

授与番号	甲第 357 号
------	----------

論文内容の要旨

Preparation of Collagen/Hydroxyapatite Composites Using the Alternate Immersion Method and Evaluation of the Cranial Bone-Forming Capability of Composites Complexed with Acidic Gelatin and b-FGF

交互浸漬法によるコラーゲン/アパタイト複合体の作製と酸性ゼラチンおよび b-FGF と複合化した複合体の頭蓋骨形成能の評価

(materials 第 15 巻、第 24 号 8802、令和 4 年 12 月)

ほし みき
星 美貴

I. 研究目的

口腔インプラント治療において、コラーゲン系材料は骨補填材として顎骨の再生に多用されている。近年は、アパタイトや成長因子の配合により骨形成の促進が試みられている。今回、歯科臨床での使用頻度の高い塩基性線維芽細胞増殖因子(b-FGF)を含む4元系骨補填材の開発を目的として、コラーゲン・アパタイト・酸性ゼラチン製顆粒を自家調製し、b-FGFを配合して、ラット頭蓋欠損部に埋入し骨再生効果に関する検討を加えた。なお、4元系のうち、アパタイトと酸性ゼラチンは、b-FGFの担持・徐放に有効なキャリアーと考えられている。

II. 研究方法

1. 顆粒の調製：10%医療用コラーゲン(NMP、日本ハム)を凍結乾燥(-85°C12h)後、脱水熱架橋(真空、135°C、24h)によりコラーゲンスポンジとした。そのコラーゲンスポンジをCaCl₂水溶液とNa₂HPO₄水溶液に交互に浸漬後、真空下56°C48h加熱しアパタイトを析出させた。浸漬時間は20分5回と60分5回とした。一方、酸性ゼラチン(新田ゼラチン)溶液を2官能エポキシ架橋剤(EX-810、ナガセ化学)で4°C72h化学架橋し、自作コラーゲン・アパタイト体に含浸させ顆粒(0.5~1.0mm)とした。その後、b-FGF製剤(科研製薬;b-FGF10 μ g)を顆粒に4°C1h吸収させた。試料にはコントロールとしてアパタイトなしの酸性ゼラチンの含浸のみも含めた。
2. 物性評価：形態と化学組成をSEM/EDSで、結晶状態をXRDで、有機官能基をFTIRで分析した。試料表面の形態観察と化学分析は酸化オスミウムをコーティング後にSEM(SU8010、日立)、EDS(JSM-7100F、JEOL)を行った。FTIRはATR法で行った。3種類の顆粒の密度とb-FGF吸収量を浸漬前後の重量測定より計測した。
3. 動物実験：10週齢の雄性Wistarラットの頭蓋骨に直径6mmのトレフィンバーを用いて骨欠損部を形成し、3材料(20分5回、60分5回、含浸のみ)を埋入した(各群n=6)。コントロールとして欠損のみの実験も行った。8週後、軟エックス線撮影によって骨形成の程度を評価した。脱灰標本にはHE染色を行い、非脱灰標本にはVillanueva染色と蛍光染色(TC、CL)(処分3週間~2日前)を施し骨再生の状態を観察した。

III. 研究成績

1. 理工学的評価：SEM/EDS 観察から、帯状の小結晶がコラーゲン上に析出し主たる化学成分が Ca と P であることが明らかとなった。XRD から、結晶は低結晶性アパタイトであることが判明した。FTIR からはアパタイトのリン酸基と水酸基及びコラーゲンのアミド基が確認された。顆粒の密度は 60 分 5 回試料が最大で 20 分 5 回試料が続き、含浸のみが最小であった。ラットの欠損部相当部位での b-FGF 配合量は $5\mu\text{g}$ 程度であることが判明した。
2. 動物実験：欠損部における骨再生は、軟エックス線画像上の不透過像の差異(濃淡)によって評価でき、骨延長部や島状骨形成が判別された。ImageJ(NIH)を用いた画像解析から、20 分 5 回試料の不透過度が最大(111)であり、欠損のみの不透過度(53)より有意に大きい($p < 0.05$)ことが明らかとなった。60 分 5 回試料(86)と交互浸漬なし(83)には、有意差のある組み合わせはなかった。組織学的観察において、残存試料の存在が非脱灰標本では一部確認できた。新生骨の形成、特に骨延長は非脱灰標本と脱灰標本の双方で確認された。非脱灰標本での TC と CL の蛍光像は骨形成を動的に明示した。20 分 5 回試料は骨延長を有意に促進していた。

IV. 考察及び結論

1. 調製したコラーゲン・アパタイト複合体は理工学的評価により低結晶アパタイトを配合し骨伝導性に優れることが示唆された。低結晶アパタイトは溶解性が高く、骨と置換しやすいと思われる。酸性ゼラチンを含浸すると b-FGF の配合が効率的となることが確認された。酸性ゼラチンの含浸は、また、析出アパタイト結晶のコラーゲン表面からの剥離防止に役立つと考えられた。
2. 動物実験より、コラーゲン・アパタイト・酸性ゼラチン・bFGF 顆粒による欠損部における骨形成は、骨端からの骨延長か、骨端前方での島状小片骨形成のいずれかであった。これらは膜性骨化の特徴であり、時間経過とともに既存骨と融合すると考えられた。
3. bFGF の役割としては血管新生の亢進や、間葉系幹細胞の増殖と分化であり、アパタイトと酸性ゼラチンに効果的に保持されたと思われた。生体吸収を促進し骨組織の再生を促進できる可能性がある。作製したコラーゲン・アパタイト・酸性ゼラチン・bFGF 顆粒は低結晶アパタイトを多く含み、かつ b-FGF は酸性ゼラチンから徐放されるため、この顆粒には高い骨伝導能と生体吸収性が期待されることが示唆された。20 分 5 回顆粒が最大の骨形成傾向を示したのは b-FGF の保持と徐放が最も効率的であったためと生体のアパタイトの吸収が適度であったためと推察された。

以上のように今回調製したコラーゲン・アパタイト・酸性ゼラチン複合体に b-FGF を配合したコンストラクトは新規骨補填材に応用可能と思われ、インプラント治療や口腔外科での治癒成績の向上に資すると推察された。

論文審査担当者

- 主査 山田 浩之 教授 (口腔顎顔面再建学講座 口腔外科学分野)
副査 近藤 尚知 教授 (補綴・インプラント学講座 補綴・インプラント学分)
副査 平 雅之 准教授 (医療工学講座)

論文審査の結果の要旨

口腔インプラント治療において、コラーゲン系材料は骨補填材として顎骨の再生に多用されている。近年は、アパタイトや成長因子の配合により骨形成の促進が試みられている。今回、歯科臨床での使用頻度の高い塩基性線維芽細胞増殖因子(b-FGF)を含む4元系骨補填材の開発を目的として、コラーゲン・アパタイト・酸性ゼラチン製顆粒を自家調製後、b-FGFを配合して4元系ハイブリッド型骨補填材を調製した。ラット頭蓋欠損部に、調整した骨補填材を埋入し、骨再生効果に関する検索を行った。なお、4元系のうち、アパタイトと酸性ゼラチンは、b-FGFの担持・徐放に有効なキャリアーと考えられている。

本研究においては、下記の3つの実験を行っており、材料と方法、結果、考察と結論の順に要旨を述べる。

1. 顆粒の調製と物性の評価：10%医療用コラーゲン(NMP、日本ハム)を凍結乾燥(-85℃、12h)後、脱水熱架橋(真空、135℃、24h)によりコラーゲンスポンジとした。そのコラーゲンスポンジをCaCl₂水溶液とNa₂HPO₄水溶液に交互に浸漬後、真空下56℃、48h加熱しアパタイトを析出させた。浸漬時間は20分5回と60分5回とした。一方、酸性ゼラチン(新田ゼラチン)溶液を2官能エポキシ架橋剤(EX-810、ナガセ化学)で4℃、72h化学架橋し、自作コラーゲン・アパタイト体に含浸させ顆粒(0.5~1.0mm)とした。その後、b-FGF製剤(科研製薬、b-FGF 10 μg)を顆粒に4℃、1h吸収させた。試料にはコントロールとしてアパタイトなしの酸性ゼラチンの含浸のみも含めた。形態と化学組成をSEM/EDSで、結晶状態をXRDで、有機官能基をFTIRで分析した。試料表面の形態観察と化学分析は酸化オスミウムをコーティング後にSEM(SU8010、日立)、EDS(JSM-7100F、JEOL)を行った。FTIRはATR法で行った。3種類の顆粒の密度とb-FGF吸収量を浸漬前後の重量測定より計測した。
2. 動物実験：10週齢の雄性Wistarラットの頭蓋骨に直径6mmのトレフィンバーを用いて骨欠損部を形成し、3材料(20分5回、60分5回、含浸のみ)を埋入した(各群n=6)。コントロールとして欠損のみの実験も行った。8週後、軟エックス線撮影によって

骨形成の程度を評価した。脱灰標本には HE 染色を行い、非脱灰標本には Villanueva 染色と蛍光染色 (TC、CL) (処分 3 週間～2 日前) を施し骨再生の状態を観察した。

1. 顆粒の理工学的評価：SEM/EDS 観察から、帯状の小結晶がコラーゲン上に析出し主たる化学成分が Ca と P であることが明らかとなった。XRD から、結晶は低結晶性アパタイトであることが判明した。FTIR からはアパタイトのリン酸基と水酸基及びコラーゲンのアミド基が確認された。顆粒の密度は 60 分 5 回試料が最大で 20 分 5 回試料が続き、含浸のみが最小であった。ラットの欠損部相当部位での b-FGF 配合量は 5 μ g 程度であることが判明した。
2. 動物実験：欠損部における骨再生は、軟エックス線画像上の不透過像の差異(濃淡)によって評価でき、骨延長部や島状骨形成が判別された。ImageJ (NIH) を用いた画像解析から、20 分 5 回試料の不透過度が最大(111)であり、欠損のみの不透過度(53)より有意に大きい ($p < 0.05$) ことが明らかとなった。60 分 5 回試料(86)と交互浸漬なし(83)には、有意差のある組み合わせはなかった。組織学的観察において、残存試料の存在が非脱灰標本では一部確認できた。新生骨の形成、特に骨延長は非脱灰標本と脱灰標本の双方で確認された。非脱灰標本での TC と CL の蛍光像は骨形成を動的に明示した。20 分 5 回試料は骨延長を有意に促進していた。
1. 顆粒の評価：調製したコラーゲン・アパタイト複合体は理工学的評価により低結晶アパタイトを配合し骨伝導性に優れることが示唆された。低結晶アパタイトは溶解性が高く、骨と置換しやすいと思われる。酸性ゼラチンを含浸すると b-FGF の配合が効率的となることが確認された。酸性ゼラチンの含浸は、また、析出アパタイト結晶のコラーゲン表面からの剥離防止に役立つと考えられた。
2. 動物実験：コラーゲン・アパタイト・酸性ゼラチン・b-FGF 顆粒による欠損部における骨形成は、骨端からの骨延長か、骨端前方での島状小片骨形成のいずれかであった。これらは膜性骨化の特徴であり、時間経過とともに既存骨と融合すると考えられた。b-FGF の役割としては血管新生の亢進や、間葉系幹細胞の増殖と分化であり、アパタイトと酸性ゼラチンに効果的に保持されたと思われた。生体吸収を促進し骨組織の再生を促進できる可能性がある。作製したコラーゲン・アパタイト・酸性ゼラチン・b-FGF 顆粒は低結晶アパタイトを多く含み、かつ b-FGF は酸性ゼラチンから徐放されるため、この顆粒には高い骨伝導能と生体吸収性が期待されることが示唆された。20 分 5 回顆粒が最大の骨形成傾向を示したのは b-FGF の保持と徐放が最も効率的であったためと生体のアパタイトの吸収が適度であったためと推察された。

上記より導きだされた結論は、コラーゲン・アパタイト・酸性ゼラチン複合体に b-FGF を配合したコンストラクトは、骨形成を促進する新規骨補填材として臨床応用可能であることが示唆され、インプラント治療や口腔外科での治癒成績の向上に資すると推察され、さらに今後の補綴歯科学の発展に大いに貢献するものと考えられ、本論文は学位論文に値すると評価した。

試験・試問結果の要旨

本研究の内容について、本人からの説明を受け質問を行った。また、今後の研究の展開並びに関連する基本事項についても試問を行い、適切かつ十分な回答を得られたことから、学位に値する十分な学識と研究能力を有するものと認めた。

主査・副査から星に対して、多くの質問があり、下記のような質疑応答が行われた。

山田主査：現在使われている骨補填材の Bio-0ss の特徴や問題、また自作顆粒との比較は？

答：Bio-0ss は臨床でよく使用されている骨補填材である。牛骨を 300 °C 以上 16 時間以上で高温焼成させた脱タンパク・アパタイトであり、ほぼ生体非吸収性である。ゆえに生体内残存期間が長く、感染のリスクもある。一方、自作顆粒は 56 °C という低温で焼成しているためコラーゲン基質を多く残し、生成アパタイトが低結晶であることから生体内吸収速度が早く、骨置換の効率に優れていることが特徴である。

山田主査：生体組織工学の 3 要素中の一つの成長因子で b-FGF を使用した理由は？

答：成長因子の歯科臨床での認可は極めて少なく、b-FGF を含むリグロスが歯周外科で使用されているのみである。手続きをすればインプラントの骨造成のためにも b-FGF を含む生体材料の使用が可能である。骨欠損部に b-FGF が作用することで、血管新生、創傷治癒、間葉系幹細胞の増殖から骨系分化、骨芽細胞による骨基質の分泌と石灰化により骨組織形成が行われるため、b-FGF に間接的な骨形成促進作用があると言えるため使用した。

山田主査：b-FGF は悪性腫瘍を増大させないか？

答：今回の試料に配合した量は 3.5~5 μg と少ない量であったので、悪性腫瘍の増悪の懸念はないと考える。また、今回使用した b-FGF 製剤の添付文書にも使用の際に悪性腫瘍の発現はなかったと報告されている。ただし、使用量が非常に多い場合は、血管新生能の亢進から悪性腫瘍の増大を否定できないと思われる。

山田主査：作製アパタイトの低結晶性はどのデータから言えるのか？

答：XRDの回折パターンピークの乱れから判断できる。結晶性が高いと $2\theta = 10$ 度から70度で20個程度のシャープなピークを有する反面、結晶性が低くなると12個程度の不明瞭なピークに変化する。ピークのシャープさを判別する主ピークは26度と32度である。さらに結晶性を精査する追加実験としては透過電子顕微鏡観察と電子線回折を行うことができ、アパタイトの結晶性を結晶学的に調べる方法もある。高結晶性であると明確な水玉模様の電子線回折像が認められ、低結晶になるとハロー状の電子線回折像が認められる。

山田主査：酸性ゼラチンの使用理由は、あるいは酸性ゼラチンでないといけない理由は？

答：酸性ゼラチンはb-FGFを担持、徐放するのに必要であり、京都大学再生医科学研究所の田畑教授の一連の研究からも証明されている。等電点が高い酸性ゼラチン(pI = 5)は、等電点が高いb-FGF(pI = 9.6)と電荷的結合をし、酸性ゼラチンが体内のゼラチナーゼによって分解されることに伴いb-FGFを徐放し、各種薬理効果(血管新生、幹細胞の増殖と分化、骨形成)を発揮する。(pI: Isoelectric point、等電点)

山田主査：酸性ゼラチン含浸後、アパタイト粒子は見えないのか？どこにあるのか？

答：コラーゲン・アパタイト複合体の表面を酸性ゼラチンが完全に覆っているため、複合体表面に析出したアパタイトをSEMによって観察することができなかった。しかし、析出アパタイトがコラーゲン・アパタイト複合体表面に完全に存在し、含浸した酸性ゼラチンに覆われている。

山田主査：b-FGF量の2材料内測定で、20分交互浸漬試料はばらつきが少ないが、Co1のみと60分交互浸漬試料ではばらつきが多いのはなぜか？

答：切り出し方によって材料の密度や析出アパタイトの分布に影響を受けたためと思われる。20分交互浸漬試料の偏差が60分交互浸漬試料よりも少なかったのは、前者で析出アパタイトの分布と量がより近似したためと思われる。Co1のみで偏差が大きかったのはコラーゲンスポンジの内部の気孔の大きさと分布の影響と思われる。

山田主査：動物実験で骨欠損部上の粒子の上に見えるものはメンブレンか？メンブレンは必要なのか？

答：自作コラーゲン製メンブレンである。コラーゲン原液を中和し、2官能性エポキシ架橋剤であるエチレングリコールジグリシジルエーテルで架橋し、凍結乾燥によってメンブレンとしている。メンブレン使用により、上皮の侵入防止、顆粒脱落防止、オペ部位の出血抑制、創傷治癒促進、感染防止、Ratによるオペ部位の損傷防止等が期待できる。

山田主査：軟X線測定での Grey Value とは何処で何を測定したのか？

答：軟X線像において初期の骨欠損部（相当部）の領域内の白化度を、ImageJというソフトを使用し計測することで新生骨形成量を測定した。骨化の進展に伴い、白化度は比例的に増加する。

山田主査：Villanueva 染色を用いる理由は？

答：Villanueva 染色は非脱灰組織切片において行われる標準的な染色法であり、多色かつ組織内での部位を明示することができる。

山田主査：20分交互浸漬の試料が60分交互浸漬の試料よりも骨形成量が良かった理由を粒径が大きい、低結晶性のためとしているが説明に矛盾はないか？

答：20分交互浸漬試料の方が60分交互浸漬試料に比べアパタイト粒径が小さく、結晶性も低く、また析出量も少ないのでより早く生体内に吸収され、骨形成の増加を生じたと類推される。

近藤副査：Villanueva 染色で既存骨と類骨の違いは何か？

答：Villanueva 染色では既存骨は茶色、新生骨は白色、類骨は紫から黒色、細胞核は青色に染色されるため区別が可能である。

近藤副査：蛍光染色で2本線、4本線がでる違いはなぜか？

答：2種類の蛍光顕微鏡を使用したため2本線（カルセインのみ）と4本線（テトラサイクリンとカルセインの2種）の違いがでた。顕微鏡の励起波長と発光波長の違いによって2本線と4本線の違いがでた。2本線が得られる顕微鏡では明視野像と2本線の蛍光像が得られ、4本線が得られる顕微鏡では4本線のみの蛍光像が得られた。同じ視野でも、2種類の蛍光顕微鏡を使用し、骨形成の組織像を詳細に解析している。

近藤副査：幹細胞から骨が出るシーマ（模式図）で、4 元系材料・薬剤の効果は付加的なのか？それとも複合効果で効果が減じることもあるのか？

答：おそらく付加的であると思われる。相乗効果で骨形成能が向上していると考える。減弱させることはないと思われる。b-FGF の担持・徐放については酸性ゼラチンが最も効果的であり、アパタイト（低結晶ナノアパタイト）が続き、コラーゲンマトリックスが最小の効果を有し、3 材料が付加的に骨形成を誘導すると思われる。

近藤副査：作製した顆粒が臨床応用されているものや過去に研究されたものよりも良いものでないと採用されない。成績を上げてほしい。

答：現状は同等であると考えている。現在の材料（顆粒）は 8 週埋入後にはかなり消失し、骨形成効果は長期持続していなかった。材料が 12 週まで残存し、成長因子を徐放し続けると骨形成効果の向上が期待できる。そのため、コラーゲンや酸性ゼラチンといった足場材料の架橋率を上げ、アパタイトと複合化させた新規コンストラクトを作り、より骨形成能を上げたいと考える。

平副査：動物実験で骨膜を利用した実験ができなかったか考察してください。

答：骨膜縫合を丁寧にやれば可能と思われ、今後、検討する。

平副査：b-FGF による膜性骨化について説明してください。

答：膜内骨化は頭蓋冠、上顎骨、下顎骨、鎖骨の形成様式であり、この方式でできた骨を付加骨という。

b-FGF が欠損部に作用することにより、未分化間葉系幹細胞が増殖し、幹細胞の骨系分化が起こり、その後骨芽細胞が増殖する。増殖した骨芽細胞は骨基質の分泌を行いそれが石灰化し、骨組織形成が起こる。このほかにも骨膜下にある骨前駆細胞が分化し骨形成が行われることもある。このような骨系分化は MAPK カスケードによるとされている。膜性骨化は骨欠損部において島状骨を形成するのが特徴である。

平副査：論文の日本語訳で複合体が三度も出てきて奇異なので 2 つ目の複合体は混合や配合に訂正するのが望ましい。

答：そのように直したいと思います。

平副査：1か所の図でb-FGFはb-FGF配合水溶液（薬剤）に表現を修正する方が良い。

答：そのように直したいと思います。