

論文の内容の要旨

氏名：古 畑 光 昭

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Real-time assessment of guided bone regeneration in rat critical size mandibular bone defects in rats using collagen membranes with adjunct high and low concentration of fibroblast growth factor-2

（高濃度または低濃度 fibroblast growth factor-2 添加コラーゲン膜のラット下顎角臨界骨欠損に対する骨再生の経時的変化）

歯の喪失に対する治療として歯科インプラント治療が日常臨床で広く行われている。インプラント治療では適切な位置にインプラントを埋入するために、骨形態の改善を必要とすることが多い。その際、応用される骨再生誘導（guided bone regeneration ; GBR）法は、保護膜（メンブレン）を使用し、欠損部位への軟組織の侵入を防ぎ再生するスペースを確保し、骨形成に関する細胞を選択的に誘導する方法である。メンブレンの主成分として、I型コラーゲンを適用したものが頻用されている。コラーゲンは、歯肉結合組織や骨組織の構成成分であることから組織構造の恒常性を維持する役割があり、組織伸展性や安定性にも関与している。また、細胞遊走、細胞の増殖や分化、形態発生あるいは創傷治癒時の組織リモデリングを調節している。さらに、血餅保持や血管形成をサポートし、創傷部位へ線維芽細胞を遊走し治癒を促進することなどが知られている。臨床では、加工成形しやすく取り扱いに優れ、生体内で吸収されることからメンブレン除去のための二次手術の必要がなく、患者に対する外科的侵襲が軽減される利点がある。そのためコラーゲンメンブレン（collagen membrane ; CM）をスキャホールドに用い、様々な成長因子と組み合わせた新規骨再生ユニットによる効果的な組織再生を検討した研究も行われている。

成長因子として、fibroblast growth factor (FGF) -2 は、血管形成誘導および骨形成促進作用を有している。さらに、FGF-2 は創傷治癒に関連する血管内皮細胞や骨芽細胞の増殖や、骨髄間葉系細胞から骨形成能を有する細胞へと分化誘導することも知られている。また、骨癒合を増進する能力があることや大腿骨に作成した骨欠損の治癒促進を示すことが報告されている。さらに、臨床において歯周病による骨内欠損に対する歯周組織再生材としても応用されている。

そこで、GBR 法を応用した骨造成量の改善や骨成熟に必要な時間を短縮することを目的に CM と FGF-2 を組み合わせた新たな骨再生ユニットを作製し、FGF-2 添加 CM がラット下顎角臨界骨欠損モデルに対する骨造成に及ぼす影響を放射線学および組織学的に評価した。

はじめに、*in vitro* において CM から FGF-2 が持続的に徐放されるかについて調べた。CM に FGF-2 を 0.5 μg (low ; L) 添加、もしくは 2.0 μg (high ; H) 添加した。その後、CM/FGF-2 を PBS に浸漬し、2, 4, 6, 10, 14 日目にそれぞれ上清を回収後、ELISA 法にて FGF-2 のタンパク発現量を測定した。

つぎに、*in vivo* でラット下顎角骨欠損モデルを作製し、FGF-2 添加 CM による骨再生の影響を調べた。雄性近交系ラット 10 週齢、10 頭 (F344/jcl) 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 0.5 ml 注射した。手術野の下顎骨相当部を剃毛し、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。骨欠損を無作為に振り分け、欠損を被覆しない群 (control 群)、欠損を CM で被覆した群 (CM 群)、欠損を CM で被覆し 0.5 μg 添加 (CM/L-FGF-2 群) または 2.0 μg 添加した (CM/H-FGF-2 群) 4 群に分けた。欠損部施術後、咬筋および皮膚を縫合し、手術日を 0 日とし 6 週まで飼育した、実験動物用 3D マイクロ CT (マイクロ CT) 撮影を行い、新生骨量、骨密度、骨欠損閉鎖率を求めた。データは平均値と標準偏差で表し、各群間の比較は、two-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。

骨欠損部を含む周囲組織を一塊として切り出し、Hematoxylin Eosin (HE) 染色、Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) 染色およびオステオカルシン (OCN)、runt-related transcription factor 2 (Runx2) に関する免疫組織化学染色によって組織学的観察を行った。

その結果, *in vitro* において 0.5 μg 添加 (CM/L-FGF-2 群) または 2.0 μg 添加 (CM/H-FGF-2 群) ともに 6 日目をピークとし, 14 日間で計約 100% の FGF-2 を CM から徐放することが確認された。

さらに, *in vivo* におけるマイクロ CT 像において, CM/H-FGF-2, CM/L-FGF-2 群で control 群, CM 群と比較し骨欠損部に骨様組織の再生が増加していた。また, CM/H-FGF-2 群において CM/L-FGF-2 群に比べ, 顕著な骨欠損の改善が認められ, 術後 6 週で骨欠損部が骨様組織で完全に閉鎖した。新生骨量, 骨密度, 骨欠損閉鎖率はすべての群で経時的な増加傾向が認められた。とくに, 術後 2 週と 6 週で control 群, CM 群に比べ CM/L-FGF-2 群, CM/H-FGF-2 群で有意に増加した。

組織学的観察において, HE 染色の術後 6 週における組織切片像から CM/H, L-FGF-2 群では, 既存骨と連続した新生骨の再生を認めた。また, 骨内には骨芽細胞, 骨細胞および血管が観察され, 既存骨と類似した組織像であった。TRAP 染色で, control 群および CM 群よりも CM/H, L-FGF-2 群で破骨細胞数が有意に少なかった。免疫染色では, CM/H-FGF-2, CM/L-FGF-2 群において OCN と Runx2 陽性細胞が観察された。

以上のことから, 放射線学のおよび組織学的に CM/H-FGF-2, CM/L-FGF-2 群は control 群, CM 群に比較してラット下顎角臨界骨欠損に対して顕著な骨造成を示すことが明らかとなり, 経時的により速く再生骨が成熟することが確認された。したがって, CM/FGF-2 を応用した骨再生ユニットは新たな GBR 法の一手段となり得る可能性が示された。