

学位論文題名

Carbon Nanohorns Accelerate Bone Regeneration in Rat Calvarial Bone Defect

(カーボンナノホーンはラット頭蓋冠骨欠損部の骨再生を促進する)

学位論文内容の要旨

緒言

カーボンナノホーン(CNHs)は直径 2~5nm、長さ 40~50nm のカーボンナノ物質の一種であり、それらが数千集合して約 100nm の球状を呈している。CNHs はその様々な特性から、ドラッグデリバリーシステム(DDS)、光線力学療法、ガス吸蔵体、さらには燃料電池電極など医療分野を含めた様々な分野での応用が検討され研究が進められており、近年の研究において、CNHs は短期毒性が極めて低いことが報告されている。このように CNHs は生体への応用が期待されている材料の一つである。また、カーボンナノチューブは生体適合性、骨伝導性、高い細胞接着性を示すことが報告されており、さらにナノサイズの炭素繊維が骨芽細胞の機能を高めるという報告もなされている。このような状況をもとに、CNHs もまた骨適合性を示し、骨形成に有効なのではないかとの仮説を構築した。一方、Guided Bone Regeneration (GBR)法は骨再生を誘導する最も効果的な方法の一つとされており、Polytetrafluoroethylene(PTFE)膜は長い間 GBR 法に用いられており良好な結果を得ている。そこで本研究では CNHs の骨再生への影響、特に Guided Bone Regeneration(GBR)法への応用について検討した。

材料と方法

CNHs を 50%エタノールに分散し、吸引濾過装置を用いて PTFE 膜に固着した。この膜を CNHs/PTFE とし、加えて CNHs の量の評価を行うため、CNHs/PTFE 同士を擦り合わせるにより表面の余剰の CNHs を取り除いた膜(Scrubbed CNHs/PTFE)を作製した。10 週齢 Wistar 雄性ラット頭頂骨に直径 7mm の骨欠損を形成し、骨欠損部を CNHs/PTFE で被覆した群(CNHs/PTFE 群)、Scrubbed CNHs/PTFE で被覆した群(S-CNHs/PTFE 群)、PTFE 膜で被覆した群(PTFE 群)、および未処置で縫合のみ行った群(Control 群)の 4 群に分類した。術後 2 週および 8 週で周囲組織とともに試料を摘出し、軟 X 線による検

索、組織学的検索、組織計量学的検索および超微細構造学的検索を行った。

結果

軟 X 線撮影による検索において、CNHs を含む群は CNHs を含まない群と比較し、高い X 線不透過性を示した。2 週では、CNHs/PTFE 群の X 線不透過性が最も高い傾向を示した。X 線不透過部位は経時的に拡大し、8 週では、4 群間の差は減少していた。

組織学的検索において、2 週では CNHs/PTFE 群および S-CNHs/PTFE 群の膜周囲にわずかな炎症反応を伴う肉芽組織が認められたが、Control 群と PTFE 群ではほとんど炎症反応は認められなかった。新生骨は既存骨端から欠損部中心へ向かって形成されていた。CNHs/PTFE 群では膜に沿って CNHs を貪食した多数のマクロファージが観察された。PTFE 群においては、薄層の新生骨が膜に沿って形成され、その一部は PTFE 膜と直接接していた。Control 群では欠損部辺縁に新生骨が観察された。8 週では、2 週と比較して炎症反応は収束し、CNHs/PTFE 群および S-CNHs/PTFE 群においても一部で膜に固着した CNHs と新生骨が直接接していた。

組織計量学的検索において、2 週では、CNHs/PTFE 群は他群と比較して最も多い新生骨量、マクロファージ数を示し、S-CNHs/PTFE 群は CNHs/PTFE 群に次ぐ新生骨量、マクロファージ数を示した。CNHs/PTFE 群の新生骨量は Control 群、PTFE 群と比較して、S-CNHs/PTFE 群の新生骨量は PTFE 群と比較して有意に多かった。しかしながら 8 週ではすべての群間において差は見られなかった。また、CNHs/PTFE 群、S-CNHs/PTFE 群では 2 週、8 週の両方で PTFE 群、Control 群よりも有意に多いマクロファージ数を示した。8 週では、2 週と比較してマクロファージ数は減少していた。

8 週後の超微細構造学的検索において、CNHs/PTFE 群では軟組織中の CNHs が細胞に貪食されている像が観察され、骨組織部では CNHs が骨基質に封入されている像が観察された。

考察

本研究では、骨欠損部における CNHs の骨再生への影響と GBR 法への応用の可能性について評価した。2 週の CNHs を含む群では、膜に沿って軽微な炎症反応が認められ、CNHs を貪食したマクロファージが観察された。しかしながら、周囲組織に壊死、変性といった強い炎症性変化は見られなかった。また、8 週では、新生骨と CNHs が直接接している像が観察された。TEM 観察像では CNHs が骨基質に囲まれ、コラーゲン線維に近接して存在していることが認められた。これらの所見から CNHs の起炎性は低く、骨組織に対する適合性を有することが示唆された。

マクロファージは異物除去、貪食作用、抗原提示、さらに炎症性サイトカイ

ンの分泌など、免疫反応に携わっており、骨形成に良い影響を与えないという報告も多くなされている。一方、マクロファージが骨関連因子である TGF- β 、オステオポンチン、BMP-2などを産生するという文献もある。CNHs/PTFE 群では膜の周囲で活発な骨形成がみられるとともに、マクロファージや異物巨細胞などが観察された。CNHs/PTFE 群の新生骨量とマクロファージ数は他群と比較して多く、マクロファージ数が多い群では新生骨量も多かった。加えて、S-CNHs/PTFE 群は CNHs/PTFE 群と比してマクロファージ数が少なく、新生骨量も少なかったため、CNHs により遊走したマクロファージと新生骨形成の間に何らかの関連があることが推察された。

CNHs は様々な物質を内包、徐放できるため、骨形成を促進する薬剤、成長因子、タンパク等を担持させることにより、より多くの新生骨を得ることができると期待される。

結論

CNHs は起炎性が低く、初期の骨形成に有効であることが明らかとなり、GBR 法への応用の可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 山 敦 郎

副 査 教 授 網 塚 憲 生

副 査 准教授 飯 塚 正

学 位 論 文 題 名

Carbon Nanohorns Accelerate Bone Regeneration in Rat Calvarial Bone Defect

(カーボンナノホーンはラット頭蓋冠骨欠損部の骨再生を促進する)

審査は、主査、副査が一堂に会し、論文提出者が提出論文の内容の要旨を説明し、随時、論文の内容について審査委員の口頭試問を行った。以下に提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

論文要旨

カーボンナノホーン(CNHs)は直径 2-5nm、長さ 40-50nm のカーボンナノ物質の一種であり、それらが数千集合して約 100nm の球状を呈している。CNHs はその様々な特性から、医療分野を含めた様々な分野での応用が検討され研究が進められている。本研究では CNHs の骨再生への影響、特に Guided Bone Regeneration(GBR)法への応用について検討した。

CNHs を PTFE 膜に固着した膜を CNHs/PTFE とし、加えて余剰の CNHs を取り除いた膜(Scrubbed CNHs/PTFE)を作製した。ラット頭頂骨に直径 7mm の骨欠損を形成し、骨欠損部を CNHs/PTFE で被覆した群(CNHs/PTFE 群)、Scrubbed CNHs/PTFE で被覆した群(S-CNHs/PTFE 群)、PTFE 膜で被覆した群(PTFE 群)、および未処置で縫合のみ行った群(Control 群)の 4 群に分類した。術後 2 週および 8 週で試料を含めた周囲組織を摘出し、軟 X 線による検索、組織学的検索、組織計量学的検索および超微細構造学的検索を行った。

軟 X 線による検索において、2 週では、CNHs/PTFE 群の X 線不透過性が最も高い傾向を示した。8 週では、4 群間の差は減少していた。組織学的検索において、2 週では CNHs/PTFE 群および S-CNHs/PTFE 群の膜周囲にわずかな炎症反応を伴う肉芽組織が認められ、CNHs/PTFE 群では膜に沿って CNHs を貪食した多数のマクロファージが観察された。8 週では、炎症反応は収束し、CNHs/PTFE 群、S-CNHs/PTFE 群において一部で CNHs と新生骨が直接接していた。組織計量学的検索において、2 週における CNHs を含む群の骨形成量

およびマクロファージ数は、CNHs を含まない群と比較して有意に多かった。8 週では、マクロファージは減少し、膜に固着した一部の CNHs は、新生骨と直接接していた。超微細構造学的検索において、CNHs が骨基質に囲まれている像が観察された。

これらの所見から CNHs の起炎性は低く、骨組織に対する適合性を有することが示唆された。また、新生骨量とマクロファージ数の間に関連が見られたことから、CNHs により遊走したマクロファージと新生骨形成の間に何らかの関連があることが推察された。CNHs は起炎性が低く、初期の骨形成に有効であることが明らかとなり、GBR 法への応用の可能性が示唆された。

審査の内容

1. 欠損の作成方法、どこまで骨を削除したか

直径 7mm のトレフィンバーを用い、脳硬膜が観察できるまで骨削除を行った。

2. 欠損の大きさの設定理由について

7mm がクリティカルサイズと記載された文献が見られたため、今回 7mm と設定した。

3. 軟 X 線において正中が石灰化しないのは縫合の影響を受けているのか

Control 群においては縫合部軟組織の嵌入の影響が考えられるが、PTFE 膜を用いた群では、細胞は PTFE 膜を通過しにくいと考えられるので、影響はないと考えられた。

4. S-CNHs/PTFE 群の設定理由について

定量的ではないが、CNHs の量が少ないものとして群を設定した。

5. PTFE と Control に有意差がない理由

PTFE 膜を骨に接着あるいは固定していないので、骨形成のスペースが十分に確保されなかったことなどが考えられる。

6. CNHs が骨芽細胞に直接影響している可能性はあるか

細胞接着の面で良好な可能性はあるが、それ以上のことは本研究からはわからない。

本研究結果から、CNHs は初期の骨形成に有効であることが明らかとなり、GBR 法への応用が期待される。今後さらに研究を進めることにより臨床に応用しうると考えられ、将来性の点についても高く評価されるものであった。よって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。