

論文内容要旨

若年齢および成熟マウスにおける高気圧酸素療法が骨再生へ及ぼす影響について

主指導教員：谷本 幸太郎教授
(医系科学研究科 歯科矯正学)

副指導教員：加来 真人教授
(医系科学研究科 生体構造・機能修復学)

副指導教員：柴 秀樹教授
(医系科学研究科 歯髓生物学)

泉野 尋

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

高気圧酸素療法 (HBO) とは、大気圧より高い気圧環境の中で、酸素を吸入することにより病態の改善を図ろうとする治療のことで、チャンバー内で2絶対気圧以上の圧力下にて100%酸素を1時間以上吸引する治療法と定義されており、放射線性骨壊死や糖尿病性壊疽、減圧症や急性一酸化炭素中毒などの治療法として用いられている。近年、HBOは創傷部位における新生骨の形成を促すことで骨折や骨移植時の治癒促進に有効であるとされており、動物実験では、成熟したウサギの頭頂骨に自然に治癒が生じない大きさの骨欠損に対してHBOを行った群では骨再生量が増加したことが報告されている。しかしながら、若年齢の生体に対するHBOの効果については未だ明らかになっていない。そこで本研究では、HBOが若年齢および成熟マウスの頭蓋骨欠損部の骨再生に与える影響を比較するとともに、治癒促進のメカニズムを探索することとした。また、骨再生は血管新生と密接に関連しており、HBOにより血管新生が促進されることが考えられている。しかしながら、血管新生の誘導因子として知られるvascular endothelial growth factor (VEGF)の発現はHBOにより低下することが報告されていることから、我々はbasic fibroblast growth factor (bFGF)の発現が血管新生に関与していると仮説をたて、検討を行った。また、VEGFの発現に影響を及ぼすとされているHIF1- α の発現に及ぼすHBOの影響について検討を行った。

実験1では実験動物を用い、HBOの骨再生および血管新生へ与える影響を検討した。3週齢および32週齢のC57BL6Jマウスの頭蓋骨に3種混合麻酔下にて自然治癒が生じないとされる直径6.0 mmの骨欠損部をトレフィンバーにて作製し、HBO群と対照群とに分類した。HBO群は2.5絶対気圧の圧力下にて100%酸素中に90分間曝露する過程を週5回12週間行った。対照群は同期間ゲージ飼育のみを行った。マイクロCTを実験開始4週後以降2週毎に撮影し、3次元再構築ソフトウェアZedView、3次元データ処理ソフトウェアRapid Form、3次元データモデリングソフトウェアFree Formを用いて再生骨体積の計測を行った。次に、再生骨周囲に出現する血管について7日ごとに毛細血管血流スコープB scan-zにて撮影し、画像処理ソフトウェアimage jを用いて血管面積を測定し、2群間の比較を行った。また、HBOによる骨欠損部周囲における血管新生に及ぼすメカニズムを検討するため、再生骨周囲の滲出液をペーパーポイントを用いて回収し、滲出液中のVEGFおよびbFGFのタンパク発現量をELISA法にて検討した。さらに、組織学的観察として、実験開始12週後に実験動物の屠殺を行い、厚さ7 μ mの前頭断連続パラフィン切片を作製し、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)染色による破骨細胞数の計測と再生骨面積の比較を行った。

実験2ではHBOによる骨芽細胞の骨分化および血管新生促進メカニズムの解析をMC3T3-E1細胞を用いて行った。MC3T3-E1細胞をHBOに曝露させ、ALP染色、アリザリン染色およびALP定量、カルシウム定量を行い、対照群との比較を行った。次にオステオカルシン、I型コラーゲン、VEGF、bFGF、HIF1- α の遺伝子発現に与えるHBOの影響について定量PCR解析を行った。また、HBOによる骨芽細胞のATP合成量へ与える影響をルミノメーターを用いて検討した。この結果より、以下のことが明らかになった。

1. 若年齢、成熟マウスともに HBO によりマウス頭蓋骨欠損部周囲の骨再生が有意に促進された。また、若年齢マウスでは成熟マウスと比較して早期の段階から骨再生の促進が認められた。HBO により骨欠損部周囲の VEGF の発現は HBO 曝露から早い時期に有意に減少していたが、bFGF の発現は有意に亢進した。再生骨面積および再生骨周囲の破骨細胞数は HBO の曝露により有意に増加した。
2. MC3T3-E1 細胞への HBO 曝露によりオステオカルシン、I 型コラーゲン、bFGF の遺伝子発現は有意に亢進した。また、VEGF、HIF1- α の遺伝子発現は HBO により有意に減少し、MC3T3-E1 細胞の ATP 合成量は HBO により有意に亢進した。

以上の結果から、HBO は骨再生能力を促進させ、その効果は若年齢であるほどより早期に現れることが示された。また、HBO は血管新生を促進させるが、HBO 曝露初期では VEGF の代わりに bFGF が作用している可能性が示唆された。