

## 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 5 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22592197

研究課題名（和文） 血管新生の制御による骨再生の研究

研究課題名（英文） Modulation of angiogenesis in bone regeneration

研究代表者

佐藤 秀一（SATO SHUICHI）

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：50225942

研究成果の概要（和文）：

骨再生時の血管新生をマイクロ CT と血管造影法を併用し、自然閉鎖可能な骨欠損（非臨界骨欠損）と自然閉鎖不可能な骨欠損（臨界骨欠損）の再生過程における血管新生の動態について、ラット骨欠損を用いて分析した。その結果、骨再生時の新生血管は、非臨界骨欠損では骨欠損部全体に広がるように形成されたが、臨界骨欠損では欠損部全体には広がらなかった。血管新生と骨再生との間には、正の相関性を認めた。ラット骨欠損では、血管新生量と骨再生量に高い相関性が認められ、血管新生が骨再生を調節している可能性が示唆された。とくに、非臨界骨欠損においては血管新生が完全な骨再生を誘導することがわかった。

研究成果の概要（英文）：

. This study evaluated angiogenesis in rat non-critical and critical calvarial flat bone defects using *in vivo* micro-CT. Critical- and non-critical-sized calvarial bone defects showed bone regeneration and angiogenesis around the midsagittal suture. New blood vessel networks were observed around defects of both sizes. Angiogenesis preceded bone regeneration around critical- and non-critical-sized calvarial bone defects. Angiogenesis led to full bone formation in non-critical-sized defects

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：血管新生，骨，再生

1. 研究開始当初の背景

歯周病などで失われた顎骨を再生させる

ためには再生因子（細胞，足場，増殖因子）の適切な作用が必要である。研究者は，再生困難な骨外側（垂直）方向の骨再生を検討することを目的とし，規格化した中空スペース内の骨再生についてウサギおよびラット GBA（guided bone augmentation）モデルを用いて，各種再生因子の作用について検討してきた。その結果，骨髄穿通による細胞供給，適切な足場としての移植材の種類やその形態，さらに増殖因子を添加することによって骨再生が促進された。しかし，常に十分な量と質の再生骨が得られなかった。とくに，組織末梢の方向で再生組織が不十分となる傾向があり，再生因子や栄養が十分に供給されなかったのではないかと考えた。そこで，申請者は再生組織に栄養や再生因子を供給している新生血管と骨再生の関係についての検討することに着想した。

## 2. 研究の目的

再生医療にとって重要かつ不可欠なのは，移植細胞や組織の生着であり，そのためには移植細胞や組織では血管新生をいかに誘導・制御するかが重要である。本研究では骨再生過程における血管新生に着目し，そのメカニズムについて解析した。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験材料

#### ①実験動物

本研究では，7 週齢の雄性 Fischer ラット 40 匹を用いた。ラットは午前 7 時点灯，12 時間明暗サイクル，室温  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相対湿度  $55 \pm 5\%$  に設定した恒温恒湿の環境下でラット用固型飼料と水道水を自由に摂取させて飼育した。また，2 週間の予備飼育を行い，全身状態が健康であることを確認した。

#### ②造影剤

造影剤は，非イオン性造影剤であるイオパ

ミドール，およびシリコーンラバー系造影剤（MICROFIL<sup>®</sup> injection compounds）を使用した。シリコーンラバー造影剤は，通法に従い本剤と希釈剤を 4 対 5 の割合で混和し，硬化剤を 5% 加えて調合した。

### (2) ラット骨欠損モデル

#### ①麻酔

ラット腹腔内に  $0.6 \text{ ml/kg}$  ペントバルビタールナトリウムを注射し，全身麻酔を施した。ついで，手術野の頭頂骨相当部を剃毛し，同部に  $1/80,000$  エピネフリン含有の 2% キシロカインで局所麻酔を行った。

#### ②実験母地の形成

矢状縫合に沿う切開を施し，筋層および骨膜を剥離した。左右の頭頂骨を露出させ，正中縫合を避けて，右側に直径  $5.0 \text{ mm}$  の臨界骨欠損と左側に直径  $2.7 \text{ mm}$  の非臨界骨欠損をトレファインバーで形成した。

その後，骨膜および皮膚をそれぞれ 4-0 吸収性縫合糸を用いて縫合した。手術後の感染予防のため，縫合部にペリオフィールを貼薬し，さらにペニシリン G カリウム ( $2,500,000 \text{ IU/5 ml}$ ;  $0.1 \text{ ml/kg}$ , シグマ) を 1 回筋肉注射した。実験期間は 28 日とし，予備飼育と同様の環境下で飼育を行った。

#### (3) マイクロ CT による撮影

ラットに全身麻酔を施し，0，7，14，21，28 日に実験動物用 3D マイクロ CT（マイクロ CT）を用いて当該部の撮影を行った。撮影条件は，管電圧  $90 \text{ kV}$ ，管電流  $88 \mu\text{A}$ ，照射時間 17 秒，voxel size  $30 \times 30 \times 30 \mu\text{m}$  とした。また，撮影時は骨底面が基準平面（水平面）と平行になるように，マイクロ CT 内での試料方向を調整した。

#### (4) 血管造影

施術後 7，14，21，28 日まで 1 週間に 1 回，ラットに全身麻酔を施した後，腹腔内に局所麻酔を施し，還流固定法に準じた方法に

より脱血した後、10% 中性緩衝ホルマリン液を用いて全身を固定した。その後、2 種の造影剤 20 ml を 2 ml/min の速度で自動注入器（シリンジポンプ）で心臓から注入し、その後 4°C の冷暗所で 12 時間保管した。

#### (5) マイクロ CT 断層像の観察と解析

術後の骨再生と血管新生についての定量的評価を i-VIEW（モリタ）によって、3 軸方向、とくに矢状方向（Y）と前頭方向（Z）の断層像を分析した。骨体積計測ソフト（北千住ラジスト歯科）を用いて、術後の骨再生と血管新生についての定量的評価を行った。

骨定量にあたっては、断層像から得られるヒストグラムで、周囲軟組織と明らかな硬組織（既存骨）それぞれの放射線吸収度のピーク値を求め、その中間値を術後再生した骨の放射線吸収度の下限とした。この値を基準として、各週、臨界および非臨界の骨欠損 5 例ずつの CT データについて、関心領域における再生骨量を測定し、骨欠損中の再生骨量の割合を算出して、骨再生率とした。

一方、新生血管量は、血管造影前後の CT データ（差分）をもとに算出し、骨再生率と同様に、骨欠損中の血管新生量の割合を算出し、血管占有率とした。

#### (6) 全載標本における新生血管の定量

シリコーンラバー造影剤の硬化後、骨欠損部および周囲組織を含む頭部組織を一塊として切り出し、全載標本とした。この標本をシャーカステン上で脳硬膜側よりデジタル撮影し、解像度 600 dpi のデジタル画像とした。画像解析ソフトの自動選択ツールによって、組織学的形態および色調を指標として血管新生量のピクセル数を計測した。この血管新生量から、骨欠損部における血管新生量の割合（%）を算出し、血管占有率とした。

#### (7) 組織標本の作製

術後 14 日および 28 日のイオパミドール

造影例ではマイクロ CT 撮影後に、周囲組織を含む頭頂部組織を採取し、さらに、同固定液に 3 週間浸漬した。そして、Morse の脱灰液で 24 時間の脱灰を行った後に、通法に従ってパラフィン包埋し、矢状縫合に平行で厚さ約 5  $\mu\text{m}$  の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

#### (8) 統計学的分析

骨再生率と血管占有率の経時的変化を調べるために、Pearson の相関係数および決定係数を求めた。また、骨再生率と血管占有率の関連性を検討するために、各群における割合を昇べき順にプロットしたグラフを作成した。

また、臨界と非臨界骨欠損における骨再生率および血管占有率の比較には Mann-Whitney *U* 検定を用いてそれぞれ危険率 5% 未満を有意差として統計処理を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 臨床所見

すべてのラットの施術部に感染や炎症は認めず、術後の経過は良好であった。

### (2) マイクロ CT 所見

#### 臨界骨欠損

新生血管は術後 14 日から骨膜側および既存骨辺縁から骨欠損内に向かって増加していき、術後 21、28 日では骨欠損内に広く分布していた。しかし、再生骨は術後 21 日で既存骨辺縁にわずかに認められるのみであった。

#### 非臨界骨欠損

新生血管は術後 7 日から認められるようになり、骨膜側および既存骨から骨欠損内部に向かって経時的に増加していき、術後 28 日では骨欠損内に広く分布していた。再生骨は術後 7 日から既存骨辺縁に認められ、術後 28 日で骨欠損の約半分が再生骨で満た

されていた。(図1)

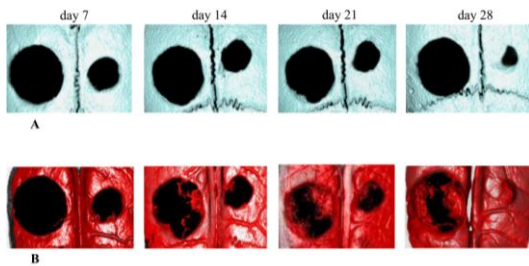


図1：血管新生および骨再生

(3) 組織学的所見 (図2, 3)

#### 臨界骨欠損

術後14日では、骨欠損部は結合組織でほぼ満たされていた。術後28日では再生骨がわずかに増加し、血管はその周囲の結合組織に認められた。

#### 非臨界骨欠損

術後14日で骨欠損内では結合組織が広がり、再生骨は既存骨辺縁部にわずかに認められるのみであった。術後28日では、骨欠損部は骨組織で満たされ、この再生骨組織には多数のハバース管構造が認められた。

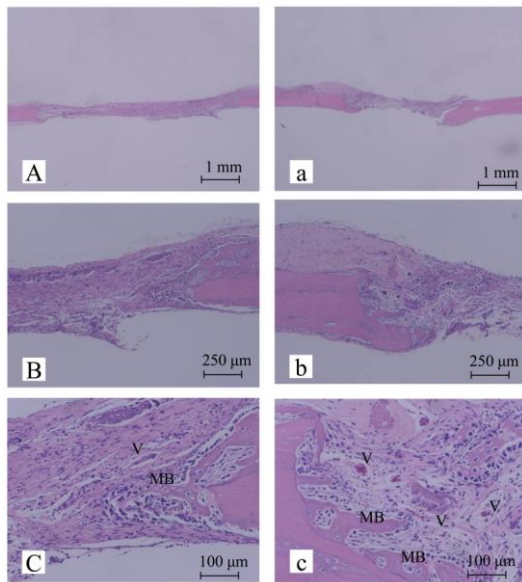


図2：術後14日の組織切片

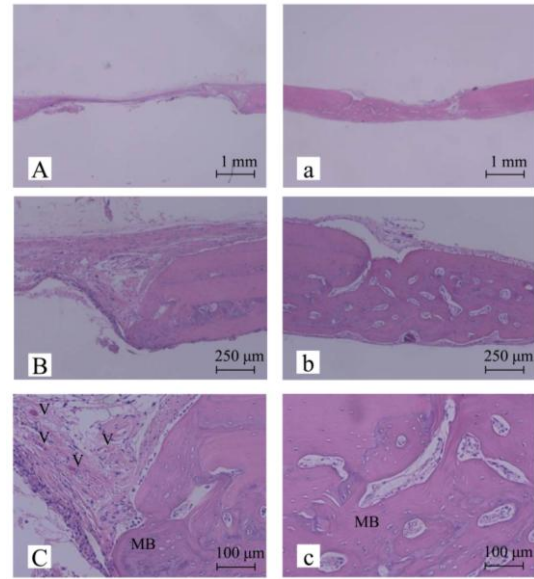


図3：術後28日の組織切片

(4) 定量的評価

全載標本で計測した血管占有率は、臨界および非臨界骨欠損において術後7日から術後28日の期間では、経時的に血管の増加を認め、両群間に有意差が認められた。

マイクロCTによって定量した血管占有率および骨再生率は術後28日まで、臨界骨欠損および非臨界骨欠損群ともに経時的に増加する傾向を示した。

血管占有率と骨再生率は、臨界および非臨界骨欠損いずれにおいても、正の相関関係を認めたが、とくに非臨界骨欠損で高い相関性を認めた。

#### 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7件)

- ① Udagawa A, Sato S, Hasuike A, Arai Y, Ito K (2012) Micro CT observation of angiogenesis in bone regeneration. Clin Oral Implants Res, doi: 10.1111/j.1600-501.2012.02458x, 査読有
- ② Saito Y, Sato S, Oginuma T, Saito Y, Arai Y, Ito K (2012) Effect of nicotine on bone

- augmentation in rat calvarium, Clin Oral Implants Res. doi: 10.1111/j.1600-501.2011.02416x, 査読有
- ③ Oginuma T, Sato S, Udagawa A, Saito Y, Arai Y, Ito K (2012) Autogenous bone with or without hydroxyapatite bone substitute augmentation in rat calvarium within a plastic cap. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 114, S107-S113, 査読有
- ④ Yamada Y, Sato S, Yagi H, Ujiie H, Ezawa T (2012) Correlation in the densities of augmented and existing bone in guided bone augmentation. Clin Oral Implants Res, 23, 837-845, 査読有
- ⑤ 福山富久, 佐藤秀一, 石橋和也, 汐見 登, 菅井健二, 深瀬康公, 伊藤公一 (2011)  $\alpha$ -リン酸三カルシウムセメントにおける培養骨芽細胞様細胞の付着および浸潤率について. 日大歯学, 85, 23-28, 査読有
- ⑥ Kochi G, Sato S, Ebihara H, Hirano J, Arai Y, Ito K (2010) A comparative study of micro-CT and the histomorphometry in evaluating bone augmentation in rat calvarium. J Oral Sci, 52, 203-211, 査読有
- ⑦ Fukuyama T, Sato S, Fukase Y, Ito K (2010) Effects of  $\alpha$ -DT cement with hydroxypropylcellulose on bone augmentation within a titanium cap in the rabbit calvarium. Dent Mater J, 29, 160-166, 査読有
- [学会発表] (計 16 件)
- ① Udagawa A, SEM observation of angiogenesis in bone augmentation. (2012, 10.10) 20<sup>th</sup> European Association for Osseointegration, Copenhagen, Denmark
- ② Saito Y, Influence of nicotine concentration on bone augmentation (2012, 10.10) 20<sup>th</sup> European Association for Osseointegration, Copenhagen, Denmark
- ③ Sato S, Effects of bone marrow penetration rate and size on the guided bone augmentation in the rat calvarium, (2012, 9.28) 98<sup>th</sup> American Academy of Periodontology, Los Angeles, USA
- ④ Yoshimaki T, Bone regeneration by lactoferin in rat calvarial bone defects (2012, 9.28) 98<sup>th</sup> American Academy of Periodontology, Los Angeles, USA
- ⑤ 木上理沙, 内側性骨欠損の血管新生に対するbFGFの効果 (2012, 6. 28) 第136回日本歯科保存学会学術大会, 沖縄
- ⑥ 木上理沙, bFGFによるラット内側性骨欠損における血管新生および骨再生のエックス線・組織学的検討 (2012, 5. 20) 第64回日本大学歯学会総会学術大会, 東京
- ⑦ 土屋紀子, PDGFがラット頭頂骨におよぼす影響 (2012, 5. 20) 第64回日本大学歯学会総会学術大会, 東京
- ⑧ 土屋紀子, ラット頭頂骨における骨外側方向への骨増生に対するPDGFの影響 (2012, 5. 17) 第55回春季日本歯周病学会学術大会, 北海道
- ⑨ 津徳克成, ウサギGBAモデルにおいて増生した新生組織の移植骨としての検討 (2012, 5. 17) 第55回春季日本歯周病学会学術大会, 北海道
- ⑩ Oginuma T, Autogenous bone with or without hydroxyapatite bone substitute augmentation in rat calvarium within a plastic cap (2011, 11.12) 97<sup>th</sup> American Academy of Periodontology, Florida, USA
- ⑪ 宇田川麻美, 内側性骨欠損の血管新生および骨再生の動態観察 (2010, 5. 20) 第63回日本大学歯学会総会学術大会, 東京
- ⑫ Udagawa A, Micro-CT observation of angiogenesis in guided bone regeneration.

(2010, 10. 30) 50<sup>th</sup> Korean Academy of Periodontology, Seoul, South Korea

- ⑬ Sato S, Effect of bone marrow penetration on the guided bone augmentation in the rat calvarium: comparative study of micro-CT and histomorphometry. (2010, 10. 30) 96<sup>th</sup>American Academy of Periodontology, Honolulu, USA
- ⑭ Fukuyama T, The adhesion and infiltration of cultured osteoblast-like cells within  $\alpha$ -DT and  $\beta$ -TCP. (2010, 10. 30) 96<sup>th</sup>American Academy of Periodontology, Honolulu, USA
- ⑮ 佐藤秀一, 骨外側方向への骨増生法に関する研究 (2010, 1. 30) 第33回 臨床応用を目指した3次元臓器造形研究会. 東京
- ⑯ 荻沼 毅, ラットGBAモデルを用いた自家骨と骨補填材の併用による骨外側方向への骨増生の影響 (2010, 5.13) 第53回 春季日本歯周病学会学術大会, 岩手

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 秀一 (SATO SHUICHI)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：50225942