

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

秋山泰範

論文題目

ラット頭蓋骨欠損部にヒトI型コラーゲンリコンビナントペプチドを移植した時の骨形成の評価

## I. 緒言

顎裂は、内側鼻突起と上顎突起の癒合不全で生じる一次口蓋部の骨欠損であり、歯の萌出障害、歯列不整等の機能不全の原因となる。そこで、顎裂部への骨再建は必須であり、腸骨や脛骨から採取した海綿骨を移植する自家骨移植が主な治療法である。自家骨移植では、自家骨の採取部位への侵襲が大きく、その侵襲を軽減するために新たな治療法の開発が急務である。そこで、我々は新たな骨代替材料として、ヒト I 型コラーゲンベースの骨代替材料であるリコンビナントペプチド (以下 RCP) を研究してきた。この材料の特徴として、脱水素熱処理を用いて結合する反応時間を調整することで架橋密度を調整する事が可能である。そこで、低度、中程度、高度架橋度をもつ RCP の骨形成能を比較してきた。その結果、中程度架橋度を持つ RCP が最も適切な架橋度であると確認できた。

本研究では、中程度架橋度リコンビナントペプチド (以下 mRCP) が顎裂部への骨代替材料として適切であるかを検討するために、ラット頭蓋冠臨界骨欠損モデルを用いて、自家骨移植の場合と比較し、放射線学および組織学的解析に基づいて検討した。

## II. 材料及び方法

### II-1. 使用動物

実験には、体重 200～250 g の雄性 T 細胞機能欠損ラット 9 週齢を使用した。

ラットは、12 時間の明暗サイクルで恒温恒湿の環境下におき、十分な飼料と水で飼育した。本研究は、愛知学院大学歯学部動物研究委員会（承認番号 AGUD412）にて承認された。

## II-2. 使用材料

RCP 溶液を凍結乾燥した後、多孔質 RCP スポンジブロックに架橋し、脱水素熱処理を行い 4.75 時間結合させ、粒子状に粉碎して mRCP を作製した。

## II-3. 自家碎片骨採取

自家碎片骨は、T 細胞欠損ラット（9 週齢）の脛骨から採取した。脛骨の下縁に沿って 10mm の皮膚切開を行い、脛骨を明示させた。脛骨から皮質骨と海綿骨を採取し、採取した骨片はオステオトームを使用して碎片骨（0.5 mm～1 mm）を作成した。

## II-4. 移植部位の作成

ラットを無作為に mRCP 移植群（n = 5）と、自家骨移植群（n = 5）、頭蓋骨欠損部のみ（n = 3）に分けた。頭部を消毒後、皮膚および骨膜を切開し、骨膜を挙上して頭蓋骨を明示した。そして、矢状縫合を避けて左側頭蓋冠に径 5.0mm のトレフィンバーで外径 5 mm の骨欠損を作成した。なお、欠損部には mRCP（3mg）または自家碎片骨（200mg）を移植した。移植後は

切開した骨膜を戻し、4-0 バイクリルで縫合し、手術を終了した。

## II-5. 放射線学的解析

移植部における硬組織形成過程を、マイクロCTで、移植前、移植後1、2、3 および4週で両実験群のラットを撮影した。骨体積および骨塩密度 (Bone mineral density, 以下 BMD) は、骨量測定ソフトウェア 3 by 4 ビューア 2011 でボクセル画像から関心領域 (Region of Interest ; 以下 ROI) 内を測定した。なお、測定時の ROI サイズは  $2.5 \times 2.5 \times 3.14 \times 0.7$  mm とした。新生骨の体積量は移植前、移植後1、2、3、および4週で測定し、個々のラットにおける新生骨の体積量の増加は、移植後の各計測点の計測値から移植前に測定した値の差で算出した。一方、BMD は、移植後4週で測定し、ハイドロキシアパタイトファントムを骨量測定ソフトウェア 3 x 4 ビューア 2011 で測定し、得られた骨塩量の検量線を基準として測定した。BMD は、mRCP 移植群、自家骨移植群、そして対照群として頭蓋骨の皮質骨を加えた3群間で比較した。

## II-6. 組織学的解析

mRCP 移植群は移植後1、2、3、および4週、自家骨移植群は移植後4週で二酸化炭素の吸入により安楽死させ、新生骨の形成を観察するために、

パラフィン切片 (厚さ  $5\mu\text{m}$ ) を作製して組織学的に解析した。ヘマトキシリン・エオジン (H-E) で染色するとともに、一部のパラフィン切片は、アルカリホスファターゼ (ALP) および酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) で染色した。mRCP 移植群の移植後 1、2、3、および 4 週の H-E 染色標本を用いて、移植部を低倍率 (4 倍) で撮影し、以下の標準化された領域における新生骨の面積を ImageJ software で測定した。なお標準化された領域は、移植部全体 ( $5.0 \times 0.7\text{ mm}$ )、移植部の骨辺縁領域 ( $1.25 \times 0.7 \times 2\text{ mm}$ ) と中央領域 ( $2.5 \times 0.7\text{ mm}$ )、および硬膜側領域 ( $5.0 \times 0.35\text{ mm}$ ) と骨膜側領域 ( $5.0 \times 0.35\text{ mm}$ ) とした。

## II-7. 統計分析

統計解析にはエクセル統計ファイルソフトウェアを用いて行なった。各グループ内の測定値には標準偏差 (SD) を用いた。各グループ間の比較は、Tukey-Kramer Post-hoc test にて統計分析を行い、 $P < 0.05$  は統計学的に有意差があるものとした。

## III. 結果

### III-1. 臨床所見

実験期間を通し、実験動物には、創の哆開や重篤な炎症所見を認めなかつ

た。また、体重の減少は無く、術後の経過は良好であった。

### Ⅲ-2. 放射線学的評価

移植部位の硬組織形成を観察するために、移植後 1、2、3、および 4 週のマイクロ CT 画像 (冠状面) を用いた。mRCP 移植群は、移植後 3 週以降では、移植部位の全領域を満たす連続性のある不透過像の形成を認めた。一方、自家骨移植群は、4 週において移植部位の全領域を連続する不透過像は認められなかった。mRCP 移植群は、冠状面の CT 像と一致して移植後 4 週では移植部位全体を覆う不透過像を認めた。一方、自家骨移植群では、移植後 1 週では移植した自家骨を認めたが、移植後 4 週では移植部位全体を覆う不透過像を認めなかった。頭蓋骨欠損群は移植後 4 週でも、欠損部に不透過像は認めなかった。

次に硬組織の形成過程を評価するために、移植後 1、2、3、および 4 週の骨体積と、移植後 4 週の BMD を測定した。まず、ROI 内の骨体積は、mRCP 移植群では移植後 2 週までは自家骨移植群と比較し有意に小さかった ( $P < 0.05$ ) が、3 週以降は有意な差はなかった。また、ROI 内の BMD において、mRCP 移植群と自家骨移植群の移植後 4 週での不透過像および頭蓋部の皮質骨を比較したところ、3 群間で有意な差はなかった。

### Ⅲ-3. 組織学的評価

骨形成過程を組織学的に評価するために、mRCP 移植後 1、2、3、および 4 週、自家骨移植群では移植後 4 週の、移植部位の H-E 染色像を観察した。mRCP 移植群の移植部は、移植後 2、3 週で、母床骨の辺縁および硬膜側から骨の形成を認め、4 週になると移植部全体に骨の形成を認めた。自家骨移植群では、移植後 4 週で、移植した自家碎片骨の周囲に新生骨の添加を認めたが、母床骨との辺縁、ならびに移植部の硬膜側および骨膜側からの新生骨の形成を認めなかった。頭蓋骨欠損群は、骨辺縁領域にのみ新生骨の形成を認めたが、中央部には認めなかった。mRCP 移植群と自家骨移植群の新生骨の形成過程を定量的に評価するために、ImageJ software を用いて新生骨の面積を測定したところ、移植後 4 週での新生骨の面積は 2 群間で有意な差はなかった。次に、mRCP 移植群の新生骨の形成過程を、週の経過とともに定量的に評価した。移植後 1～3 週での新生骨の面積は、移植部における中央領域よりも母床骨との辺縁領域で有意に大きかった ( $P < 0.05$ ) が、4 週では有意な差はなかった。

mRCP 移植群の、骨芽細胞および破骨細胞の存在を観察するために、ALP 染色と TRAP 染色をした。移植後 2～3 週で、mRCP 周囲に新生骨が観察され、その表面には ALP 陽性および TRAP 陽性細胞を認めた。さらに 4 週で、新生骨の内部に骨髄様組織が観察され、同部に ALP 陽性細胞、TRAP 陽性細胞を認めた。また移植部位の TRAP 陽性細胞を数えると、移植後 1 週では認めなかったが、スライド 1 枚につき平均 ( $n = 3$ )、2 週で 18 細胞、3 週で 57 細

胞、および4週で73細胞と、週を追うごとにTRAP陽性細胞は増加した。

#### IV. 考察

I型コラーゲンは骨の主成分であるため、I型コラーゲンをベースにした骨代替材料は数多く開発されている。しかし従来のコラーゲン様移植材料はウシやブタなどの異種組織から得られており、現段階では化学処理で完全にタンパク質を除去することで使用可能ではあるが、感染のリスクは否定できず、使用に関しては注意が必要である。mRCPはヒトI型コラーゲンを主成分としており、動物由来成分を含んでいない。また、コラーゲンの主たる抗原部位であるテロペプチドを酵素処理で除去しているため、感染のリスクはなく、安全性の高い材料である。

骨再生に使用される骨代替材料は、機械的特性と生体分解性は新生骨の骨量、骨密度に影響を与える。機械的特性は新生骨の足場として重要な役割を持ち、生体分解性は、低いと新生骨に置換される前に吸収されて新生骨の足場としての役割を担えなくなり、高いと新生骨内に残留し、骨密度の低下をおこす。今回の組織学的解析では移植後1週目では吸収されず、骨膜、硬膜に押し潰されることなく骨形成の足場として残留しており、3週以降で吸収されつつ骨に置換していた。また、放射線学的解析においても骨形成量、骨密度は自家骨移植群と比較しても有意な差を認めなかったことから、mRCPは骨代替材料として求められる機械的特性と生体分解性を



有する可能性が示唆された。

mRCP は様々な形態に加工することが可能で、今回は顆粒状で多孔性の粒子を使用した。細孔は小さすぎると細胞移動が制限され、大きすぎると表面積が減少して細胞接着と機械的特性が制限されると報告されている。通常、腸骨等の修復に使用される多孔性の骨代替材料は、200～350  $\mu\text{m}$  の孔径であり、歯槽骨の骨再生には孔径が約 130  $\mu\text{m}$  が最適と報告がある。今回使用した mRCP の孔径は約 100  $\mu\text{m}$  であり、mRCP 表面には、細胞増殖を促す受容体であるインテグリンとの接着性に優れる RGD 配列のアミノ酸を多く含むため、細胞接着性が高いと報告されている。組織学的解析においても mRCP 周囲の TRAP/ALP 活性を確認したところ、移植後初期より骨形成で重要な役割を担う骨芽細胞と破骨細胞が細孔周囲に確認できた。

## V. 結論

ラット頭蓋冠臨界骨欠損モデルを用いて mRCP の骨形成能を自家骨移植と比較し、放射線学的大約び組織学的解析を行なった結果、自家骨移植と有意差を認めなかった。顎裂部が狭い症例等において、mRCP は自家骨移植に代わる新たな骨代替材料として臨床応用の可能性がある事が考えられた。