

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861683

研究課題名(和文)末梢血由来単核球とリン酸三カルシウム顆粒を用いた骨再生効果

研究課題名(英文)effect of peripheral blood mononuclear cells and beta-tricalcium phosphate on bone regeneration

研究代表者

石井 麻紀子(Ishii, Makiko)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：00637986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は新たな骨移植材料の開発を行うことを目的とした。イヌ静脈血より比重遠心分離法(Ficoll群)、不織布フィルター法(Filter群)で末梢血由来単核球(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)の分離を行い、これをβ-TCP顆粒と混和した。このPBMCs付加β-TCP顆粒をイヌ下顎骨に移植し骨再生効果を組織学的に検討した結果、コントロール群と比較しFicoll群、Filter群で新生骨形成量が多い傾向が認められた。以上の結果から、不織布フィルターを用いて採取したPBMCsとβ-TCP顆粒は、骨組織再生に有用な材料となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a novel bone grafting material. We isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from venous blood taken from the front legs of male mongrel adult dogs by means of gradient centrifugation (Ficoll group) or nonwoven filtering (Filter group), and mixed and incubated these cells with β-TCP microgranules to adhere to the surface of β-TCP granules. We then grafted the PBMCs/β-TCP granules into experimentally prepared bone defects in dog mandibles. A tendency toward greater osteogenesis was recognized in the Ficoll and Filter groups compared with the control group. Furthermore, the procedure for the filtering method is simple and may be applicable for dental graft treatment in general dental clinics. Taken together, PBMCs harvested using a nonwoven filter and incubated with β-TCP granules may provide a useful material for regenerating periodontal tissue and bone.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯槽骨再生 骨再生 歯周組織再生療法 β-TCP 末梢血由来単核球細胞 不織布フィルター

## 1. 研究開始当初の背景

組織再生医工学においては、再生すべき組織に適した細胞、細胞の足場材料、そして細胞の増殖・分化を促す増殖因子の3要素に、適切な環境と時間が必要であることが知られている。その中で、歯周組織や骨組織の再生には、この3要素のうち、細胞として間葉系幹細胞や歯周組織構成細胞、足場材料としてハイドロキシアパタイト (hydroxyapatite, HA) や  $\beta$ -TCP、さらに増殖因子としては塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、骨形成タンパク質 (bone morphogenetic protein, BMP)、多血小板血漿 (platelet rich plasma, PRP)、エナメルマトリックスタンパク質 (enamel matrix protein) 等が検討され、一部で臨床応用されている。特に間葉系幹細胞を用いた再生療法は様々な分野で検討されているが、骨髓液採取に伴うドナーへの侵襲、培養操作に必要とされる細胞培養施設の設置や移植に伴うコストなど、一般臨床の現場ではその実施が難しく、改善の余地があるのが現状である。

移植材料は、生体親和性を有し、最終的には生体内で分解されて再生組織に置換され、さらには組織誘導能を有しているのが最も理想的である。また、歯科医療の臨床の現場で実行可能等の条件を満たさなければならず、これらの条件をすべて満たす理想的な材料は現在も研究途上である。一般的に間葉系幹細胞は骨髓中に多く存在し、末梢血においても一部存在することが示されている (Cho SH et al, J Korean Med Sci, 520-525, 1999)。この末梢血に存在する間葉系幹細胞を歯周組織や骨組織の再生に利用することができれば、より簡便で侵襲の少ない組織再生療法が実現できる可能性がある。さらに、末梢血から目的とする細胞を採取するためには、通常、比重分離法等の方法が広く用いられているが、細胞分離操作の際のコンタミネーシ

ンや、手技による回収率のばらつきなどの問題点がある。そこで、より安全で簡便に末梢血由来細胞を採取するために、近年、細胞分離用不織布フィルター (西村隆雄、繊維学会誌、215-216, 2005) を用いた細胞分離法が開発された。

一方で、採取した細胞が生体局所において骨および歯周組織を再生するために、上記の細胞の足場となる材料が必要とされる。この足場材料の候補として、自家骨や人工骨材料である HA、 $\beta$ -TCP 等が挙げられるが、供給量に制限が無く、生体内での吸収、置換が起きやすい  $\beta$ -TCP は足場材料として有用な材料である。末梢血由来細胞と  $\beta$ -TCP を併用し移植した研究では、皮下での異所性石灰化が認められたことがすでに報告されており (程 錦雁ら、再生医療、194, 2009)、局所での組織再生に優れた移植材となりうる可能性が示唆されている。さらに増殖因子は、採取した末梢血由来細胞から分泌される増殖因子にその作用を期待できると考えられる。

## 2. 研究の目的

そこで本研究の目的は、組織再生医工学の細胞として、より簡便で生体に対し侵襲が少なく採取可能な末梢血由来単核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) を、足場材料としては  $\beta$ -TCP 顆粒を用い、新たな骨移植材料の開発を行うこととした。

## 3. 研究の方法

(1) 実験動物、抜歯および実験的歯槽骨内欠損の作製

### 抜歯

実験に先立ち、全身麻酔・局所麻酔下にて12か月齢の雄雑種成犬 (体重  $20.0 \pm 1.5$  kg) 6頭の下顎両側第1から第4前臼歯の抜歯を行う。

## 実験的骨欠損の作製

抜歯窩治癒後、全身麻酔・局所麻酔下でイヌ下顎骨に計6か所（中心間距離が10 mm以上、直径4 mm、深度10 mm）の円柱状骨内欠損を作製する。

### (2) 末梢血採取およびPBMCs分離

#### 末梢血採取

骨内欠損作製と同時に、イヌ前肢皮静脈より末梢血40 mlを血液保存液（CPD）液28 ml入り200 ml採血用血液バッグに採取し、PBMCsの分離を行う。

PBMCs分離前後の血球比率および回収率を、多項目自動血球計数装置を用いて赤血球、白血球、血小板数の測定を行う。

さらに塗末標本作製し、白血球分画を測定する。

#### 比重分離法によるPBMCs分離法

採取した血液を約20 mlずつ2等分し、比重分離液を加えた血液を5 mlずつ4本のチューブに重層し、比重分離（30分間1,500 rpm）を行う。

比重分離後、白血球層（PBMCs）を回収する。回収した細胞浮遊液はphosphate-buffered saline（PBS（-））で攪拌、遠心を行う。

その沈渣のPBMCsが $5 \times 10^6$  cell/mlとなるよう、F12培地を用いて懸濁、調整する。

#### 不織布フィルターによるPBMCs分離法

約20 mlの血液を細胞分離不織布フィルター（旭化成クラレメディカル、東京、図1）でろ過を行い、フィルター内のPBMCsを回収後、 $5 \times 10^6$  cell/mlとなるよう、F12培地を用いて調整する。

### (3) PBMCs付加 -TCP 顆粒作製と移植

-TCP 顆粒へのPBMCsの付加

25~75  $\mu$ mの微細顆粒に調整した -TCP

顆粒（オスフェリオン<sup>®</sup>、気孔率75%、オリンパステルモバイオマテリアル、東京）1 gをPBS（-）で混和、この -TCP 顆粒懸濁液を $5 \times 10^6$  cell/mlのPBMCs添加し、60分間インキュベーション（37℃、5% CO<sub>2</sub> 下）を行う。

インキュベーション中は30分経過時に1回攪拌を行う。

PBMCs付加 -TCP 顆粒の -TCP ブロックへの填入

PBMCs付加 -TCP 顆粒は賦形性に乏しいため、歯槽骨内欠損へ移植する際の溢出防止を目的として、長さ10 mm、直径3.7 mmの円柱状 -TCP ブロック（オスフェリオン<sup>®</sup>）に、深度8 mm、直径1.3 mmの円柱状中空部を付与した試料を作製する。

この中空部にPBMCs付加 -TCP 顆粒を85  $\mu$ l填入する。

### (4) 実験群の設定と骨欠損部への移植

#### 実験群の設定

- ・Ficoll 群：比重分離液を用いて採取したPBMCs付加 -TCP 顆粒を填入した -TCP ブロック
- ・Filter 群：不織布フィルターを用いて採取したPBMCs付加 -TCP 顆粒を填入した -TCP ブロック
- ・コントロール群： -TCP ブロック単体

#### 骨欠損部への移植

イヌ下顎骨に作製した前述の6か所の骨欠損に、3群の移植材をそれぞれ任意の部位に移植する。

### (5) 評価項目

#### 血球数の比較

細胞分離前後の白血球、赤血球、血小板数を算出し、回収率の比較を行う。

細胞分離前後の好中球、好酸球、単球、リ

ンパ球の比率および回収率の比較を行う。

#### 組織切片の作製および組織学的観察

各観察期間の4週または8週経過後、ペントバルビタールナトリウムを用いてイヌを安楽死させ、組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡にてブロック中空部を組織学的に観察する。

#### -TCP ブロック中空部の骨組織占有率

組織像を拡大した画像上で、ブロック中空部の骨組織占有率を算出し、各群の比較を行う。

#### (6) 統計学的解析

上記の結果を統計学的に解析し、細胞分離用不織布フィルターの有効性およびPBMCs付加 -TCP 顆粒の骨形成促進作用を分析する。

### 4. 研究成果

#### (1) PBMCs の分離

##### PBMCs 分離前後の血球数の比較

細胞分離前後の末梢血中の血球数の比率を比較した。各群の血球含有率を算出し比較した結果、白血球はFicoll 群 (平均 18.9%) に対し Filter 群では平均 33.9% であった。また赤血球は、Ficoll 群ではほとんどが除去され (平均 0.2%)、Filter 群では平均 8.9% が残余していた。血小板回収率は Ficoll 群が平均 14.3%、Filter 群が平均 11.6% であった。

##### PBMCs 分離前後の白血球分画

各群の細胞分離前後の白血球分画について、計測できた一部の検体を比較した。Ficoll 群の4検体、Filter 群の1検体においては、塗末した血球がスライドガラス上に定着しなかったことから、白血球分画の計測が不可能であった。計測できたもののうち、各群の白血球含有率を算出し比較した結果、

全ての白血球において Filter 群で高い値となった。また好酸球回収率は Ficoll 群で平均 18.8%、Filter 群では平均 31.1% となり、リンパ球回収率は Ficoll 群で平均 46.5%、Filter 群で平均 52.3% であった。好中球回収率は Filter 群 (平均 29.8%) が Ficoll 群 (平均 3.9%) の約 8 倍、単球回収率は Filter 群 (平均 26.2%) が Ficoll 群 (平均 5.0%) の約 5 倍であった。

#### (2) 組織学的観察

##### 弱拡大における組織学的所見

すべての組織片において顕著な炎症性細胞浸潤は認められなかった。皮質骨、あるいは海綿骨に埋入された -TCP ブロックが4週群、8週群ともに各群で明瞭に認められ、吸収・分解されずに残存しており、歯槽骨とブロックの境界面も明瞭に確認できる状態であった。中空部においては、4週コントロール群では上部に石灰化像が認められたが、Ficoll, Filter 群では上部から中央部、下部におよぶ石灰化像が認められた。特にコントロール群と Filter 群との比較では、中空部下においてコントロール群では軟組織で満たされているのに対し、Filter 群では骨組織で満たされている所見が認められた。さらに8週においては、コントロール群では中空部内面に沿って骨組織の形成が認められる傾向があったが、中空部中央部では依然軟組織で満たされている所見が認められた。これに対し Ficoll, Filter 群では、中空部全体で骨組織が形成されている所見が認められた。さらに8週 Ficoll, Filter 群では、中空部の境界が一部不明瞭となっている所見が認められた。

##### 40倍組織像における組織学的所見

-TCP ブロック中空部を詳細に観察するため、1倍組織像の任意の3計測領域を上部、中央部、下部に分け、40倍に拡大して観察を

行った。4週群では -TCP ブロックの上面を被覆する軟組織中に顕著な炎症性細胞浸潤は認められなかった。 -TCP ブロック体部の気孔内面には立方状の細胞が規則正しく配列し、気孔表面において層板構造を持たない幼若な骨組織の形成が認められ、すべての群において同様の所見が認められた。上部では、コントロール、Ficoll, Filter 群ともに良好な骨形成が認められた。中央部では、コントロール群では -TCP ブロック中空部内面に沿って骨形成が認められたが、中心部では軟組織ならびに血管腔が多く認められた。それに対し、Ficoll, Filter 群ではブロック中空部内面に沿って厚い骨組織像を認め、中心部にわずかな軟組織が認められた。さらに下部では、コントロール群において、界面に立方状の細胞が規則正しく配列している所見が認められるものの、骨組織はほとんど認められなかった。それに対し Ficoll 群ではすでに中空部を満たすように骨組織が形成されていた。Filter 群では、Ficoll 群と同様に中空部を骨組織が満たしており、さらに中空部との界面が一部で不明瞭となっていた。

8週群では、 -TCP ブロック上面を被覆する軟組織中に顕著な炎症性細胞浸潤は認められなかった。 -TCP ブロック体部の気孔内面では、すべての群において新生骨形成の亢進が認められたが、4週群のような立方状の細胞の規則正しい配列は認められず、血管腔が多数認められた。上部では、すべての群において新生骨形成が認められたが、コントロール群では中心部に軟組織が残存していた。中央部においては Ficoll, Filter 群では新生骨形成が亢進しており、中心部においても新生骨形成が認められたのに対し、コントロール群では中心部に軟組織が多く認められた。下部では、すべての群で新生骨形成が促進していた。特に Ficoll, Filter 群では、ブロック中空部内面とブロック体部の界面が一部不明瞭になっていた。Filter 群におい

ては、新生骨形成部周囲に血管腔が多数認められた。

100倍組織像における -TCP ブロック中空部内面の拡大所見

-TCP ブロック中空部内面の任意の3計測領域を100倍に拡大した各群の組織像を比較した。4週群では、 -TCP ブロック体部の -TCP 表面において、コントロール群では立方状の細胞が配列していることが認められたが、新生骨形成は認められなかった。これに対し、Ficoll, Filter 群では -TCP 表面に新生骨形成が認められた。中空部内面での新生骨形成は、コントロール群では薄く一層形成されていたのに対し、Ficoll, Filter 群ではすでに厚い新生骨形成が認められた。8週群では、コントロール群において -TCP ブロック体部の -TCP 表面において立方状の細胞が配列し、新生骨形成が認められた。これに対し Ficoll, Filter 群では -TCP 表面の多くの部位で新生骨形成が認められ、界面での新生骨中に血管腔が多数認められた。

新生骨形成部の拡大所見

中空部の任意の計測点で観察した200倍組織像から、4週コントロール群では軟組織中に薄い新生骨形成が認められ、その表面には立方状の細胞が規則正しく配列していることから、新生骨形成部の表層において骨形成が亢進していることが示唆された。Ficoll 群ではすでに厚い新生骨形成が認められ、骨組織中に -TCP 顆粒が封入されている所見も認められた。Filter 群では、Ficoll 群と同様に厚い骨組織の形成が認められ、さらに新生骨表面には立方状の細胞が規則正しく配列していることが観察された。

一方8週コントロール群では、4週群と大差ない薄い骨組織が認められ、4週群で認められた立方状の細胞は少なくなっていた。これに対し Ficoll 群では、4週群と同様に厚い新生骨形成が認められ、一部では -TCP 顆粒

が周囲骨組織に取り囲まれている所見が認められた。Filter 群でも厚い新生骨が -TCP 顆粒を取り囲んでいる所見が認められた。また一部では立方状の細胞が骨形成表面および -TCP 顆粒表面に認められた。

(3) -TCP ブロック中空部の骨組織占有率

各群の -TCP ブロック中空部の骨組織占有率を比較した結果、4 週群はコントロール群 (34.45 ± 2.33%)、Ficoll 群 (37.52 ± 12.17%)、Filter 群 (47.94 ± 5.70%) の順に骨組織の割合が高くなる傾向を示し、8 週群においてもコントロール群 (34.51 ± 3.93%)、Ficoll 群 (42.58 ± 10.76%)、Filter 群 (57.45 ± 6.47%) の順に高くなる傾向を示した。8 週コントロール群と 8 週 Filter 群との間には統計学的有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。

また 4 週群と 8 週群の比較では、統計学的有意差を認めなかった。

以上の結果から、PBMCs 付加 -TCP 顆粒はイヌ実験的歯槽骨内欠損において、コントロール群と比較し 8 週 Filter 群で有意に骨形成を促進し、不織布フィルターによる PBMCs 分離法は、比重遠心分離法と同等の分離能を有し、安全性、操作性の面でも優れていることから、今後の骨移植材料の作製への応用が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

石井麻紀子、末梢血由来単核球と人工骨移植材による骨再生効果の検討、2014 年 6 月 5 日、明海歯科医学会第 23 回学術大会、埼玉・坂戸

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

石井 麻紀子 (ISHII, Makiko)