

学 位 論 文 題 名

家兎下顎骨骨空洞の治癒過程における
PLGA・コラーゲン・ハイブリッドメッシュの
有用性の検討

学位論文内容の要旨

【緒言】

口腔顎顔面領域の疾患のなかでも、とりわけ腫瘍は治療後に顎骨形態異常をきたすことがある。口腔では形態と機能は密接な関係を持っており、形態異常はすなわち機能異常につながり、咀嚼、発音などに多大な影響を及ぼす。顎骨の形態回復には、外骨膜が重要な役割をはたしていることが報告されており、外骨膜を病変とともに切除せざるをえない悪性腫瘍の治療においては、患者固有の顎骨形態を回復するのは困難を極める。現在、顎骨欠損を伴う悪性腫瘍の治療には、一般にチタン性金属材料と自家骨移植の併用、または合成高分子等の人工材料が用いられている。自家骨移植には、遊離自家骨移植、有茎骨移植、ならびに血管柄付き遊離骨移植がある。しかし、いずれの自家骨移植も自家骨採取部位への二次的な手術侵襲を伴うこと、骨採取量に限界があること、採取骨と移植床の顎骨形態の不一致などから顎骨の形態ならびに口腔の機能回復に満足 of いく結果が得られていないのが現状である。

一方で、自家骨移植のリスクを軽減するために古くから合成高分子化合物を用いた生体吸収性人工材料とおもに腸骨から採取した遊離自家骨移植を併用した顎骨再建法が臨床でも応用されており、症例によっては良好な結果が得られている。現在、使用されている合成高分子の人工材料は、polyglycolic acid (PGA)、polylactic acid (PLA) ならびに本研究で用いた poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) である。これら合成高分子化合物は scaffolds として骨形成の場を提供することは可能であるが、疎水性であることから細胞接着の足場にはなり得ず、骨芽細胞との共培養により骨形成能を持たせた合成高分子—細胞複合材料という将来性に欠けることが問題点としてあげられる。

今回、われわれは、scaffolds を PLGA に、また、細胞接着性をコラーゲンにより得るべく開発された PLGA・コラーゲン・ハイブリッドメッシュ（以下、ハイブリッドメッシュ）を用いて、成熟家兎の下顎骨における骨形成への影響ならびに培養株化細胞に対する影響について検討した。

【材料と方法】

骨空洞形成の実験には、月齢約 18 か月、平均体重約 3.0kg の健常な雄の家兎を用い、背部皮下移植の実験には 4 週齢の雄のマウスを用いた。

下顎骨骨空洞は、家兎の左下顎骨骨体部皮質骨を露出させ、近遠心距離 12mm、高さ 10mm の長方形に削除し、舌側皮質骨に達する深さ平均 4mm で形成した。最後に、相対する部位の骨膜を切除し、対照群ではそのまま軟組織で被覆し、実験群では骨空洞をハイブリッドメッシュで被覆した後に閉鎖創とした。

細胞培養ならびに細胞数計測の方法は、培養細胞にはマウス C57BL/6 由来の MC3T3-E1 細胞を用いた。MC3T3-E1 を 5×10^4 個/ml、または 2×10^4 個/ml に調整し、それぞれ 50 μ l ずつ 96well プレートに分注培養し、細胞数の測定は培養開始から 24 時間ごとに 7 日目まで行い、ATP 量で代用した。

次に、長期培養におけるハイブリッドメッシュの培養液に対する影響を調べた。1.5 $\times$ 1.5cm のサイズのハイブリッドメッシュを 10ml の α -MEM と D-MEM とにそれぞれに浸漬させ、0 日、10 日、20 日、26 日、34 日後の pH を pH メーターにて測定した。

【結果】

1) 家兎における下顎骨骨空洞の治癒過程

骨空洞形成 7 日目には、手術部位に対照群では治癒傾向を認めたが、ハイブリッドメッシュ使用群では手術部位に腫脹を認めた。

骨空洞形成から 10 日目の対照群では切除された骨膜外側からの軟組織の侵入が著明なのに対し、ハイブリッドメッシュ使用群ではハイブリッドメッシュが軟組織の侵入を防ぎ、本来の下顎骨の外形を保持していた。また、ハイブリッドメッシュに接する肉芽組織中には炎症細胞浸潤を認めた。

骨空洞形成から 30 日目では、対照群とハイブリッドメッシュ使用群ともに新生骨が形成され、対照群では骨空洞内への周囲軟組織の侵入により陥凹した形態で骨新生が行われていた。一方、ハイブリッドメッシュ使用群では、下顎骨の形態が保持されたまま骨形成が進み、ハイブリッドメッシュに接する部位では、炎症細胞浸潤は消退していた。

骨空洞形成から 60 日目では、ハイブリッドメッシュ使用群で、皮質骨ならびに骨髓の形態回復を伴う骨改造を認め、ハイブリッドメッシュに接する部位では皮質骨化していた。また、ハイブリッドメッシュは連続性を欠いておりハイブリッドメッシュの周囲に巨細胞を認めた。

2) マウスのハイブリッドメッシュに対する反応

家兎の下顎骨体部では、骨空洞形成後から 10 日目前後にハイブリッドメッシュ周囲組織に腫脹を伴い、組織学的にも炎症細胞の浸潤を認めたことからマウスでも同様の反応が起こるか確認した。ハイブリッドメッシュを c57/BL6 の背部皮下に移植したところ、移植後 7 日目、14 日目ともにハイブリッドメッシュ周囲の軟組織に炎症細胞の浸潤は認めなかった。

3) ハイブリッドメッシュの培養細胞に対する影響

ハイブリッドメッシュの株化培養細胞の増殖能に対する影響を検討した。ハイブリッドメッシュと c57/BL6 マウス由来の株化骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 をメッシュ上で培養したところ、MC3T3-E1 細胞はハイブリッドメッシュの存在下でも、細胞単独で培養しているのと同程度の増殖能を保っていた。

4) 長期培養におけるハイブリッドメッシュの培養液に対する影響

ハイブリッドメッシュの細胞の石灰化能に与える影響を検討するために、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 とハイブリッドメッシュを共培養した。

緩衝剤 NaHCO_3 を含む α -MEM を用いて培養していたところ、培養開始 25 日目頃より培養上清が黄色に変色した。培養上清の pH を測定したところ、培養上清の pH は経時的に低下していたため、より幅広い緩衝能を有する HEPES を含む DMEM に培養液を変更しハイブリッドメッシュのみを培養液に浸漬した。これにより、pH の低下は変曲点が延長する傾向がみられた。

【考察】

ハイブリッドメッシュは、骨空洞形成初期の家兎において炎症反応を惹起していたが、この反応はマウスでは認めなかった。骨空洞の治癒過程において周囲軟組織の骨空洞内への侵入を防止し、下顎骨の形態を維持したまま、治癒を可能にしていた。骨空洞形成から 60 日目には、ハイブリッドメッシュは連続性を欠き、溶解と吸収が生体内で行われていた。以上より、動物種によっては初期に炎症反応を惹起する可能性があるものの、骨形態を維持したまま治癒させる有用な生体材料になり得ると考えられた。

また、7 日間の共培養では、ハイブリッドメッシュは株化細胞の増殖能に影響を与えなかった。約 1 か月の長期培養では、培養液の pH の低下により細胞の培養は不可能であった。この、pH の低下はハイブリッドメッシュの分解によるものと考えられた。

【結論】

本研究により、PLGA・コラーゲン・ハイブリッドメッシュは、炎症反応を惹起する可能性があるものの、骨空洞という欠損に対して顎骨の形態を保持しながら骨を形成させるのに有用であること、ならびに培養細胞に対して増殖能に影響を与えない可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 田 村 正 人

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

家兎下顎骨骨空洞の治癒過程における PLGA・コラーゲン・ハイブリッドメッシュの 有用性の検討

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は以下の通りである。

現在、顎骨再建に使用されている合成高分子化合物は scaffolds として骨形成の場を提供することは可能であるが、疎水性であることから細胞接着の足場にはなりえず、細胞複合材料には適さない。本研究は、scaffolds として polylactic-co-glycolic acid (PLGA) をベースに、コラーゲンにより細胞接着性がえられるよう開発された PLGA・コラーゲン・ハイブリッドメッシュ（以下、ハイブリッドメッシュ）を用い、成熟家兎の下顎骨における骨形成への有効性ならびに培養株化細胞に対する影響について検討したものである。

骨空洞形成の実験には、月齢約 18 か月、体重約 3.0 kg の健常な雄の家兎を用い、左下顎骨体部に横 12 mm、高さ 10 mm、深さ 4 mm の骨空洞を形成し、骨膜切除後に、実験群では骨空洞をハイブリッドメッシュで被覆し、対照群ではそのまま軟組織で被覆し、閉創した。

骨空洞形成 7 日目、対照群では手術部位に治癒傾向を認めたが、実験群では手術部位に腫脹と肉芽組織を認めた。骨空洞形成 10 日目、対照群では切除された骨膜外側からの軟組織の侵入が著明なのに対し、実験群ではハイブリッドメッシュが軟組織の侵入を防ぎ、本来の下顎骨の概形を保持していた。また、ハイブリッドメッシュに接する肉芽組織中に炎症細胞浸潤を認めた。骨空洞形成 30 日目には、両群とも新生骨が形成されていた。対照群では、新生骨は骨空洞内への周囲軟組織の侵入により陥凹した形態であったが、実験群では下顎骨の形態が保持されていた。骨空洞形成 60 日目、実験群では、皮質骨ならびに骨髓への形態的な分化を伴う骨改造を認めた。また、ハイブリッドメッシュは連続性を欠き、周囲に巨細胞を認めた。このことは、生体内でハイブリッドメッシュの溶解と吸収が行われていることを示している。

家兎において骨空洞形成後 10 日目前後にハイブリッドメッシュ周囲組織に腫脹を生じ、組織学的にも炎症細胞の浸潤を認めたことからマウスでも同様の反応が起こるか否かを検討するため、4 週齢、雄の c57/BL6 マウス背部皮下にハイブリッドメッシュを移植し、経過を観察した。結果は、移植後 7、14 日目ともにハイブリッドメッシュ周囲の軟組織に異常を認めず、炎症細胞の浸潤も認めなかった。

株化培養細胞の増殖能に対するハイブリッドメッシュの影響を検討するため、c57/BL6 マウス由来の株化骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 をメッシュ上で培養し、培養開始から 24 時間ごとに 7 日目まで、細胞数を測定した。MC3T3-E1 細胞はハイブリッドメッシュの存在下でも、細胞単独で培養しているのと同程度の増殖能を保っていた。

次に、ハイブリッドメッシュの細胞の石灰化能に与える影響を検討するため、緩衝剤 NaHCO_3 を含む α -MEM を用いて、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 とハイブリッドメッシュとの長期間の共培養を試みた。培養開始 25 日目頃より培養上清が黄色に変色したため、培養上清の pH を測定したところ、培養上清の pH は経時的に低下していた。そこで、長期培養におけるハイブリッドメッシュの培養液に対する影響をしらべるため、ハイブリッドメッシュを 10 ml の α -MEM と、より幅広い緩衝能を有する HEPES を含む D-MEM とにそれぞれに浸漬し、34 日後までの pH を測定した。その結果、D-MEM において、pH の低下は変曲点が延長する傾向がみられた。

本研究により、ハイブリッドメッシュは、下顎骨空洞の治癒に関して、動物種によっては初期に炎症反応を惹起する可能性があるものの、骨形態を維持したまま治癒を可能とする有用な生体材料になりうることを示された。また、ハイブリッドメッシュと株化細胞の短期間の共培養では、株化細胞の増殖能に影響はみられないものの、長期間の共培養においては培養液の pH の低下への対策が不可欠なことが示された。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。

主な質問事項は、以下の通りである。

- 1) Scaffolds にコラーゲンを混在させる理由は、
- 2) PLGA とコラーゲンをメッシュ構造にした理由は、
- 3) ATP 量の測定法ならびに細胞数計測と ATP 量測定との関連について、
- 4) PLGA と PLLA の特徴と違いについて、
- 5) pH の低下における変曲点の延長とは、
- 6) ハイブリッドメッシュを臨床に応用するまでに解決すべき問題について、
- 7) 株化骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 が死滅した理由および取りうる対応策について、

いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、ハイブリッドメッシュは、下顎骨空洞の治癒に関して、骨形態を維持したまま治癒を可能とする有用な生体材料になりうることを示したことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。