

論文の内容の要旨

氏名：津 徳 亮 成

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Effects of the schedule and dosage of parathyroid hormone on bone regeneration

(副甲状腺ホルモンの投与回数および投与量が骨再生に与える影響)

歯周炎は、歯周病原細菌によって引き起こされる慢性疾患であり、歯槽骨の吸収が高度に進行すると歯が喪失する。しかし、高度に吸収された歯槽骨を再生させる方法は、いまだ確立されていない。

副甲状腺ホルモン (PTH) は骨吸収を促進し、血中カルシウム濃度を上昇させる骨代謝に関連したホルモンである。しかし、PTH を間歇的に投与すると骨芽細胞が増殖し、さらに、骨芽細胞のアポトーシスが抑制され骨形成が促進される。この PTH の間歇投与による骨形成促進作用を利用して、PTH は骨粗鬆症治療薬として広く用いられている。また、最近、PTH を骨欠損部の骨再生に応用させる試みが報告されている。しかし、骨欠損部を効果的に骨再生させるための PTH 投与方法については不明な点が多い。そこで、本研究はラット頭頂骨に作製した臨界骨欠損をモデルにして、効果的な骨再生を促すための PTH 投与量および投与回数について検討した。

12 週齢の近交系 Fischer 雄性ラット F344/jcl 50 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、PTH の投与量と投与回数の異なるラットを各 10 匹 5 群に分けた。すなわち、15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PTH を毎日 1 回投与する PTH-15 群、35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を週 3 回投与する PTH-35 群、105 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を週 1 回投与する PTH-105 (週 1 回) 群、105 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を週 3 回投与する PTH-105 (週 3 回) 群および生理食塩水を投与する対照群とした。

ラット臨界骨欠損モデルの作製では、まず、イソフルラン吸入後、3 種混合麻酔薬 (塩酸メドミジン 0.15 mg/kg, ミダゾラム 2.0 mg/kg および酒石酸ブトルバノール 2.5 mg/kg) を腹腔内投与することによって全身麻酔を施し、頭頂部を剃毛し同部皮下に 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。次いで、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、生理食塩水注水下で頭頂骨の右側に直径 5.0 mm のトレファインバーを用いて臨界骨欠損を形成した。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 28 日とし、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 日) から 28 日間、7 日毎に実験動物用 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 μA , 照射時間 17 秒、および voxel size 30 \times 30 \times 30 μm 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併せて行った。定量的評価では、断層像から得られるヒストグラムで、明らかな硬組織 (既存骨) と周囲軟組織、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、術直後から連日 7 日間尾静脈から血液を採取し、血清カルシウム (Ca^{2+}) 濃度およびアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を測定し、PTH の全身への影響を検討した。

組織標本の作製は、術後 28 日のマイクロ CT 撮影後に行った。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 日間同固定液に浸漬した。次いで、10% EDTA に 3 週間浸漬後、通法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。

組織形態計測には、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、骨欠損部の閉鎖率 (%) および骨欠損部の当初辺縁部における任意の 4 点で骨芽細胞様細胞をカウントしてその平均値を求めた。各群の統計学

的分析には Kruskal-Wallis 検定を用いて、危険率を 5% で行った。

血液検査の結果、血清 Ca^{2+} 濃度は PTH 投与群および対照群の間に差は認められなかった。また、ALP 活性は、PTH 投与量が増加するのに伴って僅かに上昇する傾向が認められたが、PTH を投与した各群間に有意差は認められなかった。

マイクロ CT 観察の結果、PTH 投与群および対照群で、術後 14 日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。術後 21 および 28 日で PTH 投与群では対照群と比べ明らかな不透過像の充進が認められた。定量的評価では、すべての群で新生骨様組織形成量が経日的に増加する傾向を示した。術後 21 および 28 日では、対照群と比較して PTH 投与群の骨形成量が有意に増加した。術後 21 日では、PTH を投与した各群間の骨形成量に有意差は認められなかった。しかし、術後 28 日で PTH-105 (週 3 回) 群は PTH-15, PTH-35 および PTH-105 (週 1 回) 群と比較して有意に大きな骨形成量を示した。

組織学的観察では、PTH 投与群は対照群と比較して骨欠損部の閉鎖傾向が明瞭であった。PTH を投与した各群間の比較では、PTH-15, PTH-35 および PTH-105 (週 1 回) 群の骨欠損部の閉鎖率は約 40% であったのに対して、PTH-105 (週 3 回) 群の閉鎖率は約 70% であった。PTH 投与群の骨芽細胞様細胞数は、対照群に比較して有意に多かった。とくに、PTH-105 (週 3 回) 群では、PTH-15, PTH-35 および PTH-105 (週 1 回) 群と比較して有意に多くの骨芽細胞様細胞が認められた。

以上のことから、PTH の間歇投与では、ラット頭頂骨の臨界骨欠損の骨再生は、投与した PTH の累積総量依存的に促進することが判明した。また、投与期間内の投与累積総量が同じであれば少ない投与回数でも同レベルの骨再生を期待できる可能性が示唆された。