

骨形態制御機構の解明

—元素レベルから器官レベルまで—

新潟大学歯学部 歯学部長 小澤英浩

本研究課題の目的と意義

骨は石灰沈着より形成される剛体である。しかし、骨組織は加齢現象や内外の環境変化に応じてダイナミックに形態変化する。骨組織の形態変化は、歯科臨床領域においては歯科矯正や顎骨延長術などに応用される一方、病的変化である骨粗鬆症や変形性関節症は、咬合・咀嚼機能の低下、顎関節の変形、義歯の不安定化などの障害を招き、超高齢化社会においては生活の質 (quality of life) や生産性を低下させるため、大きな社会的な問題となっている。したがって、骨の形態変化の機序を検索することは、歯・医学の急務である。

しかし骨の形態は、構成細胞である骨芽細胞、骨細胞と破骨細胞のバランスや、軟骨、血管、神経、腱などの周囲組織との協調関係によって維持されると推測されているものの、年齢や環境、あるいは種差によって骨組織の形態が多様化する機構は未知である。

本研究の目的は、石灰化骨基質の形成・維持機構を微細形態学的・組織細胞化学的に元素・分子レベルで解析し、さらに加齢現象、内外の環境変化、種差による形態変化あるいは分子細胞学的変化を検索することにより、骨組織の形態制御機構を解明し、骨組織の根本的理解を図ることである。その為、本研究においては(A)石灰化骨基質の形成・維持機構の解明、(B)加齢現象および内外の環境変化に伴う形態変化の解析を試みる。

(A)においては、現有している最新の分析電顕である電子エネルギー損失分光電子顕微鏡 (EELS) と、当研究室が開発に成功した石灰化結晶単離法を発展させて、長年の懸案である石灰化の分子機構とそれらの細胞制御を解明する。さらに、今まで余り注目されていなかった骨組織の神経、血管、腱等を細胞組織化学的に検索し、総合的に考察する。(B)においては(A)での情報をもとに、加齢や機械的刺激を含む様々な要因に対する骨組織の形態変化を検索する。さらに(A)(B)から得られた情報を統合することにより、骨形態が有する意義を理解し、骨組織の形態制御機構を解明する。

本研究により、多様かつ複雑な骨形態の役割が明らかとなると同時に、骨粗鬆症や変形性関節症、あるいは骨折などの外傷の治療、腫瘍性疾患や先天性疾患による骨欠損の再建にも、貴重な情報を与えると思われる。

各研究計画の成果および進行状況

研究計画の成果および進行状況に関しては、申請時の研究計画に対応させて、現時点での研究成果を以下に記載した。

(A) 石灰化基質形成・維持機構の解明

【目的】 非石灰化組織である皮膚や腱などを骨と比較すると、微細形態には共通点が多く、ともにI型コラーゲンやプロテオグリカンを基調とした細胞外基質に囲まれている。一般に細胞外液は石灰化結晶であるヒドロキシアパタイトに対しては過飽和であることが知られているが、共通した細胞外基質を有しているにも関わらず、骨や歯のみに石灰化が生じる機構は依然、未知である。本研究の目的は、分子レベルで元素マッピングができるエネルギーフィルター透過型電子顕微鏡(EFTEM)と免疫電子顕微鏡の手法を導入し、生物学的石灰化における分子機構を解明することである。

【材料と方法】 胎児期19.5日齢ラット頭蓋骨を、アルデヒド化学固定し、一部の試料は4.13%EDTAで脱灰した。組織学的観察には、Azan染色あるいはvon Kossa染色を用いた。微細形態学観察にはEFTEMであるCarl Zeiss 902Aを用いた。微細構造の組成同定のため、Cuprolinic blueによるプロテオグリカンの電顕的局在、あるいは特異的結合蛋白によるヒアルロン酸の電顕的局在、デコリン、コンドロイチン4-硫酸の免疫電顕的局在、アルカリ性ホスファターゼの酵素あるいは免疫電顕的局在を検討した。さらに、Carl Zeiss 902Aを用いて、石灰化の主要元素であるカルシウム(Ca)、リン(P)あるいは窒素(N)などの元素分析を行うとともに、Kontron社製の解析ソフトあるいは富士フィルム社製のイメージングプレートおよび解析ソフトを用いて、これらの元素のマッピングを行った。

【結果と考察】 ラット胎仔頭蓋骨では、基質小胞内での結晶析出から、石灰化球の形成、コラーゲン性石灰化による広範な石灰化基質の確立にいたる一連の過程が観察できる。非石灰化部位である類骨においては約640nmの周期構造を有する直径40nm程度のI型コラーゲン細線維が観察され、その周囲にはコラーゲン結合性のデコリンあるいは遊離型のヒアルロン酸の線維構造が網目状に存在していた。この部位では、CaとPの局在パターンは、異なっているように思われた。石灰化が始まる基質小胞の膜にはアルカリ性ホスファターゼが局在し、これら小胞には結晶を含まない小胞でもCa・P両者の集積が観察された。基質小胞由来の石灰化球が形成されると、石灰化球の結晶や結晶間隙の電子密領域にもCa・Pの共局在が見られ、そこにはアルカリ性ホスファターゼと断片化されたプロテオグリカンの局在が観察された。結晶表面には、酢酸ウラン・クエン酸鉛の電子染色で染色される結晶鞘が存在しており、その部位には、Nの明らかな集積は見られなかった。この段階では、コラーゲン細線維は周囲からデコリンが脱却し、コラーゲン細線維同志の癒合が起こり径が200nm以上に増大した。さらにアルカリ性ホスファターゼと断片化したプロテオグリカンが局在する部位を前線としてCa・Pが共在する石灰化領域が拡大し、最終的に、広範な石灰化基質が形成された。

非石灰化部位では、CaとPの局在パターンが異なっており、両元素の共在は認められなかった。プロテオグリカンはCaと親和性が高く、また、コラーゲンはリン酸蛋白と結合している可能性があるため、Caは主にプロテオグリカんに、Pは主にコラーゲン細線維に局在している可能性が推測された。石灰化結晶が認められない基質小胞にもCa・Pの集積があることから、基質小胞には特異的なCa・P集積機構が存在することが示唆された。類骨におけるコラーゲン細線維周囲のプロテオグリカンは、おそらく骨芽細胞あるいは基質小胞が分泌する蛋白分解酵素によって断片化されて石灰化球に集積する一方、保持されていたCaは、同じく石灰化球に局在するアルカリ性ホスファターゼにより形成されるPと結合して、石灰化球の増大に関与するものと考えられた。また、コラーゲン細線維からのデコリン脱却は、石灰化結晶の成長に対し抑制的な作用を有するプロテオグリカンを除去するとともに、コラーゲン細線維同志の癒合による空間の供給を介して石灰化球増大を促進すると思われた。

析出した結晶表面にはNを含まない、おそらくは非蛋白性の有機成分が局在し、結晶鞘を形成していた。この結晶鞘は結晶と密接な関係を保っていることから、これらの非蛋白性の結晶鞘が石灰化結晶形成・成長の制御を担っているものと推測された。

従って、非石灰化部位ではCaが主にプロテオグリカんに、Pがコラーゲン細線維に局在し、局所のイオン積の上昇を抑制するとともに、石灰化進行部位では断片化されたプロテオグリカンやアルカリ性ホスファターゼがCaとPの共在化を促し、おそらくは非蛋白性の有機質より構成される結晶鞘の制御により、石灰化結晶が析出すると推測された。(実験終了、現在論文投稿中)

(B) 加齢および内外の各種変化に伴う骨形態変化の検索

1) 加齢および卵巣摘出によるラット下顎頭の骨代謝変化

【目的】 高齢化社会を迎え、我が国では閉経後骨粗鬆症の罹患率上昇が大きな問題となっており、歯科臨床の場においても骨粗鬆症と顎骨動態との関連性を明らかにする必要性が高まってきている。近年、ヒトの顎骨を対象とした研究が多数行われているが、残存歯数や義歯の装着状態といった顎骨に機能的な影響を及ぼす環境因子に個人差が大きく、未だ全身の骨粗鬆症と顎骨との関係は明らかになっていない。しかしながら、腰椎骨密度の低い人に、顎機能異常の症状が多いという報告や、高齢者における下顎頭の変形が男性より女性に多いとの疫学的報告があり、閉経後のエストロゲン欠乏と顎関節の異常との間に何らかの相関関係があることが予想される。そこで本研究では顎関節の骨組織がエストロゲン欠乏の影響をどのように受けるのかを明らかにするために、卵巣摘出ラットの顎関節部の骨代謝動態について、共焦点走査型レーザー顕微鏡を用いた骨形態計測学的手法により解析した。

【材料と方法】 実験には64匹の120日齢Fischer系雌性ラットを用い、無作為に2群に分け、全身麻酔下、両側卵巣摘出術 (Ovariectomy ; OVX)、または偽手術 (Sham surgery ; Sham) を施した。テ

トラサイクリン・カルセインによる二重骨標識を行い、術後7、14、30、60日後に各群8匹ずつを全身麻酔下で緩衝4% paraformaldehydeにて灌流固定した。また対照群として6匹を実験の開始時点で手術を行わずに固定した。全てのラットの下顎頭部を未脱灰のまま Villanueva bone stainにて染色し、MMA樹脂に包埋した。その後、ブロックを片面研磨し、下顎頭中央部矢状断面の前後の中央領域(750 μ m \times 870 μ m)を共焦点走査型レーザー顕微鏡で観察し、画像解析装置にて骨形態計測を行った。解析は軟骨に接している軟骨下顎領域とその下の中央領域に分け、個々にパラメーター値(骨量、各個骨髄腔量、破骨細胞数、吸収面、骨石灰化面、骨形成速度、骨代謝回転インデックス)を算出して統計学的に有意差判定を行った。

【結果と考察】 Sham群では週齢が増すにつれ、下顎頭の軟骨下領域、中央領域とも、骨量が増加し、骨髄腔が狭窄した。これは齧歯類特有の咀嚼によるメカニカルストレスが下顎頭に常に負荷される為、成長期以降も持続的に骨形成が活性化されている結果と考えられる。

一方、OVX群の下顎頭では、軟骨下領域において術後7日目に骨吸収の著明な亢進と骨形成の抑制が認められ一時的に骨量が減少した。下顎頭中央領域では、14日目に骨吸収活性が最高値となり、30日目には骨吸収優位の高骨代謝回転を呈し、それ以降、Sham群に比べ骨領が有意に低値を示した。軟骨下領域では、中央領域よりも卵巣摘出後早期に骨吸収が亢進したが、これは、軟骨下領域では破骨細胞がより多く存在し、それらの破骨細胞が卵巣摘出直後に骨吸収を開始したためと考えられる。この所見では、破骨細胞の多い海綿骨領域ほど、卵巣摘出の影響が早く現れるという長管骨での報告と同様の結果が示された。

週齢が増すにつれて、OVX群の下顎頭中央領域の骨領はSham群に比較し有意に低値を示すようになったが、骨領そのものは増減せずほぼ一定であった。しかしながら、隣接する骨髄腔同志は互いに連結して大きな骨髄腔を形成し、骨構造は大きな変化を示した。この現象は骨量の連結性の減少とも解釈することができ、下顎頭部の骨量強度を減少させる一因となる可能性を示唆している。また、連結した大きな骨髄腔は下顎頭前方領域よりも後方領域に著明に認められた。これは、ラットの咀嚼運動において下顎頭前方部と後方部にかかるメカニカルストレスの大きさが異なる事に起因すると考えられる。すなわち、下顎頭前方部ではエストロゲン欠乏による影響よりも、咀嚼時の咬合により負荷されるメカニカルストレスにより骨形成が優位であることの表れであり、一方、下顎頭後方領域ではメカニカルストレスが小さく卵巣摘出による骨吸収亢進の影響が直接的に表れたものと考えられる。

本研究において、下顎頭の骨代謝動態はエストロゲンによる全身的な調節とメカニカルストレスによる局所での調節を受けており、それらが相互に作用し合うことによって部位による反応性の違いを生じ、下顎頭全体の骨量および骨構造の維持改変が行われていることが明らかとなった。(Bone 25:339-347, 1999)

2) 卵巣摘出ラットした顎頭に対するヒト副甲状腺ホルモン (1-34) 間欠投与の効果

【目的】 近年、我が国では高齢者社会を迎え、閉経後骨粗鬆症が社会問題の一つとなっている。顎顔面領域においても、エストロゲン欠乏による骨粗鬆症が生じる可能性が指摘されており、我々も卵巣摘出ラット下顎頭の骨量が偽手術ラットの骨量と比較して低値を示すことを明らかにしてきた。一方、副甲状腺ホルモン (PTH) を間欠的に投与すると椎骨や長管骨では骨量増加作用が認められており、骨粗鬆症の治療法として注目されている。本研究では、エストロゲン欠乏によって生じる下顎頭の骨量低下現象を改善することを目的として、卵巣摘出ラットに対し予防的・治療的PTHの間欠投与を行い、その効果と投与方法について骨形態計測法を用いて比較検討した。

【材料と方法】 6ヶ月齢のFischer系雌性ラット55匹に、卵巣摘出術を施し溶媒のみを投与する群 (卵巣摘出群)、偽手術を施し溶媒のみを投与する群 (偽手術群)、卵巣摘出術を施し週1回PTHを6 μ g/kgの用量で投与する群、卵巣摘出術を施し週1回PTHを60 μ g/kgの用量で投与する群、卵巣摘出術を施し週3回PTHを20 μ g/kgの用量で投与する群に分け、各群について予防的投与実験では術直後より、治療的投与実験では6ヶ月間無処置にて飼育した後、6ヶ月間に亘り溶媒またはPTHを間欠投与した。投与期間終了4日前にカルセインによる骨標識を行い、全身麻酔下にて屠殺し下顎骨を摘出した後、軟X線写真を用いた下顎頭骨髓腔面積の算出と共焦点レーザー顕微鏡を用いた骨形態計測を行った。

【結果と考察】 予防的投与実験 (術後6ヶ月) における卵巣摘出群の下顎頭骨量は、偽手術群の下顎頭骨量に比較して有意に低値を示した。治療的投与実験 (術後12ヶ月) においても卵巣摘出群の骨量は、偽手術群の骨量に比較して有意に低値を示したが、両実験における卵巣摘出群と偽手術群の骨量差は、ほぼ同値であった。すなわち、卵巣摘出ラット下顎頭の骨量は術後6ヶ月以内に偽手術群の骨量と比較して有意に低値を示すようになり、その骨量差は術後6ヶ月から12ヶ月までの間ほとんど変化しないことが明らかとなった。

予防的投与実験において、卵巣摘出直後よりPTHを間欠投与したラット下顎頭の骨量は、溶媒のみを投与した卵巣摘出群の骨量と比較して高値となった。すなわち、卵巣摘出後、下顎頭骨量が偽手術群と比較して低値を示すようになる時期にPTHを間欠的に投与し骨量減少を予防する方法は有効であることが示された。また治療的投与実験において、卵巣摘出後6ヶ月間無処置にて飼育した後PTHを間欠投与したラット下顎頭の骨量は、溶媒のみを投与した卵巣摘出群と比較して高値となった。従って治療的投与方法を用いた場合でも、エストロゲン欠乏により既に減少した骨量を偽手術群と同程度までに回復できることが示された。

骨形成の指標として骨石灰化面を測定した結果、両実験におけるPTH投与群の骨石灰化面は、溶媒のみを投与した卵巣摘出群の骨石灰化面と比較して有意に高値となった。一方、PTH投与群の吸収面は卵巣摘出群と比較して低値を示した。これらの事より、卵巣摘出ラットの下顎頭骨量低下現象に対し予防的および治療的にPTHを間欠投与すると、骨吸収を活性化させることなく骨

形成が亢進することが明らかとなった。

このPTH間欠投与による骨量増加作用について投与用量および頻度の関係について見ると、両実験系において、PTHを週3回20 μ g/kgで投与したラット下顎頭の骨量は、他の用量および頻度（週1回6 μ g/kg、週1回60 μ g/kg）でPTHを投与したラット下顎頭の骨量に比較して有意に高値を示し、偽手術群とほぼ同程度まで骨量が維持・回復していることが示された。PTH週3回20 μ g/kgと週1回60 μ g/kgを投与する方法を比較すると、週当たりの投与用量は同じで、投与頻度のみ異なることから、卵巣摘出ラット下顎頭における骨量増加作用には投与用量より、投与頻度がより強く影響するものと考えられる。

以上より、卵巣摘出群の下顎頭骨量が偽手術群の骨量よりも低下する時期にPTHを間欠投与し骨量の減少を予防する方法は有効であり、かつ、一旦骨量が減少してしまった状態でもPTHを間欠投与すれば骨量が回復することが明らかとなった。またPTHを週3回20 μ g/kgの用量で投与したラット下顎頭の骨量は偽手術群とほぼ同様の値を示しており、この投与方法が卵巣摘出ラット下顎頭の骨量維持、回復に有効であると考えられる。これらのことから、卵巣摘出ラットの同様にヒト顎関節部にエストロゲン欠乏による骨粗鬆症状態が生じた場合においても、予防的・治療的な副甲状腺ホルモンの間欠投与は有効である可能性が示唆された。(J Bone Miner. Metab. 18:9-17, 2000)

3) インプラント骨窩洞形成時の侵襲が修復過程および骨改造減少に及ぼす影響

【目的】 インプラント植立に関する組織学的研究のほとんどがインプラント体と骨との界面を観察しているものであり、このためインプラント体の周囲に新生骨が形成されることで治癒したとみなされることが多い。しかし、実験動物や臨床でインプラント除去に至ったケースにおいて、インプラント窩洞に沿って空虚な骨小腔が残存していることが報告されている。すなわちインプラント周囲の新生骨と既存骨との境界部に、窩洞形成時の傷害により形成された病的な骨基質が残されたままになっている可能性がある。したがってインプラント治療の治癒過程を知るためには、窩洞形成時に傷害された既存骨がインプラントの予後に及ぼす影響を、長期にわたって観察する必要があると思われる。そこで今回は、骨窩洞形成時の侵襲が治癒過程および既存骨の骨改造現象にどのような影響を及ぼすかを明らかにする目的で、骨窩洞形成時の侵襲条件を変え、その治癒過程を長期にわたって組織学的、組織化学的に検索した。

【材料と方法】 5週齢のWistar系ラットを用い、頰骨・腓骨癒合部に骨欠損窩洞を骨髓に達しないように形成した。骨窩洞形成時の侵襲条件を変えるために、生食を注水しながら窩洞を形成した群（注水群）、生食の注水なしで窩洞を形成した群（無注水群）、生食を注水しながら窩洞を形成したのちに、液体窒素で冷やした線栓を窩洞に一瞬間押し当てた群（凍結群）の3群を作成した。観察期間は、術後3、5、7、14、35、70日とした。パラフィン切片を製作し、H-E染色、ALPase局在の検出、TRAPase活性の検出を行い、顕微鏡観察するとともに窩洞底面のセメントライン消失

割合の算出、既存骨中の単位面積あたりの血管数の算出を行った。

【結果と考察】 術後3日では注水、無注水群とも窩洞底面に沿って空虚な骨小腔の領域が認められ、その領域の深さを測定した結果、注水群では平均 $28.2\mu\text{m}$ 、無注水群では平均 $45.0\mu\text{m}$ 、凍結群では $1,016.6\mu\text{m}$ であった。3群間に有意差が認められたことから、今回の実験系では傷害された骨組織の量を3段階に設定できたものと考えられる。3群とも窩洞内には少量の出血とフィブリン、わずかな紡錘形の細胞が観察されたほか、ほとんど組織像に違いは認められなかった。術後5日では、注水群、無注水群とも骨膜側より血管と伴にALPase陽性の紡錘形細胞の浸潤が認められた。一方、凍結群では、骨膜組織の再生が不良で、窩洞内にALPase陽性反応を示す細胞は殆ど認められなかった。術後7日では注水、無注水群とも窩洞内での骨芽細胞の分化が進み、窩洞底面に骨基質が直接添加されている像が観察されたが、凍結群では治癒が遅延していた。術後14日では注水、無注水群とも窩洞は新生骨で満たされていた。したがって本実験における窩洞内の新生骨形成は骨膜由来の骨原性細胞による膜性骨化様式で生じていることが明らかとなった。凍結群では骨膜組織にも凍結傷害が及んでいる為、治癒が遅れていたと考えられる。術後35日では3群とも窩洞内は緻密な骨組織で満たされていたことから骨原性細胞が供給されれば、骨細胞の傷害程度にかかわらず、骨窩洞は治癒することが明らかとなった。窩洞内の骨基質産生が始まる術後7日目のTRAP染色所見では、TRAP陽性細胞が窩洞底面には観察されず、骨芽細胞が直接骨基質を分泌添加している像が認められたことから、窩洞形成時に傷害された既存骨は吸収されず、その表面にヘマトキシリンに濃染するセメントラインを介して新生骨が添加されていくことが明らかとなった。さらに窩洞形成時に傷害を受けた骨基質がどのように改変されるかを調べる目的で、新生骨と既存骨との境界面に作られたセメントラインの消失割合を計測した結果、術後35、70日の無注水群および凍結群は、注水群よりセメントラインの改選率が低下しており、骨細胞が傷害を受けた領域の骨改造現象が抑制されていることが示唆された。窩洞内の新生骨と既存骨との間に改変が生じず、力学的に脆弱なセメントラインが長期的に残存することは、インプラント周囲骨の弱点になるものと考えられる。また骨細胞が傷害された領域では、血管走行の乱れや新生骨基質による血管の閉鎖が認められ、その領域の血管数は、術後3日に比べ70日では減少していることが統計学的に明らかとなった。この現象は骨細胞のみならず、血管内皮細胞や血管周囲の間質細胞が傷害され、その後、血管の再生や制御された骨吸収が誘導されず骨形成のみが生じたためと思われる。これらの所見より、インプラント窩洞形成時における既存骨の傷害は、インプラント周囲骨の骨改造現象の制御機構に異常をきたし、インプラントの予後に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。(実験終了、現在論文投稿中)

4) 歯の挺出に伴う歯槽骨変化とエストロゲン欠乏の影響に関する組織学的・組織形態計測学的研究

【目的】 近年、急速な高齢化社会の進行に伴い歯科診療においても、高齢者の解剖学的・生理学的特徴を把握した治療体系の確立が要求されている。その中で、閉経に伴う全身的なエストロゲン

欠乏が顎骨にも影響を及ぼす可能性が指摘され、高齢者に多く見られる口腔内変化、特に歯牙喪失本数の増加との関連性にもその指摘が及んでいる。対合歯を喪失すると、咀嚼による機能圧の減少によって歯を支持する歯槽骨および周囲歯周組織にも様々な変化を生じ、やがて歯が挺出することが知られている。しかしながら、この機能圧の減少した歯槽骨に対して、閉経に伴うエストロゲン欠乏がどのような影響を与えるか、検索した報告は殆どない。本研究では、高齢女性において生じうる閉経と歯牙喪失という2つの状況によって、歯槽骨がどのように変化するのかを明確に把握すると共に、顎骨の構造維持にホルモンによる調節と、咀嚼による機能圧がどのように関わり合っているのかを、明らかにすることを目的として、対合歯を抜歯したラットに卵巣摘出あるいは偽手術を施し、その臼歯部歯槽骨を組織形態学的、形態計測学的に比較検討した。

【方法】 5週齢SD系雌性ラット24匹の右側下顎臼歯を全て抜歯し、13週齢時に卵巣摘出術（OVX）または偽手術（Sham）を施し、術後4週目に屠殺した。なお、骨形成の標識として屠殺の1週間前にテトラサイクリンを、1日前にカルセインを投与した。まず、マイクロフォーカスX線CT（ μ CT）を用いて、Sham群の咬合側と挺出側、およびOVX群挺出側歯槽骨の第一臼歯近心根と第三臼歯遠心根を通る矢状断面を観察した。次いで、 μ CT像を画像解析装置に入力し、歯槽骨高径（歯根膜に面する歯槽骨面から眼窩底までの距離）および骨量（総骨面積/総組織面積）を算出し、第二臼歯部歯槽骨においては、骨構造の評価として、骨量幅、骨量数、骨量間距離を算出した。次に上顎骨をVillanueva染色した後、MMA樹脂に包埋し、共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）を用いて歯槽骨矢状断面を観察した。さらに、第二臼歯部歯槽骨の歯槽骨内部と歯根膜に面する歯槽骨について、骨形態計測を行なった。また一部の試料の脱灰パラフィン切片を酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）染色し、破骨細胞の局在を光顕観察すると共に、細胞数を計測した。

【結果と考察】 Sham挺出側では、Sham咬合側に比べて歯槽骨高径が増大していたが、内部の骨髓腔が拡大し歯槽骨全体の骨量は減少していた。歯槽骨の内部では、咬合側に比較して骨形成が大きく抑制されていたが、骨吸収に関しては顕著な亢進は認められなかった。一方、歯根膜に面した歯槽骨面では、Sham咬合側が骨吸収と骨形成が混在した組織像を呈していたのに対して、Sham挺出側では骨吸収を伴わない活発な骨形成が生じていた。したがって、歯牙挺出の際に生じる歯槽骨高径の増大は、この活発な骨形成による持続的な骨添加に起因するものと考えられる。対合歯喪失によって咬合による機能圧が減少した歯槽骨の内部では、力学的負荷が減少した体肢骨、体幹骨と同様に骨代謝が骨吸収の方向に傾き、骨量の減少が生じたと考えられる。しかし、歯根膜の介在する歯槽骨面だけでは、歯槽骨内部とは逆に活発な骨形成が行われ、歯牙挺出という歯槽骨特有の減少が生じたと考えられる。OVX挺出側でも、Sham挺出側と同程度の歯槽骨高径の増大が生じていたが、内部の骨髓腔はSham挺出側よりもさらに拡大し、骨量の減少および骨量構造の脆弱化が亢進していることが明らかとなった。歯槽骨内部の骨代謝は骨形成および骨吸収が共に亢進していたことにより、卵巣摘出によるエストロゲン欠乏は挺出歯の歯槽骨内部に骨吸収

優位の高代謝回転を惹起し、骨量減少がSham挺出側よりさらに亢進したと考えられる。一方、歯根膜に面した歯槽骨面では、Sham挺出側と同様に骨吸収を伴わない活発な骨形成が行われており、この部位におけるエストロゲン欠乏の影響は歯槽骨内部ほど顕著には認められなかった。

以上の結果より、エストロゲン欠乏に対する挺出歯槽骨の反応性は、部位によって異なるが、歯槽骨内部では機能圧の減少により生じていた骨量減少が、骨吸収優位の高代謝回転によって更に亢進することが明らかとなった。

【結論】 高齢女性において、対合歯喪失による機能圧の減少と、閉経におけるエストロゲン欠乏という状況が重なった場合、歯槽骨の内部に著しい骨量の減少が生じ、顎骨構造の脆弱化を引き起こす可能性が示唆された。(実験終了、現在論文投稿中)

5) BMP移植骨に対するbisphosphonateの影響

【目的】 BMPは異所性骨化を誘導する成長因子であり、临床上、骨折の治癒や骨欠損補填剤として、その効果が期待されている。しかし、BMPにより異所性骨化を誘導すると、旺盛な骨形成の後、吸収が進み、その後消失してしまうことが知られており、生理的な骨とは、代謝機構が異なる可能性がある。一方、bisphosphonateは骨吸収抑制剤である。この薬剤を利用し、BMP骨の破骨細胞による吸収を抑制することにより、BMP骨がどう変化するかという観察は、BMPによって誘導された骨の代謝機構解明に重要な情報をもたらすことが予想される。本研究の目的は、BMPで誘導された異所性骨に対するbisphosphonateの影響を検討し、BMPで誘導された異所性骨に特異的な代謝機構を解明する事である。

【材料と方法】 4週齢のWistar系ラットのBMP-2を投与し、異所性骨化を誘導する。異所性骨化形成後、bisphosphonateを投与し、その後の経過を、組織学的、組織化学的に検索する。(現在、実験結果を解析中である。)

6) PTH投与による骨細胞性骨溶解の検索

【目的】 骨細胞性骨溶解減少は、生化学的な根拠から、その存在を推測されているが、形態学的な根拠に乏しく、実証はされていない。本研究ではPTH投与による骨吸収促進モデルと用いて、形態学的手法により骨細胞性骨溶解現象の実証を試みる。

【材料と方法】 8カ月齢のWistar系ラットにPTHを連続投与し、骨吸収を促進する。このラットの皮質骨を、組織学的、組織化学的、微細形態学的に観察し、骨細胞、骨小腔などの構造の変化を評価する。(現在、実験結果を解析中である。)

本研究課題に関連する研究業績

【著書】

- 小澤英治：骨の基本構造 最新骨粗鬆症、ライフサイエンス出版、93-96 (640頁)、1999
- 小澤英治：骨の細胞群 最新骨粗鬆症、ライフサイエンス出版、97-117 (640頁)、1999
- 網塚憲生、小澤英治：カルシウム その基礎・臨床・栄養 監修：西沢良記、白木正孝、江澤郁子、
広田孝子 骨とカルシウム 社団法人 全国牛乳普及協会 p20-34、1999年
- 江尻貞一、小澤英治：マイクロCTに夜骨組織微細構造のイメージング。バイオイメージングの最先
端。監修 石川春律、先端医療技術研究所、p127~131 (324頁)、1999
- 江尻貞一：ME用語辞典 (分担執筆) 日本エム・イー学会編 コロナ社 東京 1999年
- 江尻貞一、小澤英治：硬組織「骨」。走査電子顕微鏡。日本電子顕微鏡学会関東支部会編 共立出
版社、213-216 (印刷中)
- 網塚憲生、佐々木朝代、小澤英治：「骨原生細胞」カルシウムと骨 監修：西井易穂、小島 至、
江澤郁子、森井浩世、朝倉書店 (印刷中)
- 網塚憲生、渡邊純一、佐々木朝代、小澤英治：「カルシトニンの標的組織と作用」カルシウムと骨
監修：西井易穂、小島 至、江澤郁子、森井浩世、朝倉書店 (印刷中)

【総説】

- 平賀 徹、小澤英治：癌の骨転移の微細形態 腎と骨代謝 12 (1) : 15-21, 1999年
- 小澤英治：骨の微細構造 ザ・クインテッセンス 18 (1) : 176-185, 1999年
- 小澤英治、網塚憲生：骨組織におけるアポトーシス The Bone 13 (2) : 47-56, 1999
- 網塚憲生：軟骨細胞のアポトーシス The Bone 13 (2) : 73-79, 1999年
- 網塚憲生：軟骨発生におけるPTHrPの役割とその欠損による異常について ザ・クインテッセンス
18 (3) : 174-181, 1999年
- 江尻貞一：骨の形成とそれに影響を及ぼす要因。1. 骨代謝の基礎 (形態) 歯科臨床のための骨の
科学 ザ・クインテッセンス 18 (1) : 170-175, 1999年
- 平賀 徹、米田俊之、小澤英治：癌の骨転移の微細形態とビスホスホネート CLINICAL CALCIUM
9 (11) : 22 (1386)-27 (1391), 1999
- 網塚憲生：軟骨におけるPTHrPの作用 腎と骨代謝 骨の分子発生学 12 (3), 253-266, 1999
- 田中みか子、江尻貞一、河野正司、小澤英治：加齢および卵巣摘出によるラット下顎頭の海綿骨変
化、新潟歯学会雑誌 28 : 85-86, 1999
- Amizuka, N., Henderson, J. E., White, J. H., Karaplis A. C., Goltzman, D. and Ozawa, H. : Recent studies on
the biological action of parathyroid hormone (PTH) -related peptide (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor
in cartilage and bone. Histol. Histopath (in press)

網塚憲生、佐々木朝代、小澤英治：副甲状腺ホルモン関連ペプチド遺伝子組み替えマウスの軟骨・骨の異常 医学のあゆみ（印刷中）

【原著】

- Karaplis, A., He, M. B., Nguyen, A., Young, L. D., Semeraro, D., Ozawa, H. and Amizuka, N. : Blomstrand chondrodysplasia caused by a missense mutation in the human parathyroid hormone receptor-1. *Endocrinology*. 139 (12) : 5255-5258, 1999
- Amizuka, N., Kwan, M., Goltzman, D., Ozawa, H. and White, J. H. : Vitamin D₃ differentially regulates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor expression in bone and cartilage. *J Clin Invest*. 103 (3) : 373-381, 1999
- Hoshi, K., Kenmotsu, S., Takeuchi, Y., Amizuka, N. and Ozawa, H. : The primary calcification in bones follows removal of decorin and fusion of collagen fibrils. *J Bone Miner. Res.* 14 (2) : 273-280, 1999
- Horiuchi, K., Amizuka, N., Takeshita, S., Takamatsu, H., Katsuura, M., Toyama, Y., Bonewald, L. F. and Kudo, A. Identification and characterization of a novel protein, periostin (OSF-2) with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming factor. *J Bone Miner Res.* 14 (7) : 1239-1249, 1999
- Tanaka, M., Ejiri, S., Nakajima, M., Kohno, S., and Ozawa, H. : Changes of cancellous bone mass in rat mandibular condyle following ovariectomy. *Bone* 25 (3) : 339-347, 1999
- Ito, M., Amizuka, N., Nakajima, T. and Ozawa, H. : Ultrastructural and cytochemical studies on cell death of osteoclasts induced by bisphosphonate treatment. *Bone* 25 (4) : 447-452, 1999
- Nakajima, M., Ejiri, S., Tanaka, M., Toyooka, E., Kohno, S. and Ozawa, H. : Effect of intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) on the mandibular condyle of ovariectomized rats. *J Bone Miner. Metab.* 18 (1) 9-17, 1999
- Wakita, K., Amizuka, N., Murakami, C., Satoda, T., Fukae, M., Simmer, J. P., Ozawa, H. and Uchida T. : Maturation ameloblasts of the porcine germ do not express amelogenin. *Histochem Cell Biol.* 111 : 297-303, 1999
- Hoshi, K., Komori, T. and Ozawa, H. : Morphological characterization of skeletal cells in cbfal-deficient mice. *Bone* 26 : 639-651, 1999
- Izumi, N., Amizuka, N., Oda, K., Ikehara, Y., Ozawa, H. : Ultrastructural alteration of osteoclasts treated with brefeldin A and wortmannin. *Acta Histo. Cyto.* 32 (5) : 393-405, 1999
- Hoshi, K., Amizuka, N., Kurokawa, T., Nakamura, K., Shiro, R. and Ozawa, H. : Histopathological characterization of melorheostosis. *Orthopedics* (in press)
- Tanizawa, T., Yamaguchi, A., Uchiyama, Y., Miyaura, C., Ikeda, T., Ejiri, S., Yamato, H. and Nakaura, T. : Early reduction in bone formation and elevated bone resorption in ovariectomized rats with special

reference to acute inflammation. Bone (in press)

Takeyama, M., Irie, K., Nakamura, H., Kominami, E., Hanada, K. and Ozawa, H. : Immunohistochemical demonstration of cathepsin B and L in periodontal ligament (PDL) of rat molar. J Dent Res. (in press)

【国際シンポジウム】

Ozawa, H. : Morphology of bone remodeling. Scientific workshop "Enamel matrix components in formation, mineralisation and regeneration of dental tissues." Invited Lecture, Oslo, Norway, Sep. 24-29, 1999

Ozawa, H. : Bone remodeling on a cellular level. The international symposium on stomatology facing the challenge of 21st century. Invited Lecture, Wuhan, China, Oct. 7-10, 1999 Program and Abstracts issue, p. 75-76, 1999

Yoshida, K., Yoshida, N., Iwaku, M. and Ozawa, H. : Immunohistochemical localization of laminin-5 and integrin $\alpha 6 \beta 4$ during cytodifferentiation of ameloblasts in the mouse incisor. Ninth international symposium on basement membranes. Nice, France, Nov. 14-16, 1999

【国際学会発表】

Tanaka, S., Ito, M., Amizuka, N., Asano, H., Kamiya, U., Miyata, K. and Ozawa, H. : Bisphosphonate YM529 inhibits tumor-induced osteolysis in nude rats bone metastases. Cancer-induced bone disease. Switzerland. March. 1999.

Hoshi, K., Ejiri, S. and Ozawa, H. : Ultrastructural analysis of bone calcification by using electron energy loss spectroscopy. XV Congress of the international federation of associations of anatomists and 4th International malpighi symposium. Rome, Sep. 11-16, 1999 Italian journal of anatomy and embryology. Vol. 104-Supplement No. 1, p. 292, 1999

Amizuka, N., Chen, M.-F., Goodyer, C., Ozawa, H. and Henderson, J. E. : Distinct growth plate abnormalities associated with mutations in the extracellular and intracellular domains of FGFR3 in thanatophoric dysplasia (TD). 21st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Sep. 30-Oct. 4, 1999, St. Louis, USA Program and Abstract, Journal of Bone and Mineral Research, vol. 14 Suppl 1, F017, 1999

Hoshi, K., Ejiri, S. and Ozawa, H. : Molecular mechanisms of bone calcification. 21st Annual Meeting of the American Society for Bone Mineral Research, Sep. 30-Oct. 4, 1999, St. Louis, USA Program and Abstract, Journal of Bone and Mineral Research, vol. 14 Suppl 1, SA016, 1999

Amizuka, N., Wang, D., Colvon, J., Ozawa, H., Goltzman, D., Ornitz, D. and Henderson, J. E. : PTHrP lies upstream of FGFR3 during cartilage development. 21st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Sep. 30-Oct. 4, 1999, St. Louis, USA Program and Abstract, Journal of Bone and Mineral Research, vol. 14 Suppl 1, SU014, 1999

- Saito, Y., Ikegame, M., Ishibashi, O., Okuda, K., Ishibashi, K., Obinata, M., Kawashima, H. : Murine periodontal ligament cell lines : Isolation and characterization. 21st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Sept. 30-Oct. 4, 1999, St. Louis, Missouri, U. S. A. J. Bone Min. Res. vol. 14 (Supp. 1) : S552 (SU483), 1999
- Shimomura, J., Ishibashi, O., Ikegame, M., Noda, T., Kawashima, H. : Tensile stress markedly increased tetranectin gene expression in cranial sutures of mouse calvariae. 21th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Sept. 30-Oct. 4, 1999, St. Louis, Missouri, U. S. A. J. Bone Min. Res. vol. 14 (Supp. 1) : S194 (T124), 1999.

【国内シンポジウム】

- 網塚憲生、入江一元、小澤英治：OCIF遺伝子欠損マウスにおける組織化学的・微細構造学的観察
第14回 ビタミンDワークショップ 1999年2月19日、横浜 プログラム抄録集 p. 18
- 小澤英治、星 和人、入江一元、中村浩彰、網塚憲生、江尻貞一：骨組織の再建－微細形態学的・細胞化学的特徴－第104回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム「硬組織再生誘導」
1999年3月29日 東京 プログラム予稿集 p. 12 (S2-1)
- 江尻貞一、小澤英治： μ CTと共焦点レーザー顕微鏡を用いた卵巣摘出ラット歯槽骨の形態計測学的研究 第104回日本解剖学会総会・全国学術集会 ミニシンポジウム「硬組織の3次元構造解析」1999年3月30日 東京 プログラム予稿集 p. 40 (M11-2)
- 小澤英治：骨リモデリング現象の細胞生物学的視点 第52回日本細胞生物学会大会 1999年8月29日 東京 講演要旨集 p. 25 (S13-1)
- 江尻貞一、小澤英治：石灰化組織の三次元構造解析：Micro CTの応用 日本電子顕微鏡学会 第44回シンポジウム C-I. 硬組織の電顕技法－最近の話題から、1999年11月17-19日、東京
- 星 和人、江尻貞一、小澤英治：Electron energy loss spectroscopy (EELS) による生物学的石灰化現象の解析 日本電子顕微鏡学会第44回シンポジウム C-I. 硬組織の電顕技法－最近の話題から、1999年11月17-19日、東京
- 小澤英治：オーバービュー B. 石灰化 硬組織の細胞生物学 第15回形態科学シンポジウム「硬組織形態科学の最近の進歩」、1999年11月20日、神奈川歯科大学、神奈川
- 江尻貞一：卵巣摘出による顎骨微細構築の変化「硬組織の立体微細構造と微笑循環」硬組織の立体微細形態 第15回形態科学シンポジウム神奈川歯科大学 横須賀 1999年11月20日
- 星 和人：骨組織の石灰化「硬組織形態科学の最近の進歩」硬組織の細胞生物学 第15回形態科学シンポジウム 神奈川歯科大学 横須賀 1999年11月20日
- 網塚憲生：軟骨細胞に対するPTHrPとFGFR3の作用「硬組織形態科学の最近の進歩」骨組織 第15回形態科学シンポジウム 神奈川歯科大学 横須賀 1999年11月20日
- Ozawa, H. and Ejiri, S. : Cellular Events on Bone Remodeling Healthpotential and Periodontal Treatment 47

【国内学会発表】

- 佐々木朝代、入江一元、江尻貞一、小澤英治：マウス尾椎における軟骨内骨化の観察 第104回日本解剖学会総会・全国学術集会 1999年3月29日～31日、東京 プログラム予稿集 p. 112 (C84)
- 福士真理子、網塚憲生、織田公光、小澤英治：変異型組織非特異的アルカリホスファターゼの細胞内局在と酵素活性 第104回日本解剖学会総会・全国学術集会 1999年3月29日～31日、東京 プログラム予稿集 p. 125 (D13)
- 星 和人、江尻貞一、小澤英治：骨基質の石灰化におけるミネラル集積機構の解明 第104回日本解剖学会総会・全国学術集会 1999年3月29日～31日、東京 プログラム予稿集 p. 136 (D81)
- 網塚憲生、小澤英治：軟骨・骨の分化形成におけるFGFレセプター3とPTHrPの作用 (FGFR3/PTHrP遺伝子二重欠損マウスを用いた形態学的解析) 第104回日本解剖学会総会・全国学術集会 1999年3月29日～31日、東京 プログラム予稿集 p. 137 (D87)
- 川崎直子、濱本宜興、入江一元、小澤英治、中島民雄：凍結保存を行った自家移植歯の歯根膜再生過程に関する研究 第32回新潟歯学会総会 平成11年4月17日、新潟 新潟歯学会雑誌 29 (1) : 55, 1999
- 田中みか子、河野正司、江尻貞一、豊岡英一、小澤英治：卵巣摘出ラット下顎頭における部位特異的骨量変化と咬合によるメカニカルストレスとの関連 第101回日本補綴歯科学会 1999年5月21日、22日、福岡、補綴誌43、101回特別号 : 63, 1999
- 豊岡英一、江尻貞一、田中みか子、河野正司、小澤英治：歯の挺出に伴う歯槽骨変化とエストロゲン欠乏の影響に関する組織学的観察 第10回日本老年歯科医学会 1996年6月17, 18日 京都
- 田中みか子、江尻貞一、豊岡英一、野中希一、川口博明、福崎好一郎、河野正司、小澤英治：pQCTを用いた卵巣摘出サル顎骨の解析 第19回日本骨形態計測学会 1999年6月25、26日、北九州 日本骨形態計測学会雑誌 9 (2) : S52, 1999
- 星 和人、江尻貞一、小澤英治：老齢ラットの骨形成における基質小胞性石灰化 第19回日本骨形態計測学会 1999年6月25、26日、北九州 日本骨形態計測学会雑誌 9 (2) : S56, 1999
- 網塚憲生、Goltzman, D., Orinitz, D., Henderson, J., 小澤英治：軟骨細胞の分化増殖に対してPTHrPはFGFR3よりも機能的に有意に作用する—FGFR3/PTHrP遺伝子二重欠損マウスにおける軟骨異常の解析—第17回日本骨代謝学会 1999年7月29—31日、大阪 日本骨代謝学会雑誌 17 (2) : 7, 1999
- 堀内圭輔、網塚憲生、竹下 淳、小澤英治、戸山芳昭、工藤 明：新規遺伝子periostin (OSF-2) は外骨膜、歯根膜に特異的に発現し、in vitroにて細胞接着・伸展を支持する。第17回日本骨代謝学会 1999年7月29—31日、大阪 日本骨代謝学会雑誌 17 (2) : 18, 1999
- 藤井幸一、田中良哉、星 和人、小澤英治、江藤澄哉：骨芽細胞におけるCD44刺激によるFas依存

- 性アポトーシスの誘導機構 第17回日本骨代謝学会 1999年7月29-31日、大阪 日本骨代謝学会雑誌 17(2):152,1999
- 池亀美華、石橋 幸、小守壽文、小澤英治、川島博行：張力刺激により誘導される骨芽細胞の分化にはBMP-4遺伝子の発現が重要である 第17回日本骨代謝学会 1999年7月29-31日、大阪 日本骨代謝学会雑誌 17(2):153,1999
- 星 和人、江尻貞一、小澤英治：骨基質石灰化結晶の形成・成長はプロテオグリカンとアルカリホスファターゼが関与するCa・Pの共存化により進行する 第17回日本骨代謝学会 1999年7月29-31日、大阪 日本骨代謝学会雑誌 17(2):213,1999
- 島村拓也、網塚憲生、中島民雄、小澤英治：悪性腫瘍の骨転移モデルを用いた初期の転移巣における形態学的観察 第41回歯科基礎医学会総会、1999年9月24-25日、東京 歯科基礎誌 41(5):111,1999
- 網塚憲生、小澤英治：FGFR3/PTHrP遺伝子欠損マウスにおける軟骨異常の形態学的解析 第41回歯科基礎医学会総会、1999年9月24-25日、東京 歯科基礎誌 41(5):115,1999
- 池亀美華、石橋 幸、小澤英治、川島博行：張力刺激により起因される骨形成促進機構の解析 第41回歯科基礎医学会総会、1999年9月24-25日、東京 歯科基礎誌 41(5):118,1999
- 近藤由香里、入江一元、池亀美華、小澤英治：破骨細胞の分化過程にはALP陽性の骨髄間質系細胞のネットワークが関与する 第41回歯科基礎医学会総会、1999年9月24-25日、東京 歯科基礎誌 41(5):140,1999
- 吉羽邦彦、吉羽永子、岩久正明、小澤英治：エナメル芽細胞分化過程におけるラミニン-5と $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンの局在 第41回歯科基礎医学会総会、1999年9月24-25日、東京 歯科基礎誌 41(5):148,1999
- 豊岡英一、江尻貞一、田中みか子、河野正司、小澤英治：歯の挺出に伴う歯層骨変化とエストロゲン欠乏の影響— μ CTと共焦点レーザー顕微鏡を用いた研究—第41回歯科基礎医学会総会、1999年9月24-25日、東京 歯科基礎誌 41(5):148,1999
- 豊岡英一、江尻貞一、田中みか子、河野正司、小澤英治：卵巣摘出ラット挺出歯歯層骨の動態に関する形態学的、形態計測学的研究 第102回日本補綴歯科学会、1999年10月22-23日、名古屋 補綴誌43、102回特別号：151、1999
- 田中みか子、河野正司、江尻貞一、豊岡英一、小澤英治：第102回日本補綴歯科学会、1999年10月22-23日、名古屋 補綴誌43、102回特別号：152、1999
- 柴崎伸恭、江尻貞一、入江一元、草刈 玄、小澤英治：骨組織の傷害が骨改造現象に及ぼす影響 第102回日本補綴歯科学会、1999年10月22-23日、名古屋 補綴誌43、102回特別号：52、1999
- 石田陽子、江尻貞一、監物新一、坂井日出男、小澤英治：キンギョ咽頭歯の微細形態学的研究— μ CTを応用した観察法—平成11年度新潟歯学会第2会例会、1999年11月13日、新潟 プログラム 4p

豊岡英一、河野正司、江尻貞一、田中みか子、小澤英治：ラット挺出歯歯槽骨の動態とそれに及ぼすエストロゲン欠乏の影響 平成11年度新潟歯学会第2会例会、1999年11月13日、新潟 プログラム4p

柴崎伸恭、江尻貞一、入江一元、北村絵里子、志賀和代、草刈 玄、小澤英治：骨組織の傷害が骨欠損修復過程および骨改造現象に及ぼす影響 平成11年度新潟歯学会第2会例会、1999年11月13日、新潟 プログラム4p