

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	大坪誠治
-------	----	----	------

学位論文題目

Angiogenesis after Sintered Bone Implantation
in Rat Parietal Bone

(ラットの頭頂骨における焼成骨移植後の血管形成)

共著者名: 松田 光悦、竹川政範

Histology and Histopathology,
Vol. 18, No. 1 : 153-163, 2003

研究目的

焼成骨は天然の骨組織から得られた骨移植材料である。この材料は骨の組成や骨構造を自然な形で保存した天然のヒドロキシアパタイトであり、有機成分がないため同種骨移植などにおいても免疫反応を引き起こさず、さらに生体親和性や骨伝導性において優れた代用骨といわれている。われわれがこれまで行ってきた各種骨移植材料を用いた移植後の形態学的研究においても、焼成骨は新生骨との癒合、置換に関して最もすぐれた成績を示していた (Matsuda et. al., 1995)。

骨移植後の治癒において、一般的に移植部位の血管新生と血流再開は移植後の新生骨形成と骨吸収、そして母骨との癒合にきわめて重要であるといわれている。焼成骨移植が他の骨移植材料に比較してすぐれた成績を示したのは、天然の骨から作製された本材料には骨髓と血管新生のための自然な構造が保存されているなど、人工の移植材料と比較して移植後の血管新生と骨形成に有利な環境であるためと推察される。

本研究の目的は、この仮説を証明することであり、そのために新鮮自家骨移植と合成ヒドロキシアパタイト移植をコントロールとして、各骨移植後の微小血管腐食鑄型を作成し走査型電子顕微鏡を用いて詳細な血管新生について観察した。さらに血管新生とその成長について光学顕微鏡と免疫組織化学的手法を用いてコントロール群との比較検討を行った。

方 法

実験動物

115匹のSD系ラット、雄（生後7週令、体重約150g）を本研究に使用した。

移植材料の準備

焼成骨の作製に3匹のSD系ラットを使用した。頭頂骨を切除後、骨表面の除蛋白を目的として、1%NaOHと1%H₂O₂(1:1)の混合溶液に浸漬させた(室温、3時間)。電気炉(Automatic Precision Muffle Furnace., Thomas Scientific Co., Ltd. Tokyo, Japan)を用いて、一次焼成(600°C、4時間)を行い、引き続き二次焼成(1100°C、3時間)を行った後、自然冷却した。焼成骨はあらかじめ約2×3mmの大きさに調整し、4°Cで保存した。比較研究のための合成ヒドロキシアパタイトはアパセラム(APACERAM, porous and dense type., Asahi Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan)を使用した。

移植方法と試料作成

頭頂骨を約2×3mmの大きさに脳硬膜を損傷しないように低速の歯科用エンジンを用いて移植床を作成した。実験群には焼成骨を、コントロール群には合成のヒドロキシアパタイトと新鮮自家頭頂骨を各移植床に移植した。

移植後4,7,14,21日目に、以下のように試料を作成した。

走査型電子顕微鏡観察：ペントバルビタール(40mg/kg)腹腔内麻酔下で開胸後、経心臓的に約20mlのMercoxを手動で注入した。室温で1時間放置し、60°Cの温水中で完全に重合させた。5%次亜塩素酸ナトリウムを用いて軟部組織を溶解させ、微小血管腐食鋳型を蒸留水で注意深く洗浄した後、1%オスミウムを用いて後固定を行った。臨界点乾燥後、真空装置内で白金蒸着し、走査型電子顕微鏡(S-4100, HITACHI, Co., Ltd., Tokyo, Japan)で観察した。

光学顕微鏡的観察：ペントバルビタール(40mg/kg)腹腔内麻酔下で開胸後、経心臓的に1.25%のグルタルアルデヒドと4%のパラホルムアルデヒド(0.1mol/l PBS、pH7.4)の混合固定液で20分間灌流固定した。GMA樹脂に包埋した後、3μmの薄切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った後、光学顕微鏡で観察した。

免疫組織化学的観察：ペントバルビタール(40mg/kg)腹腔内麻酔下で開胸後、経心臓的に4%パラホルムアルデヒド(0.1mol/l PBS、pH7.4)で灌流固定し、摘出した試料を10%EDTA液で10日間脱灰後、パラフィン包埋した。5μmの連続切片を作成し、脱パラフィン後、Vectastain ABC rabbit IgG kit (Vector Laboratories INC.)を用いてAvidin-biotin-peroxidase complex法に従い、免疫組織学的染色を行った。一次抗体に200倍希釈の抗VEGF抗体および200倍希釈の抗TGF-β1抗体(Santa Cruz Biotechnology)を用いて反応を行った。コントロールは上記の一次抗体の代わりに正常ウサギIgGを使用した。対比染色(ヘマトキシリン)を行い、光学顕微鏡で観察した。

成 績

1. 走査型電子顕微鏡観察

新鮮自家骨移植と焼成骨移植群では経時的観察において類似した結果を得た。すなわち、移植初期には大小さまざまな球状、棒状の未熟な新生血管が認められ、それらは次第に分枝、融合し均等な太さになり血管網を形成していた。移植後 21 日目では血管は成熟しその数は減少していた。合成ヒドロキシアパタイト移植群では、初期には大小さまざまな新生血管が気孔内に侵入していたが、新鮮自家骨移植や焼成骨群に比較して成熟した血管に乏しく、移植後 21 日目になっても未熟な血管が多数存在していた。

2. 光学顕微鏡観察

新鮮自家骨移植と焼成骨移植群では、移植初期から多数の新生血管が認められた。成熟とともに血管の数は減少し、21 日目には太さも均一になっていた。合成ヒドロキシアパタイト移植群では、移植後 7 日目では多数の新生血管が認められた。しかし移植後 21 日目においても、多数の血管において大きさが不均一であり未熟なままであった。

3. 免疫組織化学的観察

新鮮自家骨移植および焼成骨移植群で、VEGF 蛋白は移植後早期に出現し、それらは TGF- β 蛋白の出現と平行して減少していた。合成ヒドロキシアパタイト移植群では、TGF- β 蛋白が早期に出現していた。ヒドロキシアパタイト移植群の VEGF 蛋白は遅れて出現し、21 日目でも気孔周囲に存在していた。

考 案

一般に、創傷治癒における血管再形成は、内皮細胞から発芽することによって既存の微細血管から新しい毛細血管を形成する血管新生の過程を示すといわれている。本研究における走査型電子顕微鏡や光学顕微鏡での観察により、新鮮自家骨移植後の再血管形成は一般の創傷治癒と同じ過程を呈することが明らかになった。焼成骨移植では、再血管形成の過程は形態的にも時間的にも新鮮自家骨移植群に類似していた。焼成骨にはもともと血管の存在していた自然な構造や無機組成が保存されており、これらの差が血管の新生と成熟に有利に働いたものと思われた。しかし、合成ヒドロキシアパタイト移植群では、移植後 21 日目でも合成ヒドロキシアパタイトの気孔内に未熟な新生血管が存在し、その成熟や伸展など血管新生の一般的な過程が阻害されていた。

これらのことから移植材料の構造は、移植後の新生骨形成や移植材料の結合に重要な役割を持つ血管形成に影響を与えることが示唆された。

免疫組織化学的には、新鮮自家骨移植および焼成骨移植で、VEGF 蛋白は移植後早期に出現し血管形成を誘導した。VEGF 蛋白は TGF- β 蛋白の出現と平行して減少し、血管新生は徐々に成熟過程へ移行した。合成ヒドロキシアパタイト移植では、TGF- β 蛋白は早期に出現していたが、VEGF 蛋白は比較的遅れて出現し、21 日目でも気孔の周囲に存在していた。さらに内皮細胞の増殖と遊走は継続しており、血管の成熟はみられなかった。この結果は本研究における走査型電子顕微鏡所見と一致していた。このことから骨移植材料としての合成ヒドロキシアパタイトが移植後の血管形成を阻害するのは、単にその形態学的構造だけでなく、他の何らかの因子が血管形成に対する調整因子の出現に影響を与えているということが示唆された。どのような因子が影響しているのかは本研究からは明確にすることはできず、他の人工骨材料も含めて、それらの構造や成分と生体の持つ各因子との関わりについてさらに詳細な検討を行うことが今後の課題と考えている。

結 論

- ① 各材料移植後の血管新生に関し、走査型電子顕微鏡および免疫組織化学的に観察した。
- ② 焼成骨では経時的に新鮮自家骨と類似した成績を示した。
- ③ ヒドロキシアパタイトでは 移植後21日目でもVEGF蛋白の反応が強く認められがTGF- β 1蛋白は減少しており、血管が未熟なままの状態であった。
- ④ 免疫組織化学的所見は走査型電子顕微鏡所見と一致していた。
- ⑤ 移植材料の構造および性状の差が移植後の血管形成に影響を与え、骨移植の成績を左右することが示唆された。
- ⑥ 今後、他の移植材料も含めて、それらの性状の差による検討を行うことが、理想的な代用骨開発に重要なことでありさらに研究を進める計画である。

引用文献

1. Risau W. and Flamme I.: Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11: 73-91, 1995.
2. Ferrare N.: Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent. Prog. Horm. Res.* 55: 15-35, 2000.
3. Chalmers J., Gray D. H. and Rush J.: Observations on the induction of bone in soft tissues. *J. Bone Joint Surg.* 57-B(1): 36-45, 1975.

参考論文

1. Matusda M., Kita S., Takekawa M., Ohtsubo S. and Tsuyama K.: Scanning electron and light microscopic observation on the healing process after sintered bone implantation in rats. *Histology and Histopathology* 10: 673-679, 1995.
2. Young T.Q., Matusda M., Takekawa M., Ohtsubo S., Tsuyama K. and Kita S.: Morphological changes of autoclaved autogenic bone implantation and autoclaved autogenic bone supplemented with allogenic demineralized bone matrix in rat parietal bone. *Histology and Histopathology* 11: 361-369, 1996.
3. Takekawa M., Matusda M. and Ohtsubo S.: Effect of irradiation on autogenous bone transplantation in rat parietal bone. *Histology and Histopathology* 15: 7-19, 2000.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	大坪 誠治
審査委員長 北 進一 ㊞			
審査委員 田中 達也 ㊞			
審査委員 鈴木 裕 ㊞			
学位論文題目			
Angiogenesis after Sintered Bone Implantation in Rat Parietal Bone			
(ラットの頭頂骨における焼成骨移植後の血管形成)			
<p>焼成骨は天然の骨組織から得られた骨移植材料で、同種骨移植などにおいても免疫反応を引き起こさず、さらに生体親和性や骨伝導性において優れた代用骨といわれている。焼成骨移植が他の移植材料に比較して優れているのは、移植後の血管形成に優れているためと考えられた。本論文は、焼成骨移植後の微小血管腐食鑄型を作成し、走査型電子顕微鏡を用いて血管新生について観察し、また血管新生を光学顕微鏡と免疫組織化学的手法を用いて新鮮自家骨(コントロール)、さらに合成ヒドロキシアパタイト(HA)との比較を行ったものである。</p> <p>実験方法はラットの頭頂骨に新鮮自家骨と焼成骨および合成ヒドロキシアパタイトを移植し、経時的に走査型電子顕微鏡と光学顕微鏡(HE染色、免疫染色)で観察した。</p> <p>走査型電子顕微鏡所見では、焼成骨移植は形態的にも時間的にも新鮮自家骨移植群に類似していた。しかし、HA移植では、移植後21日目でもHAの気孔内に未熟な新生血管が存在していた。</p> <p>免疫組織化学的所見では、コントロールおよび焼成骨移植で、vascular endothelial</p>			

growth factor (VEGF) 蛋白質は移植後早期に出現し、transforming growth factor-beta-1(TGF- β -1)蛋白質の出現とともに減少して血管は徐々に成熟した。HA 移植では、21 日目でも VEGF 蛋白質は気孔の周囲に存在しており、内皮細胞の増殖と遊走は継続していることを示していた。このように走査型電子顕微鏡所見と免疫組織化学的所見は一致していた。

これらの結果から移植材料の構造は、移植後の新生骨形成や移植材料の結合に重要な役割を持つ血管形成に影響を与えることが示唆され、焼成骨は新鮮自家骨と同様に骨移植材料として優れていることが示された。

以上、本論文は骨移植における代用骨として焼成骨は非常に優れていることを示すとともに、今後の代用骨の開発および再生医学に関し重要な知見を与えたものであり、この分野の研究の発展に大きく寄与するものと考えられる。

なお、各審査委員より本論文とその関係領域に関して試問が行われた結果、適切な回答が得られた。以上より、本論文を学位論文に値するものと判定した。