

## 論文の内容の要旨

氏名：尾崎 愛美

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：A collagen membrane containing osteogenic protein-1 promotes bone regeneration in a rat mandibular bone defect  
(Osteogenic protein-1 添加コラーゲン膜はラット下顎角骨欠損の骨再生を促進する)

日本人の歯の喪失原因の第一位は歯周病であり、年齢を重ねるにつれて歯周病によって歯を喪失する割合が増加している。歯を喪失すると、咬合・咀嚼障害および審美・発音障害を引き起こし、それらを回復するために補綴処置を行う必要がある。最近では、補綴処置として歯科インプラント治療が選択されることが増えている。歯科インプラント治療を行う場合、適切な位置にインプラント埋入するために、骨形態の改善が必要ことが多い。その際、骨再生誘導 (guided bone regeneration; GBR) 法を応用するが、その応用例に生体吸収性コラーゲン膜 (bioabsorbable collagen membrane; BCM) を用いた方法がある。BCM は欠損部に骨再生をさせるためのスペースを確保し、歯肉上皮や歯肉結合組織の侵入を防ぎ、歯槽骨由来細胞を選択的に欠損部に誘導することで、臨床で広く用いられている。しかし、BCM には骨再生を促進する歯槽骨由来細胞の増殖と分化に直接作用する能力はない。そこで、BCM にさまざまな成長因子を添加し歯槽骨由来細胞に直接作用させ、より効果的に骨再生させるための検討が行われている。

成長因子の一つである osteogenic protein-1 (OP-1) は、*in vitro* においてマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) の alkaline phosphatase (ALP) 活性およびオステオカルシンの遺伝子発現を用量依存的に増加させ、マウス株化筋芽細胞 (C2C12 細胞) を骨芽細胞へ分化誘導することが報告されている。そのため、OP-1 は整形外科領域ではすでに骨折の治癒を促進させるための治療に臨床応用されている。そこで、本研究では BCM に OP-1 を添加することで骨再生を促進させる可能性を想定し、OP-1 添加コラーゲン膜 (BCM/OP-1) の骨再生に及ぼす影響について *in vitro* および *in vivo* で検討した。

はじめに、*in vitro* において BCM/OP-1 から OP-1 が持続的に徐放されるかについて調べた。BCM を 5.0 mm × 7.5 mm サイズに調整し、BCM に OP-1 を低用量 (low; L) 0.5 μg 添加 (L-OP-1 群)、もしくは高用量 (high; H) 2.0 μg 添加 (H-OP-1 群) した。その後、BCM/OP-1 を PBS に浸漬し、1, 3, 5, 7, 14 日目にそれぞれ上清を回収後、ELISA 法にて OP-1 のタンパク発現量を測定した。ついで、BCM/OP-1 の細胞為害性および ALP 活性を調べるために MC3T3-E1 細胞を用いて、BCM を 5.0 mm × 7.5 mm サイズに調整後、未処置 (control) 群、BCM 群、BCM に 50 ng, 100 ng, 200 ng の OP-1 をそれぞれ添加した群の 5 つに分け、methyl thiazolyl tetrazolium assay (MTT 試験) および ALP 染色を行った。MTT 試験は、96 well プレートに細胞を播種 ( $5.0 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>) し、BCM または BCM/OP-1 を静置後、1 晩培養し、MTT 溶液を 15 μl/well 添加、4 時間培養後、ジメチルスルホキシドを 100 μl/well 加え、ホルマザンを溶解させ、室温で 1 時間振動を加えた。その後、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度 570 nm で測定した。ALP 染色は 24 well プレートに細胞を播種 ( $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) し、BCM または BCM/OP-1 を静置後 7 日間培養を行い、4% パラホルムアルデヒドにて固定し、ALP 染色を行った。

つぎに、*in vivo* では、ラット下顎角骨欠損モデルを作製し、BCM/OP-1 による骨再生の影響を調べた。雄性近交系ラット (F344/jcl, 10 週齢) にイソフルランによる吸入麻酔を行った後、3 種混合麻酔を腹腔内注射し全身麻酔を施し、出血のコントロールのために追加の局所麻酔として 1/80,000 希釈リドカインを 500 μl 注射した。手術野の下顎骨相当部を剃毛し、無菌的に実験が行えるように準備した後、口角部から下顎角に至る皮膚切開を行い、咬筋を切断、翻転し、下顎骨骨面を露出させ、内径 4.0 mm のトレファインバーを用いて円形の臨界骨欠損を作製した。その後、BCM を 5.0 mm × 15.0 mm サイズに調整し、OP-1 を BCM 設置時に添加した。下顎角骨欠損は無作為に分けられ、欠損

のみ (control 群), 欠損を BCM のみで被覆 (BCM 群), L-OP-1 群, もしくは H-OP-1 群とし, 4 群に分けた。欠損部施術後, 咬筋および皮膚を 5-0 吸収性縫合糸を用いて縫合を行い, 手術日を 0 日とし, 8 週まで飼育し, 術後 8 週で安楽死させた後, 実験動物用 3D マイクロ CT (マイクロ CT) およびエックス線撮影を行い, マイクロ CT 像, 新生骨量, 骨密度, 骨欠損閉鎖率およびエックス線画像による放射線学的観察を行った。ついで, 骨欠損部位を含む周囲組織を一塊として切り出し, hematoxylin eosin (HE) 染色および Villanueva bone (VB) 染色による組織学的観察を行った。HE 染色は, 4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液にて 3 日間固定を行い, 不要な軟組織を除去し, 脱灰液にて 5 日間脱灰後, 5% 硫酸ナトリウム溶液で中和を行い, リン酸緩衝生理食塩水で希釈した 20% スクロースにて凍結し, O.C.T compound にて包埋後, 厚さ 12  $\mu\text{m}$  の矢状断の切片を作製し, HE 染色を行った。VB 染色は, 骨欠損部位を含む周囲組織一塊を 70% エタノールにて固定し, 不要な軟組織を除去後, VB 染色溶液中に 7 日間浸漬した。その後, エタノールにて脱水し, メタクリル酸メチルで包埋後, 厚さ 5  $\mu\text{m}$  の水平断の切片を作製した。データは平均値と標準誤差で表し, 各群間の比較は, one-way analysis of variance (ANOVA) に続いて Tukey's test を用い,  $p$  値が 0.05 未満のときに有意差ありとした。

その結果, *in vitro* において, BCM/OP-1 は 3 日目をピークとし 14 日間で計約 85% の OP-1 を BCM から徐放することが確認できた。さらに, いずれの群においても細胞為害性に有意差はなく, 細胞形態の変化も認められなかった。また, ALP 染色では control 群, BCM 群と比較し, BCM/OP-1 群で濃染され, 200 ng 添加群において最も濃染度が顕著であり, 用量依存的に濃染される傾向を示した。

さらに, *in vivo* では, マイクロ CT 像において, control 群, BCM 群と比較し, BCM/OP-1 群において骨欠損部に骨様組織の再生が多く認められた。また, L-OP-1 群に比べ, H-OP-1 群において顕著な骨欠損改善を認め, 骨欠損は骨様組織で完全に閉鎖されていた。新生骨量においては, control 群, BCM 群と比較し, BCM/OP-1 群では有意な新生骨量の増加を認め, 骨密度および骨欠損閉鎖率においても同様の結果が得られた。また, H-OP-1 群で L-OP-1 群より新生骨量および骨密度に増加傾向を認め, 骨欠損閉鎖率では有意差を認めた。また, エックス線画像では, マイクロ CT 像と同様に control 群, BCM 群, L-OP-1 群, H-OP-1 群の順に骨欠損部に新生骨様のエックス線不透過像の亢進を認めた。

組織学的観察では, HE 染色の結果, control 群, BCM 群, L-OP-1 群, H-OP-1 群の順に新生骨による骨再生が増加した。とくに, H-OP-1 群では既存骨と連続した骨再生を認め, 骨欠損部が新生骨で完全に閉鎖されていた。さらに, VB 染色では, 骨欠損部は骨との境界部分から欠損を中心に同心円状の骨再生をする組織像が確認された。また, BCM/OP-1 群の新生骨には, 類骨, 骨芽細胞, 骨細胞, 破骨細胞が確認され, 既存骨と同様の構造を示すことがわかった。

以上のことから, BCM/OP-1 は MC3T3-E1 細胞に対して細胞為害作用は認められず, ALP 活性を促進し, OP-1 の用量依存的にその傾向を示すことがわかった。また, ラット下顎角骨欠損モデルに対して, BCM/OP-1 群は放射線学的および組織学的に骨欠損部の骨再生を促進し, さらに, H-OP-1 群では骨欠損部が再生骨で完全に閉鎖していた。このことから, GBR 法に BCM/OP-1 を利用することで骨再生が促進される可能性が考えられ, 新たな治療法として有効性が示唆された。