

学 位 論 文 題 名

骨髄幹細胞のためのスキャホールドとして移植した
スポンジ状コラーゲンの組成と濃度が
骨欠損の治癒に及ぼす影響

学位論文内容の要旨

緒言

骨髄には多分化能と自己増殖能が高い間葉系幹細胞が存在することから、再生医療の分野で広く応用が期待されており、歯周組織再生療法への利用も検討され始めている。しかし幹細胞を有効に利用するには、細胞の増殖や分化を促進し、再生スペースを確保できる適切な足場（スキャホールド）が必要である。幹細胞の足場として種々のコラーゲンが応用されているが、コラーゲンは、架橋処理、化学処理などの相違により、細胞の増殖や分化、組織修復に及ぼす作用が大きく異なると報告されている。

そこで本研究は、骨髄幹細胞や骨再生に働く細胞の足場としての有効性を明らかにする目的で、組成と濃度の異なるスポンジ状コラーゲンを人工的骨欠損に移植して骨髄液を浸潤させ、治癒過程に及ぼす影響を検討した。

材料と方法

成ビーグル犬9頭の下顎下縁部に皮膚切開を加え、骨膜を剥離、露出した下顎骨体部にツイストドリルで直径 3 mm、深さ 3 mmの円筒状の骨欠損を形成し、骨欠損底部を骨髄腔に穿孔した。FC 群（n=72）は、骨欠損と同じ大きさのスポンジ状に作製した線維化コラーゲンを骨欠損部に移植し、FC-HAC 群（n=72）は線維化コラーゲンと熱変性コラーゲンの複合体を移植し、両群とも骨髄液を十分に浸潤させた。非移植群（n=18）は何も移植せず、3群とも骨欠損部を骨膜弁で被覆、縫合して閉鎖創とした。

移植したスポンジ状線維化コラーゲンは、タイプⅠアテロコラーゲンを酸性溶液に溶解後、中和処理して線維化コラーゲン（FC）を作製、コラーゲン濃度を 2.5、3、4、5%に調整して凍結乾燥処理によりスポンジ状に成形し、熱脱水架橋を行って作

製した。スポンジ状の線維化コラーゲンと熱変性コラーゲンの複合体は、タイプⅠアテロコラーゲン溶液を熱処理して熱変性コラーゲン（HAC）を作製し、FC と HAC の溶液を 9：1 の割合で混合して同様の処理を行い、2.5、3、4、5%の物を作製した。

移植 1、4、12 週後、灌流固定し、通法に従いパラフィン包埋して、厚さ 6 μ m の頬舌縦断連続切片を作製、H・E 重染色、オステオカルシン（OC）免疫組織学的染色を行った。

組織学的計測は画像解析ソフトウェアを用いて、作製した骨欠損、残存コラーゲン、炎症性細胞浸潤残存コラーゲン、炎症性細胞浸潤結合組織、新生骨の各面積を計測、①残存コラーゲン面積率、②炎症性細胞浸潤コラーゲン面積率、③炎症性細胞浸潤結合組織率、④新生骨率を算出した。統計学的分析には Mann-Whitney の U 検定を用いた。

結果

1. 病理組織学的観察結果

1) 術後 1 週

FC-HAC 群と FC 群は大部分の移植コラーゲンが残存し、その内部には血球の他に有核細胞が観察され、炎症性細胞はほとんど観察されなかった。

非移植群の骨欠損部には、線維芽細胞様細胞と炎症性細胞が多く観察された。

3 群とも、骨欠損内部に OC 陽性細胞は観察されなかった。

2) 術後 4 週

FC-HAC 群は、残存コラーゲン辺縁部に細胞密度の高い層が観察され、その外側に新生骨が認められる部位と、残存コラーゲンと新生骨が接している部位が観察された。残存コラーゲン内部には、細胞がほぼ均一の細胞密度で観察され、その数は術後 1 週に比較して明らかに増加し、多くは OC 陽性であった。

FC 群は、残存コラーゲン内部に細胞は少なく、コラーゲン濃度が高くなるに従って炎症性細胞浸潤が増加する傾向が観察された。残存コラーゲン内の細胞は OC 陰性だった。

非移植群は、新生骨が骨欠損の半分程度まで形成されており、骨欠損中央部には OC 陰性の細胞が多数観察された。

3) 術後 12 週

FC-HAC 群は、いずれのコラーゲン濃度でも残存コラーゲンはほとんど観察されず、コラーゲン濃度が高い場合では、作製した骨欠損のさらに外側まで新生骨が形成されていた。

FC 群は、コラーゲン濃度が高くなるに従って残存コラーゲンが増加し、その内部や周囲の結合組織に炎症性細胞が多く観察された。

非移植群は、骨欠損の大部分に新生骨が再生していた。

2.組織学的計測結果

1) 骨欠損面積

骨欠損面積は 3 群間で有意差は認められなかった。

2) 残存コラーゲン面積率

FC-HAC 群は、1 週後では 83.5～99.2%と移植コラーゲンのほとんどが残存していたが、12 週後にはほぼ消失した。いずれの観察期間でも、コラーゲン濃度の違いにより有意差は認められなかった。

FC 群は、1 週後ではほとんどのコラーゲンが残存し、12 週後ではコラーゲン濃度 2.5%ではほぼ消失したが、5%では 17.8%の残存率であった。いずれの観察期間でも、コラーゲン濃度が高いものは低いものに比較して有意に高い値を示した。

3) 炎症性細胞浸潤コラーゲン面積率

FC-HAC 群は、いずれのコラーゲン濃度、観察期間でもコラーゲン内部への炎症性細胞浸潤はほとんどなく、有意差は認められなかった。

FC 群は、1 週後では 8.6～16.2%、4 週後では 40.1～67.3%、12 週後では 2.5～47.8%で、12 週後はコラーゲン濃度が高いものは低いものに比較して有意に高い値を示した。

同じコラーゲン濃度の FC-HAC 群と FC 群を比較すると、FC 群の方が FC-HAC 群より有意に高い値を示した。

4) 炎症性細胞浸潤結合組織率

FC-HAC 群は、いずれのコラーゲン濃度、観察期間でもコラーゲン周囲の結合組織への炎症性細胞浸潤はほとんどなく、有意差は認められなかった。

FC 群は、1 週後では 12.0～18.0%、4 週後では 6.9～42.2%、12 週後では 0.8～19.3%で、4、12 週後はコラーゲン濃度が高いものは低いものに比べて有意に高い値を示した。

同じコラーゲン濃度の FC-HAC 群と FC 群を比較すると、FC 群の方が FC-HAC 群より有意に高い値を示した。

5) 新生骨率

FC-HAC 群は、1 週後では 0～8.8%、4 週後では 38.2～68.2%、12 週後では 76.1～87.0%で、いずれの観察期間でもコラーゲン濃度の違いによって有意差は認められなかった。

FC 群は、1 週後では 0.6~3.2%、4 週後では 21.0~59.8%、12 週後では 58.0~76.0%で、4、12 週後はコラーゲン濃度が高くなるにしたがって有意に低い値を示した。

非移植群との比較では、FC-HAC 群はすべての観察期間とコラーゲン濃度で有意差がなかったが、FC 群は 4 週後で有意に低い値を示した。

考察

FC-HAC 群と FC 群は、1 週後、残存コラーゲン内部に血球の他に有核細胞が観察され、これらは OC 陰性で骨芽細胞への分化レベルが低かったことから、移植時に浸潤させた骨髄液中の幹細胞の可能性が高いと考えられた。また、4 週後には、FC-HAC 群では細胞数が増加し、これらの細胞は OC 陽性を示すものが多くなった。これらは、残存コラーゲン内の細胞密度が均一であったことから、骨髄液中の幹細胞が増殖して骨芽細胞に分化した可能性が高いと思われた。一方、FC 群では 4 週後には炎症性細胞が残存コラーゲン内部にまで浸潤しているものが多く、残存コラーゲン内に観察された細胞は OC 陰性だった。従って、FC に HAC を添加することによって、骨髄幹細胞や骨再生に働く細胞を増加させるのに有効であると考えられた。

移植コラーゲンの吸収と骨形成過程は FC 群と FC-HAC 群では大きく異なっていた。FC 群では炎症性細胞浸潤が著しく、移植したコラーゲンが貪食された後に骨形成に必要な細胞が出現すると考えられたが、FC-HAC 群では炎症性細胞浸潤はほとんど観察されず、残存コラーゲン辺縁部に線維芽細胞や骨芽細胞が多数観察され、一部には残存コラーゲンと新生骨が接していた部分も見られたことから、残存コラーゲンの分解と同時に骨形成が進むものと思われた。

以上から、FC-HAC 複合体は骨髄由来の幹細胞や骨再生に働く細胞の増殖や分化に有効であると考えられたが、歯周組織再生に応用するためには再生スペースを確保できる機械的強度を有していることも重要である。FC-HAC 群でコラーゲン濃度が高い場合に、作製した骨欠損を越えて外側に新生骨が形成されていたものがあり、これは骨欠損から溢出した移植コラーゲンが皮膚弁に圧迫されても骨形成スペースを確保していたためと考えられた。従って、FC-HAC 複合体は、歯周組織欠損が水平性や幅の広い 1 壁性などの場合にも、コラーゲン濃度を高めて強度を向上させて応用することが可能と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 浪 雅 光

副 査 教 授 向 後 隆 男

副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

骨髄幹細胞のためのスキャホールドとして移植した スポンジ状コラーゲンの組成と濃度が 骨欠損の治癒に及ぼす影響

審査は主査、副査全員が一同に会して口頭で行った。はじめに申請書に対し本論文の要旨の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

近年、再生医学の分野では幹細胞を利用する研究が多く行われている。骨髄に少量存在し、多分化能を有する幹細胞を歯周組織再生療法へ応用することが考えられる。幹細胞を組織再生に応用するためには、再生スペース確保のための機械的性質と細胞や組織の侵入性に優れたスキャホールドが必要である。本研究では、組成や濃度の異なるスポンジ状コラーゲンを人工的骨欠損に移植し、骨髄幹細胞や骨再生に働く細胞のスキャホールドとしての有効性を検討した。

成ビーグル犬 9 頭の下顎骨下縁部を全層弁で剥離して、直径 3 mm 深さ 3 mm の円筒状の骨欠損を形成、骨髄腔に穿孔した。FC-HAC 群 (n=72) は 2.5、3、4、5% の線維化コラーゲン (FC) - 熱変性コラーゲン (HAC) 複合体をスポンジ状に成型したものを移植し、骨髄液が十分に浸潤したことを確認した。FC 群 (n=72) は 2.5、3、4、5% の FC を同様に移植し、非移植群 (n=18) には何も移植しなかった。術後 1、4、12 週で組織標本作製し、H・E 重染色、オステオカルシン免疫染色を行い、組織学的観察及び、残存コラーゲン率、炎症性細胞侵入組織率、新生骨形成率を組織計測した。統計学的分析は、Kruskal-Wallis 検定、Mann-Whitney の U 検定を用いた。

その結果、1 週後では、FC 群、FC-HAC 群とも、移植コラーゲン内部に多数の血球の他にヘマトキシリンに染まる細胞がわずかに観察された。炎症性細胞浸潤組織率は、FC 群の方が FC・HAC 群に比べて多かったが、非移植群と比較し

て有意に低かった。4週後では、FC 群は、いずれのコラーゲン濃度でも炎症が観察され、濃度が高くなると移植コラーゲンの残存量が多くなり、炎症が強くなる傾向が観察された。FC-HAC 群は移植コラーゲン内部に、オステオカルシン陽性の細胞の増殖が多く観察され、コラーゲン濃度が異なっても治癒状態にほとんど差は観察されなかった。12週後では、FC 群は、コラーゲン濃度が高いと移植コラーゲンの残存量が増加して炎症性細胞浸潤が多くなり、骨の新生量も減少した。FC-HAC 群は、移植コラーゲンはほぼ吸収されて新生骨が欠損を埋めており、コラーゲン濃度が異なっても治癒状態に差はなかった。

以上の結果から、線維化コラーゲンに熱変性コラーゲンを添加することにより、再生スペース確保のためにコラーゲン濃度を上げても、炎症を生じにくく、骨髄由来の幹細胞や骨再生に働く細胞のスキヤホールドとして有効であることが明らかとなり、歯周組織再生に応用できる可能性が示唆された。

引き続き審査担当者と申請者の間で論文内容および関連事項について質疑応答が行われた。

主な質問事項は、

- (1) スポンジ状コラーゲンの濃度の決定方法
- (2) 観察期間の決定方法
- (3) FCとFC-HAC複合体の吸収の差
- (4) 骨髄幹細胞の割合
- (5) 骨欠損面積の計測方法

などであった。

これらの質問に対し、申請者は適切な説明によって回答し、本研究の内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野についても十分な理解と学識を有していることが確認された。

本研究は、骨髄幹細胞や骨再生に働く細胞のためのスキヤホールドとしての有効性を検索する目的のもと、組成や濃度の異なるスポンジ状コラーゲンを人工的骨欠損に移植し、骨髄液を浸潤させ、コラーゲンの細胞増殖・分化に与える影響や、吸収性を組織学的に明らかにし、歯周組織を再生できる可能性が高いことを明確にした点が高く評価された。本研究の内容は、歯科医学の発展に十分貢献するものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと審査担当者全員が認めた。