移植骨材料としての幼若同種骨組織の有用性に関する実験的検討

ラット移植骨の形態学的, X線学的, 組織学的変化

岩田 雅 裕

Experimental study of possible use of immature bone
as bone grafting material

— Morphological, radiological, and histological changes of grafted fetal bone —

Masahiro IWATA

Abstract: Attention has focused on fetal tissues in recent years as cellular grafting material for patients with parkinsonism, diabetes, and other diseases, whereas no study has reported the use of fetal bone tissue for bone grafting. I noted that fetal bone has low antigenicity and has growth potential. Thus, I performed two-step grafting of fetal bone. In the present study, I carried out experimental primary grafting with fetal tibia as the first stage of this study design and evaluated the possibility of using fetal bone as bone grafting material. As donor, fetuses were removed by cesarean section from Lewis rats on the 17th day of pregnancy. Disarticulation was performed under an operating microscope, and the tibia was collected. Fischer and Brown-Norway rats were used as recipients, and the tibia was grafted to the back. The graft was collected at the 1st, 2nd, 3rd, and 4th weeks after grafting, and the longer axis was measured. Further more, histopathological and radiological examinations were performed. Growth of the graft bone over time was macroscopically, histologically, and radiologically confirmed at the subcutaneous site of primary grafting. The longer axis was 2.36 ± 0.13 mm when the tibia was collected from the fetus. After grafting, it increased with time to 12.40 ± 2.50 mm at the 4th week, equivalent to an increase of 5.25 times. In both recipient rats, the longer axis increased, and there was no difference between two types of rats. I conclude that fetal bone has low immunogenicity and is useful as allogenic bone grafting material in the early stage of primary grafting.

Key words: fetal bone (胎児骨), allogenic bone grafting material (同種骨移植材料), two-step grafting (二段階移植), antigenicity (抗原性), major histocompatible antigen (主要組織適合抗原)

緒 言

顎骨には歯源性嚢胞, 腫瘍, 外傷などにより骨欠損

を生じることがある。骨移植はこのような骨欠損部の治療手段としてきわめて有用で, 歯科口腔外科領域でも盛んに用いられている。骨移植に関する研究は, 今世紀の初めより盛んに行われ, 現在までに多数の実験的, 臨床的研究が報告されてきた。従来の骨移植研究において, 実験的にも, 臨床的な結果からみても, 新鮮自家骨移植の成績が最も優れていることは明らかである。一方, 同種骨移植には拒絶反応が必発で, 成人からの移植骨は敏速に拒絶され, この反応の回避が同

岡山大学歯学部口腔外科学第一講座

(主任: 西嶋克巳教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery I,
Okayama University Dental School (Chief: Prof.
Katsumi Nishijima)

受付日: 平成8年3月21日

骨移植の最大の問題点である。近年、免疫抑制剤の開発、進歩に伴い臓器移植にとっての最大の課題である拒絶反応も克服されようとしている。しかしながら、骨移植に関しては骨細胞の超生を絶対条件としないことから、骨誘導能を保持させ抗原性を除いた処理保存骨が検討されてきた。近年、パーキンソン病¹⁾、糖尿病患者²⁻⁴⁾などに対する細胞移植材料として胎生期組織が注目を集めているが、胎生期の骨組織を用いた骨移植に関する研究はいまだみられない。そこで著者は、胎生期組織が免疫学的に抗原性が乏しく、再生力、成長能力が旺盛であると考え、胎児骨の二段階移植、すなわち皮下などの軟組織内に一次移植を行い、骨の成長後骨欠損部に二次移植を行う方法を考案した。今回、ラット胎児脛骨を用いた同種他家移植の一次移植実験を行い、胎児骨の新しい骨移植材料としての可能性を検討した。

実験材料および方法

1. 移植骨の形態学的、X線学的、組織学的変化—新生児骨との比較検討—

ドナー：ペントバルビタール（投与量 1 ml/kg）を腹腔内に注射し、妊娠 17 日目の Lewis 系ラットの子宮内から胎児を帝王切開にて摘出、実体顕微鏡下で胎児から膝関節、脛腓関節、距腿関節を剥離、軟組織を除去し、脛骨を採取した（胎児骨群）。対照として、胎児骨群として用いる半数の胎児を摘出後、母親ラットの子宮壁を 7-0 吸収糸で縫合、筋層縫合の上、ナイロン糸にて皮膚縫合し、その後自然分娩により出生した残り半数のラットを用いた（新生児骨群）。

レシピエントおよび移植方法：胎児骨群、新生児骨群とも生後 8 週齢、体重 200-220g の Fischer 系成熟雄性ラット各 50 匹を用い、ペントバルビタール（1 ml/kg）を腹腔内に注射し、背部皮下組織内にポケットを作製、脛骨を移植した。移植骨は周囲筋組織に 7-0 吸収糸にて固定後、ナイロン糸にて皮膚縫合した。

評価方法：胎児骨群、新生児骨群とも実験動物を移植後 1 週、2 週、3 週、4 週目に薬殺し、移植片を採取し、形態学的評価として移植骨骨端間の長径を測定した。骨組織の成熟度および拒絶反応、リンパ球浸潤を検討するため、通法に従い HE 染色による病理組織学的検討と軟 X 線発生装置（Softex 社製）の CMB を用いて X 線学的検討を行った。そして肉眼的、組織学的、X 線学的、移植骨長径変化についての結果を両群間で比較検討した。結果の分析には χ^2 検定を行った。また、参考に生後 2 週、4 週の Lewis 系ラットの脛骨の長径を各週 20 匹測定した。さらに胎児骨移植後 3 週目の移植骨に AMeX 包埋法⁵⁾、ストレプトアビジン-ビオチン（SAB）染色法を行い、免疫組織化学的

に TGF- β の局在を検討した。すなわち抗 TGF- β 抗体（R&D System 社製）を用い、次に第二抗体（ビオチン標識抗マウス Ig 抗体）を反応させ、続いてペロキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させ抗原部位を染色し検討した。

2. 胎児骨移植における主要組織適合抗原（以下 MHC）の影響—同種異系移植—

ドナー：ペントバルビタール（1 ml/kg）を腹腔内に注射し、妊娠 17 日目の Lewis 系ラット（MHC haplotype RT 1¹）から胎児を摘出、実験 1 と同様に脛骨を採取した。

レシピエントおよび移植方法：生後 8 週齢の MHC が Lewis 系と minor mismatch の Fischer 系（MHC haplotype RT 1¹）（F 群）、major mismatch の Brown-Norway 系（MHC haplotype RT 1ⁿ）（B 群）および対照として同種同系移植である Lewis 系ラット（L 群）をそれぞれ 20 匹用い、実験 1 と同様に移植実験を行った。

評価方法：移植骨骨端間の長径を測定し、各群間で比較検討した。結果の分析には χ^2 検定を行った。

なお、ラットはすべて日本チャールス・リバー（株）（神奈川）より購入し、実験に供した。

結 果

1. 移植骨の形態学的、X線学的、組織学的変化—新生児骨との比較検討—

長径変化：胎児骨群では、胎児からの脛骨採取時、最大長径が 2.36 ± 0.13 mm であった。移植後経時的に大きくなり、移植後 1 週で 5.38 ± 1.53 mm、2 週で 6.80 ± 1.20 mm、3 週で 9.10 ± 2.60 mm、4 週では 12.40 ± 2.50 mm で、長径は 4 週目で採取時の 5.25 倍に増加していた。一方新生児骨群では、新生児からの脛骨採取時、最大長径が 6.43 ± 0.27 mm であった。移植後 2 週目までは一定の速度で経時的に大きくなり、移植後 2 週で最大長径は 13.75 ± 1.50 mm となった。しかしその後縮小傾向を示し、移植後 4 週では 11.55 ± 1.75 mm となった。移植後 4 週目の長径では、胎児骨群が新生児骨群に対し有意に大きかった（ $p < 0.05$ ）（図 1）。

X 線学的評価：両群とも移植後 1 週目と比較して 4 週目では、不透過性が著しく亢進し、形態的に増加しただけでなく石灰化も進行していた。しかしながら、新生児骨群では、移植後 4 週目の骨の一部に X 線透過性を示す部位が認められた（写真 1）。

病理組織学的評価：胎児骨群移植後 2 週目の組織像では、骨組織内に多数の骨細胞を有する幼弱な骨梁が認められた。骨梁内には赤血球、骨芽細胞を認めるが、リンパ球などの炎症性細胞浸潤は認めなかった（写真 2-a）。

胎児骨群移植後 4 週目の組織像では、移植後 2 週目

図1 移植骨の長径変化

(●: 胎児骨群 n=50, ■: 新生児骨群 n=50, ▲: 正常な発育過程のラット脛骨 n=20)

※ $p < 0.05$ 新生児骨群移植後4週に対して

写真1 移植骨の軟X線写真

(上段: 胎児骨群; 左・移植後1週目, 右・移植後4週目, 下段: 新生児骨群; 左・移植後1週目, 右・移植後4週目)

新生児骨群移植後4週目の移植骨の一部にX線透過部が認められた(矢印).

写真2 胎児骨群移植骨のHE染色組織像(×200)

(a: 移植後2週目, b: 移植後4週目)

と比較して, 成熟した骨梁の形成が認められた(写真2-b).

新生児骨群移植後1週目の組織像では, すでに骨梁周囲に炎症性細胞浸潤が認められ, 一部骨の変性が認められた(写真3-a).

新生児骨群移植後4週目の組織像では, 骨梁の萎縮傾向が認められ, 骨細胞の消失を認めた(写真3-b).

免疫組織化学的評価: 胎児骨群移植後3週目の移植骨の類骨組織, 軟骨などが褐色に染色されており, TGF- β の局在が認められた(写真4).

2. 胎児骨移植におけるMHCの影響—同種異系移植—

長径変化: minor mismatch 間移植のF群, major mismatch 間移植のB群とも, 対照の同種同系移植で

写真3 新生児骨群移植骨の HE 染色組織像 (×200)
(a: 移植後1週目, b: 移植後4週目)

写真4 胎児骨群移植後3週目の組織像 (×200)
(上段: HE 染色, 下段: SAB 染色)

図2 移植骨の長径変化-MHCの影響-
(●: B 群 n=20, ■: F 群 n=20, ▲: 対照・L 群 n=20)

※ N. S. 対照・L 群に対して

ある L 群と同様に長径は経時的に増加していた。移植骨の長径は、1, 2, 3, 4 週とも F 群, B 群の間に有意差は認めず、さらに両群は L 群とも有意差は認めなかった (図2)。

考 察

移植学における研究は過去 20 年間、HLA と免疫抑制方法開発に集中してきた。しかし、免疫抑制剤利用に代表される宿主に対する免疫抑制には感染など種々

の問題が認められる。一方、移植に利用可能な臓器の不足という問題も近年指摘されるようになってきた。骨移植においては、整形外科を中心に骨バンクが開設されているものの移植骨の不足に悩まされているのが現状である。また骨移植に免疫抑制剤を使用することは危険性を考えると避けるべきである。これら2つの問題を解決するために、抗原性の低い新しい移植可能な材料、新しい移植方法を開発することは重要である。そこで著者は、胎児組織が抗原性が低いと報告されている^{6, 7)}ことに着目、胎児骨組織の抗原性が低いと仮定し、胎児骨組織を用いた移植法の検討を行った。

移植抗原性の個体発生についてはすでに検討されており、移植材料として用いる胎児組織の抗原性を Billingham ら⁸⁾は7.5日目に、Chutna ら⁹⁾は8.5日目に検出している。したがって、胎生初期の胎児組織は移植抗原性を示さない。また、胎児組織は再生力、成長能力が旺盛で、移植片の生着、増殖には有利であると考えられる。

胎児組織を移植に利用するにあたり、倫理的、法的问题を解決することは避けることができない。本邦ではまだ検討されていないが、米国においては1988年にすでに検討されている。米国立衛生研究所(NIH)は胎児組織の移植問題を倫理的、法的、科学的側面から検討し、胎児組織移植は認められるべきと結論し、胎児組織バンクもすでにいくつかの施設に設置されている¹⁰⁾。今後本邦でも、胎児組織を得るための意図的な人工流産の禁止、胎児組織の売買の禁止など倫理的な問題の解決が必要である。さらに人への臨床応用に当たっては、倫理委員会の設置、倫理委員会への提出が不可欠であると考ええる。

胎児組織を用いた移植研究はすでにいくつか認められる。妊娠後期の胎児小腸、すい臓を用いた研究^{6, 11)}では、移植片の拒絶が報告されている。一方、妊娠初期の胎児腎臓、副腎を用いた研究¹²⁾では生着する結果を得ており、必ずしも胎児組織移植は良好な一定の結果を得ているわけではない。その原因として、Foglia ら⁷⁾は胎児組織移植において、移植片の生着、成長には移植組織の臓器種および妊娠時期に依存すると述べている。骨組織に関しては、移植材料として胎児骨を用いた研究をまだ認めていない。しかし Hayashi¹³⁾は胎児造血に関する研究で、骨髓造血の観点から胎児骨を用いた。その結果、ラット胎生17±1日では大腿骨に骨髓造血はまだ発現しておらず、19日目で骨髓形成が始まり、未分化骨髓細胞が現れるのは出産前、赤芽球は出産後に現れると述べている。また Bhaskar ら¹⁴⁾はラットでは胎生17日目で骨化が開始され、胎生17日目から出生まで脛骨が急速に成長すると述べている。そこで著者は、骨髓造血が未発達で免疫原性が弱いと考えられ、さらに骨化が開始される胎生17日目ラットが骨の成長、移植に有利であると仮定し、

今回ドナーとして用いた。

結果として、胎児脛骨移植は皮下一次移植において、移植骨の経時的成長が肉眼的、組織学的、X線学的に認められた。正常な発育過程のラットの脛骨の最大長径は、生後2週で $17.2 \pm 0.5 \text{ mm}$ 、4週で $28.3 \pm 0.8 \text{ mm}$ であり、胎児骨群、新生児骨群とも正常な発育過程のラットの脛骨に比較して成長は緩やかであった。骨組織形成は血液供給が正常化してはじめて認められ、周囲組織から移植骨への血管新生、血管吻合形成し骨内血液循環が回復しないと、骨形成、成長はおこらない。骨の成長速度を考える場合、血管新生に要する時間的ずれを考慮する必要がある。今回の検討では胎児骨群の移植骨は2週までの成長の割合が、正常なラットの脛骨より小さかった。しかし血管新生に要した時間的ずれを考慮し、4～5日のずれを考えれば、胎児骨群の成長速度は正常なラットと2週まではほぼ等しいものとなった。一方、新生児骨群では2週までは正常なラット脛骨より早い成長を示した。これは正常な脛骨は周囲組織に影響され成長するのに対し、新生児骨群は周囲からの成長抑制的影響を受けることなく成長したからと考えられたが、詳細は不明である。移植後2週以降では、胎児骨群は新生児骨群にみられたような免疫拒絶反応に由来する組織変性は認められなかった。特に、組織像で活発な骨新生が、移植後4週目でも起こっていることが示唆された。

TGF- β は骨形成に重要な役割をもつサイトカインで、骨基質や筋膜などに存在し¹⁵⁾、骨では骨芽細胞が産生する¹⁶⁾。TGF- β は破骨細胞の形成、成熟破骨細胞の骨吸収活性を抑制し^{17, 18)}、骨芽細胞の活性を高め骨形成を促進すること^{19, 20)}はすでに示されている。胎児骨移植後3週目の免疫組織化学染色像で移植骨にこのTGF- β の局在が示されたことは、移植後3週目では拒絶反応による骨の変性を認めず、移植骨としての機能を維持しているといえる。さらに移植後3週以降になると胎児骨群は移植骨の成長速度が正常なラット脛骨とほぼ同程度となった。これらの結果は、胎児骨の抗原性はかなり低いことを示している。

胎児骨移植における主要組織適合抗原(MHC)の影響の検討で、ドナーとレシピエントの間のMHCがminor mismatch, major mismatchに関係なく同程度の移植骨の成長を認めた。特に、拒絶反応が起こらない同種同系移植における移植骨の成長と有意な差を認めなかったことは、胎児骨の抗原性がかなり低いことを示すものである。胎児骨の抗原性が低い理由として、胎生17日目のラットでは骨髓の造血能力が未発達で弱いためと推察されたが、この点についてはさらに検討が必要であろう。胎児骨の抗原性に関しては、定量的に検討を加え次報で論じたい。

今回は一次移植の初期である移植後4週までの検討を行った。移植後4週までの検討にとどめた理由とし

て、移植部位が背部皮下組織内であるため、移植後長期になると異物反応による吸収が起こること、背部皮下組織では移植骨に応力がかからないが、長期にわたる骨の成長には骨に対して応力がかかる必要があることである。しかし二次移植に適した時期を検討するためには今後さらに長期経過を追う必要があろう。

以上、今後詳細な検討が必要ではあるが、胎児骨は免疫原性が低く、一次移植初期において同種骨移植材料として有用である可能性が示唆された。

結 論

新しい骨移植材料としての胎児骨組織の可能性について、移植骨の変化、移植における主要組織適合抗原(MHC)の影響を検討し、以下の結果を得た。

1. 妊娠17日目の胎児骨は、対照として用いた新生児骨が移植後2週目以降長径の減少を認めたのに対し、移植後4週目まで長径の増加を認め、移植後3週から4週にかけては、正常な発育過程のラット脛骨とほぼ同程度の長径の増加率を示した。

2. 妊娠17日目の胎児骨は移植後4週目でも、X線学的、組織学的に、新生児骨にみられた拒絶反応による骨の変性は認めず、成熟した骨組織となっていた。

3. 妊娠17日目の胎児骨の移植後3週目の移植片には、TGF- β が多量に局在し、活発な骨形成が示唆された。

4. 妊娠17日目の胎児骨移植においては、ドナーとレシピエント間の主要組織適合抗原(MHC)がmajor mismatch, minor mismatchに関係なく、移植骨の成長を認めた。さらに同種異系移植と拒絶反応が起こらない同種同系移植の移植骨の成長に有意な差は認めなかった。

以上より、妊娠17日目の胎児骨は抗原性が低く、成長能力が大きいことより、骨移植材料として有用であることが示唆された。

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご校閲を賜りました恩師西嶋克巳教授に心より感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたりご協力、ご援助頂いた教室員各位に心から謝意を表します。

本論文の要旨は、1991 International Symposium on Oral and Maxillofacial Surgery (1991年9月10-12日, Shenyang, P.R. China), 第11回骨・関節・軟部組織移植研究会(1992年11月12-13日, 奈良), 第29回日本移植学会総会(1993年9月16-18日, 金沢), 第38回日本口腔外科学会総会(1993年10月21-22日, 新潟), 第41回国際歯科学研究学会日本部会(1993年12月2-3日, 岡山)において発表した。

引用文献

- 1) Lindvall, O., Brundin, P., et al.: Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in parkinson's disease. *Science* 247: 574-577 1990.
- 2) Brown, J., Molnar, I.G., et al.: Control of experimental diabetes mellitus in rats by transplantation of fetal pancreases. *Science* 184: 1377-1379 1974.
- 3) Simeonovic, C.J. and Lafferty, K.J.: The isolation and transplantation of foetal mouse proislets. *Aust J Exp Biol Med Sci* 60: 383-390 1982.
- 4) Edelman, G., Duke, D., et al.: Fetal islet allotransplantation in rabbits. *Transplantation* 46: 660-664 1988.
- 5) Sato, Y., Mukai, K., et al.: The AMeX method. a simplified technique of tissue processing and paraffin embedding with improved preservation of antigens for immunostaining. *Am J Pathol* 125: 431-435 1986.
- 6) Brown, J., Clark, W.R., et al.: Pancreas transplantation for diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 89: 951-965 1978.
- 7) Foglia, R.P., DiPreta, J., et al.: Fetal allograft survival in immunocompetent recipients is age dependent and organ specific. *Ann Surg* 204: 402-410 1986.
- 8) Billingham, R.E., Brent, L., et al.: The antigenic stimulus in transplantation immunity. *Nature* 178: 514-519 1956.
- 9) Chutna, J. and Haskova, V.: Antigenicity of embryonic tissues in homo transplantation. *Folia Biol* 5: 85-88 1959.
- 10) Culliton, B.J.: Needed: fetal tissue research. *Nature* 355: 295 1992.
- 11) Deutsch, A.A., Arensman, R., et al.: The effect of antilymphocyte serum on fetal rat intestine transplanted as free subcutaneous homografts. *J Pediatr Surg* 9: 29-34 1974.
- 12) Foglia, R.P., LaQuaglia, M., et al.: Can fetal and newborn allografts survive in an immunocompetent host? *J Pediatr Surg* 21: 608-612 1986.
- 13) Hayashi, C.H.F.: Transitions of fetal hemopoietic tissue. *Acta Haem Jap* 41: 1196-1203 1978.
- 14) Bhaskar, S.N., Weinmann, J.P., et al.: The growth rate of the tibia of the *ia* rat from 17 days insemination age to 30 days after birth. *Anat Rec* 119: 231-245 1954.
- 15) Heine, U.I., Munoz, E.F., et al.: Role of

- transforming growth factor- β in the development of the mouse embryo. J Cell Biol 105: 2861-2876 1987.
- 16) Robey, P.G., Young, M.F., et al.: Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type β (TGF- β) *in vitro*. J Cell Biol 105: 457-463 1987.
- 17) 野田政樹: Transforming growth factor β と骨代謝. Bone 2: 49-63 1988.
- 18) Boneward, L.F. and Mundy, G.R.: Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. Clin Orthop 250: 261-276 1990.
- 19) Noda, M. and Camillier J. J.: *In vivo* stimulation of bone formation by transforming growth factor- β . Endocrinology 124: 2991-2994 1989.
- 20) Joyce, M.E., Roberts, A.B., et al.: Transforming growth factor- β and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. J Cell Biol 110: 2195-2207 1990.
-