



Title	リン酸化プルランと塩基性線維芽細胞増殖因子のOnlay Graftによる骨増生 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	竹中, 裕喜
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15955号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92554
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroki_Takenaka_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

大学院歯学院口腔医学専攻 博士（歯学） 氏 名 竹 中 裕 喜

学 位 論 文 題 名

リン酸化プルランと塩基性線維芽細胞増殖因子の Onlay Graft による骨増生

キーワード 塩基性線維芽細胞増殖因子、リン酸化プルラン、骨増生、皮質骨穿孔、Onlay graft

塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）は血管新生や骨芽細胞、未分化間葉系細胞などの増殖を促進することから、歯周組織再生への応用が進められ上市に至っている。しかし、臨床研究では 5.6mm の骨欠損部に対する新生骨形成量が、歯肉剥離搔爬術で 0.676mm、bFGF を移植した場合には 1.927mm と報告されており、大きな歯周組織欠損に対して十分な再生量が得られているとは言えないのが現状である。さらに、人工骨との併用も試みられているが再生量の増加はほとんど見られていない。一方、皮質骨を穿孔し骨髓腔からの細胞を欠損部に導入する方法は、再生効果を向上させると考えられており、歯槽骨増生で広く用いられている。したがって、皮質骨穿孔と bFGF を併用すると、骨髓由来間葉系細胞や血管を欠損部に誘導して再生量を増加できる可能性がある。しかし、現在の bFGF 製剤は流動性が高いため、皮質骨穿孔すると出血により欠損局所に滞留できずに流出する危険性が高く、皮質骨穿孔は推奨されていない。

一方、リン酸化プルラン（PPL）は水に濡れている骨に接着し、塩化カルシウムを混和するとゾル状やゲル状にでき、 β TCP 顆粒を混和するとパテ状になって強度も向上するため、出血があっても骨欠損局所で形態が維持されと考えられる。また、PPL の分子量を変えることで吸収性や物性の調整が可能で、生体親和性にも優れ PPL 周囲に炎症が生じることはなく、PPL の一部には直接骨基質が添加して骨内に取り込まれることも報告されている。これらのことから、PPL をパテ状にして bFGF の担体とし、骨髓腔へ穿孔して出血した骨欠損部局所に移植すると、骨面に接着し欠損部局所に形態を維持しながら滞留して、骨髓由来細胞や血管を PPL 内に誘導し、再生効果を向上できるのではないかと思われる。

そこで本研究では、ラット頭蓋骨の皮質骨を穿孔し、bFGF と塩化カルシウム、 β TCP 顆粒を複合化した PPL を onlay graft して、PPL 内への血管新生、細胞侵入、骨形成に及ぼす効果を検討するとともに、PPL を担体とした場合の bFGF の至適濃度を検討した。

分子量 32 万と 100 万の PPL を等量混和し、塩化カルシウム、注射用水、bFGF（トラフェルミン）を 0、0.01、0.03、0.1% 加え、 β TCP を混和してパテ状の移植材を作製した。実験動物は 10 週齢の Wister 雄性ラットを用い、全身麻酔と局所麻酔を行って、頭蓋骨を露出させ、直径 0.25mm のラウンドバーで脳硬膜に達するまで 9 か所を穿孔した。作製した移植材で骨穿孔部を全て被覆して皮弁を復位し、直ちに切開部を縫合した。観察期間は 7 日、28 日とし脱灰薄切標本を作製して、ヘマトキシリン・エオジン染色を行なって光学顕微鏡観察を行なうとともに、

28 日の試料については頭蓋骨上面の骨形成高さを計測した。

組織学的観察の結果、7 日後の bFGF 0%では、移植材中に PPL や β TCP が見られ、周囲に炎症はなく線維性結合組織に囲まれていた。移植材近傍の結合組織内にはわずかに血管が認められる程度であった。bFGF 0.01%は 0%と類似の所見であったが、bFGF 0.03%では頭蓋骨上の結合組織は細胞に富んでおり、類円形や方形の細胞、新生血管が多数見られ、PPL の残存は少なかった。bFGF 0.1%では、皮下結合組織の直下付近まで密な結合組織が見られ、類円形の細胞や血管が多かった。

28 日後の bFGF 0%および 0.01%では、頭蓋骨上に PPL や β TCP が残存し、紡錘形や類円形の細胞を含む結合組織で囲まれていたが、新生骨の形成は頭蓋骨上にも移植材中にも見られなかった。bFGF 0.03%では、頭蓋骨上に厚い新生骨が見られ、新生骨は走行が不規則でヘマトキシリンに濃染するセメントラインは観察されなかった。新生骨と頭蓋骨の間には結合組織が介在している部分が多く、新生骨と頭蓋骨が接している部分では頭蓋骨は平坦で吸収窩などは見られなかった。新生骨の結合組織側には卵円形や方形の骨芽細胞様細胞が多数配列していた。bFGF 0.1%は、0.03%と類似の所見であったが、新生骨の結合組織側には紡錘形から扁平な細胞が見られる部位があった。28 日後の新生骨形成は、bFGF 0%では全試料でまったくみられず、0.01%ではごく少量の骨形成が見られた試料があったのに対して、bFGF 0.03%と 0.1%は全ての試料で骨形成が認められた。新生骨の高さは、bFGF 0.03%では 0%との間に有意差 ($p < 0.05$) が認められ、0.1%は 0%および 0.01%との間に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

bFGF は極めて不安定な成長因子で、崩壊が早く酸性あるいはアルカリ性でも活性が失われるが、本実験では血管新生や骨増生が見られ bFGF が機能していたと考えられることから、PPL は生体内での吸収過程においても pH をほぼ中性に維持し、bFGF の活性低下はなかったと考えられた。また、臨床応用されている bFGF 製剤は 0.3%が最も新生骨形成に有効とされているが、本実験では 0.03 %や 0.1 %で血管新生効果や骨形成効果が最も高かったことから、PPL を担体とした場合にはより低濃度で同等の効果が得られる可能性があると思われた。さらに、28 日後の bFGF 0.1%では頭蓋骨と新生骨の間に結合組織の介在が見られたことから、bFGF によって PPL 内に誘導された細胞が直接骨芽細胞へ分化し骨を形成した可能性が示唆された。また、リモデリングでなくモデリングによる骨形成が生じていたと考えられることから、本移植材内では急速な骨形成が進行していたと考えられた。

以上の結果から、リン酸化プルランと塩化カルシウム、 β TCP の複合体を bFGF の担体とし、皮質骨穿孔を行って onlay graft に用いることは骨形成に有効であり、この場合の bFGF の至適濃度は 0.03~0.1%であることが明らかとなった。