博士論文

後鼻神経切断術が鼻粘膜の生理機能およびアレルギー性鼻炎の病態に及ぼす影響の解析

西嶌大宣

後鼻神経切断術が鼻粘膜の生理機能およびアレルギー性鼻炎の病態に及ぼす影響の解析

東京大学医学系研究科

論文博士課程　外科学専攻

指導教員　山岨　達也　教授

西嶌大宣

目次

第 1 章　要旨

第 2 章　序文

第 3 章　方法

第 4 章　結果

第 5 章　考察

第 6 章　結論

第 7 章　謝辞

第 8 章　参考文献

第 1 章　要旨

後鼻神経切断術のモデル動物を作成し，後鼻神経切断が鼻粘膜及びアレルギー性鼻炎の病態に及ぼす影響を検討した．

後鼻神経切断により鼻粘膜呼吸上皮の神経線維及び神経ペプチド発現低下と，アセチルコリン合成不全による鼻汁量減少を認めた．アレルギー性鼻炎モデルでは，後鼻神経切断術により鼻汁量が減少したが，鼻掻き・くしゃみ症状には効果がなかった．アレルギー感作に伴う粘膜の肥厚や，好酸球・肥満細胞の浸潤，炎症サイトカインの発現亢進は，後鼻神経切断術により変化しなかった．アレルギー性鼻炎の病態において鼻粘膜の脱神経は，鼻汁を抑制する一方で，過敏症の抑制および粘膜のアレルギー反応への関与が少ないことが示された．

第 2 章　序文

アレルギー性鼻炎は，鼻粘膜のⅠ型アレルギー疾患で，くしゃみ，鼻漏，鼻閉を 3 主徴とする[1)]．アレルギー性鼻炎は通年性アレルギー性鼻炎と季節性アレルギー性鼻炎（花粉症）に分けられる．アレルギー性鼻炎の有病率は 1960 年代後半から増加が認められ，先進国での有病率は 10-30%といわれている[1, 2)]．本邦における 2008 年の疫学調査では，通年性アレルギー性鼻炎の有病率が 23.4%，スギ花粉症の有病率が 26.5%，スギ以外の花粉症の有病率が 15.4%，アレルギー性鼻炎全体では 39.4%と報告されている[3)]．このようにアレルギー性鼻炎は有病率が高く，耳鼻咽喉科の診療においてしばしば遭遇する疾患である．またとくにスギ花粉症の有病率の高さと症状の強さはしばしば社会問題としても取り上げられることが多い．

アレルギー性鼻炎の治療法は抗ヒスタミン薬，ステロイド点鼻を中心とした段階的な薬物治療が中心である[1)]．しかし薬物治療を受けた患者の満足度は必ずしも高いとは限らず，さまざまな薬物療法にも抵抗性でコントロールが不十分な患者にしばしば遭遇する．薬物治療で症状のコントロールができない患者には手術療法も考慮される.アレルギー性鼻炎に対する手術療法には鼻粘膜表面の変性を目的としたレーザー治療や，鼻腔形態の改善を目的とする鼻腔整復手術(鼻中隔矯正術，下鼻甲介手術)など様々なものがある[1, 4, 5)]．その手術治療の一つとして，特に難治性なアレルギー性鼻炎に対しては，後鼻神経切断術が行われており，本邦では広く普及している．この後鼻

神経切断術は，鼻腔の支配神経の切断による鼻炎症状の制御を目的とし，本邦の鼻アレルギー診療ガイドラインでも治療方法の一つとして挙げられている[1)]．

後鼻神経は，翼口蓋神経節から蝶口蓋孔を通り鼻腔内へ分布する鼻粘膜呼吸上皮の支配神経の一つである[6, 7)]．後鼻神経切断術は，鼻腔内へ分布する後鼻神経を内視鏡下に鼻腔入口部である蝶口蓋孔の基部で切断し，鼻炎症状を選択的に抑える方法である．後鼻神経切断術は，鼻アレルギー症状のうち特に鼻汁抑制に効果があることが知られている[6)]．歴史的には，後鼻神経の中枢側の神経である Vidian 神経の切断術が 1961 年に血管運動性鼻炎に対して報告され[8)]，1970 年代にはアレルギー性鼻炎に対する効果も報告されてきた[9)]．Vidian 神経は鼻腔へ分布する副交感神経を含み，それを切断することで鼻症状，特に鼻汁を減少させる[6)]．その一方で，Vidian 神経切断術に伴う涙分泌障害や口蓋知覚麻痺などの合併症，手術手技の難しさなどの問題があり，次第に行われなくなっていった[6, 9)]．しかし 1990 年代に内視鏡下で低侵襲な Vidian 神経切断術が報告されるようになり，1998 年には黄川田らにより Vidian 神経の末梢枝を切断する後鼻神経切断術が提案された[10, 11)]．その後，後鼻神経切断術のアレルギー性鼻炎および通年性難治性鼻過敏症に対する効果が数多く報告され，本邦では広く行われるようになっていった．

後鼻神経切断術は，理論的には後鼻神経に含まれる副交感神経線維および知覚神経線維が切断されることで腺の分泌や反射を抑制し，鼻症状が軽快すると考えられ

ている. しかしヒトにおける研究の限界や, モデル動物がいないことからその実際の作用機序や, 分子メカニズム, 切断後の病態の詳細については十分な基礎研究が行われておらず不明な点も多い. 過去に Ogawa ら, Ikeda らはヒトの後鼻神経切断術後の鼻粘膜における炎症抑制効果について報告をしているが, その病態の理解に関しては限定的であった [12, 13].

後鼻神経切断術は鼻汁のみならず, くしゃみを抑制したという報告が多くある [6, 12-14]. 一方で, 鼻汁のみを抑制し, 過敏症状は抑制しなかったという報告もあり, その効果については定まっていない [15, 16]. 鼻汁に関してはほぼ全ての報告で VAS スケールなどを用いた自覚症状の評価において, 有意差をもって鼻汁量の減少が報告されている. しかしながら海外では, 後鼻神経切断術はエビデンスが不十分という理由で, 評価が定まっておらず, あまり行われていないのが現状である [4, 5, 17]. 加えてアレルギー性鼻炎は, 欧米では主に家庭医が診療にあたっていることも治療法として外科的治療が選択されない理由となっている. また後鼻神経切断術および Vidian 神経切断術は, 術後 1-3 年での症状の再燃が報告されている [6, 9, 15, 18].これは再生した神経が症状の再燃を引き起こしていることが予想されるが, 後鼻神経切断術後の実際の粘膜の変化など, 術後の長期的な病態に関しては不明な点が多い.

アレルギー性鼻炎の病態においては, IgE などの免疫系の反応のみならず, 神経系を介した反応が関与している. 具体的には, 知覚神経を介したくしゃみ反射や, 副交

感神経を介した鼻汁分泌など多くの症状が神経系と関与している. そして神経系は免疫系と相互作用をし, 鼻炎において重要な役割を果たしていることが報告されている[19-22]. しかしその神経と免疫の相互作用については不明な点も多く, 実際に脱神経がおきた鼻粘膜において, どのような免疫反応が起きるのかなどの研究はこれまでに報告されていない.

今回の研究では, ラットを用いて後鼻神経切断術モデルを作成した. 最初に後鼻神経切断が鼻粘膜へ及ぼす影響について検討した. 次にアレルギー感作をしたラットに後鼻神経切断術を行い, その病態に及ぼす影響を検討した. 後鼻神経切断がアレルギー性鼻炎の病態に及ぼす影響を検討することで, アレルギー性鼻炎における支配神経のはたす役割を検討した. ヒトにおける後鼻神経切断術の臨床経験から, “後鼻神経切断術は鼻粘膜におけるアレルギー反応を抑制する“という仮説をたて検討を行った. さらに後鼻神経切断後の鼻粘膜の長期の観察をおこなうことで, 支配神経の切断が鼻粘膜へ及ぼす長期的な影響についても検討をした. これらの課題に取り組むことで, 鼻粘膜における神経制御を明らかにするとともに, アレルギー性鼻炎における神経のはたす役割について明らかにすることを目的とした. そして後鼻神経切断術の基礎的なエビデンスの構築と, 鼻炎の病態の更なる解明および治療法の進歩に寄与することを目的とした.

第 3 章　方法

3-1. 実験動物に関して

実験には 8 週令の雄の Sprague-Dawley ラットを使用した. クレアジャパンより購入し実験をおこなった. ラットは 9:00-21:00 までの明期で, 室温 23 度の管理環境で, 自由摂食・飲水条件下で飼育をした. これらの実験の全過程は東京大学の動物実験実施規則及び, NIH guide for the Care and Use of Laboratory Animals に則り施行され, 実験動物の苦痛を最小限にするように努めた. 研究は, 東京大学医学系研究科動物実験委員会の倫理審査(医 P21-31)を経て施行した.

3-2. 後鼻神経切断モデル動物作成と組織採取

ラットの後鼻神経の切断は, ラットの翼口蓋神経節へのアプローチを記した先行論文を参考に行った [23]. この操作はラットを 1:2 の比率で混合したキシラジン(バイエル, 20mg/ml)とケタミン(第一三共, 50mg/ml)による深麻酔下に顕微鏡をもちいて行った. ラットの上眼窩縁に約 1.5 センチの皮膚切開を行い, 前頭骨膜下で皮膚と皮下組織を挙上した(図 1a, 1b). 眼窩縁より眼窩骨膜下で眼窩内容物を外側へとよけていき, 経眼窩的に翼口蓋窩方向へと深部へ剥離をすすめた. この時まず三叉神経第一枝の枝である鼻毛様体枝が浅部にみとめられ, これを焼灼切離した(図 1c). さらに深部へと

剥離を進めていくと三叉神経第二枝(上顎神経)が認された(図 1d,1e). これを外側へとよけると深部に翼口蓋神経節が確認された(図 1f,1g). この翼口蓋神経節からは前方に進む眼枝と蝶口蓋孔を通って鼻腔内へと分布する鼻腔枝が確認された. この鼻腔枝を蝶口蓋孔へと入る直前で切断することにより後鼻神経切断モデルラットを作成した(図 1f,1g). この焼灼切断はできる限り翼口蓋神経節よりはなれた末梢側でおこない, 翼口蓋神経節への影響が少ないように焼灼力はできる限り小さい値でおこなった. コントロールとして, 皮膚切開のみを行ったシャム手術の群と, 鼻毛様体枝切断のみを行った群を作成した. また後述の鼻粘膜の定量 PCR 用の群もそれぞれ作成した.

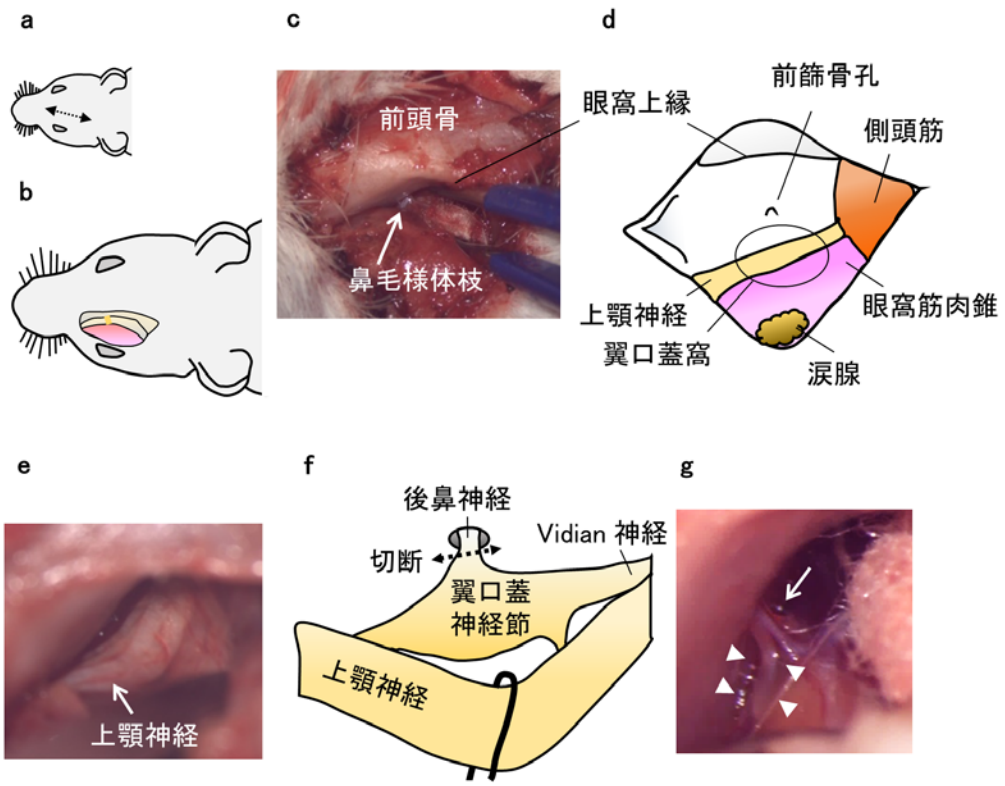

図1. ラット後鼻神経切断術の方法 (a–g)

眼窩上縁を切開し(a,b), 経眼窩的に翼口蓋神経節へアプローチした. 三叉神経鼻毛様体枝を浅部で同定し切離後(c,d), 深部で上顎神経を同定し外側へよけた(e,f). さらに深部で翼口蓋神経節および後鼻神経を同定し, 後鼻神経を切断した(f,g).

3-3. 組織の標本の作製

後鼻神経切断から 2 週間後の鼻腔組織を摘出した. 組織学的解析用の鼻腔組織は, 1:2 の比率で混合したキシラジンとケタミンによる深麻酔下に, 4%のパラホルムアルデヒドによる灌流固定の上, 断頭をし, 鼻腔組織を採取した. 後鼻孔より鼻腔局所にも同固定液を還流した. 下顎をはずし, 頭皮を剥離した後に, 摘出した鼻組織をふくむ頭蓋をパラホルムアルデヒドにて 2 日間固定後, 10%のエチレジンアミンン四酢酸(EDTA)にて 4 週間の脱灰を行った. 脱灰後, パラフィンおよび凍結切片用の OTC 溶剤(Tissue-Tek OTC Compound;Sakura Finetek, Torrance, CA, USA)へ包埋し, 冠状断で鼻粘膜呼吸上皮の切片を作製した. この際にパラフィン標本用としては 4μm, 凍結標本用としては 15μm の厚みで切片の作成を行い, MAS コーティングされたスライド(Matsunami Glass, Osaka, Japan)へ載せて切片を用意した.

パラフィン標本は脱パラフィン, 水和後, S1700 溶液(Target Retrieval Solution; Dako, Tokyo, Japan)へ浸透し, 121 度, 20 分の条件でオートクレーブを用いて抗原賦活化をおこなった. また凍結標本は洗浄し水和した. これらの標本は, ブロッキング液(Protein Block, Serum-Free; Dako)をもちいて非特異的染色の抑制のために常温にて 1 時間のブロッキングをおこなった. 酵素抗体法を用いた染色の際にはさらに 3%の過酸化水に 10 分間浸透し, 内因性ペルオキシダーゼの除去を行った.

定量 PCR 用の検体として, 後鼻神経切断後 2 週間の動物から, 正常側, 神経切断

側の鼻腔粘膜呼吸上皮よりそれぞれより新鮮粘膜の採取も行った.

3-4. 免疫組織化学染色

標本は表 1 の一次抗体を用いて染色をおこなった.

表 1. 免疫組織化学に用いた一次抗体の一覧

名称	役割	宿主	濃度	品番	会社
パラフィン標本					
Protein Gene Product 9.5 (PGP 9.5)	神経線維マーカー	Rabbit	1:1000	Z5116	Dako
anti-choline acetyltransferase (ChAT)	アセチルコリントランスフェラーゼ	Goat	1:100	AB144p	Millipore
Major Basic Protein (MBP)	好酸球マーカー	Mouse	1:50	CBL419	Millipore
Mast cell tryptase (MCT)	肥満細胞マーカー	Mouse	1:1000	ab2378	Abcam
凍結標本					
Substance P (SP)	知覚神経の神経ペプチド	Rabbit	1:1000	ab133240	Abcam
Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)	知覚神経の神経ペプチド	Rabbit	1:4000	C8198	Sigma-Aldrich
Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)	副交感神経の神経ペプチド	Rabbit	1:1000	BP882	Acris
Neuropeptide Y (NPY)	交感神経の神経ペプチド	Rabbit	1:4000	ab30914	Abcam
Muscarinic acetylcholine receptor M3	アセチルコリンレセプター	Rabbit	1:500	ab87199	Abcam

Major Basic Protein (MBP)の染色の際には 0.5 mg/ml proteinase (type XXIV; Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) を用いて室温で3分間反応させた. MBP と Mast cell tryptase

(MCT)陽性細胞数は，鼻粘膜の呼吸上皮粘膜の 3 か所で強拡大の視野にてカウントした．

蛍光染色法の際には，二次抗体として，それぞれの宿主にあった Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies で 37 度にて1時間反応後，Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を用いて封入した．酵素抗体法の際には，宿主に対応した HRP 付加抗ウサギ/ヤギ IgG 二次抗体（シンプルステイン MAX-PO（Rabbit/Goat），ニチレイ）を添加して，室温で1時間反応させた．さらにジアミノベンジン液（DAB,ニチレイ）で発色させ，脱水・透徹した．組織の観察と撮影には光学顕微鏡(Keyence BZ-9000)を用いた．

3-5. 後鼻神経切断後の組織および形態学的変化の検討

組織学的検討は Shimizu らの報告に従い [24]，硬口蓋の切歯乳頭の位置における鼻粘膜呼吸上皮領域の鼻中隔の粘膜および側壁における腺で行った．粘膜の厚さなど個体間の差を少なくするために主に鼻中隔粘膜にて観察が行われた．一連の検体は Hematoxylin and Eosin 染色（H.E.染色）および，中性ムチンの観察のための Periodic acid-Schiff (PAS)染色，酸性ムチン検出のための Alcian blue (pH = 2.5)染色 ，膠原組織観察のための Elastica van Gieson (EVG)染色が行われた．

後鼻神経切断側（左側）と非切断側（右側）において，以下の免疫染色を行い，神

経切断側と，非切断側の比較検討を行った．免疫染色では，神経線維マーカーとして，Protein Gene Product 9.5（PGP 9.5），知覚神経のマーカーとして，サブスタンスP（SP），カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP），副交感神経のマーカーとして Vasoactive intestinal peptide （VIP），交感神経のマーカーとしてニューロペプタイド Y （NPY）の分布を調べた．腺分泌に関する検討のためにアセチルコリントランスフェラーゼ（ChAT），およびアセチルコリンムスカリン受容体 M3（M3）の免疫染色も行った．

また後鼻神経の支配領域を調べるために，後鼻神経切断後の鼻腔検体を前鼻孔から後鼻孔まで等間隔な 10 の部位に分け，組織の詳細な観察をおこなった．また鼻腔粘液について調べるために，鼻中隔呼吸上皮を強拡大で，基底膜上の Alcian blue 陽性細胞の面積を計測した．これは Image analysis software (Micro Analyzer Ver. 1.1; Nippon Poladigital, Tokyo, Japan)をもちいて行った．

3-6. 神経線維密度の定量

鼻粘膜における神経の密度は，NIS Elements AR Software (Nikon, Melville, NY, USA)をもちいて定量化された．PGP 9.5 陽性を検知する the image RGB threshold が設定され，鼻粘膜呼吸上皮の単位面積当たりの神経線維の占める面積を鼻中隔の異なる 3 か所でカウントし，コントロールの動物に対する神経密度の比を求めた．

3-7. 鼻汁量の検討

後鼻神経切断術が鼻汁分泌に及ぼす影響を定量的に検討した. 片鼻に後鼻神経切断術を行ったラットをもちいて, 左右の鼻汁量を計測した. 先行研究を参考にし, 後鼻神経切断後, 2週間のラットに対して, 全身麻酔後, 気管内挿管をし, 1mm×15mm 大に作成した濾紙(吸水用濾紙 No.26-WA, ADVENTEC)を両側の鼻腔内に 10 分間留置し, 重量の変化を計測した(filter paper technique)[25].

3-8. コリン作動薬の鼻汁に及ぼす影響の検討

鼻汁変化のメカニズムを調べるためにコリン作動薬およびアセチルコリン分解阻害剤を投与し, 鼻汁量の変化を測定した. 後鼻神経切断後 2 週間のラットに対してコリン作動薬のピロカルピン(0.1 mg/kg; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)またはアセチルコリン分解阻害剤のネオスチグミン(0.1 mg/kg; Wako Pure Chemical Industries)を腹腔内投与し, 上記の filter paper technique を用いて鼻汁量を計測した.

3-9. 後鼻神経切断後鼻粘膜における遺伝子発現の網羅的検討

後鼻神経切断術後の鼻粘膜の変化の病態をさらに調べるために, マイクロアレイにより後鼻神経切断後の鼻粘膜呼吸上皮における遺伝子発現の網羅的検討を行った.

後鼻神経切断後 2 週間のラット2匹から後鼻神経切断側の鼻腔呼吸上皮を2検体採取し, the Nucleo Spin RNA kit (Takara Biotechnology, Shiga, Japan)を用いて RNA を抽出した. コントロールとして無処置のラットの鼻粘膜からも同様に鼻粘膜呼吸上皮を2検体採取し, RNA を抽出し, 比較検討を行った. この RNA を the Agilent Sure Print G3 Rat Gene Expression 8x60K v2 Array platform (Agilent, Santa Clara, CA, USA)を用いて DNA マイクロアレイによる網羅的発現解析を行い, 正常鼻粘膜群との比較検討を行った. 遺伝子発現のデータは, GENESPRING's "Percentile Normalization" にて平均化後, DAVID Gene ontology v6.7 (http://david.abcc.ncifcrf.gov/)を用いて解析を行った. さらにこの結果から得られた遺伝子の候補を後述の定量 PCR にて測定した.

3-10. アレルギーモデルに対する後鼻神経切断術の検討

Ovalbumin (OVA)をもちいてアレルギー感作を行い, アレルギー性鼻炎モデルラットを作成した. OVA感作モデルの作成は, OVAの腹腔内および点鼻投与により感作を行った(図2).

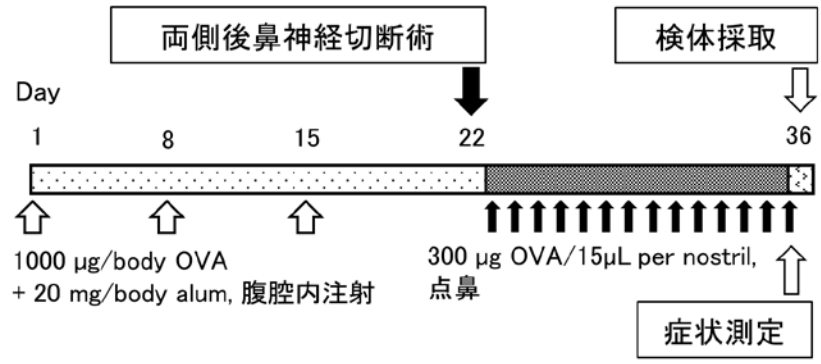

図2. 実験タイムライン

OVA: オボアルブミン.

具体的には, Chicken egg white albumin (ovalbumin (OVA); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1000 μg/body と20-mg/bodyのaluminum hydroxide gel (Imject Alum; Pierce, Rockford, IL, USA)の混合物 1 mlをday 1, 8, and 15の3回腹腔内投与をした. Day 21に両側の後鼻神経切断術を行い, 引き続いて生理食塩水にて希釈したOVA (300 μg OVA/15 μl per nostril)をday 22-35に連日点鼻することによりアレルギーモデルを作成した. コントロール群では, OVAのかわりにPBSを用いた. 最終点鼻のday 36にはアレルギーの表現型をしらべるために, 点鼻後20分間の鼻掻きとくしゃみの計測をおこなった. この計測はビデオに録画して行った. 最終点鼻後24時間のday 37には鼻腔組織および定量PCR用の鼻粘膜を前述の方法で摘出した.

OVA感作単独群と, OVA感作＋後鼻神経切断群, およびコントロール群との比較

検討を行った. 検討項目としては, H.E.染色, PAS染色, Alcian Blue染色等による組織変化に加え, 免疫組織学的ではPGP9.5による神経線維および各種の神経ペプチド, 好酸球(Major Basic Protein), 肥満細胞(Mast Cell Tryptase)の免疫染色を行った. 行動実験としては最終点鼻日のday35にOVA点鼻後20分間のくしゃみ・鼻掻き数をカウントした. 鼻汁量は最終点鼻後に前述の記載のごとくfilter paper techniqueをもちいて測定をした. また鼻粘膜におけるアレルギーに関連する炎症性サイトカインの遺伝子の発現の比較をおこなった.

3-11. 後鼻神経切断術がヒスタミン反応性に及ぼす影響の検討

後鼻神経のアレルギー反応における役割を調べるために, ヒスタミンを用いた検討をおこなった. 最初に後鼻神経切断術がヒスタミン過敏性に及ぼす影響を調べるために, 両側の後鼻神経切断術をおこなったモデル群および非切断のコントロール群に, ヒスタミン二塩酸塩(150 μg/15 μl per nostril; Wako Pure Chemical Industries)またはPBSを点鼻し, 症状(鼻掻き, くしゃみ)の比較を行った. さらに, ヒスタミン受容体の遮断薬である抗ヒスタミン薬Chlorpheniramine maleate (1 mg/kg; Wako Pure Chemical Industries)をヒスタミン点鼻の60分前に腹腔内投与をした群も作成し, その影響を検討した[26]. この検討では以下の4群が作成された(n=4/群). (1) コントロール群 (PBS点鼻, 非切断), (2) ヒスタミン点鼻群 (非切断), (3) 後鼻神経切断＋ヒスタミン点鼻群,

(4) 後鼻神経切断＋ヒスタミン点鼻＋抗ヒスタミン薬投与群. さらにヒスタミンの鼻汁に対する影響および残存する神経経路を調べるために, 鼻汁量の検討も行った. まず後鼻神経切断モデルおよびコントロールにおいてヒスタミン点鼻後の鼻汁量の変化を測定した. また片側の後鼻神経切断術をおこなったモデルに対して片鼻にヒスタミンの点鼻を行い, 対側における鼻汁量を測定し比較検討した.

3-12. 後鼻神経切断が鼻粘膜に及ぼす長期的な影響の検討

後鼻神経切断術が鼻粘膜に及ぼす長期な影響を調べるために, ラット後鼻神経切断術の鼻腔呼吸粘膜組織の長期的な変化について検討した. 片側の後鼻神経切断後, 2 週, 12 週, 24 週, 48 週に鼻腔組織採取をし, 鼻粘膜呼吸上皮の形態, および前述の神経線維マーカーおよび各種の神経ペプチドの免疫染色をおこなった. また鼻汁に対する影響を調べるために後鼻神経切断後 2 週, 48 週における鼻汁量の定量を用いておこなった.

3-13. 定量 PCR

今回の検討では, 鼻粘膜における種々の mRNA が計測された. 鼻中隔の呼吸上皮部分より採取した鼻粘膜より the Nucleo Spin RNA kit を用いて RNA を抽出した. 抽出した RNA は PrimeScript RT Master Mix (Takara Biotechnology)をもちいて cDNA へ

と転写した． 定量 PCR は SYBR Green 法にて SYBR Premix Ex Taq II(Takara Biotechnology) の試薬と ABI prism 7500 Sequence Detector system (Thermo Fisher Scientific K.K,. Kanagawa, Japan)の器械を用いて計測された. 表 2 に定量 PCR で用いたプライマーの配列が示してある. 遺伝子の変化量は the comparative threshold cycle (2−Δ ΔCT) method をもちいて, GAPDH とターゲットの遺伝子との the cycle threshold (Ct)の差を計測した.

表 2. 実験で用いたプライマーの一覧

遺伝子名		配列
mucin 5ac (*Muc5ac*)	Forward	5′ -CTCCGTCTTAGTCAATAACCACC-3
	Reverse	5′ -GGAACTCGTTGGATTTTGGACTG-3′
mucin 5b (*Muc5b*)	Forward	5′ - GGCCTCTGGCAAGAAGATGT-3′
	Reverse	5′ - GTTCTCTGCCCGACACTCAA-3′
interleukin-4 (*Il4*)	Forward	5′ -CAGGGTGCTTCGCAAATTTT-3′
	Reverse	5′ - CTCAGTTCACCGAGAACCCC-3′
interferon gamma (*Ifn-γ*)	Forward	5′ - TCTGGAGGAACTGGCAAAAG-3′
	reverse	5′ - GTGCTGGATCTGTGGGTT;G-3′
interleukin 13 (*Il-13*)	forward	5’ -GCTGAGCAACATCACACAAG-3’
	reverse	5’ -GAGGCCATTCAATATCCTCTG-3’
transforming growth factor, beta 1 (*Tgf-β1*)	forward	5’ - CATTGCTGTCCCGTGCAGA-3’
	reverse	5’ - AGGTAACGCCAGGAATTGTTGCTA-3’
matrix metallopeptidase 9 (*Mmp9*)	forward	5’ -AGCCGGGAACGTATCTGGA-3’
	reverse	5’ -TGGAAACTCACACGCCAGAAG-3’
metallopeptidase inhibitor 1 (*Timp1*)	forward	5’ -CATCTCTGGCCTCTGGCATC-3’
	reverse	5’ -CATAACGCTGGTATAAGGTGGTCTC-3’
brain-derived neurotrophic factor (*Bdnf*)	forward	5’ -CAGCGCGAATGTGGTTAGTGGTTA-3’
	reverse	5’ -CAGTGGACAGCCACTTTGTTTCA-3’
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*)	forward	5′ -CCTCAAGATTGTCAGCAAT-3′
	reverse	5′ -CCATCCACAGTCTTCTGAGT-3′

3-14. 統計学的分析

全ての統計はStatmate IV software (ATMS, Tokyo, Japan)を用いて行われた. 2群間の比較はStudent's t-test, 多群間の比較はパラメトリックに分布しているものはanalysis of variance with post hoc Tukey's testsを用いて比較検討した. ノンパラメトリックに分布しているものはKruskal-Wallis tests with post hoc Dunn's testsを用いて比較検討をした. $P < 0.05$を有意な所見とした.

第 4 章　結果

4-1. 後鼻神経切断後の鼻粘膜呼吸上皮の組織変化

後鼻神経切断後 2 週間の鼻粘膜において，後鼻神経切断側と非切断側の比較検討をおこなった．H.E.染色では，鼻粘膜呼吸上皮に大きな差は認めなかった（図 3a-b’）．免疫染色では以下の差異が観察された．後鼻神経切断側では鼻中隔の呼吸上皮粘膜および側壁の大部分において，PGP9.5 の染色および各種の神経ペプチド（SP,VIP,CGPR,VIP）の染色の著明な発現低下を認めた（図 3c-g’）．また腺分泌に関連する，コリン作動性神経のマーカーとして使用したアセチルコリントランスフェラーゼも切断側においては消失をしている一方で，アセチルコリンムスカリンレセプターM3 の免疫染色は切断側，非切断側において差は認められなかった(図 3h-i’)．　また後鼻神経の分布範囲を調べるために施行した神経線維の鼻腔全体における検討では，最前方の鼻腔入口部および嗅粘膜においては後鼻神経切断側でも PGP9.5 および，各種神経ペプチドの染色を認めた(図 4a-b’)．このことから鼻腔の最前方および，嗅粘膜では後鼻神経切断後も神経線維は保たれていることが確認された．また鼻毛様体枝のみの切断を行った群でも，鼻の形態および神経線維，神経ペプチドの染色において神経切断側，非切断側では明らかな差は認めなかった(図 4c,c’)．これらのことより，後鼻神経切断術により鼻粘膜呼吸上皮の大部分が脱神経し，その神経には知覚神

経，交感神経，副交感神経が含まれていることが示された．

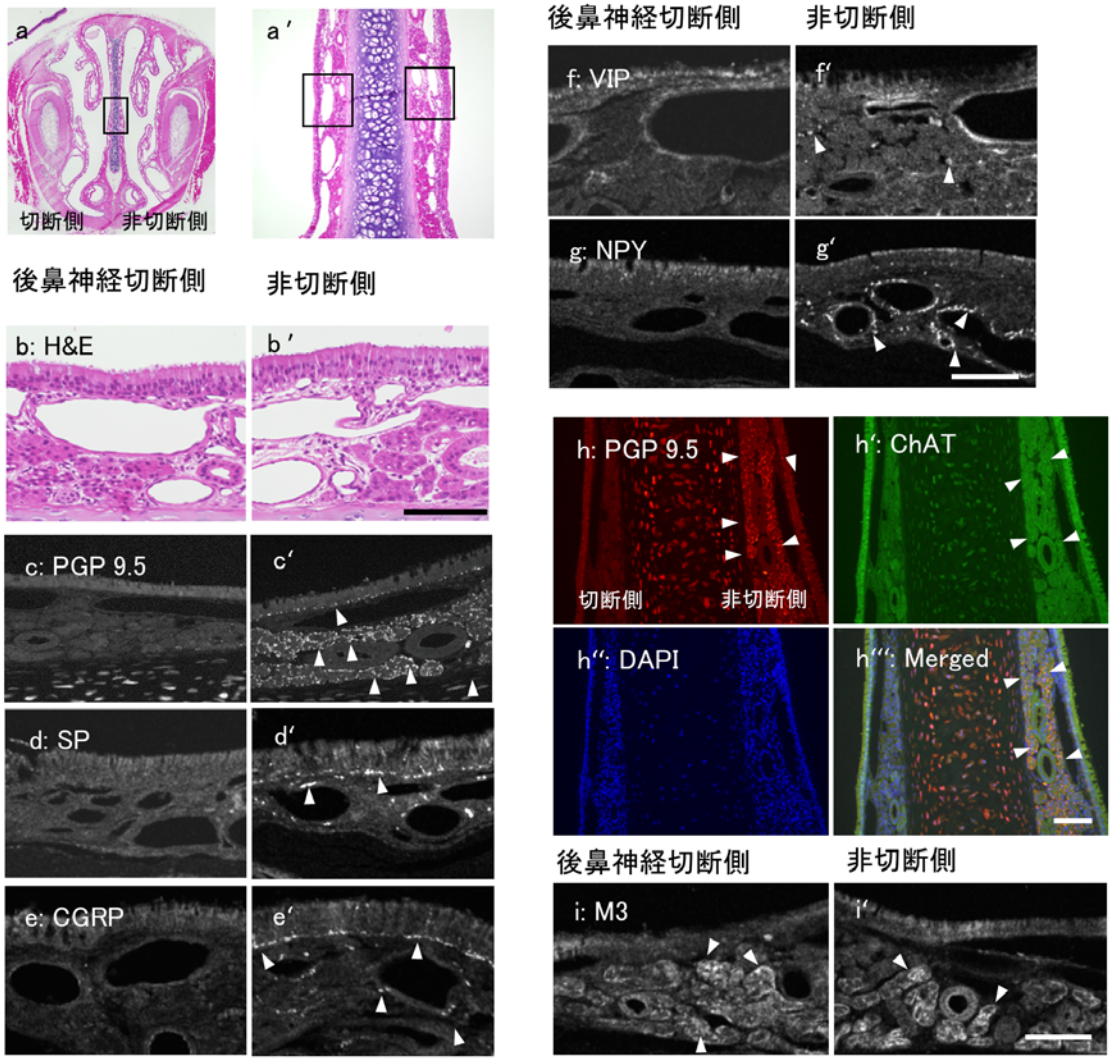

図3．後鼻神経切断後2週間の鼻粘膜所見．
H.E染色では後鼻神経切断側と非切断側の鼻粘膜上皮に大きな差は認められなかった(a-b')． 後鼻神経切断側では神経線維マーカー(c,c')および神経ペプチドの消失をみとめた(d-g')． アセチルコリントランスフェラーゼは消失していたがムスカリン受容体は変化しなかった(h-i'')． a-i'は各染色のそれぞれ代表的な図を示す．(n = 4)．aの四角で囲まれた領域はa'の領域を，a'の四角で囲まれた領域はb-i'の領域を示している．Scale bar: 100 μm． 矢頭: PGP9.5．各種神経ペプチド，ChAT陽性線維およびM3陽性細胞．

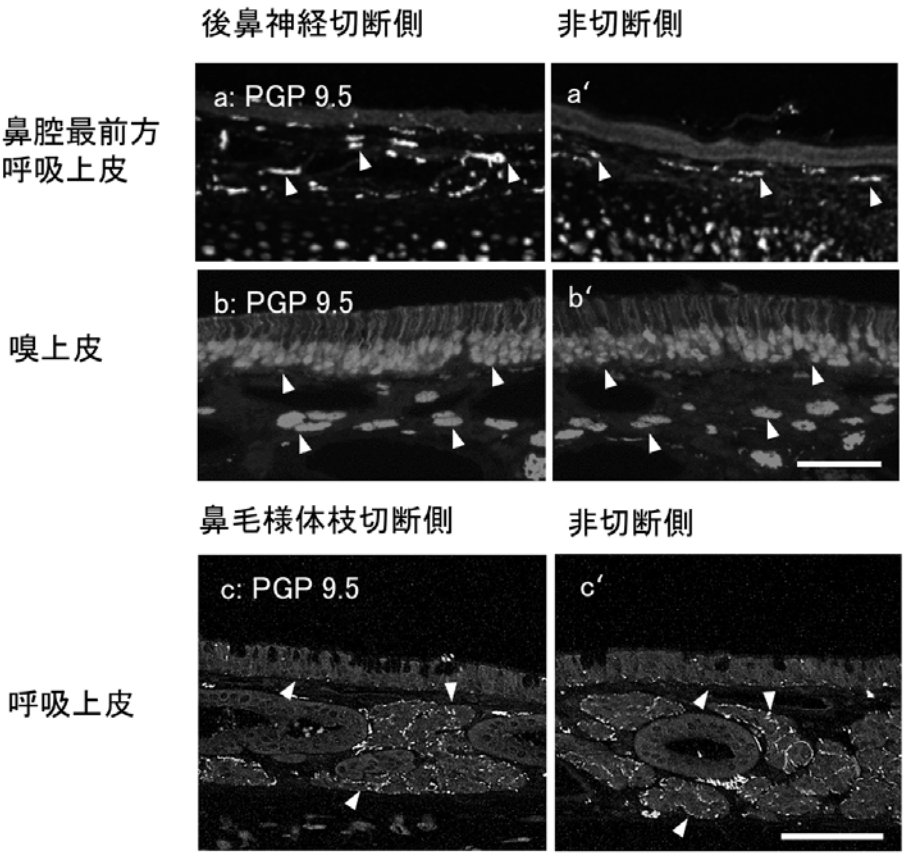

図4. 後鼻神経または三叉神経毛様体枝切断後の鼻粘膜所見.

後鼻神経切断後2週間の粘膜において，後鼻神経切断側でも鼻腔最前方と嗅上皮の神経線維は保たれていた(a-b')． 鼻毛様体枝のみの切断では，鼻腔の粘膜の神経線維マーカーの発現に変化は認められなかった(c-c')． a-c'は各染色のそれぞれ代表的な図を示す．(n = 4). Scale bar: 100 μm． 矢頭:PGP9.5陽性組織.

4-2. 後鼻神経切断後の腺組織の変化

後鼻神経切断術後の鼻中隔粘膜呼吸上皮の杯細胞および鼻腺において，粘液が過剰に貯蔵された部分が見られた．一方で外側壁の腺は切断側において萎縮していた（図 5a-c’）．後鼻神経切断後の鼻中隔粘膜において，中性ムチンの指標である PAS 染色では鼻中隔の粘膜下の腺および上皮の杯細胞において陽性所見をみとめた（図 5d）．酸性ムチンの指標である Alcian blue 染色では鼻中隔粘膜上皮の大部分が Alcian Blue 陽性の杯細胞となっていた．この Alcian blue 陽性上皮細胞が占める割合を定量したところ，後鼻神経切断側においては有意に陽性細胞の占める面積が増加していた(図 5f)．またムチンの性質を調べるために Muc5ac の mRNA を定量したところ，後鼻神経切断側において有意に発現が亢進していることが確認された(図 5g)．Muc5b は後鼻神経切断側と非切断側間での差は認められなかった(図示せず)．これらのことは，後鼻神経切断術により脱神経の起きた鼻粘膜において，ムチンが貯留し，外側では鼻腺の萎縮が起きていること，遺伝子レベルではムチンの産生亢進がおきていることが示された．

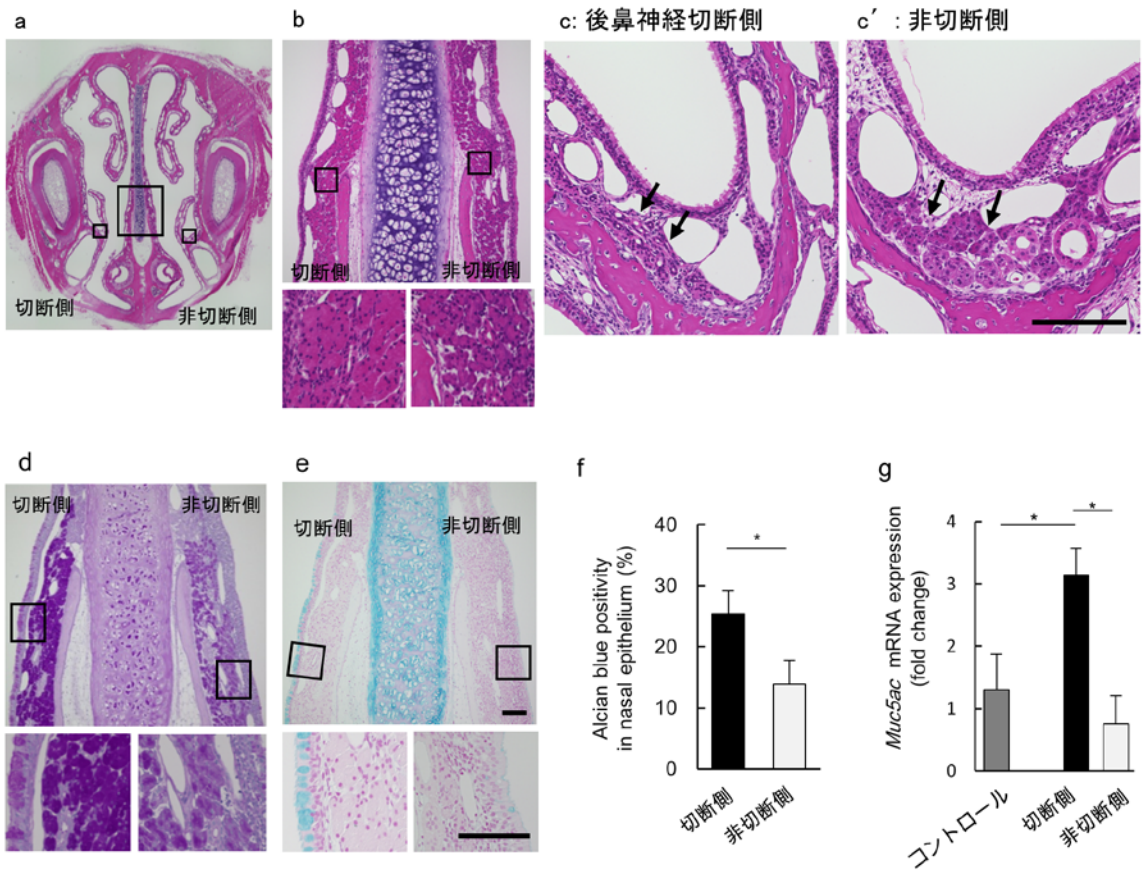

図5. 後鼻神経切断後2週間の鼻腺所見.

後鼻神経切断側の鼻中隔粘膜の呼吸上皮では, H.E.染色にて杯細胞の増生および腺組織の膨満を認める (a, b, d-g). 一方で, 後鼻神経切断側の外側壁の鼻腺は萎縮していた (c,c'矢印). a-eは各染色のそれぞれ代表的な図を示す. aの四角で囲まれたエリアはb,d,eにおける上の図のエリアを示している. b,d,eにおける四角で囲まれたエリアの拡大図は下の図に示している. 後鼻神経切断側において, PAS染色では粘膜下の鼻腺の膨満所見を認め(d), アルシアンブルー染色では上皮における杯細胞の過形成をみとめた(e). Scale bar: 100 μm. この部分を定量化すると後鼻神経切断側と非切断側の間に有意差をみとめた (f). $*P<0.05$ (unpaired two-tailed Student t-test). データは平均値±標準誤差を示している. (n = 4). Muc5acの遺伝子定量においても後鼻神経切断側と非切断側の間に有意差をみとめた (g). $*P<0.05$ (Dunn's test). データは平均値±標準誤差を示す. (n = 4). 各実験はduplicateで行われた.

4-3. 後鼻神経切断後が鼻汁量に及ぼす影響

後鼻神経切断後 2 週間のラットにおいて，切断側では鼻入口部に痂皮の付着をみとめた（図 6a）．この痂皮は切断後，数日より，数ヶ月まで認められた．このことから鼻汁量の減少が示唆されたため，filter paper technique を用いて実際の鼻汁量を測定したところ，後鼻神経切断側では鼻汁量が有意に減少していた（図 6b）．

ムスカリン受容体 M3 は，上気道における分泌を促す役割をしている [27]．前述の免疫染色では，後鼻神経切断術によりこのムスカリン受容体の発現に差は認められなかった（図 3i, i'）．一方で後鼻神経切断側では鼻汁量の減少をみとめた（図 6b）．この鼻汁量減少の機序を調べるために，コリン作動薬を用いて鼻汁分泌を検討した．コリン作動薬であるピロカルピン投与し鼻汁量を測定したところ，後鼻切断側と非切断側でともに鼻汁量は増加し，その差は認められなかった（図 6c）．一方で，コリンエステラーゼ阻害薬であるネオスチグミンを投与し鼻汁量を測定したところ，後鼻神経切断側では非切断側に比べ，ピロカルピン投与後の増加量が少なかった(図 6d)．ムスカリン受容体およびアセチルコリントランスフェラーゼの免疫染色所見と合わせて，後鼻神経切断術に伴う鼻汁量の減少は，神経切断側におけるムスカリン受容体の発現と機能の異常によるものではなく，アセチルコリンの合成不全によることが示唆された．

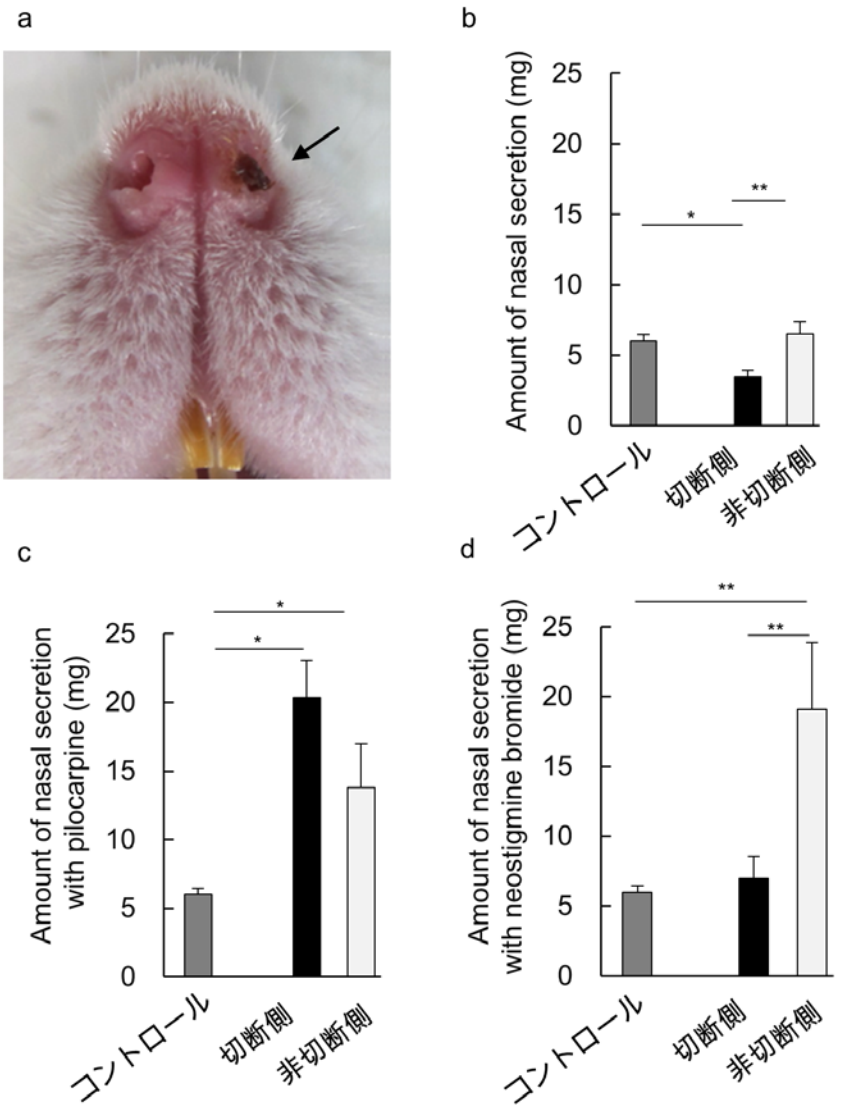

図6. 後鼻神経切断後2週間の鼻入口部所見および鼻汁量の変化. 切断側では鼻入口部に痂皮の付着をみとめた(a 矢印). 鼻汁量は後鼻神経切断側で減少していた(b). ピロカルピン投与では切断側, 非切断側ともにの鼻汁量の増加を認めた一方で(c), ネオスチグミン投与では非切断側のみの鼻汁量の増加をみとめた(d).
$*P<0.05$, $**P<0.01$ (Turkey's test). データは平均値±標準誤差を示す. (n = 4). 各実験はduplicateで行われた.

4-4. 後鼻神経切断粘膜におけるマイクロアレイ解析

後鼻神経切断術後の組織変化の病態を調べるためにマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行った. 後鼻神経切断後 2 週間の鼻粘膜呼吸上皮におけるマイクロアレイの解析では, 0.16%の遺伝子の発現が亢進しており, 0.15%の遺伝子の発現が低下していた. 具体的には発現変動量の大きい遺伝子として, *Bdnf, Sst, Igll1, Anxa10, Vom2r70* の発現亢進および *Nefm, Ambn, Pmp2, Mbp* の発現低下が著明であった. これらの遺伝子変化に対して Gene Ontology 解析を行ったところ, 後鼻神経切断群で transmission of nerve impulse や axon target recognition など, 神経の伝達や分化に関する遺伝子群が有意に変動していた. 表 3 には代表的な GO 解析の結果を示している. GO 解析では主だった変化として, 鼻粘膜の支配神経切断後粘膜における神経の変性や再生という変化を示唆していた. その他では炎症に関する変化(defense response)などが認められた. 各 GO term に含まれる遺伝子に関して詳細に検討を行ったところ, Bdnf など神経再生に関わる遺伝子の発現亢進をみとめた(表 4). 当初の予想していた結果と異なり, アレルギー性鼻炎に関わる免疫系に関する変化や, 後述の組織のリモデリングに関する変化は今回行った解析では認めなかった.

表 3

The top 10 GO functional terms of differentially expressed genes in PNN-treated mucosa

GO: gene ontology, *BP*: biological process, *FDR*: false discovery rate

Category		Term	*P* value	FDR (Benjamini)
BP	GO:0019226	transmission of nerve impulse	1.20E-03	5.1E-01
BP	GO:0042391	regulation of membrane potential	3.9E-03	7.0E-01
BP	GO:0006952	defense response	6.4E-03	7.3E-01
BP	GO:0007610	behavior	8.5E-03	7.3E-01
BP	GO:0007412	axon target recognition	1.3E-02	7.9E-01
BP	GO:0007268	synaptic transmission	1.5E-02	7.5E-02
BP	GO:0051960	regulation of nervous system development	1.5E-02	7.4E-02
BP	GO:006955	immune response	3.0E-02	9.0E-02
BP	GO:0050804	modulation of synaptic transmission	3.2E-02	8.9E-02
BP	GO:0045664	regulation of neuron differentiation	3.3E-02	8.6E-02

表 4

Representative differentially expressed gene products categorized according to GO terms

General category	Biological process	Gene	Symbol	Fold increase
Nerve	Transmission of nerve impulse	brain derived neurotrophic factor	*Bdnf*	5.7
		myelin basic protein	*Mbp*	0.14
		prodynorphin	*Pdyn*	0.24
		sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha	*Scn9a*	0.23
		synaptosomal-associated protein 25	*Snap25*	0.34
		synaptotagmin X	*Syt10*	2.43
		synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)	*Snca*	2.29
Inflammation	Defense response	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	*Cxcl3*	1.6
		proteoglycan 2, bone marrow	*Prg2*	0.38
		sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha	*Scn9a*	0.23
Others		interleukin 36	*Il36g*	3.3
		somatostatin	*Sst*	7.3
		vomeronasal 2 receptor	*Vom2r70*	8.7

4-5. 後鼻神経切断後の粘膜の定量 PCR による検討

定量 PCR を行い，マイクロアレイの結果の詳細検討をした．特に，マイクロアレイにて変化の大きかった *Bdnf* および，リモデリングに関連する遺伝子に注目し検討を行った．後鼻神経切断後 2 週間の神経切断側では *Muc5ac*, *Il-13*,および *Bdnf* は亢進していた．一方で，リモデリングの関連する遺伝子である *Tgfβ1*, *Mmp9* および *Timp1* の遺伝子発現は変化しなかった（図 7）．

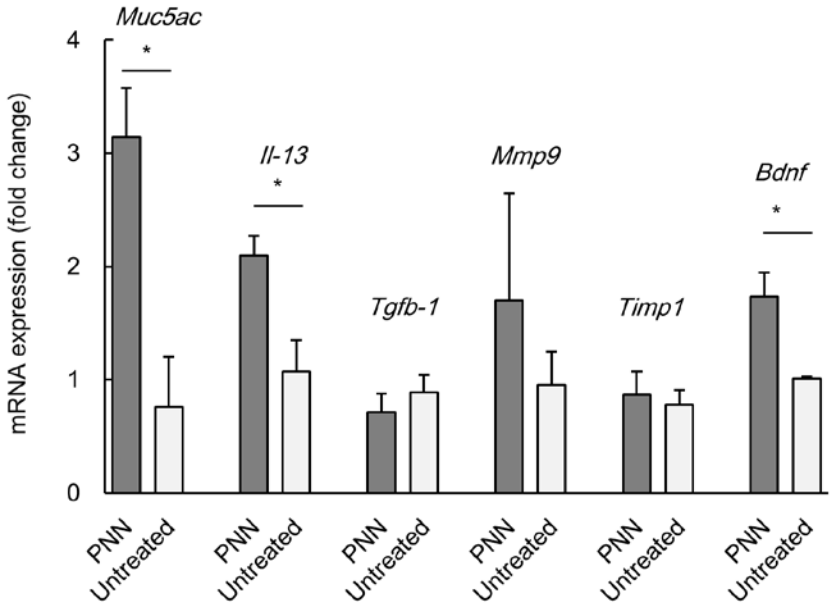

図7. 後鼻神経切断後のmRNA発現の検討
後鼻神経切断後2週の鼻粘膜における遺伝子発現の検討では，*Muc5ac*, *Il-13*, *Bdnf*の遺伝子発現は，後鼻神経切断側と非切断側の間で有意差をみとめた．
PNN:後鼻神経切断側，Untreated:非切断側．データは平均値±標準誤差を示す．
(n = 4). $*P<0.05$ (unpaired 2-tailed Student's t-test).

4-6. 後鼻神経切断術がアレルギー性鼻炎モデルの鼻粘膜組織に及ぼす影響

後鼻神経切断術が鼻粘膜におけるアレルギー反応を抑制するという仮説を検討するために，OVA を用いてアレルギー性鼻炎のモデル動物を作成し，この動物に両側の後鼻神経切断術を行いその効果を検討した.

OVA で感作をしたアレルギー性鼻炎モデルラット（OVA 感作単独群）において，鼻粘膜呼吸上皮の肥厚性変化を認めた（図 8a,8a'）. この肥厚した鼻粘膜には好酸球（図 8b,8b'）および肥満細胞（図 8c,8c'）の粘膜への浸潤が認められ，同時に鼻掻きくしゃみの行動実験によるアレルギー症状の亢進をみとめた(図 9b,9c). これらの所見より，OVA によるアレルギー感作がされていることが確認された.

このアレルギーモデルに対する後鼻神経切断術の効果を検討したところ，感作によって引き起こされた鼻粘膜肥厚所見は，後鼻神経切断術を行っても（OVA 感作＋後鼻神経切断群）でも同様に認められた(図 8a"). 免疫組織学的検討においては OVA 感作単独群では神経線維マーカーおよび神経ペプチドの過発現が認められていた一方で，OVA 感作＋後鼻神経切断術群では，これらの神経線維マーカーおよび神経ペプチドは消失していた(図 8d-d",8e). また OVA 感作単独群みられた好酸球，肥満細胞の上皮および粘膜下層へ浸潤は， OVA 感作＋後鼻神経切断群でも同様に認められた(図 8b", 8c", 8f, 8g). これらのことは粘膜の肥厚や好酸球および好中球の浸潤といった組織のアレルギー反応は，脱神経され神経ペプチドが消失した粘膜においても起こりうることを示唆していた.

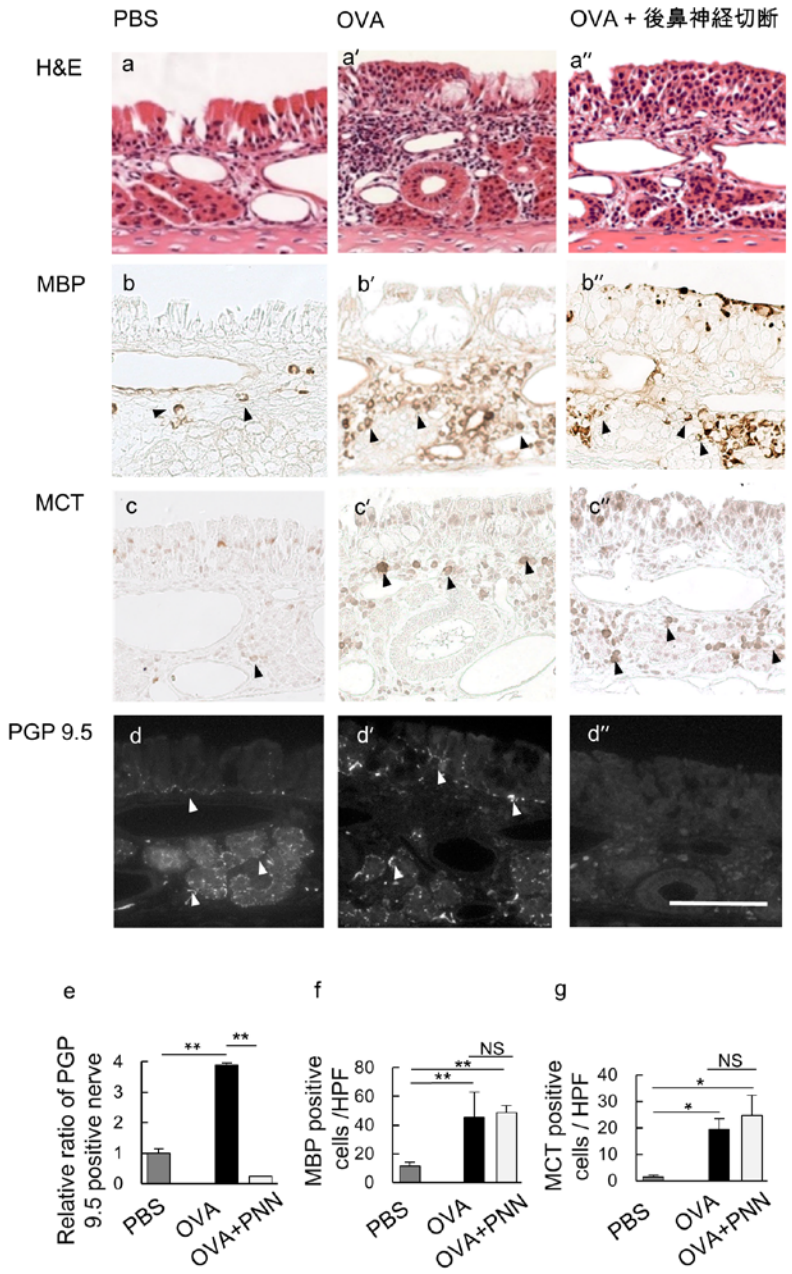

図8. アレルギー性鼻炎モデルにおける後鼻神経切断術が組織に及ぼす影響.

コントロール群と比較し，アレルギー感作群では，鼻粘膜の肥厚および粘膜下への好酸球および肥満細胞の浸潤，神経線維の過剰発現をみとめた(a–d’，e–g). アレルギー感作＋後鼻神経切断群では神経線維は消失していた（d’’）. a–d’’は各染色のそれぞれ代表的な図を示す. 神経線維は後鼻神経切断により減少した(e). $^{**}P$ <0.01 (Turkey’s test). OVA感作により引き起こされた粘膜の肥厚，好酸球・肥満細胞の浸潤所見は，後鼻神経切断術をおこなった群でも同様に認められた（a’’-c’’）. MBPおよびMCT陽性細胞数の比較では後鼻神経切断の有無での有意差は認めなかった(b’’,c’’,f,g). $^{*}P$ <0.05, $^{**}P$ <0.01 (Dunn’s test). データは平均値±標準誤差を示す. (n = 4). 各実験はduplicateで行われた. OVA:オボアルブミン, PNN:後鼻神経切断術. MBP: major basic protein, MCT: mast cell tryptase. HPF: high-power field. NS: not significant. Scale bar: 100μm. 矢頭: MBP及びMCT陽性細胞，PGP9.5陽性線維.

4-7.　後鼻神経切断術がアレルギー性鼻炎モデルの症状および遺伝子発現に及ぼす影響

後鼻神経切断術がアレルギー症状およびサイトカインの発現に及ぼす影響を検討した. 鼻汁量は OVA 感作群では無感作のコントロール群と比較し増加したが, OVA 感作＋後鼻神経切断群では OVA 感作単独群に比較し有意に減少していた(図 9a). 一方で鼻掻き, くしゃみの行動実験においては, OVA 感作単独群と OVA 感作＋後鼻神経切断群では, 無感作群と比較し, くゃみ・鼻掻き症状が増加していた. OVA 感作単独群と OVA 感作＋後鼻神経切断群間には有意な差をみとめなかった(図 9b,c). 鼻粘膜の定量 PCR では, OVA 感作単独群では IL-4 の発現亢進及び IFN-γの発現低下をみとめたが, これは OVA 感作＋後鼻神経切断群でも同様の所見であった(図 9d,9e). これらの結果から, 後鼻神経切断術はアレルギー性鼻炎モデルに対して, 鼻汁量の抑制には効果があるが, 過敏症（鼻掻き, くしゃみ）, および粘膜におけるサイトカインの発現には影響が少ないことが示された.

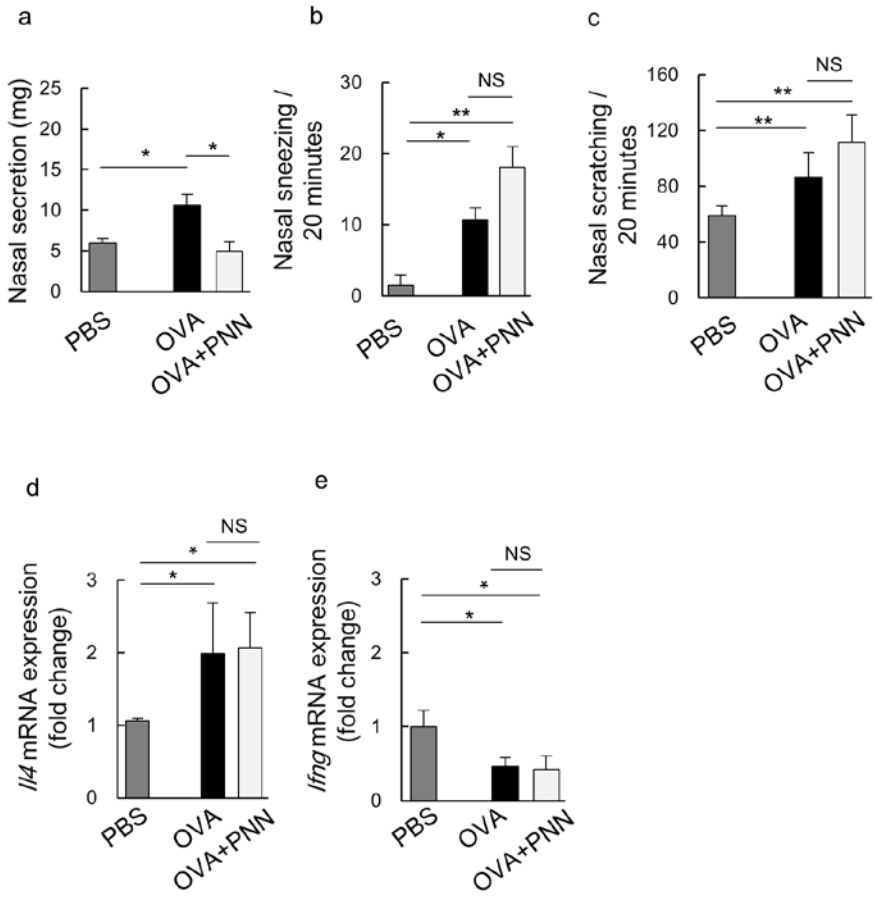

図9. アレルギー性鼻炎モデルにおいて後鼻神経切断術が鼻症状および遺伝子発現に及ぼす影響.

OVA感作により鼻汁量は増加したが, 後鼻神経切断により減少した(a). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (Dunn's test). OVA感作により鼻掻きくしゃみなどの症状は亢進したが, 後鼻神経切断術をおこなった群でも同様に亢進所見が認められた(b, c). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (Turkey's test). 各種サイトカインもアレルギー感作により変化したが, 後鼻神経切断術を行うことによる影響はみとめなかった. データは平均値±標準誤差を示す. (n = 4). 各実験はduplicateで行われた. $*P < 0.05$ (Dunn's test). OVA:オボアルブミン, NS: not significant. PNN:後鼻神経切断術.

4-8. 後鼻神経切断術がヒスタミン反応性に及ぼす影響

後鼻神経切断後の病態を調べるためにヒスタミンを用いて更なる検討を行った. 後鼻神経切断術が, ヒスタミンの反応性に及ぼす影響及びそれに続く神経反射に与える影響について検討をした. ヒスタミンの点鼻による鼻掻き・くしゃみの検討では, ヒスタミンの点鼻をおこなうと, コントロール群および後鼻神経切断群で供に鼻掻き・くしゃみの増強が認められた(図 10a,10b). ヒスタミン点鼻前に抗ヒスタミン薬を投与した群では, これらの過敏症状はコントロール群, 後鼻神経切断群ともに抑制された. さらにヒスタミンが鼻汁分泌に及ぼす影響について検討をした. ヒスタミン点鼻により鼻汁量の増加がみられ, これはコントロール群, 後鼻神経切断群で共にみられた. 片側の後鼻神経切断術をおこなった動物においてヒスタミン点鼻側の対側の鼻汁量を測定した実験では, 後鼻神経切断側に点鼻した場合でも, 非切断側に点鼻をした場合でも共に対側の鼻汁量の増加が認められた. これらの所見は, 後鼻神経切断後もヒスタミンに対する反応は残存していること, ヒスタミンを介する神経反射の遠心路, 求心路は残存していることが示唆された.

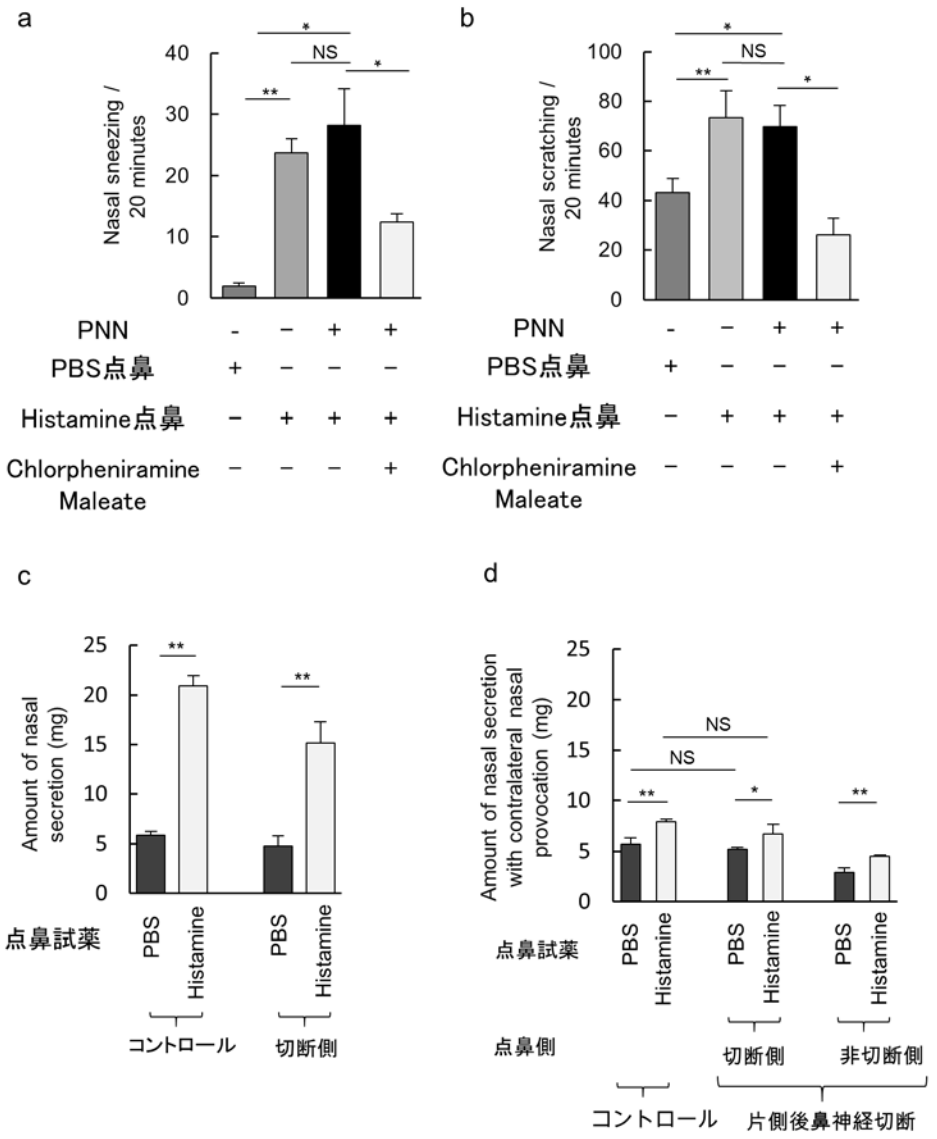

図10. 後鼻神経切断術がヒスタミン反応性に及ぼす影響

後鼻神経切断群においてもヒスタミン点鼻により過敏症状が惹起された. これは抗ヒスタミン薬で抑制された(a). ヒスタミンによる鼻汁量の増加は後鼻神経切断側でもみとめられた(b). 片側の後鼻神経切断術を行ったモデルにおいて, 対側に点鼻をした場合にも鼻汁量の増加は認められた(d). データは平均値±標準誤差を示す. (n = 4). 各実験はduplicateで行われた. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (Turkey's test). NS: not significant. PNN:後鼻神経切断術.

4-9. 後鼻神経切断後の鼻粘膜の長期的変化

後鼻神経切断術に伴う粘膜の脱神経が，鼻粘膜に長期的に与える影響についての検討をおこなった．後鼻神経切断後，2 週間，12 週間の鼻粘膜において，H.E.染色では鼻粘膜呼吸上皮の変化はみられなかった．切断後 24 週および 48 週では，後鼻神経切断側の呼吸上皮で，鼻粘膜の肥厚，特に基底膜肥厚および細胞浸潤をみとめ，鼻粘膜の扁平上皮化生をみとめた(図 11a,11b)．PAS 染色(図 12a)および Alcian blue 染色(図 12b)では正常形態を保った腺組織の減少とともに，上皮下の杯細胞化生，粘液の貯留を認めた．Elastica van Gieson 染色(図 12 c)では膠原組織の増加と基底膜の肥厚所見を認めた．これらの所見を合わせると，後鼻神経切断術後の長期経過では鼻粘膜のリモデリングが起きていることが示唆された．

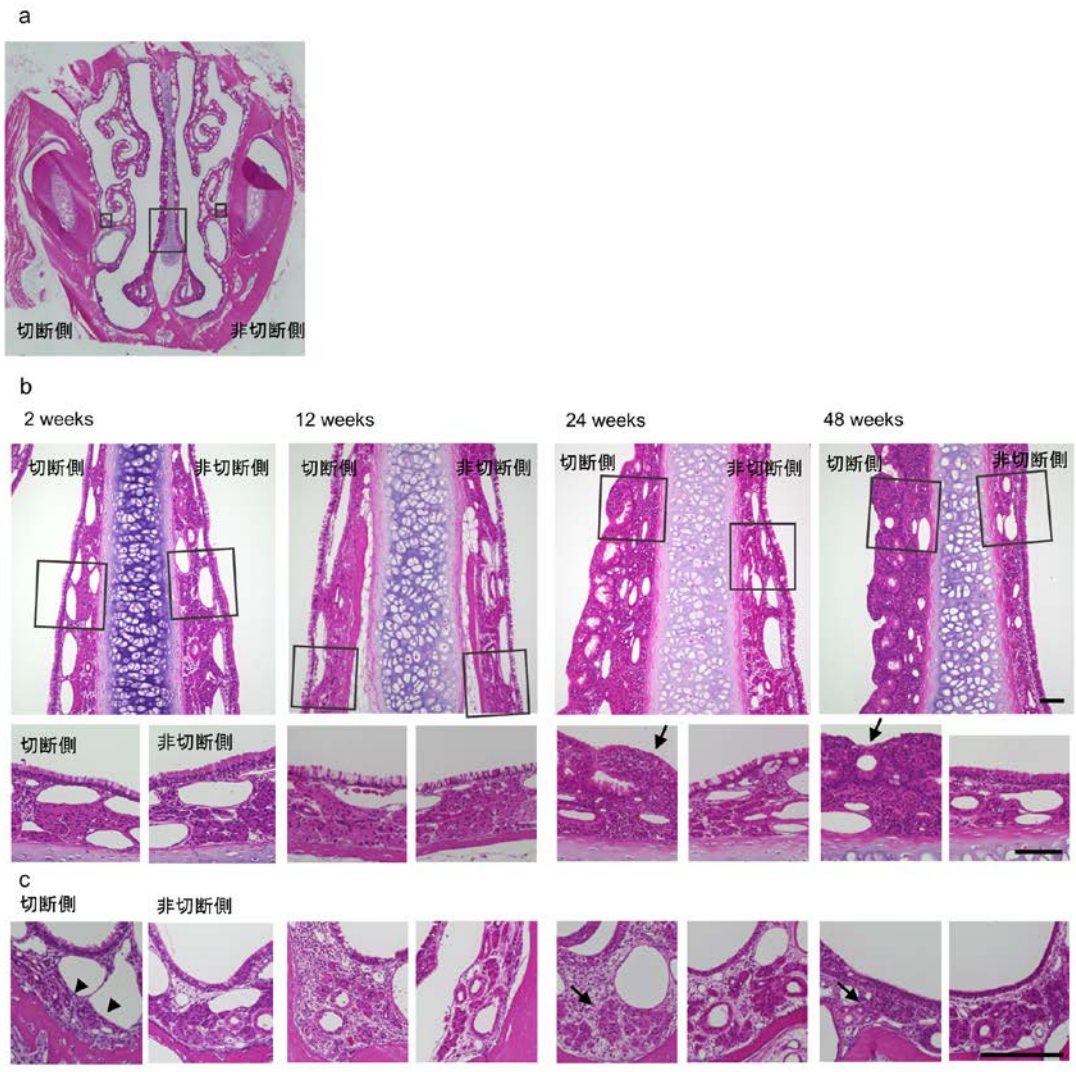

図11. 後鼻神経切断後，長期経過における鼻粘膜の変化

aの四角で囲まれた鼻中隔および外側のエリアの拡大図はbの上図およびc図である．bの上図の四角で囲まれたエリアの拡大図はbの下図となっている．後鼻神経切断側の鼻粘膜は長期経過（神経切断後24週，48週）において基底膜の肥厚および細胞浸潤など，リモデリング様の変化を認めた(b 矢印)．後鼻神経切断後2週間で認められた外側壁の腺の萎縮(c 矢頭)は，長期経過においても同様に萎縮したままであった（c矢印）． a-cは鼻腔全体、鼻呼吸上皮、外側の腺のそれぞれ代表的な図を示す．Scale bar：100μm.

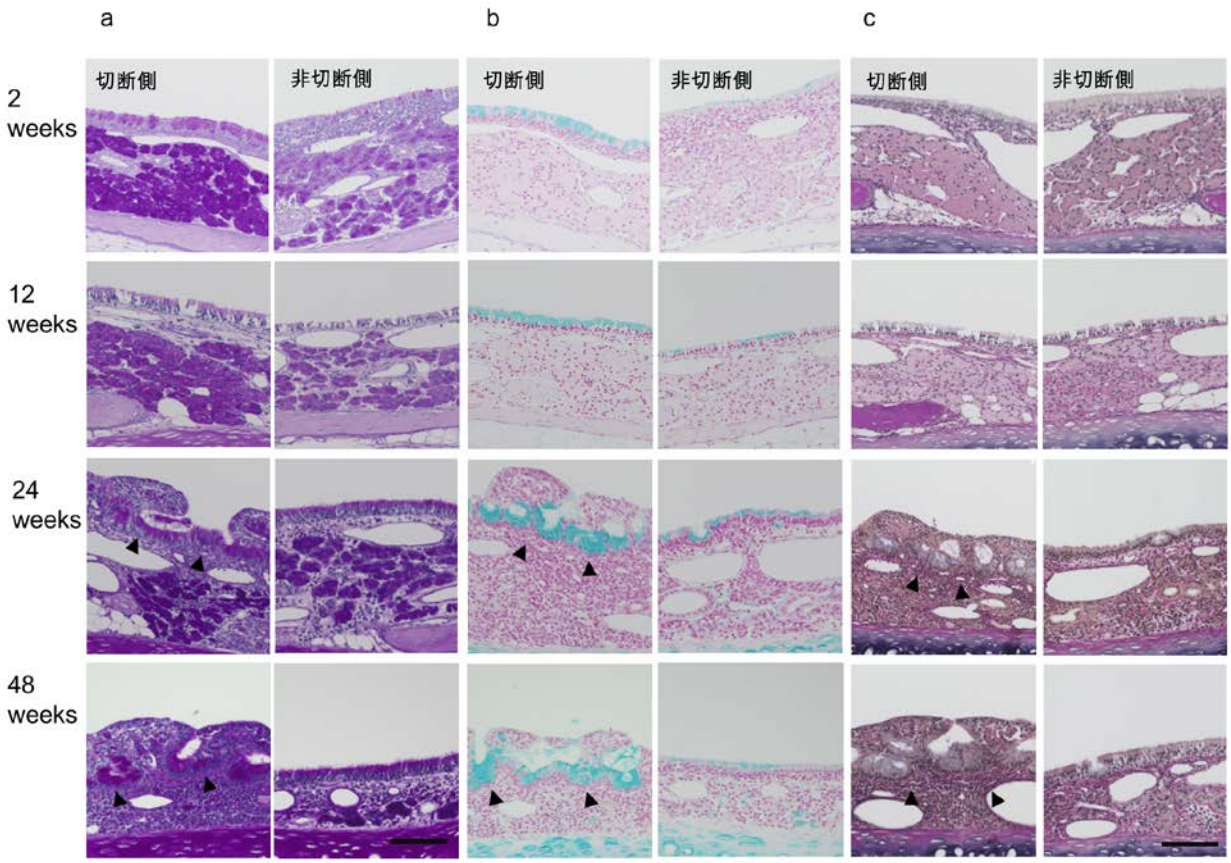

図12. 後鼻神経切断後，長期経過（24週，48週）における鼻粘膜の変化

a:PAS染色，b:Alcian Blue染色，c: Elastica van Gieson染色．後鼻神経切断側においてPAS染色およびAlcian Blue染色では粘液の貯留所見をみとめた(a, b 矢頭)．Elastica van Gieson染色では，粘膜下層を中心に膠原繊維の増生をみとめた(c 矢頭)．a-cは各染色のそれぞれ代表的な図を示す．Scale bar：100 μm.

4-10. 後鼻神経切断後長期経過における神経再生および鼻汁量の変化

ヒトの後鼻神経切断術ではしばしば症状の再燃を認める. しかし後鼻神経切断後の鼻粘膜の経時的な変化は不明な点が多い. そこで, 後鼻神経切断後, 長期間での鼻粘膜呼吸上皮おける神経再生及び鼻汁量の変化を検討した. 神経線維マーカーである PGP 9.5 は, 後鼻神経切断後 12 週より徐々に再発現をみとめ, 経過とともにその数が増えていった. 神経線維を定量すると後鼻神経切断後, 48 週で約 40%程度まで再生してきていることが確認された(図 13a,13b). 神経ペプチドの染色では, 知覚神経マーカーである SP,CGRP,副交感神経線維マーカーである VIP,交感神経のマーカーである NPY の神経マーカーの再発現とともに, 徐々にそれらの神経ペプチド陽性線維の発現が増加していった (図 13c). 神経ペプチドの検討からは, 再生した神経には交感, 副交感, 知覚神経のいずれも含まれていることが示唆された.

後鼻神経切断後 48 週における鼻汁量は, 後鼻神経切断側では非切断側と比較し少ないままであった(図 14b). アセチルコリントランスフェラーゼは後鼻神経後 48 週の鼻粘膜では依然として発現をみとめなかった(図 14a). これらの所見から, 後鼻神経切断後 48 週における鼻汁量減少の原因として, 粘膜における腺形態の変化と共にアセチルコリンの合成不全が遷延していることが示唆された.

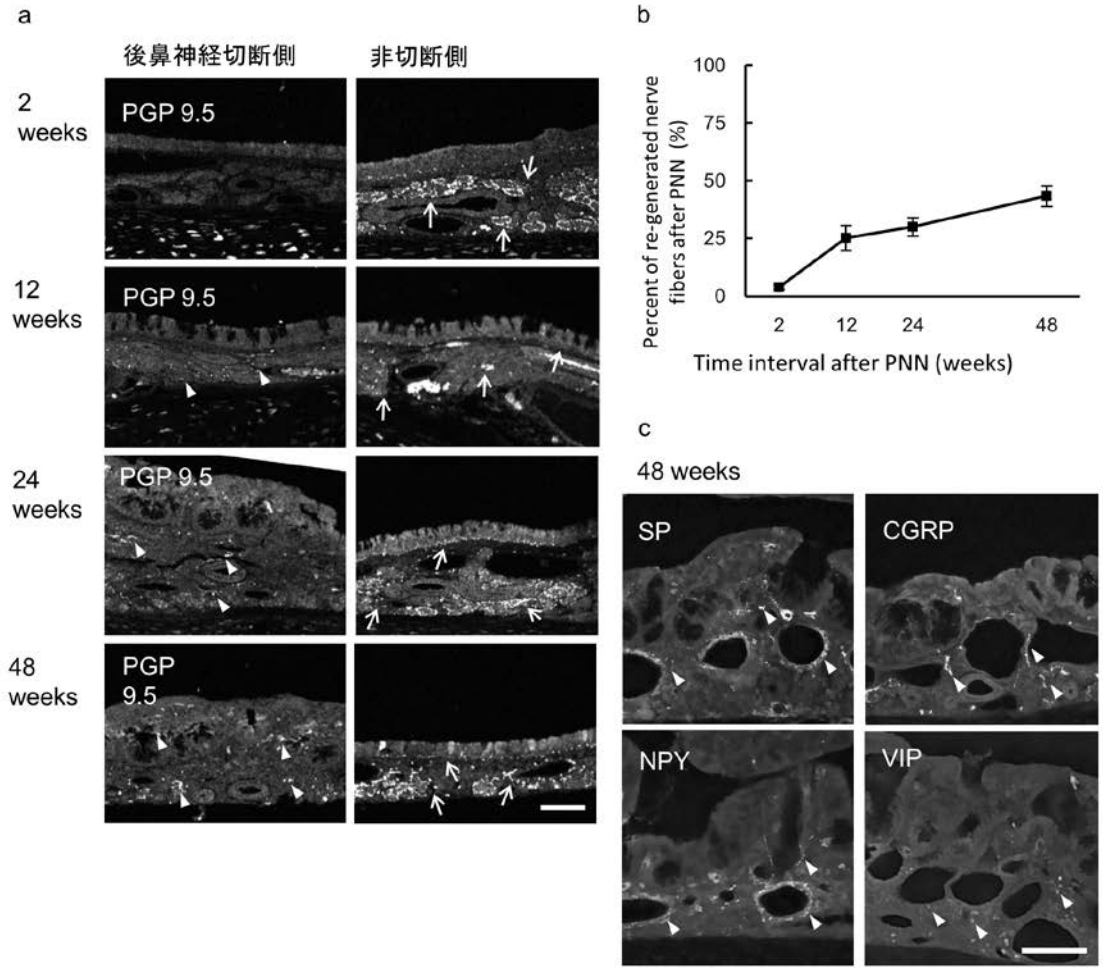

図13. 後鼻神経切断後, 長期経過における神経再生の検討

後鼻神経切断後12週より徐々に神経線維の再発現をみとめた(a, b). データは平均値±標準誤差を示す. (n = 3). 後鼻神経切断後48週の鼻粘膜では各種の神経ペプチドも再度発現していた(c). a, cは鼻粘膜呼吸上皮のそれぞれ代表的な図を示す. PNN:後鼻神経切断術. 矢頭(a):PGP9.5陽性線維. 矢印(a):再生した神経線維. 矢頭(c):各種神経ペプチド陽性線維. Scale bar: 100μm.

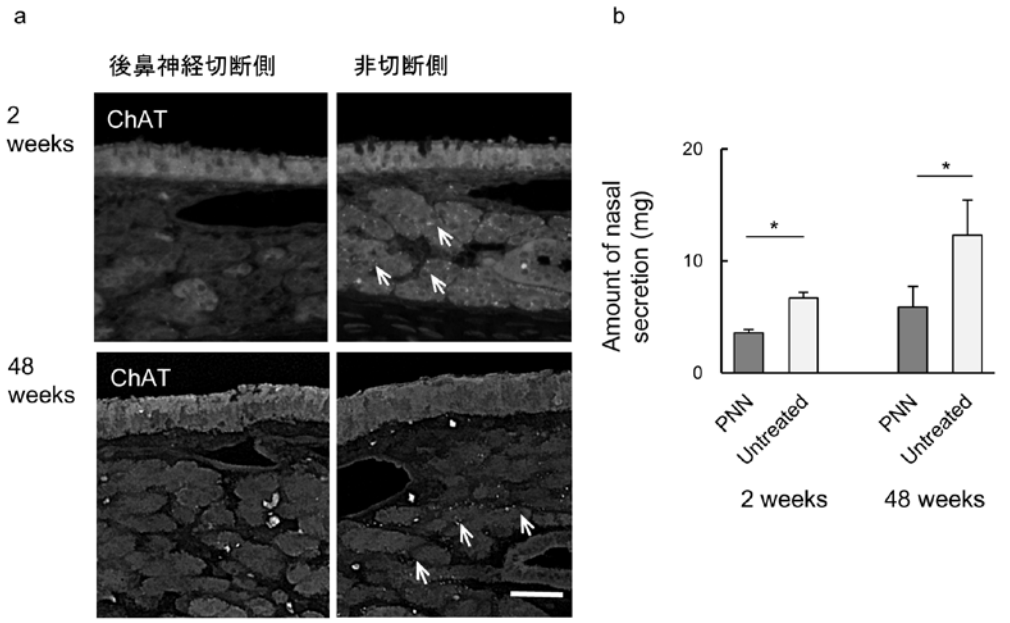

図14. 後鼻神経切断後長期(切断後48週)におけるアセチルコリントランスフェラーゼの発現および鼻汁量の検討

後鼻神経切断後2週で消失したアセチルコリントランスフェラーゼの発現は，神経切断後48週でも同様に消失したままであった(a)． 鼻粘膜呼吸上皮の代表的な図を示す．後鼻神経切断側と非切断側の鼻汁量の比較において，後鼻神経切断後2週で減少した鼻汁量は，後鼻神経切断後48週においても後鼻神経切断側において減少したままであった(b)．データは平均値±標準誤差を示す．(n = 3)．$*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (unpaired 2-tailed Student's t-test)．NS: not significant． 矢印(a):ChAT陽性線維．ChAT:アセチルコリントランスフェラーゼ， PNN:後鼻神経切断側，Untreated:非切断側．Scale bar:100μm．

第 5 章　考察

後鼻神経切断術は，耳鼻咽喉科の通常診療でしばしば行われており，アレルギー性鼻炎の患者に対して一定の効果を得ている．しかし後鼻神経切断術後の鼻腔の病態生理および切断後の鼻腔粘膜の変化，及びなぜ後鼻神経切断がアレルギー性鼻炎に対して効果があるのかに関して，これまでに基礎的な詳細な研究はなされておらず，不明な点が多い．後鼻神経切断術後の鼻炎の病態に関して，これまでに動物を用いた報告はない．ヒトにおける検討も手術後の臨床所見に関するものがほとんどであり，手術前後の鼻腔組織の変化に関しては限定的であった [12–14, 28]．今回の検討では，後鼻神経切断術のモデル動物を作成し，後鼻神経切断後の鼻粘膜の組織変化およびアレルギー性鼻炎の病態に与える影響を明らかにすることで，診療で行われている後鼻神経切断術のエビデンスを構築することを目的とした．

まず，最初にアレルギー感作をされていない通常のラットに後鼻神経切断術をおこない，鼻腔粘膜および鼻症状の変化を観察した．この検討からはラットの後鼻神経は鼻腔呼吸上皮の大部分を支配していること，後鼻神経切断術は鼻粘膜呼吸上皮の脱神経を引き起こし，この神経には交感神経，副交感神経，知覚神経が含まれること，後鼻神経切断術はアセチルコリンの合成不全により鼻汁量を減少させることが明らかになった．

後鼻神経切断により，ラット鼻粘膜呼吸上皮において鼻腔前方を除いた大部分で

神経線維マーカーである PGP9.5 の発現が消失した. また知覚神経, 交感神経, 副交感神経のマーカーとしてもちいた神経ペプチドのサブスタンス P, CGRP, ニューロペプタイド Y, VIP の発現も後鼻神経切断により消失したことから, 後鼻神経切断術により引き起こされた脱神経には知覚神経, 交感神経, 副交感神経が含まれることが明らかになった. 過去の神経トレーサーを用いた実験では, ラットの鼻粘膜呼吸上皮は, 交感神経線維は上頚神経節から, 副交感神経線維は翼口蓋神経節および耳神経節から. 知覚神経線維は三叉神経節から投射されていることが報告されている[29, 30]. また後鼻神経は, 交感神経および副交感神経の節後線維が鼻へとむかう主たる神経であることが報告されており, 今回の検討結果と矛盾しない[31]. ヒトにおいても, その神経の走行から後鼻神経は鼻腔呼吸上皮の大部分を支配しており, ヒトにおける後鼻神経切断術後も同様に鼻粘膜呼吸上皮での脱神経の所見が起きていることが予想された. 一方でヒトの遺体を用いた近年の検討では, 翼口蓋神経節からの自律神経は, 後鼻神経のみならず, 他に accessory posterolateral nerve など複数の神経からなっていることが報告されており[32, 33], 今回のモデル動物との違いは考慮すべきである.

臨床において後鼻神経切断術は鼻汁量を減少させるが, その明確な機序は不明であった. 後鼻神経に含まれる副交感神経の切断に伴う腺分泌の機能不全により, 鼻汁が減少すると考えられているが, 実際にヒトや動物実験でその病態が示されたことはなかった. 今回の検討では, 後鼻神経切断術はアセチルコリンの合成不全により鼻汁

量を減少させることが明らかになった. 後鼻神経切断術後の鼻粘膜では, 神経線維および副交感神経の神経ペプチドである VIP の消失とともに, コリン作動性神経の指標であるアセチルコリントランスフェラーゼの消失をみとめた. また鼻粘膜において腺分泌に対して重要な役割を担っている [27, 34, 35]アセチルコリンレセプターM3 の発現は神経切断による影響は受けなかった. またコリン作動薬の実験では, コリン作動薬投与では後鼻神経切断側で鼻汁量の増加を認めた一方で, コリンエステラーゼ阻害薬投与では後鼻神経切断側で鼻汁の増加量が抑制された. このアセチルコリンレセプターM3 の染色およびコリン作動薬の実験から, 後鼻神経切断後もアセチルコリンのターゲットとなる腺の受容体や機能は保たれていることが示唆された. これらの所見から後鼻神経切断術では, 脱神経した粘膜における腺への直接の影響というよりも, 脱神経によりアセチルコリンの合成不全を引き起こされ, 腺分泌が刺激されずに鼻汁量が減少することが示唆された. (図 15)

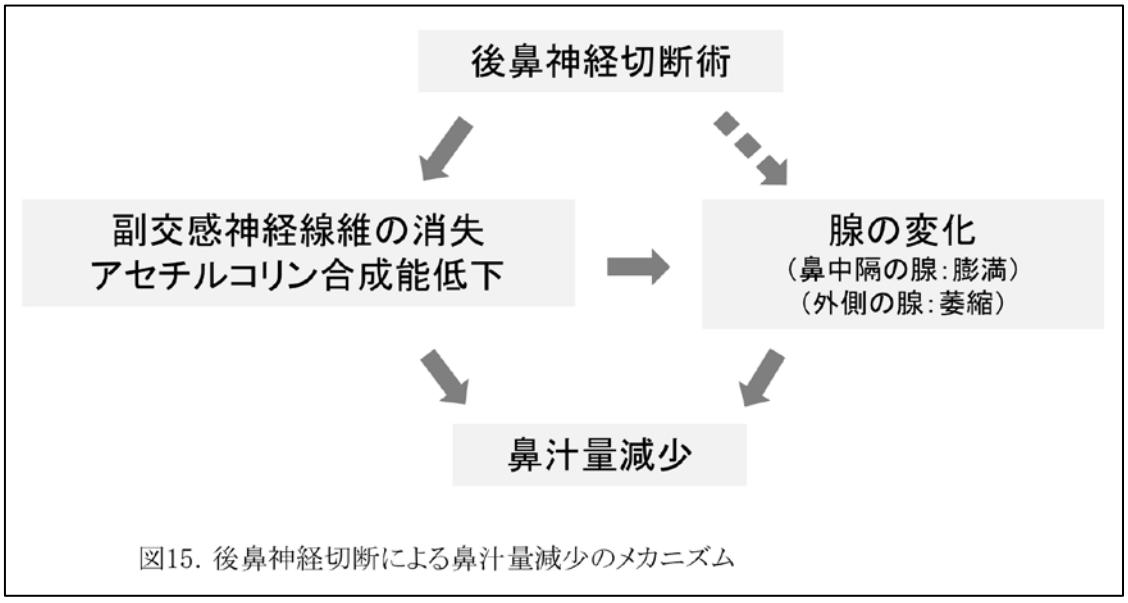

図15. 後鼻神経切断による鼻汁量減少のメカニズム

後鼻神経切断後の粘膜において，鼻中隔では粘膜下の腺の膨満及び杯細胞の貯留所見をみとめた．粘膜下の腺は PAS 染色では陽性で，アルシアンブルー染色では染色されなかったことから中性ムチンの貯留と考えられた．後鼻神経切断側と非切断側の遺伝子発現の検討では，切断側で Muc5ac の発現亢進をみとめたが，Muc5b では有意な差は認なかった．我々はさらに MUC5AC および MUC5B の免疫染色も試みたが，非特異的な染色により，信頼できる結果を得ることはできず，ムチンの構成成分の更なる詳細は不明であった．これらの腺および杯細胞の変化は脱神経が直接ひきおこしているのか，後鼻神経切断後に鼻腔の炎症が惹起され，二次的に杯細胞の過剰な貯留所見や MUC5AC の過剰発現が引き起こされたかは不明である．粘膜下腺組織で見られた特徴的な腺の膨満所見に関しては，ウサギの知覚神経および副交感神経の切断を非選択的におこなった鼻粘膜においても同様の所見が報告されている[36]．この報告では，増大した腺においてチモーゲン顆粒の増加と圧縮された核およびミトコンドリアの変位が報告されており，この原因として鼻粘膜の脱神経がムチンの合成と分泌能の不均衡をもたらしたためと報告している．今回の検討でも，脱神経にともなう鼻汁分泌量の低下を代償するために粘液産生が亢進している可能性も考えられた．一方で，後鼻神経切断後の鼻腔の外側では腺の萎縮所見を認めた．脱神経後の腺組織の萎縮については，ウサギの顎下腺において副交感神経の選択的切断後に腺の萎縮を認めたという報告がある[37]．しかしなぜ神経切断後の組織変化が鼻中隔と

鼻腔の外側の組織で異なるのかは不明である．一つの可能性としては，組織の位置により神経支配が異なること，解剖学的にも鼻中隔は後鼻神経のみならず，複数の起源からの副交感神経支配を受けていることがあげられた．

後鼻神経切断後の病態変化をさらに調べるために，後鼻神経切断後 2 週での鼻粘膜呼吸上皮において，DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の検討をおこなった．この検討では，主に脱神経に関わる変化はみとめたものの，当初予想をしていた免疫系に関連する因子の変動や，長期経過にて認められるリモデリングに関連する遺伝子変化は認めなかった．今回の DNA マイクロアレイおよび定量 PCR の検討では，Il-13，Muc5ac,Bdnf の発現は亢進している一方で，Tgf-β1，Mmp9，Timp1 などの発現には変化がなかった．Il-13 は Muc5ac の発現を亢進し，気道のリモデリングにおいて粘液産生を促進する[38]．一方で Tgfβ-1 は，副鼻腔粘膜の炎症性変化の上流の誘導物質となっており，線維芽細胞の分化を促進することで組織のリモデリング過程において重要な役割を担っている[39, 40]．TGF-β1 のシグナリングパスウェイは，組織の浮腫とリモデリングに関与する metalloproteinases（MMPs）や the tissue inhibitor of metalloproteinases（TIMP)の発現を調整している[40, 41]．しかしこれらの遺伝子はいずれも後鼻神経切断術による影響は見られなかった．組織学的検討では後鼻神経切断後 24 週よりリモデリング変化をみとめていたが，今回の遺伝子発現の検討は切断後 2 週間の検体を用いており，この切断後の期間の違いも影響しているのかもしれない．また

近年の研究では，Bdnf が MMPs のような炎症メディエーターの増殖，遊走，分泌を介して気道のリモデリングを調整することが報告されている [42]．今回の病態においては，脱神経が引き起こされた鼻粘膜では Bdnf が著明に発現亢進しており，鼻腔粘膜の表現型と関連している可能性も示唆された．

後鼻神経切断術は，本邦ではアレルギー性鼻炎に対して多く行われているがその明確な病態は不明であった．今回の検討では，後鼻神経切断術はアレルギー性鼻炎モデルにおいては鼻汁量減少のみに効果があり過敏症状および組織変化等には変化をもたらさないことが明らかになった．後鼻神経切断術の鼻汁に対する効果は多くの論文で報告されているが [43, 44]，過敏症に対する効果に関しては定まった見解がない．後鼻神経切断術は，鼻汁のみならず，過敏症にも効果があるという報告がある一方で [6, 7, 12–14, 45, 46]，過敏症には効果がないという論文もある [15, 16]．我々のヒトにおける後鼻神経切断術の経験および，ヒトの後鼻神経切断後の下鼻甲介において炎症細胞浸潤と関連するサイトカインが抑制された報告 [12]から，本実験前の仮説としては，“後鼻神経切断術はアレルギー性鼻炎症状の鼻汁および過敏症状を軽快する“という仮説を立てた．しかし実際の結果は予想とは異なり，アレルギー性鼻炎モデルでは後鼻神経切断術は鼻汁抑制の効果はあるが，過敏症状およびアレルギー反応に対しては効果がないという結果であった．この鼻汁減少に関しては，前述の非感作の動物における検討と同様にアセチルコリンの合成不全によるためと考えられた．後鼻神経切断に

より鼻粘膜呼吸上皮における神経線維の消失は確認されている．同時に知覚神経の神経ペプチドであるサブスタンスＰやCGRPも消失していたことから，後鼻神経切断により知覚神経線維を含んだ鼻粘膜の神経が消失し，このため鼻粘膜からの求心路の多くは消失しているとていると考えられた．しかし鼻掻きなどの過敏症状は，後鼻神経切断後も変化しなかった．この明らかな原因は不明であるが，残存が確認された鼻腔再前方の口蓋神経などの神経線維を介した反応が原因の一つとして考えられた．また他のアレルギー反応として，組織における粘膜肥厚や好酸球，肥満細胞の浸潤などの反応や，炎症性サイトカインの遺伝子発現における反応も後鼻神経切断後も変化は見られなかった．これらのことからラットにおいて後鼻神経は，鼻汁の分泌には大きな役割をしているが，一連のアレルギー反応においては重要な役割を担っていないと考えられた．さらに後鼻神経の役割を検討するために，三叉神経節を摘出することで後鼻神経のうち知覚神経のみを遮断する方法や，上頚神経節を摘出し交感神経のみを遮断する方法なども試みたが確定的な結果は得られなかった．また鼻腔の支配神経のうち，後鼻神経以外の神経を切断することで，後鼻神経のはたす役割を解明することを検討したが，技術的に後鼻神経以外の神経を切断する方法は難しいと考えられた．

ヒスタミンを用いた検討からは，後鼻神経切断術後のラットにおいて，知覚神経の多くは脱神経しているにも関わらず，ヒスタミン刺激により鼻掻き，くしゃみなどの症状が

出現し，抗ヒスタミン薬で抑制されたことからも，後鼻神経はヒスタミンを介したアレルギー反応において主要な役割を担っていないことが明らかになった．また鼻汁量の検討では，アレルギー性鼻炎モデルに後鼻神経切断術を行うことで抑制されていた鼻汁が，ヒスタミン誘発反応では増加していた．このことの明らかな原因は不明であるが，オボアルブミンと比較し，ヒスタミンの抗原性が強いことなどが考えられた．対側の鼻汁量の測定の検討からは，後鼻神経切断後も対側の鼻汁分泌を促され，前述の後鼻神経以外を介した残存する神経反射の存在が示唆された．

神経と免疫系は密接に関連しており，互いに相互作用を及ぼすと考えられている[19-21]．アレルギー性鼻炎の鼻粘膜におけるアレルギー炎症は，神経の過支配と，増加した神経ペプチドと相関しているという報告されている[47]．ヒトの鼻粘膜ではサブスタンスPの増加が好酸球の浸潤を引き起こすこと[48]，サブスタンスPは，インターロイキン1βの様な炎症性サイトカインのmRNA の発現を亢進させ，アレルギー炎症を引き起こすこと[49]なども報告されている．しかし今回の結果は，“神経の過支配および神経ペプチドの増加はアレルギー炎症を直接的に引き起こす”という仮説を支持しないものであった．アレルギー性鼻炎モデルに対して後鼻神経切断術をおこなった場合も，神経線維および神経ペプチドの消失が認められた．しかし，炎症サイトカインや好酸球・肥満細胞の細胞浸潤は抑制されなかった．この明らかな原因は不明であるが,アジュバントを併用したオボアルブミンの腹腔内投与および点鼻という強力なアレルギー感作方法の

ために，後鼻神経切断が免疫反応に及ぼす影響がマスクされている可能性や，ヒスタミンの抗原性が強いために後鼻神経切断がもたらす効果がマスクされている可能性などが考えられた．神経と免疫の相互作用に関しては不明な点も多く，さらなる検討が必要と思われる．

後鼻神経切断側の鼻腔粘膜の長期の観察では，切断後 24 週より鼻粘膜呼吸上皮は肥厚し，扁平上皮化生，基底膜の肥厚および膠原繊維への置換，杯細胞の過形成等をみとめた．これらの変化は，慢性副鼻腔炎の際に認められるリモデリングの変化と類似していた [50]．これまでに神経切断後の長期における鼻粘膜の組織変化についての報告はなく，粘膜の脱神経とリモデリングについての報告もない．通常，鼻組織のリモデリングは炎症反応の結果としてみられる [51]．今回の検討においてこの鼻粘膜のリモデリング所見が，脱神経により直接的に引き起こされたものなのか，脱神経後の慢性的な炎症により引き起こされたものなのかは不明である．ヒトの経験においても鼻汁が極端に減少をすると，鼻腔内の痂疲付着など鼻粘膜に炎症が引き起こされていることなどから，後鼻神経切断後の鼻汁量減少によって鼻腔のクリアランスが障害され，鼻腔粘膜に慢性的な炎症が引き起こされ，その結果としてリモデリング様の変化をみとめた可能性が考えられた．脱神経した皮膚においては，サブスタンス P や CGRP が枯渇し，白血球の輸送を減少させ，感染のリスクが上がり，傷の回復が障害されることが報告されており [52]，このようなことも今回の変化と関連がある可能性が考えられた．

ヒトの後鼻神経切断後の長期経過の検討では，1-3 年後に症状が再燃すると報告されている [6, 9, 15, 16]．これらの報告は，鼻症状は自覚症状により評価されており具体的な鼻汁量の定量や，組織変化は検討されていない．今回の後鼻神経切断のモデル動物を用いた検討では，後鼻切断後 12 週より鼻粘膜にて再生神経線維がみとめられ，徐々にその密度と範囲が広がり，切断後約 1 年で鼻粘膜に約 40%の神経再生を認めた．神経ペプチドの検討からは，この再生した神経には知覚神経，交感神経，副交感神経が含まれていることが明らかになった．過去にもラットの交感神経と副交感神経節切断後，約 4 か月で鼻粘膜に神経が再生をみとめたという報告がある [31]．この報告では，頚神経節の摘出後にも鼻粘膜に新しい再生神経所見をみとめており，異なる起源からの神経再生も考えられると報告している．今回の我々の検討でも同様の期間での神経再生所見をみとめたが，再生神経の起源は不明であった．我々は試験的に後鼻神経切断術後の蝶口蓋孔を骨蝋で塞いだモデルを作成し，このモデルにおける長期経過の観察も行っている（個体数2匹）． このモデルにおいても今回の検討と同様に，リモデリング様の変化の起きた鼻粘膜呼吸上皮が認められ，その粘膜に同様の神経の再生所見が認められた． これらのことを合わせて考えると,一つの可能性としては，前述の検討で明らかになった残存する鼻腔前方からの神経再生が考えられた．神経障害モデルの検討においては，げっ歯類では，神経再生は相対的に短い神経切断の距離においておこるため，必ずしもヒトでの病態を再現しているとは限らない [53, 54]．し

かしヒトの後鼻神経切断後においても，術後の一定期間後，しばしば鼻症状の再燃を認め[6]，ラット同様に神経再生が起きていることが示唆された．

後鼻神経切断後，48 週の長期においても鼻汁量は減少したままであった．後鼻神経切断後 48 週の組織において，再生神経線維は認めるものの同様にアセチルコリントランスフェラーゼの染色が認められなかったことは，依然としてアセチルコリンの合成不全により鼻汁量が減少していることが示唆された．このことは，鼻粘膜において神経の再生が必ずしも正常な機能の再生を意味するとは限らないことを示唆している．ヒトにおいて，通常 1-3 年での鼻症状の再燃が報告されているが，粘膜の再生はもう少し早い段階より起きていることが示唆された．

第 6 章　結論

ラットの後鼻神経切断術モデル動物を作成し，後鼻神経切断が鼻粘膜へ及ぼす影響およびアレルギー性鼻炎に対する影響を検討した．後鼻神経切断術モデルは，鼻腔の大部分の脱神経および鼻汁量の減少を引き起こすことが確認された．Ovalbumin（OVA)により感作をしたアレルギー性鼻炎モデルラット対する後鼻神経切断術の効果を検討したところ，後鼻神経切断術は鼻汁量の抑制には効果を認めるものの，鼻掻き，くしゃみの症状や，粘膜組織におけるアレルギー反応およびサイトカインの遺伝子発現には効果を認めなかった．また後鼻神経切断後の長期経過の検討では，鼻粘膜は神経の再生とともに呼吸上皮粘膜の肥厚および扁平上皮化生，細胞浸潤，杯細胞化生，基底膜の肥厚などリモデリング様の所見をみとめた．アレルギー性鼻炎の病態においては，後鼻神経切断術によって引き起こされる鼻粘膜の脱神経は鼻汁抑制のみを引き起こし，過敏症の抑制および粘膜のアレルギー反応には効果が少ないことが示された．また後鼻神経切断術は長期的には鼻粘膜のリモデリング所見を引き起こすことが示された．臨床においてアレルギー性鼻炎に対する後鼻神経切断術は，日本では広く行われており，一定の効果を得ている．しかし海外では積極的には行われていないのが現状である．今回の検討からは，後鼻神経切断術は，アレルギー性鼻炎および血管運動性鼻炎などによる難治性の鼻漏に対しては効果のある治療法であると言える．　一方でアレルギー性鼻炎の過敏症に対する方法としてはより慎重

な対応が必要である．また長期経過におけるリモデリング様の変化は，臨床症状においてどのような症状を呈するかは不明であり，今後の更なる検討が必要である．後鼻神経切断術が難治性鼻漏に対する世界的な標準術式として認知されていくかは，本邦からの効果や副作用および基礎的研究によるエビデンスの蓄積およびその発信にかかっていると思われる．特に耳鼻咽喉科医師にしかできない専門性の高い治療方法として，発信していくことが重要に思われる．

略語リスト

PNN: Posterior nasal neurectomy,

PGP 9.5: Protein gene product 9.5,

SP: Substance P,

CGRP: calcitonin gene-related peptide,

VIP: Vasoactive intestinal peptide,

NPY: Neuropeptide Y,

MBP: Major basic protein,

MCT: Mast cell tryptase.

BDNF: brain derived neurotrophic factor

PBS: Phosphate buffered saline

第 7 章　謝辞

本研究は，主に東京大学医学系研究科耳鼻咽喉科学教室にて行いました．研究に従事する機会を与えてくださり，ご指導とご鞭撻を賜りました，指導教官である東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻 感覚・運動機能医学講座 耳鼻咽喉科学分野 山岨達也教授に謹んで深謝いたします．

そして，実験計画から実験の手技および論文作成まで,最初から最後まで丁寧にご指導いただいた東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻 感覚・運動機能医学講座 耳鼻咽喉科学分野 近藤健二准教授には特に感謝を申し上げます．また，様々な局面で助言をくださいました当研究室の諸先生方および実験助手，秘書のかたにはご助力いただき心から感謝申し上げます．

第8章 参考文献

1) Okubo K., Kurono Y., Fujieda S., 他：Japanese Guideline for Allergic Rhinitis 2014．Allergol Int 63 (3)：357-375，2014．

2) Singh K., Axelrod S., Bielory L.：The epidemiology of ocular and nasal allergy in the United States, 1988-1994．J Allergy Clin Immunol 126 (4)：778-783 e776，2010．

3) 馬場 廣太郎, 中江 公裕：鼻アレルギーの全国疫学調査 2008(1998 年との比較) 耳鼻咽喉科医およびその家族を対象として．Progress in Medicine 28 (8)：2001-2012，2008．

4) Bousquet J., Fau - Van Cauwenberge P., Van Cauwenberge P., 他：Allergic rhinitis and its impact on asthma．- J Allergy Clin Immunol2001 Nov;108(5 Suppl):S147-3340091-6749 (Print); 0091-6749 (Linking))．

5) Seidman M. D., Gurgel R. K., Lin S. Y., 他：Clinical practice guideline: Allergic rhinitis．Otolaryngol Head Neck Surg 152 (1 Suppl)：S1-43，2015．

6) Konno Akiyoshi：Historical, Pathophysiological, and Therapeutic Aspects of Vidian Neurectomy．Current Allergy and Asthma Reports

10 (2)：105-112，2010．

7) Kanaya T.，Kikawada T.：Endoscopic posterior nasal neurectomy: an alternative to Vidian neurectomy .Clinical and Experimental Allergy Reviews 9 (1)：24-27，2009．

8) Golding-Wood Philip H.：Observations on Petrosal and Vidian Neurectomy in Chronic Vasomotor Rhinitis．The Journal of Laryngology & Otology 75 (03)：232，1961．

9) Konno A.，Togawa K.：Vidian neurectomy for allergic rhinitis. Evaluation of long-term results and some problems concerning operative therapy．Arch Otorhinolaryngol 225 (1)：67-77，1979．

10) Kikawada Toru：Endoscopic posterior nasal neurectomy: An alternative to vidian neurectomy．Operative Techniques in Otolaryngology-Head and Neck Surgery 18 (4)：297-301，2007．

11) 黄川田 徹，岩崎 聖雄，木倉 幹乃，他：内視鏡手術の適応拡大 Office Surgery をめざして ヴィディアン神経および後鼻神経に対する鼻内視鏡手術 day surgery ないし same day surgery で可能な鼻過敏症の鼻内手術．頭頸部外科 8 (1)：43-48，1998．

12) Ogawa T.，Takeno S.，Ishino T.，他：Submucous turbinectomy combined

with posterior nasal neurectomy in the management of severe allergic rhinitis: clinical outcomes and local cytokine changes. Auris Nasus Larynx 34 (3) : 319-326 , 2007 .

13) Ikeda K., Yokoi H., Saito T., 他:Effect of resection of the posterior nasal nerve on functional and morphological changes in the inferior turbinate mucosa . Acta Otolaryngol 128 (12) : 1337-1341 , 2008 .

14) Kobayashi T., Hyodo M., Nakamura K., 他 : Resection of peripheral branches of the posterior nasal nerve compared to conventional posterior neurectomy in severe allergic rhinitis . Auris, Nasus, Larynx 39 (6) : 593-596 , 2012 .

15) Halderman A., Sindwani R. : Surgical management of vasomotor rhinitis: a systematic review . Am J Rhinol Allergy 29 (2) : 128-134 , 2015 .

16) Albu S., Trombitas V., Nagy A. : Endoscopic microdebrider-assisted inferior turbinoplasty with and without posterior nasal neurectomy . Auris Nasus Larynx 41 (3) : 273-277 , 2014 .

17) 西嶌 大宣, 近藤 健二:【アレルギー性鼻炎-新たな研究と治療の展開】 アレルギー性鼻炎治療の新たな展開　後鼻神経切断術 . JOHNS 32 (6) : 773-

776 , 2016 .

18) Tan Guolin, Ma Yanhong, Li Heqing, 他 : Long-term Results of Bilateral Endoscopic Vidian Neurectomy in the Management of Moderate to Severe Persistent Allergic Rhinitis . Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery 138 (5) : 492-497 , 2012 .

19) Van Gerven Laura, Boeckxstaens Guy, Hellings Peter W. : Up-date on neuro-immune mechanisms involved in allergic and non-allergic rhinitis . Rhinology 50 (3) : 227-235 , 2012 .

20) Undem B. J., Taylor-Clark T. : Mechanisms underlying the neuronal-based symptoms of allergy . J Allergy Clin Immunol 133 (6) : 1521-1534 , 2014 .

21) Sarin Seema, Undem Bradley, Sanico Alvin, 他 : The role of the nervous system in rhinitis . The Journal of allergy and clinical immunology 118 (5) : 999-1014 , 2006 .

22) Chiu I. M., von Hehn C. A., Woolf C. J. : Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology . Nature neuroscience 15 (8) : 1063-1067 , 2012 .

23) Spencer S. E., Sawyer W. B., Wada H., 他 : CNS projections to the

pterygopalatine parasympathetic preganglionic neurons in the rat: a retrograde transneuronal viral cell body labeling study . Brain research 534 (1-2) : 149-169 , 1990 .

24) Shimizu T., Takahashi Y., Kawaguchi S., 他 : Hypertrophic and metaplastic changes of goblet cells in rat nasal epithelium induced by endotoxin . American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 153 (4) : 1412-1418 , 1996 .

25) Petersson G., Malm L., Rosengren E., 他 : Hyperosmolarity but not histamine evokes secretion of nasal fluid in the rat . European journal of pharmacology 161 (1) : 37-43 , 1989 .

26) Shimizu Takeshi, Shimizu Shino, Hattori Reiko, 他 : A mechanism of antigen-induced goblet cell degranulation in the nasal epithelium of sensitized rats . Journal of Allergy and Clinical Immunology 112 (1) : 119-125 , 2003 .

27) Belmonte Kristen E : Cholinergic pathways in the lungs and anticholinergic therapy for chronic obstructive pulmonary disease . Proceedings of the American Thoracic Society 2 (4) : 297-304 , 2005 .

28) 竹野 幸夫 : 鼻アレルギー治療最前線　新規治療法の有用性と限界 重症

鼻過敏症に対する後鼻神経切断術．日本鼻科学会会誌 51 (1)：67-69，2012．

29) Grunditz T., Uddman R., Sundler F.：Origin and peptide content of nerve fibers in the nasal mucosa of rats．Anatomy and Embryology 189 (4)：327-337，1994．

30) Anton F., Peppel P.：Central projections of trigeminal primary afferents innervating the nasal mucosa: a horseradish peroxidase study in the rat．Neuroscience 41 (2-3)：617-628，1991．

31) Grote J. J., Juijpers W., Huygen P. L.：Selective denervation of the autonomic nerve supply of the nasal mucosa．Acta Otolaryngol 79 (1-2)：124-132，1975．

32) Bleier B. S., Schlosser R. J.：Endoscopic anatomy of the postganglionic pterygopalatine innervation of the posterolateral nasal mucosa．International forum of allergy & rhinology 1 (2)：113-117，2011．

33) Bleier B. S., Feldman R., Sadow P. M., 他：The accessory posterolateral nerve: an immunohistological analysis．Am J Rhinol Allergy 26 (4)：271-273，2012．

34) Nakaya M., Yuasa T., Usui N.：Immunohistochemical localization of subtypes of muscarinic receptors in human inferior turbinate mucosa．Ann Otol Rhinol Laryngol 111 (7 Pt 1)：593-597，2002．

35) Baraniuk J. N.：Neurogenic mechanisms in rhinosinusitis．Current allergy and asthma reports 1 (3)：252-261，2001．

36) Norlander T., Bolger W. E., Stierna P., 他：A comparison of morphological effects on the rabbit nasal and sinus mucosa after surgical denervation and topical capsaicin application．European Archives of Oto-Rhino-Laryngology 253 (4-5)：205-213，1996．

37) Kyriacou K., Garrett J. R.：Morphological changes in the rabbit submandibular gland after parasympathetic or sympathetic denervation．Archives of Oral Biology 33 (4)：281-290，1988．

38) Fahy J. V., Dickey B. F.：Airway mucus function and dysfunction．N Engl J Med 363 (23)：2233-2247，2010．

39) Kou W., Hu G. H., Yao H. B., 他：Regulation of transforming growth factor-beta1 activation and expression in the tissue remodeling involved in chronic rhinosinusitis．ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 74 (3)：172-178，2012．

40) Yang Y. C., Zhang N., Van Crombruggen K., 他：Transforming growth factor-beta1 in inflammatory airway disease: a key for understanding inflammation and remodeling．Allergy 67 (10)：1193-1202，2012．

41) Kostamo K., Toskala E., Tervahartiala T., 他：Role of matrix metalloproteinases in chronic rhinosinusitis．Curr Opin Allergy Clin Immunol 8 (1)：21-27，2008．

42) Prakash Y. S., Martin R. J.：Brain-derived neurotrophic factor in the airways．Pharmacol Ther 143 (1)：74-86，2014．

43) 百島 尚樹，今井 良吉，小林 一豊：後鼻神経切断術により鼻漏が著明に改善した症例について．KKR 札幌医療センター医学雑誌 12 (1)：67-70，2015．

44) 吉野 泰弘，遠藤 周一郎，飯田 龍一：アレルギー性鼻炎に対する内視鏡下後鼻神経切断術とその効果．山梨医学 29（：188-191，2001．

45) 浦長瀬 昌宏，川村 順子，丹生 健一：粘膜下下鼻甲介骨切除と併用した選択的後鼻神経切断術のアレルギー性鼻炎への有用性に関する検討．日本鼻科学会会誌 52 (4)：494-498，2014．

46) 池田 勝久：【色々なアレルギー疾患における最近の進歩】 耳鼻咽喉科

後鼻神経切断術のアレルギー性鼻炎に対する効果．アレルギー・免疫 22 (11)：1598-1603，2015．

47) Knipping S., Holzhausen H. J., Riederer A., 他：Allergic and idiopathic rhinitis: an ultrastructural study . Eur Arch Otorhinolaryngol 266 (8)：1249-1256，2009．

48) Fajac I, Braunstein G, Lckovic M‐R, 他：Selective recruitment of eosinophils by substance P after repeated allergen exposure in allergic rhinitis．Allergy 50 (12)：970-975，1995．

49) Okamoto Y, Shirotori K, Kudo K, 他：Cytokine expression after the topical administration of substance P to human nasal mucosa. The role of substance P in nasal allergy．The Journal of Immunology 151 (8)：4391-4398，1993．

50) Pawankar Ruby,Nonaka Manabu:Inflammatory mechanisms and remodeling in chronic rhinosinusitis and nasal polyps．Current Allergy and Asthma Reports 7 (3)：202-208，2007．

51) Watelet J. B., Dogne J. M., Mullier F.：Remodeling and Repair in Rhinosinusitis．Curr Allergy Asthma Rep 15 (6)：34，2015．

52) Barker Allison R, Rosson Gedge D, Dellon A Lee：Wound healing in

denervated tissue .Annals of plastic surgery 57 (3)：339-342 ,2006 .

53) Scheib Jami,Hoke Ahmet:Advances in peripheral nerve regeneration . Nat Rev Neurol 9 (12)：668-676 , 2013 .

54) Hoke Ahmet：Mechanisms of Disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? . Nat Clin Pract Neuro 2 (8)：448-454 , 2006 .