The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	新規有機・無機複合体の骨再生足場材料としての評価
Author(s)	須澤, 佳香
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49755
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【5】

氏　　名	須　澤　佳　香（すざわ　よしか）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２２８２７　号
学位授与年月日	平成21年３月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学　位　論　文　名	**新規有機・無機複合体の骨再生足場材料としての評価**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　由良　義明 （副査） 教　授　荘村　泰治　　准教授　中村　隆志　　講　師　前田　隆史

論　文　内　容　の　要　旨

[研究目的]

骨の再生には，骨形成細胞が接着・増殖・分化できる足場となる生体材料の構築が必要不可欠である。そのため，より生体骨に近い力学的性質と生物学的親和性，生体内吸収性や成形性に優れた骨再生材料の開発が望まれている。近年，高い骨伝導性を有するハイドロキシアパタイト（HA）あるいは細胞親和性や吸収性に優れた炭酸カルシウム（$CaCO_3$）と，有機高分子で天然由来のアガロースとを複合化させる研究によって，新規の骨再生足場材料としての有機-無機複合体が創製された。

本研究では，これら HA-アガロースゲル複合体（HA gel）及び $CaCO_3$-アガロースゲル複合体（$CaCO_3$ gel）の骨再生足場材料としての有用性を検討するため，骨欠損モデルに埋植した in vivo における骨再生効果と，骨髄由来間葉系幹細胞を用いた in vitro における培養細胞に対する効果について評価を行った。

[材料と方法]

1. HA gel と $CaCO_3$ gel は交互浸漬法にて調製した。X 線回折装置で結晶構造解析を行い，走査電子顕微鏡（SEM）にて表面性状を観察した。圧縮試験による強度測定や，含有カルシウムとリンの定量のほか，ウサギ大腿骨骨欠損モデルを用いた生体内における材料の吸収分解性の市販品との比較を行った。
2. 6 週齢雄ラットの頭蓋骨骨欠損モデルを用い，円柱型の骨欠損を作製して，HA gel, $CaCO_3$ gel, Agarose gel（アガロースゲル単体）を Disk 型（円形ディスク型の固形状）あるいは Homogenized 型（ホモジナイズしてペースト状にしたもの）として埋植した。また Defect（欠損のみ）も作製し，実験群はそれぞれの材料と形状による 6 群に，欠損のみを加えて計 7 群とした。
3. 埋植処置後，経時的に組織検体を採取し，以下の解析を行った。
   1) μ-CT 撮影と画像の三次元構築を行い，欠損作製部の骨再生状態を観察した。
   2) 面積骨密度測定装置 DEXA 及び体積骨密度測定装置 pQCT により，再生骨の骨量を測定した。
   3) 微小領域 X 線回折装置μ- XRD により，再生骨の生体アパタイト結晶の配向性を測定した。
   4) 組織検体をホルマリンで固定後，脱灰して薄切切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン（H-E）染色にて観察した。またエタノールで固定後，非脱灰研磨標本を作製し，酒石酸耐性酸性ホスファターゼ（TRAP）染色にて観察した。
4. ラットの大腿骨から採取した骨髄細胞の初代培養細胞（MSC）をプラスチックプレートあるいは 3 種類のゲルディスク上で培養し，DNA 量測定や Live&Dead 染色，ルシフェラーゼ反応を用いたアデノシン三リン酸(ATP)の定量，pNPP 基質法によるアルカリホスファターゼ(ALP)活性測定，ELISA 法によるオステオカルシン(OC)発現量の定量，ALP 染色を行った。

[結果]

1. 調製した材料を解析したところ，HA および $CaCO_3$ と Agarose gel の有機-無機複合体であった。ウサギ大腿骨モデルでは HA gel, $CaCO_3$ gel は 4 週でほぼ完全な消失と骨梁の回復がみられたが，市販品は 8 週後も残存した材料の不透過性が顕著であった。
2. ラット頭蓋骨モデルでは HA gel, $CaCO_3$ gel はともに埋植直後の画像ではいずれも透過像であったが，経時的に骨再生像が出現し不透過度は増加した。8 週後に Defect と比較すると不透過性に顕著な差がみられた。
3. DEXA と pQCT 解析の結果，経時的に再生骨量の増加がみられ，8 週後の比較では HA gel, $CaCO_3$ gel はともに Defect よりも高値であった。HA gel においては Disk 型の方が Homogenized 型よりも高値であった。
4. 再生骨の生体アパタイト結晶の配向性測定による骨質評価の結果，HA gel, $CaCO_3$ gel ともに処置後 4 週から 8 週にかけて上昇し，8 週後ではいずれも Defect より高値であった。
5. 病理組織学的には HA gel, $CaCO_3$ gel ともに 4 週で脈管や伸展する骨新生架橋像，類骨組織等が観察され，8 週後にはほぼ治癒が完了した。明らかな骨リモデリング像はみられなかった。
6. プラスチックプレート上で正常に増殖，分化を示した MSC をゲル上に播種し，Live&Dead 染色と ATP 量測定を行ったところ HA gel, $CaCO_3$ gel の方が Agarose gel よりも増殖性が高く，また ALP 活性，OC 発現量，ALP 染色性についても同様であった。

[考察と結論]

調製したHA gel, $CaCO_3$ gelの結晶構造解析とSEM像から，有機-無機複合体の形成が確認された。市販品と比較したところ生体内吸収性はHA gel, $CaCO_3$ gelの方が高く，早期の分解消失と生体骨への置換がみられた。埋植実験の結果，処置直後のX線像はHA gel, $CaCO_3$ gelともに透過像であったが，骨形成に伴ってその不透過性の増加を示し，Defectよりも骨再生に有利に働くと考えられた。それらの生体アパタイト結晶の配向性は処置後4週から8週にかけて上昇し，欠損部の再生が新生骨組織の充填とともに，配向性の回復も進行していることが示唆された。組織学的にも4週で新生骨の架橋像や類骨組織の形成が見られ，活発な骨再生の進行がうかがえた。実際のあらゆる臨床症例に対応するため，埋植形状を変化させて比較したところ，4週以降ではHA gelが$CaCO_3$ gelよりも骨量が多く，HA gelでは特にDisk型の方がHomogenized型よりも高値を示す傾向があった。また，HA gelと$CaCO_3$ gelはともにAgarose gelよりも培養骨髄細胞の接着性，増殖性を向上させ，骨への分化や分化速度を促進させると考えられた。

以上より，HA gel及び$CaCO_3$ gelは，ともに細胞親和性を備えた充填型の新規骨再生足場材料であることが示された。また，埋植形状にかかわらず骨再生効果が確認されたことから，それぞれの埋植環境や適用症例に応じて自由に形状を付与できる材料として，歯科口腔外科分野における臨床現場での有用性が高いことが期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究はハイドロキシアパタイト-アガロースゲル複合体と炭酸カルシウム-アガロースゲル複合体の生体材料としての特性について検討したものである。その結果，これらの複合体は生体において容易に吸収され，埋植形状に関わらず骨欠損部で骨再生を進行させ，培養系では骨髄由来間葉系幹細胞の増殖，骨芽細胞への分化ならびに骨形成を促すことを明らかにした。

以上の研究結果は，本複合体の新規骨再生足場材料としての有用性を示唆するものであり，博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。