

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592139

研究課題名（和文）局所作用型ホルモンCNPによる新しい顎堤吸収抑制法の基礎的検討

研究課題名（英文）Basic research of inhibition of bone resorption on residual ridge using CNP hormone with local physiological effects.

研究代表者

岡山 啓昌（OKAYAMA KEISUKE）

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：30436092

研究成果の概要（和文）：

本研究では、無歯顎顎堤の骨吸収を予防するための方法として局所に作用し、骨形成への効果が期待されているCNPホルモンを応用する基礎的な研究を行った。ラット頭蓋に硬膜を開放する直径8.8mmの骨欠損部に生理食塩水およびCNPを含浸した水熱処理ハイドロキシアパタイト顆粒を移植した。移植した欠損部は、辺縁および硬膜側より新生骨の形成が確認された。4週まで新生骨が占める範囲は大きくなった。骨形成量は、生理食塩水とCNP含浸顆粒移植群で差はみられなかった。4週までに明らかな骨形成の差は認められず、CNPの局所作用については拡散を調査してそれらを制御することも検討が必要であると思われた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, local bone formation effects of CNP hormone was examined to develop a new clinical treatment of inhabitation of bone resorption on residual ridge. The bone defect of 8.8 mm diameter to expose the dura mater was made in rat cranium. Hydrothermal hydroxyapatite containing saline solution and CNP hormone was prepared and implanted in the defect area. The new bone was formed from peripheral bone and dura mater. The area of newly formed bone increased to 4 weeks after implantation. No significant differences in new bone area showed between saline and CNP groups. The diffusion velocity of CNP hormone in local area should be examined to understand of the *in vivo* local effect of CNP hormone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：歯学、骨、ホルモン

1. 研究開始当初の背景

骨は、力学的環境に対する適応機能を有し、荷重状況に応じ適応的に形状を変化させるが、この義歯を介し義歯床下組織に伝達される咬合圧は、粘膜や骨表面の変化のみならず、より深部の海面骨、骨髄等へも影響を及ぼすと考えられている。顎骨における咬合圧の受容は、顎骨全体の形態としてや、内部構造等で行われ、全体の調和の中で機能し維持されると考えられるため、義歯床下での内部の海綿骨構造や細胞の反応は、義歯の力学的適合を表現する上、義歯安定のための顎堤形態維持に重要な役割を持つと思われる。しかし義歯床圧に対する骨内部（海綿骨）の反応については不明な点が多く、またストレスを感受する反応経路や内部構造の形態的变化を制御する機構については不明な点が多いため、顎堤を維持することを目的とした骨への治療法についてはまだ有効な方法がない。そこでこれまで実験床を作製し荷重圧を調整し持続的負荷を与える動物実験モデルを作製し、骨外面からの持続的負荷により、内骨膜の骨芽細胞の活動性を上昇、新生骨の形成促進があることを明らかにしてきた。また骨芽細胞の活動は、負荷が小さいものでは初期に活動性の上昇を示すが、一定の期間後に活動が徐々に低下することを示した。一方大きな負荷をかけた場合、内部は継続的に活動性の上昇が確認された。負荷の大きさの違いにより骨芽細胞の活動性の経時的変化が異なることは、骨の形態的、力学的な適応を表していると考えられる。即ち、内部に伝達される負荷の大きさに応じて骨が形態的な適応を示し、それに応じて骨芽細胞の活動が制御される機構の存在が示唆された。顎堤吸収の原因として、不適合な義歯の使用による局所的な刺激とともに、咬合や義歯設計上の問題から生じる異常な圧力などにより促進されることは、臨床的に明らかである。そこで異常な咬合圧などにも骨吸収を抑制し、顎堤を維持するための治療法は意義があり、義歯床からの圧によるメカニカルストレス応答の解明と同時に、それらの異常ストレスに対しても骨の吸収を抑制する事を目的として、近年注目されている局所作用ホルモンである CNP を用いて顎骨の吸収抑制をはかる治療法の確立を目指していこうと考え本研究に至った。

2. 研究の目的

本研究では、ラットを CNP 静脈持続投与群と対照群に分け、内部構造を形成する骨芽細胞が圧力に対していかに制御されるのかについて組織標本やマイクロCTによる形態学的比較検討を行い、ストレスに対する反応について各種抗体を用いてその局在、反応

の強さについて検討するとともに、被圧骨髄組織を採取し、さらにマイクロアレイ法により骨芽細胞を含む骨髄組織の活動を制御する遺伝子の検索を試み、CNP 依存的に骨形成を制御する遺伝子について網羅的な検討を行う。こうした検討により顎骨の形態変化を制御する CNP 関連因子を体系的に捉えることができ、それにより臨床的に義歯の安定を長期的に維持できる顎堤形態の維持のための CNP による新しいより効果的な治療法の開発に繋げられる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究では、CNP の骨形成効果を検討するために、ラット骨欠損部に CNP を投与する方法を用いた。

全身麻酔下にて、頭蓋皮膚に局所麻酔を施した後、ラット頭蓋にトレフィンバーを用いて直径約 8.8mm の硬膜に達する円形の骨欠損を作製した。(図 1)

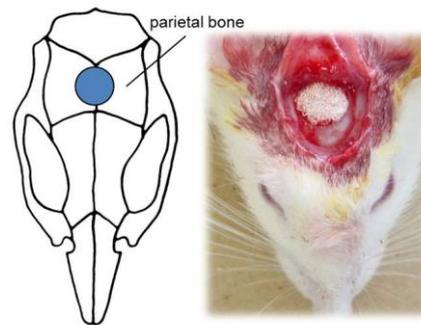
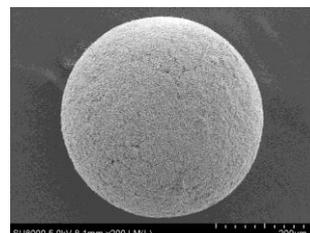


図 1. 頭蓋冠に形成した欠損部と移植した骨補填材

また CNP を含有できるハイドロキシアパタイトとして、針状結晶構造を有し薬剤の浸透が可能な水熱処理ハイドロキシアパタイトを作製した。ハイドロキシアパタイトは、 α リン酸トリカルシウムを 10%ゼラチン溶液に混入し、1200°C で水蒸気圧中で 10 分処理した。作製した顆粒は、シーベを用いて、大きさ約 350~500 ミクロンの正球顆粒に分別した。水熱処理ハイドロキシアパタイトは SEM 画像にて針状結晶構造であることを確認した。(図 2) CNP を含有させるために CNP 溶液中に顆粒を浸漬し、真空引きを行った。重量変化を計測して顆粒内の含有量を計測した。



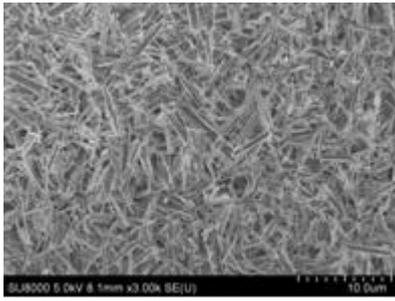


図2. 水熱処理顆粒の走査型電子顕微鏡像

CNPを含有する顆粒をラット頭蓋欠損部に移植し、骨膜および皮膚を縫合した。移植後1, 2, 4週で過剰麻酔にて屠殺し、10%ホルマリン緩衝液にて灌流固定を行った後、すぐに70%エタノール固定を行った。マイクロCTにて撮影後、前半分はEDTA脱灰、後半分は樹脂包埋を行った。EDTA脱灰したものは通法に従いパラフィン包埋し、HE染色、TRAP染色、ALP染色を施した。一方樹脂包埋したものは、ビラヌエバ染色を施し、いずれも光学顕微鏡下にて観察を行った。

4. 研究成果

(1) マイクロCT像

移植後4週がしめすマイクロCT画像では、欠損部に顆粒が充填されており、これらはいずれも4週まで残存していた。また欠損部の縁ないし不規則に中央の特に硬膜即には、新生骨と思われる不規則な形状を示す不透過領域が観察された。所見としてはやや対照群が縁を中心として骨形成を示したのに対し、CNP群では、骨形成領域が不規則である可能性が示されたが、対照群としての生理食塩水に浸漬した顆粒群とCNP顆粒群では骨形成量について明らかな違いはみられなかった。

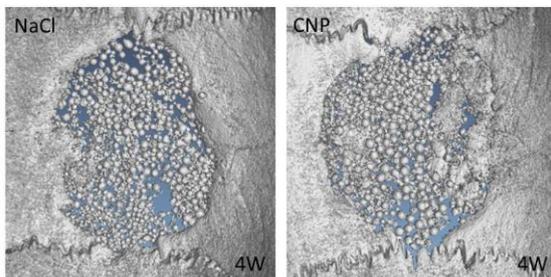


図3 欠損部4週後のマイクロCTによる立体構築像

(2) 病理組織学的所見

① ヘマトキシリンエオジン染色所見 (図4)

病理組織学的に、2週、4週いずれも生理食塩水を含浸した顆粒もCNPを含浸した顆粒もいずれもあきらかな高度な炎症性反応は

みられなかった。2週では、欠損部における骨形成と同様に縁および一部硬膜側からの新生骨形成がみられた。新生骨は比較的成熟度の高い骨で、明らかな線維性骨はみられなかった。新生骨はいずれも顆粒に近接して形成され一部は接していた。顆粒と近接する隙間には巨細胞がみられた。新生骨に改造線はみられなかった。顆粒は顕微鏡下での観察で、結晶構造がみられ、大きさに明らかな変化はみられなかった。しかし部分的に線維芽細胞、マクロファージと思われる不定形の細胞が顆粒内に侵入していた。新生骨のない顆粒間の隙間には血管を有する線維性結合組織の形成がみられた。4週では欠損部の大部分を新生骨がしめる像が観察された。明らかな改造線はみられず、改造の少ない骨形成を特徴としていた。顆粒との関係は2週と同様、部分的に接触を持ちながら取り囲むように骨形成がみられるが、一部は隙間があり、巨細胞等が介在していた。骨形成のない顆粒間隙には、炎症性細胞浸潤のほとんどみられない線維性結合組織が観察された。

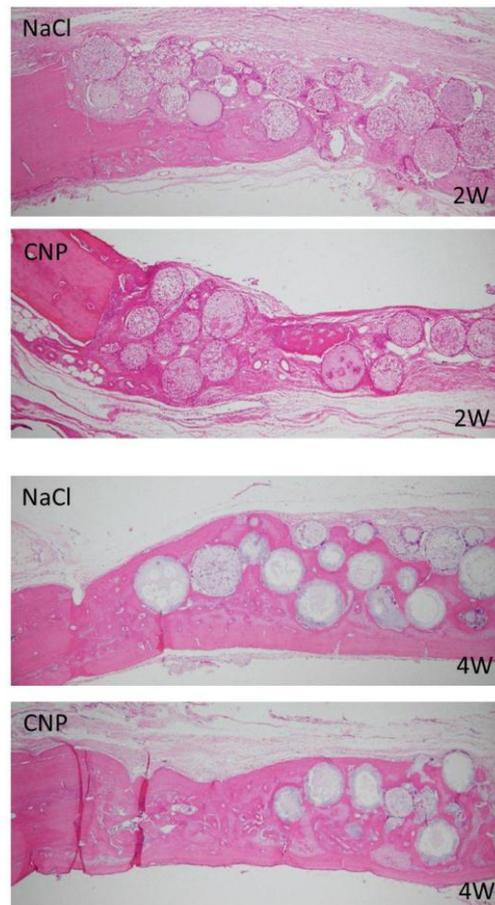


図4 上：欠損部の2週後の前頭断面での組織像、下：欠損部の4週後の前頭断面での組織像。いずれもヘマトキシリンエオジン染色像

②エラスティカマッソン染色所見 (図5)

エラスティカマッソン染色では、顆粒間隙組織の線維化について検討を行った。生理食塩水の群もCNPの群もいずれも2週にかけて血管を含む線維性結合組織の形成が明瞭で、青く染まる膠原線維などの形成がみられる。しかし癒痕組織とまでは行かないレベルでの線維化と判断され、骨形成にとって不利な組織変化をしめさないと思われる。しかし客観的な評価は困難であるが、生理食塩水に比べ、CNPは比較的膠原線維の量が少なく線維化の傾向が進まないか遅い傾向がみられた。また中空性の顆粒は内部に線維性結合組織の増生が確認され、何らかの形で顆粒表面に孔状の欠損が生まれ、そこから内部に細胞の侵入がみられると思われた。

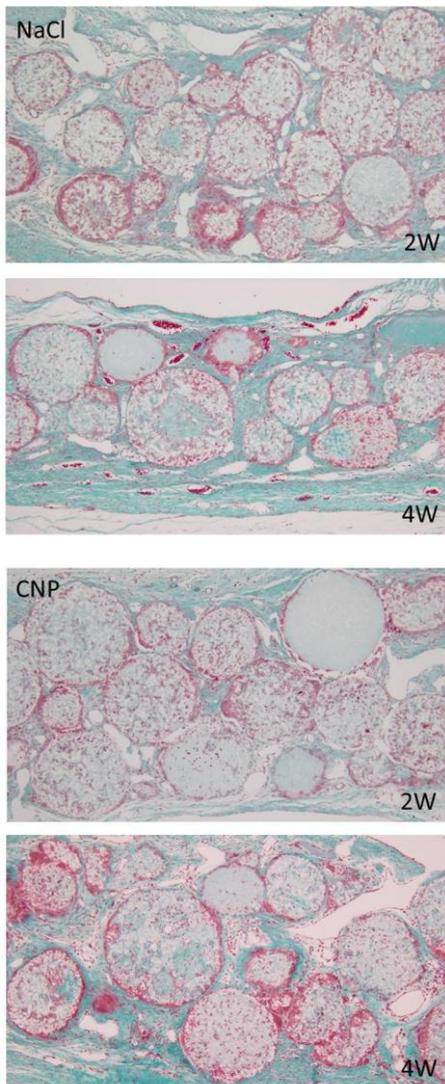


図5 生理食塩水(上2)、CNP(下2)を含浸した顆粒のエラスティカマッソン染色像、それぞれ上が2週、下が4週。

③TRAP染色所見(図6)

トラップ染色にて、顆粒周囲のトラップ陽

性破骨細胞様細胞の局在、数的な差について検討を行った。生理食塩水含浸群、CNP含浸群いずれも顆粒周囲には1週からトラップ陽性破骨細胞様細胞の出現がみられた。しかし局在、特に欠損部の辺縁部と中央部での違いや数的な差はみられなかった。破骨細胞は、骨芽細胞分化への誘導も考えられるが骨形成における差がみられないため、この結果について矛盾はないと思われる。一方、CNP自体はマクロファージの誘導はあっても破骨細胞への分化を促進する効果はないと思われた。

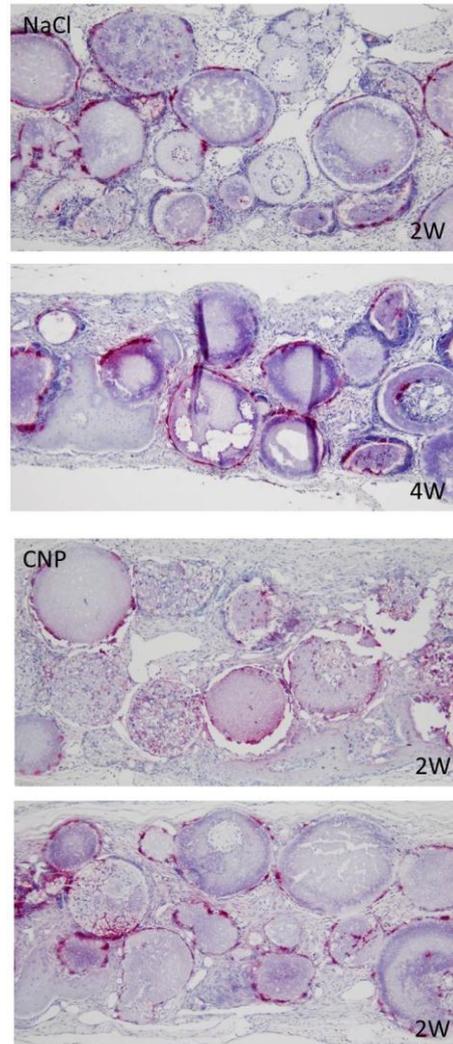


図6 生理食塩水(上2)、CNP(下2)を含浸した顆粒のトラップ染色像、それぞれ上が2週、下が4週

④アルカリフォスファターゼ染色所見(図7)

アルカリフォスファターゼ活性を示す骨芽細胞の出現を評価するために局在等を観察した。生理食塩水含浸、CNP含浸いずれの群もCNPが拡散して間もない1週から明らかな分化誘導を示さなかった。しかし2、4週で

は、特に辺縁部において顆粒周囲に陽性を示した。これらは生理食塩水含浸も同様の所見であることから CNP による骨芽細胞への分化誘導が促進されたとは言えない。

副所見としては、中空性顆粒においては内部の顆粒内中空構造の内壁に一致してアルカリフォスファターゼの陽性反応がみられた。この所見も生理食塩水含浸群と CNP 含浸群のいずれにもみられた。

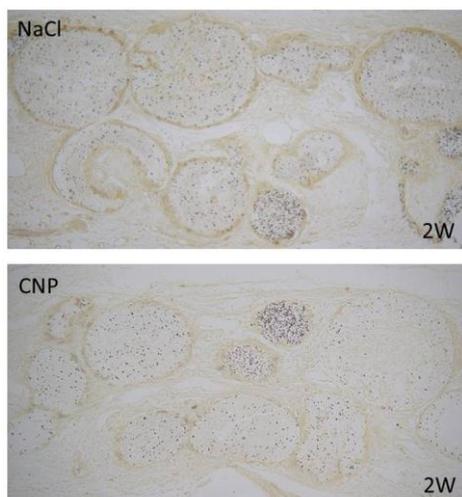


図7 生理食塩水（上2）、CNP（下2）を
含浸した顆粒のアルカリフォスファターゼ
染色像、いずれも2週で、上が生理食塩水、下
が CNP の含浸群。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡山 啓昌 (OKAYAMA KEISUKE)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常
勤講師

研究者番号：30436092

(2) 研究分担者

工藤 忠明 (KUDO TADAAKI)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50431606

清水 良央 (SHIMIZU YOSHINAKA)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：30302152

金高 弘恭 (KANETAKA HIROYASU)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：50292222

佐々木 啓一 (SASAKI KEIICHI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：30178644

(3) 連携研究者

なし