

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	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。この顎裂は、内側鼻突起と上顎の癒合不全によって生じる。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。顎裂部の再建手術では、腸骨や脛骨から採取した海綿骨を移植する自家骨移植術が一般的な治療法として行われている。しかし、この方法には採取に伴う慢性的な痛み、感染、瘢痕形成、血腫、神経損傷などの合併症が起きることがある。そこで、近年では、自家骨移植の代わりとなる様々な種類の骨補填材料が開発されている。しかし、骨補填材料は、顎裂部の再建における自家骨移植と比較して優位性が示されていない。したがって、顎裂部の再建手術で良好な治療の結果を得るためには、新たな骨補填材料の開発が必要である。また、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。

理想的な骨補填材料は、生体適合性、骨誘導性、骨伝導性、制御された生体分解性、目的の部位に細胞を誘導する能力、幹細胞の分化を補助する能力、および欠損部への新生骨の成長を促進する能力などの特性が必要である。また、多孔質の骨補填材料は、欠損部位に細胞を保持できるだけでなく、組織の成長と血管新生の基質として機能する。

富士フイルム株式会社（東京都、日本）は、ヒト I 型コラーゲンの  $\alpha-1$  配

列 ( $\alpha 1$  鎖) をベースに、1 分子内に 12 個の RGD 配列を持ち、RGD ペプチドの繰り返し配列を持つ新規の生体吸収性組み換えタンパク質 (RCP) を Cellnest®として医療用途に開発した。酵母 *Pichia pastoris* によって生産された RCP は、従来の動物性コラーゲンとは異なり牛海綿状脳症などの感染症の危険性がない。また、RCP は分解酵素が作用しやすい構造を有していることから、生体分解性が高いため、体内に残らない。さらに、RGD 配列のアミノ酸を多く含んでいるため、細胞増殖を促す受容体であるインテグリンとの接着性に優れ、高い細胞接着能をもつ。

これまでに、RCP が顎裂部の修復に有効な骨補填材料であることを検討するために一連の実験を行ってきた。初めに、ラット下顎骨下縁に人工的に作成した 3cm×4cm の臨界サイズの骨欠損に RCP ブロック (富士フィルム株式会社) を移植すると、移植後 4 週間で RCP ブロック内に新生骨の形成が観察されることを実証した。この結果は、RCP ブロックが骨欠損の修復に有用であることを示している。しかし、RCP ブロックでは、賦形性に乏しいためにヒトの顎裂の複雑な形態に適合されることが困難となる。そこで、顎裂部の様々な形態に適用できる顆粒状の RCP を作製した。ラット頭蓋冠に RCP 顆粒を用いた過去の研究では、自家骨移植と比較して、RCP 移植群と自家骨移植群の骨形成量は同等であることが示唆されている。

コラーゲンを基にした材料は、架橋の程度が細胞の活性に影響を与えるため、その活性を制御するために適切な架橋密度が必要である。さらに、架

橋度を調節することで吸収に伴う材料の機械的特性を向上させることも可能となる。しかし、RCP 顆粒の顎裂部の骨再生における最適な架橋度については、これまでに報告されていない。そこで RCP 顆粒の最適な架橋度を決定するために、口蓋裂動物実験モデルを用いた過去の研究では、気孔径と空隙率が類似した低度・中等度・高度架橋度をもつ 3 種類の密度の RCP 顆粒を作製した。ラットの口蓋裂は、口腔内の上顎の中央部に存在し、左右の口蓋裂は鼻中隔で隔てられており、ヒトの顎裂に似た先天性の骨欠損である。3 種類の RCP 顆粒をラット口蓋裂に移植したところ、マイクロ CT 解析および組織学的解析の結果、中程度の架橋度の RCP 顆粒 (mRCP) は、低・高架橋度の RCP 顆粒に比べて、骨組織の形成に適した環境を作ることが明らかとなった。これらの結果は、mRCP 顆粒が顎裂部の再建における新しい骨再生療法の骨代替材料となる可能性が示唆された。

また、興味深いことに、RCP 顆粒を用いた研究により、頭蓋冠欠損モデルと口蓋裂モデルの間で骨再生能に大きな差があることも明らかになった。これは、自己修復能力を持たない先天性欠損とは対照的に、欠損部の骨には再生能力が備わっているため、頭蓋冠欠損モデルは、研究者が欠損部の大きさをコントロールすることによって、再現性のある結果と移植材料の正確な比較を可能にする有効なモデルとして確立されている。

一方、骨補填材料の開発においては、前述のように、気孔径の検討が不可欠である。また、相互に連結した気孔径をもつ骨補填材料では、気孔径内

への細胞の円滑な供給、代謝分子の交換・除去、栄養分の拡散に影響を与えることが報告されている。さらに、連通孔の気孔径は、細胞の侵入と移動を容易にし、細胞の集合や分化を誘導する三次元的な微小環境を供給することができる範囲であることが望ましいと言われている。したがって、理想的な多孔質骨補填材料を作るためには、相互に連結した気孔径の構造を調節することが重要である。しかし、これまでの研究では、連結した気孔径を持つ mRCP についての検討は行われていない。そこで本研究では、連通孔の気孔径が異なる 2 つの範囲 ( $100\sim 300\ \mu\text{m}$  および  $200\sim 500\ \mu\text{m}$ ) の mRCP を開発し、この 2 種類の mRCP を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  $290\sim 350\ \text{g}$  の 9 週齢、雄性 SD ラット (Japan SLC, Inc. Nagoya) 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。動物の飼育および実験手順は、愛知学院大学歯学部動物実験規程に基づいて行われた。

## II-2. 連通孔を有する異なる気孔径の mRCP 顆粒の作製

mRCP は、過去の一連の研究と同様に以下のように作製された。10wt%に調製した RCP 溶液を、9°Cに冷却したポット内でディゾルバーを用いて攪拌し、溶液中に気泡を発生させながらゲル化させ、気泡を含んだゲルの凍結乾燥により形成された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れた。また、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 (S-mRCP) の場合は、40mm の攪拌翼を用いて 2100rpm で攪拌し、Large-mRCP (L-mRCP) の場合は、40mm の攪拌翼を用いて 1400rpm で攪拌することにより、S-mRCP および 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。また、mRCP 顆粒の直径や気孔径を ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を使用し、測定を行うために、真空蒸発器を (JEE-420T; JEOL, Tokyo, Japan) を用いて約 30nm の炭素層を 2 種類の mRCP 顆粒に噴霧した。mRCP 顆粒は、電界放出形電子線マイクロアナライザー (FE-EPMA)、(JXA-8530FA, JEOL) で撮影した。L-mRCP 顆粒の平均直径は約 1171  $\mu\text{m}$  で、1104~1265  $\mu\text{m}$  の範囲であった。また、S-mRCP 顆粒の平均直径は約 1169  $\mu\text{m}$  で、1015~1284  $\mu\text{m}$  の範囲であり、L-mRCP 顆粒と S-mRCP 顆粒の大きさに差は認めなかった。

### 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、30%酸素及び70%亜酸化窒素中の3.0%イソフルラン (Mylan, Canonsburg, Pennsylvania, USA) を用いた吸入麻酔を使用し、全身麻酔下で行った。頭部をポビドンヨード消毒し、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。直径 5.0mm のトレフインバー (Meisinger, Neuss, Germany) を用いて、約 1,500rpm/min 以下で生理食塩水による洗浄を行いながら、上矢状静脈洞と硬膜を損傷させることなく、矢状縫合を避けるように左側頭蓋冠に外径 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に次のように 3 群に分けた。(1) L-mRCP 移植群 (n = 6)。(2) S-mRCP 移植群 (n = 6) (3) 対照群 (欠損部に mRCP は移植なし) (n = 3)。次に、剥離した骨膜を戻し、絹縫合糸 4-0 号 (Ethicon Inc., GA, USA) 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 (Cosmo Scan GX; Rigaku Corporation, Tokyo) にてラット頭蓋冠の撮影を従来の通りに行った。撮影は、18sec、90kv、100  $\mu$  A、ボクセルサイズは 45  $\mu$  m の条件下で行い、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 (Kitasenjyu Radist Dental Clinic i-View Image Center, Tokyo) 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、移植後 2 週から 1 週、3 週から 2 週、および 4 週から 3 週の間の新生骨体積量を、3 x 4 ビューア 2019 で測定した。

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 (No. 0802-08、RATOC、Tokyo) を骨量測定ソフトウェア 3 x 4 ビューア 2019 で測定し、得られた骨塩量の検量線を基準に測定を行った。

さらに、3D 再構築したマイクロ CT 画像から得た軸方向ボリュームレンダリング画像を使用して、頭蓋冠欠損内の新生骨量の割合を算出した。(骨形成面積 / ROI 面積) × 100。

## 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、組織学的評価を行った。頭

蓋骨標本を 4%中性緩衝パラホルムアルデヒドで 24 時間固定し、10%エチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム溶液 (Muto Pure Chemicals, Tokyo) を用いて 8 週間脱灰した。次いで、エタノールにて脱水し、パラフィンに包埋した。標本はミクロトーム (Leica RM2165, Nussloch, Germany) を用い、水平断 (厚さ  $5\mu\text{m}$ ) にて組織切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。光学顕微鏡を使用して、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た (Septsapie, Tokyo, Japan)。さらに、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、過去の研究同様に、作製された骨欠損領域 ( $5.0\text{mm}\times 0.8\text{mm}$ ) 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 ( $1.25\text{mm}\times 0.8\text{mm}$ ) の両側 ( $1.25\text{mm}\times 0.8\text{mm}\times 2$ ) および中央部 ( $2.5\text{mm}\times 0.8\text{mm}$ ) の欠損幅の新生骨の面積と、下部 (硬膜側、 $5.0\text{mm}\times 0.4\text{mm}$ ) と上部 (骨膜側、 $5.0\text{mm}\times 0.4\text{mm}$ )

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 mRCP の残存量を評価するために、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<sup>®</sup> (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) 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

始めに、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、形成程度を解析した。mRCP 移植群は、両者とも手術後 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た。骨欠損部の不透過像は週が経つにつれ、徐々に増加した。手術後 4 週間では、連続性かつ高密度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。移植後 4 週間では、欠損部において S-mRCP 移植群の方が L-mRCP 移植群よりも不透過性が高い傾向がみられた。これに対し、対照群では、移植後 4 週間において、欠損部に不透過像はほとんど観察されなかった。

次に、3 x 4 ビューア 2019 を使用し、骨欠損部位における骨形成量を測定した。しかしながら、移植後 1、2、3、4 週間において、S-mRCP 移植群と L-mRCP 移植群の間で骨形成量に有意差は認められなかったが、対照群と S-mRCP 移植群では、移植後 4 週間において骨形成量は S-mRCP が有意に大きい値を認めた。

さらに、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。移植後 1 週目から 2 週目まで、または 2 週目から 3 週目までに得られた骨形成量を比較したところ、有意差は認めなかった。しかし、移植後 3 週目から 4 週目の間に、S-mRCP 移植群と L-mRCP 移植群の骨形成量において S-mRCP が有意に大きい値を認めた。

BMD は、移植後 4 週間に新たに形成された骨と隣接する母床骨の最も高い放射線不透過像をポイントとして測定された。S-mRCP 移植群と L-mRCP 移植群、隣接する母床骨の間で BMD に有意差を認めなかった。

さらに、直径 5mm、高さ 0.8mm の骨欠損内に新たに形成された骨形成量の割

合を評価するために、3D再構築したマイクロCT画像を用いて軸面方向から移植部位の観察を行った。対照群では、術後4週間でも、冠状面の画像と一致して、骨欠損領域の辺縁に少量の新生骨が観察されたが、ほとんど新生骨は認められなかった。また、S-mRCP移植群とL-mRCP移植群では、移植後1、2、3、4週間と徐々に新生骨の形成が認められ、冠状画像と一致した結果であった。加えて、移植後4週間で、S-mRCP移植群の方がL-mRCP移植群よりも骨欠損部の新生骨量が大きくなる傾向が認められた。さらに移植部位内の骨量の割合を計算すると、S-mRCP移植群はL-mRCP移植群と比較して高い割合を示した。

### 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、マイクロCT画像で骨欠損部に新生骨の形成が認められたため、HE染色による組織学的解析で比較検討を行った。HE画像の骨欠損部全体を低倍率で観察すると、移植部位と隣接する母床骨との境界が容易に判別できた。

mRCP顆粒周囲に形成された細胞・血管化した肉芽組織は、L-mRCPおよびS-mRCP移植群の新生骨において、血管の存在と多核巨細胞に富んでいた。

また、両群の欠損部の周辺部、および中央部のごく限られた領域で、骨の再生が観察された。

これまでの研究では、mRCPを移植した標本では、欠損部のピンク色に染まった構造が新生骨を示し、紫色に染まった構造が移植されたmRCPを示すこ

とが明らかとなっている。さらに、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い、ピンク色に染まった組織が骨であることを確認した。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。次に、両群ともピンク色に染色された組織に、ハウシップ窩に似た骨吸収腔が観察された。破骨細胞の有無を確認するために、TRAP/カテプシン K 染色を行った。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。さらに、TRAP 陽性細胞とカテプシン K 陽性細胞がほぼ同じ部位に観察された。一方、紫色に染まった構造物を HE 染色で観察すると、移植した S-mRCP 移植群の方が紫色に染まった領域が多いという明らかな傾向を認めた。この傾向は、骨欠損部における紫色に染色された領域の総量を ImageJ software で測定したところ、移植後 4 週間で残存する 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。

次に、ピンク色に染色された新生骨量を ImageJ software を用いて骨欠損部の総面積に対する割合を測定したところ、S-mRCP 移植群は L-mRCP 移植群に比べて新生骨量が有意に多かった。

これまで、ラット頭蓋冠欠損部に連通路のない mRCP を移植した *in vivo* 実験により骨形成過程を評価する際には、周辺部の 2 辺（右、左）で形成された新生骨量を中央部で形成された新生骨量と比較するとともに、骨膜側

(上部)と硬膜側(下部)で形成された新生骨量の比較を行ってきた<sup>27,39)</sup>。本研究でも同様に、上記のように新生骨量を測定することで、新生骨形成の過程を評価することとした。S-mRCP移植群とL-mRCP移植群の新生骨量は、母床骨に隣接する周辺部が中央部よりも有意に多く、また、硬膜側(下部)が骨膜側(上部)よりも有意に多い値を示した。さらに、欠損部の中央部、周辺部(左右)、骨膜側(上部)と硬膜側(下部)の骨形成量を比較すると、いずれの部位もS-mRCP移植群の方がL-mRCP移植群よりも新生骨量が有意に多かった。

#### IV. 考察

骨芽細胞や破骨細胞の直径は、それぞれ $10\sim 30\mu\text{m}$ 、 $100\sim 300\mu\text{m}$ の範囲であることから、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 $100\sim 400\mu\text{m}$ であることが示されている。さらに、気孔径は、長骨の再生において、骨補填材料が細胞の生存と増殖に必要な栄養と酸素を供給するために少なくとも $100\mu\text{m}$ の気孔径を必要とし、骨組織の成長には $200\sim 350\mu\text{m}$ の気孔径が最適であることが実験的に証明されている。Wangらは、ラット頭蓋冠欠損モデルにおける石灰化コラーゲン/ポリ- $\epsilon$ -カプロラクトン(PCL)を骨再生の足場とした時の最適な気孔径は $130\mu\text{m}$ であると報告し、さらに $100\sim 200\mu\text{m}$ の気孔径の範囲が骨芽細胞の分化に適し、 $290\sim 310\mu\text{m}$ 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 $350\sim 800\mu\text{m}$ にすると、骨形成に関係しないことも報告され

ている。これらの報告より、骨補填材料として適切な気孔径は材料によっても異なり、一定の結果を得られていない。そこで本研究では、mRCP の骨再生における適切な気孔径を決定するために、連通孔を有する気孔径の異なる 2 種類の mRCP (S-mRCP : 100~300  $\mu$ m と L-mRCP : 200~500  $\mu$ m) を作製し、ラット頭蓋冠欠損部に移植した。

これまでの過去の一連の研究では、mRCP の骨再生の評価部位として、ラットの頭蓋冠とラットの口蓋裂を使用してきた。本研究では、これまでの研究データから、頭蓋骨を移植部位として選択した。その理由として、頭蓋骨は、口蓋裂周囲の骨と比較して、骨欠損部位の修復期間が 4 週間と短期間であり、移植後 4 週間で、mRCP 移植群と自家骨移植群の間で新生骨量と BMD に有意差を認めなかったことより、骨再生能力が高いことが示唆されている。したがって、短期間で骨補填材料の骨形成能力が評価できること、また、ヒトにおいても頭蓋骨切除の際の骨補填材料として応用できる可能性を有することから、新規の骨補填材料の開発に有利と考えてこの実験では、頭蓋骨を mRCP の移植部位とした。

本研究の放射線学的解析の結果から、気孔径の違いによる新しく形成された骨の骨密度に有意差を認めなかったが、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形成量が低下することを示唆している。以上のことから、本研究で用いた S-mRCP の気孔径範囲は、L-mRCP の気

孔径範囲よりも頭蓋骨欠損部の骨形成に有利な条件であった。これは、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していることなどが考えられる。そして、その結果、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。したがって、骨補填材料としての mRCP を開発するには、連通孔の気孔径の大きさを慎重に検討する必要があることが示唆された。

組織学的解析において、S-mRCP 移植群と L-mRCP 移植群の新生骨量を比較すると欠損部の母床骨に隣接する周辺部に形成された骨量は、中央部よりも有意に多く、また、硬膜側（下部）に形成された骨量は、骨膜側（上部）よりも有意に多い値を示した。また、連通孔を備えていない mRCP を移植した以前の研究においても、欠損部の骨形成量は中央部に比べ周辺部で有意に多く、骨膜側に比べ硬膜側で有意に多いことが示されており、本研究の結果と一致していた。これは、mRCP 粒子を欠損部に移植すると、骨膜（上部）、板間層（周辺部）、硬膜（下部）の3種類の面に接触することになるが、骨膜（上部）からの血液供給は比較的乏しく、幹細胞の供給も少ない。一方で、海綿骨である板間層（周辺部）は、栄養と幹細胞の供給が豊富であり、硬膜（下部）は骨形成成長因子（TGF- $\beta$ 1、オステオカルシン、I型コラーゲン）の分泌に関与し、頭蓋冠の膜内骨化において重要な役割を果たしている。以上のことから、連通孔を備えた mRCP は、連通孔を備えてい

ない mRCP と比べても頭蓋骨の骨欠損部における骨形成過程は阻害されず、正常な骨形成を認めることが示唆された。さらに、各部位（周辺部・中央部・下部・上部）における S-mRCP と L-mRCP の骨形成量を比較すると、S-mRCP を移植した欠損部は、すべての部位で L-mRCP よりも有意に多い骨形成量を示した。このことより、S-mRCP は、各部位（周辺部・中央部・下部・上部）においても骨形成過程を阻害することなく、骨形成を促進することが示唆された。

さらに、S-mRCP と L-mRCP の骨形成量の差について考察を加えると、移植後 4 週間における組織形態学的解析において、ImageJ software で mRCP の残存量を測定してみると、S-mRCP の残存量は L-mRCP よりも有意に多いことである。このことから、mRCP 顆粒の気孔径が大きいほど吸収率が高くなり、S-mRCP と L-mRCP の吸収率が骨形成に影響することが示唆された。この結果は、移植後 3 週から 4 週の間形成された骨量は、S-mRCP 移植群の方が L-mRCP 移植群よりも有意に多い放射線学的解析結果とも一致し、mRCP が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と考えた。一般に、足場材料の吸収率は、組織形成と相関関係があることが知られている。つまり、吸収率が高すぎても低すぎても、細胞の増殖や分化が阻害されるため、組織形成を抑制することになる。したがって、組織再生における足場材料の最適な吸収率を検討することは、重要であり、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

ている。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。よって、機械的強度と共に、吸収置換率についても、今後の研究で検討する必要がある。

次に、移植後 4 週での S-mRCP 移植群と L-mRCP 移植群の新生骨の骨密度を測定したところ、S-mRCP 移植群と L-mRCP 移植群の間に有意差は認めなかった。さらに、外板、板間層、内板からなる未処理の頭蓋骨の骨密度を測定し、S-mRCP 移植群と L-mRCP 移植群を比較したところ、S-mRCP 移植後と L-mRCP 移植後に形成された骨の骨密度は、隣接する母床骨と同等であることが明らかとなった。そこで、組織学的に観察したところ、ALP 染色および TRAP/カテプシン K 染色により骨芽細胞および破骨細胞がそれぞれ確認されたが、骨芽細胞および破骨細胞の数には両群間で有意差は認められなかった。この結果から、mRCP 移植 4 週間後には形成された骨にすでにリモデリングが始まっていることが示された。

本研究の一連の放射線学的および組織学的解析結果から、100～300  $\mu\text{m}$  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。今後は、ラットの口蓋裂モデルを使用して、S-mRCP の有効性を検討する予定である。よって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・補填されれば、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、100～300  $\mu\text{m}$  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。以上のことから、骨補填材料であるmRCP顆粒は、100～300  $\mu\text{m}$  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。