骨髄細胞・多孔性 β -TCPブロック複合体による 骨形成に関する組織学的検討

小野由起子・泉 直也・芳澤享子・齊藤 力

Histological study of bone formation associated with the implantation of bone marrow cells/porous beta-TCP block composites

ONO Yukiko · IZUMI Naoya · YOSHIKAWA Michiko · SAITO Chikara

Abstract: Recently, some types of cell/biomaterial composites have been fabricated to regenerate bone experimentally and clinically. The objectives of this study were to compare the osteogenic potential of bone marrow cells differentiated into osteoblast-like cell/beta-TCP composites with that of undifferentiated bone marrow cell/beta-TCP composites implanted at ectopic sites, to investigate how such bone marrow cells and osteoclasts histologically participate in the absorption of beta-TCP and bone formation, and to assess the potential use of these composites as an alternative material for the repair of jaw bone defects.

Fischer rat bone marrow cells were cultured and divided into two different medium groups. One medium contained standard medium plus beta-glycerophosphate, dexamethasone and ascorbic acid to induce osteoblast-like cells. The other medium did not contain the additives. Porous beta-TCP blocks (OSferion®) were seeded with the cells in each group; the former was designated as the differentiated group and the latter as the undifferentiated group. As a negative control, beta-TCP blocks without cell seeding were used. The blocks were implanted subcutaneously and harvested 6 weeks and 12 weeks after implantation for histological analysis.

In the differentiated group, bone extensively covered the surfaces of the pores of the beta-TCP block, and osteoblasts lined the new bone. Osteoclasts were observed on the surfaces of the pores. Twelve weeks after implantation, the new bone was thicker than that observed at 6 weeks, and the cement lines were also observed. In addition, a large amount of capillary ingrowth was seen in the pores. In the undifferentiated group, clusters of round cells regarded to be marrow cells were recognized on the surfaces of the pores, and a small amount of newly formed bone was seen at the same site. In the control group, few cells were observed on the pore surfaces, and there was no evidence of new bone formation. The number of osteoclasts in the differentiated group was larger than those in the other two groups.

These results showed that differentiated bone marrow cell/beta-TCP composites had a high osteogenic potential in an ectopic environment. In contrast, undifferentiated bone marrow cell/beta-TCP composites demonstrated little such potential. Differentiated bone marrow cells were thus suggested to play an important role in the bone formation and induction of osteoclasts on the composites.

Key words: beta-TCP (β -TCP), tissue engineering (組織工学), osteoblast (骨芽細胞), osteoclast (破骨細胞), bone formation (骨形成)

新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔生命科学専攻顎顔面再
建学講座組織再建口腔外科学分野
(主任：齊藤 力教授)

Division of Reconstructive Surgery for Oral and Maxillofacial
Region, Department of Tissue Regeneration and
Reconstruction, Course for Oral Life Science, Niigata
University Graduate School of Medical and Dental Sciences
(Chief: Prof. SAITO Chikara)

受付日：2006年7月21日

採択日：2007年5月29日

緒 言

顎顔面口腔外科領域では腫瘍、嚢胞、炎症性疾患など顎骨を大きく吸収・破壊する疾患がある。これらの病変を外科的に切除、摘出すると広範囲にわたる骨欠損が生じる場合では、顎骨再建が必要となる。

自家骨移植は拒絶反応がないという利点があるものの、採取部位と採取量が制限され、しかも正常組織への侵襲に

図1 実験方法

より患者の負担が増えるという欠点がある。そのため、自家骨の代替材料として組織工学的手法により作製した細胞と基材より成る複合体を用いることができれば、採取部位と採取量の低減をはかり、手術侵襲の軽減に寄与できると思われる。

支持組織機能の観点から、細胞－基材複合体は顎骨形態を保つだけの力学的強度を有し、かつその形態を維持しつつ徐々に生体骨組織に置換されていくことが理想的で、さらに骨形成後長期間にわたりその形態と骨質が維持できることが要件であると考える。

われわれはこのような要件を満たす細胞－基材複合体の開発を目標に、基礎的研究として、生体内で経時的に吸収され、骨伝導能にも優れた β -TCP (β -リン酸三カルシウム)のブロック体とラット大腿骨骨髓細胞から分化誘導させた骨芽細胞様細胞との組み合わせによる細胞－基材複合体を作製した(以下複合体と略す)。そしてラット皮下埋入モデルを用いて、骨形成の程度や過程について、 β -TCP

ブロック単体を埋入したものと組織学的に比較した。本研究では、骨芽細胞様細胞および破骨細胞が β -TCPの吸収および骨への置換にどのように関与しているかを組織学的に検索し、本実験で作製した複合体が顎骨の再建材料となる可能性があるかどうかについて検討した。

材料と方法

本実験は新潟大学大学院医歯学総合研究科動物実験委員会の承認を得て、同ガイドラインに従って以下のようにおこなった(図1)。

1. 細胞採取と培養

Fischer系5週齢雄性ラットの大腿骨から骨髓細胞を採取して、10%牛胎仔血清および抗菌薬(ペニシリン1000U/ml, ストレプトマイシン0.1mg/ml, アンホテリシンB 0.25 μ g/ml)を加えた α MEM (Minimum Essential

Medium) 培地で約 10 日間初代培養をおこなった。培養はすべて 37℃, 5% CO₂ 下でおこなった。その後, トリプシン-EDTA 処理して細胞懸濁液を作製し, 2 群に分け, 一方は上記基本培地に添加剤として 10⁻⁸M デキサメタゾン, 10mM β グリセロリン酸, 50 μg/ml アスコルビン酸を加えて骨芽細胞様細胞への分化を誘導しながら, もう一方はこれらの添加剤を加えずに, すなわち骨芽細胞様細胞への分化を誘導せずに, それぞれ培地交換を週に 3 回おこないながら培養した。

2. 培養細胞の骨芽細胞様細胞への分化の評価

培養骨髄細胞が骨芽細胞様細胞に分化しているかどうかを評価するために, それぞれの培地で 10 日間培養した細胞を 1 × 10⁴ 個の細胞懸濁液に調整し, 6 ウェルプレートに播種して同様に 3 週間培養し, 骨芽細胞のマーカー酵素であるアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色と, 石灰化に関してはアリザリンレッド染色, フォンコッサ染色をおこなった。

3. 骨髄細胞・β-TCP ブロック複合体 (以下複合体と略す) の作製

それぞれの培地で 10 日間培養した細胞を細胞濃度約 10⁶ 個/ml に調整し, 気孔率約 75%, 気孔径 100 ~ 400 μm, 5 × 5 × 5 mm の多孔性 β-TCP ブロック (商品名オスフェリオン, オリパス社製) に播種して上記の培地でそれぞれ 3 週間培養し, 複合体を作製した。

4. 複合体のラット皮下への埋入

両群の複合体を同系 7 週齢雄性ラットの背部皮下に埋入した。添加剤を加えて培養した複合体を埋入したものを分化誘導群とし, 添加剤を加えずに培養した複合体を埋入したものを非誘導群とした。対照群として, 培養液に浸漬した β-TCP ブロックのみを皮下埋入した。1 匹のラットの背部皮下にそれぞれの複合体およびブロック単体を埋入し, 計 10 匹とした。

5. 観察時期と方法

皮下埋入後 6 週目, 12 週目にそれぞれ 5 匹ずつラットを屠殺して複合体あるいはブロックを摘出し, 摘出物は 10% リン酸緩衝ホルマリンで固定した後, 10% EDTA で約 1 週間脱灰し, 複合体あるいはブロックのほぼ中央の断面でパラフィン切片と凍結切片を作製した。パラフィン切片をヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色および破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色を施した。凍結切片では, 骨芽細胞のマーカー酵素であるアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色を施

して光学顕微鏡で組織学的に観察した。観察部位は, 複合体あるいはブロックの全域を含む 5 × 5 mm の範囲とし, 複合体あるいはブロックの全域を観察した。

また, TRAP 染色で赤紫色に強く染まった細胞を TRAP 陽性細胞と判定し, それぞれの摘出物のほぼ中央の断面の切片における, 複合体あるいはブロック全域を含む 5 × 5 mm の範囲の TRAP 陽性細胞数を数え, 1 標本あたりの平均値を算出し, 皮下埋入後 6 週目, 12 週目ともに分化誘導群・非誘導群・対照群について統計学的に比較した。統計学的方法として, 3 群間の差の検定を Kruskal Wallis の順位検定でおこない (p < 0.001), そこで有意差が認められた場合は, さらに各群間の差の検定を Post-hoc test の Steel-Dwass 法を用いておこなった (p < 0.05)。

結 果

培養細胞の染色像

添加剤 (デキサメタゾン, β グリセロリン酸, アスコルビン酸) を加えた培地で 3 週間培養した骨髄細胞は ALP 染色で濃く染色され, 石灰化を示すアリザリンレッド, フォンコッサ染色陽性の部分が認められた。添加剤を加えない培地で 3 週間培養した骨髄細胞は ALP 染色では反応は弱く, 他の染色では陽性反応はみられなかった (写真 1)。

皮下埋入後 6 週目の H.E. 染色像

分化誘導群では β-TCP のブロック孔表面に骨組織が比較的均質に広範囲に形成されており, ブロック孔部には多数の毛細血管が入り込んでいた (写真 2a, b)。非誘導群, 対照群では, ブロック孔には毛細血管, 線維性結合組織が入り込んでいたが, 骨形成は認められなかった (写真 2c, d, e, f)。非誘導群では β-TCP の表面には類円形の細胞が数層に配列していたが (写真 2d), 対照群では, β-TCP の表面には非誘導群のような細胞の配列は認められなかった (写真 2f)。

皮下埋入後 6 週目の TRAP 染色像

分化誘導群では TRAP 陽性細胞が多数認められたが, 新生した骨の表面ではなく線維性結合組織のなかに β-TCP に接して存在していた (写真 3a, b)。非誘導群では埋入した複体の辺縁部にわずかに TRAP 陽性細胞が認められた (写真 3c, d)。対照群では TRAP 陽性細胞はほとんど認められなかった (写真 3e, f)。

皮下埋入後 6 週目の ALP 染色像

分化誘導群では新生骨の表面に単層に配列した赤紫色に染まった ALP 陽性細胞が認められた (写真 4a, b)。非誘導

写真1 培養細胞の染色像

a : 添加剤 (デキサメタゾン, β グリセロリン酸, アスコルビン酸) を加えて 3 週間培養した骨髓細胞.

b : 添加剤を加えないで 3 週間培養した骨髓細胞.

アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色, アリザリンレッド染色, フォンコッサ染色.

添加剤を加えた細胞の方が ALP 染色で強く染色され, アリザリンレッド, フォンコッサ染色で染色される部分が認められる.

群, 対照群では ALP 陽性細胞は認められなかった (写真 4c, d, e, f).

皮下埋入後 12 週目の H.E.染色像

分化誘導群では β -TCP の幅が対照群と比較して狭くなり, 幅の広い骨組織が形成され, セメントラインを伴う層状を呈する部分も認められた (写真 5a, b). 複合体の中心部と辺縁部では骨形成の程度に大きな違いは認められなかった. 非誘導群ではブロック孔部分に類円形の細胞の増殖している部分がところどころ認められた. また, 埋入した複合体の辺縁で β -TCP の表面にわずかに新生骨が認められる部分もあったが, 骨の形成はほとんど認められなかった (写真 5c, d). 対照群では骨の形成は全く認められず, ブロック孔表面の細胞成分はわずかであった (写真 5e, f).

皮下埋入後 12 週目の TRAP 染色像

分化誘導群では TRAP 陽性細胞は複合体の辺縁部を中心に認められた. いずれも TRAP 陽性細胞は骨の表面にはみられず, β -TCP の表面に存在していた (写真 6a, b). 非誘

導群では埋入した複合体の辺縁部の β -TCP の表面にわずかに TRAP 陽性細胞が認められた (写真 6c, d). 対照群では TRAP 陽性細胞はほとんど認められなかった (写真 6e, f).

皮下埋入後 12 週目の ALP 染色像

分化誘導群でも新生骨の表面には ALP 陽性細胞はほとんどみられなかった (写真 7a, b). 写真には示さないものの, 非誘導群, 対照群において ALP 陽性細胞は認められなかった.

TRAP 陽性細胞数の比較

Kruskal Wallis の順位検定において, 皮下埋入後 6 週目, 12 週目ともに, 分化誘導群, 非誘導群, 対照群の 3 群間で差がみられた ($p < 0.001$). さらに Post-hoc test の Steel-Dwass 法で各群間の差を検定したところ, 埋入後 6 週目, 12 週目ともに, 分化誘導群と対照群, 分化誘導群と非誘導群, 非誘導群と対照群の各群間において有意差が認められた ($p < 0.05$) (表 1).

写真2 皮下埋入後6週目のH.E.染色像

a, b : 分化誘導群 c, d : 非誘導群 e, f : 対照群

分化誘導群では β -TCPの表面に骨組織が広範囲に形成されており、ブロック孔部には多数の毛細血管が入り込んでいる(a, b)。非誘導群、対照群ではブロック孔に毛細血管、線維性結合組織が入り込んでいるが、骨形成は認められない(c, d, e, f)。非誘導群では β -TCPの表面に類円形の細胞(矢頭)が数層に配列しているが(d)、対照群では β -TCPの表面には非誘導群のような細胞の配列はみられない(f)。

B : 骨, T : β -TCP, C : 結合組織

a, c, e : bar = 125 μ m b, d, f : bar = 50 μ m

写真3 皮下埋入後6週目のTRAP染色像

a, b : 分化誘導群 c, d : 非誘導群 e, f : 対照群

分化誘導群ではTRAP陽性細胞(矢頭)が認められ、新生した骨の表面ではなく β -TCPに接している(a, b)。非誘導群では少数のTRAP陽性細胞(矢頭)が認められる(c, d)。対照群ではTRAP陽性細胞はほとんどみられない(e, f)。

B : 骨, T : β -TCP, C : 結合組織a, c, e : bar = 125 μ m b, d, f : bar = 50 μ m

写真4 皮下埋入後6週目のALP染色像

a, b : 分化誘導群 c, d : 非誘導群 e, f : 対照群

分化誘導群では新生骨の表面に、単層に配列した赤紫色に染まったALP陽性細胞(矢頭)が認められる(a, b). 非誘導群, 対照群ではALP陽性細胞はみられない(c, d, e, f).

B : 骨, T : β -TCP, C : 結合組織

a, c, e : bar = 125 μ m b, d, f : bar = 50 μ m

写真5 皮下埋入後12週目のH.E.染色像

a, b : 分化誘導群 c, d : 非誘導群 e, f : 対照群

分化誘導群では β -TCPの幅が対照群と比較して狭くなり、幅の広い骨組織が形成され、セメントラインを伴い層状を呈する部分も認められる (a, b)。非誘導群ではブロック孔部分に類円形の細胞の増殖している部分がところどころ認められる (c, d)。非誘導群では複合体の辺縁でブロック孔の表面にわずかに新生骨が認められる部分もあるが (d 四角枠内)、ほとんど骨の形成は認められない。対照群では骨の形成は全く認められず、ブロック孔表面の細胞成分はわずかである (e, f)。

B : 骨, T : β -TCP, C : 結合組織

a, c, e : bar = 125 μ m b, d, f : bar = 50 μ m

写真6 皮下埋入後12週目のTRAP染色像

a, b: 分化誘導群 c, d: 非誘導群 e, f: 対照群

分化誘導群ではTRAP陽性細胞(矢頭)が複合体の辺縁部を中心に認められる。TRAP陽性細胞は新生した骨の表面ではなく、 β -TCPの表面にみられる(a, b)。非誘導群ではわずかにTRAP陽性細胞(矢頭)が認められる(c, d)。対照群ではTRAP陽性細胞はほとんどみられない(e, f)。

B: 骨, T: β -TCP, C: 結合組織

a, c, e: bar = 125 μ m b, d, f: bar = 50 μ m

写真7 皮下埋入後12週目の分化誘導群のALP染色像
 新生骨の表面にはALP陽性細胞はほとんどみられない(a, b).
 B: 骨, T: β -TCP, C: 結合組織
 a: bar = 125 μ m b: bar = 50 μ m

表1 TRAP陽性細胞数の比較

	6 w			12 w		
	Mean	SD		Mean	SD	
分化誘導群	198.0	11.58	p < 0.001	111.2	8.93	p < 0.001
非誘導群	24.8	2.39		23.0	1.87	
対照群	5.2	4.66		6.6	6.84	

§ p values were obtained from Kruskal Wallis Rank Test

* : p < 0.05 Steel-Dwass test

Kruskal Wallisの順位検定において、皮下埋入後6週目、12週目ともに分化誘導群、非誘導群、対照群の3群間で $p < 0.001$ で有意差が認められたため、さらにPost-hoc testのSteel-Dwass法で各群間の差を検定したところ、皮下埋入後6週目、12週目ともに、分化誘導群—対照群、分化誘導群—非誘導群、非誘導群—対照群の各群間において $p < 0.05$ で有意差が認められた。

考 察

歯科口腔外科領域では、骨髓由来間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化誘導させ、トロンビンと塩化カルシウムを加えてゲル化した多血小板血漿(Platelet Rich Plasma: PRP)と混合して作製した注入型の細胞—基材複合体が開発され^{1~4)}、すでに臨床応用されており良好な骨形成が得られている^{5, 6)}。この注入型複合体は流動性に優れた複雑な形態の部位にも応用が可能であるため、インプラント治療や歯周炎の治療などに用いられるが、形態保持が難しいため閉鎖腔を有する3cm以下の比較的小さな空洞状骨欠損に対して適しているとされている⁶⁾。またそのほかに、脱灰された骨基質から成るOsteovit[®]と顎骨由来の骨芽細胞で作製した細胞—基

材複合体を顎骨嚢胞の摘出腔内に埋入し、良好な骨形成が得られた臨床報告例もある⁷⁾が、この複合体の適応もやはり閉鎖腔を有する空洞状骨欠損と思われる。

一方、腫瘍性、炎症性、嚢胞性疾患の切除、摘出後に生じる広範な顎骨欠損部の再建には、咬合機能の回復を前提とした再建が望まれるため、顎骨形態を保つだけの力学的強度を有し、かつその形態を保ちながら徐々に骨に置換されていく性状を有した細胞—基材複合体が適していると考えられる。

そのため足場は立体であることが必要と思われ、これまでも立体の足場を用いた細胞—基材複合体に関しては、 β -TCP多孔ブロックと骨髓由来間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化誘導させて作製した複合体をラットの皮下^{8~10)}

図2 分化誘導群の組織像のまとめ

骨芽細胞は新生骨の表面に帯状に認められたのに対し、破骨細胞は β -TCPの表面にのみ多数存在し、新生骨の表面には認められなかった。

やウサギの上顎骨¹¹⁾に埋入した報告、poly-DL-lactic-coglycolic acidと骨髓由来間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化誘導させて作製した複合体をミニプタの下顎骨欠損部へ埋入した報告¹²⁾などがあり、それによる骨形成能が示されている。また、整形外科領域ではハイドロキシアパタイト (HA) の多孔体を足場にして作製した複合体を生体内に埋入すると骨形成が活発に認められることが実験的および臨床的に報告されている^{13~19)}。HAと β -TCPはともに優れた生体親和性、骨伝導能を有するセラミック材料で、どちらもさまざまな形態のものが開発されているが、HAは生体内ではほとんど吸収されずに残る¹⁰⁾のに対し、 β -TCPは生体内で経時的に吸収される²⁰⁾。そのため顎骨再建用の細胞-基材複合体の足場としては β -TCPが適していると思われる、われわれは β -TCP多孔性ブロックを選択した。

過去の細胞-基材複合体に関する報告では、主として骨形成能に関する検討がおこなわれていた。本研究では広範囲の顎骨再建に用いることができる細胞-基材複合体の開発を目標に、基礎的研究として、ラット大腿骨より採取して骨芽細胞様細胞に分化誘導させた骨髓細胞と多孔性 β -TCPブロック複合体の皮下埋入モデルを用いて、この複合体における骨芽細胞や破骨細胞の出現の頻度や分布が β -TCPの吸収および骨への置換にどのように関与しているかを組織学的に検索し、本研究で作製した複合体が顎骨再建の材料になる可能性があるかどうかについて検討した。

分化誘導群では β -TCPのブロック孔部表面に骨が多量に形成され、皮下埋入後6週目の新生骨の表面にはALP陽性細胞が認められた。それに対し対照群では骨の新生は全く認められなかった。これは、これまでの報告^{8, 9)}と同様の結果であった。非誘導群では、皮下埋入後12週目に複合体の辺縁のブロック孔部の一部にわずかではあるが新生骨が認められた。Yoshikawaら¹³⁾はHA・骨髓細胞複合体をラットの皮下に埋入して骨形成を観察しているが、培地にデキサメタゾンを添加した群では骨が形成されたが、デキサメタゾンを添加しない群では骨は全く形成されなかったと報告している。しかし、デキサメタゾンを添加せずに培養した骨髓細胞が骨形成能を示したという報告^{21~23)}もあるため、今回非誘導群でわずかに骨が形成されたのは、培地にデキサメタゾンを加えなくとも、少数の骨髓細胞は培養期間中に骨形成能のある骨芽細胞様細胞に分化している可能性が考えられた。

今回の実験は複合体および β -TCPブロック単体を皮下に埋入するという異所性移植モデルである。対照群ではALP染色陽性細胞および骨形成は認められず、TRAP陽性細胞もほとんど認められなかった。 β -TCP単体を骨内に埋入した報告^{24~26)}においては骨芽細胞、破骨細胞および骨形成が認められたのに対し、本実験の対照群でそれらがみられなかったのは、皮下組織内は骨内と異なり、周囲の骨髓組織から骨芽細胞、破骨細胞が常に供給されるような環境ではないためと考えられた。

一方、分化誘導群ではALP陽性を示す骨芽細胞とともにTRAP陽性を示す多数の破骨細胞も観察されており、破骨細胞の数は6週目、12週目ともに対照群、非誘導群と比較して有意に多かった。非誘導群では骨の形成はほとんどみられないにもかかわらず、分化誘導群と比較すると少ないもののTRAP陽性細胞の出現がみられた。これらのことから、TRAP陽性の破骨細胞が出現するのは、骨組織そのものよりも骨髓細胞を分化誘導させた骨芽細胞様細胞による影響が大きいものと思われる。すなわち、非誘導群の培養骨髓細胞の大多数は未分化のままなのでTRAP陽性細胞の出現に影響は及ぼさないが、少数の骨髓細胞は培養期間中に骨芽細胞様細胞に分化し、その細胞がTRAP陽性細胞を誘導しているのではないかと考えられた。

また、分化誘導群では骨芽細胞は新生骨の表面に帯状に認められたのに対し、破骨細胞は β -TCPの表面にのみ存在し、新生骨の表面には全く認められなかった(図2)。 β -TCP単体を骨内に埋入した報告^{24~26)}でも、TRAP陽性細胞は β -TCP上に認められ、新生骨の表面には存在していない。これらのことから破骨細胞は骨よりも異物である β -TCPをよりターゲットにしやすいのかもしれないと推測された。

さらに、本実験で認められた破骨細胞と骨形成との関わりについては、Chazono ら²⁴⁾によれば、 β -TCP ブロックをウサギの大腿骨頭に埋入すると TRAP 陽性細胞数が埋入後 2 週目でピークを迎えるのに対し、骨形成は埋入後 4 から 6 週目でピークを迎えていたことから、 β -TCP は骨内ではまず破骨細胞により吸収され、それに続いて新生骨が形成されるというように、 β -TCP においてカップリング様現象がおこっていることを示しているのではないかと仮説をたてている。本実験でも、分化誘導群の TRAP 陽性細胞数は埋入後 6 週目より 12 週目の方が減少しており、新生骨の性状も、埋入後 6 週目ではセメントラインがわずかにしか認められないのに対し、埋入後 12 週目では新生骨の厚みが層状に増し、さらにはっきりしたセメントラインが認められた。また、埋入後 12 週目の分化誘導群では β -TCP の幅が狭くなり吸収が進んだことが示唆され、6 週目では新生骨と β -TCP の周囲には毛細血管の豊富な比較的死な結合組織が認められたのに対し、12 週目には線維性結合組織の幅が減少して密になり、破骨細胞の数は減少し、骨芽細胞は認められなかった。これらのことから、12 週目では骨新生の活性が 6 週目より低下し、より成熟した骨への変化が進んでいると考えられた。

以上のことにより、骨芽細胞様細胞に分化誘導した培養骨髄細胞と多孔性 β -TCP ブロック複合体を皮下埋入した場合の骨形成は、埋入後初期の段階では骨芽細胞様細胞に分化した骨髄細胞による骨形成が主であるが、そこに周囲の毛細血管から破骨細胞前駆細胞が遊走し β -TCP に接着すると、骨芽細胞に刺激をうけて破骨細胞に分化して骨芽細胞とのカップリング現象を生じ、より成熟した骨の形成が進むことが示唆された。

よって、本複合体は将来的に顎骨欠損の再建材料として応用できる可能性が示唆されるが、今後さらに観察時期を細かくかつ長期間に設定し探求するとともに、顎骨欠損動物モデルを用いた同様の検討を進める必要があると考えている。

結 語

骨芽細胞様細胞に分化した骨髄由来細胞と多孔性 β -TCP ブロックの複合体は異所性に活発な骨形成能をもつ一方、未分化な骨髄由来細胞と β -TCP の複合体はほとんど骨形成能をもたないことが明らかとなった。in vitro で骨芽細胞様細胞に分化した骨髄細胞が骨形成および破骨細胞の誘導に重要な役割を果たしていると考えられ、 β -TCP との複合体は将来的に顎骨欠損の再建材料として使用できる性質を兼ね備えている可能性が示唆された。

謝辞

最後に、本研究を始めるにあたりご指導いただきました、名古屋大学大学院医学系研究科頭頸部感覚器外科学講座の上田実先生をはじめとする諸先生方に、心より感謝申し上げます。

なお、本研究の要旨は第 60 回日本口腔科学会総会（平成 18 年 5 月、名古屋市）において発表した。

また、本研究の一部は平成 16 年度文部科学省科学研究費補助金若手研究（B）課題番号 16791232 によりおこなわれた。

引 用 文 献

- 1) 大屋盛道, 山田陽一, 他: 間葉系幹細胞と PRP 複合体を用いた上顎洞底挙上術における骨造成法の実験的研究. 日口外誌 50: 559-566 2004.
- 2) Yamada, Y., Ueda, M., et al.: Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. Clin Oral Implants Res 15: 589-597 2004.
- 3) Ito, K., Yamada, Y., et al.: Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: A comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-oss[®]), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings. J Biomed Mater Res A 73: 63-72 2005.
- 4) Yamada, Y., Boo, J.S., et al.: Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. J Craniomaxillofac Surg 31: 27-33 2003.
- 5) Ueda, M., Yamada, Y., et al.: Clinical case reports of injectable tissue-engineered bone for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. Int J Periodontics Restorative Dent 25: 129-137 2005.
- 6) 山田陽一, 上田 実: 幹細胞・ES 細胞 歯・歯周組織 歯槽骨の再生医療 (13). 再生医療 5: 105-111 2006.
- 7) Pradel, W., Eckelt, U., et al.: Bone regeneration after enucleation of mandibular cysts: Comparing autogenous grafts from tissue-engineered bone and iliac bone. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 101: 285-290 2006.
- 8) 夫 才成, 日比野祥敬, 他: 生体吸収性セラミックス β -TCP を足場に用いた培養人工骨に関する実験的研究. 日口外誌 47: 1-7 2001.
- 9) Fu, S., Hibino, Y., et al.: Experimental study of tissue engineered bone using biodegradable ceramic/ β -TCP as scaffold. DENTISTRY IN JAPAN 38: 67-72 2002.
- 10) Boo, J.S., Yamada, Y., et al.: Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. J Craniofac Surg 13: 231-239; discussion 240-233 2002.
- 11) Ueda, M., Tohnai, I., et al.: Tissue engineering research in oral implant surgery. Artif Organs 25: 164-171 2001.
- 12) Abukawa, H., Shin, M., et al.: Reconstruction of

- mandibular defects with autologous tissue-engineered bone. *J Oral Maxillofac Surg* 62: 601-606 2004.
- 13) Yoshikawa, T., Ohgushi, H., et al.: Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 32: 481-492 1996.
 - 14) Yoshikawa, T., Ohgushi, H., et al.: Analysis of gene expression in osteogenic cultured marrow/hydroxyapatite construct implanted at ectopic sites: A comparison with the osteogenic ability of cancellous bone. *J Biomed Mater Res* 41: 568-573 1998.
 - 15) Yoshikawa, T., Ohgushi, H., et al.: Human marrow cells-derived cultured bone in porous ceramics. *Biomed Mater Eng* 8: 311-320 1998.
 - 16) Yoshikawa, T., Ohgushi, H., et al.: In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics: A novel method for autogenous bone graft substitution. *Transplantation* 69: 128-134 2000.
 - 17) Noshi, T., Yoshikawa, T., et al.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 potentiates the in vivo osteogenic ability of marrow/hydroxyapatite composites. *Artif Organs* 25: 201-208 2001.
 - 18) Yoshikawa, T., Iida, J., et al.: Bone regeneration by grafting of an autogenous cultured bone/ceramic construct. *J Biomed Mater Res A* 67: 1437-1441 2003.
 - 19) Yoshikawa, T., Nakajima, H., et al.: Osteogenesis with cryopreserved marrow mesenchymal cells. *Tissue Eng* 11: 152-160 2005.
 - 20) 小澤正宏：高純度 β -TCP の骨形成能と溶解性に関する実験的研究. *生体材料* 13: 167-175 1995.
 - 21) Ohgushi, H. and Okumura, M.: Osteogenic capacity of rat and human marrow cells in porous ceramics. Experiments in athymic (nude) mice. *Acta Orthop Scand* 61: 431-434 1990.
 - 22) Goshima, J., Goldberg, V.M., et al.: Osteogenic potential of culture-expanded rat marrow cells as assayed in vivo with porous calcium phosphate ceramic. *Biomaterials* 12: 253-258 1991.
 - 23) Goshima, J., Goldberg, V.M., et al.: The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop Relat Res* 262: 298-311 1991.
 - 24) Chazono, M., Tanaka, T., et al.: Bone formation and bioresorption after implantation of injectable beta-tricalcium phosphate granules-hyaluronate complex in rabbit bone defects. *J Biomed Mater Res A* 70: 542-549 2004.
 - 25) Kondo, N., Ogose, A., et al.: Bone formation and resorption of highly purified beta-tricalcium phosphate in the rat femoral condyle. *Biomaterials* 26: 5600-5608 2005.
 - 26) Ogose, A., Kondo, N., et al.: Histological assessment in grafts of highly purified beta-tricalcium phosphate (OSferion®) in human bones. *Biomaterials* 27: 1542-1549 2006.