

下顎骨治療に向けた脱細胞化皮質骨置換モデルの開発

Development of decellularized cortical bone graft model for mandible bone treatment

○中村奈緒子(東医歯大生材研) 菅野桐子(東医歯大生材研) 南 広祐(東医歯大生材研)

木村剛(東医歯大生材研) 藤里俊哉(大阪工大) 岸田晶夫(東医歯大生材研)

Naoko NAKAMURA¹, Kiriko SUGANO¹, Kwangwoo NAM¹,
Tsuyoshi KIMURA¹, Toshiya FUJISATO², Akio KISHIDA¹,
1 Tokyo Medical and Dental University
2 Osaka Institute of Technology

Abstract: Autologous bone grafting is performed to reconstruct the lack of mandible bone because of high osteogenic ability and no immune reactions. However, it needs invasive surgical procedure to get bone fragments. Therefore, we tried to prepare the alternative bone graft using decellularized bone. The bone fragments were prepared from porcine femur and two pieces of them were fixed with suture. They were pressurized hydrostatically to disrupt cells and washed to remove the debris. The fragments were implanted to rat subcutaneously. From the micro-CT image, the cell in the gap between fragments could be observed after 1 week. After 2 weeks, bone like collagen matrix was observed. Therefore it was suggested that the appropriate gap between decellularized bone fragments induces bone matrix. It means forming of graft materials and replacement dose not need completely attachment when decellularized bone is used. Therefore, decellularized bone could become alternative material for bone graft.

Key Words: Decellularization, Cortical bone, Bone graft

1. 緒言

高齢者率が23.3%に到達し高齢社会となった日本では、癌患者数が増加している。口腔癌に関しても同様に患者数は増加しており、年間約7000名が罹患している。口腔癌の治療法として、癌の種類によっては顎骨の一部を切除する必要がある。治療によって欠損した顎骨を機能的、審美的に回復させるために、骨移植が行われている。骨移植に多く用いられる方法としては、自家骨移植が挙げられる。自家骨移植は、骨誘導能、骨形成能、骨伝導能といった移植骨に必要な条件をすべて満たしており、さらに物理特性も近く、他の移植材料と比較して多くの利点を有する。しかし、自家骨移植には病変部以外への手術が必要であり、手術時間が延長するだけでなく、採取部にも痛みを伴うなど、患者への侵襲が大きいという問題がある。また、自家骨移植以外の骨移植法としてセラミックスや金属を用いた人工骨移植が挙げられる。しかし、これらは物理特性や生体適合性の点で問題を抱えている。そこで本研究では、生物由来材料である異種骨を用いて、自家骨移植よりも侵襲が小さく、さらに人工骨移植よりも生体の特性を保持した骨移植法について検討した。異種骨における感染のリスクや拒絶反応といった問題を解決するため、我々は欧米で一部実用化されている脱細胞化異種骨を用いて、下顎骨再建モデルを検討した。また、手術によって失われた骨は患者によってサイズや形状が異なることに注目し、骨欠損部に必要とされる形状に適したオーダーメイドの移植骨を術中に組み上げることが可能な骨移植材料の開発を目指している。そこでわれわれは、脱細胞化異種骨の作製と、適切な形状の移植骨を調製する方法および移植方法について検討した。本研究では、脱細胞化異種骨が移植骨に必要な骨誘導能、骨伝導能、骨形成能について *in vivo* にて評価した。さらに移植骨成形に必要な骨接合の方法について検討するため、ラット皮下に隣接して埋植した二つの骨片間の細胞浸潤や骨形成について評価した。

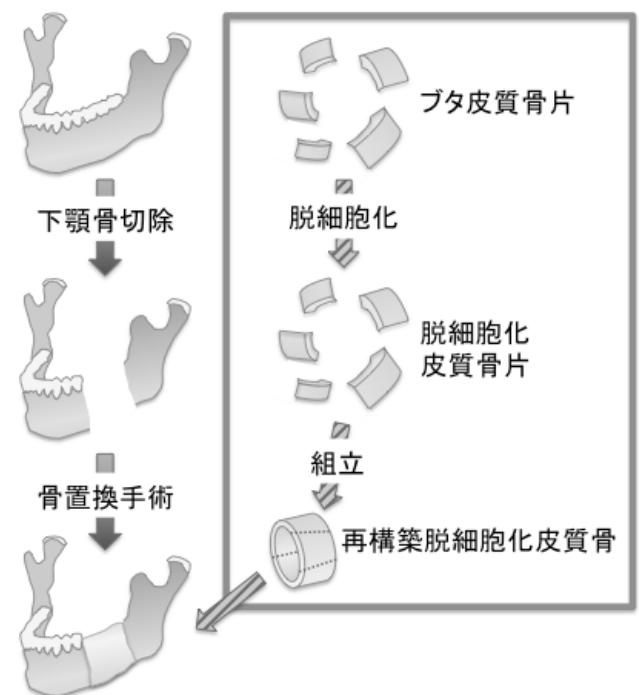


Fig. 1 Schematic illustration for mandible bone graft using decellularized cortical bone.

2. 実験方法

2-1 脱細胞化皮質骨片の調製

ブタ大腿骨の骨幹部から骨髓を除去し、皮質骨を採取した。皮質骨を切断して10 × 10 mmの正方形の骨片を得た。2つの骨片の接合させたい面を合わせ、縫合糸で結紮した。本実験では接合面の条件として、切断(研磨)面を合わせたもの、骨梁形成面を合わせたもの、周辺組織面を合わせたものの三つを調製した。このとき、切断面に関しては、表

Table 1 Materials and methods for graft.

移植材料	接合方法	接合面
脱細胞化皮質骨	縫合糸	切断(研磨)面
	縫合糸	骨梁形成面
	縫合糸	周辺組織面
	石膏	切断(研磨)面
	骨セメント	切断(研磨)面
焼結骨	縫合糸	切断(研磨)面
アパタイトペレット	縫合糸	機械的処理面

面を研磨して平らにした面を用いた。また、他の接合条件として骨片間を石膏で埋めたもの、骨片間を骨セメントで埋めたものを調製した。これらは、高静水圧印加処理法により脱細胞化した¹⁾。脱細胞化評価は、組織学的評価によって行われた。脱細胞化皮質骨片の他に、移植材料のコントロールとして焼結骨を合わせたもの、アパタイトペレットを合わせたものを調製し、計7種類のサンプルを調製した。

2-2 ラット皮下埋植実験

調製したサンプルをラット(male, 8-week-old)の皮下に埋植した。移植後1、2、4週目に移植サンプルを採取した。移植サンプルは、マイクロX線CTおよび走査型顕微鏡観察、ヘマトキシリン-エオジン染色によって評価した。

3. 結果と考察

ブタ大腿骨骨幹部より皮質骨片を作製し、二つの骨片を縫合糸で結紮した。脱細胞化処理後、未処理の皮質骨と脱細胞化皮質骨を比較すると、形状や見た目、硬さに違いはなかった。組織学的評価により、細胞核の除去が確認され、コラーゲンなどの構造は変化せず、細胞のみの除去が可能であることがわかった。

得られた脱細胞化皮質骨片およびその他のサンプルをラット皮下に埋植した。埋植後4週目において、脱細胞化皮質骨片のサンプルに関しては、炎症性は低く、吸収も観察されなかった。また、マイクロX線CTにより、骨片の間隙の観察を行った。埋植1週目では間隙がはっきりと観察されたのに対し、2週目以降は間隙部分が不明瞭となり、脱細胞化皮質骨片と同様の不透過像となった。脱細胞化皮質骨片間の間隙に関して、組織学的評価を行ったところ、脱細胞化皮質骨片と同様のコラーゲンマトリックスが観察された。したがって、二つの脱細胞化皮質骨片の間隙における骨形成が示唆された。これは脱細胞化皮質骨の間隙に浸潤した細胞が、脱細胞化皮質骨によって刺激を受け、異所性での骨形成を促進させたと考えられた。しかし一方で、骨梁形成面や周辺組織面を合わせたサンプルでは、骨片間の間隙に骨形成は観察されなかった。これは、骨梁形成面の湾曲により間隙が広がったことや、周辺組織の存在が影響し、切断面サンプルとの違いが生じたものと考えられる。また、石膏や骨セメントで骨片間を接着させた場合、接着力が弱かった。石膏による接着は石膏自体の形状が維持されていなかった。骨セメントによって接着させたサンプルでは骨セメントが維持されており、サンプルの形状には変化がなかったものの、骨形成は観察されなかった。材料コントロールとして移植した焼結骨同士を合わせたものは、細胞浸潤は観察されたものの骨形成は確認できなかった。本実験で使用したアパタイトペレットは研究用に市販

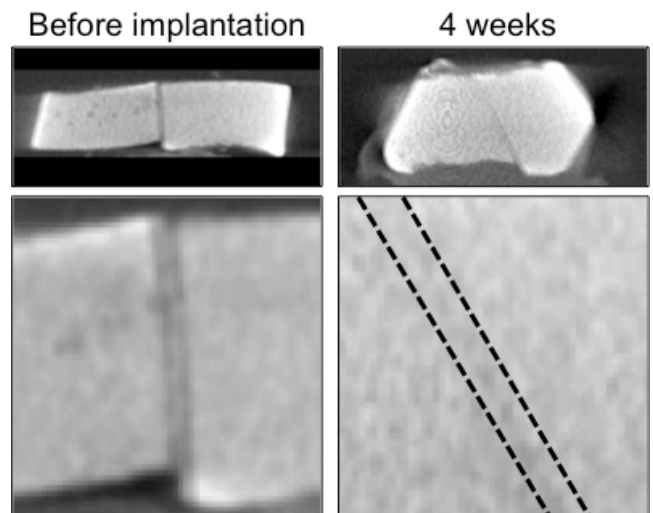


Fig. 2 The gap between decellularized cortical bones was disappeared after 4 weeks of implantation. The dot-line shows the gap.

されているものを用いており、機械的に処理されているため材料表面が極めて平らである。この平らな面同士を重ね合わせて皮下埋植した。マイクロCTにて解析したところ、二つのアパタイトペレットの間隙はほぼ存在せず密着している様子が観察された。間隙における細胞浸潤や骨形成を評価するために、走査型顕微鏡観察を行った。アパタイトペレットの接合面を観察したところ、細胞は観察されなかった。したがって、間隙が極めて小さい場合は細胞の浸潤が行われなかったことがわかった。以上より、細胞の浸潤や、特に浸潤細胞による新生骨の産生に関しては、間隙が広すぎても狭すぎても行われなかったことがわかった。また、簡易な研磨で得られる表面の凹凸によって生じるほどの適度な間隙が必要であることが明らかになった。したがって、術場での簡易な加工によって目的の形状をした移植片の調製が可能であり、下顎骨移植材料としての脱細胞化皮質骨の応用可能性が示された。

4. 結言

高静水圧処理により脱細胞化皮質骨を調製した。二つの脱細胞化皮質骨片間に生じる間隙の大きさによって、細胞の浸潤や骨形成能が異なることが明らかとなった。適度な大きさの間隙により、新生骨が産生されたことから、術場での簡易な加工によって目的の形状をした移植片の調製が可能であると考えられた。以上より、下顎骨移植材料としての脱細胞化皮質骨の応用可能性が示された。

5. 謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金の助成を受けて行われた。

参考文献

- (1) Y. Hashimoto, S. Funamoto, The effect of decellularized bone/bone marrow produced by high-hydrostatic pressurization on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Biomaterials*, vol. 32, pp. 7060-7067, 2011.