

低出力超音波パルス LIPUS を照射したヒト歯槽骨骨膜由来 スフェロイドに関する超微細構造学的研究

宮 城 直 美 川 津 布 美* 東 一 善*
前 田 信 吾 河 田 亮 高 橋 理

神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔科学講座神経組織発生学分野
(主任 高橋 理)

* 川津歯科医院

(受付：2016年5月11日)

Ultrastructural study of human alveolar bone periosteal cell spheroids upon exposure to Low-intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS)

Naomi MIYAGI, Fumi KAWATSU*, Kazuyoshi HIGASHI, Shingo MAEDA,
Akira KAWATA and Osamu TAKAHASHI

Department of Neuroanatomy, Histology, and Embryology, Kanagawa Dental University Graduate School,
82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa 238-8580, Japan

* Kawatsu Dental Clinic, 2-11-8 Higashishukugou, Utsunomiya, Tochigi 321-0953, Japan

Abstract

Previously, low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) was reported to accelerate periodontal wound healing in experimental alveolar bone defects in dogs, however, the exact mechanism is still unknown. This study attempted to determine how daily LIPUS stimulation might affect morphological and cytoarchitectonic changes of the cells and bone matrix protein expression in spheroids of human alveolar bone periosteal cells. Histological (toluidine blue), immunohistochemical, and ultra-structural analyses (osteopontin (OP) and osteocalcin (OC)) of spheroid cells were conducted after 1, 3, 7, and 14 days of culture with daily LIPUS stimulation. Layered structures, distinguished by the directionality of the cells, were observed in the spheroids from day 1, with the layered structures becoming indistinct over time in the order of the irradiated side, non-irradiated side, and control. Immuno-histochemically positive cells indicating OP and OC were observed in the order of the core, middle layer, and outer layer of the spheroids. The shapes of the cell bodies were columnar, cuboidal, and flattened, respectively. Cells at the core part of the spheroids showed electron-dense granules in their cytoplasm and in matrix between their cell bodies. Furthermore, immuno-positive cells for OC and OP were encountered over time in the order of the irradiation side, non-irradiation side, and controls. In addition, cells with funicular structure were observed in the core from the outer layer of the spheroids on the irradiated side from day 1. These findings show that LIPUS irradiation promotes cell differentiation and changes the cell direction within spheroids.

緒 言

最近,川津らはヒト歯槽骨骨膜由来細胞 (HABPCs) のスフェロイドを作製した後に低出力超音波パルス

(Low-intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS)) を照射し, スフェロイド内の細胞形態およびオステオポンチン (OP) およびオステオカルシン (OC), すなわち骨基質タンパクの発現に与える LIPUS の影響を経時

的に検索した結果、細胞構築および細胞形態により分類された層構造がスフェロイドに認められ照射近位部、照射遠位部、コントロールの順で経時的に層構造は不明瞭になり、さらに全てのスフェロイドに深層から中層、表層の順に OP ないしは OC に対する免疫陽性細胞の発現を報告した¹⁾。また LIPUS 照射近位部で早期に OP、OC の発現と細胞の索状構造が認められ、スフェロイド内における HABPCs の分化促進と細胞構築の変化が生ずることも示唆された¹⁾。OP は骨のリモデリングやメカニカルストレスの調整に関わるタンパク質で、もともとカルシウムの沈着した骨組織のマトリックスを構成する主要な非コラーゲン性タンパク質として同定された分泌型酸性リン酸化糖タンパク質である²³⁾。またその名の示すように骨基質中で破骨細胞とハイドロキシアパタイトをつなぐ架け橋 (Pons) として働くと考えられていたが⁴⁾、他にも OP は細胞接着、細胞遊走、一酸化窒素産生の制御など多彩な機能が報告されてきている⁵⁾。一方、OC は骨芽細胞から分泌され、代謝調節および骨形成促進性に働くものと考えられ、骨の石灰化とカルシウムイオンの恒常性維持に関与すると考えられている⁶⁾。

従来、超音波を臨床医学に応用した研究は数種類が実際に臨床現場において利用されている⁷⁻⁹⁾。この物理学的療法の一つである超音波療法は、超音波の物理的性質による対象組織への温熱効果あるいは非温熱効果によるタンパク質の合成、およびサイトカインの産生を促すものと報告される¹⁰⁻¹³⁾。LIPUS は、その微弱な超音波エネルギーを利用した超音波療法の一つである臨床応用例である^{14,15)}。LIPUS の出力は対象組織に対して温熱効果を与える出力範囲 (13 W/cm^2)^{7,16)}、および日本超音波医学会により示された生体に何らかの影響を及ぼす超音波強度の最低値 (240 mW/cm^2)^{7,17)} より低いレベルであり、対象組織に対して低侵襲である非温熱効果を有するものと考えられる^{18,19)}。LIPUS の効果はウサギ腓骨における骨折治癒、および大腿骨骨欠損の修復について 1983 年に Duarte らにより初めて報告された²⁰⁾。その後、LIPUS の照射はラットの大腿骨骨折に対する治癒促進効果や脛骨骨折、橈骨遠位端骨折に対して治癒期間の短縮に有効であることが報告された^{8,21,22)}。さらに LIPUS 照射はウサギ下顎骨骨折モデルにおいても骨折に対する治癒促進効果が報告された²³⁾。これらより現在、LIPUS 照射は骨折治癒における効率的な治療法として整形外科領域にて応用されている^{17,24)}。

歯学領域では、骨組織の形成を目的とした LIPUS 照射が、インプラント処置にかかわる臨床応用研究において多数報告された²⁵⁻²⁸⁾。LIPUS 照射は臨床歯

学の研究ですでに有用性が認められているものの、LIPUS 照射を受けた支持組織について細胞学的な変化は明らかにされていない点多々あり、現在もなお LIPUS 照射を用いた基礎的な実験研究があまり報告されていないのが現状である。*in vitro* の実験結果によると、LIPUS 照射の効果により LIPUS の刺激がインテグリンなどの細胞接着因子を介して細胞にシグナル伝達されているとされる^{17,29,30)}。その結果として LIPUS 照射により骨芽細胞におけるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) を介したプロスタグランジン E2 (PGE2) の産生増加が報告され³⁰⁻³²⁾、その他にも Runx2, I 型コラーゲン, オステオネクチン (ON), オステオポンチン (OP), オステオカルシン (OC) の合成が上昇し³³⁻⁴⁰⁾、さらに歯根膜細胞においても I 型コラーゲンとアルカリホスファターゼ (ALP) 活性の上昇がともにみられた⁴¹⁾。一方で伊海らは、ビーグル犬の下顎骨骨欠損モデルに対する LIPUS 照射が、接合上皮の根尖側への移動を抑制し、新生セメント質および新生骨が再生すると報告した⁴²⁾。真野らによると、LIPUS 照射は HABPCs に対して細胞増殖に影響を与えず、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性に対して上昇を来した事実を報告した⁴³⁾。宗正らの研究では、平面培養と比較するために、細胞の分化誘導に有用な三次元スフェロイドを HABPCs により作製、LIPUS 照射を行ったところ、コントロール群と比較して早期に骨基質タンパク質が発現すると報告した⁴⁴⁾。しかしスフェロイド内の細胞分化時期に差異が認められたものの、LIPUS の照射方向が規定されておらず、さらにスフェロイドの一定部位に持続的に照射されなかったため、骨基質タンパク発現と LIPUS の照射強度との関係については明らかではない。

本研究ではスフェロイドの位置を固定することにより LIPUS 照射方向を規格化し、スフェロイド内の組織学的な変化と細胞分化への影響を同時に明らかにすることを目的とした。すなわち、トルイジンブルー染色による組織学的検索と、骨芽細胞のマーカーとして広く用いられ骨のリモデリングやメカニカルストレスの調整に関わる OP、そして成熟した骨芽細胞に認められる非コラーゲン性タンパク質である OC、これらの発現を免疫組織化学的に検索した。

材料と方法

1. 培養した細胞の確立

本研究に用いた骨膜組織は、本学歯周外科の処置時に部分層弁にて歯肉剥離を行った歯槽骨表面に存在する骨膜組織を $2.0 \times 2.0 \text{ mm}$ 程度で採取した。本研究は



図1 オリングにて位置固定したスフェロイド。
スフェロイド形成後、照射1日目。

神奈川歯科大学倫理委員会の承認(認証番号第178番)のもとに、神奈川歯科大学附属病院に来院し、インフォームドコンセントの得られた患者より採取した検体により施行された。

本研究に用いた培地は10%ウシ胎児血清(FCS), 0.25 mM L-ascorbic acid-2-phosphate (WAKO, 大阪) および 10 units/ml penicillin (Gibco, USA), 10 μg/ml streptomycin (Gibco, USA), 3.5 mg/ml D (+)-glucose (WAKO, 大阪) の最終濃度になるように調整した。その後、上記の方法により採取された骨膜組織は添加した α Minimum Essential Medium (α MEM Gibco, USA) にて洗浄後、メスを用いて細分化させ 24 well culture dish 上に播種し前述の培地中で cell culture slip (Thermanox Plastic, Nalge Nunc International, USA) にて組織片を押さえ 37°C, 5% CO₂ 下においてインキュベータ内にて静置した。これらの組織片から遊走してきた細胞を HABPCs の初代培養細胞とした。HABPCs はコンフルエントに達した後に、0.25% trypsin (Difco, USA)/(Ca²⁺ and Mg²⁺ free phosphate buffered saline (PBS (-)), 日水製薬, 東京) にて剥離、細胞密度を 1.8×10⁴ cells/cm² に調整し、100 mm culture dish 中で前述の培地を用い、37°C, 5% CO₂ 下においてインキュベータ内で継代培養を行った。培地交換は2日ごとに実施し、継代培養を行った。本実験では第5代目の HABPCs を使用した。なお、本研究はヘルシンキ宣言を遵守して行われた。

2. 三次元細胞スフェロイドの作製について

HABPCs を 1.8×10⁴ cells/cm² の細胞密度にて 100 mm culture dish 中に播種し、48時間ごとの培地交換を行いつつ 10日間、培養した。10日後、培養された HABPCs を 100 mm culture dish から 0.25% trypsin にてシート状のまま剥離した。剥離した細胞シートは 300 G にて 4°C, 3分間遠心沈殿し、球状にしたものを培地中にて 24時間静置し、直径約 3 mm のスフェロイドを形成した。

3. LIPUS 照射

本研究の LIPUS 照射装置 (BR ソニック -Pro, 伊藤超短波, 東京) はプローブ先端の直径が 1.8 cm の

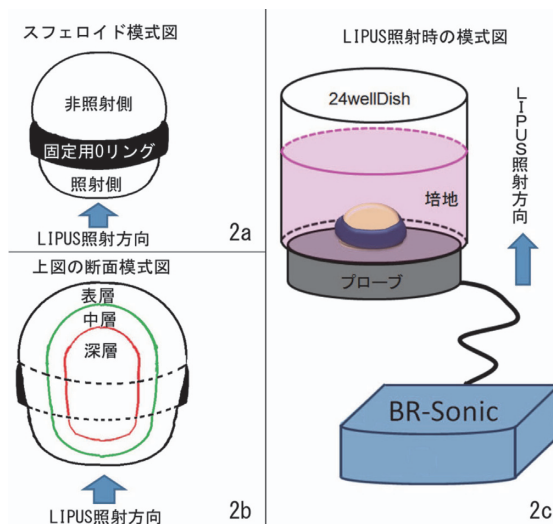


図2 スフェロイドへの LIPUS 照射の模式図。2a: 固定用オリングによるスフェロイドの固定。スフェロイドの各部位は LIPUS 振動子に近い部位を照射側、振動子から遠い部位を非照射側とした。2b: スフェロイドの断面模式図。細胞構築および細胞形態に基づき表層、中層、深層の各層に分類した。2c: BR ソニック -Pro (伊藤超短波, 東京) を用いた LIPUS 照射実験の模式図。

円形の振動子を用いた。24 well culture dish にスフェロイドを内径 3.0 mm のオリング (アラスチックモジュール, 3M Unitek, 東京) にて位置を固定し静置した内部に上記の培地を満たした。dish の底部に対して振動子を設置、固定することで方向を規格化した (図 1), 振動子と dish の底部には LIPUS に由来する振動に対する良導体であるジェルを塗布した。

照射条件は周波数を 1 MHz, パルス周波数 100 Hz, 出力は 178 mW/cm² とし、1, 3, 7 および 14 日間、毎日 15 分間の LIPUS 照射を継続した¹⁾。LIPUS を照射したスフェロイドについては振動子に近い部位を LIPUS 照射側、振動子から遠い部位を LIPUS 非照射側とした (図 2)。

4. スフェロイドの組織学的な検索

LIPUS の照射を受けたスフェロイドは、PBS (-) にて 3回洗浄し、2.5% glutaraldehyde 溶液 (Wako, 大阪) にて 90 分間の浸漬固定を施した。この後にスフェロイドには滅菌されたメス刃で割が入り、さらに 2.5% glutaraldehyde 溶液にて 30 分間の浸漬固定を施した。その後、PBS (-) にて 3回洗浄し、1% オスミウム酸溶液 (Wako, 大阪) で 90 分間の浸漬固定をした。さらに漸次、エタノール脱水系列で処理した後に、試料は酸化プロピレン (Wako, 大阪) を介して水溶性樹脂 (Queto1651, Electron Microscopy Sciences, USA) に包埋した。包埋された組織試料はウルトラミクロト-

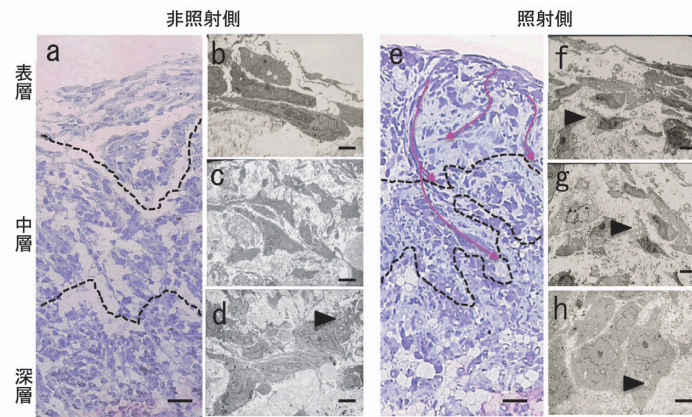


図3 照射1日目, a~d: LIPUS非照射側, (a) トルイジンブルー染色像, 点線は各層の境界を示す。scale bar=30 μ m。(b) スフェロイドの表層細胞の超微形態, (c) 中層細胞の超微形態, (d) 深層細胞の超微形態。b~d: scale bar=2 μ m。f~h: LIPUS照射側, (e) トルイジンブルー染色像, 点線は各層の境界を示す。scale bar=30 μ m。(f) スフェロイドの表層細胞の超微形態, (g) 中層細胞の超微形態, (h) 深層細胞の超微形態。赤線: 索状構造。黒矢頭: 細胞内顆粒。e~h: scale bar=2 μ m。

ム (MT-1, SORVALL, USA) 上にて, ガラスナイフを用いて約1 μ mの連続切片とした。この試料に1.0%トルイジンブルーによる染色を施し, 光学顕微鏡 (BZ-8000, KEYENCE, 大阪) にてスフェロイドの表層より深層にかけて培養された細胞の構築形態を解析した。

5. 電子顕微鏡学的な解析

LIPUSの照射を受けたスフェロイドを生理食塩水にて3回洗浄し, 0.1 M PBS (pH7.3) にて希釈した2.5% glutaraldehyde 溶液 (WAKO, 大阪) で40分間前固定, さらに1% オスミウム酸液 (WAKO, 大阪) で40分間後固定を施した。その後, 漸次エタノール系列で脱水し, 酸化プロピレン (WAKO, 大阪) を介して水溶性樹脂 (Queto1651, Electron Microscopy Sciences, USA) に包埋した。包埋された組織試料はウルトラマイクロトーム上にて, ガラスナイフを用いて約1 μ mの連続切片を作製し, 1.0%トルイジンブルー染色を施した。光学顕微鏡下で試料の部位を確認した後, ダイヤモンドナイフを用いて超薄切片を作製した。この超薄切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛による二重電子染色を施し, 透過型電子顕微鏡 (JEM1220, 日本電子, 東京) にて観察した。

6. 免疫組織化学法によるスフェロイドの組織学的検索

LIPUSの照射を受けたスフェロイドを0.1 M リン酸緩衝液 (PBS (-)) にて3回洗浄, 4% paraformaldehyde 溶液 (WAKO, 大阪) で4 $^{\circ}$ Cにて12時間の固定を施した。その後, 液体窒素にて凍結させ, 凍結切片用包埋剤 (Tissue-Tek, SAKURA, 大阪) に包埋し, 凍結マイクロトーム (クリオスタット HM500-

OM, カールツァイス, Germany) にて厚さ約25 μ mの連続切片を作製した。

この切片をPBS (-) にて洗浄後, 10% 正常ヤギ血清 (NGS) で30分間のブロッキングを施した。一次抗体としてはマウス・モノクローナル抗 OP 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, USA), ウサギ・ポリクローナル抗 OC 抗体 (Santa Cruz, Biotechnology, USA) を10% NGSにて希釈, 4 $^{\circ}$ Cにて12時間, 一次抗体の溶液に浸漬させた。

PBS (-) にて切片を2回洗浄後, OPに対する二次抗体として蛍光物質で標識された抗マウス IgG-Alexa 488 標識 (DAKO, Denmark), ならびに OC に対する二次抗体としては抗ウサギ IgG-ビオチン標識 (Life technology, USA) を用いた溶液に1時間浸漬させた。PBS (-) にて2回洗浄し, 抗ウサギ IgG-ビオチン標識 (Life technology, USA) を用いた溶液に1時間浸漬させた。PBS (-) にて2回洗浄し, OC に対する蛍光標識物質として Cy-3 (SIGMA, USA) に1時間浸漬させた。さらに照射1, 3, 7, 14日目のスフェロイドの切片に対して, ネガティブコントロールとして同様の二次抗体および標識物質を1時間作用させ, 非特異的な標識をおこなった。その後, PBS (-) にて2回洗浄, 70% グリセリン/PBS 溶液を用いて封入, 共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon E800, Nikon, 東京) にて観察を行った。

結 果

1. スフェロイドにおける細胞構築と細胞形態の変化

1) 照射1日目

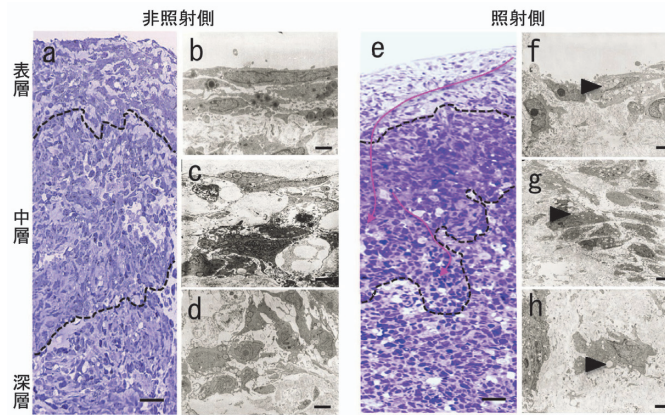


図4 照射3日目, a~d: LIPUS 非照射側, (a) トルイジンブルー染色像, 点線は各層の境界を示す。scale bar=30 μ m。(b) スフェロイドの表層細胞の超微形態, (c) 中層細胞の超微形態, (d) 深層細胞の超微形態。b~d: scale bar=2 μ m。f~h: LIPUS 照射側, (e) トルイジンブルー染色像, 点線は各層の境界を示す。scale bar=30 μ m。(f) スフェロイドの表層細胞の超微形態, (g) 中層細胞の超微形態, (h) 深層細胞の超微形態。赤線: 索状構造。黒矢頭: 細胞内顆粒。e~h: scale bar=2 μ m。

LIPUS 照射後に1日が経過したスフェロイドの組織像は, トルイジンブルー染色を施した標本により光学顕微鏡レベルでは表層, 中層そして深層にかけて細胞構築を観察した結果, 主として光学顕微鏡レベルで観察しうる細胞の形状, 細胞の長軸方向, 分布密度により3層に区別されたが, 非照射側ではその境界はやや不明瞭であった(図3a)。

照射側におけるスフェロイド最表層の細胞群は細胞体が扁平を呈し表層の深部では桿状, 中層ではやや大型の桿状, 深層の細胞では突起を有する多角形ないしは卵円形を呈した。細胞が形成する組織の密度は表層から深層に移るにしたがい高くなった(図3a)。スフェロイドの非照射側に位置する細胞を電子顕微鏡を用いて細胞形態を観察した結果, 表層では細胞が卵円形ないしは桿状形(図3b), 中層ではやや細胞密度が高まり, 多角形ないしは三角形を呈する細胞が増加した(図3c)。スフェロイドの深層にかけて細胞は大型化するものの, その形態に顕著な差異は観察されなかった。深層ではごく少数の細胞の細胞質内に, 電子密度の低い顆粒が少数観察された。(図3d)

LIPUS 照射後1日が経過したスフェロイドの照射側において, 光学顕微鏡レベルの観察により表層は扁平の細胞が, 中層において四角形ないしは長方形, そして深層では大型で多角形の細胞が多数, 観察された(図3e)。また照射側については表層から深層にかけて細胞の長軸をスフェロイドの表層から深層に向けた索状構造が少数, 観察された(図3e)。電子顕微鏡を用いた超微構造学的な細胞形態を観察すると, 表層を構成する細胞は扁平形(図3f), 中層では四角形ないし長方形の細胞が密に配列した(図3g),

そして深層では大型で多角形の細胞が観察された(図3h)。スフェロイドの表層から深層に向けた細胞の索状構造では表層から深層の全層にわたり, 細胞を構成する細胞質内に電子密度の低い顆粒が観察された(図3f~h)。

2) 照射3日目

LIPUS 照射の後に3日が経過した照射側では, スフェロイドの内部について構成する細胞の形態, 方向性および分布密度など細胞構築学的な3層が明瞭に区別された。すなわち, トルイジンブルー染色による光学顕微鏡レベルの観察では, LIPUS 照射側に対してスフェロイドの非照射側における最表層の細胞は1日目と同様に扁平であり, その直下に位置する表層の細胞群は桿状が多数, 中層ではやや大型の桿状, 深層では紡錘形ないしは卵円形の細胞が明瞭にスフェロイドを特徴づけていた。また, スフェロイドを構成する細胞の密度は深層にゆくに高くなった(図4a)。電子顕微鏡を用いた超微構造学的な細胞形態を観察すると, 表層を構成する細胞は扁平形(図4b), 中層では四角形ないし長方形(図4c), そして深層では大型で多角形の細胞が観察された(図4d)。

一方で, 照射側のスフェロイドを観察すると, 細胞構築学的な3層構造がより明瞭に区別され, 中層に位置する細胞群は非照射側と比較してその細胞密度が中層において特に高く観察された(図4e)。電子顕微鏡を用いた超微構造学的な細胞形態を3日目の照射側において観察すると, 表層を構成する細胞は厚みを帯びた扁平形で最表層の細胞は紡錘形(図4f), 中層では四角形ないし長方形の細胞が密に配列した(図4g)。

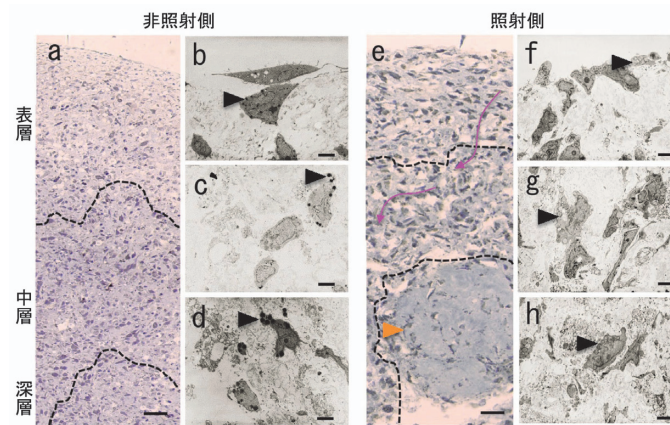


図5 照射7日目, a~d: LIPUS非照射側, (a) トルイジンブルー染色像, 点線は各層の境界を示す。scale bar=30 μm 。(b) スフェロイドの表層細胞の超微形態, (c) 中層細胞の超微形態, (d) 深層細胞の超微形態。b~d: scale bar=2 μm 。f~h: LIPUS照射側, (e) トルイジンブルー染色像, 点線は各層の境界を示す。scale bar=30 μm 。(f) スフェロイドの表層細胞の超微形態, (g) 中層細胞の超微形態, (h) 深層細胞の超微形態。赤線: 索状構造。橙矢頭: 類骨様構造。黒矢頭: 細胞内顆粒。e~h: scale bar=2 μm 。

そして特徴的なことに、深層を構成する大型で多角形の細胞と細胞の間には多くのコラーゲン線維が観察された(図4h)。スフェロイドの表層から深層に細胞の長軸を向けた索状構造では表層から深層の全層にわたり、細胞を構成する細胞質内に電子密度の低い顆粒が観察された(図4f~h)。照射3日目の例では表層から中層付近にまで明瞭な索状構造が多数認められたが、深層では不明瞭であった(図4e)。

3) 照射7日目

LIPUS照射7日目のスフェロイド非照射側の組織像は、細胞の形態および走行、細胞の分布密度により明確に表層、中層および深層を構成する3層構造を示す細胞構築像が観察された(図5a)。すなわち、最表層の細胞は厚みを持つ扁平形を呈し、その直下を構成する表層細胞は主として紡錘形(図5b)、中層の細胞は一部が星状形で他の細胞は卵円形(図5c)、そして深層ではやや大型の星状形および卵円形の細胞群が観察された(図5c)。これらの細胞についてその分布密度は表層より深層に移行すると高くなった。さらに表層、中層、深層の全層にわたり細胞質内の超微形態学的構造より、電子密度の高い顆粒が散在性に認められた(図5b~d)。

この照射7日目におけるLIPUS照射側では、スフェロイドを構成する個々の細胞の形状や走行、細胞の分布密度により照射側と同様に明確な3層構造が区別されたが、その境界は照射側と比較してやや不明瞭であった(図5e)。そして、最表層の細胞は扁平形をなし、直下の表層細胞、中層細胞は球形ないしは卵円形、深層の細胞は大型で卵円形を呈した(図5f~h)。細胞

の分布密度は照射側と同様に表層より順次、深層に向かうにつれ高くなった(図5e)。さらにこの照射側では照射3日目のスフェロイド照射側と同様に、深層を構成する大型で多角形の細胞と細胞の間には多くのコラーゲン線維が観察された(図5h)。そしてスフェロイドの表層から深層に向けた細胞の索状構造では表層から深層の全層にわたり観察され、細胞を構成する細胞質内に電子密度の低い顆粒が観察され、照射3日目の同例と比較して顆粒の出現はより顕著であった(図5f~h)。また照射3日目と同様に表層から中層にまで明瞭な細胞の索状構造が多数認められたが、深層では中型ないしは大型の細胞間にトルイジンブルーに濃染する細胞間基質が多く観察され、さらにこの組織領域の周囲をコラーゲン線維が取り囲む類骨様の形態を呈した(図5e)。

4) 照射14日目

LIPUS照射14日目に至るも、スフェロイドの大きさそのものに変化はみられなかった。細胞構築学的なスフェロイドの3層構造は光学顕微鏡的に認識できるものの、その境界は著しく不明瞭となり、わずかに中層と深層との境界が識別された(図6a)。また、照射7日目までに観察された、表層から深層に向けて細胞の長軸を向けた細胞の配列、すなわち索状構造については14日目の照射側では観察されなかった。電子顕微鏡を用いた観察では、細胞の形態は最表層で扁平形(図6b)、中層は四角形ないしは長方形(図6c)、深層では多角形であり(図6d)、全層にわたり細胞質内に顆粒が観察された(図6b~d)。

一方、照射側においてはスフェロイドの全層にわた

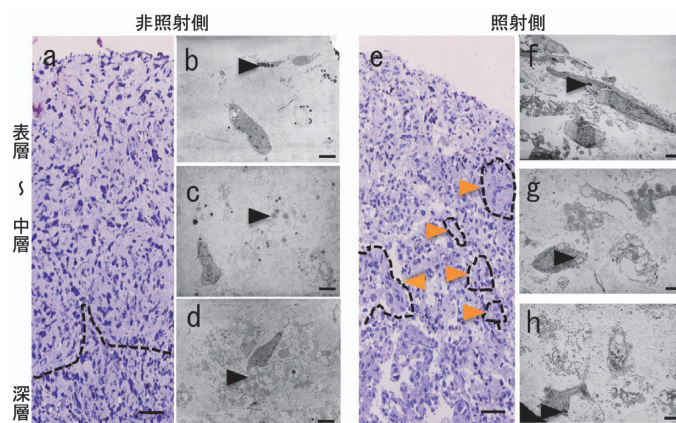


図6 照射14日目, a~d: LIPUS非照射側, (a) トルイジンブルー染色像, 点線は各層の境界を示す。scale bar=30 μ m。(b) スフェロイドの表層細胞の超微形態, (c) 中層細胞の超微形態, (d) 深層細胞の超微形態。b~d: scale bar=2 μ m。e~h: LIPUS照射側, (e) トルイジンブルー染色像, 点線は各層の境界を示す。scale bar=30 μ m。(f) スフェロイドの表層細胞の超微形態, (g) 中層細胞の超微形態, (h) 深層細胞の超微形態。橙矢頭: 類骨様構造。黒矢頭: 細胞内顆粒。f~h: scale bar=2 μ m。

り細胞構築学的な細胞の形態, 走行, および分布密度に差異は認められなかった (図6e)。細胞の形態は最表層の細胞のみ扁平形を呈し (図6f), その他は楕円形ないしは多角形を呈した (図6f~h)。この14日目のスフェロイド照射側において, 細胞の長軸を深層に向けた細胞の集合体, すなわち索状構造がスフェロイドの表層一部に観察され, 照射7日目例で観察された大小の類骨様構造が散在性にみられた (図6e)。この照射側における電子顕微鏡像では, 表層, 中層, そして深層にいたる全層の細胞質内に電子密度の高い顆粒が多数認められ, さらに深層では細胞外基質の中にコラーゲン線維の間にも電子密度の高い顆粒が多数, 観察された (図6f~h)。

2. スフェロイドの各層におけるOPならびにOC発現の変化

1) 照射1日目

LIPUS照射1日目のスフェロイドにおいて, 非照射側ではその表層から深層の全域にかけてOP, OCいずれに対しても細胞はすべて免疫陰性を示した (図7a)。

これに対して1日目のスフェロイド照射側ではOPに対する免疫陽性細胞 (緑矢頭) が表層, 中層の少数の細胞に観察され, 深層においては多くの細胞に認められた。また少数の表層と中層の細胞にOCに対する免疫陽性 (赤矢頭) が観察された。OPとOCに対する二重免疫陽性の細胞 (黄二重矢頭) は表層を中心に少数が認められた (図7b)。このなかで照射1日目例においてはスフェロイドの表層に細胞の索状構造がみられるが, 上記と同様にOPとOCのいずれか一方,

もしくは双方に対する免疫陽性細胞がみられた。

2) 照射3日目

LIPUS照射3日目のスフェロイドにおいては, 非照射側の表層にOP免疫陽性細胞が, そして深層でOC免疫陽性細胞がそれぞれ少数観察された。また, この深層においてOPとOCに対する二重免疫陽性細胞がごく少数みられた (図7c)。

照射側の細胞では表層の最表層に多数のOP, OCに対する免疫陽性細胞が観察できたほか, 二重免疫陽性細胞も少数が最表層に観察された。さらに, 深層ではOPに対する免疫陽性細胞が細胞の索状構造に一致したほとんどすべての細胞に認められ, 深層のさらに深部にOCに対する免疫陽性細胞も多数が観察された。そして, 一部の細胞はOPとOCに対する二重免疫陽性を示した (図7d)。

3) 照射7日目

7日目にいたった非照射側では, 表層と中層のほぼすべて, そして深層で多数の細胞がOP免疫陽性細胞であった。また表層の最表層と深層には一部, OC免疫陽性細胞が認められた。表層と深層においてOPとOCに対する二重免疫陽性細胞が観察された (図7e)。

これに対して照射7日目の照射側ではスフェロイドの表層, 中層においてほぼすべて, 深層で多数の細胞がOP免疫陽性を示し, 深層には多数の大型の細胞がOCに対する免疫陽性を示した。OPとOCに対する二重免疫陽性細胞は表層と中層において散在性に, そして深層では多数の二重免疫陽性細胞がスフェロイドを構成する細胞の索状構造に対応して観察された (図7f)。

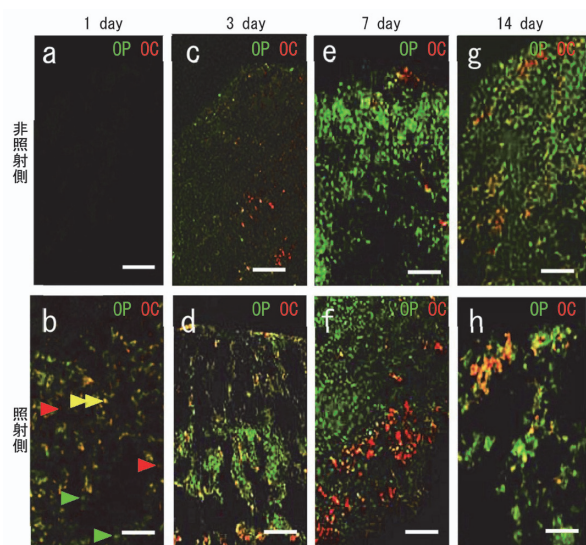


図7 OP, OC に対する免疫組織化学法を用いた蛍光標識写真 (OP: 緑, OC: 赤)。a, c, e, g: LIPUS 非照射側, b, d, f, h: LIPUS 照射側, 各写真は上方がスフェロイドの表層を, 下方が深層をそれぞれ示す。(a), (b): LIPUS 照射 1 日目の表層から深層, (c), (d) 照射 3 日目の表層と中層, (e), (f): 照射 7 日目の表層と中層, (g), (h): 照射 14 日目の表層と中層。緑矢頭: OP 免疫陽性細胞, 赤矢頭: OC 免疫陽性細胞, 二重黄矢頭: OP・OC 二重免疫陽性細胞。scale bar=30 μm 。

4) 照射 14 日目

LIPUS を照射して 14 日目のスフェロイドでは, 非照射側の細胞が表層, 中層, 深層を問わずすべてにおいて OP 免疫陽性を示した。また表層と深層における類骨様構造に対応して OC 免疫陽性細胞が多数, 観察された。OC と OP に対する二重免疫陽性細胞は表層, 中層, 深層の全層において, スフェロイドを構成する細胞の索状構造, ならびに類骨様構造に対応した部位に多数が観察された (図 7g)。

これに対して, 照射側の細胞は OC, OP に対する免疫陽性細胞の数が照射 7 日目例と比較して減少し, また OC と OP に対する二重免疫陽性細胞も類骨様構造に一致して少数が観察されるにとどまった (図 7h)。

考 察

近年, 歯周疾患の治療を目的として LIPUS を用いた研究が報告され, さらにスフェロイドの形態学的研究も同時に行われている^{42,43)}。組織工学的な手法としてスフェロイドは再生に際して必要な三要素, すなわち足場, 細胞, そして増殖因子^{45,46)}の3つを合わせ持つ材料として肝臓細胞の再生, および関節軟骨再生に用いられる⁴⁷⁻⁴⁹⁾。また, 骨膜においては骨芽細胞に分

化する骨原生細胞の存在が報告されている⁵⁰⁾。これらより, 小野らはヒト歯槽骨骨膜由来細胞 (HABPCs) を用いてスフェロイドという立体的な培養と平面培養を比較し, スフェロイドの培養形態の ALP, OC, 活性型ビタミン D 受容体が多く発現した事実より, スフェロイドが細胞の分化誘導に有用であることを報告した⁵¹⁾。田胡らはヒト歯槽骨骨膜由来細胞 (HABPCs) を用いたスフェロイドの研究において, 経時的な細胞小器官の変化と OP, OC の発現との関連性について報告した⁵²⁾。

トルイジンブルー染色による光学顕微鏡レベルの観察の結果, スフェロイド作製後の 1 日目では, いずれの照射例においても細胞の形態的差異は認められなかった。しかし LIPUS 照射後の経時変化による組織学的な対応な変化を観察するとスフェロイドの表層, 中層, および深層の全層にわたり, 細胞の形状が扁平形, 紡錘形, 桿状形より卵円形を経て多角形ないしは円形を呈する変化が観察された。これら細胞の変化は非照射側では 3~7 日目, 照射側の細胞では 1~3 日目に観察され, その際にスフェロイドの表層より深層へ部位が移動するにつれて細胞の形態が大型化することが認められた。本研究の細胞においてスフェロイドの各層における細胞の活性や分化に差異が生じたものと考えられる。そして, Oリングをスフェロイドの固定装置として利用して解析した本研究の非照射側の所見は, 無処置のスフェロイドを検索した田胡らの所見と差異は認められなかった⁵²⁾。一方, スフェロイド中の細胞の形態, 配列および分布密度により 3 層の構造に分類されたことは前研究と同様の所見であった⁵²⁾。この層構造はヒトの間葉系幹細胞を用いた細胞塊の研究において, その細胞塊を構成する細胞の分化とともに層構造の形成が確認される, との報告⁵³⁾があることから, 層構造が認められるスフェロイドにおいては細胞の分化が生じたと考えられる。また本研究では, スフェロイドの細胞構築学的な 3 層構造の形成がスフェロイドの照射側にて早期に観察され, 非照射側でもその後に 3 層の層形成が確認できたことより, スフェロイドの形成が細胞分化を生じさせたと考えられる。この所見は田胡らの所見と一致する⁵²⁾。また, 照射側より得た組織切片において 3 層構造が早期に観察された事実より, LIPUS の照射は細胞の分化を促進する働きがあるものと考えられる。

免疫組織化学的な実験の結果, OC 免疫陽性細胞の分布を OP 免疫陽性細胞の局在と比較した場合, OP の発現と OC のそれとの間に経時的な差異が認められ, OC の発現は OP の発現よりも晩期であった。OP および OC に対する二重標識を施した標本を観察する

と、OP免疫陽性細胞のみ観察され、引き続きOPおよびOCの双方に対する二重免疫陽性細胞が出現する時期があり、その後にOP免疫陽性細胞が減少してOC免疫陽性細胞のみが観察された。この実験結果は、骨の形成という細胞プロセスにおいて骨基質タンパク質のOPが形成された後に骨芽細胞が成熟することによりOCの産生が生ずる、というメカニズムを用いた研究報告と一致するものである⁵⁴⁻⁵⁶⁾。またOPおよびOCの発現が最初にスフェロイドの照射側に観察され、その後に非照射側にも認められることより、LIPUS照射によりスフェロイドの内部で細胞の分化が促進されたものと考えられる¹⁾。

スフェロイドの表層から深層にかけて索状構造は非照射側では観察されず、照射側のみ認められた。照射1日目のスフェロイドの照射側・表層において細胞の索状構造が観察され、またOPおよびOC免疫陽性細胞が認められたことは、非照射側と比較した場合に細胞の索状構造の出現時期がより早期であったことを裏付ける。特にLIPUSの照射3日目の照射側では、細胞が索状構造を呈しOPおよびOCに対する免疫陽性細胞が多数観察された。照射3日目の照射側における索状構造を構成する細胞と層構造を示す細胞を比較した場合、索状構造を示す細胞にはOPおよびOC免疫陽性細胞がより早期に観察された。このことは索状構造が細胞分化およびOC産生に影響を与えたと考えられる。また経時的な変化を観察すると、細胞の索状構造は照射1日目で最表層から最表層直下の範囲の中で観察されたのに対し、照射3日目、7日目と日数の経過とともに出現範囲がスフェロイドのより深層まで達したことが認められその後、索状構造は14日目で認められなくなった。索状構造の消失は、スフェロイド全域にて細胞の分化が始まり、索状構造を示す細胞群との差異がなくなってきたためと考えられる。しかし、LIPUS照射により生じる可能性がある磁界への影響および細胞接着力の変化により、スフェロイドを構成する細胞が配向、配置するという報告もあり^{57,58)}、より詳細な解析が、LIPUS照射が細胞に与える影響を示す指標の一つになるものと考えられる。

また、電子顕微鏡像で細胞内に観察された低電子密度、または高電子密度の顆粒はその発現時期や分布がOPとOCの免疫組織化学的な実験結果と類似していることから、これらの細胞内顆粒はOPやOCである可能性もあるが、このことを証明するためには免疫電顕法などによる解析が必要である。

以上の結果より、スフェロイドの経時的変化はLIPUS照射の影響を最も多く受ける照射側より初期に観察され、非照射側の変化は遅れた。すなわち、細

胞の分化はLIPUS照射によって促進されたと考えられる。また、細胞の形態変化およびOP、OCの発現がすべてのスフェロイドで深層から表層に向かって観察された事実は、細胞塊ではその中心部から細胞の分化が生じるという報告⁵³⁾や、低酸素環境下にて骨芽細胞が分化促進するという報告⁵⁹⁾と一致する。すなわち、HABPCsを用いて作製したスフェロイドでは、LIPUS照射は細胞の分化が生じる部位には影響しないものの、細胞の分化を促進すると考えられる。また、細胞の分化はLIPUSの刺激により影響されると推察される。以上より、同条件でLIPUSを照射した場合、スフェロイド内の細胞に分化を効率よく惹起するため条件、つまりLIPUSを照射したスフェロイド内で深層より細胞の分化が生じ表層に達すると考えられる。

本研究で示したように、スフェロイドとLIPUS照射との併用は、細胞の分化に対して促進的に働くことが示された。つまり、HABPCsスフェロイド培養系においてLIPUSは、既に報告されている通り^{43,44)}、細胞増殖には影響を及ぼさないが、骨芽細胞系細胞への分化を促進するという事を見出すことが出来た。しかしながら、経時的に起こる可能性のあるスフェロイド内の細胞壊死の制御、細胞分化を効率よく生じさせる距離やスフェロイド内に出現した索状構造の生物学的な意義については、さらに研究を進めていく必要がある。

本論文に関連し、開示すべきCOI状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

文 献

1. 川津布美, 東 一善, 根本賢治, 高橋 理, 出口眞二. 低出力超音波パルスを照射したヒト歯槽骨骨膜由来スフェロイドの組織学的変化. 日本歯周病学会誌 **55** (4): 312-325, 2013.
2. Prince CW, Oosawa T, Butler WT et al. Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J Bio Chem* **262**: 2900-2907, 1987.
3. Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8819-8823, 1986.
4. EM, Teti A, Grano M, Colucci S, Zamboni-Zallone A, Ross FP, Teitelbaum SL, Cheresch D, Hruska KA. (1991) Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *J Biol Chem* **266**: 20369-20374, 1991.

5. Denhartdt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* **7**: 1475-1482, 1993.
6. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* **130** (3): 456-469, 2007.
7. Min BH, Choi BH, Park SR. Low intensity ultrasound as a supporter of cartilage regeneration and its engineering. *Biotechnol and Bioprocess Eng* **12**: 22-31, 2007.
8. 前重伯社, 萩原信夫, 寺師浩人, 杉元雅晴. 超音波照射が褥瘡に対して与える影響. *褥瘡会誌* **10**: 507-512, 2008.
9. Soofia N, Noureddeen NA, Mohanmmad F. A clinical trial on the treatment of chronic rhinosinusitis with continuous ultrasound. *J Phys Ther Sci* **20**: 233-238, 2008.
10. Dalecki D. Mechanical bioeffects of ultrasound. *Annu Rev Biomed Eng* **6**: 229-248, 2004.
11. Speed CA. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. *Rheumatology* **40**: 1331-1336, 2001.
12. Doan N, Reher P, Meghji S, Harris M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts and monocytes. *J Oral Maxillofac Surg* **57**: 409-419, 1999.
13. Reher P, Doan N, Bradnock B, Meghji S, Harris M. Effect of ultrasound on the production of IL-8 basic FGF and VEGF. *Cytokine* **11**: 416-423, 1999.
14. Feril LB Jr, Kondo T. Biological effects of low intensity ultrasound: the mechanism involved, and its implications on therapy and on biosafety of ultrasound. *J Radiat Res* **45**: 479-489, 2004.
15. Walker NA, Denegar CR, Preische J. Low intensity pulsed ultrasound and pulsed electromagnetic field in the treatment of tibial fractures : a systematic review. *J Athl Train* **42**: 530-535, 2007.
16. Chang WH, Sun JS, Chang SP, Lin JC. Study of thermal effects of ultrasound stimulation on fracture healing. *Bioelectromagnetics* **23**: 256-263, 2002.
17. 神宮司誠也, 松下 隆. 骨折に対する低出力超音波パルス治療の基礎と臨床; メディカルレビュー社, 大阪, 26, 44, 2008.
18. Haar TG. Therapeutic ultrasound. *Eur J Ultrasound* **9**: 3-9, 1999.
19. Duarte LR. The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orth optrauma* **101**: 153-159, 1983.
20. Wang SJ, Lewallen DG, Bolander ME, Chao EY, Ilstrup DM, Greenleaf JF. Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* **12**: 40-47, 1994.
21. Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Kilcoyne RF. Acceleration of tibial fracture healing by noninvasive, low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg Am* **76**: 26-34, 1994.
22. Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Roe LR. Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. *J Bone Joint Surg Am* **79**: 961-973, 1997.
23. Erdogan O, Esen E, Ustun Y, Kurkcu M, Akova T, Gönluen G, Uysal H, Cevlik F. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on healing of mandibular fractures: an experimental study in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* **64**: 180-188, 2006.
24. 水野耕作, 山野慶樹, 糸満盛憲. 超音波骨折治療器の遷延癒合・偽関節に対する多施設臨床試験. *整形・災害外科* **46**: 757-765, 2003.
25. Nakanishi Y, Wang PL, Ochi M, Nakanishi K, Matsubara H. Low intensity pulsed ultrasound stimulation significantly enhances the promotion of bone formation around dental implants. *J Hard Tissue Biol* **20**: 139-146, 2011.
26. 米田征司, 高木宏太, 伊藤範明, 梶本忠保, 竹内 宏, 山本宏治. 低出力超音波パルス照射のインプラント体表面性状に対する効果. *岐歯学誌* **34**: 64-71, 2007.
27. 藤井秀朋. インプラントの治療期間短縮における超音波刺激療法の有用性. *日本口腔インプラント学会誌* **17**: 183-195, 2004.
28. Dimitriou R, Babis GC. Biomaterial osseointegration enhancement with biophysical stimulation. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **7**: 253-265, 2007.
29. 神宮司誠也. 低出力超音波パルス. *THE BONE* **18**: 713-717, 2004.
30. Tang CH, Lu DY, Tan TW, Fu WM, Yang RS. Ultrasound induces hypoxia-inducible factor-1 activation and inducible nitric-oxide synthase expression through the integrin/ integrin-linked kinase/ Akt/ mammalian target of rapamycin pathway in osteoblasts. *J Biol Chem* **282**: 25406-25415, 2007.
31. Kokubu T, Matsui N, Fujioka H, Tsunoda M, Mizuno K. Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E2 production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in mouse osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **256**: 284-287, 1999.
32. Ito M, Azuma Y, Ohta T, Komoriya K. Effects of ultrasound and 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on growth factor secretion in cocultures of osteoblasts and endothelial cells. *Ultrasound Med Biol* **26**: 161-166, 2000.
33. Warden SJ, Favalaro JM, Bennell KL, McMeeken JM, Ng KW, Zajac JD, Wark JD. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates a bone-forming response in UMR-106 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **286**: 443-450, 2001.

34. Sant'Anna EF, Leven RM, Viridi AS, Sumner DR. Effect of low intensity pulsed ultrasound and BMP-2 on rat bone marrow stromal cell gene expression. *J Orthop Res* **23**: 646-652, 2005.
35. Sena K, Leven RM, Mazhar K, Sumner DR, Viridi AS. Early gene response to low intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells. *Ultrasound Med Biol* **31**: 703-708, 2005.
36. Gleizal A, Li S, Pialat JB, Beziat JL. Transcriptional expression of calvarial bone after treatment with low intensity ultrasound : an in vitro study. *Ultrasound Med Biol* **32**: 1569-1574, 2006.
37. Takayama T, Suzuki N, Ikeda K, Shimada T, Suzuki A, Maeno M, Otsuka K, Ito K. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic differentiation in ROS 17/ 2.8 cells. *Life Sci* **80**: 965-971, 2006.
38. Arnaud Gleizal, Shuli Li, Jean-Baptiste Pialat, Jean-Luc Beziat. Transcriptional expression of calvarial bone after treatment with low intensity ultrasound : An in vitro study. *Ultrasound in Medicine & Biology* **32**: 1569-1574, 2006.
39. Naruse K, Mikuni-Takagaki Y, Azuma Y, Ito M, Oota T, Kameyama K, Itoman M. Anabolic response of mouse bone-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound. *Biochem Biophys Res Commun* **268** : 216-220, 2000.
40. 森下恭資, 山本謙吾, 正岡利紀. 骨芽細胞様細胞株に対する低出力超音波刺激の影響. *東京医科大学雑誌* **61** : 192-203, 2003.
41. Inubushi T, Tanaka E, Rego EB, Kitagawa M, Kawazoe A, Ohta A, Okada H, Koolstra JH, Miyachi M, Takata T, Tanne K. Effects of ultrasound on the proliferation and differentiation of cementoblast lineage cells. *J Periodontol* **79**: 1984-1990, 2008.
42. Ikai H, Tamura T, Watanabe T, Itou M, Sugaya A, Iwabuchi S, Mikuni-Takagaki Y, Deguchi S. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates periodontal wound healing after flap surgery. *J Periodontal Res* **43**: 212-216, 2008.
43. 眞野壮一郎, 宗正憲和, 岩崎和人, 高橋弘行, 田胡和浩, 川瀬俊夫, 出口眞二. LIPUS照射による歯周組織由来細胞および間葉系幹細胞の増殖と分化への影響. *神奈川歯学* **46** : 37-45, 2011.
44. 宗正憲和, 田胡和浩, 光家由紀子, 岩崎和人, 高橋弘行, 川津布美, 東一善, 辻上弘, 菅谷彰, 高橋理, 出口眞二. LIPUS照射によるスフェロイドの形態学的検索 (会議録). *秋季特別* **53** : 118, 2011.
45. Yamauchi N, Yamada O, Takahashi T, Hashizume K. Spheroid formation of bovine endometrial stromal cells with non-adherent culture plate. *J Reprod Dev* **47**: 165-171, 2001.
46. Langer R, Vaccanti JP. Tissue engineering. *Science* **260**: 920-926, 1993.
47. Koide N, Sakaguchi K, Koide Y, Asano K, Kawaguchi M, Matsushima H, Takenami T, Shinji T, Mori M, Tsuji T. Formation of multicellular spheroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and under other non-adherent environments. *Expl Cell Res* **186**: 227-235, 1990.
48. Jian ZT, Olivier B, Fernando A. Longterm culture of rat liver cell spheroids in hormonally defined media. *Exp Cell Res* **189**: 87-92, 1990.
49. 李禎翼, 佐藤正人, 三谷玄弥, 持田讓治. 関節軟骨修復・再生を目指した軟骨滑膜混合細胞体の開発. *東日本震災会誌* **22** : 207-213, 2010.
50. 藤田尚男, 藤田恒夫. *標準組織学総論*; 第4版, 医学書院, 東京, 198, 2002.
51. 小野智嗣, 宗正憲和, 辻上弘, 岩崎和人, 高橋弘行, 川津布美, 北村綾乃, 根本賢治, 田胡和浩, 菅谷彰, 出口眞二. 三次元培養環境はヒト歯槽骨骨膜由来細胞 (HABPCs) の骨芽細胞系への分化を誘導した (会議録). *秋季特別* **54** : 85, 2012.
52. 田胡和浩, 光家由紀子, 東一善, 宗正憲和, 根本賢治, 辻上弘, 菅谷彰, 高橋理, 出口眞二. ヒト歯槽骨骨膜由来細胞凝集塊 (スフェロイド) の微細構造学的形態の経時的変化. *日歯周誌* **54** : 155-166, 2012.
53. 市野瀬志津子, 田上幹樹, 宗田大, 関矢一郎. ヒト間葉幹細胞を用いた軟骨組織の再生. *細胞* **39** : 311-315, 2007.
54. Lekic P, Sodek J, McCulloch CAG. Relationship of cellular proliferation to expression of osteopontin and bone sialoprotein in regenerating rat periodontium. *Cell Tissue Res* **285**: 491-500, 1996.
55. William TB, Helena R. The Nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol* **39**: 169-179, 1995.
56. Liu F, Malaval L, Gupta AK, Aubin JE. Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation : Polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. *Dev Biol* **166**: 220-234, 1994.
57. Koibuchi N, Tochinai S. Existence of gradient in cell adhesiveness along the developing *Xenopus* hind limb bud, shown by a cellular sorting-out experiment in vitro. *Dev Growth Differ* **40**: 355-362, 1998.
58. Eguchi Y, Ogiue-Ikeda M, Ueno S. Control of orientation of rat Schwann cells using an 8-T static magnetic field. *Neurosci Lett* **351**: 130-132, 2003.
59. Hirao M, Hashimoto J, Yamasaki N, Ando W, Tsuboi H, Myoui A, Yoshikawa H. Oxygen tension is an important mediator of the transformation of osteoblasts to osteocytes. *J Bone Miner Metab* **25**: 266-276, 2007.