

ラットオトガイ神経損傷部への嗅粘膜移植

河西敬子¹ 高田 諒²

The Olfactory Mucosa Transplanted in Damaged Mental Nerve

Keiko KASAI¹ and Satoshi TAKADA²

According to a recent report, stem cells and olfactory ensheathing cells (OEC) exist in the olfactory mucosa, and may induce nerve regeneration. We herein examined whether olfactory mucosa, transplanted in damaged inferior alveolar nerve, induced nerve regeneration in rats.

The mental nerve was transected to create a mental foramen in the form of a transplant bed. Then, the olfactory mucosa was collected from the nasal cavity to be transplanted into the bed. On days 3, 7, 14, 21, and 28 after the transplantation of olfactory mucosa, the mandibles were removed to prepare sections. The sections were stained with hematoxylin-eosin (H-E) and Luxol fast blue (LFB). In addition, the sections were stained with anti-p75^{NTR}, anti-S100, and anti-NFP antibodies for immunohistological examination. The number of axons and the area of myelin sheath were determined using the sections to be quantitatively and morphologically examined for statistical comparison.

On day 3, fibrous connective tissue was observed in the transplant bed of the non-transplanted group, while p75^{NTR}-positive cells were observed around S100-positive cells in the transplanted olfactory mucosa of the transplanted group. On day 7, the p75^{NTR}-positive cells were linearly aligned to be observed in the same region with the S100-positive cells. On day 14, the transplant bed of the nontransplanted group was filled by bone addition. Few S100- and NFP-positive cells were observed. The mandibles of the transplanted group were morphologically maintained. Many S100- and NFP-positive cells were observed.

In conclusion, olfactory mucosa, transplanted in damaged mental nerve, may facilitate peripheral nerve regeneration.

Key words : olfactory mucosa, mental nerve, transplant

緒 言

嗅粘膜は鼻腔上部で鼻腔天蓋，鼻中隔上部，鼻甲介および鼻腔外側の骨壁に広く分布し，嗅上皮

と粘膜固有層で構成されている¹⁾。嗅上皮には基底細胞，嗅神経細胞，支持細胞が存在し，基底細胞は neural stem cell として嗅神経や支持細胞へ，また，粘膜固有層に存在する神経軸索再生能を有

受付：平成24年12月18日，受理：平成25年2月5日
奥羽大学大学院歯学研究科顎口腔外科学専攻¹
奥羽大学歯学部口腔外科学講座²

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Ohu University, Graduate School of Dentistry¹
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Ohu University²

する嗅神経鞘細胞 (OEC ; Olfactory Ensheathing Cells) へと分化する。さらに嗅神経系の嗅神経細胞や OEC は中枢神経系の細胞でありながら生涯再生を繰り返す特異な性質を持っている²⁾。

中枢神経系の再生に関与する細胞には OEC と類似した髄鞘形成細胞のオリゴデンドロサイトが存在する。通常、オリゴデンドロサイトは中枢神経における神経損傷の修復過程において軸索伸長を化学的にブロックする性質がある^{2,3)}。しかし、OEC は中枢神経系の細胞でありながら末梢神経系の Schwann 細胞と同等の軸索伸長促進作用があり、神経の再生を誘導・促進するとされている³⁾。この神経再生や軸索伸長の検索には抗 S100タンパク抗体 (以下 S100タンパク) や抗 Neurofilament protein 抗体 (以下 NFP) が用いられおり、S100タンパクは末梢神経だけでなく Schwann 細胞と類似した表現特性を有する OEC にも反応すると考えられる⁴⁾。また、O₄や抗 P75 Neurotrophin Receptor 抗体 (以下 p75^{NTR})、27C7、FGF-2等も OEC のマーカーとして用いられ⁵⁾、中でも p75^{NTR} は中枢神経内に存在する OEC の特異的なマーカーとして用いられている^{2,4,6-8)}。近年、治療が不可能とされてきた脊髄損傷に対する OEC の臨床応用が試みられ^{2,3,9-14)}、その背景では脊髄離断モデルラットへの嗅粘膜移植の実験的成果が報告されており、中枢神経系においては嗅粘膜が脱髄軸索を再髄化させることは免疫組織学的にも明らかである¹²⁻¹⁵⁾。

脊髄のように骨に囲まれた空間に存在する神経として顎口腔外科領域には下顎管内に存在する下歯槽神経がある。また、日常臨床において抜歯術やインプラント手術、消炎術などで下歯槽神経損傷に遭遇する機会は少なくない。神経損傷に対する治療はビタミン製剤や神経代謝賦活剤、末梢血管拡張薬などによる薬物療法¹⁶⁾、ソフトレーザー、温療法などによる理学療法¹⁷⁾、さらに損傷部に対しての神経縫合法やポリエチレンチューブ挿入法、神経移植術など、様々な手段が講じられている¹⁸⁾。しかし、いずれも完治には至らず後遺症が残存する場合が多い。さらに神経移植を行う場合は健全な神経が犠牲になるなどの問題がある¹⁹⁾。

そこで本研究では、中枢神経再生に有用とされ

ている嗅粘膜移植が下歯槽神経の再生に有用であるか検索することを目的に、ラットのオトガイ神経損傷部に嗅粘膜移植を行い形態学的な変化を観察した。

材料および方法

1. 実験動物

実験動物には10～11週齢、体重400～450 gの雄性 Wistar 系ラット (日本クレア) を縦断面検索のため各日数5匹ずつ、横断面検索のため各日数7匹ずつ、未処置のラット3匹の計75匹を用いた。購入後、実験動物用固形飼料 (オリエンタル社製) と水道水を1週間自由に与え、奥羽大学歯学部動物実験研究施設 (室温23℃、湿度65%) で飼育した。なお、実験は奥羽大学動物実験委員会の承認 (平成23年度第37号) を得てから、奥羽大学実験動物指針を遵守して行った。

2. 実験方法

実験に使用した器材は滅菌を行い、無菌的に行った。

1) ドナーラット

Wistar 系ラットの鼻腔上部より粘液状の嗅粘膜を歯科用鋭匙で採取して、室温の滅菌生理食塩水中に保存した (図1 a, b, c, d)。

2) オトガイ神経損傷ラット

処置はジエチルエーテルとフローセンの全身麻酔およびエピネフリン1/80,000含有2%リドカインの局所麻酔下に行った。ドナーラットとは異なる Wistar 系ラットの顎下部を剃毛して皮膚切開を加えて骨膜剥離を行い、オトガイ孔とオトガイ神経を明示したのち、オトガイ孔出口から遠位3 mm のオトガイ神経を切り取った。その後、生理食塩水注水下に1分間6000回転のラウンドバーでオトガイ孔を中心に直径2 mm の半球状移植床を形成した (図1 e, f)。

移植群は採取した嗅粘膜を形成した移植床を満たすように移植し、非移植群は移植せずに骨膜を戻して縫合した。嗅粘膜の採取から移植までの時間は最大15分であった。

3. 標本作製

移植群、非移植群とも処置後3, 5, 7, 14, 21, 28日目およびコントロールとして未処置の10週齢

ラットの下顎骨を摘出し、室温の10%中性緩衝ホルマリン液で24時間浸漬固定した。試料は、10%2NA(EDTA・2Na)液(pH7.0)に4~5週間浸漬して常温脱灰を行った後、10%中性緩衝ホルマリン液で24時間浸漬固定した。脱灰試料はパラフィン包埋して、下歯槽神経とオトガイ孔が連続して観察できる下顎管縦断面(以下縦断面)および下顎第1臼歯近心縁に接する前額面で下顎骨を切断後、連続切片により観察した下顎管横断面(以下横断面)で4 μ mのパラフィン切片を作製した(図1f, g)。切片は組織学的観察のためヘマトキシリン-エオジン染色(以下H-E)を行い、光学顕微鏡(SHIMAZU)下に観察した。

4. 免疫組織学的観察

切片は内因性ペルオキシダーゼの除去のため3%過酸化水素水(H₂O₂)を室温で15分間作用させた。抗p75^{NTR}モノクローナル抗体(low affinity NGF receptor, MC192)(フナコシ, 東京), ウサギ抗S-100タンパクポリクローナル抗体(ニチレイ, 東京), マウス抗ニューロフィラメントモノクローナル抗体(ニチレイ, 東京)を第一抗体として室温で1時間反応させた。その後、シンプルステインラットMAX-PO(MULTI)(ニチレイ, 東京)を室温で30分反応させ、0.02%3,3'-ジアミノベンチジン・4HCl/0.05M トリス塩酸緩衝液pH7.6(ニチレイ, 東京)で発色してマイヤーのヘマトキシリンで核染色後、光学顕微鏡下に観察を行った。NFP染色では発色後、軸索周囲に存在する髄鞘を明らかにするためにルクソールファストブルー染色(以下LFB染色)を行い、核染色は行わずに観察した。

5. 定量形態学的観察

各群での下顎管横断面の経時的な数量形態学的変化を観察した。

1) 横断面における下顎管直径の最長軸と最短軸との交点を中心とした150×100 μ mの範囲で、光学顕微鏡下にNFP陽性線維数の計測を行った。

2) Motic Images Plus 2.2S(SHIMAZU)を用いて、NFP陽性線維数を計測した同範囲での、NFPおよびLFB染色で陽性を示した面積の測定を行った。

3) 移植群と非移植群の間に統計学的に有意差

があるか検討するためMann-Whitney U-testを用いて両群の比較を行った。

結 果

1. 移植片の形態

採取した嗅粘膜は嗅上皮と粘膜固有層に分かれており(図1b-d)、粘膜固有層にはS100タンパク陽性細胞が確認できたが(図1c)、p75^{NTR}での陽性反応は見られなかった(図1d)。

2. 正常下歯槽神経およびオトガイ孔の形態

正常なラット下歯槽神経では神経束の直径はほぼ一定で、神経束はさまざまな太さの有髄神経線維と無髄神経線維からなっている。Schwann細胞はS100タンパク陽性で軸索はNFP陽性であり有髄神経線維では軸索の周囲にLFB陽性である髄鞘(ミエリン)が認められた。それぞれ神経束全体に平均して分布しており、部分的に神経周膜により区切られていた。また、神経束と骨面は神経上膜により隔てられており、下顎管内の骨面は平滑で、下顎管は円形ないし楕円形を呈していた(図2a-f)。

2. 縦断面

処置後3日目の縦断面では、両群とも下顎管内の神経構造は消失していた。

移植群では移植床内に血管やS100タンパク陽性細胞を含む移植した嗅粘膜が確認でき、損傷下歯槽神経と連続していた(図3a, b)。また、嗅粘膜に含まれていたと思われるS100タンパク陽性細胞が存在し、その周囲には円形のp75^{NTR}陽性細胞が見られた(図3b, c)。一方、非移植群の移植床には線維性結合組織が見られ、細胞成分は認められなかった。下歯槽神経切断面には炎症細胞が浸潤しており、移植床形成時の侵襲によると思われる潰瘍形成が見られた(図3d-f)。

5日目には移植群のp75^{NTR}陽性細胞は増加して、7日目には線状になりS100タンパク陽性細胞と同様の部分に認められた(図4a-c)。非移植群では、未熟な骨梁を含む肉芽組織で移植床は満たされており、p75^{NTR}陽性細胞あるいはS100タンパク陽性細胞とも見られなかった(図4d-f)。

14日目の移植群ではS100タンパク陽性細胞は長さを増して束状に配列し(図5b)、それと一

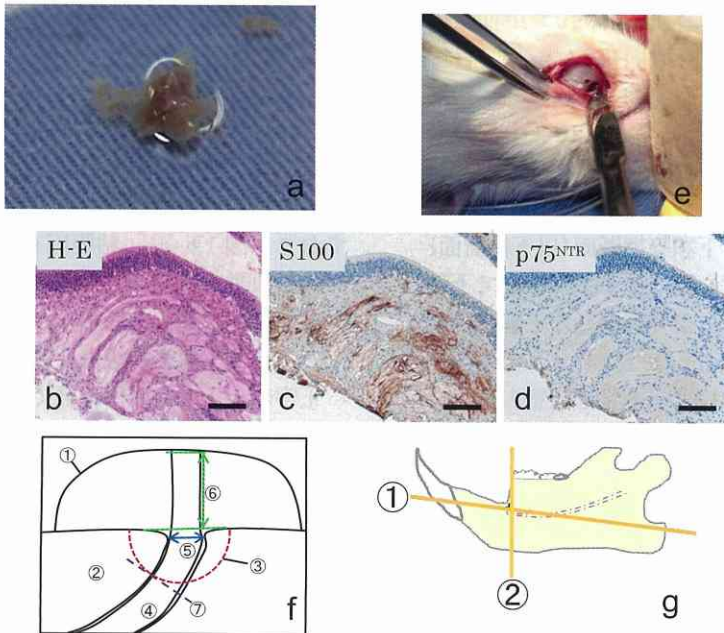


図 1

- a ラット鼻腔より採取した嗅粘膜
 b 嗅粘膜 H-E
 嗅上皮と固有層からなり，固有層には嗅神経が認められる。
 c 嗅粘膜 S100タンパク
 d 嗅粘膜 p75^{NTR}
 e オトガイ神経切除後，オトガイ孔に形成された移植床。
 f 実験部の模式図
 ①骨膜 ②骨 ③移植床 ④下歯槽神経
 ⑤オトガイ孔 ⑥切除したオトガイ神経
 ⑦下顎管横断面
 g 観察面
 ①下歯槽神経とオトガイ孔が連続して観察できる下顎管縦断面。
 ②下顎第1臼歯近心縁での下顎骨切断面。
 スケールバー：b, c, d=200 μ m

致して NFP 陽性線維も増加していた (図 5 c)。非移植群では骨梁が増加して，骨梁の間隙や骨膜周辺にわずかな S100タンパク陽性細胞および NFP 陽性線維が存在した (図 5 d-f)。移植群においても骨形成を認めたが (図 5 a)，その量は非移植群に比べてわずかであり，数多くの S100陽性細胞と NFP 陽性線維が存在した。

21日目以降も移植群では S100タンパク陽性細胞と NFP 陽性線維は増加して密度が増えていた。一方，非移植群の移植床内に形成された骨は増加して，骨梁間や骨膜下にわずかな S100タンパク陽性細胞と NFP 陽性線維が存在した。

3. 横断面

処置後3日目では両群とも神経様構造は見られず，S100タンパク陽性細胞と NFP 陽性線維は認められなかった。5日目の移植群では下顎管の形態は保たれており (図 6 a)，非移植群では下顎管内に網目状に骨梁形成が起こっていた (図 6 d)。両群とも少数の S100タンパク陽性細胞と NFP 陽性線維が存在した (図 6 b, c, e, f)。

14日目の移植群では，下顎管周囲より骨形成が起こったがわずかで (図 7 a)，多くの S100タンパク陽性細胞と NFP 陽性線維が存在した (図 7 b, c)。非移植群では徐々に骨量を増して下顎

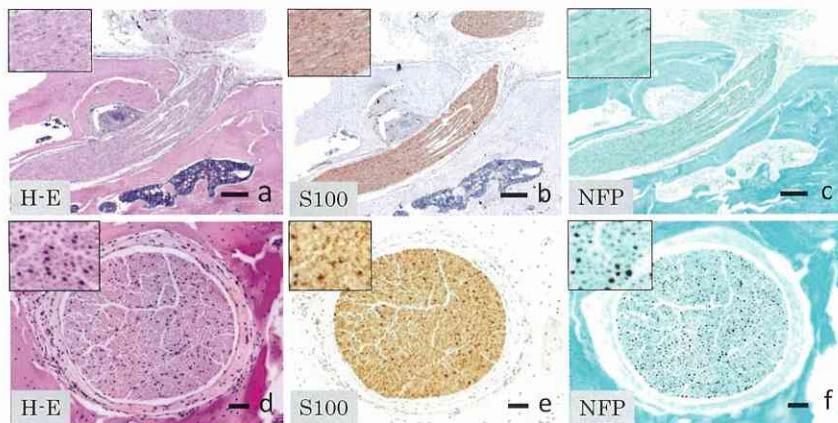


図2 下歯槽神経正常像

a-c 縦断面

a : H-E b : S100タンパク c : NFP

d-f 横断面

d : H-E e : S100タンパク f : NFP

スケールバー : a, b, c=500 μ m, d, e, f=100 μ m

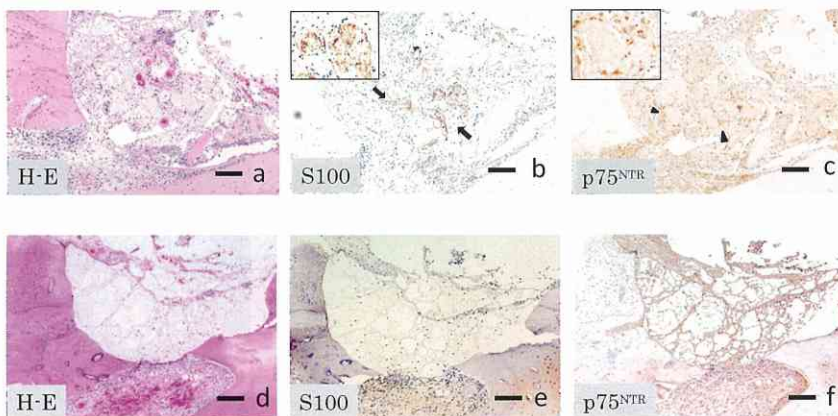


図3 3日目の縦断面・中拡大

a-c 移植床内には移植した嗅粘膜の血管やS100タンパク陽性細胞およびp75^{NTR}陽性細胞が認められる。

a 移植群H-E

b 移植群S100タンパク：嗅粘膜に含まれていたと思われるS100タンパク陽性細胞(矢印)。

c 移植群p75^{NTR}：S100タンパク陽性細胞周囲に存在するp75^{NTR}陽性細胞(矢頭印)。

d-f 移植床は線維性結合で埋められており、細胞成分は認めない。

d 非移植群 H-E

e 非移植群 S100タンパク

f 非移植群 p75^{NTR}

スケールバー : a, b, c, d, e, f=200 μ m

管は元の形態を失っていた (図7 d-f)。

S100タンパク陽性細胞およびNFP陽性線維、LFB陽性細胞は中心から徐々に密度を増し(図

8 b, c), 28日目の移植群では、正常下歯槽神経に類似した構造となった(図8 a)。一方、非移植群では下顎管内は形成した骨により置換され

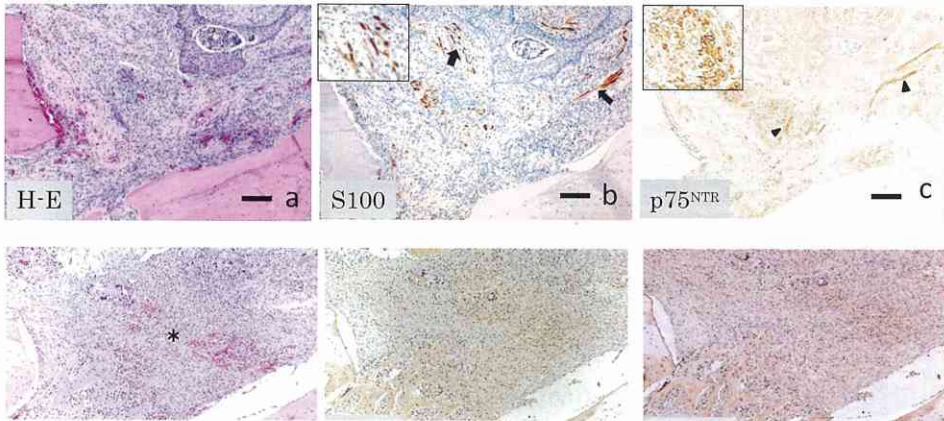


図4 7日目の縦断面

a-c p75^{NTR}陽性細胞は線状となりS100タンパク陽性細胞と同様の部位に認められた。

a 移植群 H-E

b 移植群 S100タンパク：線状になったS100タンパク陽性細胞（矢印）。

c 移植群p75^{NTR}：線状になってS100タンパク陽性細胞と同様の部位に存在したp75^{NTR}陽性細胞（矢印）。

d-f 移植床内は肉芽組織で覆われている。

d 非移植群H-E：肉芽組織で覆われた移植床（*）。

e 非移植S100タンパク

f 非移植群p75^{NTR}

スケールバー：a, b, c, d, e, f=200 μ m

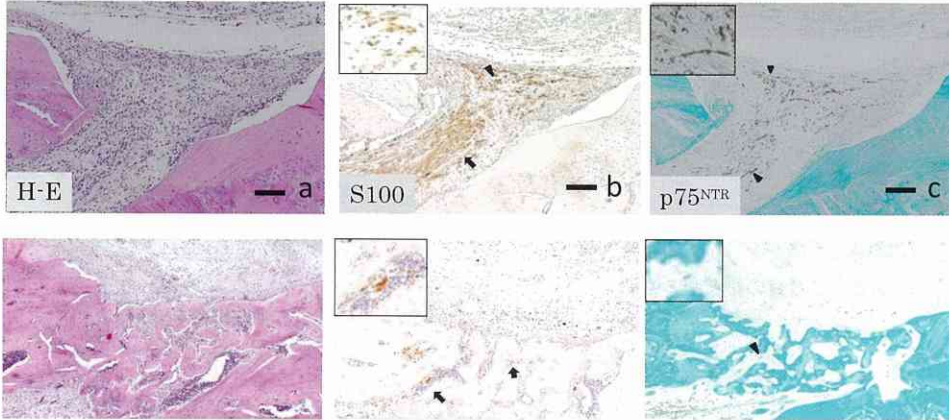


図5 14日目の縦断面

a-c 移植床に多くのS100タンパク陽性細胞とNFP陽性線維を認める。

a 移植群H-E

b 移植群S100タンパク：束状に配列したS100タンパク陽性細胞（矢印）と移植部のS100タンパク陽性細胞（矢印）の連続性は断たれている。

c 移植群NFP：増加したNFP陽性線維（矢印）。

d-f 移植床から下顎管内は骨で覆われており、形成した骨の間隙にわずかなS100タンパク陽性細胞とNFP陽性線維を認める。

d 非移植群H-E：骨で覆われた移植床。

e 非移植群S100タンパク：わずかにS100タンパク陽性細胞を認める（矢印）。

f 非移植群NFP：わずかにNFP陽性線維を認める（矢印）。

スケールバー：a, b, c, d, e, f=200 μ m

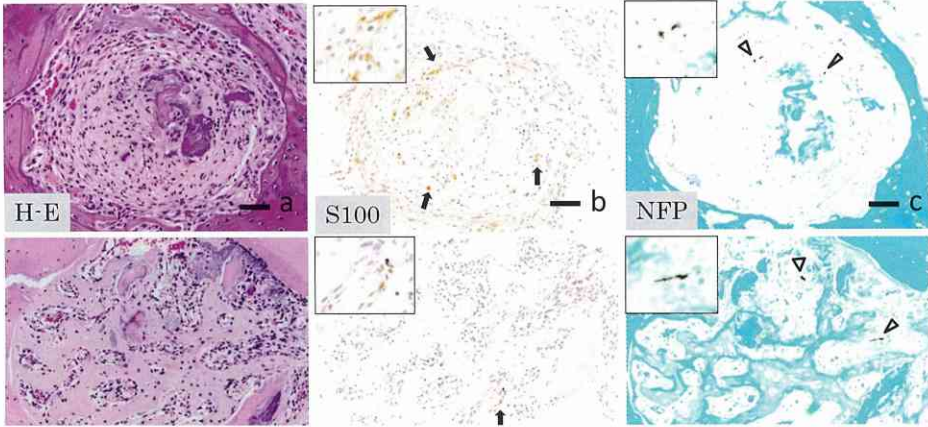


図6 5日目の横断面

a-c 下顎管の形態は保っている。

a 移植群 H-E

b 移植群 S100タンパク：少数のS100タンパク陽性細胞を認める（矢印）。

c 移植群 NFP：少数のNFP陽性線維を認める（矢頭印）。

d-f 下顎管内には網目状に骨梁形成を認める。

d 非移植群 H-E：下顎管内に骨梁形成を認める。

e 非移植群 S100タンパク：少数のS100タンパク陽性細胞を認める（矢印）。

f 非移植群 NFP：少数のNFP陽性線維を認める（矢頭印）。

スケールバー：a, b, c, d, e, f=100 μm

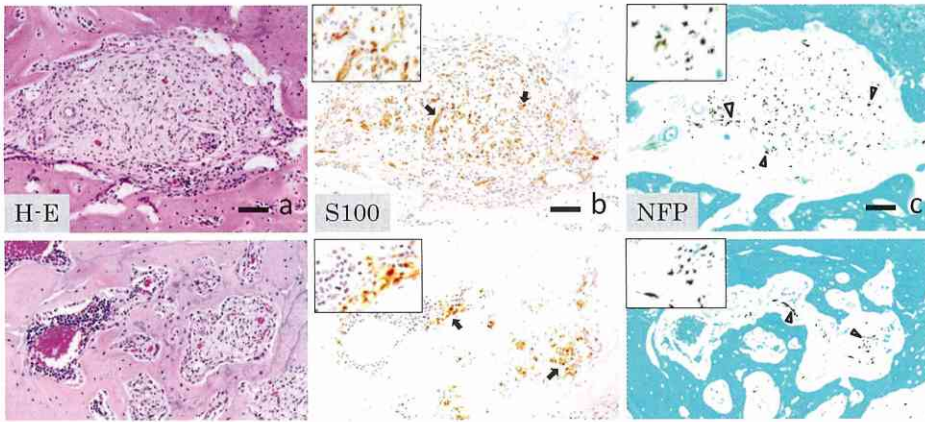


図7 14日目の横断面

a-c 下顎管周囲に骨形成が見られる。多くのS100タンパク陽性細胞とNFP陽性線維が存在した。

a 移植群 H-E

b 移植群 S100タンパク：多くのS100タンパク陽性細胞を認める（矢印）。

c 移植群 NFP：多くのNFP陽性線維を認める（矢頭印）。

d-f 骨形成は徐々に増加して、形成された骨の間隙にS100タンパク陽性細胞やNFP陽性線維が認められた。

d 非移植群 H-E

e 非移植群 S100タンパク：骨の間隙にS100タンパク陽性細胞を認める（矢印）。

f 非移植群 NFP：骨の間隙にNFP陽性線維を認める（矢頭印）。

スケールバー：a, b, c, d, e, f=100 μm

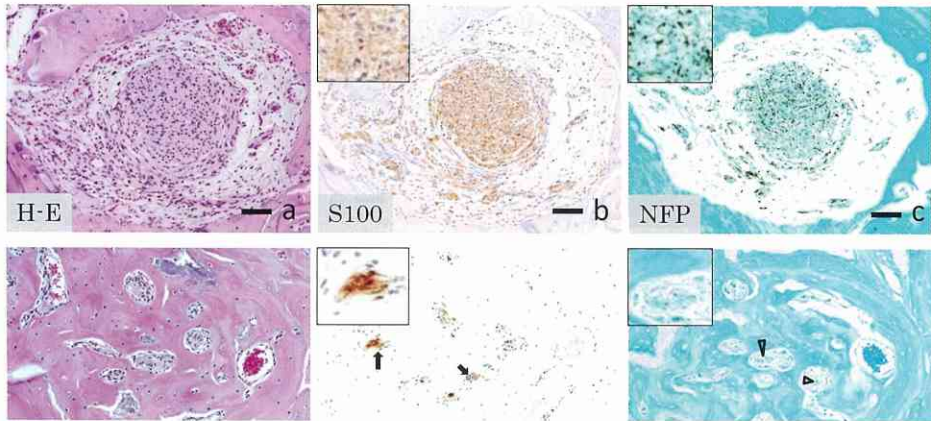


図8 28日目の横断面

a-c S100タンパク陽性細胞とNFP陽性線維は中心部より太さを増し、密度が濃くなった。

a 移植群 H-E

b 移植群 S100タンパク

c 移植群 NFP

d-f 骨形成は経時的に増加してわずかな骨の間隙にS100タンパク陽性細胞やNFP陽性線維が認められた。

d 非移植群 H-E

e 非移植群 S100タンパク：骨の間隙にわずかなS100タンパク陽性細胞を認める（矢印）。

f 非移植群 NFP：骨の間隙にわずかなNFP陽性線維を認める（矢頭印）。

スケールバー：a, b, c, d, e, f=100 μ m

(図8 d), わずかな円形の空隙を残すのみで、その空隙の中には少数のS100タンパク陽性細胞とNFP陽性線維が認められた(図8 e, f)。

4. 定量形態学的観察

1) 軸索数の比較では両群とも21日目まで増加傾向を示した。移植群では7日目以降に急激な増加を示し、21日目には非移植群に対して約7倍の軸索数で、正常神経と比較すると約90%まで回復していた。統計学的には14日目より有意差を認めた(図9)。

2) 軸索と髓鞘の面積の比較では移植群では28日目まで増加傾向を示した。非移植群でも21日目まで増加傾向を示したが移植群と比べてわずかで、28日目にはやや減少した。統計学的には7日目より有意差を認めた(図10)。

考 察

一般にラットの末梢神経線維の生後発育は13週齢でほぼ成熟するとされている。下歯槽神経に限ると63日目から140日目の間で一定値の成熟に達するため²⁰⁾、今回の実験ではラットの個体差を

考え、10~11週齢のラットを用いて検討を行った。

末梢神経が切断されると切断部より末梢側にはWaller変性が生じ、中枢側にも逆行性に軸索や髓鞘の退行変性が生じる^{21,22)}。本実験でも中枢側では近位断端部のS100タンパクおよびNFPの染色性は失われたため、Schwann細胞および軸索の変性が起こっていたとみなされる。神経切断後は3時間目から受傷部近傍のランビエ絞輪より再生神経が発生し、Schwann細胞の遊走により18日頃になると髓鞘を形成して伸長すると報告されている²³⁾。Waller変性の起こった遠位断端からも損傷後1週目よりSchwann細胞の遊走が始まる。遠位からのSchwann細胞は神経再生促進作用が近位からのSchwann細胞よりも強く^{23,24)}、さらに神経再生に必要な神経栄養因子や接着因子がSchwann細胞より放出されるため、神経再生が促進される環境が整うと報告されている。本実験では促進作用の強い遠位断端を骨膜下で切除して遠位Schwann細胞からの神経再生因子の供給を絶っている。従って、中枢側からの神経再生や軸索伸長、Schwann細胞の増殖に嗅粘膜がおよ

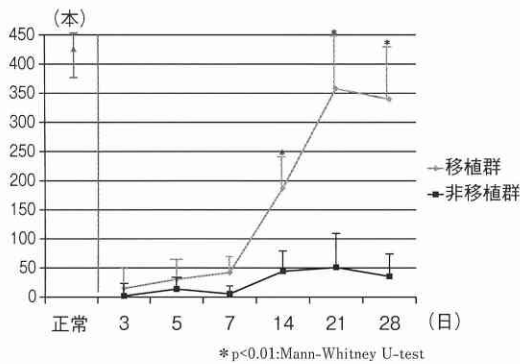


図9 軸索数の経時的变化

両群とも21日目までは増加傾向を示し、移植群では7日目以降急激に増加した。21日目の移植群の軸索数は非移植群の約7倍であった。

ばず影響を検索したと言える。

移植後3日目の移植群縦断面では Ibanez ら⁸⁾の示す嗅粘膜の構造と同様の S100タンパク陽性細胞および周囲に位置する P75^{NTR} 陽性細胞が確認できた。OEC は低親和性受容体の p75^{NTR} を発現するとされているため⁴⁻⁷⁾、3日目の移植床内に見られた p75^{NTR} 陽性細胞は OEC であると考えられ、移植床内に嗅粘膜が生着して S100タンパクまたは p75^{NTR} に反応したと考えられる。また、神経が成長するために必要な神経成長因子 (NGF: Nerve growth factor) は、主に Schwann 細胞で生産され、p75^{NTR} は NGF を受容して神経細胞の分化とアポトーシスの両方のシグナル伝達を行っている。さらに、神経損傷後の遠位 Schwann 細胞では p75^{NTR} が長期間発現し、そこに NGF が結合して軸索再生に備えるとされている^{25,26)}。本実験では移植片の OEC は p75^{NTR} 陰性であったが、3日後の移植床内では OEC が p75^{NTR} 陽性であった。従って、OEC は嗅神経が切断された刺激により活性化し、損傷した中枢側の神経断端に接する嗅粘膜が末梢神経系の遠位 Schwann 細胞の役割を果たしていると考えられた。

脊髄損傷部への OEC 移植については臨床的にも有用性が議論されている。OEC は Schwann 細胞とアストロサイトの性質を持ち、移植後は Schwann 細胞として再生軸索を囲み、神経周膜の細胞となって軸索伸長の枠組みをつくる^{6,27)}。また、Radtke ら²⁸⁾ は、OEC は Schwann 細胞に

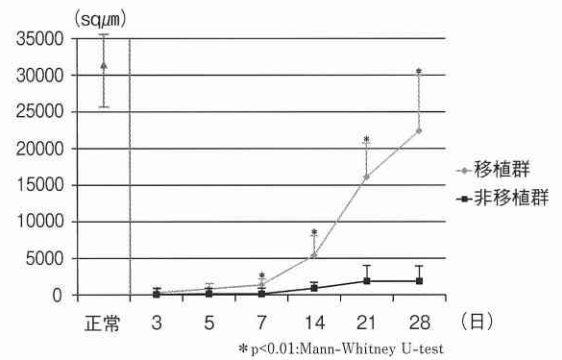


図10 軸索および髄鞘の面積の経時的变化

両群とも増加傾向を示したが、非移植群ではわずかであり、28日目にはやや減少した。

比べ神経栄養因子の放出が多く、障害部位への遊走能が高い。さらに線維芽細胞より早く損傷部に到達して瘢痕形成を防ぐと述べている。本実験においても、非移植群の移植床内では早期より線維芽細胞や骨芽細胞の増殖が起こり移植床から下顎管にかけて骨の形成がみられた。14日目には移植床から下顎管内にかけて骨形成がみられ、わずかな骨の間隙に神経線維を認めた。骨形成は28日目まで増加し続け、横断面での再生神経線維の数は正常軸索数の約1/10であった。これに対して移植群の骨形成は少なく、再生神経線維は経時的に太さを増して正常構造に近づいた。野村ら²¹⁾は、軸索が伸長するためには末梢組織の抵抗力に打ち勝つ力が必要であるとしている。すなわち移植された嗅粘膜が骨の再生を抑制する物質を放出して軸索伸長の抵抗となる骨形成を弱め、神経伸長に適した環境を形成し、さらに嗅粘膜に含まれている OEC が神経損傷部に遊走して、神経栄養因子が放出しやすい環境を早期に形成したため神経再生を促した可能性が考えられる。

また、OEC は通常ミエリンを形成しないが、移植後の脱髄癆痕部ではミエリン形成することができるとされている^{10,28,29)}。脊髄損傷後6か月以上経過した慢性期患者に対して損傷部瘢痕組織除去後に嗅粘膜移植を行うと運動機能が回復し、さらに動物実験では機能回復に加えて、肉眼的にも軸索の再生および再有髄化がみられたと報告されている^{10,13-15)}。Schwann 細胞も同様に脱髄部へ

の移植により再有髄化するが、癒痕部への侵入力が低いため、慢性期ではOECの方が優位に軸索再生および再有髄化を行うことができると言われている^{28,29)}。再生神経は標的器官を目標として伸長するが、神経終末に達した再生軸索のみが生存して太さを増す^{30,31)}。そのため、終末器官の機能が回復するためにはできるだけ多くの再生軸索を結合部へ送り込む必要がある²¹⁾。Orlandoら³²⁾は顔面神経を切除してシリコンチューブでつなぎ、チューブ内に培養OECを移植すると軸索萌芽は神経縫合の2倍になったと報告している。したがってOECが軸索萌芽の有効な誘導物質であり、大幅に軸索萌芽を増加させるのであれば機能回復の可能性が高くなることが考えられる。

近年では、OECだけではなく嗅上皮の基底層に存在する神経幹細胞も含めて嗅粘膜全体に神経軸索誘導能があるとされている^{13,15)}。これは嗅粘膜の組織自体が軸索再生の足場となりOECと嗅粘膜上皮由来の幹細胞が軸索伸長を促進するためであると考えられている¹⁰⁾。本実験においても嗅粘膜全体を移植することにより、OECやSchwann細胞が軸索再生の足場を形成して軸索の伸長に適した環境を作り、神経断端部から移植床部分への軸索伸長を促すと考えられた。また、移植された嗅上皮細胞から軸索や髄鞘形成細胞であるSchwann細胞およびOECが分化し、伸長した再生神経の有髄化に関与することも示唆された。

結 論

ラット下歯槽神経損傷部への嗅粘膜移植を行って、組織学的、定量形態学的な検索を行い、以下の結果を得た。

1. 移植群では28日目まで移植床および下顎管の形態は保たれ、3～5日目の移植床内にp75^{NTR}陽性のOECがS100タンパク陽性のSchwann細胞周囲に認められた。7日目にはOECは線状となりS100タンパク陽性細胞と同様の部分に認められ、14日目以降は下歯槽神経の切断面から移植床にかけてS100タンパク陽性細胞とNFP陽性線維が存在した。

2. 非移植群では5日目より移植床および下顎管内に骨形成を認め、経時的に増加して28日目

の下顎管内には形成した骨の間隙にS100タンパク陽性細胞とNFP陽性線維がわずかに存在した。

3. 定量形態学的には、移植群の軸索数は7日目以降急激に増加して21日目では非移植群の約7倍であった。移植群の軸索と髄鞘の面積は28日目まで増加傾向を示し、非移植群との間に7日目以降は有意差を認めた。

以上より、下歯槽神経損傷部への嗅粘膜移植は神経損傷部に対して神経再生に適した環境を形成し、嗅粘膜に含まれるOECやSchwann細胞および幹細胞が軸索誘導や再有髄化を促進するとみなせることから、神経再生に有用であると推察された。

謝 辞

本研究は、日本学術振興会の学術研究助成基金助成金(科研費, No.20592378)の助成を受けた。

稿を終えるに臨み、御指導、御鞭撻を頂いた奥羽大学歯学部口腔外科学講座大野敬教授に衷心より謝意を表します。また、数々の御協力を頂いた奥羽大学歯学部口腔病態学解析制御学講座口腔病理学分野の伊東博司教授と諸先生方ならびに生体構造学講座口腔組織分野の渡邊弘樹教授に厚く御礼申し上げます。また、御協力頂きました奥羽大学歯学部口腔外科学講座の先生方に感謝致します。

本論文の要旨の一部は、第65回NPO法人日本口腔外科学会学術集会(平成23年4月21日 東京)、第56回社団法人日本口腔外科学会総会・学術集会(平成23年10月22日 大阪)、第52回奥羽大学歯学会(平成23年11月12日 郡山)において発表した。

文 献

- 1) 西田直樹, 園田祐治: マウス嗅粘膜の計量組織学的観察—特に嗅粘膜固有層の逐齡変化. 川崎医学会誌 **35**: 285-293 2009.
- 2) 岩月幸一, 吉峰俊樹: 自家嗅粘膜の移植による脊髄再建. 脳21 **12**: 58-62 2009.
- 3) 岡田誠司, 芝 啓一郎, 岩本幸英: 脊髄損傷に対する細胞移植療法の現状と展望. 福岡医誌 **101**: 85-93 2010.
- 4) Kocsis, J. D., Lankford, K. L., Sasaki, M. and Radtke, C.: Unique in vivo properties of olfactory ensheathing cells that may contribute to neural repair and protection following spinal cord injury. *Neurosci Lett* **456**: 137-142 2009.
- 5) Brandes, G., Khayami, M., Peck, C. T., Baumgartner, W., Buggday, H. and Wewetzer,

- K. : Cell surface expression of 27C7 by neonatal rat olfactory ensheathing cells in situ and *in vitro* is independent of axonal contact. *Histochem. Cell Biol.* **135** ; 397-408 2011.
- 6) Blanchart, A., Martin-Lopez, E., Carlos, J. A. and Mascaraque, L. L. : Peripheral contributions to olfactory bulb cell populations (Migrations towards the olfactory bulb). *Glia* **59** ; 278-292 2011.
- 7) Guerout, N., Duclos, C., Drouot, L., Abramovici O., Mardion, N. B., Lacoume, Y., Jean, L., Boyer, O. and Marie, J. P. : Transplantation of olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration and functional recovery of peripheral nerve lesion in rats. *Muscle&Nerve* April : 543-551 2011.
- 8) Ibanez, C., Ito, D., Zawadzka, M., Jeffery, N. D. and Franklin, R. J. M. : Calponin is expressed by fibroblasts and meningeal cells but not olfactory ensheathing cells in the adult peripheral olfactory system. *Glia* **55** ; 144-151 2007.
- 9) 土井清司：嗅神経細胞の再生. *日鼻誌* **47** ; 68-69 2008.
- 10) 大西諭一郎, 岩月幸一, 吉峰俊樹：脊髄損傷慢性期に対する嗅粘膜移植法. *Annu. Rev. 神経* **2011** : 234-240 2011.
- 11) 丹生健一, 土井清司, 西川 匠, 越智尚樹：嗅覚の再生医療—嗅上皮の再生に向けて. *医のあゆみ* **226** ; 991-995 2008.
- 12) 本望 修：骨髄幹細胞と神経再生. *医のあゆみ* **231** ; 1097-1100 2009.
- 13) 岩月幸一, 吉峰俊樹, 安田恵多良, 貴島晴彦, 中平理恵：脊髄損傷に対する嗅粘膜移植（嗅神経鞘細胞移植）による神経再生治療. *日脊髄障害医会雑* **18** ; 24-25 2005.
- 14) 貴島晴彦, 岩月幸一, 青木正典, Carlos M, 加藤天美, 齋藤洋一, 吉峰俊樹：嗅粘膜移植による損傷脊髄再生への試み. *機能脳神外* **45** ; 8-9 2006.
- 15) 岩月幸一：嗅粘膜移植によるラット脊髄損傷治療. *日脊髄障害医会誌* **20** ; 174-175 2007.
- 16) 西田麻子, 住友雅人, 古屋英毅：ラット三叉神経末梢枝損傷回復に対する薬剤の効果に関する研究. *日歯麻誌* **27** ; 48-58 1999.
- 17) 野間弘康, 井出吉信：下歯槽神経麻痺(野間弘康, 佐々木研一, 他 編著)第1版：190-193, 医歯薬出版 東京 2001.
- 18) 鳥越甲順：末梢神経再生の鍵を握るシュワン細胞. *末梢神経* **17** : 144-152 2006.
- 19) 西浦康正, Saijilafu, 山田康貴, 原 友紀, Sarula, 市村晴充, 吉井雄一, 落合直之：神経断端直接緩徐伸長による末梢神経欠損部修復術—基礎的研究と臨床応用への課題—. *日整会誌* **84** ; 10-14 2010.
- 20) 中 慶三：ラット下歯槽神経の線維構造に関する組織学的ならびに組織化学研究—自律神経の混在について—. *明海大歯誌* **22** ; 39-55 1993.
- 21) 野村 進：末梢神経の再生. *日整会誌* **53** ; 105-114 1979.
- 22) 林 由季：ラット下歯槽神経切断後の神経の回復過程—定量形態学のおよび HRP 神経標識法による検索—. *奥羽大歯学誌* **33** ; 195-206 2006.
- 23) 鳥越甲順：末梢神経の再生—促進と抑制. *細胞* **37** ; 216-219 2005.
- 24) Torigoe, K., Tanaka, H. F., Takahashi, A., Awaya, A. and Hashimoto, K. : Basic behavior of migratory schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol.* **137** ; 301-308 1996.
- 25) Liu, H. M., Lei, H. Y. and Kao, K. : Correlation between NGF levels in wound chamber fluid and cytological localization of NGF and NGF receptor in axotomized rat sciatic nerve. *Exp. Neurol.* **132** ; 24-32 1995.
- 26) 上村知弘, 白石洋介：末梢神経損傷における軸索再生と神経成長因子 NGF. *柔道整復・接骨医* **18** ; 111-121 2010.
- 27) 井出千東：再生から見た末梢神経と脊髄. *細胞* **37** ; 214-215 2005.
- 28) Radtke, C., Aizer, A. A., Agulian, S. K., Lankford, K. L., Vogt, P. M. and Kocsis J. D. : Transplantation of olfactory ensheathing cells enhances peripheral nerve regeneration after microsurgical nerve repair. *Brain Res.* **1254** ; 10-17 2009.
- 29) Radtke, C., Wewetzer, K., Reimers, K. and Vogt, P. M. : Transplantation of olfactory ensheathing cells as adjunct cell therapy for peripheral nerve injury. *Cell Transplant* **20** ; 145-152 2011.
- 30) 高田 訓：凍結乾燥同種神経移植後の移植神経ならびに末梢筋組織の修復過程に関する実験的研究. *奥羽大歯学誌* **19** ; 332-351 1992.
- 31) 金 秀樹：除神経筋への神経移植後の治癒経過に関する実験的研究—組織化学的ならびに定量形態学的研究—. *奥羽大歯学誌* **27** ; 237-250 2000.
- 32) Guntinas-Lichius, O., Angelov, D. N., Tmov, T. L., Dramiga, J., Neiss, W. F. and Wewetzer, K. : Transplantation of olfactory ensheathing cells stimulates the collateral sprouting from axotomized adult rat facial motoneurons. *Exp. Neurol.* **172** ; 70-80 2001.

著者への連絡先：河西敬子, (〒963-8611) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔外科学講座
Reprint requests : Keiko KASAI, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Ohu University School of Dentistry
31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan