

炎症制御による外傷性嗅覚障害の再生治療研究

著者	小林 正佳
雑誌名	日本味と匂学会誌
巻	19
号	1
ページ	37-48
発行年	2012-04-01
その他のタイトル	Research for regenerative treatment of olfactory dysfunction following head trauma by control of local inflammation
URL	http://hdl.handle.net/10076/13902

炎症制御による外傷性嗅覚障害の再生治療研究

小林正佳

三重大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科

〒514-8507 三重県津市江戸橋 2-174

TEL: 059-231-5028

FAX: 059-231-5218

e-mail: m-koba@doc.medic.mie-u.ac.jp

Research for regenerative treatment of olfactory dysfunction following head trauma by control of local inflammation. Masayoshi Kobayashi, Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Mie University Graduate School of Medicine. 2-174 Edobashi, Tsu, Mie 514-8507, Japan.

抄録

交通事故などで生じる頭部外傷は副鼻腔炎、感冒とともに嗅覚障害の三大原因のひとつであり、他の原因と比較して嗅覚の予後が悪い。本来嗅神経には他の脳神経よりも強い再生能力が備わっているにもかかわらず、外傷性嗅覚障害の予後成績がよくないのはなぜか？これを突き止めるために外傷性嗅覚障害モデルマウスを用いて予後因子の探究と予後改善のための治療研究を施行した。嗅神経の確認が容易な OMP-tau-lacZ マウスを用い、2種類のカッターを使い分けて嗅神経を切断して軽傷と重傷の外傷性嗅覚障害モデルを作製し、篩板-嗅球創部の傷害組織の所見、局所炎症の程度、嗅神経の再生度を比較検討した。その結果、外傷性嗅覚障害の予後は局所炎症の程度に依存し、外傷後早期に積極的な消炎治療を施行すれば、外傷性嗅覚障害の予後成績を改善できる可能性が考えられた。消炎治療薬として抗 IL-6 受容体抗体はステロイドよりも副作用が少なく、実際に臨床応用できる外傷性嗅覚障害の有効な治療薬の候補であると考えられる。

はじめに

交通事故などで生じる頭部外傷は副鼻腔炎、感冒とともに嗅覚障害の三大原因のひとつである。前二者の治療後改善率が70～80%と高いのに比べ¹⁾、外傷性嗅覚障害の改善率は10～40%と予後が悪い²⁻⁷⁾ (図1)。しかし、組織学的な観点で見れば、嗅覚レセプターを有する嗅細胞は他の脳神経と比較して強い再生能力を備えていて、マウスの場合はおおよそ35日周期でターンオーバーを繰り返す特徴を持っている。それなのに、実際の臨床医療の場で外傷性嗅覚障害の予後成績がよくないのはなぜであろうか。車社会である現代において交通外傷患者数は依然多く、残念ながら頭部外傷患者が絶えることがない。今後の嗅覚障害医療の発展を目指すにあたり、このような外傷性嗅覚障害の予後を向上させることは重要な課題のひとつである。予後向上のために最初に着目すべき点は、嗅覚障害が改善する例としない例との相違点、すなわち予後を決定する因子である。これが解明できれば予後改善のための治療戦略を計画することができるはずである。本稿では筆者がこれまでに施行してきた外傷性嗅覚障害の予後因子の探究と予後改善のための研究を紹介する。

外傷性嗅覚障害モデル動物を用いる研究

外傷性嗅覚障害をモデルとした動物実験として、一般に嗅神経切断実験が行われている。嗅神経の切断は主に嗅球と篩板の間にカッターを滑り込ませて、ここに走行する嗅神経(嗅糸とも言う)を切断する方法が多い⁸⁾。嗅糸を切断すると、切断部位よりも末梢側の鼻内に存在する細胞体は一旦退縮し、嗅粘膜内の嗅細胞数が減少する。その後再び嗅細胞数が増加すると同時に嗅球へ向かって軸索が伸長し、再び嗅球の糸球体に接続、投射する。これをコントロールとして、嗅神経再生を修飾する因子を加えて、その後の嗅神経再生を観察するという基礎的研究がよく行われている。嗅神経再生の確認は組織学的手法で行われることが多いが、電気生理学的手法、そして実際に動物の嗅覚嗜好に基づいて餌付けなどの条件付けを利用した行動観察的方法などもある。

今回も同様に、外傷性嗅覚障害のモデルをマウスに手術操作を加えて作製した。ペントバルビタールで全身麻酔し、前頭開頭後、篩板と嗅球との間の嗅糸を切断した(図2)。その後閉創して覚醒後、経日的に嗅神経、嗅球、嗅覚の回復過程を組織学的、生理学的に検討した。実験にはOMP-tau-lacZ マウスを用いた。これは嗅神経の特異的マーカーであるOlfactory marker protein (OMP) の遺伝子をレポーター遺伝子lacZで置換した遺伝子組み換えマウスで、5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosideを用いたX-gal染色で反応させると嗅神経は青色を呈する⁹⁾ (図2)。これにより、嗅神経が容易に確認することができるので、神経再生の組織学的研究には便利である。

予後因子の仮説1：線維性瘢痕形成による物理的障害の可能性について

外傷により傷害された局所には炎症反応が惹起される。本来炎症反応は損傷した組織修

復のためには必要な治癒過程であるが、その一方で、増生する癒痕組織は再生する神経の糸球体への投射を物理的に障害する可能性がある。本研究を始めるに当たり、最初に考えたのは、外傷受傷後の嗅覚回復不良例では嗅神経傷害部位に線維性癒痕が形成され、これが物理的障害となり再生伸長する嗅神経軸索の嗅球糸球体への再結合を抑制するという仮説であった。この根拠は、一般に神経切断後の軸索端に形成される神経腫（Traumatic neuroma）の存在であり、今回施行した予備実験においても神経腫形成が認められた（図3 矢印）。そこで、線維性癒痕の確認目的で、膠原線維組織確認に使用されるTrichrome 染色を用いて嗅神経切断後の篩板、嗅球周囲の組織学的検討を施行した。その結果、嗅神経切断後5日目、14日目に創部に何らかの組織増生を認めたものの、予想に反して線維性癒痕の主成分である膠原線維が染色されず、術後42日目には局所に増生していた組織も大部分が消退した（図4）。また、線維性癒痕が嗅神経再生の物理的障害と成り得るかを確認する目的で、同じマウスから膠原線維組織である側頭筋膜を一部採取して、嗅神経切断直後に篩板と嗅球との間に留置するという人工的癒痕形成実験を施行した。その結果、再生した嗅神経は筋膜片を貫通して嗅球へと軸索を伸長させているのが認められた（図5）。以上から、頭蓋底の嗅神経切断部位に認められる増生組織は膠原線維が主成分ではなく、また膠原線維組織は神経再生の物理的障害にはならないことが確認された。

予後因子の仮説 2：神経膠細胞と炎症反応の関わりについて

次に考えたのが、外傷受傷部位に生じる局所炎症反応自体が嗅神経軸索の再生を抑制するという仮説である。これを確認するために2種類の嗅神経切断実験を施行した（図6）。可塑性があり組織傷害度を軽微にできるテフロン性のカッターと、可塑性がなく組織傷害度が高度になるステンレス製のカッターを使い分けて、それぞれ軽傷と重傷の2種類の外傷性嗅覚障害モデル動物を作製し（図7）、嗅神経切断後5、14、42日目の組織標本を比較検討した。嗅神経はX-gal染色で青色に発色する嗅神経軸索が糸球体に再投射する程度で評価し、局所に増生した炎症組織とともにImage Jを用いた画像解析で定量した¹⁰⁾（図2）。免疫染色も施行し、嗅球傷害の程度のマーカーとして活性化した星状膠細胞を抗 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体で、また炎症反応のマーカーとしてマクロファージなどの組織球を抗 CD68 抗体でそれぞれ確認した。以上により嗅神経の再生度、組織傷害の程度、局所炎症の程度を調べた。

その結果、軽傷群では重傷群よりも、嗅球と篩板との間に傷害に伴う炎症組織増生が少なく、再生して嗅球に達する嗅神経がより多く認められた（図7、8）。また、両群で嗅神経切断後に星状膠細胞とマクロファージの増加を認め、局所増生した炎症組織の主体がグリア癒痕であることを確認した。そして術後42日目には、重傷群では軽傷群よりも多くの星状膠細胞とマクロファージ浸潤の持続を認めた（図9）。

続いて、重傷群のみを対象に、抗炎症作用のあるステロイド薬であるデキサメサゾン

(DXM) を嗅神経切断直後に投与して同様の検討を施行した。その結果、嗅神経切断後早期にDXMを投与した群では濃度依存性に炎症所見が軽度となり、嗅神経再生が良好であった (図10)。

以上の結果は、外傷による組織傷害度が軽度の場合にはグリア瘢痕形成と炎症所見が軽度で嗅神経再生が良好となり、一方、組織傷害度が重度の場合にはこれらも重度で神経再生が不良になることを示している。グリアは本来神経が傷害されたときに増生して、新たに神経が修復、再生されるのに必要な因子、栄養などを供給し、また神経再生時のガイド的役割を成すものと考えられている。しかし、ラットの視神経で作製したグリア瘢痕を抽出して嗅球に移植した研究では、逆に嗅神経の再生が阻害されたと報告されている¹¹⁾。今回、このグリア瘢痕がステロイド薬により抑制され、重傷群も軽傷群と同様に嗅神経再生が良好となった。したがって、嗅神経再生の予後は炎症反応の程度に依存し、受傷後急性期の消炎治療が嗅神経再生に有用であると考えられる。

しかし、実際の救急医療の場においては、頭部外傷受傷後の急性期に嗅覚障害発症の有無に関心が寄せられることは少なく、慢性期で他症状が落ち着く数週間～数カ月後によく嗅覚障害に気付いて耳鼻咽喉科を受診する例が多い。そこで、この実態を踏まえて、陳旧性 (慢性期) モデル動物を作製して同様に実験した。すなわち、重傷群マウスを作製し、嗅神経切断後42日経過してからステロイド薬を投与し、その後の経過を検討した。その結果、炎症所見は慢性期のためか比較的軽度であったにもかかわらず、嗅神経の再生は不良なままであった (図11)。この結果から、陳旧性の嗅神経切断例における消炎薬の投与は嗅神経再生に有用ではないと考えられた。これはおそらく傷害受傷後の嗅神経再生に「ゴールデンタイム」があり、その時期に局所環境が好条件であれば嗅神経が良好に再生するが、その時期を過ぎれば再生が困難になるものと推察される。よって、実際の外傷性嗅覚障害の予後不良因子は、初期治療の好機を逃していることであると考えられた。

インターロイキン6の抑制による嗅神経の再生促進

上記の結果に基づけば、今後外傷性嗅覚傷害の予後改善を図るためには、外傷急性期にステロイド薬を投与することが望まれるが、実際のところ、日本神経外傷学会が定めている頭部外傷の管理、治療ガイドラインでは急性期のステロイド薬投与は脊髄損傷例を除いて一般に推奨されていない¹²⁾。この理由は、全身状態が不安定な時期にステロイド薬を投与すると感染症、高血糖、高血圧、骨壊死などの副作用症状を容易に発症する可能性があることと、これまでに外傷治療におけるステロイド薬の有用性のエビデンスが確立されていないためである¹³⁻¹⁵⁾。そこで筆者はステロイドよりも副作用の少ない他の抗炎症薬を用いた治療法を考案し、炎症性サイトカインのひとつであるインターロイキン6 (IL-6) に着目した。この受容体抗体である抗IL-6受容体 (R) 抗体は、慢性関節リウマチなどの難治性炎症の新しい治療薬として、最近臨床実用化が開始され、注目されている。また、神経系

については、脊髄損傷モデルマウスに対して、マウス用抗IL-6R抗体であるMR16-1の投与により脊髄再生が促進されたという報告もされている¹⁶⁾。

嗅神経切断・重傷群を対象にMR16-1の効果をまず組織学的に検討した。その結果、MR16-1投与群はコントロールのIgG投与群と比較して、濃度依存性にグリア瘢痕形成と炎症細胞浸潤を抑制し、嗅神経再生を促進させることが明らかになった(図12)。さらに実際の嗅覚機能の回復も行動学的実験と電気生理学実験で確認した。行動学的実験は、マウスがナラマイシン(シクロヘキシミド)に対して忌避行動をとる習性を利用した。マウスは一度ナラマイシン溶液を嘗めると強い忌避行動をとり、その後はこのにおいを記憶してそのにおいを嗅ぐだけでその溶液を回避する。これにて嗅覚の嫌悪学習を行い、48時間絶飲としたマウスにナラマイシン溶液と蒸留水の入った給水ボトルを2本同時にランダムな配置で呈示し、10回連続蒸留水ボトルを選択して嘗めたマウスは嗅覚機能があり、1回でもナラマイシン溶液を嘗めたマウスは嗅覚障害のあるマウスと判定した。嗅覚嫌悪学習が成立したマウスに対して、同様の嗅神経切断実験を施行した結果、MR16-1投与群はIgG投与群よりも有意に多くの嗅覚回復例が認められた(表1)。さらにこの裏付けとして、嗅粘膜を電気刺激し、嗅球内でField potential(電場電位)を記録する(図13)電気生理学実験も施行した。その結果、MR16-1投与マウスでは、その多くでField potentialが回復しており(図14)、IgG投与群と比較してField potentialが有意に大きかった(図15A)。また、両群のうち、ナラマイシンテストで蒸留水を100%同定して嗅覚機能回復を認めた群と、ナラマイシンテストで100%に達しなかった嗅覚機能不変群のマウスを比較すると、嗅覚機能回復群では不変群よりも有意にField potentialが回復していた(図15)。

以上の結果から、抗IL-6R抗体は実際に臨床応用できる外傷性嗅覚障害の有効な治療薬の候補であると考えられた。

まとめ

表2に今回のまとめを示す。現在の医療現場において、頭部外傷の急性期に嗅覚障害の有無と予後まで考慮に入れた治療を行っている施設はかなり少ないと考えられる。しかし、医療機関での統計において嗅覚障害の三大原因に外傷性嗅覚障害が挙がるということは、時間が経過してから残存する嗅覚障害を主訴とする患者が決して少なくないことを意味している。今後外傷性嗅覚障害の予後成績を向上させるためには、慢性期の治療法開発よりも発症急性期に適切に対処して嗅覚障害の発症率を下げるように取り組むのがもっとも効果的であるということを今回の研究結果は示唆している。抗IL-6R抗体はステロイド薬よりも副作用が少なく、すでに臨床実用化されている薬物であるので、現時点ではこの研究結果をもとに実地医療の場で応用を進めることで、今後の外傷性嗅覚障害の予後成績向上が図れるのではないかと考える。

文 献

- 1) 小林正佳、今西義宜、石川雅子、西田幸平、足立光朗、大石真綾、中村哲、坂井田寛、間島雄一：嗅覚障害に対するステロイド薬の長期点鼻療法の安全性と有用性の検討。日耳鼻 108, 986-995 (2005)
- 2) Sumner D: Post-traumatic anosmia. *Brain* 87, 107-120 (1964)
- 3) Zusho H: Posttraumatic anosmia. *Arch Otolaryngol* 108, 90-92 (1982)
- 4) Costanzo RM and Becker DP: Smell and taste disorders in head injury and neurosurgery patients. In *Clinical Measurements of Taste and Smell*. (Meiselman HL and Rivlin RS eds.), MacMillian Publishing Company. New York pp 565-578 (1986)
- 5) Ikeda K, Sakurada T, Takasaka T, Okitsu T and Yoshida S: Anosmia following head trauma: preliminary study of steroid treatment. *Tohoku J Exp Med* 177, 343-351 (1995)
- 6) Jimenez DF, Sundrani S and Barone CM: Posttraumatic anosmia in craniofacial trauma. *J Craniomaxillofac Trauma* 3, 8-15 (1997)
- 7) London B, Nabet B, Fisher AR, White B, Sammel MD and Doty RL.: Predictors of prognosis in patients with olfactory disturbance. *Ann Neurol* 63, 159-166 (2008)
- 8) Costanzo RM: Rewiring the olfactory bulb: changes in odor maps following recovery from nerve transection. *Chem Senses* 25, 199-205 (2000)
- 9) Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J and Axel R: Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87, 675-686 (1996)
- 10) Kobayashi M and Costanzo RM: Olfactory nerve recovery following mild and severe injury and the efficacy of dexamethasone treatment. *Chem Senses* 34, 573-580, (2009).
- 11) Anders JJ and Hurlock JA: Transplanted glial scar impedes olfactory bulb reinnervation. *Exp Neurol* 142, 144-150 (1996)
- 12) 日本神経外傷学会：重症頭部外傷治療・管理のガイドライン 第2版. 医学書院、東京 (2007)
- 13) Cooper PR, Moody S, Clark WK, Kirkpatrick J, Maravilla K, Gould AL and Drane W: Dexamethasone and severe head injury. A prospective double-blind study. *J Neurosurg* 51, 307-316 (1979)
- 14) Braakman R, Schouten HJ, Blaauw-van DM and Minderhoud JM: Megadose steroids in severe head injury. Results of a prospective double-blind clinical trial. *J Neurosurg* 58, 326-330 (1983)
- 15) Dearden NM, Gibson JS, McDowall DG, Gibson RM and Cameron MM: Effect of high-dose dexamethasone on outcome from severe head injury. *J Neurosurg* 64, 81-88 (1986)
- 16) Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Mihara M, Ohsugi Y, Iwamoto Y, Yoshizaki K, Kishimoto T, Toyama Y and Okano H: Blockade of Interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *J Neurosci*

Res 76, 265-276 (2004)

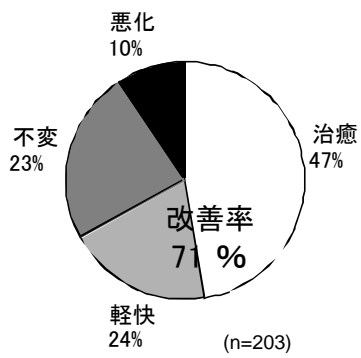
表1 におい嫌悪学習による嗅覚機能回復確認結果

	MR16-1 4 mg	IgG 4 mg (control)	<i>p</i> 値
100%到達数 (%)	10/15 (67)	2/10 (20)	< 0.05
100%到達日	55±9	66±22	n.s.

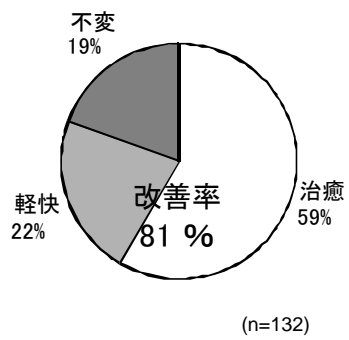
表2 結果のまとめ

	コントロール		ステロイド薬 急性期投与	ステロイド薬 慢性期投与	抗 IL-6R 抗体 急性期投与
	軽傷	重傷	重傷	重傷	重傷
傷害度	少	多	少	効果なし	少
炎症組織	少	多	少	効果なし	少
星状膠細胞増殖	少	多	少	効果なし	少
炎症細胞浸潤	少	多	少	効果なし	少
神経再生	良好	不良	良好	不良のまま	良好

副鼻腔炎



感冒



外傷

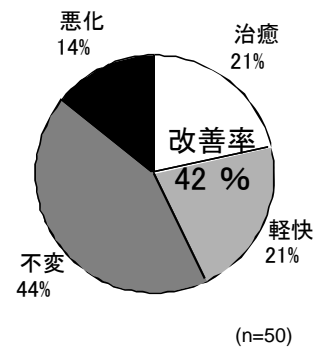
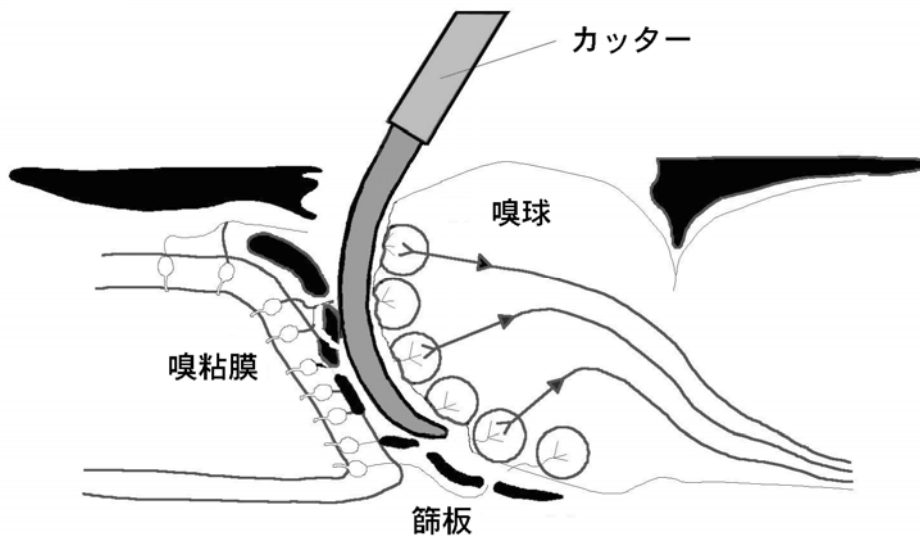


図1 嗅覚障害の三大原因と当施設における各予後成績

A



B

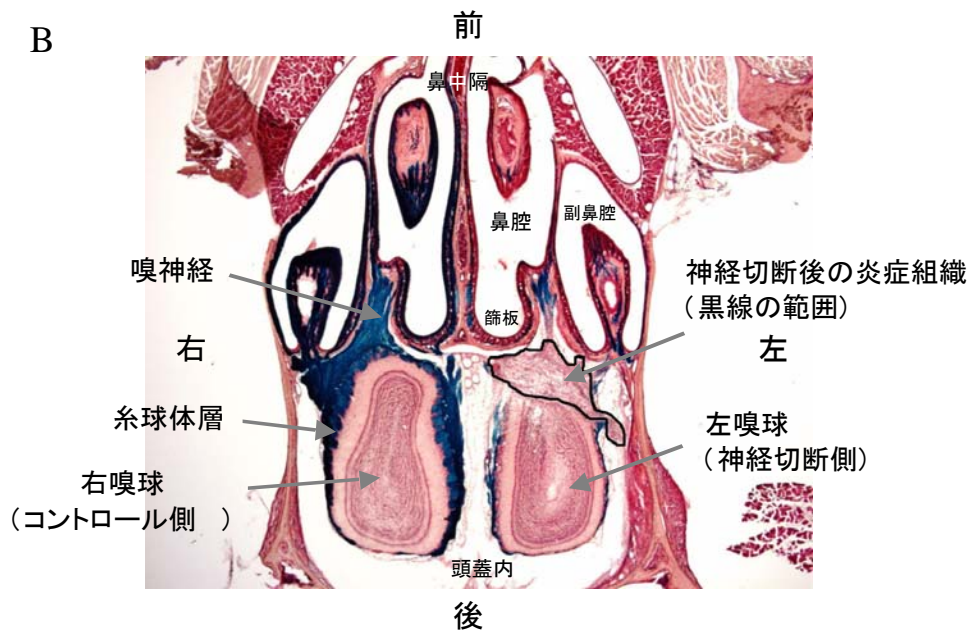


図2 嗅神経切断実験図 (A) と切断後のマウス頭部水平断組織標本 (B)

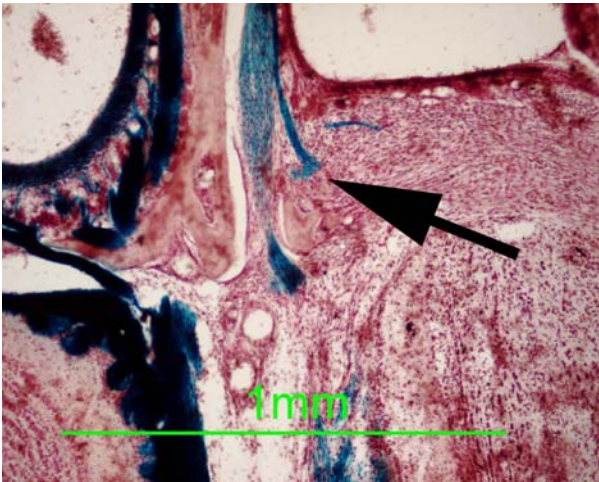
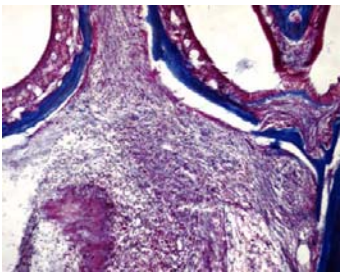
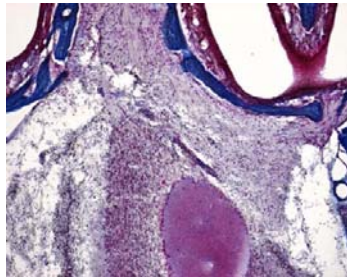


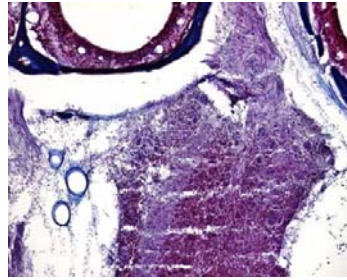
図3 神経切断後の再生嗅神経軸索端に認められた神経腫（Traumatic neuroma）の形成（矢印）



嗅神経切断後 5 日目



14 日目



42 日目

図4 嗅神経切断後のTrichrome染色組織

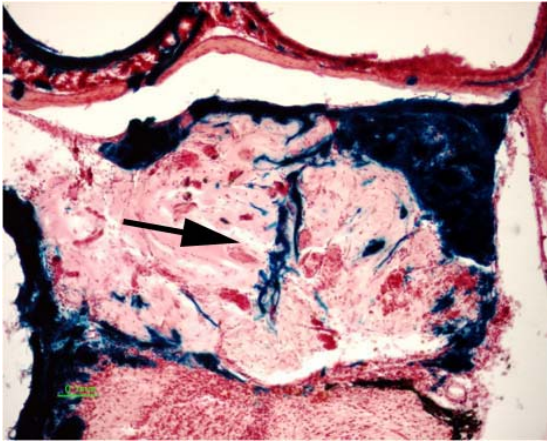


図5 嗅神経切断後42日目の側頭筋膜移植実験結果
矢印は移植筋膜片を貫通する再生嗅神経軸索

