

## 論文の内容の要旨

氏名：土屋紀子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Effects of platelet-derived growth factor on bone augmentation beyond the skeletal envelope in rat calvaria  
(ラット頭頂骨における骨外側方向への骨増生に対する PDGF の影響)

血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor; PDGF) は、血管新生や骨芽細胞の増殖を促進し、さらに I 型コラーゲンを増生させることによって骨形成を誘導する増殖因子である。PDGF を再生治療で効果的に用いるためには、徐放性の足場が必要である。足場には細胞外基質の主成分であるコラーゲンを基に作製された吸収性のコラーゲンスポンジ (absorbable collagen sponge; ACS) とキトサン (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) スポンジがよく用いられている。ACS は生体親和性に優れており、キトサンスポンジは生体吸収性で毒性が少なく抗菌作用を有し、創傷治癒を促進させることが知られている。そこで、本研究では、ACS およびキトサンスポンジを足場として用いて、骨外側方向への骨増生に対する PDGF の影響を比較検討した。

第 1 章では、PDGF を含浸させた ACS の骨外側方向への骨増生に対する影響について検討した。12 週齢の雄性近交系 Fischer ラット F344/jcl 14 匹を、12 時間明暗サイクル、恒温、恒湿の環境下で、固形飼料と水道水を自由に摂取させて飼育した。2 週間の予備飼育を行い全身状態が健康であることを確認した後、実験を行った。骨増生を期待する部位に設置する遮蔽キャップとして、規格化されたプラスチックキャップ (キャップ; 内径: 4.4 mm, 高さ: 1.5 mm) を用いた。キャップは使用前に、0.1% 塩化ベンザルコニウム液に 10 分間浸漬し、40°C、2 時間のエチレンオキサイドガス滅菌を施した。ラットに予備麻酔としてイソフルランを吸入させた後、0.6 ml/kg ペントバルビタールナトリウム腹腔内注射による全身麻酔を施し、頭頂部を剃毛した。同部皮下に 1/80,000 エピネフリン含有 2% キシロカインで局所浸潤麻酔を行い、頭頂部の矢状縫合に沿って皮膚切開を加え、筋層と骨膜を剥離し、頭頂骨を露出させた。続いて、頭頂骨の正中縫合を避け左右に直径 5 mm のトレファインバーを用いて外周溝を形成し、その内側に No.2 のラウンドバーを用いて 5 つの穿孔孔を形成して実験母地とした。ラット 14 匹を 2 群に分け実験群 (n = 7) それぞれに 0.01% もしくは 0.03% の PDGF 20  $\mu$ l を含浸させた ACS を、一方、対側の対照群には生理食塩水 20  $\mu$ l を含浸させた ACS をそれぞれキャップ内へ緊密に填入した。キャップは外周溝に合致させて設置し、骨膜および皮膚を縫合した。実験期間は 12 週とし、予備飼育と同様の環境下でラットを飼育した。

骨増生の経時的变化の観察は、前述の方法でラットに全身麻酔を施し、施術直後 (0 週) から 12 週に至るまで、2 週毎に、*in vivo* micro-CT (マイクロ CT) を用いて行った。撮影条件は、管電圧 90 kV、管電流 100  $\mu$ A、照射時間 17 秒、voxel size 30  $\times$  30  $\times$  30  $\mu$ m とした。また、撮影時はキャップ底面が基準平面 (水平面) と平行になるようにラットの固定方向を調整した。

マイクロ CT 断層像の観察と解析は、術後の骨再生を定性的に評価するとともに、骨体積計測ソフトを用いた定量的評価も行った。定性的評価では i-View を用いて 3 軸方向の精査を行った。定量的評価では、断層像から得られるヒストグラムで、周囲軟組織と既存骨それぞれのエックス線吸収のピーク値を求め、その中間値を術後再生した骨のエックス線吸収度の下限とした。この値をリファレンスとして、各群とも断層像についてキャップ内の関心領域における新生骨様組織量 ( $\text{mm}^3$ ) を測定した。

組織標本の作製は、術後 12 週のマイクロ CT 撮影後、前述の方法でラットに全身麻酔を施し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて灌流固定を行った。その後、キャップと周囲組織を含む頭頂骨を採取し、固定液に浸漬した。次に、10% ギ酸で 24 時間脱灰した後、通法に従ってパラフィン包埋し、矢状縫合に平行でキャップ中央部を通る厚さ約 5  $\mu$ m の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

組織形態計測は、光学顕微鏡下で撮影した組織像を用いた。各群の組織標本中のキャップ内組織を 600 dpi デジタル画像とし、画像解析ソフトを使用し、組織学的な形態および色調を指標に新生骨様組織のピクセル数を算出し、キャップ内に新生骨様組織が占める割合を新生骨様組織の占有率 (%) とした。また、キャップの内径を 4 分割する 3 点を用いて、キャップの高さに対する新生骨様組織の高さの割合を求め、

その平均値を当該キャップにおける新生骨様組織の高さ (%) とした。計測は、1 実験母地あたり 1 切片 (n = 7) について平均値および標準偏差を算出し、Wilcoxon rank test を用いて、有意水準 5% で統計学的分析を行った。

定性的評価の結果、実験群および対照群のキャップ内の新生骨様組織は、経時的に増加していく所見が得られた。また、新生骨様組織は 0.03% PDGF 群は、術後 4 週でキャップ内のほぼ上端に達したが、0.01% PDGF 群では、術後 8 週でキャップ内のほぼ上端に達した。一方、対照群は、術後 12 週でキャップの高さの約 1/3 までしか達しなかった。

定量的評価の結果、新生骨様組織量は、実験群および対照群において、術後 12 週まで経時的に増加した。0.03% PDGF 群では術後 4 週以降、0.01% PDGF 群では術後 6 週以降に対照群と比較して有意に高値であった。しかし、0.03% PDGF 群と 0.01% PDGF 群間には実験期間内で有意差は認められなかった。

組織学的観察の結果、新生骨様組織の占有率および高さは、実験群で対照群よりも有意に高値であったが、0.03% PDGF 群と 0.01% PDGF 群間に有意差は認められなかった。

第 2 章では、PDGF を含浸させた吸収性のキトサンスポンジのラット頭頂骨骨外側方向への骨増生に対する影響について検討した。12 週齢の雄性近交系 Fischer ラット 7 匹を用い、飼育条件、実験母地の作製方法は第 1 章の方法に準じて行った。実験群 (n = 7) には 0.03% PDGF を含浸させたキトサンスポンジを、対側の対照群には生理食塩水を含浸させたキトサンスポンジをキャップ内へ緊密に填入し実験を行った。組織標本の作製、骨増生の評価・分析および統計学的解析は、第 1 章の方法に準じて行った。

定性的評価の結果、実験群および対照群のキャップ内の新生骨様組織を示し、経時的に増加していく所見が得られた。実験群の新生骨様組織は、術後 8 週でキャップ内のほぼ上端に達したが、対照群では術後 12 週でキャップの高さの約 1/3 までしか達しなかった。

定量的評価の結果、新生骨様組織量は、実験群および対照群において、術後 12 週まで経時的に増加した。また、PDGF 群は対照群と比較して術後 4 週以降、有意に高値であった。

組織学的観察の結果、新生骨様組織の占有率および高さは、実験群で対照群よりも有意に高値であった。

以上の実験結果から、ラット頭頂骨の骨外側方向の骨増生において PDGF は効果的であることが示唆された。また、骨増生を促進させる増殖因子として PDGF を用いる場合の足場として、ACS および吸収性キトサンスポンジの臨床的局所適用は有効であると考えられた。