

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

大桑 雄太

論文題目

ラット末梢神経圧挫損傷後の歯髄細胞移植における
運動機能評価と組織学的評価

I. 緒言

顎顔面領域において外科的処置の合併症として末梢神経の損傷が生じることが多い。損傷後の末梢神経系には再生能力がある程度有することが知られているものの、その再生能力は不十分であり完全に機能回復するまでには至らないことが多い。そこで、臨床的な問題となる末梢神経の損傷後に引き起こされる機能的な障害に対する根治的治療法の開発は急務である。顎顔面領域の手術で損傷しやすい神経は、下歯槽神経、舌神経および舌下神経であり、下顎第三大臼歯抜歯後の神経損傷は0.4%から8.4%の割合で生じるとの報告がある。これまでの末梢神経損傷に対する治療法として、圧挫や軽度の切断症例においては薬物療法や理学療法などの対症療法があるものの、神経の欠損部の大きい症例では自家神経移植が適用されている。しかしながら、自家神経移植に必要な移植神経を採取するために新たな外科的侵襲を加えることから、末梢神経損傷後の機能回復のために神経採取をする必要の無い、新規の根治的な治療法の開発が望まれている。

近年、末梢神経再生の治療法として細胞移植療法が注目されている。成体幹細胞の一つである間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪組織、骨格筋、歯根膜、歯肉および歯髓組織といったさまざまな組織から単離されることから、再生医療に利用される幹細胞の中で造血幹細胞と共に注目されている細胞である。近年、この間葉系幹細胞は免疫および炎症反応を調整する機能や傷害部位に移動する能力などを備えることが報告され、パラクリン機構を介

した組織固有の細胞への効果を期待した医療の開発が進んでいる。今回の研究で焦点をあてた末梢神経損傷における細胞治療の細胞源となる条件としては、神経栄養因子を産生することが重要となる。

Gronthos らが歯髄組織の間葉系幹細胞（歯髄幹細胞）を 2000 年に同定してからすでに 17 年が経過し、その特性を解析した研究報告は多い。近年では、歯髄幹細胞が神経損傷を抑止し修復するという結果も示され、歯髄幹細胞を顔面神経の損傷部位に移植すると軸索の再生が促進することも報告されている。これらの研究から、ヒト歯髄幹細胞は神経疾患の治療に対して他の幹細胞と同様に有効であると考えられる。さらに、他の中胚葉由来の間葉系幹細胞と比較すると、歯髄は廃棄される抜去歯から採取でき、倫理的な問題もない点を考えると細胞治療における利点がある。

本研究では下顎埋伏智歯抜歯による末梢神経損傷の状態と類似する坐骨神経圧挫モデルを作製し、ヒト歯髄細胞の移植効果を検討することとした。

II. 材料および方法

II-1 細胞培養

本研究は、愛知学院大学歯学部倫理委員会の承認（承認番号：406）を得て実施した。愛知学院大学歯学部附属病院口腔外科外来を受診し、インフォームドコンセントの得られた患者（18 歳～29 歳）より第三大臼歯を抜去した。それらの歯髄組織を摘出後、以下の方法を用いて歯髄幹細胞を含む

間葉系細胞（以下歯髄細胞）を採取した。歯髄組織を酵素処理および濾過して細胞を分離し、 3.0×10^4 個を 35 mm 培養ディッシュ上に播種した。コロニーを形成した歯髄細胞が培養ディッシュ内で 70%コンフルエントに達した後に細胞を分散し、100 mm 培養ディッシュへ継代培養した。なお、第 6 継代目の歯髄細胞を本研究に供した。

II - 2 坐骨神経圧挫モデルの作製

本研究は愛知学院大学歯学部動物実験委員会の承認（AGUD258 号）を得て実施し、実験動物の取り扱いと同委員会の指針に沿っておこなった。実験には Fischer344 系雄性ラット（体重 190~210 g）を用いた（n = 18）。ラットの頭部マスクを装着しイソフルラン濃度を 1.7%で維持した吸入麻醉下で手術を行った。坐骨神経を剖出した後、坐骨神経をマイクロバスキュラークリップにて 30 分間圧挫した。なお、圧挫部位を明示するために、圧挫部位中央部の坐骨神経上膜に 10-0 ナイロン糸 1 糸で縫合した。細胞懸濁液は次のように調整した。2 μ l のアテロコラーゲンに 0.2 μ l のフィブロネクチン、0.1 μ l のラミニンおよび 8 μ l のハンクス液にて作製したコラーゲン混合液 10 μ l にて 3.0×10^5 個の歯髄細胞を懸濁し、酸化セルロース（SURGICEL）に播種後に圧挫部を取り囲むように留置した（細胞移植群、n = 6）。また、対照として坐骨神経を圧挫したのみの群（圧挫群、n = 6）、および左側後肢外側面を皮膚切開後に閉創した群（Sham 群、n = 6）を設定した。なお、免疫抑制剤であるタクロリムスを手術前日から術後 14

日目まで毎日体重 1 kg あたり 0.05 mg を腹腔内に投与した。

II-3 運動機能解析

圧挫群および細胞移植群の運動機能解析には CatWalk XT を用いて、ラットの自然歩行を分析した。なお、ラット後肢の第一指と第五指の間隔（以下 1～5 指間隔）、第二指と第四指の間隔（以下 2～4 指間隔）および第三指先と踵の間隔の 3 項目を測定し、圧挫群と細胞移植群で比較した。なお、1～5 指間隔、2～4 指間隔および第三指先と踵の間隔は、個体差を考慮してそれぞれ健側の間隔から患側の間隔を減じた値としてあらわした。

II-4 前脛骨筋湿重量の測定

ラットを術後 14 日目で安楽死させ、圧挫した患側および健側の前脛骨筋を摘出し、筋湿重量を秤量した。圧挫群と細胞移植群において、健側の筋湿重量を 100% とした時の患側の筋湿重量比を算出し、両群で比較した。

II-5 組織学的解析

術後 14 日目に左側坐骨神経を採取し、通法に従いパラフィン包埋した。パラフィン切片は、パラフィン包埋された試料をマイクロトームで厚さ 5 μ m に薄切し、スライドグラスに載せ作製した。ヘマトキシリン・エオジン（以下 H・E）染色、またはルクソールファストブルー（以下 LFB）染色を実施しマリノールで封入した。まず圧挫群と細胞移植群における神経線維間の空隙面積率（空隙部の面積／規定した画像全体の面積）を解析した。変性の割合を圧挫群と細胞移植群で比較するために、H・E 染色した組織切片を

強拡大 (×40) し、その視野 (0.21 × 0.37 mm) で観察される空胞数を測定した。また、LFB 陽性面積率 (LFB 染色陽性部位の面積 / 規定した画像全体の面積) を求めた。

II - 6 免疫組織化学的解析

II - 5 と同様の手法で厚さ 5 μm のパラフィン切片を作製し、抗 Myelin basic protein (以下 MBP) 抗体を用いた免疫組織化学的手法による染色をおこなった。そして抗 MBP 抗体陽性部位の面積率 (抗 MBP 抗体陽性部位の面積 / 規定した画像全体の面積) 解析した。

II - 7 統計処理

データは平均値 ± 標準偏差で表し、Student' s *t*-test にて有意差検定をおこなった。なお、有意水準は 5 % とした。

III. 結果および考察

III - 1 細胞培養

移植に利用する歯髄細胞を位相差顕微鏡で観察した。培養 6 日目には間葉系幹細胞の特性の一つであるコロニー形成能をもつ細胞を認めたことから、歯髄から採取した細胞集団内に歯髄幹細胞が存在することが示唆された。

III - 2 坐骨神経圧挫後の肉眼的所見

術後 14 日目での圧挫群および細胞移植群における左側後肢 (患側) の第

一指から第五指の間隔を測定し、坐骨神経圧挫部位の肉眼的所見を比較した。細胞移植群の左側後肢において、第一指から第五指の屈曲はなく、間隔は右側後肢（健側）と比較しても顕著な差はみられなかった。また、細胞移植群と比較すると、圧挫群の左側後肢の第一指から第五指は内反し屈曲しており、間隔は狭かった。また、剖出した坐骨神経の肉眼所見では、細胞移植群および圧挫群に形態的な差が観察されなかった。

Ⅲ－３ 運動機能評価

① CatWalk XT による運動機能評価

指間隔および指踵間隔を坐骨神経圧挫後7、10および14日目に計測した。指間隔はすべての測定日において、細胞移植群と圧挫群の間で有意な差 ($P < 0.05$) を認めた。さらに、指踵間隔は7日目および10日目において細胞移植群と圧挫群の間で有意な差 ($P < 0.05$) を認めた。

② 前脛骨筋湿重量の変化

坐骨神経麻痺により前脛骨筋が委縮することが知られているので、圧挫後の前脛骨筋を摘出し、筋湿重量および健側に対する患側の筋湿重量比 (%) を求めた。両実験群において坐骨神経麻痺による前脛骨筋の委縮を認めたが、細胞移植群では圧挫群よりも前脛骨筋の筋重量比が有意に高かった ($P < 0.05$)。

Ⅲ－２およびⅢ－３の結果から、圧挫群と比較して細胞移植群では再生した軸索がより早期に支配筋に到達し、自発的な筋活動が再開されて運動

機能が早期に回復したことが示唆された。

Ⅲ－４ 組織学的解析

① H・E 染色

圧挫部位を中心とし、その中枢側および末梢側に位置する坐骨神経の H・E 染色像を観察した。その結果、細胞移植群における神経線維間の空隙は圧挫群よりも有意に少なかった ($P < 0.05$)。また空胞数を測定したところ、細胞移植群における空胞数は圧挫群よりも有意に少なかった ($P < 0.05$)。これらの結果から細胞移植群の中枢側では髄鞘の形成量が多いことが示唆された。

② LFB 染色

画像全体の面積に対する LFB 陽性面積の割合を圧挫群および細胞移植群で比較したところ、細胞移植群は圧挫群よりも LFB 陽性面積の割合が有意に高かった ($P < 0.05$)。

Ⅲ－５ 抗 MBP 抗体による免疫組織化学的解析

画像全体の面積に対する抗 MBP 抗体陽性面積の割合を圧挫群および細胞移植群で比較したところ、細胞移植群は圧挫群よりも抗 MBP 抗体陽性面積の割合が有意に高かった ($P < 0.05$)。LFB 染色と抗 MBP 抗体を用いた染色結果より、細胞移植群の圧挫部より中枢側から再生した神経線維周囲の髄鞘の形成量が多いことが明らかとなった。

IV. まとめ

ヒト歯髄幹細胞を含む歯髄細胞をラット坐骨神経の圧挫部モデルへ移植すると、坐骨神経の再生を促進することが明らかになった。今回の研究結果からヒト歯髄幹細胞を含む歯髄細胞は末梢神経後の再生治療の幹細胞治療における細胞源として有用であることが示唆された。