

氏名	山田 知枝
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5944号
学位授与の日付	平成31年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	BMP-2含有光重合型PDVAで補強したコラーゲンスポンジによる吸収性骨補填材
論文審査委員	窪木 拓男 教授      上岡 寛 教授      岡田 正弘 准教授

## 学位論文内容の要旨

### 論文内容の要旨（2000字程度）

#### 【緒言】

骨欠損が生じた場合の骨補填材として自家骨が用いられてきたが、自家骨の採取には外科的侵襲や採取量の限界があることから、人工骨補填材の開発と骨形成因子との併用が研究されている。アジピン酸ジビニル(DVA)の重合体(PDVA)はエステル結合に基づいた架橋構造であり、生体内のエステラーゼにより加水分解される。加熱重合型PDVAは生分解性を有し、骨補填材として有用であることが確認されている。BMP-2は骨誘導能を有する蛋白であり、臨床応用に向けて有用な担体の開発が進められているが、高温処理によって生物学的活性が低下する。本研究の目的は、熱処理を必要としないBMP-2含有光重合型PDVAで表層を補強したコラーゲンスポンジの吸収性骨補填材としての有用性および骨形成因子BMP-2の担体としての可能性を評価することである。

#### 【材料ならびに方法】

DVAには光増感剤としてカンファーキノン(CQ)1.2w/v%, 重合促進剤として第3級アミンである4-(ジメチルアミノ)安息香酸エチル(EDMAB)4.8w/v%を添加した。直径8mmのコラーゲンスポンジを厚さ2mmにトリミングして、D群にはDVA、DB群にはrhBMP-2(10 $\mu$ g/30 $\mu$ LDVA)含有DVAを表面にコーティングし、DVA/コラーゲンスポンジ質量比13/2とすることで気孔率70%として、嫌気条件下で180秒間光重合させた。対照群はコラーゲンスポンジとした。

D群試料の細胞毒性試験にはMC3T3-E1細胞を用い、陽性対照をコラーゲンスポンジ、陰性対象をアクリル板として細胞に24時間曝露させた。MTS assayを用いて試料曝露のない細胞の生存率を100%として各試料の細胞生存率を測定した。骨石灰化試験はPDVAブロック体上でMC3T3-E1細胞を用いて骨分化誘導させ、アリザリンレッド染色を行った。3点曲げ試験ではコラーゲンスポンジを2 $\times$ 2 $\times$ 25mmにトリミングして、DVA/コラーゲンスポンジ質量比13/2となるようDVAでコーティングした後、嫌気条件下で180秒間光重合させた。対照群はトリミングしたコラーゲンスポンジとした。支点間距離20mm、クロスヘッドスピード0.5mm/minの条件下において最大曲げ応力を計測した。動物埋入試験にはD群、DB群および対照群試料を用いた。動物は8週齢Wistar系雄性ラット45匹を15匹ずつの3群に分け、麻酔下で各群の試料を頭蓋骨上正中

に位置付けて骨膜と皮膚を縫合した。術後、1, 2および4ヶ月後に各群5匹ずつに対して灌流固定を施し、頭蓋骨ごと試料を採取し、病理組織学的観察ならびに骨形態計測を行って骨量(BV/TV)%を算出した。統計学的解析は分散分析の後Tukey法による多重比較,あるいはt検定を行い,有意水準は5%とした。本実験は岡山大学動物実験委員会の承認を得て行った(OKU-2017021)。

#### 【結果と考察】

細胞生存率はアクリル板では有意に低値を示したが, D 群では有意差を認めず, 低毒性であることが示された。アリザリンレッド染色では PDVA ブロック体試料表面は赤く染色され, 石灰化物の沈着が認められた。これらの結果から, PDVA 細胞毒性は低く生体内で骨芽細胞が接着し骨再生の足場となる可能性があることが示唆された。3点曲げ試験では D 群は対照群と比較して有意に高値を示し, コラーゲンスポンジの物性改善が認められた。また, 動物埋入試験において D 群および DB 群試料は 4 ヶ月後においても骨膜下で試料の形態を保っていたことから, 本研究試料は骨再生の足場としての強度を有することが示された。動物埋入試験において対照群では新生骨の形成は認められなかったが, D 群, DB 群では全観察期間において部分的に既存骨表面から試料内部への新生骨の形成が認められ, 細胞増殖が可能なサイズの連通孔構造を有することが示された。骨量(BV/TV)%は D 群, DB 群ともに 1 ヶ月後と比較して 2 ヶ月後および 4 ヶ月後において有意に高値を示した。D 群では 2 ヶ月後までは新生骨量は増加したが, その後はほぼ同程度であった。一方, DB 群の新生骨量は観察期間を通して増加した。D 群と DB 群の新生骨量を比較すると, 1 ヶ月後および 2 ヶ月後には有意差を認めなかったが, 4 ヶ月後には DB 群では D 群より有意に高値を示した。このことから, DB 群試料は動物埋入後に PDVA が徐々に生体内で分解され, それに伴い徐放された BMP-2 が生物学的活性を示して骨形成を持続したと考えられた。

#### 【結論】

本研究試料の BMP-2 含有光重合型 PDVA で表層を補強したコラーゲンスポンジは, 生体適合性と骨伝導性および BMP-2 徐放による骨誘導性を示したことから, 骨補填材ならびに BMP-2 担体として有用である可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

骨欠損が生じた場合の骨補填材として自家骨が用いられてきたが、自家骨の採取には外科的侵襲や採取量の限界があることから、人工骨補填材の開発と骨形成因子との併用が研究されている。アジピン酸ジビニル(DVA)の重合体(PDVA)はエステル結合に基づいた架橋構造を呈し、生体内のエステラーゼにより加水分解される。加熱重合型PDVAは生分解性を有し、骨補填材として有用であることがすでに確認されている。BMP-2は骨誘導能を有する蛋白であり、臨床応用に向けて有用な担体の開発が進められているが、高温処理によって生物学的活性が低下する。本研究は、コラーゲンスポンジのコラーゲン繊維を、熱処理を必要としないBMP-2含有光重合型PDVAで補強した試料の吸収性骨補填材としての有効性および骨形成因子BMP-2の担体としての可能性を検討したものである。

本研究によって以下の研究成果が得られた。

- 1) 細胞毒性試験の結果、180秒間の光照射で重合したPDVAでコラーゲン繊維をコーティングした試料の毒性はアクリル板よりも低いことが示された。
- 2) 骨石灰化試験の結果、光重合型PDVA上での骨芽細胞の増殖および石灰化物の沈着が観察された。
- 3) 3点曲げ試験の結果、光重合型PDVAによるコラーゲン繊維のコーティングによって物性の改善が認められた。
- 4) 動物埋入実験の結果、試料は骨再生の足場としての強度を有し、その連通孔構造によって試料内への線維性組織の侵入と新生骨の形成が認められた。また、光重合型PDVAが生体内で分解されるに伴いBMP-2が徐放され、新生骨の形成を促進した可能性が示された。

上記の結果から、コラーゲン繊維を光重合型PDVAで補強した試料は、生体適合性と骨伝導性およびBMP-2徐放による骨誘導性を示したことから、骨補填材ならびにBMP-2の担体として有効である可能性が示唆された。本論文は、今後の新規骨補填材の開発において新たな知見となりうるものであると考えられる。よって、審査委員会は本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。