

令和元年6月13日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2018

課題番号：25463132

研究課題名(和文) 舌神経断裂後の味覚受容機構の回復過程の解析

研究課題名(英文) Analysis of the recovery process of the taste receptor mechanisms after lingual nerve injury

研究代表者

吉川 博之 (YOSHIKAWA, HIROYUKI)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：20547575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では舌神経損傷と味蕾を含む舌乳頭の変化について臨床およびモデル動物を用いて検討した。神経MRIを用いた損傷神経の画像解析では感覚・味覚と舌粘膜萎縮、損傷神経の形態の関連性は低かった。神経損傷モデルでは切断後BDNF発現が一過性に上昇し、その活性を抑制するとアロデニア様反応を呈さなかった。神経修復過程において、BDNF活性抑制は神経腫を形成せず軸索再生を誘導したが、機能の再生は阻害しないと考えられた。舌神経切断後も味覚受容体T1R1、T1R3 mRNAの発現増加傾向を認めたことから、損傷後の味覚と舌乳頭萎縮の関係は神経の治癒状態のみならず味覚受容体の発現量の違いによるものも考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経が損傷した後の修復にはBDNFが関与しており、修復された神経の形態・機能に影響を与える。ヒトで損傷神経を画像解析と異常感覚の重症度、味覚および舌乳頭萎縮の関係を検討すると、神経の形態異常と症状の関連性は低いことが示された。一方、動物実験で味覚受容体T1RファミリーとBDNFの発現の解析結果から、味覚回復についても修復神経の形態よりも味覚受容体の発現が関わっている可能性がある。これらより舌神経損傷に対する機能的回復を目指した治療には、BDNFなどの薬物による治療が役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, changes in the tongue papilla, including the taste buds, caused by lingual nerve injury, were examined using clinical and model animals. Imaging of injured nerves using 3-dimensional volume rendering MR neurography showed low relevance between sensation and taste, tongue mucosal atrophy, and injured nerve morphology. In the nerve injury model, BDNF mRNA expression was transiently elevated after nerve injury, and suppressing its activity did not exhibit an allodynia-like response. In the neural repair process, suppression of the BDNF activity did not form a neuroma, instead induced axonal regeneration. Functional regeneration was not inhibited. As the taste receptors T1R1 and T1R3 mRNA expression tended to increase even after tongue nerve transection, the relationship between the taste after injury and papillary atrophy was considered not to be the healing state alone, but to the difference in the expression level of taste receptors.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：舌神経障害 BDNF 味蕾 神経再生

## 1. 研究開始当初の背景

下顎埋伏智歯の抜去や各種の口腔外科手術、さらにインプラント埋入術などにより、舌神経や下歯槽神経が損傷を受けている症例がしばしば見られる。しかし的確な診断がなされないまま自然治癒を期待しただけで、結果として難治性疼痛や機能障害を生じている症例が少なくない。顔面神経の味覚枝を含む舌神経は損傷により、知覚麻痺・味覚障害を呈する。特に舌神経傷害の症例では、知覚麻痺・味覚障害の他に舌粘膜の萎縮、味蕾の消失を認める。この舌神経障害では神経の再生に伴い味蕾細胞の再生が起こることが知られている。しかしながら断裂した神経の修復後、舌乳頭は認められるにも関わらず、味覚の回復がないことなど、舌神経損傷と味蕾細胞を含む舌乳頭の変化についての機構はあまりよく分かっていない。

神経の機能には興奮の伝達・伝導の他、支配臓器・組織の領域の細胞の分化を誘導する働きや機能維持の働きがあることがわかっている。舌乳頭のうち茸状乳頭は顔面神経の枝である鼓索神経および三叉神経第3枝下顎神経の枝である舌神経の二重支配を受けていることが知られており、これらの神経の障害により茸状乳頭の味蕾の消失が認められる。切断後の神経断端を接合することにより神経の再生が認められるが、神経が再生したからと言って必ずしも味覚の回復が得られるとは限らない。したがって舌神経切断後の神経回復機構を臨床・基礎研究より明らかにすることで舌神経損傷に対する治療の指針を確立できる。

## 2. 研究の目的

本研究では舌神経障害と味覚受容機構の関連について明らかにすることを目的とする。臨床的分析および動物実験による基礎的分析の2つから検討を行い、舌神経障害により生じた変化を解析する。臨床的分析では、舌神経障害によって生じた症状、感覚の種類の変化および画像解析により神経損傷後の構造的変化を解析し、経過によりそれらがどう変化するか観察し検討する。基礎的分析では実験的にラットの神経に物理的損傷を与え、それによる変化を非損傷側との比較で分析する。特にニューロトロフィンのひとつである脳由来神経栄養因子 (BDNF) の影響を中心に形態的・機能的・生化学的に検討を行う。

臨床的分析・実験的検討から得られた結果を総合検討し、舌神経損傷による味覚受容機構の変化について考察する。

## 3. 研究の方法

### (1) 舌神経障害の臨床的解析

舌神経障害 12 症例を対象とし、舌乳頭の萎縮と受傷後期間、味覚、臨床症状、重症度、舌乳頭の状態、味覚、病的神経形態との関連を解析した。異常感覚の重症度は臨床症状により感覚の異常から3段階に分け、: Paresthesia、: Dysesthesia、: Dolorosa, Spontaneous pain とした。また高磁場 (3 テスラ) または (1.5 テスラ) の MRI 装置を使用し、神経走行に沿った断面を設定して3次元情報を2次元平面に投影する高分解能3DVR-MRN (3-dimensional volume rendering MR neurography) を用いて損傷神経を描出し、画像解析を行った。神経の形態異常の判定は、正常舌神経の画像との比較により評価した。

### (2) 神経損傷モデル動物

モデル動物は舌神経と同じく三叉神経第三枝の下顎神経の枝であり、臨床において神経障害が多い下歯槽神経を切断した下歯槽神経損傷モデルおよび舌神経切断モデルを用いた。6週齢雄性SDラットを使用し、処置はセボフルラン、ペントバルビタール麻酔下で1%リドカインを局所麻酔で併用して行った。舌神経切断モデルは仰臥位固定後、オトガイ下部から広頸筋、顎二腹筋を剥離し、口腔外より舌神経にアプローチする方法により作製を行った。下歯槽神経切断モデルは頬部皮膚を切開し、頬側の下顎骨皮質骨を切削し、下歯槽神経を下顎孔より遠位で切断することにより作製した。

### (3) 遺伝子発現量の解析

神経切断後のラット BDNF, T1R1, T1R3 の mRNA の発現量を定量的リアルタイム PCR 法を用いて測定した。発現量の変化は切断側と非切断側で比較した。三叉神経節は神経切断後 0, 6, 24, 72 時間および 1 2 週間後に採取し、舌の試料は 1 週間後に採取した。PCR はラット BDNF, T1R1, T1R3 および Beta-actin (内部標準) に特異的なプライマーを用いて行った。各検体の比較には BDNF, T1R1, T1R3 との比率 (BDNF/Beta-actin, T1R1/Beta-actin, T1R3/Beta-actin) による相対定量法で行った。

### (4) 神経損傷からの回復における BDNF の関与についての検討

神経損傷後の BDNF の関与を検討するために、下歯槽神経損傷モデルの神経切断部位に抗 BDNF 抗体 1 µg を局所投与した。この抗体投与群と抗体の代わりに生理食塩水を投与した抗体非投与群とを組織学的・電気生理的・行動学的に比較検討した。

組織学的解析: 切断 2 週間後に得た組織標本を筋組織や神経とコラーゲンを識別するためにア

ザン染色を行ない、形態を観察した。

電気生理学的解析：再生神経の機能を確認するため、jaw opening reflex(JOR)を神経切断後3週間目に測定した。オトガイ部に刺激電極を、顎二腹筋(Dig;開口反射筋)に記録電極を挿入して電気筋運動記録(EMG)活性を測定し、刺激閾値および反応潜時を記録した。

行動学的解析：神経切断部の支配領域の機械刺激(von Frey filamentを用いた触刺激)による逃避反応閾値を観察した。測定にあたって、1週間ラットに対しオトガイ部への触刺激に慣れさせる訓練を行った。訓練を行ったラットの歯槽神経を切断し、切断後3日目より機械的刺激に対する逃避閾値を測定した。測定は切断3日目より開始し、切断後3週間目まで行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 舌神経損傷患者の病態分析

舌乳頭の萎縮は患者12人中7人で認められた。受傷後の期間は萎縮ありでは中央値24か月(最小11日、最大12年)、萎縮なしでは中央値が2.5か月(最小20日、最大4年3か月)であった。味覚検査では萎縮と判定され、味覚検査を行った5例中4例で全味スケールアウトであった。萎縮なしの例でも4例中3例でスケールアウトしていた。重症度は重症度が12人中9人で、他はすべてであった(図1A)。MRI所見では、萎縮がある例では神経の走行の異常が認められる(deformity型)ものが71%、萎縮のないものでは40%であった(図1B-1)。また神経周囲の結合組織増生(isolated型：神経は正常走行、正常形態であるが、周囲に神経と分離した増生組織(瘢痕組織)を認めるタイプおよびdeformity型で増生組織伴うもの)は、萎縮例のみ42%でみとめられた(図1B-2)。

異常感覚および味覚と舌乳頭萎縮の関連性は低く、経時的変化との関連が示唆された。神経の走行が異常または発芽や神経腫など神経の形態が異常のタイプであるdeformity型は重度の神経損傷を示しているとされている。今回の結果では神経走行に異常があり、かつ舌乳頭萎縮が認められた例は約70%であり、神経損傷の程度と舌乳頭萎縮は関連があるかもしれない。より高度な神経障害のMRI所見での解析は舌乳頭萎縮と相関がある可能性が考えられる。また今回の舌乳頭萎縮の判定はカルテ上の記載をもとにしたものであることから、萎縮の判定基準を設定する必要がある。

##### (2) 神経損傷からの神経回復におけるBDNFの関与

###### 神経切断後に誘導されるBDNF mRNA発現量解析

歯槽神経損傷モデルにおいて、その切断部および神経節のBDNF mRNA発現の解析を行った。末梢における神経切断部位周囲組織のBDNF mRNA発現は、切断後0時間が $0.265 \pm 0.038$ に対して切断後24時間が $0.807 \pm 0.14$ と切断後24時間の方が有意に増加していた(unpaired t-test,  $P < 0.01$ )。三叉神経節では、切断側の神経節において切断後6時間で非切断側と比べmRNA発現の上昇傾向あり、24、72時間では有意な増加がみとめられた。また切断後2週間では切断側、非切断側の発現量は有意な差は認められなかった(図2)。これによりBDNFは切断後早期に上昇し、神経再生がかなり進行しているとされる2週間では差がないことから、BDNFは神経損傷後の回復過程において早い段階での関与が示唆された。

###### BDNFが神経再生に果たす役割の組織学的検討

組織学的分析では、神経切断後に抗BDNF抗体の局所投与により局所におけるBDNFの作用を抑制すると、切断神経断端の神経突起伸長を抑制、膠原線維の減少、および外傷性神経腫形成を抑制することが認められた(図3)。この結果から、BDNFは組織学的に神経再生に参与する可

図1 舌神経損傷症例における臨床および検査所見と舌乳頭の萎縮の関係

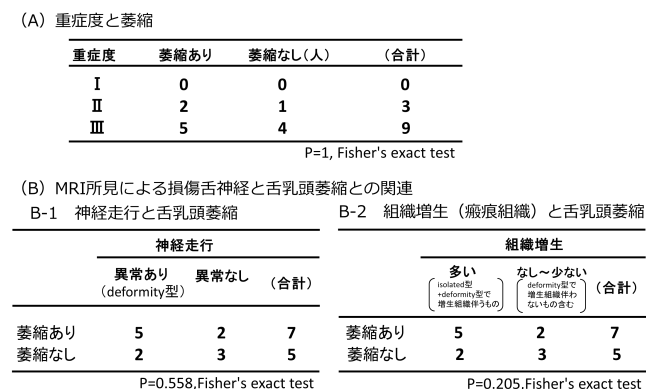
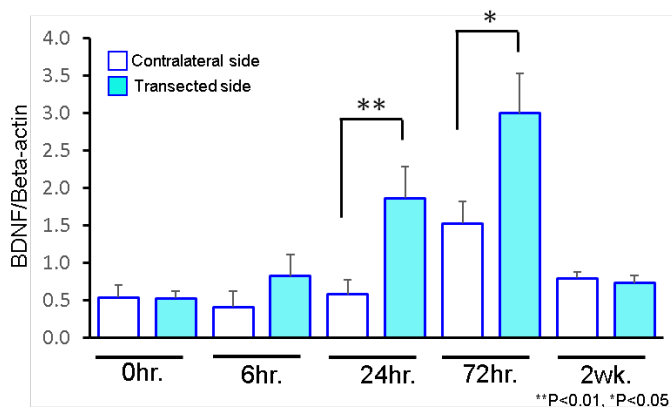
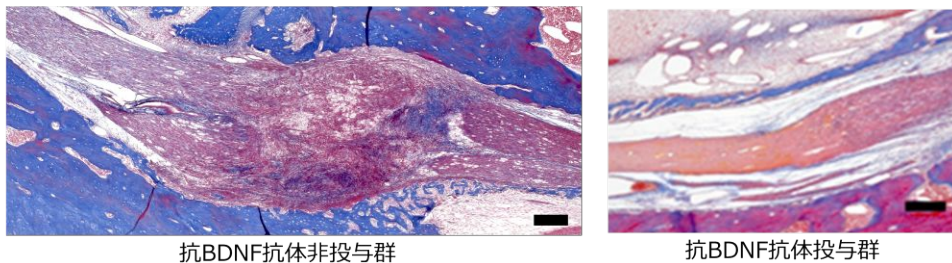


図2 神経切断後のBDNF mRNA発現量



能性が示唆された。

図3 神経切断後の切断部組織図



BDNF が神経機能回復に与える影響についての検討

JOR は三叉神経脊髄路核を介し運動ニューロンにより開口筋(顎二腹筋)を動かす反応である。今回は求心路の伝導障害、つまり神経損傷の程度の判定のために本法を用いた。JOR は抗体投与群、抗体非投与群の両群で測定したすべてのラットの切断側顎二腹筋で生じた。切断側オトガイ神経を刺激した際のJORの刺激閾値(図4A)および反応潜時(図4B)は両群で統計学的に有意差はみられなかった。

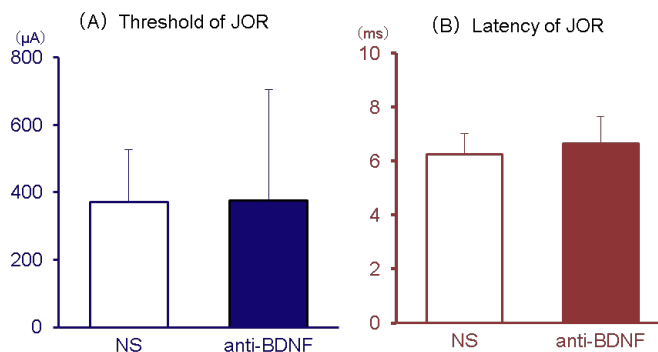


図4 再生神経における開口反射 (JOR)

神経切断側への機械的触圧刺激による逃避閾値は、切断後3日で閾値の上昇ピークが認められ、以降低下した。抗体非投与群では14, 21日目では切断前よりも閾値の低下を示した。一方、切断後7, 14, 21日目で非抗体投与群と比較して抗体投与群の閾値は有意に高かった(図5)。

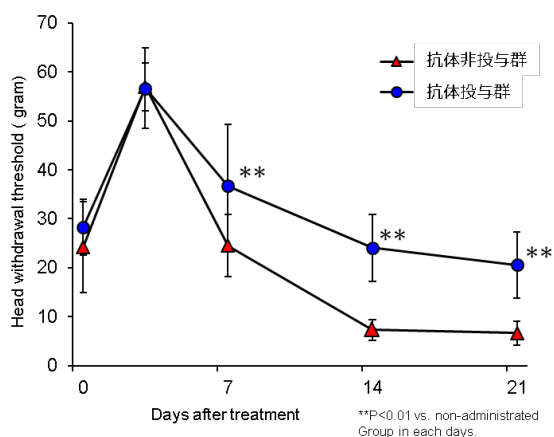


図5 機械的触刺激に対する逃避閾値測定

mRNA 発現量の解析結果より、神経が切断されたことでmRNAの発現が切断部と神経節で上昇したことから、BDNFが切断後の神経修復に必要なため発現量の増加が見られたのではないかと考えられる。

今回測定したJORによっても切断後のBDNF活性の抑制が再生神経の機能を阻害しないことを確認した。切断した下歯槽神経にはA、A、C線維が含まれている。Aは短潜時であり、今回は潜時が6ms程度であったことなどからA線維の求心路が反応したと思われる。

触刺激による逃避反応の測定は、A線維の回復を判定するために用いた。神経切断により逃避閾値は上昇し、神経の修復に伴い上昇した閾値は低下した。切断された三叉神経は、1~2週間で再生するとされるが、触覚は、切断直後に一時的に閾値は上昇し、炎症反応の消退、傷害神経の修復に伴い触覚閾値は徐々に低下を始める。今回の結果では切断後2週間でBDNF活性を抑えないと、切断前より閾値は低下しアロデニア様の反応を呈した。触刺激の逃避閾値で差が見られたが、JORでは差が見られなかったのは、JORは吻側亜核を介するが、触刺激などによる逃避行動は尾側亜核を介する経路の違いからではないかと考えられた。

以上の結果から神経損傷は、局所のBDNF増加を誘発し、それが過剰な神経再生を生じさせ、神経腫を形成するが、適度のBDNFの機能抑制は、正常の神経再生を規定できる可能性が示唆された。今後は抗体量をコントロールすることでさらに良好な治癒が得られるかもしれない。

#### (4) 舌神経損傷モデルによる解析

##### 舌神経切断後の舌粘膜表面の変化

舌神経切断モデルの実体顕微鏡による舌粘膜表面の観察では、舌神経切断後 7 日後の舌粘膜はやや萎縮がみられ、非切断側に比べ切断側は茸状乳頭の萎縮・減少がみとめられた(図6)。また舌に咬傷を認める個体もあり、舌の知覚変化を生じていると推測された。

図6 切断後7日の舌粘膜表面



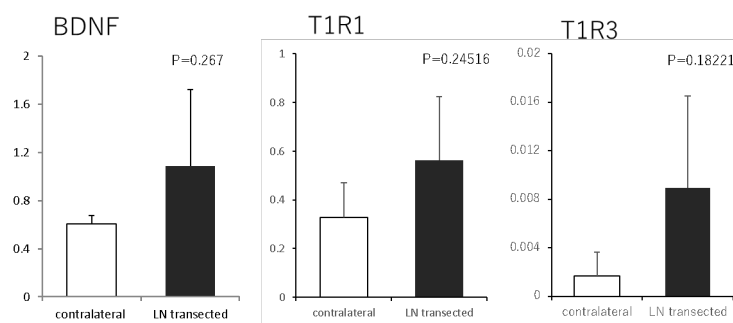
(切断側) (非切断側)

##### 神経損傷後の遺伝子発現量

リアルタイム PCR による神経切断部および神経節の BDNF mRNA の発現量測定の結果をグラフに示す(図7)。

舌神経切断後 7 日の三叉神経節では、切断側の神経節において非切断側に比べ BDNF mRNA 発現の増加傾向がみられた。この結果から、舌神経切断後に誘導された BDNF mRNA は、舌神経切断においても下歯槽神経損傷の際とほぼ同様の発現傾向を示していると考えられる。

図7 舌神経切断後の mRNA 発現量



すなわち舌神経損傷においても損傷後の BDNF が神経修復過程に関与するが、その発現量によりその後の味覚または触覚の回復に影響を及ぼすことが考えられる。

また神経損傷後の舌粘膜の観察より、茸状乳頭の萎縮・減少がみられた。このことから味蕾のマーカーとして味覚受容体 T1R ファミリーのうち茸状乳頭に強く発現される T1R1, T1R3 を設定し、切断後の mRNA を測定し検討を行った。その結果、T1R1, T1R3 mRNA も増加傾向がみられた。切断後の粘膜萎縮舌における T1R1, T1R3 mRNA の発現は、切断後も萎縮・変性中の細胞により発現が続いているのに加え、神経再生に伴い支配を受けている味蕾も再生過程であり、それによる発現もあるものと考えられた。

臨床的研究で、舌乳頭の萎縮が無くとも味覚が逸脱していた例が存在し、さらに神経 MRI による検討から異常感覚および味覚と舌乳頭萎縮の関連は低いことが示唆された。このことから損傷後 BDNF の発現が上昇し、それにより神経腫を生じたとしても、神経腫の存在が味覚や舌乳頭萎縮などの変化に影響をおよぼさないと考えることもできる。この臨床的研究の結果および今回の結果より、損傷後に萎縮が無くとも味覚の逸脱がある、もしくは萎縮があっても味覚は不変というのは、味覚受容体の発現量の違いによる可能性が考えられた。

#### 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1件)

Yoshikawa H, Yamada Y, Kurose M, Yamamura K, Maeda T, Seo K; Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor Modulates Regeneration Following Inferior Alveolar Nerve Injury in Rats. J Oral Facial Pain Headache. 2016;30(4): 346-354.(査読有)

[学会発表](計3件)

吉川博之、照光真、須田有紀子、田中裕、弦巻立、倉田行伸、佐藤由美子、金丸博子、小玉由記、瀬尾憲司: 舌神経障害における舌乳頭萎縮に関連する異常所見の検討、第45回日本歯科麻酔学会総会・学術集会、平成29年10月13-15日、まつもと市民芸術館、松本市

H. Yoshikawa, Y. M. Valverde, T. Maeda, M. Kurose, K. Yamamura, K. Seo; Functional analysis of the regenerated inferior alveolar nerve after local administration of anti-BDNF antibody to the transected site. 44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Nov.15-19, 2014, Washington DC, USA

吉川博之、弦巻立、瀬尾憲司: 神経損傷によるニューロトロフィンの変化を導くメカニズムについて、第41回日本歯科麻酔学会総会・学術集会、平成25年10月2-4日、新横浜国際ホテル、横浜市

[図書](計0件)

該当事項なし

〔産業財産権〕  
出願状況（計 0件）  
該当事項なし

取得状況（計 0件）  
該当事項なし

〔その他〕  
ホームページ等  
該当事項なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：瀬尾 憲司

ローマ字氏名：SEO, Kenji

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：教授

研究者番号（8桁）：40242440

研究分担者氏名：照光 真

ローマ字氏名：TERUMITSU, Makoto

所属研究機関名：北海道医療大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：60401767

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。