学 位 論 文 内 容 の 要 旨

愛知学院大学

論 文 提 出 者	伊藤　発明
論　文　題　目	下歯槽神経再生におけるシュワン細胞移植の効果

１．緒言

　下歯槽神経は、三叉神経下顎枝の終枝のひとつであり、下顎孔から下顎管へ侵入する。そして下顎管の経路と一致して顎骨内を進むことから、埋伏した下顎智歯抜歯に起因して、一過性または完全な下歯槽神経麻痺を生じる可能性が高い。末梢神経が断裂した症例では自家神経移植を含む外科的治療を要するが、挫滅症例においては薬物療法や理学療法などの対症療法が適応されている。このような治療法はヒトではしばしばおこなわれるが、動物実験モデルでは下顎管内でおこる下歯槽神経の再生研究に適したものが無い。シュワン細胞は末梢神経系のグリア細胞であり、軸索を取り囲んで髄鞘化し、跳躍伝導を可能にするとともに、損傷後の神経再生にも関与し、末梢神経の再生を促進する可能性を有する。そこで本研究では、臨床に即した新規実験動物モデルを開発、そのモデルを利用してシュワン細胞の移植効果を検討することを目的におこなった。

２．材料と方法

　２－１．シュワン細胞の単離と培養

　全身麻酔下に４週齢の SD または GFP ラットの坐骨神経を摘出し、通法に沿って酵素処理を行い、シュワン細胞培地（SCM）で懸濁してディッシュ上に播種した。無血清の培地で線維芽細胞を除去し、純度が高くなったシュワン細胞（SC6）を細胞移植に使用した。

　２－２．シュワン細胞の特性解析

単離したシュワン細胞の細胞特性を評価するために、シュワン細胞のマーカーであるS-100Bで免疫細胞染色をおこなった。

２－３．ラット下歯槽神経損傷モデルの作製

モデルの作製には、体重80〜100 gである４週齢の雄性SDラットを用いた。全身麻酔下に、下顎右側第一臼歯を顕微鏡下で抜去し、すぐに抜歯窩から虫ピンを下顎下縁に達するまで 30 分間挿入して下歯槽神経（IAN）を損傷した。なお、下顎第一臼歯を抜去したのみでは下顎管に損傷は認めず、これを Control group とした。また、下顎第一臼歯を抜去後、遠心根の抜歯窩に虫ピンを30分間挿入することによりIANを損傷させ、これをInjury groupとした。

２－４．シュワン細胞の移植

２－１でSC純度は94％であった。

抜歯窩より虫ピンを取り外した後、GFPまたはSDシュワン細胞（4.0 × 10^5個／SCM４μL)をマイクロシリンジで抜歯窩に移植し、これをCell groupとした。なお、Injury groupにはSCM ４μLのみを抜歯窩に注入した。

２－５．von Frey testによる知覚機能評価

von Frey フィラメントを昇順に使用して、機械的刺激をオトガイ孔上の右側顔面皮膚へ与えた。術前の機械的刺激の最小強度を100％として、頭部の逃避反射閾値（HWT）を決定した。von Frey試験は、Cell group、Injury group、およびControl groupで術後２週間毎日実施し、知覚機能を評価し

た。

２－６．マイクロ CT による骨形態分析

手術直後、術後１および２週で実験各群のラットの下顎骨をマイクロ CT で撮影した。骨量は、ボクセル画像から計測領域（ROI）内を骨量測定ソフトウェアで測定した。各ラットの骨量の増減は、術後１週および２週で測定した値から手術直後に測定した値の差で求めた。

２－７．組織学的解析

術後１週および２週で Cell group，Injury group の下顎骨を摘出し、冠状面で薄切したパラフィン切片をヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色をおこなった。術後１週および２週における下顎第一臼歯遠位根の抜歯窩に形成された新生骨を、画像解析ソフトを用いて、低倍率で撮影した組織像中における標準化された領域で解析した。

さらに、術後２週の検体において、下顎管内に再生した IAN の最大直径を測定し、その再生程度を解析した。

２－８．免疫組織化学的解析

術後１週および２週の SD ラットの下顎骨を冠状面で薄切したパラフィン切片を用いて免疫組織化学的に解析した。一次抗体として抗 Myelin basic protein（以下 MBP）抗体を使用して髄鞘の観察を、抗 S-100B 抗体を使用してシュワン細胞の分布を、抗 GFP 抗体を使用して移植されたシュワン細胞を同定した。陽性部位の検出のため、diaminobenzidine substrate で発色

させた。ヘマトキシリンによる対比染色を施し、組織切片を CCD カメラを備えた光学顕微鏡で観察した。高倍率で撮影した組織の画像サイズを統一して、再生した IAN 中の MBP 陽性髄鞘数および S100B 陽性領域を ImageJ (NIH) で計測した。

２−９．統計処理

計測データは平均値±標準偏差（SD）で表し、Student’s-*t* test にて有意差検定をエクセル統計を用いておこなった。なお、有意水準は５％とした。

３．結果

３−１．ラットシュワン細胞（SCs）の特性

拡大培養した細胞は抗 S100B 抗体で陽性を示し、その陽性率は 94.9%であった。

３−２．知覚機能評価

Cell group と Injury group における逃避反射閾値（HWT）は、どちらも術後７日目に低下をし始めた。術後８および９日目になると、Cell group の HWT は Injury group よりも有意に低くなった。しかし、術後 10 日目になると、両群の HWT は有意な差を認めず、control group の HWT と同等までに低下した。

３－３．マイクロ CT 解析

術直後（０週）のマイクロ CT 画像では、両群ともに下顎第一臼歯遠位根

の抜歯窩底部に位置する下顎管が損傷していた。術後２週になると、Cell group では下顎管上壁部において放射線不透過像を認めたが、Injury group では認めなかった。

定量分析ソフトウェアを使用して当該領域の骨量と骨塩密度（BMD）を測定したところ、Injury group と Cell group における骨量と BMD は、術後１週および２週でも有意な差を認めなかった。

３‐４．抜歯窩の骨治癒

H&E 染色した組織像における、両群の抜歯窩に形成された新生骨の面積を ImageJ（NIH）で計測して比較すると、術後１および２週において、Cell group の骨面積は Injury group よりも有意に大きかった（$p < 0.05$）。

また、GFP 陽性である SCs は、新たに形成された結合組織中および骨組織に面して存在することが確認された。

３‐５. 下顎管の骨治癒

H&E 染色した組織像における、下顎管横断像の形状は、Injury group において術後１週では円形を呈しておらず、術後２週になると円形を呈した。一方、Cell group では術後１週で円形を呈していた。

また、両群において、術後１週では下顎管の周囲はまだ骨梁で取り囲まれていた。Injury group において、術後２週でも下顎管の上壁を構成する骨は形成されていなかった。Cell group において、術後 1 週では下顎管の上壁はまだ形成されていなかったが、術後２週になると、下顎管の上壁は

形成されていた。

３－６．下歯槽神経の再生

H&E 染色した組織像における、両群の術後２週における再生 IAN の直径を ImageJ (NIH) で測定したところ、再生した IAN の神経線維束の直径は Injury group よりも Cell group が有意に大きかった ($p < 0.05$)。

術後２週における MBP 陽性髄鞘の平均数は Injury group よりも Cell group が有意に多かった ($p < 0.05$)。また、術後１週および２週における S-100B 陽性領域の面積は、Injury group よりも Cell group が有意に大きかった ($p < 0.05$)。

また、GFP 陽性である SCs は、術後１および２週で再生した IAN 中の髄鞘に主に存在することが確認された。

４．考察

IAN の損傷を評価するために、右顔面皮膚の感覚機能を von Frey 試験で測定した。機械的刺激に対する知覚の感受性が回復した日数はラット IAN 切断モデルの場合と同じであった。

シュワン細胞は末梢神経の再生に重要な役割を果たすことから、損傷した IAN の回復にも有効であるかを評価した。von Frey 試験の結果から、Cell group の知覚機能の回復がより早いことが示された。再生した IAN の H&E 染色において、Cell group における再生神経の直径は太く、正常なラット IAN の太さとほぼ同じであった。これらの結果から感覚機能と再生した IAN の

太さには相関があることが示唆される。髄鞘特異的タンパクであるMBPは、術後２週間で、Injury groupと比較して、Cell groupにおけるMBP陽性髄鞘数は有意に多かった。加えて、MBPの染色パターンは、シュワン細胞マーカーである S100B の染色パターンと顕著に類似していた。これらの結果より、シュワン細胞による細胞移植療法は軸索の数と有髄線維束の太さを増加させることが示唆された。また、本研究では、移植したシュワン細胞を追跡するために、GFPシュワン細胞を移植細胞として使用しており、再生した IAN 中にはGFP 陽性細胞を検出した。この結果から、ドナー細胞であるシュワン細胞は IAN の再生に関与し、髄鞘化の促進に寄与することが示された。

また、本研究では、損傷した下顎管と抜歯窩の治癒過程の評価もおこなった。抜歯窩に新生した骨の成熟度は同程度であることから、両群の治癒過程は同程度と考える。また、GFP陽性細胞は術後１週と２週目において抜歯窩の新生骨中でも観察された。しかしながら、本研究において、シュワン細胞が骨芽細胞に分化できるかどうかについては検討していない。これらの複雑なメカニズムを解明することは今後の研究課題とする。