

学位論文題名

骨髄穿孔とコラーゲンスポンジの骨上への埋植が
骨増生に及ぼす効果

学位論文内容の要旨

【緒言】

現在行われている歯周組織再生療法は水平性骨欠損や1壁性骨欠損症例では再生はほとんど得られていないのが現状である。

骨髄間葉系幹細胞を再生療法に利用する方法として骨髄穿孔して細胞を供給する方法があり、歯周外科処置においても容易に行える方法である。

再生療法にはスキャホールドが必要とされ、イヌの下顎骨に骨窩洞を形成して骨髄穿孔し、線維化アテロコラーゲン・熱変性アテロコラーゲン複合体(FC-HAC)スポンジを穿孔部に移植することで、スポンジに骨髄液や細胞が保持され、骨再生が促進されたという報告があり、このスポンジがスキャホールドとして有効であることを示している。ただ、歯周病の水平性骨欠損に応用するための機械的な強度やスペースメイキングの効果は明らかではない。そこで本研究では、FC-HACスポンジの骨髄細胞と骨増生にかかわる細胞のスキャホールドとスペースメイキングの効果を評価するために、ラットの大腿骨に骨髄穿孔して穿孔部の上にFC-HACスポンジを埋植した際の骨増生に及ぼす効果を検討した。

【材料と方法】

実験にはWistar系雄性ラット(12週齢)88匹の大腿骨を用いた。被験部位の皮膚切開を行った後に大腿二頭筋と大腿四頭筋の間を切開し、大腿骨骨幹を露出、骨膜を剥離した。その後、4群に分け、穿孔+スポンジ群では骨髄腔に3ヶ所穿孔(直径0.5mm、約1.5mm間隔)し、FC-HACスポンジで穿孔部を覆い、ナイロン糸で大腿骨に結紮して固定し、皮膚弁を縫合した。FC-HACスポンジは、線維化アテロコラーゲンと熱変性アテロコラーゲンを9:1の割合で混合し、凍結乾燥処理によりスポンジ状に成形し、熱脱水架橋されたものである。また、スポンジ群は穿孔せずにスポンジを大腿骨上に埋植し、穿孔群では穿孔のみを行い、剥離群では剥離のみを行った。3、5、10、14、28日の観察期間終了後、通法に従い標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色を行い、病理組織学的観察と組織学的計測を行った。組織学的計測は術後28日の標本を用いて①

新生骨面積、②新生骨高さ、③残存 FC-HAC スポンジ面積について行った。各計測値の統計学的有意差検定には Mann-Whitney *U* 検定を用いた。

【結果】

1. 病理組織学的観察結果

1) 術後 3 日：穿孔+スポンジ群では、スポンジ内に多くの赤血球とまばらに円形の細胞やメガカリオサイトと思われる核の大きな細胞や骨髄細胞様細胞がみられた。スポンジ群では、スポンジ内に多数の赤血球が観察された。穿孔群では、穿孔部に赤血球や炎症性細胞浸潤が多くみられ、その外側には紡錘形の細胞が観察された。剥離群では炎症性細胞浸潤とフィブリン網が一部に観察された。4 群ともに新生骨の形成は認められなかった。

2) 術後 5 日：穿孔+スポンジ群の新生骨は骨梁が細く、スポンジ内には紡錘形の細胞、立方形や楕円形の細胞が散在してみられた。スポンジ群の新生骨は骨梁が細く、スポンジ内には赤血球や紡錘形の細胞がみられ、立方形や楕円形の細胞がわずかに観察された。穿孔群では穿孔部を封鎖するように新生骨がみられ、剥離群では軟骨様組織が若干観察された。

3) 術後 10 日：穿孔+スポンジ群では穿孔部から連続して骨梁の細い新生骨がみられ、スポンジ内には紡錘形の細胞、立方形や楕円形の細胞がみられ、血管の形成も認められた。スポンジ群ではスポンジ辺縁から母床骨と連続した骨梁の細い新生骨が認められ、軟骨様組織が混在していた。スポンジ内には紡錘形の細胞が散在し、血管の形成はほぼ認められなかった。穿孔群では穿孔部から新生した骨が母床骨の外側にまで連続してみられた。剥離群では骨基質がやや密な新生骨が母床骨と連続してみられた。

4) 術後 14 日：4 群ともに新生骨の増加が観察された。穿孔+スポンジ群では穿孔部は完全に新生骨で封鎖され、スポンジの残存量は減少していた。スポンジ群もスポンジの残存量は減少していた。穿孔群では穿孔部からの新生骨が母床骨の外側にまで形成されていた。剥離群の新生骨は骨梁が太くなっていた。

5) 術後 28 日：穿孔+スポンジ群ではスポンジ内に新生骨が増生し、骨梁が太くなり、スポンジの残存量はさらに減少していた。スポンジ群では新生骨が増生し、スポンジの残存量は減少していた。穿孔群、剥離群では新生骨の量の増加は少なく、骨梁はさらに太くなっていた。

2. 病理組織学的計測結果

1) 新生骨面積：穿孔+スポンジ群はスポンジ群、穿孔群、剥離群と比べて有意に多く新生骨が認められ、穿孔群は剥離群と比べて有意に多く新生骨が認められた。

2) 新生骨高さ；穿孔+スポンジ群はスポンジ群、穿孔群、剥離群と比べて有意に高く、スポンジ群は剥離群と比べて有意に高く新生骨が形成された。

3) 残存 FC-HAC スポンジ面積：穿孔+スポンジ群とスポンジ群との間で有意差は認められなかった。

【考察】

本研究の28日後において新生骨面積は、穿孔+スポンジ群が他の3群よりも有意に多かった。これは、FC-HAC スポンジによる骨髄および周囲組織由来細胞の保持と分化増殖促進、および骨髄穿孔による血管新生促進と細胞の分化増殖促進によると考えられた。穿孔+スポンジ群のスポンジ内には骨髄細胞が侵入保持されており、FC-HAC スポンジは穿孔部から流出する骨髄液や細胞を含浸保持し、細胞のスキャホールドとしての性質を有していると考えられた。さらに、スポンジは骨髄液に含まれ骨形成に関与するサイトカインなどの成分を一定期間保持していると考えられ、それによって内部に存在する骨髄細胞が増殖分化し始めている可能性が考えられた。一方でコラーゲンは石灰化を誘導する細胞外基質で、骨髄間質細胞をコラーゲンゲルに移植すると骨マーカーの発現が認められたという報告もあることから直接的にFC-HACの作用で細胞の分化増殖が起きている可能性も考えられた。また、スポンジ群でもスポンジ外側辺縁に紡錘形や楕円形の細胞が観察されたことから、周囲組織由来の細胞がスポンジに侵入したと考えられ、穿孔+スポンジ群で観察されたスポンジ外側辺縁の細胞も周囲組織由来細胞の可能性が考えられた。また、穿孔+スポンジ群のスポンジ内にはスポンジ群ではみられなかった血管の侵入が認められた。骨髄細胞の一部が血管内皮細胞に分化するという報告や骨髄液をイヌ皮下に注入し、毛細血管の増生が起こるといった報告があり、骨髄は血管の新生にも効果があると考えられている。本実験でみられた穿孔+スポンジ群の豊富な血管新生も、骨髄細胞の効果ではないかと思われ、骨髄穿孔は間葉系幹細胞を有効に利用できるだけでなく、血管新生を高めることでも骨再生を促進すると考えられた。

高分子材料をスキャホールドとして使用すると吸収するために炎症が生じると必要な組織の再生を障害するとされている。FC-HAC スポンジは炎症性細胞や貪食像を示すマクロファージは一部に認められるのみで、さらに残存コラーゲンと新生骨が接している像が多数観察されたことから、スポンジの吸収は貪食作用よりも分解によるものが多く、吸収と同時に骨形成が進んでいると思われるスキャホールドとして優れた性質を有していると考えられた。

本研究の新生骨高さにおいて、スポンジ群は剥離群に対して有意に大きいことから、スポンジ担体を移植するだけでスペースメイキングの効果があると思われた。

これらのことから、FC-HAC スポンジを骨髄穿孔部に埋植することは骨増生を促進させ、歯周病の水平性骨欠損に応用できる可能性があると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 浪 雅 光
副 査 教 授 進 藤 正 信
副 査 教 授 脇 田 稔

学 位 論 文 題 名

骨髄穿孔とコラーゲンスポンジの骨上への埋植が 骨増生に及ぼす効果

審査は主査、副査全員が一同に会して口頭で行った。はじめに申請者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。

現在臨床応用されている歯周組織再生療法である GTR 法やエムドゲインは適応が狭く、2~3 壁性の垂直性骨欠損部の再生にのみ用いられている。多くの歯周病にみられる水平性骨欠損や 1 壁性骨欠損症例では再生がほとんど得られないのが現状である。

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おり、骨髄には多分化能を有する間葉系幹細胞が存在することから、これを利用する研究が進められている。骨髄細胞を利用する方法の一つとして、骨髄腔に穿孔して骨髄を露出させる方法があり、この方法は歯周外科処置においても歯槽骨に容易に行える方法であることから臨床応用しやすいものと考えられる。また組織再生のためには細胞だけでなく適切なスキャホールドが必要である。我々はこれまでに濃度の異なる線維化コラーゲンと熱変性コラーゲンの複合体(FC-HAC)をイヌ下顎骨下縁の円筒状骨欠損に用いてそのスキャホールドとしての有効性を報告した。そこで本研究ではコラーゲンスポンジのスキャホールドとスペースメイキングとしての効果を期待してラットの大腿骨を骨髄穿孔し、その上に FC-HAC スポンジを埋植して骨増生に及ぼす効果を検討した。

実験には 12 週齢の Wistar 系ラット 88 匹を用いた。皮膚切開、骨膜剥離して大腿骨に直径 0.5mm で 3ヶ所骨髄穿孔し、その上に 5×4×3mm の 4%FC-HAC スポンジを埋植したものを穿孔+スポンジ群とした。穿孔を行わずに FC-HAC スポンジを埋植した群をスポンジ群、穿孔のみを行ったものを穿孔群、骨膜剥離のみを行ったものを剥離群とした。術後 3、5、10、15、28 日で組織標本作製し、H・E 重染色を行い、組織学的観察及び組織計測を①新生骨面積、②新生骨高さ、③残存スポンジ量について行った。統計学的分析は、Mann-Whitney の *U* 検定を用いた。

3、5 日後では穿孔+スポンジ群では多くの血球や紡錘形の細胞と楕円形の細胞がスポンジ内部に観察された。5 日後では穿孔+スポンジ群、スポンジ群、穿孔群で、10 日後

では 4 群ともに幼若な新生骨がわずかに認められたがあきらかな差は認められなかった。各群ともに残存スポンジ量は経時的に減少し、14 日後に比べ 28 日後では新生骨の量の増加が認められた。28 日後の新生骨面積は穿孔+スポンジ群では $4.09 \pm 1.05 \text{ mm}^2$ 、スポンジ群では $2.33 \pm 0.31 \text{ mm}^2$ 、穿孔群では $2.52 \pm 0.74 \text{ mm}^2$ 、剥離群では $1.76 \pm 0.70 \text{ mm}^2$ で、穿孔+スポンジ群は他の 3 群よりも有意に大きな値を示した ($p < 0.01$)。新生骨高さは穿孔+スポンジ群では $1.51 \pm 0.70 \text{ mm}$ 、スポンジ群では $0.86 \pm 0.20 \text{ mm}$ 、穿孔群では $0.64 \pm 0.14 \text{ mm}$ 、剥離群では $0.49 \pm 0.16 \text{ mm}$ で、穿孔+スポンジ群は他の 3 群よりも有意に大きな値を示した ($p < 0.01$)。以上の結果から 4%FC-HAC スポンジはスキャホールドとスペースメイキングの役割を持ち、骨髄穿孔部に埋植することで歯周病の水平性骨欠損部の骨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、論文内容及び関連事項についての質疑応答がなされた。主な質問事項として、

- (1) 骨髄液の作用について
- (2) 骨髄細胞の性質・特徴について
- (3) 組織標本の作成法について
- (4) 骨髄穿孔を臨床応用する際の効果的な方法について
- (5) FC-HAC スポンジの吸収過程について
- (6) 新生骨のでき方について、どのような部位に形成されるのかなどであった。

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。本研究は骨髄穿孔部の上に FC-HAC スポンジを埋植することは骨増生を促進させることを示したことにより、臨床における水平性骨欠損への応用に対して重要な指針を与えたことが高く評価された。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、審査担当者全員は、学位申請者が博士（歯学）の学位を授与するのに値するものと認めた。