

論文の内容の要旨

氏名：吉 卷 友 裕

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Systemic and local administration of lactoferrin promotes bone regeneration in non-critical-sized rat calvarial bone defects

（ラクトフェリンの全身投与および局所投与はラット頭頂骨内側性骨欠損の骨再生を促進する）

歯周炎は歯周病原細菌によって引き起こされる慢性感染症であり、歯槽骨の吸収が高度に進行すると歯が喪失する。歯周治療の目的は、失われた歯槽骨をも含めて歯周組織の再生を図ることである。現在、歯周組織再生治療には、歯周組織再生誘導（GTR）法やエナメルマトリックスタンパク質（エムドゲイン）を応用した方法が用いられている。また、インプラント治療ではGTR法を応用した骨再生誘導（GBR）法を用いる場合がある。

ラクトフェリン（LF）は、トランスフェリンファミリーに属する 80 kDa の鉄結合性糖タンパクであり、牛乳や初乳中に多く含まれる。LF は細菌の増殖に必要な鉄を奪うことによって抗菌作用を示すほか、抗炎症作用、鎮痛作用、免疫調節機能など様々な作用を有する。また、LF は未分化間葉系細胞の脂肪細胞への分化を抑制し、全身的な脂質代謝を改善することが知られている。さらに、骨芽細胞への分化、増殖を促進させ、逆に破骨細胞への分化を抑制することで、骨形成を誘導することも知られている。実際、骨粗鬆症のモデルラットおよびマウスに対して LF を作用させると、骨吸収を抑制して骨密度の低下を防ぐことから骨粗鬆症の治療薬としての可能性も示されている。一方、LF はこれまで歯周組織再生や骨再生に応用されてきた線維芽細胞成長因子、血小板由来成長因子および骨形成タンパク質などの成長因子と比較して、安価で、抗原性が極めて低く、安全性も高い物質であると考えられる。これらのことから、LF は新たな骨形成誘導因子として期待が寄せられる。そこで本研究では、LF の骨形成誘導作用に注目し、ラット頭頂骨骨欠損部における骨再生への LF の影響を全身および局所投与下において検討した。

第 1 章では、ラットに LF を全身投与し、ラット頭頂部における骨欠損に対する骨再生への影響を検討した。具体的には、11 週齢の雄性近交系 Fischer ラット F344/jcl 30 匹 (250~300 g) を 12 時間の明暗サイクルおよび恒温・恒湿の環境下で、固形飼料と水道水を自由に摂取させて飼育した。全身状態が良好であることを 2 週間の予備飼育を行って確認した後、ラットを 10 匹ずつ、ウシラクトフェリン (bLF) 100 mg/kg および 10 mg/kg 投与群、対照群として生理食塩水投与群の 3 群に分けた。bLF 投与群のラットには、施術直後から安楽死させるまでの期間中、生理食塩水に溶解した前述量の bLF を 1 日 1 回腹腔内投与した。一方、対照群のラットには等量の生理食塩水を腹腔内投与した。

ラット骨欠損モデルの作製では、予備麻酔としてイソフルラン麻酔を吸入させた後、腹腔内に 0.6 ml/kg のペントバルビタールナトリウムを投与して全身麻酔を施し、頭頂部を剃毛して同部皮下に 1/80,000 エピネフリン含有 2% キシロカインを 0.2 ml 用いて局所浸潤麻酔を施した。実験母地の形成では、頭頂部の矢状縫合に沿って皮膚切開を加え、筋層と骨膜とを剥離して行った。続いて、生理食塩水注水下で頭頂骨の左右に直径 2.7 mm のトレファインバーを用いて骨欠損を形成した。骨欠損部に生理食塩水を含浸させた吸収性コラーゲンスポンジ（テルプラグ）を設置し、その後、骨膜に減張切開を施して骨膜で骨欠損部を可能な限り被覆し、筋層および皮膚を復位して骨欠損部を完全に被覆した。実験期間は 4 週とし、予備飼育と同様の環境下でラットを飼育した。

骨再生の経日的な変化は、全身麻酔下で施術直後（0 週）から 4 週に至るまで、実験動物用 3D マイクロ CT を用いて観察した。撮影条件は、管電圧 90 kV、管電流 88 μ A、照射時間 17 秒、voxel size 30 \times 30 \times 30 μ m とした。

マイクロ CT 断層像の観察と解析は、i-VIEW を用いて 3 軸方向で行い、術後の骨再生を定性的に評価するとともに、骨体積計測ソフトを用いた定量的評価も合わせて行った。定量的評価では、断層像から得られるヒストグラムで、周囲組織と明らかな硬組織（既存骨）、それぞれの放射線吸収のピーク値を求め、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。この値をリファレンスとして、各群とも断層像について骨欠損内の関心領域における新生骨様組織骨量 (mm^3) を測定した。

また、術後 4 週で血液を尾静脈より採取し、血清カルシウム (Ca^{2+}) およびアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を測定し、bLF 投与量の差異による全身への影響を評価した。

組織標本の作製は、術後 4 週のマイクロ CT 撮影および血液採取後に行った。まず、ラットに前述の方法で全身麻酔を施し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて灌流固定を行った。その後、骨欠損部と周囲組織を含む頭頂部組織を採取し、2 週間同固定液に浸漬した。次いで、10% ギ酸に 24 時間浸漬後、通常に従ってパラフィン包埋し、骨欠損の中央部を通る厚さ約 5 μm の前頭方向の切片を作製してヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

組織形態計測では、光学顕微鏡下で撮影した組織像を用いた。各群のヘマトキシリン・エオジン染色標本中の骨欠損内組織を 600 dpi のデジタル画像とし、骨欠損の閉鎖率 (%) を算出した。また、骨欠損内部における新生骨様組織の占有率 (%) を、画像解析ソフトを使用し、組織学的な形態および色調を指標にして求めた再生骨のピクセル数から算出した。骨芽細胞様細胞数は光学顕微鏡下でカウントした。各群の比較には Mann-Whitney U-test を用いて行い、危険率を 5% とした。

マイクロ CT 観察の結果、bLF 投与群および対照群で、術後 2 週から新生骨様組織を示す不透過像が認められ、経日的に増加していく所見が認められた。各群とも、骨欠損の辺縁から新生骨様組織が形成され、4 週で bLF 100 mg/kg 投与群は術後他の群と比べ顕著な形成を認めた。定量的評価では、各群ともに新生骨様組織量は、経日的に増加する傾向を示し、bLF 100 mg/kg 投与群では対照群と比較して術後 1 週から 4 週まで有意に高値であった。血液検査では、血清 Ca^{2+} 濃度は bLF 投与量によって差異は認められなかった。ALP 活性は、bLF 投与量増加によって僅かに上昇する傾向が認められたが、有意差はなかった。骨芽細胞様細胞は、bLF 投与群において、対照群よりも有意に高値であった。また、欠損部の骨閉鎖率および新生骨様組織占有率は、bLF 100 mg/kg 投与群において有意に高値であった。対照群では、既存骨辺縁に僅かな新生骨様組織の形成が見られたが、骨欠損内部は線維性結合組織で満たされていた。以上のことから、頭頂骨欠損ラットモデルに対する bLF の全身投与は、欠損部の骨再生を促進すると示された。

第 2 章では、ラット頭頂骨欠損部に bLF を局所投与し、骨欠損部における骨再生の経日的変化を検討した。ラット 10 匹を用い、飼育条件、ラット骨欠損モデルの作製方法は第 1 章の方法に準じて行った。形成した骨欠損の一方を実験側、もう一方を対照側とし、実験側には bLF 含浸コラーゲンスポンジを、対照側には生理食塩水を含浸させたコラーゲンスポンジを設置した。設置する bLF 含浸スポンジは、濃度 0.5 mg/ μl に調整した bLF を 11 μl 滴下することで、スポンジ内に bLF 量を 5.5 mg 含浸させ、滴下後は 48 時間乾燥させて用いた。骨再生の評価と分析は第 1 章の方法に準じ、新生骨様組織密度 (mg) の定量も併せて行った。統計学的分析は Wilcoxon test を用いて行い、危険率を 5% とした。

マイクロ CT 観察の結果、実験側および対照側で術後 2 週から新生骨様組織を示す不透過像が認められ、これが経日的に増加していく所見が得られた。実験側では術後 4 週で対照側と比べて顕著な骨形成を認めた。定量的評価では、両側ともに新生骨様組織量は経日的に増加する傾向を示したが、実験側の新生骨様組織量は対照群と比較して術後 3 週および 4 週で有意に高値であった。また、新生骨様組織密度は術後 4 週で実験側において対照側よりも有意に高値であった。骨芽細胞様細胞数は実験側で有意に多かった。骨閉鎖率および新生骨様組織占有率においても同様に実験側で有意に高値であった。対照側では、既存骨辺縁に僅かな新生骨様組織の形成が見られ、骨欠損内部は線維性結合組織で満たされていた。

以上の実験結果は、ラット頭頂骨に設けた実験的骨欠損部での骨再生において、全身投与あるいは局所投与した bLF が促進的に作用することを明確に示している。したがって、LF は、いずれの投与方法でも骨形成誘導因子として適用可能と考えられるが、作用範囲、量、頻度などの面でより調節性に優れる局所適用による歯科臨床応用が期待される。