

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

山原 章司

論文題目

ヒト I 型コラーゲン様リコンビナントペプチドで  
作製した連通孔を有する顆粒の骨形成に適した気孔  
径の検討

## I. 緒言

口唇口蓋裂修復の困難な手術の一つが顎裂の再建手術である。顎裂部の再建手術により上顎骨の連続性が回復し、歯の萌出が誘導されて、良好な矯正治療の結果を得ることができる。近年では、自家骨移植の代わりとなる新たな骨補填材料の開発が必要であり、矯正歯科においても外傷や先天性欠損歯部の骨量が少なく、歯の移動のための新生骨形成が長年にわたり望まれてきた。

そこで我々は新たな骨補填材料として、ヒト I 型コラーゲン様リコンビナントペプチド (以下 RCP) を研究してきた。これまでに、ラット頭蓋冠に RCP 顆粒を用いた研究では、自家骨移植と比較して、骨形成量は同等であることが確認された。さらに、低度・中等度・高度架橋度をもつ 3 種類の密度の RCP 顆粒で骨形成能を比較した結果、中程度の架橋度の RCP 顆粒 (以下 mRCP) が最も適切な架橋度であることが確認された。そこで本研究では、連通孔の気孔径が異なる 2 つの範囲 (100~300  $\mu$ m, 200~500  $\mu$ m) の mRCP を開発し、この 2 種類の mRCP をラット頭蓋冠欠損部に移植して、連結した気孔径が骨再生に及ぼす影響を比較した。

## II. 材料及び方法

### II-1. 使用動物

本研究は、体重 290~350 g の 9 週齢、雄性 SD ラット 15 匹を使用した。

すべてのラットは、愛知学院大学動物研究センターにて、標準化された温度と湿度の下で、12時間の昼/夜サイクルで飼育された。本研究は、愛知学院大学歯学部動物研究委員会（承認番号 AGUD412）によって承認された。

## II-2. 連通孔を有する異なる気孔径の mRCP 顆粒の作製

RCP 溶液を凍結乾燥した後、多孔性スポンジブロックを顆粒に粉碎し、熱依存性脱水縮合反応を 4.75 時間行うことにより架橋させ、1 つの mRCP の大きさは同じ大きさになるよう調製され、攪拌条件を変えることにより、気孔径の異なる 2 種類の mRCP 顆粒を準備した。Small-mRCP (以下 S-mRCP) および Large-mRCP (以下 L-mRCP) の気孔径はそれぞれ約 100~300  $\mu\text{m}$ 、約 200~500  $\mu\text{m}$  で調製された。

## II-3. 動物実験モデル

ラットを無作為に L-mRCP 移植群 (n=6)、S-mRCP 移植群 (n=6)、頭蓋冠欠損のみ (n=3) に分けた。手術は、吸入麻酔を使用し、全身麻酔下で行った。頭部を消毒し、表皮及び骨膜に切開を行い、骨膜を挙上し頭蓋冠を明示した。矢状縫合を避けて左側頭蓋冠に直径 5.0mm のトレフィンバーを用いて、外径 5 mm の骨欠損を形成し、移植部とした。続いて、欠損部に 3 mg の L-mRCP または S-mRCP 顆粒を移植する群と、mRCP 顆粒を移植しない群の 3 群に分けた。手術後は、剥離した骨膜を戻し、絹縫合糸 4-0 号を使用し

て縫合した。

#### II-4. 放射線学的評価および解析

マイクロ CT にてラット頭蓋冠の撮影を移植直後と移植後 1、2、3、4 週間で行った。頭蓋冠欠損部に新生された骨の骨体積と、新生された骨と隣接する母床骨の骨密度 (BMD) を、骨量測定ソフトウェア 3 x 4 ビューア 2019 で測定した。測定時の ROI サイズは 2.5mm (半径) × 2.5mm (半径) × 3.14 × 0.8mm (深さ) を用いた。個々のラットの新生骨体積量の増加は、移植直後に測定された ROI における骨体積量の値を、移植後 1、2、3、および 4 週で測定された新生骨体積量の値から差し引くことによって算出した。また、S-mRCP 移植群と L-mRCP 移植群において、移植後 4 週間での新生骨の BMD を測定し、隣接する母床骨の BMD と比較した。BMD 値は、ハイドロキシアパタイトファントムを測定し、得られた骨塩量の検量線を基準に測定を行った。

#### II-5. 組織学的評価

ラットは移植後 4 週間で CO<sub>2</sub> を用い安楽死させ、組織切片 (厚さ 5 μm) を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、骨形成および再建された領域の新生骨量について組織学的観察により評価した。組織切片の移植領域内の骨芽細胞および破骨細胞は、それぞれアルカリホスファター

ゼ (ALP) および酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色によって評価し、破骨細胞は、抗カテプシン K ウサギポリクローナル抗体を使用して免疫組織化学的染色によって評価した。

## II-6. 組織形態学的評価および解析

S-mRCP 移植群と L-mRCP 移植群の移植後 4 週間の HE 染色標本を用いて、移植部を低倍率 (4 倍) で撮影し、ImageJ software を用いて、作製された骨欠損領域 (5.0mm×0.8mm) 内に新生された骨体積量を測定した。また、各 mRCP 移植群での新生骨は、周辺部 (1.25mm×0.8mm) の両側 (1.25mm×0.8mm×2) と中央部 (2.5mm×0.8mm)、および下部 (硬膜側、5.0mm×0.4mm) と上部 (骨膜側、5.0mm×0.4mm) の欠損幅の新生骨の面積を測定した。さらに、移植後 4 週間での HE 染色像を用いて、ImageJ software を使用し、mRCP 残存量を測定した。

## II-7. 統計分析

データは各グループの平均値と標準偏差 (SD) で表した。統計分析には GraphPad Prism7®を用いて行った。各グループ間の比較は、Tukey-Kramer post-hoc test にて統計分析を行い、 $p < 0.05$  を統計学的に有意差があると判断した。

### III. 結果

#### III-1. 術後経過

創傷裂開または重度の炎症などの術後合併症は、すべてのラットで観察されなかった。さらに、ラットは実験期間を通して体重減少を認めず、術後経過は良好であった。

#### III-2. 放射線学的解析結果

冠状面のマイクロ CT 画像を用いて、S-mRCP 移植群と L-mRCP 移植群の移植後 1、2、3 および 4 週間での移植部位の骨形成量を測定した結果、mRCP 移植群は、両群とも手術後 1 週間より骨欠損部辺縁にわずかに不透過像の形成を認め、手術後 4 週間では、連続性の不透過像が移植部位のほぼ全領域を満たすことが観察された。これに対し、対照群では、欠損部に不透過像はほとんど観察されなかった。

また、S-mRCP 移植群と L-mRCP 移植群の骨形成量を比較した結果、両群に有意差は認められなかったが、1 週間の間隔で、S-mRCP 移植群と L-mRCP 移植群で得られた骨形成量を比較した結果、移植後 3 週目から 4 週目の間で S-mRCP が有意に大きい値を認めた。一方、BMD は、S-mRCP 移植群と L-mRCP 移植群、隣接する母床骨の間で有意差を認めなかった。

#### III-3. 組織学的および組織形態学的解析結果

S-mRCP 移植群、L-mRCP 移植群ともに、HE、ALP、TRAP およびカテプシン K 染色による組織学的および免疫組織化学的分析を行った。両群とも、ALP 陽性細胞は多角形の形態を示し、新たに形成された骨に隣接する部位に観察された。さらに、TRAP 陽性細胞およびカテプシン K 陽性細胞は、HE 染色で観察された骨吸収腔の近傍に存在することがわかった。一方、紫色に染まった構造物を HE 染色で観察すると、残存する S-mRCP の総量は、残存する L-mRCP よりも有意に多いことが確認された。加えて、欠損部の中央部、周辺部、骨膜側と硬膜側の骨形成量を比較すると、いずれの部位も S-mRCP 移植群で新生骨量が有意に多かった。

#### IV. 考察

骨補填材料における気孔径の研究では、細胞が侵入しやすい気孔径は 100～400  $\mu\text{m}$  であることが示されている。さらに 100～200  $\mu\text{m}$  の気孔径の範囲が骨芽細胞の分化に適し、290～310  $\mu\text{m}$  の気孔径で最も速い骨形成を示すことが報告されている。一方で、気孔径を 350～800  $\mu\text{m}$  にすると、骨形成に関係しないことも報告されている。

組織学的解析においては、移植後 4 週間で L-mRCP 移植群の骨形成量は S-mRCP 移植群に比べて劣っていた。このことは、気孔径が大きすぎると骨芽細胞などが接着可能な mRCP 粒子の表面積が少ないことや mRCP 粒子の機械的安定性が低下する結果、細胞増殖に必要な細胞間接触が不十分となり、

骨形成が抑制されたと考えている。さらに、S-mRCP の残存量は有意に多いことから、気孔径が大きいほど吸収率が高くなり、吸収率が骨形成に影響することが示唆され、骨欠損部に長く留まることで細胞を長時間維持し、骨形成を促進している。今回の結果は、S-mRCP の吸収率が頭蓋冠の骨再生に適していることを示唆した。一方、新生骨が形成されても、骨補填材料が長期にわたり残存すると、矯正歯科治療における歯の移動の障害になると予想され、新生骨形成と同時期もしくは可能な限り早期に吸収され、新生骨と置換される骨補填材料が必要と考えられる。

本研究の一連の放射線学および組織学的解析結果から、 $100\sim 300\ \mu\text{m}$  の範囲の気孔径で、より適切な吸収率が得られたため、頭蓋冠の骨再生において、適した気孔径であることを示した。本研究の意義として、特に矯正歯科臨床においては口蓋裂部、また外傷によって骨が欠損した部分に歯を正常に動かすことが困難であるため、本研究によって骨欠損部に新生骨が形成・補填され、その部分に歯を移動させることが可能となり、矯正歯科治療の臨床に大きく貢献すると考えられる。

## V. 結論

連通孔の気孔径が異なる2つの範囲のmRCP顆粒を頭蓋冠欠損部に移植した結果、 $100\sim 300\ \mu\text{m}$  の範囲の気孔径が、骨欠損部における骨形成過程を阻害することなく骨形成を促進し、さらに適切な吸収率を得ることができた。



(論文内容の要旨)

No. 8

愛知学院大学

以上のことから、骨補填材料である mRCP 顆粒は、 $100\sim 300\mu\text{m}$  の範囲の気孔径が、骨再生に適していることが示唆された。