顕微鏡下で組織学的に確認できた。ただ、その神経束は小さく、数も少なかった。ニューロフィラメント抗体、S-100抗体で免疫染色したところ、陽性所見を認めた。これは、歯髄内に残存しているシュワン細胞の基底膜が足場となって、軸索が中枢側から伸展してきたと考えられた。以上の所見より、歯髄はこの異種移植モデルにおいて、神経移植のドナー候補に十分になり得る事が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We investigated whether dental pulp could be a candidate for graft in a xeno-graft model. It was obtained from the vital extracted tooth for orthodontic treatment, and then treated with freezing and thawing method for killing viable cells and for reducing antigenicity. After putting the dental pulp into chitosan tube, it was transplanted into transected sciatic nerve. Eight weeks after transplantation, regenerated nerve was obviously observed on microscopic investigation, although the mini fascicles were localized and the number of them was small. Anti-neurofilament and Anti-S-100 antibody indicated regeneration as well, suggesting that remaining Schwann cell basal laminae in the pulp acted as a scaffold. Taken together, dental pulp nerve could be a good candidate for nerve grafting in a xeno-graft model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	540,000	3,840,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：歯髄、神経移植、神経再生

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

日常の臨床において自家神経移植のドナーは、運動神経ではなく、かつ重要な感覚を司らないことが望ましい観点より、腓腹神経を用いる事が多い。しかし、神経採取部の瘢痕やその周囲の違和感、時によっては断端神経腫に起因する疼痛などが生じかねない。そのため、可及的に術後障害を少なくするため、近年では人工素材による神経移植も行われている。そのなかで、カニの腱の成分であるキチン由来のキトサンチューブが神経移植に有効であるとの報告がある。神経移植実験初期での獲得目標はシュワン細胞をより活性化することであったが、現在ではより長い間隙を架橋すること、そして何よりもより効果的に架橋することに注目が集まっている。

そのような状況下、私は神経そのものの選択に注目し、歯の神経すなわち歯髄に着目した。われわれ歯科医は抜髄や抜歯により容易に神経を破棄している。歯髄は取りもなおさず末梢神経である。ただ、血管やリンパ管、そして他の結合組織との複合体であり、一般的な末梢神経とは性質を異にする。一般に太い神経束が根尖から歯冠歯髄に向かって、根管歯髄の部分では分枝を出さず上向し、歯冠部歯髄の部分では豊富に分枝を出している。その結合組織の内部には間葉系細胞や増殖因子が豊富に含まれている。最近では豊富な幹細胞も含まれている事が判明してきている。そのため、歯髄に対しての注目度も上がってきている。しかし、歯髄をそのままの形で使用する発想はほとんどない。一方で、同種移植の系でも、異種移植の系でもシュワン細胞の基底膜が軸索再生の効果的な導管であることも分かってきている。そこで、われわれは歯髄が神経移植の候補になり得るのではとの仮説を立て、異種移植の系で実験を行った。

2. 研究の目的

歯髄神経が神経移植のドナーになり得るかを、異種移植の実験系で検討する。シュワン細胞の基底膜が scaffold になり得ないかを検討する。歯髄神経の移植の概念を確立する。

3. 研究の方法

歯髄の採取ならびに使用については、北海道大学大学院歯学研究科・歯学部倫理委員会で承認されている。また、動物実験については動物実験委員会で承認されている（承認番号：No 08-0094）。

患者に実験の目的を説明し、同意書にサインをいただいた後、矯正治療のため便宜抜歯した生活歯から歯髄を採取した。歯牙を近心

遠心に分かれるようカーボランダムディスクでガイド溝を入れた後、チゼルを用いて長軸方向に分割し、歯髄を一塊として採取した (Fig. 1)。



Fig.1 分割した歯牙を歯髄神経
歯髄は矯正治療のため便宜抜去した歯から採取した。チゼルを用いて近遠心的に分割した。鑷子で神経を把持して摘出した。直線的で分枝が少ない歯根部の歯髄を利用した。

異種移植の系であるため、抗原性を低下させる必要があり、移植前に液体窒素と常温の生理食塩水に交互に5回入れて、vital cell を失活させた。歯根部歯髄を切断して8mmの長さにトリミングした。歯幹部の歯髄は太く分枝が網状になっているため実験には不適合で用いなかった。ミエリン化の観点からも歯根部歯髄の方が理想的であった。

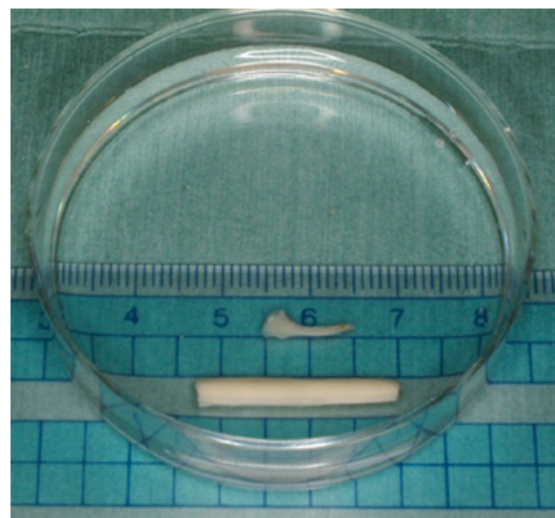


Fig.2 歯髄とキトサンチューブ
歯髄は液体窒素を用いて凍結融解を繰り返して、生活細胞はすべて失活させてある。すなわち軸索を取り囲むシュワン細胞の基底膜をscaffoldとして使用することとなる。

動物は、180～200gの雄のSprague-Dawley (SD)ラットを用いた。麻酔はペントバルビタールを腹腔内注射(50 mg/kg body weight)



Fig. 3 歯髄が填入されたキトサンチューブ凍結融解を繰り返した後、歯髄を8mmの長さにトリミングし、キトサンチューブに填入した。

して行った。

剃毛後ラットの膝から上に約30mmの皮膚切開し、筋層を剥離して坐骨神経を明示した。明示後、坐骨神経を8mm切断して架橋に備えた。顕微鏡下で歯髄神経を坐骨神経に直接縫合することは困難であるため、本実験では人工神経として地位が確立しているキトサンチューブ（前述）に歯髄を填入して行った。なお、このキトサンチューブ（分子量210,000）は脱アセチル化度(DAc) 93%としたものを北海道曹達より提供を受けた。縫合は10mmのキトサンチューブに8mmの歯髄神経を填入して、両端1mmは縫いしろとして空けておいた。坐骨神経をチューブ内に牽引するように、坐骨神経の上膜とキトサンチューブの端を縫合した。縫合は、チューブが抜けないように合わせておくため、1-2針縫うだけで十分であった。これにより神経の切断面を直接縫合しなくても、端々縫合したことと同様な意味合いとなる。この縫合により、顕微鏡下で縫合する必要がなくなる上、歯髄への器械的損傷を軽減でき、サンプルや症例によるばらつきがなくなりデータが安定する利点もあった。

実験系は下記の通りとした。

グループ1：キトサンチューブ単体で縫合
グループ2：キトサンチューブ内に別のSDラットより採取した坐骨神経を填入（同種移植、positive control）

グループ3：キトサンチューブにヒト歯髄を填入（異種移植、実験群）

8-0のモノフィラメント縫合糸（ケイセイ医科工業）を用いて拡大鏡の下で縫合した。坐骨神経の上膜を断端から2mmの位置から針を入れ、断端から1mmの位置から出し、ついでキトサンチューブの内部から入れて断端より1mmの部分からチューブ外に出して縫合した。このように縫合することにより、坐骨神経がチューブ内に引き込まれ、神経断端が面と面で合わさることになった。移植後8週目に犠牲死させ、縫合チューブを丁寧に剥離して摘出した(Fig. 4)。



Fig. 4 移植後8週目の移植部位
移植した箇所を露出させ、キトサンチューブごと摘出した。

組織学的検討はその採取したサンプルの中央部1/3を用いて行った。サンプルの横断面をトルイジンブルー染色して光学顕微鏡で確認した。同様に免疫染色も行った。免疫染色は厚さ4 μ mにサンプルを切断し、下記抗体を4度で一晩反応させた。

新生軸索の同定 1次抗体 anti neurofilament160 抗体(1:100, clone NN18, SIGMA, USA)、2次抗体 goat anti-mouse IgG FITC

シュワン細胞の同定 1次抗体 anti-S-100 (1:100, SIGMA, USA)、二次抗体 goat anti-rabbit IgG TRITC

新生軸索の直径、ならびに占有率もトルイジンブルー染色後測定した。

4、研究成果

Fig. 5の如く、歯髄を填入した系では、positive controlである同種ラットの坐骨神経を用いた系と同様に、新生軸索が認められた。しかし、グループ2では一様に豊富な新生軸索の伸展が認められたのに対し、グループ3では部分的に mini fascicle を認めた。た、その1つ1つの minifascicle を確認すると、比較的厚い神経周膜に被覆され、新生軸索は確実に豊富に存在し、ミエリン化も起きていた。これは、歯髄は神経だけでなく、血管やその他の組織からなる複合体であり、中枢からの新生軸索は元来あった神経の部分に選択的に伸展してきている証しであった。軸索の直径は両グループ間には差がなかったが、その密度はグループ3が劣っていた(Fig. 6)。貪食細胞はほとんど認めず、debris もなかった。ただ、軸索を認めず、基底膜のみが存在している部分もあり、伸展のスピードは遅いことが示唆された。これは、グループ2は同種の実験系でしかも神経単体である坐骨神経と異なり、グループ3の歯髄は前述の通り、複合体であり、かつ凍結融解を繰り返す際に生じる debris が吸収するためには時間がかかることは考えられた。

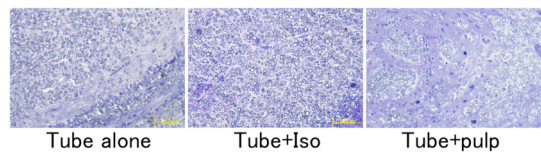


Fig. 5 新生軸索の状態（トルイジンブルー染色）

キトサンチューブ単体移植群(Tube alone)、新生軸索が豊富に認められる。同種ラットより採取した坐骨神経をキトサンチューブに填入した群(Tube+Iso)でも、凝集した新生軸索が認められる。ただ、ヒト歯髄をキトサンチューブに填入した群(Tube+pulp)でも新生軸索を認めるが、それを含む minifascicle は局限しており、量も比較的少ない。

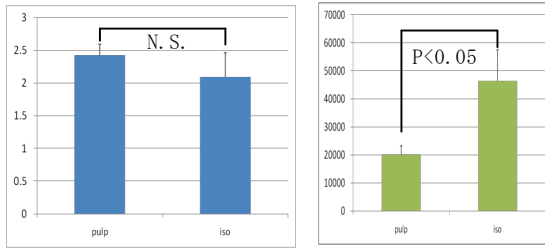


Fig. 6 軸索の直径は歯髄を用いた群 (Pulp) と同種の坐骨神経を入れた群 (Iso) との間に差異は無かったが、軸索密度は有意に pulp 群が少なかった ($p < 0.05$)。

Neurofilament の免疫染色の結果は (Fig. 7)、グループ 3 の歯髄移植系でもグループ 2 の坐骨神経移植系でも量は異なるものの、質的には同様であった。シュワン細胞の存在を確認するために行った S-100 抗体による免疫染色でも、Neurofilament 抗体による染色パターンとほぼ同様の所見が認められた。さらに増殖マーカーである DAPI との二重染色では、S-100 陽性の箇所と DAPI 陽性の箇所が近接し、シュワン細胞の増殖が示唆された。

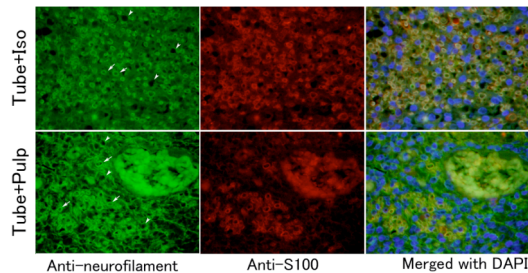


Fig. 7 免疫染色結果 (Neurofilament, S100, DAPI)

髄鞘が Anti-neurofilament 抗体にて染色されている (矢印)。髄鞘を伴わない空隙は、固有の軸索が存在していた箇所と推察される。Anti-S100 抗体にて髄鞘がほぼ同様に染色されている。これは、髄鞘がシュワン細胞に被覆されていることが示唆される。DAPI による二重染色にて、細胞増殖が髄鞘の近傍で起こっている事がわかる

本結果より歯髄神経のシュワン細胞の基底膜が、軸索伸展の Scaffold になり得る事が証明された。よって、歯髄神経はその軸索密度こそ少なかれ、軸索 1 つ 1 つの直径は positive control と同様であり、神経移植のドナーとなり得ることが判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 和裕 (MATSUSHITA KAZUHIRO)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：10399933

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし