



Title	リン酸化プルラン／塩化カルシウム／ β -TCP／BMP-2 複合体移植によるBMP 濃度の低減と垂直的骨造成の検討
Author(s)	原田, 天乃
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。利用可能日以前の閲覧方法は https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ をご参照ください。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第16938号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16938
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99783
Type	doctoral thesis
File Information	Amano_Harada_summary.pdf, 全文の要約



学位論文内容の要約

学位論文題目

リン酸化プルラン／塩化カルシウム／ β -TCP
／BMP-2 複合体移植による BMP 濃度の低減
と垂直的骨造成の検討

博士の専攻分野名称 博士（歯学） 氏名 原田 天乃

骨形成タンパク質（bone morphogenetic protein-2：BMP-2）は優れた骨誘導能を有する一方で、単独では速やかに拡散・代謝されるため、適切な担体により局所滞留性と徐放性を付与することが不可欠である。臨床で主に用いられてきたコラーゲンスポンジは BMP 担持能や徐放性に優れるものの、機械的強度が低く再生スペースの維持が困難であること、動物由来材料であること、低用量 BMP-2 では十分な骨形成が得られず高用量使用が求められることなど、感染リスクや過剰骨形成・炎症・腫瘍発生リスクの増大といった問題が指摘されている。これらの課題を克服するため、本研究では生体吸収性高分子であるリン酸化プルラン

（phosphorylated pullulan：PPL）に着目し、BMP-2 の新規担体としての有用性を検討した。PPL はリン酸基による負電荷を有し、正電荷をもつ BMP-2 との静電的結合が期待されるとともに、CaCl₂や β リン酸三カルシウム（ β TCP）との混和によりゲル状・硬質ゴム状まで物性調整が可能であり、骨再生に必要な賦形性と機械的強度を兼ね備えた材料となり得る。

本実験 1 では、BMP-2 の担体としてリン酸化プルラン（PPL）を用いた際に、PPL の分子量の違い、 β -TCP の添加有無、さらに BMP-2 濃度が骨形成に与える影響を検討した。具体的には、分子量 32 万の PPL（PPL1）、分子量 100 万の PPL（PPL2）、両者を 1：1 で混合したもの（PPL3）、さらに PPL3 に β -TCP 顆粒を添加したもの（PPL4）を担体として使用した。対照として、従来使用されているアテロコラーゲンスポンジも含めた。BMP-2 濃度は、メーカー指定の 1.167 mg/mg に加え、1/10 濃度の 0.1167 mg/mg、1/20 濃度の 0.056 mg/mg、ならびに無添加の 0 mg/mg の 4 段階で設定し、各担体と組み合わせて計 20 種類の移植材料を作製した。各移植材は 4×4×2 mm の大きさに成形し、9 週齢の Wistar 系雄性ラットの背部皮下に移植した。移植後 6 週の時点で、マイクロ CT を用いて骨形成の指標となる不透過像の有無を評価し、得られたデータをもとに、BMP-2 濃度と担体の種類が骨形成に及ぼす影響について二項ロジスティック回帰分析を行った。続く実験 2 では、頭蓋骨上に PPL4 またはコラーゲンスポンジと BMP-2 を onlay graft 方式で移植し、1 週および 6 週後の骨造成効果をマイクロ CT および組織学的に評価した。PPL 群では半球状の新生骨が形成され、頭蓋骨と一体化する明瞭な骨構造が観察された。特に新生骨の高さおよび面積において、PPL 群はコラーゲン群に対して統計的に有意な増加を示した（高さ：4.41mm vs 1.02mm、面積：32.47 mm² vs 8.61 mm²）。1 週後の組織像では、PPL の残存はわずかで炎症性細胞浸潤も少なく、生体親和性と細胞侵入性の高さが示唆された。6 週後には、PPL は完全に消失し、 β -TCP も大部分が吸収されていたが、新生骨の内部には骨髓様の細胞も認められ、骨リモデリングの進行が確認された。

実験 1 の結果、PPL4 はすべての BMP-2 濃度において最も高い不透過像検出率を示し、メーカー指定濃度では 100%、1/10 濃度でも 80%以上、1/20 濃度でも 60%以上の骨形成が認められた。一方、PPL1 および PPL2 は高濃度 BMP-2 でのみ骨形成が認められ、低濃度では検出率が著しく低下した。PPL3 は高濃度では中等度の検出率を示したものの、1/20 濃度では不透過像を認めなかった。コラーゲン担体はメーカー指定濃度においても 67%の検出率にとどま

り、PPL4のような高い骨形成能は得られなかった。ロジスティック回帰分析では、BMP-2濃度 ($p<0.001$) および担体の種類 ($p=0.048$) が不透過像検出率に有意な影響を与えており、とくにPPL1, PPL2, PPL3はいずれもPPL4に比して有意に骨形成効果が低いことが示された。またCollagenとPPL4では有意差はなかった。これらの結果から、PPLの分子量に加えて β TCPを併用することにより、低用量BMP-2であっても効率的かつ安定した骨形成が誘導されることが明らかとなった。

実験2では、実験1で最も良好な結果を示したPPL4を担体としたPPL+BMP群と、アテロコラーゲンスポンジを担体としたCol+BMP群を設定し、いずれもメーカー指定濃度のBMP-2 (1.167 mg/mg) を含有させた5 mm立方体の移植材をラット頭蓋骨上にonlay graftとして移植した。観察期間は1週および6週とし、6週例ではマイクロCT画像および組織切片を用いて新生骨の高さと面積を計測した。マイクロCTによる評価では、Col+BMP群の新生骨は薄く偏平で限局的であったのに対し、PPL+BMP群では頭蓋骨上に半球状の大きな骨膨隆が形成され、既存骨と連続した三次元的な骨増生が確認された。新生骨の高さの中央値(四分位範囲)は、Col+BMP群 1.02 (0.82–1.13) mm に対し、PPL+BMP群では 4.41 (2.10–6.26) mm と有意に高値を示し ($p=0.003$)、面積についても Col+BMP群 8.61 (7.00–8.91) mm² に対し、PPL+BMP群 32.47 (14.80–58.19) mm² と有意な増加が認められた ($p=0.027$)。

組織学的には、1週後のCol+BMP群で頭蓋骨表面に薄い新生骨とその表層に配列する線維芽細胞様細胞が観察されたが、骨梁は細く走行は不整であり、骨量は限られていた。これに対しPPL+BMP群では、頭蓋骨上に大きな塊状構造が形成され、皮膚は上方へ明らかに膨隆していた。移植材周囲には多数の紡錘形細胞や方形の細胞が集簇し、残存 β TCP顆粒の周囲には多核巨細胞が配列していた。6週後には、PPL+BMP群において新生骨内部のPPLはほぼ消失し、 β TCPもわずかに残存するのみで、移植材の大部分が骨組織に置換されていた。新生骨の内部には骨髓様組織も認められ、骨梁は既存頭蓋骨と連続していた。一部に細胞侵入の遅れた均質な無細胞領域が残存していたが、その範囲は限定的であり、全体としては膨隆部外周に沿って良好な骨形成が得られていた。

以上の結果から、PPLはBMP-2の局所滞留性と骨誘導能を高める担体として機能し、とくに β TCPとの複合化により低用量BMP-2でも十分な骨形成が得られることが示された。また、PPL+BMPにより頭蓋骨上で明瞭な垂直的骨造成が達成され、従来再生が困難であった水平的歯槽骨吸収などへの応用可能性が示唆された。PPLは生体親和性に優れ、炎症性反応や母床骨の過剰吸収もほとんど認められなかったことから、安全性の面でも利点を有すると考えられる。今後は、歯槽骨欠損モデルなどより臨床に近い条件での検討を行い、最適なPPL組成・BMP-2用量・ β TCP配合比を明らかにすることで、歯周再生治療への臨床応用が期待される。