合成ヒドロキシアパタイトと自家海綿骨骨髓の
混合移植に関する実験的研究
——血管密着型 **incubating chamber** による異所性骨形成実験——

三 宅 実

**An experimental study of combined implantation with porous
hydroxyapatite and particulate cancellous bone and marrow
—Ectopic bone formation study using vessel attached incubating chamber—**

Minoru MIYAKE

Abstract: Hydroxyapatites (HAPs), which are synthetic ceramics (complex calcium phosphates), are very similar to bone and tooth minerals in their complex and have a biocompatibility. Recently, HAPs are used as a bone implant material in variety of situations, eg, surgical reconstruction, augmentation of the facial skeleton, also used to fill acquired and congenital bone defects.

Autogenous particulate cancellous bone and marrow (PCBM) had been known to have an active osteogenesis. These implant materials produce desirable effects on regeneration in osseous defects.

The aim of this investigation was to ascertain experimentally the biocompatibility, osteo-inductive and/or conductive ability of a combined implant material with HAP and autogenous bone in an ectopic situation. Mixed type of materials, porous HAP granules and PCBM (volume ratio, HAP: PCBM=2:1), were implanted into adult dogs using an vessel attached type incubating chamber which enabled to make the circumstances being free from the influences of recipient site. This chamber was attached to bilateral carotid artery, HAP•PCBM mixed group was implanted on one side and HAP alone group on the other side. Periodical (7, 14, 28, 60, 90 days) histopathological examinations were carried out by light and electron microscopies after implantation.

The results were as follows:

New bone formation was not observed in HAP alone group throughout the experimental period (90 days). Implanted HAP was encapsulated with fibrous tissue and these tissues were infiltrated with a few inflammatory cells. Macrophages and multinuclear giant cells (MGC) were observed on the HAP-tissue interface (MGC, I supposed to be a fusion cell type of macrophage). HAP resorption occurred by the activities of macrophage and MGC.

After 28 days, a newly formed calcified bone matrix surrounded by transplanted trabecular bone chips was observed in HAP•PCBM group. These new bones, initially grew toward the HAP granules, were formed along with the HAP's surface. The osteoconductive ability of HAP in an ectopic site was also confirmed with this results. Under the same experimental conditions, a lamellar bone formation, which was a matured type of bone formation, was confirmed

香川医科大学医学部歯科口腔外科学講座
(主任: 長嶋駿一郎教授)
Department of Oral and Maxillofacial Surgery,

Kagawa Medical School
(Chief: Prof. Shunichiro Nagahata)
受付日: 平成2年7月24日

after 90 days.

MGC have a different ultramicroscopical features depending on the contact materials. Namely, MGC surrounding a newly formed bone matrix had a ruffled border and clear zone, which were characteristic in osteoclast, but MGC around HAP or transplanted bone chips had not such organelles.

Key words: hydroxyapatite (ヒドロキシアパタイト), PCBM (骨髄を含む海綿骨片), mixed implantation (混合移植)

緒 言

外傷、腫瘍などにより生じた骨欠損は、同時に不可逆的機能障害をもたらす。このため欠損部の修復は重要であり、従来より二次的に骨移植が行われてきた。移植材も新鮮自家骨以外に、脱灰骨や焼成骨など種々の処理骨あるいは人工材料が考案、開発されている。

海綿骨を含む新鮮自家骨髄 (Particulate cancellous bone and marrow, 以下 PCBM と略す) は、多くの未分化間葉系細胞を含み、優れた骨誘導能を有することが明らかになり¹⁾、本来生体のもつ自然治癒ともいふべき欠損部の積極的な骨形成を目的として利用されるようになった²⁻⁶⁾。しかしながら、欠損部の大きさや形態によっては、単独で用いて三次元的形態を回復することが困難な場合や、PCBM 自体の採取量に制限があるため、単独では十分な量的補填が困難なことも多い。このような欠点を補うために形態付与や入手が容易な種々の人工材料と組み合わせることでより効果的な骨補填が可能になると考えられる。

今回、PCBM と組み合わせる人工材料のなかで、骨や歯の無機主成分である生体アパタイトと類似の化学成分を有し、またその高い生体親和性から、臨床で広く利用されている非吸収性の人工骨補填材の1つである合成ヒドロキシアパタイト (以下 HAP と略す) に注目した⁷⁻⁹⁾。Bio-composite material としての HAP と PCBM の混合移植実験は、人工的骨欠損部や皮下組織内で行われている¹⁰⁻¹²⁾。しかしながら、骨形成にいたる過程において母床側組織の影響は避けられず、移植材料周囲組織からの因子は多様であり HAP のもつ微小環境、PCBM の造骨能などその骨形成に関して不明な点も多く存在する。そこで周囲組織からの影響を極力排除するため、独自に血管密着型装置を考案し、総頸動脈周囲で HAP・PCBM 混合移植による異所性骨形成実験を行い、HAP 単独群と比較しながら、病理組織学的に検討、観察を行った。

材料および方法

実験動物として体重 7~15 kg の健康な雑種成犬20頭を用いた。HAP はアバセラムタイプ G、サイズ M (旭光学工業社製)、大きさ 600~1,000 μm の多孔性顆粒状不定形で、焼成温度 1,200°C のものを用いた。

実験方法は、麻酔前投薬として、塩酸ケタミン 10 mg/kg、硫酸アトロピン 0.2 mg 筋注し、術野剃毛、橈側皮静脈よりルート確保後、ペントバルビタールナトリウム 25 mg/kg を静注し麻酔した。頸部正中に電気メスで皮切を加え左右総頸動脈を剖出し、腸骨からダイヤモンドディスクで皮質骨を 15 mm $\times$ 7 mm 除去し、鋭匙にて PCBM を採取した。採取した PCBM を無菌的に HAP と混合し、incubating chamber に装填した (図1)。他方は HAP のみとし左右の総頸動脈に密着させ縫合した。また1部の実験動物には、chamber 内の状態を調べるため、直径 10 mm の内溶液採取用 chamber を装着した (図2)。筋層縫合、皮膚縫合し、術後感染予防として抗生剤を投与した。香川医科大学動物実験室で飼育を行い、順次経時的に屠殺し組織を採取、1/2karnovsky 液 (pH=7.2 カコジレートバッファー、4°C) を用い固定した。

Incubating chamber 内溶液分析:

実験動物を屠殺する前に末梢血液を 2 ml 程度採取、またその同一個体から内溶液採取用のチューブを取りつけた chamber より内溶液をシリンジで採取、4°C で5分間、3,000 rpm 冷却遠沈し、日立7050型自動分析機を用い分析を行った。

光顕用試料:

10%蟻酸クエン酸水溶液で脱灰、通法に従い 4 μm パラフィン切片を作製しヘマトキシリン・エオジン染色を施し、観察試料とした。また1部のものは、ジアゾ色素法による酸性フォスファターゼ染色を施した。

電顕用試料:

1. 走査型電顕用試料として、固定した試料をまず氷晶防止のため 12.5%, 25%, 50% の DMSO (dimethyl sulfoxide) 水溶液におおの2時間浸漬し置換した。液体窒素で均一に冷却した真鍮盤の上で凍結させ切断を行

表 1 Chamber 内溶液分析結果

		7 日 (n=2)	28 日 (n=3)	60 日 (n=3)
総蛋白	(g/dl)	4.0 (6.6)	4.7 (7.4)	4.6 (7.1)
アルブミン	(g/dl)	1.2 (2.7)	1.2 (3.03)	1.3 (3.43)
A/G		0.4 (0.74)	0.34(0.74)	0.39(0.94)
グルコース	(mg/dl)	14.0 (74.0)	23.0 (85.3)	16.0 (77.7)
総コレステロール	(IU/l)	51.5 (93.0)	63.5 (155)	62.0 (141)
アルカリフォスファターゼ	(mg/dl)	0 (49.0)	2.0 (65.0)	6.0 (55.7)
カルシウム	(mg/dl)	3.3 (7.6)	7.0 (9.1)	6.9 (9.3)
無機リン	(mg/dl)	2.2 (3.3)	4.2 (2.7)	4.5 (4.1)
IG-G	(mg/dl)	358 (907)	252 (1,455)	1,070 (1,127)
IG-A	(mg/dl)	20 (17.0)	55.5 (11.0)	16.0 (9.67)
IG-M	(mg/dl)	194 (351.5)	273 (29.0)	260 (260)
CRP	(mg/dl)	0 (0.3)	0.03(1.1)	0.9 (0.23)

日立 7050 型自動分析機 (Control serum)

図 1 Incubating chamber

図 2 手術模式図

通法に従いエタノール上昇列による脱水，酸化プロピレンで置換，エポキシ樹脂包埋しブロックを作製した。まずライヘルトウルトラマイクロームで1μmの厚切り切片を作製，トリジンブルー単染色を施し観察部位を確認後トリミングを行った。ダイヤモンドナイフを用い超薄切片を作製し，酢酸ウラン・鉛二重染色を施し日本電子 JEOL 1200 EX 透過電子顕微鏡で観察を行った。

実験結果

1. Chamber 内の組織液組成分析結果 (表1)

血清と比較すると，術後7日で総蛋白は61%，アルブミン44%，グルコース19%，総コレステロール55%，カルシウム43%，無機リン67%，IG-G39%であった。術後28日，60日経過後は，総蛋白，アルブミン，グルコースでは大きな変化はなく，カルシウム，無機リンは血清とほぼ同様な値となっていた。免疫グロブリン値は，術後7日では血清の40～50%程度であり局所的炎症所見は

い，続いて試料を50% DMSO 水溶液に投入し融解，0.05M カゴジレート緩衝液 (0.2M 蔗糖添加，4°C) で十分に洗浄し，2%オスミウム酸にて後固定，2%タンニン酸による導電染色を行い，以下通法に従い臨界点乾燥，白金パラジウム蒸着を施し，日立 S-900型走査電子顕微鏡で観察を行った。

2. 透過型電子顕微鏡用試料としては，試料を10% EDTA-2Na 水溶液 (pH=7.2) で4週間脱灰 (1部試料は非脱灰) し，1%オスミウム酸による後固定，以下

写真 1a HAP 単独群 7 日目

Chamber の上方には出血によるフィブリンの沈着がみられ、chamber 全体はまだ線維性組織で満たされていない (H-E 染色, $\times 63$).

写真 2 HAP-PCBM 混合群 7 日目

移植骨の骨小腔に骨細胞はなく、多核巨細胞およびマクロファージによる吸収像 (矢印) が観察される TB: 移植骨 (H-E 染色, $\times 160$).

写真 1b 7 日目線維芽細胞が動脈側 (写真右側) より chamber 内へ増殖している (H-E 染色, $\times 160$).

写真 3 HAP 単独群 14 日目

Chamber 内は線維性組織で満たされ、HAP 周囲には、リンパ球、マクロファージが散見される (矢印) *: HAP (H-E 染色, $\times 160$).

認められなかった。

2. 組織学的所見

術後 7 日目

HAP 単独群 Chamber 上方には、出血によるフィブリンが沈着し、線維性結合組織は chamber 全体には形成されていなかった。HAP 周囲には、マクロファージ、リンパ球の浸潤が観察され、動脈に近い側から幼弱な線維芽細胞の進入や毛細血管の形成も 1 部に認められた (写真 1a, b)。

HAP-PCBM 混合群 Chamber 内は、凝血塊が散見され、HAP および移植骨片は疎な線維性結合組織で囲まれており、HAP 単独群と比較するとわずかに線維性結合組織による組織修復は速やかな傾向がみられた。移植骨の骨小腔には骨細胞はみられず、破骨細胞と思われる多核巨細胞による移植骨片の吸収像が認められた。HAP 周囲には、マクロファージ、リンパ球が浸潤し、

異物型多核巨細胞も観察され、肉芽組織は動脈側より chamber 内へと増殖していた (写真 2)。

術後 14 日目

HAP 単独群 Chamber 内は、ほぼ線維性結合組織で満たされるようになり、HAP 周囲にはリンパ系細胞、マクロファージの浸潤が観察された (写真 3)。

HAP-PCBM 混合群 肉芽組織はさらに増殖し、そのなかに線維芽細胞が多く散在するようになった。多核巨細胞、マクロファージによる移植骨片の吸収はさらに進んでおり、chamber 内に骨髓組織はみられず、骨新生像はまだ認められなかった (写真 4)。HAP 界面では、単独群と同様に軽度の炎症性細胞浸潤が観察された。

術後 28 日目

HAP 単独群 HAP 周囲の線維性結合組織による被包化がさらに進み、線維性組織内には、少数のリンパ系

写真 4 HAP・PCBM 混合群14日目

移植骨はさらに吸収を受けているが、骨の新生は認められない GC: 多核巨細胞 TB: 移植骨 (H-E 染色, $\times 200$).

写真 5b HAP 界面のマクロファージ, 多核巨細胞(矢印) *: HAP (H-E 染色, $\times 200$).

写真 5a HAP 単独群28日目

マクロファージ, 多核巨細胞が HAP の周囲に顕著に認められるようになり, 軽度の炎症性細胞浸潤が観察される *: HAP (H-E 染色, $\times 63$).

写真 5c HAP 単独群28日目

HAP 界面のマクロファージ, 多核巨細胞 (矢印) (SEM 像).

細胞の浸潤も認められ, HAP 界面では, マクロファージ, 異物型の多核巨細胞による HAP の吸収像が観察された (写真 5a~e). 線維性結合組織は同時期の HAP の小腔内部にまで進入していた (写真 6a, b).

HAP・PCBM 混合群: 移植骨小腔に骨細胞はなく, 移植骨片周囲より活発な線維性の骨新生が認められた。しかし, 新生骨は未熟で, 層板構造は認められなかった (写真 7)。また HAP 周囲からの骨新生像は全例において観察されなかった。

術後60日目

HAP 単独群: HAP 周囲からの骨新生像はみられず, 線維性結合組織による安定した被包化が観察された。しかし, HAP 周囲に認められたマクロファージ, 多核巨細胞の数は28日目と比較して明らかに減少していた (写真 8a~c)。

HAP・PCBM 混合群: 移植骨周囲は, 毛細血管の新生が著明で, 旺盛な線維性の骨新生が観察され, 新生骨では, 吸収と添加のリモデリングがみられ, 活発な骨代謝が認められた。また骨髄様組織の形成も認められた (写真 9a~e)。新生骨周囲の吸収窩に認められた多核巨細胞は, 核の辺縁クロマチンが発達し, 細胞質中にはミトコンドリアおよび大小の空胞が多数認められ, 骨吸収面には刷子縁が観察された (写真 10)。同時期の新生骨および HAP 周囲の多核巨細胞は, 酸性フォスファターゼ染色では両者とも陽性像を呈した (写真 11a, b)。HAP との界面では, HAP 側からは骨新生を認めなかったが, 移植骨周囲から新生した骨組織は増殖し, HAP 表面に沿って, 連続して骨が形成されている像が

写真 5d HAP 界面の多核巨細胞

細胞質内に卵円状の多数のミトコンドリアが認められる
Nu: 核 Mt: ミトコンドリア V: 空胞 (TEM 脱灰像).

写真 5e HAP界面のマクロファージで、細胞質内に HAP 顆粒を含んだ食胞が認められる (矢印) Nu: Nucleus Ps: Phagosome (TEM 未脱灰像).

写真 6a HAP 単独群28日目

HAP 切断面で HAP の小腔には、線維性組織が侵入している (SEM 像).

写真 6b 写真 6a の HAP 小腔部の拡大像

細網様細胞が HAP 壁に膜様物を張りそれに結合している像が観察される (SEM 像).

観察された (写真 12a, b).

術後90日目

HAP 単独群: HAP 界面のマクロファージは60日目と比較してさらに減少していたが、HAP 間の組織は60日目と比べて、大きな変化がみられず、非常に安定した線維性結合組織で満たされていた (写真 13a, b).

写真 7 HAP・PCBM 混合群28日目

移植骨片を中心に幼弱な線維性の骨新生が観察される NB: 新生骨 TB: 移植骨 Oc: 破骨細胞 (H-E 染色, $\times 160$).

写真 8a HAP 単独群60日目

HAP 周囲のマクロファージ、多核巨細胞は28日例と比較して減少している *: HAP (H-E 染色, $\times 63$).

写真 8b 試料切断面の SEM 像

写真 8c 写真 8b の拡大像

HAP 顆粒は線維性結合組織により密に被包されている (矢印)。

写真 9a HAP・PCBM 混合群60日目

旺盛な骨の新生が観察される TB: 移植骨 NB: 新生骨 (H-E 染色, $\times 160$)。

写真 9b 新生骨間には骨髓様組織 (BM) が認められる (H-E 染色, $\times 160$)。

写真 9c 新生骨は、移植骨小片を中心に形成されている TB: 移植骨 NB: 新生骨 *: HAP (H-E 染色, $\times 160$)。

写真 9d 新生骨周囲の細胞群の TEM 像

骨芽細胞内には、発達した粗面小胞体および Golgi 装置が観察される Ost: 類骨 OB: 骨芽細胞 (TEM 脱灰像)。

HAP・PCBM 混合群: 旺盛な骨形成は観察されなくなったが、新生骨は、明瞭な層板構造が観察されるようになり、骨の成熟化が認められた。また新生骨の周囲には、扁平な静止期様の骨芽細胞が観察された (写真 14)。

考 察

一般に、生体での骨組織の形成は、血管のよく発達した間葉系組織から始まり、血管に近接した間葉系細胞が多数の突起で互いに接合し網目を作り、その細胞が大型化し、骨芽細胞に分化して、骨組織が形成される¹³⁾。一

写真 9e 類骨層には、基質小胞(Mv)、石灰化球(CG)が観察される(TEM 脱灰像)。

写真 10 新生骨の吸収窩にみられた多核巨細胞明帯、刷子縁が観察される Nu: 核 CZ: 明帯 Rb: 刷子縁 Mt: ミトコンドリア (TEM 脱灰像)。

方、軟骨組織は、組織中に血管がないため拡散によって栄養を得ており、その骨化は軟骨基質に存在する血管進入阻止因子 (AIF: anti invasive factor)¹⁴⁾が、軟骨細胞の肥大化に伴い減少し、血管系が新生されることで未分化間葉系細胞が供給され、それらの細胞が骨芽細胞に分化し骨組織が形成されると考えられている。また diffusion chamber による骨髄組織の異所性骨形成はすでに知られているが、液性成分の拡散だけでは、主に軟骨が形成される¹⁵⁻¹⁹⁾。これらのことを考え合わせると、血管系が骨組織への分化にかなり大きく関わっており、周囲組織の環境条件もこのような移植実験には十分な考慮が必要であると考えられる。従来より骨、種々の処理骨ある

写真 11a HAP・PCBM 混合群60日目

新生骨の吸収窩の多核巨細胞および HAP 周囲の多核巨細胞も陽性像を呈している NB: 新生骨 Oc: 破骨細胞 (酸フォスファターゼ染色, ×160)。

写真 11b HAP 界面の多核巨細胞も陽性を呈している (矢印) *: HAP (酸フォスファターゼ染色, ×200)。

いは HAP などの人工材料の移植実験、異所性骨形成実験は皮下組織、筋肉組織、人工的骨欠損部で行われている²⁰⁻³²⁾。しかしながら、骨や骨髄を皮下組織、筋肉組織に移植した場合、軟骨を誘導したり、骨形成量も少なく成熟度が低いなど不十分な点もあり、また人工的骨欠損部への移植では、母床周囲組織の影響が大きく、骨新生は母床側から始まり、移植材自体の組織動態、骨誘導能を観察するためには適していないように考えられる。

このような理由から、人工的骨欠損部や皮下組織を避け、血管の新生の旺盛な動脈外膜に異所性環境を設定し、HAP と自家海綿骨骨髄との混合移植による異所性骨形成能および HAP の異所性環境下での骨誘導能、骨伝導能を明らかにするために本実験を行った。

1. 血管密着型 incubating chamber について

本実験系では総頸動脈外膜周囲に閉空間を設定した。総頸動脈は、中枢に安定した酸素、栄養を供給する必要

写真 12a HAP・PCBM 混合群60日目
HAP に沿って形成された新生骨 (矢印) *: HAP (H-E 染色, $\times 200$).

写真 13a HAP 単独群90日目
HAP は緻密な線維性結合組織により囲まれ、マクロファージ、多核巨細胞はほとんど観察されない (H-E 染色, $\times 63$).

写真 12b 写真12aの SEM 像
HAP 界面に沿って形成された新生骨 (矢印).

写真 13b 同部の拡大像 (H-E 染色, $\times 160$)

写真 14 HAP・PCBM 混合群90日目

新生骨は層板骨まで成熟し、骨周囲には扁平な静止期の骨芽細胞様細胞が観察される (矢印) Oc: 破骨細胞 LB: 層板骨 * HAP (H-E染色, $\times 160$).

性から血流および酸素分圧が非常に安定しており、また外膜には血管を養うための栄養血管 (血管の血管: vasa vasorum) が発達している。血管外膜周囲では、移植後、組織修復も早く、血管系の新生も旺盛である。総頸動脈に取りつけた chamber の内容液分析結果をみても血清と比較して電解質はほぼ等しく、アルブミンなどの有機成分は血清値の50%と高く、これは皮下組織などの組織間質液が一般に10~15%であることと比較して栄養条件は良好である。また総頸動脈は側枝がなく chamber を装着する十分な長さや太さが確保でき、術式も比較的簡便で、さらに左右の動脈を利用できることで同一個体で異なる条件を設定することが可能である。以上のことから血管密着型 incubating chamber は、移植材の組織

反応を観察するための移植環境として有用な方法であることが確認された。

2. HAP と HAP-PCBM bio-composite material について

HAP は、青木ら (1977年)³³⁾が、犬の顎骨移植実験において、移植部に炎症反応も少なく HAP 周囲に骨新生が旺盛に認められたと報告して以来、種々の基礎データも多く、*in vitro* においても細胞親和性は線維芽細胞の付着実験などにより確認されている^{34~40)}

HAP の骨欠損部への補填については、炎症反応、異物反応が少なく、早期より HAP 表面に骨組織が形成され、移植後長期間にわたり安定し、骨補填材としての有用性が高いと報告されている³⁴⁾。しかし、皮下組織での HAP の組織動態についての実験報告をみると、HAP は一般に、線維性組織による被包化、異物巨細胞による貪食を受け、組織為害性は少ないものの積極的な骨補填材としての利点を肯定する要素は少ない^{23,25)}。永井ら²³⁾は、ラット皮下埋入実験において HAP のこのような組織学的変化は生体側の外来異物、とくに非抗原性、非炎症性物質に対する基本的生体防御反応として認識されるものであって、埋入材料の動揺、化学的刺激に基づくものではないと述べている。本実験でも、HAP 単独群、HAP-PCBM 混合群の両群とも HAP 界面には移植後早期に軽度のリンパ球、組織球の浸潤を認め、比較的長期間にわたり、マクロファージ、多核巨細胞による HAP の貪食像が観察され、明らかに生体にとっては異物として認識されていると考えられる。

HAP の骨誘導能については、現在では骨伝導能はあるが、誘導能については否定的な意見が多く^{11,12,39,40)}、本実験では HAP 単独群で、90日観察例において1例も HAP 周囲からの骨新生像が認められなかったことより、骨誘導能はないと考える。

HAP 顆粒による組織反応は、HAP 単独群、HAP-PCBM 混合群の間で違いは観察されず、PCBM を混合することによる HAP 自体の組織反応性は変わらないと思われる。しかし、HAP-PCBM 混合群において移植骨片より新生された線維性骨は HAP に沿って形成されており、異所性環境においても HAP の優れた骨伝導能が認められた。

新鮮自家骨髄移植の異所性骨形成能は、Tavassoli ら¹⁾により報告され、Boyne⁴¹⁾はその骨誘導能をもつ骨髄を単独、新鮮自家海綿骨と混合、同種海綿骨と混合の3つの組み合わせで diffusion chamber を用い骨膜下、筋膜上に移植しその骨新生を調べた結果、骨髄と新鮮自家海綿骨との混合が最も旺盛な骨新生を認めたと報告している。本実験では、HAP-PCBM 混合例において、形成量に若干の差があったが、ほぼ全例に移植骨を中心として線維性の骨が形成され、血管外膜周囲という異所性環境においても新鮮自家海綿骨骨髄の骨形成能が確認された。とくに従来の報告と異なっていた点は、本実験では、軟骨の形成がほとんどなく、線維性の骨形成が観察

されたことで、この結果は前述したように周囲環境の違いによるものと考えている。

骨形成細胞の由来については、①移植した骨髄細胞、海綿骨に付着している骨原性細胞が死滅せず着生し、環境が変化することで骨形成細胞に分化増殖し、骨を形成する、②周囲の未分化間葉系細胞が、移植した骨髄や骨片などからの何らかの骨誘導因子により刺激され、分化し骨芽細胞となり骨を形成する場合の2つが考えられている⁴¹⁾

長内³¹⁾は、H³thymidine でラベルした腸骨 PCBM を顎骨欠損部に移植した実験で、移植した骨髄細胞は生き残り骨芽細胞へ分化し骨を形成したと述べている。本実験では、人工的骨欠損部と異なり、母床組織に骨組織はないため骨原性細胞の周囲からの供給は考えられない。また骨髄単独を diffusion chamber に移植し、細胞の移動がない状態でも、骨および軟骨組織は形成されるので、骨髄細胞が骨原性細胞に分化することも否定できない。しかしながら、移植した骨髄細胞から分化した骨芽細胞によって主に骨が形成されたとすると、比較的早期より移植骨と同様に、マクロファージ、多核巨細胞による吸収を受けている HAP からの新生像が観察されてもよいように思われる。本実験の所見では、移植した骨髄は、移植後7日目には1部観察されたが、14日目になると全く認められなくなり、移植骨小片の骨小腔には骨細胞がなく失活した状態であり、移植骨片はマクロファージ、多核巨細胞により著明な吸収を受けていた。また28日目で観察された骨新生は、部分的に吸収を受けた骨小片を核として始まっており、HAP 周囲からの骨新生像は観察されなかった。このことから骨形成細胞は骨髄細胞以外から分化した可能性も考えられる。すなわち、骨を形成した細胞は動脈外膜に存在するかあるいは血管の新生により供給された未分化間葉系細胞から分化したものであり、骨新生は主に骨小片が吸収されることで何らかの骨誘導因子が放出され、それを核として周囲組織中の未分化間葉系細胞が分化し、骨を形成したと考えられる。しかし、骨原性細胞の由来については今後の検討が必要と思われた。

3. HAP 界面の多核巨細胞について

HAP 単独群、HAP-PCBM 混合群の両群ともに HAP 界面にマクロファージおよび多核巨細胞が著明に認められた。森²⁵⁾は、HAP 微粒子のラット皮下注入実験で、HAP を貪食する多核巨細胞は、形態的にもマクロファージに近似しており、多核巨細胞はそのマクロファージが癒合したものであって、骨を吸収する多核巨細胞である破骨細胞とは、電顕的に異なっていたと述べている。一方、永井ら²⁶⁾は、HAP 粉末を皮下に埋入するという同様な実験で HAP 周囲に認められる多核巨細胞に1部刷子縁様構造物が観察されたとしている。破骨細胞の由来は造血幹細胞の単核細胞により形成されると考えられ

ており、単球やマクロファージなどの mononuclear phagocytes と発生起源は同じである⁴²⁾ またその運動性や発達した消化機構など形態機能的には破骨細胞に類似した特徴を有し、mononuclear phagocytes は *in vivo*, *in vitro* において骨小片を消化吸収し、互いに癒合して多核巨細胞を形成したとする報告もある^{43,44)} また犬井⁴⁵⁾ は、人工骨移植材周囲に出現する多核巨細胞の性質を同定するため、ラットおよびマウスの皮下に骨移植材として吸収性 β -tricalcium phosphate、非吸収性のヒドロキシアパタイトを移植し組織化学的検索を行い、人工骨周囲に出現する多核巨細胞は、失活骨顆粒周囲に出現する多核巨細胞と同様、酸フォスファターゼおよび酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ活性が陽性であったとして移植材周囲の多核巨細胞の起源はマクロファージの癒合による破骨細胞である可能性を指摘している。

しかしながら、破骨細胞とマクロファージなどの mononuclear phagocytes の相違点についての報告もある。まず第一に mononuclear phagocytes が癒合して多核になった巨細胞の細胞膜には mononuclear phagocytes の特徴の1つである FC receptor や C_3 receptor が検出されるが、破骨細胞には検出されないこと、また mononuclear phagocytes には非特異性 esterase 活性や内因性 peroxidase 活性が検出されるが、破骨細胞には認められないこと、mononuclear phagocytes が癒合して多核化した巨細胞は、骨基質を吸収する際にも破骨細胞の特徴である刷子縁 (ruffled border) の形成が観察されないことなどである^{42,46)}

本実験では、HAP 界面にはマクロファージ、多核巨細胞が観察され、また移植骨および新生された線維性骨の吸収窩部には破骨細胞と思われる多核の細胞が観察された。光顕試料の酸性フォスファターゼ染色では、HAP 周囲の多核巨細胞、新生骨あるいは移植した骨小片周囲の多核巨細胞とも陽性であったが、電顕的観察では新生骨周囲の多核巨細胞には破骨細胞に特徴的な刷子縁、明帯が観察された。これと異なり HAP および移植骨小片周囲の多核巨細胞には、刷子縁様構造物が認められず、細胞周囲の突起はマクロファージに酷似し、卵状の多数のミトコンドリア、phagosome が観察され、形態学的には森²⁵⁾の実験結果と同様、HAP 周囲の多核巨細胞の由来はマクロファージが癒合したものと考えられた。

正常な骨組織においては、動的平衡状態を維持するため常に骨のリモデリングが基礎的多細胞単位 (BMU: basic multicellular unit)で行われている。骨吸収から骨形成への細胞連鎖機構において、骨芽細胞の分化にはカップリング因子が関与することが考えられている^{49,50)} つまり破骨細胞による骨吸収過程で骨基質に含まれる BMP⁴⁹⁾や TGF- β ^{50,51)}などの骨誘導因子が活性化し、周囲の未分化間葉系細胞を軟骨細胞ないしは骨芽細胞へ分化、誘導することによって骨が形成されるといわれてい

る。

本実験において、新生骨が HAP 界面に沿って形成されている部位では、HAP 単独群と比較して HAP を吸収している多核巨細胞、マクロファージが多く認められた。このことは正常骨組織と同様に吸収が先行し、その後添加が行われていることを示唆している。またマクロファージ、そしてこれが癒合したものと考えられる多核巨細胞もまた破骨細胞と同様に骨の動的平衡状態に関与していることも考えられる。HAP は骨組織と異なり有機成分は含んでいない。すなわち HAP 自体は骨誘導因子蛋白を含んでいないので、吸収されて誘導因子が活性化を受けることはない。マクロファージ、多核巨細胞は無機質である HAP を吸収し、内部消化の過程で何らかの誘導因子を放出している可能性も示唆される。臨床において骨移植は、緻密骨質を主体としたブロック骨移植や bone chip 移植が行われており、移植後の骨新生は、後者の方が一般的に速やかであり、目減りも少ないとされる。この理由として細片の方が周囲組織液の浸透性がよく、また血管の新生が速やかであるためといわれている。さらに今回の実験結果から示唆されたことを考え合わせると、細片化することによりマクロファージなどの吸収系細胞との接触範囲も広くなり、速やかに吸収されるためその過程で骨に含まれる骨誘導因子、あるいはマクロファージ、異物型巨細胞などの吸収系細胞から未分化間葉系細胞を骨原性細胞に分化させる因子を放出する可能性も考えられる。

結 語

合成ヒドロキシアパタイトと新鮮自家海綿骨髄の混合移植実験を、独自に考案した血管密着型 incubating chamber で HAP 単独群および HAP-PCBM 混合群の2群に分けて行い以下のような結論を得た。

1. 総頸動脈密着型 incubating chamber は、術後早期より安定し、かつ再現可能な環境が設定でき人工材料などの移植実験では有用な方法であった。
2. HAP 単独群では、90日経過例にも骨新生は観察されず、HAP 自体の骨誘導は認められなかった。
3. HAP-PCBM 混合群では、移植後28日目にはほぼ全例に移植骨片を核として線維性の骨形成が認められ、移植後90日目には新生骨は層板構造を有するまで成熟していた。
4. 新生骨は HAP に沿って形成されており、異性環境においても HAP の高い骨伝導能が確認された。
5. HAP 周囲に出現する多核巨細胞には、破骨細胞に特徴的な刷子縁、明帯が観察されず、破骨細胞とは形態的に異なっていた。

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導ならびに

ご校閲いただきました香川医科大学歯科口腔外科学講座長島駿一郎教授に深甚なる謝意を表します。また本研究の遂行にあたり、ご協力、ご助言をいただきました岡山大学歯学部口腔病理学教室竹下信義助教授、当教室の武田則昭先生、池内孝芳博士を始め教室員諸兄各位に心より感謝いたします。

なお本論文の要旨は、第18回日本口腔外科学会中国・四国地方会（平成元年6月17日、岡山）、第44回日本口腔科学会総会（平成2年4月20日、松江）において発表した。

引用文献

- 1) Tavassoli, M. and Crosby, W.H.: Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science* 161: 54-56 1968.
- 2) Gongloff, R.K., Cole, M., et al.: Titanium mesh and particulate cancellous bone and marrow grafts to augment the maxillary alveolar ridge. *Int J Oral Maxillofac Surg* 15: 263-268 1986.
- 3) Ames, J.R. and Ryan, D.E., et al.: The autogenous particulate cancellous bone marrow graft in alveolar clefts. *Oral Surg* 51: 588-591 1981.
- 4) 幸地省子, 越後成志, 他: 顎裂部に対する自家腸骨海绵骨細片移植 第2報 骨架橋形成について. *日口外誌* 33: 2152-2158 1987.
- 5) 大森清弘, 野間弘康, 他: 顎顔面欠損に対する particulate cancellous bone and marrow (PCBM) graft. *日口外誌* 25: 1563-1574 1979.
- 6) Connole, P.W.: Mandibular cancellous bone grafts: Discussion of 25 cases. *J Oral Surg* 32: 745-754 1974.
- 7) Grote, J.J., Kuypers, W., et al.: Use of sintered hydroxylapatite in middle ear surgery. *J Otorhinolaryngol Relat Spec* 43: 248-254 1981.
- 8) Frame, J.W.: Hydroxyapatite as a biomaterial for alveolar ridge augmentation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 16: 642-655 1987.
- 9) 高橋庄二郎, 斎藤 力, 他: 口腔外科領域におけるハイドロキシアパタイト・セラミック Alveograf の臨床評価—多施設における共同研究—. *日口外誌* 32: 92-107 1986.
- 10) Cobb, C.M., Eick, J.D., et al.: Restoration of mandibular continuity defects using combination of hydroxylapatite and autogenous bone: Microscopic observations. *J Oral Maxillofac Surg* 48: 268-275 1990.
- 11) 柴田貞彦: 新鮮自家骨髄とハイドロキシアパタイト顆粒の混合埋入に関する実験的研究—皮下ならびに顎骨欠損部への埋入—. *日口外誌* 34: 2178-2187 1988.
- 12) 斎藤善広: 同種脱灰骨, 新鮮自家骨髄, ヒドロキシアパタイト顆粒の単独および混合埋入に関する実験的研究—皮下ならびに顎骨欠損部への埋入—. *日口外誌* 36: 21-36 1990.
- 13) 須田立雄, 高橋栄明, 他: 骨の科学. 第1版, 医歯薬出版, 東京, 1986, 65-70頁.
- 14) Wezeman, F.H. and Childs, G.V.: Ultrastructural immunohistochemical localization of anti-invasion factor (AIF) in bovine cartilage matrix. *J Histochem Cytochem* 30: 524-531 1982.
- 15) 磯部 饒, 荒井孝和, 他: 骨誘導実験における骨芽細胞の由来と石灰化. 骨代謝 10: 21-26 1977.
- 16) Ashton, B.A., Allen, T.D., et al.: Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. *Clin Orthop* 151: 294-307 1980.
- 17) Bab, I., Howlett, C.R., et al.: Ultrastructure of bone and cartilage formed *in vivo* in diffusion chambers. *Clin Orthop* 187: 243-254 1984.
- 18) Bab, I., Ashton, B.A., et al.: Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. *J Cell Sci* 84: 139-151 1986.
- 19) Mardon, H.J., Bee, J., et al.: Development of osteogenic tissue in diffusion chambers from early precursor cells in bone marrow of adult rats. *Cell Tissue Res* 250: 157-165 1987.
- 20) Frame, J.W., Rout, P.G.J., et al.: Ridge augmentation using solid and porous hydroxylapatite particles with and without autogenous bone or plaster. *J Oral Maxillofac Surg* 45: 771-777 1987.
- 21) Blitterswijk, C.A., Grote, J.J., et al.: Bioreactions at the tissue/hydroxyapatite interface. *Biomaterials* 6: 243-251 1985.
- 22) Blitterswijk, C.A., Kuipers, W., et al.: Epithelial reactions to hydroxyapatite. An *in vivo* and *in vitro* study. *Acta Otolaryngol* 101: 231-241 1986.
- 23) 永井教之, 丸山晴義, 他: 合成水酸化アパタイト粉末の皮下移植試験に関する基礎的研究. *岡山歯誌* 4: 57-65 1985.
- 24) 永井教之, 竹下信義, 他: 合成水酸化アパタイトのラット顎骨補填時における病理組織学的研究. *日口外誌* 31: 1352-1361 1985.
- 25) 森 雅美: 合成ハイドロキシアパタイトセラミック微粒子に対する組織反応—電子顕微鏡的研究—. *新潟歯学会誌* 17: 99-115 1987.
- 26) 永井教之, 竹下信義, 他: 顎骨埋入合成水酸化アパタイト界面域における細胞動態の電顕的研究. *岡山歯誌* 6: 31-48 1987.
- 27) Holmes, R.E. and Hagler, H.K.: Porous hy-

- droxyapatite as a bone graft substitute in cranial reconstruction: A histometric study. *Plas Reconstr Surg* 81: 662-671 1988.
- 28) Holmes, R. and Hagler, H.: Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in maxillary augmentation. An histometric study. *J Craniomaxillofac Surg* 16: 199-205 1988.
- 29) Krajewski, A. and Ravaglioli, A., et al.: Mineralization and calcium fixation within a porous apatitic ceramic material after implantation in the femur of rabbits. *J Biomed Mater Res* 22: 445-457 1988.
- 30) Horswell, B.B. and Deeb, M.E.: Nonporous hydroxylapatite in the repair of alveolar clefts in a primate model: Clinical and histologic findings. *J Oral Maxillofac Surg* 47: 946-952 1989.
- 31) 長内幸一: 骨髓を含む海綿骨梁移植の実験的研究. *歯科学報* 81: 875-887 1981.
- 32) 黒田雅仁: 下顎骨欠損部への骨髓を含む海綿骨梁移植における骨新生と骨再構築機転に関する研究. *歯科学報* 83: 683-711 1983.
- 33) 青木秀希, 加藤一男, 他: アパタイトの歯科材料への応用に関する研究 (第二報) — 人工歯根への利用 — *歯理工誌* 18: 86-89 1977.
- 34) 小木曾 誠: アパタイト表面における骨組織形成ならびにその石灰化について. *口病誌* 50: 1-22 1983.
- 35) Orly, I., Gregoire, M., et al.: Chemical changes in hydroxyapatite biomaterial under *in vivo* and *in vitro* biological conditions. *Calcif Tissue Int* 45: 20-26 1989.
- 36) Ammar, A., Kobayashi, S., et al.: Tissue compatibility of ceramics as compared with other implant materials by means of tissue culture. *Orthop Ceramic Implants* 1: 25-30 1981.
- 37) 飯島啓一郎, 板倉良暢, 他: 骨原性細胞 MC3 T3-E1 によるハイドロキシアパタイトの生体適合性に関する研究. *歯基礎誌* 28: 170-176 1986.
- 38) 小林 俊, 木下鞆彦, 他: 骨適合性を有する多相系生医学材料に関する研究 — 第3報 ハイドロキシアパタイト—ポリマー複合材料の細胞培養試験 —. *日口外誌* 34: 618-626 1988.
- 39) Drobeck, H.P., Rothstein, S.S., et al.: Histologic observation of soft tissue responses to implanted, multifaceted particles and discs of hydroxylapatite. *J Oral Maxillofac Surg* 42: 143-149 1984.
- 40) Jarco, M., Kay, J.F., et al.: Tissue, cellular and subcellular events at a bone-ceramic hydroxylapatite interface. *J Bioengin* 1: 79-92 1977.
- 41) Boyne, P.J.: Autogenous cancellous bone and marrow transplants. *Clin Orthop* 73: 199-209 1970.
- 42) Ejiri, S.: The preosteoclast and its cytodifferentiation into the osteoclast: Ultrastructural and histochemical studies of rat fetal parietal bone. *Arch histol Jap* 46: 533-557 1983.
- 43) Mundy, G.R., Altman, A.J., et al.: Direct resorption of bone by human monocytes. *Science* 196: 1109-1111 1977.
- 44) Glowacki, J. and Cox, K.A.: Osteoclastic features of cells that resorb bone implants in rats. *Calcif Tissue Int* 39: 97-103 1986.
- 45) 犬井清孝: 骨移植によって生ずる多核巨細胞の組織学的検討. *日歯周誌* 31: 72-82 1989.
- 46) Holtrop, M.E., Cox, K.A., et al.: Cells of the mononuclear phagocytic system resorb implanted bone matrix: A histologic and ultrastructural study. *Calcif Tissue Int* 34: 488-494 1982.
- 47) Baron, R., Vignery, A., et al.: Lymphocytes, macrophages and the regulation of bone remodeling. *Bone Miner Res* 2: 175-243 1983.
- 48) Farley, J.R. and Baylink, D.J.: Purification of a skeletal growth factor from human bone. *Biochemistry* 21: 3502-3507 1982.
- 49) Urist, M.R.: Bone: Formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899 1965.
- 50) Seyedin, S.M., Thompson, A.Y., et al.: Cartilage-inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 261: 5693-5695 1986.
- 51) Centrella, M., Massague, J., et al.: Human platelet-derived transforming growth factor- β stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvariae. *Endocrinology* 119: 2306-2312 1986.