遺伝子組み換えヒト骨形成因子によるラット 下腿筋肉内骨誘導におけるニコチンの影響

園部 純也¹⁾・海原 真治²⁾・大久保康則³⁾
河井まりこ⁴⁾・楠本 健司⁵⁾・別所 和久³⁾

Effect of nicotine on osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2

SONOBE Junya¹⁾・KAIHARA Shinji²⁾
OKUBO Yasunori³⁾・KAWAI Mariko⁴⁾
KUSUMOTO Kenji⁵⁾・BESSHO Kazuhisa³⁾

Abstract: We evaluated the effect of nicotine on osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). Five micrograms of rhBMP-2 was implanted into the calf muscle of 10-week-old Wistar rats. For 14 days after implantation, nicotine was continuously administered subcutaneously in a dose of 0.1 (group L), 1.0 (group M), or 10.0 (group H) mg/kg/day. In the control group (group C), only physiological saline was administered. On day 21 after implantation, soft radiographs were obtained, and histological and biochemical analyses were performed. The results suggested that a high dose of nicotine prevents bone formation.

In addition, we investigated the effect of nicotine on osteoinduction. For 14 days after rhBMP-2 implantation, nicotine was continuously administered in the dose used in group M. The control group was given only physiological saline. On days 3, 7, 14, and 21 after implantation, soft radiographs were obtained after the injection of contrast media, and histological and biochemical analyses were performed. In the radiographic study with contrast media, there were fewer small capillaries in the rhBMP-2-implanted muscle in the nicotine group than in the control group. Histologically, nicotine reduced new bone and cartilage formation and decreased the number of capillaries. On quantitative biochemical analysis, indices of bone formation in the nicotine group were significantly lower than those in control. These results suggest that the prevention of bone formation by nicotine may be caused by a reduced blood supply to rhBMP-2-implanted muscle.

Key words: bone morphogenetic protein (骨形成因子), nicotine (ニコチン), osteoinduction (骨誘導), blood supply (血液供給)

緒 言

近年、喫煙によって創傷治癒の遅延や歯槽骨の吸収が惹

起されることが明らかとなってきた¹⁻³⁾。そのため、
歯周外科手術やインプラント手術前に患者教育として禁煙
指導を行うことが一般的になりつつある。しかし現状では、

¹⁾ 市立宇和島病院歯科口腔外科
(主任：園部純也科長)

²⁾ 京都桂病院歯科口腔外科
(主任：海原真治統括医長)

³⁾ 京都大学大学院医学研究科感覚運動系外科学講座口腔外
科学分野
(主任：飯塚忠彦教授)

⁴⁾ 岡山大学大学院医歯学総合研究科生体機能再生・再建学
講座口腔形態学分野
(主任：山本敏男教授)

⁵⁾ 関西医科大学形成外科学講座
(主任：小川 豊教授)

¹⁾ Department of Dentistry and Oral surgery, Uwajima City
Hospital (Chief: Dr. SONOBE Junya)

²⁾ Department of Dentistry and Oral Surgery, Kyoto-Katsura
Hospital (Chief: Dr. KAIHARA Shinji)

³⁾ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Graduate
School of Medicine, Kyoto University (Chief: Prof. IIZUKA
Tadahiko)

⁴⁾ Oral Morphology, Department of Science of Functional
Recovery and Reconstruction, Graduate School of Medicine
and Dentistry, Okayama University (Chief: Prof.
YAMAMOTO Toshio)

⁵⁾ Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Kansai
Medical University (Chief: Prof. OGAWA Yutaka)

受付日：2004年11月8日

採択日：2005年3月29日

ヘビースモーカーに対しインプラント治療をする頻度は少なくないため、骨形成に対する喫煙の影響を検討することは臨床上有用である。現在までにどの程度の喫煙で骨形成に問題が生じるかを実験的に検索した論文はみられない。そこでわれわれは、骨形成に対する影響を実験的に示す方法として、われわれの教室で確立された骨形成因子 (BMP) による骨誘導系を用いた。まず、どの程度のニコチン濃度で骨誘導に影響が認められるのかを検索した (実験 1)。さらに喫煙者で実際に達する可能性のあるニコチン濃度において、骨誘導過程での経時的影響を検索した (実験 2)。

実 験 1

材料および方法

[実験動物]

10 週齢の雄性 Wistar 系ラット (体重: 230 ~ 260g) 24 匹を検定に用いた。BMP を埋入する 7 日前から屠殺するまで、すべてのラットに対し飼料 (オリエンタル酵母工業, 東京) を与えた。なお、実験動物の取り扱いに関しては、京都大学医学部動物実験施設の指針を遵守した。

[埋入材料]

5 μ g の *Escherichia coli* 由来 rhBMP-2⁴⁾ を 1ml のコラーゲン溶液 (pH3.0, 3 mg/ml: Cellmatrix LA[®]; 新田ゼラチン, 大阪) と混和し、凍結乾燥後、直径 4.0mm, 厚さ 1.5mm の円板状に成形し、10 週齢雄性 Wistar 系ラットの右側下腿部腓腹筋内に埋入した。同時にラット腹部皮下には、175 μ l の (一)-nicotine (和光純薬工業, 大阪) 溶液を注入した浸透圧ミニポンプ (Alzet 2002, USA) を埋入した。これらの施術は、ペントバルビタール (5 mg/100g: ネンブタール[®], 大日本製薬, 大阪) の腹腔内投与麻酔下に無痛的に行った。浸透圧ミニポンプ内のニコチンは、0.52 $\pm$ 0.02 μ l/hr の速度で流出する設定とし、14 日間ラットの皮下に持続投与した。ポンプ内のニコチン溶液の濃度は、低・中・高濃度 (0.1, 1.0, 10.0mg/kg/day) に調整し、それぞれ L, M, H 群とした。C (対照) 群のポンプには、同容量の生理的食塩水を注入した。4 群とも各 6 匹とし、計 24 匹を使用した。

[術式および評価方法]

(軟 X 線学的観察方法)

埋入 21 日後に各群 6 匹ずつペントバルビタールの過剰投与により屠殺を行った。rhBMP-2 を埋入した右側下腿部腓腹筋を摘出し、軟 X 線撮影 (SRO-M50; Sofron Inc., 東京) を行い、各群間で比較した。撮影後、各群より 1 検体を無作為抽出し、脱灰 H-E 染色標本として、組織学的に検索した。各群残りの 5 検体については生化学的分析に使用した。

(組織学的観察方法)

10 % 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、EDTA にて脱灰し、パラフィン包埋を行った。ミクロトームを用い 4 μ m の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、組織学的観察を行った。

(生化学的分析方法)

筋肉内に誘導された硬固物のみを摘出し、重量を計測した後、0.25 M sucrose 5ml 内でバイオミキサー (Bio-Mixer, type ABM; 日本精機製作所, 東京) を用い、ホモジナイズした。1250 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、その上清のアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、総蛋白量 (TP) を 4-nitro-phenylphosphate 法⁵⁾ で測定した。また、沈澱画分には 0.5N 塩酸 5ml を加え、16 時間 20 $^{\circ}$ C にて脱灰した後、1250 $\times$ g で 10 分間遠心分離し上清中のカルシウム (Ca) 含有量を Orthocresolphthalein complexone 法⁶⁾ にて測定した。ALP 活性を TP で除した蛋白質重量当たりの ALP 活性 (IU/mg) と、Ca 量を摘出した硬固物重量で除した Ca 濃度 (μ g/mg) を、骨形成の生化学的検索の定量的指標とした。

(統計学的分析方法)

ALP 活性、Ca 濃度における各群間での統計学的有意差は Fisher's test を用いて検定し、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。

結果

(軟 X 線学的所見)

各群とも rhBMP-2 を埋入したすべての筋肉内には、埋入物形体にほぼ一致した不透過像が認められた。その不透過性は C 群, L 群, M 群, H 群の順に、ニコチン投与濃度が高くなるに従い、弱くなっていた (写真 1)。

(組織学的所見)

各群とも筋肉と接する埋入物内の辺縁付近に誘導された新生骨が認められ、中心部にはコラーゲンの残存がみられた。新生骨の組織学的な形態には、明らかな違いは認められなかった。しかし、新生骨量は C 群, L 群, M 群, H 群の順に、ニコチン投与濃度が高くなるに従い少なくなっていた。逆にコラーゲンの残存量は、ニコチン投与濃度が高くなるに従い、多くなっていた。

(生化学的分析結果)

各群とも、5 検体の筋肉内に誘導された新生骨内の蛋白質重量当たりの ALP 活性と重量当たりの Ca 濃度は、いずれも C 群, L 群, M 群, H 群の順に、ニコチン投与濃度が高くなるに従い低くなる傾向が認められた (図 1)。ALP 活性については、C 群と L, M 群間に有意差は認められなかったが、M 群は L 群より $p < 0.05$ で有意に低く、H 群は C, L, M 群より $p < 0.01$ で有意に低かった。Ca 濃度につ

写真1 rhBMP-2埋入21日後に摘出したC, L, M, H群のラット下腿部腓腹筋の軟X線写真

ニコチン投与濃度が高くなるに従い、X線不透過性が弱くなっている。

図1 rhBMP-2埋入21日後におけるC, L, M, H群のラット下腿部腓腹筋内に誘導された骨組織のALP活性とCa濃度 (Mean ± SD, n = 5)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

ニコチン投与濃度が高くなるに従い、ALP活性およびCa濃度は低くなっている。

いては、C群とL群間に有意差は認められなかったが、M群はC, L群より $p < 0.05$ で有意に低く、H群はC, L, M群より $p < 0.01$ で有意に低かった。

以上、M, H群のニコチン濃度で有意に骨形成阻害が認められた。さらに実験2として、有意差の生じた最低濃度であるM群の濃度を用いて経時的な影響を検索するとともに、局所血流量に対する影響についても検索した。

実験 2

材料および方法

[実験動物]

10週齢の雄性Wistar系ラット(体重: 230-260g) 48匹を検定に用いた。

[埋入材料]

実験1と同様に、5 μ gのrhBMP-2を3mgのコラーゲン溶液と混和し、凍結乾燥後円板状に成形し、10週齢雄性Wistar系ラットの右側下腿部腓腹筋内に埋入した。同時にラット腹部皮下には、175 μ lの(-)-nicotine溶液を注入した浸透圧ミニポンプを埋入した。N(ニコチン投与)群のポンプ内ニコチン溶液は、1.0mg/kg/dayで投与されるよう濃度を調整した。C(対照)群のポンプには、同容量の生理的食塩水を注入した。この2群は各24匹とし、計48匹使用した。

[術式および評価方法]

(軟X線学的観察方法)

埋入3, 7, 14, 21日後に各群1匹ずつを開胸し、造影剤(5%ゼラチン含有60%硫酸バリウム)を上行大動脈より

写真2 rhBMP-2埋入14日後に血管造影の後、摘出したC, N群のラット下腿部腓腹筋の軟X線写真

N群ではC群と比較し微細な血管が造影されていない。

写真3 rhBMP-2埋入3, 7, 14, 21日後に血管造影の後、摘出したC, N群のラット下腿部腓腹筋の脱灰H-E染色標本の組織像 (M: 筋肉, NB: 新生骨, NC: 新生軟骨, CL: コラーゲン) (H-E染色, $\times 10$)

N, C群とも埋入14, 21日後に新生骨を認める。N群での新生骨量はC群より少ない。

図2 rhBMP-2埋入3, 7, 14, 21日後のラット下腿部腓腹筋内埋入物のALP活性 (Mean ± SD, n = 5)
* p < 0.05, ** p < 0.01, ○: C群, ●: N群
ALP活性はすべての時期においてN群はC群と比較し有意に低い。

図3 rhBMP-2埋入3, 7, 14, 21日後のラット下腿部腓腹筋内埋入物のCa濃度 (Mean ± SD, n = 5)
** p < 0.01, △: C群, ▲: N群
Ca濃度は埋入14, 21日後においてN群はC群と比較し有意に低い。

カテーテルにて末梢血管まで満たすに十分な量 (約20ml) を注入した⁷⁾。その後, rhBMP-2を埋入した右側下腿部腓腹筋を摘出し, 軟X線撮影を行い両群間で比較した。

(組織学的観察方法)

軟X線撮影後, 同検体を脱灰H-E染色標本として, 組織学的に検索した。

(生化学的および統計学的分析方法)

埋入3, 7, 14, 21日後に各群5匹ずつの筋肉内に埋入したペレットのみを摘出し, 実験1と同様に, ALP活性, Ca濃度を測定した後, 統計学的有意差を検定した。

結果

(軟X線学的所見)

埋入14, 21日後では, rhBMP-2を埋入した筋肉内にペレットの形体にほぼ一致した不透過像が両群ともに認められた。その不透過性については, 両群間で差を見出せなかったが, その周囲に造影された血管については, 今回検索したすべての時期において, N群ではC群でみられるような微細な血管が造影されていないという比較的明確な差異が得られた (写真2)。

(組織学的所見)

両群とも埋入14, 21日後には, 筋肉と接する埋入したペレットの辺縁付近に誘導された新生骨が認められ, 中心部にはコラーゲンの残存がみられた。両群間で新生骨の組織学的な形態には, 明らかな違いは認められなかったが, 新

生骨量はN群ではC群と比較し少なく, コラーゲン残存量は逆に多くなっていた。また, 埋入7日後の新生軟骨についても同様に, 形態学的な違いは認められなかったものの, 新生軟骨量はN群で少なかった (写真3)。

(生化学的分析結果)

両群各時期5検体ずつの埋入したペレット内の蛋白質重量当たりのALP活性と重量当たりのCa濃度の平均は, いずれの時期においてもN群がC群より低かった。Ca濃度は埋入21日後まで徐々に上昇するのに対し, ALP活性は埋入14日後をピークとし21日後ではすでに下がり始める傾向が認められた。ALP活性については, すべての時期において, N群はC群より有意に低く, Ca濃度については, 埋入14, 21日後で低かった (図2, 3)。

考 察

喫煙の骨組織治癒に対する影響を検討するため, 今回, ニコチンが骨形成に対し影響を与えるのか否かについて検索した。

検定に用いた骨形成因子によるin vivoでの実験系は, われわれが常に使用している安定した骨形成過程への影響を評価する実験系であり⁸⁾, かつ将来臨床においてインプラント治療に用いる可能性のある骨形成因子について検討していることから, 最適の実験系であると考えられた。本実験系で今回設定した中濃度以上において有意に骨形成阻害

を認めたことは、ニコチンが *in vivo* における骨形成過程に何らかの影響を与えることを示唆するものである。しかし一方でニコチンは、骨形成過程に対して強い影響をもたないとする報告もある⁹⁾。

今回の研究におけるニコチン濃度の設定は、喫煙者の血中ニコチン濃度は 10^{-7} M 台であり¹⁰⁾、ラットでの静脈内投与のデータでは、0.18-4.7mg/kg/day の 14 日間持続投与で、血中ニコチン濃度がほぼ 2×10^{-6} M となる¹¹⁾ ことを参考とし、0.1, 1.0, 10.0mg/kg/day で 14 日間皮下持続投与とした。H 群の 10.0mg/kg/day は少し高過ぎる濃度設定なのかも知れないが、陽性対照の意味でも必要と考え実施した。ラットでの研究結果がすべて臨床に対応するものではないが、今回 M 群の濃度でも骨形成能を有意に阻害したという結果から、この濃度設定でさらに詳細な検索を進めた。今回、有意差がみられたニコチン濃度は大量喫煙者では一時的に達する可能性のある血中濃度である。しかし、今回の実験系は 14 日間の慢性的実験なので実際の臨床ではこの研究ほどの影響はでない可能性もある。また今回、ニコチン投与開始 3 日後というかなり早期より、微細な毛細血管の収縮および血管新生阻害の可能性が示されたことから、血流の減少による間接作用としての骨形成阻害の可能性が示唆された。今後、この血流減少について、局所血流量の測定を行い、骨形成量との関係についてさらに検索を進めていく予定である。

結 語

今回、遺伝子組み換えヒト骨形成因子を用いたラット下腿筋肉内骨誘導におけるニコチンの影響を検索した。骨形成過程において、大量喫煙者では到達しうる濃度のニコチン投与で骨形成阻害がみられ、局所血流量の低下が関係していることが示唆された。

謝辞

本研究の一部は、平成 15 年度文部科学省科学研究費補助金基盤研究 (B) (2) 課題番号 15390612 および喫煙科学研究財団の助成により行われたものである。

引 用 文 献

- 1) Silverstein, P.: Smoking and wound healing. *Am J Med* 93: 22s-24s 1992.
- 2) Krall, E.A., Garvey, A.J., et al.: Alveolar bone loss and tooth loss in male cigar and pipe smokers. *J Am Dent Assoc* 130: 57-64 1999.
- 3) Levin, L., Herzberg, R., et al.: Smoking and complications of onlay bone grafts and sinus lift operations. *Int J Oral Maxillofac Implants* 19: 369-373 2004.
- 4) Bessho, K., Konishi, Y., et al.: Bone induction by *Escherichia coli*-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 compared with Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Br J Oral Maxillofac Surg* 38: 645-649 2000.
- 5) 日本臨床化学会分析部会酵素部会：血清アルカリホスファターゼ活性測定に対する標準的測定法。第 7 回臨床化学分析部会資料 Draft 1, Step 2, p11-19 1988.
- 6) Connetry, H.V. and Briggs, A.R.: Determination of serum by means of orthocresolphthalein complexone. *Am J Clin Pathol* 45: 290-296 1966.
- 7) Akioka, J., Kusumoto, K., et al.: Angiogenesis around induced bone with recombinant human BMP-2 in a latissimus dorsi muscle flap. *J Musculoskeletal Res* 6: 17-21 2002.
- 8) Okubo, Y., Bessho, K., et al.: Effect of elcatonin on osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 317-321 2000.
- 9) 田中 清：喫煙あるいはニコチンの末梢作用の修飾因子とその分子機構に関する研究—骨代謝に及ぼす喫煙の影響及びその修飾因子とその分子機構に関する基礎的臨床的研究—。平成 11 年度喫煙科学研究財団研究年報：841-846 2000.
- 10) Henningfield, J.E., Stapleton, J.M., et al.: Higher levels of nicotine in arterial than in venous blood after cigarette smoking. *Drug Alcohol Depend* 33: 23-29 1993.
- 11) Li, Z., Barrios, V., et al.: Chronic nicotine administration does not affect peripheral vascular reactivity in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 1135-1142 1994.