

学位論文題名

骨髄液の移植が骨増生に及ぼす効果

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周組織再生療法として、組織再生誘導法やエナメル基質タンパクを用いた方法が臨床応用されているが、歯周組織欠損が広範囲に及んだ症例では十分な歯周組織再生が期待できないのが現状である。そこで近年、骨髄を再生医療に応用する研究が行われている。骨髄液中の間葉系幹細胞は増殖能が高く多分化能を有し、また骨髄液中には成長因子が含まれていることから、骨髄液を移植すると創傷治癒や組織再生を促進する可能性がある。加藤らは、骨髄穿孔部に線維化コラーゲン・熱変性コラーゲン複合体スポンジ (FC-HAC) を移植し、骨髄間質細胞や骨形成に働く細胞のスキヤホールドとして有効であることを報告している。この実験方法では、コラーゲンスポンジを骨髄穿孔部へ限局して移植したことから、スポンジ内に骨髄からの細胞や成長因子が常に供給される環境であった。スポンジに骨髄液を含浸させて、骨髄穿孔していない部位へ移植することで骨増生の促進が可能であれば、歯槽骨増生における臨床応用が広がる可能性があると考えた。そこで本研究では、穿孔していない骨体上に骨髄液を含浸させた FC-HAC を移植し、骨増生に及ぼす効果を検討した。

【材料および方法】

実験には、Wistar 系雄性ラット、10 週齢、計 24 匹を用いた。大腿部より皮膚切開を加えて大腿骨を露出させ、骨全周にわたり骨膜を剥離した。実験群は右側大腿骨にラウンドバーにて骨髄腔に穿孔し、滲出する骨髄液を 5×4×3mm の FC-HAC に十分含浸させ、同じラットの左側大腿骨骨体上に移植した。対照群は、生理食塩水を含浸させた FC-HAC を、左側大腿骨骨体上に移植した。術後 5、15 日で組織標本を作製し、H・E 重染色、bone sialoprotein(BSP)免疫染色を行い、組織学的観察を行った。また、骨髄液や骨髄細胞のスポンジへの含浸状態を調べるために、穿孔部からの骨髄液を含浸したスポンジ、あるいは生理食塩水を含浸させたスポンジを、移植せずに組織標本を作製した。組織学

的計測は、新生骨面積、残存 FC-HAC 面積について行った。統計学的分析は、Mann-Whitney の *U* 検定を用いた。

【結果】

1 組織学的観察結果

- 1) 移植前のスポンジ内部の組織像：骨髓液を含浸させたスポンジは、疎なコラーゲン構造の間に、多量の赤血球とともにヘマトキシリンに濃染した核をもつ細胞がスポンジ内部まで認められ、骨髓由来と考えられるメガカリオサイトが観察された。生理的食塩水を含浸させたスポンジは、疎なコラーゲン構造が観察された。
- 2) 術後 5 日：実験群、対照群ともに既存骨の表層に新生骨の形成はほとんど認められず、大部分の FC-HAC は残存していた。実験群は、残存 FC-HAC 内部に多数の紡錘形や楕円形の細胞が認められた。BSP は既存骨および新生骨の表層に発現する一方で、残存 FC-HAC 周囲の細胞の密な結合組織にも、部分的に発現しているのが観察された。対照群では、残存 FC-HAC 内部の細胞数は、実験群と比較して少なく、スポンジ辺縁部に紡錘形や楕円形の細胞が散在しているのが観察された。
- 3) 術後 15 日：実験群では、既存骨と連続して新生骨が観察され、FC-HAC の残存はわずかに認められた。新生骨は、改造線が不明瞭で骨小腔が広く未熟な構造を示し、骨基質内には骨芽細胞様細胞や破骨細胞様細胞が認められ、スポンジ内部には多数の楕円形や立方形の細胞、および血管の新生も観察された。対照群は、既存骨と連続して若干の新生骨の形成が認められ、FC-HAC が多く残存していた。新生骨は実験群と同様に、骨小腔の広い構造を示しました。FC-HAC 内部には、紡錘形や楕円形の細胞が観察されたが実験群に比較するとわずかでした。血管の新生はほとんど認められなかった。

2 組織学的計測結果

- 1) 新生骨面積：術後 5 日では、両群間に有意差は認められなかった。術後 15 日では、実験群が有意に高い値を示した。
- 2) 残存 FC-HAC 面積：術後 5 日では、両群間に有意差は認められなかった。術後 15 日では、実験群が有意に低い値を示した。

【考察】

本研究は、骨髓液を含浸させた FC-HAC をラット大腿骨上に移植した際の、

新生骨の形成について評価した。

組織再生にはスキャホールドが重要である。スキャホールドは細胞の分化と増殖のための基質を提供し、組織再生のためのスペースを確保し、細胞への酸素の供給と栄養素の供給路を確保するなどの役割を有している。本研究で用いた FC-HAC は、炎症反応が少なく生体親和性に優れているとの報告があり、2.5～5.0%の濃度の FC-HAC は良好な細胞侵入性と生体親和性を有しており、スキャホールドとして有効であることが報告されている。

本研究の結果、骨髓液を含浸させた FC-HAC を移植すると、含浸しないものに比較して骨増生が促進された。移植前の FC-HAC 内部に骨髓由来のメガカリオサイトが観察されたことから、骨髓液中の血清成分や細胞成分が保持されたことが明らかとなり、また、術後5日の実験群で FC-HAC 内部に細胞成分が大量に観察されたことから、FC-HAC に含浸した骨髓由来細胞が骨芽細胞に分化増殖して骨増生が促進された可能性が考えられた。しかし、一般に骨髓に含まれる細胞中の間葉系幹細胞の割合は、ヒト新生児で1/10,000であることが報告されており、FC-HAC 内部に観察された細胞が骨髓間葉系幹細胞が増殖したものであるかは不明であり、FC-HAC 内の細胞動態をさらに詳細に検討する必要があると思われた。

一方、実験群15日では FC-HAC 内部に血管新生が多く観察された。骨形成は血管構築が十分に行われ、組織内の酸素分圧が高いほど促進されることから、骨髓液による血管新生が促進され、血流が豊富になり良好な血液供給がなされた結果、骨増生が促進された可能性も示唆された。

また、実験群5日の BSP 免疫染色において FC-HAC 周囲に BSP の高い発現がみられた。したがって、FC-HAC 中に保持された骨髓液中の成長因子が、スポンジ周囲の骨や骨膜の細胞に作用して骨芽細胞に分化、増殖させ骨増生に効果的に働いた可能性も考えられた。

本研究の結果、コラーゲンスポンジに骨髓液を含浸させて移植すると、骨増生を促進することが明らかとなり、さまざまな部位に臨床応用できる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 浪 雅 光
副 査 教 授 吉 田 重 光
副 査 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

骨髄液の移植が骨増生に及ぼす効果

審査は主査、副査全員が一同に会して口頭で行った。はじめに申請者に対し本論文の要旨説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

歯周組織再生療法として、組織再生誘導法やエナメル基質タンパクを用いた方法が臨床応用されているが、歯周組織欠損が広範囲に及んだ症例では十分な歯周組織再生が期待できないのが現状である。そこで近年、骨髄を再生医療に応用する研究が行われている。骨髄液中の間葉系幹細胞は増殖能が高く多分化能を有し、また骨髄液中には成長因子が含まれていることから、骨髄液を移植すると創傷治癒や組織再生を促進する可能性がある。スポンジに骨髄液を含浸させて、骨髄穿孔していない部位へ移植することで骨増生の促進が可能であれば、歯槽骨増生における臨床応用が広がる可能性があると考えた。そこで本研究では、穿孔していない骨体上に骨髄液を含浸させたFC-HACを移植し、骨増生に及ぼす効果を検討した。

実験には、Wistar系雄性ラット、10週齢、計24匹を用いた。大腿部より皮膚切開を加えて大腿骨を露出させ、骨全周にわたり骨膜を除去した。実験群は右側大腿骨にラウンドバーにて骨髄腔に穿孔し、滲出する骨髄液を5×4×3mmのFC-HACに十分含浸させ、同じラットの左側大腿骨骨体上に移植した。対照群は、生理食塩水を含浸させたFC-HACを、左側大腿骨骨体上に移植した。術後5、15日で組織標本作製し、H・E重染色、bone sialoprotein(BSP)免疫染色を行い、組織学的観察を行った。また、骨髄液や骨髄細胞のスポンジへの含浸状態を調べるために、穿孔部からの骨髄液を含浸したスポンジ、あるいは生理食塩水を含浸させたスポンジを、移植せずに組織標本作製した。組織学的計測は、新生骨面積、残存FC-HAC面積について行った。統計学的分析は、Mann-WhitneyのU検定を用いた。

移植前のスポンジ内部の組織像は、骨髄液を含浸させたスポンジは、疎なコラーゲ

ン構造の間に、多量の赤血球とともにヘマトキシリンに濃染した核をもつ細胞がスポンジ内部まで認められ、骨髓由来と考えられるメガカリオサイトが観察された。術後5日において、実験群、対照群ともに既存骨の表層に新生骨の形成はほとんど認められず、大部分のFC-HACは残存していた。実験群は、残存FC-HAC内部に多数の紡錘形や楕円形の細胞が認められた。BSPは既存骨および新生骨の表層に発現する一方で、残存FC-HAC周囲の細胞の密な結合組織にも発現していた。術後15日では、実験群は、既存骨と連続して新生骨が観察され、FC-HACの残存はわずかに認められた。新生骨は未熟な構造を示し、骨基質内には骨芽細胞様細胞や破骨細胞様細胞が認められ、スポンジ内部には多数の楕円形や立方形の細胞、および血管の新生も観察された。対照群は、既存骨と連続して若干の新生骨の形成が認められ、FC-HACが多く残存していた。血管の新生はほとんど認められなかった。

以上の結果から、コラーゲンスポンジに骨髓液を含浸させて移植すると、骨増生を促進することが明らかとなり、さまざまな部位に臨床応用できる可能性が示唆された。

引き続き審査担当者と申請者との間で論文内容及び関連事項について質疑応答が行われた。

主な質問事項は、

- (1) FC-HACのコラーゲンの由来と抗原性について
- (2) FC-HACの吸収について
- (3) BSPの発現部位について
- (4) 新生骨の形について
- (5) 骨再生量を増加させるために必要なことについて
- (6) 幹細胞について

などであった。これらの質問に対し、申請者は適切な説明によって回答し、本研究の内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野についても十分な理解と学識を有していることが確認された。

本研究は、骨髓液含浸コラーゲンスポンジの移植が、骨増生を促進することを明らかとし、さまざまな部位に臨床応用できる可能性を示唆したことが高く評価された。本研究の内容は、歯科医学の発展に十分貢献するものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと審査担当者全員が認めた。