

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	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	

I. 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した後に下顎管の経路と一致して顎骨内を進む。解剖学的な位置関係から、下顎智歯の歯根は下顎管と近接しているため、埋伏した下顎智歯を抜歯する際には下歯槽神経を損傷することがあり、一過性または慢性的な下歯槽神経麻痺が生じる主な原因となっている。下歯槽神経の損傷は、局所浮腫、開口制限、疼痛などのさまざまな症状と関連し、会話や咀嚼などの社会的生活にも影響を与えるために生活の質を低下させる。損傷した下歯槽神経は、内在性の再生能力により、ある程度まで自然に回復する場合がある。それは下歯槽神経が下顎管内部に存在しているため、断裂した神経が、近位から遠位へと自然に再生するのに適した構造をしているからである。しかし、損傷した神経が自然に再生した場合には、完全な機能回復が不十分なこともある。もし、神経障害性疼痛が存在する場合には、慢性および不可逆的な下歯槽神経損傷を防ぐために即時に治療することが重要となる。

顎口腔外科領域において、現在、損傷した下歯槽神経の治癒を促進させる治療法についての研究が注目されている。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、中等度の挫滅症例で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、下顎管内を走る下歯槽神経の再生研究に科学的に適した動物実験モデルは存在しない。

過去数十年にわたり、細胞移植療法は末梢神経再生の治療法として注目されている。シュワン細胞、神経幹細胞、骨髄間質細胞および臍帯由来間質細胞といったさまざまな種類の細胞が、神経栄養因子の産生とシュワン細胞への分化を介して神経再生に適した環境をつくるために使用されている。ただし、損傷した下歯槽神経を再生するために、どの細胞が最適であるかはまだわかっていない。

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、跳躍伝導や損傷を受けた神経の再生にも関与する。末梢神経が損傷すると損傷遠位ではワーラー変性を起こし、シュワン細胞はマクロファージと一緒に壊れた髄鞘を除去する。そして、増殖して軸索誘導を補助するビュングナー帯を形成し、正確な神経支配を可能にする適切な微小環境のために神経栄養因子を分泌する。つまり、シュワン細胞がさまざまな成長因子を分泌し、損傷神経の近位断端にある軸索を遠位断端へと誘導するために必要な微小環境を提供することから、シュワン細胞を利用した細胞治療は末梢神経の再生を促進する可能性が大きい。しかし、これまでに損傷した下歯槽神経に対するシュワン細胞の移植効果についての報告はない。

損傷した下歯槽神経の再生を評価するために、これまで、下歯槽神経の結紮、圧挫、切断を含む動物実験モデルが考案されている。しかし、これらのモデルでは下歯槽神経を明示するために、頬部皮膚と咬筋に切開を加え、露出した下顎骨を削合して開窓しなければならない。このような下歯槽神経へのアプローチは、抜歯やインプラント埋入手術後に生じる神経損傷とは発生する過程が異なる。臨床で遭遇する神経損傷に類似した損傷した下歯槽神経への細胞の移植効果を評価するのに適した動物実験モデルはこれまでに存在していなかった。

そこで本研究では、1) 臨床に即した新規動物実験モデルを開発し、2) そのモデルを利用したシュワン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

本研究は愛知学院大学歯学部動物実験委員会の承認（承認番号：AGUD392 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。また、緑色蛍光タンパク質を発現するラットの利用に対しては、愛知学院大学安全委員会の承認（承認番号：17-5 号）をもとに実施した。

II - 1. シュワン細胞の単離と培養

これまでに報告された方法を一部改変して、ラット坐骨神経を酵素処理して得られた細胞よりシュワン細胞 (SCs) を単離した。実験には雄性 Sprague Dawley (SD) ラット (中部科学資材、名古屋、日本) または緑色蛍光タンパク質 (enhanced green fluorescent protein: EGFP) を全身で発現する EGFP 遺伝子導入雄性 SD ラット (GFP ラット; 日本エスエルシー、浜松、日本) を使用した。4 週齢の SD または GFP ラットを、ナルコビット E 麻酔ユニット (夏目製作所、東京、日本) の導入ボックス内に入れてイソフルラン (DS Pharma Animal Health, 大阪、日本) で導入し、頭部マスクを装着してイソフルラン 2.5% で維持した吸入麻酔下で手術した。右側後肢外側面上の皮膚を剃毛および消毒し、皮膚切開を加えて坐骨神経を剖出し、周囲の結合組織を剥離して坐骨神経を明示した。その後、ワーラー変性をさせるために、坐骨神経の一か所を 4-0 絹糸で結紮し、結び目の遠位で坐骨神経を切断し、閉創した。2 週後に再び開創し、ワーラー変性を起こした坐骨神経を長さ 10 mm で切除した。神経上膜を除去した後、採取した神経片はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 富士フィルム和光純薬、大阪、日本) で洗浄し、1 mm の断片で切断した。そして、0.2% コラゲナーゼ NB4 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) および 0.2% ディスパーゼ II (富士フィルム和光) の混合液で 37°C、50 分間酵素処理をおこなった。血清入りの培地を添加して酵素反応を停止後、1500 rpm で 24°C、5 分間遠心分離をした。上清を廃棄後、沈殿したペレットを 2 μ M フォルスコリン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、10 ng / mL ヘレグリン- β 1 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)、50 ng/mL 塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF; R&D systems, Minneapolis, MN, USA)、および 1% ペニシリン-ストربتマイシン溶液 (FUJIFILM Wako) を添加したダルベッコ改良イーグル培地 (D-MEM; 富士フィルム和光純薬) からなるシュワン細胞培地 (SCM) で懸濁した。次に、20% ウシ胎仔血清 (FBS) を含有した SCM で再懸濁して 60 mm 培養ディッシュ (TPP, トラサディンゲン、スイス) へ播種し、37°C、5% CO₂ で培養した。すると、数日後に線維芽細胞および双極または三極の突起を有するシュワン細胞が観察されるので、それらの細胞がサブコンフルエントに達した後、SCM で 8 日間培養して得られた細胞を 0 継代 (P0) とした。続けて SCM で培養すると、ディッシュ中の線維芽細胞が徐々に死ぬためにシュワン細胞が優勢となった。このようにして得られた SCs (GFP シュワン細胞または SD シュワン細胞) を、10% FBS 含有 SCM で 4 継代まで培養して実験に供した。

II - 2. シュワン細胞の特性解析

単離した SCs の細胞特性を評価するために、蛍光抗体法による免疫細胞染色をおこなった。まず、4% パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) で膜透過処理をおこなった。そして 2.5% 正常ウマ血清 (Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, USA) を用いて室温 30 分間で非特異的反応部位のブロッキングし、マウスモノクローナル抗 S100

カルシウム結合タンパク B (S100B) 抗体 (ab4066, 1: 50; abcam, Cambridge, UK) で 4℃、一晩反応させた。そして二次抗体である Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗マウス IgG (A11032, 1: 100, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて室温で 60 分間反応させた。最後に、細胞を 1 μg/mL 4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI; 同仁化学、熊本、日本) で核染色し、BZ-X710 蛍光顕微鏡 (KEYENCE, 大阪、日本) で観察した。SCs の純度として培養細胞中の S100B 陽性細胞の割合を求めるために、ランダムに選択した 3 領域中で S100B 陽性細胞をカウントして、その平均数を求めた。なお、SCs の純度は以下の式より求めた。

SC 純度 (%) = S-100B 陽性細胞数 / DAPI 陽性である核の総数 × 100

II - 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 (日本エスエルシー) を用いた。7.4%塩酸メデトミジン (明治製菓株式会社、東京、日本)、8%ミダゾラム (アステラス製薬株式会社、東京、日本) および 10%ブトルファノール (明治製菓ファーマ株式会社) の三種混合麻酔液を腹腔内注射して全身麻酔をかけた。まず、下顎第一臼歯の遠心根と下顎管の位置をマイクロコンピューター断層撮影法 (マイクロ CT) で撮影し、全ラットの下顎管が第一臼歯の遠位根の直下を走行していることを確認した。次に、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。これを Injury group とした (n = 5)。虫ピンを抜去後に、抜歯窩からの出血をガーゼによる圧迫で止血したのを確認した。

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 (n = 5)。

II-4. シュワン細胞の移植

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 × 10⁵ 個 / SCM 4 μL) をマイクロシリンジ (ITO MICRO SYRINGE MS-NE05; 伊藤製作所、富士、日本) で抜歯窩に移植し、これを Cell group とした (n = 5)。なお、Injury group には SCM 4 μL のみを抜歯窩に注入した。

II - 5. von Frey test による知覚機能評価

von Frey 試験を実施するに際し、ラットを実験者の手で暗いプラスチックケージに誘導し、ケージの穴から鼻と口だけが突き出るように 1 週間毎日訓練をした。von Frey フィラメント (室町機械株式会社、東京、日本) を昇順に使用して、オトガイ孔上の右側顔面皮膚へ機械的刺激を与えた。なお、術後に 5 回のうち 3 回以上の刺激に反応して逃避反射を誘発した機械的刺激の最小強度を求め、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。また、刺激間隔は 4 秒以上あけ、機械的刺激の最大強度は 60 g とした。von Frey 試験は、Cell group (n = 5)、Injury group (n = 5)、および Control group (n = 5) で術後 2 週間毎日実施して知覚機能を評価した。

II - 6. マイクロコンピューター断層撮影 (マイクロ CT) による骨形態分析

下顎管と抜歯窩の治癒経過を、マイクロ CT (Cosmo Scan GX ; リガク、東京、日本) で撮影し、既に報告されている 17-19) 方法で評価した。照射パラメータは 120 秒、90 kV、100 mA、ボクセルサイズは 25 mm とし、手術直後、術後 1 および 2 週で各実験群のラットを撮影した。なお、骨量と骨塩密度 (BMD) を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 3 by 4 viewer 2011 (北千住ラジスト歯科 i-VIEW イメージセンター、東京、日本) で測定した。ROI サイズは $1.5 \times 1.5 \times 1.0$ mm とし、これは遠心根の抜歯窩を全て覆う大きさである。測定範囲は下顎第一大臼歯の遠心根の抜歯窩に分布し、Injury group および Cell group の抜歯窩における放射線の不透過性を測定した。個々のラットにおける骨量と BMD の増加は、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。

II-7. 組織学的解析

ラット下歯槽神経損傷モデルの作製において、下顎第一大臼歯遠心根の抜歯窩から挿入した虫ピンが下顎下縁に達し、IAN を損傷しているかどうかを評価するため、非脱灰硬組織研磨標本作製した。虫ピンを挿入した下顎骨を摘出し、70% エタノールで 3 日間固定した。そして検体を Villanueva osteochrome bone 染色をし、その後 70% から 100% の上昇エタノール系列で脱水し、メチルメタクリレート (MMA) で樹脂包埋した。非脱灰 MMA ブロックを冠状面および矢状面で、厚さ約 $20 \mu\text{m}$ まで研磨して標本作製した (伊藤骨形態計測研究所、新潟、日本)。

また、軸索再生の確認と損傷した下顎管を観察するため、パラフィン切片を作製して組織学的解析をおこなった。術後 1 週および 2 週で Cell group および Injury group の下顎骨を摘出し、4% パラホルムアルデヒドで固定し、10% EDTA-2Na (武藤化学、東京、日本) で 3 週間脱灰して、通法に従いパラフィンで包埋した。そして、下顎骨の冠状面を厚さ $5 \mu\text{m}$ 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) 染色した。

術後 1 週および 2 週の H&E 染色像における下顎第一大臼歯遠心根の抜歯窩に形成された新生骨を、画像解析ソフトである ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda; NIH, MD, USA) を用いて、低倍率 (4 倍) で撮影した組織像中における標準化された領域 (1.4×1.4 mm) で解析した。なお、各実験群で 3 検体ずつ選択して計測した。また、術後 2 週の各実験群で H&E 染色された標本から、横断された下顎管内に再生した IAN の最大直径を測定して再生程度を解析した。なお、標本 3 枚を無作為に選択し、再生神経線維の直径を計測して得られた結果を平均して比較した。

II-8. 免疫組織化学的解析

術後 1 週および 2 週の SD ラットの下の顎骨を厚さ $5 \mu\text{m}$ 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。なお、一次抗体として以下を使用した。抗 Myelin basic protein (以下 MBP) 抗体 (ab40390, 1 : 500; Abcam) を使用して髄鞘の観察を、抗 S-100B 抗体 (ab4066, 1 : 50; abcam) を使用してシュワン細胞の分布を、抗 GFP 抗体 (ab290, 1 : 1000 ; Abcam) を使用して移植されたシュワン細胞を同定した。まずパラフィン切片を脱パラフィンおよび脱水後、蒸留水で水洗した。内因性ペルオキシダーゼ活性を除去するために、メタノールで希釈した 3% 過酸化水素水に室温で 20 分間反応させた。そして、HistoVT One (ナカライテスク、京都、日本) を蒸留水で 10 倍希釈して作成した溶液を用いて 90°C 、20 分間で抗原賦活化処理、2.5% 正常ウマ

血清 (Vector Laboratories) を用いて室温、30 分間で非特異的反応部位のブロッキングを実施し、ブロッキング液で希釈した一次抗体を 4 °C、一晩で反応させた。次いで、ImmPRESS horseradish peroxidase detection kit (Vector Laboratories) を用いて室温、30 分間で反応させた。そして陽性部位の検出のため、diaminobenzidine substrate (Vector Laboratories) で発色させた。蒸留水で洗浄後、ヘマトキシリンによる対比染色を施し、マルチマウント 480 (松浪硝子工業株式会社、岸和田、日本) で封入した組織切片を CCD カメラ (Nikon Digital Sight DS-Fi1 ; ニコン、東京、日本) を備えた光学顕微鏡 (Eclipse E800M ; ニコン) で観察した。高倍率 (100 倍) で撮影した組織の画像サイズを統一 ($128\mu\text{m} \times 96\mu\text{m}$) 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。なお、計測領域は各実験群で合計 3 つずつ無作為に選択した (各群 $n = 3$)。

II-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 (バージョン 1.04 ; 株式会社 社会情報サービス、東京、日本) を用いておこなった。なお、有意水準は 5 % とした。

III. 結果

III-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。

III-2. 臨床所見

実験期間中、抜歯窩には重篤な炎症所見を認めることなく治癒した。また、すべてのラットで術中の疼痛管理はできており、術後に体重減少を示さなかった。

III-3. 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 日目に低下を始めた。そして、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。

III-4. マイクロ CT 解析

下顎管と抜歯窩の治癒過程をマイクロ CT 画像 (冠状面) で観察するために、術直後 (0 週)、術後 1 週および 2 週における下顎骨の冠状断を撮影して Injury group および Cell group で比較した。まず下顎管に着目すると、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。そして、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。次に抜歯窩の治癒過程に着目した。Cell group における術後 2 週での抜歯窩の放射線不透過領域は Injury group よりも多かった。そこで、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。

III - 5. 抜歯窩の骨治癒

抜歯窩の治癒過程を観察するために、術後 1 週および 2 週における下顎骨を H&E 染色した組織像を観察し、Injury group および Cell group で比較検討した。低倍率の組織像を観察すると、術後 1 週において、両群の抜歯窩には新たに形成された組織で満たされており、新生骨は歯槽頂に達するまでに形成されていた。そして両群における骨梁の幅は、術後 1 週よりも術後 2 週になると大きくなっていった。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 ($P < 0.05$)。

なお、骨髄は、Cell group では術後 1 週においてすでに認められたが、Injury group では認められなかった。

さらに高倍率の組織像を観察すると、Injury group の新生骨では術後 2 週においても線維性骨を認め、また骨組織に面して並ぶ骨芽細胞の形態は立方状を呈した。Cell group では術後 1 週では線維骨であったが、術後 2 週になると同心円状の骨層板を認める層板骨で形成されており、骨組織に面して並ぶ骨芽細胞の形態は扁平であった。さらに、術後 2 週になると、層板骨中の骨細胞は同心円状に配置されていた。

また、移植した SCs の存在を検出するために、抗 GFP 抗体を用いて免疫組織化学的解析を実施した。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。

III-6. 下顎管の骨治癒

下顎管の治癒過程を観察するために、術後 1 週および 2 週における下顎骨の H&E 染色した組織像を観察し、Injury group および Cell group で比較検討した。低倍率で組織像を観察すると、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。

高倍率で観察すると、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。一方、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。

III-7. 下歯槽神経の再生

IAN の再生を観察するために、術後 1 週および 2 週の下顎管内に存在する組織像を観察し、Injury group および Cell group で比較検討した。低倍率で組織像を観察すると、両群ともに術後 1 週で下顎管内に再生した組織を認めた。高倍率で観察すると、再生した組織には末梢神経様組織の横断像を認めた。そこで、両群の術後 2 週における下顎管内を満たす再生 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 ($P < 0.05$)。

末梢神経様組織が H&E 染色で観察されたため、抗 MBP および抗 S100B 抗体を用いて免疫組織化学を実施し、髄鞘およびシュワン細胞の存在を確認した。術後 2 週目で再生した IAN を観察してみると、Cell group では MBP 陽性髄鞘が多数存在することを確認できたが、Injury group では MBP 陽性髄鞘がわずかに存在していた。そこで、両実験群において MBP 陽性髄鞘の数を計測したところ、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、両群における再生 IAN 中の S100B 陽性領域を ImageJ (NIH) で測定したところ、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、移植した SCs の存在を検出するために、抗 GFP 抗体を用いて免疫組織化学的解析を実施した。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。

IV. 考察

近年、末梢神経の再生を促進する治療法として細胞移植療法が注目されている。しかしながら、損傷した IAN に対する細胞治療の可能性を検証した研究はなされていない。その理由のひとつとして、適切な動物実験モデルが存在しないことが挙げられる。IAN の再生を評価するためには、これまで神経の結紮、圧挫や切断といった方法で作製した動物実験モデルが利用されているが、下顎管内を走行する IAN を明示するには、骨の開削といった外科的処置が必要となる。加えて、これらのモデルは実際に臨床の現場で遭遇する IAN 損傷とは状況が一致しないのである。ヒトにおいて、下顎智歯の抜歯後に生じる IAN 損傷を模倣するには、下顎骨を開削する外科的処置を有しないモデルが必要となってくる。そこで、本研究では日常の臨床で遭遇する症例に類似した IAN 損傷モデルを新規に開発すること、および開発したモデルを使用して、損傷した IAN に対して、細胞移植が適切な治療法であるかを検討することを目的におこなった。

まず、機械的刺激に対する反射を測定することが感覚機能の評価の主要な方法となっている。機械的刺激に対する実験動物の反応を評価するためには、von Frey フィラメントを用いた up-down 刺激法がよく利用される方法のひとつである。そこで本研究においても、ラット下顎第一臼歯遠心根の抜歯窩へ虫ピンを挿入したことにより生じる IAN の損傷を評価するために、右顔面皮膚に対する機械的刺激により誘発される逃避反射を von Frey 試験で測定した。すると IAN の損傷後 1 日目で、Injury group の逃避反射閾値は 1000%へと上昇（術前の閾値を 100%とする）した。7 日目で閾値の低下がみられたことから知覚機能の回復を認めた。これらの結果は、虫ピンの挿入によって IAN が損傷されたことで知覚麻痺が生じたことを示している。興味深いことに、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 (30)。一方で IAN 挫滅モデルでは、機械的刺激に対する知覚の感受性は術後 2 日目より回復していた (31)。つまり、知覚の感受性から解釈すると、新規に開発したラット IAN 損傷モデルの損傷程度は切断モデルに該当すると考えられる。なお、挫滅モデルの場合では、大抵の基底膜は損傷されずに残っており、軸索やシュワン細胞は残存した基底膜に沿って伸長・増殖が可能であるが、切除モデルの場合では、基底膜の連続性が完全に途絶えるため、結果として軸索の再生は遅くなる。開発した新規モデルでは、虫ピンを挿入することにより IAN の基底膜が完全に損傷されたと考えられる。日常の臨床で遭遇する症例に類似した IAN 損傷モデルについての報告は本

研究が初めてとなる。

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。本研究では、IAN 再生におけるシュワン細胞の役割について 2 つの重要な知見を得ることができた。まず、von Frey 試験の結果から、Cell group の機械的刺激に対する逃避反射閾値は、Injury group と比較すると術後 8 および 9 日で有意に低下したので、Cell group の知覚機能の回復がより早いことが示された。知覚機能の回復は末梢神経の再生を評価する主要な目的であるが、損傷した IAN の再生は組織学的解析でも評価できる。再生した IAN の H&E 染色において、Cell group では大小さまざまな有髄線維が術後 14 日目で観察された。興味深いことに、Injury group と比較すると、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。つまり、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。また、神経線維の髄鞘化は、神経の再生程度を決める指標になると考えられる。髄鞘特異的タンパクである MBP は、末梢神経においてシュワン細胞が形成する髄鞘の主要な構成要素である。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。Injury 群と比較して、Cell 群の免疫組織化学的解析の結果から、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。つまり、再生する軸索はシュワン細胞の存在と密接に関与するのである。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、SD シュワン細胞以外に 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。本研究結果は、シュワン細胞移植は IAN の再生と神経支配が促進させ、再生神経の髄鞘化に寄与するという最初の報告となる。

最近の研究において、感覚神経は神経ペプチドの合成と分泌を介して、骨形成および骨リモデリングを制御する (37-43)。IAN の切断により下顎骨の治癒が有意に遅れ、そして骨芽細胞の機能が阻害され、破骨細胞の形成が促進されることで歯周組織の破壊が進む。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。これらの結果より、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。また興味深いことに 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。なお、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。IAN は下顎骨を構成する皮質骨と海綿骨で囲まれた知覚神経であるために、本研究で開発した IAN 損傷モデルは、骨のリモデリングに対する末梢性の感覚神経の影響を研究する理想的なモデルともなり得る。

V. まとめ

本研究では、ラット下顎第一臼歯遠心根の抜歯窩に虫ピンを挿入して IAN を損傷させるラット IAN モデルを開発した。そして、本動物実験モデルを利用してシュワン細胞の移植効果について検討したところ、以下の結果および結論を得た。

1. ラット下顎第一臼歯遠心根の抜歯窩から虫ピンを挿入すると、下顎管が損傷された。
2. 1. の結果で得られた IAN 損傷モデルは、術後 1～6 日において von Frey 試験による最大

強度の機械的刺激を与えても逃避反射を認めなかった。

3. IAN 損傷モデルは、術後 7 日目より逃避反射閾値の低下を認めた。さらにシュワン細胞移植した Cell group は、細胞移植をしない Injury group と比較すると、術後 8 日および 9 日で有意に逃避反射閾値が低下した。

4. Cell group および Injury group では、術後 1 週および 2 週における抜歯窩の骨量と BMD に有意な差を認めなかった。

5. Cell group では、Injury group より術後 2 週で下顎管に再生した IAN の直径が有意に太かった。

6. Cell group では、Injury group より術後 2 週で再生した IAN 中の MBP 陽性髄鞘数が有意に多かった。

7. Cell group では、Injury group より術後 1 週および 2 週で再生した IAN 中の S100B 陽性領域の面積が有意に大きかった。

8. GFP シュワン細胞を移植した Cell group では、術後 1 週および 2 週においても再生した IAN 中に GFP 陽性細胞の存在を認めた。

以上より、ラット下顎第一臼歯遠心根の抜歯窩から下顎骨下縁にかけて虫ピンを挿入すると、IAN が損傷されることが明らかとなり、臨床症例に類似し、低侵襲に作製できる IAN 損傷モデルを開発することができた。また本実験モデルを使用すると、シュワン細胞移植により IAN の再生が促進することが示された。すなわち、IAN 損傷に対するシュワン細胞移植は有用であることが示唆された。