

論文要旨等報告書

氏名	白敷 信明
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3 8 4 2 号
学位授与の日付	平成 2 1 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	ラット頭蓋骨骨欠損部における骨髄と β -リン酸三カルシウム複合移植による骨形成過程の組織学的検討
論文審査委員	教授 長塚 仁 教授 皆木 省吾 准教授 高木 慎

学位論文内容の要旨

【緒言】

骨髄は豊富な骨形成能を持つ事が知られており、顎顔面再建分野においての有効な骨組織の再生材料として骨髄とともに期待されている。われわれは、過去に骨髄と人工骨 β -リン酸三カルシウム製剤(β -TCP)を骨欠損部に複合移植することで骨形成が促進されることを報告した。この研究では、ラット頭蓋骨骨欠損部に β -TCPと自家骨髄を複合移植し、その骨形成過程を組織学的、酵素組織学的、免疫組織学的に観察を行った。

【材料と方法】

実験動物は7週齢 Sprague-Dawley (SD) 系雌性ラット、56 匹を用いた。この実験は、ヘルシンキ宣言の原則に基づき岡山大学動物実験管理委員会の指針に従い、承認を得て行った。ラット頭蓋骨骨欠損は歯科用ラウンドバーを用いて脳硬膜頂上まで達する円形の骨欠損(ϕ 4 mm)を作製し、骨髄は右側脛骨を明示した後、骨の開窓を行い、骨髄の採取(0.02cc)を行った。

実験群は

- 1) 骨髄+ β -TCP (BTG) 群 (n=16)
- 2) 骨髄単独 (BG) 群 (n=16)
- 3) β -TCP 単独 (TG) 群 (n=16)
- 4) コントロール (NG) 群 (n=8)

の4群とし、移植後5日目、10日目、20日目、30日目にラットの頭蓋骨を摘出し、組織学的、酵素組織学的 (TRAP 染色)、免疫組織学的観察 (PCNA 発現、Runx2/Cbfa1 発現、OPN 発現) を行なった。

骨形成能の評価として、各グループでの形成骨を画像解析ソフト Mac Scope にて欠損部全体に占める新生骨の割合を計測した。統計分析は Mann-Whitney' s U-test を行いた。

【結果】

(移植後5日目) 全群で新生骨の形成は認められなかった。BTG 群、BG 群では、移植された骨髄は肥大し、活発な細胞増殖が観察され、これらは、PCNA 陽性であった。TG 群、NG 群では、活発な細胞増殖は観察されなかった。

(移植後10日目) BTG 群、BG 群では、PCNA 陽性細胞は一段増加し、Runx2 陽性細胞も増加した。BTG 群では、 β -TCP 周囲には TRAP 陽性細胞の増殖が認められた。BG 群はわずかに

TRAP 陽性細胞が観察された。TG 群では β -TCP 周囲には線維性結合組織が観察され、PCNA 陽性細胞、Runx2 陽性細胞、OPN 陽性細胞はわずかであった。TRAP 陽性細胞は β -TCP 周囲にわずかに観察された。NG 群では、新生骨の形成は認めず、PCNA 陽性細胞、Runx2 陽性細胞、OPN 陽性細胞、TRAP 陽性細胞も認めなかった。新生骨形成はいずれの群でも観察されなかった。

(移植後 20 から 30 日目)BTG 群では、海綿骨様構造を伴った新生骨で骨欠損部全体を満たし、 β -TCP が新生骨に置換されている様子が観察された。形成骨周辺の骨芽細胞に OPN 陽性を認めたが、TRAP 陽性細胞の数は減少した。BG 群では、骨髄様構造を含む新生骨の形成を認めるが、欠損部全体を満たすにはいたらなかった。TG 群では、新生骨の形成はあまり認めず、残存している β -TCP は線維性結合組織で覆われていた。NG 群では、ほとんど新生骨の形成は認めなかった。

移植後 30 日の新生骨占有率は、BTG 群で(39.0 ± 4.50)一番高く、ついで BG 群(20.1 ± 1.21)、TG 群(1.50 ± 0.26)、コントロール群(2.01 ± 1.01)であった。

【考察】

骨欠損部に自家移植された骨髄は移植後 20 から 30 日目に骨を形成した。また β -TCP を複合移植することで形成骨の促進を組織学的に認めた。

BTG 群、BG 群では欠損部では移植後 5 から 10 日目に PCNA 陽性細胞を観察した。移植後 10 日目からは Runx2 陽性細胞が観察された。一方、TG 群、NG 群では、骨欠損部に活発な PCNA 陽性細胞や Runx2 陽性細胞の発現は観察されなかった。このことより、移植骨髄からの骨形成細胞の増殖・分化が示唆された。

β -TCP を骨髄に複合した BTG 群では、骨髄単独移植の BG 群に比較して移植後 30 日目の形成骨量は有意に高かった。BTG 群においては、移植後 10 日目に TRAP 陽性破骨細胞が BG 群に較べて β -TCP 周囲に多く認められた。TRAP 陽性破骨細胞の出現が、その後の Runx2 陽性の骨芽細胞の分化に影響を与え、結果的に骨形成が促進された可能性が示唆された。また、 β -TCP の移植後の溶出による局所的な高 Ca, P 濃度が骨形成を促進するとの報告もあり、こうした理由から移植骨髄と β -TCP の複合移植による骨形成の促進効果がなされたものと推察される。

論文審査結果の要旨

骨髄には豊富な骨形成細胞が存在し、移植骨髄の骨形成能は口腔外科、整形外科、形成外科などの骨再建領域で注目されてきた。しかしながら、実際の骨欠損部の修復において骨髄を応用する場合は、移植された骨髄の流動性のために、欠損部内で適切な部位に維持されず、有効な骨形成能を示すためには人工骨などの適切な担体と複合させ移植することが必要である。β-リン酸三カルシウム(β-TCP)は生体内で骨に置換することが知られる人工骨補填材で、近年、整形外科・形成外科の領域で基礎的・臨床的に非常に注目されている。このβ-TCPと骨髄などの骨形成能を持つ組織を有効に組み合わせて移植することで、顎顔面領域においても有効な骨修復材となりうることを期待される。しかしながら、骨髄とβ-TCP複合体の持つ骨形成能は、顎顔面領域を含め口腔外科領域において十分な検証はなされておらず、特に移植後の骨髄細胞の移植部位での細胞増殖・分化の過程は不明な点が多い。本研究では、ラット頭蓋骨骨欠損部に骨髄およびβ-TCP、さらにその複合体を移植し、その細胞増殖・分化の過程を組織学的、免疫組織化学的、酵素組織化学的に観察を行っている。その結果、以下の結論を得ている。

1. 骨髄の細胞増殖能

骨形成細胞を豊富に含む骨髄を移植する事により、移植後早期より細胞の増殖が観察された。そして、それらの細胞は骨形成細胞へと分化し、新生骨形成に働いた。

2. 骨髄とβ-TCP複合移植の有効性

骨髄とβ-TCPを複合移植する事により、それぞれの単独移植群と比較して明らかに新生骨形成量が多かった。これは、骨髄から増殖・分化した細胞が新生骨形成に有効に働き、scaffoldとしてのβ-TCPが存在することにより、より効率的に新生骨形成がなされたと考えられた。

3. 欠損部内での細胞増殖・分化過程

骨髄を移植した群において、移植後早期よりPCNA陽性細胞が観察された。TRAP陽性細胞は骨髄とβ-TCP複合移植群において移植後10日目頃よりβ-TCP周囲に多数観察され、Runx2陽性細胞も観察されるようになった。このことより、移植骨髄より細胞の増殖が起こり、TRAP陽性細胞の出現により、骨芽細胞の分化に影響を与えた可能性が考えられた。

上記の研究結果は、骨組織の再生医学に重要な知見を与えるものである。したがって、本研究論文は博士(歯学)の学位論文に値すると考えられる。