

コラーゲンハイドロゲル-スポンジ複合体の スキャフォールドとしての有効性と BMP 併用による骨増生

学位論文内容の要旨

【緒言】

再生療法には細胞が増殖する場や growth factor の保持のために適切なスキャフォールドが必要であると考えられている。アスコルビン酸-銅架橋によるコラーゲンハイドロゲルは、高い細胞誘導性と良好な生体吸収性を示すことが明らかになっているが、スキャフォールドとして再生療法に応用する場合、流動性が高く、機械的強度が低いことが欠点として考えられ、水平性骨欠損や 1 壁性骨欠損症例ではゲルの保持が困難で、移植しても十分な歯周組織再生が得られない可能性が考えられる。一方、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)スポンジは、スペースメイキング効果があることが確認されている。そこで FC-HAC スポンジにコラーゲンハイドロゲルを含浸させたコラーゲンハイドロゲル-スポンジ複合体を用いることで、コラーゲンハイドロゲルの流動性が改善され、高い細胞誘導効果とともに、FC-HAC スポンジが有するスペースメイキング効果を併せ持つことが可能であると考えた。またコラーゲンハイドロゲル-スポンジ複合体にさらに BMP を保持させることが可能であれば、高い骨誘導能を有した新しいスキャフォールドとして再生療法に応用できるのではないかと考えた。本研究では、コラーゲンハイドロゲル-スポンジ複合体のスキャフォールドとしての有効性と BMP を併用した場合の効果について組織学的評価を行った。

【材料・方法】

Wistar 系雄性ラット(10 週齢)87 匹に麻酔下にて皮膚切開を行い、頭蓋骨中央を露出、骨窩洞を形成し、移植材料によって 5 群に分けた。BMP 含有コラーゲンハイドロゲル-スポンジ移植群(以下 BGS 群)では FC-HAC スポンジにコラーゲンハイドロゲルを浸透させ、コラーゲンハイドロゲル-スポンジ複合体を作製したのち、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を溶媒とした 100 μ g/ml リコンビナントヒト BMP-2 溶液に浸漬して骨窩洞を被覆するように移植した。コラーゲンハイドロゲル-スポンジ移植群(以下 GS 群)ではコラーゲンハイドロゲル-スポンジ複合体を PBS に浸漬して移植した。BMP 含有スポンジ移植群(以下 BS 群)では FC-HAC スポンジのみを 100 μ g/ml リコンビナントヒト BMP-2 溶液に浸漬して移植した。スポンジ移植群(以下 S 群)では FC-HAC スポンジのみを PBS に浸漬して移植した。非移植群(以下 C 群)は何も移植しなかった。各群とも皮膚弁を縫合して閉鎖創とし、観察期間を 5, 10, 15 日とし、組織学的観察および計測を行った。組織学的計測は観察期間 15 日の標本を用いて、①新生骨面積②新生骨高さ③残存スポンジ面積④残存スポンジ高さを求めた。

【結果】

病理組織学的観察結果

術後 5 日では BGS 群、GS 群において多量のコラーゲンハイドロゲル-スポンジ複合体が残存し、内部には線維芽細胞様細胞が認められ、コラーゲンハイドロゲル-スポンジ複合体と母床骨の間には骨芽細胞様細胞や線維芽細胞様細胞

胞を含む結合組織が形成され、炎症性細胞浸潤がわずかに観察された。BS群、S群では多量のスポンジが残存し、スポンジ内部には線維芽細胞様細胞と炎症性細胞浸潤がわずかに観察された。C群では炎症性細胞浸潤、フィブリン網および赤血球が観察された。術後10日ではBGS群、GS群でコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体が残存していたがその量は減少しており、スポンジ周囲には血管新生を伴う結合組織が形成され、スポンジ周囲および内部には線維芽細胞様細胞や骨芽細胞様細胞が豊富に見られ、炎症性細胞はほとんど認められなかった。骨窩洞底部ではコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体周囲に新生骨の形成が観察され、骨芽細胞が顕著に認められた。BS群、S群ではスポンジが残存し、スポンジ内には線維芽細胞様細胞が散在し、赤血球が多く観察された。スポンジ内および周囲には炎症性細胞浸潤が観察された。骨窩洞底部に若干の骨形成と骨芽細胞が認められた。C群では、骨窩洞に結合組織の形成を認め、線維芽細胞様細胞や炎症性細胞浸潤が観察された。骨窩洞底部に新生骨の形成が若干見られた。術後15日ではBGS群では骨窩洞の大部分が新生骨によって修復され、母床骨から連続して著しく増生している部位や母床骨と連続しない新生骨が観察された。コラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体は新生骨に接してわずかに残存しており、周囲に骨芽細胞が多数観察された。GS群でも骨窩洞底部に新生骨形成が認められ、周辺に骨芽細胞が観察された。コラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体は骨窩洞付近ではほとんど認められず、骨窩洞の多くは結合組織で満たされていた。BS群、S群ではスポンジが残存し、スポンジ内には線維芽細胞様細胞や赤血球が認められた。骨窩洞底部に新生骨の形成がわずかにみられた。C群では新生骨が骨窩洞底部にわずかに形成されているのが観察され、骨窩洞は結合組織で満たされていた。

組織学的計測結果

新生骨面積においてBGS群は他の4群と比べて、GS群はC群と比べて有意に大きかった。新生骨高さにおいてBGS群は他の4群と比較して、GS群、BS群およびS群はC群と比べて有意に大きかった。残存スポンジ面積においてBGS群はGS群、BS群およびS群に比べて有意に少なかった。残存スポンジ高さにおいてBGS群、GS群はS群に比べて有意に少なかった。

【考察】

FC-HACスポンジは以前の研究から生体親和性が良好であることが明らかになっており、コラーゲンハイドロゲルはアスコルビン酸-銅で架橋しているため細胞毒性が発現しない特徴を有している。これらを併用したコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体は、移植後早期から内部へ線維芽細胞や骨芽細胞が侵入増殖し、吸収されたと考えられた。コラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体の吸収は、炎症性貪食作用よりもコラーゲンハイドロゲル内に侵入増殖した線維芽細胞が産生する酵素による分解が主体で、コラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体の吸収と同時に結合組織形成や骨形成が進み、組織への置換が迅速であったと考えられた。またBGS群では多量の骨増生が観察されたことから移植後早期からコラーゲンハイドロゲル中で増殖した細胞が、コラーゲンの刺激やコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体に保持されたBMPによる刺激によって骨芽細胞への分化や骨誘導作用を促進された可能性が考えられた。以上のことからコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体は生体親和性、細胞侵入性が高く、骨窩洞部に移植することにより早期に組織に置換されて骨増生を引き起こし、BMPを併用するとさらに骨形成量を増加させることが可能ことが明らかとなった。

【結論】

本研究ではコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体のスキファールドとしての有効性とBMPを併用した場合の効果について検討し、その結果、以下の結論を得た。

1. FC-HACスポンジにコラーゲンハイドロゲルを含浸させることによって、細胞侵入性と組織への置換性、再生スペースの確保に有効なスキファールドになることが明らかとなった。

2. コラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体に BMP を併用することで新生骨量を増加させることができた.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 浪 雅 光
副 査 教 授 鈴 木 邦 明
副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

コラーゲンハイドロゲル-スポンジ複合体の スキャフォールドとしての有効性と BMP 併用による骨増生

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て本論文の概要の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

再生療法には細胞が増殖する場や growth factor の保持のために適切なスキャフォールドが必要であると考えられている。アスコルビン酸銅錯体によるコラーゲンハイドロゲルは、高い細胞誘導性と良好な生体吸収性を示すことが明らかになったが、スキャフォールドとして再生療法に应用する場合、流動性が高く、機械的強度が低いことが欠点として考えられ、水平性骨欠損や1壁性骨欠損症例ではゲルの保持が困難で、移植しても十分な歯周組織再生が得られない可能性が考えられる。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)スポンジは、その良好な生体親和性が確認されている。この FC-HAC スポンジにコラーゲンハイドロゲルを含浸させ移植することで、コラーゲンハイドロゲルの高い細胞誘導効果とともに流動性の問題点が改善され、FC-HAC スポンジのスペースメイキング効果を併せ持つことが可能であると考えた。コラーゲンハイドロゲル-スポンジ複合体さらに BMP を保持させることが可能であれば、強力な骨誘導性を有した新しいスキャフォールドとして再生療法に应用できるのではないかと考えた。本研究では、コラーゲンハイドロゲル-スポンジ複合体のスキャフォールドとしての有効性と BMP を併用した場合の効果について組織学的評価を行った。Wistar 系雄生ラット 87 匹の頭蓋骨に骨窩洞を形成し、移植材料によって 5 群に分けた。BMP 含有コラーゲンハイドロゲル-スポンジ移植群(以下 BGS 群)では FC-HAC スポンジにコラーゲンハイドロゲルを浸透させ、コラーゲンハイドロゲル-スポンジ複合体を作製したのち、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を溶媒とした BMP-2 溶液に浸漬し、骨窩洞を被覆するように移植した。コラーゲンハイドロゲル-スポンジ移植群(以下 GS 群)ではコラーゲンハイドロゲル-スポンジ複合体を PBS に浸漬し移植した。BMP 含有スポンジ移植群(以下 BS 群)では FC-HAC スポンジのみを BMP-2 溶液に浸漬し移植した。スポンジ移植群(以下 S 群)では FC-HAC スポンジのみを PBS に浸漬し移植した。非移植群(以下 C 群)は何も移植しなかった。各群とも皮膚弁を縫合して閉鎖し、観察期間を 5、10、15 日とし、組織学的観察および計測を行った。組織学的計測は観察期間 15 日の標本を用いて、①新生骨面積②新生骨高さ③残存スポンジ面積④残存スポンジ高さを求めた。

術後 5 日では BGS 群、GS 群において多量のコラーゲンハイドロゲル-スポンジ複合体が残存し、内部に線維芽細胞様細胞が、コラーゲンハイドロゲル-スポンジ複合体と母床骨の間には骨芽細胞様細胞や線維芽細胞様細胞を含む結合組織が観察された。BS 群、S 群でも多量のスポンジが残存し、内部には線維芽細胞様細胞、炎症性細胞浸潤がわずかに観察された。C 群では炎症性細胞浸潤、フィブリン網および赤血球の凝集が観察された。術後 10 日では BGS 群、GS 群でコラーゲンハイドロゲル-スポンジ複合体が残存していたがその量は減少しており、スポンジ周囲には血管新生を伴う結合組織が形成され、スポンジ周囲および内部には

線維芽細胞様細胞や骨芽細胞様細胞が豊富に見られ、炎症性細胞はほとんど認められなかった。骨窩洞底部ではコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体周囲に新生骨の形成が観察され、骨芽細胞が顕著に認められた。BS群、S群ではスポンジが残存し、スポンジ内には線維芽細胞様細胞が散在し、赤血球が多く残存していた。スポンジ内および周囲には炎症性細胞浸潤が観察された。骨窩洞底部に若干の骨形成と骨芽細胞が認められた。C群では、骨窩洞に結合組織の形成を認め、線維芽細胞様細胞や炎症性細胞浸潤が観察された。術後15日では、BGS群では骨窩洞の大部分が新生骨によって修復され、母床骨から連続して著しく隆起している部位や母床骨と連続しない新生骨が観察された。コラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体は新生骨に接してわずかに残存しており、周囲に骨芽細胞が多数観察された。GS群でも骨窩洞底部に新生骨形成が認められ、骨芽細胞が観察された。コラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体は骨窩洞付近ではほとんど認められず、骨窩洞の多くは結合組織で満たされていた。BS群、S群ではスポンジの残存が認められ、スポンジ内には線維芽細胞様細胞や赤血球の存在が認められた。骨窩洞底部に新生骨の形成がわずかにみられた。C群では新生骨がわずかに形成されているのが観察され、骨窩洞は結合組織で満たされていた。新生骨面積においてBGS群は他の4群と比べて、GS群はC群と比べて有意に大きかった。新生骨高さにおいてBGS群は他の4群と比較して、GS群、BS群およびS群はC群と比べて有意に大きかった。残存スポンジ面積においてBGS群は他の3群と比べて有意に少なかった。残存スポンジ高さにおいてBGS群、GS群はS群と比べて有意に少なかった。

以上の結果からコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体は、移植後早期から内部へ線維芽細胞や骨芽細胞が侵入増殖し、吸収が起ったと考えられた。コラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体の吸収は、炎症性食作用よりもコラーゲンハイドロゲル内に侵入増殖した線維芽細胞が産生する酵素による分解が主体で、コラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体の吸収と同時に結合組織形成や骨形成が進み、組織への置換が迅速であったと考えられた。またBGS群では多量の骨増生が観察されたことから移植後早期からコラーゲンハイドロゲル中で増殖した細胞が、コラーゲンによって骨芽細胞へ分化が誘導され、さらにコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体に保持されたBMPが細胞の骨芽細胞の分化や骨誘導作用を促進した可能性が考えられた。以上のことからコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体は生体親和性、細胞侵入性が高く、骨窩洞部に移植することにより早期に組織に置換されて骨増生を引き起こし、BMPを併用するとさらに骨形成量を増加させることが可能となった。

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質疑応答がなされた。主な質問事項として、

- (1) アスコルビン酸銅架橋のメカニズムについて。
 - (2) コラーゲンハイドロゲル作製方法について。
 - (3) ラット頭蓋骨に作製した骨窩洞の大きさ及び穿孔について。
 - (4) BGS群が骨増生を増強するメカニズムについて。
 - (5) 臨床で使用する場合、どのようなケースで用いるのが良いか、また今後の展望について。
- 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。本研究はコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体のスキヤフォールドとしての有効性とBMPを併用することによる骨形成能を評価しており、臨床における骨欠損部へのコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体移植の応用に対し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。