

学位論文

培養骨の骨形成過程における
ステロイド系抗炎症薬の影響

千原 隆弘

大学院歯学独立研究科 硬組織制御再建学講座
(主指導教員:各務 秀明 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

Effects of anti-inflammatory steroid on the osteogenic process
of tissue-engineered bone

Takahiro Chihara

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine
(Chief Academic Advisor : Professor Hideaki Kagami)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph. D. (in Science)

【目的】

歯科領域においては、自家骨移植や人工骨による骨再生が行われてきたが、近年細胞を用いた骨再生治療の実用化が期待されている。これまでの臨床研究から、骨再生治療の安全性や有効性が示されてきたが、その一方で骨再生のメカニズムには不明な点も多い。近年、移植部位における炎症が骨再生を阻害する可能性が報告されている。実際の細胞による骨再生治療の効果を最大化するためには、局所の炎症が骨再生に与える影響の詳細を理解する必要がある。そこで、本研究では免疫正常マウスを用いた骨形成モデルを確立した。さらに、同マウスモデルに対して抗炎症作用を持つステロイド系抗炎症薬を投与し、その影響についても検討を行った。

【材料と方法】

マウスの骨髄由来間葉系幹細胞は安定した培養が困難であることから、われわれは皮質骨由来の細胞に着目した。BALB/cAJc1 の大腿骨および脛骨の皮質骨より細胞を採取し、接着性細胞の培養を行った。この細胞をデキサメタゾン、 β グリセロリン酸、アスコルビン酸および BMP-2 を含む分化誘導培地で培養後、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性を測定し、骨分化を確認した。次に、培養細胞を担体である β -TCP 顆粒上に播種し、分化誘導を行った。得られた細胞-担体複合体(培養骨)を同系マウスの背部皮下へ移植した。骨形成過程に対するステロイド系抗炎症薬の影響について検討するために、実験群へは培養骨移植直後に1回と翌日に2回ベタメタゾンリン酸エステルナトリウムの腹腔内投与を行った。対照群へは、同量の生理食塩水を腹腔内に投与した。移植3、7および28日目に培養骨を摘出し、HE染色、TRAP染色および免疫染色(抗F4/80抗体、抗TNF- α 抗体、抗Sp-7抗体)により比較検討を行った。また、サンプルの一部は液体窒素中で直ちに凍結し、RNAを抽出後定量的PCRにてTNF- α の遺伝子発現を解析した。

【結果】

培養された接着性の細胞は、間葉系幹細胞のマーカーであるCD29、CD105およびSca-1を発現していた。得られた細胞を骨分化誘導培地で培養を行ったところ、ALP活性が上昇した。さらに、免疫不全マウス(BALB/cAJc1-nu/nu)背部皮下へ移植後に骨形成が認められたことから、骨芽細胞様の細胞が得られていることを確認した。経時的に摘出されたサンプルの所見では、培養骨移植後に炎症性細胞浸潤が認められ、特に3日目では対照群において炎症性細胞の浸潤が顕著であった。F4/80陽性細胞は細胞の有無にかかわらず担体周囲に認められたため、移植された担体に対するマクロファージの浸潤と考えられた。F4/80陽性細胞数を面積比で検討

したところ、培養骨移植 7 日目において、実験群では少ない傾向であったが、それ以降ではステロイド系抗炎症薬投与の有無による差は認められなかった。TNF- α 陽性細胞は、移植 7 日目から担体周囲に見られ、28 日目にも局在していた。しかしながら、ステロイド系抗炎症薬投与の有無による差は認められなかった。TRAP 染色の結果では、実験群では 7 日目より陽性細胞がわずかに認められ、28 日にかけて増加した。一方、対照群では 7 日目には認められず、28 日には実験群と同程度の陽性細胞数となっていた。Sp7 陽性細胞は、実験群、対照群ともに培養骨移植 3 日目から認められ、その後形成された骨周囲で強陽性の細胞が出現した。しかしながら、ステロイド系抗炎症薬投与の有無による分布や発現強度の差は認められなかった。

【考察】

マウス下腿の皮質骨より得られた細胞は、骨髄間質細胞と比較して安定した増殖が得られた。また、間葉系幹細胞マーカーを発現するとともに、分化誘導によって ALP 活性が上昇することから、マウスにおける骨芽細胞の細胞源として有用と考えられた。この細胞を用いることで、免疫正常マウスを用いた骨形成モデルの作製が可能であった。これまでの研究から、免疫正常マウスでは、骨形成過程の初期に起こる炎症性サイトカインの上昇によって骨形成が抑制されることが示唆されている。培養骨移植の初期には、移植操作による炎症や移植された担体に対する生体反応として、マクロファージなど炎症性細胞の浸潤が認められた。ステロイド系抗炎症薬の投与によって、初期の炎症性細胞の浸潤が軽減される可能性が示唆された。しかしながら、炎症性サイトカインである TNF- α の発現には差を認めず、また 28 日以降では実験群と対照群の炎症性細胞浸潤、破骨細胞や骨芽細胞の分布に差を認めなかった。以上から、培養骨移植後短期間のステロイド系抗炎症薬投与は、培養骨移植に伴う初期の炎症反応の一部を軽減する可能性があることが示唆された。その一方で骨形成への影響は明らかでなく、今後投与量や投与方法の違いによる影響についても、さらに検討する必要があるものと考えられた。

緒言

歯科領域においては、自家骨移植や人工骨による骨再生が行われてきたが、近年細胞を用いた骨再生治療の実用化が期待されている^{1, 2)}。これまでの臨床研究から、骨再生治療の安全性や有効性が示されてきたが、その一方で骨再生のメカニズムには不明な点も多い³⁾。実際の細胞による骨再生治療の効果を最大化するためには、細胞移植後の局所での骨再生メカニズムの詳細を理解する必要がある。

骨再生のメカニズムや条件の最適化のために、動物モデルが使用されている。現在骨再生にもっとも多く用いられている細胞源は、骨髄由来の間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells : MSCs) であるが、MSCs の性質には種差が大きいことが知られている⁴⁾。したがって、実際の治療効果を検証するための基礎研究としては、動物モデルを用いた実験以外にも、ヒト骨髄細胞を免疫不全動物へ移植する実験系が必須と考えられている。一方、近年、移植部位における炎症が骨再生を阻害する可能性が報告されている⁵⁾。また、免疫正常動物への移植では、移植された担体に対する強い炎症反応が起こり、組織再生を阻害する可能性が報告されている⁶⁾。実際の臨床では免疫正常な個体への細胞移植となることから、免疫不全動物を用いた実験系以外にも、免疫正常動物において起こる局所の炎症反応やその制御について理解することは重要と考えられる。

ステロイド (Steroid) は強力な抗炎症作用と免疫抑制作用を有し、炎症性疾患の症状緩和の他、自己免疫疾患である膠原病や、アレルギー疾患、移植後拒絶反応などさまざまな治療に用いられている⁷⁾。ステロイドはグルココルチコイド受容体 α (glucocorticoid receptor alpha : GR α) に結合し、核内に移行した GR は activator protein-1 (AP-1) や NF- κ B 等の拮抗阻害を介して炎症サイトカイン、ケモカイン、接着分子などの転写を制御し、抗炎症作用などの薬理作用を発揮する⁸⁾。しかし、高濃度のステロイドは骨芽細胞のアポトーシスを誘導し、ステロイド長期投与では骨密度が低下することが知られている⁹⁾。そこで、細胞移植後短期間のステロイド系抗炎症薬の投与は、局所の炎症の軽減効果が期待され、骨再生に有利に働くものと考えられるが、これまでに検証されてこなかった。

そこで、本研究では初めに免疫正常マウスを用いた骨形成モデルを確立した。次に、このマウスモデルに対して抗炎症作用を持つステロイド系抗炎症薬を短期間投与して、その影響について検討を行った。

実験材料及び方法

1) 皮質骨由来細胞(compact bone-derived cells, CBDCs)の調製

マウス(BALB/cAJcl, 5-7 週齢, メス)にジエチルエーテルを用いて全身麻酔後, 頸椎脱臼にて屠殺した. 次に消毒用エタノール中に浸漬し, 大腿骨及び脛骨を摘出した. 骨周囲の軟組織を除去後, 両骨端部を切除し Hank's Balanced Salt Solution (ScienCell Research Laboratories, USA)を用いてシリンジにて骨髓を洗浄した. 次に 1 mM EDTA (Maxim Biotech, Inc. , USA), 2% fetal bovine serum (FBS; CEllect Gold, USA)を含む phosphate buffered saline (PBS) (和光純薬工業)溶液中で 2 分間洗浄した. 骨片を 0.25% コラゲナーゼ(和光純薬工業), 20% FBS を含む PBS 1.5ml に浸漬し 5 分間室温にてインキュベート後, 骨を 1~2 mm 程度に細切した. コラゲナーゼ溶液を 13.5ml 追加し 50ml チューブへ移した. 回収した骨片と細胞溶液をバイオシェーカーにて 37°C, 45 分間インキュベートした. インキュベート後, 1mM EDTA, 2%FBS 含有 PBS を 10 ml 加え, 40 μ m のセルストレイナーを通し, 細胞液を遠心管に回収した. 残った骨片に 1 mM EDTA, 2%FBS 含有 PBS を 10ml 加え, 室温で 5 分間インキュベートした. 再度 40 μ m セルストレイナーを通し, 細胞液を同じ遠心管に回収した. 回収した細胞液を 4°C, 300g にて 10 分間遠心分離を行った. 遠心分離後, 10%FBS, 10ng b-FGF/ml, ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン溶液添加 α -MEM を 6ml 加え, 6 ウェルプレート上に播種した. 残った骨片にも同培地を 6ml 加え, 6 ウェルプレート上に播種した.

2) 継代

培養上清を除去し, 培地と同量の PBS で 2 回洗浄を行った. 0.5% Trypsin-EDTA (Santa Cruz Biotechnology, Inc. , USA)を加え 37°C, 5%CO₂ 下で 3 分間インキュベートした. インキュベート後, 倍量の 10%FBS 含有 α -MEM を加え, 50ml 遠心管に回収した. 細胞計数を行い, 4°C, 300g にて 5 分間遠心分離を行った. 遠心分離後, 上清を除去し, 培地を加え播種した.

3) フローサイトメトリー

フローサイトメトリーは FACS Aria flow cytometer (Becton, Dickinson and Company, USA)を用いて行った. 抗マウス CD29 抗体, 抗マウス CD105 抗体, 抗

マウス CD11b 抗体, 抗マウス CD45 抗体, 抗マウス Sca-1 抗体 (Biolegend, USA) と抗 ALP ビオチン標識抗体(BAM1448, R&D Systems, Inc. , USA)を分析のために使用した. ビオチン標識抗体にはフルオロセイン抱合streptavidin(Biolegend)を用いた. ネガティブコントロールとして color-conjugated mouse-IgG1k (BD Pharmingen)を使用した. Propidium iodide (同仁化学研究所)で死細胞を判別した. 詳細な手順は Agata ら¹⁰⁾の方法に従った. 始めにトリプシン-EDTA と細胞懸濁液(1×10^6 cells)を 50 μ l PBS にて懸濁した. 抗体と共に 20 分間氷上でインキュベートした. streptavidin と 20 分氷上でインキュベートした後洗浄し, 200 μ l の PBS にて懸濁した. propidium iodide で染色後, 分析を行った. データの解析には FlowJo software (TreeStar, Inc. , USA)を用いた.

4) クリスタルバイオレット染色

培養液を除去し, PBS にて 2 回洗浄した. 10%中性緩衝ホルマリン液 pH7.4(和光純薬工業)を 1ml 加え, 室温下で 20 分固定した. 水洗後, 0.2%クリスタルバイオレット溶液(和光純薬工業)にて 5 分間染色を行った. サンプルを水洗し, 位相差顕微鏡にて観察した.

5) Alkaline phosphatase (ALP) 染色

ALP 染色は, アルカリホスファターゼ染色キット(コスモバイオ)を用いた.

6) ALP 活性測定

24 ウェルプレートのそれぞれのウェルに 2 継代目の CBDCs 懸濁液(4×10^4 cells/ml)を 500 μ l 加え, 培養を行った. 細胞播種翌日より培地を骨分化誘導培地 (α -MEM10% FBS, 1% ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン溶液, 100nM デキサメタゾン(Sigma-Aldrich, USA), 50 μ M L-アスコルビンリン酸エステルマグネシウム塩 n 水和物(和光純薬工業), 10 mM グリセロリン酸二ナトリウム塩(Sigma-Aldrich), 100ng/ml recombinant human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2; PeproTech, Inc. , USA)添加 α -MEM)へと交換し, 14 日間培養を行った. コントロールとしては, 通常の培地で同期培養した細胞を用いた. 作製した 2 群の培養液を 500 μ l の α MEM+10%FBS に置換し. Cell Counting Kit-8 (WST-8, 同仁化学研究所)を 50 μ l 添加後 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 下で 1 時間インキュベートした. 96 ウェルプレートに Blank として α -MEM を 100 μ l, WST-8 を 10 μ l 加え, 同じく 37 $^{\circ}$ C,

5%CO₂にて1時間インキュベートした。1時間後にサンプルとコントロールの上清 110 μ l を 96 ウェルプレートに移し， Multi-Detection Microplate Reader POWERSCAN® HT (大日本住友製薬株式会社)を使用し 450nm における吸光度を測定した。次にサンプルとコントロールを PBS にて 2 回洗浄して着色を完全に取り除いた後， p-NPP 溶液 (SIGMA Fast™ p-Nitrophenyl Phosphate Tablet; Sigma-Aldrich Co. LLC., USA)を 400 μ l 加え，室温，遮光下にて 10 分インキュベートした。インキュベート後 3N NaOH を 400 μ l 加え反応を停止させたのち， 24 ウェルプレートから 96 ウェルプレートにそれぞれ 200 μ l ずつ移し， 405nm における吸光度を測定して ALP 活性を算出した。

7) 培養骨の調製方法

25mg の β -TCP 顆粒(G0 0.5-1.5mm;オスフェリオン， オリンパステルモバイオマテリアル)を 14ml ポリプロピレンチューブ(Greiner Bio One International GmbH, Austria)に移し， 2 継代目の CBDCs 懸濁液(5.0×10^5 cells/ml) 500 μ l を β -TCP 上へ播種し， 30 分後に 2ml の培養液を加えた。24 時間後に骨分化誘導培地へと培地交換し， 14 日間培養を行った。骨分化誘導培地の培地交換は 3 日毎に行った。

8) 培養骨の移植方法

マウス(BALB/cAJc1, 6~8 週齢，オス)にペントバルビタール溶液(65 mg/kg; Somnopentyl®, 共立製薬株式会社)を腹腔内注射し，麻酔が十分奏功したところで切開，剥離を行い，背部皮下 4 か所へと培養骨を移植し，縫合した(図 1a, b)。免疫不全マウス (BALB/cAJc1-nu/nu) に対しても同様に移植を行った。

9) マウスへのステロイド系抗炎症薬の投与

ベタメタゾンリン酸エステルナトリウム(リンデロン注 2 mg，大塚製薬)に生理食塩水を加え 10 μ g/ml に希釈した。移植直後と 12 時間後， 24 時間後の合計 3 回，腹腔内注射した(0.01 ml/g bw)。コントロール群には，同量の生理食塩水を移植直後と 12 時間後， 24 時間後の合計 3 回腹腔内注射した。

10) サンプルの摘出と組織切片の作製

移植後 3 日， 7 日， 28 日目に培養骨を摘出した。サンプルは 2 つに切断し，一つは液体窒素にて急速に凍結し， RNA 抽出用のサンプルとした。もう一方は

10%中性緩衝ホルマリン pH7.4 に 24 時間固定した後， Decalcifying Solution B (和光純薬工業)にて 4°Cで 12 日間脱灰した． 脱灰後， パラフィンに包埋し， 4 μ m の厚さに薄切した．

11) ヘマトキシリン-エオシン(H-E)染色

薄切した組織切片を脱パラフィンし， カラッチヘマトキシリン液($\times 2$)(和光純薬工業)で染色した後流水およびPBSにて洗浄し， 1%エオシンY溶液(和光純薬工業)で染色を行った． アルコール系列にて脱水後キシレンにて透徹し， 封入した．

12) TRAP 染色

染色液の調整:蒸留水 5ml に 0.2mol/l 酢酸緩衝溶液(pH5.0;ナカライテスク株式会社)を 5ml と， *N,N*-Dimethylformamide (Sigma-Aldrich Co.)を 50 μ l, Fast Red Violet LB Salt (Sigma-Aldrich Co.)を 6 mg, L-(+)-酒石酸(ナカライテスク株式会社)を 75 mg, Naphthol AS-BI Phosphoric Acid Sodium Salt (和光純薬工業)を 1mg を加えた後， 5mol/l 水酸化ナトリウム(関東化学株式会社)にて pH5.0 に調整した． 作製した組織切片を脱パラフィンし， 上記染色液とともに湿箱に入れ 37°Cでインキュベートを行い， 15 分毎に発色を確認し， 最大で 1 時間反応させた． 水洗後ヘマトキシリンにて対比染色を行い， 封入した． ImageJ (National Institutes of Health, USA)を用いて陽性部分の面積を計測した． 可及的に標本全体をカバーするよう 4 枚以上の切片を抽出し， β -TCP を除く組織の面積中の染色陽性部分の面積率を算出した． それぞれの標本における割合を平均し， 比較に用いた．

13) 免疫組織化学染色

作製した組織切片をキシレンとエタノールで脱パラフィンし， PBS にて洗浄した． 抗原賦活剤としてクエン酸ナトリウム緩衝溶液， pH6.0 (Trisodium Citrate Dihydrate; 和光純薬工業)を使用し， 電子レンジにて熱処理を行った． その後 0.3%過酸化水素水添加 0.01M PBS 溶液， pH7.4 に 30 分浸漬して内因性ペルオキシダーゼ活性を取り除いた． 10%ヤギ血清含有 PBS 溶液をブロッッキング溶液として使用し， 室温にて 30 分間インキュベートした． インキュベート後， 一次抗体として抗マウス TNF- α ウサギポリクローナル抗体(1:800, Abcam, UK)および抗マウス Sp7ウサギポリクローナル抗体(1:1000, Abcam, UK)を用いて 4°Cで 12 時間反応させた． ヤギ抗ウサギ IgG Vectastain Elite ABC Kit(Vector Laboratories, Inc. , USA)と DAB Substrate

Kit(Vector Laboratories, Inc., USA)を説明書に従い使用した。抗マウス F4/80 抗体としてはラットモノクローナル抗体 (AbD Serotec®, UK), 二次抗体は Histostar (Rat) (No.8463, 医学生物学研究所)を使用した。対比染色としてヘマトキシリンを使用した。陰性コントロールとして, 一次抗体の代わりに PBS を使用した。すべての染色において, 陰性コントロールに陽性反応は見られなかった。

マクロファージの浸潤程度を比較するため, ImageJ (National Institutes of Health, USA)を用いて, F4/80 陽性部分の面積を計測した。可及的に標本全体をカバーするよう4枚以上の切片を抽出し, β -TCPを除く組織の面積中の陽性部分の面積率を算出した。それぞれの標本における割合を平均し, 比較に用いた。

14) 定量的 PCR 法

凍結保存していたサンプルを TRIzol reagent (Ambion®, Life Technologies, USA) に浸漬し TissueLyser II (Qiagen, Germany)を用いて破碎し RNA を抽出した。RNase-free DNase I digestion (Qiagen, Germany)を用いて DNA を除去した。The PureLink RNA Mini Kit (Ambion®)にて RNA の精製を行った。RNA サンプル(5 μ g)を ReverTra Ace® (東洋紡株式会社)を用いて逆転写し, oligo (dT)₁₂₋₁₈ primers (Life Technologies)と dNTPs (東洋紡株式会社)を用いて PCR を行った。PCR には Step One Plus PCR system (Applied Biosystems, Life Technologies)を使用した。

反応条件を以下に示す。

95.0°C30 秒 1 サイクル, 95.0°C3 秒 60°C30 秒 40 サイクル 95.0°C15 秒 60.0°C60 秒 95.0°C15 秒。

PCR に使用したプライマーを以下に示す。

β -actin (internal control);

(forward 5'-CGTTGACATCCGTAAGACC-3',

reverse 5'-CTAGGAGCCAGAGCAGTAATC-3') (111bp)

TNF- α ;

(forward 5'-AGTTCCCAAATGGCCTCCCT-3',

reverse 5'-ACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3') (115bp)

結果

1) CBDCs のフローサイトメトリーによる解析

フローサイトメトリーによる解析では、間葉系幹細胞マーカーである CD29 陽性細胞は 95.8%(図 2 a), CD105 陽性細胞は 21.8%(図 2 b), Sca-1 陽性細胞は 31%(図 2 c)であった。一方骨形成性細胞のマーカーである ALP 陽性細胞は 45.3%(図 2 d)であった。得られた細胞は CD45(0.29%), CD11b (1.81%)と血球系マーカーは陰性であり (図 2 e)。また、間葉系幹細胞マーカーである CD29 と Sca-1 にダブルポジティブな細胞は 30.7%であった (図 2 f)。

2) CBDCs の分化誘導条件の最適化

始めに、CBDCs に対する分化誘導条件の最適化を行った。分化誘導培地に添加されるデキサメタゾン、および 1-100ng/ml の各濃度の BMP-2 を添加し、細胞増殖および ALP 活性を測定した。デキサメタゾンおよび BMP-2 の添加群においても、細胞の増殖には有意差を認めなかった(図 3 a)。一方、ALP 活性はデキサメタゾンのみの群や BMP-2 のみを添加した群では有意な上昇は認めなかったが、デキサメタゾンと BMP-2 を併用した群では有意な上昇を認めた(図 3 b)。したがって、マウス CBDCs の分化誘導には、デキサメタゾンと BMP-2 を併用する必要があることが示された。この分化誘導条件を用いて 2 週間の分化誘導後に ALP 染色を行ったところ、分化誘導群のみに染色が認められた(図 3 c)。また、非分化誘導群と分化誘導群における ALP 活性を比較した。その結果、非分化誘導群と比較して、分化誘導群では有意な ALP 活性の上昇を認めた ($p<0.01$) (図 3 d)。次に、骨分化誘導を行った培養骨への細胞接着を確認するためにクリスタルバイオレット染色を行った。青い染色が β -TCP 顆粒全体に分布しており、細胞が顆粒を覆いながら増殖していることが示された(図 3 e)。

3) 培養骨移植による骨形成

細胞移植のコントロールとして、免疫正常マウス (BALB/cAJc1) に β -TCP のみを移植した。8 週後に摘出したサンプルでは、骨形成は認められなかった (図 4 a)。同様に、 β -TCP 顆粒のみを免疫不全マウス (BALB/cAJc1-nu/nu) に移植した。8 週後に摘出したサンプルでは、骨形成は認められなかった (図 4 b)。次に、細胞を播種し、2 週間分化誘導を行った培養骨を、免疫正常マ

ウスに移植した。移植後 8 週の組織では、骨形成が認められた (図 4 c)。また、同様に培養骨を免疫不全マウスに培養骨を移植し、8 週後に摘出した組織でも同様の骨形成を認めた (図 4 d)。骨形成は細胞移植群のみで認められ、さらに異所性の骨形成であった事から、移植細胞による骨形成が可能であることが示された。また、免疫不全マウスと同様に、免疫正常マウスにおいても骨形成が認められることが示された。

4) 移植後早期の炎症性細胞浸潤

予備実験から移植後 3 日で最も炎症性細胞の浸潤が顕著であったことから、培養骨移植 3 日目の組織像と F4/80 に対する抗体を用いた免疫組織化学的染色により、マクロファージの浸潤について検討を行った。BALB/cAJc1 に培養骨を移植し、3 日目に摘出したサンプルの H-E 染色では、担体周囲に炎症性細胞の浸潤が認められた (図 5 a)。また、培養骨移植後 3 日目の摘出組織に F4/80 に対する免疫染色を行ったところ、担体の周囲に陽性細胞が認められた (図 5 b)。しかしながら、コントロールとして行った BALB/cAJc1 に β -TCP のみを移植した群でも、3 日目に摘出したサンプルの H-E 染色では、培養骨群と同様に炎症性細胞の浸潤が認められた (図 5 c)。また、同様に BALB/cAJc1 に β -TCP のみを移植し、3 日目に摘出した組織切片の F4/80 に対する免疫染色によりマクロファージの浸潤について検討を行った。その結果、培養骨の移植と同様に担体周囲に陽性細胞を認めた (図 5 d)。細胞の有無による炎症性細胞の浸潤およびマクロファージの分布には明らかな差は認められなかった。

5) ステロイド系抗炎症薬の投与が組織像に与える影響

培養骨を BALB/cAJc1 に移植後、3、7 および 28 日目のサンプルを摘出し、薄切後 H-E 染色により観察を行った。実験群として、培養骨移植後にステロイド系抗炎症薬を投与 (以下実験群) し、それぞれ 3、7 および 28 日目に摘出し、H-E 染色を行った (図 6 a, b, c)。また、コントロールとして培養骨を移植後同量の生食水を投与し、それぞれ 3、7 および 28 日目にサンプルを摘出し、H-E 染色を行った (図 6 d, e, f)。移植 3 日目では、ステロイド系抗炎症薬投与群と比較してコントロール群でやや炎症性細胞の浸潤が多い傾向であった。一方移植 7 日以降には徐々に炎症性細胞が減少し、担体間には結合組織様の組織で置き換わっていった。移植 7 日目以降では、両群に明らかな差は認められな

かった。

6) ステロイド系抗炎症薬の投与がマクロファージの浸潤に与える影響

培養骨を BALB/cAJc1 に移植後、3、7 および 28 日目のサンプルを摘出し、薄切後 F4/80 に対する免疫組織化学染色を行った。培養骨移植後にステロイド系抗炎症薬を投与し、それぞれ 3、7 および 28 日目にサンプルを摘出し、免疫染色を行った (図 7 a, b, c)。また、コントロールとして同量の生食水を投与し、それぞれ 3、7 および 28 日目にサンプルを摘出し、免疫染色を行った (図 7 d, e, f)。培養骨移植 3 日目では、実験群と比較して、コントロール群で F4/80 陽性細胞が多く認められた。一方、7 日目以降では、両群の陽性細胞の分布に明らかな差は認められなかった。この結果をさらに詳細に解析するために、培養骨移植後 3 日目の組織標本を用いて、F4/80 陽性細胞の面積を計測し、組織標本全体の面積に対する割合を解析した (図 7 g)。陽性細胞はコントロール群で多く見られたが、サンプル間の差が大きく、有意差は認められなかった。

7) ステロイド系抗炎症薬の投与が TNF- α の発現に与える影響

培養骨を BALB/cAJc1 に移植後、3、7 および 28 日目のサンプルを摘出し、薄切後抗 TNF- α 抗体に対する免疫組織化学染色を行った。実験群の免疫染色を行った (図 8 a, b, c)。また、対照群の免疫染色を行った (図 8 d, e, f)。TNF- α 陽性細胞は培養骨移植 3 日目から認められ、担体と担体の間の結合組織様の組織内に分布していた。陽性細胞の分布は 7、28 日目でもほぼ同様であり、ステロイド系抗炎症薬の投与の有無による差は見られなかった。次に、ステロイド系抗炎症薬の投与が TNF- α の発現に与える影響を検討するため、培養骨移植後 3 日目に摘出したサンプルより RNA を抽出し、Real Time PCR による TNF- α 遺伝子発現の定量的解析を行った。実験群でやや高値を示したが、対照群との間に有意差は認められなかった (図 8 g)。

8) ステロイド系抗炎症薬の投与が破骨細胞分化に与える影響

培養骨を BALB/cAJc1 に移植後、3、7 および 28 日目のサンプルを摘出し、薄切後 TRAP 染色を行った。実験群に対して TRAP 染色を行った (図 9 a, b, c)。また、対照群に対して TRAP 染色を行った (図 9 d, e, f)。実験群にお

いては、細胞移植 7 日目よりわずかな TRAP 陽性細胞が認められ、28 日目では急激に増加した。陽性細胞は担体周囲に分布していた。一方対照群においては、TRAP 陽性細胞は培養骨移植 7 日目に比べ 28 日目では急激に増加したが、7 日目のサンプルでは陽性細胞は認められなかった。TRAP 陽性細胞数を比較するために、培養骨 28 日目に摘出したサンプルの TRAP 陽性面積率を Image J を用いて解析した (図 9g)。その結果、両群に有意差は認められなかった。

9) ステロイド系抗炎症薬の投与が骨芽細胞分化に与える影響

培養骨を BALB/cAJc1 に移植後、3、7 および 28 日目のサンプルを摘出し、薄切後抗 Osterix (Sp7) 抗体を用いて免疫染色を行った。実験群としては、培養骨移植後にステロイド系抗炎症薬を投与し、それぞれ 3、7 および 28 日目に摘出したサンプルに対して免疫染色を行った (図 10a, b, c)。また、対照群には同量の生食水を投与し、それぞれ 3、7 および 28 日目にサンプルを摘出し、得られた組織に対する免疫染色を行った (図 10d, e, f)。陽性細胞は移植 3 日目より見られ、担体の周囲に分布していた。移植 7 日から 28 日にかけて徐々に濃染される細胞が増加したが、両群の陽性細胞の分布に有意差は認められなかった。

考 察

移植部位における炎症が骨再生に与える影響について検討するためには、免疫正常動物を用いた骨再生モデルを用いる必要がある。特に、大動物ではなくマウスなどの小動物を用いた実験系は、用いることのできる抗体の豊富さや動物の取り扱いの容易さから有用である。しかしながら、免疫正常マウスを用いた再生研究では、軟骨や骨の再生が得られなかったという報告がなされている^{5, 6, 11)}。したがって、本研究ではまず免疫正常マウスを用いた骨形成のモデルを確立することを計画した。

骨形成性細胞の細胞源としては、骨髄由来の間葉系幹細胞が知られている¹²⁾しかし、ヒトやラットの骨髄由来間葉系幹細胞と異なり、マウスの骨髄由来間葉系幹細胞は、安定した培養が困難であった。近年、皮質骨由来の細胞は間葉系幹細胞と同様の性質を持ち、かつ安定した増殖と骨形成能を発揮することが報告された¹³⁾。したがって、まず皮質骨由来の骨芽細胞様細胞の培養、分化誘導方法を確立した。下腿皮質骨より得られた細胞は、表面マーカーの発現では間葉系幹細胞と同一ではないものの、安定した増殖を示した。また、本研究で最適化された分化誘導方法を用いることで、ALP活性が大きく上昇した。*in vivo*の移植実験からは、同系の免疫正常動物への移植でも骨形成が見られることから、免疫正常マウスを用いた骨形成モデルとして使用できることが示された。

培養骨に対する炎症反応には、移植操作などによる外科的侵襲に対する反応、移植された担体(異物)に対する反応、そして移植された細胞に対する反応が考えられる^{14, 15, 16)}。移植された細胞は同系マウス由来であり、ヒトでは自家移植に近いものと考えられる。したがって、移植された細胞は同一の主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex:MHC)を発現することから、移植細胞に対する免疫応答は起こりにくいものと考えられる。しかし、細胞培養にはウシ由来の血清などを用いていることから、何らかの免疫応答を惹起する可能性も否定できない。本研究で用いた担体のみの移植と培養骨の移植とを比較した所見からは、細胞の移植に伴う明らかな免疫応答の増加は認められなかった。したがって、培養骨の移植に伴う炎症に対しては、手術操作の物理的侵襲と、移植された人工材料であるβ-TCPに対する炎症反応が主な原因と考えられた。

次に、培養骨移植後の組織像の時間的経過について検討を行った。培養骨移植後には直ちに炎症性細胞の浸潤を認め、移植3日目が最も顕著であった。初期の浸

潤細胞の詳細は検討していないが、組織標本からは好中球、リンパ球が主体と考えられた。また、マクロファージは細胞移植3日目の組織標本でも認められ、以後28日の標本でも担体周囲に広く分布していた。したがって、中長期の影響としては、マクロファージが重要な役割を果たすことが推察された。

ステロイド系抗炎症薬は、強い抗炎症作用を示すことから、炎症性疾患、免疫抑制などに広く用いられている⁸⁾。本研究では、ステロイド系抗炎症薬の投与が培養骨移植後の炎症に与える影響についても検討を行った。細胞移植後初期の炎症細胞浸潤、マクロファージの浸潤に対しては、ステロイド系抗炎症薬投与群で減少する傾向が認められた。今回の研究結果からは対照群との有意差はみられなかったが、これはサンプル数が十分ではなかったことや、サンプル間での差が大きかったことが影響しているものと考えられた。また、今回用いたステロイド系抗炎症薬の投与量は、ヒトに対する投与量を基準としている。しかしながら、小動物への投与量としては不十分であった可能性も否定できない。

マクロファージ以外にも、代表的な炎症性サイトカインであるTNF- α 陽性細胞の分布とRNAの発現を比較した。しかしながら、TNF- α 陽性細胞の分布やRNAの発現には有意差を認めなかった。われわれのグループの研究から、培養骨移植部に認められる炎症反応としては、TNF- α 以外のサイトカイン、特にIL-4の重要性が示唆されている¹⁷⁾。TNF- α は局所の炎症反応に重要な役割を果たしていると考えられるものの、その他のサイトカインがより大きな影響を与えている可能性も考えられる。したがって、ステロイド系抗炎症薬投与の影響については、今後TNF- α 以外のサイトカインも含めて広く検討する必要があるものと考えられた。

局所の炎症反応は、さまざまなサイトカインを通じて、破骨細胞の分化に影響を与えることが知られている^{18, 19, 20, 21)}したがって、本研究ではステロイド系抗炎症薬が破骨細胞へ与える影響についても検討を行った。その結果、ステロイド系抗炎症薬の投与群では、移植7日目と早期から破骨細胞が認められた。IL-4など一部の炎症性サイトカインは、破骨細胞の分化を抑制することが知られている¹⁸⁾。ステロイド系抗炎症薬投与群においては、局所の炎症が抑えられ、IL-4など破骨細胞の分化抑制に働くサイトカインが減少したことにより、破骨細胞の分化が促進された可能性が示唆された。しかしながら、本研究で使用した条件においてはその影響は持続せず、移植28日目の破骨細胞数には有意差を認めなかった。

ステロイド系抗炎症薬は、長期投与により骨芽細胞のアポトーシスを誘導し、破骨細胞の分化を促進することで、骨粗鬆症を発症させることが知られている⁹⁾。本研究で

は細胞移植翌日までの短期投与ではあるが、骨芽細胞に与える影響が懸念された。しかしながら、osterix に対する免疫染色からは、ステロイド系抗炎症薬の投与による骨芽細胞への影響は認められなかった。これは、投与期間が短かったことが理由と考えられるが、より多量のステロイド系抗炎症薬を長期に用いた場合には、骨吸収を促進し、骨再生には不利に働く可能性は否定できない。

本研究では、ステロイド系抗炎症剤投与による影響について、対照群との間で明確な違いを見いだすことはできなかった。その主な原因としては、もともと培養骨による炎症反応が強くないことや、投与量が適切でなかった可能性が考えられる。今後は、ステロイド系抗炎症薬の投与量や投与回数の増加が局所の炎症性サイトカインに与える影響についても検討することで、より妥当性のある実験モデルを作製することが重要と考えられた。その一方で、炎症の初期の免疫応答やマクロファージの浸潤にはステロイド系抗炎症薬が抑制的に作用する可能性が示唆された。適切な投与量と投与時期を決定することで、ステロイド系抗炎症薬の投与が骨再生治療に有用となることが期待される。

結 論

マウス下腿長管骨の皮質骨より得られた細胞は、安定して培養することが可能であり、マウスにおける骨芽細胞の細胞源として有用と考えられた。また、この細胞を免疫正常マウスへと移植することで、免疫正常動物による骨形成モデルを作製した。本研究からはステロイド系抗炎症薬の短期投与の有効性は明らかではないが、培養骨移植後早期に見られる炎症性細胞浸潤を抑制する可能性があり、今後は適切な投与量や投与回数を検討することで、骨再生治療効果の増大につながることを期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に際し、終始御指導、御校閲をいただきました大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座 硬組織発生・再生工学 各務秀明教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、ご指導いただきました李憲起先生に心より感謝の意を表します。

最後に、この研究生活を絶えず支え励ましてくれました両親(父:博之、母:玲子)に心から感謝致します。

参考文献

- 1) Kagami H, Agata H, Inoue M, Asahina I, Tojo A, Yamashita N, Imai K. (2014) The use of bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. *Tissue Eng Part B Rev.* **20** : 229-32.
- 2) Daniel E. (2011) *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*, Intech 3-20
- 3) Kagami H, Agata H, Tojo A. (2011) Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering : basic science to clinical translation. *Int J. Biochem. Cell Biol.* **43** : 286-289.
- 4) Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'huillie A, Zhang J, Lu Y, Roberts AI, Ji W, Zhang H, Rabson AB, Shi Y. (2009) Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* **27** : 1954-1962.
- 5) Kanazawa S, Fujihara Y, Sakamoto T, Asawa Y, Komura M, Nagata S, Takato T, Hoshi K. (2013) Tissue responses against tissue-engineered cartilage consisting of chondrocytes encapsulated within non-absorbable hydrogel. *J Tissue Eng Regen Med* **7** : 1-9.
- 6) Liu Y, Wang L, Kikuri T, Akiyama K, Chen C, Xu X, Yang R, Chen W, Wang S, Shi S. (2011) Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- γ and TNF- α . *Nat Med* **17** : 1594-1601.
- 7) Ericson-Neilsen W, Kaye AD. (2014) Steroids: pharmacology, complications, and practice delivery issues. *Ochsner J.* **14** : 203-7.
- 8) Ayroldi E, Cannarile L, Migliorati G, Nocentini G, Delfino DV, Riccardi C. (2012) Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids : genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *FASEB J.* **26** : 4805-4820.
- 9) Weinstein RS. (2012) Glucocorticoid-induced osteoporosis and osteone-

- crosis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* **41** : 595-611.
- 10) Agata H, Yamazaki M, Uehara M, Hori A, Sumita Y, Tojo A, Kagami H. (2012) Characteristic differences among osteogenic cell populations of rat bone marrow stromal cells isolated from untreated, hemolyzed or Ficoll-treated marrow. *Cytotherapy* **14** : 791-801.
 - 11) Liu Y, Wang S, Shi S. (2012) The role of recipient T cells in mesenchymal stem cell-based tissue regeneration. *Int J Biochem Cell Biol* **44** : 2044-2050.
 - 12) Friedenstein AJ, Challakhyan RK, Gerasimov UV. (1987) Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* **20** : 263-72.
 - 13) Zhu H, Guo ZK, Jiang XX, Li H, Wang XY, Yao HY, Zhang Y, Mao N. (2010) A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat Protoc* **5** : 550-560.
 - 14) Zakrzewski JL, van den Brink MR, Hubbell JA. (2014) Overcoming immunological barriers in regenerative medicine. *Nat Biotechnol.* **32** : 786-94.
 - 15) Wong ML, Griffiths LG. (2014) Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation: antigen removal vs. decellularization. *Acta Biomater.* **10** : 1806-16.
 - 16) Tonti GA, Mannello F. (2008) From bone marrow to therapeutic applications : different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera? *Int J Dev Biol.* **52** : 1023-32.
 - 17) Zhang Y, Li X, Chihara T, Mizoguchi T, Hori A, Udagawa N, Nakamura H, Hasegawa H, Taguchi A, Shinohara A, Kagami H. Comparing immunocompetent and immunodeficient mice as animal models for bone tissue engineering. *Oral Diseases*, in press.
 - 18) Fujii T, Kitaura H, Kimura K, Hakami ZW, Takano-Yamamoto T. (2012) IL-4 inhibits TNF- α -mediated osteoclast formation by inhibition of RANKL expression in TNF- α -activated stromal cells and direct inhibition of TNF- α -activated osteoclast precursors via a T-cell-indepe-

- ndent mechanism in vivo. *Bone*. **51** : 771-780.
- 19) Mori G, D'Amelio P, Faccio R, Brunetti G. (2013) The interplay between the bone and the immune system. *Clin Dev Immunol*. 720504.
 - 20) Riancho JA, Zarrabeitia MT, Gonzalez-Macias J. (1993) Interleukin-4 modulates osteoclast differentiation and inhibits the formation of resorption pits in mouse osteoclast cultures. *Biochem Biophys Res Commun* **196** : 678-685.
 - 21) Yamashita T, Takahashi N, Udagawa N. (2012) New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation. *World J Orthop* **3** : 175-181.

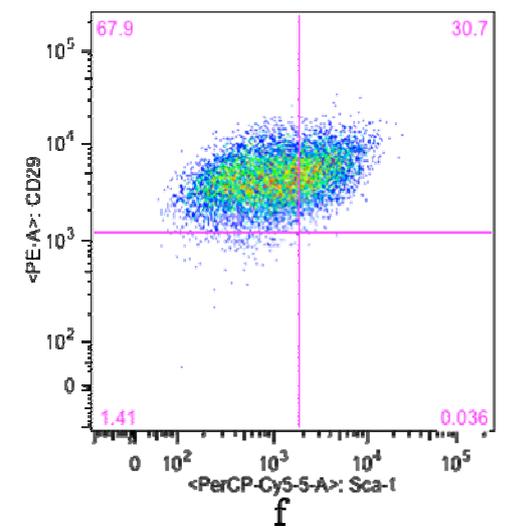
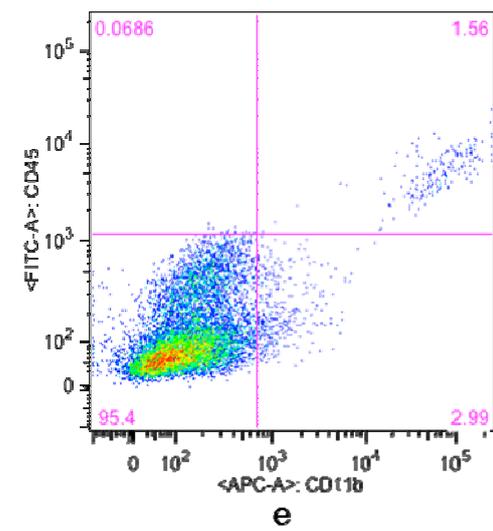
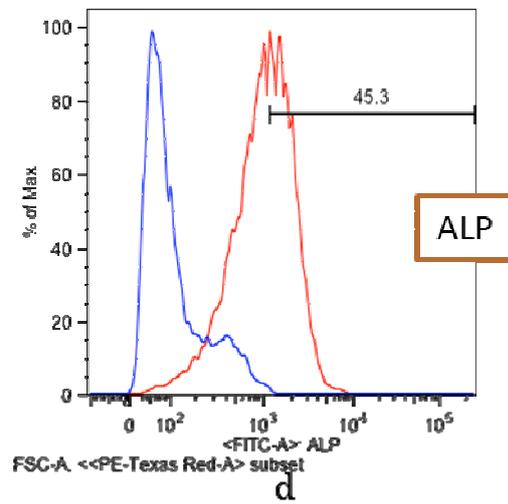
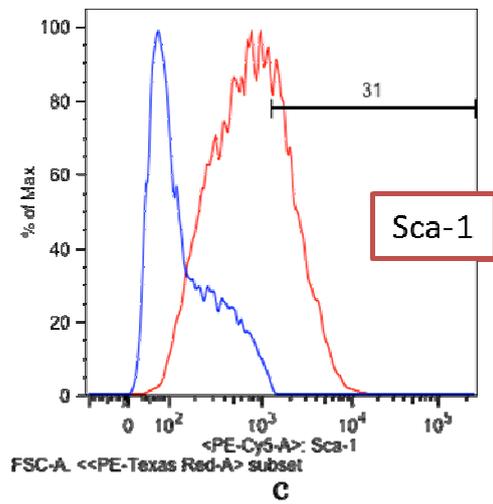
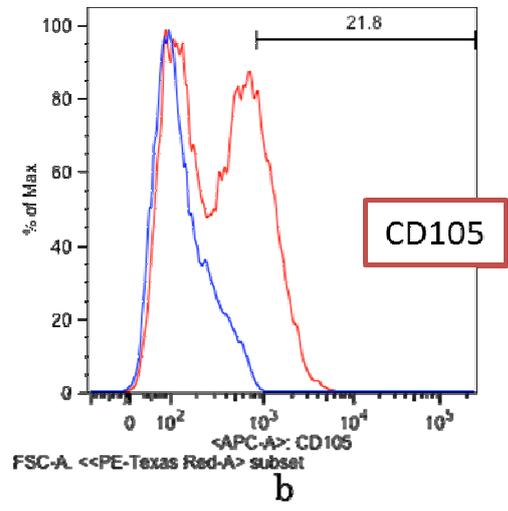
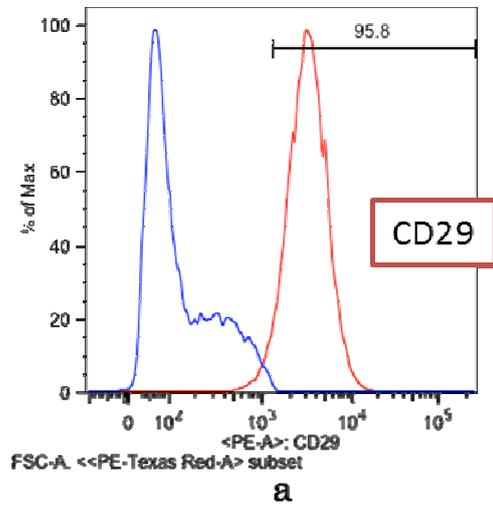


a

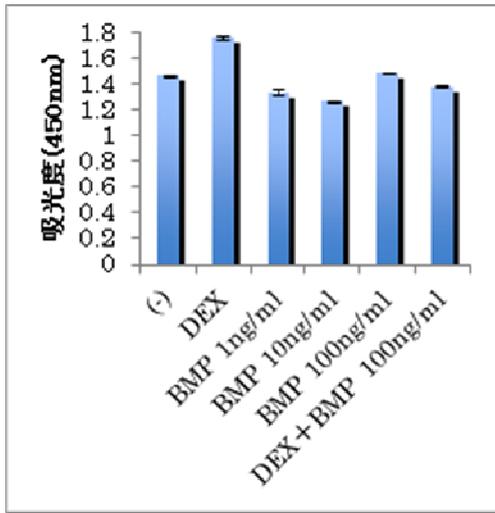


b

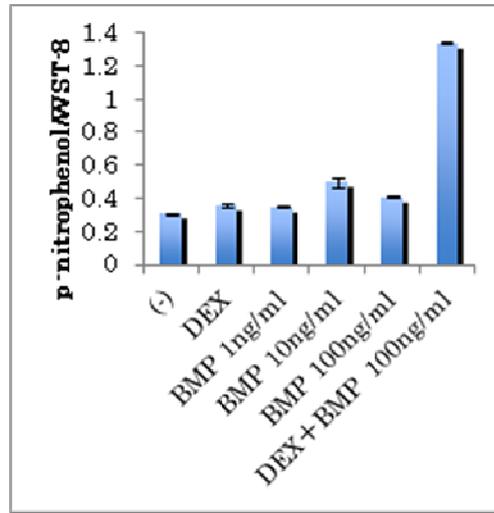
☒ 1



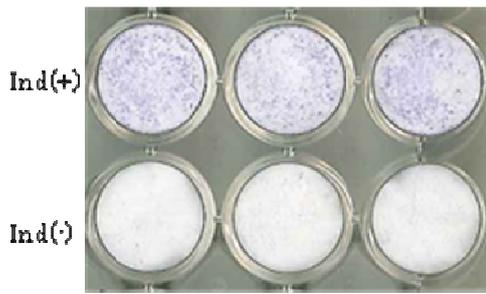
☒ 2



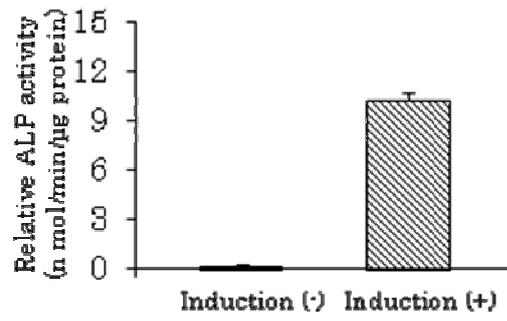
a



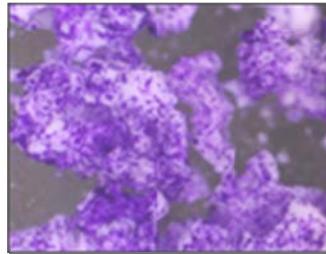
b



c



d



e

图 3

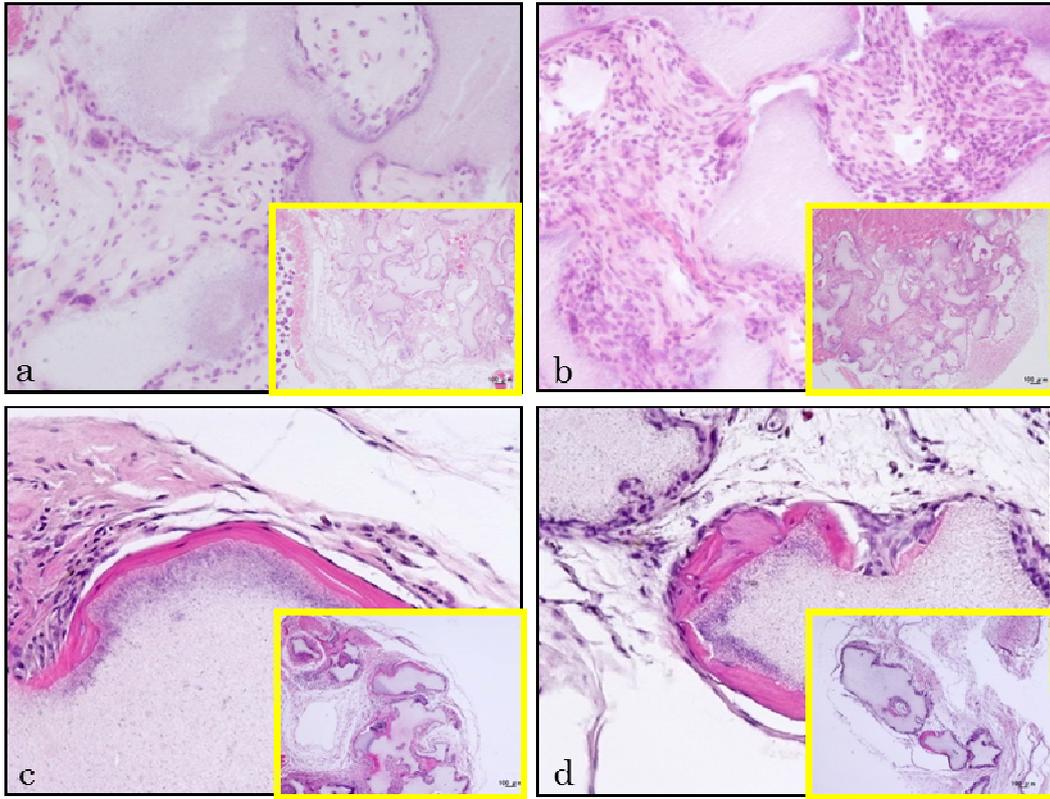


图 4

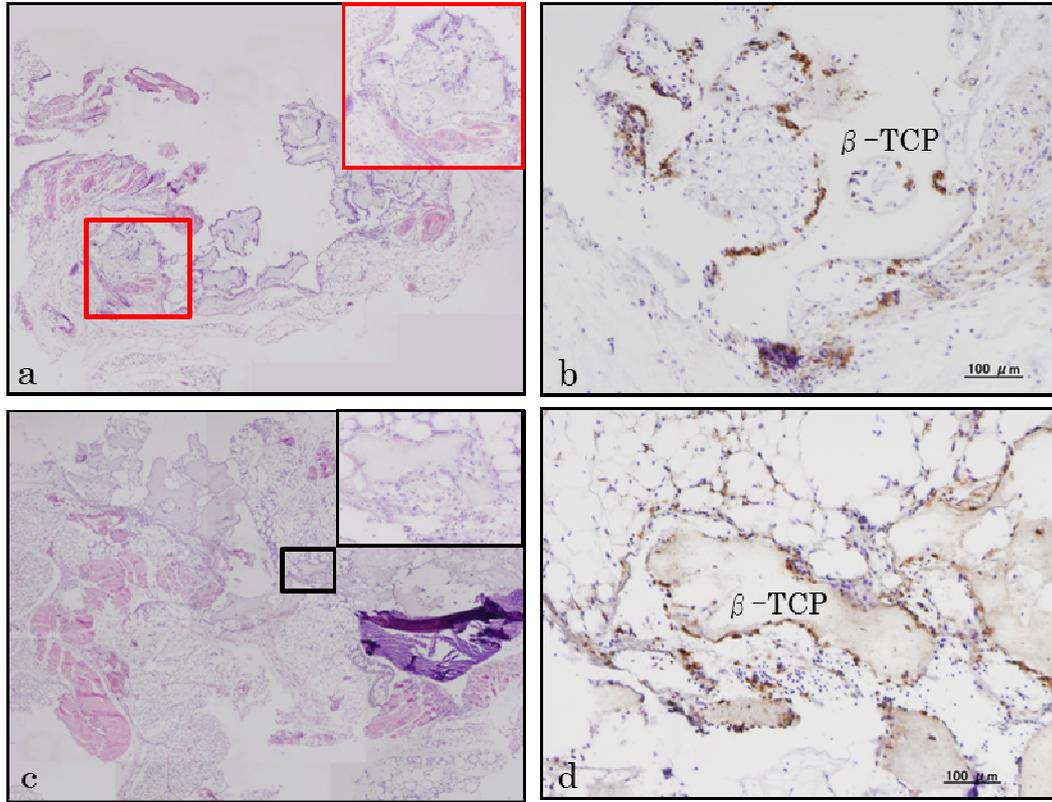


图 5

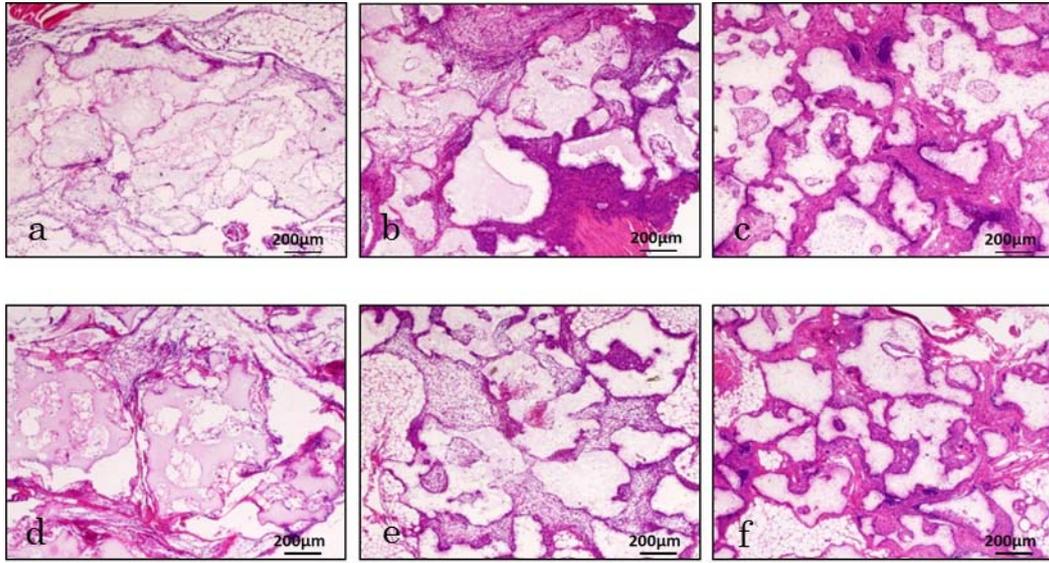


图 6

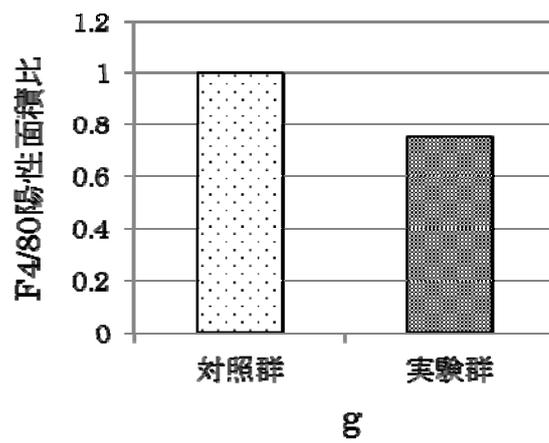
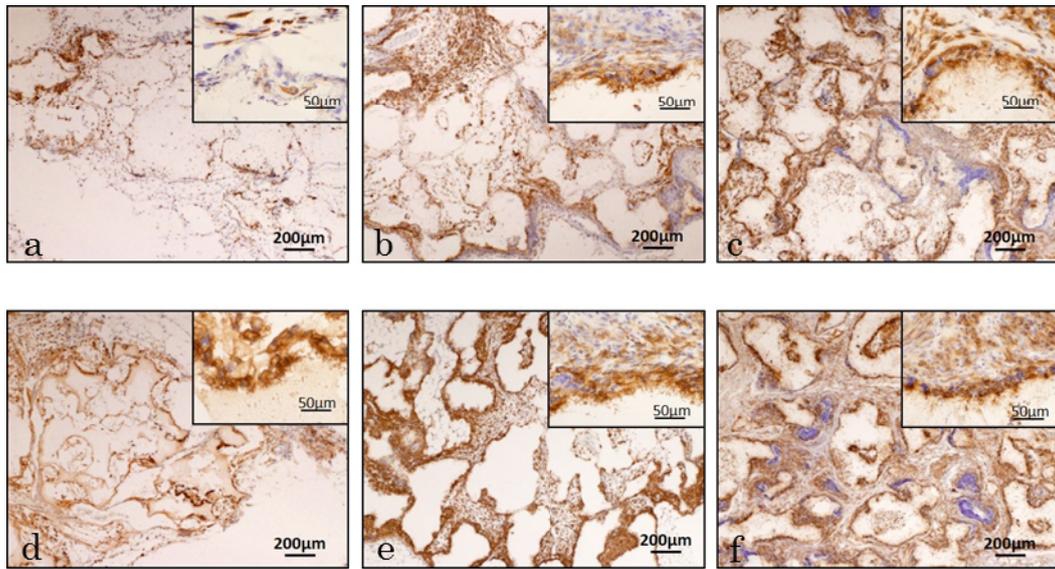


図 7

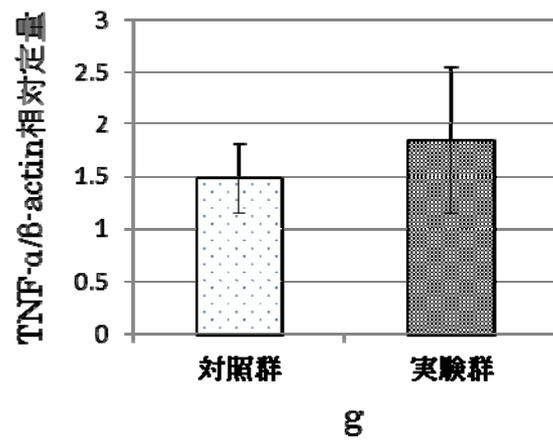
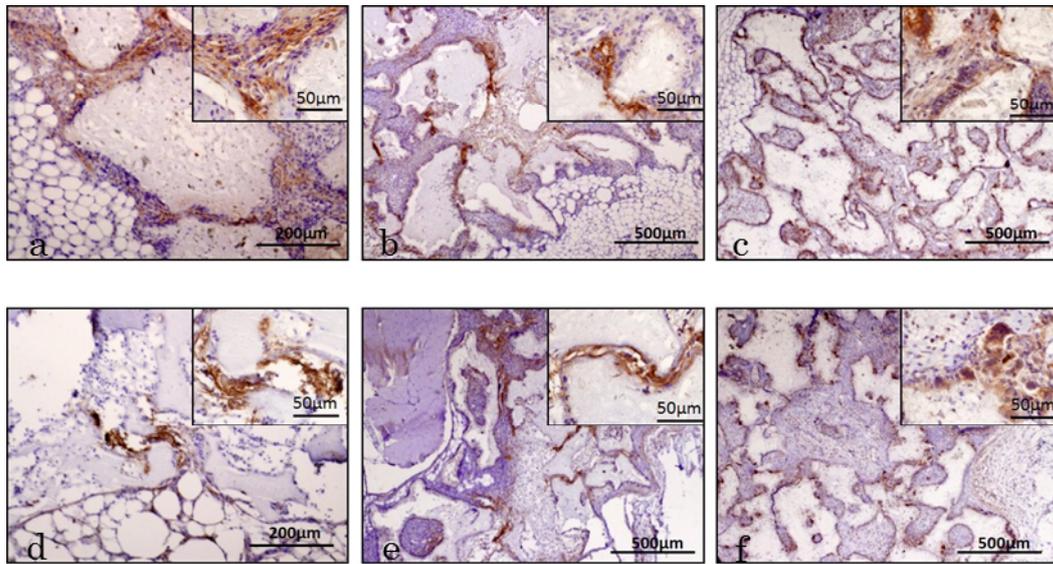


図 8

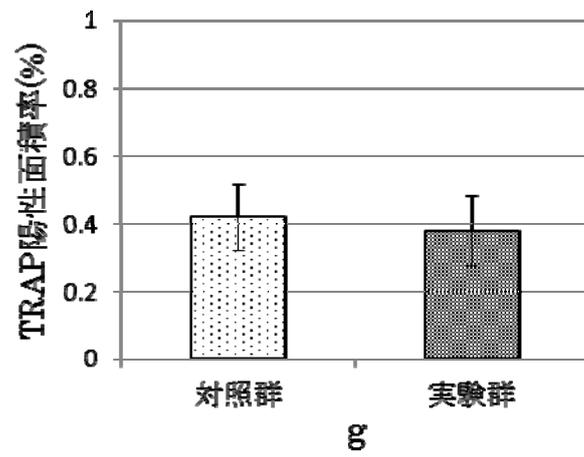
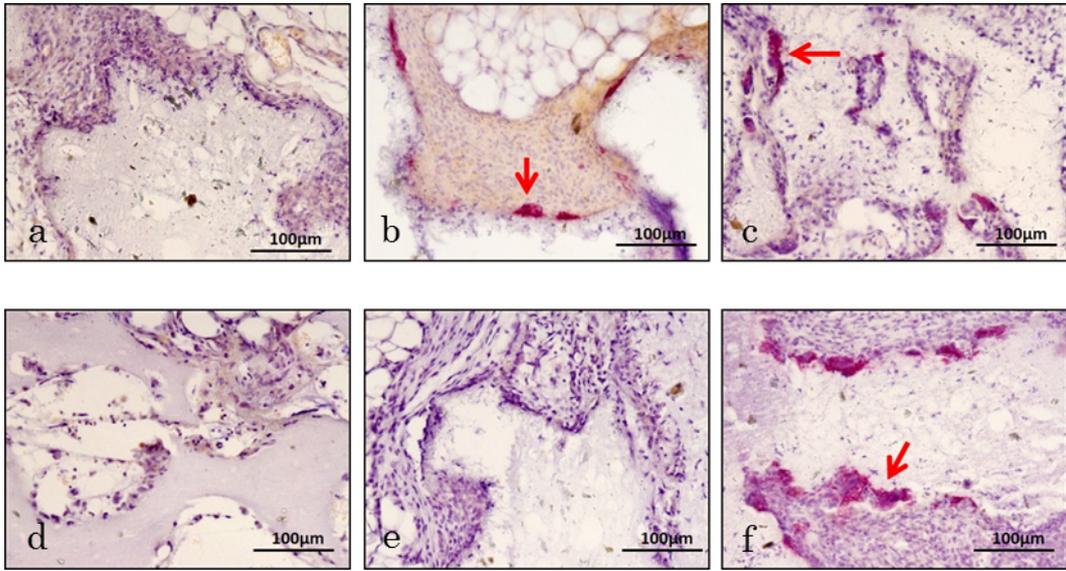
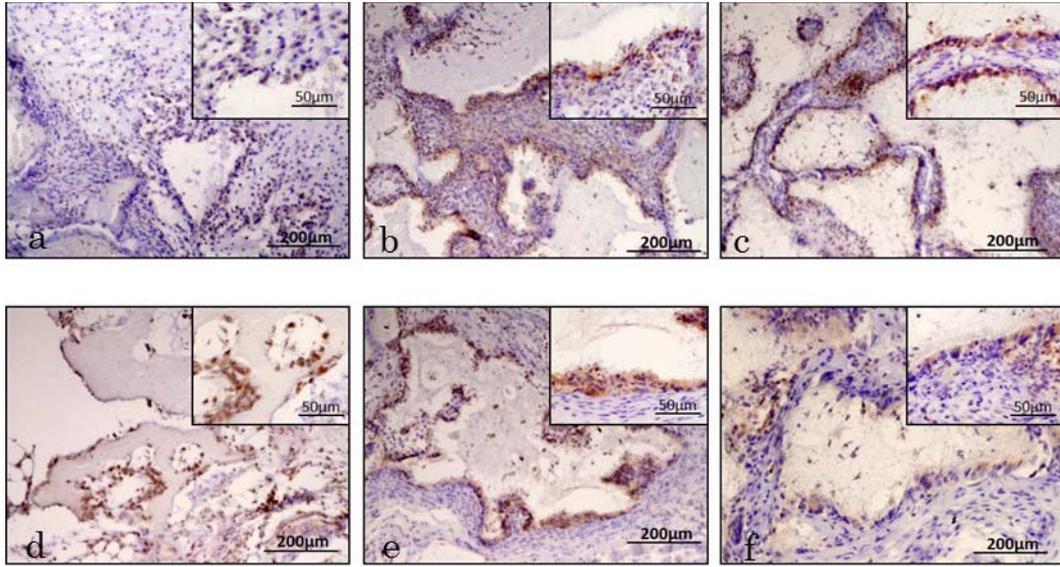


图 9



☒ 10

図の説明

図 1：培養骨のマウスへの移植。全身麻酔後に背部に縦切開を加え、左右に剥離を行った(a)。次に左右それぞれの頭側および尾側（赤丸）部に培養骨を移植した(b)。

図 2：CBDCs のフローサイトメトリーによる解析。CD29 陽性細胞は 95.8%(a)，CD105 陽性細胞は 21.8%(b)，Sca-1 陽性細胞は 31%(c)，ALP 陽性細胞は 45.3%(d)であった。得られた細胞は CD45，CD11b 陰性であった(e)。また，CD29 と Sca-1 に陽性である細胞は 30.7%であった(f)。

図 3：CBDCs の分化誘導条件の最適化。CBDCs に対する分化誘導条件を決定するために，デキサメタゾンおよび 1-100ng/ml の BMP-2 を添加し，細胞増殖(a)および ALP 活性(b)を測定した。すべての群で細胞の増殖には有意差を認めなかった(a)。ALP 活性は，デキサメタゾンと BMP-2 を併用したもののみ有意な上昇を認めた(b)。ALP 染色(c)。非分化誘導群と分化誘導群における ALP 活性の比較(d)。培養細胞のクリスタルバイオレット染色(e)。

図 4：移植培養骨組織の H-E 染色。BALB/cAJc1 および BALB/cAJc1-nu/nu に β -TCP のみを移植し，3 日目に摘出したサンプルでは，BALB/cAJc1 (a)，BALB/cAJc1-nu/nu (b)ともに骨形成は認められなかった。一方 BALB/cAJc1 に培養骨を移植後 8 週の組織では，骨形成が認められた(c)。また，同様に培養骨を BALB/cAJc1-nu/nu に培養骨を移植し，8 週後に摘出した組織では骨形成を認めた(d)。枠内は弱拡大像。

図 5：培養骨移植 3 日目の組織像と免疫組織化学染色所見。BALB/cAJc1 に培養骨を移植し，3 日目に摘出したサンプルの H-E 染色では，担体周囲に炎症性細胞の浸潤が認められた(a)。培養骨移植後 3 日目の組織切片の F4/80 に対する免疫染色では，担体の周囲に陽性細胞が認められた(b)。BALB/cAJc1 に β -TCP のみを移植し，3 日目に摘出したサンプルの H-E 染色では，炎症性細胞の浸潤が認められた(c)。また，同様に BALB/cAJc1 に β -TCP のみを移植し，3 日目に摘出した組織切片の F4/80 に対する免疫染色の結果では，担体周囲に陽性細胞を認めた(d)。細枠内は太枠部分の強拡大像を示す。

図 6：ステロイド系抗炎症薬の投与が組織像に与える影響。培養骨を BALB/cAJc1 に移植後，3，7 および 28 日目のサンプルを摘出し，薄切後 H-E 染色により観察を行った。(a)，(b)，(c)は，実験群として培養骨移植後にステ

ロイド系抗炎症薬を投与し、それぞれ 3、7 および 28 日目に摘出したサンプル（以下実験群とする）の H-E 染色である。また、(d)、(e)、(f)は対照群として同量の生食水を投与し、それぞれ 3、7 および 28 日目に摘出したサンプル（以下対照群とする）の H-E 染色である。移植 3 日目では、実験群と比較して対照群ではやや炎症性細胞の浸潤が多い傾向であった。

図 7：ステロイド系抗炎症薬の投与がマクロファージの浸潤に与える影響。培養骨を BALB/cAJc1 に移植後、3、7 および 28 日目のサンプルを摘出し、薄切後 F4/80 に対する免疫組織化学染色を行った。(a)、(b)、(c)は、実験群の免疫染色を示す。また、(d)、(e)、(f)は対照群の免疫染色を示す。培養骨移植 3 日目では、実験群と比較して、対照群で F4/80 陽性細胞が多く認められた。一方、7 日目以降では、両群の陽性細胞の分布に明らかな差は認められなかった。培養骨移植後 3 日目の組織標本を用いて、F4/80 陽性細胞のしめる割合を Image J を用いて解析した(g)。陽性細胞は対照群で多く見られたが、有意差は認められなかった。

図 8：ステロイド系抗炎症薬の投与が TNF- α の発現に与える影響。培養骨を BALB/cAJc1 に移植後、3、7 および 28 日目のサンプルを摘出し、薄切後抗 TNF- α 抗体に対する免疫組織化学染色を行った。(a)、(b)、(c)は、実験群の免疫染色を示す。また、(d)、(e)、(f)は対照群の免疫染色を示す。TNF- α 陽性細胞は培養骨移植 3 日目のサンプルにも認められ、7、28 日目のサンプルにも見られた。陽性細胞の分布は 3 日目から 28 日目まで一定しており、またステロイド系抗炎症薬投与の有無による差は見られなかった。培養骨移植後 3 日目に摘出したサンプルより RNA を抽出し、Real Time PCR による TNF- α の定量的解析を行った。実験群でやや高値を示したが、対照群との間に有意差は認められなかった(g)。

図 9：ステロイド系抗炎症薬の投与が破骨細胞分化に与える影響。培養骨を BALB/cAJc1 に移植後、3、7 および 28 日目のサンプルを摘出し、薄切後 TRAP 染色を行った。(a)、(b)、(c)は、実験群の TRAP 染色を示す。また、(d)、(e)、(f)は対照群の TRAP 染色を示す。実験群においては、細胞移植 7 日目よりわずかな TRAP 陽性細胞が認められ、28 日にかけて急激に増加した。一方対照群においては、TRAP 陽性細胞は培養骨移植 7 日目以降 28 日にかけて急激に増加したが、7 日目のサンプルでは陽性細胞は認められなかった。TRAP 陽性細胞数を比較するために、培養骨 28 日目に摘出したサンプルの TRAP 陽性面積率を Image J を用いて解析した(g)。その結果、両群に有意差は認められなかった。

図 10：ステロイド系抗炎症薬の投与が骨芽細胞分化に与える影響。培養骨を BALB/cAJc1 に移植後， 3， 7 および 28 日目のサンプルを摘出し， 薄切後抗 Osterix (Sp7)抗体を用いて免疫染色を行った。(a)， (b)， (c)は， 実験群の免疫染色を示す。また， (d)， (e)， (f)は対照群の免疫染色を示す。陽性細胞は移植 3 日目より見られ， 徐々に濃染される細胞が増加した。しかしながら， 陽性細胞の分布には， ステロイド系抗炎症薬投与による影響は認められなかった。枠内は強拡大像。