

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 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592251

研究課題名（和文）自家神経移植の新たなドナーの臨床応用をめざして一歯髄神経を用いて一

研究課題名（英文）Clinical establishment of novel nerve donor as an auto-grafting material. -Application of dental nerve-

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になり得るか否かを検討するために、異種移植系で移植実験をおこなった。歯髄は抜歯した歯から採取し、凍結融解法で抗原性を低下させ、キトサン・メッシュチューブに挿入し、Sprague-Dawley (SD) ラットの坐骨神経を切断した部分に移植した。移植後 4 週目、新生軸索が宿主由来のシュワン細胞を伴いながら基底膜上を中枢側から進展していることが、電子顕微鏡で確認できた。移植後 12 週、新生軸索が光学顕微鏡でも認められた。移植後 32 週、新生軸索の旺盛な増殖像が認められた。よって、歯髄も神経移植のドナーになることは示された。

研究成果の概要（英文）：

This study was designed to examine whether a dental pulp could be a candidate of donor for nerve grafting in xenografting model. The dental pulp was obtained from a human vital extracted tooth, and treated with freezing and thawing method for reducing antigenicity. The treated sample was inserted into chitosan mesh tube, and then the complex was implanted into transected sciatic nerve in Sprague-Dawley (SD) rats. As early as 4 weeks after grafting, regenerating axons accompanied by host Schwann cells were found to grow out through basal laminae by electron microscopy. Twelve weeks after grafting, sporadic axonal regeneration was confirmed by light microscopy, thirty-two weeks after implantation, aggregation of axons was observed in this group. These findings clearly demonstrate that even dental pulp can act as conduits for regenerating axons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：歯髄、神経移植、自家移植

1. 研究開始当初の背景

自家末梢神経移植は、重要な機能を担って

いないとされる神経を第一選択とし、一般的には腓腹神経が選択されることが多い。しか

し、自家移植は神経移植のための創部の増加、癒痕形成、遠心部の神経麻痺、断端神経腫やそれに起因する痛みが生じる問題点もある。海外では、死体から神経を採取して同種移植する報告もあるが、本邦では感染の伝播や倫理的な問題もある。そのため、各種生態材料が注目され、吸収性の素材もいくつか報告されている。本研究の連携研究者である伊藤らは、生態材料としてカニの腱から抽出精製したキトサンからナノメッシュチューブを開発し、各種論文を発表してきた。現在、神経移植研究の主眼はシュワン細胞の活動を増強であり、軸索の新生を効率的に促す手法が詮索されている。組織再生には cell (細胞), scaffold (足場), growth factor (増殖因子) が必須の 3 要素され、その観点での各種生態材料の開発や代替物の検討が行われている。そこで、われわれ歯科医は、日常の臨床で、抜髄や抜歯を頻繁に行っており、歯髄は躊躇なく破棄している。歯髄はとりもなおさず、末梢神経であり、そのまま破棄するのはもったいない。そこで、臨床家としての視点でこの歯髄の有効利用を考え、神経移植の実験を思案した。ただ、ヒトの歯髄をヒトに移植する実験系は実験初期からは当然設定できず、また、ラットの歯髄をラットに移植するのは、大きさの観点から困難であるため、ヒトの歯髄をラットの坐骨神経切断部に移植する、異種移植での実験系を考案した。その際は、ヒトの歯髄中に入っている生細胞は抗原性を低下させる必要があり、これは細胞を死滅させることになる。また、growth factor も細胞の処置中に流出や消失するため、コラーゲン等の細胞外器質が scaffold となって活用できないかとの観点で異種の系で実験を企画した。

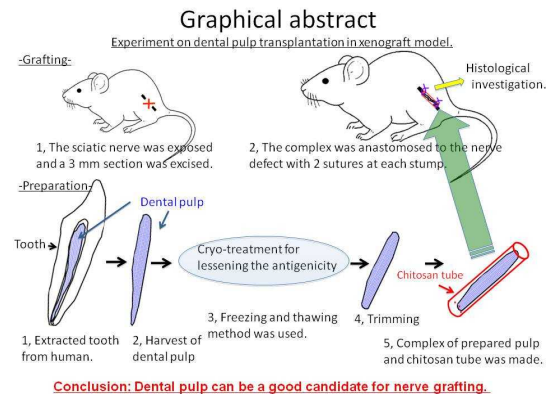
2. 研究の目的

歯髄神経が末梢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。異種の系であるため、抗原性の問題があり、抗原性を凍結融解法で低下させる。そのため、生細胞の活躍は期待せず、細胞外器質や骨格を scaffold として活用することを期待する。結果、歯髄神経も末梢神経移植のドナーとして活用できる概念を確立する。

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・歯学部倫理委員会に申請し、承認された (平成 19 年 9 月 18 日付)。また、動物実験については動物実験委員会に申請し承認された (承認番号: 第 19(56)号)。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。採取した歯髄は次の処理まで生理的食塩水に漬け、冷所保存した。実験の概略を下記に示す。



抗原性の低下処理は、神経採取後 4 時間以内に液体窒素と常温の生理食塩水に交互に 5 回入れて、生細胞を失活させた。その後、歯根部歯髄を切断して長さ 8mm 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。動物は、180~200g の雄の Sprague-Dawley (SD) ラットを用い、麻酔はペントバルビタールを腹腔内注射 (50 mg/kg body weight) で行った。

剃毛後ラットの膝から上に 30mm 程度の皮膚切開入れ、筋層を剥離して坐骨神経を明示した。明示後、坐骨神経を 5mm 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・ナノメッシュチューブ (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った。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 : キトサンチューブ内に別の SD ラットより採取した坐骨神経を填入 (Isograft group, 同種同系移植: positive

control)

グループ 2 : キトサンチューブにヒトの歯髄を填入

(Dental pulp group, 異種移植: 実験群)

グループ 3 : キトサンチューブ単体で縫合 (Tube group)

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。

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 $4\mu\text{m}$ にサンプルを切断し、下記抗体を 4°C 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

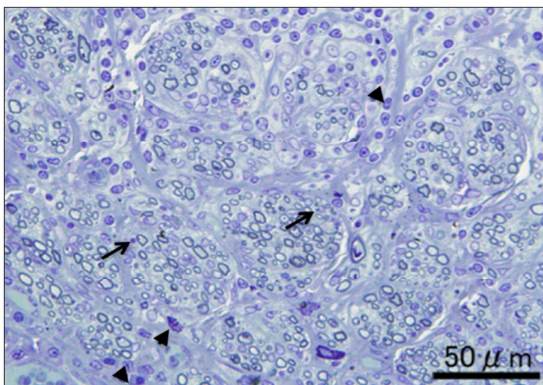
1 次抗体 anti-S-100 (1:100, SIGMA, USA)、2 次抗体 goat anti-rabbit IgG TRITC

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。

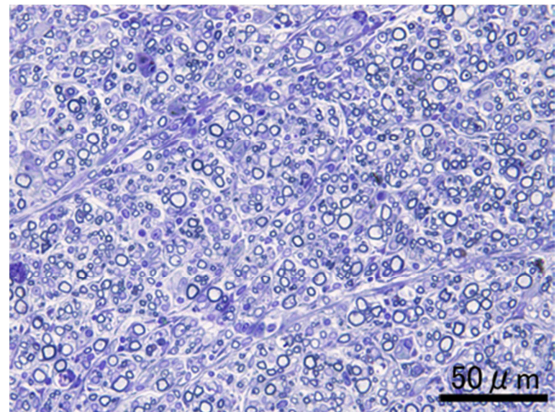
電子顕微鏡での評価は移植後 4 週のサンプルを用いて行った。Epon 包埋して TEM (Hitachi H-600; Hitachi Co., Tokyo, Japan) で行った。

4. 研究成果

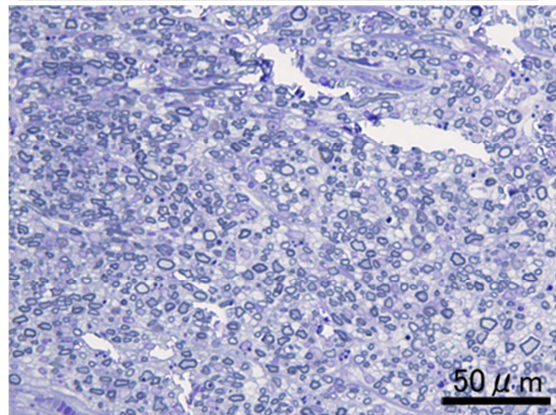
移植後 12 週、dental pulp group では、新生軸索は認められるもの、isograft group に比較して、やや太さが細く、局在して認められた。さらに、変性したミエリン梢や炎症細胞も認められた。この所見より、dental pulp group ではワーラー変性と軸索新生が混在していることが判明した。Tube group では isograft group とほぼ同様の軸索新生像を認めた。



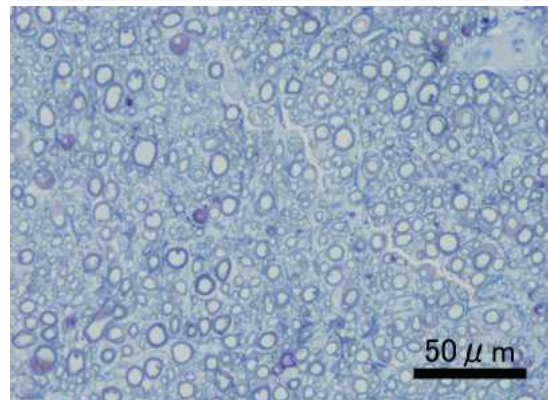
Dental pulp group. 移植後 12 週。新生軸索は認められ凝集塊をつくるものの、その数は少ない (矢印)。変性したミエリン鞘も認められる (矢頭)。



Isograft group. 移植後 12 週。数多くの新生軸索は認められ、凝集塊も豊富に様に認められる。



Tube group. 移植後 12 週。Isograft 同様に数多くの新生軸索が認められ、凝集塊も豊富である。



Dental pulp group. 移植後 32 週。変性したミエリン鞘は認めず、新生軸索が豊富である。

移植後 32 週後、dental pulp group でも、成熟した厚みのあるミエリン梢が認められ、炎症細胞は減少し、他の group とほぼ同様の軸索新生となった。

続いて、免疫組織染色を行った。新生軸索は Neurofilament 抗体で染色され、その軸索は S-100 抗体で染色されたシュワン細胞に取り囲まれていた。ただ、dental pulp group は isograft group に比べ数は少なかった。

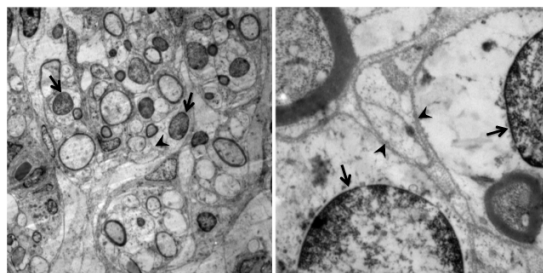
そこで、客観的に評価するため、軸索の直径、凝集率、軸索の占拠率を測定した。軸索の直径については、有意差なかったものの、凝集率と占拠率は dental pulp group で劣っていた。

Histological analysis of the grafted tubes (means±SD)

	Experimental Group	Isograft Group
Duration after grafting	12 months	6 months
Number	N=4	N=5
Axon diameter (μm)	2.43±0.17	2.09±0.37
Axon density (X10 ³ number/mm ²)	20.10±3.14*	46.37±11.15*
Axon area (%)	20.60±1.94*	33.79±6.82*

There is no significant differences in axon diameter between 2 groups.
The axon density and axon area in experimental group were significantly smaller than that in isograft (*p<0.05).

移植後 4 週目のサンプルを、電子顕微鏡で確認すると、新生軸索がシュワン細胞を伴いながら基底膜上を中枢側から進展していた。この移植後早期に認められたシュワン細胞は宿主由来で、基底膜はドナー由来であることが示唆された。



TEM 像。シュワン細胞と基底膜が認められる。
矢印：シュワン細胞、矢頭：基底膜

考察

歯髄は血管、神経、リンパ管、その他結合組織の複合体である。当然シュワン細胞は存在している。最近で、歯髄には幹細胞（歯髄幹細胞）も豊富に存在しているとも言われており、我々臨床歯科医が日常あまり関知しない再生医療の分野で着目されている。一報では、歯髄細胞が脊髄損傷の治癒に役に立ったとのことである¹。

今回、われわれは、結果的にはシュワン細胞の基底膜が神経移植の scaffold になれないかの観点で異種移植の系で実験した。抗原性を低下させるための凍結融解法では、生細胞を効果的に死滅させるが、コラーゲン線維やシュワン細胞の基底膜は保存されているため、この特徴を生かしての実験であった。

一方でキトサン・ナノメッシュチューブは神経親和性が良好で、機械的強度もあるとされている²。よって、今回は歯髄神経が小さくて、機械的強度も弱いため、その強度の補強する意味や神経縫合を容易にするため、ま

た、再現性を確保するために、歯髄神経をキトサン・ナノメッシュチューブに入れた状態で縫合した。

移植後 12 週、dental pulp 群で、ニューロフィラメントと S-100 の二重免疫染色が陽性であり、シュワン細胞により軸索が確実に新生されていることが確認できた。トルイジンブルー染色では、軸索が凝集して認められた。ただ、tube 群や isograft 群に比べて、凝集数は少なかった。炎症細胞の浸潤や変性したミエリン鞘も数多く認められ、ワーラー変性と神経軸索の新生が共存していた。変性した残骸には DNA³ やヌクレオチド⁴ が多く含まれていると推察され、これは炎症反応を強く引き起こすとも報告されており、事実今回の系では移植後 12 週には強い炎症反応が認められた。ただ、移植後 32 週、dental pulp 群でも他の群に劣らない状態での軸索の新生が認められ、炎症細胞は減少していた。

今回の実験で、歯髄は神経移植のドナーとして活用できることが明らかとなったが、凍結融解法で抗原性を有する細胞を死滅させることによってその残骸が残り、その貪食処理に時間がかかり、結果、中枢側からの神経軸索の伸展が遅くなり効率が悪かった。そのため、より効率の良い神経架橋材料の開発する目的で細胞骨格のみ残り、細胞成分のみをすべて除去する脱細胞化 (decellularization) の技術を取り入れた。一般的に SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) や Triton X-100 で行うが、コラーゲンへの障害やボリュームの減少のため力学的強度についての影響が懸念された。しかも、歯髄は小さく細いため、通常の方法 (1% SDS 25° で 24 時間攪拌、洗浄後 1% triton-X で 1 時間攪拌、その後 7 日間洗浄) で処置すると、実際に神経の強度が低下した。そのため攪拌時間や濃度の調整も行ったが、可及的に太い神経を使うことがまず必須と考えられた。ただ、効率良く神経を再生するためには、本処置が有効である実感はあり、強度増強の意味合いでキトサン・ナノメッシュチューブでの被覆が合目的とも思われ実験の途中である。

また、今回は異種移植の系であり、ドナー由来のシュワン細胞の活躍を期待していなかった。また、ドナー内に存在されていると思われる歯髄幹細胞、増殖因子関与の観点からは実験していない。今後、この点からもアプローチすることで、神経移植の発展に寄与することが期待される。

歯髄は一番容易に採取できる末梢神経であり、歯髄を用いた幅広い移植実験が今後も可能であると考えられる。

¹Nosrat IV, Widenfalk J, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. Dev Biol 2001;238:120-32.

²Itoh S, Suzuki M, Yamaguchi I, Takakuda K, Kobayashi H, Shinomiya K, et al. Development of a nerve scaffold using a tendon chitosan tube. *Artif Organs* 2003;27:1079-88.

³Ishii KJ, Suzuki K, Coban C, Takeshita F, Itoh Y, Matoba H, et al. Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J Immunol* 2001;167:2602-7.

⁴Krysko DV, Leybaert L, Vandenabeele P, D'Herde K. Gap junctions and the propagation of cell survival and cell death signals. *Apoptosis* 2005;10:459-69.

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1件)

- ① Matsushita K, Wang W, Itoh S, Domon T, Funahashi M, Totsuka Y. Dental pulp can be a good candidate for nerve grafting in a xeno-graft model *Journal of Neuroscience Method* 205, 246-251, 2012. 査読あり。

[学会発表] (計2件)

- ① 松下和裕、王 巍、伊藤聡一郎、柏崎晴彦、戸塚靖則、鄭 漢忠. キトサン・ナノ繊維チューブ/歯髄神経ハイブリッド型人工神経を用いた異種移植実験. 第26回キチン・キトサンシンポジウム. 2012年7月12日, 北海道大学学術交流会館, 札幌.
- ② Matsushita K, Wang W, Itoh S, Totsuka Y, Tei K. An experimental study of xenograft using a hybrid artificial nerve of chitosan nanofiber mesh tube and dental pulp. 10th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery. 12 Nov, 2012. Discovery Kartika Plaza Hotel, Bali, Indonesia.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

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：19791477

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

伊藤 聡一郎 (ITOH SOUICHIRO)
東京医科歯科大学・生体材料工学
研究所・研究員
研究者番号：10242190

王 巍 (WANG WEI)

東京医科歯科大学・生体材料工学
研究所・助教
研究者番号：60451944