

〔原著〕 松本歯学 25 : 118~123, 1999

key words : 骨形成因子 (BMP) - 異所性骨組織 - 類軟骨 - 類軟骨性骨化 - 免疫組織化学

骨形成因子により誘導される類軟骨性骨化の病理学的検討

木村晃大, 川上敏行, 長谷川博雅, 枝 重夫

松本歯科大学 口腔病理学教室 (主任 枝 重夫教授)

河合達志

愛知学院大学 歯学部 歯科理工学講座 (主任 長谷川二郎教授)

Pathological Examination of Transchondroid Bone Formation Induced by Bone Morphogenetic Protein

AKIHIRO KIMURA, TOSHIYUKI KAWAKAMI, HIROMASA HASEGAWA and SHIGEO EDA

*Department of Oral Pathology, Matsumoto Dental University School of Dentistry
(Chief: Prof. S. Eda)*

TATSUSHI KAWAI

*Department of Dental Material Science, Aichi-Gakuin University School of Dentistry
(Chief: Prof. J. Hasegawa)*

Summary

Previously, we reported that BMP-induced heterotopic osteogenesis was thought to belong the third ossification mode, as described by Yasui *et al.* We reported that transchondroid bone formation and that BMP-induced heterotopic bone was "chondroid bone," a tissue intermediate between cartilage and bone, by histochemical examinations. Therefore, we have investigated the characteristics of BMP-induced heterotopic transchondroid bone formation using histochemical and immunohistochemical techniques, especially the localization of typical matrix proteins of cartilage and bone: collagen type I and type II antibodies. We found that both collagen peptides were detected in the matrix of "chondroid bone" in the early phase of BMP-induced heterotopic transchondroid bone formation. Therefore, we believe that the third ossification mode, "transchondroid bone formation", was chiefly displayed in the BMP-induced heterotopic osteogenesis.

緒 言

骨形成因子 (bone morphogenetic protein : BMP) によって誘導される異所性骨組織は一般に軟骨内骨化の様式を経て形成されるとされて来たが^{1,2)}、ある種の担体を使った場合などでは膜内骨化を示すことも報告されている^{3,4)}。また、いわゆる軟骨内骨化を示す場合にも、骨基質タンパクの局在^{5,6)}およびその遺伝子の発現状況⁷⁻⁹⁾の検索結果から生理的なそれとは微妙に異なる点があるなどの指摘がされている。しかし生理的な骨化様式である膜内骨化あるいは軟骨内骨化と同一なものなのか、あるいはどのような相違点があるかなど、その特殊性については未だ十分に明らかにされていない。この点について我々は病理組織学的ならびに組織化学的検索を行うと共に文献的考察を加え、BMPの誘導する異所性骨組織には軟骨内骨化とも膜内骨化とも異なる Yasui ら¹⁰⁾の提唱する“類軟骨性骨化”と呼ばれる第三の骨化様式の出現していることを報告した¹¹⁾。そこで今回、この BMP の誘導する類軟骨性骨化について病理組織学的、組織化学的に再検討するとともに骨・軟骨を特徴づける基質タンパクについて免疫組織化学的にも検討し若干の知見を得たので、ここに報告する次第である。

材料および方法

実験には、4週齢の雄性 ddY 系マウス (日本エスエルシー、浜松) を搬入後約 1 週間の経過観察を行い、健康と思われたもののみを使用した。実験に先立ち、まず、マウスにエーテルによる吸入麻酔を施し、剃刀にて背部皮膚表面を剃毛後、メスで切開を加えた。同部より大腿部粘膜・筋膜を鈍的に剥離した後、同部筋膜下組織内に部分精製段階の BMP 約 5 mg を容れたゼラチンカプセル (日本薬局方第 5 号) を埋入した。なお、使用した BMP は既報⁹⁾に準じ調製した。手術の 3 日、5 日、7 日、10 日、14 日および 21 日後、経時的にエーテルによる吸入麻酔下に、骨形成相当部位を周囲組織を含めて一塊として摘出した。直ちに同組織を 10% 中性緩衝ホルマリン液で 24 時間浸漬固定し、10% EDTA にて 1 週間脱灰した。その後、通法にしたがい 4 μm のパラフィン包埋切片とし hematoxylin-eosin (H-E) 染色および Toluidin

blue (TB) 染色 (pH 4.1) 等を行い観察した。さらに、一次抗体として TBS にて各々 200 倍希釈した抗 collagen type I 抗体 (コスモバイオ、東京) および抗 collagen type II 抗体 (コスモバイオ、東京) を使用して、ヒストステイン-DS キット (Zymed lab inc. San francisco, USA) によって免疫組織化学的に検索した。

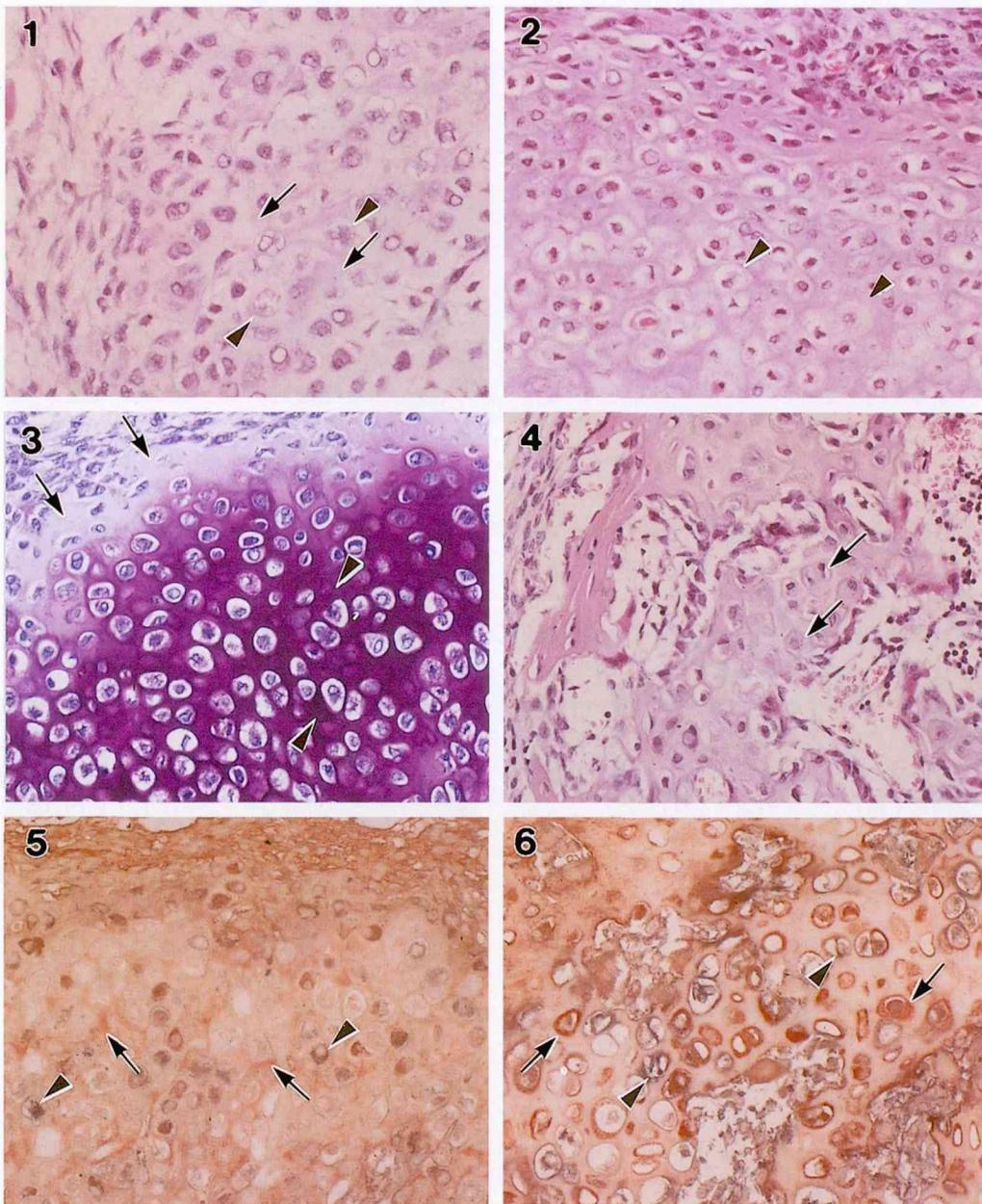
結 果

病理組織学的ならびに組織化学的所見：

BMP の埋入後 3 日では未分化な紡錘形の細胞の増殖がみられた。5 日では、紡錘形の線維芽細胞様細胞の増殖がみられ、部分的には胞体の大きい軟骨芽細胞様細胞が確認された。しかしながら、その基質の形成は不明瞭であった。7 日経過すると、紡錘形の線維芽細胞様細胞の増殖する中に少量の軟骨芽細胞様細胞の集簇が存在し始め、その基質の形成も開始されていた (図 1)。わずかに形成された基質相当部は、TB で異染性を示した。10 日経過すると、密に軟骨様基質が形成され、その基質の中心部に胞体の大きい軟骨芽細胞様細胞があり、その周囲に多くの軟骨細胞様細胞を有する軟骨様組織の形成があった。同組織の辺縁ではわずかに幼若な骨組織の形成が開始されており、その部には、辺縁に細胞質が膨らんで楕円形を呈する骨芽細胞が並んでいた (図 2)。TB にて軟骨芽細胞様細胞周囲基質に異染性を認めた (図 3)。しかし、周縁の骨組織部分にはこれらを呈さなかった。14 日経過すると、辺縁部では骨組織の形成が進行していたが、その多くは層板構造が不明瞭であった。これらの部には軟骨細胞様細胞と骨細胞様細胞が混在する部分が随所にみられた (図 4)。また、基質間に骨髄の形成が開始されていた。この時期の TB 標本でも骨梁内に斑状の異染性が観察された。21 日例では、ほとんどは、扁平な骨芽細胞様細胞と骨小腔内に存在する骨細胞様細胞を有する比較的成熟した骨様組織が梁状に形成されており、その間に形成された骨髄は一部において脂肪髄化していた。なお、TB では成熟した骨基質中心寄りに強い異染性を示す部が残っていた。

免疫組織化学的所見：

埋入 3 日例では増殖する紡錘形の細胞には collagen type II および collagen type I の陽性反応は



- 図1：軟骨芽細胞様細胞（楔印）の増殖が始まり、その基質（矢印）も確認される。（7日例，H-E， $\times 400$ ）
- 図2：軟骨芽細胞様細胞の増殖（楔印）とその基質が形成され、辺縁部には骨芽細胞が出現している。（10日例，H-E， $\times 400$ ）
- 図3：軟骨芽細胞様細胞周囲基質は異染性を示すが（楔印）、辺縁は示さない（矢印）。（10日例，T-B， $\times 400$ ）
- 図4：広範囲に骨基質が形成され、その中には胞体の大きな軟骨芽細胞様細胞（矢印）が介在している。（14日例，H-E， $\times 400$ ）
- 図5：増殖する細胞の細胞質および周囲基質に黒色に反応するII型コラーゲン（楔印）と赤褐色に反応するI型コラーゲン（矢印）の両タンパクの反応がある。辺縁部の骨芽細胞の細胞質にはI型コラーゲンの反応のみがある。（7日例，免疫染色， $\times 400$ ，発色：黒：II型コラーゲン，赤褐色：I型コラーゲン）
- 図6：基質内に存在する軟骨芽細胞様細胞の細胞質およびその周囲に、II型コラーゲン（楔印）とI型コラーゲン（矢印）の両タンパクの反応がある。（14日例，免疫染色， $\times 400$ ，発色：黒色：II型コラーゲン，赤褐色：I型コラーゲン）

ともに得られなかった。しかし、5日経過すると、部分的に増殖する軟骨芽細胞様細胞の細胞質内に collagen type II の陽性の反応が現われた。しかし collagen type I の反応はなかった。7日経過例では、増殖し始めた軟骨芽細胞様細胞の細胞質および一部に形成された軟骨様基質に collagen type II の陽性反応がみられた。さらに、それらに混在するように、同基質に部分的ではあるが collagen type I の陽性反応があった。また、辺縁の扁平な骨芽細胞様細胞の細胞質内に collagen type I の陽性反応が認められた (図5)。10日経過すると、軟骨細胞様細胞の細胞質および周囲の軟骨様基質に collagen type II および collagen type I の両者に陽性反応があり、骨様組織の辺縁基質においては collagen type I の反応のみが得られた。14日例では、基質内に存在する軟骨芽細胞様細胞の細胞質および軟骨細胞様細胞の周囲には collagen type II および collagen type I の両方の陽性反応があった (図6)。21日後には、基質内に残存する軟骨芽細胞様細胞の細胞質および軟骨細胞様細胞の周囲基質にも collagen type II および collagen type I の反応が陽性を呈していた。

考 察

BMP により誘導される異所性骨組織の形成は、担体の種類によって、膜内骨化の様式を経る場合もある⁹⁾。しかし、従来はその初期に一旦、軟骨細胞様細胞が現れてから骨組織が作られるということからのみ、軟骨内骨化の過程を経るとされてきた^{1,2)}。しかしながら、これはただ単に軟骨細胞様細胞が出現してから骨組織が形成されるという事実から記述されたものであり、これについての詳細な検討はなされていなかった。

一方、先にも述べたようにこの骨化様式は生理的なそれと相違していると考えられる点が知られていた^{7,8)}。すなわち、異所性骨組織の形成過程において、その基質成分の免疫組織化学的検討により、軟骨と骨の中間的な組織がみられたと報告^{5,7,12)}されている。すなわち、collagen type I および collagen type II の局在が、正常とは異なるというものである。しかし、いずれも“軟骨様組織”あるいは“類軟骨”と呼ぶ組織について述べているものであり、“類軟骨性骨化”の過程とし

てとらえた報告はされていない。我々は BMP の誘導による異所性骨を病理組織学的ならびに組織化学的に検索し、軟骨芽細胞様細胞もしくは軟骨細胞様細胞は出現しているが、その細胞が比較的成熟した時期の骨梁内に残存していたことから、膜性骨化や軟骨内骨化とは異なる第三の骨化様式である“類軟骨性骨化”に相当する経過を経るであろうと述べた¹⁰⁾。この様式は Yasui ら (1997)¹⁰⁾ がラットを用いた仮骨延長術の実験系において提唱したもので、これは初期に一旦類軟骨の形成を経てから骨組織へと移行するというものである。そこで今回さらに BMP の誘導する骨形成過程が類軟骨性骨化であることを確認するために詳細な検索を実施したのである。すなわち、これらの主要な基質成分、すなわち、軟骨を特徴づける collagen type II および骨組織の collagen type I の両者の局在を免疫組織化学的に検索した。その結果、これら基質タンパクの異所性骨組織内の局在は、結果に記したように、通常の軟骨内骨化とは異なる形成様式であるということを裏付けするものであった。すなわち、10日例の軟骨様組織においては、TB で異染性を示す組織化学的に典型的な軟骨を示す基質部分に本来存在し得ない骨基質を特徴づける collagen type I の陽性反応が得られたのである。さらに14日例では不整形の骨梁内に通常の骨細胞とは形態的に異なり、胞体が大い細胞が存在していた。これらの細胞は、その細胞質内および周囲基質に collagen type II が局在する軟骨芽細胞に類似し塊状に介在していた。さらに、脂肪髄を伴う成熟した骨梁内に残存していた軟骨細胞様細胞周囲には collagen type II が、また、その細胞質内にも collagen type I が確認された。これらのデータは、明らかに生理的な軟骨内骨化による骨形成とは異なるものであり、軟骨芽細胞様細胞は軟骨細胞だけでなく、骨細胞としての性格を保有していると考えられた。したがって、我々はこの組織を“類軟骨 (chondroid bone)”，介在する細胞は“類軟骨形成細胞 (chondroid bone forming cell)”と呼びたい。そして、この様に一旦類軟骨が形成された後に骨組織に置換する骨化様式であり“類軟骨性骨化”を起こしていると考えている。なお、中川ら (1999) も、その基質タンパクの免疫組織化学的検索によって、BMP の誘導する異所性骨組織の形成様

式をこの“類軟骨性骨化”であろうと考えている¹³⁾。

今回の実験系に用いた BMP は部分精製段階のものであるので、ヒト合成 BMP (rhBMP) を用いた実験結果と同一とは限らない。しかし、他の研究者による数種の担体を用いた実験系においても⁶⁻⁸⁾、同様な病理組織学的、免疫組織化学的、*in situ hybridization* による所見が確認されている。したがって、rhBMP を用いた場合には担体などの条件によりその膜内骨化を示す場合もあるものと思われる。しかし、従来考えられていた軟骨内骨化が発現する場合には、この“類軟骨性骨化”である可能性が強いと思われる。

さて、この軟骨と骨の中間的な性格を示す組織“類軟骨 (chondroid bone)”について、古くは Enlow (1962)¹⁵⁾により、骨が急速に形成される場合などに出現し、軟骨様細胞がさらなる分化を遂げ骨形成を行うであろうとの記載がなされている。また、BMP により誘導された軟骨内の肥大軟骨様細胞については、光顕、電顕および免疫電顕的に検索されている¹⁴⁾。それによると、肥大軟骨細胞のほとんどは死滅していくが、一部は生き残っており、免疫電顕的検索で、その細胞の周囲に collagen type I の陽性反応があると言う。すなわち、生き残った肥大軟骨細胞が、直接的に骨形成に関与していると考えられる。しかし、この研究グループは BMP の誘導による骨形成過程にみられるこれらの事実について報告しているのみで、骨の形成様式についての言及はない。我々は、これらのデータは“類軟骨性骨化”の様式を示すものと考えている。

さて、形成された異所性骨組織の骨化様式は以上の論議にあるような類軟骨性骨化だけでなく、辺縁部では直接的に骨が形成されていることが確認された。この様式は膜内骨化の像を呈しており、その位置関係から生理的な軟骨外骨化⁹⁾に相当するものと考えられる。

以上、今回の研究結果は BMP の誘導する異所性骨形成過程には“類軟骨性骨化”が主として出現するとの我々の主張を肯定するものであるが、それだけでなく、生理的な軟骨内骨化と思われる部分もみられるので、その詳細についてはさらなる追究が必要である。そして、“類軟骨性骨化”を特徴づける“類軟骨形成細胞”の増殖・分化の

機構について Kawakami ら (1999)¹⁶⁾は同時期に発現する TGF- β が何らかの役割を負っていると推察しているが、今後はこれらについてさらに追究していく予定である。

結 論

BMP の誘導による異所性骨組織の形成について、組織化学および免疫組織化学的に追究した結果、主として“類軟骨”の形成を経る“類軟骨性骨化”と言う第三の骨化様式によることが強く示唆された。

なお、本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金 (課題番号11877320) および1998年度松本歯科大学特別研究補助金によって行った。

参 考 文 献

- 1) Rapamonti U, Magan A, Ma S, Vendenheever B, Moehl T and Reddi AH (1991) Xenogenic osteogenin, a bone morphogenetic protein, and induce demineralization bone matrices, including human, induce bone differentiation in athymic rats and baboons. *Matrix* **11**: 404-11.
- 2) Sampath TK and Reddi AH (1981) Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 7599-603.
- 3) Kawakami T, Kawai T, Takei N, Kise T, Eda S and Urist M R (1997) Evaluation of heterotopic bone formation induced by squalane and bone morphogenetic protein composite. *Clin Orthop* **337**: 261-6.
- 4) Sasano Y, Ohtani E, Narita K, Kagayama M, Murata M, Saito T, Shigenobu K, Takita H, Mizuno M and Kuboki Y (1993) BMPs induce direct bone formation in ectopic sites independent of endochondral ossification in vivo. *Anat Rec* **236**: 373-80.
- 5) Inoue M, Qin C L, Nojima T, Nagatsuka H, Murata M, Nosaka Y, Akagi T, Kuroda K, Mabuchi M, Hoh K and Nagai N (1996) Histopathological and immunohistochemical study of heterotopic chondro-osseous tissue formation induced by S-200 BMP. *J Hard Tissue Biol* **5**: 1-6.
- 6) Inoue M, Qin C L, Murata M, Akagi T and Nagai N (1995) Immunohistochemical study of heterotopic cartilage-bone formation induced by BMP-FGM. *Dentistry in Japan*. **32**: 19-21.
- 7) Nagai N, Nagatsuka H, Murata M, Inoue M, Akagi T, Qin C L, Nakano K, Ishiwari Y,

- Konouchi H, Tsujigiwa H, Chigono Y and Takagi T (1995) Gene expression of matrix protein mRNA during BMP induced chondrogenesis and osteogenesis by *in situ* hybridization. *J Hard Tissue Biol* **4**: 15-23.
- 8) Nagatsuka H, Inoue M, Akagi T, Ishiwari Y, Guiru L, Huang B, Takagi T, Attia-zouair M G and Nagai N (1997) Gene expression of chondro-osseous cells in heterotopic bone formation induced by rhBMP-2. *J Hard Tissue Biol.* **6**: 10-5.
- 9) 長塚 仁, 今村高行, 井上正久, 村田 勝, 赤木 巧, 石割裕三, 林 勝彦, 此内浩信, 申 洪仁, 秦 春林, Liliana M, 高木亨, 永井教之 (1994) BMP 誘導異所性硬組織界面の骨芽細胞分化と骨基質蛋白遺伝子の発現 - *In Situ* Hybridization 法による検討 -. *J Hard Tissue Biol.* **3**: 7-12.
- 10) Yasui N, Sato M, Ochi T, Kimura T, Kawahata H, Kitamura Y and Nomura S (1997) Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. *J Bone Joint Surg* **79-B**: 824-30.
- 11) Kawakami T, Kawai T, Kimura A, Hasegawa H, Yoshikawa Y and Eda S (1998) Transchondroid bone formation displayed in BMP-induced heterotopic osteogenesis. *J Hard Tissue Biol* **7**: 21-6.
- 12) Qin C L, Murata M, Nagatsuka H, Kuroda K and Nagai N (1997) Morphological and immunohistochemical study of ectopic bone formation induced by crude BMP in 4-week-old and 6-month-old rats. *日口腔インプラント誌* **10**: 288-95.
- 13) 中川俊幸, 井上有子, 後藤 匡, 松尾和昭, 森 恵行, 栗田勇岐, 関田素子, 田川俊郎 (1999) rhBMP-2 誘導骨・軟骨組織における I, II, X 型コラーゲンの局在. *日口外誌* **48**: 239-40.
- 14) Mizutani H, Hattori H, Yasue K, Senga K, Kawai M, Ueda M and Hoshino T (1996) The hypertrophic chondrocytes of the bone morphogenetic protein induced cartilage. *Jpn J Oral Biol* **38**: 309-16.
- 15) Enlow DH (1962) A study of the post-natal growth and remodeling of bone. *Am J Anat* **110**: 79-101.
- 16) Kawakami T, Hiraoka B Y, Kawai T, Takei N, Hasegawa M and Eda S (1999) Expression of transforming growth factor-beta peptide and its mRNA in chondrocytes in the early phase of BMP induced heterotopic 'transchondroid bone formation'. *Med Sci Res* **27**: 419-21.