

bFGF の皮下注射は授乳期における 新生児マウスの下顎頭の発育を促進する

青山 祐紀

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座
(主指導教員：長谷川 博雅 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士（歯学）学位申請論文

Subcutaneous basic FGF-injection accelerates the development of
mandibular condyle of newborn mice during lactation period

YUKI AOYAMA

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University
(Chief Academic Advisor : Professor Hiromasa Hasegawa)*

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

【目的】

線維芽細胞増殖因子（FGF）は、ウシ下垂体から精製された成長因子であり、種々の細胞の増殖や分化に関与する。bFGF（FGF-2）は軟骨組織の恒常性維持や成長発育に重要であり、下顎頭でも正常組織だけでなく腫瘍細胞の増殖促進に関与することが知られている。ラット膝関節へのbFGF局所投与実験はあるが、下顎頭におけるbFGFの局所作用に関する報告は知られていない。そこで、本研究では新生児マウスの下顎頭におけるbFGFの局所投与効果を検討した。

【方法】

実験動物は、生後0日齢のddY系マウス40匹を用いた。実験群は、1 µg/µlのrhbFGFを生後1日目、2日目、3日目の3回（0.1µl/回）に分けて左側下顎頭に総量0.3µg投与した。対照群は、右側下顎頭に同量の生理食塩水を局所投与した。

投与1日後、4日後、7日後および14日後に各群10匹を屠殺し、4%パラホルムアルデヒドに浸漬固定した。通法に従って10%EDTAで脱灰後、パラフィン包埋し、3 µmの前頭断連続切片（約800枚/ブロック）を作製し、20枚毎にHE染色を行った。下顎頭が最大幅径となる標本を含む20枚の連続切片を用いてPCNA免疫染色を行った。HE標本では下顎頭の最大幅径、増殖層の厚さおよび下顎頭の長さに対する増殖層の長さの比率を求めた。PCNA免疫染色標本では、増殖層の細胞数に対するPCNA陽性細胞の割合を求めて増殖率（PI）とした。形態計測と陽性細胞数の抽出にはMotic[®] Images Plus 2.2 ver.2.1.2を用いた。これらの結果は、Wilcoxon signed-rank testで対照群と実験群を比較した。群間の多重比較はKruskal-Wallis testを用い、Steel-Dwass testで事後検定した。全ての統計解析はRで行いp

<0.05を有意差ありとした。

【結果】

1. 組織学的所見：対照群と実験群の下顎頭に明らかな構造異常はみられなかった。投与1日後では、実験群で増殖層の著しい肥厚が確認された。投与後4日でも同様に増殖層の肥厚を認め、さらに軟骨細胞と肥大軟骨細胞の数は増加し、最大幅径と垂直方向の増加があった。投与7日後の対照群では頭頂から骨化層までの垂直距離が短縮し、骨化層先端部は下顎頭方向へ移動していた。しかし、実験群では対照群に比較して軟骨組織の全体的な厚さは依然として厚かった。投与後14日では、実験群でも対照群同様に最大幅径の増加と骨化の亢進があり、骨化層の前線は頭頂方向へ移動していた。

2. 免疫染色所見：PCNA陽性細胞は主に増殖層に分布し、対照群に比べ実験群で陽性率が高い傾向を示した。投与後7日までは陽性細胞は増加したが、実験14日目で陽性細胞は減少していた。

3. 形態計測解析：対照群の最大幅径は $408.0 \pm 128.3\mu\text{m}$ (1日後)、 $512.8 \pm 25.5\mu\text{m}$ (4日後)、 $629.4 \pm 36.8\mu\text{m}$ (7日後)、 $743.3 \pm 78.7\mu\text{m}$ (14日後)であり、実験群は、 $533.4 \pm 86.1\mu\text{m}$ (1日後)、 $512.8 \pm 25.5\mu\text{m}$ (4日後)、 $722.6 \pm 56.7\mu\text{m}$ (7日後)、 $810.8 \pm 90.8\mu\text{m}$ (14日後)だった。最大幅径は対照群と実験群ともに徐々に増加する傾向を示し、統計学的に有意に実験群の最大幅径が大きかった ($p < 0.01$)。増殖層の厚みは、対照群で $117.1 \pm 4.4\mu\text{m}$ (1日後)、 $124.5 \pm 6.0\mu\text{m}$ (4日後)、 $136.5 \pm 3.4\mu\text{m}$ (7日後)、 $129.9 \pm 2.4\mu\text{m}$ (14日後)であり、実験群は $155.0 \pm 6.7\mu\text{m}$ (1日後)、 $195.2 \pm 8.2\mu\text{m}$ (4日後)、 $175.8 \pm 10.3\mu\text{m}$ (7日後)、 $142.1 \pm 8.0\mu\text{m}$ (14日後)だった。対照群は7日目まで徐々に増加した後に減少傾向を示し、実験群は4日目に最大値を示し徐々に減少する傾向を示した。実験群の4日目が有意に他群に比べ厚かった。増殖層の厚さの比率は、対照群で50.5

$\pm 2.0\%$ (1日後)、 $49.8 \pm 3.0\%$ (4日後)、 $49.4 \pm 1.0\%$ (7日後)、 $36.2 \pm 1.0\%$ (14日後)であり、実験群で $60.4 \pm 1.0\%$ (1日後)、 $69.7 \pm 3.0\%$ (4日後)、 $58.6 \pm 4.0\%$ (7日後)、 $37.8 \pm 2.0\%$ (14日後)だった。対照群は、7日目まで変化は無く14日目に値が小さくなった。実験群は、増殖層の厚さと同様に4日目に最大値を示し、その後減少した。実験群の4日目の値は他群に比べ有意 ($p < 0.001$) に高値であった。

4. 増殖率解析：PIは、対照群で $39.7 \pm 3.0\%$ (1日後)、 $43.2 \pm 1.0\%$ (4日後)、 $47.1 \pm 3.0\%$ (7日後)、 $43.0 \pm 3.0\%$ (14日後)で、実験群では $50.2 \pm 3.0\%$ (1日後)、 $68.9 \pm 4.0\%$ (4日後)、 $50.5 \pm 3.0\%$ (7日後)、 $50.4 \pm 2.0\%$ (14日後)だった。対照群の増殖率は1日目から徐々に増加傾向を示し7日目に最大となった。実験群は、4日目に最大値を示し統計学的にも有意 ($p < 0.001$) に高値だった。

【考察】

増殖層の厚さと増殖率は、対照群が7日目、実験群では4日目に最大となった。これらはrhbFGFが間葉系細胞の増殖を促進した結果と考えられた。しかし、rhbFGFは生体内で24時間以内に消失するので、実験群が4日目で効果が最大となる結果と矛盾する。生体内ではbFGFはbFGFとTGF- β 1の発現を増強する。さらにTGF- β 1もbFGFの発現を増加することから、成長因子の相乗作用により効果時間が延長し、投与後4日目に最大の効果が現れたものと考えられた。また、実験群の軟骨細胞の層が厚く、線維層から骨化層先端までの距離が長かったことから、rhbFGFは軟骨細胞や肥大軟骨細胞への分化を促進するが、軟骨細胞の最終分化を抑制している可能性が示唆された。本研究は、rhbFGFの局所投与が授乳期マウスの下顎頭間葉系細胞の増殖を促進し得ることを示した。