

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861369

研究課題名(和文) 嗅神経再生促進のための抗炎症治療戦略のタイムリミットの解明

研究課題名(英文) A time limit for starting anti-inflammatory treatment for better improvement of olfactory dysfunction after head injury

研究代表者

北野 雅子 (Kitano, Masako)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20378334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、予後の良くない外傷性嗅覚障害がどのタイミングまでに治療を開始すれば嗅覚の改善が期待できるのかを明らかにする目的で施行した。外傷性嗅覚モデルマウスを作製して、嗅神経切断後1、2、4、6週間後にステロイド治療を施行した。その結果、炎症抑制による外傷性嗅覚障害治療は受傷後1週間までは有効だが2週間以上経過すると無効であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The present study was designed to reveal the time limit for starting anti-inflammatory treatment for better improvement of traumatic olfactory dysfunction. Olfactory nerve transection (NTx) was performed in OMP (olfactory marker protein)-tau-lacZ mice and subcutaneous injection of dexamethasone sodium phosphate (DXM) for consecutive 5 days was started at 7, 14, 28 and 42 days after the NTx (7, 14, 28 and 42-day interval). Histological assessment of nerve recovery in the olfactory bulb was made at 5, 14 and 42 days after the injury. Olfactory function assessments using both an olfactory avoidance behavioral test and evoked potential testing were also performed. An anti-inflammatory treatment using steroids for traumatic olfactory dysfunction may be effective until 7 days but ineffective at 14 days or later after head injury.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：鼻科学 嗅覚 再生医学

1. 研究開始当初の背景

近年、嗅覚に関する基礎研究がめざましく進歩しており、この分野からはその研究成果により 2004 年には Axel 博士、Buck 博士というノーベル医学生理学賞受賞者を輩出しているほどである。この発展に伴い、耳鼻咽喉科領域においても嗅覚障害患者の数とこの診療に取り組む施設が年々増加しており、嗅覚障害に対する医療の重要性が高まっている。これまで嗅覚障害は予後が悪いというイメージを持たれてきたが、本来嗅神経は他の脳神経とは異なり、強い再生能力を備えていて、鼻副鼻腔炎が原因の炎症性嗅覚障害の改善率は 70~80% と実は高いことも報告されている(小林正佳・他: 日耳鼻 108: 986-995, 2005)。その一方で、嗅神経の物理的損傷が原因である外傷性嗅覚障害の予後は悪く、交通外傷が原因の嗅覚障害の改善率は 10~50% と低い(小林正佳: JOHNS 25: 1343-1349, 2009) (図 1)。

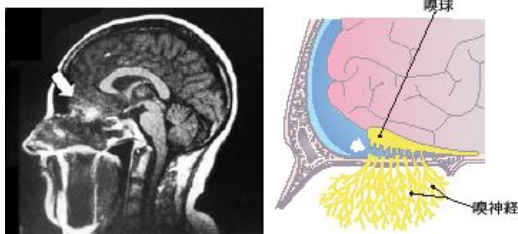


図 1 頭部外傷後の嗅覚脱失例の脳 MRI 所見(左図・矢印が傷害箇所)と頭部外傷時の嗅神経切断のシエマ(右図)

外傷性嗅覚障害の予後改善を目的として、マウスなどの実験動物の嗅神経を切断して外傷性嗅覚障害モデルを作製し、その神経再生に注目した研究報告がある。その中でも、Kobayashi と Costanzo (Chem Senses 34: 573-580, 2009) は、嗅神経切断後の神経再生が局所傷害の重症度と炎症の強度に依存すること、またこの局所炎症に対して傷害急性期にステロイド薬投与による消炎治療を施行す

れば、マクロファージなどの炎症細胞浸潤とグリア瘢痕形成を抑制し、嗅神経再生が促進されることを明らかにしている。

しかし、実際の臨床医療では、受傷後嗅覚障害を自覚して、その治療が開始されるのは数週間から数カ月後である例が多く、このことが外傷性嗅覚障害の予後が悪い一因と考えられている。

それではどのタイミングまでに治療を開始すれば、外傷性嗅覚障害の改善が期待できるのか、これを検討した研究報告はこれまでにない。

2. 研究の目的

今回の研究は、外傷性嗅覚障害モデル動物を用いて、嗅神経切断後にしばらく期間をおいてから抗炎症治療を開始して、どのくらいまでの治療開始タイミングであれば嗅神経再生が良好であるかを明らかにする目的で施行した。

3. 研究の方法

まず最初に、嗅神経再生の組織学的検出を施行した。

実験動物として、組織学的に嗅神経を容易に視覚的に確認可能な遺伝子組み換えマウスである OMP-tau-lacZ マウスを用いた。マウスにペントバルビタールを腹腔内注射して全身麻酔し、固定器で固定した。前頭開頭を行い、嗅球と篩板を露出させて、ステンレスカッターを一側の篩板と嗅球との間に挿入して嗅神経を切断した(図 2)。対側はコントロールとして神経切断を行わずにおいておいた。止血後、閉頭し、動物を覚醒させた。

手術後 5、14、28、42 日経過してから、デキサメサゾン腹腔内注射した。低用量、高用量の 2 種類の投与群とコントロールとして生食投与群の 3 群を設けた。

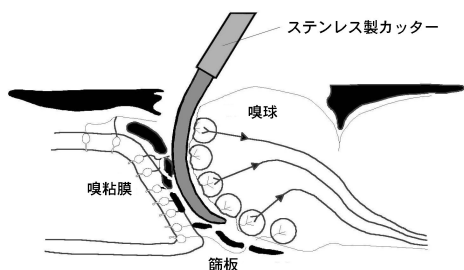


図2 嗅神経切断実験のシェーマ

デキサメサゾン投与開始後5日目、14日目、42日目、70日目に、それぞれマウスをパラホルムアルデヒドで還流固定し、頭部骨をEDTAで脱灰後、組織切片を作成し、各種染色を行い、CCDカメラでデジタル画像化し、嗅神経の再生、グリア瘢痕形成、マクロファージの局所浸潤などの程度を定量化して測定した。

なお、嗅神経の確認にはX-Gal染色にて嗅神経と嗅球の糸球体を可視化した。グリア瘢痕と組織全体の確認にはニュートラルレッド染色を用いた。またグリア瘢痕内の活性化星状膠細胞の確認には抗GFAP抗体を用いた免疫染色を行った。マクロファージの確認にはマクロファージ特異的な抗CD68抗体で免疫染色を行い、確認した。

次に、行動学的実験による嗅覚検査で嗅覚機能の回復について検証を施行した。まず、マウスに0.1%ナラマイシン(シクロヘキサミド)水溶液を用いて味覚を利用したにおい条件付けの嫌悪学習を行った。嫌悪学習に成功したマウスに対して、嗅神経切断とその後のデキサメサゾン投与を行い、経日的にナラマイシンに対する忌避行動の程度を確認し、嗅覚機能の回復の有無を確認した。

最後に、電気生理学的実験により嗅神経の機能的再生を確認した。電気生理学的検証は以下のように施行した。まず、嗅神経切断手術とデキサメサゾン投与を行った。

MR16-1投与開始後5日目、14日目、42日目、70日目のマウスをそれぞれ麻酔し、固定器に固定し、再開頭した。鼻骨も一部削開し、鼻腔も露出させた。鼻腔の嗅粘膜に刺激電極を当て、嗅球内に記録電極を挿入し、神経のField potentialまたは単一神経活動記録を行い、神経伝導の回復の有無を確認した。

4. 研究成果

嗅神経切断後の局所炎症の抑制、グリア瘢痕の抑制、嗅神経再生の促進は、手術後7日経過してからステロイドを投与した群では良好で、14日以上経過してから投与した群では不良であった。また、行動学的実験、電気生理学的実験ともに、術後7日後投与群の嗅覚機能回復は良好であったが、術後14日後投与群の嗅覚機能回復は有意に不良という結果であった。

以上から、炎症抑制による外傷性嗅覚障害治療は受傷後1週間までは有効だが、2週間以上経過すると無効であると考えられた

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)

名称:

発明者:

権利者:

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

北野 雅子 （KITANO, Masako）

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20378334

(2)研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者

（ ）

研究者番号：

(4)研究協力者

（ ）