博 士 論 文

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－

令和４年３月申請

北海道大学
大学院歯学院口腔医学専攻

吉　野　友　都

抄録

ヒトＩ型コラーゲン様リコンビナントペプチドは，遺伝子組み換え技術によってアルギニン-グリシン-アスパラギン酸配列を豊富に含み，動物由来成分を含まないバイオマテリアルとして注目されている．これを顆粒状に成形し（RCP），さらに β 型リン酸三カルシウム（β-TCP）微粒子を配合した β-TCP/RCP は，良好な生体親和性と骨形成能を示すことが報告されている．そこで本研究では β-TCP/RCP をビーグル犬に作製した実験的骨欠損部に埋植して歯周組織再生効果があるかどうかを検討した．術後 8 週におけるマイクロＣＴ画像解析の結果，β-TCP/RCP 埋植後の新生骨量は対照（ctrl）群と比較して 2.2 倍多く，両群間に有意差を認めた（Ｐ＜0.05）．組織学的所見から，埋植された β-TCP/RCP の周囲や内部に新生骨様組織の形成を認め，β-TCP/RCP 埋植によって歯根膜様組織が 2.1 倍多く形成され（Ｐ＜0.05），歯肉退縮を有意に抑制した（Ｐ＜0.05）．以上より β-TCP/RCP は歯周組織再生材料として有効であることが示唆された．

1.はじめに

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[1)]であり，近年はティッシュエンジニアリングの概念を取り入れた研究開発が盛んに進められている[2,3)]．ティッシュエンジニアリングでは，細胞[4,5)]，成長因子[6,7)]，スキャフォールド（足場材）[8,9)]の 3 つの要素がそろうことで組織再生が起こると考えられている[10)]．なかでも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果たす[11,12)]．さらに再生の場の確保，血管構築促進，細胞外マトリックスの沈着，増殖因子の担持，栄養素や老廃物の移動に関して重要な役割があることも知られている[13)]．これまで歯周組織再生効果を示すスキャフォールドとして，コラーゲン，ポリ乳酸，ハイドロキシアパタイト，β型リン酸三カルシウム（β-TCP）等が報告されているが[14,15)]，中でも天然高分子のコラーゲンは優れた生体親和性，生体吸収性，親水性などの特徴を有している[16-18)]．これまでに，コラーゲンスキャフォールドをイヌ歯槽骨欠損モデルに埋植した結果，高い生体親和性，生体分解吸収性を示すとともに，歯槽骨，歯根膜，セメント質の再生が促進されたことが報告されている[19,20)]．

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，外来病原体や抗原性のリスクを有するため，安全な医療材料とは言えないのが現状である[21)]．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[22,23)]，動物由来コラーゲンの問題点を解決出来る可能性が示された．ヒトＩ型コラーゲン様リコンビナントペプチドは，ヒトＩ型コラーゲン（α1 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，酵母によって産生され動物由来成分を含まない（ゼノフリー）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[24,25)]，生体内での細胞の足場としての効果を強く発揮できる可能性がある．また天然コラーゲン同様に架橋による加工性を有し，生体吸収性も示され

ている [26]．これまでに顆粒状に加工したヒト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（RCP）が骨芽細胞様細胞の骨分化マーカー発現を促進したことが報告され [27]，RCPの骨補填材としての有用性が示されている [27,28]．

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 [29]．そこで，骨形成量を増大するためにコラーゲンと各種バイオセラミクスを組み合わせる方法が検討されている．Murakami らは，ウシ由来コラーゲンスキャフォールドに β-TCP のサブミクロン微粒子の配合を行った結果，コラーゲンスキャフォールド単独と比較して生体吸収性は損なわず，細胞増殖，タンパク質吸着，骨組織形成などの生理活性効果を高めることを報告した [30]．さらに Ogawa らは，そのスキャフォールドが，イヌにおける歯周組織再生に有効であることを報告した [31]．またオクタリン酸カルシウムや低結晶性ハイドロキシアパタイトと動物由来コラーゲンの複合体は優れた骨再生効果が報告されている [32-35]．これらの結果を踏まえ，Furihata らは近年，RCP に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，β-TCP を配合しない RCP と比較して骨芽細胞の増殖分化を促進し，in vivo において骨形成が有意に促進されることを示した [27]．そこでβ-TCP/RCP が骨伝導性と生体吸収性に優れた歯周組織再生材料になり得るのではないかとの仮説を立てた．本研究の目的は，β-TCP/RCP の歯周組織再生効果を評価することであり，イヌの下顎に作製した 3 壁性骨欠損へβ-TCP/RCP を埋植し，マイクロＣＴ画像分析ならびに組織学的に歯周組織再生効果を検討した．

2.材料と方法

2.1 β-TCP/RCP の作製

ヒトⅠ型コラーゲン様リコンビナントペプチド水溶液 （7.5 %，セルネスト；富士フイルム和光純薬，大阪)を凍結乾燥し，整粒機 （クアドロコーミル U5；クアドロエンジニアリング社，ウォータールー，カナダ）によって粒径約 1mm の顆粒状に粉砕した．続いて，142℃で 5 時間熱架橋し，真空常温乾燥器（DP-43；ヤマト科学，東京）を用いて乾燥して RCP とした（図 1A）．RCP の大きさは，全自動画像式粒度分布測定装置 （モルフォロギ G3；Malvern Panalytical，モルバーン，イギリス）により質量中央値径$_{(D50)}$として測定し，平均粒径が約 1ｍｍであることを確認した．次に β-TCP（β-TCP-100 粉砕物；大平化学工業，大阪）を湿式超高圧微粒化装置ナノヴェイタ （NVL-AS200-D10；吉田機械興行，愛知）によって粉砕し，水に分散させた．粉砕後の β-TCP/水分散液に含まれる β-TCP 粒子の体積基準粒度分布は，レーザ回折式粒度分布測定装置（SALD-2100；島津製作所，京都）を用いてレーザ回折法で測定し，体積平均径が 0.73μｍのサブミクロン粒子であることを確認した．続いて，500μＬの β-TCP 分散液（1wt%）を 100 mg の凍結乾燥された RCP に添加して膨潤させ，β-TCP/RCP とした 27)（図 1B）．

2.2 3 壁性骨欠損の作製と埋植

動物実験は国立大学法人北海道大学動物実験委員会の審査承認を得て実施した（承認番号 19-84）．実験には，10 カ月齢で体重が約 9〜10kg の 5 頭の健康な雌ビーグル犬（北山ラベス，長野）を使用した．外科的処置は，ミダゾラム（5.0 mg/mL，ドルミカム；アステラス製薬，東京），メデトミジン塩酸塩（1.0 mg/mL，ドミトール；日本全薬工業，福島）ブトルファノール酒石酸塩（5.0 mg /mL，ベトルファール； Meiji Seika ファルマ，東京）の筋注による全身麻酔下で実施され，さらに術野に対し塩酸リドカイン（20 mg/mL，エピリド配合注；ニプロ，大阪）による局所麻酔を行って実施された．はじめにビーグル犬の左右下顎第四前臼歯を抜歯し（図 1C），8 週間の抜歯窩治癒期間を設けた．抜歯窩治癒後（図 1D）に同様に全身麻酔および局所麻酔を行い，歯肉切開後粘膜骨膜弁を剥離し（図 1E），左右下顎第一後臼歯近心に 3 壁性の骨欠損（近遠心幅×頬舌幅×深さ；5 mm×3 mm×4mm）を，歯科用カーバイドバー（ジーシー，東京）を回転数 5000rpm で使用して作製した（図 1F）[36]．露出した歯根表面はトゥースプレーニングバー（デンテック，東京）使用して滑沢にした．作製した骨欠損底部に相当する根面に歯科用カーバイドバーでノッチを作製し，骨欠損底部の位置を記録した．次に作製した骨欠損部に β-TCP/RCP を 50mg 埋植して β-TCP/RCP 群（図 1G）とし，試料を何も埋植しなかった部位を対照（Ctrl）群とした． β-TCP/RCP 群と Ctrl 群はビーグル犬 1 頭につき 1 部位ずつ（左右第一後臼歯近心部）設定した．粘膜骨膜弁を復位縫合したのち（図 1H）アンピシリンナトリウム（200mg/mL，注射用アンピシリンナトリウム NZ；日本全薬工業，東京）を 3 日間投与した．また，0.5%クロルヘキシジン（ヒビテン；大日本住友製薬，東京）によるプラークコントロールを，観察期間中に週 2 回行った．

2.3 マイクロ CT 撮影と骨形成量評価

術後 4 週（2 頭）および 8 週（3 頭）に全身麻酔後，埋植部位のデジタル写真撮影を行った（図 2）．その後ペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル；共立製薬，東京）の過剰投与にて安楽死させ，10%緩衝ホルマリンによる還流固定を行った．歯および周囲組織を含む試料を摘出し，マイクロ CT（Latheta LCT-200；日立製作所，東京）を用いて，骨欠損部を撮影（撮影条件：管電圧 50kV，電流 500 μA，フィルタなし，スライス厚さ 40 μm，回転角 0.1°）して，骨の再生状態を観察した．8 週の試料を撮影したマイクロ CT 画像から，画像処理ソフトウェア（ImageJ；アメリカ国立衛生研究所，ベセスダ，アメリカ）を用いて新生骨量を測定した．作製した骨欠損が近遠心的に観察できるように調整後，根面の根尖側ノッチを基準として近遠心幅×深さ；5 mm×4mm を計測範囲とし，頬舌的に 1.2ｍｍの連続画像（画像 30 枚分）の骨梁面積ピクセル数を測定し，その総和を新生骨量とした．

2.4 組織学的観察

試料を 10%エチレンジアミン四酢酸で脱灰し，通法にしたがってパラフィン包埋後，近遠心方向に薄切して組織切片とした．その後，通法に従ってマッソントリクローム（ＭＴ）染色，酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）染色を行った．また免疫組織化学的に，CD3，オステ

オカルシン（OCN），ペリオスチン（POSTIN）染色を行った．抗原賦活化後，一次抗体のマウス抗 CD3 抗体（Dako Denmark，ネストベズ，デンマーク），マウス抗オステオカルシン抗体（タカラバイオ，滋賀），ウサギ抗ペリオスチン抗体（Abcam，ケンブリッジ，イギリス）で一晩インキュベートし，抗原抗体反応部位を，ジアミノベンジジンよって発色した．得られた染色切片は，光学顕微鏡（NanoZoomer S210 C13239-01；浜松ホトニクス，静岡）にて観察し，評価を行った．

2.5 組織学的計測

術後 8 週の MT 染色，および POSTIN 染色画像を用いて，根面ノッチから歯肉頂部までの距離（歯肉高さ，mm），根面ノッチから新生骨様組織頂部までの距離（新生骨高さ，mm），
根面ノッチから付着上皮の最根尖側の位置までの距離（上皮高さ，mm），根面ノッチから POSTIN 発現組織最上部までの距離（POSTIN 高さ，mm）を，画像処理ソフトウェアを用いて測定した．

2.6 統計学的分析

新生骨量，組織学的計測の値は，それぞれ Wilcoxon の順位和検定を用いて危険率 5%で検定を行った．統計解析はソフトウェアパッケージ（SPSS ver. 11.0、日本 IBM，東京）を使用して行った．

3.結果

3.1 口腔内所見

術後 4 週，8 週の埋植部のデジタル写真を図 3 に示す（図 2）．β-TCP/RCP 群，Ctrl 群ともに手術部位に発赤等の強い炎症所見は肉眼的に観察されなかった．Ctrl 群の歯肉がやや陥凹（図 2 矢印）しているのが観察された．

3.2 マイクロ CT 画像による評価

術後 4 週，8 週のマイクロＣＴ画像を図 3Ａに示す．4 週において，β-TCP/RCP 群では骨欠損領域（黄色破線で示す）の内部に既存歯槽骨と連続した不透過性領域を認めたが，骨欠損領域の一部を占める程度であった．Ctrl 群ではβ-TCP/RCP 群と同様に骨欠損領域に部分的な不透過性領域が認められたが，骨欠損領域の近心部（近心壁）の既存骨の垂直的な高さがβ-TCP/RCP 群に比較して低かった．

8 週においてβ-TCP/RCP 群では骨欠損領域を満たすように既存歯槽骨と連続した不透過性領域を認め，歯根との間には歯根膜腔様の空隙が存在し，骨欠損領域近心壁も垂直的高さを維持していた．一方，Ctrl 群では 4 週に比較して不透過性が亢進していたが，4 週と同様に骨欠損領域近心壁が減少した．

術後 8 週における新生骨量（×10^4 pixel）の平均値と標準偏差は，β-TCP/RCP 群では 12.9±3.5，Ctrl 群では 6.0±2.1 であった．β-TCP/RCP 群の新生骨量は，Ctrl 群と比較して約 2.2 倍多く，両群間には有意差がみられた（P＜0.05）（図 3B）．

3.3 組織学的観察（術後 4 週）

術後 4 週のβ-TCP/RCP 群の MT 染色，OCN 染色の結果を図 4 に示す．骨欠損部にβ-TCP/RCP の残留が認められ, 既存歯槽骨（図 4A, PB）から連続して新生骨様組織（図 4A, NB）が形成されているのが観察された．上皮の down-growth はほとんどなく、セメントーエナメル境付近にとどまっていた（図 4B 矢印)．β-TCP/RCP を取り囲むように新生骨様組織が観察され，β-TCP/RCP の内部では赤染された RCP が網目構造を形成していた．網目内にも青染する骨様組織が存在した．β-TCP 粒の残留は観察されなかった（図 4C）．一方で，歯肉溝や歯肉結合組織に近接したβ-TCP/RCP 顆粒への骨様組織形成は認められなかった（図 4D)．歯根表面には線維性結合組織（図 4E, FT）を認めたが，セメント質形成やシャーピー線維を伴う歯根膜様組織は認められなかった（図 4E)．OCN 染色の結果，β-TCP/RCP の内外部に見られる骨様組織周囲に，OCN 陽性細胞が観察された（図 4F 矢印)．

術後 4 週のβ-TCP/RCP 群の TRAP 染色，CD3 染色，POSTIN 染色の結果を図 5 に示す．TRAP 染色の結果，骨様組織周囲に赤染した TRA P 陽性細胞が認められたが，β-TCP/RCP の周囲や内部では TRA P 陽性細胞がほとんど認められなかった（図 5 A，B，C)．CD3 染色の結果，歯肉溝に近接する歯肉結合組織内に CD3 陽性細胞（褐色）が認められた（図 5E 矢印)．しかしβ-TCP/RCP 周囲ではほとんど認められなかった（図 5D，E，F)．POSTIN 染色の結果，既存の歯根膜から連続するように歯根と新生骨様組織間に発現（褐色）が認められた（図 5G)．根尖側では新生骨様組織周囲に多く発現していた（図 5H)．歯冠側では根尖側より発現が弱かった（図 5I)．

術後 4 週の Ctrl 群の MT 染色，OCN 染色の結果を図 6 に示す．MT 染色では骨欠損部に既存骨と連続した新生骨様組織と歯肉結合組織がみられ，新生骨様組織は骨梁が密であった（図 6A)．上皮は欠損中央部付まで down-growth し（図 6B 矢印)，歯根膜様組織やセメント質の形成は認められなかった（図 6B)．OCN 染色では，β-TCP/RCP 群と同様に骨様組織周囲に OCN 陽性細胞を認めた（図 6C 矢印)．

術後 4 週の Ctrl 群の TRAP 染色，CD3 染色，POSTIN 染色の結果を図 7 に示す．TRAP 染色では，新生骨様組織表面に TRA P 陽性細胞が散在していた（図 7A，B)．CD3 染色では，歯肉溝付近に CD3 陽性細胞が認められたが，新生骨様組織周囲ではほとんど認められなかった（図 7C，D 矢印)．POSTIN 染色では，歯根と骨様組織の間に発現が認められた（図 7E，F）が，上皮の down-growth がみられる歯冠側の歯肉結合組織においては，発現がほとんど見られなかった（図 7G)．

3.4 組織学的観察（術後 8 週）

術後8週のβ-TCP/RCP 群の MT 染色，OCN 染色の結果を図 8 に示す．MT 染色では，4 週と同様に，骨欠損内にβ-TCP/RCP が認められた．上皮の down-growth は歯頸部にとどまっていた．歯根と新生骨間には既存の歯根膜から連続する歯根膜様組織が認められた（図 8A)．β-TCP/RCP 顆粒の内外部に新生骨様組織が観察され，4 週に比較して血管も多く認められた（図 8B)．また，歯肉結合組織内にもβ-TCP/RCP が認められ，顆粒内部に線維性結合組織が入り込んでいた（図 8C)．歯根膜様組織は細胞に富み，血管も多く観察されたが、明瞭なセメント質の添加は認めなかった（図 8D)．OCN 染色では 4 週と同様に，β-TCP/RCP の内外部に見られる骨様組織周囲に OCN 陽性細胞が観察された（図 8E 矢印)．

術後 8 週のβ-TCP/RCP 群の TRAP 染色，CD3 染色，POSTIN 染色の結果を図 9 に示す．TRAP 染色では，歯肉結合組織との境界部，歯根膜様組織の骨側，β-TCP/RCP 周囲に TRAP 陽性細胞が散在していた（図 9A，B，C)．CD3 染色では，4 週と同様に遊離歯肉の結合組織内に CD3 陽性細胞が認められた（図 9E 矢印）が，β-TCP/RCP 周囲ではほとんど観察されなかった（図 9F)．POSTIN 染色の結果，既存の歯根膜から連続して歯根と新生骨様組織の間に発現が認められた（図 9G)．根尖側ならびに歯冠側において，歯根から新生骨様組織へ斜走する線維様の発現を認めた（図 9H 矢印，Ｉ矢印)．

術後 8 週の Ctrl 群の MT 染色，OCN 染色の結果を図 10 に示す．ＭＴ染色によると，骨欠損部には既存骨と連続した新生骨様組織が見られ，4 週に比較して骨梁は太く密になっていた（図 10A)．OCN 染色では，4 週同様に骨様組織周囲に OCN 陽性細胞を認めた（図 10B 矢印)．

術後 8 週の Ctrl 群の TRAP 染色，CD3 染色，POSTIN 染色の結果を図 11 に示す．TRAP 染色では，歯根膜様組織が結合する骨の表面や新生骨様組織周囲に散在していた（図Ａ，Ｂ，Ｃ)．CD3 染色では，歯肉溝付近に CD3 陽性細胞が認められ（図 11E 矢印)，新生骨様組織周囲にはほとんど認められなかった（図 11D)．POSTIN 染色の結果，β-TCP/RCP 群と同様に歯根と新生骨様組織間に発現が認められた（図 11F)．しかし歯冠側の歯根近接領域では発現は不明瞭だった（図 11G)．

3.5 組織学的計測評価

術後 8 週における組織学的計測結果を図 12 に示す．β-TCP/RCP 群および Ctrl 群の歯肉高さは 6.8±0.9，5.3±0.2，新生骨高さは 2.2±0.2，1.3±0.2，上皮高さは 3.7±0.2，2.7±0.5，POSTIN 高さは 2.8±1.0，1.4±0.2 であった．β-TCP/RCP 群の歯肉高さ，新生骨高さ，上皮高さ，POSTIN 高さは Ctrl 群と比較してそれぞれ約 1.3 倍，約 1.7 倍，約 1.3 倍，約 2.1 倍高く，すべてのパラメーターにおいて両群間に有意差を検出した（P＜0.05）．

4 考察

4.1 β-TCP/RCP による骨再生メカニズム

術後 8 週のマイクロ CT 画像分析から，β-TCP/RCP 群は Ctrl 群と比較して有意に多い新生骨量（不透過性領域）を示した（図 3A，B）．また，不透過領域は MT 染色による新生骨様組織領域と概ね一致していた．さらに組織学的計測からβ-TCP/RCP 群は Ctrl 群と比較して新生骨高さが有意に高かった（図 12B）．以上のことから，β-TCP/RCP の埋植は骨再生を促進したと考えられた．Furihata らはβ-TCP/RCP と骨芽細胞様細胞を共培養すると，骨形成マーカーである Runt 関連転写因子 2（Runx2），アルカリフォスファターゼ，骨シアロタンパクの mRNA 発現を促進し，同時にインテグリンβ1 の発現も刺激したことを報告している [27]．インテグリンを介した I 型コラーゲン等の細胞外基質への細胞接着は，Focal adhesion kinase，並びにその下流の Bone morphogenetic protein (BMP) -smad シグナルを活性化し，骨芽細胞分化促進に関与することが知られている [37]．Verstappen らは，RGD で修飾された材料にインテグリンを介して骨芽細胞が接着することで骨芽細胞の増殖分化が促進され，RGD 修飾されていないものと比較して，骨形成マーカーである Runx2，オステオポンチン（OPN）等の骨形成マーカーの発現が多かったことを報告している [38]．β-TCP/RCP は遺伝子工学的手法によって多くの RGD 配列を保有することから [24,25]，インテグリンを介した細胞接着が多く発生して骨芽細胞分化が促進され，β-TCP/RCP 埋植部の骨再生が促進されたと考えられた．またβ-TCP/RCP はサブミクロンに調整したβ-TCP が添加されている．β-TCP から放出されるカルシウムイオン，リン酸イオンは骨形成に関与するとの報告があり [39,40]，Chang らは，カルシウムイオンとリン酸塩濃度の上昇が骨形成を促進することを明らかにしている [41]． Dvorak らは，細胞外カルシウム濃度の上昇は骨芽細胞増殖を促進し，OCN，OPN 等の骨形成マーカー発現を上昇させると報告し [42]，また，Kanatani らは，無機リン酸塩の濃度が上昇すると破骨細胞の分化と骨吸収活性を阻害することを報告している [43]．本研究でも，4 週のβ-TCP/RCP 埋植部の新生骨様組織形成が見られる部位に TRAP 陽性の破骨細胞の発現はほとんど見られなかった（図 5C）．一方，術後 8 週では多くの発現を確認した（図 9A，B，C）．したがって過去の報告 [43]のように早期にβ-TCP サブミクロン微粒子から大量に放出されたリン酸イオン濃度上昇による破骨細胞の分化，骨吸収活性の阻害が起こり，骨再生量の増加につながった可能性がある．またこれまでに，コラーゲンスポンジにβ-TCP サブミクロン微粒子を配合することで，タンパク質吸着の増加 [31]や細胞付着増殖の増加 [30]が起こることが示され，これらはマテリアル表面積の増加によるものと考察されている．以上のことから，β-TCP サブミクロン微粒子の配合は RCP の骨形成能をさらに上昇させた可能性がある．

4.2 β-TCP/RCP による再生の場の確保

歯周組織再生療法においては一般に，骨組織よりも再生速度の速い上皮 [44]の down-growth を抑止して，骨が形成されるまでの再生空間を維持することが重要であると考えられている [45,46]．本研究の 4 週のマイクロ CT 画像では，β-TCP/RCP 群と Ctrl 群ともに欠損の歯冠側に透過像を認めた（図 3A）．しかし 4 週の組織学的観察では，β-TCP/RCP 群では骨欠損内をβ-TCP/RCP が満たしているのに対し，Ctrl 群では欠損の大部分に歯肉結合組織を認めた．さらに Ctrl 群は

上皮の down-growth が生じ，また外科的に作製した骨欠損の近心壁の高さを維持できていなかった（図 4，6）．したがって β-TCP/RCP を埋入することで，4 週時点ではいまだ骨再生が不十分であるものの，上皮の down-growth を抑止して再生空間を維持できたと推察された．また，組織学的計測から β-TCP/RCP 群は Ctrl 群と比較して，上皮高さが有意に高かった（図 12C）ことからもポケット上皮の down-growth を抑止できていることが裏付けられた．また埋植後 8 週の組織像において，歯肉結合組織内に β-TCP/RCP が多数見られた（図 8 C）．このことは β-TCP/RCP の親和性が骨組織に対して良好であるだけでなく，歯肉組織に対しても良好であることを示唆している．これまでにヒト I 型コラーゲン様リコンビナントペプチドは様々な細胞の増殖を促進することが報告されている．Muraya らは 本ペプチドによる間葉系間質細胞の細胞増殖促進 [47] を，Naritomi らは滑膜間葉系細胞の増殖を報告している [48]．しかし一方で，歯肉結合組織内に β-TCP/RCP がみられることは，β-TCP/RCP の周囲に骨組織がある場合にのみ骨再生が起こることを示唆しており，異所性に骨再生を起こす能力はないと考えられ，重度歯周炎など骨吸収が大きいケースでは大量の骨再生を誘導できない可能性がある．近年足場材に未分化の間葉系幹細胞 [59,50] や増殖因子を併用 [51] して骨再生を促進する試みが行われており，β-TCP/RCP も骨再生量の増大のために細胞，増殖因子の併用が望まれ，今後検討されるべきであろう．

4.3 β-TCP/RCP による歯周組織再生

歯根膜は正常な歯周組織において，歯根表面のセメント質と歯槽骨の間を結びつけ咀嚼に大きく関与する重要な構造であり，歯槽骨と同時に歯周組織再生療法において再生を達成すべき組織である [52,53]．骨を強力に再生するバイオマテリアルを埋入すると，歯根膜が形成されずに新生骨と歯根との癒着（アンキローシス）を認める場合がある．例えば Takahashi らは，BMP をネコ歯根分岐部に埋植して骨再生を強力に誘導した結果，アンキローシスが発生することを報告した [53]．しかし本研究では β-TCP/RCP 群においてアンキローシスは認められなかった．さらに本研究の POSTIN 染色の結果より，β-TCP/RCP 群では 4 週から歯根に沿って POSTIN 陽性の線維性組織の構築が認められた（図 5G，9G）．一方 Ctrl 群では上皮の down-growth や歯肉退縮（図 2，図 12A）がおこり POSTIN の発現も少なかった．POSTIN は骨膜および歯根膜で多く発現される分泌型マトリセルラータンパク質であり [54,55]，歯根膜再生のマーカーとして用いられている [56-58]．したがって POSTIN 陽性部位は歯根膜あるいはその前駆組織である可能性があり，その存在は歯根膜再生を示唆するものである．本研究では，POSTIN 高さが β-TCP/RCP 群において Ctrl 群より有意に高かった（図 12D）．これらの結果は β-TCP/RCP が歯根膜再生能を有する可能性を示唆するものである．一方で歯根膜再生には歯根面の線維のアンカーであるセメント質の再生も重要な因子である [59] が，本研究では明確なセメント質形成は認められなかった．しかし本研究では埋植後 8 週においても β-TCP/RCP は再生の場に残存していることから，さらなる歯周組織再生効果が得られる可能性があり，長期的な検討が必要である．

4.4 β-TCP/RCP の生体分解吸収と起炎性

歯周組織再生用材料は，埋植部位が口腔内に近接しているため，常に口腔内細菌による感染のリスクがある[60]．したがって，速やかに生体内で分解吸収され，組織に置き換わる特性を有するべきである．Ogawa らはイヌ骨欠損部にβ-TCP を配合した子牛由来コラーゲンスポンジを埋植し，4 週間で完全に吸収されたと報告している[31]。本研究では 8 週において，徐々にβ-TCP/RCP のスポンジ構造が疎になり分解吸収を受けていることが想像できるが，完全に消失しなかった（図 8B，C）．これはβ-TCP/RCP の吸収が，Ogawa らによって報告されたβ-TCP 配合コラーゲンよりも遅いことを示唆するものである．上述の子牛由来コラーゲンスポンジは完全連通孔構造であり，一方 RCP は内部にスポンジ構造を有するが連通が不完全であるため，細胞が早期から内部に侵入しづらいため吸収が遅いものと思われた[27]．また Nishida らは子牛由来コラーゲンスポンジの吸収をラット背部皮下で観察した結果，多核巨細胞を多数認めたことを報告している[61]が，本研究ではβ-TCP/RCP 周囲に多核巨細胞をほとんど認めなかった．Furihata らはβ-TCP/RCP の吸収が単核の CD68 陽性マクロファージによって行われていることを示唆した[27]が，コラーゲンの吸収はコラゲナーゼを原因とする場合もあり[62]，β-TCP/RCP の歯周組織再生における吸収動態については更なる詳細な検討が必要であると思われた．しかしβ-TCP/RCP の 8 週にわたる残留によって肉眼的にも組織学的にも強い炎症性細胞浸潤などの負反応は認められず，CD3 陽性細胞[63]のβ-TCP/RCP に対しての集積もほとんど見られなかった．RCP は天然コラーゲンの抗原部位を除外した設計の材料であり，本研究でも起炎性の低さが実証された．また，バイオセラミクスであるハイドロキシアパタイトやβ-TCP は，非吸収性である場合や[64]，吸収されるが生体内で半年以上の残留を示し組織置換を阻害する報告がある[65,66]．本研究でも骨形成の促進を目的としてβ-TCP を添加しているが，吸収が円滑に進むようサブミクロンサイズに調整したものを使用しており，組織学的にもβ-TCP の残留は認めなかった．これは Murakami ら[30]や Ibara ら[67]の報告と一致しており，本研究のβ-TCP の残留による歯周組織再生への長期的影響はないものと考えられる．

5.結論

本研究ではβ-TCP/RCP をビーグル犬の実験的骨欠損部に埋入して，歯周組織再生効果を評価した．その結果，術後 8 週の新生骨量は，β-TCP/RCP 群が Ctrl 群に比較して 2.2 倍多く，両群間に有意差を認めた．組織学的所見から，β-TCP/RCP の埋植部位に新生骨様組織が形成され，歯根膜を再生させる可能性も示した．さらに組織学的計測から，β-TCP/RCP 群が Ctrl 群に比較して歯肉高さ，新生骨高さ，上皮高さ，POSTIN 高さにおいてそれぞれ 1.3 倍，1.7 倍，1.3 倍，2.1 倍高く，両群間に有意差を認めた．以上のことから，β-TCP/RCP は歯周組織再生材料として有効であることが示唆された．

6.参考文献

1） Vaquette C, Pilipchuk SP, Bartold PM, Hutmacher DW, Giannobile WV, Ivanovski S. Tissue engineered constructs for periodontal regeneration: current status and future perspectives. Adv Healthc Mater. 2018 Nov;7(21):e1800457. doi: 10.1002/adhm.201800457.

2） Seciu AM, Craciunescu O, Stanciuc AM, Zarnescu O. Tailored biomaterials for therapeutic strategies applied in periodontal tissue engineering. Stem Cells Dev. 2019 Aug 1;28(15):963-973. doi: 10.1089/scd.2019.0016.

3） Staples RJ, Ivanovski S, Vaquette C. Fibre guiding scaffolds for periodontal tissue engineering. J Periodontal Res. 2020 Jun;55(3):331-341. doi: 10.1111/jre.12729.

4） Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. Aust Dent J. 2014 Jun;59 Suppl 1:117-30. doi: 10.1111/adj.12100.

5） Liu J, Ruan J, Weir MD, Ren K, Schneider A, Wang P, Oates TW, Chang X, Xu HHK. Periodontal bone-ligament-cementum regeneration via scaffolds and stem cells. Cells. 2019 Jun 4;8(6):537. doi: 10.3390/cells8060537.

6） Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, Saho T, Nozaki T, Okada H. Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. J Periodontal Res. 2003 Feb;38(1):97-103. doi: 10.1034/j.1600-0765.2003.00640.x.

7） Anzai J, Nagayasu-Tanaka T, Terashima A, Asano T, Yamada S, Nozaki T, Kitamura M, Murakami S. Long-term observation of regenerated periodontium induced by FGF-2 in the beagle dog 2-wall periodontal defect model. PLoS One. 2016 Jul 8;11(7):e0158485. doi: 10.1371/journal.pone.0158485.

8） Bartold PM, Xiao Y, Lyngstaadas SP, Paine ML, Snead ML. Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration. Periodontol 2000. 2006;41:123-35. doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00156.x.

9） Imber JC, Roccuzzo A, Stähli A, Saulacic N, Deschner J, Sculean A, Bosshardt DD. Immunohistochemical evaluation of periodontal regeneration using a porous collagen scaffold. Int J Mol Sci. 2021 Oct 9;22(20):10915. doi: 10.3390/ijms222010915.

10) Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. J Pediatr Surg. 2016 Jan;51(1):8-12. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022.

11) Ivanovski S, Vaquette C, Gronthos S, Hutmacher DW, Bartold PM. Multiphasic scaffolds for periodontal tissue engineering. J Dent Res. 2014 Dec;93(12):1212-21. doi: 10.1177/0022034514544301.

12) Varoni EM, Vijayakumar S, Canciani E, Cochis A, De Nardo L, Lodi G, Rimondini L, Cerruti M. Chitosan-based trilayer scaffold for multitissue periodontal regeneration. J Dent Res. 2018

Mar;97(3):303-311. doi: 10.1177/0022034517736255.

13) Abdulghani S, Mitchell GR. Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: A Review. Biomolecules. 2019 Nov 19;9(11):750. doi: 10.3390/biom9110750.

14) Liang Y, Luan X, Liu X. Recent advances in periodontal regeneration: A biomaterial perspective. Bioact Mater. 2020 Feb 28;5(2):297-308. doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.02.012.

15) Woo HN, Cho YJ, Tarafder S, Lee CH. The recent advances in scaffolds for integrated periodontal regeneration. Bioact Mater. 2021 Mar 18;6(10):3328-3342. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.03.012.

16) Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G. Collagen for bone tissue regeneration. Acta Biomater. 2012 Sep;8(9):3191-200. doi: 10.1016/j.actbio.2012.06.014.

17) Jia L, Duan Z, Fan D, Mi Y, Hui J, Chang L. Human-like collagen/nano-hydroxyapatite scaffolds for the culture of chondrocytes. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2013 Mar 1;33(2):727-34. doi: 10.1016/j.msec.2012.10.025.

18) Kuttappan S, Mathew D, Nair MB. Biomimetic composite scaffolds containing bioceramics and collagen/gelatin for bone tissue engineering - a mini review. Int J Biol Macromol. 2016 Dec;93(Pt B):1390-1401. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.06.043.

19) Kosen Y, Miyaji H, Kato A, Sugaya T, Kawanami M. Application of collagen hydrogel/sponge scaffold facilitates periodontal wound healing in class II furcation defects in beagle dogs. J Periodontal Res. 2012 Oct;47(5):626-34. doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01475.x.

20) Momose T, Miyaji H, Kato A, Ogawa K, Yoshida T, Nishida E, Murakami S, Kosen Y, Sugaya T, Kawanami M. Collagen hydrogel scaffold and fibroblast growth factor-2 accelerate periodontal healing of class II furcation defects in dog. Open Dent J. 2016 Jul 29;10:347-59. doi: 10.2174/1874210601610010347.

21) Schmitt T, Kajave N, Cai HH, Gu L, Albanna M, Kishore V. In vitro characterization of xeno-free clinically relevant human collagen and its applicability in cell-laden 3D bioprinting. J Biomater Appl. 2021 Mar;35(8):912-923. doi: 10.1177/0885328220959162.

22) Werkmeister JA, Ramshaw JA. Recombinant protein scaffolds for tissue engineering. Biomed Mater. 2012 Feb;7(1):012002. doi: 10.1088/1748-6041/7/1/012002.

23) Pawelec KM, Confalonieri D, Ehlicke F, van Boxtel HA, Walles H, Kluijtmans SGJM. Osteogenesis and mineralization of mesenchymal stem cells in collagen type I-based recombinant peptide scaffolds. J Biomed Mater Res A. 2017 Jul;105(7):1856-1866. doi: 10.1002/jbm.a.36049.

24) Nakamura K, Tabata Y. A new fluorescent imaging of renal inflammation with RCP. J Control Release. 2010 Dec 20;148(3):351-8. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.09.005.

25) Nakamura K, Iwazawa R, Yoshioka Y. Introduction to a new cell transplantation platform via recombinant peptide petaloid pieces and its application to islet transplantation with

mesenchymal stem cells. Transpl Int. 2016 Sep;29(9):1039-50. doi: 10.1111/tri.12810.

26) Tuin A, Kluijtmans SG, Bouwstra JB, Harmsen MC, Van Luyn MJ. Recombinant gelatin microspheres: novel formulations for tissue repair? Tissue Eng Part A. 2010 Jun;16(6):1811-21. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0592.

27) Furihata T, Miyaji H, Nishida E, Kato A, Miyata S, Shitomi K, Mayumi K, Kanemoto Y, Sugaya T, Akasaka T. Bone forming ability of recombinant human collagen peptide granules applied with β-tricalcium phosphate fine particles. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2020 Oct;108(7):3033-3044. doi: 10.1002/jbm.b.34632.

28) Akiyama Y, Ito M, Toriumi T, Hiratsuka T, Arai Y, Tanaka S, Futenma T, Akiyama Y, Yamaguchi K, Azuma A, Hata KI, Natsume N, Honda M. Bone formation potential of collagen type I-based recombinant peptide particles in rat calvaria defects. Regen Ther. 2020 Dec 24;16:12-22. doi: 10.1016/j.reth.2020.12.001.

29) Li C, Qin W, Lakshmanan S, Ma X, Sun X, Xu B. Hydroxyapatite based biocomposite scaffold: a highly biocompatible material for bone regeneration. Saudi J Biol Sci. 2020 Aug;27(8):2143-2148. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.05.029.

30) Murakami S, Miyaji H, Nishida E, Kawamoto K, Miyata S, Takita H, Akasaka T, Fugetsu B, Iwanaga T, Hongo H, Amizuka N, Sugaya T, Kawanami M. Dose effects of beta-tricalcium phosphate nanoparticles on biocompatibility and bone conductive ability of three-dimensional collagen scaffolds. Dent Mater J. 2017 Sep 26;36(5):573-583. doi: 10.4012/dmj.2016-295.

31) Ogawa K, Miyaji H, Kato A, Kosen Y, Momose T, Yoshida T, Nishida E, Miyata S, Murakami S, Takita H, Fugetsu B, Sugaya T, Kawanami M. Periodontal tissue engineering by nano beta-tricalcium phosphate scaffold and fibroblast growth factor-2 in one-wall infrabony defects of dogs. J Periodontal Res. 2016 Dec;51(6):758-767. doi: 10.1111/jre.12352.

32) Kikuchi M. Hydroxyapatite/collagen bone-like nanocomposite. Biol Pharm Bull. 2013;36(11):1666-9. doi: 10.1248/bpb.b13-00460.

33) Matsui K, Kawai T, Ezoe Y, Yanagisawa T, Takahashi T, Kamakura S. Segmental bone reconstruction by octacalcium phosphate collagen composites with teriparatide. Tissue Eng Part A. 2021 May;27(9-10):561-571. doi: 10.1089/ten.TEA.2020.0150.

34) Santhakumar S, Oyane A, Nakamura M, Yoshino Y, Alruwaili MK, Miyaji H. Bone tissue regeneration by collagen scaffolds with different calcium phosphate coatings: amorphous calcium phosphate and low-crystalline apatite. Materials (Basel). 2021 Oct 7;14(19):5860. doi: 10.3390/ma14195860.

35) Kanemoto Y, Miyaji H, Nishida E, Miyata S, Mayumi K, Yoshino Y, Kato A, Sugaya T, Akasaka T, Nathanael AJ, Santhakumar S, Oyane A. Periodontal tissue engineering using an apatite/collagen scaffold obtained by a plasma- and precursor-assisted biomimetic process. J Periodontal Res. 2021 Nov 16. doi: 10.1111/jre.12946.

36) Nagayasu-Tanaka T, Anzai J, Takaki S, Shiraishi N, Terashima A, Asano T, Nozaki T, Kitamura M, Murakami S. Action mechanism of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the promotion of periodontal regeneration in beagle dogs. PLoS One. 2015 Jun 29;10(6):e0131870. doi: 10.1371/journal.pone.0131870.
37) Suzawa M, Tamura Y, Fukumoto S, Miyazono K, Fujita T, Kato S, Takeuchi Y. Stimulation of smad1 transcriptional activity by ras-extracellular signal-regulated kinase pathway: a possible mechanism for collagen-dependent osteoblastic differentiation. J Bone Miner Res. 2002 Feb;17(2):240-8. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.2.240.
38) Verstappen JFM, Jin J, Koçer G, Haroon M, Jonkheijm P, Bakker AD, Klein-Nulend J, Jaspers RT. RGD-functionalized supported lipid bilayers modulate pre-osteoblast adherence and promote osteogenic differentiation. J Biomed Mater Res A. 2020 Apr;108(4):923-937. doi: 10.1002/jbm.a.36870.
39) An S, Gao Y, Huang X, Ling J, Liu Z, Xiao Y. A comparative study of the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells cultured on β-TCP ceramics and demineralized bone matrix with or without osteogenic inducers in vitro. Int J Mol Med. 2015 May;35(5):1341-6. doi: 10.3892/ijmm.2015.2122.
40) Maazouz Y, Rentsch I, Lu B, Santoni BLG, Doebelin N, Bohner M. In vitro measurement of the chemical changes occurring within β-tricalcium phosphate bone graft substitutes. Acta Biomater. 2020 Jan 15;102:440-457. doi: 10.1016/j.actbio.2019.11.035.
41) Chang YL, Stanford CM, Keller JC. Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: implications for hydroxyapatite (HA)-enhanced bone formation. J Biomed Mater Res. 2000 Nov;52(2):270-8. doi: 10.1002/1097-4636(200011)52:2<270::aid-jbm5>3.0.co;2-1.
42) Dvorak MM, Siddiqua A, Ward DT, Carter DH, Dallas SL, Nemeth EF, Riccardi D. Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Apr 6;101(14):5140-5. doi: 10.1073/pnas.0306141101.
43) Kanatani M, Sugimoto T, Kano J, Kanzawa M, Chihara K. Effect of high phosphate concentration on osteoclast differentiation as well as bone-resorbing activity. J Cell Physiol. 2003 Jul;196(1):180-9. doi: 10.1002/jcp.10270.
44) Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. Plast Reconstr Surg. 1988 May;81(5):672-6. doi: 10.1097/00006534-198805000-00004.
45) Wang HL, Boyapati L. "PASS" principles for predictable bone regeneration. Implant Dent. 2006 Mar;15(1):8-17. doi: 10.1097/01.id.0000204762.39826.0f.
46) Sheikh Z, Qureshi J, Alshahrani AM, Nassar H, Ikeda Y, Glogauer M, Ganss B. Collagen based barrier membranes for periodontal guided bone regeneration applications. Odontology. 2017

Jan;105(1):1-12. doi: 10.1007/s10266-016-0267-0.

47) Muraya K, Kawasaki T, Yamamoto T, Akutsu H. Enhancement of cellular adhesion and proliferation in human mesenchymal stromal cells by the direct addition of recombinant collagen I peptide to the culture medium. Biores Open Access. 2019 Nov 22;8(1):210-218. doi: 10.1089/biores.2019.0012.

48) Naritomi M, Mizuno M, Katano H, Ozeki N, Otabe K, Komori K, Fujii S, Ichinose S, Tsuji K, Koga H, Muneta T, Sekiya I. Petaloid recombinant peptide enhances in vitro cartilage formation by synovial mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 2019 Jun;37(6):1350-1357. doi: 10.1002/jor.24042.

49) Ji X, Yuan X, Ma L, Bi B, Zhu H, Lei Z, Liu W, Pu H, Jiang J, Jiang X, Zhang Y, Xiao J. Mesenchymal stem cell-loaded thermosensitive hydroxypropyl chitin hydrogel combined with a three-dimensional-printed poly(ε-caprolactone) /nano-hydroxyapatite scaffold to repair bone defects via osteogenesis, angiogenesis and immunomodulation. Theranostics. 2020 Jan 1;10(2):725-740. doi: 10.7150/thno.39167.

50) Xia Y, Chen J, Ding J, Zhang J, Chen H. IGF1- and BM-MSC-incorporating collagen-chitosan scaffolds promote wound healing and hair follicle regeneration. Am J Transl Res. 2020 Oct 15;12(10):6264-6276.

51) Jiang L, Ding Z, Xia S, Liu Y, Lei S, Zhong M, Chen X. Poly lactic-co-glycolic acid scaffold loaded with plasmid DNA encoding fibroblast growth factor-2 promotes periodontal ligament regeneration of replanted teeth. J Periodontal Res. 2020 Aug;55(4):488-495. doi: 10.1111/jre.12734.

52) Zhu W, Zhang Q, Zhang Y, Cen L, Wang J. PDL regeneration via cell homing in delayed replantation of avulsed teeth. J Transl Med. 2015 Nov 14;13:357. doi: 10.1186/s12967-015-0719-2.

53) Takahashi D, Odajima T, Morita M, Kawanami M, Kato H. Formation and resolution of ankylosis under application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) to class III furcation defects in cats. J Periodontal Res. 2005 Aug;40(4):299-305. doi: 10.1111/j.1600-0765.2005.00794.x.

54) Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsuura M, Ozawa H, Toyama Y, Bonewald LF, Kudo A. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. J Bone Miner Res. 1999 Jul;14(7):1239-49. doi: 10.1359/jbmr.1999.14.7.1239.

55) Du J, Li M. Functions of periostin in dental tissues and its role in periodontal tissues' regeneration. Cell Mol Life Sci. 2017 Dec;74(23):4279-4286. doi: 10.1007/s00018-017-2645-3.

56) Park CH, Rios HF, Jin Q, Sugai JV, Padial-Molina M, Taut AD, Flanagan CL, Hollister SJ, Giannobile WV. Tissue engineering bone-ligament complexes using fiber-guiding scaffolds. Biomaterials. 2012 Jan;33(1):137-45. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.057.
57) Basu A, Rothermund K, Ahmed MN, Syed-Picard FN. Self-assembly of an organized cementum-periodontal ligament-like complex using scaffold-free tissue engineering. Front Physiol. 2019 Apr 11;10:422. doi: 10.3389/fphys.2019.00422.
58) Pilipchuk SP, Fretwurst T, Yu N, Larsson L, Kavanagh NM, Asa'ad F, Cheng KCK, Lahann J, Giannobile WV. Micropatterned scaffolds with Immobilized growth factor genes regenerate bone and periodontal ligament-like tissues. Adv Healthc Mater. 2018 Nov;7(22):e1800750. doi: 10.1002/adhm.201800750.
59) Arzate H, Zeichner-David M, Mercado-Celis G. Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. Periodontol 2000. 2015 Feb;67(1):211-33. doi: 10.1111/prd.12062.
60) Arweiler NB, Netuschil L. The oral microbiota. Adv Exp Med Biol. 2016;902:45-60. doi: 10.1007/978-3-319-31248-4_4.
61) E Nishida, H Miyaji, H Takita, I Kanayama, M Tsuji, T Akasaka, T Sugaya, R Sakagami, M Kawanami. Graphene oxide coating facilitates the bioactivity of scaffold material for tissue engineering. Jpn J Appl Phys. 2014 M;53:1-7(06JD04). doi.org/10.2147/IJN.S62342.
62) Ng HW, Zhang Y, Naffa R, Prabakar S. Monitoring the degradation of collagen hydrogels by collagenase clostridium histolyticum. Gels. 2020 Nov 27;6(4):46. doi: 10.3390/gels6040046.
63) Katagiri H, Mendes LF, Luyten FP. Reduction of BMP6-induced bone formation by calcium phosphate in wild-type compared with nude mice. J Tissue Eng Regen Med. 2019 May;13(5):846-856. doi: 10.1002/term.2837.
64) Hoogendoorn HA, Renooij W, Akkermans LM, Visser W, Wittebol P. Long-term study of large ceramic implants (porous hydroxyapatite) in dog femora. Clin Orthop Relat Res. 1984 Jul-Aug;(187):281-8.
65) Kurashina K, Kurita H, Wu Q, Ohtsuka A, Kobayashi H. Ectopic osteogenesis with biphasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium phosphate in rabbits. Biomaterials. 2002 Jan;23(2):407-12. doi: 10.1016/s0142-9612(01)00119-3.
66) Kamakura S, Sasano Y, Shimizu T, Hatori K, Suzuki O, Kagayama M, Motegi K. Implanted octacalcium phosphate is more resorbable than beta-tricalcium phosphate and hydroxyapatite. J Biomed Mater Res. 2002 Jan;59(1):29-34. doi: 10.1002/jbm.1213.
67) Ibara A, Miyaji H, Fugetsu B, Nishida E, Takita H, Tanaka S, Sugaya T, Kawanami K. Osteoconductivity and biodegradability of collagen scaffold coated with nano-β-TCP and fibroblast growth factor 2. J Nanomater. Journal of Nanomaterials, vol. 2013;11 pages. doi.org/10.1155/2013/639502

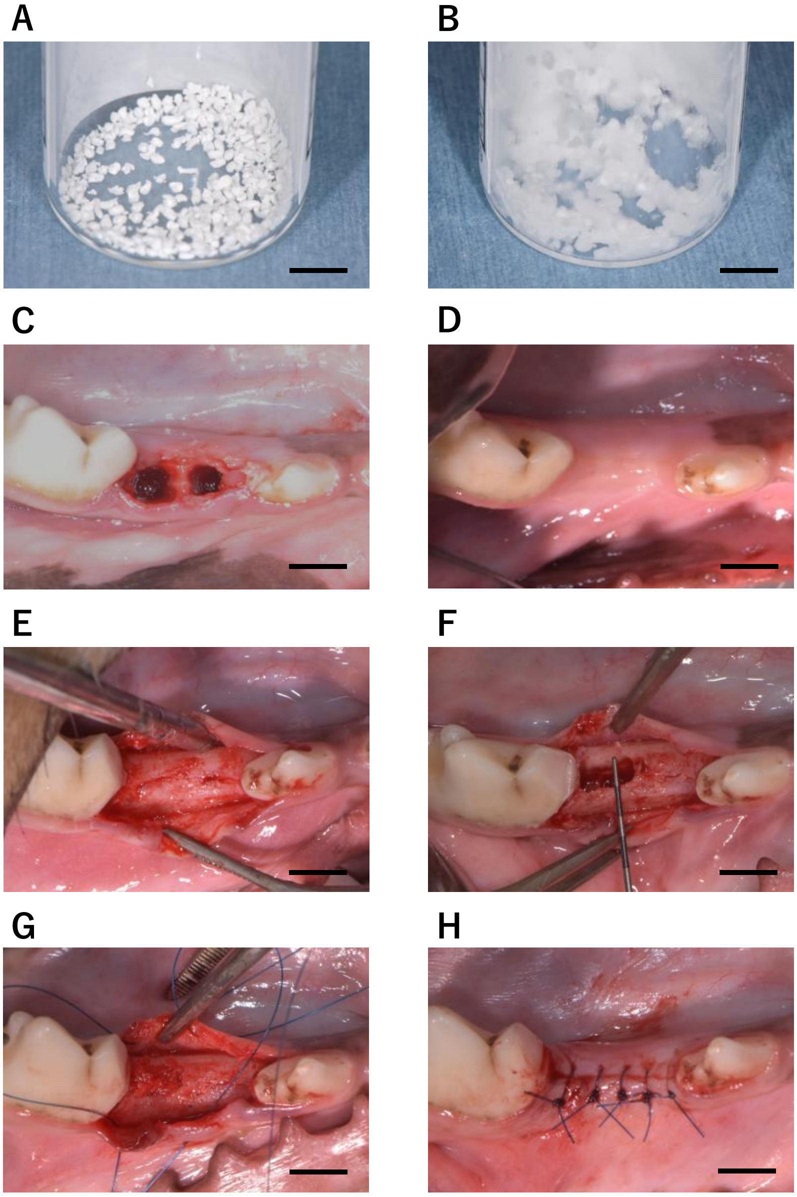

図１　β-TCP/RCP の調整並びに外科手術方法のデジタル写真

　A：RCP．B：β-TCP/RCP．C：第四前臼歯抜歯時．D：抜歯後８週の顎堤粘膜．E：粘膜骨膜弁剥離時．F：骨欠損作製時．G：骨欠損部への β-TCP/RCP 埋植時．H：粘膜骨膜弁復位縫合時．スケールバー；5ｍｍ．

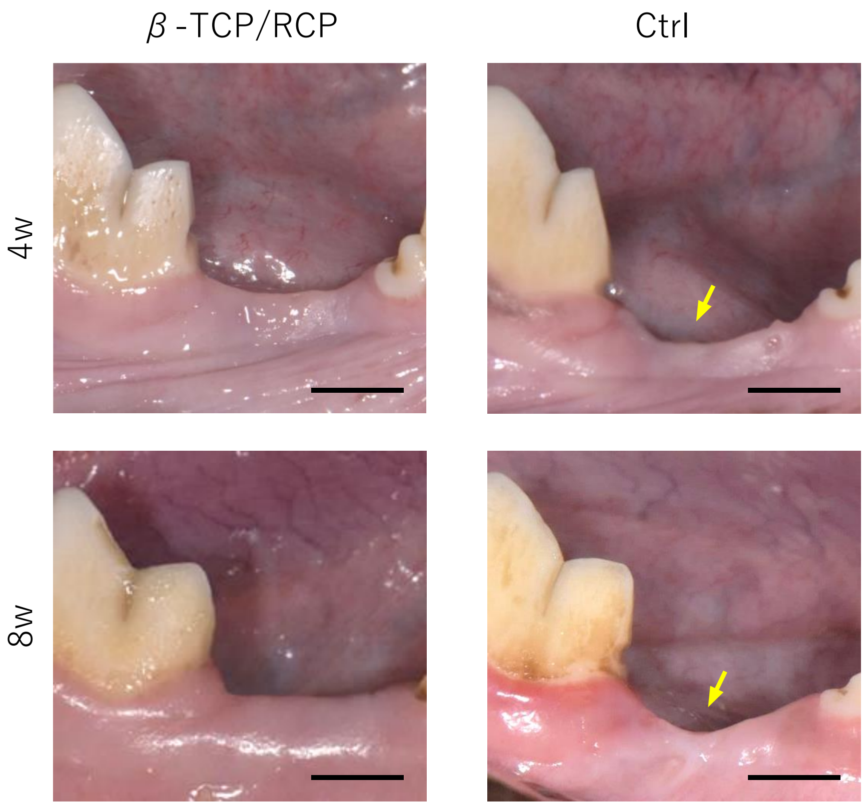

図２　外科手術後の口腔内デジタル写真

術後４週，８週におけるβ-TCP/RCP 群，Ctrl 群の埋植部位の口腔内写真．Ctrl 群において歯肉陥凹部を観察した（黄色矢印）．スケールバー；5ｍｍ.

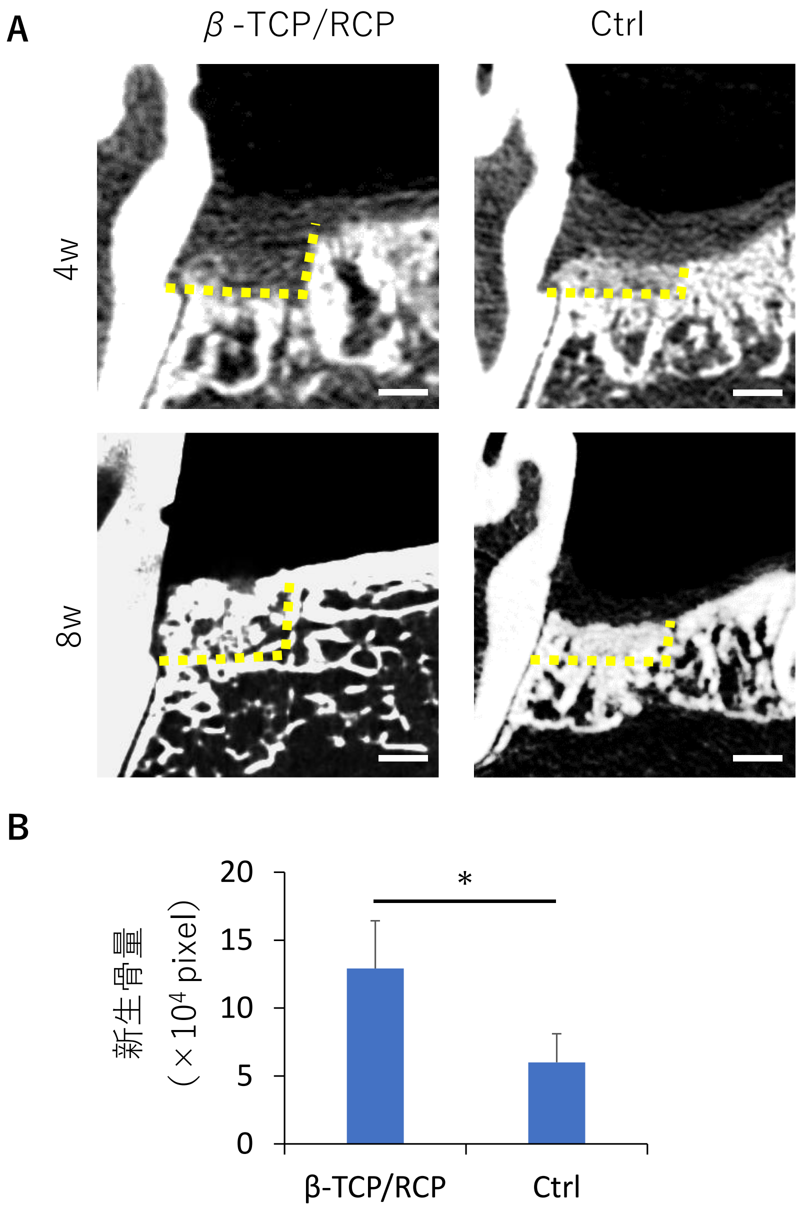

図 3　マイクロ CT 画像分析

A：術後 4 週，8 週における β-TCP/RCP 群，Ctrl 群のマイクロ CT 画像．黄色破線は骨欠損概形を示す．スケールバー；2mm．B：新生骨量（N＝3，平均+標準偏差）．統計分析方法：Wilcoxon の順位和検定，*P＜0.05.

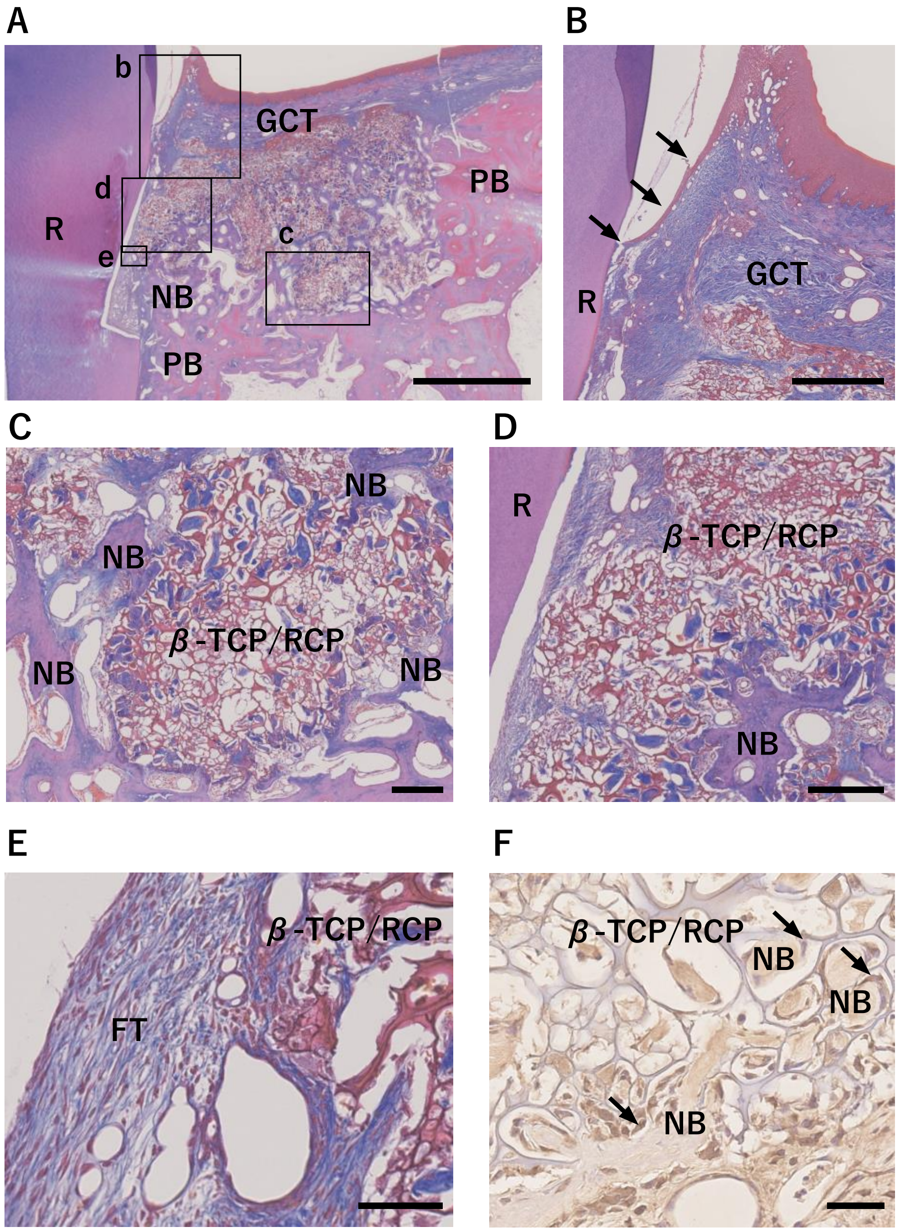

図 4　β-TCP/RCP 群 4 週の MT および OCN 染色

A- E；MT 染色像．A：骨欠損部全体像．B：内縁上皮（矢印）．C：β-TCP/RCP と新生骨様組織．D：歯根付近の β-TCP/RCP．E：歯根付近の線維性結合組織．F；OCN 染色像．β-TCP/RCP と新生骨様組織周囲にＯＣＮ陽性細胞（矢印）を認めた．B，C，D，E は b，c，d，e のフレーム領域における高倍率画像を示す．スケールバー；A：2mm，B，D：500μm，C：200μm，　E：100μm，F：50μm．

略語の説明；FT：線維性結合組織，GCT：歯肉結合組織，MT：マッソントリクローム，NB：新生骨様組織，OCN：オステオカルシン，PB：既存骨，R：歯根．

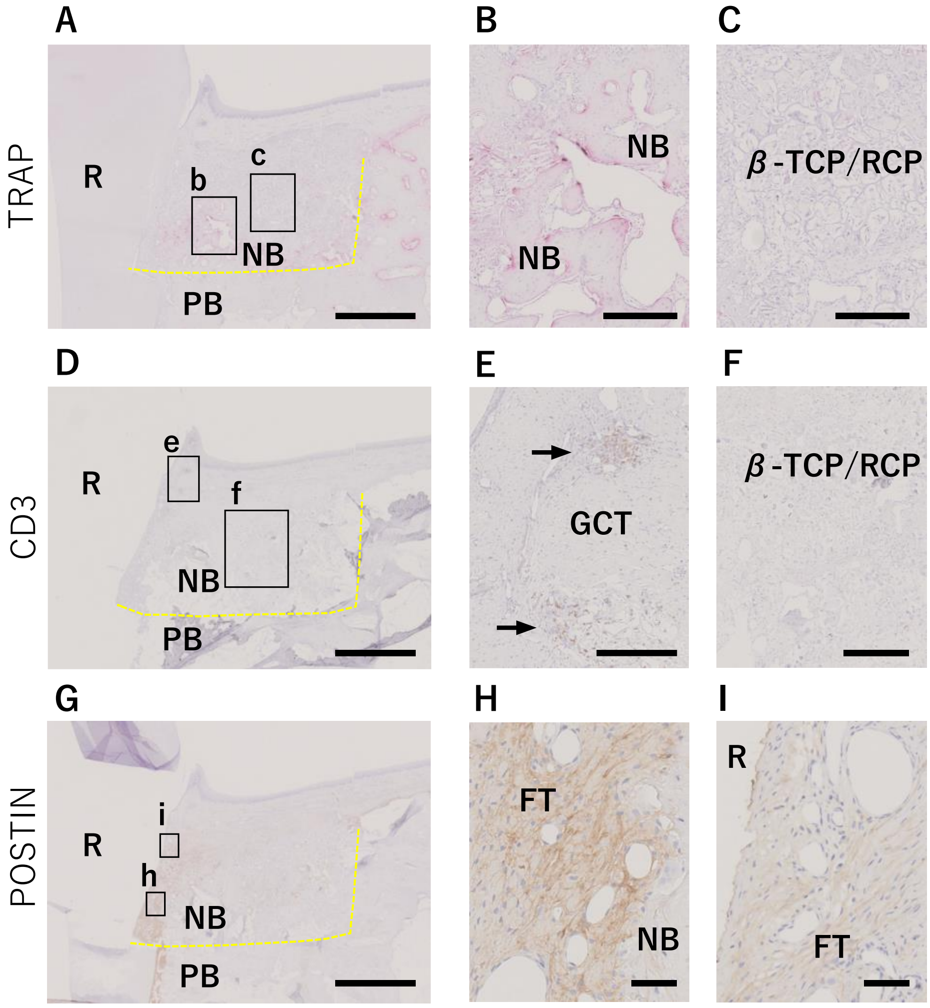

図 5　β-TCP/RCP 群 4 週の TRAP，CD3，POSTIN 染色

A-C；TRAP 染色像．A：骨欠損部全体像．B：新生骨様組織付近．C：β-TCP/RCP 付近．D-F：CD3 染色像．D：骨欠損部全体像．E：歯肉溝付近．CD3 陽性細胞（矢印）を認めた．F：β-TCP/RCP 付近．G-Ｉ；POSTIN 染色像．G：骨欠損部全体像．H：根尖側歯根付近．I：歯冠側歯根付近．B，C，E，F，H，Ｉはそれぞれ b，c，e，f，h，i のフレーム領域における高倍率画像を示す．スケールバー；A，D，G：2mm，B，C：500μm，E，F：100μm，H，I：50μm．黄色破線は骨欠損部概形を示す．

略語の説明；FT：線維性結合組織，GCT：歯肉結合組織，NB：新生骨様組織，PB：既存骨，POSTIN：ペリオスチン，R：歯根，TRAP：酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ染色．

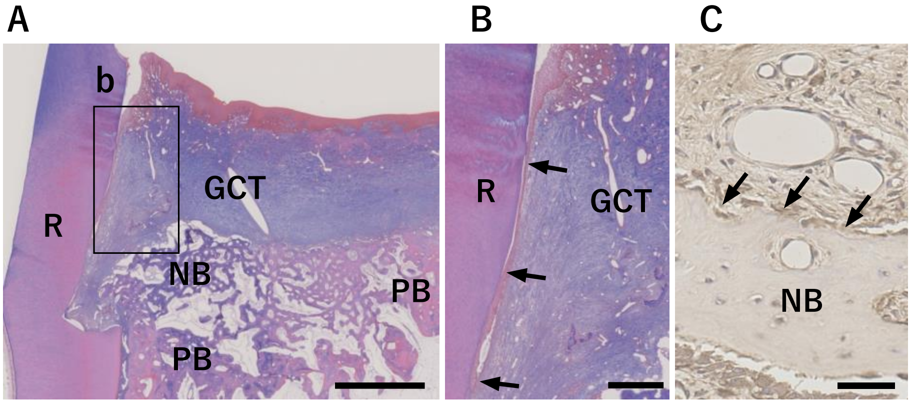

図 6　Ctrl 群 4 週の MT および OCN 染色

A，B；MT 染色像．A：骨欠損部全体像．B：内縁上皮（矢印）．C；OCN 染色像．新生骨様組織周囲にＯＣＮ陽性細胞（矢印）を認めた．B は b のフレーム領域における高倍率画像を示す．スケールバー；A：2mm，B：500μm，C：50μm．

略語の説明；GCT：歯肉結合組織，MT：マッソントリクローム，NB：新生骨様組織，OCN：オステオカルシン，PB：既存骨，R：歯根．

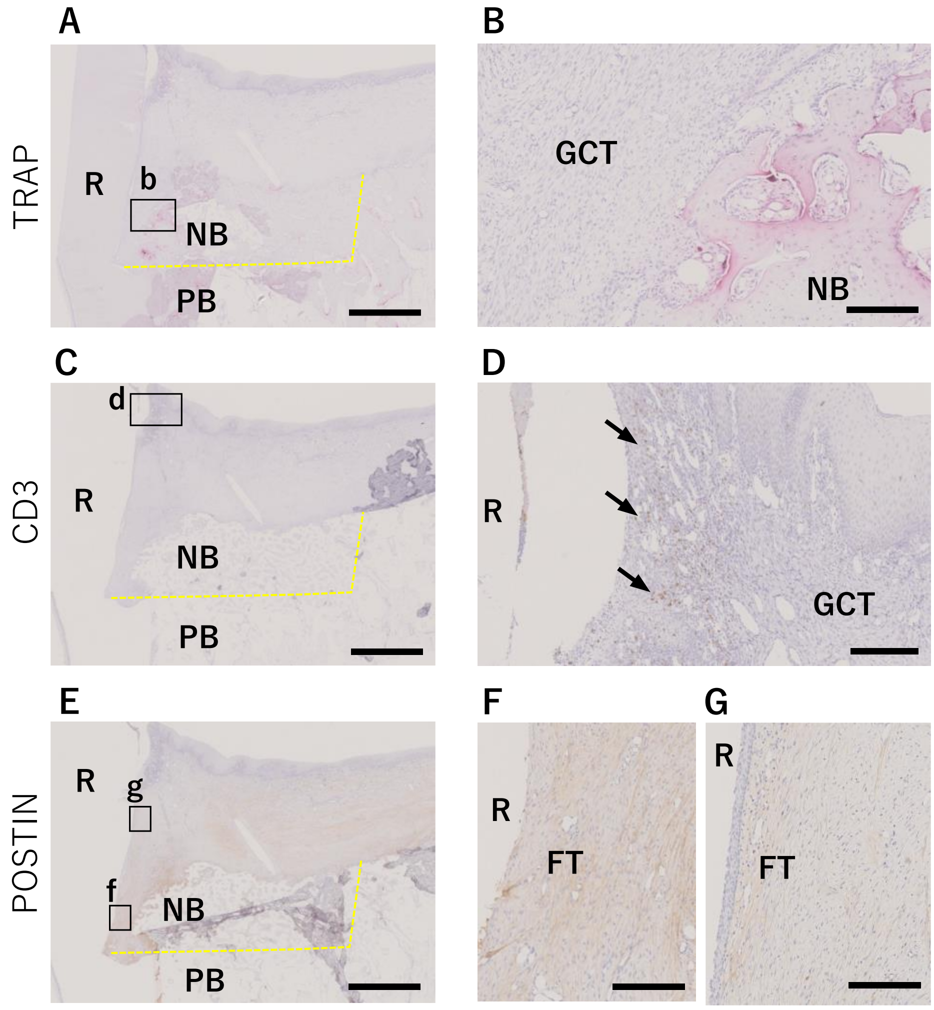

図 7　Ctrl 群 4 週の TRAP，CD3，POSTIN 染色

A，B；TRAP 染色像．A：骨欠損部全体像．B：新生骨様組織付近．　C，D：CD3 染色像．C：骨欠損部全体像．D：歯肉溝付近．CD3 陽性細胞（矢印）を認めた．E-G；POSTIN 染色像．E：骨欠損部全体像．F：根尖側歯根付近．G：歯冠側歯根付近．B，D，F，G は b，d，f，g のフレーム領域における高倍率画像を示す．スケールバー；A，C，E：2mm，B，D，F，G：200μm．黄色破線は骨欠損部概形を示す．

略語の説明；FT：線維性結合組織，GCT：歯肉結合組織，NB：新生骨，PB：既存骨，POSTIN：ペリオスチン，R：歯根，TRAP：酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ染色．

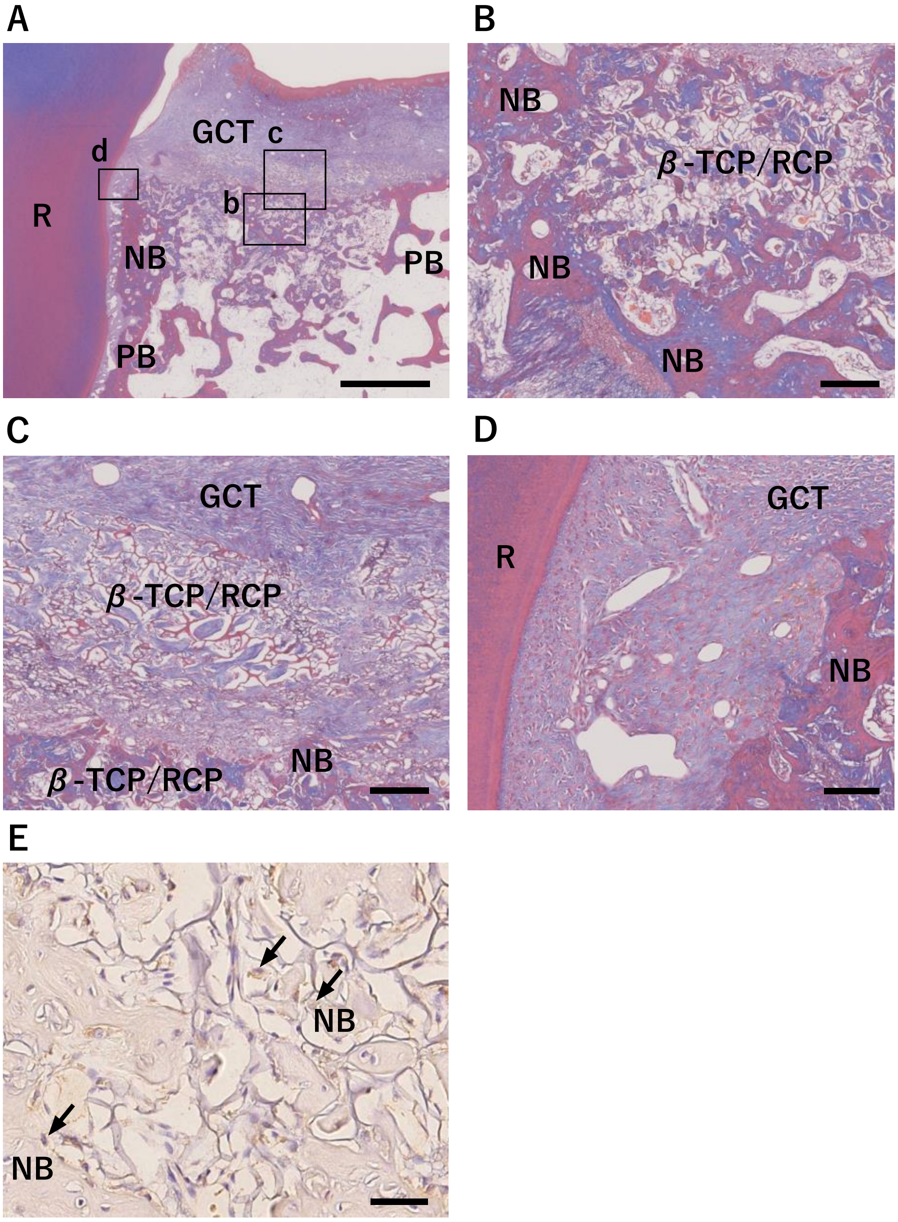

図８　β-TCP/RCP 群 ８週の MT および OCN 染色

A-D；MT 染色像．A：骨欠損部全体像．B：β-TCP/RCP と新生骨様組織．C：歯肉結合組織内の β-TCP/RCP．D：歯根膜様組織．E；OCN 染色像．新生骨様組織周囲にＯＣＮ陽性細胞（矢印）を認めた．B，C，D は b，c，d のフレーム領域における高倍率画像を示す．スケールバー；A：2mm，B，C：200μm，D：100μm，E：50μm．

略語の説明；FT：線維性結合組織，GCT：歯肉結合組織，MT：マッソントリクローム，NB：新生骨様組織，OCN：オステオカルシン，PB：既存骨，R：歯根．

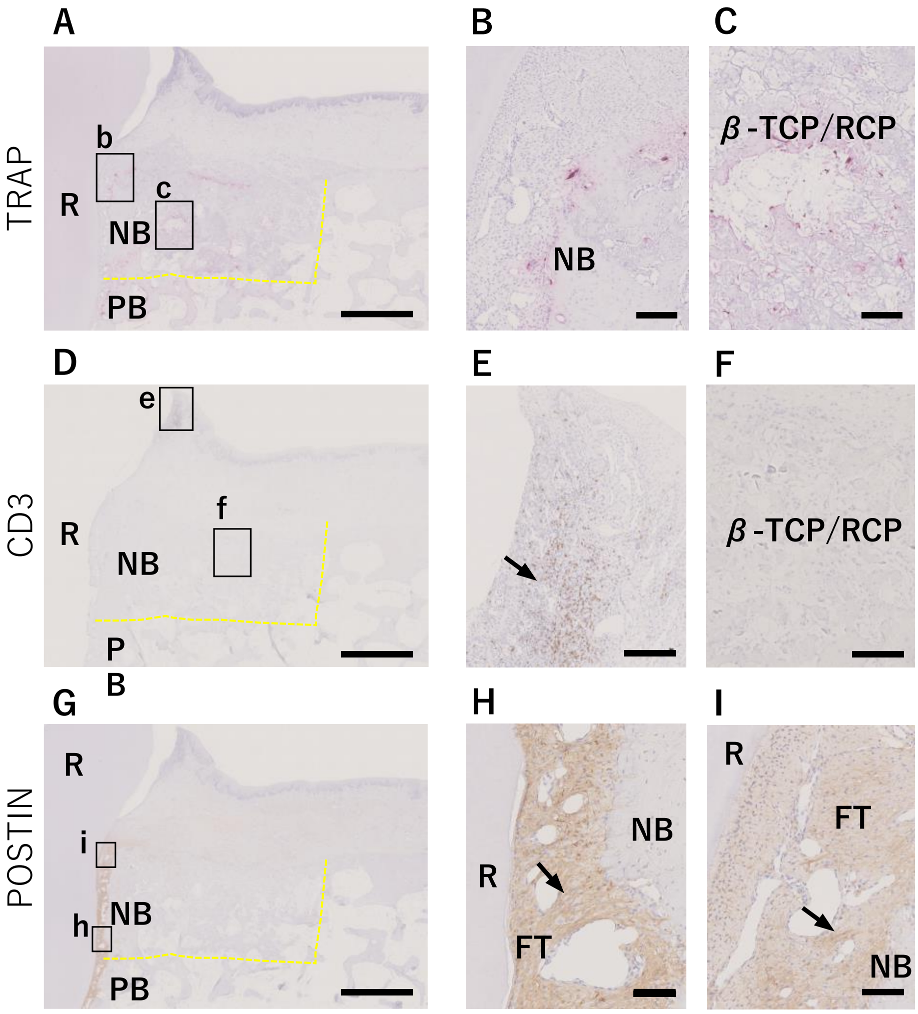

図 9　β-TCP/RCP 群 8 週の TRAP，CD3，POSTIN 染色

A-C；TRAP 染色像．A：骨欠損部全体像．B：新生骨様組織付近．C：β-TCP/RCP 付近．D-F：CD3 染色像．D：骨欠損部全体像．E：歯肉溝付近．CD3 陽性細胞（矢印）を認めた．F：β-TCP/RCP 付近．G-Ｉ；POSTIN 染色像．G：骨欠損部全体像．H：根尖側歯根付近．斜走線維様の発現（矢印）を認めた．I：歯冠側歯根付近．斜走線維様の発現（矢印）を認めた．B, C，E，F，H，I は b，c，e，f，h，i のフレーム領域における高倍率画像を示す．スケールバー；A，D，G：2mm，B，C，E，F：200µm，H，I：100µm．黄色破線は骨欠損部概形を示す．

略語の説明；FT：線維性結合組織，GCT：歯肉結合組織，NB：新生骨様組織，PB：既存骨，POSTIN：ペリオスチン，R：歯根，TRAP：酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ染色．

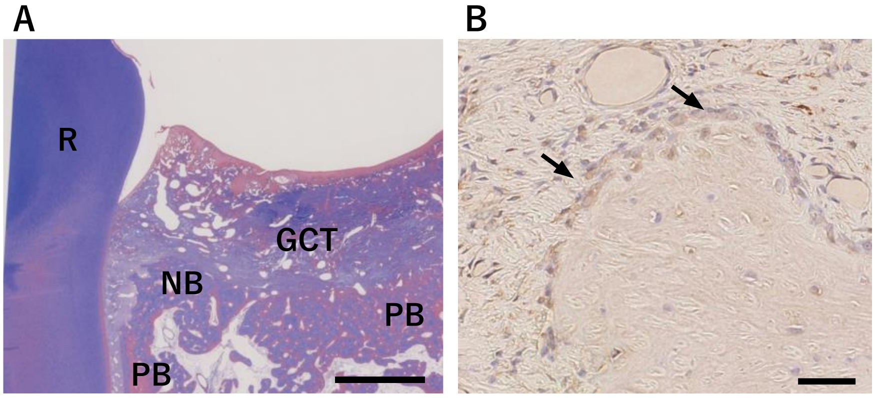

図 10　Ctrl 群 8 週の MT および OCN 染色

A；MT 染色像．A：骨欠損部全体像．B；OCN 染色像．新生骨様組織周囲にＯＣＮ陽性細胞（矢印）を認めた．スケールバー；A：2mm，B：50μm.

　略語の説明；GCT：歯肉結合組織，MT：マッソントリクローム，NB：新生骨様組織，OCN：オステオカルシン，PB：既存骨，R：歯根.

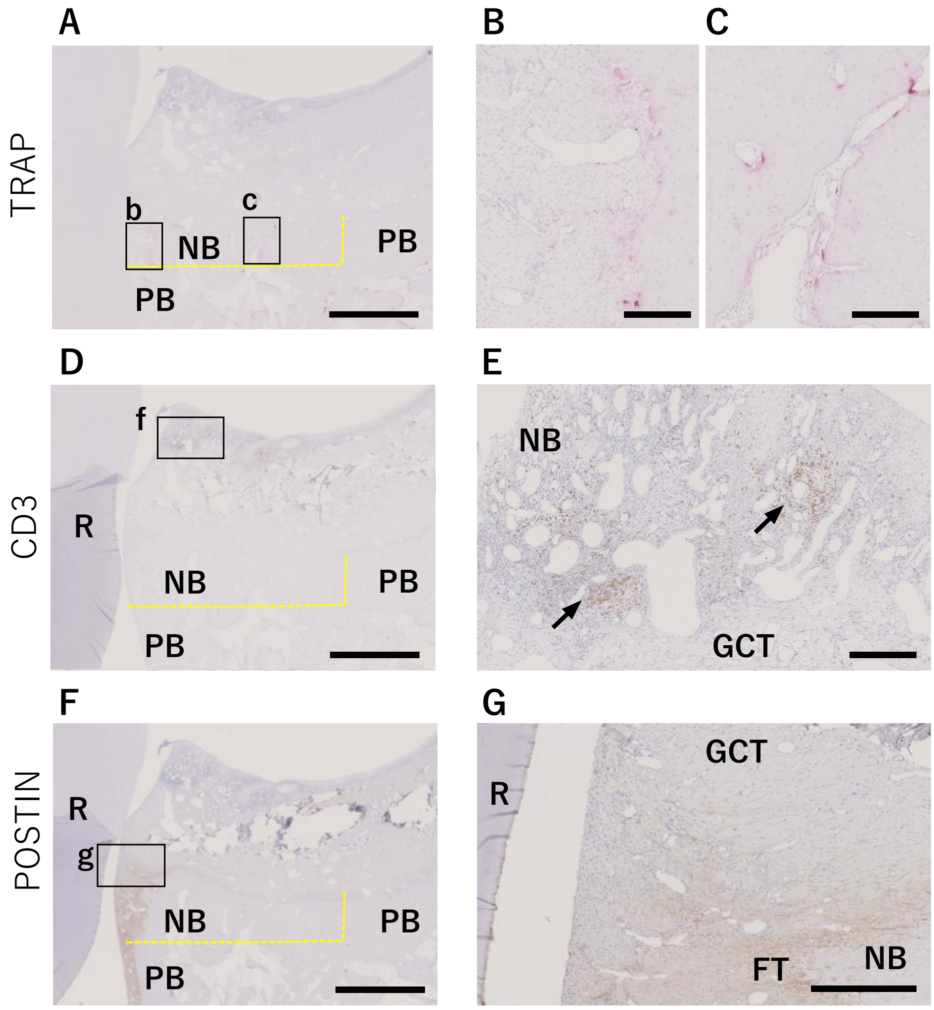

図 11　Ctrl 群 4 週の TRAP，CD3，POSTIN 染色

A-C；TRAP 染色像．A：骨欠損部全体像．B，C：新生骨様組織付近．D，E：CD3 染色像．D：骨欠損部全体像．E：歯肉溝付近．CD3 陽性細胞（矢印）を認めた．F，G；POSTIN 染色像．F：骨欠損部全体像．G：根尖側歯根付近．B，C，F，G は b，c，f，g のフレーム領域における高倍率画像を示す．スケールバー；A，D，F：2mm，B，C，E，G：200μm．黄色破線は骨欠損部概形を示す．

略語の説明；FT：線維性結合組織，GCT：歯肉結合組織，NB：新生骨様組織，PB：既存骨，POSTIN：ペリオスチン，R：歯根，TRAP：酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ染色．

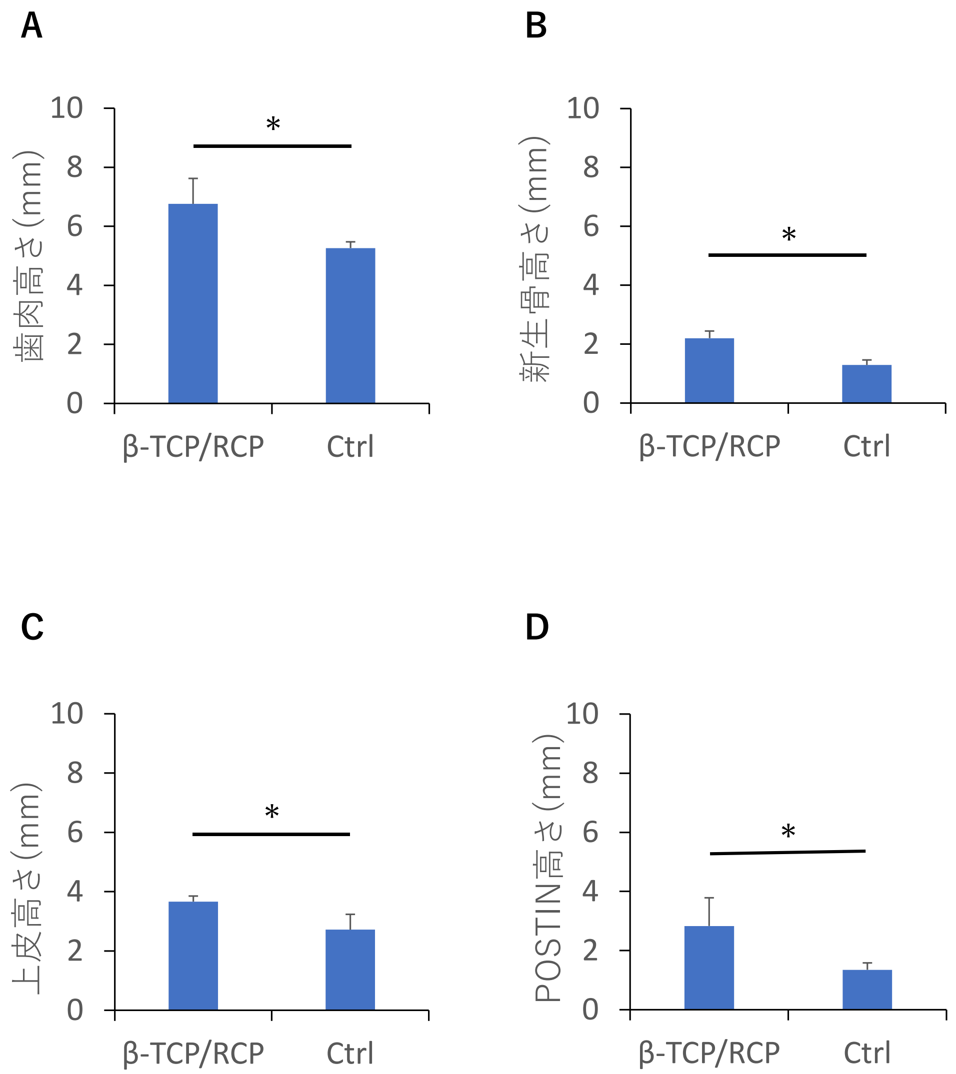

図 12　組織学的計測

A：歯肉高さ（mm），B：新生骨高さ（mm），C：上皮高さ（mm），D：POSTIN 高さ（mm），（すべて N＝3，平均+標準偏差）．統計分析方法：Wilcoxon の順位和検定，*P＜0.05.

略語の説明；POSTIN：ペリオスチン．