

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 吉川 博之
学位 博士(歯学)
学位記番号 新大院博(歯)第312号
学位授与の日付 平成26年9月22日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 下歯槽神経切断に対する抗BDNF抗体の局所投与による神経再生への影響

論文審査委員 主査 教授 山村 健介
副査 教授 前田 健康
副査 教授 瀬尾 憲司

博士論文の要旨

【背景と目的】

下歯槽神経(IAN)は、歯科処置などにより損傷することがあり、そのような末梢神経の損傷は慢性疼痛を誘発することが多い。損傷を受けた部位では外傷性神経腫が形成していることを認めることがあり、痛みとの関連が疑われているが、その発生機序はよくわかっていない。これについて、神経栄養因子が神経損傷後の慢性疼痛や神経腫の形成に寄与しているとの報告がある。特に脳由来神経栄養因子BDNFは神経細胞の生存と軸索突起の伸長の促進に寄与することが知られているが、その一方で神経腫の形成・発達にも関与していることも示唆されている。今までの抗BDNF抗体の損傷部位への投与により、神経腫形成が抑制されることが形態学的に確認されている。そこで本研究では末梢神経損傷後の神経腫形成におけるBDNFの影響について形態的・機能的・生化学的に検討を行った。

【方法】

使用動物は6週齢雄性SDラットを用いた。全身麻酔下にラット下歯槽神経を下顎孔より遠位で切断し、次いでラットを以下のような群に分けて各種の測定をした。①抗体投与群として、神経切断直後、切断部に抗BDNF抗体1または10 μ gを投与し、抗体1 μ g投与したものをA-B1群、10 μ g投与したものをA-B10群とした。②対照群として、抗体の代わりに生理食塩水を投与したものをNS群とした。③切断後神経が再結合しないように両切断端を絹糸で結紮したものをLN群とした。

1) 組織病理学的解析: 神経切断2週間後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、IANを含んだ下顎骨を脱灰後、パラフィン包埋し、アザン染色を行った。

2) 開口反射(JOR)の測定: 使用したラットは、A-B1群、NS群、およびLN群を用いた。神経切断後3週間目に誘発筋電図の測定のために記録電極を顎二腹筋に、そして刺激電極をオトガイ神経に留置した。刺激は1Hz、0.2 ms durationの短脈波で誘発させ、反応潜時と誘発閾値を測定し、比較検討した。

3) 機械的触刺激閾値の測定: 機械刺激(触刺激)による逃避反応閾値を、3週間経時的にその変化を観察した。ラットは、A-B1群、A-B10群、NS群、LN群を用いた。測定はvon Freyフィラメントを用い、切断3日目から切断後3週間目まで行った。

4) BDNF mRNA: 神経切断後24時間のラットより神経切断部位周囲組織および三叉神経節を取り出し試料を得た。対照は無処置のラットを0時間として用いた。得られた試料からRNAを抽出後、Real-Time PCRにより解析し切断後のBDNF mRNAの発現量の変化を比較した。さらに神経節では同一時間内で切断側と非切断側の発現量も比較した。

5) 統計解析: 結果は、mean \pm SDで表した。統計解析には、機械的触刺激閾値には、two-way RMANOVA、JORには、unpaired t-test、mRNAの定量には、unpaired t-test、one-way ANOVAを用いた。P値0.05未満を統計学的に有意差ありとした。

【結果】

1) 組織病理学的解析

神経切断後2週間目には下歯槽神経の再生が認められた。神経切断後2週目では切断部で神経重畳の形態を確認できるが、BDNF 抗体1 μ g 投与群は明らかな神経重畳の形成は見られなかった。さらに抗体10 μ g 投与では神経が接合していない部位もあり、膠質線維の入り込みも認められなかった。

2) JOR

顎二腹筋の収縮は、切断後3週間目の測定で抗BDNF 抗体投与と非投与の両群とも誘発されたがLN 群では誘発されなかった。

誘発閾値および潜伏期は抗体投与群と非投与群の間で有意な差はなかった。

3) 機械的触刺激閾値の測定

触刺激による逃避閾値は切断後3日目で閾値上昇のピークを迎え、その後徐々に低下した。抗体非投与では、切断後2週間で切断前より閾値は低下した。一方、BDNF 抗体1 μ g 投与群では、切断後3週間目には切断前とほぼ同等の閾値を示した。抗体10 μ g 投与群では、7、14日目で抗体1 μ g 投与群に対し、有意に高い閾値を示した。

さらにLN 群では切断により上昇した閾値は測定期間を通じて変化がなかった。

4) BDNF mRNA

神経切断後24時間目において、切断部位ではBDNF mRNA の有意な発現上昇がみられた。神経切断後、神経節でもBDNF mRNA の発現が有意に上昇した。非切断側の神経節では切断前後で発現量に差はなかった。

【考察】

末梢神経損傷により局所に産生されたBDNFは、軸索突起の異常伸長や膠質線維の増加を生じさせることにより、神経重畳を形成し、触覚の過敏化などを引き起こすが、その一方で損傷した軸索の再生促進にも寄与するものと考えられた。

審査結果の要旨

下顎智歯の抜歯、局所麻酔時、顎骨腫瘍や嚢胞の摘出、デンタルインプラントの埋入や顎矯正手術など様々な歯科治療の偶発症として下歯槽神経や舌神経損傷はしばしば遭遇する。これら末梢神経の損傷により難治性で慢性化した疼痛を引き起こすことが知られており、大きな問題となっている。臨床的な所見として、神経損傷部での外傷性神経重畳の形成されるケースが多く報告されており、神経重畳が神経損傷後の痛みに関与している可能性が示唆されている。しかしながら、神経損傷後の神経重畳の形成メカニズムや痛みとの関連性についてはまだ、明らかではない。申請者は、神経細胞の生存や軸索突起の伸長を促進するニューロトロフィン的一种である脳由来神経栄養因子 (BDNF) に着目した。BDNF は神経再生に促進因子である反面、末梢神経損傷部への投与により神経重畳の形成が促進されたという報告もあり、神経重畳形成および慢性疼痛への関与が示唆されている。

そこで、申請者は末梢神経損傷後にBDNF が神経重畳形成に及ぼす影響について明らかにすることを目的に本研究を行った。実験には6週齢雄生SD ラットを用い、まず深麻酔下にて下顎骨頬側皮質骨を削除し、露出させた下歯槽神経を切断した。ついでラットを神経切断部で抗BDNF 抗体1 μ g 投与した群 (A-B1 群)、10 μ g 投与した群 (A-B10 群)、神経切断部で抗体の代わりに生理食塩水を投与した対照群 (NS 群)、さらに神経切断後神経が再結合しないように切断端を結紮した群 (LN 群) の4群に分け、これら4群についてAZAN 染色による切断後の形態学的変化の観察、開口反射 (JOR)、von Frey フィラメントによる触刺激による閾値の測定による再生神経の機能評価、さらにリアルタイムPCRによるBDNF mRNA の測定による局所BDNF の解析を行った。

その結果、下歯槽神経切断部では術後2週間では、NS 群では結合組織を多く含み、膨化した神経重畳の形態を確認したが、A-B1 群では明らかな神経重畳の形成を認めず、さらにA-B10 群では神経線維の方向も不規則で神経接合していない部位も存在し、結合組織の入り込みも認めなかった。JOR は、切断後3週間目でLN 群を除く全群で反射が誘発された。また、触刺激閾値は神経切断後3日目の測定では、全群閾値が切断前より上昇し、その後徐々に低下したが、LN 群は切断により上昇した閾値は測定期間を通じて変化を認めなかった。これに対しNS 群では切断後2週間目には切断前より閾値が低下し、A-B1 群では切断後3週間目には切断前とほぼ同等の閾値を示し、A-B10 群では測定7、14日目でA-B1 群に対し有意に高い閾値を示した。リアルタイムPCRによるBDNF mRNA の測定では、神経切断後24時間目で神経切断部および三叉神経節において発現量の有意な上昇を認めた。

以上の結果から、神経切断後に局所投与した抗BDNF 抗体は神経再生において過剰な軸索突起の伸長、線維芽細胞によるコラーゲンなどの結合組織の増加を抑制し、神経重畳の形成を抑制することが示された。また、触刺激の結果より抗体10 μ g 投与では1 μ g 投与よりも知覚の回復が遅延したことから、申請者は形態のみならず機能的な回復も切断部局所のBDNF 存在量によって影響を受けると結論づけた。

本研究は末梢神経切断後に切断部局所へ増加したBDNFは神経突起の伸長を促進させ神経再生に寄与するが、神経腫の形成にも関与することを明らかにした。この知見は、今後の歯科治療において神経損傷後の慢性疼痛に対する診断・治療に寄与することが期待される。よって学位論文として十分な価値を認める。