

の超微細構造を観察し、共焦点顕微鏡にて基底膜の接着タンパク質である Laminin-5 およびタイトジャンクションの接着タンパク質である ZO-1 を免疫細胞化学的に観察した。さらに ELISA にて、培養上清中に分泌された抗菌ペプチドである LL37、および血小板凝集塊分解能を持つ線溶系プロテアーゼである tPA, uPA およびプラスミンを測定した。また、Laminin-5 と DAPI 陽性の核面積を Fiji (Image Processing Program) にて分析した。得られたデータは、t 検定または一元配置分散分析および Tukey の検定によって統計学的分析を行った。

結果：血小板の凝集は PAR4-AP 処理群で急速に進行し、SEM 像で密に凝集した血小板凝集塊が観察された。また、各種上皮誘導因子の有意な増加が確認された。接着細胞数は、PAR4-AP 処理群において経時的な増加が認められ、SEM 像にてチタン表面上への上皮細胞の接着が確認された。免疫細胞化学染色により、Laminin-5 陽性の伸展した基底膜および ZO-1 陽性のタイトジャンクションで連結している上皮シートが観察された。さらに、培養上清中の LL37 および tPA, uPA, プラスミンの有意な増加が確認された。未処理群では、チタン表面上に付着している上皮細胞は小さくラウンドアップしていたのに対し、PAR4-AP 処理群では Laminin-5 陽性面積が有意に増加し、チタン表面上への伸展した基底膜での接着を示した。

考察及びまとめ：血小板活性化能を有するペプチドの応用によって、タイトジャンクションで連結している上皮細胞が、基底膜を介してチタン表面へ接着可能であることが明らかとなった。PAR4-AP 処理群の培養上清中には高濃度の tPA, uPA およびプラスミンが検出されており、これは上皮細胞が血小板凝集塊を分解してチタン表面に接着したことを示唆している。また PAR4-AP 処理群より LL37 の分泌が確認されたことから、抗菌活性向上への寄与が期待される。血小板活性化能を有するペプチドの修飾をチタンカスタムアバットメントに施すことが可能となれば、基底膜を介した細胞接着による抗菌性の獲得が可能と考えられ、インプラントの長期安定への貢献が期待できる。

## 6. 骨置換性バイオマテリアルを用いた骨再生の試み

○池田 功司, 近藤 尚知, 平 雅之\*, 鬼原 英道

補綴・インプラント学講座補綴・インプラント学分野, 医療工学講座\*

背景・目的：インプラント治療による機能回復は、無菌顎患者等にとってクオリティ・オブ・ライフ向上に繋がる。しかし、埋入可能な骨量がない場合、インプラント治療が容易には適用出来ない。本研究の目的は、プレス加工したナノ・アパタイト/コラーゲン複合体を新規に自家作製し、*in vitro* 細胞培養と *in vivo* 動物実験の両面から骨伝導性を調べ、新規骨補填材としての有用性を評価することである。

方法：複合体調製：ナノサイズのアパタイトには (40 nm 径) (nHAP) を用いた。nHAP 粒子を中和した I 型コラーゲン (Col) に混練し、-80°C 3 時間の予備凍結後、12 時間凍結乾燥した。次に、ニュートンプレス装置 (3ton, 2 分) で加圧後、打ち抜きによって直径 6mm × 厚さ 1mm の試料 (P-nHAP/Col) とした。対照として Col のみの加圧試料も製作した (P-Col)。全試料にはエチレンオキサイドガス滅菌を施した。

1. 細胞培養：両試料の上に骨芽細胞様細胞 SaOS-2 を播種し、5%CO<sub>2</sub>/95% 空気、37°C 環境下で培養した。1, 2, 3, 4 週後、Total RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法による骨系分化マーカーの遺伝子発現解析を行った。また、1 週、4 週培養後の SaOS-2 の形態変化を走査型電子顕微鏡で観察した。

2. 動物実験：10 週齢の雄性 Wistar ラットの頭蓋骨に対し直径 6 mm のトレフィンバーを用いて骨欠損部を形成し、両試料を埋入した。術後 3 日、4 週および 8 週経過後、マイクロ CT によって骨欠損部における骨形成の程度を CT 不透過度より評価した。8 週飼育ラットについては、蛍光二重染色 (5 週での TC と術後 7 週の CL) を施し、安楽死後、欠損部を含むラット頭部をダイヤモンドバンドでブロック状に切り出し Villanueva 染色後、非脱灰薄切標本とし、蛍光顕微鏡によって組織像観察を行った。

結果：

1. P-nHAP/Col 上では、ALPL, COL1 と BSP の遺伝子発現は 2 週から 3 週でピークとなり以降低下した。BGLAP (OCN 前駆体) では 1 週から 4 週にかけて持続的に増加した。SaOS-2 細胞は 1 週の顆粒状から 4 週の高度伸展形に変化した。従って、骨系分化が有意に進行し 4 週で、最終ステージに達したと判断された。一方、P-Col 上では、4 つのマーカー (ALPL, COL1, BSP, BGLAP) 共、有意な経時的な遺伝子の発現増加を認めず、SaOS-2 細胞は線維芽細胞の形態を維持し、骨系分化は進展しないと判断された。

2. P-nHAP/Col は骨欠損部において多核異物巨細胞によって広範に吸収され、近傍で類骨と新生骨の形成を活発に誘導することが組織学的に観察された。二重染色によって、新生骨の動態学的な情報が得られた。マイクロ CT のデータでも欠損部における新生骨形成の有意な増加が確認された。一方、P-Col はマイクロ CT 上で欠損部において不透過度の有意な増加が認められず、骨伝導性は極めて小さかった。

考察及びまとめ：

(1) SaOS-2 細胞は P-nHAP/Col 上で有意に骨系分化が促進された。SaOS-2 細胞が nHAP 粒子を貪食溶解し放出 Ca イオン等が細胞内での細胞情報伝達機能 (MAPK 系等) に影響を与えたからと考えられた。

(2) P-nHAP/Col は疑似骨様の作用で骨リモデリング、骨新生を誘導したと考えられた。

(3) 以上の結果から、P-nHAP/Col は新規骨補填材料として、極めて有用と期待出来る。

7. 赤色蛍光強発現遺伝子導入マウスを用いた骨欠損部における移植骨周囲組織の治癒機構の解析

○井上 学, 客本 齊子\*, 石崎 明\*, 近藤 尚知

補綴・インプラント学講座補綴・インプラント学分野, 生化学講座細胞情報科学分野\*

背景・目的：歯を喪失した場合の機能回復のためデンタルインプラントが適用となる症例が増

加しているが、歯槽骨が失われ、骨造成が必要な症例も少なくない。骨造成または骨移植手術のゴールドスタンダードは自家骨移植であり、水平的、垂直的な骨量の回復が必要となる骨欠損症例に対しては、自家骨を一塊として用いる。一方、移植骨と既存骨の界面における細胞動態と治癒機構の詳細は現在も明らかとされていない。本研究においては、赤色蛍光強発現遺伝子導入マウス (以下 td Tomato マウス) の蛍光反応を利用することで、生体内に移植した組織の細胞動態を体表から観察することを可能とした。さらに、ヌードマウスの骨欠損部に td Tomato マウスの骨片を移植して、蛍光反応を追跡し、骨移植後の治癒機構と細胞動態の解明、さらには低侵襲で効率的な骨造成法の検討を目的として以下の実験を行った。

方法 (1) 8 週齢ヌードマウス頭蓋骨正中に直径 4 mm の骨欠損を形成し、8 週齢 td Tomato マウスより採取した同径の頭蓋骨を、骨欠損部に移植した。移植部位の形態学的評価は、2, 4, 8, 20, 24 週で、マイクロ CT の撮影、さらに IVIS® Lumina Imaging System (以下 IVIS) を用いて蛍光イメージングを行った。IVIS における評価は Image J にて、蛍光強度および蛍光発現部位の面積を測定、評価した。

(2) 垂直的な骨量回復を想定し、8 週齢ヌードマウスの頭蓋骨上へ td Tomato マウスより採取した直径 4 mm の頭蓋骨を移植し、既存骨と移植骨界面における骨再生能をマイクロ CT および IVIS にて評価した。8 週、16 週でマウスを屠殺し、組織切片を作成した。

結果：ヌードマウス頭蓋骨欠損部と移植骨接触面においては新生骨様組織が一部確認された。移植した td Tomato マウス頭蓋骨は 24 週経過後においても、蛍光反応を示していた。頭蓋骨欠損部では、移植骨からの新生骨形成を示す赤色蛍光反応は観察されなかった。蛍光発現部位の面積は、対照群と比較し優位に減少したが、術後 2 週から 16 週において蛍光発現部位の面積に有意差はなかった。

考察及びまとめ：骨欠損部に移植した td Tomato 頭蓋骨は IVIS にてその存在を確認できたことから、移植された組織は壊死することなく、生着しその骨片自らが代謝していることが明らかとなった。また新生骨の形成は、移植骨側の細胞ではなく、既存骨側の骨系細胞が担