



Title	β -TCP配合ヒトI型コラーゲン様リコンビナントペプチドスキャフォールドの歯周組織再生効果：イヌ3壁性骨欠損モデルにおける検討〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	吉野, 友都
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15021号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86064
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuto_Yoshino_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 吉野友都

学位論文題名

β -TCP 配合ヒト I 型コラーゲン様リコンビナントペプチドスキャフォールドの
歯周組織再生効果
— イヌ 3 壁性骨欠損モデルにおける検討 —

キーワード リコンビナントペプチドスキャフォールド, β -TCP, 組織工学,
歯周組織再生, イヌ

歯周組織再生療法は、歯周炎によって破壊され失われた結合組織性付着や歯槽骨を回復させる治療法であり、ティッシュエンジニアリングの概念を取り入れた研究が進められている。スキャフォールドは、組織再生が起こる際に細胞の定着、増殖、分化を促進する等の重要な役割を示すことから、これまでに当教室ではコラーゲンスキャフォールドの研究を行い、高い生体親和性、生体分解吸収性、歯槽骨、歯根膜、セメント質の再生が促進されることを報告している。しかし、市販のコラーゲンスキャフォールドはウシやブタ等の動物に由来し、病原体や抗原性のリスクを有する。近年ヒト I 型コラーゲン様リコンビナントペプチドが遺伝子組み換え技術を駆使して創製された。これらは、ヒト I 型コラーゲン（ $\alpha 1$ 鎖）を基に抗原部位を含まないアミノ酸配列設計がされており、動物由来成分を含まないため安全性が高い。また、天然コラーゲンに比較して、細胞接着に関与するアミノ酸のアルギニン・グリシン・アスパラギン酸（RGD）配列を多く含有することから、細胞の足場として効果を発揮できる可能性がある。一方で、コラーゲン単独を基材としたスキャフォールドは、バイオセラミクス系材料に比較して骨伝導能が低いという欠点がある。そこで Furihata らはヒト I 型コラーゲン様リコンビナントペプチドを顆粒状に加工したスキャフォールド（RCP）に β リン酸三カルシウム（ β -TCP）サブミクロン微粒子を配合した骨補填材（ β -TCP/RCP）を作製し、RCP と比較して骨形成が有意に促進されることを示した。そこで本研究では、 β -TCP/RCP が優れた歯周組織再生材料になり得るのではないかと考え、イヌの下顎に作製した 3 壁性骨欠損へ β -TCP/RCP を埋植し、その歯周組織再生効果を評価した。

まず、RCP 水溶液を凍結乾燥し、粒径約 1mm の顆粒状に粉碎した。続いて

142°Cで5時間熱架橋し、真空常温乾燥器で乾燥、サブミクロン粒子に粉碎した β -TCPの分散液をRCPに添加して β -TCP/RCPとした。10か月齢のビーグル犬の左右下顎第4前臼歯を抜歯し、8週間後、左右下顎第1後臼歯近心に3壁性の骨欠損（近遠心幅×頬舌幅×深さ；5 mm×3 mm×4mm）を作製した。さらに骨欠損底部に相当する根面にノッチを付与した。作製した骨欠損へ β -TCP/RCPを埋植したものを β -TCP/RCP群、何も埋植しなかったものをCtrl群とし、術後4週、8週間後にそれぞれマイクロCT撮影、マッソントリクローム（MT）染色、オステオカルシン（OCN）染色、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）染色、CD3染色、ペリオスチン（POSTIN）染色を行った。また、術後8週のマイクロCT画像をもとに新生骨量を、術後8週のMT染色、POSTIN染色の組織像をもとに根面ノッチから歯肉最上部までの高さ（歯肉高さ）、新生骨様組織頂部までの高さ（新生骨高さ）、付着上皮最根尖側部までの距離（上皮高さ）、POSTIN発現組織最上部までの距離（POSTIN高さ）を測定した。

術後4週のマイクロCT画像では、骨欠損領域における近心部既存骨の垂直的な高さが β -TCP/RCP群はCtrl群と比較して高く、また、術後8週では β -TCP/RCP群は骨欠損領域を満たすように不透過像がみられ、骨欠損領域近心壁も垂直的高さを維持していたが、Ctrl群では近心壁の高さはさらに減少していた。マイクロCT画像による新生骨量は、 β -TCP/RCP群がCtrl群と比較して有意に多かった。

術後4週における組織学的観察の結果、 β -TCP/RCP群では β -TCP/RCP顆粒を取り囲むように新生骨様組織が確認され、顆粒内部にも新生骨様組織がみられた。新生骨様組織周囲にOCN陽性細胞とTRAP陽性細胞を認めた。CD3陽性細胞は歯肉溝付近に確認されたが β -TCP/RCP周囲にはみられなかった。既存歯根膜から連続するようにPOSTINの発現を認め、上皮のdown-growthはなかった。Ctrl群では、歯根表面に上皮のdown-growthを認め、POSTINの発現は上皮の最根尖側付近では少なかった。術後8週では、 β -TCP/RCP顆粒内部にも4週に比較してより多くの血管が認められた。TRAP陽性細胞は歯根膜様の組織の骨側、残留 β -TCP/RCP付近に散在していた。POSTIN発現は歯冠側でも認められ、歯根から新生骨様組織へ斜走する繊維様の発現がみられた。Ctrl群では、既存骨と連続した新生骨様組織の骨梁が4週に比較して密であった。POSTIN発現は歯根と新生骨様組織間に認められたが、歯冠側では不明瞭であった。

組織学的計測結果では、歯肉高さ、新生骨高さ、上皮高さ、POSTIN高さともに、 β -TCP/RCP群がCtrl群と比較して有意に高かった。

術後8週のマイクロCT画像解析から、 β -TCP/RCP群はCtrl群と比較して有

意に多い新生骨量を示し、また新生骨高さの組織計測結果からも、 β -TCP/RCP の埋植は骨再生を促進したと考えられた。これには RCP のもつ多くの RGD 配列や、配合した β -TCP によって骨芽細胞分化の促進や、骨形成マーカーの上昇が関与していると考えられた。組織学的計測結果から、歯肉高さと上皮高さは β -TCP/RCP 群が有意に高く、 β -TCP/RCP を埋植することは歯肉退縮を防止して上皮の down-growth も抑制する効果があると考えられた。しかし、セメント質の再生効果は不明確で、骨再生量も十分とは言えなかったことから、今後細胞移植や増殖因子の併用などを検討することが望まれる。

以上の結果から、 β -TCP/RCP は起炎性が低く、歯槽骨だけでなく歯根膜も再生し、歯周組織再生材料として有効である可能性が示唆された。