

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792460

研究課題名(和文) bFGF 投与による口蓋裂術後瘢痕組織の正常組織化

研究課題名(英文) The normalization of postoperative scar tissue by bFGF administration.

研究代表者

秦 雄一郎 (HATA, Yuichiro)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60465747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、線維芽細胞成長因子(以下 bFGF) 投与が既存の瘢痕組織に対して組織を再改変させることが可能かを病理組織学的に明らかにし、既存の瘢痕組織を正常組織化させる方法について検討することを目的とした。その結果、HE 染色像から bFGF 群でコントロールに近い組織像を認めたことから既存の瘢痕組織に対する bFGF 投与が、一部に効果を認める可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is examining how to make the normalization of existing scar tissue by basic fibroblast growth factor (bFGF) administration. According to the HE staining image, the histological finding in the bFGF group was similar to the control group partially. The result suggested that the bFGF administration may be effective to normalize existing scar tissue.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、矯正・小児系歯学

キーワード：瘢痕組織 bFGF 口蓋裂 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂患者では幼少期に口腔と鼻腔の分離と正常な鼻咽腔閉鎖機能の獲得を目的に口蓋形成手術が行われる。push back 法は、数多くの口蓋形成手術法の中で世界的に行われている手術方の一つであり良好な鼻咽腔閉鎖が得られる。しかし術後の創傷治癒過程で形成される癒痕組織が、上顎骨および上顎歯列歯槽部の成長発育に抑制的な影響を与えることが知られている。また、矯正歯科治療では、治療後の後戻りの原因となっている。さらに口蓋瘻孔や鼻咽腔閉鎖機能不全ともなう構音障害が存在しても広範な癒痕組織が生じた場合、再手術が困難になる場合も多い。

そこで我々は、線維芽細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞および軟骨細胞を増殖させる作用を有するサイトカインの一つである線維芽細胞成長因子(bFGF)に着目して口蓋形成手術後の癒痕形成を抑制する研究を行ってきた。これまでの研究で、癒痕組織周囲の歯列の側方成長、上顎骨の垂直的成長の抑制が緩和されること(川鍋ら、Orthod waves 2004)、血管新生による微小循環網が維持されること(Hata et. al., Cleft Palate Craniofac J. 2008)さらに、コラーゲンタイプ線維の合成を減少し、再生した粘膜下組織の歯周組織や口蓋骨への機械的結合力を弱くすること(Choi et. al., Acta Odontol Scand. 2008)から、bFGF投与が癒痕形成を抑制し、成長抑制を緩和する可能性が示唆された。

一方で、すでに術後癒痕組織が生じてしまい、前述したような障害に悩まされている患者が多くいる。皮膚の再生医療では、切開創に投与することで肥厚性癒痕を抑制したものの(Akasaka et. al., J Pathol. 2004)などbFGFのヒトへの臨床応用が進んでいる。さらに既存の癒痕組織についても、肥厚性癒痕、成熟癒痕、正常皮膚組織のどの線維芽細胞にもbFGFのレセプターが存在していることもわかっており(Akimoto et. al., Eur J Dermatol. 1999) bFGFが既存の癒痕組織を修飾する可能性が考えられる。そこで、これまでの研究手技、手法を応用して、本研究では、bFGF投与で既存の癒痕組織を正常組織化させる方法について検討することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は、口唇口蓋裂患者において、口蓋形成手術後の創傷治癒過程で生じた癒痕組織に対してbFGFを投与することで正常組織化する可能性を形態学的、生化学的に検証する。これによって、すでに口蓋形成術で癒痕組織を生じた患者に対して口蓋粘膜の正常組織化の治療の確立にむけて基礎データを蓄積する。

3. 研究の方法

(1) 口蓋癒痕形成術後の成熟癒痕モデルの作製

実験動物には、生後20日齢雄性Wistar系ラットをもちいて以下の4群を設定して形態学的、生化学的に癒痕組織の改変状態を評価した。

コントロール群：何も処置を施していない群
癒痕群：成熟癒痕モデルに何も投与しない群
bFGF群：成熟癒痕モデルにbFGF溶液を投与した群

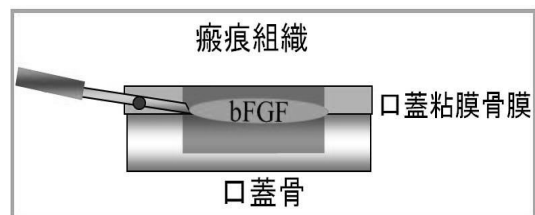
Sham群：成熟癒痕モデルにbFGFの溶媒である蒸留水のみを加えた群

各群のラットは、生後20日齢時に口蓋左右側各1/3の部位で第1臼歯から第3臼歯にかけて骨膜に達する切開を加え、粘膜骨膜を剥離、除去し骨面を露出させた。その後、露出した骨面を小綿球にて数回擦過して残存する骨膜を可及的に除去した。成熟癒痕組織の条件は、我々の過去の研究では術後6週経過時であるが、さらに確実な成熟癒痕を目指し術後8週経過時とした。(川鍋ら、Orthod waves 2004、Hata et. al., Cleft Palate Craniofac J. 2008)

(2) bFGF投与後の変化の評価

bFGF投与方法(下図)

術後8週経過時に、GASTIGHT シリンジにて第1臼歯前縁から手術部位にbFGF水溶液を各10 μ l(濃度は我々の過去の研究から20 μ g/10 μ l)注入した。Sham群では、蒸留水を各10 μ l投与した。投与部位については、bFGFレセプターは癒痕組織中の線維芽細胞に存在するというAkimoto et. al.の報告に基づき癒痕組織中央とした。



bFGF投与後の癒痕組織の改変状態の評価

bFGF投与後は、1週、2週に屠殺後、目視における口蓋部の変化をデジタルカメラにて撮影した。その後、通法に従いパラフィン包埋後7 μ mの厚みで切片を作製し、Hematoxylin - Eosin 染色(HE染色)を行い、光学顕微鏡にて病理組織学的に検索し形態学的に評価した。

4. 研究成果

(1) 各群の口蓋部の状態

コントロール群では、口蓋ヒダが各臼歯部辺縁まで途切れることなくきれいに認められる。(図1)



図1

癒痕群では、図2の赤丸部分のように口蓋ヒダが粘膜骨膜剥離部分で消失しており、周囲の組織と比べて白濁した癒痕組織の状態を示している。

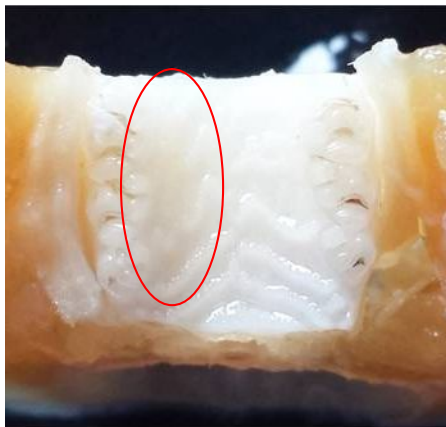


図2

bFGF投与後1週の群では、図3のように口蓋ヒダについては、癒痕群と同様に粘膜骨膜剥離した臼歯周囲で消失しているものの、白濁が癒痕群と比較して少ない感じが見られた。



図3

bFGF投与後2週の群では、投与後1週の群と比較して著明な変化は見られず類似した像を認めた。(図4)



図4

Sham群では、口蓋ヒダは消失し組織の白濁についても癒痕群と類似の像を認めた。bFGF群と比較しても著明な変化は見られなかった。(図5)



図5

(2) HE染色による評価

コントロール群では、角化重層扁平上皮に覆われた粘膜下組織をみとめ疎なコラーゲン線維によって満たされていた。血管は豊富に認められた。また、歯槽骨は一層の骨膜によっておおわれていた。(図6)

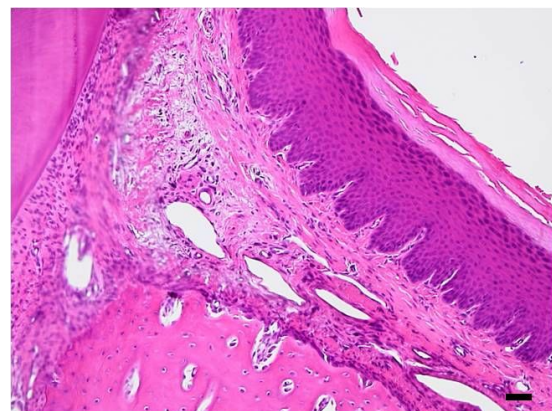


図6 黒線は100µm

癒痕群では、コントロールと比較して粘膜下組織までコラーゲン繊維の肥厚した束がみられ歯槽骨と骨膜を介することなく直接結合していた。血管は疎であった。(図7)

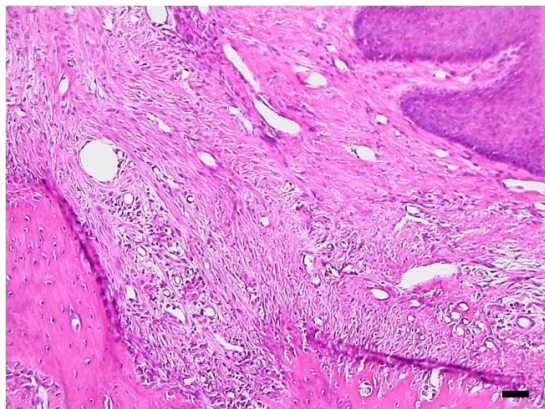


図7 黒線は100 μ m

投与後1週のbFGF群では、癒痕群と比べて骨膜の消失は見られないもののコラーゲン線維束の様子はあまり変化を認めなかった。しかし、一部に粘膜下組織で線維束が疎な部分も見られ、コントロール群のそれに近似した像を認めた。また、2週の群でも1週と類似した像を示した。(図8)

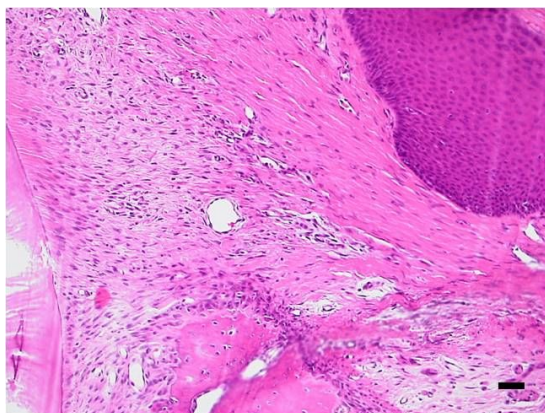


図8 黒線は100 μ m

Sham群では、癒痕群と同様の像を認めたものの、腐骨と思われる骨分離像やその周囲に炎症細胞浸潤を認めた。(図9)

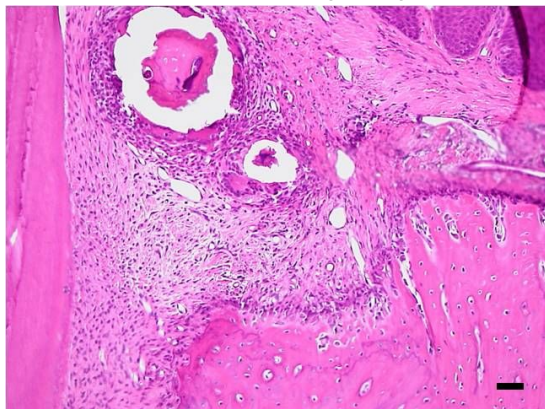


図9 黒線は100 μ m

(3) 考察とまとめ

各群の口蓋部を直接観察した結果、投与後1、2週のbFGF群と、癒痕群、Sham群との間に著明な差は見られず類似した像であると考えられた。

しかし、HE染色結果から、bFGF群でコントロールに近い組織像を認めたことから既存の癒痕組織に対するbFGF投与が、一部に効果を認める可能性が示唆された。

今後は、bFGF投与部位として創中央ではなく栄養血管の豊富な創周囲から投与することや、bFGF濃度の変化させることでより効率よく効果を得られるようにさらなる検討が必要である。さらに、本研究に関連する臨床評価として出生後ただちに顎矯正治療を施行した患者を評価して学会発表を行った。今後は臨床においての評価ともリンクさせながら進める必要があると考えられた。

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

秦雄一郎、玉置幸雄、高村雄太郎、梶井貴史、石川博之、高木誠司、大慈弥裕之
術前顎矯正を行った片側性口唇口蓋裂患者の5歳時の顎態評価
第37回日本口蓋裂学会総会・学術集会 2013年5月30-31日 佐賀市文化会館(佐賀)

6. 研究組織

(1)研究代表者

秦 雄一郎 (HATA, Yuichiro)
福岡歯科大学 歯学部 講師
研究者番号：60465747