

氏名 香 川 智 正

授与した学位 博 士
専攻分野の名称 歯 学

学位授与の番号 博 甲 第 2315 号

学位授与の日付 平 成 14 年 3 月 25 日

学位授与の要件 歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)

学位論文題名 ラット頭蓋骨骨延長における骨形成過程の組織学的観察

論文審査委員 教授 杉本 朋貞 教授 山本 敏男 教授 山本 照子

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

骨延長術は少ない侵襲で骨の大きな変形の治療ができる利点があり、近年頭蓋顎顔面領域でも臨床応用が始まっている。骨延長における骨形成機構については長管骨を用いた研究がされているが、頭蓋骨延長時の骨形成についてはモデルの作製が困難であるため詳細は不明である。本研究ではラット頭蓋骨骨延長モデルを確立し、骨延長における骨形成機構を組織学的に観察することを目的とした。

【方法】

SD ラット(8 週齢♂40 匹)を使用した。頭蓋骨の冠状縫合に直交するように組織埋入型骨延長装置を装着し、冠状縫合上を骨切りした。骨延長は術後 8 日目より 0.4 mm/日の割合で 1 週間、合計 2.8mm 行った。対照として無処理のものと骨切りのみで骨延長しないものを用いた。材料採取は術後 3,7,10(延長 3 日目),14(延長 7 日目),28(保定 14 日目),42 日目(保定 28 日目)に行い、マイクロ CT, 光顕, 電顕で観察した。また免疫組織化学的に I, II 型 collagen, PCNA, BMP-2,-4, オステオポンチン(OPN), オステオカルシン(OC)の検出, 酵素組織化学的に酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ(TRAP)活性の検出を行った。

【結果】

マイクロ CT で骨形成過程を観察すると、延長ギャップでは島状に、骨断端からは添加的にそれぞれ骨形成が生じ、しだいにギャップが新生骨で埋められていった。

組織学的に観察すると、無処理の骨膜は骨形成層と線維層からなっていた。BMP-2 は骨芽細胞とその外側の細胞, BMP-4 と PCNA は骨芽細胞外側の細胞が陽性を呈していた。OPN と OC は骨芽細胞に陽性であった。硬膜は骨芽細胞とその外側の 3~4 層の扁平な細胞からなり、BMP-2,-4, PCNA, OPN, OC は陰性であった。

術後 3 日目では骨膜は剥離操作により損傷し、骨膜部と骨切りで生じたギャップには血腫が認められた。硬膜の細胞は増殖し、骨表面に新生骨の添加が認められた。骨芽細胞は BMP-2, その外側の細胞は BMP-2,-4 および PCNA 陽性を呈するようになった。OPN, OC は骨芽細胞が陽性を呈するようになった。

術後 7 日目には、骨膜からも骨形成が見られるようになり、骨芽細胞は OPN, OC 陽性

を呈し、その外側には BMP-2,-4, PCNA 陽性を示す紡錘形の細胞が出現した。新生骨は I 型 collagen 陽性, II 型 collagen 陰性で軟骨の形成はみられなかった。骨断端を電顕で観察すると電子密度が高く、且つ OPN 陽性となり、近傍に細胞質に富む細胞が多く認められるようになった。

骨延長開始後 3 日目(術後 10 日)を観察すると、骨断端に連続した骨形成とギャップ内に島状の骨形成が観察され、周囲の骨芽細胞は OPN, OC 陽性を呈した。ギャップ内には線維芽細胞様細胞が分布した。

骨延長開始後 7 日目(術後 14 日)では、骨膜、硬膜の細胞はさらに増殖し各部位の新生骨は増大した。ギャップ内の線維芽細胞様細胞は密に分布し、延長方向に伸長して配列していた。この細胞は BMP-2,-4, PCNA 陽性を呈していた。TRAP 活性陽性を示す破骨細胞が新生骨周囲に認められるようになった。

骨切りを行い骨延長をしなかった対照群の術後 14 日目を観察すると、骨膜、硬膜の細胞の顕著な増加は認められなかった。ギャップ内の細胞の配列には規則性がなく疎に分布し、BMP, PCNA はほぼ陰性であった。

保定 14 日目(術後 28 日目)になると、骨膜と硬膜は術前と同様の組織像を呈し、免疫組織化学的反応性も同様であった。

【考察】

本研究では新たに骨延長装置を設計し、ラット頭蓋骨骨延長実験を行った結果、骨形成が観察されたので骨延長における骨形成過程を調べるうえで有効なモデルが確立された。

頭蓋骨骨延長における骨形成過程を経時的に観察すると、新生骨は骨膜、硬膜、延長ギャップのいずれからも形成されるが、骨形成の開始時期と形成機序に差が認められた。これは手術による各部位の損傷程度、再生修復能、再生修復過程の差異によるものと考えられる。骨膜が剥離された既存の骨表面ならびに骨断端における新生骨の添加に際しては、骨表面が OPN 陽性を呈するようになり、その後骨芽細胞ないし前骨芽細胞が骨基質に接触し骨形成がみられた。このことから OPN は骨形成系細胞の骨基質への接着に関与していることが示唆された。新生骨の形成に先立って BMP 陽性細胞が出現し、その後骨が形成されたので、骨形成系細胞の分化に BMP の関与が示された。ギャップ内の細胞においては、BMP-2,-4 は延長力を加えている間持続的に発現し、加えない場合は僅かであった。したがって骨延長における骨形成には、延長中持続的に誘導される BMP-2,-4 が関与していることが示唆された。長管骨骨延長では、延長の初期に軟骨内骨化、後期に膜内骨化が認められると報告されているが、頭蓋骨骨延長による骨形成は膜内骨化によることが示された。

論文審査結果の要旨

骨延長術は少ない侵襲で骨の大きな変形の治療ができる利点があり、頭蓋顎顔面領域でも臨床応用が行われているが、骨延長における骨形成機構については実験モデルの作製が困難であるため詳細は不明である。本研究はラットを用いた頭蓋骨骨延長モデルを確立し、骨延長における骨形成機構を組織学的に検索したものである。

得られた結果は次のようなものである。骨形成過程を検索するうえで有効な実験モデルが確立された。頭蓋骨骨延長においては、新生骨の形成は骨膜、硬膜、ギャップ内の各部位から生じるものの、手術による各部位の損傷程度、再生修復能、再生修復過程の差異によって骨形成の開始時期、骨形成過程が異なっていること、また頭蓋骨骨延長では膜内骨化による骨形成が進行する。骨形成系細胞の分化および延長中の継続的な骨形成には骨延長力の負荷、すなわちメカニカルストレスにより持続的に誘導される BMP-2,-4 の関与が示された。損傷を受けた骨表面への骨形成系細胞の接着には骨基質表面のオステオポンチンが関与することがわかった。

組織学的検索が容易で実験動物として汎用されるラットを用いた頭蓋骨骨延長モデルを初めて確立し、頭蓋骨骨延長における骨形成過程を組織学的に明らかにしたことは、頭蓋骨骨延長の研究にとって重要であり、今後の基礎的・臨床的研究を発展させるうえで基盤となるものである。

よって本研究論文は博士(歯学)の学位論文に値するものと認められた。