

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20592378

研究課題名（和文）末梢神経損傷部への嗅神経被膜細胞（OEC）移植の有用性

研究課題名（英文）THE AVAILABILITY OF THE OLFACTORY ENSHEATHING CELLS TRANSPLANTATION TO INJURED PERIPHERAL NERVE.

研究代表者

高田 訓（TAKADA SATOSHI）

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：40254875

研究成果の概要（和文）：嗅粘膜に存在する幹細胞と嗅神経鞘細胞（OEC；Olfactory Ensheathing Cells）が神経の再生を誘導する可能性がある。本研究ではラットを用い、下歯槽神経損傷部に嗅粘膜を移植し嗅粘膜が神経再生を誘導するか検証した。その結果、下歯槽神経周囲の下顎管形態は保たれ、多くの S100 タンパク陽性細胞と NFP 陽性線維が認められ、下歯槽神経損傷部への嗅粘膜の移植が末梢神経再生を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：According to a recent report, stem cells and olfactory ensheathing cells (OEC) exist in the olfactory mucosa, and may induce nerve regeneration. We herein examined whether olfactory mucosa, transplanted in damaged inferior alveolar nerve, induced nerve regeneration in rats. The mandibles of the transplanted group were morphologically maintained. Many S100- and NFP- positive cells were observed. In conclusion, olfactory mucosa, transplanted in damaged inferior alveolar nerve, may facilitate peripheral nerve regeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	200,000	60,000	260,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：末梢神経、神経損傷、嗅神経、嗅神経被膜細胞、移植

1. 研究開始当初の背景

2008年の本研究立案当初は、脊髄損傷患者への嗅神経被膜細胞（OEC；olfactory ensheathing cells）移植が注目されるようになり、本邦においても自家嗅粘膜移植の臨床治験がスタートした。この OEC は嗅球に連続する嗅上皮由来の神経幹細胞（NSCs；Neural stem cells）で、未分化のまま増殖する自己複製能を有しており、中枢神経の損傷部修復

に有効であることが示唆されていた。また、Schwann 細胞は成長因子や栄養因子、細胞接着分子（NCAM；neural cell adhesion molecule）の生産能を有しており、末梢神経細胞でありながら中枢神経の損傷部修復にも有効な細胞であった。しかし、培養細胞以外で OEC 細胞を末梢神経の損傷部修復に応用したという報告はなかった。

口腔領域における日常臨床の間ではイン

プラント手術や抜歯、外傷や骨髄炎などが原因で下歯槽神経損傷が生じる。また、腫瘍や嚢胞では下歯槽神経の切断除去を余儀なくされるケースもある。研究者ら（日口診誌 19:50-55 2006、奥羽大歯学誌 33:135-140 2006、口腔顔面神経機能学会会報 7:25 2004）は、下歯槽神経損傷例の治癒経過とその背景を調査した結果、一過性の圧迫損傷や一部の軸索損傷であれば可逆的な機能低下のみで知覚機能の回復が望める。その一方で神経線維の断裂に至った症例では、長期的に下歯槽神経支配領域の口腔感覚や皮膚感覚に異常をきたし、これが患者のみならず偶発事故の場合は執刀医にも大きな苦痛を与え、様々な方面から訴訟問題に至ってしまう背景がある。こういった訴訟事例への中立的な立場で発足した口腔顔面神経機能学会の研究グループが臨床症状の追跡結果をまとめた。すなわち神経損傷以降1年以上経過しても知覚機能の回復傾向がない場合は、症状固定と判断し、それ以上の回復は望めないと結論づけている（口腔顔面神経機能学会会報 vol. 1～vol. 10）。

一方、多くの末梢神経損傷例を経験しながら、有効な治療法や治療方針、特効薬がない。現行では保存的治療として、ビタミン製剤やステロイドなどの薬物療法、遠赤外線やレーザー、電法などの理学療法が施行されているが、神経断裂症例に対して確実に奏効しているか疑問が残る。外科的治療では、神経縫合や神経移植が行われ、人工神経や成長因子、栄養因子などを応用した研究報告もあり、一様の成果をあげているが、臨床上絶対的な治療方針ではなかった。

2. 研究の目的

脊髄損傷患者への OEC 移植が各国で施行され、本邦でも 2006 年に吉峰ら（大阪大学）が自家嗅粘膜移植の臨床治験に着手した。OEC は嗅球に連続する嗅上皮由来の神経幹細胞（NSCs ; Neural stem cells）で、未分化のまま増殖する自己複製能を有しており、中枢神経の損傷部修復に有効であることが示唆されている。また、Schwann 細胞は成長因子や栄養因子、NCAM の生産能を有しており、末梢神経細胞でありながら中枢神経の損傷部修復にも有効な細胞である（Ying ら : Science 277 : 2000-2002 1997、出澤 : 臨床神経 45:877-879 2005）。このように中枢神経の損傷部修復には中枢神経系の細胞のみならず末梢神経系の細胞も donor となって成果をあげている。

そこで本研究では嗅上皮に存在する OEC が有する自己複製能と増殖能が末梢神経の Schwann 細胞や軸索の成長因子、または栄養因子として機能するかを検索し、OEC 移植が

末梢神経損傷の修復方法として有効であるかを検索するために、ラット下歯槽神経損傷部への同種新鮮 OEC 移植後の Schwann 細胞の再生・分化・誘導様相および軸索再生を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験動物には 10 週齢以上、体重 400~450 g の雄性 Wistar 系（日本クレア社）ラットを用いた。購入後、実験動物用固形飼料（オリエンタル社製）と水道水を 1 週間自由に与え、奥羽大学歯学部動物実験研究施設（室温 23℃、湿度 65%）で飼育した。なお、実験は奥羽大学動物実験委員会の承認を得て奥羽大学実験動物指針を遵守して行った（動物実験許可番号：平成 22 年度第 29 号、平成 23 年度第 37 号）。

(2) 実験方法

実験に使用した器材は滅菌を行い、無菌的に行った。まずドナーとして、ラット鼻腔上部より嗅粘膜を採取して、滅菌生理食塩水中に保存した。次に下歯槽神経損傷ラットの処置はジエチルエーテルとフローセンの全身麻酔およびエピネフリン 1/80,000 含有 2% リドカインの局所麻酔下に行った。ラット顎下部を剃毛して皮膚切開を加えて骨膜剥離を行い、オトガイ孔と下歯槽神経を明示したのち、オトガイ孔から骨膜までのオトガイ神経を切り取った。その後、直径 2mm のラウンドバーで、生理食塩水注水下に 1 分間 6000 回転でオトガイ孔を中心に半球状の移植床を形成した。

移植群は採取した嗅粘膜を形成した移植床を満たすように移植し、非移植群は移植せずに骨膜を戻して縫合した。嗅粘膜の採取から移植までの時間は 15 分以内とした。

(3) 標本作製

処置後 3, 5, 7, 14, 21, 28 日目および未処置のラットの下顎骨を摘出し、室温の 10% 中性緩衝ホルマリン液で 24 時間浸漬固定した。試料は、10%2NA (EDTA・2Na) 液 (pH7.0) に 4~5 週間浸漬して常温脱灰を行った後、10%中性緩衝ホルマリン液で 24 時間浸漬固定した。脱灰試料はパラフィン包埋して、下歯槽神経とオトガイ孔が連続して観察できる下顎管縦断面（以下縦断面）および下顎第 1 臼歯前方部の下顎管横断面（以下横断面）で 4 μm のパラフィン切片を作製した (Fig. 1d)。切片は組織学的観察のためヘマトキシリン-エオジン染色（以下 H-E）を行い、光学顕微鏡（SHIMAZU）下に観察した。

(4) 免疫組織学的観察

切片は内因性ペルオキシダーゼの除去のため3%過酸化水素水(H₂O₂)を室温で15分間作用させた。抗p75^{NTR}モノクローナル抗体(low affinity NGF receptor, MC192)(フナコシ, 東京), ウサギ抗S-100タンパクポリクローナル抗体(ニチレイ, 東京), マウス抗ニューロフィラメントモノクローナル抗体(ニチレイ, 東京)を第一抗体として室温で1時間反応させた。その後, シンプルステインラットMAX-P0(MULTI)(ニチレイ, 東京)を室温で30分反応させ, 0.02%3,3'-ジアミノベンチジン・4HCl/0.05Mトリス塩酸緩衝液pH7.6(ニチレイ, 東京)で発色してマイヤーのヘマトキシリンで核染色後, 光学顕微鏡下に観察を行った。NFP染色では発色後, 軸索周囲に存在する髄鞘を明らかにするためにルクソールファストブルー染色(以下LFB染色)を行い, 核染色は行わずに観察した。

(5) 定量形態学的観察

各群での下顎管横断面の経時的な数量形態学的変化を観察した。①横断面における下顎管直径の最長軸と最短軸との交点を中心として範囲を定め, 光学顕微鏡下にNFP陽性線維数の計測を行った。②Motic Images Plus 2.2S(SHIMAZU)を用いて, NFP陽性線維数を計測した同範囲での, NFPおよびLFB染色で陽性を示した面積の測定を行った。③移植群と非移植群の間に統計学的に有意差があるか検討するためMann-Whitney U-testを用いて両群の比較を行った。

4. 研究成果

(1) 正常下歯槽神経およびオトガイ孔の形態

正常ラット下歯槽神経では神経束の直径はほぼ一定で, 神経束はさまざまな太さの有髄神経線維と無髄神経線維からなっている。Schwann細胞はS100タンパク陽性で軸索はNFP陽性であり有髄神経線維では軸索の周囲にLFB陽性である髄鞘(ミエリン)が認められた。それぞれ神経束全体に平均して分布しており, 部分的に神経周膜により区切られていた。また, 神経束と骨面は神経上膜により隔てられており下顎管内の骨面は平滑で下顎管は円形ないし楕円形を呈していた。

(2) 移植部縦断面の変化

移植後3日目の縦断面では, 両群とも下顎管内の神経構造は消失していた。移植群では移植床内に血管やS100タンパク陽性細胞を含む移植した嗅粘膜が確認でき, 損傷下歯槽神経と連続していた。また, 嗅粘膜に含まれていたと思われるS100タンパク陽性細胞が存在し, その周囲には円形のp75^{NTR}陽性細胞が見られた。一方, 非移植群の移植床には線

維性結合組織が見られ, 細胞成分は認められなかった。下歯槽神経切断面には炎症細胞が浸潤しており, 移植床形成時の侵襲によると思われる潰瘍形成が見られた。

5日目には移植群のp75^{NTR}陽性細胞は増加して, 7日目には線状になりS100タンパク陽性細胞と同様の部分に認められた。非移植群では, 未熟な骨梁を含む肉芽組織で移植床は満たされており, p75^{NTR}陽性細胞あるいはS100タンパク陽性細胞とも見られなかった。

14日目の移植群ではS100タンパク陽性細胞は長さを増して束状に配列し, それと一致してNFP陽性線維も増加, 伸長していた。非移植群では骨梁が増加して, 骨梁の間隙や骨膜周辺にわずかなS100タンパク陽性細胞およびNFP陽性線維が存在した。移植群においても骨形成を認めたが, その量は非移植群に比べてわずかであり, 数多くのS100陽性細胞とNFP陽性線維が存在した。

21日目以降も移植群ではS100タンパク陽性細胞の束の太さが増してNFP陽性線維は長くなり密度が増えていた。一方, 非移植群の移植床内に形成された骨は増加して, 骨梁間や骨膜下にわずかなS100タンパク陽性細胞とNFP陽性線維が存在した。

(3) 移植部横断面の変化

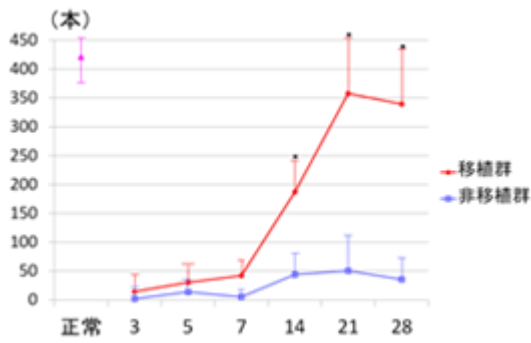
3日目では両群とも神経様構造は見られずS100タンパク陽性細胞とNFP陽性線維は認められなかった。5日目の移植群では下顎管の形態は保たれており, 非移植群では下顎管内に網目状に骨梁形成が起こっていた。両群とも少数のS100タンパク陽性細胞とNFP陽性線維が存在した。

14日目の移植群では下顎管周囲より骨形成が起こったがわずかであり, 多くのS100タンパク陽性細胞とNFP陽性線維が存在した。非移植群では徐々に骨量を増して下顎管は元の形態を失っていた。

28日目の移植群では, 正常下歯槽神経に類似した構造となり, S100タンパク陽性細胞およびNFP陽性線維は中心から徐々に太くなり密度を増していた。一方, 非移植群では下顎管内は形成した骨により置換され, わずかな円形の空隙を残すのみで, その空隙の中には少数のS100タンパク陽性細胞とNFP陽性線維が認められた。

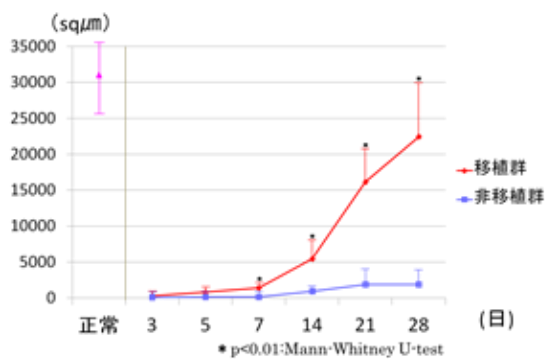
(4) 定量形態学的観察

①軸索数の比較では両群とも21日目まで増加傾向を示した。移植群では7日目以降に急激な増加を示し, 21日目には非移植群に対して約7倍の軸索数であった。統計学的には14日目より有意差を認めた。



* p<0.01: Mann-Whitney U-test (日)

②軸索と髄鞘の面積の比較では移植群では28日目まで増加傾向を示した。非移植群でも21日目まで増加傾向を示したが移植群と比べてわずかであり、28日目にはやや減少した。統計学的には7日目より有意差を認めた。



* p<0.01: Mann-Whitney U-test (日)

結論として、非移植群では下歯槽粗神経が肉芽化し下顎管が添加した新生骨で満たされたのに対し、移植群では移植部下歯槽神経周囲の下顎管の空洞形態は維持され、既存の神経線維から Schwann 細胞の侵入を認めた。また、OEC を移植した損傷部の神経線維内には再生神経線維が出現していることが確認できた。これにより本研究における嗅粘膜移植が下歯槽神経損傷部の神経再生に有用であり、臨床的にも下歯槽神経損傷によって失われた機能を回復させる手段として有効であることが示唆された。

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4件)

- ①宮下照展、筋組織の外科的侵襲後の筋機能回復過程、奥羽大学歯学誌、36巻、149-156頁、2009年、査読有
- ②常盤賢市、高田 訓、当科における神経疾患に関する臨床統計的検討、口腔顔面神経機能学会会報、14巻、11-12頁、2010年、査読無

③林 由季、高田 訓、ラット下歯槽神経切断後の神経の回復経過、口腔顔面神経機能学会会報、13巻、5-6頁、2009年、査読無

④高田 訓、筋束間剥離に伴う筋機能の変化、口腔顔面神経機能学会会報、13巻、5頁、2009年、査読無

[学会発表] (計7件)

①河西敬子、高田 訓、下歯槽神経損傷部への嗅粘膜移植、第52回奥羽大学歯学会、2011年11月12日、奥羽大学(郡山市)

②河西敬子、高田 訓、下歯槽神経損傷部への嗅粘膜移植、第56回日本口腔外科学会、2011年10月22日、大阪国際会議場(大阪府)

③河西敬子、高田 訓、下歯槽神経損傷部への嗅粘膜移植、第65回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2011年4月21日、東京

④菅野勝也、高田 訓、舌表面温度変化による知覚・味覚への影響、第15回口腔顔面神経機能学会、2011年3月5日、新潟大学歯学部

⑤常盤賢市、高田 訓、当科における神経疾患に関する臨床統計的検討、第14回口腔顔面神経機能学会、2010年2月27日、大阪

⑥林 由季、高田 訓、ラット下歯槽神経切断後の神経の回復経過、第13回口腔顔面神経機能学会、2009年2月28日、兵庫

⑦高田 訓、筋束間剥離に伴う筋機能の変化、第13回口腔顔面神経機能学会、2009年2月28日、兵庫

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 訓 (TAKADA SATOSHI)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：40254875

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：