

テトラポッド形状 $\alpha$ -TCP とコラーゲンの併用による  
骨再生過程の放射線学的および免疫組織化学的検討

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

瓜生 豪

(指導：米原 啓之 教授， 松本 直行 助教)

## 概要

本研究は膜性骨骨再生におけるテトラポッド形を呈す人工骨である Tetrabone<sup>®</sup> (NEXT21, TB) と、TB とコラーゲンの併用による骨再生の効果を調べることを目的としている。実験動物として9週齢の雄性 Wistar 系ラットを用いた。頭蓋骨欠損モデルは、直径 8 mm の円柱状頭蓋骨欠損を作製し、同部に TB 単体 (TB 群)、コラーゲン単体 (コラーゲン群)、あるいは TB とコラーゲンの併用したもの (併用群) を充填した。また、未充填のものをコントロール群とした。術後 1, 4, 8 週で観察を行った。また、下顎骨における TB 移植の影響を検討するために、直径 2 mm の円柱状下顎骨欠損モデルラットを作製した。TB 単体を充填したものを TB 群、未充填のものをコントロール群とし、術後 1, 4, 8, 12 週で観察を行った。

マイクロ CT による頭蓋骨欠損モデルの新生骨量を定量的に解析した結果、併用群およびコラーゲン群では術後 4 および 8 週において、TB 群およびコントロール群より有意に高い骨形成量を示した ( $p < 0.05$ )。組織学的には、TB 群では、既存骨端と TB 間に形成された骨が連続して見られた。一方、コラーゲン群では欠損内に散在性の骨形成が認められた。併用群では既存骨端と TB 間に連続する骨形成と散在性の骨形成が見られ、TB 群とコラーゲン群、双方の特徴を有していた。骨芽細胞分化に関与する Runx2 および TGF- $\beta$  の陽性反応はコラーゲンおよび TB 表面に認められた。破骨細胞の指標である TRAP 陽性反応は、TB および新生骨の表面に認められた。

下顎骨における骨欠損モデルの検討結果では、定量的解析において TB 群は術後 12 週において約 2 倍の骨形成量を示した。TB 群では既存骨と TB 間に連続した骨形成が認められ、コントロール群では欠損は肉芽組織で占められていた。Runx2, TGF- $\beta$ および TRAP の陽性反応を、TB および新生骨の表面に認めた。

これらの結果から、TB は足場材料としての良好な特性を有し、TB とコラーゲンの併用は骨欠損の効果的な治療法になりうると考えられた。

なお、本論文は Uryu T et al., Histochemical and Radiological Study of Bone Regeneration by the Combinatorial Use of Tetrapod-Shaped Artificial Bone and Collagen, J Hard Tissue Biol (in press) を基幹論文とし、これに TB を下顎骨に移植した成績を新たな実験データとして加えることによって総括したものである。

## 緒言

顎顔面領域の骨欠損部に用いる骨移植材は、主として自家骨が用いられている<sup>1,2)</sup>。自家骨は骨誘導因子や骨形成に関与する細胞を供給し、さらに骨誘導における足場材料として機能することから、理想的な骨移植材と考えられている<sup>3,4)</sup>。しかし、自家骨移植には、手術時間の延長、供給量の制限、創傷合併症、術後の骨採取部の神経麻痺や慢性疼痛などの有害事象を認めることがある<sup>5,6)</sup>。これらの問題を克服するために種々の人工骨が開発されている。しかし、これらの人工骨には特に骨誘導能、骨親和性、力学的強度、異物反応の抑制において大幅な改善が必要である<sup>4,7)</sup>。

近年、新たな人工骨としてテトラポッド形を呈する $\alpha$ -tricalcium phosphate ( $\alpha$ -TCP) 顆粒である Tetrabone<sup>®</sup> (TB) が開発された<sup>8,9)</sup>。TB の形態は、顆粒間に細胞や血管の遊走を可能にする間隙を形成することが可能である<sup>10)</sup>。TB の骨欠損部への移植では、TB 間隙に従来の $\beta$ -TCP 移植に比較して良好な骨形成が認められていた<sup>8)</sup>。また、人工骨に種々の成長因子やコラーゲンを添加した骨移植材による骨再生の研究が行われ、良好な成績を収めている<sup>11)</sup>。コラーゲン線維は骨形成の足場材料として重要な役割を持つ主要なタンパクである<sup>12,13)</sup>。ラット頭蓋骨欠損において、コラーゲンの移植は骨形成を促進すると報告されている<sup>14)</sup>。また、コラーゲンとオクタリン酸カルシウム複合体の移植も、骨形成量が有意に増加したと報告されている<sup>15)</sup>。

今回の研究では、膜性骨骨再生における TB とコラーゲン併用の影響について検討を

行った。さらに，口腔領域における骨欠損に対する TB の有用性についても検討を行った。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

体重 210 - 230 g の 9 週齢の雄性 Wistar 系ラット（三共ラボサービス）75 匹を実験に用いた。実験動物は、気温 22°C、湿度 55%、標準明暗サイクル下（12 時間）で飼育した。飼料と水道水を任意に与えた。なお、本研究は日本大学歯学部実験動物委員会の承認を得て実施し、実験動物の取り扱いと同委員会の指針に従って行った（承認番号 AP10D020）。

### 2. 移植材料

TB 群では欠損部に 50 mg の TB を移植した。コラーゲン群ではコラーゲン（Avitene<sup>®</sup>, Davol）と滅菌生理食塩水（大塚生食注，大塚製薬）を最終濃度 0.1 g/ml となるよう混合し，コラーゲン移植材として 0.05 ml を欠損部に移植した。本コラーゲンはウシ由来の I 型および III 型コラーゲンを主成分とする微線維性の局所止血剤である。併用群の移植材は TB とコラーゲンを重量比 1 : 5 で混合したものを 0.05 ml 用いた。これら移植材料は，手術直前に調整した。

### 3. 頭蓋骨欠損モデル

ラットはペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg, 共立製薬）を腹腔内投与して麻

酔を行った。頭頂部を剃毛した後、頭頂部皮下に 2%リドカイン（キシロカイン<sup>®</sup>, AstraZeneca）で局所麻酔し、皮膚および骨膜を約 20 mm の長さで剥離・翻転して頭蓋骨を露出し、ダイヤモンドバー（直径 8 mm）で持続的注水下に直径 8 mm の円柱状骨欠損を頭蓋骨に作製した。骨欠損部は TB 単体（TB 群 n=15）、コラーゲン単体（コラーゲン群 n=15）、および TB とコラーゲンの混合物（併用群 n=15）で充填した。欠損部に何も充填しないものをコントロール群（n=15）として設定した。拳上した骨膜を旧位に復し、5-0 吸収性糸（アルフレッサ）で縫合した後、皮膚を 5-0 ナイロン製糸（ペアーメディック）で縫合した。

#### 4. 下顎骨欠損モデル

頭蓋骨欠損モデルと同様に、Wistar 系ラット 15 匹に麻酔を行った後、左側下顎角部を剃毛し、同部に局所麻酔を行った。皮膚、筋肉および骨膜上に約 20 mm の横切開を加え、筋肉および骨膜を剥離・翻転して下顎骨を露出し、ダイヤモンドバー（直径 2 mm）で直径 3 mm の円柱状骨欠損を作製した。骨欠損部は TB 単体 1.5mg（TB 群 n=8）で充填し、欠損部に何も充填しないものをコントロール群（n=7）として設定した。皮膚、筋肉および骨膜を旧位に復した後縫合した。

#### 5. マイクロ CT 解析

動物用マイクロ CT (リガク) (マイクロ CT) 撮影を、頭蓋骨欠損モデルでは術直後、術後 1, 4, 8 週で、下顎骨欠損モデルでは術後 1, 4, 8, 12 週に行った。ラットをイソフルラン (DS ファーマアニマルヘルス) で麻酔し、ラットの頭部をマイクロ CT のチャンバーに固定した。マイクロ CT の撮影条件は Bouxsein らのガイドライン<sup>16)</sup>に従って、倍率 6.7 倍、ボクセルサイズ  $30 \times 30 \times 30 \mu\text{m}^3$ 、管電圧 : 90 kV、管電流 : 100  $\mu\text{A}$ 、照射時間 : 17 秒に設定し、周囲の既存骨を含む範囲で設定した。3D 画像構築には i-VIEW-R image reconstruction software (リガク) を使用し、水平方向、矢状方向、前頭方面で再構築した。骨量は 3 by 4 viewer software (ver. 2.4; 北千住ラジスト歯科, i-View イメージセンター) を用いて計測した。関心領域 (ROI) を頭蓋骨欠損モデルは直径 8.76 mm  $\times$  厚さ 3.00 mm の円柱状領域、下顎骨欠損モデルは直径 3.00 mm  $\times$  厚さ 3.00 mm の円柱状領域に設定し、ROI 内で骨量を測定した (第 2 図 A, B)。ROI 内での新生骨量を評価するために、既知の骨密度模型 ( $400 \text{ mg/cm}^3$ ) (ラトックシステムエンジニアリング) と対比し、 $400 \text{ mg/cm}^3$  以上を骨とみなした。術直後撮影時と比較し、増加部分 (緑) と減少部分 (赤) の骨ボクセル数を計測し、骨ボクセルの増加量から減少量を減算して骨量とした (第 2 図 C)。統計学的分析は Kruskal Wallis H-test と Student-Newman-Keuls test を用い、有意水準を  $p < 0.05$  とした。

## 6. 組織学的解析

頭蓋骨欠損モデルでは術後 1, 4, 8 週で、下顎骨欠損モデルは術後 12 週でラットを安



楽死させた。ラットの頭蓋骨および下顎骨を採取し、4%パラホルムアルデヒドで24時間固定した。その後、骨組織を0.5 M エチレンジアミン四酢酸 (EDTA, 和光純薬工業株式会社) で14日間脱灰した。次いで、骨組織をエタノール上昇系列により脱水処理し、通法に従ってパラフィン包埋した。パラフィン包埋した検体は5  $\mu$ m の厚さで薄切片を作製した。切片はヘマトキシリン/エオジン (武藤化学株式会社) 染色を施し、デジタル顕微鏡システム (顕微鏡: DM6000B, Leica Microsystems ; カメラ: DFC500, Leica Microsystems) で撮影した。

骨芽細胞を検出するために、Runx2 の免疫組織化学を行った。脱パラフィン処理した切片を10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0, 和光純薬) で98°C, 20 分間反応させ、抗原賦活化処理した。蒸留水で洗浄後、非特異的抗体反応を阻害するため、5%BSA/TBST (5% ウシ血清アルブミン, 0.05%Tween-20 添加 Tris 緩衝食塩水) で5分間処理した。一次抗体としてウサギ抗 Runx2 抗体 (ab23981, Abcam) を用い、4°C で一晩反応させた。二次抗体としてヒストファインシンプルステインラット MAX-PO MULTI (ニチレイバイオサイエンス) を用い切片と反応させた後、0.01%過酸化水素添加, 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride (D5637, Sigma-Aldrich) を反応させ、免疫複合体を可視化した。ネガティブコントロールとして、一次抗体の代わりに 1%BSA/TBST を用いた。

破骨細胞を標識するために、切片を TRAP/ALP 染色キット (和光純薬工業株式会社)

を用い、用法に従って TRAP 陽性細胞の局在を調べた。

## 7. 蛍光免疫染色

切片は 5%BSA/TBST で非特異的抗体反応のブロッキング処理を行った後、一次抗体としてマウス抗 TGF- $\beta$ 抗体 (ab66043, Abcam) と 4°C で一晩反応させた。次いで、切片を二次抗体としてビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (BA1000, Vector laboratories) と 1 時間反応させた。さらに、Streptavidin-FITC (554060, BD Biosciences) で反応させた後、4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride solution (DAPI, Dojindo Laboratories) を 37°C で 30 分間反応させた。

蛍光シグナルの撮影には、蛍光顕微鏡システム (顕微鏡: BX60F5, Olympus ; カメラ : Penguin 600CL, Pixera) を使用した。

## 結果

### マイクロ CT 所見

#### 頭蓋骨欠損モデル

TB 群では、術後 1 週間ではほとんど変化は認められなかったが、術後 4 および 8 週で、high density 像が既存骨端と TB 間に認められた (第 3 図 A, 白矢印)。また、一部に High density 像とともに、moderate density 像も TB 間に認められた (第 3 図 A, 黒矢印)。

コラーゲン群では術後 1 週より moderate density 像が認められ、以降 high density 像に変化していく様子が認められた (第 3 図 B, 黒矢印, 白矢印)。術後 4 週以降, high density 像が散在性に認められた。

併用群では、術後 1 週から TB 間に moderate density 像が認められた (第 3 図 C, 黒矢印)。さらに術後 4 週以降では、既存骨と連続する high density 像と、欠損中央付近の TB 間に認められた moderate density 像が high density 像に変化した (第 3 図 C, 白矢印)。

コントロール群では、術後 1 週で欠損中央に moderate density 像を認めた。同時に既存骨断端の肥厚も認められた。その一方で、術後 4 週以降では顆粒状の high density 像を認めるのみであった (第 3 図 D, 白矢印)。

#### 下顎骨欠損モデル

TB 群では、術後 1 週より既存骨の肥厚が認められ、術後 4 週以降、経時的に既存骨

から欠損部の TB 表面を伝う high density 像が認められた (第 3 図 E)。

コントロール群では術後 1 週で TB 群と同様に既存骨の肥厚が認められた。しかし、欠損に向かう骨形成は少わずかであり、術後 12 週においても欠損の大部分は残存していた (第 3 図 F)。

#### マイクロ CT による定量的解析

##### 頭蓋骨欠損モデル

各群の骨量(各群：n = 5 匹)は術後 8 週まで経時的に増加した (第 4 図 A, 第 1 表)。

術後 4 週における全実験群の骨量は (TB 群： $3.71 \pm 0.35 \text{ mm}^3$ ; コラーゲン群： $8.45 \pm 0.92 \text{ mm}^3$ ; 併用群： $7.98 \pm 0.95 \text{ mm}^3$ ), コントロール群 ( $1.51 \pm 0.33 \text{ mm}^3$ ,  $p < 0.05$ ) と比較し有意に多かった。加えて、術後 4 週におけるコラーゲン群と併用群の骨量は、TB 群と比較し有意に骨量が多かった。術後 8 週におけるコラーゲン群 ( $9.20 \pm 1.30 \text{ mm}^3$ ) と併用群 ( $9.30 \pm 1.93 \text{ mm}^3$ ) の骨量は、TB 群 ( $3.98 \pm 1.15 \text{ mm}^3$ ,  $p < 0.05$ ) と比較し有意に増加していた。しかしながら、コラーゲン群と併用群では有意差が認められなかった。

コントロール群 (1 週： $0.34 \pm 0.03 \text{ mm}^3$ , 4 週： $1.51 \pm 0.33 \text{ mm}^3$ ) と比較し、術後 1 週, 4 週では TB 群 (1 週： $2.68 \pm 0.32 \text{ mm}^3$ , 4 週： $3.71 \pm 0.35 \text{ mm}^3$ ) が有意に骨量が多かったが ( $p < 0.05$ ), 術後 8 週では有意差は認めなかった (コントロール群： $1.61 \pm 0.46 \text{ mm}^3$ , TB 群： $3.98 \pm 1.15 \text{ mm}^3$ )。術後 8 週における併用群の骨量 ( $9.30 \pm 1.93 \text{ mm}^3$ ) は、術後 8

週におけるコントロール群の骨量 ( $1.61 \pm 0.46 \text{ mm}^3$ ) の約 6 倍の形成量を示した。

#### 下顎骨欠損モデル

両群の骨量 (各群:  $n = 6$  匹) は術後 12 週で増加していた (第 4 図 B, 第 2 表)。TB 群の骨増加量 ( $5.47 \pm 1.86 \text{ mm}^3$ ) はコントロール群 ( $2.72 \pm 1.14 \text{ mm}^3$ ) に比べ有意に多い骨形成を示した ( $p < 0.05$ )。

#### 組織学的評価

##### 頭蓋骨欠損モデル

TB 群では術後 1 週で TB 間は肉芽組織で占められており, 同部に小石灰化物を混じていた。TB と石灰化物の表面に楕円形の間葉系細胞を多数認めた (第 5 図 A)。さらに, 術後 4 週および 8 週では TB 表面に骨が形成され, 既存骨端と癒合する像を認めた (第 5 図 B, C)。しかし, 欠損中央付近の TB 間は, 術後 8 週まで線維性結合組織で満たされていた。

コラーゲン群では, 術後 1 週において移植したコラーゲンの周囲を肉芽組織が取り囲んでいた (第 5 図 D)。術後 4 週でコラーゲンは欠損全体で徐々に線維骨へ置換され減少した (第 5 図 E)。さらに, 術後 8 週では, 線維骨の一部が層板骨へ置換され, 骨の占める面積が拡大した (第 5 図 F)。

併用群では, 術後 1 週では TB 間は肉芽組織およびコラーゲンで満たされていた (第

5 図 G)。TB およびコラーゲン周囲に、楕円形の大型の単核細胞と多核巨細胞が認められた。術後 8 週では、欠損中央部のコラーゲン周囲に線維性化骨と、TB 周囲に層板状の骨形成が見られた（第 5 図 H, I）。

コントロール群は術後 1 週では、小石灰化物が欠損周辺部に限局して見られた。欠損部は線維性肉芽組織で満たされ、また既存骨端部には骨の添加が見られた（第 5 図 J）。術後 4 週では肉芽組織内の小石灰化物の量が増加した。8 週では、欠損内の肉芽組織中に小型顆粒状の石灰化物が骨化する像を認めるものの、その量は前述の二者に比べ極めて少量であった（第 5 図 K, L）。

#### 下顎骨欠損モデル

TB 群では既存骨端で骨の添加と、TB 表面での層状の骨形成を認めた。また、欠損内の TB 間に浮腫性の肉芽組織を認めた（第 5 図 M）。

コントロール群では既存骨端で骨の添加が認められたが、欠損へ向かう骨形成は認められず、線維性肉芽組織で満たされていた（第 5 図 N）。

#### 免疫組織化学的評価

##### 1. Runx2

#### 頭蓋骨欠損モデル

TB 群は、術後 1 週で Runx2 陽性の細胞を既存骨、TB および石灰化物表面に認めた

(第 6 図 A)。さらに術後 4 週では新生骨と TB の表面に多数の陽性細胞を認めた (第 6 図 B, C)。

コラーゲン群では、術後 1 週から 4 週にかけて、陽性細胞を既存骨およびコラーゲン表面に認めた。加えて、コラーゲン内に少量の陽性細胞が侵入していた (第 6 図 D)。

術後 4 週では、陽性細胞が増加し、コラーゲン周囲と、線維性化骨周囲に認められた (第 6 図 E)。術後 8 週では層板骨周囲に多数の陽性細胞を認め、さらに骨細胞が陽性を示していた (第 6 図 F)。

併用群では、術後 1 週から 4 週にかけて陽性細胞をコラーゲン周囲と TB 周囲に認めた (第 6 図 G)。前述の TB 群とコラーゲン群と同様な陽性細胞の分布が認められた (第 6 図 H, I)。

コントロール群では既存骨に添加された骨表面と石灰化物の表面に陽性細胞を認めたが、その数は TB 群、コラーゲン群および併用群と比較して少量であった (第 6 図 J, K, L)。

#### 下顎骨欠損モデル

TB 群では、TB および新生骨表面に Runx2 陽性細胞を認めた (第 6 図 M)。コントロール群では肥厚した既存骨表面に Runx2 陽性細胞を認めた (第 6 図 N)。

## 2. TRAP 染色

#### 頭蓋骨欠損モデル

TB 群では、術後 1 週で、既存骨表面の多核巨細胞に陽性反応が認められた（第 7 図 A）。術後 4 週では、TB 表面の多核巨細胞においても陽性反応が認められた（第 7 図 B）。術後 8 週では、TB 表面に加えて新生骨表面とその内部にも陽性反応が認められた（第 7 図 C）。

コラーゲン群では、術後 1 週で既存骨と添加された骨およびコラーゲン表面に陽性反応が認められた（第 7 図 D）。術後 4 週以降では、新生骨表面とその内部およびコラーゲン周囲に陽性反応が認められた（第 7 図 E, F）。

併用群では、術後 1 週では既存骨周囲にのみ陽性反応を認めた（第 7 図 G）。術後 4 週から 8 週にかけて既存骨、新生骨および TB 表面と、新生骨内部に陽性反応を認めた（第 7 図 H, I）。

コントロール群では、術後 1 週で既存骨表面に陽性反応を認めた（第 7 図 J）。その後、陽性反応は既存骨および石灰化物周囲に散在していた（第 7 図 K, L）。

#### 下顎骨欠損モデル

TB 群では、TB および新生骨表面に陽性反応を認めた（第 7 図 M）。コントロール群では既存骨に添加された骨の表面に陽性反応を認めた（第 7 図 N）。

### 3. TGF- $\beta$

#### 頭蓋骨欠損モデル

TB 群では、術後 1 週で肉芽組織内の単核細胞と、TB 表面の単核細胞および多核巨細



胞に陽性反応を認めた（第 8 図 A）。術後 4 週以降では、TB 表面および新生骨表面の単核細胞と多核巨細胞にのみ陽性反応を認めた（第 8 図 B, C）。

コラーゲン群では、術後 1 週で肉芽組織内の単核細胞に加えて、コラーゲン表面の単核細胞および多核巨細胞に陽性反応を認めた（第 8 図 D）。術後 4 週以降では、コラーゲンおよび新生骨表面の単核細胞と多核巨細胞にのみ陽性反応を認めた（第 8 図 E, F）。

併用群では、術後 1 週で肉芽組織内の単核細胞に加えて、TB およびコラーゲン表面の単核細胞と多核巨細胞に陽性反応を認めた（第 8 図 G）。術後 4 週以降では、肉芽組織内の陽性細胞が減少し、TB、コラーゲンおよび新生骨表面に分布する単核細胞と多核巨細胞に陽性反応を認めた（第 8 図 H, I）。

コントロール群では、各実験期間において小石灰化物と既存骨に添加された骨表面に陽性反応を認めた（第 8 図 J, K, L）。

#### 下顎骨欠損モデル

TB 群では、TB 表面の単核細胞と多核巨細胞に陽性反応を認めた（第 8 図 M）。コントロール群では、既存骨に添加された骨表面の単核細胞および多核巨細胞に陽性反応を認めた（第 8 図 N）。

## 考察

本研究では、TB とコラーゲンを併用した骨移植材が骨再生におよぼす影響を、骨形成量および、Runx2, TRAP, TGF- $\beta$ の各陽性細胞の局在に注目して検討した。その結果、TB のみを移植した場合、組織学的には既存骨端に添加される骨に加えて、TB の表層に層状の骨形成を示した。コラーゲンのみを移植した場合、欠損部肉芽組織中に散在性の骨形成を示した。TB とコラーゲンを混和して移植した併用群では TB 群とコラーゲン群の両者の骨形成像が混在して認められた。これらの骨形成過程は、マイクロ CT と組織所見で一致していた。Rodriguez らの研究では $\alpha$ -TCP 顆粒を移植した結果、欠損周囲と顆粒間に high density 像が認められたと報告されている<sup>17)</sup>。さらに、コラーゲンを移植した研究においては、散在性の骨形成を示したと報告されている<sup>15)</sup>。これらの結果は、本研究で得られた TB 群とコラーゲン群の結果と一致する。併用群は、骨欠損部に充填した TB の表面と、TB 間でコラーゲンを足場とした骨形成を示した。同様の結果がオクタリン酸カルシウムとコラーゲンを併用した研究で報告されている<sup>15,18)</sup>。

マイクロ CT による定量的解析結果は、併用群の骨量およびコラーゲン群の骨量は、TB 群と比較して有意に増加していた。また、併用群とコラーゲン群では、同等の骨量を示した。これらの結果は、TB とコラーゲンの併用は TB 顆粒間の骨形成によって早期の欠損閉鎖を可能にすることを示唆している。

骨芽細胞の局在を調べるために、Runx2 に対する免疫組織化学的検討を行った。

Runx2 は未分化間葉系細胞からの骨芽細胞への分化に必須な転写因子であり、I型コラーゲンやオステオカルシンなど骨マトリックスタンパク遺伝子の発現を誘導する<sup>19-21)</sup>。移植後1週では、骨芽細胞がTB表面とコラーゲン表面を取り囲んでいた。その後、骨組織がTB表面とコラーゲン表面に形成されていた。これらの結果から、TBとコラーゲンが骨形成の足場として機能したと推測される。

TGF- $\beta$ は骨微小環境において、骨芽細胞、破骨細胞や線維芽細胞から産生される、多機能を有する成長因子である<sup>22,23)</sup>。TGF- $\beta$ は骨欠損部位への間葉系幹細胞の遊走を促進することから、TGF- $\beta$ の発現は骨形成を増強すると報告されている<sup>20,23,24)</sup>。また、TGF- $\beta$ はRANKL誘導型破骨細胞形成を促進することが知られている<sup>6,25-27)</sup>。骨欠損部位にTGF- $\beta$ を添加したコラーゲンスポンジを移植した研究では、TGF- $\beta$ の添加により骨形成量が増加することが明らかにされている<sup>11)</sup>。これらの作用は骨の形成およびそのリモデリングに重要な役割を果たしている<sup>8)</sup>。本研究では、TGF- $\beta$ 陽性の細胞が、コラーゲン、TBおよび新生骨表面に豊富に認められた。また、このTGF- $\beta$ の局在は、TRAP陽性の破骨細胞とRunx2陽性の骨芽細胞に一致していた。これらの結果は、併用群において骨芽細胞と破骨細胞によるTGF- $\beta$ 産生が、骨欠損部への未分化間葉系幹細胞の遊走に関与していることを示唆している。

## 結論

本研究では TB とコラーゲンを併用した骨移植材が、頭蓋骨および下顎骨欠損ラットモデルにおける骨再生におよぼす影響を検討し、以下の結果を得た。

1. 定量的解析では、併用群は術後 8 週において TB 群と比較して約 2 倍の骨形成量を示した。また、コラーゲン群と比較し同等の骨形成量を示した。
2. 組織学的検討では、TB 群は既存骨端と TB 表面間に連続する骨形成を認め、コラーゲン群では欠損内に散在性に骨形成を認めた。併用群は TB 群、コラーゲン群の両者の特徴を持つ骨形成を示していた。
3. 免疫組織化学的検討では、TB およびコラーゲンの表面に、TGF- $\beta$ 陽性の細胞を認め、この TGF- $\beta$ の局在は、TRAP 陽性の破骨細胞と Runx2 陽性の骨芽細胞に一致していた。

以上のことから、TB とコラーゲンの併用は骨形成の足場として機能し、広範な骨形成を促進することが示唆され、骨欠損に対する有用な移植材となり得ると考えられた。

## 謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、多くのご支援とご指導を賜りました、指導教官である米原啓之教授に深く感謝します。また、日々の研究だけでなく多くのご指導をしていただきました病理学講座松本直行博士に深く感謝します。実験材料を提供していただきました東京大学大学院医学系研究科鄭雄一教授に深く感謝致します。

本研究は平成 24～26 年度日本大学大学院歯学研究科研究費（学生研究費）、平成 23～26 年度日本大学歯学部総合歯学研究所研究費 B、平成 25 年度日本大学歯学部佐藤研究費、平成 24 年度日本大学歯学部上村安男・治子研究費（短期研究）および JSPS 科研費 24593063（基盤研究 C）の助成を受けたものである。

## 参考文献

- 1) Horch HH, Sader R, Pautke C, Neff A, Deppe H, Kolk A (2006) Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb<sup>®</sup>) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg* 35, 708-713.
- 2) Saijo H, Igawa K, Kanno Y, Mori Y, Kondo K, Shimizu K, Suzuki S, Chikazu D, Iino M, Anzai M, Sasaki N, Chung UI, Takato T (2009) Maxillofacial reconstruction using custom-made artificial bones fabricated by inkjet printing technology. *J Artif Organs* 12, 200-205.
- 3) Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E (2005) Bone substitutes: an update. *Injury* 36, S20-S27.
- 4) Elgali I, Igawa K, Palmquist A, Lenneras M, Xia W, Choi S, Chung UI, Omar O, Thomsen P (2014) Molecular and structural patterns of bone regeneration in surgically created defects containing bone substitutes. *Biomaterials* 35, 3229-3242.
- 5) Kurz LT, Garfin SR, Booth RE Jr (1989) Harvesting autogenous iliac bone grafts: A review of complications and techniques. *Spine* 14, 1324-1331.
- 6) Moore WR, Graves SE, Bain GI (2001) Synthetic bone graft substitutes. *Aust N Z J Surg* 71, 354-361.

- 7) Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemin G (2000) Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 18, 959-963.
- 8) Teraoka K, Tei Y, Sasaki N, Suzuki S, Takane K (2008) An introduction of new artificial bone unit "Tetra-Bone". *Key Eng Mat* 361, 163-166.
- 9) Choi S, Liu IL, Yamamoto K, Igawa K, Mochizuki M, Sakai T, Echigo R, Honnami M, Suzuki S, Chung UI, Sasaki N (2012) Development and evaluation of tetrapod-shaped granular artificial bones. *Acta Biomater* 8, 2340-2347.
- 10) Maeda Y, Hojo H, Shimohata N, Choi S, Yamamoto K, Takato T, Chung UI, Ohba S (2013) Bone healing by sterilizable calcium phosphate tetrapods eluting osteogenic molecules. *Biomaterials* 34, 5530-5537.
- 11) Ueda H, Hong L, Yamamoto M, Shigeno K, Inoue M, Toda T, Yoshitani M, Nakamura T, Tabata Y, Shimizu Y (2002) Use of collagen sponge incorporating transforming growth factor- $\beta$ 1 to promote bone repair in skull defects in rabbits. *Biomaterials* 23, 1003-1010.
- 12) Katz EP, Li ST (1973) Structure and function of bone collagen fibrils. *J Mol Biol* 80, 1-15.
- 13) Masuda H, Hosokawa N, Nagata K (1998) Expression and localization of collagen-binding stress protein Hsp47 in mouse embryo development: comparison with types I and II collagen. *Cell Stress Chaperones* 3, 256-264.

- 14) Vigier S, Catania C, Baroukh B, Saffar JL, Giraud-Guille MM, Colombier ML (2011)
- Dense fibrillar collagen matrices sustain osteoblast phenotype in vitro and promote bone formation in rat calvaria defect. *Tissue Eng Part A* 17, 889-898.
- 15) Kawai T, Anada T, Masuda T, Honda Y, Sakai Y, Kato Y, Kamakura S, Echigo S, Suzuki O (2011) The effect of synthetic octacalcium phosphate in a collagen scaffold on the osteogenicity of mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 5, 124-136.
- 16) Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R (2010)
- Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25, 1468-1486.
- 17) Rodriguez R, Kondo H, Nyan M, Hao J, Miyahara T, Ohya K, Kasugai S (2011)
- Implantation of green tea catechin  $\alpha$ -tricalcium phosphate combination enhances bone repair in rat skull defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 98, 263-271.
- 18) Kamakura S, Sasaki K, Honda Y, Anada T, Matsui K, Echigo S, Suzuki O (2007)
- Dehydrothermal treatment of collagen influences on bone regeneration by octacalcium phosphate (OCP) collagen composites. *J Tissue Eng Regen Med* 1, 450-456.
- 19) Franceschi RT, Xiao G (2003) Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem* 15, 446-454.



- 20) Karsenty G (2010) Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. *Semin Cell Dev Biol* 11, 343-346.
- 21) Komori T (2011) Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *J Cell Biochem* 112, 750-755.
- 22) Chen G, Deng C, Li YP (2012) TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci* 8, 272-288.
- 23) Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, Zhao L, Nagy TR, Peng X, Hu J, Feng X, Van Hul W, Wan M (2009) TGF- $\beta$ 1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med* 15, 757-765.
- 24) Balooch G, Balooch M, Nalla RK, Schilling S, Filvaroff EH, Marshall GW, Marshall SJ, Ritchie RO, Derynck R, Alliston T (2005) TGF- $\beta$  regulates the mechanical properties and composition of bone matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 18813-18818.
- 25) Itonaga I, Sabokbar A, Sun SG, Kudo O, Danks L, Ferguson D, Fujikawa Y, Athanasou NA (2004) Transforming growth factor- $\beta$  induces osteoclast formation in the absence of RANKL. *Bone* 34, 57-64.
- 26) Quinn JM, Itoh K, Udagawa N, Hausler K, Yasuda H, Shima N, Mizuno A, Higashio K, Takahashi N, Suda T, Martin TJ, Gillespie MT (2001) Transforming growth factor  $\beta$  affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *J Bone Miner Res* 16, 1787-1794.

27) Yasui T, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Matsumoto T, Masuda H, Hirose J, Omata Y,

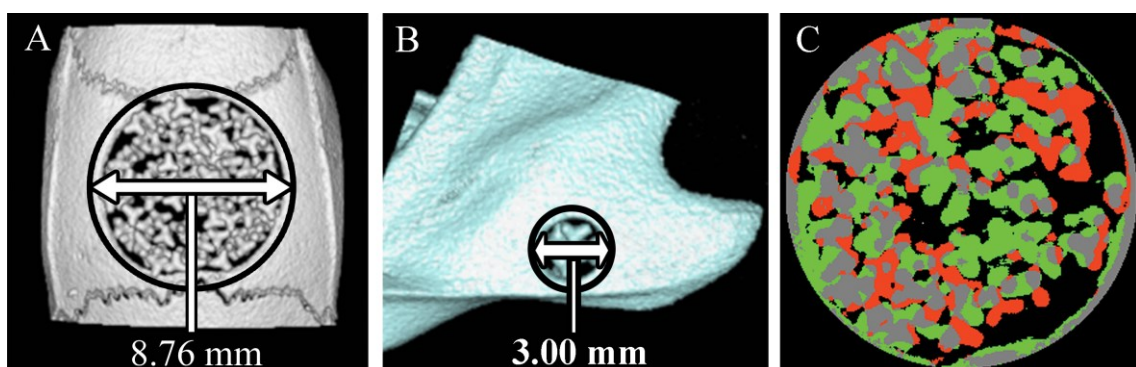
Yasuda H, Imamura T, Nakamura K, Tanaka S (2011) Regulation of RANKL-induced osteoclastogenesis by TGF- $\beta$  through molecular interaction between Smad3 and Traf6. *J*

*Bone Miner Res* 26, 1447-1456.



第1図 本研究に用いた移植材

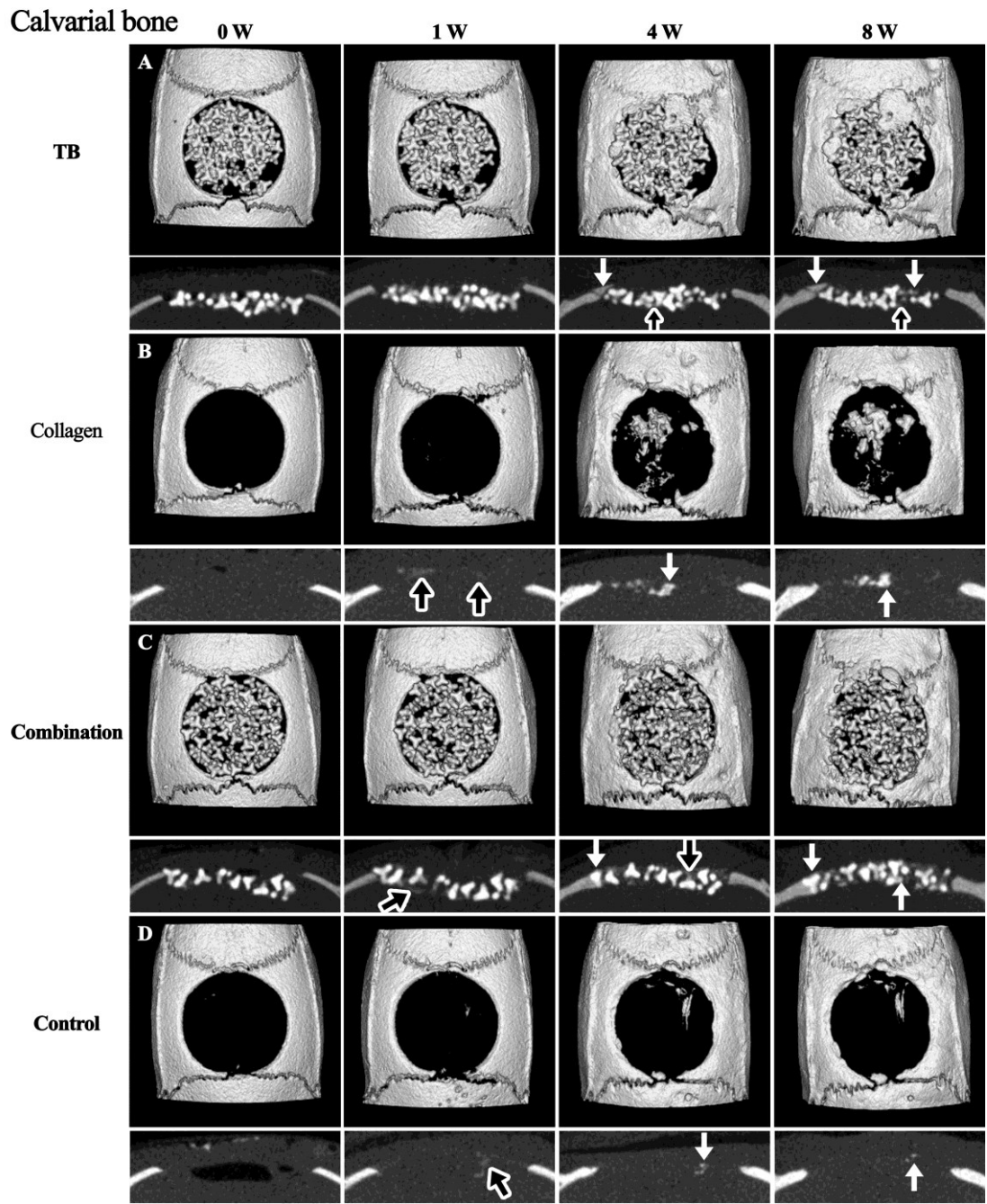
(A) TB, (B) コラーゲン, (C) TB およびコラーゲンの混和物。



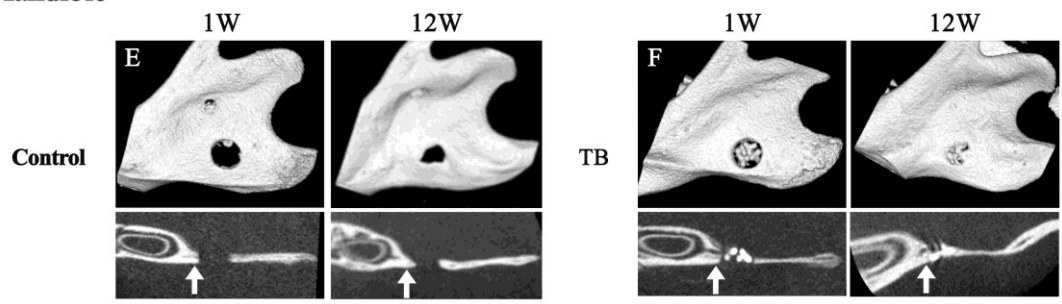
第2図 定量的解析イメージ

(A) 頭蓋骨欠損モデルにおける関心領域 (ROI) (B) 下顎骨欠損モデルにおける関心領域 (ROI) (C) 3 by 4 viewer software による欠損部解析画面。緑部：増加部分, 赤部：減少部分。

Calvarial bone



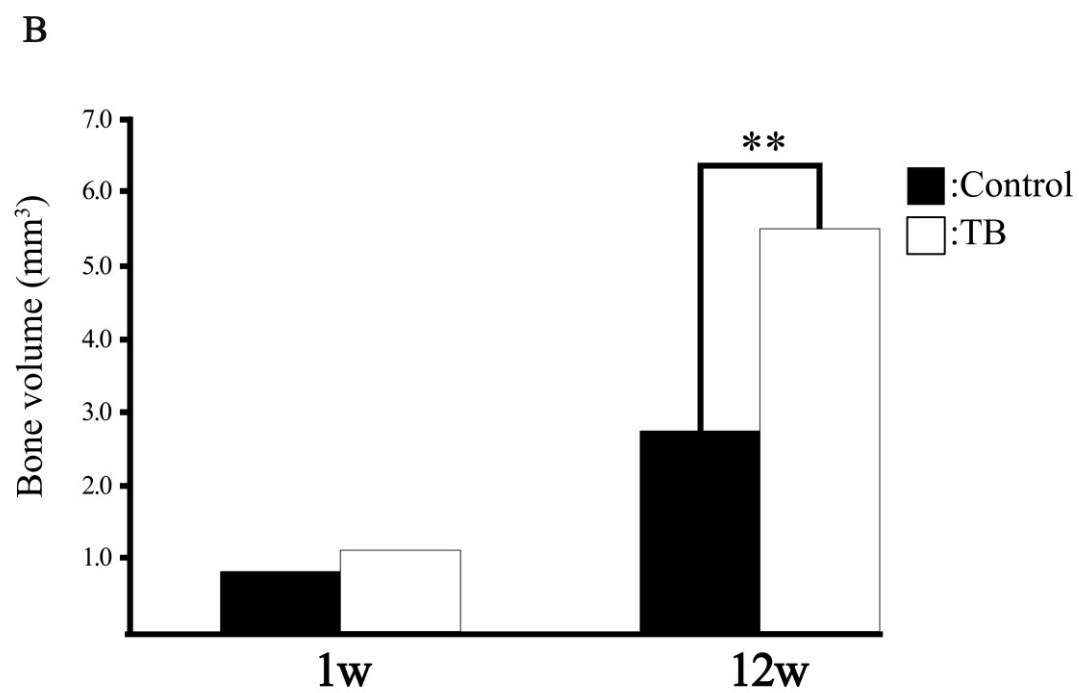
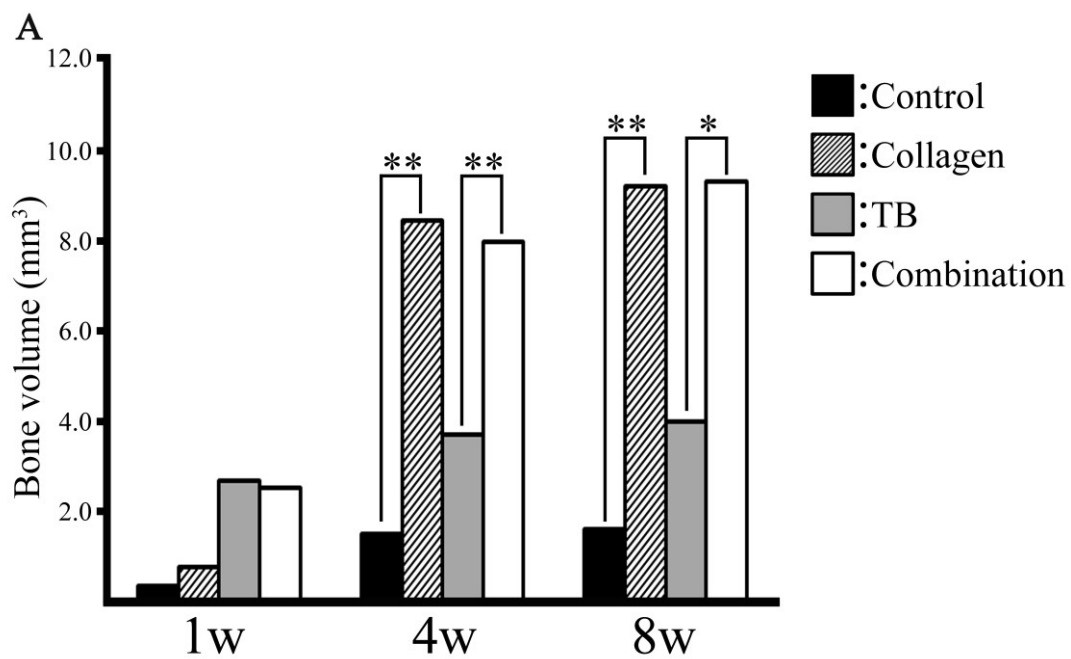
Mandible



### 第3図 3D画像およびCT画像

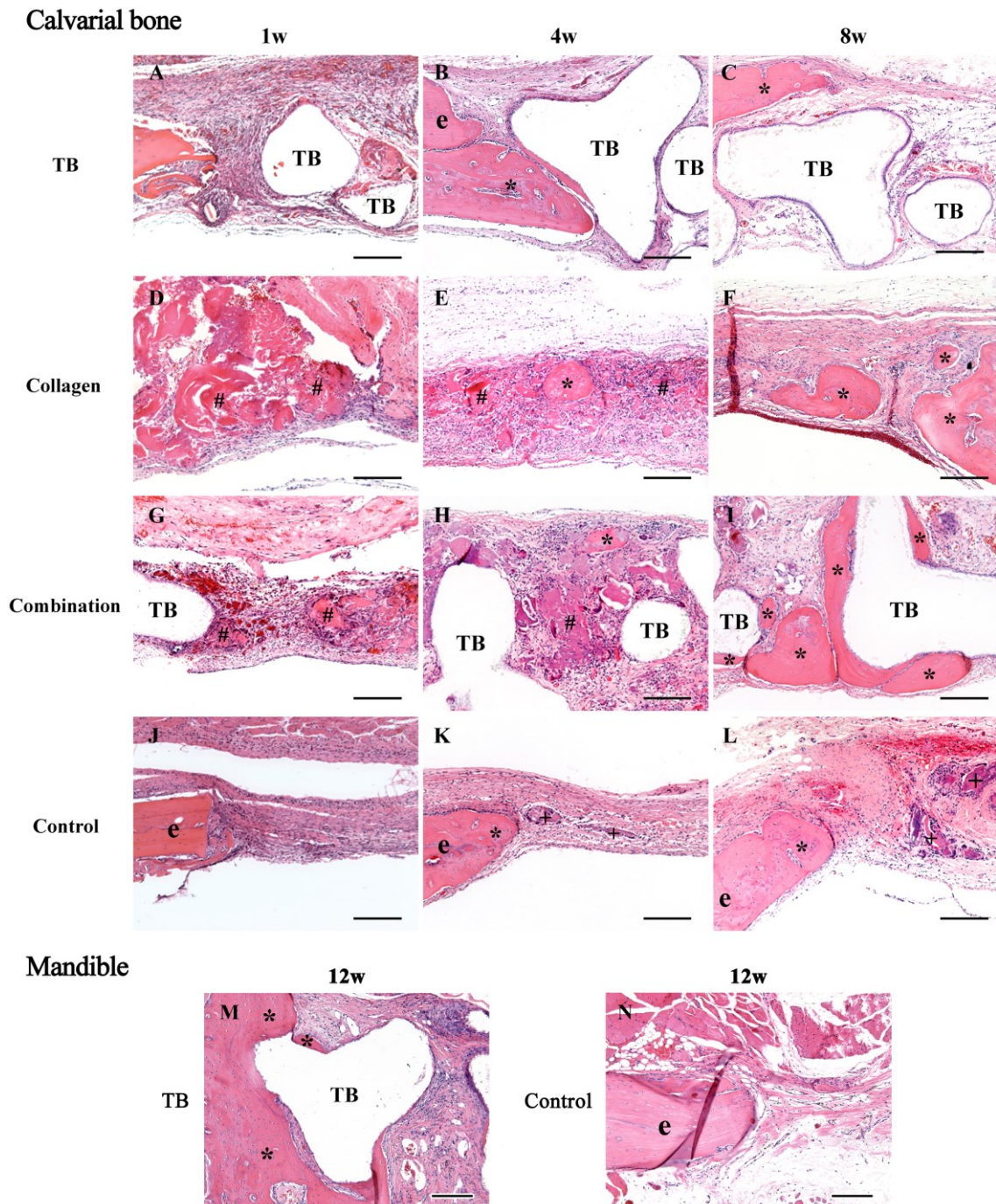
TB群の術後4週以降で既存骨端と連続する high density 像を認めた(第3図A, 白矢印)。コーゲン群の術後4週以降で欠損中央付近に high density 像を認めた(第3図B, 白矢印)。併用群の術後4週以降で、既存骨端と連続する high density 像に加えて、欠損中央付近にも high density 像を認めた(第3図C, 白矢印)。コントロール群は術後4週以降で、欠損内に顆粒状の high density 像を認めるのみであった。(第3図D, 白矢印)。

黒矢印： moderate density 像， 白矢印： high density 像



第4図 新生骨の定量的解析結果

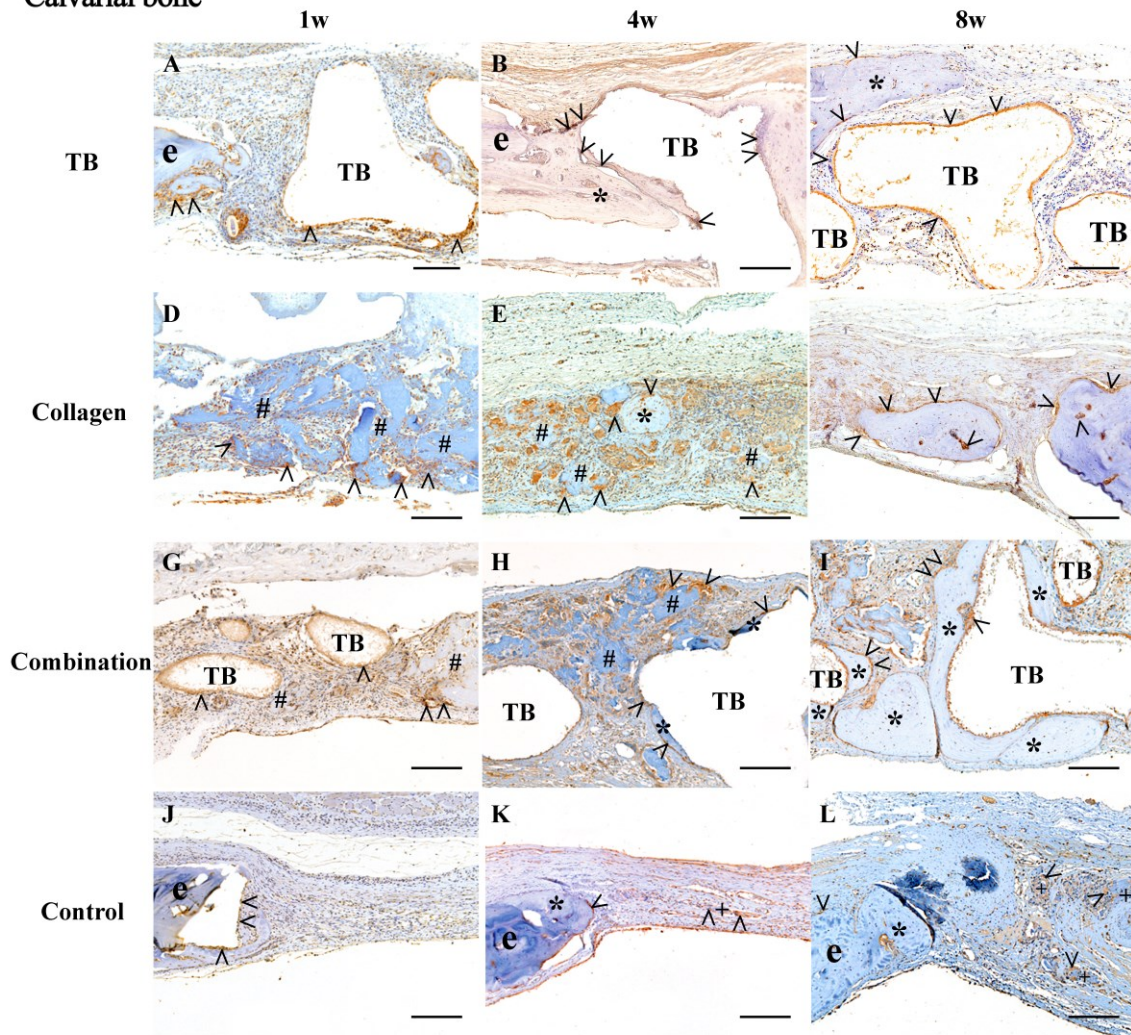
(A) 頭蓋骨欠損モデル (B) 下顎骨欠損モデル (mean ± SD, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )。



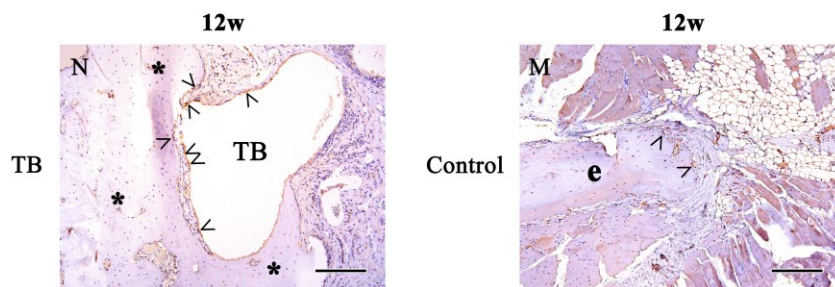
第 5 図 組織学的解析結果 TB 群では、既存骨端から TB 表面に伸びる伝導性の骨形成を認めた。コラーゲン群では、散在性の骨形成を認めた。併用群では、TB 群とコラーゲン群の両者の骨形成の特徴を有していた。コントロール群は、既存骨端の肥厚および石灰化物を認めたが、欠損部は線維性結合組織で満たされていた。

# : コラーゲン, \* : 新生骨, TB : テトラボン, + : 石灰化物, e : 既存骨. Scale Bar = 200  $\mu$ m

Calvarial bone



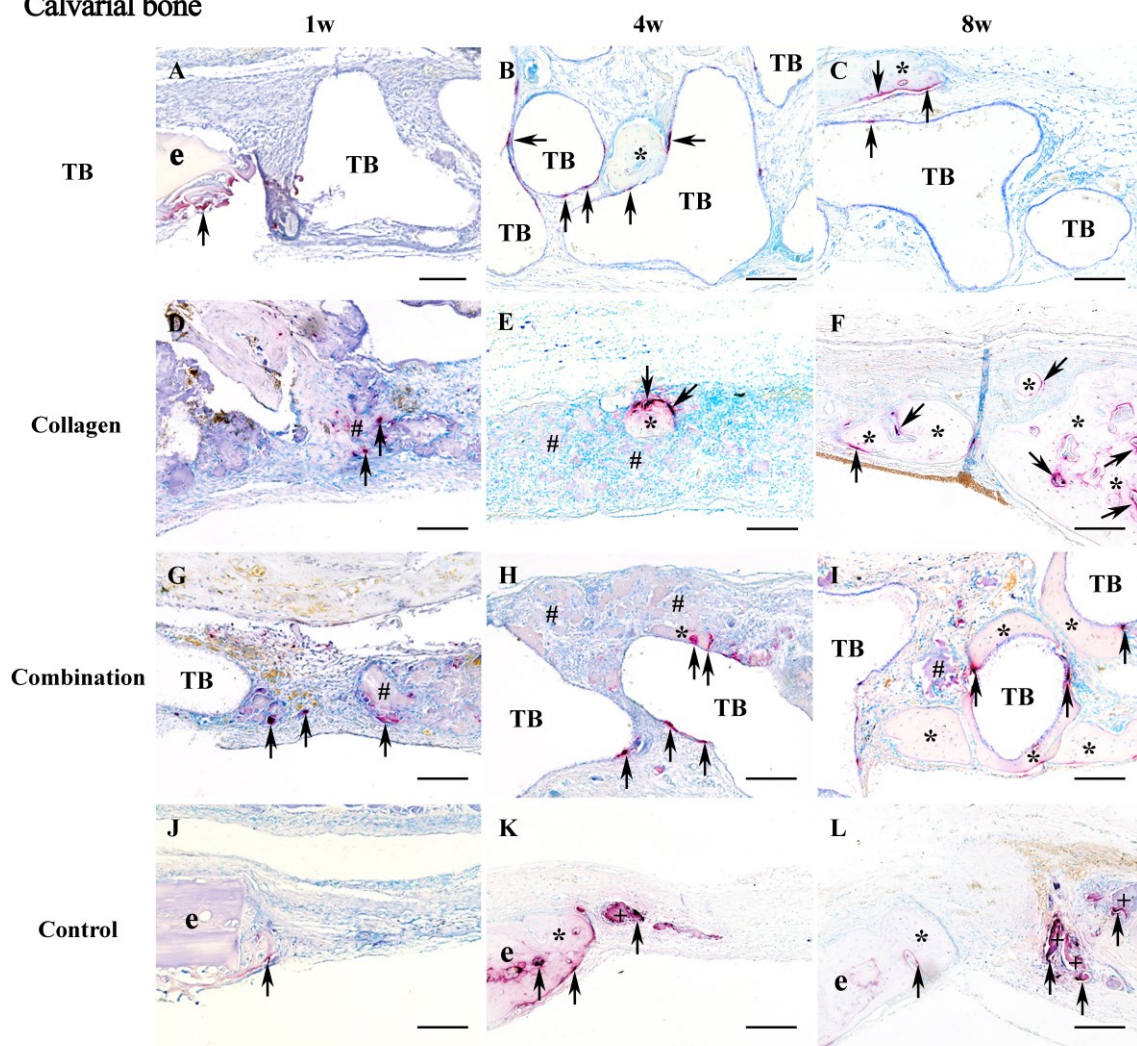
Mandible



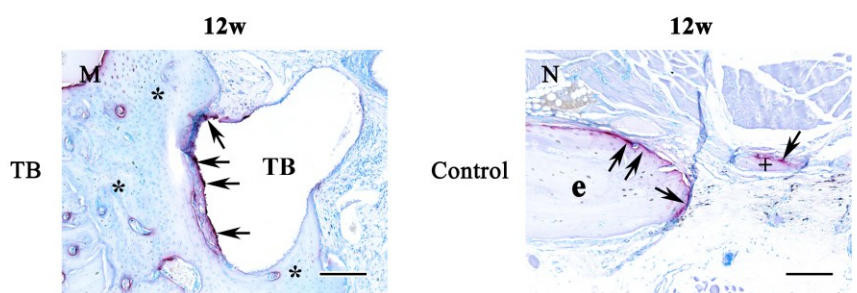
第 6 図 Runx2 免疫染色結果 Runx2 陽性反応を TB およびコラーゲン表面に認められた。  
 #: コラーゲン, \*: 新生骨, >: 陽性反応部位, TB: テトラボーン, +: 石灰化物, e: 既存骨. Scale  
 Bar = 200  $\mu$ m



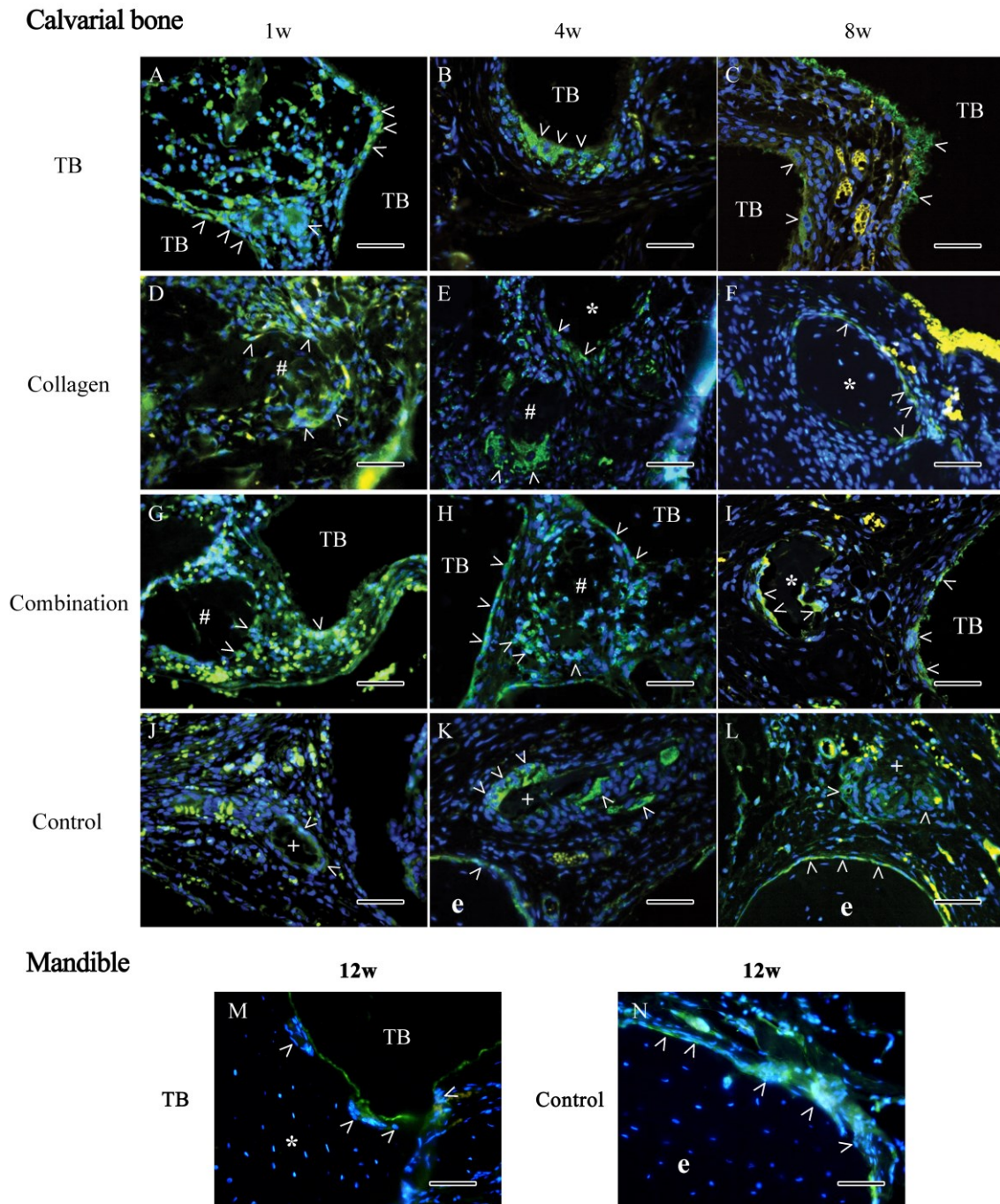
### Calvarial bone



### Mandible



第7図 TRAP 染色結果 TRAP 陽性反応を TB およびコラーゲン表面に認められた。  
 # : コラーゲン, \* : 新生骨, 矢印 : 陽性反応部位, TB : テトラボーン, + : 石灰化物,  
 e : 既存骨. Scale Bar = 200 μm



第 8 図 TGF-β免疫染色結果

#: コラーゲン, \*: 新生骨, >: 陽性反応部位, TB: テトラボーン, +: 石灰化物, e: 既存骨. Scale

Bar = 50 μm

Bone volume (mm<sup>3</sup>)

	1w	4w	8w
<b>TB</b>	2.68 ± 0.32	3.71 ± 0.35	3.98 ± 1.15
<b>Collagen</b>	0.76 ± 0.09	8.45 ± 0.92	9.20 ± 1.30
<b>Hybrid</b>	2.53 ± 0.66	7.98 ± 0.95	9.30 ± 1.93
<b>Control</b>	0.34 ± 0.03	1.51 ± 0.33	1.61 ± 0.46

第1表 頭蓋骨欠損モデルでの新生骨の定量的解析結果 (mean ± SD)

Bone volume (mm<sup>3</sup>)

	1w	12w
<b>TB</b>	1.11 ± 0.60	5.47 ± 0.70
<b>Control</b>	0.82 ± 0.16	2.72 ± 0.46

第2表 下顎骨欠損モデルでの新生骨の定量的解析結果 (mean ± SD)