

論 文 要 旨

Bone formation using
 β -tricalcium phosphate/carboxymethyl-chitin composite scaffold
in rat calvarial defects

ラット頭蓋骨欠損における β -リン酸三カルシウム/
カルボキシメチルキチン複合体スキャフォールド
を用いた骨再生に関する研究

谷山 勝義

【序論および目的】

現在、顎顔面領域では顎骨再建や抜歯窩、歯周組織欠損等の骨欠損部に対して、その機能と形態を回復するため様々な骨補填材が使用されている。特に自家骨は骨形成能が最も高いことから骨移植術において理想的であると考えられている。しかし骨採取に際し二次的な外科侵襲が必要なこと、さらにその採取量には限界がある等の欠点を有している。また同種骨、異種骨は主に欧米を中心に使用されているが、それらの骨誘導能が不安定であること、未知の感染症のリスクを完全には否定できないことから、特に本邦では使用に制限がある。

そこで、これらの骨補填材の欠点を克服すべく、人工骨の開発が盛んに為されている。人工骨として生体親和性、生体吸収性、骨伝導能を有する β -tricalcium phosphate (β -TCP)は特に注目されており、多くの製品が市販されている。ただ、そのほとんどは形態が顆粒であるため欠損部に移植時に移植部位から漏出したり、充填量をコントロールしにくいという操作性、規格性に問題がある。またその粒径も様々であるため、吸収速度が異なり、吸収速度が速すぎると十分な骨伝導能が発揮されず、吸収速度が遅すぎるとむしろ骨再生を遅延させてしまうという報告もある。骨補填材を用いて安定した骨再生を獲得するためには、骨補填材が有する骨伝導能を維持すると同時に、補填材自体は適切な速度で吸収される必要がある。

カニやエビなどの甲殻類に含有される多糖類の一種であるキチンを、カルボキシメチル化して水溶性にした6-O-carboxymethylchitin (CM-chitin)は低い抗原性、高い生体親和性、良好な生体分解性を有することから、これまでに、薬物担体などの生物医学的分野で使用されてきた。 β -TCP充填時の操作性向上と吸収速度を適切に調節するために、このCM-chitinと β -TCP (粒径: 50-150 μ m) を混合してスポンジ状に成形した β -TCP/ CM-chitin

複合体スポンジ(β -TCP/CM)が開発された。これまでの報告で、 β -TCP/CMは軟骨形成を促進することは示されているが、骨形成への影響は不明である。そこで、今回ラット頭蓋骨欠損を用いて、 β -TCP/CMの骨形成に及ぼす影響および β -TCP/CMの吸収性を評価した。

【材料および方法】

β -TCP 顆粒 (粒径: 50-150 μ m)と真空熱架橋 (140 $^{\circ}$ C、12 時間) 処理 CM-chitin powder と Milli-Q 水を 5:1:32 (重量比) で混合した後に凍結乾燥を行い、直径 5mm、厚さ 1mm の β -TCP/CM を作製した。 γ 線滅菌処理後、実験に供した。

実験動物にはWistar系ラット (10週齢、雄) を18匹用いた(動物実験承認番号: D10019)。全身麻酔にて鎮静後、術野頭頂部を剃毛、消毒し、同部に局所麻酔を行った。その後に皮膚に縦切開を加え、全層弁にて剥離を行った。生理食塩水の注水下にてトレフィンバー (直径5mm) を用いて頭蓋骨左右2部位に5mmの骨欠損を外科的に作製した。片側には β -TCP/CM(直径5mm、厚さ1mm)を充填 (実験群) し、対側は充填せず未処置 (コントロール群) とし、創を縫合した。観察期間を4週、8週、12週とし3群(N=6)に割り振り、それぞれの観察期間終了後、実験動物を安楽死させ、頭蓋骨を摘出した。通法に従い脱灰薄切標本を作製し、HE染色を行った。光学顕微鏡下で欠損中心部に相当する組織切片について組織学的所見の観察および形態計測を行った。組織形態計測については新生骨による欠損の閉鎖率、欠損部における新生骨および残存 β -TCP/CMの占有面積を評価した。統計解析は実験群とコントロール群の比較にはWilcoxon符号付き順位検定、群内における経時的比較にはMann-WhitneyのU検定を行った。

【結果】

観察期間中、実験群およびコントロール群に創の裂開や材料の露出等は認められず良好な治癒であった。組織学的所見においては全個体で炎症性細胞浸潤等は認められなかった。実験群およびコントロール群の両群において経時的な新生骨の増加を認めたが、コントロール群は欠損の辺縁から僅かに認められるのみで、全ての観察週において、実験群はコントロール群より有意に新生骨面積が大きかった。また、欠損閉鎖率は実験群がコントロール群より有意に高かった。残存 β -TCP/CMは経時的に減少しており、12週においてわずかに残った β -TCP粒子は完全に新生骨に取り込まれている像が認められた。

【結論及び考察】

本実験にて用いた β -TCP/CMは、容易に充填が可能で欠損部より脱落することもなく操作性も高かった。組織学的所見において、実験群では炎症性細胞浸潤は認められず、 β -TCP/CMの生体為害性は低く生体親和性は高いことが示された。

本研究において得られた新生骨形成量については、同様のラット欠損モデルにおいて種々の人工骨 (bioactive glass, nano-hydroxyapatite/collagen/poly (L-lactic acid), inorganic bovine mineral/cell-binding peptide)の骨伝導能評価を行ったこれまでの報告結果と比較して多かった。術後4週においてCM-chitinは完全に吸収されており、これは以前の報告とも一致する結果であった。さらに術後12週において、残留 β -TCP粒子はわずかであったことから、 β -TCP/CMは高い吸収性を有していると考えられる。これらのことから β -TCP/CMは、CM-chitinが介在し β -TCP顆粒間距離が適切に維持されたことで、良好な吸収速度と骨伝導を両立していたと考えられる。

以上のことより、 β -TCP/CMは良好な骨伝導性と生体吸収性を併せ持つことによりラット頭蓋骨骨欠損において有意に骨形成を促進させることが示され、有用な骨補填材となりうる可能性が示唆された。(Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology 掲載予定)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 190 号		学位申請者	谷山 勝義
審査委員	主査	杉原 一正		学位
	副査	田中 卓男		副査
	副査	徳田 雅行		副査
				町頭 三保

**Bone formation using
β-tricalcium phosphate/carboxymethyl-chitin composite scaffold
in rat calvarial defects**

(ラット頭蓋骨欠損における β-リン酸三カルシウム/カルボキシメチルキチン複合体
スキャフォールドを用いた骨再生に関する研究)

現在、骨欠損部に対してその機能と形態を回復するため、人工骨の開発が盛んに為されている。その中でも β-tricalcium phosphate (β-TCP)は、生体親和性、生体吸収性、骨伝導性を有することから特に注目されており、多くの製品が市販されている。また、カニやエビなどの甲殻に含有される多糖類の一種であるキチンをカルボキシメチル化して水溶性にした 6-O-carboxymethylchitin (CM-chitin)は、低い抗原性、高い生体親和性、良好な生体分解性を有することから、これまでに薬物担体などの生物医学的分野で使用されてきた。β-TCP/CM-chitin 複合体 (β-TCP/CM)は、この CM-chitin と β-TCP (粒径: 50-150μm) を混合してスポンジ状に成形したものである。これまでの報告で、β-TCP/CM は軟骨形成を促進することは示されているが、骨形成への影響について十分な報告がされていない。そこで、今回ラット頭蓋骨欠損モデルを用いて、β-TCP/CM の骨形成に及ぼす影響および β-TCP/CM の吸収性を評価した。

Wistar 系ラット (10 週齢、雄) 18 匹に対してトレフィンバー (直径 5mm) を用いて頭蓋骨左右 2 部位に 5mm の骨欠損を外科的に作製した。片側には β-TCP/CM(直径 5mm、厚さ 1mm)を充填し (実験群)、対側は未処置 (コントロール群) とした。観察期間を 4 週、8 週、12 週とし、それぞれの観察期間終了後、実験動物を安楽死させ、頭蓋骨を摘出し脱灰薄切標本を作製した。光学顕微鏡下で組織学的所見の観察および組織形態計測を行った。

その結果、本研究では以下の知見が明らかにされた。

- 1) 観察期間中、実験群、コントロール群ともに創の裂開や材料の露出等は認められず、組織学的所見においても全個体で炎症性細胞浸潤等は認められなかった。
- 2) 欠損領域に対する新生骨の閉鎖率は 12 週においてコントロール群では 43.2%であったのに対して、実験群では 84.6%と有意に高い値を示した。
- 3) 実験群、およびコントロール群の両群において経時的な新生骨形成量の増加を認めたが、コントロール群において新生骨は欠損の辺縁から僅かに認められるのみで、全ての観察週において実験群はコントロール群より有意に新生骨形成量が多かった。
- 4) 残存 β-TCP/CM は経時的に減少しており、12 週において残存 β-TCP 粒子は完全に新生骨に取り込まれている像が認められた。

以上のことより、β-TCP/CM は良好な骨伝導性と生体吸収性を併せ持つことによりラット頭蓋骨欠損において有意に骨形成を促進させるスキャフォールド(scaffold: 足場材)として有効であることが示された。これは CM-chitin が β-TCP 顆粒間に介在することで β-TCP 顆粒間距離を最適化し、骨芽細胞の遊走を促したためによると考えられる。

本研究は β-TCP/CM をスキャフォールドとして骨欠損部に充填すると骨形成が促進されることを示し、β-TCP/CM は将来有用な骨補填材となりうる可能性を示した点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 190 号		学位申請者	谷山 勝義
審査委員	主査	杉原 一正	学位	博士 (歯学)
	副査	田中 卓男	副査	植村 正憲
	副査	徳田 雅行	副査	町頭 三保

主査および副査の5名は、平成24年4月5日、学位申請者 谷山 勝義君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 本研究で使用した β -tricalcium phosphate/carboxymethyl-chitin composite scaffold (β -TCP/CM)における β -TCP と CM の配合比はどのように決定したのか。

(回答) 予備実験において様々な比率で β -TCP と CM を配合してウサギの顎骨欠損における骨再生を評価した。その結果、骨形性能が最も優れていた配合比(重量比 5:1)を本研究に使用した。

質問2) 組織切片の染色をヘマトキシリンエオジン染色以外の方法で行わなかった理由は何か。

(回答) 本研究では、骨欠損部における新生骨形成と残留 β -TCP/CM を定量的に評価することに主眼をおいたため、ヘマトキシリンエオジン染色で十分な評価が可能であると判断した。

質問3) 組織像で骨芽細胞様細胞と判断した根拠は何か。

(回答) 観察期間4週において、 β -TCP 顆粒の周囲を取り囲んでいた細胞が結合組織中に存在する線維芽細胞とは明らかに形態が異なっていたこと、またその細胞の形態と出現部位が骨芽細胞の特徴と一致していたこと、その細胞の周囲に骨様の基質が添加されていたことから骨芽細胞様細胞と判断した。

質問4) β -TCP/CM が骨再生を促進させたことを結論づけるためには β -TCP 単独の移植群も必要なのではないか。

(回答) 本来なら β -TCP 単独の移植群と比較することが適切であると考えられる。これまでに、本研究と同様の粒径(50-150 μ m)の β -TCP 顆粒をラット頭蓋骨欠損に移植した研究が報告されているが、 β -TCP 単独移植群では新生骨形成は有意に促進されなかった。この報告から本研究で使用した粒径の β -TCP 単独移植では骨再生に限界があると判断し、本研究では β -TCP 単独移植を行わなかった。

質問5) 一般的には β -TCP 単体でも骨補填剤としての有効性が報告されているのに、顆粒径が 50-150 μ m の β -TCP 単体では新生骨形成が促進されないのはなぜか。

(回答) 顆粒径が 50-150 μ m の β -TCP は、一般に市販されている β -TCP 顆粒よりも小さい。顆粒径が 50-150 μ m 程度の β -TCP 顆粒は密に充填されることで顆粒間距離が短くなり、骨芽細胞が β -TCP 顆粒間に遊走しにくくなるために新生骨形成が起りにくくなると考えられる。

質問6) 口腔内で使用されている β -TCP は顆粒状のものが多いのはなぜか。

(回答) 整形外科の領域においては、力学的負荷がかかり易く、大きな欠損部位に適応することを目的に β -TCP ブロックも販売されている。しかし口腔内の骨欠損部は必ずしも大きくなく顆粒状の方が汎用性が高いこと、 β -TCP に対して大きな力学的負荷がかかる可能性が低いことからブロック状のものはあまり使用されていない。

最終試験の結果の要旨

質問 7) β -TCP/CM の作成時に行っている熱架橋の目的は何か。

(回答) CM は生体内における吸収が非常に早いため、熱架橋を行うことで吸収速度を適切に調整している。

質問 8) β -TCP と CM の吸収はどのような形で進むのが理想的と考えるか。

(回答) CM の役割として、操作性の向上と β -TCP 顆粒間距離の最適化を期待しており、 β -TCP の位置が組織内で固定されれば CM は速やかに吸収されるのが理想的と考える。

質問 9) 骨伝導能、骨誘導能とは何か。

(回答) 骨伝導能とは骨形成を行う骨芽細胞やその前駆細胞が骨移植材を足場として骨欠損部に誘導する能力である。骨誘導能とは骨移植材が未分化間葉系細胞に作用することで骨芽細胞への分化を促し新生骨形成を促進させる能力のことである。

質問 10) CM に骨伝導能は存在しないのか。

(回答) CM をウサギの大腿骨欠損部に移植した実験において、CM 自体には骨伝導能はなかったことが報告されている。

質問 11) CM に成長因子のような生理活性は存在しないのか。

(回答) CM は免疫細胞に作用して、骨形成を促進させる TGF- β 1 産生を促すといった報告はあるが、骨再生に関する直接的な生理活性は報告されていない。

質問 12) 将来の臨床応用を考えた場合、どのような形で β -TCP/CM が加工されるのが望ましいか。

(回答) 抜歯窩や歯周組織欠損等の複雑な欠損形態に合わせてチェアサイドで形態を修正し、一塊で充填できるようなスポンジ形状とするのが望ましいと考えられる。

質問 13) 本実験のラット頭蓋骨欠損では、欠損作製部位の底部には既存骨が残存しているのか。

(回答) 欠損部の骨は全て除去しており、底部には硬膜が存在する。

質問 14) 移植後に細菌感染による炎症は認められたか。

(回答) 移植後には細菌感染等が原因と考えられる炎症反応や排膿等は認められなかった。

質問 15) β -TCP/CM はオンレーグラフトにも応用可能か。

(回答) β -TCP/CM には力学的負荷をかけると容易に圧縮されるのでオンレーグラフトへの応用は難しいと考える。

質問 16) 4 週の組織所見で CM と結合組織の判別は可能か。

(回答) 予備実験で行った 2 週の組織像では明らかな CM の構造物が認められた。4 週の時点では CM の構造物は全く認められなかったため、CM は完全に吸収したと判断した。

質問 17) β -TCP/CM は軟骨再生に有効という報告があるにもかかわらず、今回 β -TCP/CM 充填部に軟骨が形成されなかったのは何故か。

(回答) 移植部位周囲には軟骨が存在しないために軟骨形成を担う軟骨細胞が遊走してこなかったためと考える。

質問 18) 本研究では β -TCP/CM を用いた観察期間を最長で 12 週としているが、12 週以降も観察した場合にはどのような結果が予想されるか。

(回答) β -TCP/CM 移植群では、12 週の時点で既に新生骨と既存骨は同様の厚みで連続性を保っていたことから、12 週以降に観察期間を設定した場合でも新生骨は既存骨と同様の厚みを保ちながらリモデリングされていくと予想される。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (歯学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。