

Novel insights into mechanisms of bone loss from allergic inflammation using experimental mouse model

大内, 雅博
九州大学大学院歯学府

<https://doi.org/10.15017/26324>

出版情報：九州大学，2012，博士（歯学），課程博士
バージョン：
権利関係：



骨粗鬆症発症へのアレルギー性炎症の関与

2012 年

大 内 雅 博

九州大学大学院歯学府歯学専攻

九州大学大学院歯学研究院

口腔保健推進学講座 歯科矯正学分野

指導：教授 高橋 一郎

九州大学大学院歯学研究院

口腔常態制御学講座 分子口腔解剖学分野

指導：准教授 城戸 瑞穂

略語表

Alum	・	・	・	Hydroxyl aluminum gel
ALP	・	・	・	Alkaline phosphatase
ATP5f1	・	・	・	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit B1
BLT	・	・	・	Leukotriene B4 receptor
BMD	・	・	・	Bone mineral density
BV / TV	・	・	・	Bone volume / tissue volume
cDNA	・	・	・	Complementary DNA
CysLT	・	・	・	Cysteinyl leukotriene receptor
DNase	・	・	・	Deoxyribonuclease
EDTA	・	・	・	Ethylenediaminetetraacetic acid
FLAP	・	・	・	Five lipoxygenase activating protein
HMGB1	・	・	・	High mobility group box 1
IgE	・	・	・	Immunoglobulin E
IL	・	・	・	Interleukin
Lta4h	・	・	・	Leukotriene A4 hydrolase
mRNA	・	・	・	Messenger ribo nucleic acid
OVA	・	・	・	Ovalbumine
PBS	・	・	・	Phosphate buffer saline
PCR	・	・	・	Polymerase chain reaction
RANKL	・	・	・	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RANTES	・	・	・	Regulated and normal T cell expressed and secreted
Tb. N	・	・	・	Trabecular bone number
Tb. Th	・	・	・	Trabecular bone thickness
Th1,2	・	・	・	Helper T cell 1, 2
TRAP	・	・	・	Tartrate resistant acid phosphatase
TNF- α	・	・	・	Tumor necrosis factor - α
5-LO	・	・	・	Arachidonate 5 - lipoxygenase

本研究の一部は投稿中である。

Novel insights into mechanisms of bone loss from allergic inflammation using experimental mouse model

Masahiro Ouchi, Junko Hatakeyama, Naohisa Murata , Masao Yoshinari, Reona Aijima, Hideki Ioi,

Ichiro Takahashi, Mizuho A.Kido

Bone (現在投稿中)

本文の内容の一部は、下記学会において報告した。

アレルギーモデルマウスにおける脛骨骨髓の経時的骨梁変化

大内雅博、村田直久、五百井秀樹、高橋一郎、城戸瑞穂

第 53 回 歯科基礎医学会 (2011 年、岐阜)

Masahiro Ouchi, Junko Hatakeyama, Naohisa Murata , Masao Yoshinari, Reona Aijima, Hideki Ioi,

Ichiro Takahashi, Mizuho A.Kido

Novel insights into mechanisms of bone loss from allergic inflammation using experimental mouse model

2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research (2013 年、神戸) 予定

目次

I. 要旨	1
II. アレルギー炎症が骨量へ与える影響の解明	2
II-1. 緒言	2
II-2. 材料と方法	6
動物実験について	
アレルギー疾患モデルマウスの作製	
肺におけるアレルギー炎症の組織像観察	
組織学的検討	
血液学的検査	
Micro Computed Tomography (μCT) による脛骨海綿骨骨梁の解析	
三点曲げ試験	
定量的リアルタイム PCR 法による遺伝子発現量解析	
ロイコトリエン量の測定	
統計処理	
II-3. 結果	10
II-4. 考察	23
III. マウスを用いた矯正的歯の移動へのアレルギーの影響解明のための予備的研究	26
III-1. 緒言	26
III-2. 試料と方法	27
アレルギー疾患モデルマウスの作成	
コイルスプリングの装着	
血液学的調査	
TRAP 染色	
形態計測	
III-3. 結果	30
III-4. 考察	30
IV. 総括	32
V. 謝辞	33
VI. 参考文献	34

I. 要旨

喘息・アトピー性皮膚炎・アレルギー性鼻炎などアレルギー疾患の罹患者は世界的に増加傾向にあると言われており、我が国においては国民の約3人に1人以上であると考えられている。こうした患者は、症状の増悪と寛解を繰り返し、抗アレルギー薬やステロイド剤による治療を受けている事が多い。アレルギー患者における骨粗鬆症の罹患率が非患者群よりも高いことが報告されており、局所的あるいは全身的なステロイド投与が骨量の低下を導くと考えられてきた。しかし、喘息やアトピー性皮膚炎患者と骨密度あるいは骨粗鬆症罹患についての統計的な解析の報告をみると、その関連性は明らかとはいえない。そこで、本研究では卵白アルブミン(OVA)の全身投与によるアレルギーモデルマウスを作製し、骨代謝調節への影響を調べた。

OVA投与により血漿中総IgEおよびOVA特異的IgE量が対照群よりも有意に上昇していた。OVA投与群にOVA溶液を鼻より吸引させると気管支周囲に炎症性細胞浸潤が認められた。 μ CT解析による脛骨の三次元解析では、骨量、骨梁幅、骨密度がアレルギー惹起9週間後に有意に減少していた。骨組織においては、OVA投与後3週目より破骨細胞数の増加が確認された。定量的PCR解析により骨組織中のmRNA発現変化を、IL-1 β 、IL-17、IL-4, IL-10, RANKLなどの炎症性サイトカインの上昇が認められた。さらにアレルギー増悪に関わることが知られている脂質メディエーターの合成酵素やその受容体群の発現上昇が確認された。骨中のロイコトリエン量の増加も確認された。

これらのことより、全身的なアレルギー炎症が破骨細胞形成を誘導し、骨減少を引き起こすことが示唆された。

Ⅱ．アレルギー炎症が骨量へ与える影響の解明

Ⅱ-1. 緒言

我が国の高齢化は世界に類のないスピードで進行しており、2025年には国民の4人に一人が65歳以上という超高齢化社会が到来すると予想されている（内閣府，平成23年版，高齢社会白書）。骨粗鬆症患者も高齢化社会の進展と共に増加し、その患者数は1000万人以上と推測されている（山本，1999）。

骨粗鬆症による脊椎や大腿骨頸部骨折は高齢者の生活の質を低下させ、自立機能を損ない、寝たきりへと繋がる大きな要因である（森 et al., 1997）。従って、骨粗鬆症をできる限り早期に診断し適切な治療を行い、骨折を予防することはきわめて重要である。

近年、我が国においては、骨密度測定器などの普及により骨への関心が高まったとは言え、1000万人と推測される骨粗鬆症患者のうち、治療を受けているのは、わずか2割とも言われ、早期の診断・治療にはほど遠い現状である。骨粗鬆症は、Fuller Albright がその病名を1948年に記載したにもかかわらず（Reifenstein and Albright, 2011）、WHO が疾患として正式に認知したのは1994年である。骨粗鬆症は沈黙の疾患ともいわれ、自覚症状が現れたときはすでに進行した状態にあることもその治療介入の難しさに繋がっている。

骨は常に作られ、その一方で壊されるという改造を繰り返すことで構造を保ち、身体の保護や姿勢の維持、造血などの役割を果たしている。力学的負荷の減少や栄養摂取の変化、糖質コルチコイドや炎症性サイトカイン量の変化などにより、骨形成と骨吸収とのバランスの変化がおこり、骨の構造的特性を変化させ、骨の強度の低下を招く。

加齢およびそれと並行しておこる性ホルモン低下を主な要因とする骨粗鬆症は、原発性骨粗鬆症といわれる。それに対して、原因となる基礎疾患が存在するものは続発性骨粗鬆症という。続発性骨粗鬆症の原因は、非常に多様であり、副甲状腺機能亢進症、性腺機能低下症など内分泌性疾患やカル

シウム、リン、ビタミン D などの栄養や代謝に関わる疾患、あるいは薬物、血液疾患、動脈硬化や糖尿病、喫煙、アルコールなどが報告されている（井上、2011）。その中でも、慢性の炎症性疾患として慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患や慢性閉塞性肺疾患、喘息などと骨減少あるいは骨粗鬆症の関連性も報告されてきた。

特に関節リウマチや歯周病などの炎症性疾患において、炎症や感染による骨破壊機構が明らかになるにつれ、免疫系による骨代謝制御の重要性が認められるようになった。その中でも破骨細胞分化因子である Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) (Udagawa et al., 1999) が T 細胞に発現する樹状細胞活性化因子 TNF-related activation induced cytokine と同じ分子であることがわかって以来、(Matsuzaki et al., 1998; Yasuda et al., 1998) 「骨免疫学」という概念が導かれた (Takayanagi et al., 2000)。炎症性サイトカインとしてよく知られている Interleukin (IL) -1、IL-6 や Tumor necrosis factor- α (TNF- α) 等のサイトカインは破骨細胞分化因子である RANKL の発現を誘導することで、間接的に骨吸収を促す (Jandinski, 1988; Kwan Tat et al., 2004)。これらの分子群を対象とした薬剤はすでに治療にも応用されている。

慢性炎症性疾患患者は、骨粗鬆症の頻度が高いとの疫学的な研究は数多くみられる。慢性の炎症性疾患の治療には、糖質コルチコイドが主に処方されることが多いことから、糖質コルチコイドの骨代謝への影響を鑑みた研究が多く、いわゆるステロイド性骨粗鬆症と考えられている。興味深いことに、ステロイド性骨粗鬆症患者に対し、ステロイド投与をやめたとき、骨減少や骨折リスクはステロイド投与前のレベルに戻ることが報告されている (van Staa et al., 2002)

こうした慢性炎症患者における骨粗鬆症の頻度を調べた影響は多くあるが、その因果関係を明らかにするのは容易ではない。なぜなら、高度の炎症が存在するとステロイドの投与濃度や頻度が高くなることから、慢性炎症性疾患による炎症自体が直接骨代謝へ影響を及ぼしているのか、あるいは投与されたステロイドが骨へ影響しているのかを判断できないからである。

骨粗鬆症と並んで、アレルギー疾患の罹患もまた高い頻度が知られている。世界的に喘息やアレルギー

ギー性鼻炎・花粉症・アトピー性皮膚炎・アレルギー性結膜炎をはじめ、食物アレルギーやなどのアレルギー疾患の患者数は増加を続けており、骨粗鬆症と同様に社会的、経済的損失を招いている。当初は西欧諸国の疾患と捉えられていたが、近年は発展途上国にも広がりを見せており、“allergy epidemic”という言葉も使われるほどである。我が国においても、2008年の小児喘息の有病率は幼稚園児で19.9%、成人有病率は5.4%、花粉症を含む鼻アレルギーの頻度は47.2%（厚生労働科学赤澤班2010報告）と判明している。また、アトピー性皮膚炎も小児で12%前後、20-30歳代で9%程度（厚生労働研究、アトピー性皮膚炎ガイドライン2008）と報告されている。これらの結果から我が国の人口の約2人に1人は何らかのアレルギー疾患に罹患していることを示し、急速な増加を顕している。

アレルギー疾患の中でも、喘息と骨粗鬆症との関係についての疫学的な研究は数多い。喘息の治療にはステロイド剤が使用される頻度が高いことから、骨密度への影響を評価するそれらの研究では、ステロイド剤の使用量や頻度・投与期間と骨密度との関係を研究対象としている。比較的長期的な検証を行ったコホート研究では、小児および成人において経口投与されるステロイド剤の量や投与期間と骨密度低下に関連がある事が報告されている（Kelly et al., 2008; Matsumoto et al., 2001）。その一方で閉経後の女性を対象とした調査によると、ステロイド吸入と骨粗鬆症頻度とは関連性が認められなかったとの報告もある（Elmstahl et al., 2003）。近年、Damらは、男性5541人を対象とし、慢性閉塞性肺疾患や喘息の既往が骨粗鬆症のリスクファクターであることが報告した（Dam et al., 2010）。また、Haeckらは、中等度から重度のアトピー性皮膚炎患者を調べ、骨密度とステロイド投与量とは有意な関連はないことを報告した（Haeck et al., 2009）。これらは、喘息やアトピーの炎症が骨へ与える影響を示唆している。しかしながら、これらの一連の研究は、患者の背景や調査方法も多様であることから一定の見解は得られたとは言い難い。

アレルギー疾患も慢性の炎症性疾患であるが、現在のところ、骨粗鬆症や骨減少との直接的な関連性についてはほとんど報告がない。アレルギー炎症の際に好酸球や好中球の強力な遊走作用を示し、炎症の増悪に関わることが知られているロイコトリエン（leukotriene：LT）が骨代謝を調節することが

報告されている。LTB₄は破骨細胞分化を促進することや破骨細胞による骨吸収を亢進させること (Garcia et al., 1996)、骨芽細胞による硬組織形成を抑制することも報告されている (Ren and Dziak, 1991)。最近、リポポリサッカライド誘導骨減少や卵巣摘出による骨吸収が LT の受容体である Leukotriene B4 receptor (BLT1) の遺伝子欠失マウスでは抑えられることが報告された。LT は細胞内で 5-lipoxygenase (5 - LO) の作用によってアラキドン酸から合成される。5-LO も RANKL による破骨細胞形成を強めることが報告され、これら脂質メディエーターと破骨細胞分化との関連もまた創薬ターゲットと考えられるようになっている。

私は、他の慢性炎症疾患の報告や前述の疫学調査の結果、さらにはアレルギー炎症の場で活発に分泌される分子の骨代謝調節機能の報告などから、アレルギーによる慢性炎症も骨粗鬆症のリスクファクターのひとつになっているのではないかと考えた。そこで慢性アレルギー炎症そのものが骨に与える影響を調べるために、マウスのアレルギーモデルを用いて骨減少がおこるかどうかを調べた。

Ⅱ - 2. 材料と方法

動物実験について

全ての実験は、九動株式会社（鳥栖）より購入した 6 週齢の C57BL / 6N マウス（雄）を用いた。動物実験は九州大学動物規則実施細則を遵守し、九州大学動物実験委員会の承認を得た。

アレルギー疾患モデルマウスの作製

アレルギー惹起には、卵白アルブミン（OVA, Sigma-Aldrich, St. Louis）をアレルゲンとし、アジュバントとして水酸化アルミニウムゲル（Alum ; Sigma-Aldrich, St. Louis）を用いた。実験は、マウスを以下の 4 群に分け、行った。1), OVA 50 μ g と Alum 2mg を 200 μ l の phosphate buffer saline (PBS, 0.01M, pH7.4) に溶解し腹腔内に注入した群（OVA + Alum 群）、アレルゲンあるいはアジュバントの影響を知るため、2), OVA のみを投与する群（OVA 群）、および 3), Alum のみを投与する群（Alum 群）、4), PBS を投与する群（PBS 群）の 4 群である。

各群への投与は毎週行った。試料採取を初回投与から 1 週目、3 週目、5 週目、7 週目、9 週目に行った。試料を採取する週では感作は行わなかった。

肺におけるアレルギー炎症の組織像観察

アレルギー炎症の惹起を確認するため、9 週間の OVA + Alum 群において、ジエチルエーテル（ナカライテスク株式会社, 京都）にて浅麻酔後、マウスの鼻に OVA 溶液（OVA100 μ g in 40 μ l PBS）を 1 日 1 回 5 日間吸引させた。対照として、無処置の同種マウスおよび PBS 群に PBS を吸引させた。

組織学的検討

ペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル ; 共立製薬株式会社, 東京）を用いて、腹腔内投与にて麻酔（濃度 : 50mg / kg）を行った後、1%ヘパリン（ノボ・ヘパリン, 持田製薬株式会社, 東京）含有 PBS にて脱血し、4%パラホルムアルデヒド 0.1M PBS (4°C, pH7.4) にて灌流固定後、大腿骨、肺組織を採取した。同固定液を用いて 12 時間浸潤固定した後、20%ショ糖含有 PBS 溶液にて浸漬した。

組織は Tissue-Tek O.C.T compound (Sakura Finetek, 東京) にて包埋し、前頭断にて $8\mu\text{m}$ 凍結切片を作成した。HE 染色を行った後、通法に従って脱水、透徹を行い、エンテラン (Entellan, MERCK, Darmstadt) で封入後、デジタル顕微鏡 (BZ-9000, Keyence, 大阪) を用いて観察を行った。TRAP 染色には、前頭断切片を $50\mu\text{m}$ 毎に採取し、成長板の最深部より前後6枚ずつ、合計 12 切片を観察対象とした。TRAP 染色キット (Sigma-Aldrich, St. Louis) を用いて、プロトコルに従い染色を行い、トルイジン・ブルーで対比染色を行った。封入後、デジタル顕微鏡を用いて観察、撮影を行った。成長板直下に $660\times 380\mu\text{m}$ の枠を設定し、枠内の TRAP 陽性細胞数 (2 核以上) を付属ソフトウェア (MZ-II Analyzer) を用いて解析を行った。

血液学的検査

OVA 感作による効果を確認するため、1 週目、3 週目、5 週目、9 週目にマウス右心房より採血を行い、血漿を分離し、OVA 特異的 IgE (OVA-IgE) および総 IgE 量を ELISA により調べた。シバヤギ社製の IgE-ELISA キット (シバヤギ, 東京)、OVA-IgE ELISA キット (シバヤギ, 東京) を用いて、総 IgE 濃度、OVA-IgE 濃度 (ng / ml) を測定した。

Micro Computed Tomography (μCT) による脛骨海綿骨骨梁の解析

骨への影響を知るために、PBS 群、Alum 群、OVA 群、OVA + Alum 群それぞれを対象に、micro-CT SkyScan1076 (SkyScan, Antwerp) を用いて脛骨を撮影し、ならびに測定を行った。CT 撮影は感作開始時、3 週目、5 週目、9 週目に行った。マウスを 1%イソフルランにて吸入麻酔を施し、右後ろ足を固定して撮影を行った。撮影は、0.5mm Aluminium フィルターを用いて、電圧 50kV、電流 $200\mu\text{A}$ 、空間分解能 $9\mu\text{m}$ 、ローテーション角度 0.7° 、カメラ解像度 4000×2672 にて行った。撮影されたデータは InstaRecon software (InstaRecon, Inc. Champaign, IL) を用いて、 4000×2672 ピクセルにて再構成した。さらに CTan (Skyscan) を用いて、脛骨近位の成長板直下より 0.5mm 離れた部分から遠位に 1mm の部位の海綿骨を計測領域とし解析を行った。CTan を用いて骨三次元解析パラメータである単位面積

あたりの骨単位 (bone volume / total tissue volume: BV / TV)、骨梁の幅 (trabecular thickness: Tb.Th)、骨梁数 (trabecular number: Tb.N)、骨密度 (bone mineral density: BMD) の解析を行った。また、同ソフトを用いて、計測領域から水平断 50 スライス (450 μ m 分) の最大輝度投影画像を作成、厚さ 500 μ m の前頭断 3D 画像を作成した。

三点曲げ試験

各群のマウスを前述と同様に、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与にて麻酔を行った後、脛骨を採取し、液体窒素で凍結した。三点曲試験は東京歯科大学口腔科学研究センター口腔インプラント学研究部門にて静的材料試験機 (AG-I 20kN, 島津製作所, 京都) を用い行った。曲げ応力の解析は「日本金属学会編 材料試験法」(1976 仙台) をもとに行われた。

定量的リアルタイム PCR 法による遺伝子発現量解析

1、3、5、7、9 週目における各群の脛骨を取り出し、液体窒素下にて粉碎後、TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad) にて total RNA を回収し、Deoxyribonuclease (DNase) 処理 (DNase I, Takara Bio Inc, 滋賀) を行った。Complementary DNA (cDNA) 合成は total ribo nucleic acid (total RNA) と Random Primer および逆転写酵素 ReverTra Ace (Toyobo Co.Ltd., 大阪) を含む反応液を混和し、30°C で 10 分の前処理後、42°C で 20 分逆転写反応を行い、99°C で 5 分加熱して不活性化を行った。標的遺伝子の PCR プライマーは、MacVector (Ceres Bioscience, 埼玉) を用いて、増幅サイズが 50-250bp となるよう設計した (Table 1)。Polymerase chain reaction (PCR) 反応には、SYBR Premix EX Taq kit (Takara Bio Inc.) を用いた。キット中の 2xSYBR Premix Ex Taq、Rox Ref Dye、10 μ M PCR Forward Primer、10M PCR Reverse Primer、H₂O および cDNA を混和後、増幅反応を行った。増幅反応には、Rotor Gene3000 (QIAGEN, Valencia) を用いて、95°C で 15 秒、57°C で 30 秒、72°C で 60 秒の加熱をサイクルとし、35 サイクル行った。結果は、それぞれの遺伝子の発現強度を内部標準である ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit B1 (Atp5f1) にて補正を行った。

ロイコトリエン量の測定

大腿骨を液体窒素下にて粉末状にすり潰し、1%蟻酸含有メタノール 1ml に混合することで脂質を抽出した。脂質濃度は LTB₄, LTC₄ ELISA kit (Cayman Chemical, Ann Arbor,) を用い、プロトコールに従い

測定した。組織の重量をあらかじめ測定しておき、骨単位重量あたりの脂質量を算定した。

統計処理

統計解析は、多群間の比較について、一元配置の分散分析（ANOVA）およびBonferroniの多重比較検定を行った。全てのデータは mean±SE.で表し、統計的有意さは 危険率5%未満（ $p < 0.05$ ）とした。

Table 1

Genes	Amplicon size	Forward	Reverse	Genbank acc. no.
mIL-1 β	283	GACCTTCCAGGATGAGGACA	AGGCCACAGGTATTTTGTCG	NM 008361.3
mIL-4	399	TAKARA (RR081A)		NM 021283.2
mIL-10	161	CCAAGCCTTATCGGAAATGA	TTTTCACAGGGGAGAAATCG	NM 010548.2
mRANTES	70	GCAAGTGCTCCAATCTTGCA	CTTCTCTGGGTTGGCACACA	NM 013653.3
mTNF- α	131	CCCCAAAGGGATGAGAAAGTT	CACTTGGTGGTTTGCTACGA	NM 013693.2
mHMGB1	158	CATTGGTGATGTTGCAAAG	CTTTTTCGCTGCATCAGGTT	NM 010439
mRANKL	197	TGTACTTTCGAGCGCAGATG	CCACAATGTGTTGCAGTTCC	NM 011613
mALP	68	CTGATCATTCCCACGTTTTC	GAGCCAGACCAAAGATGGAG	NM 007431.2
m5-LO	337	CCGCTTCATGCACATGTTCCAG	GCAGCCAGGAACTGGTGTGTAC	NM 009662
mFLAP	150	TACACTGCCAACCAGAACTGC	TCCCAGATAGCCGACAAAGT	NM 009663
mLta4h	110	CTGGCACAGGTGCTTCAGAAG	GCAGTCACGGGATGCATGCTG	NM 008517
mCysLT1	164	CAACGAACTATCCACCTTCACC	AGCCTTCTCCTAAAGTTTCCAC	NM 021476
mCysLT2	169	GTCCACGTGCTGCTCATAGG	ATTGGCTGCAGCCATGGTC	NM 001162412
mBLT1	237	TTGCTCACTGCTCCCTTTTT	AAAAGACACCACCCAGATGC	NM 008519
mBLT2	135	GCGTCAACCCAGTGCTCTAT	TGCCCCATTACTTTCAGCTT	NM 020490
Atp5f1	109	TAKARA (RR081A)	TAKARA	

Ⅱ - 3. 結果

体重変化、および血中 IgE 濃度の計測

本研究では慢性的なアレルギーが骨へ与える影響を調べるために OVA を毎週1回腹腔内注射を行った。最初の感作時、マウスは6週齢であり、PBS 群では、週令を重ねるごとに体重の増加が認められた。一方、OVA 群、OVA + Alum 群では、それぞれ投与後数日は体重の減少がみられたが、その後回復し、実験期間を通じて各実験グループ間では、統計学的有意差は認められなかった。OVA + Alum 群では体重が他の群よりも減少する傾向にあった (Fig. 1A)。

アレルギー炎症の惹起を確認するために、OVA + Alum 群に経鼻的に OVA 溶液を吸引させた。OVA 溶液の吸入により、気管支周囲への炎症性細胞の浸潤が顕著で、組織の線維化も認められた。PBS を吸引させた群では、無処置群と比較して、血管周囲にわずかな炎症性細胞の浸潤を認めるのみであった (Fig. 1B)。

次に、血漿中の IgE 濃度を調べた。OVA + Alum 群における総 IgE 濃度は、感作 5 週目にて、PBS 群、Alum 群よりも有意に上昇していた。統計的有意差はないが、OVA 群においても、上昇傾向がみられた。感作 9 週目において OVA + Alum 群、OVA 群共に PBS 群や Alum 群に比べ、有意に上昇していた。

OVA 特異的 IgE においては、感作後 3 週目より OVA + Alum 群がその他の群に比べ、有意に上昇していた。その後、OVA + Alum 群における OVA 特異的 IgE は減少傾向を示したが、9 週目においても、PBS 群、Alum 群と比べ、有意に上昇している事が確認された。OVA 群の特異的 IgE は、実験期間を通じて、その他の群と有意差を認めなかった (Fig. 1C)

脛骨の骨形態計測

0 週、3 週、5 週、9 週目の各群における脛骨を μ CT にて撮影し、解析した。9 週目において、OVA + Alum 群の BV / TV は PBS 群および Alum 群に比べ有意に減少していた (Fig. 2A)。骨梁の厚さでは、OVA + Alum 群と PBS 群の間および OVA 群と PBS 群の間で 5 週目、9 週目に有意差が見られた (Fig. 2B)。また、骨梁の数は、9 週目の OVA + Alum 群は、その他の群に比べ有意に減少していた (Fig. 2C)。さらに骨密度は 9 週目の OVA + Alum 群と Alum 群との間に有意な差が見られた (Fig. 2D)。どの測定項目においても PBS 群と Alum 群との間に有意差は認められなかった (Fig. 2E)。

また、骨の実質的な強度を三点曲げ試験にて調べた。7 週目において OVA 群と OVA + Alum 群は、PBS 群に対し有意に曲げ強さが減少した。また、9 週目において OVA 群は PBS 群に対し有意に曲げ強さが減少していた (Fig. 2. F)。

組織レベルでの変化を観察するために、HE 染色および TRAP 染色を行った。5 週目、9 週目において、成長板の厚さには各群で差異は見られなかった (Figs. 3A, B, C)。9 週目における H-E 染色では大腿骨の骨端部の骨梁が OVA + Alum 群、OVA 群で PBS 群、Alum 群と比べて細くなっていた。また、2 核以上の TRAR 陽性細胞数を計測した結果、3 週目では OVA + Alum 群はその他の群に比べ、有意に増加していた (Fig. 3D)。5 週目では、OVA + Alum 群と OVA 群が PBS 群、Alum 群よりも有意に増加していた (Fig. 3E)。9 週目において、いずれの群間にも有意差は認められなかった (Fig. 3F)。

RANKL、炎症性サイトカインの mRNA 発現量変化

アレルギー炎症に関わるサイトカイン、および骨代謝調節に関わる遺伝子の発現量を解析した。炎症に強く関わることで知られる IL-1 β は、1 週目から 5 週目において OVA + Alum 群がその他の群よりも有意に高い値を示した (Fig. 4A)。しかし、7 週目以降は各群に有意差は認められなかった。また、IL-4、IL-10、RANTES (Figs. 4B, C, D) は、OVA + Alum 群は、1 週目から 5 週目にその他の群と比較して有意に高い値を示した。OVA + Alum 群の TNF- α は、3 週目から 7 週目において有意に発現上昇が認められた。一方、RANKL の mRNA 発現量は 1 週目から 5 週目まで OVA + Alum 群において有意に高い値を示した。最近、破骨細胞分化を促すとされている High mobility group box 1 (HMGB1) (Scaffidi et al., 2002; Wang et al., 1999; Yang et al., 2008) は、今回の実験期間を通じて、各実験群の間に有意差は認めなかった (Fig. 4H)。骨形成マーカーである ALP mRNA の発現量は実験期間では、各群に有意差は見られなかった。

脂質メディエーターメディエーター関連分子群の発現量変化

脂質合成酵素である 5-LO、5-LO の活性化分子である 5-lipoxygenase activation protein (FLAP) (Fig. 4I)、LT 合成酵素である LTA4h (Fig. 4J)、LT の受容体である CysLT1、CysLT2、BLT1、BLT2 (Figs. 4L, M, N, O) の mRNA 発現量の変化を調べた。OVA + Alum 群の 5-LO mRNA 発現量は 5 週目、9 週目で高い値を示した。また、OVA + Alum 群における FLAP mRNA はその他の群と比べ、3 週目で増加に有意差があったが、実験期間を通じ他群と比較して統計的有意差は見られなかった。さらに、LTA4h mRNA 発現量は Alum 群、OVA 群、OVA + Alum 群において、1 週目と 3 週目に PBS 群よりも高い値を示した。さらに、7、9 週目では、OVA + Alum 群は PBS 群よりも有意に高い値を示した。

LTC4 レセプターである CysLT1,2 と LTB4 レセプターである BLT1,2 の mRNA 発現量の変化を測定した。CysLT1 の mRNA は、統計学的有意差はなかった。CysLT2 の mRNA は、5 週目、9 週目において OVA + Alum 群が OVA 群よりも有意に高い値を示しており、7 週目では OVA + Alum 群はその他の群

より有意に高い値を示していた。BLT1 の mRNA 発現量は 9 週目に OVA + Alum 群がその他の群よりも有意に増加していた。BLT2m の RNA 発現量において、統計学的有意差は見られなかった。

LTB₄ および LTC₄ の骨中の濃度は、5 週目ではどちらも有意な差は認められなかった (Figs. 5A, B) が、9 週目では、OVA + Alum 群で PBS 群や Alum 群よりも高い値を示した (Figs. 5C, D)。

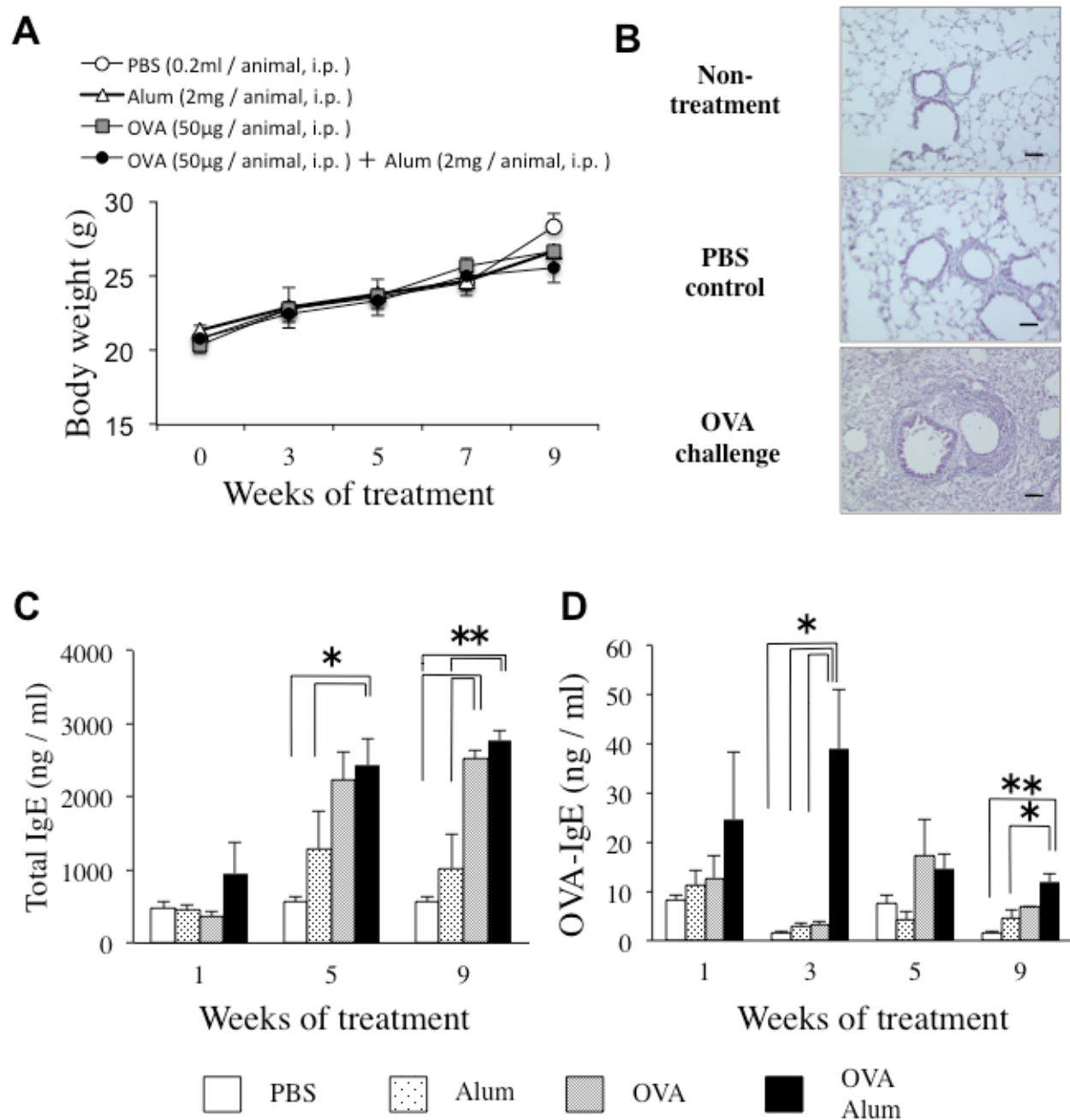


Figure 1

(A) OVAによる感作の影響。各群の体重変化を示す。

(B) 9週間腹腔内注射を行った後、OVA (100 μ g in 40 μ l PBS) 溶液もしくは 0.01M PBSを経鼻的に投与した肺の組織像 (HE 染色)

(C,D) 血漿中総IgE、OVA-IgE量を示す。

Mean $\pm$ SE of 4 animals per group. * p < 0.05, ** p < 0.01, Scale bars : 50 μ m

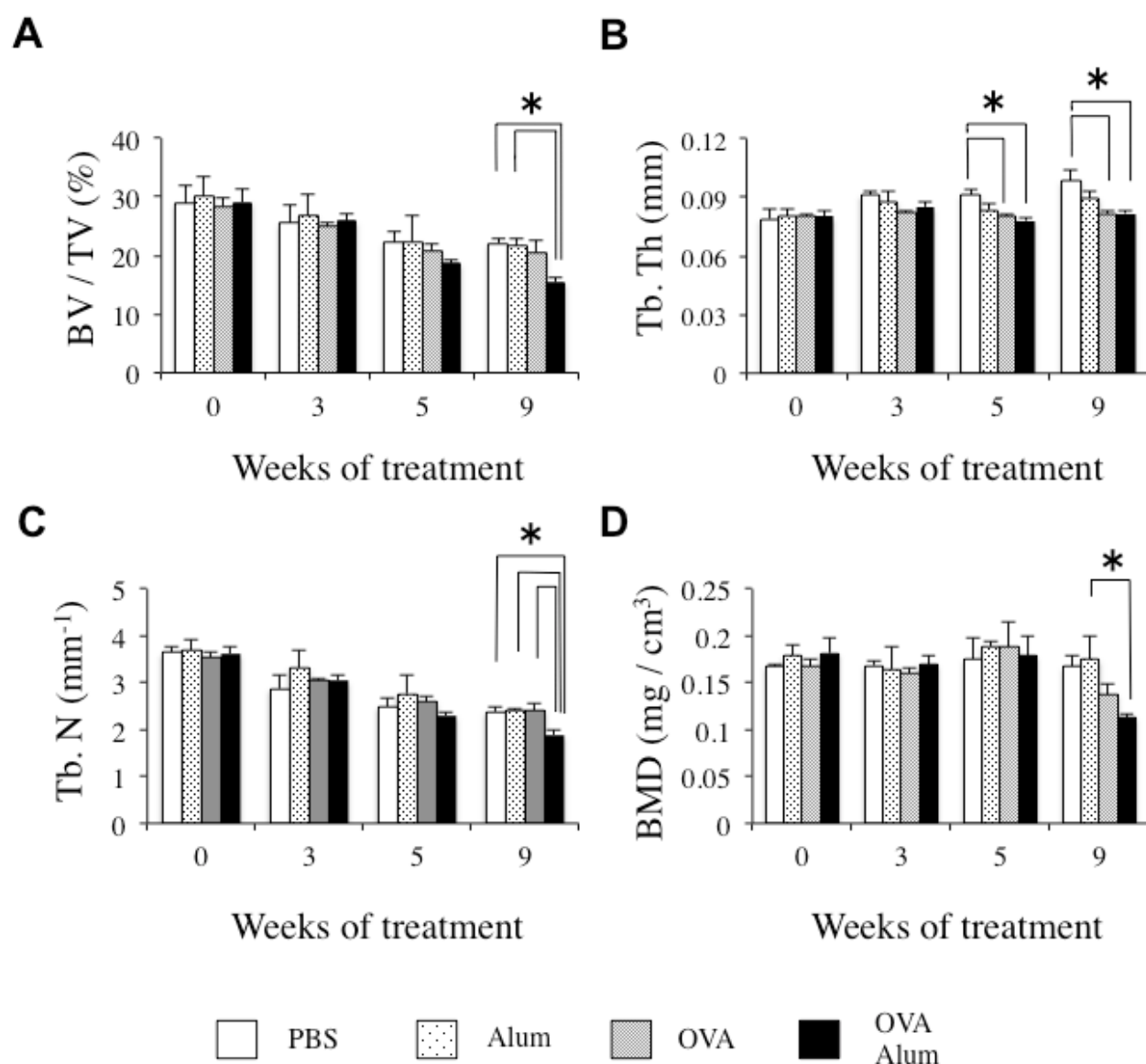


Figure 2

脛骨近位端における成長板軟骨直下の海綿骨骨梁を μ CTにて撮影、計測した。

(A) 組織単位あたりの骨量 (Bone Volume per Tissue Volume ; BV / TV)

(B) 骨梁の厚さ (Trabecular bone Thickness ; Tb. Th)

(D) 骨密度 (Bone Mineral Density ; BMD)

Mean $\pm$ SE of 4 animals per group. * $p < 0.05$, 骨梁の数 (Trabecular bone number ; Tb. N)

E

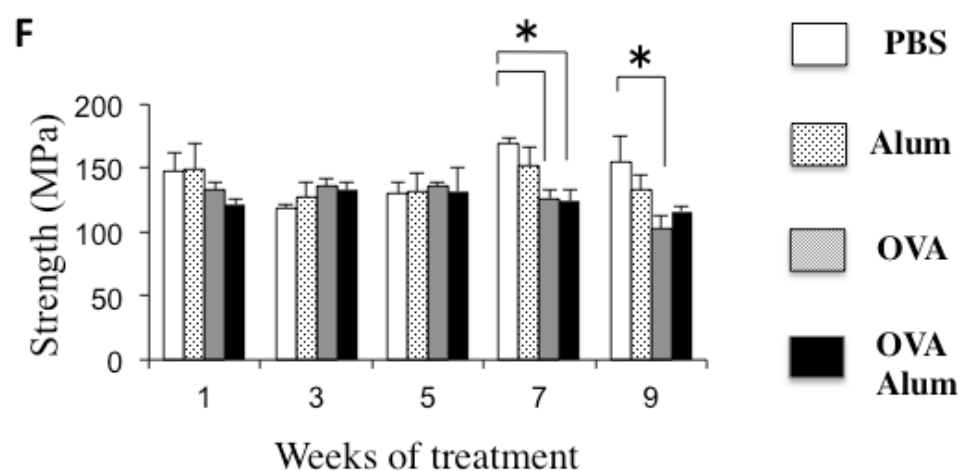
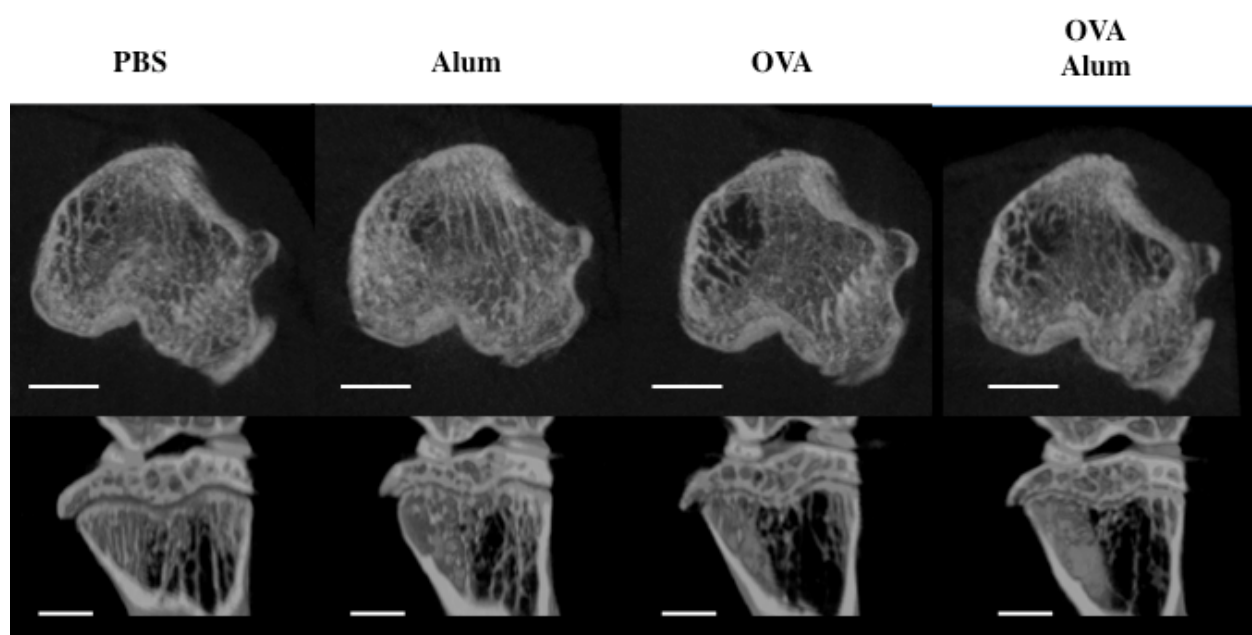


Figure 2

(E) 上段；実験9週目における脛骨成長板軟骨直下で撮影したCT像を50枚 (450 μ m) 重ね合わせた像

下段；前頭断で再構成された脛骨の像

(F) 実験9週目における脛骨の三点曲げ試験による曲げ強さを示す。

Mean $\pm$ SE of 4 animals per group. * $p < 0.01$, Scale bars equal 800 μ m

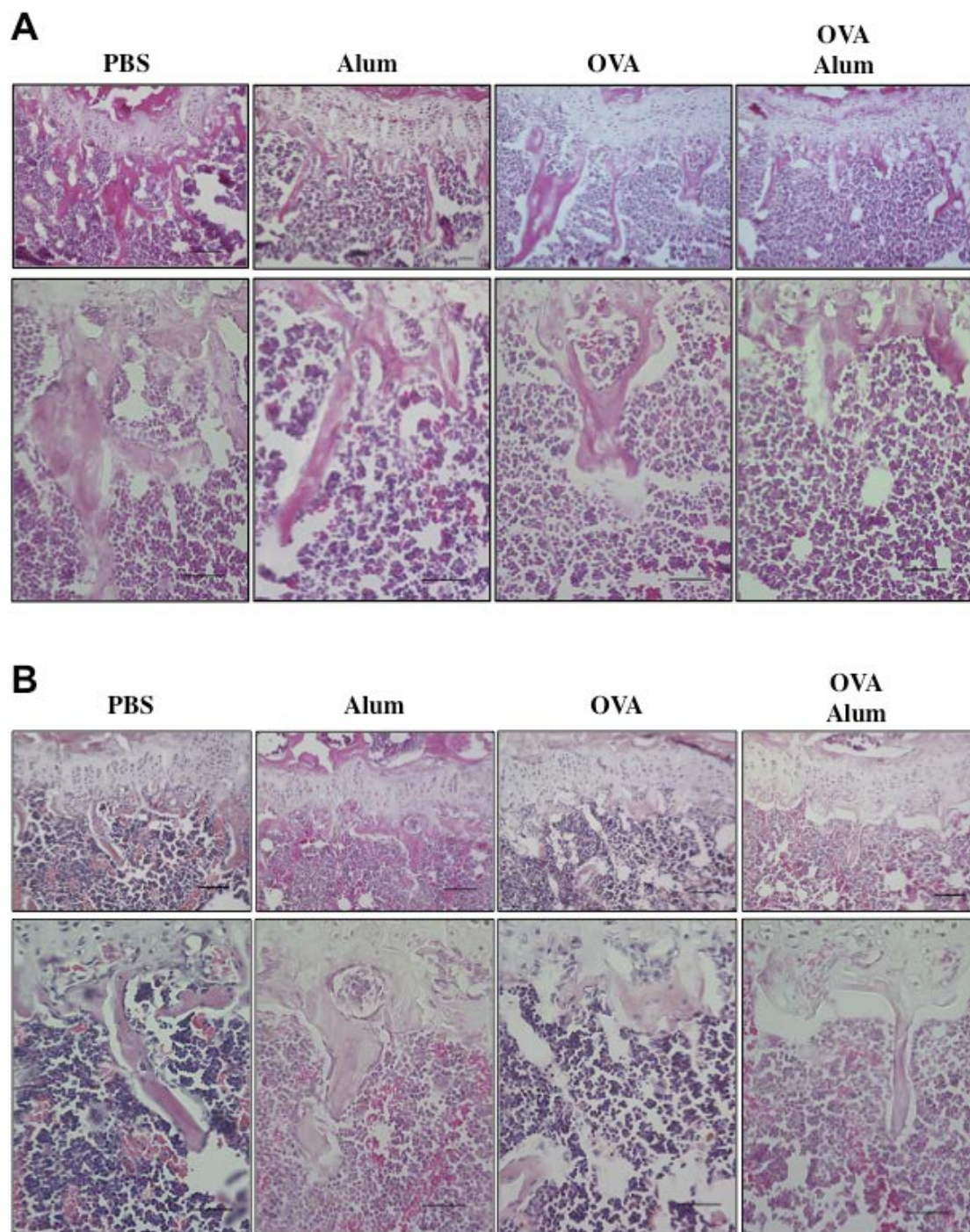


Figure 3

大腿骨遠位端成長板軟骨部の組織像を示す。(HE染色)

(A) 腹腔内投与開始5週目

(B) 腹腔内投与開始9週目

OVA + Alum群で、骨梁が細くなっている像が見られる。Scale bars : 50 μ m

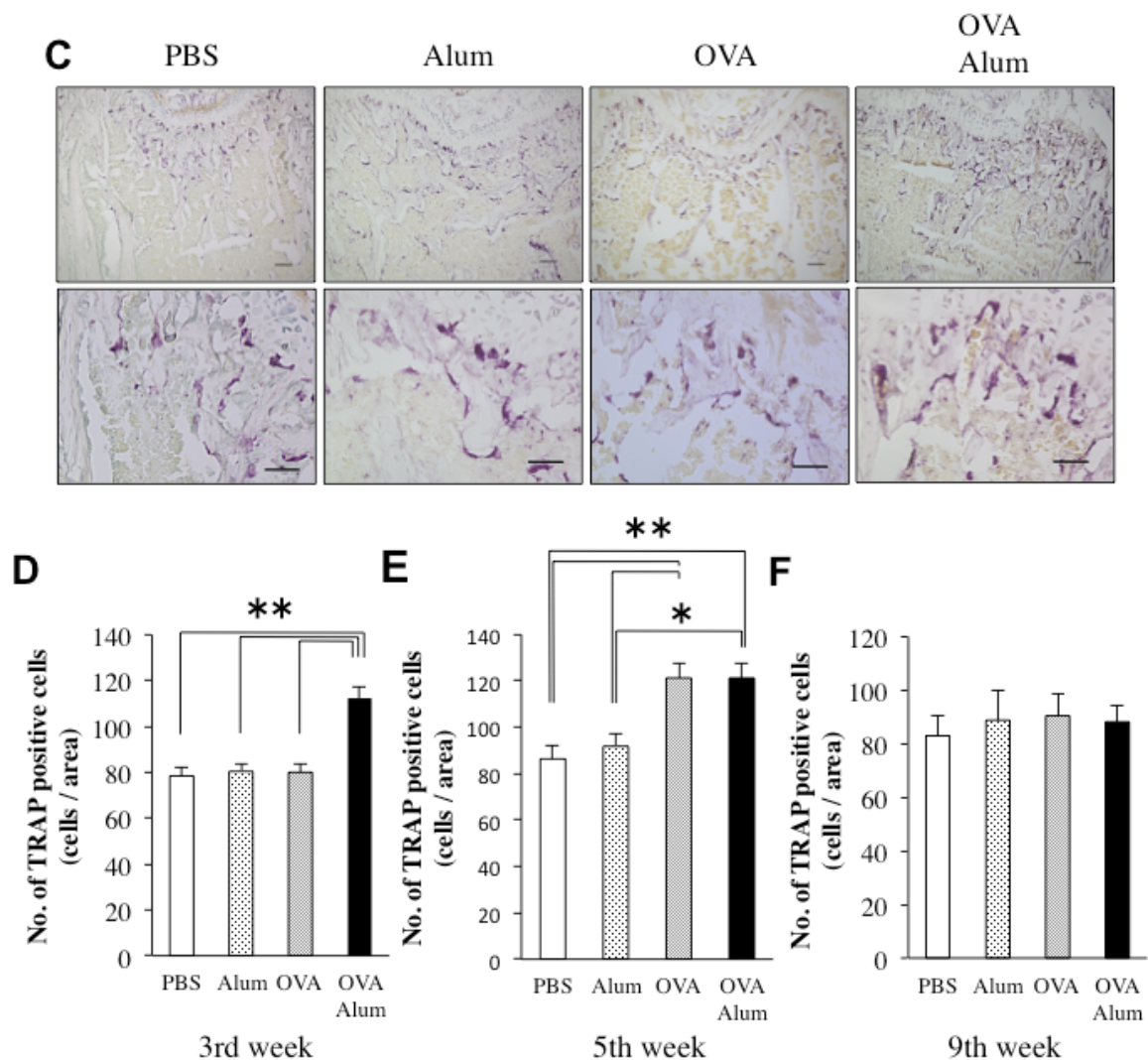


Figure 3

(C) 腹腔内投与を開始して5週目の大腿骨遠位端成長板軟骨部の組織像 (TRAP 染色) を示す。上段 ; 10倍像 下段 ; 40倍像 OVA + Alum群において破骨細胞の増加が見られる。

(D) 3週目のTRAP陽性細胞数

OVA + Alum群のみ、その他の群より有意に上昇している。

(E) 5週目のTRAP陽性細胞数

OVAを投与した群において、投与していない群よりも有意に上昇している。

(F) 9週目のTRAP陽性細胞数

各群における有意差は見られなかった。

Mean $\pm$ SE of 3 animals per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Scale bars : 50 μ m

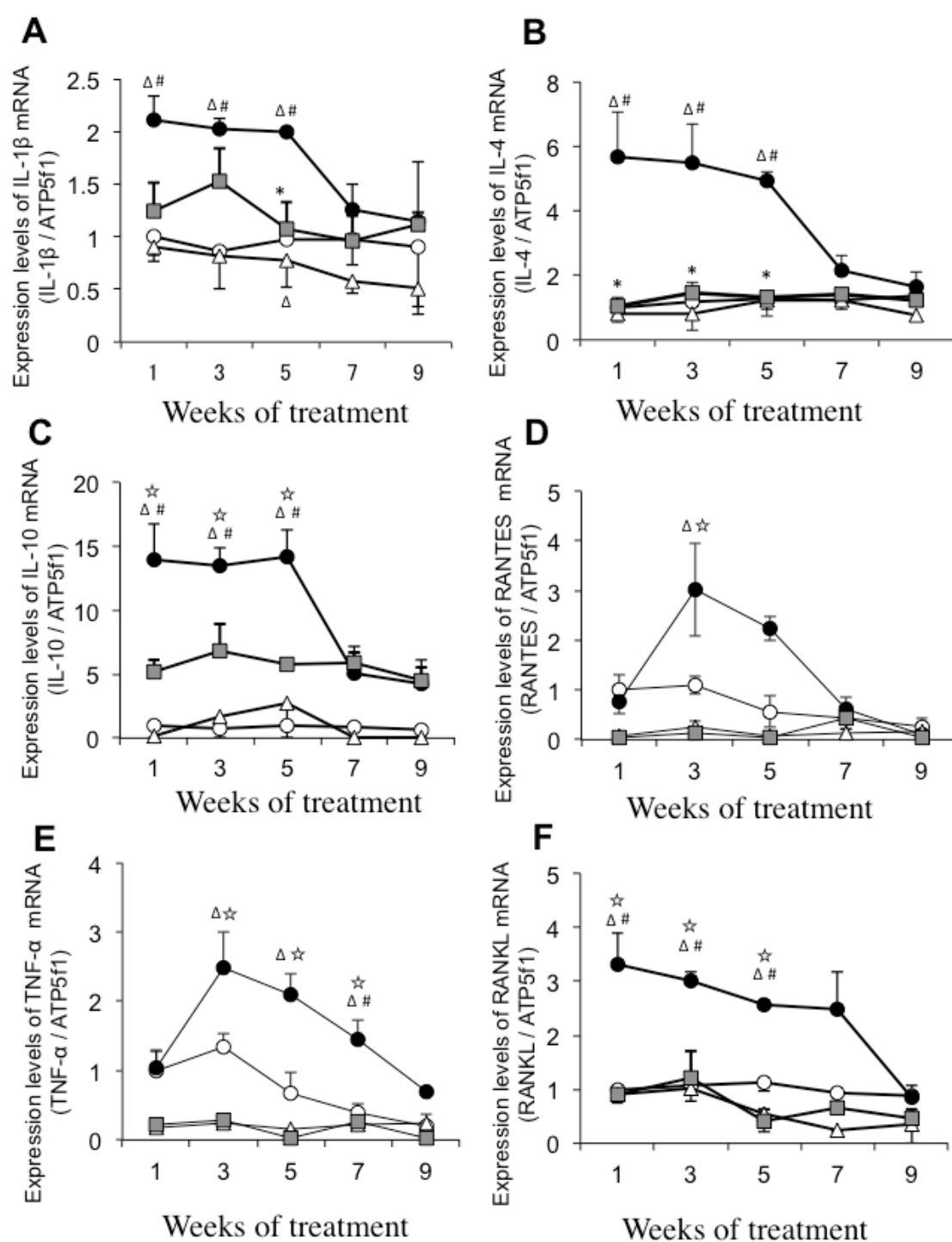


Figure 4

定量的RT-PCRにてmRNA発現量の解析を行った。

(A) IL-1 β (B) IL-4 (C) IL-10, (D) RANTES, (E) TNF- α , (E) TNF- α , (F) RANKL, Mean $\pm$ SE of 4 animals per group. # p < 0.05 versus the PBS group, ☆ p < 0.05 versus the Alum group, Δ p < 0.05 versus the OVA group, * p < 0.05 versus the OVA + Alum group.

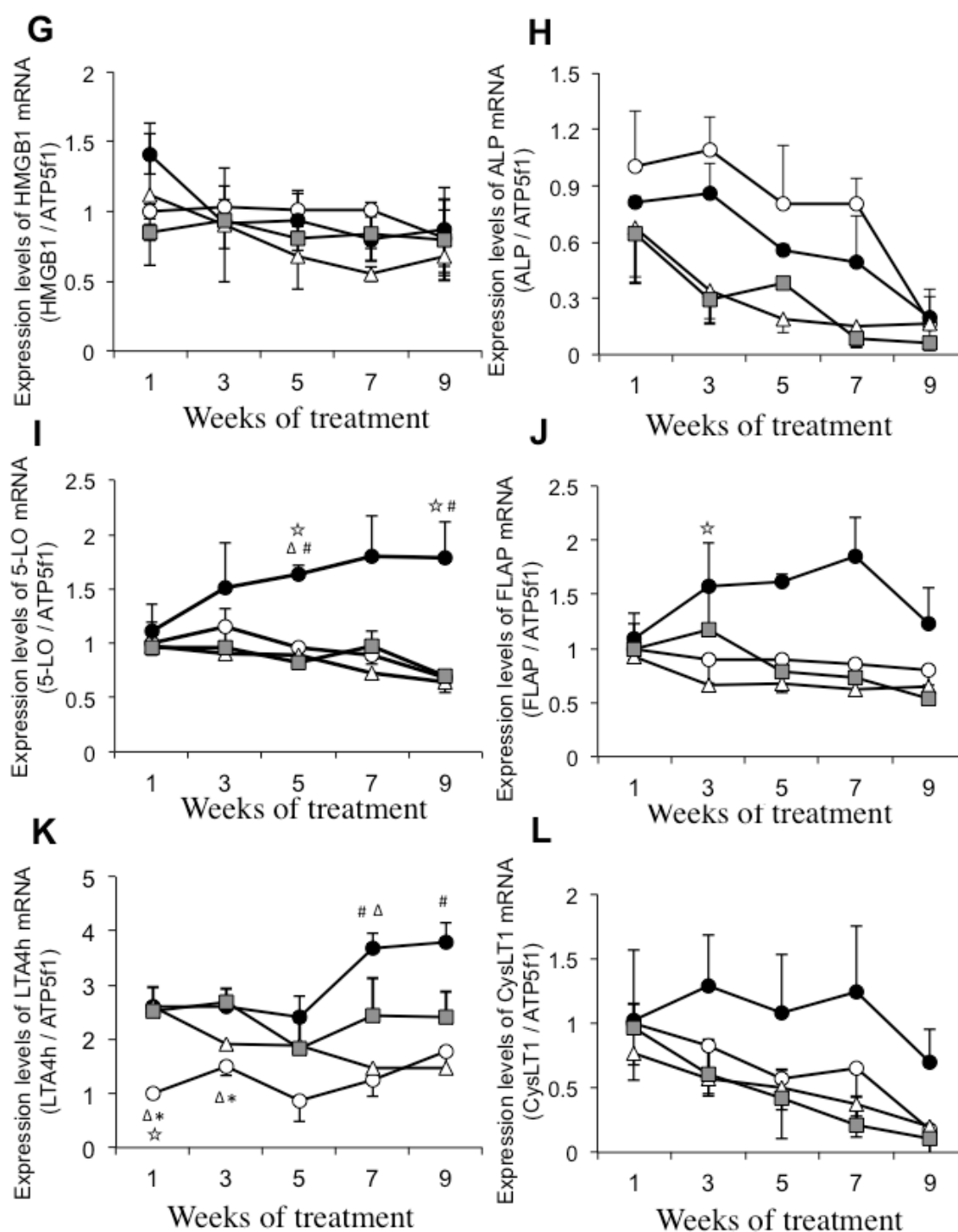


Figure 4

定量的RT-PCRにてmRNA発現量の解析を行った。

(G) ALP, (H) HMGB1, (I) 5-lipoxygenase, (J) FLAP, (K) LTA4h, (L) CysLT1

Mean $\pm$ SE of 4 animals per group. # $p < 0.05$ versus the PBS group, ☆ $p < 0.05$ versus the Alum group, Δ $p < 0.05$ versus the OVA group, * $p < 0.05$ versus the OVA + Alum group.

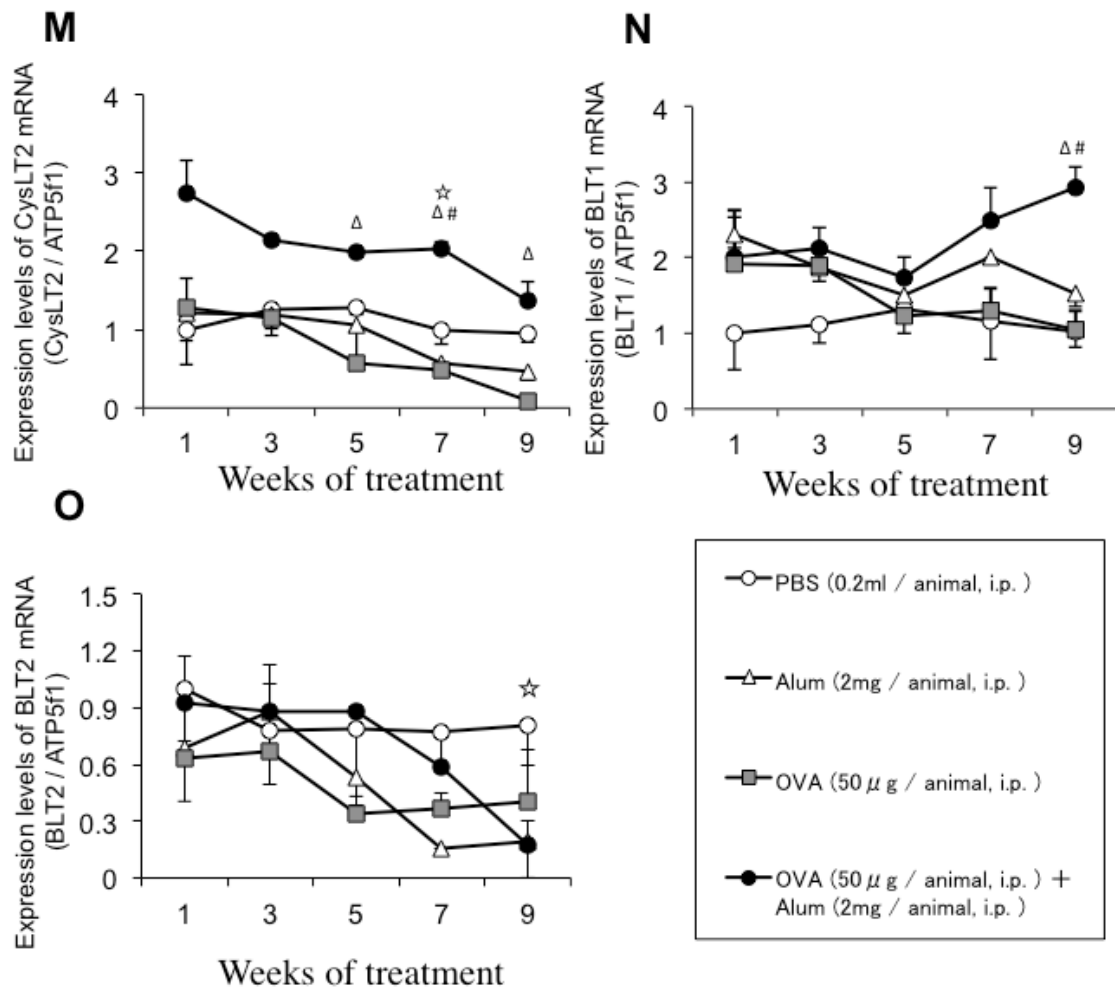


Figure 4

定量的RT-PCRにてmRNA発現量の解析を行った。

(M) CysLT2, (N) BLT1, (O) BLT2

Mean $\pm$ SE of 4 animals per group. # $p < 0.05$ versus the PBS group,

☆ $p < 0.05$ versus the Alum group, Δ $p < 0.05$ versus the OVA group, * $p < 0.05$ versus the OVA + Alum group.

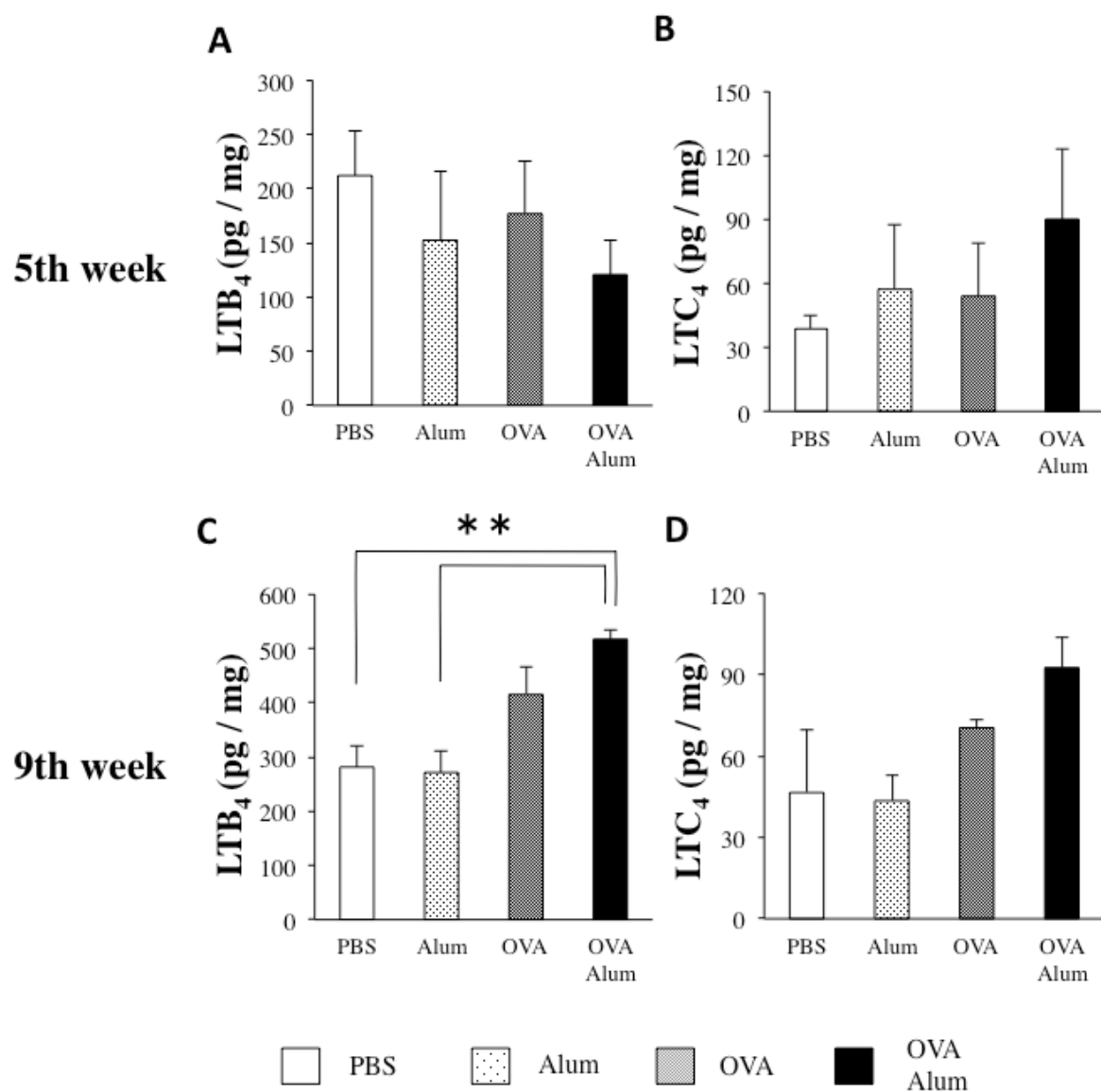


Figure 5

大腿骨より脂質を抽出し、骨量 (mg) あたりの各脂質量 (pg) をELISAにて計測した。
 上段は各群における5週目における LTB_4 (A)、 LTC_4 (B) の濃度を示す。

下段は9週目の LTB_4 (C)、 LTC_4 (D) の濃度を示す。

Mean $\pm$ SE of 4 animals per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Ⅱ - 4. 考察

喘息やアレルギー性鼻炎・アトピー性皮膚炎・食物アレルギーなど、アレルギー疾患は多数あり、それぞれ異なった病態を示し、アレルギーマーチという言葉が使われるように、一人の患者がアトピー素因をもち、多種のアレルギー疾患を持っていることも少なくない。乳幼児期の食物アレルギーに始まり、アトピー性皮膚炎等、成人においてもその有病率は増加傾向にある。アレルギー疾患に続発する病態としては、喘息やアトピー性皮膚炎の増悪の後に発症すると言われているアトピー性脊髄炎 (Kira, 2000) などもあるが、あまり報告はない。

村田らはラットを対象とした矯正的歯の移動モデルにおいて、骨や歯根吸収に対するアレルギーの影響を報告している (Murata et al., submitted)。Brown Norway ラットに OVA により高 IgE 血症など急性アレルギーを誘導したところ、アレルギー群では歯の移動距離が大きく、また歯根の吸収が亢進していた。この実験で観察した2週間では、脛骨に有意な変化は見られなかった。本研究では、C57BL6 / N マウスを対象として、週毎に OVA と Alum を投与した際、X 線学的な3次元定量解析において5週後に脛骨の骨梁厚さが小さい値を示し、9週後で骨量・骨梁厚さ・骨梁の数および BMD で有意な減少を確認した。X 線写真や組織学的な観察により OVA のみ投与された群においても PBS 群、Alum 群と比較して、血漿中 IgE に加え、前述の骨パラメーターにて骨減少の値が得られたことから、アジュバント無し抗原刺激でも骨の減少が起こることも示唆された。

アレルギーと骨減少や骨粗鬆症については、ステロイド性骨粗鬆症と言われるようになって、多くの疫学研究が行われてきた。しかし、喘息と骨粗鬆症に関する多くの調査からも、統一した見解は得られていない (Boulet et al., 1994; Sambrook and Jones, 1995)。ステロイド剤の投与頻度や投与量が多い喘息患者ほど骨密度が減少することが指摘されてきた (Hanania et al., 1995; Matsumoto et al., 2001)。最近の研究では、5 年以内のステロイド剤使用経験のある、中等度から重度のアトピー患者の 30%以上が、低い骨密度を示す事が示唆された。多くの研究が行われているのに関わらず、それら研究は

決定的なものではなく、アレルギーと骨減少との関連については依然不明な点が多い。ヒトを対象とした研究では、調査対象や方法などが多様であるために、アレルギー炎症と投薬や服薬による作用とを区別することは現実的にはできない。そこで、私は、アレルギー自体が骨に影響を及ぼすかどうかを明らかにするため、実験的なアレルギーモデルマウスを作成し、今回の研究を行った。

OVA と Alum による感作は OVA 特異的 IgE 産生を誘導し、Th2 細胞が誘導されることが知られている (Boros, 1994)(Sokol, Barton, Farr, & Medzhitov, 2008)。本研究では、OVA 単独もしくは OVA + Alum を投与することで、血漿中の総 IgE および OVA-IgE が上昇し、感作1週間後から5週間後の脛骨において、Th2 サイトカインと言われる IL-4、IL-10 の mRNA 発現量が上昇した。さらに炎症細胞の遊走を促す RANTES の発現も増加していることは、骨において Th2 反応が誘導されていることを示唆している。我々の知る限り、これはアレルギー性の炎症が骨に影響を与えたことを示唆する初めての研究であり、慢性的なアレルギー疾患が骨減少や骨粗鬆症のリスクファクターとなりうることを示唆できると考えている。

骨の代謝調節に炎症性サイトカインが関わっていることはよく知られている。アレルギー惹起による骨減少のメカニズムを知ることを目的として、定量的 PCR にて炎症性サイトカインの発現レベルを調べた。IL-1, TNF- α は破骨細胞分化を促し、骨を破壊するとの報告 (Zhang et al., 2001) もあることから、脛骨中の IL-1, TNF- α そして RANKL 発現の増加により破骨細胞の増加や活性化を導かれ、骨減少に繋がったことが考えられる。

近年、脂質メディエーターが骨代謝調節をするという報告が相次いでいる。Garcia ら (Garcia et al., 1996) は LTB₄ で直接破骨細胞を刺激し、骨吸収を引き起こすことを示した。卵巣摘出マウスや LPS 投与により骨減少が起こる事が明らかにされているが、BLT1 遺伝子欠失マウスでは骨減少が抑制されることが示された (Hikiji et al., 2009)。また、5-LO の阻害剤で骨折の治癒が早まること (Bonewald et al., 1997) が報告されていたが、ごく最近 Lee ら (Lee et al., 2012) は 5-LO の阻害が破骨細胞分化を抑制する事を示した。今回、OVA + Alum 群で 5-LO や LTA4h の発現が上昇し、後に CysLT2 や BLT1

の上昇が確認された。骨における LTB_4 が 9 週目に増加していることを考慮すると、骨減少に LTB_4 -BLT1 経路が関与していることが示唆された。

本研究において、OVA 感作では、上述したように IL-4 や IL-10 の mRNA 発現量の有位な上昇にも関わらず、多数の TRAP 陽性の破骨細胞の発現によって骨量の減少が確認された。これら IL-4 や IL-10 は破骨細胞形成の抑制因子であると報告がある (Dresner-Pollak et al., 2004; Shioi et al., 1991) が、その一方で IL-4 の過剰発現は骨吸収を抑制するとの報告もある (Lewis et al., 1993)。サイトカインや脂質などの破骨細胞活性を調節する分子が複雑に作用して骨減少という減少に繋がったことが推測される。OVA 感作後、比較的早期に、IL-1、TNF- α の IL-4、RANKL などのサイトカインが高発現することで、破骨細胞を活性化し、その後 LTB_4 などが作用して骨の回復を抑制しているのかも知れない。今回用いたモデルにおいて、骨減少がおこったメカニズムを明らかにするには、さらなる解析が必要である。最近、OVA によるアレルギー惹起後数日で、骨髄における好酸球や好中球などの分化が促進することが報告されている (Sokol et al., 2008)。アレルギーにおける骨中の多様な分子の相互作用をより理解するため、このモデルの全身状態の理解と骨局所での今後のさらなる研究が必要である。

本研究では、アレルギー炎症が骨量の減少に関与する可能性を示唆した。骨減少から引き続く骨粗鬆症の罹患は生活の質の低下を招き、健康寿命の短縮に大きく関わることから、社会的・経済的に大きな問題である。アレルギーが骨減少症のリスクファクターとして認識され、早期の治療介入や予防につながることを期待される。

Ⅲ. マウスを用いた矯正的歯の移動へのアレルギーの影響解明のための予備的研究

Ⅲ- 1. 緒言

矯正治療は、歯を移動させることにより、歯列を整え、適切な上下顎の咬合関係を獲得することを目指して行われる。矯正的歯の移動は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨添加による骨のリモデリングによって行われる (Kaare, 1960)。しかし、矯正的歯の移動に伴い、副作用として歯根吸収が起こることが知られており、特に重度な場合には歯根の $1/3$ から $1/2$ が吸収することすることもあるため、将来の歯の喪失リスクを高める事となる (Davidovitch and Krishnan, 2009)。一度吸収された歯根は修復されることされることはほとんどないことから、歯根吸収は、矯正治療における克服すべき重要な課題である。

歯根吸収は、歯や歯根の形態、患者の年齢、遺伝因子、ホルモンバランスの異常などの宿主の因子や、治療期間や治療に用いる装置、食事などの環境因子といった複合的な因子によって起こるとされている (Hartsfield et al., 2004; Weltman et al., 2010)。Davidovitch ら (Davidovitch et al., 2000) は、喘息やアレルギーが矯正治療に関係している可能性について総括で触れている。西岡ら (Nishioka et al., 2006) は、九州大学病因矯正歯科を受診した患者を対象に、後ろ向き調査を行い、喘息やアレルギー患者における歯根吸収の頻度が高いことを報告している。前章で述べた様に、喘息やアトピーといったアレルギー患者数が世界的に増加傾向であり、そのため矯正歯科治療を受けるアレルギー疾患を有する患者も増えてきている。アレルギー疾患患者における歯根吸収増悪の機構については依然不明な点が多い。そこで今回、アレルギー疾患と歯根吸収の関連性を解明するため、アレルギー疾患モデルマウスを作成し、さらにコイルスプリングを用いた矯正的歯の移動を行うことで歯根吸収への影響を検証した。

Ⅲ- 2. 材料と方法

アレルギー疾患モデルマウスの作成

6 週齢の C57BL / 6N マウス(雄)を九動株式会社(鳥栖)より購入した。前述に従い、感作のために OVA50 μ g、アジュバントとして Alum2mg を 200 μ l の 0.01M PBS 溶液にまぜて腹腔内投与を行った。さらに、追加効果を狙い、初期感作の 7 日後に再び投与を行った。対照群には 200 μ l の 0.01M PBS を 6 週齢のマウスに腹腔内投与し、1 週間後、再び PBS 200 μ l を腹腔内に投与した。

コイルスプリングの装着

二回目の腹腔内投与の際に、実験群、対照群に対し、King らの用いた手法 (King and Fischlschweiger, 1982) に基づき、歯牙移動のための装置を装着した (Fig. 6A)。具体的には、弱く持続的な矯正力をマウス上顎臼歯に適応させることができる超弾性ニッケルチタニウム (Ni-Ti) コイルスプリング (SentalloyR, Ultra Light Tomy International Inc, 東京) を用いた。このコイルスプリングを上顎右側第一大臼歯 (M1) と上顎前歯の間に挿入し、大臼歯を約 10g の矯正力で近心方向に牽引した。両者の固定には 0.2mm ステンレススチールワイヤーと歯科用光重合接着剤 (Transbond LR, 3M Unitek, 東京) を用い、前歯部におけるワイヤーの脱離を防ぐために、前歯に溝を付与し、ワイヤーを溝に引っ掛ける構造とした。スプリング挿入後は、粉末試料を練り餌にして与えた。装置装着した 1 週間後に試料採取を行った。

血液学的調査

OVA + Alum 感作による効果を確認するため、OVA 特異的 IgE (OVA-IgE)、総 IgE 量を解析した。試料採取の際、右心房より採血後、すぐに遠心分離し血、漿を採取した後、IgE-ELISA キット (シバヤギ)、OVA-IgE-ELISA キット (シバヤギ) を用いて測定した。

TRAP 染色

前述と同様に、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与にて麻酔し、ヘパリン含有 0.1M PBS にて脱血、4%パラホルムアルデヒド / 0.1M PBS (4°C, pH7.4) にて還流固定後、上顎骨を採取した。同固定液を用いて 12 時間浸潤固定した後、5%EDTA 溶液にて 1 週間脱灰した。その後、20% sucrose PBS 溶液にて脱水し、Tissue-Tek O.C.T compound (Sakura Finetek) にて包埋し、水平断にて 10 μ m 凍結切片を作成した。分岐部より根尖方向へ切片を作成し、3 枚毎に 1 枚採取した。分岐部から 480 μ m までを調査対象とした。

TRAP染色キット (Sigma-Aldrich) を用いて染色を行った。トルイジン・ブルーで対比染色を行った。封入後、デジタル顕微鏡 (BZ-9000) を用いて観察、撮影を行った。

形態計測

組織切片の測定は、M1口蓋根近心面（圧迫側）の歯根膜腔における破骨細胞数、歯根吸収窩面積、歯根吸収窩面積 / 歯根面積を計測した (Figs. 6B, C)。計測には付属ソフトウェア (MZ-II Analyzer) を用いて解析を行った。破骨細胞については2核以上のTRAP陽性細胞数を計測した。

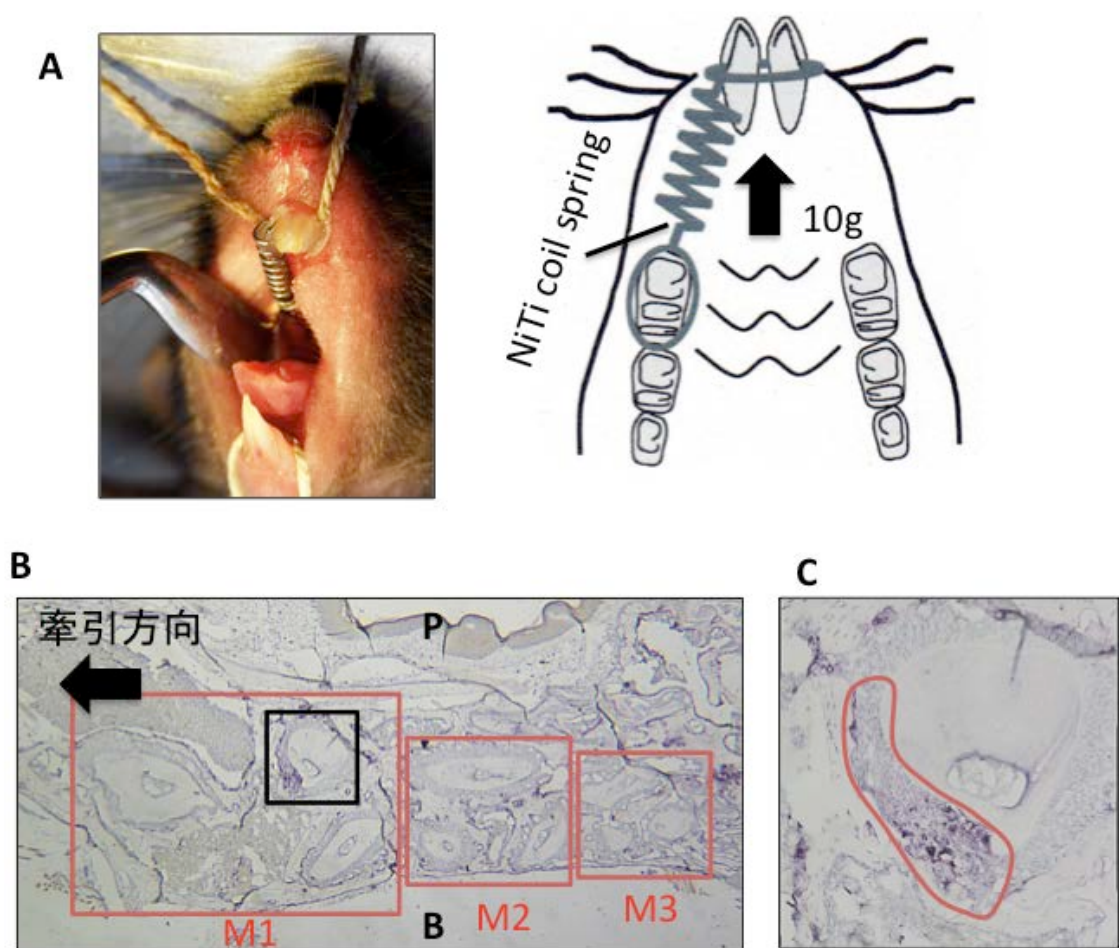


Figure 6

- (A) 上顎右側第一大臼歯 (M1) をNiTiコイルスプリングにて10gの力で牽引した。
- (B) M1歯根は3根あり、M1口蓋根分 (P ; 口蓋側 B ; 頬側)
- (C) (B) 黒枠部の拡大図を示す。圧迫側歯根膜における破骨細胞数を測定した (赤枠)。
また、歯根吸収窩面積、歯根吸収窩面積 / 歯根面積を計測した。

Ⅲ- 3. 結果

OVA + Alum 群は PBS 群と比較して、総 IgE、OVA-IgE の増加傾向が確認されたが、統計的有意差はみられなかった (Figs. 7A, B)。

顕微鏡で得られた画像から、歯の移動により、圧迫側における TRAP 陽性細胞は増加していた。圧迫側歯根膜の、TRAP 陽性破骨細胞数、歯根吸収窩面積、歯根面積に対する歯根吸収窩面積の割合、破骨細胞の数に統計的有意差は見られなかった (Fig. 7C, D, E)。

Ⅲ- 4. 考察

村田らは、OVA により高 IgE 血症を誘導した Brown Norway Rat にコイルスプリングを装着し、歯を牽引した。すると、TRAP 陽性破骨細胞数が増え、歯根吸収ならびに歯根膜圧迫側の歯槽骨吸収が有意に亢進していた。本研究では、OVA と Alum を用いた感作により総 IgE の上昇、OVA-IgE の上昇はみられたが、感作 1 週間では歯根吸収をうまく再現することが出来なかった。

今回用いた Ni-Ti コイルスプリングは約 10g の牽引力を発生させることができる。本研究で OVA + Alum 群で有意な変化をとらえることが出来なかった理由として、マウスの口腔内が狭小であり、それ故の技術的なばらつきによって、有意な差が認められなかったと考えられる。今後装置装着への技術的な修正を加えると共に、実験期間も考慮して行う予定である。

Chung ら (Chung et al., 2004) はマウス第一大臼歯に 10g の矯正力を適用させた後、7 および 21 日で X 線および μ CT の分析による歯の動きを広範囲に検討し、マウスの歯の移動に有用であることを実証した。Kitaura ら (Kitaura et al., 2009) の報告によると、同様の装置をつけてから 10 日後で TRAP 陽性破骨細胞数が最大になり、その後減少していた。今回の実験では、装置装着の 7 日後に試料を採取したものであり、OVA + Alum 群、PBS 群において、TRAP 陽性細胞が形成される前に試料を採取したために差異が認められなかった可能性がある。今後期間を変更してより検証する必要がある。

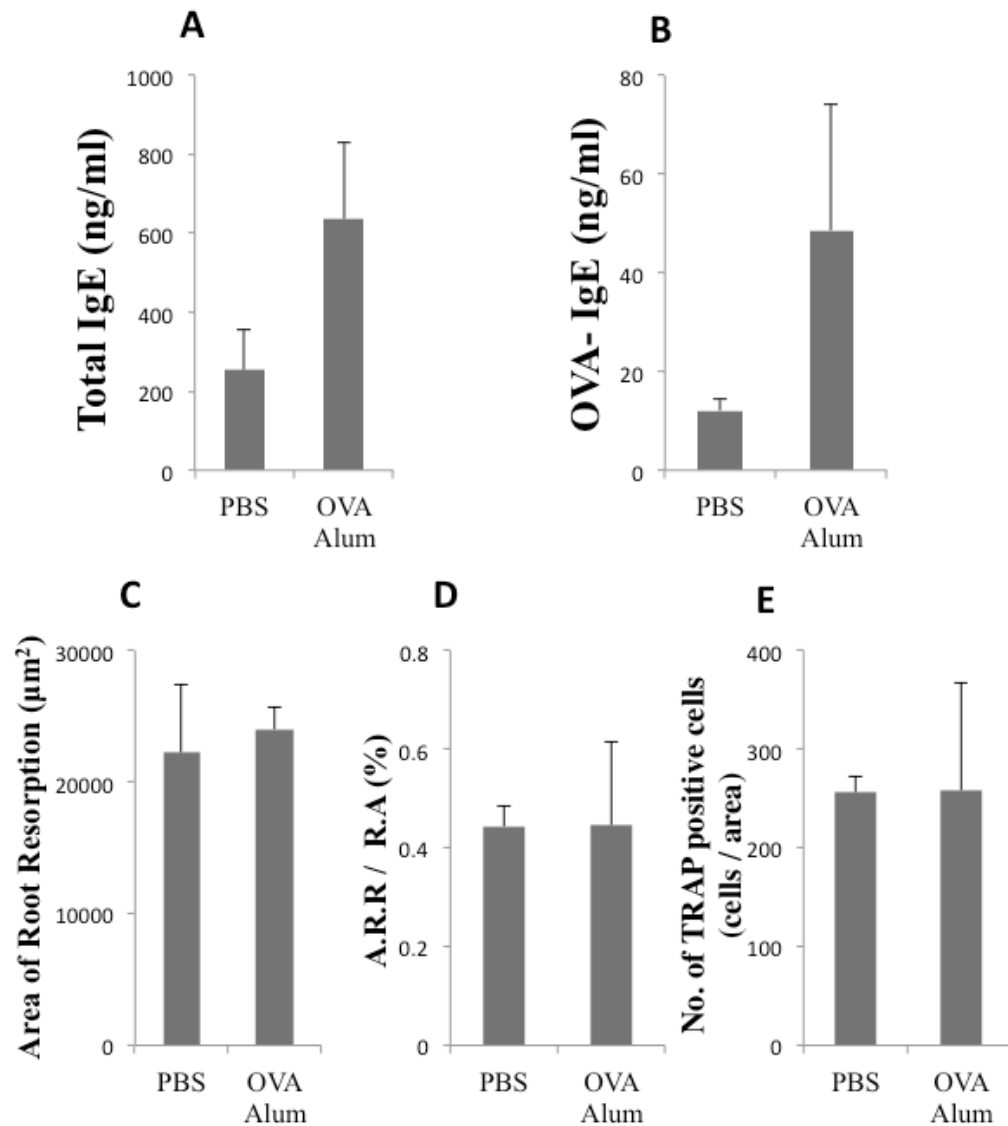


Figure 7

(A,B) ; コイルスプリング装着より1週間後の総IgE量,OVA-IgE量を示す。

OVA + Alum群に上昇傾向が見られる。

(C) ; 歯根吸収窩面積を示す。

(D) ; Area of Root Resorption per Root Area (A.R.R / R.A)

; 歯根吸収窩面積／歯根面積を示す。

(E) ; 破骨細胞数を示す。

Mean $\pm$ SE of 3 animals per group. Student' s t test * $p < 0.05$

IV. 総括

アレルギーと骨粗鬆症という二つのありふれた疾患に着目し、その関連性を明らかにすることを目的としてマウスを対象とした基礎研究を行った。卵白アルブミンによる中長期的なアレルギー炎症が、骨の減少を導くという現象について提示することができたと考える。マウスの結果がヒトへとそのまま反映できるとは言えないが、こうした研究はこれまでに報告がないことから、意義ある研究であると考えている。ヒトの疫学的な研究においては、続発性骨粗鬆症と位置づけられているステロイド性骨粗鬆症とアレルギー疾患との関連性が報告されている。本研究成果を考慮すると、ステロイド投与による骨粗鬆症と捉えられている患者の中には、アレルギーの炎症自体が骨減少を引き起こしている患者も含まれている可能性がある。過去の文献や本研究の結果をよく考察した上で、アレルギーが骨減少、歯根吸収、および骨粗鬆症のリスクファクターであるのかを今後も検討していく必要がある。さらに、全身における生化学的、生理学的所見を増やし、骨代謝と免疫系の相互作用に理解を深めていきたい。

V. 謝辞

稿を終えるに当たり、本研究に御指導、御助言、御校閲を賜りました

九州大学大学院歯学研究院口腔常態制御学講座分子口腔解剖学分野 教授

久木田 敏夫 先生

並びに 歯学研究院口腔保健推進学講座歯科矯正学分野 教授

高橋 一郎 先生 に心より感謝申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、終始御指導を賜りました

歯学研究院口腔常態制御学講座分子口腔解剖学分野 准教授

城戸 瑞穂先生に深く感謝いたします。

加えて、多くの御助力や御援助を頂きました

歯学研究院 口腔常態制御学講座 分子口腔解剖学分野

並びに歯学研究院 口腔保健推進学講座 歯科矯正学分野

の皆様方に感謝申し上げます。

VI. 参考文献

- Bonewald, L.F., Flynn, M., Qiao, M., Dallas, M.R., Mundy, G.R., and Boyce, B.F. (1997). Mice lacking 5-lipoxygenase have increased cortical bone thickness. *Advances in experimental medicine and biology* 433, 299-302.
- Boros, D.L. (1994). The role of cytokines in the formation of the schistosome egg granuloma. *Immunobiology* 191, 441-450.
- Boulet, L.P., Giguere, M.C., Milot, J., and Brown, J. (1994). Effects of long-term use of high-dose inhaled steroids on bone density and calcium metabolism. *The Journal of allergy and clinical immunology* 94, 796-803.
- Chung, C.R., Tsuji, K., Nifuji, A., Komori, T., Soma, K., and Noda, M. (2004). Micro-CT evaluation of tooth, calvaria and mechanical stress-induced tooth movement in adult Runx2/Cbfa1 heterozygous knock-out mice. *Journal of medical and dental sciences* 51, 105-113.
- Dam, T.T., Harrison, S., Fink, H.A., Ramsdell, J., and Barrett-Connor, E. (2010). Bone mineral density and fractures in older men with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 21, 1341-1349.
- Davidovitch, Z., J, L.Y., and AL, C. (2000). The immune system possibly modulates orthodontic root resorption. 2000.
- Davidovitch, Z., and Krishnan, V. (2009). Role of basic biological sciences in clinical orthodontics: a case series. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics* 135, 222-231.
- Dresner-Pollak, R., Gelb, N., Rachmilewitz, D., Karmeli, F., and Weinreb, M. (2004). Interleukin 10-deficient mice develop osteopenia, decreased bone formation, and mechanical fragility of long bones. *Gastroenterology* 127, 792-801.
- Elmstahl, S., Ekstrom, H., Galvard, H., Johnell, O., Gerhardsson de Verdier, M., and Norjavaara, E. (2003). Is there an association between inhaled corticosteroids and bone density in postmenopausal women? *The Journal of allergy and clinical immunology* 111, 91-96.
- Garcia, C., Boyce, B.F., Gilles, J., Dallas, M., Qiao, M., Mundy, G.R., and Bonewald,

- L.F. (1996). Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 11, 1619-1627.
- Haeck, I.M., Hamdy, N.A., Timmer-de Mik, L., Lentjes, E.G., Verhaar, H.J., Knol, M.J., de Bruin-Weller, M.S., and Bruijnzeel-Koomen, C.A. (2009). Low bone mineral density in adult patients with moderate to severe atopic dermatitis. *The British journal of dermatology* 161, 1248-1254.
- Hanania, N.A., Chapman, K.R., Sturtridge, W.C., Szalai, J.P., and Kesten, S. (1995). Dose-related decrease in bone density among asthmatic patients treated with inhaled corticosteroids. *The Journal of allergy and clinical immunology* 96, 571-579.
- Hartsfield, J.K., Jr., Everett, E.T., and Al-Qawasmi, R.A. (2004). GENETIC FACTORS IN EXTERNAL APICAL ROOT RESORPTION AND ORTHODONTIC TREATMENT. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 15, 115-122.
- Hikiji, H., Ishii, S., Yokomizo, T., Takato, T., and Shimizu, T. (2009). A distinctive role of the leukotriene B4 receptor BLT1 in osteoclastic activity during bone loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 21294-21299.
- Jandinski, J.J. (1988). Osteoclast activating factor is now interleukin-1 beta: historical perspective and biological implications. *Journal of oral pathology* 17, 145-152.
- Kaare, R. (1960). Tissue behavior during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod* 46, 881-900.
- Kelly, H.W., Van Natta, M.L., Covar, R.A., Tonascia, J., Green, R.P., and Strunk, R.C. (2008). Effect of long-term corticosteroid use on bone mineral density in children: a prospective longitudinal assessment in the childhood Asthma Management Program (CAMP) study. *Pediatrics* 122, e53-61.
- King, G.J., and Fischlschweiger, W. (1982). The effect of force magnitude on extractable bone resorptive activity and cemental cratering in orthodontic tooth movement. *Journal of dental research* 61, 775-779.
- Kira, J. (2000). [Atopic myelitis and related disorders]. *No to shinkei = Brain and nerve* 52, 960-968.
- Kitaura, H., Fujimura, Y., Yoshimatsu, M., Eguchi, T., Kohara, H., Jang, I., Morita, Y., and Yoshida, N. (2009). An M-CSF receptor c-Fms antibody inhibits mechanical stress-induced root resorption during orthodontic tooth movement in mice. *The*

Angle orthodontist 79, 835-841.

Kwan Tat, S., Padrines, M., Theoleyre, S., Heymann, D., and Fortun, Y. (2004). IL-6, RANKL, TNF- α /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology.

Cytokine & growth factor reviews 15, 49-60.

Lee, J.M., Park, H., Noh, A.L., Kang, J.H., Chen, L., Zheng, T., Lee, J., Ji, S.Y., Jang, C.Y., Shin, C.S., *et al.* (2012). 5-Lipoxygenase Mediates RANKL-Induced Osteoclast Formation via the Cysteinyl Leukotriene Receptor 1. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).

Lewis, D.B., Liggitt, H.D., Effmann, E.L., Motley, S.T., Teitelbaum, S.L., Jepsen, K.J., Goldstein, S.A., Bonadio, J., Carpenter, J., and Perlmutter, R.M. (1993).

Osteoporosis induced in mice by overproduction of interleukin 4. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 11618-11622.

Matsumoto, H., Ishihara, K., Hasegawa, T., Umeda, B., Niimi, A., and Hino, M. (2001). Effects of inhaled corticosteroid and short courses of oral corticosteroids on bone mineral density in asthmatic patients : a 4-year longitudinal study. Chest 120, 1468-1473.

Matsuzaki, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Yamaguchi, K., Yasuda, H., Shima, N., Morinaga, T., Toyama, Y., Yabe, Y., Higashio, K., *et al.* (1998). Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. Biochemical and biophysical research communications 246, 199-204.

Nishioka, M., Ioi, H., Nakata, S., Nakasima, A., and Counts, A. (2006). Root resorption and immune system factors in the Japanese. The Angle orthodontist 76, 103-108.

Reifenstein, E.C., Jr., and Albright, F. (2011). The classic: the metabolic effects of steroid hormones in osteoporosis. 1946. Clinical orthopaedics and related research 469, 2096-2127.

Ren, W., and Dziak, R. (1991). Effects of leukotrienes on osteoblastic cell proliferation. Calcified tissue international 49, 197-201.

Sambrook, P.N., and Jones, G. (1995). Corticosteroid osteoporosis. British journal of rheumatology 34, 8-12.

Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M.E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. Nature 418, 191-195.

Shioi, A., Teitelbaum, S.L., Ross, F.P., Welgus, H.G., Suzuki, H., Ohara, J., and Lacey, D.L. (1991). Interleukin 4 inhibits murine osteoclast formation in vitro.

Journal of cellular biochemistry 47, 272-277.

Sokol, C.L., Barton, G.M., Farr, A.G., and Medzhitov, R. (2008). A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nature immunology* 9, 310-318.

Takayanagi, H., Ogasawara, K., Hida, S., Chiba, T., Murata, S., Sato, K., Takaoka, A., Yokochi, T., Oda, H., Tanaka, K., *et al.* (2000). T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 408, 600-605.

Udagawa, N., Takahashi, N., Jimi, E., Matsuzaki, K., Tsurukai, T., Itoh, K., Nakagawa, N., Yasuda, H., Goto, M., Tsuda, E., *et al.* (1999). Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone* 25, 517-523.

van Staa, T.P., Leufkens, H.G., and Cooper, C. (2002). The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 13, 777-787.

Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J.M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., *et al.* (1999). HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science (New York, NY)* 285, 248-251.

Weltman, B., Vig, K.W., Fields, H.W., Shanker, S., and Kaizar, E.E. (2010). Root resorption associated with orthodontic tooth movement: a systematic review. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics* 137, 462-476; discussion 412A.

Yang, J., Shah, R., Robling, A.G., Templeton, E., Yang, H., Tracey, K.J., and Bidwell, J.P. (2008). HMGB1 is a bone-active cytokine. *Journal of cellular physiology* 214, 730-739.

Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., *et al.* (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 3597-3602.

Zhang, Y.H., Heulsmann, A., Tondravi, M.M., Mukherjee, A., and Abu-Amer, Y. (2001). Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced

osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 276, 563-568.

山本, 逸. (1999). 【図でみる骨粗鬆症'99】 骨粗鬆症人口の推定 骨粗鬆症の治療に関するガイドラインより:日本骨代謝学会診断基準における成績を基準とした推定.

Osteoporosis Japan 7, 10-11.

森, 諭., 乗松, 尋., and 田中, 聡. (1997). 骨粗鬆症と骨折 寝たきりを防ぐための骨折後のリハビリテーション 機能的予後とリハビリ実施上の留意点. *Osteoporosis Japan* 5, 522-528.