各種骨補填材におけるマクロファージ・骨芽細胞分化能および Bone Morphogenetic Protein-2 の担体としての 有用性に関する *in vitro* 評価

小林真左子¹⁾・河野通秀^{1,2)}・永井孝宏^{1,3)}
片桐浩樹^{1,4)}・飯塚建行¹⁾

In vitro evaluation of bone grafting materials on macrophage polarization, osteogenic differentiation, and the potential as bone morphogenetic protein-2 carriers

FUJIOKA-KOBAYASHI Masako¹⁾・KONO Michihide^{1,2)}・NAGAI Takahiro^{1,3)}
KATAGIRI Hiroki^{1,4)}・IIZUKA Tateyuki¹⁾

Abstract: Various bone grafting materials are used for bone augmentation procedures in the field of oral-maxillofacial surgery. Knowledge of biomaterial characteristics is crucial in order to choose the appropriate materials for each clinical case. The purpose of the present study was to investigate not only the conventional method of comparison of osteogenic potential of different bone grafting materials, but also evaluate the macrophage behavior and the potential as carriers of growth factors *in vitro*.

Cell attachment/proliferation on bone grafting materials and the gene expressions of cell differentiation markers were investigated in the human leukemia monocytic cell line THP-1-derived macrophages and mouse stromal ST-2 cells, when cultured on the three different grafting materials of 1) demineralized freeze-dried bone allografts (DFDBA) (DBX[®], Synthes Inc. USA), 2) deproteinized bovine bone mineral (DBBM) (Bio-Oss[®], Geistlich Pharma AG, Switzerland), and 3) biphasic calcium phosphate (BCP) (Maxresorb[®] granules, Botiss AG, Germany). Furthermore, bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) adsorption, release kinetics, and osteoblastic activities of BMP-2-loaded materials were evaluated.

Higher cell attachment/proliferation potentials in both THP-1-derived macrophages and ST-2 cells were observed when cultured on BCP. Interestingly, DFDBA showed high TNF- α expression with a strong tendency toward M1 phenotypes, whereas BCP showed high IL-10 expression in macrophages and was polarized toward M2 phenotypes. Furthermore, DFDBA significantly increased mRNA levels of bone sialoprotein (BSP) when compared to the other materials in ST-2 cells. DBBM adsorbed a higher amount of BMP-2 when compared with the other materials while the DFDBA released BMP-2 faster. DFDBA showed higher osteopromotive potential including higher mRNA levels of ALP and BSP when used in combination with BMP-2, compared to BMP-2 alone.

From this limited study, BCP showed superior cytocompatibility. Nevertheless, DFDBA might be a good option when focusing on higher osteopromotive potential, and for use as a BMP-2 carrier.

¹⁾ ベルン大学医学部頭蓋顎顔面外科学講座
(主任：飯塚建行教授)

²⁾ 東京医科大学口腔外科学分野
(主任：近津大地教授)

³⁾ 新潟大学大学院医歯学総合研究科顎顔面口腔外科学分野
(主任：高木律男教授)

⁴⁾ 日本歯科大学新潟生命歯学部先端研究センター
(主任：中原 賢教授)

¹⁾ Department of Cranio-Maxillofacial Surgery, Inselspital, Bern University Hospital, University of Bern, Bern, Switzerland (Chief: Prof. IIZUKA Tateyuki)

²⁾ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Tokyo Medical University, Tokyo, Japan (Chief: Prof. CHIKAZU Daichi)

³⁾ Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan (Chief: Prof. TAKAGI Ritsuo)

⁴⁾ Advanced Research Center, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata, Niigata (Chief: Prof. NAKAHARA Ken)

受付日：2020年2月21日

採択日：2020年9月29日

Key words: bone grafting materials (骨補填材), macrophage polarization (マクロファージ分化), osteogenic differentiation (骨芽細胞分化), growth factor (成長因子)

緒 言

口腔外科学領域で骨欠損部の骨修復・骨再生治療を行う際、骨誘導能 (Osteoinductivity) ならびに骨伝導能 (Osteoconductivity) を考慮すると、自家骨より優れた移植材料は存在しないと報告されている¹⁾。しかしながら、自家骨を採取する際のドナー側の負担軽減を考慮する場合や、十分な自家骨量を採取できない場合、骨補填材の使用は有用である²⁾。同種骨、他家骨、人工骨を含め、市場にはさまざまな骨補填材が存在している。同種骨、とくに同種由来凍結脱灰乾燥骨 (demineralized freeze-dried bone allograft, DFDBA) は骨基質が保存されているため、骨伝導能に加え、骨誘導能をも有しているという利点があるが、免疫原性、感染症のリスクの否定はできない³⁾。一方、合成材料である人工骨はそれらの問題はないが、とくにリン酸三カルシウム (TCP) 等のリン酸カルシウム系材料は吸収が早いことから新生骨のボリュームの安定性が問題視されてきた³⁾。

DFDBA あるいは脱タンパクウシ骨ミネラル (demineralized bovine bone mineral, DBBM) を好んで選択する欧米諸国に比較し、本邦では、薬事承認、民族のおよび宗教的観点から、リン酸カルシウム系合成材料であるハイドロキシアパタイト (HA)、 β -TCP、二相性リン酸カルシウム (Biphasic calcium phosphate, BCP) がより多く使われてきた⁴⁾。DFDBA は、本邦では承認されておらず、DBBM でよく知られている Bio-Oss[®] についても欧米では約 30 年使用されてきた歴史があるが、本邦では、2012 年に医薬品医療機器総合機構 (PMDA) の承認を受けたばかりである。

骨補填材はその開発とともに、数々の臨床前研究や臨床研究が行われてきており、それらの結果を踏まえ、症例によって明確な基準をもって選択されるべきである。当然ながら、大型動物による実験や臨床研究の結果は生体反応を評価できるため、よりエビデンスレベルが高い⁵⁾。しかしながら、*in vitro* 評価実験もまた、3R (Replacement, Reduction, Refinement) の観点を鑑みても有用である^{6,7)}。

さらに、骨補填材は骨形成能の増強を目的として、しばしば成長因子とともに使用される。とくに、Urist⁸⁾ の報告以降、骨形成タンパク質-2 (Bone Morphogenetic Protein-2; BMP-2) は強力な骨誘導能を有する成長因子として、数多くの臨床前研究、臨床研究がなされてきた⁹⁾。骨補填材は BMP-2 の担体として骨再生能の増強が期待されるが、BMP-2 と組み合わせる材料によって BMP-2 の放出様式が

違うことも報告されており¹⁰⁾、適切な骨補填材の選択が重要である。

骨補填材料の生体適合性ならびに骨置換能を予測・評価するために、*in vitro* で骨芽細胞の細胞生存、分化能を評価する方法は一般的である^{7,11~13)}。しかしながら、複数の骨補填材に対して、骨芽細胞の細胞適合性や分化能に関する検討だけでなく、免疫細胞による反応や成長因子を含有した際の細胞反応など、その有用性を複数の観点から *in vitro* で明瞭に比較検討した研究は報告されていない。そこで、本研究では、国際的に発売され、広く普及している 3 種類の骨補填材 DFDBA, DBBM および BCP について、細胞適合性ならびに骨置換能を評価するため、骨芽細胞とマクロファージの細胞適合性ならびに分化能を *in vitro* で検討した。さらに、BMP-2 の吸着・放出様式ならびに骨芽細胞分化能についてそれぞれの骨補填材を比較検討した。

材 料・方 法

1. 使用した材料

DFDBA (DBX[®], Synthes Inc., West Chester, PA, USA), DBBM (Bio-Oss[®], S サイズ, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland) および BCP (Maxresorb[®] granules, 0.5~1.0mm, S サイズ, 60% HA:40% β -tricalcium phosphate (β -TCP), Botiss AG, Berlin, Germany) を使用した。リコンビナント BMP-2 は R&D systems 社 (Minneapolis, MM, USA) より購入した。

2. 使用した細胞

ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞 (ATCC, Manassas, VA, USA) と骨芽細胞の表現型を示すことが知られているマウス骨髄由来間質系細胞 ST-2 細胞 (RIKEN Cell Bank, 筑波) を使用した。本研究に関して、ベルン州ならびにベルン大学の倫理委員会の承認は必要としなかった。THP-1 細胞の培養には RPMI-1640 (Gibco, Life technologies, Carlsbad, CA, USA) に 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco) と 1% penicillin/streptomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA) を加えた培地を、ST-2 細胞には DMEM (Gibco) に 10% FBS と 1% antibiotic-antimycotic serum (Gibco) を加えた培地を用い、ともに 37°C, 5% CO₂ 条件下のインキュベータ内で培養した。骨補填材は 24 穴のプレートに 10mg を用意し、その上に細胞を播種した。また、THP-1 細胞は Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 100ng/mL) を添加し、24 時

間培養することで、マクロファージに分化させ、以後のアッセイに使用した。

3. 骨補填材の形態的観察

光学的にデジタルマイクロスコープ (VHX-6000, Keyence, 大阪) を使用し、3種類の骨補填材の形態的観察を行った。また、材料の表面性状を Scanning electron microscope (SEM) にて解析した。材料をカーボン両面テープ (Portmann Instruments, Biel-Benken, Switzerland) にてアルミニウム試料台にマウントした後、CCU-010 スパッタ装置 (Safematic, Bad Ragaz, Switzerland) にて白金コーティング (30nm) を行い、DSM 982 Gemini digital field emission SEM (Zeiss, Oberkochen, Germany) にて SEM 像を得た。

4. 骨補填材上で培養した THP-1 細胞の形態的観察

96 穴プレートを用い、DFDBA, DBBM, および BCP 上に THP-1 細胞 (1 穴あたり 5×10^4 個) を播種し、培養した。PMA 刺激 24 時間後とマクロファージ分化 3 日後の細胞を SEM にて観察した。細胞は、2.5% グルタルアルデヒドを含有した 0.1M カコジル酸緩衝液 (Merck, Darmstadt, Germany) で固定をし、段階的なエタノール置換ならびにヘキサメチルジシラザン (Sigma) にて脱水し、乾燥させた後、上記と同様に観察した。

5. 細胞接着能, 増殖能の評価

24 穴プレートを用い、コントロール (細胞培養プラスチック), DFDBA, DBBM, および BCP 上に THP-1 細胞 (1 穴あたり 5×10^4 個) と ST-2 細胞 (1 穴あたり 1×10^4 個) を播種し、培養した。培養開始から 8 時間後に、骨補填材への細胞接着能を、1 日後と 3 日後に細胞増殖能を評価した。評価は、MTS アッセイ (CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, USA) を用い、ELx808 Absorbance Reader (BIO-TEK, Winooski, VT, USA) にて吸光度を測定した。

6. 細胞分化能の評価

24 穴プレートに、1) コントロール (細胞培養プラスチック), 2) DFDBA, 3) DBBM, ならびに 4) BCP 上で THP-1 細胞 (1 穴あたり 1×10^5 個) と ST-2 細胞 (1 穴あたり 5×10^4 個) を播種し、培養した。THP-1 細胞は培養 3 日目、ST-2 細胞は培養 14 日目の目的遺伝子の mRNA の発現量をリアルタイム PCR の測定を行い評価した。なお、THP-1 細胞については Lipopolysaccharide (LPS, 100ng/mL, Sigma) 添加, あるいは、インターロイキン (IL) -4 (25ng/mL, Peprotech, London, UK) と IL-13 (25ng/mL, Peprotech) を添加することにより、それぞれ、M1 と M2 マクロファージに分化する

表 1 リアルタイム PCR に使用したプライマーとシーケンス (F = フォワードプライマー; R = リバースプライマー)

遺伝子	シーケンス (5'-3')
hTNF- α F	CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT
hTNF- α R	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA
hIL-1 F	GGTTGAGTTTAAGCCAATCCA
hIL-1 R	TGCTGACCTAGGCTTGATGA
hIL-6 F	GAAAGGAGACATGTAACAAGAGT
hIL-6 R	GATTTTCACCAGGCAAGTCT
hArg-1 F	ACGGAAGAATCAGCCTGGTG
hArg-1 R	GTCCACGTCTCTCAAGCCAA
hCD206 F	GGGTTGCTATCACTCTCTATGC
hCD206 R	TTTCTTGCTGTGTCGCTAGTT
hGAPDH F	AGCCACATCGCTCAGACA
hGAPDH R	GCCCAATACGACCAAATCC
mCOL1a2 F	GAGCTGGTGTAATGGGTCCT
mCOL1a2 R	GAGACCCAGGAAGACCTCTG
mALP F	GGACAGGACACACACACACA
mALP R	CAAACAGGAGAGCCACTTCA
mBSP F	GCACTCCAAGTGGCCAAGA
mBSP R	TTTTGGAGCCCTGCTTTCTG
mGAPDH F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
mGAPDH R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

ことを確認した。トータル RNA は High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland) を用いて精製した。Nanodrop 2000c (Thermo, Wilmington, Germany) にて抽出した RNA 量を定量し、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) にて cDNA を合成した。リアルタイム PCR は FastStart Universal SYBR[®] Green Master Mix (Roche) と Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR 装置を用い、 $\Delta\Delta$ Ct 法にて mRNA の発現量を計算した。使用したプライマーは、Tumor Necrosis Factor (TNF) - α , IL-1, IL-6, IL-10, Arginase (Arg) 1, CD206, collagen 1 (COL1), alkaline phosphatase (ALP), bone sialoprotein (BSP), および glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) で、そのシーケンスを表 1 に示す。

ST-2 細胞の ALP 活性は Leukocyte alkaline phosphatase kit (No.86R, Sigma) を用いて測定した。ST-2 細胞は 5 分間アセトン・ホルムアルデヒド固定を行った後、暗所で所定の染色液にて 20 分間染色した。Wild Heerbrugg M400 ZOOM Makroskop (Wild Heerbrugg, Germany) にて得ら

れた画像を ImageJ Fiji software¹⁴⁾ を用い、染色域を閾値で設定し、ALP 活性を半定量した。

7. 免疫細胞染色

8 穴チャンバースライド (Nunc Lab-Tek II Chamber Slide, Nunc, Thermo) を用い、DFDBA, DBBM, および BCP 上で THP-1 細胞 (1 穴あたり 5×10^4 個) を播種し、培養した。PMA 刺激 24 時間後とマクロファージ分化 3 日後の細胞を免疫染色した。コントロールとして M0 マクロファージ, LPS 刺激した M1 マクロファージ, IL-4, -13 刺激した M2 マクロファージも同時に染色した。細胞は 4 %パラホルムアルデヒドにて 15 分間固定し、5 % ウシ血清アルブミン (BSA, Sigma) でブロッキング、一次抗体: CD68 (Abcam, London, UK, 希釈率 1:100), CD86 (Santa Cruz, CA, 希釈率 1:50), ならびに CD206 (Santa Cruz, 希釈率 1:50) を 4°C オーバーナイトで反応させた。ペルオキシダーゼ標識ポリマー二次抗体 (ScyTek Laboratories, Logan, UT) を室温で 1 時間反応させ、3,3'-Diaminobenzidine (ScyTek Laboratories) で基質発色させた。

8. BMP-2 含有骨補填材における BMP-2 の吸着・放出ならびに骨芽細胞分化能の評価

それぞれの骨補填材は、10 分間 BMP-2 溶液 (100ng/mL) に浸漬し、BMP-2 含有骨補填材を作製した。吸着していない BMP-2 が含まれる溶液を回収した後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加え、37°C のインキュベーター内で振盪させ、各タイムポイント (15 分, 1 時間, 8 時間, 24 時間, 72 時間, 240 時間) で溶液サンプルを回収し、新しい PBS を加えた。ELISA DuoSet キット (DY355, R&D Systems 社) を用いて、回収したサンプル中の吸着されなかった BMP-2, また放出された BMP-2 の量を定量し、BMP-2 吸着率と放出量を算出した。

骨分化能は 24 穴プレートに 1) BMP-2 単独 (100ng/mL), 2) DFDBA + BMP-2, 3) DBBM + BMP-2, および 4) BCP + BMP-2 上で ST-2 細胞 (1 穴あたり 5×10^4 個) を播種した後に、14 日間培養し、前述のようにリアルタイム PCR ならびに ALP アッセイにて評価した。

9. 統計解析

各グラフは平均値±標準誤差を用いて表記した。統計解析は Tukey's 多重比較検定を用いて、各解析項目においての各グループのデータを比較検討した (GraphPad Prism 8.0, GraphPad Software 社, La Jolla, CA, USA)。なお、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結 果

1. 各骨補填材の形態的特徴

各骨補填材の形態的特徴をデジタルマイクロスコープならびに SEM にて観察した結果を示す (図 1)。DFDBA は脱灰されているため、半透明で滑らかな表面性状を示していた。DBBM はウシ骨を比較的低温 (300°C) で焼成処理しているため、粗造な表面性状を有していた。一方、HA と β -TCP 含有の合成材料である BCP はマクロならびにミクロに多孔性を有するよう設計されていた。

2. 各骨補填材のマクロファージに及ぼす影響

各骨補填材上で培養したときの THP-1 細胞由来マクロファージの反応の結果を図 2~5 に示す。PMA 刺激により分化したマクロファージは、DFDBA 上では球状の形態をしていたが、さらに 3 日間培養を続けると細胞質部分が伸長していた (図 2)。DBBM ならびに BCP は PMA 刺激により、球状を示すものと、紡錘形を示すものがあり、3 日後には、紡錘形の細胞はさらに伸長し、微絨毛を有するものも観察された (図 2)。また、マクロファージのマーカーである CD68 の免疫染色では、3 種の骨補填材上に CD68 陽性細胞が確認された (図 3)。

材料へのマクロファージの接着率を定量すると、いずれの群に比較しても BCP が有意に高く、DFDBA で低かった (図 4A)。マクロファージ分化 1 日後と 3 日後の細胞生存に関しても接着能と類似した傾向を示し、BCP で生存率が高く、DFDBA で低かった (図 4B)。なお、使用したマクロファージは THP-1 細胞由来で、マクロファージに分化させるとその後ほぼ増殖はしなくなるため、細胞生存率を比較した。

マクロファージの極性の変化は、M1 マーカー遺伝子である TNF- α , IL-1, IL-6, M2 マーカー遺伝子である IL-10, Arg1, CD206 について mRNA の発現レベルを比較した (図 4C)。その結果、DFDBA はコントロールと BCP に対して TNF- α を有意に増加し、M1 分化傾向であったが、BCP はいずれの群と比較しても IL-10 のみ有意に増加し、M2 分化傾向を示した。一方、CD206 はどの材料についてもコントロールに比し、有意に減少していた。免疫細胞染色では M1 マクロファージマーカーである CD86 と M2 マーカーである CD206 の発現を観察し、いずれの骨補填材においても CD86 ならびに CD206 弱陽性マクロファージが観察された (図 5A, B)。

3. 各骨補填材の骨芽細胞に及ぼす影響

骨芽細胞の表現系を示す ST-2 細胞を用いて、各種骨補填材量による骨芽細胞への影響を検討した。細胞接着

図1 実験に使用した骨補填材の形態学的観察

デジタルマイクロスコープによる光学的観察（上段：低倍率 100×，中段：高倍率 500×）と SEM 像による表面性状の観察（下段 2,000×）。

図2 骨補填材で培養した THP-1 細胞由来マクロファージの SEM 像（上段：1,000×，下段：3,000×）

能は DFDBA と DBBM に比較して BCP で有意に高く，DFDBA，DBBM はコントロールに比較して有意に低かった（図 6A）。骨芽細胞の増殖は，コントロールプラスチックに比べてすべての材料で培養 1 日後に抑制されていたが，BCP は 3 日後には増殖率がコントロールに匹敵した（図 6B）。また，1 日，3 日後ともに，DBBM は一番増殖能が低かった。骨芽細胞分化能は，COL1，ALP，および BSP

図3 骨補填材で培養した THP-1 細胞由来マクロファージの CD68 免疫細胞染色（500×）

図5 骨補填材で培養した THP-1 細胞由来マクロファージの免疫細胞染色（A：CD86，B：CD206，500×）

の mRNA の発現量を検討した。COL1，ALP はどの骨補填材に関しても，コントロールに比し，統計学的に有意な変化はなかった。一方で，DFDBA は他の群と比較し，後期

図4 各骨補填材における THP-1 細胞由来マクロファージの接着, 生存および分化能

A: 骨補填材上のマクロファージの細胞接着能 (N=6).

B: 骨補填材上のマクロファージの細胞増殖能 (N=6).

C: 骨補填材上のマクロファージの分化能 (N=3).

なお, #は他のいずれの群に比較して統計学的に有意に低い, *は群間に統計学的に差を認める,

**は他のいずれの群に比較して統計学的に有意に高い ($p<0.05$) ことを示している。

骨芽細胞分化マーカーである BSP の発現が増強されていた (図 6C)。しかしながら, ALP 活性には各群に有意な差はみられなかった (図 6D)。

4. 各骨補填材の BMP-2 吸着能・放出様式および

BMP-2 含有骨補填材の骨芽細胞への影響

各骨補填材における BMP-2 の担体としての有用性を明らかにするため, ELISA 法を用いて, BMP-2 の吸着と経時的な放出量を検討した。すべての材料において BMP-2 溶液に含浸しただけで, 80%以上の BMP-2 が吸着されていた (図 7A)。DBBM は他の材料に比較し, 有意に高い吸着能を示した。吸着した BMP-2 はいずれも観察した 240 時

間後まで, 徐放が認められたが, 初期の 24 時間に多く放出されていた (図 7B)。とくに DFDBA においては 8 時間以降のタイムポイントで DBBM, BCP に比べ放出量が有意に多かった。BMP-2 含有骨補填材における骨芽細胞の分化能の検討では, 培養 14 日後において DFDBA が BMP-2 単独投与に比べて, ALP の発現を有意に増強し, 他のどの群に比べても, 有意に高い BSP の発現が観察された (図 7C)。しかしながら, ALP 活性には各群に有意な差はみられなかった (図 7D)。以上より, DFDBA のみが BMP-2 との組み合わせにより, BMP-2 を単独で使用するよりも骨芽細胞分化能を促進する傾向がみられた。

図6 各骨補填材における ST-2 細胞の接着, 増殖および分化能

A: ST-2 細胞の骨補填材への接着能 (N = 9).

B: ST-2 細胞の骨補填材上での細胞増殖能 (N = 9).

C, D: 骨補填材上で培養した ST-2 細胞の骨芽細胞分化能 (C: リアルタイム PCR, N = 3, D: ALP アッセイ, N = 3).

なお, *は群間に統計学的に差を認める, **は他のいずれの群に比較して統計学的に有意に高い ($p < 0.05$) ことを示している.

図7 各骨補填材における BMP-2 の担体としての有用性の比較

A: 各骨補填材への BMP-2 の吸着能 (N = 6).

B: 各骨補填材からの BMP-2 の経時的放出様式 (N = 6).

C, D: BMP-2 含有骨補填材上で培養した ST-2 細胞の骨芽細胞分化能 (C: リアルタイム PCR, N = 3, D: ALP アッセイ, N = 3).

なお, *は群間に統計学的に差を認める, **は他のいずれの群に比較して統計学的に有意に高い ($p < 0.05$) ことを示している.

考 察

本研究は、3つの骨補填材、DFDBA、DBBM、およびBCPを用いて、マクロファージならびに骨芽細胞の細胞反応、BMP-2の担体としての有用性について *in vitro* レベルで検討した。デジタルマイクロスコープならびにSEMにより3種類の骨補填材の形態的特徴を観察すると、表面性状の違いが明白に観察された。表面性状と骨芽細胞接着には相関があり、例えば、Annazら¹⁵⁾は4つの異なるHAを用い、SEMで細胞接着様式を観察し、粗造な性状をもつ方が接着能に寄与すると報告している。近年開発される人工骨材料は、ポーラス性状を有するよう設計されるのが主流であり、本研究に用いたBCPも骨芽細胞の足場となるよう多孔性を有していた。本研究において、DFDBA、BCPに比べ、一貫してBCPの接着能と増殖能が高かったのは、表面性状の違いが一因であると考えられた。

骨補填材上の細胞の生存ならびに増殖による細胞毒性の検査は、ISO10993-5¹⁶⁾に規定されている標準的な材料評価の方法である。本研究では、マクロファージと骨芽細胞を用い、3種の材料上への接着ならびに増殖率(生存率)を検討した。THP-1とST-2ではともに、DFDBA、DBBM、およびBCPの比較の結果、BCPで細胞毒性が低く、DBBMで高い傾向にあった。過去の報告をみると、Küblerら¹¹⁾は5種類の骨補填材、サンゴ由来HA(FRIOS Algipore[®], DENTSPLY Friadent), α -TCP (Bio-Base[®], Centerpulse), 低温(300℃)焼成処理DBBM (Bio-Oss[®], Geistlich), 高温(1,100℃)焼成処理DBBM (Osteograft[®]-N, DENTSPLY Friadent), ならびに合成ペプチドp-15含有高温処理DBBM (PepGen p-15[®], DENTSPLY Friadent Ceramed)を用い、培養6,9日後のヒト骨芽細胞の増殖、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性を検討比較している。その結果、細胞増殖能とALP活性はPepGen P-15[®]において一番高く、次いで、Osteograft[®], Algipore[®], Bio-base[®]であり、Bio-Oss[®]において低かったと報告した¹¹⁾。また、Hertenら¹³⁾は低温焼成処理DBBM (Bio-Oss[®]), 化学的処理DBBM (Tutodent Chips[®], Tutogen Medical), p-15ペプチド含有高温焼成処理DBBM (PepGen P-15[®]), ナノクリスタルHA (Ostim[®], Heraeus Kulzer), α -TCP (BioBase[®]), β -TCP (Cerasorb[®], Curasan)の6種類の骨補填材に対して、ヒト骨芽細胞、骨髄間葉系細胞ならびに単球系細胞株U937細胞を用いて細胞生存能について検討している。その結果、細胞間の違いはあるものの、TCP系顆粒とDBBM系顆粒は細胞毒性がないが、ナノサイズのHAは細胞毒性を示したと結論づけている¹³⁾。本研究で検討したBCPをはじめ、 α -TCP, β -TCPなどの合成人工骨材料は細胞毒性が低い傾向にあると示唆された。

マクロファージはあらゆる生体材料に対する生体の急性反応、すなわち材料の認識、溶解、貪食に関与しており、炎症反応過程や組織反応、さらに炎症のコントロールや修復過程に寄与する¹⁷⁾。このような役割は、炎症型のM1と抗炎症型のM2サブタイプの極性化のバランスによるところが多く、M1マクロファージは多くの炎症性サイトカインを分泌して炎症性変化を促進する一方、M2マクロファージが抗炎症性サイトカインIL-10やNO合成を抑制するArgを産生することによって炎症性変化を抑制し組織再生に関わっている¹⁸⁾。近年、骨修復・骨再生過程においても、Ostealマクロファージ(OsteoMacs)の局在、量的および形態変化が骨芽細胞分化ひいては骨モデリング・リモデリングに関わっていることがわかってきた¹⁸⁾。骨補填材が関与するマクロファージの極性の変化についてもその極性をコントロールすることで骨再生促進につながるのではないかと注目されている¹⁸⁾。Chenら¹⁹⁾は、*in vitro* ならびに *in vivo* 実験を通し、BCPがCD206やArg陽性のM2型傾向を示し骨形成促進に寄与する可能性がある一方、 β -TCPはCCケモカイン受容体7(CCR7, CD197)や誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)陽性のM1傾向を示したと報告している。本研究においてもBCPはコントロールに比べ、IL-10の高発現を伴うM2傾向を示した。DBBMについては、過去に、Shiら²⁰⁾がマウスマクロファージ株であるRAW264.7細胞を用い、コントロールに比べ、IL-10の高発現を伴うM2分化傾向があったと報告している。さらに、DBBM上で培養したRAW264.7細胞のコンディショニング培地を用い、マウス骨芽細胞様細胞株MC3T3E-1細胞の骨芽細胞分化が亢進したと報告している²⁰⁾。本研究で検討した条件内ではDBBMは明確なマクロファージの極性傾向はみられなかったが、細胞種や培養条件の違いがその要因として考えられた。DFDBAに関してはTNF- α の発現が上昇し、M1傾向が認められた。われわれが涉猟しえたかぎり、DFDBAのマクロファージへの影響を *in vitro* で評価した報告はなかったが、Muldashevら²¹⁾はallograftをラットの背部皮下移植に移植した実験で、マクロファージの活性化ならびにTNF- α 発現上昇が認められたと報告しており、本研究の結果も同様の傾向が示された。

DFDBAとDBBMは骨伝導能を有し、とくにDFDBAでは脱灰されていることによって骨基質から分泌されるBMPによる骨誘導能があるといわれている⁴⁾。本研究においても、DBBMとBCPに比較してDFDBAでは、BSPの発現が増強されるという結果が得られ、骨芽細胞分化能の観点からはDFDBAが優れていることが示唆された。また、ティッシュエンジニアリングの観点から、生体内にBMP-2をはじめとする成長因子を作用させるためには効果的な担体やスキャフォールドが必要である。そこで、

BMP-2の担体として、DFDBA、DBBMおよびBCPを使用した際の有用性の検討を行った。すべての材料において、BMP-2の優れた吸着能(80%以上)が示された。Taniyamaら²²⁾は、多孔質HA/Col複合体にBMP-2溶液を30分間含浸し、90%のBMP-2が吸着されたと報告しており、本研究と同様の結果であったといえる。一方、BMP-2の放出様式を観察すると、DFDBAでは比較的早い段階(24時間以内)で多く放出が行われているという傾向があった。これは、比較的滑らかであるDFDBAの表面性状が影響している可能性も考えられた。

一般に、BMP-2を含有する材料を用いる際、一時的に高濃度を曝露させるよりも、徐放性を有する方が骨誘導能にすぐれていると報告されている²³⁾。Yamamotoら²⁴⁾は、グルタルアルデヒド架橋したゼラチンハイドロゲルにRIラベルしたBMP-2を含有させ、その放出様式をマウスの背部皮下移植実験で示した。ハイドロゲルの含水率によってBMP-2の放出様式が異なること、またそれは単なる拡散による徐放ではなく、ハイドロゲルの分解によってコントロールされていると報告している²⁴⁾。本研究では、DBBMとBCPに比べ、DFDBAにおいてBMP-2が有意に多く放出されていたが、240時間後の時点で未だ吸着したBMP-2のうち50%しか放出されていないことを考えても、本研究で比較検討したいいずれの材料についても徐放性を有し、骨形成に有利である可能性が示された。また、ST-2細胞を用いた実験では、BMP-2を単独で作用させるよりも、DFDBAと組み合わせることにより骨芽細胞への分化が促進される傾向がみられた。しかしながら*in vitro*実験系である本研究では、骨補填材の吸収とBMP-2放出様式の関連は不明である。当然ながら、*in vitro*と*in vivo*のギャップは無視できないが、BMP-2を組み合わせたティッシュエンジニアリングの面から考えると、骨誘導能の促進が期待されるDFDBAの担体としての有用性が示唆された。

本研究の限界は、前述のように*in vitro*での細胞反応のみに焦点を当てているため、生体内での骨補填材の吸収、骨置換能および長期的変化については論じられない点である。Schmittら²⁵⁾は、上顎洞底挙上術にMineral cancellous bone allograft (MCBA, Puros®, Zimmer, Palm Beach Gardens, FL), DBBM (Bio-Oss®), BCP (Straumann BoneCeramic®, Straumann, Basel, Switzerland)ならびに自家骨を用い、ランダム化比較試験を行っている。5か月の治癒期間の後、採取した生検材料についてマイクロCTならびに組織形態計測の手法を用いて分析し、新生骨量はMCBAで $35.41 \pm 2.78\%$ 、DBBMで $24.9 \pm 5.67\%$ 、BCPで $30.28 \pm 2.16\%$ 、自家骨で $41.74 \pm 2.1\%$ であり、自家骨とBCP/DBBM間、MCBAとDBBM間に有意差がみられたとしている²⁵⁾。また、残存材料はBCP($15.8 \pm 2.1\%$)

とDBBM($21.36 \pm 4.83\%$)間に有意差がみられたと報告した²⁵⁾。彼らは、新生骨量の観点からは、自家骨が一番優れているが、比較した材料はいずれも良好な臨床結果が得られたとしつつ、材料の吸収効率、骨置換能を考えるとBCPが上顎洞底挙上術には有用なのではないかと推測している²⁵⁾。本研究において、同じ同種骨に分類されるDFDBAがDBBM、BCPに比較し、優れた骨芽細胞分化能を示したことはSchmittら²⁵⁾の結果と矛盾しなかった。

Mironら²⁶⁾は1)自家骨、2)DFDBA (LifeNet, Virginia Beach, VA, USA)、3)DBBM (Bio-Oss®)ならびに4)BCP (Vivoss®, Straumann, 10% HA:90% β -TCP)の4種類の骨補填材の骨誘導能についてラットの腓腹筋下埋植実験を用いて組織学的に検討し、新規開発されたBCP (Vivoss®)は合成材料でありながらDFDBAと同程度の骨誘導能がみられたと報告している。また、本邦では、近年歯科用インプラント治療を前提とした荷重のかかる骨欠損補填に使用することが可能な認可材料として、2017年には炭酸アパタイト材料であるサイトランスグラニュール®(ジーシー、東京)が、2019年にはオクタリン酸カルシウムとコラーゲンの複合体であるボナーク®(東洋紡、大阪)がPMDAの認可を受けた。今後も新規骨補填材の開発が進み、多くの材料が市場に出てくると容易に予想できる。骨補填材の選択肢が増えていくなかで、それらの基礎的知識を把握するための研究は重要である。本研究で用いた*in vitro*評価法は骨補填材の有用性を正確に議論することはできないが、生体との親和性についての評価の一助として寄与する可能性はある。今後、多様な骨補填材の有用性を評価するために、さらに有用な*in vitro*実験手法を発展・確立するとともに、臨床前研究ならびに臨床研究も含めたエビデンスの蓄積が望まれる。

結 語

本研究では、DFDBA、DBBMおよびBCPの3つの骨補填材の有用性について*in vitro*の手法を用いて検討した。BCPは細胞生存に比較的に有利で、高い細胞適合性が示された。一方で、骨芽細胞分化能の観点からは、DFDBAを選択する方が有利であり、ティッシュエンジニアリングの手法でBMP-2と組み合わせる際にもDFDBAの有用性が示唆された。

謝辞

本研究は、ベルン大学 Dental School, Oral Cell Biology Labならびに Department of BioMedical Research (DBMR)、顎蓋顎顔面外科学講座研究室にて行われた。稿を終えるにあたり、実験をサポートしてくださった Oral Cell Biology Lab のラボヘッドであった Dr. Richard J. Miron ならびにラボアシスタント

トの Ms. Catharine Solioz, 頭蓋顎顔面外科学講座研究室のラボアシスタントである Ms. Inga Grigaitiene ならびに SEM の撮影に協力していただいた, ベルン大学獣医学部解剖学研究室の Prof. Michael H. Stoffel, Ms. Helga M. Mogel に厚く御礼申し上げます.

本研究の一部は ITI Research Grant (No. 1287_2018) の助成を受け行われた.

本論文の要旨の一部は, The 23rd European Association for Cranio Maxillo-Facial Surgery (EACMFs) Congress (2016年9月, ロンドン) において発表した.

本論文に関して, 開示すべき利益相反状態はない.

引用文献

- 1) Sakkas A, Wilde F, et al : Autogenous bone grafts in oral implantology-is it still a "gold standard" ? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *International journal of implant dentistry* 3: 23, 2017.
- 2) Sheikh Z, Hamdan N, et al : Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomaterials research* 21: 9, 2017.
- 3) Khoury G, Lahoud P, et al : Use of Grafting Materials in Sinus Floor Elevation: Biologic Basis and Current Updates, ; Sinus Grafting Techniques. Springer, 2015, p145-194.
- 4) 佐藤秀一, 伊藤公一 : 歯周組織再生および骨再生における骨移植材の現状. *日歯周誌* 55: 300-311, 2014.
- 5) Pearce A, Richards R, et al : Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 13: 1-10, 2007.
- 6) Tornqvist E, Annas A, et al : Strategic focus on 3R principles reveals major reductions in the use of animals in pharmaceutical toxicity testing. *PLoS One* 9: e101638, 2014.
- 7) Pizzoferrato A, Ciapetti G, et al : Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clinical materials* 15: 173-190, 1994.
- 8) Urist MR : Bone: formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899, 1965.
- 9) Khojasteh A, Behnia H, et al : Effects of different growth factors and carriers on bone regeneration: a systematic review. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* 116: e405-e423, 2013.
- 10) Tazaki J, Murata M, et al : BMP-2 release and dose-response studies in hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate. *Biomed Mater Eng* 19: 141-146, 2009.
- 11) Kübler A, Neugebauer J, et al : Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes an *in vitro* study. *Implant Dentistry* 13: 171-179, 2004.
- 12) Aybar B, Bilir A, et al : Effects of tricalcium phosphate bone graft materials on primary cultures of osteoblast cells *in vitro*. *Clinical oral implants research* 15: 119-125, 2004.
- 13) Hertzen M, Rothamel D, et al : Surface- and nonsurface-dependent *in vitro* effects of bone substitutes on cell viability. *Clin Oral Investig* 13: 149-155, 2009.
- 14) Schindelin J, Arganda-Carreras I, et al : Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9: 676-682, 2012.
- 15) Annaz B, Hing K, et al : Porosity variation in hydroxyapatite and osteoblast morphology: a scanning electron microscopy study. *Journal of Microscopy* 215: 100-110, 2004.
- 16) ISO 10993-5 : Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Tests for *In Vitro* Cytotoxicity. International Organization for Standardization, Geneva, 2009.
- 17) Munerato MS, Bigueti CC, et al : Inflammatory response and macrophage polarization using different physicochemical biomaterials for oral and maxillofacial reconstruction. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 107: 110229, 2020.
- 18) Miron RJ and Bosshardt DD : Multinucleated Giant Cells: Good Guys or Bad Guys? *Tissue Eng Part B Rev* 24: 53-65, 2018.
- 19) Chen X, Wang M, et al : Correlations between macrophage polarization and osteoinduction of porous calcium phosphate ceramics. *Acta Biomater* 103: 318-332, 2020.
- 20) Shi M, Wang C, et al : Deproteinized bovine bone matrix induces osteoblast differentiation via macrophage polarization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 106: 1236-1246, 2018.
- 21) Muldashev E, Muslimov S, et al : The role of macrophages in the tissues regeneration stimulated by the biomaterials. *Cell and tissue banking* 6: 99-107, 2005.
- 22) Taniyama T, Masaoka T, et al : Repair of osteochondral defects in a rabbit model using a porous hydroxyapatite collagen composite impregnated with bone morphogenetic protein-2. *Artif Organs* 39: 529-535, 2015.
- 23) Agrawal V and Sinha M : A review on carrier systems for bone morphogenetic protein-2. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 105: 904-925, 2017.
- 24) Yamamoto M, Takahashi Y, et al : Controlled release by biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of bone morphogenetic protein. *Biomaterials* 24: 4375-4383, 2003.
- 25) Schmitt CM, Doering H, et al : Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clinical oral implants research* 24: 576-585, 2013.
- 26) Miron RJ, Zhang Q, et al : Osteoinductive potential of 4 commonly employed bone grafts. *Clin Oral Investig* 20: 2259-2265, 2016.