

学位論文

Assessment of the Osteogenic Potential of Maxilla-Derived Mesenchymal Stromal Cells and  
the Utilization of Serum-Free Medium for Culture Thereof

(上顎骨由来間葉系細胞の骨形成能の評価および無血清培地の活用)

指導教授名 内沼 栄樹

申請者氏名 石黒 匡史

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

## 【要旨】

### 1 序論

唇顎口蓋裂の治療のなかでも顎裂骨欠損部の骨形成は正常な咬合を獲得するための重要な治療である。従来、顎裂部骨形成のために顎裂部骨移植手術が行われおり、現在一般的な donor では自家腸骨海綿骨が使用される。しかし一回の移植手術で十分な骨形成がえられず複数回の骨移植が必要な症例もありその侵襲は軽くはない。当教室では骨移植の手術侵襲軽減を目的とし自家組織由来再生移植骨の開発を行ってきた。上顎骨は口唇裂・口蓋裂治療で行われる従来の手術時に、過剰な侵襲を患者に与えることなく採取できる自家組織であるため、我々は上顎骨由来間葉系細胞 (MSCs) に着目した。さらに安全な臨床応用には、ウシ胎子血清 (FBS) 使用によるリスクを回避しなくてはならないと考えた。これらの背景のもと当研究は上顎骨由来 MSCs の骨形成能を検討し、加えて無血清培養下における骨形成能を検討した。

### 2 材料と方法

当研究は北里大学倫理委員会において承認のもと施行した。

#### 2-1 検体と細胞培養

通常手術時に破棄される上顎骨余剰骨片が提供された。骨片から得られた上顎骨由来 MSCs は無血清培で培養し、3 継代目で骨分化誘導用無血清培地により骨芽細胞へ分化誘導した。対照として従来の FBS を用いた培養・分化誘導を行った検体を作成した。

#### 2-2 *In vitro study*

骨芽細胞としての細胞活性をアルカリフォスファターゼ (ALP)、カルシウム、骨芽細胞マーカー (ALP, オステオカルシン ; OC) で評価した。ALP は ALP 染色と活性の定量を行い、カルシウムはアリザリンレッド S 染色とカルシウム定量を行った。また、骨芽細胞マーカーは Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (real time RT-PCR) にて発現を測定した。

#### 2-3 *In vivo study*

MSCs をハイドロキシアパタイト (HA) ディスクを足場として播種し、この検体をヌードマウスに移植した。移植 8 週後に検体を摘出し HE 染色・免疫組織化学染色による組織学的評価と検体中に形成された骨組織面積の比較を行った。

#### 2-4 統計処理

各群の比較には unpaired Student' s t-test 検定を行い有意差は  $P < 0.05$  とした。

### 3 結果

#### 3-1 提供された検体情報

骨片の提供者は 6 ヶ月から 44 歳、男性 15 人、女性 15 人であった。

### 3-2 *In vitro study*

検体は ALP 染色で染色され、ALP 活性を認めた。また、アリザリンレッド S 染色で染色され、カルシウムを産生していた。さらに骨芽細胞マーカーの発現も認めた。これらでは、いずれも無血清培養検体と FBS 培養検体に有意な差は認めなかった。

### 3-3 *In vivo stud*

無血清培養検体と FBS 培養検体とも HA の気孔内に良好な骨組織形成を認めた。形成された骨組織の基質と細胞はそれぞれ抗ヒトオステオカルシン抗体陽性かつ抗ミトコンドリア抗体陽性でヒト細胞由来であった。両者の骨形成面積に有意差は認めなかった。

## 4 考察

上顎骨由来 MSCs は *in vitro study* で ALP 活性とカルシウム産生が確認でき、骨芽細胞の供給源となることが示唆され、*in vivo study* で骨組織形成が確認できた。したがって上顎骨は有用な骨形成細胞の供給源であると考ええる。一方、当科での腸骨由来 MSCs の骨形成能検討の経験や既存の報告より、腸骨由来 MSCs は上顎骨由来 MSCs に比べ骨形成能に優れる可能性がある。加えて、上顎骨由来 MSCs の培養は腸骨由来 MSCs の培養より感染が生じる確率が高い可能性がある。しかしながら、同一術野から容易に骨組織を採取できることを考慮すると、上顎骨はより低侵襲な骨形成細胞の供給源として有用であるといえよう。

また、無血清培地でも上顎骨 MSCs は骨形成能を有することが示された。無血清培地は細胞によって、増殖能や分化能に個体差が生じる可能性があるが、FBS 添加培地にもなうリスク回避や、自己血清添加培地にもなう患者の負担軽減を目的とするために有用であると思われる。今後、無血清培地の臨床応用には培地含有成分の細胞への長期的影響や移植床への影響など安全性の検討が必須である。

	目次	頁
1. 序論	-----	1
2. 材料と方法		
2-1 検体と細胞培養	-----	3
2-2 <i>In vitro study</i>		
2-2-1 ALP 染色	-----	4
2-2-2 ALP 活性	-----	4
2-2-3 アリザリンレッドS 染色	-----	5
2-2-4 カルシウム定量	-----	5
2-2-5 骨芽細胞マーカー (ALP、OC) の発現	-----	6
2-3 <i>In vivo study</i>		
2-3-1 細胞の足場への播種とヌードマウスへの移植	-----	7
2-3-2 HE 染色・免疫組織化学染色による組織学的評価	-----	7
2-3-3 検体中に形成された骨組織面積の比較	-----	8
2-4 統計処理	-----	8
3. 結果		
3-1 検体と細胞培養	-----	9
3-2 <i>In vitro study</i>		
3-2-1 ALP 染色	-----	9
3-2-2 ALP 活性	-----	9
3-2-3 アリザリンレッドS 染色	-----	9
3-2-4 カルシウム定量	-----	9
3-2-5 real time RT-PCR による骨芽細胞マーカー (ALP、OC) の発現	-----	10
3-3 <i>In vivo study</i>		
3-3-1 HE 染色	-----	10
3-3-2 無血清培養検体の免疫組織化学染色	-----	10
3-3-3 骨組織面積の比較	-----	10

4. 考察		
4-1 骨形成細胞供給源としての上顎骨	-----	11
4-2 上顎骨由来 MSC s の骨形成能	-----	12
4-3 無血清培地使用の意義	-----	13
4-4 UC・UCB 由来自家組織を利用した骨組織形成の可能性の検討	-----	13
4-5 本研究にかかる制限	-----	15
5. 総括	-----	15
6. 今後の課題	-----	16
7. 謝辞	-----	16
8. 引用文献	-----	17
9. 業績目録	-----	22
(10. 図表	-----	27)

## 1. 序論

先天性疾患の手術的な治療は形成外科の重要な分野の1つである。日本人の新生児約500人に1人の頻度で認められる唇顎口蓋裂は、その治療が長期かつ多岐にわたる。一連の治療のなかでも顎裂骨欠損部の骨形成は正常な咬合を獲得するための重要な治療である。従来、顎裂部骨形成のために顎裂部骨移植手術が行われており、donorとして現在は自家腸骨海綿骨が一般的である。しかし一回の移植手術で十分な骨形成がえられず複数回の骨移植が必要な症例があり、その外科的侵襲は軽くはない。当教室では骨移植の手術侵襲軽減を目的とし、顎裂部にMSCsを補填し骨形成改善を図る可能性の基礎研究を行ってきた<sup>1)2)3)</sup>。我々は、安全性や倫理面の観点から<sup>4)</sup>、補填する細胞は自己組織由来が望ましいと考える。これまでMSCsは骨組織・脂肪・皮膚など種々の組織に存在することが報告されてきた<sup>5),6),7)</sup>。近年、上顎骨歯槽部由来のMSCsが報告された<sup>8)</sup>。上顎骨は口唇裂・口蓋裂治療で行われる従来の手術時に過剰な侵襲を患者に与えることなく採取でき、骨形成を得たい顎裂部と解剖学的に隣接している部位である。これらより我々はMSCsの供給源として上顎骨に着目した。

安全な臨床応用には、その材料に関わる免疫反応や感染などを最小限にする配慮が必須である<sup>9),10)</sup>。基礎研究においては一般的にウシ胎児血清(FBS)が細胞培養に使用されている。しかし臨床応用を目的とした場合、FBS使用には残留ウシ血清タンパクによる免疫反応、未知のウィルスやプリオン感染などの問題がある。これらのリスク回避のためMSCsの培養に自己血清<sup>2)3)</sup>や無血清培地<sup>11),12),13),14)</sup>を用いる研究が報告されている。自己血清は細胞培養に有用な種々の成分を含有する利点があるが<sup>2)</sup>、患者から血液を採取する必要があるため得られる量に制限があり、とくに乳幼児から多量の血液は採取できない。また、一般に血清の細胞増殖活性には個体差があるといわれる。一方、製品である無血清培地は安定した細胞増殖活性を持ち、持続的に入手できる。このため無血清培地が活用できればより安定した細胞培養が行え、かつ自己血清

が不足した場合の補完ともなりうる。これらの理由により当研究では組成が明らかな (<http://www.ipdl.inpit.go.jp/homepg.ipdl>) 間葉系幹細胞用無血清培地を用いた。

当研究は上顎骨由来 MSCs の骨形成能を検討し、加えて無血清培養下のその骨形成能を検討した。in vitro では骨芽細胞としての細胞活性をアルカリフォスファターゼ (ALP)、カルシウム、骨芽細胞マーカー (ALP, オステオカルシン ; OC) で評価した。さらに、ハイドロキシアパタイト (HA) を足場に用いて、in vivo における骨形成能を組織学的に評価した。

## 2. 材料と方法

研究はヒト由来組織を使用するため北里大学倫理委員会の承認（B倫 01-05号、B倫 01-19号、B倫 05-40号）を得て、患者・家族の書面による同意のもとに行った。得られた組織は個人が特定できぬよう配慮して取り扱われた。動物実験は北里大学動物実験委員会の許可を得て、その規定を順守して行った。

### 2-1 検体と細胞培養

治療目的で施行された手術において通常破棄される上顎骨余剰骨片が提供された。余剰骨片は乾かないよう滅菌で生理食塩水に浸したガーゼでくるまれ、室温下で培養室に移動され、直ちに培養に供された。

骨組織は5mmの細片とし、25cm<sup>2</sup>のフラスコ（SUMILON®; Sumitomo Bakelite Co., Tokyo, Japan）で無血清培地;STK1（DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan）を用いて37°C、湿度95%、5%CO<sub>2</sub>の条件下で初代培養を行った。1フラスコに3-4個の骨片が入れられ、継代時にとりだされた。培地は週に2回交換された。Outgrowth cellのコンフルエントを待ち、Accutase®（Innovative Cell Technologies, Inc. San Diego, CA, USA）でフラスコに接着した細胞を剥離し回収した。2継代目培養は、75cm<sup>2</sup>のフラスコ（SUMILON®）に細胞を播種し無血清培地；STK2®（DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan）を用いて行った。細胞がサブコンフルエントとなった後、Accutase®（Innovative Cell Technologies, Inc.）で細胞を剥離・回収し、6well-plate（SUMILON®）に1wellあたり1×10<sup>5</sup>個の細胞を播種した。培地は骨分化誘導用無血清培地 STK3®（DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan）を用い、細胞を骨芽細胞へ分化誘導した。

FBSを用いた培養では、初代と2継代目の培養には無血清培地の代わりにα-minimum essential medium（α-MEM, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA）に10% FBSと

抗生剤 (100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin) (Invitrogen)、1 ng/ml bFGF (R & D Systems, Inc., USA) を加えた培地を用いた。また、骨芽細胞への分化誘導培養には 10% FBS に  $\alpha$ -MEM と抗生剤 (penicillin, streptomycin)、 $10^{-7}$ M デキサメサゾン (Dexamethazone, SIGMA-ALDRICH CORP., St. Louis, MO, USA)、 $50 \mu$ M L-アスコルビン酸 (L-Ascorbic Acid, Wako Pure Chemicals Industries, Osaka, Japan)、10mM  $\beta$ -グリセロフォスフェイト ( $\beta$ -Glycerophosphate, Calbiochem San Diego, CA, USA) を加えた培地を無血清培地の代わりに用いた。

## 2-2 *In vitro* study

### 2-2-1 ALP 染色

無血清培地培養・FBS 添加培地培養それぞれの細胞中の ALP を染色し両者の細胞活性を評価した。ALP 染色は分化誘導後 3 週目に行った。ALPTRACP&ALP double-stain Kit (TAKARA BIO Inc., Otsu, Japan) を用い、そのプロトコールに準じて ALP 単独染色を行った。その概要は、まず培養上清を除去し細胞を phosphate buffered saline (PBS; Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd., Osaka, Japan) で 1 回洗浄後に細胞固定液にて細胞をウェル内に固定、その後固定液を除去し蒸留水で 1 回洗浄した。次に調整した基質液を各ウェルに加え 37°C で 30 分反応させた。最後に蒸留水で 3 回洗浄して検鏡した。

### 2-2-2 ALP 活性

無血清培地培養・FBS 添加培地培養それぞれの検体の蛋白質あたりの ALP 活性を分化誘導後 1 週目、2 週目、3 週目で測定した。各検体は未分化の検体を対照とした。検体数は無血清培地培養 10 検体・FBS 添加培地培養 10 検体であった。それぞれの 2 継代目の細胞を剥離・回収、カウントし、6 well-plate (SUMILON®) に 1 ウェルあたり  $1 \times 10^5$  個の細胞を播種した。ウェルの細胞は、それぞれの骨分化誘導培地で分

化誘導した。また、対照として、骨分化誘導を行わない無血清およびFBS 添加培地細胞群も同様に培養した。活性測定は、TRACP&ALP Assay Kit® (TAKARA BIO Inc., Otsu, Japan) を用いた。骨分化誘導 1 週、2 週、3 週目に、細胞を生理食塩水で洗浄し、NP-10/生理食塩水 1ml で細胞を可溶化した。この細胞抽出液を、96 well plate に 1 ウェルあたり 50  $\mu$ l ずつ加え、基質液を 1 ウェルあたり 50  $\mu$ l 添加し、37°C で 30 分間反応させた。吸光度は、405 nm で Multi plate reader; Soft Max® (Molecular Devices) を用い測定した。ALP 活性値は、ALP 標準品 ; CIAP® (TAKARA BIO Inc., Otsu, Japan) の検量線から求めた。補正は、同細胞抽出液の蛋白質量を、Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., IL USA) を用い定量し、蛋白質質量当たりの ALP 活性を算出した。

### 2-2-3 アリザリンレッド S 染色

分化誘導後 3 週目に無血清培地培養・FBS 添加培地培養のそれぞれの検体でアリザリンレッド S 染色を行った。対照は骨分化誘導を行わなかった細胞とした。まずウェル内の培養細胞を PBS で 2 回洗浄し 100%エタノールで固定し、その後、蒸留水で 2 回洗浄した。次に 1.3 % Alizarin Red S 染色液を加え室温にて 2 分間置き、再び蒸留水にて 3 回洗浄した。ウェルを乾燥させその染色を観察した。

### 2-2-4 カルシウム定量

分化誘導後 3 週目に無血清培地培養 10 検体・FBS 添加培地培養 9 検体のそれぞれでカルシウム定量を行った。それぞれの細胞群は、各培養での未分化細胞と比較した。ALP 活性の測定と同様に、細胞を 6 well-plate に 1 ウェルあたり  $1 \times 10^5$  個播種し、無血清および FBS 添加骨分化誘導培地で分化誘導した。骨分化誘導 3 週後、細胞を生理食塩水で洗浄し、1 ウェルあたり 0.5N HCl 1ml を加え、4°C で 3 時間振とうし、カルシウムを抽出した。カルシウム抽出液は、Calcium Assay Kit (Cayman chemical

Corp., Michigan· USA) のプロトコールに従い、96 well plate に1 ウェルあたり 10  $\mu$  l ずつ加え、Working Detector Reagent を1 ウェルあたり 100  $\mu$  l 添加し、室温で 5 分間反応させた。吸光度は、570 nm で Multi plate reader を用い測定し、カルシウム標準品の検量線からカルシウム含量を求めた。

## 2-2-5 骨芽細胞マーカー (ALP、OC) の発現

アルカリフォスファターゼ活性の測定と同様に、分化誘導後 3 週目に無血清培地培養 6 検体・FBS 添加培地培養 5 検体それぞれで骨芽細胞マーカー発現の測定を行った。細胞を 6 well-plate に1 ウェルあたり  $1 \times 10^5$  個播種し、無血清および FBS 添加骨分化誘導培地で分化誘導した。骨分化誘導 3 週後、細胞を生理食塩水で洗浄し、Ribo Pure™ Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA USA) を用い、TRI Reagent 1ml で総 RNA を抽出した。得られた総 RNA 500ng 相当に対し、QuantiTect® Reverse Transcription (QIAGEN®) で逆転写反応、42°C 30 分、94°C 3 分を行ない、c DNA を得た。Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (real time RT-PCR) にて既存の報告<sup>15)</sup>に準じて骨芽細胞マーカーである ALP と OC の発現を測定した。対照は未分化の検体を用いた。得られた値は Student' s t-test で検定し、有意差は  $p < 0.05$  とした。各プライマーは、Primer 3 software program (<http://primer3.sourceforge.net/>)を用いて設計し以下の如くとした。

for ALP, I-F: gtacgagctgaacaggaacaacg and I-R: cttggcttttcttcatggtg; 、

for OC, I-F: gactgtgacgagttggctga and I-R: agcagagcgacaccctagac.

## 2-3 *In vivo study*

### 2-3-1 細胞の足場への播種とヌードマウスへの移植

血清培地培養 6 検体・FBS 添加培地培養 7 検体で行った。既存の報告<sup>3)</sup>を参考にハイドロキシアパタイト (HA) ディスク (  $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$  , PENTAX corporation, Tokyo, Japan)、気孔率 85% (気孔径 100~500  $\mu m$ )、直径 5mm, 厚さ 2mm を両培養系の細胞の足場に用いた。

2 継代目の細胞がサブコンフルエントになったら、継代せずに培地をそれぞれ STK3 , 10%FBS 添加骨分化誘導培地へ変更し、1 週間フラスコ内で細胞を培養し骨芽細胞への分化誘導を行った。その後、細胞を回収し 12 well cell culture plate (SUMILON®; SUMITOMO BAKELITE Co., Tokyo, Japan) に HA の disk を置き、1disk あたり細胞を  $1 \times 10^5$  個/30  $\mu l$  ずつ播種し、disk 内への細胞の浸潤を待った。細胞を播種した HA を 37°C、湿度 95%、5%CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間 incubate し、この検体をエーテル麻酔下の 5 週令・オスのヌードマウス (BLAB/cA Jc1-nu; CLEA Japan, Tokyo, Japan) の背部皮下に、細胞を播種した面が皮膚側にくるように移植した。

### 2-3-2 HE 染色・免疫組織化学染色による組織学的評価

移植 8 週後に NIH 動物実験指針に基づいた方法でマウスを安楽死させ背部皮下よりそれぞれの培養の検体を摘出した。摘出した検体を、10%ホルマリンで固定し K-CX 液 (Falma Co., Tokyo, Japan) にて脱灰し、蒸留水で十分に洗浄後、検体をパラフィン包埋し、厚さ 3  $\mu m$  で薄切、hematoxylin and eosin 染色 (H.E 染色) を行った。各培養の検体の組織像を光学顕微鏡で観察した。

無血清培養検体において、細胞活性の評価のため骨芽細胞マーカーであるヒトオステオカルシンと、形成された骨がヒト細胞由来かの確認のためヒトミトコンドリアに対する免疫組織化学染色を行った。抗ヒトオステオカルシン抗体の免疫組織化学染色

については、一次抗体として Human Osteocalcin(5-12H), Mouse Monoconal Antibody (Takara Bio Inc., otsu, Japan) を、二次抗体として Histofine® MOUSESTAIN KIT (NICHIREI BIOSCIENCE INC. Tokyo Japan) を用いて、抗ヒトミトコンドリア抗体の免疫組織化学染色については、一次抗体として HISTOMOUSE-PLUS KITS (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を、二次抗体として Mouse anti-Human Mitochondria Monoclonal Antibody (Chemicon International, Temecula, CA, USA) を用いて manufacturer' s protocol に従って行った。

### 2-3-3 検体中に形成された骨組織面積の比較

骨の形成量の計測は、画像解析ソフト Image J version 1.4.5I-j (National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いた。無血清培地 5 検体および FBS 添加培地 6 検体の H.E 染色標本を観察し骨形成面積を求めた。光学顕微鏡の弱拡大 (×40) での一視野における骨形成部分を計測し、面積比率として % Area で表示した。また、1 検体ずつの FBS 添加培地で培養した上顎骨由来 MSCs と腸骨海面骨由来 MSCs の骨形成面積を比較した。腸骨海面骨片は上顎骨片と同様に処理し、上顎骨由来 MSCs と同様に腸骨由来 MSC s を培養・移植・摘出し HE 染色して画像解析ソフトで形成された骨組織面積を計測した。

### 2-4 統計処理

各群の比較には unpaired Student' s t-test 検定を行い、有意差を  $P < 0.05$  とした。

### 3. 結果

#### 3-1 提供された検体情報

骨片の提供者は6ヶ月から44歳、男性15人、女性15人であった。提供された検体の詳細を表1に示した。このうち11検体は培養中に感染を生じ、また5検体では培養中に細胞増殖が留まり培養の継続ができなかった。

#### 3-2 *In vitro study*

##### 3-2-1 ALP 染色

無血清培地・FBS 添加培地いずれでも分化誘導した検体は分化誘導していない検体に比べ試薬に濃く染色された (図1)。これによりいずれの培養でも ALP が分化誘導した細胞において強く発現されていることが示された。

##### 3-2-2 ALP 活性

蛋白量あたりの ALP 活性量は、無血清培地・FBS 添加培地いずれでも分化誘導した検体は分化誘導していない検体に比べ高値であった。分化誘導した検体での発現のピークは、無血清培養では観察期間の3週間目までには認められず、FBS 添加培養では1-2週目の間であった (図2A)。ALP 活性量の分化誘導後3週目の両検体の比較では、有意差は認めなかった ( $p=0.178$ ) (図2B)。

##### 3-2-3 アリザリンレッドS 染色

無血清培地・FBS 添加培地いずれでも、骨分化誘導を行っていない細胞は染色されなかったが、分化誘導をした検体はアリザリンレッドSに染色された (図3)。これにより分化誘導した検体にカルシウムが存在することが示された。

##### 3-2-4 カルシウム定量

カルシウム定量では、無血清培地・FBS 添加培地いずれでも分化誘導した検体は分化誘導していない検体に比べ高値であった。3週間分化誘導した検体では無血清培地・FBS 添加培地の両者間に有意差は認めなかった ( $p=0.202$ ) (図4)。

### 3-2-5 real time RT-PCRによる骨芽細胞マーカー（ALP、OC）の発現

骨芽細胞マーカーであるALP、OCとも、無血清培地・FBS添加培地いずれの検体でも分化誘導した細胞は分化誘導していない細胞より高値に発現していた（図5）。分化誘導した検体でのALP発現のピークは、無血清培養では1週目以降3週目までには認められ、FBS添加培養では2週目より前に認められた。OC発現のピークは無血清培養・FBS培養とも観察期間の3週間目までには認められなかった。

### 3-3 *In vivo study*

#### 3-3-1 HE染色

無血清培地・FBS添加培地いずれの検体でも、HAの気孔内で、内部に細胞が存在する小腔が散在したエオジン好染部位を認めた。これらは骨組織であり、小腔内に存在する細胞は骨細胞と考えられ、いずれの検体でも良好な骨組織形成を認めた（図6）。

#### 3-3-2 無血清培養検体の免疫組織化学染色

形成された骨組織内の基質部分は茶褐色に染色され、抗ヒトオステオカルシン抗体陽性であることが証明され（図7）、かつ、細胞は抗ミトコンドリア抗体に染色されヒト由来の細胞であることが証明された。

#### 3-3-3 骨組織面積の比較

1視野あたりの骨形成面積（%Area）の平均は無血清培地において6.7%、FBS添加培地において10.9%であった。無血清培地の検体はFBS添加培地の検体に比べ骨形成面積（%Area）が低値であったが、有意差は認めなかった（ $p=0.379$ ）（図8）。

FBS添加培地で培養した1検体の上顎骨由来MSCsと腸骨由来MSCsの骨形成面積は、上顎骨由来MSCsは12%、腸骨由来MSCsは34%であった（図9）。

## 4. 考察

### 4-1 骨形成細胞供給源としての上顎骨

口唇裂・口蓋裂の患者にとって顎裂部に骨形成を得ることは、良好な咬合を獲得するために重要である。現在、適応症例に対して顎裂部骨形成のために腸骨海綿骨移植を施行している。しかし症例によっては骨形成不足から複数回の移植を要し患児の負担は大きくなる。原因の一つとして骨形成細胞数の不足が挙げられ、骨形成細胞が補填されれば骨形成の改善が期待できると考えられる。近年、MSC s の供給源として種々の組織の報告があり<sup>5),6),7)</sup>、上顎骨歯槽部由来 MSC s も報告されている<sup>8)</sup>。我々は、上顎骨が口唇裂・口蓋裂治療で行われる従来の手術時に過剰な侵襲を患者に与えることなく採取可能であり、また顎裂部と解剖学的に隣接している部位であることから、口唇・口蓋裂患者にとって有用な骨形成細胞の供給源であると考えた。

当研究において上顎骨を用いた培養は以前に我々が行った腸骨を用いた培養と比較し、その過程で感染が生じる確率が高い印象であった。このため、当研究に提供された上顎骨由来の連続する 20 検体と、以前に行った研究で用いた腸骨由来の連続する 20 検体とで、培養過程で生じた感染件数を比較したところ上顎骨では 9 検体、腸骨では 1 検体であった。また上顎骨由来 MSC s はこのうち 4 検体で細胞増殖が留まり、培養の継続が困難となった。これらの違いが膜性骨化をする上顎骨と軟骨内骨化をする腸骨とに含まれる間葉系細胞の差異に由来するものであるのかは当研究では解明し得ない。上顎骨由来 MSC s と腸骨由来 MSC s の骨形成能を比較した論文は散見するが<sup>16)</sup>、その感染の発生率について言及したものは我々が渉猟し得た範囲では見つからなかった。当研究は検体数が少なく同一時期の比較でないため一概に言えないが、上顎骨は菲薄な粘膜組織を介して口腔・鼻腔と接しているため容易に感染に暴露され易いことが高い感染率の原因と推察された。

#### 4-2 上顎骨由来 MSCs の骨形成能

*in vitro*にて各培地で培養し骨芽細胞へ分化誘導した上顎骨由来 MSCs では、いずれも骨芽細胞で発現する ALP と、カルシウムの存在を示すアリザリンレッド S が明らかに染色された。また、これらは骨芽細胞マーカーを対照より高値に発現し、ALP と Ca の産生を認めた。さらに *in vivo* では移植した検体内に新たに形成された骨組織を認めた。この骨組織の細胞は、抗ヒトミトコンドリア抗体および抗ヒトオステオカルシン抗体による免疫組織化学染色で陽性でありヒト由来の細胞によるものであることを確認した。以上より上顎骨組織より得られた間葉系細胞は骨芽細胞の供給源となることが示唆され、また無血清培地でも骨形成能を有することが示された。なお *in vivo* での上顎骨由来 MSCs と腸骨由来 MSCs の骨形成面積の比較では当研究では腸骨由来 MSCs が大きかった。当研究は 1 検体であったため結論を断定できないが、当科における腸骨由来 MSCs の骨形成能の結果や既存の報告では、腸骨由来 MSCs は上顎骨 MSCs に比べ骨形成能に優れるとの報告があり、今回の結果はこれに矛盾しないと考えられる。MSCs はその由来組織により分化能に差異があるといわれ<sup>17)</sup>、骨形成能において上顎骨 MSCs は腸骨 MSCs に劣ると考えられる。また感染や低成長の検体が多く培養過程により多くの注意が必要と考える。しかし、同一術野からの組織採取であることを考慮すると低侵襲であり、上顎骨は骨形成能を有し、骨形成細胞の供給源として有用であるといえよう。

当研究では骨形成に最適とは言い難い皮下で比較的良好な骨形成が認められた。また、骨分化誘導を行わなかった細胞においてもカルシウム定量において若干のカルシウムが検出され、ALP 染色では試薬に反応し、ALP 産生量も高値であり、骨芽細胞マーカーである ALP も発現していた。特異性が高いとは言えない ALP 発現単独では論拠に乏しいが、Ca の存在が示された結果をあわせると未分化の細胞中にも骨芽細胞へ分化した細胞が存在した可能性が考えられる。腸骨海面骨由来 MSCs 中には分化誘導を

人為的に行わなくても骨芽細胞となる細胞が存在する可能性が報告されている<sup>18)</sup>。上顎骨由来 MSCs の中にもこの様な細胞が存在する可能性が示唆され、骨組織形成にこれらの細胞は有利に働き、これらを含む可能性のある上顎骨 MSCs は骨形成において有用であると考えられた。

#### 4-3 無血清培地使用の意義

近年、MSCs を用いた再生医療を顎顔面領域の治療へ応用する報告が散見される<sup>19)</sup>、<sup>20)</sup>。臨床応用を考えた場合、その材料に関わる医学的安全性や倫理的事項は考慮されるべきである。細胞培養では一般的に標的細胞を維持、増加を目的として培養液中に血清を添加している。しかし FBS 使用には免疫反応や感染などの問題があり臨床応用で使用することは困難である。自己血清の使用は臨床応用を考えた際に有用な方法の一つであるが<sup>2)</sup><sup>3)</sup><sup>21)</sup>、採取に侵襲を伴い、その量に制限があり、細胞培養に必要な量が不足する可能性も考えうる。自己血清が不足する際、無血清培地はこの補完となりうる。即ち持続的に入手できる無血清培地の活用は安定した細胞培養につながると思われる。近年、無血清培地の有用性を示す研究が散見される<sup>12)</sup>、<sup>13)</sup>、<sup>14)</sup>、<sup>15)</sup>が、当研究の実験でも、無血清培地で培養した MSCs は骨芽細胞への分化を示した。骨組織形成を目的とした MSCs の培養において、無血清培地は FBS 使用のリスクを回避しうる有用な培地であるといえよう。一方、無血清培地培養による腫瘍化の可能性に言及した論文もあり<sup>22)</sup>、臨床応用のためには長期的な安全性の検討が必須と考える。

#### 4-4 無血清培地と FBS 添加培地の比較

無血清培地の細胞は FBS 添加培地の細胞と比較すると、in vitro では Ca 産生量は少なかった。また、in vivo では統計的に骨組織形成面積 (%Area) に有意差はなかった。しかし、骨形成面積が 10%以上の検体は無血清培養で 5 検体中 1 検体、FBS 培養で 6 検体中 3 検体、その平均値は無血清培養 6.7%、FBS 培養 10.9%と、無血清培養

の検体がより低い印象であった。また *in vitro* の分化誘導後検体において ALP 発現量のピークは FBS 添加培地では測定期間の 3 週目までに現れたが、無血清培地培養ではピークを認めなかった。骨芽細胞マーカーの発現は細胞の分化の成熟度によって異なるが ALP は比較的早期に発現するマーカーである<sup>23) 24)</sup>。この結果は骨芽細胞への分化速度が無血清培地より FBS 添加培地で速かった可能性を示した。当研究で使用した無血清培地 (STK シリーズ) は従来の培地に比べ、初代培養において細胞の接着を促し、細胞増殖能に優れ、骨分化が短期間に行えるとされる培地である<sup>19)</sup>。しかし細胞数を統一し比較した当研究の結果では、初期培養において FBS 添加培地より細胞増殖速度は遅く、骨芽細胞への分化速度も遅かった。これらより、無血清培地を使用しても細胞増殖速度や骨分化速度が遅くなる場合があるといえる。また、培養の初めから骨芽細胞に分化する能力を持つ細胞数が少なかった可能性も示唆される。これには当研究で使用した細胞が、臨床治療で提供された上顎骨の余剰組織で個体差があることや、検体数不足が考慮されるべきである。しかし実際に臨床応用で使用する細胞は研究用に調整された細胞とは異なる。無血清培地は MSCs の培養において有用ではあるが、全ての MSCs にとって FBS 添加培地より増殖能に優れるものではなく、細胞によって個体差が生じる可能性があると考えられる。

今後、より確実に効率よく骨形成を得ることが課題であるが、当実験の結果より、FBS 添加培地にとまなうリスク回避や、自己血清添加培地にとまなう患者の負担軽減を目的とするために標的細胞の能力を保持できる無血清培地は有用であると思われる。臨床応用には培地含有成分の細胞への長期的影響や移植床への影響など安全性の検討は必須である。今後、さらに安定して骨形成能を発現し、安全性の高い無血清培地の開発が待たれる。

#### 4-5 本研究にかかる制限

手術時に余剰組織として提供された材料を使用したため検体の数量ともに制限があった。また本研究でを使用した MSCs は多分化能と自己増殖能を確認した細胞であるが、獲得した接着系紡錘形細胞を細胞表面マーカーで選別して培養したものはなかった。

### 5. 総括

上顎骨由来 MSCs の骨分化能を *in vitro* で確認した。

無血清培地を用いた培養で上顎骨由来 MSCs が骨組織を形成することを *in vivo* で確認した。

患者に新たな外科的侵襲を加えることなく得られる上顎骨より上顎骨由来間葉系幹細胞を得て、無血清培養で骨組織形成を得る可能性が示唆され、骨形成改善を目的とした再生医療の実現への可能性が示唆された。

## 6 今後の課題

臨床応用を可能にすることが最終的な目標であるため、安全性の確認が最重要と考える。「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」に基づき、感染・癌化の評価が課題である。

また、確実な治療効果を得るためには安定した組織形成が必要であるため、より確実に効率よく骨形成を得ることが課題である。

## 7 謝辞

本研究は「2011 年度科学研究補助金（23592942）、研究代表者：山崎安晴；再生医工学を用いた腸骨海綿骨非依存型顎裂部骨移植の臨床展開の可能性について。」の助成を受けて行ったものである。

本研究には北里大学医学部病態・診療系 曾根由美子様の多大な貢献があったことを特記し心から感謝を申し上げます。

本研究に対する北里大学医学部形成外科・美容外科 内沼栄樹先生・山崎安晴先生のご指導、同医局員の各先生方のご協力に深く感謝いたします。

## 8. 引用文献

- 1) Shimakura Y, Yamazaki Y, Uchinuma E: Experimental Study on Bone Formation Potential of Cryopreserved Human Bone Marrow Mesenchymal Cell/Hydroxyapatite Complex in the Presence of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Journal of Craniofacial Surgery* 14(1):108-116, 2003
- 2) Matsuo A, Yamazaki Y, Takase C, Aoyagi K, Uchinuma E.: Osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured with autologous serum. *J Craniofac Surg.* 19(3):693-700, 2008
- 3) Baba K, Yamazaki Y, Ikemoto S, Aoyagi, K, Takeda A, Uchinuma E: Osteogenic potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells cultured with umbilical cord blood-derived autoserum. *J Craniomaxillofac Surg.* 40; 768-772, 2012
- 4) Ohgushi H, Kitamura S, Kotobuki N, Hirose M, Machida H, Muraki K, Takakura Y: Clinical application of marrow mesenchymal stem cells for hard tissue repair. *Yonsei Med J* 45:61-67, 2004
- 5) Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al.: Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. *Stem cells* 24:1294-1301, 2006

- 6) Pivoriūnas A, Bernotiene E, Unguryte A, et al. : Isolation and differentiation of mesenchymal stem-like cells from human umbilical cord vein endothelium and subendothelium. *Biologi ja.* 2:99–103, 2006
  
- 7) Sarugaser R, Sarugaser D, Lickorish D, et al.: Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: A source of mesenchymal progenitors. *Stem cells* 23: 220–229, 2005
  
- 8) Matsubara T, Suardita K, Ishii M, Sugiyama M, Igarashi A, Oda R, Nishimura M, Saito M, Nakagawa K, Yamanaka K, Miyazaki K, Shimizu M, Bhawal UK, Tsuji K, Nakamura K, Kato Y: Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* 20: 399–409. 2005
  
- 9) Bubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd A. C, Bernad A: Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 65(8):3035–3039, 2005.
  
- 10) Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer B W, Cohen Y, Loewenthal R, Trakhtenbrot L, Paz N, Koren-Michowitz M, Waldman D, Leider-Trejo L, Toren A, Constantini S, Rechavi G: Donor-Derived Brain Tumor Following Neural Stem Cell Transplantation in an Ataxia Telangiectasia Patient. *PLoS Med.* 6: 221–231, 2009

- 11) Chase LG, Lakshmipathy U, Solchaga LA, Rao MS, Vemuri MC: A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 1:8 2010.
  
- 12) Mannello F, Tonti G A: Concise Review: No Breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: Conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells* 25:1603-1609, 2007
  
- 13) Liu C, Wu M, Hwang S: Optimization of serum free medium for cord blood mesenchymal stem cells. *Biochem Eng J* 33:1-9, 2007
  
- 14) Ishikawa K, Sawada R, Katou Y, Tsuji K, Shao J, Yamada T, Katou R, Tsutiya T: The effectivity of the novel serum-free Medium STK2 for proliferating human mesenchymal stem cells. *Yakugaku Zasshi* 129(3):381-384, 2009
  
- 15) Ogata S, Ogihara Y, Nomoto K, Akiyama K, Nakahata Y, Sato K, Minoura K, Kokubo K, Kobayashi H, Ishii M: Clinical score and transcript abundance patterns identify Kawasaki disease patients who may benefit from addition of methylprednisolone. *Pediat Res* 19: 577-584, 2009

- 16) Sunday SO, Akintoye, Thanh Lam, Songtao Shi, Jaime Brahim, Michael T. Collins, Pamela G. Robey: Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. Bone 38, (6) 758-768 2006
- 17) Kern S, Eichler H, Stoeve J, Bieback K: Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. Stem cells 24: 1294-1301, 2006
- 18) Takeda A, Yamazaki Y, Baba K, Ishiguro M, Aoyagi K, Ikemoto S, Uchinuma E: Osteogenic Potential of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Cultured in Autologous Serum: A preliminary Study. J Oral Maxillofac Surg 70: e469-476, 2012
- 19) Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Atashi A: Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: A preliminary report. J Craniomaxillofac Surg 40: 2-7, 2012
- 20) Wongchuensoontorn C, Liebehenschel N, Schwarz U, Schmelzeisen R, Gutwald R, Ellis E, Sauerbier S.: Application of a new chair-side method for the harvest of mesenchymal stem cells in a patient with nonunion of a fracture of the atrophic mandible - A case report. J Craniomaxillofac Surg 37: 155-161, 2009

- 21) Baba K, Yamazaki Y, Ishiguro M, Kumazawa K, Aoyagi K, Ikemoto S, Takeda A, Uchinuma E: Osteogenic potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells cultured with umbilical cord blood-derived fibrin: A preliminary study. *J Craniomaxillofac Surg* 41:775–782, 2013
- 22) Sawada R, Yamada T, Tsuchiya T, Matsuoka A: A Microarray Analysis of the Effects of Serum-free Medium on Gene Expression Changes in Human Mesenchymal Stem Cells during the in Vitro Culture. *Yakugaku Zasshi* 130: 1387–1392, 2010
- 23) Sun H, Ye F, Wan J, Shi Y, Tu Z, Bao J, Qin M, Bu H, Li Y: The upregulation of osteoblast marker genes in mesenchymal stem cells prove the osteoinductivity of hydroxyapatite/tricalcium phosphate biomaterial. *Transplantation* 40: 2645–2648, 2008
- 24) Meister G, Tuschl T: Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343–349, 2004

## 9 業績目録

### (I) 原 著

1. Masashi Ishiguro, Yasuharu Yamazaki, Kyoko Baba, Kenichi Kumazawa, Takayuki Sugimoto, Akira Takeda, Eiju Uchinuma : Assessment of the Osteogenic Potential of Maxilla-Derived Mesenchymal Stromal Cells and the Utilization of Serum-Free Medium for Culture Thereof.  
The Kitasato Medical Journal 44 (1) in press.
2. Kyoko Baba, Yasuharu Yamazaki, Masashi Ishiguro, Kenichi Kumazawa, Kazuya Aoyagi, Shigehiro Ikemoto, Akira Takeda, Eiju Uchinuma : Osteogenic potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells cultured with umbilical cord blood-derived fibrin: A preliminary study.  
Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 41:775-782, 2013
3. Akira Takeda, Yasuharu Yamazaki, Kyoko Baba, Masashi Ishiguro, Kazuya Aoyagi, Shigehiro Ikemoto, Eiju Uchinuma : Osteogenic Potential of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Cultured in Autologous Serum: A preliminary Study.  
Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 70:e469-476, 2012
4. 石黒匡史・松尾あおい・永島和貴・上野聡一郎・馬場香子・武田啓・内沼栄樹 :  
眼瞼下垂手術症例の検討. 埼玉県医学会雑誌 46 : 215-221, 2011

5. 馬場香子、石黒匡史、鳥居博子、内沼栄樹：飛来した金属異物による腹部穿通性外傷の1例. 日本職業・災害医学会誌、57:87～91, 2009
6. 池本繁弘、石黒匡史、内沼栄樹：脊髄髄膜炎の統計的検討. 日本形成外科学会誌、25:502～508, 2005
7. Ryuji Masuda, Akira Tkeda, Takayuki Sugimoto, Masashi Ishiguro, Eiju Uchiuma; Reconstruction of the Umbilicus Using a Reverse Fan-Shaped Flap: Aesth. Plast. Surg. 27:349-353, 2003
8. 山下理絵、石黒匡史、内沼栄樹：美容外科でのレーザー治療:aging に対するレーザー治療. 日本美容外科学会報、24:13～22, 2002
9. 石黒匡史、山下理絵、橋本信子、内沼栄樹：壊死性筋膜炎の臨床学的検討. 日本形成外科学会誌、22:421～427, 2002
10. 山本博、酒井直彦、石黒匡史、内沼栄樹:当科における耳前瘻孔の検討. 日本形成外科学会誌、21:77～81, 2001
11. 石黒匡史、瀬崎晃一郎、内沼栄樹：Bednar Tumor (Pigmented Dermatofibrosarcoma Protuberans):本邦報告例からみた臨床増と組織像の検討. 日本形成外科学会誌、20:302～311, 2000

12. 酒井直彦、山崎安晴、中北信明、山本博、石黒匡史、内沼栄樹：小児下顎骨関節突起部骨折の保存的治療(第1報)．日本形成外科学会誌、19:203～212, 1999
13. 佐藤明男、石黒匡史、山本博、松井潔、内沼栄樹、黒柳能光：新規培養皮膚(K-CDS)の動物実験評価.Press in Medicine、18:172-173, 1998

(Ⅱ) 著 書

な し

(Ⅲ) 総説・講座

な し

(Ⅳ) 症例・臨床治験・その他

1. 馬場香子、石黒匡史、武田啓、内沼栄樹、小室万里：若年男性に発症した特発性腹直筋血腫の1例．日本職業・災害医学会誌、60:240-244, 2012
2. 森山慶太、石黒匡史：異物注入による陰茎壊死の1例．日本美容外科学会誌、34:29～34, 2012
3. 馬場香子、石黒匡史、上田晃子、松尾あおい、武田啓、内沼栄樹：十味敗毒湯を内服した慢性膿皮症9症例の検討．漢方医学、36：312～315, 2012
4. 石黒匡史、松尾あおい、永島和貴、石川心介、武田啓、内沼栄樹：洗浄剤による足背部アルカリ損傷の1例．産業医学ジャーナル、3:28～31, 2011

5. 森美穂子、大崎政海、肥田修、肥田和恵、中島正己、木下慎吾、原睦子、徳永栄吉、矢吹明彦、石黒匡史、長田宏巳：嗅神経芽細胞腫の2例. 埼玉県医学会雑誌、46：209～214, 2011
6. 馬場香子、石黒匡史、下総美奈子、柴田裕達、内沼栄樹：リン酸カルシウム骨ペーストとチタンメッシュシートを併用して再建を行った頭蓋顔面骨変形の1例. 日本職業・災害医学会誌、56:62～67, 2008.
7. 石黒匡史、吉竹俊裕、松尾あおい、宮内邦浩、武田啓、内沼栄樹：組織拡張器で治療した頭部先天性巨大母斑の1例. 埼玉県医学会雑誌、44:191～195；2009
8. 下総美奈子、石黒匡史、馬場香子、上野聡一郎、内沼栄樹：新たな便失禁管理システム（フレキシシール<sup>®</sup> ConvaTec 社製）の使用経験  
埼玉県医学会雑誌、42:172～181, 2007
9. 増田竜二、瀬崎晃一郎、石黒匡史、内沼栄樹：先天性外鼻孔腫瘍の3例.  
日本形成外科学会誌、24:305～311, 2004.
10. 増田竜二、石黒匡史、徳田真紀子、内沼栄樹：再発，転移をきたした鼻翼部 Basosquamous Cell Carcinoma の1例. 日本形成外科学会誌、24:706～712, 2004.
11. 石黒匡史、橋本信子、山下理絵、有馬裕子、内沼栄樹：上腕二頭筋に認めた筋肉内血管腫の1例. 整形・災害外科、45:595～599, 2002.

12. 石黒匡史、田中早苗、増田竜二、内沼栄樹：人工透析患者に生じた Tumoral Calcinosis の 1 例. 日本形成外科学会誌、20 ; 328~334, 2000
13. 高浜英人、能登重光、相崎一雄、千島由朗、佐藤好信、野呂昌美、石黒匡史、瀬崎晃一郎、馬場タカ子、田所衛：異所性乳癌の 1 例. 西日本皮膚科、62;54~57, 2000
14. 山田直人、新沢博子、石黒匡史、内沼栄樹：外傷性皮膚欠損創における人工真皮の使用経験. 日本形成外科学外科系連合会、24 ; 619~624, 1999
15. 山田直人、中北信昭、石黒匡史、新沢博子、内沼栄樹：救命救急センターにおける形成外科診療. 日本形成外科学外科系連合会、23 ; 980~983, 1998
16. 天野正宏、内沼栄樹、高山敦子、石黒匡史、村下一晃、塩谷信行：剣状強皮症の 1 例. 臨床皮膚科、51 ; 821~823, 1997
17. 内沼栄樹、山本博、酒井直彦、石黒匡史、鈴木雅美、林和弘：浅側頭動脈島状皮弁による眼瞼の再建. 耳鼻咽喉頭頸、68 ; 915~918, 1996

## 10. 図表

### 図表解説

#### 図 1. ALP 染色

無血清培地・FBS 添加培地 両検体ともほぼ同等に藍色に染色された。

- A, 無血清培養の検体 ; 分化 (+)
- B, 無血清培養の検体 ; 分化 (-)
- C, FBS 添加培地培養の検体 ; 分化 (+)
- D, FBS 添加培地培養の検体 ; 分化 (-)

#### 図 2. ALP 定量

蛋白量あたりの ALP 活性量を求めた。無血清培地・FBS 添加培地いずれの検体も骨分化誘導を行っていない細胞より ALP 活性量は高値であった。

- A, 分化誘導 1. 2. 3 週目における ALP 活性量 ; FBS 添加培地では ALP 活性量のピークは観察期間中に認められ、無血清培地では認められなかった。
- B, 分化誘導 3 週目における ALP 活性量の比較 ; 両者に有意差は認めなかった ( $p=0.178$ ) 。

#### 図 3. アリザリンレッド S 染色

無血清培地・FBS 添加培地いずれでも、骨分化誘導を行っていない細胞は染色されなかったが、検体はアリザリンレッドに染色された。

- A, 無血清培養の検体 ; 分化 (+)
- B, 無血清培養の検体 ; 分化 (-)
- C, FBS 添加培地培養の検体 ; 分化 (+)
- D, FBS 添加培地培養の検体 ; 分化 (-)

#### 図 4. カルシウム定量

無血清培地・FBS 添加培地いずれの検体も骨分化誘導を行っていない細胞よりカルシウム量は高値であった。無血清培地・FBS 添加培地の分化誘導後の細胞両者間の Ca 値に有意差は認めなかった ( $p=0.202$ )。

#### 図 5. 骨芽細胞マーカー (ALP、OC) の発現

ALP、OC とも、無血清培地・FBS 添加培地いずれの検体も未分化の細胞より ALP と OC を高値に発現した。

- A, ALP 発現 ; 無血清培地培養細胞
- B, OC 発現 ; 無血清培地培養細胞
- C, ALP 発現 ; FBS 添加培地培養細胞
- D, OC 発現 ; FBS 添加培地培養細胞

#### 図 6. HE 染色

無血清培地・FBS 添加培地いずれの検体でも骨気質・骨小腔・骨細胞をみとめ、良好な骨組織形成を認めた。

- A, 無血清培地培養
- B, FBS 添加培地培養

#### 図 7. 無血清培養検体の免疫組織化学染色

骨組織内の基質は抗ヒトオステオカルシン抗体により、細胞は抗ヒトミトコンドリア抗体によりそれぞれ褐色に染色された (矢印)。

- A, 抗ヒトオステオカルシン抗体染色
- B, パネル A に対応する部位の HE 染色

C, 抗ヒトミトコンドリア抗体染色

D, パネル C に対応する部位の HE 染色

#### 図 8. 無血清培地と FBS 添加培地の検体における骨組織面積の比較

A, 無血清培地の 5 検体、FBS 添加培地の 6 検体の骨形成面積を示した。

B, 無血清培地の検体は FBS 添加培地の検体に比べ骨形成面積 (%Area) が低値であったが、有意差は認めなかった ( $p=0.379$ )。

#### 図 9. 上顎骨由来 MSC s と腸骨由来 MSC s の骨形成

A, FBS 添加培地での in vivo での上顎骨由来 MSC

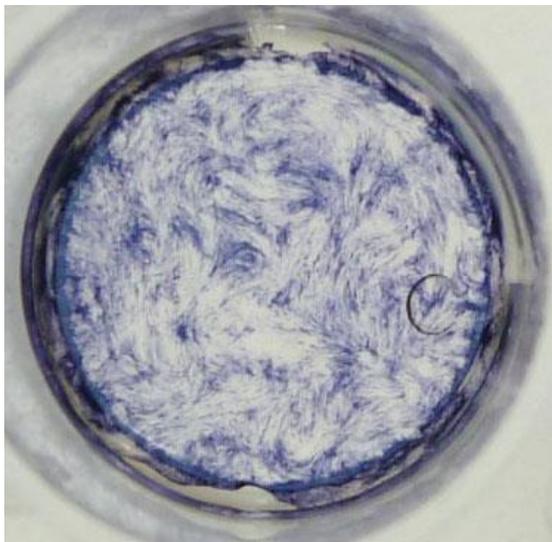
B, FBS 添加培地での in vivo での腸骨由来 MSC

#### 表 1. 検体の詳細

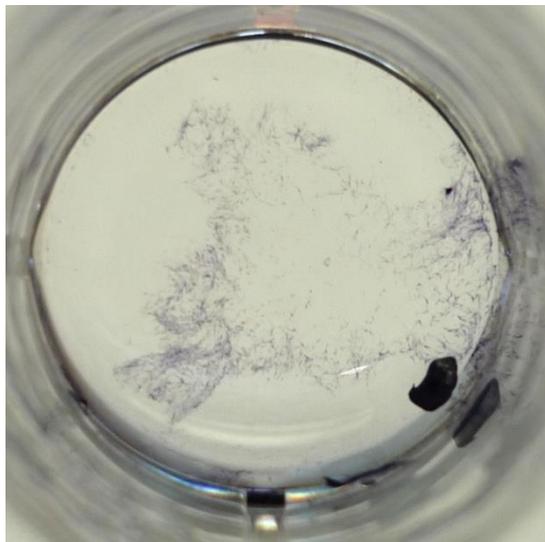
提供された検体を、培養の継続が不可能であったものも含めて提示した。

图 1

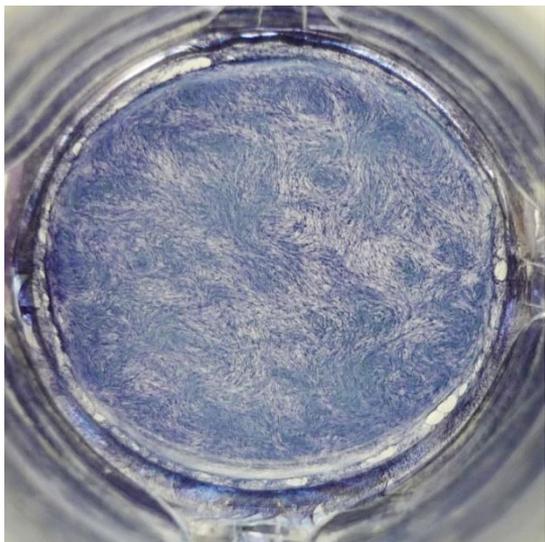
A



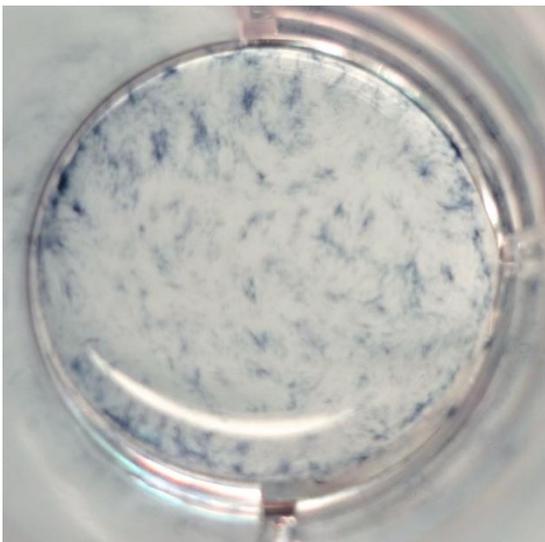
B



C



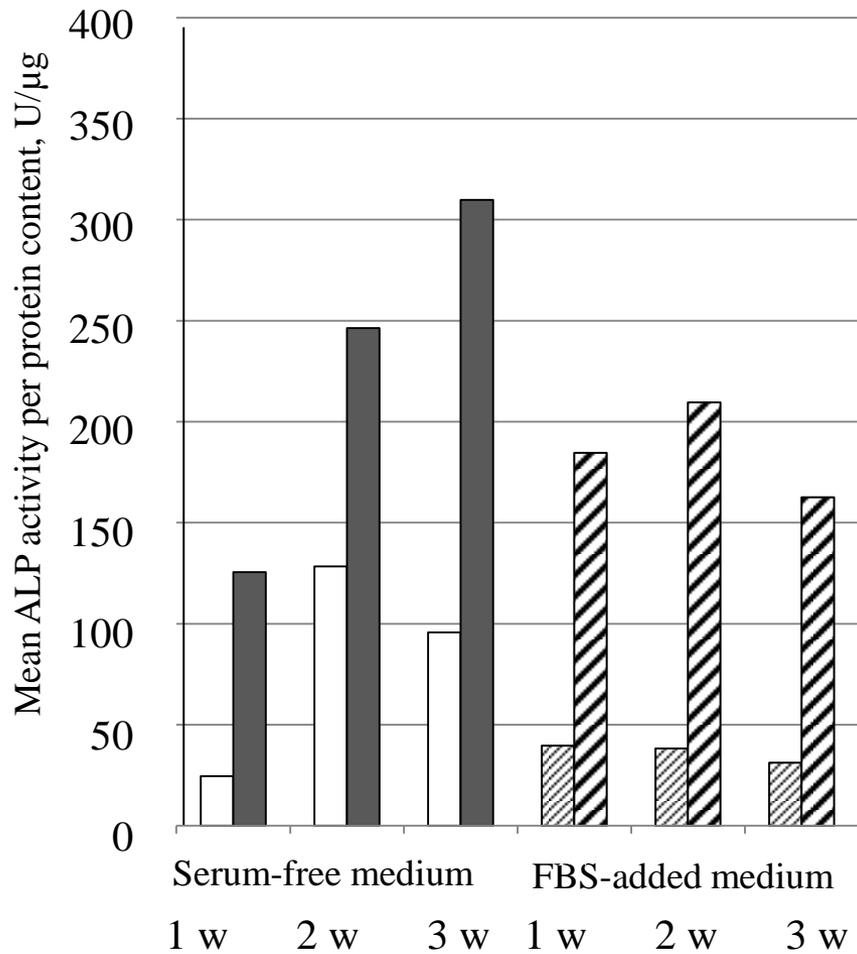
D



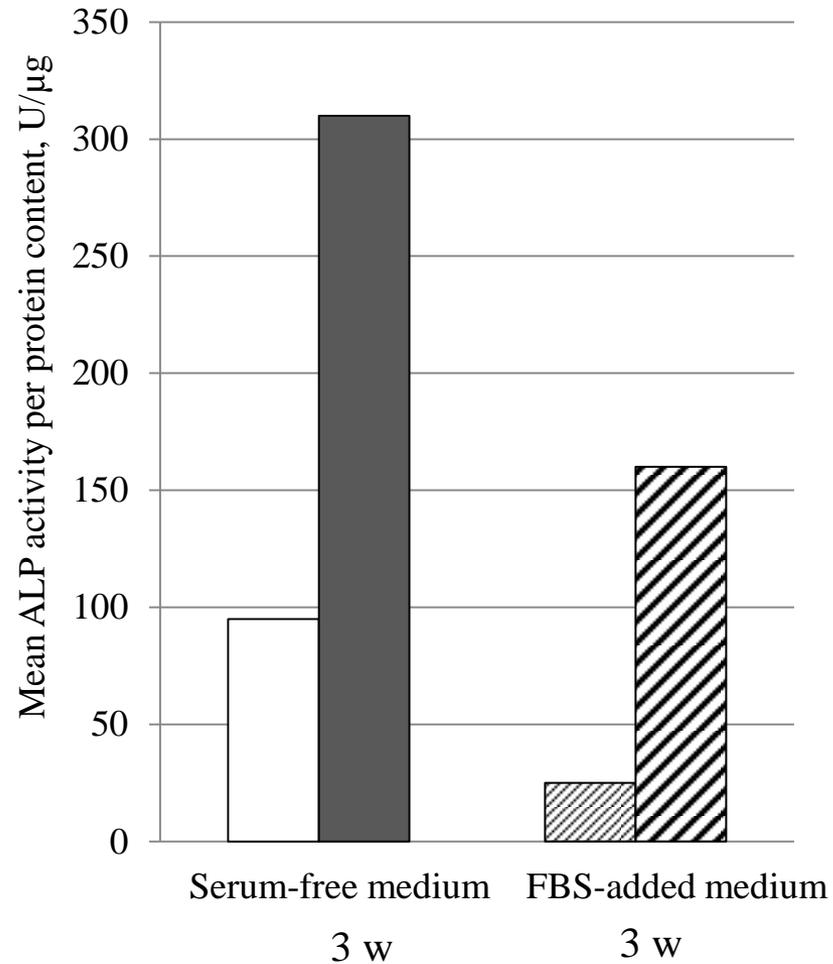
Induction for osteogenic differentiation



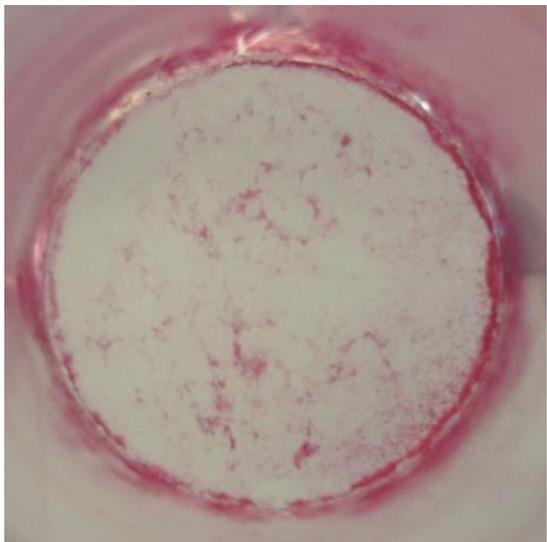
A



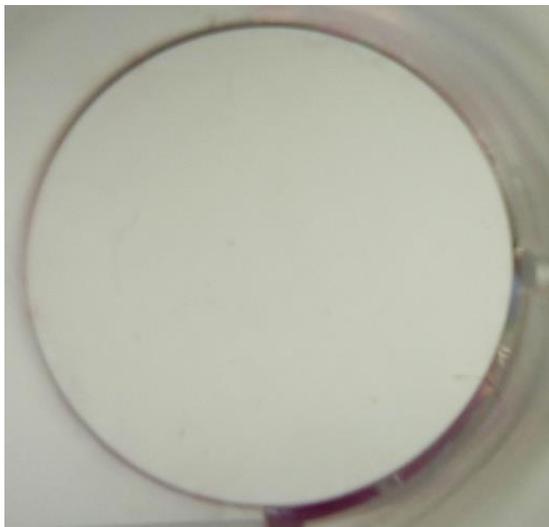
B



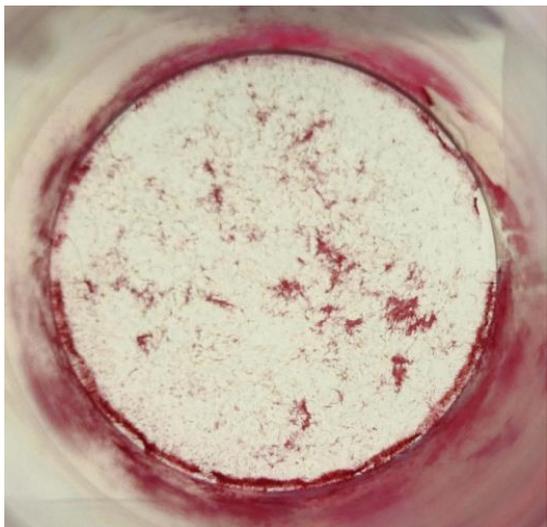
A



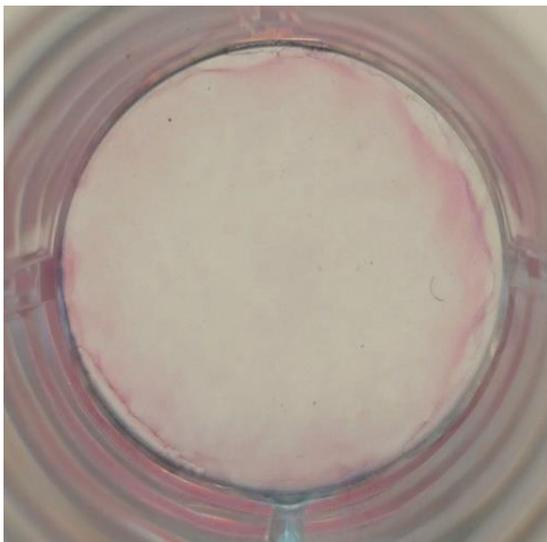
B

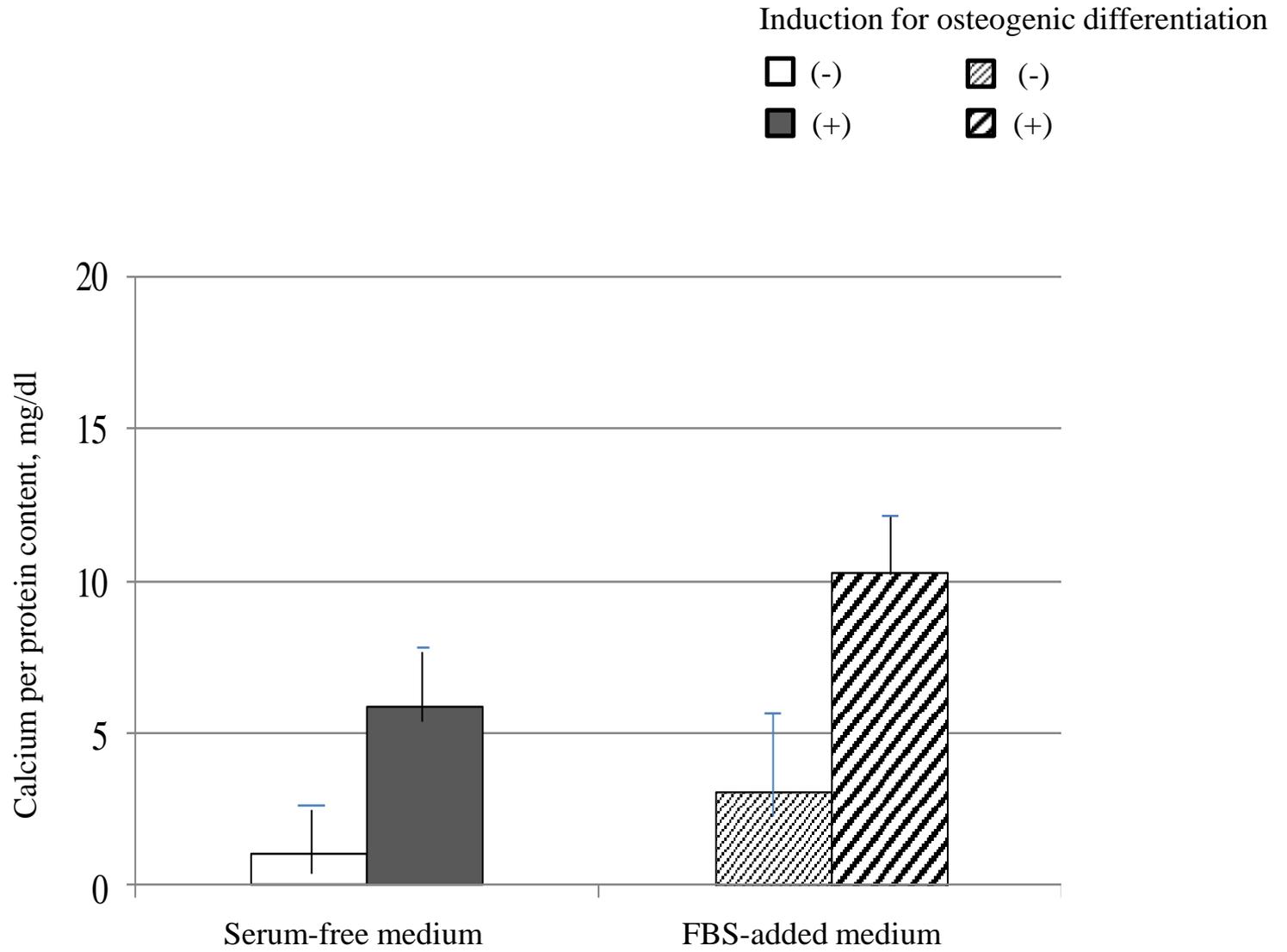


C



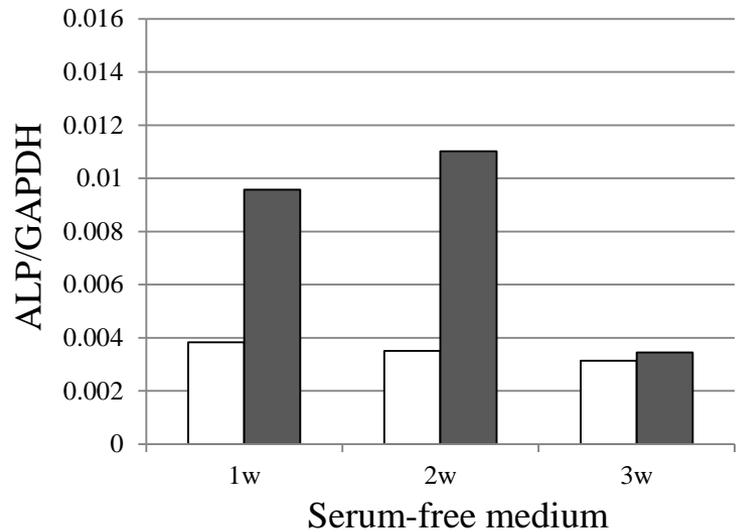
D



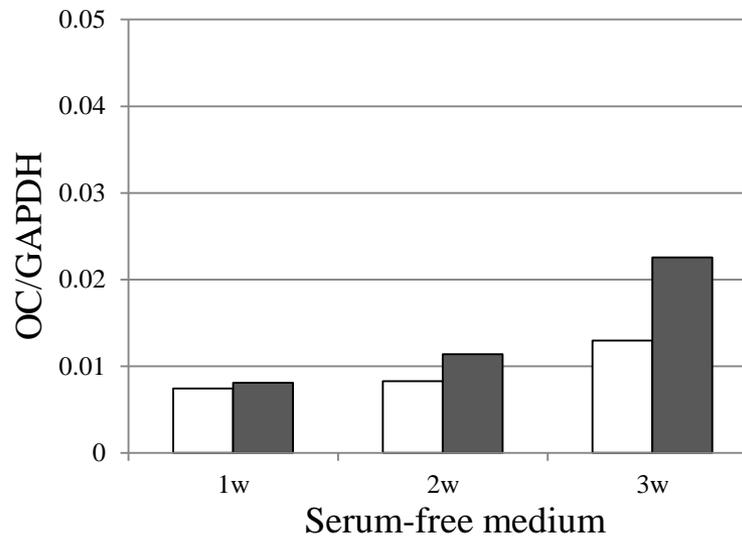


5

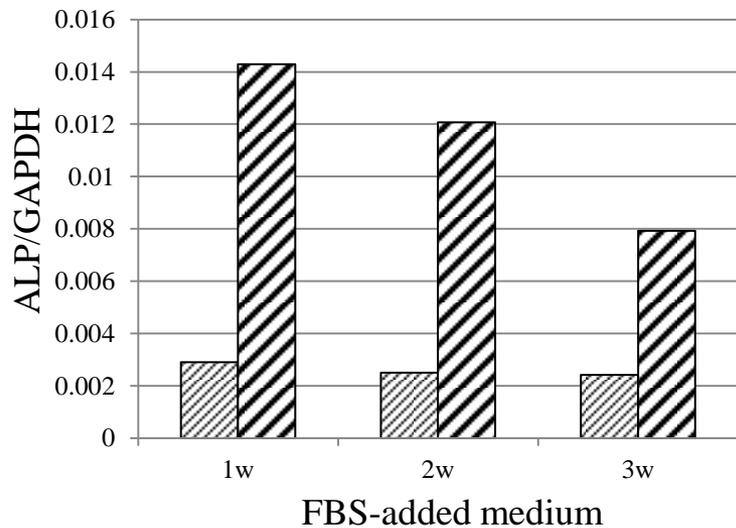
A



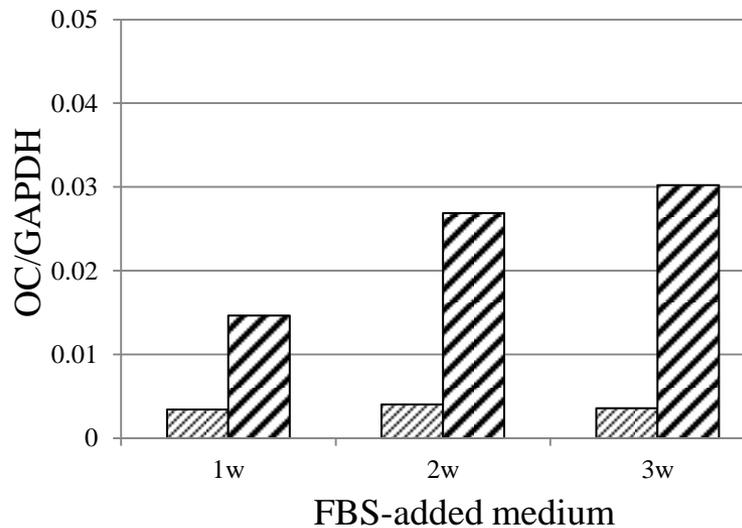
B



C



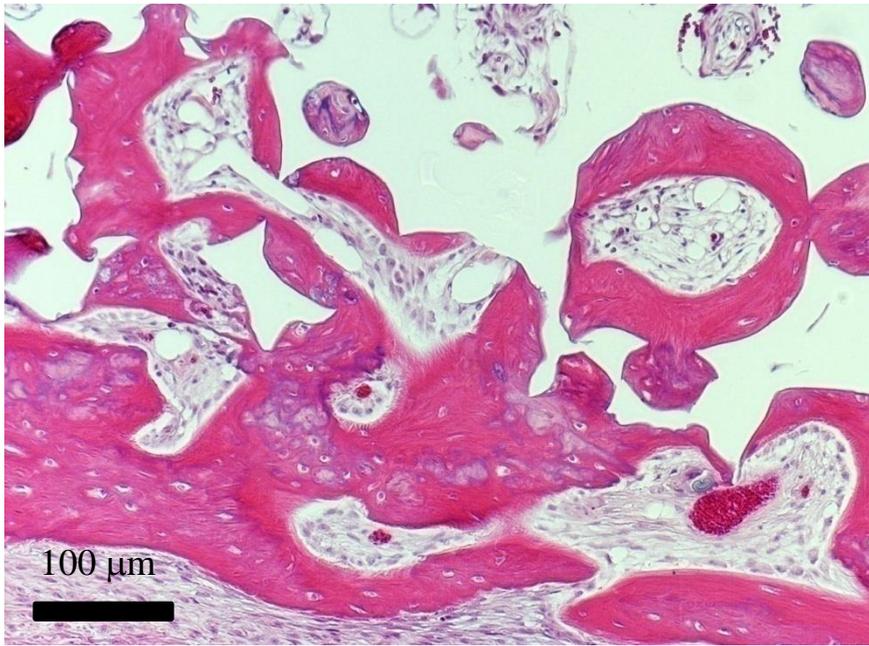
D



Induction for osteogenic differentiation

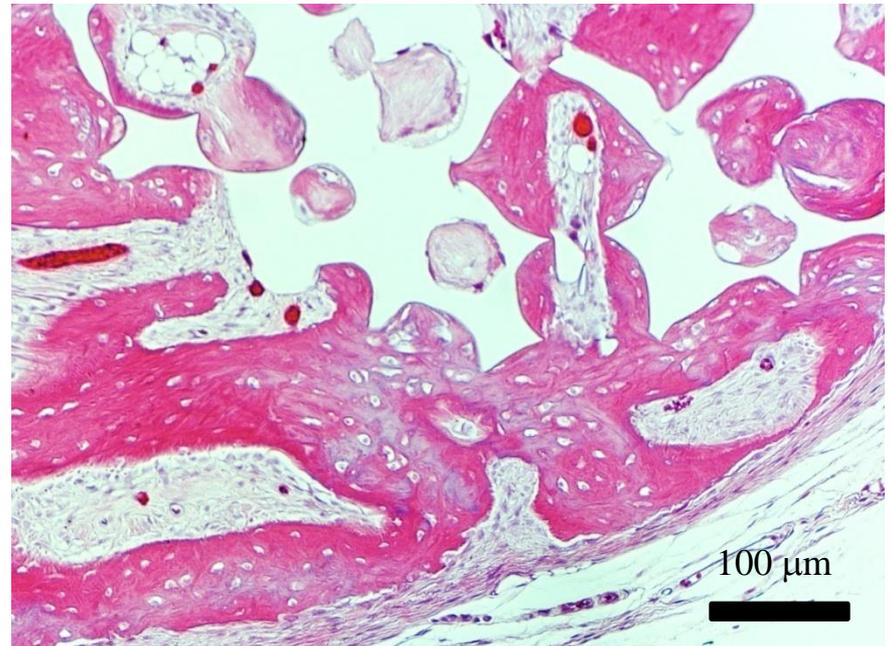


A



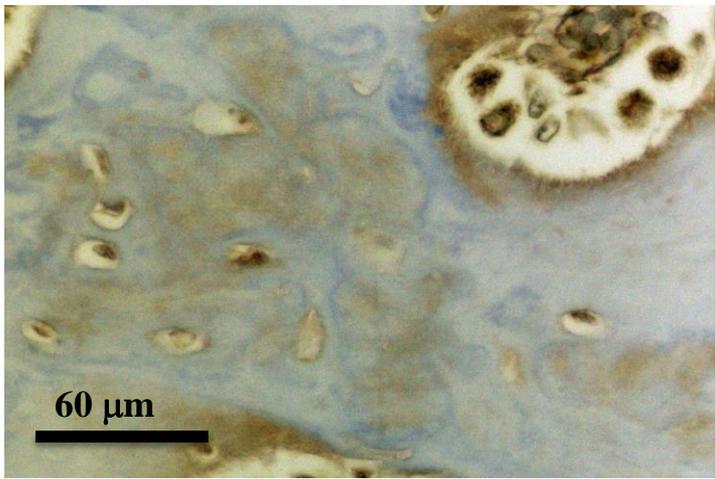
Specimen for culture using serum-free medium

B

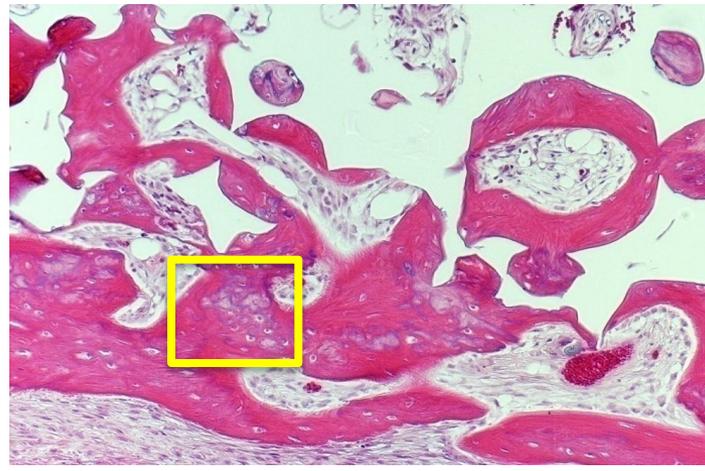


Specimen for culture using FBS-added medium

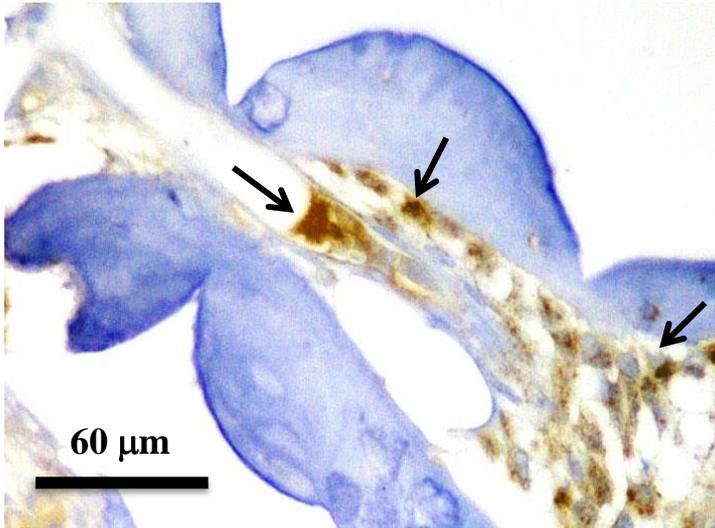
A



B



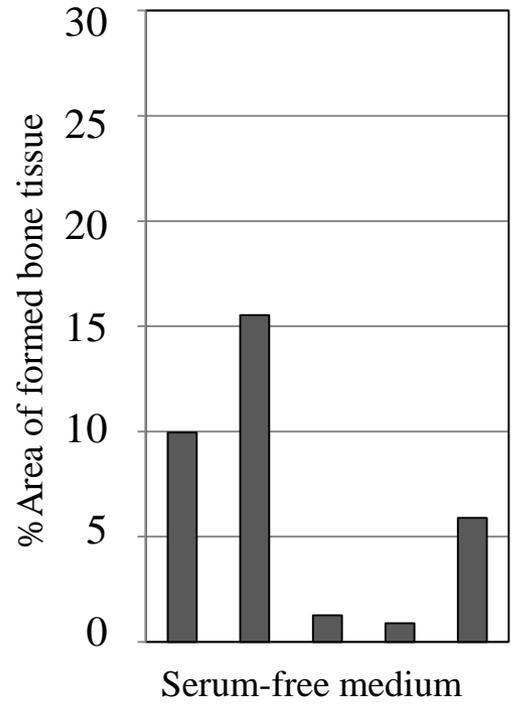
C



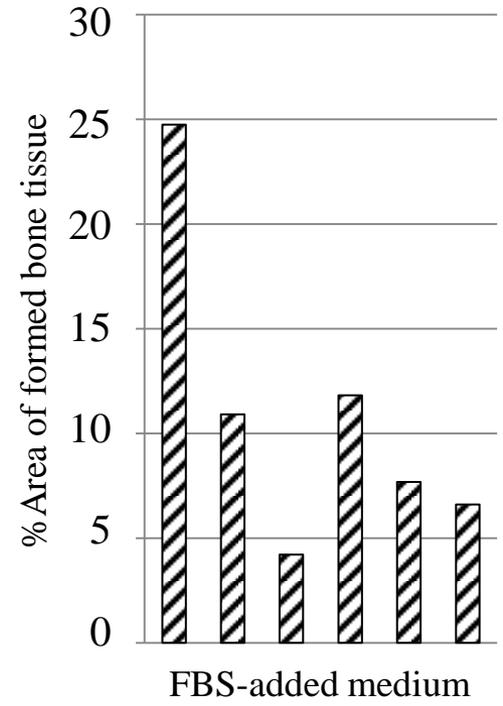
D



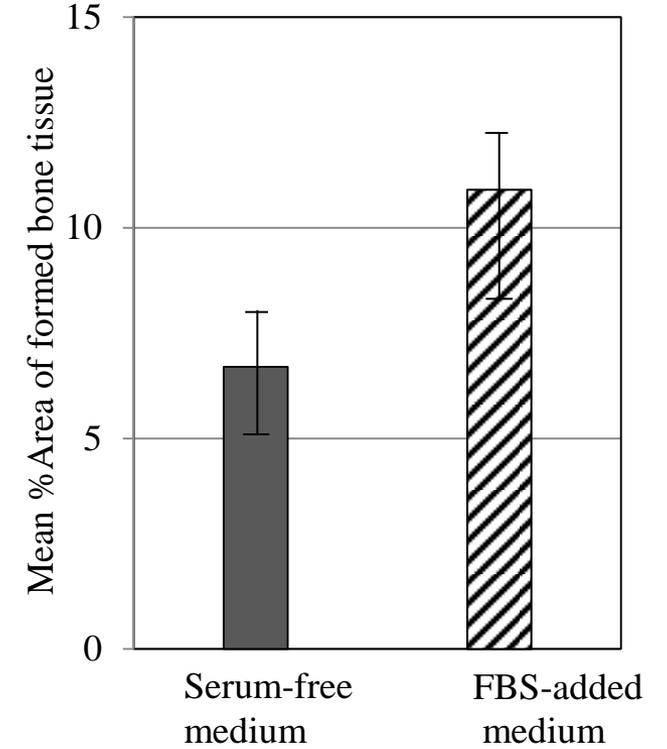
A



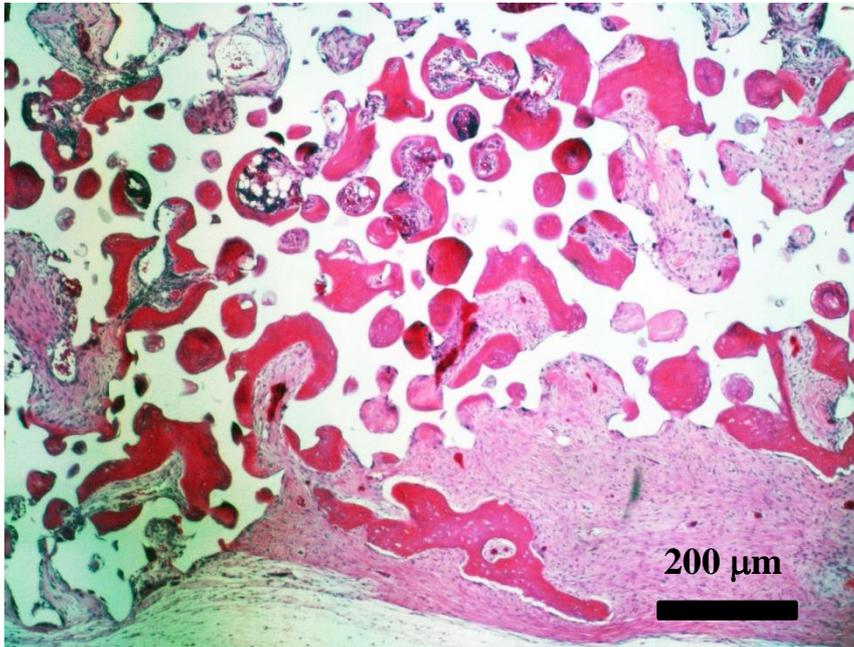
B



C



A



Maxilla-derived MSCs

B



Iliac crest-derived MSCs