

骨髓由来細胞による初期細胞外基質の産生

和田本昌良, 釜山 憲二, 天間 裕文
石田 秀幸, 和田本小百合, 橋本 正毅
赤川 安正

Early extracellular matrix synthesis by bone marrow derived cell

Masayoshi Wadamoto, Kenji Kamayama, Hirofumi Tenma, Hideyuki Ishida, Sayuri Wadamoto,
Masaki Hashimoto and Yasumasa Akagawa

(平成6年9月30日受付)

緒 言

長期の口腔インプラントの成功にとって必須であるオッセオインテグレーション¹⁻³⁾ 界面でのインプラントに対する組織の反応を解明し, 同界面構造に影響を与える因子を明らかにするために *in vivo* あるいは *in vitro* の手法を用いた多くの研究が試みられてきている⁴⁻⁷⁾。このうち, *in vivo* による研究では, 光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡等を用いてインプラント・骨界面構造の全体を把握することはできるものの, 生体環境の複雑さから, インプラントを骨内に埋入した後にインプラントに接する細胞の反応に影響をおよぼす個々の因子を検討するには困難であるとの報告⁸⁾ がなされている。このような考えから, *in vitro* の手法を用いた研究, すなわちインプラント材料に対する動物の骨髓由来細胞の反応を検討した報告^{9,10)} がなされてきている。しかし, これらの報告は, 採取した細胞を3週間以上培養した時点での, 生体材料と細胞あるいは細胞が産生し石灰化した細胞外基質との関係を明らかにしたものであり, 培養直後からの経時的な細胞形態の変化や細胞外基質の産生過程, さらに培養皿内での同様な細胞反応を観察した研究報告はほとんど見あたらない。

本研究では, 生体材料に対する骨髓由来細胞の経時的な反応を解明するに先立ち, 培養皿内での同細胞の経時的な反応を明らかにする目的でラットを用いて以下の検索を行った。

材料および方法

1. 使用細胞並びに培養条件

Maniopoulos ら (1988)¹¹⁾ の方法に従い, 6週齢雄性ウイスター系ラット (体重 110~120 g) を屠殺後, 大腿骨を摘出し周囲軟組織を可及的に除去した。その後, 抗生物質 (10.0 mg/ml penicillin G, 5.0 mg/ml gentamicin, 30.0 μ g/fungizone) を添加した15%ウシ胎児血清含有培養液 (α -Minimum Essential Medium) にて大腿骨を洗浄後, 大腿骨近遠心両骨端を切断し, 10倍に希釈した先の抗生物質に 50 μ g/ml ascorbic acid, 10 mM Na- β -glycerophosphate および 10^{-8} M dexamethasone を加え調整した15%ウシ胎児血清含有 5 ml 培養液を用いて, シリンジにて各大腿骨骨髓を同様の培養液 10 ml 中に射出し, 1匹のラットより計 30 ml の骨髓由来細胞浮遊液を得た。得られた細胞浮遊液を各 2 ml ずつ 35 mm 培養皿 (FalconTM) に分注し, 培養を行った。なお, 培養は 37°C, 5%炭酸ガス-95%空気中にて行い, 同培養液の交換は週3回行った。

2. 観察方法

培養開始 5, 7, 9, 14および21日後の各細胞を 0.2 M リン酸緩衝液 (pH. 7.2) にて洗浄後, リン酸緩衝 2%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド混合固定液にて1時間浸漬固定後, カコジル酸ナトリウム緩衝 1%オスミック酸固定液にて30分間後固定を行った。固定完了後, 一部の試料は上昇エタノール系列にて脱水し, 臨界点乾燥を行い, Pt-Pd 蒸着を施し走査型電子顕微鏡にて観察を行った。また,

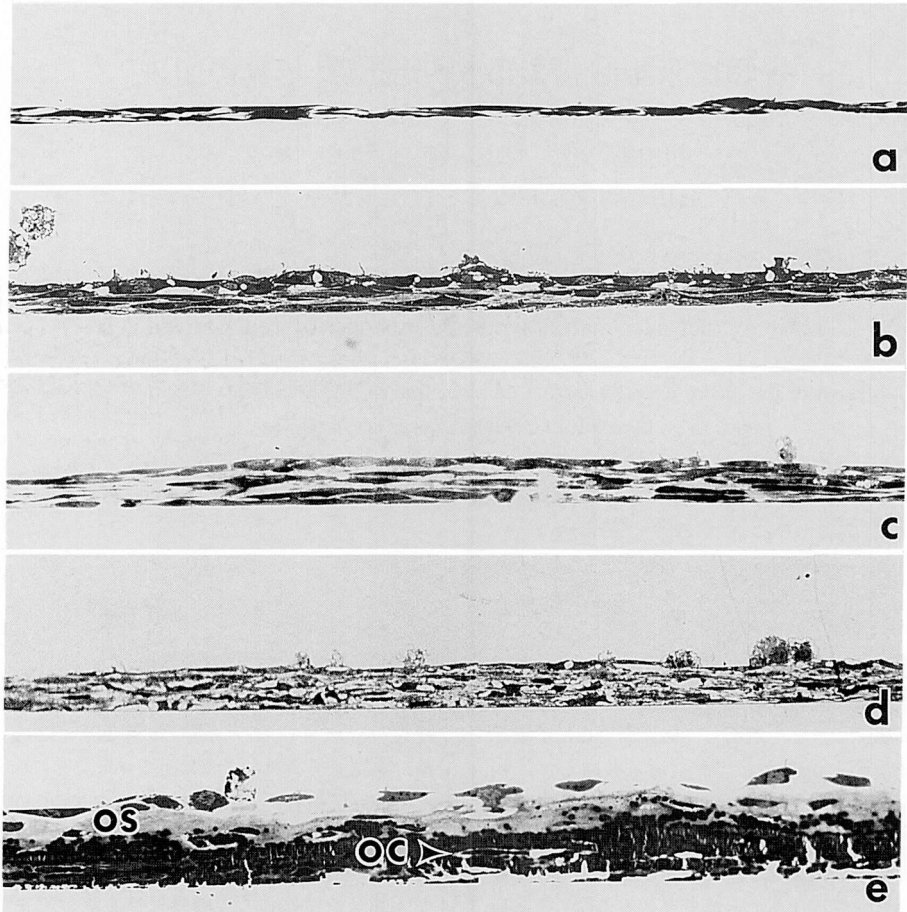


図1 ラット大腿骨骨髓由来細胞の経時的変化。(トルイジンブルー染色 ×40)
 a. 5日後 b. 7日後 c. 9日後 d. 14日後 e. 21日後 (os: 類骨様構造物,
 oc: 骨細胞様細胞)

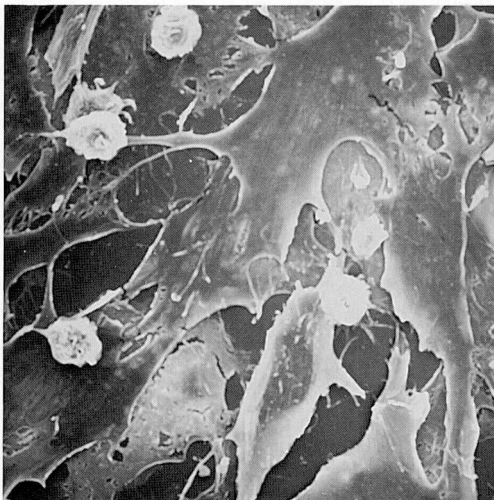


図2 培養5日後の骨髓由来細胞。(×1000)

他の試料は同様に固定完了後、1%酢酸ウラニル水溶液による染色を行い、上昇エタノール系列にて脱水後、Epon 812 に包埋した。その後、1~2 μ m 厚切片並びに超薄切片を作製し、各々光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡による観察を行った。

結 果

培養開始5日後においては、細胞が集合し結節を構成していた。同部では偏平な細胞が培養皿底部に附着、伸展しており、2~3個の細胞が重なって層状の構造を形成していた(図1a, 図2, 図3a)。これらの細胞は偏平で大きな核を有し、豊富な粗面小胞体やゴルジ装置、遊離リボソームを胞体内に備え、培養皿底部に対して細胞突起を伸展させていた(図3)。

7日後では、細胞の層は4~5層となり、5日後に観察された偏平な細胞層の上に比較的立方形の細胞が

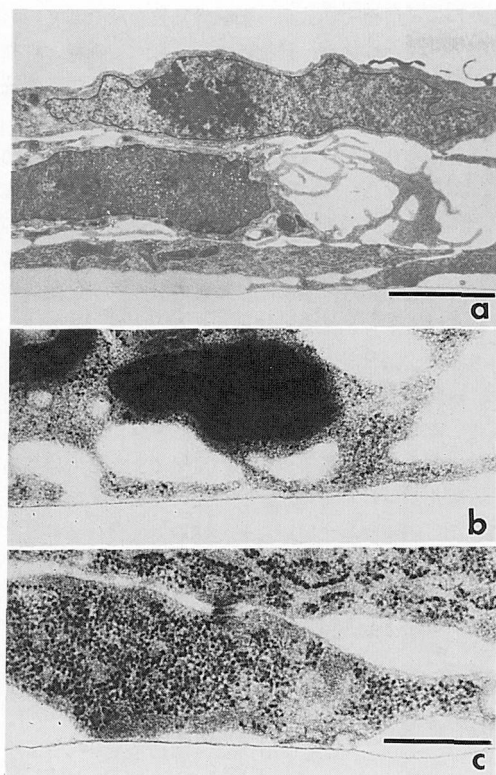


図3 培養5日後の骨髓由来細胞.

- a. 2～3個の細胞が層状構造を形成している。
(バー: $3\mu\text{m}$)
b. c. 培養皿底部に対して細胞突起を伸展させている。
(バー: $0.5\mu\text{m}$)

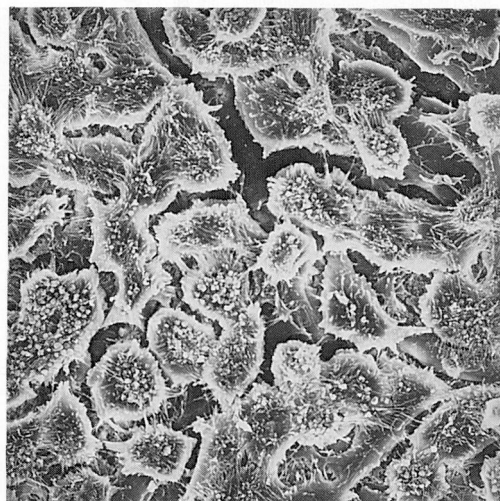


図4 培養7日後の骨髓由来細胞. ($\times 1000$)

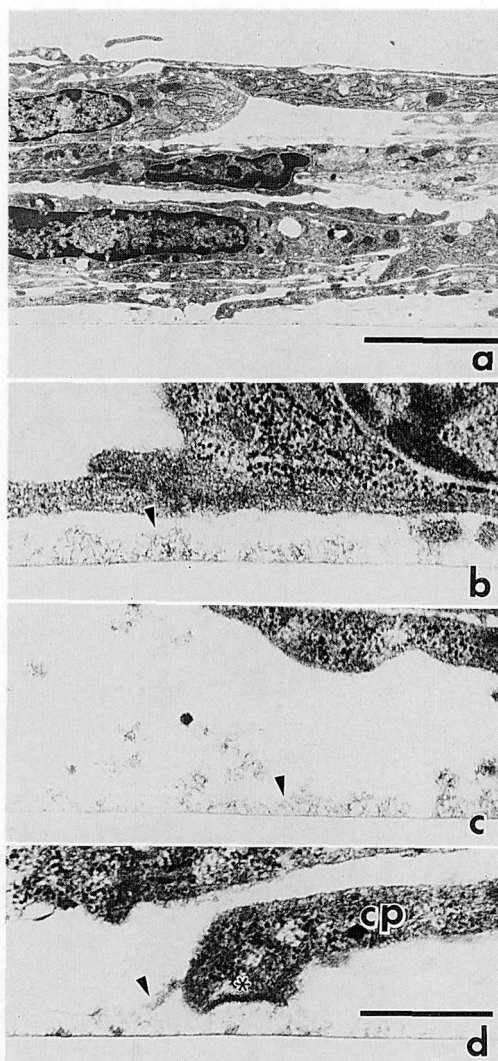


図5 培養7日後の骨髓由来細胞.

- a. 4～5個の細胞が層状構造を形成している。
(バー: $3.5\mu\text{m}$)
b. c. d. 細胞膜と培養皿底部の間に無定形の構造物が観察され、細胞が基質を産生しているようである。
矢印: 産生された細胞外基質, cp: 細胞突起, *: ヘミデスマゾーム様構造物
(バー: $0.5\mu\text{m}$)

みられ、これらの細胞は多数の細胞突起を有していた(図1b, 図4, 図5a)。また、培養皿底部に近接した細胞においては、細胞膜と培養皿底部との間に無定形で細かな粒子状の構造物がまばらに観察された。さらに、胞体内に粗面小胞体や遊離リボソームを多く含んだ細胞突起が培養皿底部に近接しており、その先端はヘミデスマゾーム様の構造物が観察され、あたかも細

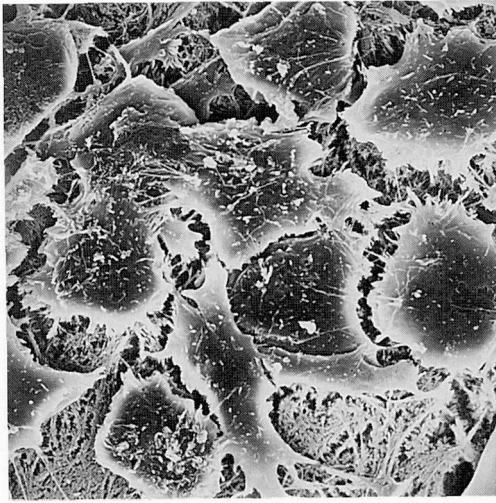


図6 培養9日後の骨髄由来細胞。(×1500)

胞外に先の構造物を放出し細胞外基質を産生しているようであった。また、部位によりこれらの細胞と培養皿底部との間に観察された構造物が蓄積され、不連続な小球状の構造物として観察された(図5)。

9日後になると、細胞の層は、その厚さを増し(図1c, 図6, 図7a), さらに、7日後に認められた培養皿底部の小球状の細胞外基質の蓄積物は連続し、その量を増すとともにアーケード状構造となっていた。また、この時期では、細胞間に多数のコラーゲン線維並びに活発な基質の産生も認められた(図6, 図7)。

さらに、14日後および21日後と時間が経過するに従い、培養皿底部に蓄積された細胞外基質は連続し、石灰化したコラーゲン線維と一体化してきており、細胞間隙に産生された基質は、その量を増すとともにさらに石灰化が進行していた。21日後になると、培養皿底部並びに細胞間隙に認められた細胞外基質は連続して

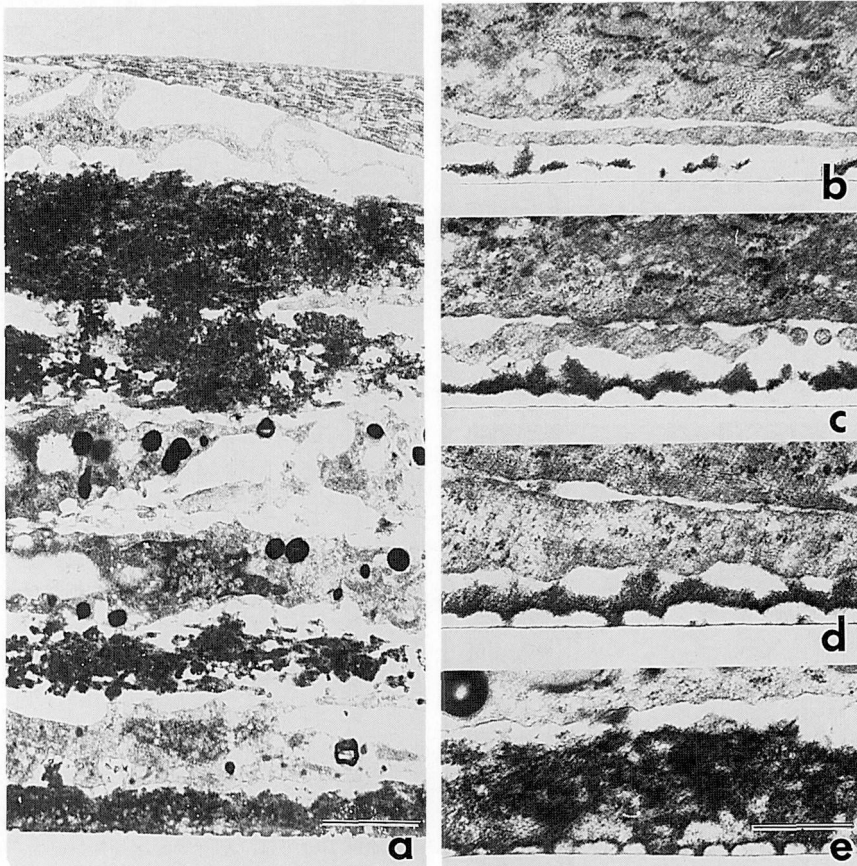


図7 培養9日後の骨髄由来細胞。
 a. 細胞間にコラーゲンや基質の産生が認められる。(バー: 3 μ m)
 b. c. d. e. 7日後に認められた培養皿底部の細胞外基質の蓄積物は連続し、その量を増している。(バー: 0.5 μ m)

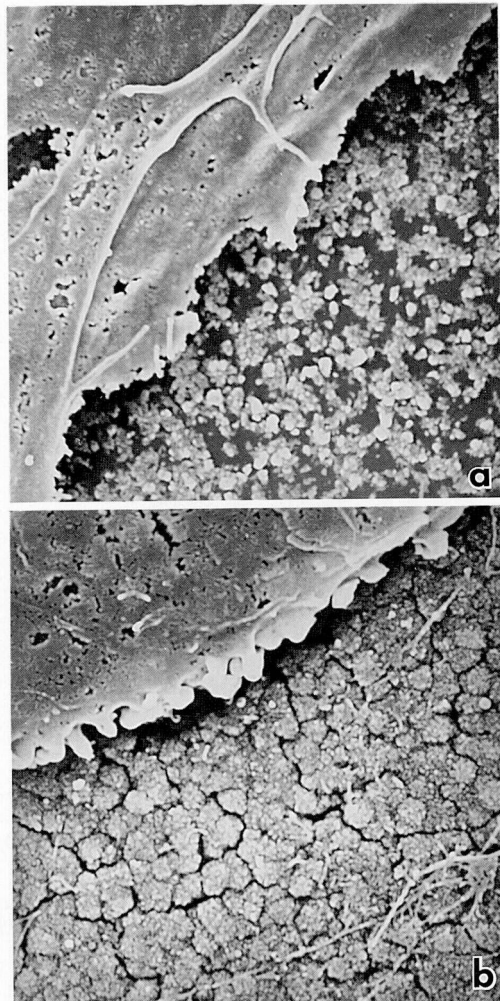


図8
 a. 培養14日後の骨髄由来細胞と培養皿底部に蓄積された基質 (×10000)
 b. 培養21日後の骨髄由来細胞と培養皿底部に蓄積された基質 (×10000)

おり、これらの石灰化物質により周囲を取り囲まれた骨細胞を思わせる細胞も認められ、表層より、細胞層、類骨層および骨細胞を含む石灰化基質層が観察されるなど、あたかも骨様の構造物を示していた (図1e, 図8, 図9, 図10)。

考 察

本研究結果より、*in vitro* での骨髄由来細胞による骨様構造物の経時的な形成過程が明らかとなった。すなわち、この過程は、①細胞が集合し結節並びに層状構造を形成する時期 ②初期の細胞間隙への石灰化基質の産生期 ③骨細胞様細胞を含む石灰化基質と類骨

様構造物並びに表層の細胞層などが観察される骨様構造物の完成期の3つのステージに分類することができた。

これらの骨髄由来細胞の反応に影響をおよぼす因子としては今回用いた添加物質が考えられる。Ascorbic acid に関しては、*in vitro* においてコラーゲンの合成と骨形成に必須であるとされており、Anderson ら (1984)¹²⁾ は培養骨芽細胞の ATPase とアルカリフォスファターゼ活性の調整因子として Ascorbic acid が関与していると報告している。また、 β -glycerophosphate は *in vitro* の実験系においてリン酸イオンの供給源として働いていると考えられる¹³⁾。さらに、副腎皮質ホルモン的一种である Dexamethasone の骨形成に及ぼす影響のメカニズムの詳細にはいまだ明らかにされていないが、骨原性細胞の増殖と最終分化に関わっているらしい¹¹⁾。また、血清中のホルモンや成長因子などの各種成分による影響も考えられるが、これらのことに関してはさらなる研究が必要と考えられる。

培養初期に培養皿底部に観察された小球状の蓄積物に関しては、細胞が産生したものとみなされるが、各種添加物質を含む培養液由来との考えも否定できない。しかし、同様の細胞を用いて、Dexamethasone を含まない培養液にて検討を行った Maniatopoulos ら (1988)¹¹⁾ や Davies ら (1991)¹⁰⁾ の報告では、今回観察された構造物は観察されなかったことから、培養液由来とは考えづらく、やはり細胞由来との考えが妥当であろう。

今回用いた骨髄由来細胞の培養条件では、まず始めに培養皿底部に細胞由来の産生物が蓄積され、同物質の石灰化が進行するとともにコラーゲンの産生が活発となり、最終的にはこれらの石灰化物質とコラーゲンが一体化し骨様構造物を形成すると考えられる。

総 括

本研究より、*in vitro* での骨髄由来細胞による骨様構造物の形成過程、すなわち、細胞が集合し結節並びに層状構造を形成する時期、初期の細胞間隙への石灰化基質の産生期、骨細胞様細胞を含む石灰化基質と類骨様構造物並びに表層の細胞層などが観察される骨様構造物の完成期などの3つの時期よりなることが判明した。この結果は、インプラントを構成する各種生体材料に対する初期の細胞応答を明らかにする上で、本培養系が有用であることを示唆している。

文 献

- 1) Brånemark, P.I.: Osseointegration and its ex-

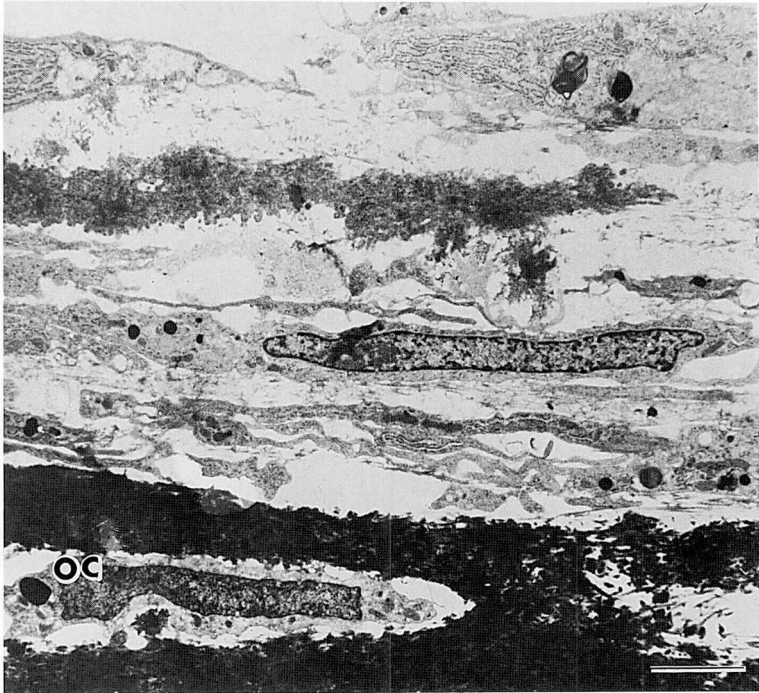


図9 培養21日後の骨髓由来細胞。
石灰化物質に周囲を取り囲まれた骨細胞様細胞 (oc) が観察される。(バー: 3.5 μm)

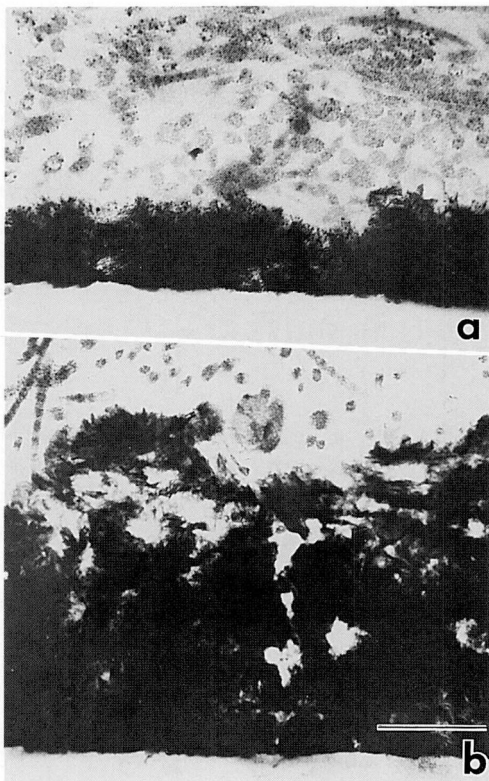


図10 培養皿底部に蓄積され、石灰化した基質。(培養21日後) (バー: 0.5 μm)

- perimental background. *J. Prosthet. Dent.* 50, 399-410, 1983.
- 2) Albrektsson, T. and Lekholm, U.: Osseointegration; Current state of the art. *Dent. Clin. North Am.* 33, 537-554, 1989.
 - 3) Adell, R., Eriksson, B., Lekholm, U., Brånemark, P.I. and Jemt, T.: A long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 5, 347-389, 1990.
 - 4) Akagawa, Y., Hashimoto, M., Kondo, N., Yamasaki, A. and Tsuru, H.: Tissue reaction to implanted materials. *J. Prosthet. Dent.*, 53, 681-686, 1985.
 - 5) Akagawa, Y., Hashimoto, M., Kondo, N., Satomi, K., Takata, T. and Tsuru, H.: Initial bone-implant interfaces of submergible and supramergible endosseous single-crystal sapphire implants. *J. Prosthet. Dent.*, 55, 96-100, 1986.
 - 6) Hashimoto, M., Akagawa, Y., Nikai, H. and Tsuru, H.: Single-crystal sapphire endosseous dental implant loaded with functional stress. —Clinical and histological evaluation of peri-implant tissues. *J. Oral Rehabil.*, 15, 65-76, 1988.
 - 7) Hashimoto, M., Akagawa, Y., Nikai, H. and Tsuru, H.: Ultrastructure of the peri-implant junctional epithelium on single-crystal sapphire en-

- osseous dental implant loaded with functional stress. *J. Oral Rehabil.*, **16**, 261-270, 1989.
- 8) Davies J.E.: The use of cell and tissue culture to investigate bone cell reactions to bioactive materials. *CRC Handbook of Bioactive Ceramics* (Eds; Yamamuro, Hench and Wilson). Vol. 1. *CRC Press, Boca Raton, FL.*, 195-225, 1990.
 - 9) Davies, J.E., Lowenberg, B. and Shiga, A.: The bone-titanium interface in vitro. *J. Biomed. Mat. Res.*, **24**, 1289-1306, 1990.
 - 10) Davies, J.E., Chernecky, R., Lowenberg, B. and Shiga, A.: Deposition and resorption of calcified matrix in vitro by rat marrow cells. *J. Cells and Mat.*, **1**, 3-15.
 - 11) Maniatopoulos, C., Sodek, J. and Melcher, A.H.: Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tiss. Res.*, **254**, 317-330, 1988.
 - 12) Anderson, R.E., Kemp, J.W., Jee, W.S.S. and Woodbury, D.M.: Ion-transporting ATP-ases and matrix mineralization in cultured osteoblast-like cells. *In Vitro*, **20**, 837-846, 1984.
 - 13) Bellows, C.G., Aubin, J.E., Heersche J.N.M. and Antosz, N.M.: Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif. Tissue Int.*, **38**, 143-154, 1986.