The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	細胞足場材料およびbasic fibroblast growth factor徐放性担体としての新規有機無機複合体材料の有用性
Author(s)	水田, 法彦
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58464
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

【11】

氏　　名	水　田　法　彦（みず　た　のり　ひこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２４４６８　号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 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	細胞足場材料およびbasic fibroblast growth factor徐放性担体としての新規有機無機複合体材料の有用性
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　由良　義明 （副査） 教　授　村上　伸也　　教　授　今里　　聡　　講　師　松本　卓也

論　文　内　容　の　要　旨

【緒言】

炎症や腫瘍、外傷、あるいは先天性奇形などの様々な口腔疾患に伴う骨欠損に対し、骨移植が必要となるが、自家骨移植に替わりうる生体材料の一つとして開発された新規有機無機複合体材料である Hydroxyapatite-Agarose composite gel(HA gel)、$CaCO_3$-Agarose composite gel(Ca gel)は、生体親和性、分解吸収性、操作性に優れ、良好な骨伝導性を有することがこれまでの研究により明らかにされてきた。本研究では、周囲からの骨再生が困難な環境下において、より効率的に骨再生を促進する方法の確立を目的に、この新規有機無機複合体材料の、骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)の足場材料、あるいは basic fibroblast growth factor(bFGF)徐放性担体としての有用性の評価を行った。

【材料と方法】

1. 有機無機複合体材料の調製：Disk 型の Agarose gel(Aga gel)から、交互浸漬法により HA gel、Ca gel を調製した。
2. MSC 採取、gel 上での培養：ラット大腿骨より骨髄細胞を採取し、初代培養後に T75 フラスコ底面に接着している MSC を回収し、gel 上に $5x10^4$ cell/gel 播種し、培養した。
3. gel 上での MSC の接着、増殖、骨分化能の評価：gel 上に MSC を播種し、Live&Dead 染色で gel に接着した生細胞を染色し、走査電子顕微鏡(SEM)により細胞接着像を観察した。増殖については、MSC を播種した gel を骨分化誘導培地下で培養し、アデノシン三リン酸(ATP)の定量を行い、骨分化能はアルカリフォスファターゼ(ALP)活性、オステオカルシン(OC)発現量の測定により評価した。
4. ラット頭蓋骨への MSC 生着 gel の埋植実験：HA gel あるいは Ca gel 上に、$1x10^7$ cell/gel の MSC を播種し、ラットの頭蓋骨全層骨欠損部へ細胞播種面が脳硬膜側になるように埋植したものを細胞移植群(MSC+)とし、gel のみを材料単独群(MSC−)とした。埋植 4、8 週後に頭蓋骨を摘出し、解析用検体とした。
5. gel の bFGF 担持能および徐放能の評価：gel を 10 μg/ml の bFGF 溶液中に含浸させた後に PBS 溶液中へ移し、経時的に gel を取り出して gel 中の bFGF 濃度を ELISA 法により測定した。さらに、経時的に採取した上清中の bFGF 濃度を測定し、各 gel の bFGF 担持能および徐放能を求めた。
6. ラット頭蓋骨への bFGF 含浸 gel の埋植実験：HA gel あるいは Ca gel を、100 μg/ml の bFGF 溶液中へ含浸させ、ラット頭蓋骨全層骨欠損部へ埋植したものを bFGF 含浸群(bFGF+)、gel のみを材料単独群(bFGF−)とした。埋植 4、8 週後に頭蓋骨を摘出し、解析用検体とした。
7. ラット頭蓋骨の画像解析および組織標本の解析：画像解析として、再生骨の定性評価は μCT 撮影、骨量評価は体積骨密度測定装置(pQCT)にて行い、骨質の指標となる生体アパタイト結晶の配向性は微小領域 X 線回折装置(μXRD)にて測定した。H-E 染色により組織像を観察し、組織像より再生骨の面積を測定した。

【結果】

1. gel 上での MSC の接着、増殖、骨への分化能の評価

gel 上への MSC 播種翌日に Live&Dead 染色を行ったところ、HA gel、Ca gel ともに多数の接着した生細胞が観察された。培養 21 日目の SEM 像より、HA gel、Ca gel ともに、gel 表面に接着した細胞が、周囲に突起を伸ばした像が観察された。ATP 量は、Aga gel ではほとんど変化が認められなかったのに対し、HA gel、Ca gel では経時的な増加が認められた。ALP 活性は、Aga gel と比較し、HA gel、Ca gel では培養 14 日目以降で高く、OC 発現量は、Aga gel と比較し、HA gel では培養 21 日目以降、Ca gel では 14 日目以降で有意に高値を示した。

2. ラット頭蓋骨への MSC 生着 gel の埋植実験

μCT 撮影では、埋植後 4 週の時点で MSC−群、および欠損のみの群(Defect)に比較して MSC+群では X 線不透過像の占める割合は大きく、8 週ではさらに不透過性の亢進を認めた。pQCT による再生骨量の測定、μXRD による配向性の測定でも、MSC+群は、MSC−群、Defect 群に比較して、埋植後 4 週および 8 週共に有意に高値を示した。組織像においては、埋植後 4 週では MSC+群で脳硬膜側からの新生骨の形成を認め、8 週では欠損部の大半は新生骨で満たされた。MSC−群では辺縁からの骨形成が主体をなしており、骨面積の割合においても有意差を認めた。

3. gel の bFGF 担持能および徐放能の評価

gel の経時的な bFGF 担持量を比較したところ、Aga gel では 7 日目で担持量がほぼ 0 になったのに対し、HA gel、Ca gel では 21 日目まで緩やかに減少した。上清中の bFGF 濃度においても同様の経時的変化を認めた。

4. ラット頭蓋骨への bFGF 含浸 gel の埋植実験

μCT 撮影では埋植後 4 週、8 週共に、bFGF－群に比較し bFGF+群では不透過像の占める割合は大きかった。pQCT による再生骨量の測定においても、bFGF+群で有意に高値を示した。組織像では、欠損辺縁からの骨新生を認めた。

【結論】

HA gel、Ca gel 上で MSC は良好な細胞接着・増殖性を示し、骨への分化も促進されたことから HA gel、Ca gel は細胞足場材料として適しており、また、bFGF の担持能、徐放能も有することから bFGF の徐放性担体としても適した生体材料であるといえる。以上のことから、HA gel、Ca gel に MSC あるいは bFGF と材料を組み合わせることで、より効率的な骨再生が期待できる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、新規有機無機複合体材料である Hydroxyapatite-Agarose composite gel および $CaCO_3$-Agarose composite gel を用いて、より効率的な骨再生治療の方法を確立しようとしたものである。その結果、これらの材料は、骨髄由来間葉系幹細胞の足場材料、あるいは basic fibroblast growth factor の徐放性担体として機能し、骨再生効果を高めることが示された。

以上の研究結果は、この新規有機無機複合体材料が顎顔面領域の骨再生治療において様々な症例に応用できることを示唆するものであり、博士（歯学または学術）の学位論文として価値のあるものと認める。