

学位論文

放射線照射後の骨欠損部に移植をおこなった骨髄由来間葉系幹細胞の機能

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程臨床生殖・
発達・再生医学領域専攻

近藤英司

(竹川政範・伊藤広也・柴山尚大・稲積実佳子・松田光悦)

[緒 言]

口腔悪性腫瘍の治療では放射線治療を行うことが多いが、照射後の骨創の治療は遅延し、放射線性顎骨壊死や感染を発症しやすく難治性である。またこれらの治療には、顎骨を切除し骨移植や人工骨移植が行われるが、患者の QOL は著しく低下する。

近年、体性幹細胞を用いた骨、軟骨、筋組織などの再生医療が飛躍的な進歩を遂げており、ES 細胞や iPS 細胞が話題となっている [1,2]。しかし ES 細胞や iPS 細胞に関しては、いまだ感染や腫瘍化のリスク、治療費の問題、倫理的問題などがあげられる。一方、臨床応用を考慮した場合、障害された組織を再生するために体性幹細胞を用いた治療に期待が高まっており、このような細胞治療は傷害された組織を再生するのみでなく、疾病治療や各種創傷の治療促進に応用することも期待されている [3-13]。

骨髄中には、造血系幹細胞とともに骨、軟骨、脂肪、筋へ分化可能な間葉系幹細胞が含まれている [14]。動物実験においても、間葉系幹細胞移植による骨形成の可能性が示されており [15]、臨床においては、下顎骨区域切除を施行した患者に、間葉系幹細胞移植による骨再生を行った報告 [11] や、上顎洞底挙上術への応用した報告 [12] がある。またマウス下肢虚血部への間葉系幹細胞移植による血流の回復ならびに血管新生促進が得られた報告 [10] や、急性心筋梗塞モデルに対する細胞移植により、血管新生、梗塞サイズの減少

が誘導できたという報告 [16]がある。

今回われわれは、放射線照射後の骨創の治癒に対する骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSCs) 移植の有用性と BMSCs の骨創治癒における機能を明らかにすることを目的として研究を行った。

【材料と方法】 (図 1)

1. 骨髄細胞の採取と培養

F344ラット(オス, 8週齢, 5匹; 三共ラボサービス INC, Tokyo, Japan) から無菌的に切離し摘出した大腿骨の骨端を切除し, 10% fetal bovine serum (GIBCO: Life technology Japan, Tokyo, Japan) と複合抗生物質 (streptomycin-penicillin-fungizone: GIBCO; : Life technology Japan, Tokyo, Japan) を含有した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)® (Sigma, St. Louis, U.S.A.) の標準培地を 20G 針付き注射筒に入れ骨髄を洗い出し, BMSCs の初代培養とした。両者とも初代培養は 1 週間継続し, その後, 0.2% トリプシンと 1mM EDTA で処理し (5 分間), 1×10^5 細胞/ml で再播種した。この継代で得た細胞を 2 週間培養し, 80% コンフルエントで継代培養を重ねた。第 2 継代目に達した後, 10% FBS, 10nM デキサメタゾン, 10nM β -グリセロリン酸, 82 μ g/ml ビタミン C を加えた骨芽細胞分化誘導培地において 2 週間培養を行った (分化 BMSCs)。同様に骨芽細胞分化誘導培地での培養を行わない間葉系幹

細胞（未分化 BMSCs）も準備した。

2. 実験動物

実験には F344 ラット雄，8 週齢を 72 匹使用した。放射線照射は Cs ガンマ線照射装置，Cs¹³⁷ 線源（Gammacell 40:Best Theratronics Co. Ltd. Canada）を用いて 15Gy の 1 回照射をそれぞれのラット頭部に行った。照射後 2 週目にネンブタール 100 μ l/100g による腹腔内麻酔下で，歯科用マイクロモーターと直径 4mm のトレフィンバーを用いて，ラット頭頂骨左右に直径 4mm の骨欠損部を作製した。

3. ラット頭頂骨骨欠損部への BMSCs の移植

3×10^5 個の BMSCs を直径 4mm のコラーゲンスポンジ（テルダーミス[®]，TERUMO, Tokyo, Japan）に播種させてそれぞれの骨欠損部に埋入した。骨分化誘導培地で培養した分化 BMSCs を移植した例を分化細胞移植群とし 23 匹のラットを使用，未分化 BMSCs を移植した例を未分化細胞移植群として同様に 23 匹のラットを使用した。対照は担体のみの埋入とし，26 匹のラットを使用し対照群とした。移植後 1, 2, 4 週目にそれぞれ 2~4 匹ずつ，各評価方法に合わせて試料を作製した。

4. 評価方法

① 放射線学的観察

欠損部の新生骨形成について軟 X 線発生装置

(Softex M-1005)を使用し、放射線学的に観察した。
移植床の骨欠損部面積の測定は ImageJ(National
institutes of Health Co. Ltd, USA)を使用した。統
計学的解析処理には Statview 5.0.software(Abacus
concepts, Berkeley, CA)を用い、p 値 <0.05 を統計学
的有意差ありとした。

② 血管鑄型の作製と観察

移植部周囲の血管再生を検討するために血管鑄型
注入剤(メタクリレート樹脂:メルコックス;大日
本インキ化学工業株式会社,Tokyo, Japan)を右心房
から生理食塩水による脱血後、血管内注入した。樹
脂の硬化後に頭頂骨を採取し、実体顕微鏡下で試料
から軟組織を除去、次いで5%NaOClを使用して脱有機
を行った。0.01M PBSで洗浄後0.1M 4酸化オスミウム
-PBSで後固定を行い、上昇エタノール系列で脱水、第
三ブチルアルコールで置換後に凍結乾燥(ID-2,EIKO
Engineering Co. Ltd., Mito, Japan)を行なった。
白金-金蒸着(E-1030 Ion Sputter, HITACHI Co.
LTD., Tokyo, Japan)の後、走査型電子顕微鏡(S
-4100, HITACHI Co. LTD., Tokyo, Japan)で観察し
た。

③ 骨表面の微細構造学的観察

4%パラホルムアルデヒドを用いて経心臓的に灌流固
定し、頭頂骨を採取した。資料は血管鑄型作製時と同

様に実体顕微鏡下で，試料から軟組織を除去し，次いで 5%NaOCl を使用して脱有機を行った．0.01M PBS で洗浄後 0.1M 4 酸化オスミウム-PBS で後固定をし，上昇エタノール系列で脱水，第三ブチルアルコールで置換後に凍結乾燥を行なった．白金-金蒸着の後，走査型電子顕微鏡により，骨表面の超微細形態を観察した

④ 組織学的観察

経心臓的に灌流固定後採取した頭頂骨を，10%EDTA 液を用いて脱灰し，エタノール系列による脱水後，水溶性プラスチック包埋材（JB-4，Polysciences INC.，Warrington，USA）に包埋した．3 μ m で薄切した後，ヘマトキシリン・エオジン染色を行い光学顕微鏡で観察した．

5. 免疫組織化学的検討

細胞は第2継代の未分化BMSCsを使用し，BrdUを添加した培養液中で2時間の培養を2回行った． 3×10^5 個の細胞を直径4mmの担体に播種して細胞移植に使用し，骨欠損部に埋入した（照射群）．対照群は，放射線照射を行わないで移植した群（対照群）とした．移植後1週目に試料を採取し，10%EDTA液により脱灰した後，パラフィン包埋をして6 μ m で薄切し，通法に従い脱パラフィン後に，0.3 %H₂O₂加メタノール溶液で20分間浸透させ，内因性ペルオキシダーゼ不活性化処置を行った．DNA変性を行なうために，4規定塩酸にて37℃，30分間処理をして硼酸・硼砂緩衝液（PH9.0）を用いて中和した．その後一

次抗体として抗BrdU抗体(Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA)を室温で60分間反応させた。次にABC法(VECTASTAIN®ABC KIT, Vector Laboratories, Inc., California, USA)により,二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体と30分反応させた。免疫組織化学的染色としてはDAB・H₂O₂(DAB SUBSTRATE KIT FOR PEROXIDASE, Vector Laboratories, Inc., California, USA)を基質として発色させた後に光学顕微鏡により骨創部位への抗BrdU抗体陽性細胞の局在を観察した。

【結果】

1. 放射線学的所見(写真1)

対照群の移植後1, 2週目では, 移植床辺縁部は形成した骨欠損部の形態と類似していたが, 4週目では辺縁から内方に向かって不透過像が僅かに認められた。細胞移植群では, 移植後1週目から, 分化, 未分化ともに骨欠損部の辺縁から連続して進展する広い面積の不透過像が認められ, 骨欠損部面積は形成された石灰化物により縮小していた。石灰化物は細胞移植4週目で, より著明に認められた。分化, 未分化細胞移植群の骨欠損部面積に明らかな差は認めなかった。4週目における骨欠損部を示す透過像の面積は細胞移植群が対照群に比較して小さく, 透過像面積の計測では

統計学的に 5%水準で有意差を認めた(図 2).

2. 超微細構造学的所見(レジン血管注入像)(写真 2-4)

対照群 1 週目: 脳硬膜側から骨欠損方向に向かう多数の毛細血管が認められた.

対照群 2 週目: 脳硬膜側の新生骨周囲に太い血管を僅かに認める. 1 週目よりも血管数は減少していた.

対照群 4 週目: 新生骨周囲に太い血管を認め, 血管数は 2 週目よりも減少していた.

分化細胞移植群 1 週目: 脳硬膜側から骨欠損方向に向かう毛細血管が多数みられる. 対照群と比較して血管数は多く認められた.

分化細胞移植群 2 週目: 脳硬膜側の新生骨周囲に太い血管を僅かに認める. 1 週目よりも血管数は減少していた. 対照群 2 週目と比較して血管数に差は認めなかった.

分化細胞移植群 4 週目: 新生骨周囲では部分的に毛細血管および太い血管を認めた. 血管数は 2 週目よりも増加していた.

未分化細胞移植群 1 週目: 脳硬膜側から骨欠損方向に向かう毛細血管が多数認められ, 骨欠損部を完全に充たしていた. 対照群 1 週目, 分化細胞移植 1 週目と比較して血管数は多く認められた.

未分化細胞移植群 2 週目: 脳硬膜側の新生骨周囲に毛細血管および太い血管を認めた. 1 週目よりも血管は

限局的に位置しており，その数は減少していた．しかし対照群や分化細胞移植群の 2 週目との比較では血管数は多くみられた．

未分化細胞移植群 4 週目：新生骨周囲に太い血管を僅かに認めた．血管数は 2 週目よりも著明に減少していた．

3 . 超微細構造学的所見（写真 5-7）

対照群 1 週目：SEM の低倍像で母骨の表面は骨新生がほとんど認められず，骨欠損作製時の形態に類似していた．拡大像で母骨表面は血管腔を認めず平坦であった．

対照群 2 週目：1 週目と同様に，母骨表面に骨新生はほとんど認められず，骨欠損作製時の形態に類似していた．拡大像では血管腔を伴った新生骨が僅かに認められた．

対照群 4 週目：SEM の低倍像で，大小さまざまな孔を伴った新生骨が骨欠損形成部周囲の脳硬膜側で見られたが，母骨表面は新生骨に被覆されていない部分もみられた．拡大像で新生骨は大小さまざまな血管腔を囲んだ梁状構造を示し，その表面には米粒状の石灰化物が不規則に並んでおり，膜性骨形成初期における多数の血管腔を伴った新生骨の形態を示した．

分化細胞移植群 1 週目：SEM の低倍像で，新生骨は骨欠損部形成部周囲の脳硬膜側から形成されていたが，

母骨表面の一部は，新生骨による被覆の無い部分が認められた．新生骨に被覆された部分では，その表面は平坦で血管腔が多数認められた．骨欠損部の面積は対照群よりも縮小していた．拡大像で大小不均一な血管腔が多数認められた．

分化細胞移植群 2 週目：SEM の低倍像で，新生骨は母骨全体を完全に被覆しており，対照群 2 週目，分化細胞移植 1 週目と比較してその新生骨表面は平坦で緻密な構造を示し，また血管腔も多数認められた．1 週目および対照群 2 週目と比較して，骨欠損部の面積は小さくなっていた．拡大像では，1 週目以上に大小の血管腔を認め，その表面の一部に成熟骨の形態を示していた．

分化細胞移植群 4 週目：SEM の低倍像で，新生骨は母骨全体を完全に被覆していた．新生骨表面は平坦で，大小さまざまな血管腔が混在し，その数は 2 週目と比較して減少していた．形成した骨欠損部の面積は 1，2 週目および対照群と比較して小さくなっていた．拡大像では，骨芽細胞窩が散在する成熟骨の骨面を示しており，その表面に広範囲の骨吸収窩がみられた．

未分化細胞移植群 1 週目：SEM の低倍像で，新生骨は骨欠損部形成部周囲の脳硬膜側から形成されていたが，母骨表面の一部は，新生骨による被覆の無い部分が認められた．新生骨に被覆された部分では，血管腔

を多数伴った平坦な表面を呈していた。骨欠損部の面積は対照群よりも縮小していたが、分化細胞移植 1 週目と差は認めなかった。拡大像で新生骨は均一で小さな血管腔を多数伴っていた。

未分化細胞移植群 2 週目：SEM の低倍像で、新生骨は母骨全体を完全に被覆しており、対照群 2 週目、未分化細胞移植 1 週目と比較してその新生骨表面はやや緻密な構造を示していた。また小さな血管腔が認められた。1 週目および対照群 2 週目と比較して、骨欠損部の面積は小さくなっていた。拡大像では、新生骨は大小の複雑な形態の石灰化物を伴う、すう疎な梁状構造で、均一な小さい血管腔が認められた。また、その周囲は成熟骨面を呈しており、その表面に骨吸収窩がみられた。

未分化細胞移植群 4 週目：SEM の低倍像で、新生骨は母骨全体を完全に被覆していた。新生骨表面は平坦で、血管腔を認めたが、その数は 2 週目と比較して減少していた。形成した骨欠損部の面積は 1, 2 週目および対照群と比較して小さくなっていた。拡大像では、新生骨表面に大小の血管腔が混在していた。また、骨芽細胞窩が散在する成熟骨の骨面を示しており、一部その表面に骨吸収窩がみられた。

4. 組織学的所見 (写真 8-10)

対照群 1 週目：母骨周囲には新生骨は認められず、血

管および細胞も少なかった。

対照群 2 週目：母骨の脳硬膜側から骨欠損方向に向けてわずかに新生骨を認めた。欠損部位周囲には大小の血管が認められた。

対照群 4 週目：母骨の脳硬膜側から骨欠損方向に向かって、わずかに新生骨が形成されていた。新生骨の骨梁は一部すう疎で内部に血管の侵入を認めた。新生骨の外側には大きな核を持つ類円形の細胞が存在していた。欠損内部では類円形の小さな炎症性細胞が集合し、その間に血管が存在していた。

分化細胞移植群 1 週目：母骨から骨欠損方向に向けて新生骨形成が認められた。新生骨の骨梁は比較的すう疎で内部に血管を認めた。新生骨周囲は骨芽細胞様の細胞が認められ、その間に小さな腔の血管が存在していた。

分化細胞移植群 2 週目：新生骨形成は母骨の脳硬膜側から骨欠損方向に向けて認められ、母骨を被覆するように形成されていた。新生骨の周囲は骨芽細胞様の細胞に縁取られており、骨梁は緻密で、内部の血管はわずかに認められた。

分化細胞移植群 4 週目：母骨の脳硬膜側から骨欠損部断端を被覆するように新生骨形成が認められた。新生骨は立方形の骨芽細胞様細胞に 1 列に縁取られ、その内部に比較的大きな血管を認めた。2 週目とほぼ同様

に骨欠損部に類円形の小さな細胞と血管が認められた。

未分化細胞移植群 1 週目：母骨の脳硬膜側から骨欠損方向に向けて新生骨形成が認められた。新生骨の外側に類円形の大きな細胞が存在した。新生骨の骨梁は緻密で血管が多数認められた。骨欠損部では類円形の小さな細胞が認められ、その間に多数の血管が存在していた。

未分化細胞移植群 2 週目：母骨の脳硬膜側から骨欠損方向に新生骨形成が認められた。新生骨の骨梁は緻密で、内部の血管は 1 週目と同様に多数認められた。新生骨の辺縁の形態は不整であり、その周囲は骨芽細胞様の縁取られていた。骨欠損部には類円形の小さな細胞が認められた。

未分化細胞移植群 4 週目：母骨の脳硬膜側から骨欠損部を完全に被覆するように新生骨形成が認められた。新生骨は骨芽細胞様細胞に 1 列に縁取られ、その骨梁は 2 週目よりも密で血管は少なかった。骨欠損部の類円形の小さな細胞と血管は 1, 2 週目と同様に多数認められた。

5. 免疫組織学的所見 (写真 11, 12)

DAB により発色した抗 BrdU 抗体陽性細胞は、BrdU 移植群では新生骨形成部周囲、新生骨内、および骨欠損内部の血管に多数分布していた。BrdU 対照群では

BrdU 陽性細胞は新生骨内および新生骨周囲に分布しており，骨欠損部の血管には認めなかった．

【考察】

放射線照射された骨の創傷治癒過程において肉芽組織の形成不良，骨形成の遅延などが確認されている^[17-29]．その機序として放射線照射が骨創部のアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の低下をもたらす^[26, 29]，破骨細胞の数が減少する^[29, 30]，さらには照射部位の毛細血管の増殖が低下し，血管再生の遅延を招く^[31]などの報告がある．骨組織中の ALP は活発な基質形成を営む骨芽細胞や未石灰化骨に強い活性を示すため，ALP 活性の低下は骨形成における基質形成や石灰化の低下を意味している．Takekawa ら^[32]は，放射線照射後 2 週目にラットの頭頂骨に欠損を形成し，同部に腸骨移植をおこなったところ，非照射群もしくは放射線照射後 4 週目に骨移植した群と比較して新生骨形成が抑制されることを報告し，放射線照射が血管再生と微小循環を障害したためとしている．本研究においても放射線照射後 2 週目に移植実験を行ったところ，過去の報告^[32]と同様に対照群では新生骨形成，血管新生ともに移植後 4 週経過しても抑制されていた．このように放射線照射後の骨組織は骨芽細胞や破骨細胞の増殖能や活動能の低下，骨周囲血管の形成不良を呈していると考えられる．

本研究では骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSCs) が多分化能を

有しているところに注目し，放射線照射後の骨創治癒に対する効果と治癒経過を検討した．さらに移植に使用した細胞は，骨芽細胞に分化させた BMSCs に加え，骨細胞への分化をはじめ血管新生が期待できる多分化能を有した未分化状態の BMSCs を用い検討した．本研究結果から，対照群は新生骨形成，血管新生ともに移植後 4 週経過しても抑制されていたが，幹細胞移植を行った実験群では著明な新生骨形成が見られた．さらに未分化幹細胞移植群と分化幹細胞移植群の間で，血管形成は未分化幹細胞移植群のほうが著明であったが，骨形成量に差は認めなかった．骨芽細胞へ分化した幹細胞移植群ではその骨芽細胞が骨新生を行っているが，未分化のまま移植した幹細胞は，骨芽細胞への分化だけでなく，血管内皮細胞への分化など多種の細胞へ分化し組織再生に関わった可能性が考えられる．このため骨芽細胞へ分化する幹細胞数が，分化誘導後に移植した場合と比較して少ないことが推察され，2 群間の骨形成能に差が出なかったものと考えられる．

通常組織損傷部において BMSCs は，一過性に出現して短期間のうちに組織破壊を食い止め，組織の修復・再生を促すために多種多様の成長因子やサイトカインを産生，分泌することが報告されている^[33-36]．このような細胞間情報伝達に関しては，今回は検討を行っていないが，本研究においても同様の現象が起こったものと推察された．

一般的に頭頂骨は膜内骨化を行う部位である．膜内骨化

が起こる場所は血管の発達のよい間葉組織で，血管に近接した間葉系細胞は結合し，細胞間隙はエオジン好性の基質が線維状に配列し血管の分布にしたがって網目状になり，骨小柱を形成する．さらにこの基質に近接した間葉系細胞は骨芽細胞へと分化する．骨芽細胞は骨基質の沈着と石灰化を行い，骨組織が形成される^{〔37〕}．天井ら^{〔38〕}はラット頭頂部の欠損部に骨芽細胞に分化した骨髓由来間葉系幹細胞を移植した場合には，移植後4週目に新生骨が出現し，8週後には顕著な骨増生を認めると報告した．彼らは同部において骨形成マーカーであるALP活性陽性細胞数が経時的に減少していたことから，細胞移植時にそのほとんどを占めていた骨芽細胞が骨形成することによって，ALP活性を有さない骨細胞へと移行したとしている．また，再生骨周囲に出現する破骨細胞数は，術後8週目に最大値を示したとし，これは，再生した骨が正常な骨代謝を営み，周囲骨との融合が進んでいく過程を表すと推察されている．本研究においては，骨新生の過程を走査型電子顕微鏡によって観察した．その結果，骨芽細胞へ分化した細胞移植においても，未分化のまま移植した場合においても，正常な膜性骨形成の形態^{〔39〕}を示し，さらに，幹細胞移植群では，照射した骨といえども早期に血管新生が進み，それに伴って新生骨形成と成熟骨への成長が確認された．

前述のごとく，放射線照射後にBMSCsの移植を行うと障害された血管形成および新生骨形成が改善することが明ら

かとなった。

骨形成の場での血管の存在は，特に骨芽細胞を形成するために必要であるが，本研究結果から骨芽細胞に分化誘導して移植した場合でも血管の形成が認められた。これは前述したように分化した骨芽細胞が血管新生を誘導するために必要な成長因子やサイトカインを産生，分泌した可能性があることに加えて，骨芽細胞分化誘導培地で培養した幹細胞においても未分化細胞が残存していた可能性もあると考えられる。

一方，未分化な BMSCs は分化した BMSCs と比較して血管形成を促進していることが確認できた。BrdU による BMSCs のトレーサー実験において，放射線照射群では，新生骨だけではなく，新生した血管にも存在が認められ，移植した未分化 BMSCs は血管形成細胞，骨形成細胞に分化・誘導されることが推測された。このことは未分化 BMSCs が多分化能を有している^[40]ため，骨形成細胞，血管形成細胞など骨形成に必要な細胞に分化し，放射線照射によって傷害された骨の創傷治癒に必要な細胞の供給源となって治癒を促進すると考えられた。しかし，放射線照射をしていない BrdU 対照群では創傷治癒に利用される細胞増殖能が正常であること，さらに骨芽細胞，血管形成細胞に分化する能力が低下していないことから，生体内での治癒機能が十分に働き，移植した細胞を必要としなかったと考えられ，放射線照射後の障害を受けた骨創に，BMSCs を移植することは，骨創

治癒を促進し，正常な骨形成に有用であると思われた．

移植された BMSCs は免疫作用，抗炎症作用および成長因子や細胞外分泌物の放出により創傷治癒を促進する作用などを有していると報告されている^[41,42]．さらに骨髄由来間葉系幹細胞移植による創傷治癒促進は，EGF や bEGF，VEGF，TGF- β などを分泌し血管新生，抗アポトーシス効果を局所でもたらすと考えられている^[43]．今後はこのような成長因子の存在やその内容に関して，更に検討する必要があると考えられた．

【結語】

骨髄由来間葉系幹細胞は放射線照射後の骨再生医療に有用であると考えられる．また，照射後の骨欠損部に移植した骨髄由来間葉系幹細胞は，骨形成細胞および血管形成細胞に分化することで骨形成および創傷治癒の改善に関与していることが明らかとなった．

参考文献

- 1) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282:1145-1147.
- 2) Takahashi, K. Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006; 126: 663-676.
- 3) 吉田 耕 治 : 再 生 医 療 最 新 技 術 と 産 業 化 へ の 動 き 心 筋 再 生 療 法 の 確 立 を め ざ し て . Bio ベ ン チ ャ ー 2003; 3: 38-39.
- 4) 岡 林 浩 嗣 , 津 島 誠 : 未 分 化 細 胞 か ら の 臓 器 形 成 の 現 状 と 展 望 . 東 京 歯 科 医 師 会 誌 2003; 51: 3-11.
- 5) 木 下 正 嘉 , 福 田 恵 一 : 再 生 医 療 臨 床 応 用 の 動 向 と 将 来 へ の 展 望 循 環 器 系 疾 患 に 対 す る 再 生 医 療 心 疾 患 に 対 す る 再 生 医 療 . 日 本 臨 床 2003; 61: 480-484.
- 6) 伊 藤 嘉 一 : 再 生 医 療 臨 床 応 用 の 動 向 と 将 来 へ の 展 望 感 覚 器 を 対 象 と し た 再 生 医 療 聴 覚 神 経 の 再 生 療 法 . 日 本 臨 床 2003; 61: 469-474.
- 7) 岡 田 誠 司 , 岡 野 栄 之 : 再 生 医 療 臨 床 応 用 の 動 向 と 将 来 へ の 展 望 脳 及 び 神 経 を 対 象 と し た 再 生 医 療 神 経 幹 細 胞 の 分 化 制 御 と 中 枢 神 経 再 生 医 療 . 日 本 臨 床 61:449-456.
- 8) 砂 掘 毅 彦 , 岡 野 栄 之 : ト ラ ン ス レ ー シ ョ ナ ル リ サ ー チ

の展開 大学発開発研究：ティッシュエンジニアリングから再生療法へ 神経系 幹細胞を利用した中枢神経系の再生. 最新医学 2003; 58: 102-107.

- 9) 大串始, 高倉義則: 間葉系幹細胞を利用した骨関節疾患治療. 実験医学 2003; 21: 161-165.
- 10) Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. N Engl J Med 2001; 344: 385-386.
- 11) Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmöller M, Russo PA, Bolte H, Sherry E, Behrens E, Terheyden H. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. Lancet 2004; 364: 766-770.
- 12) Schimming, R. Schmelzeisen, R. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. J Oral Maxillofac Surg 2004; 62: 724-729.
- 13) Zizelmann C, Schoen R, Metzger MC, Schmelzeisen R, Schramm A, Dott B, Bormann KH, Gellrich NC. Bone formation after sinus augmentation with engineered bone. Clin Oral Implants Res 2007; 18: 69-73.
- 14) Caplan, AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res 1991; 9: 641-650.

- 15) Yoshikawa, T. Ohgushi, H. Tamai, S. Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J Biomed Mat Res* 1996; 32: 481-492.
- 16) Gandia C, Armiñan A, García-Verdugo JM, Lledó E, Ruiz A, Miñana MD, Sanchez-Torrijos J, Payá R, Mirabet V, Carbonell-Uberos F, Llop M, Montero JA, Sepúlveda P. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells* 2008; 26: 638-645.
- 17) Stein M., Brady L.W, Raventos, A. The effects of radiation on extraction wound healing in the rat. *Cancer* 1957; 10: 1167-1181.
- 18) Chambers F., Ng E., Ogden, H., Coggs, G., Crane, J. Mandibular osteomyelitis in dogs following irradiation. *Oral Surg* 1958; 11: 843-859.
- 19) Frandsen A. M. Effects of roentgen irradiation of the jaws on socket healing in young rats. *Acta Odont Scand* 1962; 20: 307-33.
- 20) Shearer H. T. Effect of cobalt-60 radiation on extraction healing in the mandibles of dog. *J Oral Surg* 1967; 25: 115-121.
- 21) Zach L., Cohen G., Scopp I., Kaplan, G., Experimental radioosteonecrosis in Rhesus Macaque

jaws; Therapeutic irradiation dose effect on dental extraction wound healing. Am J Phys Anthropol 1970; 38: 325-330.

2 2) Horn Y., Sela M.N., Shlomi, B., Ulmanky, M., Sela, J. Effect of irradiation timing on the initial socket healing in the rat. Int J Oral Surg 1979; 8: 457-461.

2 3) 藤下昌巳：放射線治療による顎骨障害に対する研究． 歯放 1980; 20: 237-261.

2 4) 鈴木章敬：電子線照射が抜歯創に及ぼす影響に関する研究—抜歯後照射について—． 日大歯学 1983; 57: 1142-1150.

2 5) 清水武文：放射線照射が抜歯窩に及ぼす影響に関する研究． 日大歯学 1982; 56: 253-261.

2 6) 飯塚正：放射線照射ラットの抜歯創治癒過程に関する形態学的研究． 歯基礎誌 1984; 26: 733-744.

2 7) 桜井徹：下顎骨の放射線障害に関する実験的研究—特に抜歯の影響について—． 九州歯会誌 1987; 41: 660-675.

2 8) 堀中昌明：放射線照射後の抜歯創治癒過程に関する実験的研究． 鶴見歯学 1991; 17: 151-167.

2 9) 岩田洋，那須優則，他：ラット上顎臼歯抜歯創治癒に対する放射線の影響． 口科誌 2001; 50:

155-161.

- 30) Tsay, P., Chen, M.H., Owen, O.J. Osteoclast activation and recruitment after application of orthodontic force. *Am J Orthod* 1999; 115: 323-330.
- 31) Reinhold, H.S., Buisman, G.H. Radiosensitivity of capillary endothelium. *Br J Radiol* 1973; 46: 554-57.
- 32) Takekawa, M., Matsuda, M., Ohotubo, S. Effect of irradiation on autogenous bone transplantation in rat parietal bone. *Histol Histopathol* 2000; 15: 7-19.
- 33) Noel, D., Caton, D., Roche, S., Bony, C., Lehmann, C., Casteilla, L., Jorgensen, C., Cousin, B. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res* 2008; 314: 1575-1584.
- 34) Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., Middleton, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, Differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells* 2007; 25: 2739-2749.
- 35) Stoicov, C., Li, H., Liu, J.H., Houghton, J. Mesenchymal stem cells utilize CXCR4-SDF-1 signaling for acute, but not chronic trafficking to gastric mucosal inflammation. *Dig Dis Sci* 2013; 58: 2466-2477.

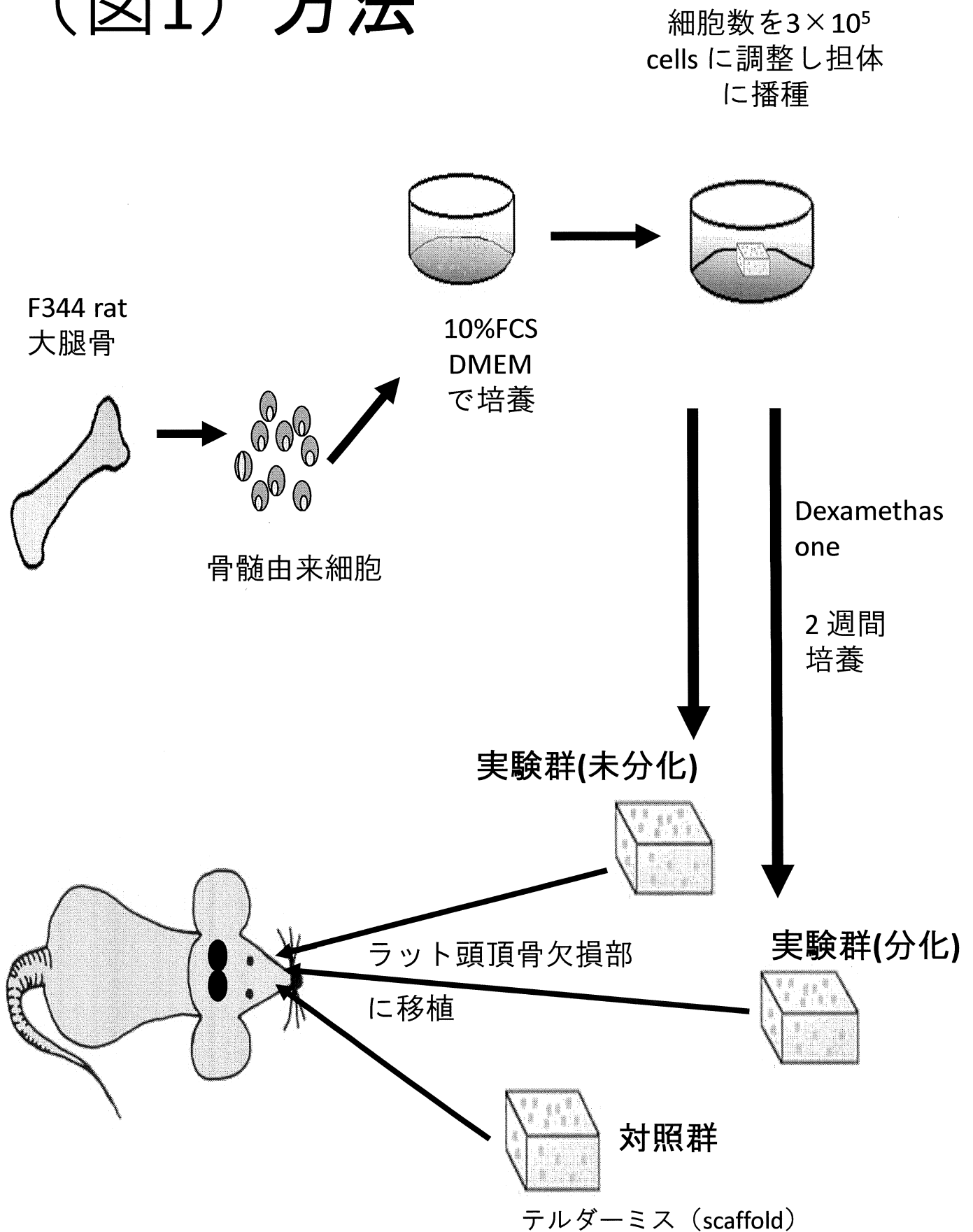
- 36) Singer, D.D., Singer, A.J., Gordon, C., Brink, P. The effect of rat mesenchymal stem cells on injury progression in a rat model. *Acad Emerg Med* 2013; 20: 398-402.
- 37) 小澤英浩. 骨の組織発生と成長[骨の科学]. 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明編, 医歯薬出版株式会社, 東京 1986: pp65-76.
- 38) 天井薫, 加来真人, 河田俊嗣, 富麻愉衣子, 山中克之, 辻紘一郎, 加藤幸夫, 丹根一夫. ラット正中矢状縫合部骨欠損へ移植した骨髄由来間葉系幹細胞の骨再生誘導能. *広歯誌* 2008; 40: 106-111.
- 39) Boyde, A., Hobdell, M.H. Scanning electron microscopy of primary membrane bone. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1969; 99: 98-108
- 40) Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswai, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
- 41) Morishita, T., Honoki, K., Ohgushi, H., Kotobuki, N., Matsushima, A., Takakura, Y. Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients'

mesenchymal stem cells. *Artif Organs* 2006; 30:
115-118.

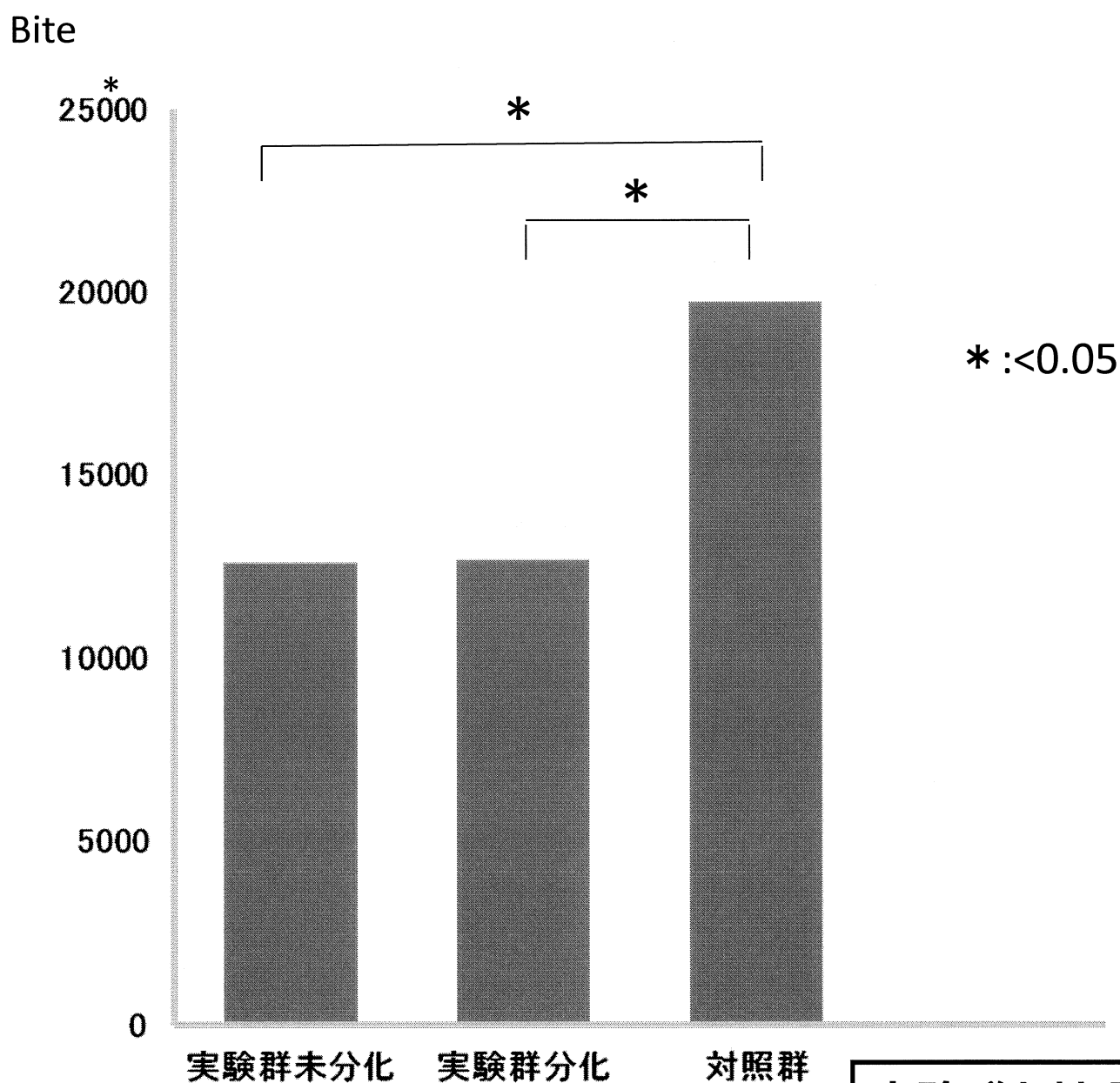
42) Ohgushi, H., Kotobuki, N., Funaoka, H., Machida, H.,
Hirose, M., Tanaka, Y., Takakura, Y. Tissue engineered
ceramic artificial joint-ex vivo osteogenic
differentiation of patient mesenchymal cells on total
ankle joints for treatment of osteoarthritis.
Biomaterials 2005; 26: 4654-4661.

43) Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Meifeld-Clauss, S.,
Tamm-Grove, C.J., Bovenkerk, J.E., Pell, C.L.,
Johnstone, B.H., Considine, R.V., March, K.L. Secretion of
angiogenic and antiapoptotic factors by human
adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109:
1292-1298.

(図1) 方法



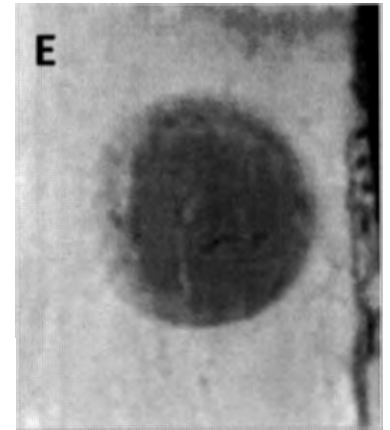
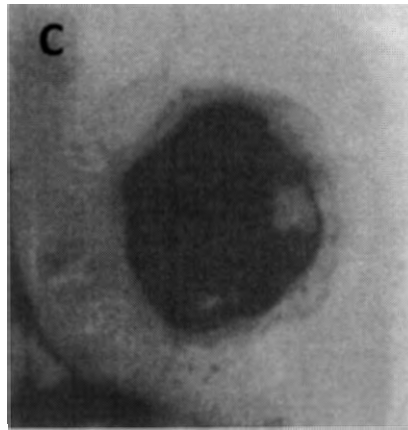
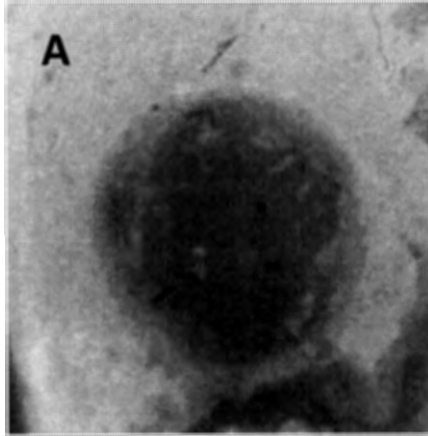
(図2) 軟X線写真による 骨欠損部面積の測定



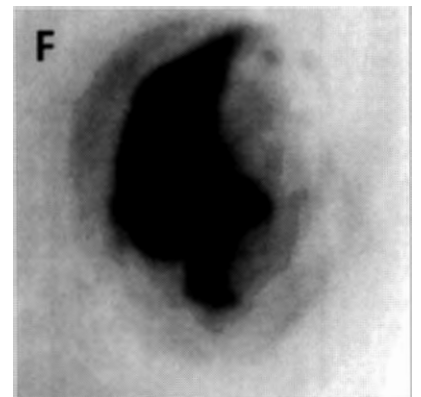
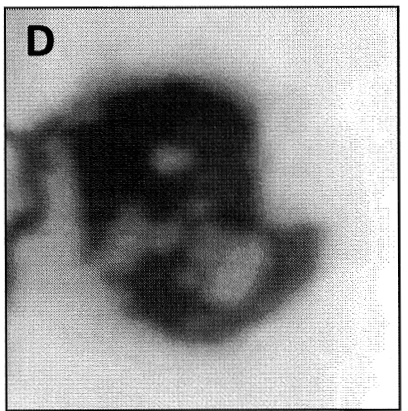
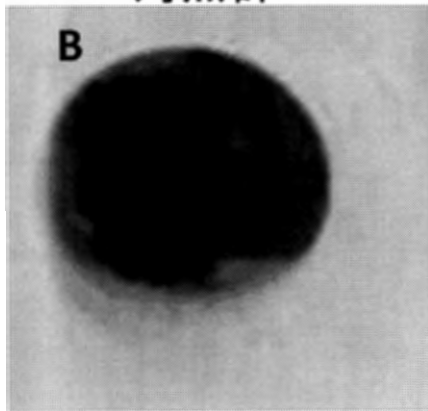
実験群と対照の間には5%水準で有意差あり

写真1 軟X線写真

1週目 対照群 分化細胞移植群 未分化細胞移植群



4週目 対照群 分化細胞移植群 未分化細胞移植群

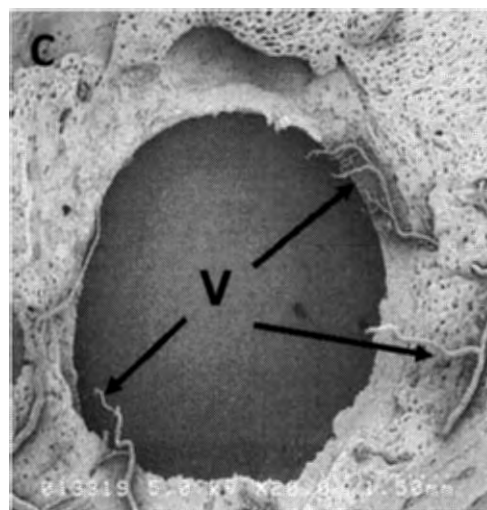
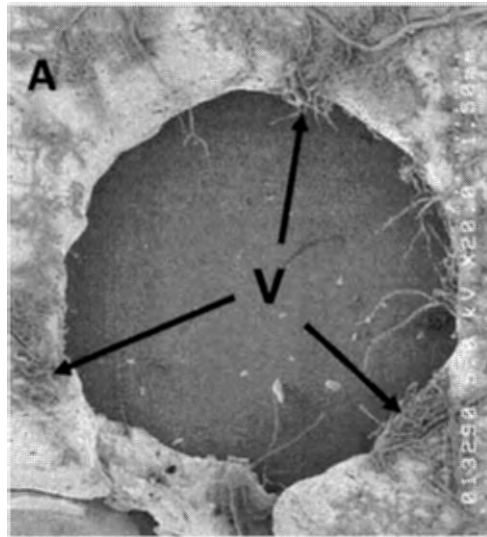


対照群: 移植後1週目(A)では、移植床辺縁部は骨欠損部の形態と類似していたが、4週目(B)では辺縁から内方に向かってわずかに不透過像が認められた。

細胞移植群: 移植後1週目において分化(C)、未分化(E)ともに骨欠損部の辺縁から不透過像が認められ、骨欠損部面積は縮小していた。

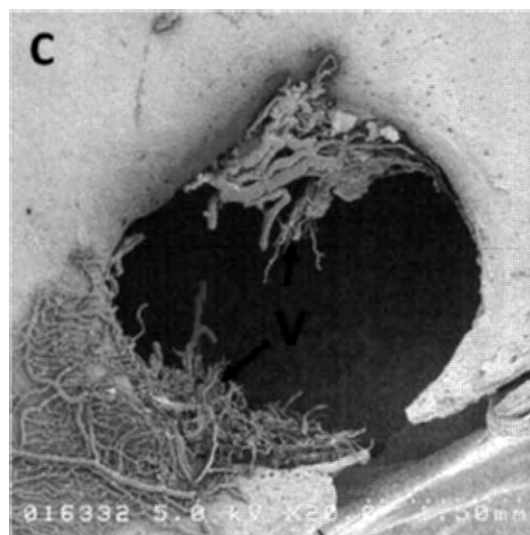
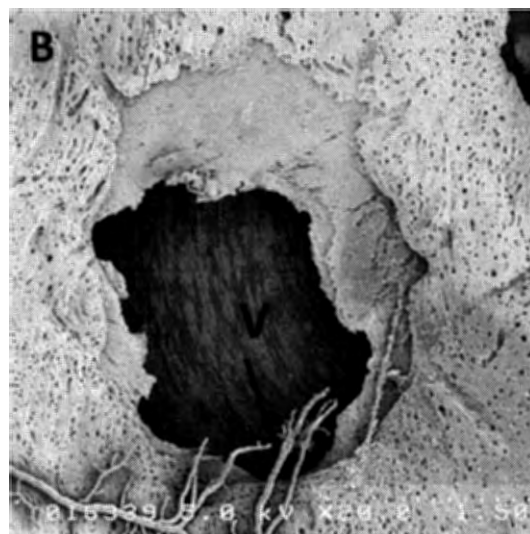
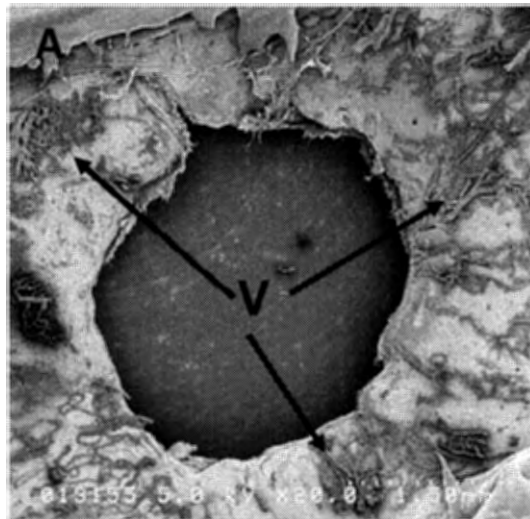
石灰化物は細胞移植4週目で分化(D)、未分化(F)ともに骨欠損部面積はより縮小していた

写真2: レジン血管注入像 対照群



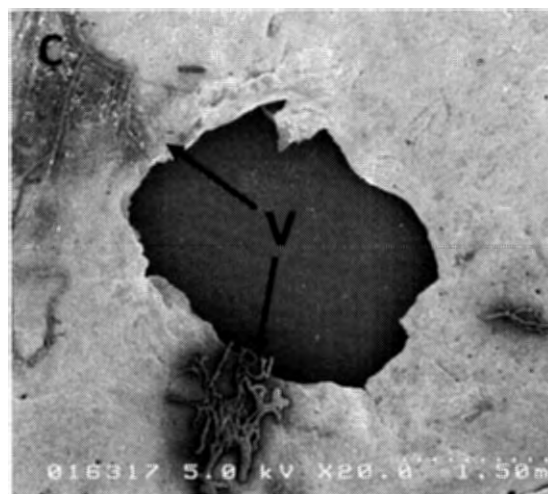
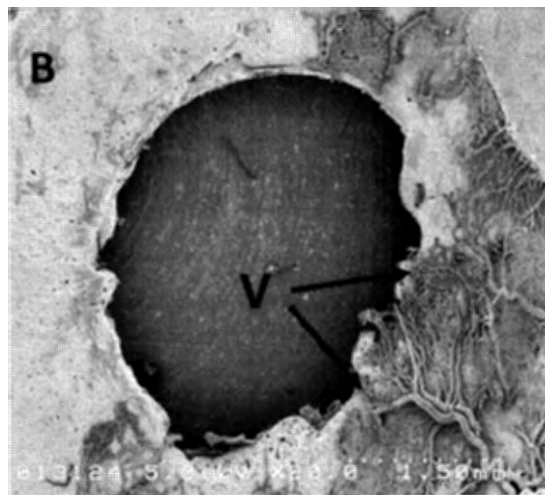
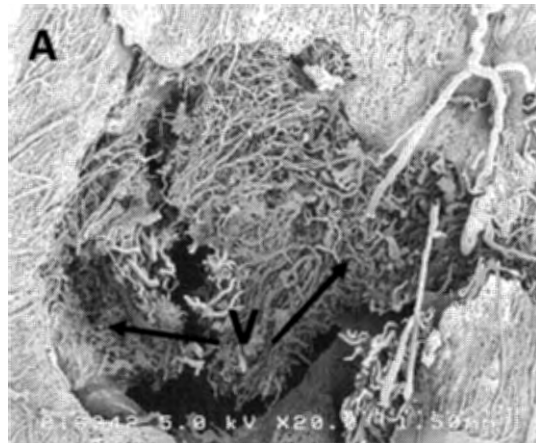
(A): 対照群1週目では脳硬膜側から欠損部に向けての血管(V)を認める.
(B,C): 対照群2, 4週目においても血管は僅かに認める程度であった.

写真3: レジン血管注入像 分化細胞移植群



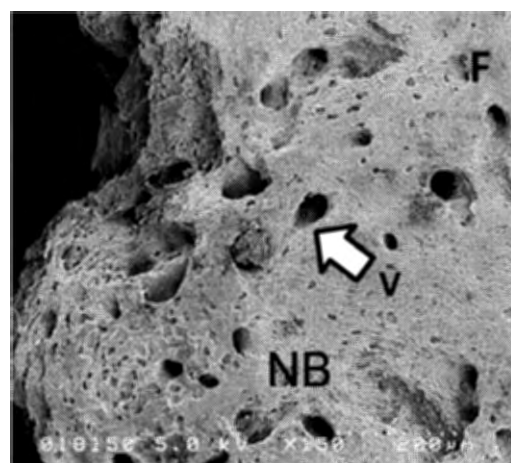
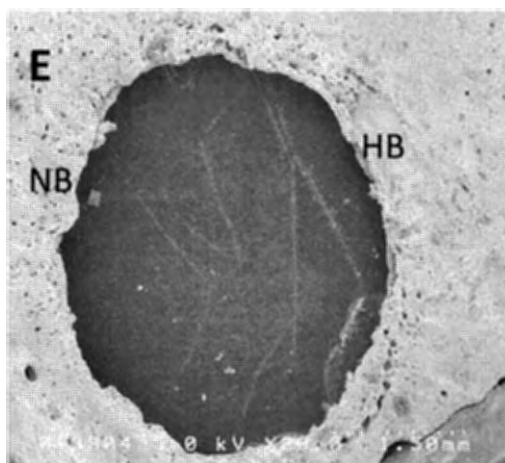
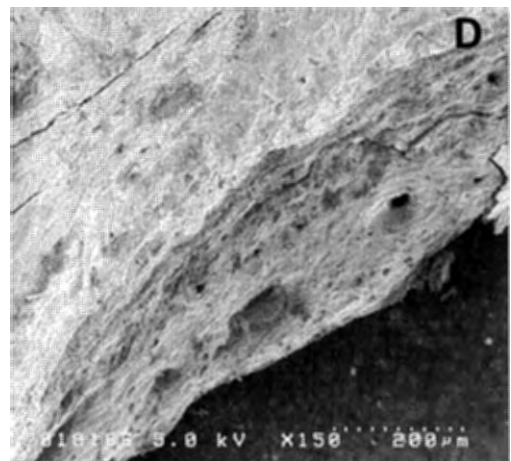
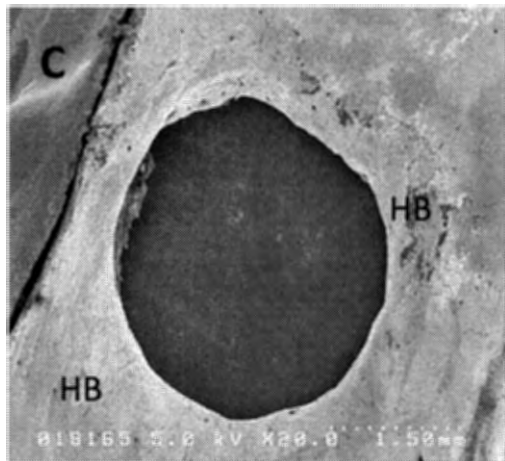
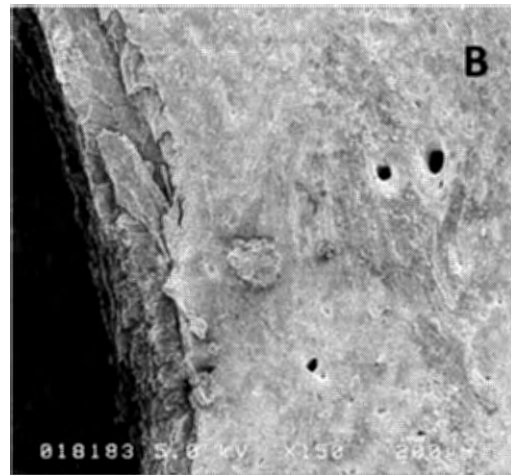
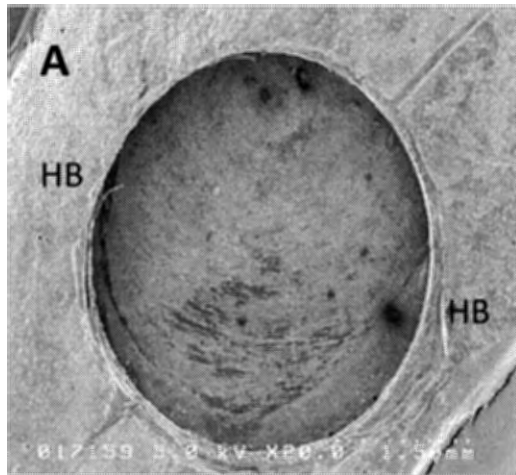
(A): 分化細胞移植群1週目では脳硬膜側から欠損部に向けて多数の血管(V)を認める. (B): 2週目では血管は僅かに認める程度であった. (C): 4週目では血管は増加していた.

写真4: レジン血管注入像 未分化細胞移植群



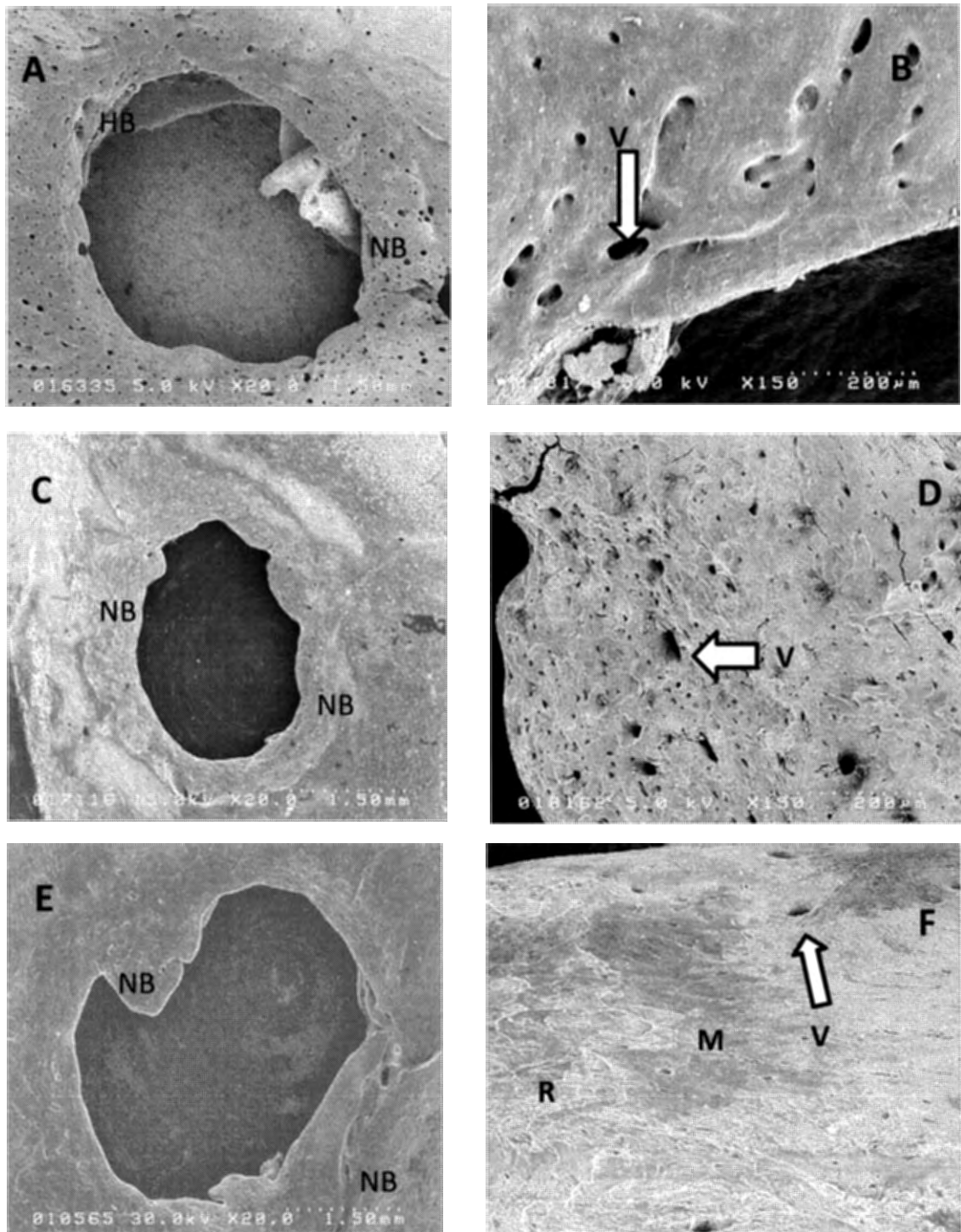
(A): 未分化細胞移植群1週目では脳硬膜側から欠損部に向けて多数の血管(V)を認める. (B): 2週目においても血管を多く認めた. (C): 4週目では血管は僅かに認める程度であった

写真5: 走査型電子顕微鏡像 対照群



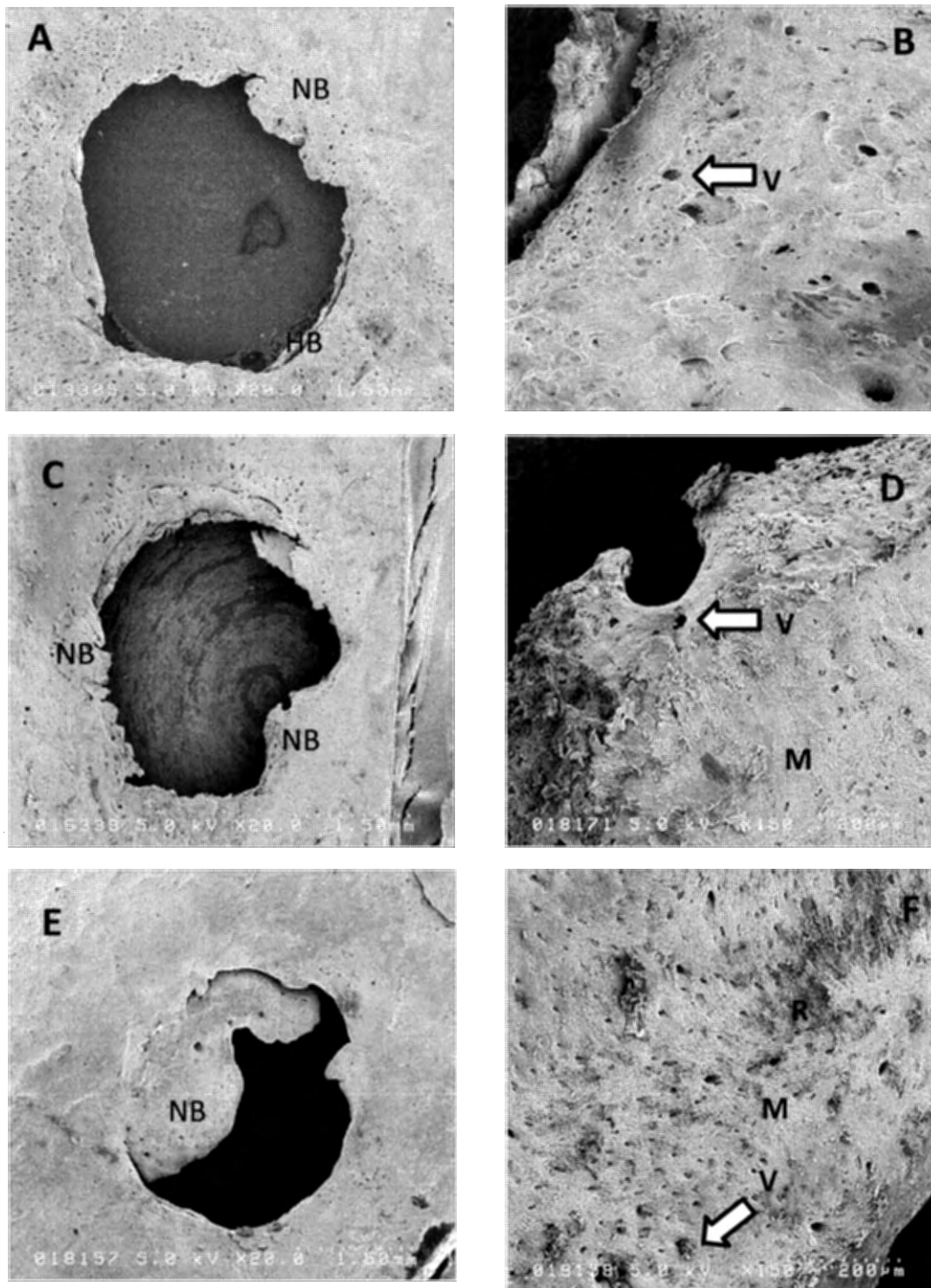
A,C,E: 弱拡大. B,D,F: 欠損辺縁部の強拡大
(A,B,C,D): 1, 2週目では母骨周囲(HB)に骨新生はほとんど認めなかった.
(E,F): 4週目では欠損側周囲に大小の血管腔(V)を伴い新生骨(NB)が形成されていた.

写真6: 走査型電子顕微鏡像 分化細胞移植群



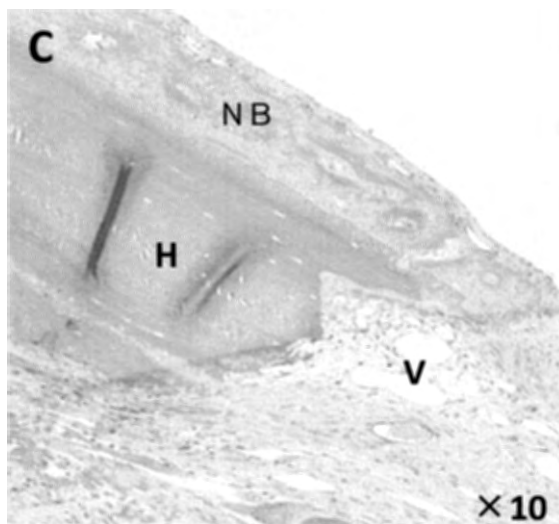
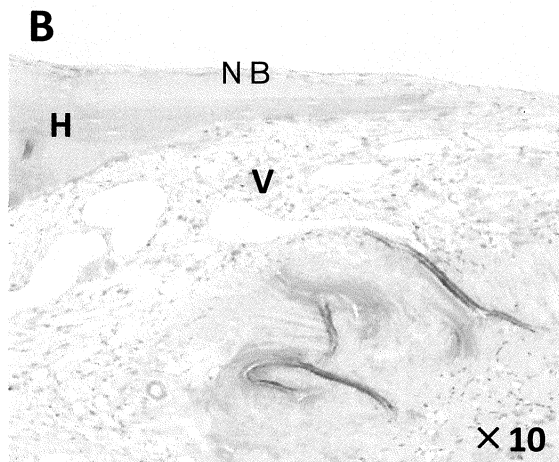
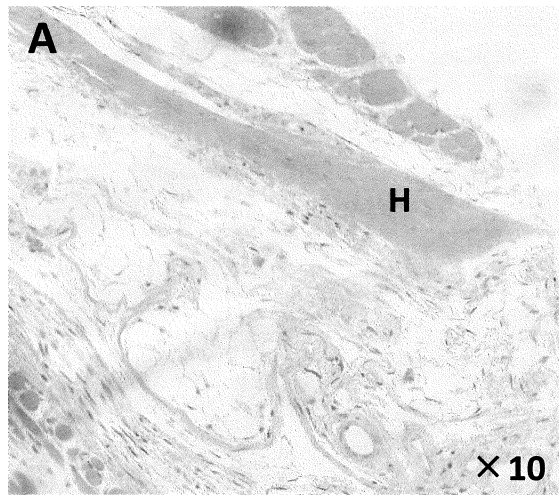
A,C,E: 弱拡大. B,D,F: 欠損辺縁部の強拡大
(A): 1週目では新生骨(NB)で母骨(HB)のほとんどを覆っていた. (B): 新生骨面に
大小の血管腔(V)を認めた. (C,D): 2週目では血管腔(V)を認め骨欠損部面積が
縮小していた. (E,F): 4週目では成熟骨面(M)や広範囲な骨吸収窩(R)を認めた.

写真7: 走査型電子顕微鏡像 未分化細胞移植群



A,C,E: 弱拡大. B,D,F: 欠損辺縁部の強拡大
(A):1週目では新生骨(NB)でほとんど母骨(HB)を覆っていた。(B):新生骨は大小の血管腔(V)を認めた。(C,D):2週目ではすう疎な梁状構造を認め骨欠損部面積が縮小していた。(E,F):4週目では成熟骨面(M)や骨吸収窩(R)を認めた。

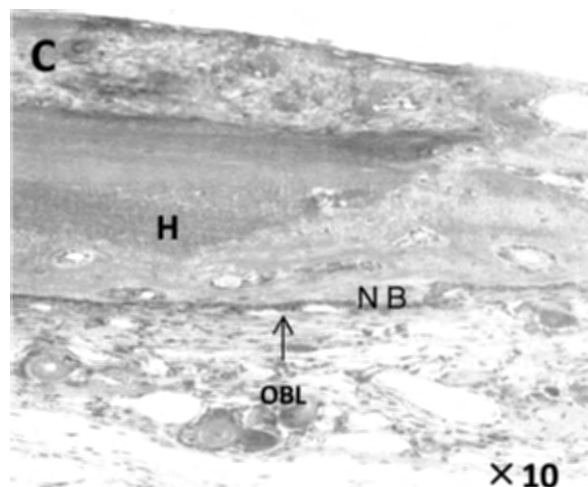
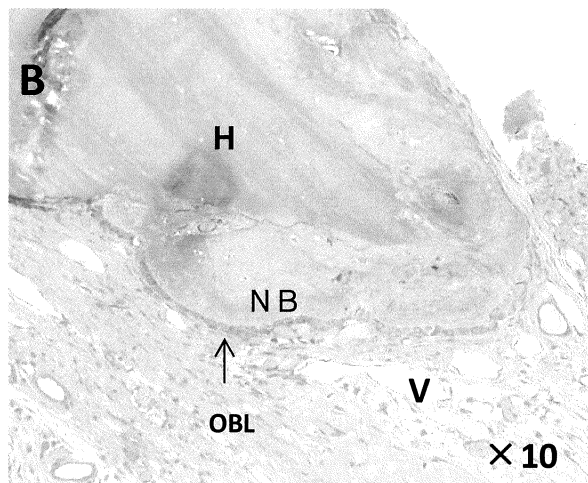
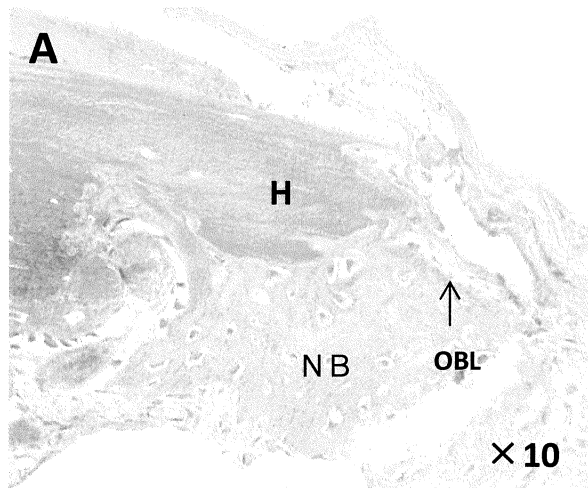
写真8 光学顕微鏡像 対照群



(A): 対照群1週目では骨新生はほとんど認めなかった.

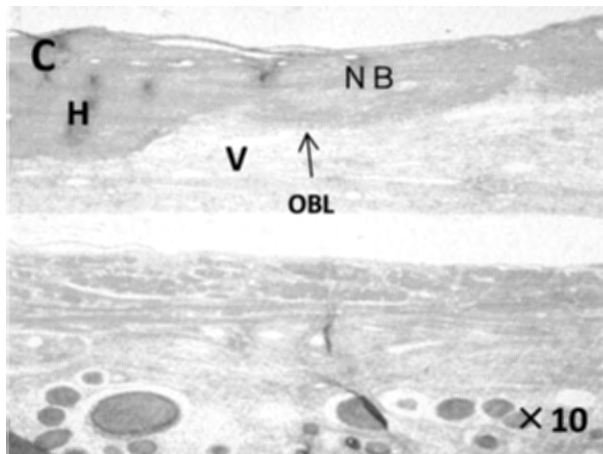
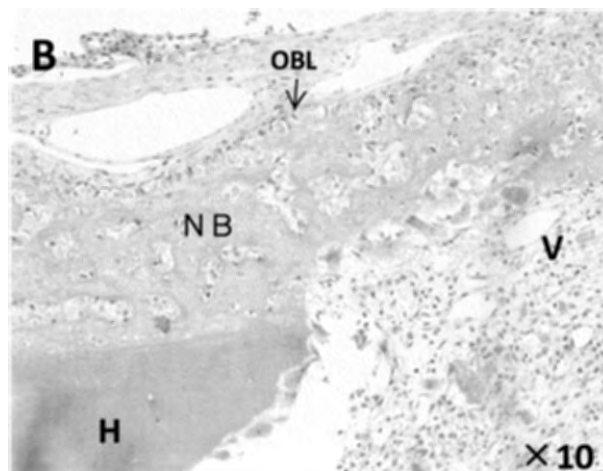
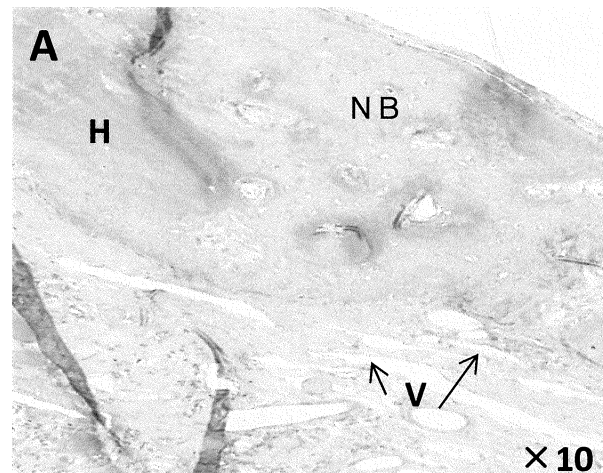
(B,C): 2,4週目では母骨周囲で新生骨がわずかに形成されていた.

写真9 光学顕微鏡像 分化細胞移植群



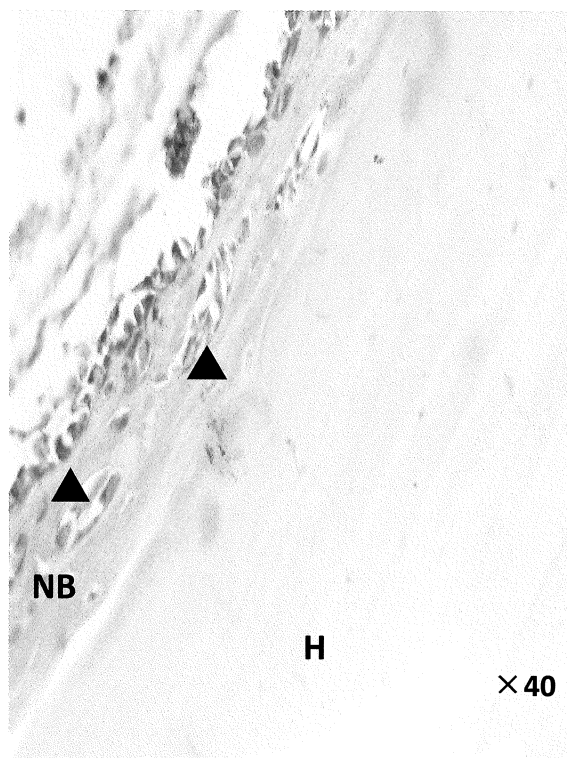
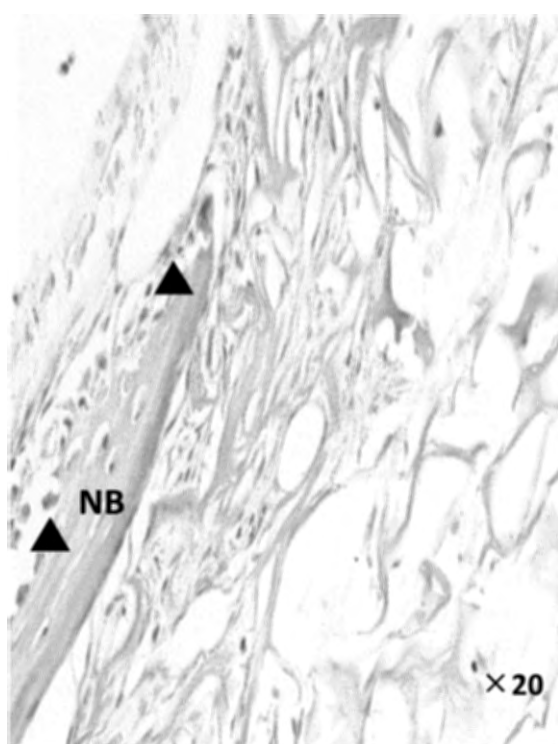
(A): 細胞移植群1週目で骨芽細胞(OBL)に囲まれた,内部に血管を伴う骨新生を認めた. (B,C): 2,4週目において新生骨内の血管減少と骨の緻密化が見られた. 骨芽細胞はやや扁平化し、規則的に配列している.

写真10 光学顕微鏡像 未分化細胞移植群



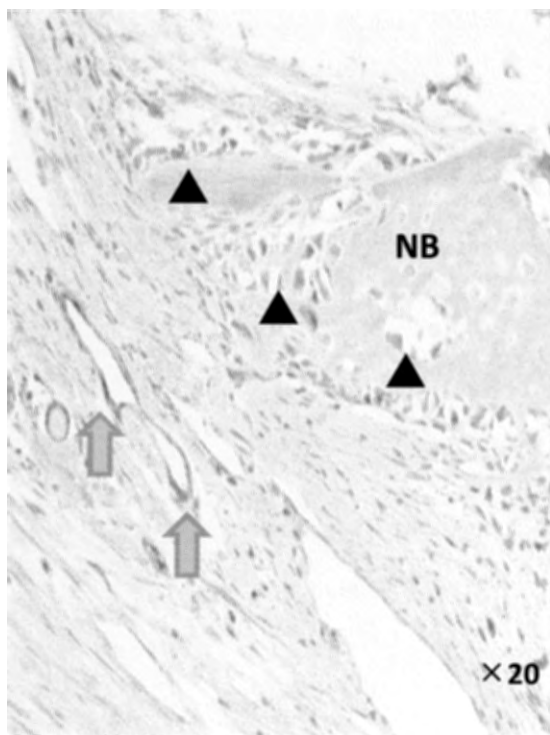
- (A): 移植後1週目から骨新生を認め、周囲に多数の血管(V)を認めた。
(B): 2週目では骨芽細胞(OBL)に囲まれた旺盛な骨新生を認める。
(C): 4週目において欠損部を覆うように緻密な新生骨が認められた。

写真11 光学顕微鏡像 免疫染色後 対照群



BrdU陽性細胞(▲で示す)は新生骨内および新生骨周囲に見られるが、骨欠損部の血管には見られない

写真12 光学顕微鏡像 免疫染色後 細胞移植群



BrdU陽性細胞(▲で示す)は新生骨内および新生骨周囲に見られる。

骨欠損部では血管にBrdU陽性細胞(↑で示す)を認める。