

論文の内容の要旨

氏名：瓜 生 豪

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：テトラポッド形状 α -TCP とコラーゲンの併用による骨再生過程の放射線学のおよび免疫組織化学的検討

顎顔面領域の骨欠損部に用いる骨移植材には、主として自家骨が用いられている。自家骨は骨誘導因子や骨形成に関与する細胞を供給し、さらに骨再生における足場材料として機能することから、理想的な移植材と考えられている。しかし、自家骨移植には、手術時間の延長、供給量の制限、創傷合併症、術後の骨採取部の神経麻痺や慢性疼痛などの有害事象を認めることがある。これらの問題を克服するために種々の人工骨が開発されている。しかし、これらの人工骨には特に骨誘導能、骨親和性、力学的強度、異物反応の抑制において大幅な改善が必要である。近年、新たな人工骨としてテトラポッド形を呈する α -tricalcium phosphate (α -TCP) 顆粒である Tetrabone[®] (TB) が開発された。この TB の形態では顆粒間隙が形成され、細胞や血管の遊走を可能にする。TB の骨欠損部への移植では、従来の β -TCP 移植と比較して良好な骨形成が認められると報告されている。また、人工骨に種々の成長因子やコラーゲンを添加した骨移植材による骨再生の研究が行われ、良好な成績を収めている。コラーゲンは骨の石灰化に重要な役割を持つ、主要なタンパクであり、コラーゲンの移植は骨形成を促進すると報告されている。また、ラット頭蓋骨欠損におけるコラーゲンとオクタリン酸カルシウムの複合体移植では、骨形成量が有意に増加したと報告されている。本研究では、骨再生における TB とコラーゲン併用移植の相乗効果を頭蓋骨および下顎骨欠損モデルで検討した。

実験動物は、体重 210 - 230 g の 9 週齢の雄性 Wistar 系ラット（三共ラボサービス）75 匹を実験に用いた。実験動物は、気温 22°C、湿度 55%、標準明暗サイクル下（12 時間）で飼育した。飼料と水道水を任意に与えた。なお、本研究は日本大学歯学部実験動物委員会の承認を得て実施し、実験動物の取り扱いは同委員会の指針に従って行った（承認番号 AP10D020）。

移植材料として、TB 群では欠損部に 50 mg の TB を移植した。コラーゲン群ではコラーゲン (Avitene[®], Davol) と滅菌生理食塩水を最終濃度 0.1 g/ml となるよう混合し、コラーゲン移植材として 0.05 ml を欠損部に移植した。併用群の移植材は TB とコラーゲンを重量比 1 : 5 で混合したものを 0.05 ml 用いた。これら移植材料は、手術直前に調整した。

頭蓋骨欠損モデルにおいて、ラットはペントバルビタールナトリウム 50 mg/kg を腹腔内投与して麻酔を行った。頭頂部を剃毛した後、頭頂部皮下に 2% リドカインで局所麻酔し、皮膚および骨膜を約 20 mm の長さで剥離・翻転して頭蓋骨を露出し、ダイヤモンドバー（直径 8 mm）で持続的注水下に直径 8 mm の円柱状骨欠損を頭蓋骨に作製した。骨欠損部は TB 単体 (TB 群 n=15)、コラーゲン単体 (コラーゲン群 n=15)、および TB とコラーゲンの混合物 (併用群 n=15) で充填した。欠損部に何も充填しないものをコントロール群 (n=15) として設定した。拳上した骨膜を旧位に復し縫合した後、皮膚を縫合した。

下顎骨欠損モデルは頭蓋骨欠損モデルと同様に、Wistar 系ラット 15 匹に麻酔を行った後、左側下顎角部を剃毛し、同部に局所麻酔を行った。皮膚、筋肉および骨膜上に約 20 mm の横切開を加え、筋肉および骨膜を剥離・翻転して下顎骨を露出し、ダイヤモンドバー（直径 2 mm）で直径 3 mm の円柱状骨欠損を作製した。骨欠損部は TB 単体 1.5 mg (TB 群 n=8) で充填し、欠損部に何も充填しないものをコントロール群 (n=7) として設定した。皮膚、筋肉および骨膜を旧位に復した後縫合した。

動物用マイクロ CT (リガク) (マイクロ CT) 撮影を、頭蓋骨欠損モデルでは術直後、術後 1, 4, 8 週で、下顎骨欠損モデルでは術後 1, 4, 8, 12 週に行った。ラットをイソフルランで麻酔し、ラットの頭部をマイクロ CT のチャンバーに固定した。マイクロ CT の撮影条件は Boussein らのガイドラインに従って、倍率 6.7 倍、ボクセルサイズ 30×30×30 μm^3 、管電圧 : 90 kV、管電流 : 100 μA 、照射時間 :

17 秒に設定し、周囲の既存骨を含む範囲で設定した。3D 画像構築には i-VIEW-R image reconstruction software (リガク) を使用し、水平方向、矢状方向、前頭方面で再構築した。骨量は 3 by 4 viewer software (ver. 2.4; 北千住ラジスト歯科, i-View イメージセンター) を用いて計測した。関心領域 (ROI) を頭蓋骨欠損モデルは直径 8.76 mm × 厚さ 3.00 mm の円柱状領域、下顎骨欠損モデルは直径 3.00 mm × 厚さ 3.00 mm の円柱状領域に設定し、ROI 内で骨量を測定した (第 2 図 A, B)。ROI 内での新生骨量を評価するために、既知の骨密度模型 (400 mg/cm^3) (ラトックシステムエンジニアリング) と対比し、 400 mg/cm^3 以上を骨とみなした。術直後撮影時と比較し、増加部分と減少部分の骨ボクセル数を計測し、骨ボクセルの増加量から減少量を減算して骨量とした。統計学的分析は Kruskal Wallis H-test と Student-Newman-Keuls test を用い、有意水準を $p < 0.05$ とした。

組織学的解析を行うため、頭蓋骨欠損モデルでは術後 1, 4, 8 週で、下顎骨欠損モデルは術後 12 週でラットを安楽死させた。ラットの頭蓋骨および下顎骨を採取し、4%パラホルムアルデヒドで 24 時間固定した。その後、骨組織を 0.5 M エチレンジアミン四酢酸で 14 日間脱灰した。次いで、骨組織をエタノール上昇系列により脱水処理し、通法に従ってパラフィン包埋した。パラフィン包埋した検体は $5 \mu\text{m}$ の厚さで薄切切片を作製した。切片はヘマトキシリン/エオジン染色を施し、デジタル顕微鏡システムで撮影した。

骨芽細胞を検出するために、Runx2 の免疫組織化学を行った。脱パラフィン処理した切片を 10 mM クエン酸緩衝液で 98°C 、20 分間反応させ、抗原賦活化処理した。蒸留水で洗浄後、非特異的抗体反応を阻害するため、5%BSA/TBST (5%ウシ血清アルブミン, 0.05%Tween-20 添加 Tris 緩衝食塩水) で 5 分間処理した。一次抗体としてウサギ抗 Runx2 抗体を用い、 4°C で一晩反応させた。二次抗体としてヒストファインシンプルステインラット MAX-PO MULTI を用い切片と反応させた後、0.01%過酸化水素添加、0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride を反応させ、免疫複合体を可視化した。ネガティブコントロールとして、一次抗体の代わりに 1%BSA/TBST を用いた。

破骨細胞を標識するために、切片を TRAP/ALP 染色キットを用い、用法に従って TRAP 陽性細胞の局在を調べた。

TGF- β 陽性細胞を確認するために、蛍光免疫染色 切片は 5%BSA/TBST で非特異的抗体反応のブロッキング処理を行った後、一次抗体としてマウス抗 TGF- β 抗体と 4°C で一晩反応させた。次いで、切片を二次抗体としてビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体と 1 時間反応させた。さらに、Streptavidin-FITC で反応させた後、4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride solution を 37°C で 30 分間反応させた。蛍光シグナルの撮影には、蛍光顕微鏡システムを使用した。

以上の研究より、以下の結果を得た。

1. 定量的解析では、併用群は術後 8 週において TB 群と比較して約 2 倍の骨形成量を示した。また、コラーゲン群と比較し同等の骨形成量を示した。
2. 組織学的検討では、TB 群は既存骨端と TB 表面間に連続する骨形成を認め、コラーゲン群では欠損内に散在性に骨形成を認めた。併用群は TB 群、コラーゲン群の両者の特徴を持つ骨形成を示していた。
3. 免疫組織化学的検討では、TB およびコラーゲンの表面に、TGF- β 陽性の細胞を認め、この TGF- β の局在は、TRAP 陽性の破骨細胞と Runx2 陽性の骨芽細胞に一致していた。

以上のことから、TB とコラーゲンの併用は骨形成の足場として機能し、骨形成を促進することが示唆され、骨欠損に対する有用な移植材となり得ると考えられた。