

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24792347

研究課題名(和文) IGF - を用いた顎口腔領域のスマートエイジングの確立

研究課題名(英文) Study of IGF-I for oral and maxillofacial smart aging

研究代表者

小嶋 郁穂 (Kojima, Ikuho)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80447169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Insulin-like growth factor I (IGF-I) の抜歯窩への影響を調べるために、下顎第一臼歯を抜去したラットモデルを用いて、IGF-I または生理食塩水を持続投与した実験群と対照群をマイクロCTにて比較検討した。

抜歯窩の新生骨量は実験群が対照群と比較して有意に増加していた。抜歯後の頬側の歯槽骨の吸収は抜歯1週間からIGF-I投与中止後にかけて、舌側の歯槽骨の吸収は抜歯2週間から投与中止後にかけて、実験群が有意に低い値となった。以上の結果より、IGF-I持続投与は抜歯窩の新生骨量を増加させること、抜歯後の歯槽骨吸収を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the longitudinal morphological changes in extraction sockets following sustained continuous subcutaneous infusion of insulin-like growth factor I (IGF-I). rats were subjected to right mandibular first molar extraction. Experimental rats received a continuous subcutaneous infusion of IGF-I by minipump. Control animals were treated with saline via the same method. All rats were then housed after stop of the infusion. Micro-CT scanning was performed immediately after tooth extraction and at regular intervals.

New bone formation was markedly higher in the IGF-I-treated group as compared with the control group. The loss in alveolar ridge height in the IGF-I group was significantly lower than that in the control group at each time point after extraction on the buccal side and at 2, 3, and 6 weeks on the lingual side. IGF-I treatment increases the volume of newly formed bone and reduces the loss in alveolar ridge height following tooth extraction.

研究分野：口腔診断学

キーワード：IGF-I 顎骨

1. 研究開始当初の背景

近年、Insulin-like growth factor (以下 IGF-) は成長発育や老化防止に最も深く関連する物質として注目され、加齢とともにその血中量は減少することが知られている。IGF- は種々の組織の成長促進作用を有し、特に骨に対しては骨芽細胞、軟骨芽細胞の分化・増殖を促進し、骨形成・骨成長作用を有する。我々は既に IGF-1 をラットへ全身投与することにより顎骨の成長を促進することを骨形態学的、組織学的に明らかとしてきた。しかしながら、顎骨の加齢に関する IGF-1 の働きについては明らかではない。IGF- の顎骨に対する成長促進作用とともに加齢における作用を解明することにより、顎口腔領域のスマートエイジング効果に関わるような IGF-1 の臨床応用を目指す。

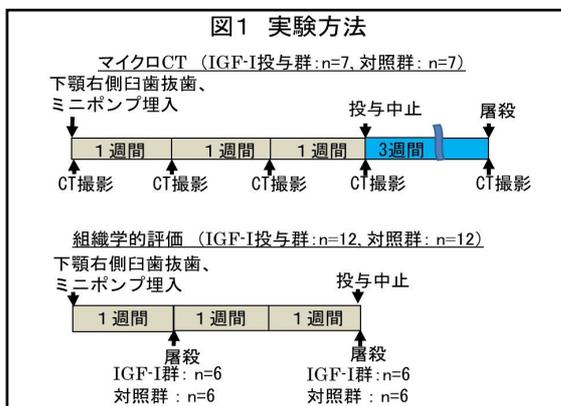
2. 研究の目的

本研究においては、顎骨の歯牙喪失後の歯槽骨に対する IGF-1 の作用を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験動物は 4 週齢雄 Wistar 系ラット (飼育環境: 室温 23、12 時間毎の明暗サイクル、固形飼料および脱イオン水の自由摂取) を用い、イソフルラン吸入およびペントバルビタールナトリウムの背部皮下注射による全身麻酔下にラット下顎右側第一臼歯の抜歯を行い、抜歯モデルを作製した。ヒト IGF-1 製剤を浸透圧ミニポンプにより背部皮下組織から 3 週間持続投与した (IGF-1 投与群: n=19)。一方、対照群には、IGF-1 投与群と同様の方法、期間にて生理食塩水を持続投与した (対照群: n=19)。各群 7 匹ずつは骨形態計測を行うため、抜歯 3 週後の時点で、イソフルラン吸入およびペントバルビタールナトリウム (4mg/100g) の背部皮下注射による全身麻酔下にミニポンプを摘出し、その後さらに 3 週間飼育した。残りのラットは組織学的評価を行うため、IGF-1 投与後 1 週間後と 3 週間後にそれぞれ各群 6 匹ずつを屠殺し、資料とした (図 1)。飼育および実験は東北大学医学部動物実験倫理委員会により承認が得られたプロトコールに基づいて行った。



(2) 骨形態学的評価

各群 7 匹ずつのラットに対し、抜歯直後、1 週後、2 週後、3 週後、6 週後にイソフルラン吸入麻酔下にて、下顎骨のマイクロ CT 撮影を行った (図 1)。撮影は、咬合平面と床を平行の状態ですつ伏せにし、管電圧: 50Kv、管電流: 0.5mA、FOV: 48mm、ボクセルサイズ: 24×24×48 μm、撮影時間: 5.8 分の条件で行った。撮影されたデータは DICOM 形式に変換し、画像構築ソフト OsiriX を用いて、咬合平面および正中矢状面に対して垂直な MPR 画像を作製した。

新生骨面積として、下顎右側第一臼歯抜歯の遠心根相当部を直行する MPR 画像上にて新生骨面積を計測した。

頬側および舌側歯槽骨の高さの変化を調べるため、基準として両側下顎第一臼歯遠心根相当部の下顎管を結んだ線を引き、頬側および舌側の歯槽骨頂からの垂線の長さを測定した。

IGF-1 投与 3 週後の抜歯窩新生骨および抜歯窩以外の既存骨について、歯槽骨の骨濃度 (平均骨濃度、骨濃度最大値、骨濃度最小値) を計測した。

(3) 組織学的評価

抜歯 1 週後 (各群 6 匹)、3 週後 (各群 6 匹) にペントバルビタールナトリウム (4mg/100g) の背部皮下注射による全身麻酔下にて、0.5%ヘパリン含有 0.1M リン酸緩衝液 (PB) 300ML (37~40、pH 7.4) をラット左心室より灌流・脱血した後、0.1M PB で溶かした 4%パラホルムアルデヒド (4) を 400~500mL 灌流し固定を行い摘出した下顎骨を資料として用いた。下顎骨正中中部で左右に分割した後に周囲軟組織を可及的に除去し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液に 48 時間浸漬固定を行った。その後、10%EDTA 溶液 (4、pH7.7) にて 3 週間脱灰し、パラフィン包埋を行った。下顎右側第一臼歯遠心根相当部の 5 μm 冠状切断連続組織切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色、および抗オステオカルシンモノクロナール抗体を用いた免疫組織化学染色を施行した。

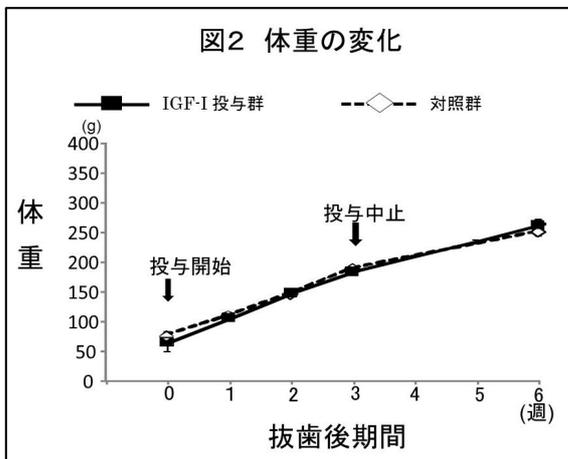
(4) 統計分析

上記の検討項目について、IGF-1 投与群および対照群それぞれの平均値 ± SD を算出した。両群間の平均値の差の検定には non paired-t test を用い、各群それぞれの経時的比較には Tukey-Kramer の HSD 検定を用い、危険率 0.05 未満を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 体重変化

IGF-1 投与群および対照群ともに抜歯後いずれの週齢においても体重の増加がみられた (図 2)。また、いずれの週齢においても IGF-1 投与群と対照群との間に統計学的有意差はみられなかった。



(2) 歯槽骨の形態学的変化

新生骨体積

両群ともに抜歯1週後には抜歯窩に薄い新生骨の形成が認められた。抜歯2週後、3週後と経過するにつれ、抜歯窩は、より高濃度を示す新生骨で満たされるようになった。抜歯6週後には、3週後に比較して、形態的には大きな変化がみられなかったが、新生骨はより高濃度を呈していた(図3)。

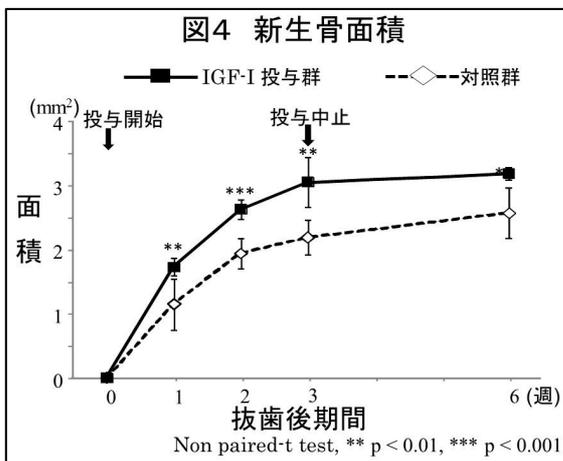
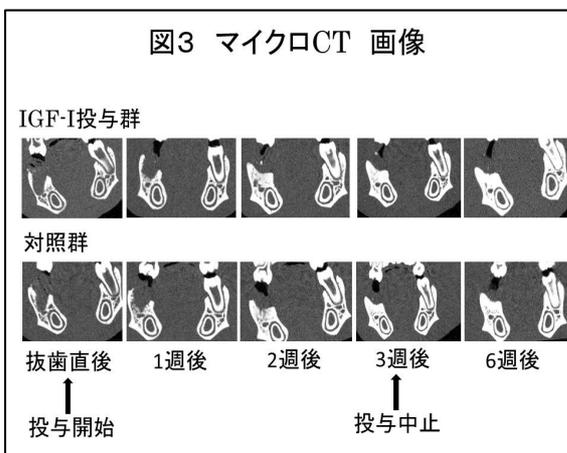


図4に新生骨面積の結果を示す。IGF-1投与群および対照群ともに抜歯3週後までは有意な新生骨面積の増加がみられた。その後、抜歯3週後から6週後にかけては両群ともに増加は少なくなり、抜歯3週後と6週後の間には有意差はみられなかった。また抜歯1

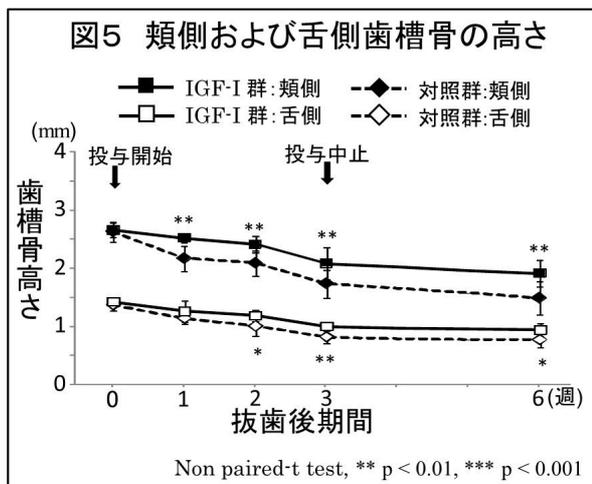
週後以降は、IGF-1投与群は対照群と比較して有意に新生骨体積は大きく、その有意差は投与中止後も引き続いて認められた。

この結果から、IGF-1投与により抜歯後の新生骨形成を促進することが示唆され、抜歯後歯槽骨吸収を防止する効果が期待された。

頬側および舌側歯槽骨の高さ

図5に歯槽骨頂の高さの結果を示す。抜歯後、頬側および舌側歯槽骨頂の高さは両群ともに有意な減少がみられた。その減少量は両群ともに抜歯2週後から3週後までが大きく、抜歯3週後から6週後にかけては両群ともに減少量が少なくなり、抜歯3週目と6週目の間には有意差はみられなかった。IGF-1投与群と対照群を比較すると、頬側歯槽骨頂の高さは抜歯1週後から対照群に比べてIGF-1投与群が有意に高かった。一方、舌側歯槽骨頂の高さは、抜歯1週後はIGF-1投与群と対照群の間に有意差はみられなかったが、抜歯2週後以降では両群間に統計学的有意差がみられ、IGF-1投与群の方が有意に高かった。

この結果からは、IGF-1投与により抜歯後の歯槽骨吸収、特に歯槽骨の高さの減少の抑制効果の可能性があると考えられ、この結果と合わせて、IGF-1投与による歯槽骨の高さと量における歯槽骨吸収を抑制する効果が期待された。

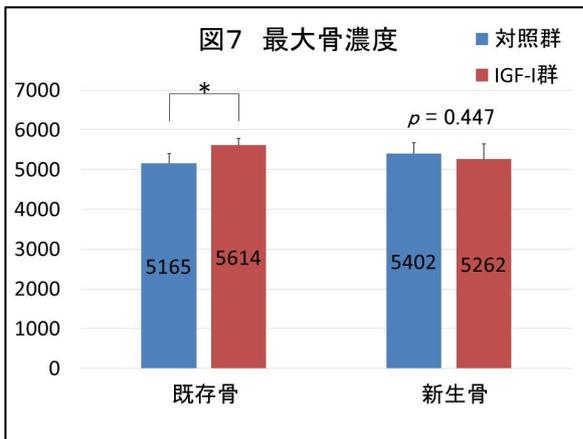
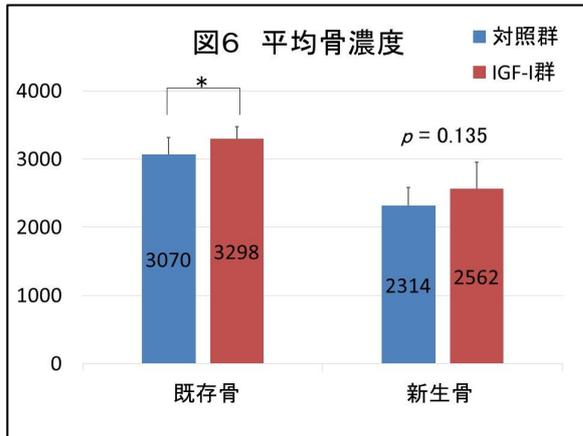


歯槽骨の骨濃度

歯槽骨の平均骨濃度の計測結果を図6、最大骨濃度の計測結果を図7のグラフに示す。新生骨の骨濃度は平均および最大、最小骨濃度いずれにおいてもIGF-1投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。抜歯窩以外の既存骨において、平均骨濃度と最大骨濃度はIGF-1投与群が対照群に比べて有意に高い値を示した。

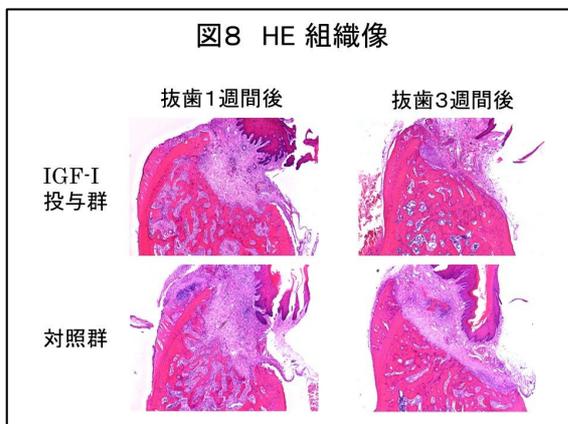
以前の研究および上記の結果から一致した解釈として、IGF-1投与による骨形成では骨量増加(骨形成促進)作用を認め、新生骨自体の骨濃度や強度は既存骨との差は無いことが示唆された。一方、成熟した海

綿骨や皮質骨においては、IGF-1 投与により骨量や骨濃度に増大効果が示された。

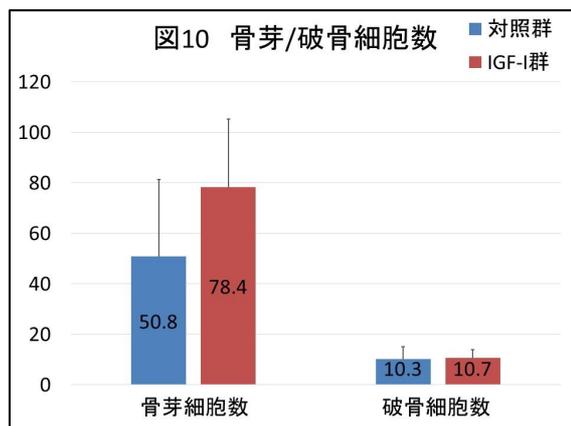
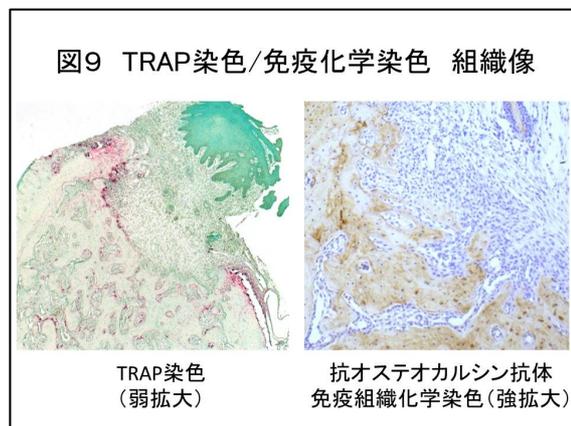


(3) 歯槽骨の組織学的変化

図8にHE染色像の代表例を示す。抜歯1週後の海綿骨は、IGF-1投与群が対照群と比較して密に形成されていた。抜歯3週後では、IGF-1投与群、対照群ともに抜歯1週後と比較して骨基質が密となり、両群の骨基質に明らかな違いはみられなかった。歯槽骨頂の高さについて、抜歯3週後の頬側皮質骨は、IGF-1投与群と比較して対照群で明らかな吸収像が観察された。一方、舌側皮質骨は、頬側皮質骨に比べて、IGF-1投与群および対照群ともに、明らかな骨吸収像は観察されなかった。



(TRAP)染色および抗オステオカルシンモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色の代表例を示す。抜歯窩の骨表面および骨表面近傍の骨基質内にオステオカルシン陽性細胞が多くみられ、骨表面の骨芽細胞またはオステオカルシンを分泌して骨基質内に封入された骨芽細胞と考えられた。統計学的手法では、IGF-1群において骨芽細胞数が増加している傾向がみられたものの、骨表面ではIGF-1群と対照群との間に有意差は認められなかった。骨基質内のオステオカルシン陽性の細胞数を含めた計測や面積を計測する方法によりIGF-1投与の効果をより評価出来る可能性が考えられ、今後検討している。一方、破骨細胞数は、抜歯窩内の突起した骨形態(特に頬側および舌側の残存歯槽骨頂)部に多く認められた。破骨細胞数はIGF-1群と対照群とほぼ同数であり、有意差はみられなかった。以上、本研究内では、骨芽細胞および破骨細胞はともにその数には明らかな群間の差は認められなかったが、その局在に特徴がみられた。追加検討によりその特性が明らかになる可能性があり、今後の課題と考えられた(図9、図10)。



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 1件)

A Kumasaka, M Iikubo, T Nishioka,

図9に酒石酸耐性酸フォスファターゼ

I Kojima, N Shoji, Ma Sakamoto, T Sasano.  
Insulin-like growth factor I inhibits  
alveolar bone loss following tooth  
extraction in rats. Clin Implant Dent  
Relat Res. December;17:1174-1179(2015)  
DOI 10.1111/cid.12227

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小嶋 郁穂 (Kojima Ikuho)

東北大学大学院・歯学研究科・助教

研究者番号：80447169

〔学会発表〕(計 6件)

熊坂 晃, 飯久保正弘, 小嶋郁穂, 庄司憲  
明, 阪本真弥, 笹野高嗣. IGF-1 は抜歯後  
の歯槽骨吸収を抑制する. 第 27 回日本口  
腔診断学会. 第 24 回日本口腔内科学会合  
同学術大会 (2014 年 9 月 18-20 日, 九州  
大学 (福岡))

小嶋郁穂, 阪本真弥, 飯久保正弘, 酒井梓,  
菅原由美子, 佐藤しづ子, 笹野高嗣. シェ  
ーグレン症候群における顎下腺および舌  
下腺の MRI と診断学的意義について 第  
3 報: MR sialography 点状高信号域およ  
び MR 信号強度不均一の診断精度について.  
第 18 回日本歯科放射線学会臨床画像大  
会 (2013 年 11 月 1-3 日, 東京歯科大学 (東  
京水道橋))

小嶋郁穂, 阪本真弥, 飯久保正弘, 酒井 梓,  
菅原由美子, 佐藤しづ子, 笹野高嗣. シェ  
ーグレン症候群患者の唾液腺  
MR-sialography における点状高信号域の  
検出能 3D 法と 2D 法の比較検討 . 第 26  
回日本口腔診断学会・第 23 回日本口腔内  
科学会同学術大会 (2013 年 9 月 13-14  
日, 学術総合センター (東京一ツ橋))

熊坂 晃, 飯久保正弘, 小嶋郁穂, 庄司憲  
明, 阪本真弥, 笹野高嗣. ラット抜歯窩治  
癒に及ぼす IGF-1 投与の効果に関する研  
究. 第 54 回 NPO 法人日本歯科放射線学会  
(2013 年 5 月 31 日-6 月 2 日, 福岡県立も  
もち文化センター (福岡))

小嶋郁穂, 阪本真弥, 酒井梓, 菅原由美子,  
佐藤しづ子, 佐藤恭子, 飯久保正弘, 笹野  
高嗣. シェーグレン症候群における顎下腺  
および舌下腺の MRI と診断学的意義につ  
いて 第 2 報: MRI 所見と安静時唾液分泌  
量との関連について. 第 17 回日本歯科放  
射線学会臨床画像大会 (2012 年 10 月  
25-27 日, グランキューブ大阪 (大阪))

阪本真弥, 小嶋郁穂, 酒井梓, 佐藤恭子,  
菅原由美子, 佐藤しづ子, 飯久保正弘, 笹  
野高嗣. シェーグレン症候群における顎下  
腺および舌下腺の MRI と診断学的意義に  
ついて. 第 53 回日本歯科放射線学会総会  
(2012 年 6 月 1-2 日, いわて県民情報交流  
センター (盛岡))

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)