

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

普山田 宏成

論文題目

純チタンスキャホールドと骨形成因子の複合化による骨誘導能の評価

I. 緒言

悪性腫瘍などに起因した広範囲な顎骨欠損症例では、その口腔諸機能の重篤な低下が惹起される。また、同部における顎骨再建は、機能性および審美性の回復に極めて有効であるが、顎骨および骨欠損部の形態は複雑であり、解剖学的制約も多いため、目的の形状に再建することは困難とされる。そこで、近年開発された電子ビーム粉末積層造形法（以下 EBM 法）を応用することで、生体親和性が良好とされる純チタン粉末を材料とした顎骨欠損部に最適な形状および優れた機械的性質を有するスキャホールドが作製可能ではないかと考えられる。本研究では EBM 法により作製した純チタンスキャホールドの生体親和性の評価および、BMP との共存による新生骨誘導能の評価を行った。

II. 材料・方法

1. 三次元造形

画像処理ソフトウェアである Magics software package を用いて試料形状データを CAD データとして作製し、STL データに変換した後に、三次元造形装置 (Arcam A1[®]、以下 EBM 装置) で試料を作製した。作製する試料の原材料には純チタン粉末 (平均粒径 70 μm) を用いた。

2. *in vitro* 試験

EBM 装置により作製したチタンディスク (以下 EBM Ti) を実験試料として用いた。また、既製のチタンディスクを鏡面研磨したもの (以下 Polish Ti)

をコントロールとして用いた。試料の形状は直径 20 mm、厚さ 1 mm の円板状とした。細胞培養には、マウス線維芽細胞由来 L929 細胞 (以下 L929) およびマウス頭蓋骨骨芽細胞様細胞由来 MC3T3-E1 細胞 (以下 MC3T3-E1) を用いて行った。L929 を用いた細胞増殖試験では、EBM Ti を使用し、培養期間は 5 日間とし、1 日ごとに細胞増殖の測定を行った。MC3T3-E1 を用いた細胞増殖試験では、EBM Ti と Polish Ti を使用し、培養期間は 10 日間とし、2 日ごとに細胞増殖の測定を行った。培養ウェル上に同一濃度の細胞懸濁液を直接播種したものを control とした。また、L929 および MC3T3-E1 の EBM Ti 上における形態観察を走査型電子顕微鏡 (以下 SEM) を用いて観察した。

3. *in vivo* 試験

1) 部分精製 BMP との複合化

埋入用の試作スキャホールドの形状は Φ 4 mm × 8.5 mm の円柱状で、ポアサイズは 1000 μ m の網目状とした。スキャホールドを 10 mM のデキストリン水溶液に浸漬後、1 時間減圧下で静置した。その後、Urist らの方法に準じて作製した部分精製 BMP 5 mg をガラス板上で吸着させることでスキャホールドと BMP を複合化し、凍結乾燥したものを埋入試料とした。実験動物には ddY conventional マウス (4 週齢、雄性) を用いた。マウスに吸入麻酔を施し、大腿部筋膜空隙に試料を埋入後、皮膚および筋層を縫合した。埋入期間は 21 日間とした。試料のマウス大腿部への埋入から 3、10、17 日

経過後にマイクロ CT 画像による観察を行った。また埋入から 21 日経過後に埋入部位およびその周囲組織を含めて採取し、マイクロ CT 撮影、組織学的観察および、元素分析を行った。

2) ヒトリコンビナント BMP との複合化

スキャホールドの形状は $\Phi 4 \text{ mm} \times 8.5 \text{ mm}$ の円柱状で、ポアサイズは 650、800、1000 μm の三種類とした。また、各スキャホールドの表面形状の観察を SEM を用いて行った。ヒトリコンビナント BMP-2 (以下 rhBMP-2) 10 μg を 10 mM デキストリン水溶液 50 μl で溶解し、この水溶液とスキャホールドをゼラチンカプセルの中に入れた後に、減圧することでそれぞれを複合化し、凍結乾燥したものを埋入試料とした。実験動物には、Sprague-Dawley ラット (4 週齢、雄性) を用いた。ラットにソムノペンチル腹腔内投与による麻酔を施し、前述の BMP 埋入試験と同様の手法で試料の埋入を行った。

試料の埋入 7 および 14 日後にマイクロ CT 撮影による観察を行った。また埋入 21 日後に埋入部位およびその周囲組織を含めて採取し、部分精製 BMP との複合化の試料と同様に、マイクロ CT 撮影、組織学的観察、元素分析を行った。

III. 結果

1. *in vitro* 試験

L929 の細胞増殖試験では、control 群と比較し、培養 5 日目での有意差は認められなかった。MC3T3-E1 の細胞増殖試験では各群において、培養日

数の経過とともに細胞増殖が認められた。特に EBM Ti 群では、培養 6 日目以降での細胞増殖が顕著となり、他の群との間に有意差が認められた。

L929 の SEM 像では多角形または紡錘形の細胞が EBM Ti 上に接着している様子が観察された。また MC3T3-E1 の SEM 像では培養初期では L929 と同様の形態を示したが、経過とともに細胞が複数層に重なるように増殖している様子が観察された。

2. *in vivo* 試験

1) 表面形態の観察

各ポアサイズにおけるスキャホールドの SEM 像において造形されたスキャホールドのポアサイズは、設計通りであることが確認された。

2) 部分精製 BMP との複合化

マイクロ CT 画像において、埋入 10 日後から 21 日後に BMP 単体および Ti+BMP の両群については、どちらもその周囲に不透過性が強くなり、範囲の拡大も観察された。スキャホールド単体群については、試料周囲の不透過像が確認されなかった。埋入 21 日後に採取した BMP 複合化スキャホールドと周囲組織の組織像において、スキャホールド周囲には骨様組織を認めたが、スキャホールド内部は血管を含む線維性結合組織で満たされていた。

埋入 21 日後に採取した BMP 複合化スキャホールドと周囲組織の元素分析において、スキャホールドを示す Ti 周囲の Ca、P がほぼ同じ部位で観察され、これにより誘導された組織は、骨と同様のリン酸カルシウム系の硬組織で

あることが示唆された。

3) rhBMP との複合化

rhBMP-2 と複合化したスキャホールド埋入後のマイクロ CT 画像において、ポアサイズ 650 μm のスキャホールド埋入後の画像では、スキャホールド周囲に不透過像が観察された。しかし、その他のポアサイズおよびコントロール群においては、不透過像は観察されなかった。埋入 21 日後に採取したスキャホールドおよび周囲組織の組織像において、ポアサイズ 650 μm のスキャホールド内部には、その形状に沿うように骨様組織が誘導されている像が観察された。しかし、その他のポアサイズでは骨様組織の誘導は少なく、それぞれのスキャホールド内部は主に線維性結合組織で満たされていた。元素分析において、ポアサイズ 650 μm のスキャホールド内部には Ca および P が顕著に検出され、それらの重ね合わせ像では Ca、P がほぼ同部位で確認された。このことから誘導された組織は骨と同様のリン酸カルシウム系の硬組織であることが示唆された。しかしながら、その他のポアサイズのスキャホールドでは Ca、P の検出は微量であった。

IV. 考察

1. *in vitro* 試験

本実験において、L929、MC3T3-E1 とともに良好な細胞増殖を示した。また、MC3T3-E1 では培養の経過とともに control に比べ有意に高い増殖能を示した。これは SEM 画像にあるように、培養初期では L929 と同様の形態を示す

細胞が観察されたが、チタン粒子の起伏により経時的に細胞が複数層に重なるように増殖しているためではないかと考えられる。これらのことから、EBM 法で作製したスキャホールドは良好な細胞適合性を有していると考えられる。

2. *in vivo* 試験

1) 部分精製 BMP

本実験において、新たにスキャホールド周囲に誘導された組織はリン酸カルシウム系の硬組織であることが確認され、新生骨であることが示唆された。このことから、本スキャホールドが BMP 活性および新生骨誘導能に対して抑制的な作用を示さない材料であることが確認された。しかし、スキャホールド周囲には良好な骨形成が観察されたものの、内部には新生骨の誘導が認められず、線維性結合組織で満たされていた。これまでの報告から、BMP の作用は細胞接触後早期に開始し、スキャホールド内部における BMP と組織が直接接触していない部分からの新生骨の誘導が生じないものと考えられる。本実験で使用した部分精製 BMP は、非水溶性であり埋入早期に溶解しないため、同部での局在が持続すると考えられるが、反面、スキャホールド内部まで BMP を十分に浸透させることは困難であり、スキャホールド内部において BMP と組織が接触しないことが考えられる。そこで、この問題を解決するために水溶性の rhBMP-2 を用いた埋入実験を行った。

2) rhBMP-2

rhBMP-2 を用いた実験において、ポアサイズ 650 μm のスキャホールド内部に著明な骨様組織が確認され、新生骨の可能性が示唆された。スキャホールド内部に骨誘導が確認されたことについては、部分精製 BMP と比較し、rhBMP-2 は水溶性であることから、スキャホールド内部に rhBMP-2 を十分に浸透させることができたためであると考えられる。しかしながら、より大きなポアサイズでの骨誘導は少なかった。本研究では3種類のポアサイズを使用した。ポアサイズが大きくなるとスキャホールドの表面積が減少し、BMP の付着量も減少する。さらに、使用した rhBMP-2 は水溶性であるため、大きなポアサイズでは血流により BMP が運び去られてしまう可能性も考えられる。また、3次元的な内部構造パターンそのものが骨形成に影響を与えている事も推測される。そのため、今後、スキャホールドのメッシュの形態、3次元的構造についてもより詳細な検討が必要であると考えられる。

V. 結論

EBM 法を用いて作製したスキャホールドを用い、生体親和性の評価および BMP と複合化後に埋入実験を行なった結果、以下の結論を得た。

1. EBM 法で作製したスキャホールドは、L929、MC3T3-E1 を用いた細胞増殖試験で、良好な細胞増殖を示した。
2. 部分精製 BMP との複合化を行った結果、スキャホールドは BMP の新生骨誘導能に対して為害作用を示さないことが確認されたが、スキャホールド内部への骨誘導はわずかであった。

3. rhBMP-2 との複合化ではポアサイズ 650 μm のスキャホールド内部に著明な骨誘導が認められたが、その他のポアサイズのスキャホールドでは骨誘導は限局的であった。

4. これらの結果から、EBM 法は複雑な形状の三次元多孔質スキャホールドの作製が可能であり、作製されたスキャホールドは BMP と複合化させることで骨欠損部に対する埋入材料として極めて有用であることが示唆された。